

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E  
FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da  
Sustentabilidade

Michelle Fidelis Corrêa

Síntese e avaliação de 1-(2-(2,3-diidrobenzofuranil)metil)piperazinas  
potencialmente ligantes de receptores histaminérgicos H<sub>4</sub>

Diadema  
2015

Michelle Fidelis Corrêa

Síntese e avaliação de 1-(2-(2,3-diidrobenzofuranil)metil)piperazinas  
potencialmente ligantes de receptores histaminérgicos H<sub>4</sub>

Dissertação apresentada, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências, ao Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema

Orientador: Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes

Co-orientador: Profa. Dra. Daniela Gonçalves Rando

Diadema  
2015

Corrêa, Michelle Fidelis

**Síntese e avaliação de 1-(2-(2,3-diidrobenzofuranil)metil)piperazinas potencialmente ligantes de receptores histaminérgicos H<sub>4</sub>** / Michelle Fidelis

Corrêa. -- Diadema, 2015.

149 f.

Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Sustentabilidade) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2015.

Orientador: João Paulo dos Santos Fernandes

1. Ligantes H<sub>4</sub>R. 2. Síntese de compostos bioativos. 3. Iodociclicização. 4. SAR de ligantes H<sub>4</sub>. 5. Planejamento de fármacos. I. Título.

CDD 615.19

Michelle Fidelis Corrêa

Síntese e avaliação de 1-(2-(2,3-diidrobenzofuranil)metil)piperazinas  
potencialmente ligantes de receptores histaminérgicos H<sub>4</sub>

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. João Paulo dos Santos Fernandes  
orientador/presidente

Prof. Dr. Lanfranco Ranieri Paolo Tronconi  
1<sup>o</sup> examinador

Profa. Dra. Adriana Karla Amorim Reis  
2<sup>o</sup> examinador

Prof. Dr. Luiz Sidney Longo Junior  
3<sup>o</sup> examinador

Diadema, 04 de setembro de 2015.

---

*“Eu posso aprender a resistir  
À qualquer coisa menos à tentação  
Eu posso aprender a co-existir  
Com qualquer coisa menos com o medo  
Eu posso aprender a entrar em acordo  
Com tudo menos com meus desejos  
Eu posso aprender a conviver  
Com todas as coisas que eu não posso explicar  
Eu posso aprender a resistir  
À qualquer coisa menos à frustração  
Eu posso aprender a persistir  
Com qualquer coisa sem grandes objetivos  
Eu posso aprender a fechar meus olhos  
À qualquer coisa menos à injustiça  
Eu posso aprender a conviver  
Com todas as coisas que eu não conheço  
Você pode se render  
Sem uma oração  
Mas nunca pode realmente orar  
Sem uma rendição  
Você pode lutar  
Sem nunca vencer  
Mas você nunca vencerá  
Sem antes lutar”.*

*Rush  
Resist*

---

---

À minha pequena Lorena,  
motivo do meu viver.  
Te amo demais princesa!

À minha família, fonte  
inesgotável de compreensão,  
amor, força e companheirismo.

À minha avó Anna,  
exemplo de bondade e força.  
Inspiro-me na senhora!

---

## **AGRADECIMENTOS**

---

Aos meus pais, Nádía Fidelis e Claudio Corrêa, pela compreensão e incentivo durante toda essa jornada. Mãe, obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos sejam eles felizes ou diante obstáculos a serem superados. Sou uma pessoa privilegiada em ter você ao meu lado. Inspiro-me em você.

Ao meu irmão, Felipe Fidelis Corrêa, obrigada por também estar sempre ao meu lado. Sei que somos um tanto complexos em demonstrar sentimentos, mas estar por perto já basta para saber que posso contar com você. E saiba que a recíproca é a mesma. Tenho você como um exemplo de homem, marido, filho e acima de tudo irmão.

À Lorena Fidelis Paulino, por se tornar minha inspiração para que eu continuasse minha caminhada de cabeça erguida. Você ainda é muito pequena, mas no momento certo entenderá o quanto a sua vinda mudou minha vida e percepção do mundo. Indo atrás sem fraquejar porque você, minha pequena, merece todo o esforço. Te amo!

Muito obrigada ao meu tio, Celso Corrêa, pelos dias de questionamentos sobre assuntos diversos, mas sempre oportunos e abordados de maneira sábia me fazendo refletir. E obviamente, agradeço por sempre alegrar nossos dias. Nossa casa se alegrou e não sabemos mais viver sem a sua presença.

À Juliane Paulino, por ser essa amiga e cunhada que sei que posso contar em todos os momentos. Obrigada também por trazer ao mundo nossa pequena e confiar em mim para que ajude vocês à guia-lá. Conte comigo para o que precisar.

Agradeço à Fabiana Marques. Amora! Tantos anos de amizade. Passamos por muita coisa e continuamos passando, mas da melhor maneira possível que você me ensinou: rindo sempre! Principalmente das próprias dificuldades. Mesmo você longe sinto seu apoio independente do objetivo que eu queira alcançar. Saiba que também torço por ti perante qualquer loucura que pense em realizar. Tenho certeza que este trabalho foi mais um de seus 75%. Aprendi com você o que é amizade

---

---

sincera e verdadeira. Amo-te demais Amorzinha e agradeço todos os dias por sua amizade.

Às gordinhas, Cristiana Mazaia e Laísa Costa, pelos momentos divertidíssimos. Obrigada por me apoiarem e me escutarem durante os dois cursos. Espero que o trio das gordinhas continue firme durante muitos anos.

Aos amigos Mariana Santos e Paolo Pulcini, pela amizade e companheirismo de sempre. Obrigada pelas divertidas conversas em nossos “happy hours”.

Ao meu professor e orientador, Dr. João Paulo dos Santos Fernandes, pela parceria de sempre. Difícil escrever tudo que te agradeço, precisaria de palavras impecáveis e um texto enorme. Mas, melhor do que palavras são as atitudes e espero sinceramente que eu tenha conseguido mostrar o quanto te admiro e me orgulho de ter trabalhado todo esse tempo contigo, como membro de seu grupo de pesquisa. Aprendi demais sobre ser profissional e amigo. Agradeço por todo o conhecimento que tens me passado e por estar presente nos momentos mais importantes de minha carreira. Aliás, carreira esta que devo em grande parte ao seu apoio e confiança. Obrigada por não desistir de mim nos momentos de desânimo e indecisão. Trata-se de alguém que desejo muito sucesso e espero poder continuar ao seu lado em distintos projetos. Espelho-me em você. Devo-te muito! Estou aqui para o que precisar.

À professora Daniela Gonçalves Rando, orientadora do coração! Obrigada por ter aceitado tão prontamente em me orientar inicialmente. No dia que nos apresentaram já agradeço a Deus por ele ter colocado você para me ajudar nessa jornada. Agradeço-te por tudo que me ensinou e espero que continue ensinando. Levarei-te sempre em mente.

Ao professor Lanfranco Troncone, do Instituto Butantan, por ter me recebido de portas abertas em seu laboratório e ter me ensinado tanto. Este trabalho não teria sido completo sem a sua ajuda. Muito obrigada.

---

---

Muito obrigada aos meus amigos de bancada, Luis Otávio, Carina Rodrigues, Marina Varela e Cristina Kortstee. Vocês foram essenciais durante esse tempo, pela amizade e companheirismo.

Obrigada à amiga e aluna de iniciação científica Rie Sato, que desempenhou seu trabalho de maneira responsável e eficiente. Obrigada por toda a ajuda no projeto.

À Fernanda Andre, pela amizade e apoio durante todo o tempo, principalmente no início, onde seu amparo e carinho fizeram toda a diferença. Obrigada Fezinha! Que trilhe um caminho de sucesso!

À Cibele Venâncio, pela convivência divertidíssima. Tamptation! Você é única e continue com esse jeito maluco de ser. Sucesso para você também!

Ao Álefe Barbosa, pela companhia nos almoços e congressos, me fazendo rir das reflexões diversas. Obrigada também, pela companhia na bancada durante as sínteses e a ajuda para os artigos que estão por vir.

Ao Professor Dr. Mario José Politi, do Instituto de Química - USP, pelo auxílio na realização das análises.

Agradeço a todos os professores que de alguma forma fizeram parte da minha formação, com os ensinamentos e conselhos dados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento disponibilizado.

Por fim, obrigada a todos que eu possa não ter citado, mas que de alguma forma me auxiliaram, sejam familiares, amigos ou colegas de trabalho.

---



A histamina é um dos mais importantes mediadores químicos do organismo. Envolvida em numerosas condições fisiológicas e patológicas, seus efeitos são produzidos mediante a interação com receptores histaminérgicos acoplados à proteína G (GPCR). Até o momento foram descritos quatro receptores para histamina ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  e  $H_4$ ) que diferem quanto à localização e mecanismo de sinalização celular. Desde a sua descoberta, o receptor  $H_4$  ( $H_4R$ ), tem sido foco de muita atenção. É expresso principalmente em células de origem imunológica e hematopoiética, apresentando, portanto, forte relação com respostas inflamatórias e imunológicas, e conseqüentemente, com a fisiopatologia de distúrbios imuno-inflamatórios. Assim, o  $H_4R$  é considerado potencial alvo para o desenvolvimento de novas entidades químicas. Haja vista o potencial terapêutico dos ligantes  $H_4R$ , o objetivo deste trabalho foi sintetizar 1-(2-(2,3-diidrobenzofuranil)metil)piperazinas inéditas e avaliar sua atividade ligante no  $H_4R$ , bem como em  $H_3R$  para analisar a seletividade frente os dois receptores e obter compostos com o maior índice de seletividade  $H_4R$  possível. As moléculas foram obtidas utilizando reações de iodociclicização, gerando o 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano, seguida da substituição do halogênio pelas piperazinas *N*-substituídas, chegando aos compostos finais (LINS01001, LINS01003, LINS01004 e LINS01005). A atividade biológica foi realizada através do deslocamento da [ $^3H$ ]-histamina de  $H_3R$  e  $H_4R$  para se obter a constante de interação ( $K_i$ ) a partir dos valores de  $IC_{50}$ , empregando a equação de Cheng-Prussoff. Os resultados indicaram que os compostos apresentaram discreta afinidade para ambos receptores exibindo valores de  $K_i$  na faixa de micromolar. Entretanto, os compostos demonstraram seletividades distintas. O grupo fenil, presente em LINS01005, levou à boa interação, porém inespecífica entre os receptores ( $H_4R$   $K_i$  28  $\mu M$ ;  $H_3R$   $K_i$  17  $\mu M$ ) e grupos alquila conferiram maior seletividade  $H_3R$ , como observado com os compostos LINS01003 ( $H_3R$   $K_i$  25  $\mu M$ ) e LINS01004 ( $H_3R$   $K_i$  7  $\mu M$ ). Além disso, notou-se que a aromaticidade do núcleo central é importante para boa afinidade aos dois receptores, assim como a presença de um substituinte hidrofóbico ligado ao  $N^4$ -piperazínico, uma vez que a molécula não substituída LINS01001, obteve a mais baixa afinidade e os valores de  $K_i$  para ambos receptores não foram determinados. Os dados obtidos neste trabalho contribuem diretamente para o desenvolvimento de novos ligantes de  $H_4R$ . Pretende-se futuramente continuar com o planejamento e otimização estrutural dos compostos propostos para obtenção de maior afinidade e seletividade.

---

Histamine is one of the most important chemical mediators of the body. Involved in numerous physiological and pathological conditions, their effects are produced by interaction with histamine G-protein coupled receptors (GPCRs). So far it was described four histamine receptors ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  and  $H_4$ ) differing among them in cell signaling mechanisms. Since its discovery, the  $H_4$  receptor ( $H_4R$ ) has been the focus of much attention. It is expressed primarily in immune cells of hematopoietic origin and, therefore has strong relationship with inflammatory and immune responses, and consequently with the pathophysiology of immuno-inflammatory disorders. Thus, the  $H_4R$  is considered to be potential target for the development of new chemical entities. Considering the therapeutic potential of  $H_4R$  ligands, this work aimed to synthesize 1-(2-(2,3-dihydrobenzofuranyl)methyl)piperazines inedited and evaluate their binding activity in  $H_4R$  as well as  $H_3R$  to analyze the selectivity towards the two receptors and obtaining compounds with increased selectivity index to  $H_4R$ . Series of compounds were synthesized using iodocyclization reaction, yielding 2-(iodomethyl)-2,3-dihydrobenzofuran, followed by halogen substitution with *N*-substituted piperazines, reaching the final compounds (LINS01001, LINS01003, LINS01004 e LINS01005). The biological activity was performed by displacement of [ $^3H$ ]-histamine from  $H_3R$  and  $H_4R$  to obtain the binding constant ( $K_i$ ) from the  $IC_{50}$  values using the Cheng-Prussoff equation. The results indicated that the compounds had mild affinity for both receptors, exhibiting  $K_i$  values in the micromolar range. However, the compounds demonstrate different selectivity. The phenyl group, present in LINS01005, took good interaction, but non specific between the receptors ( $H_4R$   $K_i$  28  $\mu M$ ;  $H_3R$   $K_i$  17  $\mu M$ ) and alkyl groups give more selective  $H_3R$ , as observed with compounds LINS01003 ( $H_3R$   $K_i$  25  $\mu M$ ) e LINS01004 ( $H_3R$   $K_i$  7  $\mu M$ ). Moreover, it was noted that the aromaticity of the core is important for good affinity to both receptor as well as the presence of a hydrophobic substituent attached at the  $N^4$ -piperazine, since the molecule unsubstituted LINS01001, had the lowest affinity and  $K_i$  values for both receptor have not been determined. The results obtained in this work contribute directly to the development of new  $H_4R$  ligands. It is intended to continue with future design and structural optimization of the proposed compounds to obtain higher affinity and selectivity.

---

## **LISTA DE ESQUEMAS**

---

<b>Esquema 1:</b> Rota sintética para obtenção dos compostos planejados.	71
<b>Esquema 2:</b> Síntese do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.	74
<b>Esquema 3:</b> Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina.	75
<b>Esquema 4:</b> Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)-4-metil-piperazina.	77
<b>Esquema 5:</b> Síntese da 1-alilpiperazina.	80
<b>Esquema 6:</b> Síntese da 1-alil-4-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina.	82
<b>Esquema 7:</b> Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)fenilpiperazina.	84
<b>Esquema 8:</b> Obtenção do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.	91
<b>Esquema 9:</b> Reações de competição durante a obtenção de 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.	94
<b>Esquema 10:</b> Formação do 2-metilbenzofurano.	95
<b>Esquema 11:</b> Síntese dos compostos propostos por substituição nucleofílica bimolecular.	97
<b>Esquema 12:</b> Estabilidade do grupo alila por ressonância.	101

---



<b>Figura 1:</b> Modelo estrutural da histamina.	26
<b>Figura 2:</b> Histamina nas formas de cátion mono e bivalente.	27
<b>Figura 3:</b> Metabolismo da Histamina. <i>I</i> -HD – <i>I</i> -histidina, HNMT - <i>N</i> -metil transferase, DAO - diamina oxidase, MAO - monoamina oxidase.	28
<b>Figura 4:</b> Modelo de um receptor histaminérgico. Adaptado com permissão de HOELZ <i>et al.</i> Direitos autorais 2013 Creative Commons.	29
<b>Figura 5:</b> Anti-histamínicos H <sub>1</sub> .	31
<b>Figura 6:</b> Modelo estrutural dos anti-histamínicos H <sub>1</sub> R e alguns ligantes.	32
<b>Figura 7:</b> Anti-histamínicos de segunda geração.	33
<b>Figura 8:</b> Planejamento dos antagonistas H <sub>2</sub> R.	35
<b>Figura 9:</b> Antagonistas do H <sub>2</sub> R.	35
<b>Figura 10:</b> Agonistas e antagonistas do H <sub>3</sub> R.	37
<b>Figura 11:</b> Antagonistas do H <sub>3</sub> R.	38
<b>Figura 12:</b> Ligantes do H <sub>3</sub> R.	39
<b>Figura 13:</b> Modelo farmacofórico para antagonistas do H <sub>3</sub> R (CERAS <i>et al.</i> , 2012).	39
<b>Figura 14:</b> Interação da histamina com aminoácidos Asp94 (3.32), Glu182 (5.46) e Thr323 (6.55) do H <sub>4</sub> R. Reproduzido com permissão de KISS <i>et al.</i> Direitos autorais 2008 Elsevier Ltd.	42
<b>Figura 15:</b> Ligantes do H <sub>4</sub> R.	45
<b>Figura 16:</b> Modo de interação do composto <b>4</b> (átomos em roxo) no H <sub>3</sub> R (A) e H <sub>4</sub> R (B) e do composto <b>5</b> (átomos em laranja) no H <sub>3</sub> R (C) e H <sub>4</sub> R (D). Reproduzido com permissão de WIJTMANS <i>et al.</i> Direitos autorais 2011 American Chemical Society.	46
<b>Figura 17:</b> Antagonistas não-imidazólicos do H <sub>4</sub> R.	47
<b>Figura 18:</b> REA das indolcarboxamidas. Adaptado com permissão de ENGELHARDT <i>et al.</i> Direitos autorais 2012 Elsevier Ltd.	48
<b>Figura 19:</b> Análogos das indolpiperazino-carboxamidas.	49
<b>Figura 20:</b> Outros ligantes do H <sub>4</sub> R.	50
<b>Figura 21:</b> Sobreposição dos compostos JNJ-7777120 ( <b>6</b> ) e <b>14</b> . Reproduzido com permissão de SAVALL <i>et al.</i> Direitos autorais 2011 Elsevier Ltd.	50
<b>Figura 22:</b> Ligantes histaminérgicos H <sub>4</sub> que seguiram para pesquisa clínica.	51
<b>Figura 23:</b> Morfina e outros alcaloides isolados do ópio.	54
<b>Figura 24:</b> Bloqueadores dos receptores nicotínicos.	54
<b>Figura 25:</b> Desenvolvimento dos benzodiazepínicos	55
<b>Figura 26:</b> Descoberta da clorpromazina a partir da prometazina.	56
<b>Figura 27:</b> Obtenção da hicantona a partir da lucantona.	57
<b>Figura 28:</b> Obtenção da mefloquina pelo processo de simplificação molecular.	59
<b>Figura 29:</b> Obtenção do zomepiraco pelo processo de simplificação molecular.	59
<b>Figura 30:</b> Regra do hidreto de Grimm (BARREIRO; FRAGA, 2008).	60
<b>Figura 31:</b> Desenvolvimento de novos antagonistas H <sub>2</sub> pelo processo de bioisosterismo.	61

---

---

<b>Figura 32:</b> Derivado bis-acridínico desenvolvido para o tratamento da malária.	62
<b>Figura 33:</b> Planejamento do composto WEB-2170 a partir do WEB-2086.	63
<b>Figura 34:</b> Compostos ligantes H <sub>4</sub> R reportados em literatura e os planejados.	65
<b>Figura 35:</b> Características consideradas para o planejamento dos compostos.	66
<b>Figura 36:</b> 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.	91
<b>Figura 37:</b> Fechamento de anel de modo <i>endo</i> e <i>exo</i> .	92
<b>Figura 38:</b> 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina.	97
<b>Figura 39:</b> 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)-4-metil-piperazina.	99
<b>Figura 40:</b> 1- alilpiperazina.	101
<b>Figura 41:</b> 1-alil-4-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina.	104
<b>Figura 42:</b> 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)fenilpiperazina.	105
<b>Figura 43:</b> Curva de saturação de [ <sup>3</sup> H]-histamina no H <sub>4</sub> R.	107
<b>Figura 44:</b> Curva de saturação de [ <sup>3</sup> H]-histamina no H <sub>3</sub> R.	107
<b>Figura 45:</b> Compostos sintetizados avaliados neste trabalho.	107
<b>Figura 46:</b> Ensaio de competição no H <sub>4</sub> R.	108
<b>Figura 47:</b> Ensaio de competição no H <sub>3</sub> R.	108
<b>Figura 48:</b> Possíveis interações com H <sub>4</sub> R.	112

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1:</b> Condições utilizadas para a síntese do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.	74
<b>Tabela 2:</b> Condições utilizadas para a síntese do <b>LINS01001</b> pelo procedimento 2.	77
<b>Tabela 3:</b> Condições utilizadas para a síntese do <b>LINS01003</b> pelo procedimento 2.	78
<b>Tabela 4:</b> Condições utilizadas para a síntese do <b>LINS01003</b> pelo procedimento 3.	79
<b>Tabela 5:</b> Condições utilizadas para a síntese do <b>LINS01003</b> pelo procedimento 4.	79
<b>Tabela 6:</b> Condições utilizadas para a síntese da 1-alilpiperazina pelo procedimento 1.	81
<b>Tabela 7:</b> Condições utilizadas para a síntese da 1-alilpiperazina pelo procedimento 2.	82
<b>Tabela 8:</b> Condições utilizadas para a síntese do <b>LINS01004</b> pelo procedimento 2.	83
<b>Tabela 9:</b> Condições utilizadas para o ensaio de saturação no H <sub>4</sub> R.	86
<b>Tabela 10:</b> Condições utilizadas para o ensaio de competição no H <sub>4</sub> R.	87
<b>Tabela 11:</b> Condições utilizadas para o ensaio de saturação no H <sub>3</sub> R.	88
<b>Tabela 12:</b> Condições utilizadas para o ensaio de competição no H <sub>3</sub> R.	90
<b>Tabela 13:</b> Regras de Baldwin para fechamento de anel.	92
<b>Tabela 14:</b> Rendimentos obtidos na síntese de 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.	93
<b>Tabela 15:</b> Rendimentos obtidos na síntese da 1-alilpiperazina pelo procedimento 1.	102
<b>Tabela 16:</b> Condições reacionais e rendimentos obtidos na síntese da 1-alilpiperazina.	104
<b>Tabela 17:</b> Valores de IC <sub>50</sub> e K <sub>i</sub> dos ligantes e seus respectivos receptores.	108

---



---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>26</b>
2.1	Histamina	26
2.1.1	Biossíntese e metabolismo da histamina	27
2.1.2	Receptores histaminérgicos	29
2.2	Receptor histaminérgico H <sub>4</sub>	40
2.3	Ligantes H <sub>4</sub> R	43
2.4	Planejamento e desenvolvimento de fármacos	52
2.4.1	Descoberta de moléculas biologicamente ativas	53
2.4.1.1	Otimização de compostos	58
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA</b>	<b>65</b>
3.1	Objetivos	65
3.2	Justificativa	68
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>70</b>
4.1	Material	70
4.1.1	Reagentes e vidrarias	70
4.1.2	Equipamentos	70
4.2	Método	71
4.2.1	Planejamento sintético dos compostos	71
4.2.2	Identificação	72
4.2.3	Ensaio da atividade biológica	72
<b>5</b>	<b>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>74</b>
5.1	Síntese dos compostos planejados	74
5.1.1	Síntese do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano (19)	74
5.1.2	Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (LINS01001)	75
5.1.3	Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)-4-metil-piperazina (LINS01003)	77
5.1.4	Síntese da 1-alilpiperazina (20)	79
5.1.5	Síntese da 1-alil-4-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (LINS01004)	82
5.1.6	Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)fenilpiperazina (LINS01005)	84
5.2	Ensaio da atividade biológica ( <i>binding assay</i> )	85
5.2.1	Avaliação da afinidade por H <sub>4</sub> R	85
5.2.2	Avaliação da afinidade por H <sub>3</sub> R	88
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>91</b>
6.1	Síntese dos compostos planejados	91
6.1.1	Síntese do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano (19)	91
6.1.2	Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (LINS01001)	95
6.1.3	Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)-4-metil-piperazina (LINS01003)	99
6.1.4	Síntese da 1-alilpiperazina (20)	101
6.1.5	Síntese da 1-alil-4-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (LINS01004)	104
6.1.6	Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)fenilpiperazina (LINS01005)	105
6.2	Ensaio da atividade biológica ( <i>binding assay</i> )	106
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>115</b>
	<b>APÊNDICE</b>	<b>133</b>

---



A histamina é um mediador químico responsável por inúmeras funções no organismo. Encontrada em uma variedade de células (MINNEMAN, WECKER, 2006), está envolvida em processos como a inflamação, reações de hipersensibilidade, produção da secreção gástrica e diversas funções no sistema nervoso central (CAMELO-NUNES, 2006; ZIMMERMANN *et al.*, 2011) que incluem controle do sono, fome, processos cognitivos (PASSANI, BLANDINA, 2011) e liberação de outros neurotransmissores (DANDU *et al.*, 2011).

Os efeitos da histamina são exercidos mediante a interação com receptores transmembranares, nomeados receptores acoplados à proteína G (*G-protein coupled receptor*, GPCR) (LIM *et al.*, 2005). Atualmente, são conhecidos quatro subtipos de receptores histaminérgicos que foram descobertos e nomeados progressivamente de H<sub>1</sub> a H<sub>4</sub>. Estes diferem quanto à localização e mecanismo de sinalização celular e assim, exercem distintas respostas fisiológicas (AKDIS; SIMONS, 2006; PARSONS, GANELLIN, 2006).

O receptor H<sub>1</sub> (H<sub>1</sub>R) é o mais conhecido, pois está relacionado às respostas alérgicas e inflamatórias, sendo amplamente utilizado como alvo na prática clínica (PASTORINO, 2010). Já o receptor H<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>R) participa, primordialmente, da secreção de ácido gástrico, sendo explorado para o tratamento de úlceras gástricas e duodenais e doenças relacionadas com a hipersecreção gastrintestinal (BRUNTON *et al.*, 2010). O receptor H<sub>3</sub> (H<sub>3</sub>R) apresenta funções tanto autoreceptoras ao modular a liberação de histamina, como heteroreceptoras inibitórias ao regular a liberação de outros neurotransmissores (DANDU *et al.*, 2011). Clinicamente, ligantes H<sub>3</sub> poderão ser utilizados no tratamento de doenças como Alzheimer, depressão, esquizofrenia e distúrbios do sono (CELANIRE *et al.*, 2005).

Desde a sua descoberta o receptor histaminérgico H<sub>4</sub> (H<sub>4</sub>R) tem sido alvo de muita atenção. Expresso principalmente em células de origem hematopoiética, como mastócitos, eosinófilos, monócitos, basófilos, células dendríticas e linfócitos T (THURMOND, GELFAND, DUNFORD, 2008), apresenta importante papel nas respostas inflamatórias e imunológicas (SUWA *et al.*, 2011; YAMAURA *et al.*, 2013).

---

Assim, o uso de antagonistas ou agonistas inversos do receptor  $H_4$  é considerado alternativa promissora no tratamento de doenças como dermatite atópica, asma, rinite alérgica, dor e outras doenças inflamatórias crônicas (DIC) como doença inflamatória intestinal (ZAMPELI; TILIGADA, 2009; ANDALOUSSI *et al.*, 2013; LAZEWSKA *et al.*, 2014).

Os receptores histaminérgicos são muito semelhantes estruturalmente, já que são todos GPCRs. Assim, possuem considerável homologia entre si (KISS *et al.*, 2008). A maior homologia foi observada entre receptores  $H_3$  e  $H_4$  (~39%) (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2010). Desta maneira, ligantes dos receptores  $H_3$  também possuem alta afinidade pelos receptores  $H_4$ , e vice-versa. Desta forma, grupos de pesquisa têm dedicado esforços para o desenvolvimento de fármacos que se liguem com maior seletividade ao receptor  $H_4$  tentando evitar os efeitos indesejáveis causados pela ligação com o receptor  $H_3$ .

Apesar das promissoras indicações, ainda não há fármacos ligantes dos receptores  $H_4$  disponíveis no mercado. No entanto, muitos compostos têm sido sintetizados e avaliados continuamente. Além disso, relações entre estrutura química e atividade biológica também são definidas para guiar o planejamento de novos ligantes (VENABLE *et al.*, 2005; ALTENBACH *et al.*, 2008; LANE *et al.*, 2012; SAVALL *et al.*, 2014; JARSKOG *et al.*, 2015).

Entre os antagonistas relatados na literatura as indolcarboxamidas são compostos com boa afinidade e seletividade pelos receptores  $H_4$ . Ao inibir a migração de mastócitos em camundongos, o antagonista JNJ-7777120 ( $K_i$  20 nM ( $H_4$ ) vs. 2000 nM ( $H_3$ )), foi utilizado como referência para estudos entre uma série de indolpiperazinas (TERZIOGLU *et al.*, 2004; GAO *et al.*, 2013; SANDER *et al.*, 2009), apresentando assim interessante atividade anti-inflamatória e potencial utilidade no tratamento da inflamação (TERZIOGLU *et al.*, 2004; THURMOND *et al.*, 2004). A partir destas, diversos grupos iniciaram pesquisas em torno de suas estruturas e muitos outros quimiotipos foram relatados, como 2-aminopirimidinas, quinazolininas, e quinoxalininas entre outros (CORRÊA; FERNANDES, 2015).

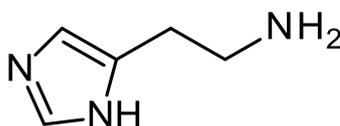
---

Diante as potenciais aplicações terapêuticas de ligantes do receptor  $H_4$  e baseando-se nas características químicas e das possíveis características farmacofóricas dos ligantes relatados na literatura, propõe-se neste trabalho a síntese e avaliação de compostos 1-(2-(2,3-diidrobenzofuranil)metil)piperazínicos como ligantes do receptor  $H_4$ . Utilizando os compostos planejados e suas constantes de interação ( $K_i$ ) obtidas, possíveis requisitos estruturais responsáveis pela afinidade e seletividade para  $H_4$  também são apresentados.

---

### 2.1 Histamina

A histamina (HA), ou 2-(4-imidazolil) etilamina (Figura 1), é uma das mais importantes aminas biogênicas mediadora de numerosas reações fisiológicas e patofisiológicas (JUTEL; AKDIS; AKDIS, 2009). Esta substância foi descoberta por Windaus e Vogt em 1907. Porém, foi em 1910 que seus efeitos biológicos foram conhecidos através de investigações realizadas por Laidlow e Daley (apud MONTES; FLORES; BARRÓN, 2005). Além de agir em grande número de músculos lisos, que incluem vasos, intestino, útero e brônquios (BRUNTON *et al.*, 2010), produz atividade na musculatura cardíaca estimulando sua contração. A histamina foi amplamente reconhecida como um mediador químico pela presença de reações anafiláticas e respiratórias em animais de laboratório após sua infusão (EMANUEL, 1999). Iniciaram-se então, investigações acerca de suas funções, bem como de substâncias que mimetizassem seus efeitos (RAMOS-JIMÉNEZ; GARDUÑO-TORRES; ARIAS-MONTAÑO, 2009).



**Figura1:** Modelo estrutural da histamina.

Apesar da histamina ser produzida e armazenada principalmente em mastócitos e outras células inflamatórias (BRUNTON *et al.*, 2010), também apresenta importantes funções moduladoras no sistema nervoso central (SNC). Os neurônios que contêm histamina podem participar do estado de vigília, controle da fome e consolidação da memória (PASSANI; BLANDINA, 2011), bem como na liberação de outros neurotransmissores (FENG; HOU; LI, 2013).

Trata-se de uma molécula hidrofílica de baixa massa molecular com um anel imidazólico e um grupo amina conectados por dois grupos metileno. Estruturalmente, a histamina pode estar em duas formas tautoméricas. Quando em pH fisiológico, o átomo de nitrogênio pertencente a amina primária encontra-se

protonado (Figura 2), e a histamina fica na forma de cátion monovalente (I), seu estado de ionização predominante. Já em meio mais ácido é amplamente encontrada na forma de cátion bivalente (II). Apesar das duas formas serem consideradas ativas, estudos sugerem que o monocátion é suficiente para a interação agonista com o receptor histaminérgico (NELSON, 2012).



**Figura 2:** Histamina nas formas de cátion mono e bivalente.

### 2.1.1 Biossíntese e metabolismo da histamina

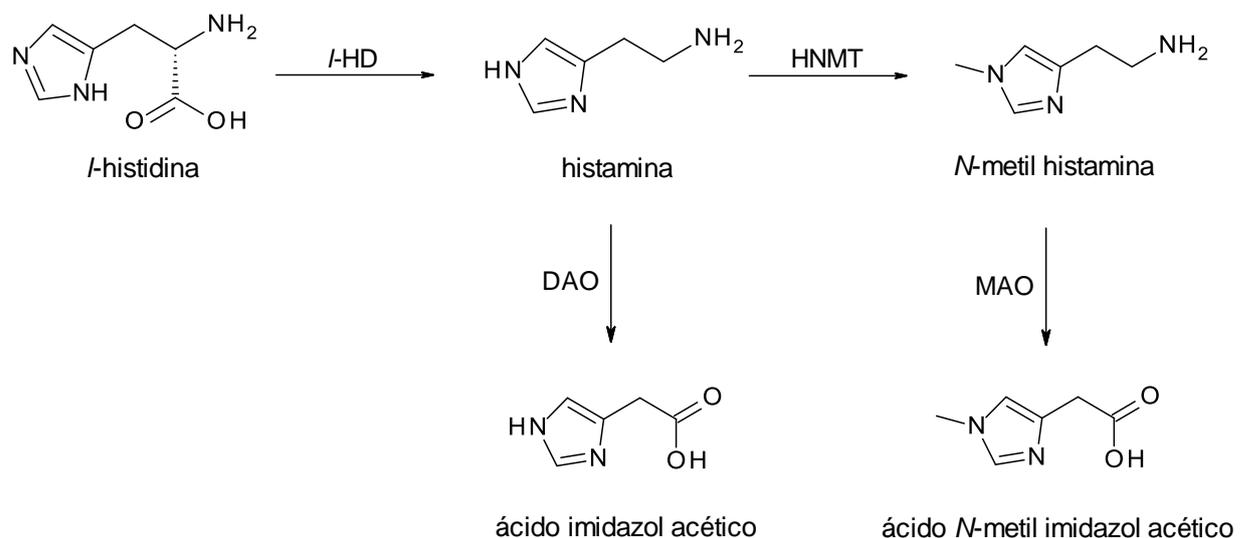
A biossíntese da histamina ocorre no meio intracelular através da descarboxilação do aminoácido *l*-histidina mediante a ação da enzima *l*-histidina descarboxilase (*l*-HD) (Figura 3) (AKDIS; BLASER, 2003). Sua produção é observada por todo o organismo em uma variedade de tipos de células que expressam esta enzima (MAINTZ; NOVAK, 2007). No SNC a histamina é proveniente de uma população restrita de neurônios histaminérgicos. Os corpos celulares se localizam exclusivamente no núcleo túbero-mamilar do hipotálamo (PASSANI, BLANDINA, 2011) e dão origem a uma vasta rede que se projeta por praticamente todo o SNC (LEURS; SMIT; TIMMERMAN, 1995). Periféricamente, pode ser sintetizada por mastócitos, linfócitos, plaquetas e células da mucosa gástrica (CRIADO *et al.*, 2010).

O armazenamento da histamina ocorre majoritariamente nos mastócitos e basófilos, que são os locais predominantes de reserva, sendo liberada sob estimulação (CAMELO-NUNES, 2006). A histamina armazenada nestas células desempenha um papel essencial no contexto de várias reações alérgicas e inflamatórias, particularmente na patogênese desses processos. Cronicamente, exerce efeitos sobre células inflamatórias ocasionando ativação celular e liberação de mediadores pró-inflamatórios (TILIGADA, 2012). No SNC, a histamina é

armazenada em vesículas nos terminais nervosos de neurônios histaminérgicos (RAMOS-JIMÉNEZ; GARDUÑO-TORRES; ARIAS-MONTAÑO, 2009).

Uma vez que a histamina é liberada, o controle de sua ação em várias áreas do organismo é de suma importância. Para isso, são necessários mecanismos que regulam sua concentração de forma rápida e eficaz. A cessação de seus efeitos em mamíferos deve-se, em grande parte, à biotransformação através de duas vias. Nelas, a histamina é rapidamente metabolizada por duas enzimas primordiais: histamina *N*-metiltransferase (HNMT) e diamina oxidase (DAO) (AKDIS; BLASER, 2003).

A histamina é catabolizada pela HNMT ou pela DAO (Figura 3) dependendo de sua localização. A HNMT catalisa uma reação de *N*-metilação, levando à formação de *N*-metilhistamina (CHEN *et al.*, 2003). Posteriormente, a *N*-metilhistamina é oxidada pela monoamina oxidase (MAO) ao ácido *N*-metilimidazolacético. Já a inativação pela DAO leva à formação do ácido imidazolacético (AKDIS; BLASER, 2003).

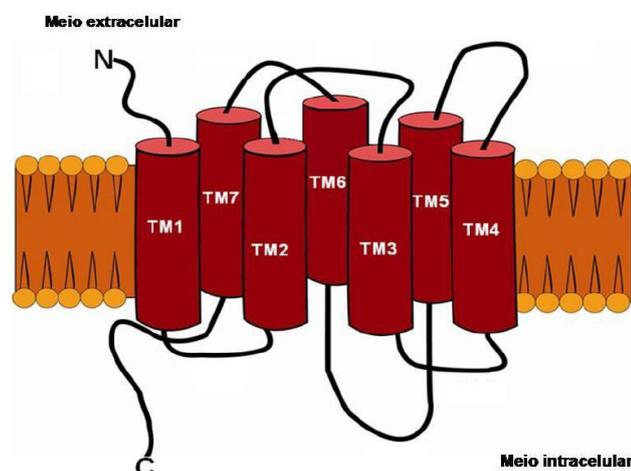


**Figura 3:** Metabolismo da Histamina. *l*-HD – *l*-histidina, HNMT - *N*-metil transferase, DAO - diamina oxidase, MAO - monoamina oxidase.

## 2.1.2 Receptores histaminérgicos

Os efeitos da histamina são produzidos mediante a interação com receptores acoplados à proteína G (KURAMASU *et al.*, 2011). Até o momento foram descritos quatro receptores para histamina ( $H_1R$ ,  $H_2R$ ,  $H_3R$  e  $H_4R$ ) que diferem quanto a localização e mecanismo de sinalização celular (PARSON; GANELLIN, 2006). A histamina apresenta diferentes afinidades pelos diferentes receptores, como pode ser observado pelos valores de  $pK_i$ :  $4,2 \pm 0,1$  para  $H_1R$ ;  $4,3 \pm 0,1$  para  $H_2R$ ;  $7,8 \pm 0,1$  para  $H_3R$  e  $8,1 \pm 0,1$  para  $H_4R$  (HUANG; THURMOND, 2008).

Apesar dos GPCRs (também conhecidos como receptores metabotrópicos) em geral exibirem diferentes tamanhos moleculares, a estrutura de todos os membros dessa classe é semelhante. São formados por uma região amino-terminal (*N*-terminal) no meio extracelular e uma região carbóxi-terminal (*C*-terminal) na face citoplasmática (FIDOM *et al.*, 2015) (Figura 4). Apresentam sete  $\alpha$ -hélices que atravessam a membrana plasmática, sendo denominados como receptores de sete domínios transmembranares (TM) e heterotriméricos por serem formados por três polipeptídios distintos,  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta) e  $\gamma$  (gama) (GHANEMI, 2013). As proteínas G podem ser classificadas e divididas em três famílias de acordo com a sinalização produzida:  $G_{\alpha_s}$ ,  $G_{\alpha_{i/o}}$ ,  $G_{\alpha_q}$ , (YAMAURA *et al.*, 2013). As proteínas  $G_s$  e  $G_i$  são responsáveis, respectivamente, pela estimulação e inibição da enzima adenilato ciclase. A isoforma  $G_q$  está envolvida com a ativação da fosfolipase C e a proteína  $G_o$  com a regulação de canais de cálcio (MOURA; VIDAL, 2011).



**Figura 4:** Modelo de um receptor histaminérgico. Adaptado com permissão de HOELZ *et al.* Direitos autorais 2013 Creative Commons.

---

Os GPCRs traduzem os sinais extracelulares para o ambiente celular interno levando a diversas respostas fisiológicas (HOELZ *et al.*, 2013). O H<sub>1</sub>R, relaciona-se principalmente com respostas alérgicas e inflamatórias, já o H<sub>2</sub>R participa primordialmente da secreção de ácido gástrico. O H<sub>3</sub>R interfere principalmente na liberação de neurotransmissores, enquanto o receptor H<sub>4</sub>R está envolvido nas funções reguladoras da histamina nas respostas imune e inflamatória (DANDU *et al.*, 2011).

- *Receptor H<sub>1</sub>*

O H<sub>1</sub>R foi o primeiro receptor histaminérgico a ser identificado (JUTEL; AKDIS; AKIDS, 2009) e é o mais conhecido na prática clínica por estar intimamente relacionado às respostas inflamatórias e às relações de hipersensibilidade (OKAMOTO *et al.*, 2009).

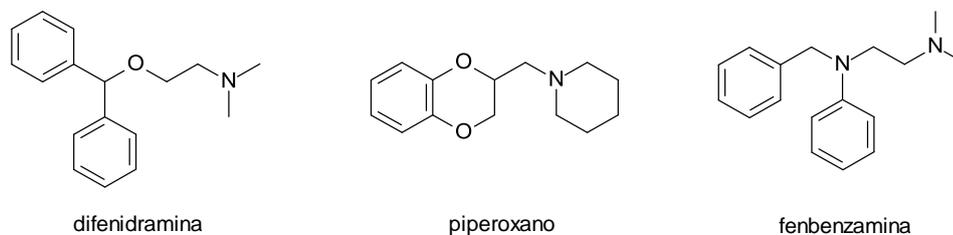
É amplamente distribuído no organismo. Os principais locais onde H<sub>1</sub>R é encontrado incluem músculo liso vascular, vias aéreas, hepatócitos, células epiteliais, neutrófilos, monócitos, linfócitos T e linfócitos B (DY; SCHNEIDER, 2004). É responsável por efeitos tais como prurido, rinorréia e broncoespasmo (O'MAHONY; MÜBECCEL; CEZMI, 2011), além de levar à contração da musculatura lisa intestinal (CRIADO *et al.*, 2010) e aumento da permeabilidade vascular (DY; SCHNEIDER, 2004). Sua expressão em células neurais pode ainda levar à efeitos centrais como aumento da ingestão de alimentos e água, e ao estado de vigília (O'MAHONY; MÜBECCEL; CEZMI, 2011).

Quando estimulado o H<sub>1</sub>R leva ao aumento do cálcio intracelular a partir da ativação da fosfolipase C (PLC) induzida pela proteína G<sub>q</sub> (HILL *et al.*, 1997). Os agonistas de H<sub>1</sub>R não são úteis terapêuticamente (STARK, 2007), no entanto os anti-histamínicos H<sub>1</sub>R existentes são largamente utilizados como antialérgicos (PARSONS, GANELLIN, 2006).

O primeiro anti-histamínico útil na prática clínica, a fenbenzamina (Figura 5), foi desenvolvido por Staub (1939), através do composto piperoxano, relatado inicialmente por Founeau e Bouvet em 1933. A descoberta da fenbenzamina,

---

juntamente com o posterior desenvolvimento da difenidramina (outro anti-histamínico útil terapêuticamente), aumentou o interesse para o desenvolvimento de anti-histamínicos  $H_1R$  e atualmente estão disponíveis na terapêutica diversos compostos (FERNANDES, 2012).



**Figura 5:** Anti-histamínicos  $H_1$ .

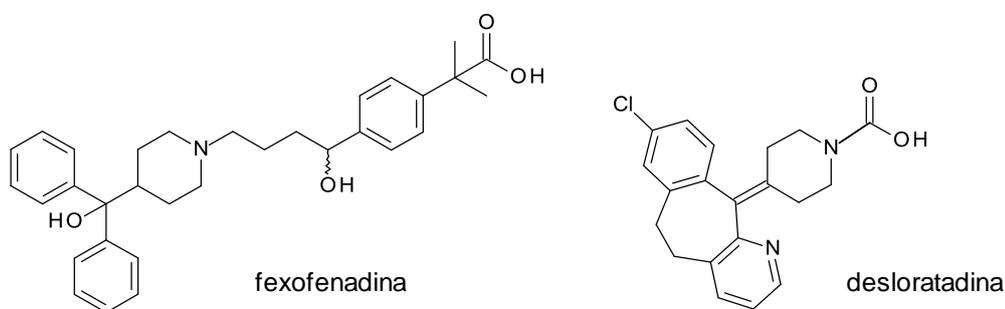
Os anti-histamínicos  $H_1R$  são divididos em 2 grupos, denominados primeira e segunda geração (BREIER, 2007). O que os diferem é o grau de efeitos colaterais, principalmente atividade sedativa, devido ao bloqueio destes receptores presentes no SNC. Como esses fármacos possuem também alta afinidade pelos receptores muscarínicos, podem levar a consideráveis efeitos anticolinérgicos, como xerostomia, cicloplegia, retenção urinária e constipação intestinal (SLATER; ZECHNICH; HAXBY, 1999).

Os anti-histamínicos de primeira geração podem ser divididos em classes químicas devido a distintas características estruturais e conseqüentemente farmacológicas. A primeira classe relatada é composta por derivados da etilenodiamina, que possui como exemplos a fenbenzamina, mepiramina e tripelenamina, sendo os efeitos sedativos comumente relacionados aos agentes desta série. Outras estruturas exploradas foram derivadas da etanolamina, que geraram como representantes a carbinoxamina, doxilamina e difenidramina. Este grupo, além da atividade sedativa, causa significativos efeitos anticolinérgicos devido à maior semelhança estrutural com fármacos anticolinérgicos como a atropina e proprantelina. Na tentativa de diminuir as ações anticolinérgicas e aumentar os efeitos anti-histamínicos, foram ainda desenvolvidas as alquilaminas, piperazinas, fenotiazinas e os dibenzocicloheptanos (NELSON, 2012). Entretanto, os efeitos indesejáveis anteriormente citados podem ainda ser verificados, principalmente o sedativo.



exemplos desta categoria citam-se a fexofenadina e desloratadina (Figura 7) (CAMELO-NUNES, 2006).

Durante muito tempo estes medicamentos foram relatados como antagonistas do H<sub>1</sub>R. Entretanto, estudos posteriores demonstraram que essa nomenclatura já não se enquadra tão adequadamente (BAKKER *et al.*, 2000). Inicialmente postulou-se que esses fármacos atuassem como antagonistas competitivos da histamina, no entanto é amplamente aceito que existem duas conformações do receptor, ativa (R\*) e inativa (R), que encontram-se em equilíbrio. De fato, GPCRs podem ter atividade constitutiva (*i.e.* independente de ligante), produzindo um efeito fisiológico basal. Assim, os anti-histamínicos H<sub>1</sub>R podem atuar de modo a suprimir a atividade intrínseca constitutiva do receptor livre (não ocupado), alterando o equilíbrio dos receptores que se encontravam ativados na ausência do fármaco (CAMELO-NUNES, 2006). Desta maneira, muitos destes fármacos atuam na verdade como agonistas inversos. A partir deste pressuposto, o termo “anti-histamínicos H<sub>1</sub>R” inclui fármacos com atividade agonista inversa e antagonista (STARK, 2007).



**Figura 7:** Anti-histamínicos de segunda geração.

- *Receptor H<sub>2</sub>*

O H<sub>2</sub>R, possui expressão mais restrita no organismo em comparação ao H<sub>1</sub>R, no entanto é encontrado em células do músculo liso, músculo cardíaco, endotélio, epitélio e hepatócitos. Estão envolvidos com efeitos como hipotensão, atividade cronotrópica e inotrópica e broncodilatação (PASTORINO, 2010). São também expressos em células do sistema imune inato, fundamentais na defesa do

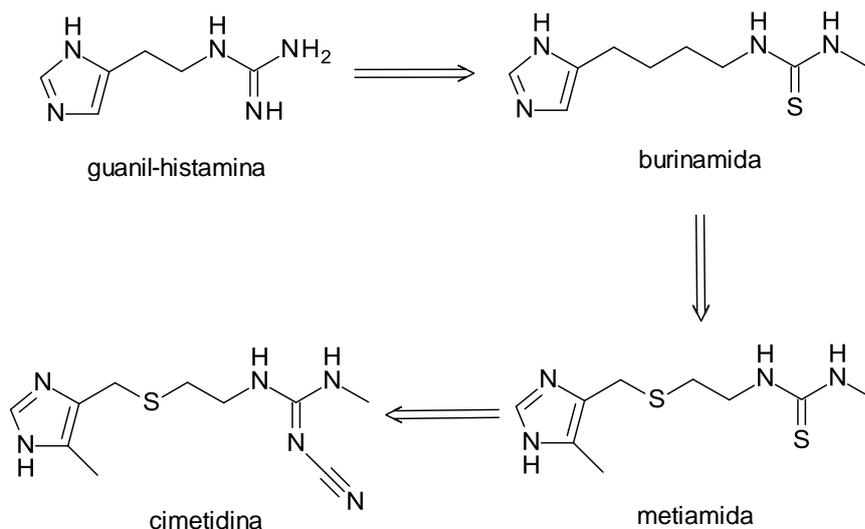
---

hospedeiro contra microrganismos. A histamina, ao atuar em H<sub>2</sub>R, inibe as funções efectoras de neutrófilos e eosinófilos (REHER *et al.*, 2012).

Acoplado á proteína G<sub>s</sub> (estimulatória), o H<sub>2</sub>R produz como principal sinalizador celular o AMP<sub>c</sub> (monofosfato cíclico de adenosina) através da ativação da adenilato ciclase (AC) (THURMOND, GELFAND, DUNFORD, 2008). No entanto, sinalização através da proteína G<sub>q</sub> com consequente ativação da fosfolipase C (PLC) e aumento de cálcio intracelular também é observada (WERNER; NEUMANN; SEIFERT, 2014). O H<sub>2</sub>R possui papel primordial na modulação da secreção gástrica (PARSONS, GANELLIN, 2006) e desta forma, é amplamente explorado para o tratamento de úlceras gástricas e duodenais e doenças relacionadas com a hipersecreção gastrintestinal, sendo os antagonistas H<sub>2</sub>R de grande utilidade na prática clínica (BRUNTON *et al.*, 2010).

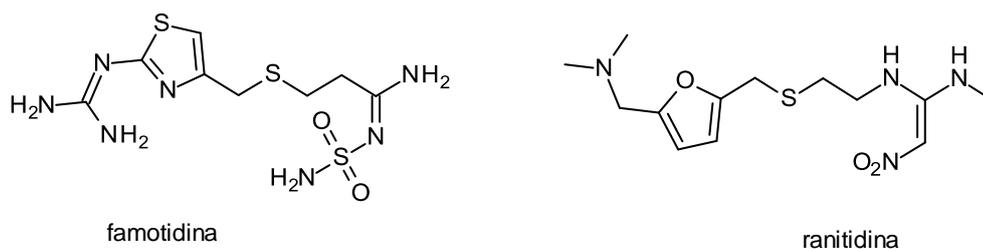
A descoberta de uma classe de fármacos com atividade antagonista em H<sub>2</sub>Rs revolucionou o tratamento para úlceras pépticas. As pesquisas iniciaram-se com análogos sintéticos da histamina. A partir da adição do grupo guanidila na cadeia etilênica, um derivado (guanidil-histamina) apresentou atividade antagonista, entretanto insuficiente. Visando distanciar-se da semelhança estrutural do agonista natural para obtenção de compostos mais ativos, modificações na distância entre o sítio ionizável terminal e o anel imidazólico e a troca do nitrogênio do grupo guanidila por enxofre deu origem a burinamida (WERMUTH, 2008; PATRICK, 2009), um composto mais potente, mas com farmacocinética insatisfatória (PARSONS; GANELLIN, 2006). Posteriormente, com a introdução de grupos alquila no anel imidazólico e do átomo de enxofre na cadeia lateral, obteve-se o derivado metiamida, 10 vezes mais potente que a burinamida. Entretanto, pode causar severos efeitos adversos, como agranulocitose e nefrotoxicidade, limitando seu uso clínico. A posterior adição do grupo ciano (ou nitro) na guanidila, levou ao aumento da atividade antagonista do H<sub>2</sub>R. Assim, atividade superior foi atribuída aos análogos seguintes que apresentaram grupos com características retiradoras de elétrons mais fortes. Por fim, a reintrodução da cianoguanidina terminal originou a cimetidina (Figura 8), primeiro fármaco introduzido na prática clínica e que se mostrou eficaz e ativo por via oral (WERMUTH, 2008; PATRICK, 2009).

---



**Figura 8:** Planejamento dos antagonistas  $H_2R$ .

A partir da cimetidina outros antagonistas  $H_2R$  foram desenvolvidos como a ranitidina e famotidina (Figura 9) (BARREIRO, 2002). A principal vantagem destes fármacos é o menor número de interações medicamentosas em relação a cimetidina, pela troca do anel imidazólico por outros anéis isósteros. Compostos imidazólicos podem interagir com enzimas do citocromo  $P_{450}$  ( $CYP_{450}$ ) envolvidas na biotransformação de várias substâncias e causar efeitos colaterais indesejáveis (ZHANG *et al.*, 2005).



**Figura 9:** Antagonistas do  $H_2R$ .

- *Receptor  $H_3$*

O  $H_3R$  é um receptor exclusivamente pré-sináptico predominantemente expresso no SNC (ZHANG *et al.*, 2005). Entretanto, pode também ser localizado em terminações nervosas periféricas do trato gastrointestinal e do coração (RAMOS-JIMÉNEZ; GARDUÑO-TORRES; ARIAS-MONTAÑO, 2009). Tem função tanto como um autoreceptor, modulando a liberação de histamina, como um heteroreceptor

---

inibitório, regulando a liberação de outros neurotransmissores (TILIGADA *et al.*, 2009), como a acetilcolina, norepinefrina, dopamina e serotonina (DANDU *et al.*, 2011). Uma vez que o H<sub>3</sub>R está envolvido com a capacidade de afetar vários sistemas de neurotransmissores, nota-se a importância da relação entre a sua modulação e o tratamento de diversas alterações do SNC (CHATTERJEE, 2015).

São receptores que possuem grande complexidade estrutural apresentando várias isoformas (BAKKER, 2004) que podem apresentar diferentes mecanismos e responder de maneiras distintas, implicando diretamente no processo de desenvolvimento de ligantes (HANCOCK, 2006). Entretanto, as isoformas mais comuns são *hH<sub>3</sub>R<sub>445</sub>* e *hH<sub>3</sub>R<sub>365</sub>* (TILIGADA *et al.*, 2009).

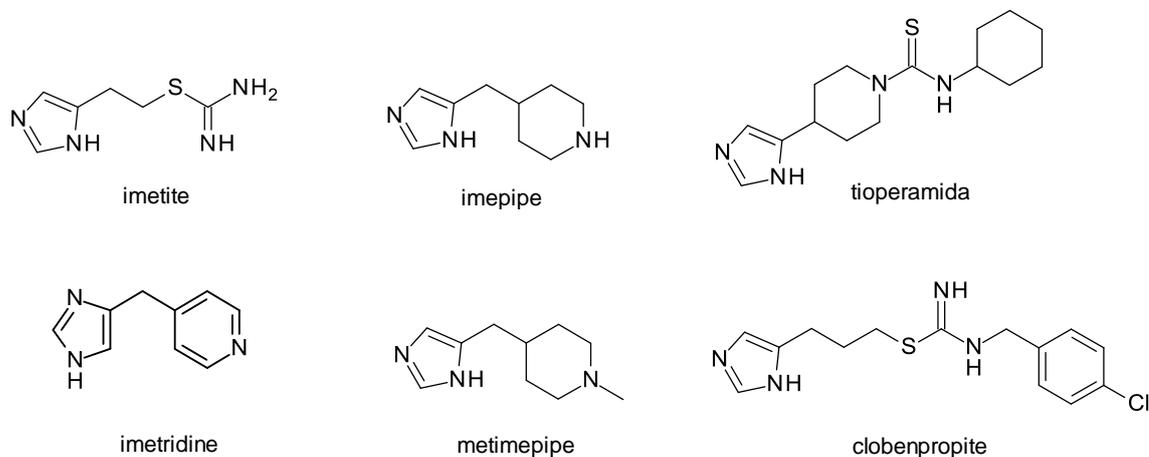
O principal mecanismo de sinalização do H<sub>3</sub>R está relacionado com a inibição da adenilato ciclase através da proteína G<sub>io</sub>. A interação com a proteína G<sub>io</sub> leva à regulação negativa da adenilato ciclase seguida da diminuição do AMPc intracelular (ODA *et al.*, 2000; BUCKLAND; WILLIAMS; CONROY, 2003) e aumento da mobilização de cálcio intracelular (THURMOND; GELFAND; DUNFORD, 2008).

Os ligantes do H<sub>3</sub>R poderão clinicamente ser utilizados no tratamento de distúrbios como sono, vigília, processos cognitivos e memória. Este receptor tem também, demonstrado um papel regulador no consumo alimentar, e seus antagonistas, tem potencial atividade anorexígena (CELANIRE *et al.*, 2005), além de utilidade no tratamento de doenças como doença de Alzheimer, hiperatividade, déficit de atenção e esquizofrenia (LEURS *et al.*, 2005). O H<sub>3</sub>R apresenta também relação na liberação (inibição) de citocinas por mastócitos e macrófagos alveolares (RAMOS-JIMÉNEZ; GARDUÑO-TORRES; ARIAS-MONTAÑO, 2009), indicando sua contribuição em processos inflamatórios

Apesar de todas as indicações descritas e o tempo decorrido desde que o H<sub>3</sub>R foi identificado, ainda não há fármacos disponíveis na terapêutica. Em contrapartida, muitos ligantes são descritos (MIKÓ *et al.*, 2004; CELANIRE *et al.*, 2005; LABEEUW *et al.*, 2010). Alguns compostos como imetite e imepipe (Figura 10) mostraram atividade agonista de H<sub>3</sub>R (LEURS *et al.*, 2005), porém após a descoberta do H<sub>4</sub>R tornou-se evidente a baixa seletividade destes pelo H<sub>3</sub>R.

---

Posteriormente, os compostos imetridine e metimepipe foram identificados como potentes agonistas H<sub>3</sub>R seletivos (CELANIRE *et al.*, 2005). Todavia, os antagonistas H<sub>3</sub>R parecem possuir maior utilidade clínica.



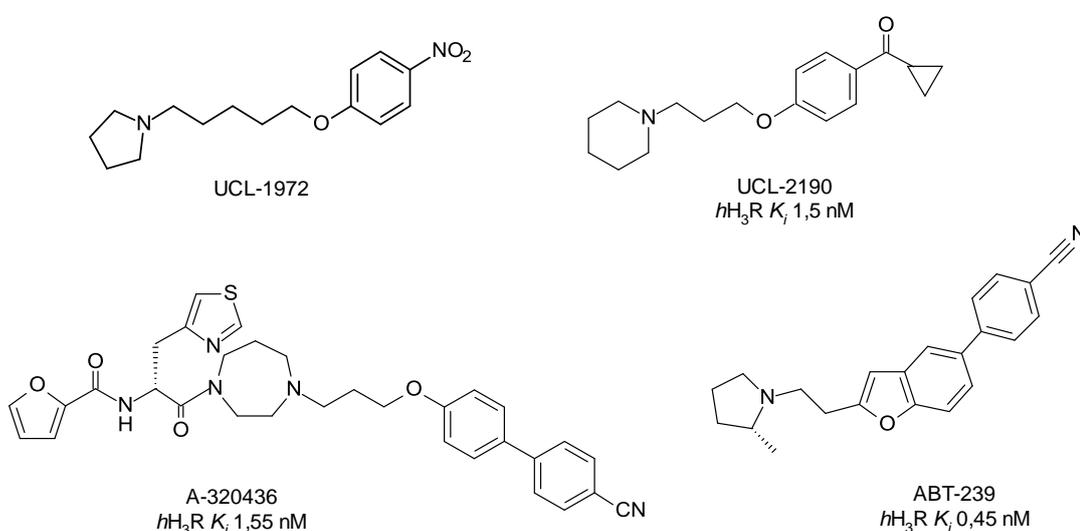
**Figura 10:** Agonistas e antagonistas do H<sub>3</sub>R.

O primeiro antagonista potente relatado para o H<sub>3</sub>R foi a tioperamida ( $K_i$  63 nM). No entanto, a adição de um grupo isotiouréia em sua cadeia lateral resultou em um novo fármaco com maior eficácia e seletividade, o clobenpropite ( $K_i$  0,4 nM) (CELANIRE *et al.*, 2005; RAMOS-JIMÉNEZ; GARDUÑO-TORRES; ARIAS-MONTAÑO, 2009). Em contrapartida, a tioperamida e o clobenpropite demonstraram baixa penetração pela barreira hematoencefálica (MEDHURST *et al.*, 2007). Ademais, como pode ser observado em suas estruturas (Figura 10), estes mantêm o anel imidazólico da histamina. Como o anel imidazólico está envolvido com interações com enzimas do citocromo P<sub>450</sub>, como mencionado anteriormente, foram considerados inadequados como agentes terapêuticos e o planejamento de ligantes não-imidazólicos tem sido amplamente explorado (ESBENSHADE *et al.*, 2004; RIVARA *et al.*, 2006).

A fenoxialquilamina nomeada como UCL-1972 (Figura 11), desenvolvida por Ganellin *et al.* em 1998, foi o primeiro antagonista não-imidazólico enunciado para H<sub>3</sub>R (ASLANIAN *et al.*, 2008; SADEK, 2011). Após novos estudos, a substituição da região imidazólica por outras aminas cíclicas levou a descoberta de um potente ligante, o UCL-2190, com  $K_i$  de 1,5 nM (H<sub>3</sub>R) (MIKÓ *et al.*, 2004). Substituições do núcleo central foram também aplicadas com sucesso. A introdução de um grupo arila conduziu à descoberta de um potente antagonista (A-320436) com  $K_i$  de 1,55

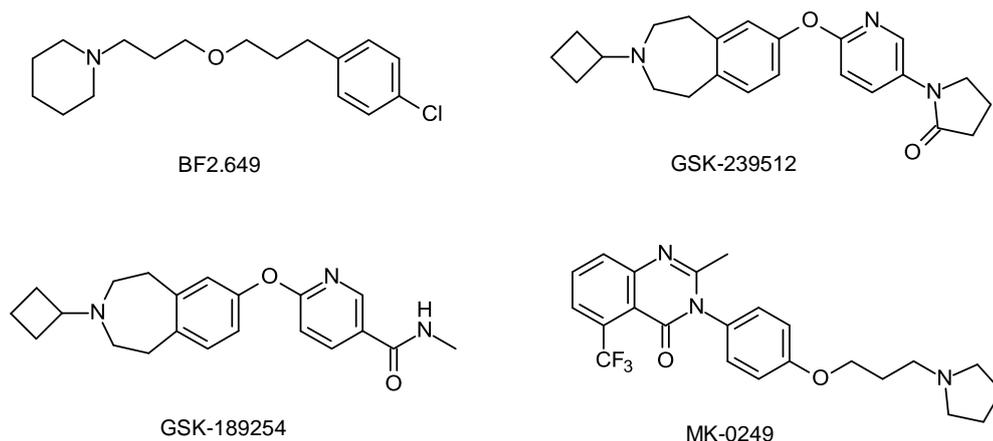
nM ( $H_3R$ ). Entretanto, anéis bicíclicos como benzotiazol, naftil, benzofurano (CELANIRE *et al.*, 2005), indol e benzotiofeno são também relatados (SANTILLAN *et al.*, 2010).

O ABT-239 apresentou  $K_i$  de 0,45 nM ( $H_3R$ ) e eficácia pré-clínica em modelos de esquizofrenia em animais (CELANIRE *et al.*, 2005; SANTILLAN *et al.*, 2010). Entretanto, os testes em humanos foram descontinuados após demonstrar perigoso efeito colateral cardiogênico (ESBENSHADE *et al.*, 2005).



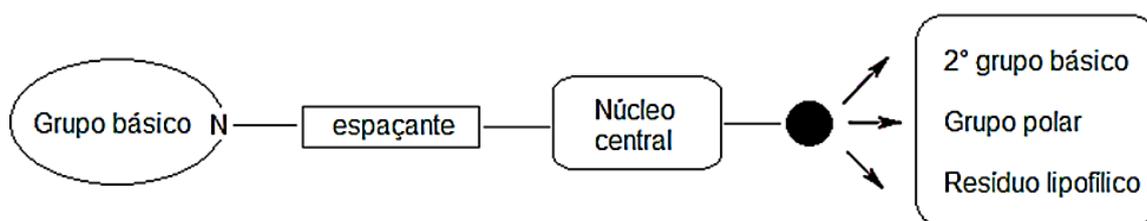
**Figura 11:** Antagonistas do  $H_3R$ .

Outros ligantes foram descritos e com variadas potencialidades. O BF2.649 foi avaliado para o tratamento de sonolência diurna excessiva, narcolepsia e doença de Parkinson, enquanto o GSK-189254 apresentou eficácia para doença de Alzheimer e narcolepsia (LABEEUW *et al.*, 2011). Já o MK-0249 foi desenvolvido para distúrbios de déficit de atenção, doença de Alzheimer e esquizofrenia (BECKNELL *et al.*, 2011). Recentemente, um candidato à fármaco denominado GSK-239512 (Figura 12) foi indicado para fase II da pesquisa clínica para o tratamento da disfunção cognitiva em indivíduos com esquizofrenia (JARSKOG *et al.*, 2015).



**Figura 12:** Ligantes do H<sub>3</sub>R.

É proposto que o modelo farmacofórico tradicional para os antagonistas dos H<sub>3</sub>Rs (Figura 13) constitui-se numa amina básica (geralmente terciária), acoplado a um núcleo central que contém um grupo polar e um resíduo lipofílico, através de um ligante linear ou estruturalmente protegido (CELANIRE *et al.*, 2005). Além disso, acredita-se que a introdução de um segundo grupo amina aumenta a afinidade por H<sub>3</sub>R, pois esta forma uma ponte salina com Glu191 na TM3 do receptor, explicando assim a maior afinidade de ligantes básicos por H<sub>3</sub>R em comparação com os não-básicos (LABEEUW *et al.*, 2011). Entretanto, uma ampla diversidade estrutural nesta região da molécula é aceita (CERAS *et al.*, 2012).



**Figura 13:** Modelo farmacofórico para antagonistas do H<sub>3</sub>R (CERAS *et al.*, 2012).

- *Receptor H<sub>4</sub>*

O H<sub>4</sub>R tem sido foco de grande interesse da comunidade científica. Expresso em células de origem hematopoiética, demonstrou interessante aplicação em processos imunes e inflamatórios e tornou-se um alvo potencial para o desenvolvimento de novas entidades químicas (NCE, *New Chemical Entities*) (GAO *et al.*, 2013).

---

Uma vez que a obtenção de novas moléculas bioativas com atividade em H<sub>4</sub>R trata-se de um ponto crucial da proposta deste trabalho, revisão sobre H<sub>4</sub>R, bem como sobre os ligantes H<sub>4</sub>R serão abordados nas seções seguintes.

## 2.2 Receptor histaminérgico H<sub>4</sub>

A existência do H<sub>4</sub>R foi proposta por Raible *et al.* (1994), através dos efeitos de ligantes H<sub>3</sub>R em eosinófilos. Resultados experimentais mostraram que a afinidade de antagonistas H<sub>3</sub>R pelos receptores dos eosinófilos foram semelhantes aos receptores presentes no SNC, sugerindo semelhança entre os receptores histaminérgicos dos dois locais. No entanto, ao utilizar agonistas H<sub>3</sub>R, as potências destes compostos foram significativamente distintas, indicando uma considerável diferença entre os H<sub>3</sub>R e esse novo receptor histaminérgico (expresso nos eosinófilos). Posteriormente, a clonagem do H<sub>4</sub>R humano (*hH<sub>4</sub>R*) foi relatada por diversos grupos entre os anos de 2000 e 2001 (ODA *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2001; NGUYEN *et al.*, 2001; MORSE *et al.*, 2001; ZHU *et al.*, 2001). Através da clonagem do H<sub>3</sub>R, identificaram uma particular sequência de aminoácidos e caracterizou-se como nova isoforma de receptor, nomeada H<sub>4</sub>R (LEURS *et al.*, 2009).

Como é principalmente expresso em células de origem hematopoiética, como mastócitos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas e linfócitos T, o H<sub>4</sub>R possui forte relação com o sistema imune. Podem ser ainda encontrados em menor quantidade no baço, timo, intestino delgado, cólon, coração e pulmão (AKDIS; SIMONS, 2006). Além disso, trabalhos recentes mostram que também são expressos no sistema nervoso central (CONNELLY *et al.*, 2009).

O H<sub>4</sub>R apresenta três isoformas, designadas como *hH<sub>4</sub>R<sub>67</sub>*, *hH<sub>4</sub>R<sub>302</sub>* e *hH<sub>4</sub>R<sub>390</sub>* (TILIGADA *et al.*, 2009). Acoplado à proteína G<sub>i/o</sub>, sugere-se possuir como via de sinalização o aumento do cálcio intracelular, através da inibição da adenilato ciclase e bloqueio na formação do AMPc (DE ESCH *et al.*, 2005). Porém, estudos demonstram que o *hH<sub>4</sub>R* produz efeitos sem transdução de sinais mediados dependente de proteína G, pelas vias da β-arrestina regulada por quinase extracelular (ERK) (SEIFERT *et al.*, 2011). Assim, atualmente o H<sub>4</sub>R é considerado

---

---

um receptor que produz resposta ligante-dependente em diferentes vias de transdução de sinal (CORRÊA; FERNANDES, 2015).

Os receptores histaminérgicos são bastante semelhantes estruturalmente, pois são todos pertencentes à mesma família de receptores. Desta forma, apresentam certa homologia entre si (KISS *et al.*, 2008). Em particular, há uma significativa similaridade entre os H<sub>3</sub>R e H<sub>4</sub>R de cerca de 39% (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2010). Por comparação, o H<sub>3</sub>R possui apenas 23% de homologia com H<sub>1</sub>R e 22% com H<sub>2</sub>R (MARSON, 2011) ao passo que H<sub>4</sub>R apresenta aproximadamente 19% de homologia com H<sub>1</sub>R e H<sub>2</sub>R (JADIDI-NIARAGH; MIRSHAFIEY, 2010). Nos domínios transmembranares, H<sub>3</sub>R e H<sub>4</sub>R possuem similaridade de 54%. Porém, ao considerar as propriedades físico-químicas dos diferentes aminoácidos, a semelhança aumenta para 68% (DE ESCH *et al.*, 2005).

Esta homologia revela algumas semelhanças nas interações ligante-receptor, levando a uma dupla ação dos ligantes (VALTER; KOTTKE; STARK, 2011). A histamina possui elevado nível de afinidade por H<sub>3</sub>R e H<sub>4</sub>R, com pK<sub>i</sub> de 7,8 e 8,1 nM, respectivamente. Desta maneira, a considerável homologia entre os receptores propicia que muitos outros ligantes do H<sub>4</sub>R tenham relativa afinidade também pelo H<sub>3</sub>R (MARSON, 2011). Consequentemente, grupos especializados têm dedicado esforços para obtenção de compostos com maior seletividade ao H<sub>4</sub>R para evitar os possíveis efeitos indesejáveis causados pela interação com o H<sub>3</sub>R (JABLONOWSKY *et al.*, 2003; TERZIOGLU *et al.*, 2004; VENABLE *et al.*, 2005; KISS *et al.*, 2008).

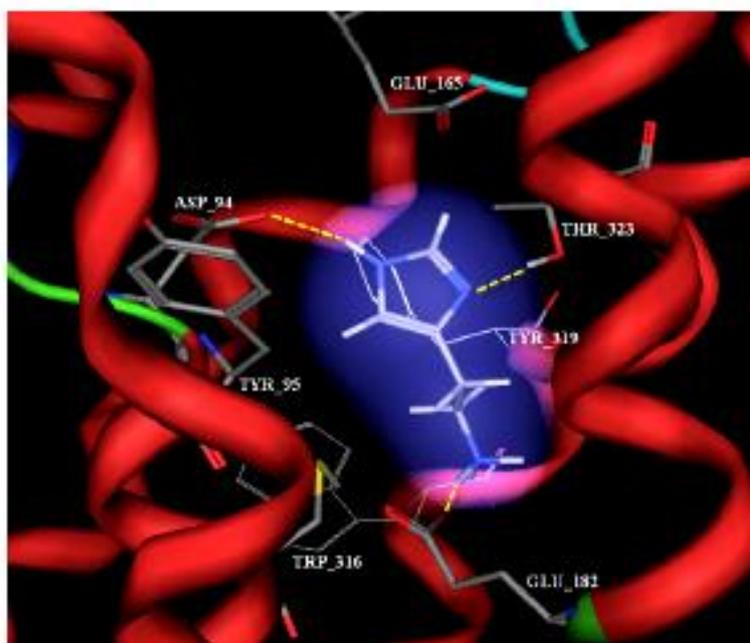
A importância de alguns aminoácidos na estrutura do H<sub>4</sub>R pode ser verificada em diversos trabalhos. Um trabalho descrito por Kiss *et al.* (2008) demonstrou, através de triagem virtual baseada em modelo de homologia baseado no receptor β-adrenérgico, que cada composto investigado mostrou ao menos uma interação com Asp94 (3.32) ou Glu182 (5.46). Aparentemente a região TM3, onde se encontra o resíduo de aminoácido Asp94 que faz interação com grupos básicos, seja um local crucial para a ligação da histamina e seus análogos, uma vez que se trata de uma região altamente conservada em todos os receptores de aminas biogênicas. Além disso, Glu182 (TM5), que faz interação com o nitrogênio protonado da histamina, também deve ser considerado (LIM *et al.*, 2009; BHATT *et al.*, 2010; FENG; HOU; LI,

---

2013). A mutação deste aminoácido por alanina foi detrimental para a interação dos ligantes, e a mutação para glutamina reduziu as afinidades (JONGEJAN *et al.*, 2008).

Sugere-se ainda que o aminoácido Thr323 (6.55) participa na ativação do receptor. Investigação realizada com dois agonistas (OUP-16 e histamina) e um antagonista (JNJ-7777120) mostrou que os agonistas formaram interações com Asp94 (3.32), Glu182 (5.46) e Thr323 (6.55), ao passo que o antagonista interagiu somente com Asp94 (3.32) e Glu182 (5.46), como pode ser observado na Figura 14 através da interação da histamina com o H<sub>4</sub>R (KISS *et al.*, 2008).

Desta forma, ao se planejar e desenvolver novos ligantes, estas são características que devem ser minuciosamente consideradas, pois pequenas diferenças na estrutura da proteína podem produzir grandes alterações nas propriedades farmacológicas do receptor.



**Figura 14:** Interação da histamina com aminoácidos Asp94 (3.32), Glu182 (5.46) e Thr323 (6.55) do H<sub>4</sub>R. Reproduzido com permissão de KISS *et al.* Direitos autorais 2008 Elsevier Ltd.

Desde a sua descoberta, o H<sub>4</sub>R tem sido foco de muita atenção. Possui importante papel na secreção de interleucinas (IL-4, IL-12, IL-16, IL-17, IL-31, entre outras), quimiocinas (como CCL2 e CXCL12) e citocinas (como IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ) que

---

induzem o recrutamento de diversos tipos celulares por quimiotaxia (CRAMP *et al.*, 2010; GUTZMER *et al.*, 2011). Experimentos demonstraram que a ativação deste receptor envolve a migração de eosinófilos e mastócitos, apresentando portanto forte relação com respostas inflamatórias e imunológicas, e conseqüentemente com a fisiopatologia de distúrbios imuno-inflamatórios (O'REILLY *et al.*, 2002; BUCKLAND; WILLIAMS; CONROY, 2003; LING *et al.*, 2004; DE ESCH *et al.*, 2005; SHIN *et al.*, 2012).

Diante do exposto, compostos antagonistas ou agonistas inversos do H<sub>4</sub>R podem ser empregados clinicamente para o tratamento de doenças como asma, doença inflamatória intestinal, artrite e outras doenças inflamatórias crônicas, bem como no controle de dor e prurido (CORRÊA; FERNANDES, 2015). O H<sub>4</sub>R é ainda visto como potencial alvo para sinergismo com anti-histamínicos H<sub>1</sub>R, principalmente em condições que apresentam sintomas resistentes aos anti-histamínicos H<sub>1</sub>R já existentes, como o prurido decorrente de processos inflamatórios proveniente de dermatite atópica e urticária crônica (YAMAURA *et al.*, 2013).

### 2.3 Ligantes H<sub>4</sub>R

Assim como o H<sub>1</sub>R, o H<sub>4</sub>R possui uma considerável atividade agonista-independente, ou seja, apresenta uma alta atividade basal da proteína G, principalmente na forma ativa, independente de ligante. Desta maneira, dependendo da condição patológica, é interessante a utilização de antagonistas ou agonistas inversos (uma vez que agonistas não trariam efeitos farmacológicos desejáveis). Se a patologia estiver associada à atividade constitutiva do receptor (R\*), os agonistas inversos podem ter ação mais vantajosa. Por outro lado, os antagonistas neutros podem ser promissores por levar ao menor estímulo do receptor ao estabilizar o estado inativo (R) (DEML *et al.*, 2009; SCHNEIDER *et al.*, 2009; SCHNEIDER *et al.*, 2010; CORRÊA; FERNANDES, 2015).

Os primeiros ligantes identificados com boa afinidade por H<sub>4</sub>R foram aqueles inicialmente desenvolvidos para o H<sub>3</sub>R. Imetíte, imepipe e tioperamida ( $K_i$  0,3, 0,4 e 25 nM respectivamente) demonstraram afinidade ( $K_i$ ) de 2,7, 9,0 e 27 nM, respectivamente, para H<sub>4</sub>R (LIU *et al.*, 2001). Desta maneira, tais compostos foram

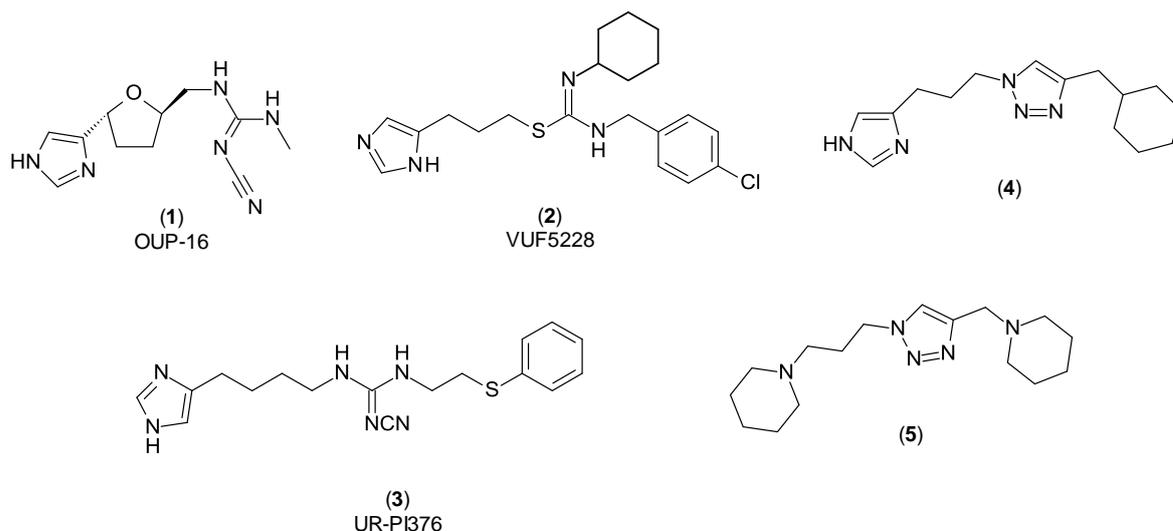
---

utilizados para o planejamento de compostos seletivos para H<sub>4</sub>R. Diversos protótipos foram relatados e com variadas modificações estruturais para obtenção de maior seletividade H<sub>4</sub>R e avaliação sobre as relações entre estrutura química e atividade biológica (REA). Um dos primeiros relatos de ligantes de H<sub>4</sub>R foram compostos tetraidrofurânilimidazóis substituídos, dos quais teve destaque o OUP-16 (**1**, figura 15). Este apresentou seletividade para o H<sub>4</sub>R 15 vezes superior em relação ao H<sub>3</sub>R, além de atividade agonista (HASHIMOTO *et al.*, 2003).

Em outro trabalho, uma série de 22 compostos análogos do clobenpropite (antagonista H<sub>3</sub>R) foram sintetizados e o VUF5228 (**2**) teve maior notoriedade. A substituição por um grupo lipofílico no nitrogênio do grupo tiouréia levou à baixa afinidade por H<sub>3</sub>R ( $pK_i$  1,66) e alta seletividade H<sub>4</sub>R, entretanto com atividade agonista total. A principal proposta desta série foi avaliar as variações estruturais que influenciam a seletividade H<sub>4</sub>R e observou-se que os compostos guanidínicos apresentaram maior afinidade por H<sub>4</sub>R (LIM *et al.*, 2009).

Outros trabalhos tem apresentado compostos com seletividade. Os derivados acilguanidínicos, especialmente as sulfonilguanidinas, demonstraram maior seletividade H<sub>3</sub>R, enquanto que as carbamoilguanidinidinas e cianoguanidinas apresentaram melhor seletividade H<sub>4</sub>R. O composto UR-PI376 (**3**) pode ser destacado, pois apresentou alta afinidade, mas com atividade agonista ( $pEC_{50}$  7,47,  $\alpha = 0,93$ ). Aparentemente a basicidade do núcleo central (guanidina) é importante para seletividade H<sub>4</sub>R (IGEL *et al.*, 2009a; IGEL *et al.*, 2009b; GEYER; BUSCHAUER, 2011).

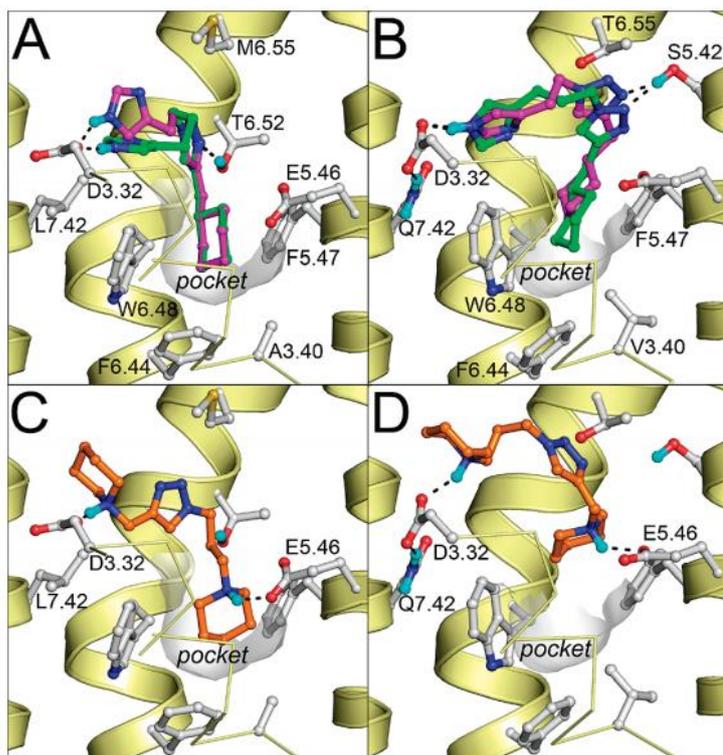
---



**Figura 15:** Ligantes do H<sub>4</sub>R.

REA de ligantes H<sub>4</sub>R foram também exploradas por Wijtmans *et al.* (2011). Estes propuseram ligantes triazólicos visando decifrar os fatores responsáveis pela seletividade H<sub>4</sub>R/H<sub>3</sub>R. Dentre os compostos destacou-se o (4) ( $pK_i$  8,08), com espaçamento de 3 carbonos (entre os grupos imidazol e triazol) e grupo cicloexila. Homólogos menores ou maiores levaram ao comprometimento da afinidade. Tais dados podem ser corroborados pelo estudo realizado por Wiecek *et al.* (2011), em que a partir de uma série de alquilcarbamatos observou-se que quanto maior o espaçante, maior a afinidade pelo H<sub>3</sub>R e menor pelo H<sub>4</sub>R. Entretanto, excessiva distância leva ao decréscimo da afinidade por ambos receptores.

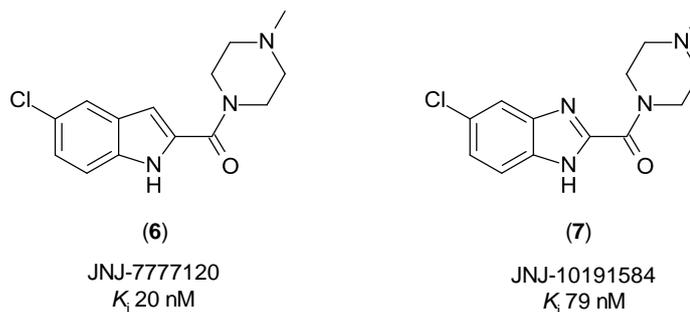
Desta maneira, acredita-se que propriedades estéricas sejam essenciais para interação H<sub>4</sub>R, pois o anel hexila pode ser acomodado no bolso hidrofóbico entre TM3, TM5 e TM6. A mudança do anel imidazol também foi avaliada e a sua substituição por amins cíclicas trouxe valores de  $pK_i$  baixos (< 5,0), bem como a substituição do anel imidazol e do cicloexil por duas piperidinas (5) trouxe maior seletividade H<sub>3</sub>R (> 300 vezes). Acredita-se que esta modificação desloca o outro anel piperidínico para fora do bolso lipofílico H<sub>4</sub>R, como pode ser observado na Figura 16, através da interação dos compostos 4 e 5 com H<sub>3</sub>R e H<sub>4</sub>R (WIJTMANS *et al.*, 2011).



**Figura 16:** Modo de interação do composto **4** (átomos em roxo) no H<sub>3</sub>R (A) e H<sub>4</sub>R (B) e do composto **5** (átomos em laranja) no H<sub>3</sub>R (C) e H<sub>4</sub>R (D). Reproduzido com permissão de WIJTMANS *et al.* Direitos autorais 2011 American Chemical Society.

Nota-se que os ligantes descritos até este momento apresentam em sua estrutura o anel imidazólico. Além do previsível potencial de inibição de diferentes isoformas do CYP<sub>450</sub>, compostos imidazólicos levam, em sua grande maioria, à atividade agonista, possivelmente por ser uma característica presente no agonista endógeno (histamina). Assim, esses compostos têm sido considerados pouco interessantes como ligantes H<sub>4</sub>R e o desenvolvimento de novos ligantes não-imidazólicos tornou-se mais promissor.

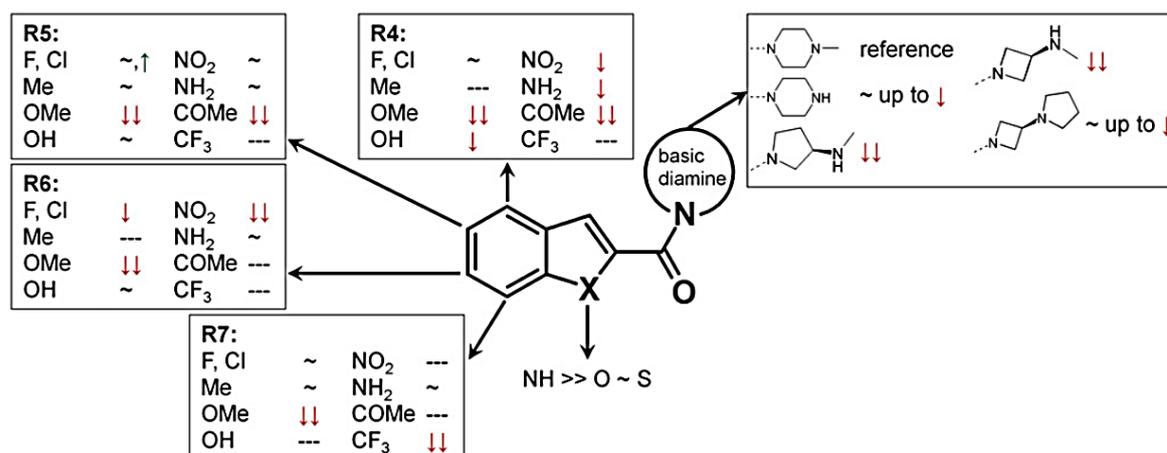
Entre os primeiros antagonistas H<sub>4</sub>R não-imidazólicos destacam-se os derivados indolcarboxamídicos. Dentre eles, a indolpiperazino-carboxamida JNJ-7777120 (**6**) e a benzimidazolpiperazino-carboxamida JNJ-10191584 (**7**) foram descritas com boa afinidade e alta seletividade apresentando  $K_i$  20 nM (H<sub>4</sub>R) vs. 2000 nM (H<sub>3</sub>R) para JNJ-7777120 e  $K_i$  79 nM (H<sub>4</sub>R) vs. 3950 nM (H<sub>3</sub>R) para JNJ-10191584 (FENG; HOU; LI, 2013).



**Figura 17:** Antagonistas não-imidazólicos do H<sub>4</sub>R.

O antagonista JNJ-7777120 (**6**, figura 17), foi relatado por Jablonowski *et al.* (2003). Este composto apresentou interessante atividade anti-inflamatória *in vivo* ao inibir a migração de mastócitos induzida pela histamina em testes com camundongos, demonstrando sua potencial utilidade no tratamento da inflamação em seres humanos (TERZIOGLU *et al.*, 2004; THURMOND *et al.*, 2004). Estudos também avaliaram suas características farmacológicas em modelos de dermatite atópica (MARSON, 2011). Entretanto, apesar das promissoras indicações, o JNJ-7777120 (**6**) apresentou farmacocinética indesejável por apresentar tempo de meia vida curto, atribuído à rápida desmetilação da *N*-metil piperazina (MOWBRAY *et al.*, 2011; SAVALL *et al.*, 2014). Porém, por ser considerado um ligante com alta afinidade e seletividade, ainda é considerado um importante protótipo, sendo o mais usado entre uma série de indolpiperazinas como referência de antagonista de H<sub>4</sub>R em estudos da literatura (GAO *et al.*, 2013; SANDER *et al.*, 2009).

Investigação realizada através de uma série de derivados indolcarboxâmicos, permitiu discutir a REA destes compostos. Modificações na estrutura de JNJ-7777120 (**6**) foram feitas e levaram à obtenção de análogos com atividade semelhante. O trabalho mostrou que substituições no anel aromático não conferem grandes vantagens na afinidade dos compostos. Já substituições em R4, R6 ou R7 (Figura 18) levaram a afinidades semelhantes ou menores e apenas a substituição em R5, por um átomo de cloro ou flúor, trouxe melhoria na afinidade H<sub>4</sub>R (ENGELHARDT *et al.*, 2012).



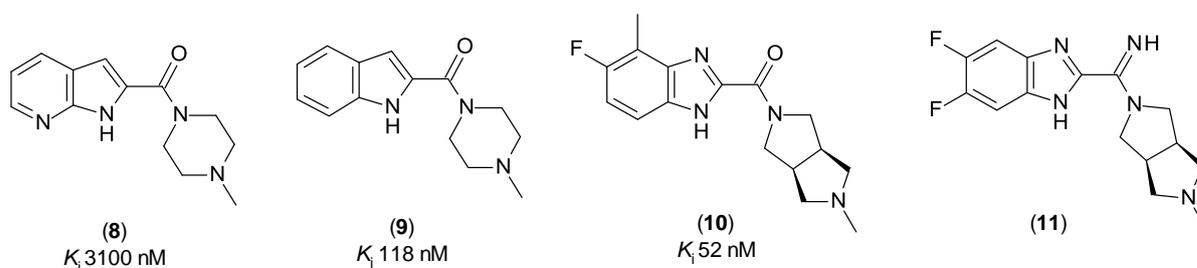
**Figura 18:** REA das indolcarboxamidas. Adaptado com permissão de ENGELHARDT *et al.* Direitos autorais 2012 Elsevier Ltd.

Os derivados indolcarboxamídicos mostraram ainda que bioisómeros do núcleo indólico, como os núcleos benzimidazólico, benzofurânico e benzotiofênico, são tolerados. O anel piperazínico não é essencial, já que compostos com boa afinidade contendo outros bioisómeros já foram descritos. Entretanto, a piperazina tem proporcionado melhores atividades, especialmente com o substituinte metila. Em geral, é observado que a metila é o grupo que leva à maior afinidade quando presente no nitrogênio básico. Jablonowski *et al.* (2003) sugerem que para manter a potência menor que 100 nM a substituição deve ser limitada à metila.

Lane *et al.* (2012) relataram ligantes análogos das indolpiperazino-carboxamidas publicadas por Venable *et al.* (2005) com alta afinidade pelos H<sub>4</sub>R<sub>s</sub>. Entre os análogos indólicos, benzimidazólicos e azaindólicos foram observadas certas diferenças na atividade. Compostos azaindólicos demonstraram redução na atividade em relação aos indóis (ver compostos **8** e **9**, figura 19), sugerindo que pelo fato do anel azaindólico ser menos rico em elétrons, este pode impactar em provável interação  $\pi$ -stacking que o ligante faça com o receptor. Assim, como publicado por outros pesquisadores, o núcleo central é considerado elemento farmacofórico.

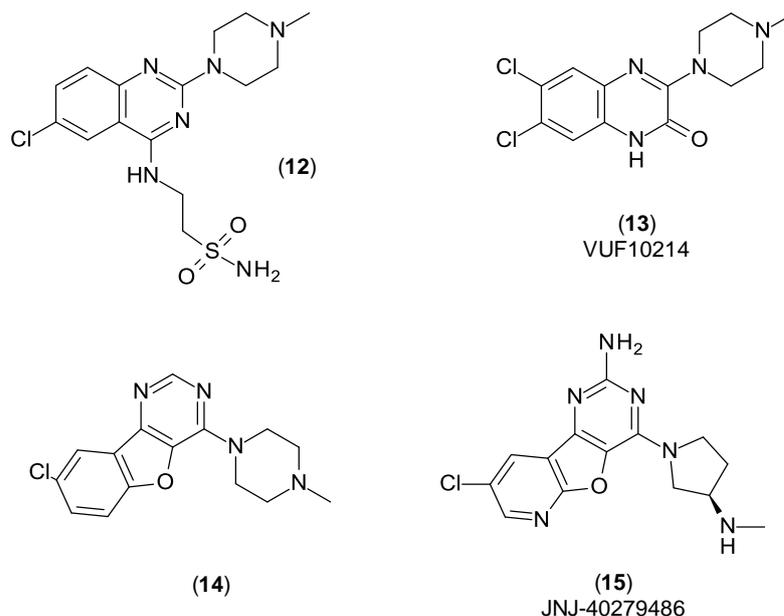
A substituição da piperazina por outro grupo básico também foi explorada e a introdução do octaidropirrol[3,4-c]pirrol trouxe boa afinidade. Essa diamina mimetiza a conformação e consequente interação da piperazina com o H<sub>4</sub>R. Assim como na piperazina, a metila parece ser o melhor substituinte nesta porção básica, pois a

desmetilação também levou ao decréscimo da atividade. Os análogos benzimidazólicos também não produziram a potência alcançada pelos indólicos. No entanto, dentre a série de benzimidazóis, destacou-se o composto **10**, que apresentou reduzida estabilidade metabólica *in vitro*. Análogos que possuem amidinas no lugar da amida demonstraram melhor potência com aumento cerca de 5 vezes em relação as amidas correspondentes. Objetivando contornar a inadequada farmacocinética do JNJ-7777120, as amidinas benzimidazólicas foram preparadas e avaliadas, sendo o composto **11** (Figura 19) o de melhor afinidade e seletividade ( $K_i$  9,5 nM para  $H_4R$  e  $K_i$  3090 para  $H_3R$ ). Em contrapartida, apresentou efeitos pró-inflamatórios e diminuição na contagem de reticulócitos, além de seletividade para o receptor serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub> (LANE *et al.*, 2012; MOWBRAY *et al.*, 2011).



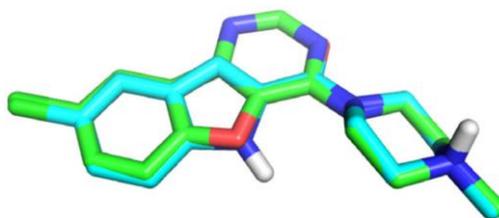
**Figura 19:** Análogos das indolpiperazino-carboxamidas.

Com as diversas informações que são frequentemente publicadas, muitos padrões estruturais de ligantes para maior seletividade  $H_4R$  foram planejados e descritos. Dentre eles, podem-se citar os compostos quinoxalínico **12** e quinazolínico VUF10214 (**13**) (Figura 20). O ligante **12** apresentou  $pK_i$  8,31 e potente atividade agonista inversa de  $H_4R$  ( $\alpha = -1,64$ ) (SMITS *et al.*, 2010). Já o composto VUF10214 (**13**), apresentou certa seletividade pelo  $H_4R$  ( $K_i$  6 nM) e atividade anti-inflamatória em modelo de edema de pata induzido por carragenina (SMITS *et al.*, 2008).



**Figura 20:** Outros ligantes do H<sub>4</sub>R.

Compostos 2-aminopirimidínicos com atividade antagonista H<sub>4</sub>R também foram publicados e têm sido considerados ligantes promissores. Ao realizar sobreposição estrutural de dois compostos (JNJ-7777120 (**6**) e **14**), Savall *et al.* (2011), observaram que estes possuíam conformações semelhantes a partir do alinhamento da carbonila e piperazina de JNJ-7777120 (**6**) com o nitrogênio pirimidínico e a piperazina de **14** (Figura 21). Deste estudo, destacou-se o JNJ-40279486 (**15**) que apresentou adequado perfil farmacocinético com atividade em modelos de asma e atividade anti-inflamatória confirmada por presença de células inflamatórias em lavagem pulmonar de camundongos.



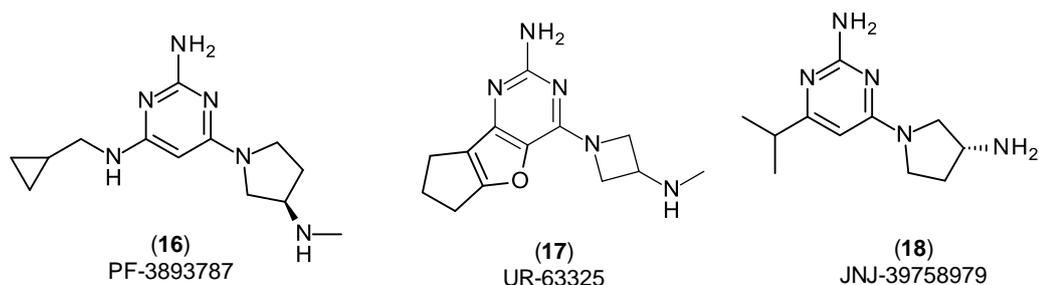
**Figura 21:** Sobreposição dos compostos JNJ-7777120 (**6**) e **14**. Reproduzido com permissão de SAVALL *et al.* Direitos autorais 2011 Elsevier Ltd.

Outros análogos 2-aminopirimidínicos também foram descritos e explorados, como PF-3893787 (**16**) e UR-63325 (**17**, figura 22). O composto PF-3893787 apresentou meia-vida de 7 horas após doses entre 7 e 20 mg em ratos e macacos.

Além disso, demonstrou inibir totalmente de a mudança de formato de eosinófilos com uma concentração de 30 nM, enquanto o JNJ-7777120 (**6**) necessitou de 300 nM para inibição apenas parcial (MOWBRAY *et al.*, 2011). Já o UR-63325 (**17**) foi aprovado em fase I da pesquisa clínica com significativa segurança e progrediu para fase II com indicação para rinite alérgica (SALCEDO; PONTES; MERLOS, 2013).

Análogos 6-alkilados das 2-aminopirimidinas também foram sintetizados e avaliados. Partindo-se da simiabilidade entre as 2-aminopirimidinas e indolcarboxamidas, e diante da observação que a saturação do anel aromático benzênico das indolcarboxamidas levou à manutenção da atividade, Savall *et al.* (2014), propuseram uma série de 6-alkil-2,4-diaminopirimidinas e avaliaram a atividade antagonista H<sub>4</sub>R. Observou-se que os grupos 6-alkil foram bem tolerados e como previamente definido em JNJ-7777120 (**6**), o grupo *N*-metilpiperazina leva à instabilidade metabólica. Todavia, derivados (*R*)-3-aminopirrolidínicos mostraram-se mais estáveis em ensaios *in vitro*.

Dentre esses análogos, o JNJ-39758979 (**18**) demonstrou atividade antagonista H<sub>4</sub>R com alta afinidade ( $K_i$  12,5 nM), mas baixa seletividade frente aos outros receptores histaminérgicos. Estudos têm demonstrado a contribuição do H<sub>4</sub>R no prurido induzida pela histamina. O JNJ-39758979 inibiu a resposta pruridogênica em doses de 5 a 20 mg/kg em camundongos, além de indicação pré-clínica para modelos de artrite em ratos. Em suma, demonstrou eficácia em modelos animais de doenças inflamatórias e atingiu a fase II da pesquisa clínica com indicação para asma e dermatite atópica. No entanto, os estudo foi abortado pois observaram-se reações adversas graves (agranulocitose) (SAVALL *et al.*, 2014).



**Figura 22:** Ligantes histaminérgicos H<sub>4</sub> que seguiram para pesquisa clínica.

Por fim, a presença da carbonila também foi avaliada. Inicialmente, acreditava-se que esse grupo exercia importante contribuição para a atividade (VENABLE *et al.*, 2005). Todavia Lee-Dutra *et al.* (2006) propuseram compostos benzimidazólicos substituídos com grupos 2-(alquilamino)arílicos no lugar do grupo 2-carboxamida. Esses análogos demonstraram variadas afinidades ( $K_i$  entre 1 e 250 nM), demonstrando que o grupo 2-carboxamida não é essencial na interação com o H<sub>4</sub>R.

Embora nenhum composto tenha ainda sido introduzido na terapêutica até o momento, vários grupos de pesquisa têm concentrado esforços para a obtenção de novos ligantes H<sub>4</sub>R, sendo atualmente uma área de intensa investigação.

De acordo com trabalho publicado recentemente por Schultes *et al.* (2013), é possível propor um modelo farmacofórico para interação com o H<sub>4</sub>R, podendo ser definido como: (1) grupo básico (protonável em pH fisiológico) para interação com Asp94 e/ou Glu182; (2) grupo aromático central para interação tipo  $\pi$ -stacking com aminoácidos tirosina; (3) sítio lipofílico para interação com regiões hidrofóbicas entre os domínios TM3 e TM6. Porém, alguns ligantes com alta potência e boa seletividade, como o clobenpropite e o JNJ7777120, não se enquadram nesta proposta de farmacóforo (FENG; HOU; LI, 2013). Desta maneira, o farmacóforo pode ainda ser considerado indefinido e distintas características estruturais necessitam serem exploradas.

## **2.4 Planejamento e desenvolvimento de fármacos**

Fármacos são substâncias químicas de constituição definida com propriedades farmacoterapêuticas, ou seja, que modificam ou interferem no sistema fisiopatológico de maneira específica. Para que atinja tal objetivo, é necessário que este chegue ao local de ação de maneira apropriada (BRUNTON *et al.*, 2010). Para facilitar o entendimento dos processos envolvidos, a ação de um fármaco pode ser didaticamente dividida em três fases: fase farmacêutica, fase farmacocinética e fase farmacodinâmica (PEREIRA, 2007).

---

---

Na fase farmacêutica ocorre a desintegração da forma farmacêutica e dissolução da substância ativa. Nesta fase a solubilidade é uma propriedade valiosa. Para que o fármaco possa ser transportado pelos compartimentos biológicos é necessário acima de tudo que ele esteja solúvel na biofase (BARREIRO; FRAGA, 2008; BRUNTON *et al.*, 2010). A fase farmacocinética está relacionada com os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), onde ainda pode-se incluir a toxicidade (ADMET). Nesta fase, o coeficiente de partição *n*-octanol/água, grau de ionização e massa molecular são propriedades primordiais a serem consideradas, já que para o fármaco exercer seus efeitos, deve ser capaz de atravessar diversas barreiras biológicas. Em geral, fármacos mais lipofílicos difundem mais facilmente por barreiras lipídicas pouco polares, bem como as formas não-ionizadas e de menor massa molecular (LIMA, 2007; WERMUTH, 2008).

A última fase de ação, a fase farmacodinâmica, está correlacionada com a afinidade do fármaco com seu alvo e conseqüente efeito terapêutico (PEREIRA, 2007). Desta forma, o ligante deve apresentar características estruturais complementares às do seu alvo molecular. O conjunto dessas características é denominado “grupo farmacofórico”, e neste conceito podem ser incluídas propriedades estéricas, eletrônicas e hidrofóbicas essenciais à adequada atividade farmacológica (WERMUTH *et al.*, 1998; BARREIRO; FRAGA, 2008). Os grupos restantes da molécula são chamados de auxofóricos, pois estes podem interagir com o alvo molecular, entretanto não são necessários para a interação (SILVA, 2013).

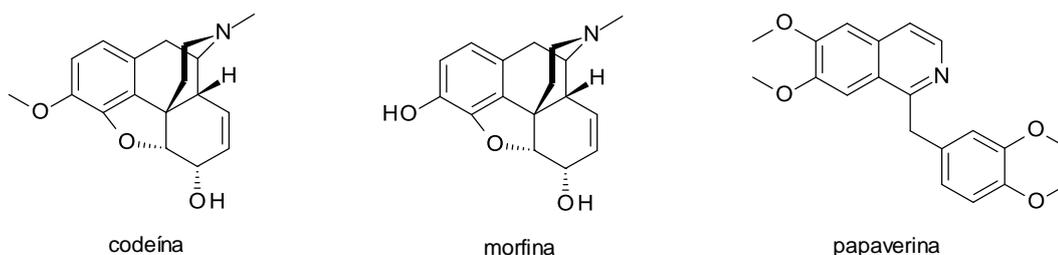
#### 2.4.1 Descoberta de moléculas biologicamente ativas

Os consideráveis avanços científicos tornaram possíveis a descoberta de importantes inovações terapêuticas. Assim, objetivando encontrar novos agentes terapêuticos úteis, muitos compostos são pesquisados e ensaiados continuamente (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Por muito tempo, a base do tratamento das doenças consistia na descoberta de substâncias de origem natural. Até 1930, os fármacos introduzidos na terapêutica provinham, em sua maioria, dessa fonte e continuam com utilidade na prática clínica.

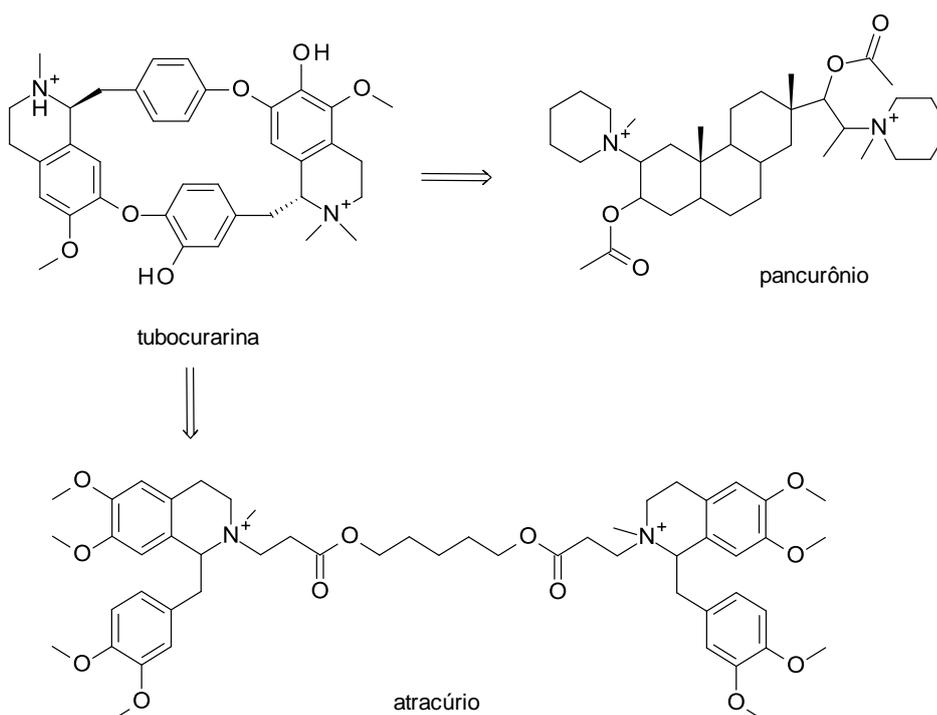
---

Por exemplo, do ópio, resina obtida a partir da *Papaver somniferum* (papoula), isolou-se a morfina, primeiro analgésico opióide utilizado terapêuticamente. A partir da mesma planta, outros fármacos foram obtidos como a codeína e a papaverina (Figura 23) (LEMKE *et al.*, 2012).



**Figura 23:** Morfina e outros alcalóides isolados do ópio.

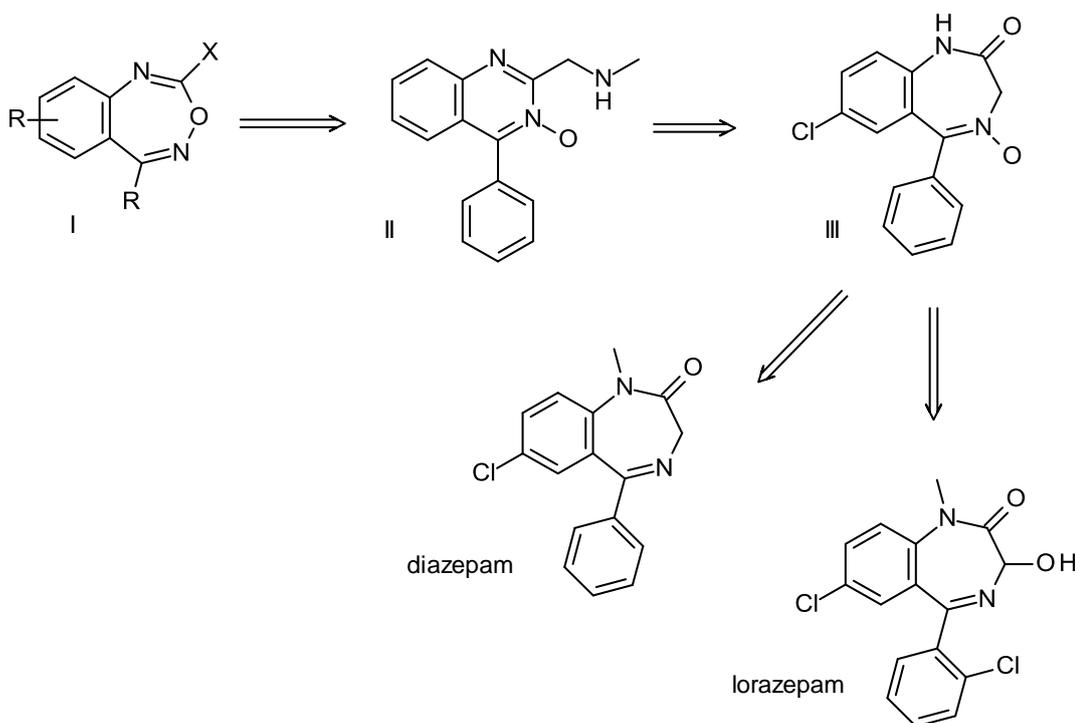
Outro fármaco de importância histórica é a tubocurarina (Figura 24). Alcalóide tetraidroquinilínico extraído da planta *Chondrodendron tomentosum*, com ação bloqueadora nos receptores nicotínicos, foi a base para o desenvolvimento de outros compostos como o pancurônio e atracúrio (BARREIRO; FRAGA, 2008), utilizados como agentes auxiliares na anestesia cirúrgica para obter o relaxamento da musculatura esquelética (BRUNTON *et al.*, 2010).



**Figura 24:** Bloqueadores dos receptores nicotínicos.

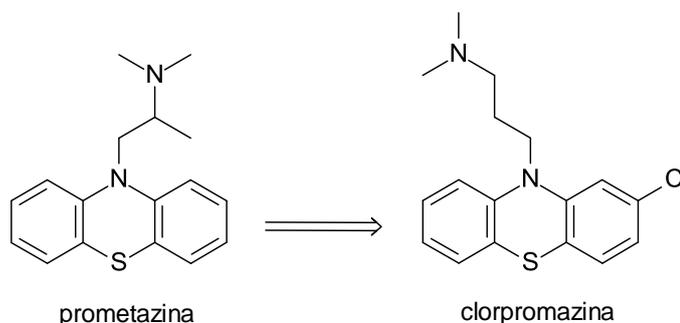
Além da triagem por produtos naturais, fatores circunstanciais (acaso) representaram um importante fator na descoberta de novos fármacos. Um exemplo clássico encontrado ao acaso foi a penicilina, molécula com propriedades antibacterianas. Observou-se que um determinado fungo do gênero *Penicillium* produzia uma substância capaz de inibir processos vitais de outros organismos (CRAGG; NEWMAN, 2013). Após seu isolamento e caracterização, a penicilina foi o primeiro antibiótico a ser introduzido na terapia antimicrobiana.

De forma empírica, diversas classes importantes de fármacos foram inseridas na terapêutica, como os benzodiazepínicos, que foram provenientes de resultados inesperados de sínteses planejadas. Na busca por novos antidepressivos e acreditando que o procedimento sintético era adequado, um pesquisador da Roche iniciou investigações acerca do núcleo benzo-heptodiazínico. Entretanto, ao desenvolver a rota sintética planejada observou-se que o produto formado não correspondia ao intermediário oxo-quinazolínico (II) pretendido e sim um composto benzodiazepínico (III) (BARREIRO; FRAGA, 2008). A partir deste, outros compostos foram sintetizados dando origem à fármacos hipnóticos, sedativos e ansiolíticos como o diazepam e lorazepam (Figura 25) (LEMKE *et al.*, 2012).



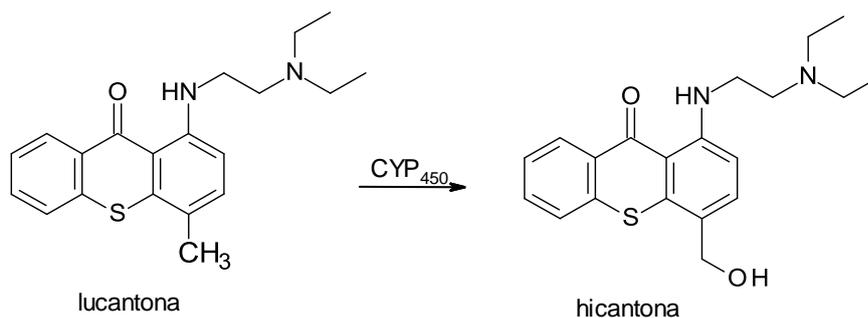
**Figura 25:** Desenvolvimento dos benzodiazepínicos.

Outro meio de descoberta de fármacos provêm da observação de possíveis indicações para outras doenças que não àquela inicialmente pretendida. Um exemplo foi a descoberta da clorpromazina. Ao utilizar a prometazina (agente anti-histamínico fenotiazínico) em alguns pacientes, notou-se que além dos efeitos esperados como anti-histamínico, causava também efeito tranquilizante. Baseando-se nesta observação, posteriormente Paul Charpentier sintetizou a clorpromazina com objetivo de otimizar os efeitos no SNC (Figura 26). Esta molécula foi testada com sucesso em pacientes psicóticos e passou a ser utilizada para abrandar o comportamento agressivo e controlar outros sinais (WERMUTH, 2008).



**Figura 26:** Descoberta da clorpromazina a partir da prometazina.

O estudo do metabolismo representa também uma alternativa para a descoberta de novos compostos bioativos. O metabolismo de fármacos compreende a transformação química destes em derivados mais hidrofílicos para facilitar a eliminação através da urina (WERMUTH, 2008). Para tal, ocorrem uma série de reações enzimáticas que modificam estruturalmente a molécula e geram produtos que podem ser ativos, e assim fármacos podem ser obtidos (PEREIRA, 2007). Pode-se tomar como exemplo a descoberta da hicantona, análogo da lucantona (anti-helmíntico da classe das tioxantonas). Em 1965, verificou-se que o fungo *Aspergillus scleroticum* oxidava a posição benzílica da lucantona, produzindo o álcool benzílico correspondente (principal metabólito hepático), nomeado hicantona (Figura 27). Esta demonstrou em ensaios *in vivo* ser mais potente que seu precursor, representando um recurso terapêutico para o combate à esquistossomose (BARREIRO; FRAGA, 2008).



**Figura 27:** Obtenção da hicantona a partir da lucantona.

Apesar dos meios de descoberta de fármacos de origem natural terem sido amplamente utilizados por muitos anos e contribuído para a introdução de diversos fármacos na terapêutica, os produtos naturais geralmente contêm substâncias com estruturas muito complexas difíceis de serem isoladas, purificadas e identificadas (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Aliado ao grande avanço da química (especialmente da química orgânica), as moléculas bioativas podem também ser obtidas através de origem sintética, sendo atualmente a principal origem da maioria dos fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2008).

O processo de descoberta de fármacos teve uma grande mudança entre os anos 1950 e 1980, a partir do uso de estratégias de modificação molecular. Os princípios racionais da otimização de compostos protótipos teve início principalmente com o desenvolvimento do bioesterismo, aliado ao avanço da biologia molecular e melhor compreensão das características do alvo molecular (LIMA, 2007).

O planejamento de fármacos compreende uma série de processos que visam descobrir novas substâncias bioativas com potenciais aplicações terapêuticas (BARREIRO; FRAGA, 2005; LIMA, 2007). Em suma, deve-se planejar fármacos que apresentem ação farmacológica específica. Esta estratégia é utilizada para a obtenção de moléculas que alcancem os efeitos desejáveis, objetivando melhorar suas características e serem aceitas clinicamente (VISTOLI; PEDRETTI; TESTA, 2008).

Inicialmente são identificados compostos de baixa potência, afinidade e seletividade que serão otimizados para alcance de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas apropriadas. Para isso, são consideradas características

estruturais que influenciam tais propriedades e que devem ser atribuídas no planejamento (FERNANDES, 2012). O protótipo pode ser planejado a partir do alvo farmacológico, baseado na biomacromolécula envolvida no mecanismo fisiopatológico, ou através da estrutura de ligantes conhecidos (SILVA, 2013). Em muitos casos, o uso das duas abordagens pode fornecer informações valiosas devido a complementariedade de dados coletados (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

As moléculas que se destacarem serão selecionadas e otimizadas, levando ao desenvolvimento de novas entidades químicas (*new chemical entity* – NCE), Estas, ao apresentarem atividade biológica desejada, podem ser submetidas a ensaios pré-clínicos e clínicos, e se tornarem promissoras candidatas á fármacos (BARREIRO, 2002; VISTOLI, PEDRETTI, TESTA, 2008).

#### 2.4.1.1 Otimização de compostos

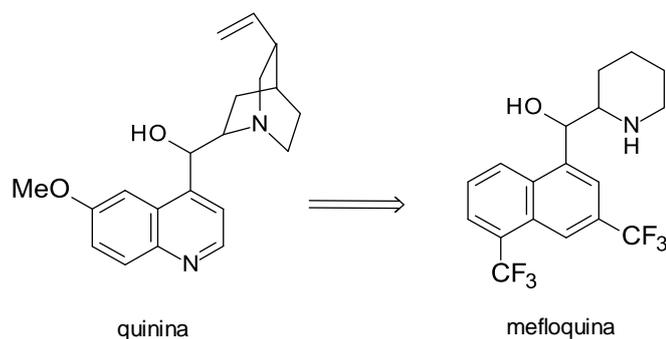
Apesar de algumas moléculas apresentarem atividade farmacológica, geralmente não possuem potência adequada e assim a sua estrutura básica deve ser submetida a subseqüentes modificações estruturais, com o objetivo de otimizar a atividade biológica. Uma das estratégias empregadas é a modificação molecular, em que de forma planejada, processos como simplificação molecular, variação de substituintes, de espaçantes e de flexibilidade conformacional, além do bioisosterismo, possibilitam a construção de um modelo farmacofórico e determinação da sua relação entre estrutura química e atividade biológica (LIMA, 2007; PATRICK, 2009; SILVA, 2013). Desta maneira, é possível sintetizar e testar inúmeros análogos, facilitando o planejamento de novos compostos bioativos (LIMA, 2007).

- *Simplificação molecular*

A simplificação molecular permite a obtenção de compostos estruturalmente mais simples em relação ao seu protótipo. Seu principal objetivo é retirar informações sobre a estrutura mínima requerida para interação do ligante com o alvo farmacológico (PATRICK, 2009). Esta técnica foi inicialmente utilizada para otimizar

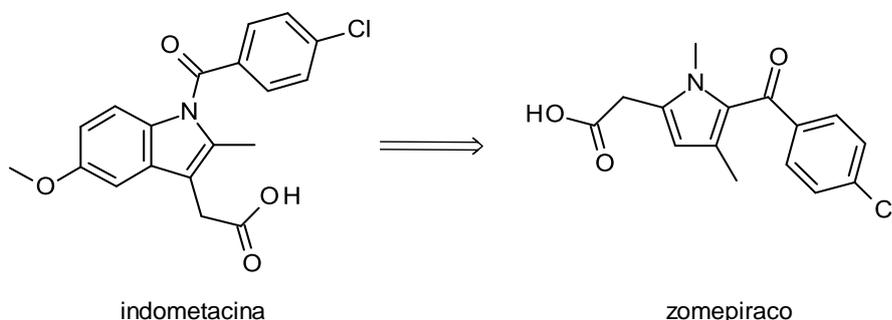
---

produtos naturais com objetivo de definir seus grupos farmacofóricos. Como exemplo, tem-se a mefloquina (figura 28). A partir da modificação do anel rubânico por um anel piperidínico presente na estrutura da quinina (BARREIRO, 2002), uma molécula isolada de *Cinchona ledgeriana*, obteve-se a mefloquina (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Atualmente, além da aplicação em estruturas de origem natural é largamente utilizada também em compostos sintéticos, conservando racionalmente as unidades farmacofóricas.



**Figura 28:** Obtenção da mefloquina pelo processo de simplificação molecular.

Um exemplo clássico de simplificação para compostos sintéticos pode ser observado no desenvolvimento do zomepiraco (anti-inflamatório não-esteróide - AINE). Este composto foi planejado a partir da indometacina (Figura 29), que apresentava efeitos adversos no SNC (BARREIRO, 2002) como tonturas, sonolência e dores de cabeça (HEGEMAN *et al.*, 2013). A mudança do grupo indólico (responsável por tais efeitos) resultou no zomepiraco (BARREIRO, 2002).



**Figura 29:** Obtenção do zomepiraco pelo processo de simplificação molecular.

- *Variação de substituintes*

O intuito primordial da modificação de substituintes é identificar na estrutura do ligante a influência de cada grupo na REA. Uma das abordagens utilizadas é a substituição isostérica (PATRICK, 2009).

Langmuir definiu o isosterismo químico como um processo de substituição de um átomo ou grupo de átomos com outro que apresente a mesma estrutura eletrônica e propriedades físico-químicas. Em 1932, este conceito foi ampliado e Erlenmeyer descreveu isósteros como átomos, íons e moléculas nos quais a camada periférica de elétrons pode ser considerada idêntica. Para esta definição, baseou-se na regra do hidreto desenvolvida por Grimm em 1925. Esta regra estabelece que a adição de um átomo de hidrogênio, fornece um pseudo-átomo com similares propriedades físico-químicas daqueles pertencentes na coluna (família) posterior da tabela periódica (Figura 30) (BARREIRO; FRAGA, 2008; WERMUTH, 2008).

6	7	8	9	10	11
C	N	O	F	Ne	
	CH	NH	OH	FH	NEH <sup>+</sup>
		CH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	OH <sub>2</sub>	FH <sub>2</sub> <sup>+</sup>
			CH <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub>	OH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
				CH <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>

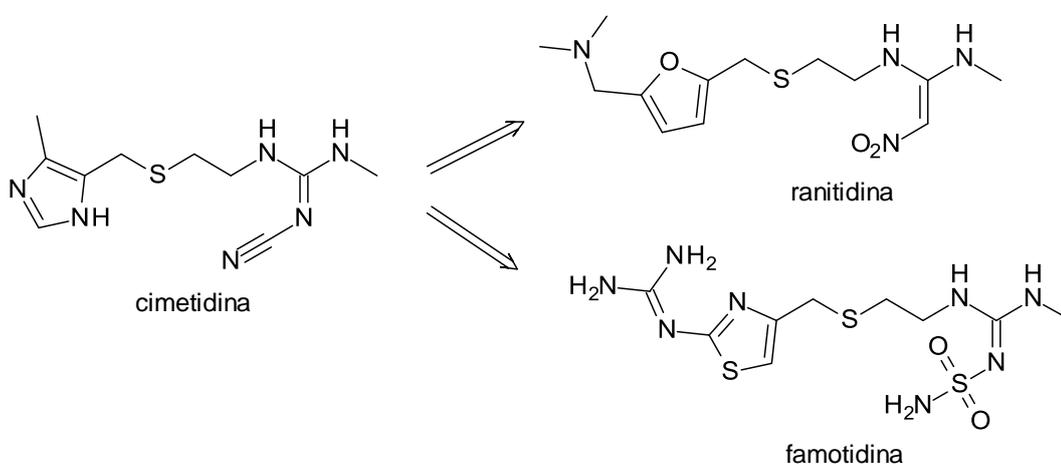
**Figura 30:** Regra do hidreto de Grimm (BARREIRO; FRAGA, 2008).

Utilizando o conceito isosterismo para moléculas biologicamente ativas, Friedman em 1951 propôs os chamados bioisósteros. Desta forma, o termo bioisosterismo é empregado para descrever substâncias que são estruturalmente relacionadas e apresentam propriedades biológicas semelhantes (BARREIRO; FRAGA, 2008; WERMUTH, 2008).

Em 1970, Burger dividiu os bioisósteros em duas classificações: bioisósteros clássicos e bioisósteros não-clássicos. Os bioisósteros clássicos atendem as definições de Grimm e Erlenmeyer, ou seja, possuem átomos ou sub-unidades estruturais que apresentam a mesma distribuição eletrônica. Já os bioisósteros não-

clássicos são representados pelos grupos que não possuem as mesmas características eletrônicas, mas sim as mesmas características estéricas produzindo atividade biológica similar (BARREIRO; FRAGA, 2008).

Um exemplo clássico de bioisosterismo é a variação de anéis ou também denominado equivalentes anelares. Por exemplo, no planejamento dos antagonistas  $H_2$  (antiulcerogênicos) a partir da cimetidina (Figura 31), a mudança do anel imidazol presente na cimetidina levou ao desenvolvimento de fármacos com menos efeitos adversos e maior potência (PATRICK, 2009). Fármacos como a ranitidina e famotidina demonstraram que outros anéis isósteros ao anel imidazol da cimetidina, como o furano presente na ranitidina e o tiazol encontrado na famotidina, apresentam reduzido efeito inibidor sobre as enzimas do  $CYP_{450}$ , diminuindo as reações adversas provocadas pela sua inibição (NELSON, 2012). Além disso, a ranitidina e a famotidina são, respectivamente, 10 e 30 vezes mais ativas que a cimetidina (PATRICK, 2009).



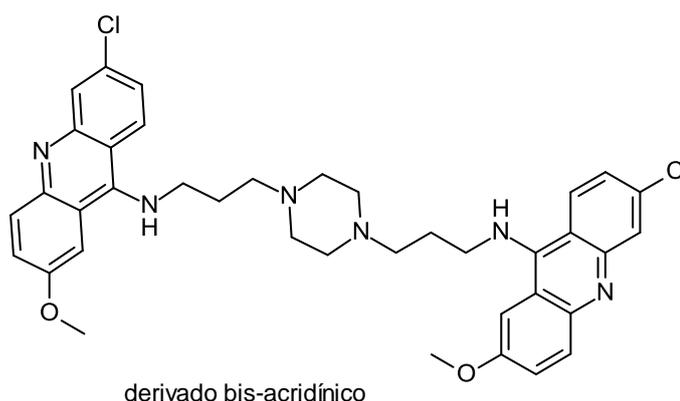
**Figura 31:** Desenvolvimento de novos antagonistas  $H_2$  pelo processo de bioisosterismo.

Outro exemplo usual é variação de substituintes alquila. Diferentes grupos alquila como metila, etila, propila ou isopropila, podem possibilitar a interação com sítios lipofílicos no alvo, ou ainda alterar o volume do ligante e levar a diferentes seletividades (PATRICK, 2009).

- *Extensão ou contração de espaçantes*

A extensão ou contração de espaçantes envolve o aumento ou redução da distância entre grupos presentes na estrutura, permitindo obter a distância necessária para a correta interação do ligante com o alvo. Além disso, é possível que determinados grupos funcionais façam interações adicionais com sítios que o próprio ligante endógeno não era capaz, além de ligação com alvos específicos que anteriormente não possuía seletividade (BARREIRO; FRAGA, 2008; PATRICK, 2009).

Pode-se citar como exemplo desta abordagem o desenvolvimento de derivados bis-aminoacridínicos com atividade antimalárica. A resistência à cloroquina, fármaco eficaz no tratamento da malária, levou ao desenvolvimento de outros ligantes (WERMUTH, 2008). Derivados bis-aminoacridinos demonstraram diferentes perfis de atividade antiparasitária para vários protozoários (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*) dependendo do comprimento do ligante entre os anéis heterocíclicos. Um dos derivados bis-aminoacridínicos com espaçante de 3 carbonos (Figura 32) demonstrou particularmente atividade contra *P. falciparum* com  $IC_{50}$  de 17 nM (GIRAULT *et al.*, 2000).



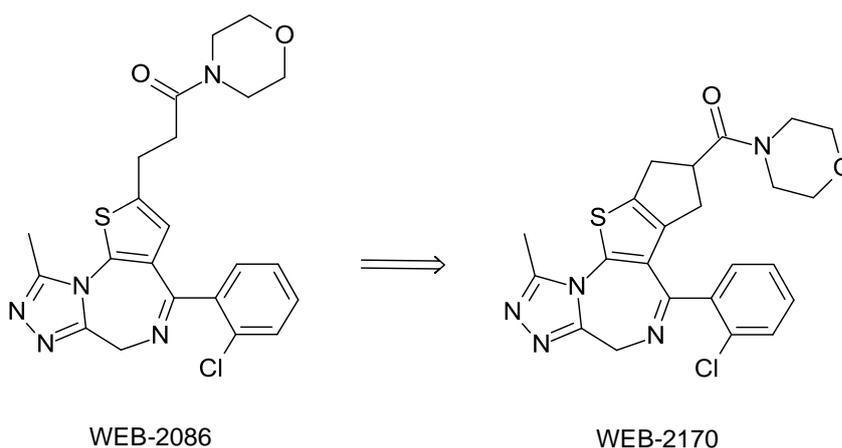
**Figura 32:** Derivado bis-acridínico desenvolvido para o tratamento da malária.

A técnica de extensão ou contração de espaçantes pode ainda, ser aplicada em sistemas anelados. Ao expandir ou contrair um anel, os grupos de ligação

podem se encontrar em diferentes posições e conduzir a melhores interações com o sítio de ligação (PATRICK, 2009).

- *Aumento ou redução da flexibilidade*

A restrição conformacional pode permitir o aumento da seletividade de um determinado ligante pelo alvo, facilitando assim, a identificação dos grupos essenciais (farmacóforo) ou não essenciais (auxóforo) para a interação. Por outro lado, maior flexibilidade conformacional pode proporcionar melhor encaixe com o sítio de ligação. A redução do grau de liberdade conformacional é obtida, normalmente, através de adição de duplas ligações ou fechamento de anéis. Já o oposto, abertura de anéis e retirada de duplas ligações, favorecem uma maior liberdade conformacional à molécula (WERMUTH, 2008). Um exemplo que pode ser utilizado para ilustrar trata-se do derivado triazolotieno-1,4-diazepínico denominado WEB-2170 com propriedades antitrombóticas. Este foi originado a partir da anelação do WEB-2086 (Figura 33). Mesmo não sendo utilizado terapeuticamente, apresentou melhor valor de  $IC_{50}$  ( $0,55 \mu M$ ) em comparação com o seu protótipo ( $IC_{50}$  de  $0,7 \mu M$ ) (BARREIRO; FRAGA, 2008).



**Figura 33:** Planejamento do composto WEB-2170 a partir do WEB-2086.

Deste modo, modificações moleculares permitem diversas variações em um composto protótipo para obtenção de novos derivados terapeuticamente úteis. Tais processos trazem a vantagem de obtenção de compostos com a mesma ação terapêutica pretendida, contudo com melhor previsão dos perfis farmacocinéticos e

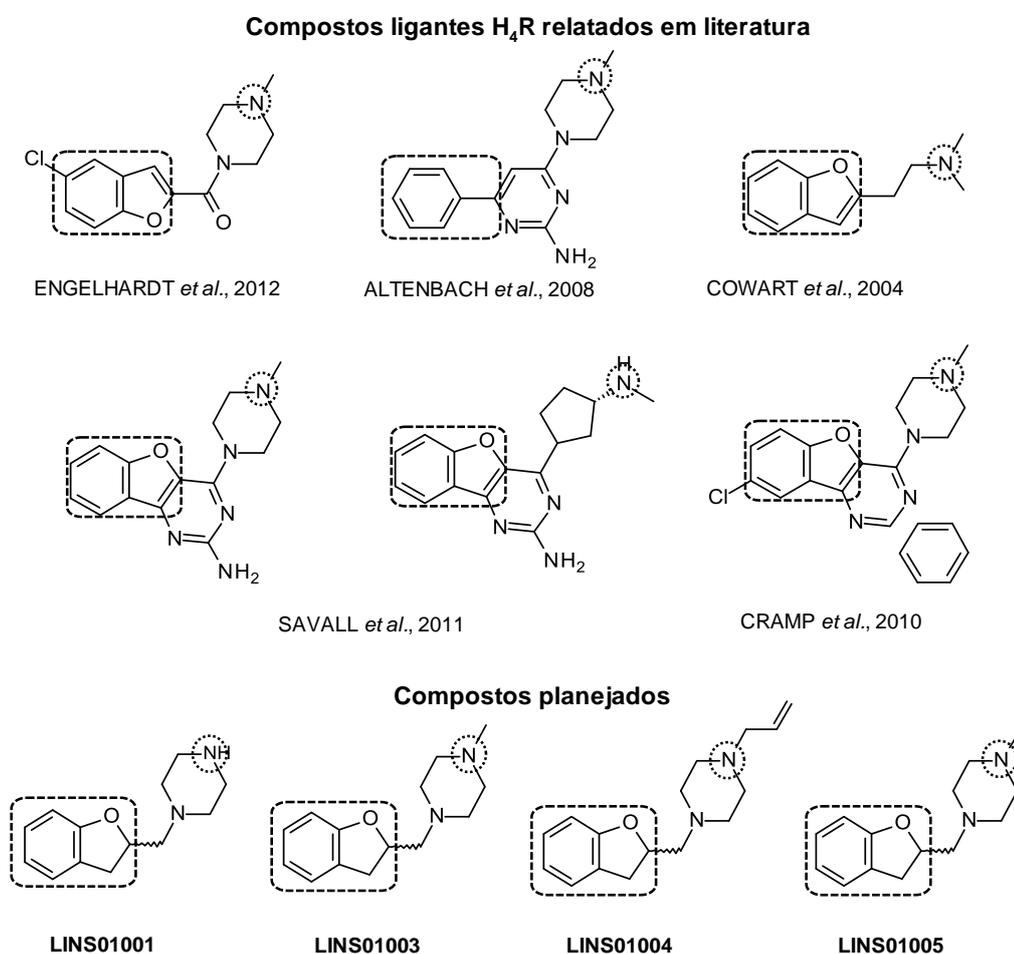
farmacodinâmicos. A necessidade de novas moléculas biologicamente ativas tem levado pesquisadores a utilizarem extensivamente diversos métodos de modificação molecular para atingir tal objetivo.

---

#### 3.1 Objetivos

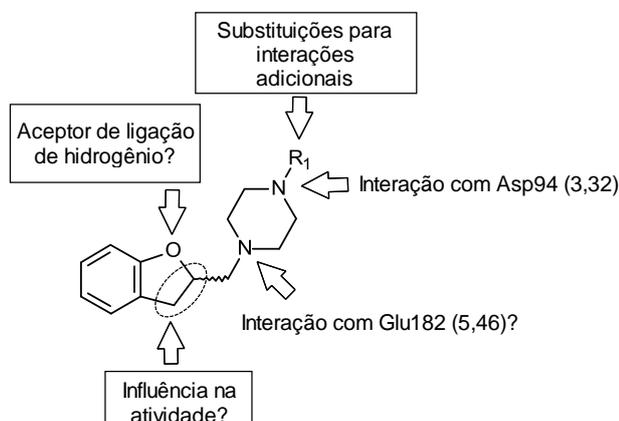
À vista do potencial terapêutico que ligantes do H<sub>4</sub>R apresentam e diante a experiência de nosso grupo na síntese de compostos heterocíclicos, objetivou-se sintetizar 1-(2-(2,3-dihidrobenzofuranil)metil)piperazinas inéditas e avaliar a atividade ligante em receptores histaminérgicos H<sub>4</sub>, bem como em receptores histaminérgicos H<sub>3</sub>, para analisar o índice de seletividade frente aos dois receptores e obter compostos com o maior índice de seletividade H<sub>4</sub>R.

O planejamento de tais compostos foi baseado em semelhanças estruturais presentes em ligantes relatados em literatura e características farmacofóricas descritas anteriormente. As estruturas e as semelhanças dos compostos planejados e os compostos relatados na literatura são mostradas na Figura 34.



**Figura 34:** Compostos ligantes H<sub>4</sub>R reportados em literatura e os planejados.

Os requisitos considerados no planejamento dos compostos acima propostos encontram-se esquematizados na figura 35. Através destes, pretendeu-se avaliar alguns pontos específicos, descritos a seguir:



**Figura 35:** Características consideradas para o planejamento dos compostos.

(1) *Presença do grupo básico (amino) para interação com Asp94 (3.32)*

O aminoácido Asp94 (3.32), presente em todos os receptores de aminas é considerado essencial para a adequada interação com H<sub>4</sub>R.

(2) *Papel do heteroátomo como doador ou aceptor de ligação de hidrogênio*

Muitos ligantes do H<sub>4</sub>R apresentados em literatura possuem um anel aromático heterocíclico, geralmente representado pelo nitrogênio presente em compostos indólicos ou benzimidazólicos. É proposto que o nitrogênio interage com o aminoácido Glu182 (5.46) como doador de ligação de hidrogênio. Uma vez que os compostos propostos neste trabalho não possuem o nitrogênio (apresentam o oxigênio em suas estruturas) almeja-se avaliar o papel do heteroátomo como doador ou aceptor de ligação de hidrogênio.

(3) *Nitrogênio piperazínico para interação com Glu182 (5.46)*

É proposto que o nitrogênio indólico realiza uma interação de hidrogênio com o aminoácido Glu182 (5.46). Entretanto, nossos compostos apresentam um segundo nitrogênio básico no grupo piperazina, protonável em pH fisiológico, e assim

---

podendo realizar a mesma interação. Como nas indolcarboxamidas esse nitrogênio não é básico, o papel envolvido na interação com o alvo pode ser diferente.

*(4) Interação do grupo carbonila como acceptor de ligação de hidrogênio*

Alguns ligantes, como as indolcarboxaminas, apresentam um grupo carbonila em sua estrutura e este grupo pode interagir como acceptor de ligação de hidrogênio. Os compostos propostos neste trabalho não apresentam a carbonila, assim mantem a característica básica do nitrogênio piperazínico. Desta forma, pretende-se avaliar se a carbonila possui papel essencial na interação com H<sub>4</sub>R ou se é apenas um grupo auxofórico, como proposto por Christopher, Thangam e Suresh (2012).

*(5) Influência de R<sub>1</sub> perante propriedades hidrofóbicas e/ou estéricas*

Com os substituintes ligados ao N<sup>4</sup>-piperazínico (R<sub>1</sub>) objetiva-se avaliar se características hidrofóbicas e/ou estéricas influenciam na interação dos ligantes com possíveis sítios hidrofóbicos presentes no receptor.

*(6) Ausência da aromaticidade do heterociclo*

Pretende-se por fim, analisar a influência da aromaticidade do heterociclo, pois os compostos enunciados até o momento na literatura apresentam propriedade aromática. Recentemente, foi verificado que não é necessário um núcleo aromático bicíclico para a interação com H<sub>4</sub>R (SAVALL *et al.*, 2014).

Os objetivos específicos deste trabalho consistem em:

- a) Desenvolver metodologias sintéticas para obtenção dos compostos 1-(2-(2,3-diidrobenzofuranil)metil)piperazínicos;
  - b) Otimizar os procedimentos sintéticos para obtenção de rendimentos satisfatórios e pureza adequada para os ensaios biológicos;
  - c) Avaliar os compostos finais propostos obtidos através de ensaios de *binding* nos receptores histaminérgicos H<sub>4</sub> e H<sub>3</sub>;
-

- d) Avaliar possíveis relações estrutura-atividade dos compostos planejados para tais receptores.

### 3.2 Justificativa

A histamina é uma das mais importantes aminas biogênicas mediadora de diversas ações fisiológicas. Encontrada em uma enorme variedade de células está envolvida em processos como a inflamação, reações de hipersensibilidade (CAMELO-NUNES, 2006), produção da secreção gástrica e numerosas funções no sistema nervoso central (ZIMMERMANN *et al.*, 2011).

Fármacos ligantes dos receptores histaminérgicos são utilizados na prática clínica durante muitos anos. Com a descoberta de um novo receptor histaminérgico (o receptor H<sub>4</sub>), o interesse no desenvolvimento de novos ligantes capazes de interagir com esses receptores cresceu continuamente.

Expresso em células de origem hematopoiética como mastócitos, monócitos, eosinófilos, células dendríticas e linfócitos T (THURMOND, GELFAND, DUNFORD, 2008), estudos foram publicados relatando interessante papel do receptor histaminérgico H<sub>4</sub> na resposta inflamatória e imunológica, e consequentemente, na fisiopatologia de diversas doenças autoimunes e inflamatórias (ZAMPELI, TILIGADA, 2009; GUTZMER *et al.*, 2011; MARSON, 2011; GLATZER *et al.*, 2013).

O processo inflamatório está envolvido em diversas condições fisiopatológicas (GILROY; MAEYER, 2015) que engloba diferentes processos do sistema imunológico. Pode ocorrer por distintas maneiras e variados mediadores pró-inflamatórios são liberados (DINARELLO, 2010), como histamina, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009) e citocinas (LEE; SURH, 2012). Este processo ocorre na tentativa de combater o agente invasor, remover os metabólitos e promover o reparo tecidual (O'CONNOR; NICHOL, 2015). Usualmente, o tratamento para as doenças inflamatórias é realizado com fármacos anti-inflamatórios subdivididos em duas classes: corticosteróides e anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

---

Os AINEs atuam através da inibição das isoenzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e consequente redução da biossíntese de prostaglandinas (PALKAR *et al.*, 2014). Uma importante limitação deste alvo farmacológico consiste na frequente presença de efeitos adversos, como modificações na hemodinâmica glomerular, hepatotoxicidade (KUMMER; COELHO, 2002), nefrotoxicidade e principalmente alterações gastrintestinais (LAGES *et al.*, 1998). Além disso, o uso a longo prazo de alguns inibidores seletivos de COX-2 demonstrou complicações cardiovasculares e atraso na cicatrização de úlceras gastroduodenais (HUSAIN *et al.*, 2015).

Já os corticosteróides atuam por inibir a fosfolipase A<sub>2</sub>, responsável pela liberação do ácido araquidônico, através da indução da síntese de um grupo de proteínas, as anexinas (ou lipocortinas) (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998). Reações adversas podem também ser observadas, como linfocitopenia, monocitopenia e eosinopenia (FAIÇAL; UEHARA, 1998). Os efeitos adversos podem ser agravados quando seu uso é contínuo. Estudos demonstram que o uso prolongado de corticosteróides pode levar a resistência insulínica, intolerância a glicose e alteração na composição óssea, podendo desenvolver osteoporose (COOPER; SEIBEL; ZHOU, 2015).

À vista dos variados efeitos adversos apresentados pelos anti-inflamatórios clássicos, o desenvolvimento de novos anti-inflamatórios com distinto mecanismo de ação é considerado uma importante estratégia devido ao impacto terapêutico para pacientes que sofrem de doenças inflamatórias.

Assim, diante das funções exercidas pelos H<sub>4</sub>Rs, ligantes destes (antagonistas ou agonistas inversos) podem ter futura aplicação como anti-inflamatórios e imunomoduladores, para o tratamento de doenças como, doença inflamatória intestinal, doença alérgica gastrintestinal, artrite e outras doenças inflamatórias crônicas. Particularmente, para as patologias que possuem sintomas resistentes aos anti-histamínicos já existentes, como a asma e o prurido relacionado à dermatite atópica e urticária crônica (PAPIRIS *et al.*, 2009; DAUGHERTY, 2004; YAMAURA *et al.*, 2013). Desta forma, a pesquisa para obtenção de novas moléculas ligantes desses receptores merece atenção.

---

### 4.1 Material

#### 4.2.1 Reagentes e vidrarias

Os reagentes e solventes utilizados foram obtidos de fornecedores padrões e quando necessário os solventes foram purificados de acordo com métodos usuais. As vidrarias utilizadas foram de uso comum de química básica e síntese orgânica.

Para os ensaios de *binding* alguns materiais foram obtidos de fornecedores específicos, sendo: [<sup>3</sup>H]-histamina (American Radiolabeled Chemicals); dibromidrato de (*R*)-(-)- $\alpha$ -metil-histamina, dicloridrato de 4-[(3*R*)-3-amino-pirrolidin-1-il]-6,7-diidro-5*H*-benzo[6,7]ciclohepta[1,2-*d*]pirimidin-2-ilamina (A-943931) e dicloridrato de histamina (Tocris Bioscience); líquido de cintilação Ecolume (MP Biochemicals); membranas de células CHO expressando os receptores H<sub>4</sub> e H<sub>3</sub> humanos (Perkin-Elmer).

As cromatografias em coluna foram realizadas usando sílica-gel 60 (230-400 mesh ASTM). As análises de CCD (cromatografia em camada delgada) foram executadas com placas de gel de sílica, utilizando luz ultra-violeta para visualização.

#### 4.2.2 Equipamentos

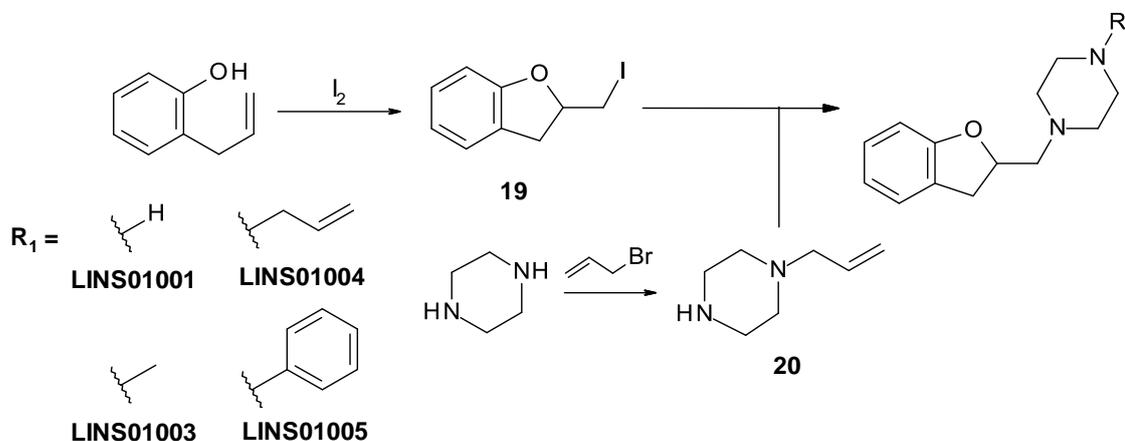
- Contador de cintilações 6500 (Beckman)
- Cromatógrafo gasoso acoplado à detector de massas (CG-MS) QP5050 A (Shimadzu)
- Cromatógrafo líquido acoplado à espectrômetro de massas de alta resolução (LC-MS) (Bruker)
- Distribuidor *Deposit & Dispenser* BK-36 (Brandel)
- Espectrômetro de RMN DPX300 operando a 300 MHz (<sup>1</sup>H) e 75 MHz (<sup>13</sup>C) (Bruker)
- Evaporador rotativo R-210 (Büchi)

- *Harvester* MB-36T (Brandel)
- Lavadora ultrassônica de 40kHz com banho termostatzado Q1.8140A (Eco-sonics)

## 4.2 Método

### 4.2.1 Planejamento sintético dos compostos

O Esquema 1 mostra a rota sintética para as 1-(2-(2,3-diidrobenzofuranil)metil)piperazinas.



**Esquema 1:** Rota sintética para obtenção dos compostos planejados.

A preparação dos compostos 1-(2-(2,3-diidrobenzofuril)metil)piperazínicos planejados consiste, inicialmente, na obtenção do produto 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano (**19**). Este foi obtido a partir da ciclização do 2-aliifenol utilizando iodo conforme metodologia publicada por Pancote *et al.* (2009), fornecendo o núcleo diidrofurânico iodometilado. Posteriormente, o produto iodociclizado teve seu halogênio substituído, por substituição nucleofílica bimolecular, para chegar aos compostos finais (ALCAIDE; ALMENDROS; ALONSO, 2003).

Os derivados com os substituintes metila (**LINS01003**) e fenila (**LINS01005**) ligados ao *N*<sup>1</sup>-piperazínico foram preparados a partir de reagentes comerciais já substituídos (1-metilpiperazina e 1-fenilpiperazina), utilizando metodologia adaptada de Ohtaka *et al.* (1987), através da mistura dos compostos dissolvidos em solvente

polar em presença de uma base. O derivado não substituído (**LINS01001**) foi obtido por metodologia sintética distinta para evitar a diss substituição. Primeiramente, preparou-se o monoclórato de piperazina a partir da mistura de 1 equivalente de diclorato de piperazina (obtido pela reação com HCl etanólico) com 1 equivalente de piperazina anidra em etanol, sob aquecimento a 65 °C (CUNICO *et al.*, 2009). Com o monoclórato de piperazina obtido realizou-se a substituição do halogênio para chegar ao composto final **LINS01001**. Por fim, o composto **LINS01004**, que apresenta o substituinte alila ligado ao  $N^4$ -piperazínico, foi também preparado a partir da alilação do monoclórato de piperazina. A alilação se dá com o uso de brometo de alila gerando a 1-alilpiperazina (**20**) (CUNICO *et al.*, 2009). Esta reagiu com o produto iodociclizado obtido na etapa comum a todos os derivados, conforme descrito anteriormente, para levar à formação do composto planejado.

#### 4.2.2 Identificação

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e os compostos obtidos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ -RMN) e de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN), além de espectrometria de massas (EM). A pureza dos compostos foi avaliada por cromatografia gasosa e líquida, e foram consideradas para os ensaios biológicos as amostras com pureza superior a 85%.

#### 4.2.3 Ensaio da atividade biológica

A atividade ligante nos receptores histaminérgicos  $H_4$  e  $H_3$  foi avaliada através de ensaios de *binding* (*binding assays*) realizados no Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan sob coordenação do Prof. Dr. Lanfranco Ranieri Paolo Troncone. O ensaio nos permitiu analisar os graus de afinidade e seletividade dos compostos propostos perante os dois receptores.

O ensaio baseia-se na interação de um ligante marcado radioativamente e um ligante competidor não-marcado com os alvos de interesse. A afinidade e seletividade do ligante não-marcado (ou competidor-teste) foram determinadas através do deslocamento da [ $^3\text{H}$ ]-histamina em concentração definida (L) com

---

concentrações crescentes do competidor (JONG *et al.*, 2005; HULME; TREVETHICK, 2010). Foram utilizadas membranas de células CHO que expressam H<sub>3</sub>R e H<sub>4</sub>R, e a quantidade de ligante radiomarcado ligado foi determinado utilizando contador de cintilação. A constante de interação ( $K_i$ ) foi obtida a partir do valor de IC<sub>50</sub> (concentração necessária para o deslocamento de 50% do ligante marcado radioativamente), empregando a equação de Cheng-Prussoff (Equação 1) (CHENG; PRUSSOFF, 1973).

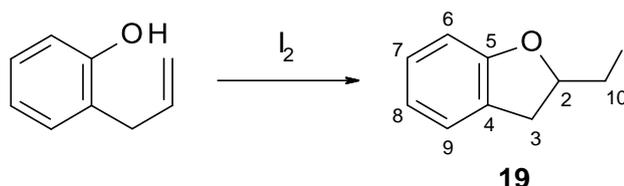
$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{(L)}{K_d}} \quad \text{(Equação 1)}$$

Foram usados como referência os ligantes (*R*)- $\alpha$ -metil-histamina (para H<sub>3</sub>R) e A-943931 (para H<sub>4</sub>R).

---

**5.1 Síntese dos compostos planejados**

5.1.1 Síntese do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano (**19**)



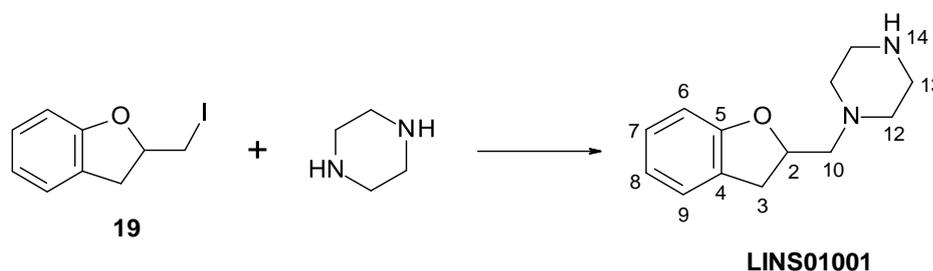
**Esquema 2:** Síntese do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.

2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano (**19**): Líquido oleoso levemente amarelado.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3,05 (dd, 1H,  $J = 16,0, 6,3$  Hz, H-10a); 3,30-3,50 (m, 3H, H-3,10b); 4,85-4,95 (m, 1H, H-2); 6,79 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz, H-6); 6,87 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, H-8); 7,08-7,22 (m, 2H, H-7,9) (Apêndice 1).

As metodologias para preparação do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano (**19**) foram realizadas variando o solvente (mistura de EtOH:H<sub>2</sub>O (1:9) ou H<sub>2</sub>O) e presença ou ausência de bicarbonato de sódio. Em um balão de 50 mL, 3,0 mmol (0,40 g) de 2-aliilfenol e 3,3 mmol (0,84 g) de iodo foram adicionados em aproximadamente 20 mL de solvente adequado. Quando necessário, 3,0 mmol (0,25 g) de NaHCO<sub>3</sub> foram também adicionados e deixados sob agitação magnética por 4 horas. A mistura aquosa foi extraída 3 vezes com 15 mL de hexano e o combinado das fases orgânicas foi lavado com solução saturada de tiosulfato de sódio até redução total do iodo excedente. A seguir, a fase orgânica foi separada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica utilizando uma mistura de hexano:acetato de etila (9:1) como eluente (Rendimento: tabela 1).

**Tabela 1:** Condições utilizadas para a síntese do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.

Experimento	Solvente	Base	Rendimento médio (%)
1	H <sub>2</sub> O	Não	87
2	EtOH:H <sub>2</sub> O	Não	72
3	H <sub>2</sub> O	NaHCO <sub>3</sub>	79
4	EtOH:H <sub>2</sub> O	NaHCO <sub>3</sub>	62

5.1.2 Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (**LINS01001**)

Esquema 3: Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina.

1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (**LINS01001**): Sólido amarelado. Pureza (CG-MS): 95%.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,50-2,75 (m, 4H, H-12a,13a); 2,76-2,86 (m, 3H, H-3a,12a); 2,87-3,00 (m, 2H, H-3b,10a); 3,14 (t, 2H,  $J = 4,9$  Hz, H-13b); 3,38 (dd, 1H,  $J = 15,7, 9,3$  Hz, H-10b); 3,64 (sl, 1H, H-14); 4,89-5,04 (m, 1H, H-2); 6,77-6,88 (m, 2H, H-6,8); 7,08-7,20 (m, 2H, H-7,9) (Apêndice 2).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  34,0 (C-3); 44,5 (C-13); 52,2 (C-12); 63,0 (C-10); 80,5 (C-2); 109,7 (C-6); 120,6 (C-4); 125,0 (C-8); 126,2 (C-9); 128,1 (C-7); 159,3 (C-5) (Apêndice 3). EM (IE):  $m/z$  218 ( $\text{M}^+$ ); 99 ( $\text{M}^+$  - diidrobenzofurano) (Apêndice 4).

As reações de preparação de 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (**LINS01001**) foram conduzidas utilizando dois métodos diferentes sendo: (1) uso do monoclóridato de piperazina ou (2) uso de piperazina como base livre, como descrito a seguir.

- Usando monoclóridato de piperazina

Em um frasco de 50 mL, adicionaram-se 2,0 mmol (0,17 g) de piperazina anidra com quantidade de isopropanol suficiente para completa dissolução. A seguir, ácido clorídrico concentrado foi gotejado até que a formação de precipitado (dicloridrato de piperazina) fosse finalizada. O sólido branco foi lavado com isopropanol e seco. Separadamente, em um balão de 50 mL, adicionaram-se 2,0 mmol (0,17 g) de piperazina anidra em cerca de 20 mL de etanol (EtOH) sob agitação magnética e aquecimento (65 °C) até dissolução. Em seguida, adicionou-se à solução o dicloridrato de piperazina previamente preparado. Esta mistura reacional foi mantida em agitação para dissolução dos componentes e a seguir, adicionou-se

lentamente 2,0 mmol (0,52 g) de **19**. Esta suspensão permaneceu em aquecimento (2 horas) e agitação por 12 horas. A mistura reacional foi filtrada, e ao filtrado adicionou-se 15 mL de etanol gelado, quando gotejou-se HCl concentrado até que cessasse a formação de precipitado. O precipitado formado foi separado e alcalinizado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) (pH > 12). Posteriormente, a mistura foi lavada 4 vezes com 10 mL de solvente apropriado (éter etílico ou acetato de etila). A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado (Rendimento: não determinado).

- *Usando piperazina como base livre*

#### *Procedimento 1*

Em um balão de 50 mL contendo 15 mL do solvente apropriado (etanol ou tetraidrofurano), adicionaram-se 2,0 mmol (0,52 g) de **19**, 8,0 mmol (0,70 g) de piperazina anidra e 2,0 mmol (0,30 g) de carbonato de potássio. A suspensão foi mantida sob agitação magnética em temperatura ambiente por 12 horas. O solvente foi evaporado, e o resíduo foi redissolvido em 10 mL de acetato de etila. A mistura resultante foi lavada 4 vezes com 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi separada, seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporada (Rendimento: não determinado).

#### *Procedimento 2*

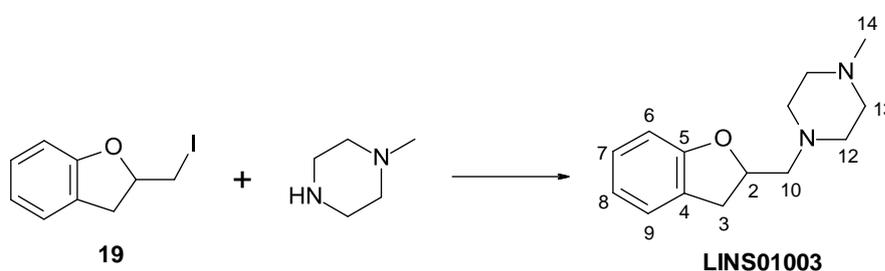
Em um balão de 50 mL contendo 15 mL do solvente adequado (etanol ou tetraidrofurano), foram adicionados 2,0 mmol (0,52 g) de **19**, 8,0 mmol (0,70 g) de piperazina anidra e 2,0 mmol (0,30 g) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A mistura foi mantida em agitação à temperatura ambiente ou em aquecimento (60 °C) por 12 horas (Tabela 2). Após, evaporou-se o solvente e acidificou-se o meio com solução de HCl 1 mol/L até pH~2. Em seguida, a mistura obtida foi lavada 4 vezes com 10 mL de hexano e a fase orgânica descartada. A fase aquosa foi alcalinizada com solução de NaOH 1 mol/L até pH > 12, e extraída com acetato de etila (4 vezes de 10 mL). O combinado das fases orgânicas foi seco com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporado (Rendimento: tabela 2).

**Tabela 2:** Condições utilizadas para a síntese do **LINS01001** pelo procedimento 2.

Experimento	Solvente	Temperatura	Rendimento (%)
1	EtOH	t.a.	n.d.
2	THF	t.a.	n.d.
3	EtOH	60 ° C	n.d.
4	THF	60 ° C	83

n.d.: rendimento não determinado

### 5.1.3 Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)-4-metil-piperazina (**LINS01003**)

**Esquema 4:** Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)-4-metil-piperazina.

1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)-4-metil-piperazina (**LINS01003**): Sólido levemente amarelado. Pureza (CG-MS): 96%.  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,29 (s, 3H, H-14); 2,35-2,70 (m, 9H, H-3a,12,13); 2,79 (dd, 1H,  $J = 13,3, 7,8$  Hz (H-3b)); 2,94 (dd, 1H,  $J = 15,6, 7,9$  Hz, H-10a); 3,26 (dd, 1H,  $J = 15,6, 9,2$  Hz, H-10b); 4,95 (dq, 1H,  $J = 9,0, 3,9$  Hz, H-2); 6,75-6,88 (m, 2H, H-6,8); 7,04-7,20 (m, 2H, H-7,9) (Apêndice 5).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  34,2 (C-3); 46,0 (C-14); 53,8 (C-13); 55,0 (C-12); 63,2 (C-10); 80,8 (C-2); 109,6 (C-6); 120,3 (C-4); 124,9 (C-8); 126,4 (C-9); 128,0 (C-7); 159,5 (C-5) (Apêndice 6). EM (MicroTOF, ESI, modo positivo, ID)  $m/z$  teórico 233,1648 (M+H), 234,1721 (M+H+1); experimental 233,1683 (M+H), 234,1680 (M+2H) (Apêndice 7); EM (IE):  $m/z$  232 ( $\text{M}^+$ ); 217 ( $\text{M}^+ - \text{CH}_3$ ) 113 ( $\text{M}^+ - \text{diidrobenzofurano}$ ) (Apêndice 8).

#### Procedimento 1

Em um balão de 50 mL contendo 15 mL de etanol, adicionaram-se 2,0 mmol (0,52 g) de **19**, 2,0 mmol (0,30 g) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e 8,0 mmol (0,80 g) de 1-metilpiperazina. A mistura reacional foi mantida em agitação em temperatura ambiente por 12 horas.

Após filtração, o solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em solução de HCl 1 mol/L. A mistura foi lavada 4 vezes com 10 mL de hexano e a fase orgânica descartada. A fase aquosa foi alcalinizada com solução de NaOH 1 mol/L (até pH > 12) e extraída com 10 mL de solvente adequado (diclorometano ou éter etílico) 4 vezes. O combinado das fases orgânicas foi seco com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporado (Rendimento: não determinado).

### *Procedimento 2*

Em um balão de 50 mL contendo 15 mL de tetraidrofurano (THF), adicionaram-se 2,0 mmol (0,52 g) de **19**, 2,0 mmol (0,30 g) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 1-metilpiperazina em quantidade de 2,0 mmol (0,20 g) ou 8,0 mmol (0,80 g). A mistura reacional foi mantida em agitação magnética, em aquecimento (60 °C) ou à temperatura ambiente por 12 horas (Tabela 3). Após filtração, o solvente foi evaporado e o resíduo obtido foi redissolvido em 10 mL de éter etílico. A mistura foi lavada por 4 vezes com 10 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporada. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica utilizando clorofórmio:metanol (8:1) como eluente (Rendimento: tabela 3).

**Tabela 3:** Condições utilizadas para a síntese do **LINS01003** pelo procedimento 2.

Experimento	Proporção	Condição reacional	Rendimento (%)
1	1:1	Agitação (t.a.)	2
2	1:4	Agitação (t.a.)	3
3	1:1	Agitação (60 °C)	9
4	1:4	Agitação (60 °C)	12

t.a.: temperatura ambiente

### *Procedimento 3*

Em frasco de fundo chato contendo 15 mL de THF, adicionaram-se 2,0 mmol (0,52 g) de **19**, 2,0 mmol (0,30 g) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e quantidade adequada de 1-metilpiperazina (2,0 mmol ou 8,0 mmol). A mistura reacional foi agitada sob irradiação ultrassônica por 2 horas. A seguir, foi filtrada e evaporada. O resíduo foi redissolvido em 10 mL de éter etílico, e a mistura foi lavada 4 vezes com 10 mL de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>. A fase orgânica separada foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro

e o solvente evaporado. O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica utilizando clorofórmio:metanol (8:1) como eluente (Rendimento: tabela 4).

**Tabela 4:** Condições utilizadas para a síntese do **LINS01003** pelo procedimento 3.

Experimento	Proporção	Rendimento (%)
1	1:1	n.d.
2	1:4	2

n.d.: não determinado

#### *Procedimento 4*

Em um balão de 50 mL adicionaram-se 2,0 mmol (0,52 g) de **19**, 2,0 mmol (0,30 g) de  $K_2CO_3$ , 8,0 mmol (0,80 g) de 1-metilpiperazina e 15 mL de tetraidrofurano. A mistura foi mantida em agitação magnética sob aquecimento (60 °C) por 12 horas, e em seguida filtrada e evaporada. A purificação do resíduo resultante foi realizada de maneiras distintas sendo: (**A**) o óleo obtido foi dissolvido em 10 mL de acetato de etila e lavado com 10 mL de solução de cloreto de sódio 4 vezes. A fase orgânica foi seca com  $Na_2SO_4$  anidro e o solvente foi evaporado. O produto obtido foi então purificado em coluna cromatográfica utilizando clorofórmio:metanol (8:1) como eluente; (**B**) o óleo obtido foi dissolvido em solução de HCl 1 mol/L e lavado 4 vezes com 10 mL de hexano. A fase aquosa foi alcalinizada com solução de NaOH 1 mol/L (pH > 12) e extraída com solvente apropriado (éter etílico ou acetato de etila – Tabela 5). O combinado das fases orgânicas foi separado, seco com  $Na_2SO_4$  anidro e o solvente evaporado (Rendimento: tabela 5).

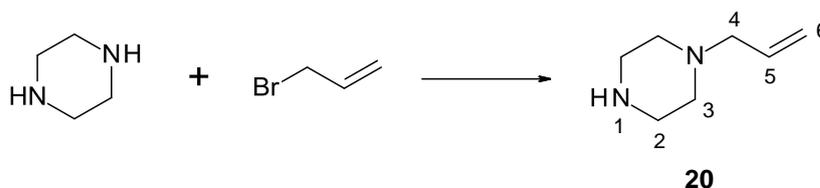
**Tabela 5:** Condições utilizadas para a síntese do **LINS01003** pelo procedimento 4.

Experimento	Extração	Rendimento (%)
1	<b>A</b>	n.d.
2	<b>B</b> (éter etílico)	n.d.
3	<b>B</b> (acetato de etila)	85

n.d.: não determinado

#### 5.1.4 Síntese da 1-alilpiperazina (**20**)

Para a obtenção da 1-álil-4-(2,3-dihidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (**LINS01004**), necessita-se primeiramente a obtenção da 1-álilpiperazina (**20**). Assim como para a obtenção do **LINS01001**, as sínteses de **20** foram conduzidas através de dois métodos distintos sendo, com o uso do monoclóridato de piperazina ou utilizando piperazina como base livre.



**Esquema 5:** Síntese da 1-álilpiperazina.

1-álilpiperazina (**20**): Líquido levemente amarelado. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,97 (sl, 2H, H-4); 2,42 (sl, 3H, H-1,3a); 2,50 (sl, 2H, H-3b); 2,81-2,95 (m, 2H, H-2a); 2,95-3,05 (m, 2H, H-2b); 5,15 (m, 1H, H-6<sub>cis</sub>); 5,19 (m, 1H, H-6<sub>trans</sub>); 5,87 (ddt, 1H, *J* = 17,1, 10,3, 6,6 Hz, H-5) (Apêndice 9). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 43,8 (C-13); 49,7 (C-12); 61,1 (C-14); 119,3 (C-16); 133,6 (C-15) (Apêndice 10).

- *Usando monoclóridato de piperazina*

Em um frasco de 50 mL, foram adicionados 2,0 mmol (0,17 g) de piperazina em quantidade suficiente de isopropanol para completa dissolução. A seguir, HCl concentrado foi gotejado até a formação de precipitado (dicloridrato de piperazina). O sólido formado foi lavado com isopropanol e seco. Separadamente, em um balão de 50 mL adicionaram-se 2,0 mmol (0,17 g) de piperazina em cerca de 20 mL de EtOH e deixou-se sob agitação e aquecimento (65 °C) até dissolução. Em seguida, adicionou-se nessa mistura o dicloridrato de piperazina previamente preparado. Esta mistura reacional foi mantida em agitação para dissolução dos componentes e a seguir, adicionou-se 2,0 mmol (0,24 g) de brometo de alila e deixou-se novamente em agitação por 12 horas. A mistura reacional foi filtrada e ao filtrado adicionou-se 15 mL de etanol gelado e gotejou-se HCl até que cessasse a formação de precipitado. O precipitado formado foi dissolvido em solução de NaOH 1 mol/L (pH > 12) e realizou-se extração com 10 mL de éter etílico ou acetato de etila 4 vezes. As

fases orgânicas foram combinadas, seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e o solvente evaporado (Rendimento: não determinado).

- *Usando a piperazina como base livre*

#### *Procedimento 1*

Em um balão de 50 mL adicionaram-se 15 mL de THF, 2,0 mmol (0,30 g) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 2,0 mmol (0,33 g) de iodeto de potássio, 2,0 mmol (0,24 g) de brometo de alila e 8,0 mmol (0,70 g) de piperazina. A suspensão foi submetida a agitação magnética em temperatura ambiente ou sob aquecimento (60 °C) por 12 horas (Tabela 6). Após filtração, evaporou-se o filtrado e o resíduo restante foi redissolvido em 10 mL de acetato de etila. A solução foi lavada com água destilada 4 vezes e a fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e o solvente evaporado (Rendimento: tabela 6).

**Tabela 6:** Condições utilizadas para a síntese da 1-alilpiperazina pelo procedimento 1.

Experimento	Condição reacional	Rendimento (%)
1	Agitação (t.a.)	15
2	Agitação (60 °C)	8 – 34

#### *Procedimento 2*

Em um frasco de fundo chato contendo 15 mL do solvente apropriado (etanol ou THF), adicionaram-se 2,0 mmol (0,24 g) de brometo de alila, 4,0 mmol (0,35 g) de piperazina e quando necessário 2,0 mmol (0,30 g) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e 2,0 mmol (0,33 g) de iodeto de potássio. A mistura reacional permaneceu sob irradiação ultrassônica pelo tempo descrito na tabela 7. Após filtração o solvente foi evaporado. Ao resíduo foram adicionados 10 mL de acetato de etila, e após nova filtração, a solução foi seca com  $\text{N}_2\text{SO}_4$  anidro e evaporada (Rendimento: tabela 7).

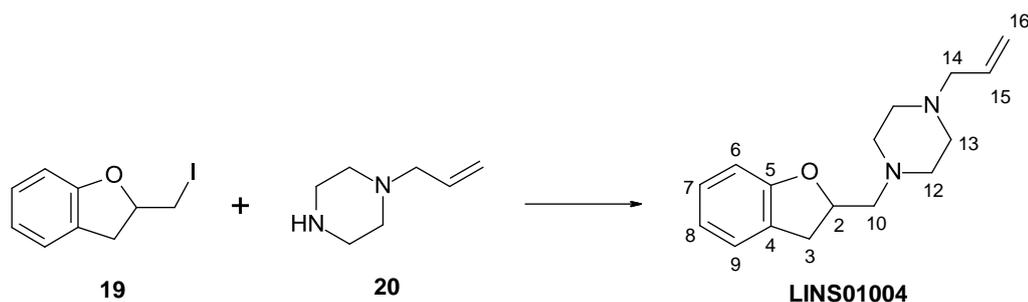
**Tabela 7:** Condições utilizadas para a síntese da 1-alilpiperazina pelo procedimento 2.

Experimento	Solvente	KI	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Tempo (horas)	Rendimento (%)*
1	THF	Sim	Sim	1	36 – 57
2	THF	Sim	Sim	1,5	67 – 82
3	EtOH	Sim	Sim	1	28 – 55
4	EtOH	Sim	Sim	1,5	42 – 52
5	THF	Não	Não	1	13 – 67
6	THF	Não	Não	1,5	53 – 95
7	EtOH	Não	Não	1	49 – 54
8	EOH	Não	Não	1,5	53 – 91
9	EtOH	Não	Não	1	73 – 84**

\* significativa variação entre proporção de piperazina monoalilada:dialilada

\*\*procedimento realizado com piperazina anidra; produto obtido isolado

### 5.1.5 Síntese da 1-alil-4-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (LINS01004)



**Esquema 6:** Síntese da 1-alil-4-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina.

1-alil-4-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (**LINS01004**): Líquido de coloração castanha. Pureza (CG-MS): 84%. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2,38-2,72 (ml, 8H, H-12,13); 2,57 (dd, 1H, *J* = 13,3, 4,1 Hz, H-3a); 2,79 (dd, 1H, *J* = 13,3, 8,1 Hz, H-3b); 2,94 (dd, 1H, *J* = 15,6, 8,1 Hz, H-10a); 3,01 (dq, 2H, *J* = 6,6, 1,4 Hz, H-14); 3,26 (dd, 1H, *J* = 15,5, 9,1 Hz, H-10b); 4,95 (dtd, 1H, *J* = 9,1, 7,9, 4,1 Hz, H-2); 5,09-5,26 (m, 2H, H-16); 5,78-5,96 (m, 1H, H-15); 6,75-6,88 (m, 2H, H-6,8); 7,05-7,21 (m, 2H, H-7,9) (Apêndice 11). <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 34,2 (C-3); 52,9 (C-13); 53,7 (C-12); 61,8 (C-14); 63,4 (C-10); 80,6 (C-2); 109,7 (C-6); 118,4 (C-16); 120,3 (C-4); 124,9 (C-8); 126,4 (C-9); 128,0 (C-7); 134,9 (C-15); 159,5 (C-5) (Apêndice 12). EM (IE): *m/z* 258 (M<sup>+</sup>); 139 (M<sup>+</sup> - diidrobenzofurano) (Apêndice 13).

### *Procedimento 1*

Em um balão de 50 mL (ou em um frasco de fundo chato) adicionaram-se 15 mL de THF, 2,0 mmol (0,30 g) de  $K_2CO_3$ , 2,0 mmol (0,52 g) de **19** e 2,0 mmol (0,25 g) de **20**. A mistura reacional permaneceu sob irradiação ultrassônica (1 ou 2 horas). Em seguida, o solvente foi evaporado e o resíduo redissolvido em solução de HCl 1 mol/L com posterior lavagem com 10 mL de hexano (4 vezes). A fase aquosa foi alcalinizada com solução de NaOH 1 mol/L até pH > 12 e extraída 4 vezes com 10 mL de diclorometano. O combinado das fases orgânicas foi seco com  $N_2SO_4$  anidro e o solvente foi evaporado (Rendimento: não determinado).

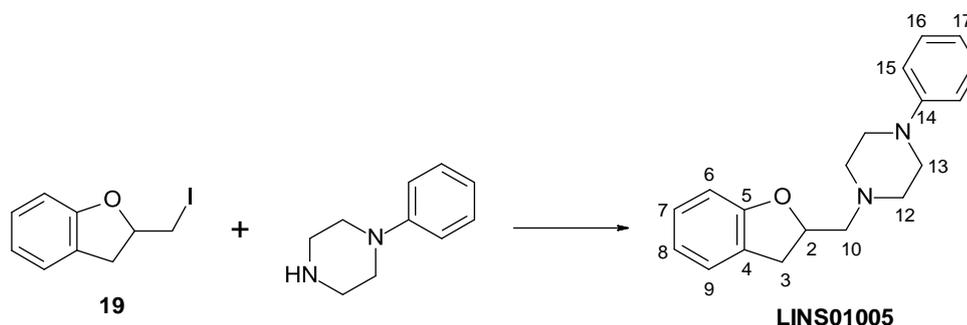
### *Procedimento 2*

Em um balão de 50 mL contendo 15 mL de THF, adicionaram-se 2,0 mmol (0,52 g) de **19**, 2,0 mmol (0,30 g) de  $K_2CO_3$  e 2,0 mmol (0,25 g) de **20**. A mistura permaneceu em agitação magnética e aquecimento (60 °C) por 12 horas. Posteriormente, a mistura foi filtrada e evaporada. O óleo resultante foi dissolvido em solução de HCl 1 mol/L e lavado 4 vezes com 10 mL de hexano. A fase aquosa foi alcalinizada com solução de NaOH 1 mol/L (até pH >12) e extraída 4 vezes com 10 mL de acetato de etila (ou diclorometano). O combinado das fases orgânicas foi então seco com  $Na_2SO_4$  anidro e evaporado (Rendimento: tabela 8).

**Tabela 8:** Condições utilizadas para a síntese de **LINS01004** pelo procedimento 2.

<b>Experimento</b>	<b>Solvente extrator</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>1</b>	diclorometano	n.d.
<b>2</b>	acetato de etila	66

n.d.: não determinado

5.1.6 Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)fenilpiperazina (**LINS01005**)

Esquema 7: Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)fenilpiperazina.

1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)fenilpiperazina (**LINS01005**): Sólido levemente amarelado. Pureza (CG-MS): 99%.  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,60-2,83 (m, 6H, H-3,12a,13a); 3,05 (dd, 1H,  $J = 15,8, 7,7$  Hz, H-10a); 3,14-3,23 (m, 4H, H-12b,13b); 3,30 (dd, 1H,  $J = 15,7, 9,0$  Hz, H-10b); 4,95-5,06 (m, 1H, H-2); 6,69-6,85 (m, 3H, H-6/15); 6,93-6,99 (m, 2H, H-7,9); 7,05-7,12 (m, 1H, H-17); 7,16-7,27 (m, 3H, H-8,16) (Apêndice 14).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  33,6 (C-3); 48,9 (C-13); 53,8 (C-12); 62,4 (C-10); 81,2 (C-2); 109,0 (C-6); 115,7 (C-15); 119,0 (C-17); 120,1 (C-4); 125,0 (C-8); 126,9 (C-9); 127,7 (C-7); 128,9 (C-16); 151,7 (C-14); 159,7 (C-5) (Apêndice 15). EM (MicroTOF, ESI, modo positivo, ID)  $m/z$  teórico 295,1805 (M+H), 296,1878 (M+H+1); experimental 295,1846 (M+H), 296,1846 (M+2H) (Apêndice 16). EM (IE):  $m/z$  294 ( $\text{M}^+$ ); 175 ( $\text{M}^+$  - diidrobenzofuranil) (Apêndice 17).

Em um balão de 50 mL contendo 15 mL de etanol, adicionaram-se 2,0 mmol (0,52 g) de **19**, 8,0 mmol (1,30 g) de 1-fenilpiperazina, 2,0 mmol (0,30 g) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e deixou-se sob agitação magnética em temperatura ambiente por 12 horas. Após filtração, evaporou-se o solvente e o resíduo obtido foi dissolvido em 10 mL de clorofórmio. A solução foi lavada 4 vezes com 10 mL de solução saturada de NaCl. Em seguida, a fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e o solvente foi evaporado (Rendimento: 19%).

## 5.2 Ensaio da atividade biológica (*binding assay*)

Baseando-se na capacidade de aspiração e filtração do *Harvester* MB-36T, os ensaios foram preparados simultaneamente para 36 amostras por procedimento. As membranas utilizadas foram da Perkin-Elmer GPCR *cell lines and membrane preparations*, consistindo de um preparado de células CHO que expressam H<sub>4</sub>R e H<sub>3</sub>R humanos obtidas comercialmente. Os valores de IC<sub>50</sub> e K<sub>d</sub> para ambos receptores (H<sub>3</sub>R e H<sub>4</sub>R) foram obtidos nos programas Phototox e GraphPad Prism, respectivamente.

### 5.2.1 Avaliação da afinidade por H<sub>4</sub>R

- *Curva de saturação de [<sup>3</sup>H]-histamina em H<sub>4</sub>R*

Os ensaios foram realizados para um volume total de 550 µL para cada amostra (Tabela 9). Em 32 tubos adequados adicionaram-se 500 µL de solução de membrana contendo H<sub>4</sub>R (diluição 1:200). Aos tubos 1 a 16, foram adicionados 25 µL de solução de [<sup>3</sup>H]-histamina nas concentrações definidas na tabela 9, e aos tubos 17 a 32, 25 µL de solução de dicloridrato de histamina 13 mM foram também acrescentados. Para os tubos 1 a 32, adicionou-se ainda o volume de 25 µL de solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo 5 mM de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). Finalmente, aos tubos 33 a 36 adicionaram-se 550 µL de solução tampão. A seguir, os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as soluções foram aspiradas e lavadas (9 x 500 µL), através do *Harvester* MB-36T com solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) gelado, sobre membrana filtrante GF/C (*Glass Fiber type C*) saturadas com 0,5% polietilenoimina. As amostras foram coletadas individualmente e adicionaram-se uma alíquota de cintilação, empregando o distribuidor *Deposit & Dispenser* BK-36. A seguir, as soluções foram analisadas em contador Beckman 6500 e as contagens radioativas foram usadas para a geração dos dados de K<sub>d</sub> para H<sub>4</sub>R.

**Tabela 9:** Condições utilizadas para o ensaio de saturação no H<sub>4</sub>R.

Tubos	Membrana (μL)	[ <sup>3</sup> H]-histamina (25 μL)	Histamina 13 mM (μL)	Tampão
1 – 2	500	50 nM	-	25
3 – 4	500	25 nM	-	25
5 – 6	500	12,5 nM	-	25
7 – 8	500	6,25 nM	-	25
9 – 10	500	3,125 nM	-	25
11 – 12	500	1,56 nM	-	25
13 – 14	500	0,78 nM	-	25
15 – 16	500	0,39 nM	-	25
17 – 18	500	50 nM	25	-
19 – 20	500	25 nM	25	-
21 – 22	500	12,5 nM	25	-
23 – 24	500	6,25 nM	25	-
25 – 26	500	3,125 nM	25	-
27 – 28	500	1,56 nM	25	-
29 – 30	500	0,78 nM	25	-
31 – 32	500	0,39 nM	25	-
33 – 34	-	-	-	550
35 – 36	-	-	-	550

- *Ensaio de competição no H<sub>4</sub>R*

Assim como para o ensaio de saturação, o ensaio de competição também foi realizado para um volume total de 550 μL para cada amostra. Em 108 tubos adequados adicionaram-se 500 μL de solução de membrana contendo H<sub>4</sub>R (diluição 1:200) e 25 μL de solução de [<sup>3</sup>H]-histamina 10 nM. Nos tubos 1 a 105, foram adicionados 25 μL de solução dos compostos competidores nas concentrações definidas na tabela 10. Os compostos utilizados foram o ligante de referência A-943931 (antagonista H<sub>4</sub>R) e os competidores-testes sintetizados. Nos tubos 106 a 108, adicionaram-se 500 μL de solução de membrana, 25 μL de solução de [<sup>3</sup>H]-histamina 10 nM e 25 μL de solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo 5 mM de EDTA. A seguir, os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as soluções foram aspiradas e lavadas (9 x 500 μL), através do *Harvester* MB-36T, com solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) gelado, sobre membrana filtrante GF/C saturadas com 0,5% polietilenoimina. As amostras foram coletadas individualmente e adicionaram-se uma alíquota de cintilação, empregando o distribuidor *Deposit & Dispenser* BK-36.

As amostras foram avaliadas em contador Beckman 6500. A constante de interação ( $K_i$ ) foi determinada a partir do valor de  $IC_{50}$  (concentração necessária para o deslocamento de 50% do ligante marcado radioativamente), através da equação de Cheng-Prussoff (CHENG; PRUSSOFF, 1973).

**Tabela 10:** Condições utilizadas para o ensaio de competição no  $H_4R$ .

Tubos	Membrana ( $\mu\text{L}$ )	$[^3\text{H}]$ -histamina 10 nM ( $\mu\text{L}$ )	Competidor (25 $\mu\text{L}$ )	Tampão ( $\mu\text{L}$ )
1 – 3	500	25	A943931 $10^{-4}$ M	-
4 – 6	500	25	A943931 $10^{-5}$ M	-
7 – 9	500	25	A943931 $10^{-6}$ M	-
10 – 12	500	25	A943931 $10^{-7}$ M	-
13 – 15	500	25	A943931 $10^{-8}$ M	-
16 – 18	500	25	A943931 $10^{-9}$ M	-
19 – 21	500	25	A943931 $10^{-10}$ M	-
22 – 24	500	25	A943931 $10^{-11}$ M	-
25 – 27	500	25	LINS01001 $10^{-4}$ M	-
28 – 30	500	25	LINS01001 $3 \times 10^{-5}$ M	-
31 – 33	500	25	LINS01001 $10^{-5}$ M	-
34 – 36	500	25	LINS01001 $3 \times 10^{-6}$ M	-
37 – 39	500	25	LINS01001 $10^{-6}$ M	-
40 – 42	500	25	LINS01001 $3 \times 10^{-7}$ M	-
43 – 45	500	25	LINS01001 $10^{-7}$ M	-
46 – 48	500	25	LINS01003 $10^{-4}$ M	-
49 – 51	500	25	LINS01003 $3 \times 10^{-5}$ M	-
52 – 54	500	25	LINS01003 $10^{-5}$ M	-
55 – 57	500	25	LINS01003 $3 \times 10^{-6}$ M	-
58 – 60	500	25	LINS01003 $10^{-6}$ M	-
61 – 63	500	25	LINS01003 $3 \times 10^{-7}$ M	-
64 – 66	500	25	LINS01004 $10^{-4}$ M	-
67 – 69	500	25	LINS01004 $3 \times 10^{-5}$ M	-
70 – 72	500	25	LINS01004 $10^{-5}$ M	-
73 – 75	500	25	LINS01004 $3 \times 10^{-6}$ M	-
76 – 78	500	25	LINS01004 $10^{-6}$ M	-
79 – 81	500	25	LINS01004 $3 \times 10^{-7}$ M	-
82 – 84	500	25	LINS01004 $10^{-7}$ M	-
85 – 87	500	25	LINS01005 $10^{-4}$ M	-
88 – 90	500	25	LINS01005 $3 \times 10^{-5}$ M	-
91 – 93	500	25	LINS01005 $10^{-5}$ M	-
94 – 96	500	25	LINS01005 $3 \times 10^{-6}$ M	-
97 – 99	500	25	LINS01005 $10^{-6}$ M	-
100 – 102	500	25	LINS01005 $3 \times 10^{-7}$ M	-
103 – 105	500	25	LINS01005 $10^{-7}$ M	-
106 -108	500	25	-	25

### 5.2.2 Avaliação da afinidade por H<sub>3</sub>R

- *Curva de saturação de [<sup>3</sup>H]-histamina em H<sub>3</sub>R*

Os ensaios foram realizados para um volume total de 550 µL para cada amostra (Tabela 11). Em 32 tubos adequados adicionaram-se 500 µL de solução de membrana contendo H<sub>3</sub>R (diluição 1:200). Aos tubos 1 a 16, foram adicionados 25 µL de solução de [<sup>3</sup>H]-histamina nas concentrações definidas na tabela 9, e aos tubos 17 a 32, 25 µL de solução de dicloridrato de histamina 13 mM foram também acrescentados. Para os tubos 1 a 32, adicionou-se ainda o volume de 25 µL de solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo 5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>). Finalmente, aos tubos 33 a 36 adicionaram-se 550 µL de solução tampão. A seguir, os tubos foram homogeneizados e incubados por 60 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as soluções foram aspiradas e lavadas (9 x 500 µL), através do *Harvester* MB-36T com solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) gelado, sobre membrana filtrante GF/C saturadas com 0,5% polietilenoimina. As amostras foram coletadas individualmente e adicionaram-se uma alíquota de cintilação, empregando o distribuidor *Deposit & Dispenser* BK-36. A seguir, as soluções foram analisadas em contador Beckman 6500 e as contagens radioativas foram usadas para a geração dos dados de  $K_d$  para H<sub>3</sub>R.

**Tabela 11:** Condições utilizadas para o ensaio de saturação no H<sub>3</sub>R.

Tubos	Membrana (µL)	[ <sup>3</sup> H]-histamina (25 µL)	Histamina 13 mM (µL)	Tampão (µL)
1 – 2	500	50 nM	-	25
3 – 4	500	25 nM	-	25
5 – 6	500	12,5 nM	-	25
7 – 8	500	6,25 nM	-	25
9 – 10	500	3,125 nM	-	25
11 – 12	500	1,56 nM	-	25
13 – 14	500	0,78 nM	-	25
15 – 16	500	0,39 nM	-	25
17 – 18	500	50 nM	25	-
19 – 20	500	25 nM	25	-
21 – 22	500	12,5 nM	25	-
23 – 24	500	6,25 nM	25	-
25 – 26	500	3,125 nM	25	-

Tabela 11: (cont.)

Tubos	Membrana ( $\mu\text{L}$ )	[ $^3\text{H}$ ]-histamina (25 $\mu\text{L}$ )	Histamina 13 mM ( $\mu\text{L}$ )	Tampão ( $\mu\text{L}$ )
27 – 28	500	1,56 nM	25	-
29 – 30	500	0,78 nM	25	-
31 – 32	500	0,39 nM	25	-
33 – 34	-	-	-	550
35 – 36	-	-	-	550

- *Ensaio de competição no  $H_3R$*

Assim como para o ensaio de saturação, o ensaio de competição também foi realizado para um volume total de 550  $\mu\text{L}$  para cada amostra. Em 108 tubos adequados adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de solução de membrana contendo  $H_4R$  (diluição 1:200) e 25  $\mu\text{L}$  de solução de [ $^3\text{H}$ ]-histamina 6 nM. Nos tubos 1 a 105, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de solução dos compostos competidores nas concentrações definidas na tabela 12. Os compostos utilizados foram o ligante de referência dibromidrato de (*R*)- $\alpha$ -metil-histamina (agonista  $H_3R$ ) e os competidores-testes sintetizados. Nos tubos 106 a 108, adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de solução de membrana, 25  $\mu\text{L}$  de solução de [ $^3\text{H}$ ]-histamina 6 nM e 25  $\mu\text{L}$  de solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ . A seguir, os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as soluções foram aspiradas e lavadas (9 x 500  $\mu\text{L}$ ), através do *Harvester* MB-36T, com solução tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) gelado, sobre membrana filtrante GF/C saturadas com 0,5% polietilenoimina. As amostras foram coletadas individualmente e adicionaram-se uma alíquota de cintilação, empregando o distribuidor *Deposit & Dispenser* BK-36. As amostras foram avaliadas em contador Beckman 6500. A constante de interação ( $K_i$ ) foi determinada a partir do valor de  $\text{IC}_{50}$  (concentração necessária para o deslocamento de 50% do ligante marcado radioativamente), através da equação de Cheng-Prussoff (CHENG; PRUSSOFF, 1973)

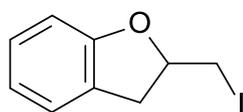
Tabela 12: Condições utilizadas para o ensaio de competição no H<sub>3</sub>R.

Tubos	Membrana (μL)	[ <sup>3</sup> H]-Histamina 6 nM (μL)	Competidor (25 μL)	Tampão (μL)
1 – 3	500	25	α-metilhist. 10 <sup>-5</sup> M	-
4 – 6	500	25	α-metilhist. 10 <sup>-6</sup> M	-
7 – 9	500	25	α-metilhist. 10 <sup>-7</sup> M	-
10 – 12	500	25	α-metilhist. 10 <sup>-8</sup> M	-
13 – 15	500	25	α-metilhist. 10 <sup>-9</sup> M	-
16 – 18	500	25	α-metilhist. 10 <sup>-10</sup> M	-
19 – 21	500	25	LINS01001 10 <sup>-4</sup> M	-
22 – 24	500	25	LINS01001 10 <sup>-5</sup> M	-
25 – 27	500	25	LINS01001 10 <sup>-6</sup> M	-
28 – 30	500	25	LINS01001 10 <sup>-7</sup> M	-
31 – 33	500	25	LINS01001 10 <sup>-8</sup> M	-
34 – 36	500	25	LINS01001 10 <sup>-9</sup> M	-
37 – 39	500	25	LINS01001 10 <sup>-10</sup> M	-
40 – 42	500	25	LINS01003 10 <sup>-4</sup> M	-
43 – 45	500	25	LINS01003 10 <sup>-5</sup> M	-
46 – 48	500	25	LINS01003 10 <sup>-6</sup> M	-
49 – 51	500	25	LINS01003 10 <sup>-7</sup> M	-
52 – 54	500	25	LINS01003 10 <sup>-8</sup> M	-
55 – 57	500	25	LINS01003 10 <sup>-9</sup> M	-
58 – 60	500	25	LINS01003 10 <sup>-10</sup> M	-
61 – 63	500	25	LINS01004 10 <sup>-4</sup> M	-
64 – 66	500	25	LINS01004 10 <sup>-5</sup> M	-
67 – 69	500	25	LINS01004 10 <sup>-6</sup> M	-
70 – 72	500	25	LINS01004 10 <sup>-7</sup> M	-
73 – 75	500	25	LINS01004 10 <sup>-9</sup> M	-
76 – 78	500	25	LINS01004 10 <sup>-10</sup> M	-
79 – 81	500	25	LINS01005 10 <sup>-4</sup> M	-
82 – 84	500	25	LINS01005 10 <sup>-5</sup> M	-
85 – 87	500	25	LINS01005 10 <sup>-6</sup> M	-
88 – 90	500	25	LINS01005 10 <sup>-7</sup> M	-
91 – 93	500	25	LINS01005 10 <sup>-8</sup> M	-
94 – 96	500	25	LINS01005 10 <sup>-9</sup> M	-
97 – 99	500	25	LINS01005 10 <sup>-10</sup> M	-
100 – 102	500	25	-	25
103 – 105	-	-	-	550
106 -108	-	-	-	550

## 6.1 Síntese dos compostos planejados

### 6.1.1 Síntese do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano (**19**)

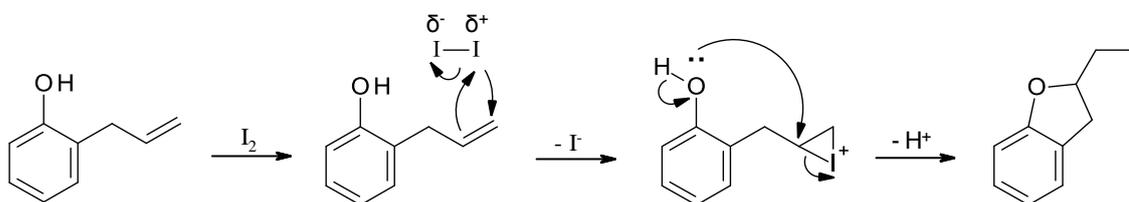
Para a obtenção das 1-(2-(2,3-diidrobenzofurânil)metil)piperazinas propostas é necessária inicialmente a síntese do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano (**19**, figura 36).



**19**

**Figura 36:** 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.

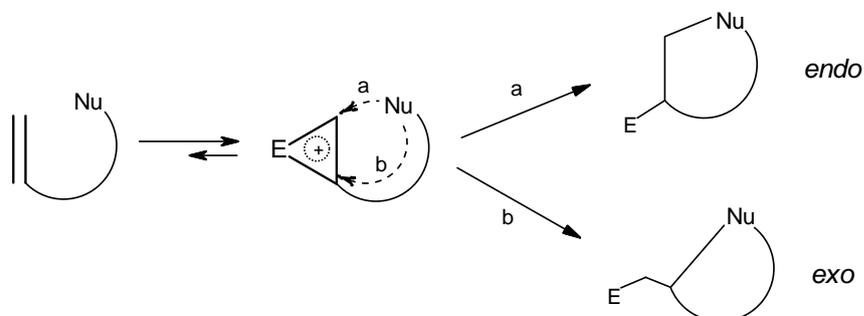
Este foi preparado através de uma reação de ciclofuncionalização do orto-alilfenol com iodo, que permite a ciclização e funcionalização de um substrato acíclico (PANCOTE *et al.*, 2009). A ciclização é caracterizada pelo ataque de um eletrófilo à uma região insaturada (dupla ou tripla ligação) do substrato acíclico com formação de um complexo  $\pi$ , que posteriormente, poderá sofrer um ataque nucleofílico intramolecular (Esquema 7) promovendo a formação do composto cíclico (CARDILLO; ORENA, 1990).



**Esquema 8:** Obtenção do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.

O ataque nucleofílico ao complexo  $\pi$  pode ocorrer de maneiras distintas, determinando o modo do fechamento do anel (*a* ou *b*), bem como o tamanho deste que será formado. O eletrófilo incorporado ao produto pode estar ligado diretamente ao anel (*endo*) ou na sua cadeia lateral (*exo*), levando à obtenção de distintas estruturas (Figura 36) (BRANDT; COMASSETO; FERRAZ, 1991). Neste contexto,

algumas orientações como as regras de Baldwin podem auxiliar na previsão da formação do produto que se formará preferencialmente (GILMORE; ALABUGIN, 2011).



**Figura 37:** Fechamento de anel de modo *endo* e *exo*.

De modo empírico, as regras de Baldwin indicam a possibilidade de formação dos anéis baseadas em três fatores. Inicialmente, avalia-se o número de átomos no anel formado, indicando-os por um prefixo numérico. A seguir, são classificados de acordo com a quebra da ligação durante o processo de ciclização, em que utiliza-se o termo *endo* quando a ligação rompida encontra-se dentro do anel e *exo* se a ligação estiver fora do anel que está se formando. Por fim, categoriza-se de acordo com a geometria do carbono que sofre o ataque nucleofílico. Emprega-se o sufixo tet (tetraédrica) para hibridização  $sp^3$ , trig (trigonal) para  $sp^2$  ou dig (digonal) para hibridização  $sp$  (BALDWIN, 1976; BALDWIN *et al.*, 1977). A tabela 13 demonstra ciclizações que podem ocorrer de forma favorável ou desfavorável de acordo com as regras de Baldwin.

**Tabela 13:** Regras de Baldwin para fechamento de anel.

		3	4	5	6
<b>Tet</b>	endo	-	-	x	x
	exo	✓	✓	✓	✓
<b>Trig</b>	endo	x	x	x	✓
	exo	✓	✓	✓	✓
<b>Dig</b>	endo	✓	✓	✓	✓
	exo	x	x	✓	✓

- não há preferência de modo de fechamento de anel; x modo de fechamento de anel desfavorável; ✓ modo de fechamento de anel favorável.

Apesar das regras de Baldwin serem amplamente aplicadas, observa-se no esquema 8, que no processo de ciclização do composto proposto, há a formação de

um intermediário cíclico de 3 membros (iodônio) em que a geometria do carbono que sofre o ataque nucleofílico não pode ser precisamente definida, dificultando a classificação pelas regras de Baldwin. No entanto, outras teorias para a formação dos anéis podem ser atribuídas, como a regra de Markovnikov (BRANDT; COMASSETO; FERRAZ, 1991). A literatura, assim como nossos resultados, confirmam que a formação do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano (**19**) ocorre pelo ataque nucleofílico da hidroxila fenólica ao carbono menos hidrogenado (MAHAJAN *et al.*, 2002; FOUSTERIS *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2011).

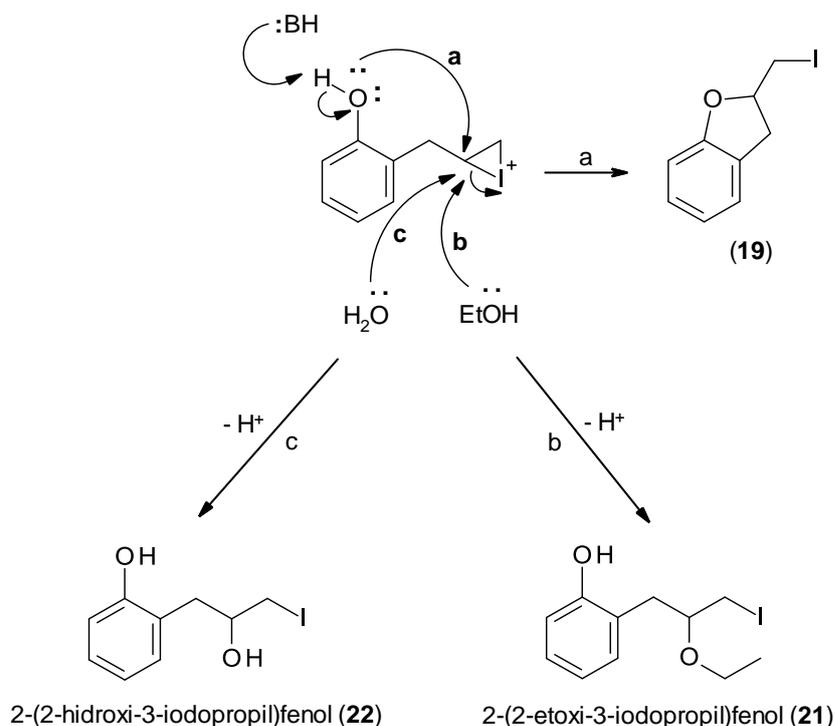
Afim de avaliar a influência da adição de uma base ( $\text{NaHCO}_3$ ) para o aumento da nucleofilicidade da hidroxila fenólica e neutralizar o ácido iodídrico formado, as reações foram conduzidas com e sem a presença desta. Também foi estudada a influência do solvente utilizado ( $\text{H}_2\text{O}$  ou mistura  $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ ) para obtenção das melhores condições reacionais. Os rendimentos obtidos variaram de 62 a 87% (Tabela 14). Os resultados indicaram que a água é o melhor solvente a ser empregado já que conduz a maiores rendimentos, e o uso de  $\text{NaHCO}_3$  leva a rendimentos mais baixos. Entretanto ainda foram obtidos bons resultados em comparação com outras metodologias reportadas.

Trabalho publicado por Zhou, He e Chen (2008), demonstrou rendimento de 46% sem uso de base, todavia com o uso de diacetoxiidobenzeno, tempo reacional de 40 horas e diclorometano como solvente. Já Chen *et al.* (2011) apresentaram metodologia sem base, e obtendo rendimento de 70% ao utilizar uma mistura de água e etanol, mas com aquecimento a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  e tempo reacional de 12 horas. A metodologia empregada neste trabalho forneceu um rendimento de 87% usando água como solvente e tempo reacional de 4 horas.

**Tabela 14:** Rendimentos obtidos na síntese de 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.

Solvente	Base	Rendimento (%)	Rendimento médio (%)
$\text{H}_2\text{O}$	Não	86	87
$\text{H}_2\text{O}$	Não	87	
$\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$	Não	74	72
$\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$	Não	70	
$\text{H}_2\text{O}$	$\text{NaHCO}_3$	77	79
$\text{H}_2\text{O}$	$\text{NaHCO}_3$	80	
$\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$	$\text{NaHCO}_3$	64	62
$\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$	$\text{NaHCO}_3$	60	

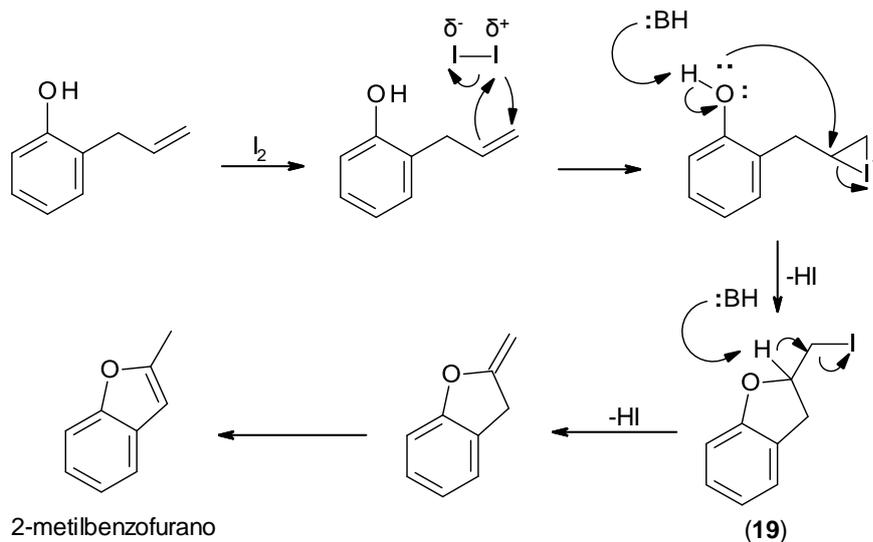
Nossos dados podem ser corroborados por trabalho de Fousteris *et al.* (2006), que também observou o efeito negativo da mistura EtOH:H<sub>2</sub>O sobre o rendimento. As reações foram conduzidas variando a quantidade de iodo, solventes (água, acetonitrila, etanol e mistura etanol:água) e sem base. Os rendimentos obtidos foram inferiores com solventes orgânicos, mas melhores com o uso de água como solvente. O uso de etanol pode promover a etoxilação como uma reação de competição, produzindo o 2-(2-etoxi-3-iodopropil)fenol (**21**). A formação dos produtos etoxilados é evitada em água, e a reação de hidroxilação (Esquema 8) é menos favorável que a etoxilação, uma vez que os reagentes possuem baixa solubilidade em água. No entanto, ao utilizar EtOH como co-solvente, a solubilidade aumenta favorecendo a etoxilação.



**Esquema 9:** Reações de competição durante a obtenção de 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano.

Já o efeito negativo da presença de base pode ser explicado pelo aumento da reação de eliminação de ácido iodídrico (Esquema 9). Haloalcanos podem sofrer a reação de desidrohalogenação, principalmente em presença de base. Esta reação é favorecida em solventes polares próticos, pois nestes solventes (como água e etanol) o íon iodeto é melhor solvatado do que em solventes apolares ou polares apróticos. Assim, pode gerar o produto de eliminação 2-metilbenzofurano, afetando

o rendimento reacional na formação do composto **19**. Apesar dos rendimentos obtidos neste trabalho serem semelhantes àqueles publicados por Fousteris *et al.* (2006), os melhores rendimentos foram obtidos com 4 equivalentes de iodo. Neste trabalho, foram utilizados 1,1 equivalente de iodo, gerando economia de reagentes e aumento da eficiência atômica.



**Esquema 10:** Formação do 2-metilbenzofurano.

Em comparação com outras metodologias que continuam sendo desenvolvidas, nota-se que a proposta deste trabalho ainda é mais eficiente. Em procedimento desenvolvido por Meng *et al.* (2014), foi utilizado diclorometano, tetracloreto de estanho, 1 equivalente de iodo e tempo reacional de 5,5 horas. Apesar desta metodologia ter sido empregada sem excesso de iodo e tempo reacional relativamente curto, resultou em apenas 36% de rendimento, demonstrando ser menos eficiente, além de utilizar o sal de estanho que produz riscos ambientais e à saúde.

### 6.1.2 Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (**LINS01001**)

Com o produto **19** obtido prosseguiu-se com a preparação dos compostos finais propostos. Estes podem ser sintetizados através de reações de substituição nucleofílica. Este tipo de reação ocorre quando uma espécie que contém um par de elétrons disponível (nucleófilo) ataca uma posição eletrofílica (deficiente de elétrons) de uma molécula que contém um grupo de saída (substrato), deslocando-o. As

---

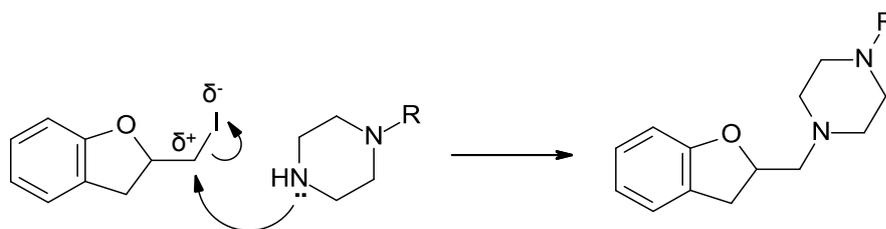
reações de substituição nucleofílica podem acontecer por dois mecanismos distintos denominados  $SN_1$  e  $SN_2$  (SMITH; MARCH, 2007).

A substituição nucleofílica unimolecular ( $SN_1$ ) ocorre em duas etapas. Primeiramente o grupo de saída é removido, quando há formação de um intermediário carbocátion, que reagirá com um nucleófilo. Este tipo de mecanismo de reação tende a acontecer quando o átomo de carbono a ser substituído encontra-se estericamente impedido. A formação do carbocátion (etapa lenta) determina a velocidade da reação, pois necessita de maior energia de ativação (SMITH; MARCH, 2007).

As reações são designadas  $SN_1$  porque apenas a concentração de uma das espécies químicas envolvidas na reação, o substrato, influencia a velocidade. A velocidade da reação também pode ser influenciada por alguns fatores, como o efeito do solvente e a estrutura do substrato. Solventes polares próticos beneficiam a reação por favorecerem a formação de carbocátions ao solvatar o grupo de saída (VOLLHARDT, SCHÖRE, 2005). Além disso, a estabilização do carbocátion também deve ser considerado. Carbocátions mais estáveis aumentam a velocidade de reação. A estabilidade dos carbocátions depende basicamente do número de grupos alquila ligados ao átomo de carbono positivamente carregado, que os estabilizam por um fenômeno denominado hiperconjugação (CLAYDEN *et al.*, 2000).

A substituição nucleofílica bimolecular ( $SN_2$ ) ocorre em uma única etapa, já que não há formação de carbocátion. É favorecida quando não há impedimento estérico e o nucleófilo tem fácil acesso ao eletrófilo do substrato. Nesta reação, ocorre o ataque nucleofílico, formando um estado de transição (etapa lenta), e ao passo que a reação prossegue, a ligação entre o nucleófilo e o átomo de carbono se fortalece e a ligação entre o átomo de carbono e o grupo de saída enfraquece. Desta forma, há a quebra da ligação carbono-grupo de saída (etapa rápida) e a formação da ligação carbono-nucleófilo simultaneamente (CLAYDEN *et al.*, 2000). Diante de tais características, denomina-se de um processo concertado (FERREIRA; ARROIO; REZENDE, 2011). Os compostos propostos neste trabalho são obtidos possivelmente por mecanismo  $SN_2$ , já que utilizam substrato primário e nucleófilo relativamente desimpedido (esquema 11).

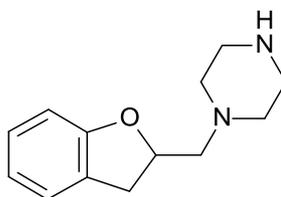
---



**Esquema 11:** Síntese dos compostos propostos por substituição nucleofílica bimolecular.

Diferentemente das reações  $SN_1$ , a velocidade da reação  $SN_2$  depende também da concentração do nucleófilo. Um bom nucleófilo relaciona-se com a rapidez com que é capaz de atacar um átomo deficiente em elétrons (eletrófilo) e favorecer o ataque nucleofílico (CLAYDEN *et al*, 2000). Além disso, o efeito do solvente é determinante na taxa de velocidade da reação. Solventes polares apróticos favorecem o mecanismo  $SN_2$ , pois não beneficiam a formação de ligação de hidrogênio com o nucleófilo, e assim sua baixa solvatação não interfere na nucleofilicidade, permitindo uma maior disponibilidade do ataque nucleofílico. Além disso, estes tipos de solventes podem estabilizar o grupo de saída favorecendo a  $SN_2$  (CAREY, SUNDBERG, 2007).

Para a síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (**LINS01001**, figura 38), optou-se primeiramente pelo uso do monoclóridato de piperazina (item 5.1.2) para evitar a formação de produtos dissustituídos através da proteção de um dos nitrogênios por protonação (MEHANNA; KIM, 2005). Preparou-se com sucesso o dicloridrato de piperazina (necessária para obtenção posterior do monoclóridato de piperazina), entretanto o composto final não foi obtido.



**LINS01001**

**Figura 38:** 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina.

Como alternativa, optou-se trabalhar com a piperazina em base livre (item 5.1.2 – procedimento 1) e em excesso (4 equivalentes), como proposto por trabalhos descritos para obtenção de vários compostos, na tentativa de evitar produtos

---

dissubstituídos (CAI *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2015). Para evitar tal ocorrência pode-se utilizar grupos protetores, porém tal método aumenta os passos sintéticos, além de dificultar a purificação do produto, causando decréscimo do rendimento global (VERMA; ACHARYA; KAUSHIK, 2010). Por isso, optou-se por prosseguir as reações com piperazina em excesso.

Nesta metodologia esperava-se avaliar a influência do solvente, entretanto nenhum produto foi formado. Apesar deste procedimento ter sido aparentemente mais eficiente que o procedimento acima descrito (usando monoclórídrico de piperazina), a confirmação da formação do produto puro, bem como o rendimento, não foram possíveis, uma vez que a visualização em placas de CCD e espectros de RMN demonstraram presença de impurezas e grande quantidade de material de partida (piperazina).

Em outra tentativa (item 5.1.2 – procedimento 2) de obtenção do produto, os procedimentos foram conduzidos alterando duas variáveis, o solvente (THF ou EtOH) e a temperatura (ambiente ou 60 °C). Além disso, optou-se pela mudança do método de extração na etapa de purificação. As reações foram primeiro realizadas em temperatura ambiente e variando o solvente. Observou-se que o uso de THF e tipo de extração (extração ácido-base) trouxe pequena melhoria, mas ainda não suficiente para obtenção de rendimento e pureza satisfatórios. Assim, as demais reações foram realizadas sob aquecimento (60 °C). O uso de etanol não demonstrou efeito positivo na reação, entretanto o uso do THF forneceu rendimento de 83%.

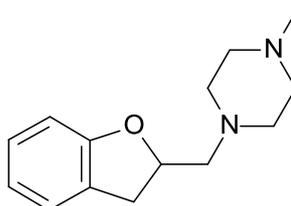
Acredita-se que os fatores-chave para o sucesso na obtenção do **LINS01001** deve-se ao uso de um solvente aprótico, favorecendo a velocidade da reação, bem como o tipo de extração. Neste tipo de extração, ao acidificar o meio ocorre protonação do **LINS01001** e da piperazina. Através da lavagem com hexano retira-se o composto iodociclizado (**19**) que porventura não reagiu, além de possíveis produtos de eliminação. A fase aquosa foi então alcalinizada e as estruturas protonadas voltam às suas formas não-ionizadas (ou moleculares) e podem ser novamente separadas por partição (já que o produto desejado encontrar-se-á na fase orgânica). Entretanto, a piperazina é pouco solúvel em solventes orgânicos, diferentemente do produto de interesse.

---

Por comparação, a busca na literatura pela obtenção da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina retornou a síntese desenvolvida por Meng *et al.* (2014). Nesta, foram utilizados 5 equivalentes de piperazina, acetonitrila como solvente e tempo reacional de apenas 2 horas. Em contrapartida, a purificação foi realizada em coluna cromatográfica utilizando metanol:diclorometano como eluente e obtenção de apenas 54% de rendimento, demonstrando a vantagem da metodologia proposta neste trabalho, em que não há necessidade de purificação em coluna cromatográfica, tornando o processo mais viável. Diante tais resultados, almeja-se futuramente avaliar a síntese de **LINS01001** com menor excesso de piperazina.

### 6.1.3 Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)-4-metil-piperazina (**LINS01003**)

Com o reagente comercial 1-metilpiperazina, prosseguiu-se com a síntese do do segundo composto proposto (figura 39).



**LINS01003**

**Figura 39:** 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)-4-metil-piperazina.

O primeiro procedimento (item 5.1.3 – procedimento 1), realizado em temperatura ambiente e variando os solventes extratores (diclorometano ou éter etílico), não forneceram bons resultados, uma vez que o produto não foi isolado. Em um segundo momento (item 5.1.3 – procedimento 2), realizaram-se os procedimentos variando a temperatura (ambiente ou 60 °C), tipo de extração (extração com NaHCO<sub>3</sub> e éter etílico) e proporção estequiométrica dos reagentes (1:1 ou 1:4 de **19**:1-metilpiperazina). Observou-se nos resultados obtidos que alguns fatores influenciaram as reações, mesmo que em pequena proporção. Aquelas conduzidas sob aquecimento (60 °C) tiveram influência positiva no rendimento

---

(rendimento de 2% para 9%), assim como o uso de maior proporção de 1-metilpiperazina (rendimento de 9% para 12%).

A extração pode também ter contribuído para melhor rendimento. Como a 1-metilpiperazina é insolúvel em éter etílico, esta fica retida na fase aquosa e o composto halogenado (**19**) pode ser separado em coluna cromatográfica. Além disso, o uso de solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  pode contribuir para a otimização do processo por diminuir o grau de ionização do produto. O produto final pode protonar em pH próximo ao neutro, todavia em solução básica, a ionização é incipiente e o composto ficará na fase etérea.

Visando a melhoria dos procedimentos reacionais, algumas reações foram assistidas por ultrassom (item 5.1.3 – procedimento 3). O uso de THF como solvente e o método de extração foram mantidos. Neste procedimento variou-se as proporções estequiométricas dos reagentes, que não conduziu a grande melhoria. Notou-se apenas que o uso de excesso de 1-metilpiperazina pareceu influenciar na reação, com rendimento de 2%, entretanto são necessárias outras investigações metodológicas para avaliar o efeito da irradiação ultrassônica na obtenção do **LINS01003**.

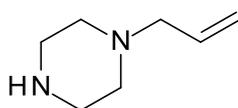
Baseando-se nos resultados anteriores e afim de aperfeiçoar o processo, o procedimento 4 (item 5.1.3) foi conduzido novamente com metodologia clássica (agitação magnética), aquecimento, excesso de 1-metilpiperazina (1:4 de **19**:1-metilpiperazina) e distintos métodos de extrações. A primeira extração (**A**), utilizando solução saturada de NaCl e acetato de etila como solvente extrator, não gerou resultado satisfatório com rendimento não determinado. Inspirando-se no resultado obtido com a síntese de **LINS01001**, foram retomados os procedimentos de extração ácido-base (**B**). A utilização de éter etílico como solvente extrator não foi favorável e levou apenas à obtenção de resquícios de produto. Porém, aparentemente o produto encontrava-se retido na fase aquosa, pois apresentava cor característica (amarelado) e assim, optou-se utilizar acetato de etila (solvente mais polar) como solvente extrator. O rendimento obtido após a troca do solvente foi de 85%.

---

Nota-se que tais resultados foram mais satisfatórios, já que não houve a necessidade de separação e/ou purificação em coluna cromatográfica, como necessário nos procedimentos anteriores. Além disso, purificações por coluna cromatográfica são mais trabalhosas e demandam maior custo para obtenção do produto. Esta mudança também é importante visando produção em maior escala, uma vez que obteve-se bom rendimento com procedimento reacional mais simples. Ademais, trata-se de um composto inédito até o momento.

#### 6.1.4 Síntese da 1-alilpiperazina (**20**)

Assim como para a obtenção do **LINS01001**, as preparações da 1-alilpiperazina (**20**, figura 40) foram conduzidas em métodos distintos, usando monoclóridato de piperazina e piperazina como base livre, mas em todos o brometo de alila foi utilizado como agente alquilante (eletrofílico) devido à sua reatividade adequada.



**20**

**Figura 40:** 1- alilpiperazina.

Considera-se um bom grupo de saída o substituinte capaz de se afastar da estrutura como um íon ou uma molécula relativamente estável. Geralmente, as bases fracas são bons grupos de saída. Uma das vantagens de se utilizar o brometo de alila refere-se a estabilidade do cátion alílico. Após a saída do ânion brometo o grupo alila é estabilizado devido à deslocalização por ressonância (Esquema 12), sendo assim amplamente empregado em reações químicas (SMITH; MARCH, 2007).



**Esquema 12:** Estabilidade do grupo alila por ressonância.

Embora este tipo de reação seja relativamente simples e bem descrita na literatura, o grande obstáculo encontrado é a grande possibilidade de formação do produto dissubstituído (*N,N*-dialilpiperazina). Desta maneira, optou-se por realizar a síntese inicialmente com o uso do monoclórato de piperazina (item 5.1.4), porém assim como para o composto **LINS01001**, esta metodologia não se mostrou eficiente, pois não houve formação do produto final de interesse. Acreditava-se inicialmente que o composto desejado estava ainda retido na fase aquosa, uma vez que tal fase encontrava-se com coloração amarelada. Assim, o solvente extrator (éter etílico) foi alterado para um mais polar (acetato de etila). Entretanto, não se obtiveram melhores resultados.

A metodologia usando piperazina como base livre foi primeiramente conduzida em procedimento clássico (agitação magnética) por 12 horas e diferentes temperaturas (60 °C ou temperatura ambiente). Apesar de uma relativa melhoria nos resultados obtidos com este procedimento (item 5.1.4 – procedimento 1), não foi possível definir as condições reacionais mais adequadas. Houve grande variação nos rendimentos obtidos quando o procedimento foi repetido (Tabela 15), e esta ampla variação nos resultados também foi verificada quando se observou a proporção de produtos monoalilados:dialilados.

**Tabela 15:** Rendimentos obtidos na síntese da 1-alilpiperazina pelo procedimento 1.

Experimento	Temperatura	Rendimento (%)
1	t.a.	15
	60 °C	34
	60 °C	5
2	60 °C	15
	60 °C	8

n.d.: não determinado; t.a: temperatura ambiente.

O terceiro experimento (item 5.1.4 – procedimento 2) foi testado variando o tempo reacional (1 ou 1,5 horas), solvente (THF ou EtOH) e presença ou não de KI e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Ainda com objetivo de controlar a proporção dos produtos *N*-alilpiperazina e *N,N'*-dialilpiperazina as sínteses foram realizadas com auxílio de ultrassom. Trabalho publicado por Maurya, Hoang e Kim (2012), demonstrou que o uso de micro-reator com a presença da irradiação ultrassônica levou a monoacilação seletiva de várias

---

diaminas. Com os resultados obtidos, notou-se que a irradiação ultrassônica melhorou a conversão, mas novamente causou ampla variação nos rendimentos obtidos (Tabela 7) e na proporção de piperazina monoalilada:dialilada quando repetida a mesma metodologia. Entretanto, observou-se que as sínteses realizadas utilizando etanol como solvente apresentaram maior seletividade à monoalilação. Mesmo utilizando excesso de compostos diamínicos, o controle da formação de produtos monossustituídos é trabalhoso.

Uma possível explicação pode estar relacionada com a solubilidade, como ocorre na monoacilação de diaminas. Para compostos monoacilados a presença de um solvente aprótico dificulta a monossustituição, pois nestas condições o produto monossustituído é mais solúvel que o não-sustituído (VERMA; ACHARYA; KAUSHIK, 2010). Neste trabalho, observou-se ainda que nas sínteses com tempo reacional maior (1,5 horas) a formação de produto dialilado foi mais frequente e o uso de  $K_2CO_3$  e KI não trouxe influência positiva ao rendimento.

A adição de KI na reação teve objetivo de aumentar a taxa de alquilação, uma vez que na presença deste, ocorre uma troca do bromo pertencente ao brometo de alila por iodo, formando brometo de potássio, sendo este menos solúvel no meio reacional e favorecendo a formação do iodeto de alila, que é um alquilante mais eficaz. Essa reação é conhecida como reação de Finkelstein (SMITH; MARCH, 2007). Classicamente, a reação de Finkelstein é feita em acetona (pela característica de solubilidade envolvida), mas pode ser aplicada em outros solventes.

A piperazina utilizada nos procedimentos acima aparentava estar consideravelmente hidratada e então realizou-se a secagem para posterior uso em novas tentativas. Além da piperazina, o equipamento de ultrassom utilizado foi alterado para uma lavadora de menor volume, e assim, melhor agitação. À vista dos resultados anteriores as sínteses foram realizadas de acordo com as condições descritas na tabela 16.

---

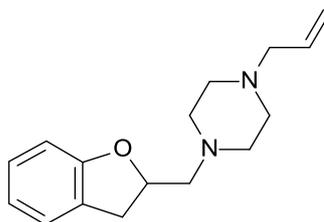
**Tabela 16:** Condições reacionais e rendimentos obtidos na síntese da 1-alilpiperazina.

Experimento	Proporção	Solvente	KI	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Tempo (h)
1	1:2	EtOH	Não	Não	1

Interessantemente, obteve-se a síntese de **20** com sucesso. Apesar de novamente ter ocorrido certa variação nos rendimentos com a repetição da mesma metodologia, foi possível obtê-la isolada e com bom rendimento médio (79%). É possível que a piperazina hidratada tenha influenciado nos procedimentos anteriores ao interferir na quantidade real de piperazina utilizada, mas certamente a mudança de equipamento também influenciou positivamente.

#### 6.1.5 Síntese da 1-alil-4-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (**LINS01004**)

Com a 1-alilpiperazina (**20**) obtida, prosseguiu-se com a preparação da 1-alil-4-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina (**LINS01004**, figura 41).

**LINS01004****Figura 41:** 1-alil-4-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)piperazina.

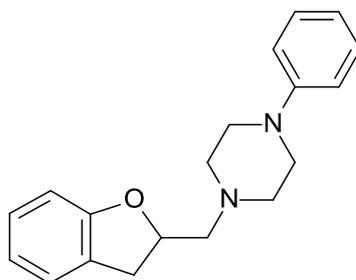
As reações foram efetuadas com o uso de ultrassom em tempos reacionais diferentes (1 ou 2 horas). O uso do solvente aprótico foi mantido, uma vez que demonstrou ótimos resultados na obtenção dos compostos anteriores. Por haver menor possibilidade de diss substituição no preparo de **LINS01004** utilizou-se proporção 1:1 dos reagentes (**19:20**). Infelizmente, os experimentos (item 5.1.5 – procedimento 1) não foram eficientes, pois o produto não foi formado. Análises de RMN demonstraram que o líquido isolado de cada reação constituía apenas de 1-alilpiperazina.

No entanto, baseando-se nos resultados obtidos com as preparações anteriores, a reação foi conduzida de acordo com as condições reacionais cujo os produtos foram formados. O procedimento (item 5.1.5 – procedimento 2) foi então realizado em agitação magnética e aquecimento (60 °C), THF como solvente e quantidade estequiométrica de reagentes 1:1. A extração também foi efetuada utilizando distintos solventes (diclorometano ou acetato de etila). Na extração realizada utilizando diclorometano não houve isolamento do produto, mas no processo extrativo com acetato de etila foi possível isolar o produto (**LINS01004**) com 66% de rendimento. Logicamente, a troca do solvente extrator foi o fator determinante para o isolamento do composto. Provavelmente, o produto permanecia na fase aquosa, e ao utilizar um solvente mais polar, foi possível isolá-lo.

O **LINS01004** é um composto inédito. Pesquisa na literatura não retornou resultados sobre a preparação deste. Portanto, sua obtenção e com rendimento satisfatório contribui diretamente no desenvolvimento de novas entidades químicas.

#### 6.1.6 Síntese da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)fenilpiperazina (**LINS01005**)

Por fim, seguiu-se com a preparação da 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)fenilpiperazina (**LINS01005**, figura 42). Foi obtido o produto final desejado, entretanto com rendimento baixo (19%). Perante os resultados obtidos com metodologias já descritas pretende-se futuramente avaliar a influências de variáveis como proporções dos reagentes, tipos de solventes (aprótico), uso da radiação ultrassônica e extrações, bem como demais condições reacionais que forem pertinentes. O **LINS01005** é também um composto inédito.



**LINS01005**

**Figura 42:** 1-(2,3-diidrobenzofuran-2-ilmetil)fenilpiperazina.

## 6.2 Ensaio da atividade biológica (*binding assay*)

Os ensaios de *binding* permitem analisar a interação dos ligantes com distintos alvos moleculares determinando suas afinidades e seletividades (POLLARD, 2010). Para tal, utilizam-se dois tipos de experimentos denominados saturação e competição. O experimento de saturação é realizado com diferentes concentrações da [<sup>3</sup>H]-histamina para definir a afinidade desta ( $K_d$ ) com o alvo (H<sub>3</sub>R e H<sub>4</sub>R). O valor de  $K_d$  refere-se à concentração onde 50% dos receptores encontram-se ocupados devido à interação com o radioligante.

Já a partir do experimento de competição é possível medir a afinidade dos ligantes não-radiomarcados (ligantes-teste) com os receptores ( $K_i$ ) através do deslocamento da [<sup>3</sup>H]-histamina em concentração fixa (L), previamente determinada no experimento de saturação. Este ensaio é efetuado com concentrações crescentes do ligante-teste, e assim, ao passo que a concentração deste aumenta, a quantidade de [<sup>3</sup>H]-histamina ligada ao alvo diminui (DEUPREE; BYLUND, 2002). A constante de interação ( $K_i$ ) pode ser obtida a partir do valor de IC<sub>50</sub> (concentração do ligante teste capaz de inibir a interação da [<sup>3</sup>H]-histamina em 50%), através da equação de Cheng-Prusoff (CHENG, PRUSSOFF, 1973).

Os valores de  $K_d$  obtidos foram 33 nM e 8 nM, para H<sub>4</sub>R e H<sub>3</sub>R, respectivamente. As figuras 43 e 44 mostram as curvas de saturação na interação da histamina com os respectivos receptores.

Juntamente com as concentrações da [<sup>3</sup>H]-histamina determinadas pelo ensaio de saturação (10 nM para H<sub>4</sub>R e 6 nM para H<sub>3</sub>R), prosseguiu-se com os ensaios de competição. Os valores de IC<sub>50</sub> e  $K_i$  obtidos são mostrados na tabela 17 e os compostos sintetizados avaliados são apresentados na figura 45. As figuras 46 e 47, apresentam as curvas concentração-resposta para cada receptor.

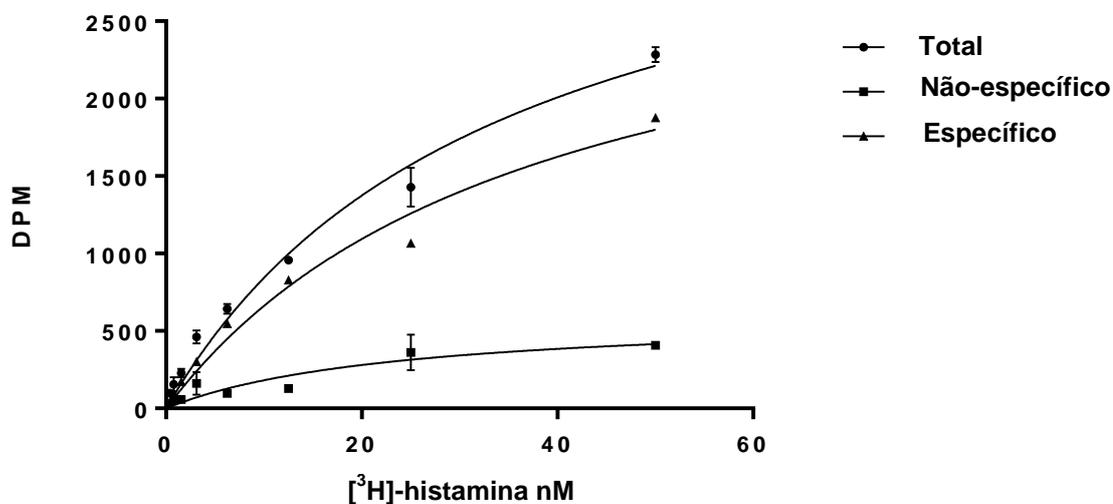
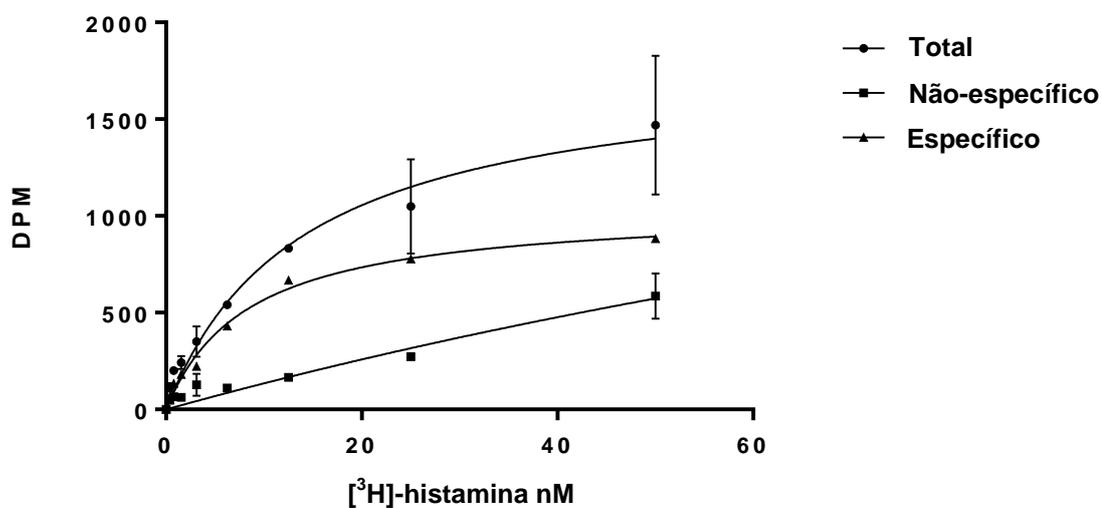
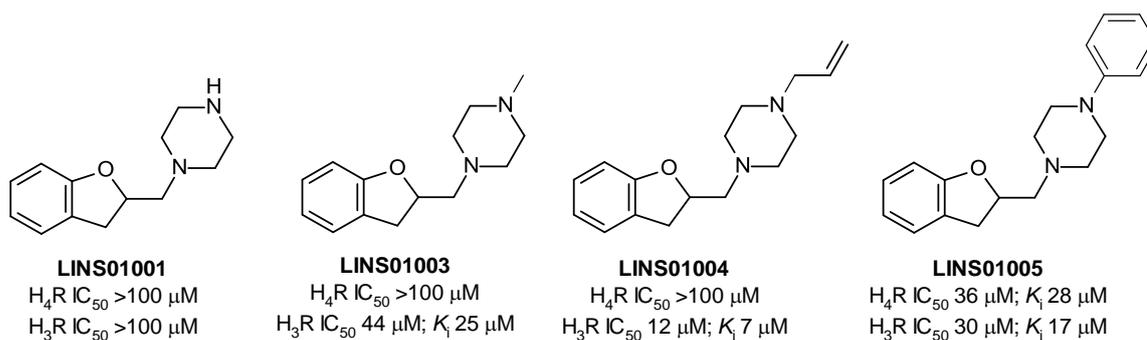
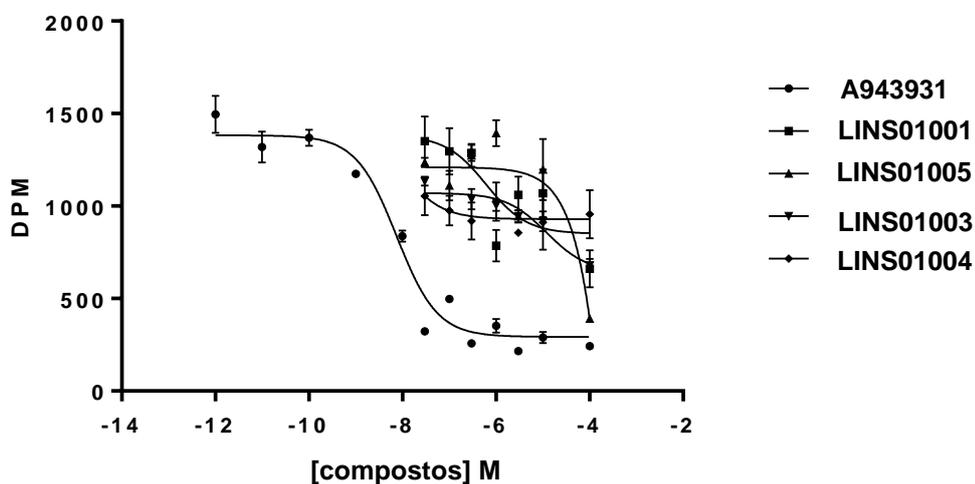
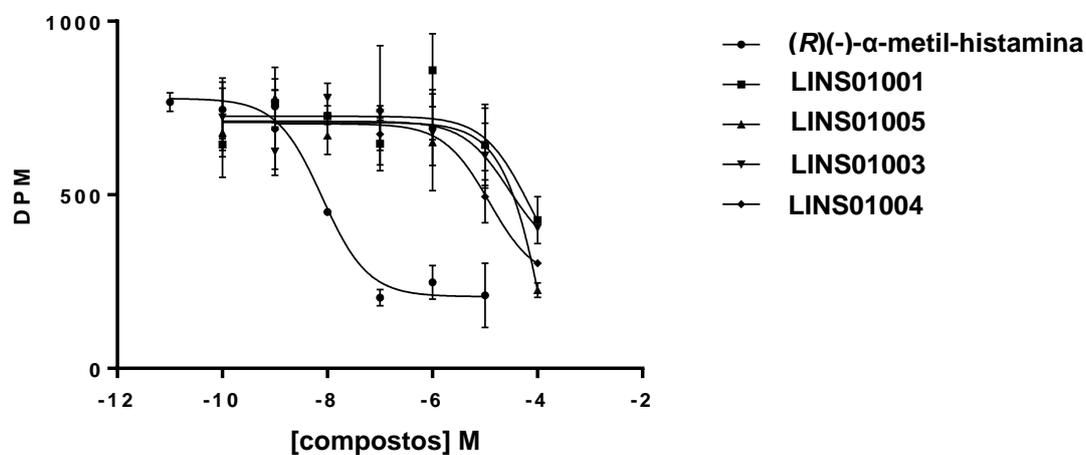
Curva de saturação de [<sup>3</sup>H]-histamina em H<sub>4</sub>RFigura 43: Curva de saturação de [<sup>3</sup>H]-histamina no H<sub>4</sub>R.Curva de saturação de [<sup>3</sup>H]-histamina em H<sub>3</sub>RFigura 44: Curva de saturação de [<sup>3</sup>H]-histamina no H<sub>3</sub>R.

Figura 45: Compostos sintetizados avaliados neste trabalho.

Tabela 17: Valores de  $IC_{50}$  e  $K_i$  dos ligantes e seus respectivos receptores.

Receptor	Ligante	$IC_{50}$	$K_i$
$H_4R$	A943931	16 nM	12 nM
	LINS01001	>100 $\mu$ M	n.d.
	LINS01003	>100 $\mu$ M	n.d.
	LINS01004	>100 $\mu$ M	n.d.
	LINS01005	36 $\mu$ M	28 $\mu$ M
$H_3R$	$\alpha$ -Me-H	55 nM	31 nM
	LINS01001	>100 $\mu$ M	n.d.
	LINS01003	44 $\mu$ M	25 $\mu$ M
	LINS01004	12 $\mu$ M	7 $\mu$ M
	LINS01005	30 $\mu$ M	17 $\mu$ M

Curva concentração-resposta em  $H_4R$ Figura 46: Ensaio de competição no  $H_4R$ .Curva concentração-resposta em  $H_3R$ Figura 47: Ensaio de competição no  $H_3R$ .

Os resultados mostraram que os compostos apresentaram baixa afinidade por ambos receptores, entretanto com seletividades distintas. Os compostos **LINS01003** ( $H_3R$   $K_i$  25  $\mu M$ ) e **LINS01004** ( $H_3R$   $K_i$  7  $\mu M$ ) apresentaram maior seletividade para  $H_3R$ , enquanto **LINS01005** não demonstrou seletividade apreciável ( $H_4R$   $K_i$  28  $\mu M$ ;  $H_3R$   $K_i$  17  $\mu M$ ). A molécula não-substituída **LINS01001** demonstrou a mais baixa afinidade entre todas testadas (Figura 43).

A primeira característica apresentada nos compostos propostos trata-se da presença de um grupo amino básico para interação com o aminoácido Asp94 (3.32) na região TM3 (SHIN *et al.*, 2002) através de uma interação iônica. Tem-se proposto que este é um ponto crucial comum para interação de ligantes em receptores aminérgicos (JONGEJAN *et al.*, 2008). O grupo básico escolhido foi a piperazina, uma vez que este grupo é amplamente utilizado no planejamento de novos ligantes com atividade anti-histamínica, exibindo boa afinidade. Apesar da discreta afinidade dos compostos planejados pelos receptores, acredita-se que o  $N^4$ -piperazínico destes tenha desenvolvido seu papel e interagido com Asp94 (3.32).

Diversos ligantes relatados em literatura apresentam o nitrogênio como heteroátomo do núcleo central. É proposto que este nitrogênio indólico pode interagir com o aminoácido Glu182 (5.46) (JONGEJAN *et al.*, 2008) na região TM5 como doador de ligação de hidrogênio, outro sítio de ligação importante para interação (SHIN *et al.*, 2002). No entanto, vários padrões estruturais são bastante tolerados e apresentam boa afinidade. Compostos contendo anéis benzofurânicos já foram explorados e sugerem serem alternativas promissoras para obtenção de novos ligantes. Dessa forma, propusemos compostos para avaliar o papel do heteroátomo como doador ou aceptor de ligação de hidrogênio, uma vez que nestes não há o nitrogênio indólico em suas estruturas. Os resultados indicam que o nitrogênio indólico parece determinar alta afinidade pelos receptores, e que de fato o oxigênio como heteroátomo do núcleo central não deve interagir com Glu182 (5.46).

A influência dos substituintes ligados ao  $N^4$ -piperazínico também foram observadas. Os resultados obtidos indicaram que o grupo fenil levou a melhor interação nos receptores, porém de forma não-específica, e aparentemente grupos alquila conferem maior seletividade  $H_3R$ . Avaliando o resultado obtido por

**LINS01001** que demonstrou a mais baixa afinidade entre todos testados, notou-se que a presença de um substituinte hidrofóbico ligado ao *N*<sup>4</sup>-piperazínico é importante para interação com os receptores, possivelmente em regiões hidrofóbicas presentes em ambos (KOTTKE *et al.*, 2011). Porém, especialmente para o H<sub>4</sub>R, entre os domínios TM3, TM5 e TM6 foi observado um possível sítio hidrofóbico de volume restrito, como proposto por Wijtmans *et al.* (2011), onde pode ocorrer interação dos grupos metila, alila e fenila dos nossos compostos. Tal proposta pode ser corroborada pela revisão de Engelhardt *et al.* (2012), que discutem que propriedades eletrônicas não parecem apresentar grande contribuição para afinidade com o H<sub>4</sub>R. Aparentemente, a característica envolvida na ligação esteja relacionada com características estéricas e hidrofóbicas.

Interessantemente, resultados obtidos neste trabalho confrontam com alguns observados em literatura. Em uma revisão recente, foi demonstrado que para a série de indolcarboxamidas, o grupo metila como substituinte *N*<sup>4</sup>-piperazínico confere maior afinidade ao H<sub>4</sub>R (ENGELHARDT *et al.*, 2012). No entanto, para os nossos compostos a metila conferiu baixa afinidade por H<sub>4</sub>R (IC<sub>50</sub> >100 μM), e maior seletividade para H<sub>3</sub>R (IC<sub>50</sub> 44 μM), demonstrando assim que os compostos benzodihidrofurânicos constituem um novo arcabouço que deve ainda ser explorado para correta definição de suas REA.

Além disso, a maioria dos ligantes descritos até o momento possui o heterociclo aromático. Nossos compostos não apresentam essa característica. Dessa forma, os resultados aqui obtidos mostraram que a aromaticidade do anel que contém o heteroátomo é importante para boa afinidade aos dois receptores.

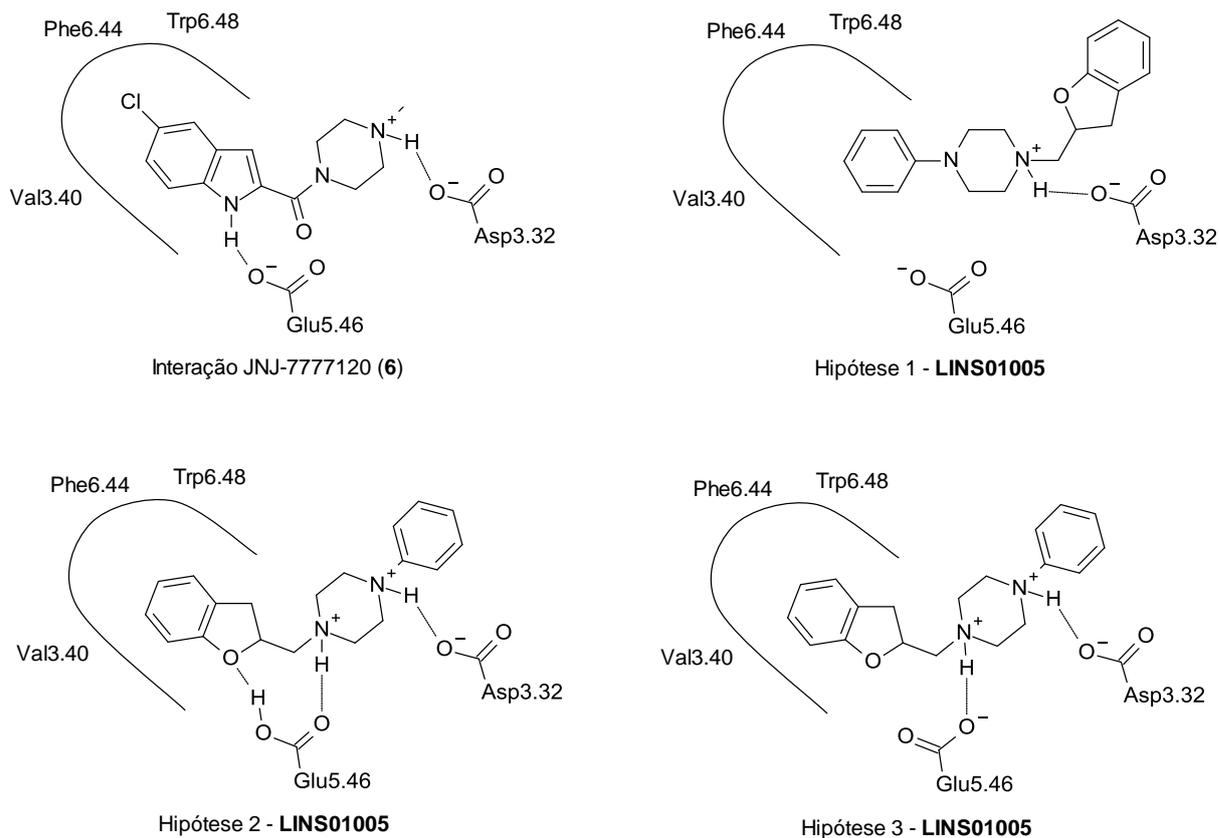
Outra característica analisada foi a ausência do grupo carbonila que mantém a característica básica do nitrogênio piperazínico. Os resultados indicaram que esta característica levou à redução da afinidade, entretanto, não parece ser farmacofórica. Christopher, Thangam e Suresh (2012) identificaram compostos não-carbonilados como possíveis ligantes de H<sub>4</sub>R, porém mantendo o anel heterocíclico com característica aromática. De qualquer forma, mesmo com a baixa afinidade apresentada pelos compostos, estes demonstraram certa interação com o receptor.

---

Por fim, desejou-se determinar também se o nitrogênio do grupo piperazínico poderia exercer o papel do nitrogênio indólico na provável interação com Glu182 (5.46). Tendo como base o composto **LINS01005**, que apresentou melhor afinidade por H<sub>4</sub>R dentre todos os avaliados e o protótipo JNJ-7777120 (**6**), é possível propor algumas hipóteses de interação com H<sub>4</sub>R.

A proposta de interação do protótipo JNJ-7777120 (**6**) com H<sub>4</sub>R é apresentada na figura 48. A interação envolve duas ligações-chave de hidrogênio com os aminoácidos Asp94 (3.32) e Glu182 (5.46), através dos nitrogênios piperazínico e indólico, respectivamente. Interações hidrofóbicas também ocorrem com os aminoácidos Val3.40, Phe6.44 e Trp6.48. Esses aminoácidos podem ser visualizados tridimensionalmente na figura 16. Baseando-se nessas interações-chave, propusemos três hipóteses de interação para o **LINS01005** com o H<sub>4</sub>R. A hipótese 1 propõe que o aminoácido Asp94 (3.32) interage com o nitrogênio piperazínico próximo ao anel benzoindólico, uma vez que com o grupo fenila o nitrogênio a ele ligado torna-se pouco básico, e dessa forma pouco ionizável em pH fisiológico. O grupo fenila pode interagir então como equivalente ao núcleo aromático presente em todos os ligantes descritos. Já a hipótese 2, sugere que o aminoácido Asp94 (3.32) interage com o nitrogênio fenilpiperazínico como esperado, enquanto Glu182 (5.46) estaria envolvido em uma interação de hidrogênio em sua forma não-ionizada com o oxigênio benzofurânico. Entretanto, isso seria improvável devido a considerável acidez do ácido carboxílico, que possivelmente estará ionizado. Assim, uma terceira hipótese é que ocorra uma interação de Glu182 (5.46), em forma de carboxilato, com o nitrogênio piperazínico próximo ao anel benzoindólico. Essas hipóteses estão também demonstradas na figura 48.

---



**Figura 48:** Possíveis interações com H<sub>4</sub>R.

Desta maneira, de acordo com as informações obtidas é possível propor, algumas características estruturais importantes para que os compostos apresentem melhor afinidade e seletividade H<sub>4</sub>R, tais como: (1) grupo amino básico, para interação com Asp94 (3.32); (2) nitrogênio como heteroátomo do núcleo central, para interação com Glu182 (5.46); (3) heterociclo aromático; (4) substituinte hidrofóbico ligado ao N<sup>t</sup>-piperazínico, para interação hidrofóbica em bolsos lipofílicos do receptor.

Entretanto, para melhor avaliação das hipóteses de interações sugeridas tornam-se necessários outros estudos mais sistemáticos, como o *docking* molecular. Estes estudos já estão sendo viabilizados com objetivo de explicar as prováveis interações com os alvos e auxiliar no planejamento de novas moléculas com atividade aprimorada.

Face aos resultados expostos foi possível concluir que as rotas sintéticas propostas para obtenção dos compostos foram satisfatórias, uma vez que os rendimentos variaram de 66 à 85%, exceto para o composto **LINS01005** que obteve rendimento de 19%. Desta maneira, ainda é necessário melhorar o processo para sua obtenção. Entretanto, foi possível sintetizar as 1-(2-(2,3-diidrobenzofuril)metil)piperazinas com rendimentos e purezas apropriadas.

A avaliação da atividade biológica demonstrou que os compostos apresentaram baixa afinidade tanto por H<sub>4</sub>R quanto por H<sub>3</sub>R. No entanto, possibilitou obter algumas informações sobre a REA dos compostos aqui avaliados para a afinidade por H<sub>4</sub>R, assim como por H<sub>3</sub>R.

Observou-se que o grupo fenil (**LINS01005**) levou a boa interação, mas inespecífica entre os dois receptores (H<sub>4</sub>R K<sub>i</sub> 28 µM; H<sub>3</sub>R K<sub>i</sub> 17 µM), e grupos alquila (**LINS01004**; H<sub>3</sub>R K<sub>i</sub> 7 µM e **LINS01003**; H<sub>3</sub>R K<sub>i</sub> 25 µM) conferiram maior seletividade H<sub>3</sub>R. Notou-se ainda, que a aromaticidade do núcleo central é importante para boa afinidade, bem como a presença de um substituinte hidrofóbico ligado ao N<sup>4</sup>-piperazínico, já que **LINS01001** (não-substituído) apresentou a mais baixa afinidade e o valor de K<sub>i</sub> não pode ser determinado.

Baseando-se no composto **LINS01005**, que apresentou melhor afinidade, é possível que este faça interação com o H<sub>4</sub>R através de dois pontos: (1) nitrogênio N<sup>1</sup>-piperazínico com Asp94 (3.32); (2) substituinte hidrofóbico ligado ao N<sup>4</sup>-piperazínico com os sítios hidrofóbicos presentes no receptor.

Além disso, os compostos planejados apresentaram um novo modelo estrutural promissor para otimização e posterior obtenção de ligantes de H<sub>4</sub>R mais eficientes, com afinidade e seletividade aprimoradas, principalmente frente ao H<sub>3</sub>R.

Pretende-se, futuramente, iniciar estratégias para otimização dos compostos, bem como estudos complementares, como o *docking* molecular, para averiguação

das interações H<sub>4</sub>R sugeridas e assim, obter maiores informações acerca da composição estrutural do receptor e seus ligantes.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AKDIS, C. A.; BLASER, K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 1, p. 15-22, 2003.

AKDIS, C. A.; SIMONS, F. E. R. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1-3, p. 69-76, 2006.

ALCAIDE, B.; ALMENDROS, P.; ALONSO, J. M. Ruthenium-catalyzed chemoselective N-allyl cleavage: novel grubbs carbene mediated deprotection of allylic amines. **Chemistry A European Journal**, v. 9, n. 23, p. 5793-5799, 2003.

ALTENBACH, R. J. *et al.* Structure-activity studies on a series of 2-aminopyrimidine-containing histamine H<sub>4</sub> receptors ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 20, p. 6571-6580, 2008.

ANDALOUSSI, M. *et al.* A novel series of histamine H<sub>4</sub> receptor antagonists based on the pyrido[3,2-d]pyrimidine scaffold: comparison of Herg binding and target residence time with PF-3893787. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 9, p. 2663–2670, 2013.

BAKKER, R. A. *et al.* Constitutive activity of the histamine H<sub>1</sub> receptor reveals inverse agonism of histamine H<sub>1</sub> receptor antagonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. R5-R7, 2000.

BAKKER, R. A. Histamine H<sub>3</sub>-receptor isoforms. **Inflammation Research**, v. 53, n. 10, p. 509-516, 2004.

BALDWIN, J. E. Rules for ring closure. **Journal of the Chemical Society**, n. 18, p. 734-736, 1976.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1172-1180, 2002.

---

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**, 2ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2008. 536p.

BECKNELL, N. C. *et al.* Synthesis and evaluation of pyridone-phenoxypropyl-R-2-methylpyrrolidine analogues as histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 23, p. 7076–7080, 2011.

BHATT, H. G. *et al.* Histamine H<sub>4</sub> receptor: a novel therapeutic target for immune and allergic responses. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 14, p. 1293-1308, 2010.

BLADWIN, J. E. *et al.* Rules for ring closure: ring formation by conjugate addition of oxygen nucleophiles. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 3846-3852, 1977.

BRANDT, C. A.; COMASSETO, J. V.; FERRAZ, H. M. C. Ciclofuncionalização envolvendo reagentes de enxofre, selênio e telúrio. **Química Nova**, v. 14, n. 3, p. 165-174, 1991.

BREIER, A. R. **Fenoxifenadina: validação de métodos analíticos e estudo de fotoestabilidade**. 2007. 281f. Tese (Doutorado) – Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BRUXTON, I. (Eds.) **Goodman & Gilman manual de farmacologia e terapêutica**. 1 ed., São Paulo: McGraw-Hill, 2010. 1220p.

BUCKLAND, K. F.; WILLIAMS, T. J.; CONROY, D. M. Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils *via* the H<sub>4</sub> receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 6, p. 1117-1127, 2003.

CAI, M. *et al.* Design and synthesis of novel insecticides based on the serotonergic ligand 1-[(4-aminophenyl)ethyl]-4-[3-(trifluoromethyl)phenyl]piperazine (PAPP). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2624-2629, 2010.

---

---

CAMELO-NUNES, I. C. Novos anti-histamínicos: uma visão crítica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 173-180, 2006.

CARDILLO, G.; ORENA, M. Stereocontrolled cyclofunctionalizations of double bonds through heterocyclic intermediates. **Tetrahedron**, v. 46, n. 10, p. 3321-3408, 1990.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry. Part A: structure and mechanisms**. 5 ed., New York: Springer, 2007. 1199 p.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, n. 2, p. 137-158, 1998.

CELANIRE, S. *et al.* Histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists reach out for the clinic. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 23-24, p. 1613-1627, 2005.

CERAS, J. *et al.* Novel sulfonylurea derivatives as H<sub>3</sub> receptor antagonists. Preliminary SAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p.1-13, 2012.

CHATTERJEE, S. In search of potent histamine-3 receptor antagonists. **Journal of King Saud University-Science**, v. 27, n. 2, p. 189-192, 2015.

CHEN, G. *et al.* Histamine N-methyltransferase gene polymorphisms in Chinese and their relationship with enzyme activity in Erythrocytes. **Pharmacogenetics**, v. 13, n. 7, p. 389-397, 2003.

CHEN, W. *et al.* Design, synthesis and cytotoxic activities of novel hybrid compounds between dihydrobenzofuran and imidazole. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 4250-4255, 2011.

CHENG, Y.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. **Biochemical Pharmacology**, v. 22, n. 23, p. 2099-2108, 1973.

CHRISTOPHER, F.; THANGAM, E. B.; SURESH, M. X. A bioinformatics search for selective histamine H<sub>4</sub> receptor antagonists through structure-based virtual

---

---

screening strategies. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 79, n. 5, p. 749-759, 2012.

CLAYDEN, J. *et al.* **Organic Chemistry**. New York: Oxford, 2000. 1415 p.

CONNELLY, W. M. *et al.* The histamine H<sub>4</sub> receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 55-63, 2009.

COOPER, M. S.; SEIBEL, M. J.; ZHOU, H. Glucocorticoids, bone and energy metabolism. **Bone**, 2015 (no prelo).

CORRÊA, M. F.; FERNANDES, J. P. S. Histamine H<sub>4</sub> receptor ligands: future applications and state of art. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 85, n. 4, p. 461-480, 2015.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F. COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRAMP, S. *et al.* Identification and hit-to-lead exploration of a novel series of histamine H<sub>4</sub> receptor inverse agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 8, p. 2516–2519, 2010.

CRIADO, P. R. *et al.* Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 2, p. 195-210, 2010.

CUNICO, W. *et al.* Synthesis and antimalarial activity of hydroxyethylpiperazine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 1363-1368, 2009.

DANDU, R. R. *et al.* Synthesis and evaluation of pyridazinone–phenethylamine derivatives as selective and orally bioavailable histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists with

---

---

robust wake-promoting activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 21, p. 6362–6365, 2011.

DAUGHERTY, B. L. Histamine H<sub>4</sub> antagonism: a therapy for chronic allergy? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 1, p. 5-7, 2004.

DE ESCH, I. J. P. *et al.* The histamine H<sub>4</sub> receptor as a new therapeutic target for inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 9, p. 462-469, 2005.

DEML, K. *et al.* Interactions of histamine H<sub>1</sub>-receptor agonists and antagonists with the human histamine H<sub>4</sub>-receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 5, p. 1019–1030, 2009.

DEUPREE, J. D.; BYLUND, David B. Basic principles and techniques for receptor binding. **Tocris Reviews**, n. 18, p. 1-8, 2002.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory agents: present and future. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 935-950, 2010.

DY, M.; SCHNEIDER, E. Histamine–cytokine connection in immunity and hematopoiesis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 5, p. 393-410, 2004.

EMANUEL, M. B. Histamine and the antiallergic antihistamines: a history of their discoveries. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, S. 3, p. 1-11, 1999.

ENGELHARDT, H. *et al.* Detailed structure-activity relationship of indolecarboxamides as H<sub>4</sub> receptor ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 660-668, 2012.

ESBENSHADE, T. A. *et al.* The histamine H<sub>4</sub> receptor as a new therapeutic target for inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 9, p. 462-469, 2005.

FAIÇAL, S.; UEHARA, M. H. Efeitos sistêmicos e síndrome de retirada em tomadores crônicos de corticosteroides. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 69-74, 1998.

---

---

FENG, Z.; HOU, T.; LI, Y.. Docking and MD study of histamine H<sub>4</sub>R based on the crystal structure of H<sub>1</sub>R. **Journal of Molecular Graphics Modelling**, v. 39, p. 1-12, 2013.

FERNANDES, J. P. S. **Planejamento e síntese de compostos potencialmente ligantes dos receptores 5-HT<sub>2c</sub> e H<sub>4</sub>**. 2012. 224f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FERREIRA, C.; ARROIO, A.; REZENDE, D. B. Uso de modelagem molecular no estudo dos conceitos de nucleofilicidade e basicidade. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1661-1665, 2011.

FIDOM, K. *et al.* A new crystal structure fragment-based pharmacophore method for G protein-coupled receptors. **Methods**, v. 71, p. 104-112, 2015.

FOUSTERIS, M. *et al.* Water-promoted iodocyclisation of 2-allylphenols. **Green Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 522-523, 2006.

Gao L. *et al.* Synthesis and evaluation of novel ligands for the histamine H<sub>4</sub> receptor based on a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine scaffold. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 1, p. 132–137, 2013.

GEYER, R.; BUSCHAUER, A. Synthesis and histamine H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptor activity of conformationally restricted cyanoguanidines related to UR-PI376. **Archiv der Pharmazie**, v. 344, p. 775–785, 2011.

GHANEMI, A. Targeting G protein coupled receptor-related pathways as emerging molecular therapies. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2015.

GILMORE, K.; ALABUGIN, I. V. Cyclizations of alkynes: revisiting baldwin's rules for ring closure. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 11, p. 6513-6556, nov. 2011.

GILROY, D.; MAEYER, R. New insights into the resolution of inflammation. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 161-168, 2015.

---

---

GIRAULT, S. *et al.* Antimalarial, Antitrypanosomal, and Antileishmanial Activities and Cytotoxicity of Bis(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): Influence of the Linker. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2646-2654, 2000.

GLATZER, F. *et al.* Histamine induces proliferation in keratinocytes from patients with atopic dermatitis through the histamine 4 receptor. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 6, p. 1358-1367, 2013.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GUTZMER, R. *et al.* Pathogenetic and therapeutic implications of the histamine H4 receptor in inflammatory skin diseases and pruritus. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 985–994, 2011.

HANCOCK, A. A. The challenge of drug discovery of a GPCR target: Analysis of preclinical pharmacology of histamine H<sub>3</sub> antagonists/inverse agonists. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 8, p. 1103-1113, 2006.

HASHIMOTO, T. *et al.* A selective human H4-receptor agonist: (-)-2-cyano-1-methyl-3-((2*R*,5*R*)-5-[1*H*-imidazol-4(5)-yl]tetrahydrofuran-2-yl)methylguanidine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 14, p. 3162-3165, 2003.

HEGEMAN, J. *et al.* CNS effects of indomethacin: should patients be cautioned about decreased mental alertness and motor coordination? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 814-821, 2013.

HILL, S. J. *et al.* International union of pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. **Pharmacology Reviews**, v. 49, n. 3, p. 253-278, 1997.

HOELZ, L. V. B. *et al.* Receptores acoplados à proteína G. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 981-1000, 2013.

HUANG, J.; THURMOND, R. L. The New Biology of Histamine Receptors. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 8, n. 1, p. 21-27, 2008.

---

---

HULME, E. C.; TREVETHICK, M. A. Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 6, p. 1219-1237, 2010.

HUSAIN, A. *et al.* Synthesis, molecular properties, toxicity and biological evaluation of some new substituted imidazolidine derivatives in search of potent anti-inflammatory agents. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2015 (no prelo).

IGEL, P. *et al.*  $N^G$ -Acylated imidazolylpropylguanidines as potent histamine  $H_4$  receptor agonists: selectivity by variation of the  $N^G$ -substituent. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2623-2627, 2009a.

IGEL, P. *et al.* Synthesis and structure\_activity relationships of cyanoguanidine-type and structurally related histamine  $H_4$  receptor agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6297-6313, 2009b.

JABLONOWSKI, J. A. The first potent and selective non-imidazole human histamine  $H_4$  receptor antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 19, p. 3957-3960, 2003.

JADIDI-NIARAGH, F.; MIRSHAFIEY, A. Histamine and histamine receptors in pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. **Neuropharmacology**, v. 59, n. 3, p. 180-189, 2010.

JARSKOG, L. F. *et al.* A Phase II study of a histamine  $H_3$  receptor antagonist GSK239512 for cognitive impairment in stable schizophrenia subjects on antipsychotic therapy. **Schizophrenia Research**, v. 164, n. 1-3, p. 136-142, 2015.

JONG, L. A. A. *et al.* Receptor–ligand binding assays: technologies and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 829, n. 1-2, p. 1-25, 2005.

JONGEJAN, A. *et al.* Delineation of agonist binding to the human histamine  $H_4$  receptor using mutational analysis, homology modeling, and ab initio calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1455-1463, 2008.

---

---

JUTEL, M.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 39, n. 12, p. 1786–1800, 2009.

KISS, R. *et al.* Binding mode analysis and enrichment studies on homology models of the human histamine H<sub>4</sub> receptor. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 1059-1070, 2008.

KOTTKE, T. *et al.* Receptor-specific functional efficacies of alkyl imidazoles as dual histamine H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> receptor ligands. **European Journal of Pharmacology**, v. 654, n. 3, p. 200-208, 2011.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.52, n.4, p. 498-512, 2002.

KURAMASU, A. *et al.* The hydrophobic amino acids in putative helix 8 in carboxy-terminus of histamine H<sub>3</sub> receptor are involved in receptor-G-protein coupling. **Cellular Signalling**, v. 23, n.11, p.1843–1849, 2011.

LABEEUW, O. *et al.* Novel and highly potent histamine H<sub>3</sub> receptor ligands. Part 2: Exploring the cyclohexylamine-based series. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 18, p. 5384-5388, 2011.

LAGES, A. S. Inibidores seletivos de prostaglandina endoperóxido sintase-2 (PGHS-2): nova estratégia para o tratamento da inflamação. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 761-771, 1998.

LANE, C. A. L. *et al.* Synthesis of novel histamine H<sub>4</sub> receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 2, p. 1156-1159, 2012.

LAZEWSKA, D. *et al.* Aryl-1,3,5-triazine derivatives as histamine H<sub>4</sub> receptor ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 83, p. 534-546, 2014.

LEE, H.; SURH, Y. Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 10, p. 1340-1350, 2012.

---

---

LEE-DUTRA, A. *et al.* Identification of 2-arylbenzimidazoles as potent human histamine H<sub>4</sub> receptor ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 23, p. 6043-6048, 2006.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. (Eds.) **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, 7 ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. 1500p.

LEURS, R. *et al.* The histamine H<sub>3</sub> receptor: from gene cloning to H<sub>3</sub> receptor drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 107-120, 2005.

LEURS, R. *et al.* Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H<sub>4</sub> receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 14-23, 2009.

LEURS, R.; SMIT, M. J.; TIMMERMAN, H. Molecular Pharmacological Aspects of Histamine Receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 66, n. 3, p. 413-463, 1995.

LIM, H. D. *et al.* Clobenpropit analogs as dual activity ligands for the histamine H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptors: Synthesis, pharmacological evaluation, and cross-target QSAR studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, n.11, p. 3987-3994, 2009.

LIM, H. D. *et al.* Evaluation of histamine H<sub>1</sub>-, H<sub>2</sub>-, and H<sub>3</sub>-receptor ligands at the human histamine H<sub>4</sub> receptor: identification of 4-Methylhistamine as the first potent and selective H<sub>4</sub> receptor agonist. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 3, p. 1310-1321, 2005.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LIMA, L. M.; BARREIRO, Eliezer J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

LING, P. *et al.* Histamine H<sub>4</sub> receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 1, p. 161-171, 2004.

---

---

LIU, C. *et al.* Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H<sub>4</sub>) expressed in bone marrow. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 420-426, 2001.

MAHAJAN, V. A. *et al.* EPZ-10 catalyzed regioselective transformation of alkenes into  $\beta$ -iodo ethers, iodohydrins and 2-iodomethyl-2,3-dihydrobenzofurans. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 325-327, 2002.

MAINTZ, L.; NOVAK, N.. Histamine and histamine intolerance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 5, p. 1185-1196, 2007.

MARSON, C. M. Targeting the histamine H<sub>4</sub> receptor. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 11, p. 7121-7156, 2011.

MAURYA, R. A.; HOANG, P. H.; KIM, D. Efficient and continuous monoacylation with superior selectivity of symmetrical diamines in microreactors. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 1, p. 65-68, 2012.

MEDHURST, A. D. *et al.* GSK189254, a Novel H<sub>3</sub> receptor antagonist that binds to histamine H<sub>3</sub> receptors in Alzheimer's disease brain and improves cognitive performance in preclinical models. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, n. 3, p. 1032-1045, 2007.

MEHANNA, A. S.; KIM, J. Y. Design, synthesis, and biological testing of thiosalicylamides as a novel class of calcium channel blockers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4323-4331, 2005.

MENG, C. Q. *et al.* Anthelmintic compounds and compositions and method of using thereof. **United States Patent and Trademark Office (USA)**. n. US2014/142114 A1, 22 maio 2014.

MIKÓ, T. *et al.* Structural variations of 1-(4-(phoxymethyl)benzyl)piperidines as nonimidazole histamine H<sub>3</sub> receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 2727-2736, 2004.

MINNEMAN, K. P.; WECKER, L. **Brody farmacologia humana**, 4 ed., São Paulo: Elsevier, 2006. 800p.

---

---

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTES, J. M.; FLORES, J. F.; BARRÓN, Enrique Alfonso. Histamina, receptores y antagonistas. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 68, n. 3, p. 164-169, jul./set. 2005.

MORSE, K. L. *et al.* Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. **The Journal of Pharmacology**, v. 296, n. 3, p. 1058-1066, 2001.

MOURA, P. R.; VIDAL, Felipe Augusto P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Scientia Medica**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2011.

MOWBRAY, C. E. *et al.* Challenges of drug Discovery in novel target space. The discovery and evaluation of PF-3893787: a novel histamine H<sub>4</sub> receptor antagonist. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 21, p. 6596-6602, 2011.

NELSON, W. L. Antihistamines and related antiallergic and antiulcer agents. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. (Eds.) **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, 7 ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1045-1072, 2012.

NGUYEN, T. *et al.* Discovery of a novel member of the histamine receptor family. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 427-433, 2001.

O'CONNOR, C. Inflammation, immunity and allergy. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 16, n. 7, p. 328-333, 2015.

O'MAHONY, L; MÜBECCEL, A; CEZMI, A A. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 128, n. 6, p. 153-162, 2011.

O'REILLY, M *et al.* Identification of a histamine H<sub>4</sub> receptor on human eosinophils. Role in eosinophil chemotaxis. **Journal of Receptors Signal Transduction**, v. 22, n. 1-4, p. 431-448, 2002.

---

---

ODA, T. *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36781-36786, 2000.

OHTAKA, H. *et al.* Benzylpiperazine derivatives. II. Syntheses and cerebral vasodilating activities of 1-[(3-alkyl-3-hydroxy-3-phenyl)propyl]-4-benzylpiperazine derivatives. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 7, p. 2782-2791, 1987.

OKAMOTO, T. *et al.* Histamine H<sub>1</sub>-receptor antagonists with immunomodulating activities: potential use for modulating T helper type 1 (Th<sub>1</sub>)/Th<sub>2</sub> cytokine imbalance and inflammatory responses in allergic diseases. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 157, n. 1, p. 27-34, 2009.

PALKAR, M. B. *et al.* Synthesis, pharmacological screening and in silico studies of new class of Diclofenac analogues as a promising anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2855-2866, 2014.

PANCOTE, C. G. *et al.* Simple and efficient access to 3-ethoxycarbonylpyrroles, benzofurans, and naphthofurans. **Synthesis**, n. 23, p. 3963-3966, 2009.

PAPIRIS, S. A. *et al.* Acute severe asthma. New approaches to assessment and treatment. **Drugs**, v. 69, n. 17, p. 2363-2391, 2009.

PARSONS, M. E.; GANELLIN, C. R. Histamine and its receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S127-S135, 2006.

PASSANI, M. B.; BLANDINA, P. Histamine receptors in the CNS as targets for therapeutic intervention. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 4, p. 242-249, 2011.

PASTORINO, A. C. Revisão sobre a eficácia e segurança dos anti-histamínicos de primeira e segunda geração. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**, v. 33, n. 3, p. 88-92, 2010.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. 4 ed., Oxford: Oxford University Press, 2009. 752 p.

---

---

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007.

POLLARD, T. D. A guide to simple and informative bonding assays. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n. 23, p. 4061-4067, 2010.

RAIBLE, D. G. *et al.* Pharmacologic characterization of a novel histamine receptor on human eosinophils. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 149, p. 1506-1511, 1994.

RAMOS-JIMÉNEZ, J.; GARDUÑO-TORRES, B.; ARIAS-MONTAÑO, J. A. Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. **Revista Biomédica**, v. 20, n. 2, p. 100-126, 2009.

REHER, T. M. *et al.* Evidence for ligand-specific conformations of the histamine H<sub>2</sub>-receptor in human eosinophils and neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, v. 84, n. 9, p. 1174-1185, 2012.

RIVARA, M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of new non-imidazole H<sub>3</sub>-receptor antagonists of the 2-aminobenzimidazole series. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1413–1424, 2006.

SADEK, B. *et al.* Non-imidazole histamine H<sub>3</sub> receptor ligands incorporating antiepileptic moieties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 77, p. 269–279, 2014.

SADEK, B. Imidazole-substituted drugs and tendency for inhibition of cytochrome P450 isoenzymes: a review. **Der Pharma Chemica**, v. 3, n. 1, p. 410-419, 2011.

SALCEDO, C.; PONTES, C.; MERLOS, M. Is the H<sub>4</sub> receptor a new drug target for allergies and asthma? **Frontiers in Bioscience**, E5, p. 178-187, 2013.

SANDER, K. *et al.* 2,4-Diaminopyrimidines as histamine H<sub>4</sub> receptor ligands-Scaffold optimization and pharmacological characterization. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 29, p. 7186-7196, 2009.

---

---

SANTILLAN, A. *et al.* Indole- and benzothiophene-based histamine H<sub>3</sub> antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 21, p. 6226–6230, 2010.

SAVALL, B. M. *et al.* Discovery and SAR of 6-alkyl- 2,4-diaminopyrimidines as histamine H<sub>4</sub> receptor antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2429–2439, 2014.

SAVALL, B. M. *et al.* Tricyclic aminopyrimidine histamine H<sub>4</sub> receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.21, n.21, p.6577–6581, 2011.

SCHNEIDER, E. H. *et al.* Structural requirements for inverse agonism and neutral antagonism of indole-, benzimidazole-, and thienopyrrole-derived histamine H<sub>4</sub> receptor ligands. **The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 2, p. 513–521, 2010.

SCHULTES, S. *et al.* Mapping histamine H<sub>4</sub> receptor-ligand binding modes. **Medicinal Chemistry Communications**, v. 4, p. 193-204, 2013.

SEIFERT, R. *et al.* Paradoxical stimulatory effects of the “standard” histamine H<sub>4</sub>-receptor antagonist JNJ7777120: the H<sub>4</sub> receptor joins the club of 7 transmembrane domain receptors exhibiting functional selectivity. **Molecular Pharmacology**, v. 79, n. 4, p. 631–638, 2011.

SHIN, N. *et al.* INCB38579, a novel and potent histamine H<sub>4</sub> receptor small molecule antagonist with anti-inflammatory pain and anti-pruritic functions. **European Journal of Pharmacology**, v. 675, n. 1-3, p. 47-56, 2012.

SHIN, N. *et al.* Molecular Molecular modeling and site-specific mutagenesis of the histamine-binding site of the histamine H<sub>4</sub> receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 38-47, 2002.

SILVA, T. F. Abordagens da Química Medicinal para o Planejamento de Protótipos de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 5, p. 921-933, 2013.

SLATER, J. W.; ZECHNICH, Andrew D.; HAXBY, Dean G. Second-generation antihistamines. A comparative review. **Drugs**, v. 57, n. 1, p. 31-47, 1999.

---

---

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's's Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure.** 6 ed., USA: John Wiley, 2007. 2357p.

SMITS, R. A. *et al.* Fragment based design of new H<sub>4</sub> receptor-ligands with anti-inflammatory properties in vivo. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2457-2467, 2008.

SMITS, R. A. *et al.* Synthesis and QSAR of quinazoline sulfonamides as highly potent human histamine H<sub>4</sub> receptor inverse agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2390-2400, 2010.

SMITS, R. A.; LEURS, Rob; DE ESCH, Iwan J. P. Major advances in the development of histamine H<sub>4</sub> receptor Ligands. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 15-16, p. 745-753, 2009.

STARK, H. Histamine receptors. **Biotrend Reviews**, n. 1, p. 1-9, 2007.

SUWA, E. *et al.* Histamine H<sub>4</sub> receptor antagonist reduces dermal inflammation and pruritus in a hapten-induced experimental model. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, n. 1-3, p. 383-388, 2011.

TERZIOGLU, N. *et al.* Synthesis and structure–activity relationships of indole and benzimidazole piperazines as histamine H<sub>4</sub> receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 21, p. 5251-5256, 2004.

THURMOND, R. L. *et al.* A potent and selective histamine H<sub>4</sub> receptor antagonist with anti-inflammatory properties. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, n. 1, p. 404-413, 2004.

THURMOND, R. L.; GELFAND, E. W.; DUNFORD, P. J. The role of histamine H<sub>1</sub> and H<sub>4</sub> receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nature Reviews**, v. 7, n. 1, p. 41-53, 2008.

TILIGADA, E. Editorial: is histamine the missing link in chronic inflammation? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 1, p. 4-6, 2012.

---

---

TILIGADA, E. *et al.* Histamine H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptors as novel drug targets. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 10, p. 1519-1531, 2009.

VALTER, M.; KOTTKE, T.; STARK, H. The histamine H<sub>4</sub> receptor: targeting inflammatory disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. 1, p. 1-5, 2011.

VENABLE, J. D. *et al.* Preparation and biological evaluation of indole, benzimidazole and thienopyrrole piperazine carboxamides: potent human histamine H<sub>4</sub> antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 8289-8298, 2005.

VERMA, S. K.; ACHARYA, B. N.; KAUSHIK, M. P. Imidazole-catalyzed monoacylation of symmetrical diamines. **Organic Letters**, v. 12, n. 19, p. 4232-4235, 2010.

VISTOLI, G.; PEDRETTI, A.; TESTA, B. Assessing drug-likeness: what are we missing? **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 7-8, p. 285-294, 2008.

VOLLHARDT, K.P.C.; SCHÖRE, N.E. **Organic chemistry: structure and function**. 5 ed., New York: W.H. Freeman, 2005. 1203p.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 3 ed., Oxford: Academic Press, 2008. 942 p.

WERNER, K.; NEUMANN, D.; SEIFERT, R. Analysis of the histamine H<sub>2</sub>-receptor in human monocytes. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, n. 2, p. 369-379, 2014.

WIEZCEK, M. *et al.* *N*-Alkenyl and cycloalkyl carbamates as dual acting histamine H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptor ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 2850-2858, 2011.

WIJTMANS, M. *et al.* Triazole ligands reveal distinct molecular features that induce histamine H<sub>4</sub> receptor affinity and subtly govern H<sub>4</sub>/H<sub>3</sub> subtype selectivity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 1693-1703, 2011.

YAMAURA, K. *et al.* Expression of the histamine H<sub>4</sub> receptor in dermal and articular tissues. **Life Sciences**. v. 92, n. 2, p. 108-113, 2013.

---

ZAMPELI, E.; TILIGADA, E. The role of histamine H<sub>4</sub> receptor in immune and inflammatory disorders. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 24-33, 2009.

ZHANG, M. *et al.* Lack of cataleptogenic potentiation with non-imidazole H<sub>3</sub> receptor antagonists reveals potential drug–drug interactions between imidazole-based H<sub>3</sub> receptor antagonists and antipsychotic drugs. **Brain Research**, v. 1045, n. 1-2, p. 142-149, 2005.

ZHOU, A. *et al.* Synthesis and evolution of paeonol derivatives as potential multifunctional agentes for the treatment of Alzheimer’s disease. **Molecules**, v. 20. n. 1, p. 1304-1318, 2015.

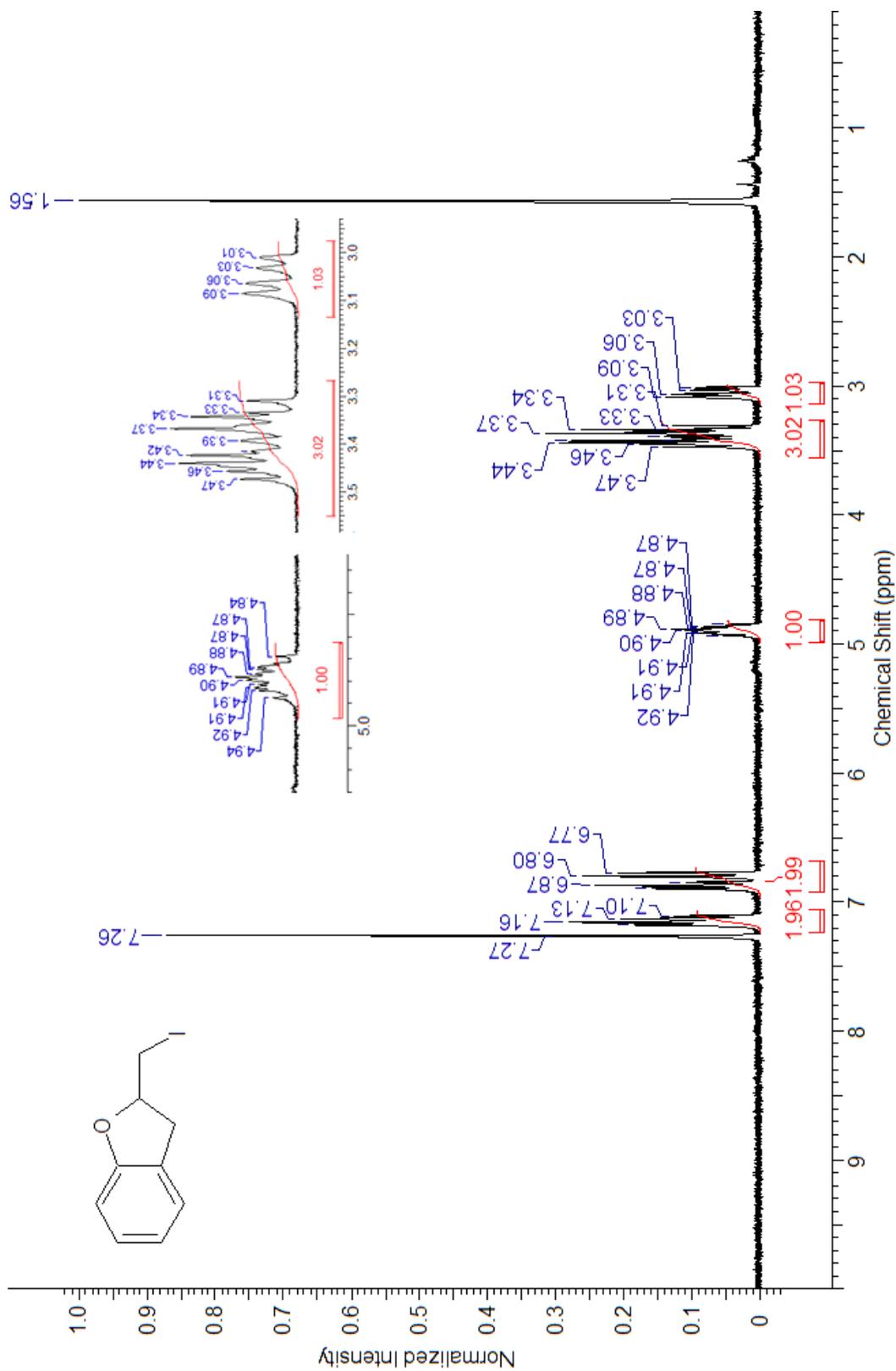
ZHOU, Q. Z.; HE, C. L.; CHEN, Z. C. Cyclization and halogenation of substituted o-allylphenols with diacetoxyiodobenzene in the presence of iodine or bromine. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, n. 6, p. 661-664, 2008.

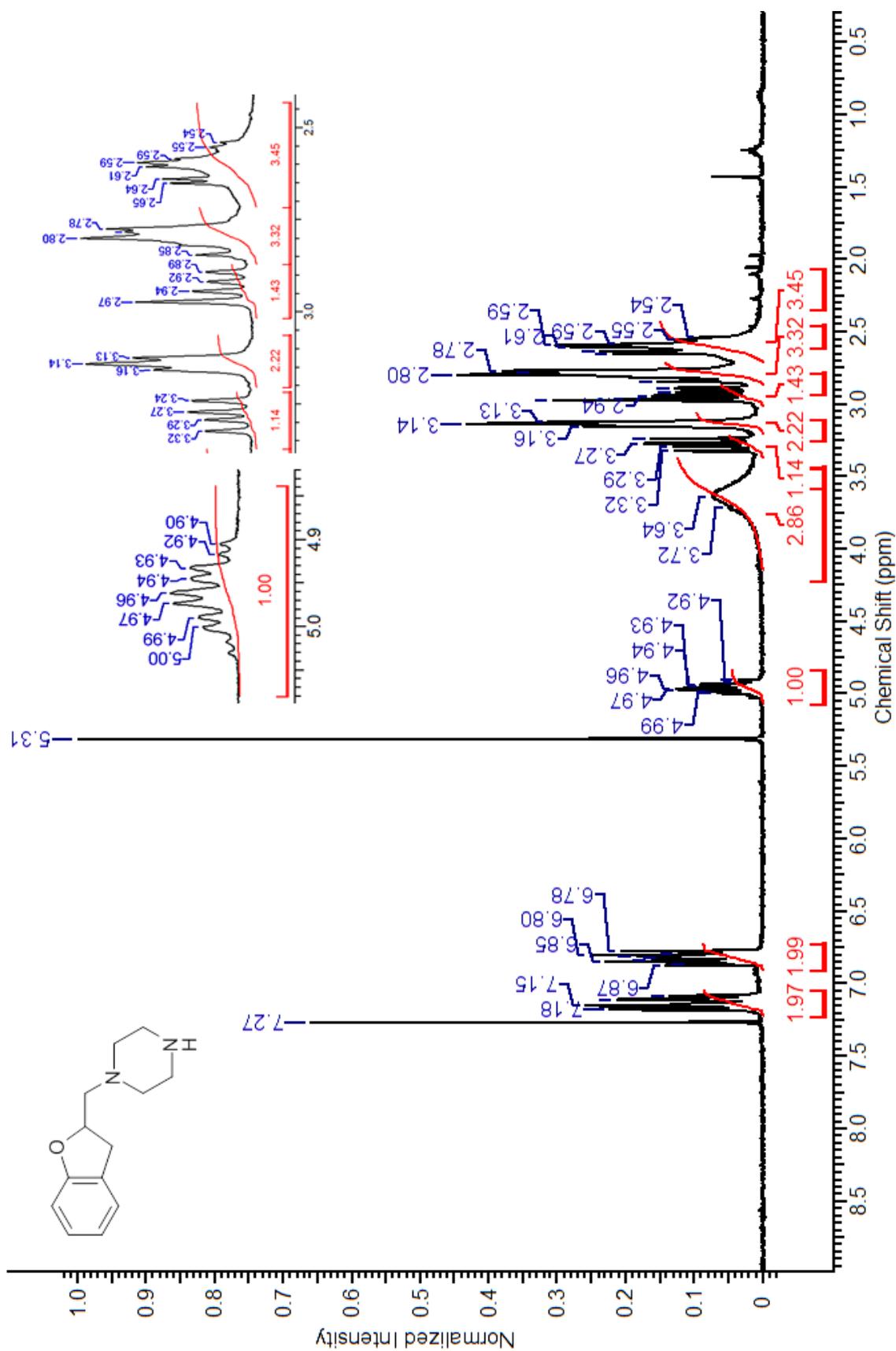
ZHU, Y. *et al.* Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 3, p. 434-441, 2001.

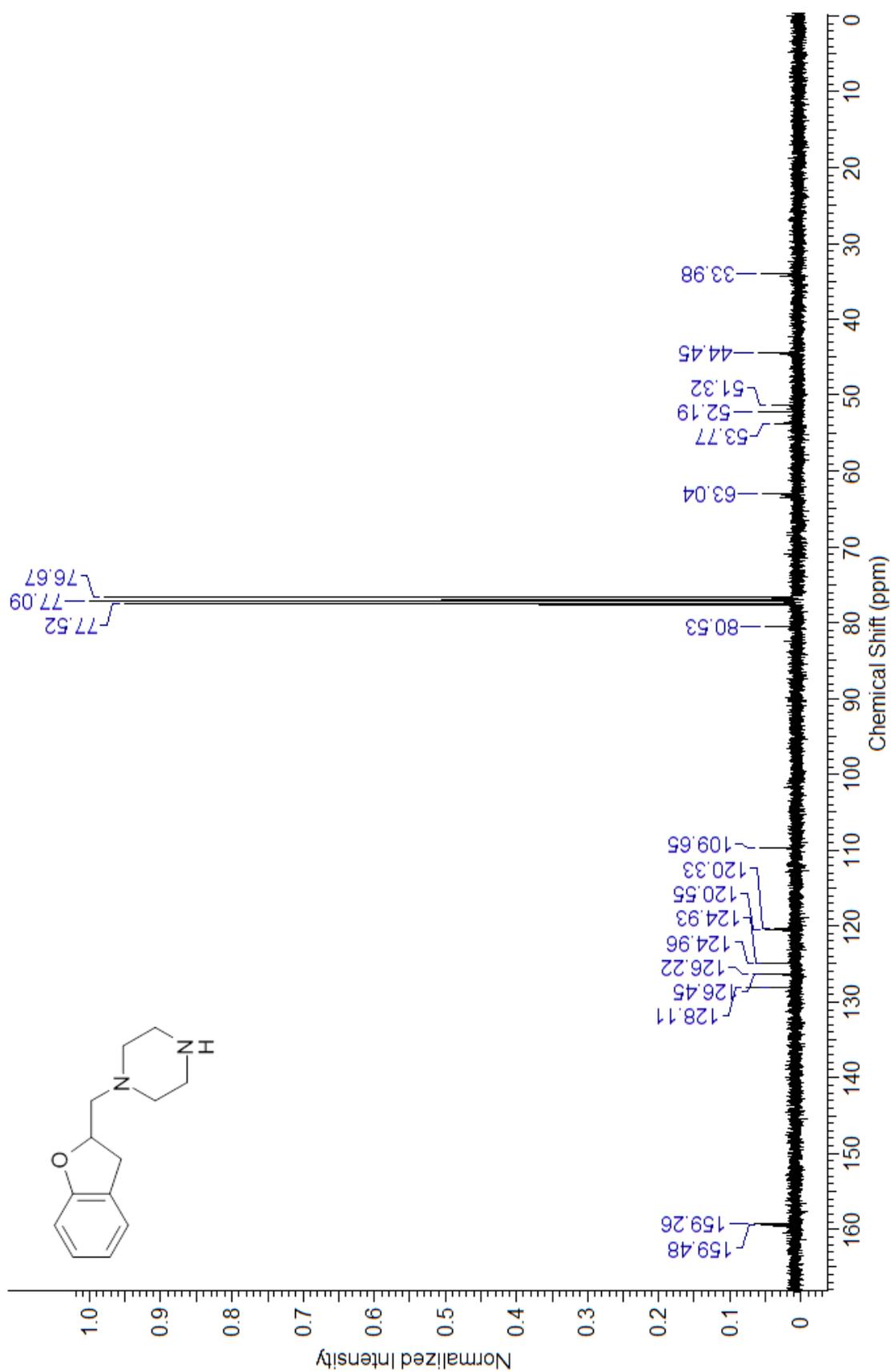
ZIMMERMANN, A. S. *et al.* Systematic analysis of histamine and *N*-methylhistamine concentrations in organs from two common laboratory mouse strains: C57Bl/6 and Balb/c. **Inflammation Research**, v. 60, n. 12, p. 1153–1159, 2011.

---

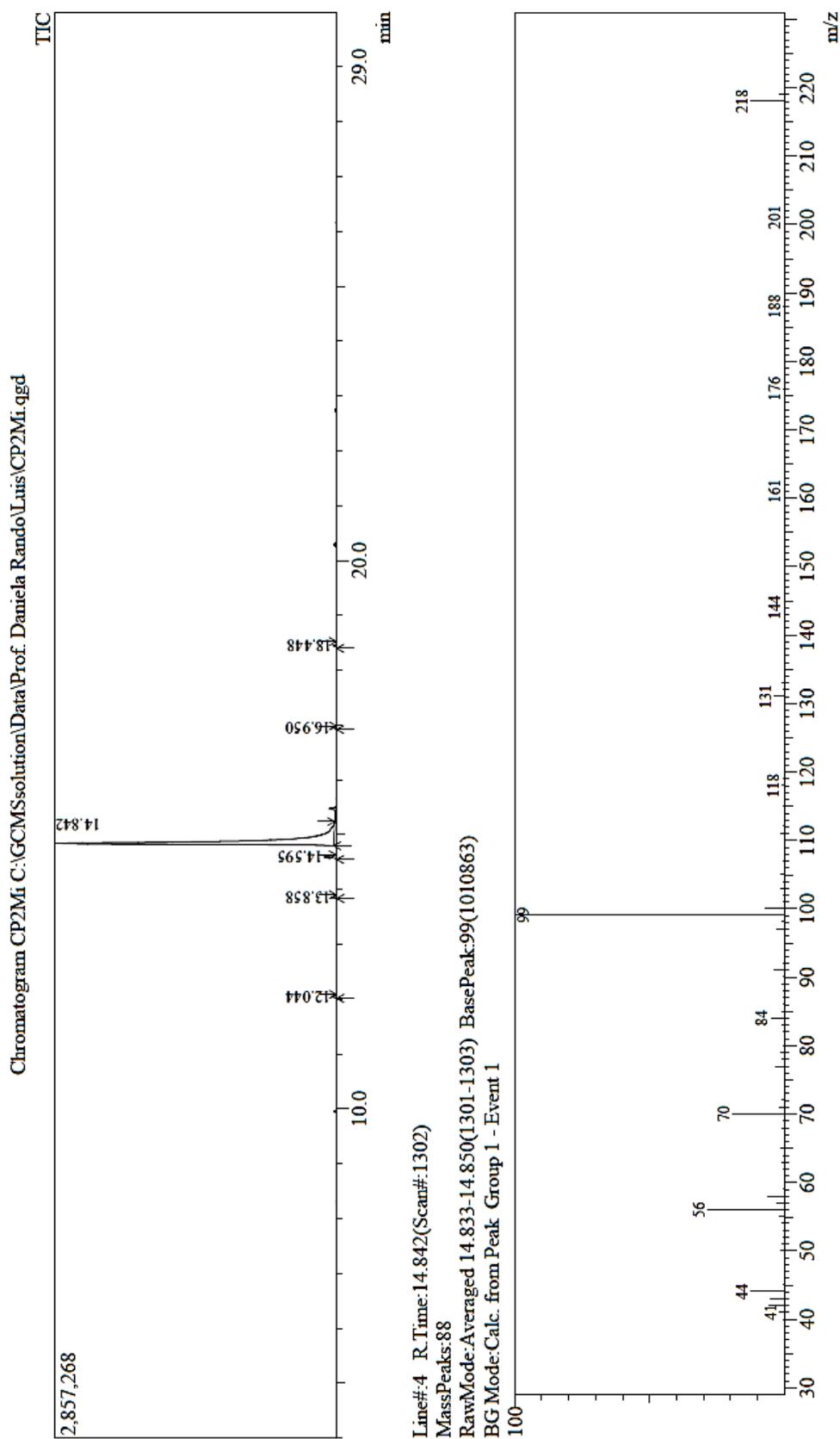
Apêndice 1 - Espectro de <sup>1</sup>H-NMR do 2-(iodometil)-2,3-diidrobenzofurano (19)

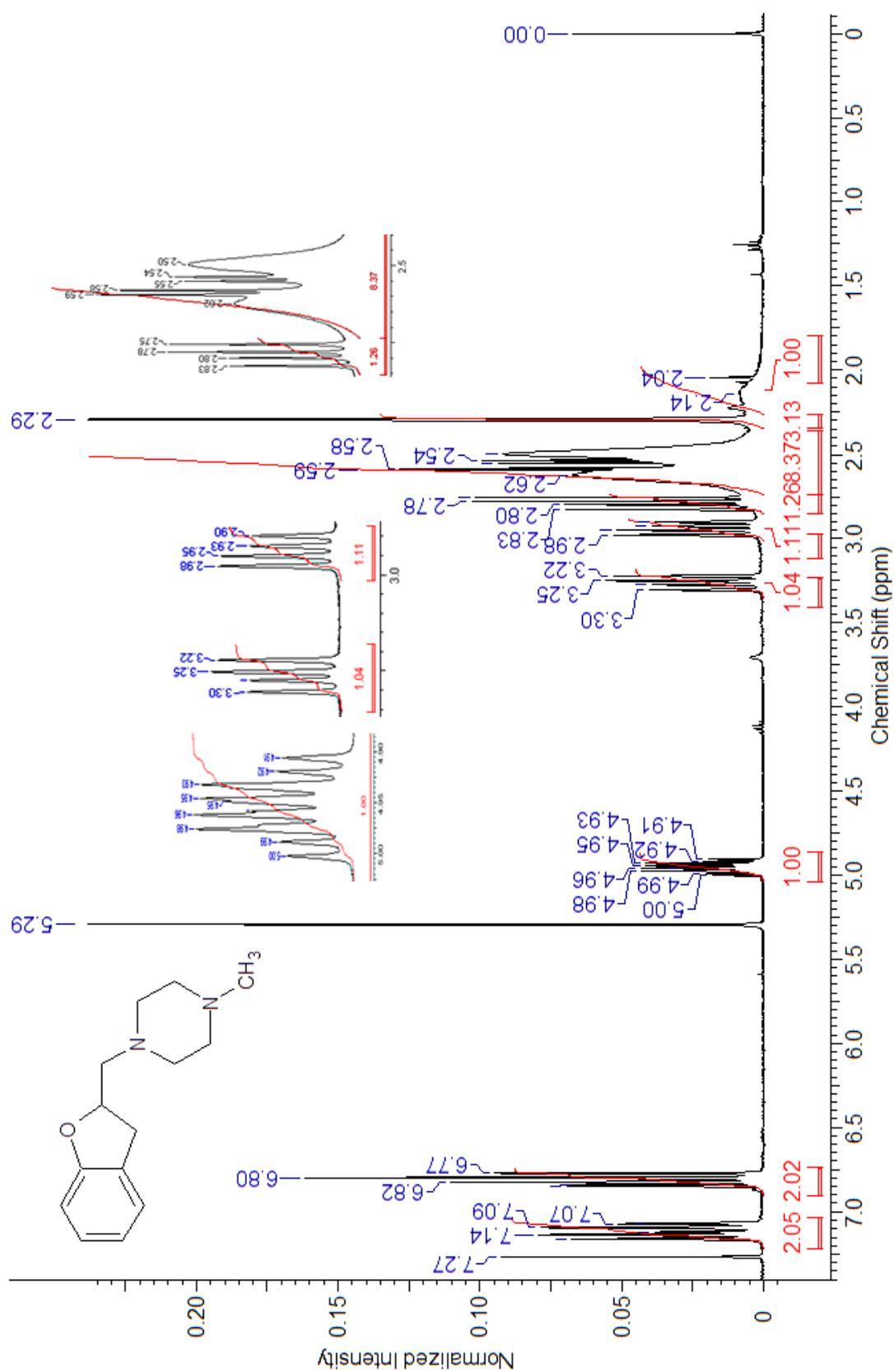


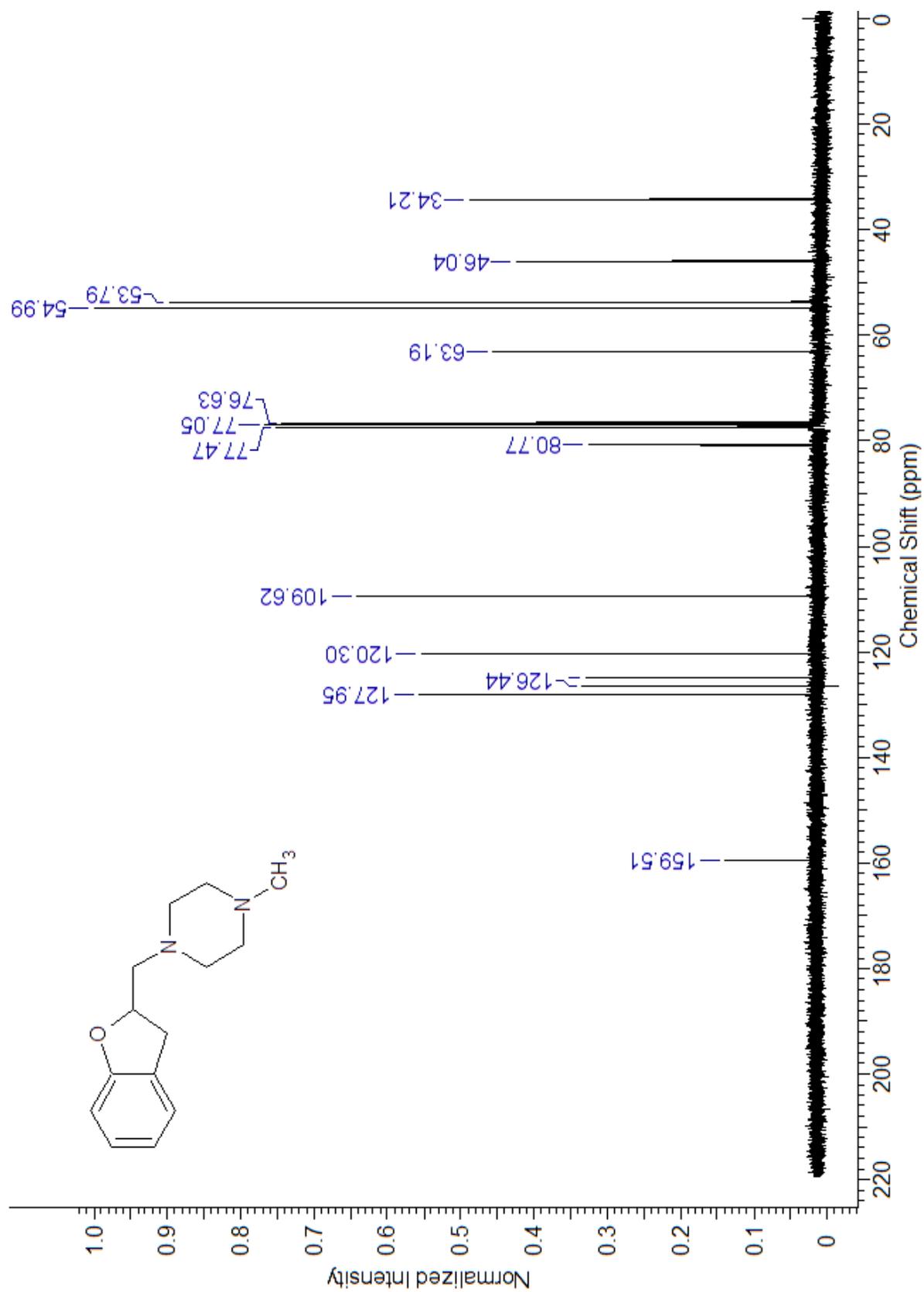
Apêndice 2 - Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  do LINS01001

Apêndice 3 – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR do LINS01001

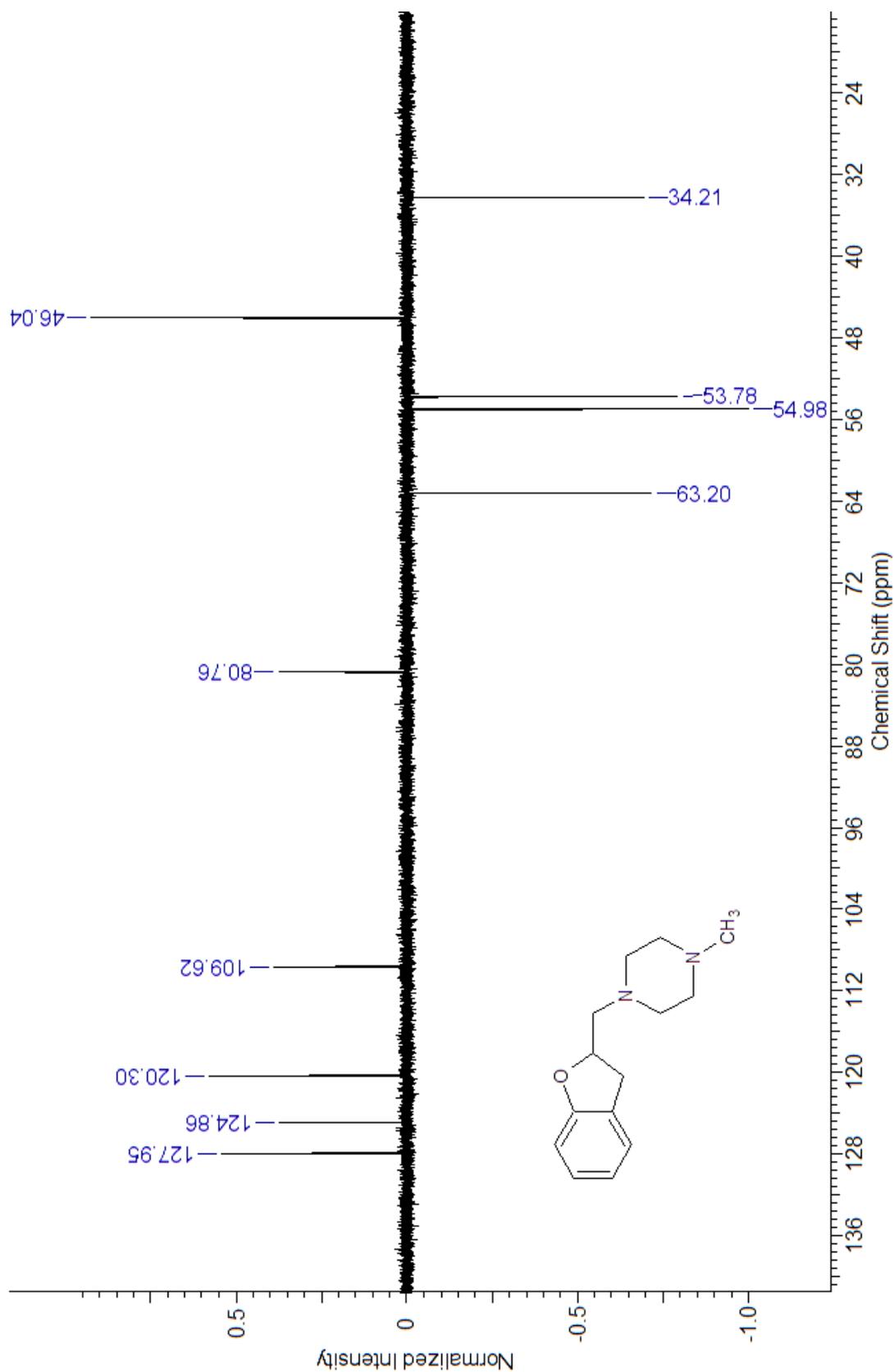
## Apêndice 4 – Cromatograma e espectro de massas do LINS01001



Apêndice 5 - Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  do LINS01003

Apêndice 6 – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR do LINS01003

## Apêndice 6.1 – DEPT 135° do LINS01003



**Apêndice 7 – Espectro de massas de alta resolução do LINS01003**

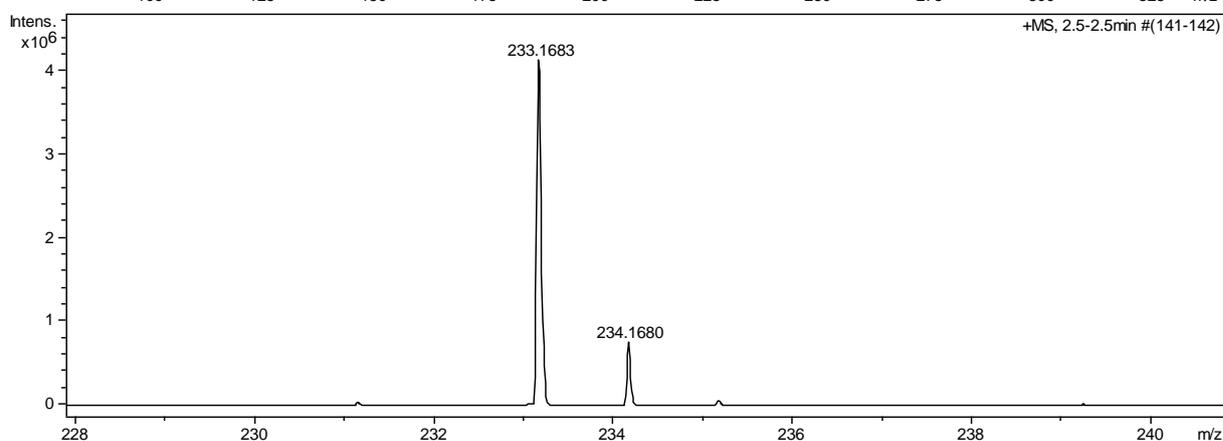
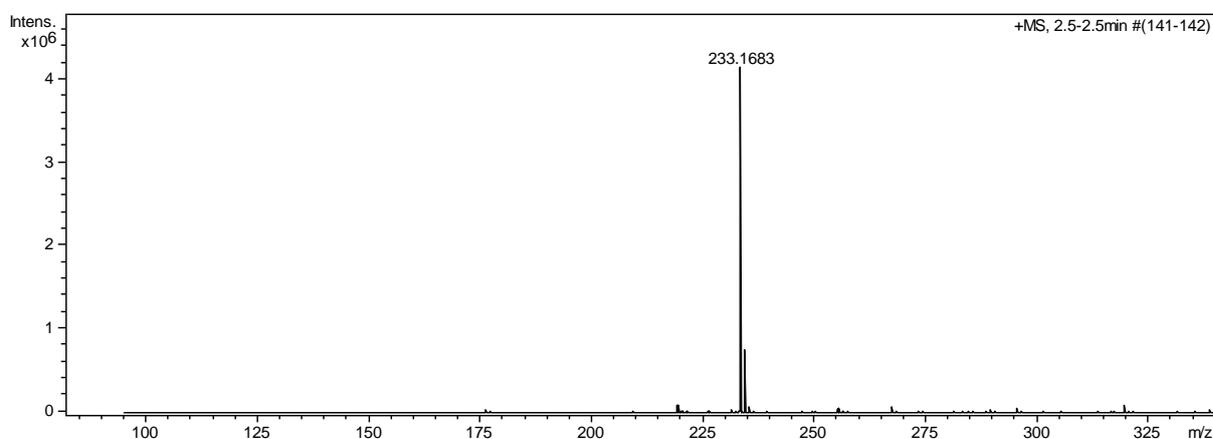
Equipamento: MICROTOF – Bruker

Nebulizer: 0.8 Bar

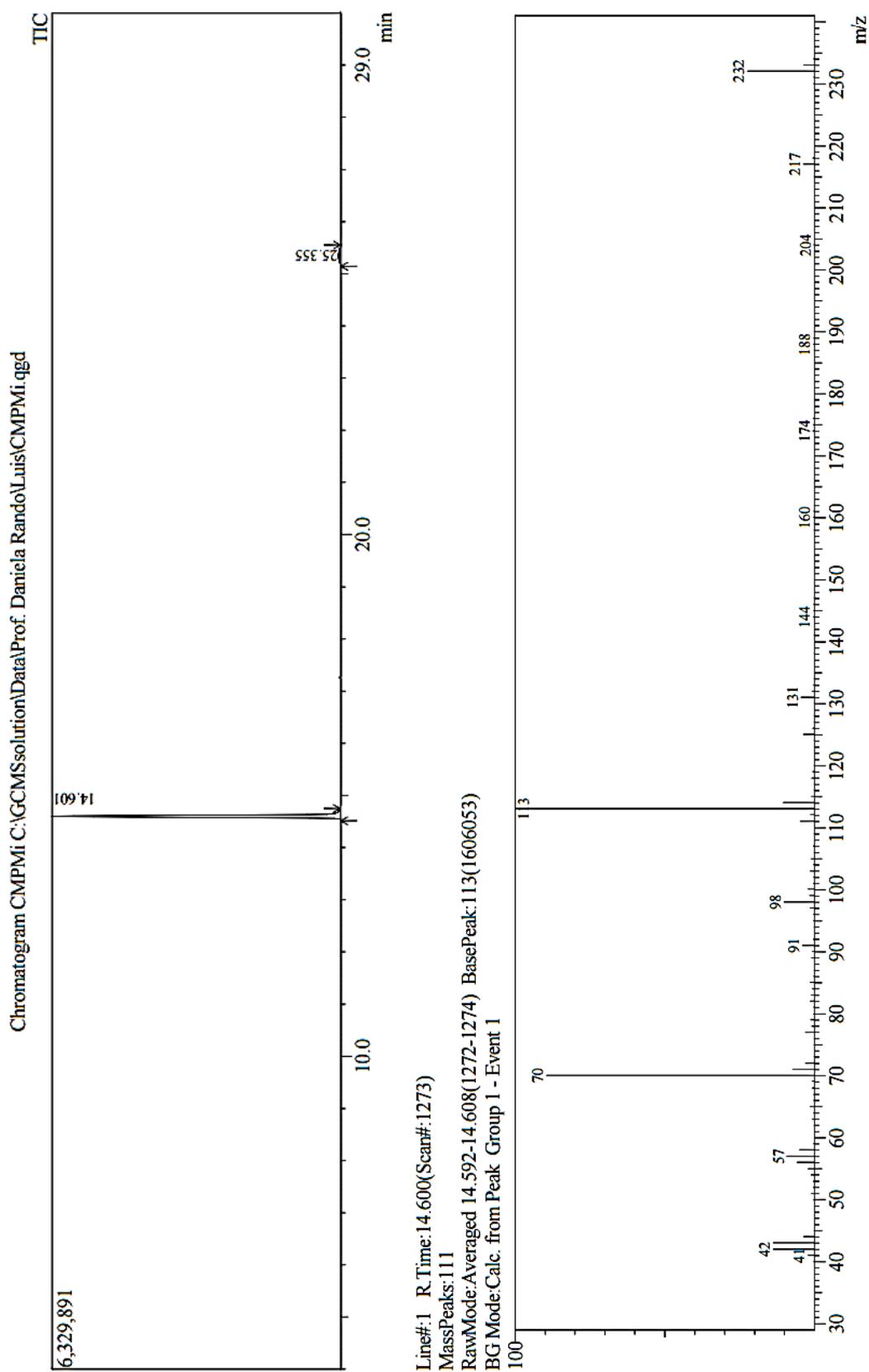
Dry gas: 5 l/min

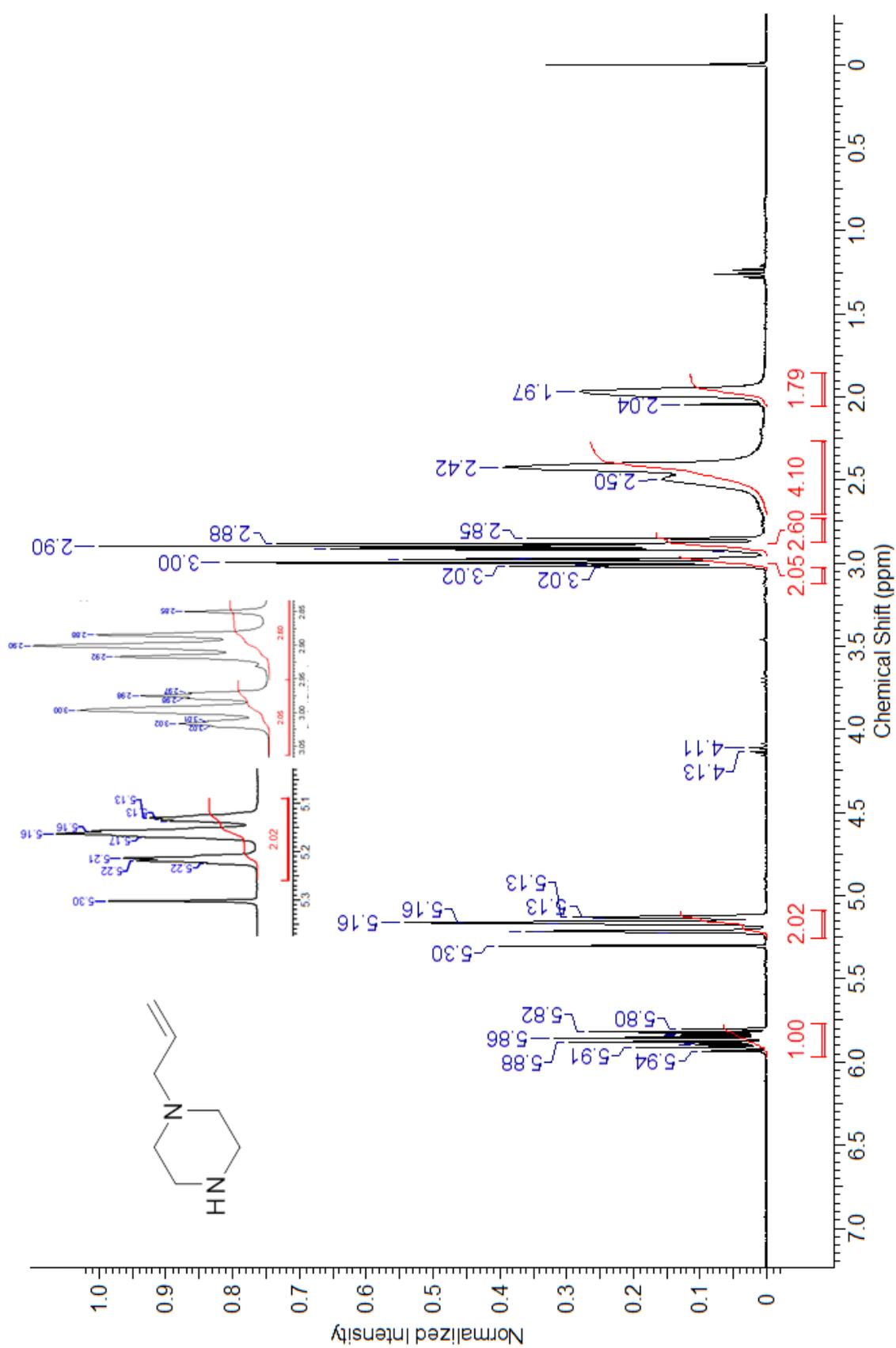
Temp: 200 °C

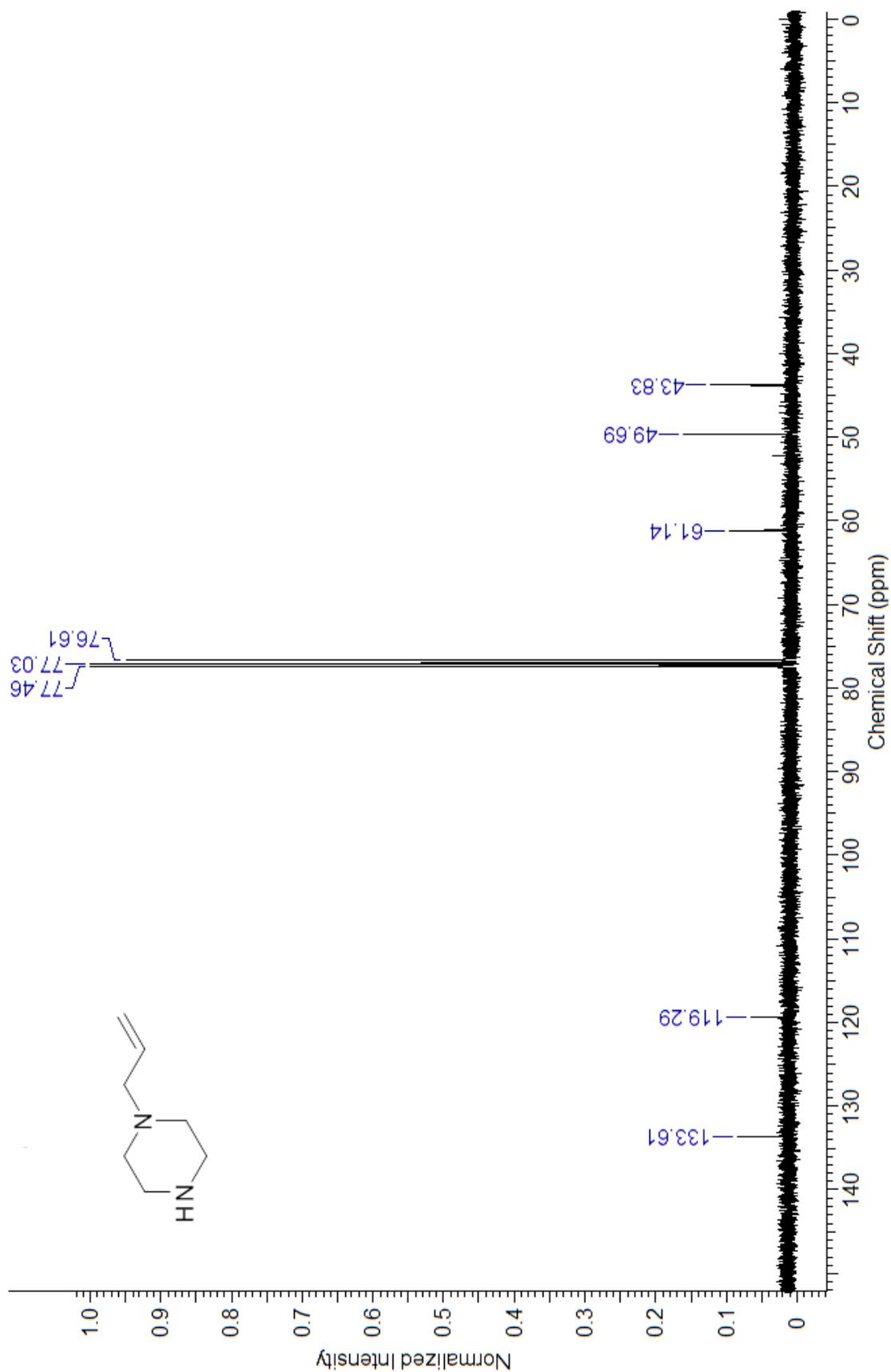
HV: 4500 V

**Solicitação: 01474****Amostra: CMP ativ****ESI + amostra dissolvida em MEOH e diluída em Me-H - 0.1% Acido fórmico**

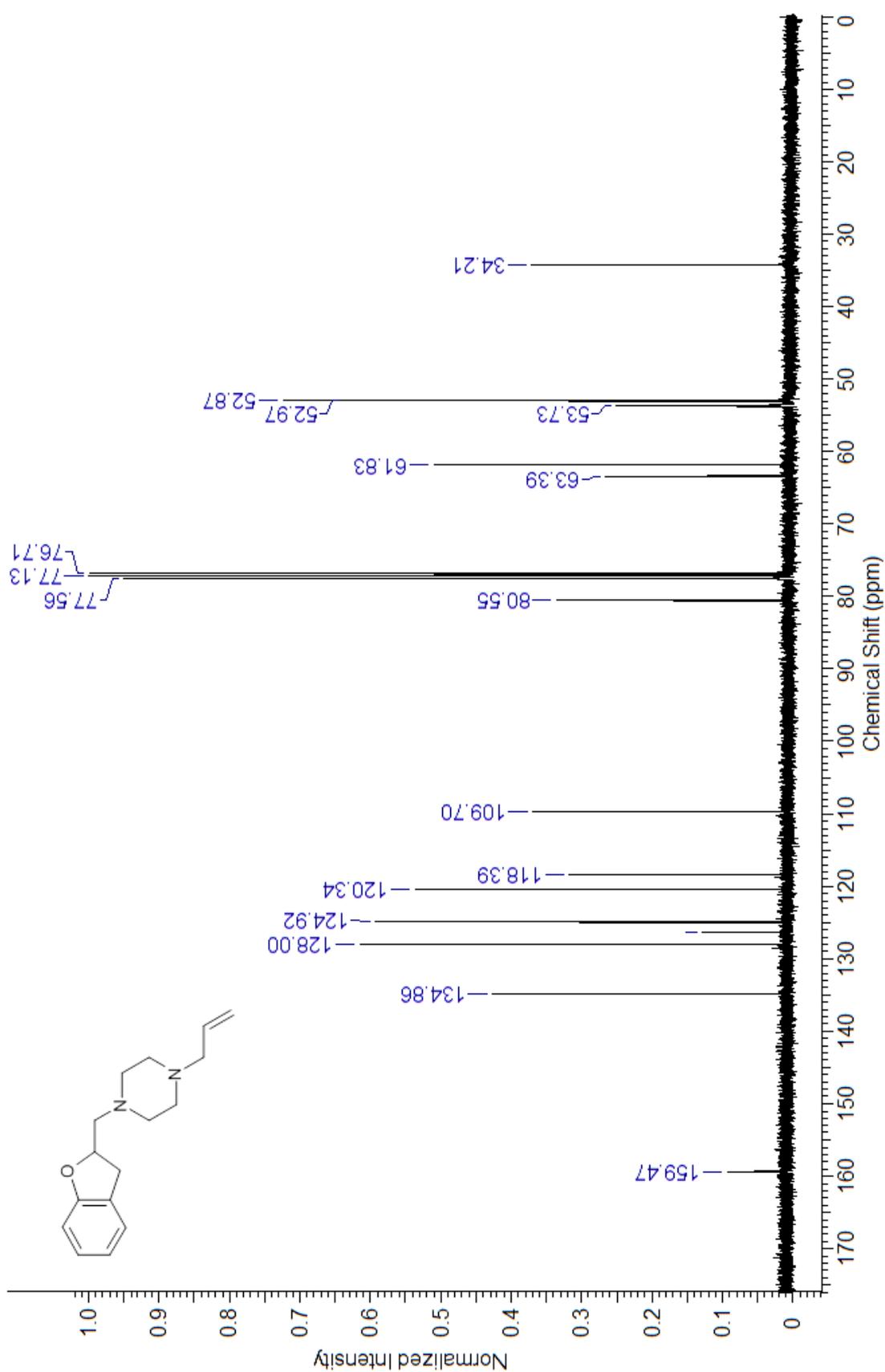
## Apêndice 8 – Cromatograma e espectro de massas do LINS01003



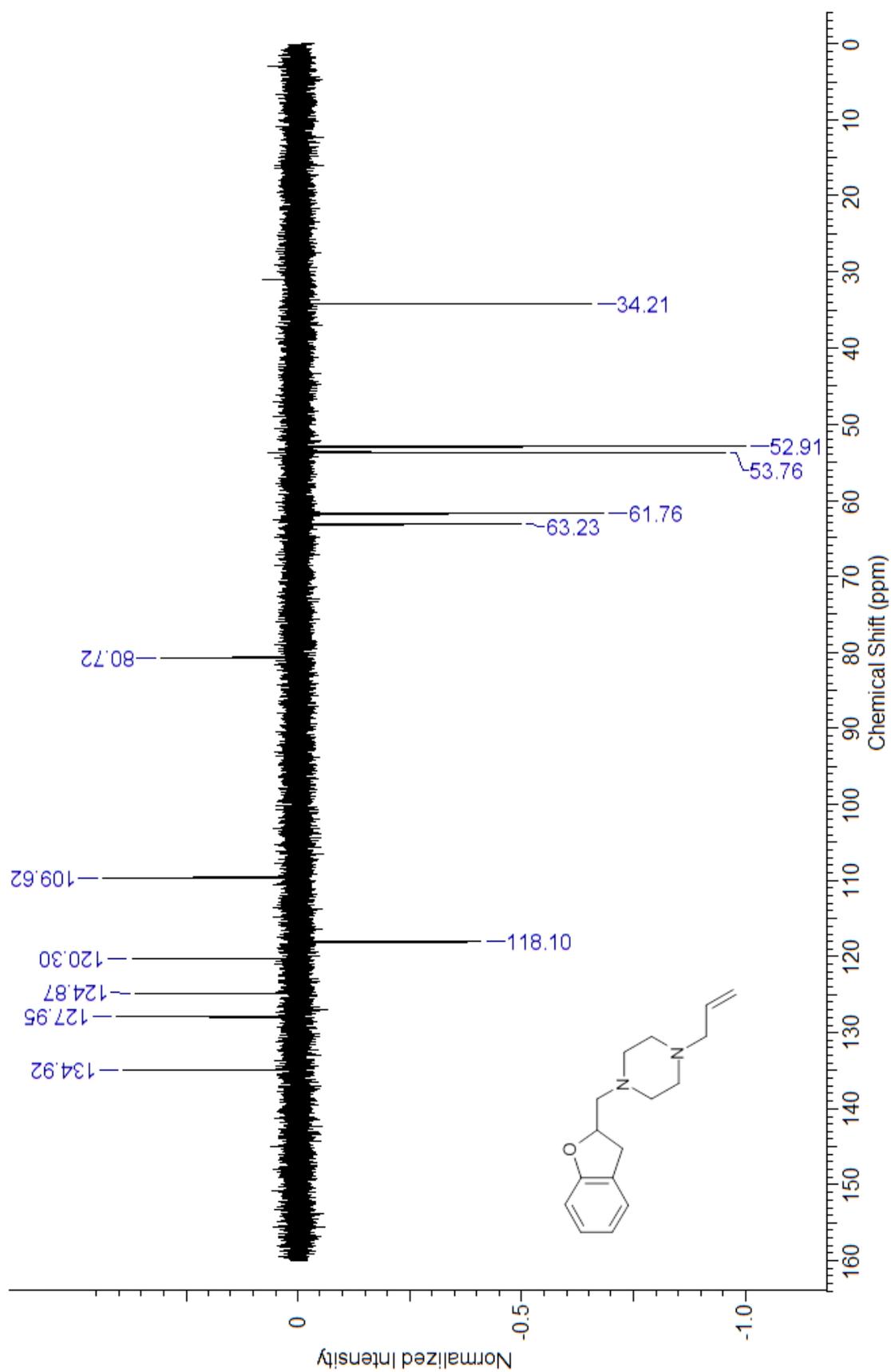
Apêndice 9 - Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  da 1-aliipiperazina (**20**)

Apêndice 10 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR da 1-aliilpiperazina (20)

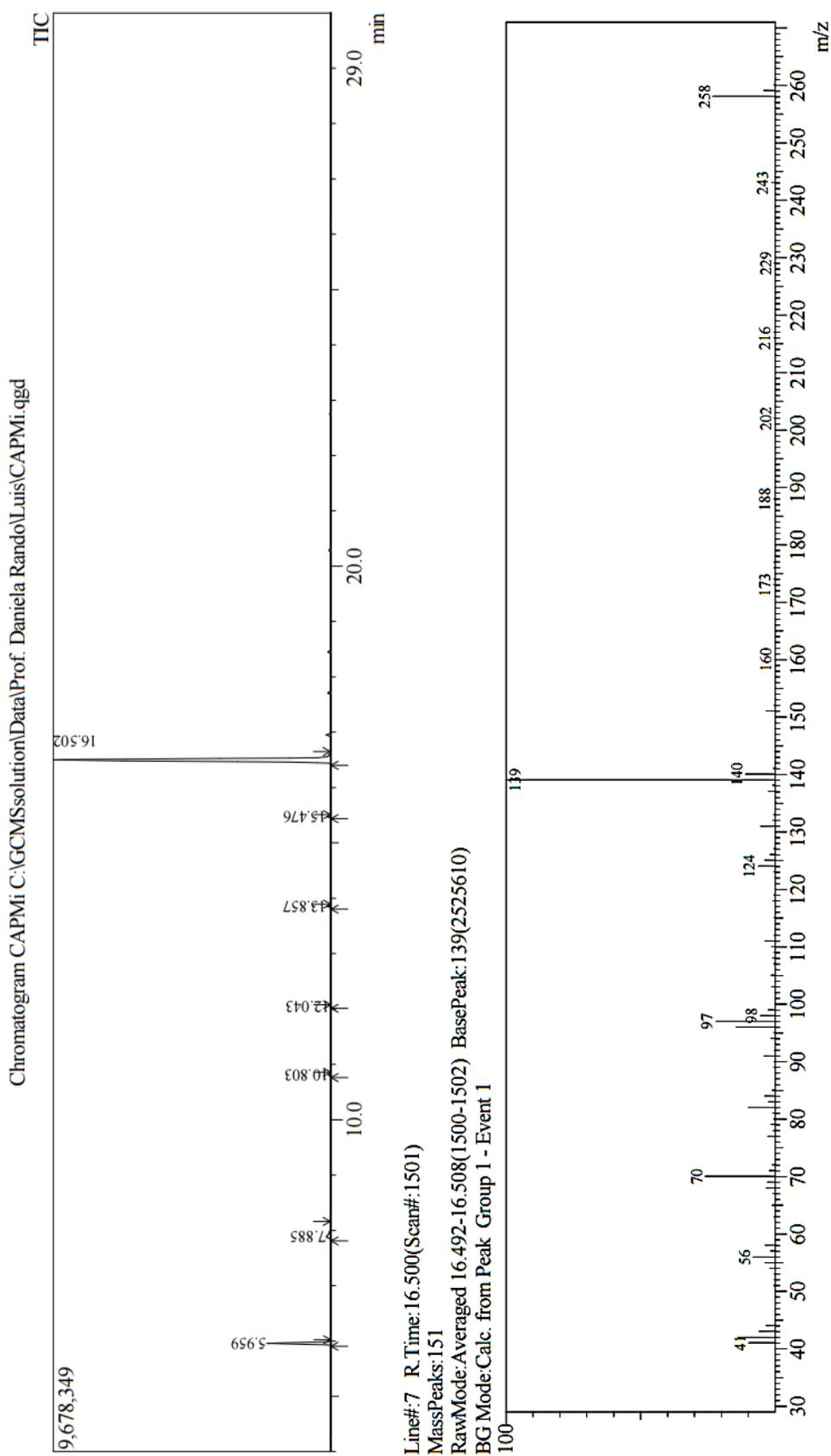


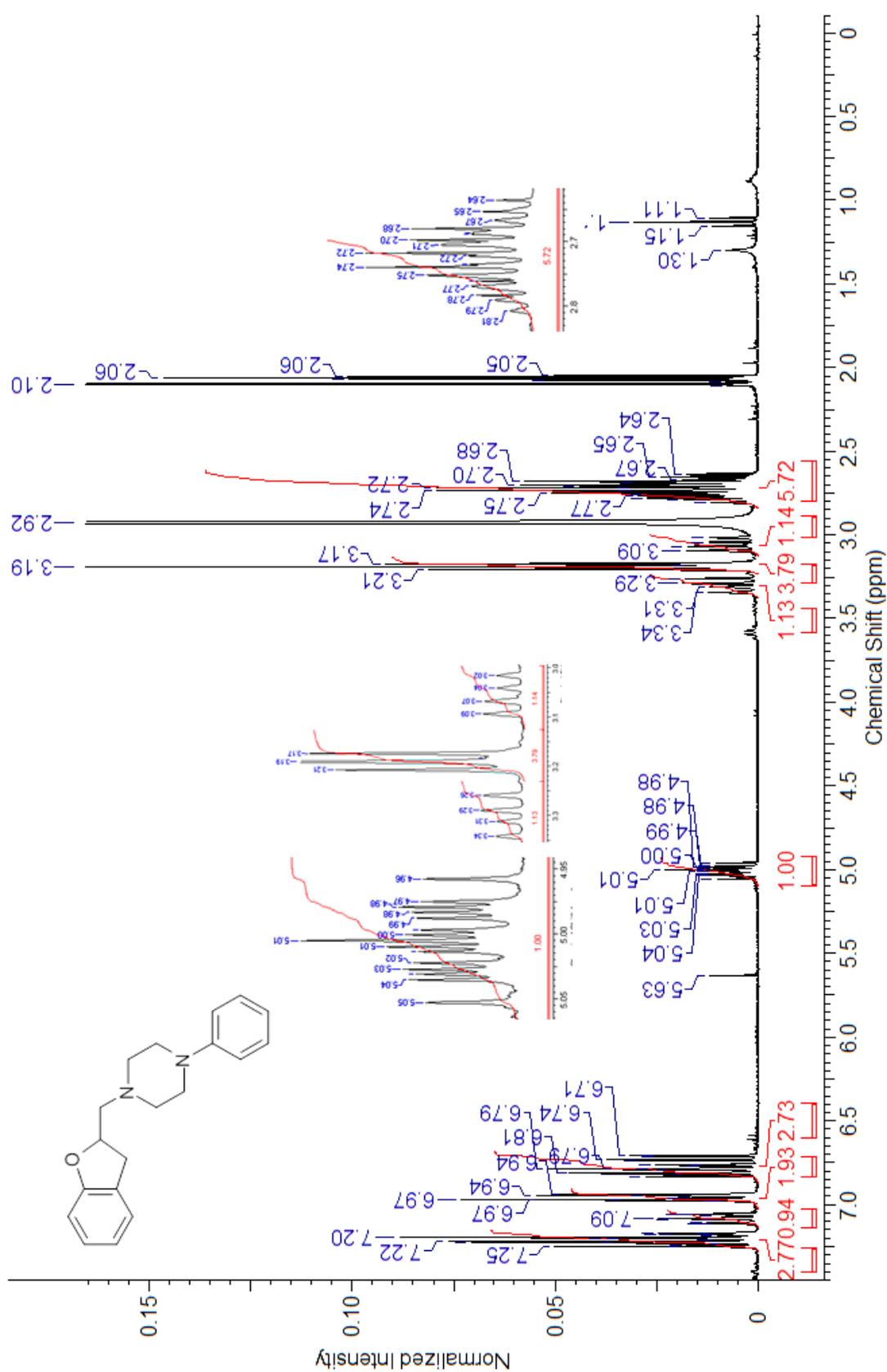
Apêndice 12 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR do LINS01004

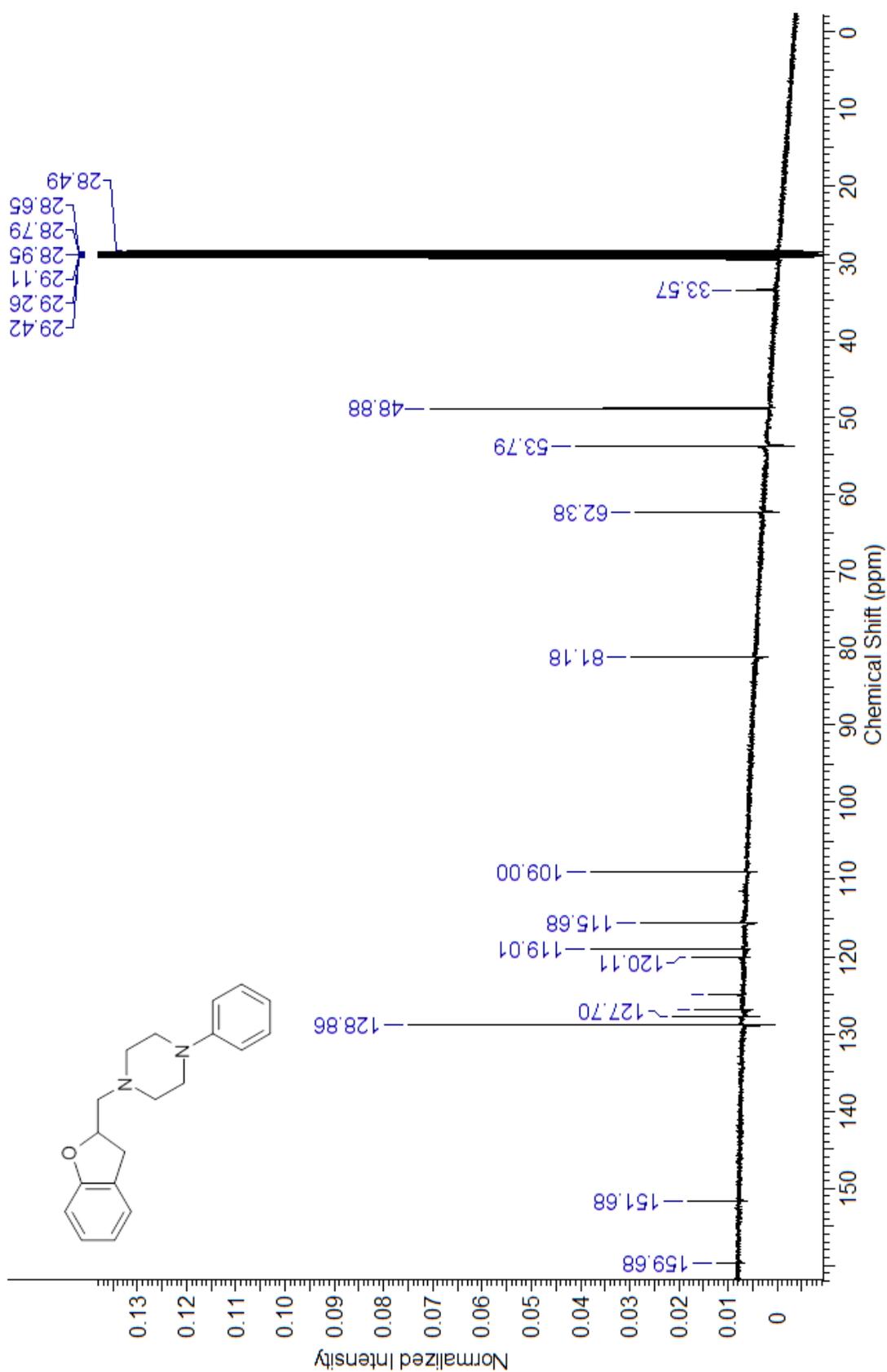
## Apêndice 12.1 – DEPT 135° do LINS01004



## Apêndice 13 – Cromatograma e espectro de massas do LINS01004



Apêndice 14 - Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  do LINS01005

Apêndice 15 - Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR do LINS01005

**Apêndice 16 – Espectro de massas de alta resolução do LINS01005**

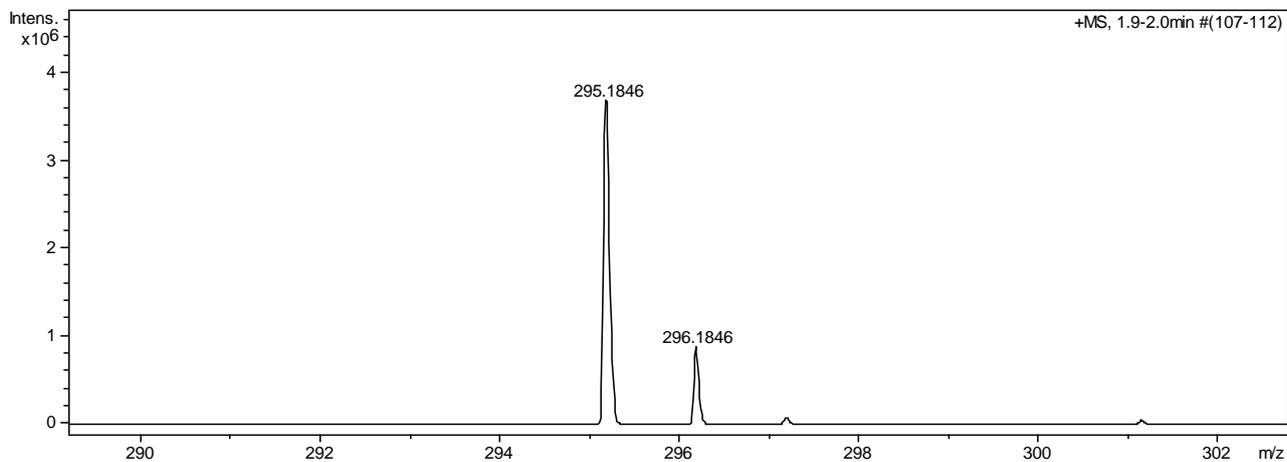
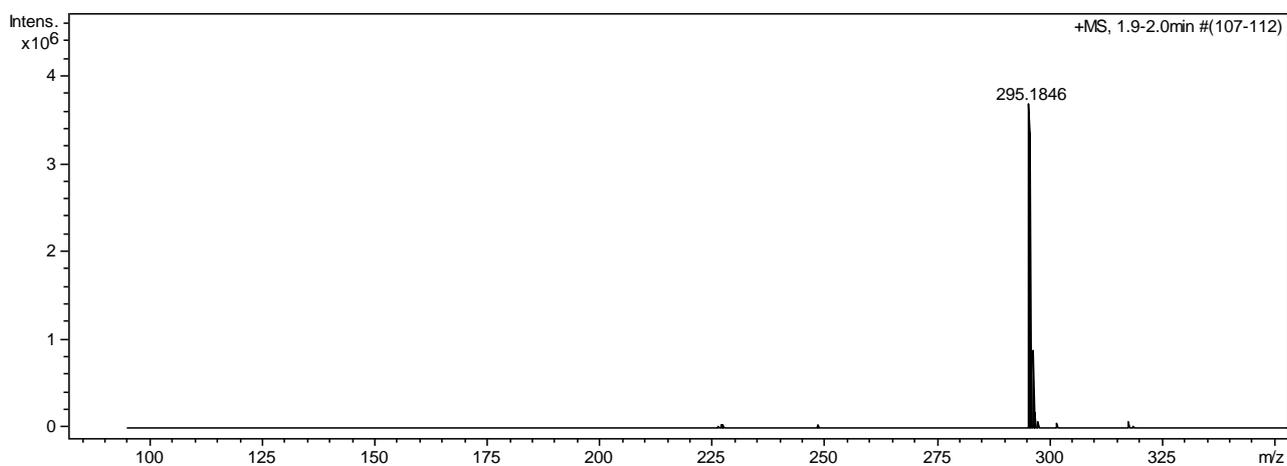
Equipamento: MICROTOF – Bruker Daltonics

Nebulizer: 0.8 Bar

Dry gas: 5 l/min

Temp: 200 °C

HV: 4500 V

**Solicitação: 01474****Amostra: CFP ativ****ESI + amostra dissolvida em MEOH e diluída em MeOH - 0.1% Acido fórmico**

## Apêndice 17 – Cromatograma e espectro de massas do LINS01005

