



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

FRANCIELLE DUTRA AGUIAR

**OTIMIZAÇÃO DE COMPOSTOS CONTENDO O NÚCLEO BENZOXAZINONA
CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS**

**CAMPINAS
2024**

FRANCIELLE DUTRA AGUIAR

**OTIMIZAÇÃO DE COMPOSTOS CONTENDO O NÚCLEO BENZOXAZINONA
CONTRA A DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Química na área de Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Dias

Coorientadora: Dra. Luiza dos Reis Cruz

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Francielle Dutra Aguiar e orientada pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Dias.

**CAMPINAS
2024**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

Ag93o Aguiar, Francielle Dutra, 1998-
Otimização de compostos contendo o núcleo benzoxazinona contra a
doença de Chagas / Francielle Dutra Aguiar. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Luiz Carlos Dias.
Coorientador: Luiza dos Reis Cruz.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Química.

1. Doenças negligenciadas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Farmacocinética. 4.
Estabilidade metabólica. 5. Relações estrutura-propriedade. I. Dias, Luiz
Carlos, 1964-. II. Cruz, Luiza dos Reis, 1989-. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Optimization of compounds containing the benzoxazinone core
against Chagas disease

Palavras-chave em inglês:

Neglected diseases

Trypanosoma cruzi

Pharmacokinetics

Metabolic stability

Structure-property relationships

Área de concentração: Química Orgânica

Títuloção: Mestra em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Luiz Carlos Dias

Daniel Fabio Kawano

Celso de Oliveira Rezende Júnior

Data de defesa: 27-02-2024

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8166-1980>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8945125462683315>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos Dias (Orientador)

Prof. Dr. Daniel Fabio Kawano (UNICAMP)

Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior (UFU)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **FRANCIELLE DUTRA AGUIAR**, aprovada pela Comissão Julgadora em 27 de fevereiro de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me dar discernimento para realizar escolhas que, por vezes, as alternativas não se apresentavam de forma clara. E, sobretudo, coragem para lidar com as implicações disso.

Agradeço aos meus pais, Luiz e Terezinha, por permanecerem presentes mesmo com a distância. Por todas as palavras de incentivo diário e pelos ensinamentos, dos quais recorri por diversas vezes para enfrentar as adversidades. Ao meu irmão, Felipe, por todo cuidado e prontidão para ajudar-me nos momentos conturbados. Aos meus familiares por todas as orações e encorajamento para desbravar o ensino superior que, até então, era desconhecido por todos.

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Luiz Carlos e Dra. Luiza Cruz, os quais tenho enorme respeito e admiração. Obrigada Professor pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisas, sua paixão pela ciência me inspira e motiva na trajetória como pesquisadora. Obrigada Luiza por guiar-me nos momentos confusos, pela paciência e, sobretudo, pela crença na minha evolução desde o início. Agradeço aos meus amigos do laboratório: Marco Desso, Luiz Fernando, Ramon Guerra, Eun Lee, Gleiston Dias, João Pedro, Marina Varela, Celso Yassuo, Stephany Vieira, Anwar Shamin e Anees Ahmad por todo acolhimento e convívio diário. Em especial, agradeço a María Mollo e a Mariana Ferrer pelas palavras de incentivo, pelo carinho e zelo por mim. Sou grata a todos do LQOS por vibrarem genuinamente pelas minhas pequenas conquistas ao longo desse percurso.

Agradeço aos supervisores dos laboratórios do Instituto de Química da UNICAMP, pela disponibilidade ao longo desse período, viabilizando a realização dos experimentos para caracterização dos compostos. Ao Prof. Adriano Andricopulo e sua equipe, do Instituto de Física da USP São Carlos, pela parceria e realização dos ensaios biológicos.

Agradeço a *Drugs for Neglected Diseases initiative* – Suíça (DNDi) – pela colaboração e por confiarem a mim esse projeto que, sem dúvidas, tem contribuído para o meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Brasil (FAPESP) – projetos Cepid CIBFar (2013/07600-3) e PITE (2015/50655-9), pelo aporte financeiro ao laboratório.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento – 001.

RESUMO

A Doença de Chagas (DC) afeta mais de 6 milhões de pessoas em todo o mundo. A maioria dos pacientes vivem na América Latina, região impactada no âmbito sanitário, econômico e social. Ainda assim, a atual quimioterapia antiparasitária tem contraindicações que comprometem a segurança e eficácia do tratamento. O Programa “Otimização de Compostos Líderes na América Latina”, do inglês “*Lead Optimization Latin America (LOLA)*”, é parte de uma cooperação internacional que visa desenvolver tratamentos eficazes e seguros para tratar a DC. A partir de uma triagem fenotípica contra o *Trypanosoma cruzi*, a série benzoxazinona destacou-se pela potência e seletividade, porém apresentou baixa estabilidade metabólica nos estudos de farmacocinética *in vivo*. Posto isto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a série de análogos benzoxazinona em relação à depuração metabólica concomitantemente à atividade antiparasitária e outros parâmetros ADME, como parte da campanha inicial para identificação de um candidato pré-clínico contra a DC. Para isso, foram empregadas estratégias multiparamétrica de Química Medicinal no planejamento e síntese dos análogos. Os compostos sintetizados foram testados contra amastigotas intracelulares do *T. cruzi*. Para determinar a seletividade e propriedades ADME, foram realizados ensaios *in vitro* de citotoxicidade, permeabilidade, estabilidade metabólica e solubilidade aquosa. A otimização multiparamétrica proporcionou compostos com melhor depuração metabólica e solubilidade moderada dentro de uma ampla faixa de lipofilicidade, mas acompanhado de redução do potencial inibitório contra *T. cruzi*. Os resultados obtidos até o momento fornecem contribuições sobre o uso de *building blocks* em diferentes estratégias de modificações estruturais para controle da depuração metabólica, somando ao entendimento da relação entre estrutura e propriedade da série benzoxazinona.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) affects more than 6 million people worldwide, with most patients residing in Latin America, a region profoundly impacted in terms of health, economy, and society. Despite this, the current antiparasitic chemotherapy has contraindications that compromise the safety and efficacy of treatment. The Lead Optimization Latin America (LOLA) program is part of an international collaboration aimed at developing effective and safe treatments for CD. Through a phenotypic screening against *Trypanosoma cruzi*, the benzoxazinone series stood out for its potency and selectivity but showed low metabolic stability in *in vivo* pharmacokinetic studies. Therefore, the objective of this work was to optimize the benzoxazinone series in relation to its metabolic clearance concurrently with antiparasitic activity and other ADME parameters, as part of the initial campaign to identify a preclinical candidate against CD. Multiparametric Medicinal Chemistry strategies were employed in the design and synthesis of analogs. Synthesized compounds were tested against intracellular amastigotes of *T. cruzi*. For the determination of selectivity and ADME properties, *in vitro* assays for cytotoxicity, permeability, metabolic stability, and solubility were conducted. Multiparametric optimization yielded compounds with improved metabolic clearance and moderate solubility within a broad range of lipophilicity. However, this was accompanied by a reduction in inhibitory potential against *T. cruzi*. The results obtained so far shed some light into the use of building blocks in different structural modification strategies for controlling metabolic clearance, adding to the understanding of the structure-property relationship of the benzoxazinone series.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos medicamentos benznidazol (BZN) e o nifurtimox (NFX)....	16
Figura 2: Estudo de identificação de metabólitos dos compostos <i>hits</i> iniciais (a) LOLA735 e (b) LOLA779	21
Figura 3: Gráfico do potencial inibitório dos 79 compostos da ChemDiv_22, sintetizados previamente, contra <i>T. cruzi</i> (IC ₅₀) em função do eLogD para (a) faixa de lipofilicidade entre 0 e 5 e para (b) valores inferiores a 2.....	22
Figura 4: (a) Modificações estruturais realizadas pelo grupo (b) Estudo da relação estrutura-atividade preliminar da série ChemDiv_22.....	23
Figura 5: Perfil farmacocinético <i>in vivo</i> do composto <i>hit</i> LOLA779	24
Figura 6: Modificações estudadas para a série ChemDiv_22	26
Figura 7: Espectro IV do composto 3e em uma faixa de 500 a 4000 cm ⁻¹	32
Figura 8: Espectro RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto 8b	36
Figura 9: Gráfico da eficiência lipofílica do ligante para (a) os análogos da série benzoxazinona sintetizados com destaque para (b) os derivados preparados ao longo do projeto	52
Figura 10: Modificações estruturais realizadas nos lados esquerdo e direito do composto <i>hit</i> LOLA779	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil do candidato alvo para a Doença de Chagas definido pela DNDi e parceiros	19
Tabela 2: Compostos <i>hits</i> LOLA735 e LOLA779 da série ChemDiv_22.....	20
Tabela 3: Rendimentos das reações de formação dos núcleos benzoxazinona (2a-e,g).....	30
Tabela 4: Rendimentos das reações de formação dos derivados alquilados (3a-g)	31
Tabela 5: Rendimentos das reações de formação dos ácidos intermediários (4a-g)	33
Tabela 6: Compostos finais (5a-b, d-e) com modificações no lado esquerdo	33
Tabela 7: Rendimentos das reações de modificação dos núcleos benzoxazinona (2h-l).....	34
Tabela 8: Rendimentos das reações de formação dos derivados alquilados (3h-l) e dos ácidos intermediários (4h-l)	35
Tabela 9: Compostos finais (8a-e) com modificações no lado esquerdo	36
Tabela 10: Compostos finais (6a-f) com modificações no lado direito.....	37
Tabela 11: Compostos finais (7a-f) com modificações no lado direito.....	38
Tabela 12: Resultados das propriedades ADME <i>in vitro</i> referentes aos análogos 5a-b, d-e ...	40
Tabela 13: Resultados das propriedades ADME <i>in vitro</i> referentes aos análogos 8a-e	42
Tabela 14: Resultados das propriedades ADME <i>in vitro</i> referentes aos análogos 6a-f	44
Tabela 15: Potencial inibitório <i>T. cruzi</i> e estabilidade metabólica <i>in vitro</i> para derivados morfolina com substituintes em pontes de um e dois carbonos	45
Tabela 16: Potencial inibitório <i>T. cruzi</i> e estabilidade metabólica <i>in vitro</i> para morfolina e heterociclos com alteração no tamanho do anel	46
Tabela 17: Resultados das propriedades ADME <i>in vitro</i> referentes aos análogos 7a-f	47
Tabela 18: Resultados do potencial inibitório contra <i>T. cruzi</i> dos análogos 5a-b, d-e	48
Tabela 19: Resultados do potencial inibitório contra <i>T. cruzi</i> dos análogos 8a-e	49
Tabela 20: Resultados do potencial inibitório contra <i>T. cruzi</i> dos análogos 6a-f	50
Tabela 21: Resultados do potencial inibitório contra <i>T. cruzi</i> dos análogos 7a-f	51

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Retrossíntese do composto <i>hit</i> LOLA779	27
Esquema 2: Síntese dos análogos benzoxazinona 5 envolvendo os reagentes e as condições experimentais: i) 1. Brometo de bromoacetila, THF, Na ₂ CO ₃ , t.a.; 2. THF, K ₂ CO ₃ , 80°C; ii) Bromoacetato de iso-propila ou bromoacetato de <i>terc</i> -butila, K ₂ CO ₃ , DMF, t.a.; iii) 1. NaOH _(aq.) , THF/MeOH, t.a.; 2. H ₃ O ⁺ _(aq.) , t.a. ou TFA, DCM, t.a.; iv) <i>N</i> -etil-morfolina ou aminas cíclicas, EDC/HOBt, DCM, t.a.....	27
Esquema 3: Rota de síntese dos núcleos benzoxazinona envolvendo os reagentes e condições experimentais: i) Amina comercial, trietilamina, DCM, Ar, t.a.; ii) Aminas alifáticas ou cíclicas, EDC/HOBt, DCM, t.a.....	28
Esquema 4: Síntese dos análogos benzoxazinona 6 e 7 envolvendo os reagentes e as condições experimentais: i) 1. Brometo de bromoacetila, THF, Na ₂ CO ₃ , t.a.; 2. THF, K ₂ CO ₃ , 80°C; ii) Bromoacetato de iso-propila, K ₂ CO ₃ , DMF, t.a.; iii) 1. NaOH _(aq.) , THF/MeOH, t.a.; 2. H ₃ O ⁺ _(aq.) , t.a.; iv) Aminas cíclicas, EDC/HOBt, DCM, t.a.....	29
Esquema 5: Proposta de mecanismo simplificado para a reação de hidrólise em meio ácido....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DTNs: Doenças Tropicais Negligenciadas

OMS: Organização Mundial da Saúde

DC: Doença de Chagas

DALYs: Anos de vida ajustados por incapacidade (do inglês, *Disability-adjusted life years*)

BZN: Benznidazol

NFX: Nifurtimox

DNDi: *Drugs for Neglected Diseases initiative*

LOLA: *Lead Optimization Latin America*

HTS: *High Throughput Screening*

ADME: Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

IS: Índice de Seletividade

PAMPA: *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*

MetID: Estudo de identificação de metabólitos (do inglês, *Metabolite Drug Identification*)

LD: Lado Direito

MLM: *Mouse Liver Microsomal*

LE: Lado Esquerdo

EDG: Grupos doadores de densidade eletrônica (do inglês *Electron Donating Groups*)

EWG: Grupos retiradores de densidade eletrônica (do inglês *Electron-Withdrawing Groups*)

SPR: Relação estrutura – propriedade (do inglês *Structure – Property Relationship*)

THF: Tetraidrofurano

DMF: Dimetilformamida

EDC: 1-etil-3-(3-cloridrato) dimetilaminopropil carbodiimida

HOBt: Hidroxibenzotriazol

TFA: Ácido trifluoroacético

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

LLE: Eficiência Lipofílica do Ligante (do inglês *Lipophilic Ligand Efficiency*)

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

PF: Ponto de Fusão

IV: Infravermelho

HRMS: Espectrometria de massas de alta resolução (do inglês *High Resolution Mass Spectrometry*)

LISTA DE SÍMBOLOS

IC₅₀: Concentração inibitória mínima

CC₅₀: Concentração citotóxica mínima

eLogD_{7.4}: Medida experimental da lipofilicidade em pH 7.4

Pe: Permeabilidade

KS_{pH 2.0}: Solubilidade cinética em pH 2.0

KS_{pH 7.4}: Solubilidade cinética em pH 7.4

Cl_{int} humano: Depuração intrínseca na presença de microsomas hepáticos humanos

Cl_{int} camundongo: Depuração intrínseca na presença de microsomas hepáticos de camundongos

Na₂CO₃: Carbonato de sódio

K₂CO₃: Carbonato de potássio

S_N1: Substituição Nucleofílica Unimolecular

ⁱPr: iso-propil

^tBu; *terc*-butil

HFF-1: Fibroblastos humanos

HepG2: Carcinoma hepático humano

[α]_D²⁰: Rotação Óptica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Doença de Chagas	14
1.1.1 <i>Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi</i>	<i>15</i>
1.1.2 <i>Quimioterapia atual.....</i>	<i>16</i>
1.2 Desenvolvimento de medicamentos para a Doença de Chagas.....	16
1.2.1 <i>Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi).....</i>	<i>17</i>
1.2.2 <i>Cascata de ensaios baseada em experimentos fenotípicos</i>	<i>18</i>
1.3 Planejamento da série benzoxazinona.....	19
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivos gerais.....	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 METODOLOGIA	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Modificações no lado esquerdo (LE)	30
4.2 Modificações no lado direito (LD)	37
4.3 Ensaios biológicos e propriedades ADME <i>in vitro</i>	39
4.3.1 <i>Avaliação multiparamétrica dos análogos com modificações do lado esquerdo (LE)..</i>	<i>39</i>
4.3.2 <i>Avaliação multiparamétrica dos análogos com modificações do lado direito (LD).....</i>	<i>41</i>
4.3.3 <i>Avaliação do potencial inibitório contra T. cruzi</i>	<i>48</i>
4.3.4 <i>Eficiência Lipofílica do Ligante</i>	<i>52</i>
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	54
REFERÊNCIAS.....	55
Apêndice A – Parte experimental.....	58
Apêndice B – Espectros de RMN.....	87
Apêndice C – Espectros de IV	143
Apêndice D – Espectros de HRMS	171

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) afetam mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, principalmente as populações desassistidas que vivem em áreas de infraestrutura precária com restrições ao acesso à saúde e ao saneamento básico. Tendo em vista o impacto humano, econômico e social, sobretudo, nas comunidades mais pobres, a Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para tratar as DTNs, reiterado pela meta global de prevenção, controle, eliminação e erradicação das epidemias até 2030 (WHO, 2023). Trata-se, portanto, de uma ação multifatorial envolvendo políticas públicas de saneamento básico, tratamento de esgoto, água potável, disponibilidade de medicamentos e diagnósticos, vacinas e a garantia de acesso a tais recursos.

1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas (DC) é classificada pela OMS como uma DTN. É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e transmitida principalmente por insetos triatomíneos hematófagos (barbeiro). A doença foi catalogada pelo brasileiro Carlos Chagas em 1909, mas, ainda hoje, é considerada um problema de saúde pública em nível global com mais de 6 milhões de pessoas infectadas e cerca de 10.000 mortes por ano (OPAS, 2023). Estima-se que entre 219.000 e 251.000 anos de vida ajustados por incapacidade (sigla em inglês, DALYs) são perdidos no mundo devido à doença, com as pessoas infectadas apresentando invalidez para exercício da profissão a longo prazo, afetando também a qualidade de vida (MARTINS – MELO *et al.*, 2019).

A DC é endêmica em 21 países na América Latina (OPAS, 2023). No Brasil, acomete principalmente as populações em situação de vulnerabilidade. Em 2019, houve mais de 4.000 mortes causadas pela doença, majoritariamente nos estados Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia. Além da transmissão vetorial, o contágio pode ocorrer através de alimentos ou bebidas contaminados, por transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou verticalmente, de mães infectadas para os filhos durante a gestação (MS, 2023).

Após a infecção, é iniciada a fase aguda inicial da doença com alta parasitemia, mas as manifestações clínicas são leves ou inexistentes, na maior parte dos casos. Assim, muitos pacientes desconhecem sua condição. Decorridas 4 a 8 semanas, a parasitemia pode reduzir a níveis indetectáveis devido a resposta imunitária do organismo. A maior parte dos infectados

permanecem assintomáticos por muitos anos, cerca de 30% a 40% deles desenvolvem sintomas em uma fase tardia denominada crônica, geralmente caracterizada por complicações cardíacas ou danos no trato digestivo, em geral, depois de 10 a 30 anos da infecção (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; KRATZ *et al.*, 2022).

1.1.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo, envolvendo etapas no inseto vetor e em hospedeiros mamíferos. O inseto vetor é infectado ao se alimentar do sangue contaminado com tripomastigostas circulantes. Essa forma circular do parasita se difere em epimastigota no intestino do inseto. Após ciclos de replicação, se reconverte em tripomastigota (CDC, 2021). Em hospedeiros, o ciclo inicia com a contaminação do indivíduo através do contato entre as fezes do inseto contaminadas com tripomastigotas e a corrente sanguínea do hospedeiro. Neste estágio, os tripomastigotas flagelados (não replicantes) invadem as células próximas ao local de inoculação formando um vacúolo parasitóforo. Após o rompimento desse vacúolo, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas intracelulares e replicam por fissão binária no citosol da célula hospedeira. Os amastigotas intracelulares se convertem novamente em tripomastigotas, sendo liberados da célula hospedeira e podem circular na corrente sanguínea infectando outras células de vários tecidos (CDC, 2021; BARRETT, *et al.*, 2019; KRATZ *et al.* 2022).

Nesse ciclo há também formas celulares do *T. cruzi* denominadas dormentes ou quiescentes. Trata-se de amastigotas intracelulares que param espontaneamente os ciclos de replicação e podem, eventualmente, retornar a forma tripomastigota infectando outras células hospedeiras (BARRETT, *et al.*, 2019; KRATZ *et al.* 2022). Embora pouco investigado, esses casos de dormência transitória podem estar associados a falhas no tratamento, já que os medicamentos são direcionados a amastigotas em replicação ativa (BARRETT, *et al.*, 2019; RYCKER *et al.*, 2022). Acredita-se que as formas persistentes do *T. cruzi* surjam desses amastigotas não replicantes devido à tolerância ao tratamento, com o crescimento de uma nova população após a retirada do medicamento (KRATZ *et al.* 2022). Além disso, esses amastigotas não replicantes podem atuar como reservatórios da doença com baixa, mas contínua, produção de tripomastigotas. Em resumo, fatores como a diversidade fenotípica envolvida nos estágios de vida do parasita e o comportamento metabólico das formas quiescentes interferem na susceptibilidade do parasita aos medicamentos (BARRETT *et al.*, 2019).

dólares (GABALDÓN-FIGUEIRA *et al.*, 2023). Em vista disso, no decorrer deste tópico, serão apresentadas as etapas envolvidas no desenvolvimento de medicamentos para DC a partir de novas entidades químicas, em colaboração com a Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas, do inglês *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi).

1.2.1 *Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi)*

A DNDi é uma organização sem fins lucrativos fundada a partir de investimentos da Instituição Médicos sem Fronteiras em 2003. Desde então, a DNDi desenvolveu 12 novos tratamentos para 6 doenças, contribuindo para salvar milhões de vidas. Dentre esses tratamentos, pode-se destacar o Benznidazol Pediátrico destinado a crianças de até 2 anos que, até o momento, não tinham um esquema de administração específico. Isso contribuía para a baixa adesão dos pacientes ao tratamento, dado que os comprimidos para adultos precisavam ser cortados ou amassados, levando a doses imprecisas. Em 2013, esse medicamento foi incluído na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS para crianças. Além de projetos envolvendo reposicionamento e mudanças de dosagem, o portfólio da DNDi também possui projetos de inovação radical como, por exemplo, o Fexinidazol. Trata-se de um medicamento desenvolvido em 2018 a partir de uma nova entidade química para tratar a Doença do Sono (DNDi, 2023).

Como parte da colaboração com a DNDi, o Programa de Otimização de Compostos Líderes na América Latina, do inglês *Lead Optimization Latin America* (LOLA), visa em longo prazo desenvolver tratamentos para os pacientes negligenciados, assim como garantir que eles consigam acessá-los (DNDi, 2013). De acordo com dados internos, não publicados, até o momento, foram mais de 30 novos *hits* identificados, dos quais 10 evoluíram para campanhas de *hit-to-lead* com mais de 1.200 compostos sintetizados no total. Esse Programa, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Dias na UNICAMP há cerca de 11 anos, foi responsável por implementar a primeira plataforma ADME em *Drug Discovery* na América Latina, contribuindo significativamente para o desenvolvimento técnico-científico da região.

O perfil do candidato alvo ou critério de progressão utilizado na campanha inicial do desenvolvimento de medicamentos para a DC, de forma geral, busca desenvolver um tratamento seguro e, pelo menos, tão eficaz quanto os atuais, visando as cepas mais recorrentes. Idealmente, a nova entidade química deve ser solúvel o suficiente para possibilitar a administração via oral, não possuir interações medicamentosas relevantes, viabilizar esquemas

de tratamento mais curtos e possibilitar o uso durante a gravidez (GABALDÓN-FIGUEIRA *et al.*, 2023).

1.2.2 Cascata de ensaios baseada em experimentos fenotípicos

As campanhas para a descoberta de medicamentos podem ser feitas empregando duas estratégias: a triagem baseada no alvo e a triagem fenotípica. Os experimentos realizados com alvos proteicos previamente validados quantificam a atividade em função da interação desse alvo (seja por inibição ou ativação) com o composto estudado, possibilitando a obtenção de informações acerca do mecanismo molecular de ação. Por outro lado, nas campanhas que utilizam ensaios fenotípicos feitos em células inteiras, a atividade é determinada em condições fisiológicas reais contra quase todos os alvos drogáveis. Embora não forneça informações sobre o mecanismo de ação, o ensaio celular possibilita avaliar concomitantemente a permeabilidade e distribuição do composto nas membranas celulares (KRATZ *et al.*, 2022).

Devido a relativa escassez de alvos caracterizados, química e geneticamente, a identificação de potenciais terapias para a DC têm sido historicamente feita através de triagens fenotípicas (KRATZ *et al.*, 2022; RYCKER *et al.*, 2023). A cascata de ensaios busca identificar inicialmente compostos que tenham potencial para cura completa da doença. São realizadas triagens de alto rendimento (do inglês, *High Throughput Screening*, HTS), nas quais milhares de compostos originados de bibliotecas comerciais ou de parceiros são triados contra *T. cruzi*. Em uma triagem típica para a DC, sabe-se que parte dos compostos ativos (*hits*) atuam inibindo a enzima esterol 14 α -desmetilase ou CYP51 (RYCKER *et al.*, 2023). Essa enzima faz parte da via de biossíntese do ergosterol, responsável pela manutenção da membrana celular do parasita. Entretanto, após ensaios clínicos com posaconazol e fosravuconazol terem falhado, verificou-se que a inibição da CYP51 estava relacionada à reincidência da doença (RILEY *et al.*, 2015). Ainda, foi verificado que inibidores CYP51 são *slow killing*, ou seja, a taxa de morte dos parasitas é mais lenta, em relação ao BZN (*fast killing*), não sendo capaz de reduzir a carga parasitaria a níveis indetectáveis (KRATZ *et al.*, 2022; GONZÁLEZ *et al.* 2023). Por isso, é importante remover esses inibidores de CYP51 logo no início da cascata (KRATZ *et al.*, 2022). Após o composto passar pela triagem inicial, é iniciada a campanha *hit-to-lead*, no qual são realizadas modificações na estrutura química do composto com objetivo de alcançar a eficácia na prova de conceito em modelos animais (RYCKER *et al.*, 2023).

Na etapa de *hit-to-lead*, os parâmetros avaliados buscam prever o comportamento farmacocinético do composto (Tabela 1). Assim, além da atividade contra amastigotas intracelulares do *T. cruzi* (IC₅₀) e índice de seletividade (IS), busca-se determinar também as propriedades ADME dos compostos, visando otimizá-las. Dentre essas propriedades, encontram-se: a lipofilicidade (eLogD_{7.4}), medida experimental do coeficiente de partição entre *n*-octanol e água em pH 7.4; a permeabilidade (Pe), determinada a partir do ensaio conhecido como PAMPA (sigla em inglês para *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*); a solubilidade cinética medida em pH 2.0 (KS_{pH2.0}) e pH 7.4 (KS_{pH7.4}); e a depuração intrínseca na presença de microsomas hepáticos humanos e de camundongos (Cl_{int} humano e Cl_{int} camundongo, respectivamente).

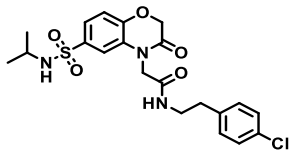
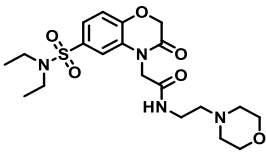
Tabela 1: Perfil do candidato alvo para a Doença de Chagas definido pela DNDi e parceiros

	Bom	Moderado	Indesejável
IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μM)	< 1	1 < IC ₅₀ < 10	> 10
IS	> 50	10 < IS < 50	< 10
eLogD _{7.4}	1 < eLogD _{7.4} < 3.5		< 1 ou > 3.5
Cl _{int} humano (μL/min/mg)	< 25	25 < Cl _{int} < 100	> 100
Cl _{int} camundongo (μL/min/mg)	< 25	25 < Cl _{int} < 100	> 100
Pe (x10 ⁻⁶ cm/s)	> 1.5	0.5 < Pe < 1.5	< 0.5
KS _{pH2.0} (μg/mL)	> 50	10 < KS _{pH2.0} < 50	< 10
KS _{pH7.4} (μg/mL)	> 50	10 < KS _{pH7.4} < 50	< 10

1.3 Planejamento da série benzoxazinona

A partir de critérios de aceitabilidade definidos pela DNDi, *subsets* de compostos pertencentes à biblioteca comercial de compostos ChemDiv da *Screening Libraries* foram avaliados em HTS e 10 séries de interesse foram encontradas após a triagem primária contra o *T. cruzi*. Uma dessas séries, a ChemDiv_22, contendo 8 compostos originados da biblioteca, foi selecionada para a expansão. Dos 8 compostos, 4 foram classificados como *hits* iniciais e sintetizados novamente pelo grupo de pesquisas do Prof. Dr. Luiz Carlos Dias no Instituto de Química da UNICAMP, na etapa conhecida como *hit assessment*. Os compostos *hits* **LOLA735** e **LOLA779** apresentaram resultados considerados promissores: atividade submicromolar contra amastigotas intracelulares do *T. cruzi*, além do índice de seletividade e propriedades ADME adequados (Tabela 2).

Tabela 2: Compostos *hits* **LOLA735** e **LOLA779** da série ChemDiv_22

			
	Referência	LOLA735	LOLA779
IC₅₀ <i>T. cruzi</i> (μM)	< 1	0.4	0.9
IS	> 50	> 160	> 71
eLogD_{7.4}	1 < eLogD _{7.4} < 3.5	3.1	2.3
Cl_{int} humano (μL/min/mg)	< 25	232	< 12
Cl_{int} camundongo (μL/min/mg)	< 25	312	46
Pe (x10 ⁻⁶ cm/s)	> 1.5	11.4	2.6
KS_{pH2.0} (μg/mL)	> 50	2.9	19.6
KS_{pH7.4} (μg/mL)	> 50	5.8	33.3

No entanto, esses compostos possuem depuração intrínseca elevada, ou seja, foram rapidamente eliminados *in vitro* na presença de microsossomas hepáticos humanos e de camundongos. Nesse contexto, o *hit* **LOLA779** mostrou-se mais promissor, em comparação ao *hit* **LOLA735**, com valores de Cl_{int} menores e solubilidade cinética moderada. Os estudos de identificação de metabólitos (MetID) em fração hepática S9, realizado na AbbVie, mostraram que o composto **LOLA779** é susceptível a *N*- e *O*-desalquilação no grupo sulfonamida dietilamina e na porção *N*-etil-morfolina (Figura 2b). O grupo morfolina também pode sofrer desidrogenação, *N*-oxidação e hidroxilação. Os estudos realizados com o composto **LOLA735** mostraram que o grupo *p*-Cl-fenil é altamente metabolizado, também sofrendo *N*-desalquilação, desidrogenação, além de hidroxilação aromática, epoxidação e glucuronidação (Figura 2a).

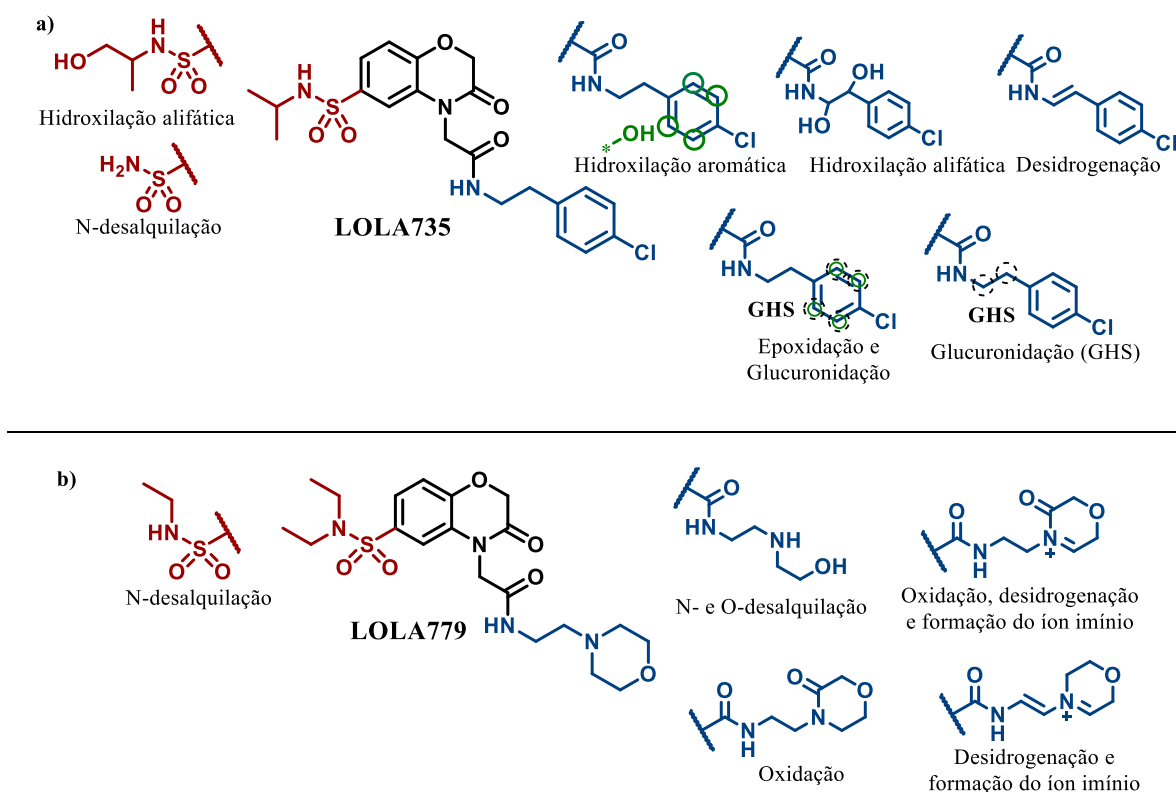


Figura 2: Estudo de identificação de metabólitos dos compostos *hits* iniciais (a) **LOLA735** e (b) **LOLA779**

Legenda: Destaque para os metabólitos formados a partir das reações de biotransformação envolvendo a função sulfonamida do lado esquerdo (em vermelho) e o grupamento *N*-etil-morfolina do lado direito (em azul).

A expansão da campanha *hit-to-lead* foi feita com a síntese de 79 análogos pelo nosso grupo de pesquisas. O foco principal envolveu modificações no lado direito (LD) do *hit* **LOLA779**, incluindo modificações no substituinte *N*-etil-morfolina, devido à taxa de metabolismo e à facilidade de síntese. Observou-se uma tendência de redução do MLM à medida em que a lipofilicidade (eLogD) assume valores menores, coincidindo como o esperado (Figura 3a). Compostos mais lipofílicos tendem a realizar interações hidrofóbicas promíscuas, sendo altamente metabolizados (BARREIRO; FRAGA, 2008). Seguindo a mesma tendência, observou-se que quando a lipofilicidade assumiu valores superiores a 2.5, a instabilidade metabólica dos compostos tornou-se mais pronunciada (Figura 4b). Cabe ressaltar que a maior parte dos compostos obtiveram potência antichagásica moderada (entre 1 μ M e 10 μ M) para uma ampla faixa de lipofilicidade.

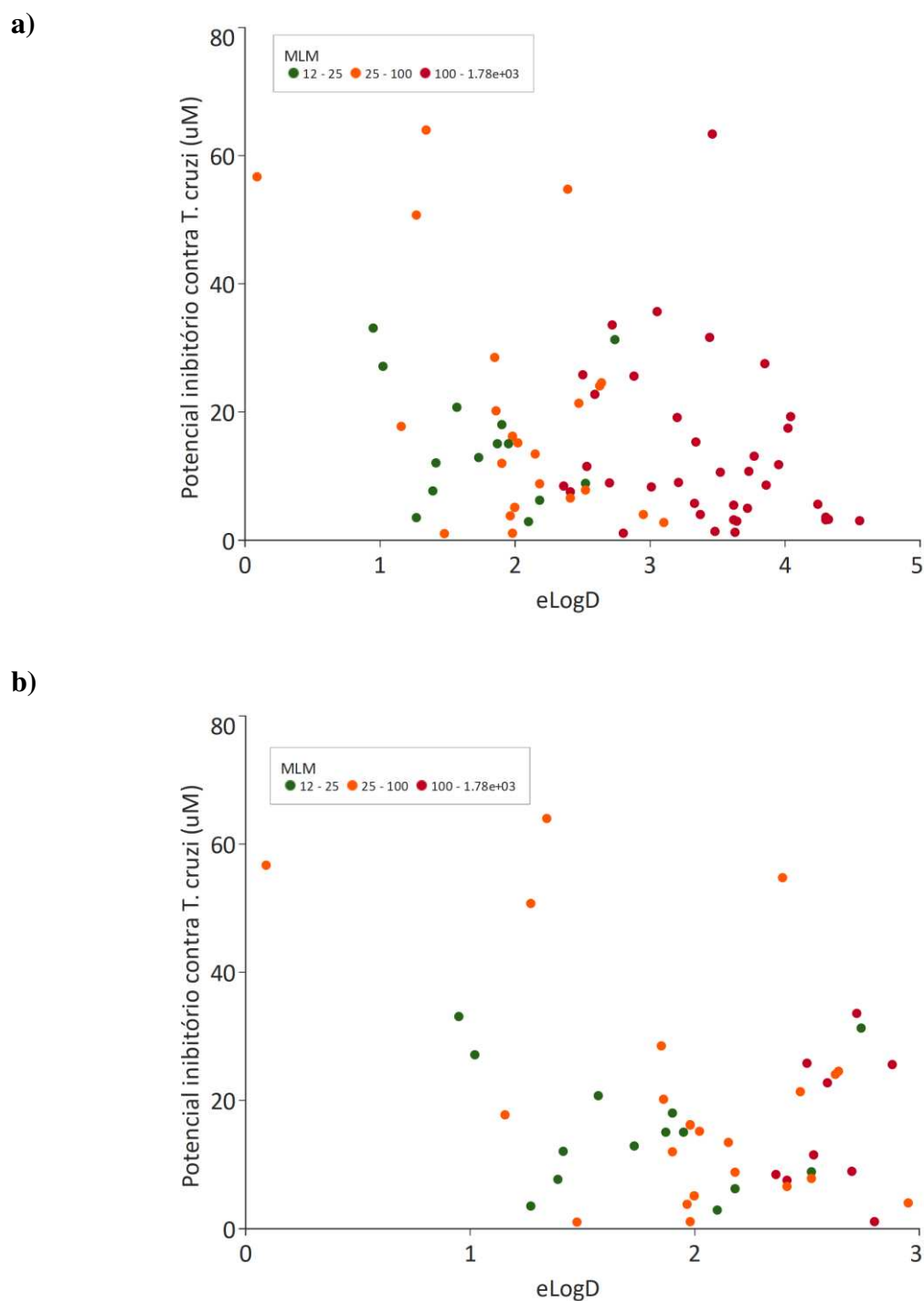


Figura 3: Gráfico do potencial inibitório dos 79 compostos da ChemDiv_22, sintetizados previamente, contra *T. cruzi* (IC₅₀) em função do eLogD para (a) faixa de lipofilicidade entre 0 e 5 e para (b) valores inferiores a 2

As modificações anteriormente realizadas partiram da identificação de regiões lábeis (MetID) do composto *hit* **LOLA779** (Figura 4). O núcleo benzoxazinona obteve potência e metabolismo mais adequados em relação aos derivados substituídos na posição 2 e aos núcleos piridoxazinona e quinolinona. O lado esquerdo (LE) foi modificado com grupos doadores de densidade eletrônica (EDG) como metila, ciclopropil, metóxi, que mostraram potência

moderada. Os grupos retiradores de densidade eletrônica (EWG) foram bem tolerados, em especial o flúor na posição 6. As sulfonamidas nesta posição (6), foram importantes para o potencial inibitório. Sulfonamidas inversas também foram toleradas. A exceção foram os derivados sulfonamida volumosos, com substituintes ciclo pentil e morfolina. Os grupos fenila e 3,5-dimetil isoxazol também não foram ativos no LE.

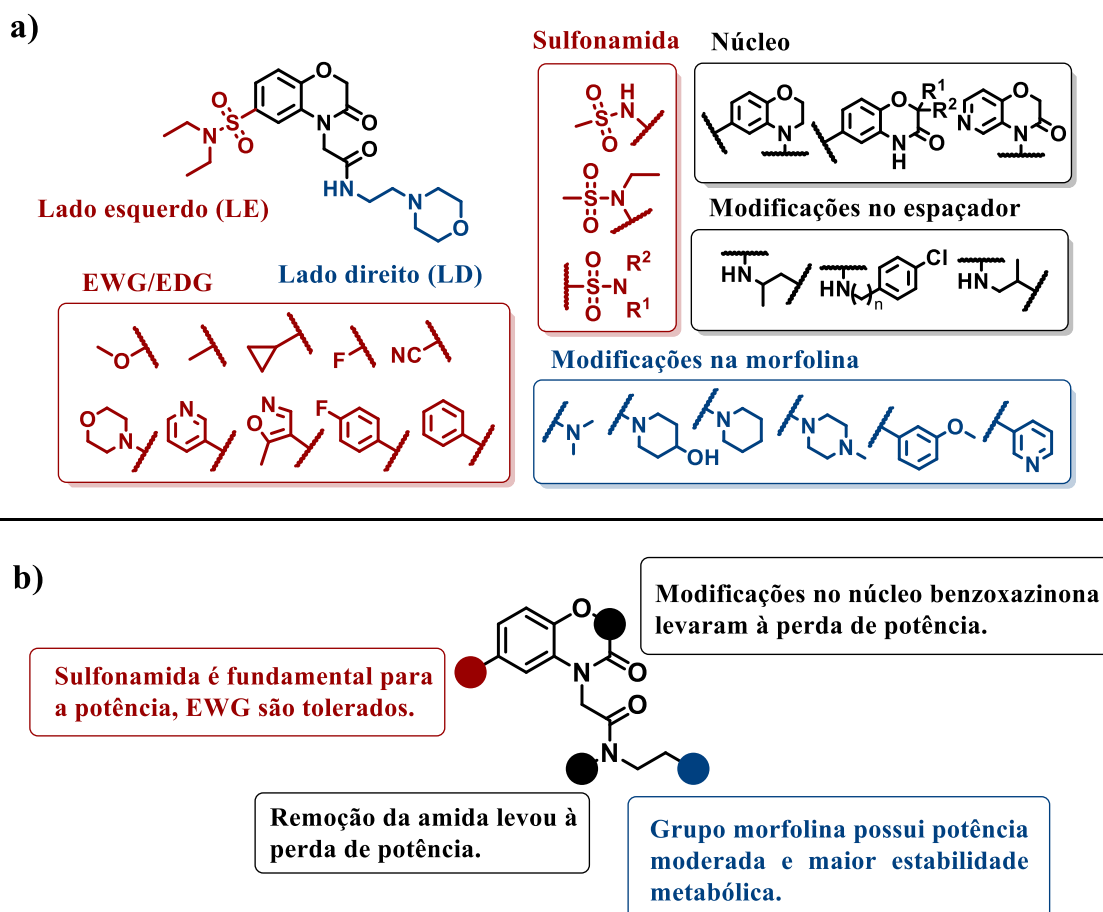


Figura 4: (a) Modificações estruturais realizadas pelo grupo (b) Estudo da relação estrutura-atividade preliminar da série ChemDiv_22

As modificações no lado direito (LD) feitas anteriormente pelo nosso grupo de pesquisas não resultaram em potências superiores ao composto *hit* inicial (Figura 4). Os grupos testados incluem modificações no espaçador etil, adição de substituintes aromáticos como piridina, anisol, *p*-cloro-fenil e benzilamida que, embora tenham apresentado potencial antichagásico promissor, mostraram-se metabolicamente instáveis. Também foram testados heterocíclicos saturados, como a piperazina e a piperidina. O substituinte morfolina do LD forneceu compostos com um equilíbrio promissor entre potência e propriedades ADME, foram avaliados também a adição de substituintes metila na porção *N*-etil-morfolina. A remoção do grupamento amida levou à perda da potência.

Em geral, os compostos avaliados não apresentaram citotoxicidade significativa contra a linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2) e fibroblastos humanos (HFF-1). O mecanismo de ação desta série é desconhecido, mas não há inibição da CYP51 correlacionada com atividade antiparasitária. No entanto, o estudo farmacocinético *in vivo* em dose única feito em camundongos com o **LOLA779**, mostrou que o composto não foi capaz de atingir concentrações plasmáticas livres acima do valor de IC_{50} , sendo totalmente eliminado do plasma após 4 horas de exposição (Figura 5). Esses ensaios foram feitos no Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos (CIEnP) em Florianópolis, sob coordenação do Prof. Dr. João Batista Calixto.

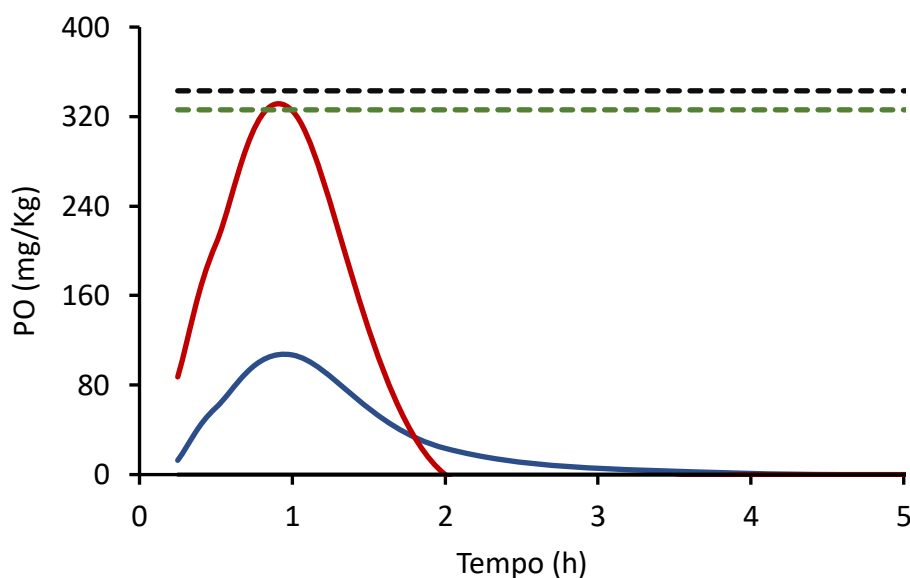


Figura 5: Perfil farmacocinético *in vivo* do composto *hit* **LOLA779**

Legenda: IC_{50} total, em preto; IC_{50} fu, em verde; 10 mg/kg, em azul; 10 mg/kg + ABT, em vermelho.

Em suma, ainda não foram obtidos avanços significativos na relação entre potência e estabilidade metabólica, ainda que a solubilidade e permeabilidade da série ChemDiv_22 sejam adequadas. Por isso, os esforços deste trabalho foram voltados à otimização dos análogos benzoxazinona com uso de *building blocks* para fornecer um estudo entre estrutura e propriedade da série, à medida em que contribuiu para aumentar a diversidade química estrutural dos compostos sintetizados pelo grupo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste projeto consiste em otimizar a série de análogos contendo o núcleo benzoxazinona em relação a depuração metabólica, concomitante à atividade antiparasitária e outros parâmetros ADME, como parte da campanha inicial para identificação de um candidato pré-clínico contra a Doença de Chagas.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar análogos do núcleo benzoxazinona com modificações nas regiões identificadas como lábeis, fragmentos sulfonamida e *N*-etil-morfolina;
- Avaliar a atividade farmacológica contra o *T.cruzi*;
- Promover um estudo multiparamétrico das propriedades ADME *in vitro* dos compostos sintetizados.

3 METODOLOGIA

A triagem de uma biblioteca diversificada contra *T. cruzi*, realizada pela DNDi, identificou o *hit* **LOLA779** com o núcleo benzoxazinona (Figura 6). Neste trabalho, serão relatadas a síntese química e a atividade biológica de análogos desses compostos, bem como a descrição de estudos da relação estrutura – propriedade (do inglês *Structure – Property Relationship*, SPR) complementares buscando melhorar a potência e o metabolismo hepático microsomal *in vitro* desta série.

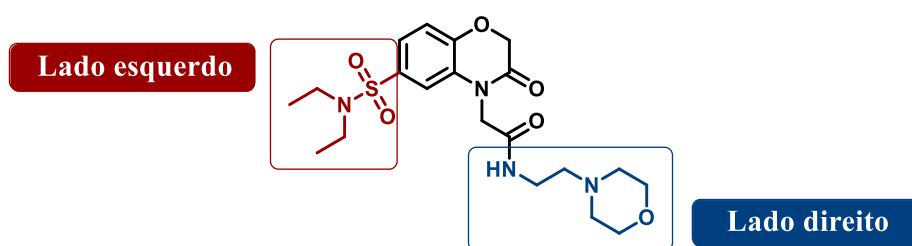
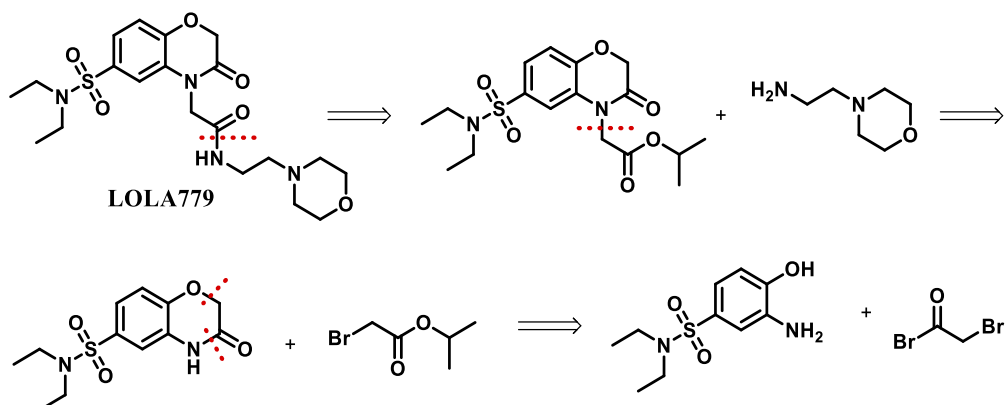


Figura 6: Modificações estudadas para a série ChemDiv_22

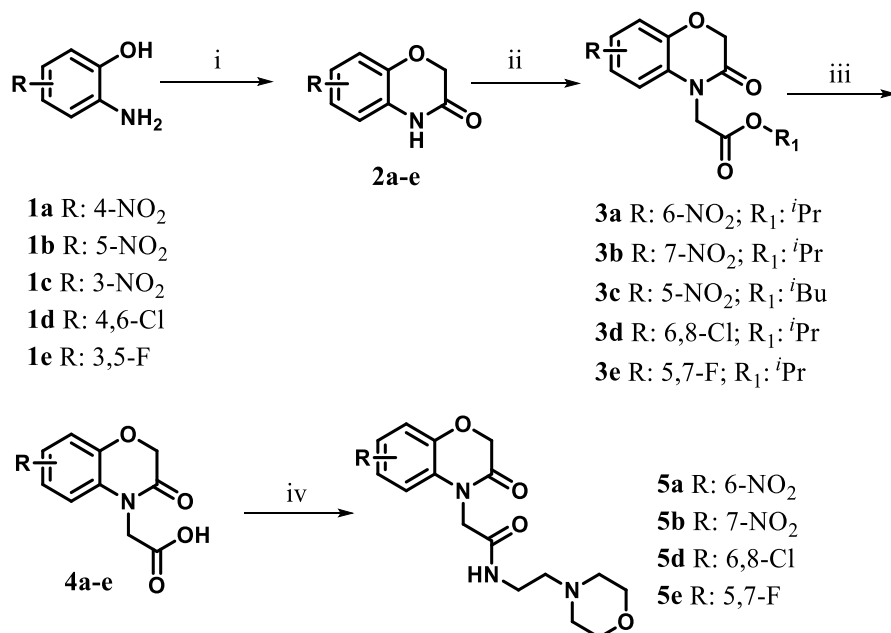
Os alvos do estudo foram modificações no anel benzoxazinona (lado esquerdo, LE) e na porção amida (lado direito, LD). A diversidade do anel benzoxazinona (Figura 6, em vermelho) foi introduzida no início da rota sintética, enquanto as modificações da porção amida (Figura 6, em azul) foram feitas na etapa final. Vários aminofenóis com padrões de substituição apropriados foram escolhidos como materiais de partida, enquanto a diversidade da fração amida é alcançada pela introdução de aminas comerciais selecionadas através de um acoplamento de amidas.

O planejamento dos análogos foi determinado a partir dos estudos de identificação de metabólitos (Figura 2) e relação estrutura-atividade (Figura 4b) realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisas. Somado à observação de relatos da literatura, foram usadas também estratégias de modificação molecular reconhecidas e predição *in silico* de propriedades através de cálculos teóricos com o uso do *software* StarDrop da Optibrium v.7.5.0.38968, com módulo P450 *Metabolism* dedicado a predição dos metabólitos de Fases I e II. A partir da retró síntese do *hit* **LOLA779** (Esquema 1), foi proposta a rota de síntese que visou contemplar as reações mais recorrentes na química medicinal (BROWN E BOSTRÖM, 2016; BOSTRÖM *et al.*, 2018), aliado à expertise do grupo na área.



Esquema 1: Retrossíntese do composto *hit* LOLA779

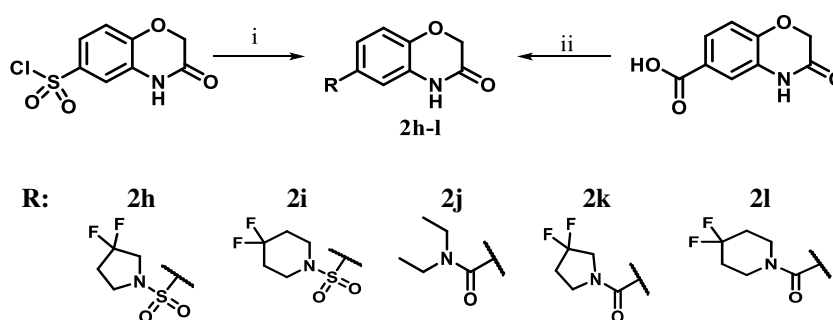
No lado esquerdo, o grupamento sulfonamida foi substituído por grupos EWG como nitro, flúor e cloro (Esquema 2). A preparação do núcleo benzoxazinona iniciou com a ciclização carbonilativa a partir dos aminofenóis comerciais (**1a-e**). A reação foi realizada sob condições padrão (CALIENDO *et al.* 2002; BANO *et al.* 2015; SPINKS *et al.*, 2015) em duas etapas, empregando brometo de bromoacetila em THF, com uso de Na₂CO₃ durante acilação e K₂CO₃ na etapa de ciclização feita à 80 °C. Os intermediários (**2a-e**) foram *N*-alquilados sob condições alcalinas (SPINKS *et al.*, 2015; MODRANKA *et al.*, 2019) com K₂CO₃ e DMF, proporcionando os compostos (**3a-e**). A variedade de eletrófilos utilizados buscou facilitar o isolamento do derivado ácido carboxílico (**4a-e**) da etapa posterior.



Esquema 2: Síntese dos análogos benzoxazinona **5** envolvendo os reagentes e as condições experimentais: i) 1. Brometo de bromoacetila, THF, Na₂CO₃, t.a.; 2. THF, K₂CO₃, 80°C; ii) Bromoacetato de iso-propila ou bromoacetato de *tert*-butila, K₂CO₃, DMF, t.a.; iii) 1. NaOH_(aq.), THF/MeOH, t.a.; 2. H₃O⁺_(aq.), t.a. ou TFA, DCM, t.a.; iv) *N*-etil-morfolina ou aminas cíclicas, EDC/HOBt, DCM, t.a.

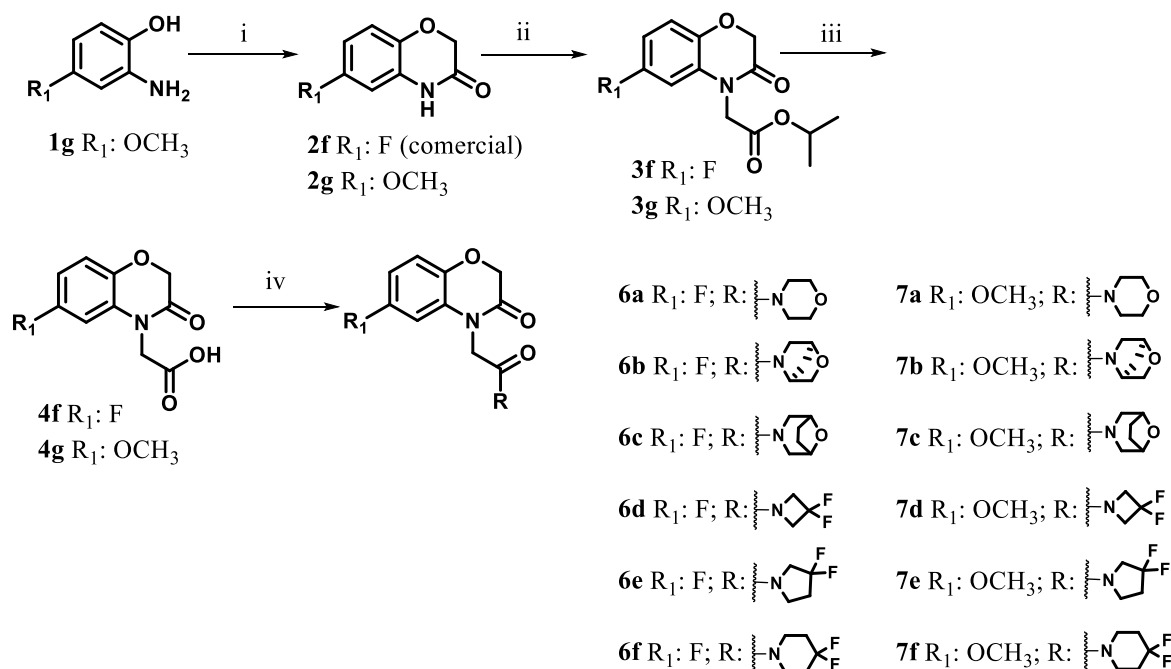
A reação de hidrólise dos ésteres (**3a-e**) foi realizada sob condições ácidas ou básicas, a depender do intermediário (ver parte experimental), levando ao ácido carboxílico correspondente (**4a-e**) (Esquema 2). Finalmente, a reação destes ácidos (**4a-l**) com as aminas comerciais selecionadas e os agentes de acoplamento peptídico, 1-etil-3-(3-cloridrato) dimetilaminopropil carbodiimida (EDC) e hidroxibenzotriazol (HOBt), produziram os compostos finais de interesse (**5a-b, d-e**) (MODRANKA *et al.*, 2019) (Esquema 2).

Para introduzir outros grupos na posição 6 do anel benzoxazinona no LE, foram selecionadas outras estratégias de acordo com o grupo funcional. O acesso aos intermediários (**2h-l**) foi feito por meio das reações descritas no Esquema 3. Os intermediários **2h-i** foram obtidos por meio de uma reação de sulfonilação entre o composto comercial e as aminas cíclicas selecionadas em meio básico sob atmosfera de argônio (LOTESTA *et al.*, 2016; KONDA *et al.*, 2015). Os intermediários **2j-l** foram obtidos a partir de um acoplamento peptídico em condições semelhantes àsquelas descritas anteriormente (MODRANKA *et al.*, 2019).



Esquema 3: Rota de síntese dos núcleos benzoxazinona envolvendo os reagentes e condições experimentais: i) Amina comercial, trietilamina, DCM, Ar, t.a.; ii) Aminas alifáticas ou cíclicas, EDC/HOBt, DCM, t.a.

Os intermediários **3h-l** foram preparados em condições análogas às descritas no Esquema 2. A substituição dos grupos alquil nos núcleos benzoxizinona (**2h-l**) foi feita em condições básicas na presença dos eletrófilos correspondentes. A hidrólise dos ésteres isopropílicos, seguida do acoplamento peptídico resultou nos análogos **8a-e**. No esquema 4 foi representada a rota sintética para obtenção dos **6a-e** e **7a-e**, na qual foram utilizadas diferentes aminas como substituintes alternativos à *N*-etil-morfolina do lado direito.



Esquema 4: Síntese dos análogos benzoxazinona **6** e **7** envolvendo os reagentes e as condições experimentais: i) 1. Brometo de bromoacetila, THF, Na₂CO₃, t.a.; 2. THF, K₂CO₃, 80°C; ii) Bromoacetato de iso-propila, K₂CO₃, DMF, t.a.; iii) 1. NaOH_(aq.), THF/MeOH, t.a.; 2. H₃O⁺_(aq.), t.a.; iv) Aminas cíclicas, EDC/HOBt, DCM, t.a.

Os produtos e intermediários foram isolados, purificados por cromatografia em coluna *flash*, recristalizados a partir de solventes orgânicos apropriados e foram caracterizados por espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C, ponto de fusão, infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução. A determinação dos parâmetros físico-químicos e propriedades ADME *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC) da Universidade de São Paulo (USP), coordenado pelo Prof. Dr. Adriano Andricopulo com uso de metodologias já reportadas (RESENDE JÚNIOR *et al.*, 2023).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os subtópicos descritos a seguir são referentes à síntese orgânica dos derivados benzoxazinona utilizado as etapas descritas nos Esquemas 2, 3 e 4, seguido pela avaliação multiparamétrica das propriedades ADME *in vitro* dos análogos preparados.

4.1 Modificações no lado esquerdo (LE)

As modificações no lado esquerdo consistiram em introduzir grupos retiradores de densidade eletrônica (EWG), incluindo os grupos nitro, cloro e flúor. Trata-se de uma das abordagens comuns para redução do metabolismo oxidativo mediado pelo citocromo P450 (CYP), o qual envolve reações de natureza eletrofílica em compostos ricos em elétrons (BARREIRO; FRAGA, 2008). As modificações no LE também incluíram grupos doadores de densidade eletrônica (EDG), como o métoxi, para avaliar comparativamente o efeito eletrônico sobre a atividade antiparasitária e as propriedades farmacocinéticas. O procedimento (Esquema 2) utilizado para sintetizar os compostos mostrou-se eficiente e, na maior parte dos casos proporcionou núcleos benzoxazinona (**2a-e,g**) com rendimentos muito bons em reações *overnight* (Tabela 3).

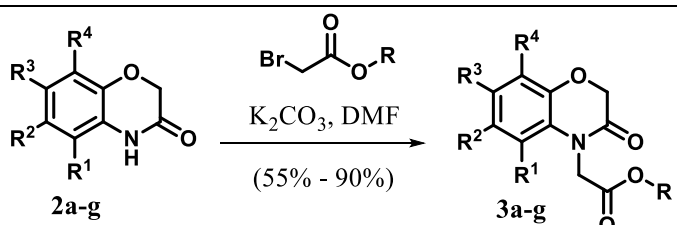
Tabela 3: Rendimentos das reações de formação dos núcleos benzoxazinona (**2a-e,g**)

Reaction scheme showing the synthesis of benzoxazinone derivatives (2a-e) from substituted phenols (1a-e). The reaction involves two steps: 1. Na_2CO_3, THF, 0°C - t.a. and 2. K_2CO_3, THF, 80°C. The yield is (44% - 87%).					
Compostos	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Rendimento (%)
2a	H	NO ₂	H	H	56%
2b	H	H	NO ₂	H	87%
2c	NO ₂	H	H	H	84%
2d	H	Cl	H	Cl	44%
2e	F	H	F	H	80%
2g	H	OMe	H	H	72%

Através da espectroscopia no infravermelho (IV), observou-se um indicativo da interconversão entre os grupos funcionais amina e amida cíclica (lactama) com a presença do estiramento característico da ligação C=O que ocorre em frequências próximas a 1700 cm^{-1} . Os espectros dos intermediários **2a-e,g** podem ser consultados no Apêndice C.

Na etapa posterior, os núcleos benzoxazinona sintetizados (**2a-g**) e obtido comercialmente (**2f**) foram *N*-alquilados com bromoacetato de iso-propila (**3a, d-g**) ou bromoacetato de *terc*-butila (**3b-c**) (ver parte experimental). De acordo com a Tabela 4, os rendimentos obtidos variaram entre 55% e 90%.

Tabela 4: Rendimentos das reações de formação dos derivados alquilados (**3a-g**)

						
Compostos	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R	Rendimento (%)
3a	H	NO ₂	H	H	<i>i</i> Pr	83%
3b	H	H	NO ₂	H	<i>t</i> Bu	90%
3c	NO ₂	H	H	H	<i>t</i> Bu	83%
3d	H	Cl	H	Cl	<i>i</i> Pr	75%
3e	F	H	F	H	<i>i</i> Pr	76%
3f	H	F	H	H	<i>i</i> Pr	83%
3g	H	OMe	H	H	<i>i</i> Pr	55%

Uma das técnicas utilizadas para verificar o progresso das reações foi o IV. A evidência do grupo funcional éster foi verificada a partir do estiramento em 1747 cm^{-1} referente à ligação C=O, que possui estiramento superior à ligação C=O (1695 cm^{-1}) de uma lactama, conforme o exemplo do composto **3e** (Figura 7). Devido ao efeito de ressonância, o par de elétrons do nitrogênio conjuga com a carbonila aumentando o caráter de ligação simples, por isso a frequência de estiramento diminui. Por outro lado, a maior eletronegatividade do oxigênio torna a ligação C=O mais forte em ésteres, assim a absorção ocorre em energias mais altas.

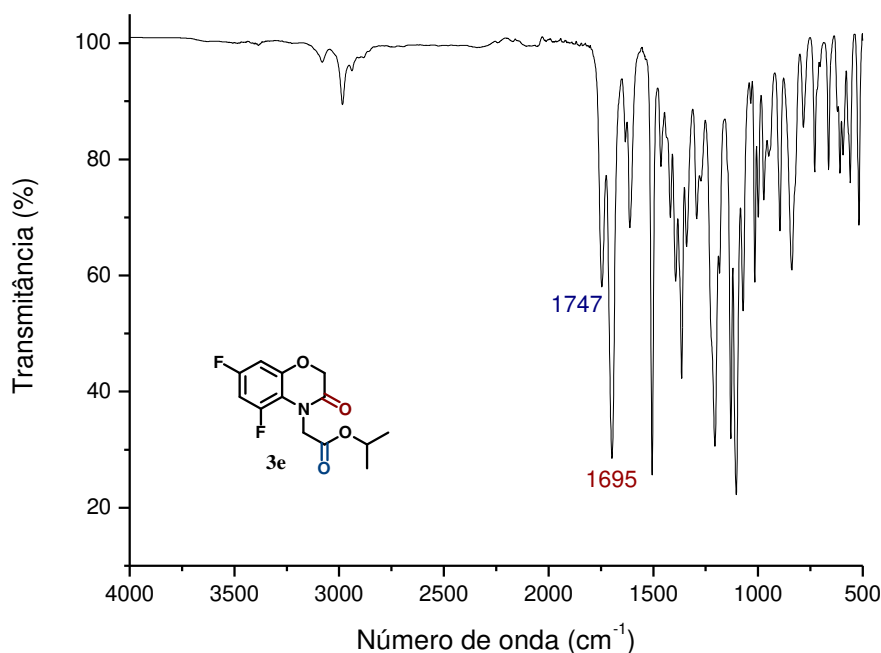
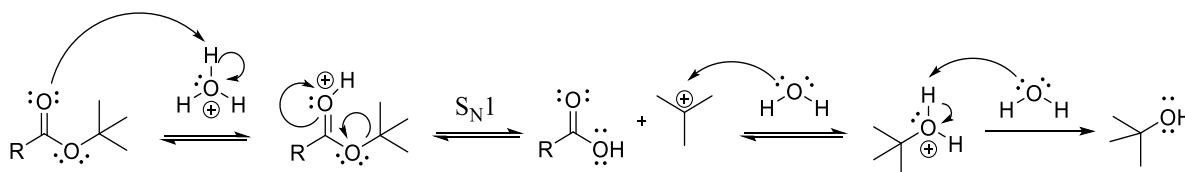


Figura 7: Espectro IV do composto **3e** em uma faixa de 500 a 4000 cm^{-1}

Na etapa seguinte, os intermediários nitro (**3b** e **3c**) apresentaram problemas de solubilidade durante as reações de hidrólise, assim, optou-se por realizá-las em meio ácido (Esquema 5) com uso do ácido trifluoroacético (TFA) como alternativa à saponificação. Nesses casos, os solventes utilizados não foram secos.



Esquema 5: Proposta de mecanismo simplificado para a reação de hidrólise em meio ácido

Dessa forma, a clivagem da ligação CO levou à formação do carbocátion terciário relativamente estável pelo mecanismo $\text{S}_{\text{N}}1$ ao invés da adição seguida de eliminação na carbonila que ocorre na hidrólise básica. Os rendimentos dos ácidos intermediários (**4a-g**) foram descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Rendimentos das reações de formação dos ácidos intermediários (**4a-g**)

Compostos	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R	Hidrólise	Rendimento (%)
4a	H	NO ₂	H	H	<i>i</i> Pr	Básica	83%
4b	H	H	NO ₂	H	<i>t</i> Bu	Ácida	90%
4c	NO ₂	H	H	H	<i>t</i> Bu	Ácida	98%
4d	H	Cl	H	Cl	<i>i</i> Pr	Básica	Quantitativo
4e	F	H	F	H	<i>i</i> Pr	Básica	Quantitativo
4f	H	F	H	H	<i>i</i> Pr	Básica	69%
4g	H	OMe	H	H	<i>i</i> Pr	Básica	91%

O grupo funcional dos ácidos carboxílicos preparados (**4a-g**) foi indicada a partir da presença da banda característica de OH entre 3400 cm⁻¹ e 2400 cm⁻¹ (ver espectros no Apêndice C). Para obter os análogos finais, as reações de acoplamento peptídico foram feitas com EDC e HOBt. Foram obtidos rendimentos entre bons e excelentes (Tabela 6).

Tabela 6: Compostos finais (**5a-b, d-e**) com modificações no lado esquerdo

Compostos	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Rendimento (%)
5a	H	NO ₂	H	H	82%
5b	H	H	NO ₂	H	70%
5d	H	Cl	H	Cl	82%
5e	F	H	F	H	94%

Em outra abordagem, buscou-se verificar a influência dos grupos EWG considerando a relação bioisostérica entre a função amida e sulfonamida. Ainda, conforme discutido anteriormente, o grupo sulfonamida foi fundamental para a manutenção da atividade antichagásica da série benzoxazinona. Entretanto, a porção *N*-dietil-sulfonil demonstrou-se propensa à *N*-desalquilação (estudos de MetID). Por isso, buscou-se também avaliar a adição de flúor no substituinte da sulfonamida, nos quais a presença da ligação C-F tende a desfavorecer as reações de oxidação devido a maior força de ligação quando comparada à ligação C-H (GILLIS *et al.*, 2015). Os intermediários **2h-l** foram sintetizados de acordo com o Esquema 3 com excelentes rendimentos, na maior parte dos casos (Tabela 7).

Tabela 7: Rendimentos das reações de modificação dos núcleos benzoxazinona (**2h-l**)

Compostos	R	Rendimento (%)
2h		96%
2i		Quantitativo
2j		82%
2k		89%
2l		75%

Os núcleos benzoxazinona com modificações no LE (**2h-l**) foram utilizados para acessar os intermediários **3h-l** (Tabela 8), os quais foram obtidos com rendimentos que variaram entre 60% e 84%. Posteriormente, esses ésteres (**3h-l**) foram hidrolisados em meio básico com rendimentos quantitativos.

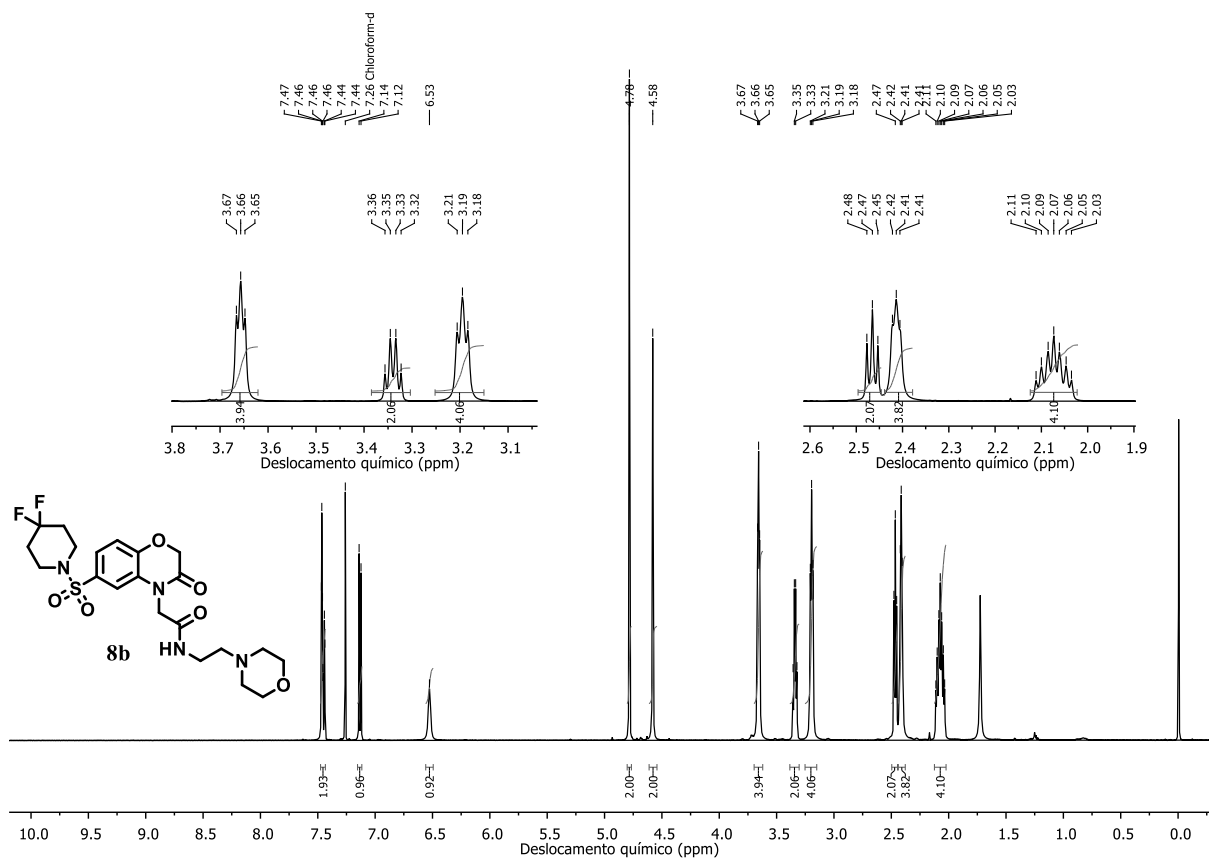
Tabela 8: Rendimentos das reações de formação dos derivados alquilados (**3h-l**) e dos ácidos intermediários (**4h-l**)

R	Compostos	Rendimento da N-alkilação (%)	Compostos	Rendimento da hidrólise (%)
	3h	60%	4h	Quantitativo
	3i	73%	4i	Quantitativo
	3j	73%	4j	Quantitativo
	3k	84%	4k	Quantitativo
	3l	81%	4l	Quantitativo

Finalmente, os análogos finais (**8a-e**) (Tabela 9) foram obtidos através da reação de acoplamento peptídico entre os ácidos carboxílicos intermediários (**4h-l**) e a amina comercial *N*-etil-morfolina. Os rendimentos obtidos variaram entre 48% e 96%. O espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) de um dos análogos finais (**8b**) foi destacado a seguir (Figura 8). Nele, observa-se a formação da amida a partir do sinal largo em 6.53 ppm referente ao hidrogênio amídico. Na região alifática, os sinais em 3.66 ppm e 2.41 ppm indicam a presença do grupo morfolina. Os metilenos do núcleo benzoxazinona e do espaçador amida são observados como singletos em 4.78 ppm e 4.58 ppm, respectivamente.

Tabela 9: Compostos finais (**8a-e**) com modificações no lado esquerdo

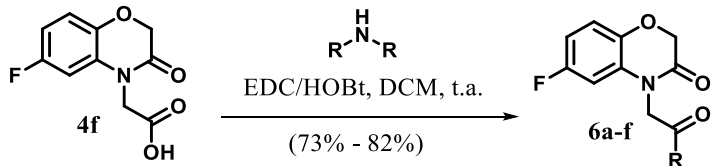
Compostos	R	Rendimento (%)
8a		82%
8b		75%
8c		48%
8d		79%
8e		96%

Figura 8: Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **8b**

4.2 Modificações no lado direito (LD)

As modificações no LD consistiram em substituir a morfolina por aminas comerciais selecionadas (Tabela 10). Embora a morfolina seja o grupo identificado até o momento como mais estável metabolicamente, possivelmente, devido ao aumento da polaridade causado pelo heteroátomo de oxigênio, essa região do composto é susceptível a reações de biotransformação (estudos de MetID). Através do estudo SAR preliminar (Figura 4b), sabe-se que heterociclos como a piperidina e piperazina são pouco toleráveis em relação à potência e à permeabilidade, ainda que nesses casos os valores de lipofilicidade não tenham destoado do esperado. Em vista disso, optou-se pela adição de átomos de flúor e alteração do tamanho do anel (**6d-f**) (JEAN; FOTSCH, 2012), além de adicionar pontes de carbono (**6b-c**) com o intuito de reduzir o parâmetro eLogD_{7.4} (DEGORCE *et al.*, 2018). A diminuição da lipofilicidade é uma das estratégias comumente utilizadas para mitigação do metabolismo, a qual baseia-se em desfavorecer as interações hidrofóbicas promíscuas do ligante. Isso torna-se importante, tendo em vista que para uma das principais isoformas CYP envolvidas nas reações de oxidação, a CYP3A4, a interação predominante é feita por sítio de ligação lipofílicos (STEPAN *et al.*, 2013).

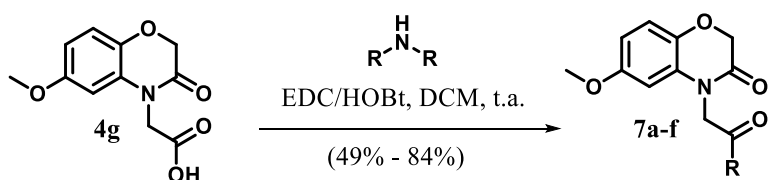
Tabela 10: Compostos finais (**6a-f**) com modificações no lado direito

					
Compostos	R	Rendimento (%)	Compostos	R	Rendimento (%)
6a		75%	6d		82%
6b		73%	6e		79%
6c		80%	6f		82%

O procedimento (Esquema 3) para a síntese dos compostos **6a-f** a partir do núcleo benzoxazinona comercial (**2f**) mostrou-se eficiente, levando a rendimentos entre bons e muito bons. Os intermediários **3f** (Tabela 4) e **4f** (Tabela 5) puderam ser obtidos em maior escala, viabilizando o acesso aos análogos na última etapa.

Adicionalmente, foi realizada a síntese dos análogos **7a-f** (Tabela 11) seguindo o mesmo padrão de substituição descrito na Tabela 10. Entretanto, foi utilizado um aminofenol comercial com grupo metóxi na posição 6 como alternativa ao átomo de flúor. Os intermediários **2g** (Tabela 3), **3g** (Tabela 4) e **4g** (Tabela 5) foram obtidos em maior escala com rendimentos que variaram de 55% a 91%.

Tabela 11: Compostos finais (**7a-f**) com modificações no lado direito

					
Compostos	R	Rendimento (%)	Compostos	R	Rendimento (%)
7a		74%	7d		84%
7b		80%	7e		67%
7c		72%	7f		49%

Os procedimentos experimentais detalhados de todos os intermediários e análogos finais discutidos ao longo dos tópicos 4.1 e 4.2 podem ser consultados no Apêndice A, assim como os espectros utilizados na caracterização e identificação da estrutura química de cada composto. Todos os intermediários e análogos finais foram caracterizados com RMN ^1H , ^{13}C e infravermelho, reportados nos Apêndices B e C, respectivamente. Adicionalmente, a fórmula molecular dos análogos finais foi determinada com uso da espectrometria de massas de alta resolução (Apêndice D).

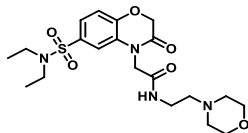
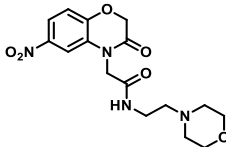
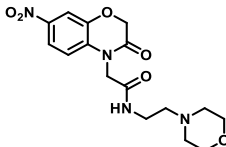
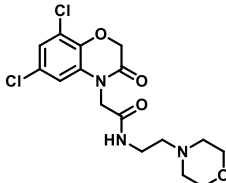
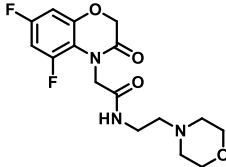
4.3 Ensaios biológicos e propriedades ADME *in vitro*

Os ensaios biológicos contra *T. cruzi* e a determinação das propriedades ADME *in vitro* foram feitas no Laboratório de Química Medicinal e Computacional da Universidade de São Paulo campus São Carlos. Os resultados obtidos estão descritos ao longo deste tópico, o qual está subdividido considerando as modificações nos lados esquerdo e direito do composto *hit* **LOLA779**. Buscou-se promover uma avaliação multiparamétrica das propriedades ADME em paralelo à atividade antiparasitária.

4.3.1 Avaliação multiparamétrica dos análogos com modificações do lado esquerdo (LE)

A lipofilicidade dos compostos com modificação no lado esquerdo (**5a-b**, **d-e**), foi ligeiramente reduzida (Tabela 12). Os valores experimentais de $e\text{LogD}_{7.4}$ não ultrapassaram 1.5 na maior parte dos casos, possivelmente, devido ao aumento dos grupos polares. A exceção foi o composto com substituinte cloro (**5d**) em que a lipofilicidade atingiu um valor superior ao *hit* inicial **LOLA779** (2.3). De forma geral, as solubilidades cinéticas em pH gástrico (2.0) e pH fisiológico (7.4) foram superiores ao *hit* inicial na maior parte dos casos, de acordo com o esperado (Tabela 2). Ainda, o transporte passivo dos compostos através da membrana sintética, determinado a partir do experimento PAMPA, não foi prejudicado. Embora os valores de permeabilidade tenham diminuído ligeiramente em relação ao composto *hit* (2.6×10^{-6} cm/s), os resultados se mantiveram dentro da faixa esperada com valores superiores a 1.5×10^{-6} cm/s. As modificações no LE resultaram em compostos **5a-b**, **d-e** com uma pequena redução do Cl_{int} em camundongos, quando comparados ao *hit* inicial **LOLA779**, exceto o análogo **5b** com substituinte nitro na posição *meta*, cuja redução da depuração intrínseca foi mais pronunciada (inferior a $12 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$).

Tabela 12: Resultados das propriedades ADME *in vitro* referentes aos análogos **5a-b, d-e**

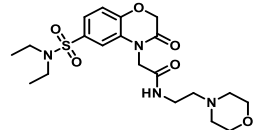
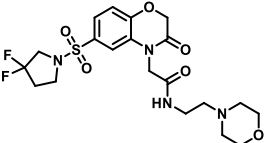
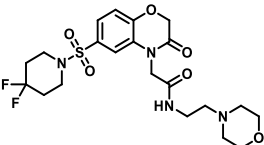
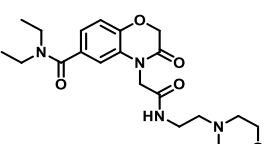
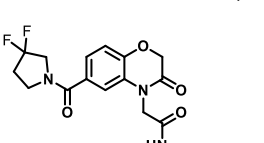
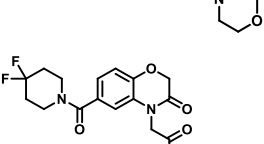
Composto	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ ^a (μM)	eLogD _{7.4} ^b	Cl _{int} humano ^c (μL/min/mg)	Cl _{int} camundongo ^c (μL/min/mg)	Pe ^d (x10 ⁻⁶ cm/s)	KS _{2.0} ^e (μg/mL)	KS _{7.4} ^e (μg/mL)	
	LOLA779	0.9	2.3	< 12	46	2.6	19.6	33.3
	5a	24.6	1.3	27.6	44	2.7	30.7	27.7
	5b	17.2	1.5	< 12	< 12	1.9	35.9	37.4
	5d	4.6	2.8	14.4	27.6	14.4	41.4	51.7
	5e	32.1	1.5	16.4	20.8	3.5	19.7	18.2

^aEnsaio intracelular com amastigotas da linhagem Tulahuen LacZ. ^bA lipofilicidade experimental foi determinada pelo coeficiente de partição entre *n*-octanol/tampão em pH 7.4. ^cDepuração intrínseca *in vitro* calculada a partir de ensaios com uso de microsossomas hepáticos humano (HLM) e de camundongo (MLM). ^dPermeabilidade determinada com uso de membranas artificiais pelo ensaio PAMPA em pH 6.5. ^eSolubilidade cinética medida em pH 2.0 e pH 7.4.

Os análogos **8a-e** apresentaram uma ligeira redução da lipofilicidade em relação ao *hit* **LOLA779** (2.3), com valores de $e\text{LogD}_{7.4}$ superiores a 1.6 (Tabela 13). Ainda assim, a permeabilidade se manteve dentro da faixa esperada com valores superiores a 1.6×10^{-6} cm/s na maior parte dos casos. Curiosamente, os análogos **8c** e **8d** apresentaram uma maior resistência ao transporte passivo pelas membranas sintéticas, com fluxos de 0.6×10^{-6} cm/s e 0.3×10^{-6} cm/s, respectivamente, ainda que possuam valores de $e\text{LogD}_{7.4}$ dentro de um intervalo esperado. A solubilidade aquosa dos compostos **8a-e**, de forma geral, foram semelhantes ou superiores ao *hit* **LOLA779**.

Como discutido anteriormente, o substituinte sulfonamida mostrou-se uma região lábil do LE, passível de reações de *N*-desalquilação (Figura 2b, MetID). Optou-se por utilizar substituintes volumosos, como alternativa aos análogos preparados anteriormente (Figura 4a), e incluir átomos de flúor à estrutura. A eletronegatividade dos átomos de flúor torna a ligação C – F mais forte que a ligação C – H, dessa forma os compostos tendem a possuir maior estabilidade metabólica à medida em que se tornam menos susceptíveis aos processos de biotransformação. No entanto, os análogos **8a** e **8b** não seguiram o esperado, considerando os resultados da depuração microsomal em camundongos em relação ao **LOLA779**. Essa mesma tendência foi observada para os demais análogos (**8c-e**), no entanto, houve acréscimos menores aos valores de Cl_{int} em camundongos e em humanos.

Tabela 13: Resultados das propriedades ADME *in vitro* referentes aos análogos **8a-e**

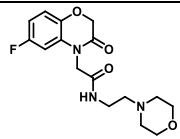
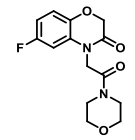
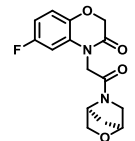
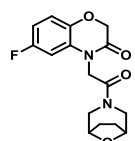
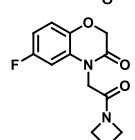
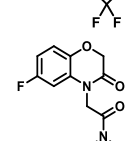
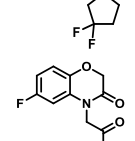
Composto	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ ^a (μM)	eLogD _{7.4} ^b	Cl _{int} humano ^c (μL/min/mg)	Cl _{int} camundongo ^c (μL/min/mg)	Pe ^d (x10 ⁻⁶ cm/s)	KS _{2.0} ^e (μg/mL)	KS _{7.4} ^e (μg/mL)	
	LOLA779	0.9	2.3	< 12	46	2.6	19.6	33.3
	8a	28.9	2.0	17.2	31.6	2.2	47.5	51.8
	8b	13.0	2.3	23.6	58	3.1	ND	ND
	8c	46.0	1.7	13.2	< 12	0.6	27.8	27.6
	8d	19.5	1.6	13.6	28	0.3	ND	ND
	8e	20.6	1.9	< 12	17.6	1.6	58.8	65.3

^aEnsaio intracelular com amastigotas da linhagem Tulahuen LacZ. ^bA lipofilicidade experimental foi determinada pelo coeficiente de partição entre *n*-octanol/tampão em pH 7.4. ^cDepuração intrínseca *in vitro* calculada a partir de ensaios com uso de microsomas hepáticos humano (HLM) e de camundongo (MLM). ^dPermeabilidade determinada com uso de membranas artificiais pelo ensaio PAMPA em pH 6.5. ^eSolubilidade cinética medida em pH 2.0 e pH 7.4.

4.3.2 Avaliação multiparamétrica dos análogos com modificações do lado direito (LD)

Dentre as modificações sugeridas para o lado direito, com intuito de aumentar a estabilidade metabólica buscou-se, em um primeiro momento, remover as regiões lábeis da estrutura. Nos análogos **6a-f** (Tabela 14), a cadeia alifática de dois carbonos foi removida devido à ocorrência de reações de hidroxilação e desidrogenação verificadas pelo estudo de identificação de metabólitos dos *hits* iniciais (Figura 2). Nestes casos, o átomo de flúor foi mantido do lado esquerdo na posição 6 do anel aromático em decorrência do composto **LOLA780**, previamente sintetizado. Nele, foi verificado uma redução significativa da instabilidade metabólica, quando comparado ao *hit* inicial **LOLA779** devido, possivelmente, à substituição da sulfonamida, uma das regiões lábeis, pelo átomo de flúor. Neste caso, verificou-se a manutenção do potencial antichagásico com valor de IC₅₀ moderado.

Tabela 14: Resultados das propriedades ADME *in vitro* referentes aos análogos **6a-f**

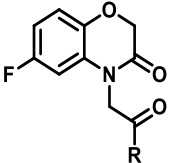
Composto	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ ^a (μM)	eLogD _{7.4} ^b	Cl _{int} humano ^c (μL/min/mg)	Cl _{int} camundongo ^c (μL/min/mg)	Pe ^d (x10 ⁻⁶ cm/s)	KS _{2.0} ^e (μg/mL)	KS _{7.4} ^e (μg/mL)	
	LOLA780	2.1	1.6	< 12	15.6	2.9	20.7	21.7
	6a	4.8	1.0	< 12	12.4	16.0	32.7	34.3
	6b	2.8	0.9	< 12	19.2	15.7	27.1	26.6
	6c	7.9	1.5	13.6	< 12	21.8	33.3	34.3
	6d	4.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	6e	6.2	1.7	< 12	14	25.2	23.3	22.8
	6f	7.2	2.0	< 12	13.6	33.3	30.7	29.3

^aEnsaio intracelular com amastigotas da linhagem Tulahuen LacZ. ^bA lipofilicidade experimental foi determinada pelo coeficiente de partição entre *n*-octanol/tampão em pH 7.4. ^cDepuração intrínseca *in vitro* calculada a partir dos ensaios utilizando microsomas hepáticos humano (HLM) e camundongo (MLM). ^dPermeabilidade determinada com uso de membranas artificiais pelo ensaio PAMPA em pH 6.5. ^eSolubilidade cinética medida em pH 2 e pH 7.4.

A partir disso, no composto **6a**, a remoção da cadeia alifática de dois carbonos levou a uma ligeira diminuição dos valores dos parâmetros Cl_{int} , assim como à redução da lipofilicidade, conforme o esperado. Entretanto, pode-se inferir que o impacto da diminuição da lipofilicidade no potencial inibitório foi mais pronunciado, dado que o IC_{50} *T. cruzi* aumentou de 2.4 μ M (**LOLA780**) para 4.8 μ M (**6a**).

Nos compostos **6b** e **6c** foram introduzidas pontes de um e dois carbonos na porção morfolina, respectivamente, com objetivo de verificar uma redução contraintuitiva da lipofilicidade (Tabela 15). De acordo com Degorce e colaboradores (2018), a introdução de um átomo de carbono em ponte pode levar ao aumento da rigidez conformacional. A estrutura resultante mais compacta leva à redução da área superficial total, tornando o oxigênio da morfolina mais exposto à solvatação em água. Dessa forma, quando particionada entre água e *n*-octanol, os derivados exibem maior preferência pela solvatação em água. Entretanto, de acordo com a hipótese dos autores, à medida em que a ponte aumenta em número de carbonos, as conformações tornam-se menos restritas e, portanto, este efeito é menos pronunciado. Observou-se que, de fato, o valor do parâmetro $eLogD_{7.4}$ dos compostos **6b** (0.9) é inferior ao composto **6c** (1.5) e mais pronunciado, considerando o valor do composto **6a** (1.0). Contudo, os valores do parâmetro Cl_{int} de camundongos, ainda que sejam inferiores ao valor do *hit* inicial **LOLA779** (46 μ L/min/mg), não seguem essa tendência. Isso sugere que, nesses casos, a depuração não foi inteiramente determinada pela lipofilicidade do composto.

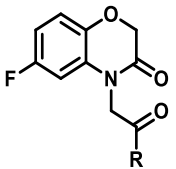
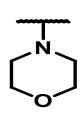
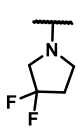
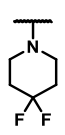
Tabela 15: Potencial inibitório *T. cruzi* e estabilidade metabólica *in vitro* para derivados morfolina com substituintes em pontes de um e dois carbonos

	 6a	 6b	 6c
IC_{50} <i>T. cruzi</i> (μ M)	4.8	2.8	7.9
$eLogD_{7.4}$	1.0	0.9	1.5
Cl_{int} camundongo (μ L/min/mg)	12.4	19.2	12

Em outra abordagem, buscou-se avaliar o impacto da alteração do tamanho do anel, utilizando derivados de pirrolidina (**6e**) e piperidina (**6f**) somado à adição de átomos de flúor, em relação ao composto **6a** com substituinte morfolina (Tabela 16), de acordo com exemplos descritos na revisão feita por Jean e Fotsch (2012). Observamos mudanças pouco significativas entre os análogos **6e** e **6f**. Em ambos os casos, houve um pequeno acréscimo no valor do

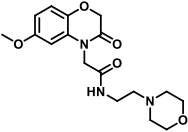
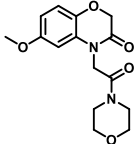
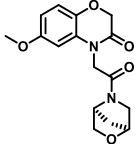
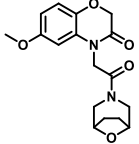
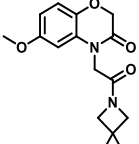
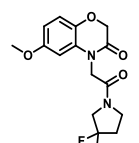
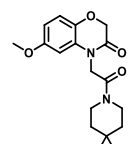
eLogD_{7.4} acompanhado de um ligeiro aumento da instabilidade metabólica que, não pôde ser compensado pelo potencial inibitório, já que nos dois casos houve perda da potência com valores de IC₅₀ superiores a 6 µM.

Tabela 16: Potencial inibitório *T. cruzi* e estabilidade metabólica *in vitro* para morfolina e heterociclos com alteração no tamanho do anel

	 6a	 6e	 6f
IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> (µM)	4.8	6.2	7.2
eLogD _{7.4}	1.0	1.7	2.0
Cl _{int} camundongo (µL/min/mg)	12.4	14	13.6

Nos compostos **7a-f** (Tabela 17), foi utilizado o mesmo padrão de substituição do lado direito, alternando o flúor do lado esquerdo pelo grupo metóxi (EDG) para avaliar o efeito eletrônico nas propriedades farmacocinéticas. O composto **LOLA781**, sintetizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisas, destacou-se pelo valor promissor de IC₅₀ (1.6 µM) frente ao *hit* **LOLA779** (0.9 µM), dentre as substituições feitas com grupos doadores de elétrons. No entanto, o composto apresentou limitações em relação à depuração. Por isso, foi retirada a cadeia alifática de dois carbonos destes análogos para remover as regiões labéis (estudos de MetID) para critério de comparação (pares combinados). A modificação feita nos compostos **7a-f** não apresentou mudanças significativas nas propriedades ADME dos compostos **6a-f** que possuíam um EWG no LE, com exceção do composto **7f** que se mostrou tão instável metabolicamente quanto o composto *hit* **LOLA779**.

Tabela 17: Resultados das propriedades ADME *in vitro* referentes aos análogos **7a-f**

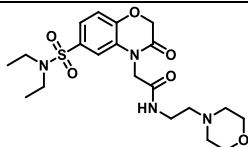
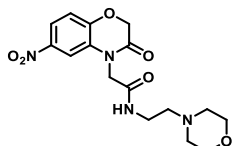
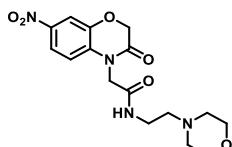
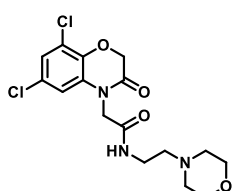
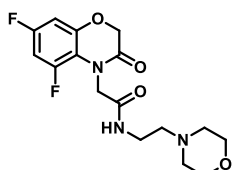
Composto	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ ^a (μ M)	eLogD _{7.4} ^b	Cl _{int} humano ^c (μ L/min/mg)	Cl _{int} camundongo ^c (μ L/min/mg)	Pe ^d ($\times 10^{-6}$ cm/s)	KS _{2.0} ^e (μ g/mL)	KS _{7.4} ^e (μ g/mL)
 LOLA781	1.1	1.6	< 12	30.4	5.5	18.4	18.1
 7a	55.4	1.2	< 12	14.8	14.3	23.1	24.9
 7b	36.7	1.2	< 12	12.8	5.6	23.6	25.8
 7c	36.9	1.6	< 12	18.0	9.9	25.0	27.1
 7d	54.8	1.7	< 12	17.6	13.1	26.5	28.0
 7e	14.3	1.9	18.0	14.0	17.2	27.3	29.6
 7f	22.0	2.1	18.0	41.2	13.4	22.1	23.6

^aEnsaio intracelular com amastigotas da linhagem Tulahuen LacZ. ^bA lipofilicidade experimental foi determinada pelo coeficiente de partição entre *n*-octanol/tampão em pH 7.4. ^cDepuração intrínseca *in vitro* calculada a partir dos ensaios utilizando microsomas hepáticos humano (HLM) e camundongo (MLM). ^dPermeabilidade determinada com uso de membranas artificiais pelo ensaio PAMPA em pH 6.5. ^eSolubilidade cinética medida em pH 2 e pH 7.4.

4.3.3 Avaliação do potencial inibitório contra *T. cruzi*

Os resultados dos ensaios para determinação do potencial inibitório contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi* da linhagem Tulahuen LacZ, foram descritos na Tabela 18 para os compostos **5a-b**, **d-e**. A introdução de grupos retiradores de densidade eletrônica como nitro, cloro e flúor levaram a perda da potência em relação ao *hit* inicial **LOLA779** (0.9 μ M). Os valores para o IC₅₀ são superiores a 17.2 μ M com exceção do composto **5d** (4.6 μ M). Observou-se também uma clara alteração da atividade antichagásica à medida em que a posição do grupo nitro foi alterada no núcleo benzoxazinona (**5a** e **5b**). Os compostos avaliados **5a-b**, **d-e** não apresentaram citotoxicidade significativa contra células de fibroblastos humanos (HFF-1).

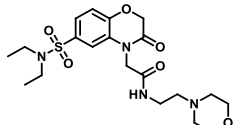
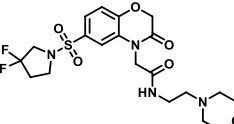
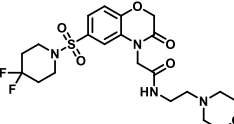
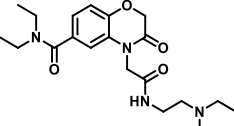
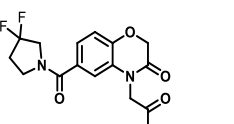
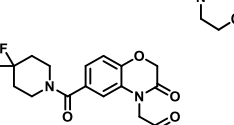
Tabela 18: Resultados do potencial inibitório contra *T. cruzi* dos análogos **5a-b**, **d-e**

Composto	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ ^a (μM)	HFF-1 CC ₅₀ ^b (μM)	IS ^c	
	LOLA779	0.9	> 64	> 72
	5a	24.6	> 64	> 2.6
	5b	17.2	> 64	> 3.7
	5d	4.6	> 64	> 13.9
	5e	32.1	> 64	> 2.0

^aEnsaio intracelular com amastigotas da linhagem Tulahuen LacZ. ^bEnsaio com fibroblastos humanos HFF-1 usados como células hospedeiras para o *T. cruzi*. ^cÍndice de seletividade representado pela razão entre citotoxicidade (CC₅₀) e potencial inibitório (IC₅₀).

As modificações feitas no LE incluíram a adição dos derivados fluorídricos piperidina e pirrolidina à sulfonamida (Tabela 19). Os resultados demonstram que a introdução dos heterocíclicos saturados no LE não é tolerada. A substituição pelo bioisótero amida (**8c-e**) também não se mostrou promissora, dado os valores de IC₅₀ superiores a 19.5 µM.

Tabela 19: Resultados do potencial inibitório contra *T. cruzi* dos análogos **8a-e**

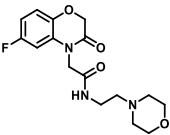
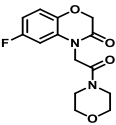
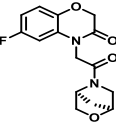
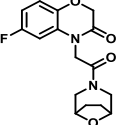
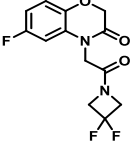
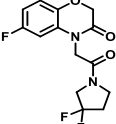
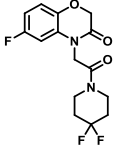
Composto	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ ^a (µM)	HFF-1 CC ₅₀ ^b (µM)	HepG2 CC ₅₀ ^c (µM)	IS ^d
	LOLA779	0.9	> 64	> 72
	8a	28.9	49.2	1.7
	8b	13.0	40.9	> 64
	8c	46.0	> 64	38.2
	8d	19.5	> 64	59.3
	8e	20.6	> 64	> 3.1

^aEnsaio intracelular com amastigotas da linhagem Tulahuen LacZ. ^bEnsaio com fibroblastos humanos HFF-1 usados como células hospedeiras para o *T. cruzi*. ^cEnsaio de citotoxicidade utilizando a linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2). ^dÍndice de seletividade representado pela razão entre citotoxicidade (CC₅₀) e potencial inibitório (IC₅₀).

Os análogos **6a-f** com flúor do LE obtiveram ligeira redução do potencial inibitório contra *T. cruzi* em relação ao composto *hit* inicial **LOLA779**, com valores de IC₅₀ moderados (Tabela 20). As modificações sugerem que o flúor no LE é um substituinte importante para a manutenção da atividade antichagásica, pois para diferentes heterocíclicos substituídos no LD, os valores de IC₅₀ dos análogos **6a-f** se mantiveram entre 2.8 µM e 7.9 µM, acompanhados de

maior estabilidade metabólica em relação à sulfonamida na posição 6 (**LOLA779**). O substituinte morfolina pode ser importante para a manutenção da atividade antichagásica, enquanto a remoção da cadeia alifática não proporcionou um aumento significativo nos valores do IC₅₀. Além disso, a maior rigidez conformacional imposta pelo incremento de carbonos com hibridização sp³ em ponte à estrutura do composto **6b**, possivelmente favorece a ancoragem nos sítios ativos, tendo em vista atividade promissora do análogo (2.8 µM). Os compostos avaliados **6a-f** também não apresentaram citotoxicidade significativa contra fibroblastos humanos (HFF-1) ou carcinoma hepático humano (HepG2).

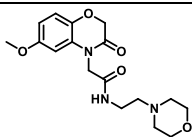
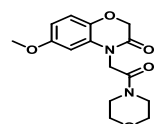
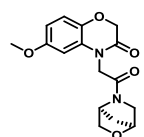
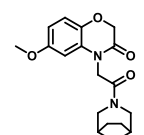
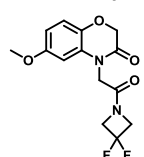
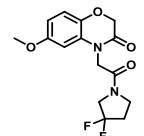
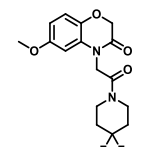
Tabela 20: Resultados do potencial inibitório contra *T. cruzi* dos análogos **6a-f**

Composto	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ ^a (µM)	HFF-1 CC ₅₀ ^b (µM)	HepG2 CC ₅₀ ^c (µM)	IS ^d
 LOLA780	2.1	> 64	> 64	> 30.5
 6a	4.8	> 64	> 64	> 12.9
 6b	2.8	> 64	> 64	> 22.6
 6c	7.9	> 64	> 64	> 8.1
 6d	4.8	> 64	> 64	> 13.2
 6e	6.2	> 64	> 64	> 10.3
 6f	7.2	> 64	> 64	> 8.9

^aEnsaio intracelular com amastigotas da linhagem Tulahuen LacZ. ^bEnsaio com fibroblastos humanos HFF-1 usados como células hospedeiras para o *T. cruzi*. ^cEnsaio de citotoxicidade utilizando a linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2). ^dÍndice de seletividade representado pela razão entre citotoxicidade (CC₅₀) e potencial inibitório (IC₅₀).

Como alternativa ao substituinte flúor, foi adicionado o grupo metóxi na posição 6 do núcleo benzoxazinona considerando o mesmo padrão de substituição no LD para os análogos **7a-f** (Tabela 21). A presença de um grupo doador de densidade eletrônica no LE reduziu significativamente o potencial inibitório contra *T. cruzi*, levando a compostos com valores de IC₅₀ superiores a 14.3 µM. Os análogos **7a-f** não apresentaram citotoxicidade no ensaio celular.

Tabela 21: Resultados do potencial inibitório contra *T. cruzi* dos análogos **7a-f**

Composto	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ ^a (μM)	HFF-1 CC ₅₀ ^b (μM)	HepG2 CC ₅₀ ^c (μM)	IS ^d	
	LOLA781	1.1	> 64	> 64	> 58.2
	7a	55.4	> 64	> 64	> 1.2
	7b	36.7	> 64	> 64	> 1.7
	7c	36.9	> 64	> 64	> 1.7
	7d	54.8	> 64	> 64	> 1.2
	7e	14.3	> 64	> 64	> 4.5
	7f	22.0	54.1	> 64	2.4

^aEnsaio intracelular com amastigotas da linhagem Tulahuen LacZ. ^bEnsaio com fibroblastos humanos HFF-1 usados como células hospedeiras para o *T. cruzi*. ^cEnsaio de citotoxicidade utilizando a linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2). ^dÍndice de seletividade representado pela razão entre citotoxicidade (CC₅₀) e potencial inibitório (IC₅₀).

4.3.4 Eficiência Lipofílica do Ligante

A eficiência lipofílica do ligante (sigla em inglês, LLE) é calculada como a diferença entre pIC_{50} ($-\log(IC_{50})$) e $eLogD_{7.4}$, cuja representação gráfica pode ser verificada no plano cartesiano pela reta que intercepta o eixo das ordenadas (JOHNSON; GALLEGOS; EDWARDS, 2018). As curvas LLE foram representadas na Figura 9, os compostos com metabolismo inferior a 25 $\mu L/min/mg$ (em verde), entre 25 e 100 $\mu L/min/mg$ (em amarelo) e superior a 100 $\mu L/min/mg$ (em vermelho).

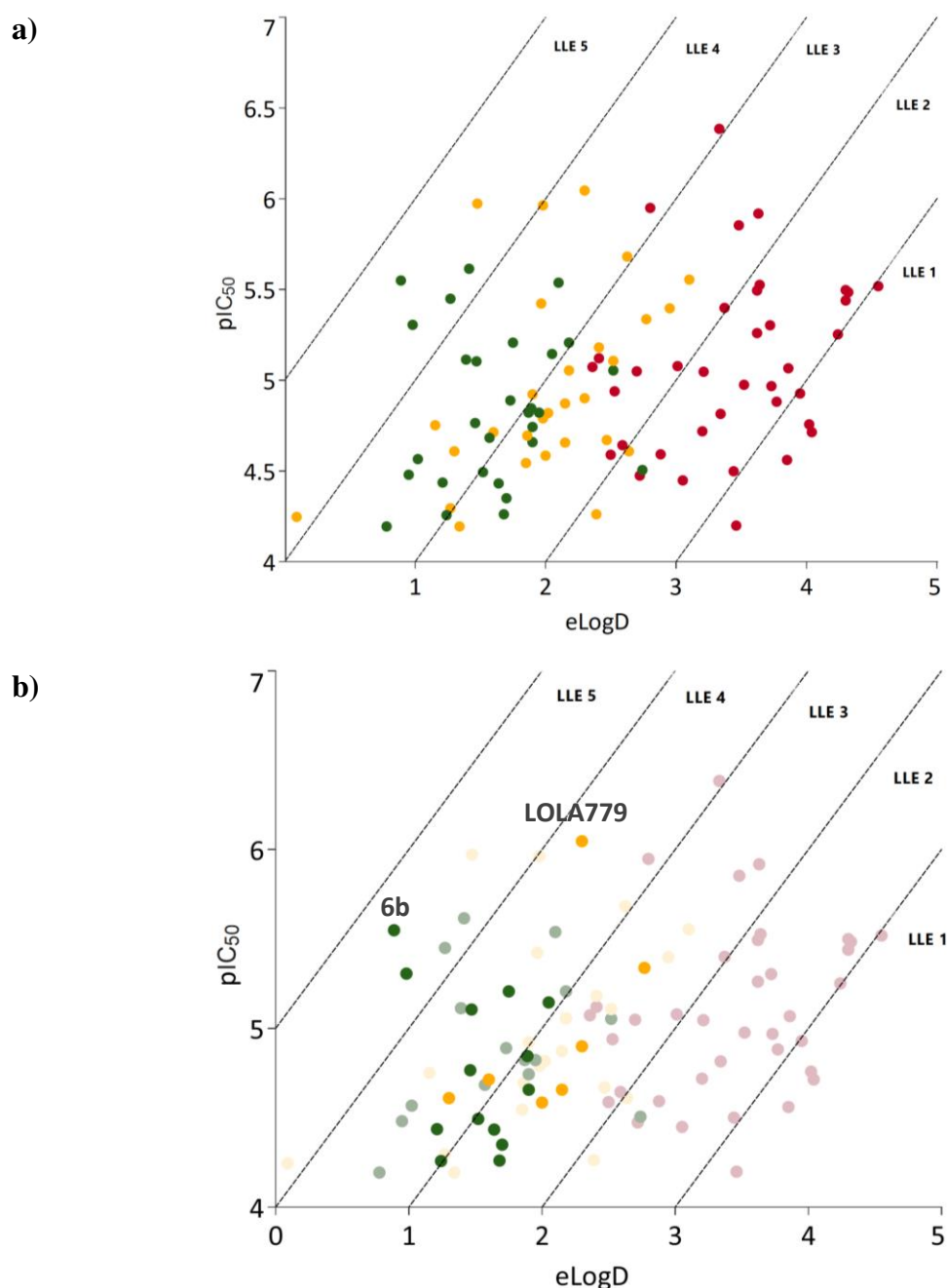


Figura 9: Gráfico da eficiência lipofílica do ligante para (a) os análogos da série benzoxazinona sintetizados com destaque para (b) os derivados preparados ao longo do projeto

Esse parâmetro determina a promiscuidade do ligante, ou seja, descreve o quão seletivo é o ligante em relação a outras proteínas homólogas (JOHNSON; GALLEGOS; EDWARDS, 2018). A análise do LLE permite normalizar a potência observada com as variações das unidades de lipofilicidade. Em outras palavras, uma determinada alteração que contribua para aumentar a potência pode ser ilusória, se também aumentar a lipofilicidade do composto. Já que o aumento da lipofilicidade favorece interações hidrofóbicas do ligante com qualquer alvo não aquoso (FREEMAN-COOK; HOFFMAN; JOHNSON, 2013). À vista disso, o aumento do LLE representa uma otimização, a qual leva em consideração também propriedades polares do ligante para além do efeito hidrofóbico. Essas propriedades polares podem favorecer as interações eletrostáticas entre a proteína-alvo e o ligante (FREEMAN-COOK; HOFFMAN; JOHNSON, 2013). Em relação às curvas do LLE, o primeiro quadrante é a região do gráfico que melhor ilustra esta otimização (Figura 9). Nesta região, há curvas do LLE superiores a 5, representando valores de pIC_{50} elevados dentro de uma faixa adequada de $eLogD_{7.4}$.

Dessa forma, quando a redução da lipofilicidade é alcançada sem a perda significativa da potência, pode-se sugerir que há uma área no sítio de ligação em que a polaridade é tolerada ou mesmo benéfica (RYCKMANS *et al.*, 2009). Essa tendência foi observada no análogo **6b** (2.8 μM), em que a redução do $eLogD_{7.4}$ em cerca de 1.4 unidades não refletiu em uma perda significativa da potência em relação ao **LOLA779** (0.9 μM). As estratégias de modificação utilizadas no planejamento do análogo **6b** incluíram a introdução de grupos EWG e o incremento de carbonos com hibridização sp^3 em ponte, como discutidas no decorrer do tópico 4.3.2, que contribuíram para o aumento da polaridade nos lados esquerdo e direito, respectivamente.

De forma geral, os análogos preparados mostram uma tendência geral de redução da lipofilicidade, faixa inferior a 2.5 (Figura 9b). Foram obtidos valores de LLE moderados, entre 3 e 4, sendo os análogos sintetizados ligeiramente mais seletivos que a maior parte dos derivados bezoxazinona sintetizados anteriormente. Essa redução do $eLogD_{7.4}$, porém, resultou em uma pequena variação do LLE para uma ampla variação do valor do pIC_{50} . Ainda assim, ressalta-se que a otimização multiparamétrica proporcionou compostos com melhor depuração metabólica e solubilidade moderada dentro de uma ampla faixa de lipofilicidade.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A expansão da campanha *hit-to-lead* avançou com a síntese de novos análogos benzoxazinona como parte da campanha inicial para identificação de uma candidato pré-clínico contra a Doença de Chagas, em colaboração com o projeto LOLA. Após ciclos de otimização, foram planejados e sintetizados 21 análogos da série ChemDiv_22 com modificações nos lados esquerdo e direito do *hit* **LOLA779** no decorrer deste trabalho (Figura 10), somando aos mais de 90 derivados benzoxazinona, sintetizados previamente.

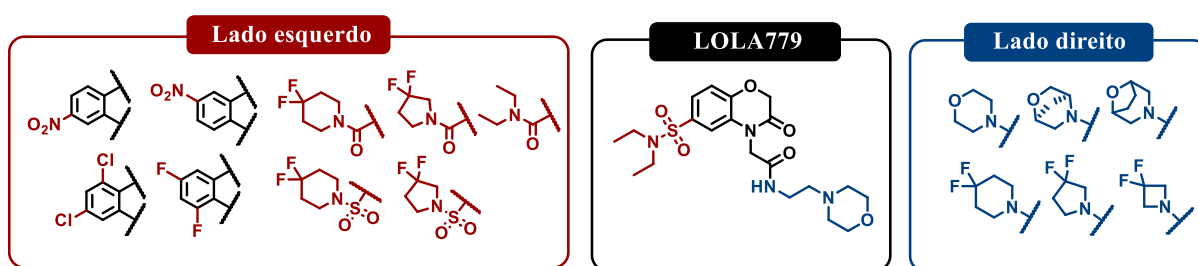


Figura 10: Modificações estruturais realizadas nos lados esquerdo e direito do composto *hit* **LOLA779**

Os análogos foram planejados a partir de estratégias clássicas e modernas de modificação estrutural visando a mitigação do metabolismo, dentre as quais se destacam o bloqueio das regiões lábeis com a introdução de grupos EWG, bioisosterismo e acréscimo de carbonos sp^3 em ponte, ambos orientados pela lipofilicidade. De forma geral, as modificações sugeridas contribuíram para a redução da depuração intrínseca microsossomal em camundongos, em relação ao composto *hit* inicial **LOLA779**, conforme o esperado. A solubilidade aquosa e a permeabilidade permaneceram adequadas. As modificações propostas levaram à diminuição do potencial inibitório contra *T. cruzi*, com valores de IC_{50} superiores a $13\ \mu M$ na maior parte dos casos. As exceções foram os análogos **6a-f** com valores de IC_{50} moderados e melhor equilíbrio das propriedades ADME. Em suma, a lipofilicidade dos compostos obteve ligeira redução quando comparada ao *hit* inicial **LOLA779**, mas os valores de LLE foram iguais ou superiores a 3, com compostos ligeiramente mais seletivos em relação à tendência desta série.

Os resultados obtidos fornecem contribuições sobre a utilização de *building blocks* em diferentes estratégias de modificação estrutural para controle da depuração metabólica da série de análogos benzoxazinona. Ao longo dos ciclos de otimização mutiparamétrica, foi possível propor um estudo de relação estrutura-propriedade que pode ser aplicado a outros projetos de descoberta de novos medicamentos em fases iniciais, somando esforços para enfrentar a Doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- BANO, Mohsina *et al.* Identification of 3-hydroxy-4[3,4-dihydro-3-oxo-2H-1,4- benzoxazin-4-yl]-2,2-dimethyldihydro-2H-benzopyran derivatives as potassium channel activators and anti-inflammatory agentes. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, p. 3008–3020, 2015.
- BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BARRETT, Michael P. *et al.* Protozoan persister-like cells and drug treatment failure. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 607-620, 2019.
- BOSTRÖM, Jonas *et al.* Expanding the medicinal chemistry synthetic toolbox. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 17, p. 709-727, 2018.
- BROWN, Dean G.; BOSTRÖM, Jonas. Analysis of Past and Present Synthetic Methodologies on Medicinal Chemistry: Where Have All the New Reactions Gone? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 4443-4458, 2016.
- CALIENDO, Giuseppe *et al.* Synthesis and Vasorelaxant Activity of New 1,4-benzoxazine Derivatives Potassium Channel Openers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2663–2669, 2002.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENNTION (CDC). **American Trypanosomiasis**. USA: 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov>. Acesso em: 17 jan. 2024.
- DEGORCE, Sébastien L. *et al.* Lowering Lipophilicity by Adding Carbon: One-Carbon Bridges of Morpholines and Piperazines. **Journal of Medicinal Chemistry**, United Kingdom, v. 61, p. 8934-8943, 2018.
- DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INICIATIVE (DNDi). **Otimização de compostos líderes**. [s.l.]: 2023. Disponível em: <https://dndial.org/reportagens/2014/otimizacao-de-compostos-lideres/>. Acesso em: 19 set. 2023.
- DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INICIATIVE (DNDi). **Otimização de compostos líderes**. [s.l.]: 2013. Disponível em: <https://dndi.org/news/2013/first-early-stage-research-latin-america/>. Acesso em: 17 jan. 2024.
- FRANCISCO, Amanda F. *et al.* Challenges in Chagas Disease Drug Development. **Molecules**, v. 12, p. 1-14, 2020.
- FREEMAN-COOK, K. D.; HOFFMAN, R. L.; JOHNSON, T. W. Lipophilic efficiency: the most important efficiency metric in medicinal chemistry. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 113– 115, 2013.
- GABALDÓN-FIGUEIRA, Juan Carlos *et al.* State-of-the-Art in the Drug Discovery Pathway for Chagas Disease: A Framework for Drug Development and Target Validation. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 14, p. 1-19, 2023.
- GILLIS, Eric P. *et al.* Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 8315 – 8359, 2015.
- JEAN, David J. St.; FOTSCH, Christopher. Mitigating Heterocycle Metabolism in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 6002–6020, 2012.

JOHNSON, Ted W.; GALLEGOS, Rebecca A.; EDWARDS, Martin P. Lipophilic Efficiency as an Important Metric in Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, p. 6401–6420, 2018.

KONDA, Saidulu *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of novel benzoxazine sulfonamide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 1643–1646, 2015.

KRATZ, Jadel M. *et al.* Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, p. 943–957, 2018.

KRATZ, Jadel M. *et al.* The translational challenge in Chagas disease drug development. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. 1–11, 2022.

LOTESTA, Stephen D. *et al.* Identification of spirooxindole and dibenzoxazepine motifs as potent mineralocorticoid receptor antagonists, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 1384–1391, 2016.

MARTINS-MELO, Francisco Rogerlândio *et al.* Burden of Chagas disease in Brazil, 1990–2016: findings from the Global Burden of Disease Study 2016. **International Journal for Parasitology**, Brazil, v. 49, p. 301–310, 2019.

MEYMAND, Sheba *et al.* Treatment of Chagas Disease in the United States. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 10, p. 373–388, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Doença de Chagas**. Brasil: 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas>. Acesso em: 17 jan. 2024.

MODRANKA, Jakub *et al.* Synthesis and Structure–Activity Relationship Studies of Benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-one Analogues as Inhibitors of Mycobacterial Thymidylate Synthase X. **ChemMedChem**, v. 14, p. 645 – 662, 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Menos de 10% das pessoas com Chagas recebem um diagnóstico**. Brasília: 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2023-menos-10-das-pessoas-com-chagas-recebem-um-diagnostico>. Acesso em: 06 set. 2023.

PÉREZ-MOLINA, José A.; MOLINA, Israel. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, p. 82–94, 2018.

RESENDE JÚNIOR, Celso de Oliveira *et al.* Hit-to-lead optimization of a 2-aminobenzimidazole series as new candidates for Chagas Disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1–10, 2023.

RILEY, Jennifer *et al.* Development of a Fluorescence-based Trypanosoma cruzi CYP51 Inhibition Assay for Effective Compound Triaging in Drug Discovery Programmes for Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 22, p. 1–12, 2015.

RYCKER, Manu De *et al.* Anti-trypanosomatid drug discovery: progress and challenges. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, p. 35–50, 2023.

RYCKMANS, Thomas *et al.* Rapid assessment of a novel series of selective CB2 agonists using parallel synthesis protocols: A lipophilic efficiency (LipE) analysis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 4406–4409, 2009.

SPINKS, Daniel *et al.* Development of Small-Molecule Trypanosoma brucei N-Myristoyltransferase Inhibitors: Discovery and Optimisation of a Novel Binding Mode. **ChemMedChem**, v. 10, p. 1821 – 1836, 2015.

STEPAN, Antonia F. *et al.* Metabolism-guided drug discovery. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 4, p. 631–652, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals**. Geneva: WHO, 2023.

Apêndice A – Parte experimental

Métodos gerais

Todos os solventes e reagentes comerciais foram utilizados sem tratamento prévio. O progresso das reações foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de alumínio pré-revestidas com sílica gel 60 F₂₅₄ 0,25 mm em diferentes sistemas de eluição, sendo analisadas sob lâmpada UV (250 nm). A evaporação dos solventes foi feita sob pressão reduzida em rotaevaporadores Buchi com banho de aquecimento B-300. Os compostos finais foram purificados por cromatografia em coluna *flash* (sílica gel 60, 200 – 400 mesh).

Ponto de Fusão

Os pontos de fusão (PF) foram determinados com uso do aparelho Buchi M – 565 com tubos capilares 75 x 1,0 x 1,5 mm e os valores obtidos não foram corrigidos.

Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio (¹H) e de carbono (¹³C) foram obtidos nos aparelhos Bruker DPX 250, Bruker Avance 400, Varian Inova 500 e Bruker Avance 600 localizados no Laboratório Institucional de Ressonância Magnética Nuclear (LIRMN), coordenado pelo técnico Anderson Santos. Utilizou-se o *software* MestReNova para a visualização dos espectros. Os deslocamentos químicos (δ) foram dados em parte por milhão (ppm) com uso dos resíduos de solventes não deuterados como padrão interno. As abreviações das multiplicidades nos espectros de RMN foram padronizadas como singlete (s), duplete (d), duplo dupletos (dd), duplo duplo duplete (ddd), tripleto de dupletos (td), tripleto (t), aparente tripleto (apt), duplo tripleto (dt), quarteto (q), hepteto (hept), multiplete (m) e sinal largo (sl). As constantes de acoplamento (*J*) foram expressas em hertz (Hz).

Rotação Óptica

A determinação da rotação óptica ($[\alpha]_D^{20}$) foi feita com uso do Polarímetro Perkin Elmer modelo 341 equipado com lâmpada de sódio, linha espectral 589 nm. O equipamento possui resolução de 0,0010° e foi utilizado tubo polarimétrico com caminho óptico de 10 mm. Os compostos quirais foram preparados em amostras de 10 mg/mL com uso de metanol como solvente. As análises foram realizadas à temperatura ambiente, no Laboratório Institucional de Espectrometria (LISPEC) supervisionado pela técnica Cláudia Martelli.

Infravermelho

As análises de espectroscopia na região do infravermelho (IV) foram feitas com uso do espectrofotômetro modelo *Spectrum Two* da marca Perkin Elmer. Os compostos orgânicos foram avaliados em uma faixa de 500 a 4000 cm^{-1} , sendo que foram utilizadas 10 varreduras para a aquisição dos espectros que foram tratados com uso do *software* Origin 8.1.

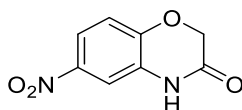
Espectrometria de Massas de Alta Resolução

As análises de espectrometria de massas de alta resolução (sigla em inglês, HRMS) foram feitas no Laboratório Institucional de Espectrometria de Massas e Cromatografia (LIEM), supervisionado pelo técnico Diego Campaci. Foi empregado o analisador Orbi-trap Thermo Q-Exactive, sem coluna, com inserção direta das amostras e uso do Eletrospray (ESI+) como modo de ionização. A tensão do cone foi ajustada em 3,5 kV, utilizando uma vazão de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ de metanol e água (1:1) na maior parte dos experimentos. Os compostos foram avaliados em uma faixa de 50 a 750 m/z ou de 80 a 1200 m/z , ambos com resolução de 70×10^3 .

Síntese Orgânica

Os métodos experimentais seguintes descrevem os procedimentos gerais para a síntese de cada um dos compostos apresentados ao longo do trabalho.

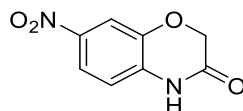
6-nitro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (2a)



A uma mistura do composto comercial 2-amino-4-nitrofenol (**1a**) (2,00 g, 13,00 mmol) e Na_2CO_3 (2,81 g, 26,5 mmol) foi adicionado THF (40,00 mL). A solução foi agitada a 0 °C e brometo de bromoacetila (2,40 mL, 27,5 mmol) foi adicionado. Após 4 horas à temperatura ambiente, K_2CO_3 (3,60 g, 26,1 mmol) foi adicionado e a mistura foi aquecida a 60 °C com agitação *overnight*. O acompanhamento da reação foi feito por CCD utilizando uma mistura de 1% de metanol em diclorometano (DCM) como eluente. O precipitado formado foi removido por filtração com acetato de etila e o filtrado foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo sólido foi lavado com água e filtrado à vácuo para fornecer um sólido amarelo pálido (PF 230,5 °C - 232 °C; 1,52 g, 56%). **IV** ν 3049, 2962, 1708 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.06 (sl, 1H), 7.83 (dd, J = 8.9, 2.7 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 8.9 Hz, 1H),

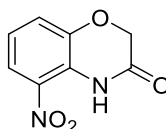
4.77 (s, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 163.8, 148.7, 141.8, 127.7, 119.1, 116.5, 110.8, 66.8.

7-nitro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (2b)



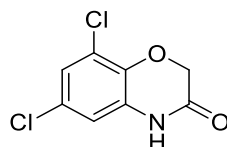
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **2a**, o composto **2b** foi preparado a partir do produto comercial 2-amino-5-nitrofenol (**1b**) (2,92 g, 18,9 mmol) para fornecer um sólido levemente marrom (**PF** 126,5 °C – 129,0 °C; 3,19 g, 87%). **IV** ν 3048, 1697 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.31 (sl, 1H), 7.89 (dd, J = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 4.72 (s, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.7, 142.9, 142.3, 133.9, 118.7, 115.6, 111.5, 66.6.

5-nitro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (2c)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **2a**, o composto **2c** foi preparado a partir do produto comercial 2-amino-3-nitrofenol (**1c**) (4,67 g, 30,3 mmol) para fornecer um sólido avermelhado (**PF** 117,0 °C – 118,0 °C; 4,92 g, 84%). **IV** ν 3273, 3098, 2942, 1717 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.36 (sl, 1H), 7.77 (dd, J = 8.5, 1.3 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 8.0, 1.3 Hz, 1H), 7.15 (apt, J = 8.3 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 164.6, 145.2, 135.4, 123.6, 122.6, 122.3, 118.8, 66.6.

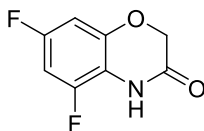
6,8-dicloro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (2d)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **2a**, o composto **2d** foi preparado a partir do produto comercial 6-amino-4,6-diclorofenol (**1d**) (1,00 g, 5,62 mmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando um gradiente de 2 a 10% de acetato de etila em DCM para fornecer um sólido marrom (**PF** 263,2 °C – 264,7 °C; 544 mg, 44%). **IV** ν 3189, 3039, 2920, 1693, 1035 cm^{-1} . **RMN** ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.98 (s, 1H), 7.19 (d, J = 2.4

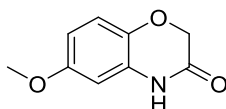
Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.72 (s, 2H). **RMN** ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 164.3, 138.5, 129.7, 125.7, 122.4, 121.1, 114.1, 67.0.

5,7-difluoro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (2e)



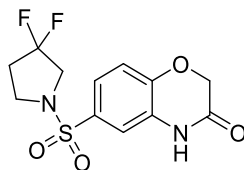
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **2a**, o composto **2e** foi preparado a partir do produto comercial 2-amino-3,5-difluorofenol (**1e**) (1,00 g, 6,89 mmol) para fornecer um sólido amarelo (**PF** 211,7 °C – 212,4 °C; 1,02 g, 80%). **IV** ν 3171, 3085, 2967, 1693, 1128 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.90 (sl, 1H), 6.95 (ddd, $J = 10.8, 9.3, 2.7$ Hz, 1H), 6.81 (dt, $J = 9.6, 2.2$ Hz, 1H), 4.64 (s, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 163.8, 156.8 (dd, $J = 240.0, 14.2$ Hz), 149.3 (dd, $J = 245.1, 15.4$ Hz), 145.4 (dd, $J = 14.7, 7.1$ Hz), 113.2 (dd, $J = 15.6, 4.0$ Hz), 100.4 (dd, $J = 26.3, 3.3$ Hz), 97.8 (dd, $J = 27.6, 23.1$ Hz), 67.0.

6-metóxi-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (2g)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **2a**, o composto **2g** foi preparado a partir do produto comercial 2-amino-4-metoxifenol (**1g**) (1,00 g, 7,19 mmol). A purificação foi feita em coluna cromatográfica *flash* utilizando um gradiente de 0 a 5% de acetato de etila em DCM para fornecer um sólido levemente rosa (**PF** 164,4 °C – 165,7 °C; 921 mg, 72%). **IV** ν 3193, 3098, 2924, 1695 cm^{-1} . **RMN** ^1H (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.61 (sl, 1H), 6.88 – 6.84 (m, 1H), 6.46 – 6.50 (m, 2H), 4.48 (s, 2H), 3.68 (s, 3H). **RMN** ^{13}C (63 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 165.3, 154.6, 137.2, 128.1, 116.5, 107.5, 101.8, 66.9, 55.4.

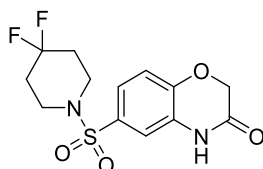
6-((3,3-difluoropirrolidin-1-il)sulfonil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (2h)



Foi adicionado a amina comercial 3,3-difluoro-pirrolidina (498 mg, 4,65 mmol) e trietilamina (1,75 mL, 12,4 mmol) à solução de cloreto de 3-oxo-4H-1,4-benzoxazina-6-sulfonila (800 mg, 3,10 mmol) em DCM (28,8 mL). A reação foi agitada sob atmosfera de argônio à temperatura

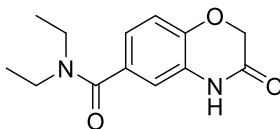
ambiente por 1 hora e 30 minutos. O monitoramento da reação foi feito via CCD utilizando uma mistura de 10% de acetato de etila em DCM como eluente. A mistura reacional foi diluída e extraída com solução aquosa saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Obteve-se um sólido com aspecto amarelado (**PF** 193,9 °C – 194,7 °C; 946 mg, 96%). **IV** ν 3046, 2953, 1698, 1160 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, Acetona) δ 9.94 (sl, 1H), 7.50 – 7.44 (m, 2H), 7.17 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.73 (s, 2H), 3.55 (t, J = 12.9 Hz, 2H), 3.43 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.43 – 2.31 (m, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, Acetona) δ 164.7, 148.4, 130.3, 128.9, 128.6 (t, J = 248.7 Hz) 124.2, 117.8, 116.2, 67.8, 55.0 (t, J = 32.5 Hz), 46.7 (t, J = 3.4 Hz), 34.9 (t, J = 24.4 Hz).

6-((4,4-difluoropiperidin-1-yl)sulfonil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (2i)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **2h**, o composto **2i** foi preparado a partir do produto comercial 3-oxo-4H-1,4-benzoxazina-6-sulfonila (1,00 g, 3,88 mmol). Obteve-se um sólido amarelado (**PF** 231,6 °C – 232,2 °C, 1,29 g, 100%). **IV** ν 3049, 2939, 1698, 1162 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.91 (s, 1H), 7.32 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.72 (s, 2H), 3.08 – 3.02 (m, 4H), 2.11 – 2.04 (m, 4H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 164.1, 147.0, 128.7, 127.9, 122.8, 121.8 (t, J = 241.2 Hz), 116.9, 114.7, 66.7, 43.3 (t, J = 5.7 Hz), 32.7 (t, J = 23.6 Hz).

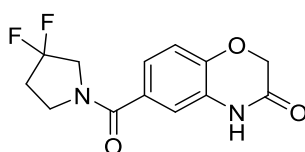
N,N-dietil-3-oxo-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oxazina-6-carboxamida (2j)



O composto comercial ácido 3-oxo-4H-1,4-benzoxazinona-6-carboxílico (1,00 g, 5,18 mmol) foi dissolvido em DCM (60,5 mL) e adicionou-se HOBt (860 mg, 6,37 mmol) e EDC (1,21 g, 6,32 mmol) à solução. A mistura turva foi agitada durante 1 hora à temperatura ambiente, quando dietilamina foi adicionada (4,79 mg, 5,18 mmol). A mistura foi agitada à temperatura ambiente *overnight*. O DCM foi removido sob pressão reduzida. Em seguida, a mistura resultante foi diluída em água (15 mL), basificada (pH entre 8 e 10) com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com

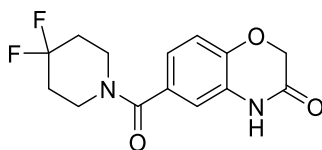
MgSO₄, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida. A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura com gradiente de 2 a 5% metanol em DCM. Obteve-se um sólido esbranquiçado (**PF** 147,2 °C – 148,1 °C; 1,05 mg, 82%). **IV** ν 3092, 2977, 1689, 1378 cm⁻¹. **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 9.55 (s, 1H), 7.03 (sl, 1H), 6.90 - 6.96 (m, 2H), 4.58 (s, 2H), 3.53 (sl, 2H), 3.30 (sl, 2H), 1.21 - 1.15 (sl, 6H). **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 170.7, 165.3, 144.5, 131.4, 126.9, 121.9, 116.3, 115.5, 67.3, 43.6, 39.7, 14.4, 13.0.

6-(3,3-difluoropirrolidina-1-carbonil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (2k)



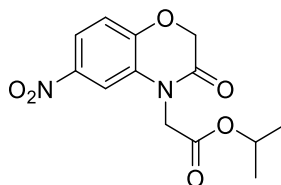
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **2h**, o composto **2i** foi preparado a partir do produto comercial ácido 3-oxo-4H-1,4-benzoxazinona-6-carboxílico (800 mg, 4,14 mmol). Obteve-se um sólido levemente rosa (**PF** 166,0 °C – 167,3 °C, 1,04 g, 89%). **IV** ν 3209, 2958, 1697, 1113 cm⁻¹. **RMN** ¹H (500 MHz, Acetona) δ 9.75 (s, 1H), 7.25 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.21 (dd, J = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.92 (t, J = 12.7 Hz, 2H), 3.85 – 3.75 (m, 2H), 2.53 – 2.42 (m, 2H). **RMN** ¹³C (126 MHz, Acetona) descrição de todos os sinais de carbono visíveis δ 169.0, 165.1, 165.0, 146.2, 128.5 (t, J = 244.4 Hz), 128.3, 128.2, 123.7, 116.8, 116.5, 116.5, 67.9.

6-(4,4-difluoropiperidina-1-carbonil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (2l)



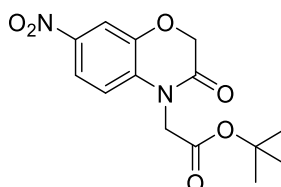
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **2h**, o composto **2i** foi preparado a partir do produto comercial ácido 3-oxo-4H-1,4-benzoxazinona-6-carboxílico (800 mg, 4,14 mmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura com gradiente de 2 a 5% metanol em DCM. Obteve-se um sólido branco higroscópico (**PF** 211,0 °C – 212,3 °C, 923 mg, 75%). **IV** ν 3165, 3068, 2976, 1680, 1090 cm⁻¹. **RMN** ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.81 (sl, 1H), 7.03 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 7.00 – 6.97 (m, 2H), 4.63 (s, 2H), 3.57 (sl, 4H), 2.08 – 1.96 (m, 4H). **RMN** ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1686.6, 164.6, 144.3, 129.4, 127.2, 128.8 (t, J = 241.3 Hz), 122.1, 115.8, 115.0, 66.7, 33.3 (t, J = 17.9 Hz).

Acetato de isopropil 2-(6-nitro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3a)



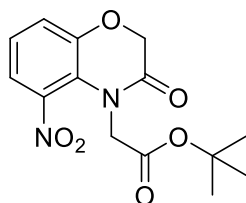
A uma mistura do composto (**2a**) (1,50 g, 7,73 mmol) e K_2CO_3 (1,07 g, 7,73 mmol) foi adicionado DMF (8,39 mL). A solução foi agitada à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, o haleto de alquila (2,00 mL, 15,5 mmol) foi adicionado e a mistura foi agitada à temperatura ambiente *overnight* e à 100°C durante 2 horas. O acompanhamento da reação foi feito por CCD utilizando DCM como eluente. Após a concentração da mistura sob pressão reduzida, o solvente residual foi extraído com acetato de etila e solução aquosa saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com $MgSO_4$, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida. Após recristalização em éter etílico, foi obtido um sólido branco (**PF** 97,3 °C – 98,0 °C; 2,03 g, 83%). **IV** ν 3100, 2986, 1738, 1692 cm^{-1} . **RMN** 1H (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.96 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 5.13 (hept, J = 6.3 Hz, 1H), 4.81 (s, 2H), 4.69 (s, 2H), 1.31 (d, J = 6.3 Hz, 6H). **RMN** ^{13}C (101 MHz, $DMSO-d_6$) δ 167.2, 163.7, 150.1, 142.4, 128.9, 120.0, 117.3, 110.8, 69.1, 66.9, 42.8, 21.4.

Acetato de terc-butil 2-(7-nitro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3b)



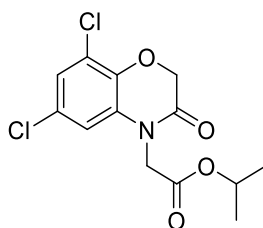
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **3a**, o composto **3b** foi preparado a partir do intermediário (**2b**) (200 mg, 1,03 mmol). A reação foi deixada sob agitação à temperatura ambiente *overnight* e acompanhada por CCD, com uso de uma mistura de 5% acetato de etila em DCM. Obteve-se um sólido amarelo pálido (**PF** 117,2 °C – 118,6 °C; 314 mg, 90%). **IV** ν 3062, 2981, 1742, 1699 cm^{-1} . **RMN** 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.94 (dd, J = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.61 (s, 2H), 1.47 (s, 9H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) δ 166.1, 164.2, 144.9, 143.8, 134.4, 118.9, 114.3, 113.1, 83.6, 67.3, 43.8, 28.1.

Acetato de terc-butil 2-(5-nitro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3c)



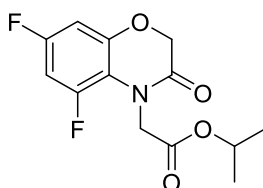
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **3a**, o composto **3c** foi preparado a partir do intermediário (**2c**) (500 mg, 2,58 mmol). A purificação feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura de 20 % acetato de etila em hexano para fornecer um óleo viscoso amarelo (662 mg, 83%). **IV** ν 3099, 2976, 1741, 1702 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.72 (dd, $J = 8.3, 1.4$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 8.1, 1.4$ Hz, 1H), 7.31 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.82 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 1.31 (s, 9H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, DMSO) δ 165.9, 165.6, 149.6, 139.8, 124.8, 124.6, 121.8, 119.9, 81.7, 68.0, 47.6, 27.4.

Acetato de isopropil 2-(6,8-dicloro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3d)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **3a**, o composto **3d** foi preparado a partir do intermediário (**2d**) (550 mg, 2,52 mmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando DCM como fase móvel. Foi obtido um sólido levemente marrom (**PF** 119,7 °C - 121,3 °C, 600 mg, 75%). **IV** ν 3080, 2991, 1744, 1687 cm^{-1} . **RMN** ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ 7.11 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 5.11 (hept, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 1.28 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 166.8, 164.1, 140.2, 130.7, 127.9, 124.6, 123.4, 113.5, 70.3, 67.7, 43.5, 21.8.

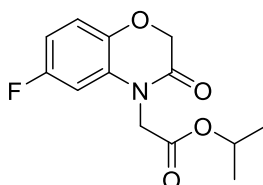
Acetato de isopropil 2-(5,7-difluoro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3e)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **3a**, o composto **3e** foi preparado a partir do intermediário (**2e**) (950 mg, 5,13 mmol). A reação foi processada à 100 °C *overnight*

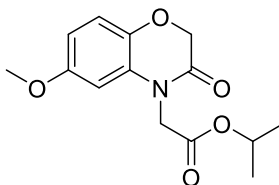
e a purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando um gradiente de 0 a 4% de acetato de etila em DCM, proporcionando um óleo viscoso vermelho (1,11 g, 76%). **IV** ν 3083, 2985, 1747, 1695 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, DMSO) δ 7.07 (ddd, $J = 13.3, 9.2, 2.9$ Hz, 1H), 6.97 (ddd, $J = 9.2, 2.7, 1.8$ Hz, 1H), 4.96 (hept, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.77 (s, 2H), 4.62 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H), 1.20 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 167.5, 164.5, 157.6 (dd, $J = 242.6, 15.6$ Hz), 150.6 (dd, $J = 245.6, 15.2$ Hz), 148.2 (dd, $J = 14.6, 6.5$ Hz), 115.1 (dd, $J = 9.8, 4.3$ Hz), 101.4 (dd, $J = 26.0, 3.1$ Hz), 99.4 (t, $J = 27.1$ Hz), 68.7, 67.6, 45.1 (d, $J = 9.3$ Hz), 21.4.

Acetato de isopropil 2-(6-fluoro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3f)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **3a**, o composto **3f** foi preparado a partir do intermediário comercial (**2f**) (2,00 g, 12,00 mmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando DCM como fase móvel. Obteve-se um sólido branco (**PF** 54,7 °C – 56,8 °C, 2,45 g, 83%). **IV** ν 3084, 2985, 1730, 1690 cm^{-1} . **RMN** ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ 6.96 (dd, $J = 8.9, 5.1$ Hz, 1H), 6.70 (ddd, $J = 8.8, 8.0, 2.8$ Hz, 1H), 6.48 (dd, $J = 9.4, 2.8$ Hz, 1H), 5.10 (hept, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 4.57 (s, 2H), 1.27 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 167.1, 164.9, 158.4 (d, $J = 240.6$ Hz), 141.3 (d, $J = 2.5$ Hz), 129.8 (d, $J = 10.2$ Hz), 118.0 (d, $J = 9.3$ Hz), 110.2 (d, $J = 23.1$ Hz), 102.5 (d, $J = 28.6$ Hz), 70.0, 67.6, 43.4, 21.8.

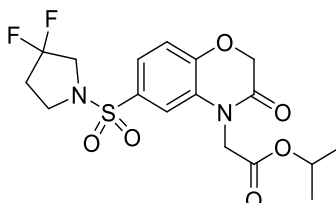
Acetato de isopropil 2-(6-metóxi-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3g)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **3a**, o composto **3g** foi preparado a partir do intermediário (**2g**) (500 mg, 2,79 mmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando uma mistura com gradiente de 0 a 1% metanol em DCM como fase móvel. Obteve-se um sólido branco (**PF** 117,0 °C – 117,7 °C; 430 mg, 55%). **IV** ν 3064, 2985, 1744, 1689, 1209 cm^{-1} . **RMN** ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ 6.93 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.53 (dd, $J = 8.8, 2.7$ Hz, 1H), 6.31 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 5.09 (hept, $J = 6.2$ Hz, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 3.76

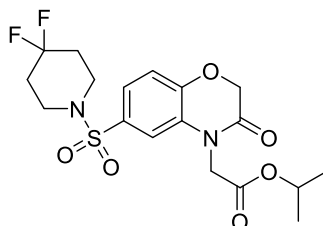
(s, 3H), 1.26 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 167.3, 165.4, 155.5, 139.3, 129.7, 117.5, 107.7, 102.1, 69.8, 67.8, 55.9, 43.4, 21.9.

Acetato de isopropil 2-(6-((3,3-difluoropirrolidin-1-il)sulfonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3h)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **3a**, o composto **3h** foi preparado a partir do intermediário (**2h**) (900 mg, 2,83 mmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando uma mistura com gradiente de 0 a 1% metanol em DCM como fase móvel. Obteve-se um sólido branco (**PF** 142,9 °C – 143,7 °C; 705 mg, 60%). **IV** ν 3072, 2985, 1738, 1697, 1205 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, Acetona) δ 7.56 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 5.03 (hept, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.84 (s, 2H), 3.55 (t, $J = 12.9$ Hz, 2H), 3.43 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.42 – 2.31 (m, 2H), 1.25 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, Acetona) δ 168.0, 164.6, 149.8, 130.8, 130.5, 128.6 (t, $J = 248.7$ Hz), 124.8, 118.4, 115.4, 70.1, 67.9, 55.0 (t, $J = 32.6$ Hz), 46.7 (t, $J = 3.4$ Hz), 43.5, 34.9 (t, $J = 24.5$ Hz), 21.9.

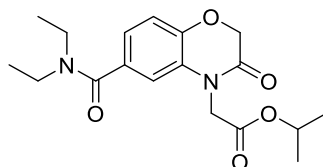
Acetato de isopropil 2-(6-((4,4-difluoropiperidin-1-il)sulfonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3i)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **3a**, o composto **3i** foi preparado a partir do intermediário (**2i**) (900 mg, 2,71 mmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando uma mistura com gradiente de 0 a 1% metanol em DCM como fase móvel. Obteve-se um sólido branco (**PF** 156,7 °C – 157,8 °C; 856 mg, 73%). **IV** ν 3068, 2982, 1741, 1699, 1204 cm^{-1} . **RMN** ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ 7.43 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H), 7.13 (m, 2H), 5.07 (hept, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 3.24 – 3.10 (m, 4H), 2.14 – 1.99 (m, 4H), 1.28 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 166.8, 163.9, 148.7, 130.7, 129.2,

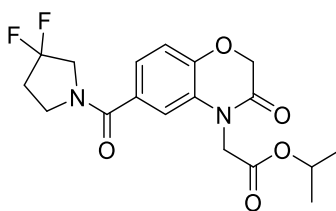
123.9, 120.7 (t, $J = 242.0$ Hz), 118.0, 114.1, 70.4, 67.3, 43.4 (t, $J = 5.6$ Hz), 43.0, 33.6 (t, $J = 24.0$ Hz), 21.8.

Acetato de isopropil 2-(6-(dietilcarbamoil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3j)



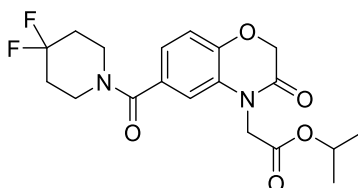
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **3a**, o composto **3j** foi preparado a partir do intermediário (**2i**) (572 mg, 2,30 mmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando acetato de etila como fase móvel. Obteve-se um sólido branco (**PF** 86,9 °C – 87,3 °C; 584 mg, 73%). **IV** ν 2983, 1731, 1687, 1274 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.00 – 7.05 (m, 2H), 6.80 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 5.07 (hept, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.50 (sl, 2H), 3.29 (sl, 2H), 1.26 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H), 1.17 (sl, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) descrição de todos os sinais de carbono visíveis δ 170.4, 167.2, 164.7, 145.9, 132.0, 128.9, 122.5, 117.0, 113.5, 70.0, 67.5, 43.5, 43.2, 39.6, 21.9, 14.3, 13.0.

Acetato de isopropil 2-(6-(3,3-difluoropirrolidina-1-carbonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3k)



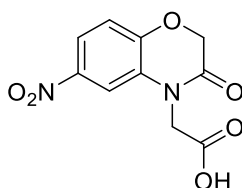
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **3a**, o composto **3k** foi preparado a partir do intermediário (**2k**) (300 mg, 1,06 mmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando uma mistura de 1% metanol em DCM como fase móvel. Obteve-se um óleo (341 mg, 84%). **IV** ν 2985, 1737, 1691, 1209 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, Acetona) δ 7.27 (dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.02 (hept, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.73 (s, 2H), 3.89 (t, $J = 13.0$ Hz, 2H), 3.78 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.51 – 2.40 (m, 2H), 1.24 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, Acetona) δ 168.9, 168.2, 165.0, 147.5, 129.8, 124.3, 117.4, 115.6, 69.9, 68.0, 43.5, 21.9.

Acetato de isopropil 2-(6-(4,4-difluoropiperidina-1-carbonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (3l)



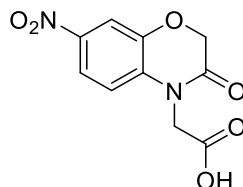
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **3a**, o composto **3l** foi preparado a partir do intermediário (**2l**) (300 mg, 1,01 mmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando uma mistura de 1% metanol em DCM como fase móvel. Obteve-se um óleo (324 mg, 81%). ν 2983, 1730, 1690, 1215 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.07 (dd, J = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 5.08 (hept, J = 6.2 Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.69 (sl, 4H), 1.99 (sl, 4H), 1.27 (d, J = 6.3 Hz, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 169.8, 167.2, 164.5, 146.6, 129.8, 129.1, 123.2, 121.5 (t, J = 242.4 Hz), 117.2, 114.3, 70.1, 67.5, 43.2, 34.4 (m), 21.9.

Ácido acético 2-(6-nitro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (4a)



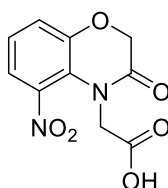
O composto (**3a**) (1,00 g, 3,40 mmol) foi dissolvido em metanol (6,52 mL) e THF (6,52 mL). À solução sob agitação, foi adicionada solução de 2,5 M de hidróxido de sódio em água (5 mL, 12,5 mmol). O acompanhamento da reação foi feito por CCD utilizando DCM como eluente. Após 4 horas à temperatura ambiente, a mistura foi acidificada (pH próximo a 1) usando solução de ácido clorídrico 1 M. Os solventes orgânicos da mistura foram evaporados sob pressão reduzida. Em seguida, foi realizado uma extração com solução aquosa saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida para fornecer um sólido amarelado (**PF** 195,3 $^{\circ}\text{C}$ – 197,0 $^{\circ}\text{C}$; 714 mg, 83%). ν 3400 – 2400, 2985, 1270, 1717 cm^{-1} . **RMN** ^1H (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.25 (sl, 1H), 7.96 (dd, J = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.92 (s, 2H), 4.79 (s, 2H). **RMN** ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 169.1, 163.5, 150.0, 142.4, 129.1, 119.9, 117.3, 110.8, 66.9, 42.6.

Ácido acético 2-(7-nitro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (4b)



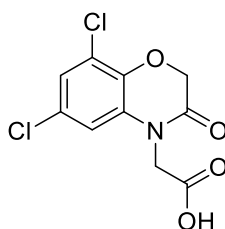
Ao composto (**3b**) (160 mg, 519 μmol) dissolvido em DCM (1,71 mL), foi adicionado TFA (199 μL , 2,59 mmol). A mistura foi agitada à 60 °C *overnight*. O acompanhamento da reação foi feito por cromatografia em camada delgada utilizando como eluente uma mistura de 5% de acetato de etila em DCM. Após evaporar o solvente orgânico sob pressão reduzida, foi feita uma extração com água. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida obtendo-se um sólido amarelado (**PF** 193,2 °C – 196 °C; 118 mg, 90%). **IV** ν 3400 – 2400, 2923, 1696 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.95 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.87 (s, 2H), 4.73 (s, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 168.9, 164.3, 144.4, 142.7, 134.8, 118.6, 115.7, 111.8, 66.8, 42.8.

Ácido acético 2-(5-nitro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (4c)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **4b**, o composto **4c** foi preparado a partir do produto intermediário (**3c**) (250 mg, 811 μmol) para fornecer um óleo viscoso preto (200 mg, 98%). **IV** ν 3400 – 2400, 2933, 1698 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.30 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.81 (s, 2H), 4.23 (s, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 168.3, 165.7, 149.5, 139.8, 124.7, 124.7, 121.9, 119.9, 68.0, 47.0.

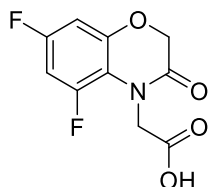
Ácido acético 2-(6,8-dichloro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (4d)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **4a**, o composto **4d** foi preparado a partir do produto intermediário (**3d**) (300 mg, 943 μmol) para fornecer um sólido branco (**PF**

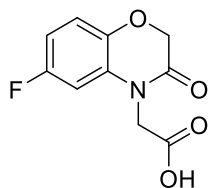
199,5 °C – 200,8 °C; 260 mg, 100%). **IV** ν 3400 – 2400, 2967, 1735, 1638 cm^{-1} . **RMN** ^1H (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.18 (sl, 1H), 7.34 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.68 (s, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 169.0, 163.9, 139.9, 131.1, 126.5, 123.3, 121.6, 114.5, 67.1, 42.8.

Ácido acético 2-(5,7-difluoro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (4e)



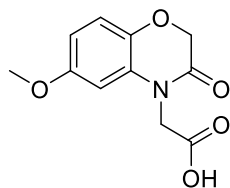
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **4a**, o composto **4e** foi preparado a partir do produto intermediário (**3e**) (550 mg, 1,93 mmol) para fornecer um sólido amarelado (**PF** 202,0 °C – 204,0 °C; 469 mg, 100%). **IV** ν 3400 – 2400, 3059, 2927, 1726, 1693 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.06 (ddd, $J = 13.3, 9.2, 2.9$ Hz, 1H), 6.95 (ddd, $J = 9.1, 2.8, 1.8$ Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.57 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 169.4, 164.4, 157.5 (dd, $J = 242.4, 15.6$ Hz), 150.6 (dd, $J = 245.5, 15.4$ Hz), 148.2 (dd, $J = 14.4, 6.5$ Hz), 115.2 (dd, $J = 9.8, 4.4$ Hz), 101.4 (dd, $J = 25.9, 3.2$ Hz), 99.5 (t, $J = 27.1$ Hz), 67.5, 44.9 (d, $J = 10.0$ Hz).

Ácido acético 2-(6-fluoro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (4f)



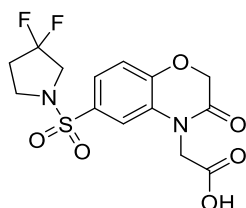
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **4a**, o composto **4f** foi preparado a partir do produto intermediário (**3f**) (700 mg, 2,62 mmol) para fornecer um sólido esbranquiçado (**PF** 178,0 °C – 179,0 °C; 407 mg, 69%). **IV** ν 3400 – 2400, 2924, 1731 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.12 (sl, 1H), 7.09 – 7.02 (m, 2H), 6.85 (dt, $J = 8.6, 2.8$ Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.63 (s, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 169.2, 164.6, 157.6 (d, $J = 236.8$ Hz), 140.9 (d, $J = 2.4$ Hz), 130.0 (d, $J = 11.0$ Hz), 117.5 (d, $J = 9.6$ Hz), 109.4 (d, $J = 23.3$ Hz), 103.2 (d, $J = 29.0$ Hz), 66.9, 42.7.

Ácido acético 2-(6-metóxi-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (4g)



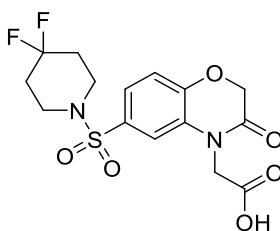
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **4a**, o composto **4g** foi preparado a partir do produto intermediário (**3g**) (400 mg, 1,43 mmol) para fornecer um sólido esbranquiçado (**PF** 115,5 °C – 117,4 °C, 308 mg, 91%). **IV** ν 3400 – 2400, 2918, 1740, 1658 cm^{-1} . **RMN** ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ 7.68 (sl, 1H), 6.94 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.54 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 4.66 (s, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.77 (s, 3H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 165.8, 155.6, 139.2, 129.4, 117.7, 107.9, 102.2, 67.7, 56.0, 42.9.

Ácido acético 2-(6-((3,3-difluoropirrolidin-1-il)sulfonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (4h)



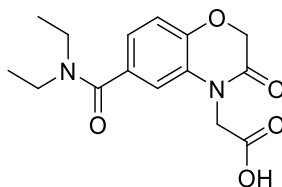
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **4a**, o composto **4h** foi preparado a partir do produto intermediário (**3h**) (350 mg, 836 μmol) para fornecer um sólido branco (**PF** 191,6 °C – 192,5 °C, 315 mg, 100%). **IV** ν 3517, 2960, 1693, 1280 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, Acetona) δ 7.56 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.84 (s, 2H), 3.54 (t, J = 12.9 Hz, 2H), 3.43 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.40 – 2.29 (m, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, Acetona) δ 169.3, 164.6, 149.7, 130.7, 130.6, 128.6 (t, J = 248.7 Hz), 124.7, 118.4, 115.5, 67.9, 55.0 (t, J = 32.6 Hz), 46.7 (t, J = 3.3 Hz), 43.0, 34.9 (t, J = 24.5 Hz).

Ácido acético 2-(6-((4,4-difluoropiperidin-1-il)sulfonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-yl) (4i)



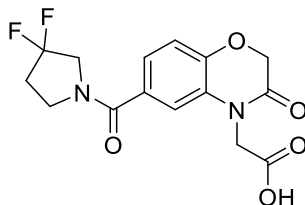
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **4a**, o composto **4i** foi preparado a partir do produto intermediário (**3i**) (350 mg, 809 μ mol) para fornecer um sólido branco (PF 185,3 °C – 186,3 °C; 316 mg, 100%). **IV** ν 3400 – 2400, 2941, 1694 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13.26 (sl, 1H), 7.44 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.77 (s, 2H), 3.08 – 3.06 (m, 4H), 2.10 – 2.00 (m, 4H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 169.3, 163.8, 148.3, 129.3, 129.3, 123.5, 121.7 (t, J = 241.1 Hz) 117.5, 114.3, 66.8, 43.2 (t, J = 5.5 Hz), 42.4, 32.7 (t, J = 23.6 Hz).

Ácido acético 2-(6-(diethylcarbamoyl)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il) (4j)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **4a**, o composto **4j** foi preparado a partir do produto intermediário (**3j**) (200 mg, 402 μ mol) para fornecer um sólido esbranquiçado (PF 176,9 °C – 178,0 °C; 123 mg, 100%). **IV** ν 3245 – 2317, 2917, 1711, 1688 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 13.13 (sl, 1H), 7.06 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.00 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 4.75 (s, 2H), 4.68 (s, 2H), 3.33 (sl, 4H), 1.09 (sl, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 169.3, 169.1, 164.3, 145.0, 131.7, 128.5, 121.9, 116.5, 113.5, 66.9, 42.9, 42.4, 14.0, 12.8.

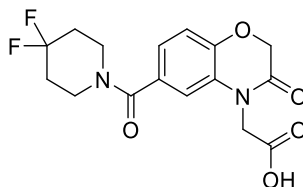
Ácido acético 2-(6-(3,3-difluoropirrolidina-1-carbonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo [b][1,4]oxazin-4-il) (4k)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **4a**, o composto **4k** foi preparado a partir do produto intermediário (**3k**) (273 mg, 714 μ mol) para fornecer um sólido branco (PF 150,7 °C - 155, 7 °C; 243 mg, 100%). **IV** ν 2820, 1736, 1688, 1215 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, Acetona) δ 7.30 - 7.26 (m, 2H), 7.07 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.73 (s, 2H), 3.90 (t, J = 12.9 Hz, 2H), 3.79 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.51 – 2.40 (m, 2H). **RMN** ^{13}C descrição de todos os

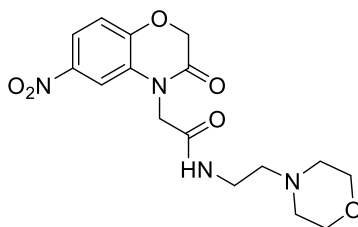
sinais de carbono visíveis (126 MHz, Acetona) δ 169.4, 169.0, 165.0, 147.5, 131.1, 129.8, 128.5 (t, $J = 234.0$ Hz), 124.2, 115.5, 68.0, 55.6, 53.5, 47.8, 44.5, 42.9, 35.3, 33.2.

Ácido acético 2-(6-(4,4-difluoropiperidina-1-carbonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo [b][1,4]oxazin-4-il) (4l)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **4a**, o composto **4l** foi preparado a partir do produto intermediário (**3l**) (273 mg, 689 μ mol) para fornecer um sólido branco (**PF** 157,2 °C – 162,7 °C, 244 mg, 100%). **IV** ν 3391 – 2315, 2924, 1729, 1689, 1268 cm^{-1} . **RMN** ^1H (250 MHz, DMSO- d_6) δ 7.19 – 7.05 (m, 3H), 4.76 (s, 2H), 4.67 (s, 2H), 3.55 (sl, 4H), 2.08 – 1.95 (m, 4H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) δ 169.3, 168.5, 164.2, 145.5, 129.9, 128.5, 122.8 (t, $J = 241.3$ Hz), 122.7, 116.6, 114.3, 79.2, 66.9, 42.4, 33.3 (m).

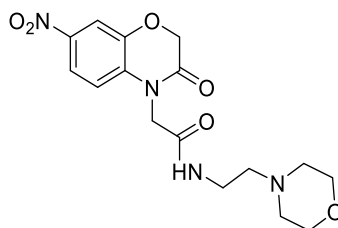
N-(2-etilmorfolina)-2-(6-nitro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il)acetamida (5a)



O composto (**4a**) (200 mg, 793 μ mol) foi dissolvido em DCM (9,26 mL) e adicionou-se HOBt (132 mg, 975 μ mol) e EDC (185 mg, 968 μ mol) à solução. A mistura turva foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguida da adição da 4-(2-aminoetil)-morfolina (132 μ L, 1,02 mmol). A mistura foi agitada à temperatura ambiente *overnight* e diluída com água (10 mL), basificada (pH entre 8 e 10) com solução de hidróxido de sódio 2,5 M e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com MgSO_4 , filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida. O precipitado foi recristalizado em éter etílico para obter um sólido amarelado (**PF** 148,7 °C – 149,3 °C; 237 mg, 82%). **IV** ν 3296, 3087, 2953, 1694, 1525, 1325 cm^{-1} . **RMN** ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.95 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.59 (sl, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.68 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 3.40 (dd, $J = 11.3, 5.4$ Hz, 2H), 2.50 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.45 (t, $J = 4.4$ Hz, 4H). **RMN** ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ

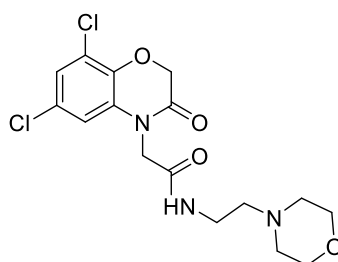
165.8, 163.8, 150.1, 143.3, 129.2, 120.5, 117.4, 111.2, 67.4, 67.0, 56.9, 53.4, 45.0, 35.9.
HRMS: calculado para $C_{16}H_{21}N_4O_6^+$ $[M + H]^+ = 365,14556$ m/z , encontrado $[M + H]^+ = 365,14544$ m/z .

N-(2- etilmorfolina)-2-(6-nitro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il)acetamida (5b)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **5b** foi preparado a partir do produto intermediário (**4b**) (100 mg, 397 μ mol) para fornecer um sólido esbranquiçado (**PF** 175,0 °C – 177,3 °C; 101 mg, 70%). **IV** ν 3280, 3086, 2946, 1660, 1520 cm^{-1} . **RMN** 1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.19 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 7.94 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.59 (s, 2H), 3.55 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 3.21 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 2.38 – 2.32 (m, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, DMSO) δ 165.9, 164.1, 144.3, 142.6, 135.1, 118.4, 115.6, 111.6, 66.8, 66.1, 57.2, 53.2, 43.8, 36.0. **HRMS:** calculado para $C_{16}H_{21}N_4O_6^+$ $[M + H]^+ = 365,14556$ m/z , encontrado $[M + H]^+ = 365,14553$ m/z .

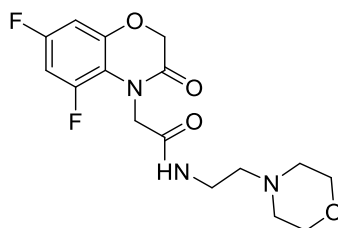
2-(6,8-dicloro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il)-N-(2-etilmorfolina) acetamida (5d)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **5d** foi preparado a partir do intermediário (**4d**) (100 mg, 362 μ mol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura de 5% metanol em DCM. Obtendo-se um sólido branco (**PF** 189,3 °C – 190,7 °C, 115 mg, 82%). **IV** ν 3303, 3084, 2951, 1662 cm^{-1} . **RMN** 1H (250 MHz, $CDCl_3$) δ 7.12 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.53 (sl, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.64 (apt, $J = 4.6$ Hz, 4H), 3.36 (dd, $J = 11.4, 5.5$ Hz, 2H), 2.49 – 2.43 (m,

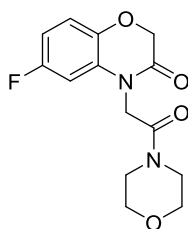
2H), 2.42 – 2.37 (m, 4H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 166.2, 164.5, 140.2, 130.8, 128.2, 125.0, 123.3, 114.4, 67.8, 67.0, 56.8, 53.4, 45.8, 35.9. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 388,08254\ m/z$, encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 388,08234\ m/z$.

2-(5,7-difluoro-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il)-N-(2-etilmorfolina acetamida (5e)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **5e** foi preparado a partir do produto intermediário (**4e**) (100 mg, 411 μmol) para fornecer um sólido amarelado (**PF** 135,7 °C – 137,8 °C; 138 mg, 94%). **IV** ν 3288, 3084, 2948, 1659, 1110 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.01 (t, $J = 5.5\ \text{Hz}$, 1H), 7.07 – 7.00 (m, 1H), 6.95 – 6.90 (m, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.46 (d, $J = 3.7\ \text{Hz}$, 2H), 3.54 (t, $J = 4.5\ \text{Hz}$, 4H), 3.18 (dd, $J = 12.8, 6.6\ \text{Hz}$, 2H), 2.32 (dd, $J = 15.4, 8.4\ \text{Hz}$, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 166.6, 164.4, 157.4 (dd, $J = 242.1, 15.4\ \text{Hz}$), 150.8 (dd, $J = 246.7, 15.2\ \text{Hz}$), 148.2 (dd, $J = 14.5, 6.6\ \text{Hz}$), 115.6 (dd, $J = 10.0, 4.4\ \text{Hz}$), 101.1 (dd, $J = 25.9, 2.9\ \text{Hz}$), 99.3 (t, $J = 27.0\ \text{Hz}$), 67.7, 66.1, 57.3, 53.3, 46.1 (d, $J = 9.8\ \text{Hz}$), 36.0. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 356,14164\ m/z$, encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 356,14149\ m/z$.

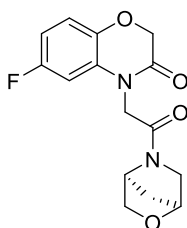
6-fluoro-4-(2-morfolina-2-oxoetil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (6a)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **6a** foi preparado a partir do intermediário (**4f**) (100 mg, 444 μmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura de 5% metanol em DCM para fornecer um sólido amarelado (**PF** 174,8 °C – 176,4 °C, 98 mg, 75%). **IV** ν 3081, 2966, 1659, 1115 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6.94 (dd, $J = 8.8, 5.1\ \text{Hz}$, 1H), 6.70 (dt, $J = 8.4, 2.8\ \text{Hz}$, 1H), 6.52 (dd, $J = 9.4, 2.8\ \text{Hz}$, 1H), 4.66 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 3.82 – 3.76 (m, 2H), 3.81 – 3.76 (m, 2H), 3.76 – 3.71 (m, 2H), 3.69 – 3.63 (m, 2H). **RMN** ^{13}C descrição de todos os sinais de carbono visíveis

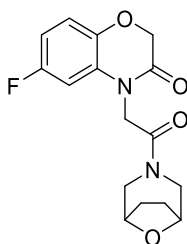
(126 MHz, CDCl_3) δ 165.4, 164.5, 158.4 (d, $J = 240.3$ Hz), 141.4 (d, $J = 2.5$ Hz), 130.2 (d, $J = 10.3$ Hz), 117.8 (d, $J = 9.4$ Hz), 110.1 (d, $J = 23.1$ Hz), 103.0 (d, $J = 28.4$ Hz), 67.7, 66.9, 66.5, 45.6, 43.2, 42.6. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{FN}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 295,10886$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 295,10876$ m/z .

4-(2-((1S,4S)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-5-yl)-2-oxoetil)-6-fluoro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (6b)



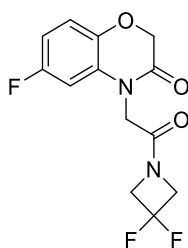
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **6b** foi preparado a partir do intermediário (**4f**) (100 mg, 444 μmol) com adição de trietanolamina (0,062 mL). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura de 5% metanol em DCM para fornecer um sólido branco (**PF** 153,2 $^\circ\text{C}$ – 155,2 $^\circ\text{C}$, 99 mg, 73%). **IV** ν 3063, 2960, 1650, 1180 cm^{-1} . **RMN** ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 80 $^\circ\text{C}$) δ 7.00 (dd, $J = 8.5$, 5.4 Hz, 1H), 6.93 (dd, $J = 10.3$, 2.8 Hz, 1H), 6.80 (dt, $J = 8.6$, 2.5 Hz, 1H), 4.87 – 4.51 (m, 4H), 4.65 (s, 2H), 3.82 (dd, $J = 27.4$, 7.3 Hz, 1H), 3.70 (dd, $J = 26.8$, 7.0 Hz, 1H), 3.62 (q, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.22 – 3.32 (m, 1H), 1.91 (s, 1H), 1.81 (s, 1H). **RMN** ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 80 $^\circ\text{C}$) descrição de todos os sinais de carbono visíveis δ 163.9, 163.3, 157.2 (d, $J = 236.4$ Hz), 140.6, 130.1 (d, $J = 9.9$ Hz), 116.7, 108.7 (d, $J = 23.1$ Hz), 103.0 (d, $J = 28.7$ Hz), 75.4, 75.4, 74.4, 74.4, 73.4, 72.9, 66.7, 66.7, 66.6, 56.9, 56.8, 55.3, 55.2, 53.9, 53.6, 42.8, 42.3, 36.4, 34.8. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{FN}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 307,10886$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 307,10864$ m/z . $[\alpha]_D^{20}$: - 5 $^\circ$

4-(2-(8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octan-3-yl)-2-oxoetil)-6-fluoro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (6c)



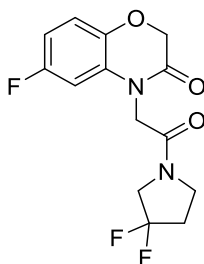
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **6c** foi preparado a partir do intermediário (**4f**) (100 mg, 444 μ mol) com adição de trietanolamina (0,062 mL). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura de 5% metanol em DCM. Obteve-se um sólido branco (PF 156,0 °C – 157,0 °C, 114 mg, 80%). **IV** ν 3081, 2956, 1655, 1044 cm^{-1} . **RMN** ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ 6.94 (dd, J = 8.8, 5.1 Hz, 1H), 6.69 (dt, J = 8.8, 8.1, 2.8 Hz, 1H), 6.50 (dd, J = 9.5, 2.8 Hz, 1H), 4.76 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.43 (dd, J = 11.0, 5.2 Hz, 3H), 4.14 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.64 – 3.42 (m, 2H), 3.04 (d, J = 13.3, 1H), 2.16 – 1.72 (m, 4H). **RMN** ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 80 °C) descrição de todos os sinais de carbono visíveis δ 165.5, 163.9, 157.2 (d, J = 236.7 Hz), 140.6 (d, J = 2.2 Hz), 130.1 (d, J = 11.0 Hz), 116.7 (d, J = 9.4 Hz), 108.7, 108.7, 108.5, 108.5, 102.9, 102.9, 102.9, 102.7, 102.7, 102.7, 72.4 (d, J = 38.1 Hz), 66.7, 66.7 (t, J = 4.6 Hz), 49.7, 47.4, 42.1, 26.8. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FN}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 321,12451$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 321,12445$ m/z .

4-(2-(3,3-difluoroazetidin-1-il)-2-oxoetil)-6-fluoro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (6d)



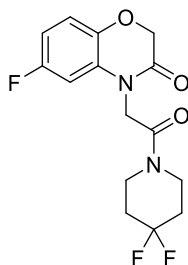
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **6d** foi preparado a partir do intermediário (**4f**) (100 mg, 444 μ mol) com adição de trietanolamina (0,062 mL). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura de 5% metanol em DCM. Obteve-se um sólido branco (PF 169,8 °C – 171,4 °C, 110 mg, 82%). **IV** ν 3081, 2924, 1661, 1350 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, Acetona) δ 6.99 (dd, J = 8.8, 5.2 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 10.1, 2.8 Hz, 1H), 6.76 (dt, J = 8.6, 2.8 Hz, 1H), 4.86 (t, J = 12.0 Hz, 2H), 4.73 (s, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.37 (t, J = 12.3 Hz, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, Acetona) δ 167.4 (t, J = 3.9 Hz), 165.4, 159.1 (d, J = 237.1 Hz), 142.3 (d, J = 2.2 Hz), 131.6 (d, J = 10.9 Hz), 118.2 (d, J = 9.5 Hz), 117.1 (t, J = 272.5 Hz), 110.1 (d, J = 23.5 Hz), 104.1 (d, J = 28.8 Hz), 68.1, 62.2 (t, J = 28.7 Hz), 61.0 (t, J = 28.5 Hz), 42.6. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 301,07945$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 301,07922$ m/z .

4-(2-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-6-fluoro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (6e)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **6e** foi preparado a partir do intermediário (**4f**) (100 mg, 444 μ mol) com adição de trietanolamina (0,062 mL). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura de 5% metanol em DCM para fornecer um sólido esbranquiçado (**PF** 164,7 °C – 165,8 °C, 110 mg, 79%). **IV** ν 3077, 2960, 1656, 1186 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6.95 (dd, J = 8.8, 5.1 Hz, 1H), 6.70 (dt, J = 8.4, 2.8 Hz, 1H), 6.59 – 6.57 (m, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.59 (s, 1H), 4.51 (s, 1H), 3.95 (t, J = 12.2 Hz, 1H), 3.90 – 3.83 (m, 2H), 3.78 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 2.58 – 2.50 (m, 1H), 2.44 – 2.36 (m, 1H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 165.3 (d, J = 2.2 Hz), 164.9, 164.8, 158.45 (d, J = 240.6 Hz), 141.37 (d, J = 1.9 Hz), 130.1 (d, J = 10.3 Hz), 130.1 (d, J = 9.9 Hz), 127.4 (t, J = 249.6 Hz), 126.2 (t, J = 247.8 Hz), 117.8 (d, J = 9.3 Hz), 110.3 (d, J = 23.2 Hz), 103.1 (d, J = 28.6 Hz), 67.7, 52.8 (m), 44.0, 43.9 (m), 43.3, 34.6 (t, J = 24.7 Hz), 32.8 (t, J = 23.6 Hz). **HRMS**: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 315,09510$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 315,09486$ m/z .

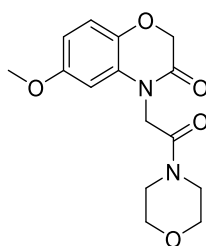
4-(2-(4,4-difluoropiperidin-1-il)-2-oxoetil)-6-fluoro-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (6f)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **6f** foi preparado a partir do intermediário (**4f**) (100 mg, 444 μ mol) com adição de trietanolamina (0,062 mL). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura de 5% metanol em DCM para fornecer um sólido branco (**PF** 182,3 °C – 183,8 °C, 120 mg, 82%). **IV** ν 3080, 2991, 1652, 1115 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6.95 (dd, J = 8.8, 5.1 Hz, 1H),

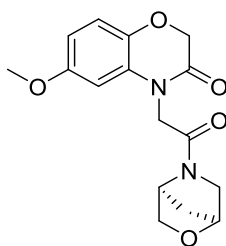
6.70 (dt, $J = 8.3, 2.6$ Hz, 1H), 6.52 (dd, $J = 9.4, 2.7$ Hz, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 3.81 – 3.74 (sl, 2H), 3.72 – 3.63 (sl, 2H), 2.20 – 2.08 (m, 2H), 2.07 – 1.97 (m, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 165.4, 164.4, 158.4 (d, $J = 240.5$ Hz), 141.4 (d, $J = 2.5$ Hz), 130.2 (d, $J = 10.6$ Hz), 121.2 (t, $J = 242.5$ Hz), 117.9 (d, $J = 9.2$ Hz), 110.2 (d, $J = 23.1$ Hz), 103.0 (d, $J = 28.6$ Hz), 67.7, 43.2, 42.1 (t, $J = 5.1$ Hz), 39.6 (t, $J = 4.9$ Hz), 34.6 (t, $J = 24.0$ Hz), 33.8 (t, $J = 23.4$ Hz). **HRMS**: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 329,11075$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 329,11045$ m/z .

6-metóxi-4-(2-morfolina-2-oxoetil)-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (7a)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **7a** foi preparado a partir do intermediário (**4g**) (100 mg, 422 μmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura de 2% metanol em DCM para fornecer um sólido amarelado (**PF** 152,3 $^\circ\text{C}$ – 154,3 $^\circ\text{C}$, 96 mg, 74%). **IV** ν 2921, 1658, 1269, 1055 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.51 (dd, $J = 8.8, 2.7$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 4.65 (s, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.78 – 3.73 (m, 5H), 3.73 – 3.69 (m, 2H), 3.66 – 3.61 (m, 2H), 3.58 – 3.54 (m, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 165.7, 164.8, 155.5, 139.4, 130.1, 117.3, 107.3, 103.0, 67.9, 66.9, 66.6, 55.9, 45.5, 43.2, 42.6. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 307,1288$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 307,1286$ m/z .

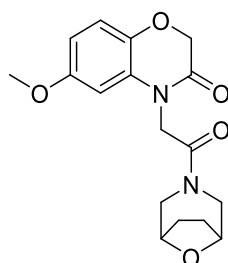
4-(2-((1S,4S)-2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]heptan-5-il)-2-oxoetil)-6-metóxi-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (7b)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **7b** foi preparado a partir do intermediário (**4g**) (100 mg, 422 μmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura com gradiente de 0 a 2% metanol em DCM para

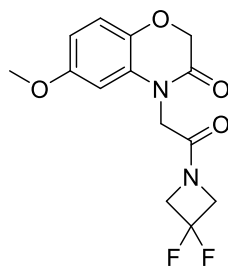
fornecer um sólido esbranquiçado (**PF** 138,7 °C – 140,1 °C; 107 mg, 80%). **IV** v 2953, 1651, 1269, 1054 cm^{-1} . **RMN ^1H** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 6.94 (dd, $J = 8.7, 3.6$ Hz, 1H), 6.57 (dt, $J = 8.7, 2.5$ Hz, 1H), 6.54 (dd, $J = 5.0, 2.7$ Hz, 1H), 4.91 – 4.84 (m, 1H), 4.77 – 4.55 (m, 5H), 3.79 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.70 – 3.61 (m, 2H), 3.31 – 3.18 (m, 1H), 1.89 (sl, 1H), 1.79 (sl, 1H). **RMN ^{13}C** (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 80 °C) descrição de todos os sinais de carbono visíveis δ 164.2, 163.5, 154.6, 138.4, 129.6, 116.2, 107.3, 102.4, 75.4, 74.4, 73.4, 72.9, 66.8, 56.9, 55.6, 54.8, 53.9, 53.7, 42.7, 42.21, 36.3, 34.8. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 319,1288$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 319,1285$ m/z . $[\alpha]_D^{20}$: - 3°

4-(2-((1R,5S)-8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octan-3-il)-2-oxoetil)-6-metóxi-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (7c)



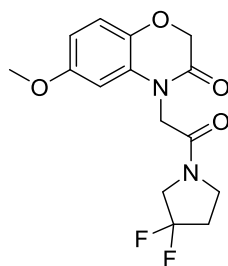
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **7c** foi preparado a partir do intermediário (**4g**) (100 mg, 422 μmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura com gradiente de 0 a 1% metanol em DCM para fornecer um sólido branco (**PF** 132,2 °C – 133,5 °C; 101 mg, 72%). **IV** v 2965, 1659, 1243, 1050 cm^{-1} . **RMN ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ 6.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.51 (dd, $J = 8.8, 2.7$ Hz, 1H), 6.35 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 4.75 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.47 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.13 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.55 (dd, $J = 12.5, 1.7$ Hz, 1H), 3.49 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H), 3.06 – 2.99 (m, 1H), 2.09 – 1.92 (m, 2H), 1.92 – 1.84 (m, 1H), 1.77 (dd, $J = 10.5, 3.3$ Hz, 1H). **RMN ^{13}C** (126 MHz, CDCl_3) δ 166.2, 165.7, 155.5, 139.3, 130.0, 117.3, 107.6, 102.7, 74.1, 73.2, 67.9, 55.9, 51.0, 48.2, 43.3, 27.9, 27.5. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_5^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 333,1445$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 333,1440$ m/z .

4-(2-(3,3-difluoroazetidin-1-il)-2-oxoetil)-6-metóxi-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (7d)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **7d** foi preparado a partir do intermediário (**4g**) (100 mg, 422 μ mol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura com gradiente de 1 a 2% metanol em DCM para fornecer um sólido branco (PF 141,7 °C – 142,8 °C; 110 mg, 84%). **IV** ν 2954, 1669, 1248, 1207, 1053 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, Acetona) δ 6.91 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.57 (dd, J = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 4.84 (t, J = 12.0 Hz, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.36 (t, J = 12.3 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 167.05 (t, J = 3.8 Hz), 165.4, 155.7, 139.2, 129.6, 117.6, 115.15 (t, J = 274.1 Hz), 108.4, 102.6, 67.9, 62.16 (t, J = 29.1 Hz), 60.97 (t, J = 28.7 Hz), 55.6, 42.8. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 313,0994$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 313,0991$ m/z .

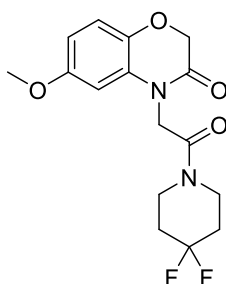
4-(2-(3,3-difluoropirrolidin-1-il)-2-oxoetil)-6-metóxi-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (7e)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **7e** foi preparado a partir do intermediário (**4g**) (100 mg, 422 μ mol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura com gradiente de 0 a 2% metanol em DCM para fornecer um sólido esbranquiçado (PF 125,4 °C – 126,5 °C; 92 mg, 67%). **IV** ν 2944, 1658, 1269, 1208, 1054 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6.92 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.52 (dd, J = 8.8, 2.7 Hz, 1H), 6.41 (dd, J = 4.4, 2.8 Hz, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.60 (s, 2H), 4.52 (s, 1H), 3.92 (t, J = 12.2 Hz, 1H), 3.88 – 3.81 (m, 2H), 3.78 – 3.77- 3.74 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 2.57 – 2.46 (m, 1H), 2.32 - 2.43 (m, 1H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 165.70 (d, J = 3.0 Hz), 165.2, 165.1,

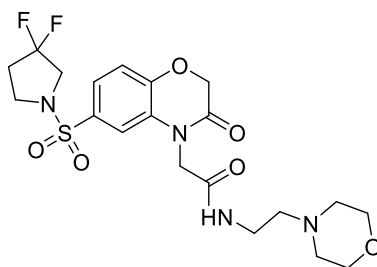
155.5, 139.3, 130.0, 129.9, 127.4 (t, $J = 249.7$ Hz), 126.2 (t, $J = 247.7$ Hz), 117.4, 117.3, 107.6, 107.5, 102.9, 102.9, 67.9, 56.0, 52.8 (t, $J = 32.2$ Hz), 52.8 (t, $J = 32.5$ Hz) 44.0, 43.9 (m), 43.3, 34.7 (t, $J = 24.8$ Hz), 32.7 (t, $J = 23.5$ Hz). **HRMS**: calculado para $C_{15}H_{17}F_2N_2O_4^+$ $[M + H]^+ = 327,1151$ m/z , encontrado $[M + H]^+ = 327,1146$ m/z .

4-(2-(4,4-difluoropiperidin-1-il)-2-oxoetil)-6-metóxi-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-ona (7f)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **6a** foi preparado a partir do intermediário (**4f**) (100 mg, 422 μ mol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura com gradiente de 0 a 5% metanol em DCM para fornecer um sólido branco (**PF** 151,5 °C – 152,4 °C, 71 mg, 49%). **IV** v 2944, 1651, 1268, 1208, 1052 cm^{-1} . **RMN** 1H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 6.93 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.52 (dd, $J = 8.8, 2.7$ Hz, 1H), 6.37 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.78 - 3.72 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.68 – 3.63 (m, 2H), 2.16 – 2.05 (m, 2H), 2.04 – 1.94 (m, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$) δ 165.8, 164.7, 155.5, 139.4, 130.0, 121.3 (t, $J = 242.4$ Hz), 117.3, 107.4, 102.9, 67.9, 55.9, 43.2, 42.04 (t, $J = 5.3$ Hz), 39.52 (t, $J = 4.6$ Hz), 34.62 (t, $J = 24.1$ Hz), 33.81 (t, $J = 23.3$ Hz). **HRMS**: calculado para $C_{16}H_{19}F_2N_2O_4^+$ $[M + H]^+ = 341,1307$ m/z , encontrado $[M + H]^+ = 341,1305$ m/z .

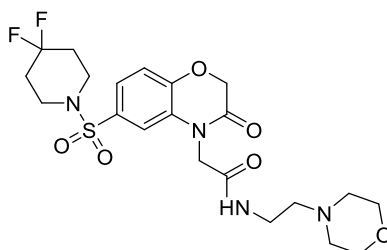
2-(6-((3,3-difluoropirrolidin-1-il)sulfonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il)-N-(2-etilmorfolina)acetamida (8a)



Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **8a** foi preparado a partir do intermediário (**4h**) (100 mg, 266 μ mol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura de 2% metanol em DCM para fornecer um sólido

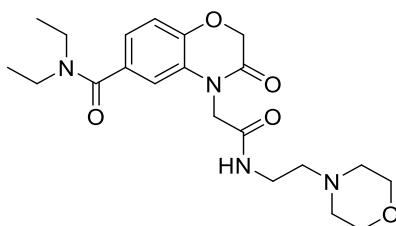
branco (PF 183,2 °C – 184,0 °C, 106 mg, 82%). **IV** ν 3390, 3085, 2959, 1676, 1159 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.51 – 7.48 (m, 2H), 7.16 – 7.12 (m, 1H), 6.53 (s largo, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.59 (s, 2H), 3.70 – 3.64 (m, 4H), 3.54 (t, $J = 12.9$ Hz, 2H), 3.43 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.35 (dd, $J = 11.3, 5.5$ Hz, 2H), 2.47 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.45 – 2.40 (m, 4H), 2.35 – 2.25 (m, 2H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 166.0, 164.1, 148.8, 130.4, 129.5, 127.2 (t, $J = 250.3$ Hz), 124.3, 117.8, 115.2, 67.4, 67.0, 56.7, 54.5 (t, $J = 32.6$ Hz), 53.4, 46.0 (t, $J = 3.0$ Hz), 45.2, 35.9, 34.7 (t, $J = 24.6$ Hz). **HRMS**: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_6\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 489,16139$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 489,16075$ m/z .

2-(6-((4,4-difluoropiperidin-1-il)sulfonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il)-N-(2-etilmorfolina)acetamida (8b)



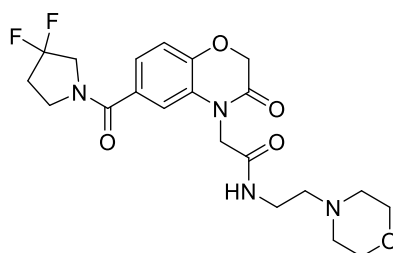
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **8b** foi preparado a partir do intermediário (**4i**) (100 mg, 256 μmol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura de 2% metanol em DCM para fornecer um sólido branco (PF 210,2 °C – 211,7 °C; 96 mg, 75%). **IV** ν 3281, 3106, 2964, 1657, 1165 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.48 – 7.43 (m, 2H), 7.13 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.53 (s largo, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 3.70 – 3.62 (m, 4H), 3.34 (dd, $J = 11.3, 5.5$ Hz, 2H), 3.25 – 3.15 (m, 4H), 2.47 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.44 – 2.38 (m, 4H), 2.03 – 2.12 (m, 4H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) δ 166.0, 164.2, 148.7, 131.0, 129.4, 124.2, 120.8 (t, $J = 242.3$ Hz), 117.8, 115.1, 67.5, 67.0, 56.7, 53.3, 45.4, 43.5 (t, $J = 5.7$ Hz), 35.9, 33.7 (t, $J = 24.0$ Hz). **HRMS**: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_6\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 503,17704$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 503,17651$ m/z .

N,N-diethyl-4-(2-((2-etilmorfolina)amina)-2-oxoetil)-3-oxo-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4] oxazina-6-carboxamida (8c)



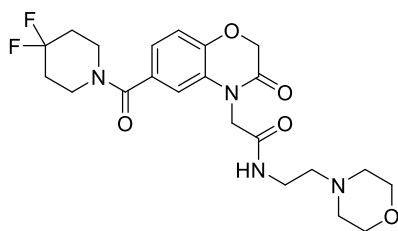
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **8c** foi preparado a partir do intermediário (**4j**) (100 mg, 326 μ mol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* em duas etapas utilizando como fase móvel uma mistura com gradiente de 2 a 5% metanol em DCM para fornecer um sólido esbranquiçado (PF 117,0 °C – 118,1 °C; 65 mg, 48%). **IV** ν 3299, 3075, 2973, 1678, 1378 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, Acetona) δ 7.36 (sl, 1H), 7.07 – 7.01 (m, 2H), 6.99 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.58 – 3.52 (m, 4H), 3.48 – 3.27 (sl, 4H), 3.32 (dd, J = 13.2, 6.3 Hz, 2H), 2.40 (t, J = 6.4 Hz, 3H), 2.37 (sl, 3H), 1.14 (t, J = 7.0 Hz, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, Acetona) δ 169.4, 166.3, 164.2, 145.5, 132.3, 129.1, 122.1, 116.3, 113.9, 67.2, 66.5, 57.3, 53.5, 44.0, 36.0, 13.0. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_5^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ = 419,22890 m/z , encontrado [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ = 419,22821 m/z .

2-(6-(3,3-difluoropirrolidina-1-carbonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il)-N-(2-etilmorfolina)acetamida (8d)



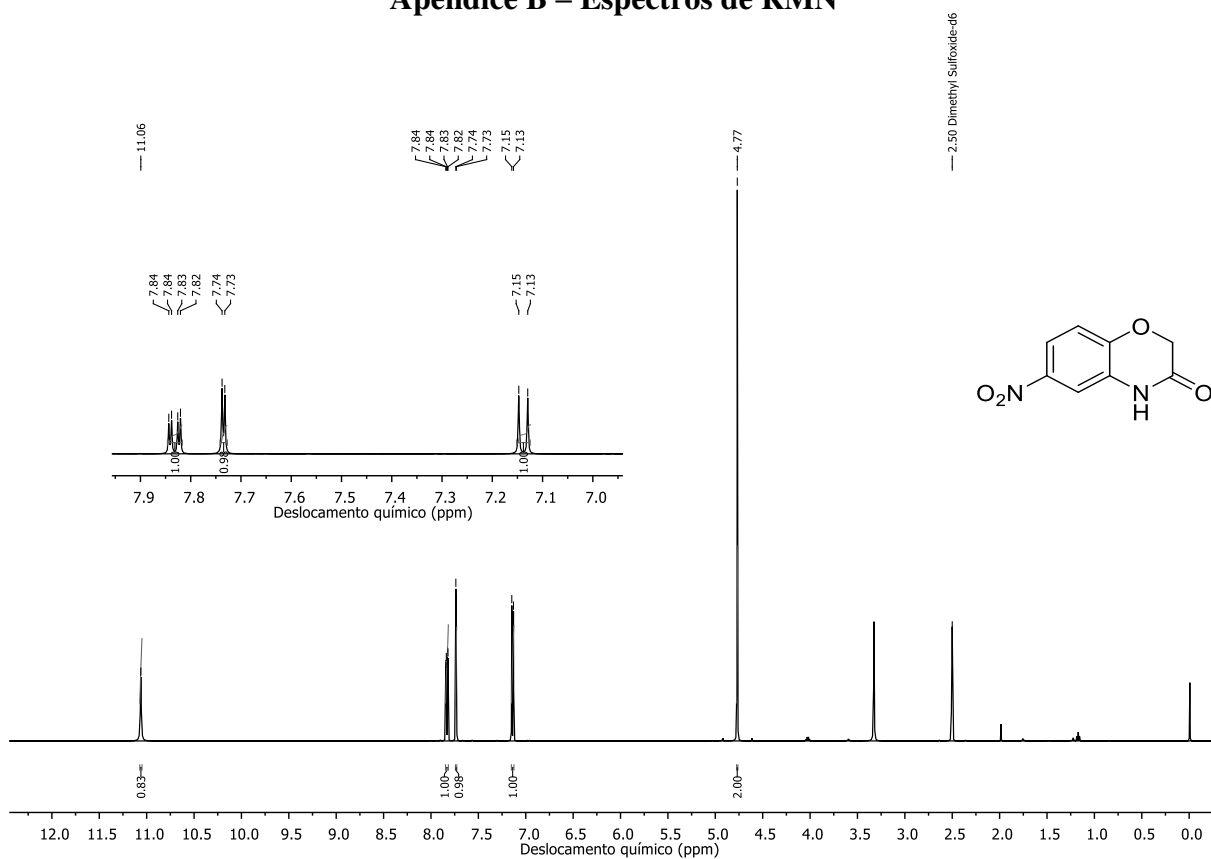
Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **8d** foi preparado a partir do intermediário (**4k**) (100 mg, 294 μ mol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura com gradiente de 0 a 10% metanol em DCM para fornecer um óleo cor salmão (105 mg, 79%). **IV** ν 3299, 3079, 2953, 1675, 1114 cm^{-1} . **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.27 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.21 (dd, J = 8.2, 1.5 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.71 (sl, 1H), 4.73 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 4.01 – 3.70 (m, 4H), 3.65 (apt, J = 3.9 Hz, 4H), 3.36 (dd, J = 11.3, 5.5 Hz, 2H), 2.48 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.33 - 2.45 (m, 6H). **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) descrição de todos os sinais de carbono visíveis δ 168.7, 166.6, 164.8, 146.9, 130.4, 128.9, 126.9 (t, J = 248.6 Hz), 124.0, 117.0, 115.4, 67.6, 66.9, 56.8, 55.7, 53.3, 53.1, 47.2, 45.5, 43.9, 35.8, 35.1, 32.9. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_5^+$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ = 453,19440 m/z , encontrado [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ = 453,19392 m/z .

2-(6-(4,4-difluoropiperidine-1-carbonil)-3-oxo-2,3-dihidro-4H-benzo[b][1,4]oxazin-4-il)-N-(2-etilmorfolina)acetamida (8e)

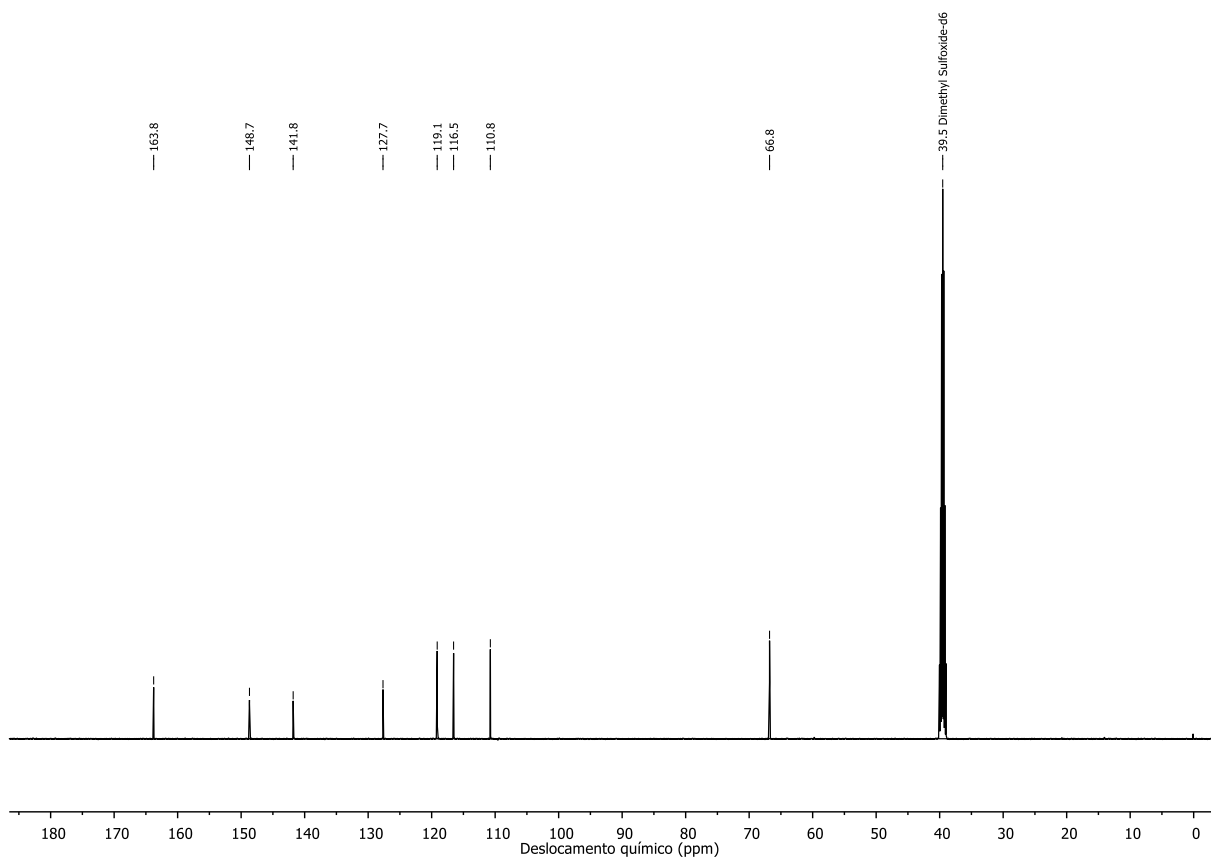


Utilizando procedimento similar ao descrito para a síntese de **5a**, o composto **8e** foi preparado a partir do intermediário (**4l**) (100 mg, 256 μ mol). A purificação foi feita por cromatografia *flash* utilizando como fase móvel uma mistura com gradiente de 2 a 10% metanol em DCM para fornecer um óleo esbranquiçado (115 mg, 96%). **IV** ν 3318, 3072, 2950, 1678, 1264 cm^{-1} . **RMN ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ 7.17 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.10 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.61 (sl, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.54 (s, 2H), 3.91 - 3.48 (m, 4H), 3.63 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.34 (dd, J = 14.0, 5.5 Hz, 2H), 2.45 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.43 - 2.37 (m, 4H) 2.14 - 1.90 (m, 4H). **RMN ^{13}C** (126 MHz, CDCl_3) δ 169.5, 166.4, 164.7, 146.4, 130.0, 128.9, 123.6, 121.4 (t, J = 242.8 Hz), 117.1, 114.9, 67.5, 66.9, 56.6, 53.2, 45.5, 35.7, 34.2. **HRMS**: calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_5^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 467,21005$ m/z , encontrado $[\text{M} + \text{H}]^+ = 467,20961$ m/z .

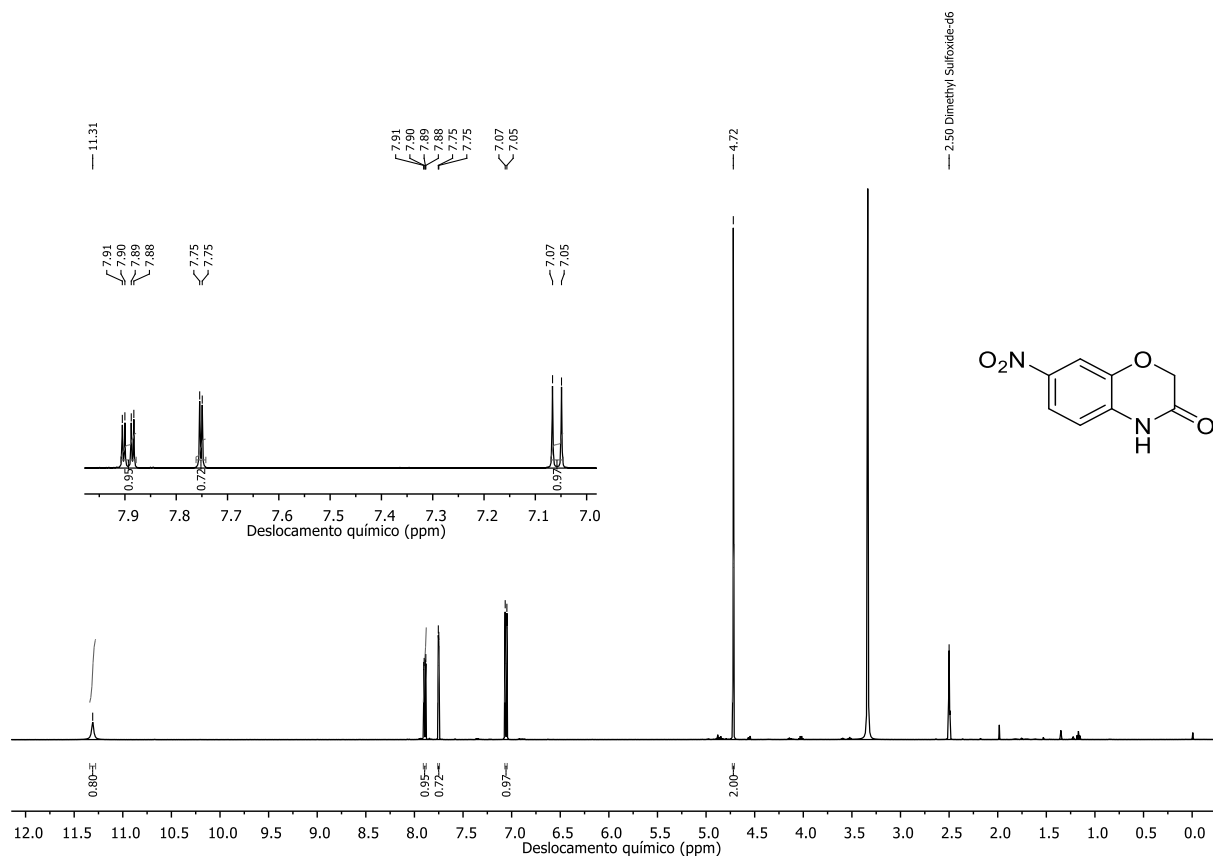
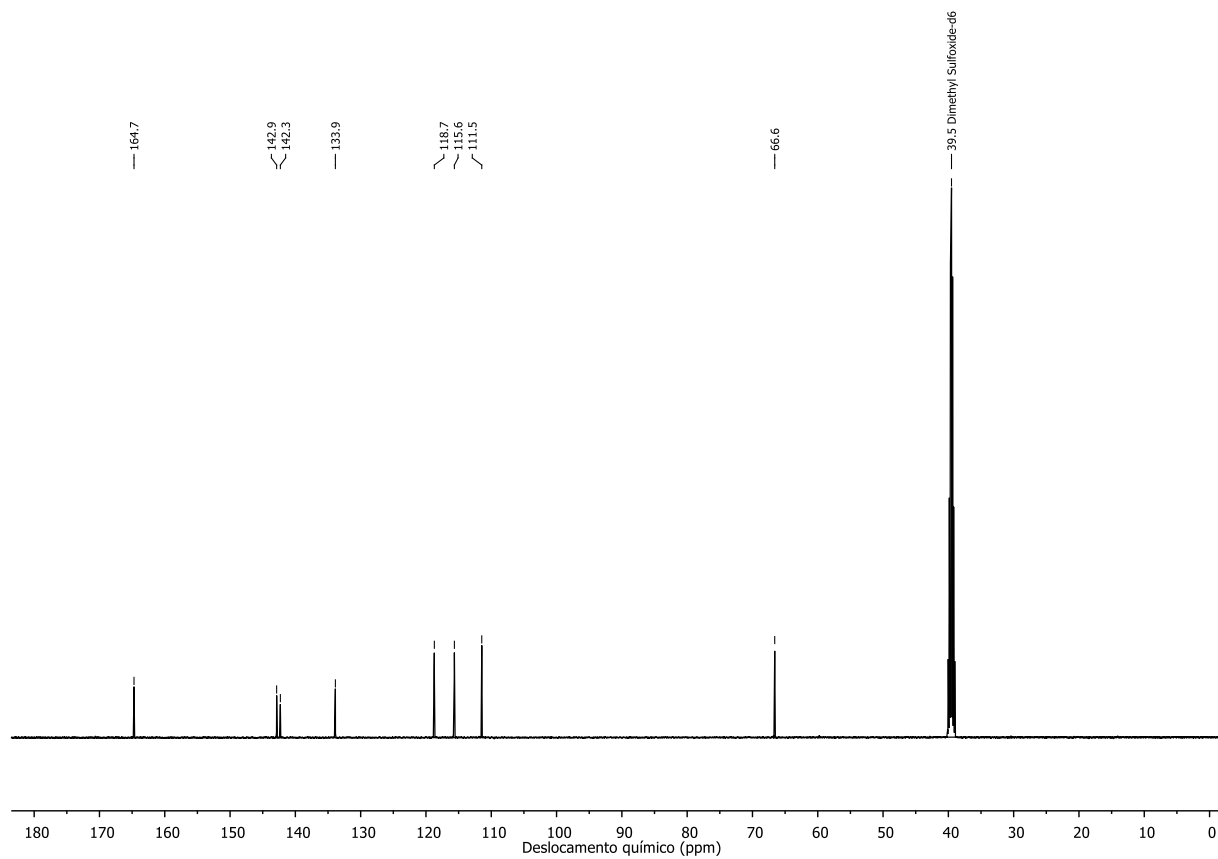
Apêndice B – Espectros de RMN

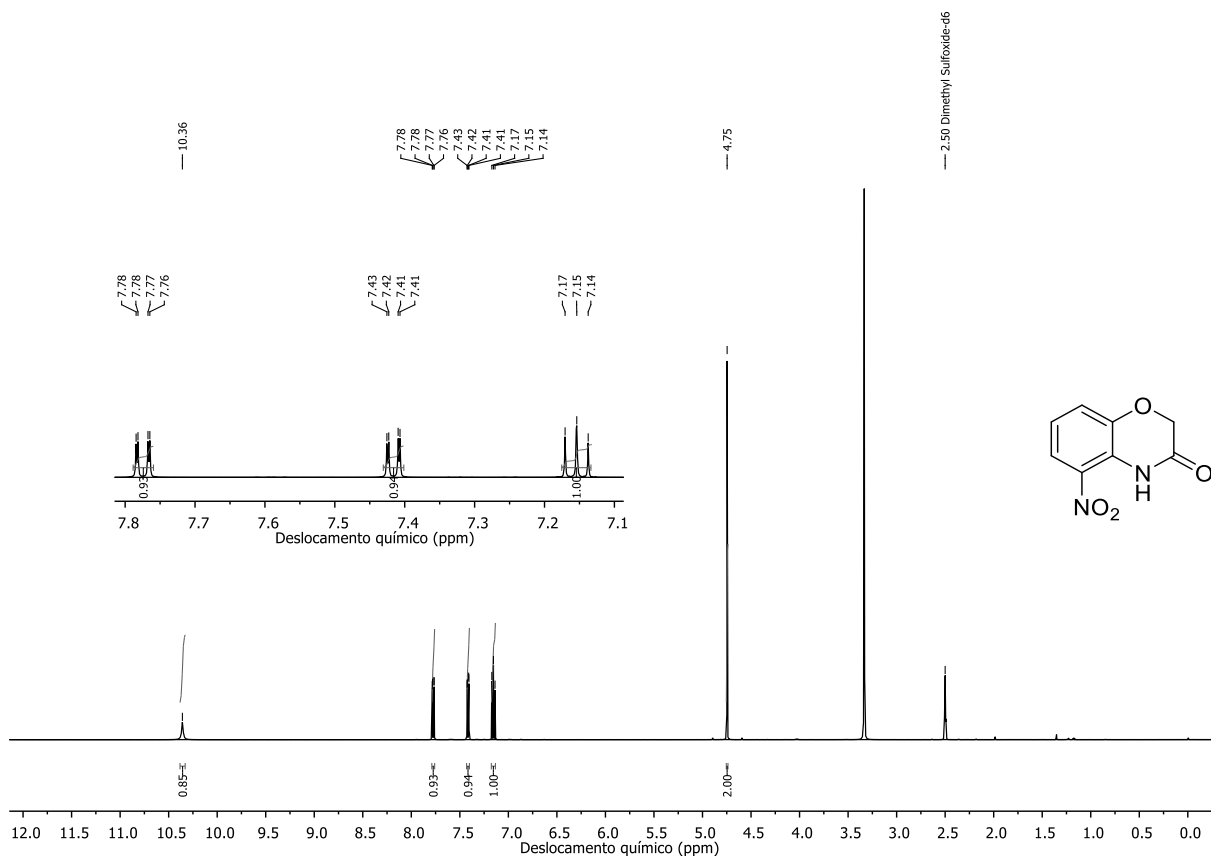


Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **2a**

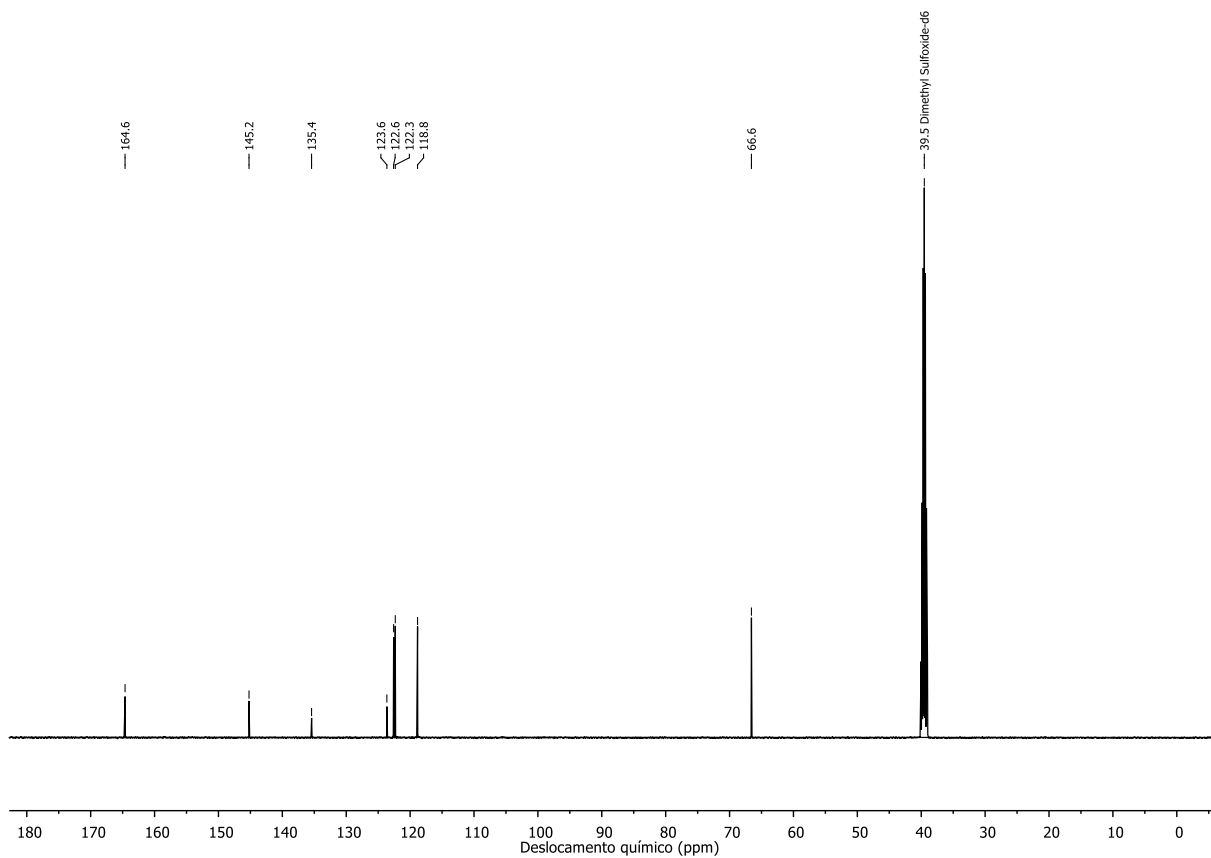


Espectro RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO) do composto **2a**

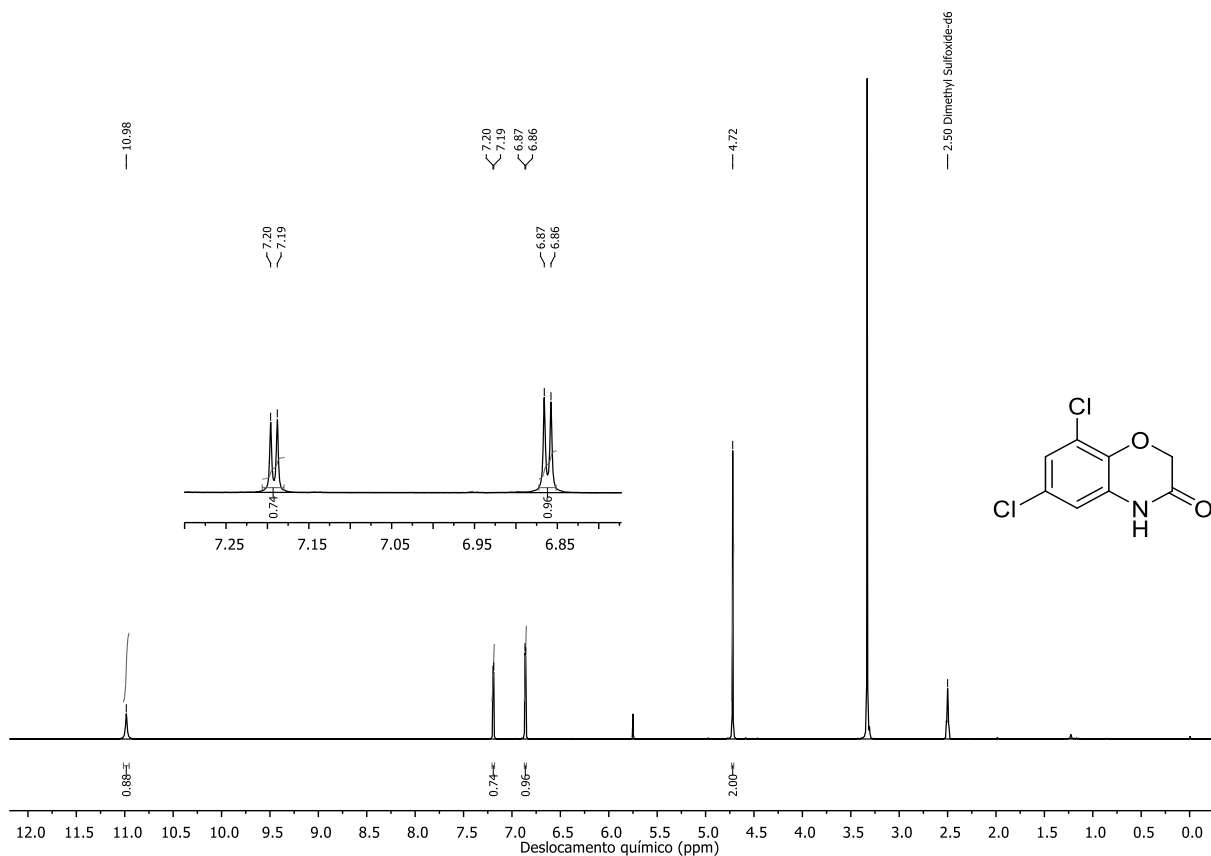
Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **2b**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **2b**



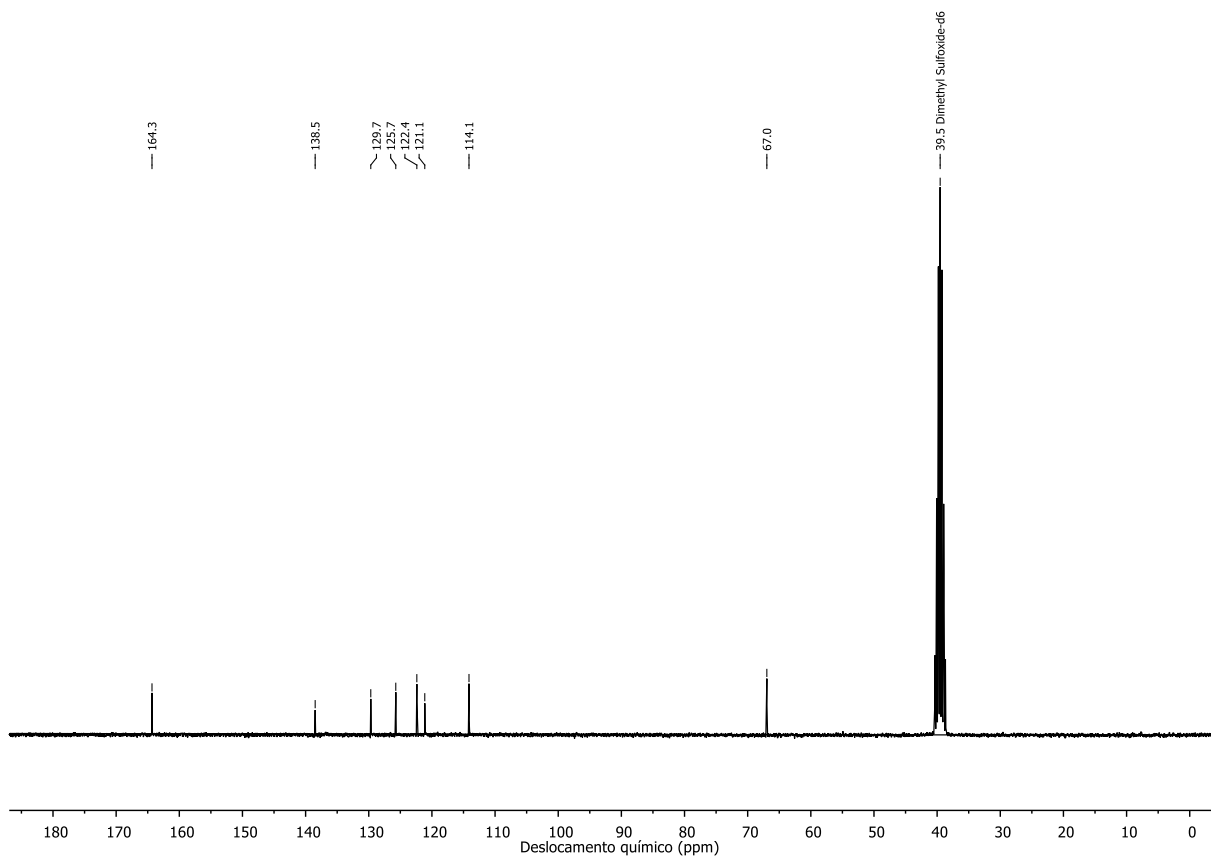
Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **2c**



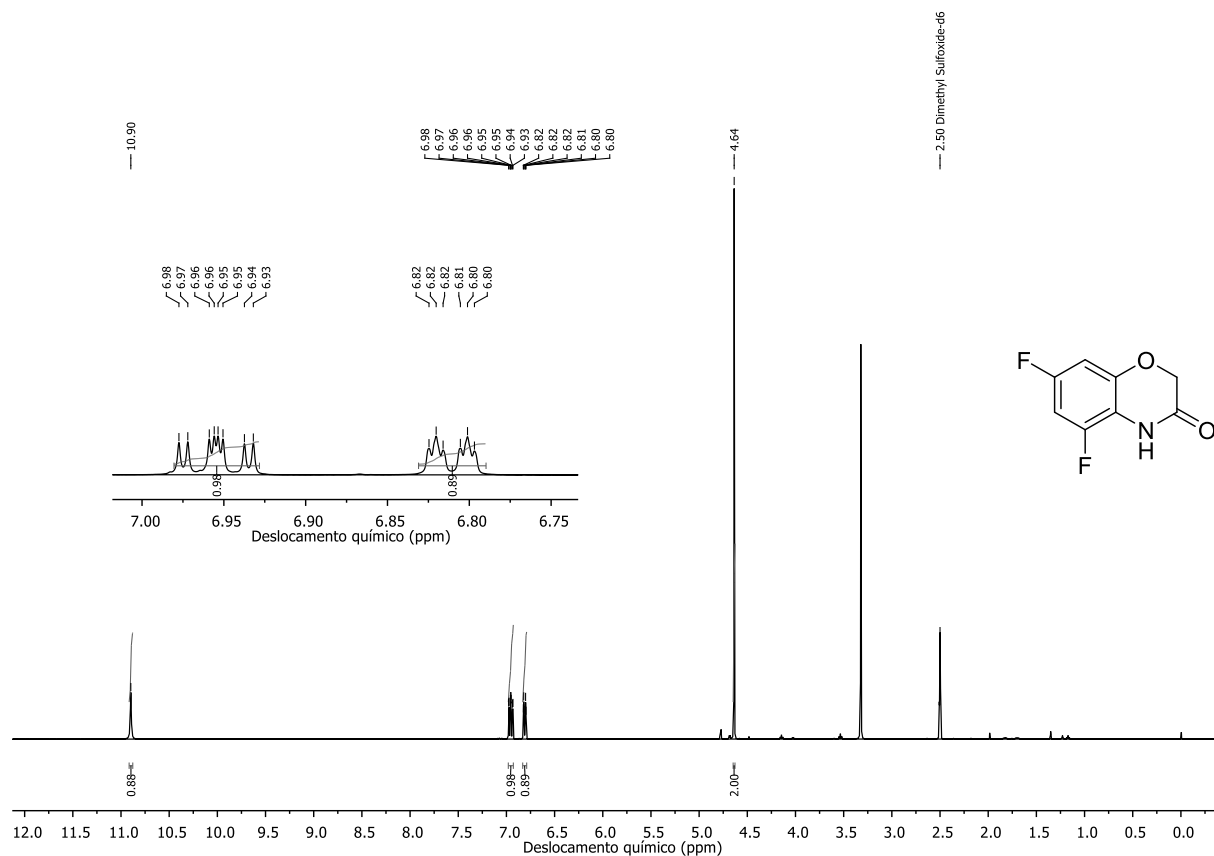
Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **2c**



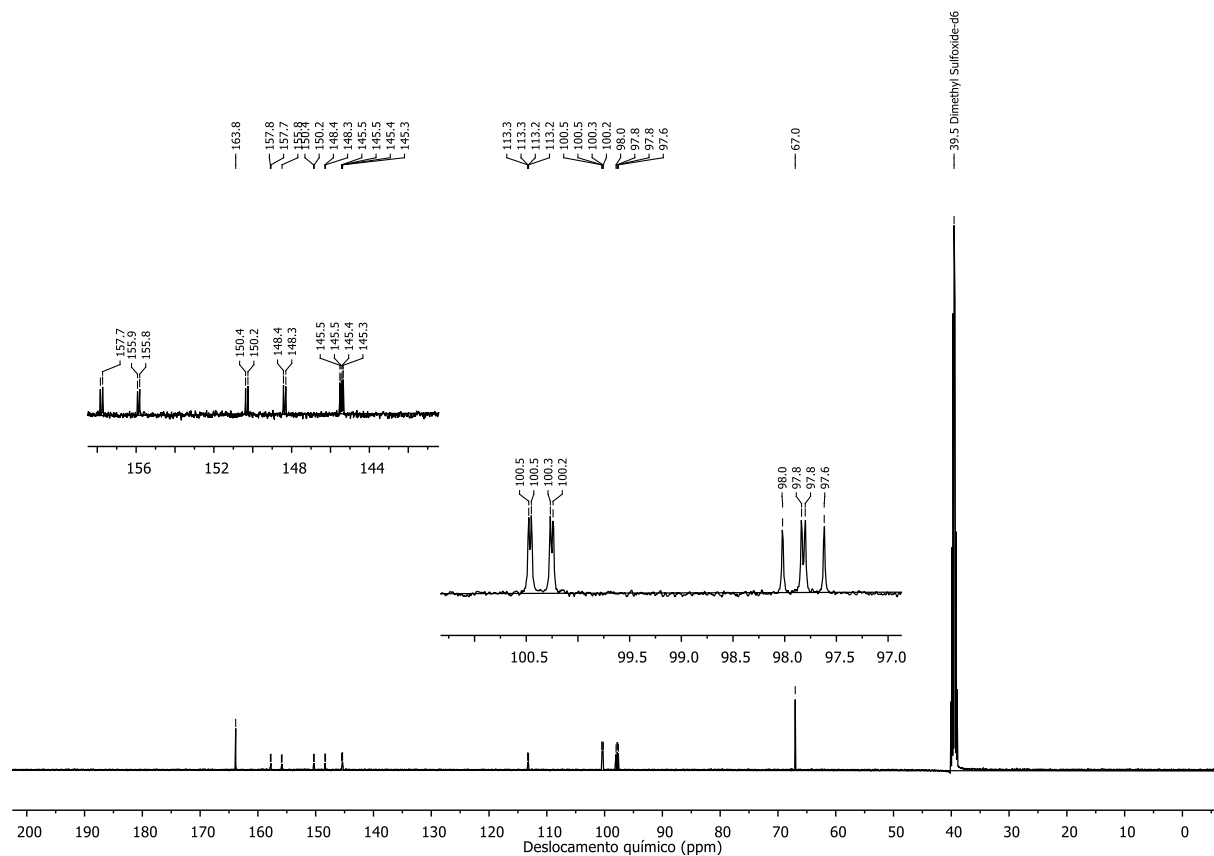
Espectro RMN ¹H (300 MHz, DMSO) do composto **2d**



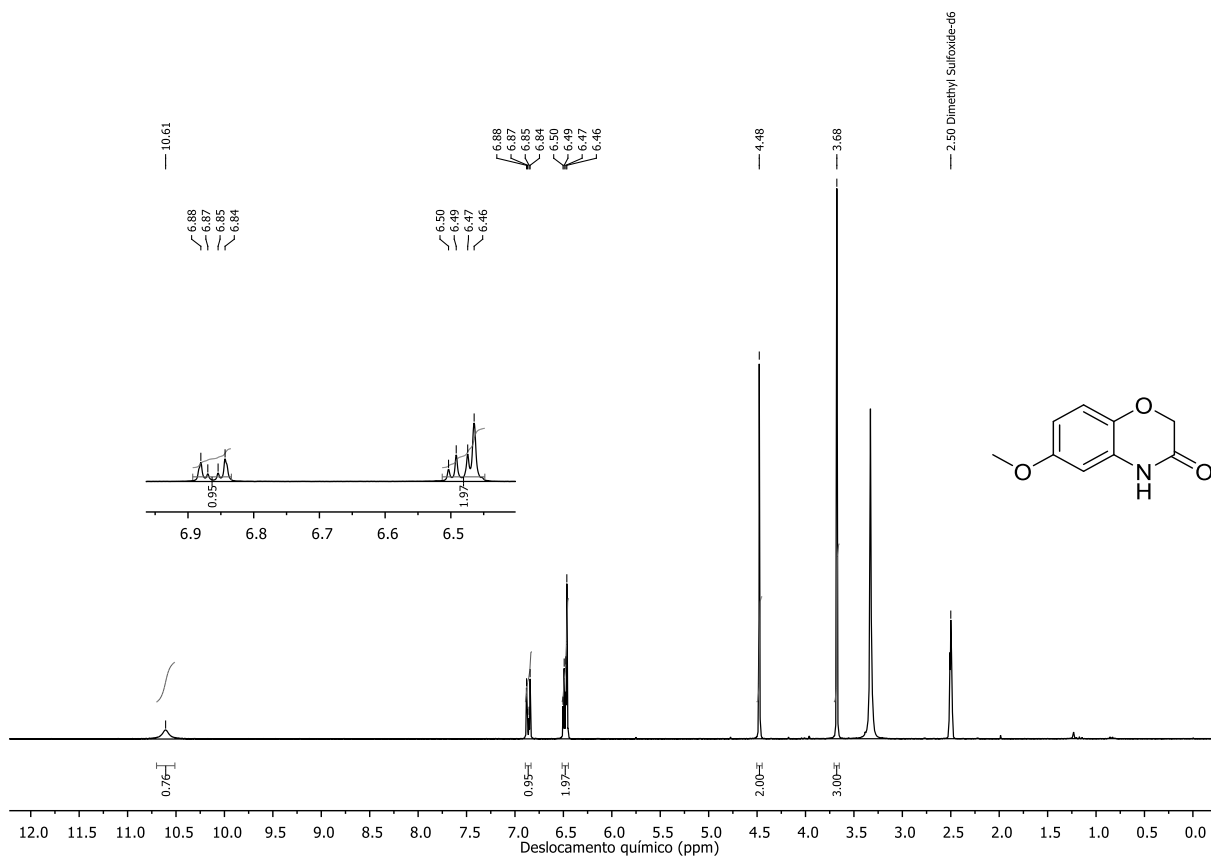
Espectro RMN ¹³C (75 MHz, DMSO) do composto **2d**



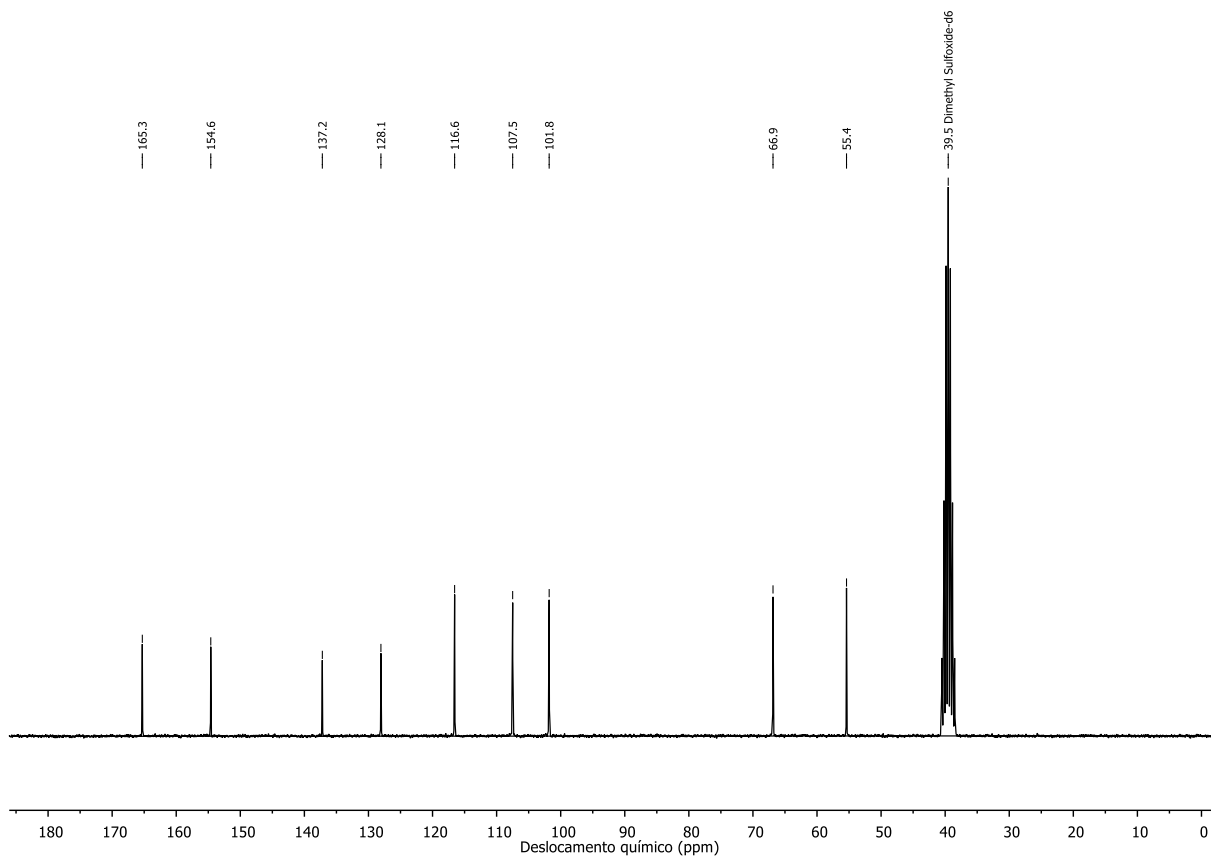
Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **2e**



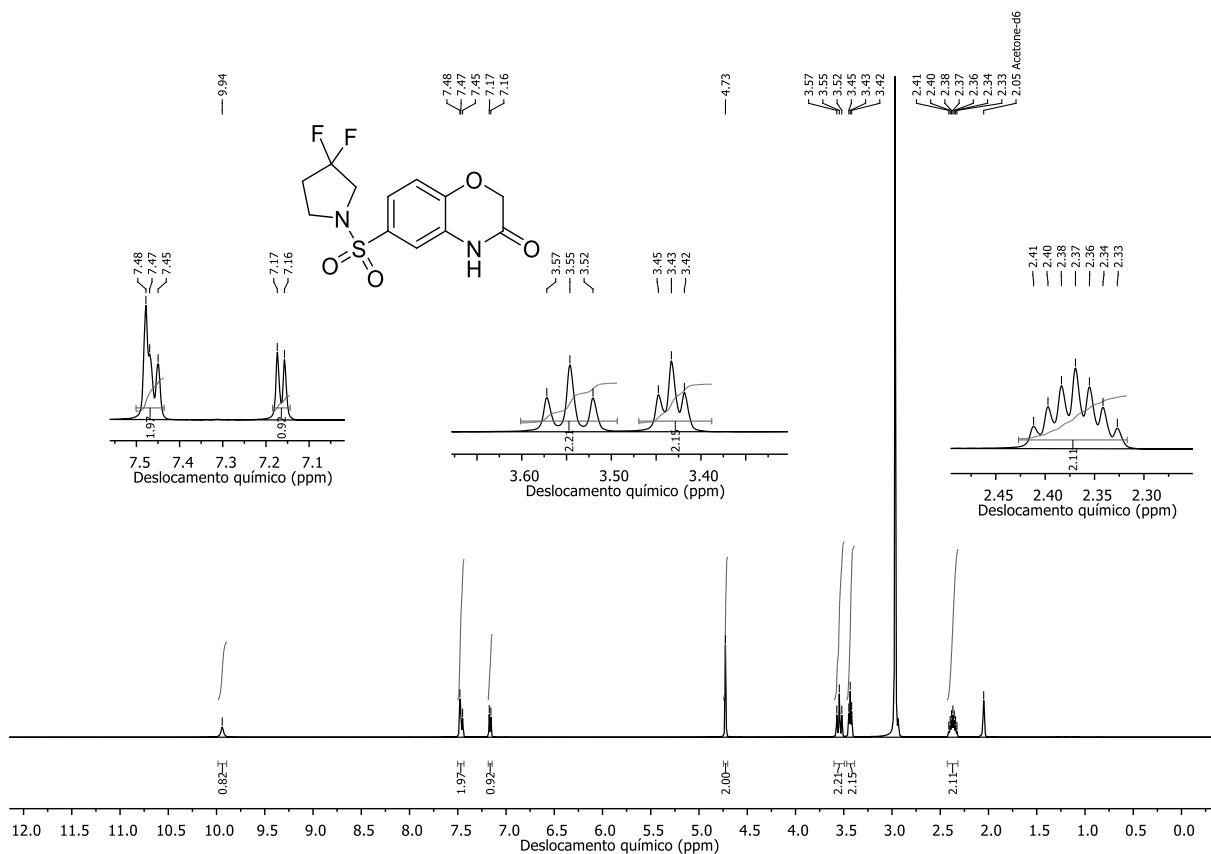
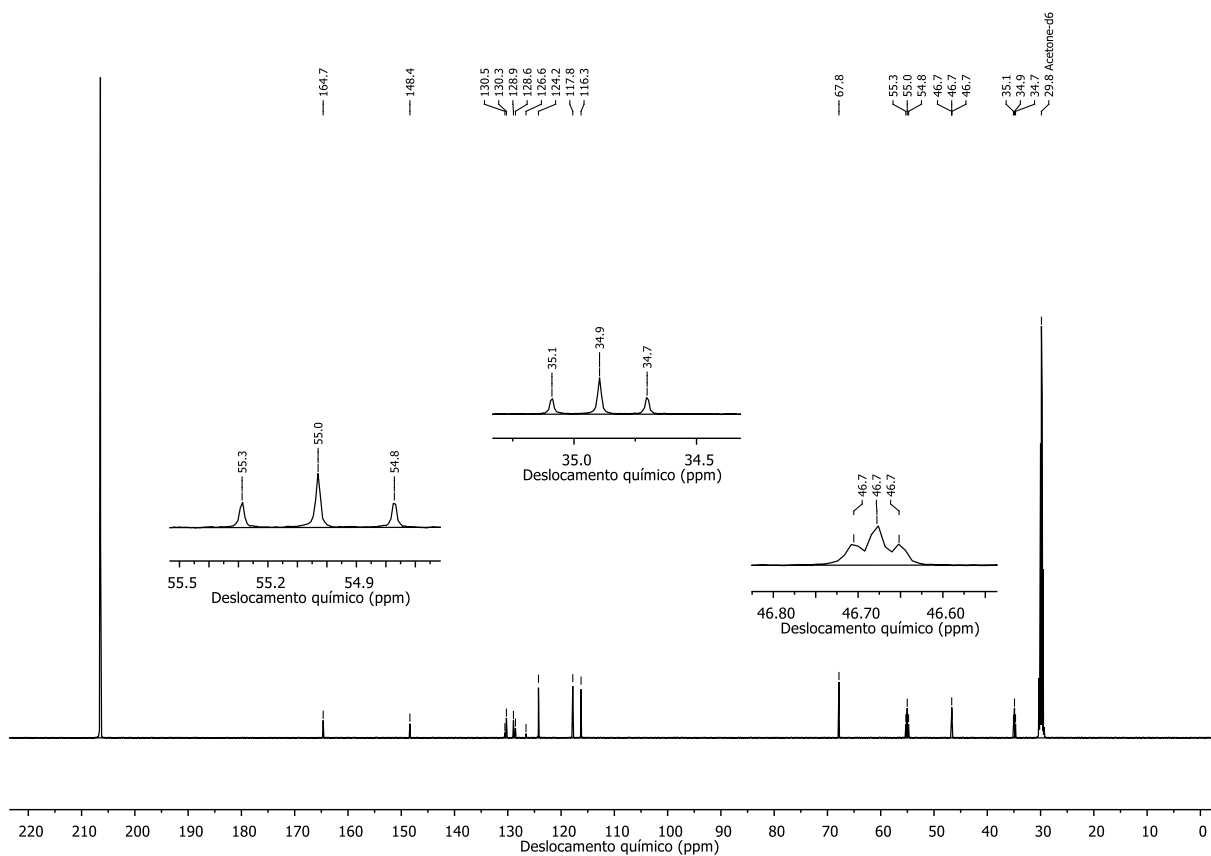
Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **2e**

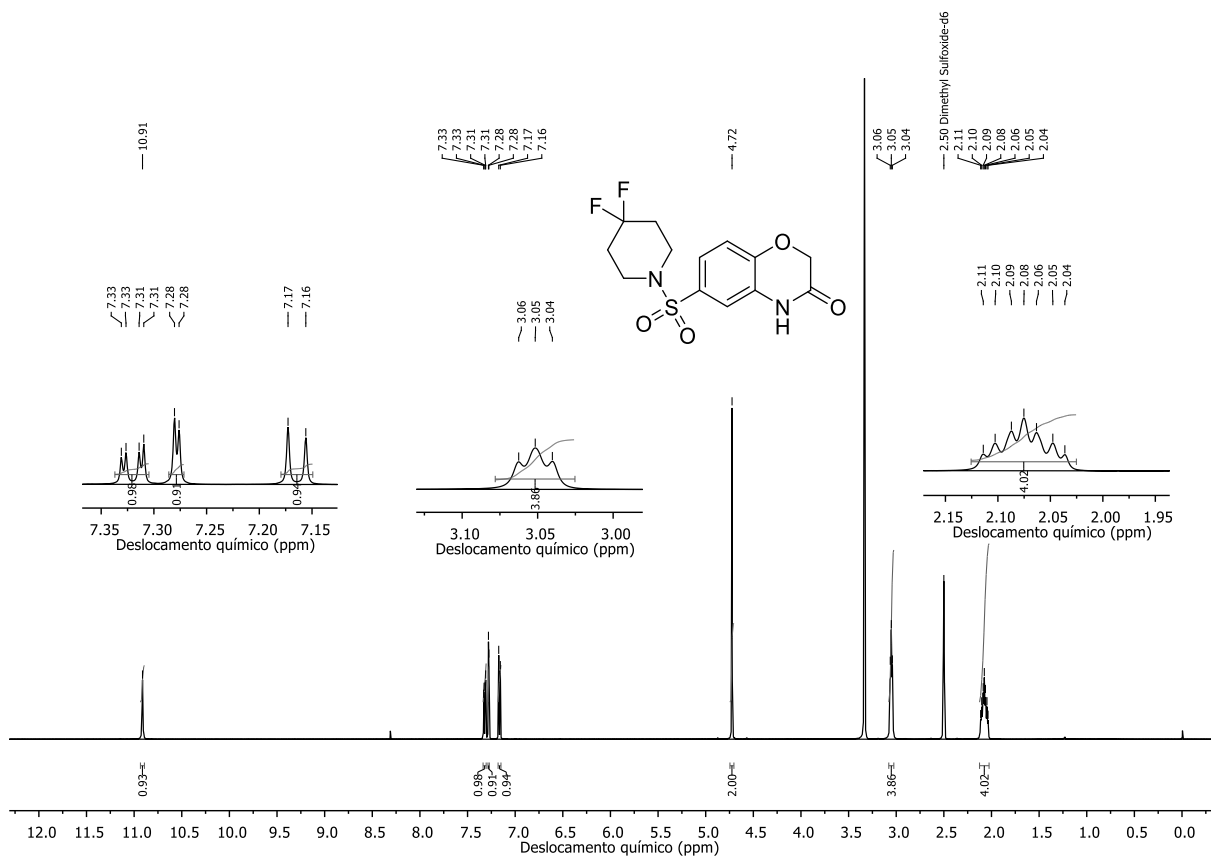
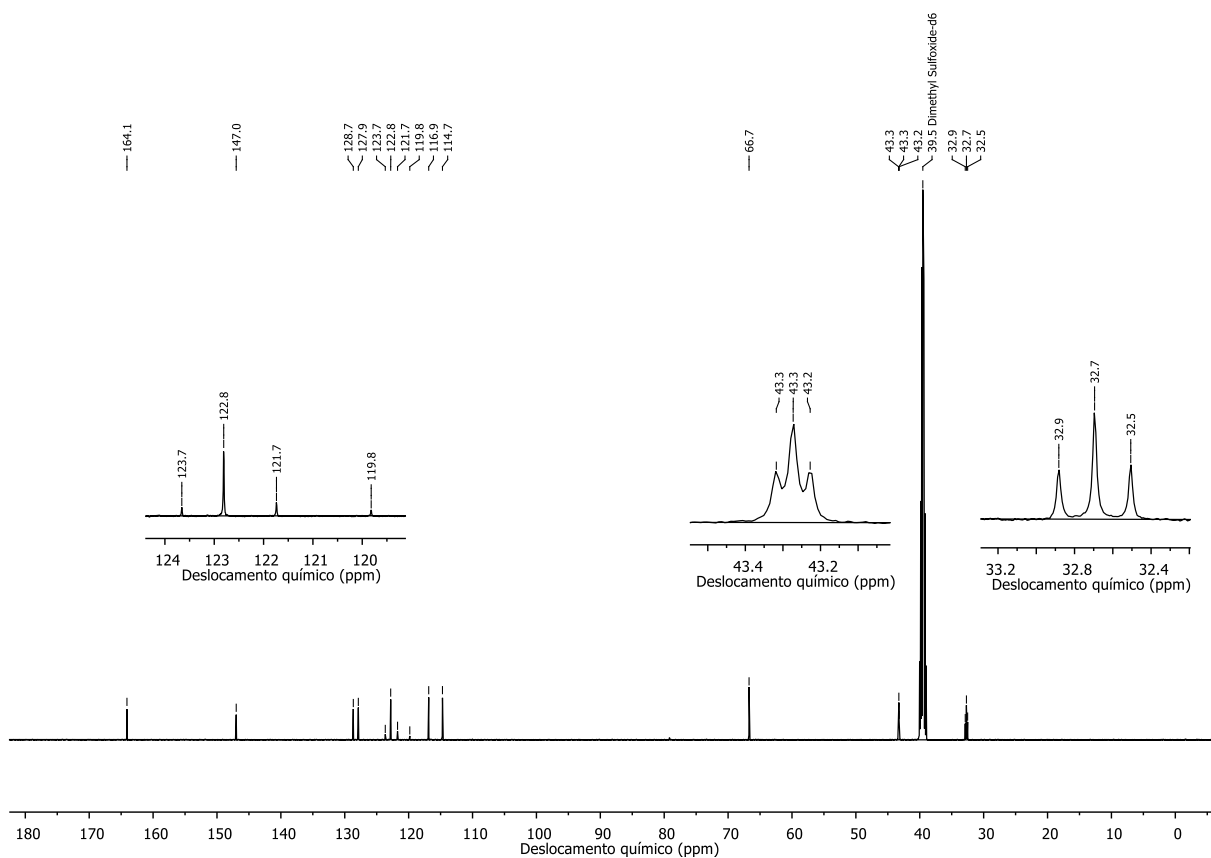


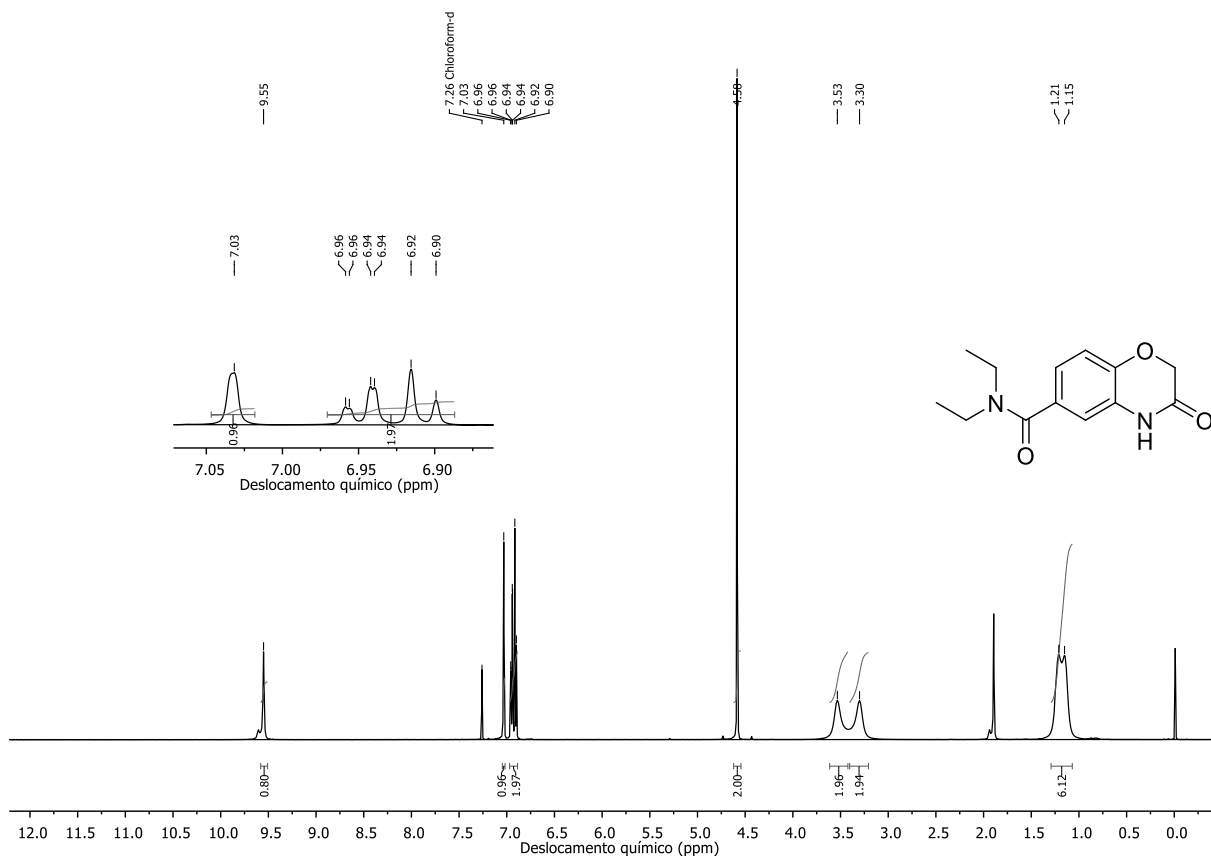
Espectro RMN ¹H (250 MHz, DMSO) do composto **2g**



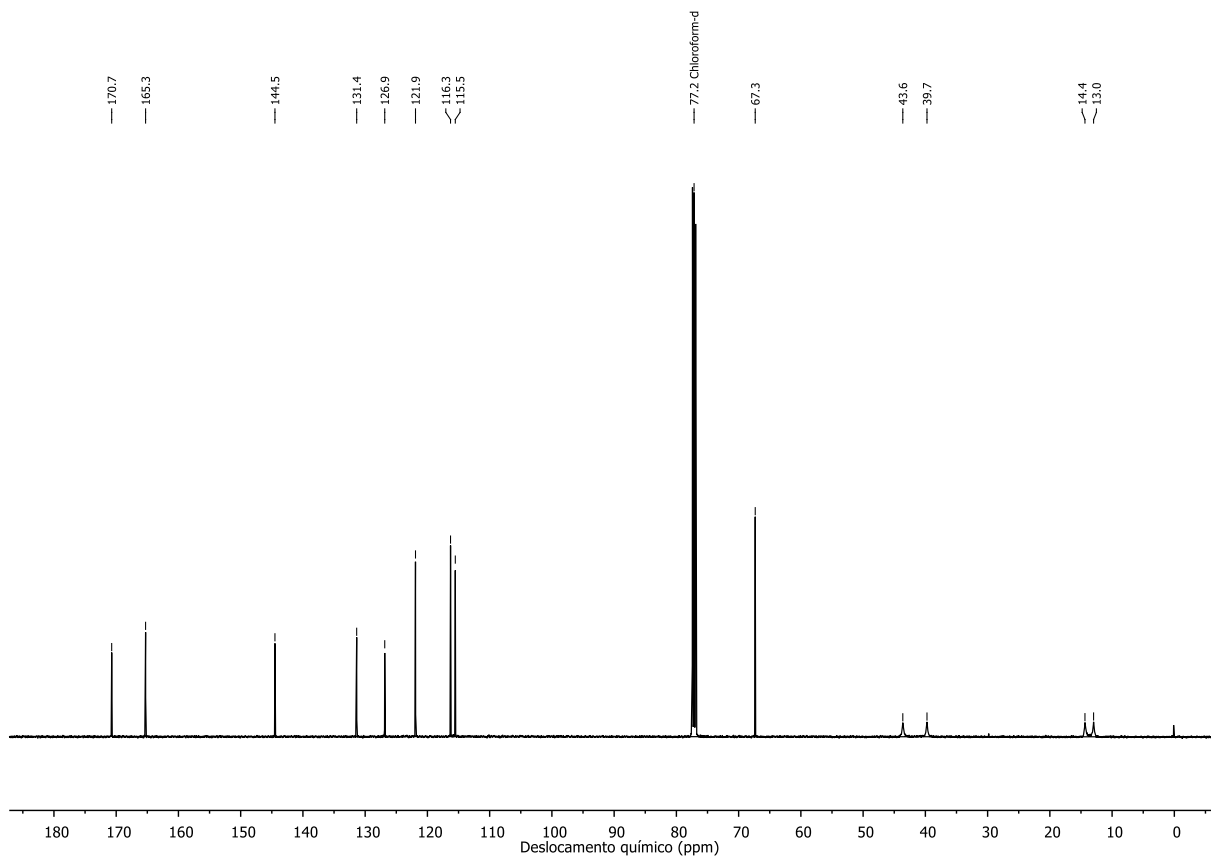
Espectro RMN ¹³C (63 MHz, DMSO) do composto **2g**

Espectro RMN ¹H (500 Hz, Acetona) do composto **2h**Espectro RMN ¹³C (126 Hz, Acetona) do composto **2h**

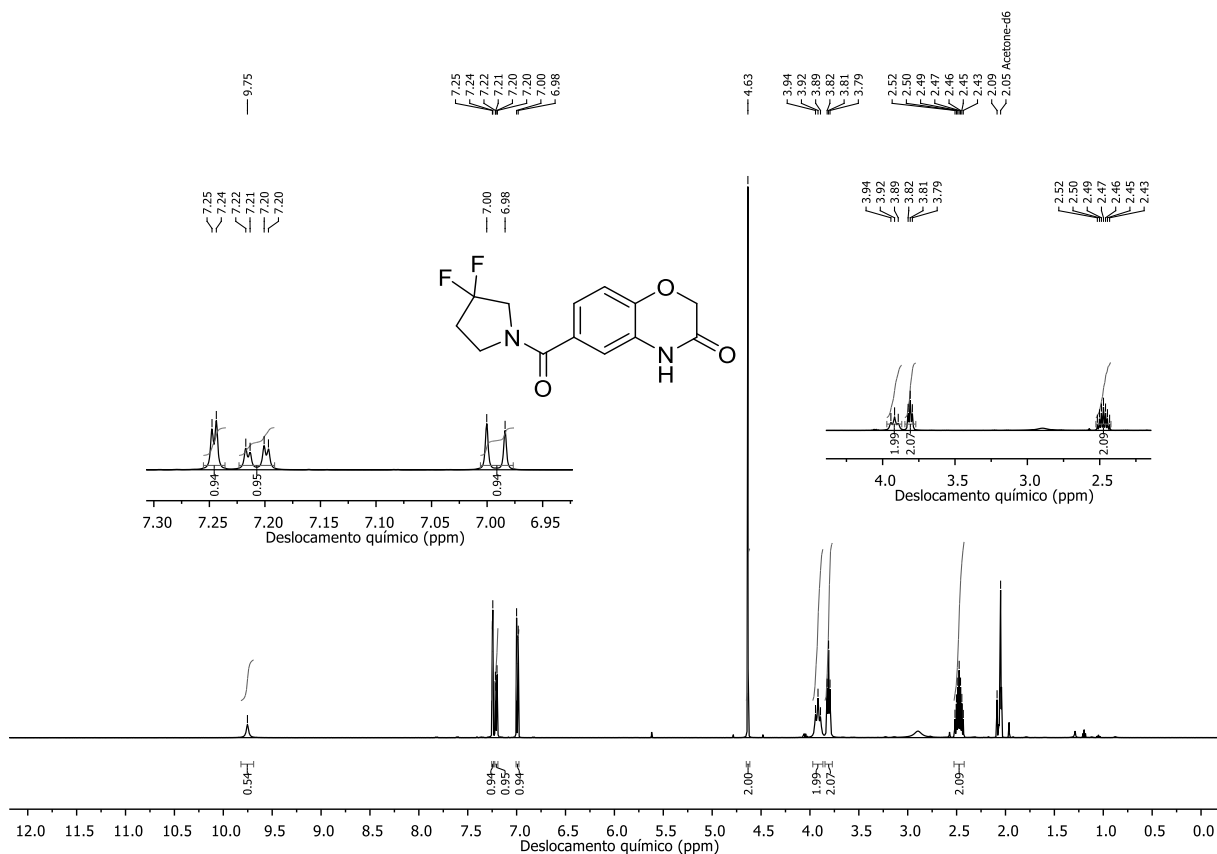
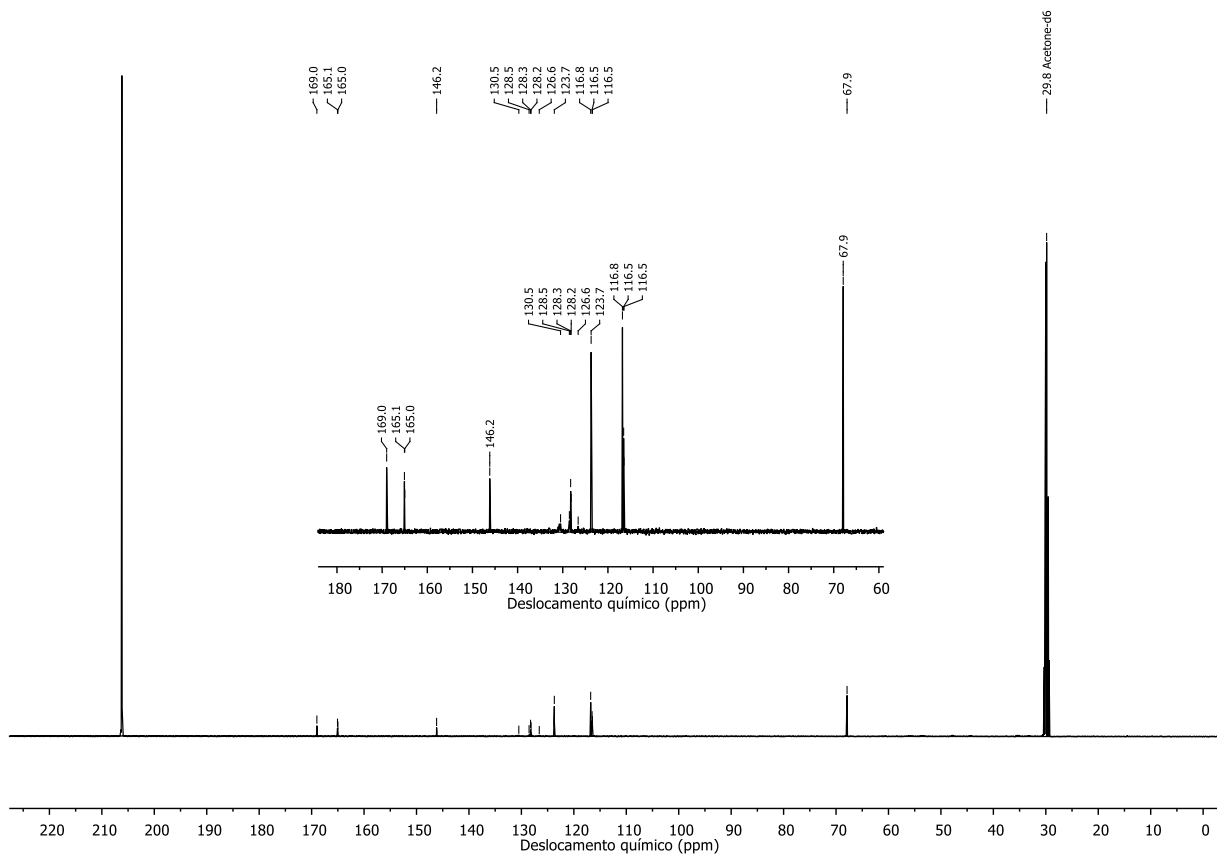
Espectro RMN ¹H (500 Hz, DMSO) do composto **2i**Espectro RMN ¹³C (126 Hz, DMSO) do composto **2i**

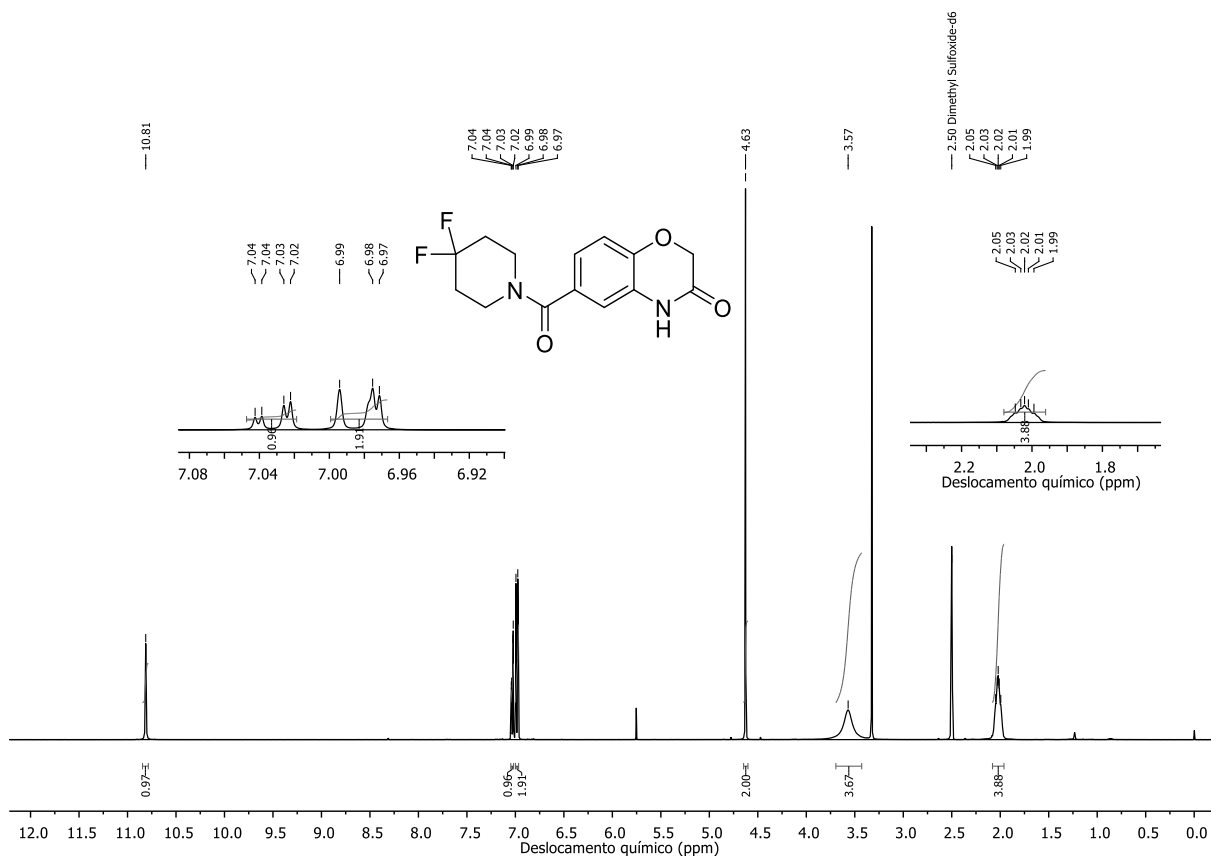
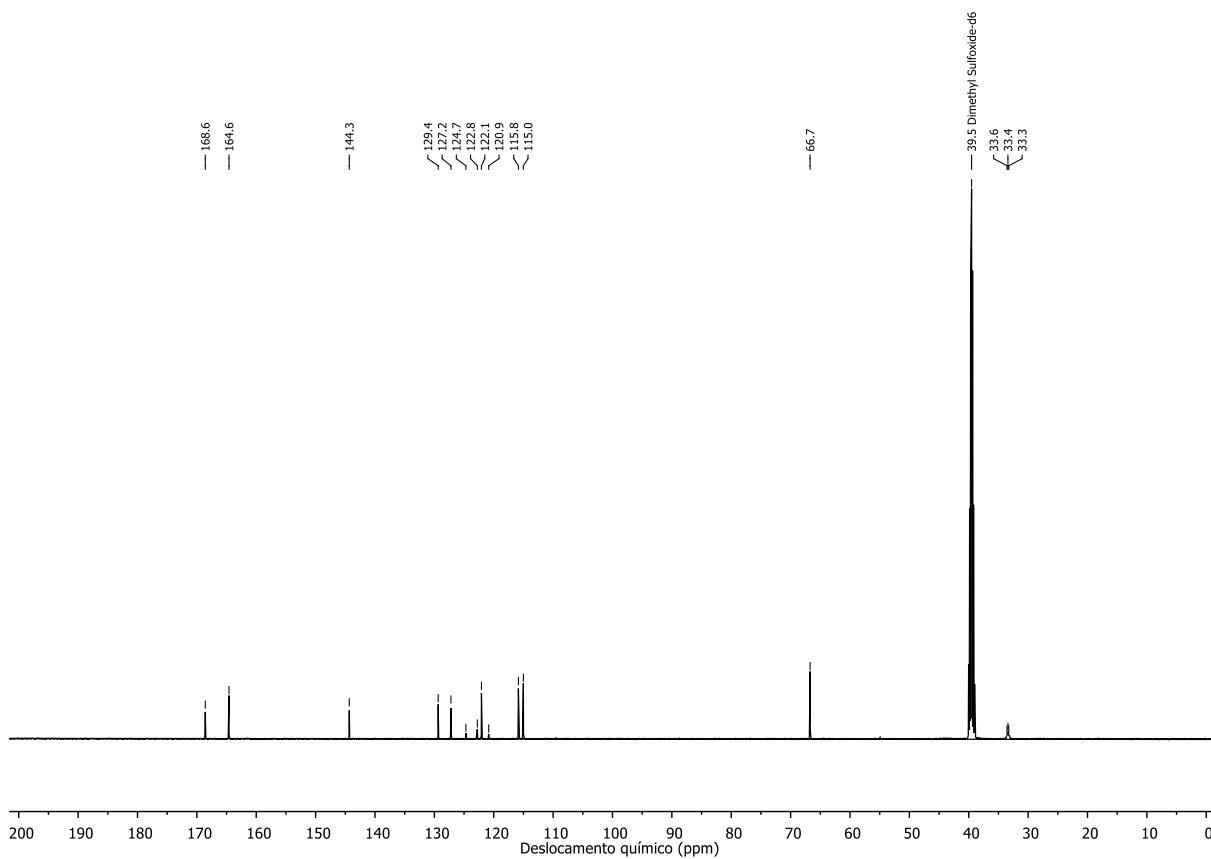


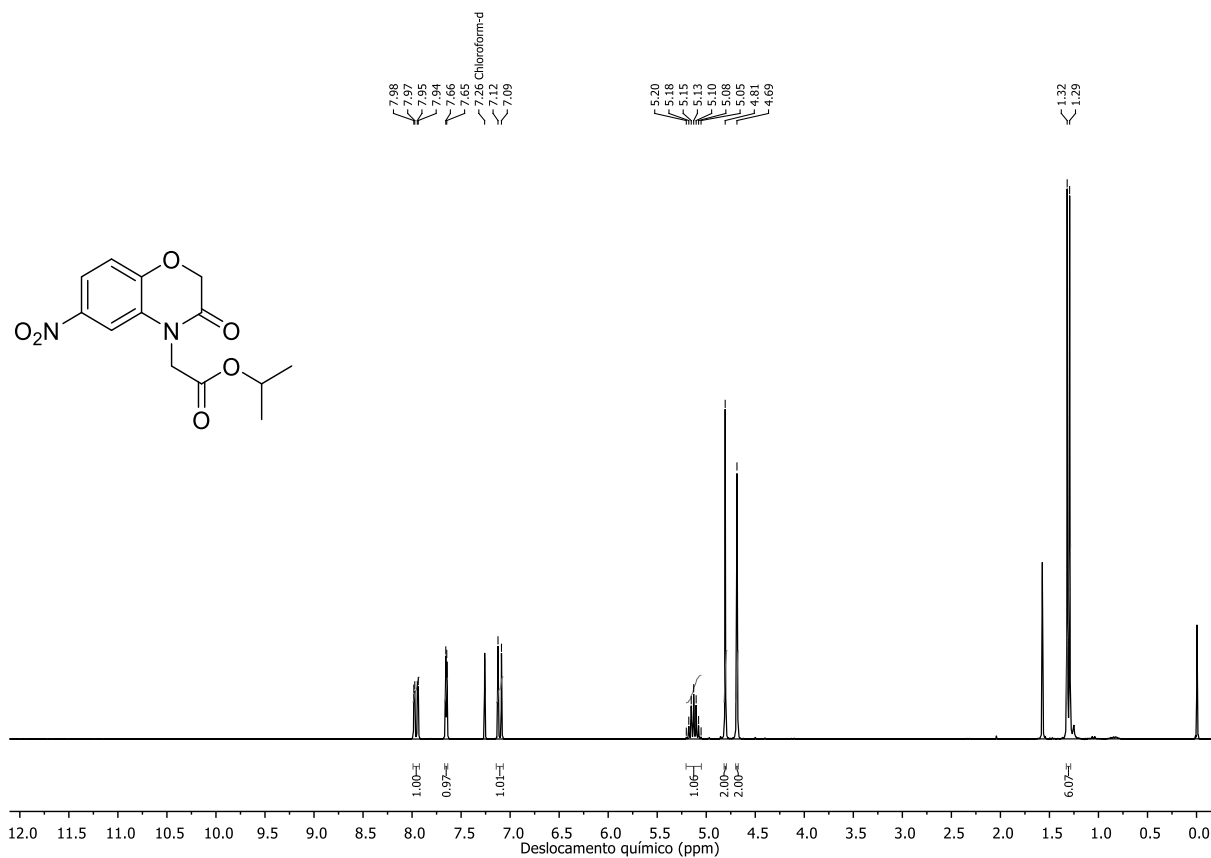
Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **2j**



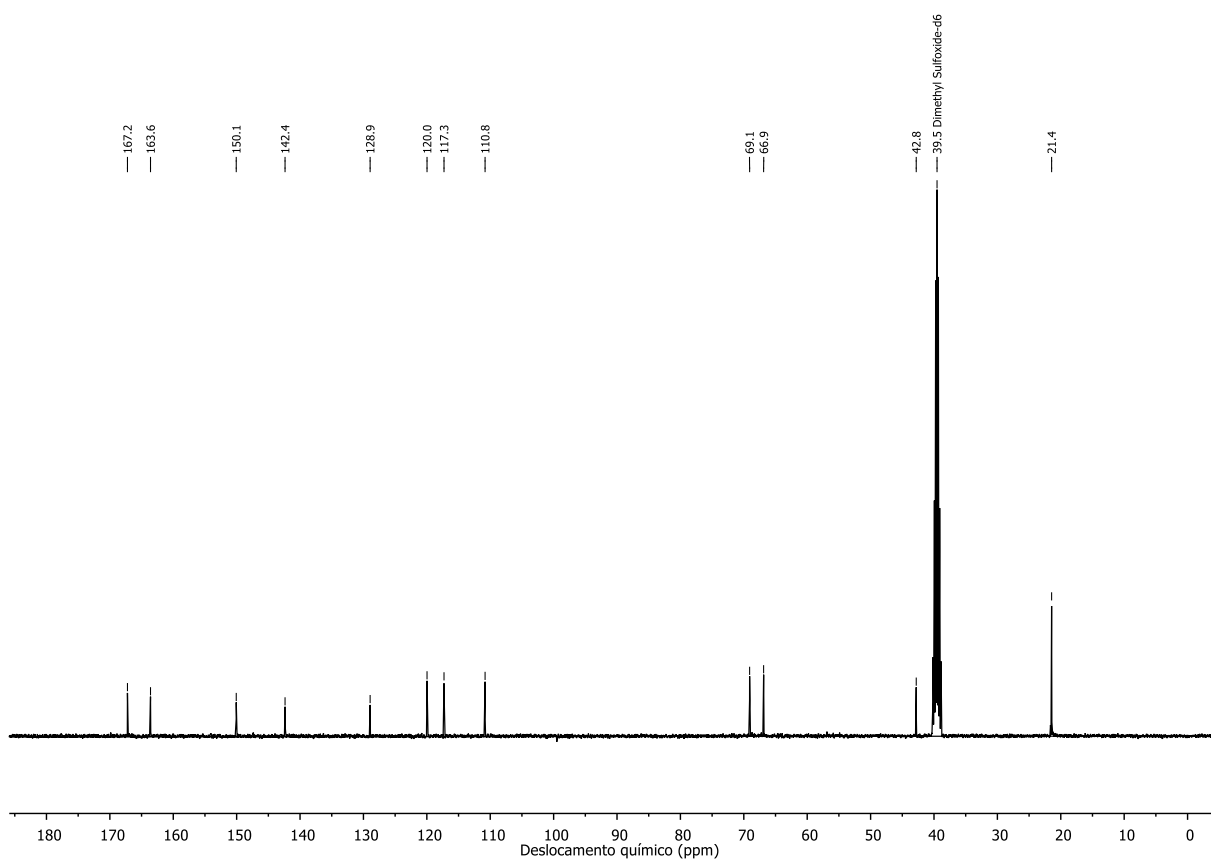
Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **2j**

Espectro RMN ¹H (500 MHz, Acetona) do composto **2k**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, Acetona) do composto **2k**

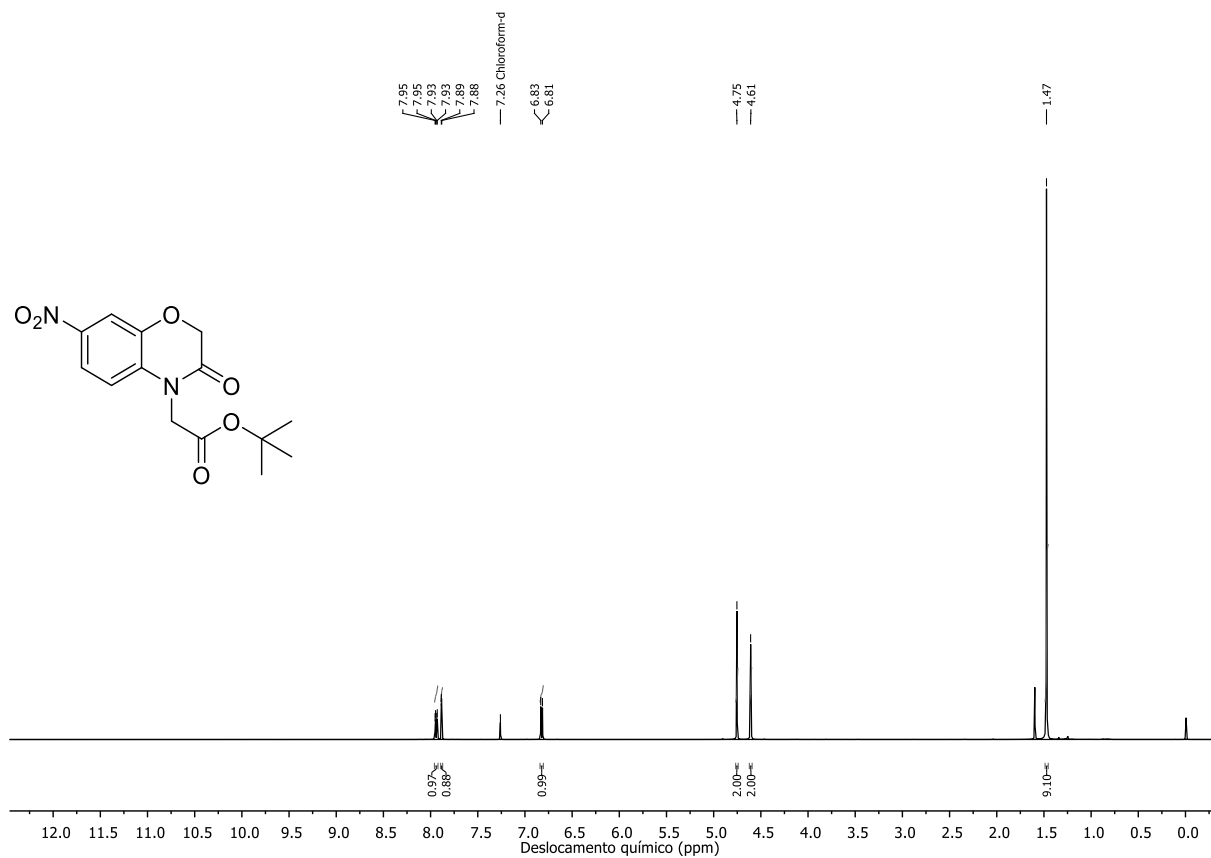
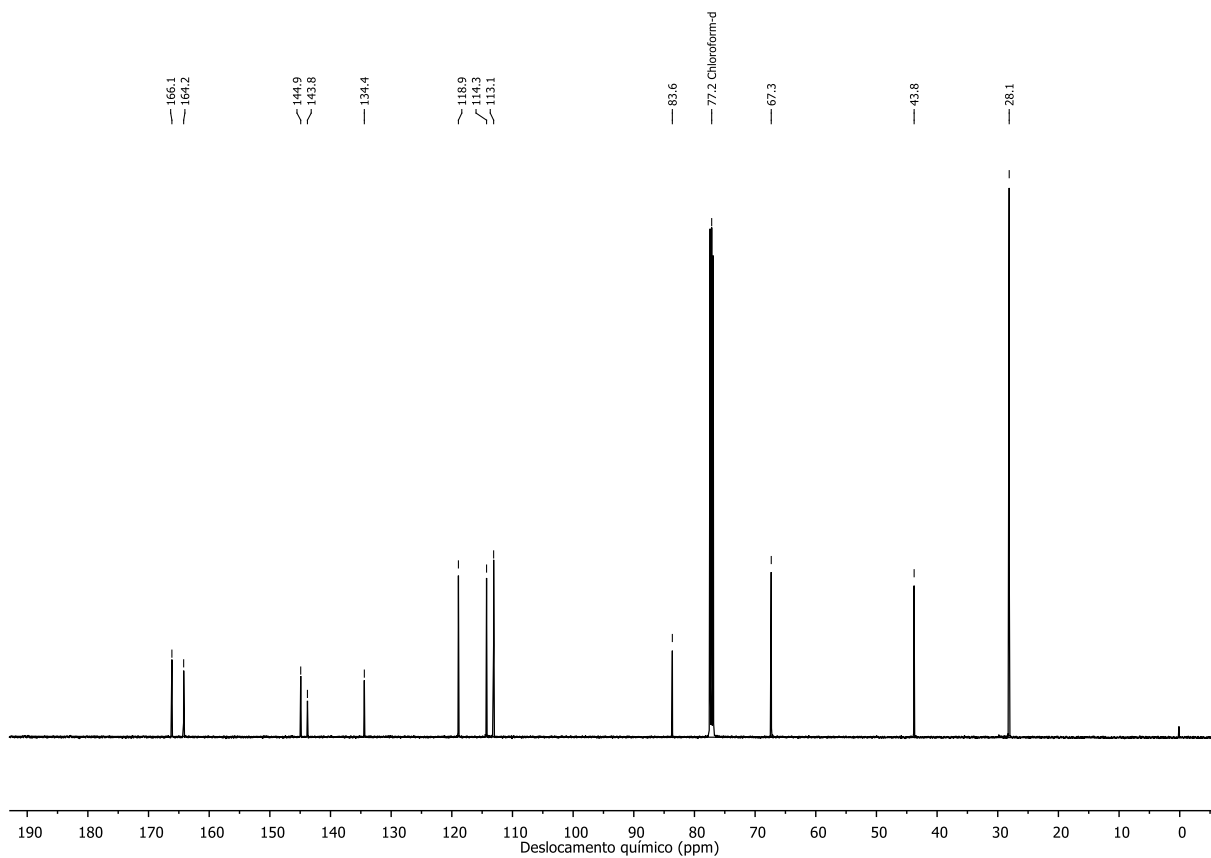
RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **2I**Espectro ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **2I**

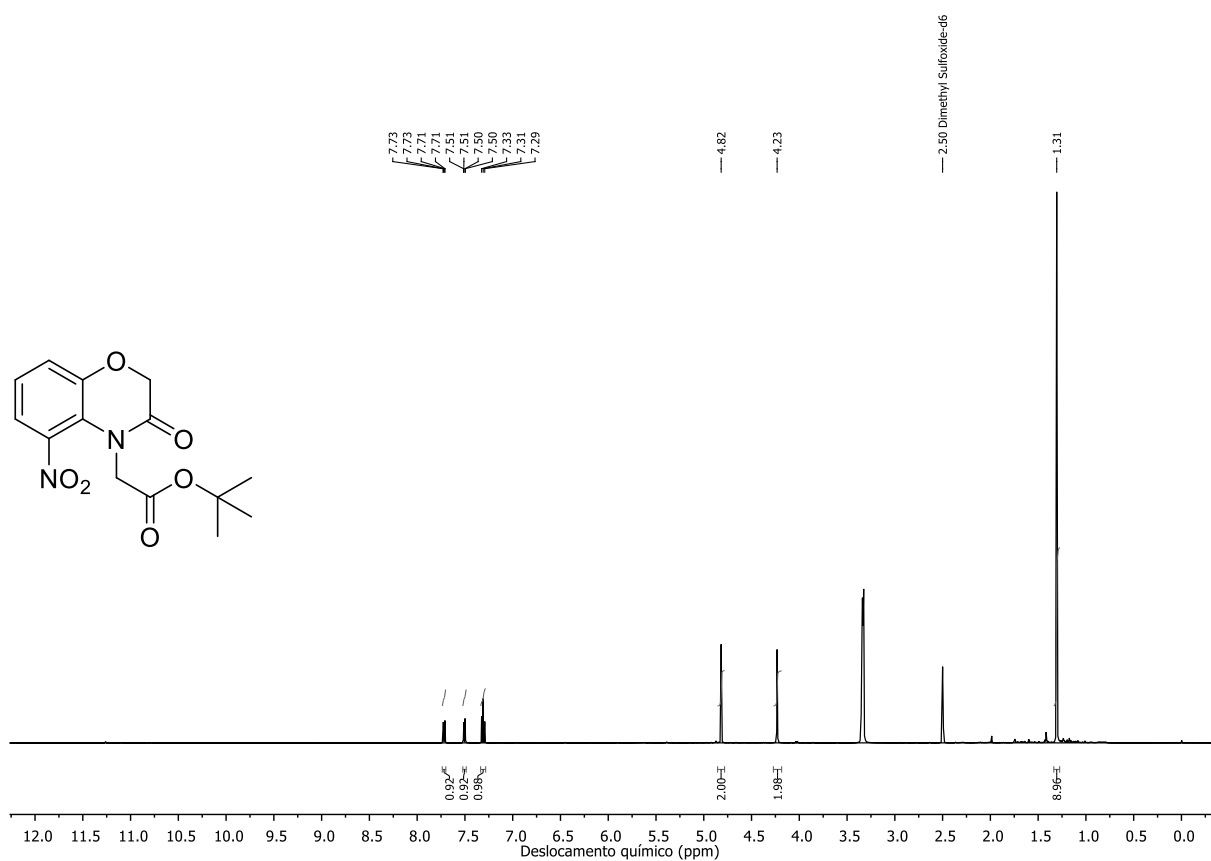
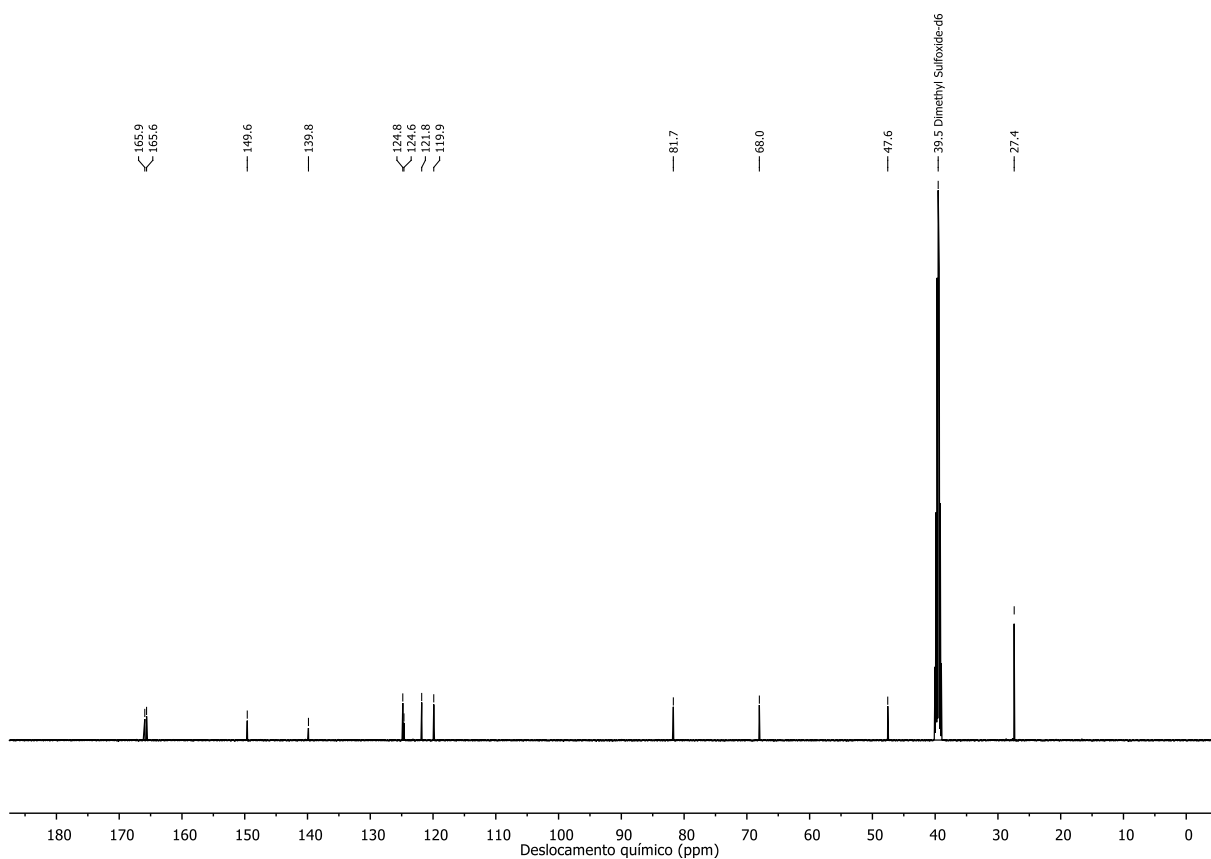


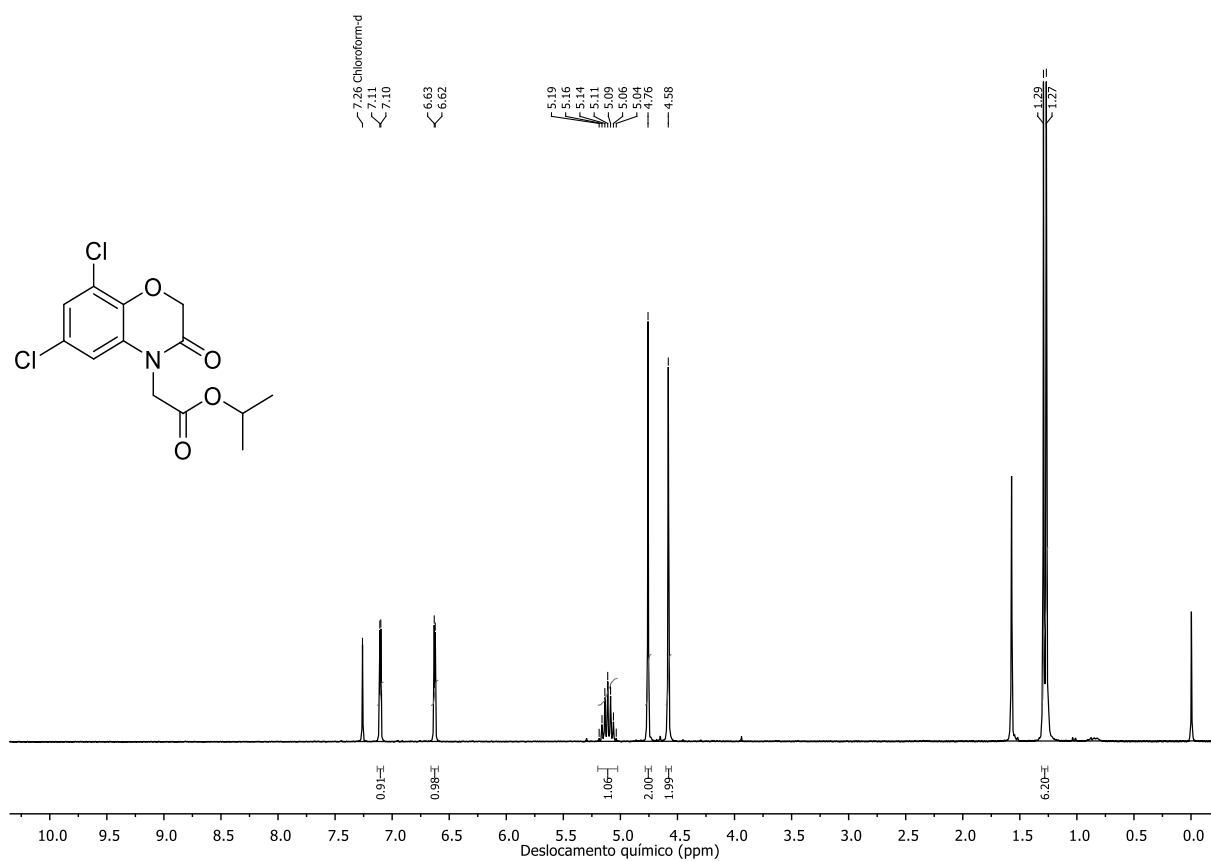
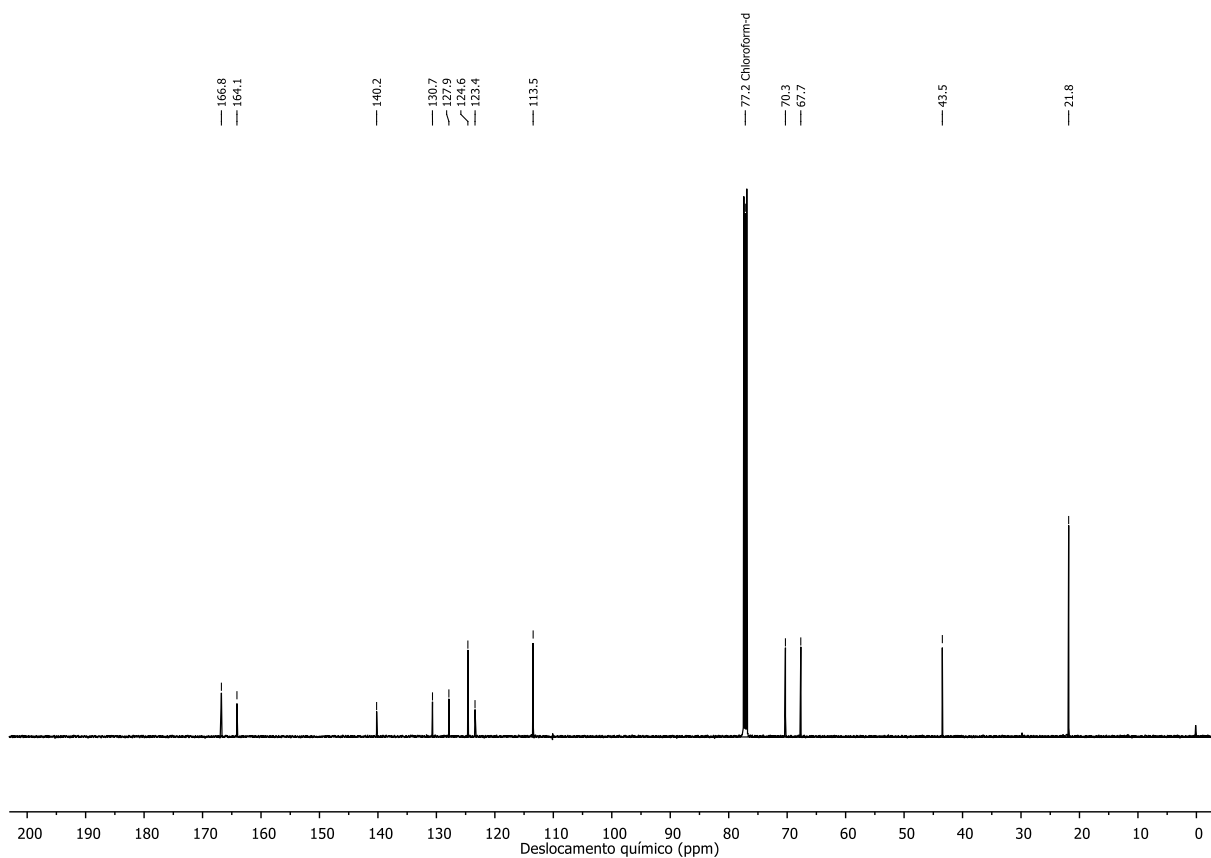
Espectro RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do composto **3a**

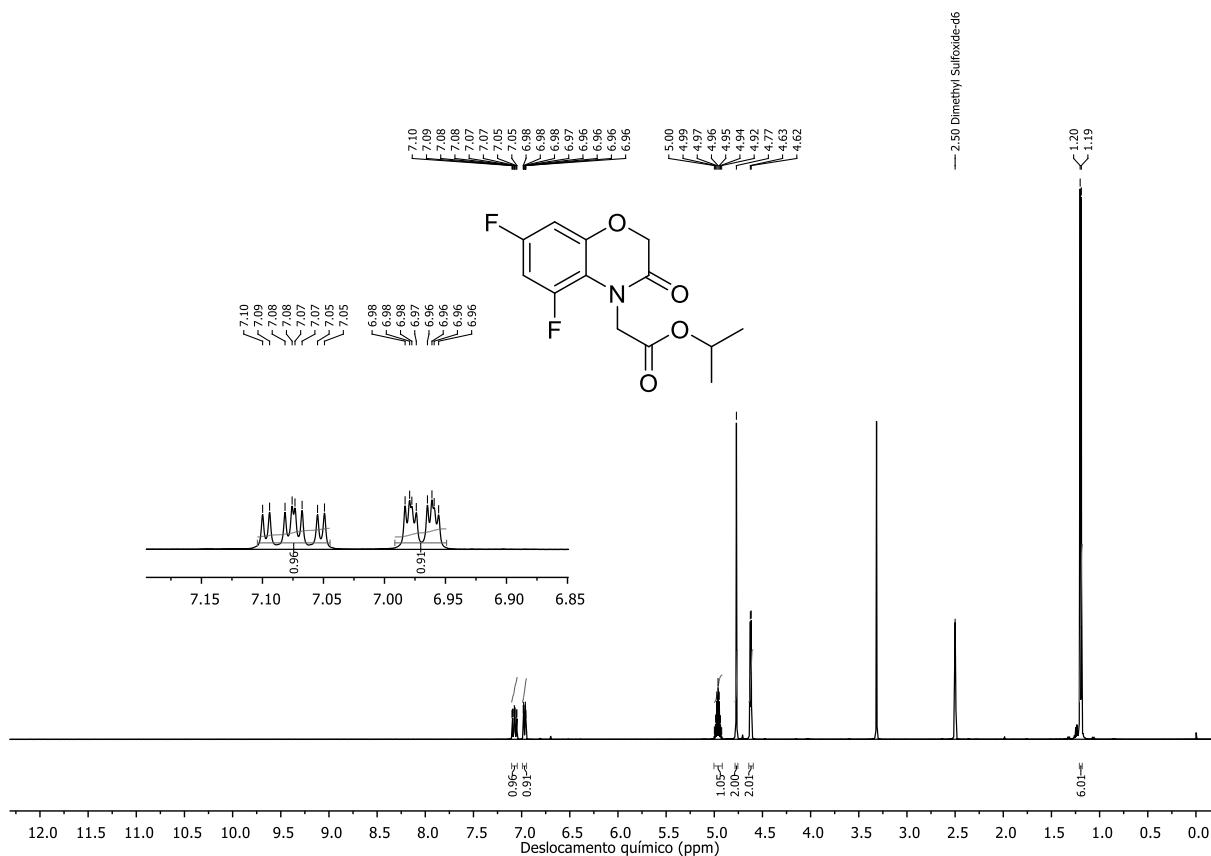
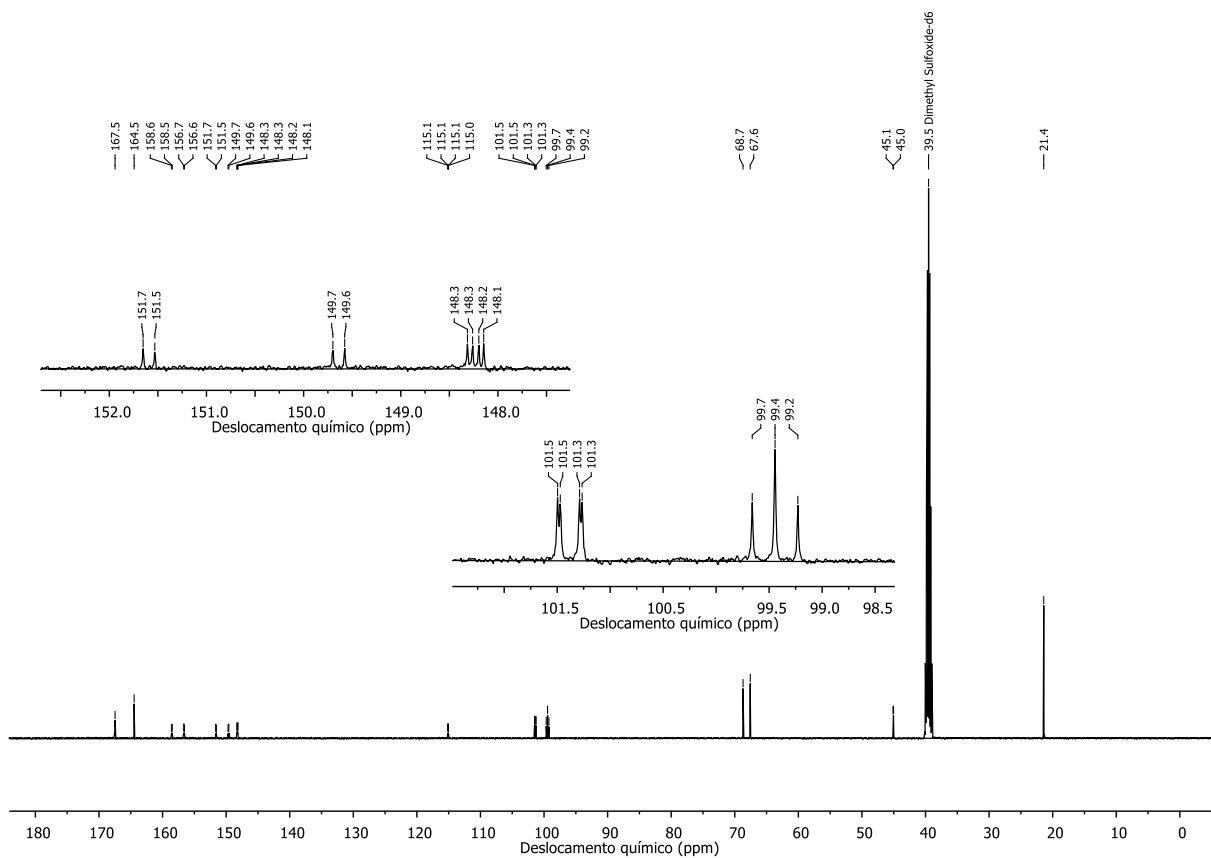


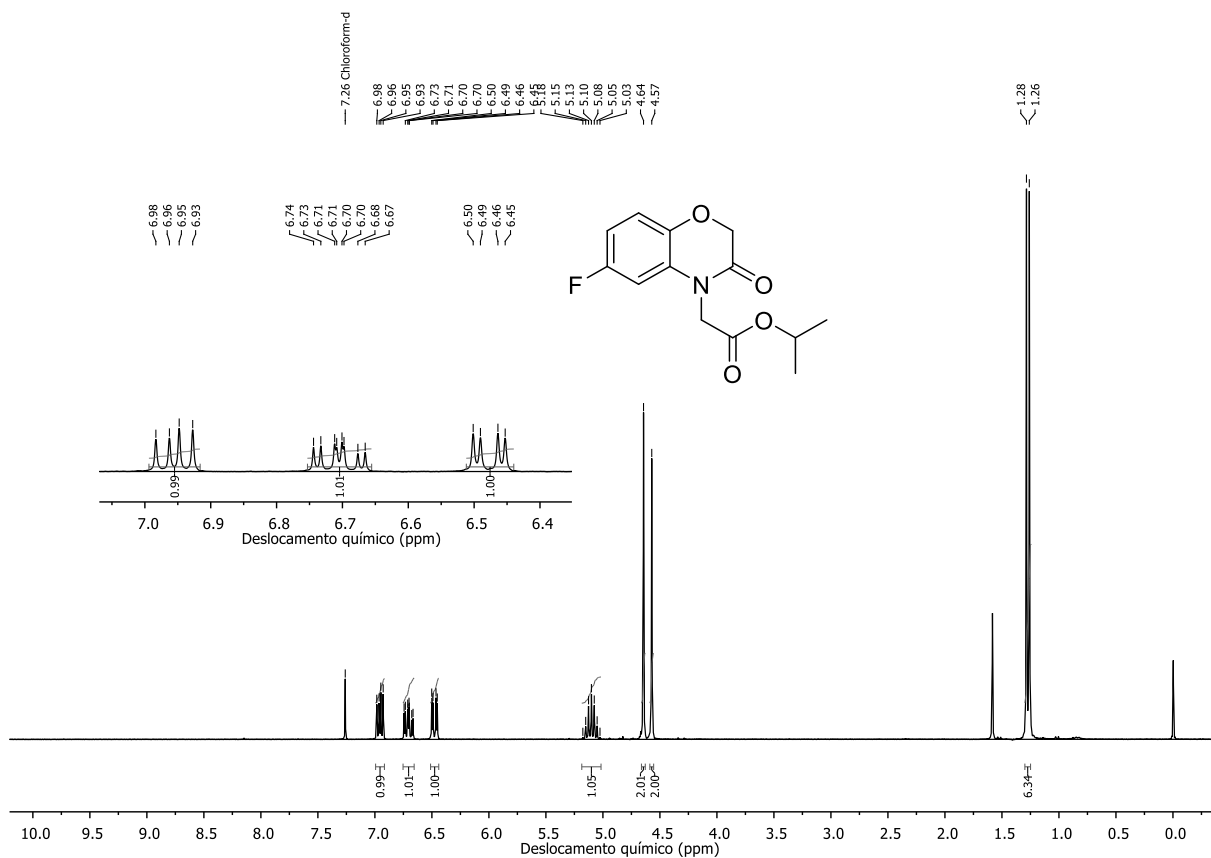
Espectro RMN ¹³C (101 MHz, DMSO) do composto **3a**

Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **3b**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **3b**

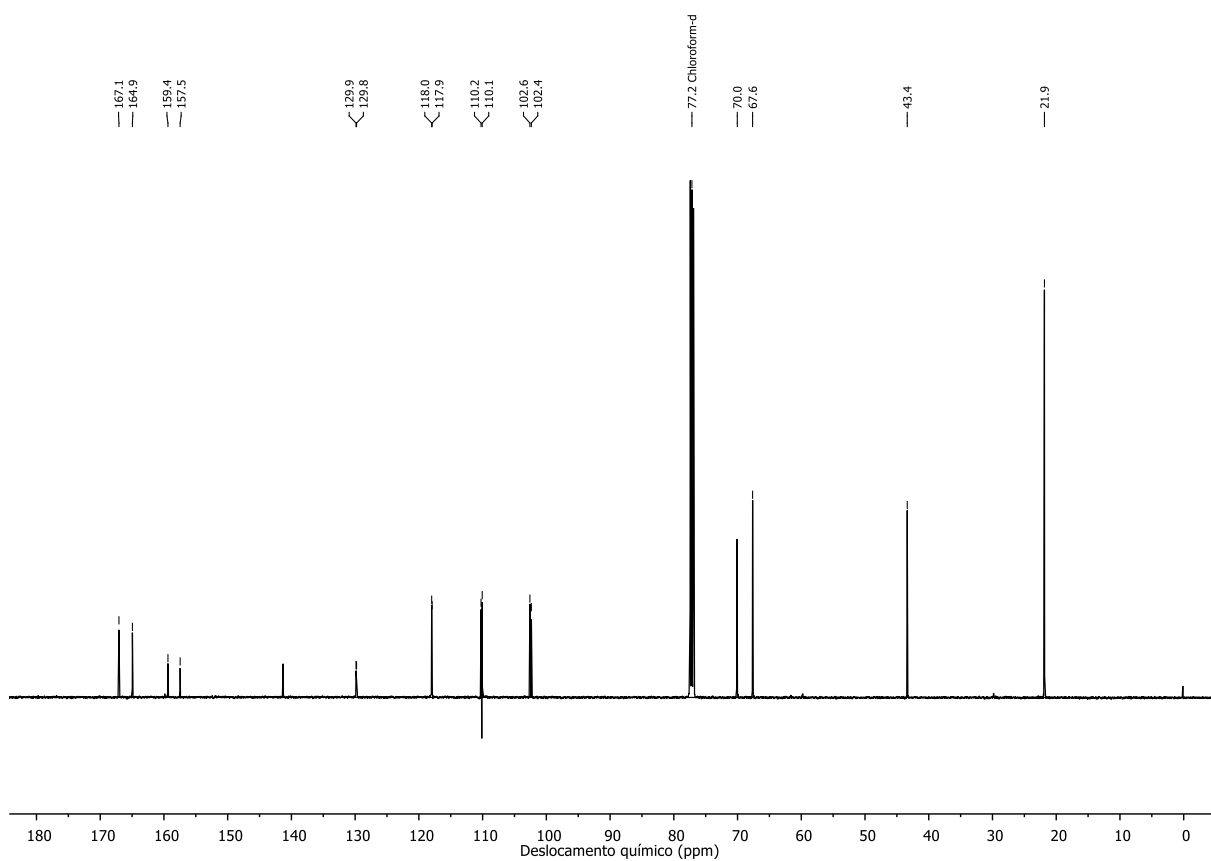
Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **3c**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **3c**

Espectro RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do composto **3d**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **3d**

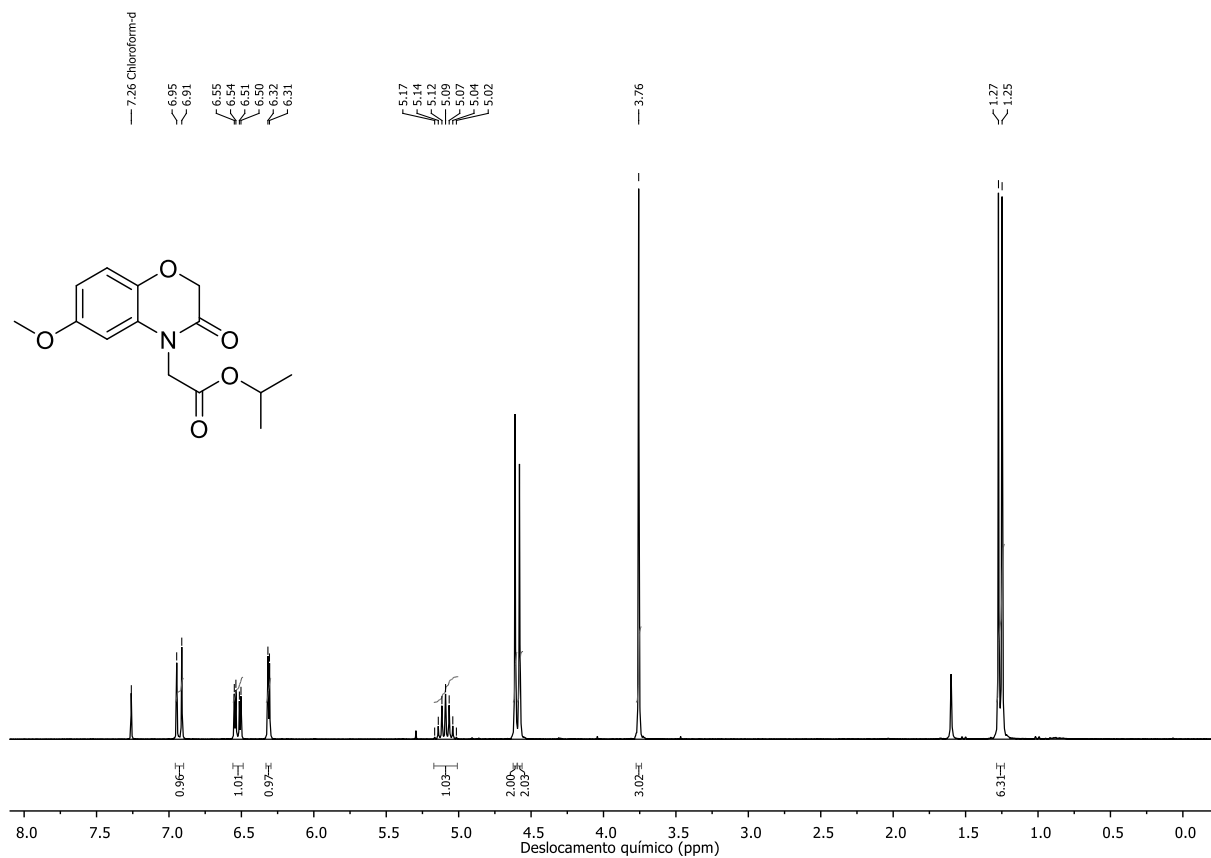
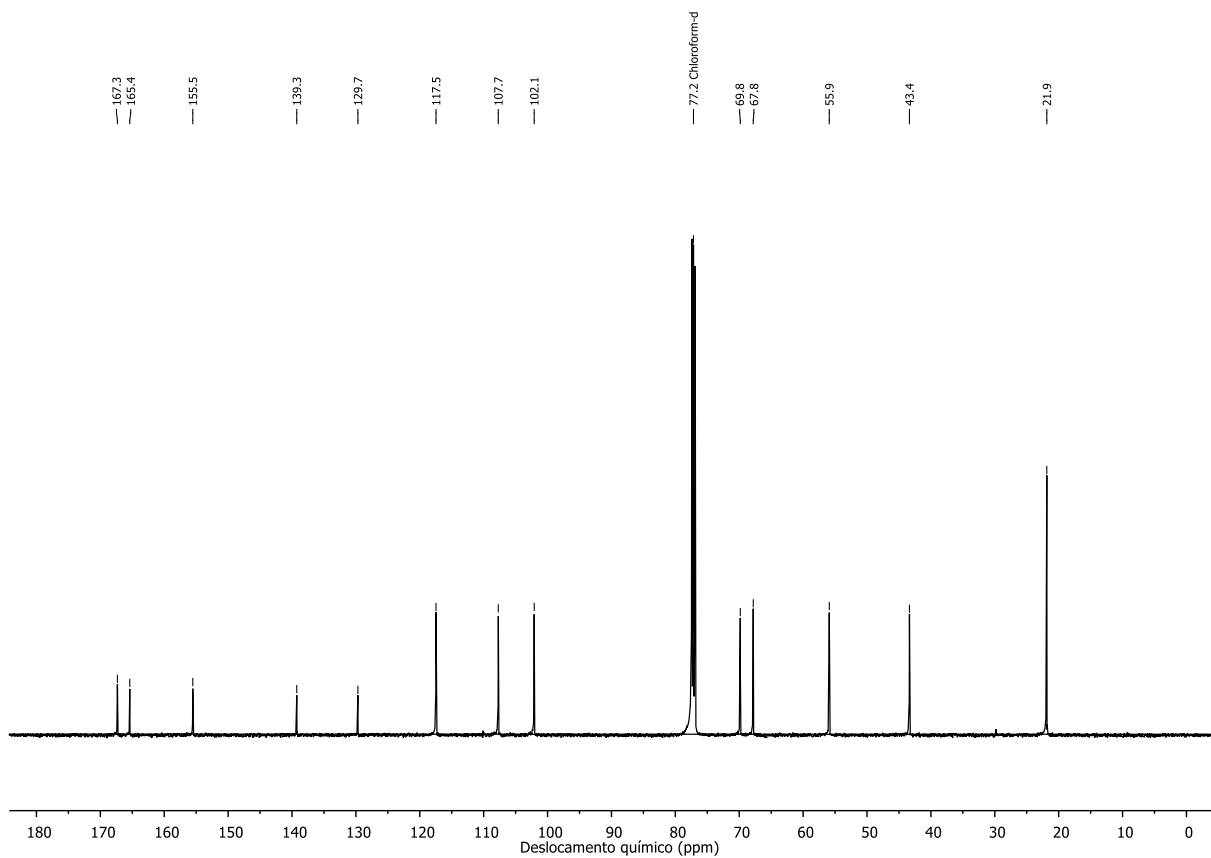
Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **3e**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **3e**

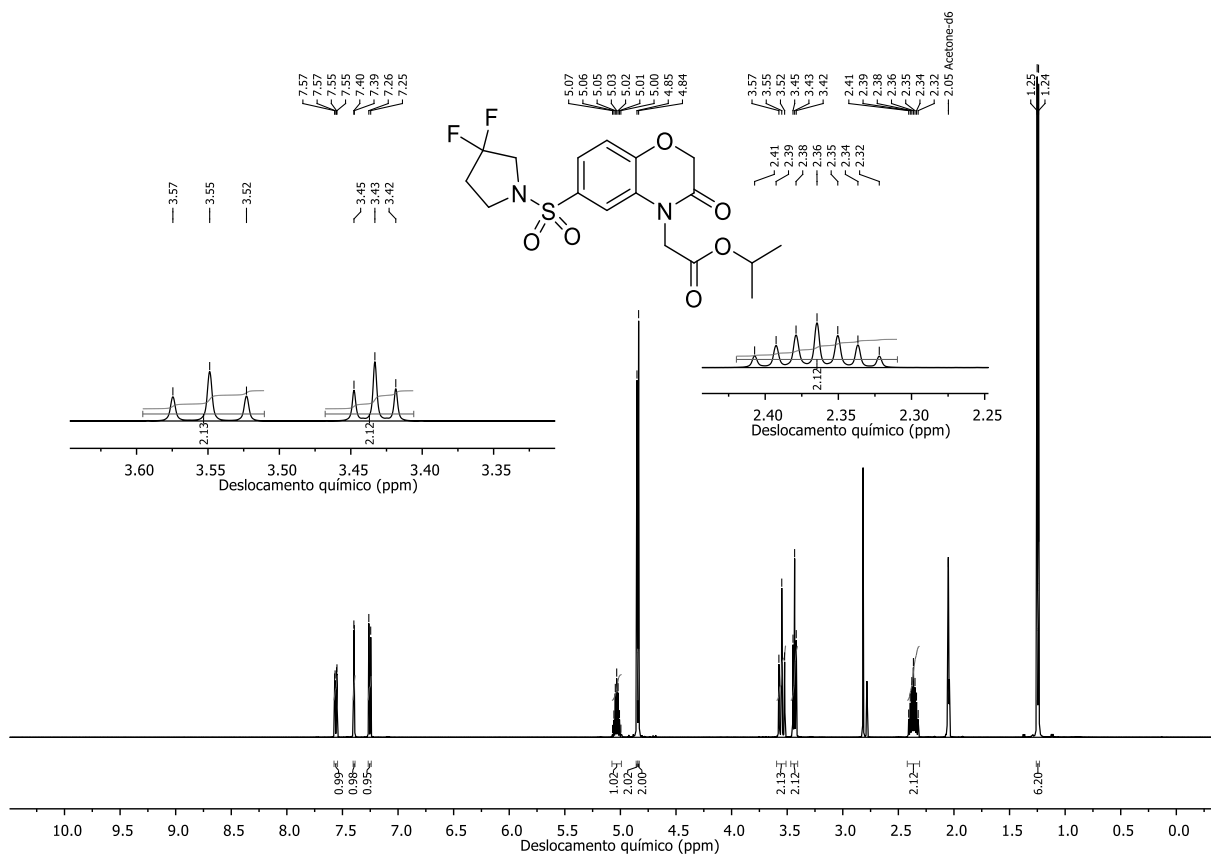
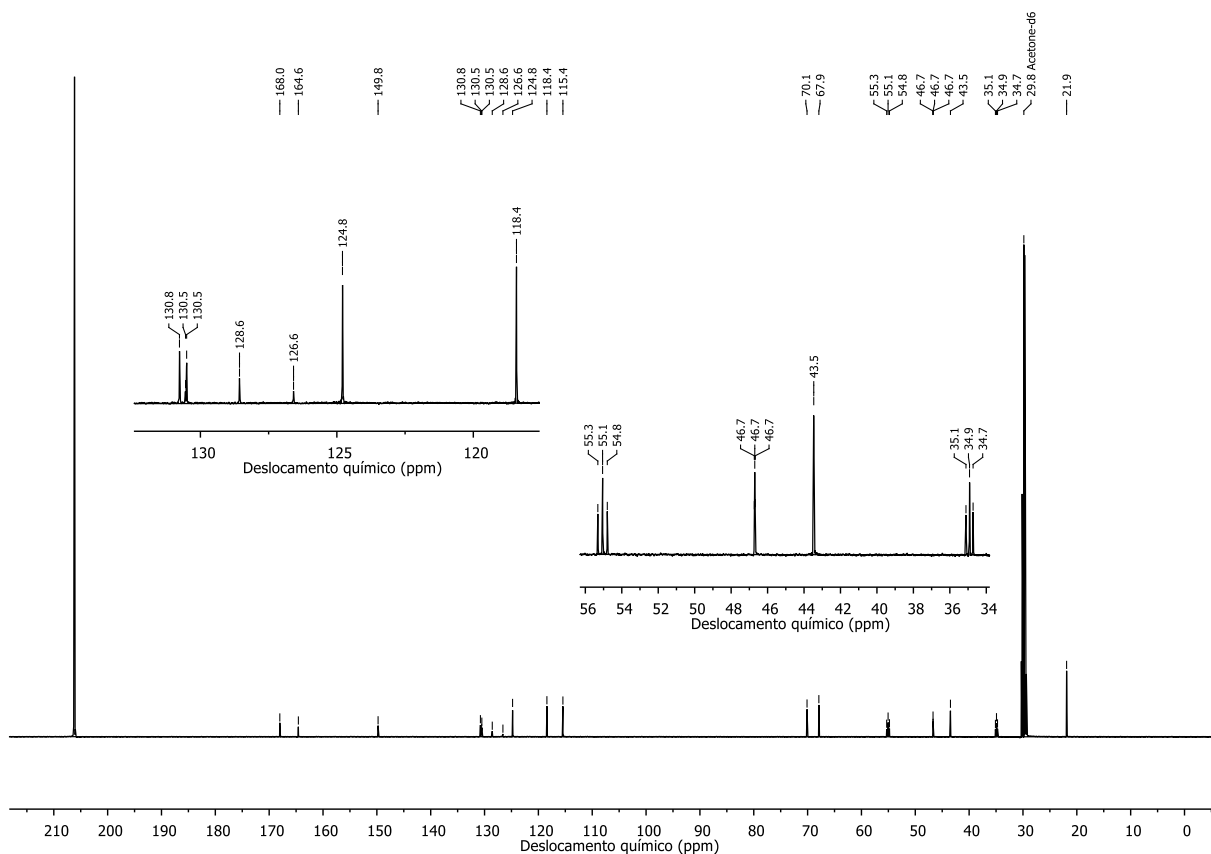


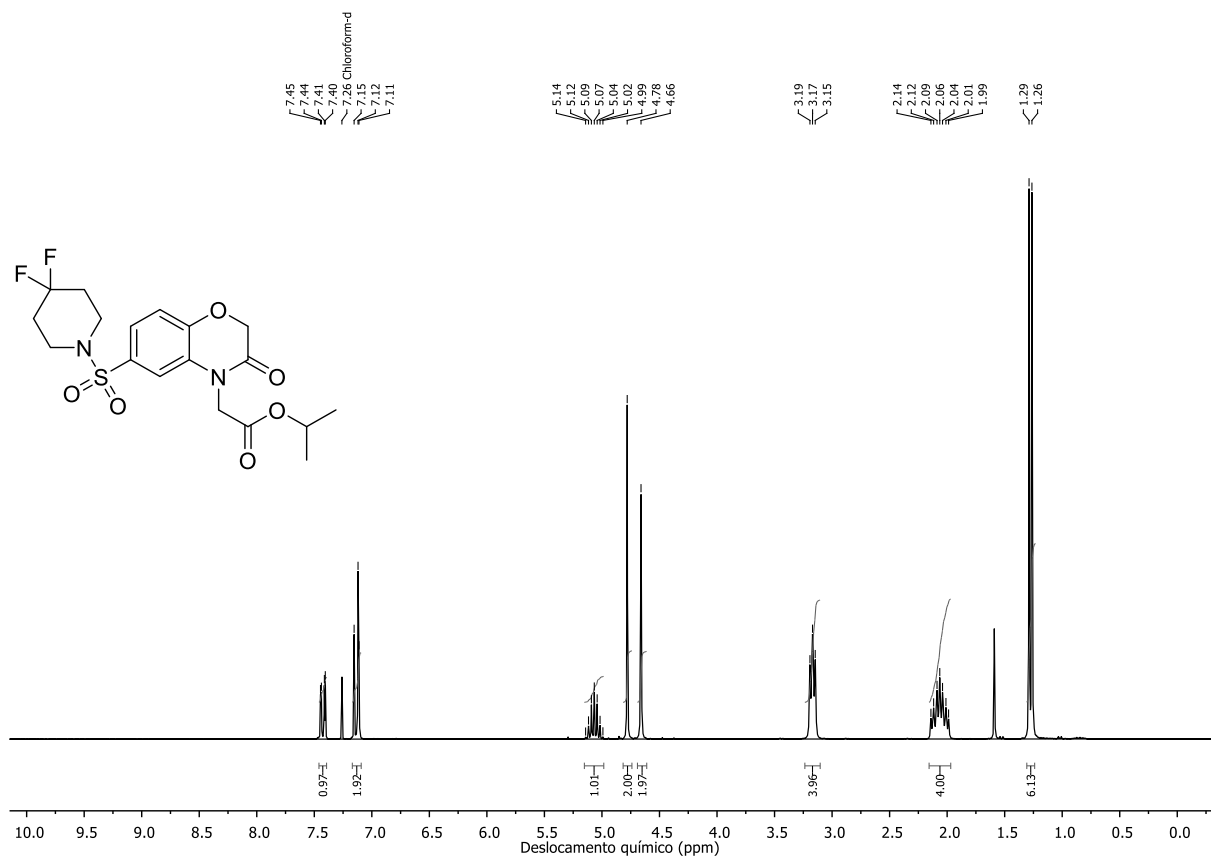
Espectro RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do composto **3f**



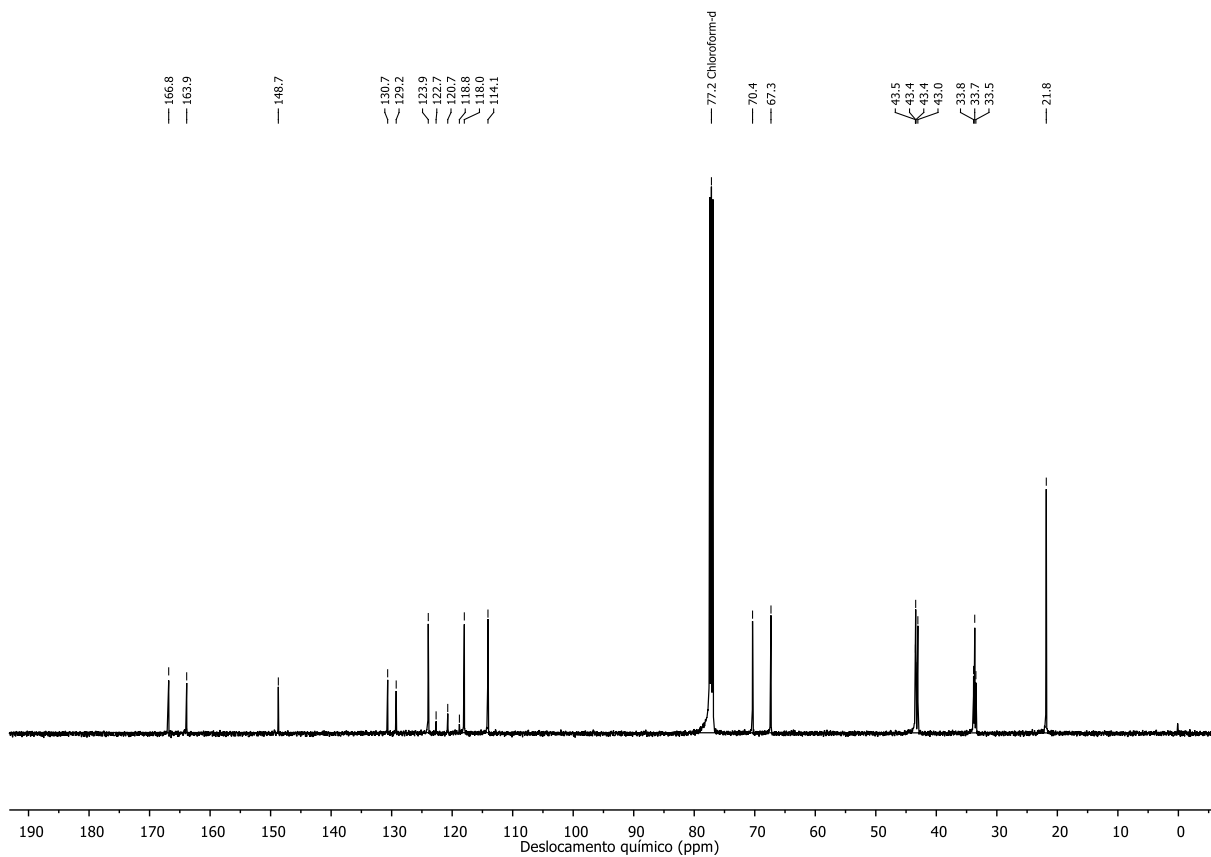
Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **3f**

Espectro RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do composto **3g**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **3g**

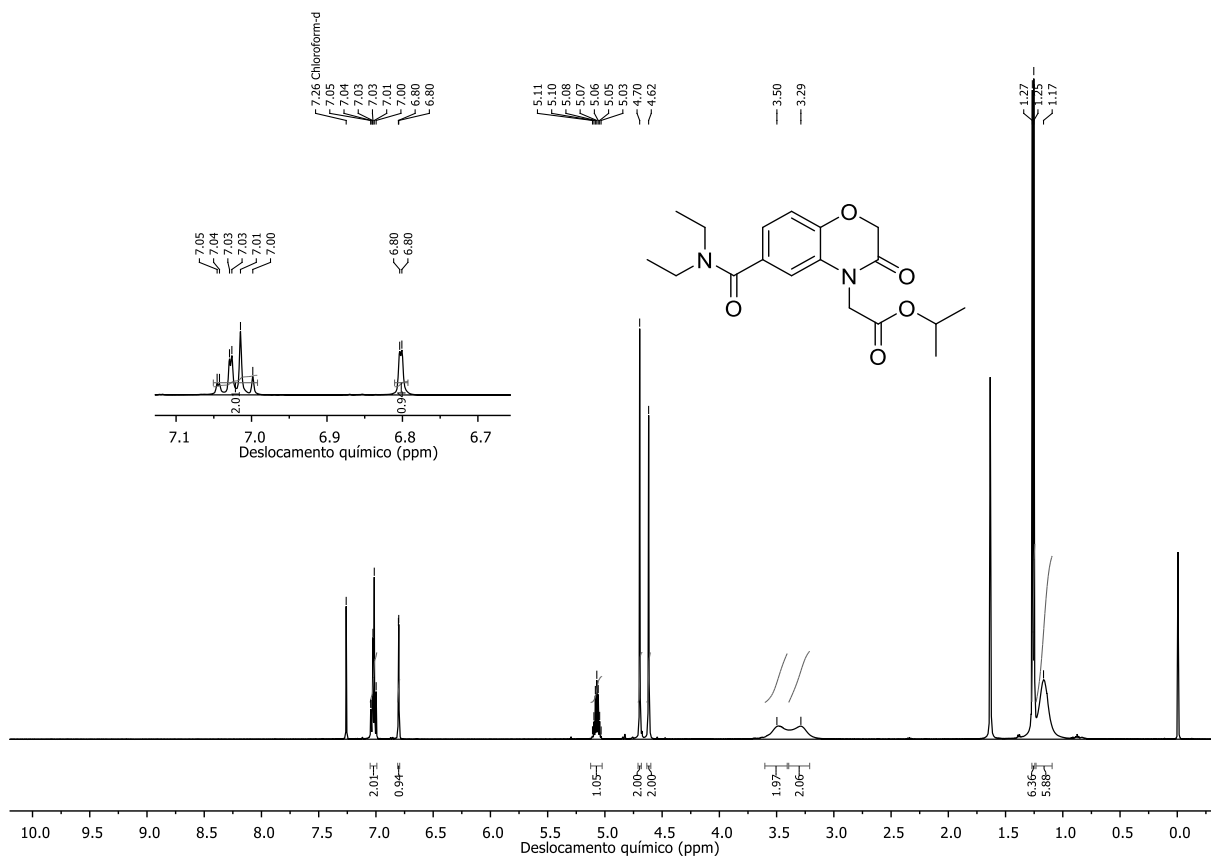
Espectro RMN ¹H (500 MHz, Acetona) do composto **3h**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, Acetona) do composto **3h**



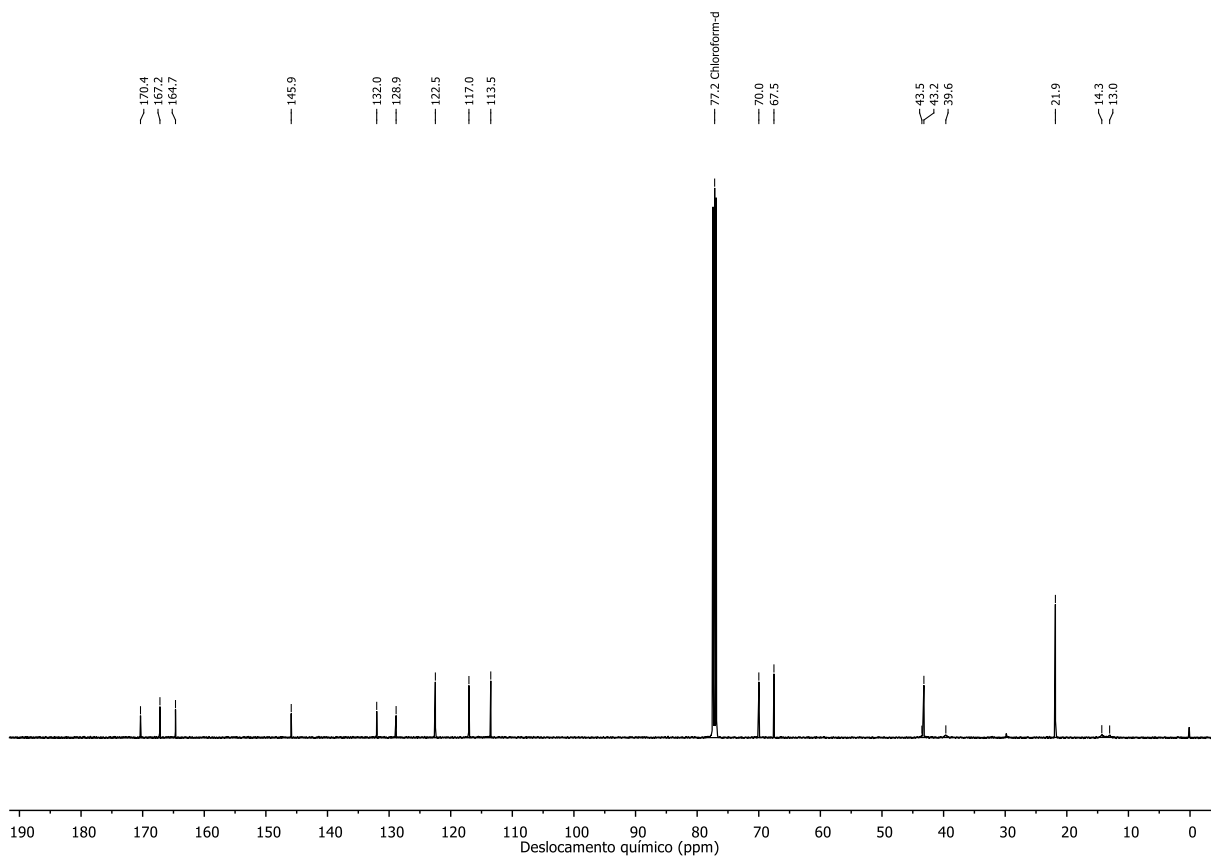
Espectro RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do composto **3i**



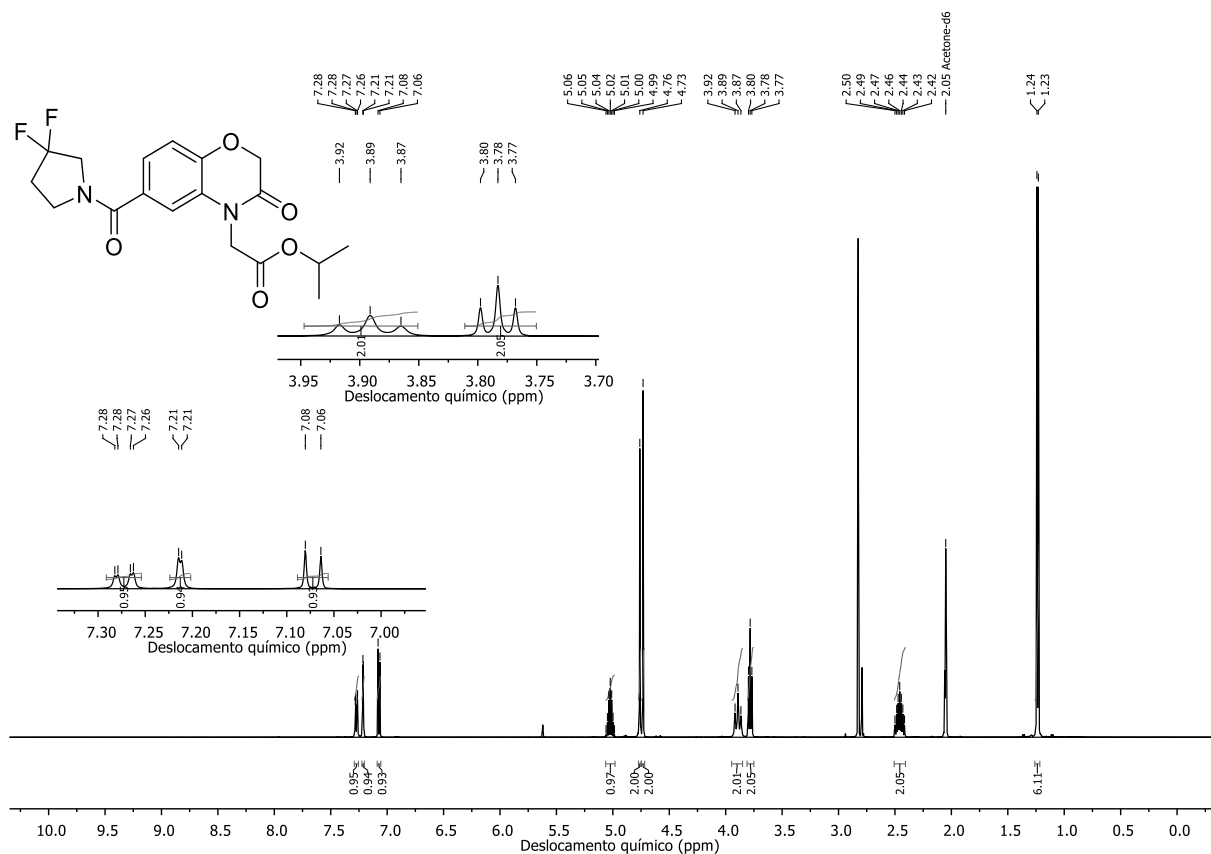
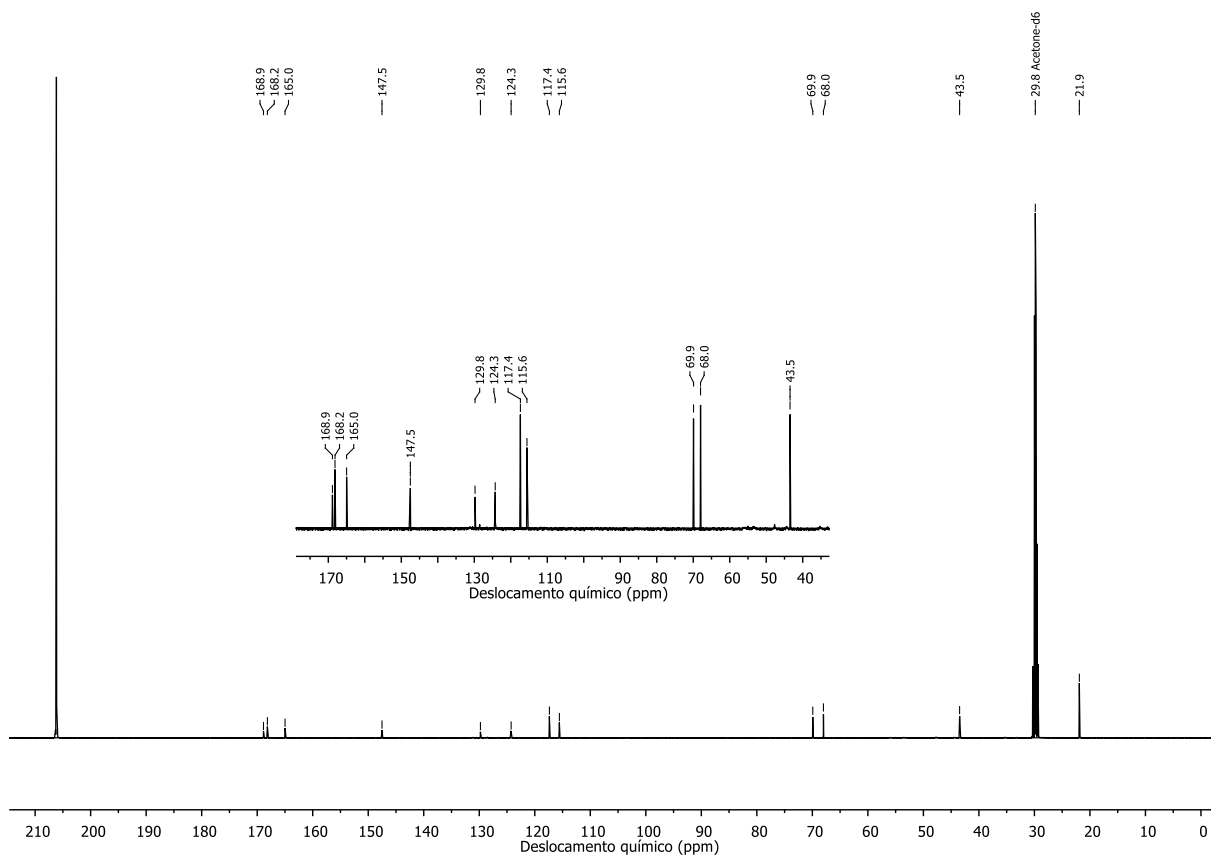
Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **3i**

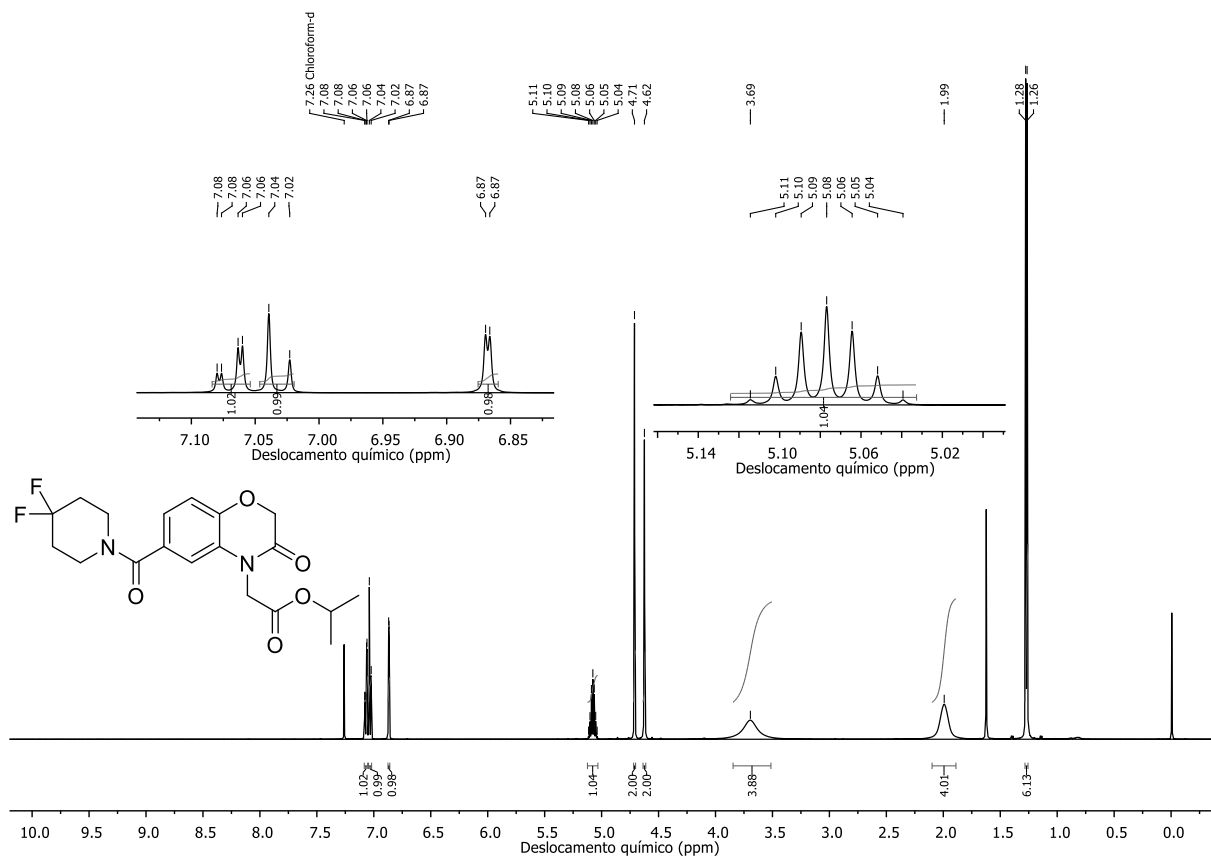


Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **3j**

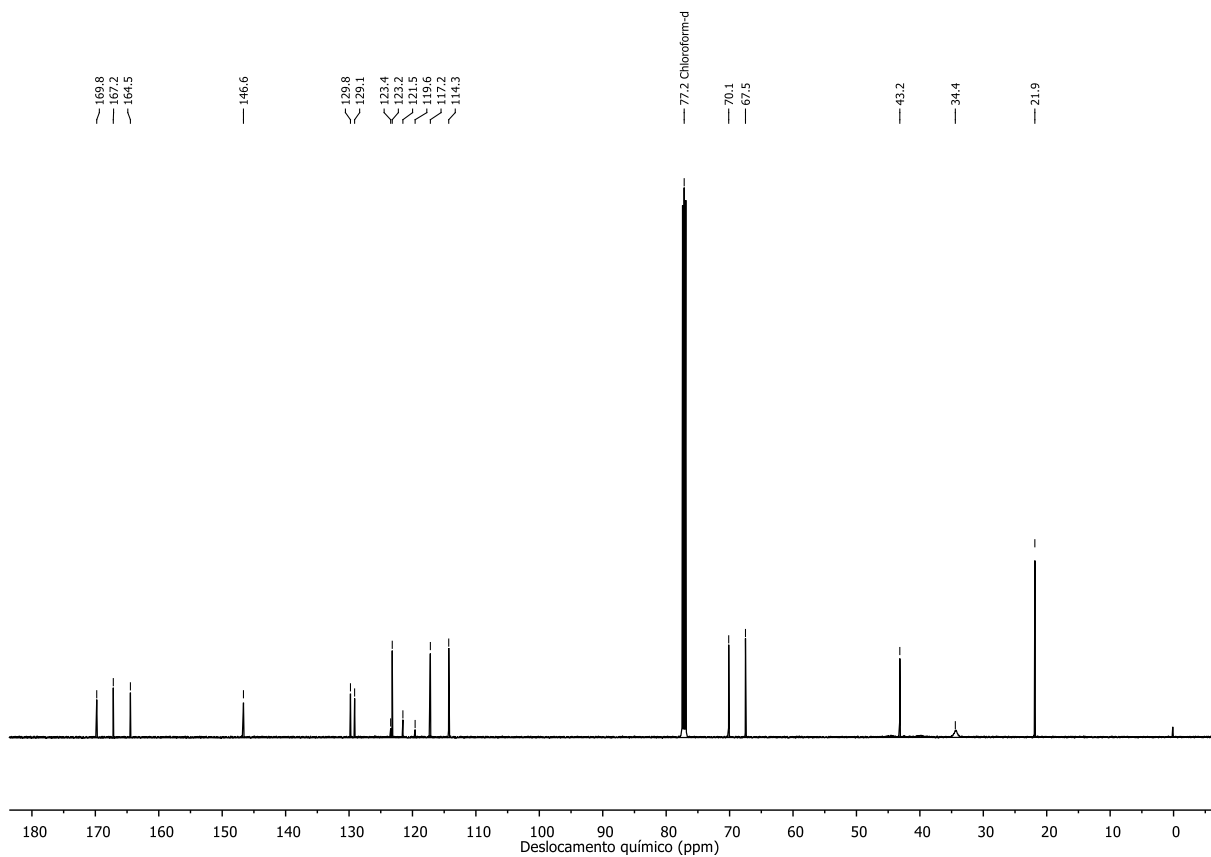


Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **3j**

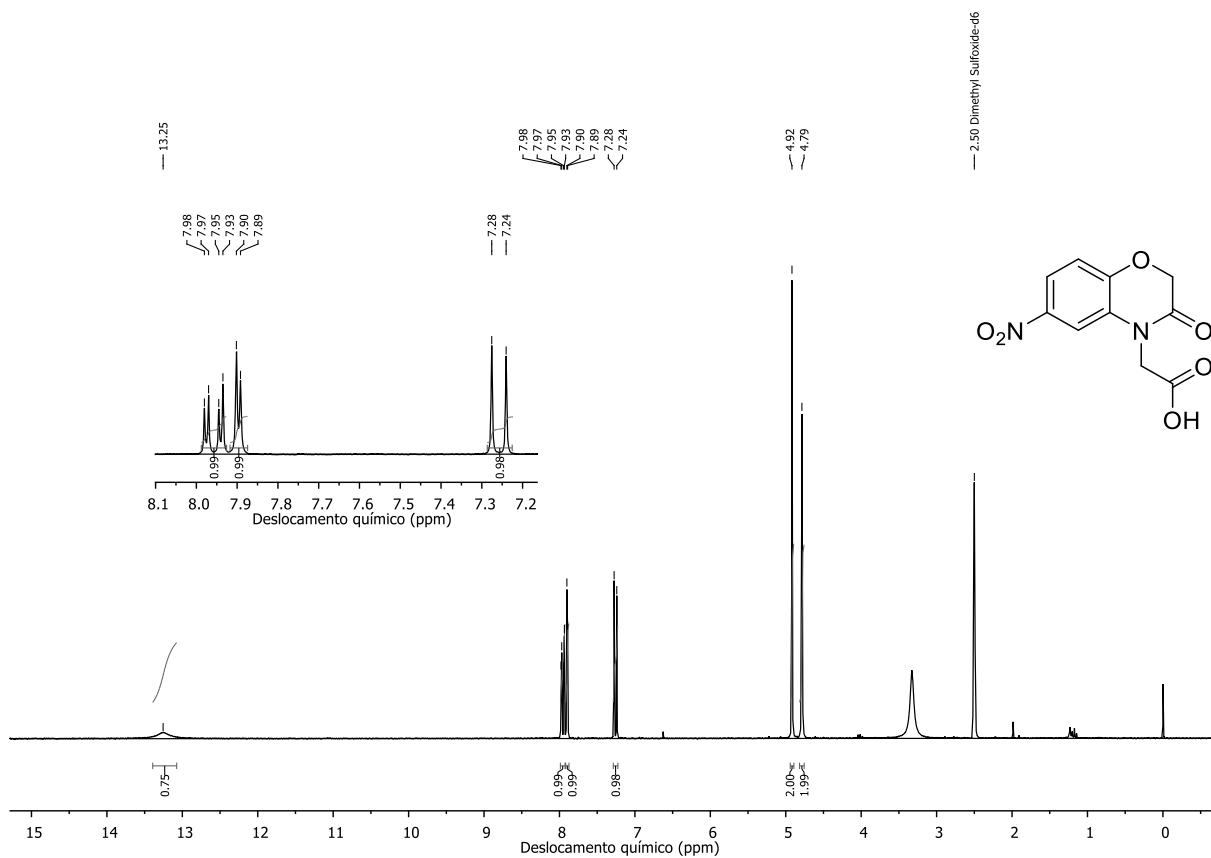
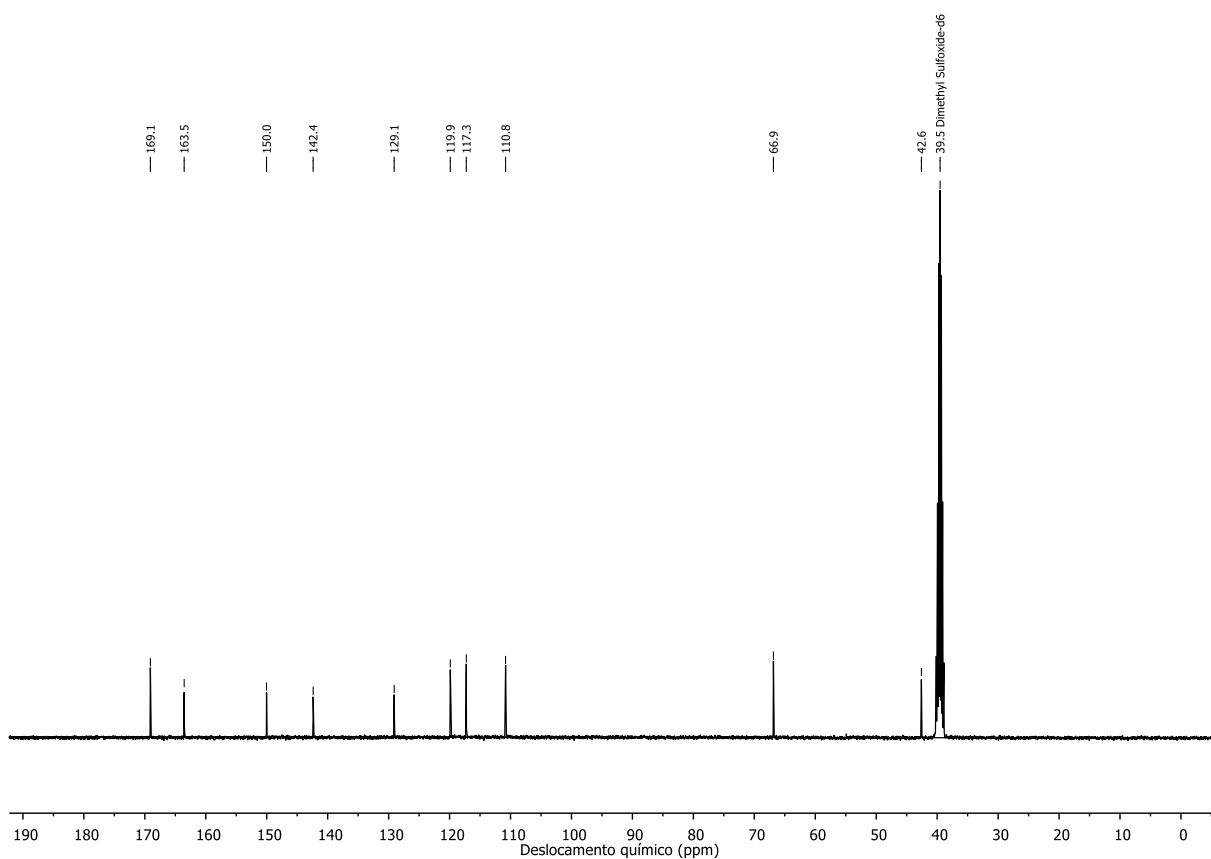
Espectro RMN ¹H (500 MHz, Acetona) do composto **3k**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, Acetona) do composto **3k**

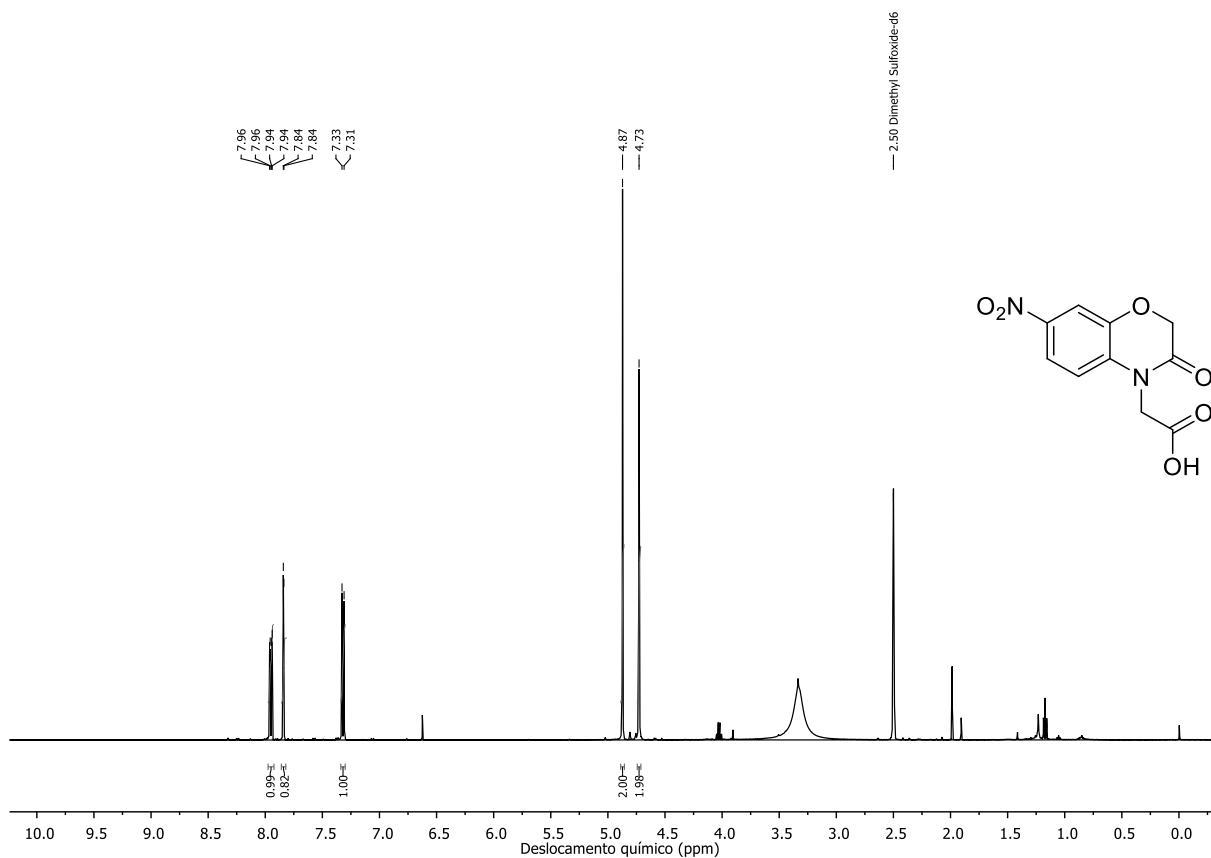


Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **31**

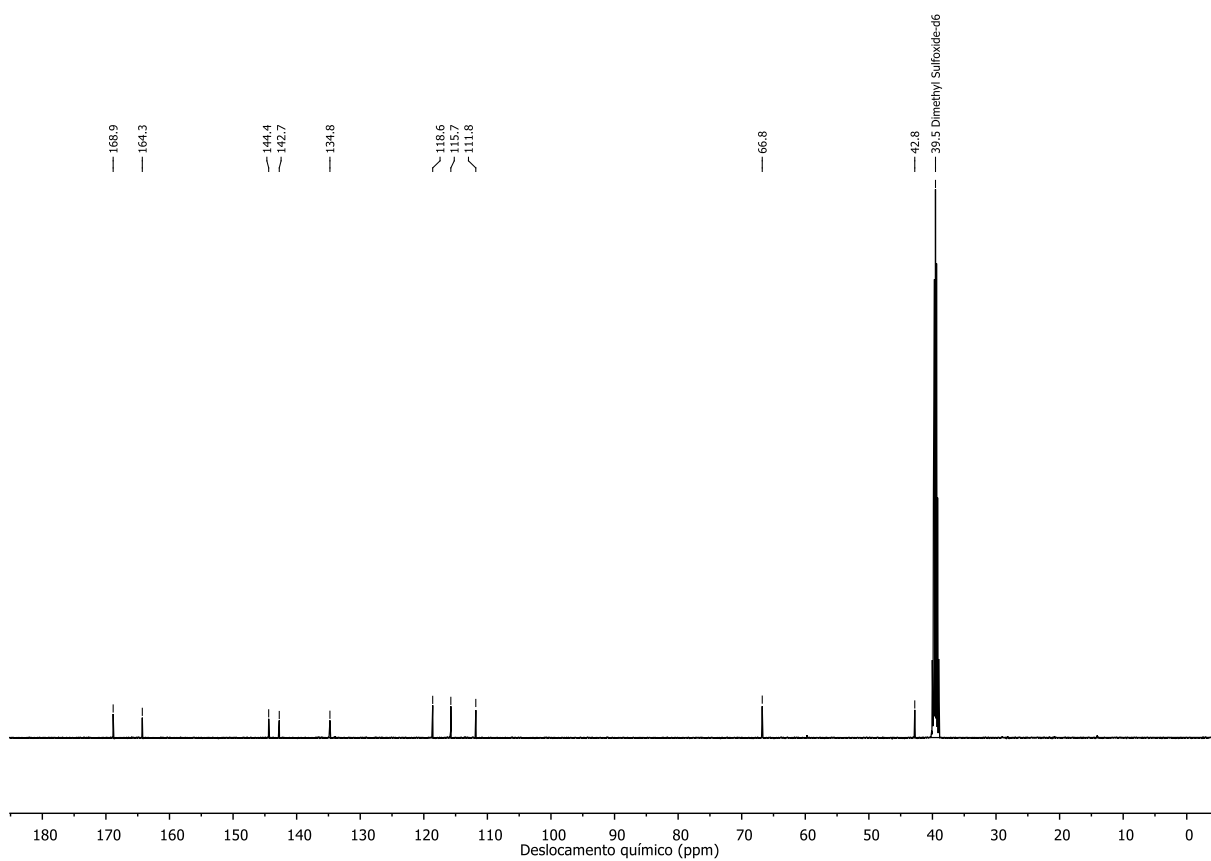


Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **31**

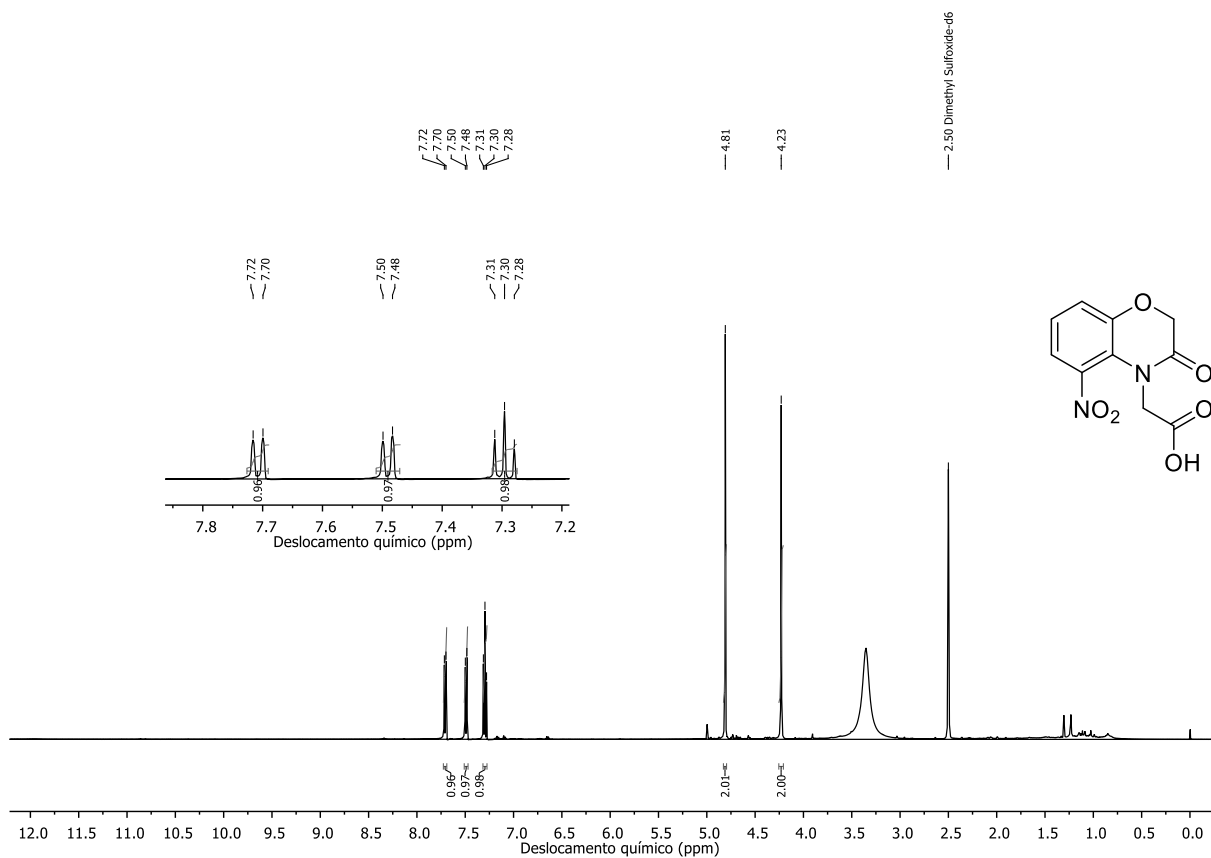
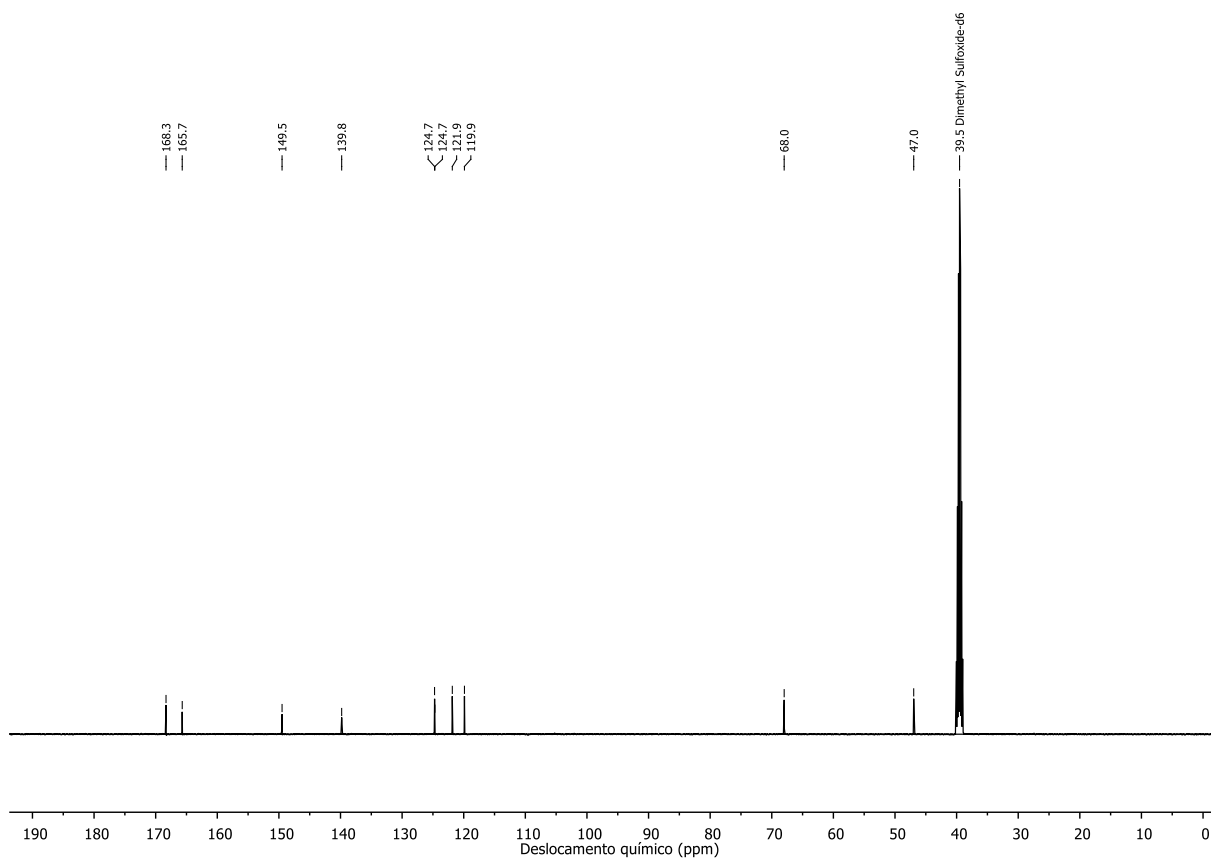
Espectro RMN ¹H (250 MHz, DMSO) do composto **4a**Espectro RMN ¹³C (101 MHz, DMSO) do composto **4a**

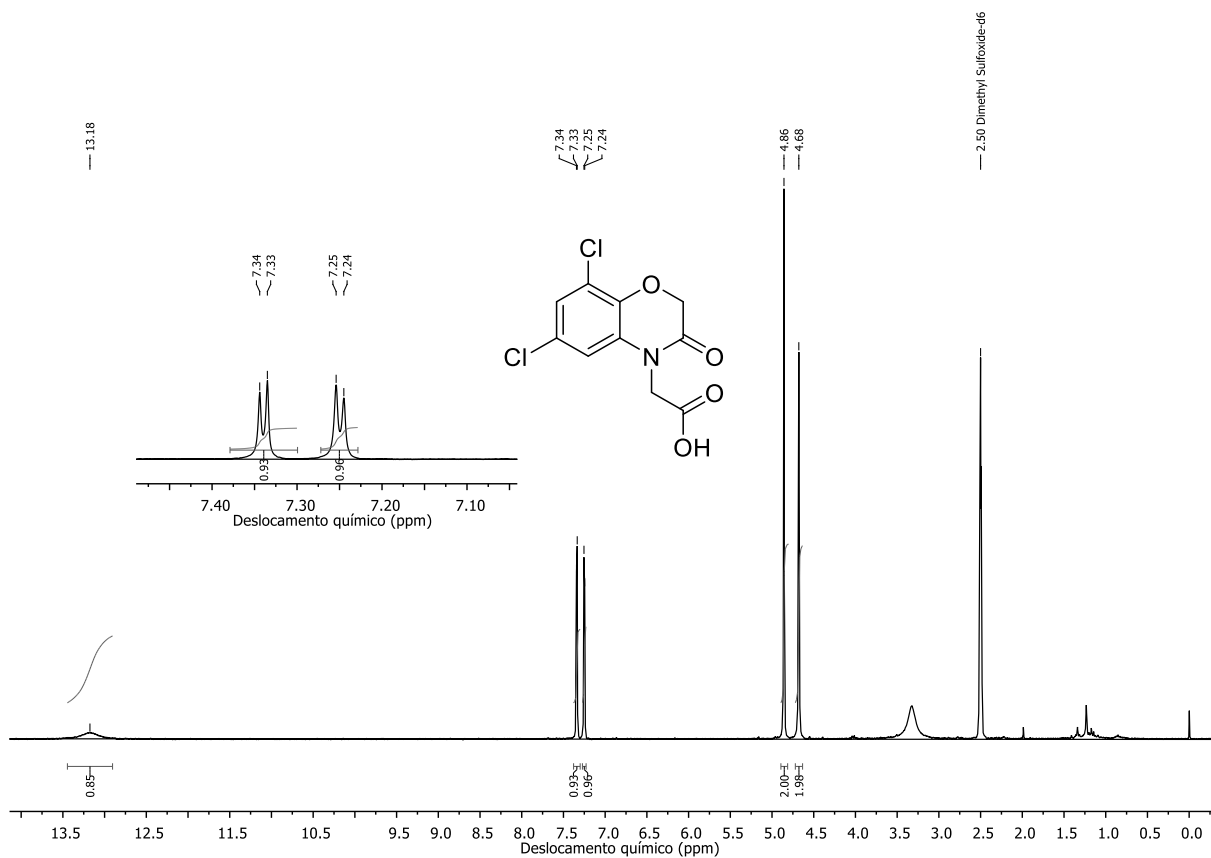
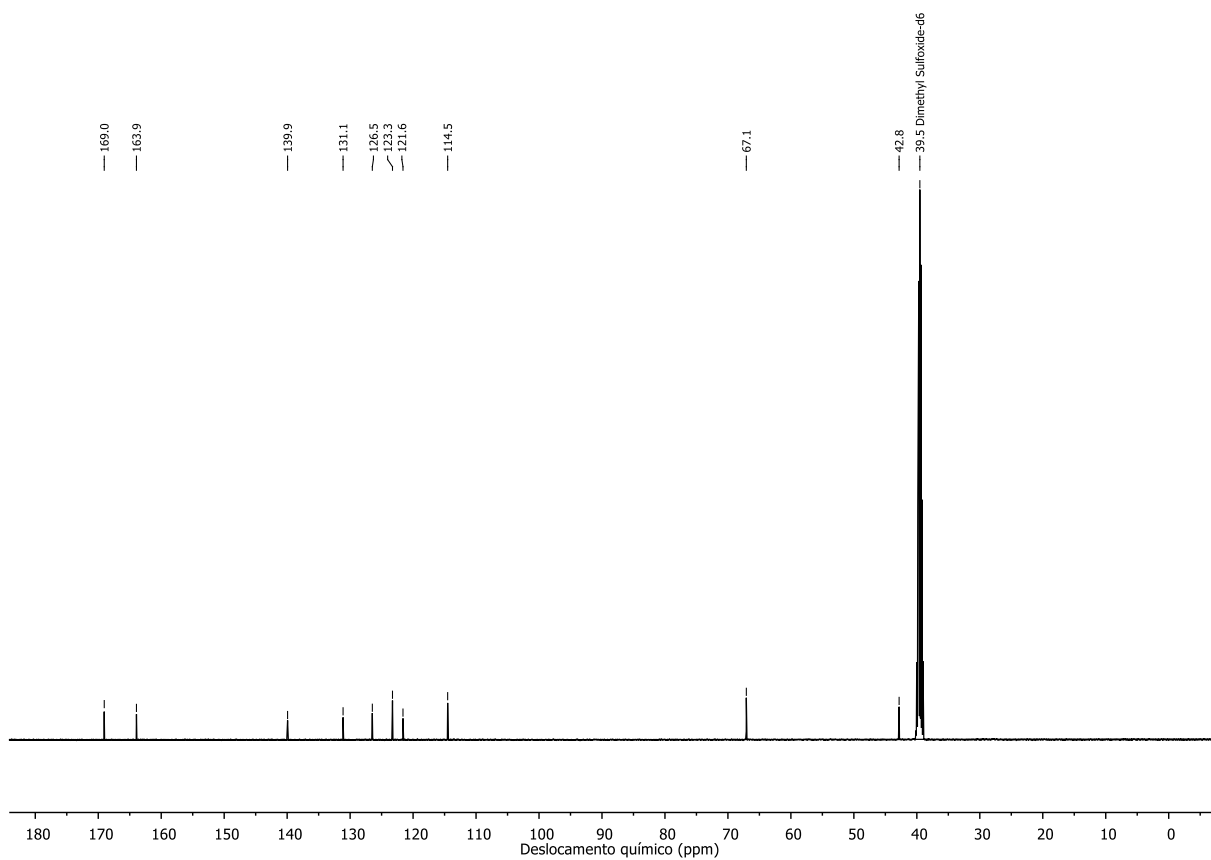


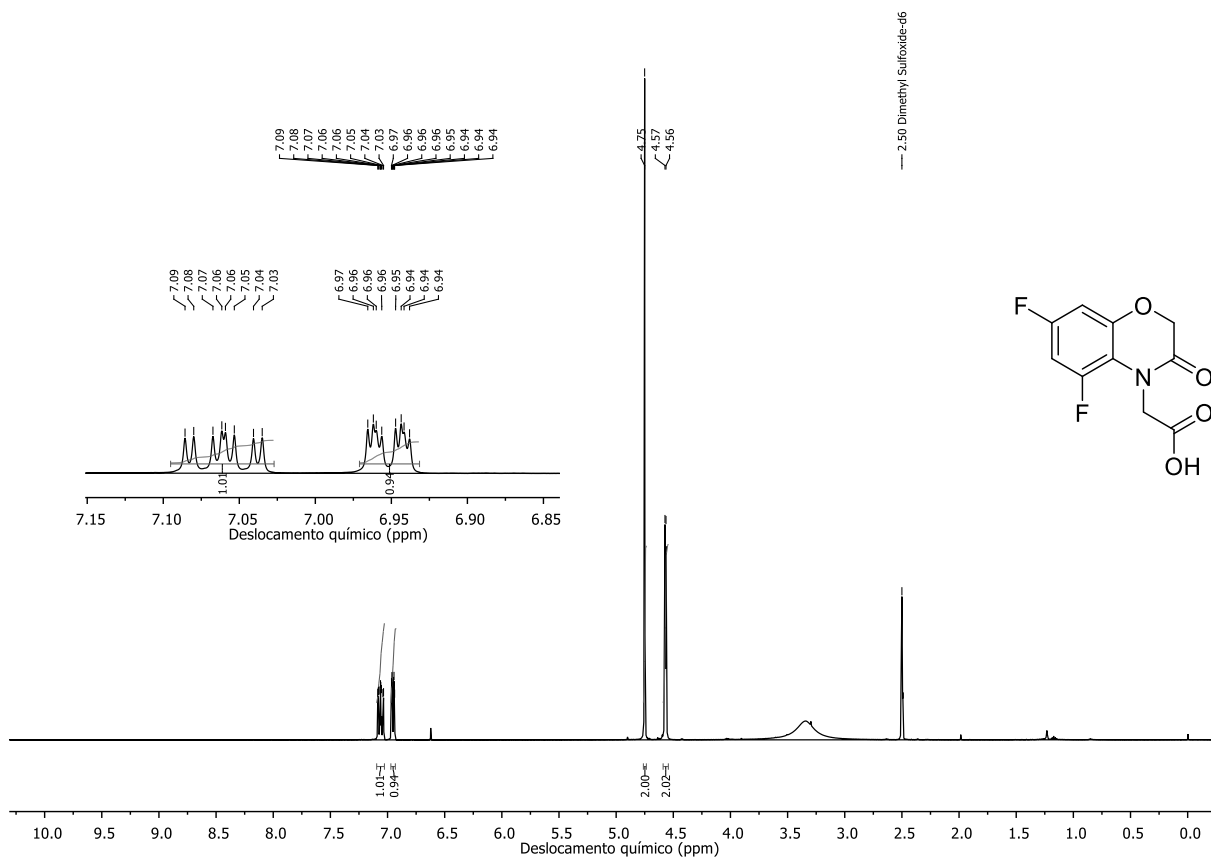
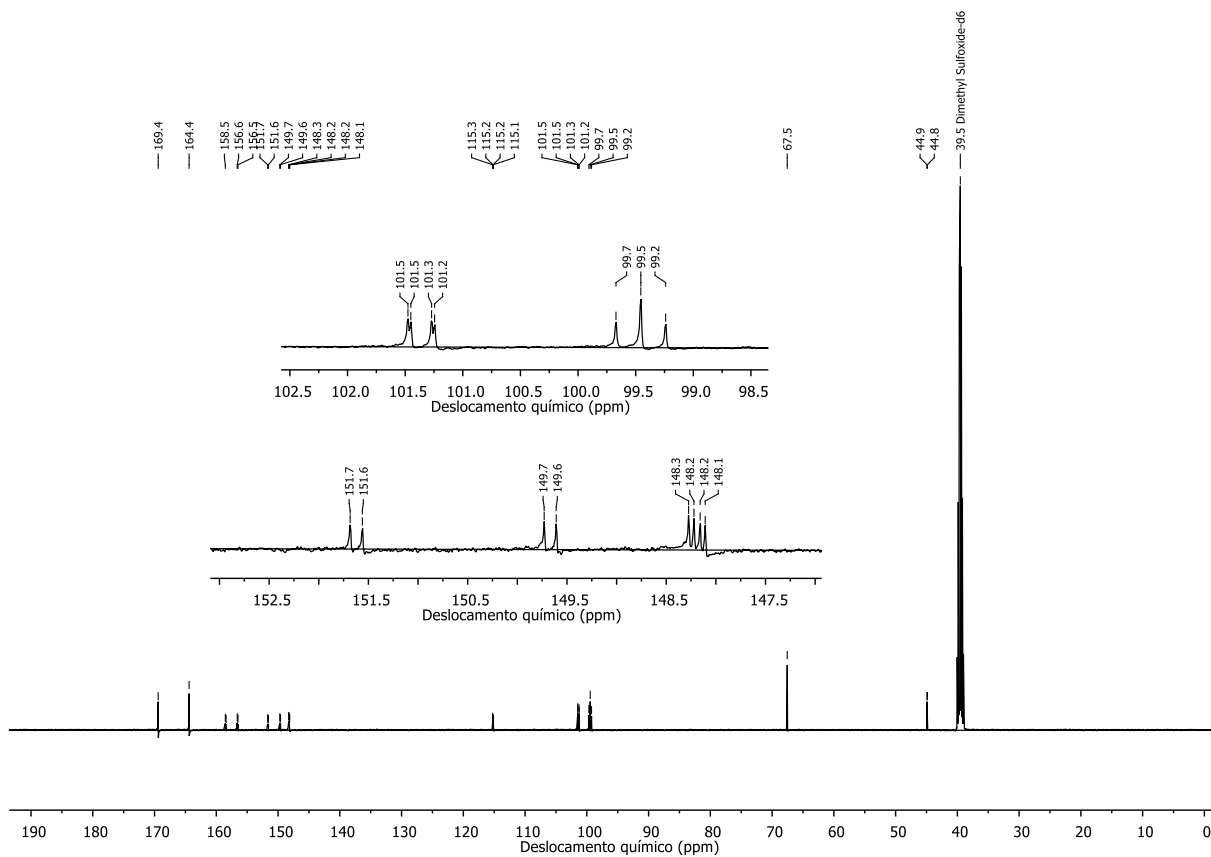
Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **4b**

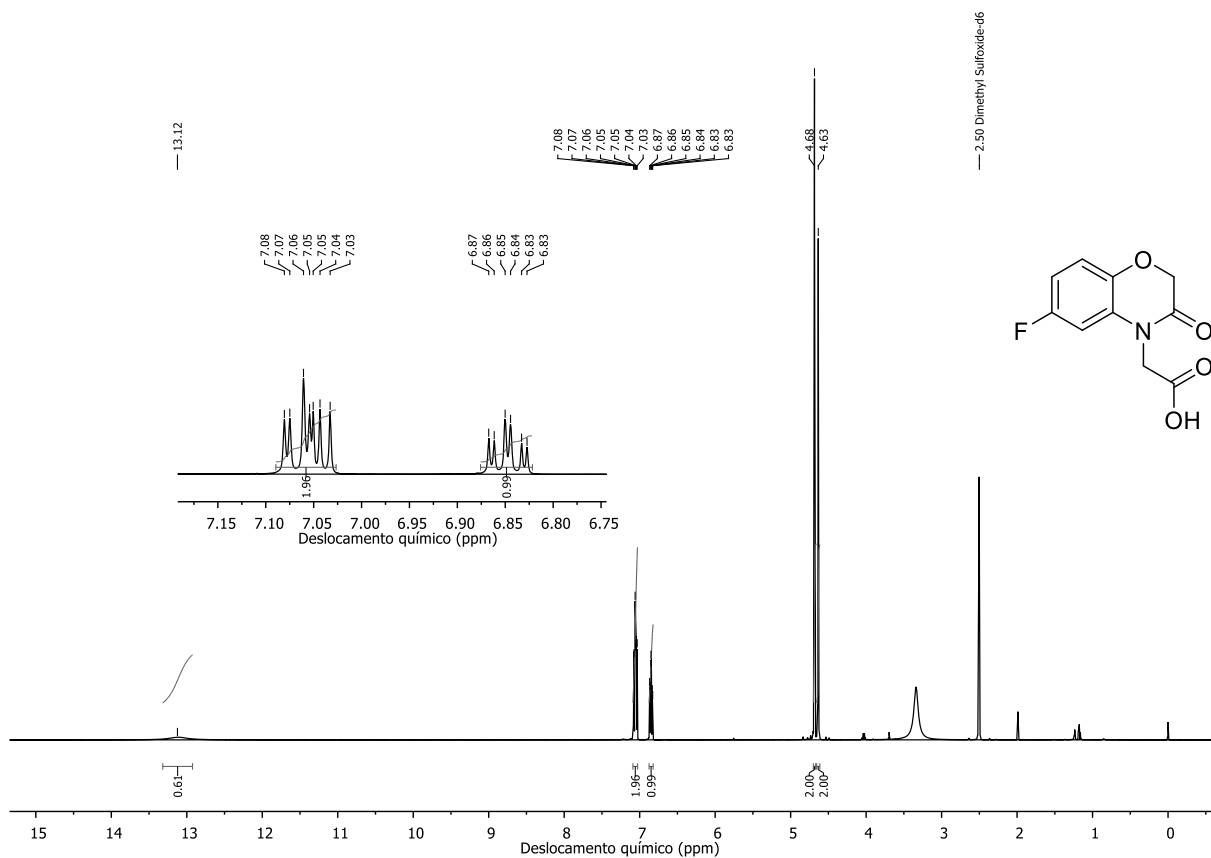
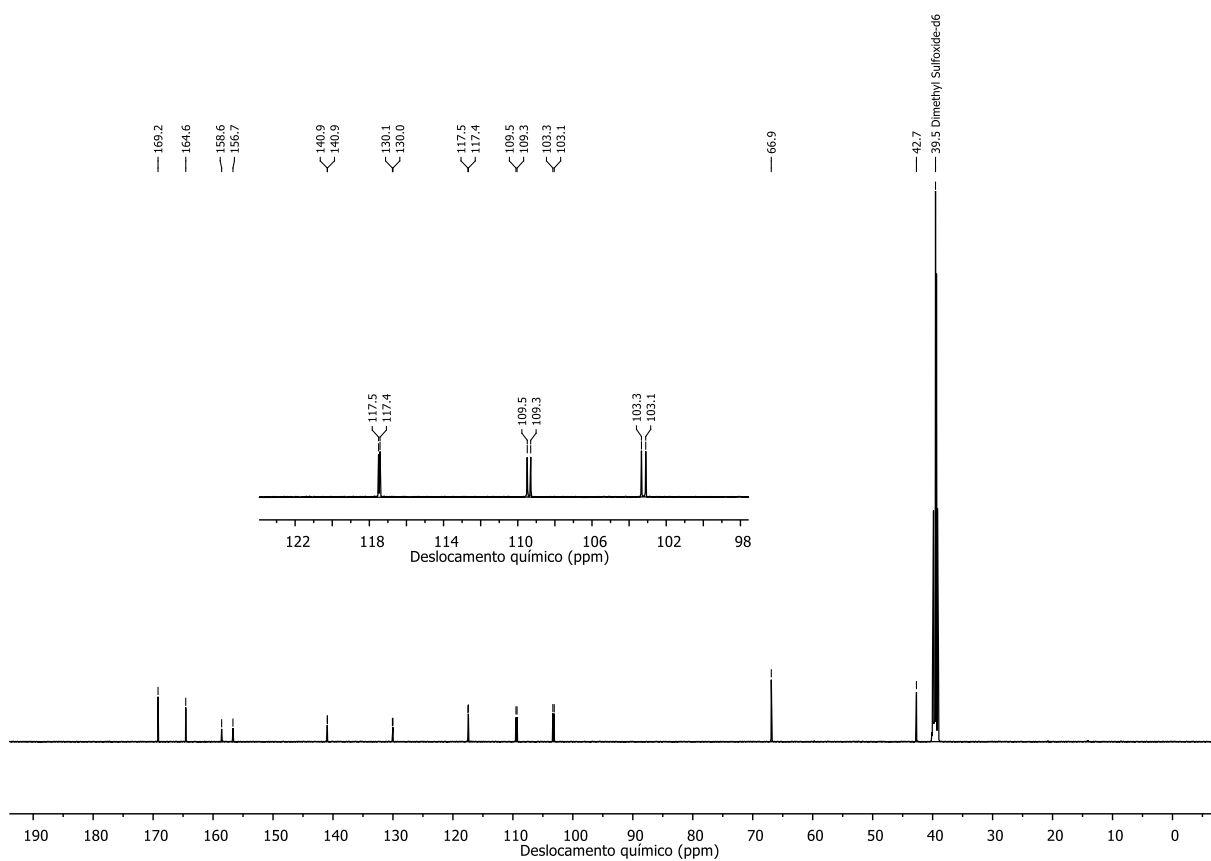


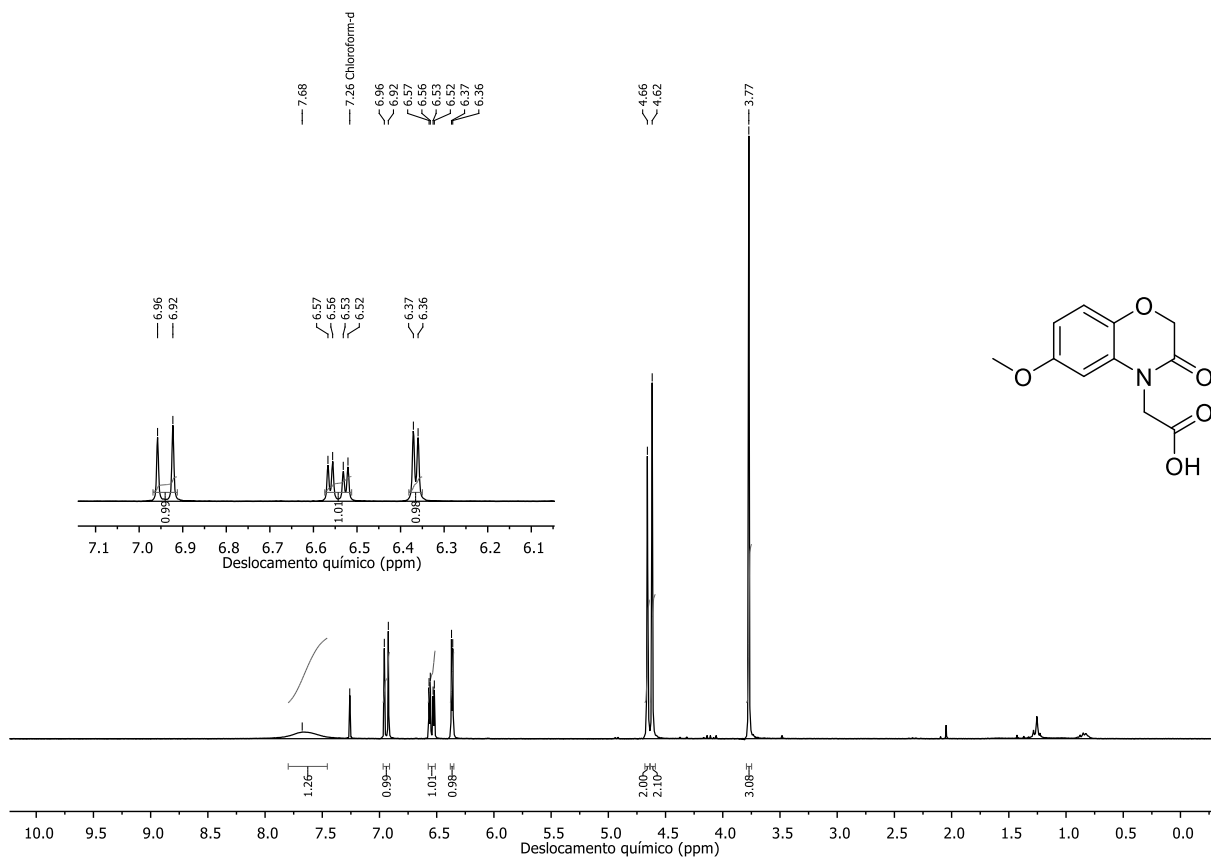
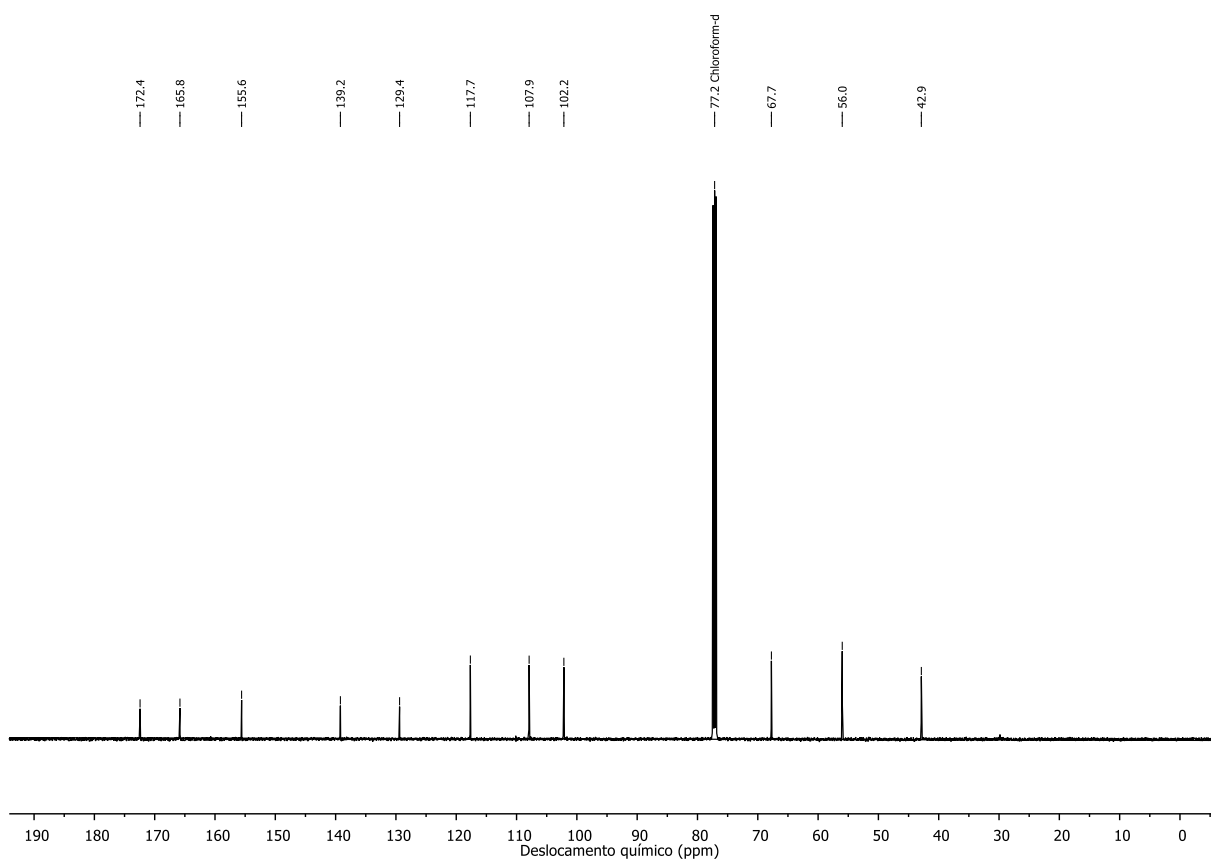
Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **4b**

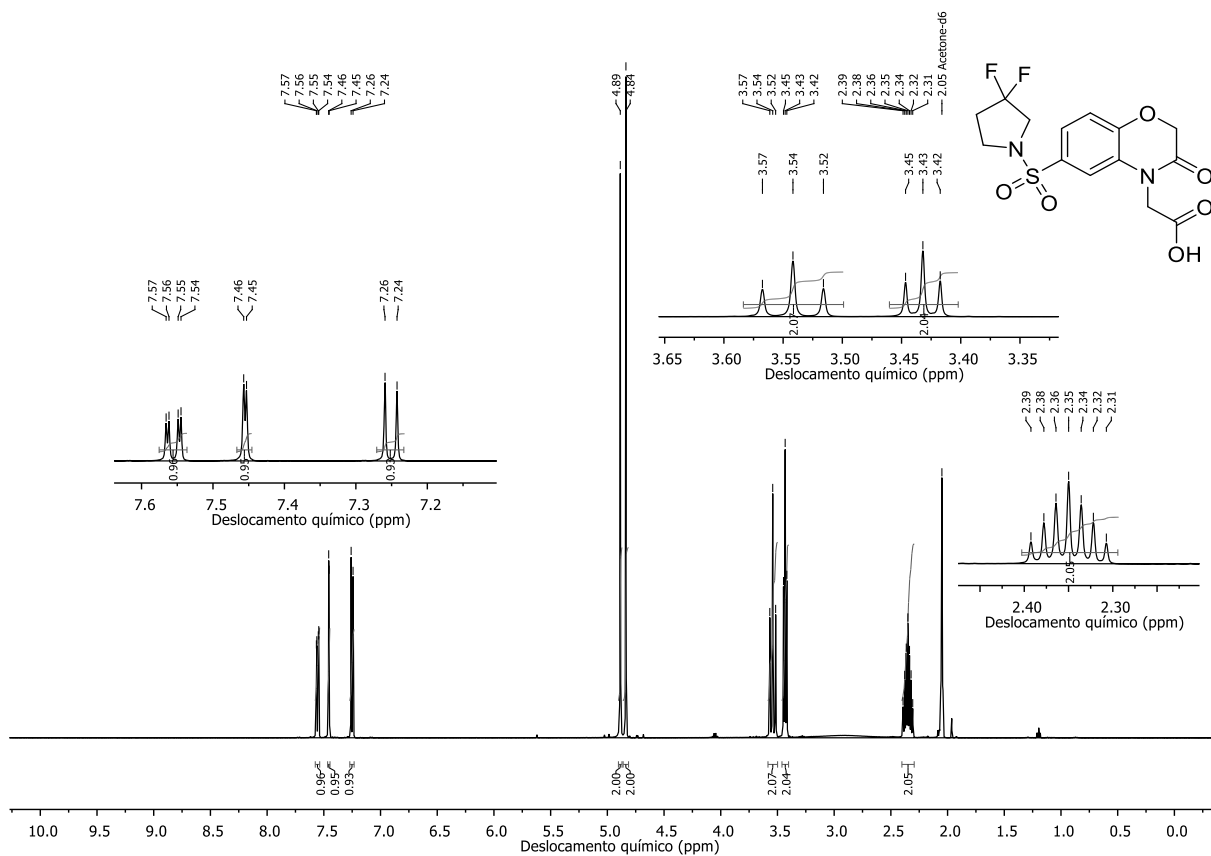
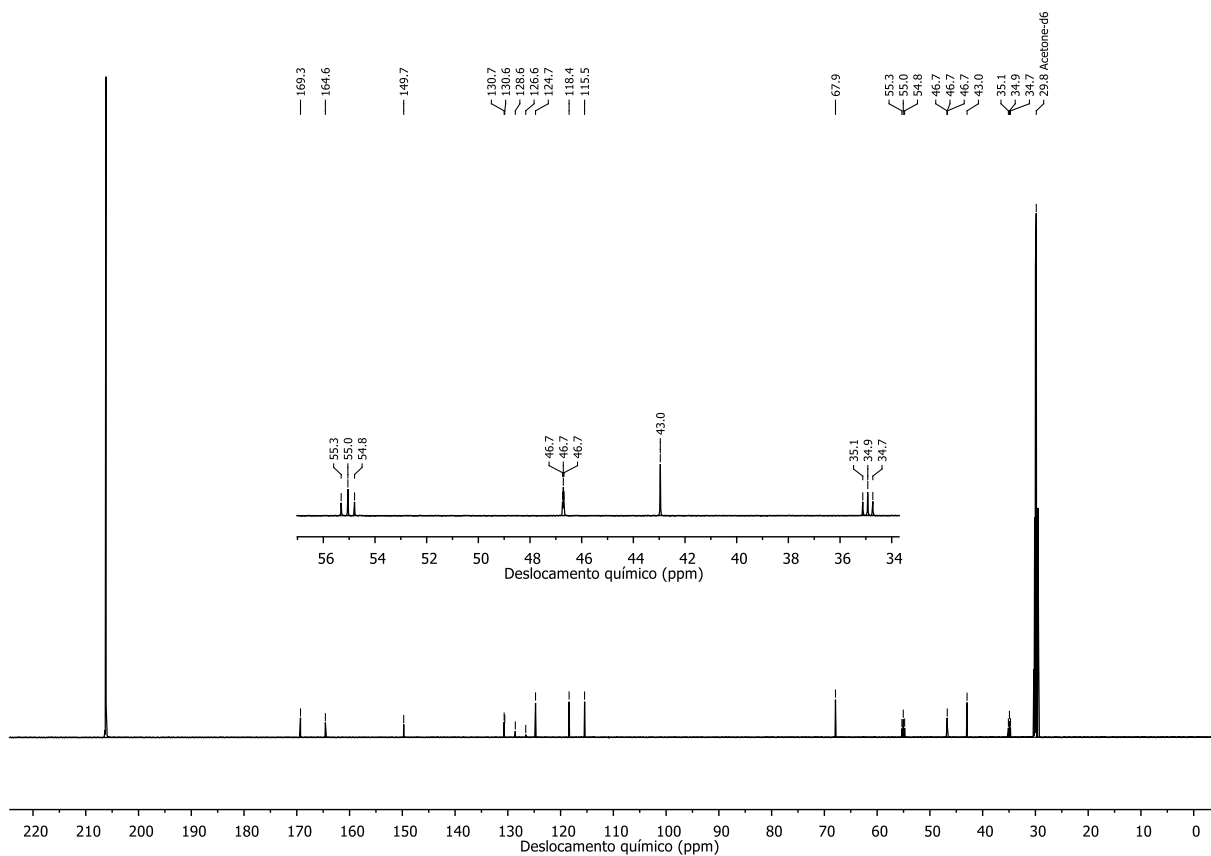
Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **4c**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **4c**

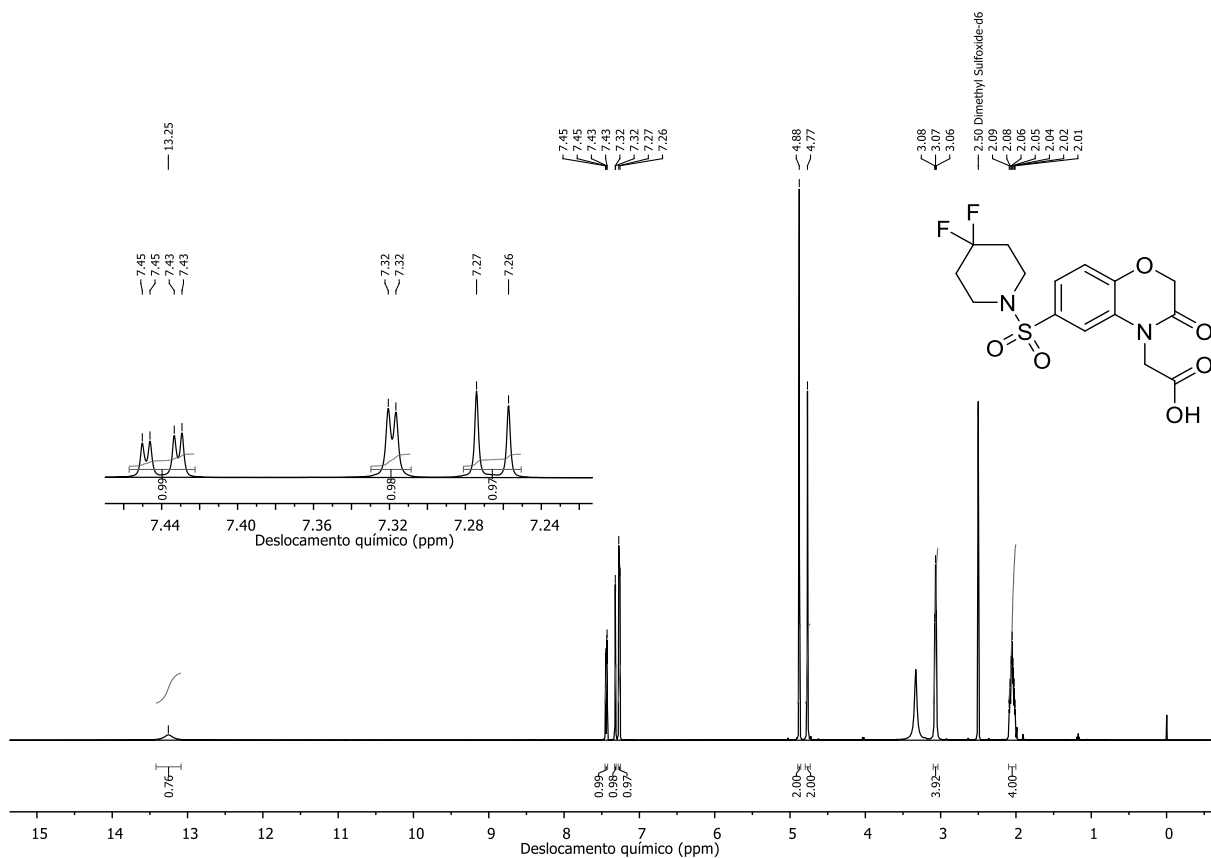
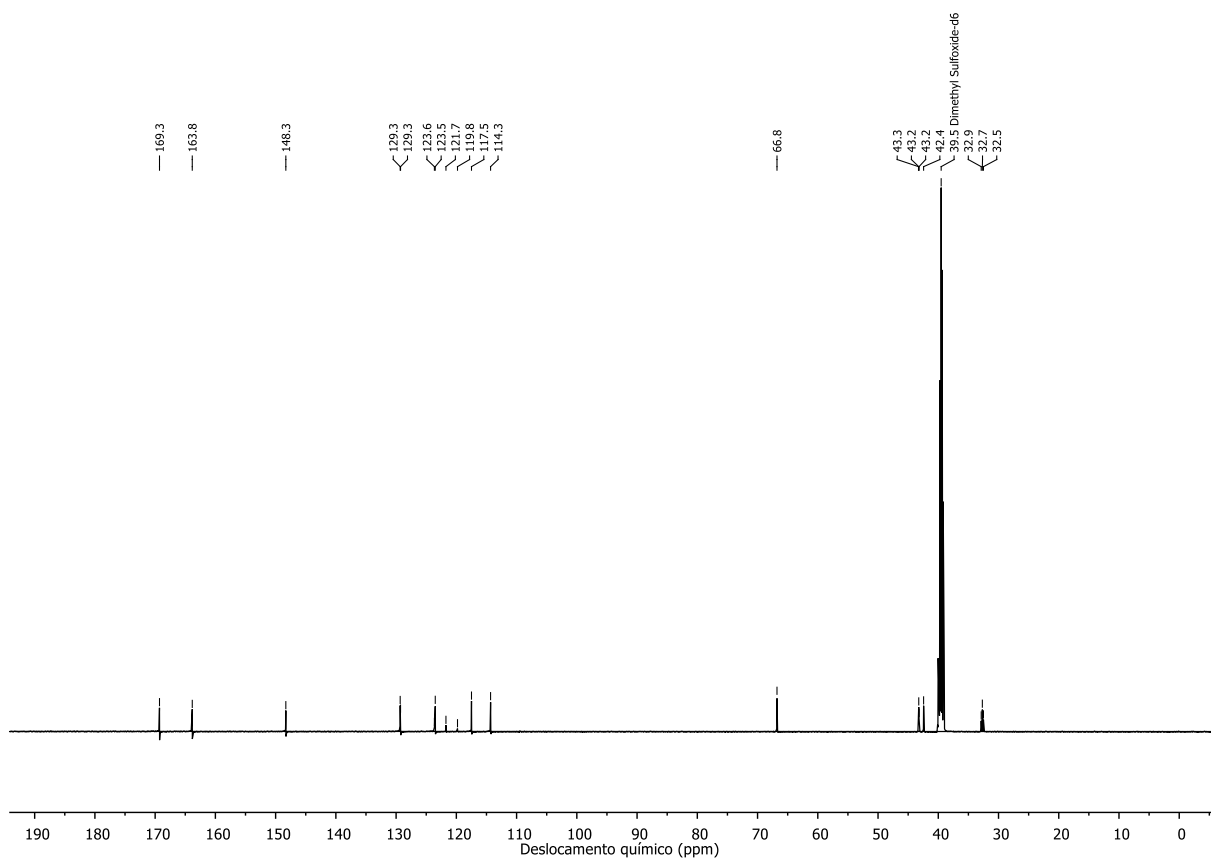
Espectro RMN ¹H (250 MHz, DMSO) do composto **4d**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **4d**

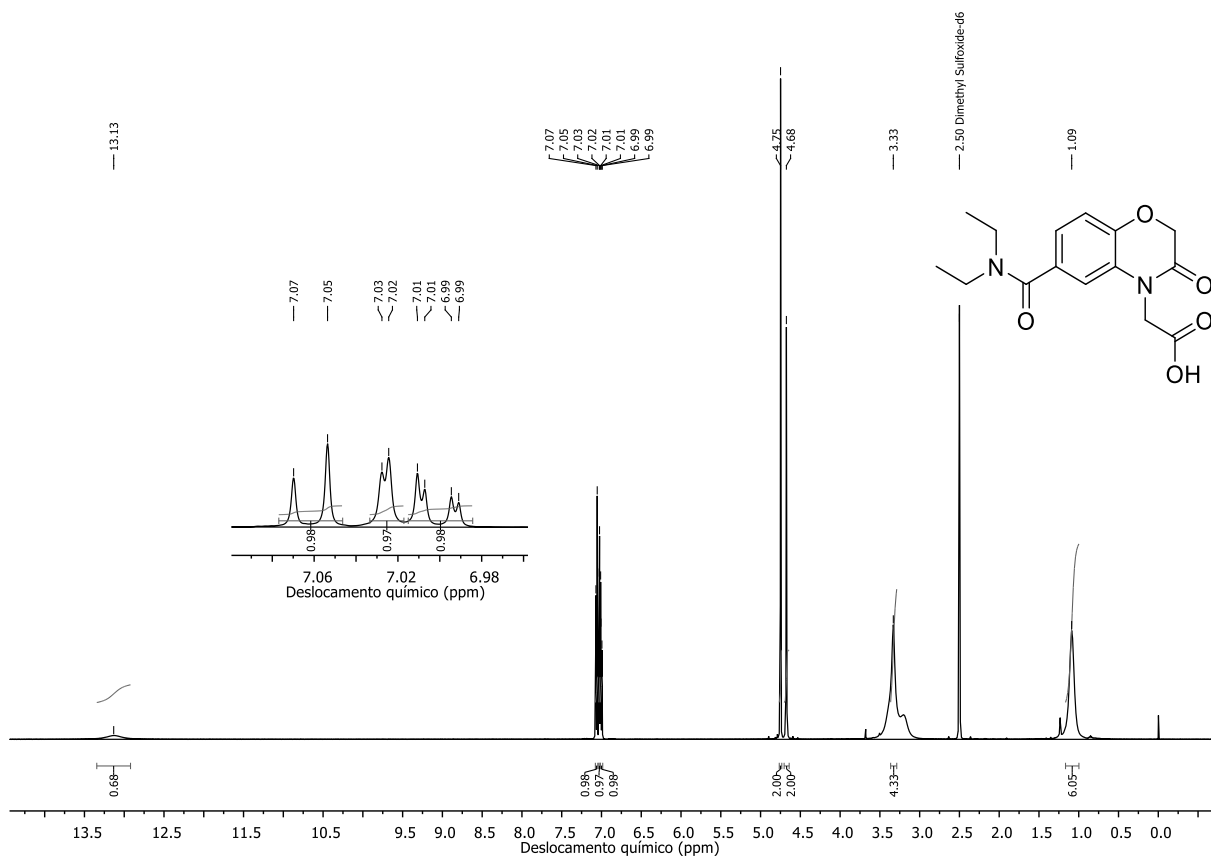
Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **4e**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **4e**

Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **4f**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **4f**

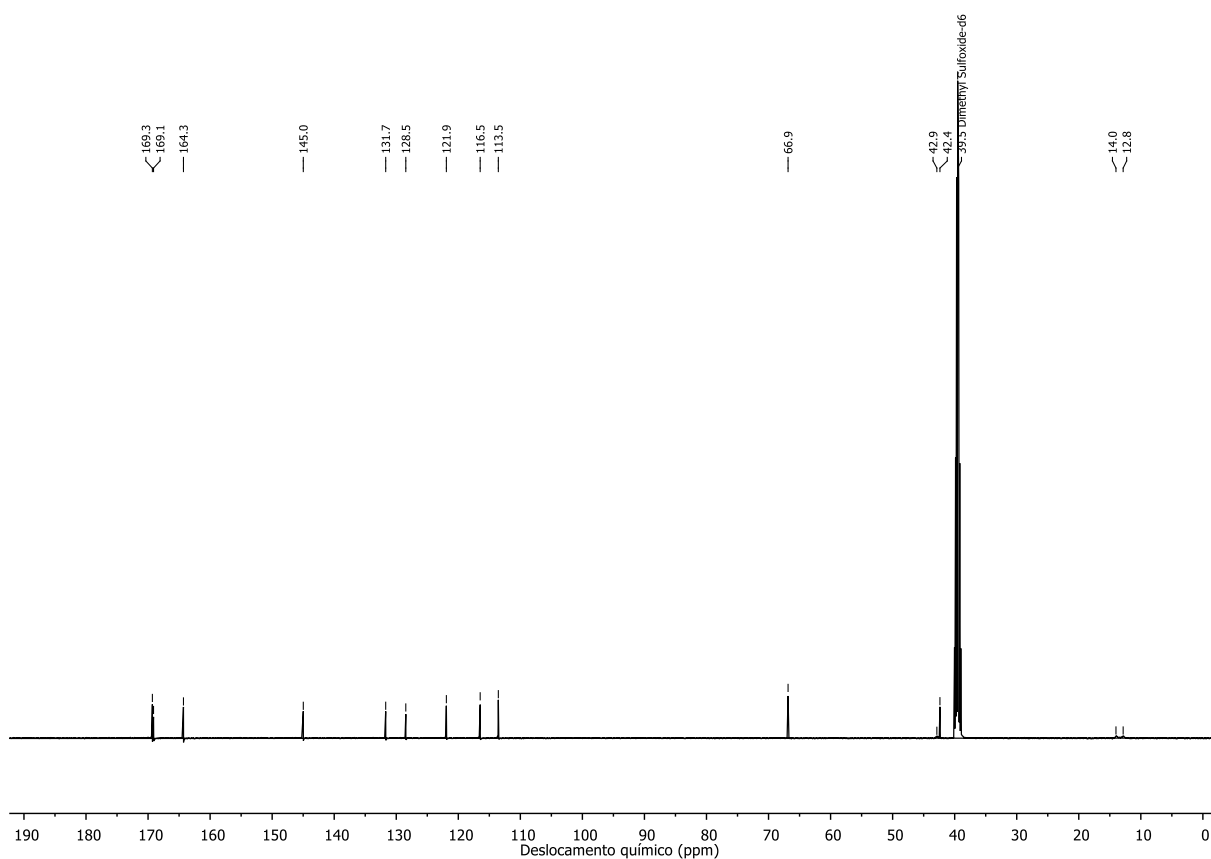
Espectro RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do composto **4g**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **4g**

Espectro RMN ¹H (500 MHz, Acetona) do composto **4h**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, Acetona) do composto **4h**

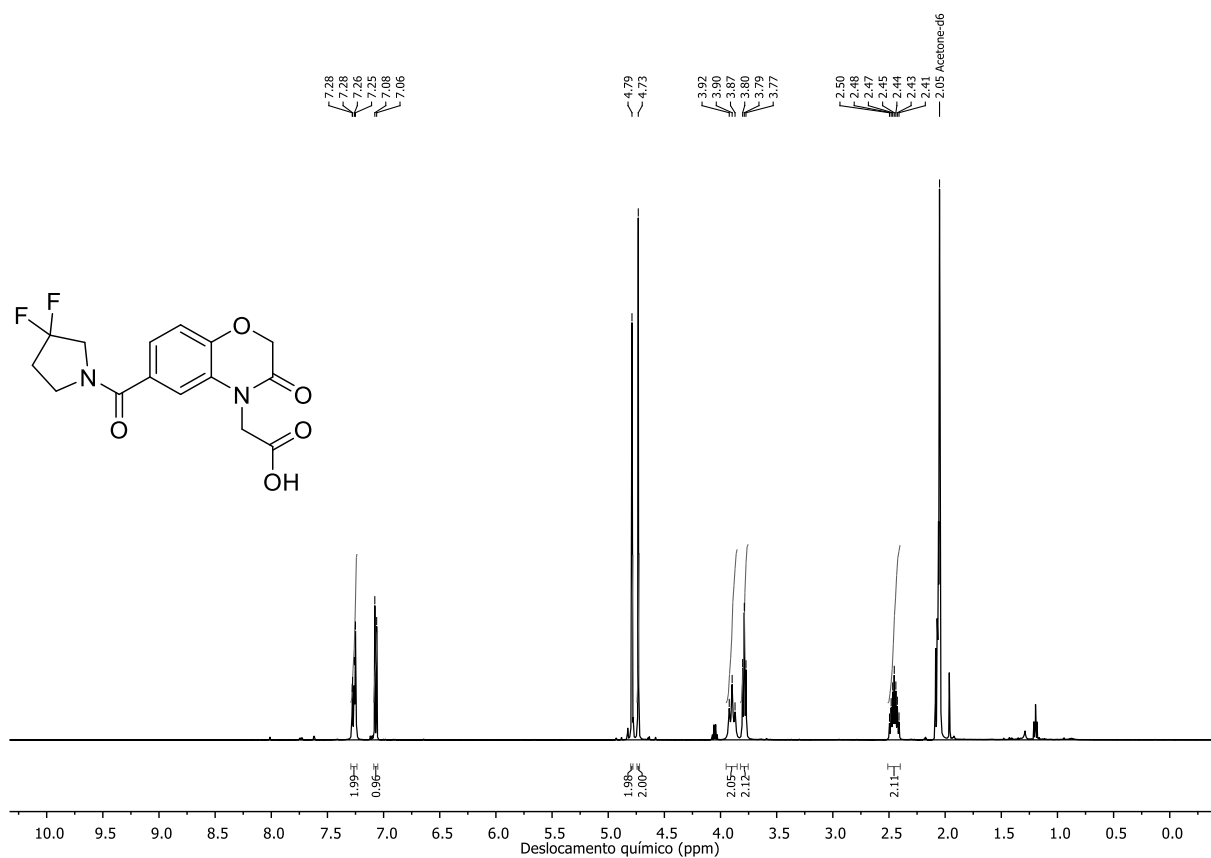
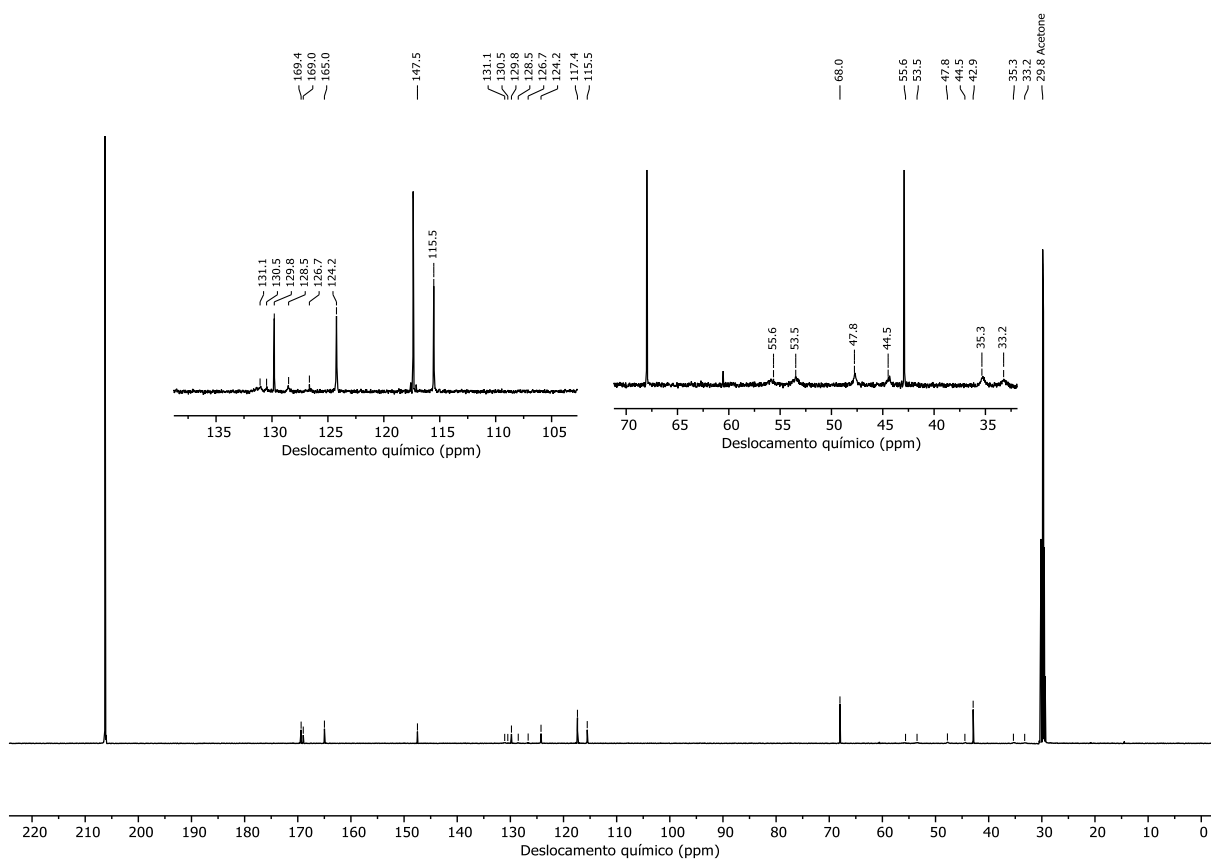
Espectro ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **4i**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **4i**

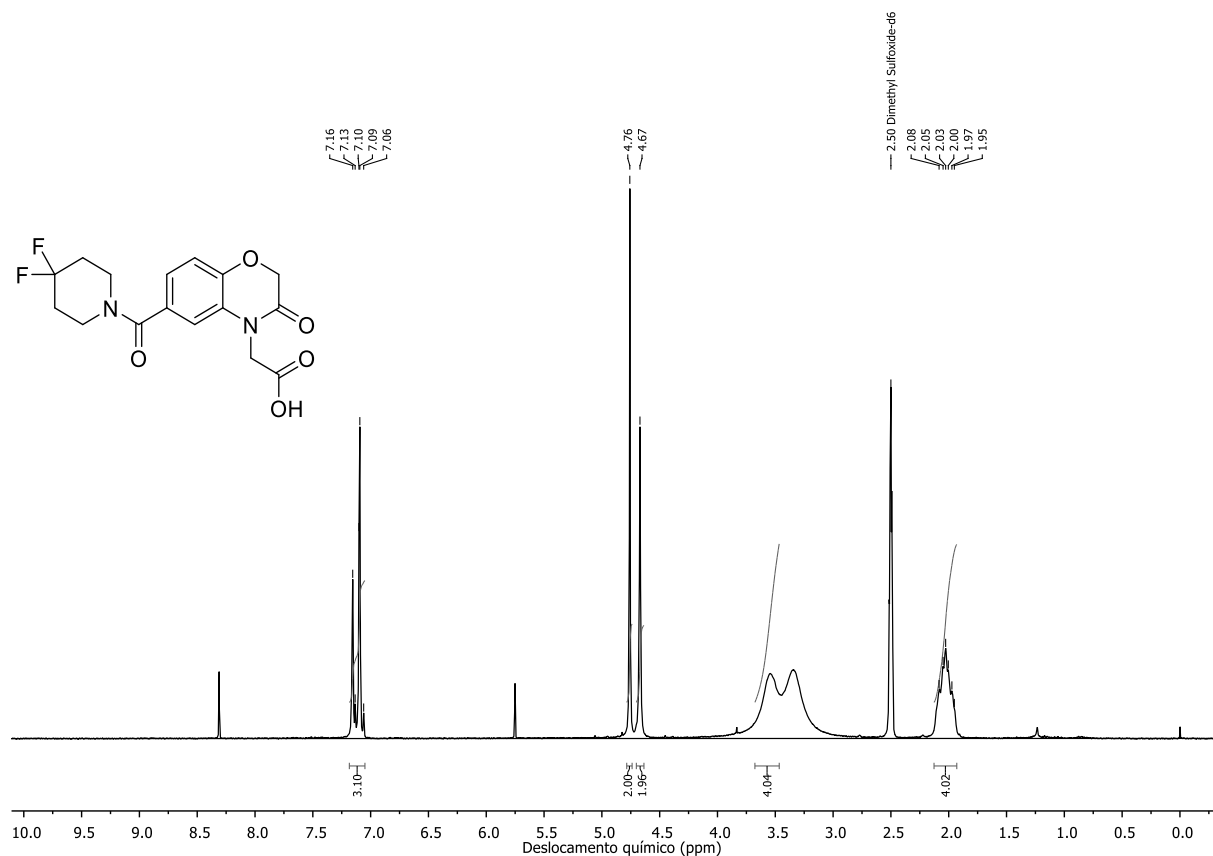


Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **4j**

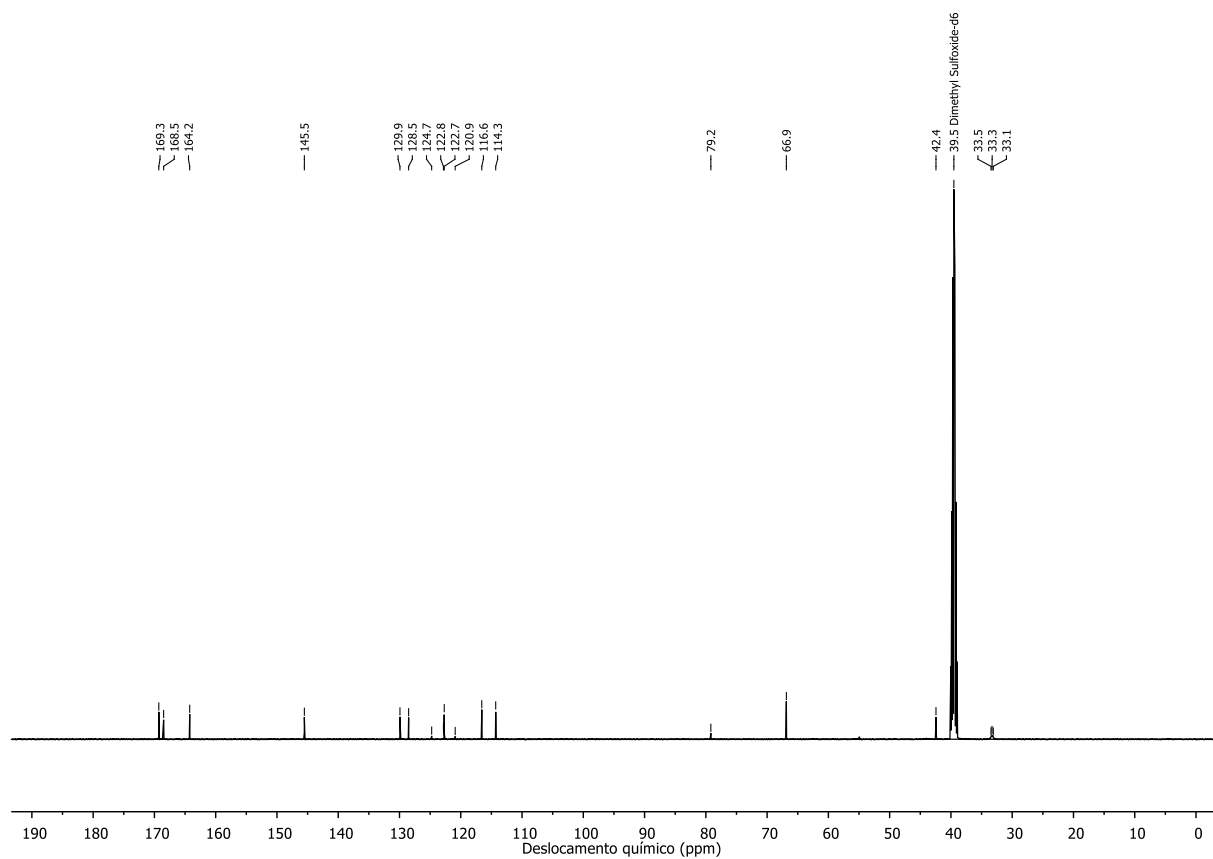


Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **4j**

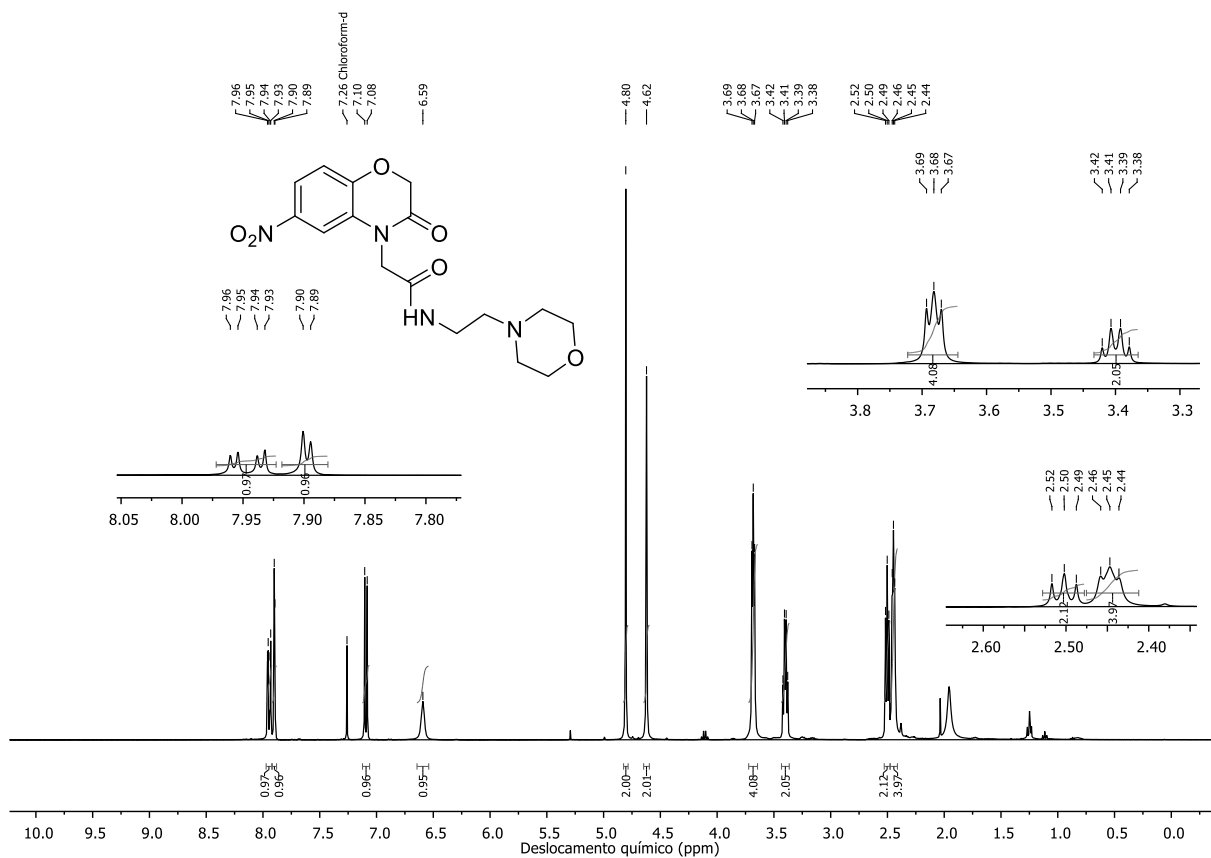
Espectro RMN ¹H (500 MHz, Acetona) do composto **4k**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, Acetona) do composto **4k**



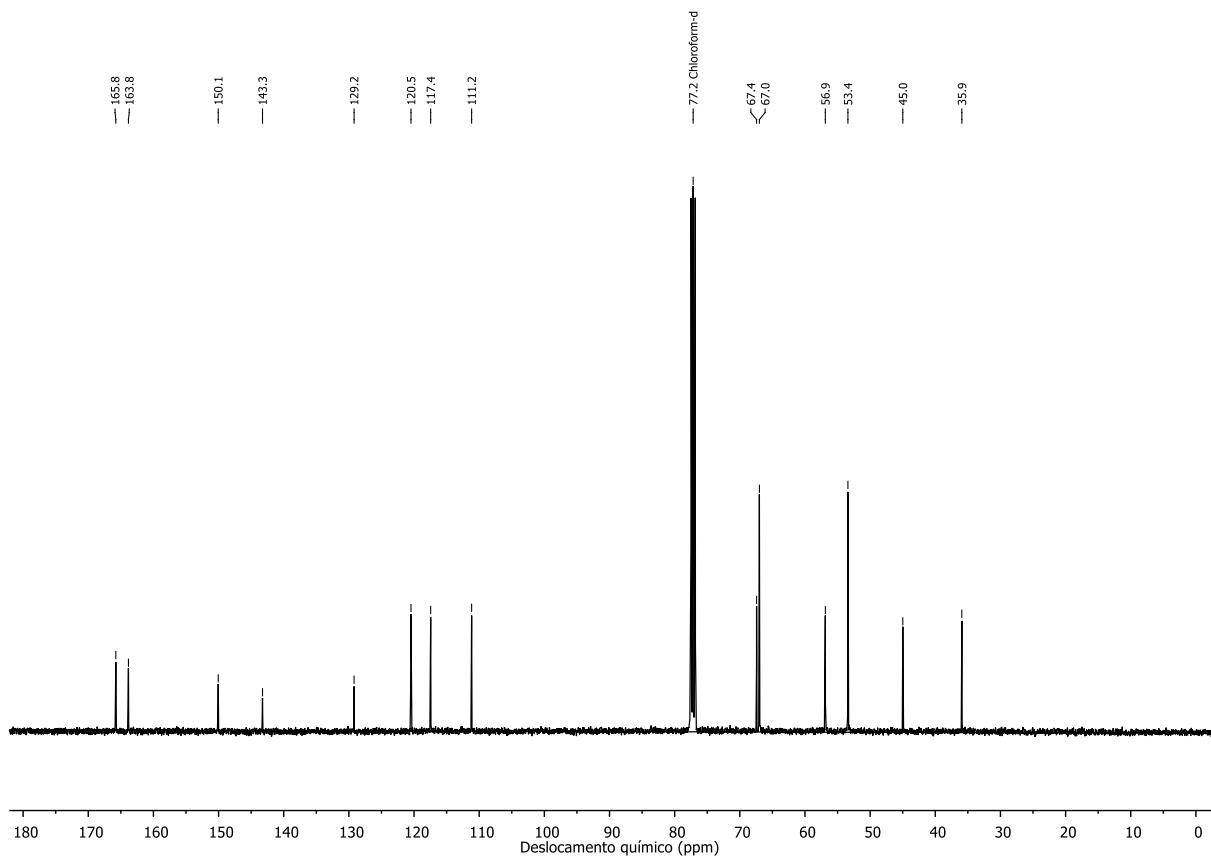
Espectro RMN ¹H (250 MHz, DMSO) do composto **4I**



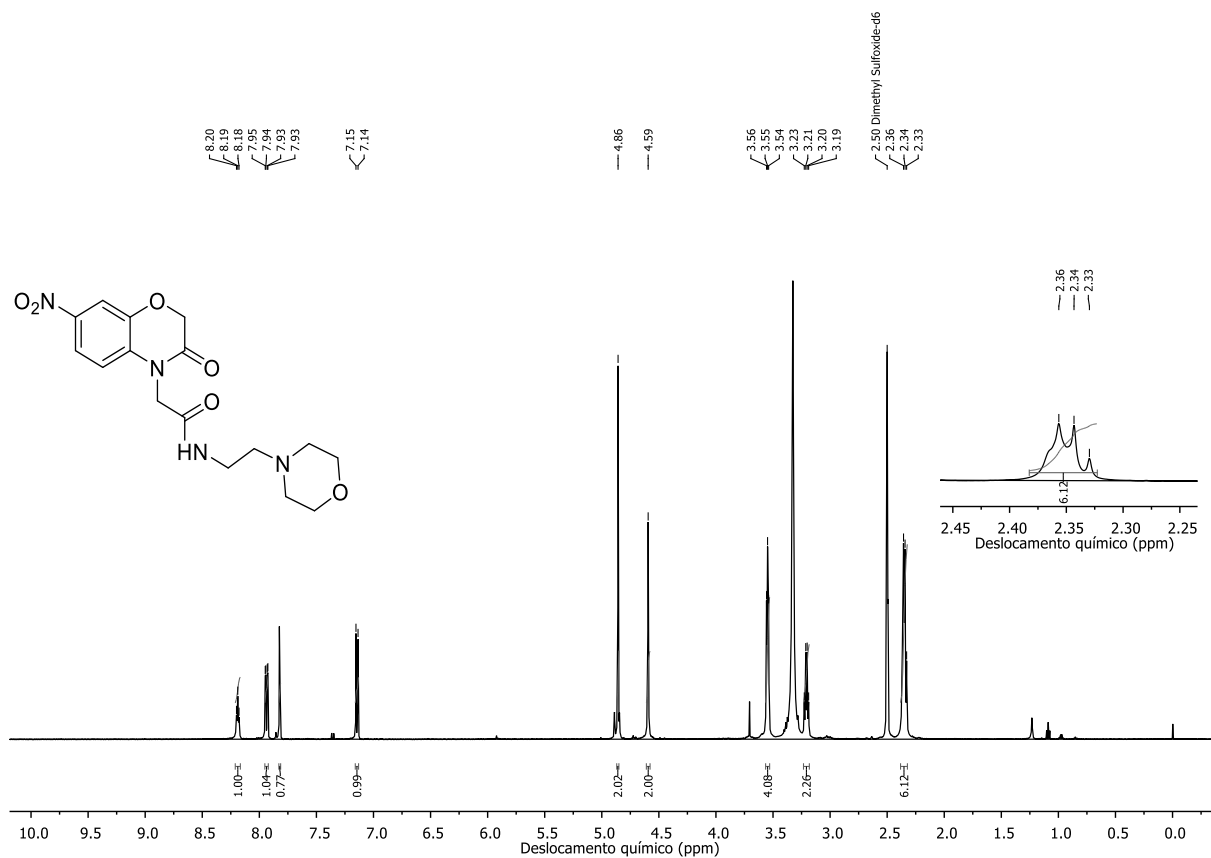
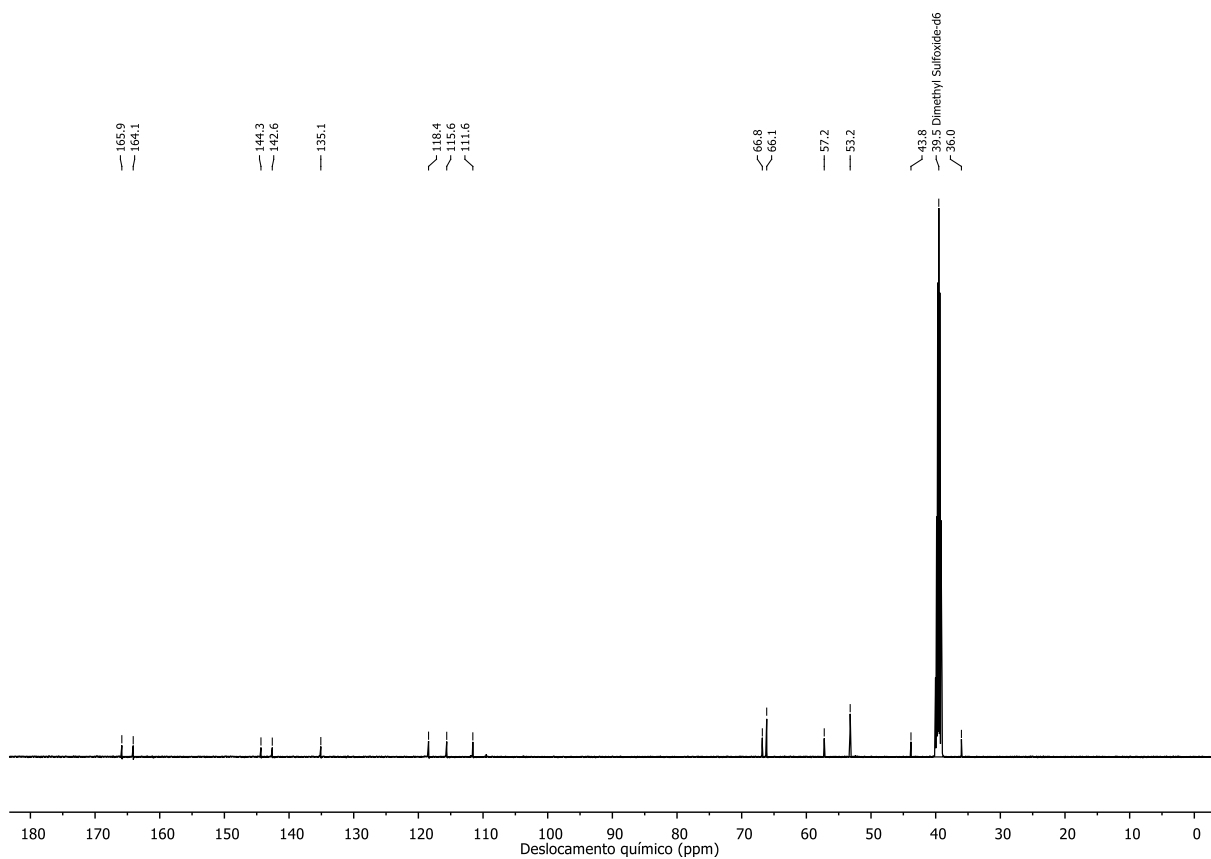
Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **4I**

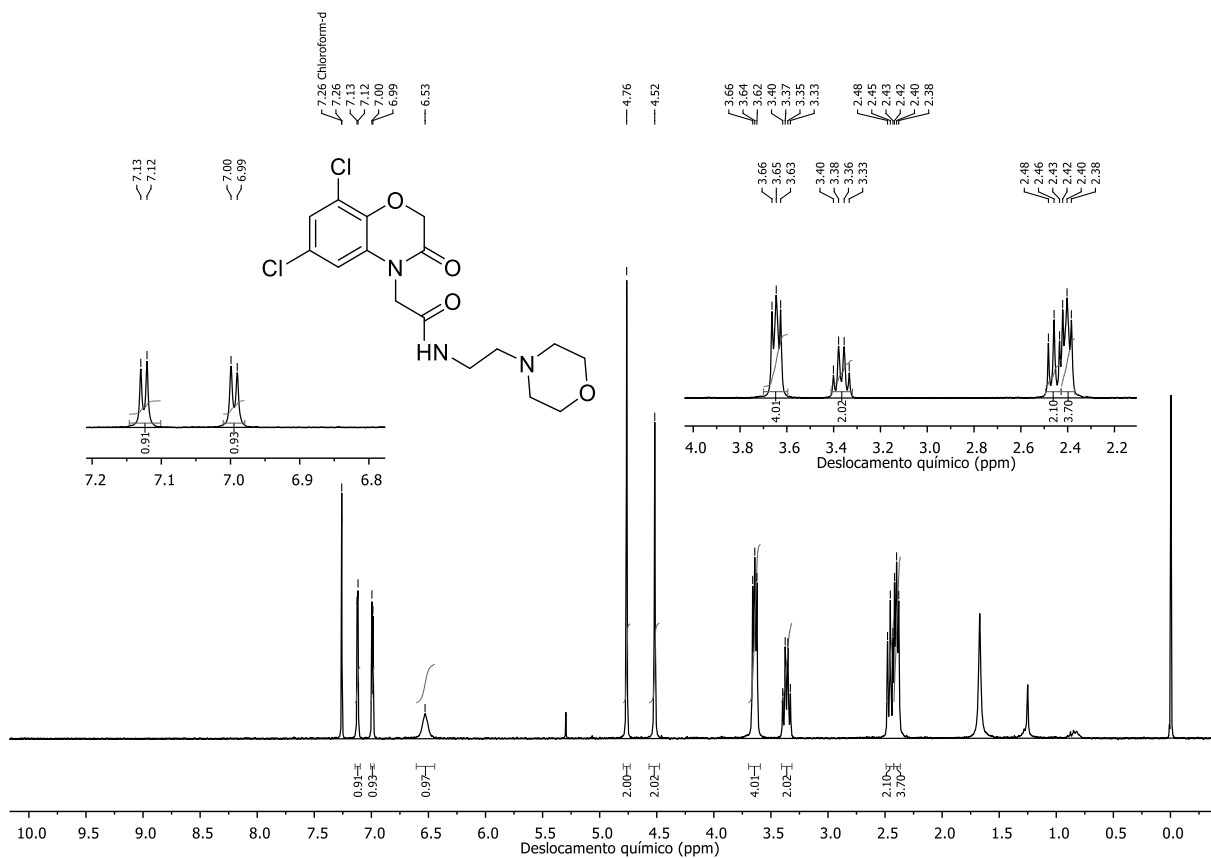


Espectro RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **5a**

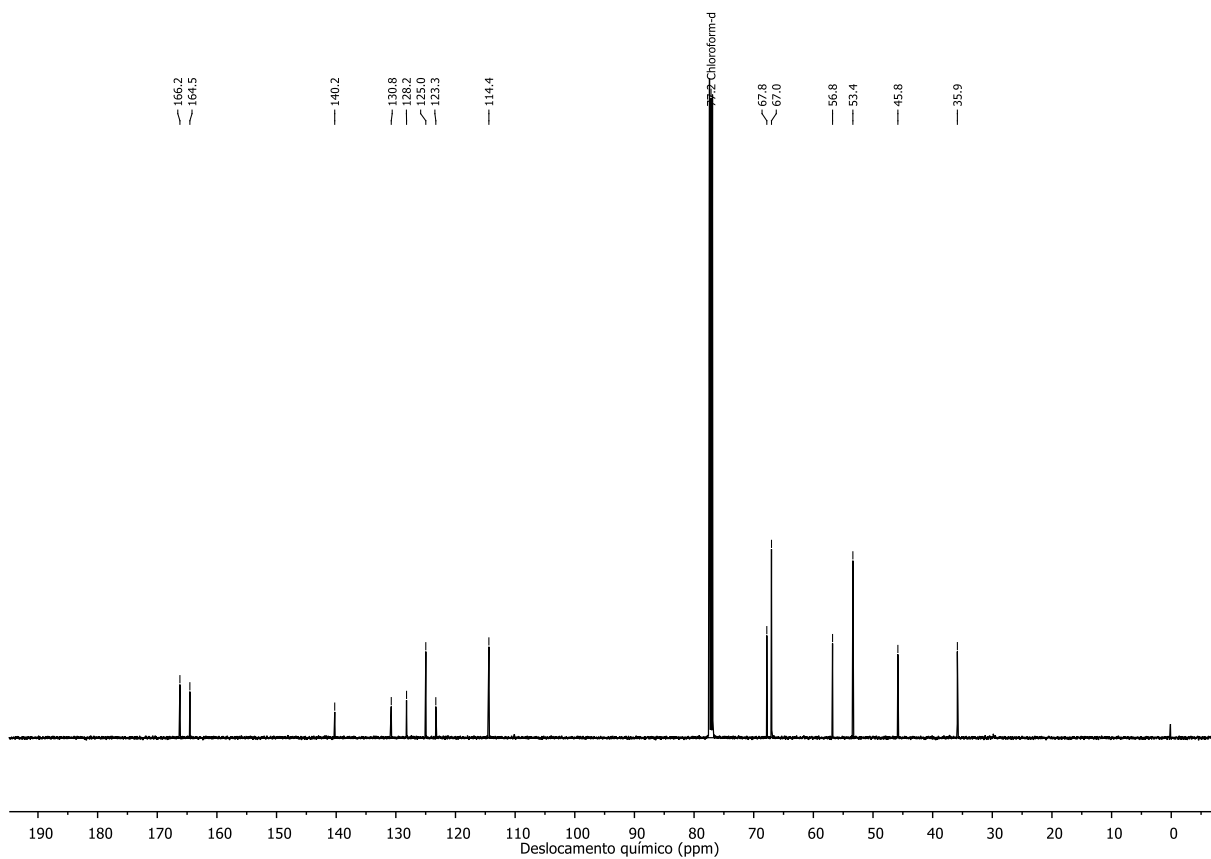


Espectro RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) do composto **5a**

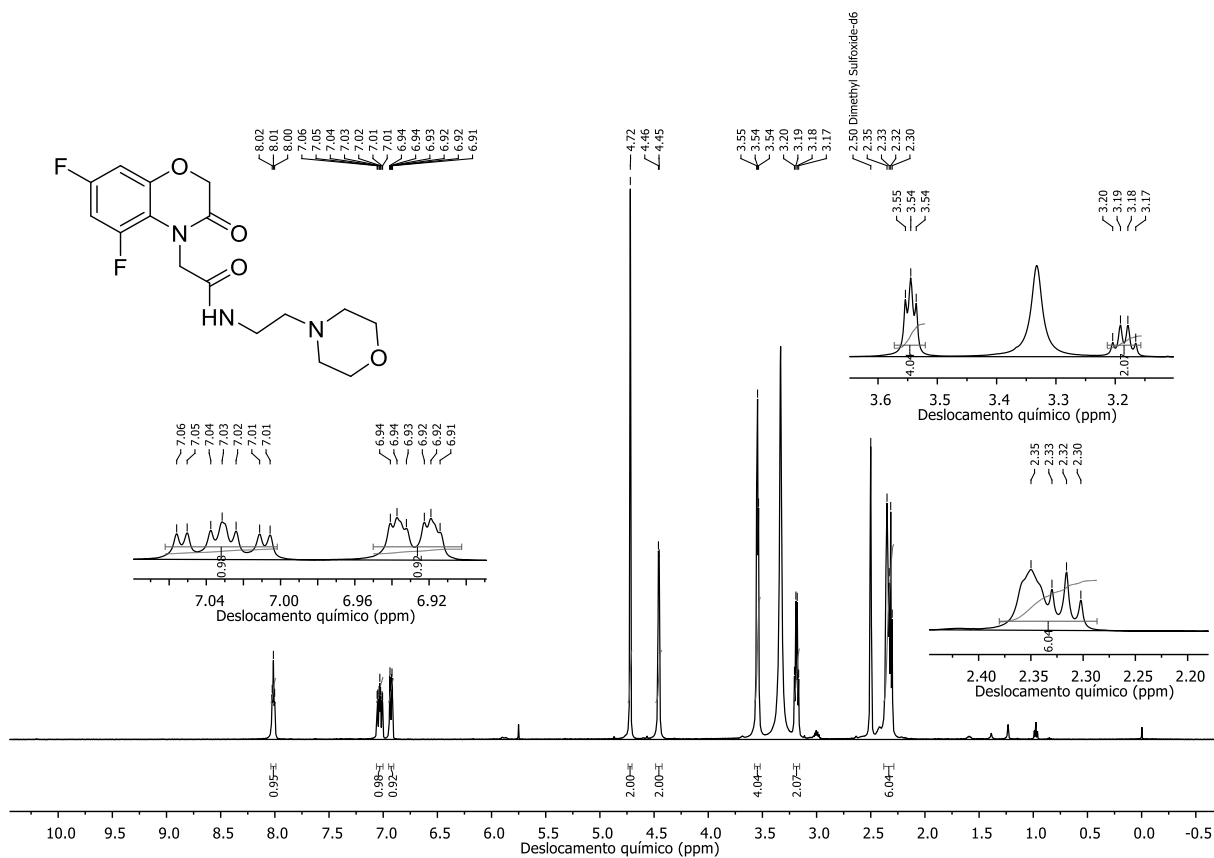
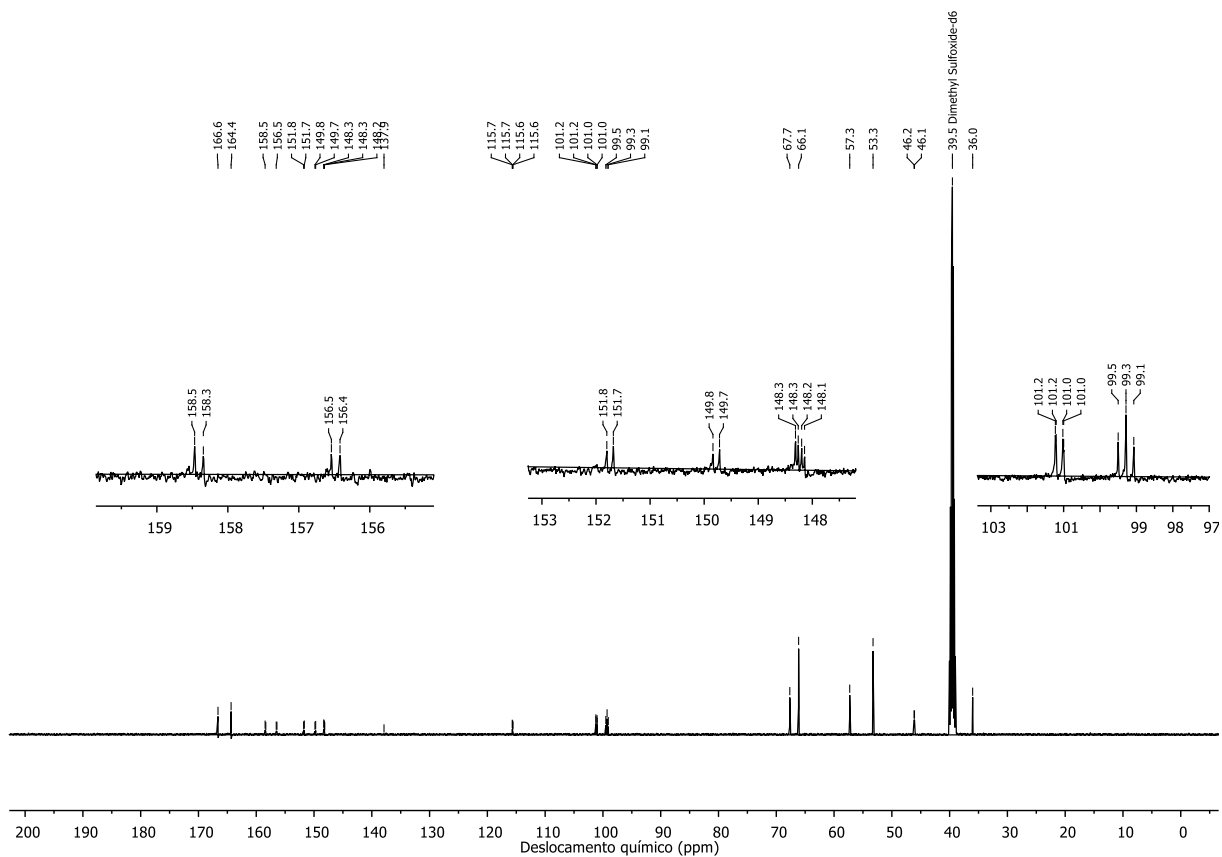
Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **5b**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **5b**

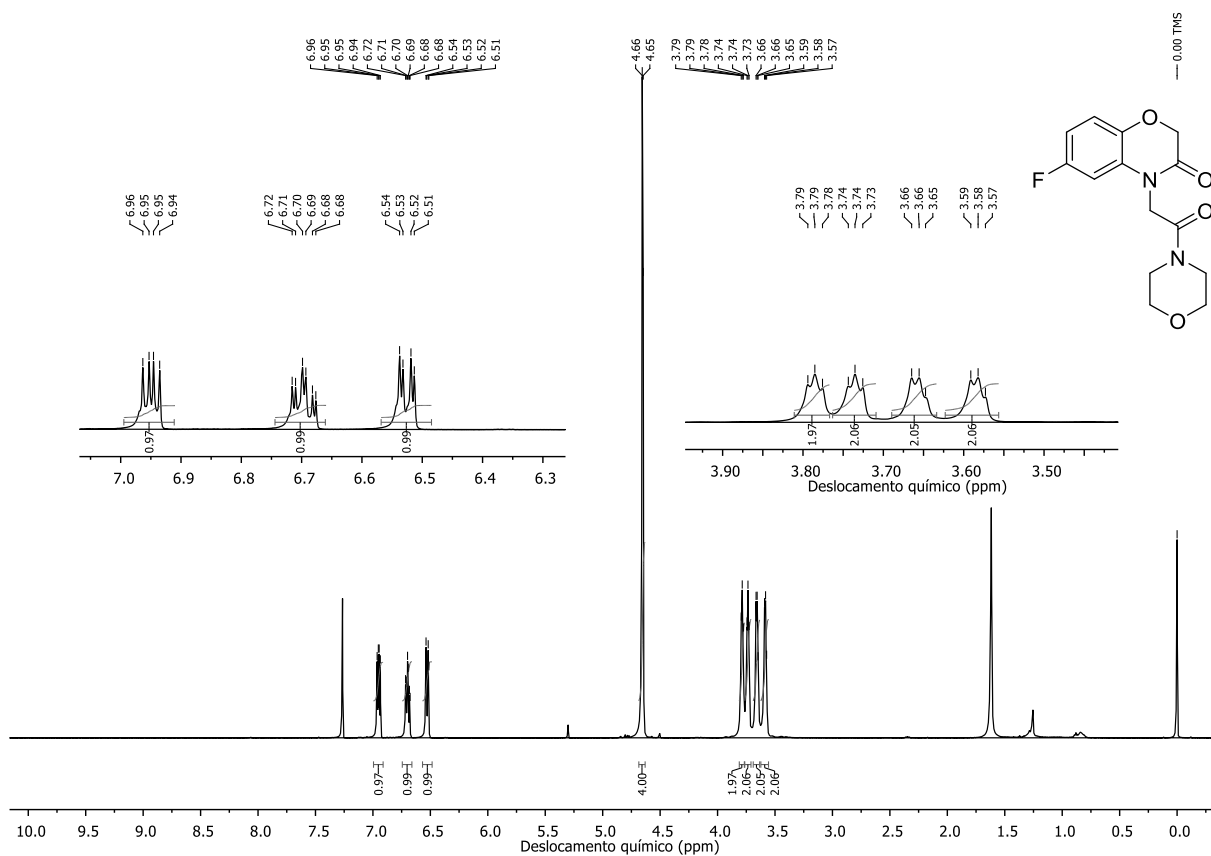
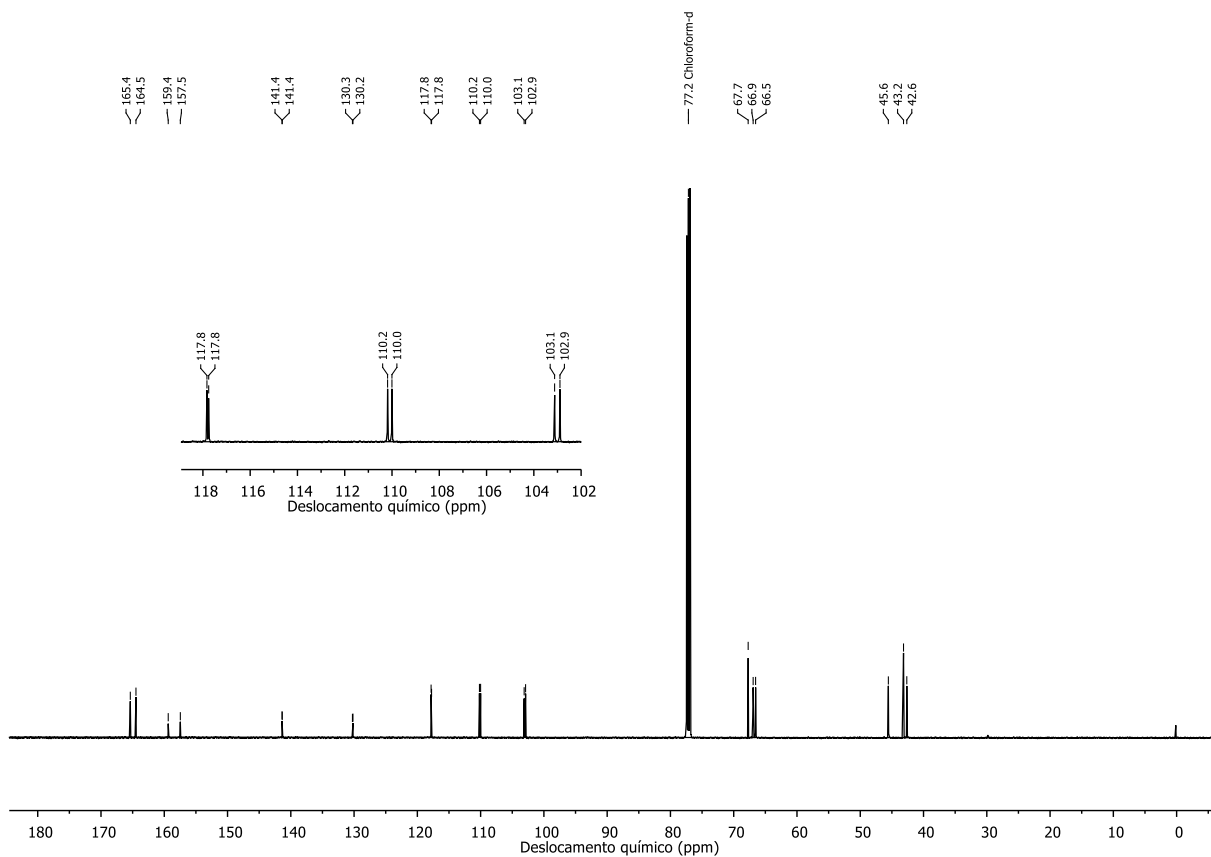


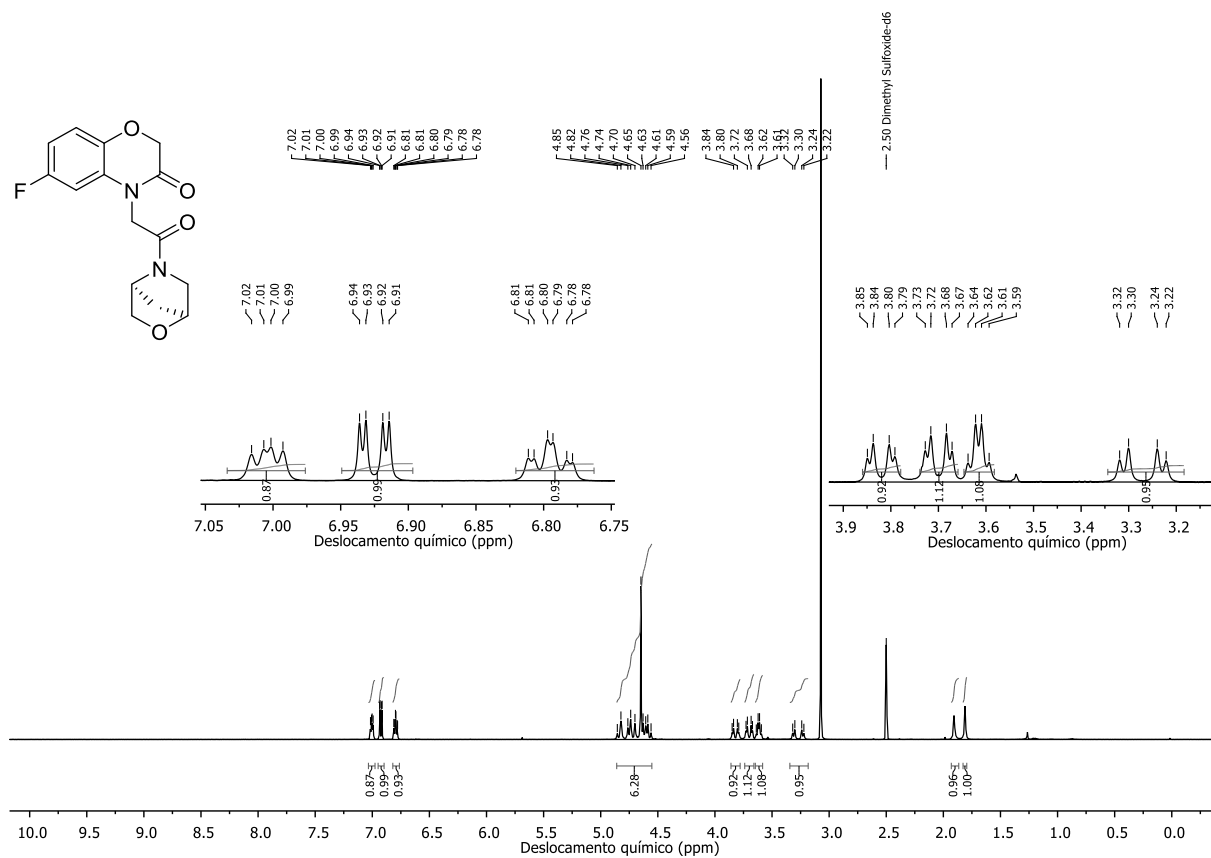
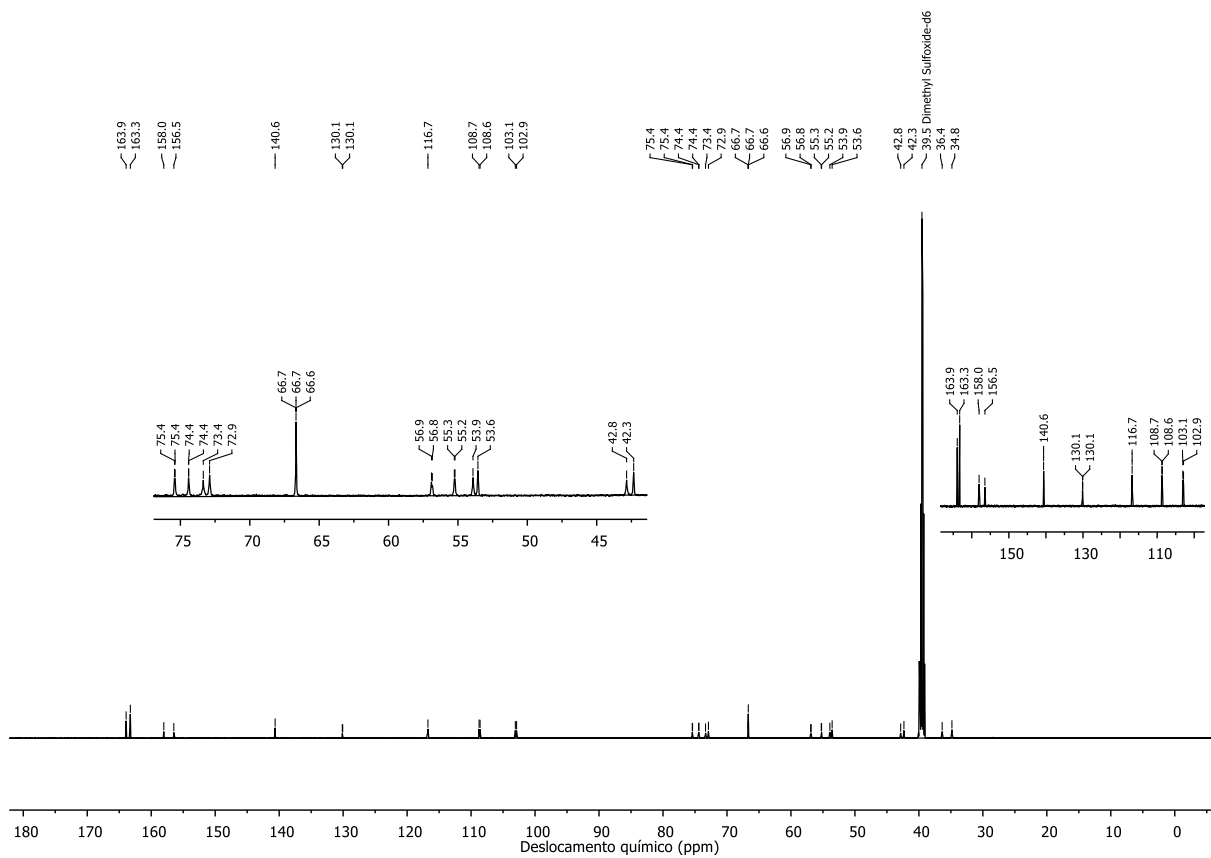
Espectro RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do composto **5d**

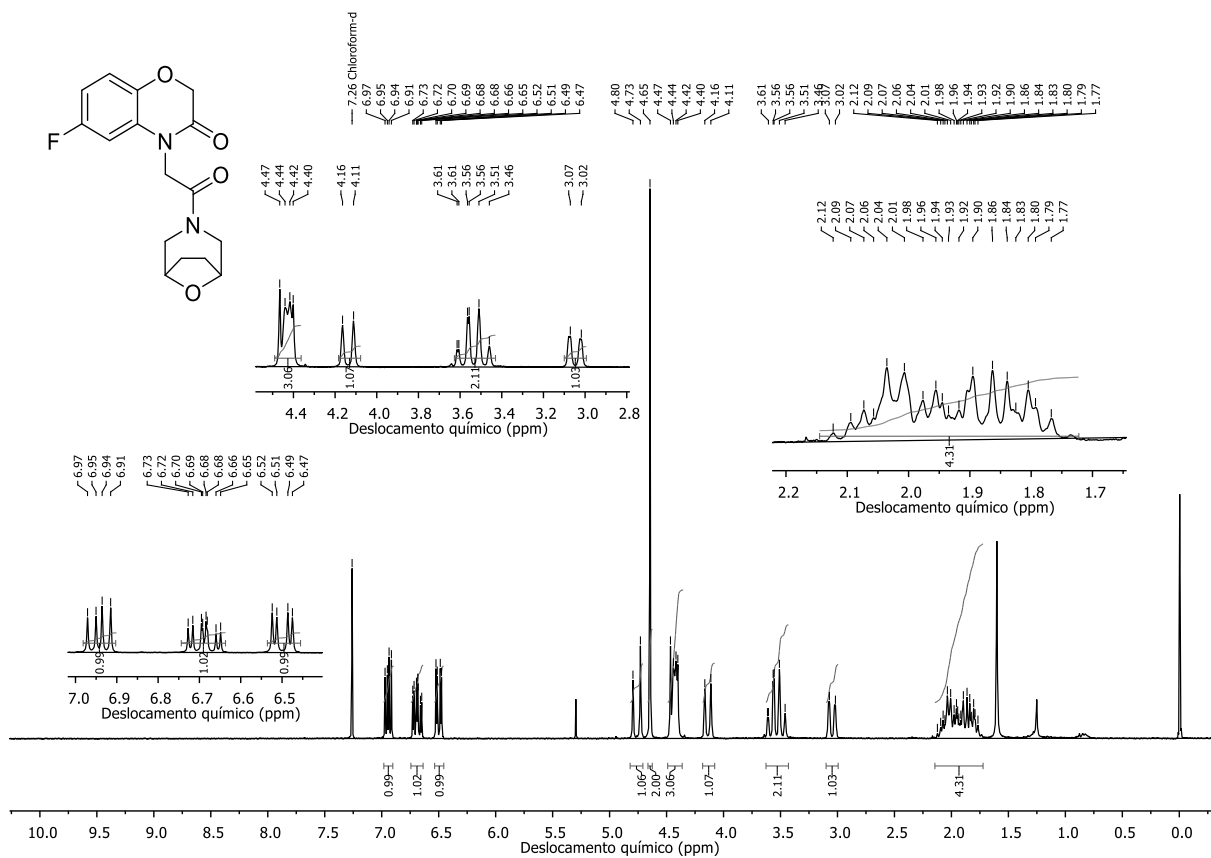
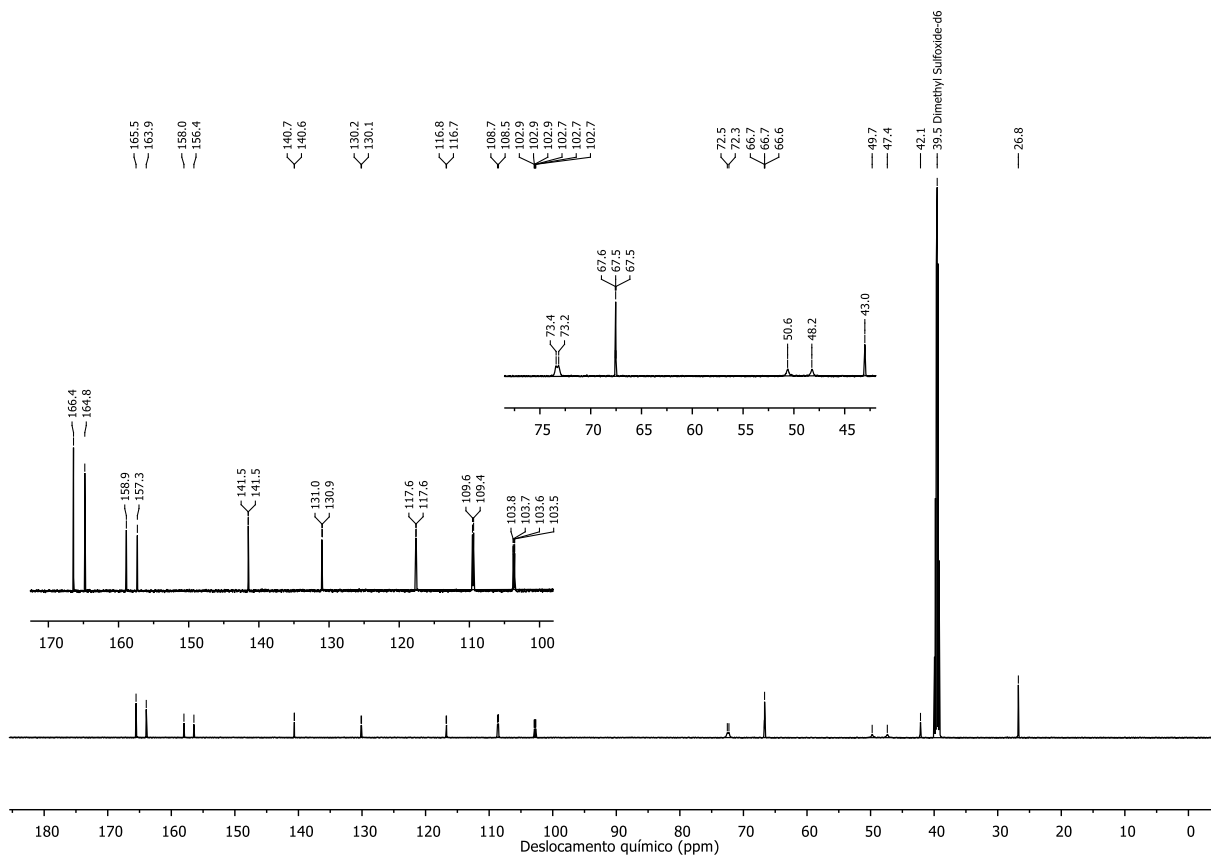


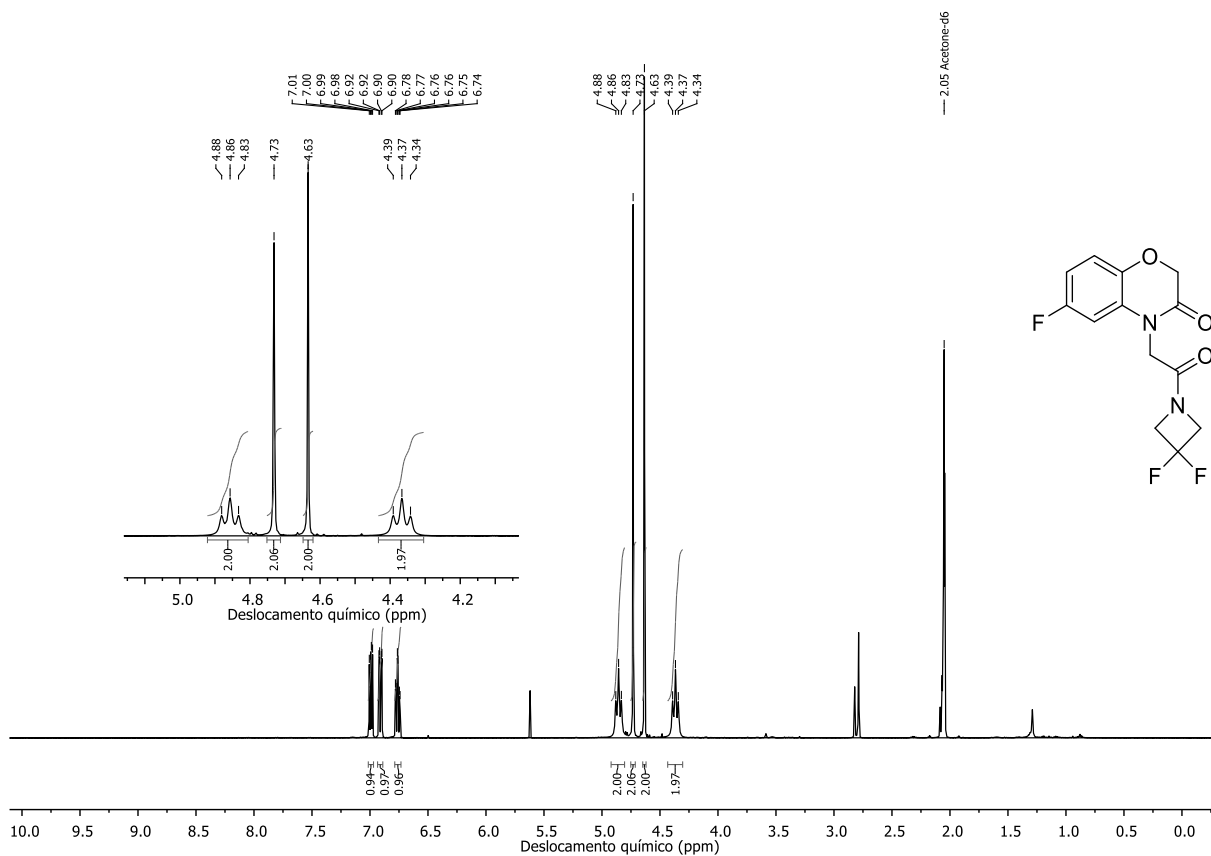
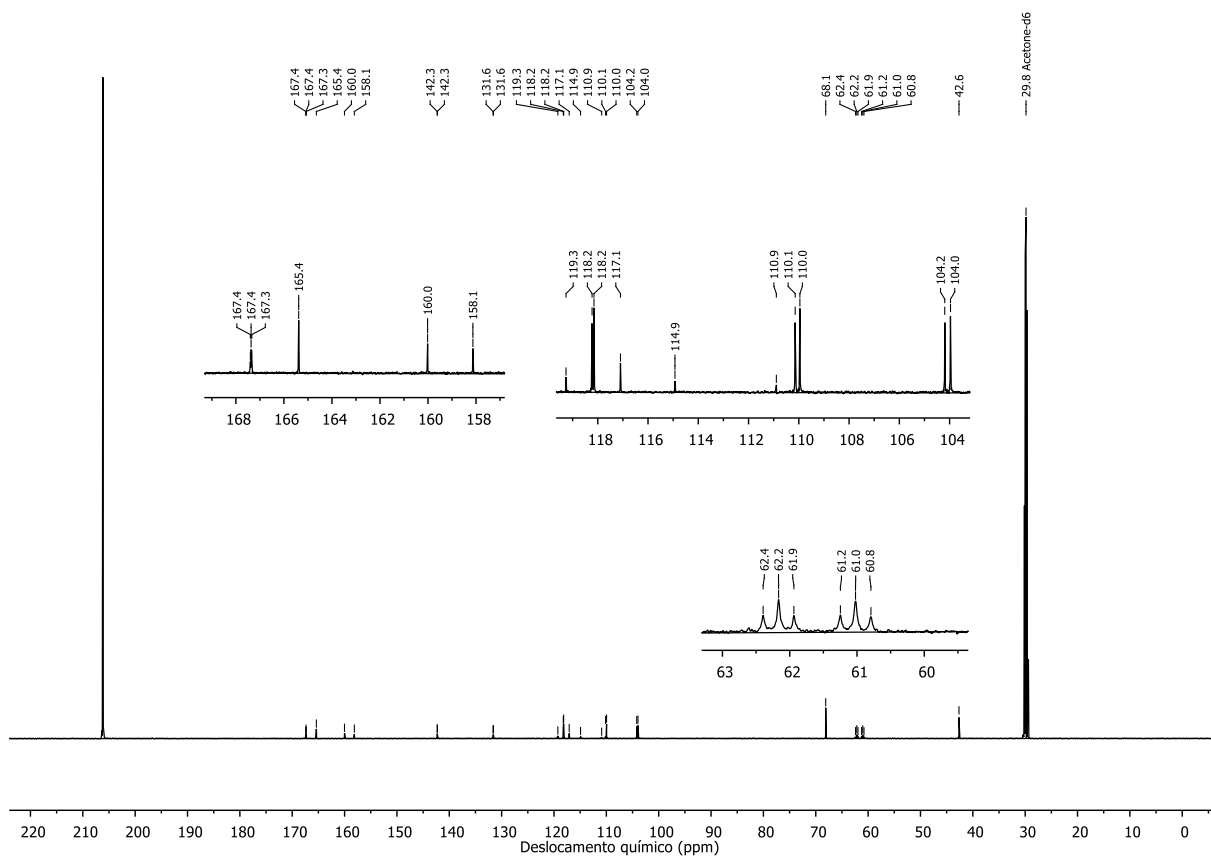
Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **5d**

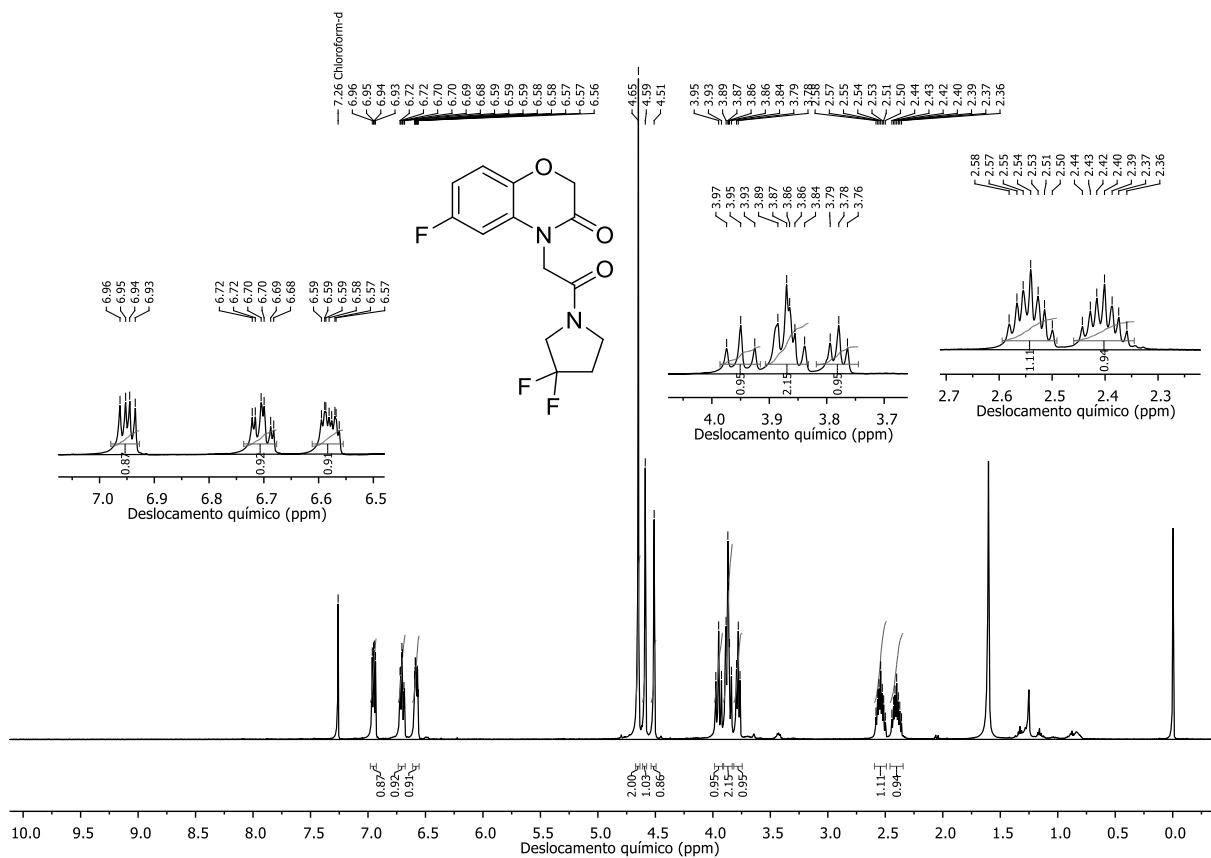
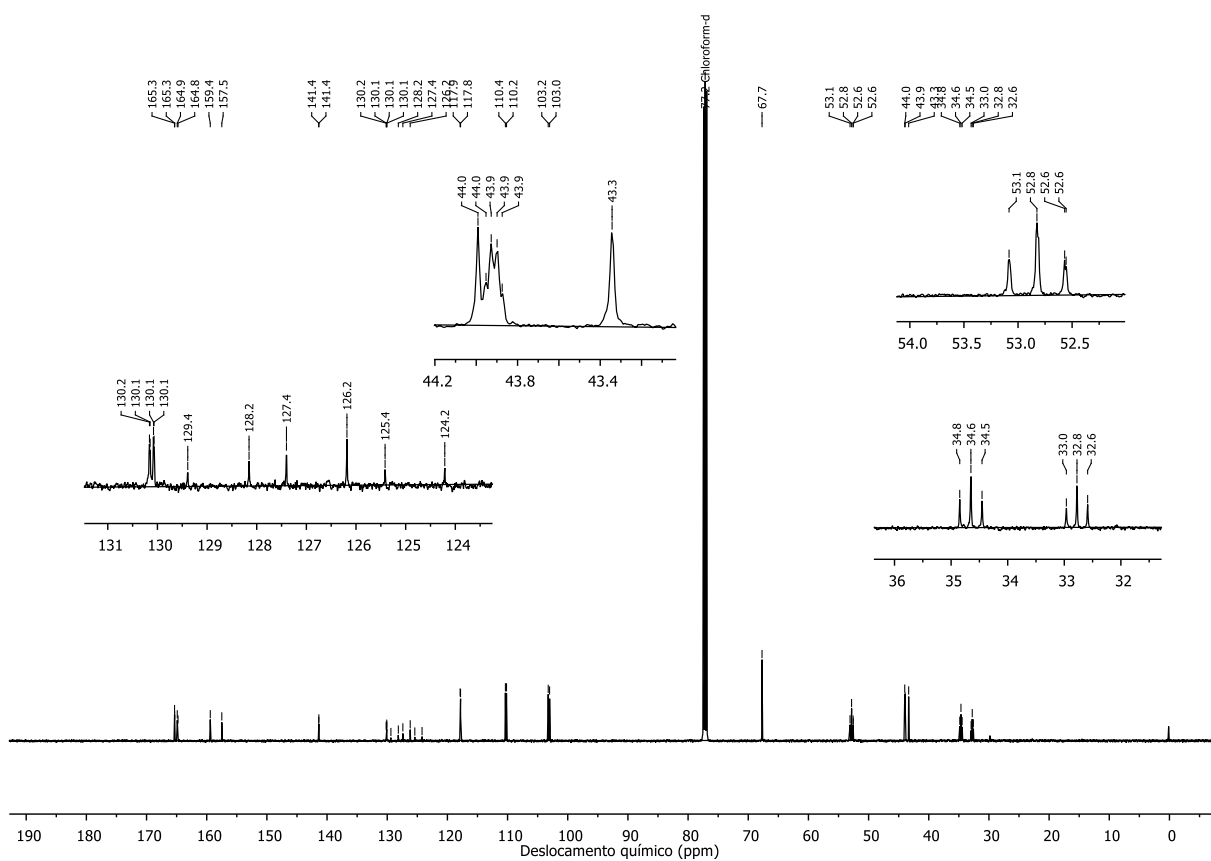
Espectro RMN ¹H (500 MHz, DMSO) do composto **5e**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) do composto **5e**

Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **6a**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **6a**

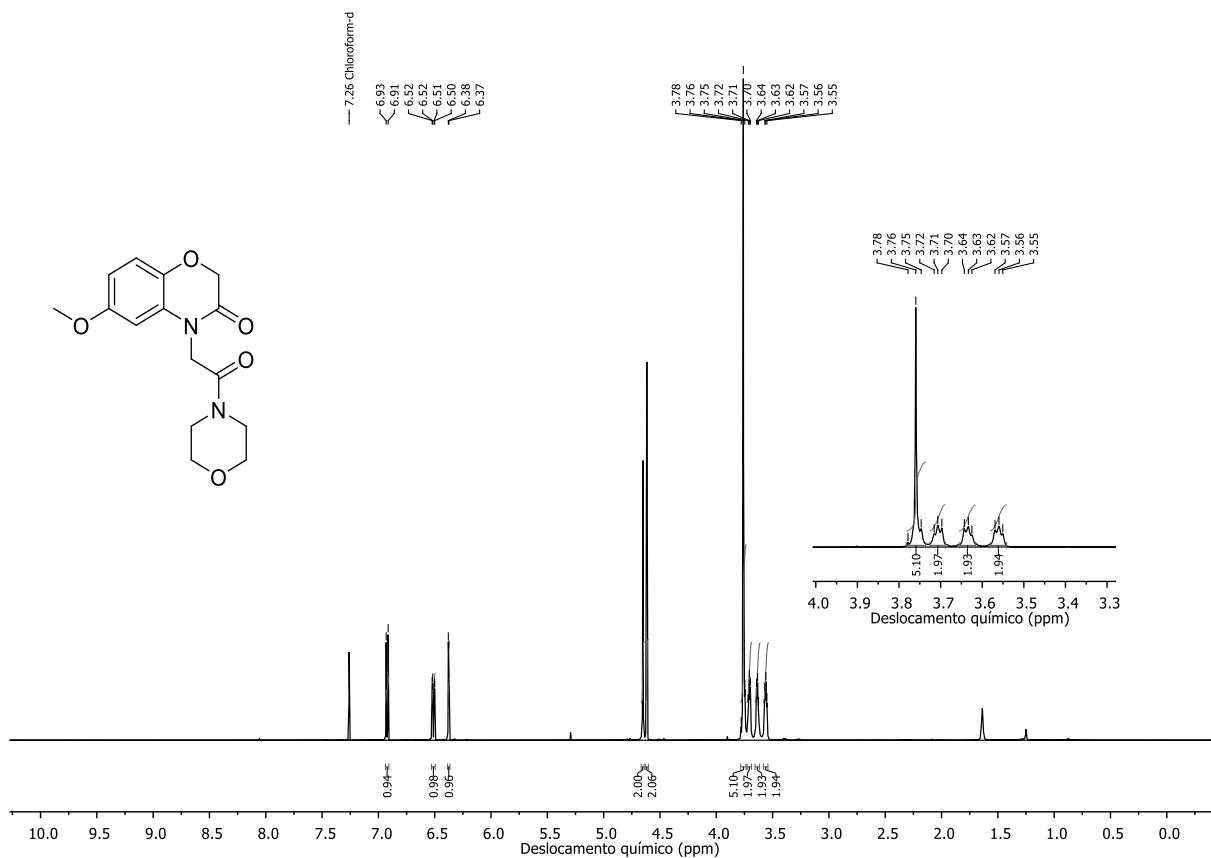
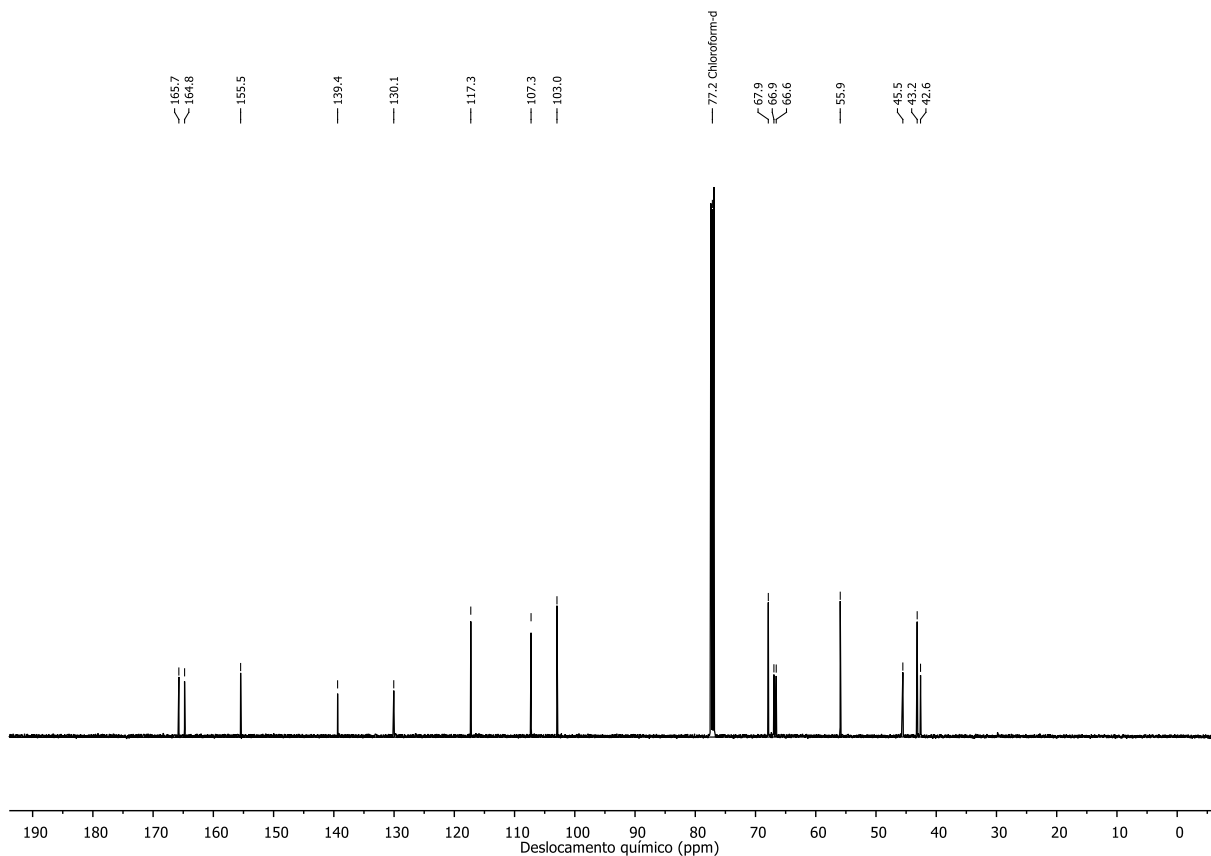
Espectro RMN ¹H (600 MHz, DMSO, 80 °C) do composto **6b**Espectro RMN ¹³C (151 MHz, DMSO, 80 °C) do composto **6b**

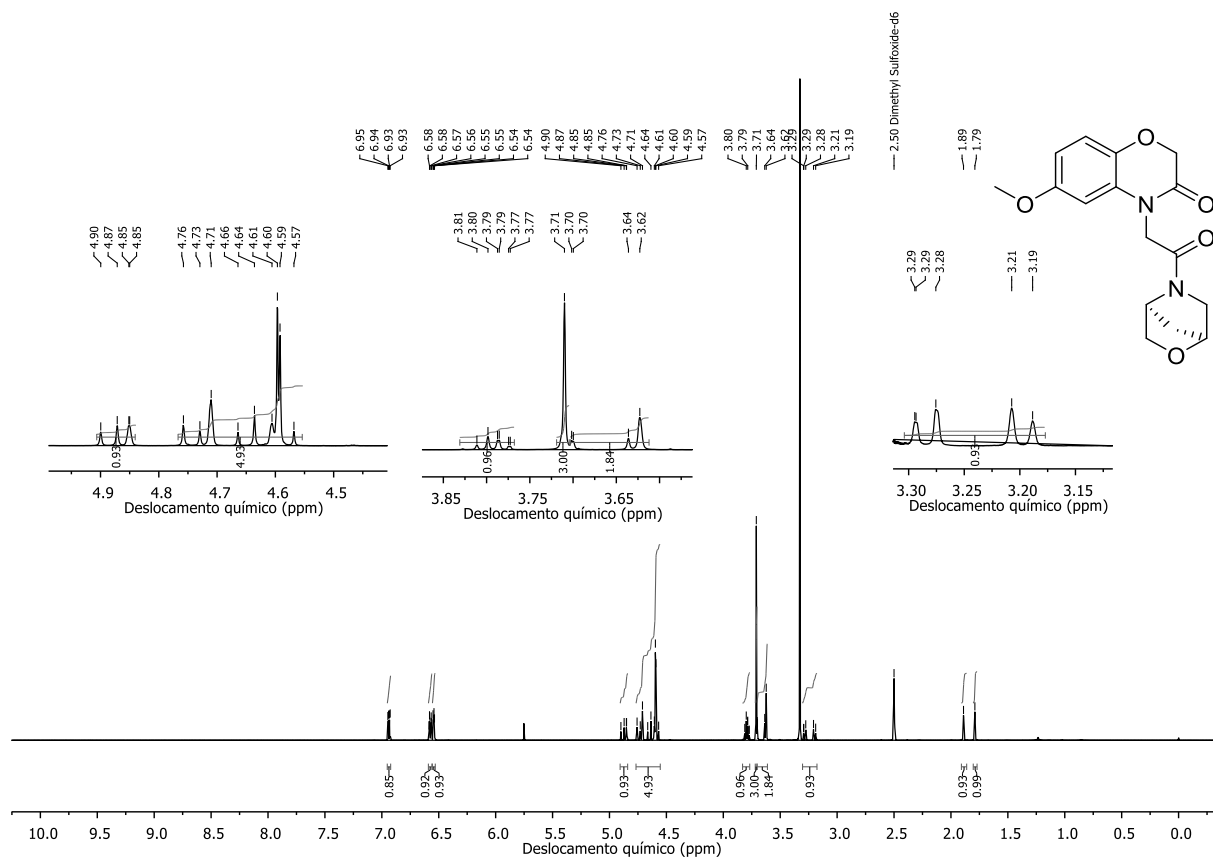
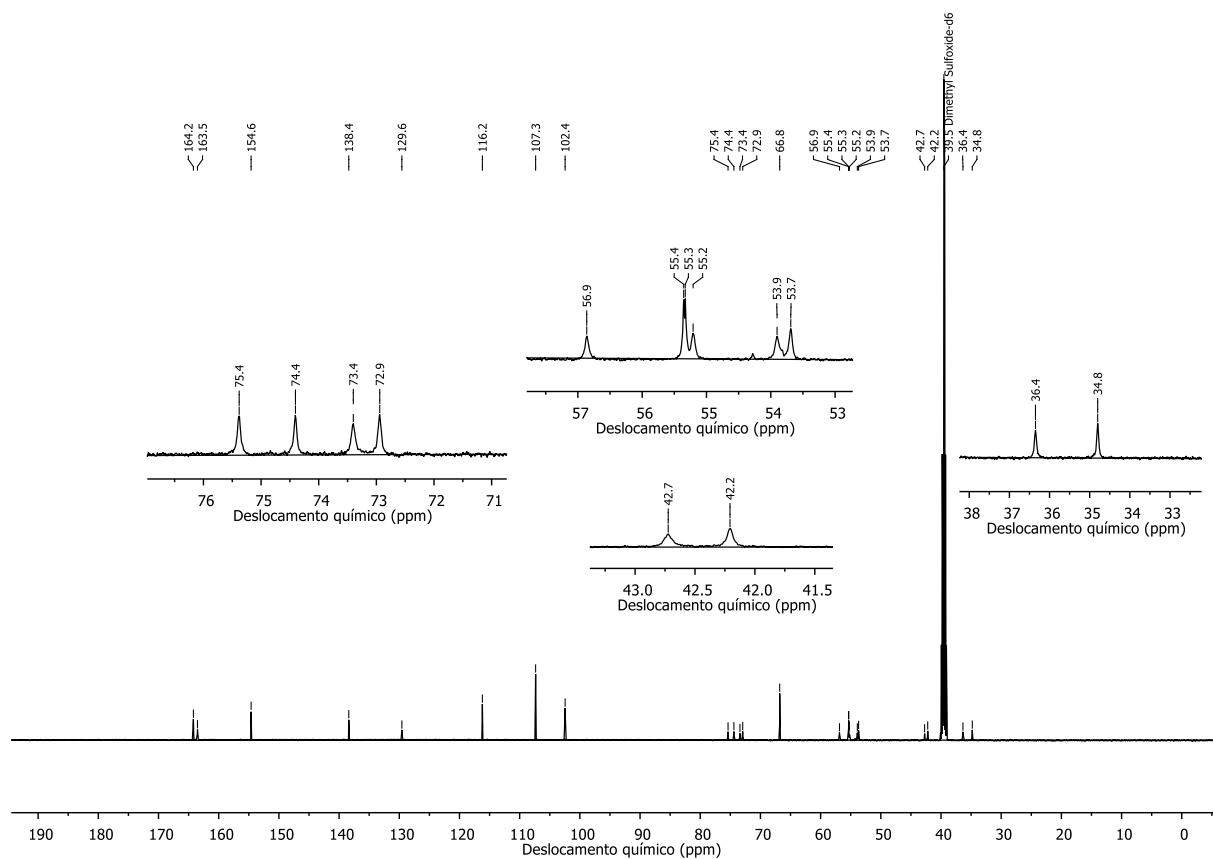
Espectro RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) do composto **6c**Espectro RMN (151 MHz, DMSO, 80 °C) do composto **6c**

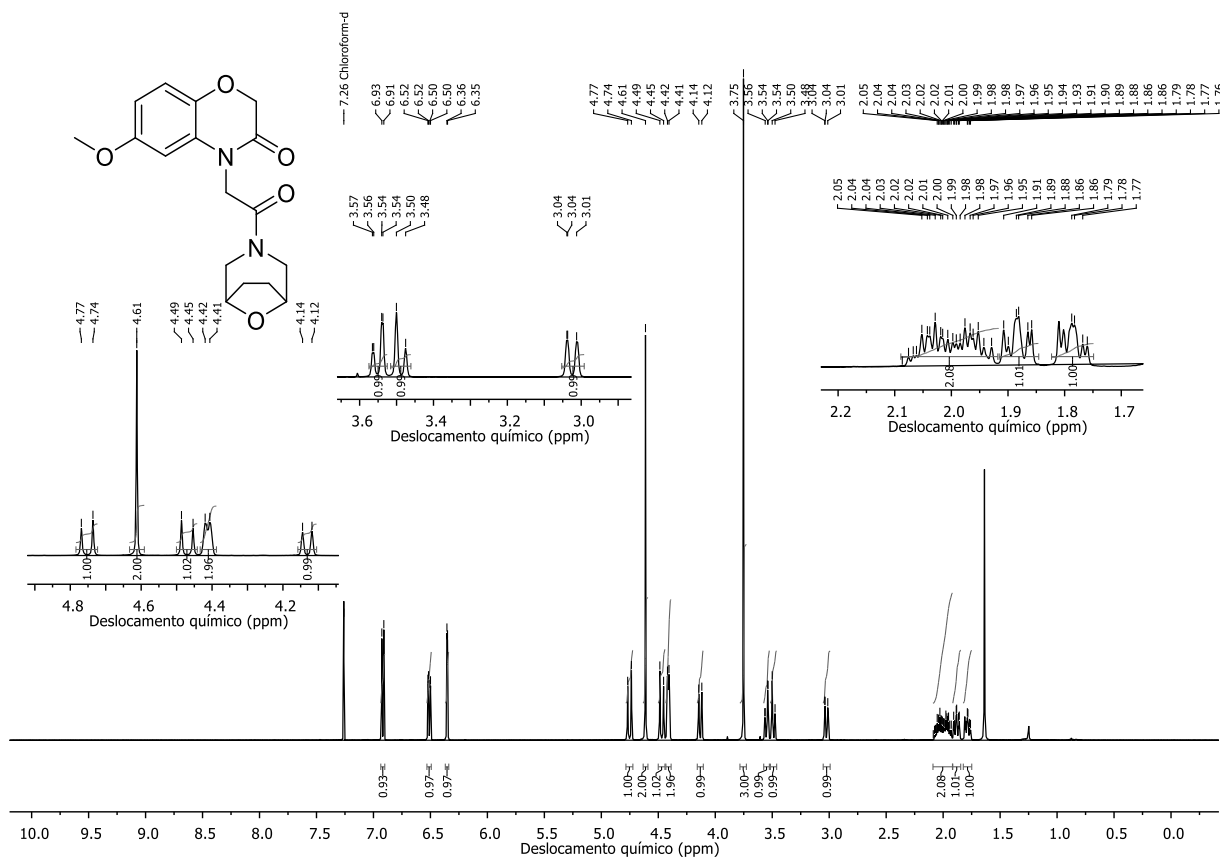
Espectro RMN ¹H (500 MHz, Acetona) do composto **6d**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, Acetona) do composto **6d**

Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **6e**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **6e**

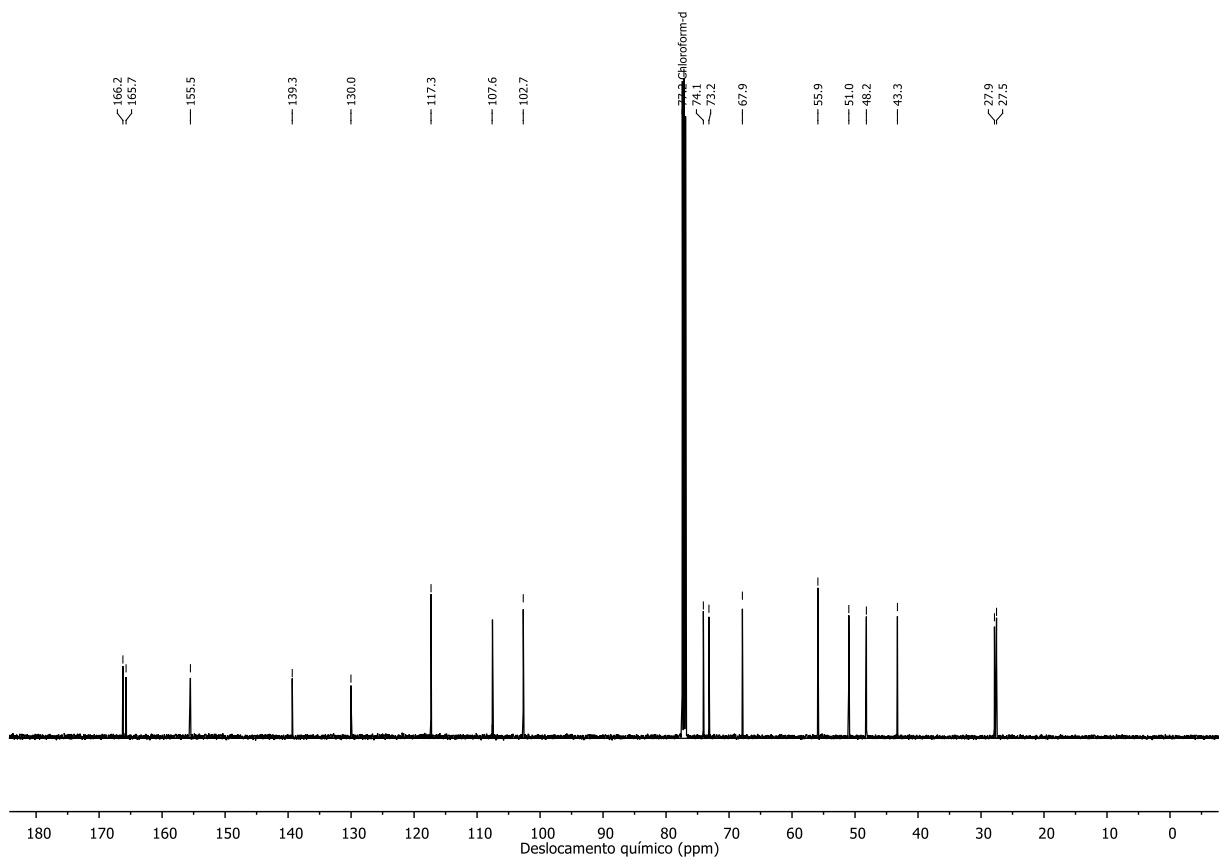


Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **7a**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **7a**

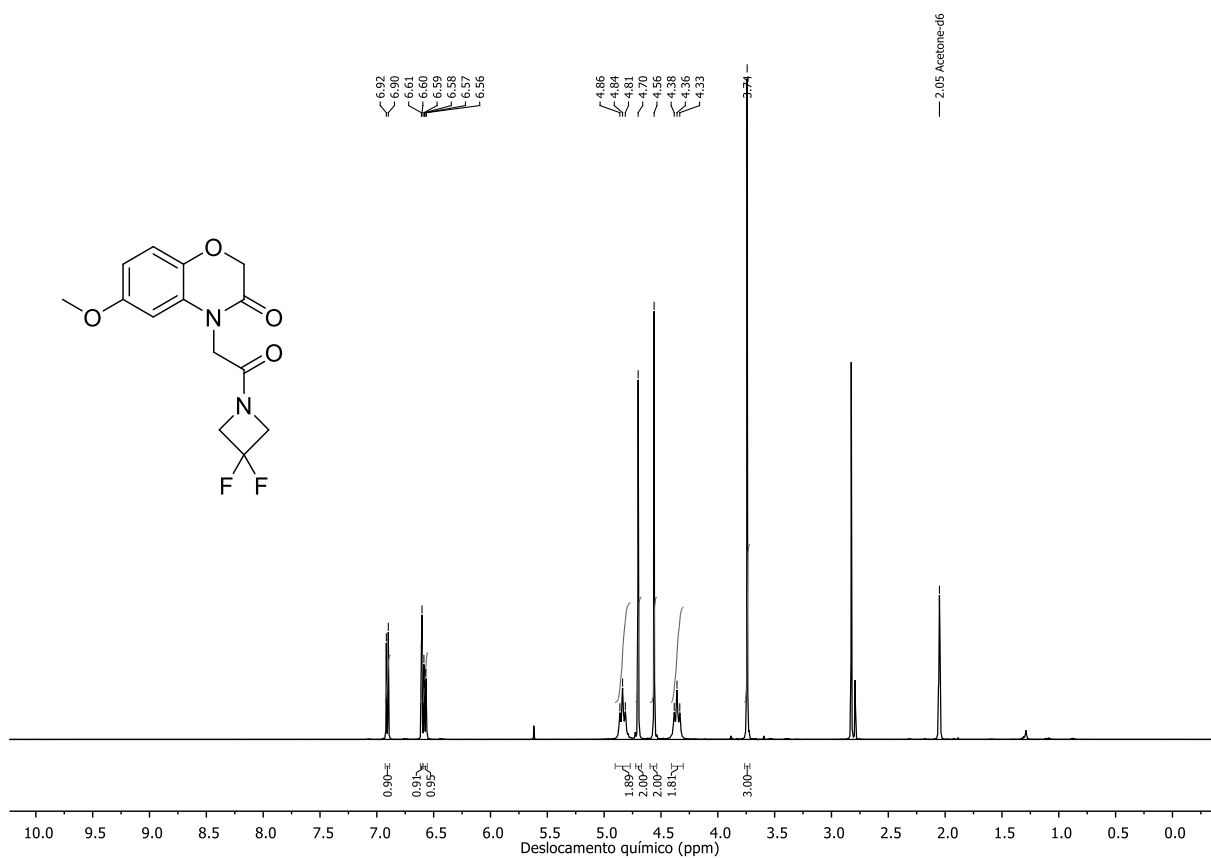
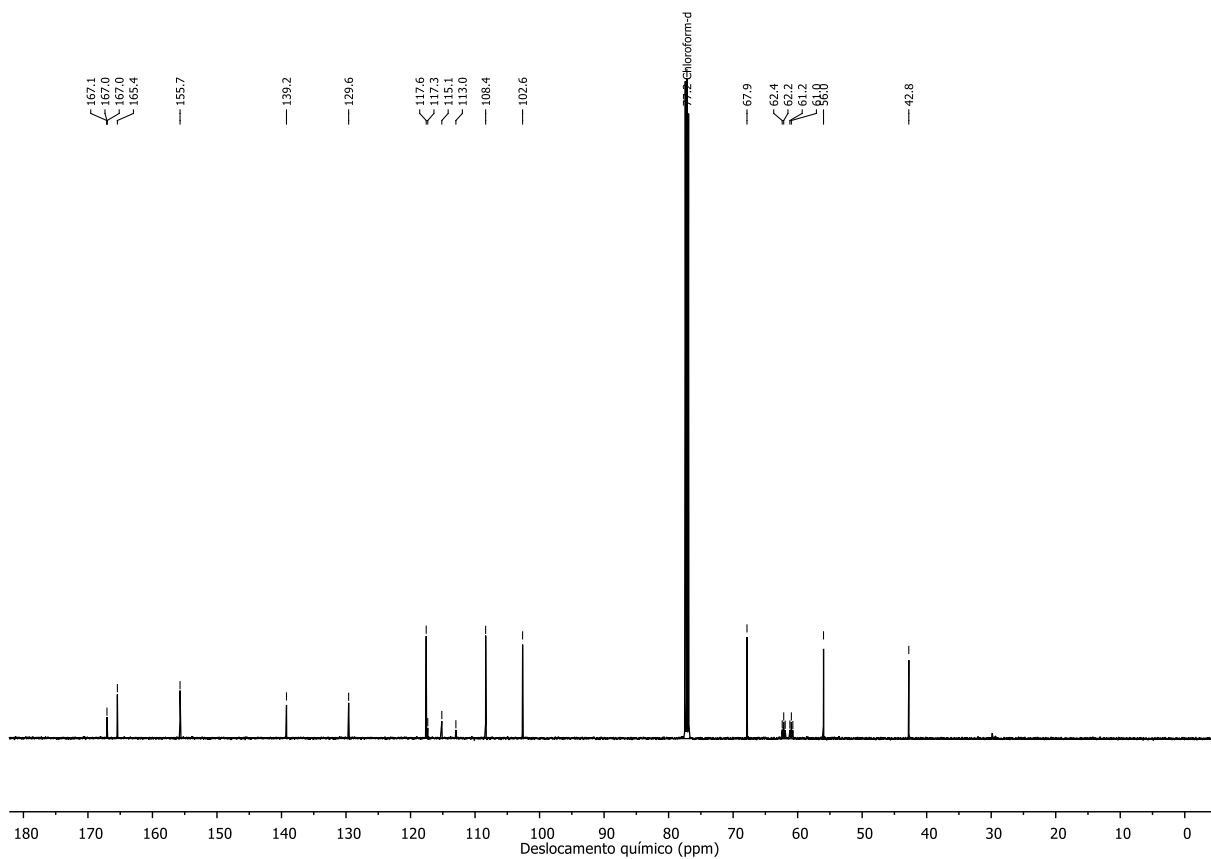
Espectro RMN ¹H (600 MHz, DMSO) do composto **7b**Espectro RMN ¹³C (151 MHz, DMSO, 80 °C) do composto **7b**

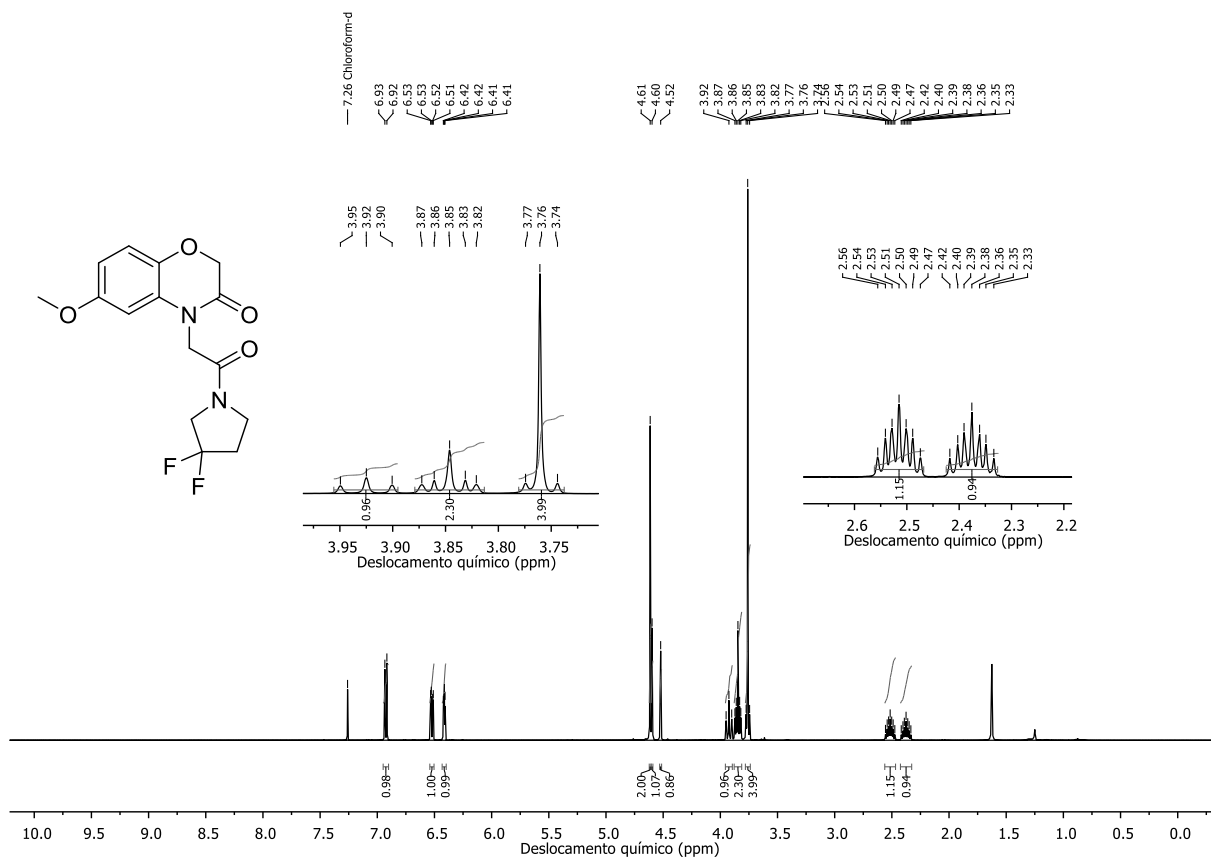
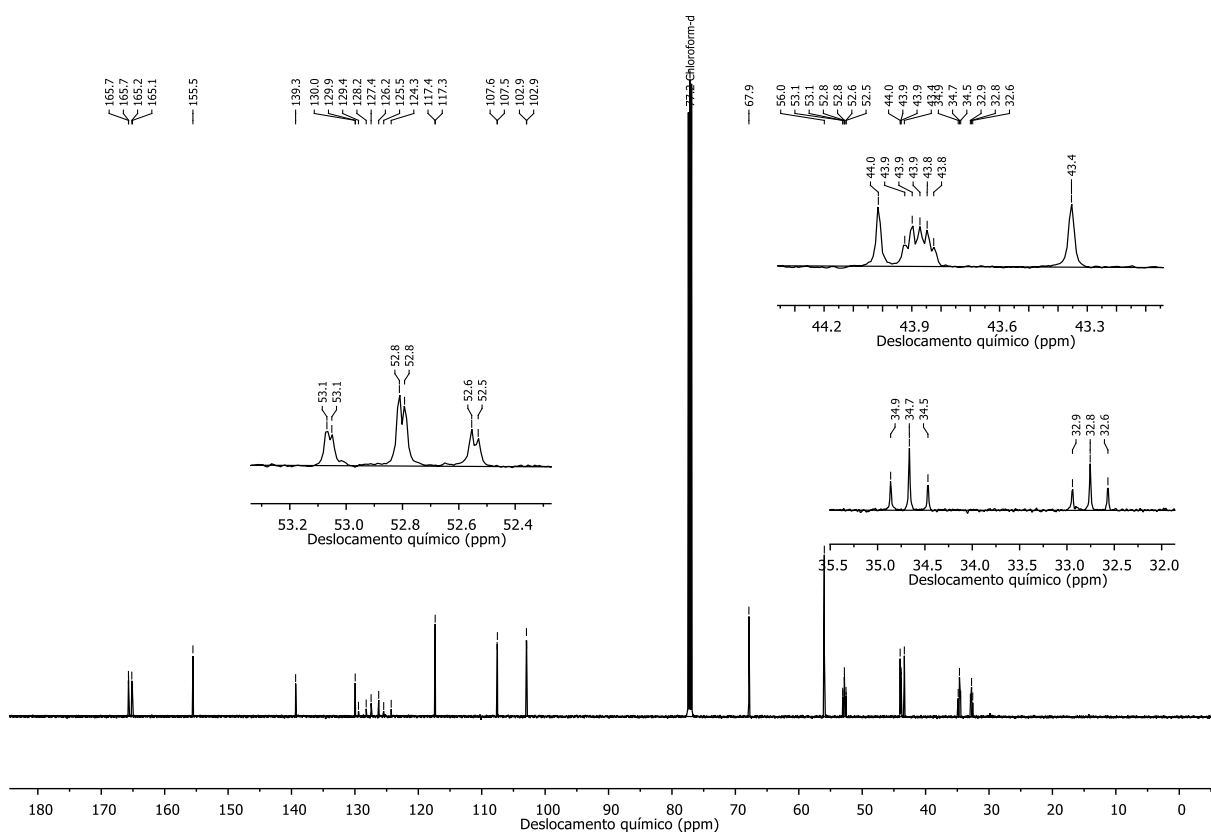


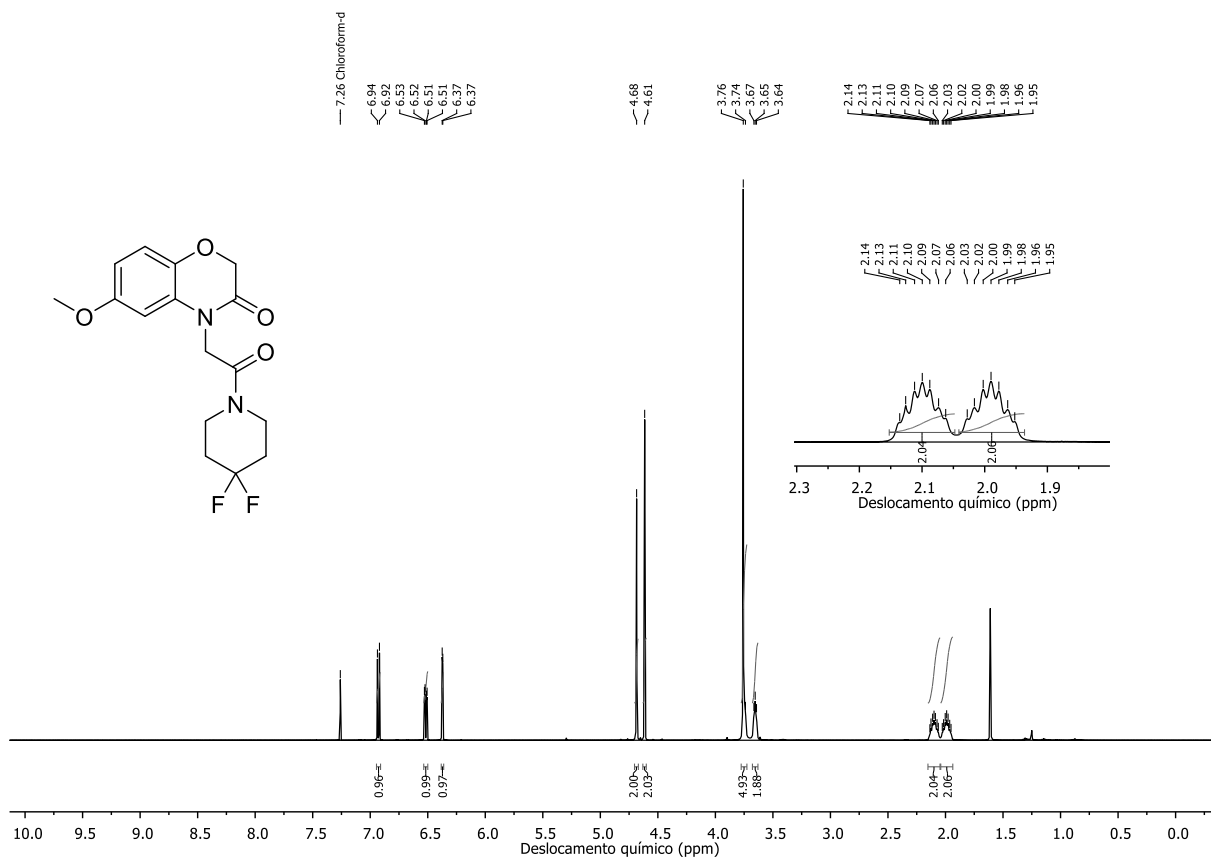
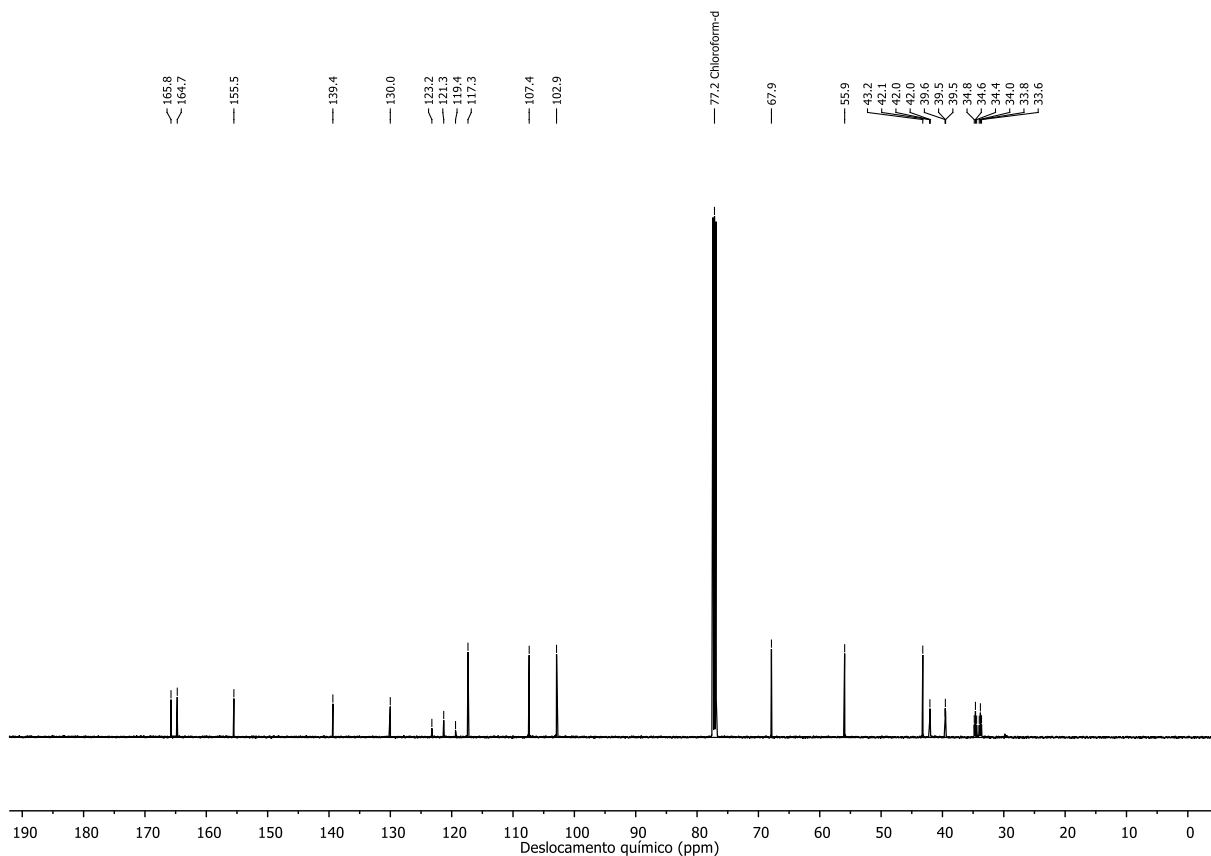
Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **7c**

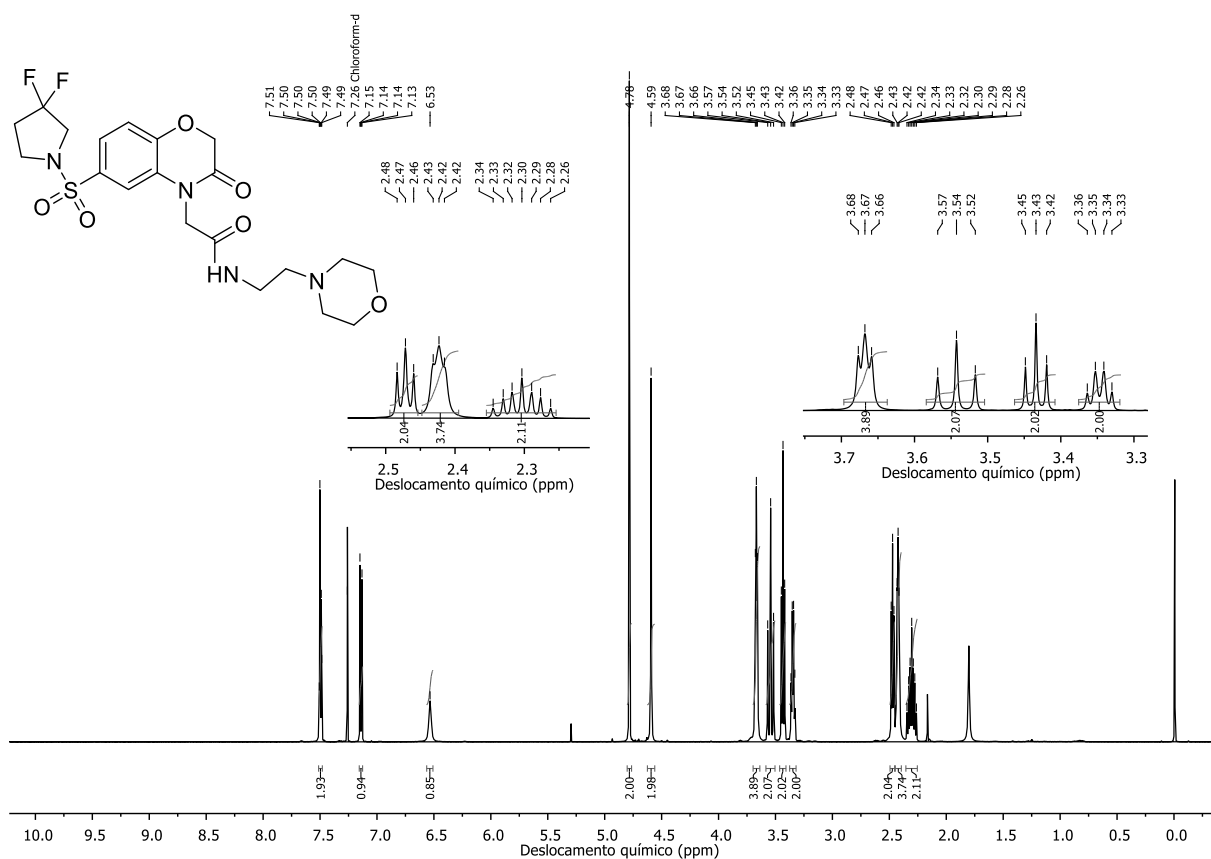


Espectro RMN ^{13}C (CDCl_3) do composto **7c**

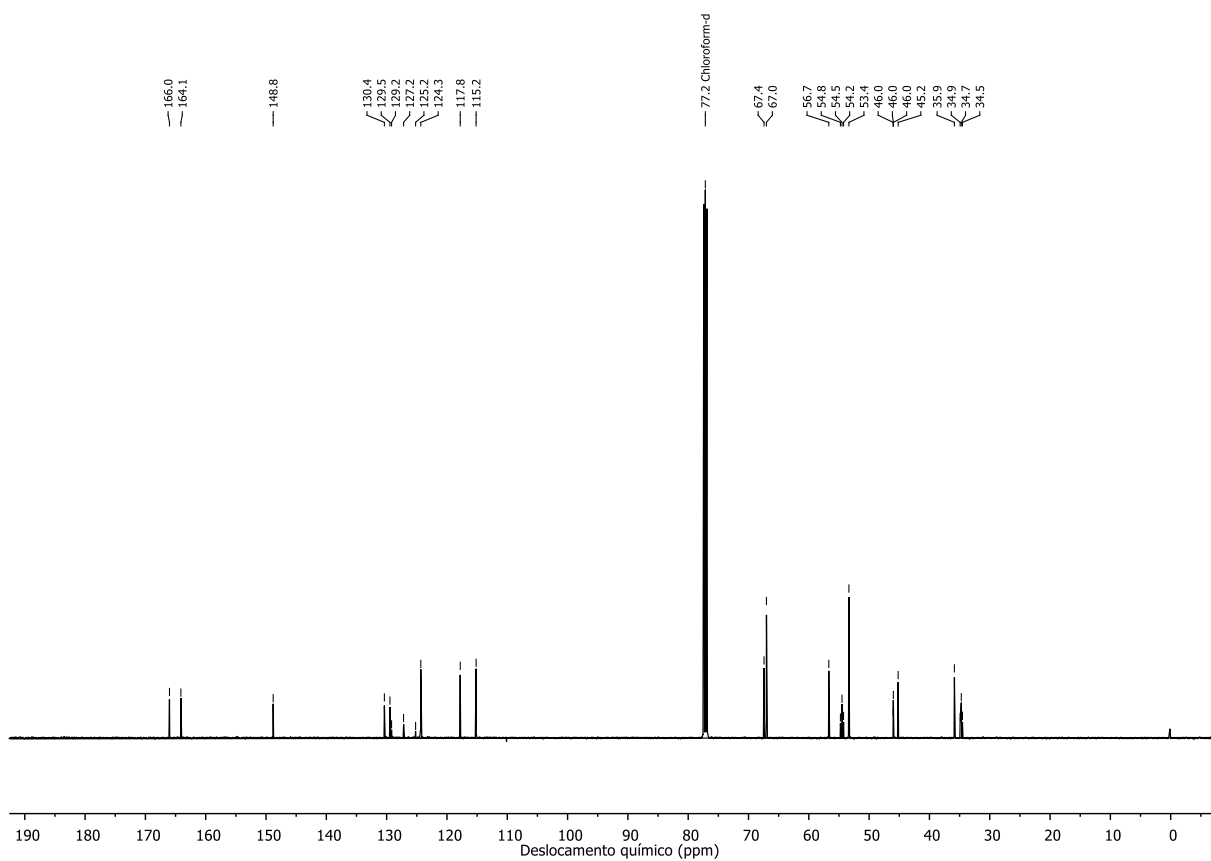
Espectro RMN ¹H (500 MHz, Acetona) do composto **7d**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **7d**

Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **7e**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **7e**

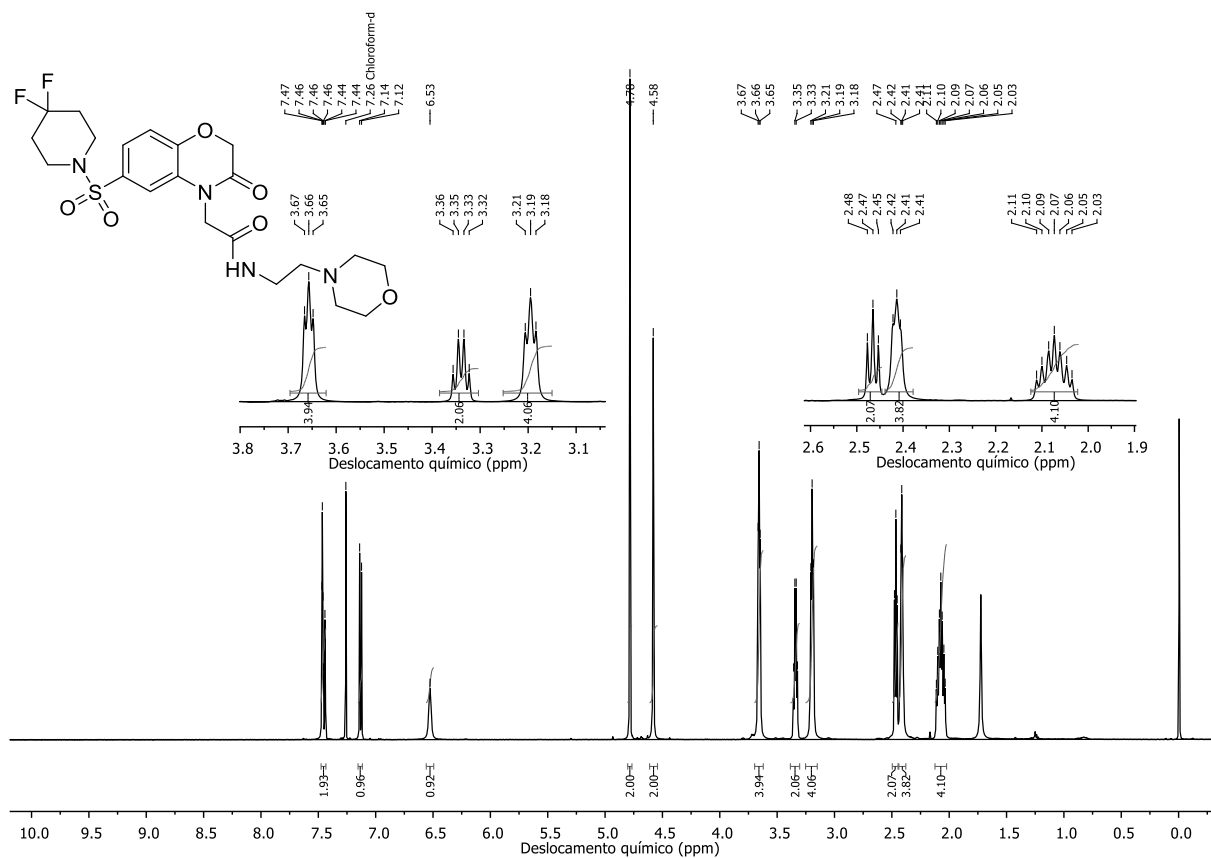
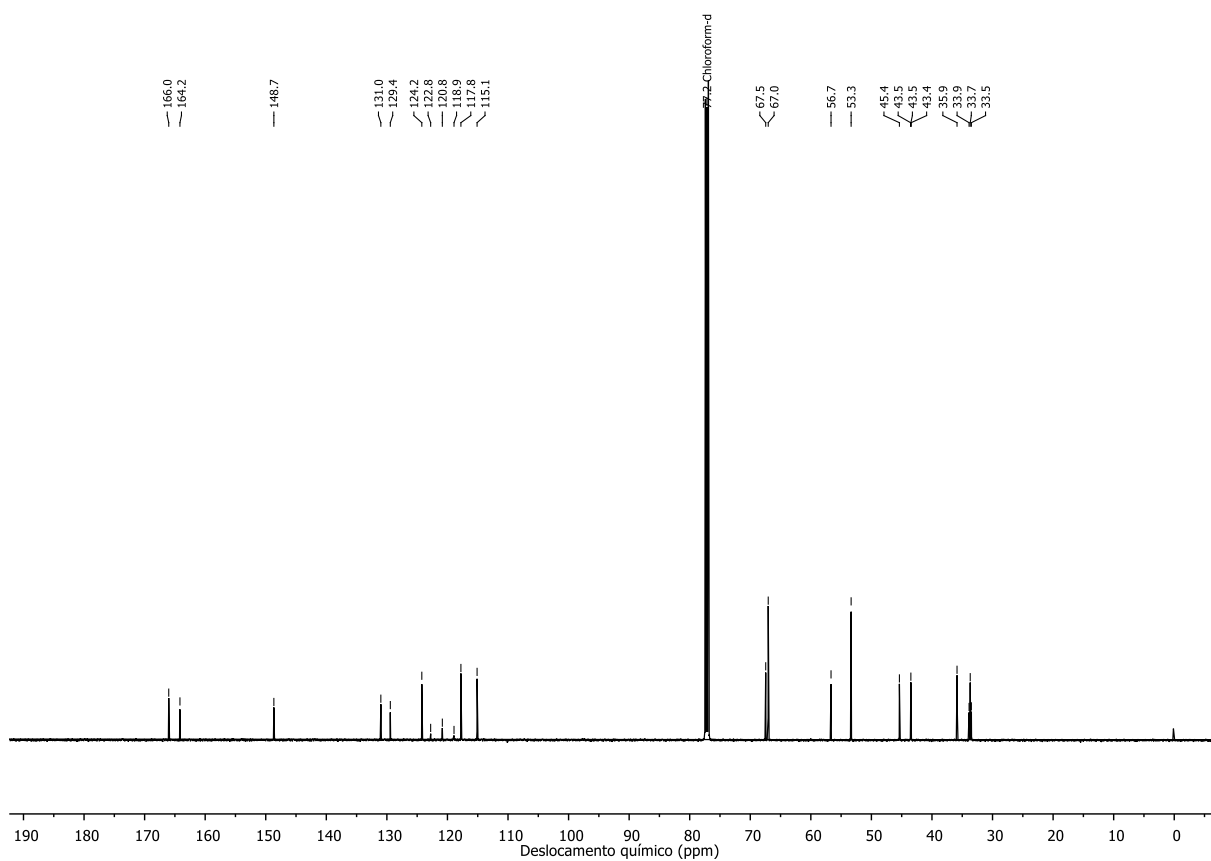
Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **7f**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **7f**

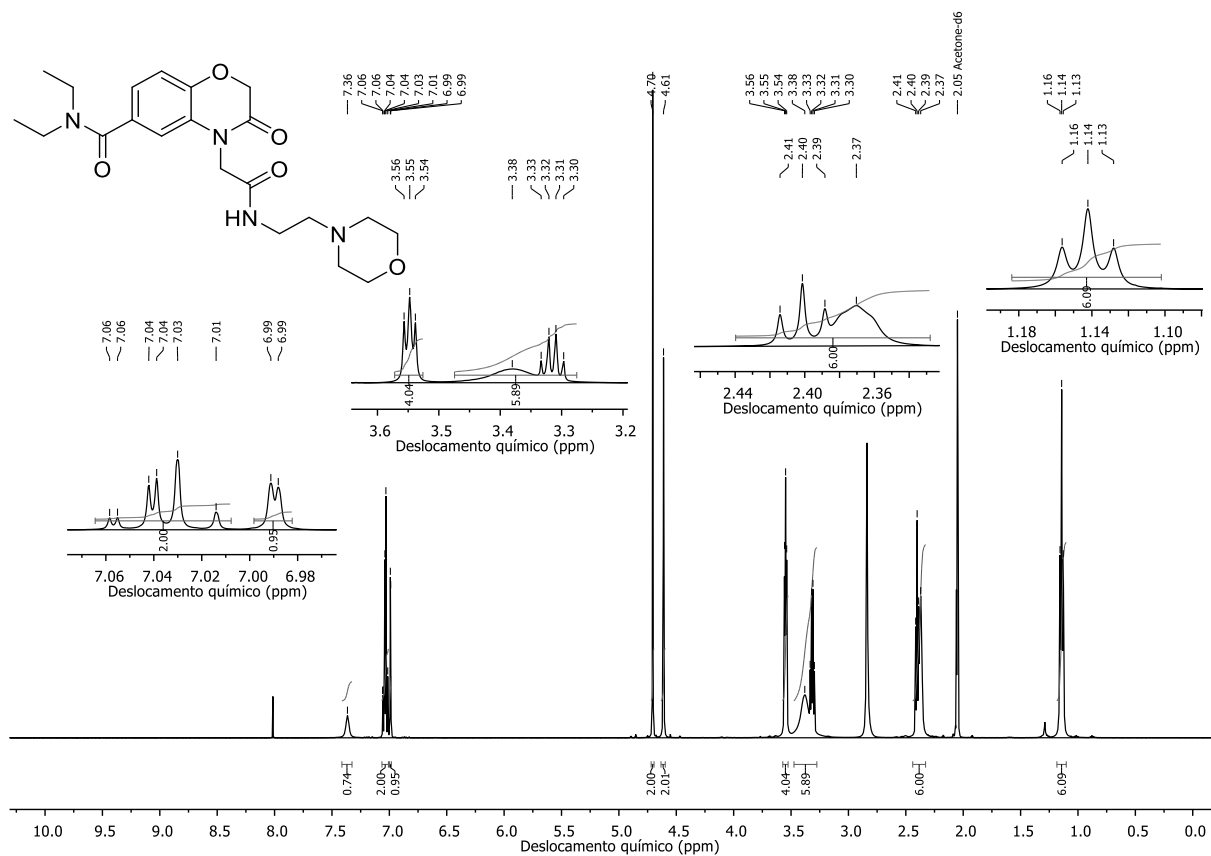
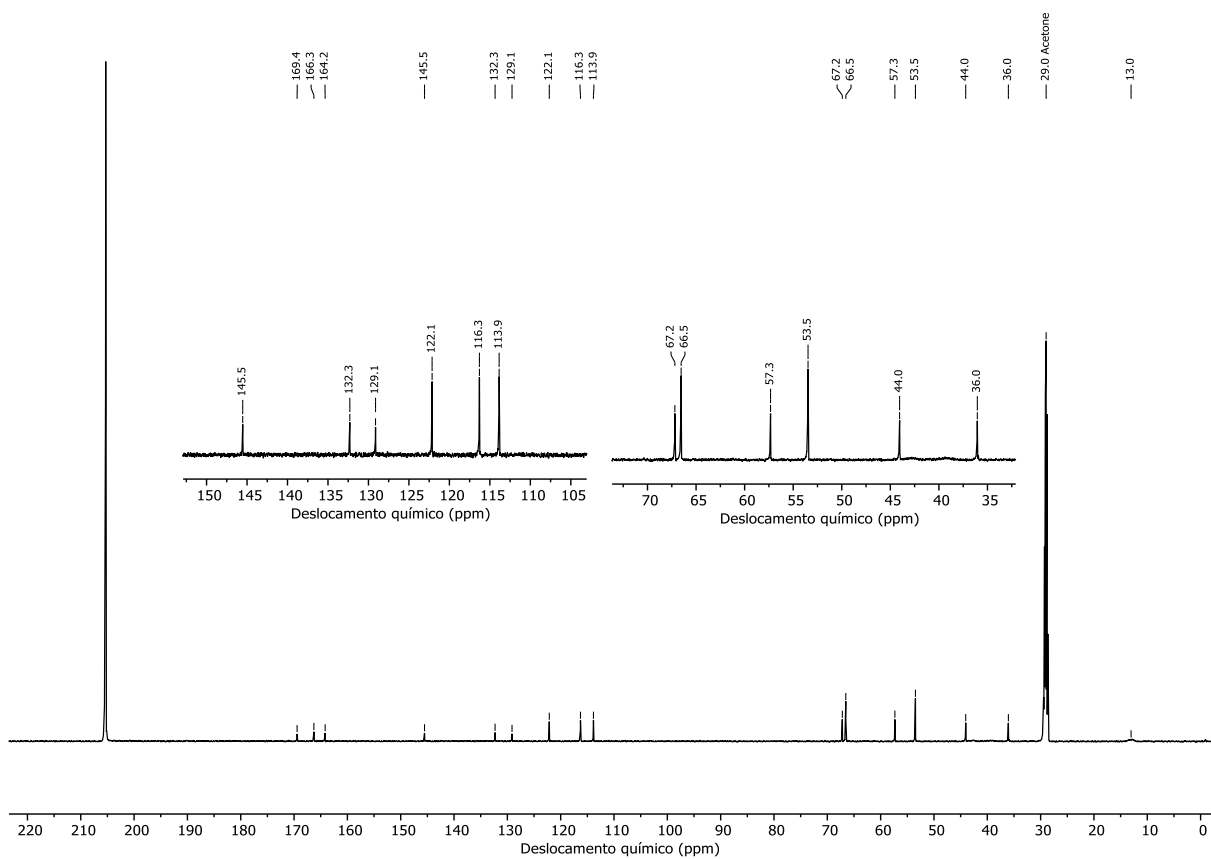


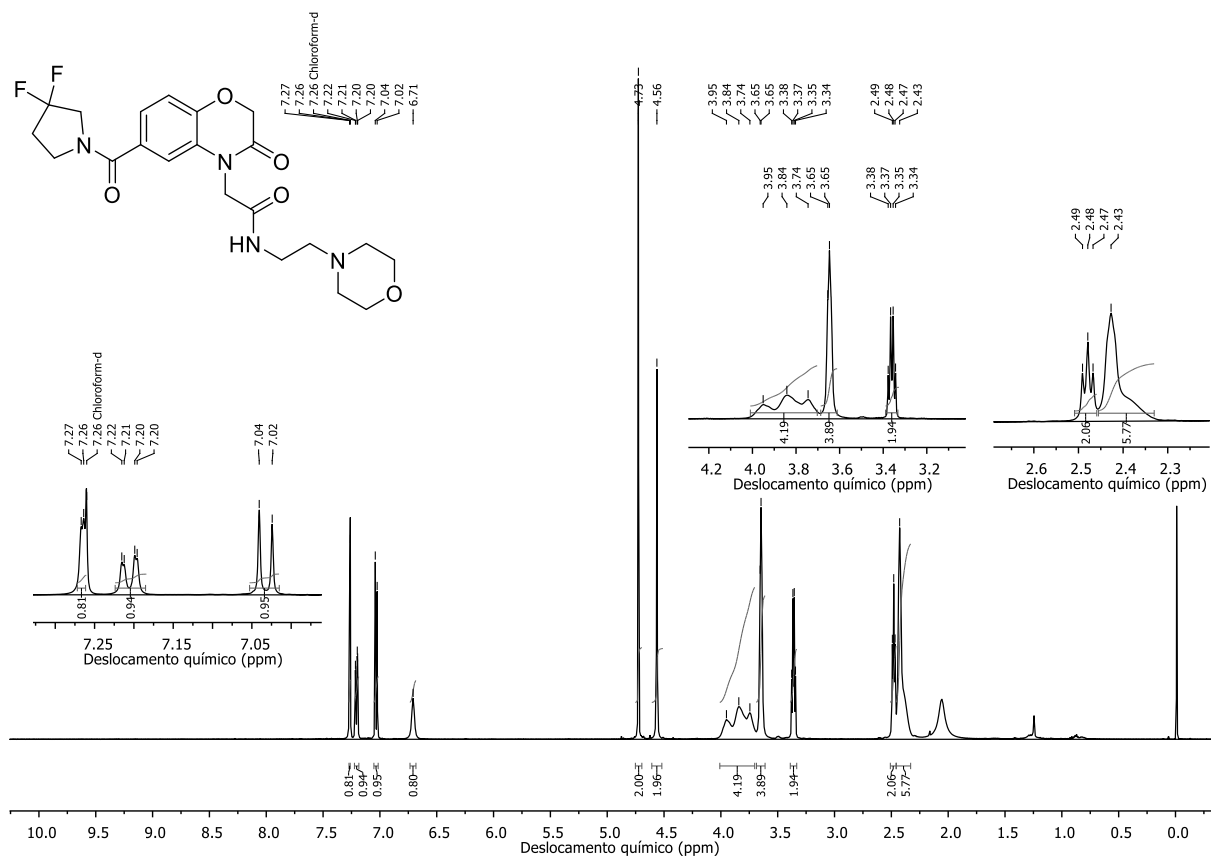
Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **8a**



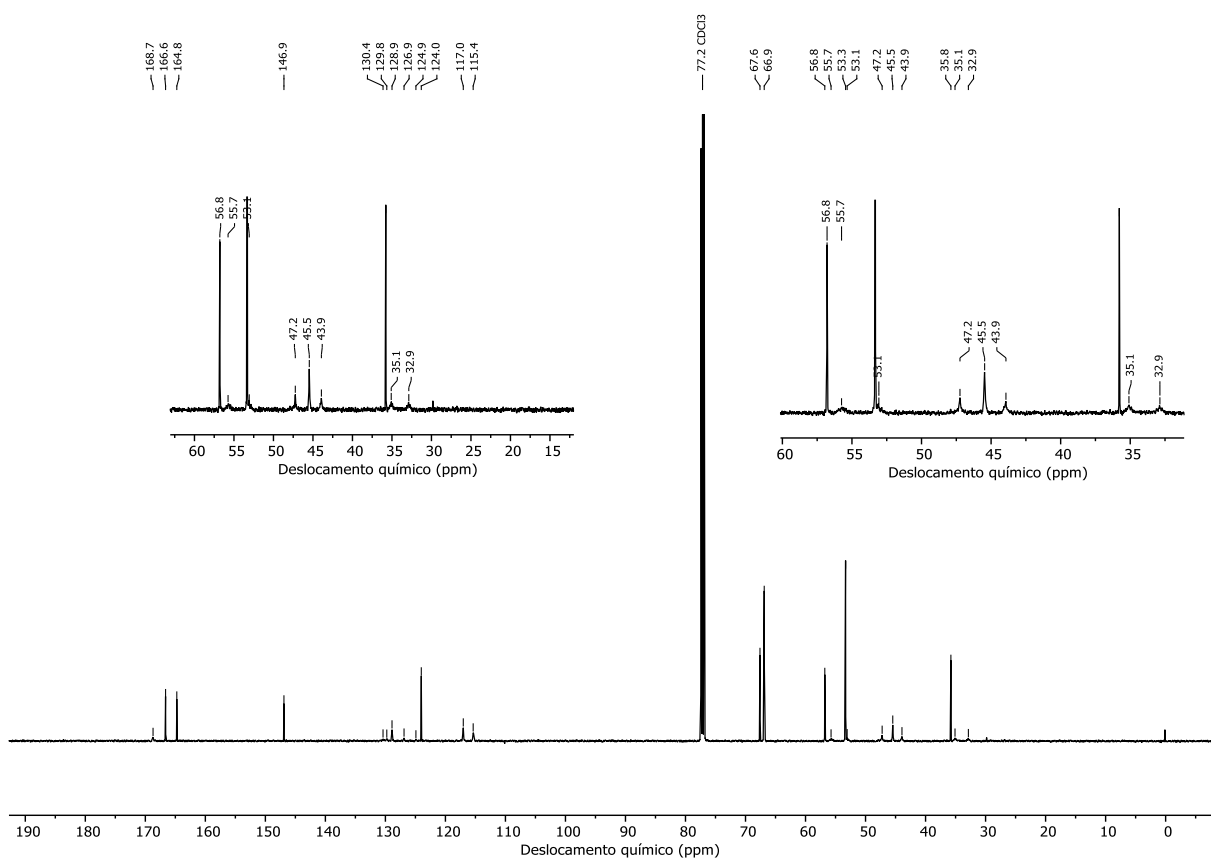
Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **8a**

Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **8b**Espectro RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) do composto **8b**

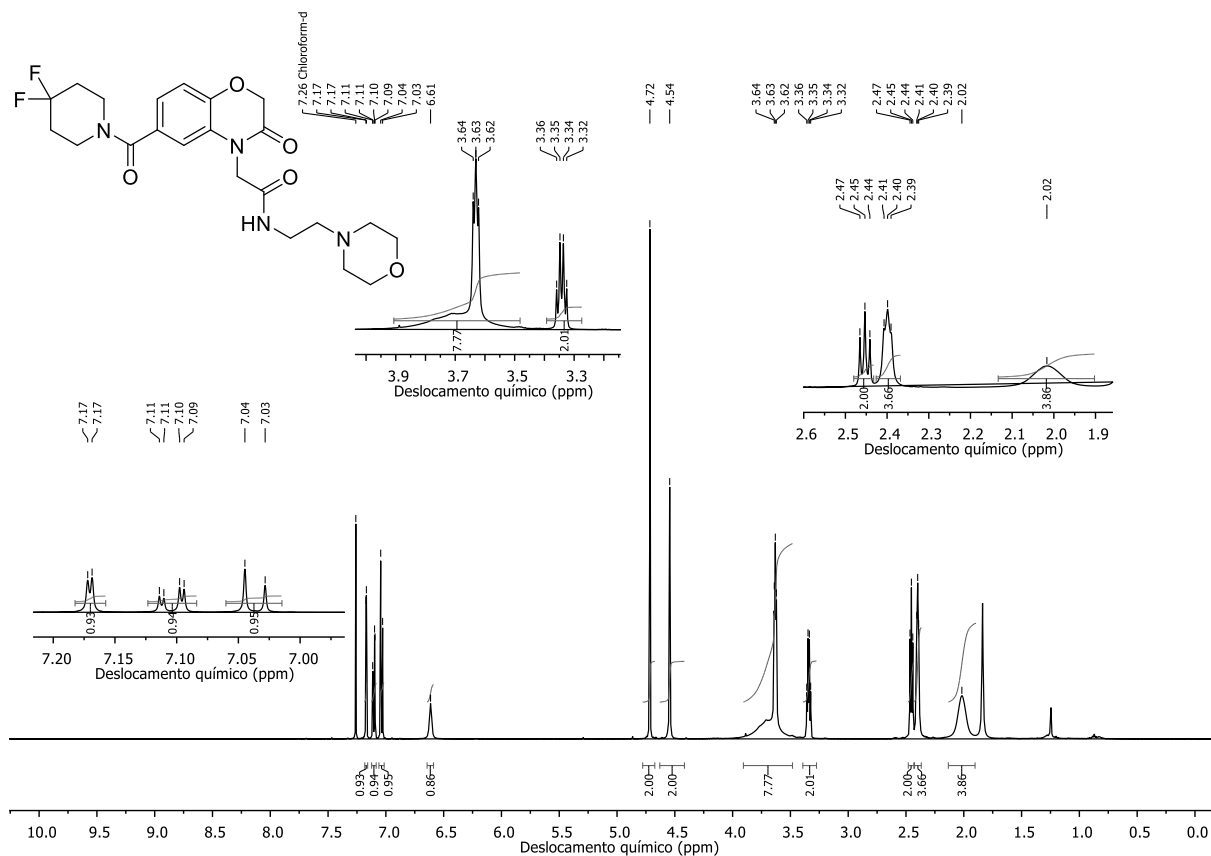
Espectro RMN ¹H (500 MHz, Acetona) do composto **8c**Espectro RMN ¹³C (126 MHz, Acetona) do composto **8c**



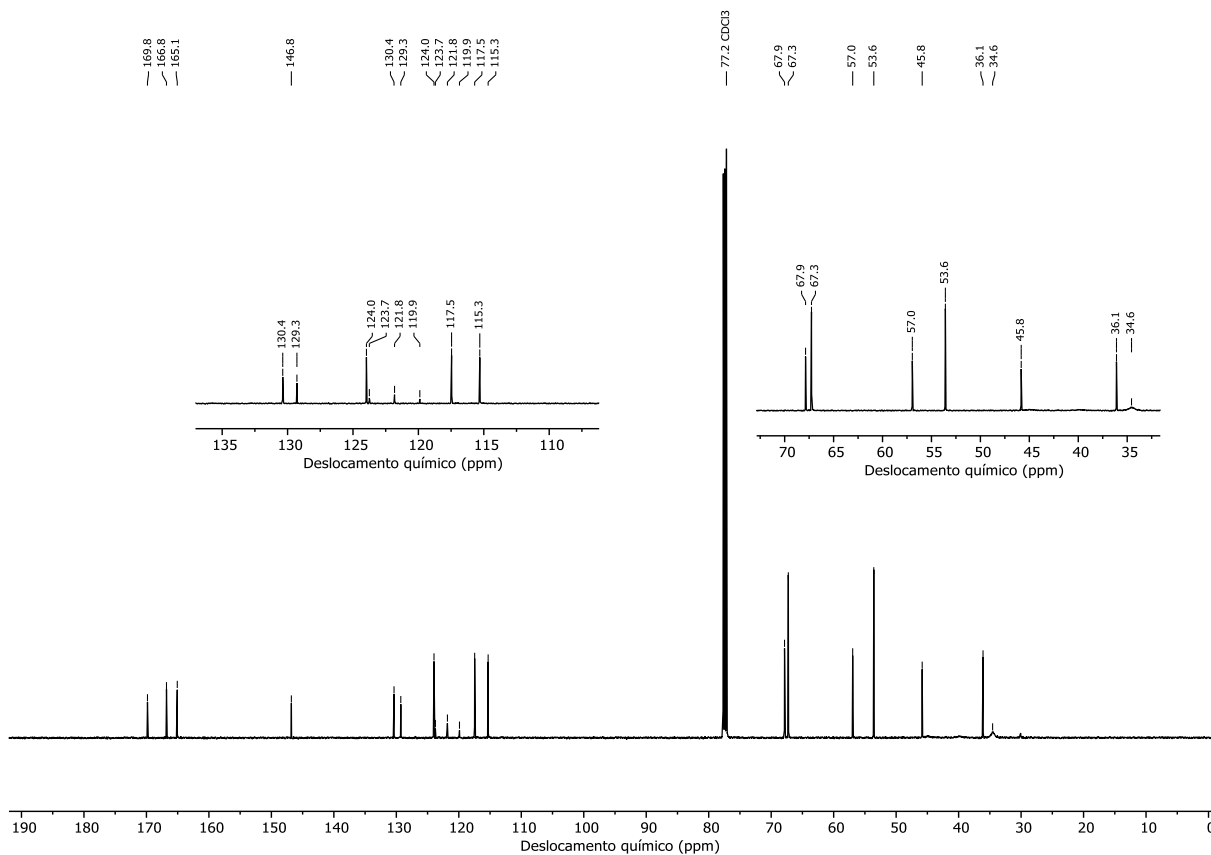
Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **8d**



Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **8d**

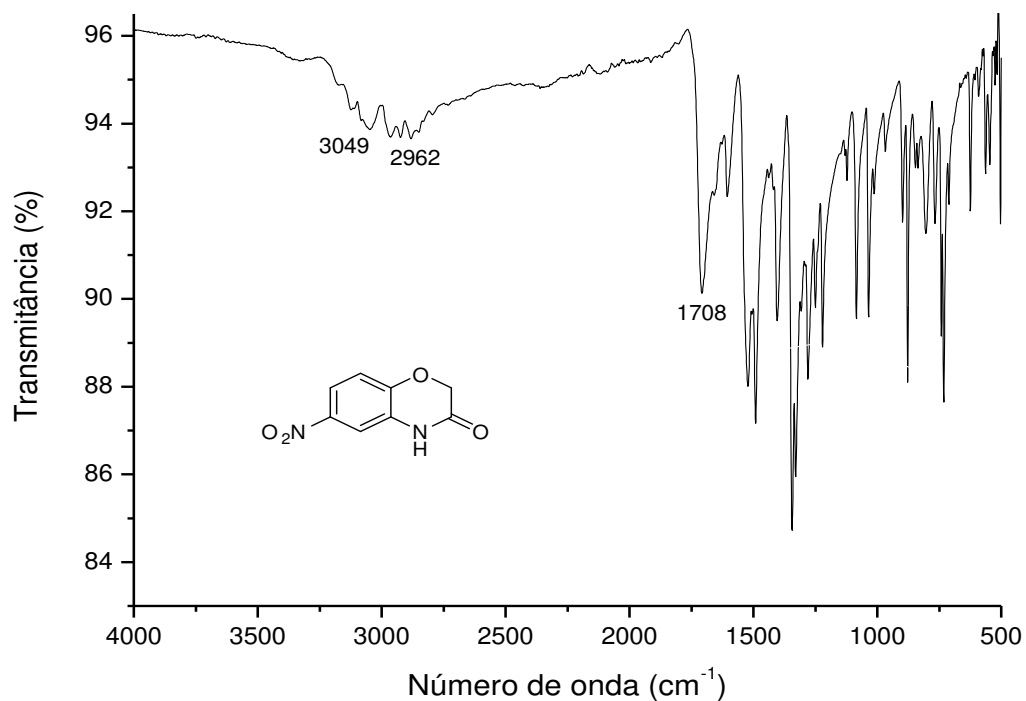
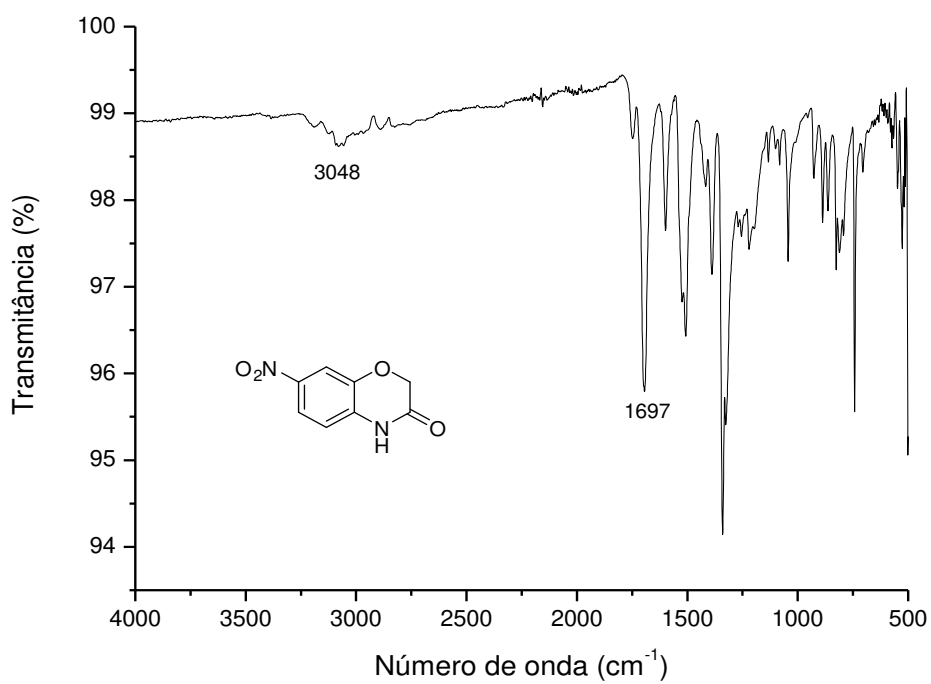


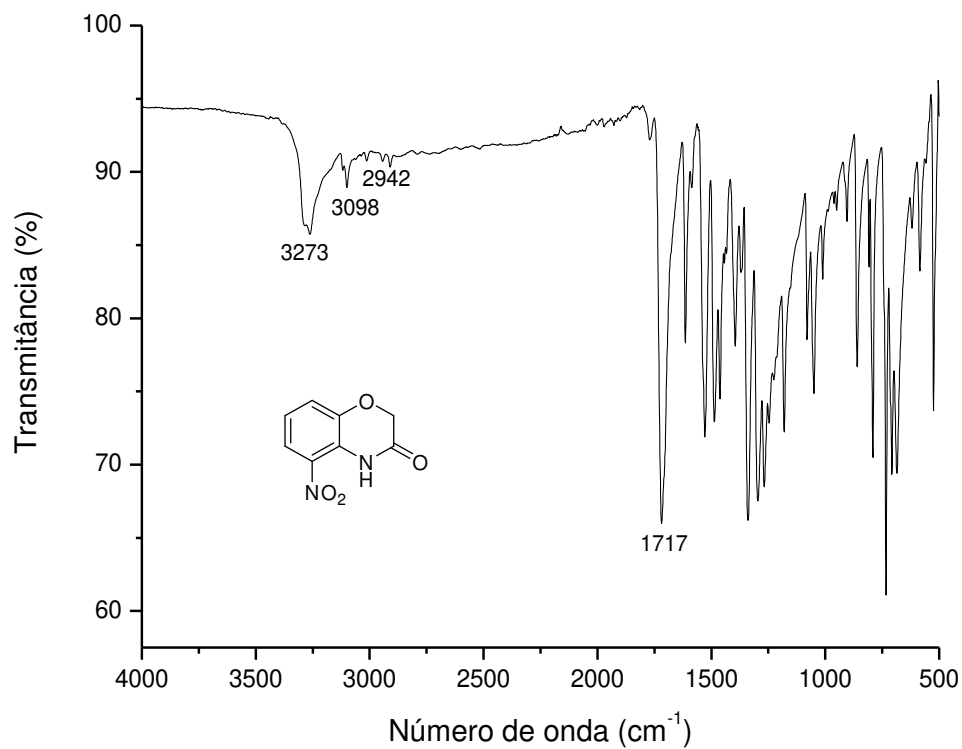
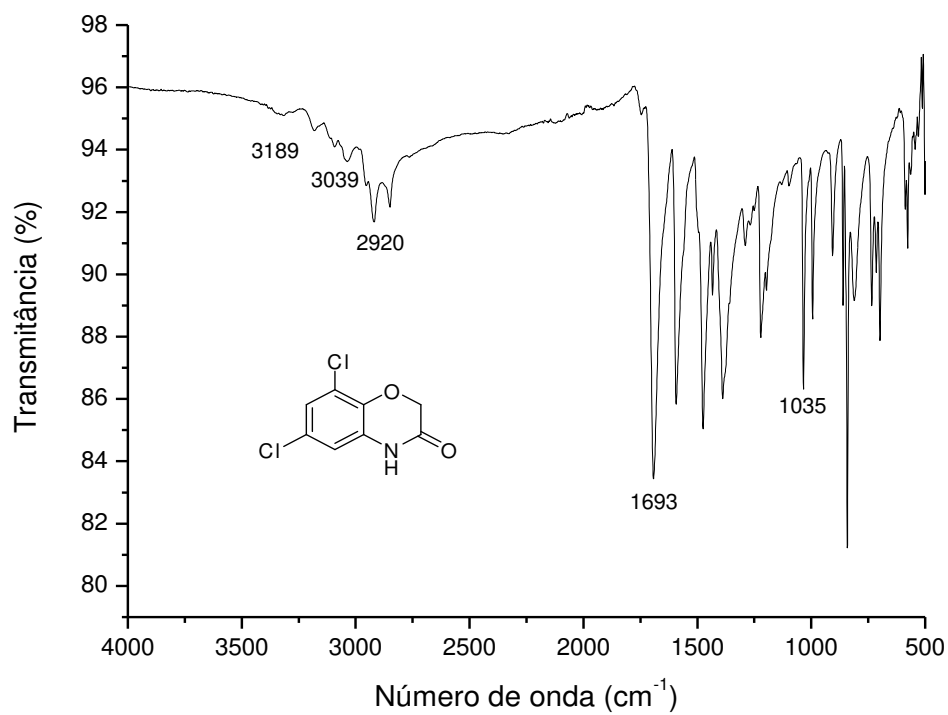
Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) do composto **8e**

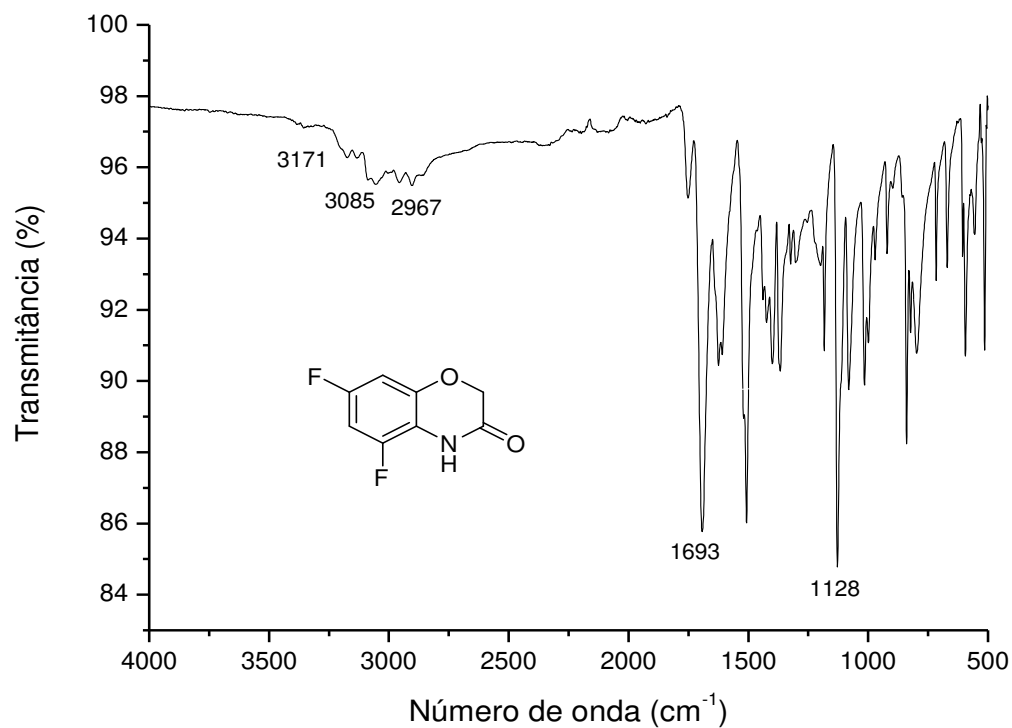
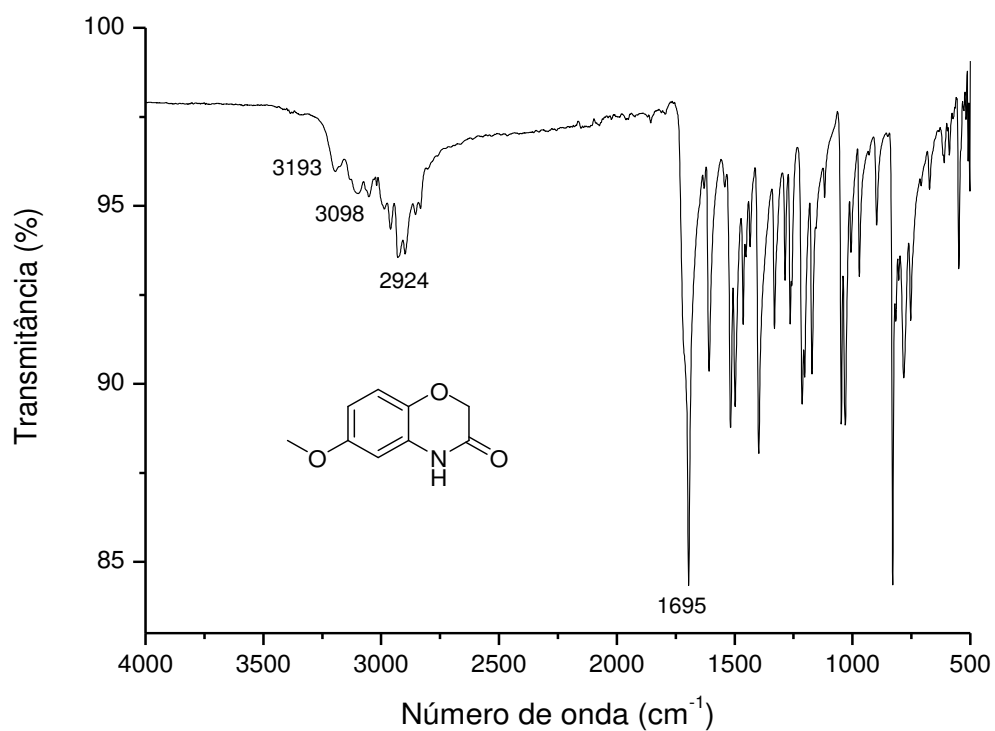


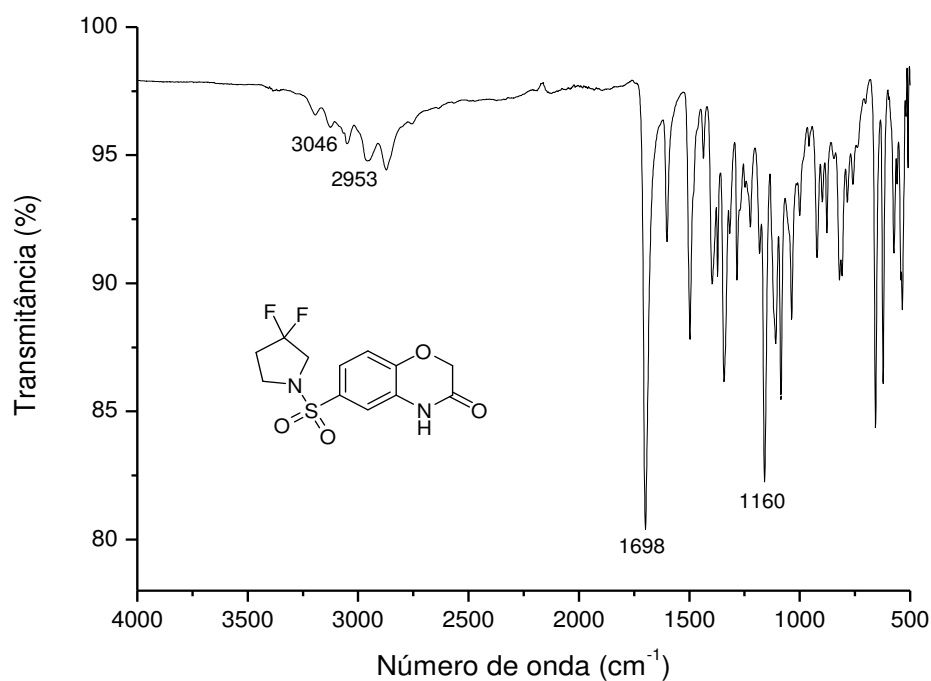
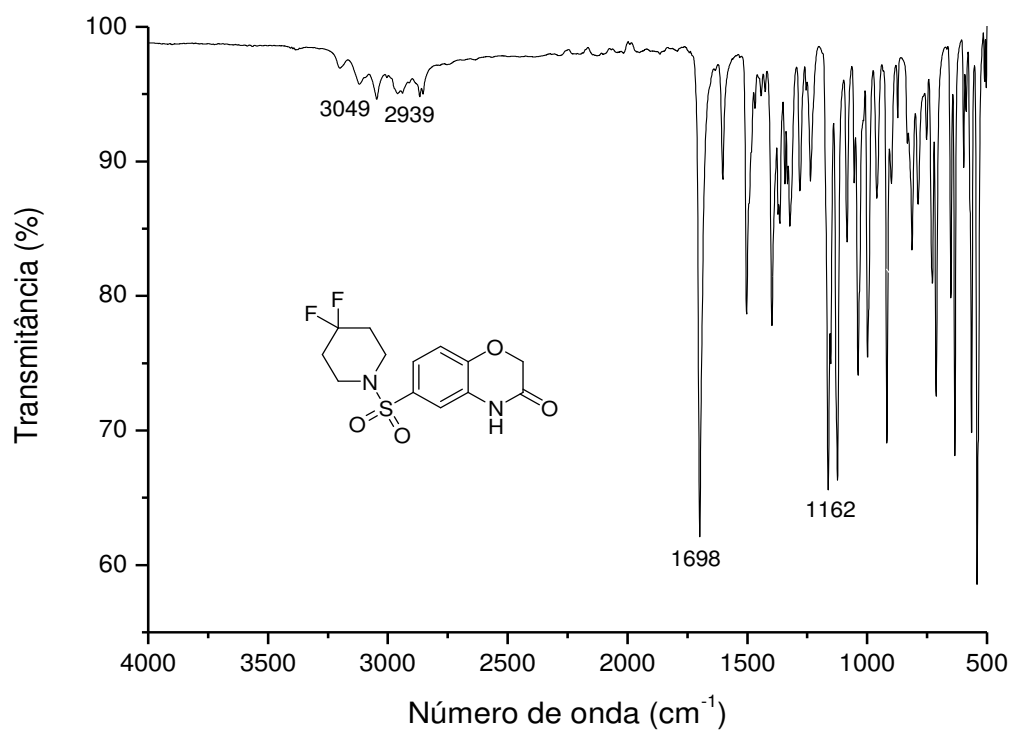
Espectro RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) do composto **8e**

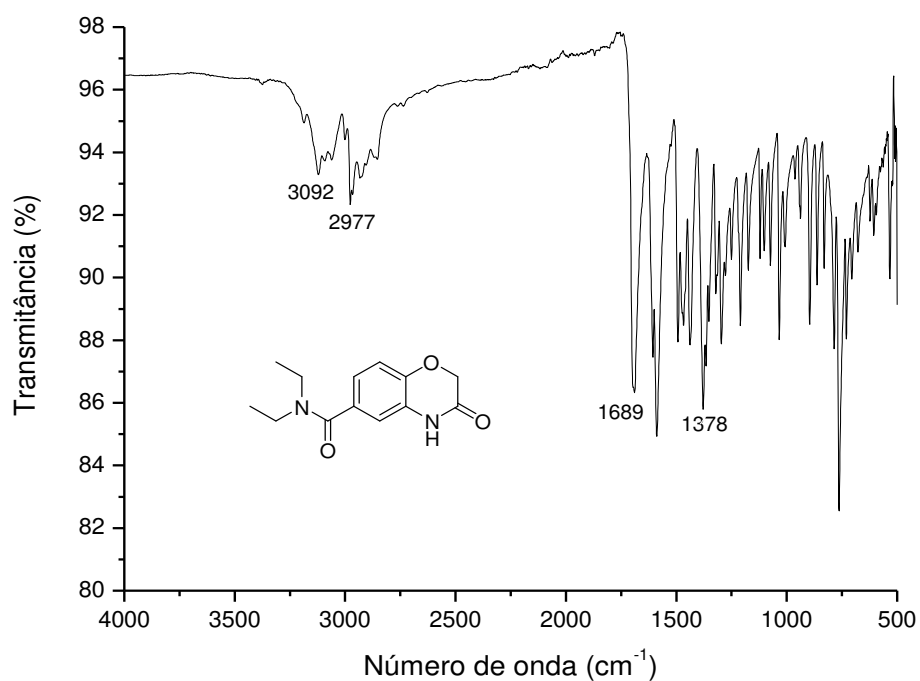
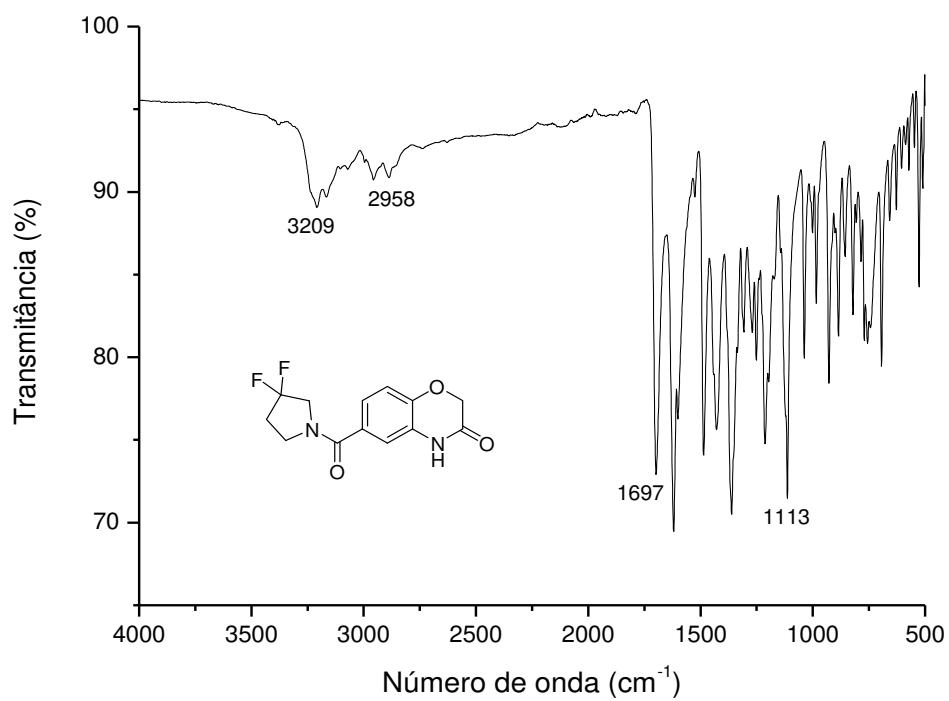
Apêndice C – Espectros de IV

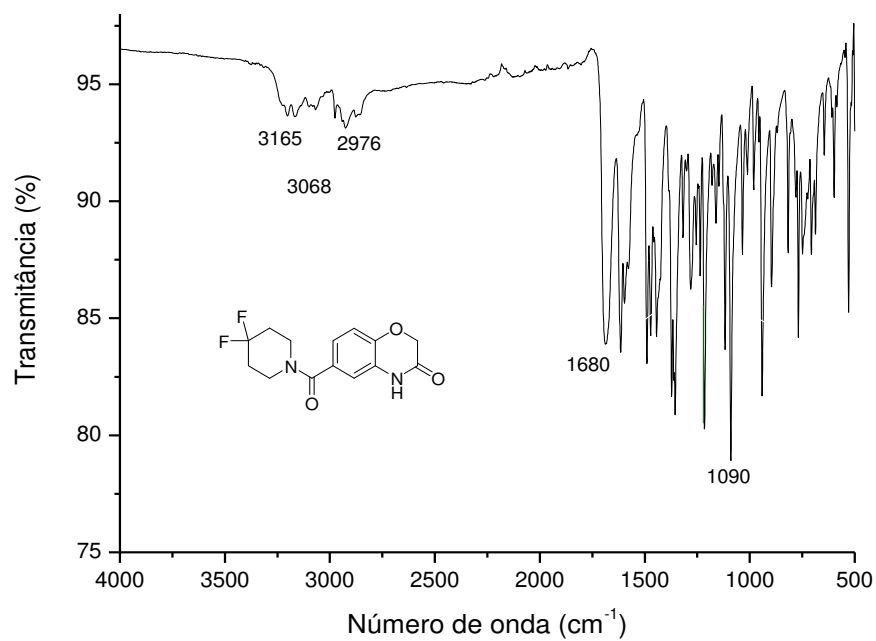
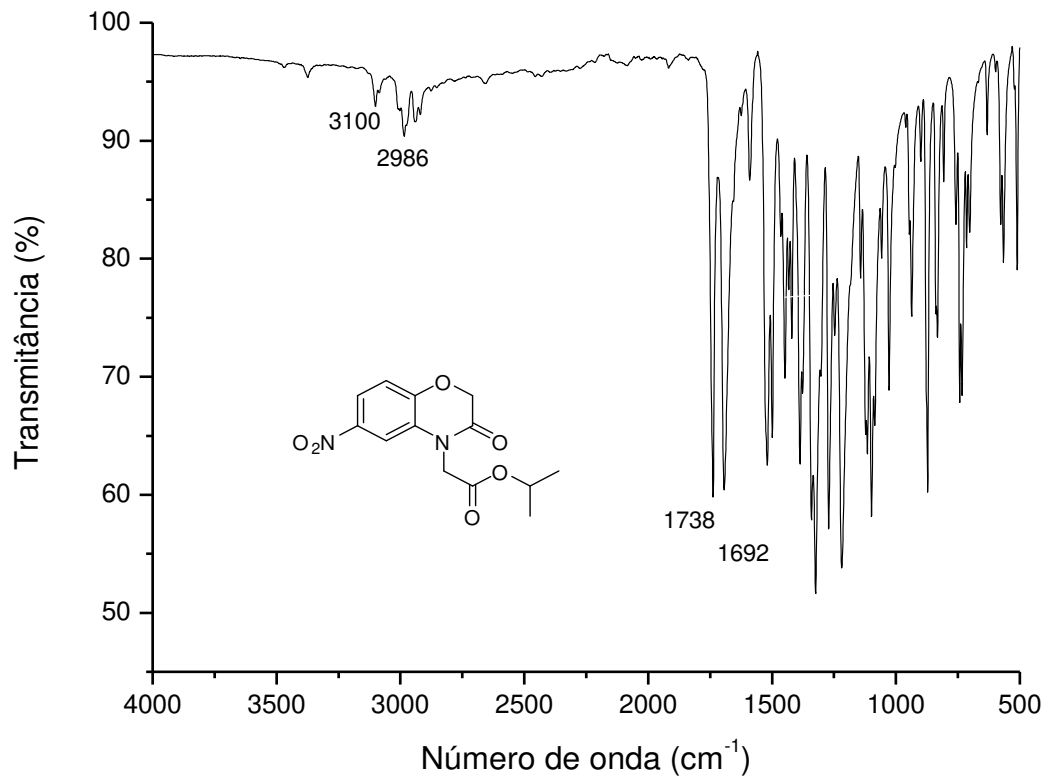
Espectro IV do composto **2a**Espectro IV do composto **2b**

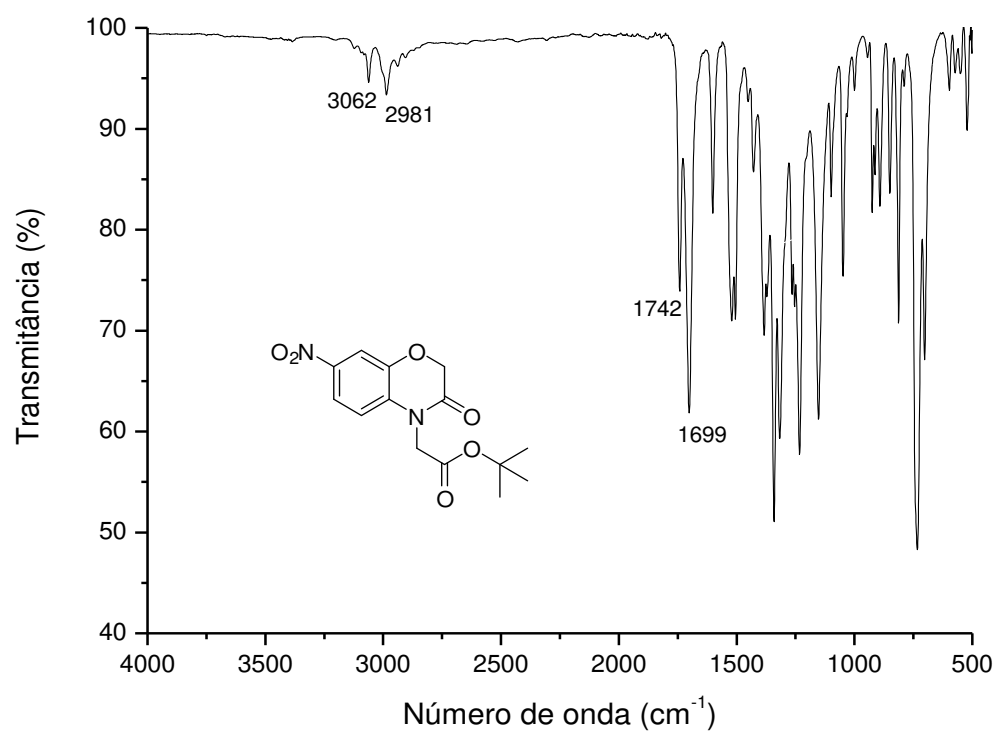
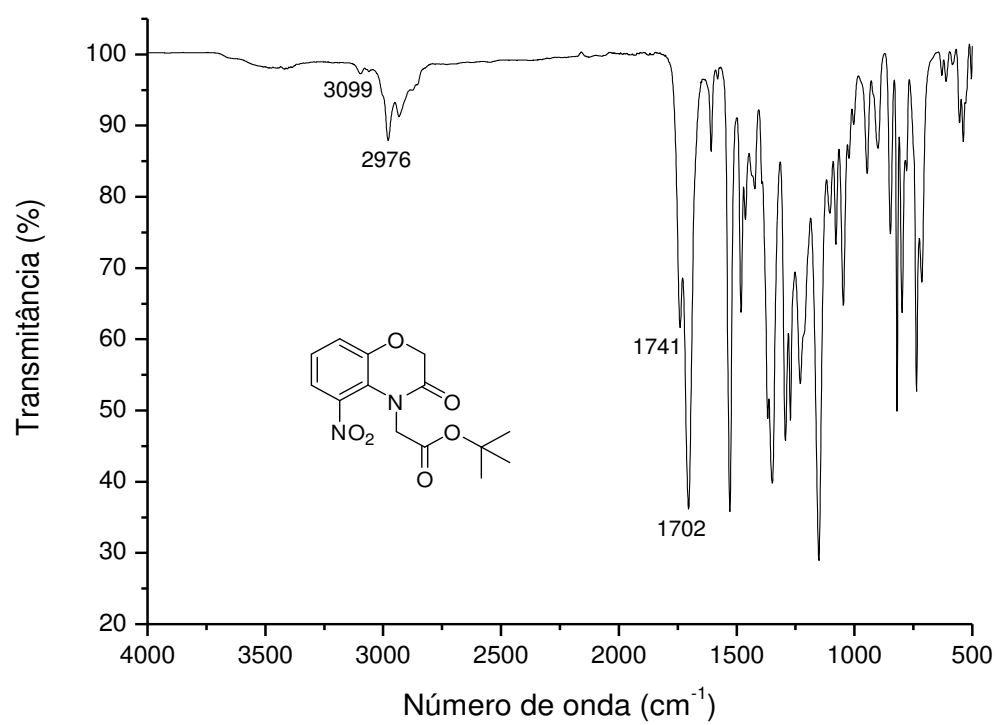
Espectro IV do composto **2c**Espectro IV do composto **2d**

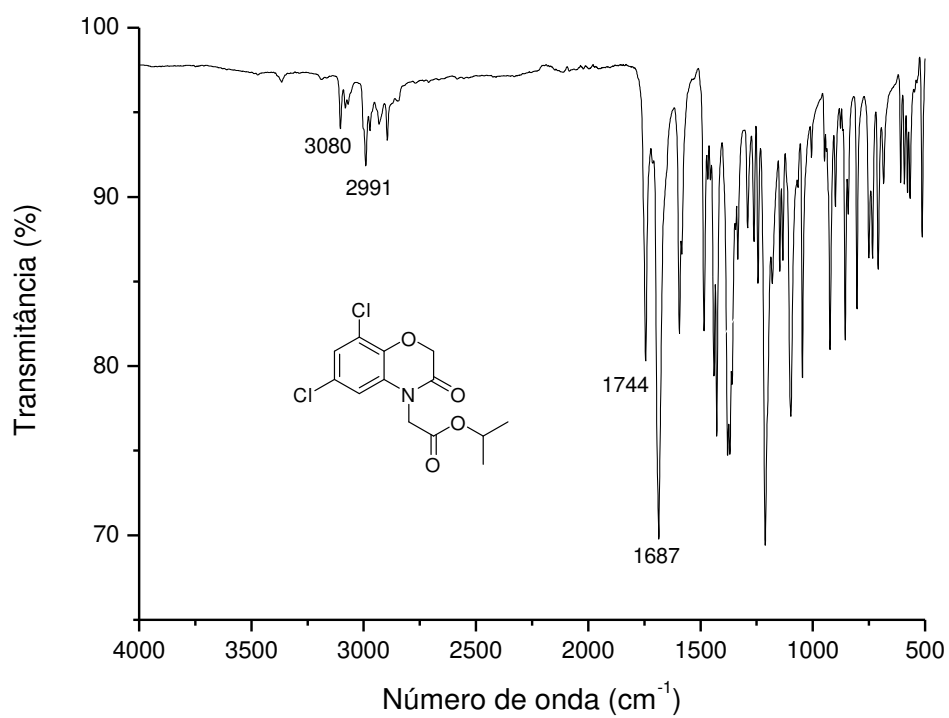
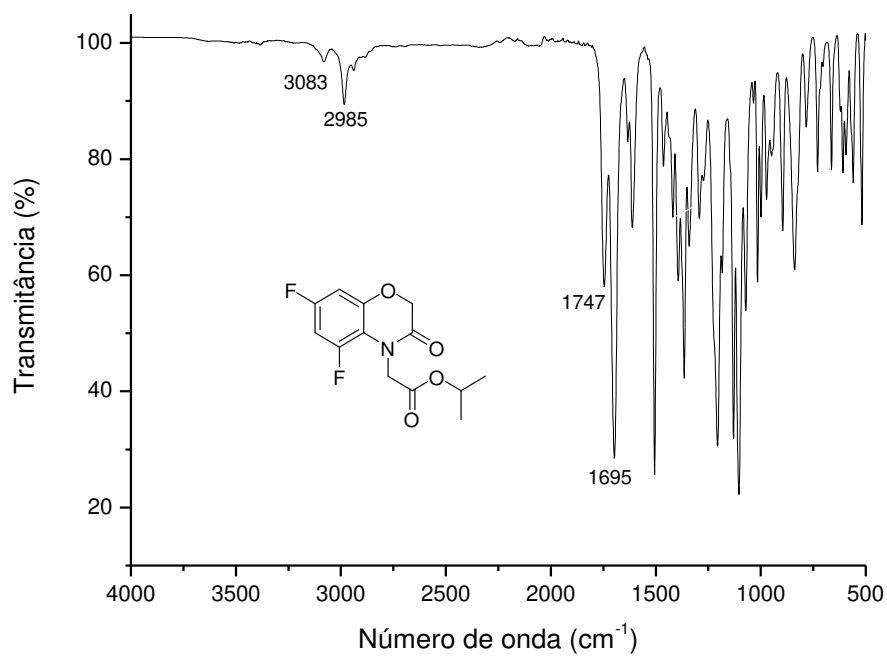
Espectro IV do composto **2e**Espectro IV do composto **2g**

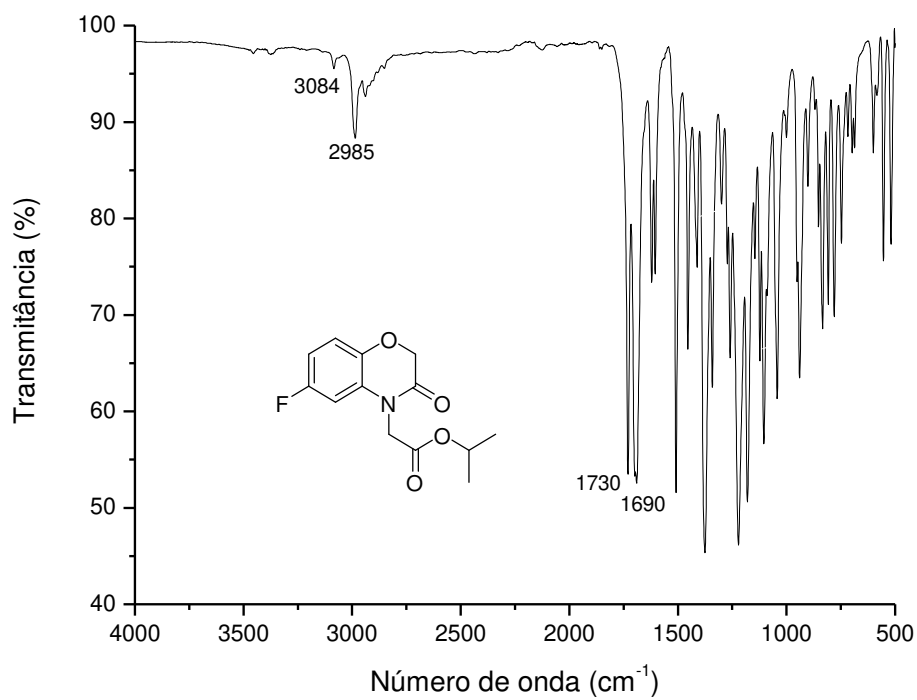
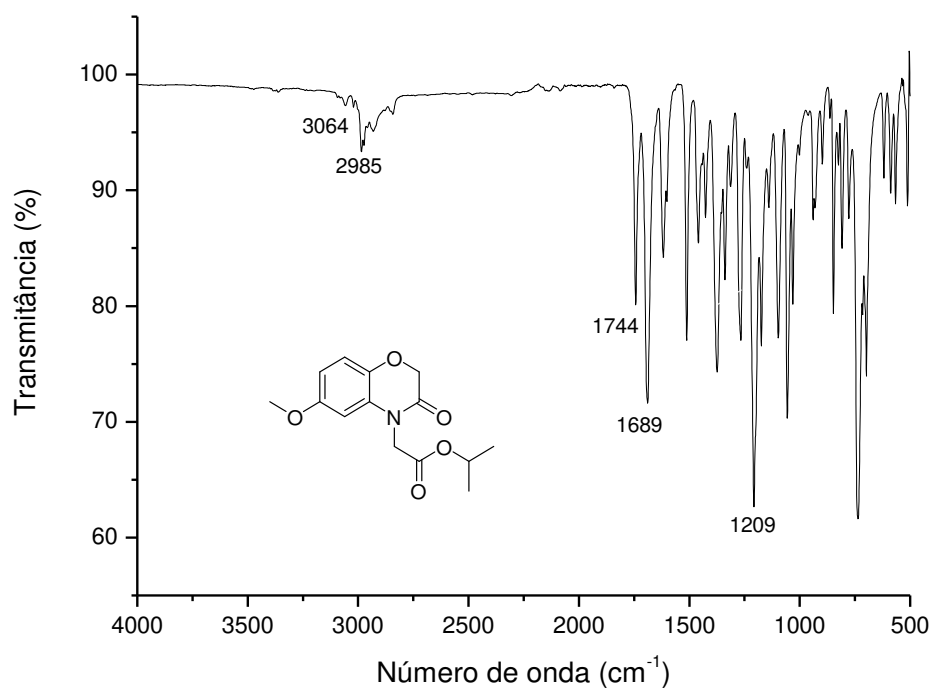
Espectro IV do composto **2h**Espectro IV do composto **2i**

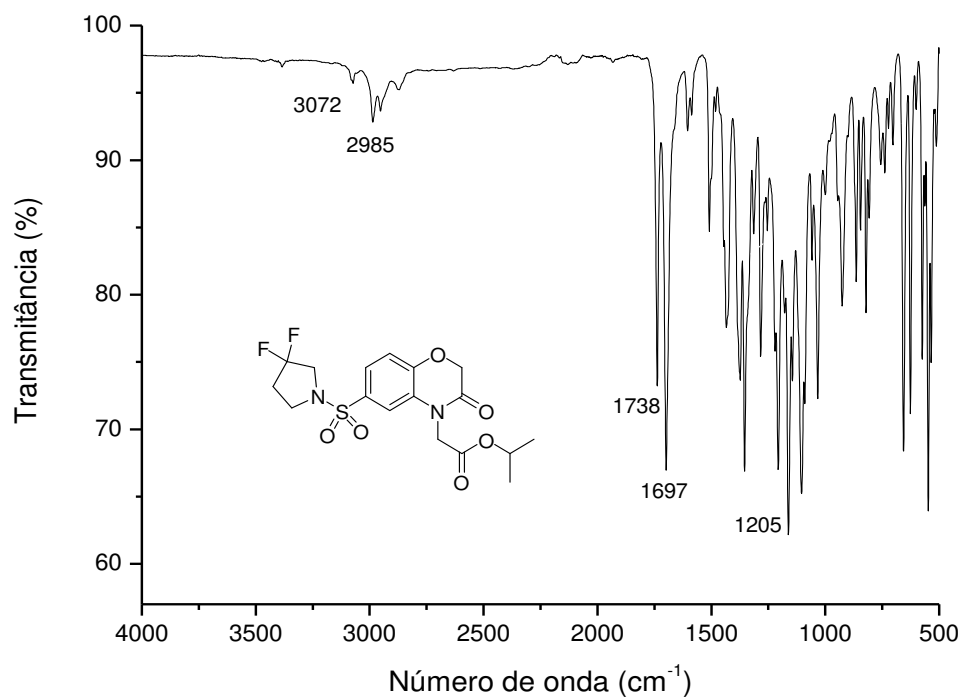
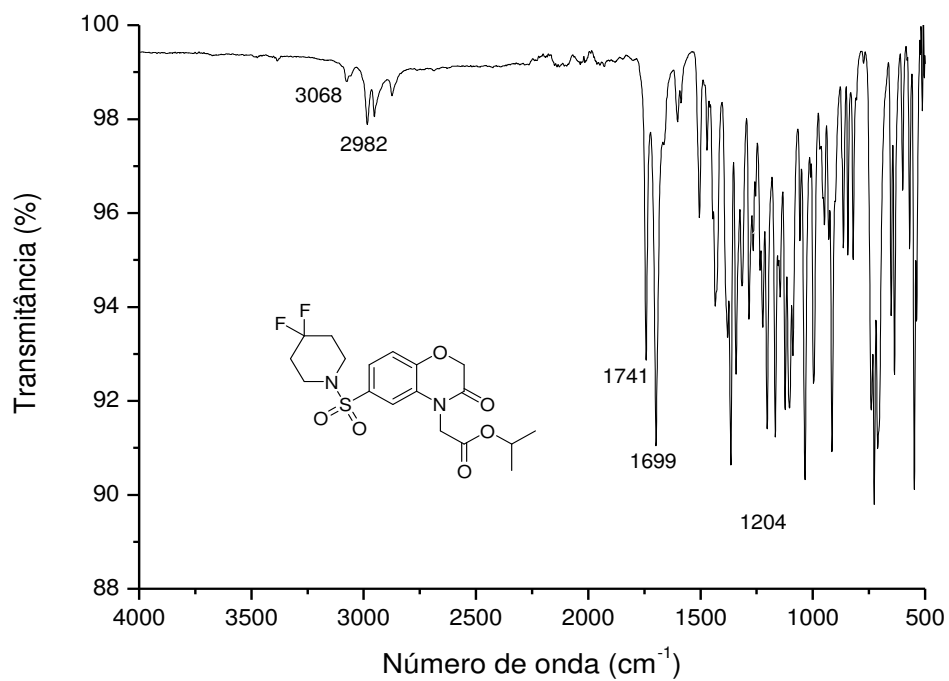
Espectro IV do composto **2j**Espectro IV do composto **2k**

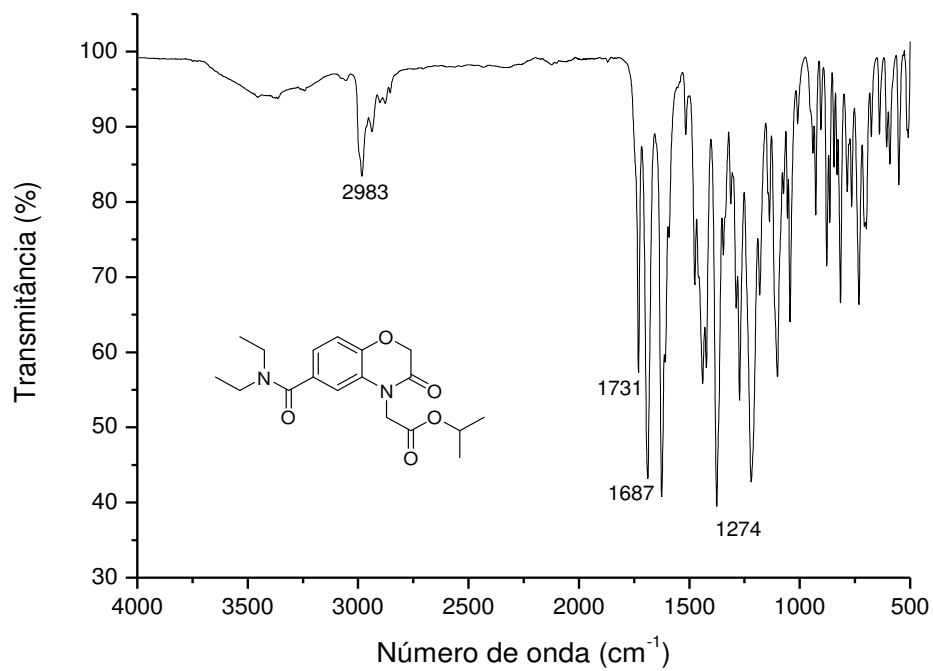
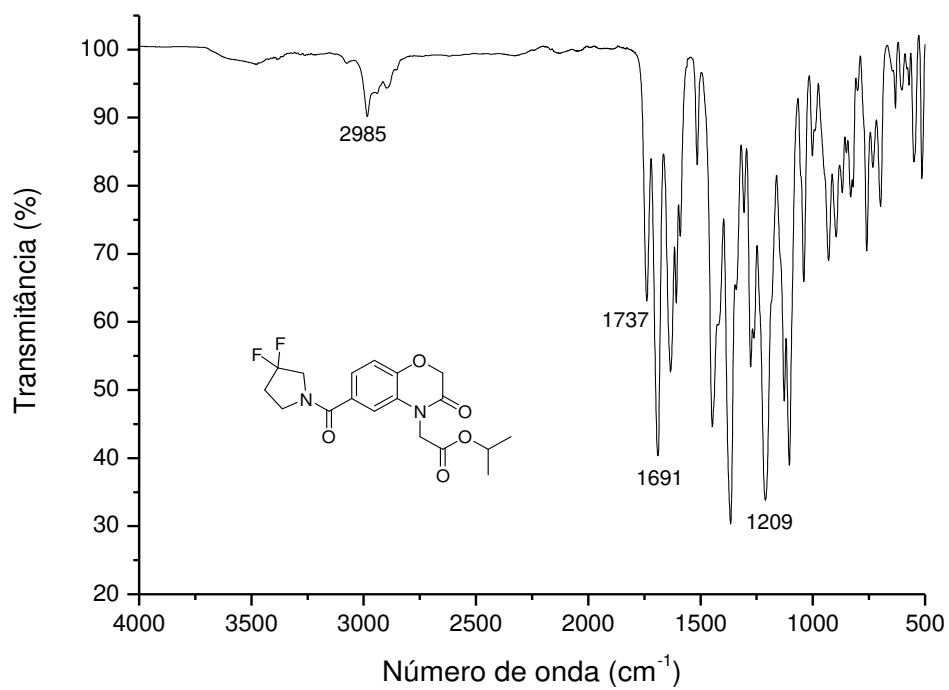
Espectro IV do composto **2l**Espectro IV do composto **3a**

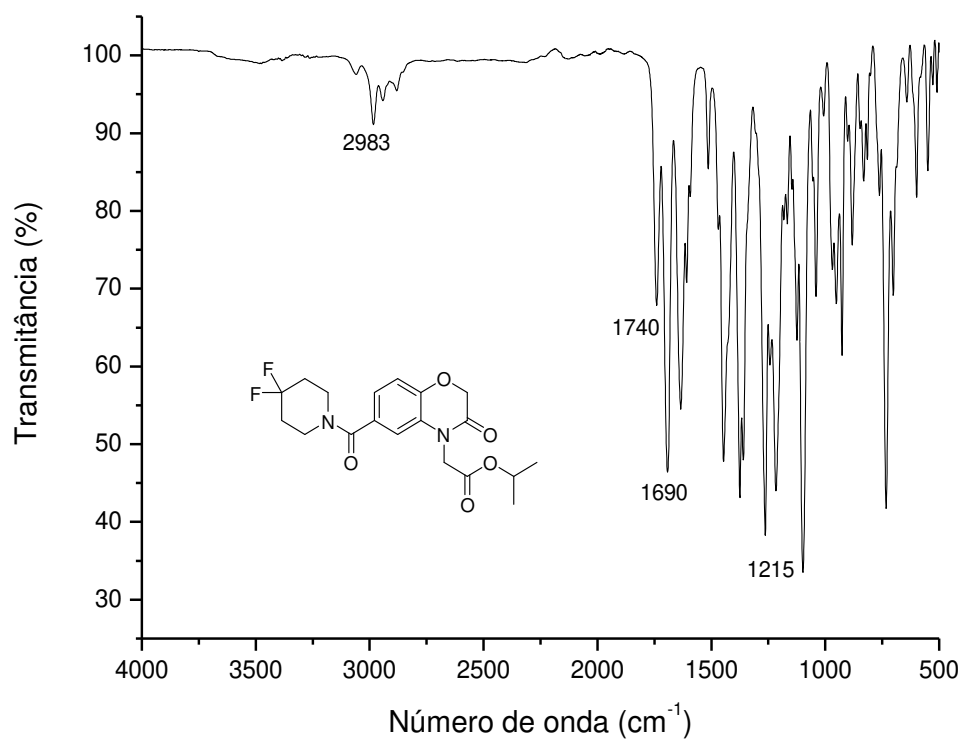
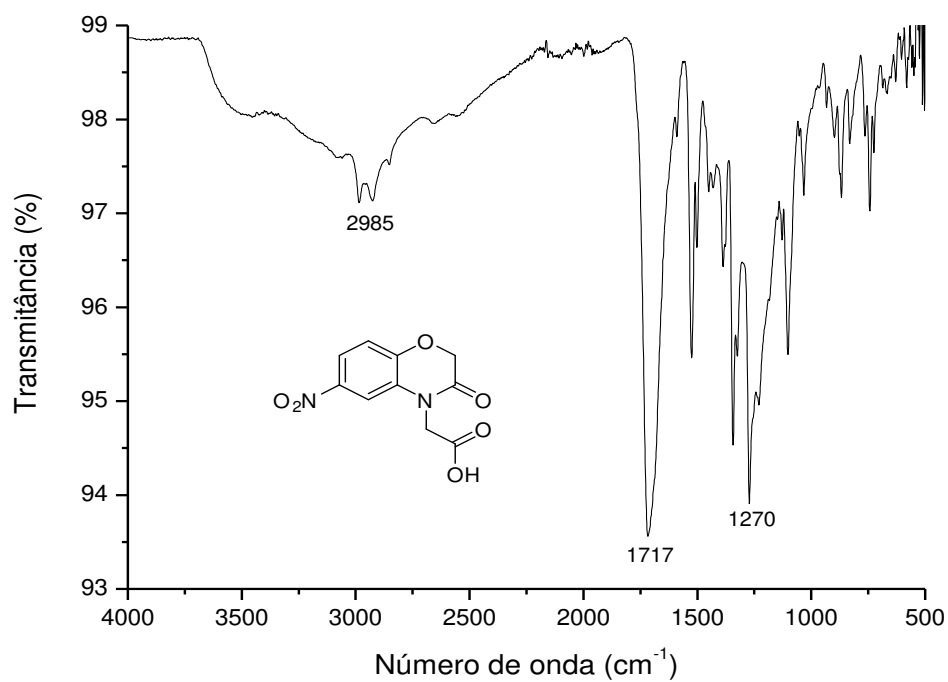
Espectro IV do composto **3b**Espectro IV do composto **3c**

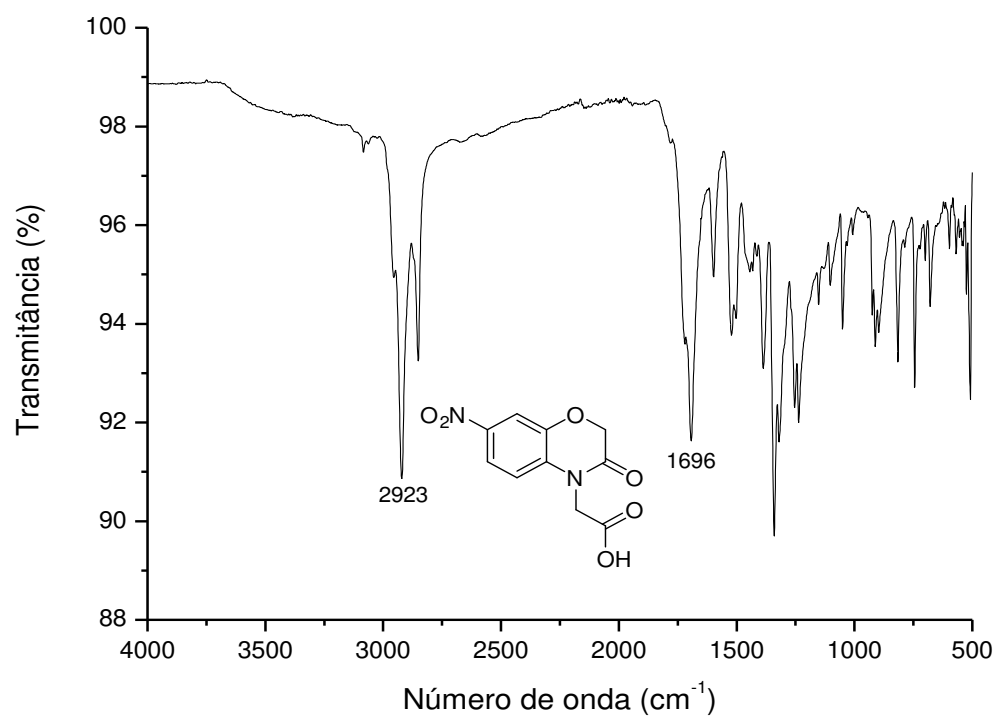
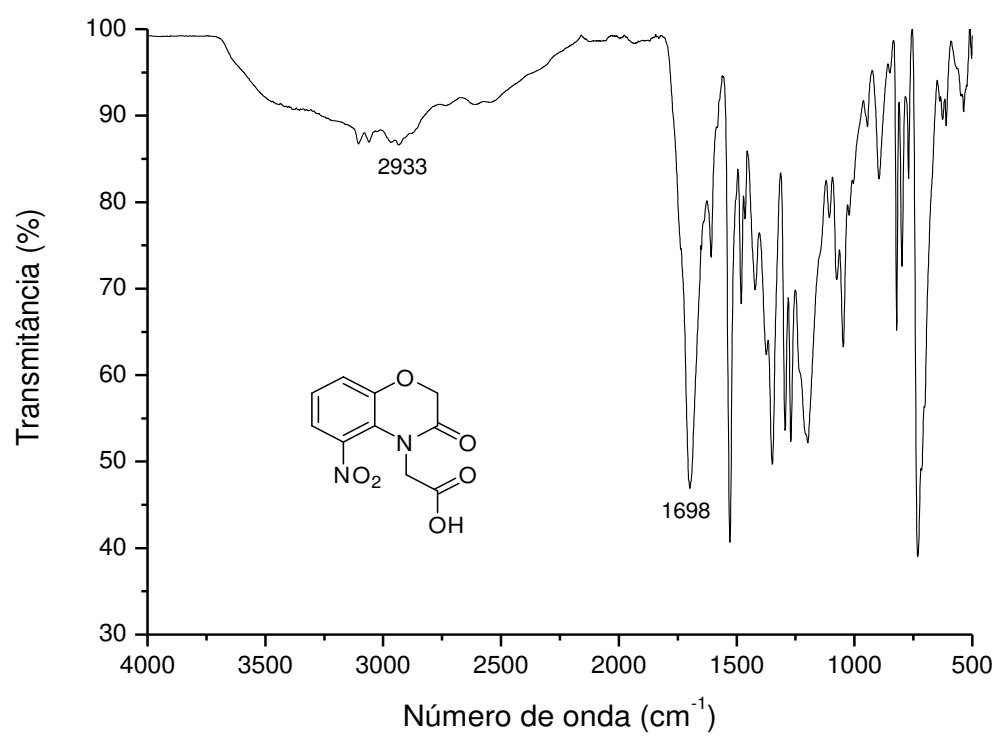
Espectro IV do composto **3d**Espectro IV do composto **3e**

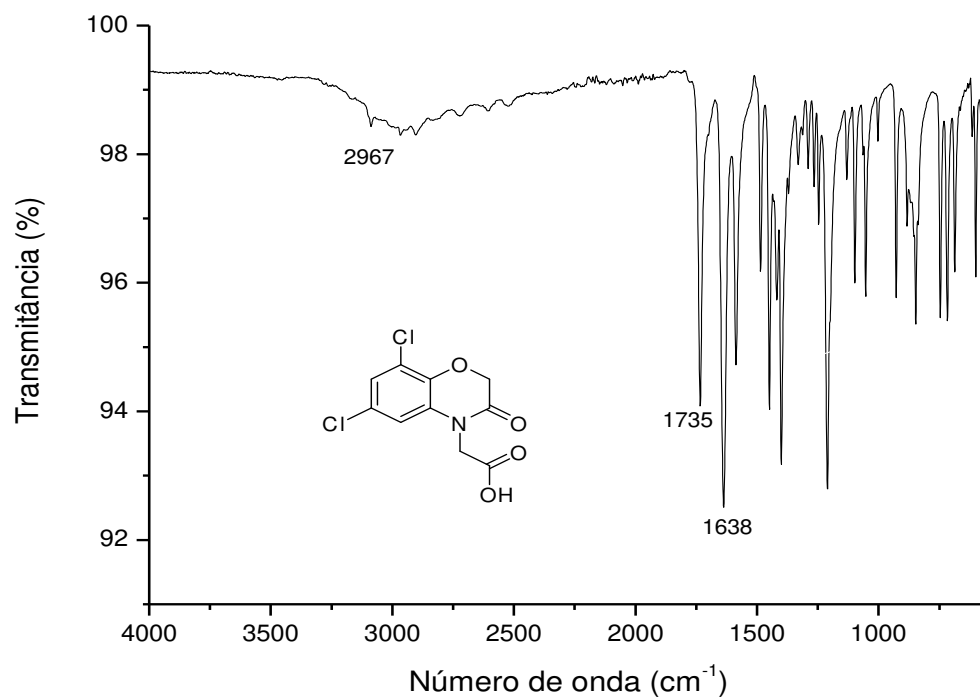
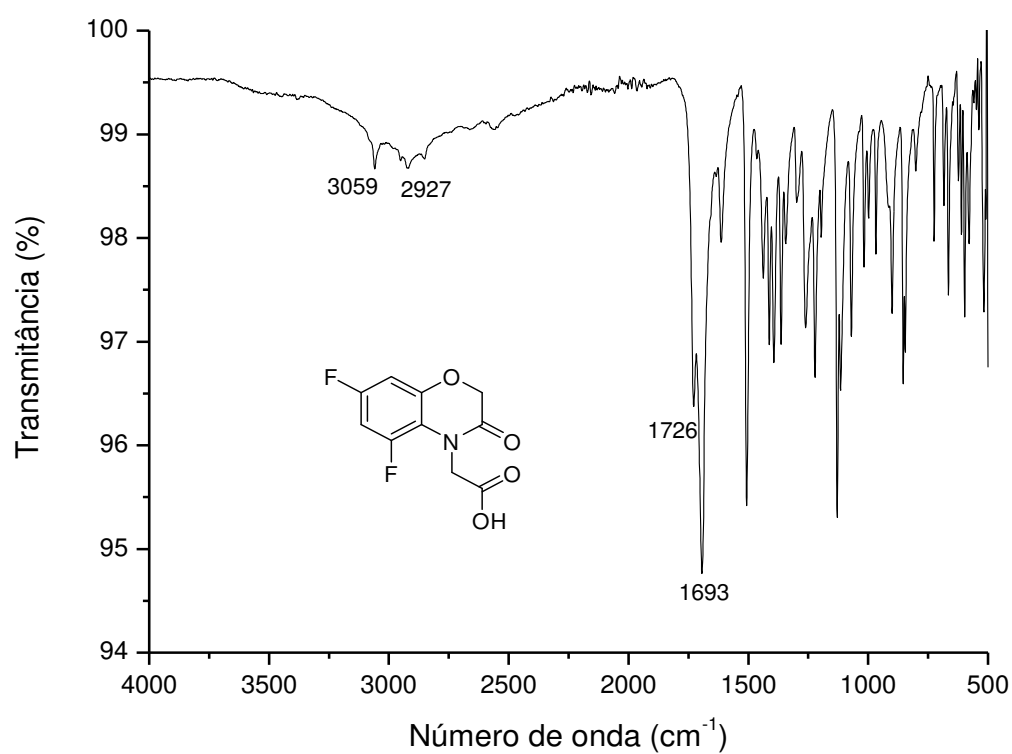
Espectro IV do composto **3f**Espectro IV do composto **3g**

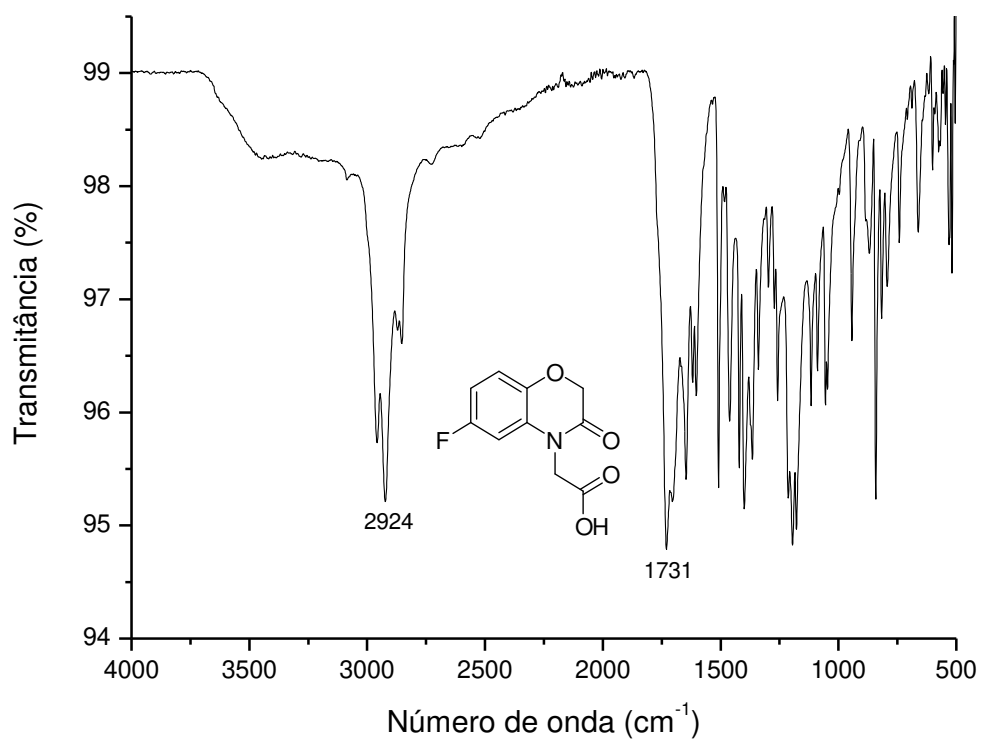
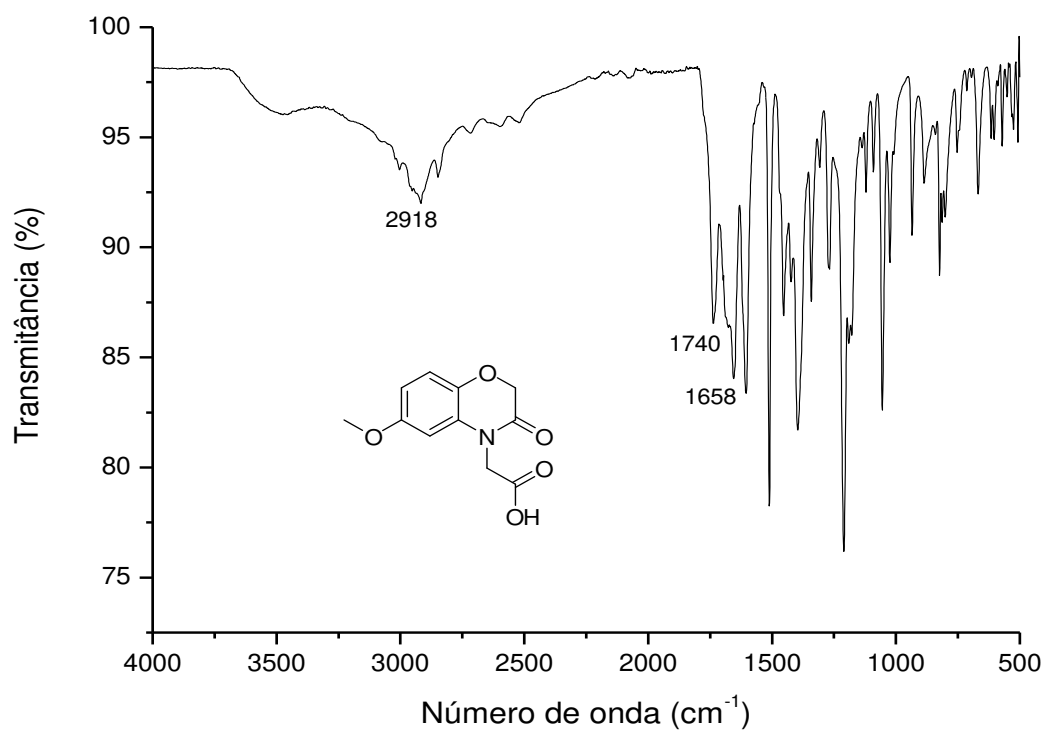
Espectro IV do composto **3h**Espectro IV do composto **3i**

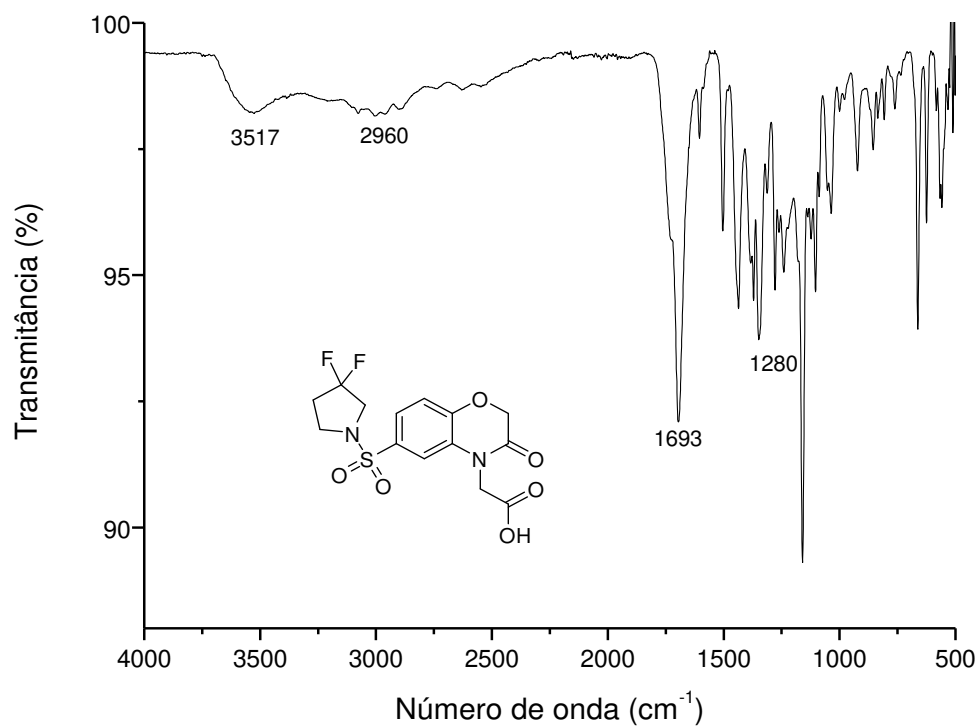
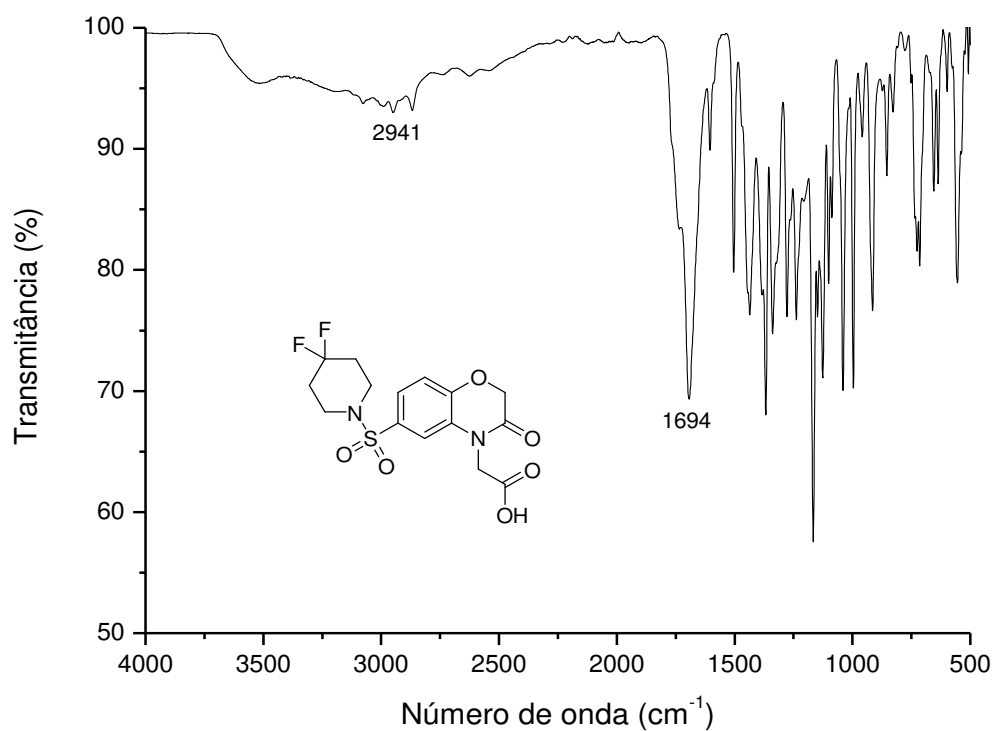
Espectro IV do composto **3j**Espectro IV do composto **3k**

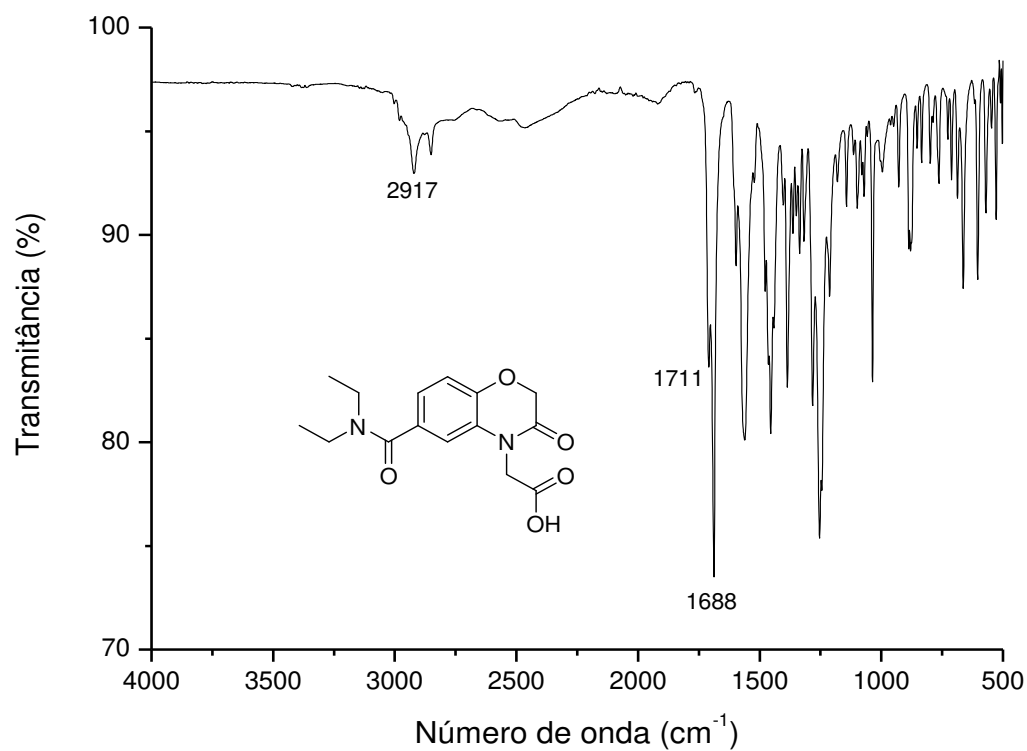
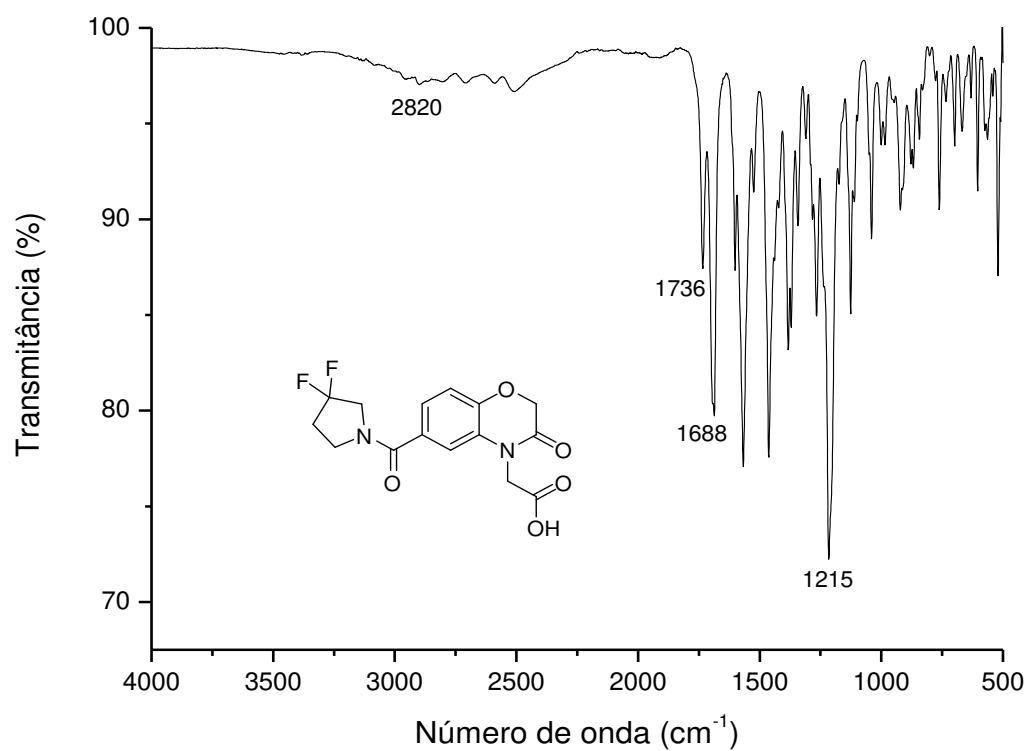
Espectro IV do composto **3l**Espectro IV do composto **4a**

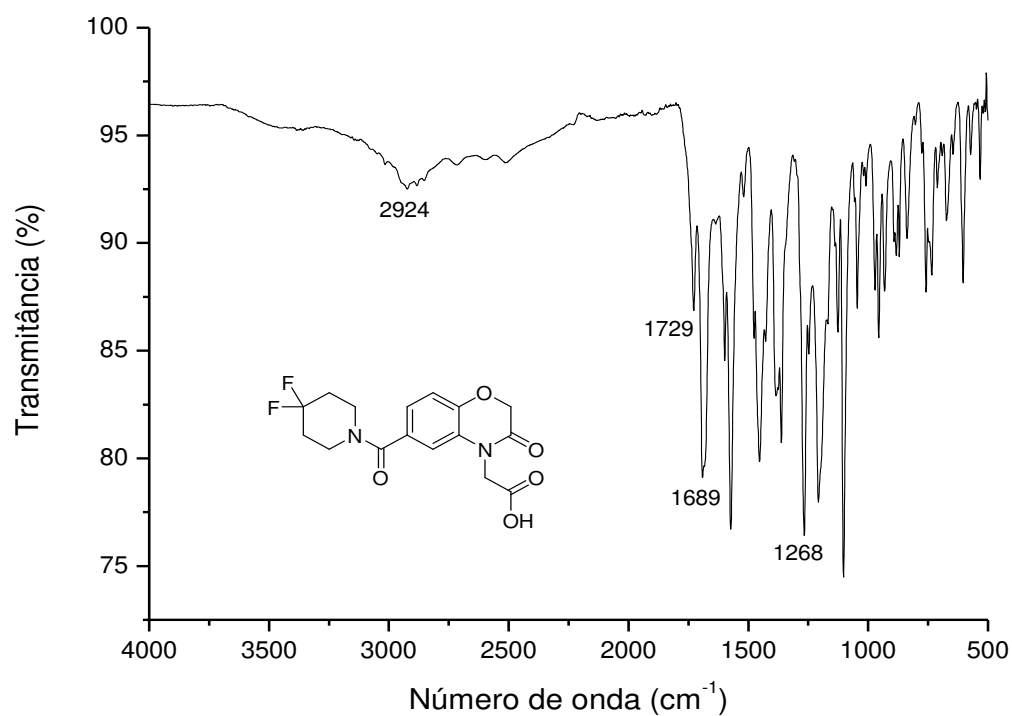
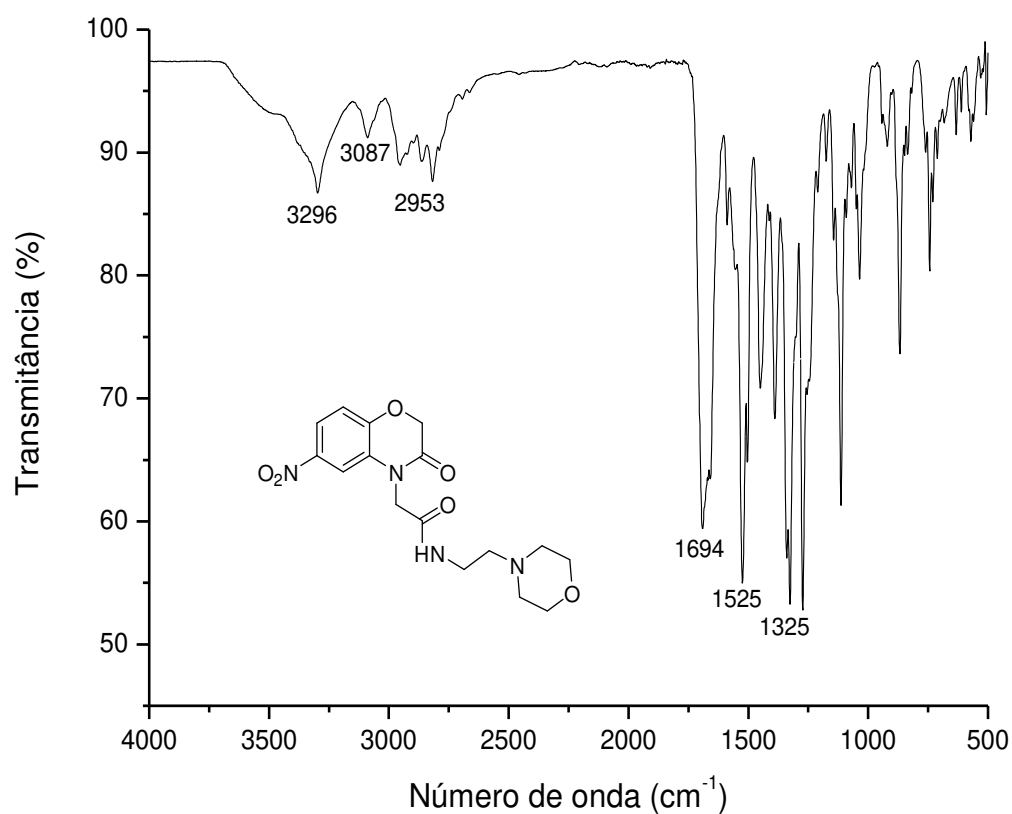
Espectro IV do composto **4b**Espectro IV do composto **4c**

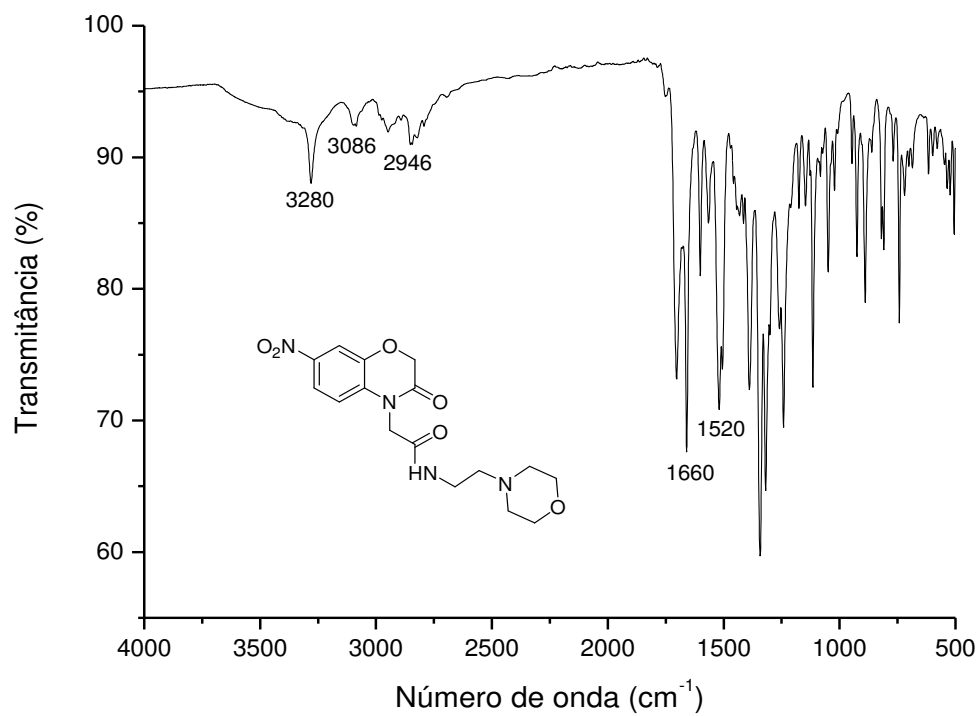
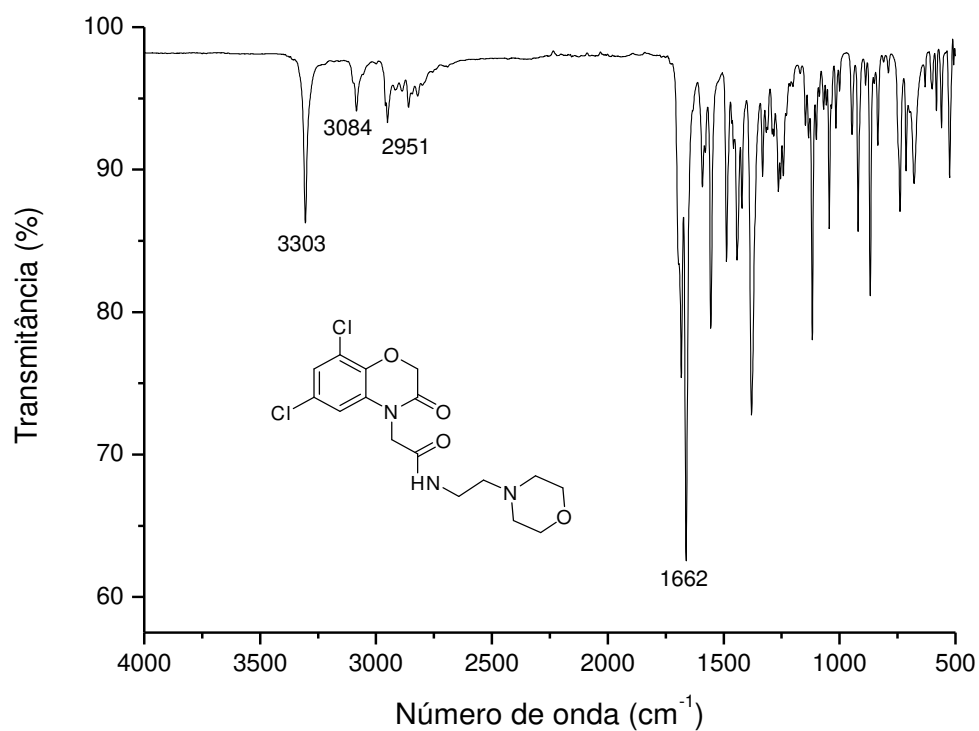
Espectro IV do composto **4d**Espectro IV do composto **4e**

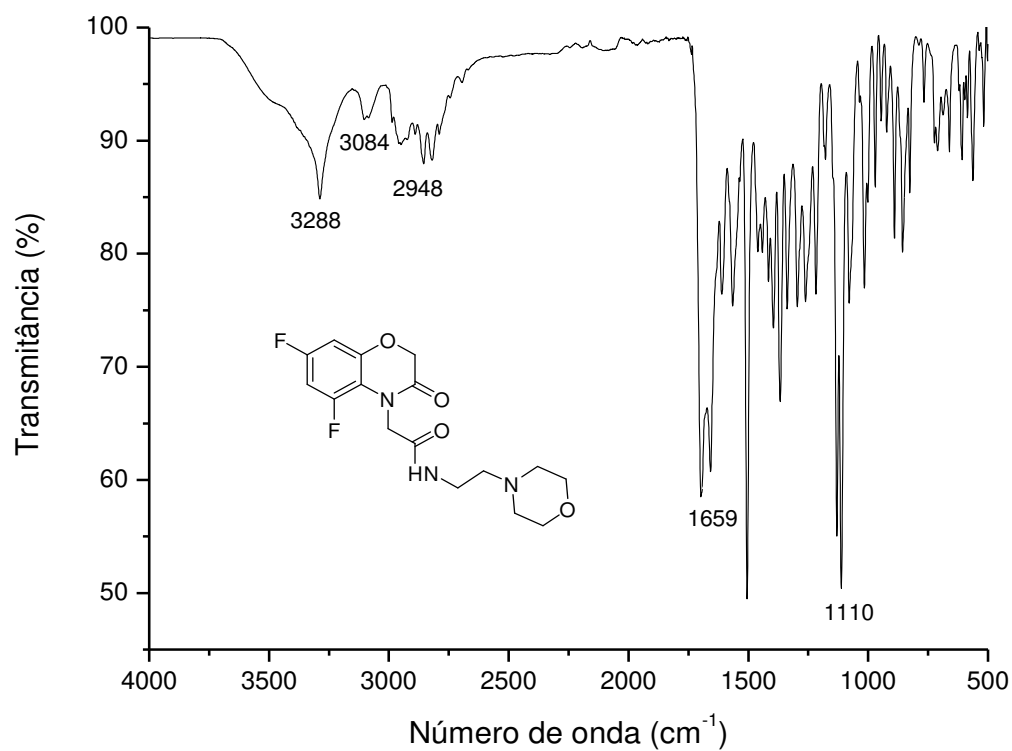
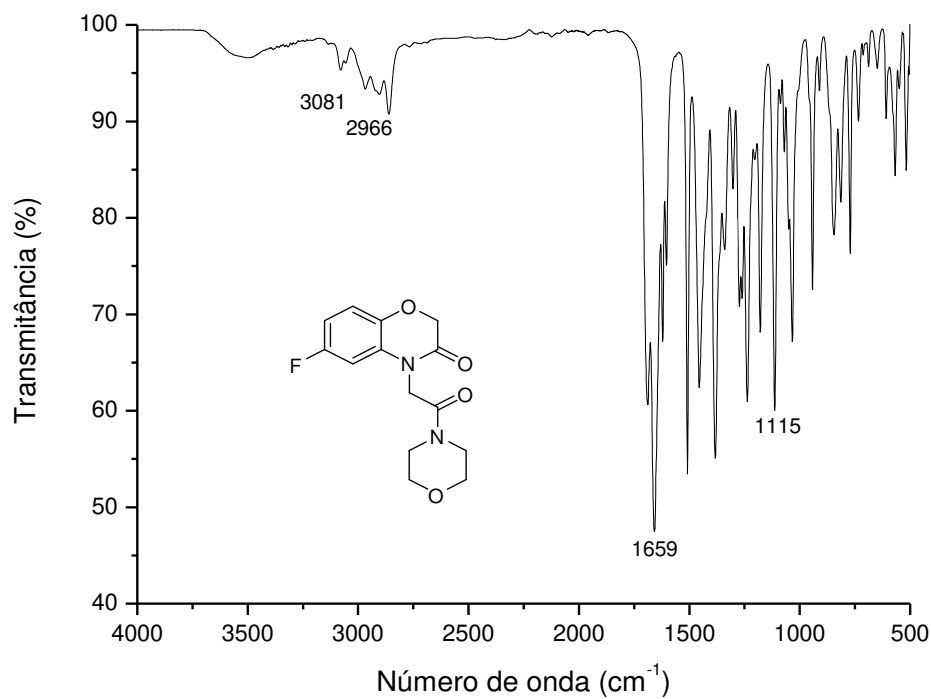
Espectro IV do composto **4f**Espectro IV do composto **4g**

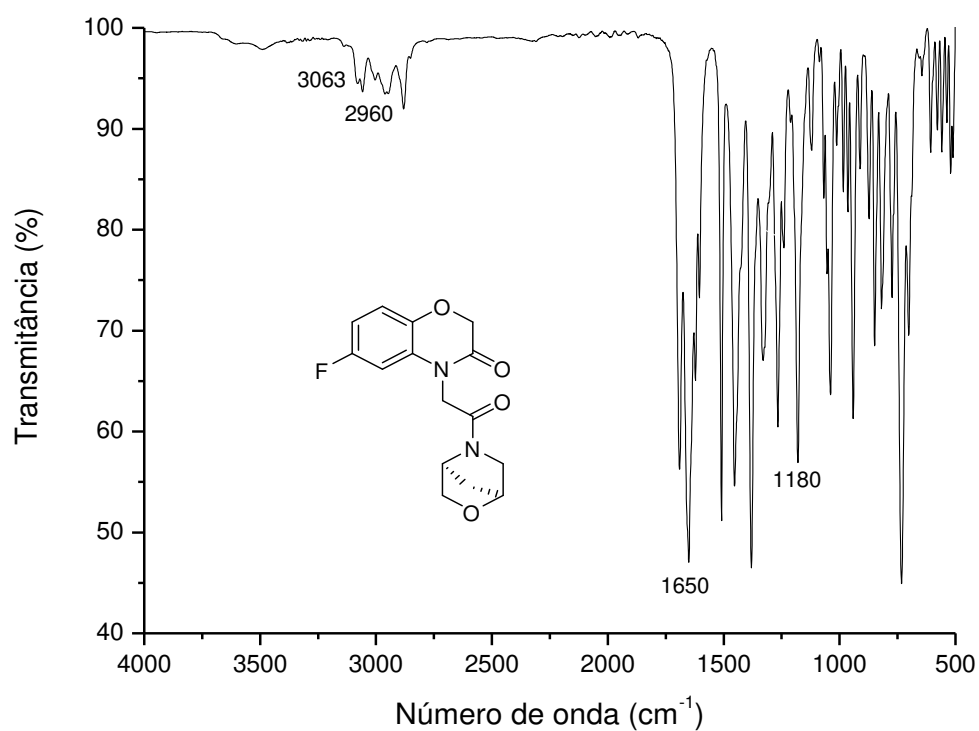
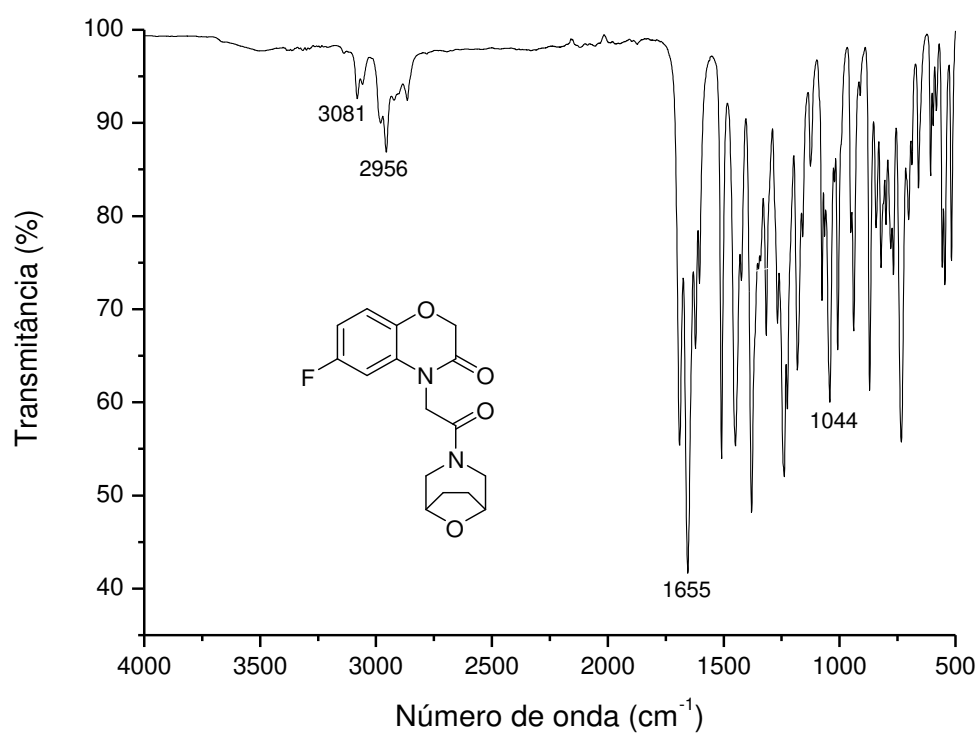
Espectro IV do composto **4h**Espectro IV do composto **4i**

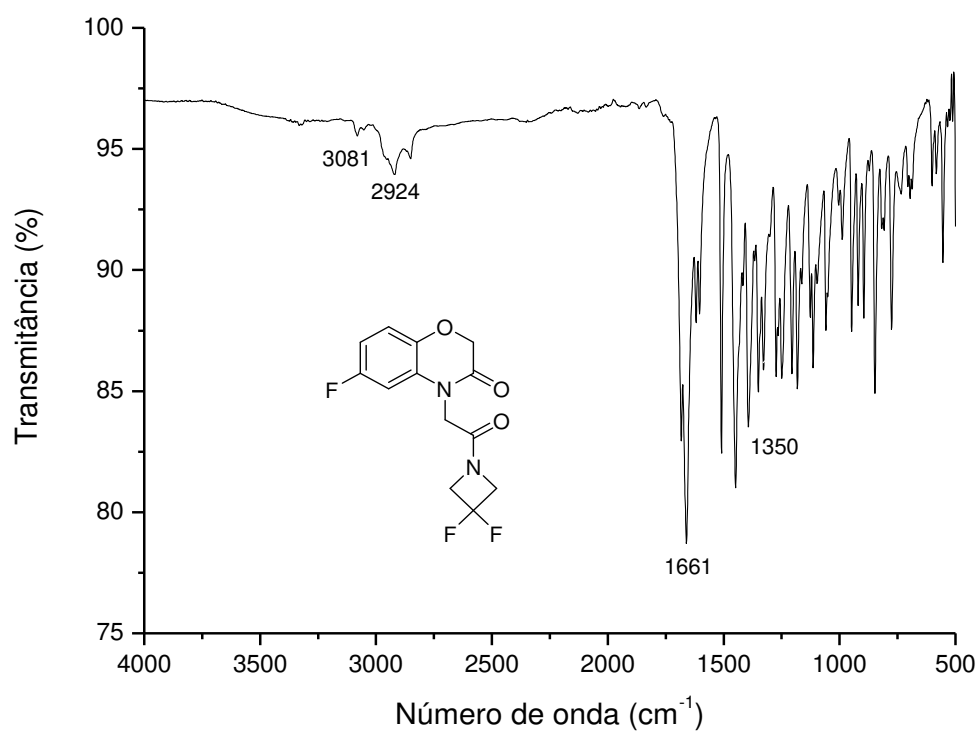
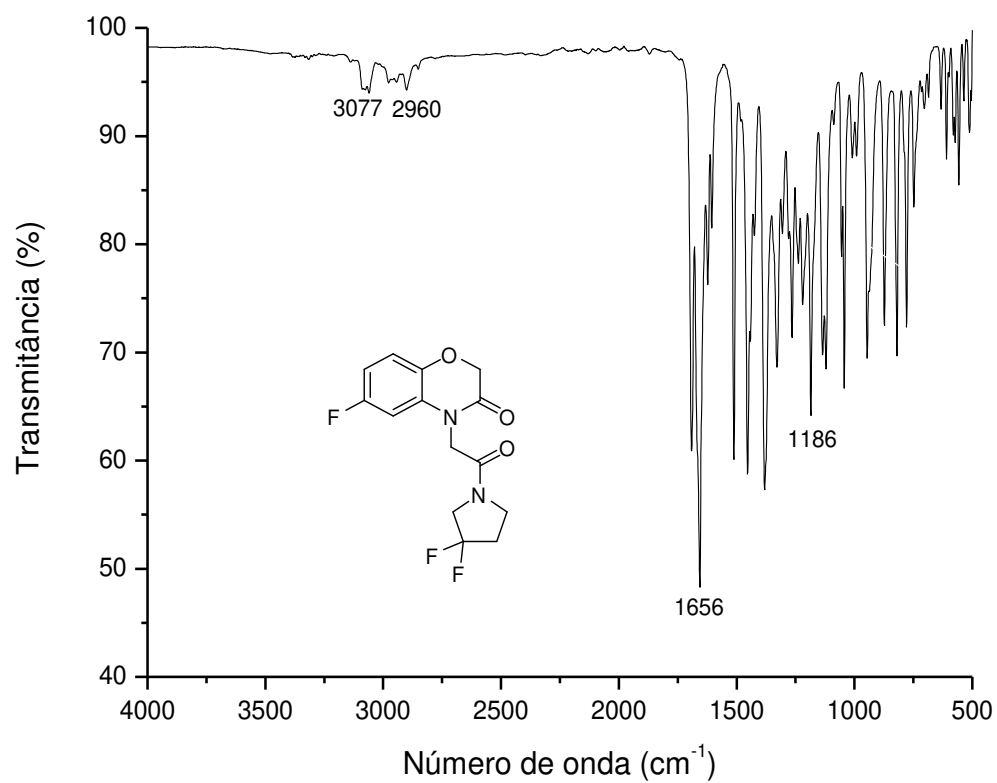
Espectro IV do composto **4j**Espectro IV do composto **4k**

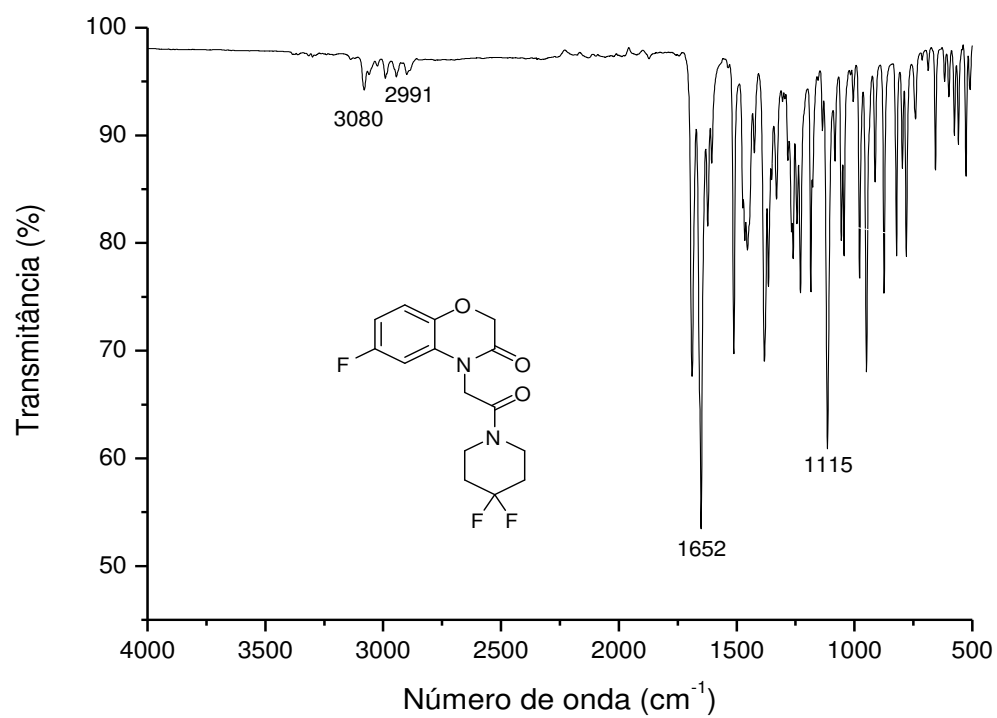
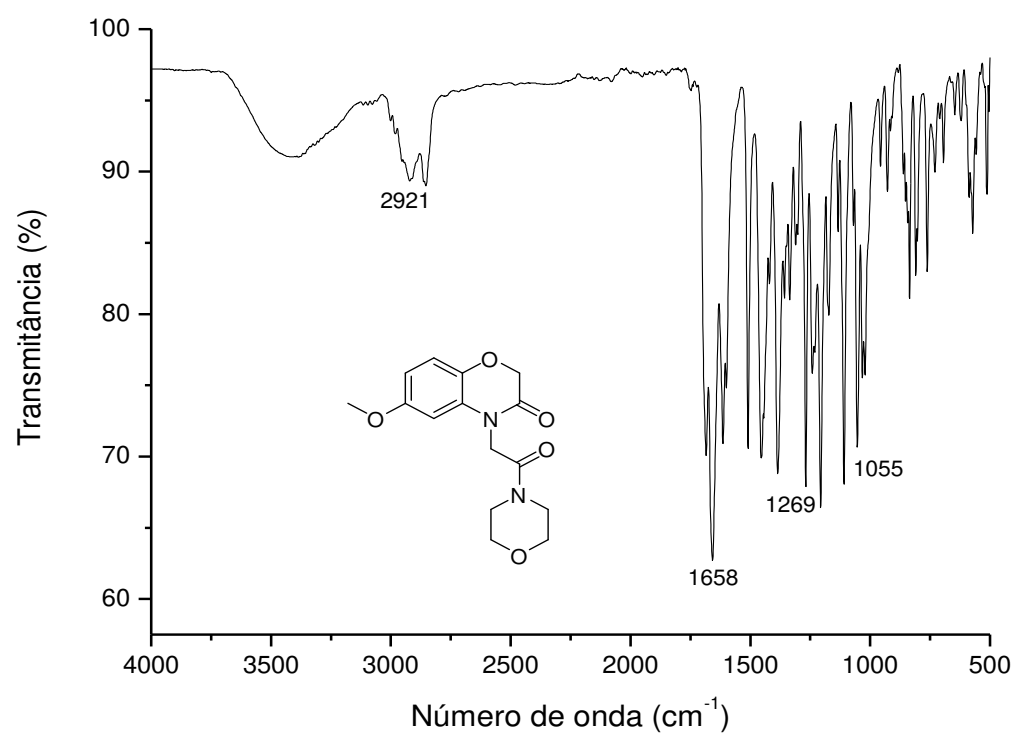
Espectro IV do composto **4l**Espectro IV do composto **5a**

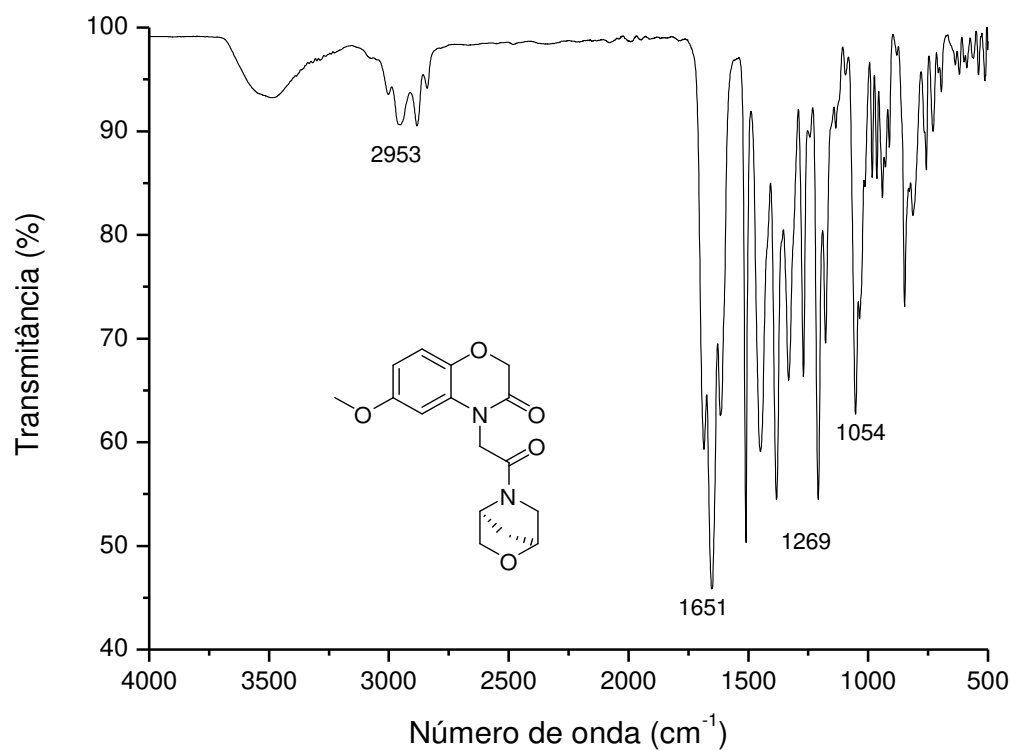
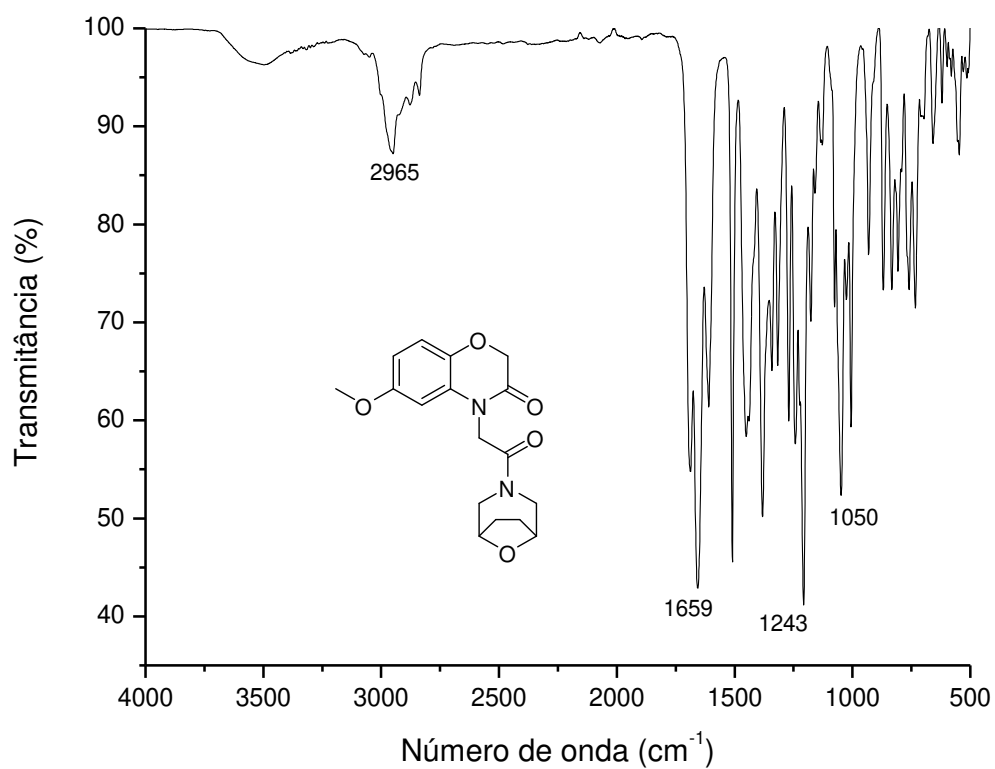
Espectro IV do composto **5b**Espectro IV do composto **5d**

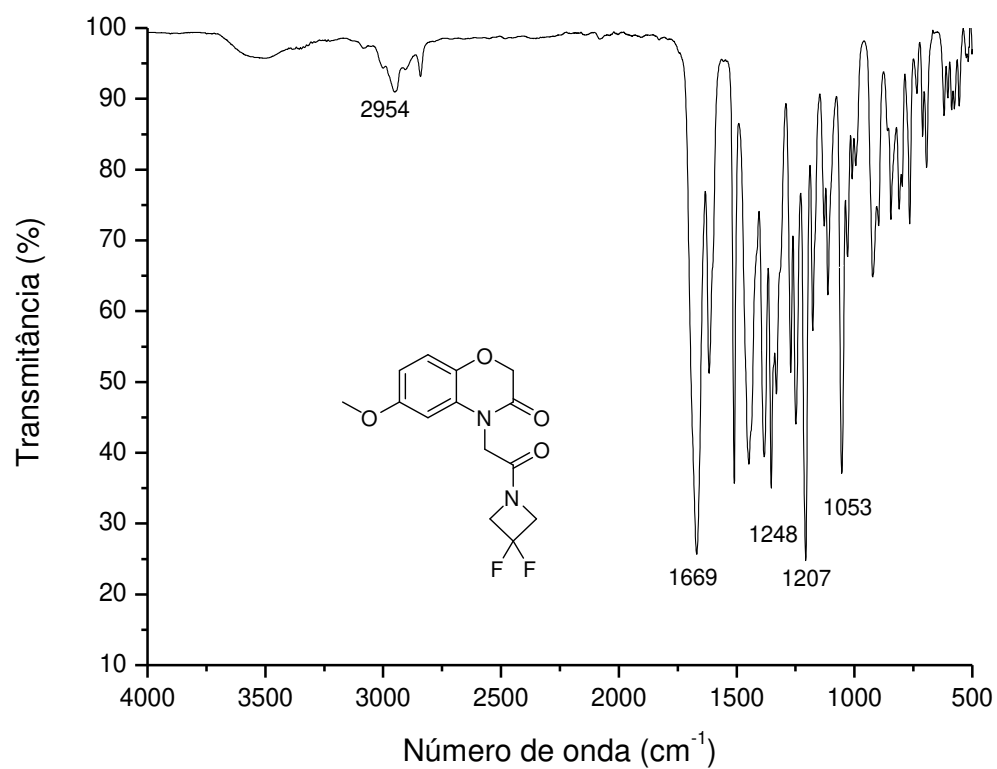
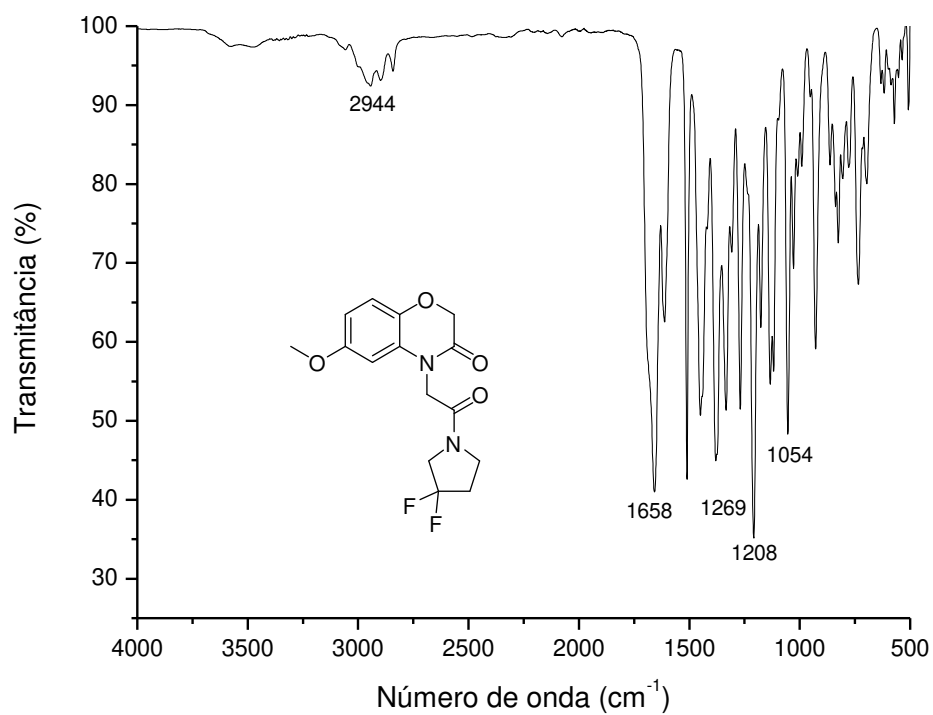
Espectro IV do composto **5e**Espectro IV do composto **6a**

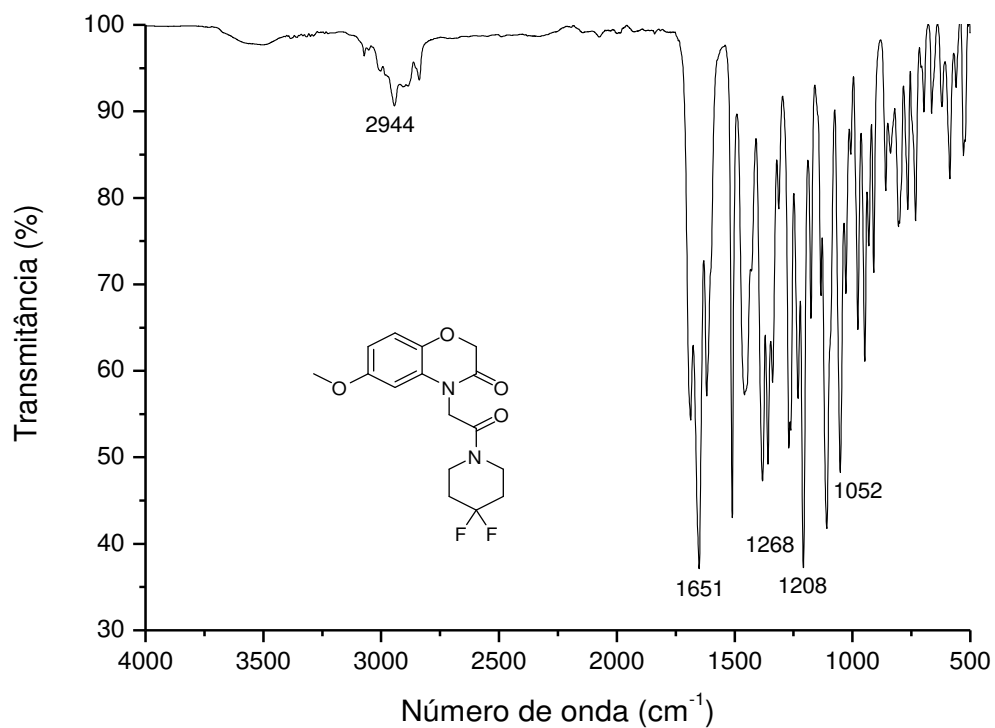
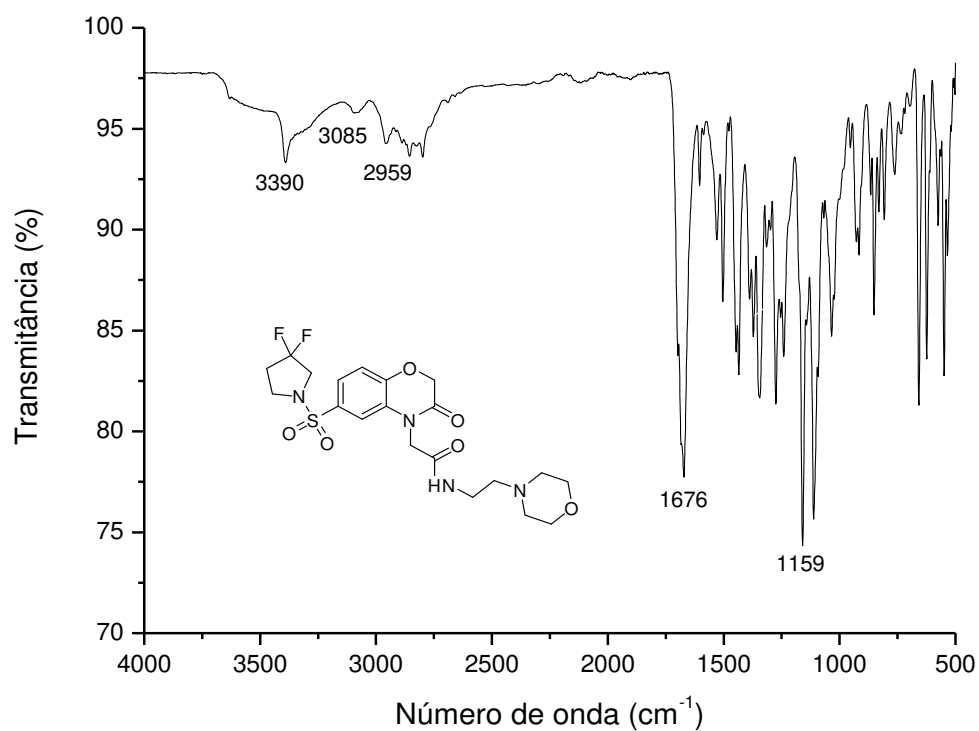
Espectro IV do composto **6b**Espectro IV do composto **6c**

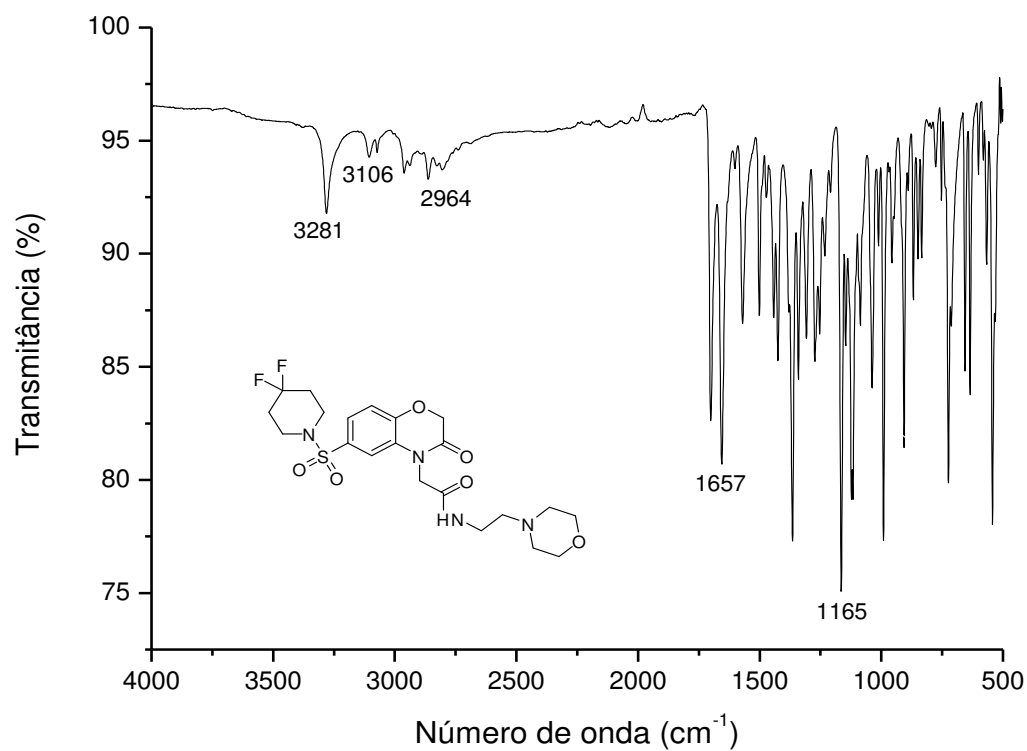
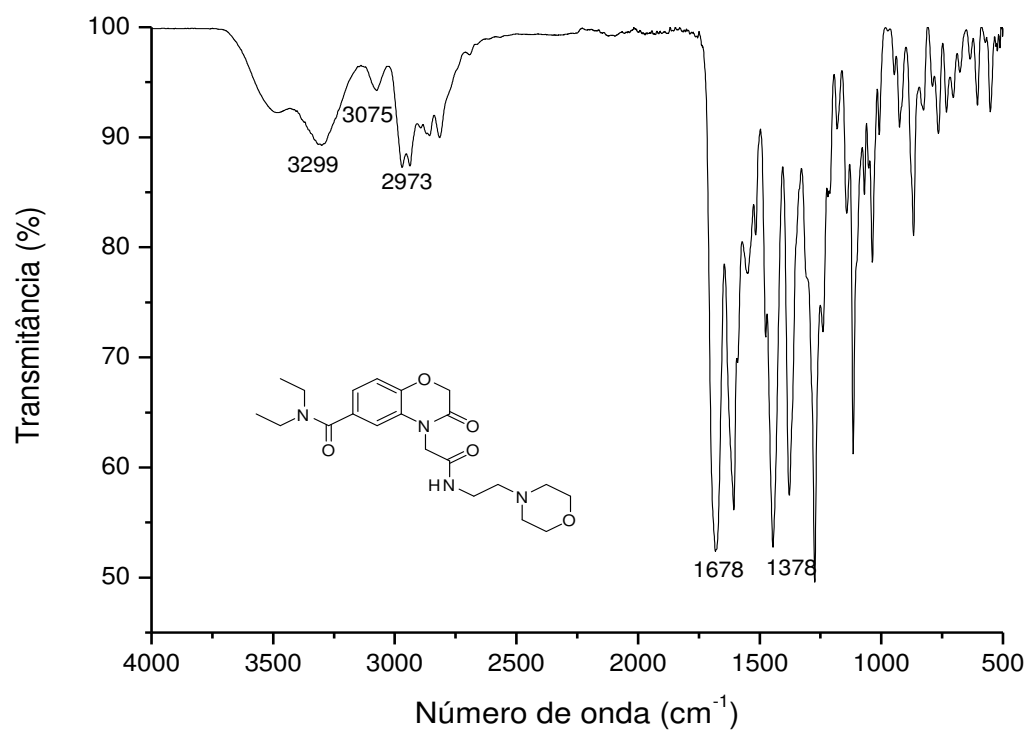
Espectro IV do composto **6d**Espectro IV do composto **6e**

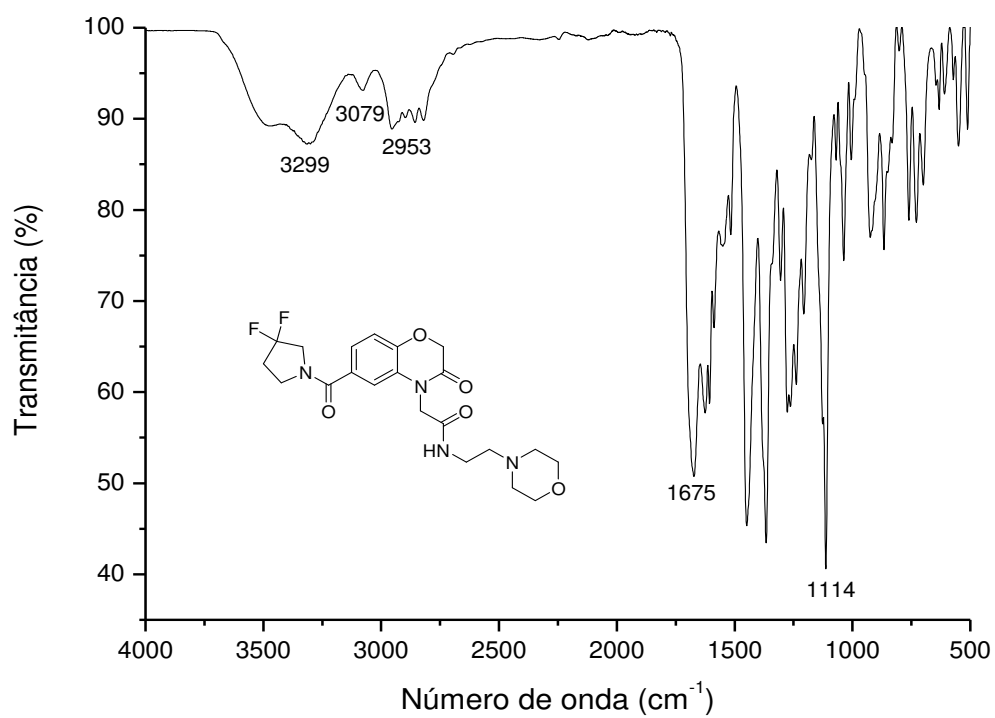
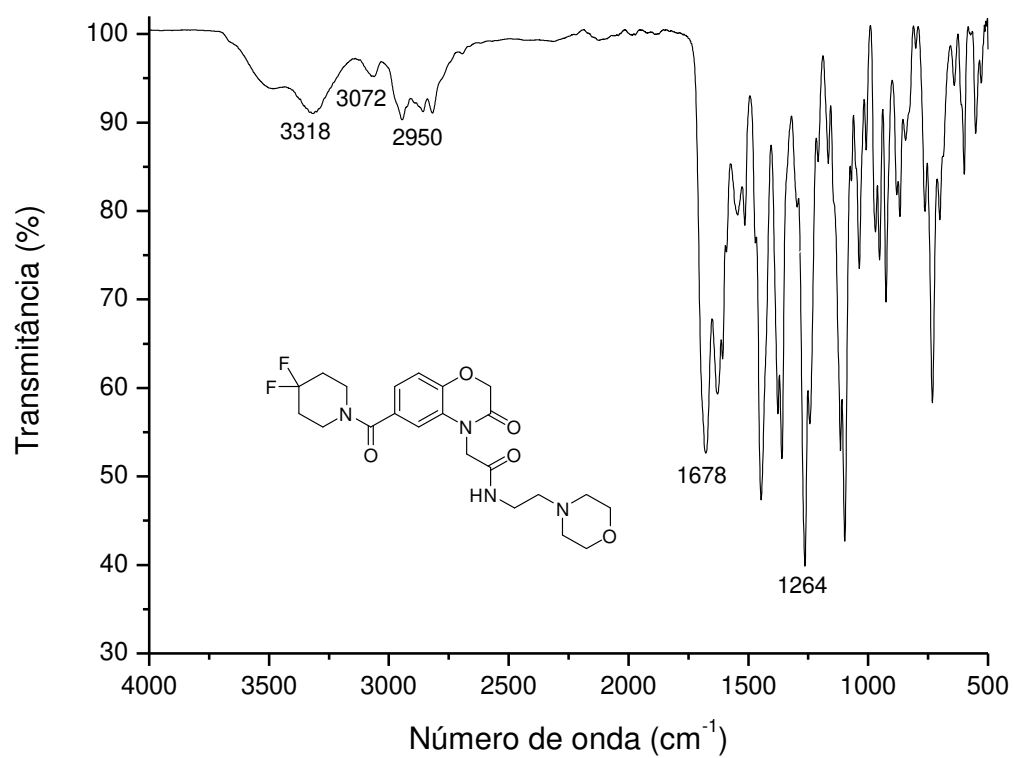
Espectro IV do composto **6f**Espectro IV do composto **7a**

Espectro IV do composto **7b**Espectro IV do composto **7c**

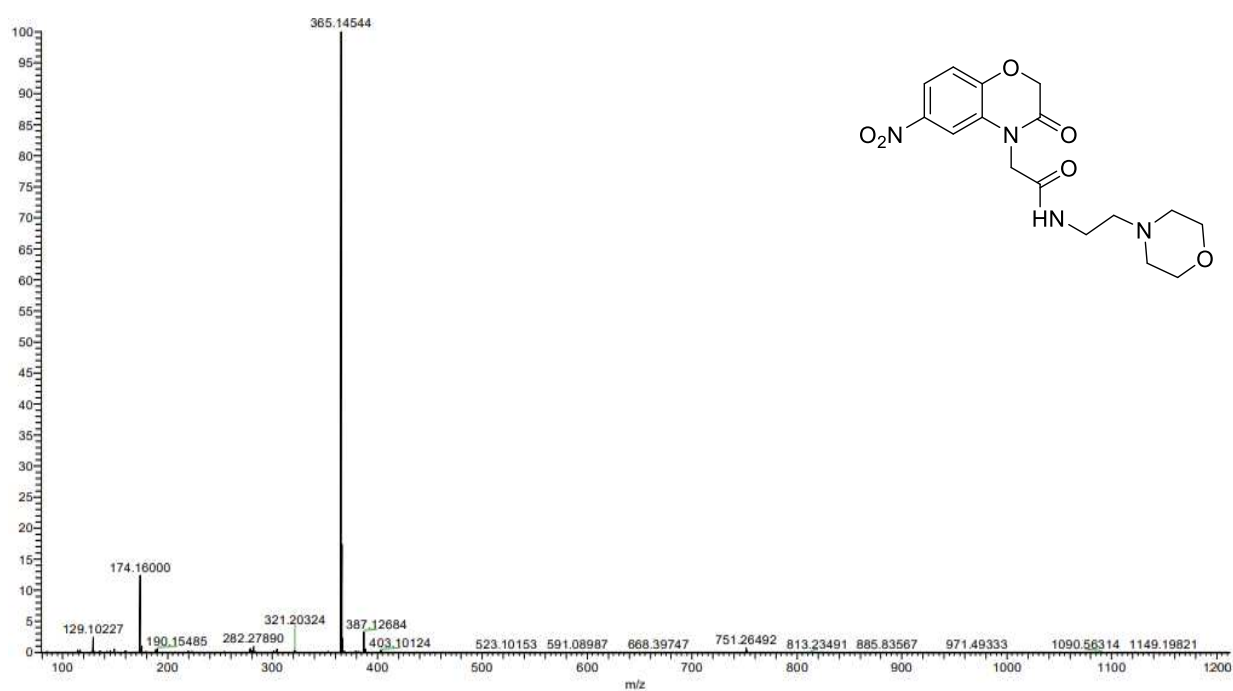
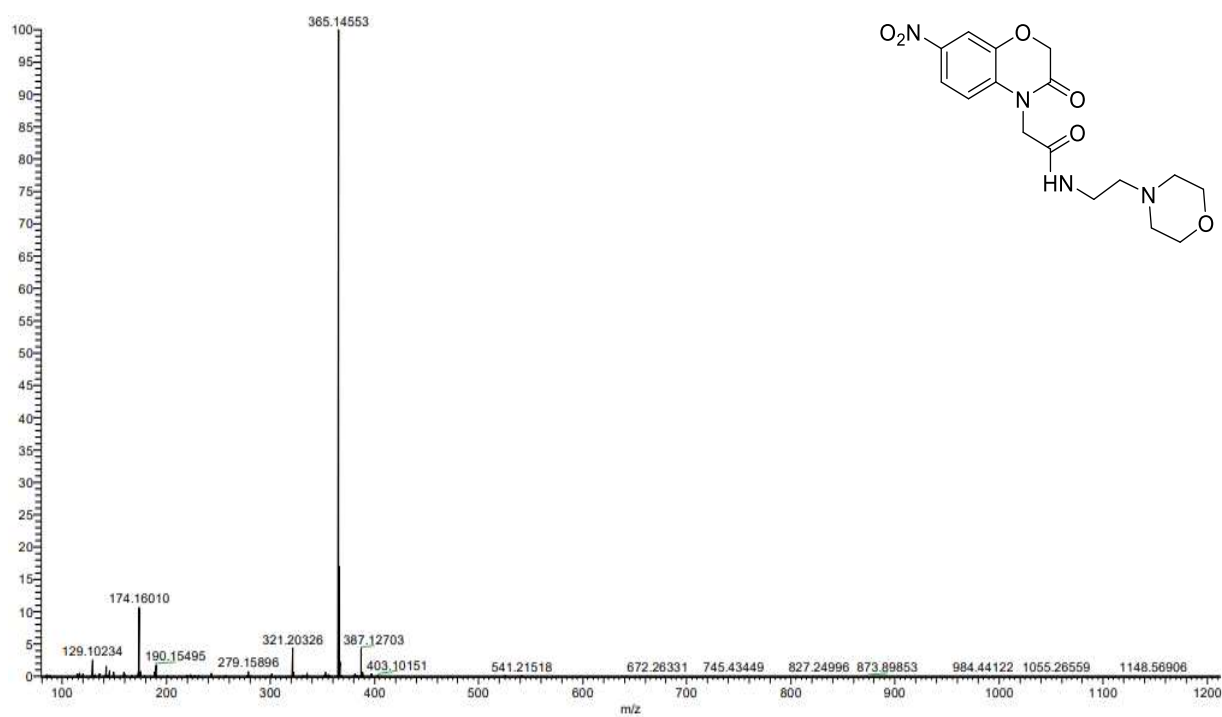
Espectro IV do composto **7d**Espectro IV do composto **7e**

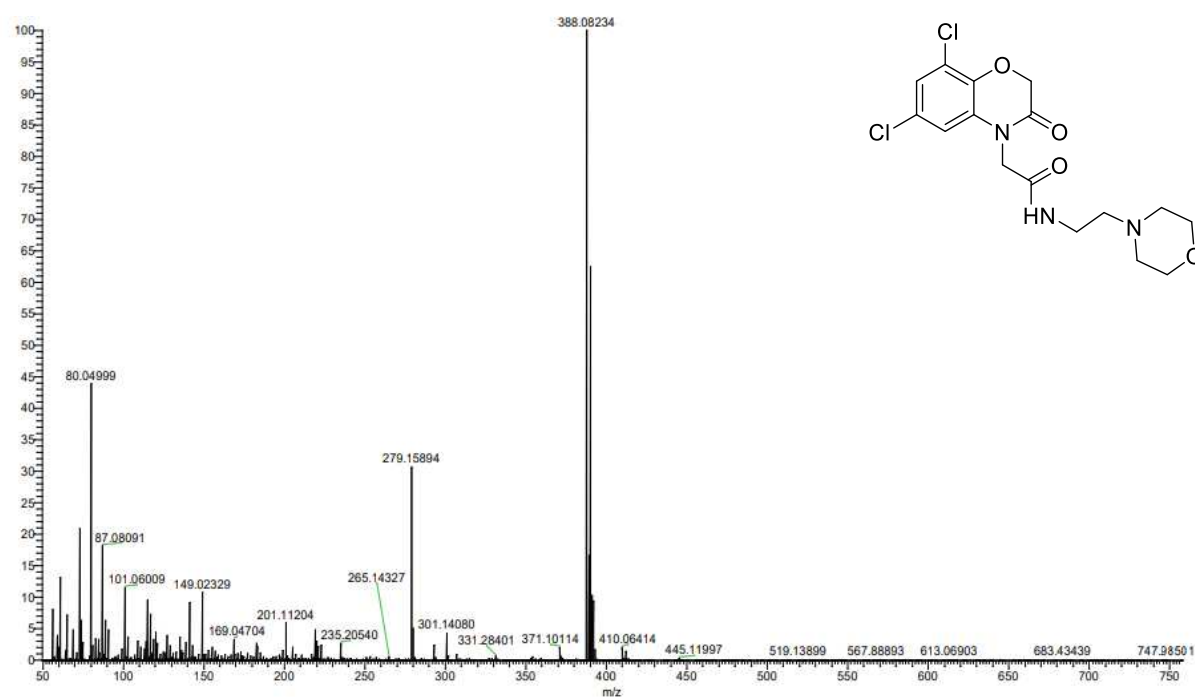
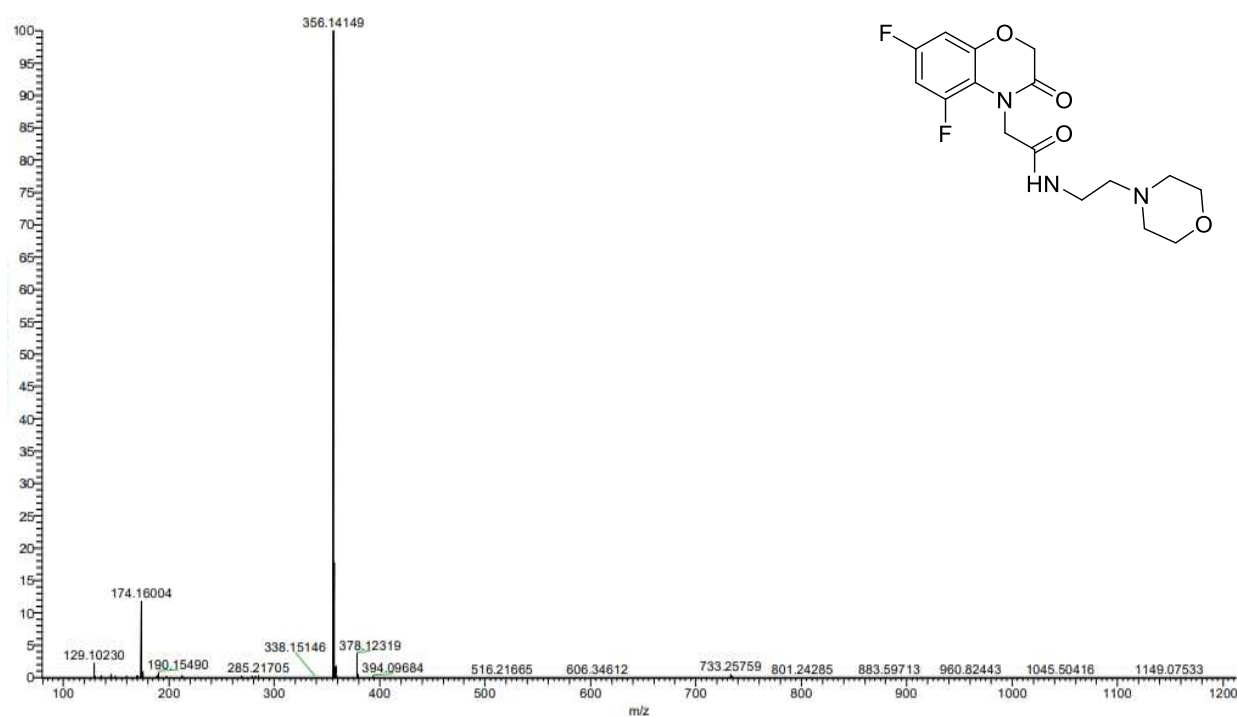
Espectro IV do composto **7f**Espectro IV do composto **8a**

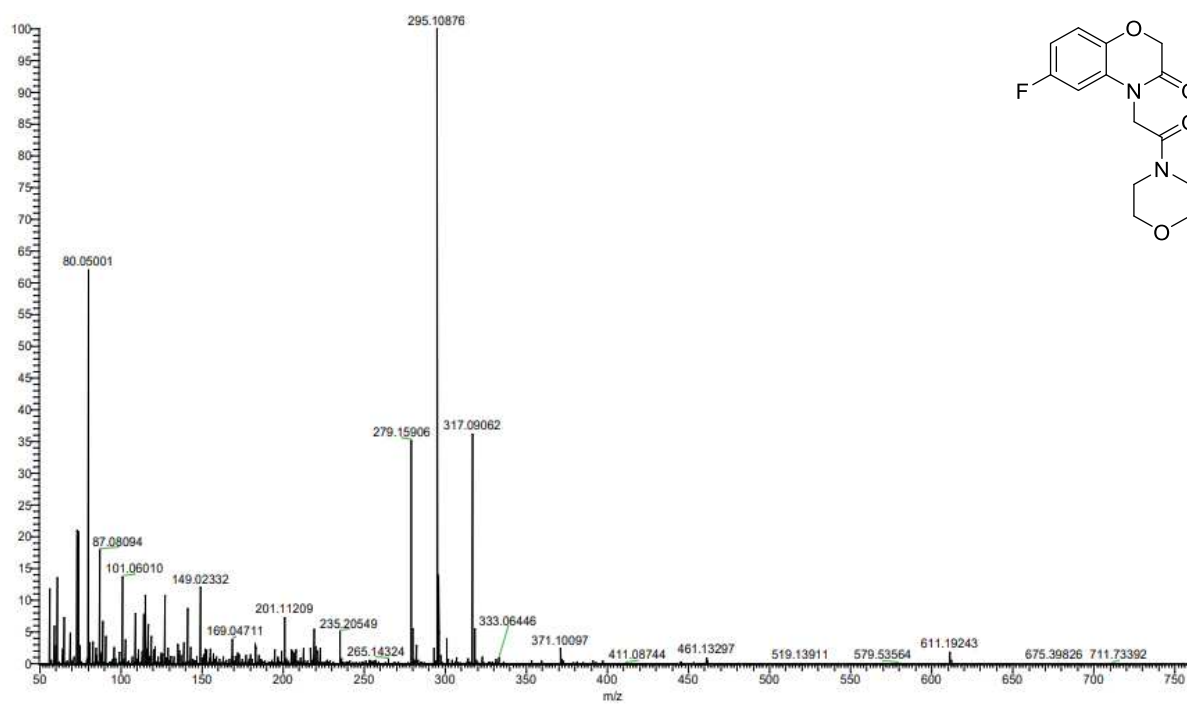
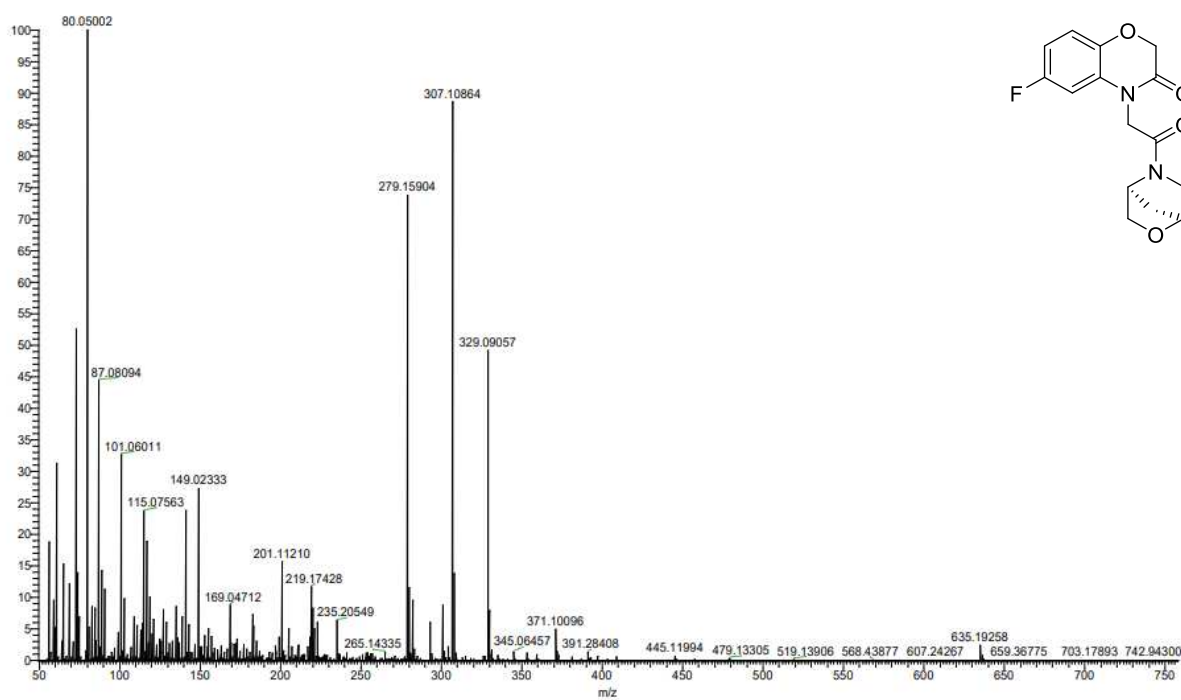
Espectro IV do composto **8b**Espectro IV do composto **8c**

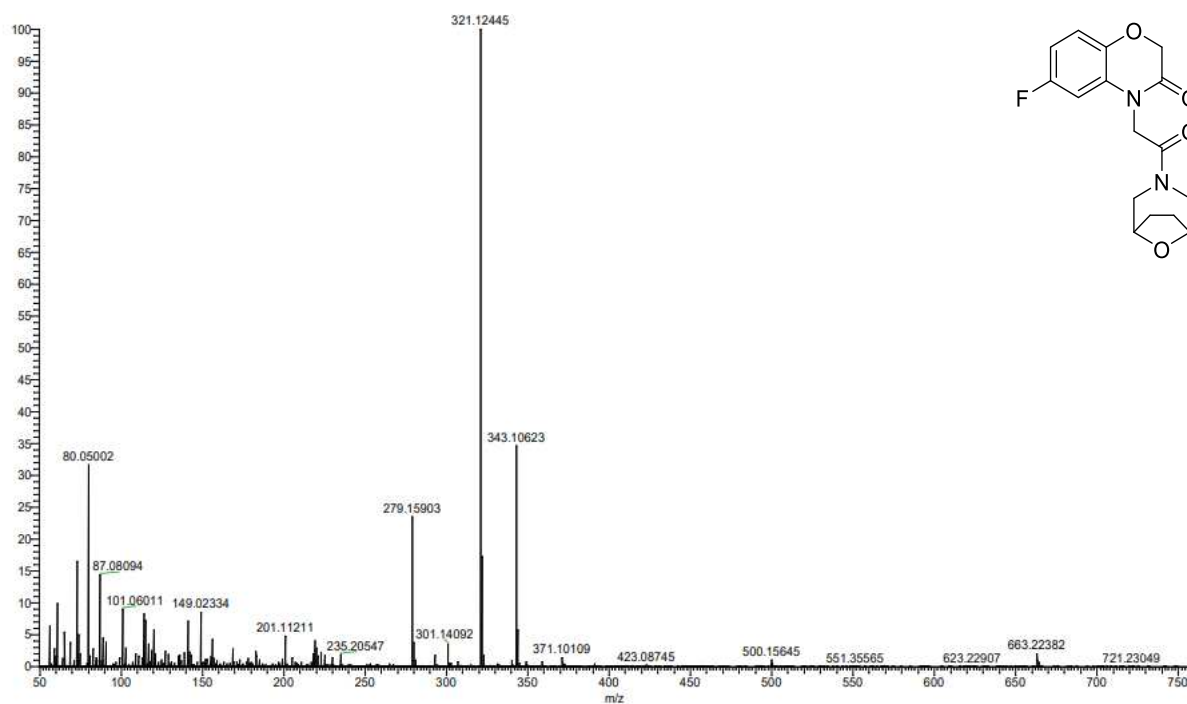
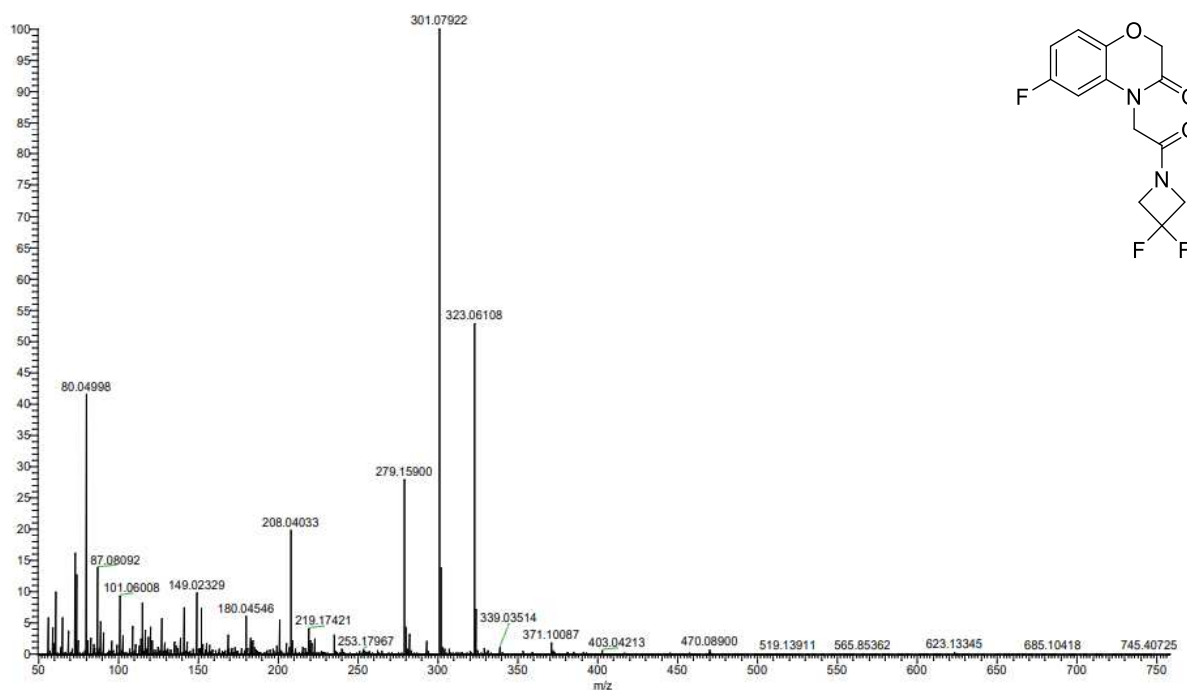
Espectro IV do composto **8d**Espectro IV do composto **8e**

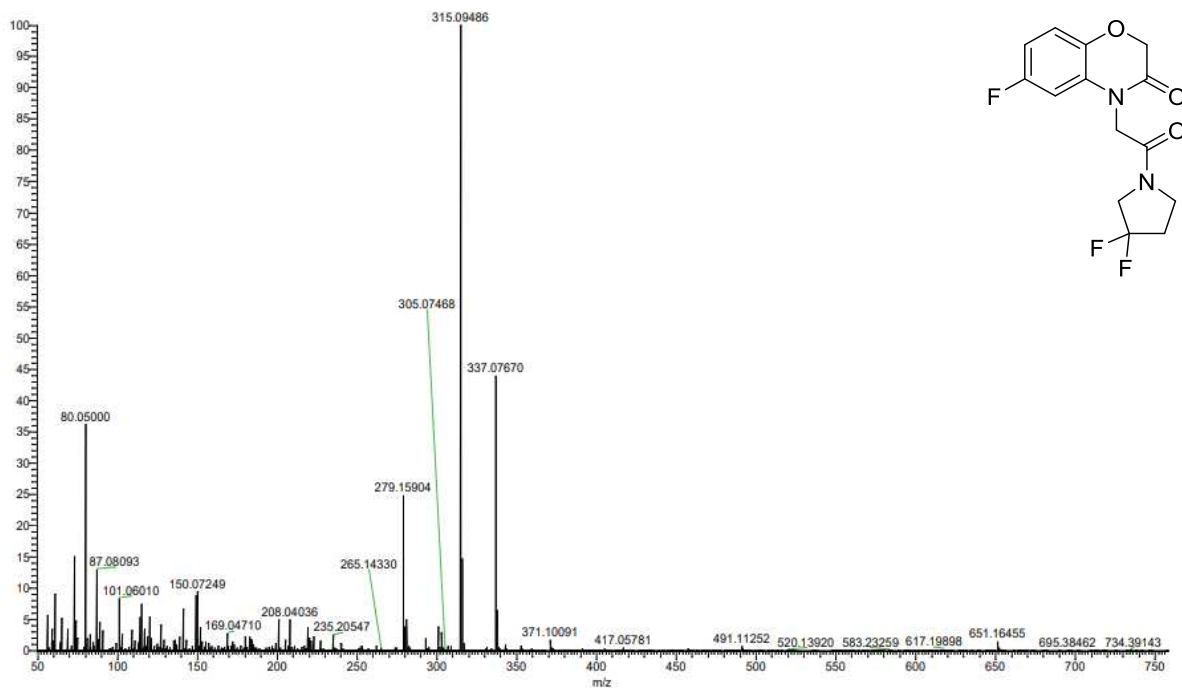
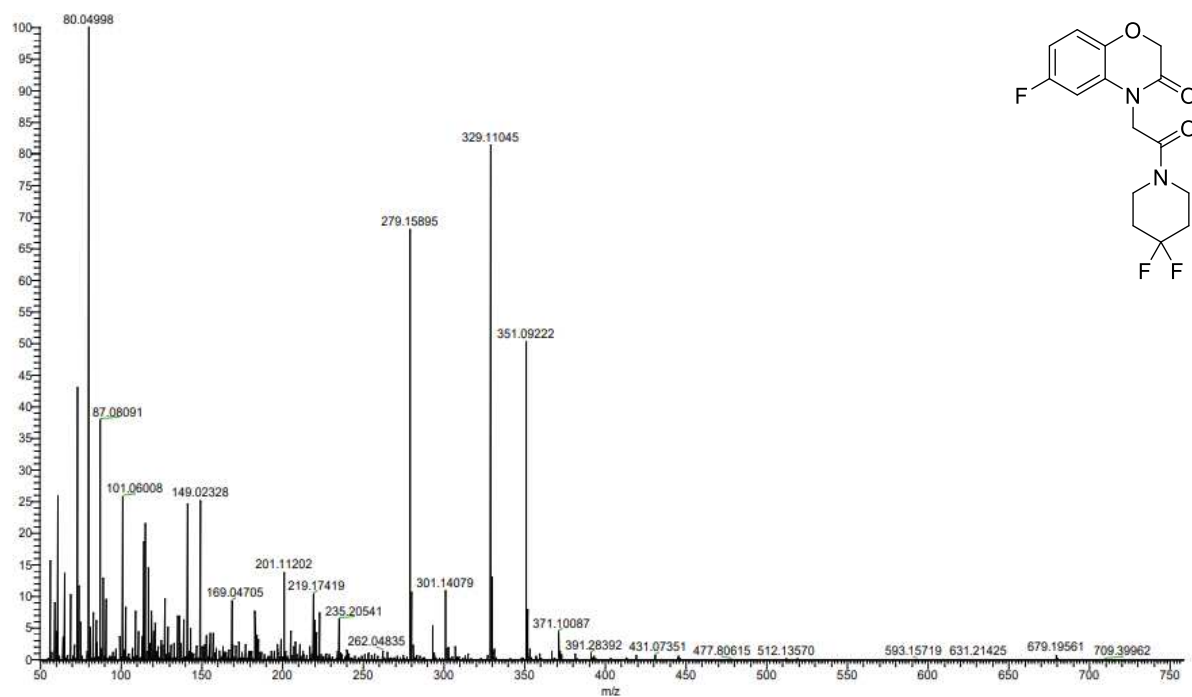
Apêndice D – Espectros de HRMS

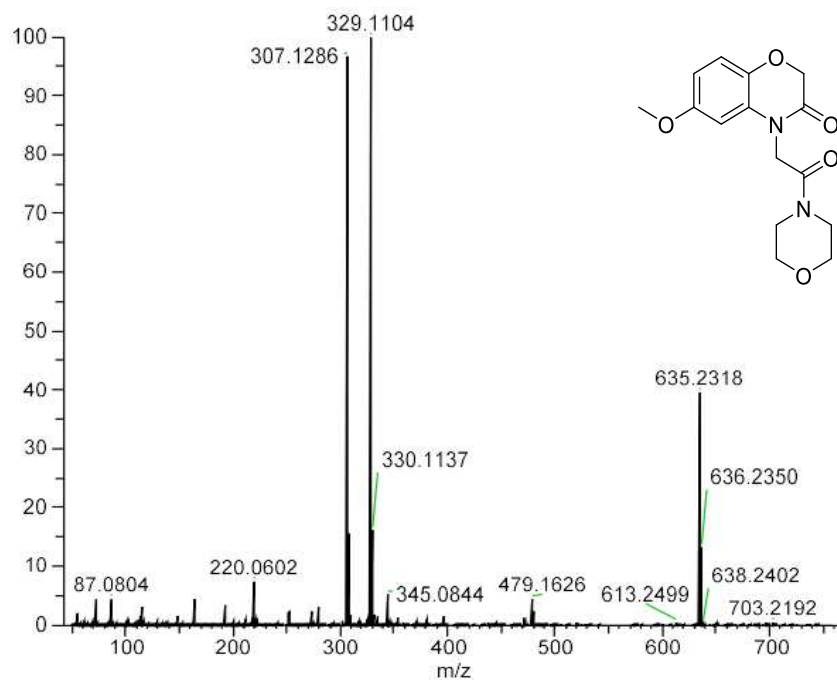
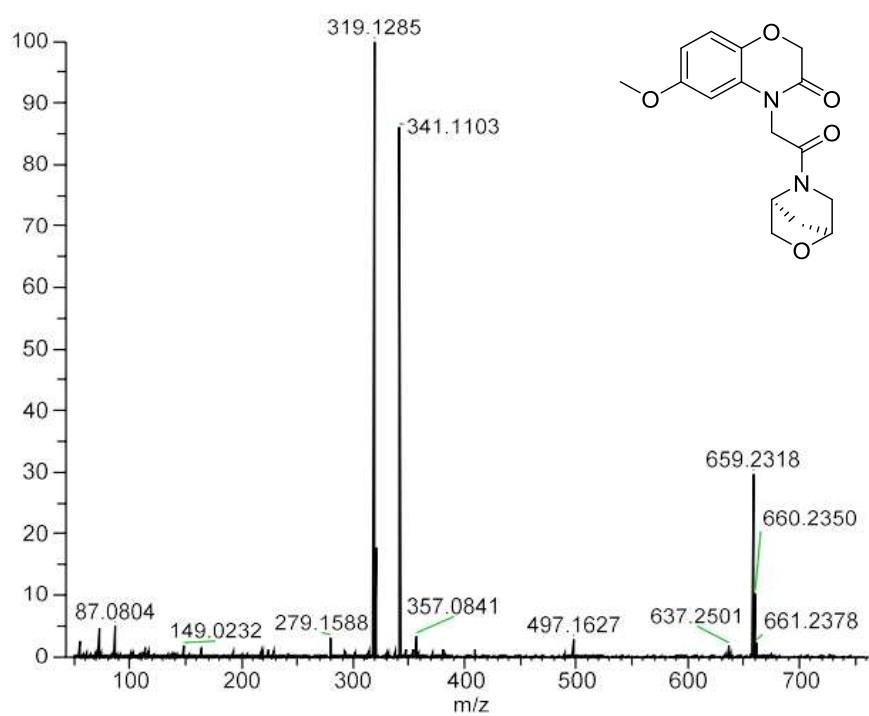
Espectro HRMS do composto **5a**Espectro HRMS do composto **5b**

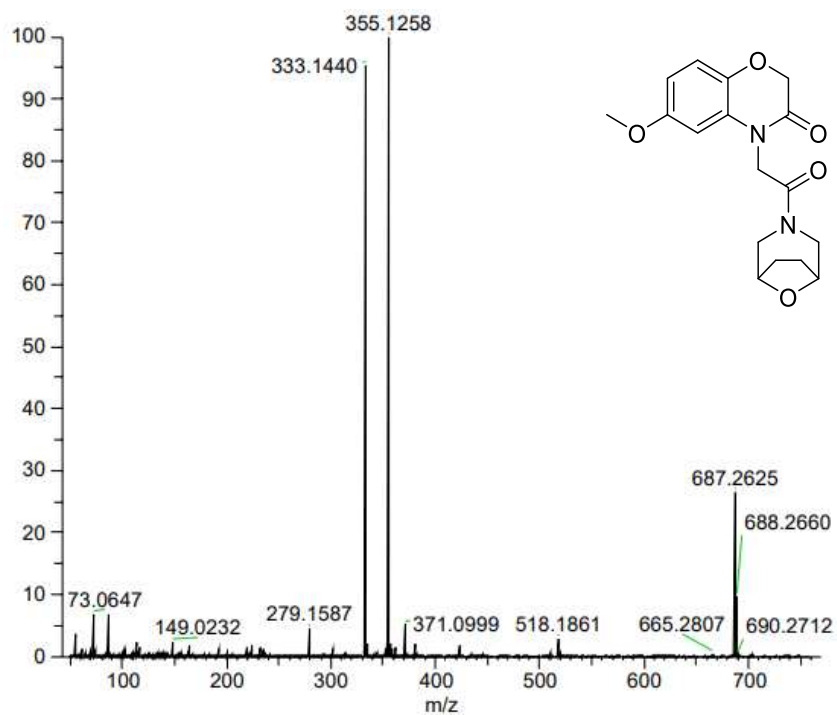
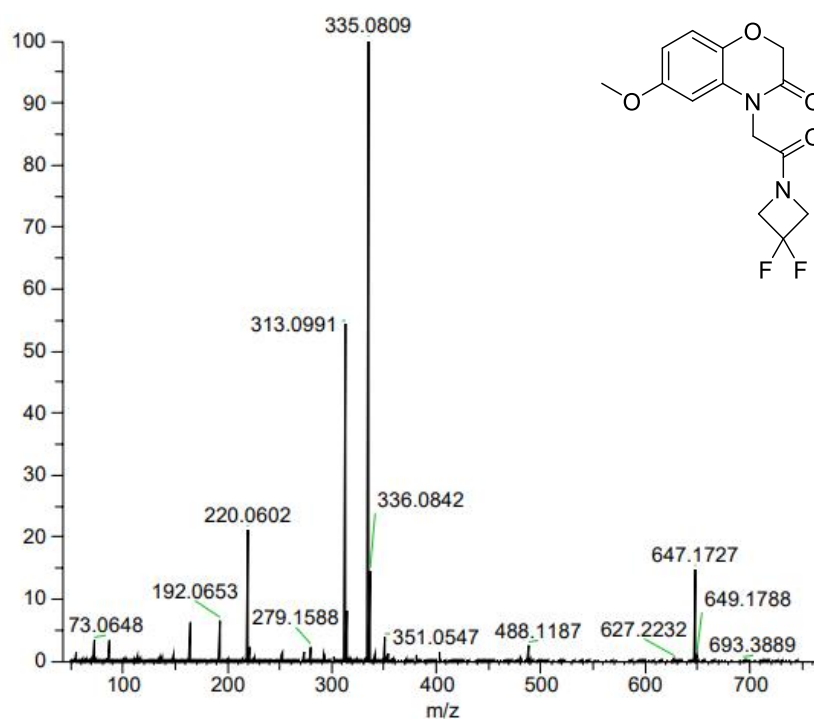
Espectro HRMS do composto **5d**Espectro HRMS do composto **5e**

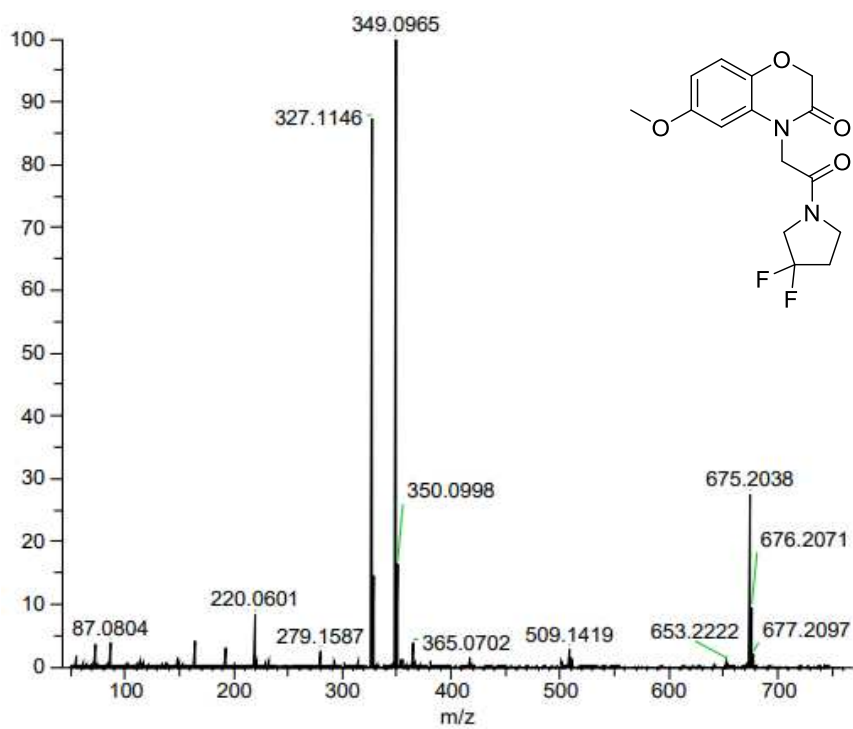
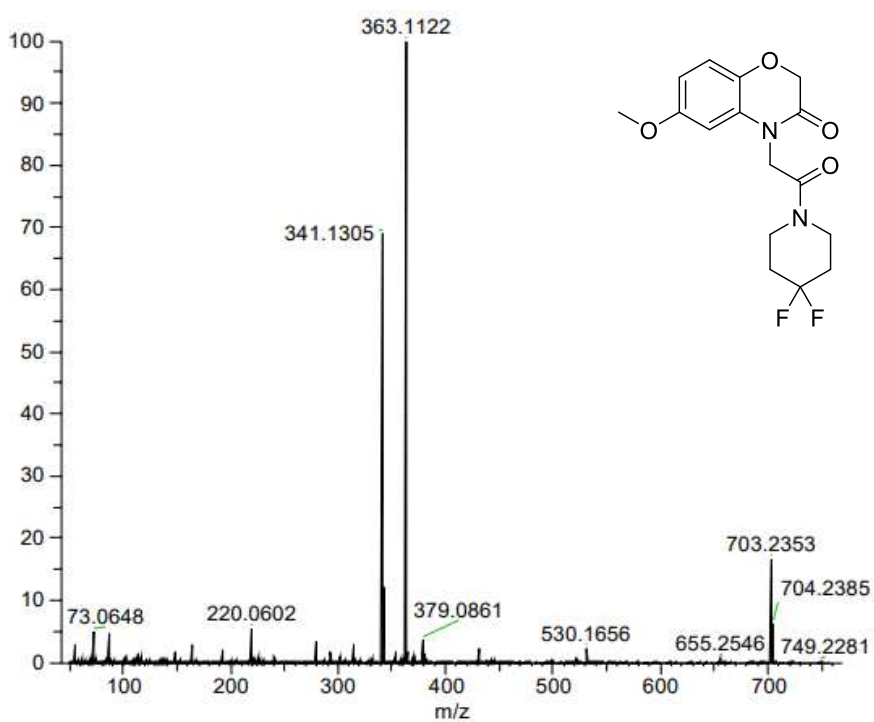
Espectro HRMS do composto **6a**Espectro HRMS do composto **6b**

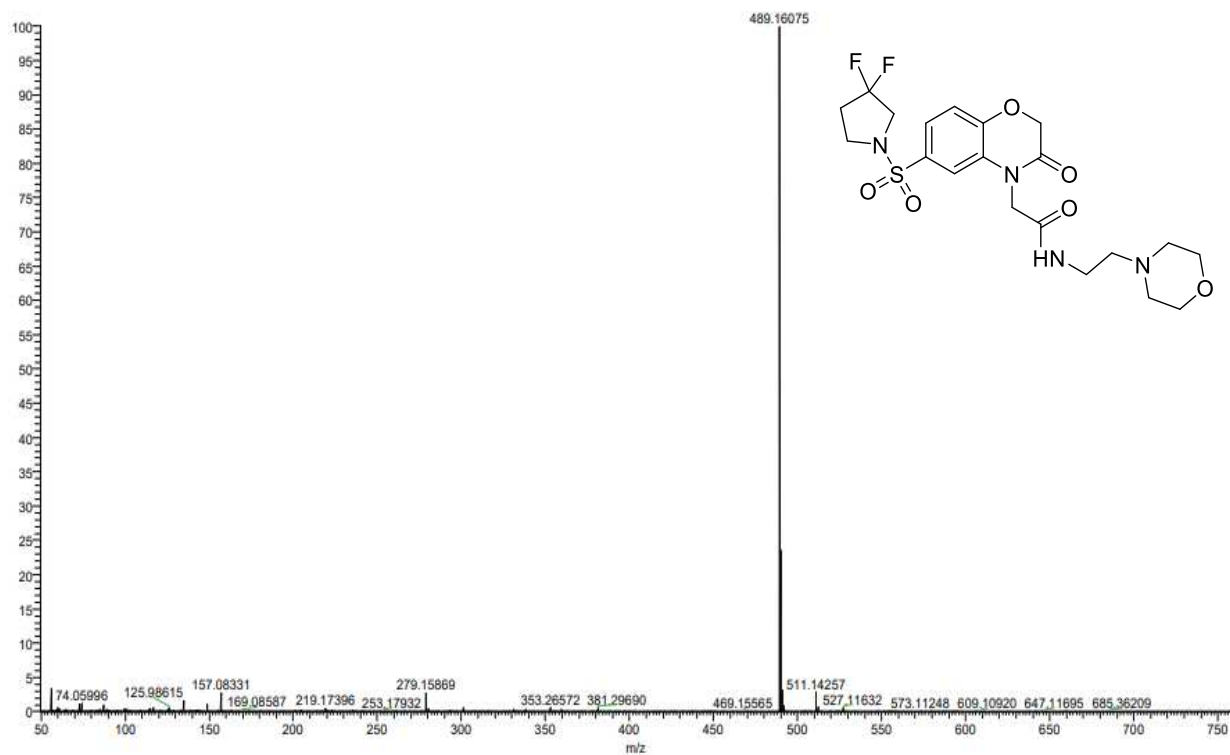
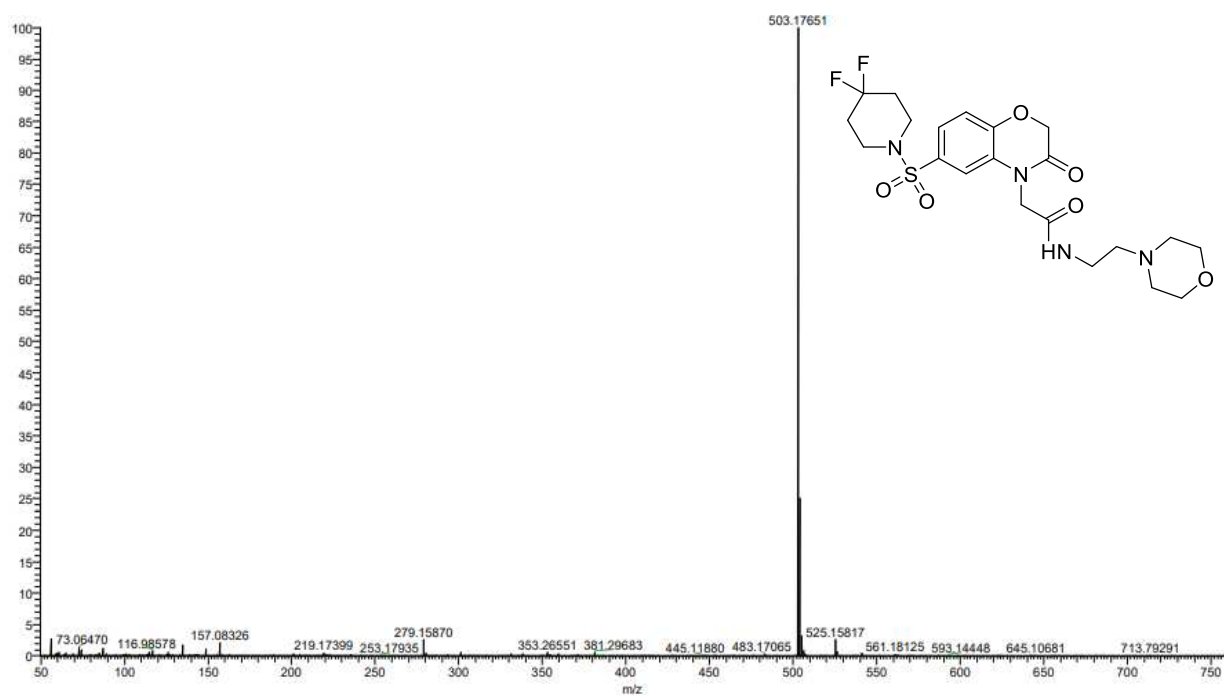
Espectro HRMS do composto **6c**Espectro HRMS do composto **6d**

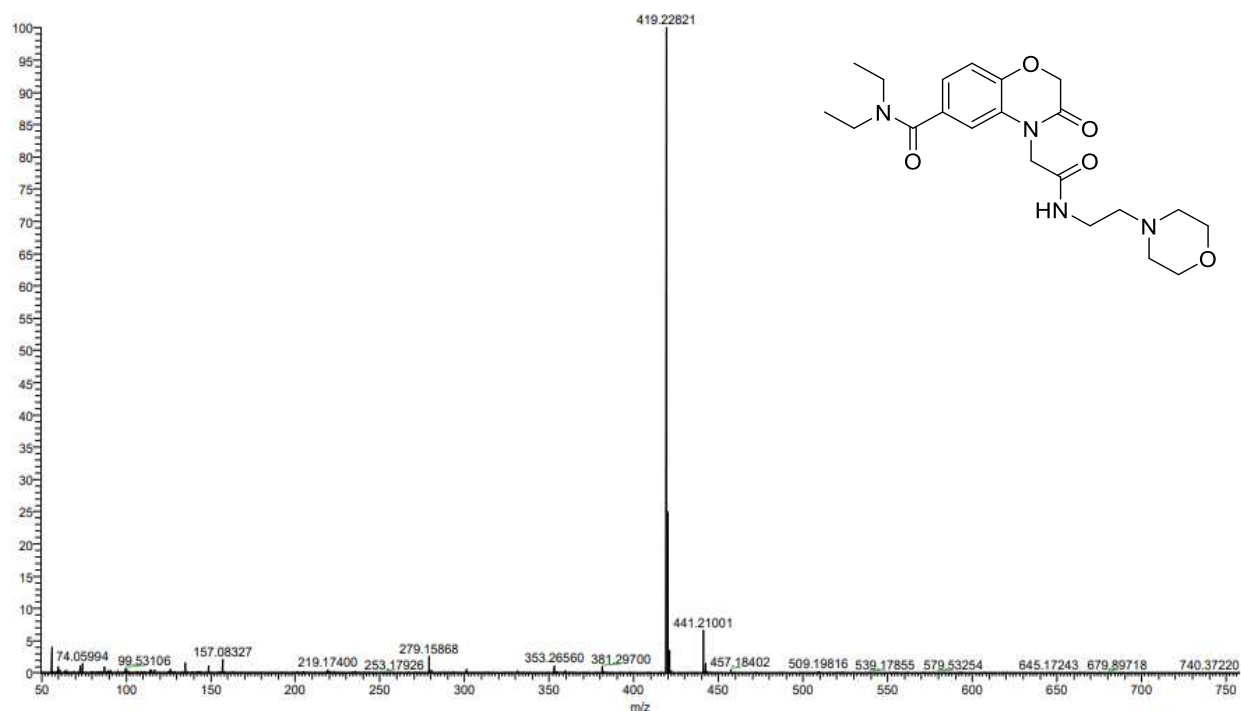
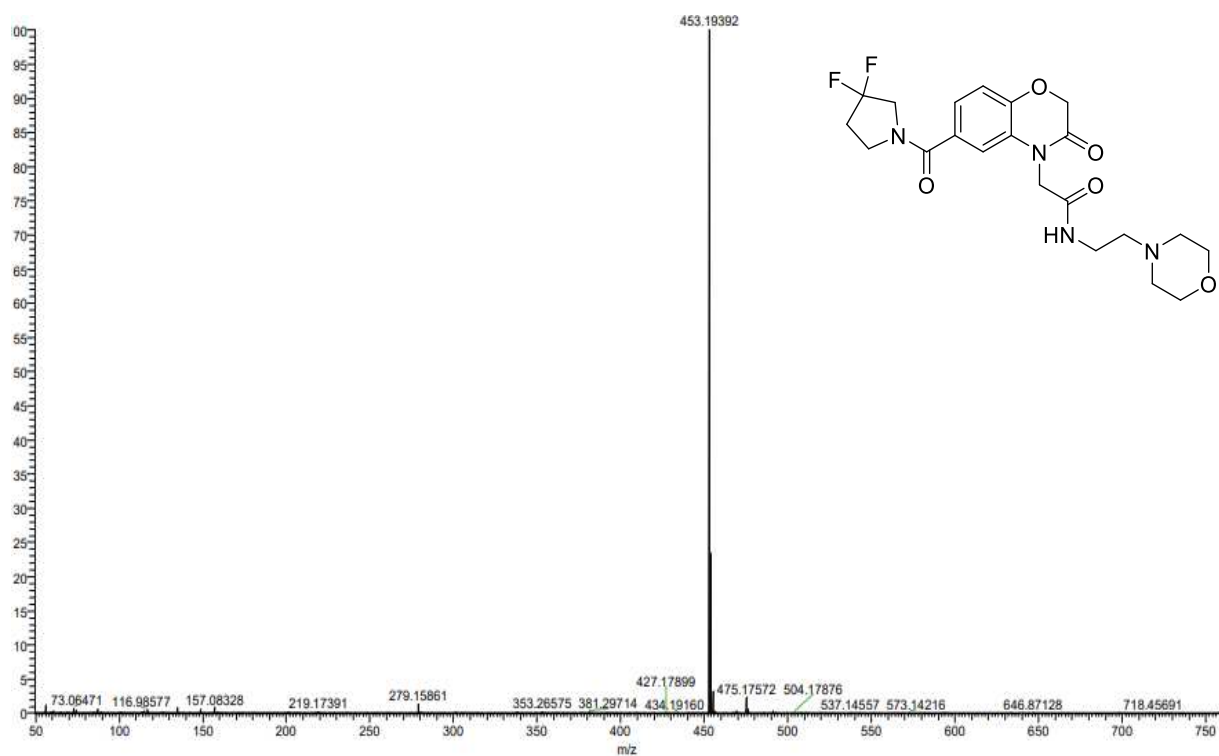
Espectro HRMS do composto **6e**Espectro HRMS do composto **6f**

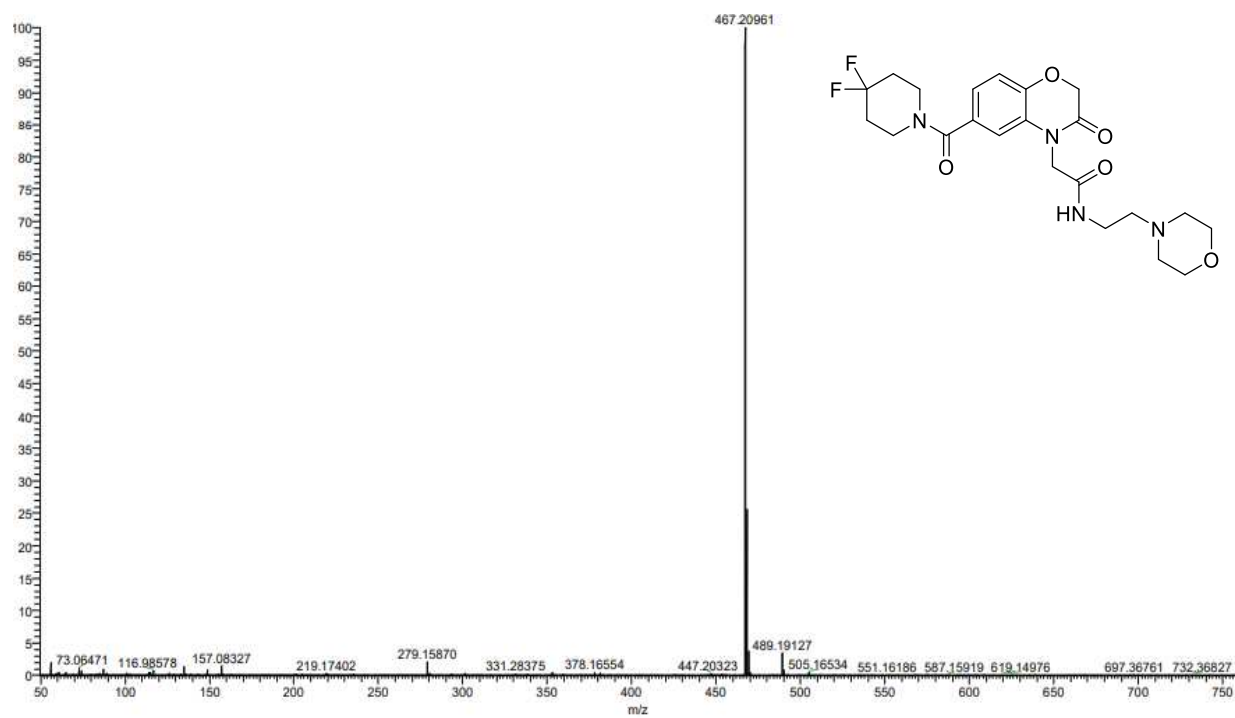
Espectro HRMS do composto **7a**Espectro HRMS do composto **7b**

Espectro HRMS do composto **7c**Espectro HRMS do composto **7d**

Espectro HRMS do composto **7e**Espectro HRMS do composto **7f**

Espectro HRMS do composto **8a**Espectro HRMS do composto **8b**

Espectro HRMS do composto **8c**Espectro HRMS do composto **8d**

Espectro HRMS do composto **8e**