



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

THAÍS DO NASCIMENTO PINHEIRO

**SÍNTESE DE NOVOS NITRÓXIDOS CÍCLICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE CONTRA SARS-CoV-2 (COVID-19)**

Natal, RN

2023

THAÍS DO NASCIMENTO PINHEIRO

**SÍNTESE DE NOVOS NITRÓXIDOS CÍCLICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE CONTRA SARS-CoV-2 (COVID-19)**

Dissertação apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio
Grande do Norte, requisito do curso mestrado em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Kappel Jordão

Co-orientador: Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa

Natal, RN

2023

Pinheiro, Thaís do Nascimento.

Síntese de novos nitróxidos cíclicos com potencial atividade antioxidante contra SARS-CoV-2 (COVID-19) / Thaís do Nascimento Pinheiro. - 2023.

74f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN, 2023.

Orientador: Alessandro Kappel Jordão.

Coorientador: Euzébio Guimarães Barbosa.

1. Antioxidantes - Dissertação. 2. Nitróxidos - Dissertação. 3. Síntese Orgânica - Dissertação. 4. COVID-19 - Dissertação. 5. SARS-CoV-2 - Dissertação. I. Jordão, Alessandro Kappel. II. Barbosa, Euzébio Guimarães. III. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 678.048

Thaís do Nascimento Pinheiro

**SÍNTESE DE NOVOS NITRÓXIDOS CÍCLICOS COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE CONTRA SARS-CoV-2 (COVID-19)**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alessandro Kappel Jordão
Presidente – UFRN

Profa. Dra. Jéssica Venância Faria Rangel
Examinador Externo – UEA

Prof. Dr. Leandro De Santis Ferreira
Examinador Interno – UFRN

Natal, 31 de janeiro de 2023

NATAL / RN
2023



Emitido em 31/01/2023

DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO Nº 3/2023 - PPGCF/CCS (15.27)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 31/01/2023 17:27)

ALESSANDRO KAPPEL JORDAO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DFARM/CCS (15.13)
Matricula: ###717#6

(Assinado digitalmente em 01/02/2023 09:18)

LEANDRO DE SANTIS FERREIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DFARM/CCS (15.13)
Matricula: ###763#4

(Assinado digitalmente em 31/01/2023 19:13)

JÉSSICA VENÂNCIA FARIA RANGEL
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.387-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrn.br/documentos/> informando seu número: 3, ano: 2023, tipo: DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO, data de emissão: 31/01/2023 e o código de verificação: 66a21a89df

AGRADECIMENTOS

Meus maiores agradecimentos vão para meu orientador Alessandro Kappel Jordão, sem ele e sem seu apoio incondicional eu não teria conseguido realizar esse trabalho. Sempre sendo paciente, presente, prestativo e perfeito, sou eternamente grata pela sua entrada na minha vida e no meu caminho acadêmico.

Agradeço ao meu co-orientador Euzébio por ter aberto as portas do laboratório para mim desde a graduação e ter confiado no meu potencial.

Agradeço especialmente a Lamark, sem seu apoio e sem a força que ele me transmitiu eu também não teria conseguido concluir essa caminhada, seu companheirismo também foi fundamental.

Agradeço as minhas amigas que sempre me apoiaram e me ajudaram nas adversidades diárias e crescimento que me proporcionam, tanto pessoal como intelectual.

Agradeço a minha irmã, por ser a única do meu núcleo familiar a acreditar em mim e me apoiar diariamente quando mais ninguém foi capaz de fazer.

Por fim, agradeço a CNPQ pela ajuda financeira durante todo o período do mestrado.

RESUMO

Os nitróxidos são radicais livres que tem recebido devida atenção em função de seu potencial emprego como agente terapêutico, de suas propriedades antioxidantes e suas baixas toxicidades. Os nitróxidos reagem com diversos oxidantes e redutores biológicos enquanto estão sendo reciclados na forma do cátion oxamônio e derivados de hidroxilamina. Por estas razões, devido a resultados promissores em outros estudos com nitroxidos, o objetivo é a síntese de derivados nitróxidos para serem testados como antioxidantes *in vitro* e posteriormente avaliados como candidatos para o tratamento de COVID-19 por meio de culturas de células Vero infectadas. Este trabalho relata o esquema de síntese e identificação dos compostos com potencial atividade antioxidante: 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (rendimento 97%), 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida (rendimento 80%), 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (rendimento de 42%), ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (rendimento 97%), 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-1-oxi (rendimento 36%), benzenossulfonato de (1-hidroxi-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-il)metil (rendimento 26%), 3-(azidometil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-1-oxi (rendimento 65%), e um produto inédito, o 3,3'-((1,3-fenilenobis(1*H*-1,2,3-triazol-4,1-diil))bis(metileno))bis(2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-oxi) (Rendimento 68%). A caracterização estrutural desses antioxidantes foi realizada através de espectroscopia de infravermelho e as reações se mostraram bastante promissoras com a obtenção do produto final planejado.

Palavras-Chave: Nitróxidos, Síntese Orgânica, Antioxidantes, COVID-19, SARS-CoV-2

ABSTRACT

Nitroxides are free radicals that have received due attention due to their potential use as a therapeutic agent, their antioxidant properties and their low toxicities. Nitroxides react with various biological oxidants and reductants while being recycled in the form of the oxammonium cation and hydroxylamine derivatives. For these reasons, due to promising results in other studies with nitroxides, the objective is the synthesis of derived nitroxides to be tested as antioxidants in vitro and later evaluated as candidates for the treatment of COVID-19 through cultures of infected Vero cells. This work reports the scheme of synthesis and identification of compounds with potential antioxidant activity: 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-one (yield 97%), 2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrroline-3-carboxamide (80% yield), 2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrroline-3-carboxamide-1-oxy (yield 42%), 2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrroline-3-carboxamide-1-oxy acid (97% yield), 3-(hydroxymethyl)-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrroline-1-oxy (yield 36%), (1-hydroxy-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrroline-3-yl)methyl (26% yield), 3-(azidomethyl)-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrroline-1-oxy (65% yield) and an unpublished product, 3,3'-((1,3-phenylenebis(1*H*-1,2,3-triazol-4,1-diyl))bis(methylene))bis(2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-oxy) (Yield 68%). The structural characterization of these antioxidants was carried out using infrared spectroscopy and the reactions are very promising with the achievement of the planned final product.

Keywords: Nitroxides, Organic Synthesis, Antioxidants, COVID-19, SARS-CoV-2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de radicais nitroxila, incluindo o Tempol	18
Figura 2: Substâncias análogas do Tempol com atividade biológica	19
Figura 3: Esquema da infecção por coronavírus. Adaptado pelo autor. Fonte Zhang et al (2020). A COVID-19 é caracterizada por uma desregulação de citocinas inflamatórias, resultando em uma tempestade de citocinas que pode resultar em morbidade e mortalidade significativas.	26
Figura 4: Estrutura química dos nitróxidos cíclicos. Adaptada pelo autor (5) (6) Fonte: HAHN et al (1994); SOULE et al (2007).....	27
Figura 5: O processo redox de metabolização de nitróxidos. Os nitróxidos passam por uma sequência de reações bioquímica, formando hidroxilamina ou cátion oxoamônio. Adaptada de ISRAELI et al (2005).....	28
Figura 6: Compostos da patente que estão sendo desenvolvidos para o tratamento de COVID-19. Molécula 7 (TP-3-01), molécula 8 (TP-1-01), molécula 9 (TP-2-01), molécula 10 (TP-4-01), molécula 11 (TP-6-01), molécula 13 (TP-5-01), molécula 12 (TP-7-01).....	31
Figura 7: Compostos derivados do triazol e suas respectivas atividades	32
Figura 8: Abordagem racional para projetar análogos de nucleosídeos baseados em ribavirina (molécula 14) (Figura adaptada de DHEER et al 2017).....	33
Figura 9: Espectro de infravermelho referente a molécula 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (16)	43
Figura 10: Comparação entre o reagente A e intermediário B (Eluente acetato de etila/etanol, revelação na região do ultravioleta (254 nm).	46
Figura 11: Espectro na região do infravermelho da 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida (17), revelação na região do ultravioleta (254 nm).....	48
Figura 12: Cromatografia contendo o intermediário B e produto D, revelação na região do ultravioleta (254 nm).....	51
Figura 13 - Espectro na região do infravermelho referente a molécula 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (18).....	53
Figura 14: Placa de CCD comparando composto 18 (representado na placa por 1) e composto 19 (representado na placa por 2), revelação na região do ultravioleta (254 nm).....	54

Figura 15: Espectro na região do infravermelho do ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (19), revelação na região do ultravioleta (254 nm).....	56
Figura 16: Cromatografia comparando o composto P e R, revelação na região do ultravioleta (254 nm).....	58
Figura 17: Espectro infravermelho comparando amostras do possível composto 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-1-oxi (20).....	59
Figura 18: Espectro infravermelho da amostra sem extração com acetato de etila do possível composto 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-1-oxi (20).....	60
Figura 19: Espectro infravermelho da amostra 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-1-oxi (20).....	61
Figura 20: Nitróxido 20 à esquerda e nitróxido 21 à direita.	63
Figura 21: Espectro de infravermelho referente ao nitroxido benzenossulfonato de (1-hidroxi-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-il)metil.	63
Figura 22: Na figura temos o nitróxido 21 ao lado esquerdo e o nitróxido 22 ao lado esquerdo, revelação na região do ultravioleta (254 nm).	65
Figura 23: Espectro de infravermelho referente ao nitróxido 22	65
Figura 24: Na figura temos o nitroxido 22 ao lado esquerdo e duas bandas referentes ao nitroxido 23 ao lado esquerdo, revelação na região do ultravioleta (254 nm).	68
Figura 25: Espectro de infravermelho referente ao nitróxido 23.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre parâmetros de caracterização Literatura x intermediário sintetizado.	47
Tabela 2: Comparação entre o infravermelho da Literatura x do intermediário sintetizado.	48
Tabela 3: Comparação entre parâmetros de caracterização da Literatura x 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi sintetizado	52
Tabela 4: Comparação entre parâmetros de caracterização da Literatura x ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi ido sintetizado	55

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Planejamento e síntese do nitróxido cíclico 20 e novos análogos 23 e 24 como prováveis candidatos à inibição de radicais livres.....	20
Esquema 2: Esquema de síntese para a preparação dos derivados nitróxidos 23 e 24	35
Esquema 3: Síntese do 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (16)	36
Esquema 4: Preparação do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-3-carboxiamida (17)	36
Esquema 5: Síntese do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (18)	37
Esquema 6: Síntese do ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (19)	38
Esquema 7: Síntese do 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-1-oxi (20)	39
Esquema 8: Síntese do intermediário nitróxido (21)	39
Esquema 9: Síntese do intermediário nitróxido (22)	40
Esquema 10: Síntese de novo análogo 23.....	40
Esquema 11: Síntese do intermediário 16 via halogenação de carbono alfa carbonílico (16)	42
Esquema 12: Mecanismo de formação do 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (16) a partir da piperidona (15)	44
Esquema 13: Síntese do intermediário 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-3-carboxiamida (17)	44
Esquema 14: Mecanismo de formação do 2,2,5,5 -tetrametilpirrolina-3-carboxiamida (17)	45
Esquema 15: Síntese do intermediário 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (18)	49
Esquema 16: Reação para síntese do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi.....	50
Esquema 17: Síntese do intermediário ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (19)	53
Esquema 18: Síntese do intermediário 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-1-oxi (20)	56

Esquema 19: Síntese do intermediário nitróxido (21)	61
Esquema 20: Representação da substituição nucleofílica para formação do benzenossulfonato de (1-hidroxi-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-3-il)metil.....	62
Esquema 21: Síntese do intermediário nitróxido (22)	64
Esquema 22: Substituição do grupamento benzenossulfonato pelo grupamento azida.....	64
Esquema 23: Síntese de novo análogo 23.....	66
Esquema 24: Proposta de cicloadição catalisada por cobre (I) (Adaptado de ROSTOVTSEV, GREEN, FOKIN, 2002)	67

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

Anti-HSV-1 - Anticorpo para herpesvírus 1

AcOH – Ácido acético

CAT - Catalase

CCL3 - Quimiocina CC ligante 3, previamente denominada MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófagos-1-alfa)

CCL5 – Quimiocina CC ligante 5, previamente denominada RANTES (regulado na ativação de células T normais expressas e secretadas)

COVID-19 - Doença do coronavírus

CoVs - Família do coronavírus, vírus de RNA que infecta humanos e animais

ERC - Espécies Reativas de Carbono

ERCI - Espécies Reativas de Cloro

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ERS - Espécies Reativas de Enxofre

GPX - Glutathione peroxidase

LPS - Lipopolissacarídeos

MERS-CoV - Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio

NADPH oxidase - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase

NF-K β – Fator de transcrição nuclear Kappa B, complexo proteico que desempenha funções de transcrição

OMS - Organização mundial da saúde

PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico

RAS - Sistema renina-angiotensina

ROS - Espécies citotóxicas reativas de oxigênio

SARS-CoV - Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave

SARS-CoV-2 - Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2

SOD - Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Radicais Livres	17
1.2 Coronavírus	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 Radicais Livres e Antioxidantes	21
2.2 Processo inflamatório na Covid-19	22
2.3 Nitróxidos Cíclicos	26
2.3.1 Nitroxidos Ciclicos Na Covid-19	28
2.4 Triazóis.....	31
2.4.1 Atividade antiviral dos triazois	32
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivo Específico	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 Síntese da 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (16)	36
4.2 Síntese da 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1<i>H</i>-pirrolina-3-carboxiamida (17)..	36
4.3 Síntese do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1<i>H</i>-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (18).....	37
4.4 Síntese do ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1<i>H</i>-pirrolina-3-carboxiamida- 1-oxi (19).....	38
4.5 Síntese do 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1<i>H</i>-pirrolina-1-oxi (20).....	38
4.6 Síntese do benzenossulfonato de (1-hidroxi-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro- 1<i>H</i>-pirrolina-3-il) metil	39
4.7 Síntese do 3-(azidometil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1<i>H</i>-pirrolina-1-oxi...	40
4.8 Preparação do 3,3'-((1,3-fenilenobis(1<i>H</i>-1,2,3-triazol-4,1- diil))bis(metileno))bis(2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1<i>H</i>-pirrol-1-oxi)	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Preparação do 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (16)	42
5.2 Preparação do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1<i>H</i>-pirrolina-3-carboxiamida (17).....	38

5.3 Preparação do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (18).....	49
5.4 Preparação do ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (19)	53
5.5 Preparação do 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-1-oxi (20).....	56
5.6 Preparação do benzenossulfonato de (1-hidroxi-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-3-il) metil	61
5.7 Composto 3-(azidometil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrolina-1-oxi ...	58
5.8 Preparação do 3,3'-((1,3-fenilenobis(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4,1-diil))bis(metileno))bis(2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirrol-1-oxi)	66
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Radicais Livres

Radicaais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons que ocupam sozinhos um orbital atômico ou molecular (elétrons desemparelhados). A presença de elétrons desemparelhados torna a maioria dos radicaais livres muito reativa frente a outras espécies com elétrons desemparelhados (outros radicaais livres, oxigênio molecular e íons de metais de transição) (SCHNEIDER; DE OLIVEIRA, 2004).

Já a reatividade dos radicaais livres em moléculas orgânicas varia enormemente e existem radicaais livres pouco reativos, como o óxido nítrico, e outros muito reativos, como o radical hidroxila. Este, por exemplo, faz uma combinação extremamente rápida com metais ou outros radicaais no próprio sítio onde foi produzido. Caso tenha sido produzido próximo ao DNA e este DNA tenha um metal fixado, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, a hidroxila pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação). (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; DE OLIVEIRA, 2004). Essa característica reativa pode levá-los a reagir com outras moléculas, em especial proteínas e DNA, prejudicando seu funcionamento (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Os sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e não enzimáticos (glutathione, carotenóide, α -tocoferol, vitamina C, flavonóide), quando eficientes, mantêm a homeostase fisiológica (crescimento e metabolismo normais) e quando estão ineficientes, permitem a instalação do estresse oxidativo, representado pelo dano celular em macromoléculas como DNA, proteínas. Há evidências de que o estresse oxidativo tem importância nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, como consequência direta em muitos processos patológicos, como indução do câncer e a propagação da AIDS em pacientes soropositivos, bem como na fisiopatologia de doenças crônicas, como cardiopatias, câncer e doenças do pulmão (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; KALYANARAMAN, 2013).

Então, o uso de antioxidantes se torna bastante importante para diminuir esses danos causados e sabe-se que os radicaais nitroxila cíclicos são exemplos de substâncias estáveis sequestradoras de radicaais livres (**Figura 1**). Estes compostos

degradam superóxidos e peróxidos, como também permitem a recombinação radical-radical no processo biológico (SHINTO et al., 2018).

Estudos mostram que a capacidade redox dos radicais nitroxila de modificar o estresse oxidativo, permitirá que estes compostos possam ser explorados para uso terapêutico, como por exemplo, prevenção e tratamento do câncer, proteção contra radiação ionizante e no controle da hipertensão. Um dos radicais nitroxila mais estudados em função da sua capacidade redox é o 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidínio-1-oxi ou Tempol (**Figura 1**). Esta substância é permeável a membrana plasmática e tem capacidade de proteger os animais de laboratório, bactérias e células mamárias dos efeitos nocivos do estresse oxidativo (FERNANDES et al., 2005).

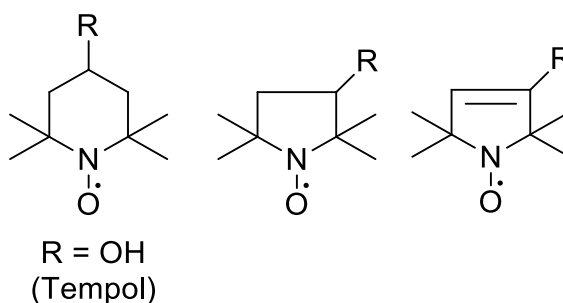


Figura 1: Exemplos de radicais nitroxila, incluindo o Tempol

Baseados na capacidade redox do Tempol, muitos derivados foram planejados e sintetizados, conforme mostrados na **Figura 2**. Estes radicais nitroxila presentes na **Figura 2** são ativos biologicamente e desempenham funções distintas, porém correlacionadas a capacidade antioxidante adquiridas pela incorporação do anel 2,2,6,6-tetrametil-piperidínio-1-oxi (BAN et al., 2007; CECCHI et al., 2008; ENDERLIN; NIELSEN, 2008; VAZQUEZ et al., 2008).

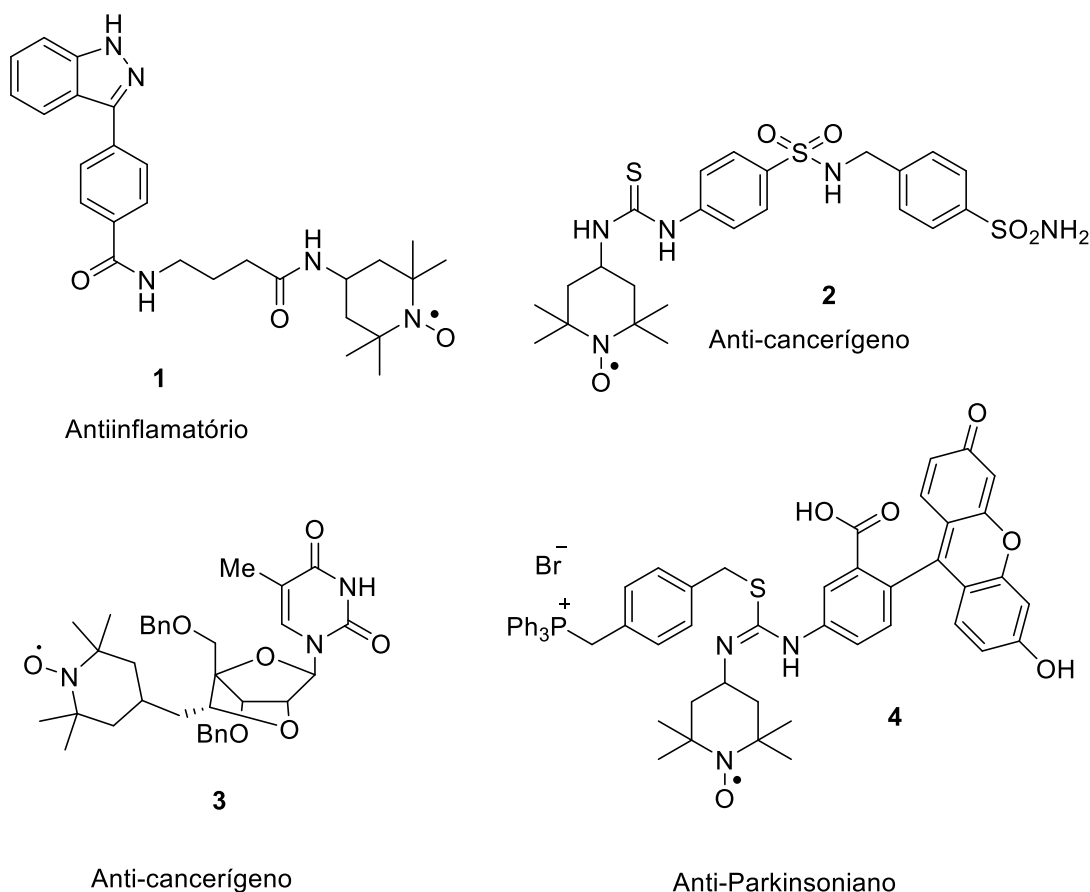


Figura 2: Substâncias análogas do Tempol com atividade biológica

1.2 Coronavírus

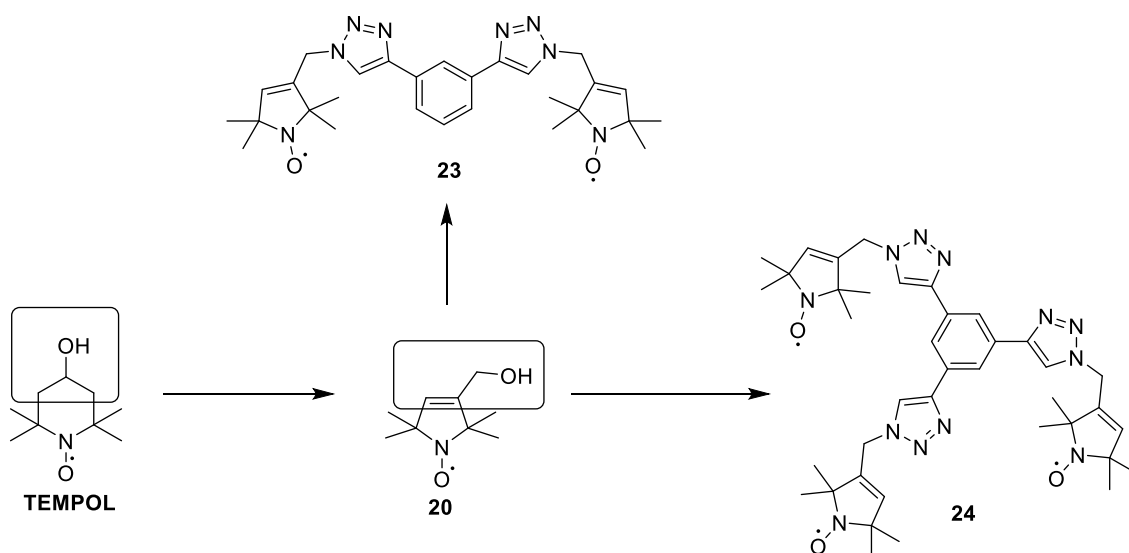
A pandemia da doença de coronavírus 2019 (COVID-19) é uma das crises de saúde mais significativas da sociedade moderna. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em dezembro de 2022, mais de 656 milhões de pessoas foram infectadas pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), e mais de 6,6 milhões de mortes confirmadas em todo o mundo (WHO, 2023). Além de causar uma síndrome de desconforto respiratório proeminente, a COVID-19 é uma doença sistêmica que afeta vários órgãos (WADMAN, COUZIN-FRANKEL J, KAISER J, MATAIC C., 2020).

Adentrando no estresse oxidativo causado pelo coronavírus, ocorre a ativação de fagócitos, como macrófagos e neutrófilos, os quais se infiltram na circulação pulmonar e causam a liberação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são citotóxicas, bem como múltiplas citocinas. A combinação de ROS com a diminuição da atividade antioxidante resulta em dano celular significativo nos pulmões, abrangendo danos às células endoteliais e epiteliais. Além disso, a produção de grandes quantidades de superóxido por fagócitos ativados pode resultar em uma cascata de liberação de citocinas como TNF-alfa e IL1 (MOSS, 2020).

Na totalidade, a liberação de ROS, bem como de citocinas inflamatórias, causa lesão pulmonar significativa, resultando em aumento do edema alveolar e pulmonar. Portanto, os agentes que atuam como antioxidantes podem ter um efeito benéfico na limitação das espécies reativas de oxigênio na doença COVID-19. O Tempol, um antioxidante, foi testado quanto à sua capacidade de proteger contra espécies reativas de oxigênio induzidas por radiação. O Tempol parece diminuir a regulação do NF- κ B, um regulador chave da inflamação. Em modelos animais de lesão pulmonar aguda e crônica, ele preservou as arquiteturas pulmonares e diminuiu as citocinas inflamatórias múltiplas. Portanto, o Tempol está sendo investigado como um tratamento para COVID-19 (MOSS, 2020; ZHU et al., 2020).

Além da atividade para tratamento do COVID-19, é importante ressaltar que a literatura apresenta os nitróxidos como possíveis agentes antivirais. Segundo Cunha (2020), nitróxidos tiveram uma importante atividade anti-HSV-1, ou seja, contra o herpesvírus 1. Essas moléculas sintetizadas são derivadas do Tempol (radicais nitroxil 4-substituídos-1,2,3-1*H*-1,2,3-triazol) e todas testadas foram inibidores mais seletivos do que o medicamento antiviral de referência, o que os tornam bons candidatos a compostos líderes devido às suas atividades anti-herpéticas e boa seletividade.

Desta forma, este trabalho visa realizar modificações moleculares e estruturais para a síntese do nitróxido cíclico de cinco membros **20** (Esquema 1) e de novos análogos correlacionados **23** e **24**.



Esquema 1: Planejamento e síntese do nitróxido cíclico **20** e novos análogos **23** e **24** como prováveis candidatos à inibição de radicais livres

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Radicais Livres e Antioxidantes

Os radicais livres são pequenas moléculas difusíveis que são altamente reativas por causa do elétron desemparelhado (BARBOSA et al., 2010)(ALKADI, 2022). Espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas em resposta a estímulos endógenos e exógenos. Em concentrações fisiológicas, as EROs atuam como moléculas sinalizadoras mediando o crescimento, migração e diferenciação celular, enquanto em concentrações mais altas, induzem a morte celular, apoptose e senescência (ZIECH et al., 2010)

Nos radicais livres, a presença de elétrons desemparelhados torna a maioria deles muito reativa frente a outras espécies com elétrons desemparelhados (outros radicais livres, oxigênio molecular e íons de metais de transição). Já a reatividade dos radicais livres com moléculas orgânicas varia enormemente e existem radicais livres pouco reativos, como o óxido nítrico, e outros muito reativos, como o radical hidroxila (SCHNEIDER; DE OLIVEIRA, 2004). Eles têm um número ímpar de elétrons e, por conta disso, podem reagir com outras moléculas, em especial proteínas e DNA, prejudicando seu funcionamento (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Os radicais livres podem ser gerados por fontes endógenas ou exógenas. As fontes endógenas são a partir de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: o resultado da atividade de oxidases, cicloxygenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; a presença de metais de transição no interior da célula e o de sistemas de transporte de elétrons. A geração de radicais livres envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas. A origem exógena dos radicais livres são tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002; ZIECH et al., 2010).

Os organismos vivos interagem com o meio ambiente visando manter um ambiente interno que favoreça a sobrevivência, o crescimento e a reprodução. O oxigênio (O₂) é vital para organismos aeróbios; contudo, espécies reativas formadas intracelularmente a partir do oxigênio ameaçam a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas, e podem comprometer processos biológicos importantes. O dano oxidativo de biomoléculas pode levar à inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, ao aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade e à morte celular. Estes efeitos tóxicos do oxigênio têm sido

associados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crônicas, inflamatórias e degenerativas (LEE; YU; WANG, 2016).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), entre outras espécies derivados de enxofre (ERS), de cloro (ERCI), de carbono (ERC), e metais de transição, é parte integrante do metabolismo humano. Estes agentes oxidantes são gerados do metabolismo normal como na mitocôndria, em peroxissomas e em uma variedade de enzimas citosólicas, tais como lipoxigenase, NADPH oxidase, Citocromo P450, citocinas e inflamações. Existem diversas fontes exógenas de produção de espécies reativas como raios ultravioleta, radiação ionizante, quimioterápicos e xenobióticos (BARBOSA et al., 2010; GOMES, 2017).

Os sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX)) e não enzimáticos (glutathione, carotenóide, α -tocoferol, vitamina C, flavonóide), quando eficientes, mantêm a homeostase fisiológica (crescimento e metabolismo normais) e quando estão ineficientes, permitem a instalação do estresse oxidativo, representado pelo dano celular em macromoléculas como DNA, proteínas e lipídeos. Há evidências de que o estresse oxidativo tem importância nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, como consequência direta em muitos processos patológicos, como indução do câncer e a propagação da AIDS em pacientes soropositivos, bem como na fisiopatologia de doenças crônicas, como cardiopatias, câncer e doenças do pulmão (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; KALYANARAMAN, 2013). No sentido de se combater os efeitos nocivos dos radicais livres é necessário a pesquisa por substâncias antioxidantes de origem natural e sintética como exemplificado a seguir.

2.2 Processo inflamatório na Covid-19

A família do coronavírus (CoVs) é de vírus de RNA que infectam tanto humanos como animais, envolvendo o sistema respiratório, gastrointestinal e sistema nervoso central. Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) são letais, altamente infecciosos e levaram a milhares de mortes nas últimas duas décadas e o SARS-CoV-2 descoberto em 2019 também (ZHANG et al., 2020).

Os pacientes infectados por SARS-CoV-2 tem como sintomas febre, tosse seca, mialgia, fadiga, diarreia entre outros distúrbios que variam de acordo com a idade do paciente. Pacientes graves desenvolvem hiperinflamação periférica,

coagulopatia, hipóxia, disfunção hepática, sepse e insuficiência renal aguda (LYRA E SILVA et al., 2022). Os distúrbios neurológicos são frequentes em pacientes com COVID-19 e variam de sintomas relativamente leves, como dor de cabeça, anosmia e ageusia, a complicações graves, incluindo encefalopatia, acidente vascular cerebral, delírio e coma (LYRA et al., 2022). Estudos de acompanhamento realizados até agora indicam que uma proporção significativa de sobreviventes de COVID-19 apresenta alterações neuropsicológicas persistentes, incluindo ansiedade, depressão e comprometimento cognitivo. Tanto a manifestação de sintomas neurológicos durante a hospitalização quanto a existência de doenças neurológicas prévias, incluindo demência e distúrbios neuropsiquiátricos, estão associados a maior mortalidade por COVID-19. Similarmente, fatores como idade, diabetes e resposta imune desadaptada aumentam o risco para gravidade e mortalidade por COVID-19 (LYRA et al., 2022)

Pacientes que descobriram que estavam com COVID-19, no momento da cirurgia de câncer de pulmão, apresentaram edema, exsudato proteico com glóbulos, infiltração celular inflamatória irregular e formação moderada de membranas hialinas. Já em uma avaliação *post mortem* de um paciente com COVID-19 em um quadro de síndrome de insuficiência respiratória aguda grave, amostras do pulmão infectado mostraram um dano alveolar bilateral difuso com edema, descamação de pneumócitos e formação de membrana hialina (ZHANG et al., 2020).

Segundo Khan e colaboradores (2020), a COVID-19 parece estar associada também com trombose venosa e arterial, ao se perceber que mesmo ao se realizar a trombopprofilaxia nos pacientes, foi comumente desenvolvido trombose venosa com tromboembolismo pulmonar.

Em um estudo recente foi observado que aqueles pacientes que estavam com SARS-CoV-2 em seu estado crítico possuíam níveis elevados de D-dímero, fibrinogênio e produtos de degradação do fibrinogênio quando comparados com pacientes controle saudáveis (HAN et al., 2020). Esse estado pode ter ocorrido devido à lesão endotelial, a qual resultou na geração de trombina e no desligamento da fibrinólise, contribuindo para o estado de hipercoagulabilidade (KHAN et al., 2020). Uma relação semelhante entre a síndrome do desconforto respiratório agudo (que pode ocorrer em pacientes com COVID-19) e a trombose venosa profunda foi previamente demonstrada com influenza A (H1N1). O processo de doença inflamatória, internação prolongada e comorbidades pré-existentes podem contribuir para o tromboembolismo venoso (OBI et al., 2019).

A imunopatogênese do SARS-CoV-2 permanece sem ser completamente compreendida. A fase inicial da infecção por SARS-CoV-2 parece ser caracterizada pela replicação viral juntamente com a regulação positiva de citocinas inflamatórias. De fato, a inflamação severa acompanhada por marcadores sistêmicos de inflamação como proteína C reativa juntamente com regulação positiva de citocinas inflamatórias são indicadores de prognóstico desfavorável para pacientes com COVID-19 (MATHI et al., 2021).

Acredita-se que o estresse oxidativo desempenhe um papel crítico na infecção do SARS-CoV, bem como outras infecções respiratórias, incluindo influenza. Tal como acontece com outros patógenos respiratórios, foi levantada a hipótese de que os danos causados pelos radicais livres devido ao estresse oxidativo podem resultar em lesão sistêmica do hospedeiro perpetuada por uma resposta imune aberrante em pacientes com COVID-19 (MATHI et al., 2021).

SARS-CoVs, MERS-CoVs e SARS-CoV-2 são classificados em membros da família beta-coronavírus. Pesquisas publicadas recentemente sugerem que o SARS-CoV-2 compartilha 79,0% de identidade de nucleotídeos com SARS-CoV e 51,8% de identidade com MERS-CoV, indicando uma alta homologia genética entre SARS-CoV-2, MERS-CoV e SARS-CoV. No modelo animal infectado por SARS-CoV e MERS-CoV, respostas inflamatórias e imunes marcantes podem ativar uma “tempestade de citocinas” e apoptose de células epiteliais e células endoteliais; subsequentemente, vazamento vascular, células T anormais e respostas de macrófagos ocorrem e induzem ALI/ARDS ou mesmo a morte (CHANNAPPANAVAR; PERLMAN, 2017; CHEN, 2020; REN et al., 2020).

Com base na homologia genética e nas características patológicas do pulmão infectado, é previsto que uma “tempestade de citocinas” ou cascata de liberação de citocinas também prevalece em pacientes com COVID-19 (**Figura 3**). No sangue de pacientes com COVID-19, houve um aumento acentuado de interleucina 1 β (IL-1 β), interferon γ (IFN- γ), proteína 10 induzida por interferon (IP-10) e proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1), bem como IL-4 e IL-10 quando comparados aos de pacientes com SARS. Isso sugere alguma diferença potencial de SARS e MERS na patogênese do coronavírus. Há também uma potencial função imune reprimida em pacientes com COVID-19 com hipoalbuminemia, linfopenia, neutropenia e diminuição da porcentagem de células T CD8⁺ (CHEN et al., 2020; HUANG et al., 2020). Relatórios recentes sugerem que, em alguns pacientes com COVID-19, embora negativos para o teste de ácido nucleico viral, às vezes ainda apresentam um

alto nível de inflamação. Coletivamente, a descoberta indica que a inflamação é uma característica importante em pacientes com COVID-19. Assim, há a hipótese de que inflamação excessiva, sistema imunológico deprimido e uma tempestade de citocinas ativadas contribuem substancialmente para a patogênese da COVID-19 (ZHANG et al., 2020).

Nos estágios iniciais da infecção por coronavírus, células dendríticas e células epiteliais são ativadas e expressam um conjunto de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias incluindo IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, ambos IFN- α / β , fator de necrose tumoral (TNF), CCL3, CCL5, CCL e IP-10 (**Figura 3**), entre outros. Estes estão sob o controle do sistema imunológico. Assim, a superprodução dessas citocinas e quimiocinas contribui para o desenvolvimento da doença (CHEUNG et al., 2005; CHU et al., 2016; LAW et al., 2016).

A IL-10, produzida pelo T-helper-2 (Th2), é antiviral, com a infecção causada por coronavírus esse marcador é levado a uma diminuição acentuada (CHIEN et al., 2006; FEHR et al., 2016). Curiosamente, os pacientes COVID-19 às vezes têm um nível significativamente elevado de IL-10 (HUANG et al., 2020). Se isso é uma característica da infecção por COVID-19 ou o resultado do tratamento médico é desconhecido. A amplificação da resposta inflamatória promoveria a apoptose celular ou necrose das células afetadas, o que aumentaria ainda mais a inflamação, seguida pelo aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e pelo acúmulo aberrante de monócitos inflamatórios, macrófagos e neutrófilos nos alvéolos pulmonares (CHANNAPPANAVAR; PERLMAN, 2017). Esse círculo vicioso intensificaria a situação, pois a regulação da resposta imune é perdida e a tempestade de citocinas é ativada ainda mais, resultando em consequências terríveis como morbidade e mortalidade significativas (MATHI et al., 2021)

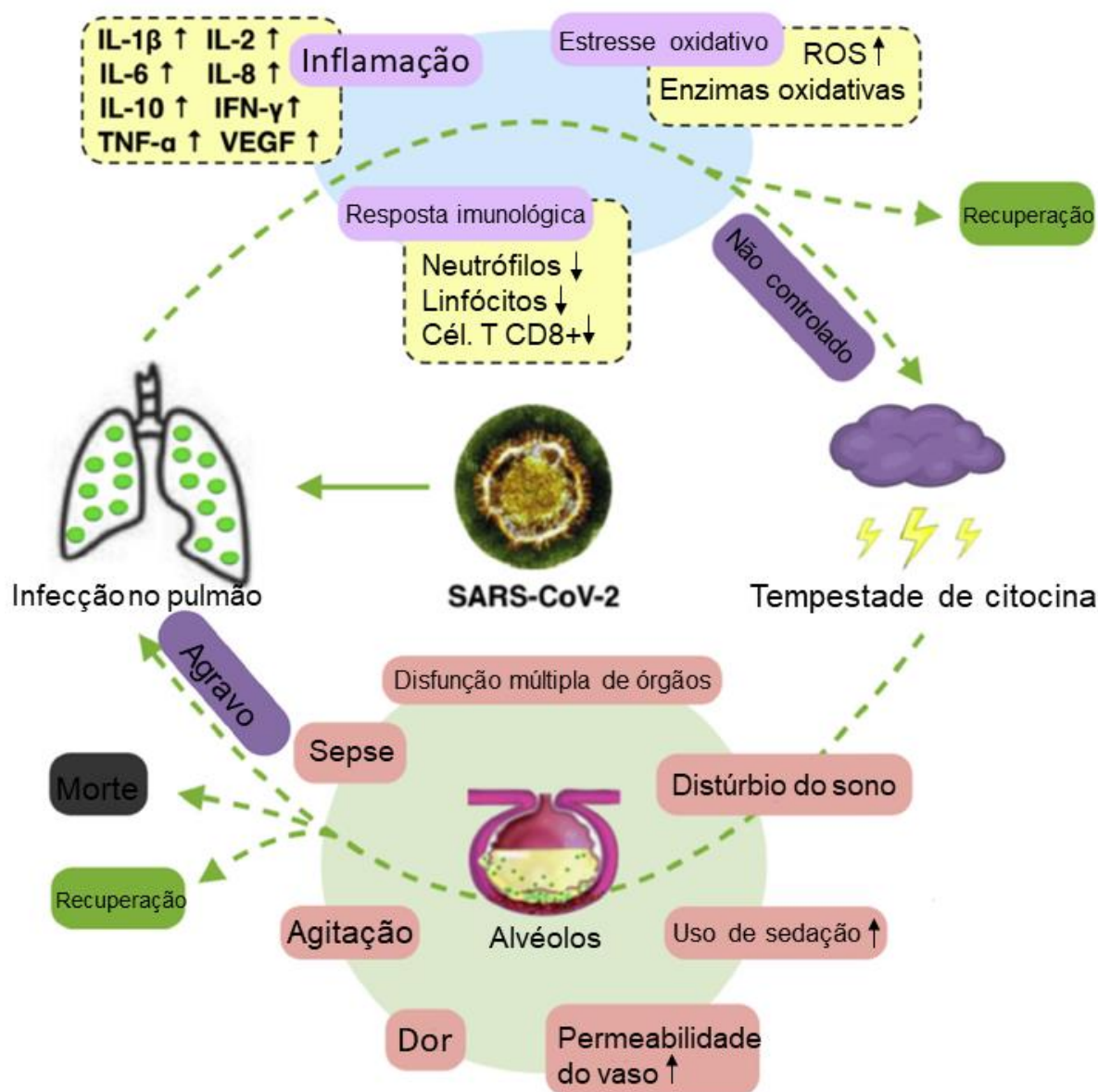


Figura 3: Esquema da infecção por coronavírus.

Adaptado pelo autor. Fonte Zhang et al (2020). A COVID-19 é caracterizada por uma desregulação de citocinas inflamatórias, resultando em uma tempestade de citocinas que pode resultar em morbidade e mortalidade significativas.

2.3 Nitróxidos Cíclicos

Os nitróxidos são quimicamente conhecidos como aminóxilas ou nitroxilas, que podem ser definidos como radicais livres sintéticos e estáveis, capazes de proteger células, tecidos e órgãos animais contra danos oxidativos (GOLDSTEIN; SAMUNI; MERENYI, 2008; SOULE et al., 2007).

Os representantes desse grupo possuem em sua estrutura um anel com cinco membros (pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina) ou seis membros (piperidina) (**Figura 4**) (SOULE et al., 2007). A estabilidade conferida ao nitróxido é responsabilidade do grupamento metil ligado ao anel, ele impede que ocorra a dismutação radical-radical

e também limita o acesso a substâncias reativas que poderiam quelar as espécies radiculares (PICHLA et al., 2020; SOULE et al., 2007). O tamanho, as cargas e a lipofilicidade variam de acordo com os demais grupos substituintes que podem estar presentes no anel (GOLDSTEIN; SAMUNI; MERENYI, 2004; SOULE et al., 2007).

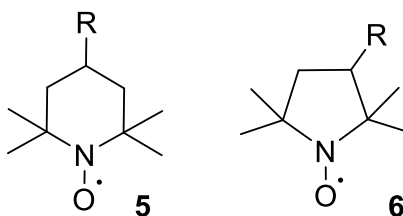


Figura 4: Estrutura química dos nitróxidos cíclicos. Adaptada pelo autor (5) (6) Fonte: HAHN et al (1994); SOULE et al (2007). Nota: O composto (5) pertence ao grupo dos nitróxidos piperidina, cujo anel possui seis membros. Já (6) integra o grupo de nitróxidos pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina, cujo anel é formado por cinco membros. Ressalta-se a existência de diferentes grupos substituintes (R), os quais podem conferir propriedades distintas a esses compostos.

Os diferentes tipos de anéis e substituintes produzem diferentes nitróxidos com propriedades físico-químicas distintas (KROLL; LANGNER; BORCHERT, 1999). Por apresentarem estabilidade química e propriedades paramagnéticas permanentes, os nitróxidos são empregados como sondas em estudos envolvendo Ressonância Paraeletromagnética Eletrônica (EPR) e são usados como agentes de contraste para imagem de ressonância magnética (MRI) (SOULE et al., 2007).

O Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi) e outros radicais nitróxidos estáveis são conhecidos há muito tempo por proteger animais de laboratório de injúrias associadas com uma variedade de condições de estresse oxidativo. Estes anti-oxidantes podem reagir com diversos oxidantes e redutores biológicos e serem reciclados através do cátion oxamônio (TPNO⁺) e derivado hidroxilamina (TPNOH) (**Figura 5**). Os efeitos protetores dos nitróxidos têm sido atribuídos a sua atividade dismutásica mimética ao reagir com ânion radical superóxido. Outros mecanismos antioxidantes investigados incluem inibição de reações de formação de radicais mediadas por metais (Reação de Fenton), terminação de reações radiculares em cadeia e recebimento de elétrons da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (GOLDSTEIN; SAMUNI; RUSSO, 2003; SOULE et al., 2007).

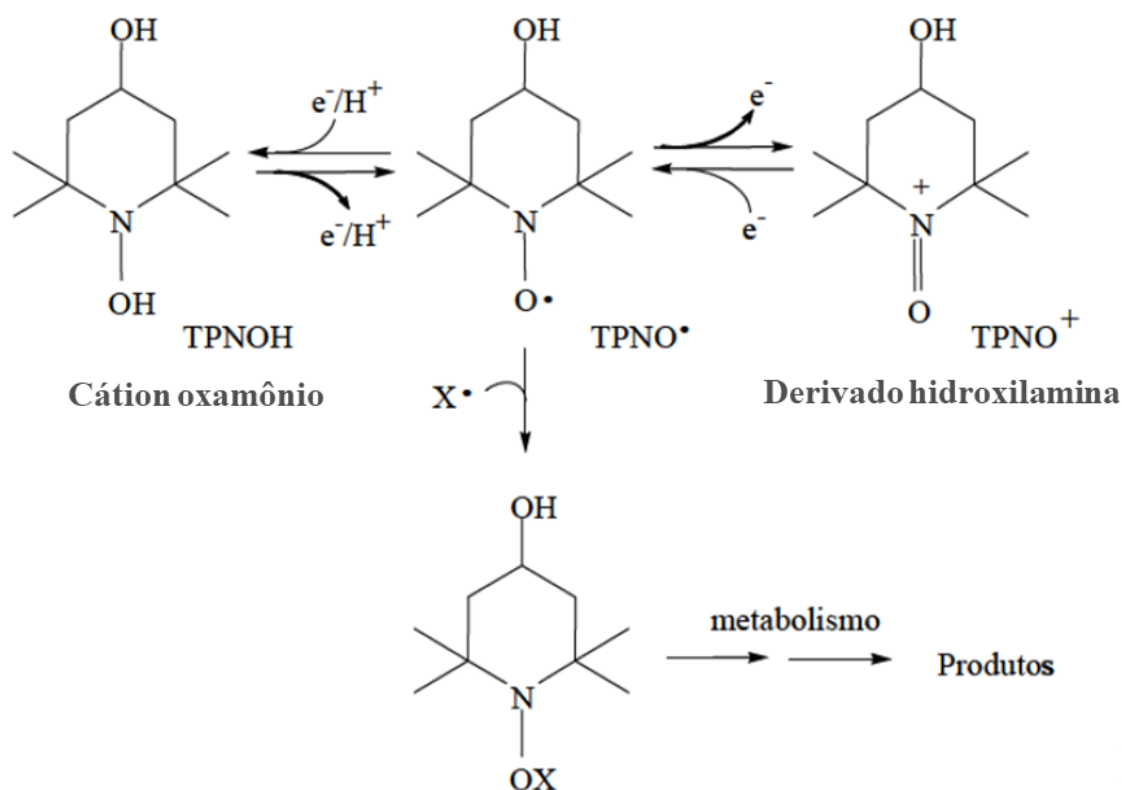


Figura 5: O processo redox de metabolização de nitróxidos. Os nitróxidos passam por uma sequência de reações bioquímicas, formando hidroxilamina ou cátion oxoamônio. Adaptada de ISRAELI et al (2005).

O cátion oxoamônio é altamente oxidante e é responsável pelas atividades pró-oxidantes dos nitróxidos e seus efeitos colaterais (ISRAELI et al., 2005). Por outro lado, a hidroxilamina pode doar um átomo de hidrogênio funcionando como defesa antioxidante (SOULE et al., 2007).

2.3.1 Nitroxidos Ciclicos Na Covid-19

Como já discutido anteriormente, acredita-se que o estresse oxidativo desempenhe um papel crítico na infecção do SARS-CoV. Baseado em outros patógenos respiratórios, foi levantada a hipótese de que os danos causados pelos radicais livres devido ao estresse oxidativo podem resultar em lesão sistêmica do hospedeiro perpetuada por uma resposta imune aberrante em pacientes com COVID-19. Um antioxidante e anti-inflamatório que protege células saudáveis pode ser um bom candidato para prevenir a progressão da doença em indivíduos de alto risco e complicações a longo prazo da COVID-19 (MATHI et al., 2021)

O Tempol é um nitróxido de ciclo redox que promove o metabolismo de muitas espécies reativas de oxigênio nocivas (ROS) e melhora a biodisponibilidade do óxido

nítrico. Estudos *in vitro* e pré-clínicos de Tempol demonstraram uma atenuação do dano pulmonar induzido por lipopolissacarídeos (LPS) em modelos *in vivo* de lesão pulmonar aguda e crônica em pequenos animais. Além disso, nestes modelos animais Tempol diminui as citocinas inflamatórias de uma variedade de tipos de células. O Tempol também pode ser administrado por diferentes vias, incluindo a administração oral. Até onde sabemos, nenhum estudo examinou os efeitos do Tempol nas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com COVID-19 (MATHI et al., 2021).

Além disso, existem outras moléculas patenteadas (BROWN; HOUCHEN; KONG, 2021) que estão sendo testadas para COVID-19 e tem grupamento nitróxido presentes em sua estrutura como representado na **Figura 6** para tratamento de infecção viral. Por exemplo, uma molécula pode incluir um modulador do sistema renina-angiotensina (RAS) e um carreador farmaceuticamente aceitável. O modulador RAS pode incluir várias combinações na molécula, podendo ser de um bloqueador do receptor da angiotensina (ARB), o inibidor da HMG-CoA redutase, o inibidor da enzima de conversão da angiotensina (ACE), 3,3'-diindolimetano (DIM), indole-3-carbinol (I3C) e/ou pirfenidona (PFD). Além disso, pelo menos um inibidor da enzima conversora de angiotensina, DIM, pirfenidona pode estar ligado a um antioxidante (BROWN; HOUCHEN; KONG, 2021)

Há também a utilização de um bloqueador do receptor de angiotensina ligado a um antioxidante (por exemplo, Tempol) para o tratamento de infecções virais. Como exemplo, YK-4-250 pode ser usado como um agente eficaz para prevenir ou inibir complicações da infecção viral. Assim como receptores de angiotensina e um inibidor de HMG-CoA redutase para o tratamento de infecções virais (tem o Telmisartan e Rosuvastatina que podem ser usados como agentes eficazes para prevenir ou inibir complicações da infecção viral). DIM ligado a um antioxidante (por exemplo, Tempol) para o tratamento de infecções virais. DIM (e seu precursor, 13 C) inibe a sinalização de RAS induzido por VEGF e outros fatores de crescimento, o que interfere em seus efeitos biológicos necessários para a angiogênese. É ainda divulgado um método de utilização de pirfenidona (PFD) relacionado a um antioxidante (por exemplo, Tempol) para o tratamento de infecções virais. O PFD exerce efeitos antifibróticos através do bloqueio do promotor de atividade TGF- β e do secretor de proteína TGF- β , inibição da fosforilação de Smad 2 induzida por TGF- β , estimulação ECM e geração de ROS, e regulação do processamento de RNA. TGF- β 1 ativa RAS e Proteína Ativada por Mitogênio (MAP) quinase, fosfoinosidato 3-quinase (PI3K) / Akt e Rho GTPases, e

regula a ativação celular, sobrevivência, migrações e organização do citoesqueleto (BROWN; HOUCHEN; KONG, 2021).

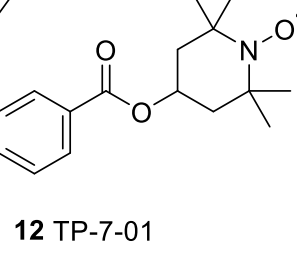
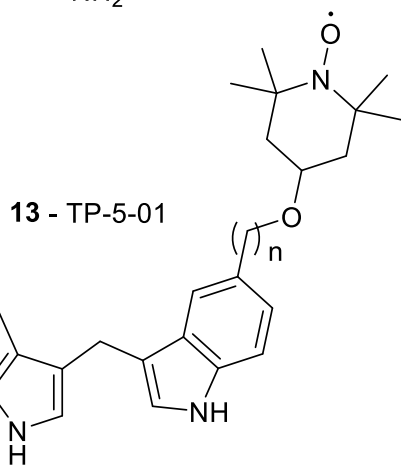
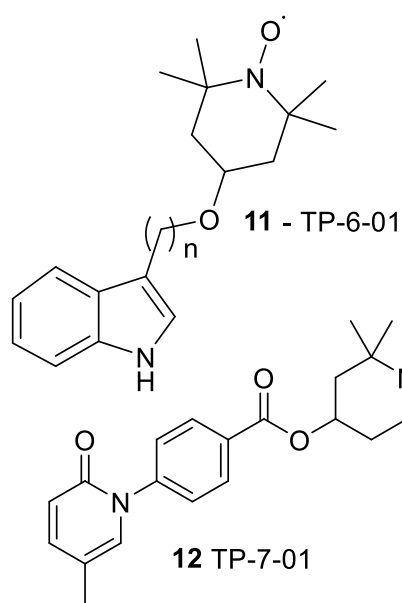
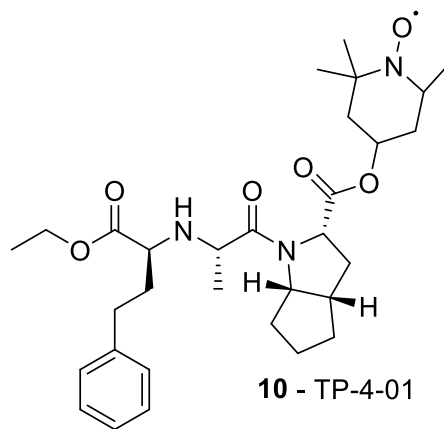
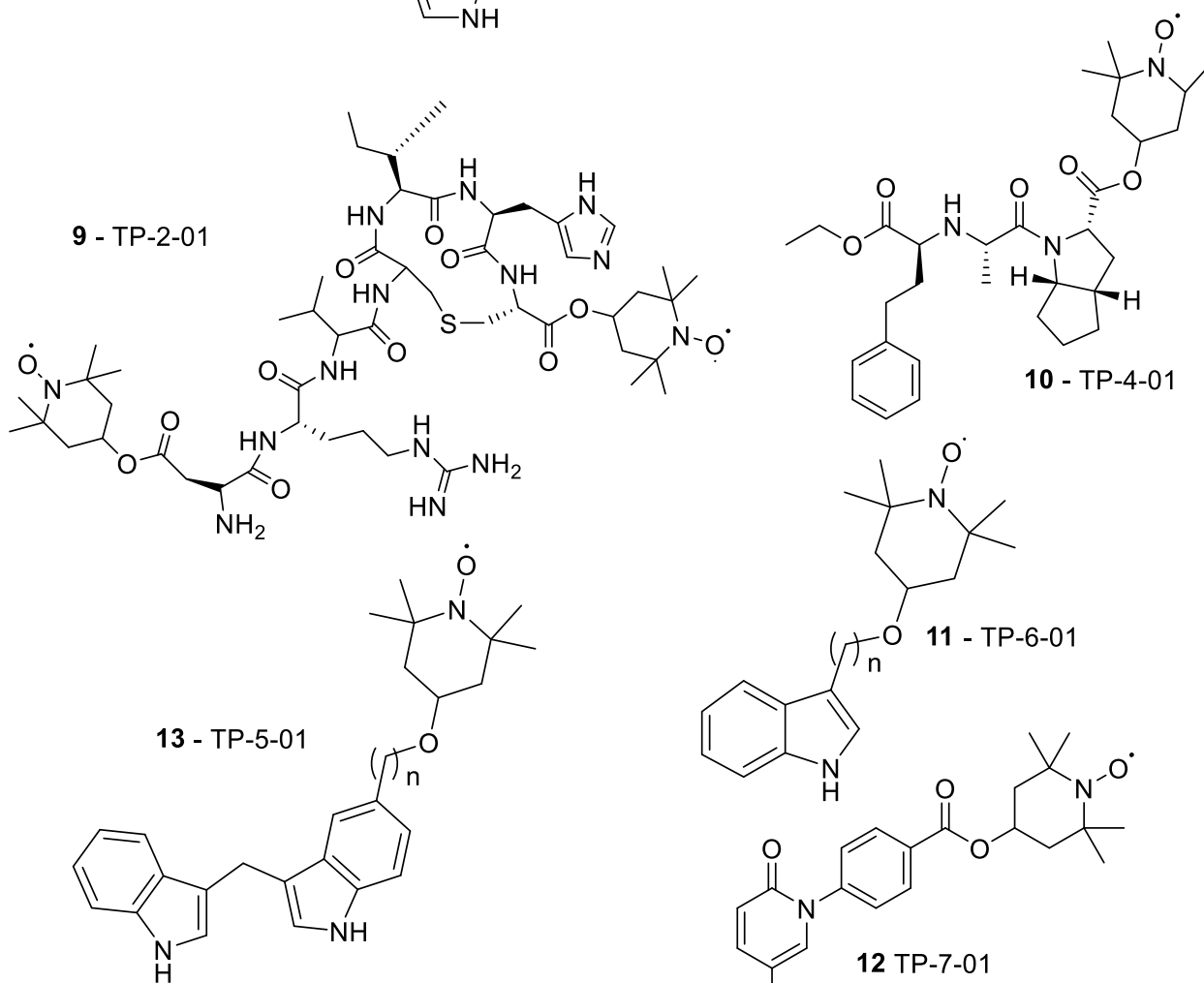
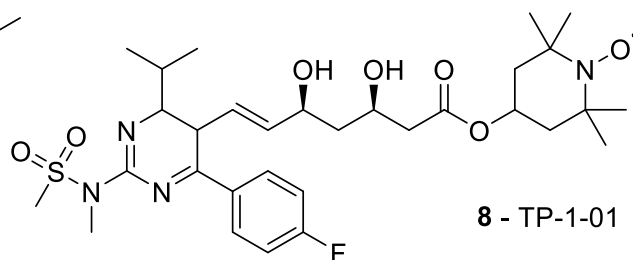
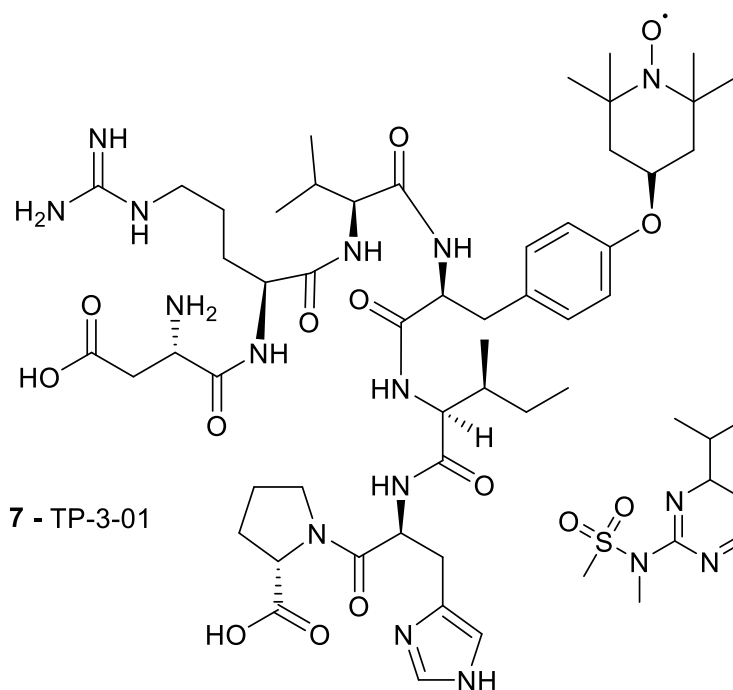


Figura 6: Compostos da patente que estão sendo desenvolvidos para o tratamento de COVID-19. Molécula **7** (TP-3-01), molécula **8** (TP-1-01), molécula **9** (TP-2-01), molécula **10** (TP-4-01), molécula **11** (TP-6-01), molécula **13** (TP-5-01), molécula **12** (TP-7-01).

2.4 Triazóis

Os triazóis são compostos orgânicos heterocíclicos que contém um anel de cinco membros com três átomos de nitrogênio e dois átomos de carbono que existem em duas formas isoméricas, o 1,2,3-triazol e o 1,2,4-triazol. Esses heterociclos possuem grande importância na química medicinal por apresentarem algumas características atraentes, como a formação de ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e as interações de empilhamento π , o que permite a ligação ao alvo biológico com alta afinidade devido à sua melhor solubilidade (DHEER; SINGH; SHANKAR, 2017). Eles são notavelmente estáveis em relação à hidrólise, condições oxidativas/redutoras e degradação enzimática, mas a clivagem redutora ocorre sob condições de forçamento que levam à formação de sais de triazólio (EL-SAGHEER; BROWN, 2012; LAU et al., 2011).

As porções 1,2,3-triazóis são protótipos atraentes, uma vez que oferecem uma elevada estabilidade, mesmo sob forte ambiente oxidativo e redutor e a sua propensão para formar ligações de hidrogênio aumenta a sua solubilidade, favorecendo a ligação a alvos biomoleculares (DALVIE et al., 2002)]. Desta maneira, os derivados de triazol exibem ampla gama de propriedades biológicas através de diferentes mecanismos de ação, na **Figura 7** temos a representação de alguns compostos (SOARES, 2017).

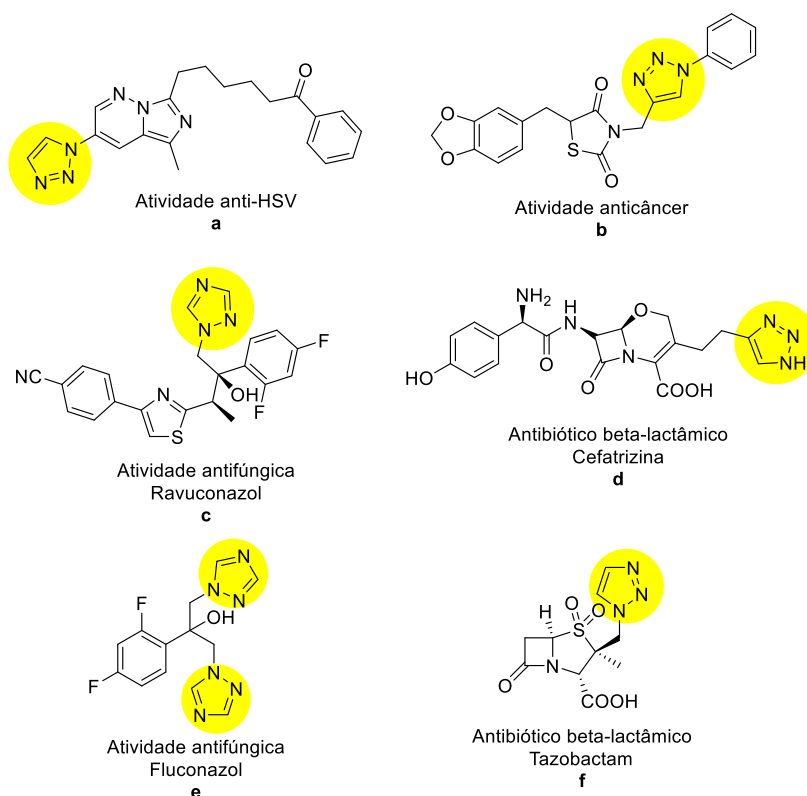


Figura 7: Compostos derivados do triazol e suas respectivas atividades

2.4.1 Atividade antiviral dos triazóis

As doenças virais são capazes de infectar praticamente todos os órgãos e sistemas de um organismo hospedeiro, causando formas latentes, agudas e crônicas de infecção (FLINT et al., 2009). Por isso a exigência de agentes antivirais ainda é inevitável (DE CLERCQ, 2004; DHEER; SINGH; SHANKAR, 2017).

De fato, mais da metade dos medicamentos clínicos para o tratamento de doenças virais são nucleosídeos análogos (DE LOURDES G. FERREIRA et al., 2014). Como exemplo de agentes antivirais à base de triazóis, a ribavirina é um composto com atividades relatadas contra herpes vírus simplex (HSV), vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), vírus influenza, vírus sincicial respiratório e vírus da hepatite C, entre outros vírus. Porém, mais tragicamente, o uso clínico rotineiro da ribavirina é limitado porque esse composto é consideravelmente citotóxico. A fim de modificar o padrão, novos nucleosídeos de análogos de ribavirina baseados em 1,2,3-triazol representados na **Figura 8** foram sintetizados com sucesso através de *click chemistry* com rendimentos de 35-65%. Verificou-se que um dos compostos preparados foi superior à ribavirina em termos de atividade antiviral contra a replicação do vírus influenza A e atividade de HIV-1 RT (transcriptase reversa).

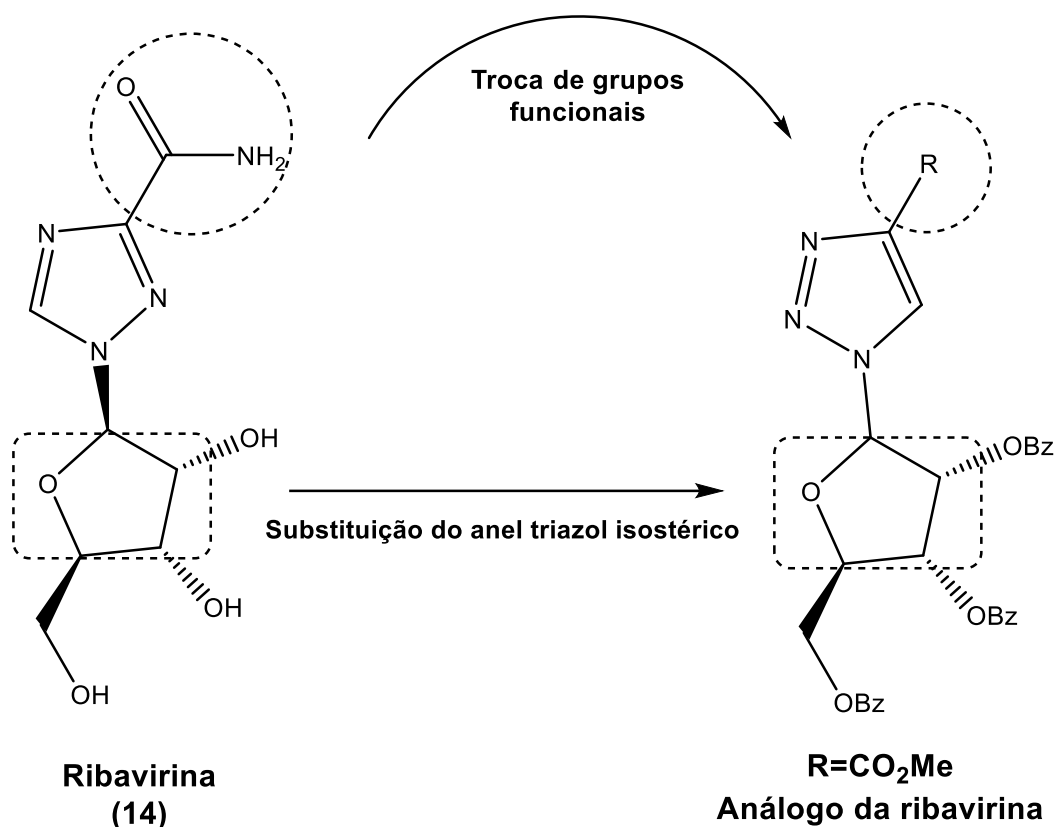


Figura 8: Abordagem racional para projetar análogos de nucleosídeos baseados em ribavirina (molécula **14**) (Figura adaptada de DHEER et al 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

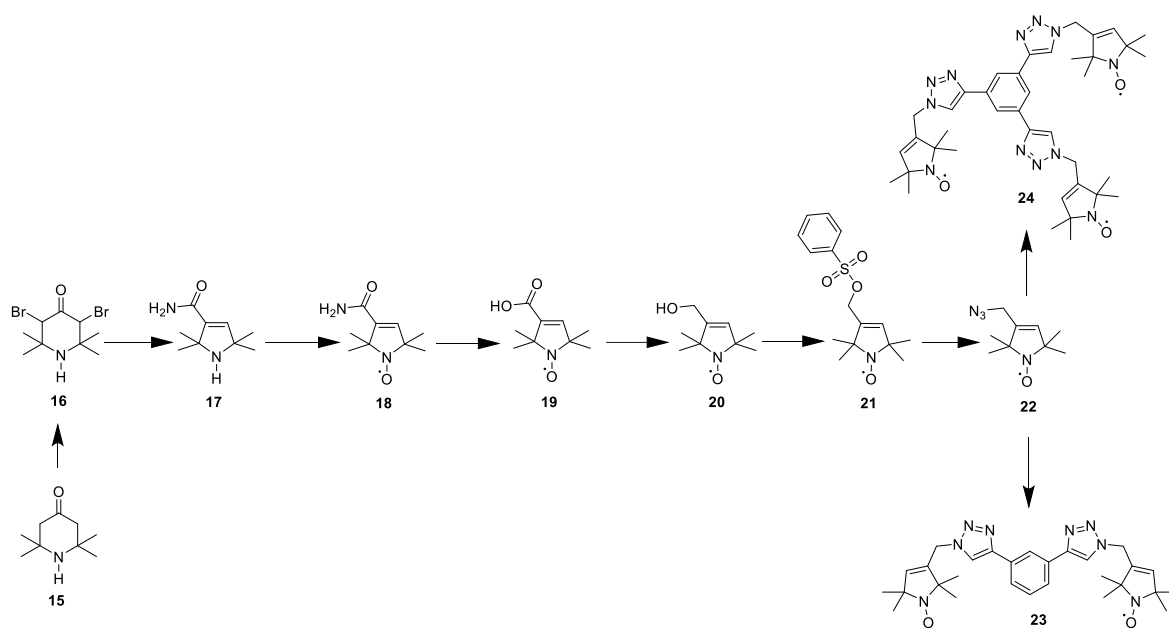
Este trabalho visa a síntese dos nitróxidos cíclicos **16**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21**, **22** e novos análogos correlacionados **23** e **24**, contendo na posição C-3 do anel 2,2,5,5-tetrametilpirrolínico-1-oxi os correspondentes grupamentos heterocíclicos, visando o desenvolvimento de inibidores radicais livres em processos biológicos.

3.2 Objetivo Específico

- Preparar e caracterizar novos nitróxidos e seus intermediários;
- Avaliar atividade antioxidante dos novos candidatos e seus intermediários à inibição de radicais livres;
- Estabelecer a citotoxicidade de diferentes concentrações dos nitróxidos **23** e **24** e seus intermediários em cultura de células Vero pelo ensaio de MTT;
- Avaliar a atividade antiviral *in vitro* dos nitróxidos **23**, **24** e seus intermediários contra SARS-CoV-19 em cultura de células Vero infectadas.

4 METODOLOGIA

A metodologia aborda todas as etapas realizadas no **Esquema 2** abaixo, no qual todas as moléculas serão sintetizadas



Esquema 2: Esquema de síntese para a preparação dos derivados nitróxidos **23** e **24**

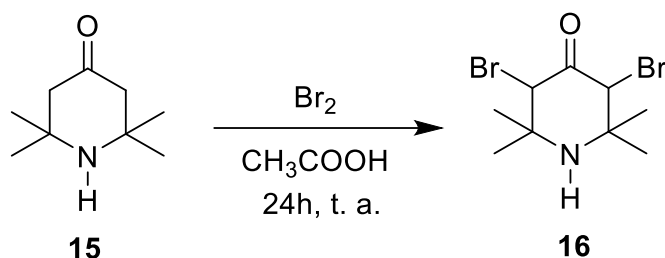
Os solventes e reagentes, para fins sintéticos, foram tratados, destilados e secos conforme necessidades requeridas nas metodologias adotadas de acordo com os processos descritos na literatura (FERREIRA, 1992). O processo de monitoramento das reações foi realizado através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD), em cromatofolhas de silicagel 60 F-254, com 0,2 mm de espessura de camada (ref. 1.05554 MERCK).

As fases móveis foram preparadas volume a volume (v/v) de acordo com suas necessidades e a visualização foi efetuada através de revelação na região do ultravioleta (254 nm).

Para a purificação de substâncias por cromatografia em coluna foi utilizado gel de sílica 60; 0,063-0,200 mm (ref. 1.05554 MERCK) e a fase móvel descrita em cada etapa e adaptada a cada uma das moléculas.

Os espectros na região do Infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR, modelo Frontier. Os valores para as bandas de absorção estão expressos em número de onda, utilizando-se como unidade o centímetro recíproco (cm^{-1}). As determinações de ponto de fusão foram obtidas em aparelho Quimis, modelo 340S.

4.1 Síntese da 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (16)



Esquema 3: Síntese do 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (**16**)

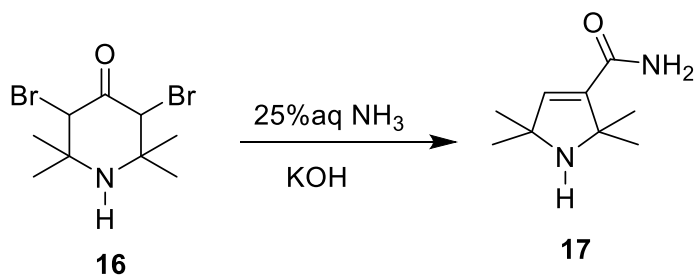
O composto 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (**16**) (**Esquema 3**), foi preparado utilizando-se 20 g de 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (118,15 mmol) (**15**) dissolvidos em um balão de fundo redondo de 250 mL com 80 mL de AcOH, em banho de água gelada. Em seguida, em um funil de separação de 250 mL, foram adicionados 14 mL de bromo (equivalente a 41,16g; 257, 55 mmol), 57 mL de AcOH e iniciado o gotejamento para o balão utilizado na dissolução anterior (mantido em banho de água gelada até o fim do gotejamento). Após o término do gotejamento, a mistura ficou em agitação magnética por 24 horas em temperatura ambiente (ROZANTSEV, 1970).

Após 24 horas a suspensão (de cor bege) foi filtrada em papel filtro e em seguida o sólido isolado foi lavado com 40 mL de AcOH, 40 mL água destilada e duas lavagens com 40 mL de éter etílico, após a lavagem (para a retirada do resíduo de bromo) foi deixado em repouso, para secar, em um dessecador de 7-10 dias e após esse tempo o sólido foi pesado (ROZANTSEV, 1970).

A substância **16** apresentou-se como um sólido de cor bege de p.f.: 195-198 °C com rendimento de 97% (39,34 g, 120,28 mmol).

IV n_{max} (cm⁻¹): 639(C-Br), 1254-1037 (C-N), 1388 (C-H), 1542 cm⁻¹ (N-H) e 1749 (C=O)

4.2 Síntese da 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida (17)



Esquema 4: Preparação do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida (**17**)

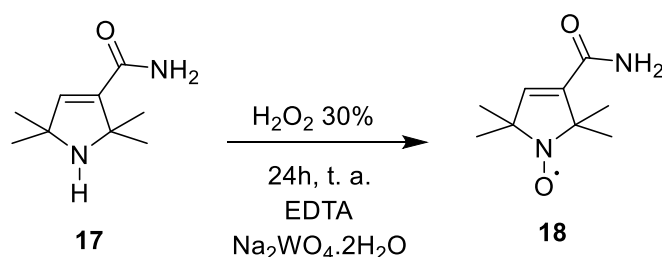
Em um balão de fundo redondo de 100 mL, contendo 35 mL de solução de amônia aquosa 25% (m/v) (hidróxido de amônia), foram adicionados 3,5 g de 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (10,70 mmol) (**16**) lentamente ao balão contendo solução aquosa de amônia 25% (m/v), sob agitação magnética. Em seguida, a solução foi saturada com hidróxido de potássio e deixada sob agitação por 24 horas e o precipitado formado foi filtrado em papel de filtro e colocado em repouso para secagem (ROZANTSEV, 1970).

Após o repouso, foi realizada a pesagem dos compostos e feita a confirmação estrutural.

A substância **17** apresentou-se como um sólido de cor bege de p.f.: 176-179 °C com rendimento de aproximadamente 80%.

IV $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$; pastilha de KBr: 3183 e 3345 (N-H), 1641 (C=C), 1661 (C=O), 774,718 e 655 (N-H), 1401 (C-N), 2866 (C-H₂) e 2926 (C-H₃).

4.3 Síntese do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**18**)



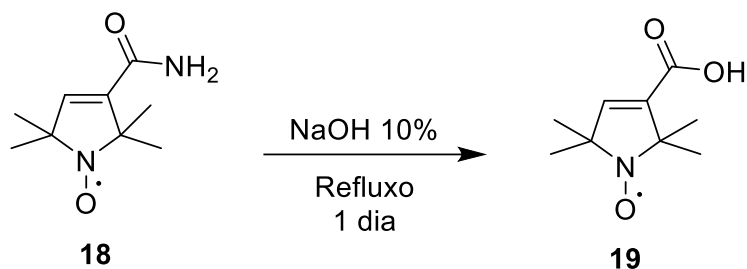
Esquema 5: Síntese do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**18**)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL foram dissolvidos 5 g de 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidropirrolina-3-carboxamida (29,71 mmol) (**17**) em 100 mL de água destilada, juntamente com 0,1 g de tungstato de sódio e 0,1 g de EDTA. A solução ficou sob agitação magnética, em banho de gelo, e 5 mL de H₂O₂ 30% (v/v) foram adicionados ao balão e a mistura deixada por 5 minutos. Em seguida, a reação foi mantida em temperatura ambiente e no escuro (balão coberto com papel alumínio) sob agitação por 24 horas. Após esse período, a mistura reacional foi filtrada em papel de filtro e o sólido lavado com 30 mL de água destilada e colocado para secar. O restante do filtrado foi extraído com acetato de etila (3 extrações com 50 mL de acetato de etila) em um funil de separação de 250 mL. A fase orgânica foi coletada e seca com sulfato de sódio, filtrada e seca a vácuo no rotaevaporador (ROZANTSEV, 1970).

A substância **18** apresentou-se como um sólido de cor amarelada de p.f.: 203-204 °C com rendimento de 42%.

IV $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 1159 (C-N), 1366 e 1411 (C-H) 1617, 3346 e 3161 (N-H), 1637 (C=C) e 1667 (C=O).

4.4 Síntese do ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**19**)



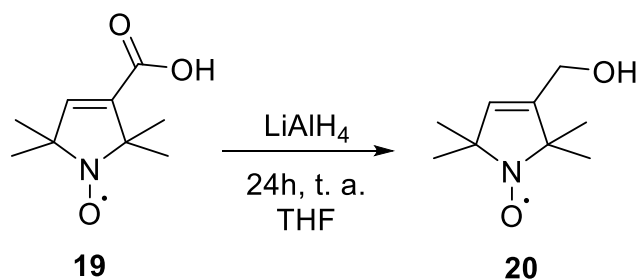
Esquema 6: Síntese do ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**19**)

Em um balão de fundo redondo de 125 mL, 3,66 g de 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxamida-1-oxi (19,86 mmol) (**18**) e 40 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 10% (m/v) foram colocados em refluxo até o término da evolução do gás amônia. Após resfriamento, a mistura reacional foi cuidadosamente acidificada com aproximadamente 1,0 mL de ácido clorídrico e o precipitado obtido foi filtrado e secado ao ar livre. A solução ácida foi extraída com éter (2 extrações de 30 mL) e seca com sulfato de sódio, filtrado e seco a vácuo.

A substância **19** apresentou-se como um sólido cristalino de cor amarelo claro de p.f.: 210-211 °C com rendimento de aproximadamente 97%.

IV $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 1147 (C-O), 2986 (O-H), 1193 (C-N), 1365 e 1405 (C-H), 1631 (C=C) e 1704 (C=O).

4.5 Síntese do 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-1-oxi (**20**)



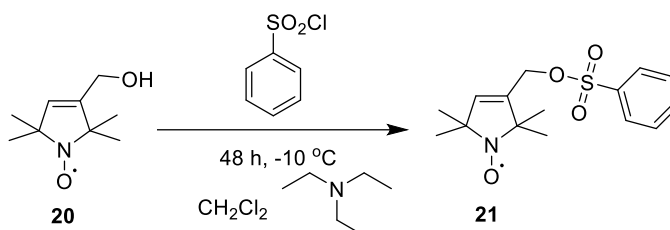
Esquema 7: Síntese do 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-1-oxi (**20**)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados 1,0 g do ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-carboxiamida-1-oxi (**19**) e 30 mL de THF seco sob atmosfera de nitrogênio e em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 300 mg de LiAlH₄ em pequenas porções. A mistura ficou em temperatura ambiente, sob agitação, por 24 horas. Após esse período, foram adicionados 30 mL de água destilada e a mistura foi filtrada. O filtrado foi submetido a cinco extrações de 30 mL com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio, filtrada e seca no rotaevaporador, em seguida, foi feita a purificação por recristalização com tolueno e o produto foi acondicionado em dessecador para evitar a umidade.

O sólido amarelo foi purificado através da cromatografia em coluna contendo gel de sílica, usando-se como eluente a mistura éter de petróleo/acetato de etila 7:3 (v/v) (KUCHER et al., 2017).

A substância **20** apresentou-se como um sólido amarelo com ponto de fusão 75-76 °C com rendimento de 36%.

IV $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: deformação axial (C-O) 1038 cm^{-1} , (C-N) 1278 cm^{-1} , (C=C) 1468 cm^{-1} e (O-H) aproximadamente 3377 cm^{-1} .

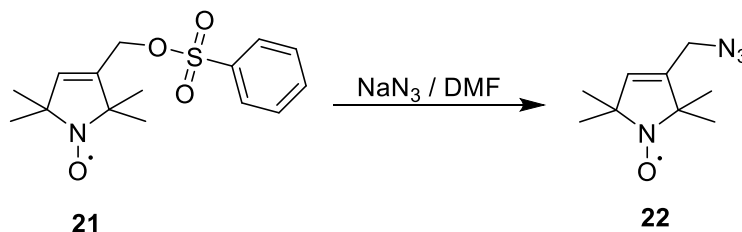
4.6 Síntese do benzenossulfonato de (1-hidroxi-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-il) metil (21)**Esquema 8:** Síntese do intermediário nitróxido (**21**)

Em um balão de fundo redondo de 100 mL foi adicionado 0,1522g do 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-1-oxi (**20**), 5 mL de diclorometano e 136 μL de trietilamina. Após, foi feita lentamente a adição de 110 μL de cloreto de benzenossulfonila em uma temperatura de -10°C, ao término da adição a mistura ficou em temperatura ambiente por 48 horas. Foi realizada extração em 10 mL de água destilada e 10 mL de solução de bicarbonato de sódio a 5% (necessário a adição de diclorometano para fazer essa extração). A fase orgânica foi seca com

sulfato de sódio e evaporada sob pressão reduzida. O produto residual é um óleo amarelo e possui um rendimento de aproximadamente 26%

IV $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 1692 (C=C deformação axial), 1462 (C=C vibrações do núcleo aromático), 1284 (C-N), 1020 (C-O) e 1185 e 1365 (SO_2).

4.7 Síntese do 3-(azidometil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-1-oxi (22)

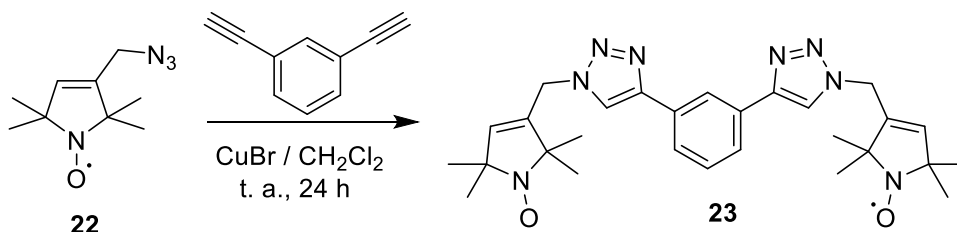


Esquema 9: Síntese do intermediário nitróxido (22)

Em um balão de fundo redondo de 100mL, uma solução de azida de sódio (1,3g 0,02mol) em água (2 mL) é adicionada a uma solução do sulfonato (3,26g; 0,01 mol) em DMF (20 ml) e colocado sob refluxo por 4h. A mistura reacional foi diluída em água e foi feita 3 extrações com 30 mL de éter. A fase do éter (orgânica) foi seca com sulfato de sódio anidro e em seguida rotaveaporado. O rendimento dessa reação foi de aproximadamente 65% e o produto residual foi um óleo amarelado.

IV $\nu_{\max}(\text{cm}^{-1})$: 3000 cm^{-1} (picos referentes a C-H aromático e alifático), 1669 cm^{-1} (C=C) e 2097 cm^{-1} (N=N=N).

4.8 Preparação do 3,3'-((1,3-fenilenobis(1H-1,2,3-triazol-4,1-diil))bis(metileno))bis(2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-oxi) (23)



Esquema 10: Síntese de novo análogo **23**

Em um balão de 50 mL adicionou-se 0,140 g (0,71mmol) do 3-(azidometil)-2,2,5,5-Tetrametil-2,5-diidro-1H-pirrol-1-oxil, dissolvido em 7 mL de diclorometano, 0,100g (0,10 mmol) de brometo de cobre (I), 0,044g (0,35mmol) de 1,3-dietinilbenzeno e 3 mL de diclorometano.

Deixou-se a reação sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Purificou-se o nitróxido obtido por cromatografia em coluna de gel de sílica usando como mistura de eluente clorofórmio/metanol em diferentes concentrações (100; 50:1; 20:1 e 10:1). Durante a purificação foram feitas placas de CCD (com fase móvel clorofórmio/metanol 20:1) com as amostras retiradas diretamente da coluna para verificar a separação dos compostos que estavam eluindo e assim realizar a separação e posterior detecção da molécula pelo infravermelho. O rendimento dessa reação foi de aproximadamente 68% e o produto residual é um óleo amarelado.

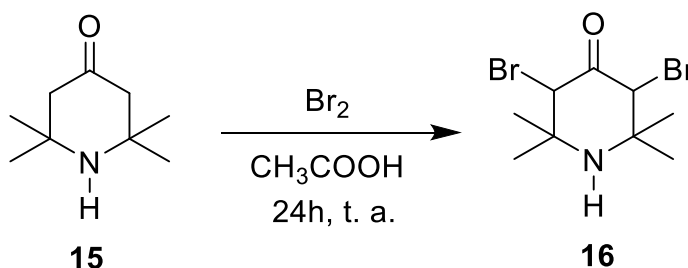
IV $\nu_{\text{max}}(\text{cm}^{-1})$: região 3000 cm^{-1} (dobramento e estiramento C-H), 1678 cm^{-1} (C=C deformação axial da ligação), 1280 cm^{-1} (C-N deformação axial anel aromático), 1458 e 1358 cm^{-1} (C-H dobramento da ligação).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação do 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (**16**)

A primeira etapa deste projeto consistiu na preparação do 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (**16**) a partir da reação de bromação da piperidona (**15**) em ácido acético, conforme apresentado no **Esquema 11** a seguir.

A reação foi efetuada à temperatura ambiente e o isolamento do produto (**16**) foi feito através da filtração da mistura em funil, seguida do tratamento do sólido formado com AcOH, água e éter etílico. Após secagem do produto, obteve-se a 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (**16**) como um sólido de coloração bege, com rendimento de 97% e ponto de fusão de acordo com a literatura foi 195-198 °C (ROZANTSEV, 1970).



Esquema 11: Síntese do intermediário 16 via halogenação de carbono alfa carbonílico (**16**)

A estrutura do produto formado foi confirmada por análise espectroscópica na região do Infravermelho (I.V.), destacando-se no espectro a absorção de deformação axial da ligação (C-Br) em 639 cm^{-1} . Adicionalmente, foram verificadas as seguintes bandas características: $1254\text{-}1037\text{ cm}^{-1}$ referente a ligação (C-N), 1388 e 1456 cm^{-1} referente a ligação (C-H), 1542 cm^{-1} referente a ligação (N-H) e 1749 cm^{-1} referente a ligação C=O, como mostrado no espectro abaixo (**Figura 9**).

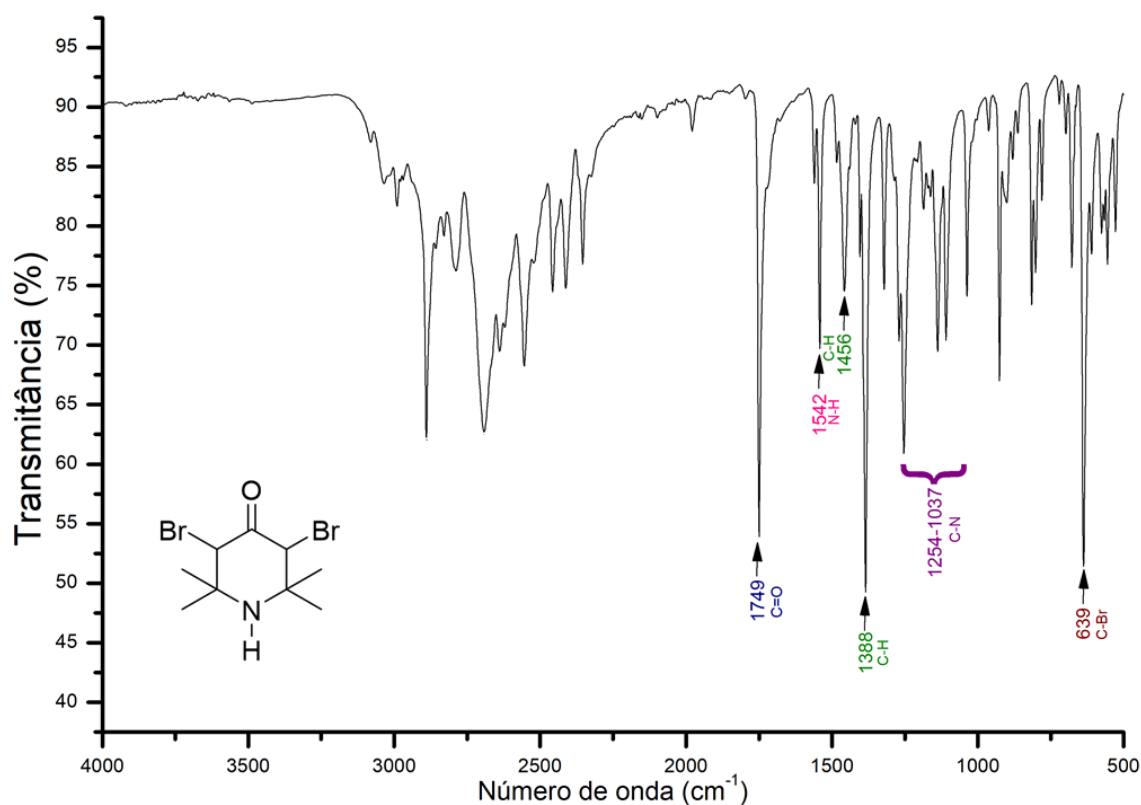
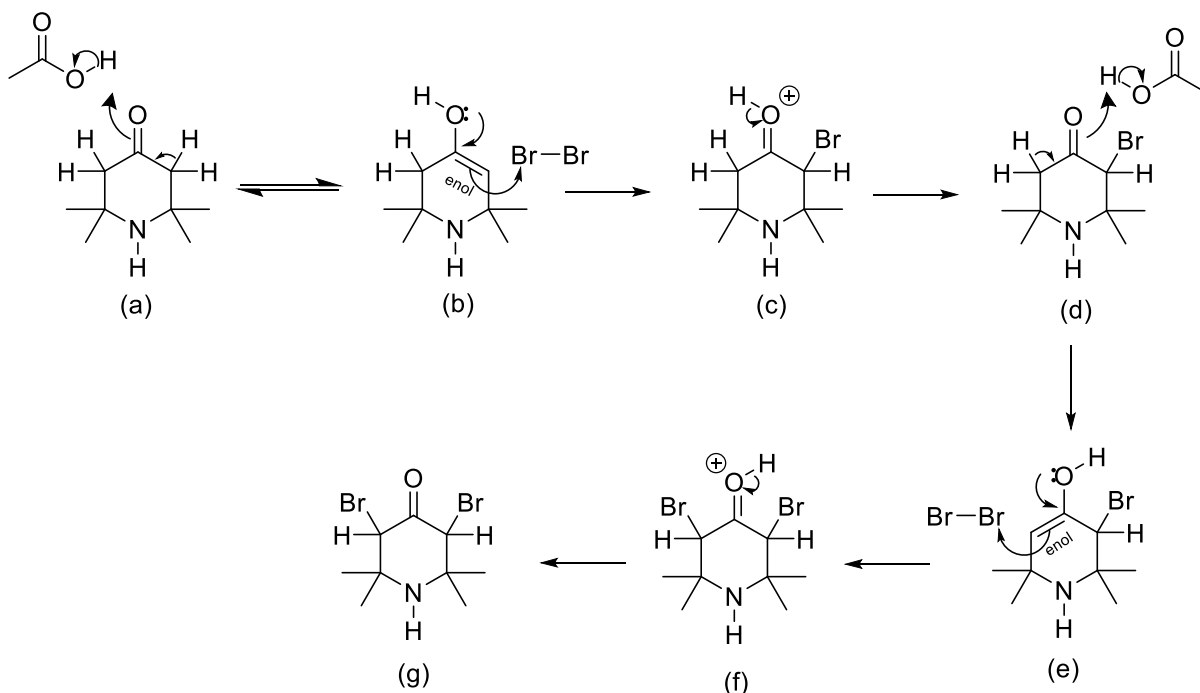


Figura 9: Espectro de infravermelho referente a molécula 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (**16**)

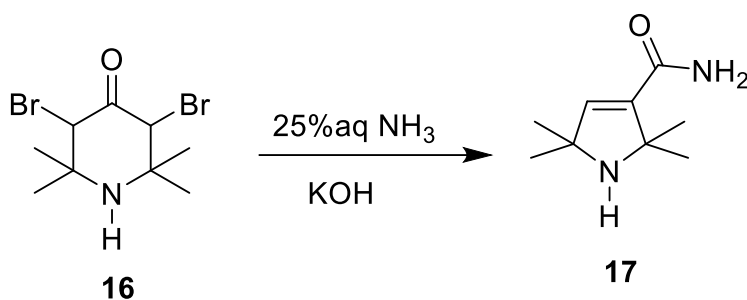
Essa reação ocorre pelo mecanismo de halogenação, no qual o carbono alfa da carbonila é halogenada pelo bromo em solução de ácido acético. A primeira etapa é a de enolização catalisada por ácido, e a molécula de bromo eletrofílica então é atacada pelo carbono nucleofílico do enol. As setas mostram porque esse carbono em particular é o atacado no **Esquema 12**.



Esquema 12: Mecanismo de formação do 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (**16**) a partir da piperidona (**15**).

5.2 Preparação do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida (**17**)

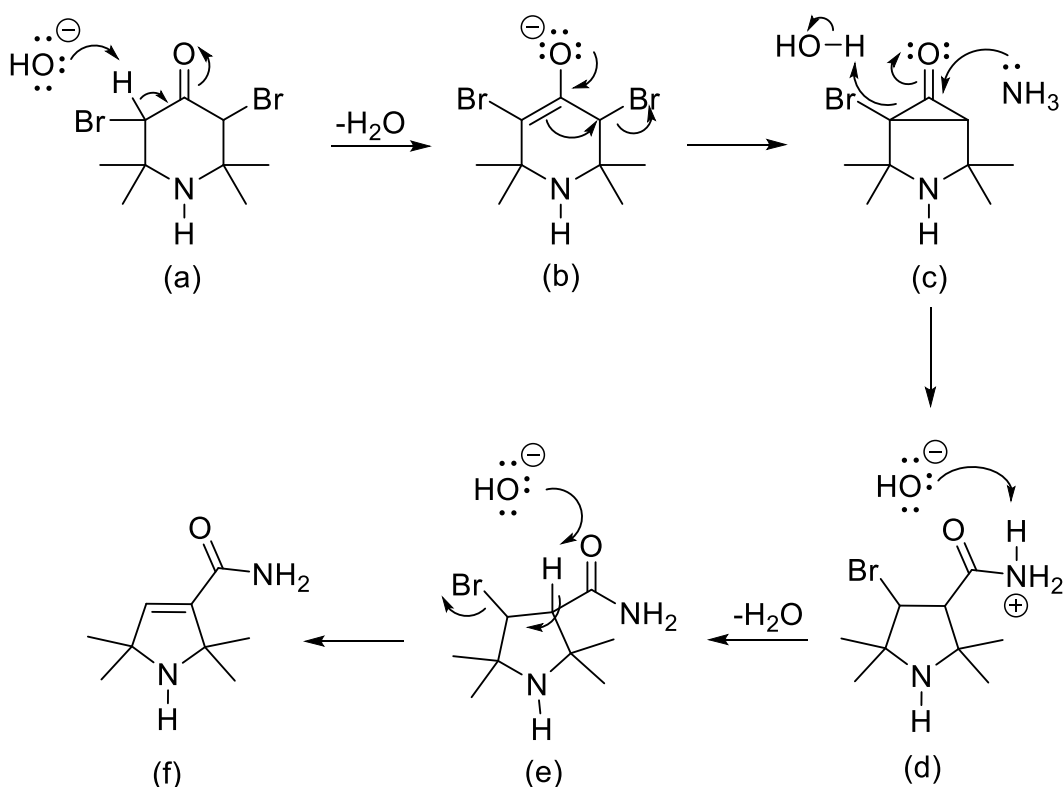
Uma vez obtido o 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ona (**16**), este foi submetido à reação de contração de anel com solução aquosa de amônia 25% (m/v) e excesso de pastilhas de KOH (**Esquema 13**), resultando no composto 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida (**17**).



Esquema 13: Síntese do intermediário 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida (**17**)

O mecanismo de formação da tetrametilpirrolinona (**17**) ocorre segundo o rearranjo de Favorskii. Nesta reação é observada uma contração do anel de 6 membros, piperidina, para um anel de cinco membros, pirrol. Neste mecanismo, a primeira etapa consiste na abstração de um hidrogênio no carbono α à carbonila da piperidona (**a**), que é uma α -halocetona. A abstração do hidrogênio é promovida pelo

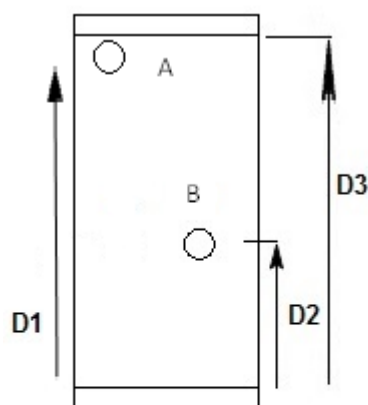
íon hidroxila do hidróxido de potássio resultando na eliminação de água e formação do intermediário enolato (b). Posteriormente, a carbonila é regenerada pela formação de uma ligação π entre carbono e oxigênio, e de maneira concertada a formação de uma nova ligação C-C resultando no intermediário (c) com eliminação de um átomo de bromo. Em seguida, o intermediário (d) é formado pelo ataque do nucleófilo amônia no carbono da carbonila. Logo após a formação do anel pirrolina (d) é constatada a abstração de um hidrogênio e a desidroalogenação de HBr levando ao intermediário (e) e finalmente ao produto desejado 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida (f), como demonstrado no **Esquema 14**.



Esquema 14: Mecanismo de formação do 2,2,5,5 -tetrametilpirrolina-3-carboxiamida (**17**)

O intermediário (**17**) sintetizado com um rendimento de 79% apresenta-se como um sólido cristalino e de coloração branca, que foi utilizado na etapa posterior, sem prévia purificação, para a preparação do nitróxido cíclico desejado.

Com a finalidade de acompanhar a formação do produto, foi realizada a técnica de cromatografia em camada delgada, utilizando-se uma cromatoplaça de alumínio revestida de sílica-gel, que é a fase estacionária e como eluente o acetato de etila/etanol. Na placa de cromatografia foram comparados o reagente 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametil-4-oxopiperidina (A) e o produto 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida (B), como demonstrado na **Figura 10**, apresentando fator de retenção (R_f) para A = 0,98 e B= 0,46



D1 = 4,9 cm

D2 = 2,3 cm

D3 = 5 cm

A: Reagente; B: Intermediário (2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida);

D1: distância da migração do reagente de partida; D2: distância da migração do intermediário; D3: distância da migração do solvente

Figura 10: Comparação entre o reagente A e intermediário B (Eluente acetato de etila/etanol, revelação na região do ultravioleta (254 nm)).

Assim comparando-se o reagente 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametil-4-oxopiperidina (A) com intermediário 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida (B), observa-se a formação de manchas e fator de retenção (R_f) distintos. As diferentes manchas observadas se devem ao fato do reagente (A) ser mais apolar com isso ficando menos retido na sílica quando comparado com o intermediário (B) que é mais polar, essas diferenças encontradas demonstram que a reação foi completa não apresentando resíduo do material de partida 3,5-dibromo-2,2,6,6-tetrametil-4-oxopiperidina (A), indicando a formação a princípio apenas do composto 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida.

O intermediário (**17**) obtido teve seu ponto de fusão e rendimento realizados como discriminados na **Tabela 1**.

De acordo com Rozantsev (1970), a 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida é caracterizada por apresentar um precipitado levemente cristalino, através desta metodologia, com um rendimento de 80% e ponto de fusão entre 178-179 °C, comparando esses resultados da literatura com os obtidos nesse estudo como discriminado na **Tabela 1**, nota-se que os resultados de aspecto cristalino, ponto de fusão e rendimento encontram-se dentro do esperado, demonstrando que a síntese

do 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida foi realizada com sucesso.

Tabela 1: Comparação entre parâmetros de caracterização Literatura x intermediário sintetizado.

CARACTERIZAÇÃO DO 2, 2, 5,5-TETRAMETILPIRROLINA-3-CARBOXIAMIDA

PARÂMETROS	LITERATURA (ROZANTSEV, 1970)	INTERMEDIÁRIO SINTETIZADO
ASPECTO	PRECIPITADO BEGE LEVEMENTE CRISTALINO	PRECIPITADO BEGE LEVEMENTE CRISTALINO
RENDIMENTO (%)	80 %	79 %
PONTO DE FUSÃO (°C)	178 – 179 °C	181 °C

A estrutura do 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida foi confirmada por análise espectroscópica na região do infravermelho (I.V.), como demonstrado na **Figura 11**. Podem-se observar duas bandas, uma simétrica e outra assimétrica, em 3180 e 3340 cm^{-1} correspondente a ligação N-H, bandas em 1640 e 1662 cm^{-1} referentes à segunda banda de C=C e a C=O respectivamente, bandas fora do plano de N-H em 774,718 e 655 cm^{-1} , uma banda em 1403 cm^{-1} correspondente à ligação C-N, bandas em 2866 e 2926 cm^{-1} correspondente a C-H.

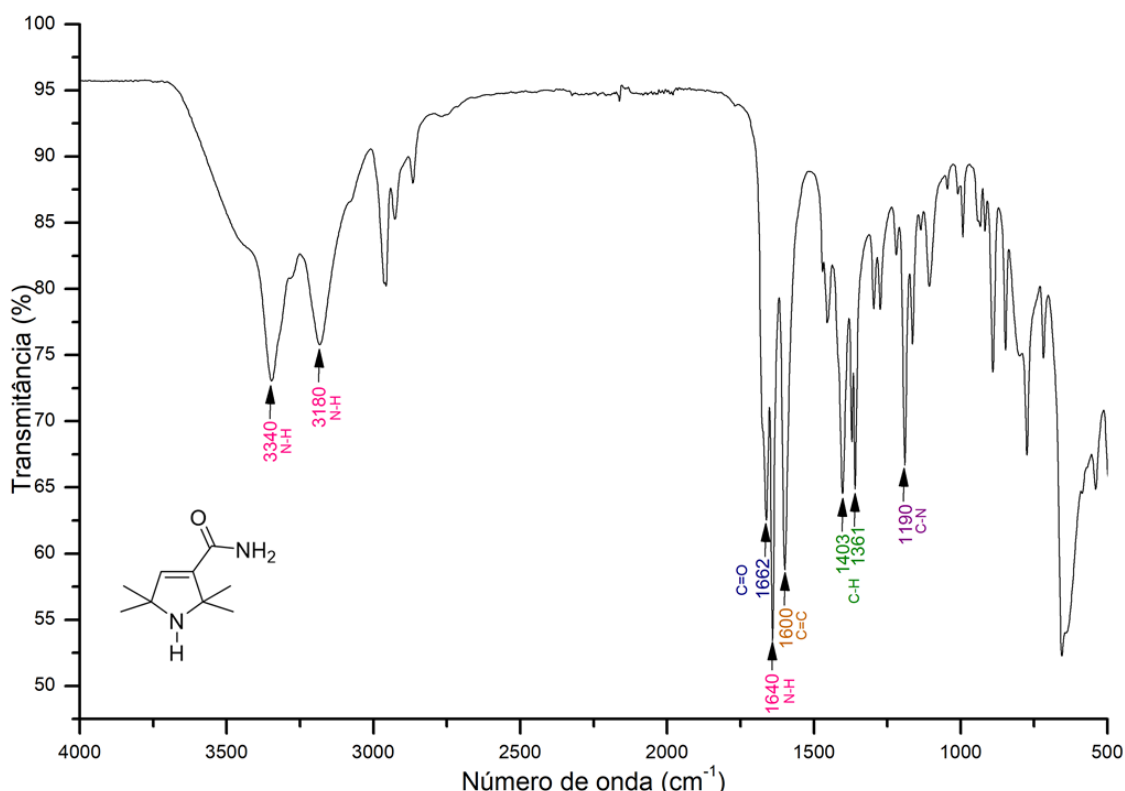


Figura 11: Espectro na região do infravermelho da 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida (**17**), revelação na região do ultravioleta (254 nm).

Desta maneira, correlacionando os resultados da literatura (ROBERT M. SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). com as principais bandas obtidas no estudo, como demonstrado na **Tabela 2**, pode-se confirmar a estrutura da carboxiamida formada.

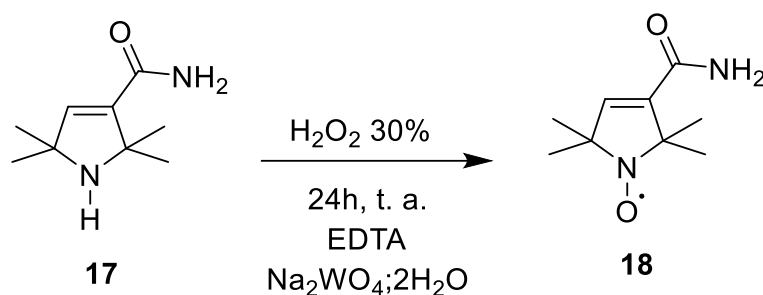
Tabela 2: Comparação entre o infravermelho da Literatura x do intermediário sintetizado.

INFRAVERMELHO - 2,2,5,5-TETRAMETILPIRROLINA-3-CARBOXIAMIDA	
TIPO DE LIGAÇÃO / FREQUÊNCIA (cm ⁻¹)	TIPO DE LIGAÇÃO / FREQUÊNCIA (cm ⁻¹)
LITERATURA (SILVESTEIN, 2005)	INTERMEDIARIO SINTETIZADO
N-H (Simétrica e assimétrica) / 3180 e 3350	3180 e 3340
N-H (Segunda Banda) / 1655-1620	1640
C=O / 1820 e 1630	1662
N-H (Fora do plano) / 800 e 660	774 ,778 e 655

C-N / 1400	1401
C=C /1641	1641
C-H / 2850-2960	2866 e 2926

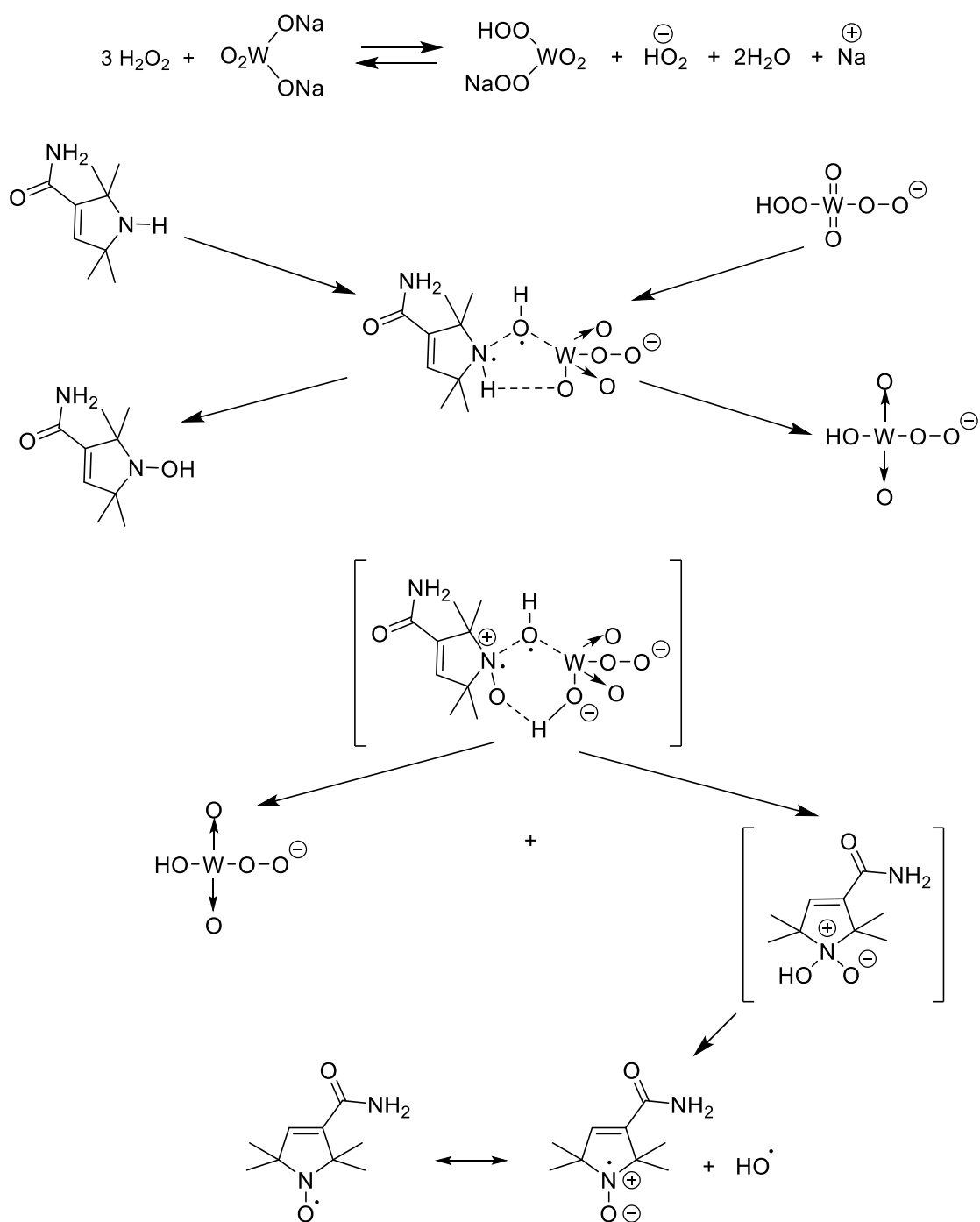
5.3 Preparação do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**18**)

A terceira etapa consistiu na síntese da 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**18**) a partir do composto 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida (**17**).



Esquema 15: Síntese do intermediário 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**18**)

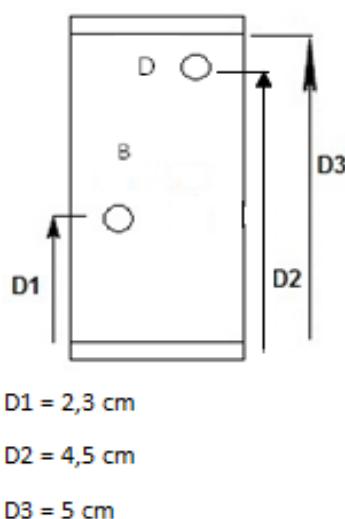
O mecanismo de reação para a formação do intermediário (**18**) por oxidação. O peróxido de hidrogênio é um agente oxidante e é estabilizado na presença de tungstato de sódio formando perácidos resultando na formação de substâncias oxidantes mais seletivas de certas aminas, conforme **Esquema 16**.



Esquema 16: Reação para síntese do 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi

A metodologia (ROZANTSEV, 1970) utilizada na preparação do nitróxido foi a oxidação do intermediário (**17**) com a adição de peróxido de hidrogênio e EDTA para a formação do nitróxido desejado 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**18**) resultando em um sólido cristalino de cor amarelo claro com rendimento de 42%.

Para o acompanhamento da reação, foi realizada a cromatografia em camada delgada, utilizando-se uma cromatoplaça de alumínio revestida de sílica-gel, como eluente o acetato de etila/etanol, para a confirmação da identidade do composto pretendido, como demonstrado na **Figura 10**, comparando o composto 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida (B) com o formado (D), apresentando (R_f) de 0,46 e 0,90, respectivamente.



B: Intermediário (2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida); D: Produto formado da segunda metodologia; D1: distância da migração do intermediário; D2: distância da migração do produto formado; D3: distância da migração do solvente.

Figura 12: Cromatografia contendo o intermediário B e produto D, revelação na região do ultravioleta (254 nm).

Como demonstrado na **Figura 12**, comparou-se o produto 2,2,5,5-tetrametilpirrolina-3-carboxiamida (B) com o produto obtido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (D), foram observadas diferentes manchas e valores de R_f ($B = 0,46$ $D = 0,90$), o que demonstra que o produto obtido (D) é mais apolar que o intermediário (B) e que a reação foi completa não apresentando resíduo do intermediário (B) e assim a possível formação do produto desejado.

O ponto de fusão e o rendimento foram discriminados na **Tabela 3**. De acordo com Rozantsev (1970), o intermediário 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi é característico por apresentar um sólido cristalino amarelo claro, com rendimento de 42% e ponto de fusão entre 203-204 °C com decomposição. Comparando esses resultados com o obtido no estudo de acordo com a **Tabela 3**, podemos observar que os valores se encontram de acordo com o esperado confirmando o nitróxido formado.

Tabela 3: Comparação entre parâmetros de caracterização da Literatura x 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi sintetizado

CARACTERIZAÇÃO - 2,2,5,5-TETRAMETIL-2,5-DIHI-DRO-1*H*-PIRROLINA-3-CARBOXIAMIDA-1-OXI (18)

PARÂMETROS	LITERATURA (ROZANTSEV, 1970)	NITRÓXIDO SINTETIZADO
ASPECTO	PRECIPITADO CRISTALINO AMARELO CLARO	PRECIPITADO CRISTALINO AMARELO CLARO
RENDIMENTO (%)	42 %	42 %
PONTO DE FUSÃO (°C)	203-204 °C (DECOMPOSIÇÃO)	203-204 °C (DECOMPOSIÇÃO)

O espectro de infravermelho do composto **(18)** está representado na **Figura 13** e nele podemos observar os picos referentes as ligações, sendo a banda 1159 referente a ligação de C-N, as bandas 1366 e 1411 representando o dobramento da ligação C-H, as bandas de valor 1617, 3346 e 3161 cm^{-1} são referentes as ligações N-H, a banda 1637 cm^{-1} representa a ligação dupla C=C e por fim a ligação dupla C=O nas amidas representada no comprimento de onda 1667 cm^{-1} .

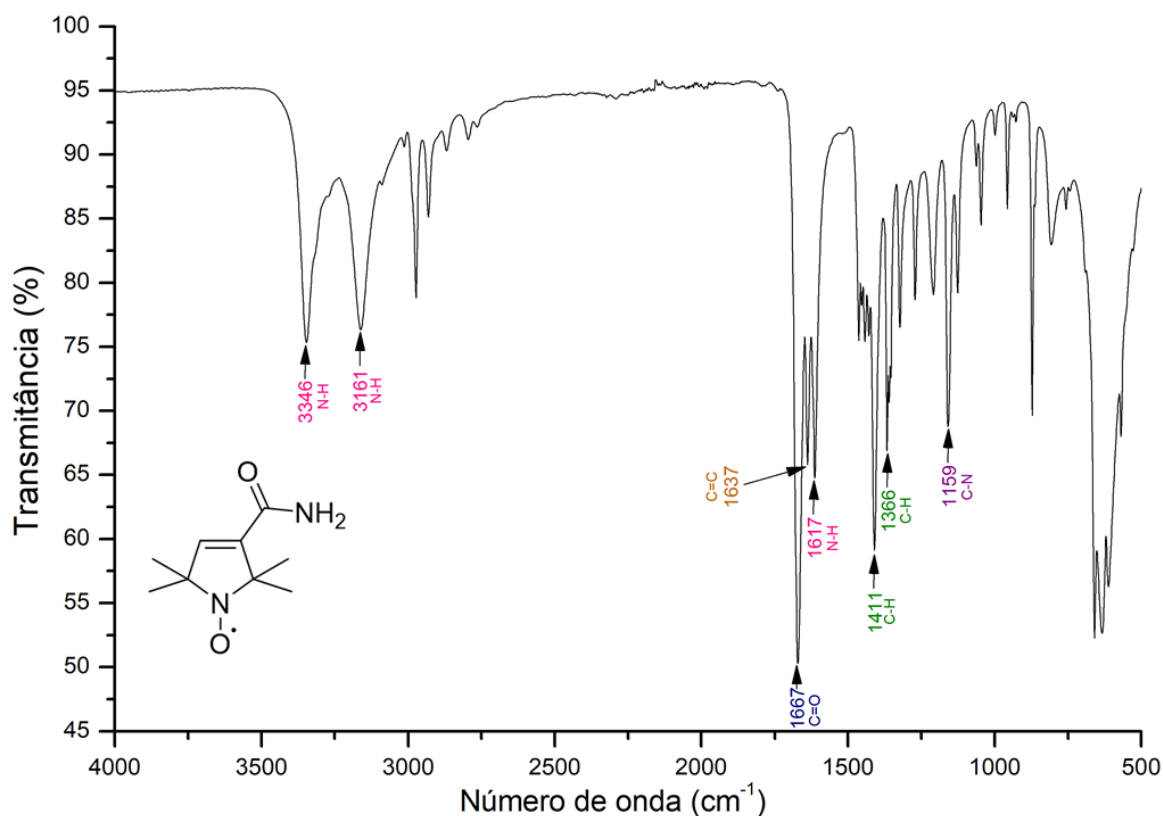
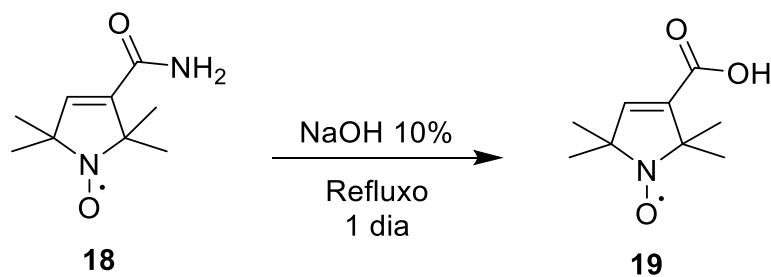


Figura 13 - Espectro na região do infravermelho referente a molécula 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**18**)

5.4 Preparação do ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**19**)

A quarta etapa do projeto consistiu na síntese do ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**19**) a partir da reação de hidrólise alcalina com solução aquosa de hidróxido de sódio 10%(m/v) do intermediário 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**18**), conforme mostrado no **Esquema 17**.

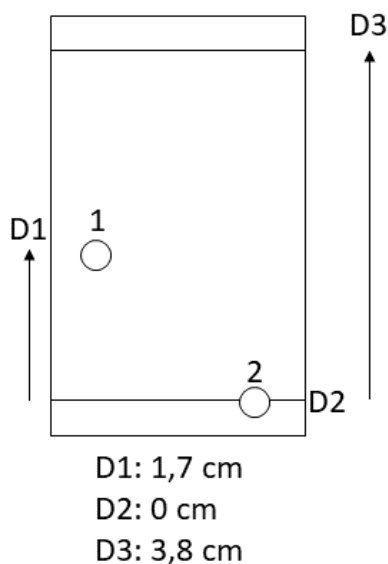


Esquema 17: Síntese do intermediário ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**19**)

O mecanismo da reação para formação do ácido (**19**) ocorre por hidrólise básica. O íon hidróxido atua como nucleófilo e como uma base e então vai atacar o carbono acílico da carbonila da amida removendo um próton para dar um diânion.

Em sequência, o diânion perde uma molécula de amônia (passo sincronizado com a transferência de próton da água) (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

A técnica de cromatografia em camada delgada foi realizada, utilizando-se uma cromatoplaça de alumínio revestida de sílica-gel, como eluente o hexano/acetato de etila (7:3), para a confirmação da identidade do composto pretendido, como demonstrado na **Figura 14**, comparando o composto 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi **18** (**1**) com o ácido formado **19** (**2**), apresentando (*R_f*) de 0,45 e 0, respectivamente.



1: 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi; 2: ácido formado; D1: distância da migração do intermediário; D2: distância da migração do produto formado; D3: distância da migração do solvente.

Figura 14: Placa de CCD comparando composto **18** (representado na placa por 1) e composto **19** (representado na placa por 2), revelação na região do ultravioleta (254 nm).

O ponto de fusão e o rendimento foram discriminados na **Tabela 4**. De acordo com Rozantsev (1970), o intermediário ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi é característico por apresentar um sólido cristalino amarelo claro, com rendimento de 97% e ponto de fusão entre 210-211°C com decomposição. Comparando esses resultados com o obtido no estudo de acordo com a **Tabela 4**, podemos observar que os valores se encontram de acordo com o esperado confirmando o nitróxido formado.

Tabela 4: Comparação entre parâmetros de caracterização da Literatura x ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi ido sintetizado
CARACTERIZAÇÃO - ÁCIDO 2,2,5,5-TETRAMETIL-2,5-DIHI-DRO-1*H*-PIRROLINA-3-CARBOXIAMIDA-1-OXI (14)

PARÂMETROS	LITERATURA (ROZANTSEV, 1970)	NITRÓXIDO SINTETIZADO
ASPECTO	PRECIPITADO CRISTALINO AMARELO CLARO	PRECIPITADO CRISTALINO AMARELO CLARO
RENDIMENTO (%)	97 %	94 %
PONTO DE FUSÃO (°C)	210-2011 °C (DECOMPOSIÇÃO)	209-212°C (DECOMPOSIÇÃO)

O espectro de infravermelho do composto **19** está representado na **Figura 15** e nele podemos observar os picos referentes as ligações, sendo a banda 1147 cm^{-1} referente a nova ligação presente na substituição da amida pelo ácido carboxílico, a ligação simples carbono-oxigênio (C-O) e a ligação oxigênio-hidrogênio (O-H), também presente no ácido carboxílico, representada entre $2876\text{-}3092\text{ cm}^{-1}$, aproximadamente. Na banda 1193 cm^{-1} temos a representação da ligação C-N, as bandas 1365 e 1405 cm^{-1} representam o dobramento das ligações C-H, em 1631 cm^{-1} temos a ligação dupla de C=C e a dupla ligação C=O no pico 1704 cm^{-1} (**Figura 15**).

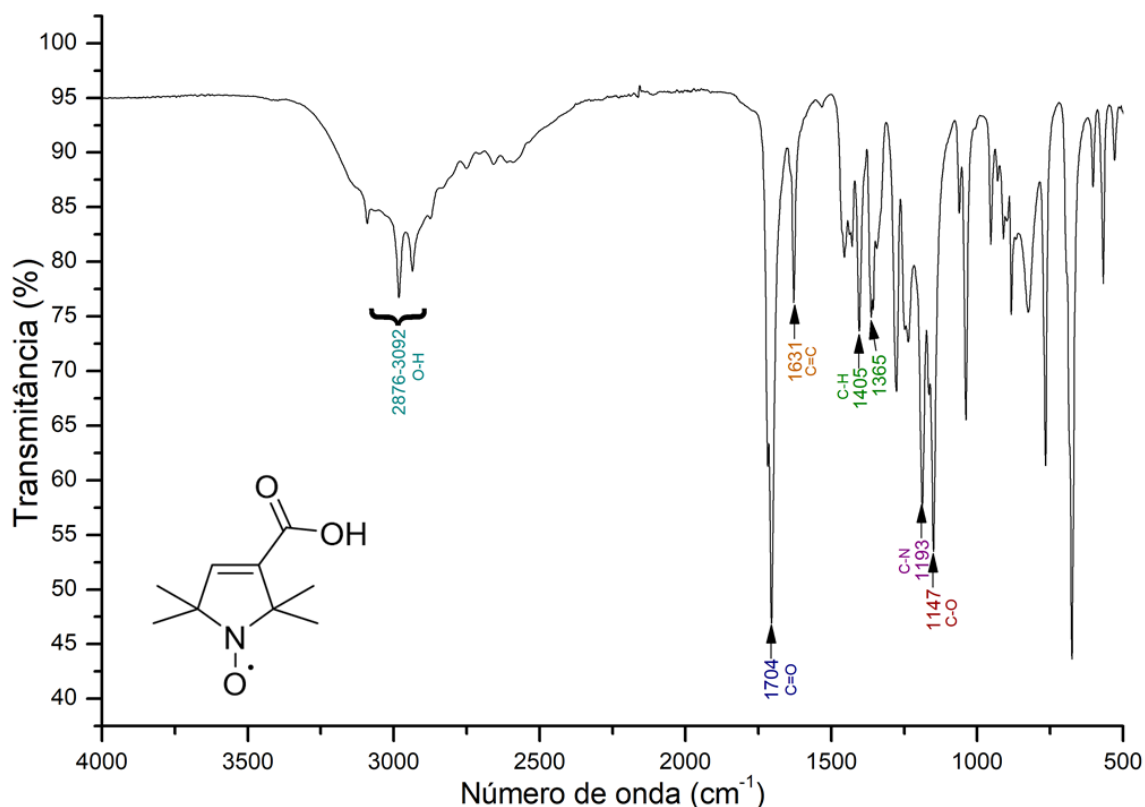
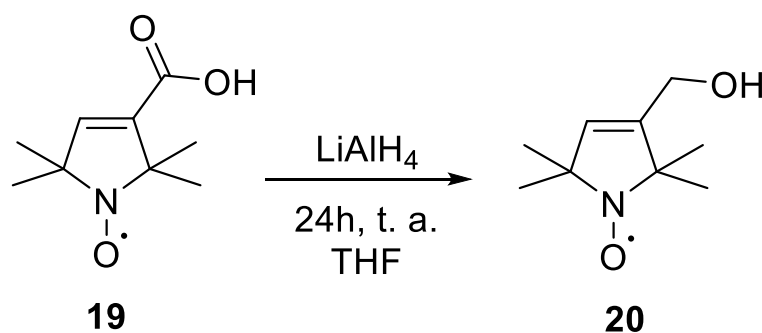


Figura 15: Espectro na região do infravermelho do ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**19**), revelação na região do ultravioleta (254 nm).

5.5 Preparação do 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-1-oxi (**20**)

A quinta etapa do projeto consistiu na síntese do 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-1-oxi (**20**) a partir do composto ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**19**).



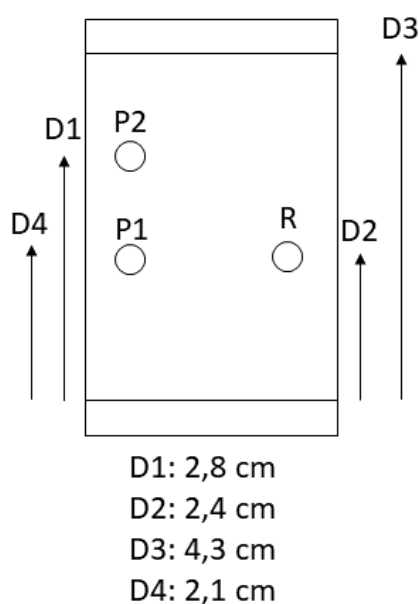
Esquema 18: Síntese do intermediário 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-1-oxi (**20**)

O mecanismo da reação para formação do 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-1-oxi (**20**) ocorre pela adição do hidreto de alumínio e lítio

(LiAlH_4), o qual realiza a redução do ácido carboxílico transformando-o em álcool. O agente redutor reage violentamente com doadores de prótons liberando gás hidrogênio e por isso é importante evitar a presença de água ou qualquer outro solvente fracamente ácido na reação. Dessa forma, o solvente utilizado foi o THF seco, preparado após destilação e tratamento com benzofenona e sódio em vidraria apropriada. O sódio realiza uma reação radicalar com a benzofenona dando origem a um composto de cor violeta. A presença desta coloração é a garantia de que o solvente está isento de água. Ao final da reação é adicionada água para decompor o complexo de alumínio (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

Após a adição da água a reação foi filtrada, submetida a extração com acetato de etila e seca no rotaevaporador. E então foi realizada a purificação utilizando uma coluna cromatográfica de sílica-gel, para separar as frações que apareciam na cromatografia em camada delgada (**Figura 16**). O óleo amarelo residual foi purificado na coluna com éter de petróleo/acetato em diferentes proporções 9:1; 8:2 e 7:3.

Uma vez mais foi realizada a cromatografia em camada delgada, utilizando-se uma cromatoplaça de alumínio revestida de sílica-gel, como eluente o éter de petróleo / acetato de etila (1:1), para observar a separação após a coluna como demonstrado na **Figura 16**, comparando o composto **20** no qual foi feita extração com acetato de etila e após isso foi purificado na coluna (P) com composto **20** que não foi feita a extração com acetato de etila e nem a purificação na coluna (R), apresentando (R_f) de P1 (0,48), P2 (0,65) e R (0,55).



P1 e P2: Produto da preparação da molécula **20** sem purificação; R: Produto da preparação da molécula **20** após purificação; D1 e D4: distância da migração do composto P; D2: distância da migração do composto R; D3: distância da migração do solvente.

Figura 16: Cromatografia comparando o composto P e R, revelação na região do ultravioleta (254 nm).

Foi realizada a caracterização por espectroscopia na região do IV do composto **20** em uma amostra na qual não foi realizada a extração com acetato de etila (espectro azul) e uma amostra na qual foi realizada a extração com acetato de etila e a purificação na coluna cromatográfica de sílica-gel (espectro preto) (**Figura 17**) (KUCHER et al., 2017).

No espectro de IV do composto **20** no qual foi realizado a extração com acetato de etila e a coluna cromatográfica, pode-se observar que a banda da carbonila ainda está presente, enquanto no qual não se realizou a etapa de extração e purificação a banda da carbonila em aproximadamente 2000 cm^{-1} não existe. Ao comparar o espectro em preto da **Figura 17** e o espectro presente na **Figura 15**, podemos observar que eles são semelhantes, mostrando que provavelmente a parte isolada na coluna corresponde ao ácido 2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-carboxiamida-1-oxi (**19**) que não reagiu.

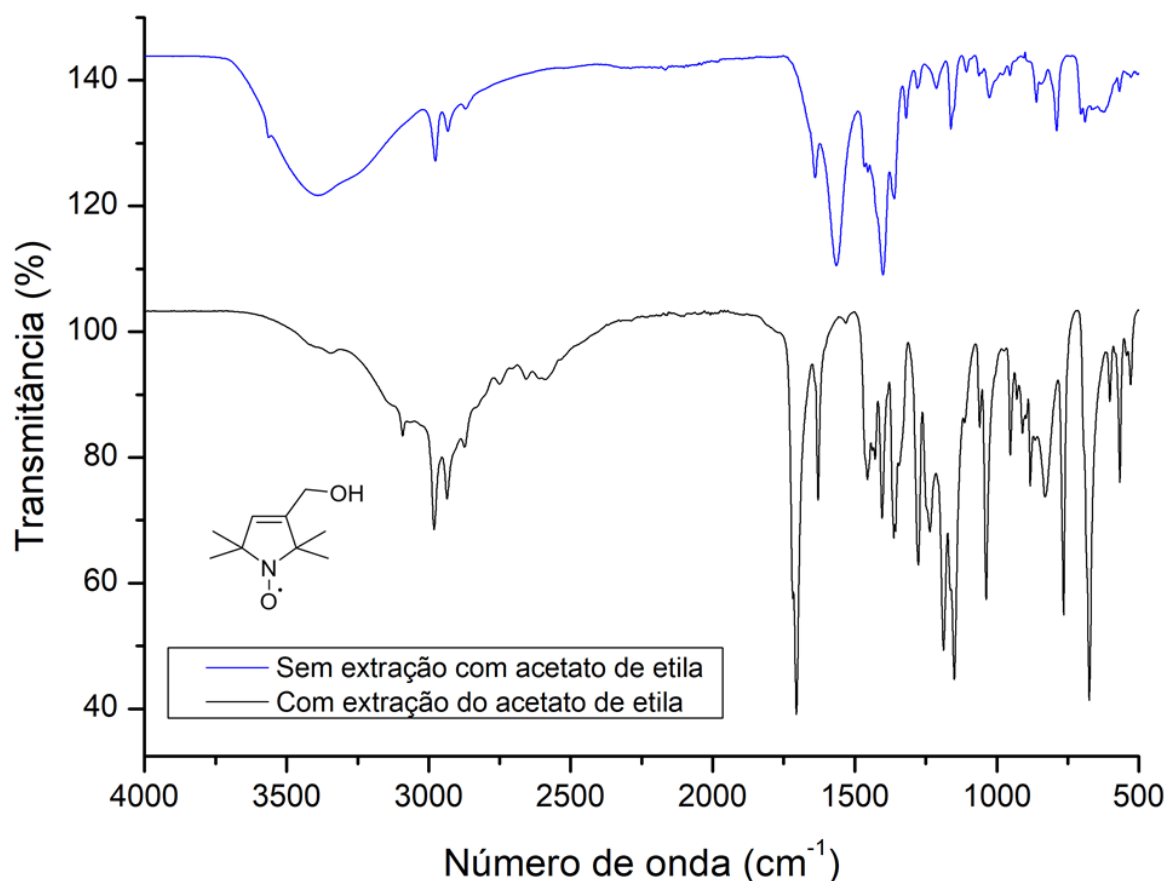


Figura 17: Espectro infravermelho comparando amostras do possível composto 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-1-oxi (**20**)

Ao ampliar o espectro em azul da amostra na qual não foi realizada a extração com acetato de etila (**Figura 18**), pode-se observar a ausência da ligação característica do ácido carboxílico a C=O. No espectro representado na **Figura 18** pode-se observar as bandas característica de C=C em 1634 cm⁻¹, a banda referente a ligação carbono-oxigênio (C-O) em 1158 cm⁻¹, já na banda 3387 cm⁻¹ é representante da ligação oxigênio-hidrogênio (O-H) e por fim 1565 e 1397 cm⁻¹ as duas bandas características da ligação carbono-hidrogênio (C-H).

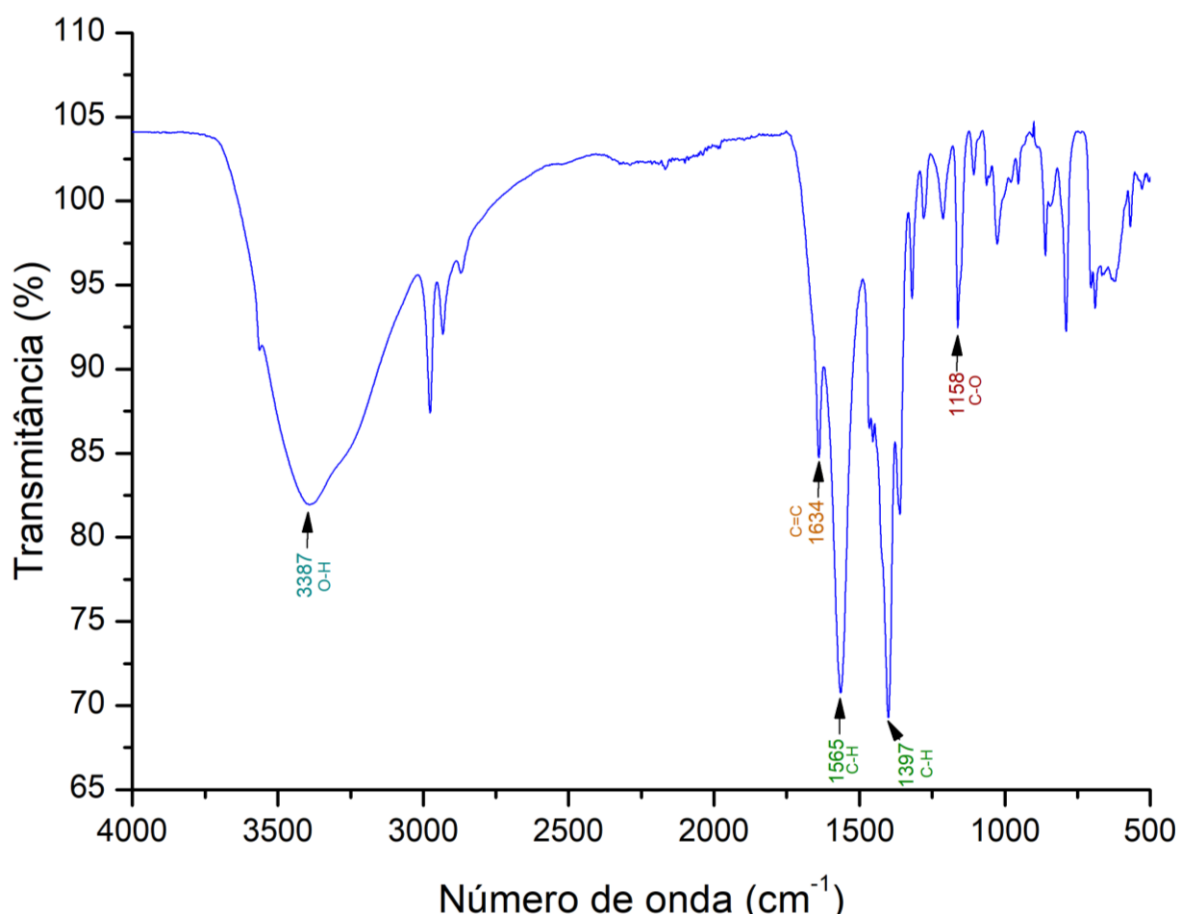


Figura 18: Espectro infravermelho da amostra sem extração com acetato de etila do possível composto 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-1-oxi (**20**)

Portanto, ao se interpretar o espectro de Infravermelho da **Figura 18** é possível afirmar que a reação funcionou, porém existe a necessidade de purificação da amostra. A cromatoplaça e o espectro de IV indicam que o produto recuperado foi o ácido **19**, enquanto na alíquota na qual não houve a extração com acetato de etila, nem a purificação, no espectro de IV é possível visualizar que não há a presença da carbonila e sim a presença da ligação O-H, mostrando o êxito dessa reação.

Posteriormente, foi realizada a recristalização das amostras com tolueno. Em seguida, as amostras foram acondicionadas no dessecador para evitar que adquirissem umidade. Foi realizada nova caracterização por IV e o espectro dessas amostras recristalizadas é apresentado na **Figura 19**

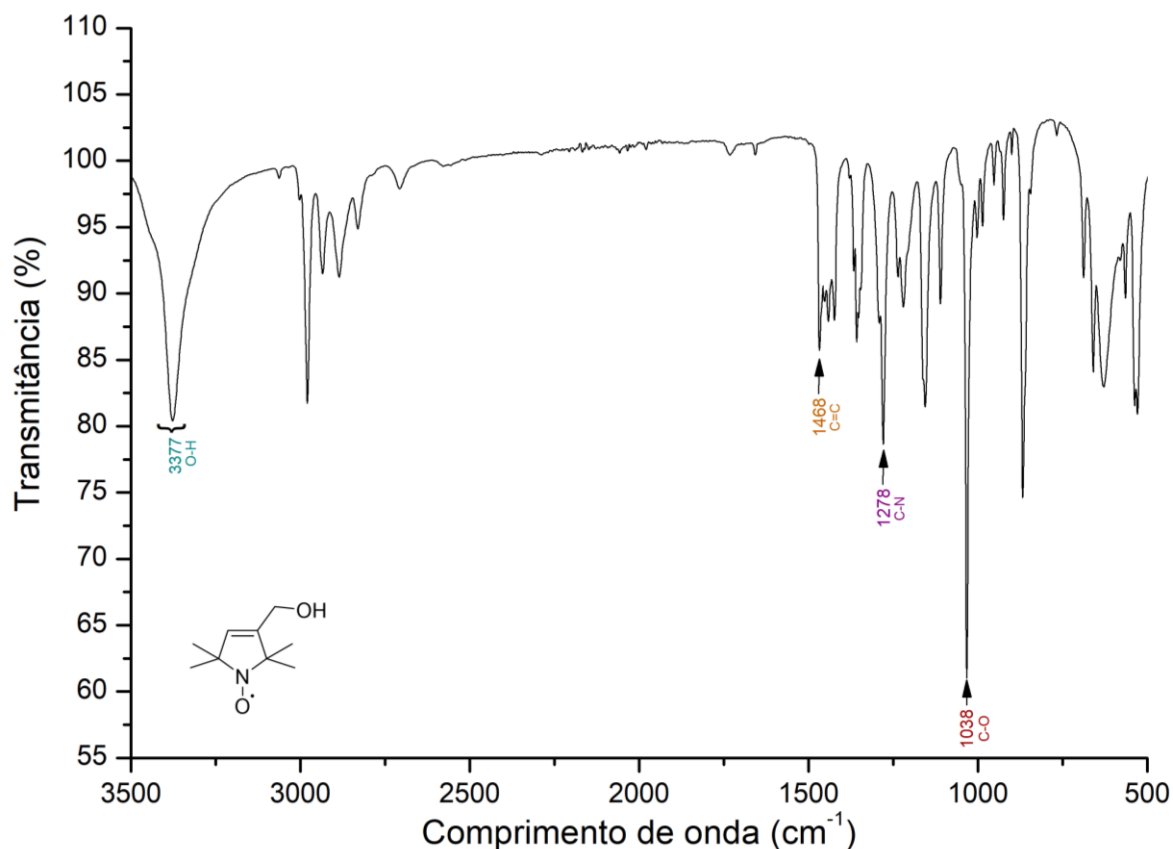
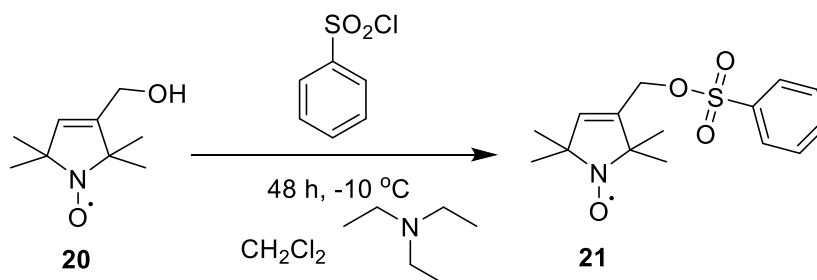


Figura 19: Espectro infravermelho da amostra 3-(hidroximetil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-1-oxi (20)

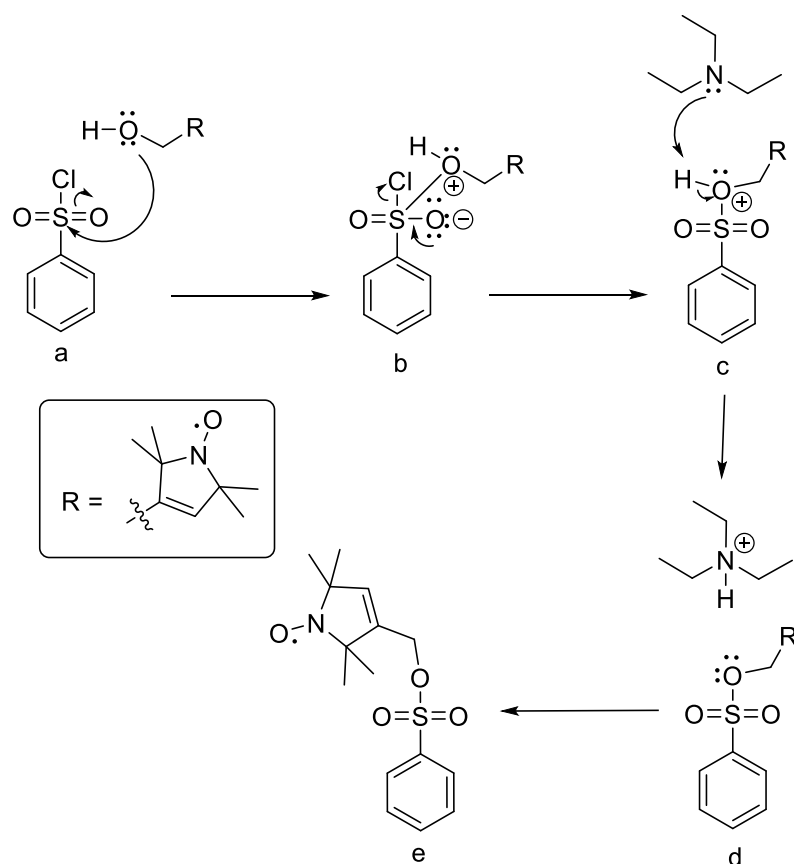
No espectro da **Figura 19** pode-se observar que a banda referente à deformação axial do ácido carboxílico não está mais presente na região de aproximadamente 1704 cm^{-1} , como no espectro representado na **Figura 15**. Podemos observar uma banda bem evidente da deformação axial C-O em 1038 cm^{-1} , como também, C-N em 1278 cm^{-1} , C=C 1468 cm^{-1} e O-H em aproximadamente 3377 cm^{-1} .

5.6 Preparação do benzenossulfonato de (1-hidroxi-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-il) metil



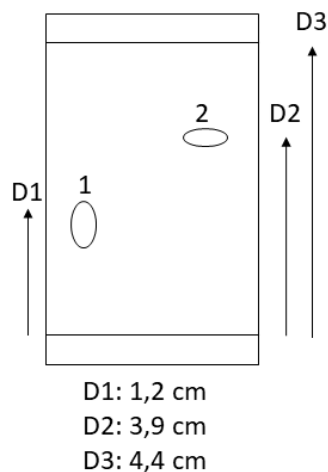
Esquema 19: Síntese do intermediário nitróxido (21)

A sexta etapa do projeto consistiu na adição de um grupamento benzenosulfonato na molécula por meio de uma reação de substituição nucleofílica entre o álcool e cloreto de benzenossulfonila. Primeiramente temos um ataque do par de elétrons do álcool ao enxofre do cloreto de benzenossulfonila, pois este está com densidade positiva (é um eletrófilo) gerada pelos seus ligantes cloro e oxigênio que possuem caráter mais eletronegativo que o enxofre. A ligação do cloro com o enxofre é desfeita e esse par de elétrons vai para o cloro formando um ânion cloreto. Em seguida o par de elétrons do nitrogênio da trietilamina vai abstrair o próton ligado ao oxigênio do grupamento álcool e o par de elétrons volta para o oxigênio e consequentemente forma o composto de interesse.



Esquema 20: Representação da substituição nucleofílica para formação do benzenossulfonato de (1-hidroxi-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-3-il)metil.

Ao se realizar a eluição da placa de CCD, com fase móvel de clorofórmio com metanol na proporção (250:1), pode-se observar na placa cromatográfica abaixo (**Figura 20**) a presença do álcool ao lado esquerdo da placa e ao lado direito o produto da reação. Consegue ser observado a formação de novas bandas ao lado esquerdo, mostrando que a reação ocorreu. Em seguida as amostras foram analisadas por espectroscopia de infravermelho.



CCD realizada (fase móvel clorofórmio/metanol na proporção 2,5:0,001), lado esquerdo da placa sendo a amostra do álcool **20** na direita temos o produto da reação **21** com formação do benzenossulfonato, revelação na região do ultravioleta (254 nm).

Figura 20: Nitróxido **20** à esquerda e nitróxido **21** à direita.

Ao se analisar o espectro de infravermelho (**Figura 21**) bandas importantes aparecem como o de comprimento 1185 cm^{-1} que é característico do grupamento benzenossulfonila.

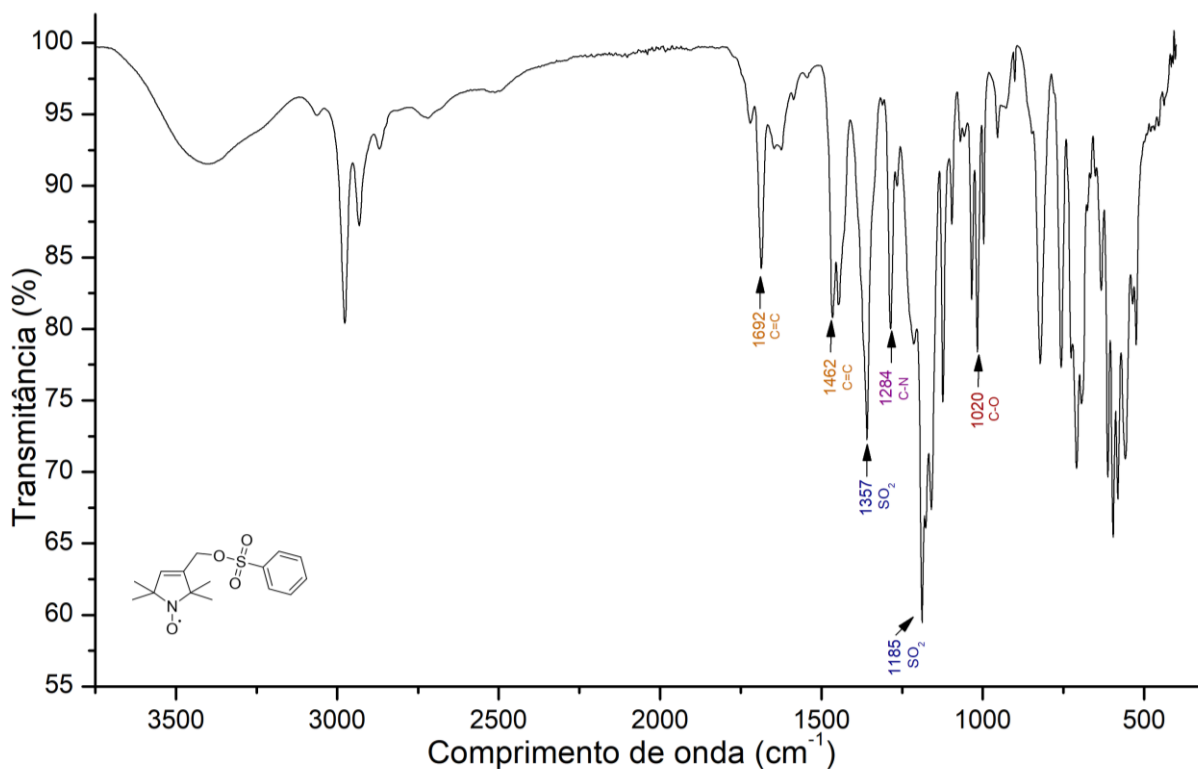
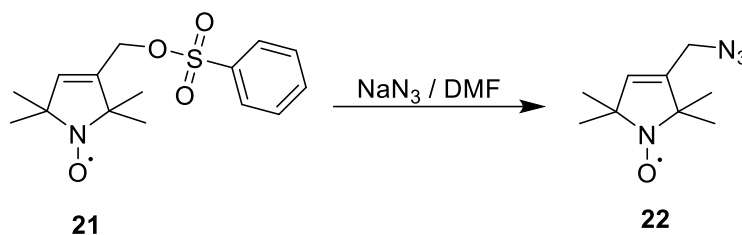


Figura 21: Espectro de infravermelho referente ao nitroxido benzenossulfonato de (1-hidroxi-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrolina-3-il)metil.

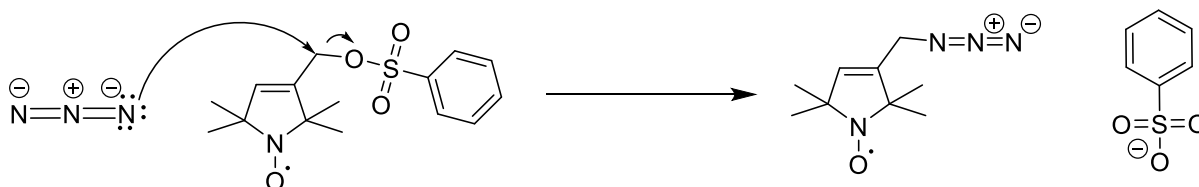
Através do espectro, podemos observar bandas características das ligações 1692 cm^{-1} C=C referente a deformação axial e 1462 cm^{-1} C=C referente as vibrações do núcleo aromático, 1284 cm^{-1} C-N aromático deformação axial, 1020 cm^{-1} deformação axial C-O de éteres e por fim a mais característica da molécula 1185 e 1365 cm^{-1} da deformação simétrica e assimétrica da sulfona SO_2 .

5.7 Composto 3-(azidometil)-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrolina-1-oxi



Esquema 21: Síntese do intermediário nitróxido (22)

A sétima etapa ocorreu com o nitróxido (**21**) reagindo com a azida de sódio em dimetilformamida (DMF) em uma temperatura de 90°C . A azida age como nucleófilo e ataca o carbono da molécula **21**, ocorrendo uma substituição nucleofílica alifática bimolecular ($\text{S}_\text{N}2$).



Esquema 22: Substituição do grupamento benzenossulfonato pelo grupamento azida

Ao realizar a eluição da placa de cromatografia com eluente éter de petróleo/éter etílico 6:4 é observado a diferença entre a separação do nitróxido **21** (lado esquerdo da **Figura 22**) e do nitróxido após a reação com a azida de sódio (nitróxido **22**) ao lado direito da **Figura 22**, mostrando que a reação ocorreu e foi formado um produto. Ao visualizar a placa, é observado que a mancha da azida tem um formato curvado como representado por **2** na **Figura 22**. O R_F calculado foi de 0,47 e segundo a literatura o R_F é de 0,33.

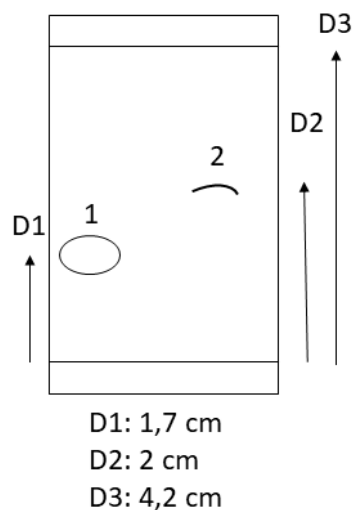


Figura 22: Na figura temos o nitróxido 21 ao lado esquerdo e o nitróxido **22** ao lado esquerdo, revelação na região do ultravioleta (254 nm).

Ao observar o espectro infravermelho a banda no comprimento de onda 2097 cm^{-1} se mostra bem característica da azida. Pode-se observar também que a banda que indicava o grupamento benzenossulfonato não é presente nesse espectro.

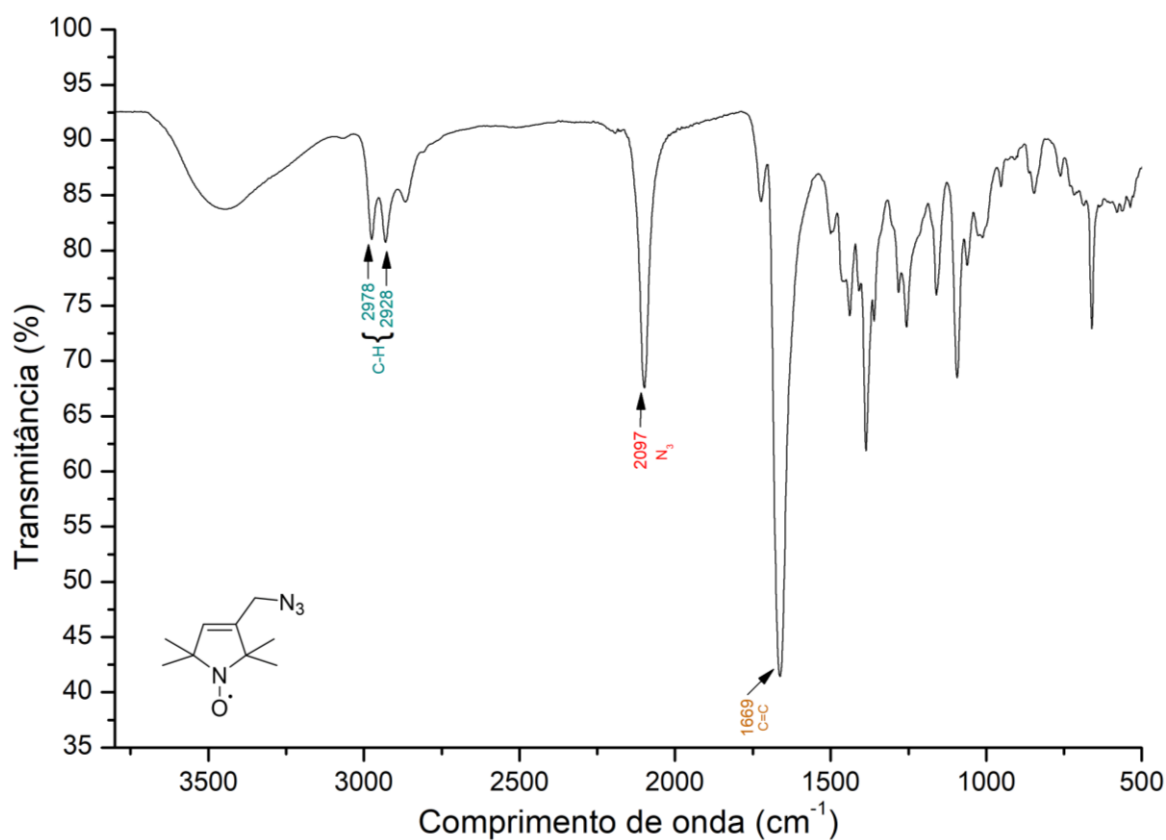
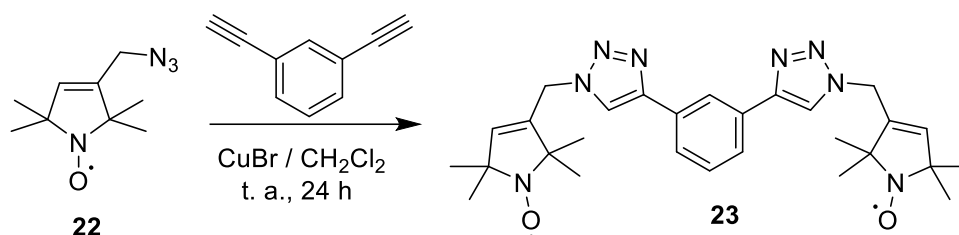


Figura 23: Espectro de infravermelho referente ao nitróxido **22**.

Ao observar o espectro relatado na **Figura 23**, é possível observar que na região de 3000 cm^{-1} temos picos referentes a ligação C-H aromático e alifático, em 1669 cm^{-1} e é observada uma deformação axial decorrente da ligação C=C. Por fim temos o pico em 2097 cm^{-1} , o qual mostra que a reação ocorreu, este pico é referente a ligação da azida ($\text{N}=\text{N}=\text{N}$), e com isso é possível seguir para a próxima etapa.

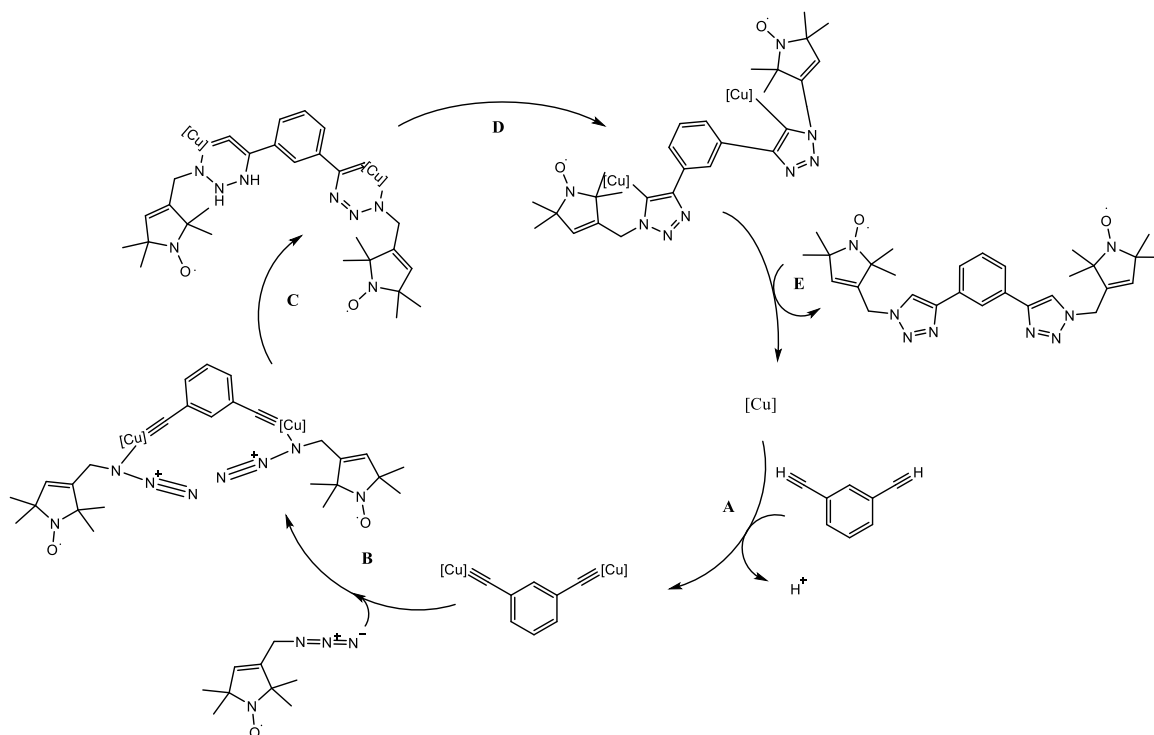
5.8 – Preparação do 3,3'-((1,3-fenilenobis(1*H*-1,2,3-triazol-4,1-diil))bis(metileno))bis(2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-oxi) (**23**)



Esquema 23: Síntese de novo análogo **23**

A síntese do novo análogo do nitróxido **23** envolve a reação de cicloadição 1,3-dipolar entre a azida derivada do nitróxido (**22**) e um alcino terminal (1,3-dietinilbenzeno) substituídos, utilizando-se as condições de “*Click Chemistry*”. Para a obtenção desse triazol foram utilizados o sal de cobre (I), brometo cuproso (**Esquema 24**) e por fim uma purificação utilizando coluna de sílica gel (QUEIROZ et al., 2012; RAUCKMAN; ROSEN; ABOU-DONIA, 1975).

Essa reação ocorre da seguinte forma (**Esquema 24**): A) Formação do acetileto de cobre; B) O nitrogênio nucleofílico da azida complexa-se ao metal, e favorece o ataque nucleofílico do carbono β do acetileto de Cu (I) ao nitrogênio eletrofílico terminal da azida orgânica; C) Após a formação da ligação C-N, o sistema passa por um metalociclo instável de 6 membros; D) O metalociclo sofre rearranjo levando à formação da triazolila de cobre; E) Em seguida sofre protonólise para dar origem ao 1,2,3-triazol 1,4 dissustituído.



Esquema 24: Proposta de cicloadição catalisada por cobre (I) (Adaptado de ROSTOVTSEV, GREEN, FOKIN, 2002).

Para a realização da placa de cromatografia em camada delgada, a mistura de solventes para fase móvel que se mostrou mais promissora foi clorofórmio/metanol 20:1 (**Figura 24**). Podemos observar do lado esquerdo, representado pelo número um, o composto **22** e do lado esquerdo observamos duas bandas referentes a reação do composto **23**, após a identificação dessas manchas foi realizada a coluna cromatográfica, porém não foi possível separar a banda número 3 da banda número 2, apenas a número 2 isoladamente, a qual foi analisada no espectro representado na **Figura 24**.

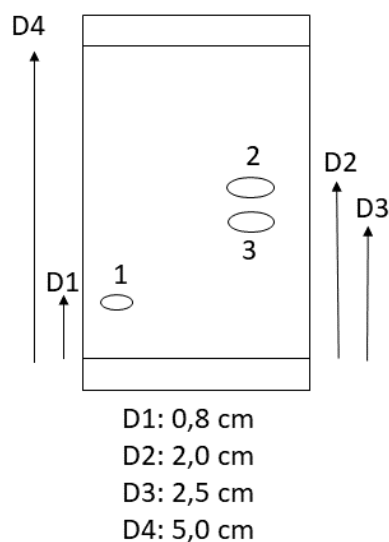


Figura 24: Na figura temos o nitroxido **22** ao lado esquerdo e duas bandas referentes ao nitroxido **23** ao lado esquerdo, revelação na região do ultravioleta (254 nm).

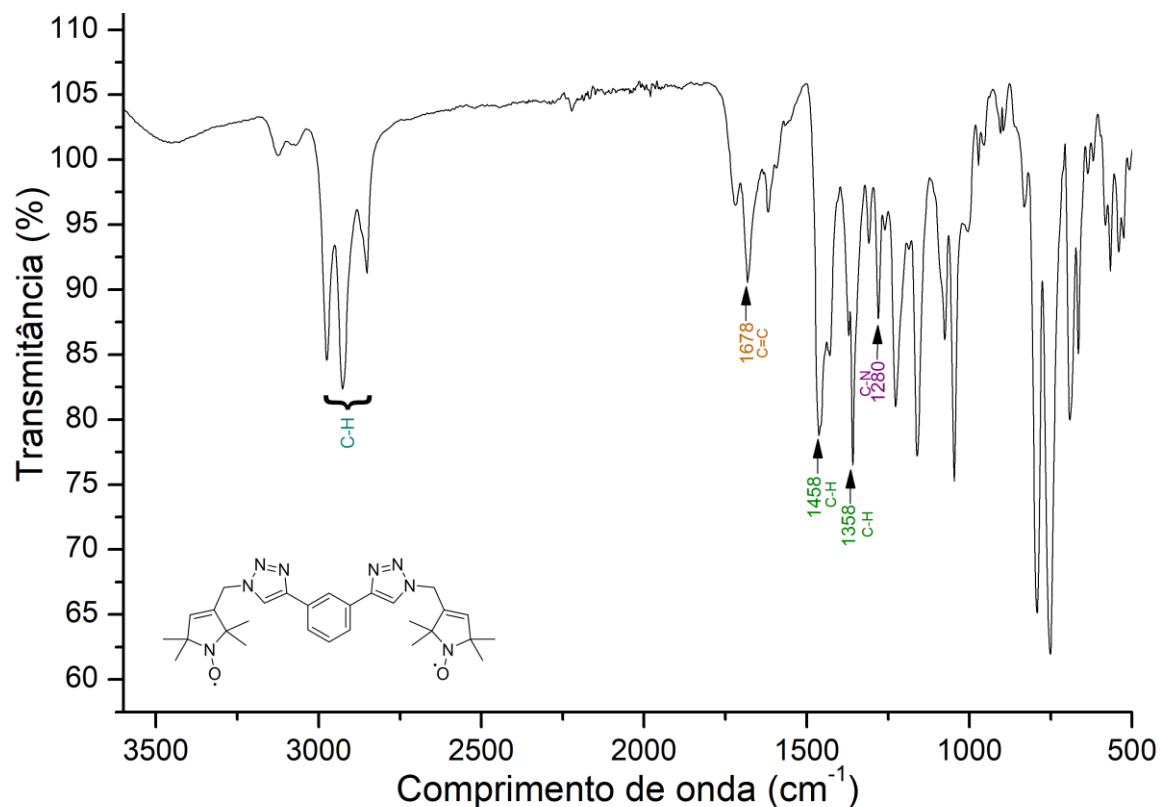


Figura 25: Espectro de infravermelho referente ao nitroxido 23.

Com relação ao espectro (**Figura 25**), pode-se observar ligações de dobramento e estiramento C-H na região próxima a 3000 cm⁻¹, já em 1678 cm⁻¹ observa-se um pico característico da deformação axial da ligação C=C, 1280 cm⁻¹ representa a deformação axial da ligação C-N no anel aromático e por fim dois picos referentes ao dobramento da ligação C-H em 1458 e 1358 cm⁻¹.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram sintetizados oito nitróxidos, sendo um deles inédito e tendo em sua estrutura 2 grupos triazóis. As metodologias sintéticas empregadas foram consideradas satisfatórias para a obtenção dos intermediários **16, 17, 18, 19, 20, 21, 22** e do produto final **23**. As dificuldades encontradas na etapa de síntese do álcool foram superadas a partir de uma série de medidas adotadas, como por exemplo, destilar e secar o THF com sódio metálico, além de várias tentativas frustradas de realizar a reação mesmo com essa etapa realizada. Somente com o tratamento do intermediário ácido carboxílico, através da recristalização com tolueno, que a reação realmente funcionou. Os rendimentos das etapas se mostraram regulares em sua maioria, sendo o menor rendimento 26% e o maior 97%. Outra problemática encontrada foi com relação à massa dos intermediários, que a cada etapa reduzia, como é de se esperar para uma síntese linear. A maioria dos compostos foi submetida à análise por ponto de fusão, os que não conseguiram foram por motivos da amostra não secar bem o suficiente ou se apresentarem como óleo. Foram realizadas CCDs durante todas as reações para acompanhar o andamento delas e sua finalização. Todos os nitróxidos foram analisados por infravermelho, tendo seus espectros condizentes com as estruturas esperadas. Os testes *in vitro* e atividade antioxidante não foram executados devido à necessidade de realizar uma caracterização inequívoca desses compostos através de RMN e espectrometria de massas.

REFERÊNCIAS

- ALKADI, H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 20, n. 1, p. 16–26, 2022.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BROWN, M. L.; HOUCHEN, C. W.; KONG, Y. **RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM (RAS) MODULATORS FOR TREATMENT OF VIRAL INFECTIONS, PHARMACEUTICAL COMPOSITION INCLUDING THE SAME** Depositante: Trocar Pharma Inc. US WO2021216678A1. Depósito: 21 de abril de 2020. Concessão 28 de Outubro de 2021.
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. DE; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.
- CHANNAPPANAVAR, R.; PERLMAN, S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 5, p. 529–539, 2017.
- CHEN, J. Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV—A quick overview and comparison with other emerging viruses. **Microbes and Infection**, v. 22, n. 2, p. 69–71, 2020.
- CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 2020.
- CHEUNG, C. Y. et al. Cytokine Responses in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Infected Macrophages In Vitro: Possible Relevance to Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 79, n. 12, p. 7819–7826, 2005.
- CHIEN, J. Y. et al. Temporal changes in cytokine/chemokine profiles and pulmonary involvement in severe acute respiratory syndrome. **Respirology**, v. 11, n. 6, p. 715–722, 2006.
- CHU, H. et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Efficiently Infects Human Primary T Lymphocytes and Activates the Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Pathways. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 6, p. 904–914, 2016.
- DALVIE, D. K. et al. Biotransformation reactions of five-membered aromatic heterocyclic rings. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 3, p. 269–299, 2002.
- DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, n. 2, p. 115–133, 2004.
- DE LOURDES G. FERREIRA, M. et al. Design, synthesis, and antiviral activity of new 1H-1,2,3-triazole nucleoside ribavirin analogs. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 3, p. 1501–1511, 2014.
- DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 30–54, 2017.
- EL-SAGHEER, A. H.; BROWN, T. Click nucleic acid ligation: Applications in biology and nanotechnology. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 8, p. 1258–1267, 2012.
- FEHR, A. R. et al. The conserved coronavirus macrodomain promotes virulence and suppresses the innate immune response during severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. **mBio**, v. 7, n. 6, p. 1–12, 2016.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, V. F. **Alguns aspectos sobre a secagem dos principais solventes orgânicos** Química Nova, , 1992.

FLINT, S. J. et al. **Principles of Virology**. THIRD EDIT ed. WASHINGTON, DC: ASM PRESS, 2009.

GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A.; MERENYI, G. Reactions of Nitric Oxide, Peroxynitrite, and Carbonate Radicals with Nitroxides and Their Corresponding Oxoammonium Cations. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, n. 2, p. 250–257, 2004.

GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A.; MERENYI, G. Kinetics of the reaction between nitroxide and thiyl radicals: Nitroxides as antioxidants in the presence of thiols. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 112, n. 37, p. 8600–8605, 2008.

GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A.; RUSSO, A. Reaction of cyclic nitroxides with nitrogen dioxide: The intermediacy of the oxoammonium cations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 27, p. 8364–8370, 2003.

GOMES, B. R. B. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a febre e a antipirese em ratos. p. 74, 2017.

HAN, H. et al. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 58, n. 7, p. 1116–1120, 2020.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.

ISRAELI, A. et al. Kinetics and mechanism of the comproportionation reaction between oxoammonium cation and hydroxylamine derived from cyclic nitroxides. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 3, p. 317–324, 2005.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 244–257, 2013.

KHAN, I. H. et al. The need to manage the risk of thromboembolism in COVID-19 patients. **Journal of Vascular Surgery**, v. 72, n. 3, p. 799–804, 2020.

KUCHER, S. et al. Orthogonal spin labeling using click chemistry for in vitro and in vivo applications. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 275, p. 38–45, 2017.

LAU, Y. H. et al. Chemical sensors that incorporate click-derived triazoles. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2848–2866, 2011.

LAW, H. K. W. et al. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus – infected , monocyte-derived human dendritic cells. v. 106, n. 7, p. 2366–2375, 2016.

LEE, C. T.; YU, L. E.; WANG, J. Y. Nitroxide antioxidant as a potential strategy to attenuate the oxidative/nitrosative stress induced by hydrogen peroxide plus nitric oxide in cultured neurons. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 54, p. 38–50, 2016.

LYRA E SILVA, N. M. et al. Inflammation at the crossroads of COVID-19, cognitive deficits and depression. **Neuropharmacology**, v. 209, n. February, p. 109023, 2022.

LYRA, N. M. et al. Neuropharmacology Inflammation at the crossroads of COVID-19 , cognitive deficits and depression. v. 209, n. February, 2022.

MATHI, K. et al. Brief report: Tempol, a novel antioxidant, inhibits both activated T cell and antigen presenting cell derived cytokines in-vitro from COVID-19 patients. **Clinical Immunology**, v. 231, p. 108828, 2021.

OBI, A. T. et al. Empirical systemic anticoagulation is associated with decreased venous thromboembolism in critically ill influenza A H1N1 acute respiratory distress syndrome patients. **Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders**, v. 7, n. 3, p. 317–324, 2019.

PICHLA, M. et al. Possible artefacts of antioxidant assays performed in the presence of nitroxides and nitroxide-containing nanoparticles. **Analytical Biochemistry**, v. 597, n. March, 2020.

QUEIROZ, R. F. et al. Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil infiltration and the resulting myeloperoxidase-mediated damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 10, p. 1942–1953, 2012.

RAUCKMAN, E. J.; ROSEN, G. M.; ABOU-DONIA, M. B. Improved Methods For The Oxidation Of Secondary Amines To Nitroxides. **Synthetic Communications**, 1975.

REN, L. L. et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. **Chinese medical journal**, v. 133, n. 9, p. 1015–1024, 2020.

ROBERT M. SILVERSTEIN; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. Seventh Ed ed. [s.l: s.n.].

ROZANTSEV, E. G. **Free Nitroxyl Radicals**. [s.l: s.n.].

SCHNEIDER, C. D.; DE OLIVEIRA, A. R. Oxygen free radicals and exercise: Mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 314–318, 2004.

SOARES, A. T. G. **ORGANOSELENOTRIAZÓIS ATENUAM O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CAENORHABDITIS ELEGANS**. [s.l.] Universidade Federal do Pampa, 2017.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica 1**. [s.l: s.n.].

SOULE, B. P. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1632–1650, 2007.

WADMAN COUZIN-FRANKEL J KAISER J MATACIC C., M. How does coronavirus kill? Clinicians trace a ferocious rampage through the body, from brain to toes. **Science**, v. 14, p. 1–11, 2020.

WHO. COVID-19 Weekly Epidemiological Update. **World Health Organization**, n. August, p. 1–33, 2023.

ZHANG, R. et al. COVID-19: Melatonin as a potential adjuvant treatment. **Life Sciences**, v. 250, n. March, p. 117583, 2020.

ZIECH, D. et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 2, p. 334–339, 2010.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO



Sodium Tungstate Dihydrate ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): A Mild Oxidizing and Efficient Reagent in Organic Synthesis

Thais N. Pinheiro

Euzébio C. Barbosa

Alexandro K. Jordão[✉]

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Farmácia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Rua General
Gustavo Cordeiro de Faria 151, Petrópolis, Centro de Ciências da Saúde,
Natal, RN, CEP 59072-970, Brasil
alexandro.jordao@ufrn.br

Received: 19.07.2022
Accepted after revision: 08.08.2022
Published online: 18.08.2022 (Accepted Manuscript)
01.09.2022 (version of Record)
DOI: 10.1055/s-10049-0000, Art ID: 10-2022-015-0026-SYN

Science Direct

© 2022 The Author(s). This is an open access article published by Thieme under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, permitting copying and reproduction so long as the original work is given appropriate credit. Contents may not be used for commercial purposes or adapted, remixed, transformed or built upon. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Key words: oxidation, sodium tungstate, inorganic reagents, organic synthesis

Sodium tungstate dihydrate ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) is a simple, cheap, commercially available, and water-soluble colorless crystalline solid inorganic material. It is synthesized when excess tungstic acid is added to aqueous sodium hydroxide, dehydrates at 100 °C, and is insoluble in ethanol. The aqueous solution is slightly alkaline (pH 8–9).¹ The solid can be stored in a hermetically closed flask in a dry place. This compound is usually used as an oxidizing agent in chemistry,² affording the corresponding peracid in conjunction with hydrogen peroxide, under mild conditions, that can oxidize amines and sulfur-containing substrates (Scheme 1).³ Sodium tungstate dihydrate is the most common hydrated form and can also be used as an efficient catalyst for epoxidation of alkenes and oxidation of alcohols into the corresponding carbonyl compounds. For example, Payne and Williams described the first use of sodium tungstate dihydrate for epoxidation of α,β -unsaturated acids.⁴ In addition, it can be used to form heterocycles. Table 1 presents a series of recent applications of this reagent.



Thais do Nascimento Pinheiro received her pharmacy degree from the Federal University of Rio Grande do Norte in 2020. Currently, she is an MSc pharmaceutical sciences student at the same institution under the supervision of Prof. A. K. Jordão and Prof. E. C. Barbosa. Her work involves the synthesis and biological evaluation of novel nitrosides.

Euzébio Guimarães Barbosa received his PhD in chemistry from Campus University (UNICAMP) in 2011 under the supervision of Prof. Marcia Miguel Castro Ferreira. Currently he is a professor at the Federal University of Rio Grande do Norte. His research interests focus on medicinal chemistry and computer-aided drug design.

Alexandro Kappel Jordão received his PhD in chemistry from the Fluminense Federal University (UFF) in 2010 under the supervision of Prof. Vitor Francisco Ferreira and Prof. Anna Claudia. Currently he is a professor at the Federal University of Rio Grande do Norte. His research interests focus on the synthesis of heterocyclic compounds.



Scheme 1 Peracid formation in the presence of sodium tungstate dihydrate ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)