

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE PEPTIDOMIMÉTICOS
CONTENDO HETEROCICLOS DE TRÊS MEMBROS COMO
INIBIDORES DE CATEPSINA L”**

Deborah Araujo dos Santos*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientadora: Profa. Dra. Arlene Gonçalves Corrêa

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Deborah Araujo dos Santos, realizada em 01/12/2017:

Prof. Dra. Arlete Gonçalves Corrêa
UFSCar

Prof. Dr. Luiz Carlos da Silva Filho
UNESP

Prof. Dr. Rodrigo Luiz Oliveira Rodrigues Cunha
UFABC

Prof. Dr. Márcio Weber Paixão
UFSCar

Prof. Dr. Marco Antonio Barbosa Ferreira
UFSCar

“You cannot hope to build a better world without improving the individuals. To that end each of us must work for his own improvement, and at the same time share a general responsibility for all humanity, our particular duty being to aid those to whom we think we can be most useful.”

Marie Curie

*“Mesmo quando tudo parece desabar,
cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir
ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri,
no caminho incerto da vida, que o mais
importante é o decidir.”*

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por me guiarem durante toda minha trajetória, sempre com muito apoio e carinho e sem jamais duvidarem do quão longe eu posso chegar. Às minhas irmãs pela amizade, companheirismo e cumplicidade. À toda minha família pelo apoio e compreensão.

À Profa. Dra. Arlene G. Corrêa pela orientação, convivência e ensinamentos ao longo desses anos.

Aos membros da banca, pelas contribuições tanto neste trabalho como na minha formação.

A todos os colegas de laboratório pelas conversas sobre química e pelos momentos de descontração. Aos amigos feitos durante esse período pelas boas risadas, pelo companheirismo e por serem como minha família em São Carlos.

À Dra. Vivian Cornélio e ao Prof. Dr. Paulo C. Vieira pela grande ajuda com ensaios enzimáticos.

À BSc. Renata C. Córnea e ao MSc. Gilberto C. R. Bernasconi pela contribuição com cálculos que foram importantes para a determinação do mecanismo de inibição.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADME = Absorção, distribuição, metabolismo, excreção

Boc = *tert*-Butoxicarbonil

Cbz = Carboxibenzil

CCD = Cromatografia em camada delgada

CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência

DET = tartarato de dietila

DMF = Dimetilformamida

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNA = Ácido desoxirribonucleico

DTE = 1,4-Ditioeritritol

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

[E] = Concentração de enzima

[E]_T = Concentração de enzima que participa da reação enzimática

ee = Excesso enantiomérico

EI = Enzima-inibidor

E.T. = Estado de transição

FP = Falcipaína

GRE = Grupo retirador de elétrons

[I] = Concentração de inibidor

IC₅₀ = 50% da concentração inibitória máxima

J = Constante de acoplamento

K_i = Constante de inibição

K_i^{app} = Constante de inibição aparente

K_M = Constante de Michaelis-Menten

r.d. = Relação diastereoisomérica

RFU = *Relative fluorescence units*

RMN = Ressonância magnética nuclear

RNA = Ácido ribonucleico

[S] = Concentração de substrato

S_N2 = Substituição nucleofílica bimolecular

TBHP = hidroperóxido *terc*-butila

TMS = Trimetilsilil

TosMIC = Tosilmetil isonitrila

t_R = Tempo de retenção

Ts = Tosil

Z-FR-MCA = Z-Phe-Arg 7-amido-4-metilcumarina

δ = Deslocamento químico

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1. Inibição das epoxi- α -aciloxicarboxamidas frente às catepsinas K, V e L... 8	8
TABELA 3.1. Otimização da reação de Ugi..... 47	47
TABELA 3.2. Estudo de otimização da reação de aziridinação organocatalisada..... 53	53
TABELA 3.3. Avaliação da reação sequencial de aziridinação/Passerini..... 55	55
TABELA 3.4. Otimização da reação sequencial <i>one-pot</i> de aziridinação-Passerini. 56	56
TABELA 3.5. Classes de inibidores reversíveis e suas principais características. 66	66
TABELA 3.6. Equações dos modos inibição <i>tight binding</i> e as características das curvas. 70	70
TABELA 3.7. Valores de IC ₅₀ obtidos para diferentes concentrações de substrato. 70	70
TABELA 3.8. Resultado das regressões para a investigação dos modos de inibição... 72	72
TABELA 3.9. Atividade frente à catepsina L para os diastereoisômeros isolados e misturas do LSPN423 74	74
TABELA 3.10. Inibição e IC ₅₀ dos compostos LSPN690-695 75	75
TABELA 3.11. Inibição das aziridina- α -aciloxicarboxamidas (LSPN696-699) frente à catepsina L. 77	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Etapas do desenvolvimento racional de um fármaco.....	1
FIGURA 1.2. Inibidores irreversíveis de cisteíno proteases.	4
FIGURA 1.3. Produto natural E-64, inibidor irreversível de cisteíno proteases.	5
FIGURA 1.4. Inibidores contendo anéis epóxidos ou aziridinas com atividade frente à cisteíno proteases.	6
FIGURA 1.5. Inibidores de cisteíno catepsinas derivados de produtos naturais.	7
FIGURA 1.6. (A) Reação sequencial com intermediário instável e/ou tóxico. (B) Deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do intermediário que é consumido na segunda etapa da reação.....	10
FIGURA 1.7. Compostos bioativos contendo os anéis epóxido ou aziridina.	24
FIGURA 3.1. Blocos construtores utilizados na síntese da coleção das epoxi- α -aciloxicarboxamidas.	41
FIGURA 3.2. Coleção de epoxi- α -aciloxicarboxamidas sintetizada. A razão diastereoisomérica (r.d.) representa apenas os diastereoisômeros majoritários.....	43
FIGURA 3.3. Configurações das epoxi- α -aciloxicarboxamidas observadas a partir dos dados de RMN ^1H	45
FIGURA 3.4. Diastereoisômeros observados para o composto 34a	48
FIGURA 3.5. Expansão da região de 2,9-5,8 ppm mostrando os sinais característicos do diastereoisômero majoritário de 34a	48
FIGURA 3.6. Expansão da região de 3,0-5,7 ppm mostrando os sinais característicos do diastereoisômero minoritário de 34a	49

FIGURA 3.7. Epoxi- α -acilaminocarboxamidas (34b-e) sintetizadas empregando a metodologia otimizada; entre parênteses, rendimentos e r.d. das reações <i>one-pot</i>	51
FIGURA 3.8. Diastereoisômeros identificados a partir da mistura reacional bruta.	57
FIGURA 3.9. Cromatograma do padrão racêmico do composto 36b	59
FIGURA 3.10. Cromatograma do composto 36b assimétrico (TABELA 3.4, Entrada 2)	59
FIGURA 3.11. Aziridina- α -aciloxicarboxamidas sintetizadas a partir da metodologia <i>one-pot</i> desenvolvida para a reação de aziridinação/Passerini.	61
FIGURA 3.12: Porcentagem de inibição das epoxi- α -aciloxicarboxamidas (a 25 μ M) frente à catepsina L.	64
FIGURA 3.13: Teste de reversibilidade para o composto LSPN423	65
FIGURA 3.14. Mecanismo para inibidores reversíveis não-clássicos.	67
FIGURA 3.15. Curvas de progresso em relação ao tempo da atividade da catepsina L na presença de diferentes concentrações do inibidor LSPN423	68
FIGURA 3.16. Curva de resposta em relação à concentração de inibidor (LSPN423).	69
FIGURA 3.17. Curva de IC ₅₀ vs [S]/K _M a partir da plotagem dos dados experimentais.	71
FIGURA 3.18. Corte do espectro de RMN ¹ H do composto LSPN423 . (A) Diastereoisômero majoritário (d1). (B) Mistura dos três diastereoisômeros isolados da reação. (C) Diastereoisômero minoritário (d3).	73

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.1. Mecanismo proposto para a inativação das cisteíno proteases por epoxissuccinatos no complexo EI.....	5
ESQUEMA 1.2. Síntese <i>one-pot</i> do (-)-oseltamivir.....	12
ESQUEMA 1.3. Síntese <i>one-pot</i> do (S)-baclofen.....	12
ESQUEMA 1.4. Reação tandem de epoxidação organocatalisada seguida da reação multicomponente de Passerini.....	13
ESQUEMA 1.5. Proposta de mecanismo para a reação de Passerini.	15
ESQUEMA 1.6. Mecanismo da reação de Passerini proposto a partir de cálculos teóricos.....	15
ESQUEMA 1.7. Reação de Passerini diastereosseletiva a partir do emprego de 2,3-epoxi-aldeídos assimétricos.	16
ESQUEMA 1.8. Reação de Passerini enantiosseletiva catalisada por (pybox)-Cu ^{II} na presença de aldeídos bidentados.....	17
ESQUEMA 1.9. Reação de Passerini enantiosseletiva catalisada por [(salen)Al ^{III} Cl] empregando aldeídos com apenas um sítio de coordenação.	18
ESQUEMA 1.10. Reação de Passerini catalisada por ácido fosfórico quiral.....	19
ESQUEMA 1.11. Exemplos de modificações da reação de Ugi.	20
ESQUEMA 1.12. Mecanismos propostos para a reação de Ugi de quatro componentes.	21
ESQUEMA 1.13. Reação de Ugi enantiosseletiva organocatalisada.	22
ESQUEMA 1.14. Reações <i>one-pot</i> de adição conjugada/reação de Ugi-Smiles.	23
ESQUEMA 1.15. Emprego de hemiacetais assimétricos na reação de Ugi.	23

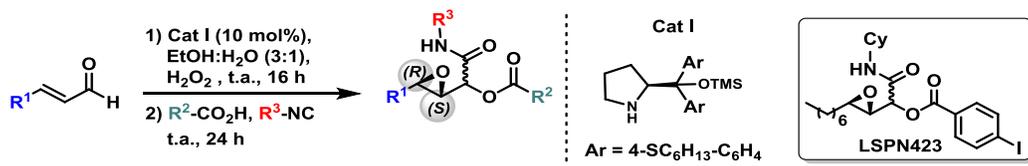
ESQUEMA 1.16. Síntese do inseticida tetraidroisocumarina (22).....	24
ESQUEMA 1.17. Epoxidação de Sharpless e modelo de indução assimétrica.....	25
ESQUEMA 1.18. Epoxidação assimétrica de alcenos Z catalisada por Mn-salen.....	26
ESQUEMA 1.19. Epoxidação enantiosseletiva mediada pelo dioxirano gerado <i>in situ</i> a partir de uma cetona assimétrica.....	26
ESQUEMA 1.20. Epoxidação enantiosseletiva de aldeídos α,β -insaturados catalisadas por diarilprolinol silil éteres.	27
ESQUEMA 1.21. Epoxidação assimétrica catalisada por um sal de imidazolidinona....	28
ESQUEMA 1.22. Epoxidação enantiosseletiva de aldeídos α,β -insaturados via organocatálise assimétrica.	28
ESQUEMA 1.23. Epoxidação assimétrica empregando os organocatalisadores desenvolvidos no grupo de pesquisa.	29
ESQUEMA 1.24. Mecanismo proposto para a epoxidação de aldeídos α,β -insaturados catalisada por diarilprolinol silil éteres.	30
ESQUEMA 1.25. Mecanismo de epoxidação assimétrica proposto a partir de estudos computacionais.....	31
ESQUEMA 1.26. Aziridinação assimétrica de aldeídos α,β -insaturados catalisada pelo difenilprolinol trimetilsilil éter (Cat XII).	32
ESQUEMA 1.27. Aziridinação assimétrica de aldeídos α,β -insaturados cíclicos.	33
ESQUEMA 1.28. Síntese de β -formilaziridinas assimétricas via organocatálise.	33
ESQUEMA 1.29. Síntese de hidantoínas reduzidas partindo de β -formilaziridinas preparadas através de organocatálise.	34

ESQUEMA 1.30. Proposta de mecanismo para a reação de aziridinação organocatalisada.	35
ESQUEMA 3.1. Reação one-pot de epoxidação/Passerini.	39
ESQUEMA 3.2. Síntese do organocatalisador Cat I	40
ESQUEMA 3.3. Reação de epoxidação assimétrica seguida da reação multicomponente de Ugi.	45
ESQUEMA 3.4. Reação sequencial de epoxidação/Ugi com o emprego de ésteres de aminoácidos.	52
ESQUEMA 3.5. Diferentes modos de inibição num mecanismo reversível.	62
ESQUEMA 3.6. Reação de hidrólise do substrato Z-FR-MCA catalisada por proteases.	62

RESUMO

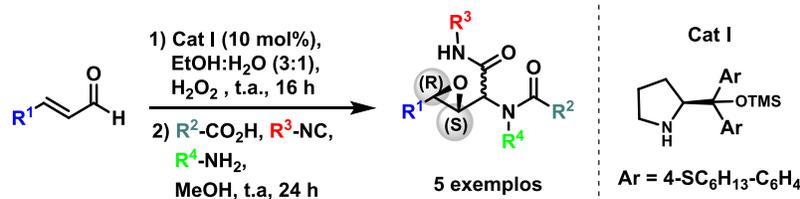
SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE PEPTIDOMIMÉTICOS CONTENDO HETEROCICLOS DE TRÊS MEMBROS COMO INIBIDORES DE CATEPSINA L – A catepsina L é uma cisteína protease lisossomal, que está envolvida em vários processos fisiológicos. Entretanto, falhas na sua expressão e regulação desencadeiam processos patológicos, por esse motivo, a catepsina L se tornou um alvo terapêutico interessante. Peptídeos contendo anéis epóxido e aziridina são reportados como inibidores potentes de catepsinas.

Em um estudo prévio desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, 6 epoxi- α -aciloxicarboxamidas foram sintetizadas de maneira *one-pot* via reação de epoxidação assimétrica organocatalisada utilizando o catalisador I seguida da reação de Passerini. Testes relacionados à atividade dos compostos como inibidores de catepsinas K, V e L mostraram o potencial da nova classe, sobretudo frente à catepsina L.

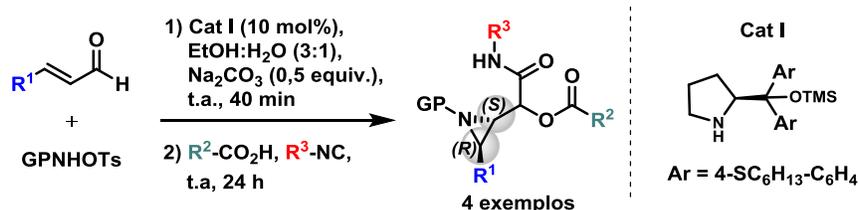


Neste trabalho, a coleção de epoxi- α -aciloxicarboxamidas foi ampliada com a síntese de mais 11 exemplos, a fim de melhor avaliar a relação estrutura-atividade desta classe de compostos frente à catepsina L. De toda a série, o **LSPN423** apresentou a melhor inibição. Estudos sobre o mecanismo de inibição demonstraram que o **LSPN423** é um inibidor reversível do tipo *tight binding* incompetitivo. Neste modo de inibição, o complexo enzima-inibidor apresenta elevada afinidade.

Com o intuito de explorar a aplicação dos 2,3-epoxi-aldeídos assimétricos preparados pela metodologia desenvolvida no grupo de pesquisa, bem como criar uma biblioteca de compostos candidatos a inibidores de catepsina L, novas epoxi- α -acilaminocarboxamidas foram sintetizadas, desta vez empregando de forma sequencial a reação multicomponente de Ugi. Os rendimentos em duas etapas variaram de 22-68% para os cinco exemplos sintetizados. Os compostos desta série foram avaliados frente à catepsina L, porém, nenhum deles apresentou atividade inibitória significativa.



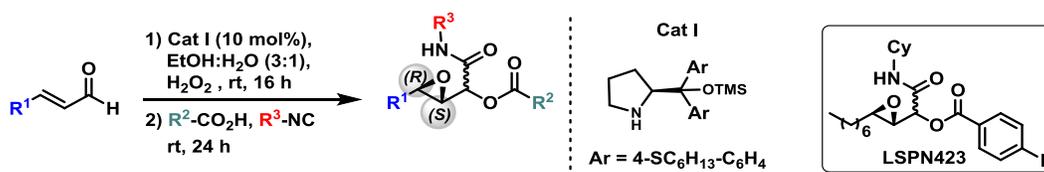
A síntese de aziridinas assimétricas via organocatálise é reportada tendo como desvantagem a utilização de solventes clorados e excessos de base. O emprego do organocatalisador I proporcionou o uso de etanol:água como solvente e diminuição da quantidade de base. Uma limitação na síntese de β -formilaziridinas está na dificuldade de isolar os produtos, por esse motivo, aplicou-se a funcionalização da aziridina na reação de Passerini *one-pot*, na qual obteve-se o produto desejado com rendimentos moderados. A avaliação preliminar das aziridinas obtidas frente à inibição da catepsina L indica uma potencial atividade dessa classe de compostos, no entanto estudos mais aprofundados serão necessários.



ABSTRACT

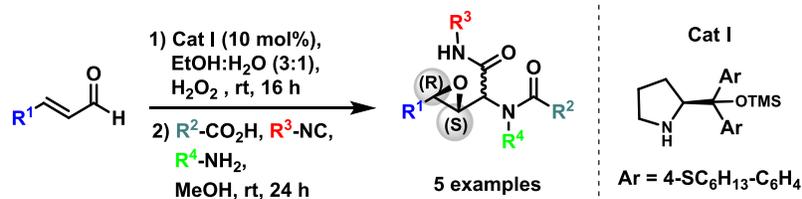
SYNTHESIS AND EVALUATION OF PEPTIDOMIMETICS BEARING THREE-MEMBERED HETEROCYCLES AS CATHEPSIN L INHIBITORS – Cathepsin L is a lysosomal cysteine protease, that is related to many physiological processes, however overexpression and up- or downregulation may cause several pathologies. Therefore, cathepsin L became an interesting drug target. Peptidyl epoxides and aziridines are reported as potent cathepsin inhibitors.

Previously, our research group has synthesized six new epoxy- α -acyloxycarboxamides through one-pot process starting with an organocatalyzed asymmetric epoxidation using catalyst I followed by Passerini reaction. Then, inhibitory assays against cathepsins K, L and V were performed, and the new compounds presented inhibition, mainly against cathepsin L.

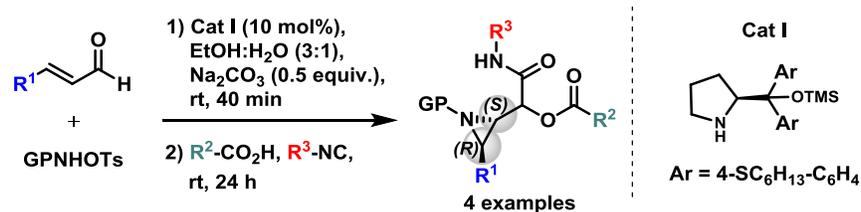


In order to further evaluate the structure-activity relationship of epoxy- α -acyloxycarboxamides 11 new compounds were synthesized. Among all, **LSPN423** exhibited the best inhibitory activity. The mechanistic study showed that **LSPN423** is a reversible tight binding uncompetitive inhibitor, which characterized by a high affinity enzyme-inhibitor complex.

To further explore the application of 2,3-epoxy-aldehydes in multicomponent reactions, in addition to create a library of compounds to be evaluated against cathepsin L, Ugi reaction were performed sequentially to epoxidation. The 2-step procedure furnished the desired product with yields ranged from 22% to 68%. The new epoxy- α -acylaminocarboxamides were tested against cathepsin L and no significant activity was observed.



The organocatalytic aziridination reaction is reported, however some drawbacks are associated with this reaction, such as the use of chlorinated solvents and large excess of base to promote the reaction. Thus, catalyst **I** allowed the use of the greener solvent mixture ethanol/water and a lower amount of base. Another drawback of this reaction is the unstable product, so to overcome this issue, the one-pot Passerini reaction was performed, right after the completion of the aziridination; the desired products were obtained from moderate to good yields. Preliminary evaluation of the new aziridine peptidomimetics indicates a potential activity of this class of compounds, although further studies are required.



Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE ESQUEMAS	xvii
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Catepsina L	2
1.1.1 Inibidores de cisteíno proteases	3
1.2 Processos <i>one-pot</i>	9
1.3 Reações multicomponente	13
1.3.1 Reação de Passerini.....	14
1.3.2 Reação de Ugi	19
1.4 Epóxidos e Aziridinas	24
1.4.1 Síntese assimétrica de epóxidos	25
1.4.2 Síntese assimétrica organocatalisada de aziridinas	32
2. OBJETIVOS	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1 Síntese das epoxi- α -aciloxicarboxamidas	39
3.2 Síntese das epoxi- α -acilaminocarboxamidas	45
3.3 Síntese das aziridina- α -aciloxicarboxamidas.....	52
3.4 Ensaio de inibição frente à catepsina L	61
3.4.1 Avaliação das epoxi- α -aciloxicarboxamidas	63
3.4.2 Avaliação das epoxi- α -acilaminocarboxamidas frente à catepsina L.....	74
3.4.3 Avaliação das aziridina- α -aciloxicarboxamidas frente à catepsina L	76
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	78
5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	81
5.1 Materiais e métodos	81
5.2 Procedimentos de síntese	82
5.2.1 Síntese do organocatalisador	82

5.2.2	Síntese dos aldeídos α,β -insaturados não comerciais.....	84
5.2.3	Esterificação dos aminoácidos.....	85
5.2.4	Síntese da <i>N</i> -Cbz- <i>O</i> -tosil-hidroxilamina.....	86
5.2.5	Procedimento geral para a síntese das epoxi- α -acilaminocarboxamidas (12g-q)	87
5.2.6	Caracterização dos compostos 12g-q	87
5.2.7	Procedimento geral para a síntese das epoxi- α -acilaminocarboxamidas (34a-e)	94
5.2.8	Caracterização dos compostos 34a-e	94
5.2.9	Procedimento para a reação de aziridinação/Passerini	99
5.2.10	Caracterização dos compostos 36a-d	100
5.3	Ensaio de inibição da catepsina L	103
5.3.1	Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M)	104
5.3.2	Procedimentos para os ensaios de inibição da catepsina L	104
5.3.3	Teste de reversibilidade.....	105
6.	REFERÊNCIAS	107
	ANEXOS.....	121

1. INTRODUÇÃO

A identificação de um composto-protótipo, etapa-chave do processo da descoberta de fármacos, é um dos principais objetivos da química medicinal, uma área multidisciplinar que envolve diversos profissionais, como: químicos, físicos, biólogos, farmacêuticos, médicos, entre outros. Entende-se por descoberta a etapa destinada à eleição do alvo terapêutico.¹ As substâncias ativas frente a este alvo podem interagir de maneira não específica, quando atuam no meio extracelular, como antiácidos, adsorventes (ex. carvão ativo) e antissépticos (ex. permanganato de potássio); ou por interações específicas com receptores, DNA e RNA, proteínas e enzimas, entre outros.²

Uma vez que o alvo específico é escolhido, diversas classes de compostos são avaliadas, inicialmente a nível molecular, e aqueles mais potentes são estudados em células e organismos vivos para definir parâmetros importantes como toxicidade e ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Os compostos que passam nesta avaliação são submetidos a teste clínicos em diversas etapas que determinam a eficácia e segurança de um candidato à fármaco (FIGURA 1.1).³

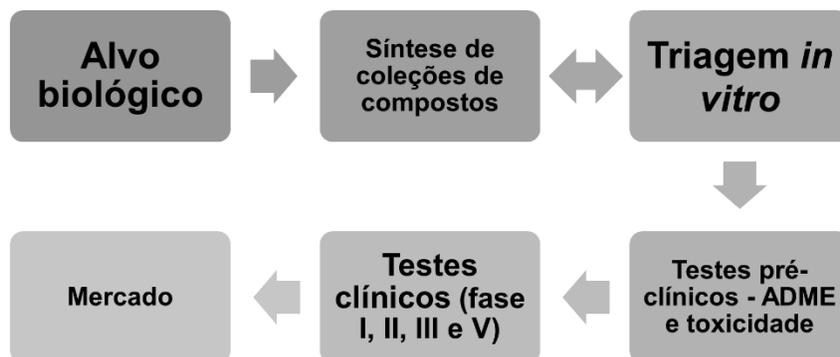


FIGURA 1.1. Etapas do desenvolvimento racional de um fármaco.

Diversas patologias estão relacionadas à superexpressão ou aumento da atividade de determinadas enzimas que, conseqüentemente são alvos importantes na descoberta de novos fármacos. Alguns fatores devem ser levados em consideração no desenvolvimento de inibidores enzimáticos, dentre eles, o mecanismo de inibição e a seletividade.⁴

Inibidores enzimáticos reversíveis são preferíveis quando se trata de um fármaco, pois a inativação de enzimas por processos irreversíveis pode levar à efeitos colaterais indesejados. Entretanto, inibidores reversíveis competitivos, ou seja, aqueles que competem pelo sítio ativo da enzima com o seu substrato natural apresentam limitações em alguns casos, como a necessidade de altas dosagens para atingir o efeito desejado. Por outro lado, os inibidores reversíveis não-competitivos ou incompetitivos normalmente requerem dosagens menores pelo fato de se ligarem às enzimas em sítios alostéricos. Inibidores reversíveis que apresentam elevada afinidade com as enzimas (*slow binding* e *tight binding*) também são vantajosos como candidatos à fármacos, pois as baixas velocidades de dissociação permitem o uso de dosagens menores de inibidor.⁵

1.1 Catepsina L

A catepsina L é uma cisteíno protease lisossomal da família da papaína C1, clã CA, que de maneira geral participam de diversos processos regulatórios de clivagem de proteínas. Em células humanas foram identificadas 11 cisteíno catepsinas: B, C, L, F, H, K, O, S, V, X e W. Uma característica em comum destas enzimas é a presença de um resíduo de cisteína no sítio ativo que é responsável pela catálise na clivagem das ligações peptídicas. Todas as cisteíno catepsinas possuem a mesma estrutura principal típica das proteases da família da papaína e normalmente apresentam-se como monômeros de cerca de 30 kDa.^{6,7,8}

A catepsina L, dentre outras cisteíno proteases, está envolvida nos processos normais de apoptose (morte celular programada). Estudos demonstraram que a catepsina L também é responsável pela produção de neurotransmissores peptídicos, conhecidos como neuropeptídios.⁹ A perda da atividade e modificações na estrutura da catepsina L nos neurônios foi associada à processos de envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como: doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica.⁶

Diversos estudos correlacionaram o aumento da atividade e/ou expressão da catepsina L com a formação de variados tipos de carcinogêneses e processos de

metástase através da disseminação das células tumorais pelos sistemas linfático e circulatório. Isso torna a catepsina L um alvo terapêutico interessante, ou um possível marcador para o diagnóstico da doença.¹⁰

O aumento da atividade proteolítica, especialmente das catepsinas K e L, foram observadas em tecidos de lesão de endometriose, uma doença que acomete cerca de 10% da população feminina em idade fértil e não existe tratamento preventivo, apenas sintomático. Porter *et al.*¹¹ estudaram a inibição das catepsinas K e L *in vivo* e observaram diminuição das lesões, tornando essas proteases alvos importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos para a endometriose.

Cisteíno proteases também são alvos para o tratamento de doenças parasitárias. Por exemplo, as catepsinas B e L das espécies de *Leishmania spp.* tem um papel importante no ciclo de vida dos parasitas, bem como no desenvolvimento da infecção em humanos. Estudos *in vitro* demonstraram que a inibição da catepsina L de *L. mexicana* comprometeu o desenvolvimento do parasita.¹² Os protozoários do gênero *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi* expressam as cisteíno proteases rodasaína e cruzaina, respectivamente; estruturalmente, ambas se assemelham à catepsina L.¹³ As falcipainas são cisteíno proteases do protozoário *Plasmodium falciparum*.¹⁴

1.1.1 Inibidores de cisteíno proteases

A regulação endógena da atividade das cisteíno catepsinas é promovida por inibidores proteicos como as cistatinas, tiropinas e serpinas, que agem de modo reversível *tight binding* competitivo, ou seja, ocupam o sítio ativo das cisteíno catepsinas. Os inibidores regulatórios não apenas inibem, mas também modulam a atividade das proteases, impedindo que ocorram a quebra inapropriada de proteínas.^{7,15}

O planejamento de inibidores irreversíveis de cisteíno proteases normalmente relaciona estruturas de peptídeos ou peptidomiméticos ligados à grupos susceptíveis à substituição nucleofílica promovida pelo resíduo de cisteína, inativando a enzima. Dentre eles estão cetonas ativadas, como halometil cetonas (1)¹⁶ e diazometil

cetonas (**2**);¹⁷ vinil sulfonas (**3a**)¹⁸ e outros aceptores de Michael (**3b**) (olefinas substituídas com grupos retiradores de elétrons - GRE);¹⁹ epóxidos (**4a**)²⁰ e aziridinas (**4b**)²¹ – que foram o enfoque deste trabalho –, entre outros (FIGURA 1.2).²²

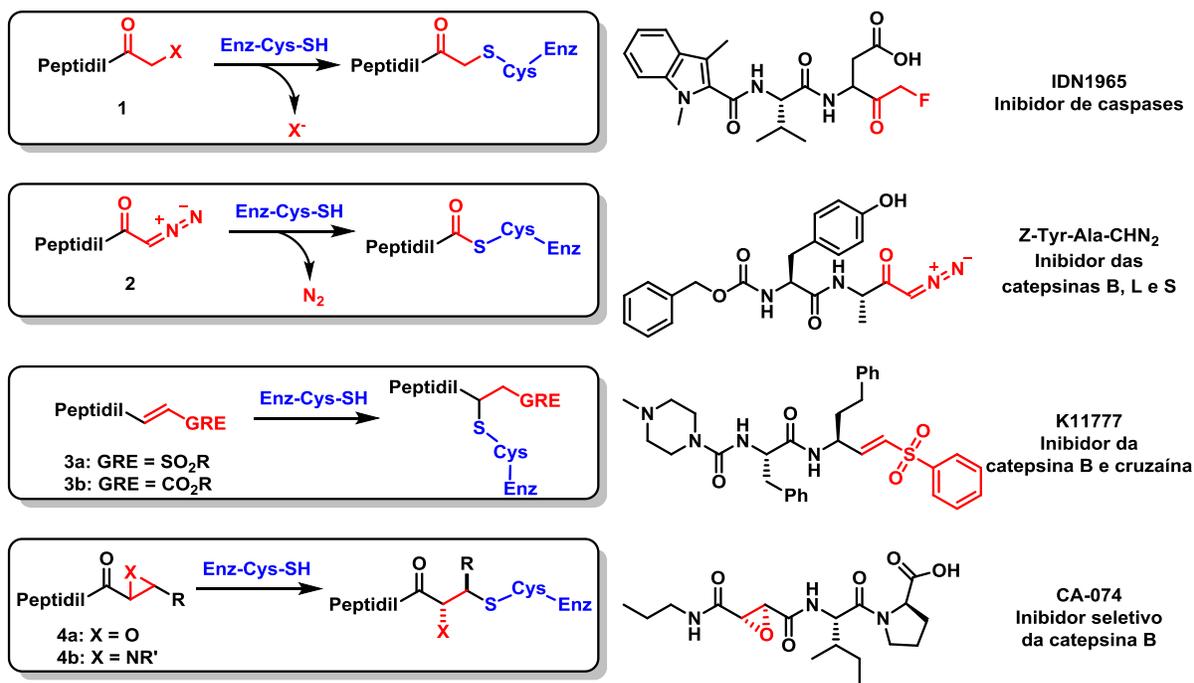


FIGURA 1.2. Inibidores irreversíveis de cisteíno proteases.

O primeiro peptidil epóxido natural descoberto foi o E-64 (FIGURA 1.3), isolado do fungo *Aspergillus japonicus* em 1978 por Hanada e colaboradores,²³ que também reportaram a atividade inibitória deste composto frente à diversas proteases e observaram seletividade em relação à papaína. Então investigações mais aprofundadas acerca da sua atividade na inibição de outras cisteíno proteases demonstraram que o E-64 é um inibidor irreversível não seletivo.²⁴ Dado que serino, asparil e metaloproteases não são inibidas pelo E-64, demonstra que este inibidor pode ser usado como um padrão para identificar a atividade de cisteíno proteases.²²

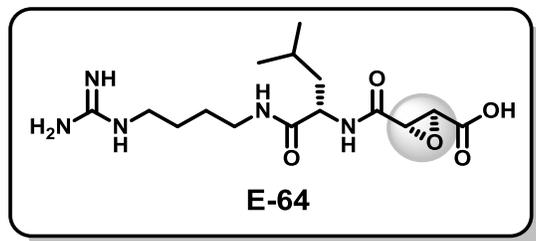
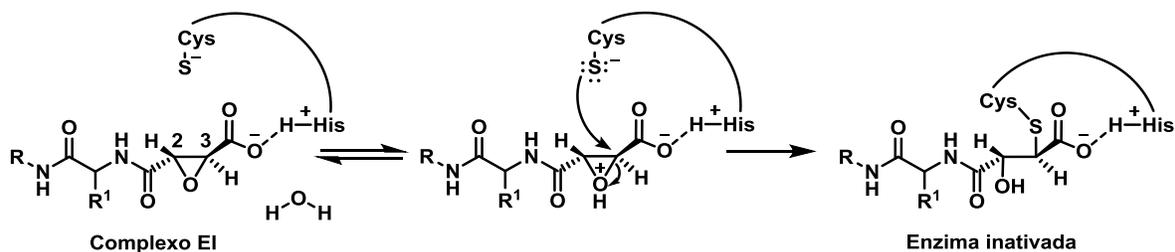


FIGURA 1.3. Produto natural E-64, inibidor irreversível de cisteíno proteases.

Diversos estudos foram realizados a fim de determinar o mecanismo pelo qual os epoxissuccinatos (E-64 e seus derivados) inativam as cisteíno proteases. Análises de cristalografia de raio-X do cristal do complexo enzima-inibidor (EI) corroboraram para a proposta sugerida de que ocorre o ataque nucleofílico do resíduo de cisteína do sítio ativo a um dos carbonos do anel epóxido (C2 ou C3) através de um mecanismo do tipo S_N2 , uma vez que é observada a inversão da configuração do carbono que sofre o ataque. A regiosseletividade da abertura do anel depende da estrutura do inibidor e de como será a interação da sua cadeia com os outros resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo (subsítios). Modelos estudados para outras classes de inibidores irreversíveis sugerem que a protonação de um determinado grupo presente nos inibidores ocorreria com a assistência do resíduo de histidina. Entretanto observou-se que, para os epoxissuccinatos, a protonação do oxigênio do anel epóxido pela histidina não seria favorável em termos espaciais, portanto propôs-se que uma molécula de água seria responsável pela protonação (ESQUEMA 1.1).²²



ESQUEMA 1.1. Mecanismo proposto para a inativação das cisteíno proteases por epoxissuccinatos no complexo EI.

A descoberta da atividade inibitória do E-64 inspirou a síntese de outros

peptidil epóxidos que apresentassem maior seletividade frente à cisteíno proteases específicas. Perlman e colaboradores²⁵ sintetizaram peptidil epóxidos *endo* e *exo* e testaram a atividade destes compostos frente à papaína e catepsina B. Os autores observaram que o peptidil epóxido *exo* – de maneira análoga aos derivados do E-64 – inibiu ambas as proteases de modo irreversível. Já os peptidil epóxidos *endo* não inativaram as enzimas e apresentaram um modo de inibição reversível competitivo, destacando-se o epóxido *cis* (**5**). Estudos complementares de modelagem molecular demonstraram que a configuração *cis* do epóxido impossibilita a abertura do anel promovida pela cisteína (FIGURA 1.4).

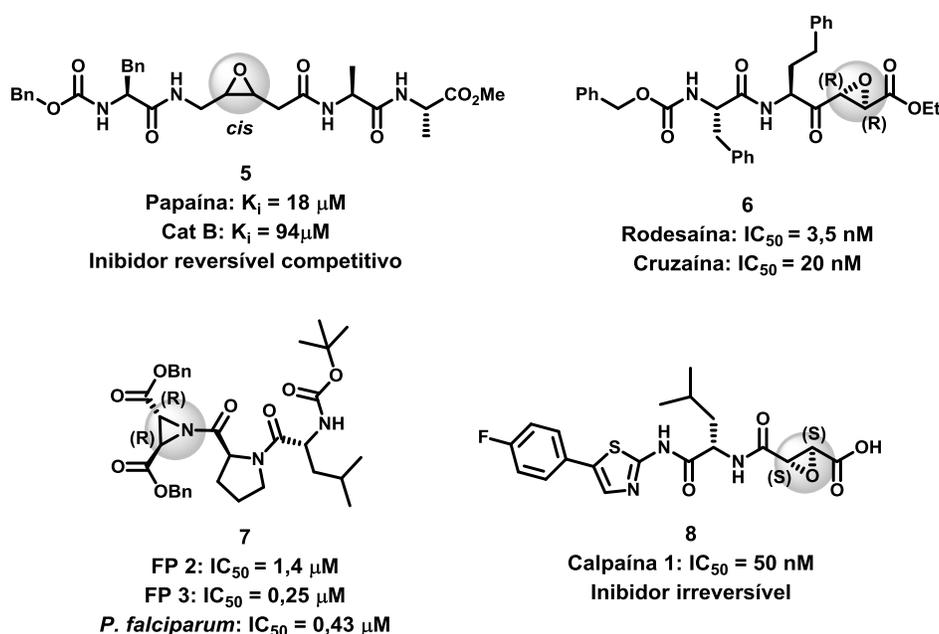


FIGURA 1.4. Inibidores contendo anéis epóxidos ou aziridinas com atividade frente à cisteíno proteases.

Dada a importância da busca por novos inibidores de protease parasitárias, González *et al.*²⁶ investigaram a atividade de peptidil epóxidos frente à rodesaína e cruzaina. Para ambas as enzimas a melhor inibição foi com o composto **6**, observando-se maior seletividade para a rodesaína. Aziridinas e epóxidos-2,3-dicarboxilatos foram sintetizados e avaliados frente ao *P. falciparum* e às falcipainas 2 e 3, e de toda a série, o composto **7** apresentou atividade, que foi comparável ao E-64 (FIGURA 1.4).²⁷

As calpaínas são cisteíno proteases cálcio-dependentes e o aumento da sua atividade está associado a problemas cardíacos e doenças neurodegenerativas. Schiefer *et al.*²⁸ avaliou uma série de epoxissuccinatos peptidomiméticos com anéis triazol e/ou tiazol, e dentre eles o composto **8** apresentou a melhor atividade frente à calpaína 1 de modo irreversível (FIGURA 1.4).

Como mostrado até aqui, a maioria dos inibidores de catepsina L conhecidos são peptídeos ou peptidomiméticos. O nosso grupo de pesquisa tem buscado novos inibidores de cisteíno proteases inspirando-se em produtos naturais não peptídicos. Dessa forma, uma coleção combinatória de derivados sintéticos de flavonas foi preparada e avaliada frente à catepsina V, obtendo-se melhor atividade inibitória para a flavona **9**.²⁹ Acridonas naturais foram reportadas como potenciais inibidores de cisteíno catepsinas, então estudou-se as relações de estrutura-atividade de acridonas sintéticas contendo vários grupos substituintes, dentre as quais a acridona **10** apresentou os melhores resultados de inibição para as catepsinas L e V (FIGURA 1.5). A síntese das acridonas teve como precursores os ácidos *N*-aril antranílicos que também foram avaliados frente às catepsinas L e V, sendo que o composto **11** teve a melhor atividade inibitória, apresentando valores de IC₅₀ mais altos do que os obtidos para as acridonas e se comportando como um inibidor incompetitivo.³⁰ Neste mesmo trabalho, foi também avaliada uma série de 4-quinolinonas, que atuaram como inibidores não-competitivos.

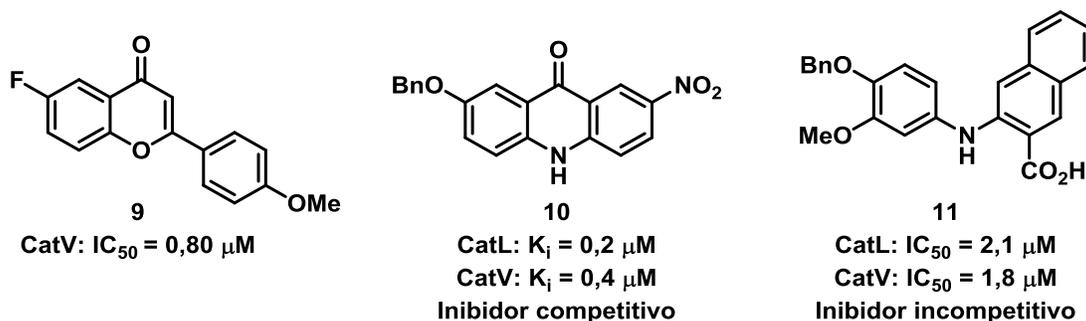
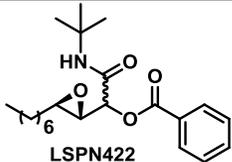
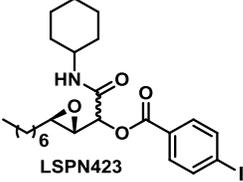
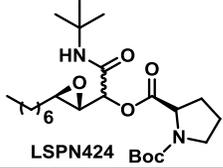
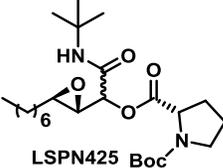
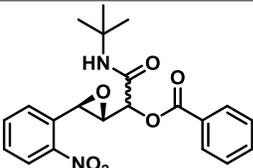


FIGURA 1.5. Inibidores de cisteíno catepsinas derivados de produtos naturais.

Baseando-se na estrutura do E-64 e de outros peptidil epóxidos que inibem cisteíno proteases, novos epoxi-peptidomiméticos foram sintetizados pelo nosso grupo

de pesquisa. Resultados preliminares indicaram uma potencial atividade dessa classe de compostos para a inibição das catepsinas K, V e L, destacando-se os compostos **LSPN422** e **423** sobretudo frente à catepsina L (TABELA 1.1).³¹ Com isso, neste presente trabalho parte dos estudos foram direcionados para a investigação das relações de estrutura-atividade das epoxi- α -acilcarboxamidas, bem como a avaliação do mecanismo de inibição.

TABELA 1.1. Inibição das epoxi- α -aciloxicarboxamidas frente às catepsinas K, V e L.

Composto	Inibição (%)		
	CatK	CatV	CatL
 LSPN422	69	43	86
 LSPN423	78	30	98
 LSPN424 Boc	38	0	67
 LSPN425 Boc	39	0	52
 LSPN426	21	21	10
 LSPN427	0	4	3

A síntese de novos compostos com atividades biológicas ou farmacológicas deve ser planejada de forma a envolver o menor número de etapas reacionais, tornando-a mais eficiente.³² Processo sequenciais simplificam a obtenção de compostos, pois diminuem etapas de purificação de intermediários. Neste sentido, as reações multicomponente são bastante atrativas para a construção rápida de coleções de compostos para avaliação biológica.³³

1.2 Processos *one-pot*

A definição de reação *one-pot* engloba diversos conceitos que descrevem reações de múltiplas etapas que ocorrem de forma sequencial em um mesmo frasco reacional, sem isolamento dos intermediários, dentre eles estão: reações dominó e tandem.³⁴ Recentemente, o termo *pot economy* foi introduzido a fim ampliar o conceito das reações *one-pot* abrangendo outros processos sequenciais.³⁵

Tietze³⁶ define reações dominó como um processo que envolve duas ou mais transformações que resultam na formação de novas ligações (carbono-carbono ou carbono-heteroátomo), as quais devem ocorrer sob as mesmas condições reacionais desde o início sem que haja adição de reagentes, solventes ou catalisadores durante a reação. Além disso as etapas reacionais se processam em uma ordem cronológica fixa, na qual uma determinada transformação só acontece em decorrência de uma etapa anterior.³⁷ A partir deste conceito, as reações multicomponente classificam-se como um sub-grupo das reações dominó que contem no mínimo três componentes e a maioria dos átomos dos reagentes são incorporados no produto final.

As reações tandem, por sua vez, são transformações sequenciais que ocorrem, segundo a própria definição, “uma após a outra”, em que por exemplo, duas funcionalidades em uma mesma molécula reagem com outros componentes de forma independente ou quando há modificação das condições reacionais para que ocorram as reações *one-pot* planejadas, como modificação da temperatura, adição de outros reagentes, catalisadores ou troca de solvente.^{36,38} No entanto, em alguns casos não é possível realizar diversas etapas reacionais de maneira *one-pot*, devido, por exemplo, à incompatibilidade de subprodutos, reagentes em excesso ou catalisadores nas etapas

posteriores da síntese. Então, uma alternativa visando realizar a síntese em multi-etapas minimizando resíduos e etapas de purificação é o emprego de processos telescópio, nos quais os intermediários são submetidos a lavagens ou filtrações, mas não são isolados em cada etapa da síntese.³⁵

Os processos de biossíntese servem de inspiração para os estudos das metodologias de síntese *one-pot*, uma vez que em meio biológico as reações ocorrem de forma sequencial com vários substratos e catalisadores na mesma solução, levando à formação dos produtos de interesse em condições brandas de maneira eficiente e seletiva.^{35,39}

Processos *one-pot* ou multi-etapas, apresentam diversas vantagens em relação àqueles em que há o isolamento dos produtos de cada etapa reacional, uma das principais é a economia de etapas de purificação, caracterizada como o primeiro princípio da Química Verde, que trata da prevenção da geração de resíduos. Outra vantagem dos processos *one-pot* é a possibilidade de trabalhar com intermediários instáveis e/ou tóxicos, evitando a manipulação dos mesmos (FIGURA 1.6A). Além disso, há a possibilidade de planejar reações sequenciais em que se desloca o equilíbrio para a formação de um intermediário que reagirá nas etapas seguintes fornecendo o produto de interesse (FIGURA 1.6B).^{35,40}

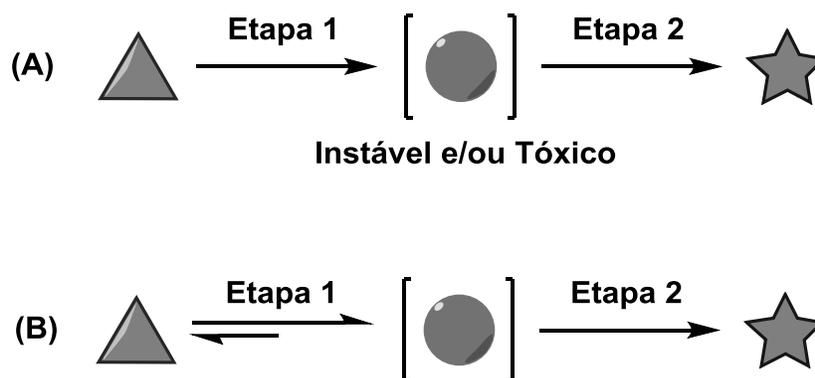
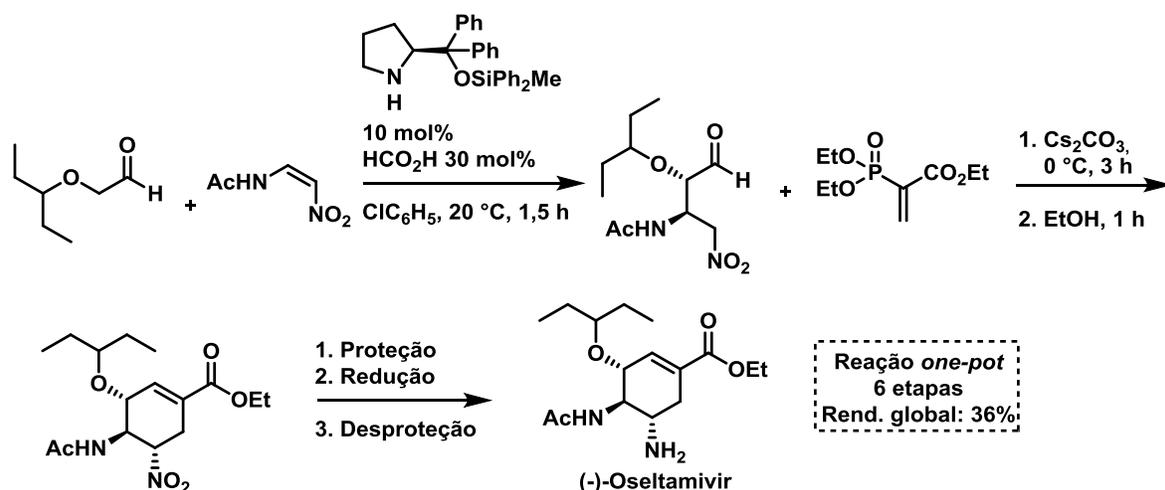


FIGURA 1.6. (A) Reação sequencial com intermediário instável e/ou tóxico. (B) Deslocamento do equilíbrio no sentido de formação do intermediário que é consumido na segunda etapa da reação.

O planejamento de uma síntese *one-pot* deve levar em consideração algumas questões importantes como: os subprodutos e produtos colaterais formados nas primeiras etapas não devem interferir nas etapas posteriores; a síntese deve ser planejada para que, preferencialmente, todas as etapas possam ser realizadas com o mesmo solvente, ou se a troca for imprescindível, solventes de alto ponto de ebulição devem ser evitados e os reagentes utilizados em excesso nas primeiras etapas devem ser compatíveis com as etapas seguintes, de modo que não interajam com os reagentes das próximas etapas.³⁵

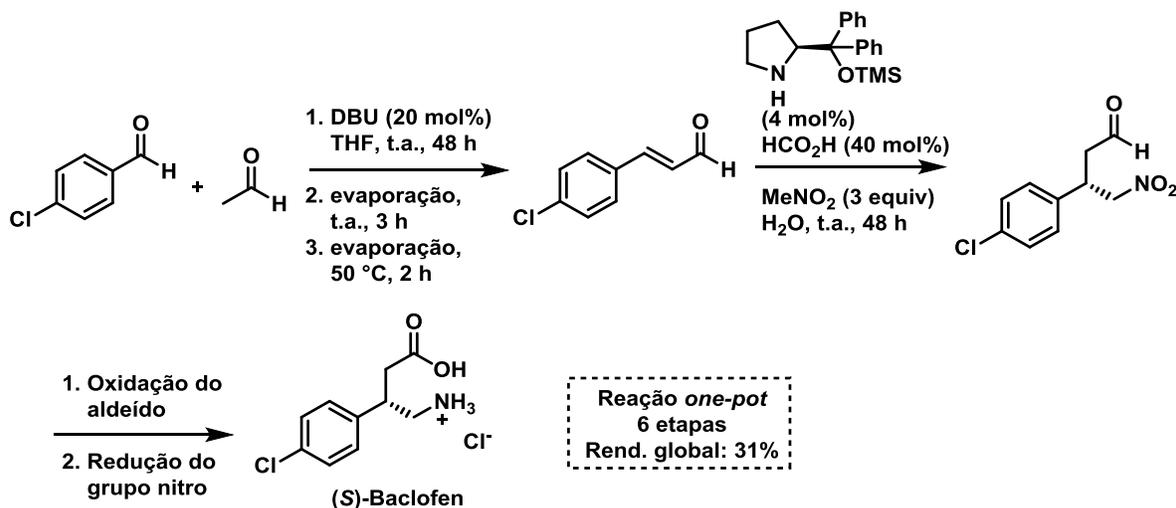
Existem diversos exemplos na literatura da síntese *one-pot* de vários produtos de interesse comercial ou de novos compostos.^{34,36} Hayashi e colaboradores⁴¹ descreveram recentemente a síntese *one-pot* de dois fármacos, o (-)-oseltamivir (tamiflu, usado no tratamento do vírus influenza) e do (S)-blacofen (utilizado no tratamento de espasmos), ambos empregando como etapa chave uma reação de Michael organocatalisada para induzir assimetria ao produto desejado.

A síntese *one-pot* do (-)-oseltamivir foi realizada em seis etapas sem purificação de nenhum dos intermediários e sem evaporação ou troca de solventes. A primeira etapa consiste em uma reação de Michael organocatalisada, em seguida uma reação de Horner–Wadsworth–Emmons (HWE) resultando no intermediário ciclizado que após etapas de tior-Michael, redução do grupo nitro e retro-Michael forneceu o (-)-oseltamivir com um rendimento global de 36% (ESQUEMA 1.2). Além disso, esta rota permitiu a obtenção do produto desejado em uma escala de gramas.^{41a}



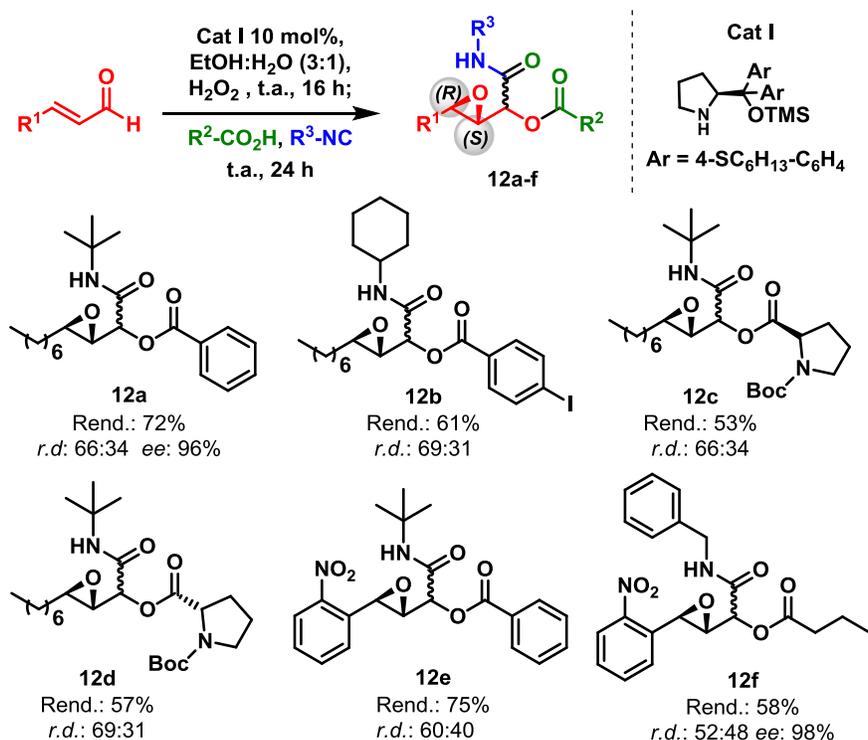
ESQUEMA 1.2. Síntese *one-pot* do (-)-oseltamivir.

Para a obtenção do (S)-baclofen, a rota sintética *one-pot* mais eficiente se iniciou com a preparação do 4-cloro-cinamaldeído através de uma condensação aldólica do 4-clorobenzaldeído e acetaldeído, a fim de minimizar a presença de subprodutos e produtos colaterais, etapas de evaporação do acetaldeído presente no meio reacional foram realizadas. Em seguida, houve a inserção do nitrometano ao aldeído α,β -insaturado por meio de uma reação de Michael organocatalisada e após etapas de oxidação dos grupos aldeído e nitro o produto foi obtido com um rendimento global de 31% (ESQUEMA 1.3).^{41b}



ESQUEMA 1.3. Síntese *one-pot* do (S)-baclofen.

Os epoxi-aldeídos sintetizados a partir da metodologia descrita pelo nosso grupo de pesquisa foram funcionalizados através da reação multicomponente de Passerini de maneira *one-pot* fornecendo os produtos **12a-f** com bons rendimentos (ESQUEMA 1.4).⁴² Estes resultados nos serviram de inspiração para aplicar os epoxi-aldeídos sintetizados pela metodologia de organocatálise assimétrica em outras reações multicomponente, como por exemplo, a reação de Ugi.



ESQUEMA 1.4. Reação tandem de epoxidação organocatalisada seguida da reação multicomponente de Passerini.

1.3 Reações multicomponente

As reações multicomponente são definidas como reações *one-pot* que empregam no mínimo três materiais de partida em um mesmo frasco reacional e que a maior parte dos átomos dos reagentes é incorporada no produto final. Os materiais de partida podem reagir simultaneamente em apenas uma etapa, ou em etapas com uma sequência definida. As reações multicomponente são metodologias úteis para a obtenção

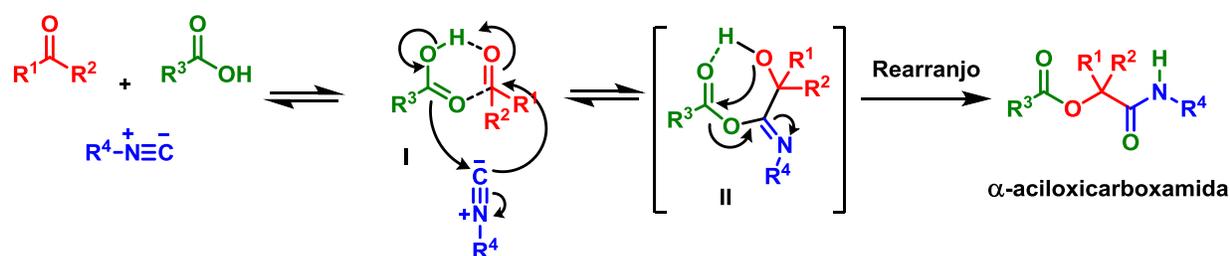
de produtos altamente funcionalizados em um processo *one-pot*, logo a rapidez e facilidade na obtenção de coleções de compostos torna estas reações atrativas como estratégia na busca por compostos bioativos. Além disso são rotas mais sustentáveis de síntese, uma vez que incorporam em seu processo pelo menos dois princípios da Química Verde: a prevenção de resíduos (1º princípio) e a economia atômica (2º princípio).^{33b,43}

Existe uma grande variedade de reações multicomponente que combinam a reatividade de diversas funções orgânicas, como as reações de Strecker, Biginelli, Mannich, Petasis, dentre outras.^{43a} Em especial, a reatividade das isonitrilas é bastante explorada nas reações multicomponente, devido à sua característica anfotérica, ou seja, a capacidade que o átomo de carbono da isonitrila tem de reagir tanto com nucleófilos como com eletrófilos,⁴⁴ como por exemplo as reações de Passerini e Ugi que fornecem estruturas do tipo peptidomiméticos, os quais foram alvos de estudo neste trabalho.

1.3.1 Reação de Passerini

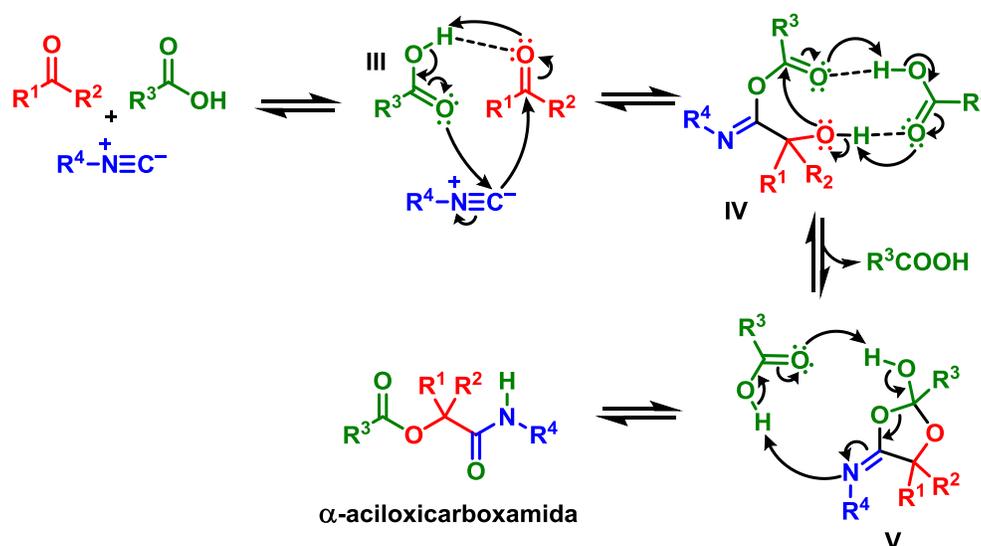
A primeira reação multicomponente descrita utilizando isonitrilas foi a reação de Passerini, em 1921, a qual emprega três componentes: um composto carbonílico (aldeídos ou cetonas), um ácido e uma isonitrila fornecendo α -aciloxicarboxamidas. A economia atômica da reação é total, uma vez que todos os átomos dos reagentes são inseridos no produto final.⁴³

O mecanismo da reação de Passerini foi extensamente estudado e a proposta mais aceita é de que ocorre a inserção da isonitrila ao composto carbonílico que é ativado por ligação de hidrogênio pelo componente ácido (intermediário I). Logo em seguida o oxigênio nucleofílico da carboxila ataca o carbono da isonitrila, formando um intermediário cíclico de sete membros (II), que por fim sofre um rearranjo de transacilação intramolecular, esta etapa da reação é irreversível e desloca do equilíbrio no sentido do produto desejado (ESQUEMA 1.5).⁴⁴



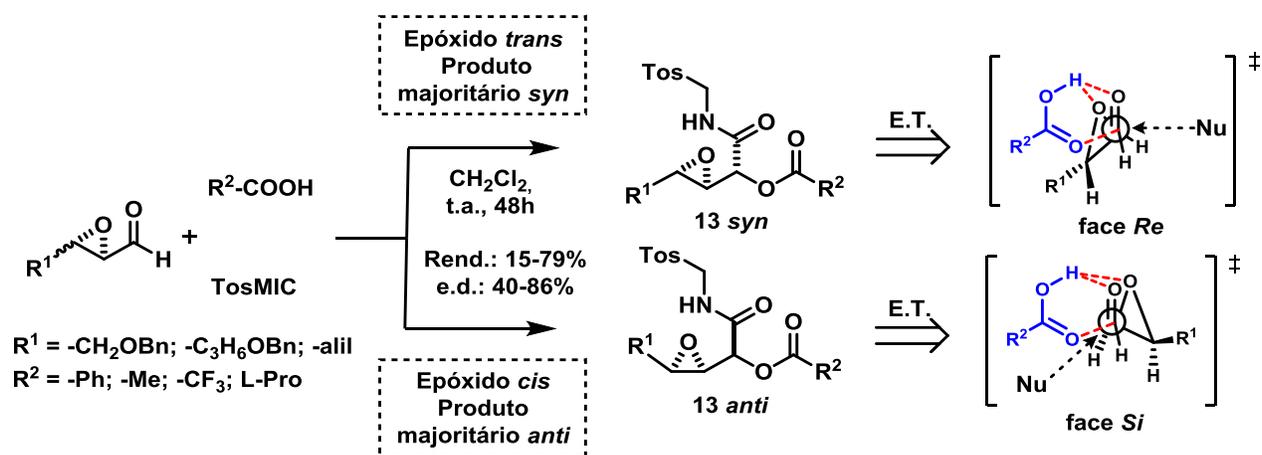
ESQUEMA 1.5. Proposta de mecanismo para a reação de Passerini.

Estudos mais recentes realizados por Maeda *et al.*⁴⁵ propõem através de cálculos teóricos que apesar da reação de Passerini apresentar três componentes, há a participação de uma segunda molécula de ácido carboxílico como um quarto componente no mecanismo da reação. A primeira etapa ocorre a partir da interação por ligação de hidrogênio do componente carbonílico e do ácido carboxílico, este intermediário (III) reage com a isonitrila e a estrutura resultante (IV) se coordena com o ácido carboxílico. Os autores demonstraram que o rearranjo do intermediário IV que levaria diretamente ao produto final tem uma barreira energética alta, de modo que a formação de V é favorecida. Então, uma molécula de ácido carboxílico auxilia no rearranjo de V, fornecendo a α-aciloxicarboxamida (ESQUEMA 1.6).



ESQUEMA 1.6. Mecanismo da reação de Passerini proposto a partir de cálculos teóricos.

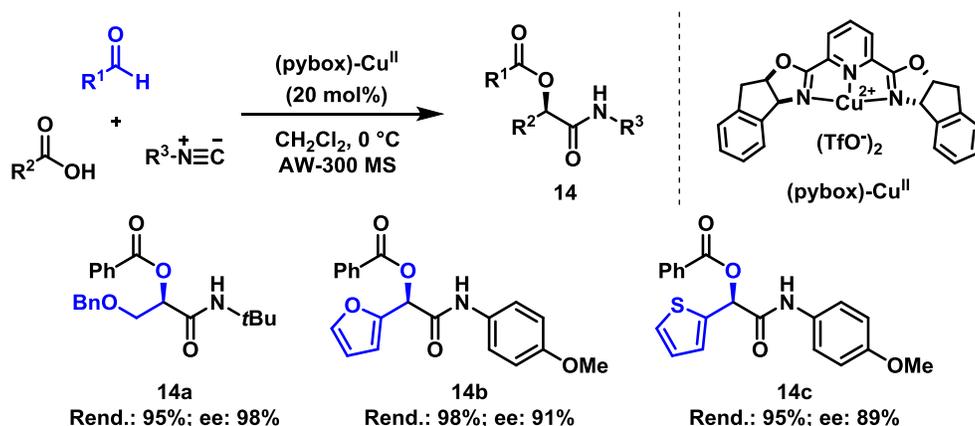
Quando o componente carbonílico da reação de Passerini possui substituintes diferentes ($R^1 \neq R^2$), o produto obtido apresenta um centro assimétrico e em condições reacionais normais há a formação do racemato. A utilização de componentes que já possuem centros estereogênicos definidos é uma das estratégias para induzir a assimetria do novo centro formado na reação. Krishna e Lopinti⁴⁶ descreveram a síntese de adutos de Passerini de forma diastereosseletiva empregando 2,3-epoxi-aldeídos assimétricos, tosilmetil isonitrila (TosMIC) e diferentes ácidos carboxílicos. Observou-se que a configuração do epóxido direcionou a seletividade da reação; epóxidos *trans* formaram o produto **13** *syn* majoritariamente, enquanto que para os epóxidos *cis* o produto **13** *anti* foi o majoritário. No estado de transição proposto, o oxigênio do epóxido também interage com hidrogênio do ácido carboxílico, dessa forma a adição da isonitrila se dá pela face menos impedida do intermediário formado entre o aldeído e o ácido carboxílico, o que justifica a preferência por cada um dos diastereoisômeros (ESQUEMA 1.7).



ESQUEMA 1.7. Reação de Passerini diastereosseletiva a partir do emprego de 2,3-epoxi-aldeídos assimétricos.

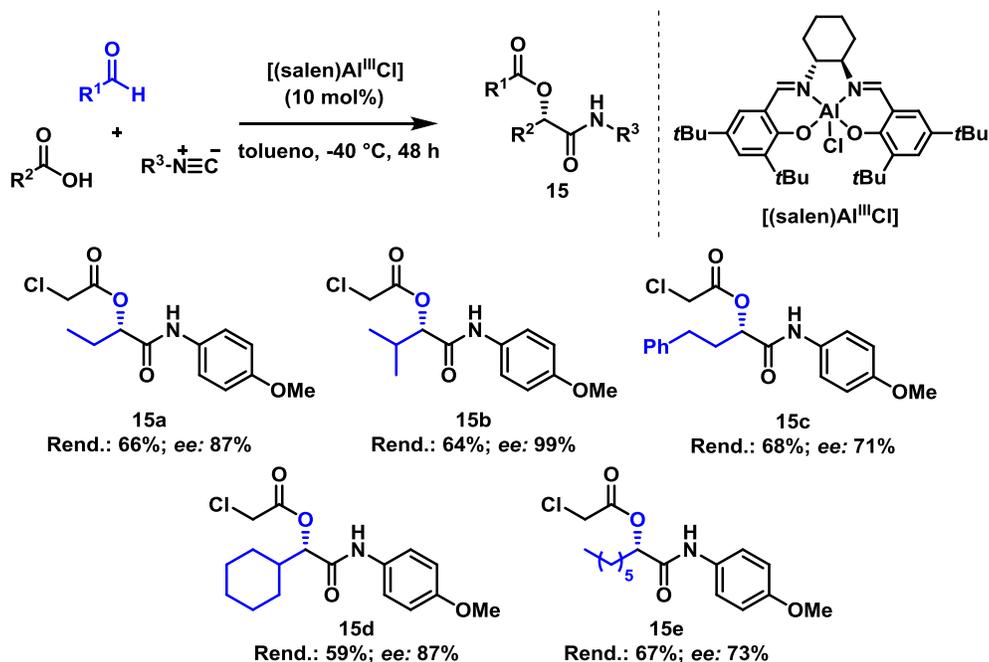
Catalisadores metálicos com ligantes quirais foram descritos para reações de Passerini enantiosseletivas. Andreana *et al.*⁴⁷ utilizaram a combinação de complexos de cobre (II) com ligantes tridentados e aldeídos bidentados para realizar a reação de Passerini com indução de assimetria. O catalisador que forneceu os melhores resultados

foi o bis(oxazolinil)piridina-Cu(II) com o ligante derivado do (1*S*,2*R*)-aminoindanol na presença de peneira molecular AW-300 MS fornecendo o produto **14** com excelentes rendimentos e excessos enantioméricos (ESQUEMA 1.8).



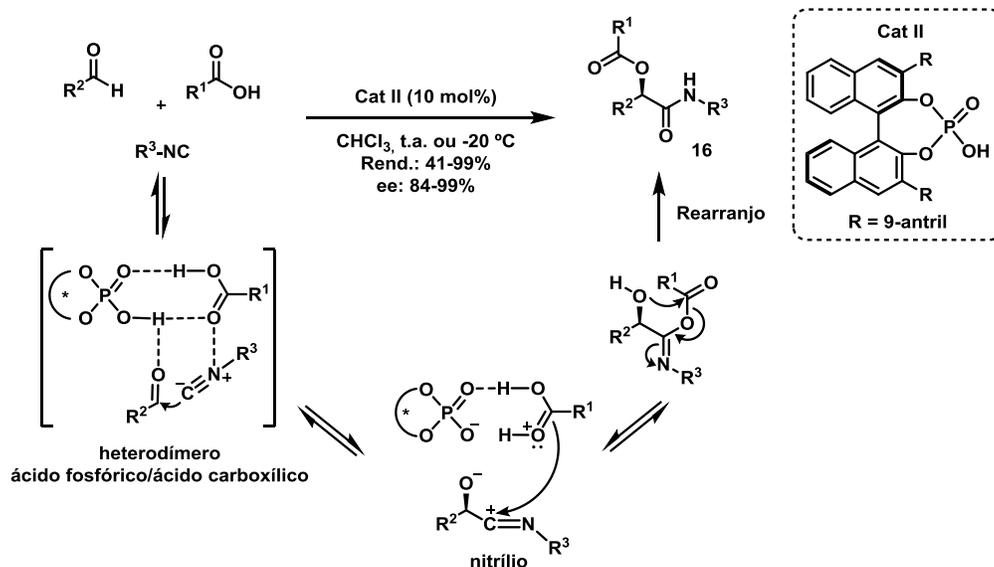
ESQUEMA 1.8. Reação de Passerini enantiosseletiva catalisada por (pybox)-Cu^{II} na presença de aldeídos bidentados.

Wang e colaboradores⁴⁸ propuseram o emprego de complexos metálicos com apenas um sítio de coordenação atuando como ácidos de Lewis para promover a reação de Passerini enantiosseletiva utilizando aldeídos alifáticos. Dentre os catalisadores avaliados, o [(salen)Al^{III}Cl] forneceu os compostos **15** com os melhores rendimentos e excessos enantioméricos (ESQUEMA 1.9).



ESQUEMA 1.9. Reação de Passerini enantiosseletiva catalisada por $[(\text{salen})\text{Al}^{\text{III}}\text{Cl}]$ empregando aldeídos com apenas um sítio de coordenação.

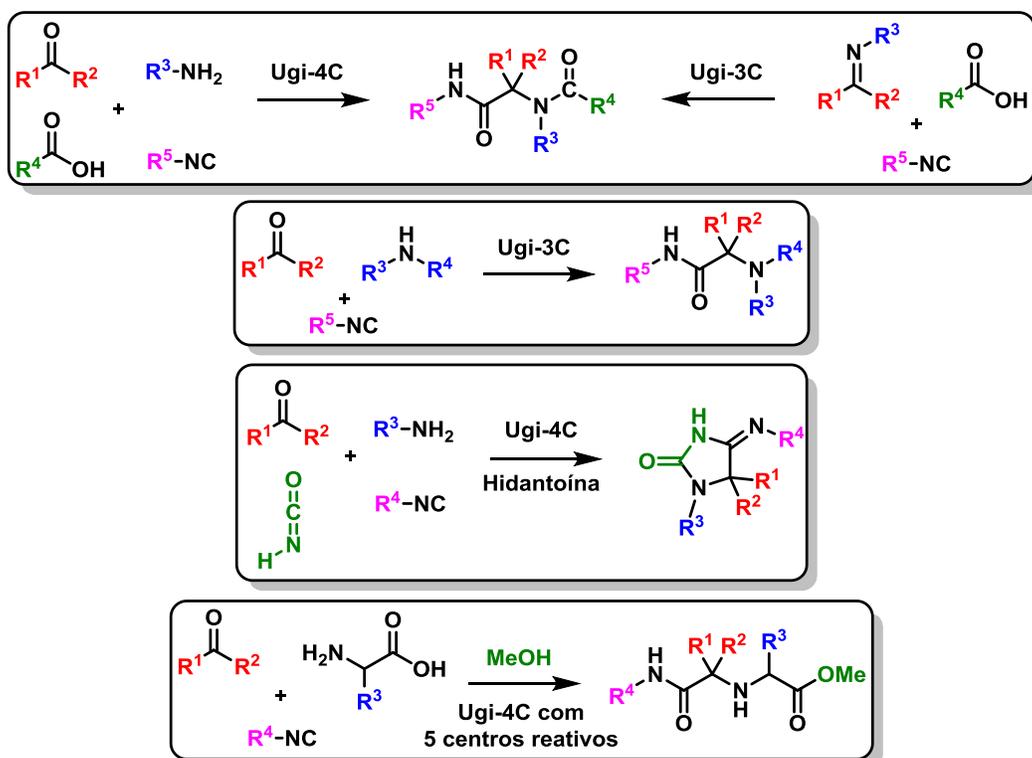
Zhang *et al.*⁴⁹ propuseram a utilização ácidos fosfóricos quirais como organocatalisadores para promover a reação de Passerini de forma enantiosseletiva por meio da ativação do ácido carboxílico permitindo a ampliação do escopo dos componentes, uma vez que as reações com complexos metálicos apresentaram certas limitações em relação aos aldeídos empregados. O mecanismo proposto se inicia com a formação de um heterodímero com o ácido fosfórico (**Cat II**) e o ácido carboxílico, o qual participa da ativação simultânea do aldeído e da isonitrila por ligação de hidrogênio e interação iônica, levando à formação do intermediário nitrílo, ao qual é adicionado o carboxilato seguido do rearranjo de transacilação intramolecular fornecendo o aduto de Passerini (**16**). Neste trabalho foi utilizada uma grande variedade de substratos – aldeídos (R^1) aromáticos, alifáticos e α,β -insaturados; ácidos carboxílicos (R^2) aromáticos e alifáticos, inclusive substituintes volumosos como tritil e adamantil; e isonitrilas (R^3) alifáticas – com bons rendimentos e excessos enantioméricos (ESQUEMA 1.10).



ESQUEMA 1.10. Reação de Passerini catalisada por ácido fosfórico quiral.

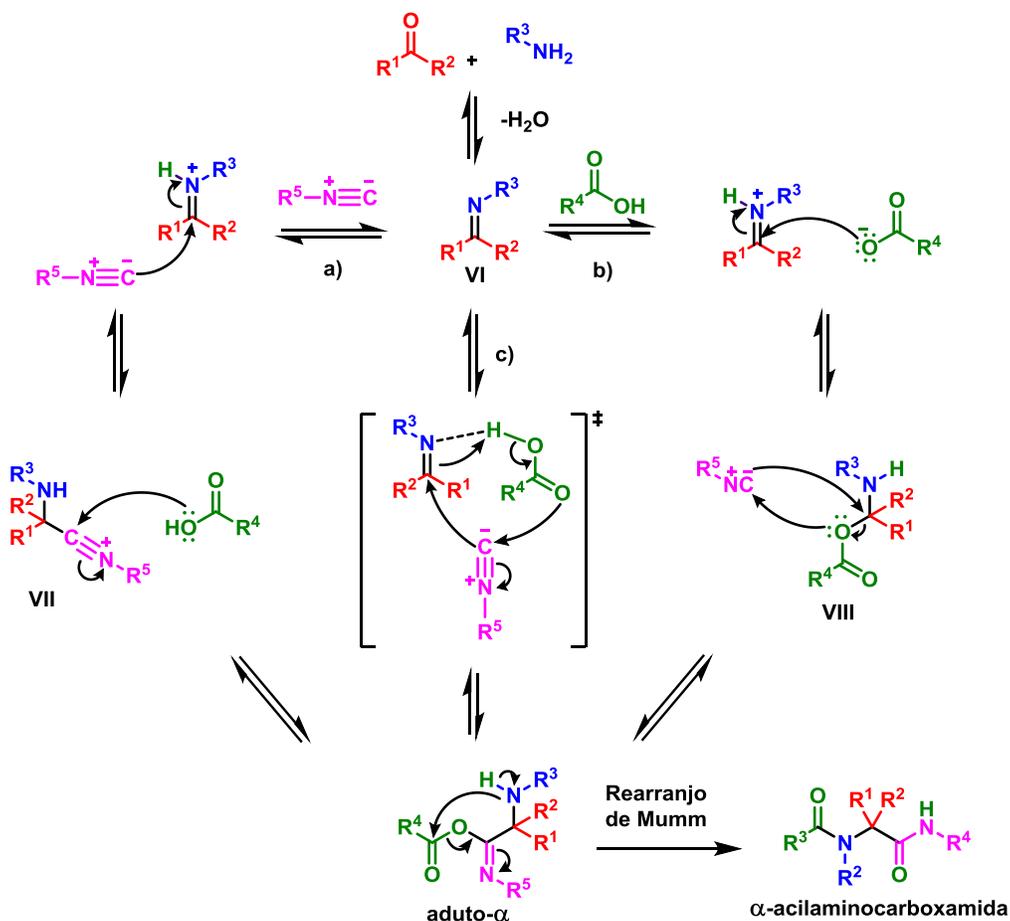
1.3.2 Reação de Ugi

A reação de Ugi foi descrita pela primeira vez por Ivar Ugi em 1959, sendo que a reação mais comum emprega quatro componentes (Ugi-4C): um composto carbonílico (aldeído ou cetona), uma amina, um componente ácido e uma isonitrila. Desde a sua descoberta, a reação de Ugi se tornou uma das reações mais exploradas, apresentando diversas modificações na quantidade e variedade dos componentes, como a reação com três (Ugi-3C) componentes que empregam, por exemplo, iminas pré-formadas ou aminas secundárias (neste caso não se utiliza o componente ácido). A reação de Ugi é bastante empregada na formação de heterociclos, como na versão de 4 componentes em que o ácido carboxílico é substituído por um isocianato, levando à formação de hidantoínas. Há versões da Ugi-4C que possuem cinco centros reativos, como por exemplo, reações em que se utiliza aminoácidos (neste caso, duas funções distintas na mesma molécula participam da reação) e metanol como solvente que também participa da reação (ESQUEMA 1.11).^{33c,50}



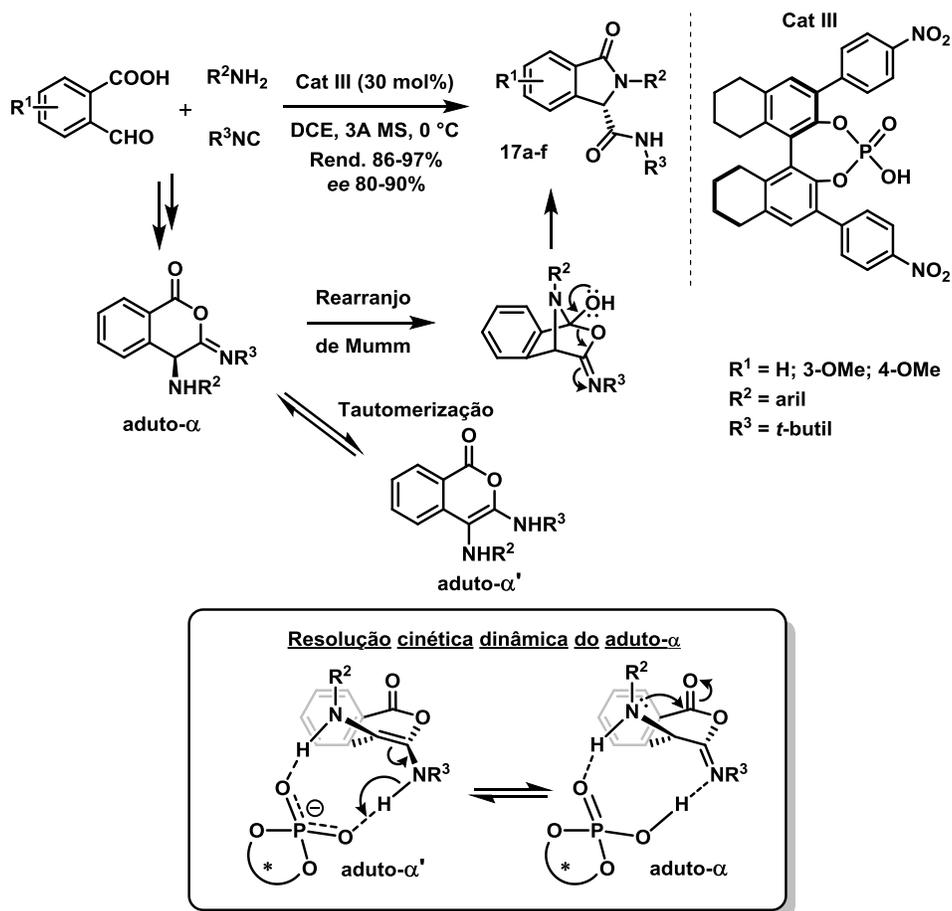
ESQUEMA 1.11. Exemplos de modificações da reação de Ugi.

Na literatura existem diferentes propostas mecanísticas para a reação de Ugi de quatro componentes e todas elas têm em comum a formação inicial de uma imina (**VI**), em seguida a obtenção do aduto- α é descrita por três caminhos distintos: a) a imina protonada sofre o ataque nucleofílico do carbono da isonitrila resultando no intermediário **VII** e posterior adição do carboxilato; b) ocorre a adição do carboxilato ao íon imínio formando o intermediário **VIII**, seguida da inserção da isonitrila; c) propõem-se um estado de transição semelhante ao da reação de Passerini em que a imina é ativada pelo ácido carboxílico por ligação de hidrogênio e então a isonitrila se adiciona ao carbono da imina e concomitantemente sofre o ataque nucleofílico do carboxilato. Então, o aduto- α passa pelo rearranjo de Mumm, uma acilação intramolecular seguida de um rearranjo hidroxilimina \rightarrow amida, etapa irreversível da reação que resulta na α -acilaminocarboxamida (ESQUEMA 1.12).⁴⁴



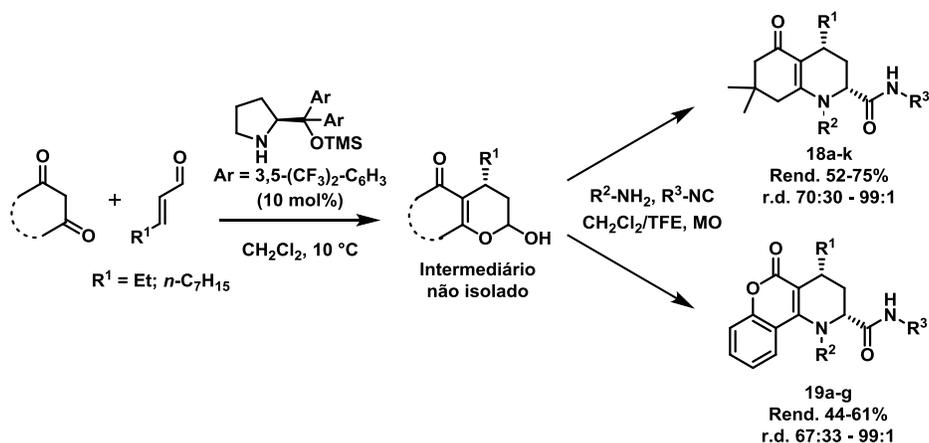
ESQUEMA 1.12. Mecanismos propostos para a reação de Ugi de quatro componentes.

Assim como na reação de Passerini, na reação de Ugi também há a formação de um centro assimétrico quando o componente carbonílico possui diferentes substituintes, no entanto, reações de Ugi enantiosseletivas apresentam diversas limitações. Recentemente, Zhang *et al.*⁵¹ reportaram a primeira reação de Ugi com três componentes e quatro centros reativos de forma enantiosseletiva com o emprego de um ácido fosfórico quiral (**Cat III**) levando aos compostos **17a-f**. Os autores sugeriram, a partir de evidências experimentais, que o controle da enantiosseletividade promovida pelo ácido fosfórico está mais relacionada à resolução cinética dinâmica do aduto- α , do que com a etapa de adição da isonitrila (que leva à formação do aduto- α). Observou-se também que a velocidade de tautomerização é maior do que a velocidade do rearranjo de Mumm, sugerindo que na etapa de tautomerização o catalisador também possa ter um papel importante para o controle estereoquímico (ESQUEMA 1.13).



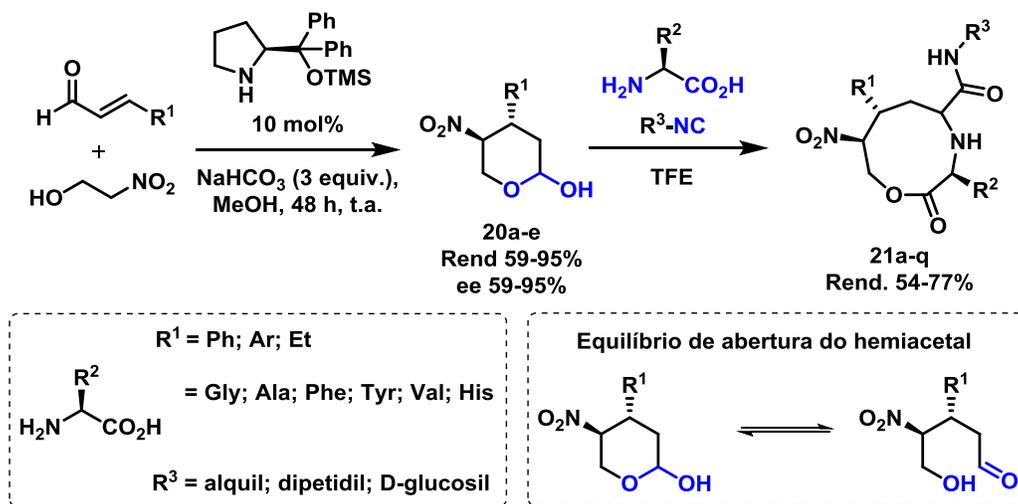
ESQUEMA 1.13. Reação de Ugi enantiosseletiva organocatalisada.

A síntese diastereosseletiva dos adutos de Ugi é amplamente descrita com diversos substratos assimétricos.⁵² Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu a síntese das hidroquinolinonas (**18**) e piperidinocumarinas (**19**) a partir de um processo tandem de adição conjugada organocatalisada seguida da reação de Ugi-Smiles com três componentes e quatro centros reativos, em que o hemiacetal apresenta duas funções que participam da reação. Observou-se que a reação de Ugi-Smiles com hemiacetais assimétricos na presença de aminas substituídas com grupos volumosos resultou em produtos com excelente diastereosseletividade para o isômero *cis* (ESQUEMA 1.14).⁵³



ESQUEMA 1.14. Reações *one-pot* de adição conjugada/reação de Ugi-Smiles.

Dando continuidade aos estudos sobre o emprego de hemiacetais assimétricos em reações multicomponentes, foi realizada a reação de adição conjugada organocatalisada de aldeídos α,β -insaturados e 2-nitroetanol para a obtenção de hemiacetais assimétricos (**20a-e**), que posteriormente foram utilizados como o componente carbonílico na reação de Ugi – proveniente da abertura *in situ* do hemiacetal – juntamente com α -aminoácidos (glicina, alanina, fenilalanina, histidina, entre outros) e isonitrilas fornecendo depsipeptidomiméticos cíclicos (**21a-q**) com diastereosseletividades baixas. Este caso é um exemplo da reação de Ugi que emprega três componentes e tem cinco centros reativos, dois deles presentes no hemiacetal mais dois presentes no aminoácido e a isonitrila (ESQUEMA 1.15).⁵⁴



ESQUEMA 1.15. Emprego de hemiacetais assimétricos na reação de Ugi.

1.4 Epóxidos e Aziridinas

Epóxidos e aziridinas são heterociclos de três membros que estão presentes em diversos produtos naturais e estruturas com atividades biológicas como os compostos mostrados na FIGURA 1.7, que apresentam atividades antimicrobianas (nisamicina) e antitumorais (mitomicina A e azinomicina B). Existe uma série de metodologias para a síntese desses heterociclos com substratos variados, dentre as quais podemos destacar as que fornecem os produtos enantiomericamente enriquecidos,⁵⁵ dada a importância da obtenção de compostos assimétricos para atividades biológicas específicas.

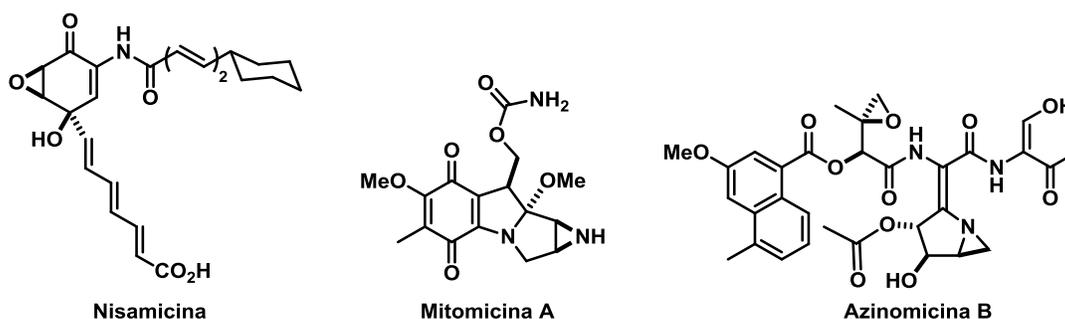
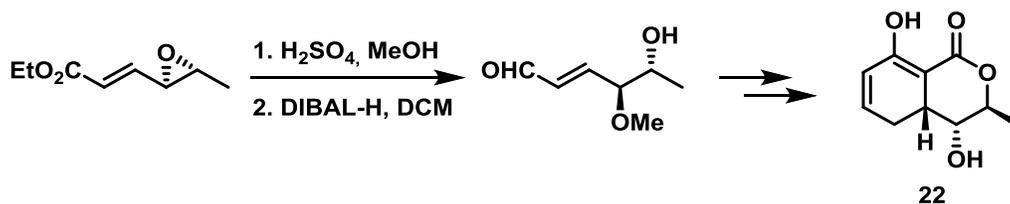


FIGURA 1.7. Compostos bioativos contendo os anéis epóxido ou aziridina.

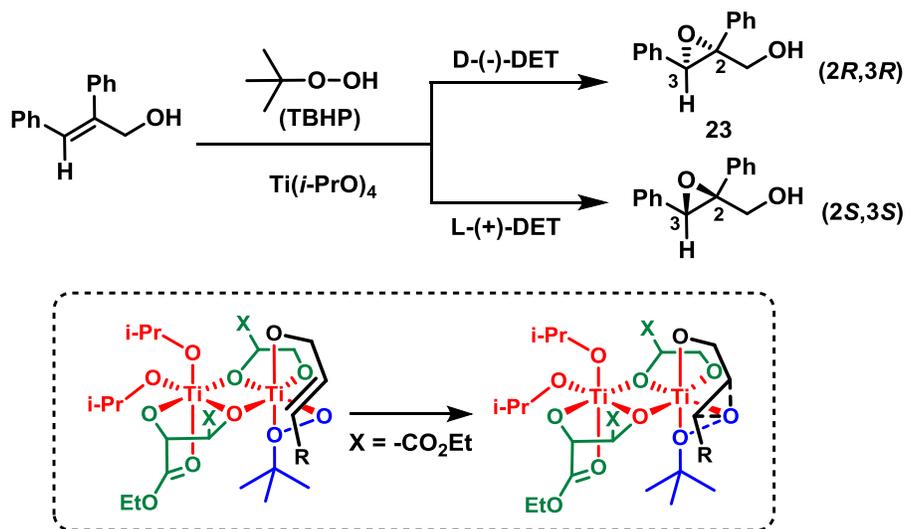
Os epóxidos e aziridinas também são importantes blocos construtores, pois devido à elevada tensão do anel, podem ser facilmente abertos na presença de diferentes nucleófilos e a abertura dos anéis ocorre de maneira diastereosseletiva, dependendo das condições reacionais pode-se obter o produto com configuração relativa *anti* ou *syn*.⁵⁶ A abertura do anel epóxido foi a estratégia sintética adotada por Uchida *et al.*⁵⁷ para síntese da tetraidroisocumarina **22** que tem atividade inseticida (ESQUEMA 1.16).



ESQUEMA 1.16. Síntese do inseticida tetraidroisocumarina (**22**).

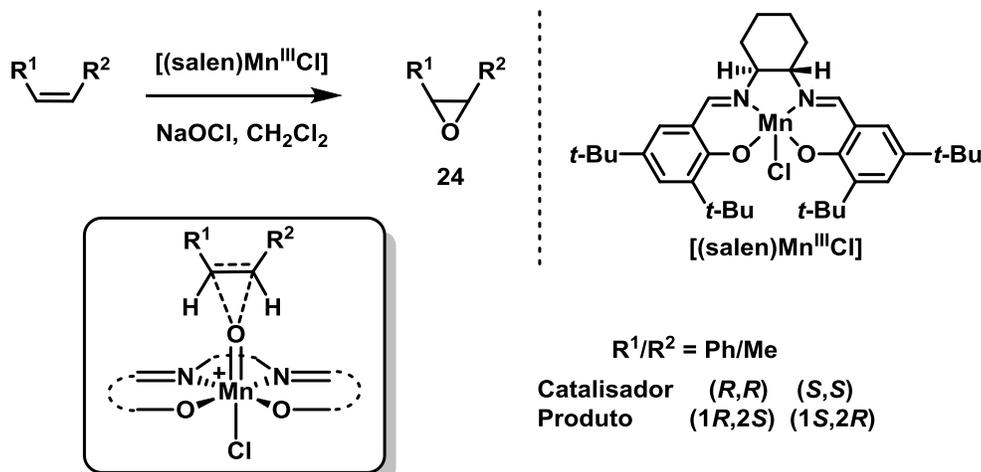
1.4.1 Síntese assimétrica de epóxidos

A primeira síntese de epóxidos assimétricos empregando uma metodologia simples e eficiente foi descrita por Katsuki e Sharpless⁵⁸ na qual álcoois alílicos foram epoxidados na presença de tetraisopropóxido de titânio e (+)- ou (-)-tartarato de dietila (DET) como ligantes quirais. A reação ocorre a partir de uma espécie dimérica formada entre o $\text{Ti}(i\text{-PrO})_4$ e o DET em que os ligantes $i\text{-PrO}$ - são trocados pelo álcool alílico e pelo oxidante (TBHP) de forma que a adição do oxigênio a ligação dupla ocorra apenas por uma das faces mantendo a posição relativa dos substituintes na ligação dupla, deste modo um mesmo substrato pode fornecer diferentes enantiômeros apenas modificando a configuração do tartarato de dietila. A reação se mostrou tolerante à diversos grupos substituintes e a configuração do produto depende da configuração do DET (ESQUEMA 1.17).



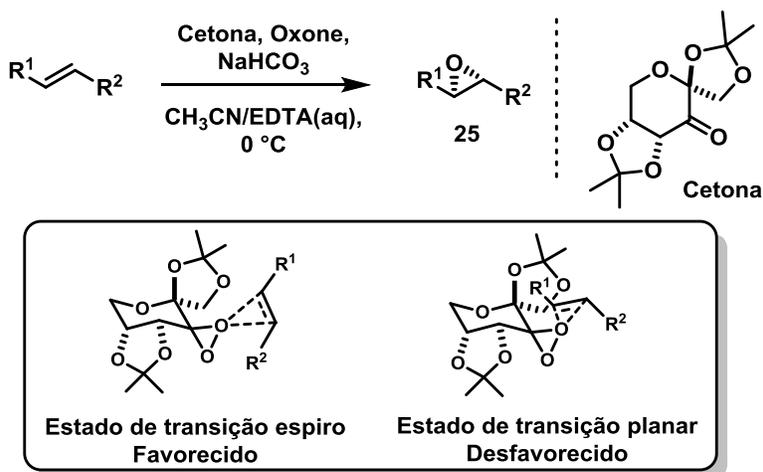
ESQUEMA 1.17. Epoxidação de Sharpless e modelo de indução assimétrica.

Jacobsen *et al.* estudaram a reação de epoxidação assimétrica utilizando alcenos com configuração *Z* e como catalisador o complexo $[(\text{salen})\text{Mn}^{\text{III}}\text{Cl}]$. A indução assimétrica da reação vem da formação do oxo-complexo de manganês (V) pelo NaOCl e a partir da aproximação preferencial de uma das faces do alceno ocorre a transferência do oxigênio regenerando o catalisador (ESQUEMA 1.18).⁵⁹



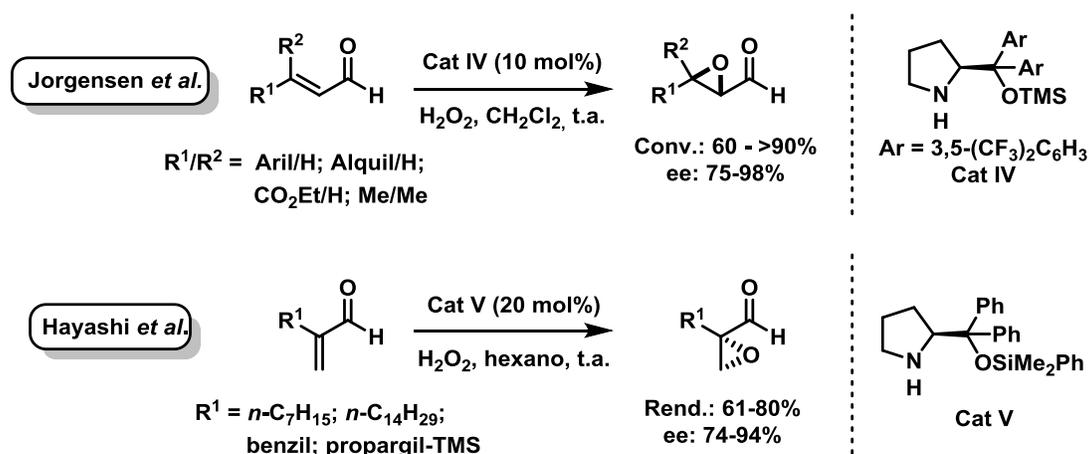
ESQUEMA 1.18. Epoxidação assimétrica de alcenos Z catalisada por Mn-salen.

A reação de epoxidação assimétrica sem a utilização de catalisadores metálicos foi descrita de forma eficiente por Shi *et al.*⁶⁰ para olefinas *trans*-substituídas e o dioxirano gerado *in situ* a partir de uma cetona derivada da D-frutose e Oxone (peroxomonosulfato de potássio). A enantiosseletividade do produto vem da aproximação dos intermediários que é favorecida quando a olefina está perpendicular ao dioxirano (E.T. espiro), em contrapartida, a aproximação pelo mesmo plano é desfavorecida por fatores estéricos (ESQUEMA 1.19).



ESQUEMA 1.19. Epoxidação enantiosseletiva mediada pelo dioxirano gerado *in situ* a partir de uma cetona assimétrica.

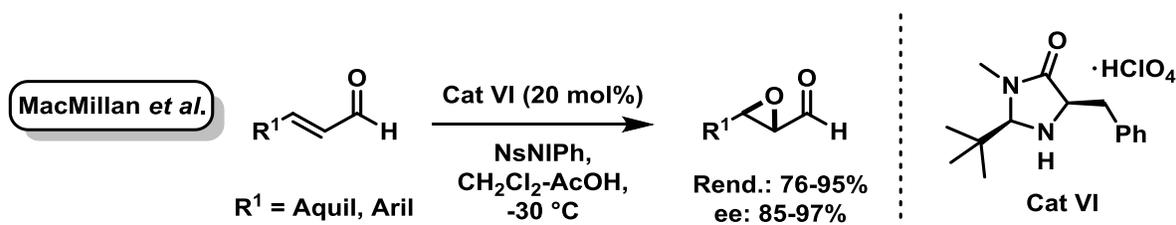
A síntese assimétrica de epóxidos partindo de aldeídos α,β -insaturados começou a ser descrita a partir do desenvolvimento dos organocatalisadores de aminas primárias e secundárias que se basearam na ativação do substrato através da formação de um íon imínio. Essas metodologias apresentaram como principais vantagens o emprego de catalisadores livres de metais e maior facilidade na manipulação dos reagentes.^{55b} Os primeiros relatos na literatura de epoxidação assimétrica de aldeídos α,β -insaturados foram descritos pelo grupo do Prof. Dr. Karl A. Jørgensen,⁶¹ onde inicialmente foi empregado o catalisador diarilprolinol silil éter (**Cat IV**), em diclorometano e com peróxido de hidrogênio como oxidante. Dando continuidade aos trabalhos, o solvente foi modificado para a mistura etanol/água (3:1) mantendo a excelente enantiosseletividade da reação com um solvente consideravelmente menos tóxico.⁶² Hayashi *et al.*⁶³ empregaram o **Cat V** visando abranger o uso de aldeídos α,β -insaturados α -substituídos que apresentaram limitações com a utilização do **Cat IV** (ESQUEMA 1.20).



ESQUEMA 1.20. Epoxidação enantiosseletiva de aldeídos α,β -insaturados catalisadas por diarilprolinol silil éteres.

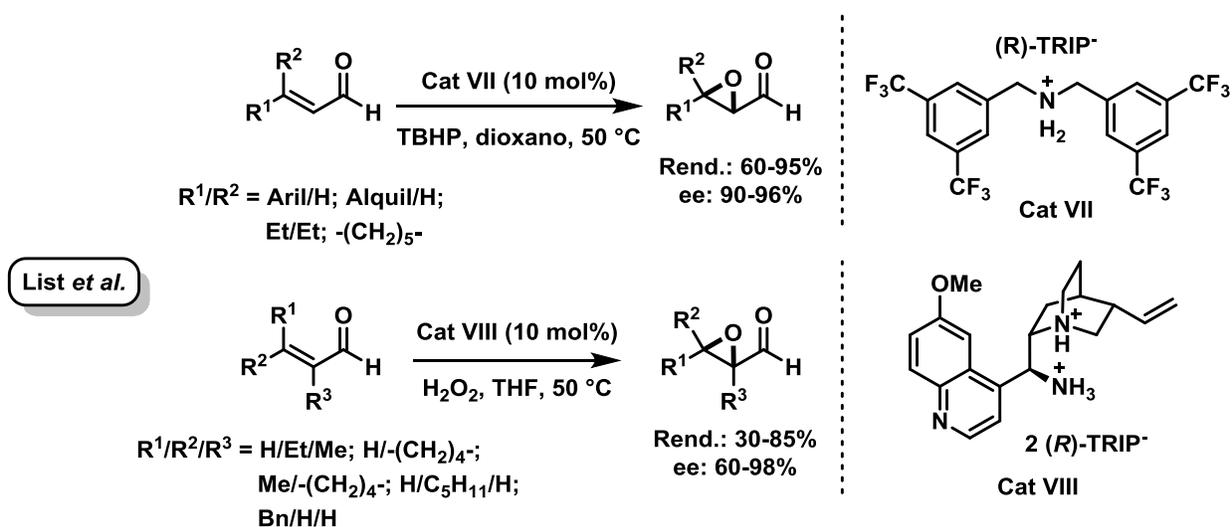
Diversos sais de aminas primárias ou secundárias foram empregados como organocatalisadores para a síntese de epóxidos assimétricos via ativação covalente.⁶⁴ O sal de imidazolidinona **Cat VI** foi usado juntamente com o oxidante PhI=O, gerado *in situ* a partir de PhI=NTs em meio levemente ácido. Nessas condições reacionais 2,3-epoxi-aldeídos com diferentes substituintes foram obtidos com bons rendimentos e excessos

enantioméricos (ESQUEMA 1.21).⁶⁵



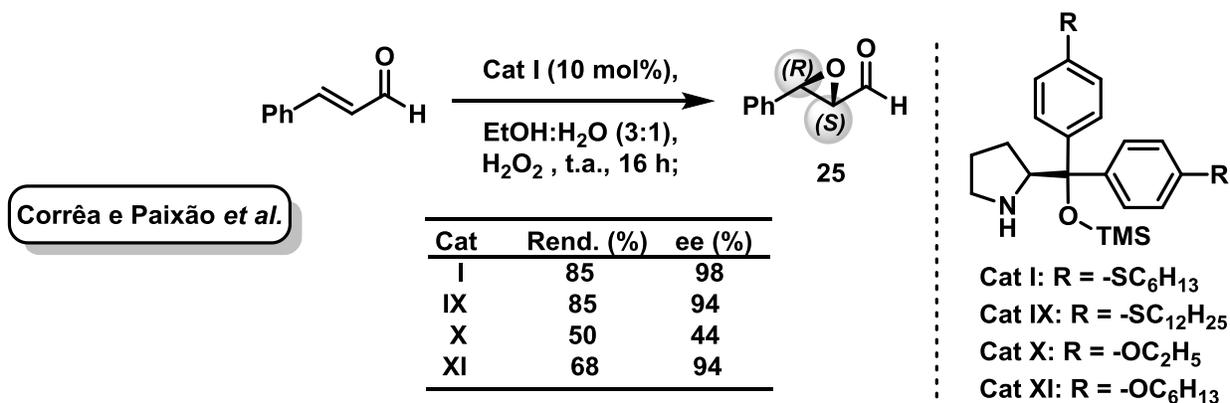
ESQUEMA 1.21. Epoxidação assimétrica catalisada por um sal de imidazolidinona.

List *et al.*⁶⁶ reportaram a reação de epoxidação com diferentes organocatalisadores tanto de amina secundária (**Cat VII**) como de amina primária (**Cat VIII**), ambos empregando ácidos fosfóricos quirais como contra-íons. O **Cat VII** forneceu produtos com boa enantiosseletividade partindo de aldeídos α,β -insaturados β -substituídos com boa tolerância para grupos aromáticos e alifáticos e também aldeídos β,β -dissubstituídos mantendo os bons rendimentos e enantiosseletividade. Por sua vez, o **Cat VIII**, derivado da quinina, apresentou uma boa aplicação para acroleínas α -substituídas e aldeídos α,β -insaturados α,β -dissubstituídos (ESQUEMA 1.22).



ESQUEMA 1.22. Epoxidação enantiosseletiva de aldeídos α,β -insaturados via organocatálise assimétrica.

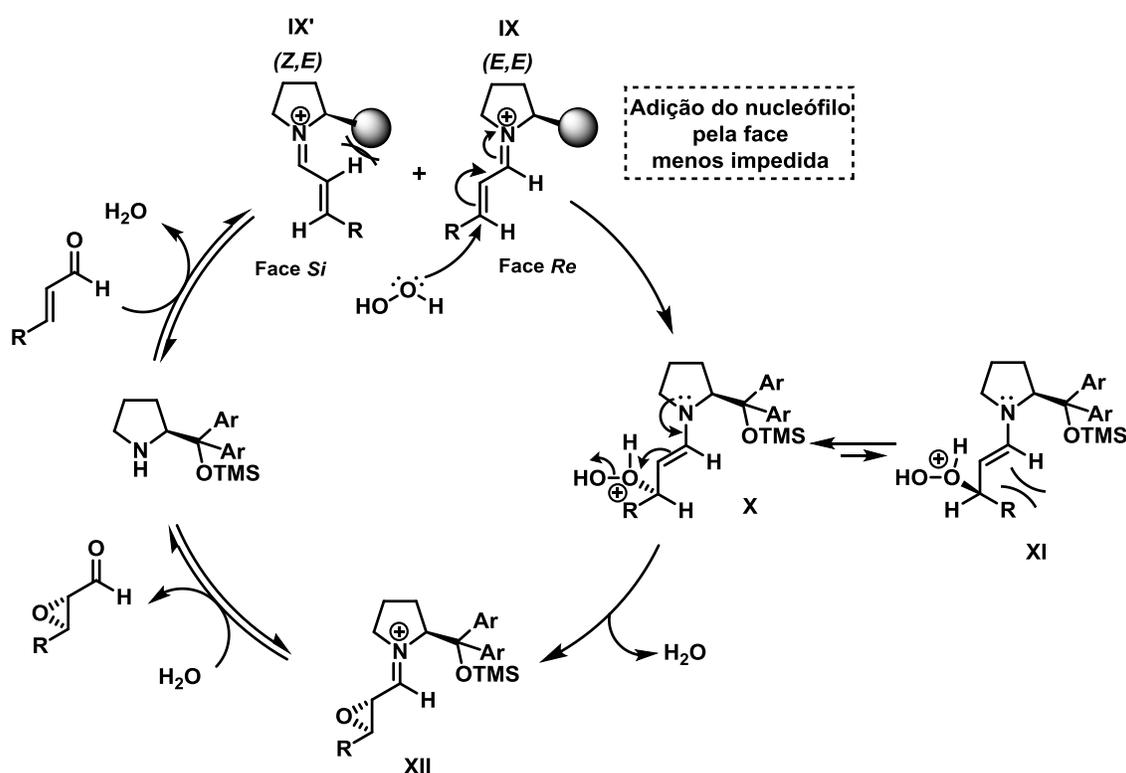
Na busca por novos organocatalisadores para promover reações enantiosseletivas, foram desenvolvidos no nosso grupo de pesquisa diversos catalisadores do tipo diarilprolinol silil éteres com substituintes na porção aril O- ou S- alquilados, com cadeias alquílicas lineares com tamanho variando de 2 a 12 carbonos (**Cat I, IX-XI**). Dentre os catalisadores sintetizados o que continha o grupo S-hexil substituído nos grupos aril (**Cat I**) foi mais efetivo tanto na reação de epoxidação.⁴² (ESQUEMA 1.23), quanto em outras reações de adição conjugada em meio hidroalcolóico.⁶⁷ Esta é uma grande vantagem em relação aos outros organocatalisadores dessa classe já descritos na literatura e que normalmente tem sua melhor atividade com solventes clorados ou apolares que apresentam maior toxicidade.



ESQUEMA 1.23. Epoxidação assimétrica empregando os organocatalisadores desenvolvidos no grupo de pesquisa.

O mecanismo da reação de epoxidação catalisada por diarilprolinol silil éteres é descrito na literatura.⁶⁸ Inicialmente, ocorre a condensação do catalisador ao aldeído, formando um íon imínio que pode assumir duas configurações distintas (**IX** *E,E* ou **IX'** *Z,E*). Estudos demonstraram que os dois isômeros estão em equilíbrio o que poderia resultar em uma baixa seletividade do produto, entretanto experimentalmente observa-se elevada seletividade para o produto proveniente do ataque nucleofílico ao isômero *E,E*, dado que o isômero *Z,E* apresenta maior energia devido à interações estéricas do hidrogênio α -imínio como o grupo volumoso do catalisador. O ataque nucleofílico do

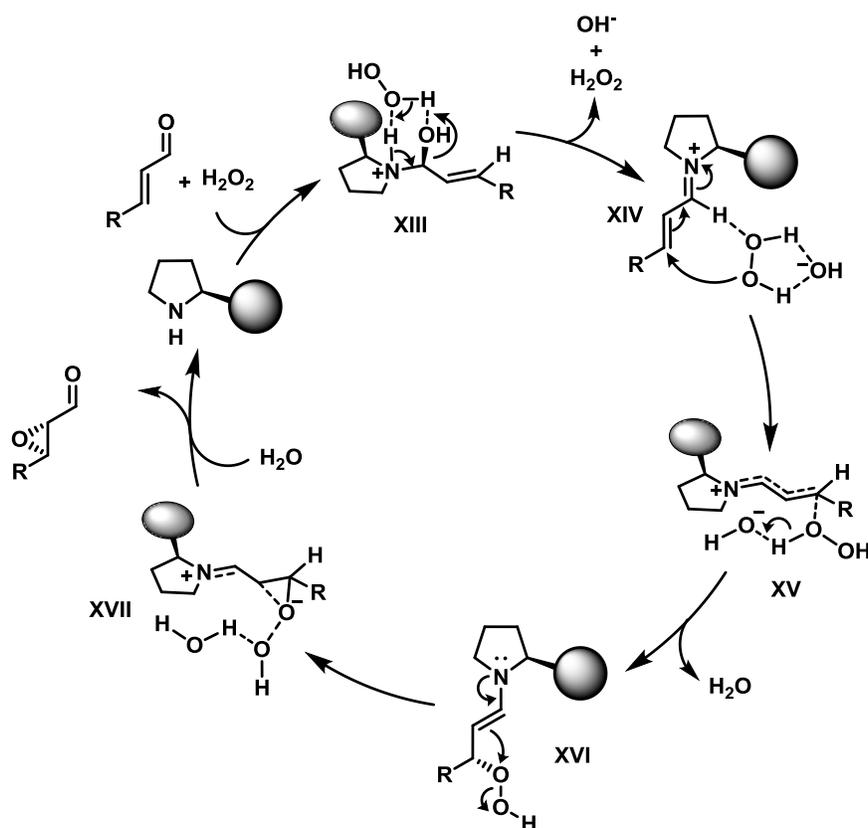
peróxido de hidrogênio (ou outro oxidante) ocorre preferencialmente pela face *Re* – oposta ao grupo volumoso do catalisador – do íon imínio **IX**. A enamina (**X**) formada após a adição do nucleófilo apresenta um equilíbrio conformacional em que a estrutura **XI** também é desfavorecido por questões estéricas. O fechamento do anel ocorre via adição nucleofílica da enamina ao heteroátomo deficiente em elétrons, seguida da quebra da ligação heteroátomo-grupo de saída. Então o íon imínio (**XII**) é regenerado e após a hidrólise libera o produto da reação e o catalisador retorna a um novo ciclo (ESQUEMA 1.24).



ESQUEMA 1.24. Mecanismo proposto para a epoxidação de aldeídos α,β -insaturados catalisada por diárilprolinol silil éteres.

Duarte e Santos⁶⁹ estudaram por meio de métodos computacionais o mecanismo das reações de epoxidação catalisadas por diárilprolinol silil éteres. A partir do cálculo da energia de diversos estados de transição e intermediários, a proposta foi

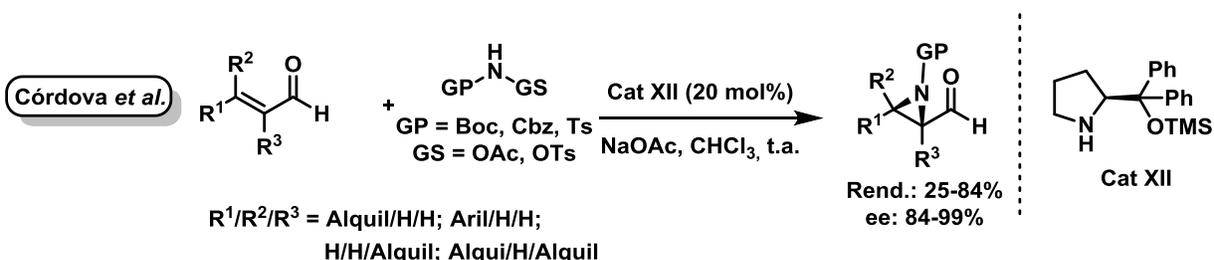
de que o peróxido de hidrogênio não age apenas como um oxidante, mas também estabilizando o estado de transição **XIII** que leva à formação do íon imínio (**XIV**) cuja configuração *E,E* apresentou energias mais baixas. A etapa de eliminação da hidroxila também é favorecida na presença do peróxido de hidrogênio ou solventes polares próticos. Então o direcionamento do ataque nucleofílico do peróxido ao carbono β do íon imínio (E.T. **XV**) ocorre pela face oposta ao grupo volumoso do catalisador sobretudo devido à fatores estéricos. A hidroxila presente no meio reacional auxilia na eliminação de água na etapa de formação da enamina (**XVI**). Por fim, o fechamento do anel acontece preferencialmente pela mesma face do primeiro ataque (E.T. **XVII**) e posteriormente a hidrólise do imínio fornece o produto desejado e regenera o catalisador. A elevada seletividade para o produto com configuração *2R,3S* observada experimentalmente também foi confirmada pelos cálculos (ESQUEMA 1.25).



ESQUEMA 1.25. Mecanismo de epoxidação assimétrica proposto a partir de estudos computacionais.

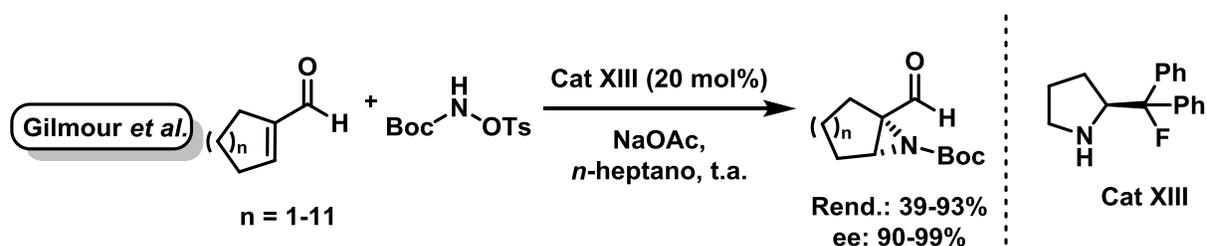
1.4.2 Síntese assimétrica organocatalisada de aziridinas

Córdova *et al.*⁷⁰ reportaram a primeira reação de aziridinação enantiosseletiva de aldeídos α,β -insaturados organocatalisada. Os autores conseguiram com a mesma metodologia (**Cat XII**) realizar a reação com diversos tipos de substratos: aldeídos alifáticos, aromáticos, acroleínas α -substituídas e aldeídos α,β -dissubstituídos. As β -formilaziridinas foram obtidas com rendimentos de moderados à bons e com excelentes excessos enantioméricos (ESQUEMA 1.26).



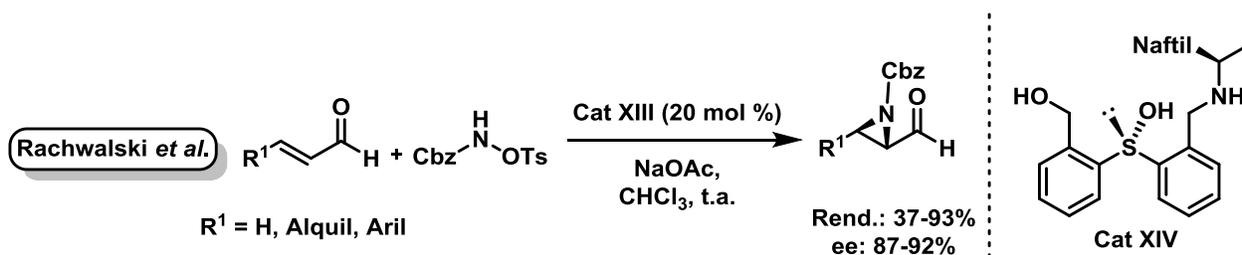
ESQUEMA 1.26. Aziridinação assimétrica de aldeídos α,β -insaturados catalisada pelo difenilprolinol trimetilsilil éter (**Cat XII**).

A utilização de catalisadores derivados da prolina substituída com um átomo de flúor (**Cat XIII**) é reportada⁷¹ e a ativação dos sistemas α,β -insaturados não se baseia apenas no impedimento estérico de uma das faces do íon imínio, mas também no efeito gauche flúor-íon imínio e devido a uma conformação mais favorável assumida pelo íon imínio, um dos grupos fenil se posiciona sobre o sistema π direcionando o ataque do nucleófilo pela face oposta. Gilmour *et al.*⁷² estudaram esses catalisadores em diversas transformações, entre elas a aziridinação de aldeídos α,β -insaturados cíclicos, em que foram obtidas boas diastereo- e enantiosseletividades mesmo para anéis de 15 membros (ESQUEMA 1.27).



ESQUEMA 1.27. Aziridinação assimétrica de aldeídos α,β -insaturados cíclicos.

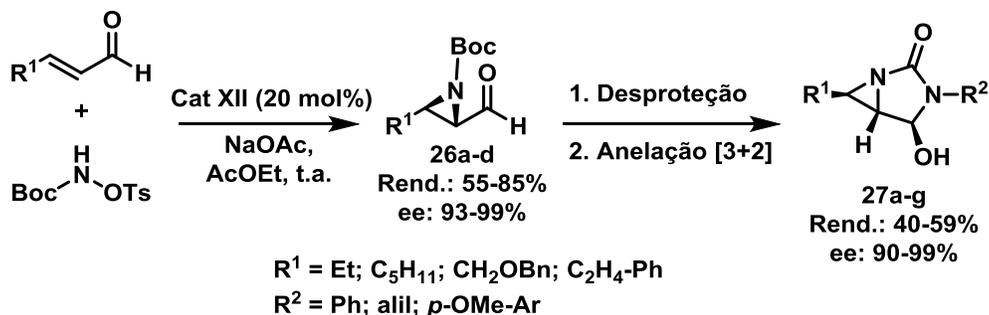
Rachwalski *et al.*⁷³ desenvolveram ligantes tridentados quirais contendo dois centros assimétricos, um localizado no enxofre e o outro no carbono vizinho ao nitrogênio que puderam ser aplicados em diversas transformações, dentre as quais está a reação de aziridinação assimétrica de aldeídos α,β -insaturados. Nesta reação o **Cat XIV** foi aplicado como um organocatalisador e os autores sugerem que a ativação do substrato, bem como o controle da estereosseletividade, ocorre por meio da formação de um íon imínio em que uma das faces está menos disponível para a adição da amina no carbono β do sistema α,β -insaturado (ESQUEMA 1.28).



ESQUEMA 1.28. Síntese de β -formilaziridinas assimétricas via organocatálise.

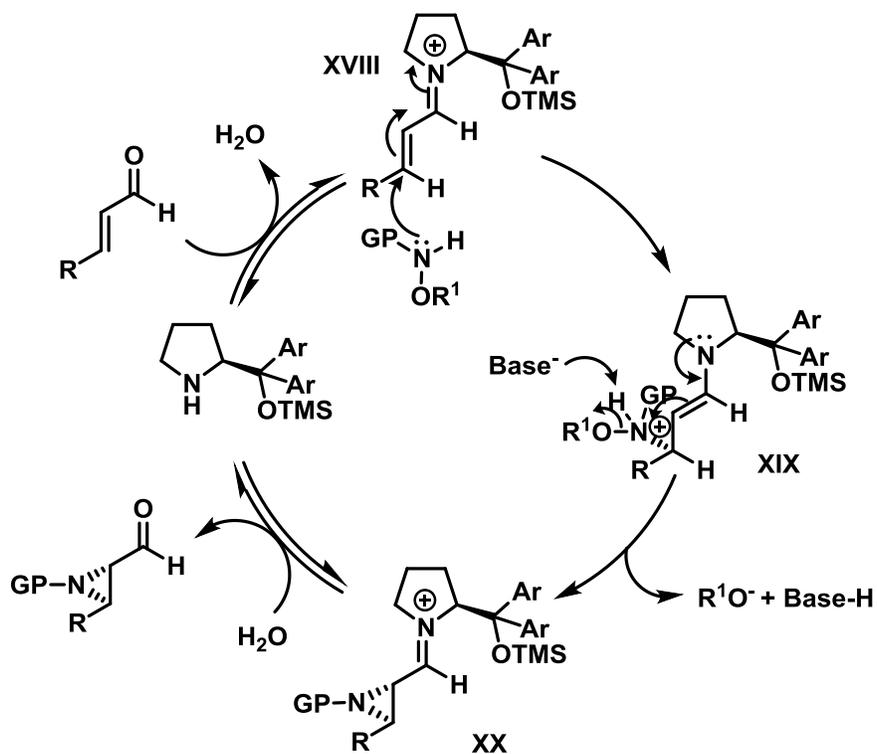
Visando a aplicação de metodologias de síntese mais sustentáveis, nosso grupo de pesquisa avaliou a síntese de β -formilaziridinas (**26a-d**) via organocatálise com solventes menos tóxicos, e dentre eles o acetato de etila forneceu rendimentos e excessos enantioméricos comparáveis as mesmas reações realizadas em solventes clorados. Então, as β -formilaziridinas foram utilizadas na síntese de hidantoínas reduzidas (**27a-g**) em duas etapas através da desproteção do grupo Boc seguida da anelação [3+2] com isocianatos. Os produtos **27a-g** mantiveram os excessos

enantioméricos do material de partida **26a-d** e foram obtidos com bons rendimentos (ESQUEMA 1.29).⁷⁴



ESQUEMA 1.29. Síntese de hidantoínas reduzidas partindo de β -formilaziridinas preparadas através de organocatálise.

As reações de aziridinação catalisadas por diarilprolinol silil éteres tem uma proposta de mecanismo semelhante às reações de epoxidação, em que a primeira etapa consiste na formação do íon imínio (**XVIII**) que sofre a adição – pela face menos impedida – do nitrogênio da amina *N*-protegida *O*-substituída resultando em na enamina **XIX**. O fechamento do anel promovido pelo ataque nucleofílico da enamina ao nitrogênio com carga positiva é auxiliado por uma base (nota-se experimentalmente que as reações podem ocorrer na ausência da base, entretanto necessita-se do aumento da temperatura da reação) e simultaneamente há a saída do grupo $-\text{OR}^1$, normalmente um sulfonil ou carbonato. A β -formilaziridina é então obtida após a hidrólise do imínio **XX** e conseqüente retorno do catalisador ao ciclo (ESQUEMA 1.30).^{70c}



ESQUEMA 1.30. Proposta de mecanismo para a reação de aziridinação organocatalisada.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho consistem na síntese de compostos peptidomiméticos contendo heterociclos de três membros e avaliação destes frente à inibição da catepsina L.

De maneira específica, buscou-se avaliar o emprego de metodologias de síntese enantiosseletiva para a obtenção de 2,3-epoxi-aldeídos e β -formilaziridinas utilizando o organocatalisador derivado da prolina, desenvolvido no nosso grupo de pesquisa, e então realizar a funcionalização direta dos aldeídos com os anéis epóxido ou aziridina nas reações multicomponentes de Passerini e Ugi, para a obtenção dos peptidomiméticos.

Tendo os compostos de interesse em mãos a atividade inibitória dos peptidomiméticos frente à catepsina L foi investigada, analisando relações de estrutura-atividade e determinando o modo de inibição das novas classes de compostos.

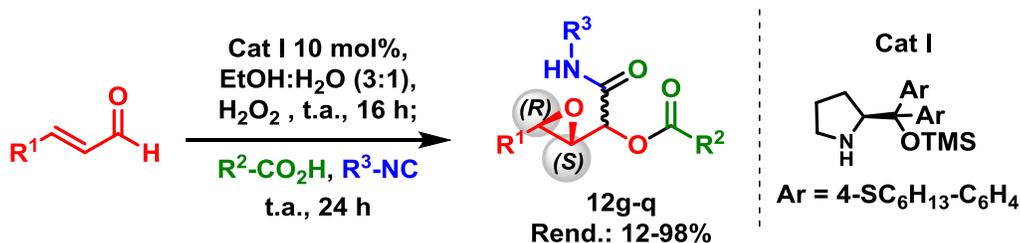
Em todas as etapas propôs-se aplicar metodologias de síntese mais sustentáveis, visando a utilização de solventes menos tóxicos, emprego de processos *one-pot*, evitando etapas de purificação e, conseqüentemente, diminuindo a geração de resíduos, e uso de organocatalisadores tornando as reações livre de metais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese das epoxi- α -aciloxicarboxamidas

Os processos sequenciais *one-pot* apresentam muitas vantagens em relação àqueles em que os intermediários são isolados em cada etapa reacional. Dentre as quais está a diminuição na quantidade de resíduos gerados, uma vez que etapas de purificação de intermediários não são necessárias, trazendo uma abordagem mais sustentável aos processos de síntese.^{40,35}

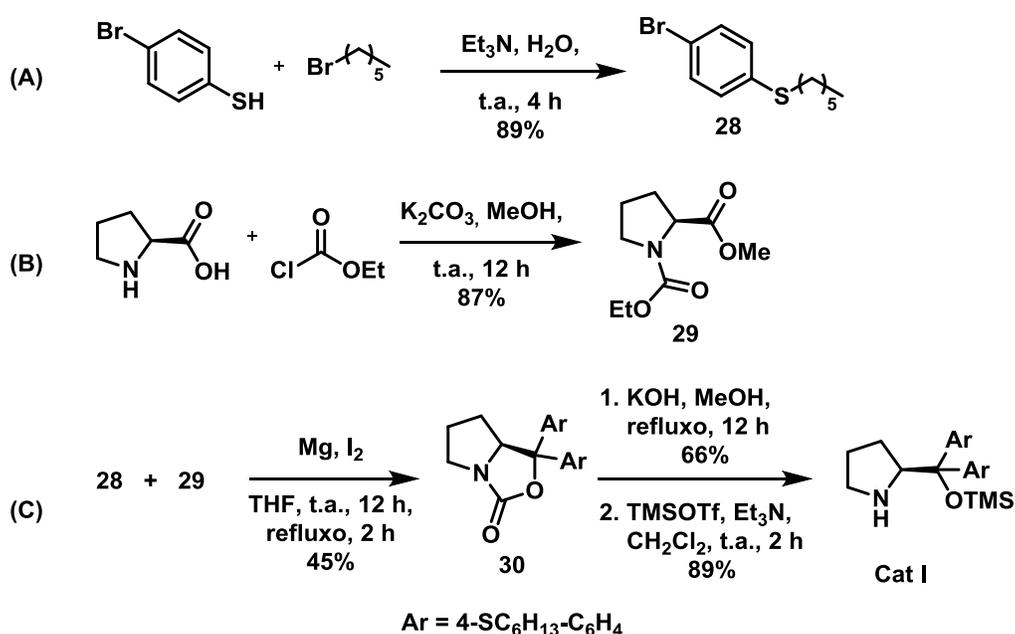
A combinação da aminocatálise com reações multicomponentes fornece uma grande diversidade de construção de novas estruturas.^{75,33c} Uma estratégia conveniente para a síntese de epóxidos altamente funcionalizados foi desenvolvida combinando uma reação de epoxidação organocatalisada e a reação de Passerini. Este processo *one-pot* foi realizado utilizando o organocatalisador **Cat I**, que apresentou uma excelente atividade em um sistema de solventes de baixa toxicidade e em um meio reacional livre de metais. Utilizando essa metodologia, as epoxi- α -aciloxicarboxamidas **12g-q** foram sintetizadas (ESQUEMA 3.1)⁴² e avaliadas frente às catepsinas K, V e L.



ESQUEMA 3.1. Reação *one-pot* de epoxidação/Passerini.

O organocatalisador foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita pelo grupo de pesquisa^{42,67} com algumas modificações. A primeira modificação foi realizada na etapa de alquilação do 4-bromotiofenol em que foi substituída a condição de K₂CO₃ em DMF para Et₃N em água. Apesar de haver um decréscimo no rendimento de 95% (DMF) para 89% (água), ele ainda se manteve alto (ESQUEMA 3.2A). A etapa de

esterificação e proteção da L-prolina *one-pot*, foi realizada de acordo com a metodologia descrita, com aumento de 10% no rendimento (ESQUEMA 3.2B).⁶⁷ A reação de Grignard do éster metílico da L-prolina *N*-protegida (**29**) com o brometo de arila (**28**) leva à formação do intermediário bicíclico **30** que após uma etapa de hidrólise do carbamato (o solvente foi modificado de DMSO para metanol) e proteção da hidroxila do aminoálcool, obtém-se o **Cat I** com um rendimento global (3 etapas) de 26% contra 80% relatado anteriormente (ESQUEMA 3.2C).



ESQUEMA 3.2. Síntese do organocatalisador **Cat I**.

Baseando-se nos resultados preliminares, neste trabalho a coleção de epoxi- α -aciloxicarboxamidas foi ampliada utilizando os blocos construtores mostrados na FIGURA 3.1. De maneira geral, a reação de Passerini é bastante tolerante à diferentes grupos substituintes em seus componentes, portanto procurou-se estudar melhor as limitações do escopo da epoxidação, como por exemplo, o emprego de aldeídos α,β -insaturados contendo: substituintes nas posições α e β (**31c**), que não foi avaliado anteriormente, apesar de serem descritas algumas limitações quanto ao uso desse tipo de substrato com organocatalisadores de aminas secundárias; e grupo heteroaromático

(**31d**) com a finalidade de ampliar o escopo de substratos empregados na reação de epoxidação com o **Cat I**. Os outros componentes da reação foram selecionados para promover algumas modificações estruturais para que se pudesse obter mais dados de relação estrutura-atividade desta classe de compostos frente à catepsina L.⁷⁶

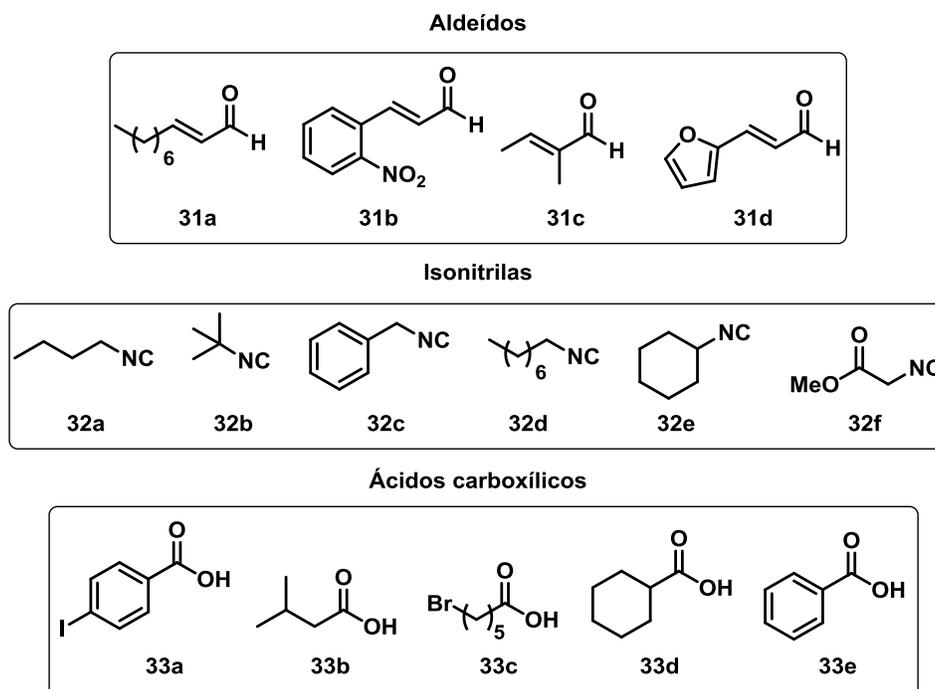


FIGURA 3.1. Blocos construtores utilizados na síntese da coleção das epoxi- α -aciloxicarboxamidas.

De maneira geral, as epoxi- α -aciloxicarboxamidas foram obtidas em rendimentos de moderados à excelentes (FIGURA 3.2), com exceção das reações com os aldeídos **31c** e **31d**, que não forneceram os produtos desejados, apenas uma mistura complexa de produtos. O emprego de um aldeído α,β -insaturado com um heterociclo aromático (2-furilacroleína, **31d**) não foi bem sucedido na reação sequencial, o que pode ser justificado pela baixa estabilidade deste aldeído, que se decompõe facilmente a temperatura ambiente. A limitação da reação empregando o aldeído tíglico (**31c**) provavelmente se encontra na formação do epóxido, uma vez que organocatalisadores de amina secundária costumam ser pouco eficientes quando utiliza-se um substrato mais

volumoso, como é o caso de enonas e enals α,β -dissubstituídos, o que também pode ser observado nas condições reacionais empregadas neste trabalho.

A reação de epoxidação assimétrica de aldeídos α,β -insaturados α,β -dissubstituídos foi descrita por List *et al.*^{66b} com a combinação do organocatalisador de amina primária derivado da cinchona com um ácido fosfórico quiral, no qual sugere-se que o mecanismo seja via íon imínio e o ácido fosfórico auxilie tanto na estabilização deste, como no fechamento do anel. Acroleínas α -substituídas foram empregadas como substrato em reações de epoxidação assimétrica por Hayashi *et al.*,⁶³ que utilizaram organocatalisadores do tipo diarilprolinolsilil éteres para a obtenção de epoxi-aldeídos α -substituídos- β,β -não-substituídos com bons rendimentos e excessos enantioméricos moderados.

Os produtos **12g** e **12k**, ambos com os mesmos epoxi-aldeído (derivado do **31a**) e ácido (**33a**), variando apenas a isonitrila (**32a** e **32b**, respectivamente) foram obtidos em excelentes rendimentos. De **12g-j** modificou-se apenas o componente ácido, em contraste com o excelente rendimento de **12g** nota-se que a reação na qual todos os componentes utilizados continham grupos alifáticos acíclicos (**31a**, **32a** e **33b**) forneceu o produto **12h** com o rendimento mais baixo, já não se observa um decréscimo tão pronunciado nos rendimentos de **12i** e **12j**, quando se utiliza os ácidos alifáticos substituído com bromo (**33c**) ou cíclico (**33d**), respectivamente. A modificação da isonitrila alifática **32a** presente em **12h**, para uma que possui um substituinte aromático (**32c**) teve como consequência a formação do produto **12i** com bom rendimento. Já quando o ácido ciclohexanocarboxílico (**33d**) foi empregado, os produtos **12j** e **12n** foram obtidos com bons rendimentos. Os compostos que tiveram como componente o ácido 6-bromo-1-hexanóico (**33c**) apresentaram rendimentos de bons a moderados (**12i**, **12m**, **12o** e **12p**). Comparando os compostos **12i**, **12m** e **12o** em que houve apenas modificação da isonitrila, observou-se que o composto **12o**, que possui o grupo cicloexil ligado ao nitrogênio da amida (proveniente da cicloexilisonitrila **32e**), apresentou o menor rendimento.

A síntese do aldeído **31b** resultou no produto com uma relação *trans/cis* de 85:15, como consequência da maior quantidade do *cis*-2-nitrocinaldeído, foi possível

observar quatro diastereoisômeros no produto **12p**, os dois majoritários referentes ao aduto de Passerini formado a partir do epóxido *trans* e os dois minoritários formados a partir do epóxido *cis*, a proporção de todos os diastereoisômeros foi de 42:40:12:6. Por fim, a utilização do metil isocianoacetato (**32f**) levou à formação do produto **12q** com baixo rendimento, o que pode ser explicado pelo fato de que esta isonitrila está mais propensa a sofrer reações colaterais, pois o carbono α isonitrila é ativado pelo carboxilato, como por exemplo com a reação com aldeídos formando oxazolinás;⁷⁷ de fato observou-se diversos produtos colaterais no meio reacional bruto, no entanto nenhum deles foi isolado em quantidade suficiente para caracterização (FIGURA 3.2).

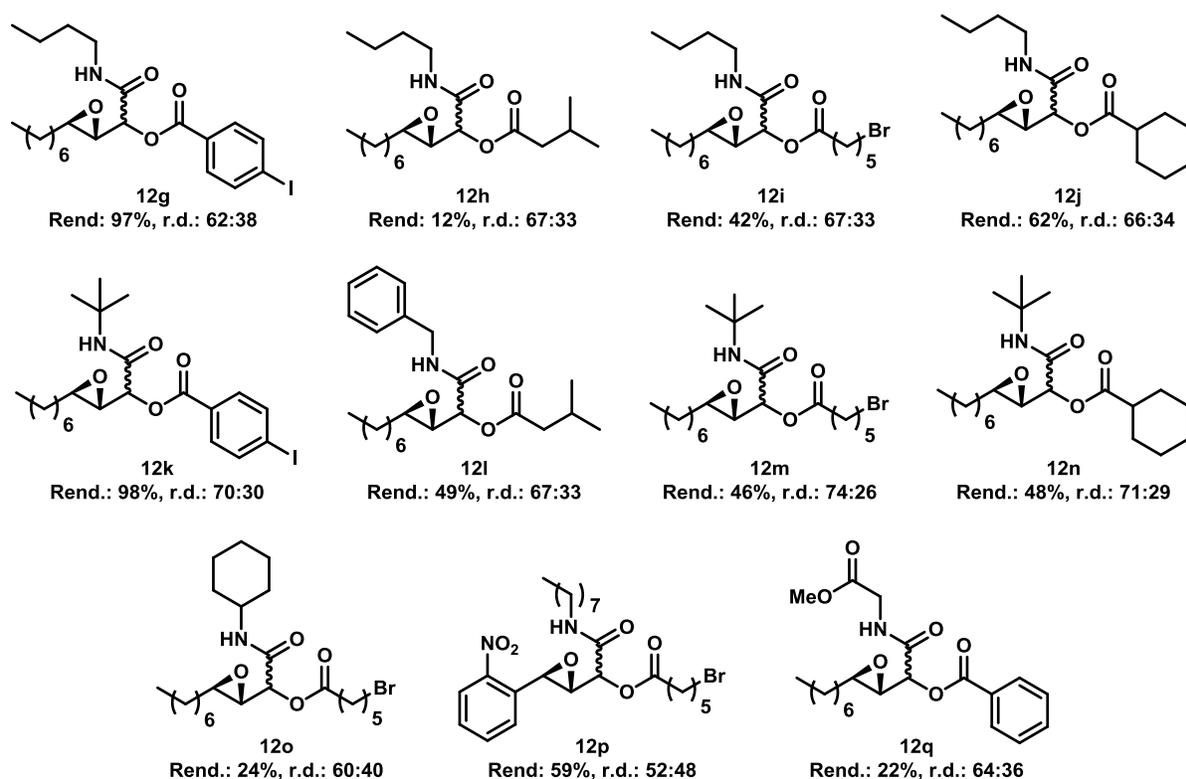


FIGURA 3.2. Coleção de epoxi- α -aciloxycarboxamidas sintetizada. A razão diastereoisomérica (r.d.) representa apenas os diastereoisômeros majoritários.

Todos os compostos foram obtidos com baixa diastereosseletividade. Embora a reação de epoxidação forneça o intermediário epoxi-aldeído com boas

diastereo- e enantiosseletividade, nas condições empregadas a reação de Passerini não ocorre com indução de assimetria. Krishna e Lopinti⁴⁶ estudaram a diastereosseletividade de reações de Passerini utilizando 2,3-epoxi-aldeídos assimétricos. Os autores demonstraram que *trans*-epoxi-aldeídos levam à um produto com a relação preferencialmente *syn* entre o epóxido e o novo centro assimétrico formado na reação de Passerini. De forma análoga, *cis*-epoxi-aldeídos formam preferencialmente adutos com relação *anti*. O modelo de indução proposto pelos autores (ESQUEMA 1.7) sugerem que quando a carbonila do aldeído é ativada pelo ácido carboxílico o oxigênio do epóxido também interage com o hidrogênio do ácido, então de acordo com a conformação assumida pelo intermediário ativado o ataque nucleofílico da isonitrila deve ocorrer mais facilmente pela face menos impedido da carbonila.

Neste trabalho, as condições reacionais foram diferentes das descritas por Krishna e Lopinti principalmente em relação ao solvente, eles usaram um solvente aprótico (CH₂Cl₂) enquanto que aqui foram utilizados solventes próticos (EtOH/H₂O) e isso pode proporcionar uma grande diferença na ativação do aldeído, uma vez que a aproximação do ácido carboxílico é menos favorável devido à solvatação, justificando a menor diastereosseletividade que foi observada para os adutos **12g-q**.

Os padrões racêmicos dos compostos **12g-q** foram submetidos às separações cromatográficas em CLAE acoplados com colunas quirais, entretanto não houve sucesso na separação dos compostos, pois devido aos três centros assimétricos presentes na molécula – levando à formação de oito enantiômeros no racemato – observou-se a co-eluição das bandas em diferentes condições e colunas (AD-H; AS-H e OD-H).

Os compostos **12g-q** foram analisados por espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C e estão em concordância com os dados obtidos previamente.⁴² Através dos espectros de RMN de ¹H é possível observar a presença de uma mistura de três diastereoisômeros, para os compostos em que o grupo ligado ao epóxido é alifático na região entre 4,7-5,3 ppm, onde são identificados 3 sinais distintos com valores de integração e constantes de acoplamento diferentes. Essa região de deslocamento químico é atribuída ao hidrogênio do centro assimétrico formado na reação de Passerini (H1), que, segundo a literatura,⁴⁶

quando apresentam uma relação *syn* (**12'**) com o hidrogênio do centro assimétrico vizinho (H2) são mais desblindados e possuem uma constante de acoplamento menor do que o mesmo hidrogênio do isômero *anti* (**12''**). Ainda pode-se considerar a formação em menor proporção do aduto de Passerini a partir do epóxido com configuração *cis* **12'''** (FIGURA 3.3).

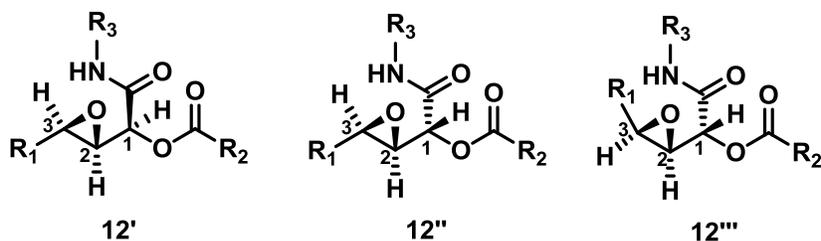
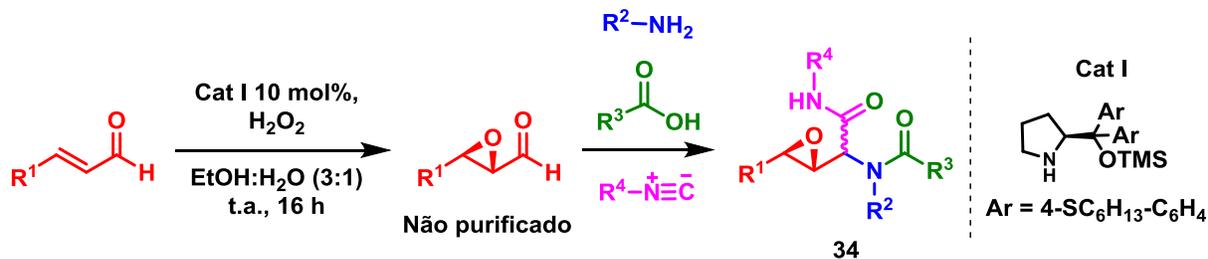


FIGURA 3.3. Configurações das epoxi- α -aciloxicarboxamidas observadas a partir dos dados de RMN ^1H .

3.2 Síntese das epoxi- α -acilaminocarboxamidas

Dando continuidade aos estudos sobre a funcionalização dos epoxi-aldeídos assimétricos preparados a partir da metodologia empregando organocatálise, já reportada pelo grupo,⁴² propôs-se a realização da reação de Ugi evitando a purificação do epoxi-aldeído a fim de se obter pseudo-dipeptídeos contendo o anel epóxido em poucas etapas reacionais de maneira sequencial (ESQUEMA 3.3).



ESQUEMA 3.3. Reação de epoxidação assimétrica seguida da reação multicomponente de Ugi.

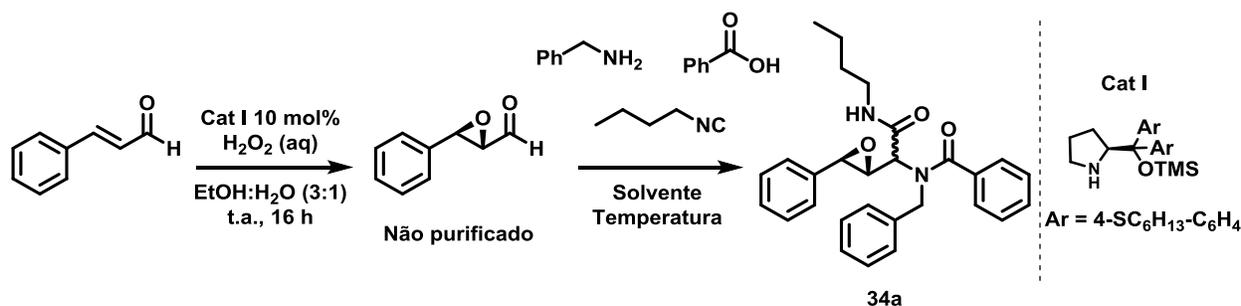
A otimização da reação de Ugi iniciou-se com o 2,3-epoxi-3-fenilpropanal,

benzilamina, ácido benzóico e *n*-butil-isonitrila (TABELA 3.1). A fim de diminuir etapas de purificação e gastos com solventes e sílica para a purificação de intermediários, houve a tentativa de se realizar ambas as etapas de maneira *one-pot*, e para a avaliação de outros solventes na reação de Ugi, o solvente da primeira etapa foi evaporado e o material bruto redissolvido para o prosseguimento da reação.

Tendo em vista que a reação de Ugi é amplamente descrita com o uso de solventes polares próticos,^{44,50} inicialmente, as reações foram realizadas de maneira *one-pot*, na tentativa de aplicar uma metodologia semelhante àquela realizada na reação epoxidação/Passerini. A temperatura ambiente, a reação se procedeu com 54% de rendimento (TABELA 3.1, entrada 1). Elevando a temperatura da reação para 60 °C, depois de 24 horas o produto **34a** foi isolado fornecendo 44% de rendimento (TABELA 3.1, entrada 2). No micro-ondas a reação foi testada a 100 °C por 40 min e observou-se a degradação dos produtos, então, diminuindo a temperatura e o tempo reacional para 80 °C e 30 minutos houve a formação de produto com 42% de rendimento (TABELA 3.1, entradas 3 e 4, respectivamente)

Um solvente alternativo, o 2,2-trifluoroetanol, foi testado, porém mesmo depois de 48 horas não houve formação do produto (TABELA 3.1, entrada 5). Quando a reação foi realizada em metanol à temperatura ambiente, notou-se que em 2 horas formou-se um precipitado, entretanto ainda era possível observar a presença dos materiais de partida, após 4 horas observou-se pela CCD o consumo total dos materiais de partida e o rendimento do produto isolado foi de 67% (TABELA 3.1, entrada 6). Na tentativa de aumentar o rendimento avaliou-se o efeito da pré-formação a imina através da adição apenas da benzilamina à solução de epoxi-aldeído, a mistura foi agitada por 1 hora e na sequência, os outros componentes foram adicionados e a reação se procedeu em 4 horas, contudo não houve acréscimo no rendimento (TABELA 3.1, entrada 7). A utilização de excesso de benzilamina (1,5 equiv.) também não levou ao aumento do rendimento (entrada 8). A reação realizada com metanol no micro-ondas não forneceu o produto desejado, apenas produtos de degradação (TABELA 3.1, entrada 9). Dessa forma, a partir dos dados da otimização, a melhor condição testada foi a entrada 6 (TABELA 3.1).

TABELA 3.1. Otimização da reação de Ugi.



Entrada	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo	Rend. (%) ^a
1 ^b	EtOH:H ₂ O (3:1)	t.a.	24 h	54
2 ^b	EtOH:H ₂ O (3:1)	60	24 h	44
3 ^{b,c}	EtOH:H ₂ O (3:1)	100	40 min	-
4 ^{b,c}	EtOH:H ₂ O (3:1)	80	30 min	42
5	TFE	t.a.	48 h	-
6	MeOH	t.a.	4 h	67
7 ^d	MeOH	t.a.	5 h	43
8 ^e	MeOH	t.a.	7 h	47
9 ^c	MeOH	80	30 min	-

^a Rendimento isolado. ^b Reação *one-pot*. ^c Reação realizada no micro-ondas. ^d Adicionou-se somente a amina, a mistura foi agitada por 1 hora então os outros componentes foram adicionados e reação de Ugi se procedeu em 4 horas. ^e 1,5 equiv. de amina.

As relações diastereoisoméricas (r.d.) foram determinadas por RMN ¹H do produto bruto, e observou-se que todas as variações nas condições reacionais da otimização resultaram numa r.d. com valores próximos (entre 6:4 e 7:3). Como foi possível separar os diastereoisômeros formados por cromatografia em coluna, os produtos puros foram analisados separadamente.

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C indicaram a formação do produto desejado. No espectro de RMN de ¹H de ambos os diastereoisômeros do composto **34a** (FIGURA 3.4), observa-se os sinais dos hidrogênios aromáticos na região entre 7,0-8.0 ppm (anéis A, B e C) e os hidrogênios alifáticos ligados aos carbonos C6, C7 como dois multipletos na região de 1,1-1,3 ppm e C8 como um tripleto em 0,8 ppm. Os sinais que mudam mais

significativamente os seus deslocamentos químicos dependendo dos diastereoisômeros são os hidrogênios H1, H2, H3, H5, H'10 e H''10.

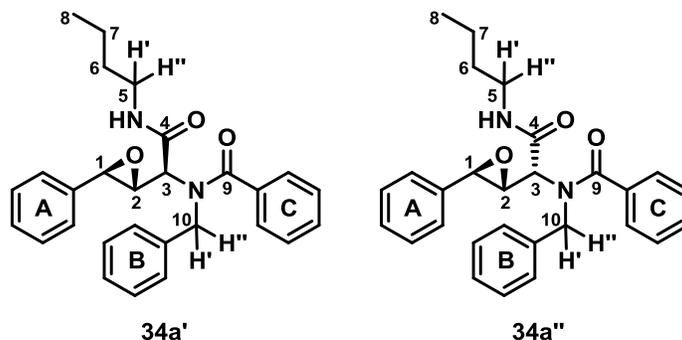


FIGURA 3.4. Diastereoisômeros observados para o composto **34a**.

Para o diastereoisômero majoritário de **34a**, os sinais de H1 e H2 apresentam deslocamento de 3,4 e 5,4 ppm, respectivamente, e constante de acoplamento (J) entre eles de 2,8 Hz. H3 apresenta um deslocamento de 5,2 ppm e $J = 4,1$ Hz, resultado do seu acoplamento com H2. Apesar de os hidrogênios H5 serem diastereotópicos, eles não apresentam separação dos sinais, e aparecem como um multiplete em 3,1 ppm. Já os hidrogênios H'10 e H''10, que também são diastereotópicos, se separam em 2 sinais (3,6 e 3,8 ppm) com uma constante de acoplamento elevada ($J = 12,6$ Hz), característico de acoplamento geminal (FIGURA 3.5).

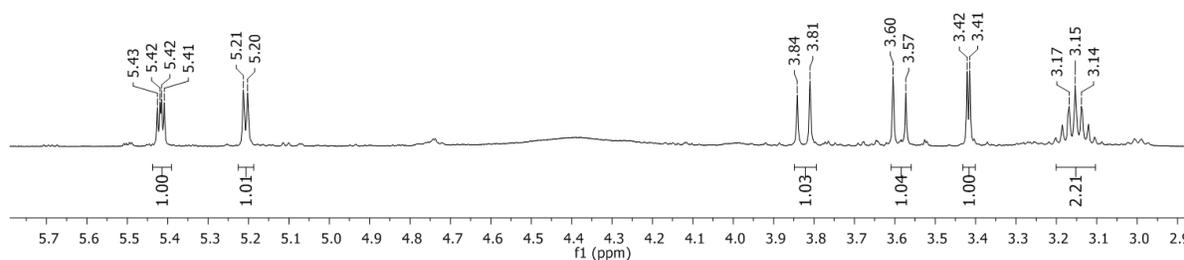


FIGURA 3.5. Expansão da região de 2,9-5,8 ppm mostrando os sinais característicos do diastereoisômero majoritário de **34a**.

O diastereoisômero minoritário de **34a** apresenta os sinais de H1 e H2 em 3,5 e 5,5 ppm, respectivamente, com o acoplamento entre eles de 2,2 Hz. O deslocamento de H3 é de 5,1 ppm e acopla com H2 a uma constante de 5,4 Hz. Neste diastereoisômero, H'5 e H''5 tem deslocamentos químicos diferentes, 3,3 e 3,2 ppm, sendo a multiplicidade um duplo tripleto (dt) com $J = 13,4$ e $6,9$ Hz para ambos, o maior valor corresponde ao acoplamento geminal e o menor ao vicinal. Novamente, os sinais H'10 e H''10 tem deslocamentos distintos, pois não são nem quimicamente, nem magneticamente equivalentes, apresentando $J = 13,1$ Hz. (FIGURA 3.6)

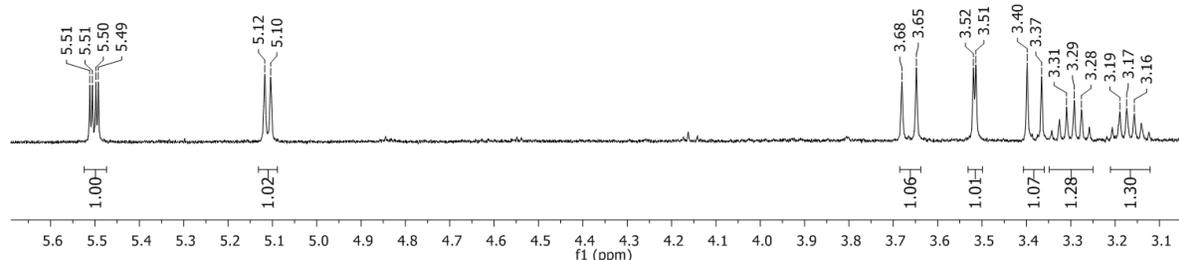


FIGURA 3.6. Expansão da região de 3,0-5,7 ppm mostrando os sinais característicos do diastereoisômero minoritário de **34a**.

Apenas o diastereoisômero majoritário de **34a** foi obtido como um sólido, algumas tentativas de cristalização para a realização de análises de raio-x foram realizadas, entretanto não se obteve sucesso. Comparando as constantes de acoplamento do sinal de H3 para ambos os diastereoisômeros, sugere-se que o diastereoisômero **34a'** com configuração relativa *syn* pode ser o diastereoisômero majoritário (H3 maj: δ 5,2 ppm; $J = 4,1$ Hz), pois apresenta uma constante de acoplamento menor que a do diastereoisômeros minoritário **34a''** (H3 min: δ 5,1 ppm; $J = 5,4$ Hz), que consequentemente pode ser atribuído como o diastereoisômero com configuração relativa *anti*. Neste caso vale ressaltar que este não é um método muito preciso para determinar a estereoquímica relativa do produto **34a**, pois a ligação entre C2 e C3 tem rotação livre, visto que diferenças mais significativas nos valores das constantes de

acoplamento são observadas em sistemas com conformação mais rígida como em compostos cíclicos saturados de seis membros, por exemplo. Estudos no sentido de se obter adutos cíclicos ou outras derivações devem ser realizados para elucidar a estereoquímica desta nova classe de compostos.

Nos espectros de RMN ^{13}C é possível observar as duas carboxilas (C4 e C9) de ambos os diastereoisômeros na região entre 160-170 ppm. Os carbonos dos anéis aromáticos estão localizados entre 125-142 ppm. Os sinais com deslocamento entre 10 e 40 ppm correspondem aos carbonos da cadeia alifática (C5-C8). O carbono benzílico (C10) tem o deslocamento de 52 ppm, típico de carbonos secundários. Por fim, os três sinais na região entre 60-80 ppm equivalem aos carbonos C1, C2 e C3.

Com o intuito de ampliar o escopo da reação sequencial de epoxidação/Ugi outros quatro exemplos foram sintetizados (**34b-e**). A fim de confirmar a necessidade de troca do solvente das etapas reacionais os produtos **34b** e **34c** foram preparados tanto pela condição ótima (TABELA 3.1, entrada 6) quanto de maneira *one-pot* (TABELA 3.1, entrada 1), uma vez que do ponto de vista operacional e ambiental os processos *one-pot* são mais vantajosos. Observou-se que a reação de Ugi quando realizada em metanol continuou fornecendo os melhores rendimentos, embora haja um decréscimo da relação diastereoisomérica (FIGURA 3.7).

Os padrões racêmicos dos compostos sintetizados foram submetidos à separação por HPLC e UPC² acoplado com colunas quirais (AD-H, AS-H, OD-H), entretanto houveram dificuldades na separação dos enantiômeros, observando-se coeluição das bandas, nas condições testadas com as colunas disponíveis.

A síntese de **34e** apresentou algumas limitações acerca do rendimento e seletividade; empregando a metodologia otimizada obteve-se apenas 17% de rendimento para o produto desejado e foi identificado o aduto de Passerini como produto colateral numa relação de 67:33 (Ugi:Passerini). Visando deslocar o equilíbrio de formação da imina, intermediário da primeira etapa da reação de Ugi, e conseqüentemente evitar a formação do aduto de Passerini, avaliou-se o aumento na quantidade de *t*-butilamina empregada na reação. Utilizando 1,5 equivalentes de amina a proporção Ugi:Passerini

aumentou para 83:17; já com o emprego de 2 equivalentes de *t*-butilamina obteve-se a razão Ugi:Passerini de 9:1, entretanto o rendimento isolado permaneceu baixo (FIGURA 3.7). A obtenção do aduto de Passerini como produto colateral, bem como o baixo rendimento observado para o produto **34e**, indicam que a formação da imina que deve ocorrer na primeira etapa da reação de Ugi não foi favorecida neste sistema. Experimentos com a adição de agentes secantes (peneira molecular 3Å ou sulfato de sódio anidro) para deslocar o equilíbrio de formação da imina através da retirada da água do meio reacional também não foram efetivos.

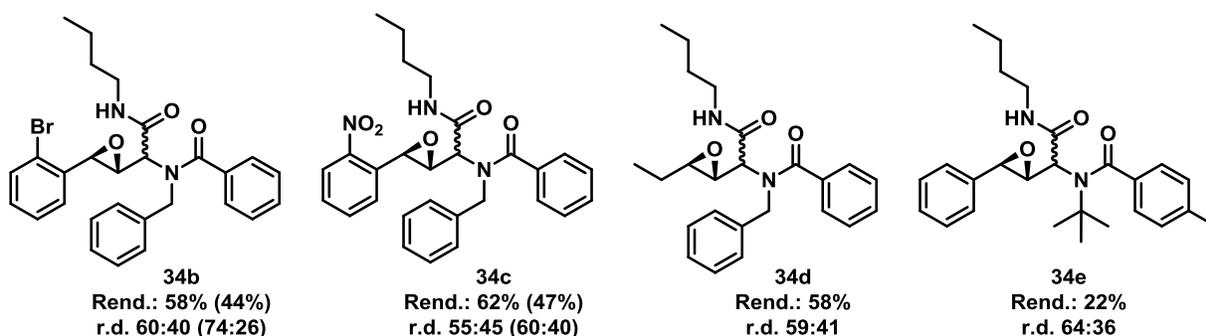
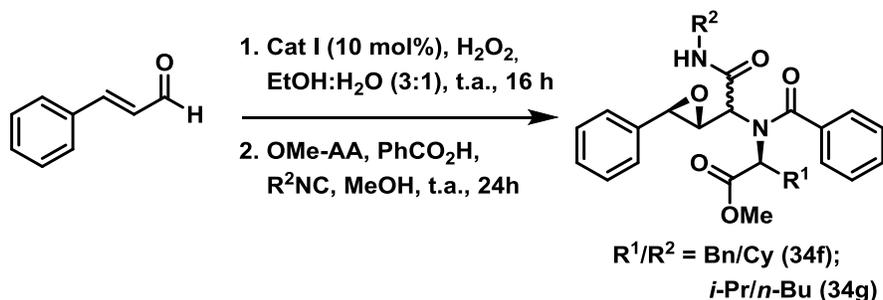


FIGURA 3.7. Epoxi- α -acilaminocarboxamidas (**34b-e**) sintetizadas empregando a metodologia otimizada; entre parênteses, rendimentos e r.d. das reações *one-pot*.

Aminas assimétricas mais impedidas estericamente foram empregadas no sentido de aumentar a diastereosseletividade do aduto de Ugi, para isso utilizou-se os ésteres metílicos da L-fenilalanina e L-valina. Observou-se pela análise de RMN ^1H do bruto reacional a formação de ambos os produtos **34f** e **34g**, entretanto observou-se que estes compostos são instáveis, pois mesmo após algumas etapas de purificação por cromatografia em coluna e em placa de CCD preparativa – incluindo a utilização de trietilamina no eluente –, as frações que continham o produto (analisadas imediatamente após o isolamento) apresentavam muitas impurezas, o que dificultou a caracterização e tornou inviável a avaliação biológica destes compostos, tendo em vista que não se pode garantir sua pureza ao longo dos experimentos (ESQUEMA 3.4).



ESQUEMA 3.4. Reação sequencial de epoxidação/Ugi com o emprego de ésteres de aminoácidos.

3.3 Síntese das aziridina- α -aciloxicarboxamidas

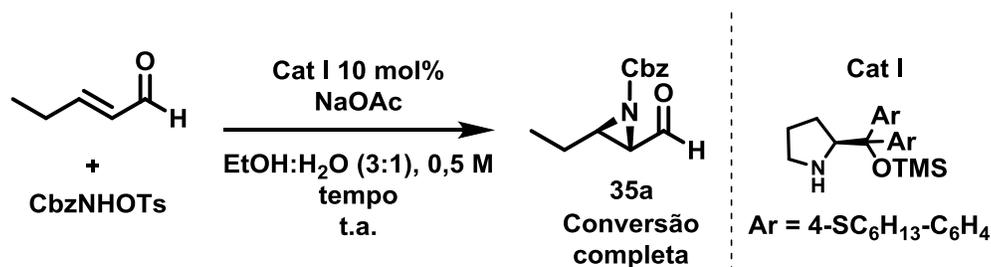
A síntese de β -formil-aziridinas *N*-protegidas assimétricas é descrita na literatura com o emprego de organocatalisadores derivados da prolina com rendimentos de moderados a bons e com excelentes diastereo- e enantiosseletividade.^{78,70} No entanto, essas metodologias possuem desvantagens como a utilização de solventes clorados e grandes excessos de base. Recentemente nosso grupo de pesquisa estudou a substituição do solvente da metodologia descrita por Córdova *et al.*,^{70c} e o acetato de etila se apresentou como um substituto viável para a reação de aziridinação com o catalisador de Hayashi-Jørgensen uma vez que os rendimentos, diastereo- e enantiosseletividade foram mantidos com a vantagem da utilização de um solvente menos tóxico.⁷⁴

Neste trabalho, foi avaliado o uso do organocatalisador **I** desenvolvido no nosso grupo de pesquisa na síntese de β -formil-aziridinas para posterior aplicação na reação multicomponente de Passerini. O **Cat I** apresenta a vantagem de poder ser empregado em meio aquoso apresentando bons rendimentos e excessos enantioméricos, como demonstrado anteriormente.^{42,67}

Nas reações de aziridinação de aldeídos α,β -insaturados com organocatalisadores derivados da prolina tem sido utilizadas como fonte de nitrogênio hidroxilaminas *N*-protegidas (Boc, Cbz, tosil) e *O*-substituídas (tosil, acetil, mesil, dentre outros).^{70,78} Neste trabalho foram escolhidas a *N*-Boc-*O*-tosil-hidroxilamina e a *N*-Cbz-*O*-tosil-hidroxilamina.

A partir do que é reportado na literatura,⁷⁰ avaliou-se inicialmente o uso do acetato de sódio como base na reação entre o 2-*trans*-pentenal e a CbzNHOTs, bem como o sistema de solvente no qual o catalisador avaliado apresentou sua melhor atividade anteriormente (etanol/água 3:1). O emprego de excesso de base (TABELA 3.2, Entrada 1) fez com que a reação se procedesse muito rapidamente, com o consumo total de CbzNHOTs em apenas 1 minuto de reação, o que pode estar relacionado a alta solubilidade da base no meio reacional, podendo levar à baixa diastereosseletividade da reação. Em meio não aquoso o excesso de base se justifica pela sua baixa solubilidade. A utilização de apenas 1 equivalente do NaOAc levou à conversão completa dos materiais de partida em 30 minutos e também uma melhora significativa na relação diastereoisomérica (TABELA 3.2, Entrada 2). A redução da quantidade da base para 0,5 equivalente não resultou na conversão total da amina, além disso após 3 horas observou-se a degradação do produto que havia sido formado (TABELA 3.2, Entrada 3), ressaltando a necessidade de no mínimo 1 equivalente de base para que a reação ocorra de forma eficiente.

TABELA 3.2. Estudo de otimização da reação de aziridinação organocatalisada.



Entrada	NaOAc (equiv.)	Tempo (min)	r.d. ^a
1	2,0	1	70:30
2	1,0	30	85:15
3	0,5	180	-

^a Relação diastereoisomérica determinada por RMN de ¹H do bruto da reação.

A fim de se determinar os rendimentos isolados, bem como os excessos enantioméricos dos produtos obtidos houve a tentativa de reduzir o grupo aldeído com NaBH₄ para a formação da aziridina-álcool correspondente, uma vez que ela é descrita⁷⁰

como sendo mais estável do que o aldeído e menos propensa a sofrer epimerização. Entretanto, não se obteve a aziridina-álcool, apenas produtos de degradação.

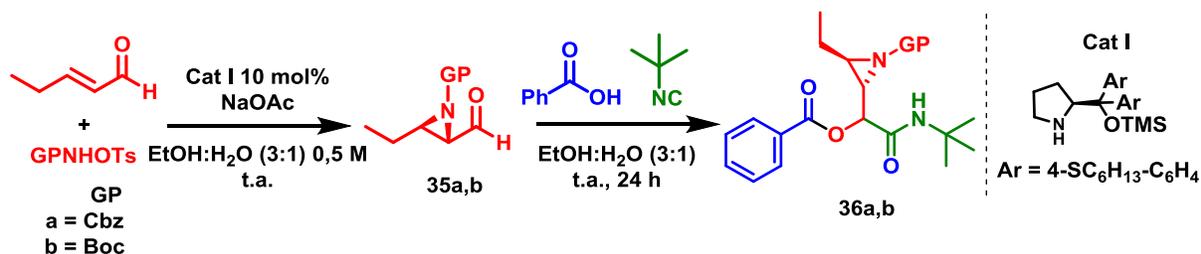
A funcionalização das β -formil-aziridinas normalmente envolve etapas de desproteção seguidas de abertura do anel. A desproteção das β -formil-aziridinas leva a formação de dímeros⁷⁹ que tiveram sua reatividade explorada em diversas transformações, incluindo reações multicomponentes de Petasis,⁸⁰ borano-Mannich⁸¹ e Ugi.⁸²

A limitação relacionada à derivatização das β -formil-aziridinas *N*-protegidas nos conduziu ao estudo da funcionalização direta do intermediário **35a** através da reação de Passerini sem que houvesse a desproteção da aziridina.

Inicialmente, a aplicação da β -formil-aziridinas **35a** preparada a partir da metodologia mostrada na TABELA 3.2 (entrada 2) foi planejada na reação de Passerini. Analisando os subprodutos que são formados na reação de aziridinação observou-se que a utilização do acetato de sódio leva à formação de ácido acético, que por sua vez interferiria na reação de Passerini, desta forma não seria viável realizar as duas reações de maneira *one-pot*. Para contornar essa questão, o intermediário foi extraído da primeira etapa, redissolvido em etanol/água e então os outros componentes da reação de Passerini foram adicionados e o produto desejado foi obtido com bons rendimentos em duas etapas para os dois grupos protetores avaliados (TABELA 3.3, entradas 1 e 2).

Uma vez que a reação com o Boc como grupo protetor (TABELA 3.3, Entrada 2) forneceu o melhor rendimento e diastereosseletividade, a otimização foi continuada para o composto **36b**. Com o intuito de aumentar o excesso enantiomérico do produto **36b**, realizou-se a reação a temperatura de 4 °C, e foi observado que a reação de aziridinação demorou mais tempo para se completar, além disso houve decréscimo do rendimento e excesso enantiomérico (TABELA 3.3, entrada 3). O aumento da diluição do meio reacional também foi avaliado, todo o material de partida da primeira etapa foi consumido em duas horas de reação, entretanto o tempo reacional mais longo acarretou na diminuição do rendimento e excesso enantiomérico de forma ainda mais pronunciada (TABELA 3.3, entrada 4).

TABELA 3.3. Avaliação da reação sequencial de aziridinação/Passerini.

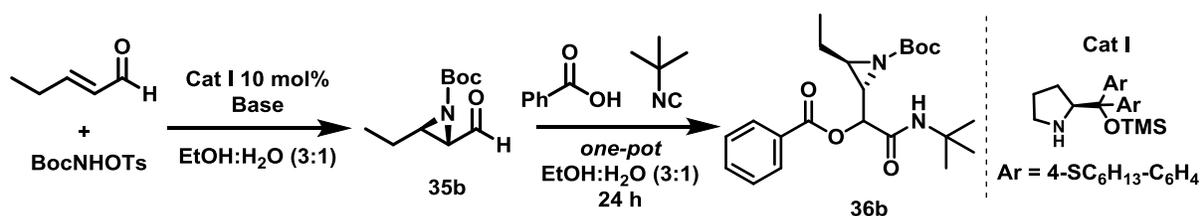


Entrada	GP	Tempo (etapa 1, min)	Rend. (%) ^a	r.d. ^b	ee ^c (%)
1 ^d	Cbz	30	42	50:33:17	nd
2 ^d	Boc	40	65	61:22:17	94
3 ^e	Boc	120	58	61:21:18	90
4 ^f	Boc	120	44	57:28:15	88

^a Rendimento isolado. ^b Determinado por RMN de ¹H do bruto da reação. ^c Determinado por UPC² quiral do diastereoisômero majoritário. ^d A β-formil-aziridinas foi extraída com AcOEt e então redissolvida em etanol/água para o prosseguimento da reação. ^e reação realizada a 4 °C. ^f concentração da mistura reacional: 0,25 M.

Para que a síntese do produto **36b** pudesse ser realizada de maneira *one-pot* modificou-se a base utilizada na primeira etapa, levando-se em consideração o ácido que é formado como subproduto da reação. O uso do bicarbonato de sódio possibilitou a realização da reação *one-pot* – uma vez que o ácido carbônico formado se decompõe em CO₂ e água – observando-se um pequeno decréscimo no rendimento, diastereo- e enantiosseletividade (TABELA 3.4, entrada 1) quando comparado à reação com acetato de sódio, em que o intermediário **35b** foi isolado da primeira etapa (TABELA 3.4, entrada 3). A utilização de carbonato de sódio, que também vai levar à formação de ácido carbônico, proporcionou a diminuição na quantidade de base para 0,5 equivalente, fornecendo o produto com 67% de rendimento, entretanto houve novamente diminuição no excesso enantiomérico (TABELA 3.4, entrada 2). Outros carbonatos (K₂CO₃ e Cs₂CO₃) foram avaliados, no entanto os rendimentos e excessos enantioméricos foram inferiores ao da reação empregando carbonato de sódio (TABELA 3.4, entradas 3 e 4).

TABELA 3.4. Otimização da reação sequencial *one-pot* de aziridinação-Passerini.



Entrada	Base (equiv.)	Temp. (°C)	Tempo (etapa 1/etapa 2)	Rend. (%) ^a	r.d. ^b	ee ^c (%)
1	NaHCO ₃ (1,0)	t.a.	40 min/24 h	51	55:28:16	92
2	Na₂CO₃ (0,5)	t.a.	40 min/24 h	67	59:27:14	90
3	K ₂ CO ₃ (0,5)	t.a.	40 min/24 h	48	61:26:13	70
4	Cs ₂ CO ₃ (0,5)	t.a.	40 min/24 h	44	59:27:14	64
5	Na ₂ CO ₃ (0,5)	-10	4,6 h/40 h	48	60:26:14	92
6 ^e	Na ₂ CO ₃ (0,5)	t.a.	40 min/24 h	40	63:27:10	56
7 ^f	Na ₂ CO ₃ (0,5)	t.a.	2 h/24 h	45	56:31:13	76
8 ^g	Na ₂ CO ₃ (0,5)	t.a.	4 h/24 h	59	57:28:15	74

^a Rendimento isolado. ^b Determinado por RMN de ¹H do bruto da reação. ^c Determinado por UPC² do diastereoisômero majoritário utilizando colunas quirais. ^e 5 mol% de catalisador. ^f Solvente da reação Etanol:H₂O (9:1). ^g Solvente da reação EtOH.

Visando melhorar a enantiosseletividade do produto **36b** – mantendo o carbonato de sódio como base para promover a reação de aziridinação – reações com temperatura mais baixa e diminuição da quantidade de catalisador foram realizadas (TABELA 3.4, entradas 5 e 6, respectivamente). Na entrada 5 não se observou melhoras significativas em ambas diastereosseletividade e excesso enantiomérico, além de haver diminuição do rendimento e o aumento do tempo reacional. Na entrada 6 houve um aumento da relação diastereoisomérica, no entanto houve decaimento do rendimento. O efeito da quantidade de água no solvente da reação foi investigado. Diminuindo a proporção de água em relação ao etanol para 10% (TABELA 3.4, entrada 7), observou-se aumento do tempo reacional para a formação do intermediário **35b**, além da diminuição tanto no rendimento como na diastereo- e enantiosseletividade da reação. A reação realizada apenas com etanol como solvente também aumentou o tempo da primeira etapa e não proporcionou melhora de rendimento e seletividade (TABELA

3.4, entrada 8). Estes últimos experimentos confirmaram que o sistema em que o catalisador apresenta sua melhor atividade é com etanol e água numa proporção de 3:1.

A partir dos estudos de otimização, escolheu-se a entrada 2 (TABELA 3.4) como condição ótima, pois esta apresentou o melhor rendimento e boas diastereo- e enantiosseletividade. Ademais nesta condição reacional foi possível executar as reações de maneira *one-pot*, obtendo-se um produto altamente funcionalizado sem a necessidade de isolar o intermediário **35b**, que neste caso, é bastante instável e propenso à abertura da aziridina ou epimerização quando o mesmo é purificado por cromatografia em sílica.

O composto **36b** foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{13}C e a partir da análise produto bruto da reação foi possível identificar três diastereoisômeros. Através das constantes de acoplamento e levando em consideração a seletividade da reação pode-se inferir que dois dos diastereoisômeros majoritários vem da aziridina *trans* com o grupo carboxamida numa relação *sin* ou *anti* à aziridina (**36b'** e **36b''**, FIGURA 3.8). Em menor quantidade observa-se aduto de Passerini proveniente da aziridina *cis* (**36b'''**, FIGURA 3.8).

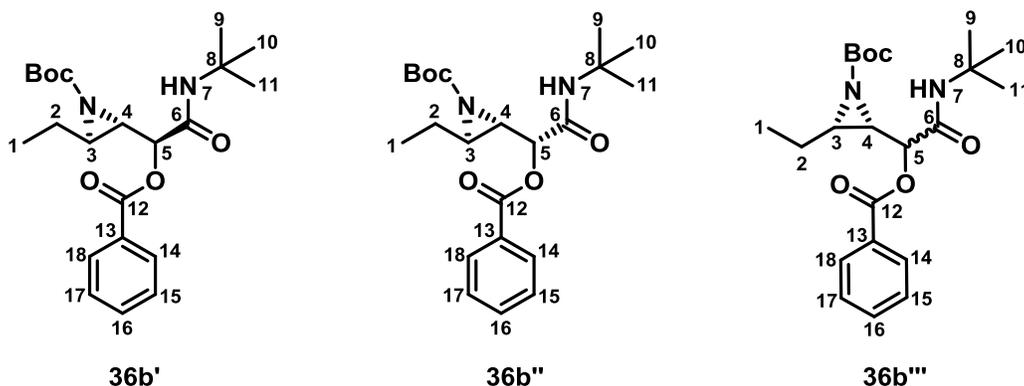


FIGURA 3.8. Diastereoisômeros identificados a partir da mistura reacional bruta.

Por cromatografia em coluna obteve-se duas frações com o produto **36b**, na primeira observou-se a presença de dois diastereoisômeros, o majoritário e o minoritário *cis* (**36b'''**), e na segunda fração obteve-se apenas o minoritário *trans*. A partir dos espectros de RMN ^1H de todos os componentes da mistura identificou-se os cinco

hidrogênios aromáticos entre 7,40 e 8,10 ppm. Na região dos hidrogênios alifáticos os sinais referentes aos 9 hidrogênios dos dois grupos *terc*-butil presentes em **36b** são observados como dois singletos com deslocamentos entre 1,35 e 1,50 ppm; os hidrogênios do grupo etil ligado à aziridina com dois multipletos em aproximadamente 1,80 e 1,20 ppm e um tripleto referente aos hidrogênios metílicos H1 em 1,05 ppm.

Pode-se diferenciar com mais clareza os diastereoisômeros a partir dos sinais dos hidrogênios H3, H4 e H5. Para o diastereoisômero majoritário observa-se os sinais dos hidrogênios da aziridina como um duplo duplo dubleto ($J = 3,1; 5,1; 8,0$ Hz) em 2,56 ppm referente ao hidrogênio H3 que acopla com H4 e com os hidrogênios diastereotópicos de C2. O hidrogênio H4 apresenta um deslocamento de 2,71 ppm e observa-se o seu acoplamento H3 e H5 ($J = 3,2; 6,5$ Hz). Atribui-se o dubleto ($J = 6,5$ Hz) em 5,04 ppm ao hidrogênio H5 que acopla com H4. O diastereoisômero minoritário *trans* apresenta os sinais com as mesmas multiplicidades e valores de constante de acoplamento próximas, porém houve diferenças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios H3, H4 e H5 (2,54; 2,78 e 5,08 ppm respectivamente).

Os excessos enantioméricos dos diastereoisômeros majoritários foram determinados por cromatografia de convergência de ultra pressão (UPC²) acoplada com colunas de fase estacionária quiral. O diastereoisômero majoritário do composto **36b** foi isolado juntamente com o diastereoisômeros minoritário **36b''**, de modo que o cromatograma do padrão racêmico apresentou quatro bandas distintas, que correspondem à cada um dos enantiômeros presentes na mistura (FIGURA 3.9.). Para os produtos obtidos na presença do organocatalisador **Cat I** os excessos enantioméricos foram medidos a partir da diferença dos valores de integração das bandas identificadas para os enantiômeros do diastereoisômero majoritário (t_R (minor) = 8,147 min; t_R (major) = 10,801 min) (FIGURA 3.10).

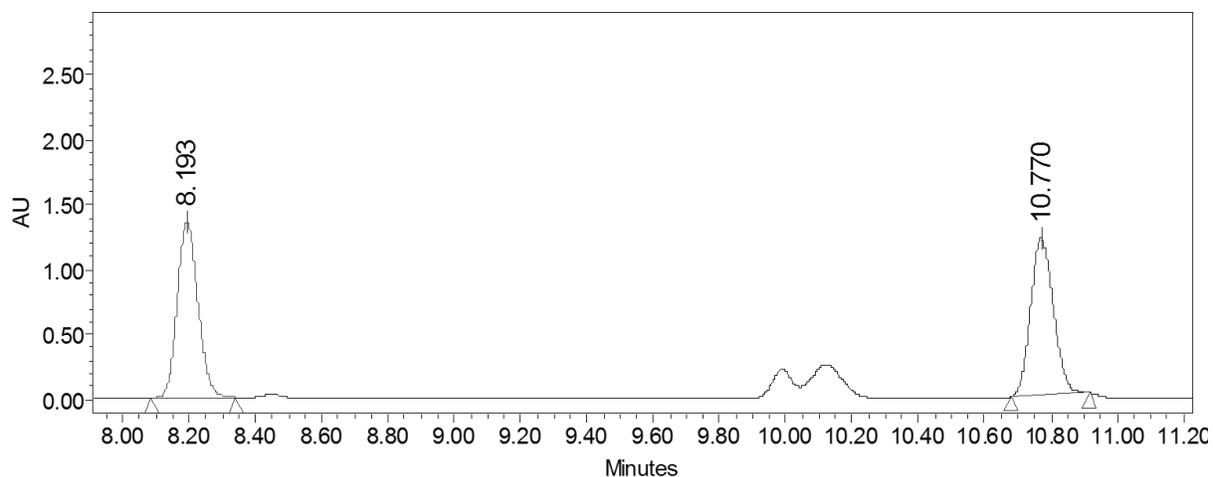


FIGURA 3.9. Cromatograma do padrão racêmico do composto **36b**.

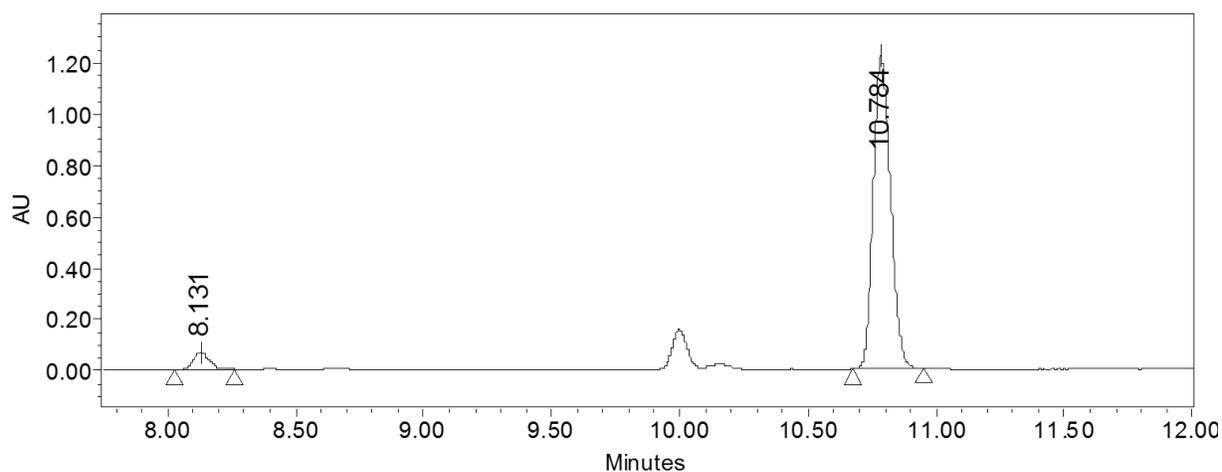


FIGURA 3.10. Cromatograma do composto **36b** assimétrico (TABELA 3.4, Entrada 2)

A ampliação do escopo reacional foi avaliada utilizando diferentes grupos em todos os componentes da reação e os rendimentos variaram de moderados a bons (FIGURA 3.11). O composto **36a** foi preparado na condição reacional ótima, o rendimento não se modificou, entretanto, observou-se diminuição da relação diastereoisomérica. O emprego de um aldeído de cadeia alifática mais longa forneceu o intermediário para a reação de Passerini levando ao produto **36c** com bom rendimento para as duas etapas. A utilização do ácido 3-metoxibenzoico levou à formação do produto desejado (**36d**) com rendimento moderado. No entanto, na reação de Passerini com o ácido 4-nitrobenzoico

não se obteve o produto **36e**; mesmo com os valores próximos de pKa do ácido 4-nitrobenzóico e do ácido 3,5-bis(trifluorometil)benzóico (3,44 e 3,34, respectivamente), apenas o produto **36c** foi obtido com um bom rendimento. Os resultados obtidos até o momento não são suficientes para permitir que se façam correlações consistentes acerca da reatividade e compatibilidade dos componentes reacionais para poder justificar porque não houve a formação de **36e**.

A reação de aziridinação com derivados do cinamaldeído costuma apresentar algumas limitações com o emprego de excesso de base no meio reacional, observa-se que a base promove a abertura do anel; uma vez que na condição reacional ótima deste estudo utiliza-se uma quantidade equivalente de base e amina, supôs-se que a utilização de derivados de cinamaldeído seria menos problemática. Para o composto **36f** a etapa de aziridinação foi acompanhada até que houvesse consumo de todo o reagente limitante (BocNHOTs) e então os demais reagentes para realizar a reação de Passerini foram adicionados. A análise da mistura reacional bruta – após o término da reação – por RMN ¹H mostrou uma mistura contendo uma pequena quantidade do produto **36f**, além de subprodutos e do aldeído de partida. Então, o produto bruto da reação foi purificado por cromatografia em coluna, e o composto **36f** foi isolado em quantidade insuficiente para realizar as análises de caracterização e o ensaio enzimático. Um dos subprodutos identificados foi o aduto de Passerini formado a partir do 2-nitrocinaldeído. Dessa forma, estudos complementares sobre a aziridinação dos derivados de cinamaldeído devem ser realizados para que o produto desejado seja obtido com melhores rendimentos.

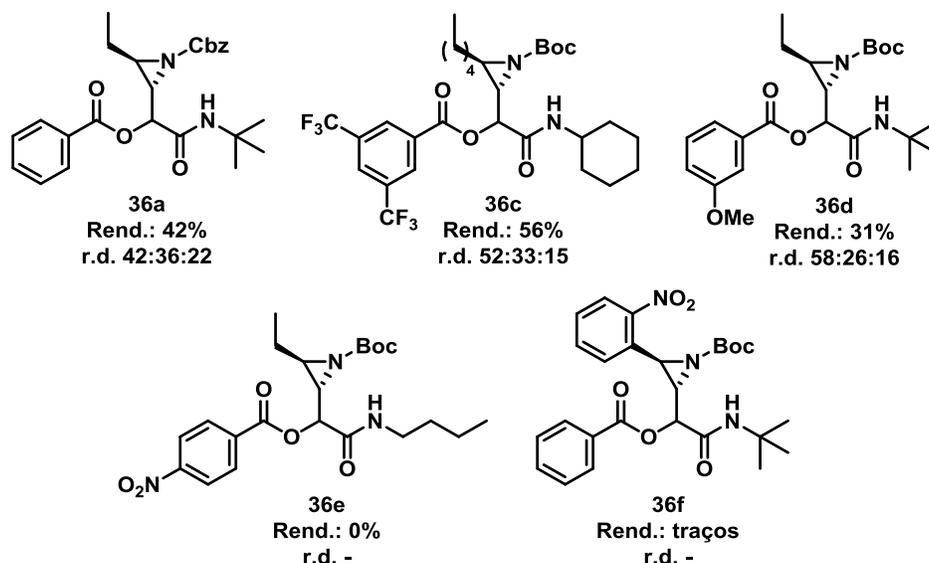
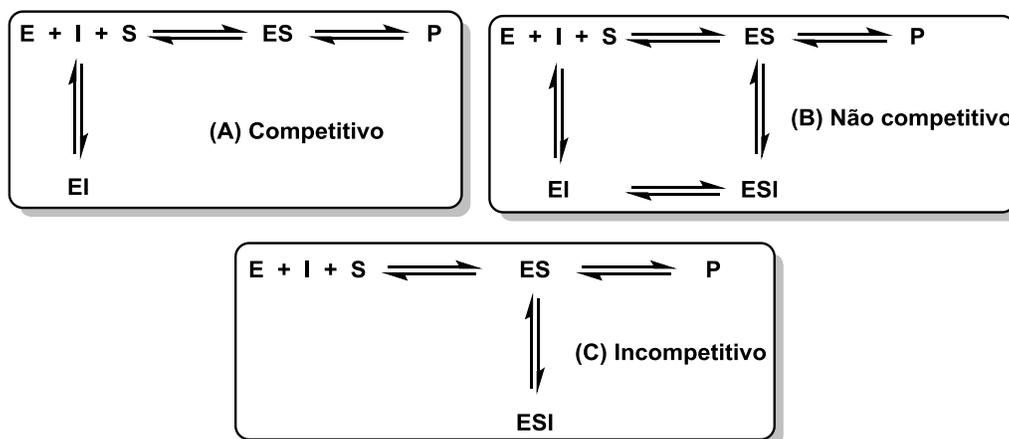


FIGURA 3.11. Aziridina- α -aciloxycarboxamidas sintetizadas a partir da metodologia *one-pot* desenvolvida para a reação de aziridinação/Passerini.

3.4 Ensaios de inibição frente à catepsina L

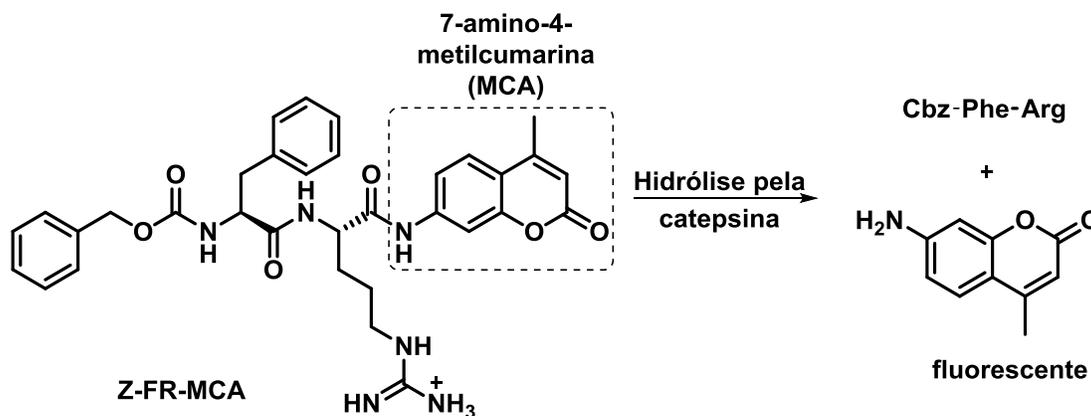
Conforme discutido anteriormente, inibidores de cisteíno proteases contendo anéis epóxidos ou aziridinas em geral se ligam irreversivelmente à enzima. No entanto, modificações estruturais, incluindo na estereoquímica do anel heterocíclico de três membros, podem causar alterações significativas no mecanismo de inibição (FIGURA 1.4).

A inibição reversível, em contraste com a inibição irreversível, é caracterizada por uma rápida dissociação do complexo enzima-inibidor. O modo com que o inibidor interfere na reação enzimática pode ser competitivo, não-competitivo ou incompetitivo. Para a inibição competitiva, o inibidor (I) irá competir pelo sítio ativo da enzima (E) com o seu substrato natural (S) (ESQUEMA 3.5A). Já no modo de inibição não-competitivo, o inibidor se liga à um sítio alostérico da enzima e tem afinidade tanto pela enzima livre quanto pelo complexo enzima-substrato (ES) (ESQUEMA 3.5B). No mecanismo de inibição incompetitivo o inibidor tem afinidade apenas pelo complexo ES (ESQUEMA 3.5C).⁸³



ESQUEMA 3.5. Diferentes modos de inibição num mecanismo reversível.

A metodologia empregada para determinar a inibição dos compostos sintetizados frente à catepsina L é amplamente descrita na literatura para as cisteíno proteases.^{27,84} Trata-se de um ensaio em solução, no qual mede-se a fluorescência da 7-amino-4-metilcumarina, que é um dos produtos da hidrólise do substrato Z-FR-MCA (Z-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina) promovida pela catepsina L (ESQUEMA 3.6). A solução reacional contém: o inibidor, a enzima (ativada no pH adequado) e o substrato. O aumento da fluorescência é proporcional à concentração do produto formado, portanto se um determinado composto inibe a catepsina L o que se observa é a diminuição da fluorescência em relação a um experimento controle, em que não se adiciona o inibidor.



ESQUEMA 3.6. Reação de hidrólise do substrato Z-FR-MCA catalisada por proteases.

Os dados obtidos através das medidas de fluorescência apresentam-se em unidade de fluorescência relativa (RFU, do inglês *Relative Fluorescence Units*). A resposta dos ensaios também pode ser expressada por $V_{\text{máx}}$, que representa a inclinação da curva de RFU em relação ao tempo, deste modo, existe uma relação proporcional de $V_{\text{máx}}$ com o aumento da fluorescência. Por sua vez, as porcentagens de inibição são calculadas comparando os valores de $V_{\text{máx}}$ obtidos para um determinado inibidor (v_i) em relação ao experimento em que a concentração de inibidor é igual a zero (v_0) (eq. 1).

$$\%Inibição = \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right) \times 100 \quad \text{eq. 1}$$

3.4.1 Avaliação das epoxi- α -aciloxicarboxamidas

A nova coleção de epoxi- α -aciloxicarboxamidas (**LSPN428-438**) teve a sua atividade avaliada frente à catepsina L através do ensaio em solução. A triagem foi realizada a fim de se determinar o percentual de inibição de cada composto a uma concentração de 25 μM (em DMSO) frente à catepsina L por meio da medida contínua da hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA (FIGURA 3.12).

Analisando as relações de estrutura-atividade pode-se inferir que os compostos que apresentam maiores atividades apresentam duas cadeias alquílicas e um anel aromático substituído em sua estrutura, como nos compostos **LSPN423**, **428** e **437**. A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que, com exceção do composto **LSPN434**, todos aqueles que possuem um átomo de halogênio em sua estrutura apresentaram de forma geral alguma atividade inibitória. Já os compostos **LSPN431** e **LSPN433**, mesmo sem nenhum átomo de halogênio nas cadeias laterais, inibiram parcialmente a catepsina L, com destaque para o composto **LSPN431** com 70% de inibição (FIGURA 3.12).

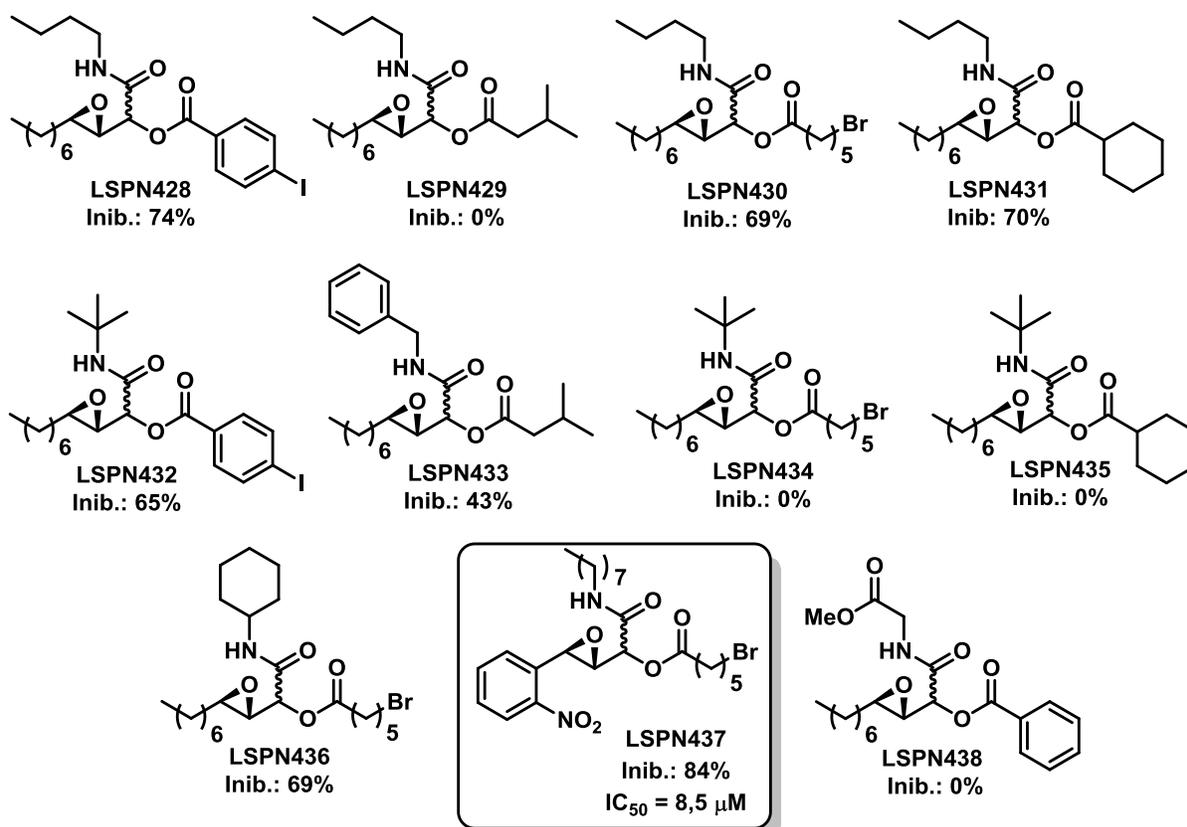


FIGURA 3.12: Porcentagem de inibição das epoxi- α -aciloxycarboxamidas (a 25 μ M) frente à catepsina L.

Após a triagem, foram selecionados os compostos com inibição acima de 80% para a determinação do IC_{50} . Neste experimento, varia-se apenas a concentração do inibidor, então a partir da equação da curva obtida calcula-se o ponto no qual o composto inibe 50% da enzima (eq. 2). Da primeira série de epoxi- α -aciloxycarboxamidas (**LSPN422-427**, TABELA 1.1) foi selecionado o composto **LSPN423**, que apresentou um valor de $IC_{50} = 5,36 \pm 1,62 \mu M$. Da nova coleção (FIGURA 3.12), o composto **LSPN437** foi avaliado apresentando $IC_{50} = 8,55 \pm 1,45 \mu M$.

$$\%Inibição = \frac{100}{1 + \frac{IC_{50}}{[I]}} \quad \text{eq. 2}$$

Uma vez que o composto **LSPN423** foi o inibidor desta classe mais potente frente à catepsina L, os estudos acerca da determinação do mecanismo de inibição

prossegiram utilizando este composto. Inicialmente, o teste de reversibilidade do composto **LSPN423** foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Copeland,⁸³ no qual mede-se a recuperação da atividade catalítica de uma enzima após uma grande e rápida diluição do complexo enzima-inibidor (EI). O ensaio foi realizado utilizando o DMSO como controle positivo e o composto E-64, inibidor irreversível, como controle negativo. Os dados obtidos a partir deste experimento são plotados em curvas de progresso – resposta do ensaio (em unidade de fluorescência relativa) vs. tempo –, nas quais quanto maior a inclinação da curva, mais rápida é a recuperação da atividade catalítica da enzima. Comparando as curvas de progresso dos controles positivo e negativo com a curva do composto **LSPN423** observa-se que o mesmo apresenta o comportamento de um inibidor reversível não-clássico, uma vez que a recuperação da atividade enzimática é intermediária em relação aos dois experimentos controle. Esse comportamento está associado a dissociação lenta do inibidor no complexo EI (FIGURA 3.13).

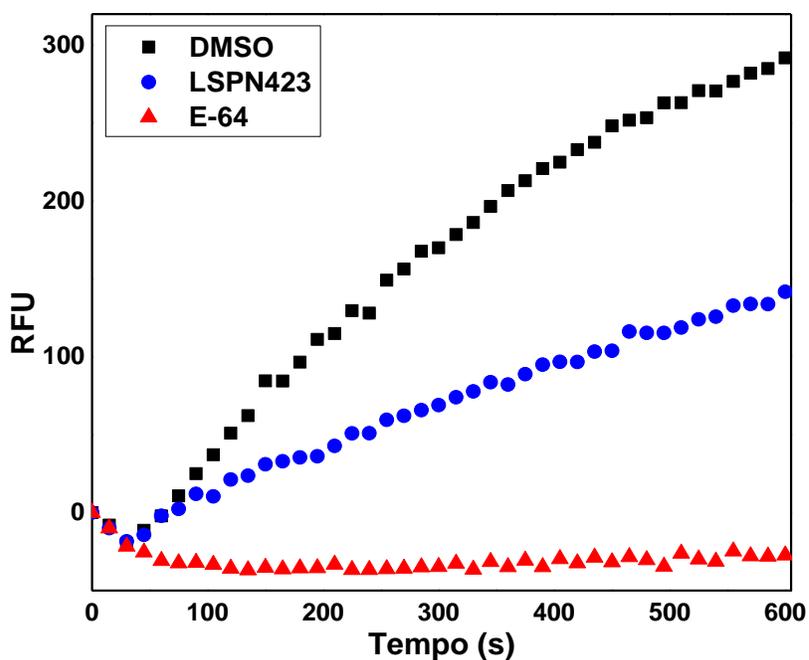


FIGURA 3.13: Teste de reversibilidade para o composto **LSPN423**.

Tendo em mãos o resultado do teste de reversibilidade (FIGURA 3.13), o mecanismo de inibição começou a ser investigado. Segundo Morrison,⁸⁵ os inibidores enzimáticos reversíveis podem ser divididos em quatro categorias de acordo com a força e a intensidade de suas interações com as enzimas. Para inibidores clássicos – ou seja, aqueles em que as concentrações de inibidor são muito maiores do que a concentração da enzima e a velocidade de formação e dissociação do complexo EI é rápida – ou do tipo *slow binding* considera-se que uma vez que $[E]_T$ – concentração de enzima que de fato participa da reação – é muito menor do que K_i (constante de inibição), a concentração do complexo enzima-inibidor (EI) é muito pequena comparada com $[I]$ (concentração do inibidor). Entretanto, esta afirmação não vale para todos os inibidores, pois alguns deles se ligam à enzima com uma afinidade tão elevada que a quantidade de moléculas de inibidor livres se esgota no meio devido à formação do complexo EI, que é o caso dos inibidores do tipo *tight binding* e *slow, tight binding* (TABELA 3.5).

TABELA 3.5. Classes de inibidores reversíveis e suas principais características.⁸⁵

Classe	Relação entre E_T e I_T	Velocidade para estabelecer o equilíbrio entre E, I e EI
Clássico	$E_T \ll I_T$	Rápido
<i>Tight binding</i>	$E_T \approx I_T$	Rápido
<i>Slow binding</i>	$E_T \ll I_T$	Lento
<i>Slow, tight binding</i>	$E_T \approx I_T$	Lento

Quando uma reação é iniciada na presença de um inibidor *tight binding*, a interação com a enzima ocorre de maneira praticamente estequiométrica, então, o equilíbrio é deslocado para a formação do complexo EI, da mesma forma, o equilíbrio de isomerização também é deslocado para o complexo EI. Para um inibidor *slow binding*, por sua vez, a velocidade de associação, ou de dissociação ou ambas são lentas. Para o mecanismo *slow, tight binding* assume-se que a velocidade em que ocorre a interação entre a enzima e o inibidor para formar o complexo EI é rápida, e a segunda etapa, que consiste na isomerização da enzima formando um complexo de elevada afinidade E^*I , é lenta (FIGURA 3.14).⁸³⁸⁶

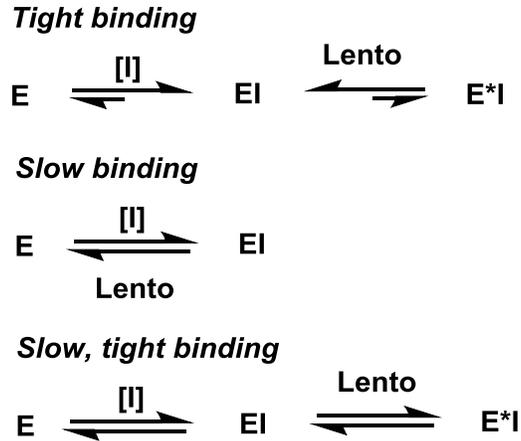


FIGURA 3.14. Mecanismo para inibidores reversíveis não-clássicos.

Inicialmente, para definir o tipo de inibição não-clássica avaliou-se a reposta obtida no ensaio enzimático. Para inibidores do tipo *slow binding*, o equilíbrio de formação do complexo EI é estabelecido lentamente, o que resulta em uma curva de progresso da reação vs tempo caracterizada como uma exponencial simples, enquanto a curva da reação sem inibidor (controle) é linear. Respostas não-lineares também são observadas para inibidores *slow, tight binding*. Já inibidores *tight binding* apresentam curvas de progresso lineares, pois a velocidade inicial é independente do tempo.⁸⁶ Observando as curvas obtidas na reação da catepsina L na presença de diferentes concentrações de **LSPN423**, nota-se um comportamento linear na resposta do ensaio (FIGURA 3.15). Com isso, os próximos estudos foram dirigidos na investigação de um mecanismo do tipo *tight binding*.

Estudos complementares foram realizados a fim de se determinar as constantes de inibição aparente e real (K_i^{app} e K_i , respectivamente), bem como o modo de inibição. K_i^{app} representa a constante de inibição aparente que é obtida experimentalmente; a equação de Morrison (eq. 3) é descrita como um método preciso para determinar K_i^{app} através do ajuste da equação à curva de resposta em relação à concentração de inibidor. Entretanto, para que o ajuste da equação de Morrison forneça valores precisos de K_i^{app} é necessário que o valor de $[E]_T$ (concentração de enzima que participa da reação enzimática) seja fixo, para isso $[E]_T$, neste modo de inibição, pode ser determinado por meio da intersecção da parte linear da curva de reposta vs $[I]$ com o eixo

x,⁸³ o qual forneceu $[E]_T = 18,5 \mu\text{M}$.

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E]_T + [I]_T + K_i^{app}) - \sqrt{([E]_T + [I]_T + K_i^{app})^2 - 4[E]_T[I]_T}}{2[E]_T} \quad \text{eq. 3}$$

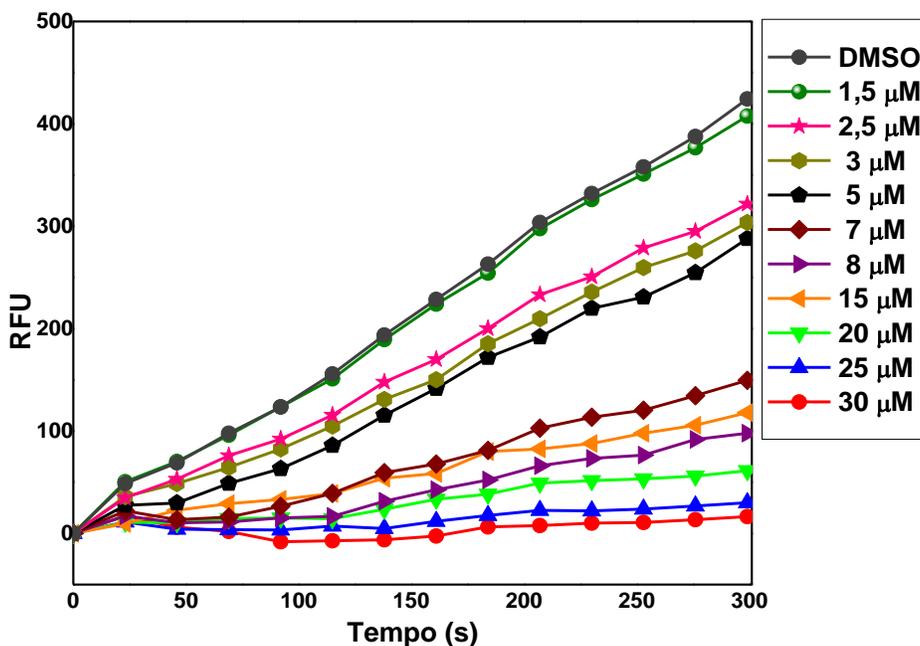


FIGURA 3.15. Curvas de progresso em relação ao tempo da atividade da catepsina L na presença de diferentes concentrações do inibidor **LSPN423**.

A regressão dos dados experimentalmente obtidos em diferentes concentrações do **LSPN423** na equação de Morrison forneceu $K_i^{app} = 2,09 \pm 1,31$ (com $[S] = 5,0 \mu\text{M}$ e $[E]_T = 18,5 \mu\text{M}$) (FIGURA 3.16).

O modo com que um inibidor do tipo *tight binding* se liga à enzima pode variar, de modo análogo aos inibidores clássicos. A curva com valores de IC_{50} obtidos em diferentes $[S]$ fornece informações acerca do modo de inibição em questão dependendo do comportamento da curva e a constante de inibição K_i .⁸⁷ A equação geral que relaciona os parâmetros IC_{50} , K_i e K_i^{app} para os inibidores *tight binding* é descrita como:

$$IC_{50} = K_i^{app} + \frac{1}{2}[E]_T \quad \text{eq. 4}$$

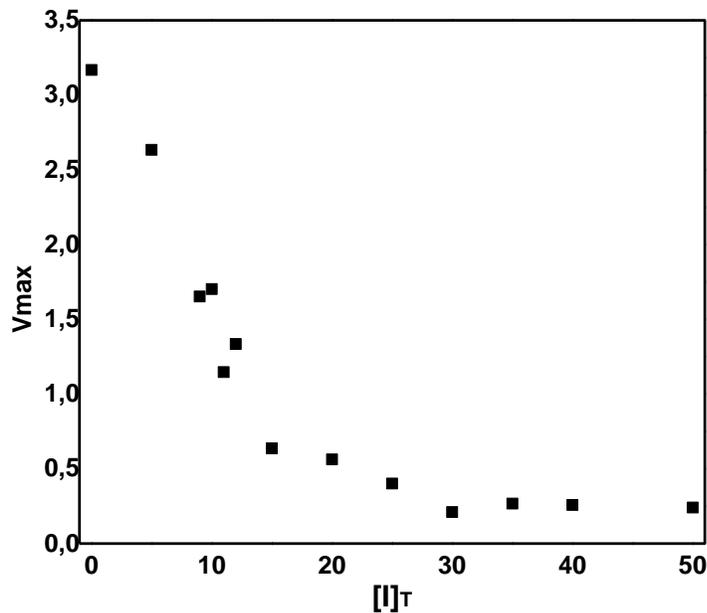


FIGURA 3.16. Curva de resposta em relação à concentração de inibidor (**LSPN423**).

Para cada modo de inibição (competitivo, não-competitivo ou incompetitivo), K_i e K_i^{app} vão ter uma relação diferente, que vai modificar o comportamento da curva IC_{50} vs $[S]/K_M$ obtida experimentalmente. Inibidores *tight binding* competitivos apresentam um comportamento linear na curva de IC_{50} vs $[S]/K_M$ em que o K_i é o coeficiente angular da reta. Os inibidores incompetitivos, por sua vez, tem o gráfico de IC_{50} vs $[S]/K_M$ caracteristicamente curvilíneo com um decrescimento acentuado do IC_{50} com o aumento de $[S]$. No caso dos inibidores não-competitivos o comportamento da plotagem dos dados experimentais depende do valor de α : valores maiores que 1 resultam em um gráfico curvilíneo ascendente, já para α menor do que 1 o comportamento é descendente e quando $\alpha = 1$, K_i^{app} é zero e o aumento da concentração de substrato não promove nenhum efeito sobre o IC_{50} (TABELA 3.6).⁸³

As medidas de IC_{50} do composto **LSPN423** foram realizadas em nove diferentes concentrações do substrato Z-FR-MCA (TABELA 3.7). A constante de inibição K_i foi calculada de acordo com o modo de inibição, o qual é determinado de acordo com a curva de IC_{50} vs $[S]/K_M$ (FIGURA 3.17).

TABELA 3.6. Equações dos modos inibição *tight binding* e as características das curvas.

Modo de inibição	Equação	Relação de K_i e K_i^{app}	Característica da curva
Competitivo	$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right) + \frac{1}{2} [E]_T$ eq. 5	$K_i^{app} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right)$ eq. 6	Linear
Incompetitivo	$IC_{50} = \alpha K_i \left(1 + \frac{K_M}{[S]} \right) + \frac{1}{2} [E]_T$ eq. 7	$K_i^{app} = K_i \left(1 + \frac{K_M}{[S]} \right)$ eq. 8	Curvilínea descendente
Não-competitivo	$IC_{50} = \frac{[S] + K_M}{\frac{K_M}{K_i} + \frac{[S]}{\alpha K_i}} + \frac{1}{2} [E]_T$ eq. 9	$K_i^{app} = \frac{[S] + K_M}{\frac{K_M}{K_i} + \frac{[S]}{\alpha K_i}}$ eq. 10	Curvilínea: $\alpha > 1$, ascendente $\alpha < 1$, descendente Linear: $\alpha < 1$

Comparando o comportamento do gráfico de IC_{50} vs $[S]/K_M$ (FIGURA 3.17) com o que é apresentado na literatura,⁸³ propôs-se que esses dados poderiam corresponder aos modos de inibição incompetitivo ou não-competitivo (para $\alpha < 1$), os quais são descritos pelas equações 7 e 9, respectivamente.

TABELA 3.7. Valores de IC_{50} obtidos para diferentes concentrações de substrato.

[S] (μM)	[S]/ K_M^a	IC_{50} (μM)	Desvio padrão
3,5	1,22	16,86	3,81
4,0	1,39	11,51	3,05
4,5	1,57	11,12	2,80
5,0	1,74	9,78	2,37
5,5	1,92	5,13	0,85
6,0	2,09	5,26	1,62
7,0	2,44	7,17	2,07
8,0	2,79	5,75	1,83
9,0	3,14	6,09	1,68

^a $K_M = 2,87 \mu\text{M}$

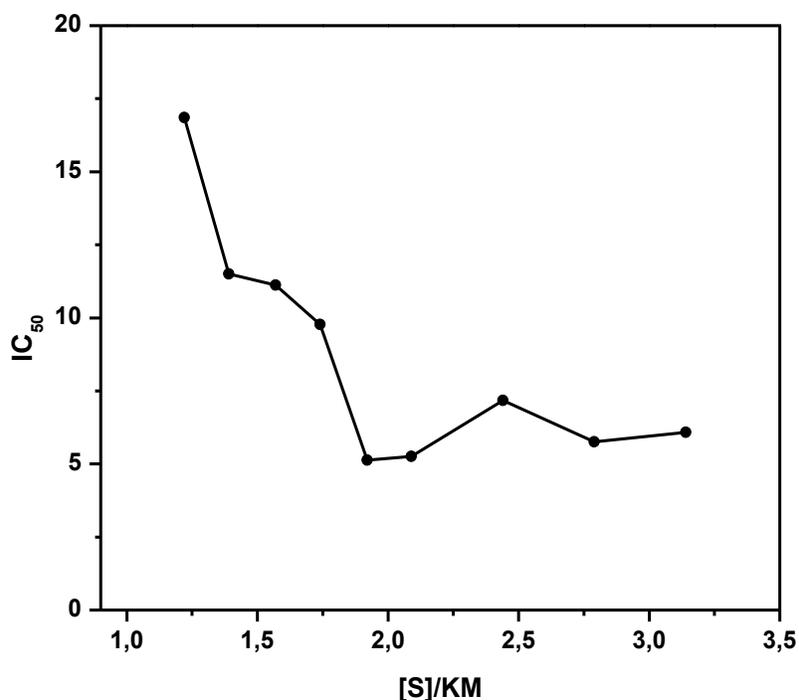


FIGURA 3.17. Curva de IC₅₀ vs [S]/K_M a partir da plotagem dos dados experimentais.

Então, regressões não lineares foram realizadas com ambas as equações (eq. 7 e 9) a fim de se determinar para qual delas os ajustes seriam mais corretos. Para a regressão utilizando a eq. 7 não foi possível estimar α e K_i separadamente, portanto, eles foram calculados como um só parâmetro. Copeland descreveu equações que relacionam K_i e K_i^{app} (eq. 8), de modo que a respectiva equação que descreve essa relação para o modo de inibição incompetitivo foi aplicada fornecendo o valor da constante K_i .⁸⁷ Utilizando o método de regressão não linear, foi possível estimar α e K_i separadamente com os dados da curva para a eq. 9. Por meio da análise dos dados obtidos a partir das regressões concluiu-se que o melhor ajuste foi para a eq. 7, que corresponde ao mecanismo *tight binding* incompetitivo (TABELA 3.8).

Cisteíno proteases lisossomais de diversos seres vivos são reguladas por inibidores *tight binding* endógenos da família das cistatinas.⁸⁸ Brzin *et al.* descreveram uma proteína isolada do fungo *Clitocybe nebularis* como um inibidor reversível *tight-binding* da papaína ($K_i = 0.59$ nm), catepsina L ($K_i = 0.41$ nm), catepsina B ($K_i = 0.48$ μ m) e bromelaína ($K_i = 0.16$ μ m).⁸⁹ Mais recentemente, Menon e Rao relataram um peptídeo

isolado do *Streptomyces* sp. MBR04 como um inibidor *slow, tight binding* competitivo de catepsina D com valores de IC_{50} e K_i de 3,2 e 2,5 nM, respectivamente.⁹⁰ O composto **LSPN423** é o primeiro produto sintético descrito como inibidor reversível *tight binding* incompetitivo de catepsina L.⁷⁶

TABELA 3.8. Resultado das regressões para a investigação dos modos de inibição.

Modo de inibição	Equação	Resultado da regressão
Incompetitivo	$IC_{50} = \alpha K_i \left(1 + \frac{K_M}{[S]}\right) + \frac{1}{2} [E]_T$ eq. 7	$\widehat{\alpha K_i} = -0,1125$
	$K_i^{app} = K_i \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)$ eq. 8	$\widehat{K_i} = 1,33 \mu M$ $\widehat{\alpha} = -0,08$
Não-competitivo	$IC_{50} = \frac{[S]+K_M}{\frac{K_M+[S]}{K_i} + \alpha K_i} + \frac{1}{2} [E]_T$ eq. 9	$\widehat{\alpha} = -0,7237$ $\widehat{K_i} = 0,0085 \mu M$

A fim de avaliar separadamente a atividade de cada um dos diastereoisômeros formados para o composto **LSPN423** (FIGURA 3.18B) – isolado como uma mistura de três diastereoisômeros, **LSPN423_d1**, **d2** e **d3** – tentou-se separar os diastereoisômeros por meio de diferentes técnicas cromatográficas. Diversas fases móveis e estacionárias foram avaliadas para realizar a separação por cromatografia em coluna de sílica flash. A utilização da mistura hexano/éter etílico (93:7) foi a mais efetiva para a separação parcial dos diastereoisômeros majoritário *trans* (**LSPN423_d1**, FIGURA 3.18A) e minoritário *cis* (**LSPN423_d3**, FIGURA 3.18C), porém nessas condições o diastereoisômeros minoritário *trans* (**LSPN423_d2**) não pôde ser isolado separadamente, apenas junto com o **LSPN423_d1**. Tentou-se também a separação por CLAE com diversos tipos de coluna e composição da fase móvel, entretanto foi observada a co-eluição das bandas inviabilizando o isolamento dos componentes da mistura por essa técnica.

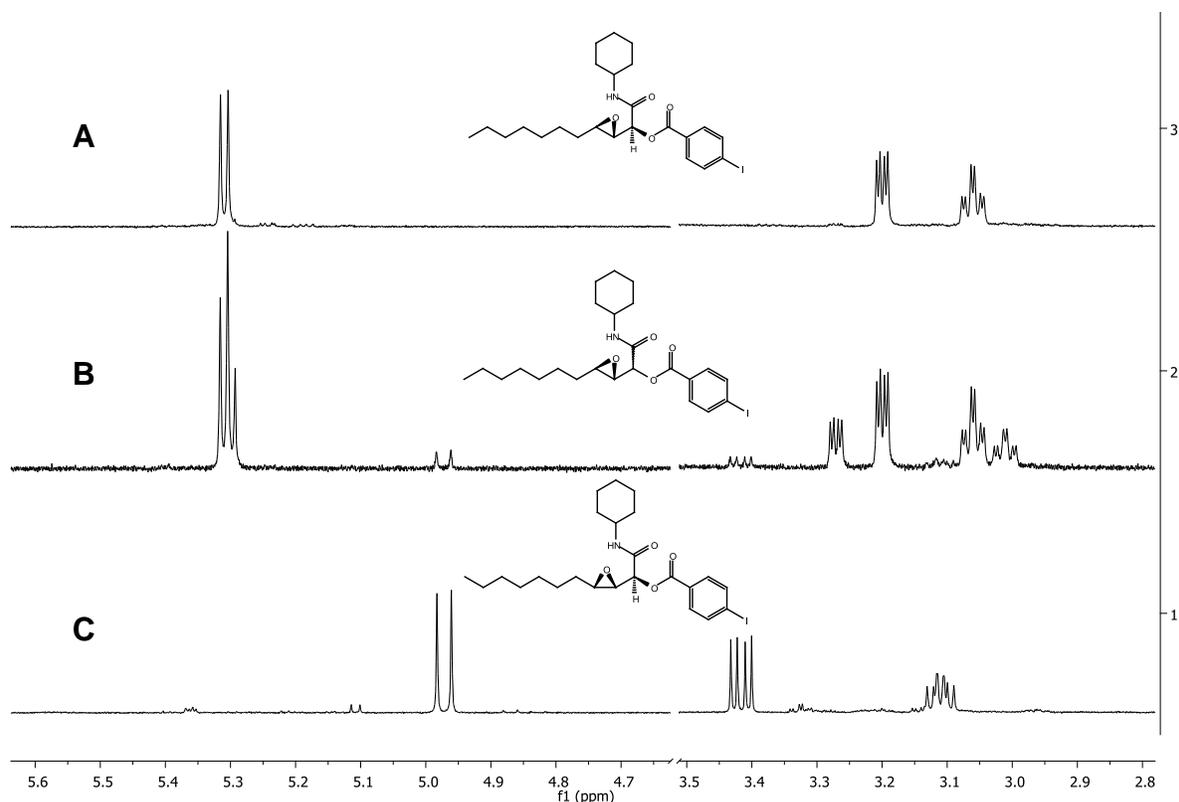


FIGURA 3.18. Corte do espectro de RMN ¹H do composto **LSPN423**. (A) Diastereoisômero majoritário (**d1**). (B) Mistura dos três diastereoisômeros isolados da reação. (C) Diastereoisômero minoritário (**d3**).

Os diastereoisômeros isolados, bem como a mistura de dois ou três componentes, além do **LSPN423** racêmico foram avaliados frente à catepsina L (TABELA 3.9). Ambos os diastereoisômeros isolados **LSPN423_d1** e **LSPN423_d3** (TABELA 3.9, entradas 1 e 4) foram ativos frente à catepsina L, destacando-se o **LSPN423_d1**, que apresentou uma atividade comparável à mistura dos três diastereoisômeros (TABELA 3.9, entrada 6). A versão racêmica do **LSPN423_d3** se mostrou menos ativa do que a versão assimétrica (TABELA 3.9, entradas 4 e 5, respectivamente). O ensaio com a mistura de **LSPN423_d1** e **d2** forneceu o melhor valor de IC₅₀, sugerindo que o **LSPN423_d2** possa ser o diastereoisômeros mais ativo, ou que há um efeito sinérgico entre ambos os componentes da mistura que aumenta a inibição frente à catepsina L. Além disso, a mistura de **LSPN423_d1** e **d2** racêmica teve sua atividade consideravelmente diminuída (TABELA 3.9, entrada 3), indicando que a configuração definida do epóxido é importante para a inibição.

TABELA 3.9. Atividade frente à catepsina L para os diastereoisômeros isolados e misturas do **LSPN423**.

Entrada	LSPN423	d1:d2:d3 ^a	IC ₅₀ (µM)
1	d1	100:0:0	2,20 ± 0,56
2	d1+d2	54:46:0	1,13 ± 0,17
3	d1+d2 racêmico	69:31:0	6,70 ± 0,55
4	d3	0:0:100	4,28 ± 1,85
5	d3 racêmico	0:0:100	5,34 ± 2,04
6	d1+d2+d3	57:31:12	2,02 ± 0,92

^a Proporção dos diastereoisômeros de cada amostra submetida ao ensaio de inibição.

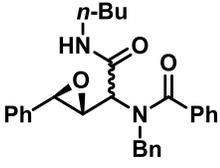
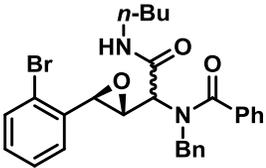
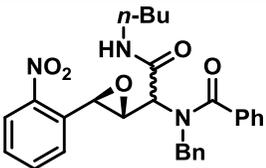
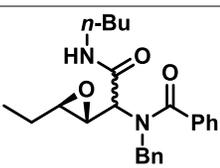
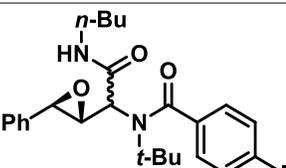
3.4.2 Avaliação das epoxi-α-acilaminocarboxamidas frente à catepsina L

Explorando a atividade inibitória frente à catepsina L de peptidomiméticos que contém o anel epóxido em sua estrutura, a investigação de novos inibidores foi continuada para as epoxi-α-acilaminocarboxamidas sintetizadas (**LSPN690-695**).

A triagem dos compostos **LSPN690-695** foi realizada com cada um dos diastereoisômeros isolados a uma concentração de 25 µM (TABELA 3.10). Os resultados obtidos indicaram que os compostos **LSPN691** e **LSPN692** apresentaram as melhores inibições para ambos os diastereoisômeros. O composto **LSPN690**, por sua vez, teve o seu diastereoisômero minoritário como mais ativo. Os outros compostos dessa classe (**LSPN693-694**) não apresentaram inibição significativa.

A determinação dos valores de IC₅₀ foi realizada para os compostos com inibição acima de 80%. Para ambos os compostos **LSPN691** e **LSPN692**, os valores de IC₅₀ foram menores para os respectivos diastereoisômeros minoritários (TABELA 3.10). Para esta nova série de compostos a inibição frente à catepsina L não foi muito pronunciada até o momento, de modo que os estudos sobre o mecanismo de inibição não foram continuados. Para se obter mais informações acerca da relação estrutura-atividade desta nova série de epoxi-peptidomiméticos, novos compostos devem ser sintetizados, promovendo diferentes modificações estruturais.

TABELA 3.10. Inibição e IC₅₀ dos compostos **LSPN690-695**.

Composto	Majoritário		Minoritário	
	Inib. (%)	IC ₅₀ (μM)	Inib. (%)	IC ₅₀ (μM)
 LSPN690	0	n.d.	73	n.d.
 LSPN691	87	>50	93	16,7
 LSPN692	83	>50	97	27,4
 LSPN693	0	n.d.	0	n.d.
 LSPN694	30	n.d.	13	n.d.

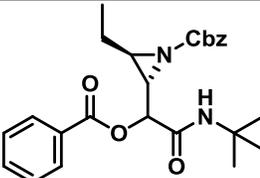
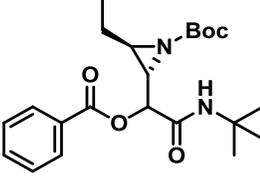
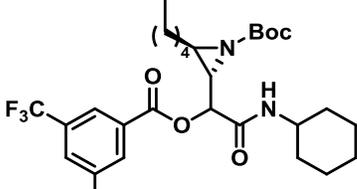
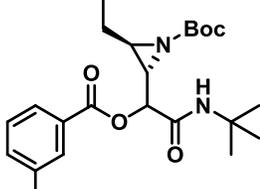
3.4.3 Avaliação das aziridina- α -aciloxicarboxamidas frente à catepsina L

A avaliação preliminar da inibição da pequena série de aziridina- α -aciloxicarboxamidas (**LSPN696-699**) foi realizada a fim de se obter um direcionamento sobre a influência dos diferentes substituintes presentes nas moléculas. Os compostos **LSPN697** e **698** puderam ser separados em duas frações: a primeira contendo uma mistura de dois diastereoisômeros, o majoritário e o minoritário *cis*; e a segunda o diastereoisômero minoritário *trans* foi isolado separadamente. Portanto, a inibição foi medida para ambas as frações isoladas. Para o composto **LSPN697** observou-se atividade, embora não muito elevada, apenas para o diastereoisômeros minoritário. Ambas as frações isoladas do composto **LSPN698** apresentaram atividade moderada frente à catepsina L (TABELA 3.11).

Por sua vez, os compostos **LSPN696** e **699** foram isolados como uma mistura contendo os três diastereoisômeros e o ensaio foi realizado com a mistura. O composto **LSPN696** não apresentou inibição, e o **LSPN699** não resultou em uma inibição significativa (TABELA 3.11). Por enquanto, não se realizou a determinação do IC₅₀, no experimento de triagem, pois nenhum composto apresentou inibição acima de 80%, que foi o critério de escolha para a avaliação deste parâmetro.

Estudos adicionais em relação ao aumento do escopo das aziridina- α -aciloxicarboxamidas, bem como a avaliação da inibição das mesmas devem ser realizados a fim de verificar a atividade desta nova classe de compostos.

TABELA 3.11. Inibição das aziridina- α -aciloxicarboxamidas (**LSPN696-699**) frente à catepsina L.

Composto	Majoritário Inib. (%)	Minoritário Inib. (%)
 <p>LSPN696</p>	0	-
 <p>LSPN697</p>	0	58
 <p>LSPN698</p>	74	75
 <p>LSPN699</p>	39	-

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os compostos peptidomiméticos contendo anéis heterocíclicos de três membros puderam ser sintetizados através de metodologias sequenciais de epoxidação e aziridinação organocatalisadas seguida das reações multicomponentes de Passerini e Ugi, tendo como principais vantagens a economia de etapas de purificação dos intermediários e o emprego de reações livres de metais e solventes menos tóxicos.

A reação *one-pot* de epoxidação assimétrica/Passerini apresentou uma boa aplicação para diferentes substratos fornecendo os produtos **12g-q** com rendimentos de moderados a excelentes. A avaliação dos adutos de Passerini frente à inibição da catepsina L mostrou o potencial desta classe de compostos, sendo o **LPSN423** aquele com melhor atividade, então os estudos foram conduzidos a fim de determinar o mecanismo pelo qual o composto **LPSN423** inibe a catepsina L, a correlação dos dados experimentais indicou um modo de inibição do tipo *tight binding* incompetitivo. Estes resultados foram recentemente publicados no periódico *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.⁷⁶

Os 2,3-epoxi-aldeídos obtidos por meio da epoxidação organocatalisada de aldeídos α,β -insaturados também puderam ser utilizados como intermediários na reação de Ugi de forma sequencial com rendimentos de moderados a bons (produtos **34a-e**) em duas etapas reacionais. Algumas limitações foram observadas com o emprego de ésteres de aminoácidos como componentes da reação de Ugi, portanto estudos complementares promovendo modificações que garantam a estabilidade dos compostos devem ser conduzidos, uma vez que a inserção dos aminoácidos aumenta a complexidade estrutural do aduto de Ugi que tem potencial como inibidores de cisteíno proteases.

A investigação inicial da inibição das epóxi- α -acilaminocarboxamidas (**LSPN690-694**) frente à catepsina L apontou a atividade desta nova classe, entretanto devido aos altos valores de IC_{50} mais estudos em relação à estrutura-atividade são necessários.

A síntese de β -formilaziridinas empregando o organocatalisador desenvolvido no nosso grupo de pesquisa (**Cat I**) proporcionou a utilização de condições

reacionais mais sustentáveis em relação ao que é reportado na literatura, como a utilização da mistura de solventes etanol/água que apresenta toxicidade inferior aos solventes clorados que normalmente são empregados. Além disso, o uso de etanol/água como solvente resultou na redução da quantidade de base necessária para promover a reação. As β -formilaziridinas são intermediários instáveis, por isso foi proposta a funcionalização direta via reação de Passerini, a qual foi realizada de maneira *one-pot* fornecendo os produtos **36a-d** com rendimentos de moderados a bons e com excelente excesso enantiomérico para o produto **36b**. Limitações relacionadas ao uso de derivados de cinamaldeído para as reações de aziridinação são reportadas e a aplicação da metodologia *one-pot* de aziridinação seguida da reação de Passerini até o momento não foi bem sucedida. Como perspectiva, uma avaliação mais aprofundada das condições reacionais da reação de aziridinação com derivados do cinamaldeído empregando o **Cat I** deve ser realizada, para então aplicar os intermediários nas reações multicomponentes.

A triagem preliminar das aziridina- α -aciloxicarboxamidas (**LSPN696-699**) sugeriu uma potencial atividade para essa nova classe de peptidomiméticos, sobretudo para o composto **LSPN698**. No entanto, é necessário o aumento da coleção de compostos para se obter maiores informações das relações de estrutura-atividade e o estudo do mecanismo de inibição.

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Materiais e métodos

Os reagentes disponíveis comercialmente foram adquiridos na Sigma-Aldrich ou Alfa Aesar e, quando necessário, tratados de acordo com os procedimentos descritos na literatura

A purificação dos produtos foi realizada por coluna cromatográfica flash, em que se utilizou sílica gel 60, 230-400 mesh ASTM Merck e sílica gel 60 Å, 70-230 mesh AldrichCo. As análises de cromatografia em camada delgada foram realizadas em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ suportada em folhas de alumínio e reveladas sobre luz ultravioleta e/ou coradas em reveladores de iodo, vanilina ácida e permanganato de potássio.

O excesso de solvente do fim de cada etapa foi evaporado em evaporadores Büchi Rotavapor R-114 com banho BüchiWatherbath B-490.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados nos espectrômetros Bruker ARX 400 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para indicar a multiplicidade dos sinais utilizou-se as seguintes abreviações: s (singleto), d (dubleto), t (tripleto), q (quadrupleto), m (multiplete).

A rotação óptica dos compostos foi medida em um polarímetro modelo Polatronic H100. As amostras foram dissolvidas em acetato de etila e analisadas a uma temperatura de 24 °C ou 27 °C.

As análises de massas de alta resolução foram realizadas em dois equipamentos: Nexera X2 UHPLC – Shimadzu, acoplado ao espectrômetro de massas Bruker Impact HD OqTOF (FAPESP PROEM 2014/50244-6), uma pré-coluna Betasil® C18 (20 x 2.1 mm, 5 μ M) foi usada para a injeção; e espectrômetro de massas micrOTOF Q IITOF (Bruker Daltonics) equipado com uma fonte de íon ESI (modo de ionização positiva).

A separação dos enantiômeros foi realizada através de análises de cromatografia convergência de ultraperformance que foram realizadas em um cromatógrafo ACQUITY UPC2™ (Waters Corp.), utilizando um sistema equipado com detector de UV-vis e colunas de fase estacionária Trefoil™ CEL1 (2.5 µm, 3 mm × 150 mm), Trefoil™ CEL2 (2.5 µm, 3 mm × 150 mm), Trefoil™ AMY1 (2.5 µm, 3 mm × 150 mm).

Os ensaios enzimáticos foram efetuados em um fluorímetro Molecular Devices – Spectra MAX M3, em placas pretas de 96 poços. As regressões dos dados obtidos para o cálculo de K_M , IC_{50} , K_i^{app} e K_i foram realizadas com auxílio dos softwares *SigmaPlot* 12 e *R* versão 3.2.3.

5.2 Procedimentos de síntese

5.2.1 Síntese do organocatalisador

O organocatalisador **Cat I** foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita previamente com algumas modificações.^{42,67}

Alquilação do 4-bromotiofenol:⁹¹ Em um balão de fundo redondo com uma mistura contendo 4-bromotiofenol (43 mmol; 10 g) e 1-bromohexano (51,6 mmol; 7,21 mL) em água destilada (20 mL), então a trietilamina (47,3 mmol, 7,2 mL) foi adicionada lentamente. Manteve-se a mistura reacional sob agitação a temperatura ambiente durante 4 horas. Ao final da reação, o bruto foi lavado com água (100 mL) e extraído com acetato de etila (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas. O produto foi purificado por meio de cromatografia em coluna com sílica flash e hexano:acetato de etila (95:5). Obtendo-se então um óleo amarelado com 89% de rendimento (10,4 g).

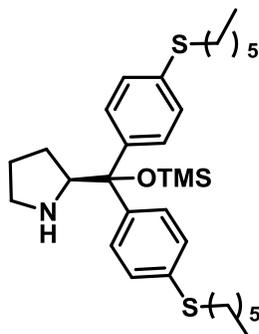
Esterificação e proteção da L-prolina: Em um balão de fundo redondo, dissolveu-se a L-prolina (20 mmol; 2,30 g) em metanol (30 mL), em seguida adicionou-se a solução K_2CO_3 (26 mmol; 3,63 g) e cloroformiato de etila (44 mmol; 4,2 mL) gota a gota. Agitou-se a mistura por 12 horas a temperatura ambiente. Ao término da reação o solvente foi

evaporado e a mistura lavada com água destilada (50 mL) e extraída com diclorometano (4 x 20 mL). As fases orgânicas foram secas com sulfato de sódio anidro e concentradas. O produto foi purificado por cromatografia em coluna com sílica flash como fase estacionária e uma mistura de hexano/acetato de etila de 10 a 60% como eluente. O produto foi obtido como um óleo amarelo claro com 87% de rendimento (3,51 g).

Reação de Grignard e ciclização do intermediário: Em um balão de fundo redondo acoplado a um condensador de refluxo sob atmosfera de N₂, adicionou-se magnésio em raspas (30 mmol; 0,73 g) previamente tratado com solução de HCl 0,1M, lavado com água destilada, etanol e acetona e seco em estufa anidra. O balão foi flambado no intuito de retirar toda a umidade do sistema. Com o balão em temperatura ambiente, um cristal de iodo e THF anidro (30 mL) foram adicionados. A mistura foi aquecida até o refluxo e então acrescentou-se lentamente uma solução contendo o haleto (30 mmol; 8,16 g) preparado anteriormente em THF anidro (30 mL). Após todo o magnésio ser consumido gerando o reagente de Grignard *in situ*, deixou-se o sistema esfriar até a temperatura ambiente, então adicionou-se o éster protegido da prolina (10 mmol; 2,01 g), também preparado previamente, dissolvido em THF anidro (10 mL). A mistura foi agitada por 12 horas a temperatura ambiente e por fim foi aquecida (refluxo) durante 2 horas, para que ocorresse a ciclização do intermediário. Terminada a reação, adicionou-se solução saturada de NH₄Cl (30 mL), o bruto foi extraído com acetato de etila (3 x 20 mL) e lavado com água destilada, a fase orgânica foi seca e concentrada. O produto foi purificado através de coluna cromatográfica com sílica flash e hexano/acetato de etila (3-20%). Obteve-se como produto um óleo amarelo com 45% de rendimento (2,25 g).

Hidrólise do intermediário cíclico: Em um balão de fundo redondo acoplado a um condensador de refluxo o intermediário cíclico (4,1 mmol; 2,25 g) foi dissolvido em metanol (15 mL). Na sequência, adicionou-se KOH (45 mmol, 2,52 g). A mistura foi mantida sob refluxo por 12 horas. O solvente da reação foi evaporado e o bruto extraído com diclorometano (3 x 15 mL). A fase orgânica foi seca e concentrada. O produto foi purificado por meio de coluna cromatográfica com sílica flash e solução de 40% de acetato de etila em hexano. O aminoálcool foi obtido com 66% (1,31 g) de rendimento como um óleo amarelo.

Proteção com TMSOTf: Em um balão de fundo redondo sob atmosfera de N₂, dissolveu-se o aminoálcool (2,7 mmol; 1,31 g) em diclorometano seco (15 mL) e a solução foi resfriada a 0 °C. Adicionou-se então, trietilamina (3,5 mmol, 0,50 mL) e trifluorometanossulfonato de trimetilsilila (TMSOTf; 3,5 mmol; 0,64 mL) lentamente. A mistura foi agitada por 2 horas. O bruto foi extraído com diclorometano (3 x 10 mL) e lavado com água (2 x 10 mL), seco com sulfato de sódio anidro e concentrado. A purificação ocorreu através de coluna cromatográfica de sílica flash e hexano:acetato de etila (9:1) com 1% de trietilamina como eluente. O organocatalisador foi obtido com 89% de rendimento (1,34 g) como um óleo amarelo viscoso.



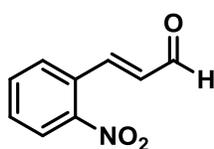
(S)- α,α -Bis(4-hexilfenilsulfeto)-2-pirrodinometanol trimetilsililéter
(Cat I): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,35 (d, J = 8,6 Hz, 2H),
 7,26 – 7,18 (m, 6H), 3,96 (t, J = 7,3 Hz, 1H), 2,90 (ddd, J = 7,5, 6,9,
 3,6, 4H), 2,87 – 2,80 (m, 1H), 2,79 – 2,72 (m, 1H), 1,68 – 1,59 (m,
 6H), 1,58 – 1,51 (m, 3H), 1,45 – 1,37 (m, 4H), 1,22-1,35 (m, 8H), 0,88
 (t, J = 7,0 Hz, 6H), -0,10 (s, 9H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ =

143,92, 142,84, 135,95, 135,77, 129,09, 128,63, 128,55, 128,35, 128,01, 127,77, 126,54,
 126,12, 82,74, 65,51, 47,26, 33,57, 33,49, 31,49 (2), 29,20 (2), 28,65 (2), 27,62, 25,18,
 22,65 (2), 14,15 (2), 2,32 (3). $[\alpha]_D^{24} = -30,60$ ($c = 0,005$ g/mL, em CH₂Cl₂).

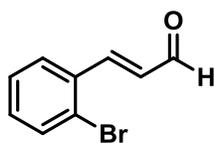
5.2.2 Síntese dos aldeídos α,β -insaturados não comerciais

Os aldeídos α,β -insaturados não comerciais foram sintetizados a partir da adaptação do procedimento descrito na literatura.^{92,93}

A uma solução de aldeído (2 mmol) em acetonitrila (20 mL) foi adicionado o trifenilfosforanilideno-acetaldeído (Ph₃P=CHCHO; 2,4 mmol; 0,730 g), e a mistura foi agitada a 60 °C durante 12 horas. Ao final da reação, a mistura foi concentrada e purificada diretamente por coluna cromatográfica com sílica gel e hexano/acetato de etila (9:1).



4-Nitrocinnamaldeído (**31b**) (*E:Z* = 85:15):⁹³ RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9,81 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 8,14 (dd, *J* = 8,2, 0,8 Hz, 1H), 8,07 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H), 7,77 – 7,68 (m, 2H), 7,68 – 7,60 (m, 1H), 6,66 (dd, *J* = 15,8, 7,7 Hz, 1H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 193,18, 150,66, 147,35, 133,85, 132,65, 131,16, 130,03, 129,09, 125,24.

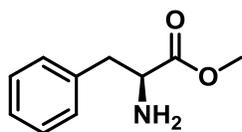


4-Bromocinnamaldeído: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):⁹³ 9,80 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,93 (dd, *J* = 16,1, 4,6 Hz, 1H), 7,68 (dd, *J* = 8,1, 1,2 Hz, 1H), 7,40 (dddd, *J* = 8,0, 7,3, 1,3, 0,7 Hz, 1H), 7,31 (ddd, *J* = 8,1, 7,3, 1,6 Hz, 1H), 6,70 (dd, *J* = 15,9, 7,7 Hz, 1H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 193,58, 150,67, 133,82, 133,68, 132,17, 130,73, 128,04, 127,97, 125,76.

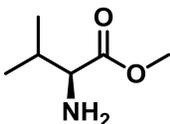
5.2.3 Esterificação dos aminoácidos

O procedimento de esterificação da L-fenilalanina e L-valina foram adaptados da metodologia descrita por Anand e Vimal.⁹⁴

Em um balão de fundo redondo acoplado a um condensador de refluxo, adicionou-se uma solução do aminoácido (2 mmol) em metanol (10 mL) e a amberlyst-15 (2,0 g). A mistura foi agitada sob refluxo por 24 horas. A amberlyst-15 foi separada do metanol por filtração, então o filtrado foi agitado com solução saturada de NaHCO₃ (20 mL) por 30 minutos e filtrada novamente. O sobrenadante foi extraído com acetato de etila (3 x 10 mL) e a amberlyst-15 lavada com acetato de etila (2 x 10 mL), as fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio anidro e concentrada. O produto é um óleo amarelado que foi obtido puro com rendimento 97%.



L-fenilalaninato de metila:⁹⁵ RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,32 (dd, *J* = 7,9, 6,4 Hz, 2H), 7,28 – 7,23 (m, 1H), 7,21 (dd, *J* = 5,2, 3,1 Hz, 2H), 3,77 (dd, *J* = 7,9, 5,2 Hz, 1H), 3,73 (s, 3H), 3,12 (dd, *J* = 13,5, 5,2 Hz, 1H), 2,90 (dd, *J* = 13,5, 7,9 Hz, 1H), 1,90 (s, 2H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 175,16, 137,07, 129,30 (2), 128,60 (2), 126,89, 55,74, 52,03, 40,87.

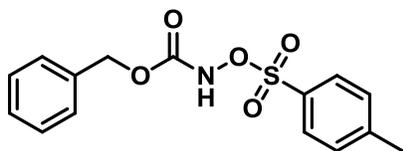


L-valinato de metila:⁹⁶ RMN ¹H (400 MHz, Acetona-d₆) δ (ppm): 3,66 (s, 1H), 3,18 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 1,89 (heptd, *J* = 6,8, 5,3 Hz, 1H), 1,49 (s, 2H), 0,92 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 0,86 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H). RMN ¹³C (101 MHz, Acetona-d₆) δ (ppm) 176,69, 60,69, 51,60, 33,10, 19,63, 17,58.

5.2.4 Síntese da *N*-Cbz-*O*-tosil-hidroxiilamina

Proteção da hidroxilamina⁹⁷: Em um balão de fundo redondo foi adicionado o HONH₂·HCl (2,4 mmol; 0,17 g) a uma solução aquosa de carbonato de sódio (3,0 M; 1 mL), então a mistura foi agitada por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se uma solução de cloroformiato de benzila (2 mmol, 285,5 μL) em diclorometano (1 mL). A mistura foi agitada por 4 horas a temperatura ambiente, depois acidificada com solução aquosa de HCl 10% (5 mL) e então extraída com diclorometano (3 x 10 mL); a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada. O produto bruto (CbzNHOH, 0,308 g) foi empregado diretamente na próxima etapa.

Tosilação da *N*-Cbz-hidroxiilamina⁹⁷: A CbzNHOH obtida na etapa anterior (0,308 g; aproximadamente 1,8 mmol) foi dissolvida em THF (1 mL), então adicionou-se a trietilamina (2,2 mmol; 301 μL). A mistura foi resfriada a 0 °C e em seguida foi adicionada uma solução de cloreto de tosila (2,2 mmol; 0,420 g) em THF (2 mL) lentamente, após a adição, a reação foi agitada até se completar. Então, o precipitado formado foi separado por filtração e o sobrenadante concentrado e purificado por lavagem com hexano, fornecendo o produto puro com 73% de rendimento (0,422 g).



N-Cbz-*O*-tosil-hidroxiilamina: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,05 (s, 1H), 7,82 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,36 – 7,31 (m, 2H), 7,25 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,20 (dd, *J* = 7,0, 2,8 Hz, 1H), 5,02 (s, 1H), 2,42 (s, 2H). RMN ¹³C 101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 155,30, 146,10, 134,50, 130,15, 129,72 (2), 129,56 (2), 128,71, 128,58 (2), 128,35 (2), 68,62, 21,84.

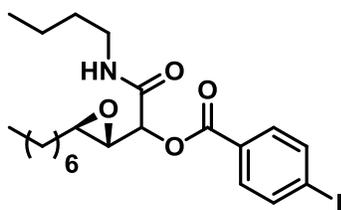
5.2.5 Procedimento geral para a síntese das epoxi- α -acilaminocarboxamidas (12g-q)

Os compostos **12g-q** foram preparados de acordo com a metodologia previamente descrita.⁴² Em um vial de 5 mL o catalisador **I** (0,03 mmol, 16.7 mg) foi dissolvido em uma mistura de etanol/água 3:1 (0,6 mL), então adicionou-se o aldeído **31** (0,3 mmol) seguido do peróxido de hidrogênio (0,9 mmol, 0.075 mL, solução aquosa 35%). A mistura reacional foi agitada por 16 horas, de forma sequencial, ou seja, sem purificar ou isolar o intermediário epoxi-aldeído, o ácido carboxílico **33** (0,3 mmol) e a isonitrila **32** (0,5 mmol) foram adicionados. A mistura foi agitada por 24 horas, seguida da adição de água destilada (10 mL) e extraída com acetato de etila (3 x 5 mL), as fases orgânicas foram recolhidas, secas com Na₂SO₄ anidro, concentradas e então a purificação foi realizada por coluna cromatográfica flash com sílica gel e como eluente misturas de hexano/acetato de etila (entre 9:1 e 8:2).

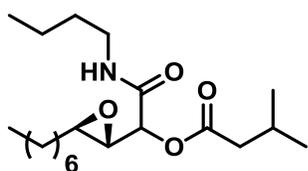
Padrão recêmico: Em um vial de 5 mL a pirrolidina (0,06 mmol, 0,005 mL) foi dissolvido em uma mistura de etanol/água 3:1 (0,6 mL), então adicionou-se o aldeído **31** (0,3 mmol) seguido do peróxido de hidrogênio (0,9 mmol, 0.075 mL, solução aquosa 35%). A mistura reacional foi agitada por 16 horas, de forma sequencial, ou seja, sem purificar ou isolar o intermediário 2,3-epoxi-aldeído, o ácido carboxílico **33** (0,3 mmol) e a isonitrila **32** (0,5 mmol) foram adicionados. A mistura foi agitada por 24 horas, seguida da adição de água destilada (10 mL) e extraída com acetato de etila (3 x 5 mL), as fases orgânicas foram recolhidas, secas com Na₂SO₄ anidro, concentradas e então a purificação foi realizada por coluna cromatográfica flash com sílica gel e como eluente misturas de hexano/acetato de etila (entre 9:1 e 8:2).

5.2.6 Caracterização dos compostos 12g-q

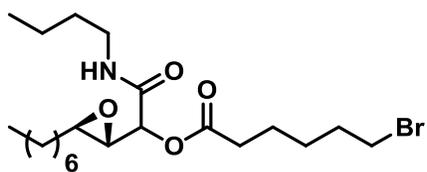
Os dados descritos a seguir referem-se a todos os estereoisômeros formados (d1 – majoritário; d2 – minoritário *trans*; d3 – minoritário *cis*).



2-(Butilamino)-1-((2*S*,3*R*)-3-heptiloxiran-2-il)-2-oxoetil-4-iodobenzoato (**12g**): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,88 – 7,81 (m, 6H), 7,81 – 7,75 (m, 6H), 6,07 (sl, 3H), 5,35 (d1) (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 5,33 (d2) (d, $J = 5,0$ Hz, 1H), 4,99 (d3) (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 3,43 (d3) (dd, $J = 8,9, 3,9$ Hz, 1H), 3,34 – 3,26 (m, 7H), 3,21 (d1) (dd, $J = 4,6, 2,1$ Hz, 1H), 3,12 (d3) (m, 1H) 3,07 (d1) (td, $J = 5,7, 2,1$ Hz, 1H), 3,02 (d2) (td, $J = 5,9, 2,1$ Hz, 1H), 1,61 – 1,55 (m, 6H), 1,53 – 1,40 (m, 12H), 1,37 – 1,21 (m, 30H), 0,97 – 0,82 (m, 18H). Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166,23, 164,61, 138,11, 138,02 (2), 131,23 (2), 128,44, 101,74, 73,76, 73,23, 57,44, 56,23, 39,21, 31,71, 31,49, 31,33, 29,23, 25,76, 22,62, 19,94, 14,07, 13,68. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +10,03$ ($c = 0,005$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{INNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 524,1268, encontrado 524,1271.

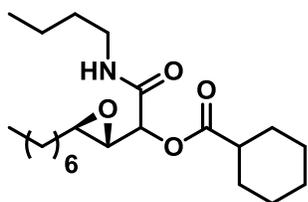


2-(Butilamino)-1-((2*S*,3*R*)-3-heptiloxiran-2-il)-2-oxoetil-3-metilbutanoato (**12h**): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6,07 (sl, 3H), 5,20 (d1) (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 5,14 (d2) (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 4,79 (d3) (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 3,32 – 3,24 (m, 7H), 3,15 (d2) (dd, $J = 4,9, 2,2$ Hz, 1H), 3,09 (d1) (dd, $J = 4,4, 2,2$ Hz, 1H), 2,99 (d1) (td, $J = 5,8, 2,3$ Hz, 1H), 2,97 – 2,93 (d2) (m, 1H), 2,31 (dd, $J = 7,0, 1,7$ Hz, 6H), 2,21 – 2,08 (m, 3H), 1,56 – 1,45 (m, 12H), 1,46 – 1,37 (m, 6H), 1,36 – 1,23 (m, 30H), 1,00 (d, $J = 6,7$ Hz, 18H), 0,92 (t, $J = 7,3$ Hz, 9H), 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 9H). Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171,26, 166,50, 72,81, 72,10, 57,03, 56,29, 43,06, 39,08, 31,71, 31,49, 31,33, 29,23, 29,14, 25,76, 25,71, 22,61, 22,35, 19,94, 14,06, 13,68. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +4,13$ ($c = 0,004$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 378,2615, encontrado 378,2617.

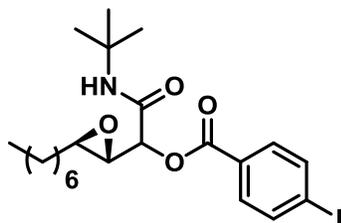


2-(Butilamino)-1-((2*S*,3*R*)-3-heptiloxiran-2-il)-2-oxo-etil-6-bromoexanoato (**12i**): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6,04 (s, 3H), 5,17 (d1) (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 5,12 (d2) (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 4,79 (d3) (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 3,42 (t, $J = 6,7$ Hz, 6H), 3,33 – 3,22

(m, 6H), 3,14 (d2) (dd, $J = 5,0, 2,2$ Hz, 1H), 3,09 (d1) (dd, $J = 4,5, 2,1$ Hz, 1H), 2,96 (d1) (td, $J = 5,6, 2,1$ Hz, 1H), 2,97 – 2,91 (d2) (m, 1H), 2,45 (td, $J = 7,4, 1,5$ Hz, 6H), 2,34 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H) 1,94 – 1,84 (m, 6H), 1,75 – 1,65 (m, 6H), 1,57 – 1,47 (m, 18H), 1,38 – 1,23 (m, 33H), 0,97 – 0,85 (m, 18H). Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171,67, 166,42, 73,06, 72,26, 57,13, 56,20, 39,11, 33,78, 32,30, 31,72, 31,51, 31,31, 29,23, 29,14, 27,53, 25,75, 23,94, 22,61, 19,96, 14,07, 13,70. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +4,65$ (c = 0,007 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{BrNNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 470,1876, encontrado 470,1877.

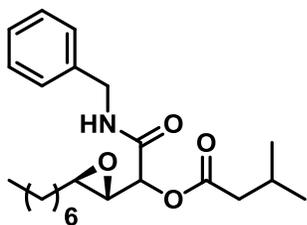


2-(Butilamino)-1-((2*S*,3*R*)-3-heptiloxiran-2-il)-2-oxoetilciclohexanocarboxilato (**12j**): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6,02 (sl, 3H), 5,18 (d1) (d, $J = 4,3$ Hz, 1H), 5,13 (d2) (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 4,76 (d3) (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 3,31 – 3,21 (m, 6H), 3,15 (d2) (dd, $J = 4,7, 2,1$ Hz, 1H), 3,07 (d1) (dd, $J = 4,3, 2,1$ Hz, 1H), 2,97 (d1) (td, $J = 5,6, 2,1$ Hz, 1H), 2,92 (d2) (td, $J = 5,8, 2,1$ Hz, 1H), 2,41 (tt, $J = 11,2, 3,6$ Hz, 3H), 1,97 – 1,90 (m, 6H), 1,80 – 1,73 (m, 6H), 1,69 – 1,62 (m, 3H), 1,55 – 1,45 (m, 6H), 1,45 – 1,36 (m, 12H), 1,44 – 1,39 (m, 6H), 1,36 – 1,23 (m, 45H), 0,91 (t, $J = 7,3$ Hz, 9H), 0,86 (t, $J = 6,7$ Hz, 9H). Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 174,18, 166,58, 72,38, 71,82, 56,87, 56,32, 42,92, 39,04, 31,72, 31,50, 31,35, 29,23, 29,16, 28,95 (2), 25,76, 25,62, 25,28, 22,62, 19,94, 14,07, 13,68. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +6,43$ (c = 0,005 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 404,2771, encontrado 404,2775.

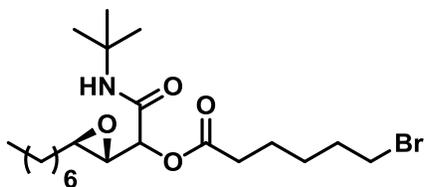


2-(*tert*-Butilamino)-1-((2*S*,3*R*)-3-heptiloxiran-2-il)-2-oxoetil-4-iodobenzoato (**12k**): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,85 (dd, $J = 8,3, 5,3$ Hz, 6H), 7,79 (t, $J = 9,3$ Hz, 6H), 5,89 (s, 3H), 5,23 (d2) (d, $J = 4,9$ Hz, 3H), 5,18 (d1) (d, $J = 5,1$ Hz, 1H), 4,92 (d3) (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 3,40 (d3) (dd, $J = 8,7, 3,9$ Hz, 1H), 3,26 (d2) (dd, $J = 4,7, 2,0$ Hz, 1H), 3,18 (d1) (dd, $J = 5,0, 1,9$ Hz, 1H), 3,14 – 3,09 (d3) (m, 1H), 3,06 (d1) (td, $J = 5,6, 1,8$ Hz, 1H), 3,00 (d2) (td, $J = 5,6, 1,8$ Hz, 1H), 1,64 – 1,52 (m, 6H), 1,47 – 1,40 (m, 6H),

1,37 (s, $J = 2,6$ Hz, 27H), 1,31 – 1,22 (m, 24H), 0,87 (t, $J = 6,6$ Hz, 9H). Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (100 MHz, Acetona- d_6) δ (ppm): 166,51, 165,23, 138,90 (2), 132,11 (2), 130,19, 101,61, 76,95, 73,81, 57,23, 56,75, 51,89, 32,49, 32,26, 32,16, 29,95, 28,86, 26,61, 23,30, 14,35. $[\alpha]_D^{24} = +2,32$ ($c = 0,007$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{INNaO}_5$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 524,1843, encontrado 524,1840.

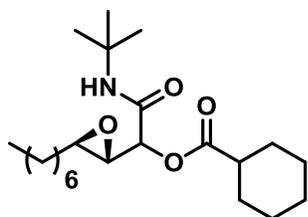


2-(Benzilamino)-1-((2*S*,3*R*)-3-heptiloxiran-2-il)-2-oxoetil-3-metilbutanoato (**12l**): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,37 – 7,31 (m, 6H), 7,31 – 7,24 (m, 6H), 6,44 – 6,34 (m, 3H), 5,28 (d1) (d, $J = 4,3$ Hz, 1H), 5,21 (d2) (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 4,85 (d3) (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 4,56 – 4,41 (m, 6H), 3,31(d3) (dd, $J = 8,8, 4,0$ Hz, 1H), 3,19 (d2) (dd, $J = 4,9, 2,2$ Hz, 1H), 3,12 (d1) (dd, $J = 4,3, 2,2$ Hz, 1H), 3,08 (d3) (ddd, $J = 6,6, 5,7, 4,0$ Hz, 1H), 3,01 (d1) (td, $J = 5,7, 2,1$ Hz, 1H), 2,96 (d2) (ddd, $J = 6,2, 5,1, 2,1$ Hz, 1H), 2,31 – 2,25 (m, 6H), 2,11 (dt, $J = 14,0, 7,0$ Hz, 3H), 1,60 – 1,50 (m, 6H), 1,47 – 1,37 (m, 6H), 1,33 – 1,24 (m, 27H), 0,99 – 0,92 (m, 18H), 0,88 (t, $J = 6,7$ Hz, 9H). Diastereoisômeros majoritário – d1: RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171,28, 166,59, 137,54, 128,76 (2), 127,64, 127,61 (2), 72,81, 72,15, 56,99, 56,27, 43,28, 43,01, 31,72, 31,33, 29,24, 29,15, 25,76, 25,71, 22,62, 22,30, 14,08. $[\alpha]_D^{24} = +5,23$ ($c = 0,007$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 412,2458, encontrado 412,2461.

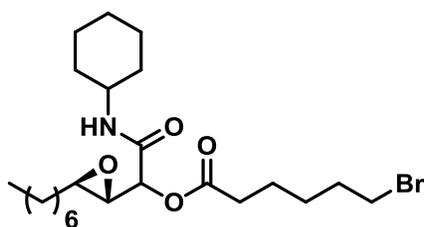


2-(*tert*-Butilamino)-1-((2*S*,3*R*)-3-heptiloxiran-2-il)-2-oxoetil-6-bromoexanoato (**12m**): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5,83 (sl, 3H), 5,02 (d1) (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), 5,01 (d2) (d, $J = 5,0$ Hz, 1H), 4,71 (d3) (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 3,41 (t, $J = 6,7$ Hz, 6H), 3,25 (d3) (dd, $J = 8,9, 4,0$ Hz, 1H), 3,12 (d2) (dd, $J = 5,0, 2,2$ Hz, 1H), 3,06 (d1) (dd, $J = 4,8, 2,2$ Hz, 1H), 2,97 (d1) (td, $J = 5,7, 2,1$ Hz, 1H), 2,93 (d2) (ddd, $J = 6,0, 5,3, 2,2$ Hz, 1H), 2,45 (td, $J = 7,2, 1,0$ Hz, 6H), 1,93 – 1,84 (m, 6H), 1,70 (dt, $J = 15,3, 7,6$ Hz, 6H), 1,62 (s, 3H), 1,59 – 1,47 (m, 12H), 1,44 -1,40 (m, 6H), 1,36 (s, 27H), 1,28 (dd, $J = 6,1, 4,4$ Hz, 27H), 0,90 – 0,85 (m, 9H). Diastereoisômero majoritário

– d1: RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171,66, 165,65, 72,37, 57,23, 56,29, 51,62, 33,80, 33,38, 32,32, 31,71, 31,33, 29,23, 29,14, 28,67 (3), 27,54, 25,74, 23,95, 22,62, 14,08. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +1,45$ (c= 0,006 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{BrNNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 470,1876, encontrado 470,1877.

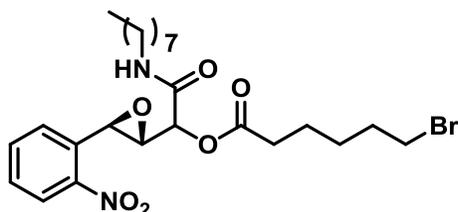


2-(*tert*-Butylamino)-1-((2*S*,3*R*)-3-heptiloxiran-2-il)-2-oxoetilciclohexanocarboxilato (**12n**): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5,83 (sl, 3H), 5,08 (d1) (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 5,04 (d2) (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 4,71 (d3) (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 3,26 (dd, $J = 8,8, 4,0$ Hz, 3H), 3,14 (d2) (dd, $J = 4,7, 2,2$ Hz, 1H), 3,06 (d1) (dd, $J = 4,5, 2,1$ Hz, 1H), 2,97 (d1) (td, $J = 5,7, 2,1$ Hz, 1H), 2,92 (d2) (ddd, $J = 6,2, 5,2, 2,1$ Hz, 1H), 2,46 – 2,35 (m, 3H), 1,99 – 1,88 (m, 6H), 1,81 – 1,74 (m, 6H), 1,70 – 1,63 (s, 3H), 1,57 – 1,42 (m, 12H), 1,35 (s, 27H), 1,31 – 1,24 (m, 36H), 1,17 (td, $J = 7,0, 4,4$ Hz, 3H), 0,88 (t, $J = 6,5$ Hz, 9H). Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174,13, 165,83, 71,85, 56,85, 56,38, 51,51, 42,89, 31,70, 31,37, 29,22, 29,15, 29,06, 29,00, 28,87, 28,66 (3), 25,74, 25,62, 25,33, 25,25, 22,62, 14,07. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +6,06$ (c= 0,004 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{NNaO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 404,277129, encontrado 404,277815.

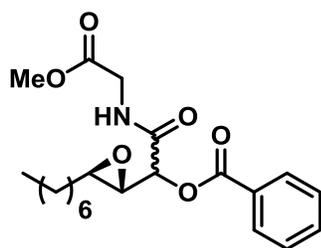


2-(Cicloexilamino)-1-((2*S*,3*R*)-3-heptiloxiran-2-il)-2-oxoetil-6-bromoexanoato (**12o**): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5,89 (t, $J = 8,3$ Hz, 3H), 5,14 (d1) (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 5,09 (d2) (d, $J = 5,0$ Hz, 1H), 4,77 (d3) (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 3,83 – 3,72 (m, 3H), 3,41 (t, $J = 6,7$ Hz, 6H), 3,27 (d3) (dd, $J = 8,8, 4,0$ Hz, 1H), 3,13 (d2) (dd, $J = 5,0, 2,2$ Hz, 1H), 3,08 (d1) (dd, $J = 4,6, 2,1$ Hz, 1H), 2,97 (d1) (td, $J = 5,5, 2,0$ Hz, 1H), 2,96 – 2,92 (d2) (m, 1H), 2,45 (td, $J = 7,5, 2,1$ Hz, 6H), 1,93 – 1,85 (m, 12H), 1,74 – 1,66 (m, 12H), 1,64 (s, 6H), 1,54 (ddd, $J = 18,6, 9,9, 6,3$ Hz, 9H), 1,45 – 1,35 (m, 9H), 1,27 (s, $J = 15,4$ Hz, 27H), 1,23 – 1,13 (m, 9H), 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 9H). Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171,69, 165,56, 72,21, 57,07, 56,22, 48,23, 33,79, 33,37, 32,91, 32,31,

31,72, 31,32, 29,23, 29,14, 27,54, 25,74, 25,44, 24,69 (2), 23,97, 22,62, 14,07. $[\alpha]_D^{24} = +4,76$ (c= 0,004 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $C_{23}H_{40}BrNNaO_4$ $[M + Na]^+$ 496,2033, encontrado 496,2035.

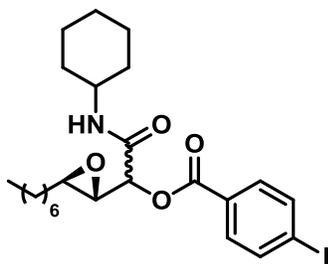


1-((2S,3R)-3-(2-Nitrofenil)oxiran-2-il)-2-(octilamino)-2-oxoetil-6-bromoexanoato (**12p**): RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) (4 diastereoisômeros): 8,18 (ddd, $J = 8,2, 4,2, 0,9$ Hz, 4H), 7,72 – 7,65 (m, 4H), 7,59 (dd, $J = 6,2, 1,8$ Hz, 4H), 7,51 (dd, $J = 8,2, 1,3$ Hz, 4H), 6,29 (d1) (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 6,22 (d2) (t, $J = 6,1$ Hz, 1H), 5,91 (d3) (s, 1H), 5,81 (d4) (s, 1H), 5,63 (d1) (d, $J = 3,3$ Hz, 1H), 5,45 (d2) (d, $J = 4,4$ Hz, 1H), 4,85 (d3) (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 4,73 (d4) (d, $J = 4,2$ Hz, 1H), 4,62 (d3) (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 4,57 (d2) (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 4,51 (d1) (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 4,23 (d4) (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 3,79 (d4) (dd, $J = 8,5, 4,2$ Hz, 1H), 3,74 (d3) (dd, $J = 8,5, 4,4$ Hz, 1H), 3,48 – 3,40 (m, 6H), 3,38 – 3,29 (m, 4H), 3,15 (dt, $J = 7,7, 2,0$ Hz, 2H), 2,53 (m, 2H), 2,38 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 2,29 – 2,19 (m, 2H), 1,96 – 1,84 (m, 6H), 1,81 – 1,72 (m, 5H), 1,72 – 1,63 (m, 5H), 1,61 – 1,48 (m, 10H), 1,36 – 1,23 (m, 22H), 0,89 (t, $J = 6,8$ Hz, 12H). Diastereoisômeros majoritários *trans* – d1 e d2: RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171,68, 171,34, 166,31, 166,16, 147,57, 147,46, 134,55, 134,50, 132,97, 132,72, 129,09, 128,91, 126,99 (2), 124,91, 124,80, 71,47, 70,15, 60,42, 59,94, 54,31, 53,30, 39,65, 39,57, 33,74, 33,77, 33,56, 33,45, 33,43, 32,37, 32,30, 31,77, 29,41, 29,39, 29,19 (2), 27,59, 27,55, 27,51, 26,88, 26,81, 23,93 (2), 23,85, 22,64 (2), 14,10 (2). $[\alpha]_D^{24} = +1,24$ (c= 0,004 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $C_{24}H_{35}BrN_2NaO_6$ $[M + Na]^+$ 549,1571, encontrado 549,1570.



1-((2S,3R)-3-Heptiloxiran-2-il)-2-((2-metoxi-2-oxoetil)amino)-2-oxoetilbenzoato (**12q**): RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8,10 (ddd, $J = 7,1, 3,3, 1,7$ Hz, 6H), 7,62 (ddd, $J = 12,8, 7,4, 4,4$ Hz, 3H), 7,52 – 7,44 (m, 6H), 6,76 (s, 3H), 5,52 (d1) (d, $J = 4,3$ Hz, 1H), 5,46 (d2) (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 5,16 (d1) (d, $J = 8,8$ Hz, 1H),

4,09 (dd, $J = 5,2, 2,0$ Hz, 6H), 3,76 (s, 9H), 3,32 (d2) (dd, $J = 4,7, 2,1$ Hz, 1H), 3,25 (d1) (dd, $J = 4,3, 2,1$ Hz, 1H), 3,14 (d1) (td, $J = 5,6, 2,0$ Hz, 1H), 3,09 (d2) (ddd, $J = 6,2, 5,3, 2,1$ Hz, 1H), 1,63 – 1,55 (m, 6H), 1,50 – 1,38 (m, 6H), 1,33 – 1,22 (m, 24H), 1,11 (dt, $J = 8,4, 7,0$ Hz, 3H), 0,90 – 0,84 (m, 9H). Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169,76, 166,92, 166,46, 133,81, 133,55, 129,94, 129,82, 128,73, 128,67, 72,60, 57,11, 56,25, 52,52, 41,05, 31,70, 31,34, 29,24, 29,15, 25,74, 22,61, 14,07. $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +3,58$ ($c = 0,004$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NNaO}_6$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 414,1887, encontrado 414,1891.

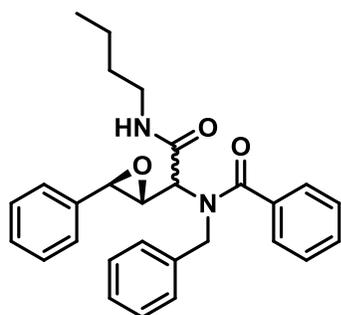


2-(Cicloexilamino)-1-((2*S*,3*R*)-3-heptiloxiran-2-il)-2-oxoetil 4-iodobenzoato (**12b**),^{42,93} Mistura de diastereoisômeros d1 – majoritário; d2 – minoritário *trans*; d3 – minoritário *cis*: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,87 – 7,81 (m, 6H), 7,81 – 7,74 (m, 6H), 5,95 – 5,87 (m, 3H), 5,31 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 5,30 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 4,97 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 3,86 – 3,74 (m, 3H), 3,42 (dd, $J = 8,9, 4,0$ Hz, 1H), 3,27 (dd, $J = 4,8, 2,2$ Hz, 1H), 3,20 (dd, $J = 4,7, 2,1$ Hz, 1H), 3,14 – 3,09 (m, 1H), 3,06 (td, $J = 5,6, 2,0$ Hz, 1H), 3,01 (td, $J = 5,8, 2,3$ Hz, 1H), 1,98 – 1,86 (m, 6H), 1,68 (s, 6H), 1,49 – 1,36 (m, 9H), 1,34 – 1,22 (m, 24H), 1,18-1,10 (m, 12H), 0,87 (m, 9H). Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165,36, 164,61, 138,01 (2), 131,21 (2), 128,47, 101,73, 73,18, 57,39, 56,25, 48,34, 32,87, 32,83, 31,71, 31,33, 29,23, 29,17, 25,75, 25,41, 24,66 (2), 22,62, 14,09. Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,85 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,77 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 5,92 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 5,31 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 3,86 – 3,74 (m, 1H), 3,20 (dd, $J = 4,7, 2,1$ Hz, 1H), 3,06 (td, $J = 5,7, 2,1$ Hz, 1H), 1,96 – 1,86 (m, 2H), 1,73 – 1,65 (m, 3H), 1,61 – 1,54 (m, 3H), 1,47 – 1,37 (m, 3H), 1,30 – 1,22 (m, 8H), 1,20 – 1,13 (m, 2H), 0,87 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H). Diastereoisômero minoritário – d3: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,83 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,79 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 5,93 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 4,97 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 3,87 – 3,79 (m, 1H), 3,42 (dd, $J = 8,8, 3,9$ Hz, 1H), 3,11 (ddd, $J = 6,5, 5,9, 4,0$ Hz, 1H), 1,97 – 1,87 (m, 2H), 1,72 – 1,66 (m, 2H), 1,64 – 1,54 (m, 5H), 1,35 – 1,17 (m, 12H), 0,83 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H).

5.2.7 Procedimento geral para a síntese das epoxi- α -acilaminocarboxamidas (34a-e)

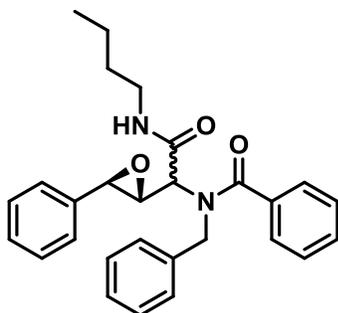
Em um vial de 5 mL, dissolveu-se o organocatalisador **I** (0,022 mmol, 0,012 g) em uma mistura de etanol (0,40 mL) e água destilada (0,10 mL). Em seguida, adicionou-se o aldeído α,β -insaturado (0,22 mmol) e peróxido de hidrogênio (0,66 mmol; 0,055 mL; solução aquosa 35%). A mistura permaneceu sob agitação constante durante 16 horas a temperatura ambiente. Quando a reação seguinte foi realizada em metanol ou TFE, a mistura etanol:água foi evaporada em um rotaevaporador e bomba de alto vácuo e a mistura seca foi redissolvida no solvente apropriado. Então, a amina (0,2 mmol) o ácido carboxílico (0,2 mmol) e a isonitrila (0,2 mmol) foram adicionados. A solução foi novamente mantida sob agitação a temperatura ambiente. Ao final da reação, acrescentou-se água destilada (10 mL) à mistura reacional e o produto bruto foi extraído com acetato de etila (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas em um rotaevaporador. O produto foi purificado por coluna cromatográfica com sílica flash como fase estacionária e uma mistura de hexano e acetato de etila como eluente na proporção de 7:3.

5.2.8 Caracterização dos compostos 34a-e

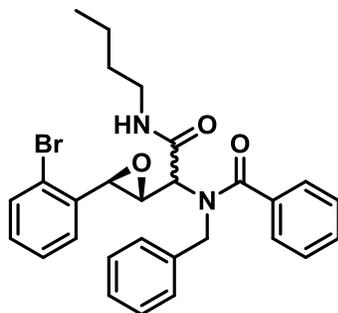


N-benzil-*N*-(2-(butilamino)-2-oxo-1-((2*R*,3*R*)-3-feniloxiran-2-yl)etil)benzamida (**34a**), diastereoisômero majoritário: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,01 (dd, $J = 8,2, 1,1$ Hz, 2H), 7,58 – 7,51 (m, 2H), 7,47 – 7,38 (m, 2H), 7,38 – 7,32 (m, 6H), 7,31 – 7,26 (m, 3H), 6,09 (s, 1H), 5,41 (dd, $J = 4,1, 2,8$ Hz, 1H), 5,21 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H), 3,83 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H), 3,59 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H), 3,40 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H), 3,23 – 3,09 (m, 1H), 1,40 – 1,29 (m, 2H), 1,29 – 1,17 (m, 2H), 0,80 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170,01, 165,73, 140,99, 138,50, 133,30, 130,06, 129,87 (2), 128,89 (2), 128,75 (2), 128,55 (2), 128,43 (2), 127,66 (2), 126,10 (2), 76,58, 75,49, 60,31, 52,66, 39,37, 31,49, 19,95, 13,60. $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = +2,45$ ($c = 0,005$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}_3\text{O}]^+$

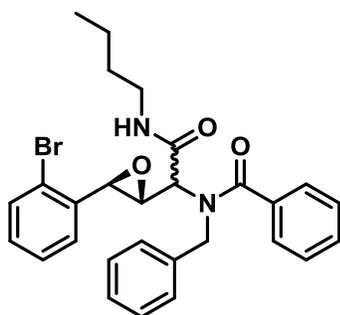
461,2435, encontrado 461,2379.



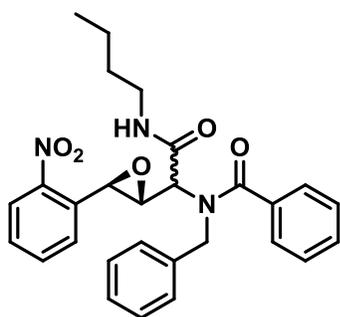
N-benzil-*N*-(2-(butilamino)-2-oxo-1-((2*R*,3*R*)-3-feniloxiran-2-il)etil)benzamida (**34a**), diastereoisômero minoritário: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,00 (dd, *J* = 8,4, 1,3 Hz, 2H), 7,59 – 7,54 (m, 2H), 7,49 – 7,40 (m, 4H), 7,34 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H), 7,30 – 7,26 (m, 2H), 7,25 – 7,20 (m, 3H), 7,00 (dd, *J* = 7,2, 2,3 Hz, 2H), 5,50 (dd, *J* = 5,4, 2,2 Hz, 1H), 5,11 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 3,66 (d, *J* = 13,1 Hz, 1H), 3,52 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 3,38 (d, *J* = 13,1 Hz, 1H), 3,30 (dt, *J* = 13,4, 6,9 Hz, 1H), 3,16 (dt, *J* = 13,1, 6,9 Hz, 1H), 1,43 – 1,32 (m, 2H), 1,29 – 1,17 (m, 2H), 0,81 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171,35, 166,57, 141,20, 138,32, 133,50, 129,86 (2), 129,31, 128,56 (2), 128,53 (2), 128,47 (2), 128,33 (2), 127,73, 127,44, 126,38 (2), 79,44, 73,73, 60,60, 52,00, 39,10, 31,51, 19,96, 13,62. [α]_D²⁷ = +19,10 (c= 0,002 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para C₂₈H₃₃N₂O₄⁺ [M + H₃O]⁺ 461,2435, encontrado 461,2317.



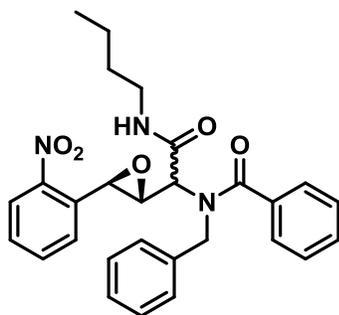
N-benzil-*N*-(1-((2*R*,3*R*)-3-(2-bromofenil)oxiran-2-il)-2-(butilamino)-2-oxoetil)benzamida (**34b**), diastereoisômero majoritário: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,06 (dd, *J* = 8,4, 1,3 Hz, 2H), 7,67 (dd, *J* = 7,8, 1,6 Hz, 2H), 7,60 – 7,54 (m, 2H), 7,46 – 7,41 (m, 2H), 7,34 – 7,29 (m, 1H), 7,24 – 7,19 (m, 3H), 7,16 (dd, *J* = 7,6, 1,7 Hz, 1H), 6,95 (dd, *J* = 6,6, 2,9 Hz, 1H), 5,81 (dd, *J* = 4,5, 1,7 Hz, 1H), 5,42 (d, *J* = 4,5 Hz, 1H), 3,67 (d, *J* = 13,1 Hz, 1H), 3,36 (d, *J* = 1,5 Hz, 1H), 3,32 (d, *J* = 13,1 Hz, 1H), 3,28 (dt, *J* = 13,6, 6,7 Hz, 1H), 3,13 (dt, *J* = 13,1, 6,4 Hz, 1H), 1,38 – 1,29 (m, 2H), 1,24 – 1,13 (m, 2H), 0,77 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171,37, 166,72, 140,31, 138,11, 133,53, 132,84, 130,05 (2), 129,35, 129,20, 128,47 (4), 128,32 (2), 128,25, 127,99, 127,41, 122,03, 77,08, 73,20, 60,28, 51,85, 39,15, 31,43, 19,92, 13,58. [α]_D²⁷ = -1,23 (c= 0,006 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para C₂₈H₃₂BrN₂O₄⁺ [M + H₃O]⁺ 539,1540, encontrado 539,1420.



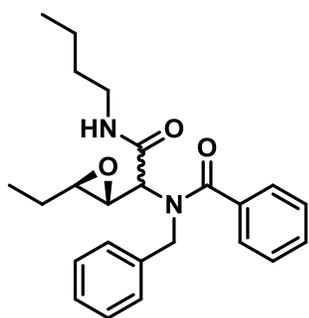
N-benzil-*N*-(1-((2*R*,3*R*)-3-(2-bromofenil)oxiran-2-il)-2-(butilamino)-2-oxoetil)benzamida (**34b**), diastereoisômero minoritário: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,02 (dd, $J = 8,4, 1,3$ Hz, 2H), 7,57 – 7,52 (m, 2H), 7,50 – 7,47 (m, 1H), 7,44 – 7,41 (m, 2H), 7,39 – 7,35 (m, 5H), 7,24 – 7,18 (m, 1H), 7,12 – 7,07 (m, 1H), 6,10 (s, 1H), 5,65 (dd, $J = 5,0, 2,6$ Hz, 1H), 5,47 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H), 3,87 (d, $J = 12,7$ Hz, 1H), 3,64 (d, $J = 12,6$ Hz, 1H), 3,39 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 3,25 – 3,18 (m, 1H), 1,45 – 1,36 (m, 2H), 1,31 – 1,22 (m, 2H), 0,84 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169,82, 165,09, 140,01, 138,48, 133,28, 132,79, 129,93 (2), 129,37, 129,34, 128,96 (2), 128,80 (2), 128,55, 128,40 (2), 127,80, 127,73, 122,49, 74,90, 73,86, 60,56, 51,22, 39,55, 31,46, 20,00, 13,65. $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -25,33$ ($c = 0,005$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{BrN}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}_3\text{O}]^+$ 539,1540, encontrado 539,1423.



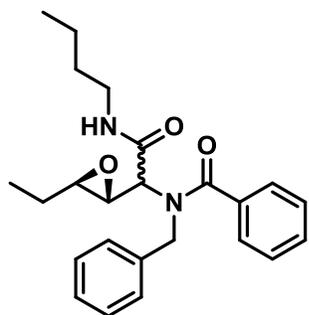
N-benzil-*N*-(2-(butilamino)-1-((2*R*,3*R*)-3-(2-nitrofenil)oxiran-2-il)-2-oxoetil)benzamida (**34c**), diastereoisômero majoritário: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,98 (dd, $J = 8,4, 1,3$ Hz, 2H), 7,89 (dt, $J = 7,7, 1,5$ Hz, 2H), 7,63 – 7,51 (m, 3H), 7,48 – 7,37 (m, 5H), 7,25 – 7,20 (m, 2H), 7,05 (dd, $J = 7,1, 2,4$ Hz, 1H), 5,73 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H), 5,68 (dd, $J = 5,5, 2,8$ Hz, 1H), 3,69 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H), 3,55 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 3,52 (d, $J = 13,3$ Hz, 1H), 3,28 (dt, $J = 13,6, 6,8$ Hz, 1H), 3,14 (dt, $J = 13,0, 6,9$ Hz, 1H), 1,37 – 1,28 (m, 2H), 1,24 – 1,15 (m, 2H), 0,78 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171,16, 166,18, 148,19, 138,11, 136,41, 133,58, 133,53, 133,39, 130,12, 129,92 (2), 129,62, 128,96, 128,64, 128,59 (2), 128,47, 128,17, 127,52, 124,58, 77,66, 70,05, 61,41, 52,23, 39,25, 31,42, 19,94, 13,57. $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -11,45$ ($c = 0,008$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{NaO}_5^+$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 510,1999, encontrado 510,1697.



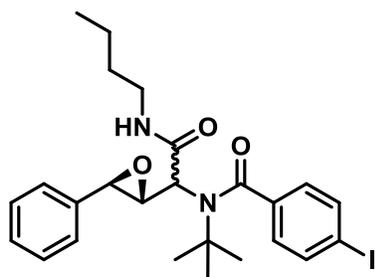
N-benzil-*N*-(2-(butilamino)-1-((2*R*,3*R*)-3-(2-nitrofenil)oxiran-2-il)-2-oxoetil)benzamida (**34c**), diastereoisômero minoritário: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,97 (dd, *J* = 8,4, 1,3 Hz, 2H), 7,88 (dd, *J* = 8,2, 1,2 Hz, 1H), 7,71 (dd, *J* = 7,9, 1,4 Hz, 1H), 7,64 – 7,57 (m, 2H), 7,53 (m, 2H), 7,46 – 7,42 (m, 2H), 7,42 – 7,38 (m, 2H), 7,38 – 7,31 (m, 2H), 6,62 – 6,54 (m, 1H), 5,81 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H), 5,59 (dd, *J* = 6,7, 3,5 Hz, 1H), 3,93 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), 3,77 (d, *J* = 13,0 Hz, 1H), 3,59 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 3,30 – 3,20 (m, 1H), 1,45 – 1,35 (m, 2H), 1,31 – 1,22 (m, 2H), 0,85 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,20, 164,71, 138,59, 136,17, 133,48, 133,44, 133,21, 129,71 (2), 129,15, 128,94, 128,83 (2), 128,62, 128,44, 128,14, 127,72, 126,99, 124,31, 124,13, 74,83, 70,16, 61,14, 52,45, 39,53, 31,38, 20,02, 13,65. [α]_D²⁷ = -37,40 (c= 0,005 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para C₂₈H₂₉N₃KO₅⁺ [M + K]⁺ 526,1739, encontrado 526,2216.



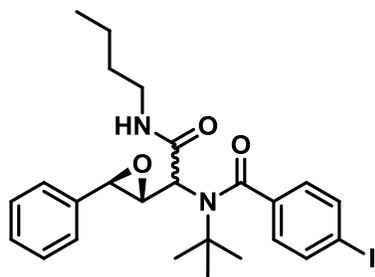
N-benzil-*N*-(2-(butilamino)-1-((2*R*,3*R*)-3-etiloxiran-2-il)-2-oxoetil)benzamida (**34d**), diastereoisômero majoritário: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,09 (dd, *J* = 8,3, 1,3 Hz, 1H), 8,00 (dd, *J* = 8,4, 1,3 Hz, 2H), 7,59 (tt, *J* = 1,1, 7,4, 1H), 7,48 – 7,42 (m, 4H), 7,34 – 7,29 (m, 2H), 7,26 – 7,23 (m, 1H), 5,29 (dd, *J* = 7,8, 3,3 Hz, 1H), 3,83 – 3,79 (m, 1H), 3,79 – 3,74 (m, 3H), 3,33 (dtd, *J* = 6,4, 7,0, 13,6, 1H), 3,20 (dtd, *J* = 5,6, 6,9, 13,6, 1H), 1,59 – 1,50 (m, 1H), 1,49 – 1,37 (m, 2H), 1,35 – 1,22 (m, 2H), 0,98 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H), 0,94 – 0,89 (m, 1H), 0,87 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,58, 166,72, 138,15, 133,56, 129,82 (2), 129,37, 128,74 (2), 128,53 (2), 128,26 (2), 127,68, 77,53, 72,11, 62,35, 52,62, 39,05, 31,65, 26,89, 20,04, 13,68, 9,87. [α]_D²⁷ = -4,96 (c= 0,005 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para C₂₄H₃₃N₂O₄⁺ [M + H₃O]⁺ 413,2435, encontrado 413,2393.



N-benzil-*N*-(2-(butilamino)-1-((2*R*,3*R*)-3-etiloxiran-2-il)-2-oxoetil)benzamida (**34d**), diastereoisômero minoritário: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,01 (dd, $J = 8,4, 1,3$ Hz, 2H), 7,59 – 7,54 (m, 1H), 7,46 – 7,41 (m, 3H), 7,34 – 7,28 (m, 4H), 6,99 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 5,26 (dd, $J = 5,4, 3,7$ Hz, 1H), 3,89 (ddd, $J = 8,9, 5,4, 3,8$, 1H), 3,85 (d, $J = 13,1$ Hz, 1H), 3,72 (d, $J = 13,0$ Hz, 1H), 3,60 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H), 3,20 (td, $J = 7,0, 6,0$ Hz, 2H), 1,61-1,53 (m, 2H), 1,43 – 1,33 (m, 2H), 1,29 – 1,19 (m, 2H), 0,99 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H), 0,96 – 0,85 (m, 1H), 0,81 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171,09, 165,60, 138,95, 133,34, 129,80 (2), 129,62, 128,62 (2), 128,51 (2), 128,48 (2), 127,51, 75,96, 73,82, 61,86, 52,75, 39,17, 31,54, 26,88, 20,01, 13,61, 10,08. $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = -15,16$ ($c = 0,005$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}_3\text{O}]^+$ 413,2435, encontrado 413,2398.



N-(*terc*-butil)-*N*-(2-(butilamino)-2-oxo-1-((2*R*,3*R*)-3-feniloxiran-2-il)etil)-4-iodobenzamida (**34e**), diastereoisômero majoritário: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,78 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,62 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,49 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,32 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H), 6,53 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H), 5,31 (dd, $J = 5,5, 4,5$ Hz, 1H), 5,13 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H), 3,61 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 3,22 – 3,06 (m, 2H), 1,38 – 1,32 (m, 2H), 1,29 – 1,20 (m, 2H), 1,08 (s, 9H), 0,85 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172,06, 165,36, 140,90, 137,82 (2), 137,68, 131,10 (2), 128,62, 128,32 (2), 127,74, 126,56 (2), 101,25, 74,95, 56,75, 39,27, 31,38, 29,17 (3), 28,40, 20,01, 13,63. $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = +18,27$ ($c = 0,004$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{IN}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}_3\text{O}]^+$ 553,1558, encontrado 553,1532.



N-(*terc*-butil)-*N*-(2-(butilamino)-2-oxo-1-((2*R*,3*R*)-3-feniloxiran-2-il)etil)-4-iodobenzamida (**34e**) diastereoisômero minoritário (mg): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,88 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H), 7,79 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,68 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 7,48 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 7,32 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H), 7,24 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 5,31 (dd, $J = 5,4, 2,3$ Hz, 1H), 5,06 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 3,69 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H), 3,23 (dtd, $J = 12,2, 8,2, 6,0$ Hz, 2H), 1,40 – 1,32 (m, 2H), 1,29 – 1,19 (m, 2H), 0,84 (s, 9H), 0,82 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172,93, 166,02, 141,26, 137,85 (2), 131,20 (2), 128,79, 128,49 (2), 127,82, 126,59 (2), 101,47, 82,12, 74,23, 55,94, 51,60, 39,09, 31,57, 28,87 (3), 20,03, 13,63. $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = +41,65$ ($c = 0,005$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{IN}_2\text{O}_4^+$ [$\text{M} + \text{H}_3\text{O}$] $^+$ 553,1558, encontrado 553,1574.

5.2.9 Procedimento para a reação de aziridinação/Passerini

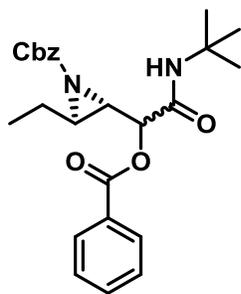
Em um vial de 5 mL, dissolveu-se o organocatalisador **I** (0,02 mmol, 0,011 g) em uma mistura de etanol (0,30 mL) e água destilada (0,10 mL). Em seguida, adicionou-se o aldeído α,β -insaturado (0,22 mmol), a *O*-tosil-hidroxilamina *N*-protegida (0,2 mmol) e o Na_2CO_3 (0,2 mmol). A mistura permaneceu sob agitação constante a temperatura ambiente até que a reação se completasse. Então, o ácido carboxílico (0,2 mmol) e a isonitrila (0,24 mmol) foram adicionados. A solução foi novamente mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas. Ao final da reação, acrescentou-se água destilada (10 mL) à mistura reacional e o produto bruto foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 anidro e concentradas em um rotaevaporador. O produto foi purificado por coluna cromatográfica com sílica flash como fase estacionária e uma mistura de hexano e acetato de etila como eluente na proporção de 9:1.

Padrão racêmico: Em um vial de 5 mL, dissolveu-se a pirrolidina (0,04 mmol, 0,0033 mL) em uma mistura de etanol (0,30 mL) e água destilada (0,10 mL). Em seguida, adicionou-se o aldeído α,β -insaturado (0,22 mmol), a *O*-tosil-hidroxilamina *N*-protegida (0,2 mmol) e o Na_2CO_3 (0,2 mmol). A mistura permaneceu sob agitação constante a

temperatura ambiente até que a reação se completasse. Então, o ácido carboxílico (0,2 mmol) e a isonitrila (0,24 mmol) foram adicionados. A solução foi novamente mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas. Ao final da reação, acrescentou-se água destilada (10 mL) à mistura reacional e o produto bruto foi extraído com AcOEt (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na₂SO₄ anidro e concentradas em um rotaevaporador. O produto foi purificado por coluna cromatográfica com sílica flash como fase estacionária e uma mistura de hexano e acetato de etila como eluente na proporção de 9:1.

5.2.10 Caracterização dos compostos 36a-d

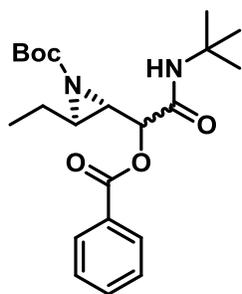
Os compostos **36a-d** foram obtidos como mistura de diastereoisômeros ou como um único diastereoisômero. Os dados de caracterização descritos abaixo referem-se aos estereoisômeros formados: d1 – majoritário; d2 – minoritário *trans*; d3 – minoritário *cis*.



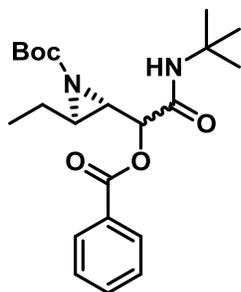
Benzil (2*S*,3*R*)-2-(1-(benzoiloxi)-2-(*tert*-butilamino)-2-oxoetil)-3-etilaziridina-1-carboxilato (**36a**), mistura de diastereoisômeros d1 – majoritário; d2 – minoritário *trans*; d3 – minoritário *cis*: RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,12 – 8,07 (m, 3H), 8,06 – 8,03 (m, 4H), 7,63 – 7,56 (m, 4H), 7,48 – 7,41 (m, 10H), 7,36 (s, 2H), 7,33 – 7,30 (m, 4H), 7,29 (s, 3H), 6,30 (d3) (s, 1H), 6,28 (d1) (s, 1H), 6,07 (d2) (s, 1H),

5,22 (d1) (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 5,19 (d2) (d, *J* = 5,8 Hz, 1H), 5,12 (d, *J* = 12,7 Hz, 2H) (d2, d3), 5,08 (d, *J* = 12,3 Hz, 2H) (d2, d3), 5,04 (d, *J* = 12,1 Hz, 1H) (d1), 5,01 (d, *J* = 12,2 Hz, 1H) (d1), 4,90 (d3) (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 3,10 (d3) (dd, *J* = 9,4, 6,3 Hz, 1H), 2,88 (d2) (dd, *J* = 5,9, 3,3 Hz, 1H), 2,82 (d1) (dd, *J* = 5,6, 3,2 Hz, 1H), 2,68 (d1) (ddd, *J* = 8,1, 5,1, 3,2 Hz, 1H), 2,64 – 2,58 (d1,d2) (m, 2H), 1,90 – 1,76 (m, 2H), 1,64 – 1,51 (m, 1H), 1,35 (s, 9H), 1,34 (s, 9H), 1,31-1,09 (m, 3H), 1,06 – 0,99 (m, 9H). Mistura de diastereoisômeros d1 – majoritário; d2 – minoritário *trans*: RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,17 (d2), 166,38 (d2), 165,98 (d1), 165,13 (d1), 161,17 (d1), 161,08 (d2), 133,74 (d2), 133,63 (d2),

133,45 (d1), 133,36 (d1), 130,12, 129,94 (2), 129,87, 128,66, 128,58 (4), 128,51 (2), 128,44 (2), 128,42 (2), 128,33 (2), 128,24, 128,08, 128,00, 73,63 (d2), 72,37 (d1), 68,35 (d1), 68,22 (d2), 51,77 (d1), 51,60 (d2), 43,25 (d1), 43,21 (d2), 43,01 (d2), 42,39 (d1), 28,61 (3) (d1), 28,58 (3) (d2), 24,02 (d1), 23,80 (d2), 10,98 (2). $[\alpha]_D^{27} = -14,50$ (c= 0,006 g/mL, em AcOEt) HRMS: calculado para $C_{25}H_{30}N_2NaO_5^+$ $[M + Na]^+$ 461,2052, encontrado 461,2044.

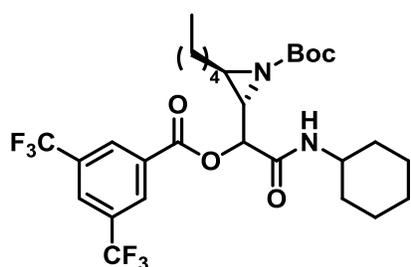


tert-Butil (2*S*,3*R*)-2-(1-(benzoiloxi)-2-(*tert*-butilamino)-2-oxoetil)-3-etilaziridina-1-carboxilato (**36b**), mistura de diastereoisômeros: d1 – majoritário e d3 – minoritário *cis*: RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8,07 (dd, $J = 8,4, 1,3$ Hz, 4H), 7,60 – 7,55 (m, 2H), 7,47 – 7,42 (m, 4H), 6,49 (d3) (s, 1H), 6,43 (d1) (s, 1H), 5,04 (d1) (d, $J = 6,6$ Hz, 1H), 4,89 (d3) (d, $J = 9,4$ Hz, 1H), 3,02 (d3) (dd, $J = 9,4, 6,3$ Hz, 1H), 2,71 (d1) (dd, $J = 6,6, 3,1$ Hz, 1H), 2,56 (d1) (ddd, $J = 8,0, 5,1, 3,1$ Hz, 1H), 2,49 (d3) (dd, $J = 13,1, 6,6$ Hz, 1H), 1,83 (ddd, $J = 13,8, 7,4, 5,2$ Hz, 2H), 1,47 (s, 9H), 1,42 (s, 9H), 1,40 (s, 9H), 1,37 (s, 9H), 1,28 – 1,19 (m, 2H), 1,05 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H), 1,02 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H), Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 166,05, 165,30, 160,27, 133,47, 129,95 (2), 129,30, 128,48 (2), 81,94, 73,16, 51,72, 43,86, 42,00, 28,64 (3), 27,92 (3), 23,91, 11,16. $[\alpha]_D^{27} = -22,04$ (c= 0,005 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $C_{22}H_{32}N_2NaO_5^+$ $[M + Na]^+$ 427,2209, encontrado 427,2202. O excesso enantiomérico foi determinado por UPC² (Coluna Trefoil, CEL1, 40% isopropanol, gradiente, 0,5 mL/min, 2000 psi, 40 °C), t_R (majoritário) = 10,78 min. ee = 90%



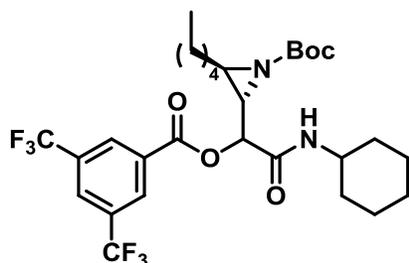
tert-Butil (2*S*,3*R*)-2-(1-(benzoiloxi)-2-(*tert*-butilamino)-2-oxoetil)-3-etilaziridina-1-carboxilato (**36b**), diastereoisômero: d2 –minoritário *trans*: RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 8,10 (dd, $J = 8,4, 1,3$ Hz, 2H), 7,61 (tt, $J = 7,5, 1,5$ Hz, 1H), 7,47 (t, $J = 7,7$ Hz, 2H), 6,01 (s, 1H), 5,07 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H), 2,76 (dd, $J = 6,4, 3,2$ Hz, 1H), 2,54 (ddd, $J = 7,6, 5,2, 3,2$ Hz, 1H), 1,84 (dq, $J = 14,6, 7,5, 5,2$ Hz, 1H), 1,41 (s,

9H), 1,35 (s, 9H), 1,33 – 1,23 (m, 1H), 1,08 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166,36, 165,23, 160,07, 133,67, 130,00 (2), 129,07, 128,60 (2), 81,52, 74,10, 51,55, 43,35, 42,67, 28,62 (3), 27,92 (3), 23,72, 11,19. $[\alpha]_D^{27} = -36,58$ ($c = 0,005$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{NaO}_5^+$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 427,2209, encontrado 427,2203.



tert-Butil (2*S*,3*R*)-2-(1-((3,5-bis(trifluorometil)benzoil)oxi)-2-(cicloexilamino)-2-oxoetil)-3-pentilaziridina-1-carboxilato (**36c**), mistura de diastereoisômeros: d1 – majoritário e d3 – minoritário *cis*: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,45 (s, 2H), 8,42 (s, 1H), 8,02 (s, 2H), 6,86 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H) (d1), 6,10 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H) (d3), 4,92 (d, $J = 9,5$ Hz,

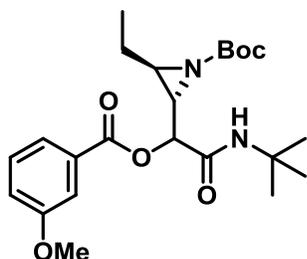
1H) (d3), 4,86 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H) (d1), 3,84 – 3,59 (m, 2H), 2,97 (dd, $J = 9,5, 6,3$ Hz, 1H) (d3), 2,67 (dd, $J = 8,1, 3,1$ Hz, 1H) (d1), 2,48 (ddd, $J = 7,9, 4,9, 3,1$ Hz, 1H) (d1), 1,95 – 1,77 (m, 8H), 1,65 (s, 9H) (d3), 1,42 (s, 9H) (d1), 1,41 (s, 6H), 1,31 – 1,06 (m, 22H), 0,72 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H). Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165,12, 163,09, 160,51, 132,47, 132,13, 131,61, 130,08 (2), 126,75, 124,14, 121,43, 82,56, 75,24, 48,84, 43,59, 41,44, 32,65 (2), 31,23, 30,26, 28,16, 27,94 (3), 26,60, 25,48, 24,68 (2), 22,43. $[\alpha]_D^{27} = +0,33$ ($c = 0,005$ g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_5^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 609,2758, encontrado 609,2751.



tert-Butil (2*S*,3*R*)-2-(1-((3,5-bis(trifluorometil)benzoil)oxi) -2-(cicloexilamino)-2-oxoetil)-3-pentilaziridina-1-carboxilato (**36c**), diastereoisômero d2 – minoritário *trans*: RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8,54 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 6,09 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 5,12 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), 4,36 –

4,24 (m, 1H), 2,76 (dd, $J = 6,8, 3,2$ Hz, 1H), 2,56 (ddd, $J = 8,0, 5,1, 3,1$ Hz, 1H), 1,97 – 1,80 (m, 4H), 1,66-1,75 (m, 3H), 1,42 (s, 9H), 1,36 – 1,26 (m, 11H), 0,91 – 0,85 (m, 3H). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 168,84, 163,52, 155,37, 132,63, 130,75, 130,22 (2),

130,02, 127,18, 124,07, 121,36, 79,82, 74,19, 73,22, 65,65, 57,77, 48,82, 32,93, 32,68, 31,39, 31,09, 28,16 (3), 25,41, 24,74, 24,14, 22,41, 13,94. $[\alpha]_{D}^{27} = -0,14$ (c= 0,004 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $C_{29}H_{39}F_6N_2NaO_5^+$ $[M + H]^+$ 609,2758, encontrado 609,2757.



tert-Butil (2*S*,3*R*)-2-(2-(*tert*-butilamino)-1-((3-metoxibenzoil)oxi)-2-oxoetil)-3-etilaziridina-1-carboxilato (**36d**), mistura de diastereoisômeros: d1 – majoritário e d2 – minoritário *trans*): RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,61 – 7,60 (m, 1H), 7,59 (dd, $J = 1,5, 1,1$ Hz, 1H), 7,58 – 7,56 (m, 1H), 7,51 (dd, $J = 2,6, 1,5$ Hz, 1H), 7,34 – 7,23 (m, 2H), 7,09 (dd, $J = 2,7, 0,9$ Hz, 1H), 7,06 (ddd, $J = 8,3, 2,7, 1,0$ Hz, 1H), 6,13 (s, 1H), 5,94 (s, 1H), 4,99 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H) (d2), 4,96 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H) (d1), 3,80 (s, 3H) (d2), 3,78 (s, 3H) (d1), 2,69 (dd, $J = 6,5, 3,2$ Hz, 1H) (d2), 2,65 (dd, $J = 6,6, 3,1$ Hz, 1H) (d1), 2,04 – 1,88 (m, 1H), 1,84 – 1,69 (m, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,35 (s, 9H), 1,31 (s, 9H), 1,27 – 1,18 (m, 2H), 0,99 (t, $J = 7,6$ Hz, 6H). Diastereoisômero majoritário – d1: RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 166,99, 159,65, 155,92, 130,29, 129,59, 129,49, 122,45, 120,09, 114,58, 79,80, 72,86, 63,87, 56,49, 55,49, 51,97, 28,54 (3), 28,33 (3), 28,20, 10,47. $[\alpha]_{D}^{27} = -8,91$ (c= 0,005 g/mL, em AcOEt). HRMS: calculado para $C_{23}H_{35}N_2O_5^+$ $[M + H]^+$ 435,2490, encontrado 435,2495

5.3 Ensaios de inibição da catepsina L

A catepsina L empregada nos procedimentos descritos a seguir é de fonte comercial (Sigma-Aldrich, C6854) e se apresenta na sua forma isolada em solução de $\geq 0,5$ unidades/mg de proteína. Em todos os ensaios, a solução inicial foi diluída 50 vezes em uma solução tampão de 100 mM de acetato de sódio pH 5,5; 5 mM de EDTA sem o ativante DTE.

5.3.1 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M)

A constante de Michaelis-Menten (K_M) foi determinada a partir da medida da atividade enzimática (relacionada com o aumento da fluorescência, que é proporcional ao aumento da concentração do produto da reação enzimática) em concentrações variadas do substrato fluorogênico Z-FR-MCA (previamente diluído em DMSO). As medidas de fluorescência foram realizadas em microplacas pretas de 96 poços e cada amostra foi analisada em triplicata.

Antes de realizar as medidas de fluorescência, a enzima (1 μ L da solução 1:50/poço) foi pré-ativada por 5 minutos em um tampão de 100 mM de acetato de sódio pH 5,5; 5 mM de EDTA e 5 mM de DTE (99 μ L/poço). As soluções estoque de substrato em DMSO (0,2 μ L/poço) foram diluídas no tampão NaOAc pH 5,5 com EDTA e DTE (99,8 μ L/poço) de modo que as concentrações finais do substrato nos poços variaram de 0 a 30 μ M. Após a adição das soluções de enzima e substrato na placa, foi realizada a leitura da fluorescência a λ_{em} 460 nm e λ_{ex} 355 nm por 5 minutos.

Os dados de $V_{m\acute{a}x}$ vs. $[S]$ foram plotados em uma curva e através da regressão não linear utilizando como modelo a eq. 10, obteve-se o valor de K_M .

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad \text{eq. 10}$$

5.3.2 Procedimentos para os ensaios de inibição da catepsina L

A inibição da catepsina L foi determinada espectrofluorimetricamente usando um substrato fluorogênico Z-FR-MCA em microplaca preta de 96 poços. Os compostos analisados nas triagens foram diluídos em DMSO e testados em triplicata a uma concentração 25 μ M.

Para cada ensaio, a solução enzimática (1 μ L/poço) foi diluída em um tampão de 100 mM de acetato de sódio pH 5,5; 5 mM de EDTA e 5 mM de DTE (99 μ L/poço) e então a solução foi pré-ativada por 5 minutos. Antes da adição do substrato, todos os compostos (5 μ L de uma solução estoque a 1 mM em DMSO) foram incubados

por 5 min com a solução enzimática ativada (100 µL/poço), diretamente na microplaca preta (96 poços). Após isto, o substrato Z-FR-MCA (em DMSO) diluído no tampão de 100 mM de acetato de sódio pH 5,5; 5 mM de EDTA e 5 mM de DTE foi adicionado nos poços (95 µL/poço de solução com as concentrações final de 7 µM) e a hidrólise foi acompanhada continuamente através do aumento da fluorescência de λ_{em} 460 nm e λ_{ex} 355 nm.

Os ensaios de IC_{50} foram realizados através do mesmo procedimento, entretanto variou-se a concentração do inibidor numa faixa de 1-50 µM em triplicata para cada concentração. Os dados obtidos foram plotados em uma curva de porcentagem de inibição vs. concentração de inibidor e por regressão não linear (eq. 2) obtiveram-se os valores de IC_{50} .

5.3.3 Teste de reversibilidade

O ensaio para determinar a reversibilidade do composto **LSPN423** foi realizado de acordo com o procedimento descrito,⁸³ no qual a enzima foi incubada a uma concentração 100 vezes maior do que aquela utilizada nos ensaios de percentual de inibição, com o inibidor a uma concentração 10 vezes maior que o IC_{50} (52,6 µM) por um período de 30 minutos. Após a incubação, a mistura foi diluída 100 vezes no tampão reacional contendo o substrato Z-FR-MCA (7 µM) e a hidrólise foi monitorada continuamente durante 10 min através do aumento da fluorescência a λ_{em} 460 nm e λ_{ex} 355 nm.

6. REFERÊNCIAS

1. LIMA, L. M. "Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira," *Quim Nova*, **30** (6): 1456, 2007.
2. IMMING, P. "Medicinal chemistry: definitions and objectives, drug activity phases, drug classification system," IN: *The Practice of medicinal chemistry*, Elsevier Ltd, 2015, p. 1–13.
3. MUNTHA, P. "Drug discovery and development - A review," *Res. Rev. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **5** (1): 135, 2016.
4. GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. "Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas," *Estudos Avançados*, **24** (70): 81, 2010.
5. SWINNEY, D. C. "Opinion: biochemical mechanisms of drug action: what does it take for success?," *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3** (9): 801, 2004.
6. STOKA, V.; TURK, V.; TURK, B. "Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration," *Ageing Res. Rev.*, **32**: 22, 2016.
7. TURK, V.; STOKA, V.; VASILJEVA, O.; RENKO, M.; SUN, T.; TURK, B.; TURK, D. "Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **1824** (1): 68, 2012.
8. VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. "Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets," *Front. Pharmacol.*, **7** (107):1, 2016.
9. HOOK, V.; FUNKELSTEIN, L.; WEGRZYN, J.; BARK, S.; KINDY, M.; HOOK, G. "Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces β -amyloid of Alzheimer's disease," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **1824** (1): 89, 2012.
10. (a) SUDHAN, D. R.; SIEMANN, D. W. "Cathepsin L targeting in cancer treatment," *Pharmacol Ther*, **155**: 105, 2015.
(b) TAN, G.-J.; PENG, Z.-K.; LU, J.-P.; TANG, F.-Q. "Cathepsins mediate tumor metastasis.," *World J. Biol. Chem.*, **4** (4): 91, 2013.

- (c) PRANJOL, M. Z. I.; GUTOWSKI, N.; HANNEMANN, M.; J. WHATMORE, “The potential role of the proteases cathepsin D and cathepsin L in the progression and metastasis of epithelial ovarian cancer,” *Biomolecules*, **5** (4): 3260–3279, 2015.
- (d) ZHANG, Q.; HAN, M.; WANG, W.; SONG, Y.; CHEN, G.; WANG, Z.; LIANG, Z. “Downregulation of cathepsin L suppresses cancer invasion and migration by inhibiting transforming growth factor- β -mediated epithelial-mesenchymal transition,” *Oncol. Rep.*, **33** (4): pp. 1851, 2015.
- (e) KUESTER, D.; LIPPERT, H.; ROESSNER, A.; KRUEGER, S. “The cathepsin family and their role in colorectal cancer,” *Pathol. Res. Pract.*, **204** (7): 491, 2008.
- (f) OKUDELA, K.; MITSUI, H.; WOO, T.; ARAI, H.; SUZUKI, T.; MATSUMURA, M.; KOJIMA, Y.; UMEDA, S.; TATEISHI, Y.; MASUDA, M.; OHASHI, K. “Alterations in cathepsin L expression in lung cancers,” *Pathol. Int.*, **66** (7): 386, 2016.
11. PORTER, K. M.; WIESER, F. A.; WILDER, C. L.; SIDELL, N.; PLATT, M. O. “Cathepsin protease inhibition reduces endometriosis lesion establishment.,” *Reprod. Sci.*, **23** (5): 623, 2016.
12. PEREIRA, B.; SOUZA-SILVA, F.; SILVA-ALMEIDA, M.; SANTOS-DE-SOUZA, R.; OLIVEIRA, L.; RIBEIRO-GUIMARAES, M.; ALVES, C. “Proteinase inhibitors: a promising drug class for treating leishmaniasis,” *Curr. Drug Targets*, **15** (12): 1121, 2014.
13. KERR, I. D.; WU, P.; MARION-TSUKAMAKI, R.; MACKEY, Z. B.; BRINEN, L. S. “Crystal structures of TbCatB and rhodesain, potential chemotherapeutic targets and major cysteine proteases of *Trypanosoma brucei*,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **4** (6): 1, 2010.
14. MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R. “Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections.,” *Bioorg. Med. Chem.*, **7** (4): 639, 1999.
15. MORI, J.; TANIKAWA, C.; FUNAUCHI, Y.; LO, P. H. Y.; NAKAMURA, Y.; MATSUDA, K. “Cystatin C as a p53-inducible apoptotic mediator that regulates cathepsin L activity,” *Cancer Sci.*, **107** (3): 298, 2016.

16. HOGLEN, N. C.; HIRAKAWA, B. P.; FISHER, C. D.; WEEKS, S.; SRINIVASAN, A. N. U. A.; WONG, M.; VALENTINO, K. L.; TOMASELLI, K. J.; BAI, X. U.; KARANEWSKY, D. O. N. S.; CONTRERAS, P. C. "Characterization of the Caspase Inhibitor IDN-1965 in a Model of Apoptosis-Associated Liver Injury," *J Pharmacol Exp Ther.* **297** (2): 811, 2001.
17. BUTTLE, D. J.; Saklatvalat, J. "Lysosomal cysteine endopeptidases mediate interleukin 1-stimulated cartilage proteoglycan degradation," *Biochem. J.*, **287**: 657, 1992.
18. ABDULLA, M.; LIM, K.; SAJID, M.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R. "Schistosomiasis Mansonii: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor," *PLOS Med.*, **4** (1): 130, 2007.
19. BOVA, F.; ETTARI, R.; MICALE, N.; CARNOVALE, C.; SCHIRMEISTER, T.; GELHAUS, C.; LEIPPE, M.; GRASSO, S.; ZAPPAL, M. "Constrained peptidomimetics as antiplasmodial falcipain-2 inhibitors," *Bioorganic Med. Chem.*, **18** (14): 4928, 2010.
20. MURATA, M.; MIYASHITA, S.; YOKOO, C.; TAMAI, M.; HANADA, K.; HATAYAMA, K.; TOWATARI, T.; NIKAWA, T.; KATUNUMA, N. "Novel epoxysuccinyl peptides: selective inhibitors of cathepsin B, in vitro," *FEBS*, **280** (2): 307, 1991.
21. SCHAD, C.; BAUM, U.; FRANK, B.; DIETZEL, U.; MATTERN, F.; GOMES, C.; PONTE-SUCRE, A.; MOLL, H.; SCHURIGT, U.; SCHIRMEISTER, T. "Development of a new antileishmanial aziridine-2,3-dicarboxylate-based inhibitor with high selectivity for parasite cysteine proteases," *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60** (2): 797, 2016.
22. POWERS, J. C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, O. D.; JAMES, K. E. "Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases.," *Chem. Rev.*, **102** (12): 4639, 2002.
23. (a) HANADA, K.; TAMAI, M.; YAMAGISHI, M.; OHMURA, S.; SAWADA, J.; TANAKA, I. "Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor," *Agric. Biol. Chem.*, **42** (3): 523, 1978.
- (b) HANADA, K.; TAMAI, M.; OHMURA, S.; SAWADA, J.; SEKI, T.; TANAKA, I. "Structure and synthesis of E-64, a new thiol protease inhibitor," *Agric. Biol. Chem.*, **42** (3): 529, 1978.

- (c) HANADA, K.; TAMAI, M.; MORIMOTO, S.; ADACHI, T.; OHMURA, S.; SAWADA, J.; TANAKA, I. "Inhibitory activities of E-64 derivatives on papain," *Agric. Biol. Chem.*, **42** (3): 537, 1978.
24. BARRETT, A. J.; KEMBHAVI, A. A.; BROWN, M. A.; KIRSCHKE, H.; KNIGHT, C. G.; TAMAI, M.; HANADA, K. "L-*trans*-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L.," *Biochem. J.*, **201** (1): 189, 1982.
25. PERLMAN, N.; HAZAN, M.; SHOKHEN, M.; ALBECK, A. "Peptidyl epoxides extended in the P' direction as cysteine protease inhibitors: effect on affinity and mechanism of inhibition.," *Bioorg. Med. Chem.*, **16** (19), 9032, 2008.
26. GONZÁLEZ, F. V.; IZQUIERDO, J.; RODRÍGUEZ, S.; MCKERROW, J. H.; HANSELL, E. "Dipeptidyl- α,β -epoxyesters as potent irreversible inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17** (24): 6697, 2007.
27. SCHULZ, F.; GELHAUS, C.; DEGEL, B.; VICIK, R.; HEPNER, S.; BREUNING, A.; LEIPPE, M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; SCHIRMEISTER, T. "Screening of protease inhibitors as antiplasmodial agents. Part I: aziridines and epoxides.," *ChemMedChem*, **2** (8): 1214, 2007.
28. SCHIEFER, I. T.; TAPADAR, S.; LITOSH, V.; SIKLOS, M.; SCISM, R.; WIJEWICKRAMA, G. T.; CHANDRASENA, E. P.; SINHA, V.; TAVASSOLI, E.; BRUNSTEINER, M.; FA', M.; ARANCIO, O.; PETUKHOV, P.; THATCHER, G. R. J. "Design, synthesis, and optimization of novel epoxide incorporating peptidomimetics as selective calpain inhibitors.," *J. Med. Chem.*, **56** (15): 6054, 2013.
29. ALVIM, J.; SEVERINO, R. P.; MARQUES, E. F.; MARTINELLI, A. M.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; CORRÊA, A. G. "Solution phase synthesis of a combinatorial library of chalcones and flavones as potent cathepsin V inhibitors," *J. Comb. Chem.*, **12** (5): 687, 2010.

30. MARQUES, E. F.; BUENO, M. A.; DUARTE, P. D.; SILVA, L. R. S. P.; MARTINELLI, A. M.; DOS SANTOS, C. Y.; SEVERINO, R. P.; BRÖMME, D.; VIEIRA, P. C.; CORRÊA, A. G. "Evaluation of synthetic acridones and 4-quinolinones as potent inhibitors of cathepsins L and V.," *Eur. J. Med. Chem.*, **54** (1): 10, 2012.
31. DEOBALD, A. M.; ÁVILA, R. M. D.; VIEIRA, P. C.; PAIXÃO, M. W.; CORRÊA, A. G. "Chiral epoxy- α -acyloxycarboxamides as inhibitors of cathepsins K, L and V," in *6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry (BrazMedChem)*, Canela-RS, 2012.
32. WENDER, P. A.; VERMA, V. A.; PAXTON, T. J.; PILLOW, T. H. "Function-oriented synthesis, step economy, and drug design," *Acc. Chem. Res.*, **41** (1): 40, 2008.
33. (a) CHIGHINE, A.; SECHI, G.; BRADLEY, M. "Tools for efficient high-throughput synthesis," *Drug Discov. Today*, **12** (11/12): 459, 2007.
(b) CIOC, R. C.; RUIJTER, E.; ORRU, R. V. A. "Multicomponent reactions: advanced tools for sustainable organic synthesis," *Green Chem.*, **16** (6): 2958, 2014.
(c) DÖMLING, A.; WANG, W.; WANG, K. "Chemistry and biology of multicomponent reactions," *Chem. Rev.*, **112**: 3083, 2012.
34. BONNE, D.; RODRIGUEZ, J. "Definitions and classifications of MBFTs," IN *Stereoselective Multiple Bond-Forming Transformations in Organic Synthesis*, First Edition, BONNE, D.; RODRIGUEZ, J. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., 2015, p. 1–8.
35. HAYASHI, Y. "Pot economy and one-pot synthesis," *Chem. Sci.*, **7** (2): 866, 2016.
36. PELLISSIER, H. "Stereocontrolled domino reactions," *Chem. Rev.*, **113** (1): 442, 2013.
37. TIETZE, L. F. *Domino reactions: concepts for efficient organic synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014.
38. DENMARK S. E.; THORARENSEN, A. "Tandem [4 + 2]/[3 + 2] cycloadditions of nitroalkenes," *Chem. Rev.*, **96**: 137, 1996.
39. WARNER, J. C.; LUDWIG, J. K. "Entropic considerations in molecular design," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **4** (11): 5897, 2016.
40. ANASTAS, P.; EGHBALI, N. "Green chemistry: principles and practice," *Chem. Soc. Rev.*, **39** (1): 301, 2010.

41. (a) MUKAIYAMA, T.; ISHIKAWA, H.; KOSHINO, H.; HAYASHI, Y. "One-pot synthesis of (-)-oseltamivir and mechanistic insights into the organocatalyzed Michael reaction," *Chem. Eur. J.*, **19** (52): 17789, 2013.
- (b) HAYASHI, Y.; SAKAMOTO, D.; OKAMURA, D. "One-pot synthesis of (S)-baclofen via aldol condensation of acetaldehyde with diphenylprolinol silyl ether mediated asymmetric Michael reaction as a key step," *Org. Lett.*, **18** (1): 4, 2016.
42. DEOBALD, A. M.; CORRÊA, A. G.; RIVERA, D. G.; PAIXÃO, M. W. "Organocatalytic asymmetric epoxidation and tandem epoxidation/Passerini reaction under eco-friendly reaction conditions.," *Org. Biomol. Chem.*, **10** (38): 7681, 2012.
43. (a) VAN DER HEIJDEN, G.; RUIJTER, E.; ORRU, R. "Efficiency, diversity, and complexity with multicomponent reactions," *Synlett*, **24** (6): 666, 2013.
- (b) ALVIM, H. G. O.; DA SILVA JR, E. N.; NETO, B. A. D. "What do we know about multicomponent reactions? Mechanisms and trends for the Biginelli, Hantzsch, Mannich, Passerini and Ugi MCRs," *RSC Adv.*, **4** (97): 54282, 2014.
44. DÖMLING A.; UGI, I. "Multicomponent reactions with isocyanides.," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**: 3168, 2000.
45. MAEDA, S.; KOMAGAWA, S.; UCHIYAMA, M.; MOROKUMA, K. "Finding reaction pathways for multicomponent reactions: the Passerini reaction is a four-component reaction," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50** (3): 644, 2011.
46. KRISHNA P. R.; LOPINTI, K. "Diastereoselective Passerini reaction of chiral 2,3-epoxy aldehydes with TosMIC," *Synlett*, **1**: 83, 2007.
47. ANDREANA, P. R.; LIU, C. C.; SCHREIBER, S. L. "Stereochemical control of the Passerini reaction.," *Org. Lett.*, **6** (23): 4231, 2004.
48. WANG, S. X.; WANG, M. X.; WANG, D. X.; ZHU, J. "Catalytic enantioselective Passerini three-component reaction," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47** (2): 388, 2008.
49. ZHANG, J.; LIN, S. X.; CHENG, D. J.; LIU, X. Y.; TAN, B. "Phosphoric acid-catalyzed asymmetric classic Passerini reaction," *J. Am. Chem. Soc.*, **137** (44): 14039, 2015.

50. WANG, Z. "Ugi Reaction," IN *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, p. 2830–2837.
51. ZHANG, Y.; AO, Y. F.; HUANG, Z. T.; WANG, D. X.; WANG, M. X.; ZHU, J. "Chiral phosphoric acid catalyzed asymmetric Ugi reaction by dynamic kinetic resolution of the primary multicomponent adduct," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55** (17): 5282, 2016.
52. VAN BERKEL, S. S.; BÖGELS, B. G. M.; WIJDEVEN, M. A.; WESTERMANN, B.; RUTJES, F. P. J. T. "Recent advances in asymmetric isocyanide-based multicomponent reactions," *Eur. J. Org. Chem.*, **19**: 3543, 2012.
53. ECHEMENDÍA, R.; DE LA TORRE, A. F.; MONTEIRO, J. L.; PILA, M.; CORRÊA, A. G.; WESTERMANN, B.; RIVERA, D. G.; PAIXÃO, M. W. "Highly stereoselective synthesis of natural-product-like hybrids by an organocatalytic/ multicomponent reaction sequence," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54** (26): 7621, 2015.
54. DE LA TORRE, A. F.; RIVERA, D. G.; CONCEPCIÓN, O.; ECHEMENDIA, R.; CORRÊA, A. G.; PAIXÃO, M. W. "Multicomponent synthesis of cyclic depsipeptide mimics by Ugi reaction including cyclic hemiacetals derived from asymmetric organocatalysis," *J. Org. Chem.*, **81** (3): 803, 2016.
- 55 (a) CHAWLA, R., SINGH, A. K., YADAV, L. D. S. "Organocatalysis in synthesis and reactions of epoxides and aziridines," *RSC Adv.*, **3** (29): 11385, 2013.
- (b) MENINNO, S.; LATTANZI, A. "Asymmetric organocatalytic journey into the world of three-membered rings," *Catal. Today*, **285**: 39, 2017.
- (c) AGGARWAL, V. K.; BADINE, D. M.; MOORTHIE, V. A. "Asymmetric synthesis of epoxides and aziridines from aldehydes and imines," IN: *Aziridines and Epoxides in Organic Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2006, p. 1–35.
- (d) H. PELLISSIER, "Recent developments in asymmetric aziridination," *Tetrahedron*, **66** (8): 1509, 2010.
56. MAJUMDAR K. C.; CHATTOPADHYAY, S. K. *Heterocycles in Natural Product Synthesis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.

57. UCHIDA, K.; ISHIGAMI, K.; WATANABE, H.; KITAHARA, T. "Synthesis of an insecticidal tetrahydroisocoumarin, (3*R*,4*S*,4*aR*)-4,8-dihydroxy-3-methyl-3,4,4*a*,5-tetrahydro-1*H*-2-benzopyran-1-one," *Tetrahedron*, **63** (5): 1281, 2007.
58. KATSUKI, T.; SHARPLESS, K. B. "The first practical method for asymmetric epoxidation," *J. Am. Chem. Soc.*, **102** (18): 5974, 1980.
59. JACOBSEN, E. N.; ZHANG, W.; MUCI, A. R.; ECKER, J. R.; DENG, L. "Highly enantioselective epoxidation catalysts derived from 1,2-diaminocyclohexane," *J. Am. Chem. Soc.*, **113** (18): 7063, 1991.
60. TU, Y.; WANG, Z.; SHI, Y. "An efficient asymmetric epoxidation method for *trans*-olefins mediated by a fructose-derived ketone," *J. Am. Chem. Soc.*, **118** (40): 9806, 1996.
61. MARIGO, M.; FRANZÉN, J.; POULSEN, T. B.; ZHUANG, W.; JØRGENSEN, K. A. "Asymmetric organocatalytic epoxidation of α,β -unsaturated aldehydes with hydrogen peroxide.," *J. Am. Chem. Soc.*, **127** (19): 6964, 2005.
62. ZHUANG, W.; MARIGO, M.; JØRGENSEN, K. A. "Organocatalytic asymmetric epoxidation reactions in water-alcohol solutions," *Org. Biomol. Chem.*, **3** (21): 3883, 2005.
63. BONDZIC, B. P.; URUSHIMA, T.; ISHIKAWA, H.; HAYASHI, Y. "Asymmetric epoxidation of α -substituted acroleins catalyzed by diphenylprolinol silyl ether," *Org. Lett.*, **12** (23): 5434, 2010.
64. ZHU, Y.; WANG, Q.; CORNWALL, R. G.; SHI, Y. "Organocatalytic Asymmetric Epoxidation and Aziridination of Olefins and Their Synthetic Applications.," *Chem. Rev.*, **114** (16): 8199, 2014.
65. LEE, S.; MACMILLAN, D. W. C. "Enantioselective organocatalytic epoxidation using hypervalent iodine reagents," *Tetrahedron*, **62** (49): 11413, 2006.
66. (a) WANG, X.; LIST, B. "Asymmetric counteranion-directed catalysis for the epoxidation of enals," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47** (6): 1119, 2008.

- (b) LIFCHITS, O.; REISINGER, C. M.; LIST, B. "Catalytic asymmetric epoxidation of α -branched enals.," *J. Am. Chem. Soc.*, **132** (30): 10227, 2010.
67. FEU, K. S.; DEOBALD, A. M.; NARAYANAPERUMAL, S.; CORRÊA, A. G.; PAIXÃO, M. W. "An eco-friendly asymmetric organocatalytic conjugate addition of malonates to α,β -unsaturated aldehydes: Application on the synthesis of chiral indoles," *Eur. J. Org. Chem.*, **26**: 5917, 2013.
68. DONSLUND, B. S.; JOHANSEN, T. K.; POULSEN, P. H.; HALSKOV, K. S.; JØRGENSEN, K. A. "The diarylprolinol silyl ethers: ten years after.," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**: 13860, 2015.
69. DUARTE F, J. S.; SANTOS, A. G. "A computational study on the stereoselective organocatalytic epoxidation of α,β -unsaturated aldehydes with hydrogen peroxide.," *Org. Biomol. Chem.*, **11** (41): 7179, 2013.
70. (a) VESELY, J.; IBRAHEM, I.; ZHAO, G.-L.; RIOS, R.; CÓRDOVA, A. "Organocatalytic enantioselective aziridination of α,β -unsaturated aldehydes.," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46** (5): 778, 2007.
- (b) DEIANA, L.; ZHAO, G.-L.; LIN, S.; DZIEDZIC, P.; ZHANG, Q.; LEIJONMARCK, H.; CÓRDOVA, A. "Organocatalytic enantioselective aziridination of α -substituted α,β -unsaturated aldehydes: asymmetric synthesis of terminal aziridines," *Adv. Synth. Catal.*, **352** (18): 3201, 2010.
- (c) DEIANA, L.; DZIEDZIC, P.; ZHAO, G.-L.; VESELY, J.; IBRAHEM, I.; RIOS, R.; SUN, J.; CÓRDOVA, A. "Catalytic asymmetric aziridination of α,β -unsaturated aldehydes.," *Chemistry*, **17** (28): 7904, 2011.
71. ZIMMER, L. E.; SPARR, C.; GILMOUR, R. "Fluorine conformational effects in organocatalysis: an emerging strategy for molecular design," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50** (50): 11860, 2011.
72. MOLNÁR, I. G.; TANZER, E. M.; DANILIUC, C.; GILMOUR, R. "Enantioselective aziridination of cyclic enals facilitated by the fluorine-iminium ion Gauche effect," *Chem. Eur. J.*, **20** (3): 794, 2014.

73. RACHWALSKI, M.; WUJKOWSKA, Z.; LEŠNIAK, S.; KIEŁBASIŃSKI, P. "Highly efficient asymmetric aziridination of unsaturated aldehydes promoted by chiral hetero-organic catalysts," *ChemCatChem*, **7** (21): 3589, 2015.
74. MONTEIRO, J. L.; MOREIRA, N. M.; SANTOS, D. A.; PAIXÃO, M. W.; CORRÊA, A. G. "Step economy strategy for the synthesis of amphoteric aminoaldehydes, key intermediates for reduced hydantoins," *Pure Appl. Chem.*, 2017. *In press*
75. C. DE GRAAFF, E. RUIJTER, AND R. V ORRU, "Recent developments in asymmetric multicomponent reactions," *Chem. Soc. Rev.*, **41**(10): 3969, 2012.
76. SANTOS, D. A.; DEOBALD, A. M.; CORNELIO, V. E.; ÁVILA, R. M. D.; CORNEA, R. C.; BERNASCONI, G. C. R.; PAIXÃO, M. W.; VIEIRA, P. C.; CORRÊA, A. G. "Asymmetric synthesis and evaluation of epoxy- α -acyloxycarboxamides as selective inhibitors of cathepsin L," *Bioorg. Med. Chem.*, **25** (17): 4620, 2017.
77. KIRCHNER, K.; BENITO-GARAGORRI, D.; BOCOKIC, V. "Copper (I) -catalyzed diastereoselective formation of oxazolines and *N*-sulfonyl-2-imidazolines," *Tetrahedron Lett.*, **47**: 8641, 2006.
78. ARAI, H.; SUGAYA, N.; SASAKI, N.; MAKINO, K.; LECTARD, S.; HAMADA, Y. "Enantioselective aziridination reaction of α,β -unsaturated aldehydes using an organocatalyst and *tert*-butyl *N*-arenesulfonyloxycarbamates," *Tetrahedron Lett.*, **50** (26): 3329, 2009.
79. ROTSTEIN, B. H.; RAI, V.; HILI, R.; YUDIN, A. K. "Synthesis of peptide macrocycles using unprotected amino aldehydes," *Nat. Protoc.*, **5** (11): 1813, 2010.
80. ROTSTEIN B. H.; YUDIN, A. K. "Aziridine-2-carboxaldehyde dimers undergo homo-Ugi 4-component-5-center reactions," *Synth.*, **44** (18): 2851, 2012.
81. LIEW, S. K.; HE, Z.; ST. DENIS, J. D.; YUDIN, A. K. "Stereocontrolled synthesis of 1,2- and 1,3-diamine building blocks from aziridine aldehyde dimers," *J. Org. Chem.*, **78** (23): 11637, 2013.

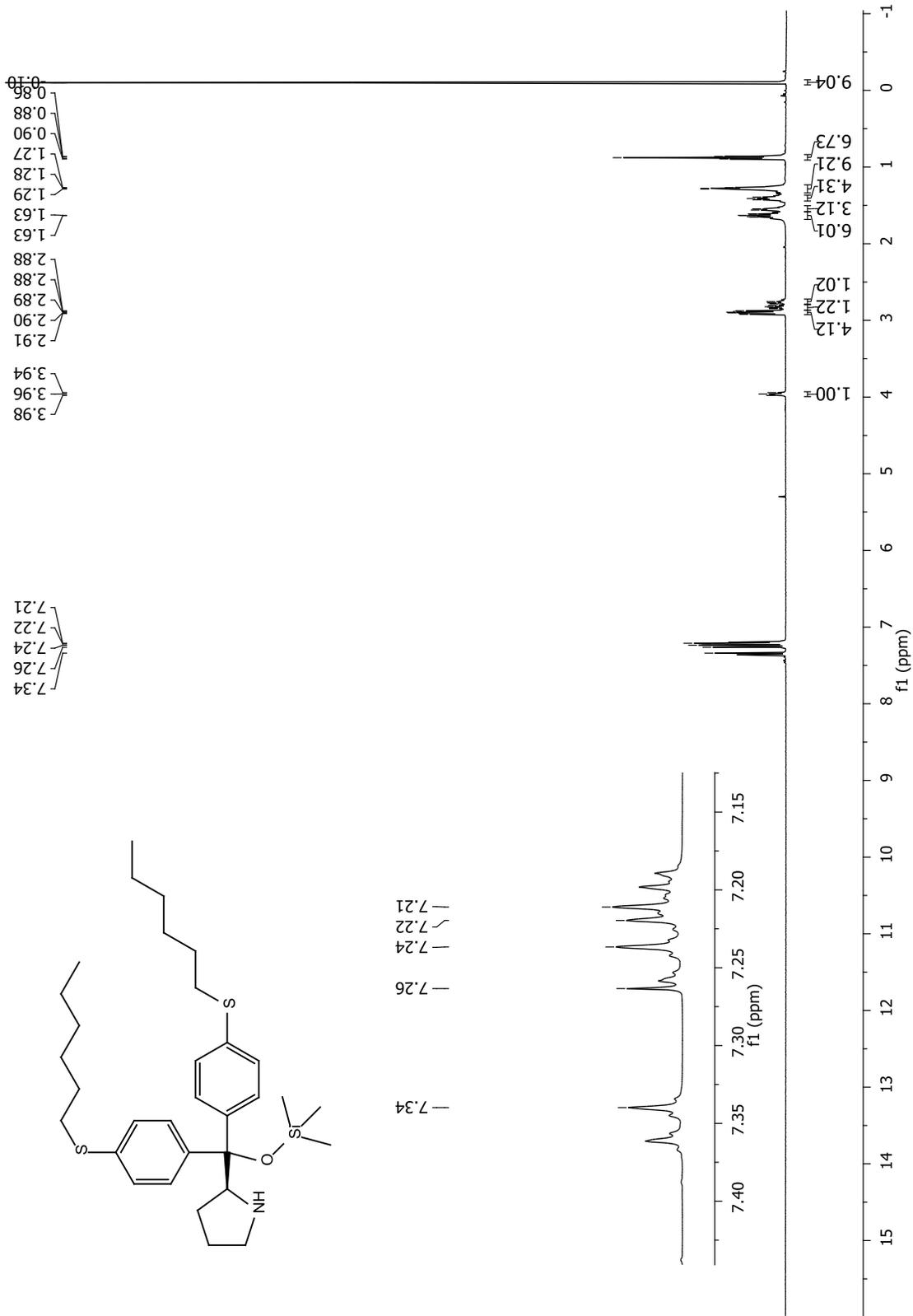
82. ZARETSKY, S.; ADACHI, S.; ROTSTEIN, B. H.; HICKEY, J. L.; SCULLY, C. C. G.; ST. DENIS, J. D.; COURTEMANCHE, R.; YU, J. C. Y.; CHUNG, B. K. W.; YUDIN, A. K. "Stereocontrolled disruption of the Ugi reaction toward the production of chiral piperazinones: Substrate scope and process development," *J. Org. Chem.*, **79** (21): 9948, 2014.
83. COPELAND, R. A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2005
84. (a) JÍLKOVÁ, A.; REZÁCOVÁ, P.; LEPSÍK, M.; HORN, M.; VÁCHOVÁ, J.; FANFRLÍK, J.; BRYNDA, J.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R.; MARES, M. "Structural basis for inhibition of cathepsin B drug target from the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*," *J. Biol. Chem.*, **286** (41): 35770, 2011.
- (b) SEVERINO, R. P.; GUIDO, R. V. C.; MARQUES, E. F.; BRÖMME, D.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; ANDRICOPULO, A. D.; VIEIRA, P. C. "Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V.," *Bioorg. Med. Chem.*, **19** (4): 1477, 2011.
- (c) OKAMOTO, K.; WANG, B. B.; BIROC, S. "Human Cathepsin O2, a Matrix Protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts," *J. Biol. Chem.*, **271** (4): 2126, 1996.
85. MORRISON, J. F. "The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions," *Trends Biochem. Sci.*, **7** (3): 102, 1982.
86. (a) M. J. SCULLEY AND J. F. MORRISON, "The determination of kinetic constants governing the slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions," *Biochim. Biophys. Acta*, **874** (1): 44, 1986.
- (b) CHA, S. "Tight-binding inhibitors-I. Kinetic behavior," *Biochem. Pharmacol.*, **24**: 2177, 1975.
- (c) CHA, S.; AGARWAL, R. P.; PARKS, R. E. "Tight-binding inhibitors-II. Non-steady state nature of inhibitors of milk xanthine oxidase by allopurinol and alloxanthine and of human erythrocytic adenosine deaminase by coformycin," *Biochem. Pharmacol.*, **24**: 2187, 1975.

- (d) CHA, S. "Tight-binding inhibitors—III. A new approach for the determination of competition between tight-binding inhibitors and substrates - inhibition of adenosine deaminase by coformycin," *Biochem. Pharmacol.*, **25**: 2695, 1976.
87. COPELAND, R. A.; *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc., 2000.
88. MONTEIRO, A. C.; ABRAHAMSON, M.; LIMA, A. P.; VANNIER-SANTOS, M. A.; SCHARFSTEIN, J. "Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*," *J. Cell Sci.*, **114** (21): 3933, 2001.
89. BRZIN, J.; ROGELJ, B.; POPOVIČ, T.; ŠTRUKELJ, B.; RITONJA, A. "Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*," *J. Biol. Chem.*, **275** (26): 20104, 2000.
90. MENON V.; RAO, M. "Interactions of a low molecular weight inhibitor from *Streptomyces sp.* MBR04 with human cathepsin D: implications in mechanism of inactivation," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **174** (5): 1705, 2014.
91. AZIZI, N.; AMIRI, A. K.; BOLOURTCHIAN, M.; SAIDI, M. R. "A green and highly efficient alkylation of thiols in water," *J. Iran. Chem. Soc.*, **6** (4): 749, 2009.
92. ZU, L.; ZHANG, S.; XIE, H.; WANG, W. "Catalytic asymmetric oxa-Michael-Michael cascade for facile construction of chiral chromans via an aminated intermediate," *Org. Lett.*, **11** (7): 1627, 2009.
- 93 DEOBALD, A. M. "Síntese e Aplicação de Organocatalisadores em Reações de Epoxidação Assimétricas Visando a Síntese de Compostos Bioativos," São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCAR, 2013. Tese de Doutorado, 230 p.
94. ANAND, R. C.; VIMAL, "A mild and convenient procedure for the esterification of amino acids," *Synth. Commun.*, **28** (11): 1963, 1998.
- 95 RIVERO, I. A.; HEREDIA, S.; OCHOA, A. "Esterification of amino acids and mono acids using triphosgene," *Synth. Commun.*, **31** (14): 2169, 2001.

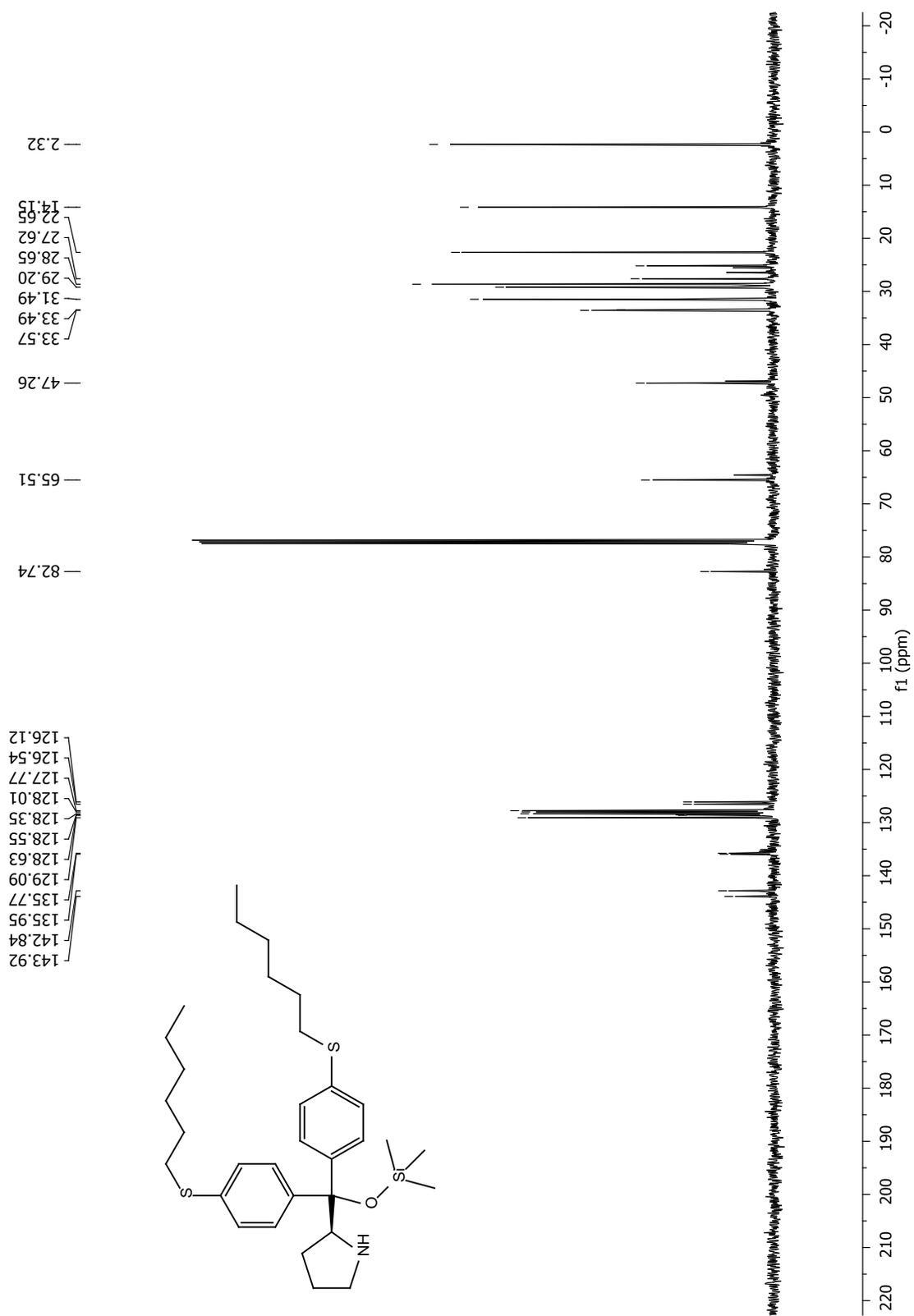
96 ANANTHI, N.; BALAKRISHNAN, U.; VELMATHI, S. "Salicylaldimine based copper (II) complex: a potential catalyst for the asymmetric Henry reaction," *Ark. Arch. Org. Chem.*, **2010** (11): 370, 2010.

97. QIN, L.; ZHOU, Z.; WEI, J.; YAN, T.; WEN, H. "General and efficient synthesis of O-sulfonylhydroxylamine derivatives," *Synth. Commun.*, **40** (5): 642, 2010.

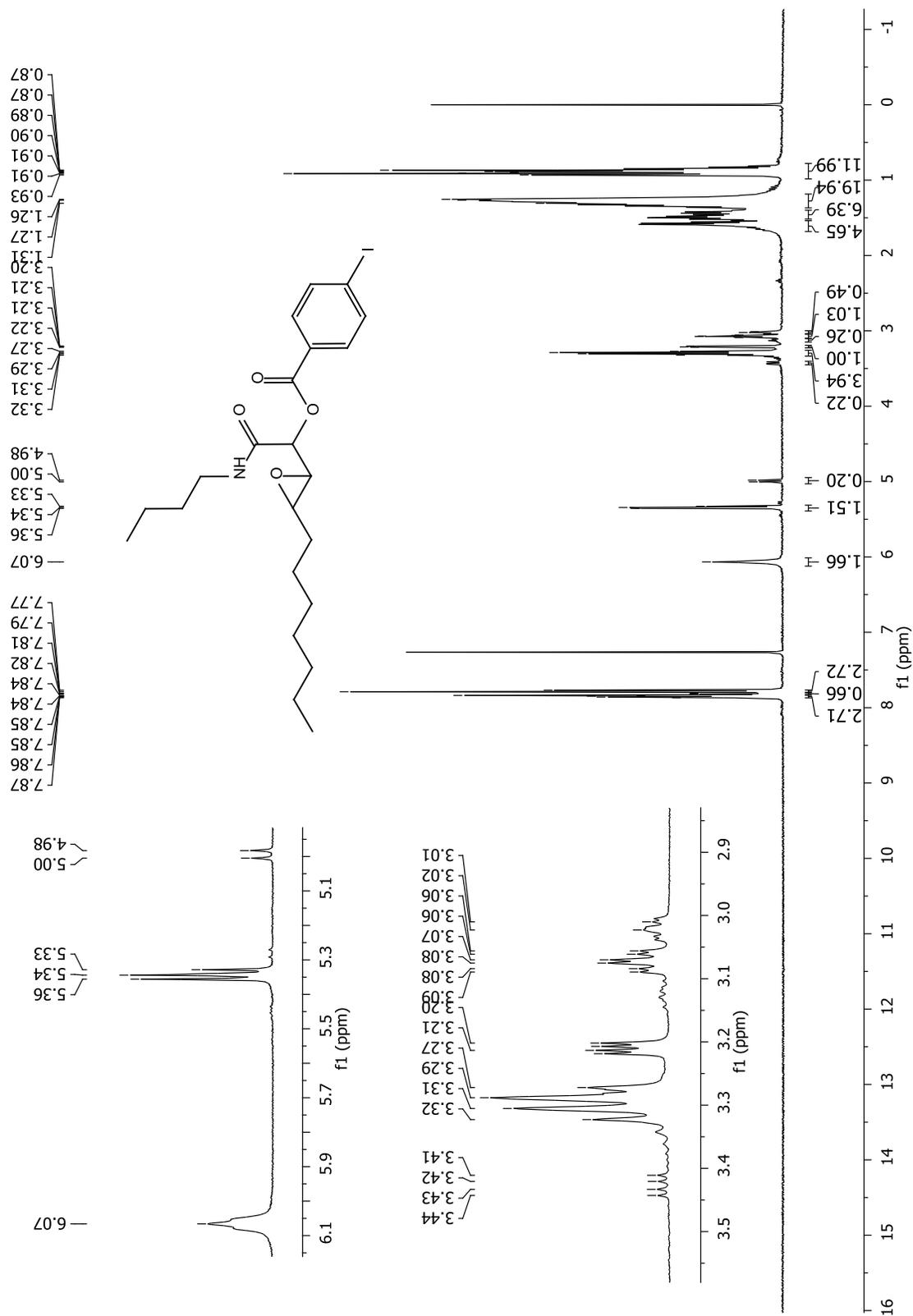
ANEXOS



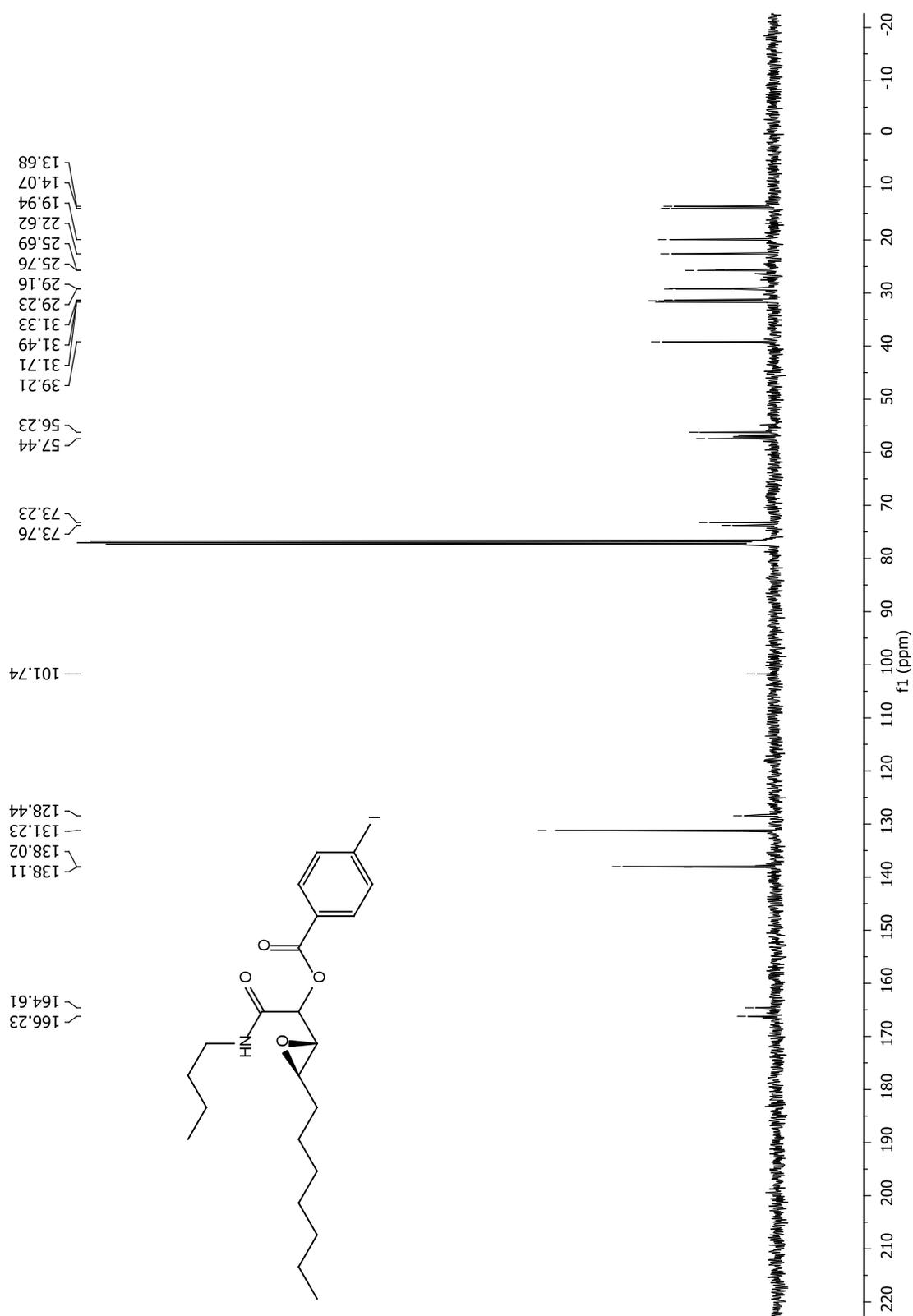
Espectro de RMN ¹H do catalisador I em CDCl₃ a 400 MHz.



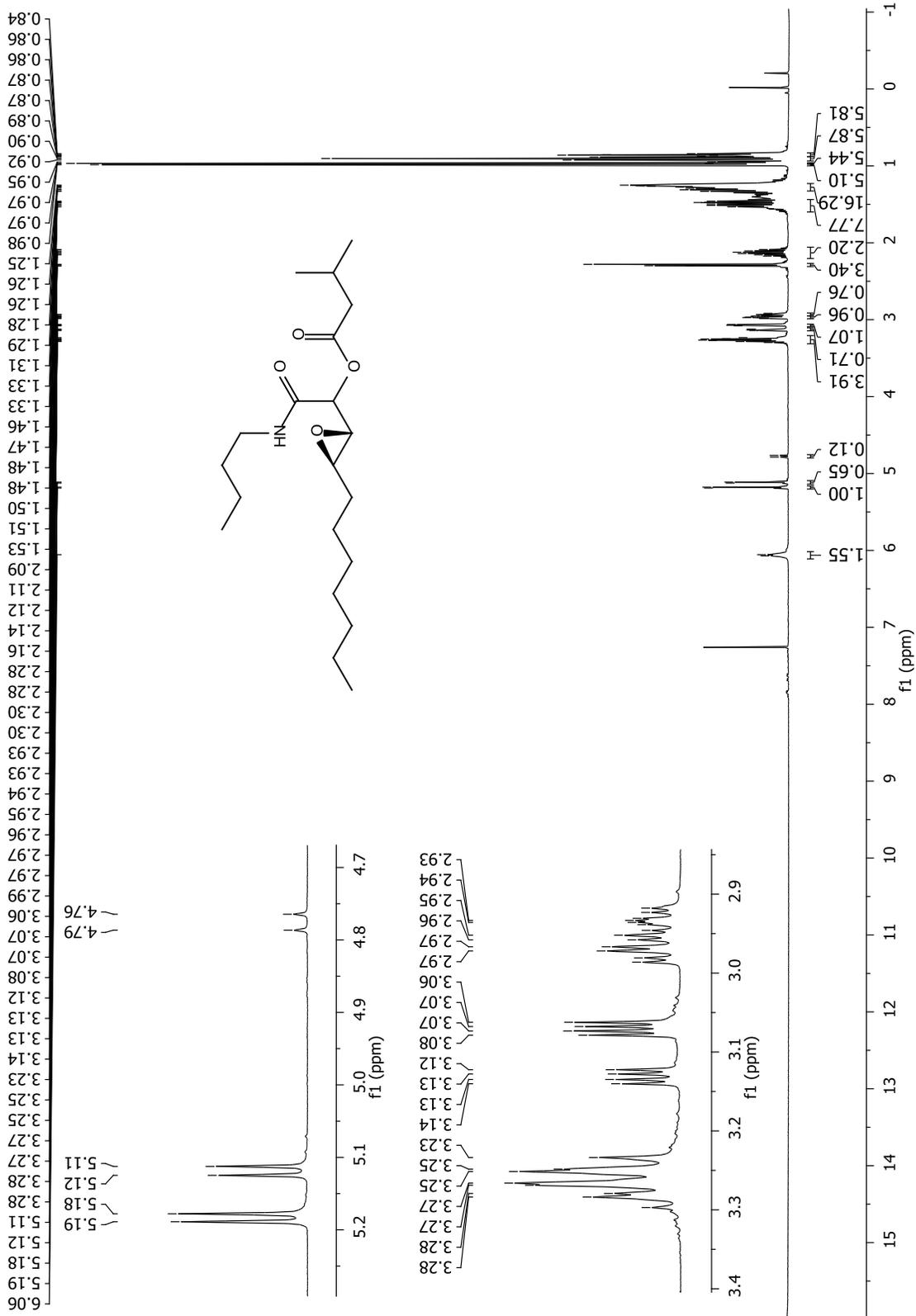
Espectro de RMN ¹³C do catalisador I em CDCl₃ a 100 MHz.



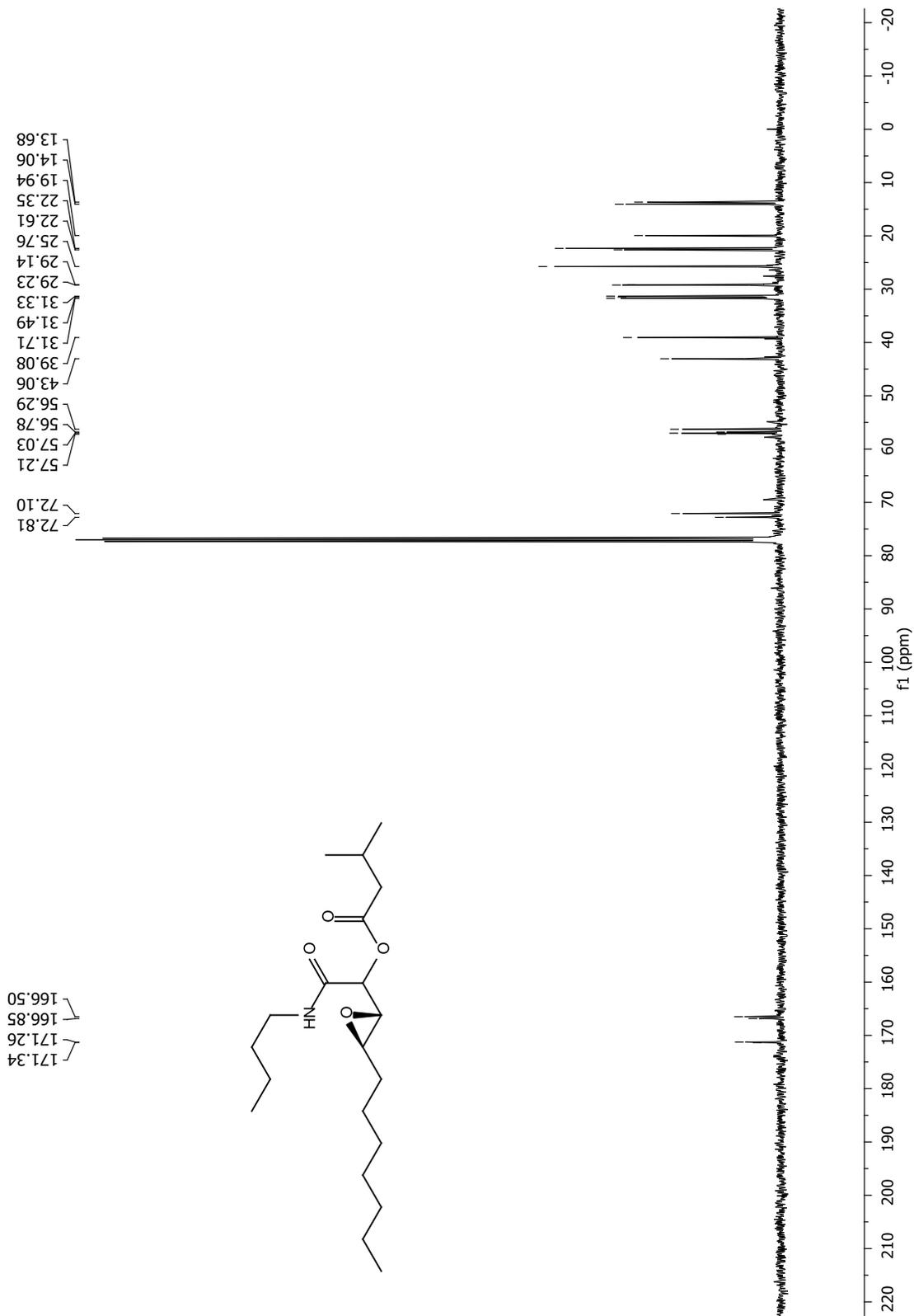
Espectro de RMN ¹H do composto 12g em CDCl₃ a 400 MHz.



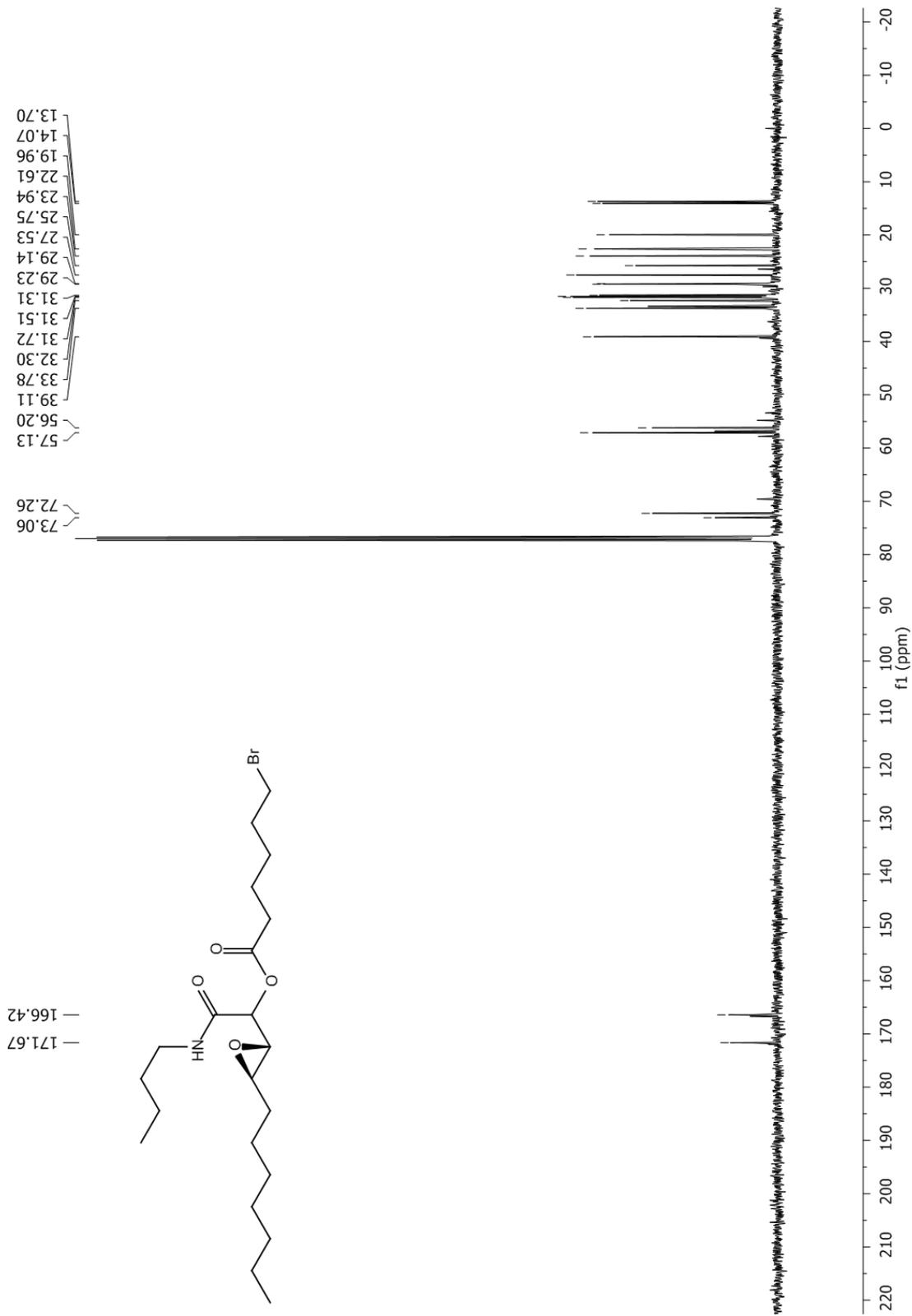
Espectro de RMN ¹³C do composto **12g** em CDCl₃ a 100 MHz.



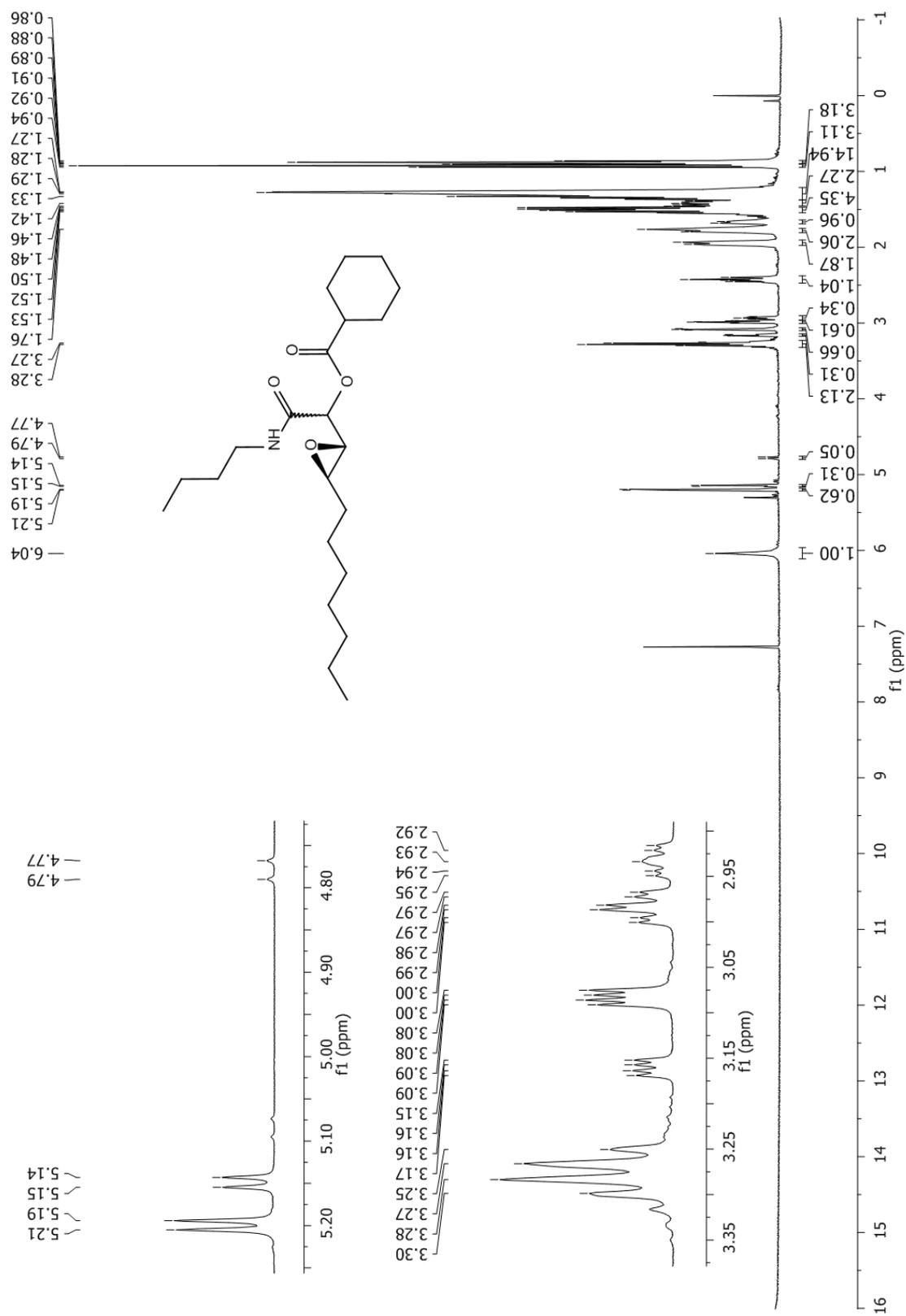
Espectro de RMN ¹H do composto 12h em CDCl₃ a 400 MHz.



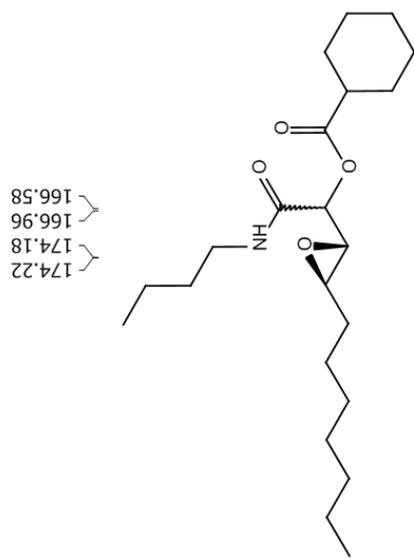
Espectro de RMN ¹³C do composto **12h** em CDCl₃ a 100 MHz.



Espectro de RMN ^{13}C do composto **12i** em CDCl_3 a 100 MHz.

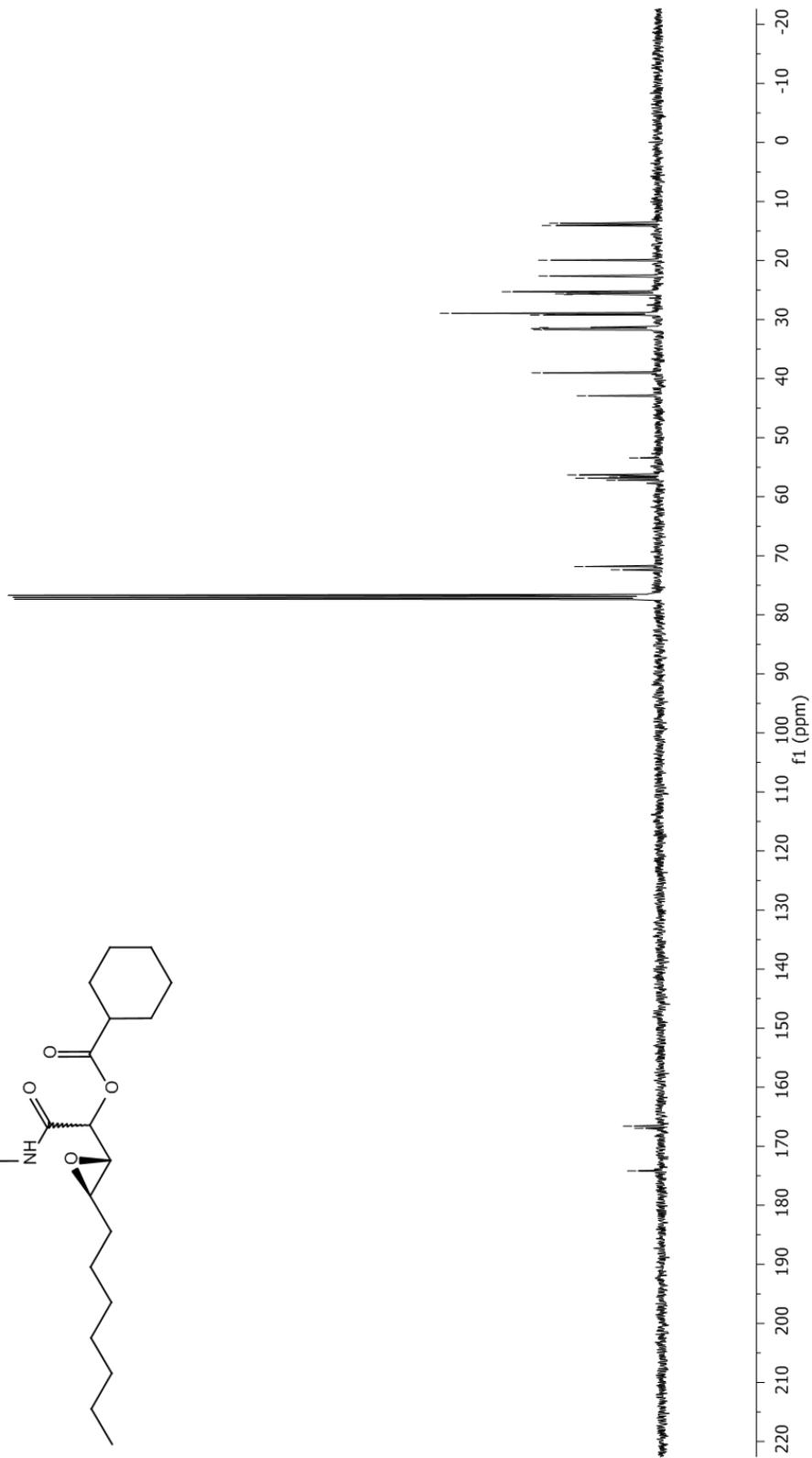


Espectro de RMN ¹H do composto 12j em CDCl₃ a 400 MHz.

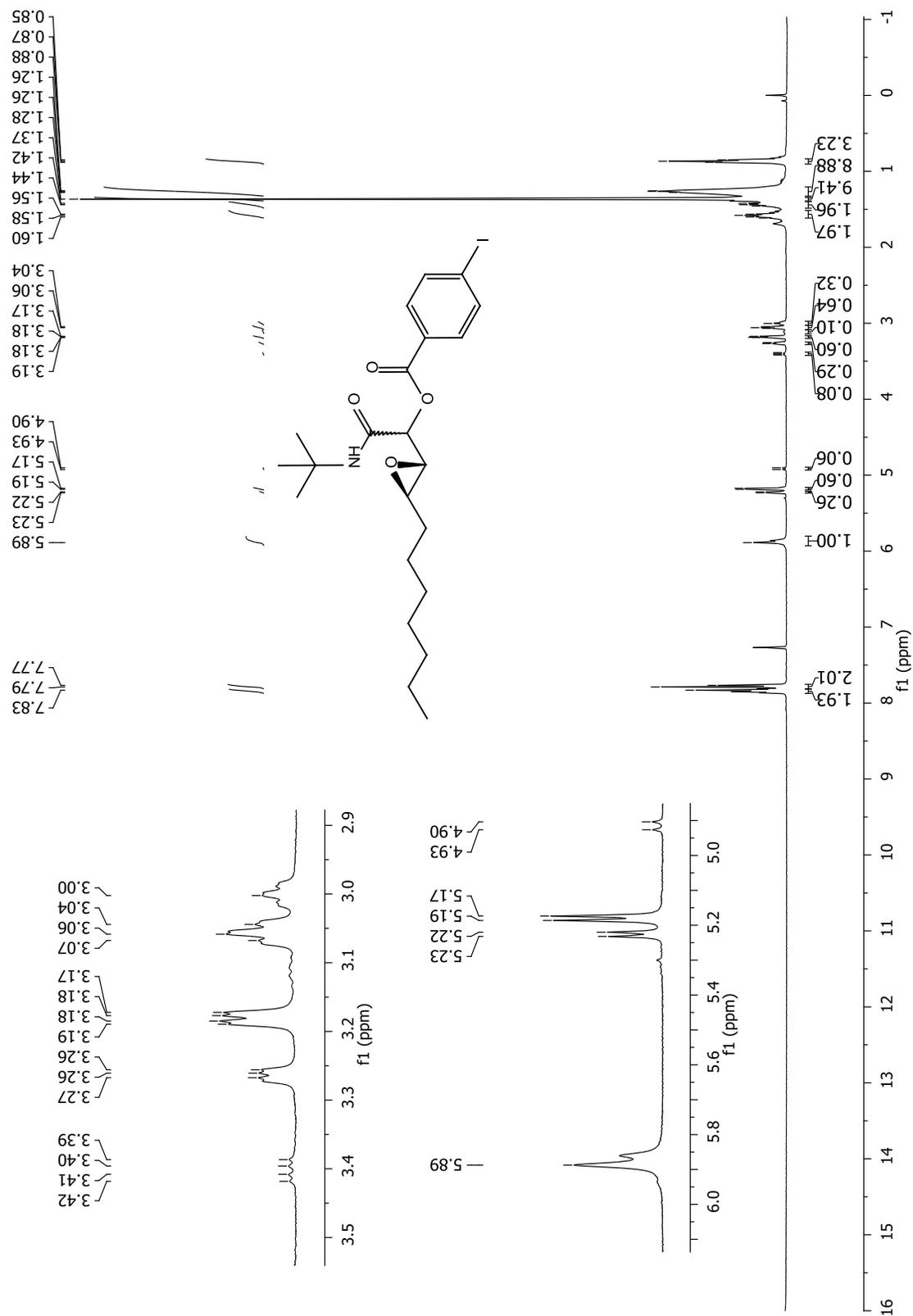


174.22
174.18
166.96
166.58

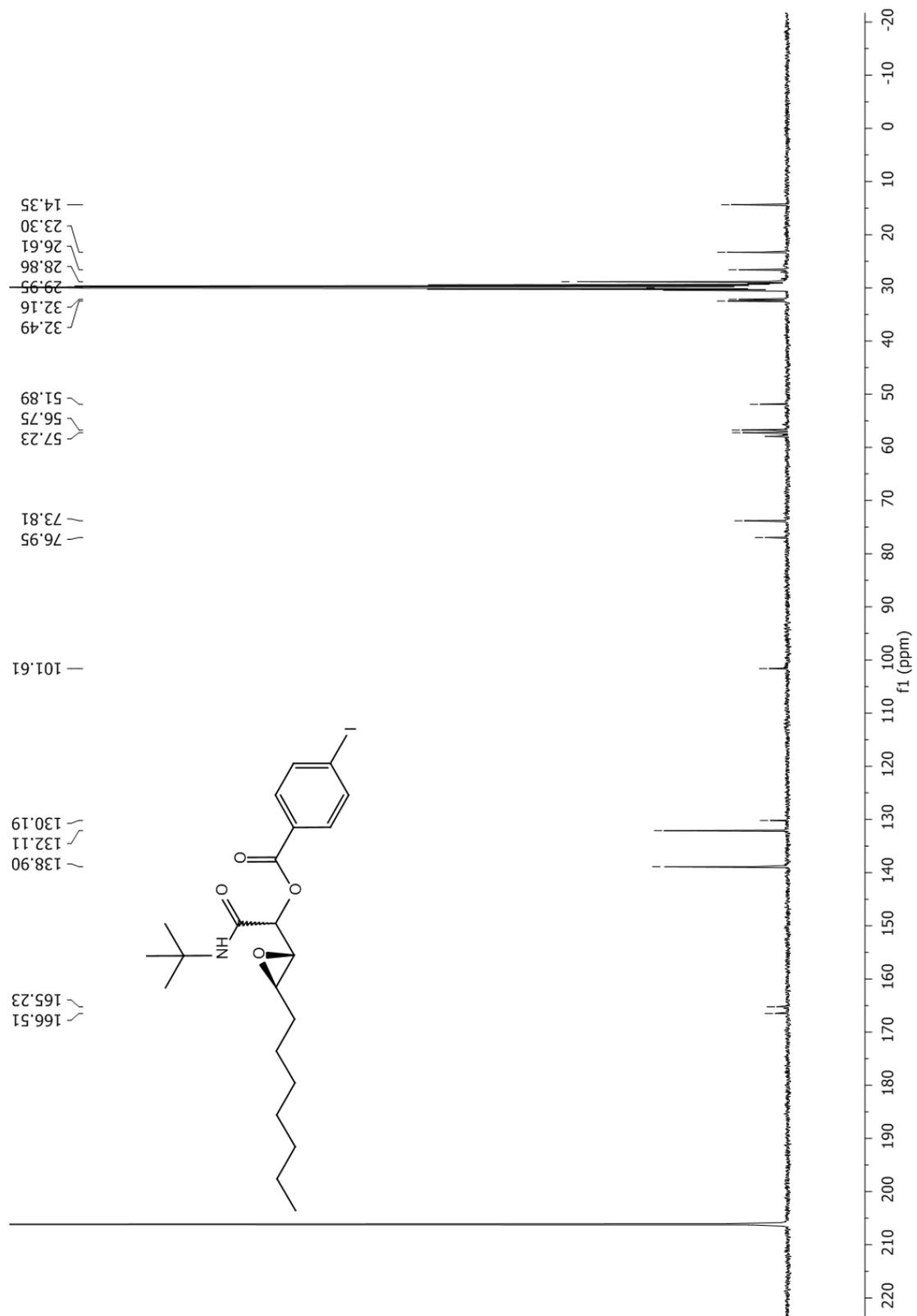
72.38
71.82
57.22
56.87
56.63
56.32
53.42
42.92
39.04
31.72
31.50
31.35
29.23
29.16
29.13
28.95
25.76
25.70
25.62
25.57
25.28
22.62
19.94
14.07
13.68



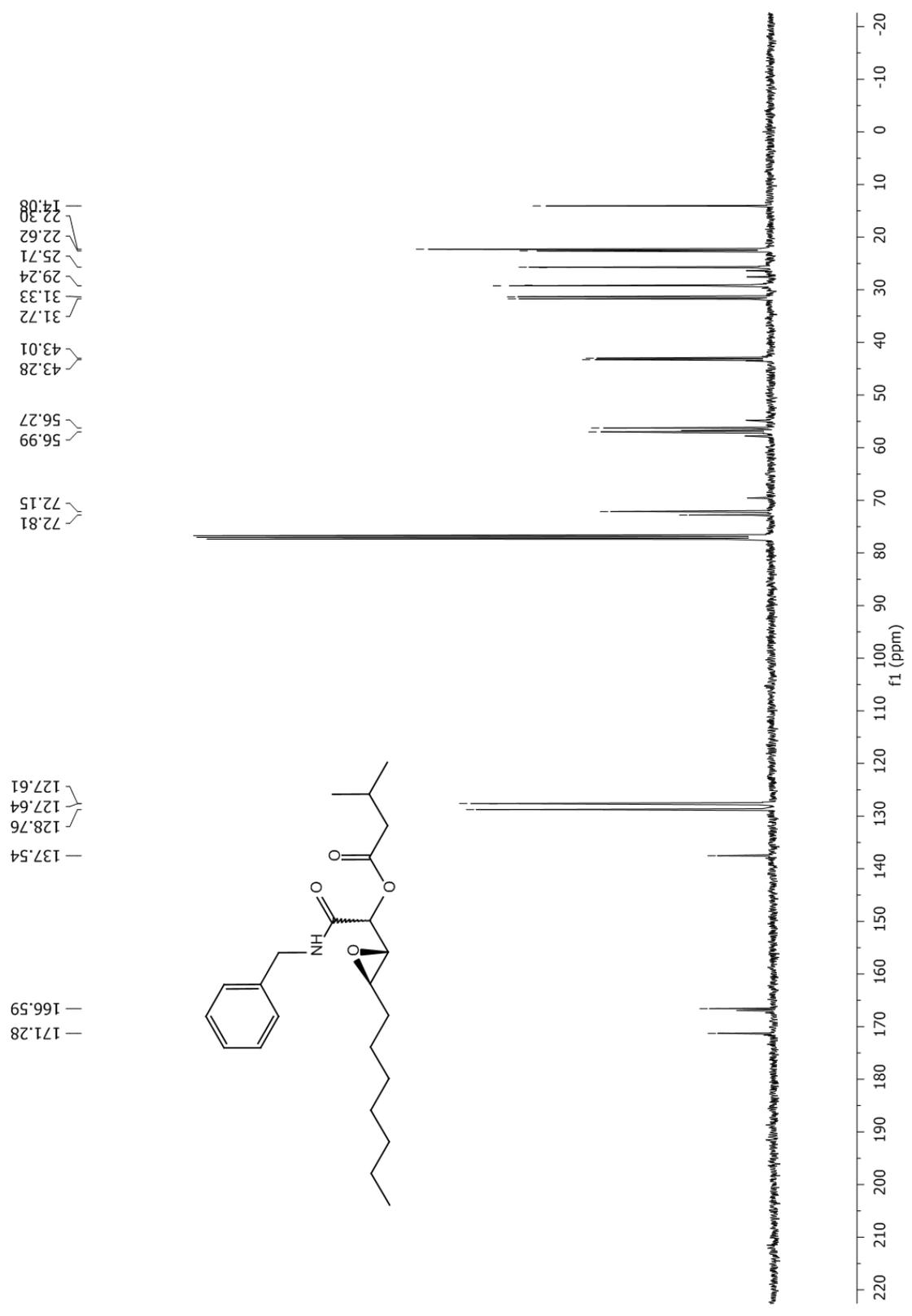
Espectro de RMN ^{13}C do composto **12j** em CDCl_3 a 100 MHz.



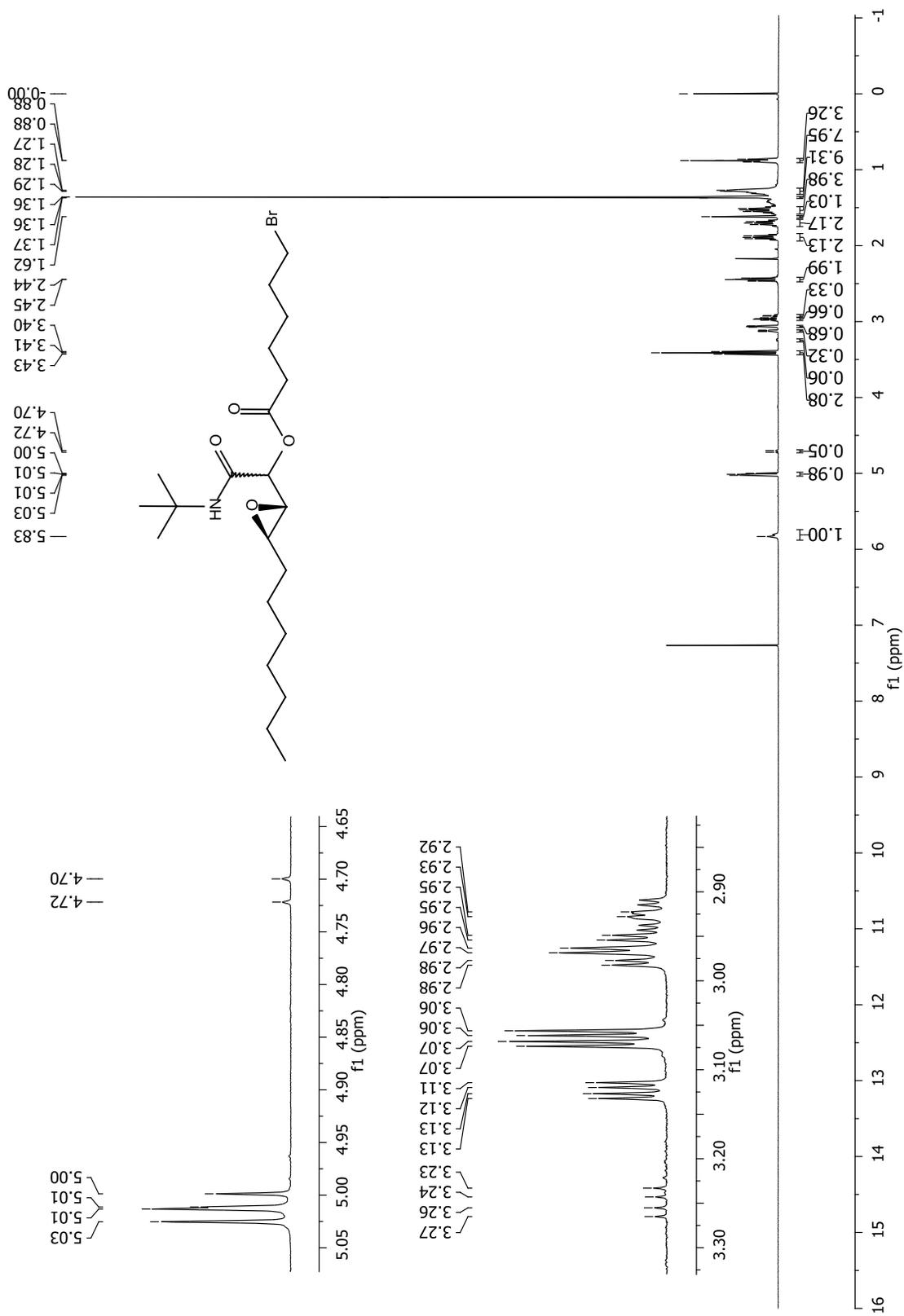
Espectro de RMN ¹H do composto **12k** em CDCl₃ a 400 MHz.



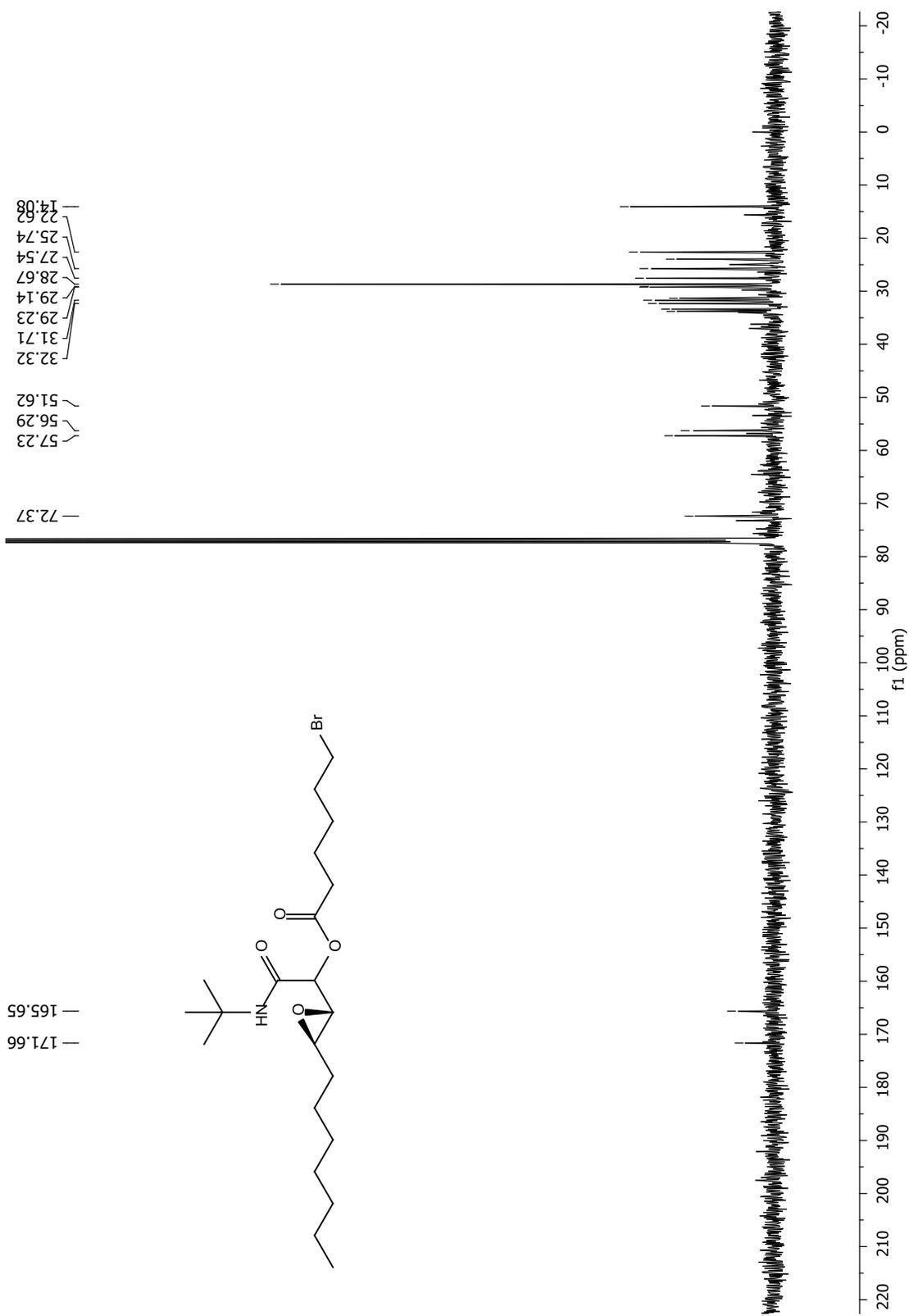
Espectro de RMN ^{13}C do composto **12k** em CDCl_3 a 100 MHz.



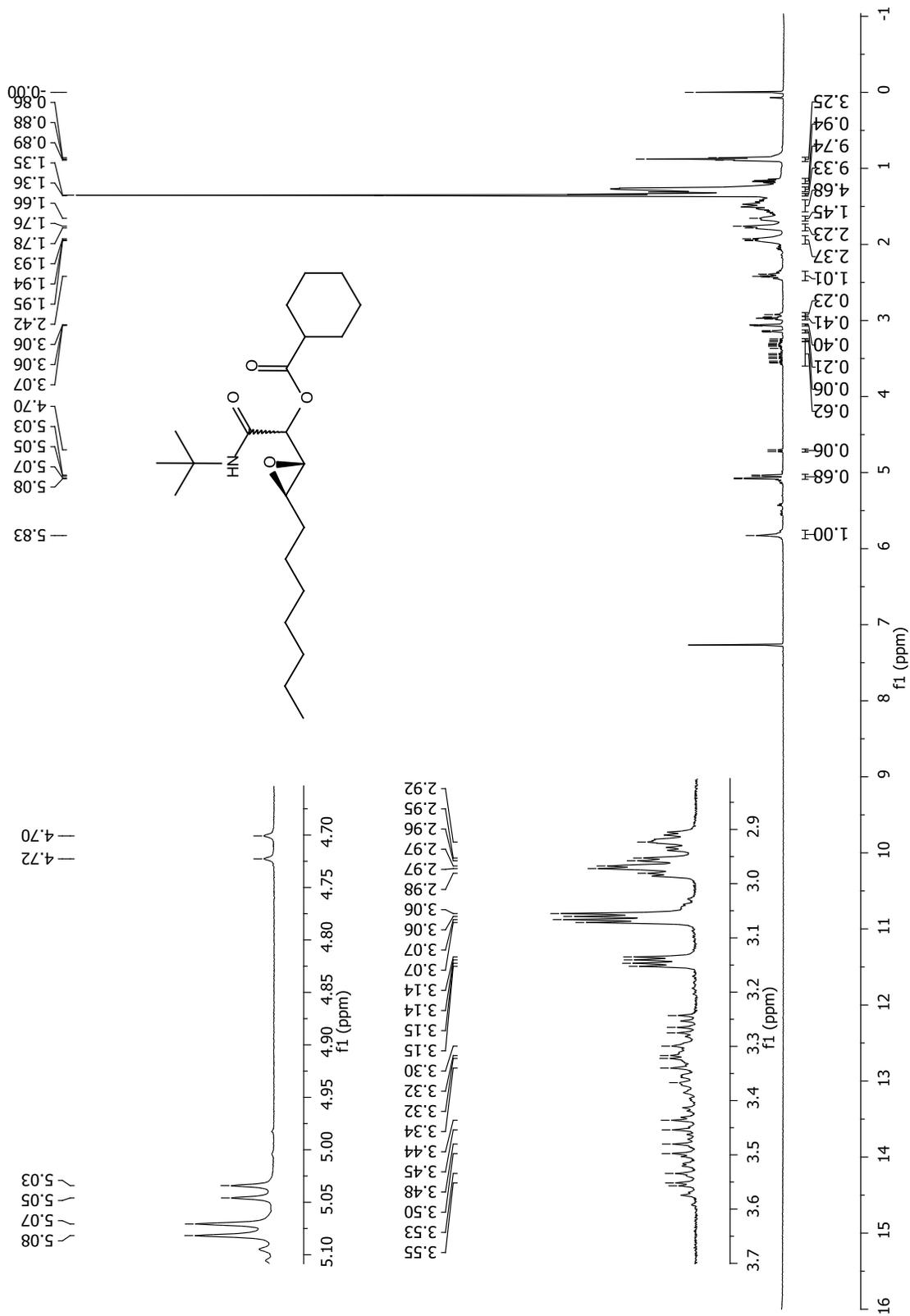
Espectro de RMN ¹³C do composto **121** em CDCl₃ a 100 mHz.



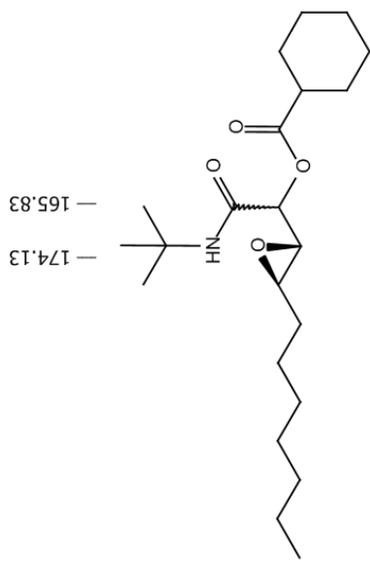
Espectro de RMN ¹H do composto 12m em CDCl₃ a 400 mHz.



Espectro de RMN ^{13}C do composto **12m** em CDCl_3 a 100 MHz.

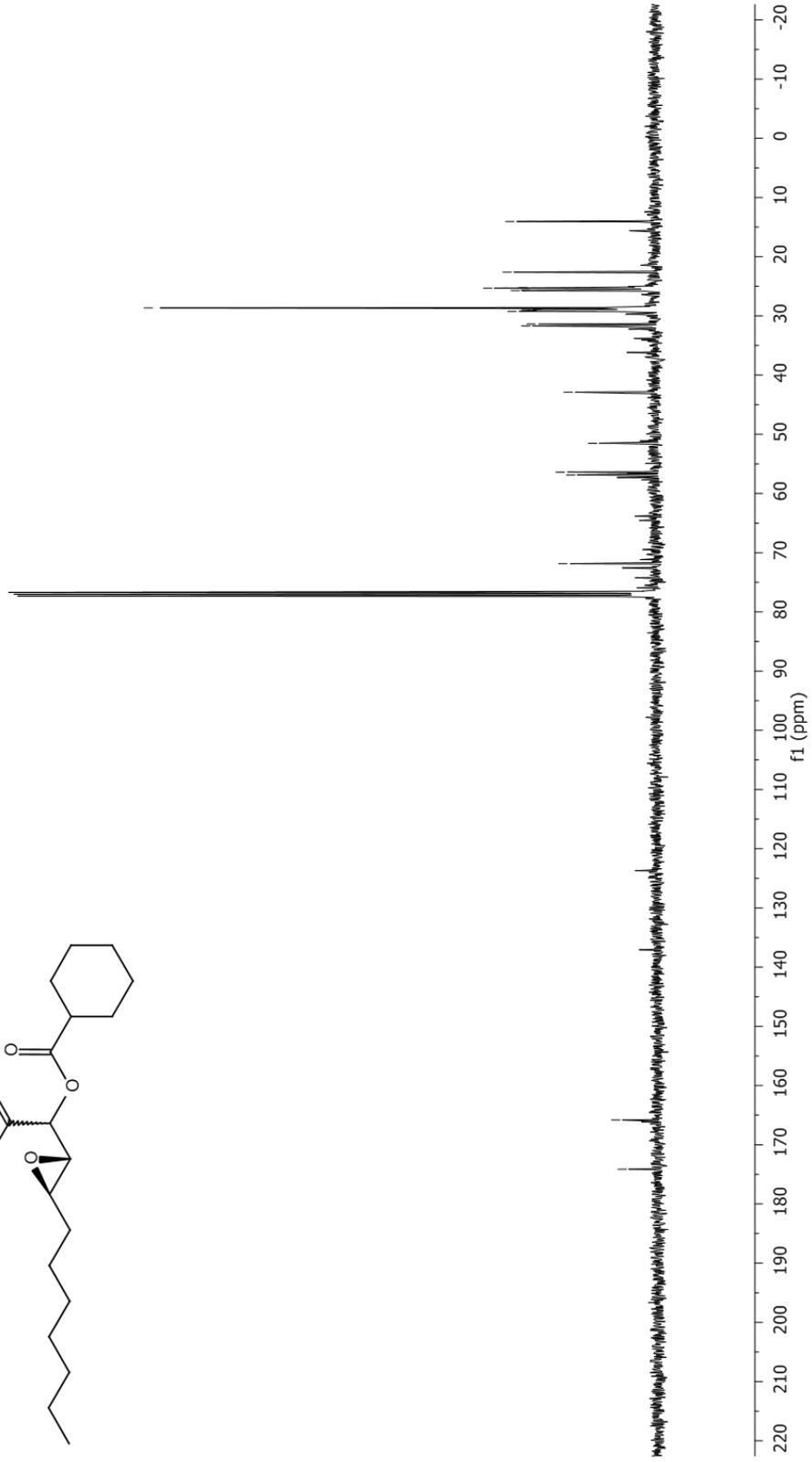


Espectro de RMN ¹H do composto 12n em CDCl₃ a 400 mHz.



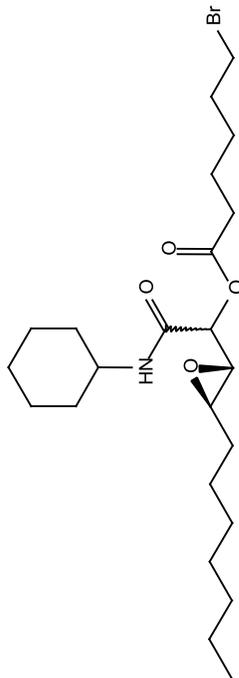
— 174.13
— 165.83

— 71.85
— 56.85
— 56.38
— 51.51
— 42.89
— 29.22
— 28.66
— 25.74
— 25.33
— 25.25
— 22.62
— 14.07

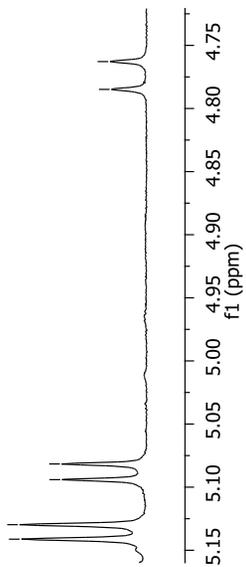


Espectro de RMN ^{13}C do composto **12n** em CDCl_3 a 100 MHz.

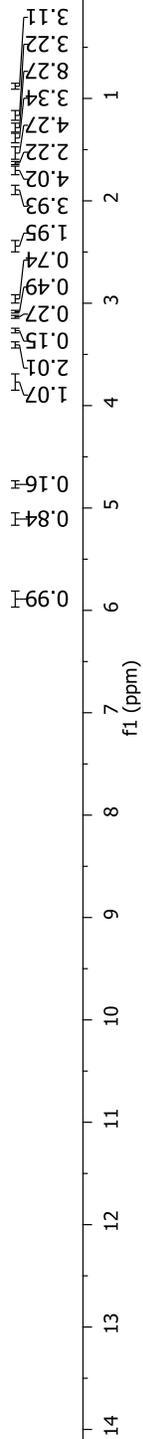
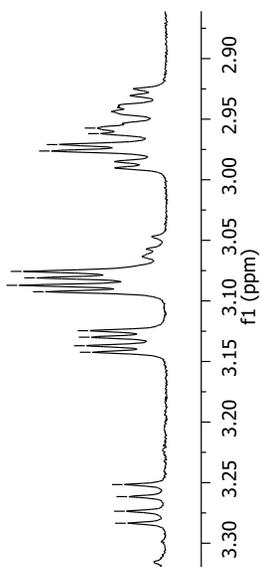
5.91
5.89
5.14
5.13
5.09
5.08
4.76
3.43
3.41
3.41
3.40
3.09
3.08
2.45
2.45
1.91
1.89
1.87
1.70
1.68
1.64
1.27
0.88



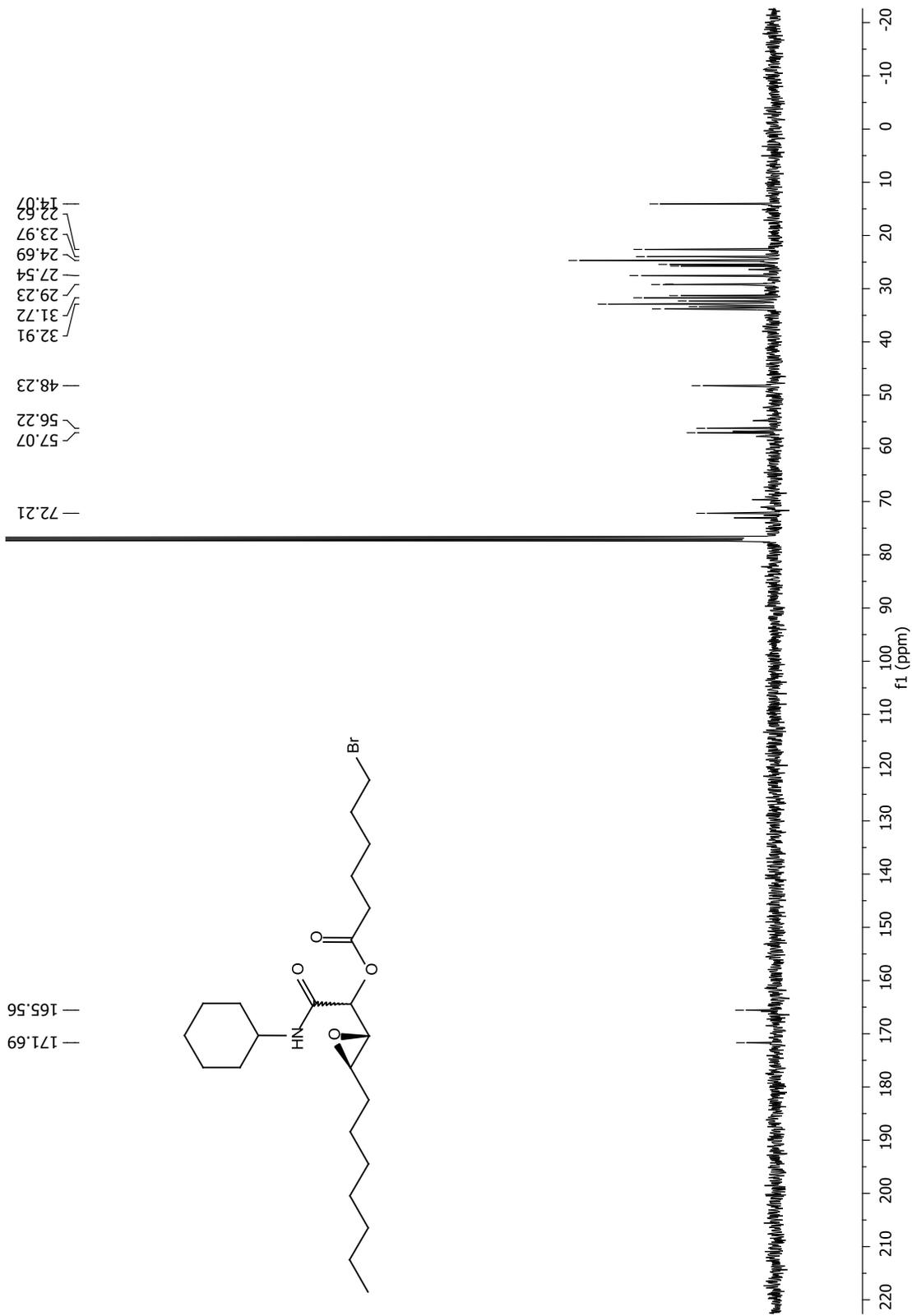
5.14
5.13
5.09
5.08
4.78
4.76



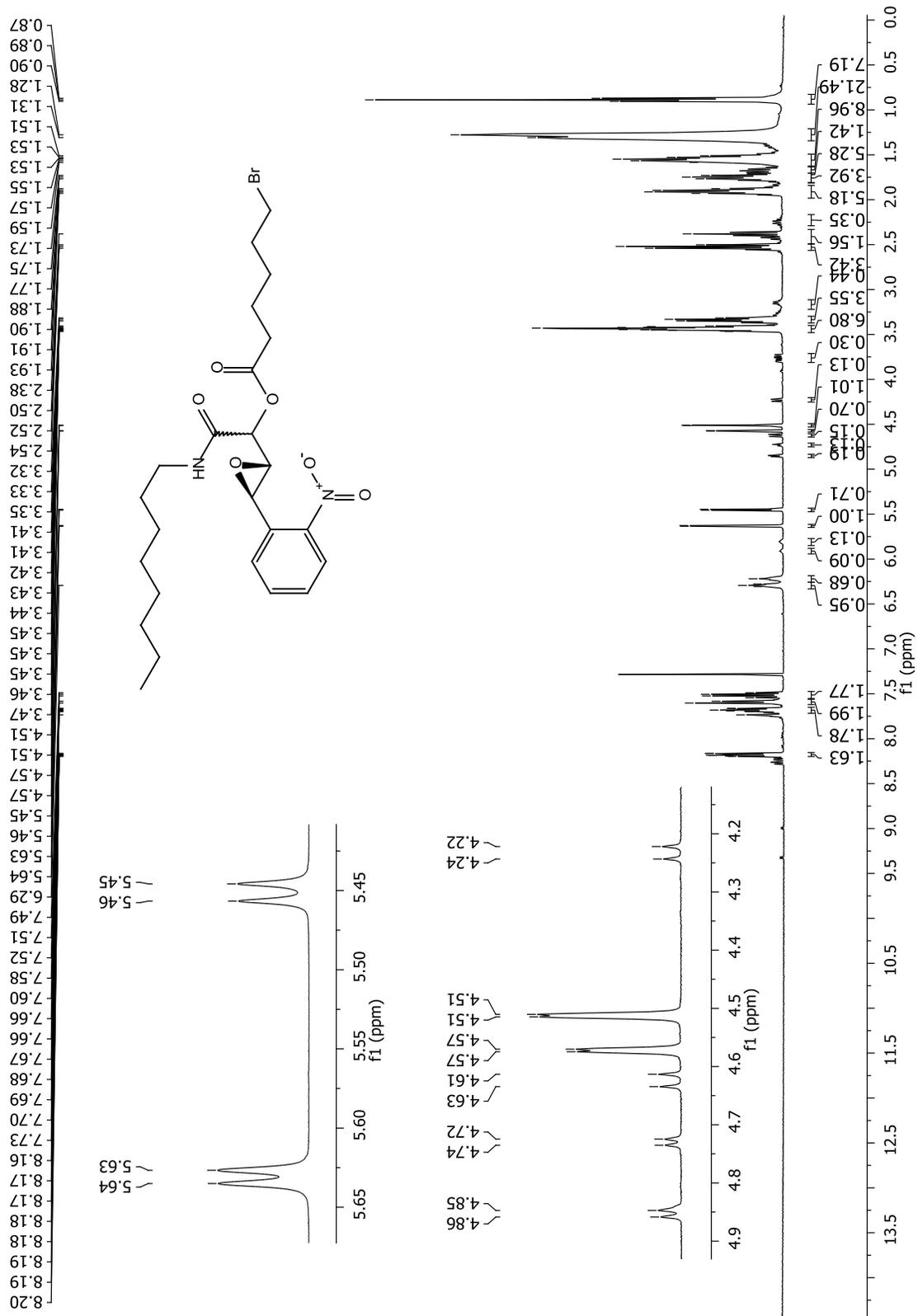
3.28
3.27
3.26
3.25
3.14
3.14
3.13
3.12
3.09
3.08
3.08
2.98
2.97
2.96
2.96



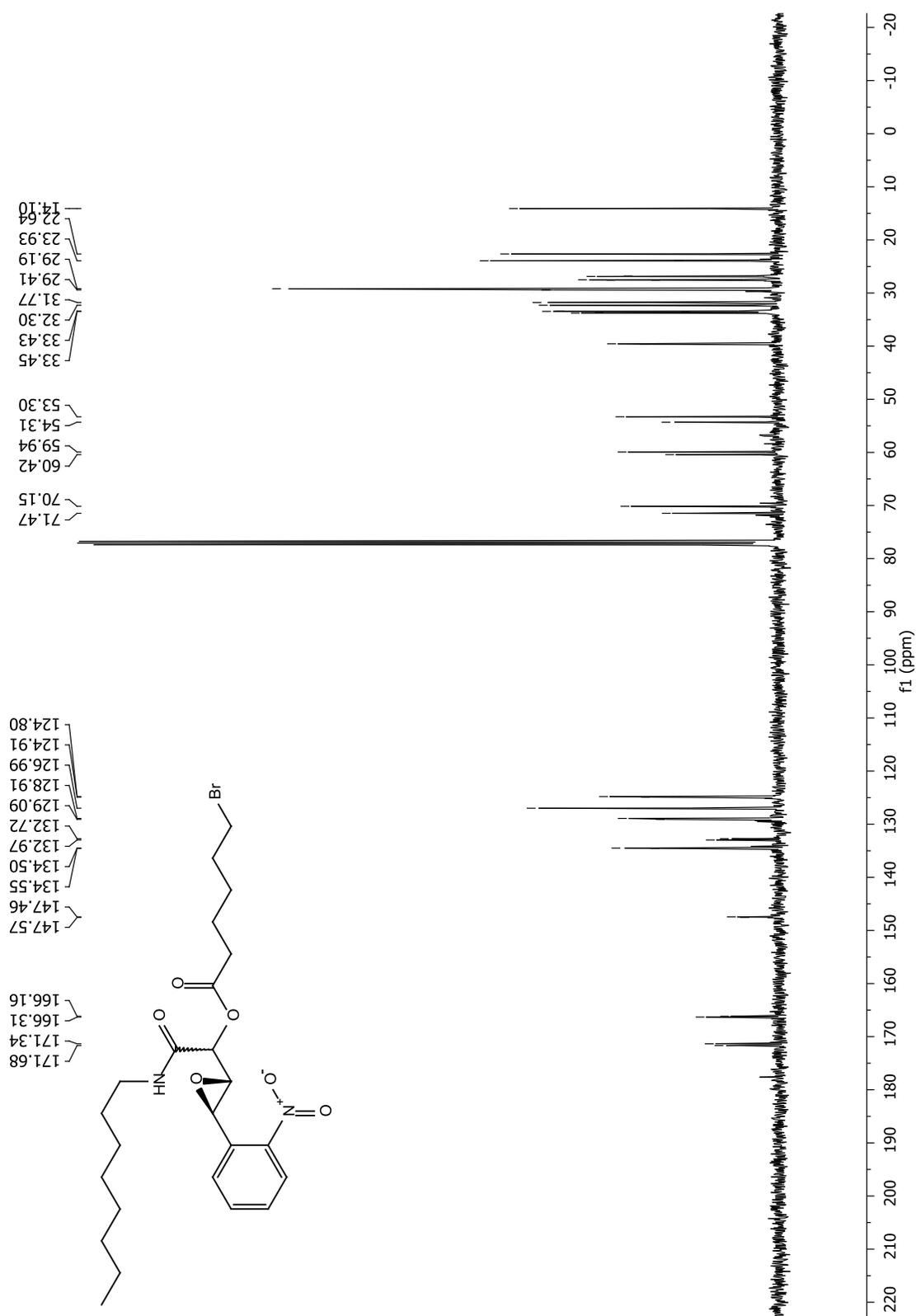
Espectro de RMN ^1H do composto **12o** em CDCl_3 a 400 MHz.



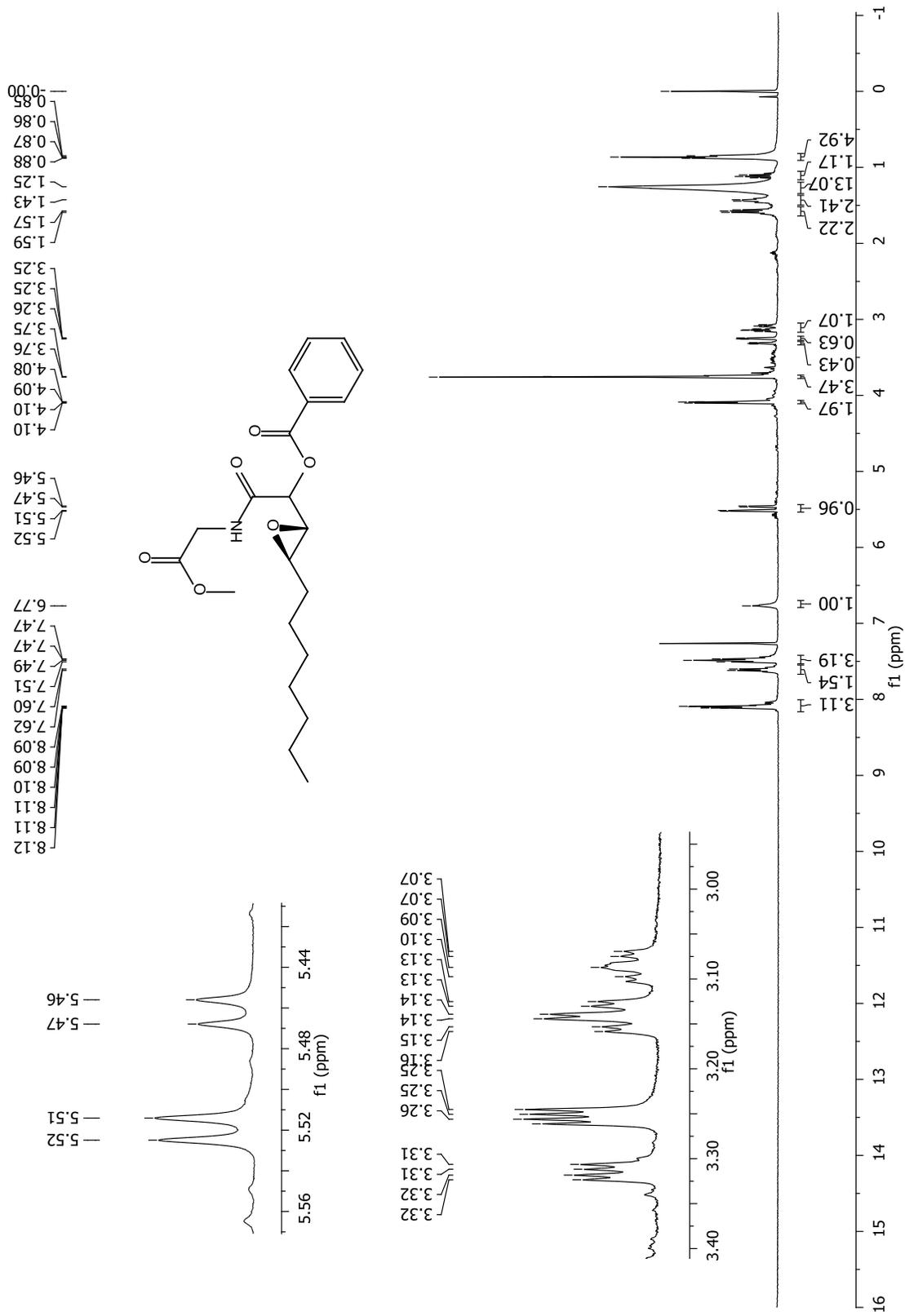
Espectro de RMN ^{13}C do composto **12o** em CDCl_3 a 100 MHz.



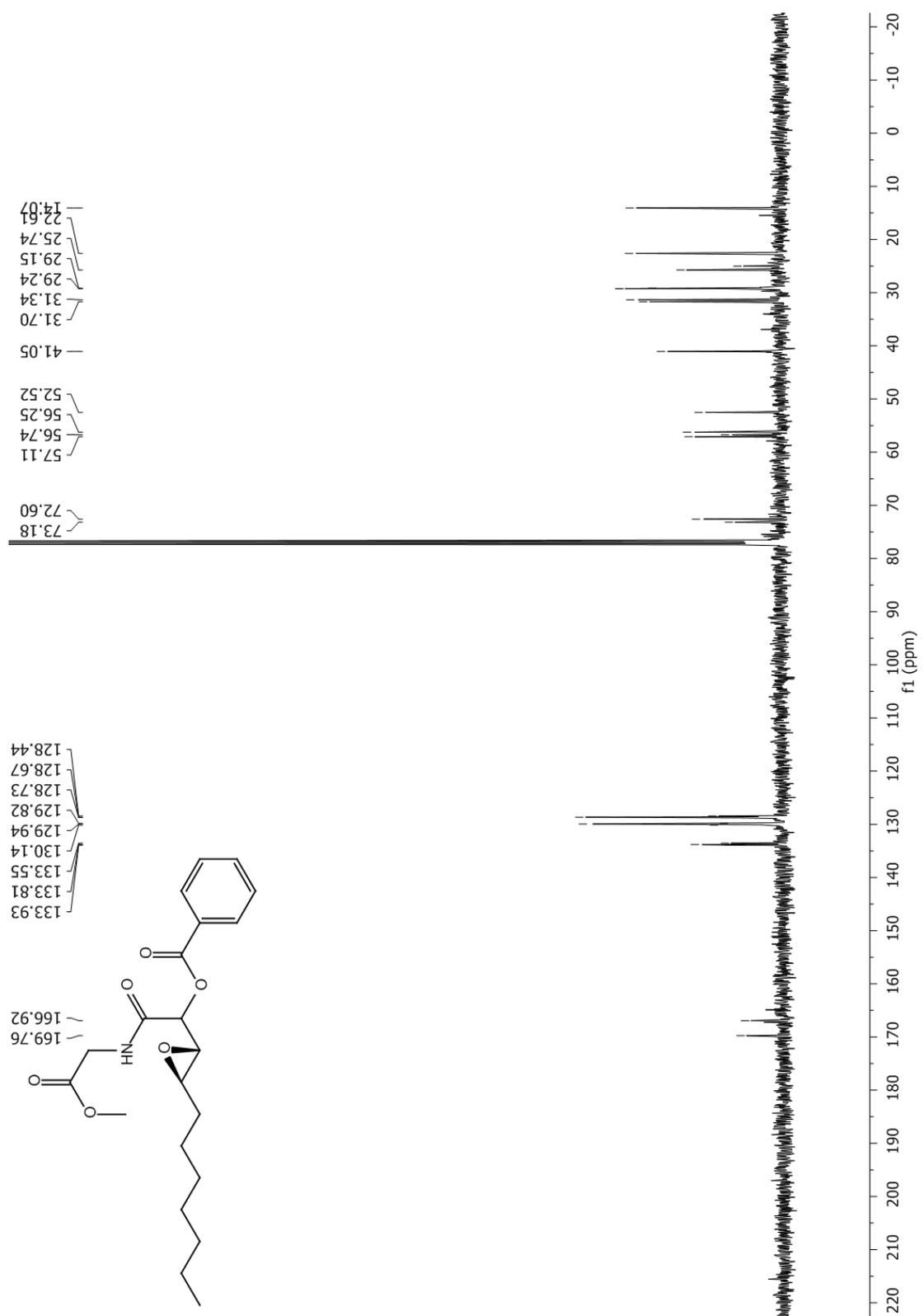
Espectro de RMN ¹H do composto 12p em CDCl₃ a 400 MHz.



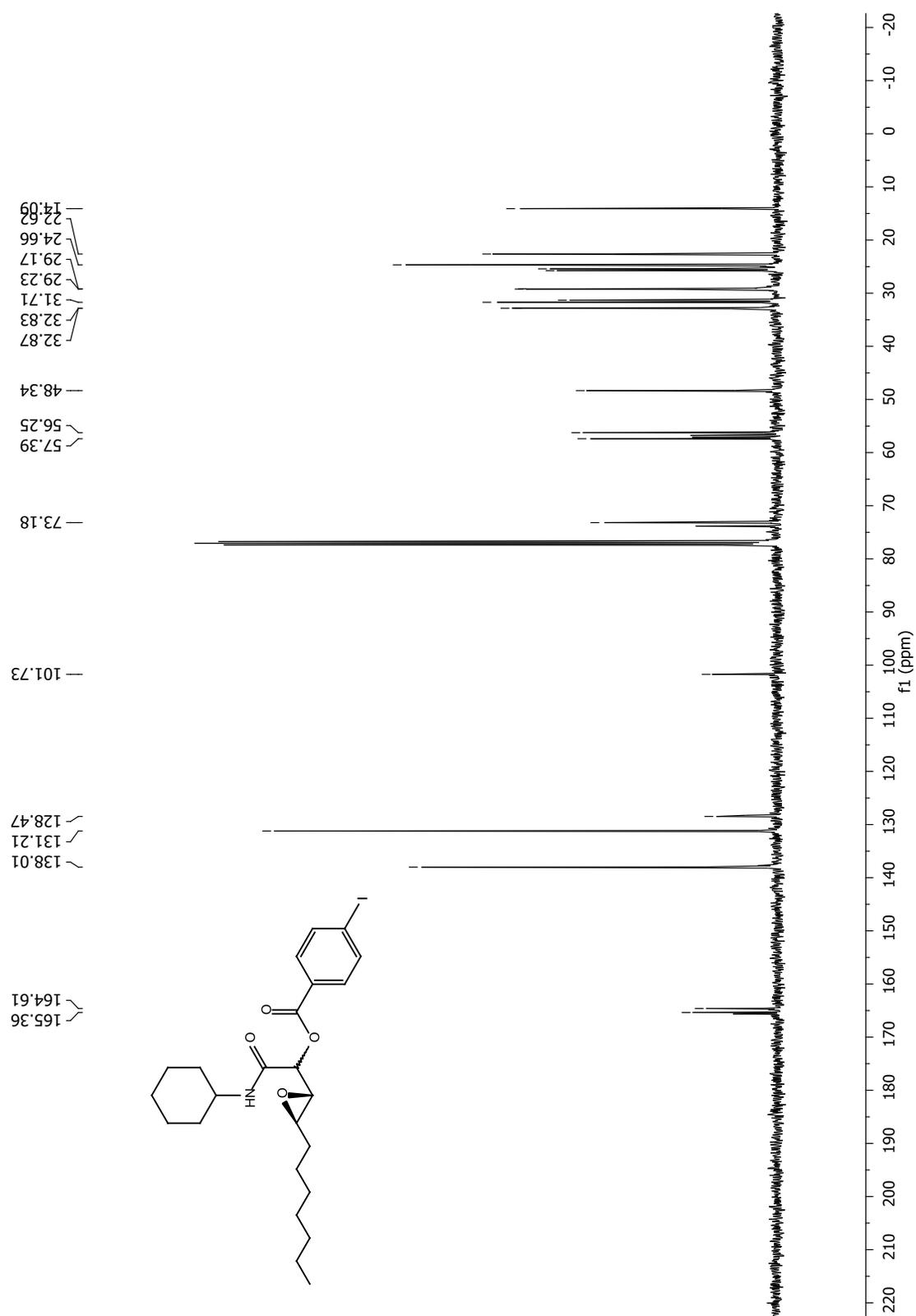
Espectro de RMN ¹³C do composto **12p** em CDCl₃ a 100 MHz.



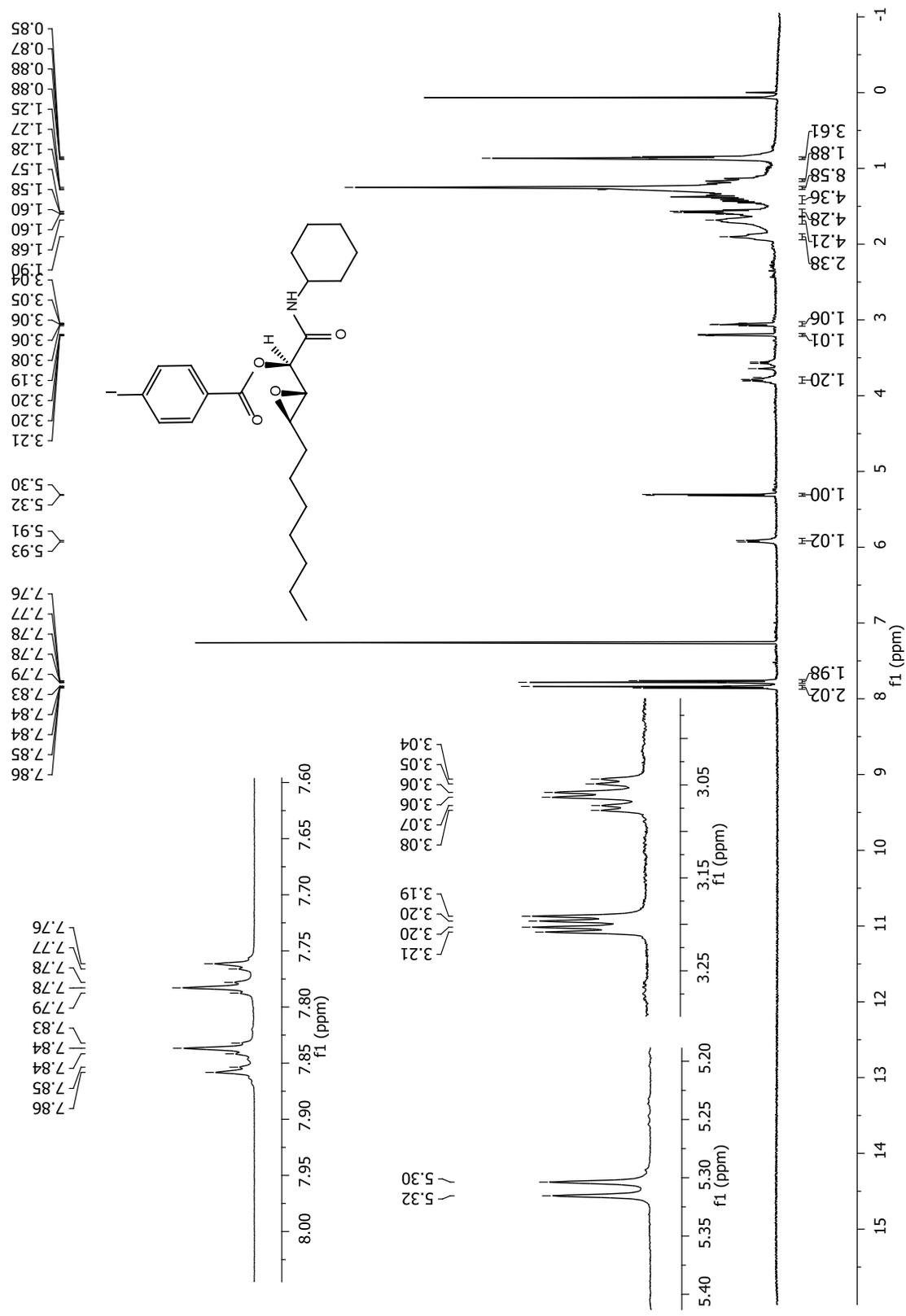
Espectro de RMN ^1H do composto **12q** em CDCl_3 a 400 mHz.



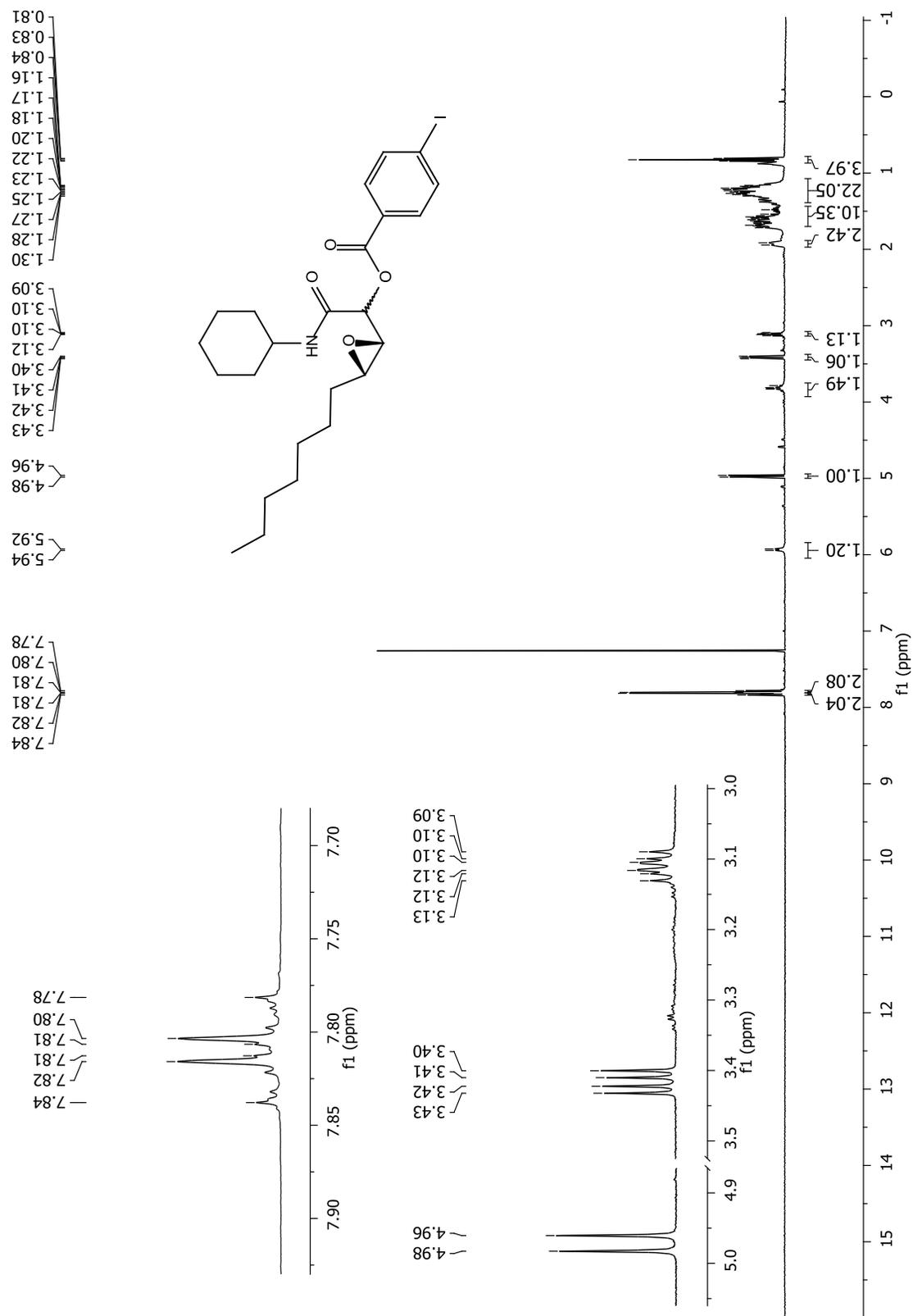
Espectro de RMN ¹³C do composto 12q em CDCl₃ a 100 mHz.



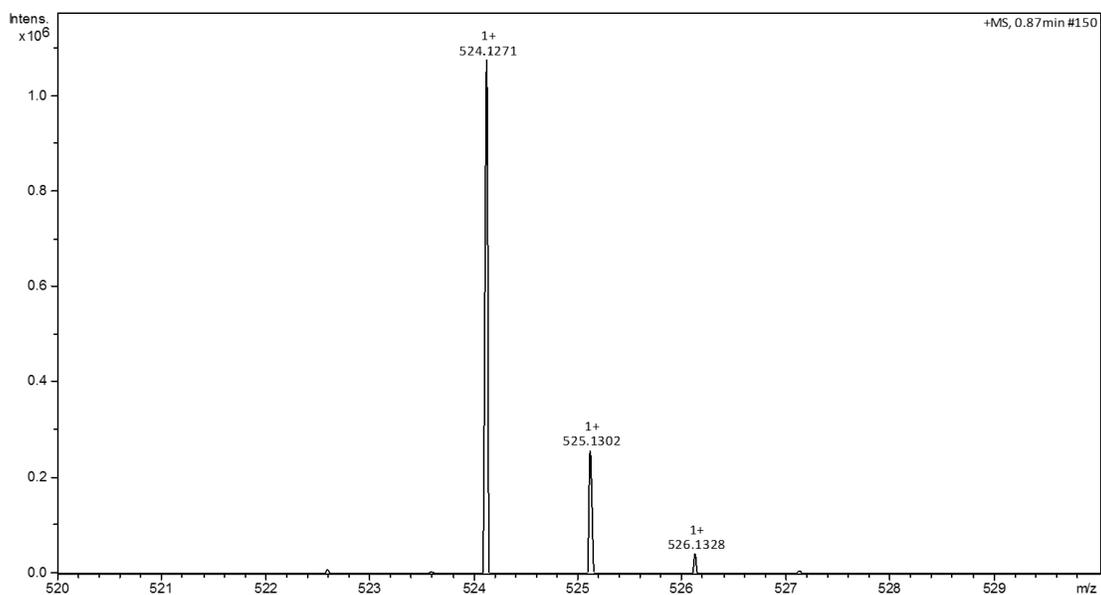
Espectro de RMN ¹³C do composto **12b** em CDCl₃ a 100 MHz.



Espectro de RMN ¹H do diastereoisômeros majoritário (**d1**) do composto **12b** em CDCl₃ a 400 MHz.

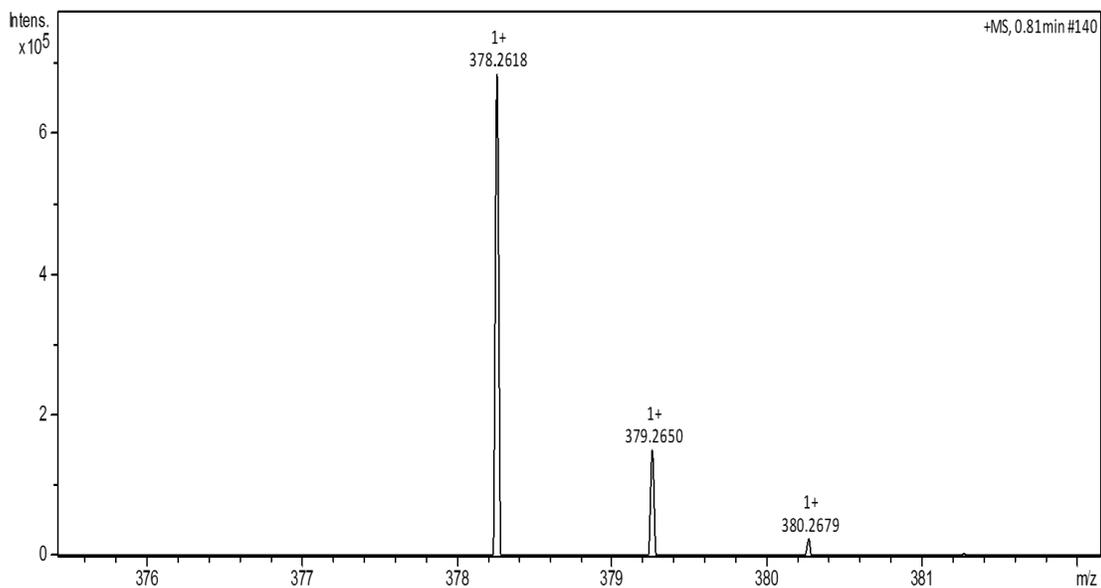


Espectro de RMN ¹H do diastereoisômeros minoritário (d3) do composto **12b** em CDCl₃ a 400 MHz.



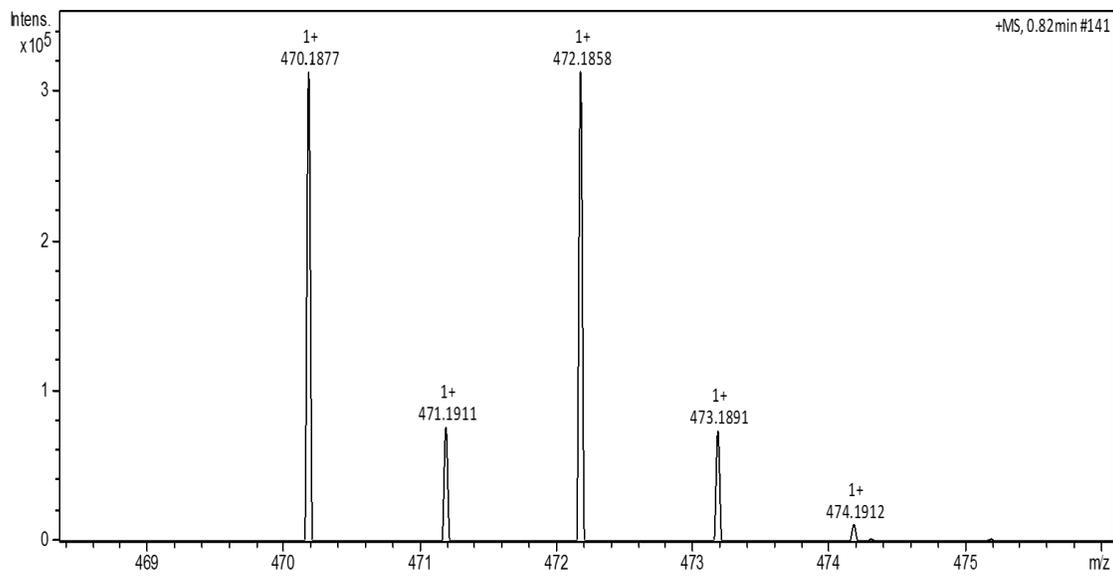
Meas. m/z	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	Adduct
524.127105	C ₂₂ H ₃₂ INNaO ₄	100	524.1268	-0.3	-0.5	3.4	M+Na

Espectro de massas de alta resolução composto **12g**.



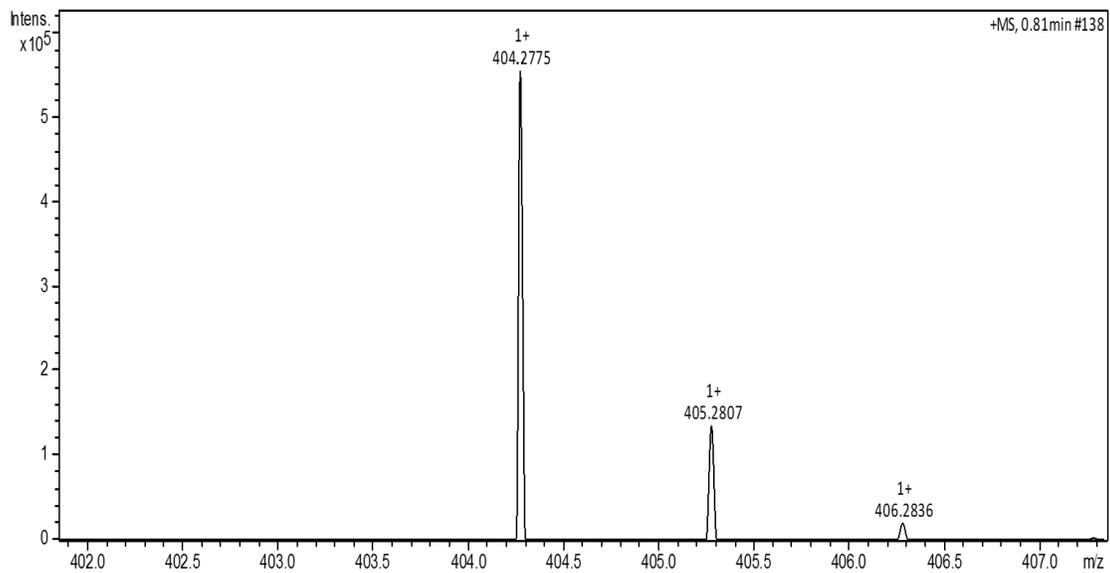
Meas. m/z	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	Adduct
378.261767	C ₂₀ H ₃₇ NNaO ₄	100	378.2615	-0.3	-0.8	2.7	M+Na

Espectro de massas de alta resolução composto **12h**.



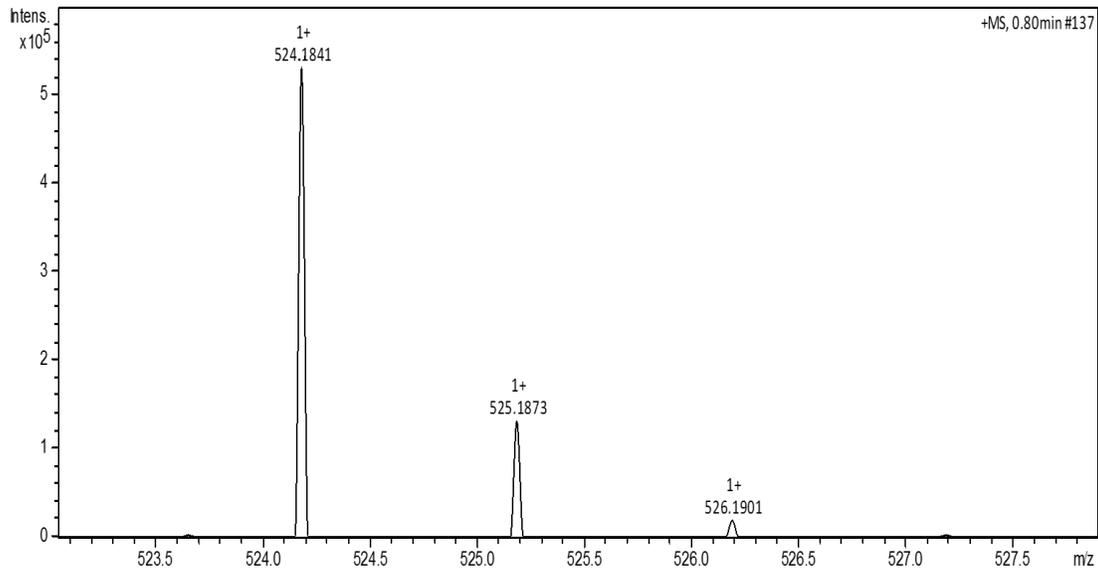
Meas. m/z	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	Adduct
470.187695	C ₂₁ H ₃₈ BrNNaO ₄	100	470.1876	-0.1	-0.1	5.4	M+Na

Espectro de massas de alta resolução composto **12i**.



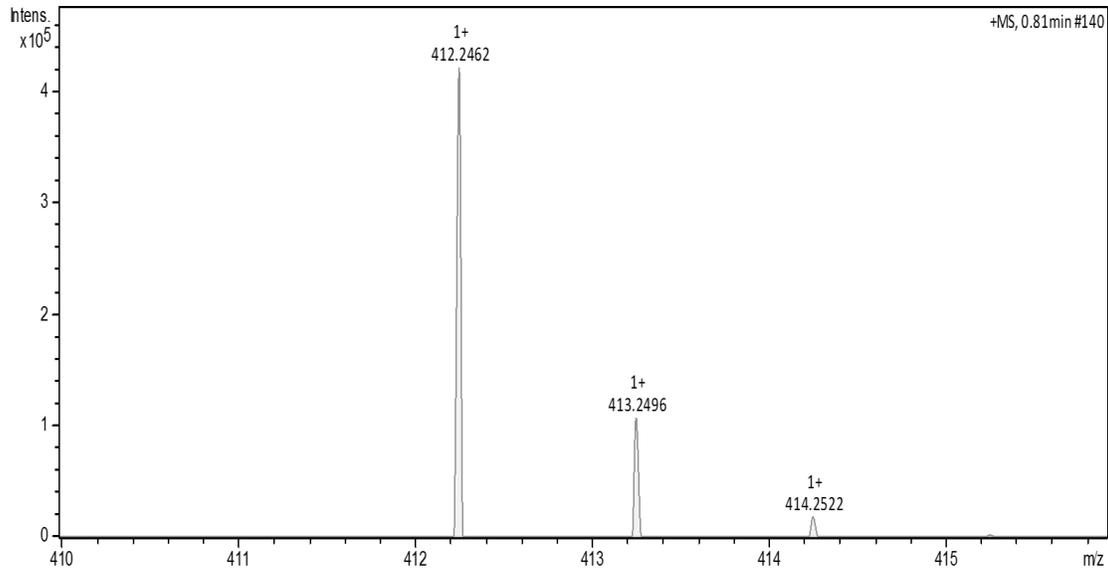
Meas. m/z	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	Adduct
404.2775	C ₂₂ H ₃₉ NNaO ₄	100	404.2771	-0.3	-0.8	1.8	M+Na

Espectro de massas de alta resolução composto **12j**.



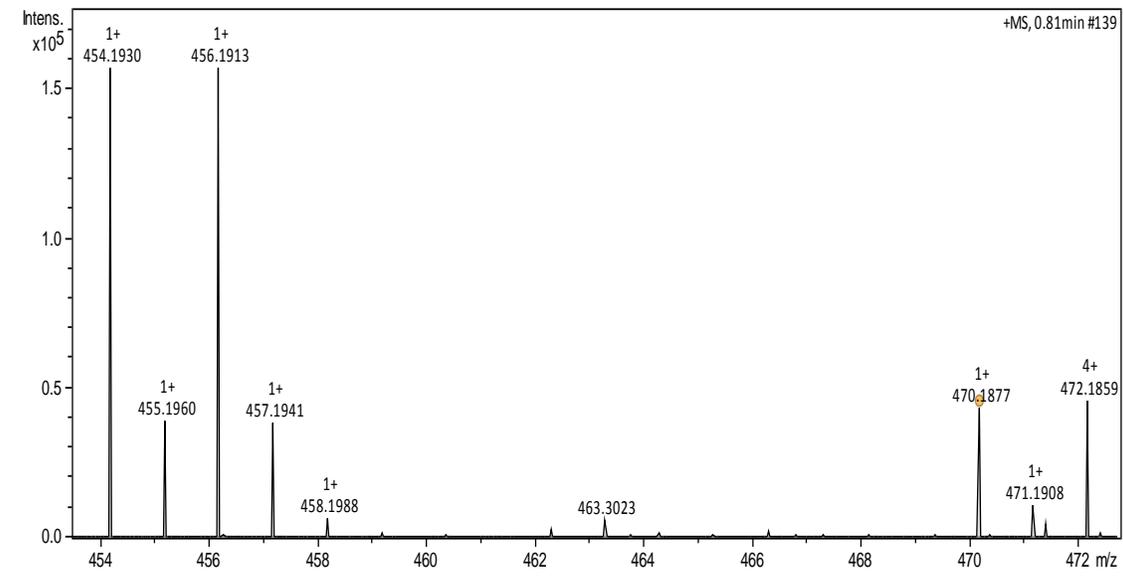
Meas. m/z	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	Adduct
524.184086	C ₂₀ H ₄₀ INNaO ₅	100	524.1843	0.3	0.5	12	M+Na

Espectro de massas de alta resolução composto **12k**.



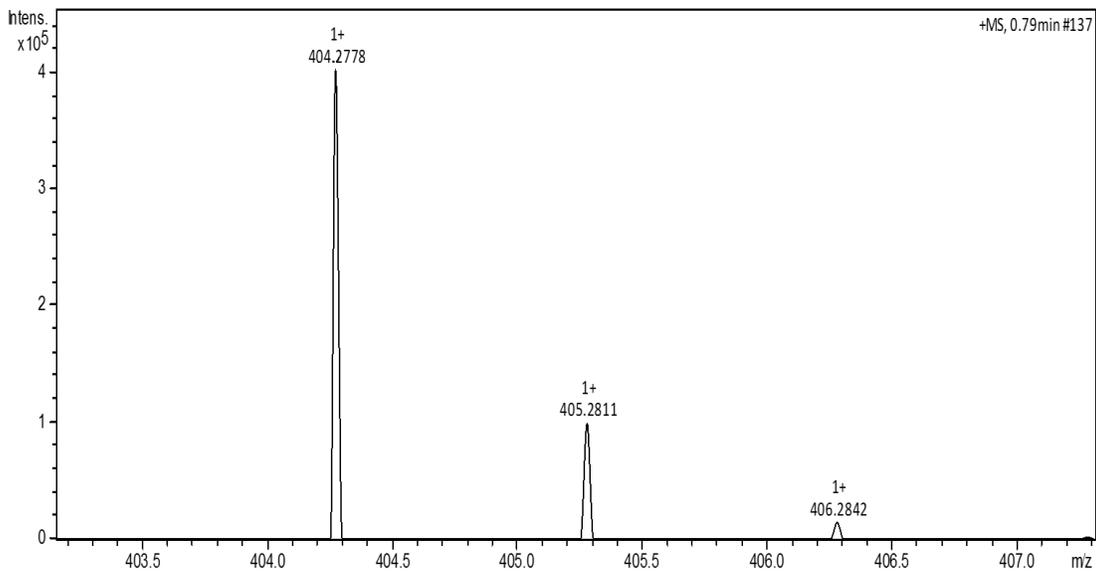
Meas. m/z	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	Adduct
412.246163	C ₂₃ H ₃₅ NNaO ₄	100	412.245829	-0.3	-0.8	1.7	M+Na

Espectro de massas de alta resolução composto **12l**.



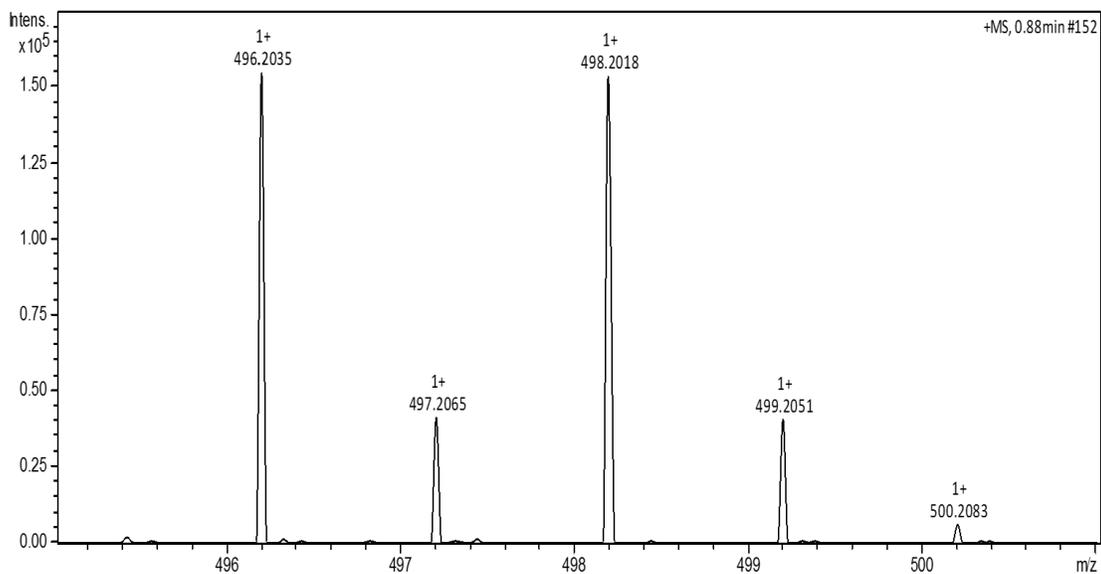
Meas. m/z	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	Adduct
470.187702	C ₂₁ H ₃₈ BrNNaO ₄	100	470.1876	-0.1	-0.1	24	M+Na

Espectro de massas de alta resolução composto **12m**.



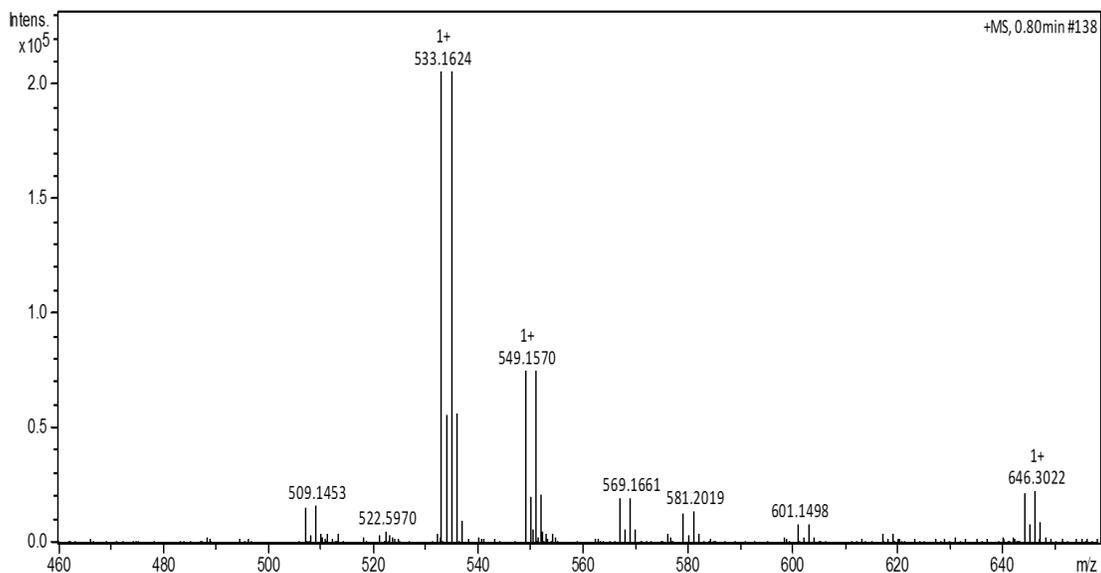
Meas. m/z	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	Adduct
404.277815	C ₂₂ H ₃₉ NNaO ₄	100	404.277129	-0.7	-1.7	0.4	M+Na

Espectro de massas de alta resolução composto **12n**.



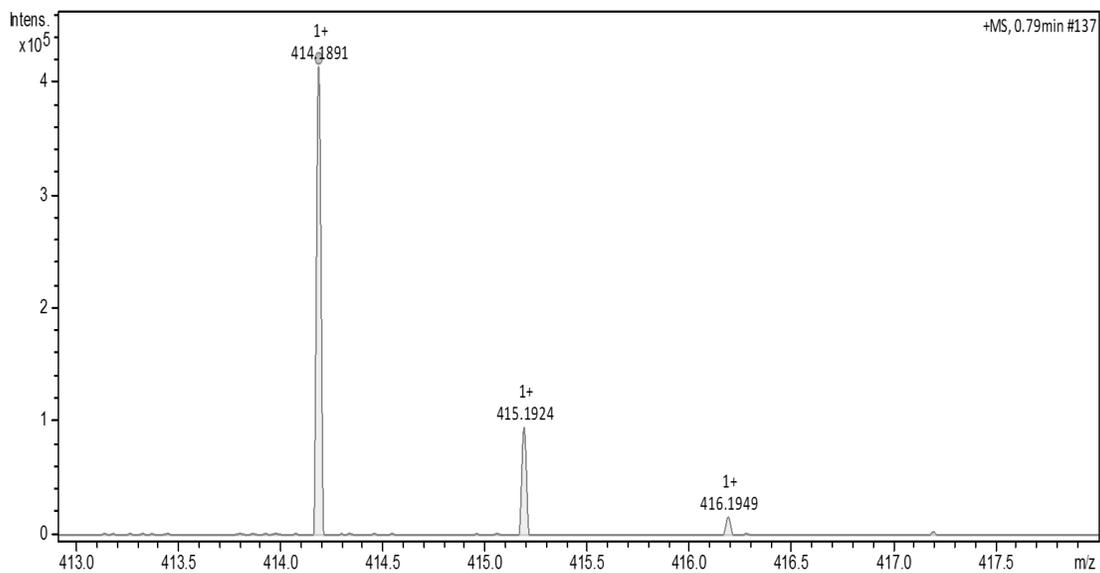
Meas. m/z	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	Adduct
496.203486	C ₂₃ H ₄₀ BrNNaO ₄	100	496.2033	-0.2	-0.4	9.3	M+Na

Espectro de massas de alta resolução composto **12o**.



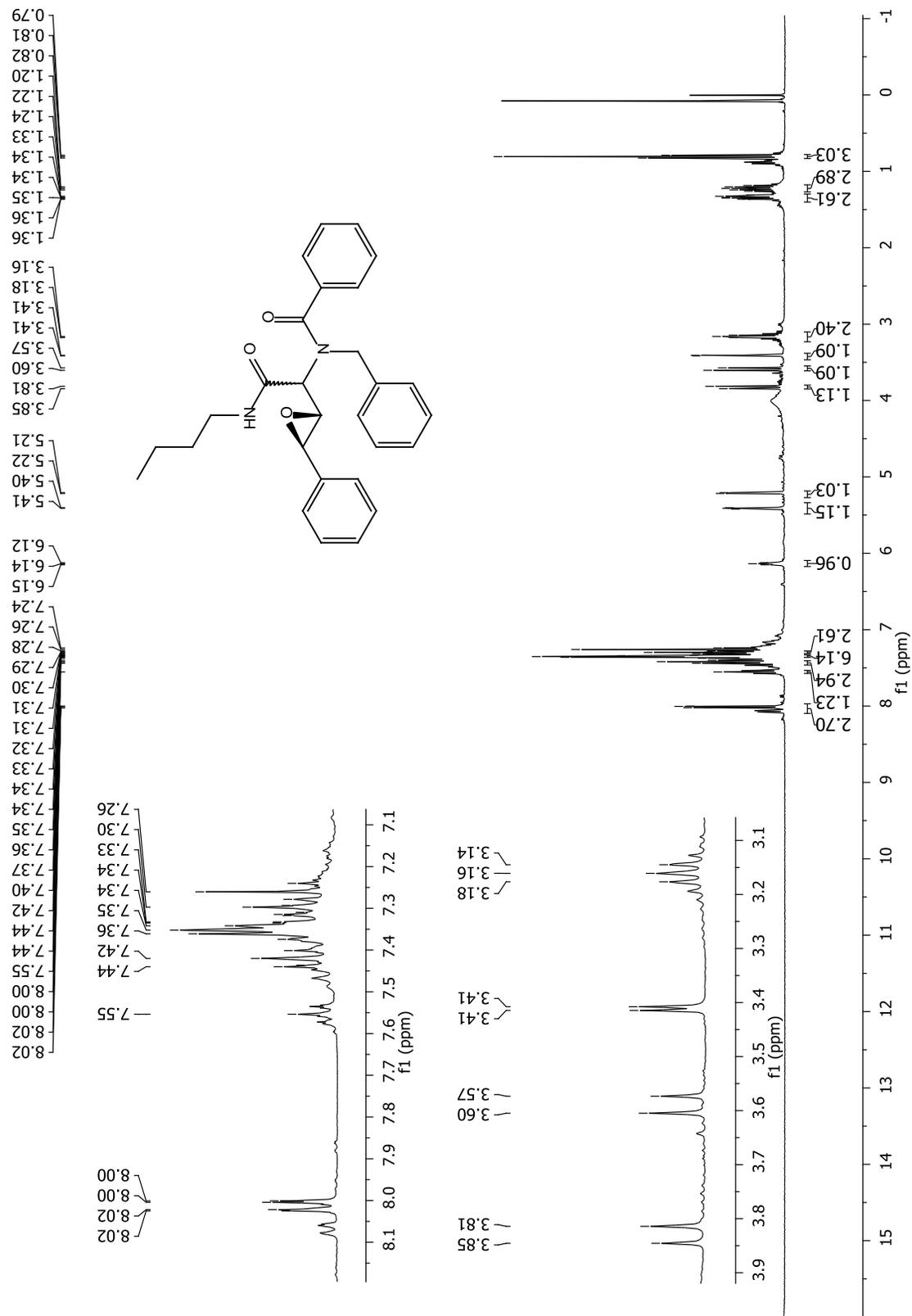
Meas. m/z	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	Adduct
549.156996	C ₂₄ H ₃₅ BrN ₂ NaO ₆	100	549.1571	0.1	0.1	10.4	M+Na

Espectro de massas de alta resolução composto **12p**.

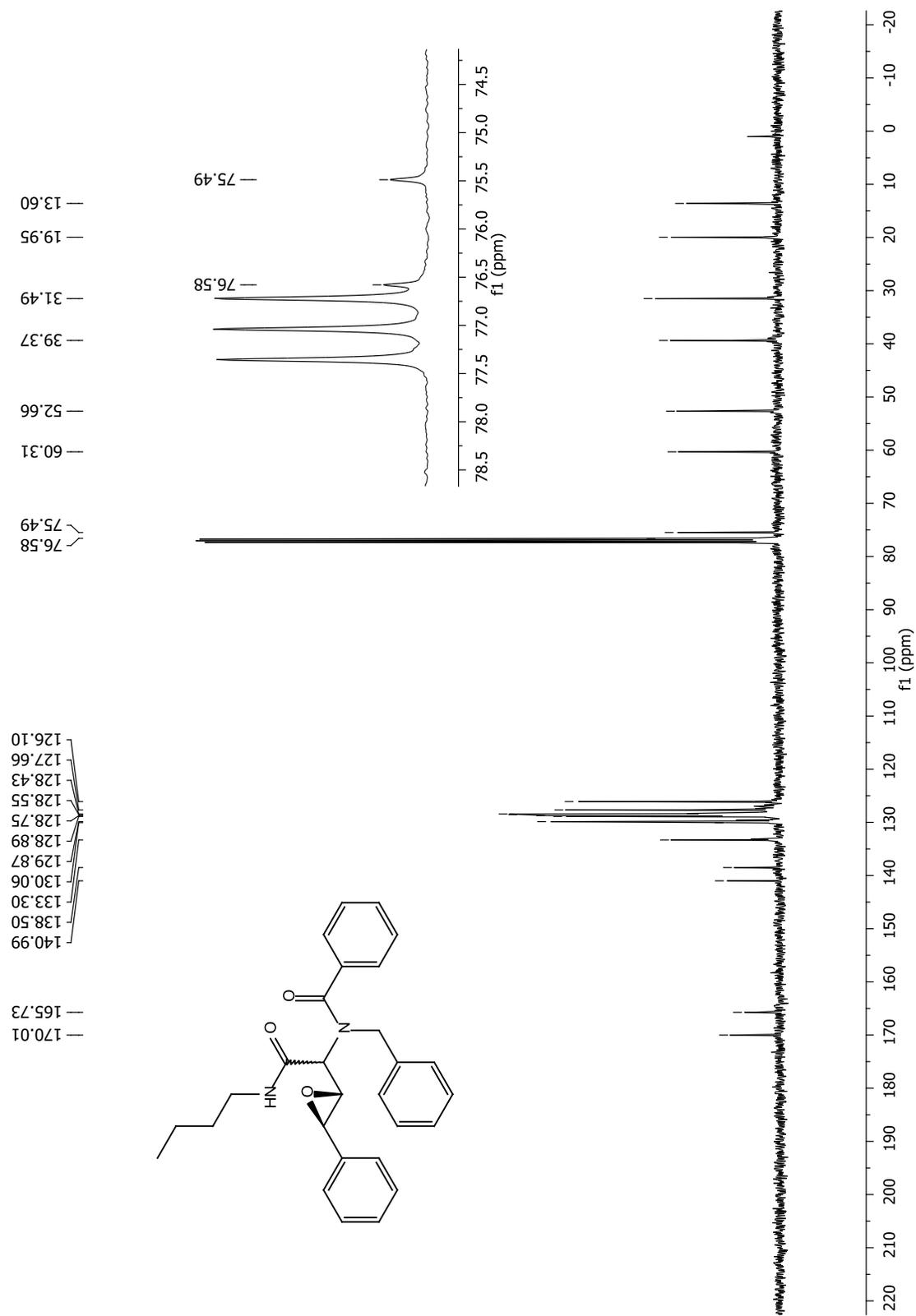


Meas. m/z	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	Adduct
414.18909	C ₂₁ H ₂₉ NNaO ₆	100	414.18871	-0.4	-0.9	2.8	M+Na

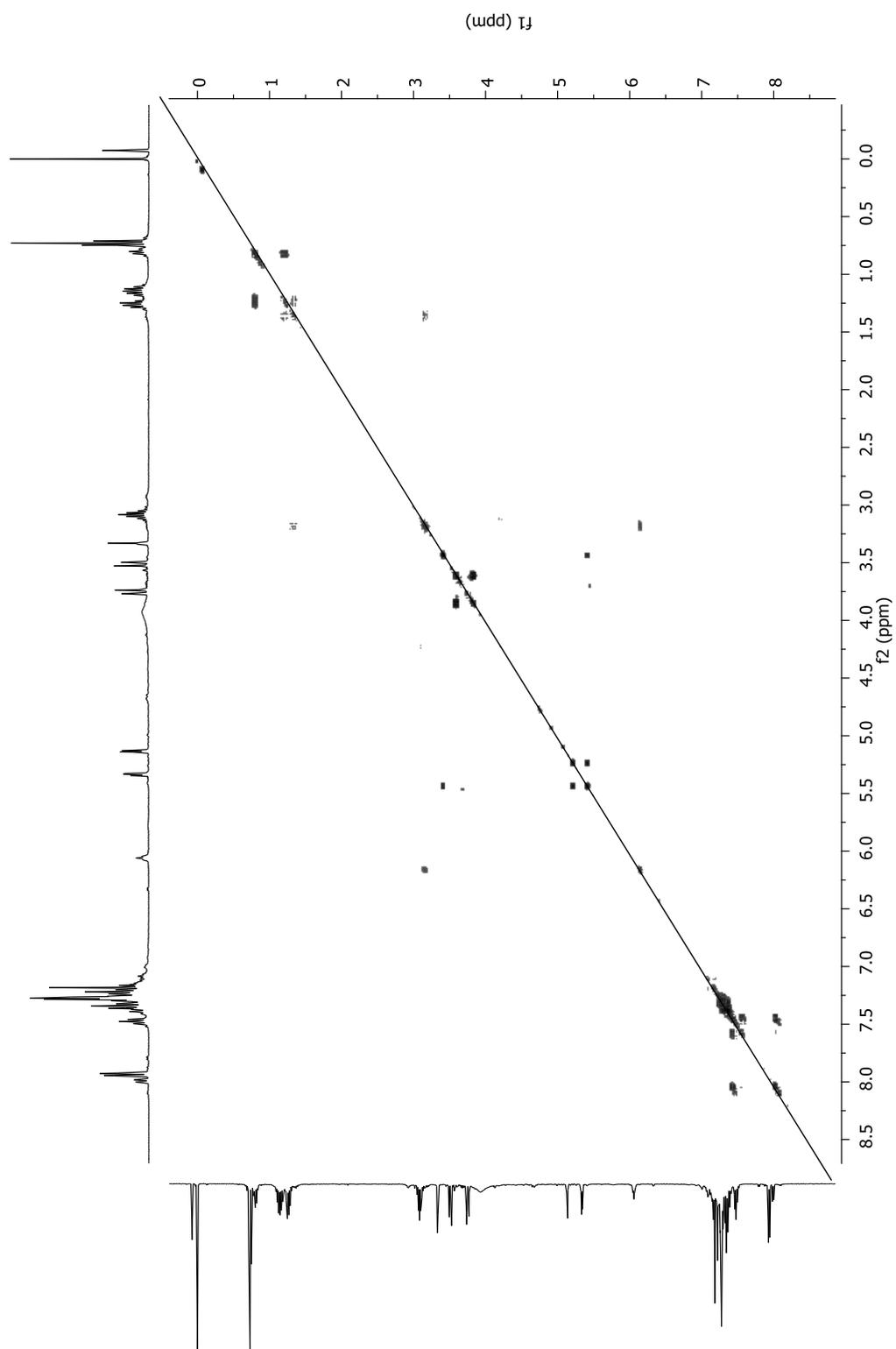
Espectro de massas de alta resolução composto **12q**.



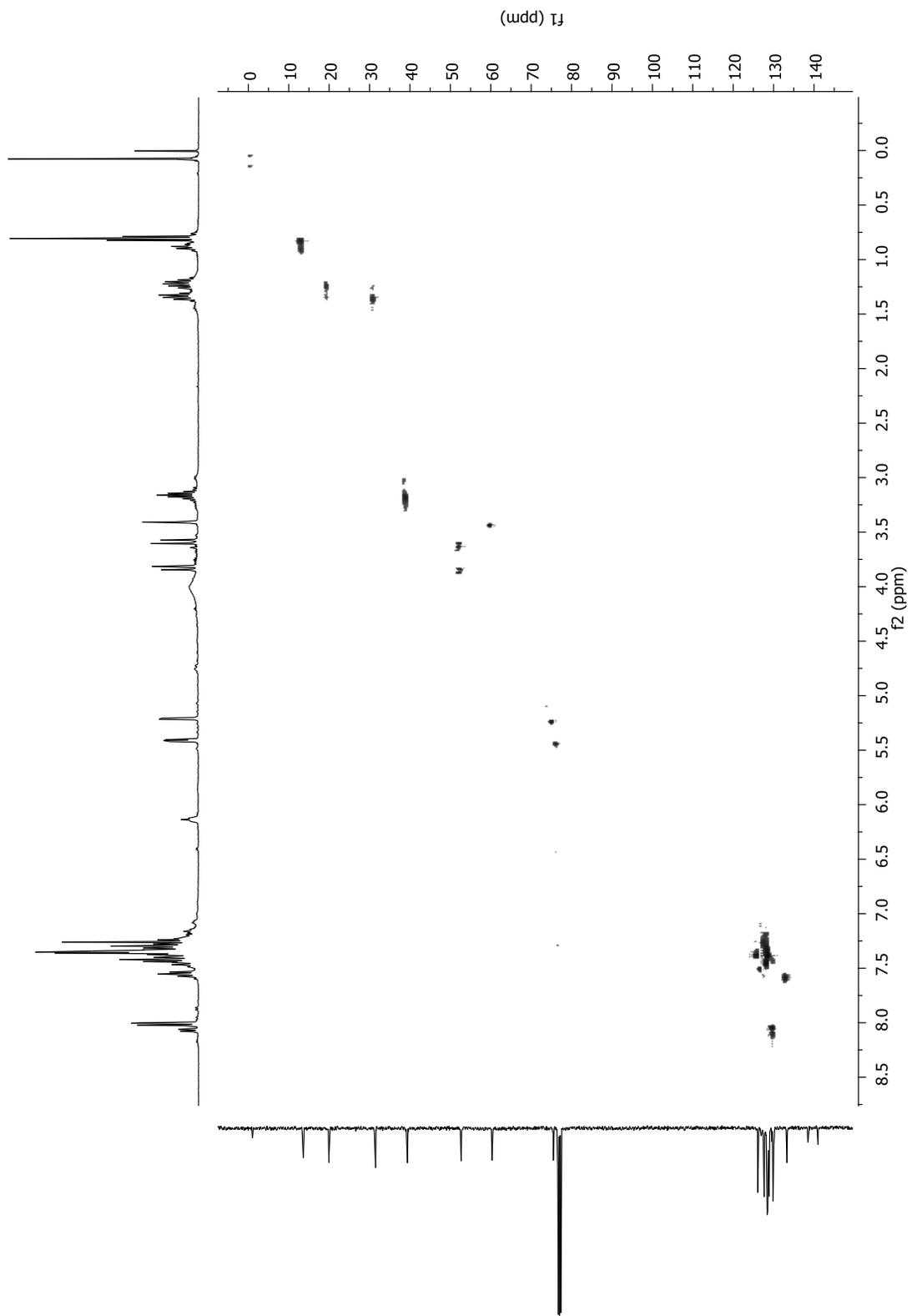
Espectro de RMN ¹H do diastereoisômero majoritário do composto **34a** em CDCl₃ a 400 MHz.



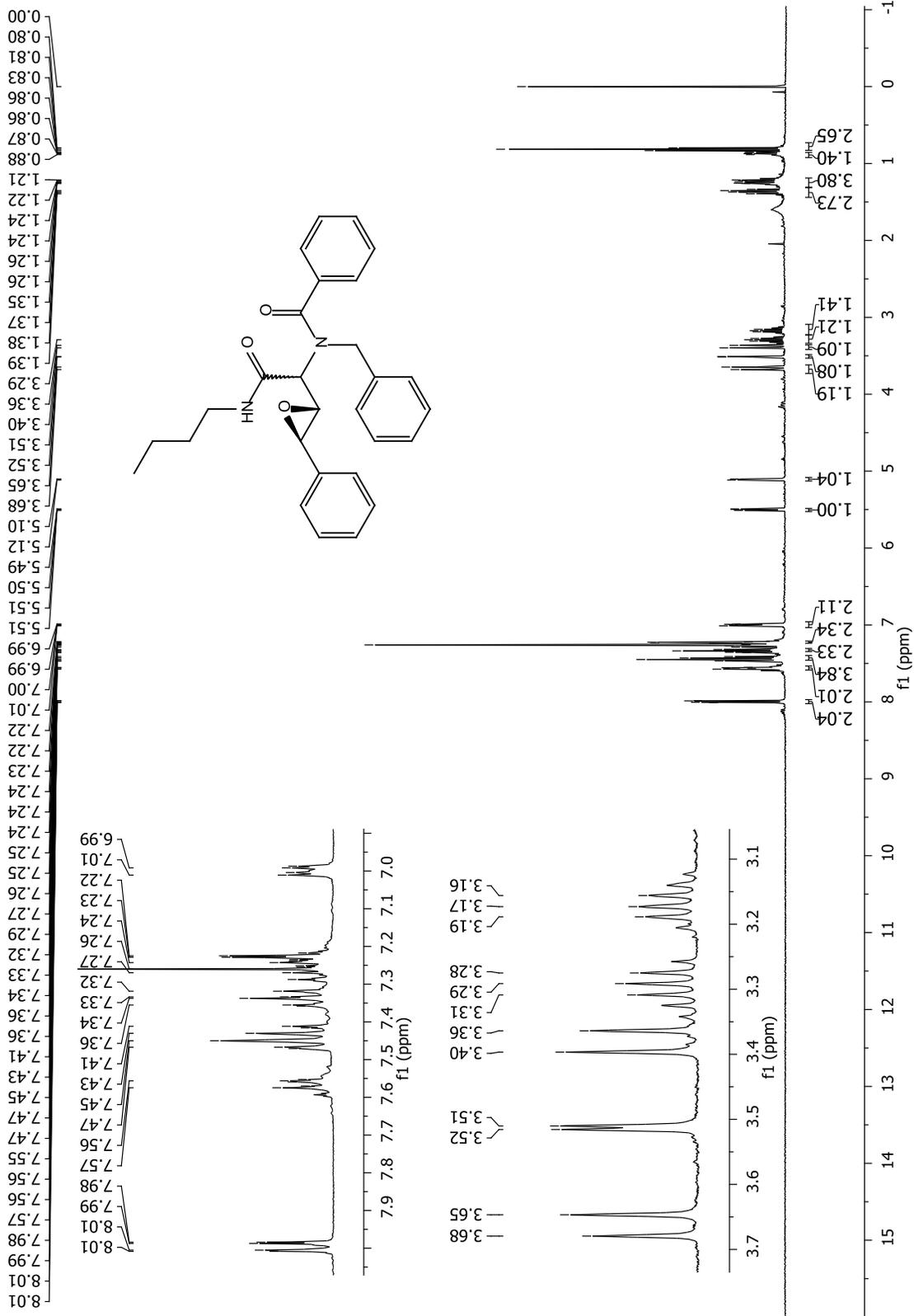
Espectro de RMN ^{13}C do diastereoisômero majoritário do composto **34a** em CDCl_3 a 100 MHz.



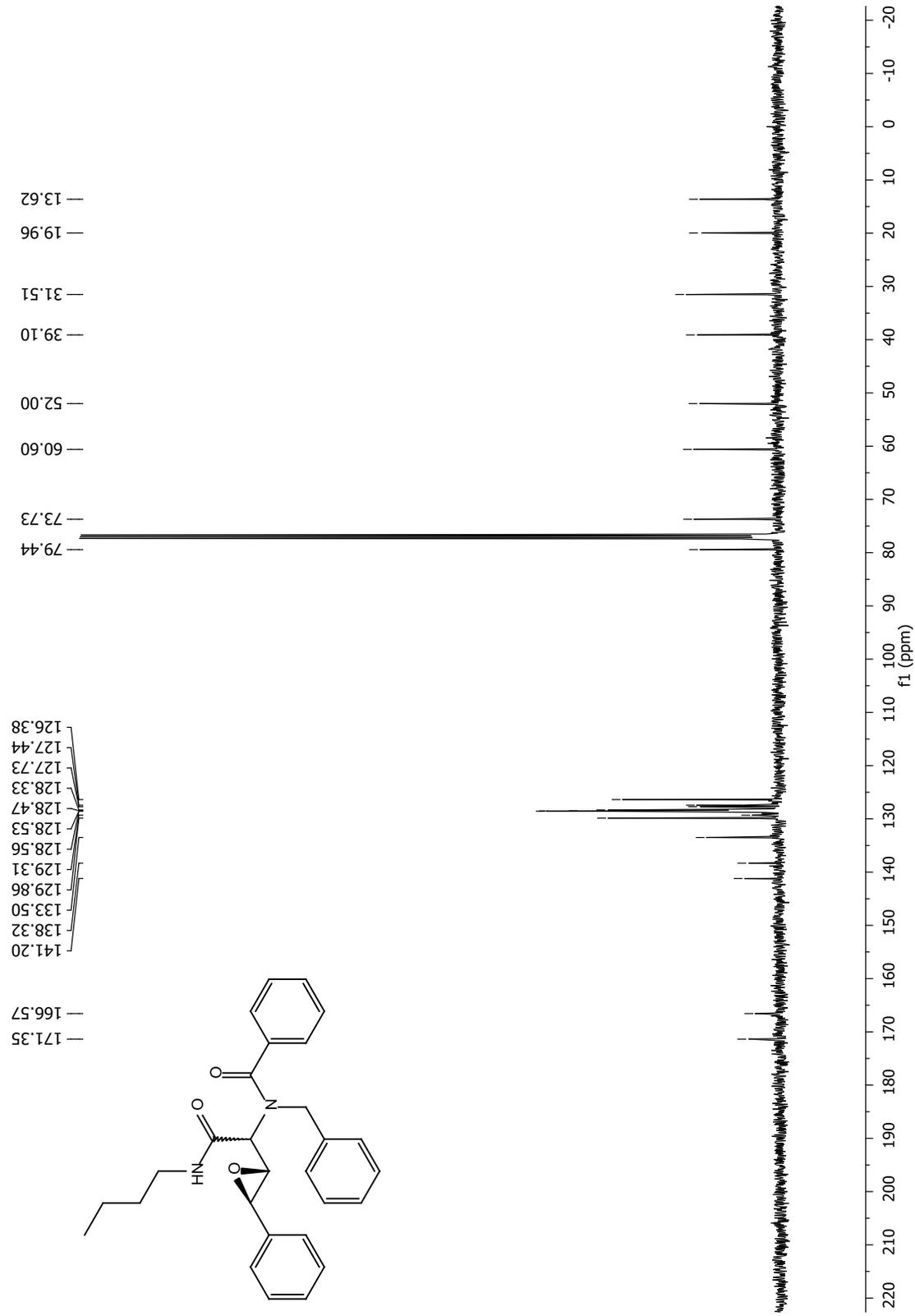
Espectro de RMN Cosy ¹H-¹H do diastereoisômero majoritário do composto **34a** em CDCl₃.



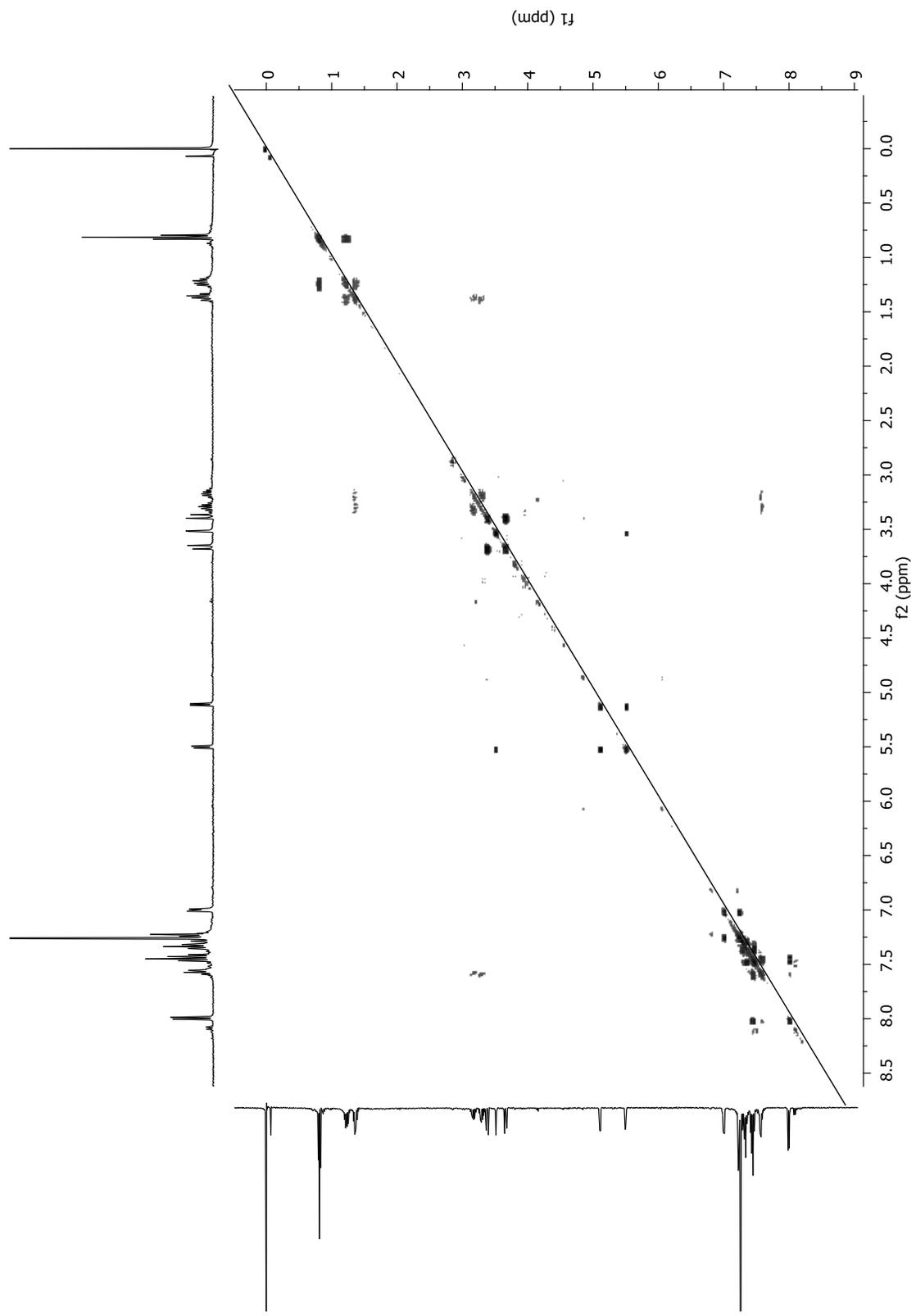
Espectro de RMN HSQC ¹H-¹³C do diastereoisômero majoritário do composto **34a** em CDCl₃.



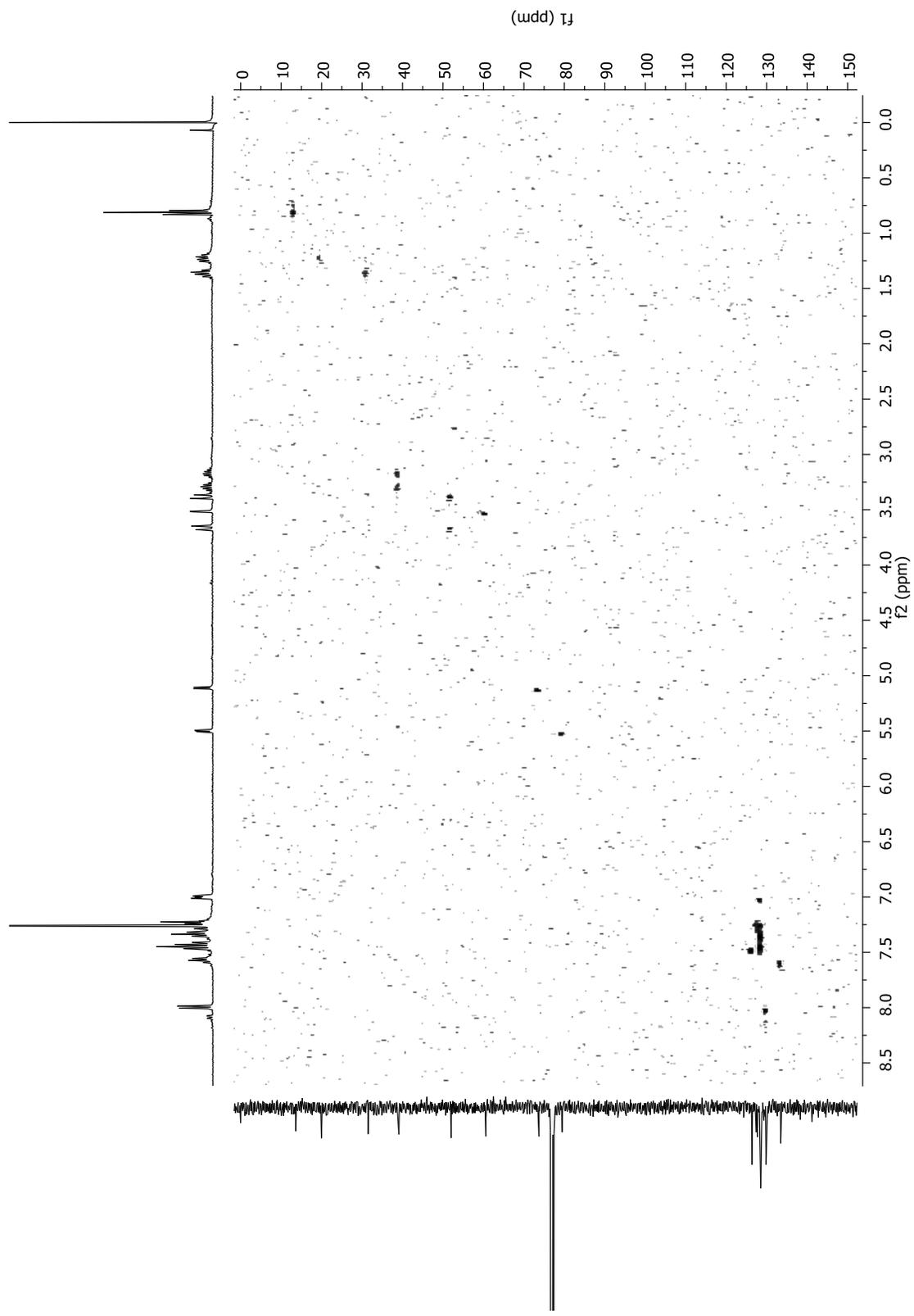
Espectro de RMN ¹H do diastereoisômero minoritário do composto **34a** em CDCl₃ a 400 MHz.



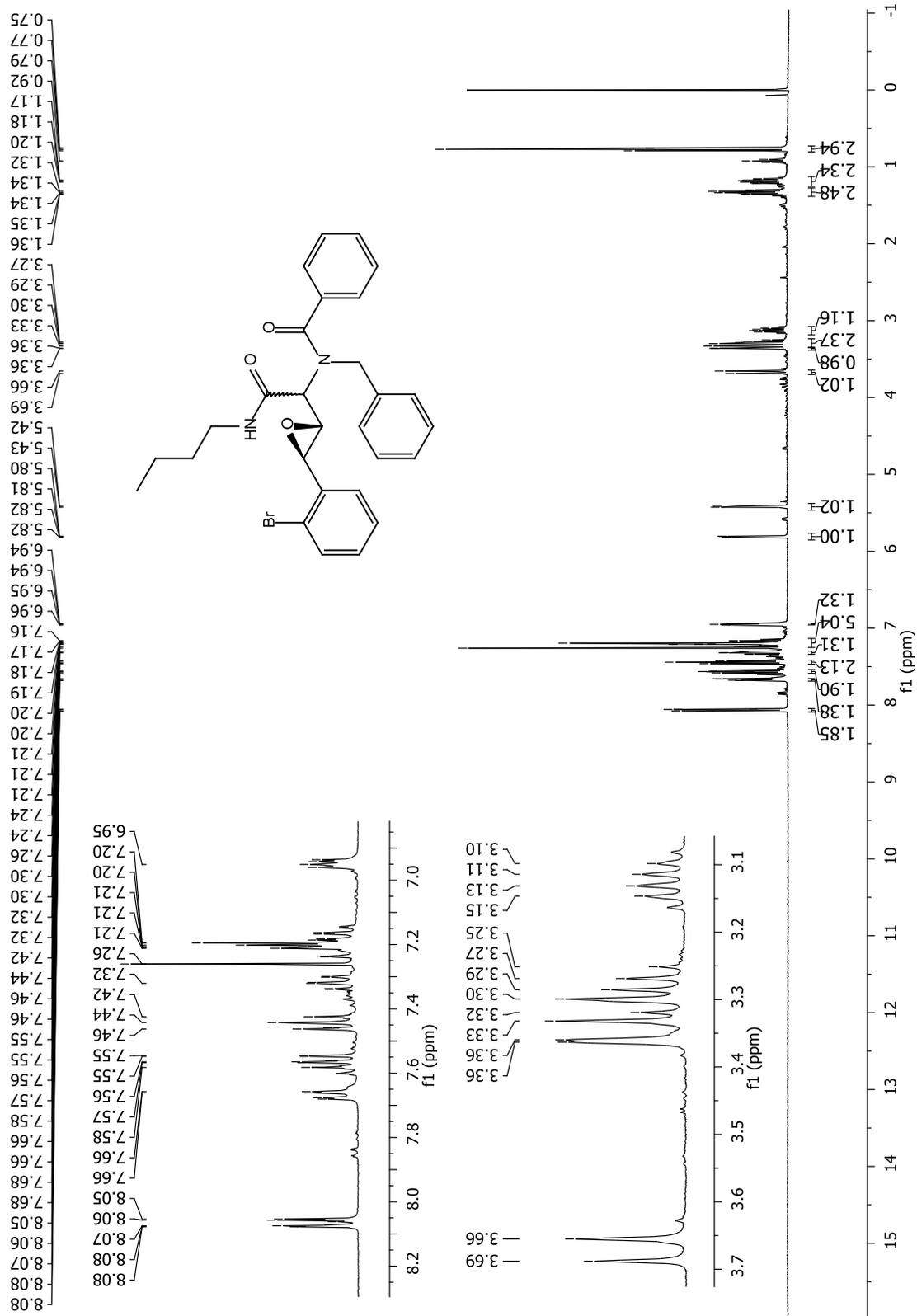
Espectro de RMN ^{13}C do diastereoisômero minoritário do composto **34a** em CDCl_3 a 100 MHz.



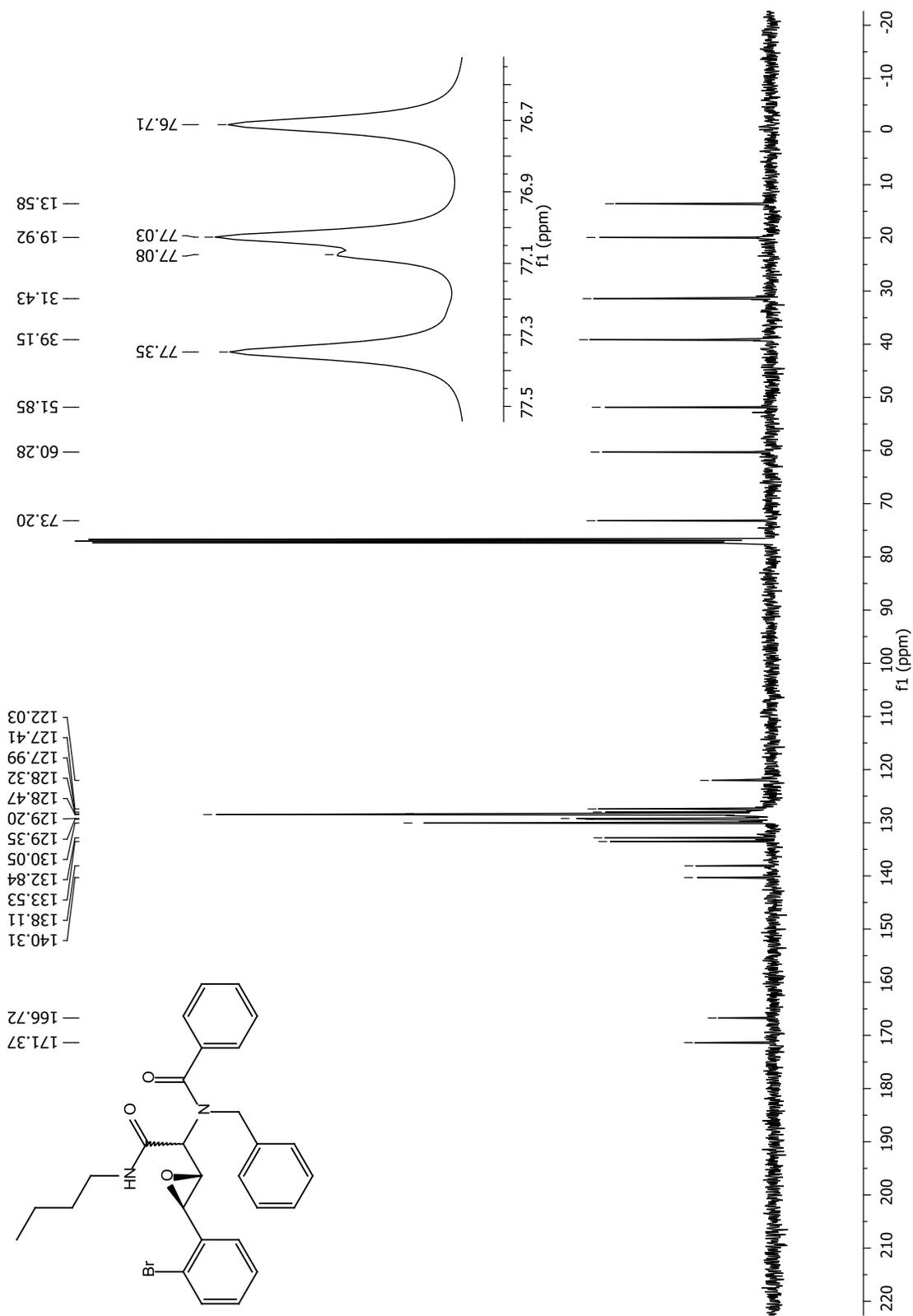
Espectro de RMN Cosy ^1H - ^1H do diastereoisômero minoritário do composto **34a** em CDCl_3 .



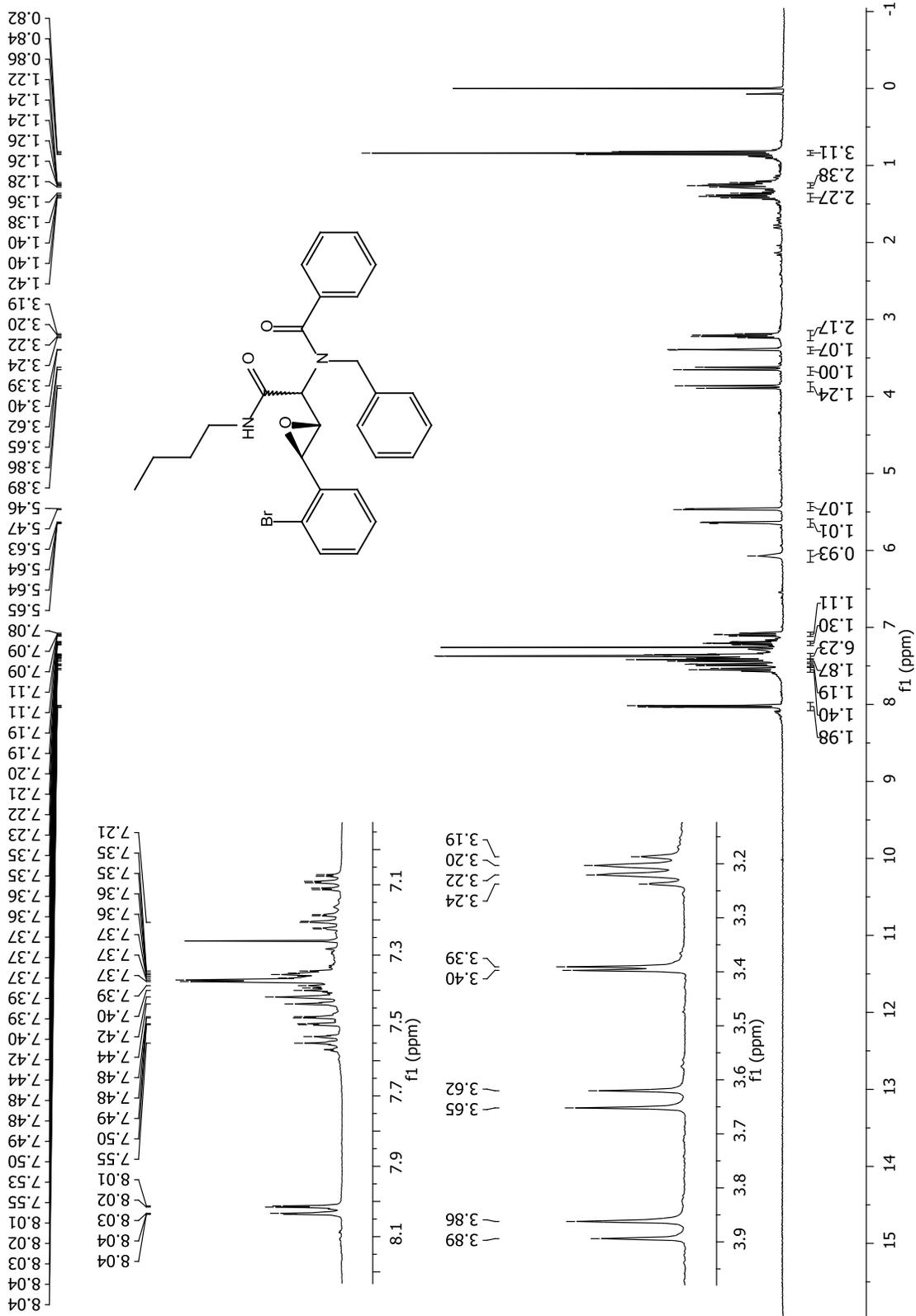
Espectro de RMN HSQC ^1H - ^{13}C do diastereoisômero minoritário do composto **34a** em CDCl_3 .



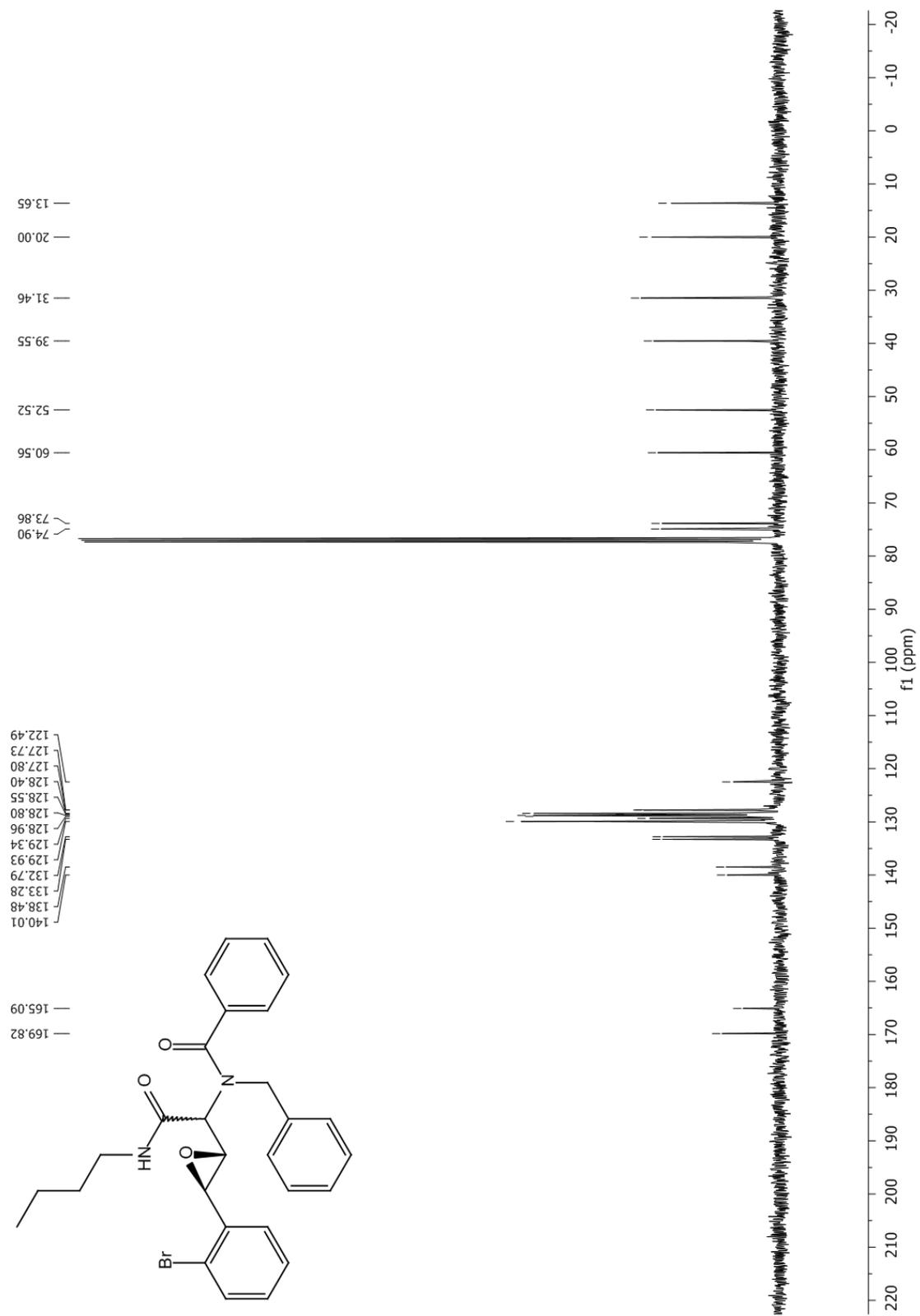
Espectro de RMN ^1H do diastereoisômero majoritário do composto **34b** em CDCl_3 a 400 MHz.



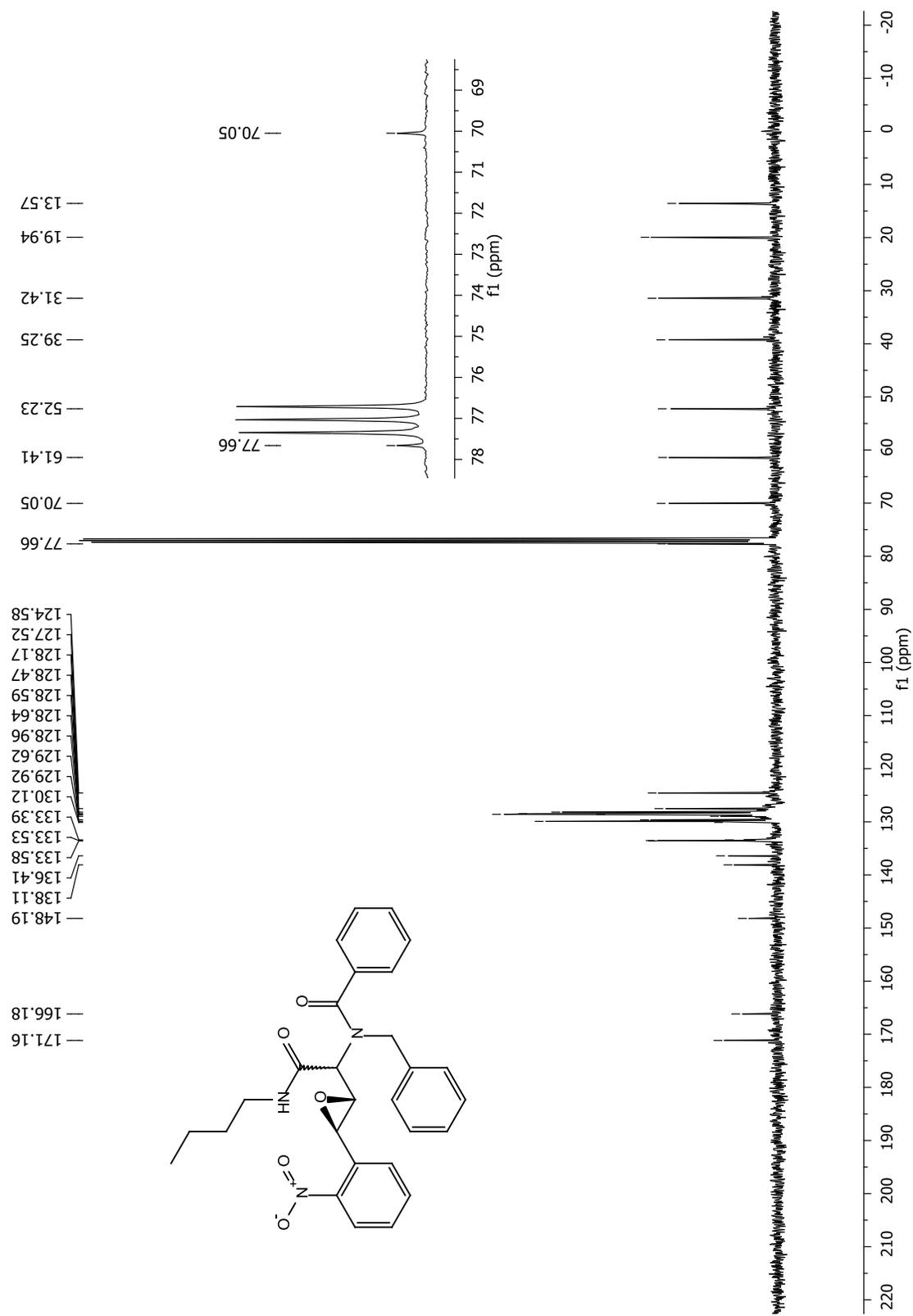
Espectro de RMN ^{13}C do diastereoisômero majoritário do composto **34b** em CDCl_3 a 100 MHz.



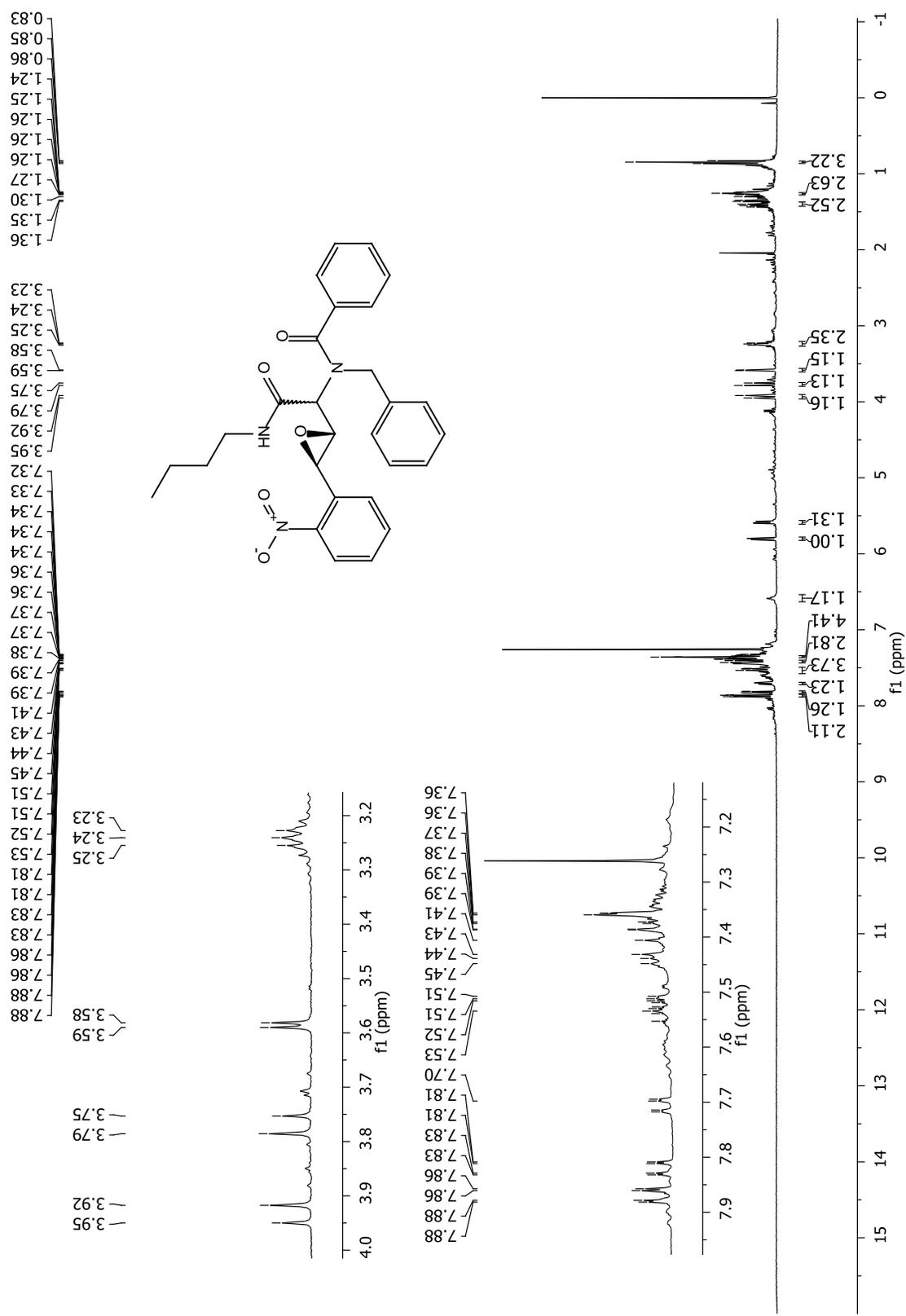
Espectro de RMN ¹H do diastereoisômero minoritário do composto **34b** em CDCl₃ a 400 MHz.



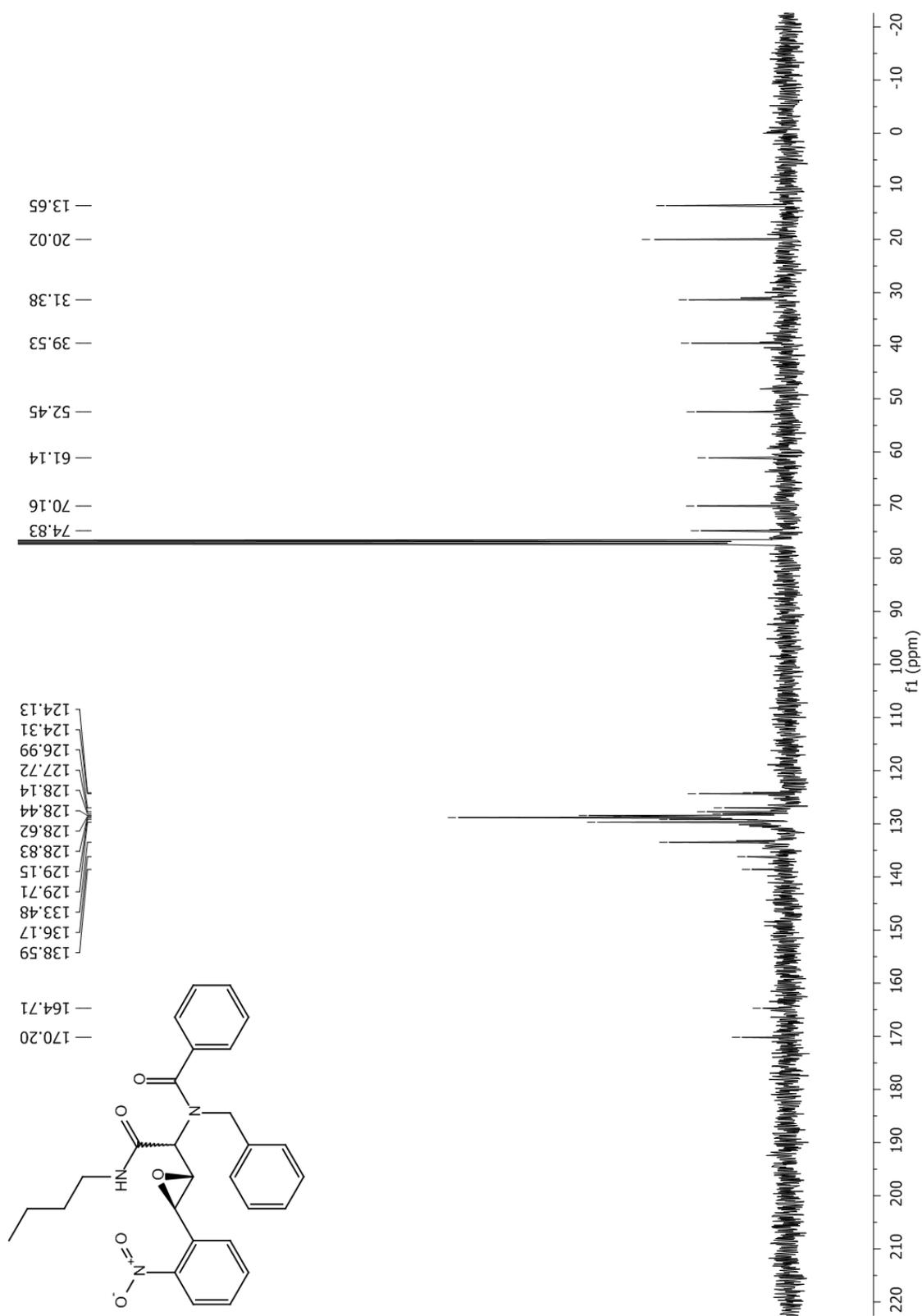
Espectro de RMN ^{13}C do diastereoisômero minoritário do composto **34b** em CDCl_3 a 100 MHz.



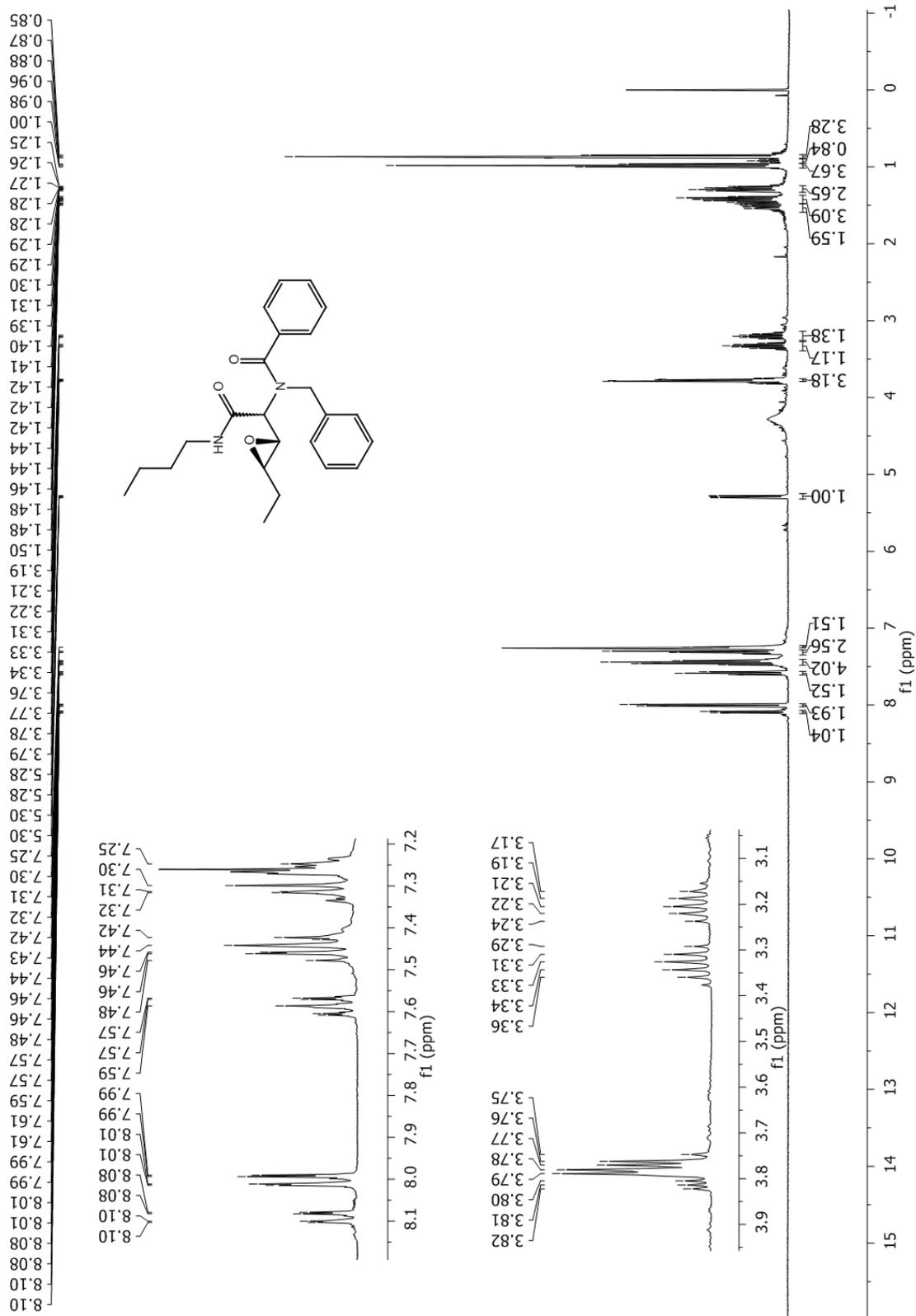
Espectro de RMN ^{13}C do diastereoisômero majoritário do composto **34c** em CDCl_3 a 100 MHz.



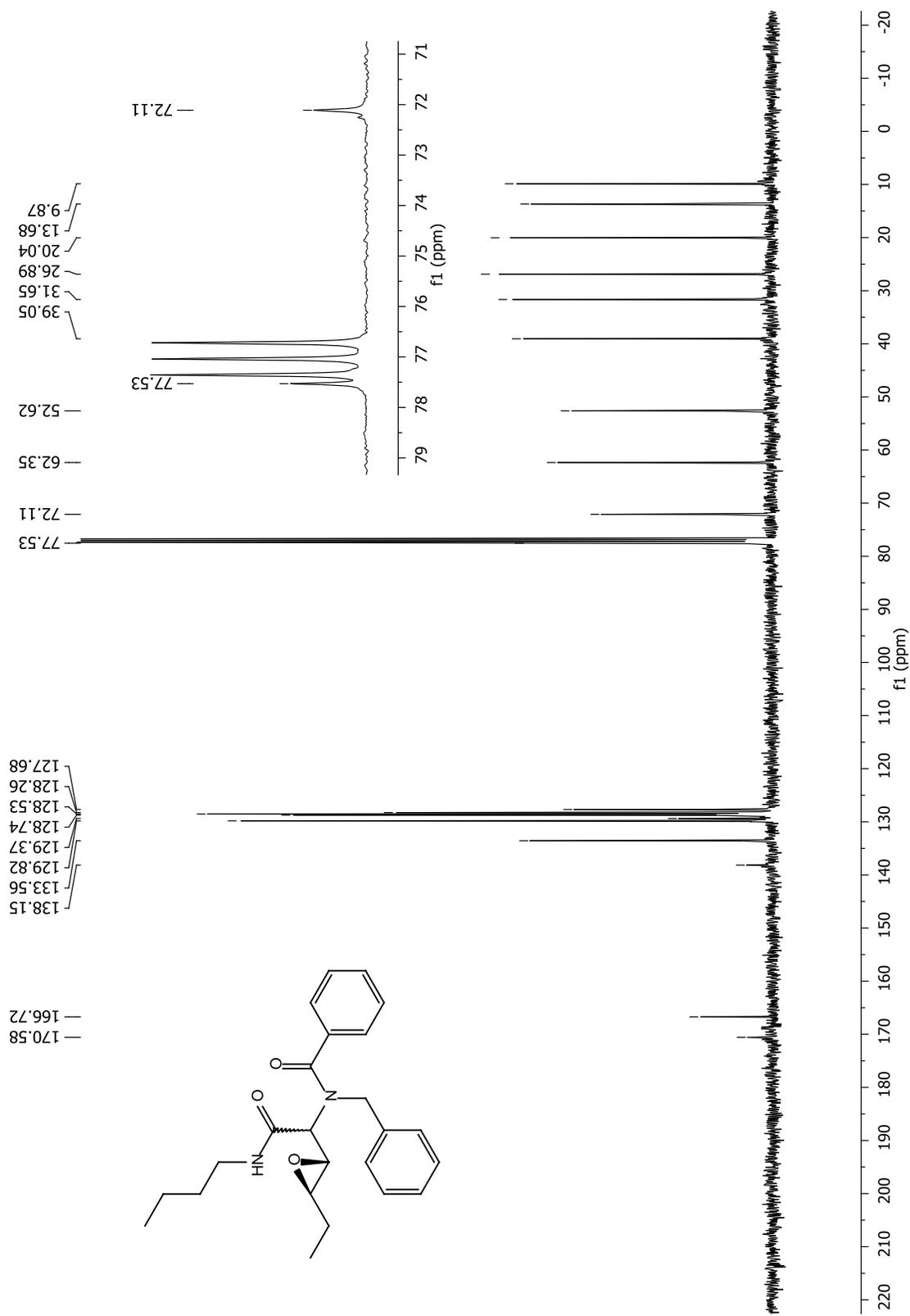
Espectro de RMN ^1H do diastereoisômero minoritário do composto **34c** em CDCl_3 a 400 MHz.



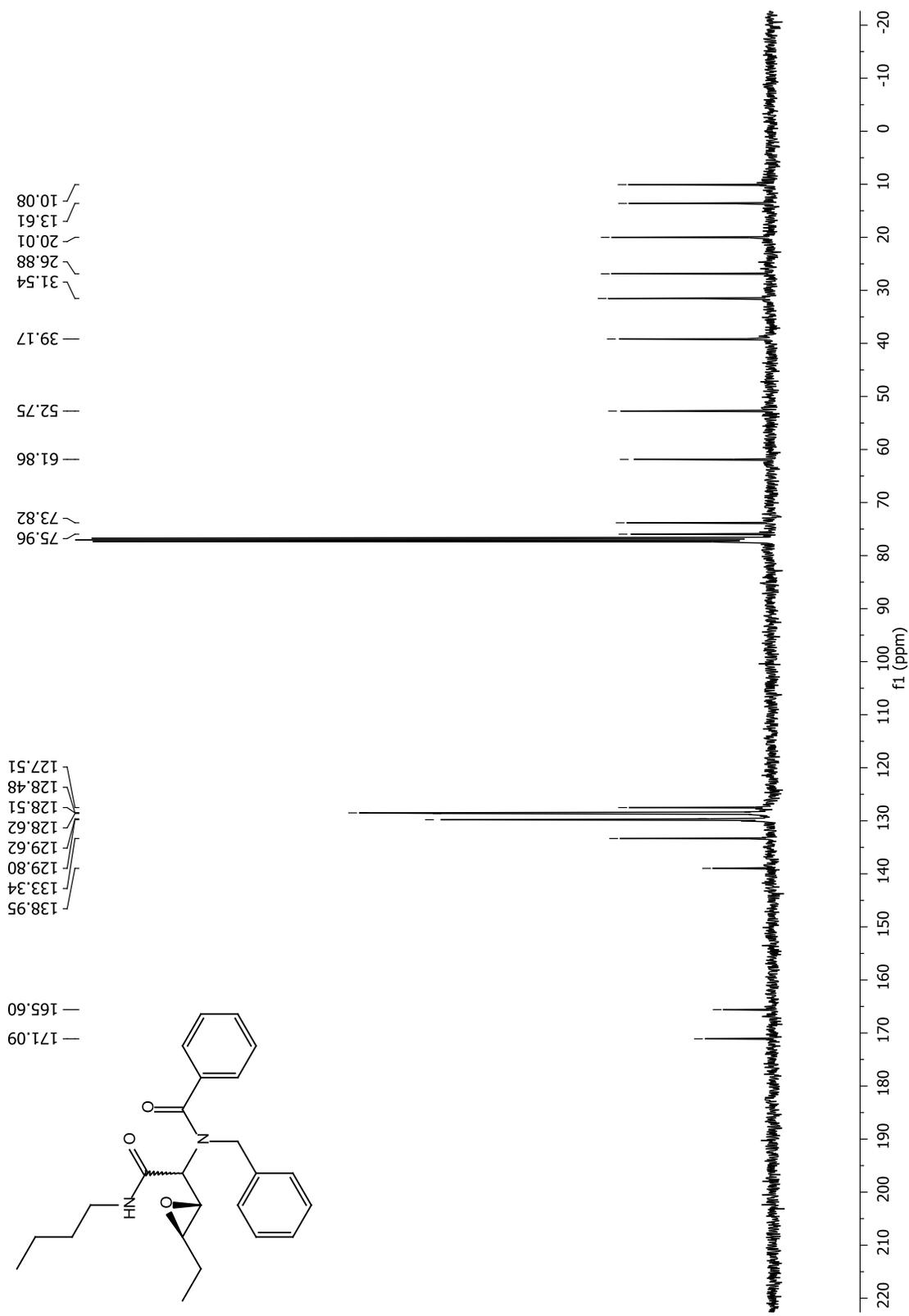
Espectro de RMN ^{13}C do diastereoisômero minoritário do composto **34c** em CDCl_3 a 100 MHz.



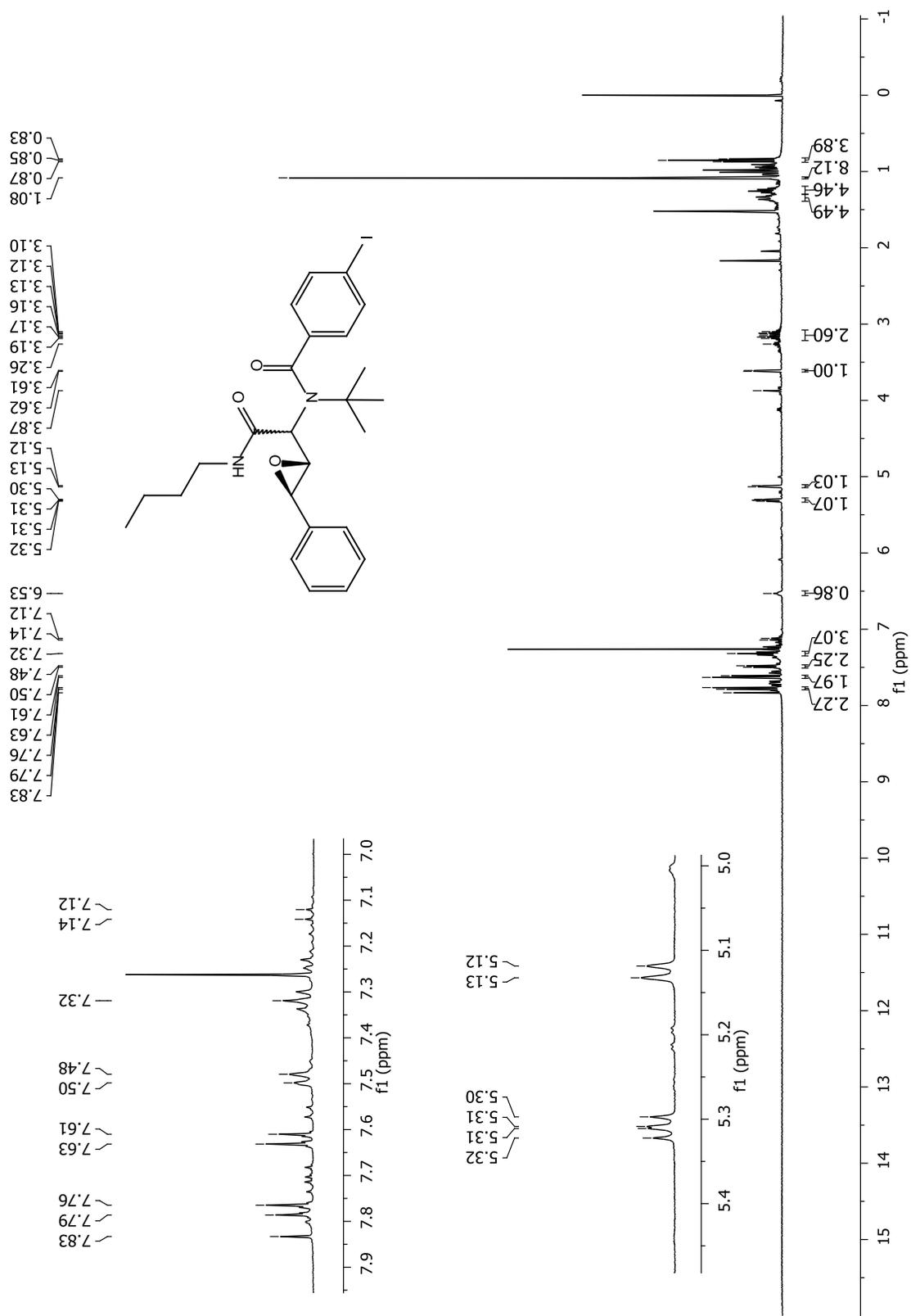
Espectro de RMN ¹H do diastereoisômero majoritário do composto **34d** em CDCl₃ a 400 MHz.



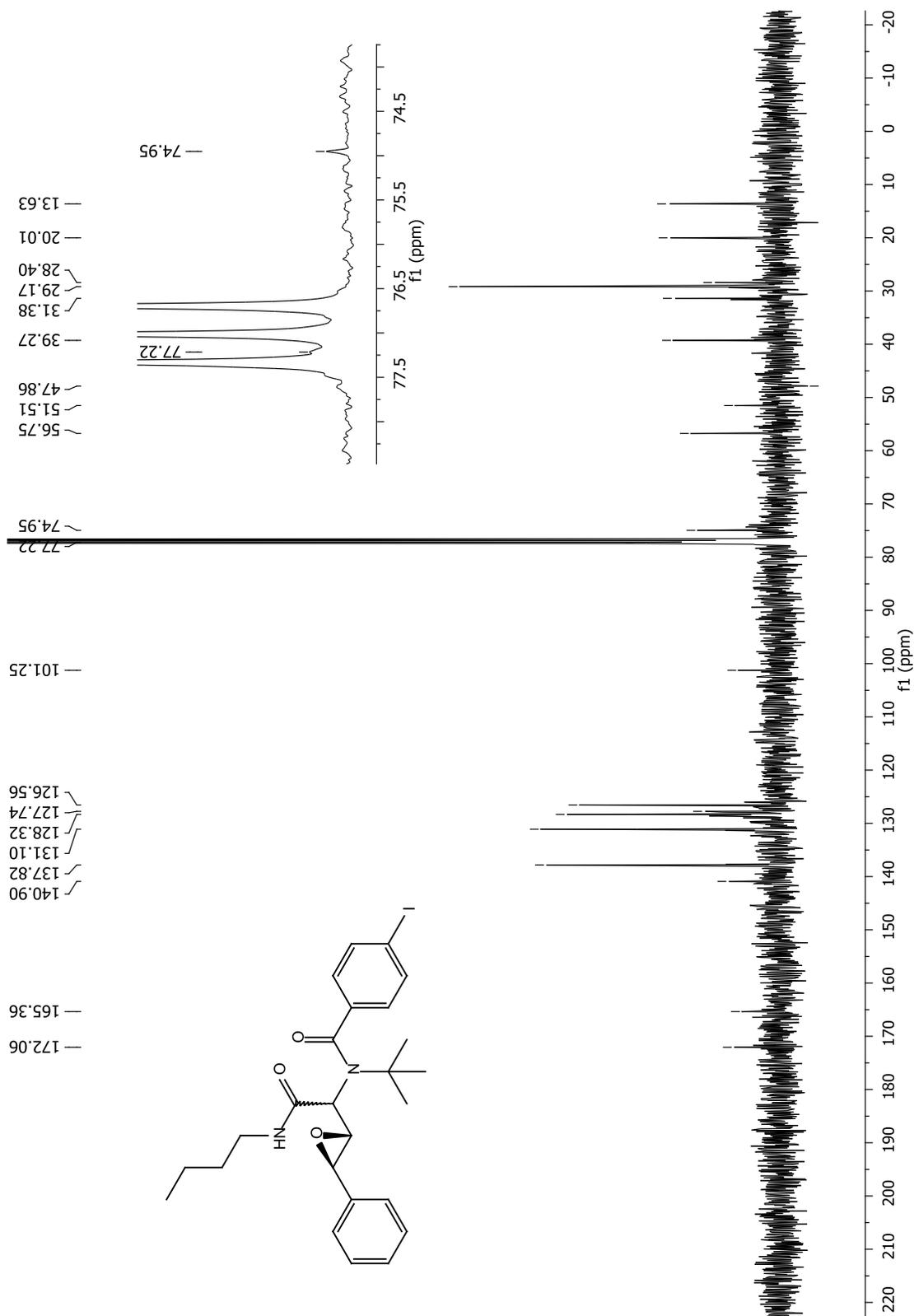
Espectro de RMN ¹³C do diastereoisômero majoritário do composto **34d** em CDCl₃ a 100 MHz.



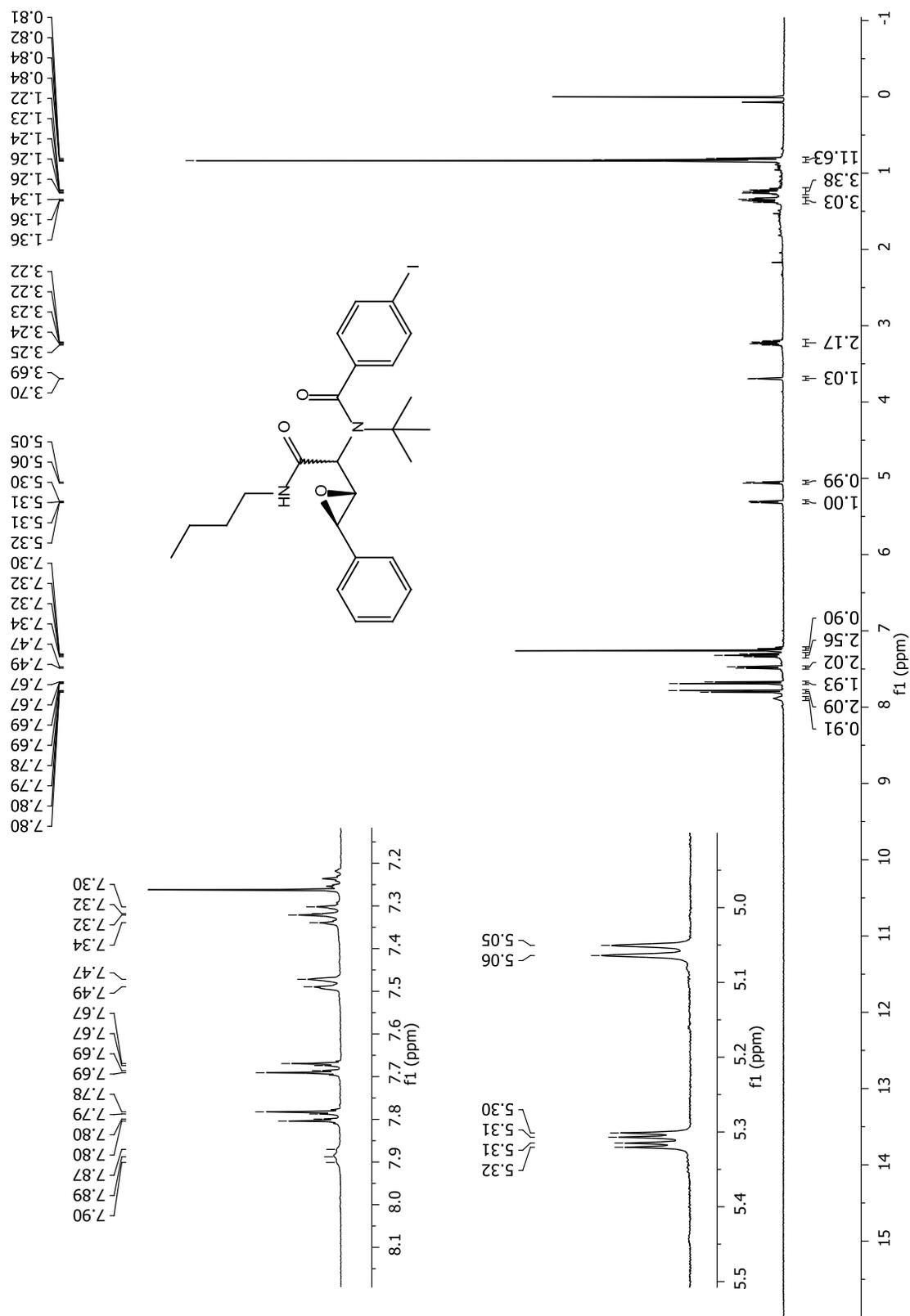
Espectro de RMN ^{13}C do diastereoisômero minoritário do composto **34d** em CDCl_3 a 100 MHz.



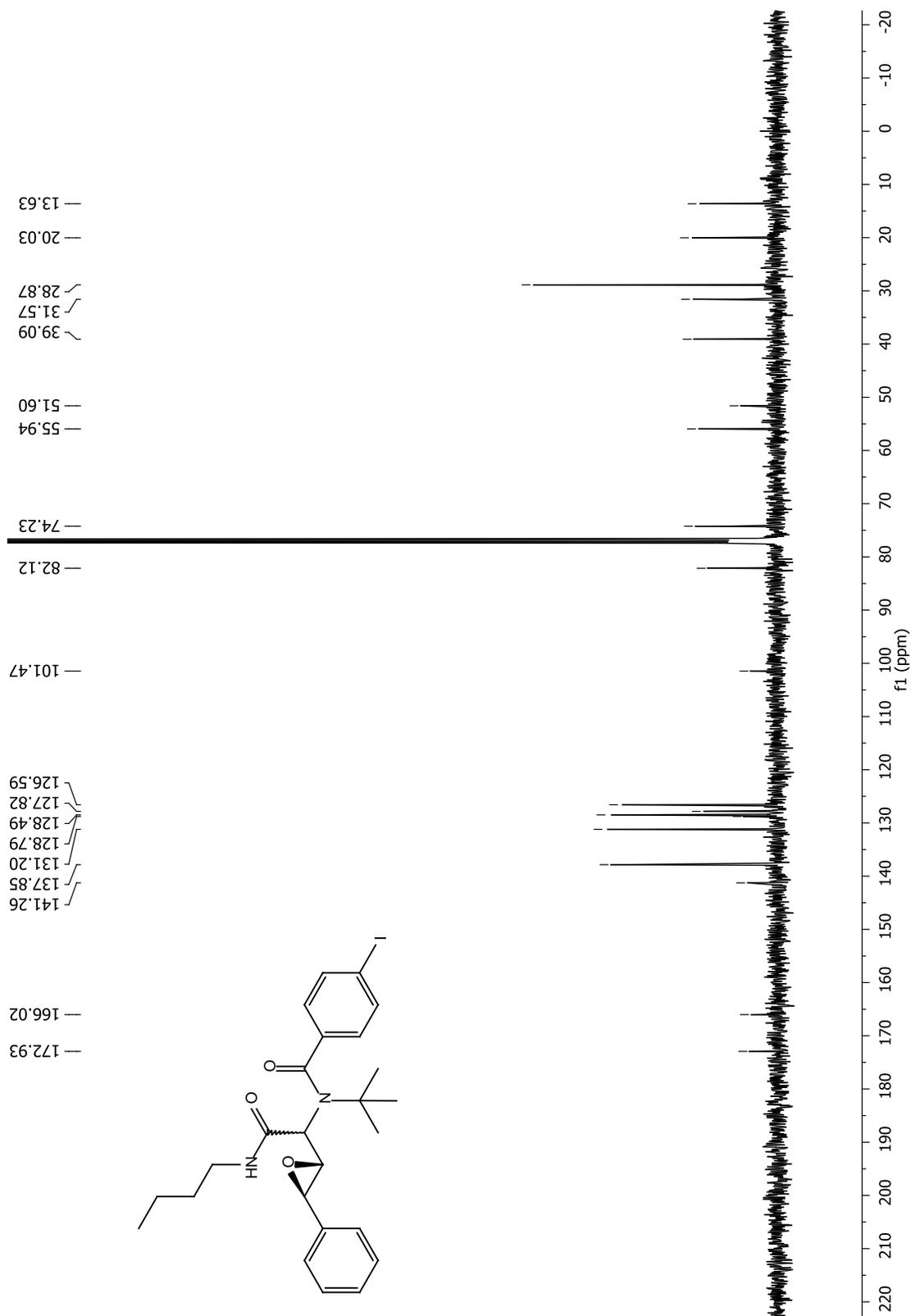
Espectro de RMN ¹H do diastereoisômero majoritário do composto **34e** em CDCl₃ a 400 MHz.



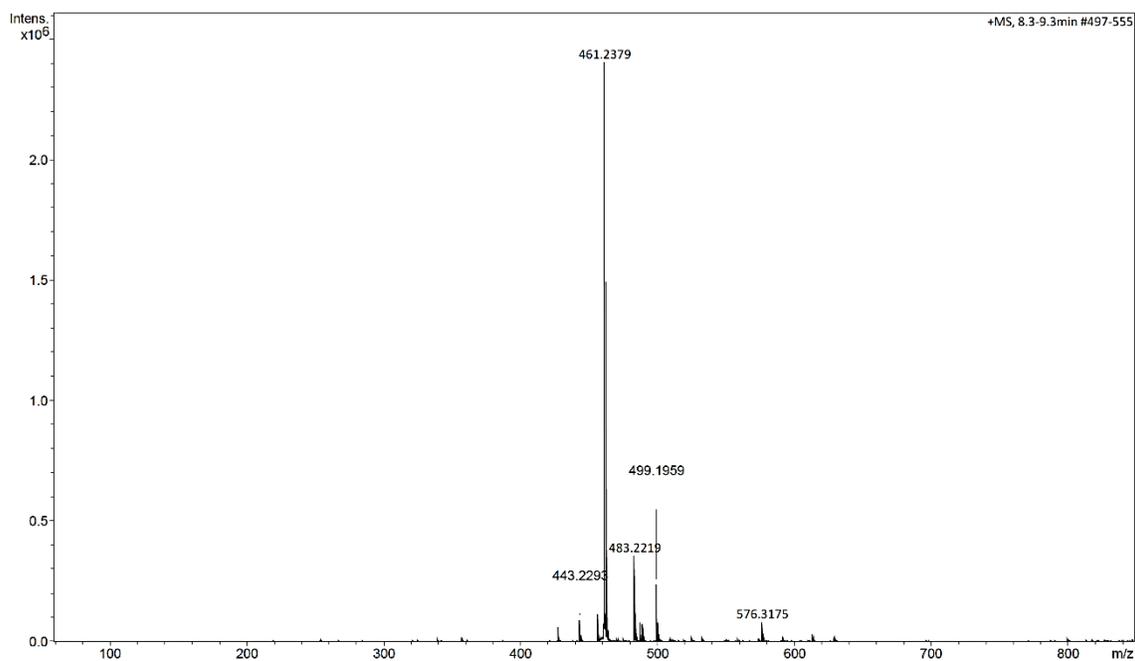
Espectro de RMN ^{13}C do diastereoisômero majoritário do composto **34e** em CDCl_3 a 100 MHz.



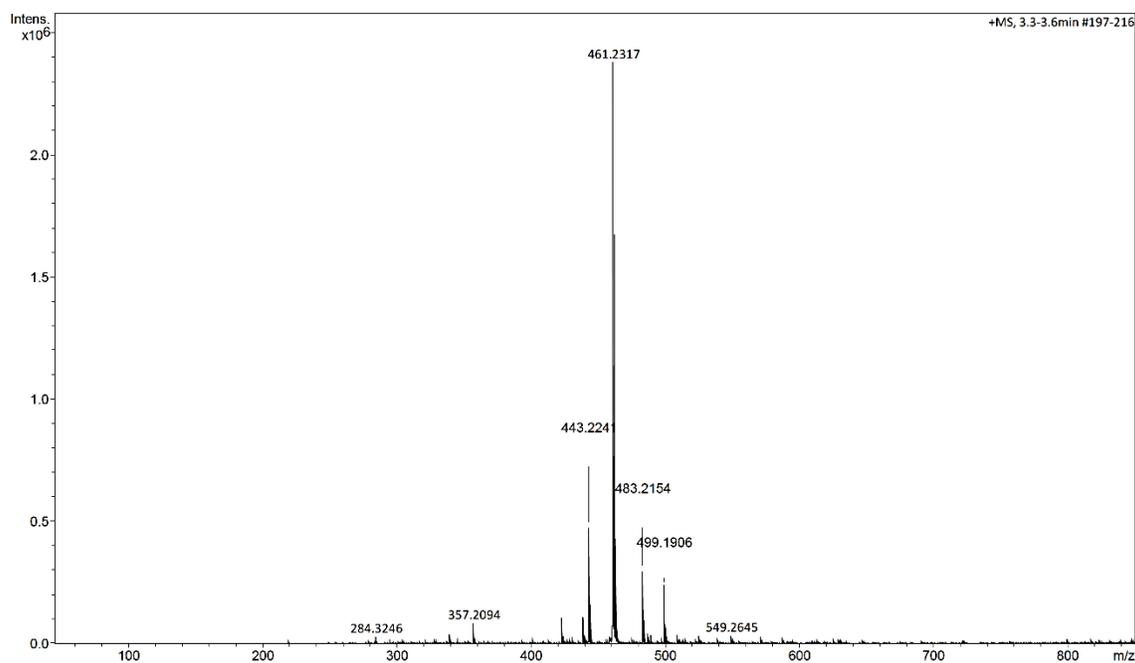
Espectro de RMN ^1H do diastereoisômero minoritário do composto **34e** em CDCl_3 a 400 MHz.



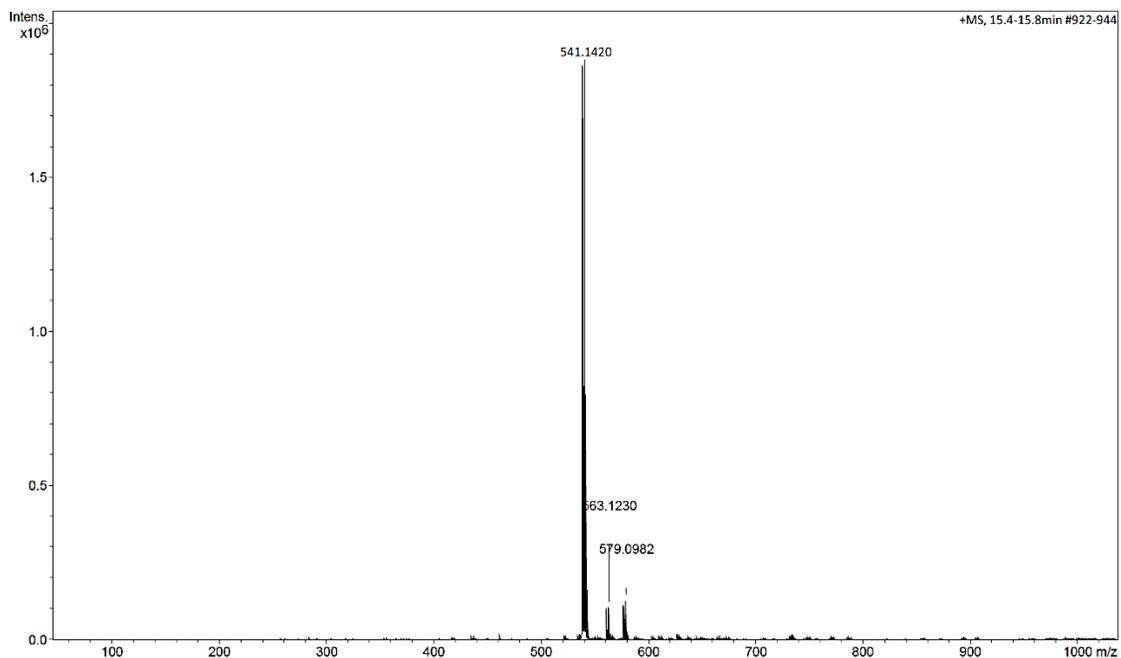
Espectro de RMN ¹³C do diastereoisômero minoritário do composto **34e** em CDCl₃ a 100 MHz.



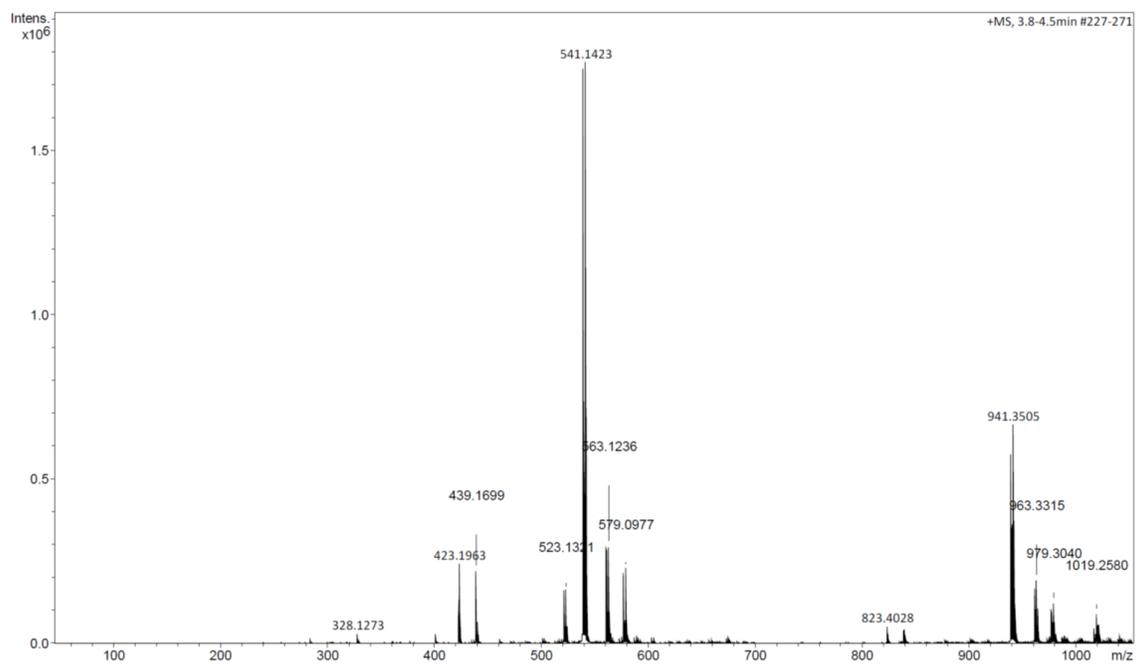
Espectro de massas de alta resolução do composto **34a** majoritário. Calculado para $C_{28}H_{33}N_2O_4^+$ [M + H₃O]⁺ 461,2435, encontrado 461,2379



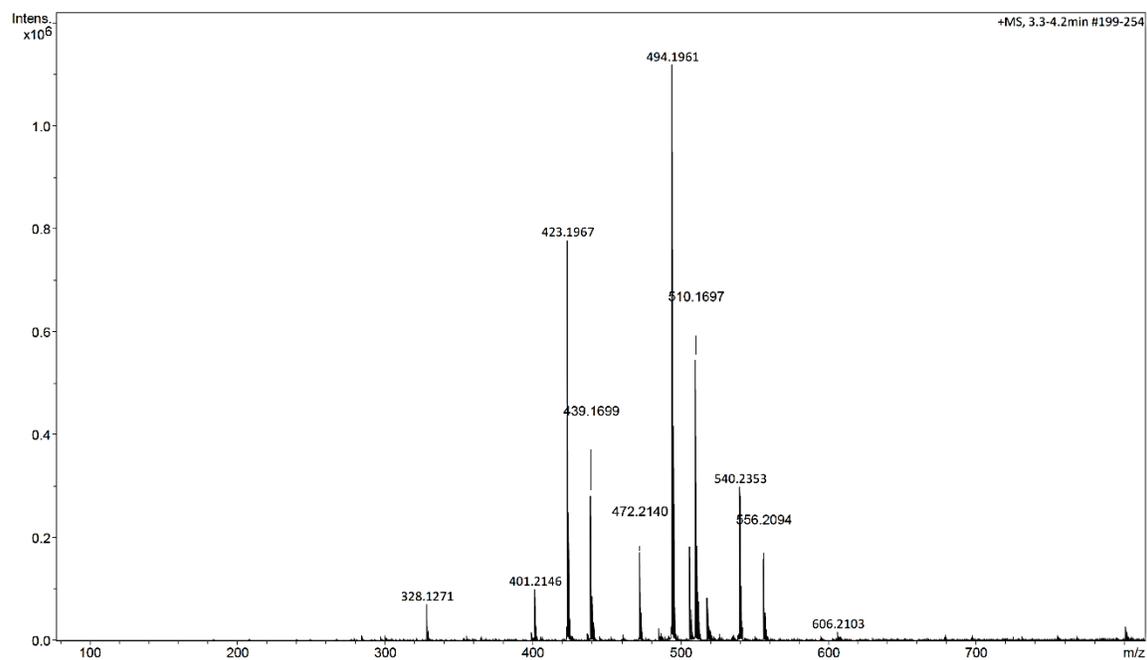
Espectro de massas de alta resolução do composto **34a** minoritário. Calculado para $C_{28}H_{33}N_2O_4^+$ [M + H₃O]⁺ 461,2435, encontrado 461,2317



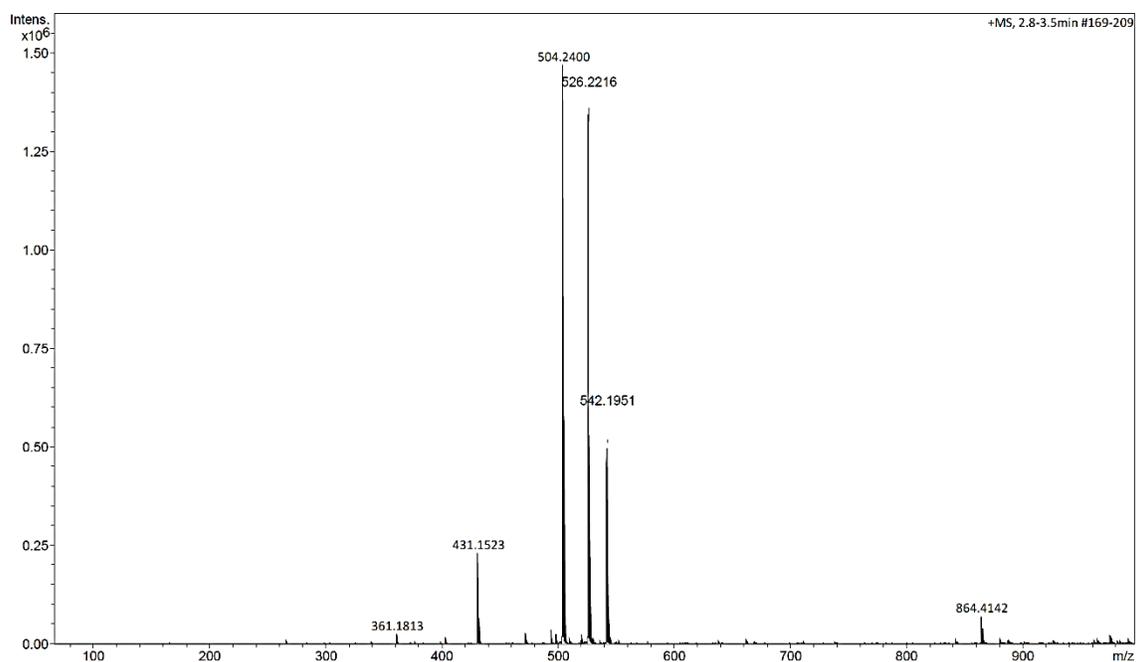
Espectro de massas de alta resolução do composto **34b** majoritário. Calculado para $C_{28}H_{32}^{81}BrN_2O_4^+ [M + H_3O]^+$ 541,1540, encontrado 541,1420.



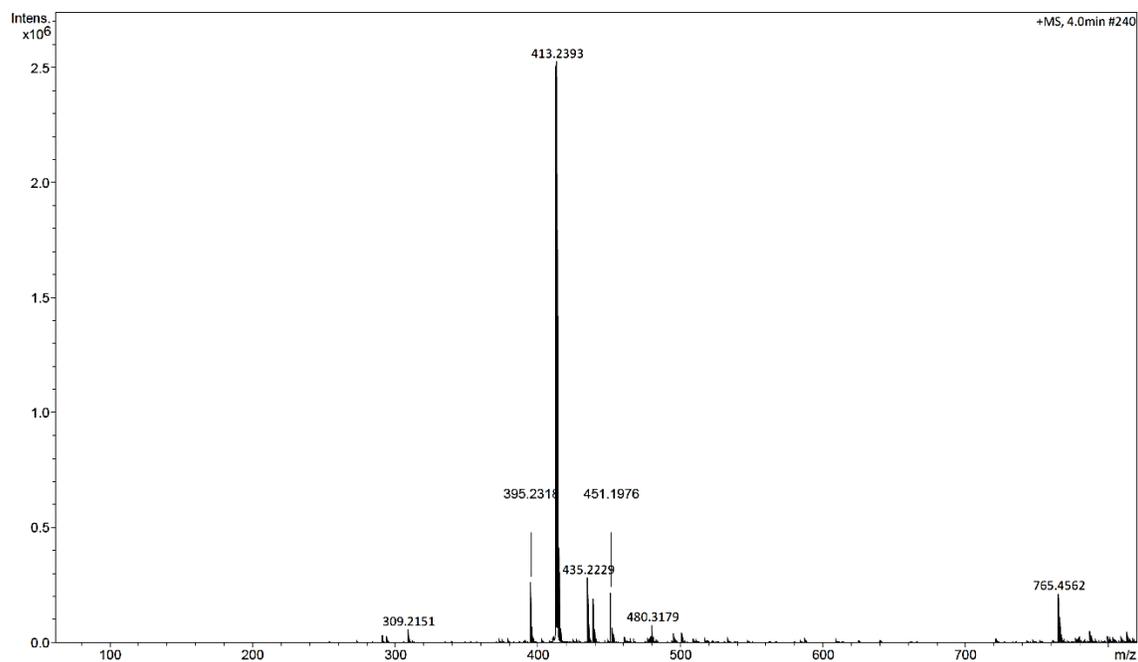
Espectro de massas de alta resolução do composto **34b** minoritário. Calculado para $C_{28}H_{32}^{81}BrN_2O_4^+ [M + H_3O]^+$ 541,1540, encontrado 541,1423.



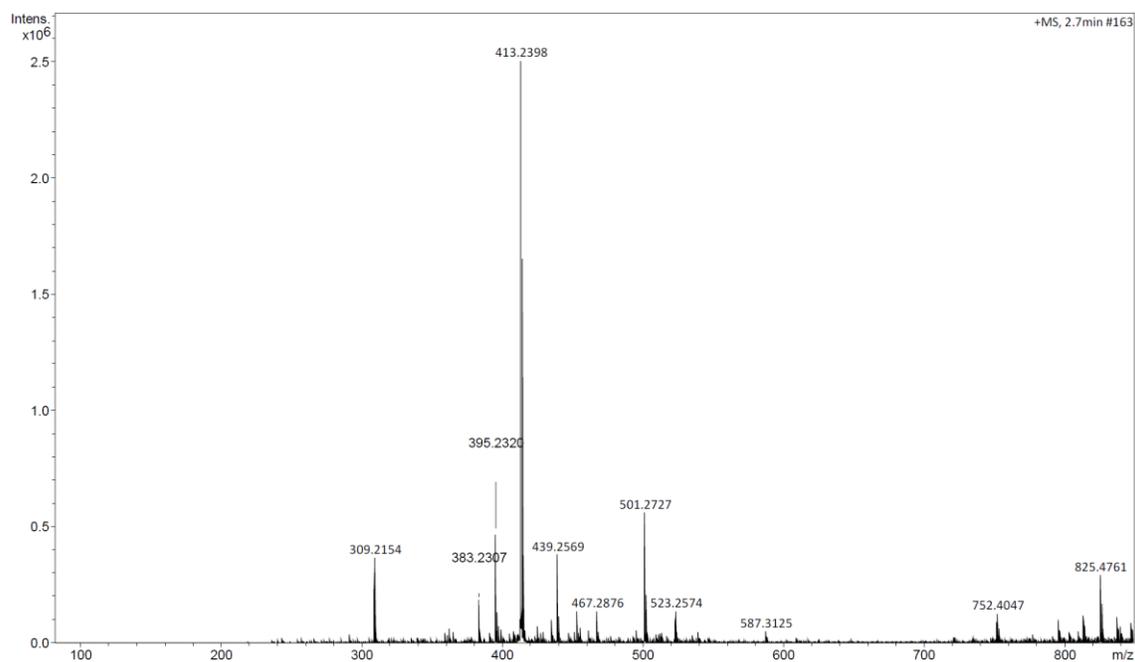
Espectro de massas de alta resolução do composto **34c** majoritário. Calculado para $C_{28}H_{29}N_3NaO_5^+ [M + Na]^+$ 510,1999, encontrado 510,1697.



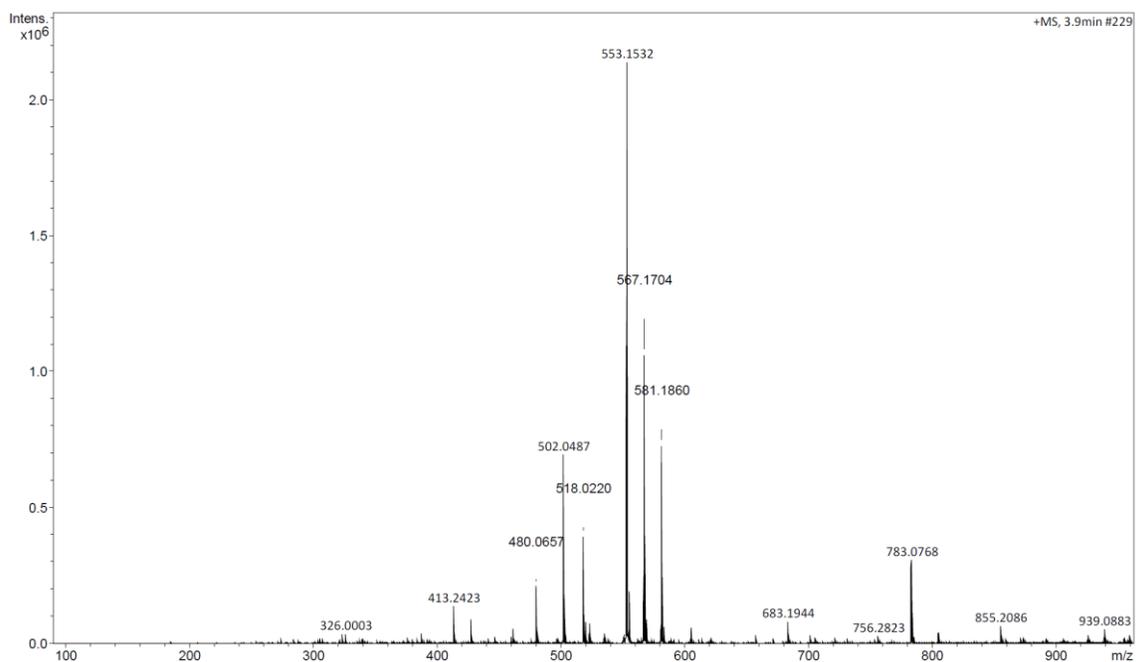
Espectro de massas de alta resolução do composto **34c** minoritário. Calculado para $C_{28}H_{29}N_3KO_5^+ [M + K]^+$ 526,1739, encontrado 526,2216.



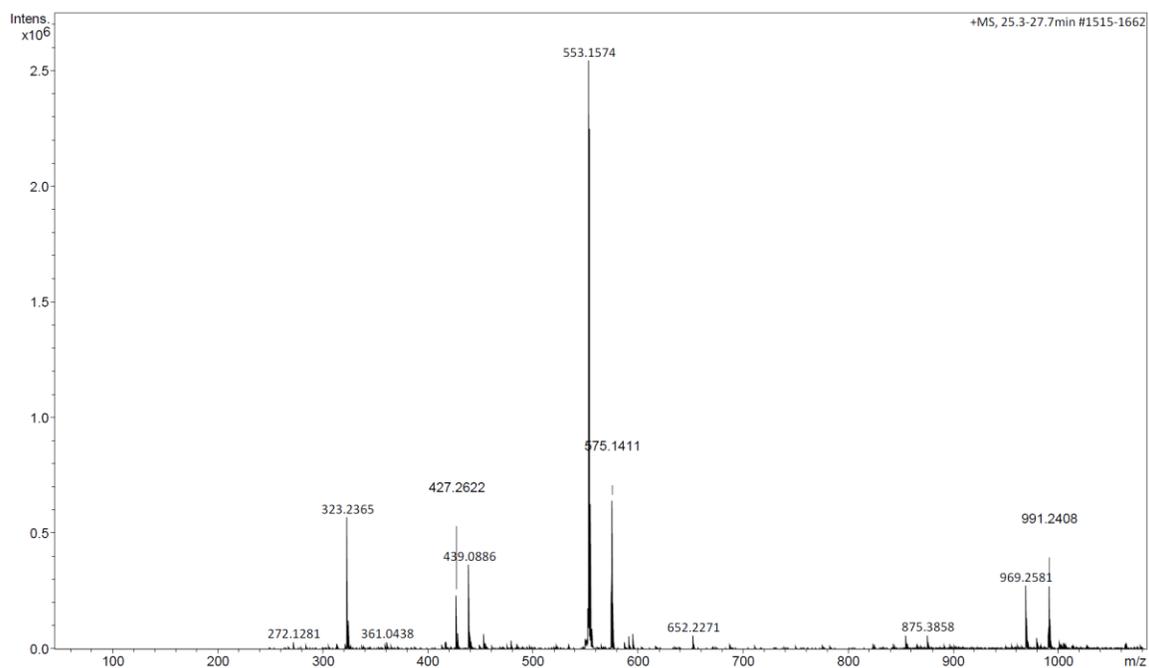
Espectro de massas de alta resolução do composto **34d** majoritário. Calculado para $C_{24}H_{33}N_2O_4^+ [M + H_3O]^+$ 413,2435, encontrado 413,2393.



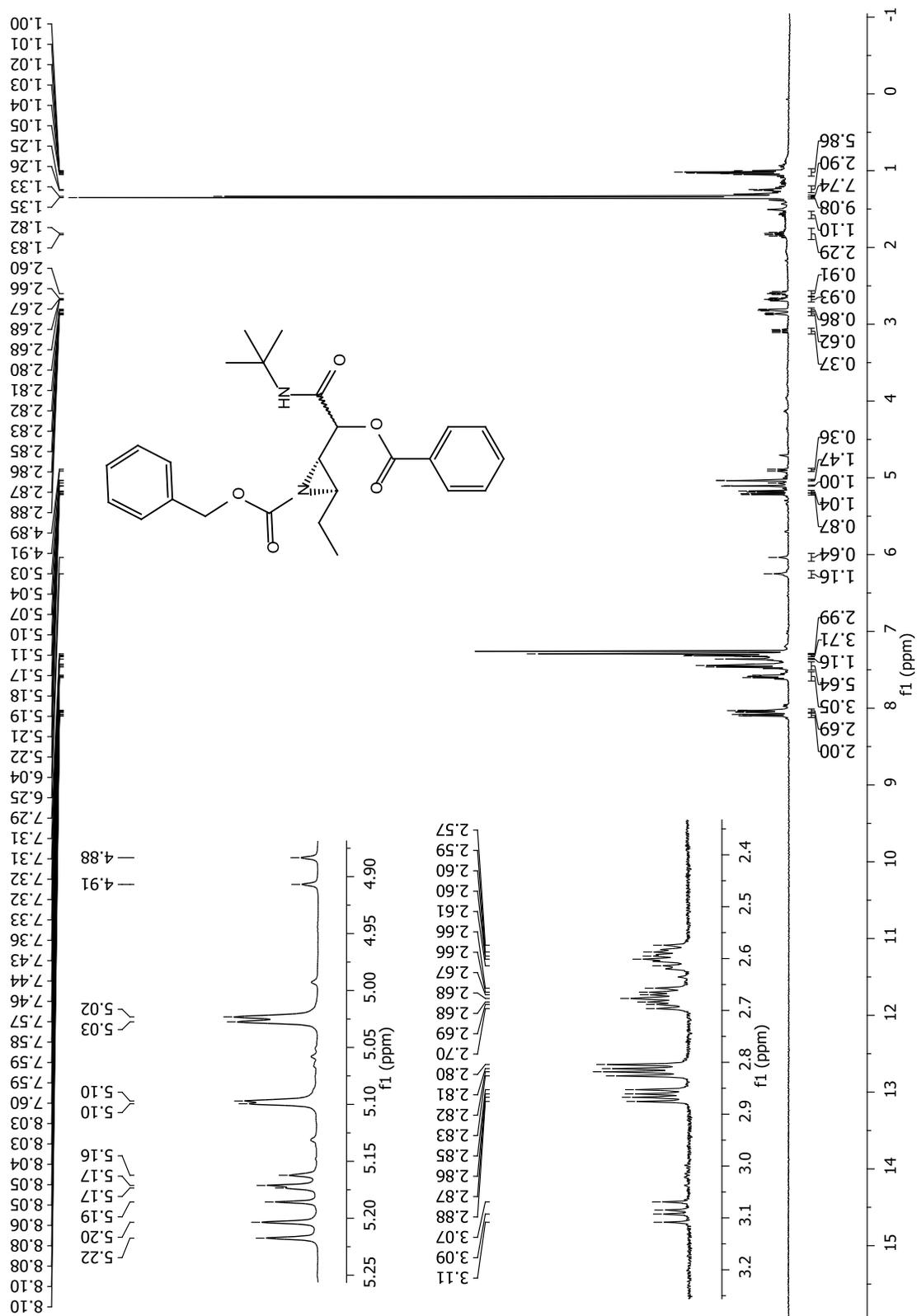
Espectro de massas de alta resolução do composto **34d** minoritário. Calculado para $C_{24}H_{33}N_2O_4^+ [M + H_3O]^+$ 413,2435, encontrado 413,2398.



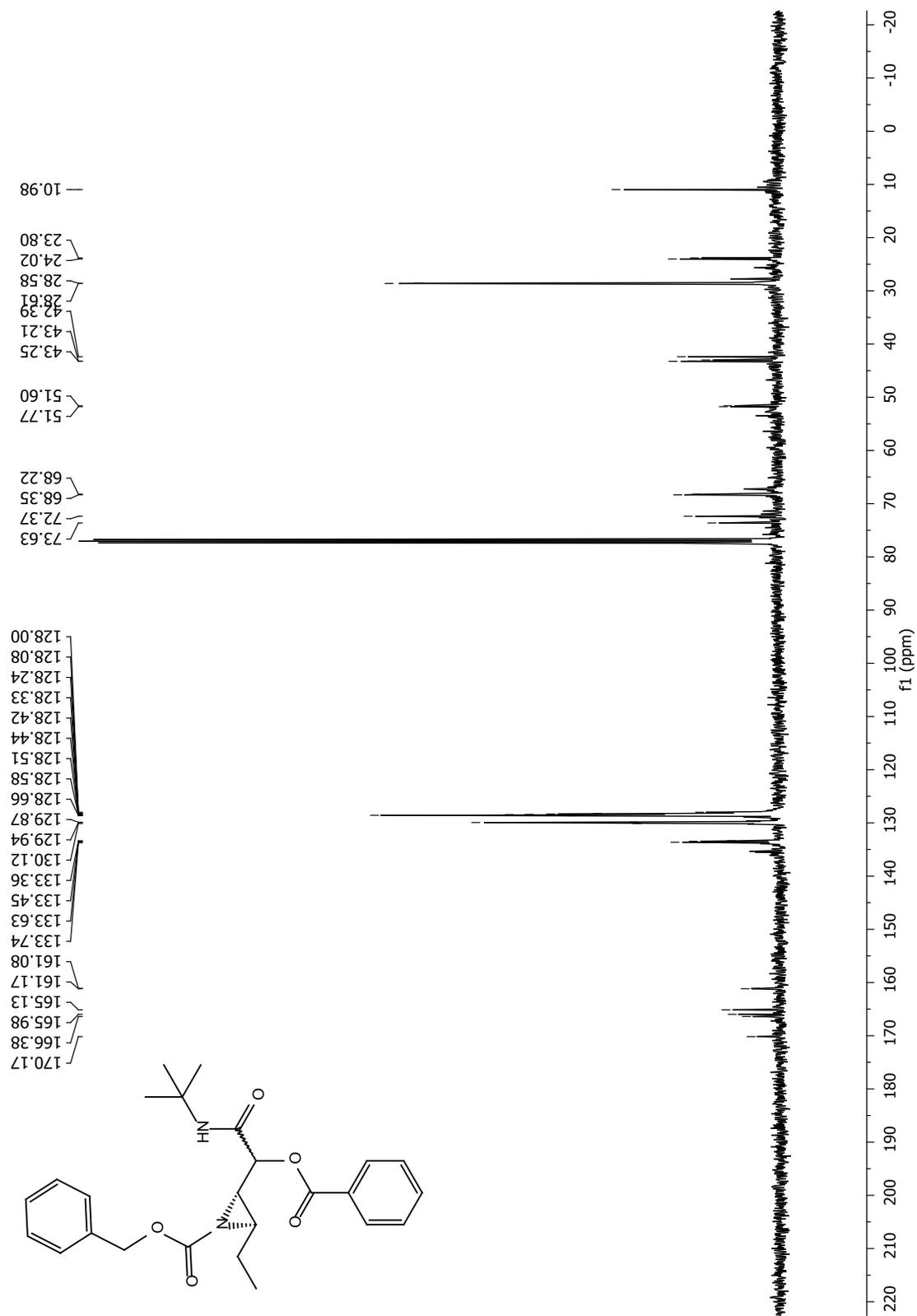
Espectro de massas de alta resolução do composto **34e** majoritário. Calculado para $C_{25}H_{34}IN_2O_4^+ [M + H_3O]^+$ 553,1558, encontrado 553,1532.



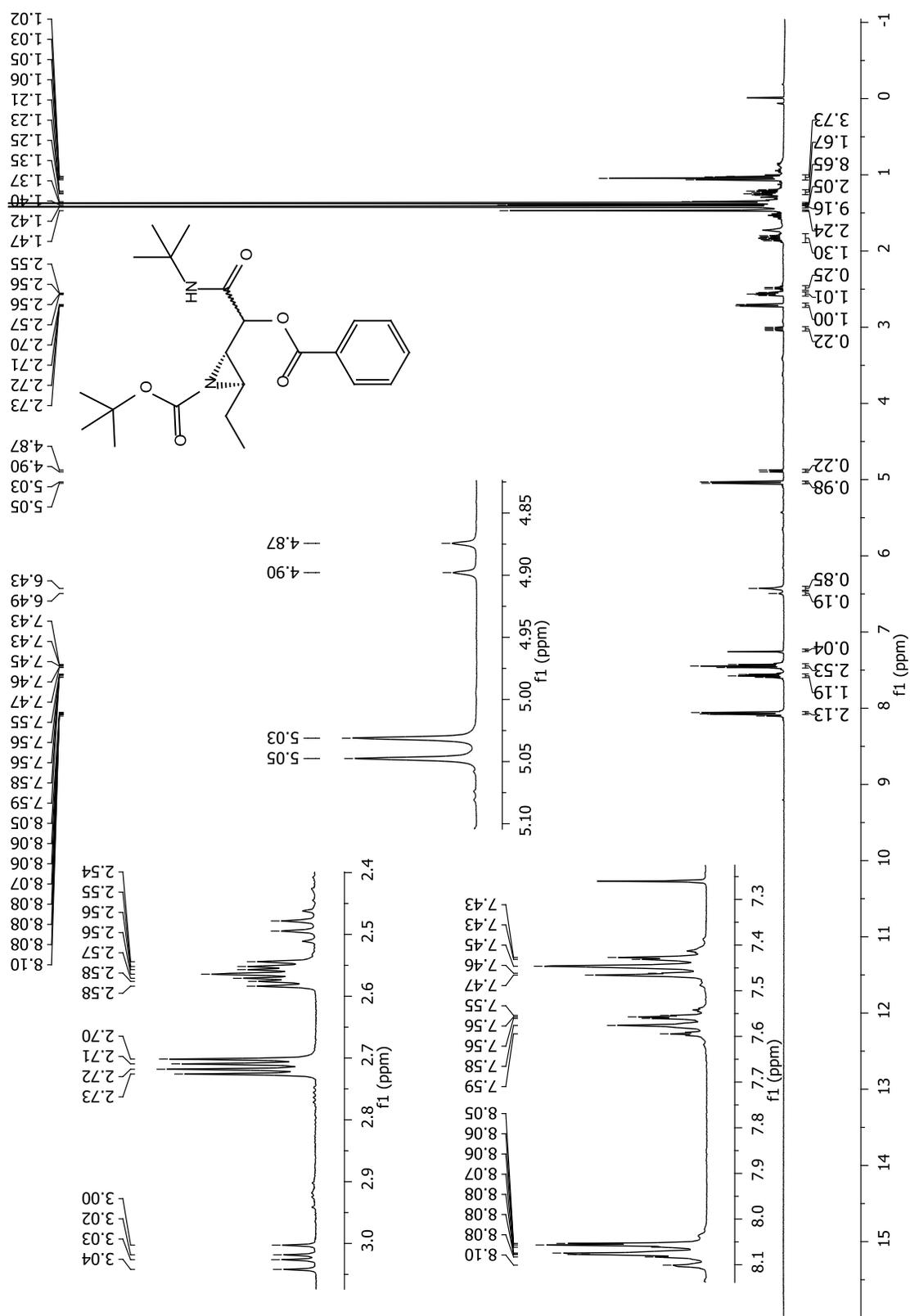
Espectro de massas de alta resolução do composto **34e** minoritário. Calculado para $C_{25}H_{34}IN_2O_4^+ [M + H_3O]^+$ 553,1558, encontrado 553,1574.



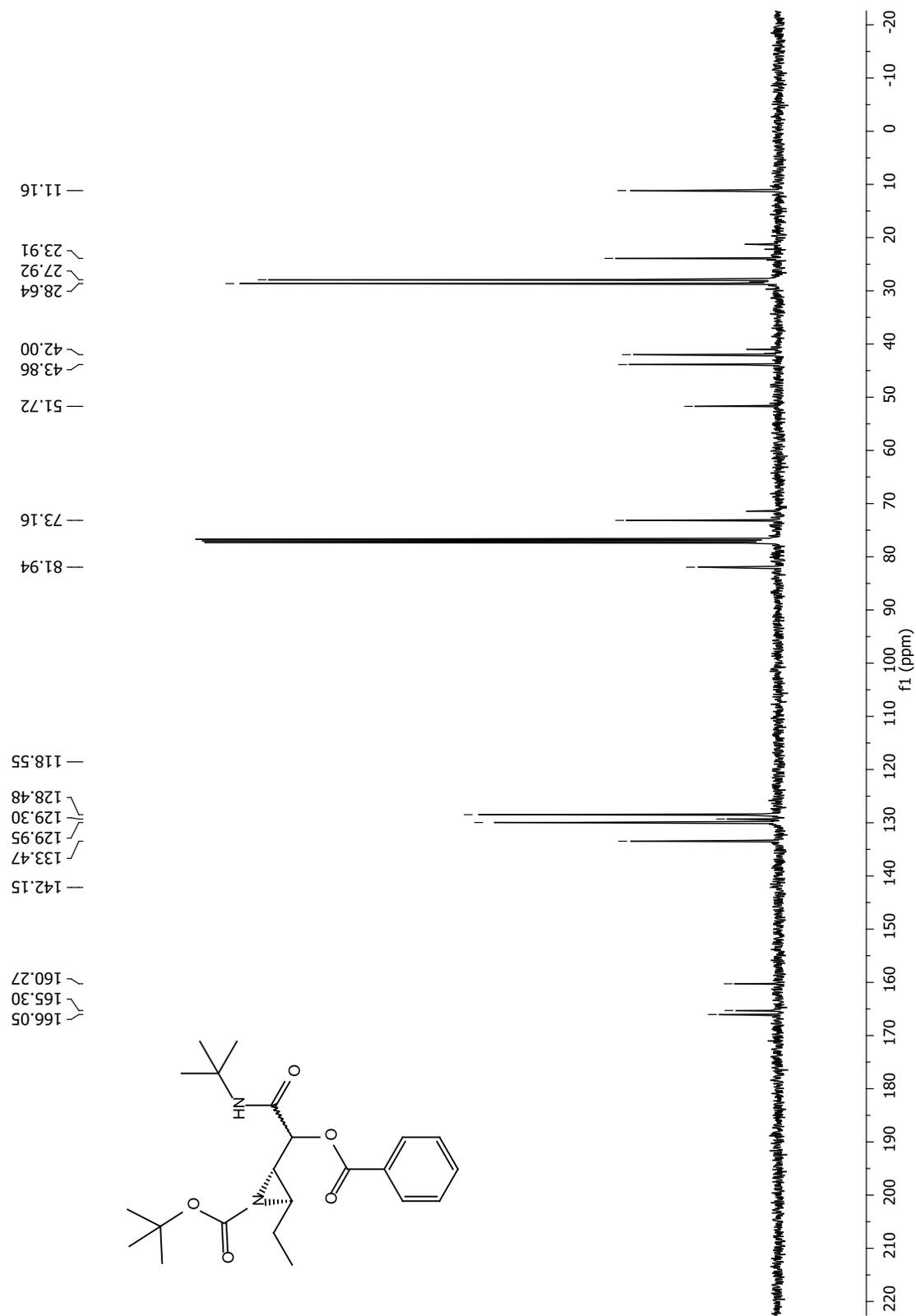
Espectro de RMN ¹H do composto 36a em CDCl₃ a 400 MHz.



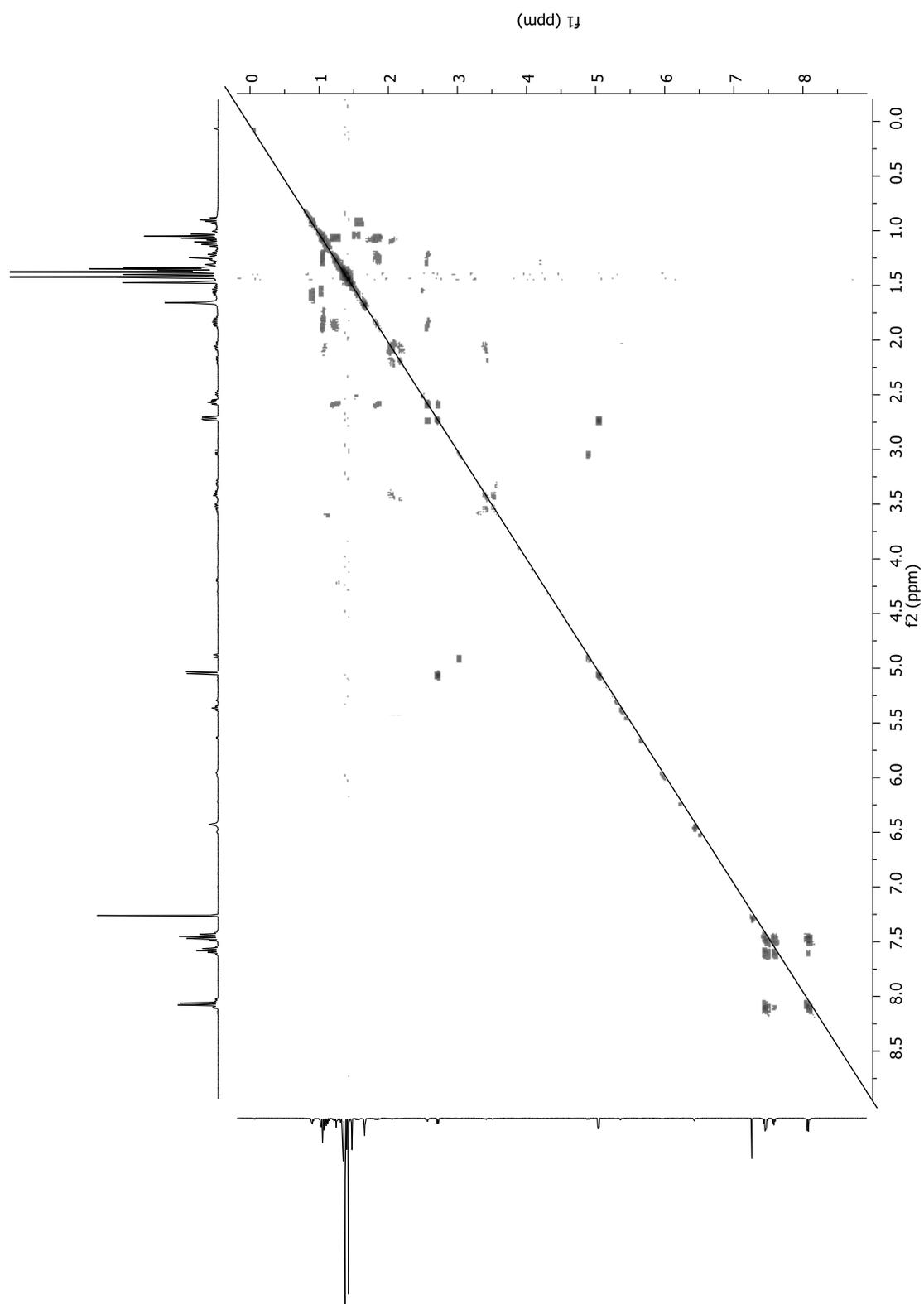
Espectro de RMN ¹³C do composto **36a** em CDCl₃ a 100 MHz.



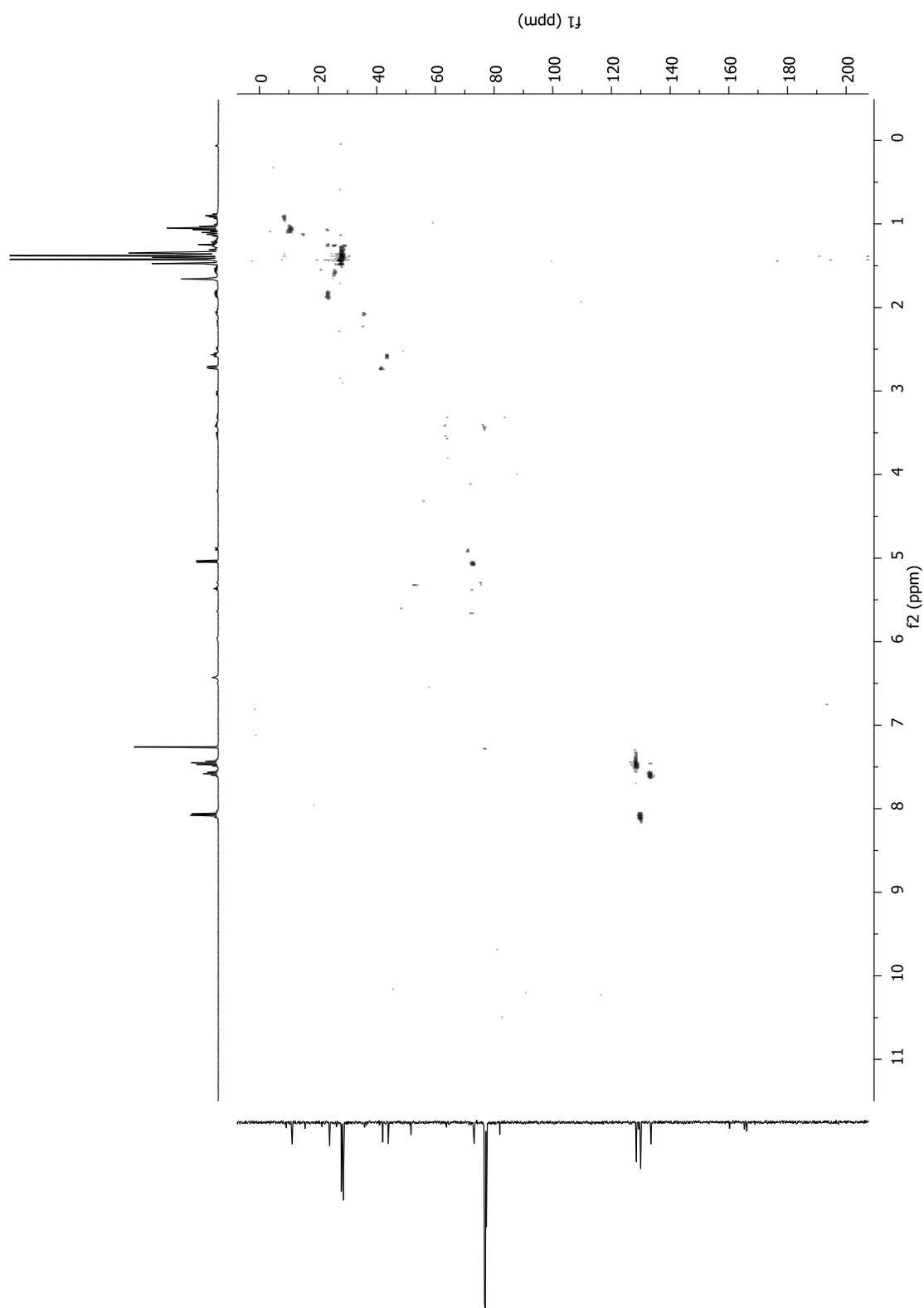
Espectro de RMN ¹H da mistura contendo os diastereoisômeros majoritário e minoritário *cis* do composto **36b** em CDCl₃ a 400 MHz.



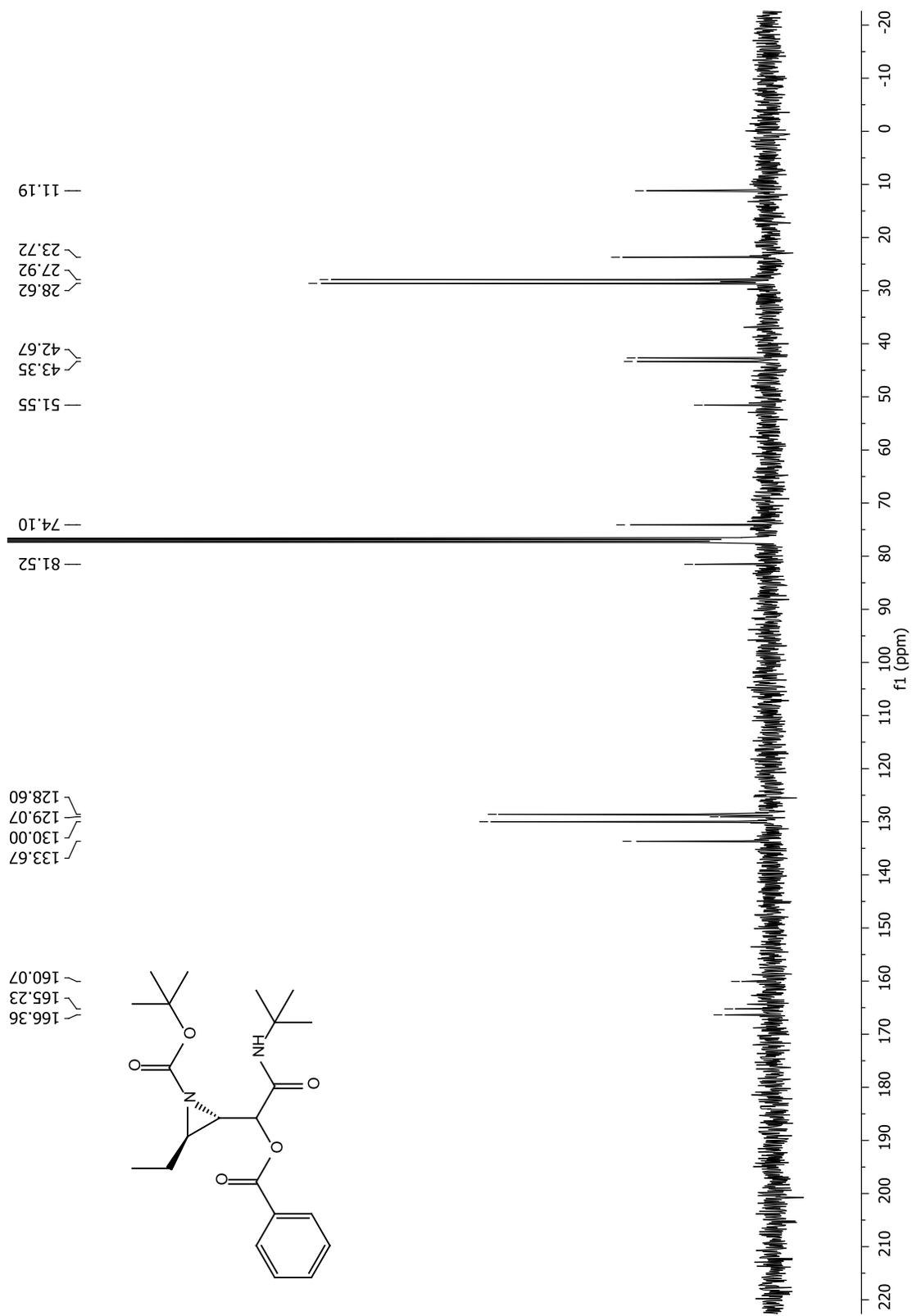
Espectro de RMN ¹³C do diastereoisômero majoritário do composto **36b** em CDCl₃ a 100 MHz.



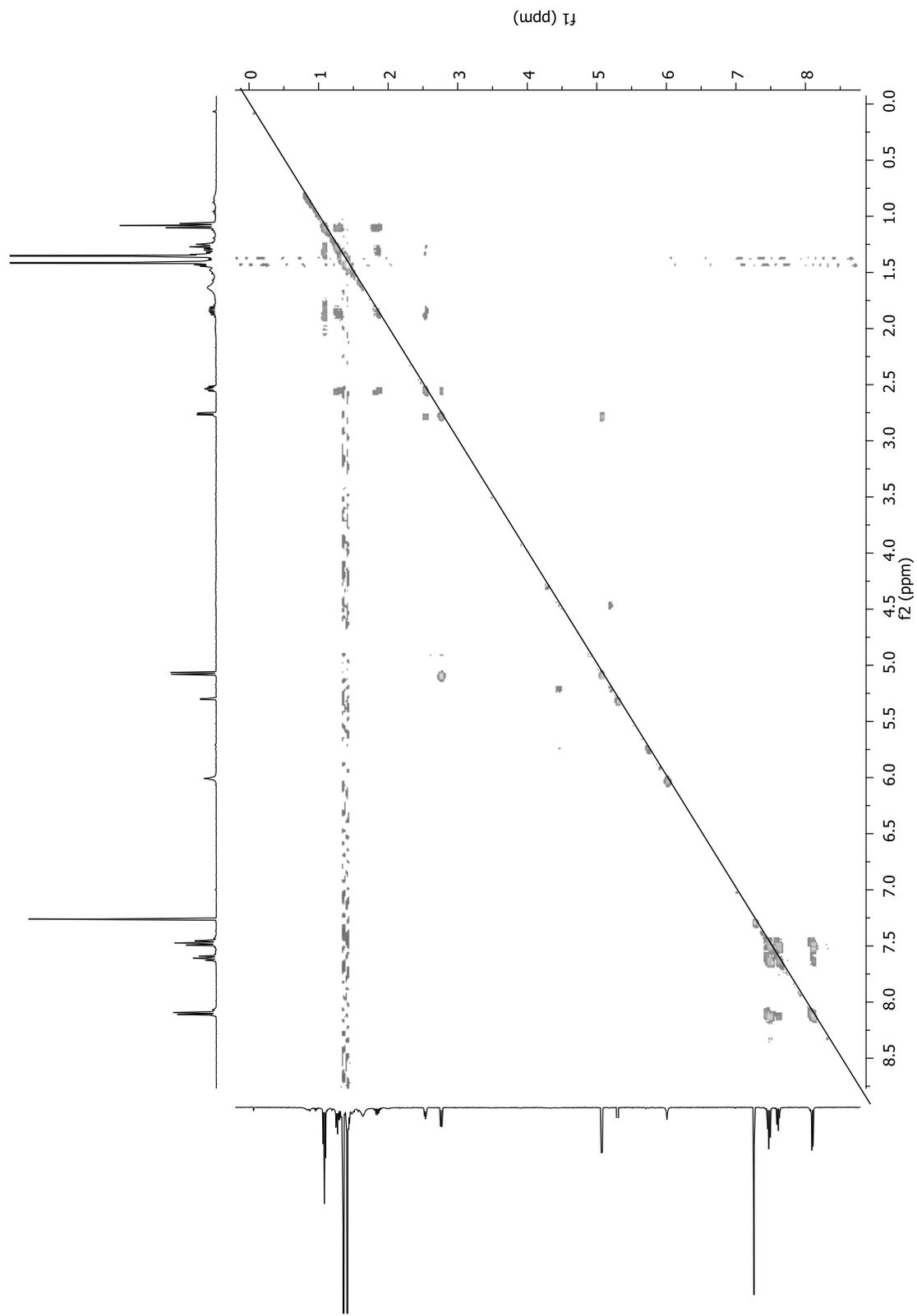
Espectro de RMN Cosy ¹H-¹H do diastereoisômero majoritário *trans* do composto **36b** em CDCl₃.

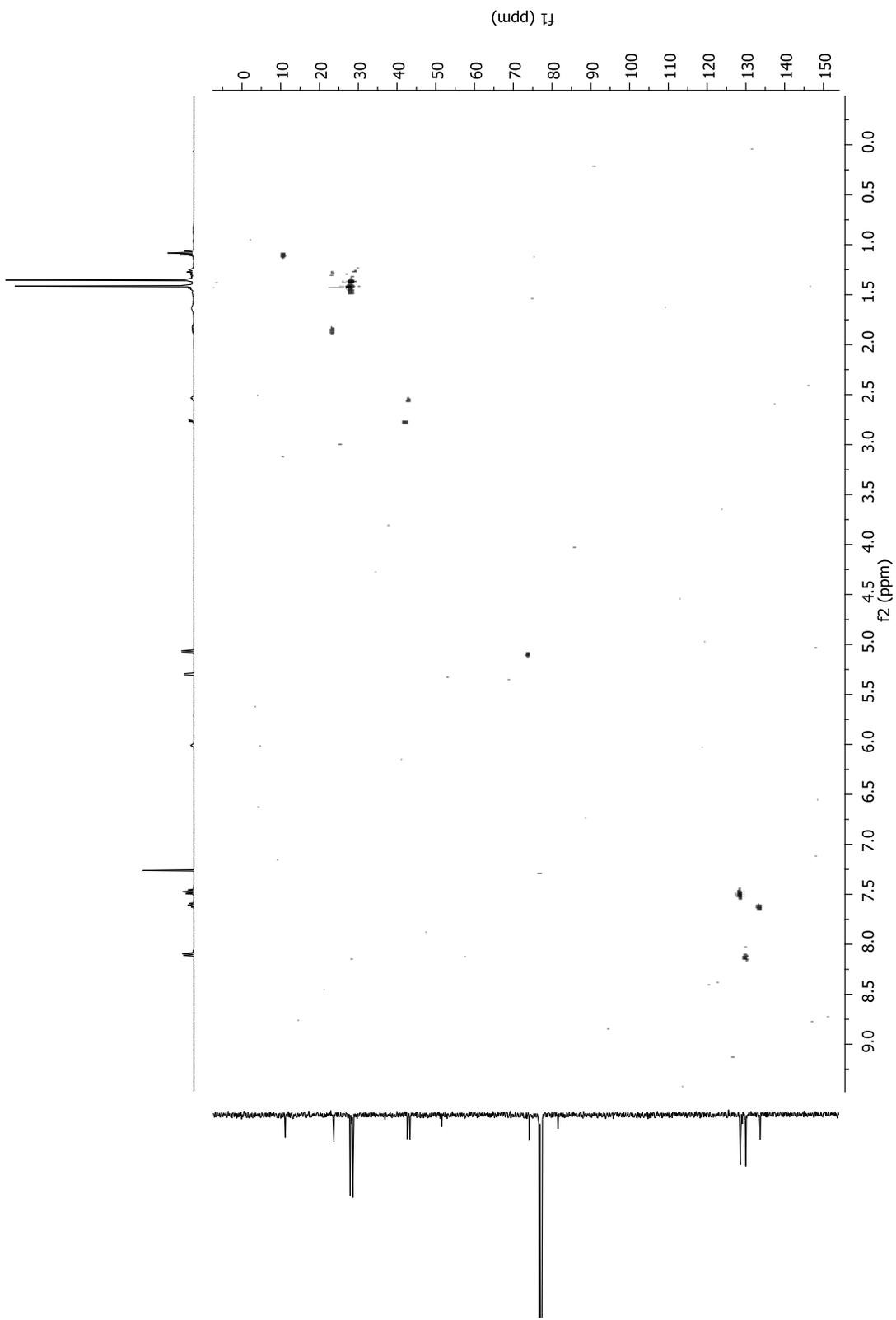


Espectro de RMN HSQC ^1H - ^{13}C do diastereoisômero majoritário *trans* do composto **36b** em CDCl_3 .

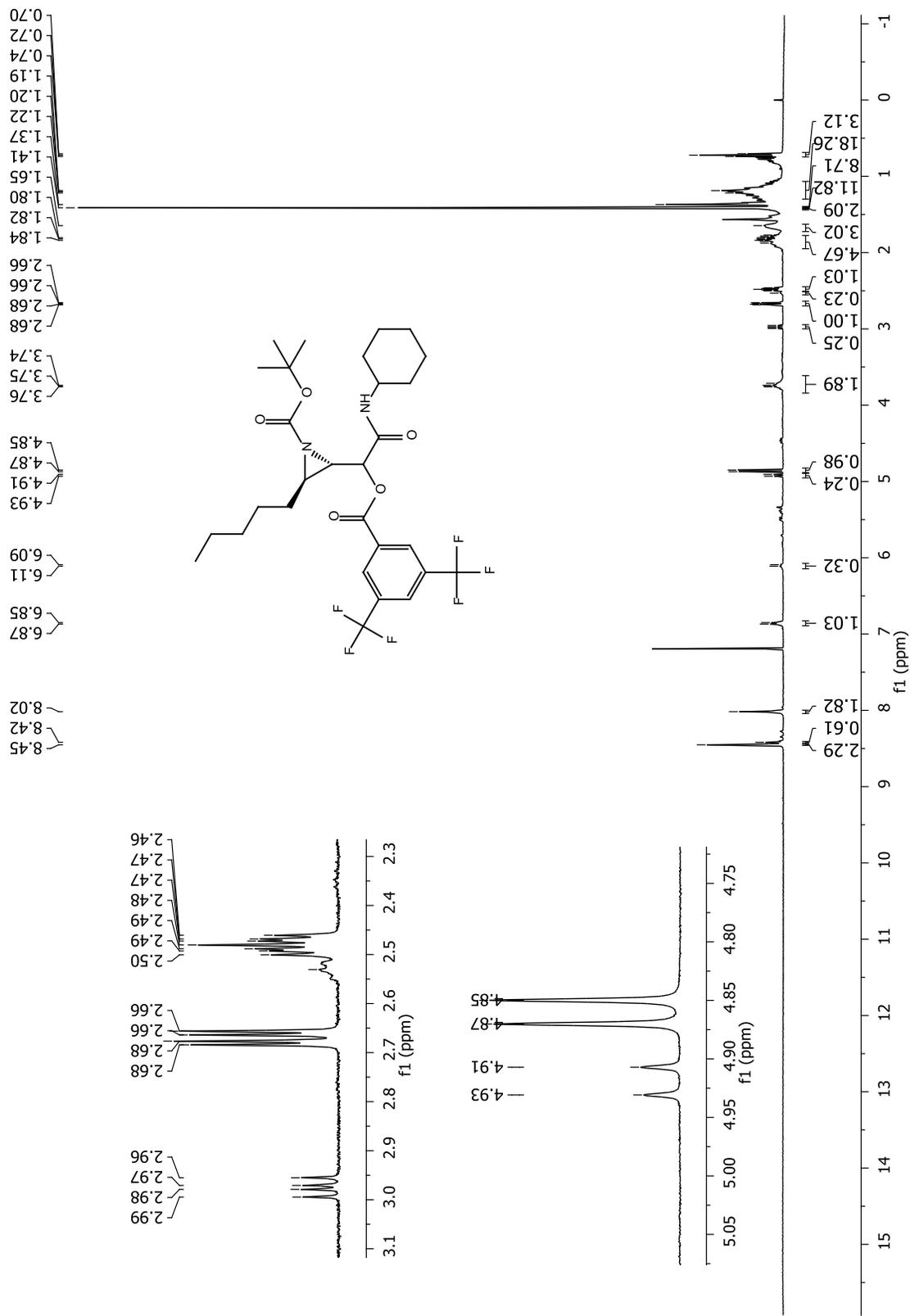


Espectro de RMN ¹³C do diastereoisômero minoritário *trans* do composto **36b** em CDCl₃ a 100 MHz.

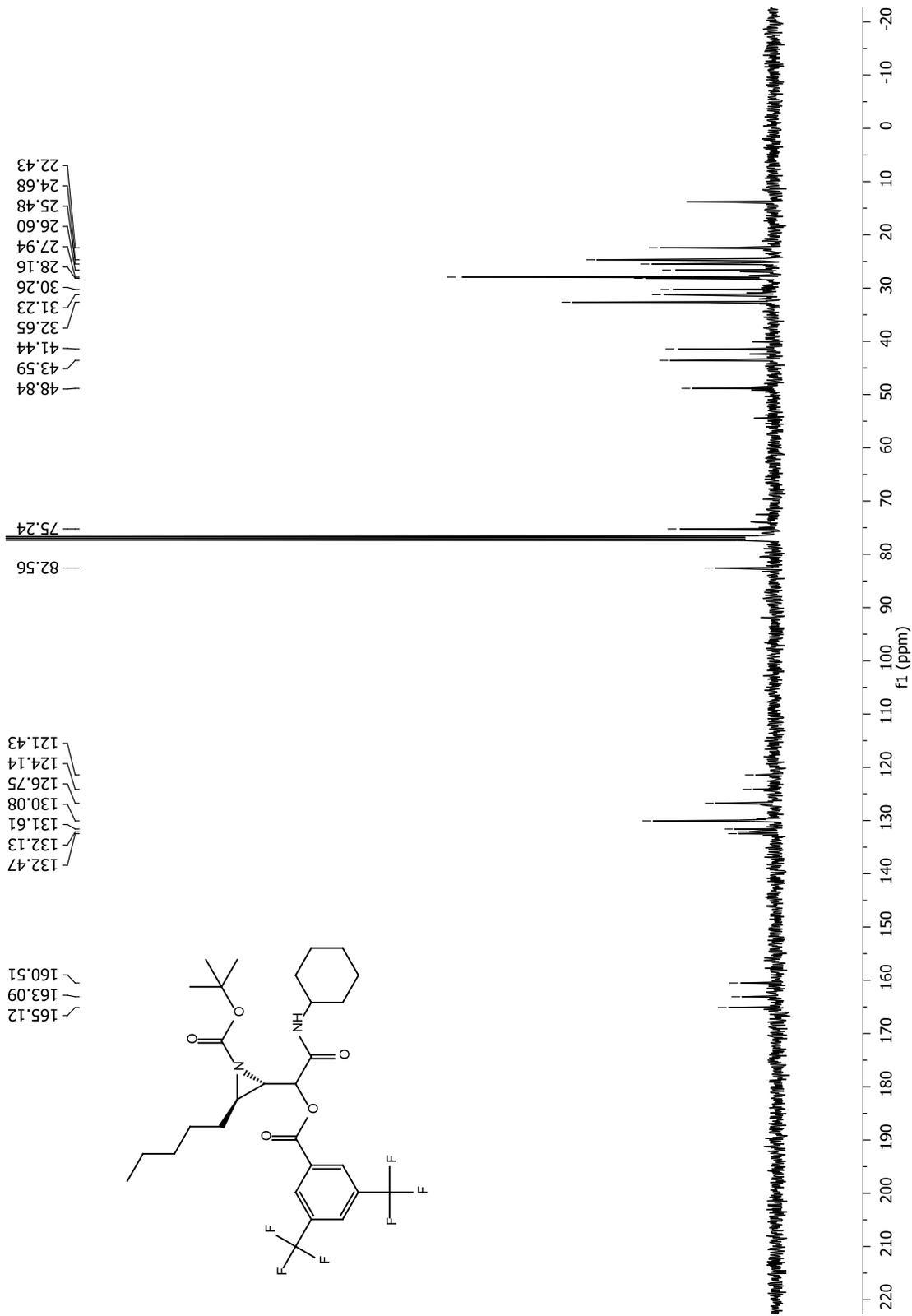




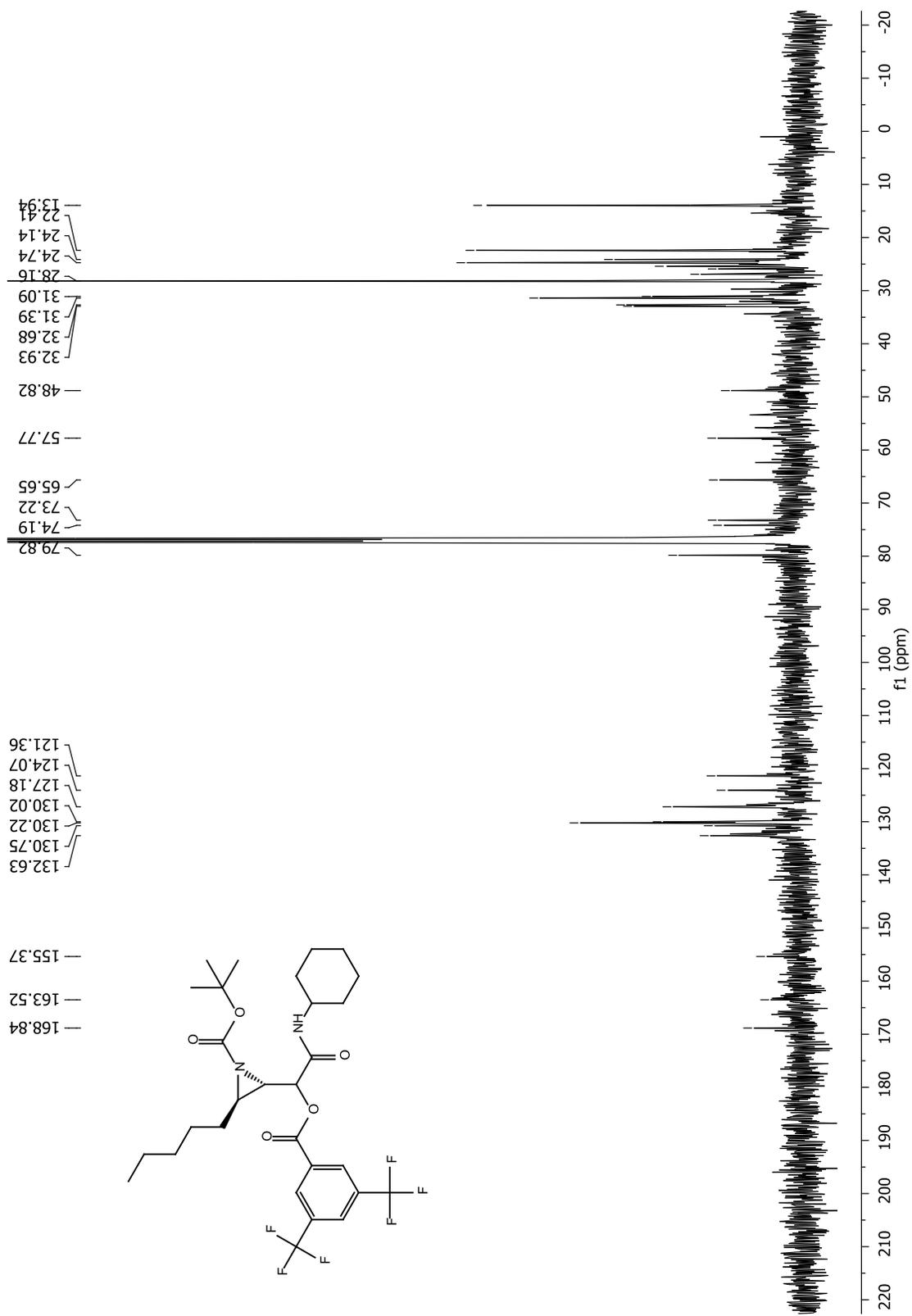
Espectro de RMN HSQC ^1H - ^{13}C do diastereoisômero minoritário *trans* do composto **36b** em CDCl_3 .



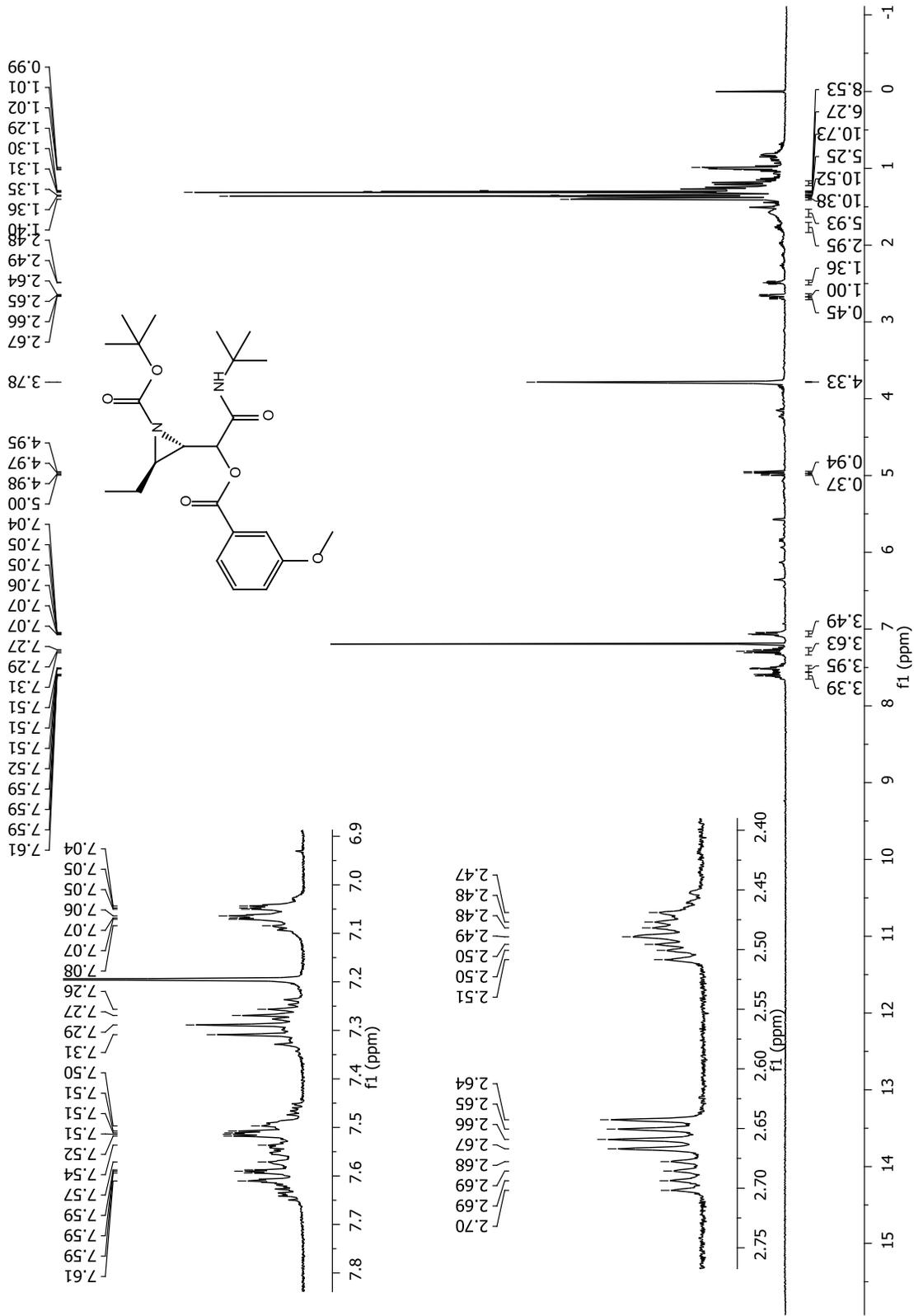
Espectro de RMN ^1H da mistura contendo os diastereoisômeros majoritário e minoritário *cis* do composto **36c** em CDCl_3 a 400 MHz.



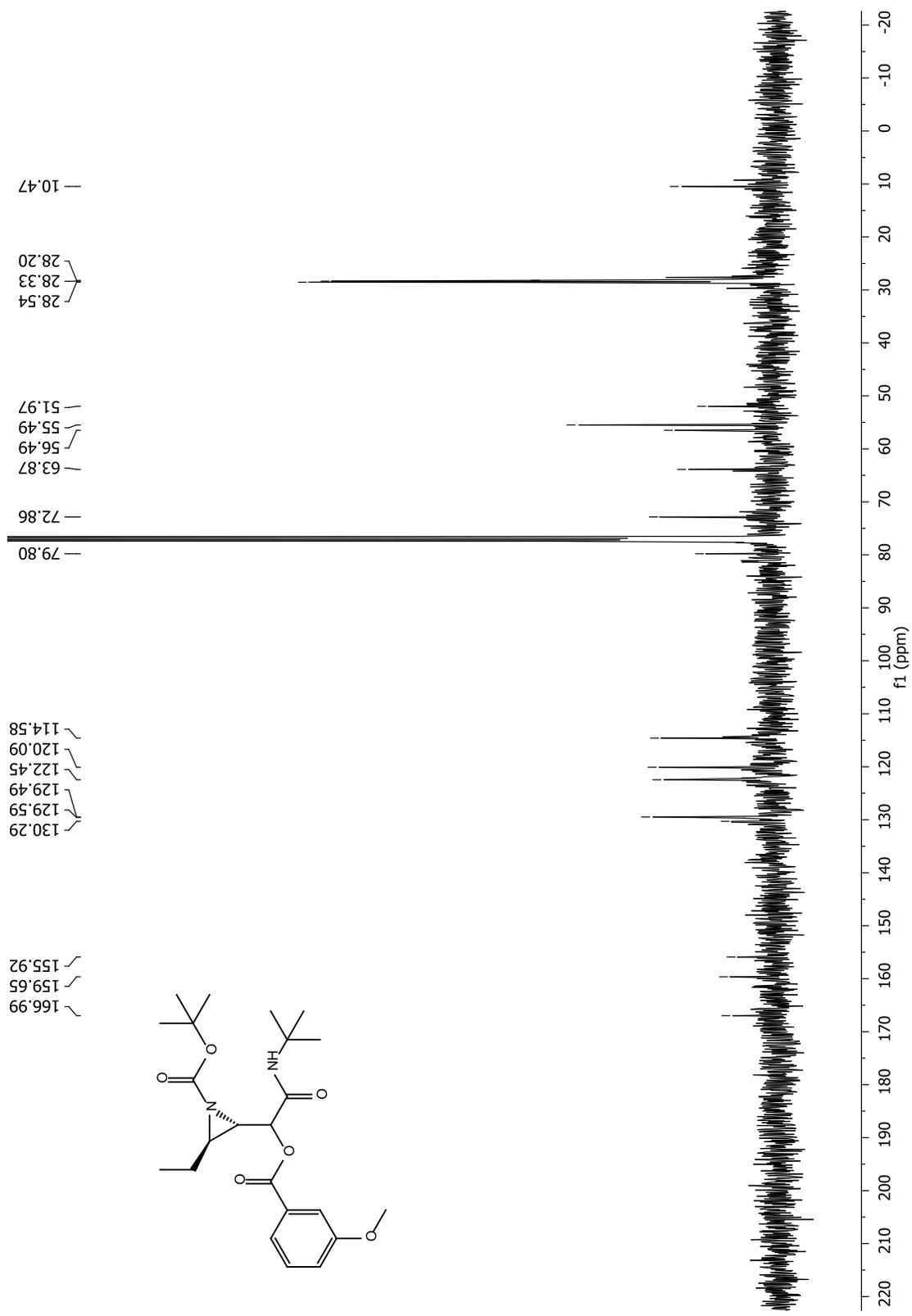
Espectro de RMN ¹³C do diastereoisômero majoritário do composto **36c** em CDCl₃ a 100 MHz.



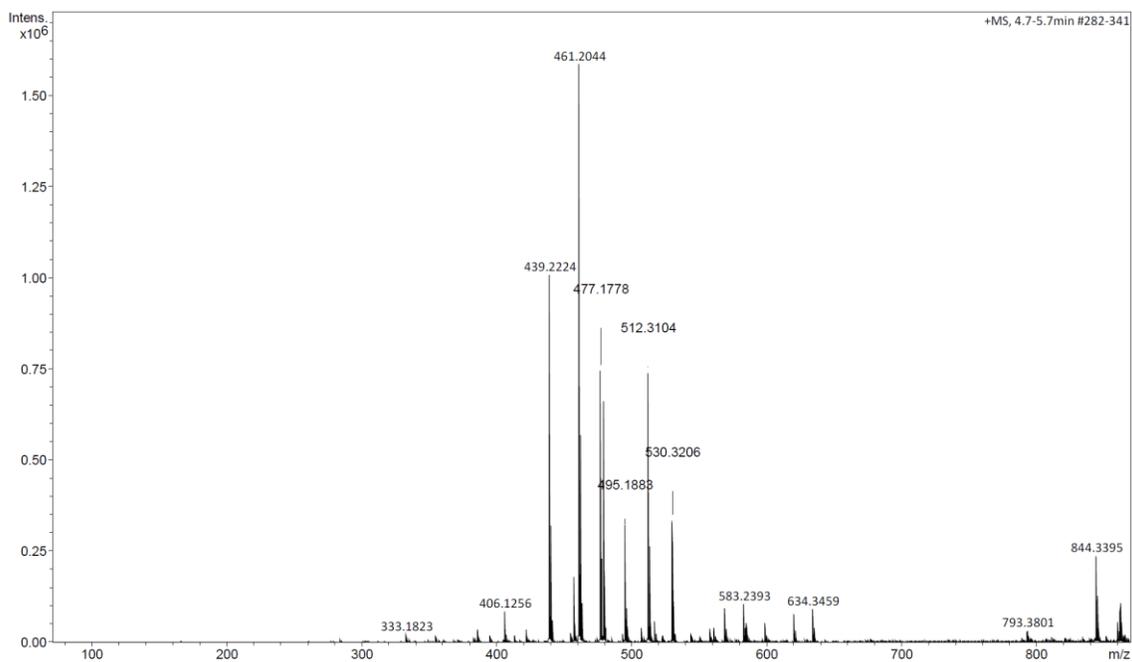
Espectro de RMN ¹³C do diastereoisômero minoritário *trans* do composto **36c** em CDCl₃ a 100 MHz.



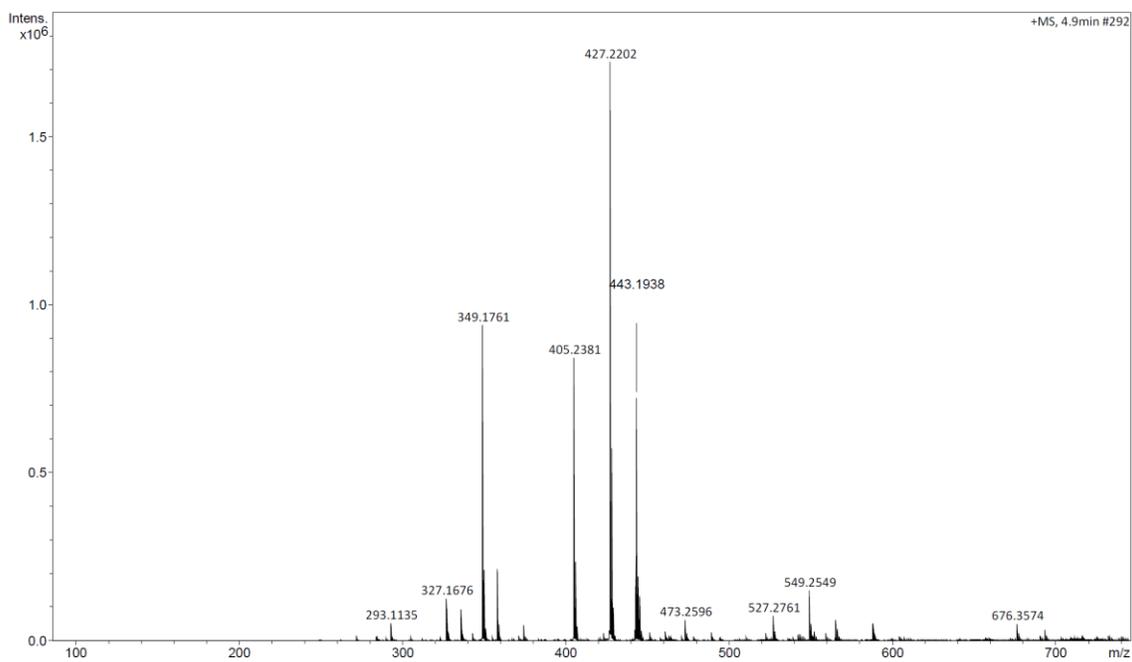
Espectro de RMN ¹H do composto 36d em CDCl₃ a 400 MHz.



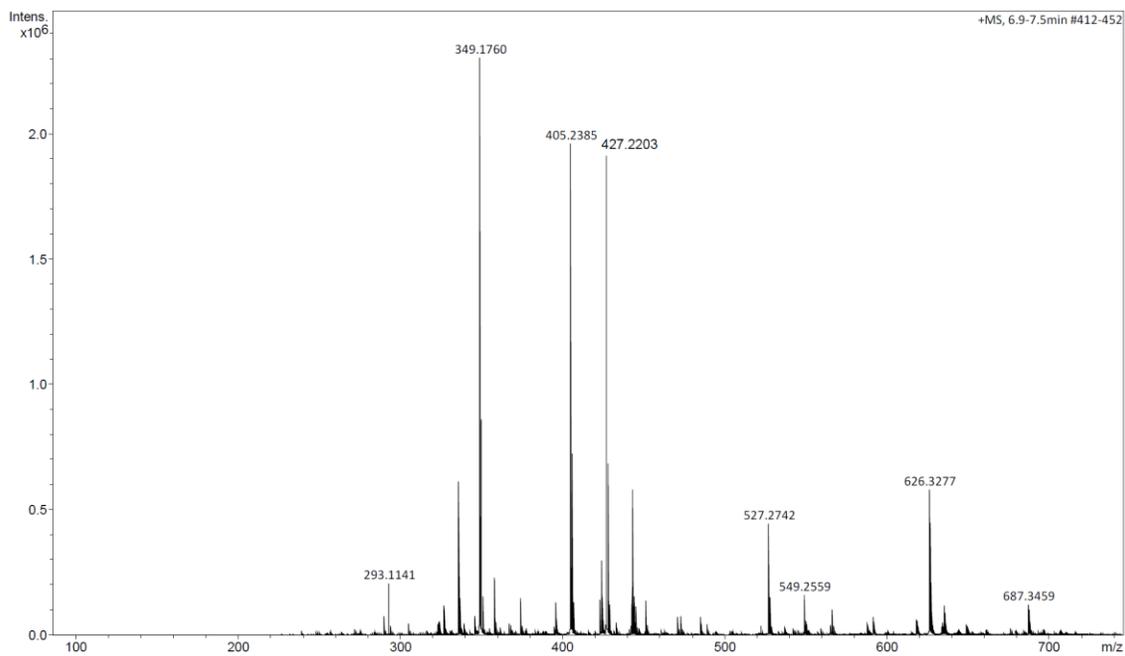
Espectro de RMN ¹³C do composto **36d** em CDCl₃ a 100 MHz.



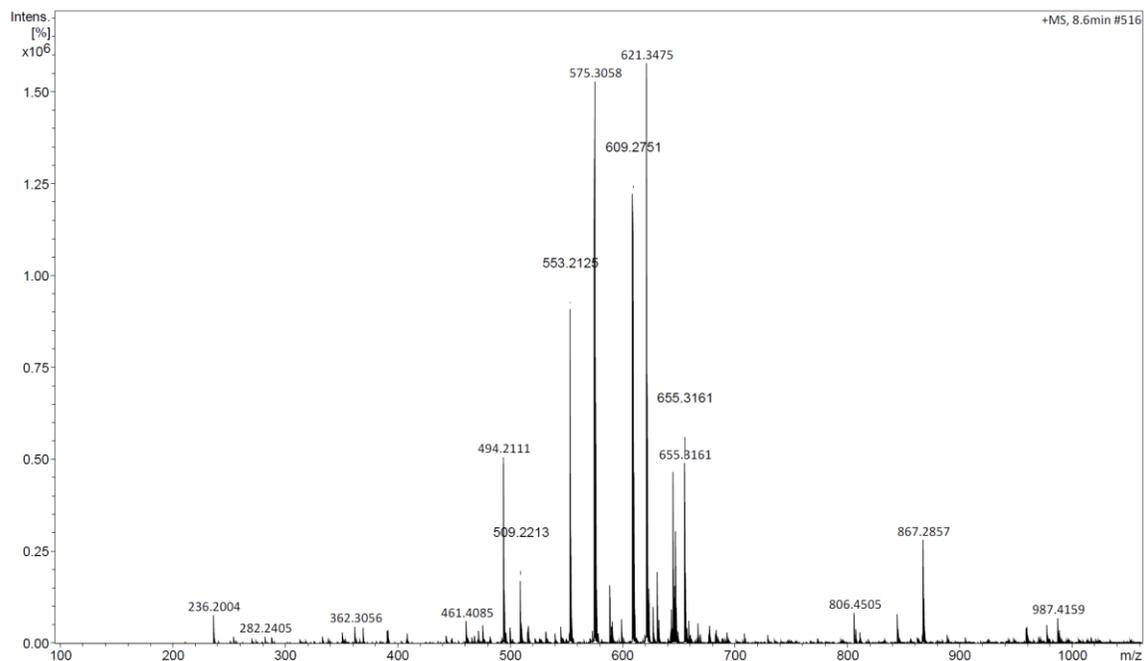
Espectro de massas de alta resolução do composto **36a** majoritário. Calculado para $C_{25}H_{30}N_2NaO_5^+ [M + Na]^+$ 461,2052, encontrado 461,2044.



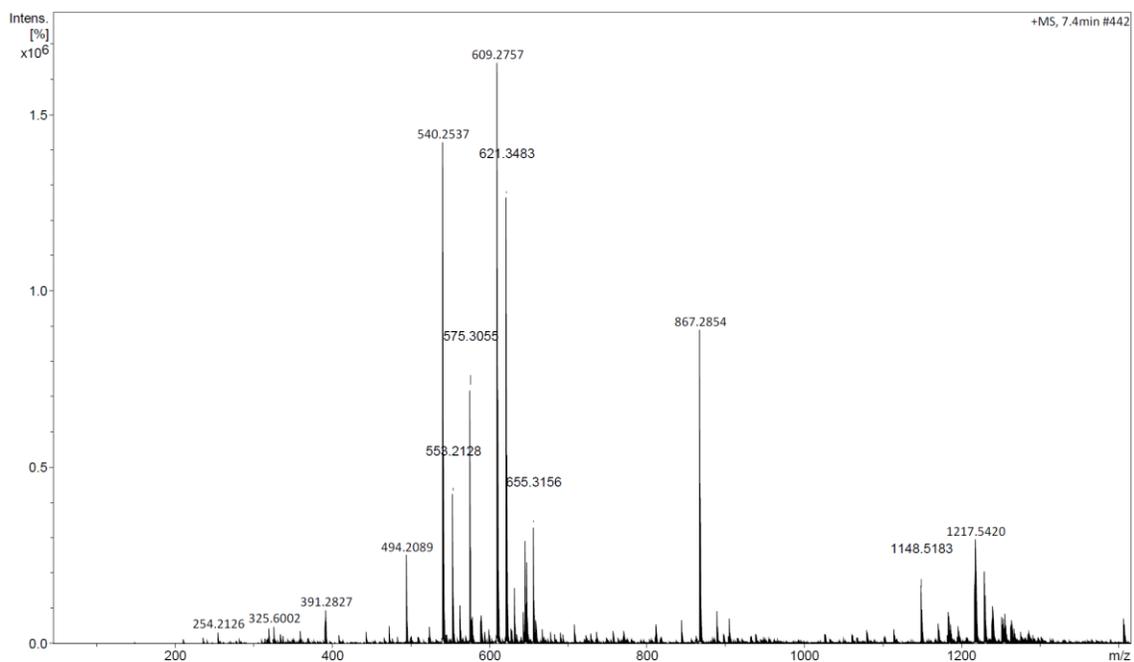
Espectro de massas de alta resolução do composto **36b** majoritário. Calculado para $C_{22}H_{32}N_2NaO_5^+ [M + Na]^+$ 427,2209, encontrado 427,2202.



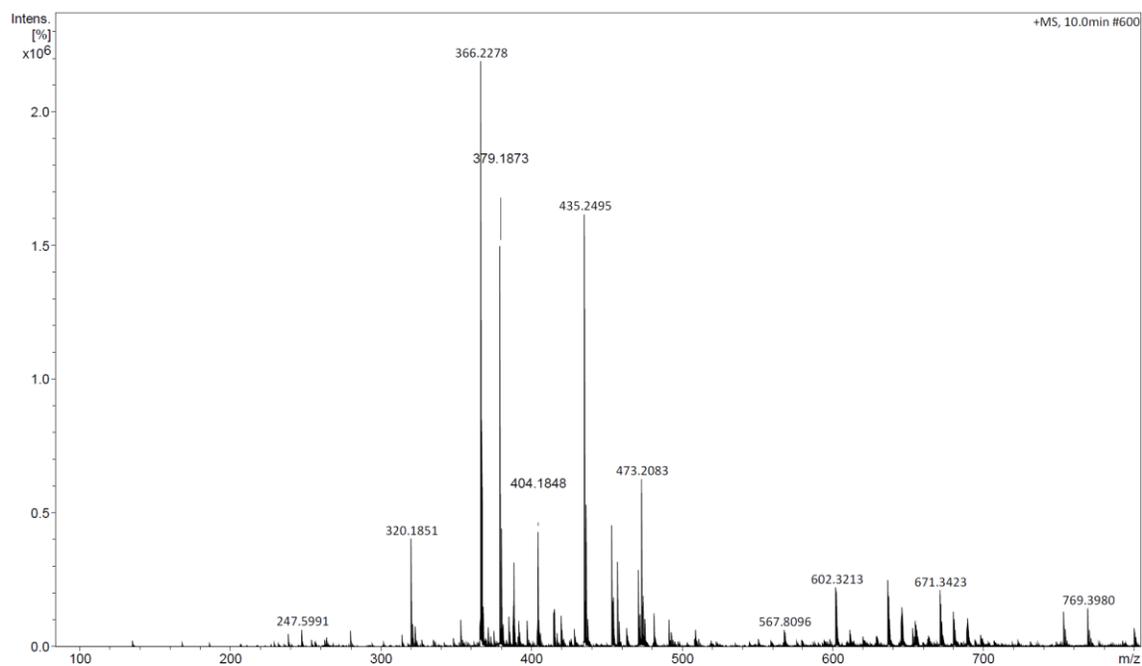
Espectro de massas de alta resolução do composto **36b** majoritário. Calculado para $C_{22}H_{32}N_2NaO_5^+ [M + Na]^+$ 427,2209, encontrado 427,2203.



Espectro de massas de alta resolução do composto **36c** majoritário. Calculado para $C_{29}H_{39}F_6N_2O_5^+ [M + H]^+$ 609,2758, encontrado 609,2751.



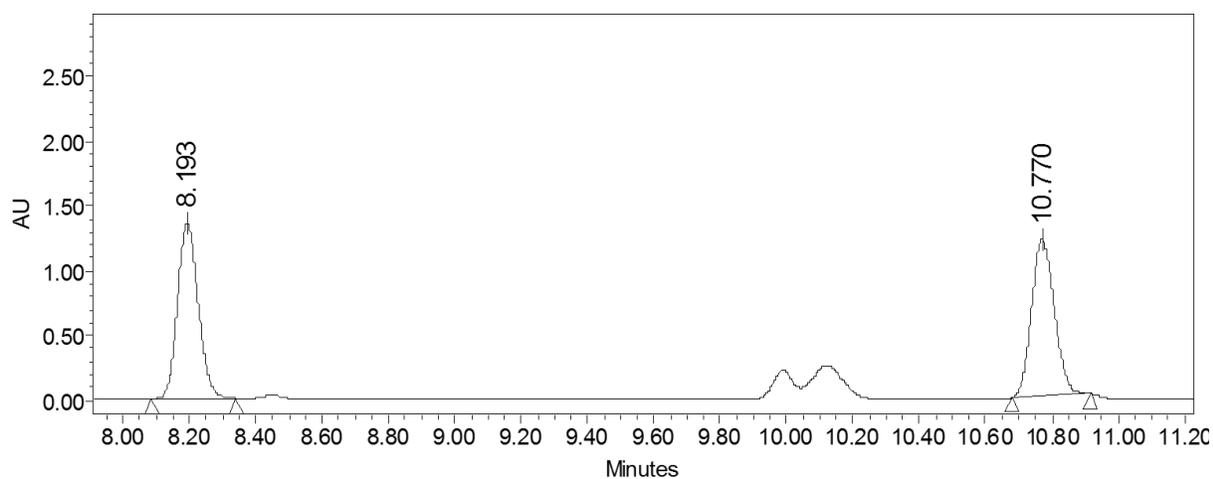
Espectro de massas de alta resolução do composto **36c** minoritário. Calculado para $C_{29}H_{39}F_6N_2NaO_5^+$ $[M + H]^+$ 609,2758, encontrado 609,2757.



Espectro de massas de alta resolução do composto **36d**. Calculado para $C_{23}H_{35}N_2O_5^+$ $[M + H]^+$ 435,2490, encontrado 435,2495.

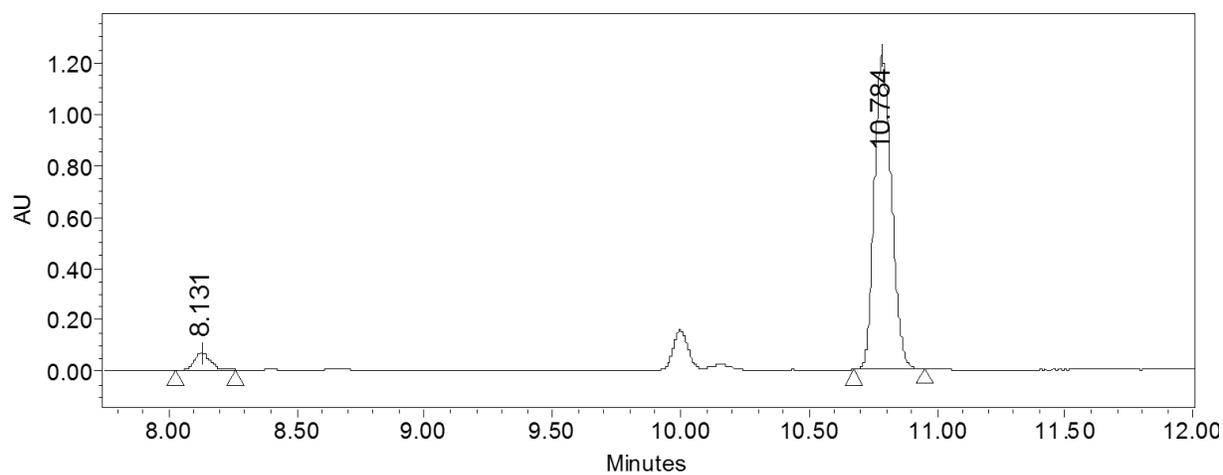
Cromatogramas do composto **36b**

36b racêmico:



	Retention Time	Area	% Area	Height
1	8,193	5876052	50,33	1351949
2	10,770	5798867	49,67	1209293

36b assimétrico:



	Retention Time	Area	% Area	Height
1	8.131	301784	5.01	66971
2	10.784	5721737	94.99	1221042