



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE DE DERIVADOS CARBAZÓLICOS E  $\beta$ -CARBOLÍNICOS  
E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO***

**ANDREIA MONTOIA**

**Manaus, 04 de outubro de 2017**

**ANDREIA MONTOIA**

**SÍNTESE DE DERIVADOS CARBAZÓLICOS E  $\beta$ -CARBOLÍNICOS E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO***

Tese apresentada á Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração Química Orgânica e Síntese de Biomoléculas.

**Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit**

**Manaus**

**2017**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M798s Montoia, Andreia  
Síntese de derivados carbazólicos e beta-carbolínicos e avaliação da atividade antimalárica in vitro / Andreia Montoia. 2017  
208 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. malária. 2. carbazol. 3. beta-carbolínico. 4. Plasmodium falciparum. 5. Pictet-Spengler. I. Pohlit, Adrian Martin II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**SÍNTESE DE DERIVADOS CARBAZÓLICOS E  $\beta$ -CARBOLÍNICOS E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO***

**ANDREIA MONTOIA**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química.

Aprovado, em 04 de outubro de 2017.

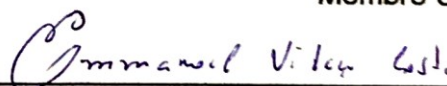
**COMISSÃO EXAMINADORA**



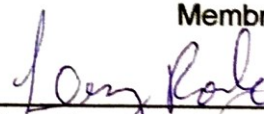
Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit  
Universidade Federal do Amazonas  
Orientador



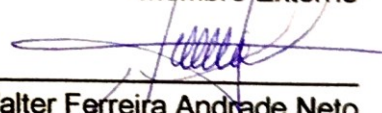
Prof. Dr. Joel Aparecido Passo  
Membro UFAM



Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa  
Membro UFAM



Prof. Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva  
Membro Externo



Prof. Dr. Valter Ferreira Andrade Neto  
Membro Externo

*Dedico aos meus pais, Sebastião Montoia Sanches e Diair da Luz Montoia, que mesmo com todas as limitações e dificuldades estiveram ao meu lado apoiando e torcendo por mim em cada momento nesta longa jornada, ao meu marido José Antonio de Melo Salvador que sempre me acalentou com palavras de carinho e confiança mesmo nas situações mais difíceis, e aos amigos e mestres que tive o prazer de conhecer e conviver ao longo destes anos.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar força e fé nos momentos mais difíceis.

Ao professor Dr. Adrian Martin Pohlit, pela amizade, orientação que tanto influenciaram em minha formação acadêmica.

Aos meus professores e mestre que me condiziram nets longa jornada.

Ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas- UFAM, ao qual fiz parte como discente.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amozônia-INPA, local no qual executei maior parte deste trabalho.

A todos os integrantes da Cental Analítica e Temática de Química e Produtos Naturais (CALTQPN), Dra. Zelina E. Torres, Dra. Sabrina Kelly Morais, em especial meu grande amigo Mestre em Ciências Magno Perêa, por todas as análises realizadas com máxima competência e amizade.

A Dr. Zelina E. Torres por todo o apoio técnico necessário para o bom funcionamento do nosso grupo de pesquisa.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Andrey Grafov e Prof<sup>a</sup>. Dra. Iryna Grafova, da Universidade de Helsinki, em parceria com o projeto Vaikutus - INPA/Brasil-Universidade de Helsinki/Finlândia, pelo apoio acadêmico e amigo durante estadia em seu laboratório.

Às alunas Mestre em Ciências Hilkem Alves, Jakeline Siqueira, Marcia Alves de Souza, Jaqueline Siqueira e IC-CNPQ Suellen Monteiro, sob a coordenação do Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva, pelas análises *in vitro* realizadas.

Ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima, Profa. Dr. Marne C. Vasconcelos (BIOPHAR/UFAM) e colaboradores pelas análises e testes citotóxicos realizados.

Aos meus amigos de laboratórios que estiveram comigo em todas as fases deste trabalho mestrando e doutorando: Rita Cynara Sales, Tiago Barbosa, Edizon Viega, Abraão Alexandre, Yara Lins, Paula Suellen, Berna Almeida , Diana Sangama, Lais, Bruna Oliveira, Renan Feitosa, Marlene Camargo.

A meus pais e familiares que sempre me apoiaram mesmo com toda a distância que nos separa (mais de 4.000 Km).

Ao meu marido José Antonio de Melo Salvador, meu amigo e companheiro de vida.

Aos órgãos de fomento CNPq e Fapeam.

A Capes da qual fui bolsista durante o doutorado.

*O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.*

*Isaac Newton*

*"Todas as vitórias ocultam uma abdicação."*

**Simone de Beauvoir**

## RESUMO

O constante aumento no número de casos de resistências aos medicamentos atuais utilizados no tratamento da malária tem incentivado estudos sobre a descoberta de novas drogas potencialmente ativas. Trabalhos anteriores realizados pelo LAPAAM/INPA revelaram a atividade antimalárica *in vitro* e também *in vivo* de alcaloides indólicos, tais como elipticina, olivacina e derivados. O grande desafio tem sido encontrar outras estruturas indólicas, de mais fácil obtenção e que apresente atividade antimalárica similar ou superior às encontradas nestas estruturas. Nessa busca, derivados tricíclicos com núcleo indólicos obtidos a partir esqueletos carbazólicos e  $\beta$ -carbolínicos foram sintetizados e avaliados frente a ensaios *in vitro*. No total foram sintetizados vinte e três derivados, dos quais dezoito foram avaliados em ensaios biológicos *in vitro* contra cepas K1 de *P. falciparum* e citotoxicidade em células não tumorais (MRC-5). Também foram submetidos aos ensaios, as cinco substâncias comerciais norhamano (**23**), harmina (**24**), harmano (**25**), harmalina (**27**) e carbazol (**29**). As principais reações utilizadas foram nitração, desmetilação, formação de sais através do borbulhamento de cloreto de hidrogênio, reação de condensação de Pictet-Splenger e alquilação, a qual formou o composto inédito na literatura 9-(2,3-diidroxi)-harmano (**25.1**). Entre os derivados submetidos aos ensaios antimaláricos, o 3-nitro-carbazol (**29.2**), *O*-acetil-harmol (**26.1**) e o sal de harmina.HCl (**24.4**) foram os mais ativos com  $CI_{50}$  8,87  $\mu$ M, 12,2  $\mu$ M e  $CI_{50}$  19,31  $\mu$ M, respectivamente. O 8-nitroharmano (**25.2**) e o 9-(2,3-diidropil)-harmano (**25.1**) tiveram sua atividade potencializada com valores de  $IC_{50}$  inferiores ao harmano. E entre as substâncias comerciais, as mais ativas foram a harmalina com  $CI_{50}$  14,7  $\mu$ M e o norharmano com  $CI_{50}$  17,67  $\mu$ M. De maneira geral todas as estruturas estudadas neste trabalho apresentaram baixa toxicidade em células normais com viabilidade maior que 50 %, na concentração de 50  $\mu$ g/mL, com exceção do 6-nitro-harmano (**25.3**) e do *O*-acetil-harmol, cujas viabilidades foram inferiores a 25%.

**Palavras-chave:** malária, carbazol, alcaloides  $\beta$ -carbolínicos, *Plasmodium falciparum*, ciclização Pictet-Spengler.



## ABSTRACT

The steady increase in the number of current drug resistance cases used without malaria treatment has encouraged studies on a discovery of potentially active new drugs. In previous work by LAPAAM / INPA has revealed the *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of indole alkaloids, such as elipticine, olivacin and derivatives. The great challenge has been found other indolic structures, which are easier to obtain and which present similar or superior antimalarial activity as found in these structures. In this search, nucleic acid tricyclic derivatives obtained from carbazolic and  $\beta$ -carbolinic skeletons were synthesized and attributes against *in vitro* assays. In total, twenty-three derivatives were synthesized, of which eighteen were evaluated *in vitro* biological assays against K1 *P. falciparum* strains and cytotoxicity in non-tumor cells (MRC-5). In addition were submitted to the tests five commercial substances harmine (**24**), harmane (**25**), harmaline (**27**) and carbazole (**29**). As the main reactions for the nitration, demethylation, formation of salts through hydrogen chloride bubbling, condensation reaction of Pictet-Splenger and alkylation, a quality formed by the unpublished compound in the 9-(2,3-dihydroxy)-harmano (**25.1**). Among the derivatives submitted antimalarial assays, 3-nitrocarbazole (**29.4**), *O*-acetyl-harmol (**26.1**) and the harmine salt HCl (**24.4**) were the most active with  $IC_{50}$  8,87  $\mu$ M, 12,2  $\mu$ M and  $IC_{50}$  19,31  $\mu$ M, respectively. The 8-nitroharmano (**25.2**) and the 9-(2,3-dihydropropyl)-harmane (**25.1**) had their activity potentiated with  $IC_{50}$  values lower than the harmane. And more active commercial substances harmaline with  $IC_{50}$  14,7  $\mu$ M and the norharman with  $IC_{50}$  17.67  $\mu$ M. According to the factory, there is no concentration of 50  $\mu$ g / mL, except for 6-nitro-harmano (**25.3**) and *O*-acetyl-harmol, whose lower viability is less than 25%.

**Keyword:** malaria,  $\beta$ -carboline alkalids, carbazole, *P. falciparum*, Pictet-Spengler cyclization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de espécies de <i>Plasmodium</i> .....	25
Figura 2. Estruturas da quinina (1) e derivados cloroquina (2) e primaquina (3) .....	26
Figura 3. Estutura da artemisinina (4) e dos derivados artesunato de sódio (5) e artemeter (6) .....	27
Figura 4. Países com resistência à artemisinina confirmada ou com suspeita, desde 2012 .....	30
Figura 5. Síntese da melatonina a partir do triptofano .....	32
Figura 6. Estrutura do 3-carboxi-indol (IAA) .....	34
Figura 7. Esqueletos de alcaloides indólicos derivados do aminoácido triptofano .....	35
Figura 8. Estruturas dos alcaloides $\beta$ -carbolínicos: norharmano (23), harmina (24), harmano (25), harmol (26), harmalina (27) e 1,2,3,4-tetrahidroharmalina (28).....	36
Figura 9. Estrutura do carbazol (29).....	37
Figura 10. Reação de Bischler-Napieralski para obtenção de sistemas 3,4-diidroisoquinolínicos .....	48
Figura 11. Reação de Bischler-Napieralski para obtenção de sistemas $\beta$ -carbolínicos ....	48
Figura 12. Formação do sal do nitrílio (intermediários da reação), segundo estudo mecanístico de Fodor e Nagubandi (1980).....	49
Figura 13. Reação de Pictet-Splenger para síntese de 1,2,3,4-tetraisoquinolinas .....	49
Figura 14. Reação de Pictet-Splenger para síntese de esqueletos $\beta$ -carbolínicos .....	49
Figura 15. Proposta mecanística de condensação de Pictet-Splenger .....	50
Figura 16. Esquema geral para síntese do carbazol via reação de Graebe-Ullmann.....	51
Figura 17. Esquema geral para a síntese do carbazol via ciclização de Borsche-Drechsel .....	51
Figura 18. Esquema geral para síntese de diarilaminas por método de Buchwald-Hartwig .....	52
Figura 19. Estruturas de ressonância do núcleo $\beta$ -carbolínico .....	53
Figura 20. Estruturas de ressonância do esqueleto carbazólico.....	53
Figura 21. Procedimento para obtenção do produto 1,8-dibromo-carbazol .....	54
Figura 22. Condições reacionais para a obtenção do 9-(2,3-epoxipropil)-carbazol (29.1) a partir do carbazol (29) .....	58

Figura 23. Condições reacionais para a obtenção do 9-(2,3-diidroxipropil)-harmano (25.1) a partir do harmano (25) .....	59
Figura 24. Condições reacionais de nitração da harmina e formação de 6,8-dinitroharmina (24.1), o 8-nitro-harmina (24.2) e 6-nitroharmina (24.3) .....	60
Figura 25. Condições reacionais para obtenção dos derivados nitrados do harmano, o 8-nitro-harmano (25.1) e o 6-nitroharmano (25.2) .....	61
Figura 26. Condições reacionais para obtenção dos derivados nitrados a partir da harmalina .....	61
Figura 27. Condições reacionais para nitração do norharmano: 8-nitronorharmano (23.1) e um isômero nitrado (23.2) .....	62
Figura 28. Condições reacionais para obtenção dos nitro-carbazóis e dinitro-carbazóis a partir do carbazol .....	63
Figura 29. Condições reacionais para redução dos grupos nitros .....	63
Figura 30. Sistema de borbulhamento para obtenção de HCl gasoso .....	64
Figura 31. Condições reacionais para obtenção do harmol (26) a partir da harmina .....	65
Figura 32. Condições reacionais para obtenção do harmalol (27.3) a partir da harmalina .....	65
Figura 33. Condições reacionais para obtenção do <i>N</i> -acetil-carbazol (29.6) a partir do carbazol .....	65
Figura 34. Condições reacionais para obtenção do <i>O</i> -acetil-harmol (26.1) a partir do harmol .....	66
Figura 35. Condições reacionais para obtenção do produto acetilado do harmalol (27.4) .....	66
Figura 36. Condições reacionais .....	68
Figura 37. Esquema reacional da epoxidação do carbazol (29) e formação do produto <i>N</i> -epoxi (29.1) .....	73
Figura 38. Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , da região entre δ 4,39 e 4,90 do produto 29.1 .....	73
Figura 39. Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , da região entre δ 2,57 e 2,80 do produto 29.1 .....	74
Figura 40. Ampliação do espectro RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , região δ 3,30 a 3,40 do produto 29.1 .....	74
Figura 41. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (75 MHz) em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> do 9-(2,3-epoxipropil)-carbazol (29.1)	75

Figura 42. Espectro de massas do produto 9-(2,3-dihidroxi-propil)-harmano e provável estrutura .....	76
Figura 43. Reação de formação do 9-(2,3-diidroxi-propil)-harmano (25.1) a partir do harmano (25).....	76
Figura 44. Ampliação da região aromática do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) em metanol- $d_4$ do produto 25.1 .....	77
Figura 45. Ampliação da região aromática do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) em metanol- $d_4$ do produto 25.1 .....	77
Figura 46. Ampliação da região alifática do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) em metanol- $d_4$ do produto 25.1 .....	78
Figura 47. Espectro de DEPT 135 do produto 25.1 .....	78
Figura 48. Ampliações do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ e HSQC do produto 9-(2,3-dihidroxi-propil)-harmano .....	79
Figura 49. Proposta mecanística para a formação do produto 9-(2,3-epoxipropil)-carbazol .....	81
Figura 50. Proposta mecanística para a formação do produto 9-(2,3-dihidroxi-propil)-harmano .....	81
Figura 51. Proposta para os híbridos de ressonância de sistemas indólicos.....	82
Figura 52. Reação de formação dos produtos nitrados derivados da harmina (24) e rendimentos .....	84
Figura 53. Cromatogramas UFLC/HRMS-ESI dos produtos nitrados 24.1, 24.2 e 24.3 ..	85
Figura 54. Ampliações das regiões $\delta$ 4,6 a 2,7 e da região aromática $\delta$ 9,2 e 8.3 do produto 6,8-dinitroharmina (24.1) em acetona- $d_6$ .....	86
Figura 55. Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz) em acetona- $d_6$ , da região aromática do produto 8-nitroharmina (24.2) .....	87
Figura 56. Correlações de HMBC do produto 8-nitroharmina.....	87
Figura 57. Espectro de HMBC do produto 24.2 (8-nitroharmina), ampliações da região aromática e alifática.....	88
Figura 58. Ampliações do espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz) em acetona- $d_6$ , do produto 6-nitro-harmina (24.3).....	89
Figura 59. Ampliação do espectro de HMBC da região aromática e correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$	90
Figura 60. Correlações de HMBC do produto 6-nitroharmina.....	90

Figura 61. Cromatograma UFLC/MS-ESI da mistura pós-reacional da nitração do harmano, após 48 h.....	94
Figura 62. Cromatogramas de UFLC/HRMS-ESI dos produtos 25.2 e 25.3 .....	94
Figura 63. Esquema do procedimento de nitração do harmano (25) e formação dos produtos 25.2 e 25.3 .....	95
Figura 64. Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , da região aromática δ 8,7- 7,5 do produto 25.2.....	96
Figura 65. Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , da região aromática do produto 25.3 .....	96
Figura 66. Cromatograma de UFLC/HRMS- ESI da mistura pós-reacional da nitração da harmalina .....	98
Figura 67. Produtos esperados para nitração da harmalina .....	98
Figura 68. Prováveis estruturas para reação da harmalina .....	99
Figura 69. Cromatogramas UFLC/HRMS-ESI dos produtos 23.1 e 23.2.....	99
Figura 70. Esquema do procedimento de nitração do norharmano (23) e formação dos produtos 23.1 e 23.2 .....	100
Figura 71. Ampliação da região aromática do espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz) em CD <sub>3</sub> OD:CDCl <sub>3</sub> (1:1) e o produto 8-nitro-norharmano (23.1).....	101
Figura 72. Ampliação da região aromática do espectro de RMN bidimensional de HMBC do produto 8-nitronorharmano.....	102
Figura 73. Correlações de HMBC do produto 8-nitronorharmano .....	102
Figura 74. Esquema de isolamento cromatográfico dos derivados nitrados do carbazol	104
Figura 75. Produtos obtidos a partir da nitração do carbazol e seus rendimentos.....	104
Figura 76. Ampliação da região aromática do espectro de hidrogênio (330 MHz) em DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> produto 1,6-dinitrocarbazol (29.2).....	105
Figura 77. Espectro de HMBC do produto 1,6-dinitrocarbazol (29.2).....	106
Figura 78. Correlações de HMBC da região aromática do produto 1,6-dinitrocarbazol (29.2). .....	106
Figura 79. Ampliações do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz) em acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> do produto (29.3) .....	107
Figura 80. Correlações e espectro de RMN bidimensional de HSQC do produto 1-nitrocarbazol (29.3) .....	108

Figura 81. Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ do produto 3-nitrocarbazol (29.4) .....	109
Figura 82. Correlações $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ e espectro de RMN bidimensional de HMBC do produto 3-nitrocarbazol (29.4) .....	110
Figura 83. Algumas correlações de HMBC do produto 3-nitrocarbazol (29.4).....	110
Figura 84. Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 MHz) em $\text{DMSO-}d_6$ do produto 1,8-dinitrocarbazol (13.5) .....	111
Figura 85. Proposta mecanística para reação de nitração do carbazol .....	114
Figura 86. Proposta mecanística para reação de nitração da harmina .....	115
Figura 87. Possíveis estruturas dos produtos da redução do 8-nitro e 6-nitro-harmano ...	116
Figura 88. Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI da mistura reacional de redução dos nitro-harmano a amino-harmano .....	116
Figura 89. Produtos obtidos a partir da <i>O</i> -desmetilação da harmina.....	117
Figura 90. Cromatograma e espectro de massas de alta resolução (UFLC/HRMS-ESI) do harmol (26) .....	117
Figura 91. Produtos obtidos a partir da <i>O</i> -desmetilação da harmalina (ii).....	117
Figura 92. Cromatograma e espectro de massas de alta resolução (UFLC/HRMS-ESI) do harmalol (27.3) .....	118
Figura 93. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ em metanol- $d_4$ do harmol (26) e ampliação da região entre $\delta$ 4,3- 2,7 do padrão harmina. (24) .....	118
Figura 94. Ampliação da região aromática do harmol (26).....	119
Figura 95. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ em metanol- $d_4$ do produto harmol (26).....	119
Figura 96. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) em metanol- $d_4$ do harmalol (27.3).....	121
Figura 97. Ampliação de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) da região de carbonos alifáticos em metanol- $d_4$ do harmalol (27.3) .....	121
Figura 98. Ampliação de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz) da região de carbonos aromáticos em metanol- $d_4$ do harmalol (27.3) .....	122
Figura 99. Proposta mecanística para <i>O</i> -desmetilação .....	123
Figura 100. Produto obtido a partir da acetilação do carbazol e o rendimento .....	123
Figura 101. Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI do produto (29.6).....	124
Figura 102. Ampliação da região aromática do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) em metanol- $d_4$ , do produto <i>N</i> -acetil-carbazol (29.6).....	124

Figura 103. Ampliação da região aromática do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) em metanol- $d_4$ , do produto <i>N</i> -acetil-carbazol (29.6).....	125
Figura 104. Provável produto obtido a partir da acetilação do harmol (26).....	126
Figura 105. Cromatograma e espectro de massas UFLC/HRMS-ESI do <i>O</i> -acetil-harmol .....	126
Figura 106. Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI da amostra HL-1-Ac e espectro de massas do pico $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z$ 261,1226 e $t_r = 4,2$ min .....	127
Figura 107. Esquema com os produtos obtidos na ciclização de Pictet-Spengler.....	128
Figura 108. Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI da mistura reacional do produto formado a partir do triptofano .....	128
Figura 109. Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI do produto (7.1 ou 7.2).....	129
Figura 110. Esquema para obtenção do produto 1- <i>p</i> -nitrofenil- harmano (7.3).....	129
Figura 111. Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI do produto (7.3).....	130
Figura 112. Ampliação do RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) em acetona- $d_6$ do produto 1- <i>p</i> -nitrofenil- harmano .....	130
Figura 113. Ampliação dos espectros de HSQC e HMBC em acetona- $d_6$ do produto 1- <i>p</i> -nitrofenil- harmano .....	131
Figura 114. Mecanismo de Pictet-Splenger.....	132

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medicamentos utilizados no Brasil, de acordo com as normas do Ministério da Saúde.....	31
Tabela 2. Dados químicos e estrutura dos materiais de partida utilizados no trabalho.....	57
Tabela 3. Derivados sintéticos identificados e caracterizados por RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ e UFLC/HRMS-ESI e testados contra <i>P. falciparum</i> .....	71
Tabela 4. Comparação dos dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do padrão carbazol (29) com o produto 9-(2, 3-epoxipropil-carbazol) (29.1).....	75
Tabela 5. Correlações observadas do espectro de HSQC do produto 9.1.....	79
Tabela 6. Comparação entre dos dados de RMN $^1\text{H}$ do padrão harmano (25) e o 9-(2,3-epoxipropil)-harmano (25.1).....	80
Tabela 7. Resultados obtidos em cada procedimento adotado.....	83
Tabela 8. Dados de RMN $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ dos produtos 6,8-dinitroharmina (24.1), 8-nitroharmina (24.2) e 6-nitroharmina (24.3) e dados da literatura.....	91
Tabela 9. Produtos formados através da nitração da harmina e seus rendimentos.....	93
Tabela 10. Dados de RMN $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ dos produtos 8-nitroharmano (25.2) e 6-nitroharmano (25.3).....	97
Tabela 11. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do produto 8-nitronorhamano (23.1) e a literatura.....	103
Tabela 12. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ dos quatro produtos nitrados do carbazol e dados da literatura.....	112
Tabela 13. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do padrão harmina (24) e do derivado harmol (26).....	120
Tabela 14. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do padrão harmalina (27) e do derivado harmalol (27.3).....	122
Tabela 15. Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ do carbazol (29) e do derivado <i>N</i> -acetil-carbazol (29.6).....	125
Tabela 16. Correlações de HSQC e HMBC do produto 7.3.....	131
Tabela 17. Ensaios <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> (K1), viabilidade em células não tumorais e índice de seletividade.....	135



**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Derivados do triptofano derivados sintéticos da melatonina.....	33
Quadro 2. Derivados do carbazol utilizados na prática clínica de acordo com o banco de dados DRUGSBANK.....	38
Quadro 3. Estruturas esqueleto benzo- $\delta$ -carbolínico e pirido-carbazólicos com atividade antimalarial.....	40
Quadro 4. Estruturas com esqueleto $\beta$ -carbolínico e atividade antimalarial.....	43
Quadro 5. Estruturas com esqueleto $\beta$ -carbolínico e atividade antimalarial.....	46

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOH	Ácido acético
AcOEt	Acetato de etila
BPC	Cromatoma do pico base
AC <sub>2</sub> O	Anidrido acético
c.a	Cerca de
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CC	Cromatografia de Coluna
CCDP	Cromatografia de Camada Delgada Preparativa
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória mediana
DCM	Diclorometano
CDOD	Metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
DE	Dose efetiva
DEPT	<i>Distortioless anhadement by polarization transfer</i>
D <sub>2</sub> O	Água deuterada
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>dt</i>	Duplo tripleto
<i>ESI</i>	Ionização por Eletrospray (Electrospray Ionization)
Et	etila
EtOH	Etanol
g	grama
h	hora
MHz	Megahertz
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IP	Intraperitoneal
IPA	Índice de Parasitemia Anual
IS	Índice de seletividade
<i>J</i>	Constante de acoplamento
K1	Cepa de <i>P. falciparum</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
L6	Mioblastos de ratos (linhagem celular)
<i>m</i>	Multiplicidade (RMN)
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
mg	Miligramas
Me	metila
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MeOH	Metanol
MS	Ministério da Saúde
MRC-5	Fibroblastos humanos (linhagem celular)

NT	Não testado
ppm	Parte por milhão
R <sub>F</sub>	Fator de Retenção
r.t	<i>Room temperature</i>
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
RMN de e de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
t.a	Temperatura ambiente
TMS	tetrametilsilano
sb	subcutâneo
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
SIVEP	Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica
SVS	Sistema de Vigilância da Saúde
<i>t</i>	triplete
TCA	Terapias Combinadas de Artemisinina
THP1	Monócitos humano (linhagem celular)
TOF	<i>Time of flight</i>
UFLC	<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>
vo	Via oral
W2	Cepa cloroquina-resistente
WHO	<i>World Health Organization</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
µg	microgramas
µM	Micromolar
nM	Nanomolar
δ	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

Introdução.....	23
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	24
1.1 Malária.....	24
1.2 Antimaláricos.....	26
1.3 Breve histórico de casos de Resistências aos antimaláricos e drogas utilizadas até os dias atuais.....	28
1.4 Derivados do triptofano.....	31
1.4.1 Alcaloides.....	34
1.4.2 Alcaloides $\beta$ -carbolínicos .....	35
1.4.3 Carbazol e análogos .....	37
1.4.4 Alcaloides indólicos e atividade antimalárica.....	38
1.5 Algumas rotas sintéticas para obtenção de estruturas $\beta$ -carbolínicas e carbazólicas.....	48
1.5.1 Reação de Bischler-Napieralski .....	48
1.5.2 Reação de Pictet-Splenger .....	49
1.5.3 Reação de Graebe-Ullmann e a Ciclização de Borsche-Drechsel ....	51
1.6 Reações comuns a esqueletos carbazólicos e $\beta$ -carbolínicos.....	52
2 OBJETIVOS.....	55
2.1 OBJETIVO GERAL.....	55
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	56
4.1 Reações de <i>N</i> -Alquilação.....	58
4.1.1 <i>N</i> -alquilação do Carbazol.....	58
4.1.2 <i>N</i> -alquilação do harmano .....	58
4.2 Reação de nitração.....	59
4.2.1 Nitração dos $\beta$ -carbolínicos .....	59
4.2.2 Nitração da harmina .....	60
4.2.3 Nitração do harmano .....	61

4.2.4	Nitração da harmalina .....	61
4.2.5	Nitração do norharmano.....	62
4.2.6	Nitração carbazol .....	62
4.2.7	Redução do 6-nitroharmano e 8-nitroharmano .....	63
4.3	Sais de HCl .....	64
4.3.1	Harmina.....	64
4.4	Reação de <i>O</i> -desmetilação.....	64
4.4.1	Harmina e harmalina .....	64
4.5	Reação de Acetilação.....	65
4.5.1	Acetilação do carbazol .....	65
4.5.2	Acetilação do harmol, harmalol .....	66
4.6	Condensação de Pictet-Splenger.....	67
4.7	Testes antimaláricos .....	68
4.7.1	Ensaio de viabilidade celular (citotóxico).....	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
5.1	REAÇÕES de SÍNTESE.....	72
5.1.1	Reação de <i>N</i> -alquilação.....	72
5.1.2	<i>N</i> -alquil-carbazol.....	72
5.1.3	<i>N</i> -alquil-harmano .....	76
5.1.4	Reação de nitração .....	82
5.1.5	Nitração dos $\beta$ -carbolínicos .....	83
5.1.6	Nitração da harmina .....	84
5.1.7	Nitração do harmano .....	94
5.1.8	Nitração da harmalina .....	98
5.1.9	Nitração do Norharmano.....	99
5.1.10	Nitração do Carbazol .....	103
5.1.11	1,6-dinitrocarbazol .....	105
5.1.12	1-nitrocarbazol .....	106
5.1.13	3-nitrocarbazol .....	108
5.1.14	Redução do 6-nitroharmano e 8-nitroharmano .....	115
5.2	Sais de harmina.....	116
5.3	<i>O</i> -desmetilação harmina e harmalina .....	117
5.4	Reação de Acetilação.....	123

5.4.1	Acetilação do carbazol .....	123
5.4.2	Acetilação do harmol .....	126
5.4.3	Acetilação do harmalol (HL1AC71):.....	127
5.5	Preparação de derivados $\beta$ -carbolínicos a partir do triptofano.....	128
5.6	Testes <i>in vitro</i> .....	132
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....		140
ATIVIDADE FUTURA .....		141
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....		141
ANEXOS .....		149

## INTRODUÇÃO

A malária é uma grave doença parasitária que atinge principalmente regiões de clima tropical e subtropical do globo terrestre, cerca de 3,2 bilhões de pessoas encontra-se em regiões de risco. As situações mais críticas se encontram na região africana, que em 2015 concentrou cerca de 90% dos casos mundiais e 92% das mortes (OMS, 2016a). Os mais vulneráveis à doença são crianças de até 5 anos de idade, além de gestantes e viajantes moradores de regiões livres de malária.

No Brasil, a região de risco localiza-se na Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) que totalizam cerca de 99% dos casos em todo o país. De acordo com o sistema de informação de vigilância epidemiológica (SIVEP-Malaria), em 2017 foram registrados aproximadamente 142 mil casos positivos, indicando um aumento de 10% em relação em 2016. Os estados que contribuíram majoritariamente para esse aumento foram os do Amazonas e do Pará (BRASIL, 2017a).

A doença é transmitida pela picada de mosquitos (*Anopheles*) fêmea infectada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Dentre as espécies de *Plasmodium* que infectam o homem, destacam-se o *P. falciparum* responsável pela maioria das mortes e o *P. vivax* responsável pelo maior número de casos. Nos últimos anos tem se observado uma significativa redução nesses números, no período de 2000 à 2015 houve queda de 41% do número de infecções e 62% da mortalidade, entre crianças e adultos em todo o mundo (OMS, 2016a). No entanto, mesmo com a diminuição geral de infecções e mortes, notícias recentes de casos de resistência do *P. falciparum* aos medicamentos atuais (TCAs -terapias combinadas à base da artemisinina), além de estudos que mostram que drogas como a cloroquina vem perdendo eficácia ao longo dos anos, tem gerado preocupação a comunidade médica e científica. De acordo com Alecrim e colaboradores (1999), os primeiros relatos de resistência do *P. vivax* a cloroquina surgiram em 1989, desde então o número de casos vem crescendo gradativamente em todas as regiões endêmicas. Analisando o histórico recente da doença é possível observar a rapidez com que os parasitos vêm adquirindo resistência aos medicamentos comumente utilizados. Estes fatos reforçam a necessidade de buscar por novas estruturas moleculares que possam ser utilizadas como protótipos para novos medicamentos.

A química de produtos naturais é com certeza uma ferramenta importante nesta busca, considerando que os principais princípios ativos antimaláricos conhecidos até os dias

atuais foram ou ainda são obtidos a partir de plantas. Uma das barreiras na utilização destas biomoléculas como medicamentos é a dificuldade de obtenção, neste contexto a química semissintética e principalmente, a sintética vem ganhando espaço. Seguindo esta tendência, esse trabalho tem como enfoque a obtenção de derivados sintéticos preparados a partir de estruturas  $\beta$ -carbolínicas e carbazólicas, e avaliação da atividade antimalárica *in vitro* contra cepas de *Plasmodium falciparum*.

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 MALÁRIA

A malária, também conhecida por paludismo, é uma doença infecciosa, cujos principais sintomas são ataques de febre, com temperaturas acima de 40 °C, seguidas de calafrios, tremores e intensas dores de cabeça, além de náuseas, delírios e dores gástricas. Os sintomas aparecem em sete dias ou mais após a picada do mosquito infectado (OMS, 2016a).

A doença tem como principal vetor de transmissão o mosquito do gênero *Anopheles*, especificamente a fêmea, que infecta o hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo. No Brasil o principal vetor é o *A. darlingi*. O agente etiológico é o *Plasmodium*, gênero o qual compreende mais de 100 espécies. No entanto apenas algumas infectam o homem, entre elas: a *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. ovale* e *P. cynomolgi*. A espécie *P. ovale* foi dividida em duas sub-espécies a *P. ovale wallikeri normal* e a *P. ovale curtisi* (SINGH *et al.*, 2004; MILLER *et al.*, 2015). A infecção humana por *P. cynomolgi* foi relatada pela primeira vez em 2014, antes disto era identificada somente em primatas (TA *et al.*, 2014). No Brasil as infecções ocorrem principalmente pelas espécies *P. vivax* e *P. falciparum*. A doença causada pelo *P. vivax* é responsável pelo maior número de caso e seus sintomas são considerados brandos, porém têm gerado preocupações ao sistema público de saúde, devido ao crescente número de relatos do aumento da gravidade clínica e de resistência dos protozoários aos antimaláricos atuais. Já a malária causada pelo *P. falciparum* é mais agressiva e seu principal sintoma é a destruição dos glóbulos vermelhos, provocando estados anêmicos e em alguns casos levando à morte.

A malária humana apresenta dois ciclos de reprodução, um sexuado que acontece no mosquito e outro assexuado que ocorre no hospedeiro vertebrado (Figura 1). No ciclo sexuado ocorre a diferenciação dos merozoítos em gametas micro e macrogametas, a partir daí inicia-se a reprodução sexuada ou esporogônica, que ocorre no estômago do inseto.

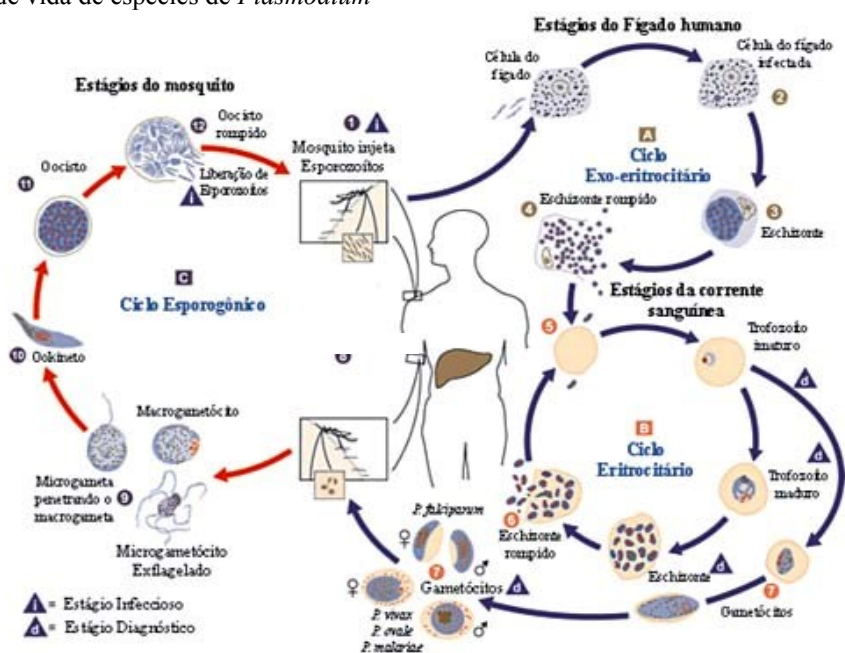


Através da fusão dos gametas ocorre à formação do oocineto, que adere a parede do intestino do inseto, gerando o oocisto, onde ocorrerá a formação dos esporozoítos. Este ciclo dura em média de 11 dias, dependendo da espécie do *Plasmodium*. Depois de formados, os esporozoítos migram até as glândulas salivares do mosquito e ficam prontos para serem transferidos para o hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo (BRASIL, 2005b).

O ciclo assexuado, também denominado ciclo esquizogônico, ocorre no hospedeiro vertebrado e se divide em duas fases: exoeritrocítica e eritrocítica. Através da picada do mosquito infetado ocorre a inoculação dos esporozoítos, que migram pela corrente sanguínea até atingirem os hepatócitos, dando início à fase exoeritrocítica ou pré-eritrocítica. Nesta etapa ocorre a formação dos esquizontes hepáticos, que rompem os hepatócitos e liberam os merozoítos na corrente sanguínea. O tempo de duração desta fase varia dependendo da espécie do *Plasmodium*. Após terem sido liberados, os merozoítos invadem as hemácias iniciando a segunda fase do ciclo, o chamado de ciclo eritrocítico ou sanguíneo.

No interior das hemácias o parasito se desenvolve num período que varia entre 48 e 72 h. Decorrido o tempo necessário para a maturação, ocorre a ruptura das hemácias e a liberação de mais merozoítos na corrente sanguínea. Esta fase do ciclo explica a periodicidade dos sintomas da malária nos pacientes infectados (FRANÇA *et al.*, 2008). Alguns merozoítos sofrem modificações se transformando nos gametócitos, os quais se tornam infectantes aos mosquitos, para que ocorra a perpetuação da espécie.

Figura 1. Ciclo de vida de espécies de *Plasmodium*



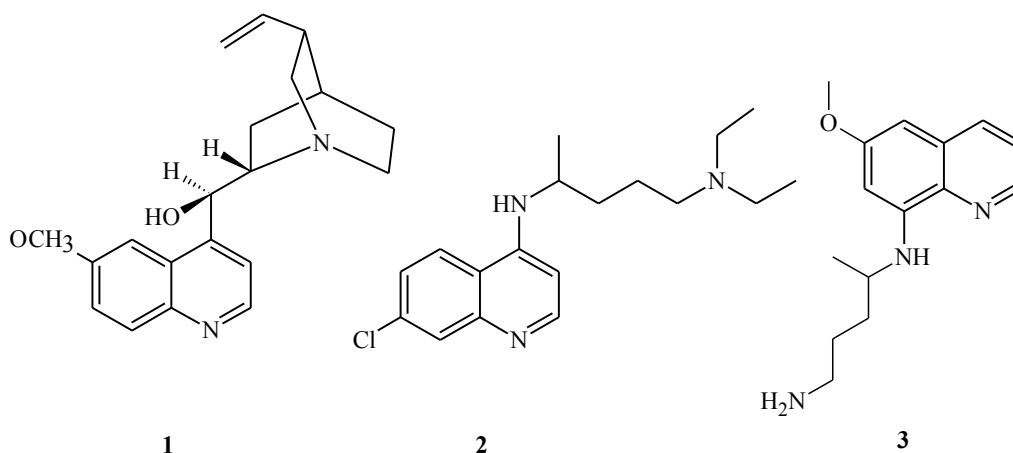
Adaptado de: Center for Disease Control and Prevention (CDC)

Devidos à alta complexidade do ciclo de vida dos parasitos, a obtenção de uma vacina ou de um único fármaco capaz de eliminar a malária muito difícil. Atualmente as drogas utilizadas na prática clínica atuam em estágios específicos no ciclo de vida do *Plasmodium*, como os fármacos eritrocíticos que combatem as formas eritrocitárias presentes no homem, os esporonticidas agem sobre os esporozoítos e os gametocíticos, que matam os gametas e impedindo o ciclo que ocorre no mosquito (FRANÇA *et al.*, 2008).

## 1.2 ANTIMALÁRICOS

A "cinchona" (*Cinchona spp*) é uma planta nativa da América do Sul, que foi levada ao continente europeu através de missionários jesuítas, por volta de 1640. A infusão de suas cascas foi utilizada durante anos no tratamento de doenças febris. Apenas em 1820, os químicos franceses Pierre Joseph Pelletier e Joseph Bienaime Caventou identificaram seu princípio ativo como sendo a quinina (1) (Figura 2). Um alcalóide quinolínicos (4-aminoquinolínicos), que durante muitos anos foi considerado a principal droga contra malária em todo o mundo. Por volta de 1944 foi obtida sua síntese completa, pelos químicos americanos Robert B. Woodward e William Von Eggers Doering. Apesar do êxito no procedimento, a produção em laboratório se tornou inviável devido à alta complexidade da molécula e aos custos associados. Atualmente sua obtenção ainda é através do isolamento fitoquímico (PEREIRA DA SILVA *et al.*, 2002; FRANÇA *et al.*, 2008; SÁ, 2011).

**Figura 2.** Estruturas da quinina (1) e derivados cloroquina (2) e primaquina (3)

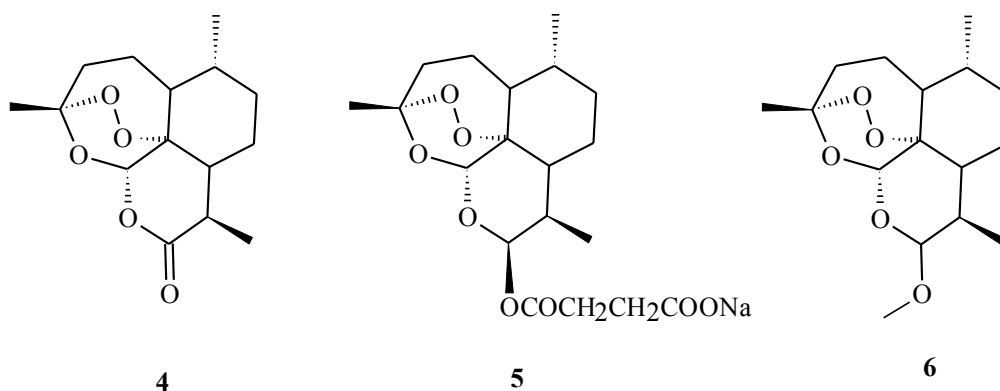


Baseados no esqueleto da quinina foram obtidos alguns derivados sintéticos, os quais tiveram papel no combate a doença. O mais famoso é a cloroquina (2), que surgiu em meados das décadas de 40, como uma promissora droga amplamente utilizada até os dias

atuais. No entanto seu uso tem sido gradativamente reduzido devido aos crescentes números de casos relatando o aparecimento de cepas de resistentes. Outro grupo de derivados sintéticos análogos a quinina são os 8-aminoquinolínicos, que tem como principal representante a primaquina (3), única droga utilizada nas formas exoeritrocitárias (hipnozoítos) em *P. vivax* e *P. ovale* (Figura 2). É muito utilizada na prática clínica principalmente combinado a derivados 4-aminoquinolínicos como cloroquina ou aos TCAs (terapias combinadas baseadas em artemisinina) (FRANÇA *et al.*, 2008).

A artemisinina (4) é uma lactona sesquiterpênica isolada pela primeira vez em meados da década de 70, a partir *Artemisia annua*, erva utilizada tradicionalmente na medicina chinesa para o tratamento de febre. A molécula apresenta em ligação endoperóxido em sua estrutura, que segundo estudos é crucial para sua atividade antimalárica (FRANCISCO e VARGAS, 2010). Devido a baixa solubilidade em pH fisiológico houve a necessidade da obtenção de derivados sintéticos da artemisina, os quais são a base dos TCAs, entre eles temos o artesunato de sódio (5) e artemeter (6) (Figura 3). Desde 2005, a Organização Mundial da Saúde passou a recomendar o uso das TCAs a todos os países nos quais, existam casos de resistência à cloroquina.

**Figura 3.** Estrutura da artemisinina (4) e dos derivados artesunato de sódio (5) e artemeter (6)



De maneira geral, esta combinação de derivados da artemisina e derivados aminoquinolínicos, têm sido clinicamente eficazes até o momento, porém, os casos de resistência em algumas regiões, geram preocupação do surgimento de novos surtos endêmicos. A busca por novas estruturas com atividade e novos alvos e mecanismos de ação se faz de grande importância.

Apesar de ainda não se saber ao certo, todos os mecanismo de ação das principais drogas antimaláricas, sabe-se que derivados aminoquinolínicos como a cloroquina, interferem na formação da hemozoína. Durante o ciclo intraeritrocitário o parasita necessita de uma grande quantidade de aminoácidos, para seu crescimento e maturação. Esses aminoácidos são obtidos a partir da digestão da hemoglobina do hospedeiro. A cloroquina e análogos podem se acumular no vacúolo digestivo do parasito formando complexos com os resíduos livres de Fe(III)Protoporfirina (tóxico ao parasita) formado após a quebra da hemoglobina. Essa complexação impede que a Fe(III)Protoporfirina, seja convertida em hemozoína, resíduo não tóxico ao parasita (SULLIVAN *et al.*, 1996), levando a morte do parasita.

### 1.3 BREVE HISTÓRICO DE CASOS DE RESISTÊNCIAS AOS ANTIMALÁRICOS E DROGAS UTILIZADAS ATÉ OS DIAS ATUAIS

Embora tenha se obtido bons avanços em pesquisas envolvendo o combate ao mosquito transmissor e desenvolvimento de vacinas, atualmente um dos principais e mais eficientes aliados na redução do número de casos ainda são os medicamentos antimaláricos. No entanto, o crescente aumento de casos de resistência a estes medicamentos tem deixado distante o sucesso da eliminação da doença em nível mundial (TAPAN KUMAR, 2015).

Simplificadamente, a resistência consiste na capacidade de determinadas cepas de parasitos em sobreviver e multiplica-se, mesmo com a utilização adequada dos medicamentos. Analisando o histórico dos antimaláricos observa-se que após a descoberta da quinina, foram necessários quase 300 anos para o surgimento dos primeiros casos de resistência. No entanto, depois do surgimento das drogas sintéticas esse intervalo reduziu drasticamente. A quinina foi substituída pela cloroquina no início dos anos 50, a substância foi considerada promissora principalmente por apresentar alta atividade e baixa toxicidade, diferente da quinina que apresentava efeitos colaterais, como distúrbios visuais, sudorese, vertigens, dor de cabeça, náuseas, vômitos, entre outros (SÁ, 2011). Na mesma época surgiu a primaquina, um derivado sintético 8-aminoquinolínico com forte atividade antimalárica.

Neste período, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aliada a estes avanços da indústria farmacêutica e desenvolvimento de inseticidas altamente eficazes, como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), lançou a "Campanha Global de Erradicação da Malária", a qual conseguiu a redução da doença em praticamente todas as regiões endêmicas do mundo. No Brasil houve a eliminação em quase todos os estados, com exceção algumas regiões serranas entre os estados do Paraná e de Santa Catarina, e as regiões da bacia amazônica (PEREIRA DA SILVA *et al.*, 2002). Entre as estratégias adotadas pelo governo

brasileiro da época como medidas profiláticas para resolver o problema, estava introdução do sal de cozinha "cloroquinado", ou "Método de Pinotti", que em 1952 foi liderado pelo malariologista Mário Pinotti, o qual consistia na distribuição do sal cloroquinado principalmente nas regiões em que a ação dos inseticidas era menos eficaz. Este método também foi testado em outras regiões endêmicas fora do país (HOCHMAN *et al.*, 2007). No final da década, surgiram os primeiros relatos concretos de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, em alguns países da Ásia, África e América do Sul, inclusive no Brasil. Alguns estudos apontaram como um dos fatores que contribuíram para o surgimento da resistência, o uso indiscriminado do "sal cloroquinado" (SILVA e HOCHMAN, 2011). A partir de 1961, a OMS reconheceu a ameaça sob os avanços já obtidos e passou a incentivar uma nova corrida na busca de estruturas ativas como alternativa aos medicamentos utilizados (SÁ, 2011).

Nas décadas seguintes muitas drogas antimalariais sintéticas foram descobertas, entre elas, a mefloquina um derivado 4-aminoquinolínico 10 vezes mais potente que a quinina, que passou a ser recomendado para casos de *P. falciparum* resistentes a cloroquina. No entanto, o parasito adquiriu rapidamente resistência. Com o surgimento da artemisina no final dos anos 70, houve um intenso empenho da indústria farmacêutica na busca por seus derivados sintéticos, para serem utilizados no tratamento de *P. falciparum* cloroquina-resistentes e muitas das descobertas deste período são utilizadas até os dias atuais. No Brasil, até o final da década de 80 ainda se estudava e fazia uso clínico, apenas de medicamentos baseados nos esqueletos quinolínicos (PEREIRA DA SILVA *et al.*, 2002). A partir de 2005, a Organização Mundial da Saúde (OMS) passou a recomendar o uso de terapias TCAs para o tratamento de todos os casos de malária causada do *P. falciparum*. No entanto, nos últimos anos os constantes relatos de resistência do *P. falciparum* a estas drogas têm levado as autoridades responsáveis a se preocupar com ameaças de novos surtos. Segundo a OMS, já foram confirmados casos de resistência em cinco países do sudeste asiático, na região do Grande Mekong: Camboja, República Democrática Popular do Laos, Myanmar, Tailândia e Vietname (Figura 4). E recentes estudos mostram que em outras regiões tem observado casos isolados (OMS 2015). Atualmente já foram documentados casos de resistência de três espécies que parasitam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. Um agravante a esse problema é a resistência cruzada. Em que a resistência a uma das drogas leva à resistência a outros medicamentos da mesma classe química ou que tenham modos de ação semelhantes (OMS, 2015).

**Figura 4.** Países com resistência à artemisinina confirmada ou com suspeita, desde 2012



Fonte: OMS, 2015

Além dos casos de resistência do *P. falciparum* aos medicamentos atuais, também tem se observado um aumento significativo de casos de resistência da espécie *P. vivax* aos quimioterápicos utilizados. Em 1999, foi relatado pela o primeiro caso de resistência a cloroquina e a mefloquina na região da Amazônia (GRAÇAS *et al.*, 1999), desde então estima-se que cerca de 15% dos estipes de *P. vivax* já são resistentes à cloroquina e 22% a mefloquina. Essas informações preocupam os órgãos responsáveis por estabelecer os protocolos utilizados clinicamente, já que estas drogas são as principais terapêuticas utilizadas.

No Brasil, o órgão que estabelece essas regras é o Ministério da Saúde (MS), baseado em normas mundiais. Nestes protocolos ele prioriza a utilização de droga combinadas com ação esquizotocidas sangüíneos e/ou gametocitocidas e no caso de contaminação pelas espécies *P. vivax* ou *P. ovale*, utiliza também medicamentos com ação hipnozoitocidas, como a primaquina (FREITAS *et al.*, 2007). Para o tratamento das infecções causadas por *P. falciparum* ou mista, são utilizados normalmente os TCAs (Tabela 1). Outras drogas como a doxiciclina, clindamicina, quinina, entre outras, dependendo do caso e situação do paciente, como no caso de crianças e gestantes, podem ser incluídas nesta lista de terapêuticas, (BRASIL, 2010c).

**Tabela 1**

Medicamentos utilizados no Brasil, de acordo com as normas do Ministério da Saúde

<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i> e <i>P. ovale</i>	Mista ( <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> ou <i>P. ovale</i> )
TCAs	aminoquinolínicos	TCAs
Arteméter e lumefantrina	Cloroquina e primaquina	Arteméter e lumefantrina
Artesunato e mefloquina		Artesunato e mefloquina
Artesunato e Primaquina		TCAs e primaquina
Diidroarteminina e piperquina		

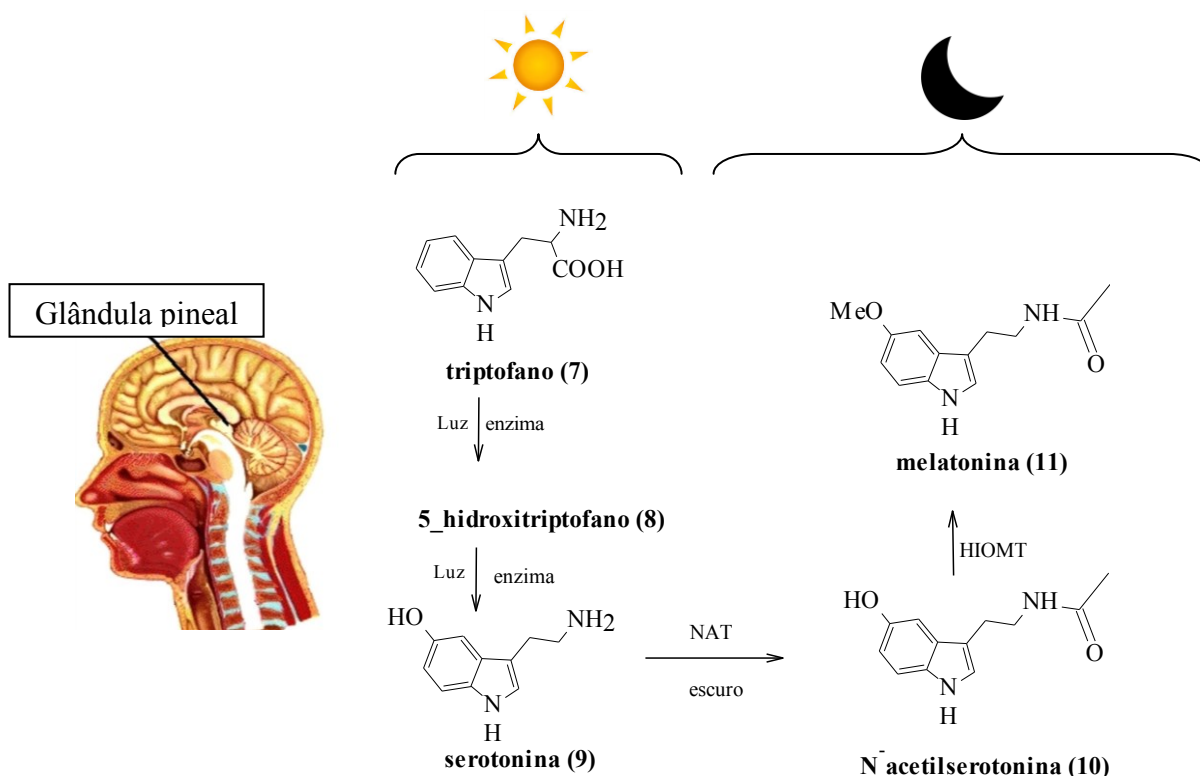
Fonte: Ministério da Saúde 2016

#### 1.4 DERIVADOS DO TRIPTOFANO

O triptofano é um aminoácido muito importante tanto no reino animal como no vegetal. Nas plantas ele é considerado um metabólito primário, obtido a partir da via do chiquimato e está associado a biossíntese de metabólitos secundários, como a classe dos alcaloides indólicos (DEWICK, 2002). No reino animal, especificamente em mamíferos ele é considerado um aminoácido essencial, ou seja, aqueles que não são produzidos pelo metabolismo e precisam ser obtidos através da alimentação. Desempenha um importante papel como precursor de diversas substâncias cruciais à vida, entre elas a serotonina e a melatonina (RIBEIRO 2010). A melatonina (**11**) é um hormônio secretado pela glândula pineal presente em todos os seres humanos, responsável por regular o sono, participando de várias atividades biológicas que são influenciadas pelo ciclo circadiano (claro/escuro).

Sua produção inicia-se com a conversão do triptofano (**7**) em 5-hidroxitriptofano pela ação da enzima triptofano hidroxilase e luz. Em seguida ocorre a descarboxilação da molécula formando a serotonina (**9**), que por ação enzimática é acetilada, formando a N-acetilserotonina (**10**) e na sequência ocorre a metilação, produzindo assim a melatonina (Figura 5). Entre as etapas limitantes deste processo esta a produção da enzima N-acetiltransferase (NAT), o qual ocorre na ausência de luz (GASTEL *et al.*, 2000).

Figura 5. Síntese da melatonina a partir do triptofano



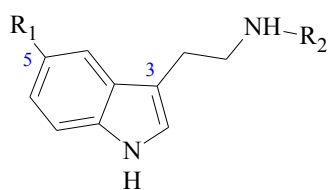
Alguns tipos de parasitas, como o *Plasmodium* utilizam a melatonina (**11**) para manutenção de suas espécies. O conhecimento sobre ciclo de vida do *Plasmodium* no hospedeiro ainda é bastante limitado, no entanto sabe-se que parasito utiliza vias complexas de mecanismos de sinalização celular que lhes permitem a interação com as células do hospedeiro e a sua adaptação ao meio. Estudos demonstraram que a melatonina é utilizada pelas espécies *P. falciparum* e *P. chabaudi* para induzir a liberação de cálcio estoque intracelular, causando o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular, condição favorável para a invasão dos merozoítos nas células sanguíneas. Além disso, a melatonina está associada modulação do ciclo do parasita, fazendo com que ocorra a sincronização dos estágios evolutivos. E essa sincronização está diretamente relacionada a interação-hospedeiro, visto em ensaios *in vitro*, a sincronicidade é rapidamente perdida (BERALDO e GARCIA, 2005, RIBEIRO 2010). Desta forma, a inibição ou bloqueio dessa via hormonal pode ser de grande relevância na descoberta de novos medicamentos antimaláricos.

De acordo com Beraldo e Garcia (2005) outros derivados indólicos do triptofano, como a triptamina (**12**), serotonina (**9**) e N-acetil-serotonina (**10**), apresentam efeitos similares à melatonina (**11**) no ciclo celular das espécies *P.falciparum* e *P.chabaudi*. No trabalho de Shuck e colaboradores (2014), uma série de derivados da melatonina foram



sintetizados e testados para determinar capacidade de modulação da malária humana, assim como a capacidade de atuar como antagonista a melatonina, bloqueando o efeito do hormônio no ciclo parasitário. Dentre as alterações, destaca-se a substituição do grupo metoxi na posição 5, por hidrogênio e a modificação da cadeia lateral na posição 3 (Quadro 1). Foi observado que apenas o composto (**15**), apresentou aumento da parasitemia similar ao ocorrido com a melatonina (**11**), indicando a importância da presença da metoxila. Os derivados **13** e **14**, cujas estruturas tem o hidrôgenio na posição 5, ao invés da metoxila e cadeias laterais volumosas na posição 3, apresentaram baixa capacidade de modulação do ciclo celular. O mesmo foi observado para os derivados **16** e **17**. No entanto os derivados **13** e **14** tiveram bons resultados como bloqueadores da melatonina já os derivados **16** e **17** tiveram resultados promissores na inibição parasitárias em cepas de *P. falciparum*, com  $CI_{50}$  19,10  $\mu$ M e 2,93  $\mu$ M, respectivamente.

**Quadro 1.** Derivados do triptofano derivados sintéticos da melatonina



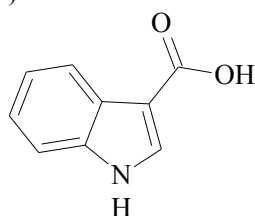
(9-17)

Nome	R1	R2
Serotonina ( <b>9</b> )	OH	H
N-acetilserotonina ( <b>10</b> )	OH	
Melatonina ( <b>11</b> )	OMe	
Triptamina ( <b>12</b> )	H	H
<b>13</b>	H	
<b>14</b>	H	
<b>15</b>	OMe	H
<b>16</b>	OMe	
<b>17</b>	OMe	

Baseado em: SHUCK *et al.*, 2014.

O composto indólico, 3-carboxi-indol (IAA) (**18**), muito comum em espécies vegetais, apresenta estrutura similar aos derivados do triptofano citados, no entanto não interfere no ciclo celular do parasito indicando especificidade dos derivados do triptofano (SHUCK *et al.*, 2014).

**Figura 6.** Estrutura do 3-carboxi-indol (IAA)



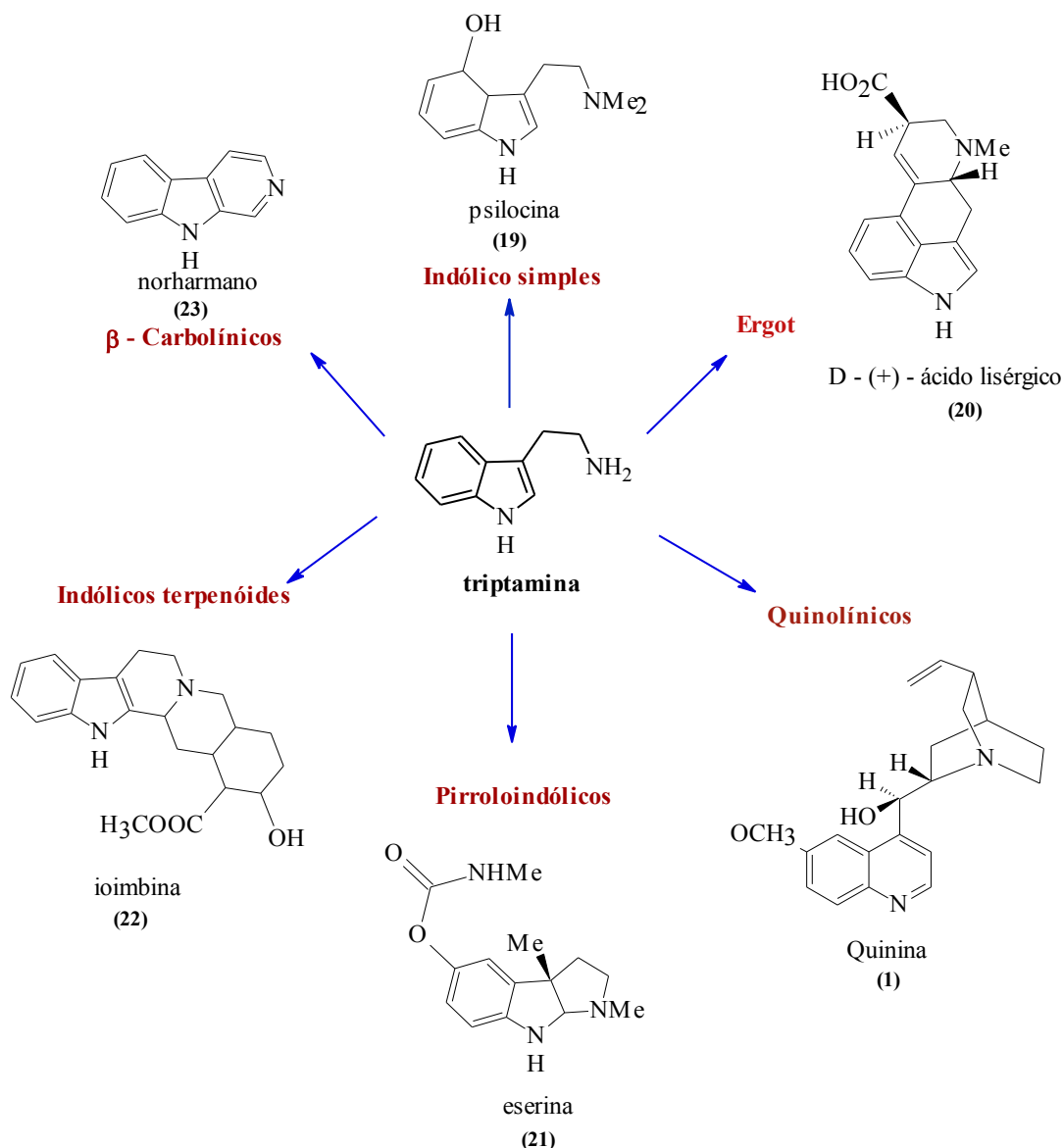
**(18)**

#### 1.4.1 Alcaloides

Alcaloides são substâncias orgânicas cíclicas de caráter básico com um ou mais átomos de nitrogênio. De maneira geral são separados em três grandes grupos de acordo com sua origem e a posição do nitrogênio: os alcaloides verdadeiros são derivados de aminoácidos e apresentam o nitrogênio no sistema cíclico. Os protoalcaloides também são derivados de aminoácidos, mas apresentam o átomo de nitrogênio fora do sistema cíclico, e por fim os pseudoalcaloides que são substâncias nitrogenadas básicas e que não derivam de aminoácidos (RODRIGUES JR, 2009). A maioria destas substâncias é de origem vegetal e apenas uma pequena porcentagem é produzida por animais. Esses compostos são formados por diversos tipos de esqueleto e sua classificação é dada de acordo com o aminoácido que lhe deu origem.

Dentre as diversas classes de alcaloides existentes destacam-se os alcaloides indólicos, que segundo Dewick (2002), compreendem mais de 3000 substâncias. Os alcaloides indólicos são a maior classe de alcalóides encontrados na natureza, podendo ser encontrados principalmente nas famílias Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae. A maioria deriva do aminoácido triptofano, que sofre uma descarboxilação pela ação enzimática da triptofano descarboxilase, formando a triptamina que através de várias rotas biossintética origina seis tipos de esqueleto diferentes, os  $\beta$ -carbólicos, indólicos simples, ergot, quinolínicos, pirroloindólicos, indólicos terpenóides indólicos, os quais mostrados na figura 7, com um exemplo de cada classe (DEWICK, 2002).

**Figura 7.** Esqueletos de alcaloides indólicos derivados do aminoácido triptofano



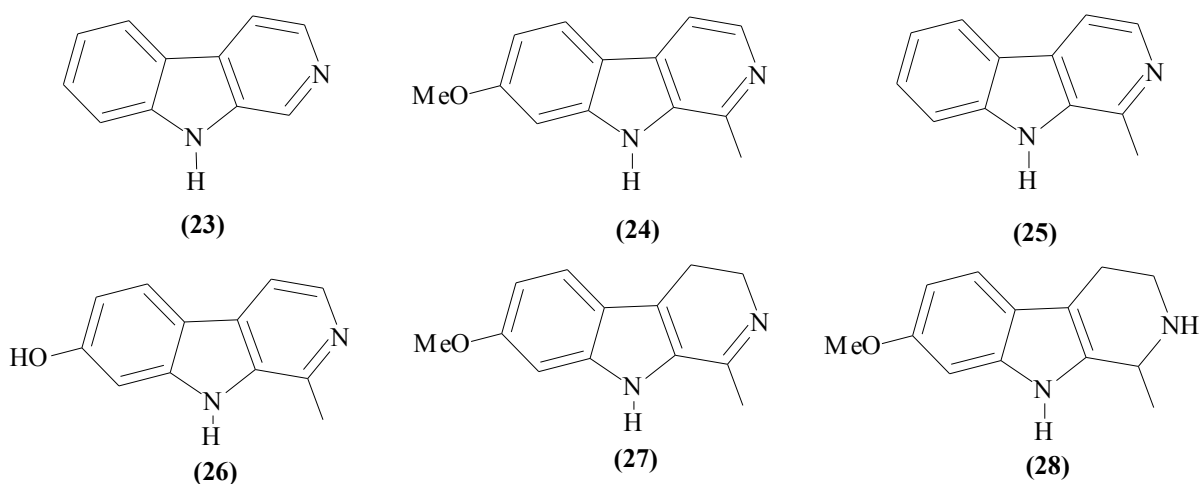
### 1.4.2 Alcaloides $\beta$ -carbolínicos

Em geral são moléculas formadas por um sistema tricíclico pirido[3,4-b]indólico, com pequenas modificações estruturais com relação aos padrões de hidrogenação e substituição nos anéis. Os alcaloides do tipo  $\beta$ -carbolínico também são conhecidos como alcaloides tipo *harmala*, a denominação se deve ao fato de que as primeiras estruturas isoladas com este tipo de esqueleto foram obtidas a partir da espécie *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) (JIMENEZ *et al.*, 2008). Esta planta é tradicionalmente utilizada na medicina popular no Oriente Médio e Norte da África para estimular a menstruação e abortos. Na China, extratos das sementes de *P. harmala* são utilizados no tratamento de

diversas doenças, entre elas o câncer e a malária (CHEN *et al.*, 2005; CAO *et al.*, 2013). Este tipo de esqueleto pode ser encontrado em diferentes famílias botânicas entre elas a Combretaceae, Zygophyllaceae, Myristacaceae e Malpighiaceae, entre outras.

As principais modificações estruturais encontradas na classe dos  $\beta$ -carbolínicos ocorrem nas posições 1 e 7 com a presença de diferentes ligantes (H, OMe, OH, entre outros), como por exemplo: norharmano (**23**) harmina (**24**), harmano (**25**), e o harmol (**26**), e variações quanto ao número de saturações no anel piridínico, podendo ser encontrado sistemas dihidro- $\beta$ -carbólinas, como no caso da harmalina (**27**) e tetrahidro- $\beta$ -carbolina, como o 1,2,3,4-tetrahidroharmalina (**28**) (Figura 8. **Estruturas dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos.**

**Figura 8.** Estruturas dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos: norharmano (**23**), harmina (**24**), harmano (**25**), harmol (**26**), harmalina (**27**) e 1,2,3,4-tetrahidroharmalina (**28**)



Os alcaloides **24**, **27** e **28** são os componentes majoritários nas cascas e folhas da espécie *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae), planta nativa da América do Sul utilizada na produção da Ayashuasca, conhecida popularmente por "santo daime". A bebida é obtida através da infusão do cipó de *Banisteriopsis caapi* e folhas de *Psychotria viridis* (Rubiaceae) e consumido em rituais religiosos de origem indígenas (COSTA *et al.*, 2005). Este chá é conhecido por seus efeitos psicotrópicos e alucinógenos, possivelmente associados às atividades neurofarmacológicas dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos. Estudos mostram que estes alcaloides atuam como inibidores das enzimas monoamina-oxidases (MAO-A), que são responsáveis pela degradação de neurotransmissores como dopamina, serotonina e noradrenalina. O desequilíbrio destas substâncias no organismo apresenta como sintomas

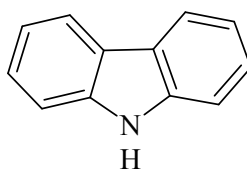
um estado de excitação e euforia, aumentando as atividades psicomotoras, entre outros efeitos (HERRAIZ *et al.*, 2010).

Atualmente o enfoque maior tem sido nas atividades citotóxicas e neurotóxicas dos derivados. Estudos mostram que a harmina e seus análogos são ativos em vários ensaios *in vitro* e *in vivo* contra diversos tipo de linhagem de células cancerígenas, entre elas PLA-801 (pulmão), HepG2 (fígado), BGC-823 (estômago), Hela (cervical) e Lovo (colón), entre outras. E que pequenas modificações estruturais, como a presença de grupos alquil-aril nas posições *N*-9 e *N*-2 potencializam as atividades citotóxicas de compostos  $\beta$ -carbolínicos (CAO *et al.*, 2013, SHI, *et al.*, 2013). Nestes trabalhos observam-se um alto potencial citotóxico, porém em alguns casos também são alto valores de toxicidade aguda e neurotoxicidade (CHEN *et al.*, 2004, CAO *et al.*, 2005, CAO *et al.*, 2013), além de outras atividades como antifúngica, antiviral (SONG, *et al.*, 2014), antiparasitária (RAO *et al.*, 2003, VAN BAELEN *et al.*, 2009, BONAZZI, *et al.*, 2010).

### 1.4.3 Carbazol e análogos

O esqueleto carbazólico é formado por um sistema indólico fundido ao um anel benzenico. A estrutura é totalmente aromática formando uma estrutura planar. O carbazol (**29**) foi isolado pela primeira vez da casca do tronco da *Murraya koenigii* (Rutaceae), planta originária da Índia e popularmente utilizada contra várias enfermidades, entre elas dor (analgésico) e febre (NANDY *et al.*, 2014). Trata-se de uma base extremamente fraca, com baixa solubilidade em solventes orgânicos, a qual pode ser aumentada transformando-o em sal (ex: em KOH forma *N*-potássio sal).

**Figura 9.** Estrutura do carbazol (**29**)



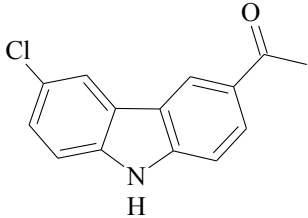
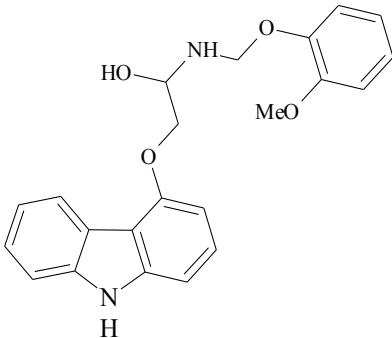
**(29)**

A química do carbazol e seus derivados têm sido muito estudados nestas últimas décadas devido a sua ampla aplicação, tanto em equipamentos eletrônicos para produção de materiais eletroluminescentes, além de corantes, semicondutores, etc. Também tem aplicações farmacêuticas, devido a seu potencial em diversas enfermidades, entre elas:

antifúngica e bactericida (ZHANG *et al.*, 2010), anti-inflamatória e antitumoral (HSU *et al.*, 2005), entre outras. Sua estrutura eletrônica apresenta grande disponibilidade de elétrons caracterizada pela presença das ligações  $\pi$  alternadas. Apresenta propriedades fluorescentes, característica que faz com que muitos derivados sejam utilizados em química de materiais. Na área farmacológica desperta interesse pela facilidade de se obter derivados a partir de uma estrutura simples e barata (NANDY *et al.*, 2014).

Dentre os derivados de carbazóis já produzidos, é importante destacar que já estão sendo usados na prática clínica, como por exemplo, o carprofeno (**30**), fármaco anti-inflamatório de uso veterinário para doenças como artrite, e o carvedilol (**31**) utilizado como anti-hipertensivo (Quadro 2). Outras atividades como anti-HIV, anti- Parkinson, anti-psicótico, antitumoral, também já foram relatadas, mas ainda estão em fase de estudos e testes (NANDY *et al.*, 2014).

**Quadro 2.** Derivados do carbazol utilizados na prática clínica de acordo com o banco de dados DRUGSBANK

Nome	Estrutura	Aplicação	Ref.
Carprofeno (30)		Artrite	(DRUGBANK, 2016a)
Carvedilol (31)		Anti-depressivo	(DRUGBANK, 2016b) KUMAR, <i>et al.</i> , 2011

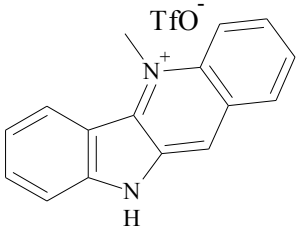
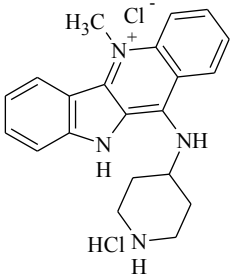
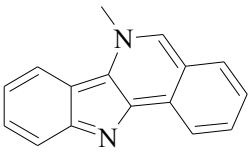
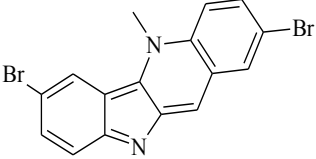
#### 1.4.4 Alcaloides indólicos e atividade antimalárica

São inúmeras as pesquisas relatando atividade antimalárica de alcaloides na literatura, nos últimos anos as classes pirido-carbazólicas e benzo- $\delta$ -carbolínicos vem sendo muito estudadas, entre os principais representantes estão a elipticina (**36**) e criptolepina (**32**) (Quadro 3).

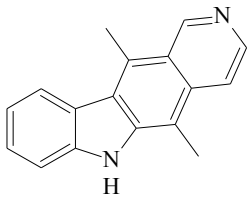
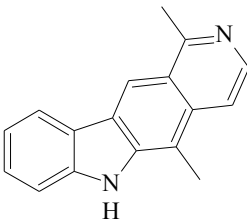
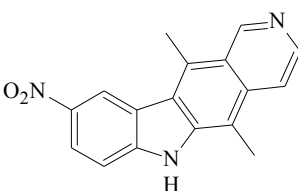
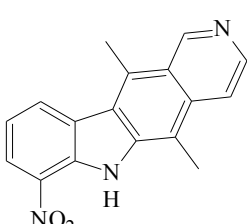
A criptolepina (**32**) é o alcaloide majoritário presente nas raízes de *Cryptolepis sanguinolenta* (Periplocaceae), planta utilizada tradicionalmente no oeste africano para o tratamento da malária. A substância foi considerada por muito um promissor antimalárico devido aos seus excelentes resultados em ensaios *in vitro* contra *P. falciparum*, com concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) entre 0,9-0,12 µM (VAN BAELEN *et al.*, 2009; ROCHA E SILVA *et al.*, 2012). E nos ensaios *in vivo* contra *P. berghei*, a substância apresentou atividade moderada com inibição de 63% da parasitemia na dose de 50 mg/Kg/dia, na via subcutânea. De forma similar seu análogo (**33**), apresentou inibição de 55% na dosagem de 50 mg/Kg/dia, nos ensaios *in vivo*. No entanto, ambos apresentaram toxicidade quando testados, na via subcutânea o composto **33** foi letal na dose de 50 mg/Kg/dia e a criptolepina (**32**) foi letal na dose de 12,5 mg/Kg/dia (via intraperitoneal). O derivado 2,7-dibromocriptolepina (**35**) também segue esta tendência, apesar do alto potencial antimalárico nos ensaios *in vitro* (49 nM), apresenta toxicidade e baixos índices de seletividade no ensaios *in vivo*, impossibilitando ensaios pré-clínicos (ONYEIBOR *at al.*, 2005; ROCHA E SILVA *et al.*, 2012).

Do grupo dos alcaloides pirido-carbazólicos, destaca-se a elipticina (**36**), que foi isolado pela primeira vez em 1959, das folhas da *Ochrosia elliptica* Labell (*Apocynaceae*). Desde então sua estrutura e de derivados semissintéticos ou naturais, vêm sendo muito estudados, em especial suas atividades antitumorais. Em 2007 foi relatado pela primeira vez o seu alto potencial contra cepas do *Plasmodium falciparum* (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007; POHLIT *et al.*, 2012). Em paralelo o grupo de Passemar e colaboradores (2011) também relataram seu alto potencial e de seus análogos. E em 2012, foi publicado o ensaio *in vivo* da elipticina (**36**) e olivacina (**37**) contra *Plasmodium berghei*, ambas apresentaram alta atividade e baixo efeitos tóxicos. O composto **36** apresentou 100% de inibição na concentração de 50 mg/Kg/dia, enquanto o composto **37** apresentou 90-97%. (ROCHA e SILVA *et al.*, 2012). E em 2014, a semissíntese de derivados, entre eles a 9-nitroelipticina (**38**), a qual apresentou melhor atividade que elipticina em ensaios *in vitro* contra *P.falciparum* (MONTIOIA *et al.*, 2014).

**Quadro 3.** Estruturas esqueleto benzo- $\delta$ -carbolínico e pirido-carbazólicos com atividade antimalarial

Nome (n°)	Estrutura	Origem	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	inibição/ dose/via	IS	Referência
			<i>P.f</i>	<i>P.berghei</i>		
Criptolepina (32)		<i>C. sanguinolenta</i>	0,12-0,80 (K1)	63 % 50mg/Kg/dia subcutânea	9,3-11 (L6)	ROCHA e SILVA <i>et al.</i> , 2012; VAN BAELEN <i>et al.</i> , 2009
11- (4- piperidinamina) -criptolepina- hidrogeno cloreto (33)		Sintética	0,10 (K1)	60 % 10mg/Kg/dia subcutânea	330	ROCHA e SILVA <i>et al.</i> , 2012;
6-metil- <i>6H</i> -indol [3,2- <i>c</i> ] isoquinolina (34)		Sintético	0,64 0,57 (sal HI)	-	2,3-3,9 (L6)	VAN BAELEN <i>et al.</i> , 2009
2,7-dibromo criptolepina (35)		Sintético	0,049	91 % 25 mg/Kg/dia	> 122 (MAC-15A)	ONYEIBOR <i>et al.</i> , 2005



Elíptica (36)		<i>A. vargassi</i>	0,81 (K1)	100% 50mg/Kg/dia oral	> 500 (macrófagos murines)	ROCHA E SILVA <i>et al.</i> , 2012
Olivacina (37)		<i>A. olivaceum</i>	1,4 (K1)	97% 50mg/Kg/dia oral	> 290 (macrófagos murines)	ROCHA E SILVA <i>et al.</i> , 2012
9-nitroelíptica (38)		Sintético	0,50	NT	> 50 (MRC-5)	MONTOIA <i>et al.</i> , 2014
7-nitroelíptica (39)		Sintético	13,0	NT	> 50 (MRC-5)	MONTOIA <i>et al.</i> , 2014

Linhagens celulares: L6 (mioblastos de ratos); MAC-15A (adenocarcinoma de cólon de camundongo); MRC-5 (fibroblastos humano).

*P.f. Plasmodium falciparum*; K1: Cepas resistentes a cloroquina

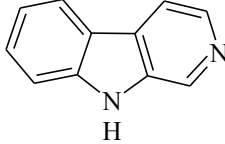
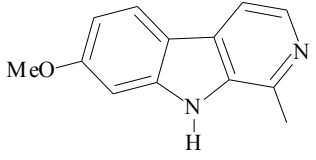
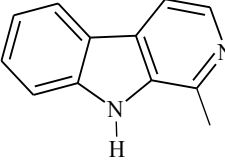
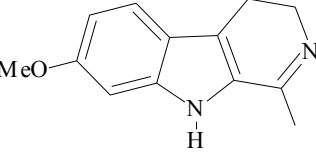
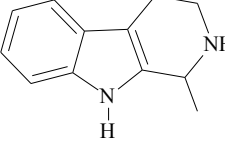
IS: Índice de seletividade ( $CI_{50}$  (citotóxico) /  $CI_{50}$  (*Plasmodium falciparum*))

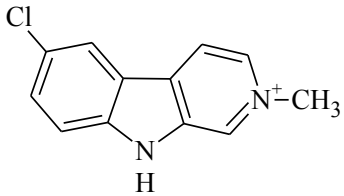
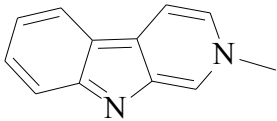
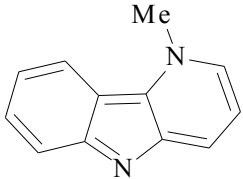
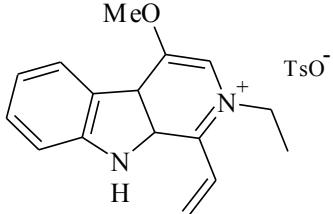
Estas duas classes de substâncias ocupam lugar de destaque devido aos excelentes resultados antimaláricos, no entanto são limitadas devido à obtenção, que ocorre por duas formas normalmente: via isolamento fitoquímico ou via síntese. Ambos os processos apresentam limitações quanto aos rendimentos. No caso da fitoquímica, limita-se a pequenas quantidades obtidas a partir das plantas e da síntese o produto final, em geral necessita de várias etapas, dificultando a obtenção de altos rendimentos. Por esses motivos entre outros, vários grupos de pesquisas, têm trabalhado na busca de estruturas similares e com esqueletos mais simples que possam apresentar bons resultados em relação à atividade antimalárica e seletividade, como no caso de sistemas indólicos tricíclicos, entre eles os esqueletos carbolínicos.

Em trabalhos de Van Baelen *et al.*, (2009) e Takasu *et al* (2005), uma série de derivados, foram sintetizados e testados contra *P. falciparum*. Os derivados mais ativos foram submetidos a testes *in vivo*. O produto **42** apresentou  $CI_{50}$  0,45  $\mu$ M, na forma neutra e  $CI_{50}$  0,35  $\mu$ M na forma de sal. E o sal cátonico  $\beta$ -carbolíneo **44** apresentou  $CI_{50}$  1,3  $\mu$ M. Interessante que ambas as substâncias (**42** e **44**), apesar de serem muito ativas nos ensaios *in vitro*, nos testes *in vivo* contra *P. berghei* tiveram sucesso (Quadro 4). Além disso, o derivado **44** ainda apresentou toxicidade aguda em concentrações acima de 50 mg/Kg/dia. Em trabalhos como de Bonazzi *et al.*, (2010) e Van Baellen *et al.*, 2009, é possível observar análogos do norharmano, com atividade comparável a dos alcaloides pirido-carbazólicos, como no caso da nostocarbolina (**41**) e do 2-metil- $\beta$ -carbolina (**42**) e seu sal de HI, que foram altamente ativos em ensaios *in vitro* contra cepas de *P. falciparum* ( $CI_{50}$  0,19 e 0,45  $\mu$ M, respectivamente). Van Baelen e colaboradores (2009) também realizou um amplo estudo com sais *versus* atividade, e mostrou que as maiorias dos derivados sintetizados apresentavam um aumento na atividade em relação às bases livres, tal característica pode estar relacionada ao aumento da solubilidade. Ainda no grupo dos tricíclicos, mas pertencente à classe do  $\delta$ -carbolinico, destaca-se o 1-metil- $\delta$ -carbolina, que apresentou  $CI_{50}$  de 0,38  $\mu$ M e alto índice de seletividade (IS).

Os  $\beta$ -carbolicos utilizados neste trabalho (harmina e seus análogos), de maneira geral apresentam atividade antiplasmodial moderada (ASTULLA, *et al.*, 2008; FIOT *et al.*, 2006). A citotoxicidade dos derivados de acordo com a literatura é de baixa a moderada, exceto em alguns casos como o tetrahydroharmano (FIOT *et al.*, 2006) ou o *N*-etil-4-metoxi-1-vinil- $\beta$ -carbolina, descrito no trabalho de Takasu e colaboradores (2005).

**Quadro 4.** Estruturas com esqueleto  $\beta$ -carbolínico e atividade antimalarial

Nome (n°)	Estrutura	Origem	CI <sub>50</sub> $\mu$ M	Inibição/ dose/ via	IS	Referência
			P.f	P.berghei		
Norharmano (23)		Esponjas marinhas (Indonésia)	Não ativo (W2)	-	Não tóxico	RAO <i>et al.</i> , 2003
Harmina (24)		<i>P. harmala</i>	37,7*	-	NT	ASTULLA <i>et al.</i> , 2008
Harmano (25)		<i>G. senegalensis</i>	18,10 (W2)	-	121 THP <sub>1</sub>	FIOT <i>et al.</i> , 2006
Harmalina (27)		<i>P. harmala</i>	117,3*	-	NT	ASTULLA <i>et al.</i> , 2008
Tetraidroharmano (40)		<i>G. senegalensis</i>	7,5 (W2)	-	11,68 THP <sub>1</sub>	FIOT <i>et al.</i> , 2006

Nostocarbolina (41)		Cyanobacteria <i>Nostoc</i> 78-12A	0,19 (K1)	49 % 50mg/Kg/dia	> 622 L6	BONAZZI <i>et al.</i> , 2010
2-metil-β-carbolina (42)		Sintético	0,45 (K1) 0,34 (sal HI)	Não ativo 50mg/Kg/dia	> 1000 L6	VAN BAELEN <i>et al.</i> , 2009
1-metil-δ-carbolina (43)		Sintético	0,48 (K1) 0,38 (sal HI)	-	> 300 L6	VAN BAELEN <i>et al.</i> , 2009
<i>N</i> -etil-4-metoxi-1-vinil-β-carbolina (44)		Sintético	1,3 (K1)	28% 20 mg/Kg/dia intraperitoneal	77	TAKASU <i>et al.</i> , 2005

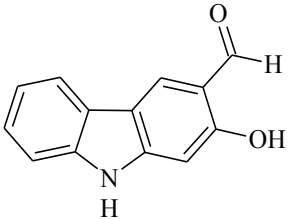
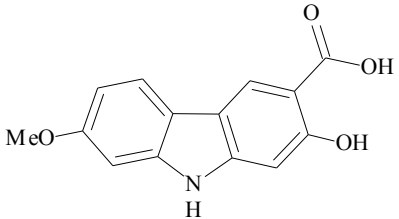
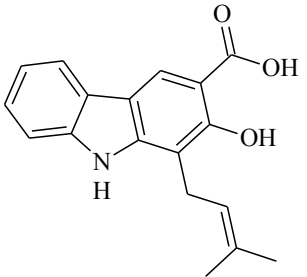
Cepas *P. falciparum*: W2 (cloroquina-resistente); K1 (Cloroquina-resistente);  
Linhagens celulares: THP1(monócitos humano); L6(mioblastos de ratos);  
IS: Índice de seletividade ( $CI_{50}$  (citotóxico) /  $CI_{50}$  (*Plasmodium falciparum*);  
NT: não testado;

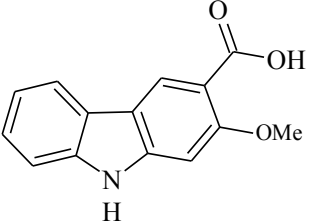
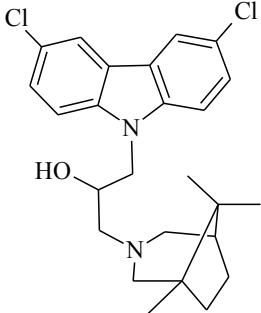
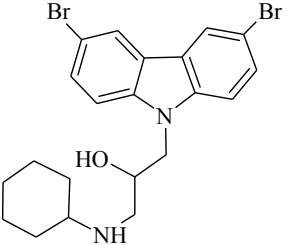
\* Os valores foram convertidos de  $\mu\text{g/mL}$  para  $\mu\text{M}$ .

Ao longo dos anos substâncias com esqueleto carbazólico tem sido muito estudadas contra diversas enfermidades. Muitas destas substâncias foram obtidas via isolamento fitoquímico, dentre as plantas em que podem ser encontradas estão diversas espécies do gênero *Clausena*. Segundo a revisão de Arbab e colaboradores publicada em 2011, mais de quarenta carbazóis já foram isoladas de *C. excavate* (Rutaceae) e muitas desta estruturas apresentam atividade antimalárica. A *C. harmandiana* (Rutaceae), uma planta utilizada na medicina tradicional oriental para diversas doenças entre elas, malária, teve frações ricas em alcaloides carbazólicos testadas contra as cepas de *P. falciparum* e se mostraram ativas com  $CI_{50}$  em torno de 8  $\mu\text{g/mL}$ . No trabalho de Thongthoom e colaboradores (2010) foi relatado o isolamento de oito alcaloides carbazólicos a partir de raízes de *C. harmandiana*. Todos foram testados os mais ativos foram, o 2-hidroxi-9H-carbazol-3-carbaldeído (**45**), também chamado de mukonal e o 7-Metoxi-mukonal (**46**) apresentaram atividade com  $CI_{50}$  3,27  $\mu\text{g/mL}$  (15,4  $\mu\text{M}$ ) e 2,94  $\mu\text{g/mL}$  (12,19  $\mu\text{M}$ ), respectivamente (Quadro 5). No trabalho de Yenjai e colaboradores (2000), também foi relatada a atividade de alguns derivados carbazólicos naturais com atividade moderada como a heptafelina (**47**) com  $CI_{50}$  3,2-6,4  $\mu\text{g/mL}$  (11,46-22,9  $\mu\text{M}$ ). A clausiane H (**48**) foi inativa frente aos ensaios *in vitro* contra *P. falciparum*, no entanto o derivado obtido através da metilação da carboxila apresentou atividade com  $CI_{50}$  entre 5,5-10,7  $\mu\text{g/mL}$  (21 - 41  $\mu\text{M}$ ). O composto comercial denominado TDR30137 (**49**) foi apontado como um promissor antimalárico, com valor de  $CI_{50}$  57 nM (K1), similar a artemisina (54 nM) e superior ao valor encontrado para a cloroquina (32  $\mu\text{M}$ ). No entanto ao ser testado em roedores (*in vivo*) contra o *Plasmodium berghei*, a substância foi inativa. Diferente da substância sintética **50**, que apresentou  $CI_{50}$  9 nM (K1) e foi potencialmente ativas contra *P. berghei* nos ensaios *in vivo*.

Apesar dos testes *in vitro* serem normalmente utilizados como parâmetros preliminares para selecionar as estruturas para ensaios *in vivo*, alguns trabalhos mostram que nem sempre substâncias ativas *in vitro* serão ativas *in vivo*. Isso pode estar associado a vários motivos, entre eles a interação entre a droga, o parasito e o hospedeiro. Essas interações fazem com que ocorra variações em relação a atividade esperada.

**Quadro 5.** Estruturas com esqueleto  $\beta$ -carbolínico e atividade antimalarial

Nome (n°)	Estrutura	Origem	CI <sub>50</sub> $\mu$ M	Inibição/ dose/ via	Referência
			<i>P.f</i>	<i>P.berghei</i>	
Mukonal (45)		<i>C.</i> <i>harmandiana</i>	15,4* (K1)	-	(THONGTHOOM <i>et al.</i> , 2010)
7-metoxi- mukonal (46)		<i>C.</i> <i>harmandiana</i>	12,19* (K1)	-	(THONGTHOOM <i>et al.</i> , 2010)
Heptafelina (47)		<i>C.</i> <i>harmandiana</i>	11,46-22,9* (K1)	-	(YENJAI <i>et al.</i> , 2000)

Clausiane H (48)		<i>C. harmandiana</i>	Inativa (K1)	-	(YENJAI <i>et al.</i> , 2000)
TDR30137 (49)		comercial	0,57 (K1)	Inativo	(MOLETTE, <i>et al.</i> , 2013)
(50)		sintético	0,009 (K1)	40 % 10 mg/Kg/dia	(MOLETTE <i>et al.</i> , 2013)

Cepas *P. falciparum*: K1 (Clorquina-resistente).

\* Os valores foram convertidos de  $\mu\text{g/mL}$  para  $\mu\text{M}$

DE: dose efetiva

*P.f.*: *Plasmodium falciparum*.

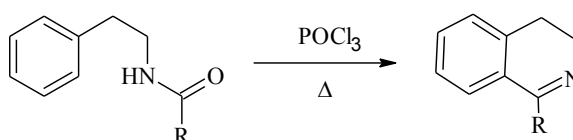
## 1.5 ALGUMAS ROTAS SINTÉTICAS PARA OBTENÇÃO DE ESTRUTURAS $\beta$ -CARBOLÍNICAS E CARBAZÓLICAS

A síntese de esqueletos  $\beta$ -carbólicos e seus derivados podem ser realizados a partir de várias rotas, dentre as mais utilizadas temos as reações de Bischler-Napieralski e a de Pictet-Splenger (MILEN E ABRÁNYI-BALOGH, 2016).

### 1.5.1 Reação de Bischler-Napieralski

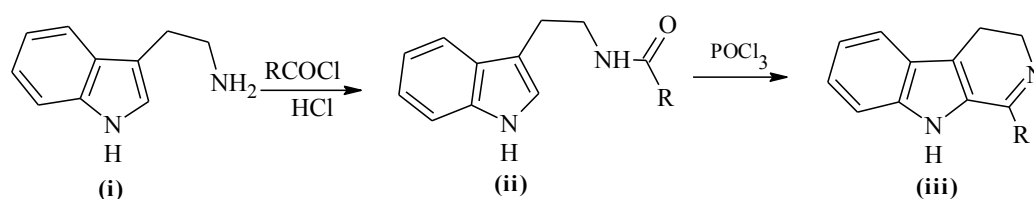
Reação realizada por August Bischler e Bernard Napieralski, em 1893 tinha como objetivo inicial sintetizar compostos isoquinolínicos, através da ciclização de derivados de  $\beta$ -ariletanamidas na presença de agentes desidratantes ( $P_2O_5$ ,  $POCl_3$ ,  $ZnCl_2$ , etc.) e aquecimento.

**Figura 10.** Reação de Bischler-Napieralski para obtenção de sistemas 3,4-diidroisoquinolínicos



O método foi adaptado para a síntese de derivados  $\beta$ -carbólicos (**iii**) utilizando como reagente de partida triptamina (**i**) um derivado de cloreto ácido ( $RCOCl$ ), em meio ácido, ao invés da  $\beta$ -ariletanamidas.

**Figura 11.** Reação de Bischler-Napieralski para obtenção de sistemas  $\beta$ -carbólicos

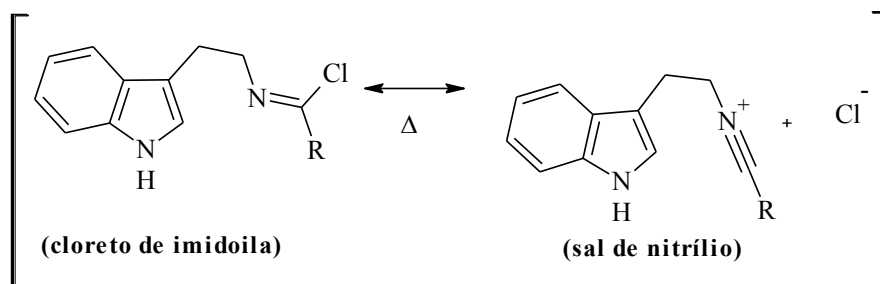


A determinação mecanística desta reação foi bastante discutida ao longo dos anos. Fodor e Nagubandi (1980) conseguiram comprovar através de estudos com diferentes grupos abandonadores e intermediários formados, acompanhado por técnicas de espectroscopia, que a reação ocorria via formação de sal de nitrílio cloreto de imidoila. Esse intermediário é obtido a partir do aquecimento do cloreto de imidoila em sal de nitrílio



(Figura 12). E que a formação do derivado carbonílico ocorre através da ciclização do anel via substituição eletrofílica aromática intramolecular.

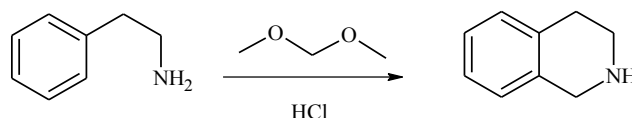
**Figura 12.** Formação do sal do nitrílio (intermediários da reação), segundo estudo mecanístico de Fodor e Nagubandi (1980)



### 1.5.2 Reação de Pictet-Splenger

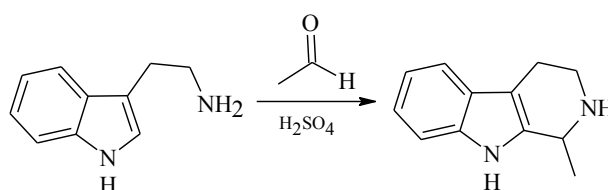
Importante reação utilizada na síntese de uma variedade de compostos heterocíclicos, entre eles alcaloides  $\beta$ -carbolínicos. Desenvolvida em 1911, pelos químicos Amè Pictet e Theodor Splenger a metodologia visava a obtenção de sistemas 1,2,3,4-tetraidroisoquinolínicos, através da reação de condensação da  $\beta$ -feniletilamina com o dimetoximetano, em meio ácido e aquecimento.

**Figura 13.** Reação de Pictet-Splenger para síntese de 1,2,3,4-tetraisoquinolinas



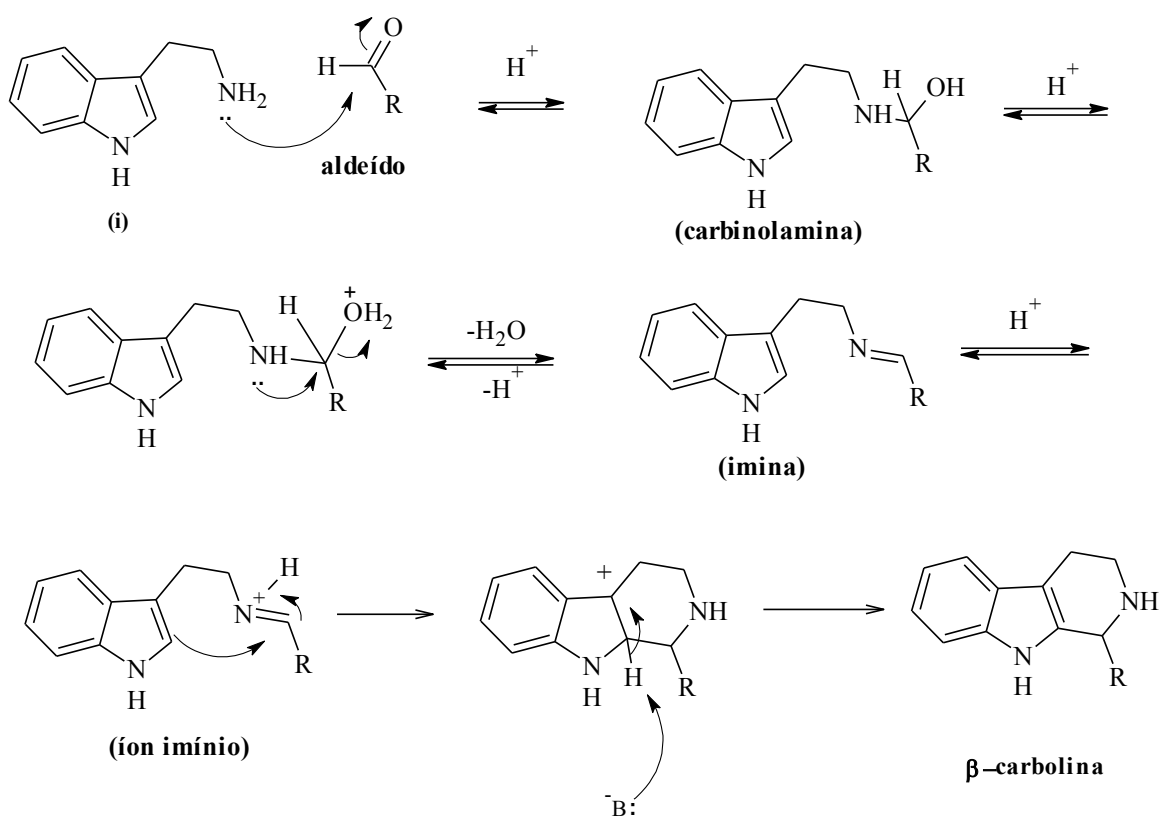
A reação ocorre através da condensação de uma amina primária com compostos carbonílicos, sob catalise ácida. Assim como para a reação de Bischler-Napieralski a metodologia foi adaptada e atualmente é muito utilizada na produção de derivados  $\beta$ -carbolínicos e de outras estruturas indólicas mais complexas (COX e COOK, 1995; MILEN e ÁBRÁNYI-BALOGH, 2016).

**Figura 14.** Reação de Pictet-Splenger para síntese de esqueletos  $\beta$ -carbolínicos



Para a formação de derivados  $\beta$ -carbolínicos o reagente mais comum utilizado é a triptamina (i). Inicialmente ocorre o ataque nucleofílico da amina ( $R-NH_2$ ) ao grupo carbonila formando o intermediário carbinolamina, que sofre desidratação em meio ácido formando a imina, também chamada de base de Schiff, que será protonada gerando o íon imínio (CAREY, 2011). E por fim a ciclização intramolecular via substituição eletrofílica aromática, que ocorre com o ataque do par de elétrons do anel indólico ao íon imínio, formando o derivado  $\beta$ -carbolina.

**Figura 15.** Proposta mecânica de condensação de Pictet-Splenger



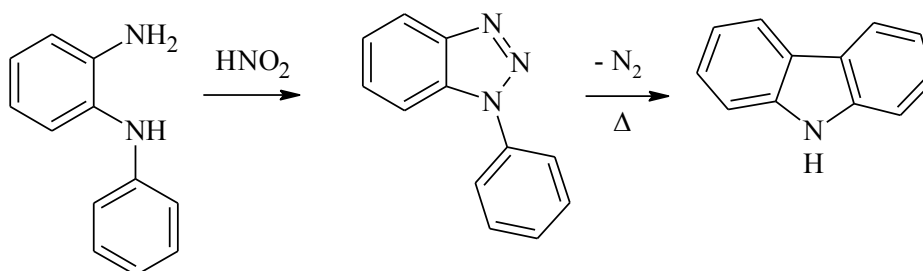
Baseado em: COX e COOK, 1995

Assim como a síntese para obtenção de estruturas  $\beta$ -carbolínicas é bastante explorada a dos esqueletos carbazólicos também é, tendo em vista que se trata de uma estrutura simples e pode ser utilizado como base para um amplo número de substâncias (Schmidt *et al.*, 2012). Várias são as estratégias utilizadas para obtenção de derivados carbazólicos, entre os métodos clássicos estão a reação de Graebe-Ullmann e a ciclização de Borsche-Drechsel e entre as mais atuais temos a reação de Buchwald-Hartwig.

### 1.5.3 Reação de Graebe-Ullmann e a Ciclização de Borsche-Drechsel

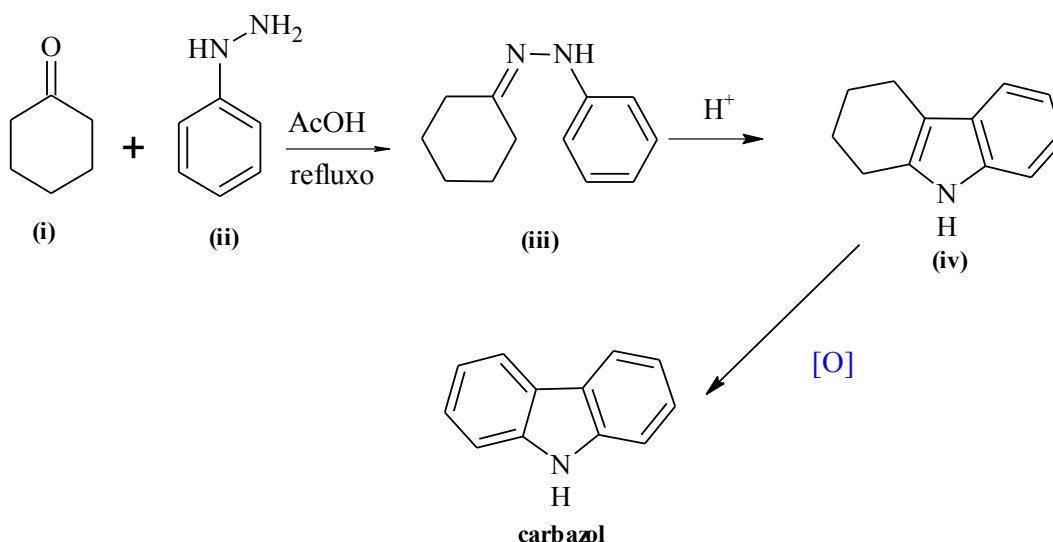
A metodologia de Graebe –Ullmann desenvolvida em 1986, baseava-se na reação entre o *N*-fenil-1,2-diaminobenzeno e o ácido nitroso, formando o 1-fenil-1,2,3-benzotriazol como intermediário. Devido sua instabilidade sofre decomposição térmica gerando o carbazol.

**Figura 16.** Esquema geral para síntese do carbazol via reação de Graebe-Ullmann



Entre os métodos clássicos para síntese do carbazol temos a ciclização de Borsche-Drechsel, que ocorre a partir da reação entre a ciclohexanona (i) e a fenilidrazina (ii), formando a imina (iii), que em meio condições ácidas sofre ciclização gerando o sistema tetrahydrocarbazol. O carbazol é obtido após oxidação do anel saturado (Figura 17).

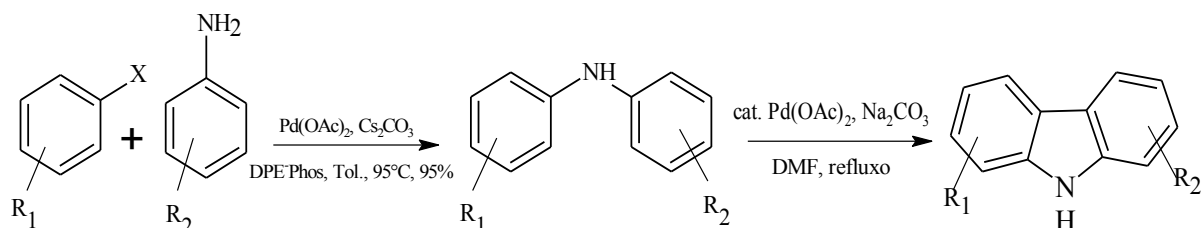
**Figura 17.** Esquema geral para a síntese do carbazol via ciclização de Borsche-Drechsel



Entre as metodologias mais atuais podemos destacar a reação de Buchwald-Hartwig (Figura 18). Trata-se de um procedimento utilizado para formar ligações C-N, a partir de haletos de arila e aminas e catalisadores metálicos. As diarilaminas são convertidas a núcleos carbazólicos por ciclodeidrogenação de diarilaminas catalisada normalmente por

metais de transição, em destaque o paládio II (Watanabe *et al.*, 2009). Csuk e colaboradores (2004), mostraram que a reação de Buchwald-Hartwig, pode apresentar excelentes rendimentos de diarilaminas na presença de substituintes nos anéis.

**Figura 18.** Esquema geral para síntese de diarilaminas por método de Buchwald-Hartwig

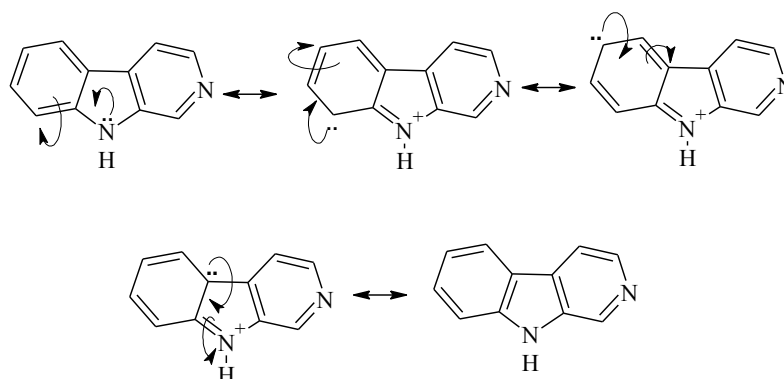


## 1.6 REAÇÕES COMUNS A ESQUELETOS CARBAZÓLICOS E $\beta$ -CARBOLÍNICOS

Uma infinidade de derivados carbazólicos e  $\beta$ -carbolínicos podem ser obtidos durante os processos de síntese, dependendo dos reagentes de partida utilizados. Entre as modificações estruturais mais comuns encontradas na literatura para estes tipos de esqueletos, temos as reações de substituições eletrofílicas aromáticas, as *N*-alquilações e *N*-acilações, além de dimerizações (CAO *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2011; KIMURA *et al.*, 2011; CAO *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2013).

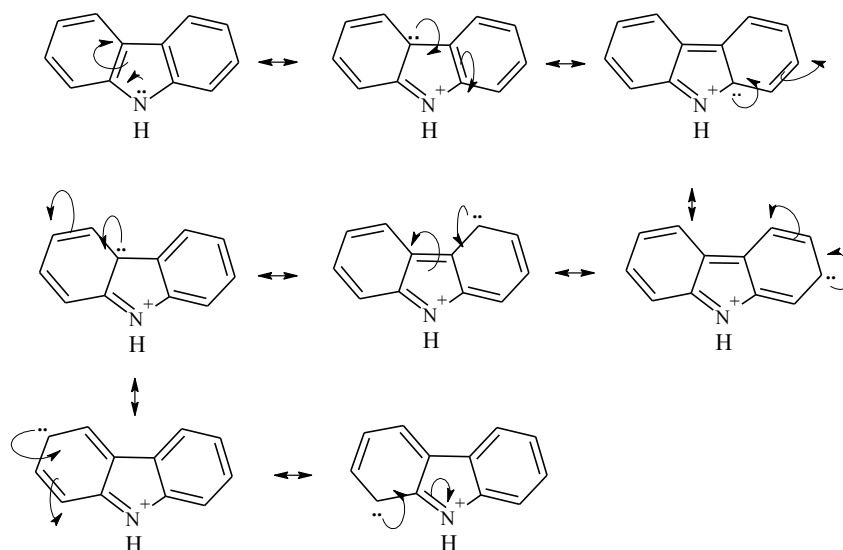
As substituições eletrofílicas aromáticas são responsáveis por um amplo número de derivados, dentre elas destaca-se a nitração. O método clássico para a nitração é a partir da reação entre o substrato e o ácido nítrico, em meio ácido. O agente nitrante é o íon nitrônio ( $\text{NO}_2^+$ ), que neste caso atua como eletrófilo (CARDOSO, 2001). O mecanismo baseia-se na substituição de um próton do anel aromático por um eletrófilo. Uma característica marcante deste tipo de reação é que as presenças de determinados ligantes influenciam diretamente a posição em que ocorrem as substituições. No caso deste trabalho, as estruturas contém nitrogênio indólico, o qual atua como um ligante ativante do anel benzênico, isso faz com que os ataques ocorram predominantemente nas posições orto e/ou para, fato que pode ser explicado pelas estruturas de ressonâncias observadas (Figuras 19 e 20).

**Figura 19.** Estruturas de ressonância do núcleo  $\beta$ -carbólico



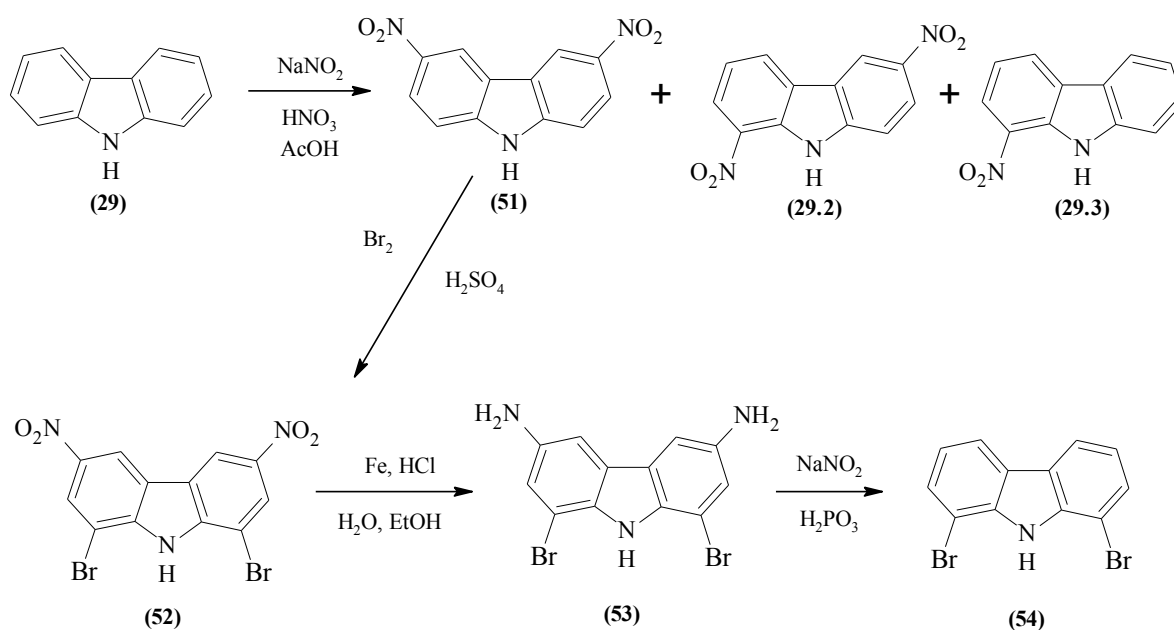
No caso do carbazol sua estrutura simétrica e planar fazem com que a deslocalização do par de elétrons ocorra em todas as posições dos anéis aromáticos, tornando todas as posições susceptíveis ao ataque eletrofílico.

**Figura 20.** Estruturas de ressonância do esqueleto carbazólico



Os estudos de modificações e síntese dos derivados apresentam os mais variados propósitos, como o de Mudadu e colaboradores (2008), no qual foram realizados estudos das propriedades espectroscópicas de derivados carbazólicos, neste trabalho foram descritos as obtenções do 3,6-dinitrocarbazol (rend. 34 %) e dos subprodutos 1-nitro-carbazol (**29.3**) e 1,6-dinitro-carbazol (**29.2**), como intermediários de reação para obtenção do 1,8-dibromo-carbazol (**54**), utilizando a metodologia de nitração a partir de nitrito de sódio e ácido nítrico (Figura 21).

**Figura 21.** Procedimento para obtenção do produto 1,8-dibromo-carbazol



Seguindo esta tendência estão os trabalhos de Bonesi *et al.*, (2004) e Ponce *et al.*, (2001), nos quais os autores realizaram estudos sobre efeito dos substituintes em sistemas carbazólicos e  $\beta$ -carbolicos, além de análise sobre de espectrometria de massas dos principais derivados. Segundo trabalho de Bonazzi e colaboradores (2010) substituintes na posição *N*-2 interferem diretamente na atividade antiplasmodial de derivados de estruturas  $\beta$ -carbolicas como o harmano e análogos, assim como a adição de substituintes halogenados na posição C-6 e adição de cadeias alquílicas no nitrogênio piridínico.

Em Wahba e Hamman (2012) foram realizados estudos de rotas sintéticas utilizando metais como zinco, paládio para redução de nitro-arenos, ou seja, neste trabalho os derivados nitrados também são apenas intermediários de reação. Em Drancynski e colaboradores (2007) foram realizadas modificações em estruturas carbazólicas e derivados da elipticina, como bromação e nitração. Apesar de muitos trabalhos realizados com enfoque puramente químico, muitos derivados destes tipos de esqueletos são conhecidos devido as suas atividades biológicas, e nesta linha trabalhos como de Kimura e colaboradores (2011) descreve a síntese de vários derivados carbazólicos *N*-substituídos e o estudo *in silico* e celular dos derivados contra doenças de prion (encefalopatas espongiformes transmissíveis-EET), com as síndromes de Creutzfeldt-Jakob entre outras, ou no trabalho de Rodriguez-Sanz *et al.*, (2015), no qual foram obtidos vários derivados sintéticos com esqueletos complexos, a partir de compostos como harmina e harmol, entre outros para avaliação da atividade antiinflamatória. Em Lan e colaboradores (2014) os derivados de esqueletos  $\beta$ -

carbolínicos foram sintetizados e testados para inibição de enzimas relacionadas no tratamento da doença de Alzheimer. Em todos os trabalhos foram obtidos resultados interessante quanto a atividade biológicas destes compostos. De maneira geral, a maioria dos derivados obtidos neste trabalho não são os produtos finais descritos na literatura e sim intermediários de sequência sintética.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar derivados  $\beta$ -carbolínicos e carbazólicos e avaliar o seu potencial antimalárico *in vitro*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar derivados a partir dos padrões comerciais de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos harmina, harmalina, norharmano e harmano;

Sintetizar derivados a partir do padrão comercial carbazol;

Sintetizar análogos de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos aplicando a reação de Pictet-Spengler;

Avaliar a atividade antimalárica *in vitro* contra *P. falciparum* dos derivados obtidos;

Avaliar a citotoxicidade dos derivados em linhagens de células não tumorais.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

As substâncias comerciais triptofano (**7**), norharmano (**23**), harmina (**24**), harmano (**25**), harmalina (**27**) e carbazol (**29**), foram obtidos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich- Brasil. Não houve purificação prévia antes das reações. As reações foram todas monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica gel 60F<sub>254</sub> (Merck), utilizando luz UV ( $\lambda$  254 e 365 nm) e reveladores, soluções de *p*-anisaldeído e dragendorff. As purificações dos produtos obtidos foram realizadas por técnica de cromatografia clássica e recristalização.

Dados sobre a pureza e massa dos produtos foram gerados por ultra fast liquid chromatography (UFLC) da marca Shimadzu acoplada a espectrometria de Massas (MS) de marca Bruker Daltonics, modelo micrOTOF com analisador Time – of - flight de

alta resolução e fonte de ionização eletrospray (ESI), ou espectrometria de massas (Bruker Daltonics), modelo AmaZon (tempo de voo) com analisador ion-trap de baixa resolução.

Equipamento de ressonância magnética nuclear marca Bruker Biospin, modelo Fourier 300 MHz de 7,0 T, operando em 300 MHz para núcleos de  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ , foi utilizado para a caracterização dos materiais de partida e produtos obtidos. Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio, acetona, metanol, dimetilsulfóxido e água. E o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno. Os espectros foram processados no programa Bruker TopSpin 3.5, versão gratuita.

#### 4 PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM/INPA), no Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA) e no Laboratório de Química Inorgânica da University de Helsinki como parte do projeto Vaikutus - INPA/Brasil-Universidade de Helsinki/ Finlândia. As análises de ressonância magnética nuclear, cromatografia líquida e espectrometria de massas foram realizadas no Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CALTQPN/INPA). Os testes antimaláricos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultivo de *Plasmodium falciparum* (Laboratório de Malária e Dengue) no INPA, pela supervisão do Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva e Jaqueline Siqueira Costa. Os testes citotóxicos realizados no laboratório BIOPHAR na Universidade Federal do Amazonas, sob supervisão do prof<sup>o</sup>. Dr. Emerson Silva Lima e prof<sup>a</sup>. Dra. Marne C. Vasconcelos.

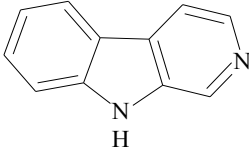
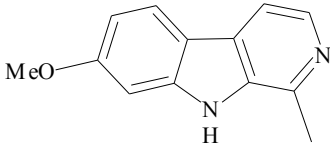
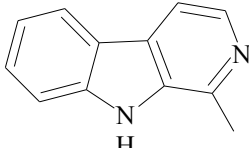
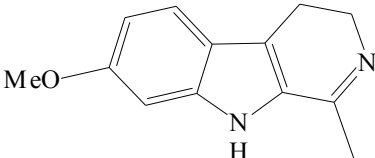
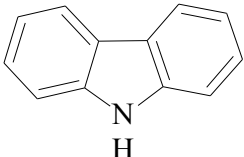
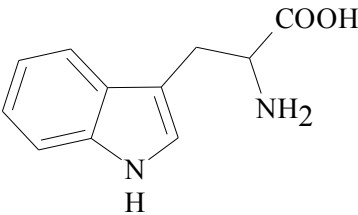
Foram utilizados seis materiais de partidas diferentes no desenvolvimento deste trabalho, os dados de fórmula molecular (F.M), massa molecular (M.M) e estrutura são mostrados na tabela 2. As reações foram executadas inicialmente em escala de miligrama de material de partida (entre 1,0 - 10 mg) e monitoradas por CCD e UFLC/HRMS-ESI, com o objetivo de desenvolver metodologias que levassem aos melhores rendimentos e reprodutibilidade. Após essa fase foram repetidas as reações com maior massa (entre 100 – 1000 mg) para obtenção de material suficiente para realização dos testes biológicos e as análises espectroscópicas. Os produtos obtidos foram purificados por CC (cromatografia de coluna), CCDP (cromatografia de camada delgada preparativa) e recristalização a quente (VOGUEL, *et al.*, 1996) e a frio (Cunha, 2008). A identificação estrutural foi realizada por RMN unidimensional de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e bidimensional HMBC e HSQC, além de



espectrometria de massas. Os solventes utilizados nas análises de UFLC foram acetonitrila e metanol, água e ácido fórmico (HCOOH) e como calibrante o formiato de sódio (10 mM).

**Tabela 2.**

Dados químicos e estrutura dos materiais de partida utilizados no trabalho

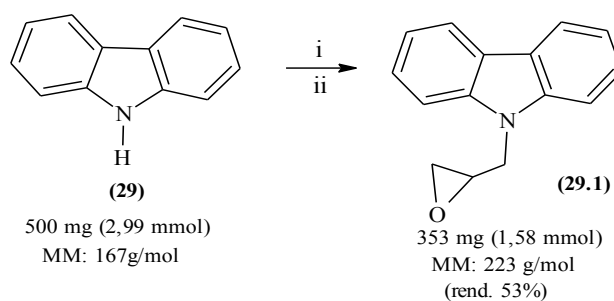
Estrutura	Nome / n°/ Dados químicos
	<p>Norharmano (<b>23</b>) F.M: C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub> M.M: 168,1946</p>
	<p>Harmina (<b>24</b>) F.M: C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O M.M= 212,2471</p>
	<p>Harmano (<b>25</b>) F.M: C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O M.M= 182,2212</p>
	<p>Harmalina (<b>27</b>) C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O M.M= 214,2630</p>
	<p>9H-Carbazol (<b>29</b>) F.M: C<sub>12</sub> H<sub>9</sub> N M.M= 167.2100</p>
	<p>Triptofano (<b>7</b>) F.M: C<sub>11</sub> H<sub>12</sub> N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> M.M= 204,2255</p>

## 4.1 REAÇÕES DE *N*-ALQUILAÇÃO

### 4.1.1 *N*-alquilação do Carbazol

O carbazol (500 mg; 2,99 mmol) foi suspenso em DMF (2 mL) e misturado a uma solução contendo NaH (dispersão em hexano 60%) (80 mg; 1:1 equiv.) em DMF (1 mL), a 0°C, em atmosfera de argônio. A reação foi agitada por 1 h em temperatura ambiente, em seguida foi adicionada a epícloridrina (0,261 mL; 3,33 mmol) a 0°C. A mistura foi mantida sob agitação por 12 h a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com adição de H<sub>2</sub>O destilada e extraída exaustivamente com DCM. A fase orgânica seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e rotaevaporada a vácuo (KIMURA *et al.*, 2011). A mistura reacional foi submetida à cromatografia de coluna (CC) em sílica gel *flash* 60 (0,040-0,0063 mm *mesh*) utilizando os sistemas de solventes Hex:Et<sub>2</sub>O, nas proporções 9:1 e 6:4, foram gerados 10 frações. O produto obtido **29.1** foi um sólido cristalino de cor branca. A caracterização foi realizada por análises de UFLC/HRMS-ESI (ANEXO 7), sob fluxo 0,4 mL/min, injeção 0,5 µL, e RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C unidimensional (ANEXO 8 e 9), cujos espectros foram obtidos em acetona-*d*<sub>6</sub>.

**Figura 22.** Condições reacionais para a obtenção do 9-(2,3-epoxipropil)-carbazol (**29.1**) a partir do carbazol (**29**)



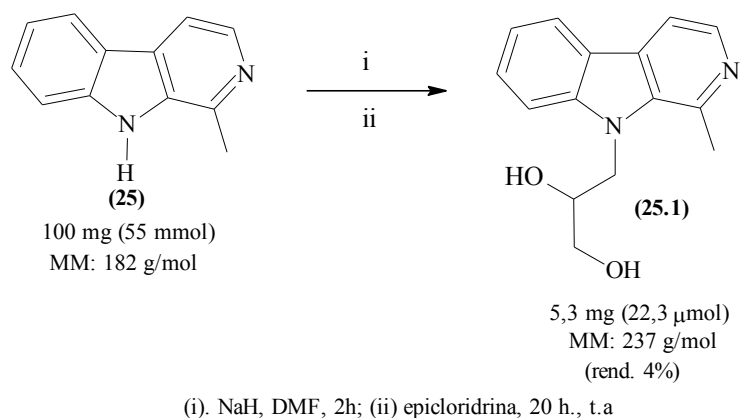
(i). NaH, DMF, 1h; (ii) epícloridrina, 12 h., t.a

### 4.1.2 *N*-alquilação do harmano

Foi preparado uma solução de harmano (100 mg, 0,55 mmol) em DMF seco (400 µL), a 0 °C, em seguida foi preparada uma suspensão de NaH 60% (1,1 equiv) em DMF seco (1000 µL) gelado. A solução foi agitada por 2 horas a temperatura ambiente, em atmosfera de argônio. Logo após foi adicionada a epícloridrina (200 µL) e a mistura foi agitada a temperatura ambiente por 20 horas. A reação foi interrompida com água destilada gelada e extraída exaustivamente com CHCl<sub>3</sub>. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro (MgSO<sub>4</sub>) e rotaevaporada. A mistura foi submetida à cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) em AcOet:MeOH: Et<sub>3</sub>N (7,6:1,6:0,8), foram obtidas 5

frações. O produto obtido **25.1** foi um sólido cristalino de coloração branca na forma de agulhas, o qual foi analisado por UFLC/HRMS-ESI, nas condições de fluxo 0,4 mL/min, injeção do volume da amostra de 0,5µL (ANEXO 10). Elucidação estrutural foi realizada por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (ANEXO 11-13). As outras 4 frações retiradas da CCDP foram submetidas a técnicas de recristalização (SHI *et al.*, 2013), e técnicas de cromatografia clássica CC e CCDP, no entanto não foi possível separar a mistura.

**Figura 23.** Condições reacionais para a obtenção do 9-(2,3-diidroxipropil)-harmano (**25.1**) a partir do harmano (**25**)



O mesmo procedimento foi aplicado para harmalina, harmina, mas não houve formação de produtos de acordo com análises de RMN de  $^1\text{H}$ . O procedimento foi repetido variando o tempo de reação, tanto na primeira etapa ( $\beta$ -carbolínicos + base) quanto da segunda (adição da epícloridrina), mas não houve sucesso. Assim como o uso de bases mais fortes como butil-lítio (BuLi), também não foi obtido grande sucesso, já que não foi possível fazer o isolamento dos derivados utilizando as técnicas clássicas.

## 4.2 REAÇÃO DE NITRAÇÃO

### 4.2.1 Nitração dos $\beta$ -carbolínicos

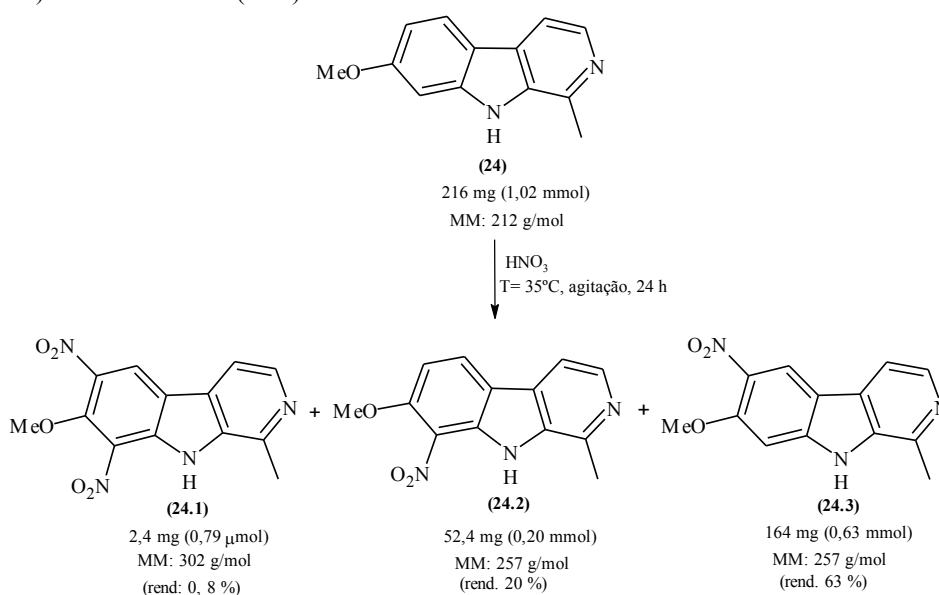
Foram testados vários métodos para a obtenção dos derivados nitrados dos  $\beta$ -carbolínicos até se determinar uma, a qual foi utilizada com todos os padrões comerciais. Dentre os métodos testados a que apresentou melhor resultado foi a nitração realizada apenas com a adição de  $\text{HNO}_3$ , controle da temperatura e tempo de reação (RODRIGUEZ-SANZ *et al.*, 2015). Os acompanhamentos das reações testes foram através de CCD e UFLC/MS de baixa resolução. A cada 12 horas uma alíquota da reação era submetida a análises, para observar a evolução e determinar os tempos de cada reação, o tempo máximo

de acompanhamento foi 120 horas. A nitração foi realizada com os padrões: norharmano (**23**), a harmina (**24**), o harmano (**25**) e com a harmalina (**27**). De maneira geral, os procedimentos pós-reacionais foram similares a todas as reações. Foram realizados com neutralização do meio através de um solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  saturada até pH  $\sim 10$ , com a neutralização ocorre a formação de precipitado sólido, o qual foi filtrado e seco em vidro de relógio. Nos casos em que não ocorreram formação de precipitado, a extração foi realizada por partição com acetato de etila (AcOEt) ou diclorometano (DCM) ou clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ). As purificações foram realizadas por CC com sílica gel e diferentes solventes orgânicos.

#### 4.2.2 Nitração da harmina

Foi preparada uma suspensão de harmina (216 mg, 1,01 mmol) em  $\text{HNO}_3$  concentrado (3 mL), a mistura foi mantida em aquecimento ( $35^\circ\text{C}$ ) e agitação por 24 horas. O pós-reacional foi descrito no item 4.2.1. A purificação foi realizada por CC ( $\phi \times h$  de 2,5 x 16 cm) em sílica gel *flash* 60 (0,040-0,0063 mm *mesh*). A eluição foi realizada em AcOEt puro, resultando em 10 frações, das quais foram obtidos 3 produtos o **24.1**, **24.2** e **24.3**. Todos foram submetidos a análises de UFLC/HRMS-ESI, cujas condições encontram-se nos anexos, produto **24.1** (ANEXO 14), **24.2** (ANEXO 17) e **24.3** (ANEXO 20). A elucidação estrutural foi realizada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , HMBC (ANEXOS 15-16 / 18-19 / 21-22).

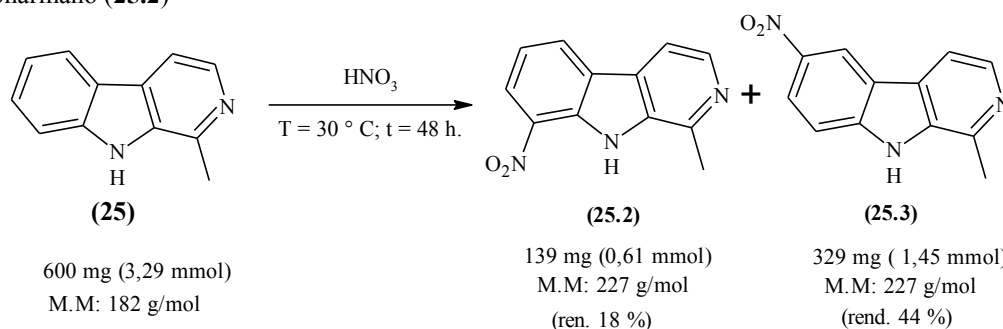
**Figura 24.** Condições reacionais de nitração da harmina e formação de 6,8-dinitroharmina (**24.1**), o 8-nitroharmina (**24.2**) e 6-nitroharmina (**24.3**)



### 4.2.3 Nitração do harmano

Foi preparada uma suspensão com harmano (600 mg; 3,29 mmol) em HNO<sub>3</sub> (6 mL). A mistura foi levada para o ultrassom por alguns minutos para solubilização da amostra. Logo em seguida foi aquecida em banho de areia a 30°C, onde permaneceu sob agitação. A reação foi interrompida e neutralizada por adição de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturada até pH ~10 e segue o procedimento descrito no item 4.2.1. A mistura pós-reacional foi submetida a análises em UFLC/HRMS-ESI, sob as condições de fluxo 0,4 mL/min, pressão de 2985 psi e concentrações de C = 0,5 mg/mL em ACN/MeOH (1:1) (ANEXOS 23 e 26) para ambos os produtos (**25.2** e **25.3**). A purificação foi realizada por CC ( $\phi$  x h de 2,5 x 16 cm) em sílica gel *flash* 60 (0,040-0,0063 mm *mesh*), utilizando o sistema de solventes CHCl<sub>3</sub>: MeOH (9,5:0,5).

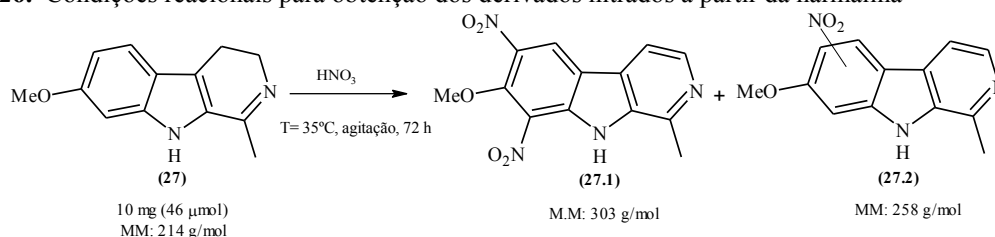
**Figura 25.** Condições reacionais para obtenção dos derivados nitrados do harmano, o 8-nitro-harmano (**25.1**) e o 6-nitroharmano (**25.2**)



### 4.2.4 Nitração da harmalina

Baseado no procedimento já descrito para os outros  $\beta$ -carbolínicos, o diferencial foi o tempo reacional, que neste caso foram 72 h. Foi preparada uma suspensão de harmalina (10 mg, 46  $\mu$ mol) em HNO<sub>3</sub> concentrado (500  $\mu$ L), a mistura foi mantida em aquecimento (35°C) e agitação por 72 h. O pós-reacional foi descrito no item 4.2.1. A mistura foi analisada em UFLC/HRMS-ESI (ANEXO 29), sob as condições de fluxo 0,4 mL/min, volume de injeção da amostra 0,5  $\mu$ L, pressão de 2685 psi e concentração da amostra C = 1mg/mL em ACN/MeOH (1:1).

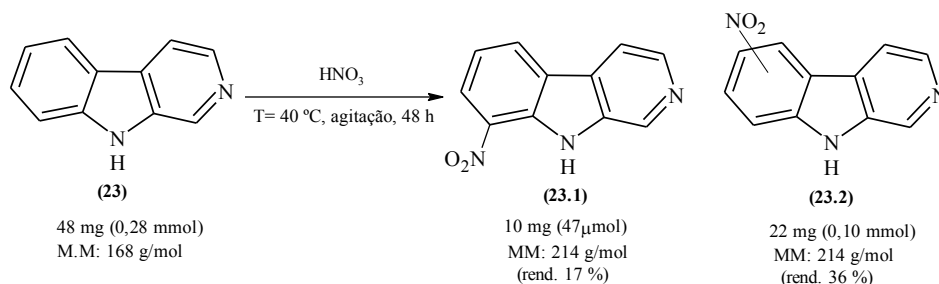
**Figura 26.** Condições reacionais para obtenção dos derivados nitrados a partir da harmalina



#### 4.2.5 Nitração do Norharmano

Foi preparada uma suspensão de norharmano (48 mg, 0,28 mmol) em HNO<sub>3</sub> concentrado (1000 µL), a mistura foi mantida em aquecimento (40°C) e agitação por 48 h.. A mistura reacional foi submetida a cromatografia de coluna (φ x h de 2,5 x 16 cm) em sílica gel *flash* 60 (0,040-0,0063 mm *mesh*), o solvente utilizado foi AcOEt puro. Foram obtidos dois produtos **23.1** e **23.2**, ambos analisados UFLC/HRMS-ESI, submetidos as mesmas condições: fluxo = 0,4 mL / min, pressão de 2731 psi, C = 1mg/mL em MeOH e injeção de 1µL. A análise em CCD, utilizando acetato de etila resultou nos R<sub>F</sub> 0,57 para o produto **23.1** e R<sub>F</sub> 0,38 para o produto **23.2**.

**Figura 27.** Condições reacionais para nitração do norharmano: 8-nitronorharmano (**23.1**) e um isômero nitrado (**23.2**)

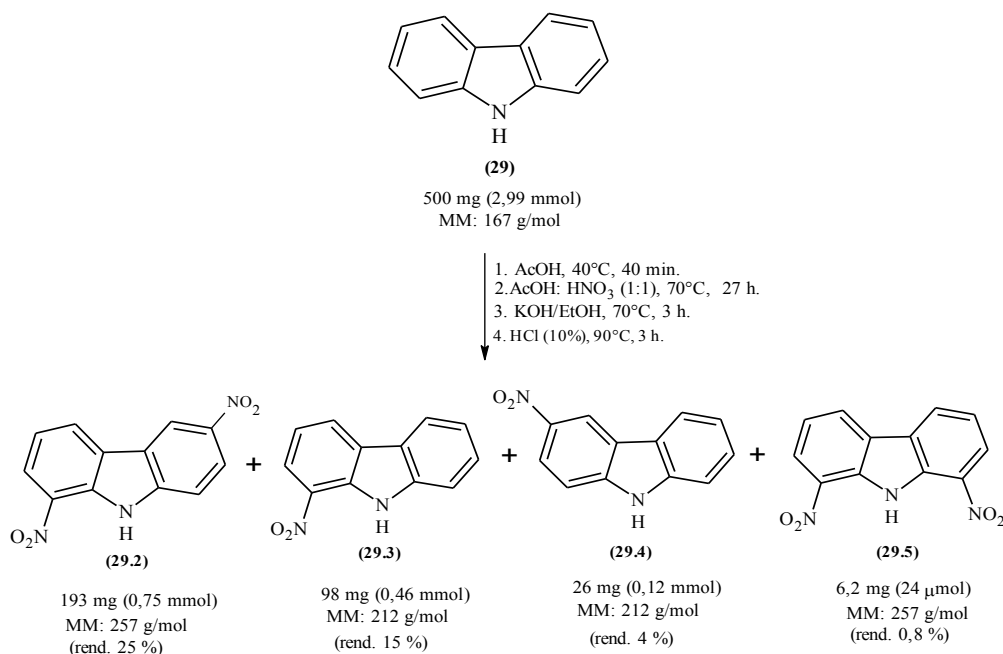


#### 4.2.6 Nitração carbazol

A reação foi conduzida baseada no procedimento descrito por Mudadu e colaboradores (2008). O carbazol (502 mg, 3 mmol) foi dissolvido em ácido acético glacial (3 mL) com auxílio de um banho de ultrassom (~40 min) a temperatura de 40°C. A mistura foi levada para o banho de gelo e sobre ela gotejado 1 mL de AcOH:HNO<sub>3</sub> (1:1). A solução foi mudando de cor, passando de branca opaca para verde, em seguida a mistura foi levada para aquecimento (T = 100°C) em banho de areia, onde permaneceu sob agitação por 3h. Logo após, o aquecimento foi desligado e a reação continuou à temperatura ambiente por mais 24 h. Para interromper a reação adicionou-se H<sub>2</sub>O destilada gelada. O sólido formado foi filtrado e transferido para um erlenmeyer, no qual foi adicionado aproximadamente 7 mL de uma solução KOH/EtOH (60 g/L). A mistura ficou sob agitação por 3 h a 70°C (mistura de cor vermelha intensa). Em seguida foram adicionadas gotas de HCl aquoso (10% m/m) até sumir a coloração vermelha, a reação continuou sob agitação a 90°C por 3 h. Após esse tempo, a reação foi interrompida com H<sub>2</sub>O destilada e o sólido formado foi filtrado e transferido para um vidro de relógio e seco a temperatura ambiente. O sólido obtido após o

procedimento acima foi submetido várias CC em sílica gel *flash* 60 (0,040-0,0063 mm *mesh*) e sistemas de solventes variados.

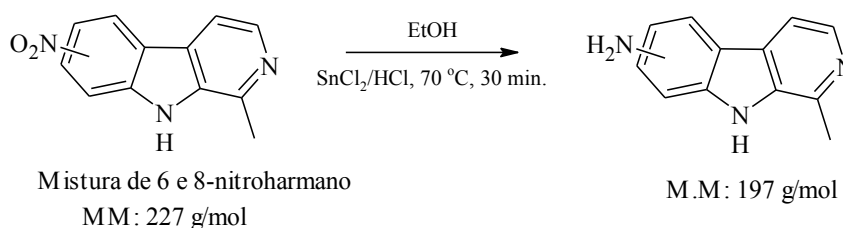
**Figura 28.** Condições reacionais para obtenção dos nitro-carbazóis e dinitro-carbazóis a partir do carbazol



#### 4.2.7 Redução do 6-nitroharmano e 8-nitroharmano

Para a redução dos grupos nitro a amino, foi preparada uma suspensão com a mistura de 6 e 8-nitroharmano (43,5 mg) em 500 μL de etanol. Em seguida houve a adição de uma solução de cloreto de estanho II (82,9 mg) em HCl (600 μL) e etanol (200 μL). A reação permaneceu em agitação e aquecimento de 70°C por 30 min. Em seguida foi interrompida pela adição de uma solução saturada de NaOH até atingir pH ~13. Os produtos foram extraídos da fase aquosa com AcOEt (SNYDER *et al.*, 1948). A mistura reacional foi analisada em UFCL/HRMS-ESI nas condições de fluxo = 0,4 mL/min, pressão de 2974 psi e concentração da amostra C = 0,5 mg/mL em ACN/MeOH e injeção de 0.5 uL (ANEXO 40). A tentativa de purificação foi realizada através de lavagem com água destilada.

**Figura 29.** Condições reacionais para redução dos grupos nitros



### 4.3 SAIS DE HCL

#### 4.3.1 Harmina

Foi preparado uma solução de 10 mg do padrão harmina em Et<sub>2</sub>O: DCM: MeOH (6,7:1,1:2,2), com ajuda de banho de ultrassom. Após a dissolução da substância foi borbulhado HCl, obtido através da reação entre NH<sub>4</sub>Cl e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fulmegante. Após alguns minutos de borbulhamento a solução ficou turva e houve a formação de cristais. O solvente foi evaporado a temperatura ambiente. Os sais foram codificados por HA.HCl (**24.4**) (ANEXO 41).

**Figura 30.** Sistema de borbulhamento para obtenção de HCl gasoso



### 4.4 REAÇÃO DE O-DESMETILAÇÃO

#### 4.4.1 Harmina e harmalina

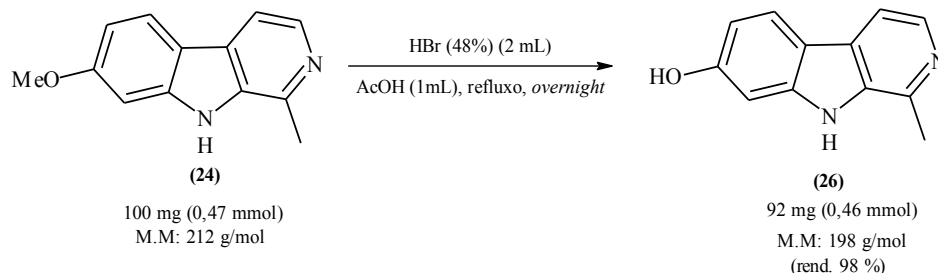
As reações de *O*-desmetilação da harmina e harmalina foram conduzidas utilizando o mesmo método. Foram preparado uma solução de harmina e outra de harmalina, com ácido acético glacial e HBr (48%). As misturas permaneceram em refluxo e agitação por 12 horas. Em seguidas a misturas foram transferidas para um vidro de relógio, e o solvente evaporado. Durante a evaporação as misturas formam cristais que foram lavados com água destilada e seco a temperatura ambiente. Não foi necessária a purificação (RENIERS *et al.*, 2011).

As massas utilizadas de cada material de partida e outros detalhes do experimento estão descritos nas figuras 31 e 32. Os produtos foram analisados por UFLC/HRMS-ESI, as condições específicas para cada padrão foram: Produto da *O*-desmetilado da harmina (**26**): fluxo = 0,4 mL/min, pressão de 3780 psi, concentração da amostra C = 0,3 mg/mL em

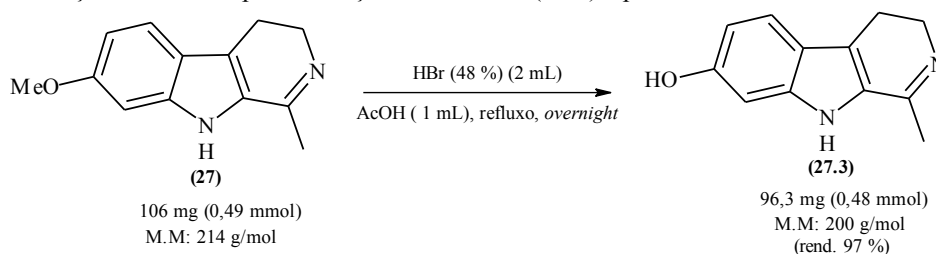


MeOH, injeção = 0.5 uL (ANEXO 42). Produto da *O*-desmetilado da harmalina (**27.3**): mesmas condições citadas para o produto **26**, exceto pelo fluxo que foi de = 0,2 mL/min (ANEXO 45).

**Figura 31.** Condições reacionais para obtenção do harmol (**26**) a partir da harmina



**Figura 32.** Condições reacionais para obtenção do harmalol (**27.3**) a partir da harmalina

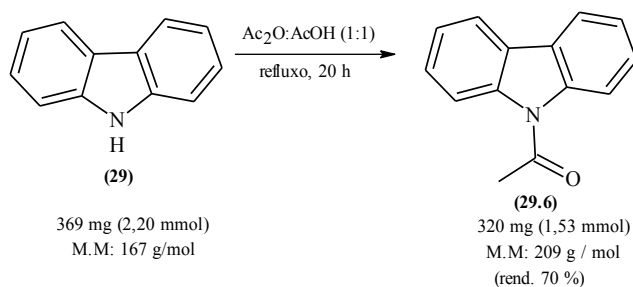


## 4.5 REAÇÃO DE ACETILAÇÃO

### 4.5.1 Acetilação do carbazol

O carbazol (369 mg, 3,20 mmol) foi suspenso em uma solução de 5 mL de (AC)<sub>2</sub>O : AcOH (1:1). A mistura foi submetida a agitação e refluxo por 20 h. A reação foi interrompida com água destilada gelada e permaneceu em geladeira por 24 h. O precipitado formado foi filtrado e seco em vidro de relógio à temperatura ambiente. A purificação foi realizada por CC *flash* ( $\phi$  x h de 2,5 x 16 cm) com sílica gel 60 (0,040-0,0063 mm *mesh*). O sistemas de solventes foram Hex (100 %) e depois Hex: DCM (8:2). O produto (**29.6**) foi um sólido branco cristalino. O procedimento foi adaptado da literatura de NIZAMI e colaboradores (2012). O produto foi analisado por UFLC/HRMS-ESI (ANEXO 48).

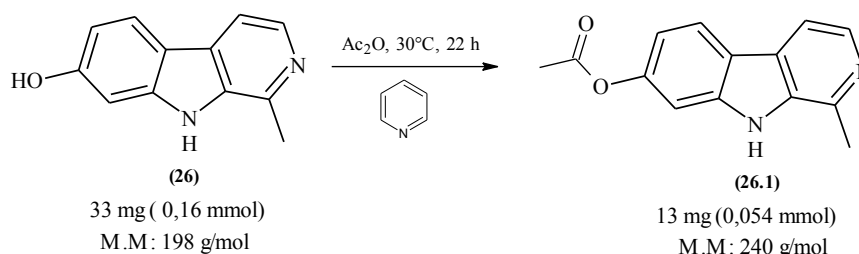
**Figura 33.** Condições reacionais para obtenção do *N*-acetil-carbazol (**29.6**) a partir do carbazol



#### 4.5.2 Acetilação do harmol, harmalol

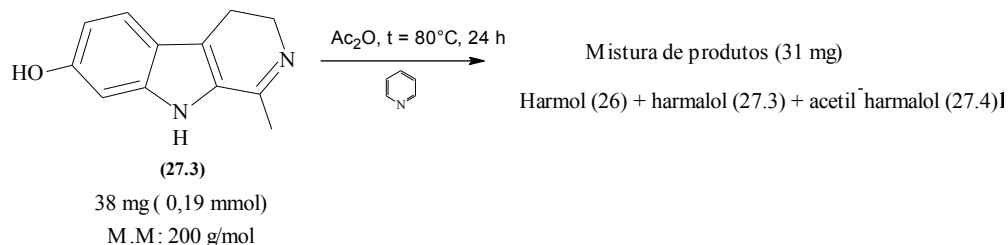
O harmol (33 mg, 0,16 mmol) foi suspenso em piridina (300  $\mu$ L) e logo em seguida foi adicionado 300  $\mu$ L de anidrido acético a 0°C. A mistura foi mantida em agitação à temperatura de 30°C por 22 h. Para auxiliar a evaporação da piridina foi adicionado tolueno, o qual forma uma mistura azeotrópica piridina-tolueno. Este pós-reacional foi adotado após observar que utilizando o procedimento padrão utilizado (neutralização com sol. básica e extração com solvente) ocorria a hidrólise do produto. O produto **26.1** foi purificado por recristalização em pentano, foi obtido um sólido marrom (m = 13 mg). O produto foi analisado por UFLC/HRMS-ESI (ANEXO 51).

**Figura 34.** Condições reacionais para obtenção do *O*-acetil-harmol (**26.1**) a partir do harmol



A acetilação do harmalol foi realizada baseada no procedimento descrito acima. O harmalol (80 mg, 0,47 mmol) foi suspenso em anidrido acético e piridina proporção 2:1 (1000  $\mu$ L : 500  $\mu$ L), a mistura foi mantida sob aquecimento e agitação por 28 h a temperatura de 80 °C, seguida de rotaevaporação. A mistura reacional foi analisada por UFLC/HRMS-ESI sob as condições fluxo de 0,4 mL/min, pressão de 2704 psi e concentração da amostra C = 1mg/mL em MeOH e injeção de 0,5  $\mu$ L (ANEXO 52).

**Figura 35.** Condições reacionais para obtenção do produto acetilado do harmalol (**27.4**)



As literaturas utilizadas como base para as reações foram de BEGUM *et al.* (2004) e PONCE e ERRA-BALSELL (2001) e para técnica de recristalização CUNHA (2008).

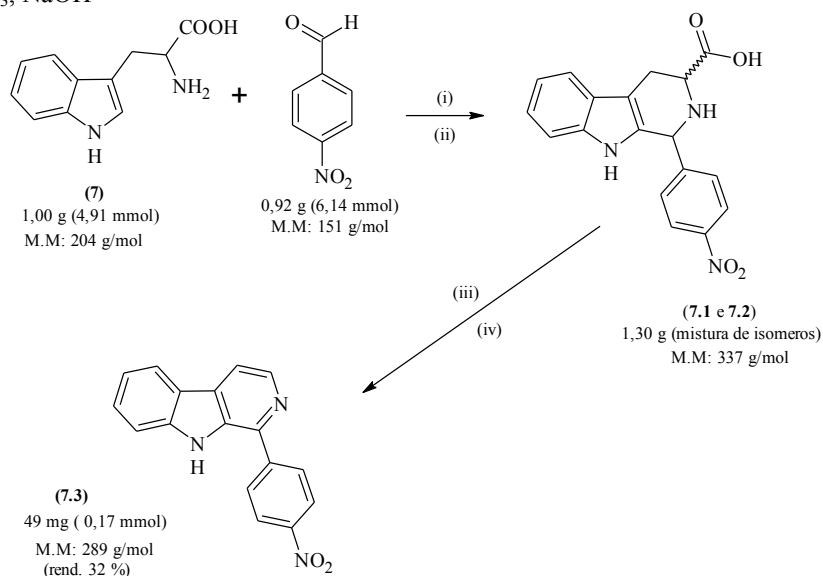
Este e outros procedimentos de acetilação foram testados para os padrões harmano, harmina e harmalina, mas houve sucesso e em nenhum. Para o norharmano foi observado a formação de um produto monoacetilado, mas a estrutura não foi elucidada.

#### 4.6 CONDENSAÇÃO DE PICTET-SPLENGER

O triptofano (1,00 g, 4,91 mmol) foi suspenso em ácido acético (20 mL) e em seguida foi adicionado 4-nitrobenzaldeído (0,92 g, 6,14 mmol). A mistura ficou sob agitação e refluxo por 2 horas. Após o resfriamento da solução, o pH foi ajustado para aproximadamente 6 com solução de NH<sub>4</sub>OH. A mistura foi deixada em repouso em banho de gelo por 1 h. Logo após o sólido foi separado por filtração e lavado com água gelada, procedimento baseado na literatura de LAN *et al.* (2014) e SHI *et al.* (2013) (Figura 36).

A mistura reacional foi analisada por UFLC/HRMS-ESI (ANEXO 53). Na tentativa de purificar os produtos obtidos, cerca de 80 mg da mistura reacional foram submetidos a CC em sílica gel *flash* ( $\phi$  x h de 3,0 x 16 cm) em sistema isocrático AcOEt : MeOH: AcOH (9,5:0,5:0,5). Foram obtidas três frações, codificadas por: TNB23C1 (10,0 mg), TNB23C2 (6,0 mg) e TNB13C3 (40 mg). A última foi submetida a uma nova CC *flash*, utilizando o mesmo sistema de solvente e quatro novas subfrações foram obtidas (TNBAL59\_A até D). Na fração TNBAL59C (7.1 e 7.2), houve a formação de cristais, os quais foram lavados com clorofórmio e produto analisado por RMN <sup>1</sup>H. A segunda etapa da reação envolveu a descarboxilação do anel  $\beta$ -carbolínico e a oxidação dos carbonos C-3 - C-4 do anel. As etapas (iii) e (iv) foram realizadas a partir da mistura dos isômeros *R* e *S* do 3-carboxi-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina (7.1 e 7.2). O procedimento para a oxidação e descarboxilação do anel piridínico foi realizada a partir da solubilização dos isômeros (200 mg, 0,98 mmol) em 2 mL de água aquecida a 100 °C, na solução a quente foi adicionado 0,95 g de dicromato de potássio e 800  $\mu$ L de ácido acético. A suspensão marrom foi agitada e aquecida por 20 min. Logo após o balão foi resfriado em água corrente e o excesso de agente oxidante (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) foi removido com bissulfito de sódio (NaHSO<sub>3</sub>) e alcalinizada com NaOH. A extração foi realizada com AcOEt e a fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A purificação dos produtos foi realizada com cromatografia de coluna em sílica gel *flash*, em DCM e o produto obtido foi analisado por UFLC/HRMS-ESI (ANEXO 54).

**Figura 36.** Condições reacionais (i) AcOH, refluxo, 2h. (ii) NH<sub>4</sub>OH, 0 °C, (iii) K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, AcOH, 100 °C, 20 min. (iv) NaHSO<sub>3</sub>, NaOH



#### 4.7 TESTES ANTIMALÁRICOS

Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultivo de *Plasmodium falciparum*/Laboratório de Malária e Dengue, localizado no INPA, pelas bolsistas (Mestre em Ciências Jaqueline Siqueira Costa e colaboradores). Os padrões harmina (**24**), harmano (**25**), harmalina (**27**) e carbazol (**29**), o sal de harmina (**24.4**), foram testados pela Mestre em Ciências Hilkem Gomes Alves e Suelen Michile Monteiro (IC-CNPQ), e fizeram parte dos resultados da sua dissertação de mestrado pelo programa de Pós-graduação em Farmácia da UFAM (ALVES, 2016).

As substâncias foram analisadas frente à cepa K1 multi-resistente K1 (MRA-159, MR4, ATCC Manassas Virginia-EUA) de *P. falciparum*. A cepa foi mantida em cultivo contínuo de acordo com a método de Trager e Jensen (1976). O período de incubação do parasita com os derivados foi de 24 horas a temperatura de 37°C. Os controles positivo utilizados foram os padrões comerciais cloroquina e quinina. Para o microteste foi utilizada uma parasitemia inicial de 1 – 2% e hematócrito de 3%. As substâncias foram diluídas em DMSO na concentração estoque de 5 mg/mL, e posteriormente diluídas em meio completo para obtenção das sete concentrações de teste que variaram entre 50 e  $3,2 \times 10^{-3}$  µg/mL. O teste foi realizado como descrito por Andrade-Neto *et al.*, (2007). As diluições das amostras foram aplicadas em poços de micro-placa contendo hemácias parasitadas. Cada concentração foi testada em triplicata. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi avaliado através de microscopia óptica e o efeito parasitário avaliado pela porcentagem de inibição do

crescimento do protozoário. A inibição do crescimento dos parasitos foi determinada pela comparação com os controles de crescimento sem amostra, segundo a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia com amostra}) \times 100}{\text{parasitemia do controle}}$$

Para os testes *in vitro*, o software Microcal Origin foi utilizado na interpolação dos dados para determinação da concentração inibitória mediana (CI<sub>50</sub>). E cada experimento foi realizado em duplicata. Três experimentos independentes foram realizados. O software usado nas análise estatística dos dados de testes será o Biostat 1,0 MCT-CNPq usando Anova e t-Student .

As substâncias passam por uma triagem inicial através do *screening* em duas concentrações 5 e 50 µg/mL, seguindo as condições descritas acima e recebem uma classificação em relação a porcentagem de inibição do crescimento do parasito, como ativas (A) parcialmente ativas (PA) e inativas (I), esta classificação segue os critérios determinados por Rocha e Silva e colaboradores (2015). A partir deste teste, as substâncias consideradas parcialmente ativas e ativas são reavaliadas para determinar o CI<sub>50</sub> (concentração inibitória matar 50% dos parasitas).

#### 4.7.1 Ensaio de viabilidade celular (citotóxico)

Os testes foram realizados no laboratório BIOPHAR/UFAM em colaboração como o Dr. Emerson Silva Lima. A citotoxicidade foi avaliada pelo método de alamar blue segundo NAKAYAMA *et al.* (1997). Neste ensaio foram utilizados fibroblastos humanos não tumorais (MRC-5). Os fibroblastos foram cultivados na concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas são tratadas com os compostos na concentração de 50 µg/mL. As células são tratadas em quadruplicata para cada período de tratamento (24, 48 e 72 h). Como controle positivo, foi avaliada a citotoxicidade da doxorrubicina (5 µg/mL) e como controle negativo foi avaliado o branco contendo somente meio de cultura. Para avaliar a influência do diluente DMSO, foi realizado um controle contendo somente DMSO. Após o período de tratamento (24, 48 e 72 horas) foi adicionado 10 µL de resazurina 0,4% (diluída 1:20). Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado, que compreende 2 h, foi realizada a leitura da fluorescência, utilizando o aparelho de microplacas (DTX-800 Beckman Coulter) na faixa de

540 nm excitação e 585 nm de emissão. A viabilidade é calculada conforme a fórmula abaixo, onde:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{Ft \times 100}{\Delta Fb}$$

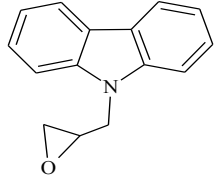
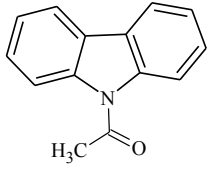
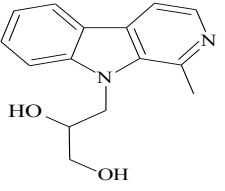
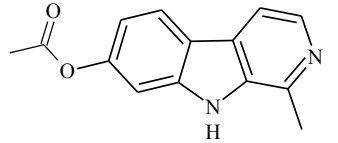
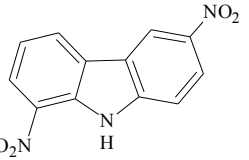
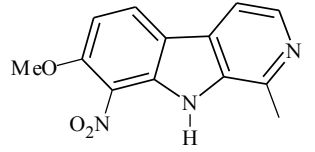
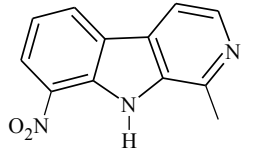
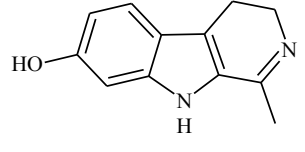
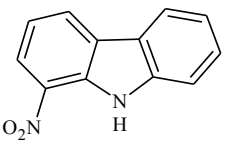
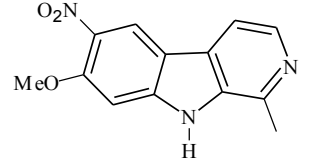
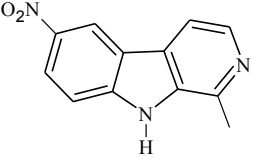
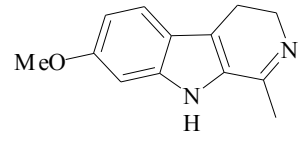
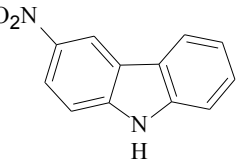
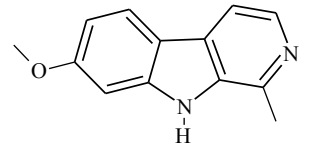
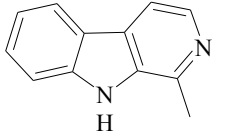
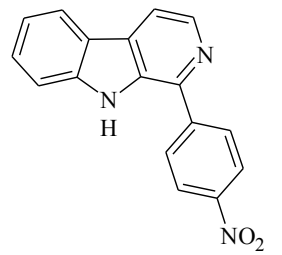
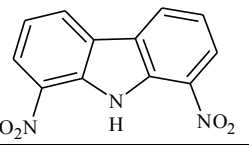
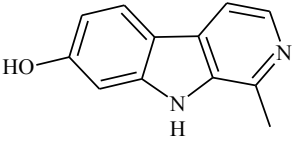
Ft= (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e

$\Delta Fb$ = (fluorescência da célula + meio + resazurina).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos as substâncias comerciais foram submetidos a análises de ressonância magnética nuclear unidimensional  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e/ou HSQC (bidimensional) e os dados obtidos encontram-se como anexo deste trabalho (ANEXO 1- 6). E os ensaios *in vitro* (*P. falciparum*) e citotóxicos (fibroblastos humanos) foram realizados com todos os derivados identificados e com cinco substâncias comerciais.

**Tabela 3.** Derivados sintéticos identificados e caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e UFLC/HRMS-ESI e testados contra *P. falciparum*

9-(2,3-epoxy)-carbazol ( <b>29.1</b> )	<i>N</i> -acetil-carbazol ( <b>29.6</b> )	9-(2,3-dihidropiril)-harmano ( <b>25.1</b> )	<i>O</i> -acetil-harmol ( <b>26.1</b> )
			
1,6-dinitrocarbazol ( <b>29.2</b> )	8-nitroharmina ( <b>24.2</b> )	8-nitroharmano ( <b>25.2</b> )	Harmalol ( <b>27.3</b> )
			
1-nitrocarbazol ( <b>29.3</b> )	6-nitroharmina ( <b>24.3</b> )	6-nitroharmano ( <b>25.3</b> )	Sal de harmalina ( <b>27.4</b> )
			
3-nitrocarbazol ( <b>29.4</b> )	sal de harmina.HCl ( <b>24.4</b> )	Sal de harmano ( <b>25.4</b> )	1- <i>p</i> -nitro-fenil-harmano ( <b>7.3</b> )
			
1,8-dinitrocarbazol ( <b>29.5</b> )		Harmol ( <b>26</b> )	
			

## 5.1 REAÇÕES DE SÍNTESE

### 5.1.1 Reação de *N*-alquilação

A alquilação é uma técnica amplamente estudada devido a sua versatilidade em formar produtos e intermediários de reações, os quais tem grande valor industrial. O processo baseia-se na introdução de grupo alquil ou aril em compostos orgânicos, os tipos mais comuns são: *O*-alquilação, *N*-alquilação e *C*-alquilação. Dois tipos de catálises são utilizados para estes tipos de reação. A catálise ácida ocorre na presença de  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{BF}_3$ , entre outros, que são ácidos de Lewis ou catalisadores de Friedel-Crafts. Nestas reações formam-se carbocátions e a reação ocorre via mecanismo de substituição eletrofílica. Na catálise básica os catalisadores são bases fortes como alcóxidos, amidetos, hidreto, entre outros, que atuam como agentes redutores, formando nucleófilos. Desta forma este tipo de catálise, favorece reações via mecanismo de substituição nucleofílica (CLAYDEN e GREEVES, 2012).

A *N*-alquilação a partir da epiclorigrina gera derivados com grupos epóxidos, que são estruturas altamente susceptíveis a ataques nucleofílicos formando amino-álcoois, ampliando o leque de estruturas possíveis, além disso também possibilitam a polimerização de compostos, formando longas cadeias carbônicas (ANANDKUMAR *et al.*, 2011; KIMURA *et al.*, 2011).

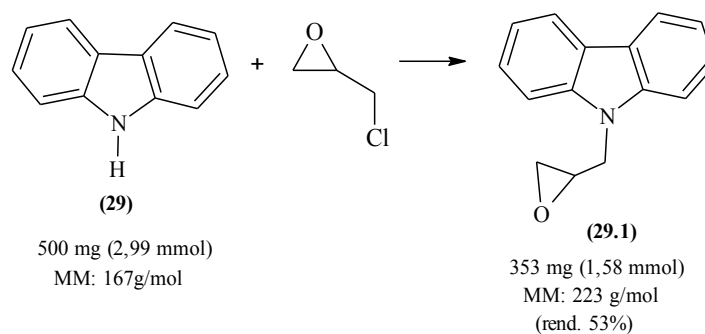
### 5.1.2 *N*-alquil-carbazol

O esqueleto carbazólico é uma estrutura chave para uma grande variedade de compostos semissintéticos, devido a sua planaridade e simetria e tem sido muito utilizado no campo da síntese. Assim como a variedade de estruturas possíveis também são suas aplicações, que vão desde atividades farmacológicas até química de materiais.

Para obtenção do carbazol *N*-alquilado foi necessária a utilização de uma base forte, capaz de abstrair o hidrogênio do nitrogênio indólico e seguida ocorreu a alquilação realizada com a adição da epiclorigrina no meio reacional sob condições estabelecidas (Figura 22). A mistura formada após o procedimento, foi um sólido acinzentado, o qual foi submetido à cromatografia de coluna no sistema de solvente Hex:Et<sub>2</sub>O nos gradientes de 9:1 e 6:4. O produto isolado foi um sólido branco cristalino, enumerado **29.1**, cujo rendimento foi de 53% (353 mg, 1,58 mmol), valor similar ao obtido por Kimura e colaboradores (2011).



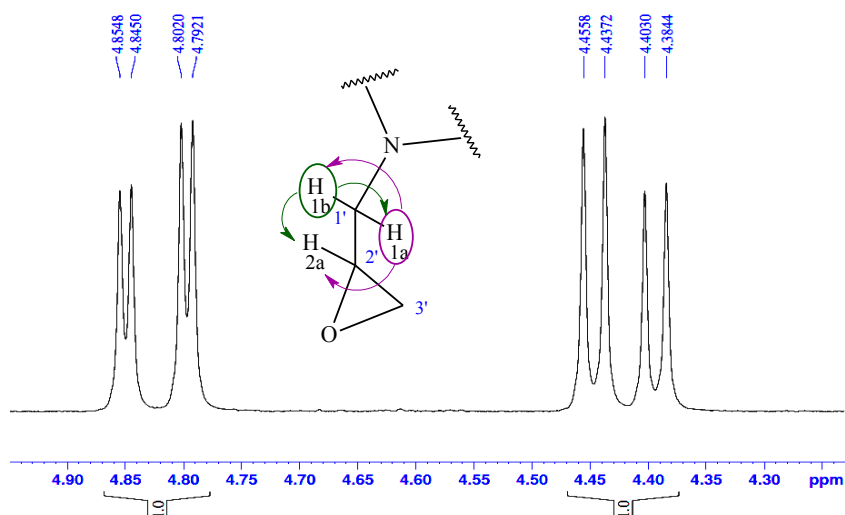
**Figura 37.** Esquema reacional da epoxidação do carbazol (29) e formação do produto *N*-epoxi (29.1)



O produto **29.1** apresentou por UFLC/HRMS-ESI espectro de massas com pico íon molecular  $[M+H]^+$   $m/z$  224,1033 Da e tempo de retenção  $t_r = 6,9$  min (ANEXO 7), condizente com o produto *N*-alquilado 9-(2,3-epoxipropil)-carbazol (valor teórico calculado para  $C_{15}H_{14}NO$   $[M+H]^+$   $m/z$  224,1069 ( $\Delta = 16$  ppm)).

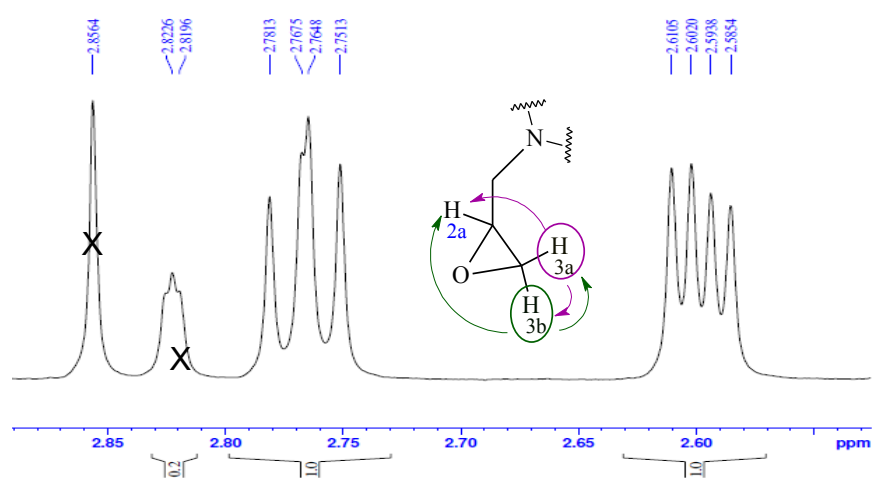
A confirmação da estrutura do produto foi realizada através da análise dos espectros de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  (ANEXOS 8 e 9). Na região alifática do espectro de hidrogênio são observados a presença de cinco sinais, com integração para um hidrogênio cada. Os hidrogênios do anel epóxi-propil não são equivalentes entre si, devido ao centro estereogênico em C-2' os sinais não apresentam deslocamentos químicos diferentes. Na ampliação da região entre os  $\delta$  4,9 e 4,39 (Figura 38) observam-se dois duplo dubletos (*dd*), referentes aos hidrogênios do carbono C-1'. O *dd* em  $\delta$  4,82 com  $J = 15,9$  e 3,0 Hz e o *dd* em  $\delta$  4,42 com  $J = 15,9$  e 5,7 Hz apresentam acoplamento geminal  $J^2$  (15,9 Hz) e acoplamento vicinal  $J^3$  (valores menores).

**Figura 38.** Ampliação do espectro de RMN  $^1H$  (300 MHz) em acetona- $d_6$ , da região entre  $\delta$  4,39 e 4,90 do produto **29.1**



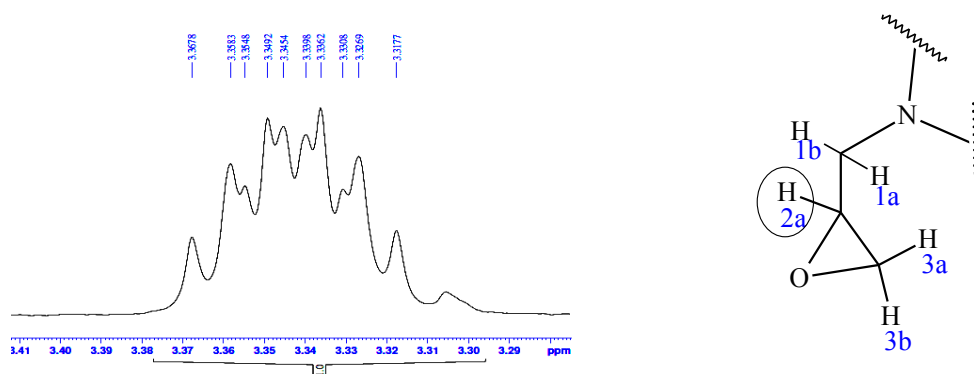
Em  $\delta$  2,76 observa-se um duplo de dubleto (*dd*), referente ao hidrogênio H<sub>3b</sub>. As constantes encontradas foram de  $J = 5,0$  e  $4,0$  Hz consistentes com acoplamento geminal entre H<sub>3b</sub> e H<sub>3a</sub> e acoplamento *cis* com H<sub>2a</sub>, respectivamente (Figura 39). O sinal em  $\delta$  2,60 foi atribuído ao H<sub>3a</sub>, também é um *dd* com  $J = 5,0$  e  $2,7$  Hz, devido ao acoplamento geminal com H<sub>3b</sub> e ao acoplamento em *trans* com H<sub>2a</sub>. Os sinais em  $\delta$  2,85 e 2,82 são resquícios de impureza da amostra e do solvente deuterado.

**Figura 39.** Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) em acetona-*d*<sub>6</sub>, da região entre  $\delta$  2,57 e 2,80 do produto **29.1**



Em  $\delta$  3,34, observa-se um multipletto (*m*) ou um *dddd* complexo referente ao hidrogênio H<sub>2a</sub>, que acopla com os quatro hidrogênios vizinhos do epóxi-propil (Figura 40).

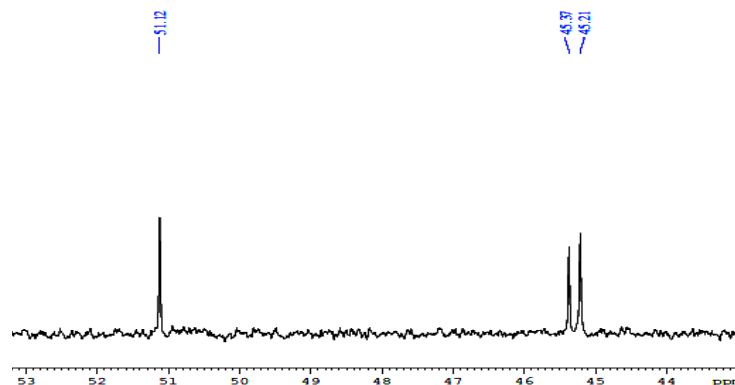
**Figura 40.** Ampliação do espectro RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) em acetona-*d*<sub>6</sub>, região  $\delta$  3,30 a 3,40 do produto **29.1**



Os hidrogênios na região aromática permaneceram similares aos observados no carbazol, como mesmo padrão de integração e multiplicidade (Tabela 4). No espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz) foram observados nove sinais de carbonos referentes produto **29.1**, sendo que seis sinais encontram-se na região aromática, como no material de partida e os

outros três apresentam deslocamento químico característico de carbono  $sp^3$  em  $\delta$  45,21 (C3'), 45,37 (C2') e 51,12 (C-1') (Figura 41) que são referentes cadeia lateral *N*-(2,3-epoxipropil)-carbazol.

**Figura 41.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em acetona- $d_6$  do 9-(2,3-epoxipropil)-carbazol (**29.1**)



Os dados obtidos nas análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono do produto **29.1** foram comparados com os dados obtidos do material de partida carbazol, e mesmo as análises tendo sido realizadas em solventes diferentes foi possível comparar os padrões de acoplamentos e os dados obtidos foram consistentes com a estrutura proposta (Tabela 4).

**Tabela 4**

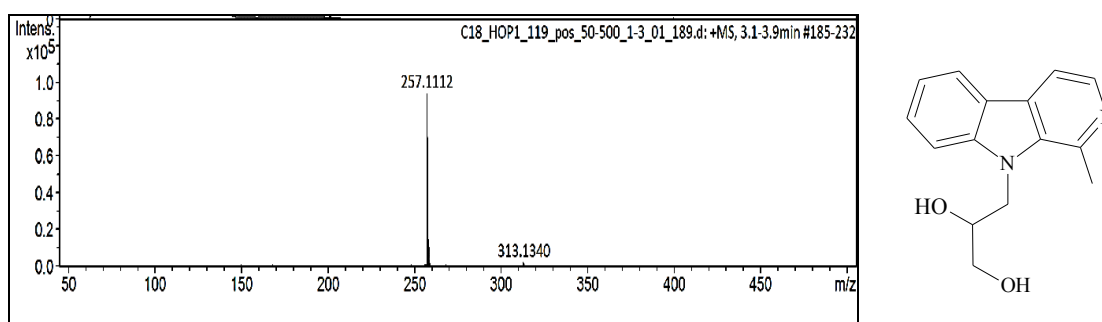
Comparação dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do padrão carbazol (**29**) com o produto 9-(2, 3-epoxipropil-carbazol) (**29.1**)

Nº C/H	RMN $^1\text{H}$ ( <b>29</b> ) DMSO- $d_6$	RMN $^1\text{H}$ ( <b>29.1</b> ) Acetona- $d_6$	RMN $^{13}\text{C}$ ( <b>29</b> ) DMSO- $d_6$	RMN $^{13}\text{C}$ ( <b>29.1</b> ) Acetona- $d_6$
	$\delta$ ( <i>m</i> , <i>J</i> (Hz); nº H)	$\delta$ ( <i>m</i> , <i>J</i> (Hz); nº H)	$\delta$	$\delta$
<b>1</b>	7,47 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,1; 2H)	7,63 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,2; (2H)	110,9	110,2
<b>2</b>	7,37 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,1; 6,8 e 1,4; 2H)	7,46 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,2, 7,2 e 1,4 2H)	122,3	123,6
<b>3</b>	7,14 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> = 7,8; 6,8 e 0,9; 2H)	7,22 ( <i>m</i> ; 2H)	120,1	120,8
<b>4</b>	8,10 ( <i>d</i> <i>J</i> = 7,8 Hz; 2H)	8,14 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,8; 2H)	118,4	119,9
<b>5</b>	-	-	125,4	126,5
<b>6</b>	-	-	139,6	141,6
<b>1a e</b>	-	4,82 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 15,9 e 3,0; 1H)	-	51,1
<b>1b</b>	-	4,42( <i>dd</i> , <i>J</i> = 15,9 e 5,7; 1H)	-	-
<b>2a</b>	-	3,34 ( <i>m</i> ; 1H)	-	45,3
<b>3a e</b>	-	2,76 ( <i>m</i> ; 1H)	-	45,2
<b>3b</b>	-	2,60 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,6; 1H)	-	-
<b>N-H</b>	11,23 ( <i>s</i> )	-	-	-

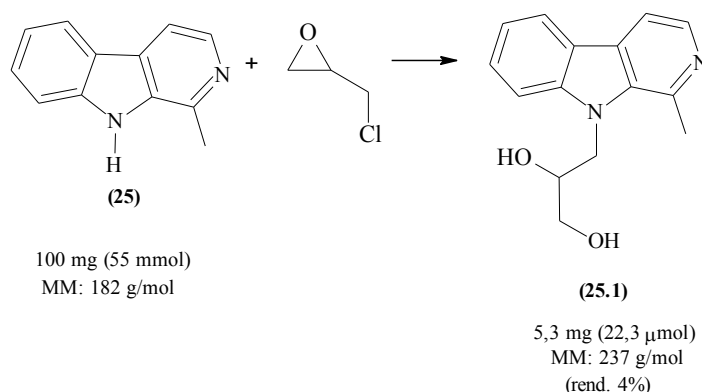
### 5.1.3 *N*-alquil-harmano

A analisando o cromatograma UFLC/HRMS-ESI (ANEXO 10) do produto **25.1** foi observado um pico com  $t_r = 3,9$  min. e  $[M+H]^+ m/z$  257,1112, valor teórico para o íon molecular do *N*-alquil-harmano seria  $[M+H]^+ m/z$  239,2918 ( $C_{15}H_{14}N_2O$ ), uma diferença de 17 Da, sugerindo a formação do produto dihidroxilado, cujo valor teórico de  $[M+H]^+ m/z$  257,1284, referente a fórmula  $C_{15}H_{16}N_2O_2$  ( $\Delta = 67$  ppm).

**Figura 42.** Espectro de massas do produto 9-(2,3-dihidroxipropil)-harmano e provável estrutura

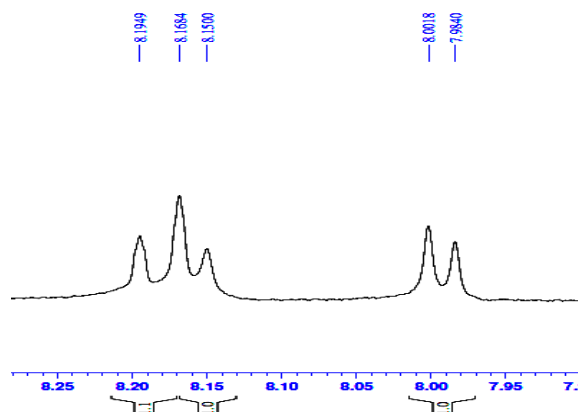


**Figura 43.** Reação de formação do 9-(2,3-diidroxipropil)-harmano (**25.1**) a partir do harmano (**25**)



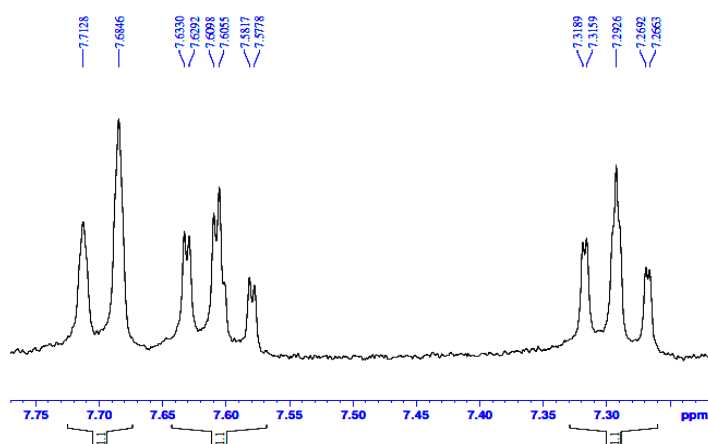
Analisando a região aromática do espectro de RMN de  $^1H$ , é possível verificar o padrão dos hidrogênios característicos do anel  $\beta$ -carbólico, fazendo a expansão da região entre 8,25 e 7,90 ppm, um duplete (*d*) em  $\delta$  8,15 com  $J = 5,4$  Hz atribuído ao H-3, que acopla com o duplete (*d*) em  $\delta$  7,99 ( $J = 5,4$  Hz) referente ao H-4 (Figura 44). O hidrogênio referente ao H-5 em  $\delta$  8,19, um duplete ( $J \sim 8,0$  Hz) está sobreposto ao sinal referente ao hidrogênio H-3.

**Figura 44.** Ampliação da região aromática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em metanol- $d_4$  do produto 25.1



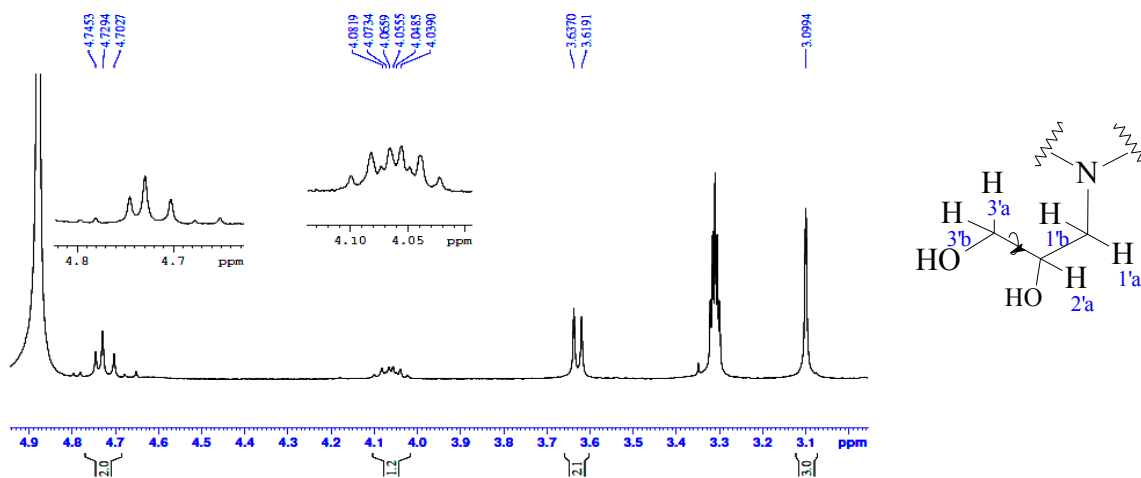
O hidrogênio H-6 foi observado como um *ddd* em  $\delta$  7,29 com constantes de acoplamento ( $J = 8,0, 7,0$  e  $1,0$  Hz), e os hidrogênios nas posições 7 e 8 em  $\delta$  7,69 (*ddd*,  $J = 8,0; 7,0$  e  $1,0$  Hz) e 7,60 *dd* ( $J = 8,0$  e  $1,0$  Hz), respectivamente.

**Figura 45.** Ampliação da região aromática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em metanol- $d_4$  do produto 25.1



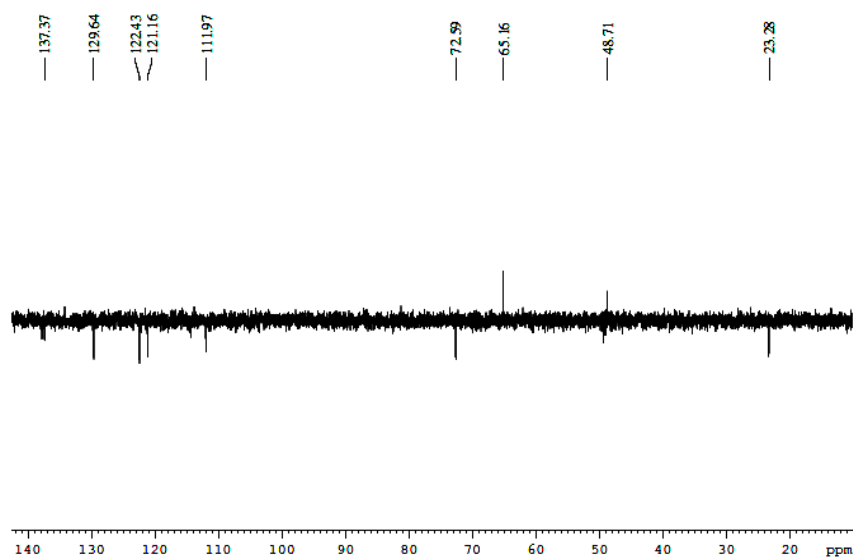
Na região dos hidrogênios da cadeia lateral foram observados o singlete em  $\delta$  3,09 referente a metila do anel purídínico, dois multipletos (*m*) com deslocamentos em  $\delta$  4,72, integrando para dois hidrogênio atribuído aos hidrogênios metilênicos (1'a e 1'b), e em  $\delta$  4,05 (1H) atribuído ao hidrogênio H-2a' e o dubleto (*d*) em 3,62 ( $J = 5,3$  Hz) com integral para dois hidrogênios referente aos hidrogênios metilênicos (3'a e 3'b), a presença do dubleto com dois hidrogênios idênticos sugere que houve a abertura do anel epóxi e que os hidrogênios (3'a e 3'b) tem livre rotação, confirmando a formação do produto dihidroxilado 9-(2,3-dihidroxipropil)-harmano (Figura 46).

**Figura 46.** Ampliação da região alifática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em metanol- $d_4$  do produto **25.1**



As atribuições dos sinais dos carbonos foram realizadas com o auxílio dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , HSQC (correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), HMBC (correlação a longa distância  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), DEPT 135 e 90. Ao analisar o espectro de carbono e o DEPT 135 são observados 15 sinais de carbonos, sendo que o sinal em  $\delta$  48,71 ( $-\text{CH}_2$ ) só foi possível visualizar no DEPT, já que no espectro de carbono  $^{13}\text{C}$  o sinal do solvente encontrava-se sobreposto. O outro carbono  $-\text{CH}_2$  presente na molécula é  $\delta$  65,13. Os outros sinais presentes no espectro (Figura 47) são  $-\text{CH}$  e em 23,25 o carbono  $-\text{CH}_3$  da metila.

**Figura 47.** Espectro de DEPT 135 do produto **25.1**

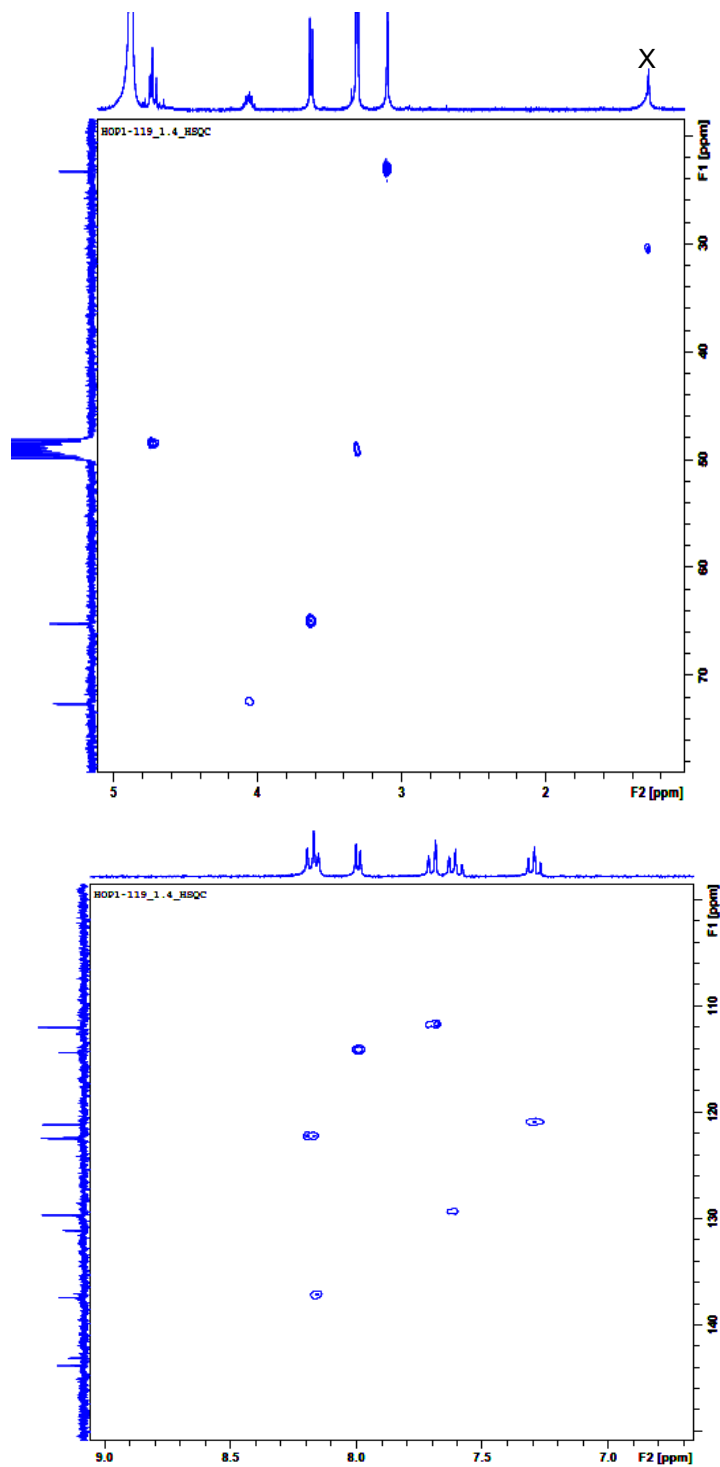


Através das ampliações do espectro de HSQC (Tabela 5 e Figura 48) foi possível a fazer as correlações diretas de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ .

Tabela 5

Correlações observadas do espectro de HSQC do produto **9.1**

Correlações HSQC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ( $J$ )									
	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-1'a e 1'b	H-2'	H-3'a e 3'b
$\delta_{\text{H}}$	8,15	7,99	8,19	7,29	7,60	7,69	4,72	4,05	3,62
$\delta_{\text{C}}$	137,3	114,3	122,4	121,4	129,6	111,9	48,7	72,5	65,2

Figura 48. Ampliações do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e HSQC do produto 9-(2,3-dihidroxiopropil)-harmano

As atribuições dos carbonos quaternários foram realizadas baseadas em dados do padrão harmano na literatura (Ski *et al.*, 2000) e foram mostradas produto tabela 6, confirmando a estrutura do produto inédito 9-(2,3-epoxipropil)-harmano.

**Tabela 6**

Comparação entre dos dados de RMN <sup>1</sup>H do padrão harmano (25) e o 9-(2,3-epoxipropil)-harmano (25.1)

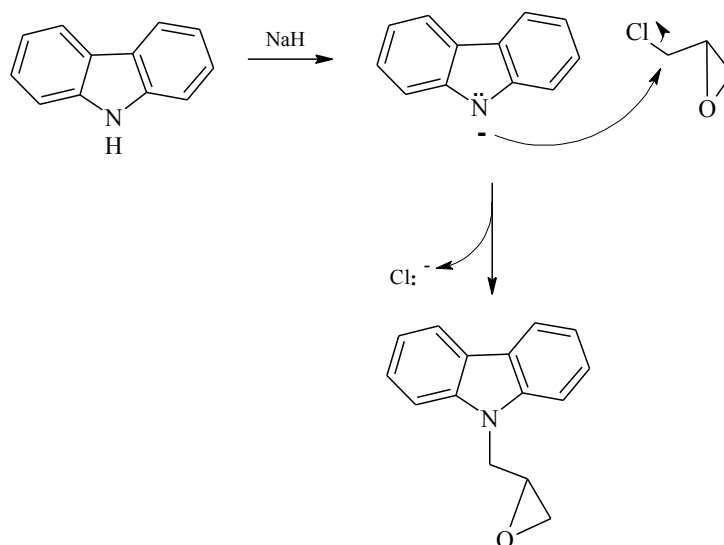
Nº C/H	RMN <sup>1</sup> H (25), literatura δ (m, J Hz; nºH)	RMN <sup>1</sup> H, (25.1), metanol- <i>d</i> 4 δ, m, J(Hz), (nºH)	RMN <sup>13</sup> C (25) literatura δ	RMN <sup>13</sup> C (25.1) δ
1	-	-	142,1	143,7
3	8,26 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,5; 1H)	8,15 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,4; 1H)	137,5	137,3
4	7,94 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,5; 1H)	7,99 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,4; 1H)	112,6	114,3
4a	-	-	126,9	131,0
4b	-	-	121,1	122,3
5	8,21 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,7 Hz; 1H)	8,19 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,0; 1H)	121,7	122,4
6	7,25 ( <i>t</i> , <i>J</i> = 7,7; 1H)	7,29 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0, 7,0 e 1,0; 1H)	119,2	121,4
7	7,55 ( <i>t</i> ; <i>J</i> = 7,7; 1H)	7,60 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> = 8,0; 7,0 e 1,0; 1H)	127,8	129,6
8	7,65 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,7; 1H)	7,69 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,0 e 1,0; 1H)	111,9	111,9
8a	-	-	140,4	143,0
9a	-	-	134,5	137,0
1a e 1b	-	4,72 ( <i>m</i> ; 2H)	-	48,7
2a	-	4,05 ( <i>m</i> ; 1H)	-	72,5
3a e 3b	-	3,62 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,4; 2H)	-	65,2
Me	2,83 ( <i>s</i> ; 3H)	3,09 ( <i>s</i> ; 3H)	20,4	

O rendimento obtido na reação foi de 4%. O baixo rendimento obtido deve estar associado ao procedimento pós-reacional, o qual foi limitado pelo baixo solubilidade do produto em CHCl<sub>3</sub> (solvente utilizado na partição) e a purificação, já que uma parte do produto ficou em mistura com outros subprodutos. Através dos dados espectrais foi confirmado que o produto isolado foi o 9-(2,3-dihidroxipropil)-harmano.



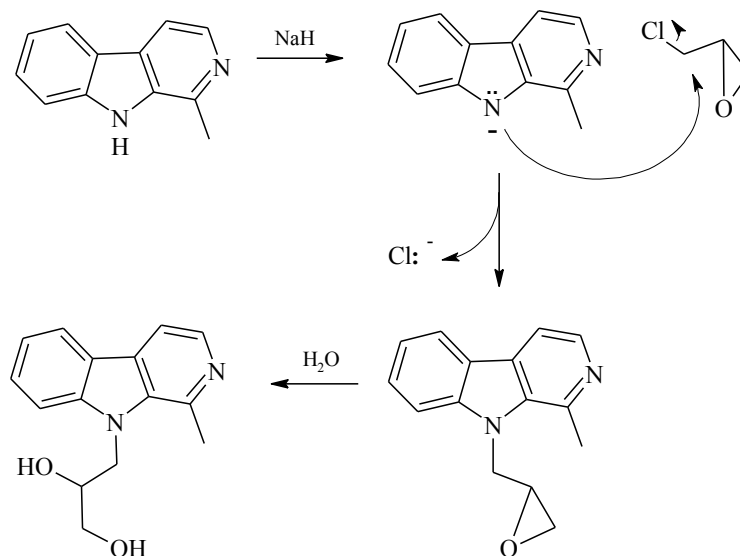
Epóxidos são relativamente instáveis e suscetíveis rupturas de suas ligações e abertura do anel. A síntese dos produtos **29.1** e **25.1** foram realizadas seguindo o mecanismo de *N*-alquilação sob catálise básica, na qual o NaH (60%) atua como uma base forte que abstrai o hidrogênio do nitrogênio indólico, formando uma nucleófilo que atacará o carbono halogenado da epiclоридrina via mecanismo de substituição nucleofílica.

**Figura 49.** Proposta mecanística para a formação do produto 9-(2,3-epoxipropil)-carbazol



Para o harmano após a formação do derivado 9-(2,3-dihidropropil)-harmano ocorre a ruptura do anel de três membros, isso pode ter ocorrido após a reação, devido a umidade do ar ou ainda ser um subproduto da reação. Trata-se de uma estrutura inédita na literatura.

**Figura 50.** Proposta mecanística para a formação do produto 9-(2,3-dihidroxi-propil)-harmano

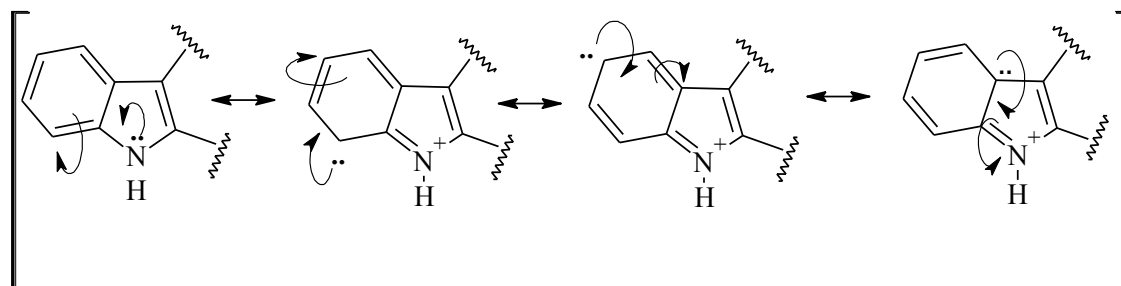


O hidreto de sódio reage violentamente com oxigênio atmosférico sendo assim o manuseio do reagente foi feito todo em atmosfera inerte de argônio e o DMF (dimetilformamida) utilizado foi seco previamente, considerando que o contato do hidreto com a água, gera gás de H<sub>2</sub>, altamente explosivo. A tentativa de alquilação das substâncias β-carbolínicas, harmina e harmalina, foram realizadas utilizando como bases o butil-lítio (Bu-Li), pois utilizando o hidreto de sódio não se observava a formação de produtos. No entanto não foi possível isolar e identificar os derivados produzidos, devido à pequena quantidade de material. Esse procedimento foi realizado no laboratório Química Inorgânica da Universidade de Helsinki, e exigia condições que não foram possíveis de reproduzir no laboratório LAPAAM

#### 5.1.4 Reação de nitração

A nitração foi considerada durante muitos anos como reações com propósito de obtenção de precursores de explosivos. Com o passar do tempo, observou-se grande versatilidade de derivados nitrados como intermediários de reações em síntese orgânica. De maneira geral, a nitração é considerada uma reação que gera uma quantidade considerável de resíduos e com baixos rendimentos (DRAČÍNSKÝ *et al.*, 2007; MUDADU *et al.*, 2008; RODRIGUEZ-SANZ *et al.*, 2015). Em sistemas aromáticos a introdução do grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) ocorre através de mecanismos de substituição eletrofilica aromática (*SEAr*). Os produtos obtidos por este tipo de reação são altamente influenciados pelos substituintes presentes no anel aromático. Em compostos indólicos particularmente, o nitrogênio presente no sistema atua como um ligante ativante do anel de benzênico direcionando as substituições dos grupos nitro para as posições *orto* e *para* do anel aromático.

**Figura 51.** Proposta para os híbridos de ressonância de sistemas indólicos



Reação de substituição eletrofilica aromática em sistemas piridínicos ocorre de maneira geral, com baixíssimo rendimento, em meio ácido, como a nitração. Um dos motivos é a protonação do nitrogênio da piridina formando o íon piridínio que diminui a

suscetibilidade de ataque ao eletrófilo (CLAYDEN e GREEVES, 2012). Esses efeitos são amenizados na presença de ligantes doadores de elétrons. De maneira geral a natureza do substrato e a temperatura reacional influenciam diretamente a regioseletividade da reação. Neste trabalho foram testados vários procedimentos com diferentes condições e reagentes adaptados a partir da literature (DRAČÍNSKÝ *et al.*, 2007; WAHBA e HAMANN, 2012; MONTOIA *et al.*, 2014; RODRIGUEZ-SANZ *et al.*, 2015).

### 5.1.5 Nitração dos $\beta$ -carbolínicos

A grande maioria dos trabalhos envolvendo a nitração, têm como propósito a obtenção de intermediários para outras reações, como redução do grupo nitro e halogenação. Os procedimentos são os mais variados, dentre os métodos destacam-se a nitração realizada a partir de  $\text{HNO}_3/\text{H}^+$ , principalmente devido a melhores rendimentos quando comparado com outras.

**Tabela 7**

Resultados obtidos em cada procedimento adotado

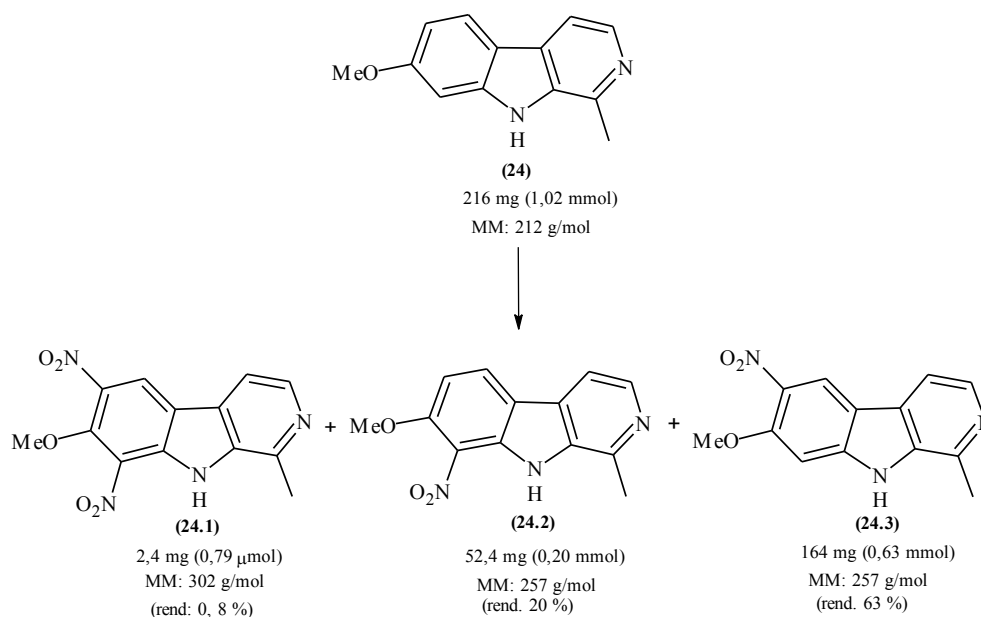
Condições	Resultados observados em cada procedimento	Referências
AcOH:HNO <sub>3</sub> (1:1), 0°C, 2,5 h	5% do mononitrados na posição 6	DRACÍNSKÝ <i>et al.</i> , 2007; MONTOIA <i>et al.</i> , 2014
1) TFA, 0 °C, 10 min. 2) NaNO <sub>2</sub> , 90 min 3) 30 min, t.a	Não houve formação dos produtos	WAHBA E HAMANN 2012
1) HNO <sub>3</sub> , 0 °C, 2h. 2) t.a, 2h	Formação de dois derivados mononitrados, rendimentos abaixo de 10 %	RODRIGUES-SANZ <i>et al.</i> , 2015
1) HNO <sub>3</sub> , 30-40 °C 2) 24 à 72 horas (dependendo do padrão)	Formação de dois a três derivados nitrados (rendimentos: 14 – 44 %)	RODRIGUES-SANZ <i>et al.</i> , 2015 [adaptado]

Durante a determinação da metodologia vários procedimentos descritos na literatura foram testados e foi observado que a temperatura é um fator importante no processo de nitração. A faixa de temperatura em que foram obtidos os melhores resultados foi entre 30°C- 40°C, ocorrendo maior facilidade no controle e formação do íon nitrônio gasoso  $\text{NO}_2^+$  (gás de coloração castanha). O íon é o eletrófilo da reação, sua formação determina a velocidade em que são formados os produtos. Em temperaturas baixas, como 0 °C sua formação é lenta.

### 5.1.6 Nitração da harmina

A nitração da harmina levou à formação de três produtos, que foram purificados por técnicas de cromatografia clássica (CC) e numerados **24.1**, **24.2** e **24.3**, cujas estruturas foram elucidadas utilizando UFLC/HRMS-ESI de alta resolução e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensional.

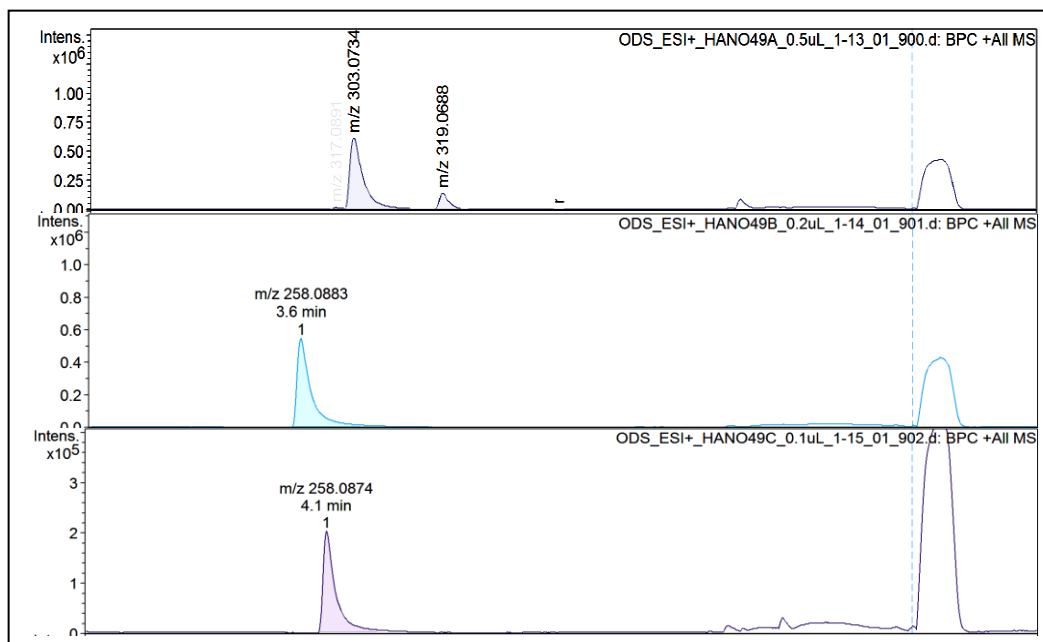
**Figura 52.** Reação de formação dos produtos nitrados derivados da harmina (**24**) e rendimentos



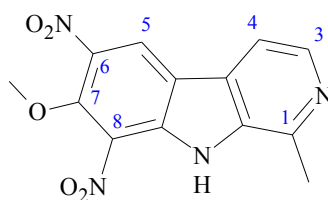
Os cromatogramas do pico base (BPC) dos produtos mostraram as seguintes informações, para o produto **24.1**, majoritariamente o pico com  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  303,0734, indicando o íon da fórmula  $\text{C}_{13}\text{N}_{11}\text{N}_4\text{O}_5$ , referente ao produto dinitrado da harmina (valor teórico  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  303,0723,  $\Delta = 3,6$  ppm). Para o produto **24.2**, com  $t_r = 3,6$  min. e  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  258,0883 atribuído a fórmula  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3$ , indicando um produto mononitrado (valor teórico  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  258,0873  $\Delta = 3,8$  ppm), e por fim o produto **24.3**, o qual

apresentou pico com  $t_r = 4,1$  min. e  $[M+H]^+$   $m/z$  258, 0874 (valor teórico  $[M+H]^+$   $m/z$  258,0873  $\Delta = 0,4$  ppm) indicando outro produto mononitrado.

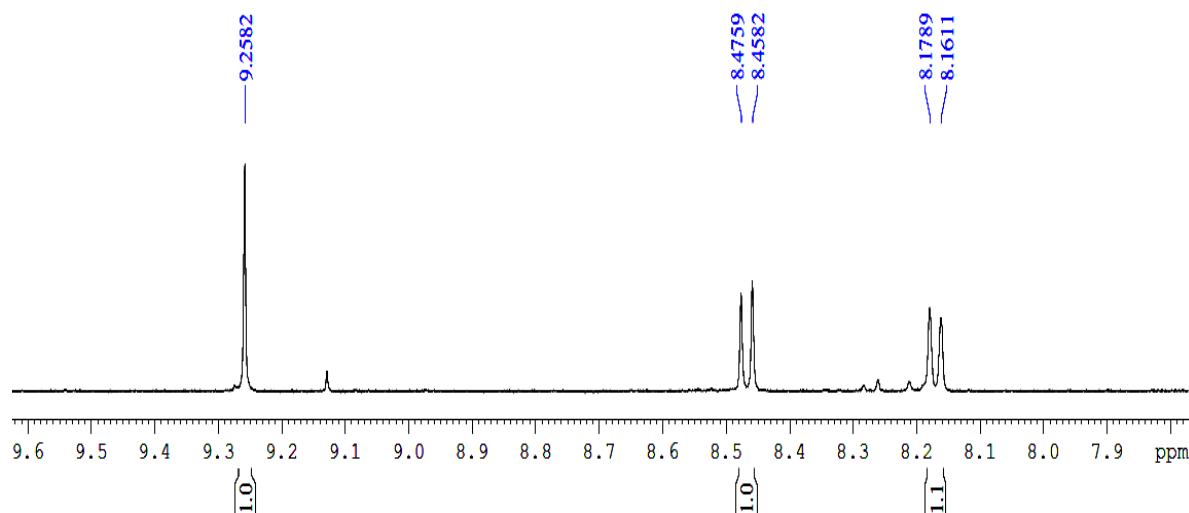
**Figura 53.** Cromatogramas UFLC/HRMS-ESI dos produtos nitrados **24.1**, **24.2** e **24.3**



Os produtos de nitração foram submetidos a análises de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em acetona- $d_6$ . Análises da região aromática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto **24.1** revelou a presença de apenas três sinais, sendo eles dois dubletos com deslocamentos em  $\delta$  8,46 e 8,17, cujas constantes são  $J = 5,4$  Hz, consistentes com acoplamento de hidrogênios de anel pirídínico. Os sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente. O outro sinal da região aromática é um singlete com  $\delta$  9,25, o qual foi atribuído ao hidrogênio H-5. Os sinais da metila em C-1 e da metoxila em C-7, foram observados como dois singletos em  $\delta$  2,91 e 4,14, respectivamente. Caracterizando a estrutura conhecida por 6,8-dinitroharmina.



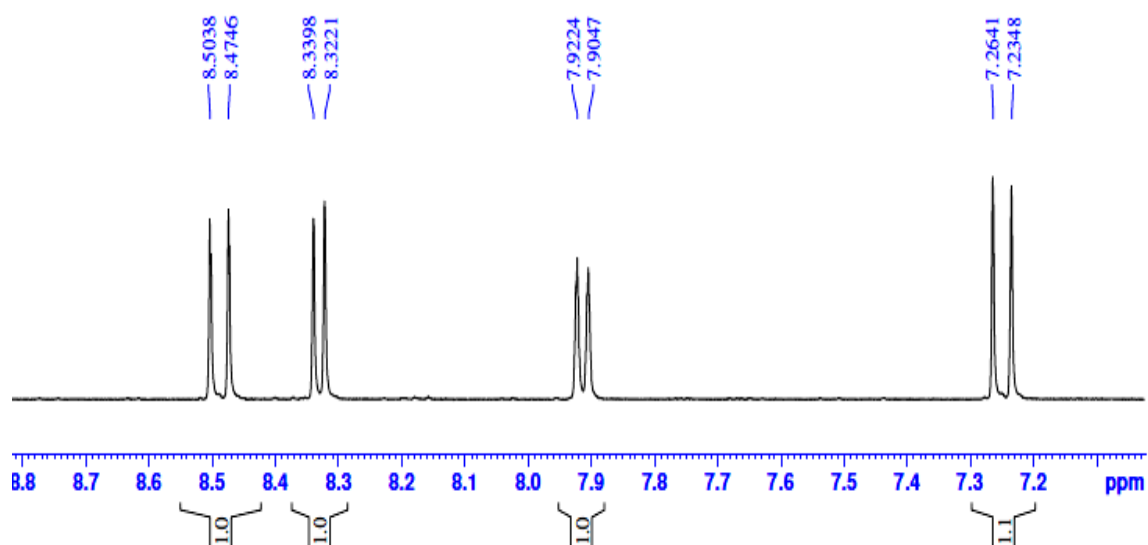
**Figura 54.** Ampliações das regiões  $\delta$  4,6 a 2,7 e da região aromática  $\delta$  9,2 e 8,3 do produto 6,8-dinitroharmina (**24.1**) em acetona- $d_6$



No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da harmina dinitrada **24.1** (ANEXO 16) foi possível verificar a presença de 13 sinais, sendo que onze encontram-se na região aromática e os outros dois na região de carbono do tipo  $\text{sp}^3$ . As atribuições foram baseadas em dados da literatura (PONCE e ERRA-BALSELLS, 2001) e foram mostrados na tabela 8, comparando os dados obtidos e a literatura foi possível confirmar a formação do produto.

O segundo produto foi **24.2** foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$  (ANEXO 18) e seu espectro evidenciou tratar de um mononitrado com substituição na posição 8, essa conclusão foi obtida pela ausência do sinal do hidrogênio nessa posição. Na ampliação da região aromática (Figura 55) foi observado a presença de quatro dubletos ( $d$ ), todos com integração para um hidrogênio cada e com constantes de acoplamentos bem características em  $\delta$  8,48 ( $J = 8,8$  Hz), referente ao hidrogênio H-5, que acopla com o hidrogênio H-6 em  $\delta$  7,24 ( $J = 8,8$ Hz) e os sinais referentes ao anel piridínico em  $\delta$  8,33 ( $J = 5,3$  Hz) e 7,91 ( $J = 5,3$  Hz). Em  $\delta$  10,67 observa-se o sinal de N-H e em  $\delta$  2,85 e em  $\delta$  4,11, os singletos da metila na posição 1 e a metoxila na posição 7, respectivamente, confirmando a já conhecida estrutura da 8-nitroharmina.

**Figura 55.** Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$ , da região aromática do produto 8-nitroharmina (**24.2**)



Em relação ao RMN  $^{13}\text{C}$  (ANEXO 19) não houve grande alteração no espectro do produto **24.2** quando comparado ao da harmina. Os sinais de maneira geral apareceram ligeiramente mais deslocados quando comparados ao espectro do padrão ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), devido à eletronegatividade do grupo nitro. As atribuições foram realizadas de acordo com o espectro de carbono e o bidimensional HMBC (correlações a longa distância  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), podemos destacar as seguintes correlações: os hidrogênios da metila em  $\delta$  2,85 com os carbonos  $\delta$  135,5 ( $J^3$ ) e 143,8 ( $J^2$ ), atribuídos aos carbonos (C-9a e C-1), o hidrogênio H-3 em  $\delta$  8,33 com os carbonos  $\delta$  112,8 (C-4) e  $\delta$  128,4 (C-4a), H-4 em  $\delta$  7,91 correlaciona-se apenas com o C-9a ( $J^3$ ). Em  $\delta$  8,48 (H-5) correlaciona-se com os carbonos C-7 ( $\delta$  156,2) e com o carbono C-8a ( $\delta$  136,2), o hidrogênio da H-6 ( $\delta$  7,24) apresenta correlação apenas em  $J^2$  com o carbono  $\delta$  118,8 atribuído ao C-5 e por os hidrogênios da metoxila em  $\delta$  4,11 com o carbono quaternário 156,2 (C-7) (Figura 56 e 57).

**Figura 56.** Correlações de HMBC do produto 8-nitroharmina

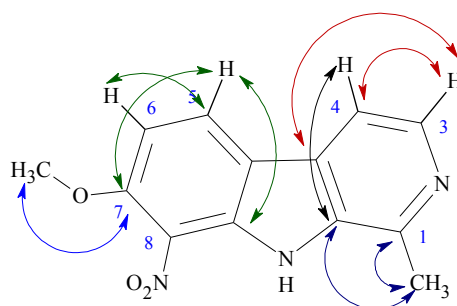
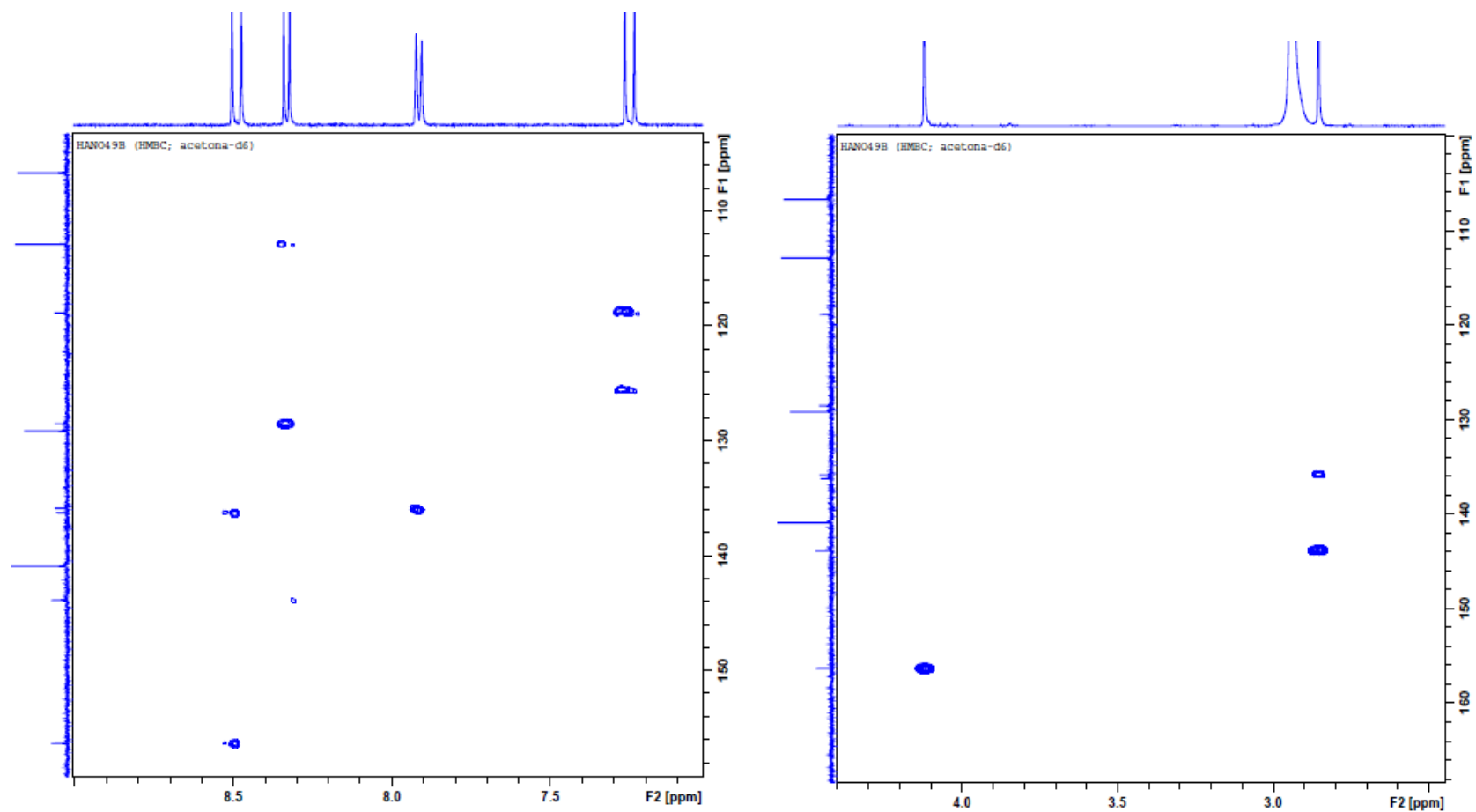


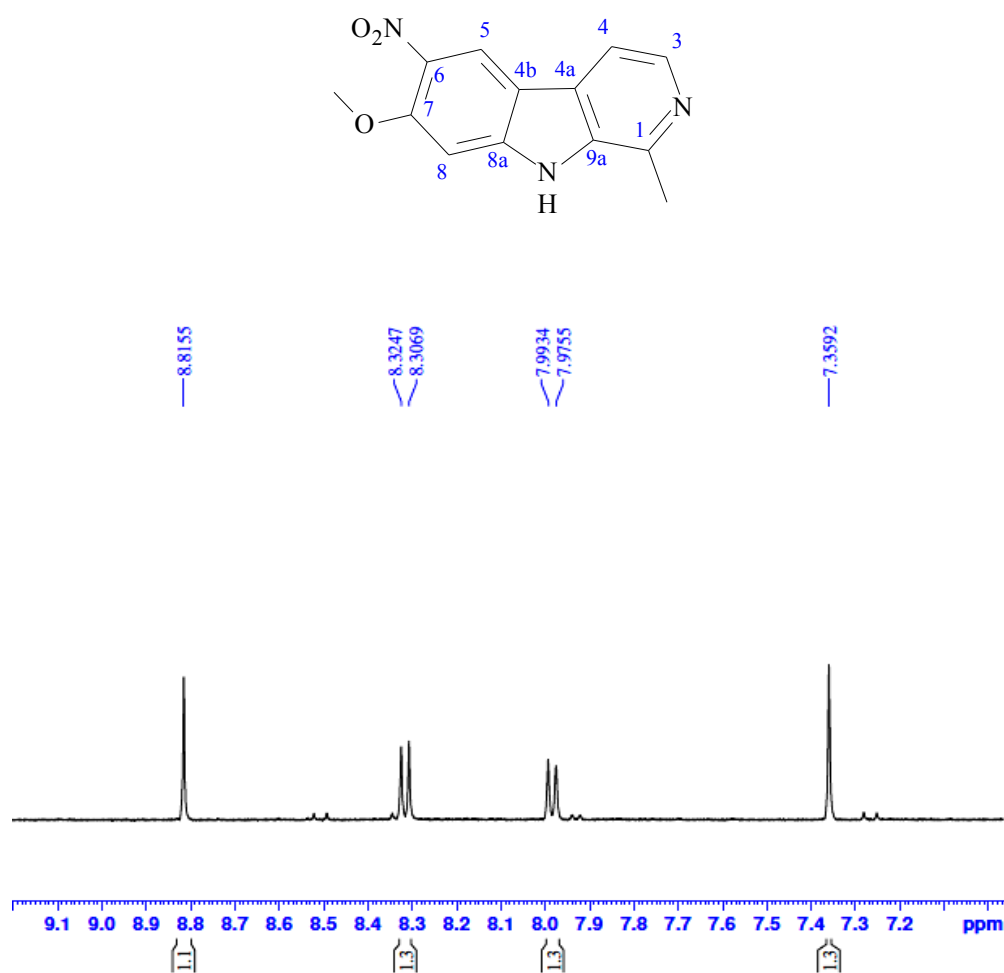
Figura 57. Espectro de HMBC do produto 24.2 (8-nitroharmina), ampliações da região aromática e alifática





A estrutura do produto **24.3** foi elucidada como sendo a já conhecida 6-nitroharmina. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram observados quatro sinais na região aromática todos com integração para um hidrogenio cada (Figura 58). O deslocamento  $\delta$  8,81 (s), foi atribuído ao H-5, os dois dupletos em  $\delta$  8,31 e 7,98 com constantes de acoplamento  $J = 5,3$  Hz, referentes aos hidrogênios piridínicos H-3 e H-4, respectivamente e por fim o singlete em  $\delta$  7,35 atribuído ao H-8. Na região alifática foram observados dois singletos com integração para três hidrogênios cada, em  $\delta$  4,05 e 2,77 característicos de metoxila e metila, respectivamente.

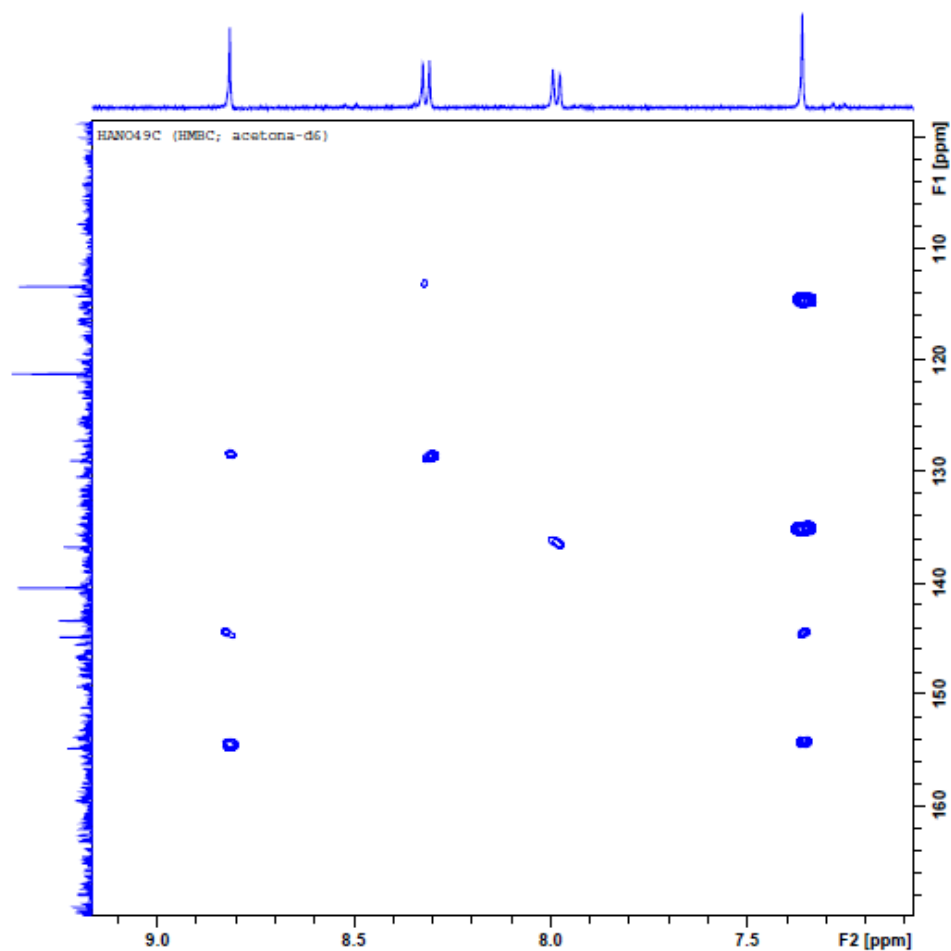
**Figura 58.** Ampliações do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$ , do produto 6-nitro-harmina (**24.3**)



No espectro de carbono foi possível verificar a presença de onze sinais (ANEXO 22). As atribuições foram realizadas com o auxílio do espectro bidimensional de HMBC e comparação com a literatura. Analisando a ampliação do HMBC da região aromática observamos as seguintes correlações principais, o hidrogênio H-3 ( $\delta$  8,31) a longa distância com o carbono C-4b em  $\delta$  128,9 e como carbono C-4 em 113,3 ppm. O hidrogênio H-4

apresenta correlação apenas como o carbono  $\delta$  136,8 (C-9a). Os hidrogênios H-5 e H-8 ( $\delta$  8,81 e 7,35) correlacionam-se com os carbonos C-8a (144,8) e  $\delta$  155,5 (C-7) (Figura 59). Os hidrogênios não aromáticos da metila em  $\delta$  2,77 ppm acoplam em  $J^2$  como o carbono C-1 ( $\delta$  143,3) e em  $J^3$  como o carbono quaternário C-9a, e da metoxila em 4,05 ppm correlaciona-se o carbono C-7.

**Figura 59.** Ampliação do espectro de HMBC da região aromática e correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$



**Figura 60.** Correlações de HMBC do produto 6-nitroharmina

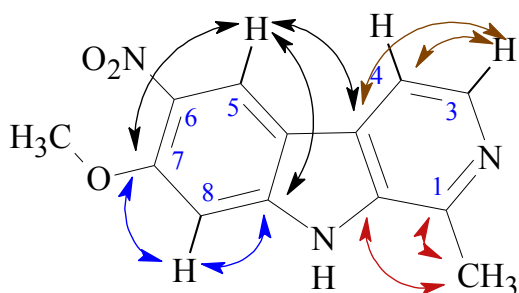


Tabela 8

Dados de RMN <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C dos produtos 6,8-dinitroharmina ( **24.1**), 8-nitroharmina ( **24.2**) e 6-nitroharmina ( **24.3**) e dados da literatura

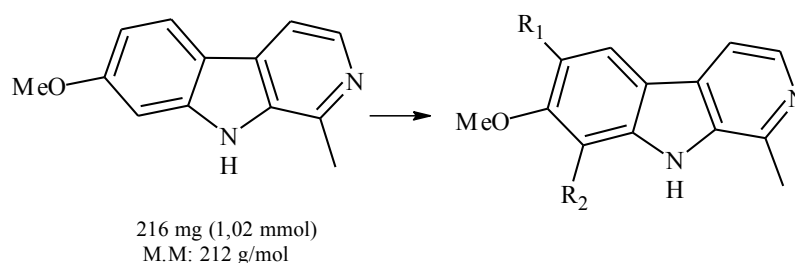
N ° H/C	RMN <sup>1</sup> H, *Literatura δ; (m) <i>J</i> Hz; (n°H)	RMN <sup>1</sup> H, Acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> δ; (m) <i>J</i> Hz; (n°H)	RMN <sup>13</sup> C, *Literatura δ	RMN <sup>13</sup> C, Acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> δ
<b>6,8-dinitro</b>				
1	-	-	145,7	145,0
3	8,56 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,3 (1H))	8,46 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,4; 1H)	134,6	136,7
4	7,84 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,3 (1H))	8,17 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,4; 1H)	112,8	113,7
4a	-	-	119,4	120,6
4b	-	-	127,9	125,0
5	8,93 ( <i>s</i> ) (1H)	9,25 ( <i>s</i> ; 1H)	124,2	123,5
6	-	-	128,3	128,4
7	-	-	158,7	149,8
8	-	-	119,40	115,4
8a	-	-	133,9	133,8
9a	-	-	140,8	141,8
MeO-	4,21 ( <i>s</i> ; 3H)	4,15, ( <i>s</i> ; 3H)	65,1	65,4
Me	2,91 ( <i>s</i> ; 3H)	2,82, ( <i>s</i> ; 3H)	29,5	20,9
N-H	9,94 (1H)	11,36 (1H)	-	-
<b>8-nitro</b>				
1	-	-	143,0	143,8
3	8,36 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,5; 1H)	8,33 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,3; 1H)	139,2	140,8
4	8,06 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,5; 1H)	7,91 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,3; 1H)	113,2	112,8
4a	-	-	118,4	128,4
4b	-	-	127,1	-
5	8,67 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4; 1H)	8,48 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8; 1H)	121,1	118,8
6	7,27 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4; 1H)	7,24 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8; 1H)	134,4	129,1
7	-	-	143,5	156,2

**Tabela 8.**Dados de RMN <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C dos produtos 6,8-dinitroharmina ( **24.1**), 8-nitroharmina ( **24.2**) e 6-nitroharmina ( **24.3**) e dados da literatura (Cont.)

8	-	-	107,1	106,6
8a	-	-	135,8	136,2
9a	-	-	142,8	135,5
MeO-	2,40 (s; 3H)	4,11 (s; 3H)	20,3	57,8
Me	2,87 (s; 3H)	2,85 (s; 3H)	20,6	20,7
N-H	11,76	10,69 (s)	-	-
<b>6-nitro</b>				
1	-	-	168,9	143,8
3	8,35 (d, <i>J</i> = 5,5; 1H)	8,31 (d, <i>J</i> = 5,3; 1H)	139,2	140,4
4	8,16 (d, <i>J</i> = 5,5; 1H)	7,98 (d, <i>J</i> = 5,3; 1H)	113,2	113,3
4a	-	-	118,4	128,9
4b	-	-	127,1	-
5	9,25 (s; 1H)	8,81 (s; 1H)	121,1	121,1
6	-	-	134,4	-
7	-	-	143,5	155,3
8	7,51 (s; 1H)	7,35 (s; 1H)	107,1	96,0
8a	-	-	135,8	144,8
9a	-	-	142,8	136,8
MeO-	2,33 (s; 3H)	4,05 (s; 3H)	20,3	57,1
Me	2,76 (s; 3H)	2,77 (s; 3H)	20,6	20,5
N-H	14,4(s)	-	-	-

\* Literatura: Ponce e Erra-Balsells, 2001- solventes deuterados utilizados: 6,8-dinitroharmina (CDCl<sub>3</sub>); 8-nitroharmina (DMSO) e para o 6-nitroharmina (CDCl<sub>3</sub> /CD<sub>3</sub>OD).

A nitração da harmina levou à formação de três produtos os quais foram caracterizados como sendo o, 6,8-dinitro-harmina (2,4 mg, 7,9  $\mu$ mol), 8-nitro-harmina (52,4 mg, 0,20 mmol) e o 6-nitroharmina (164,4 mg, 0,63 mmol), cujos rendimentos foram mostrados na tabela 9.



**Tabela 9**

Produtos formados através da nitração da harmina e seus rendimentos

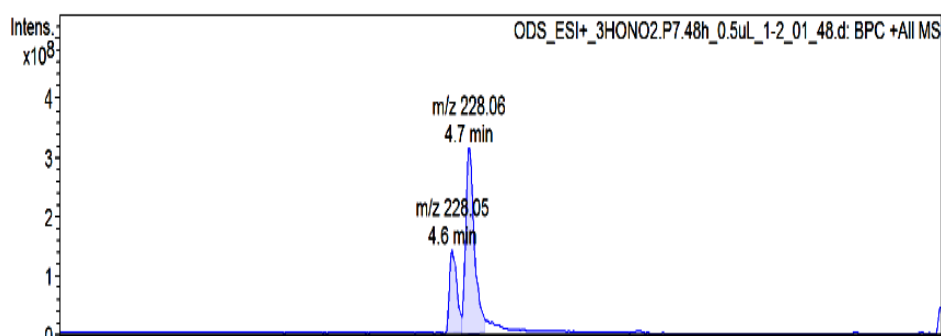
Composto	R-1	R-2	Rendimento %
<b>6,8-dinitroharmina (8.1)</b>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	0,77
<b>8- nitroharmina (8.2)</b>	H	NO <sub>2</sub>	20
<b>6-nitroharmina (8.3)</b>	NO <sub>2</sub>	H	63

Embora a síntese de nitro-harmina já tenha sido relatada por diferentes autores desde a década de 30, a caracterização estrutural completa desses compostos ainda é bastante limitada e são poucos os dados publicados. Até a alguns anos atrás se acreditava que o produto gerado a partir da nitração da harmina era o 6-nitro e que o isômero 8-nitroharmina somente poderia ser obtido a partir da oxidação da 8-nitroharmalina. O dinitrado foi relatado pela primeira vez em 2001 por Ponce e Erra-Balsells e os rendimentos observados para os mononitrados eram bem baixos, entre 2 e 12%. O procedimento utilizado neste trabalho levou obtenção de derivados já conhecidos, no entanto os rendimentos dos mononitrados foram bem mais altos que os já descritos anteriormente (PONCE E ERRA-BALSELLS, 2001).

### 5.1.7 Nitração do harmano

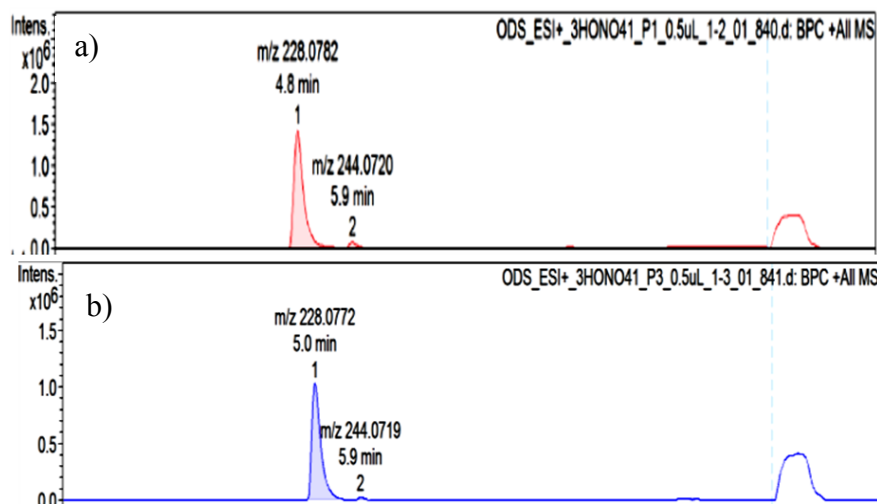
A nitração do harmano foi realizada através da reação com  $\text{HNO}_3$  concentrado sob aquecimento brando por 48 h. A mistura pós-reacional foi submetida à análise em UFLC/MS-ESI de baixa resolução e foi possível observar a presença de dois produtos, ambos com  $m/z$  228 e  $t_r = 4,6$  e  $4,7$  minutos, consistentes com a formação de dois produtos mononitrados (Figura 61).

**Figura 61.** Cromatograma UFLC/MS-ESI da mistura pós-reacional da nitração do harmano, após 48 h



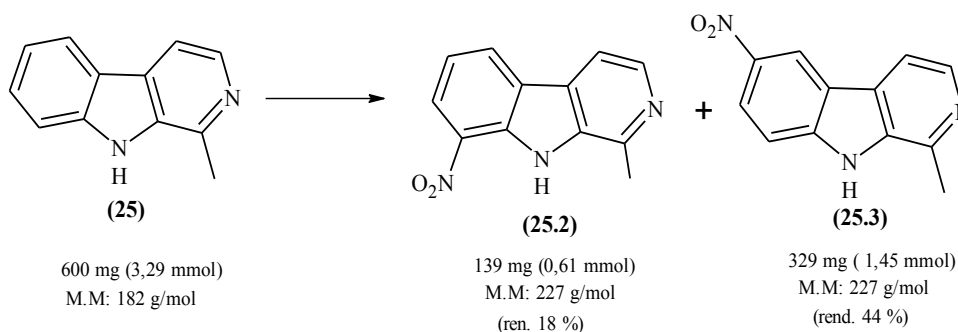
A purificação dos produtos foi realizada através de CC em sílica gel *flash* utilizando como sistema de eluentes  $\text{CHCl}_3$  : MeOH (9,5:0,5) e os produtos foram analisados por UFLC/HRMS-ESI e foram observados dois produtos com íons moleculares iguais a  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  228,0782 ( $\Delta = 6,5$  ppm) e tempo de retenção  $t_r = 4,8$  min., para o produto **25.2** (Figura 62a) e o aduto  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  228,0772 ( $\Delta = 2,2$  ppm) com tempo de retenção  $t_r = 5,0$  min., para o produto **25.3**, (Figura 62b), as massas referem-se a fórmula protonada  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2$  (valor teórico: 228,0767).

**Figura 62.** Cromatogramas de UFLC/HRMS-ESI dos produtos **25.2** e **25.3**



A reação produziu dois derivados mononitrados, cujos rendimentos foram 18 % para o 8-nitro-harmano e 44% para o 6-nitroharmano, de acordo com a literatura os rendimentos obtidos estão de acordo com os já descritos por Snyder *et al.*, (1948) e Ponce e Erra-Balsells (2001), confirmando a majoritáriedade do produto 6-nitroharmano.

**Figura 63.** Esquema do procedimento de nitração do harmano (**25**) e formação dos produtos **25.2** e **25.3**



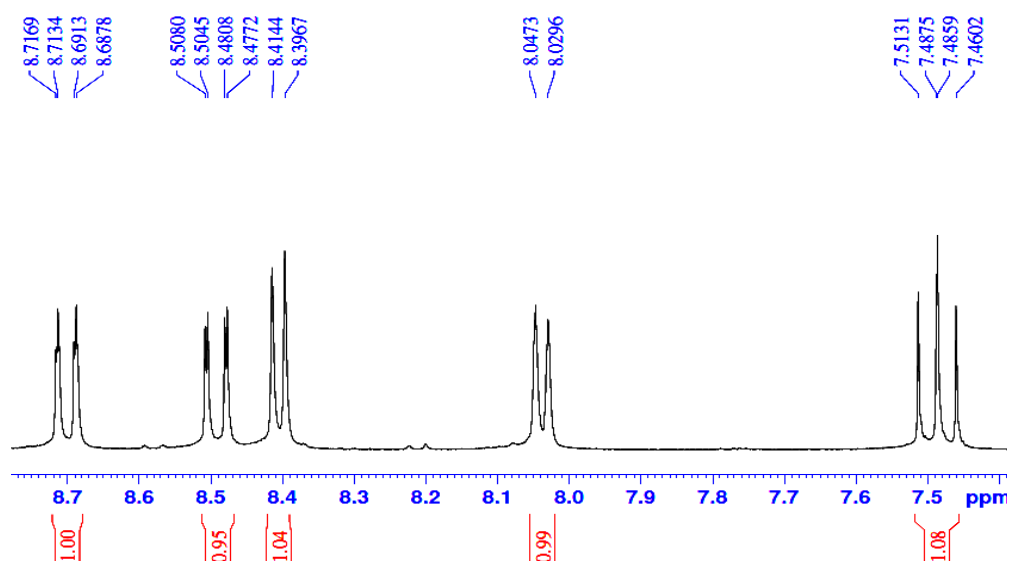
A elucidação estrutural dos produtos foi realizada com base nas análises de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C em acetona-*d*<sub>6</sub>. Analisando o espectro de hidrogenio integral do produto (**25.2**) observam-se a presença de cinco sinais na região aromática e um singlete em δ 2,81 (3H) referente à metila ligada ao C-1. Assim como para os derivados da harmina, já descritos anteriormente, os produtos do harmano também apresentam sinais bem característicos. Os hidrogênios piridínicos H-3 e H-4 apresentam-se como dois dubletos em δ 8,40 e 8,0, com *J* = 5,3 Hz. Os outros três sinais são referentes aos hidrogênios H-5, H-6 e H-7. O hidrogênio da posição 7 (δ 8,70, *dd*, *J* = 7,7 e 1,0 Hz) apresenta maior deslocamento químico devido à proximidade ao grupo nitro. De acordo com a literatura, hidrogênios vizinhos de grupo nitro são altamente desblindados. Os H-5 e H-6 foram observados como dois duplo dubletos (*dd*) em δ 8,49 (*dd*, *J* = 8,2 e 1,0 Hz) e δ 7,48 (*dd*, *J* = 8,2 e 7,7 Hz), respectivamente (Figura 64), caracterizando o produto 9.1 como sendo o 8-nitro-harmano. (**25.2**).

Assim como para o produto 8-nitro-harmano (**25.2**), no espectro de RMN de <sup>1</sup>H do produto **25.3**, também foram observados cinco sinais na região aromática e um singlete integrando δ 2,82, com integral para três hidrogênios referente à metila do C-1. Os sinais de hidrogênios na região aromática (Figura 65) apresentam integrais para 1H, são dois dubletos (*d*) em δ 8,40 e 8,16 ppm, com constantes de acoplamento de *J* = 5,4 Hz referentes aos hidrogênios piridínicos H-3 e H-4, respectivamente. O sinal mais desblindado em δ 9,20 é um dubleto *J* = 2,2 Hz, indicando acoplamento *meta*, atribuído ao H-5. E em δ 8,43 um duplo dubleto (*dd*) com *J* = 9,0 e 2,2 Hz, atribuído ao hidrogenio H-7, e por fim o dubleto

em  $\delta$  7,7 com  $J = 9,0$  Hz, sinal atribuído ao H-8, caracterizando o produto formado 6-nitroharmano (**25.3**).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram observados 12 carbonos (ANEXO 28). Os dados dos dois produtos 8-nitro-harmano (**25.2**) e 6-nitro-harmano (**25.3**) são mostrados na tabela 10.

**Figura 64.** Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$ , da região aromática  $\delta$  8,7- 7,5 do produto **25.2**



**Figura 65.** Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$ , da região aromática do produto **25.3**

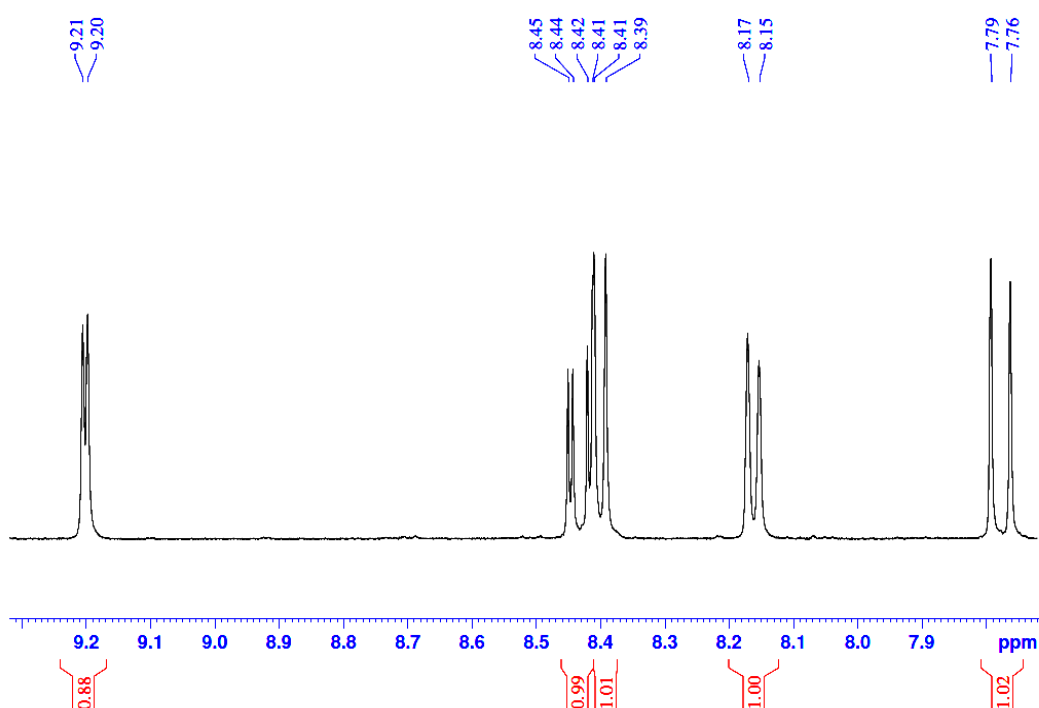




Tabela 10

Dados de RMN <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C dos produtos 8--nitroharmano (25.2) e 6-nitroharmano (25.3)

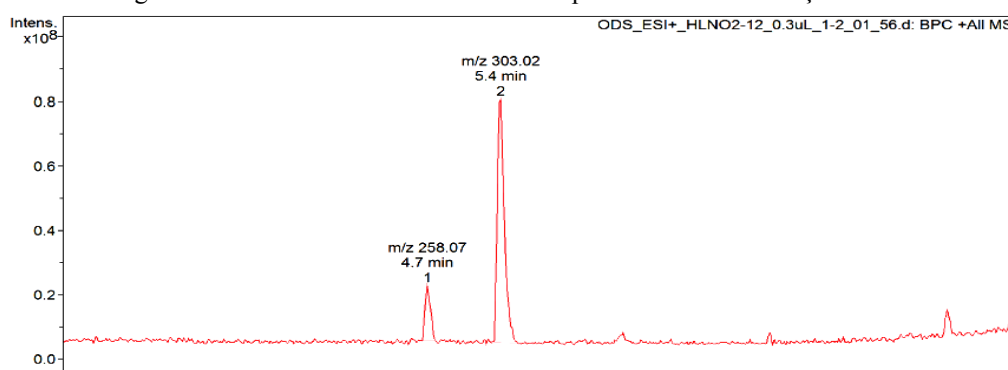
N <sup>o</sup> H/C	RMN <sup>1</sup> H *Literatura (CD <sub>3</sub> OD) δ; (m, J Hz; n <sup>o</sup> H)	RMN <sup>1</sup> H, Acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> δ; (m, J Hz; n <sup>o</sup> H)	RMN <sup>13</sup> C, *Literatura (CD <sub>3</sub> OD) δ	RMN <sup>13</sup> C Acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> δ
<b>8-nitro</b>				
1	-	-	143,8	143,8
3	8,37 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,1)	8,40 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,3; 1H)	139,5	135,1
4	8,09 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,1)	8,03( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,3; 1H)	112,7	112,6
4a			121,6	
4b			125,8	133,1
5	8,49 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4	8,49 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,16 e 1,05; 1H)	126,8	126,2
6	7,48 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 e 7,3)	7,48 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 8,16 e 7,68; 1H)	119,2	119,3
7	8,76 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 7,3)	8,70 ( <i>ddd</i> , <i>J</i> = 7,68, 1,05; 1H)	124,2	124,1
8	-	-	129,7	129,3
8a	-	-	135,0	133,6
9a	-	-	140,4	140,1
1'	2,92	2,82 ( <i>s</i> ; 3H)	20,9	21,1
N-H	11,72	11,04		
<b>6-nitro</b>				
1	-	-	143,1	144,5
3	8,50 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,5; 1H)	8,40( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,4; 1H)	138,9	140,5
4	8,39( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,5; 1H)	8,16 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 5,4; 1H)	112,4	112,9
4a	-	-	120,7	119,6
4b	-	-	127,5	123,9
5	9,0 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,8; 1H)	9,20 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2, 1H)	129,7	128,7
6	-	-	140,2	142,0
7	7,99, <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,1 e 1,8; (1H)	8,43, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,0 e 2,2; 1H)	122,9	122,3
8	7,91, <i>d</i> , <i>J</i> = 5,1; 1H)	7,7, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,0; 1H)	113,3	113,9
8a	-	-	135,6	136,8
9a	-	-	140,2	144,2
1'	2,87, <i>s</i> ; 3H)	2,82, <i>s</i> ; 3H)	20,2	20,6
N-H	10,17 (1H)	11,43	-	

\*Literatura: Ponce e Erra-Balsells, 2001

### 5.1.8 Nitração da harmalina

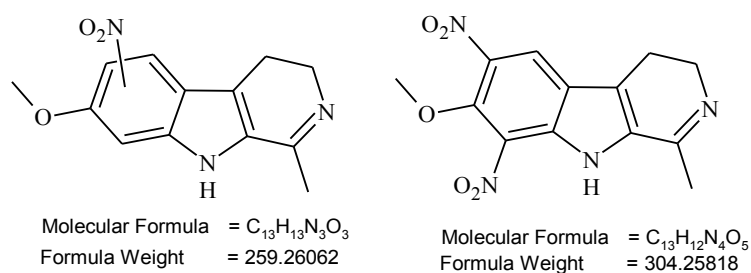
A nitração da harmalina foi realizada seguindo a mesma metodologia adotada para os outros  $\beta$ -carbolínicos, modificando apenas o tempo de reação. A mistura reacional foi analisada em UFLC/HRMS- ESI de baixa resolução e verificou-se a presença de dois picos com  $[M+H]^+$   $m/z$  303,02 (majoritário) e  $[M+H]^+$   $m/z$  258,07, com o  $t_r = 5,4$  e  $4,7$ min, respectivamente (Figura 66).

**Figura 66.** Cromatograma de UFLC/HRMS- ESI da mistura pós-reacional da nitração da harmalina



Os nitração da harmalina deveria levar a formação de produtos mononitrados e dinitrados, assim como ocorreu para harmina, cujas massas seriam  $[M+H]^+$   $m/z$  305 para fórmula molecular dinitrada  $C_{13}H_{12}N_4O_5$  e  $[M+H]^+$   $m/z$  260 u para fórmula mononitrada  $C_{13}H_{13}N_3O_3$ .

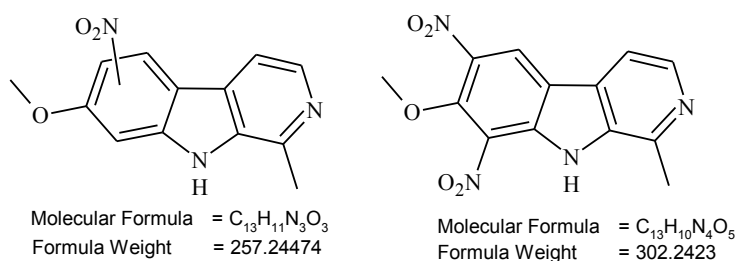
**Figura 67.** Produtos esperados para nitração da harmalina



No entantos produtos da nitração da harmalina apresentaram íons  $[M+H]^+$   $m/z$  303,02 e 258,07 com duas unidades inferior ao esperado. Esse resultado é consistente com a oxidação em C-3 e C-4, levando a aromatização do anel piridínico, formando derivados da harmina (Figura 68). Os produtos obtidos neste procedimento não foram isolados, considerando já haviam sido obtidos através da reação de nitração da harmina. Konovalova

*et al.* (1935), descreveu a formação de um derivado da harmina a partir da nitração da harmalina com ácido nítrico concentrado.

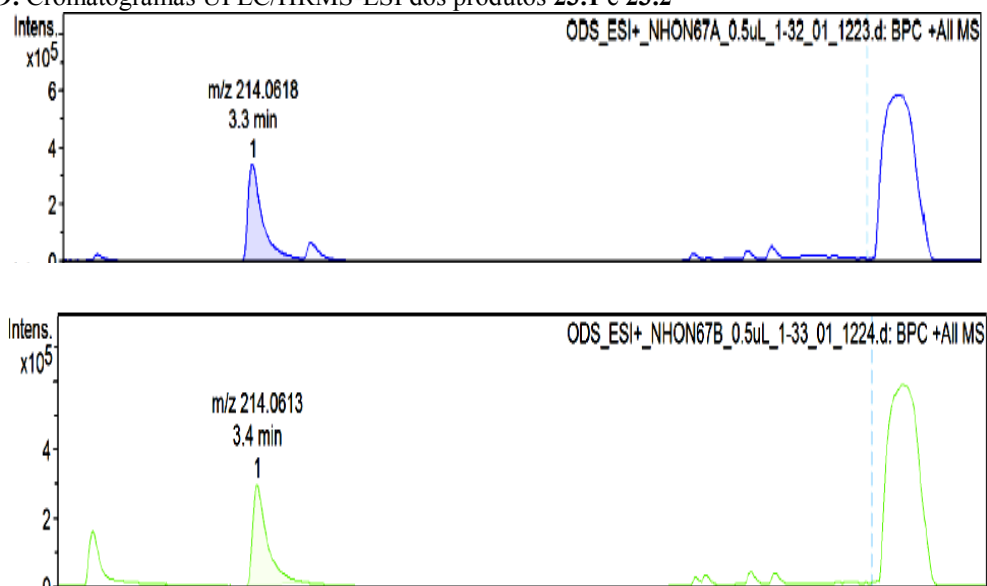
**Figura 68.** Prováveis estruturas para reação da harmalina



### 5.1.9 Nitração do Norharmano

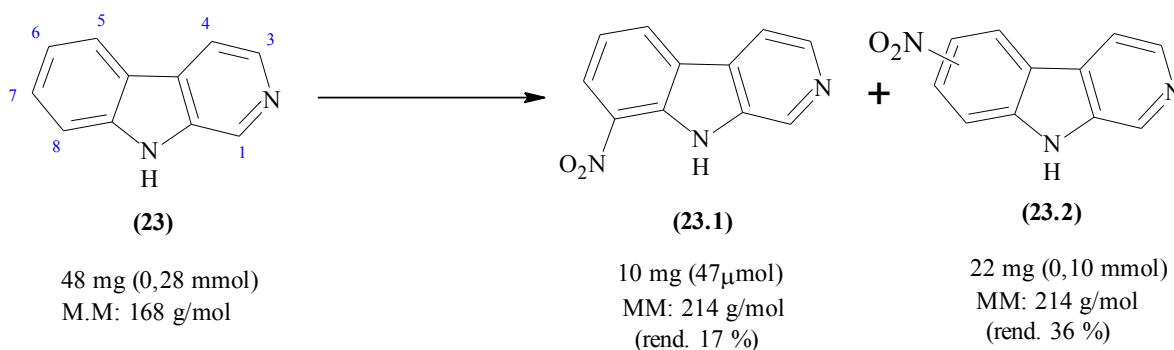
A nitração do norharmano foi realizada utilizando o procedimento já descrito para os outros materiais de partida. A mistura pós-reacional foi submetida à análise por CCD em AcOEt, na qual foi possível observar a presença de dois produtos com  $R_f$  0,32 e 0,34. A purificação dos produtos foi realizada via CC em sílica gel *flash*, utilizando AcOEt (100%) e os produtos **23.1** e **23.2** foram analisados por UFLC/HRMS-ESI, e os cromatogramas mostraram dois ions adutos com  $[M+H]^+$   $m/z$  214,0618 ( $t_r = 3,3$  min.  $\Delta = 3,3$  ppm) e 214,0613 ( $t_R = 3,4$  min.  $\Delta = 0,9$  ppm), respectivamente, indicando a formação de dois isômeros mononitrados do norharmano de massa molecular C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, valor teórico  $[[M+H]^+ m/z$  214,0611.

**Figura 69.** Cromatogramas UFLC/HRMS-ESI dos produtos **23.1** e **23.2**



O produto **23.2**, não foi identificado devido a problemas de solubilidade nos solventes utilizados nas análises de RMN (metanol, clorofórmio, DMSO e acetona).

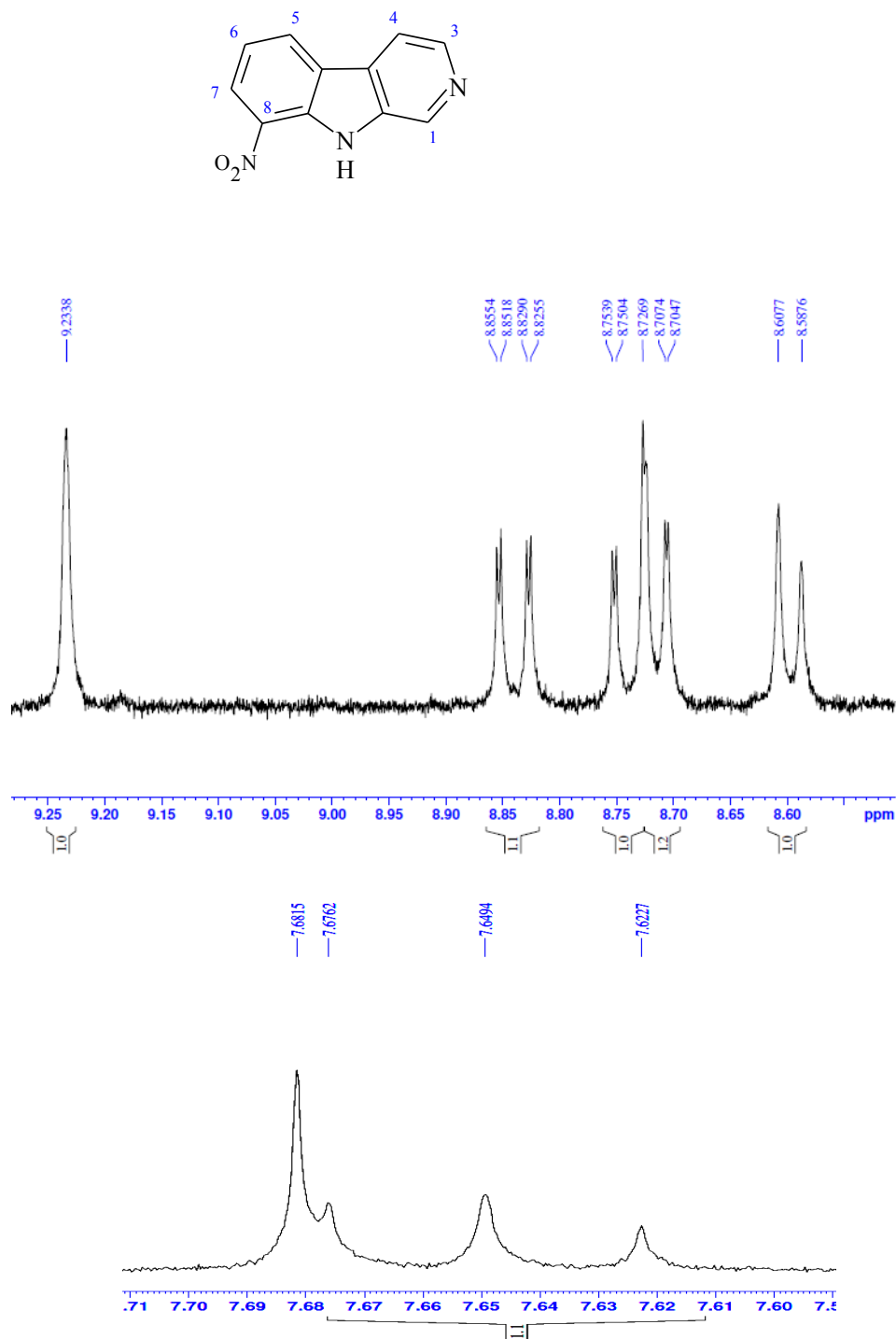
**Figura 70.** Esquema do procedimento de nitração do norharmano (**23**) e formação dos produtos **23.1** e **23.2**



As massas obtidas foram de 10 mg (0.05 mmol) para o produto **23.1** e 22 mg para o produto **23.2**. O rendimento calculado foi relativamente baixo 17 % para o produto **23.1**. O produto **23.2**, não foi elucidado, mas pelo padrão de nitração dos produtos os  $\beta$ -carbolínicos, pode-se sugerir que se tratar do 6-nitronorharmano. A literatura reporta a obtenção do 6-nitro-norharmano com rendimentos de superiores a 50% para o 6-nitronorharmano e entre 20 e 30% para o 8-nitro-norharmano (PONCE e ERRA-BALSELLS, 2001).

A elucidação estrutural do derivado **23.1** foi realizada baseada em dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$  (1:1). Analisando o padrão de integração do espectro de hidrogênio observam-se a presença de seis sinais de hidrogênios, indicando que houve a mononitração da molécula. Em  $\delta$  9,23 foi observado um singleto (s) atribuído ao H-1. Os outros hidrogênios do anel piridínico apresentaram sinais com deslocamento em  $\delta$  8,60 (*d*,  $J = 6,0$  Hz) para o H-4 e  $\delta$  8,71 para o H-3 ( $J \sim 6$  Hz). Houve uma sobreposição desse último sinal com o duplo dubleto (*dd*) em  $\delta$  8,74 ( $J = 8,0$  e 1,0 Hz) referente ao hidrogênio H-7, formando um multiplete com integração para 2 hidrogênios. O sinal atribuído ao H-5 foi um duplo dubleto (*dd*) com  $J = 8,0$  e 1,0 Hz em  $\delta$  8,84. O tripleto em  $\delta$  7,64 ppm, com  $J = 8,0$  Hz, atribuído ao H-6, é também consistente com a formação do produto 8-nitronorharmano (**23.1**).

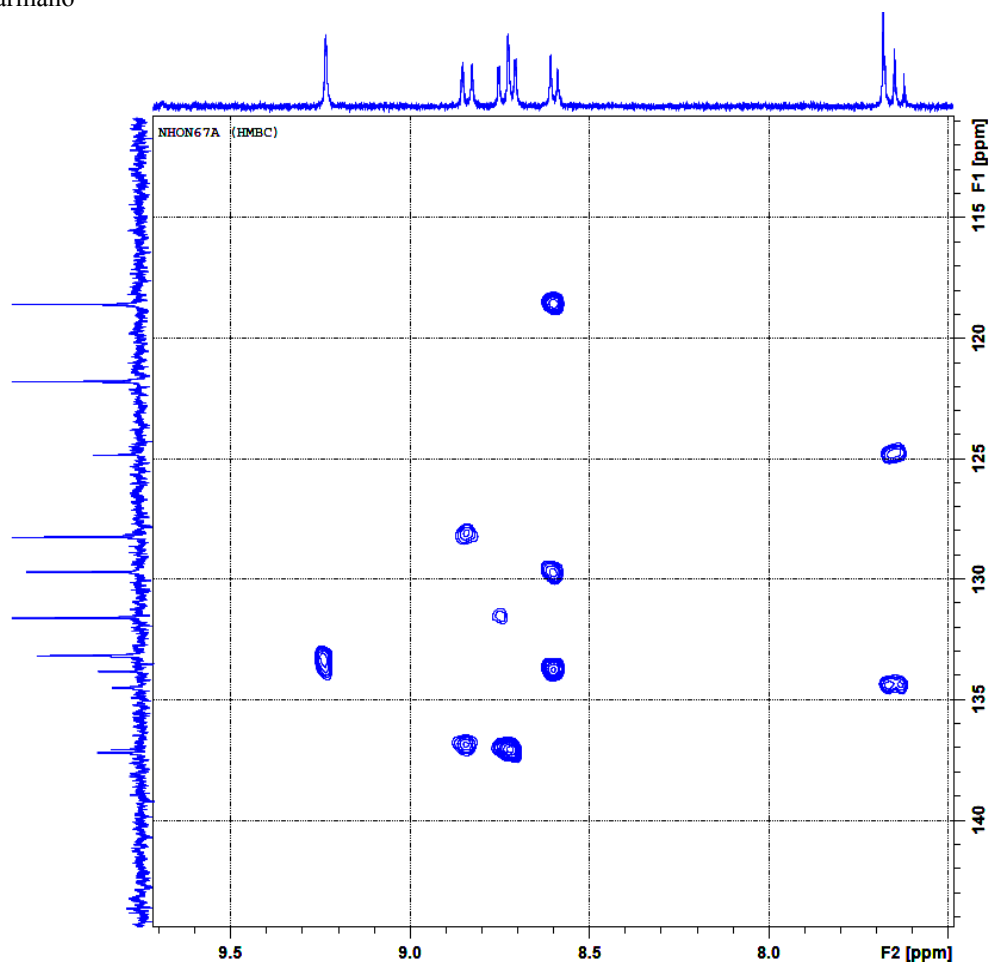
**Figura 71.** Ampliação da região aromática do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{CD}_3\text{OD}:\text{CDCl}_3$  (1:1) e o produto 8-nitro-norharmano (**23.1**).



As atribuições dos carbonos foram realizadas através das análises dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  do bidimensional HMBC (correlação a longa distância  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ) e auxílio da literatura (Figuras 72). Analisando a ampliação da região aromática do HMBC é possível observar as correlações da molécula. O hidrogênio H-1 ( $\delta$  9,23) acopla com o carbono em 133,1 ppm, atribuído ao C-9a, e o hidrogênio H-4 em  $\delta$  8,60 que acopla a longa distância

( $J^3$ ) com o carbono C-4b ( $\delta$  129,8), o carbono C4a em  $\delta$  118,5 ( $J^2$ ) e com o carbono C-3 ( $\delta$  133,8). Além deste, o hidrogênio H-5 acopla com os carbonos C-6 ( $\delta$  128,2) e C-9a ( $\delta$  137,0), além do hidrogênio H-7 e H-3 em d 8,75-8,70 que correlaciona-se com o carbono nitrado (C-8), cujo deslocamento foi  $\delta$  131,5 e 137,1 ppm.

**Figura 72.** Ampliação da região aromática do espectro de RMN bidimensional de HMBC do produto 8-nitronorharmano



**Figura 73.** Correlações de HMBC do produto 8-nitronorharmano

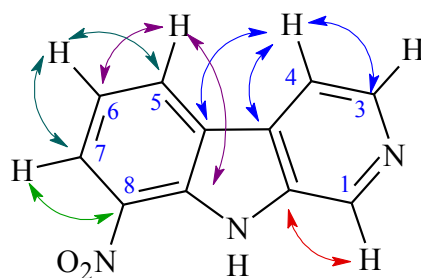


Tabela 11.

Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do produto 8-nitronorhamano (**23.1**) e a literatura

N <sup>o</sup> H/C	RMN $^1\text{H}$	RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$	RMN $^{13}\text{C}$
	*Literatura DMSO $\delta$ (m, J Hz; n <sup>o</sup> H)	CDCl <sub>3</sub> :CD <sub>3</sub> OD $\delta$ (m, J Hz; n <sup>o</sup> H)	*Literatura CD <sub>3</sub> OD $\delta$	CDCl <sub>3</sub> :CD <sub>3</sub> OD $\delta$
<b>8-nitro</b>				
<b>1</b>	9,11 (s; 1H)	9,23 (s)	133,4	137,1
<b>3</b>	8,78 (d, J = 5,3; 1H)	8,71 (d, J ~ 6; 1H)	139,7	133,8
<b>4</b>	8,26 (d, J = 5,3; 1H)	8,60 (d, J = 6; 1H)	112,3	121,7
<b>4a</b>	-	-	123,6	118,5
<b>4b</b>	-	-	127,9	129,8
<b>5</b>	8,49 (d, J = 7,4; 2H)	8,84 (dd, J = 8,0 e 1,0; 1H)	129,9	134,4
<b>6</b>	7,47 (t, J = 7,4; 1H)	7,65 (t, J = 8,0; 1H)	119,1	128,2
<b>7</b>	8,49 (d, J = 7,4; 2H)	8,74 (dd, J ~ 8,0 e 1,0; 1H)	124,3	124,8
<b>8</b>	-	-	131,4	131,5
<b>8a</b>	-	-	132,5	137,0
<b>9a</b>	-	-	142,8	133,1
<b>N-H</b>	12,45 (1H)	-	-	-

\*Literatura: Ponce e Erra-Balsells, 2001

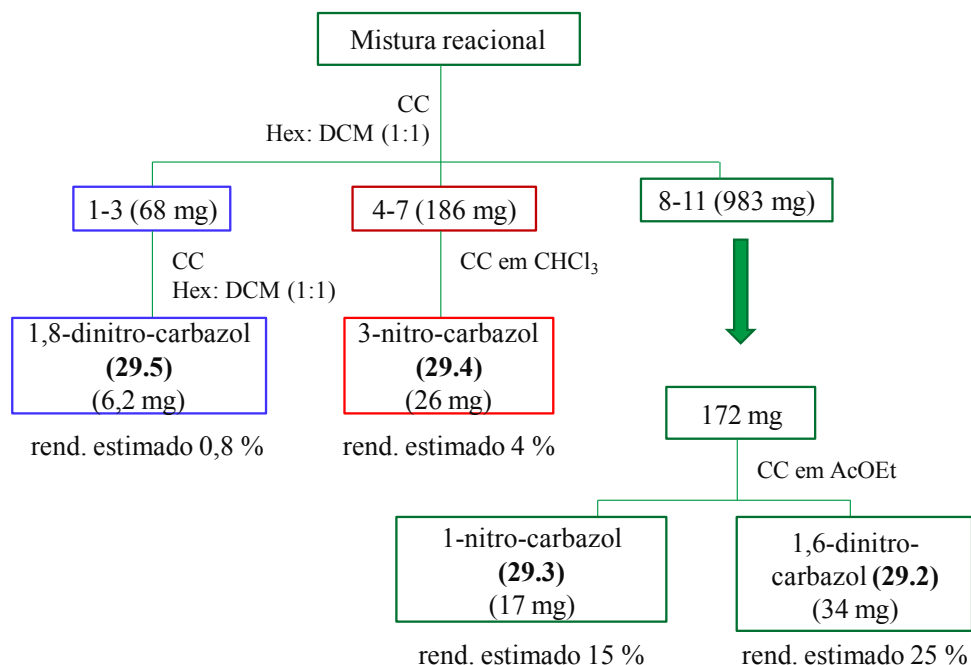
### 5.1.10 Nitração do Carbazol

A reação de nitração do carbazol gerou um maior número de derivados em relação aos observados com os esqueletos  $\beta$ -carbolínicos. No total foram 4 produtos isolados e caracterizados, mas outros subprodutos foram produzidos durante a reação e não foram identificados. Os nitrocarbazóis apresentam coloração amarelo fluorescente intensa, principalmente os produtos mononitrados. Os dinitrados apresentam baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, exceto DMSO. A identificação dos derivados foi realizada por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais. A purificação por cromatografia foi mais difícil que a dos derivados carbolínicos, já que os isômeros apresentam  $R_F$  bem próximos. Todas as etapas de purificação de cada um dos produtos foram descritas na figura 74.

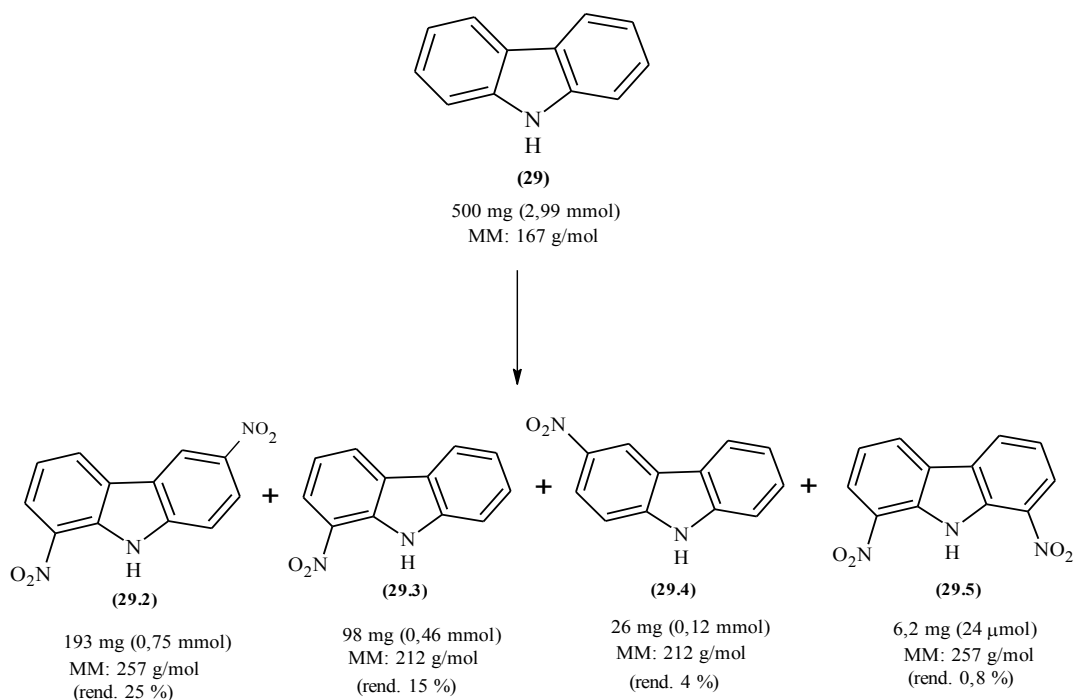
Os quatro produtos de nitração do carbazol são cristalinos de coloração amarelo fluorescente intenso. Eles foram identificados como sendo 1,6-dinitro-carbazol (34 mg, rend. 30%), 1-nitro-carbazol (17 mg, rend. 15%), 3-nitro-carbazol (26 mg, rend. 4%) e o 1,8-

dinitro-carbazol (6,2 mg, rend.1%). Os dados dos produtos obtidos foram comparados com a literatura (BONASI *et al.*, 2004; PONCE *et al.*, 2001) e foram mostrados na tabela 12.

**Figura 74.** Esquema de isolamento cromatográfico dos derivados nitrados do carbazol



**Figura 75.** Produtos obtidos a partir da nitração do carbazol e seus rendimentos

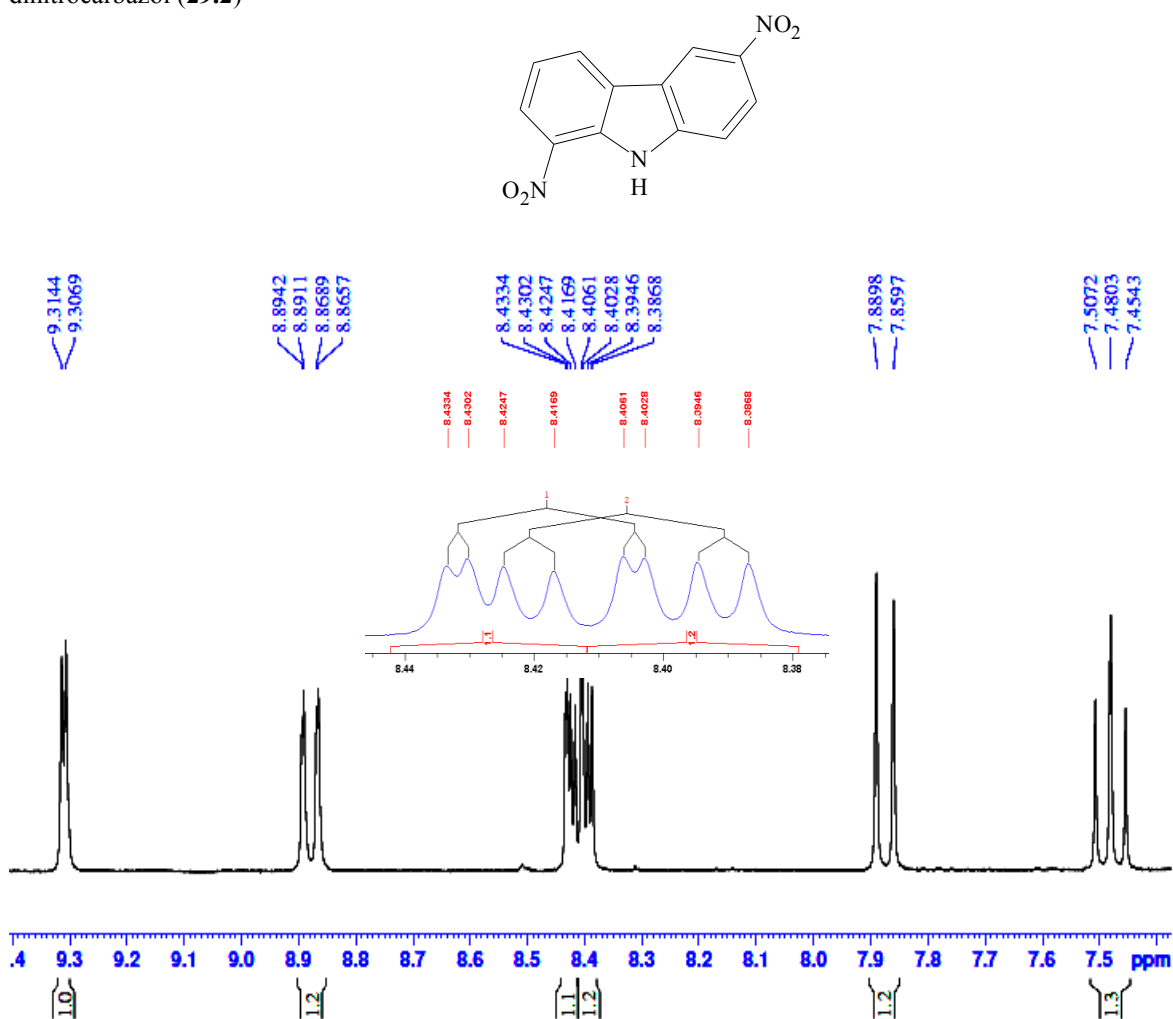




### 5.1.11 1,6-dinitrocarbazol

O espectro de hidrogênio do produto de nitração do carbazol do produto **29.2** foi realizado em DMSO- $d_6$  com supressão do sinal da água para intensificação dos sinais (ANEXO 33). Foram observados seis sinais de hidrogênios na região aromática (Figura 76), consistentes com a dupla substituição no anel carbazólico. Análise dos deslocamentos e acoplamentos confirmou a estrutura o 1,6-dinitro-carbazol. O sinal mais desblindado foi atribuído ao H-5 um dubleto em  $\delta$  9,31 com  $J = 2,2$  Hz. Na região entre  $\delta$  8,40 -8,38, observam-se os dois duplo dubletos ( $dd$ ) sobrepostos atribuídos ao H-4 ( $\delta$  8,41,  $J = 8,0$  e 0,9 Hz) e H-7 ( $\delta$  8,40,  $J = 9,0$  e 2,2 Hz). A presença do tripleto aparente em  $\delta$  7,48 ( $J = 8,0$  Hz) foi atribuído ao H-3, caracterizando a substituição na posição C-1 do anel carbazólico. Os sinais atribuídos a H-2 foi o duplo dubleto ( $dd$ ) em  $\delta$  8,87 com  $J = 8,0$  e 0,9 Hz e o H-8 um dubleto ( $d$ ) em  $\delta$  7,87, com  $J = 9,0$  Hz.

**Figura 76.** Ampliação da região aromática do espectro de hidrogênio (330 MHz) em DMSO- $d_6$  produto 1,6-dinitrocarbazol (**29.2**)



As atribuições dos carbonos foram realizadas através do espectro de carbono unidimensional e o bidimensional de HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ,  $J^2$  e  $J^3$ ) e comparação com dados da literatura. No total foram observados 12 sinais (ANEXO 34). Na ampliação da região aromática do espectro de HMBC foram observadas as seguintes correlações: o hidrogênio H-2 em  $\delta$  8,87 correlacionando-se com o carbono C-1 ( $\delta$  135,5) e ao carbono C-3 ( $\delta$  122,9). O H-3 correlaciona-se ao carbono C-4 ( $\delta$  127,0) e ao C-2 ( $\delta$  133,2). E o H-4 correlaciona-se com o C-4a. O H-5 acopla ( $J^3$ ) com o C-8a e com o C-6 em  $\delta$  141,5 e  $\delta$  145,4. E o H-8 acopla ( $J^2$ ) com o C-7, ( $\delta$  122,0).

Figura 77. Espectro de HMBC do produto 1,6-dinitrocarbazol (29.2)

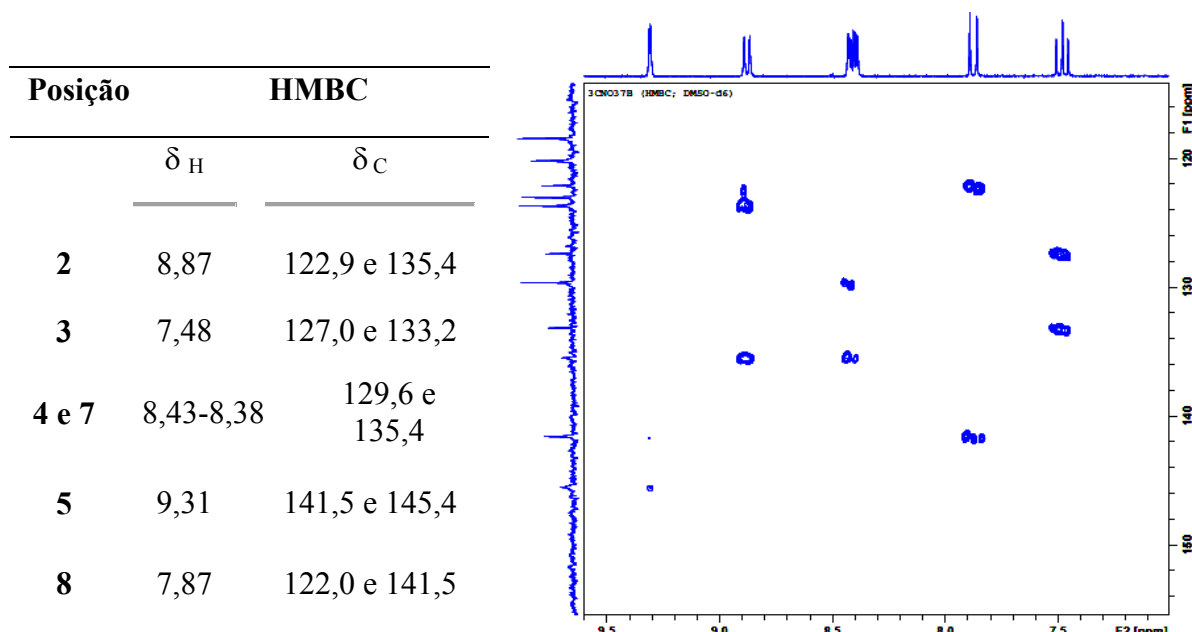
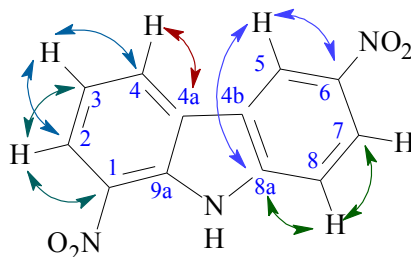


Figura 78. Correlações de HMBC da região aromática do produto 1,6-dinitrocarbazol (29.2).



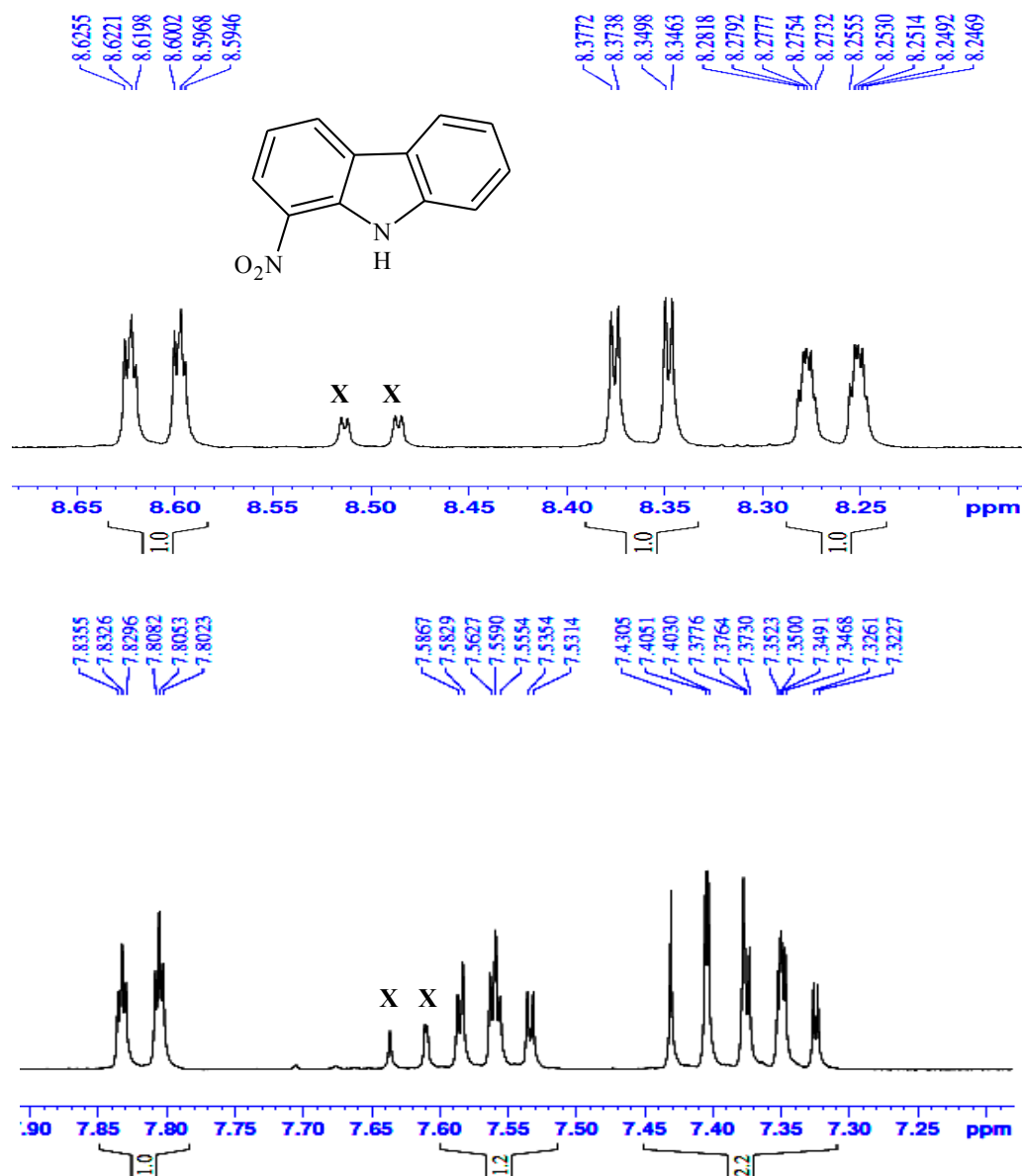
### 5.1.12 1-nitrocarbazol

A análise de RMN foi realizada em acetona deuterada (ANEXO 35). Através das ampliações da região aromática foi possível observar a presença de sete sinais de hidrogênio. Apesar de não estar completamente puro, foi possível identificar a estrutura do produto mononitrado formado. O sinal em  $\delta$  8,61 (*dd*) com  $J = 7,9$  e  $1,0$  Hz, foi atribuído ao H-4 que

está acoplado com H-3 de forma vicinal (constante maior) e com H-2 a longa distância (constante menor). Os sinais referentes aos hidrogênios H-2 e H-3, são dois multipletos (*m*) entre  $\delta$  8,24 - 8,28 e  $\delta$  7,53 - 7,58, respectivamente.

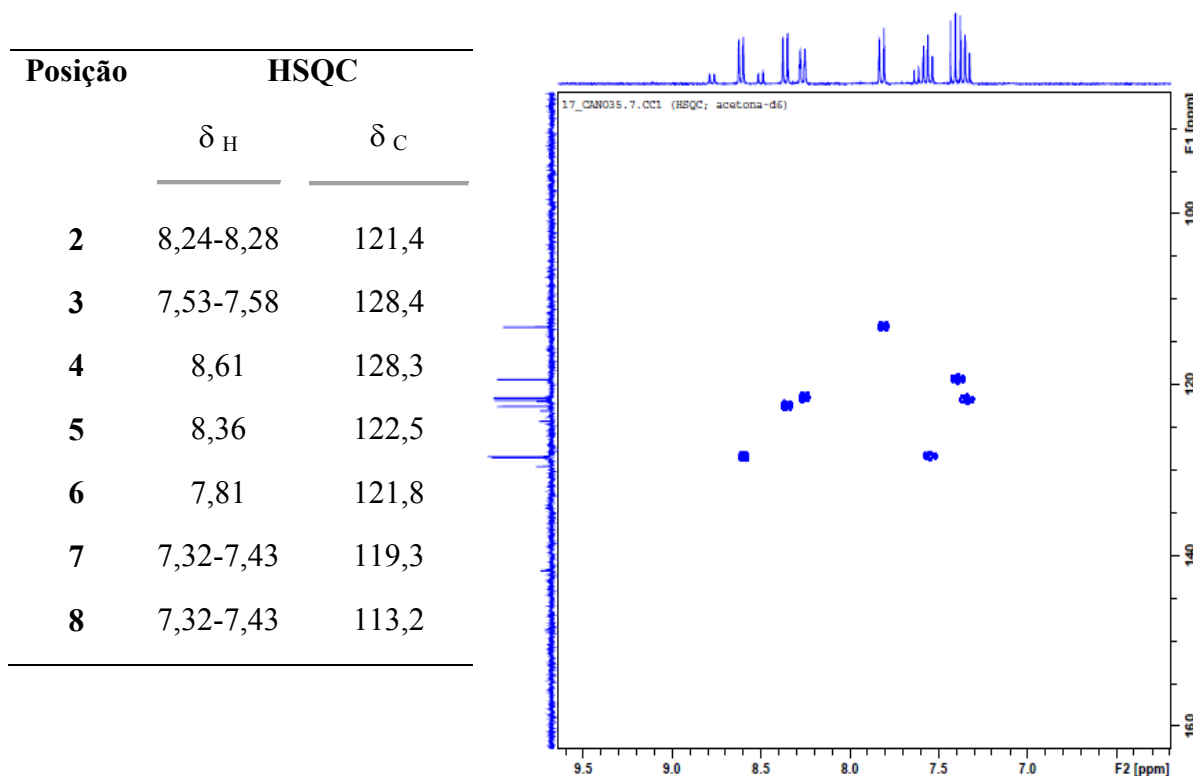
Os sinais de hidrogênios do anel benzênico não nitrado, apresentaram os seguintes deslocamentos e multiplicidades: em  $\delta$  8,36 um *dd* com  $J = 8,2$  e  $1,0$  Hz atribuído ao H-5, cujo acoplamento ocorre com H-6, um duplo triploto (*dt*) em  $\delta$  7,81 com  $J = 8,2, 1,0$  Hz. O multipletto (*m*) em  $\delta$  7,43-7,32 com integração para dois hidrogênios foram atribuídos aos H-7 e H-8 (Figura 79). As informações obtidas foram consistentes com o produto 1-nitrocarbazol.

**Figura 79.** Ampliações do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$  do produto (29.3)



As atribuições dos carbonos hidrogenados foram realizadas através do espectro de HSQC (correlação direta  $J'$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) (Figura 80), e dos carbonos quaternários foram utilizados literatura (BONESI *et al.*, 2004). Os dados foram mostrados na tabela 12.

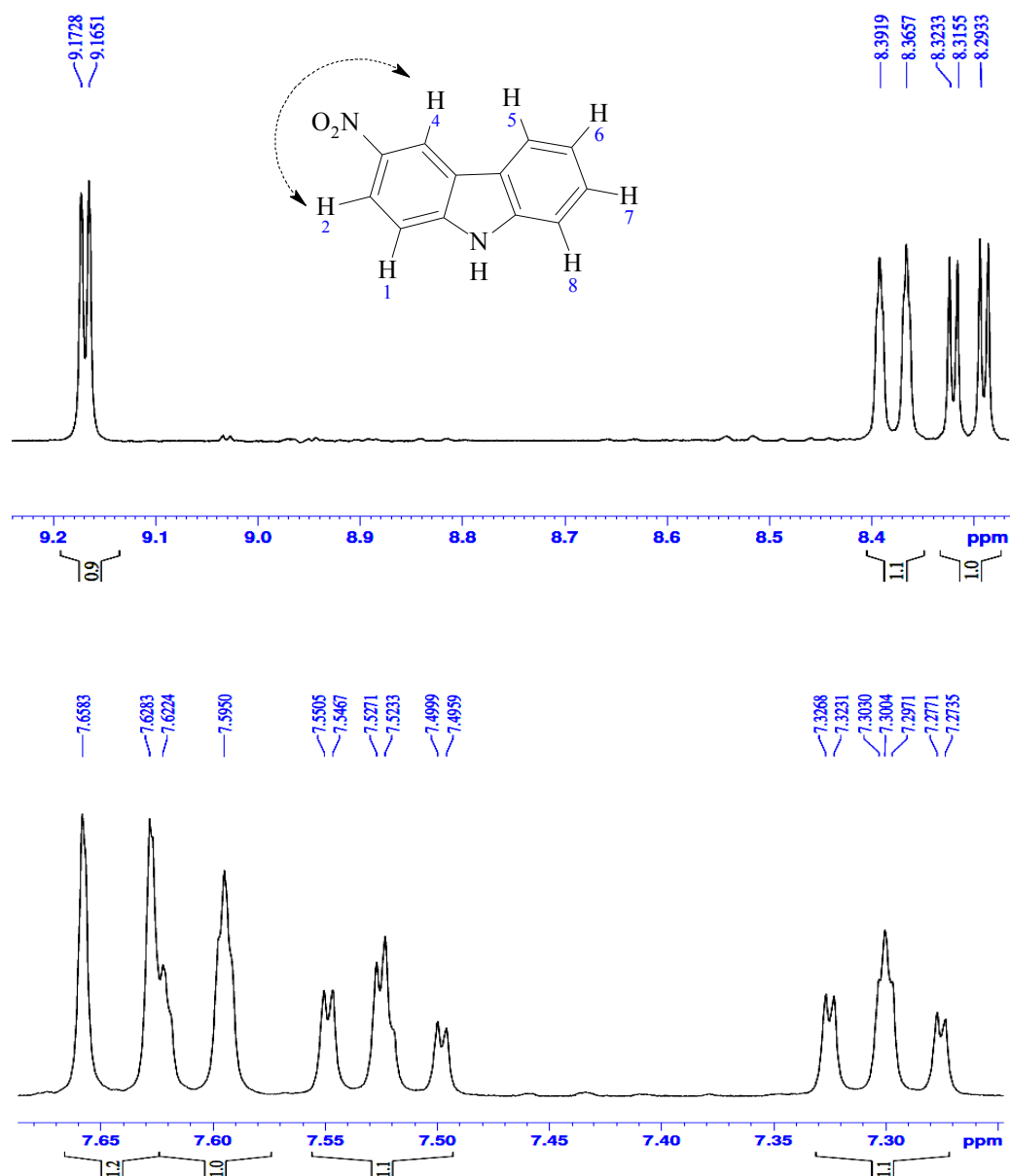
**Figura 80.** Correlações e espectro de RMN bidimensional de HSQC do produto 1-nitrocarbazol (**29.3**)



### 5.1.13 3-nitrocarbazol

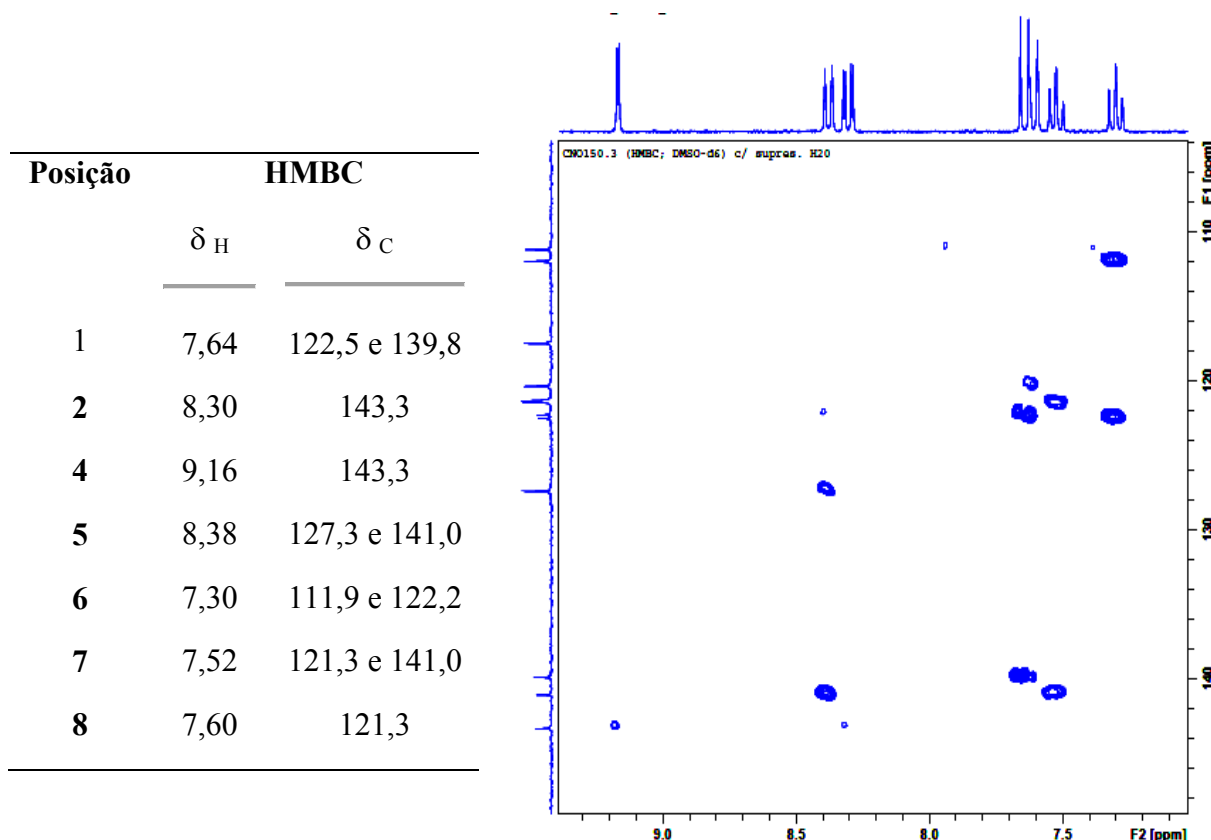
O produto **29.4** foi identificado como um produto mononitrado na posição 3 do carbazol. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram observados sete sinais, todos integrando para 1H. O sinal mais desblindado é um dubleto ( $d$ ) em  $\delta$  9,16 com  $J = 2,3$  Hz, característico de acoplamento *meta*, foi atribuído ao hidrogênio H-4. O dubleto ( $d$ ) em  $\delta$  8,38, com  $J = 7,8$  Hz foi atribuído ao H-5. O duplo dubleto ( $dd$ ) em  $\delta$  8,30 com  $J = 9,0$  e  $2,2$  Hz ao H-2. Os sinais referentes a H-1 e a H-8 ficaram ligeiramente sobrepostos, mas é possível diferenciá-los. O H-8 é um dubleto ( $d$ ) em  $\delta$  7,60 e  $J = 8,2$  Hz, e o H-1 em  $\delta$  7,64 ( $d$ ) com  $J = 9,0$  Hz. Os dois sinais em  $\delta$  7,52 e 7,30 são multipletos complexos atribuídos aos hidrogênios H-7 (" $ddd$ ",  $J = 8,2, 7,0$  e  $1,0$  Hz) e H-6 (" $ddd$ ",  $J = 7,8, 7,0$  e  $1,0$  Hz) (HOYE *et al.*, 1994).

**Figura 81.** Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{DMSO-}d_6$  do produto 3-nitrocarbazol (**29.4**)

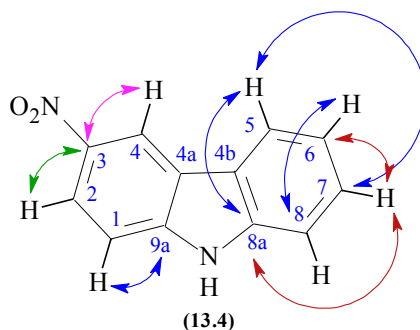


As atribuições dos carbonos foram realizadas a partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de HMBC (ANEXOS 38), além de dados da literatura (BONESI *et al.*, 2004), os quais foram mostrados na tabela 12. Foram observadas as seguintes correlações (Figura 82), para o hidrogênio H-1 ( $\delta$  7,64) acopla ( $J^2$ ) com os carbonos C-9a ( $\delta$  139,8) e com o C-2 (122,5). Os hidrogênios H-2 ( $\delta$  8,30) e H-4 ( $\delta$  9,16) correlacionam-se com o carbono C-3 ( $\delta$  143,3). As outras correlações são referentes ao anel aromático não substituído. O hidrogênio H-5 ( $\delta$  8,38) acopla ( $J^3$ ) com os carbonos C-8a ( $\delta$  141,0) e C-7 ( $\delta$  127,3). E o H-7 em  $\delta$  7,52 correlaciona-se com os carbonos  $\delta$  121,3 e 141,0 (C-6 e C-8a).

**Figura 82.** Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e espectro de RMN bidimensional de HMBC do produto 3-nitrocarbazol (29.4)



**Figura 83.** Algumas correlações de HMBC do produto 3-nitrocarbazol (29.4).



O produto minoritário **13.5**, ainda apresenta resquícios do produto **13.4**, mas foi possível caracteriza-lo como sendo o dinitrado, com as substituições nas posições 1 e 8. A elucidação estrutural foi realizada através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (ANEXO 39). Por se tratar de uma estrutura simétrica os padrões de integração observados foram de dois hidrogênios para cada sinal. A presença do tripleto (*t*) em  $\delta$  7,49 com  $J = 8,0$  Hz atribuído H-3 e H-6, é consistente com a nitração nas posições 1 e 8 e não nas posições 3 e 6. O dubleto (*d*) em  $\delta$  8,66 com  $J = 8,0$  Hz e o duplo dubleto (*dd*) em  $\delta$  8,38 com  $J = 8,0$  e  $0,8$  Hz, foram atribuídos aos hidrogênios (H-4 + H-5) e (H-2 + H-7), respectivamente (Figura 84).

**Figura 84.** Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{DMSO-}d_6$  do produto 1,8-dinitrocarbazol (**13.5**)

Andreia\_CNO150\_1 Acet

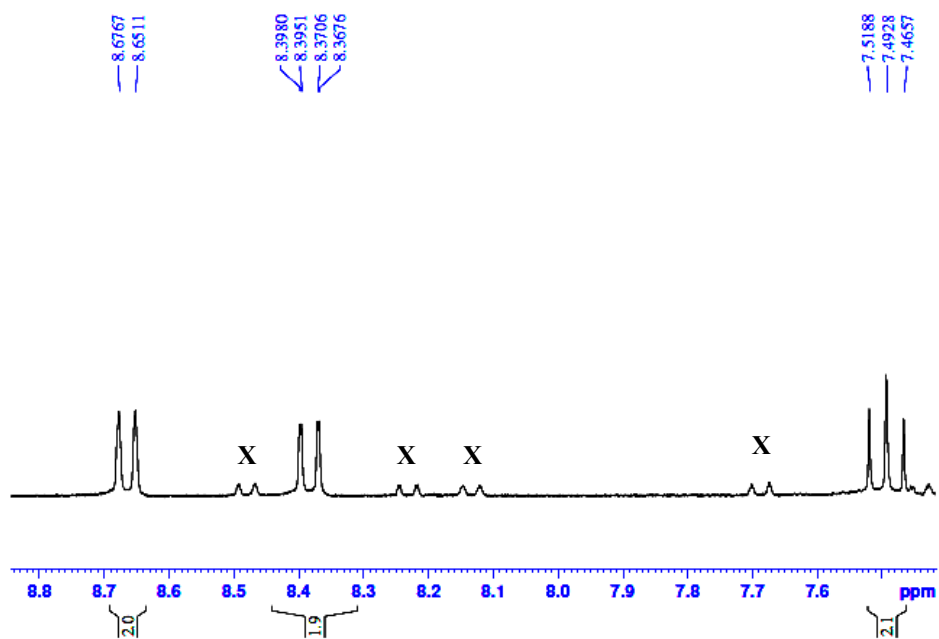


Tabela 12

Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  dos quatro produtos nitrados do carbazol e dados da literatura

N <sup>o</sup> C/H	RMN $^1\text{H}$ (literatura)* metanol- $d_4$ $\delta$ ; $m$ $J$ (n <sup>o</sup> H)	RMN $^1\text{H}$ DMSO- $d_6$ $\delta$ ( $m$ $J$ Hz; n <sup>o</sup> H)	RMN $^{13}\text{C}$ (literatura)* metanol- $d_4$ $\delta$	RMN $^{13}\text{C}$ DMSO- $d_6$ $\delta$
<b>1,6-dinitrocarbazol</b>				
1	-	-	132,4	135,4
2	8,39	8,87 ( <i>dd</i> , $J = 8,0$ e $0,9$ ; 1H)	119,9	133,1
3	7,49	7,48 ( <i>t</i> , $J = 8,0$ ; 1H)	123,2	122,9
4	8,90	8,41 ( <i>dd</i> , $J = 8,0$ e $0,9$ ; 1H)	129,2	127,3
4a	-	-	124,6	129,6
4b	-	-	121,4	120,1
5	9,30	9,31 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ ; 1H)	116,5	118,4
6	-	-	140,0	145,4
7	8,50	8,40 ( <i>dd</i> , $J = 9,0$ e $2,2$ ; 1H)	122,6	122,0
8	7,88	7,87 ( <i>d</i> , $J = 9,0$ ; 1H)	112,9	113,6
9a	-	-	129,1	123,6
8a	-	-	132,1	141,5
N-H	-	-	-	-
<b>1-nitrocarbazol</b>				
1	-	-	140,6	141,7
2	8,24 ( <i>d</i> , $J = 8,0$ ; 1H)	8,24-8,28 ( <i>m</i> ; 1H)	121,6	121,4
3	7,35 ( <i>dd</i> , $J = 8,0$ e $7,3$ ; 1H)	7,53-7,58 ( <i>m</i> ; 1H)	127,9	128,4
4	8,62 ( <i>d</i> , $J = 7,3$ ; 1H)	8,61 ( <i>dd</i> , $J = 7,9$ e $1,0$ ; 1H)	132,8	128,3
4a	-	-	127,1	123,0
4b	-	-	121,4	121,7
5	8,31 ( <i>dd</i> , $J = 7,8$ e $1,1$ ; 1H)	8,36 ( <i>dd</i> , $J = 8,2$ e $1,0$ ; 1H)	120,5	122,4
6	7,29 ( <i>ddd</i> , $J = 7,8$ , $7,3$ e $1,1$ ; 1H)	7,81 ( <i>ddd</i> , $J = 8,2$ , $1,0$ e $1,0$ ; 1H)	118,2	121,9
7	7,51 ( <i>dd</i> , $J = 8,4$ e $7,3$ ; 1H)	7,43-7,32 ( <i>m</i> ; 2H)	127,1	119,3
8	8,41 ( <i>d</i> , $J = 8,4$ ; 1H)	7,43-7,32; <i>m</i> (2H)	112,6	113,2
9a	-	-	130,9	124,2



Tabela 12

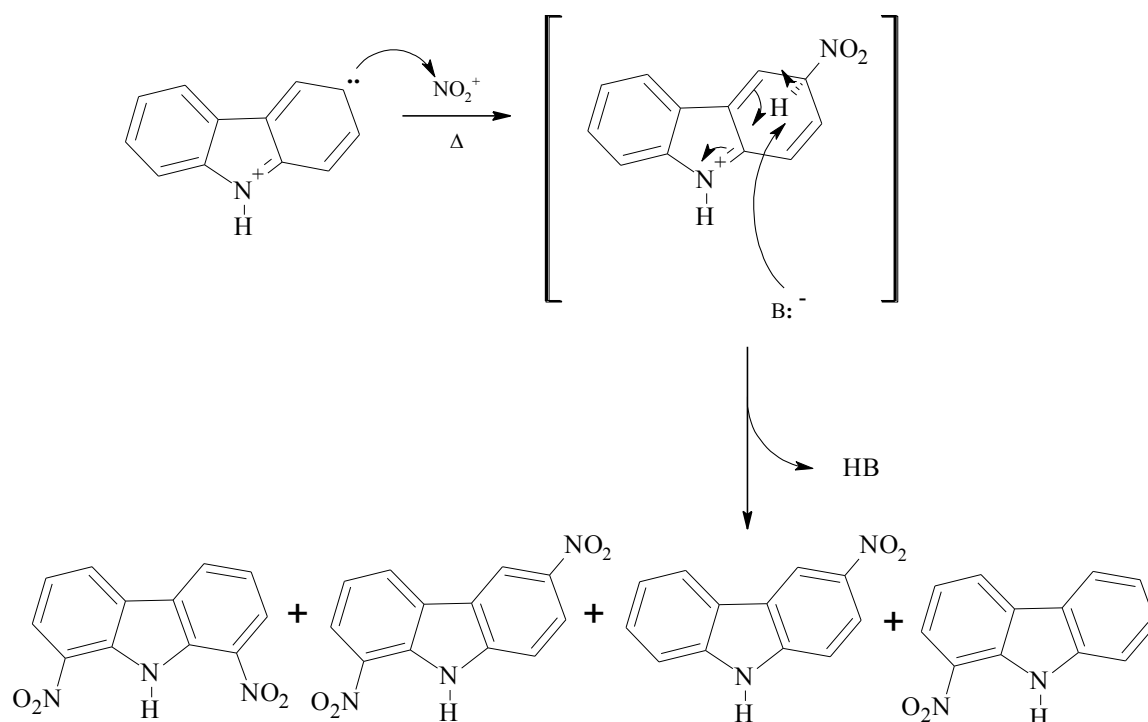
Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  dos quatro produtos nitrados do carbazol e dados da literatura (Cont.)

<b>8a</b>	-	-	131,6	129,5
<b>N-H</b>	12,15	11,53	-	-
<b><u>3-nitrocarbazol</u></b>				
<b>1</b>	7,75-7,58 ( <i>m</i> ; 2H)	7,64 ( <i>d</i> , $J = 9,0$ ; 1H)	111,7	111,1
<b>2</b>	8,29 ( <i>dd</i> , $J = 8,8$ e 1,8; 1H)	8,30 ( <i>dd</i> , $J = 9,0$ e 2,3; 1H)	121,1	122,5
<b>3</b>	-	-	143,1	143,3
<b>4</b>	9,15 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ ; 1H)	9,16 ( <i>d</i> , $J = 2,3$ ; 1H)	116,9	117,4
<b>4a</b>	-	-	122,2	122,2
<b>4b</b>	-	-	121,9	121,4
<b>5</b>	8,36 ( <i>d</i> , $J = 8,0$ ; 1H)	8,38 ( <i>d</i> , $J = 7,8$ ; 1H)	120,0	120,3
<b>6</b>	8,51 ( <i>dd</i> , $J = 8,0$ e 6,9; 1H)	7,30 ( <i>ddd</i> , $J = 7,8$ , 7,0 e 1,0; 1H)	120,0	121,3
<b>7</b>	7,29 ( <i>dd</i> , $J = 7,7$ e 6,9; 1H)	7,52 ( <i>ddd</i> , $J = 8,2$ , 7,0 e 1,0; 1H)	127,3	127,3
<b>8</b>	7,75-7,58 ( <i>m</i> ; 2H)	7,60 ( <i>d</i> , $J = 8,2$ ; 1H)	110,9	111,9
<b>8a</b>	-	-	140,8	139,8
<b>9a</b>	-	-	139,6	141,0
<b>N-H</b>	12,02	12,08, s, (1H)	-	-
<b><u>1,8-dinitrocarbazol</u></b>				
<b>1</b>	-	-	-	-
<b>2+7</b>	-	8,38 ( <i>d</i> , $J = 8,0$ ; 2H)	-	-
<b>3+6</b>	-	7,49 ( <i>t</i> , $J = 8,0$ ; 2H)	-	-
<b>4+5</b>	-	8,66 ( <i>dd</i> , $J = 8,0$ e 0,8; 2H)	-	-
<b>N-H</b>	-	11,27, s (1H)	-	-

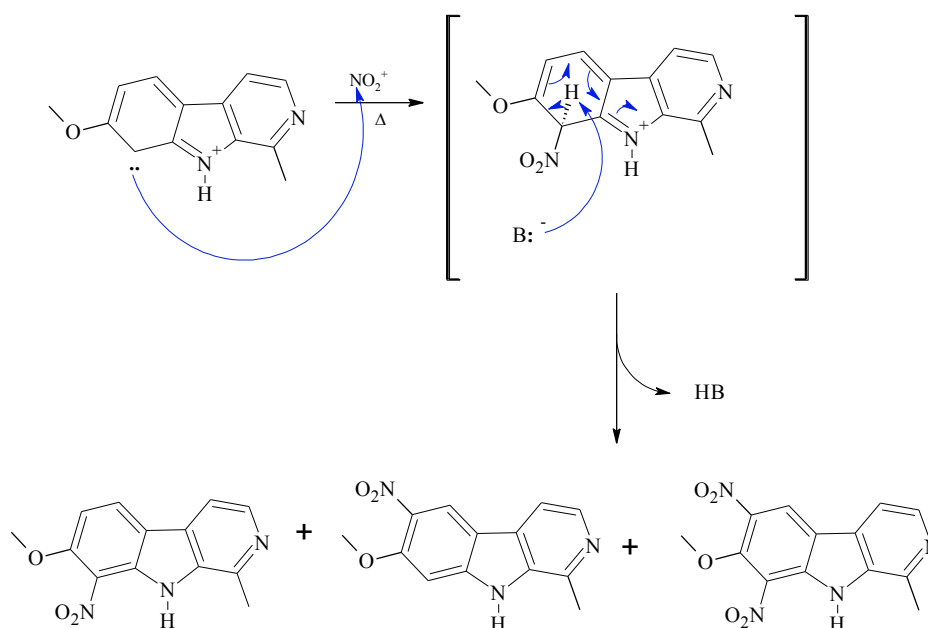
\*Bonesi *et al.*, 2004; Ponce *et al.*, 2001

No total foram obtidos e identificados dez produtos nitrados, a partir dos materiais de partida harmina, harmano, norhamano e carbazol. O mecanismo de reação de nitração ocorre de forma semelhante para os esqueletos  $\beta$ -carbolínicos e carbazólico. A reação inicia-se com a formação do eletrólito ( $\text{NO}_2^+$ ). Em seguida ocorre o ataque ao íon nitrônio, formando o complexo  $\pi$  como intermediário e em contato com a base conjugada, tem o próton abstraído e a regeneração da aromaticidade do anel. Para o carbazol devido sua estrutura simétrica, o número de posições susceptíveis a substituição é maior, sendo assim um maior número de derivados podem ser obtidos (Figura 85). Neste trabalho foram obtidos quatro derivados os monitrados 1-nitro e 3-nitro e os dinitrado 1,6-dinitro e 1,8-dinitro-carbazol. Além destes, um quinto derivado já foi discutido na literatura o 3,6-dinitrocarbazol (PONCE *et al.*, 2001), no entanto não foi isolado neste trabalho.

**Figura 85.** Proposta mecanística para reação de nitração do carbazol



Os derivados  $\beta$ -carbolínicos obedecem ao mesmo mecanismo, mas a possibilidade de derivados se limita aos três tipos obtidos neste trabalho, os 6-nitro, 8-nitro ou 1,8-dinitro- $\beta$ -carbolicinas (Figura 86).

**Figura 86.** Proposta mecanística para reação de nitração da harmina

A presença do nitrogênio indólico aumenta a densidade eletrônica do anel de seis membros ativando a substituição eletrofílica e favorecendo as substituições nas posições *orto* e *para* desse anel. Por esse motivo os derivados obtidos nas nitrações dos  $\beta$ -carbolínicos foram os produtos nitrados nas posições 6 (*para*) e 8 (*orto*). No entanto foi observado majoritariamente a formação dos derivados 6-nitro na maioria das reações, este efeito pode estar associado a distribuição das cargas, aumentando a estabilidade dos intermediários *para*-substituídos (CARDOSO, 2001).

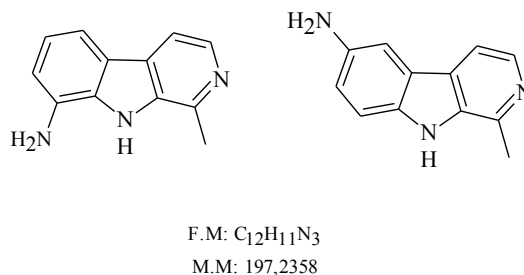
Com o objetivo de obter derivados com grupos aminos, a mistura de derivados da nitração do harmano foi submetida ao procedimento reacional para redução dos grupos nitros e formação de grupos aminos.

#### 5.1.14 Redução do 6-nitroharmano e 8-nitroharmano

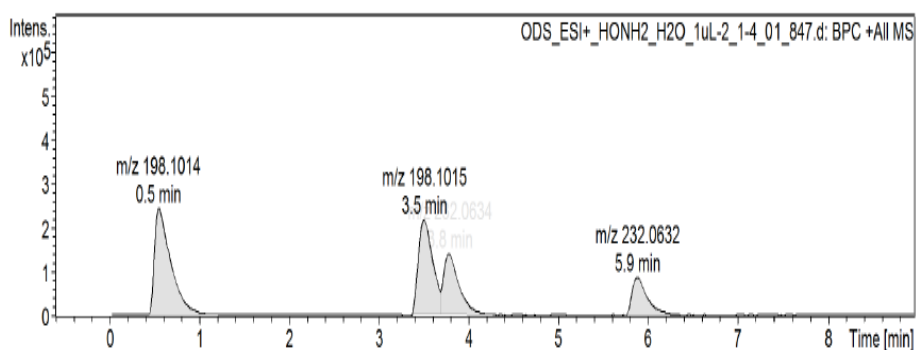
A mistura reacional após procedimento de redução dos grupos nitro, foi analisada por analisados UFLC/HRMS-ESI e no cromatograma foram observados a presença de quatro picos, sendo dois deles os íons moleculares  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  198,1014 ( $\Delta = 5,6$  ppm) e tempo de retenção  $t_r = 0,5$  min. e o  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  198,1015 ( $\Delta = 5,0$  ppm) e  $t_r = 3,5$ min, referente a fórmula  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_3$ , cuja massa molecular teórica de 198,1025, e os outros dois de 232,0634 e 232,0632 são impurezas. Na tentativa de purificar os produtos a mistura foi lavada diversas vezes com água destilada gelada e foi observado que na fase aquosa havia algo com coloração vermelho intenso e um sólido residual rosa claro. A fase aquosa foi seca sob um vidro de relógio em banho-maria e o sólido residual foi seco em banho de areia. Houve

decomposição do resíduo da fase aquosa e o resíduo sólido não solubilizaou em nenhum solvente orgânico deuterado (de clorofórmio a DMSO), impossibilitando a identificação por RMN.

**Figura 87.** Possíveis estruturas dos produtos da redução do 8-nitro e 6-nitro-harmano



**Figura 88.** Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI da mistura reacional de redução dos nitro-harmano a amino-harmano



## 5.2 SAIS DE HARMINA

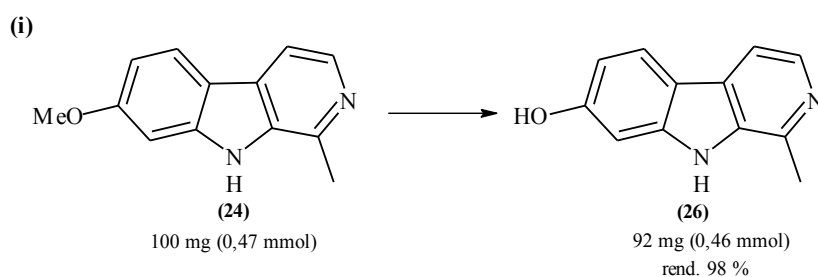
Os sais de harmina foram obtidos por borbulhamento de HCl gasoso em solução de harmina em Et<sub>2</sub>O: DCM: MeOH (6,7:1,1:2,2). A constatação da formação de sais se baseou na solubilidade em água. Os sais foram submetidos a análises de RMN <sup>1</sup>H em D<sub>2</sub>O (ANEXO 41). Para determinar a quantidade exata de moléculas de HCl que foi sendo agregadas as moléculas, amostras dos produtos deverão ser submetidas a análise elementar (C, H e N), para verificar a massa exata da substâncias e com isso determinar a quantidade de HCl em cada sal. Os dados espectrais do RMN<sup>1</sup>H em D<sub>2</sub>O foram os seguintes:

Harmina.HCl: RMN <sup>1</sup>H (300 MHz D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) 10,73 (s, N-H), 7,51 (*d*, 1H, *J* = 6,1Hz), 7,27 (*d*, 1H, *J* = 6,1 Hz), 7,08 (*d*, 1H, *J* = 8,8 e 1,7 Hz), 5,99 (*d*, 1H, *J* = 1,5 Hz), 3,58 (*s*, 3H) e 2,20 (*s*, 3H). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) 161,26, 143,45, 134,72, 131,62, 130,66, 127,18, 122,25, 112,25, 112,61, 111,69, 92,46, 55,35, 14,50.

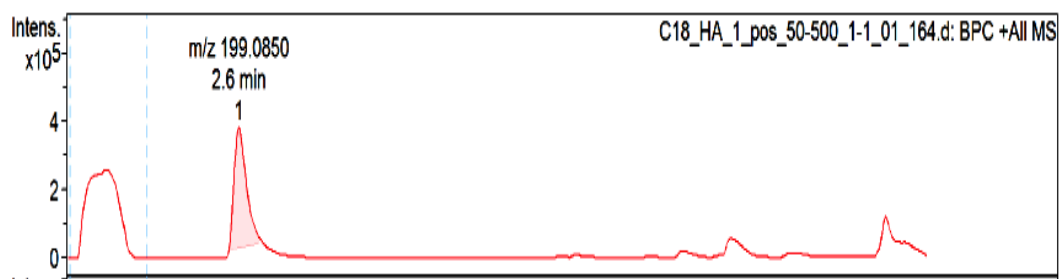
### 5.3 O-DESMETILAÇÃO HARMINA E HARMALINA

O procedimento reacional para a *O*-desmetilação da harmalina e harmina, foi baseada na metodologia descrita por Reniers *et al.* (2011). Os produtos harmol (**26**) e harmalol (**27.3**), foram obtidos através da clivagem da ligação aril metil éter, utilizando HBr aquoso e aquecimento (Figuras 89 e 91). Os produtos obtidos pela *O*-desmetilação da harmina e harmalina foram analisados UFLC/HRMS-ESI e os cromatogramas foram observados as massas dos íons adutos  $[M+H]^+$   $m/z$  199,0850 ( $\Delta = 7,5$  ppm) e tempo de retenção  $t_r = 2,6$  min. referente ao aduto  $[M+H]^+$  da fórmula  $C_{12}H_{10}N_2O$  (199,0865) (Figura 90). Para o harmalol  $[M+H]^+$   $m/z$  201,1025 ( $\Delta = 1,5$  ppm) e tempo de retenção  $t_r = 2,7$  min. referente a fórmula  $C_{12}H_{12}N_2O$ , cujo valor teórico é  $[M+H]^+$  201, 1022 (Figura 92).

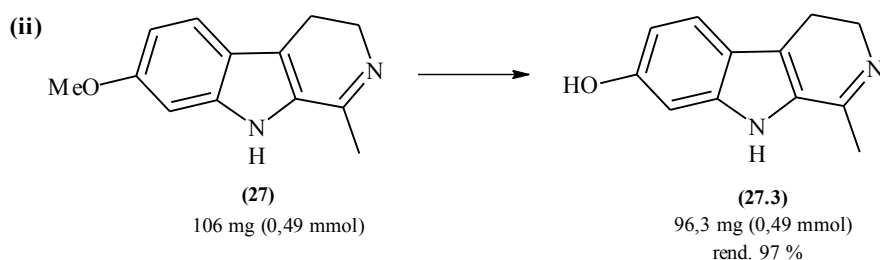
**Figura 89.** Produtos obtidos a partir da *O*-desmetilação da harmina



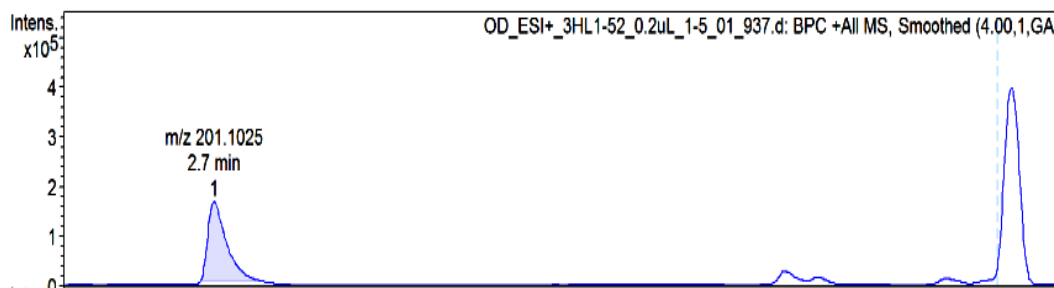
**Figura 90.** Cromatograma e espectro de massas de alta resolução (UFLC/HRMS-ESI) do harmol (**26**)



**Figura 91.** Produtos obtidos a partir da *O*-desmetilação da harmalina (ii)



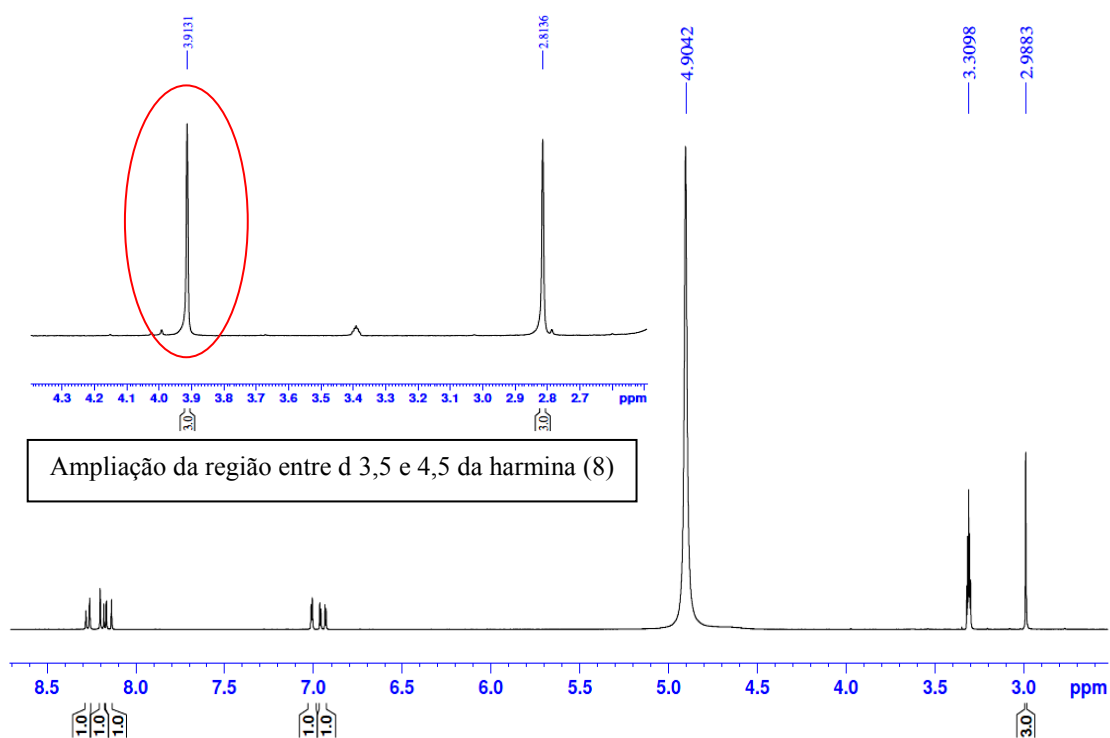
**Figura 92.** Cromatograma e espectro de massas de alta resolução (UFLC/HRMS-ESI) do harmalol (**27.3**)



Para ambas os produtos obtidos harmol (sólido cristalino de coloração branca) e harmalol (sólido no formato de agulhas de coloração marrom), não foram necessárias purificações, e os rendimentos observados foram de 98% para o harmol (**8.4**) e 97 % para o harmalol, valores condizentes com os descritos na literatura (RENIERS *et al.*, 2011). A elucidação das estruturas foi realizada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono e os dados foram comparados com os materiais de partida.

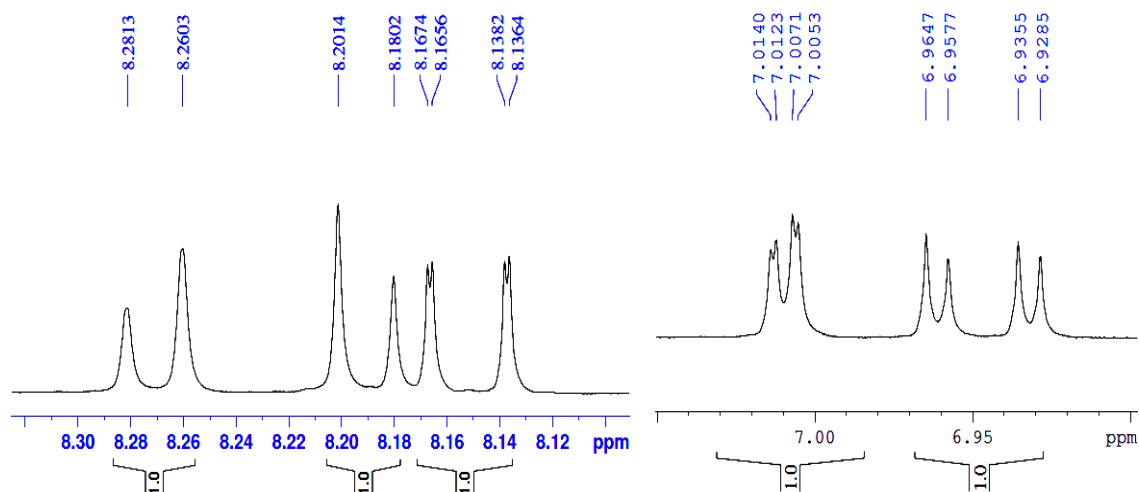
Analisando inicialmente o espectro de RMN de <sup>1</sup>H do produto **26** (harmol), observam que a ausência do singlete na região entre 3,5 e 4,5 ppm, referente a metoxila presente no espectro da harmina (Figura 93), indicando que houve a desmetilação da molécula.

**Figura 93.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H em metanol-*d*<sub>4</sub> do harmol (**26**) e ampliação da região entre δ 4,3- 2,7 do padrão harmina. (**24**)



Na análise detalhada da região aromática observam-se dois dubletos em  $\delta$  8,27 e 8,19 ( $J = 6,3$  Hz), atribuídos aos hidrogênios no anel piridínico H-3 e H-4, respectivamente, e três duplos dubletos em  $\delta$  8,15 ( $dd$ ,  $J = 8,7$  e  $0,5$  Hz) atribuído ao H-5, em  $\delta$  6,94 ( $dd$ ,  $J = 8,7$  e  $2,1$  Hz) referente ao H-6 e  $dd$  em  $\delta$  7,00 ( $J = 2,1$  e  $0,5$  Hz) atribuído ao H-8 (Figura 94).

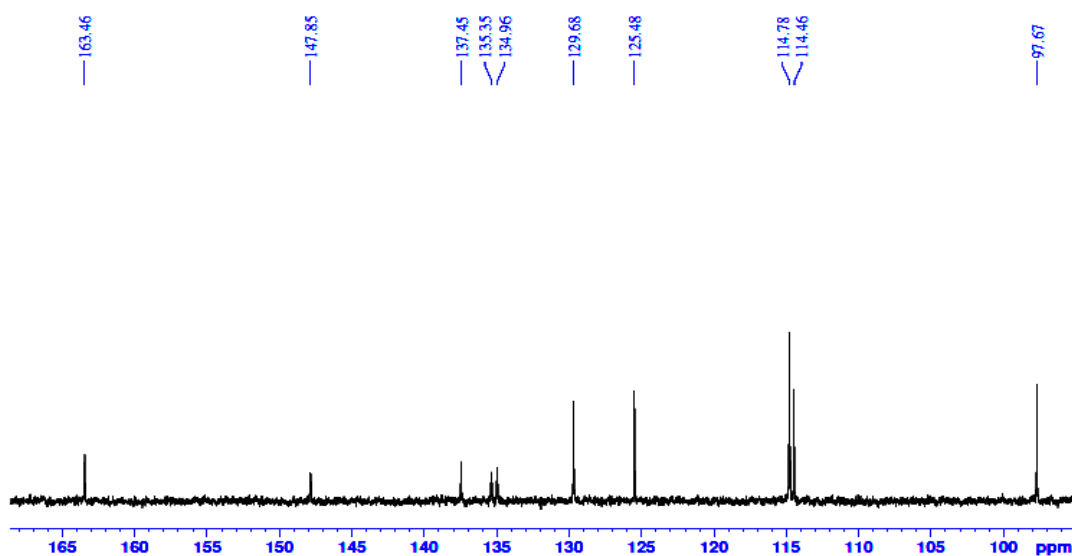
**Figura 94.** Ampliação da região aromática do harmol (26)



No espectro de carbono também não é mais observado a presença do carbono em aproximadamente  $\delta$  55 ppm (ANEXO 44), que corresponde ao carbono da metoxila. Todos os outros sinais são bem similares aos encontrados no material de partida.

**Figura 95.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em metanol- $d_4$  do produto harmol (26)

HA-1 (10 mg,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



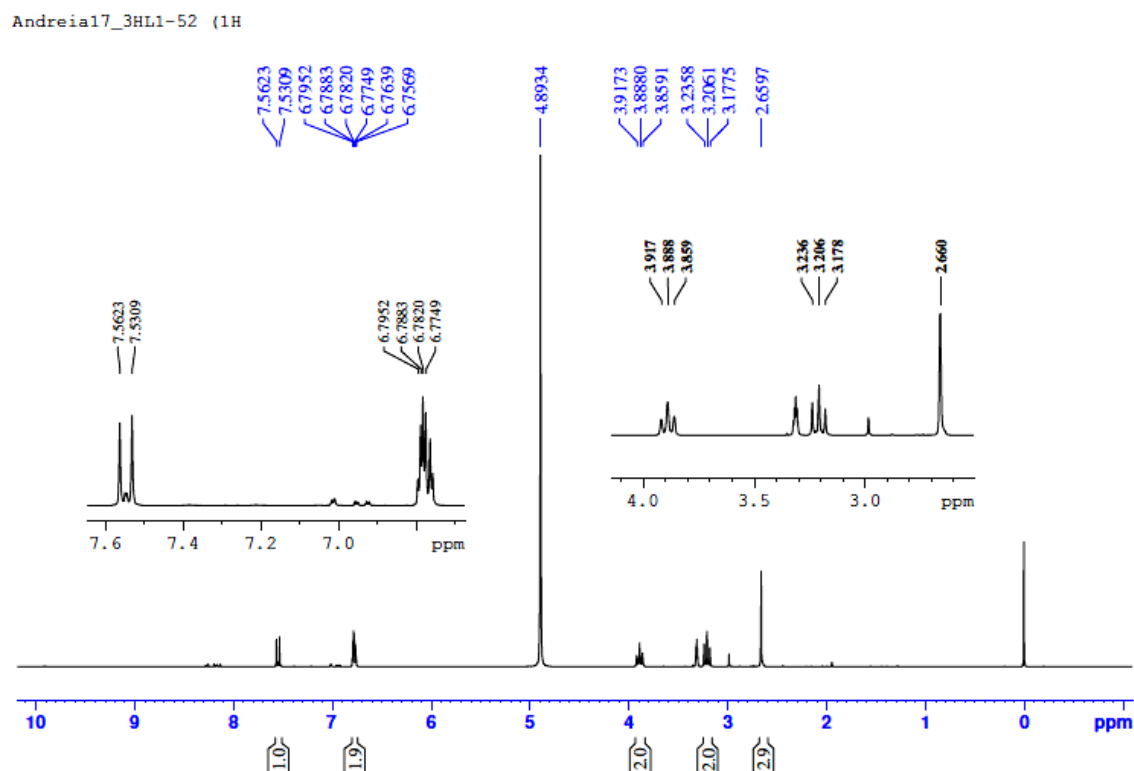
Os dados de hidrogênio e carbono do produto foram comparados com os obtidos para a harmina e estão apresentados na tabela 13.

**Tabela 13**  
Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do padrão harmina (24) e do derivado harmol (26)

C/H	RMN $^1\text{H}$ (24) Clorofórmio- $d_1$ $\delta$ (m, J Hz; n° H)	RMN $^1\text{H}$ (26) Metanol- $d_4$ $\delta$ (m, J Hz; n° H)	RMN $^{13}\text{C}$ (24) Clorofórmio- $d_1$ $\delta$	RMN $^{13}\text{C}$ (26) Metanol- $d_4$ $\delta$
1		-	-	147,86
3	8,14 ( <i>d</i> , $J= 5,6$ ; 1H)	8,27 ( <i>d</i> , $J= 6,3$ ; 1H)	-	129,67
4	7,71 ( <i>d</i> , $J= 5,6$ ; 1H)	8,19 ( <i>d</i> , $J= 6,3$ ; 1H)	112,32	114,45
4a	-	-	115,12	115,12
4b	-	-	129,42	
5	7,92 ( <i>d</i> , $J= 8,8$ ; 1H)	8,15 <i>dd</i> , $J= 8,7$ e $0,5$ (1H)	122,73	125,47
6	6,88 ( <i>dd</i> , $J= 8,8$ e $2,2$ ; 1H)	6,94 ( <i>dd</i> , $J= 8,7$ e $2,1$ ; 1H)	110,26	114,77
7		-	161,27	163,45
8	6,98, <i>d</i> , $J= 2,2$	7,00 ( <i>dd</i> , $J= 2,1$ e $0,5$ ; 1H)	96,62	97,68
8a	-	-	141,00	137,45
9a	-	-	135,73	135,34
Me	2,80 ( <i>s</i> ; 3H)	2,98 ( <i>s</i> ; 3H)	18,67	16,05
OMe	3,90 ( <i>s</i> ; 3H)	-	55,58	-

Assim como para o harmol (26), para o produto harmalol (27.3) foi observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a ausência do singlete referente a *O*-metila da hamalina (Figura 96). Os outros sinais são similares a harmalina (27), com sinais de três hidrogênios na região aromática referentes aos hidrogênios do anel indólico com deslocamentos  $\delta$  7,55 (*d*,  $J = 9,4$  Hz), integrando para um hidrogenios atribuído ao H-5 e o multiplete em  $\delta$  6,78, integrando para dois hidrogenios atribuídos aos hidrogenios H-6 e H-8. Os sinais menos deslocados em  $\delta$  3,88 e 3,21 atribuídos a H-3 e H-4, respectivamente, ambos apresentaram-se na forma de tripletos, com constantes de acoplamento  $J = 8,7$  Hz.

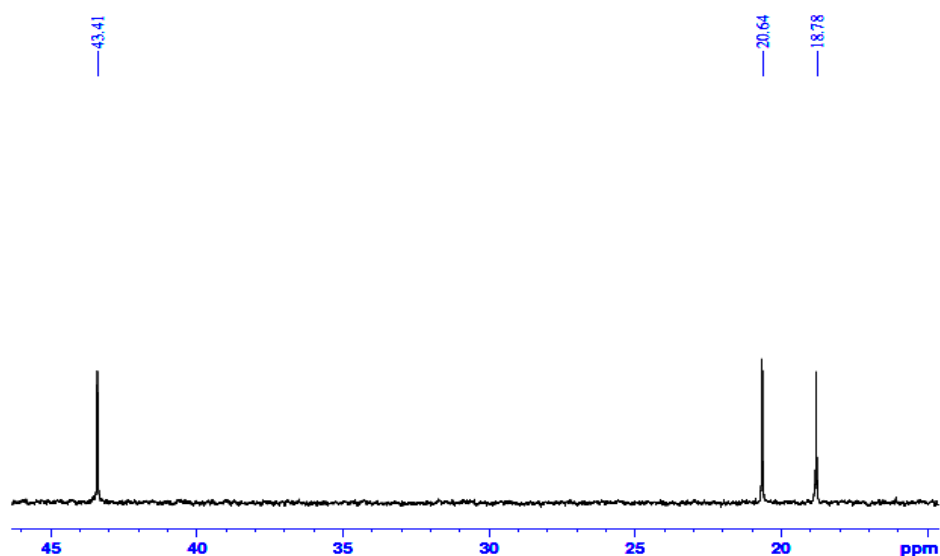


**Figura 96.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em metanol- $d_4$  do harmalol (27.3)

Analisando o espectro de carbono, observam-se doze sinais no total, três deles encontram-se na região de carbonos com hidridização  $sp^3$ . Em  $\delta$  43,41 o sinal atribuído ao C-3 e em  $\delta$  20,64 e 18,78 aos carbonos C-4 e ao carbono da metila (Figura 97).

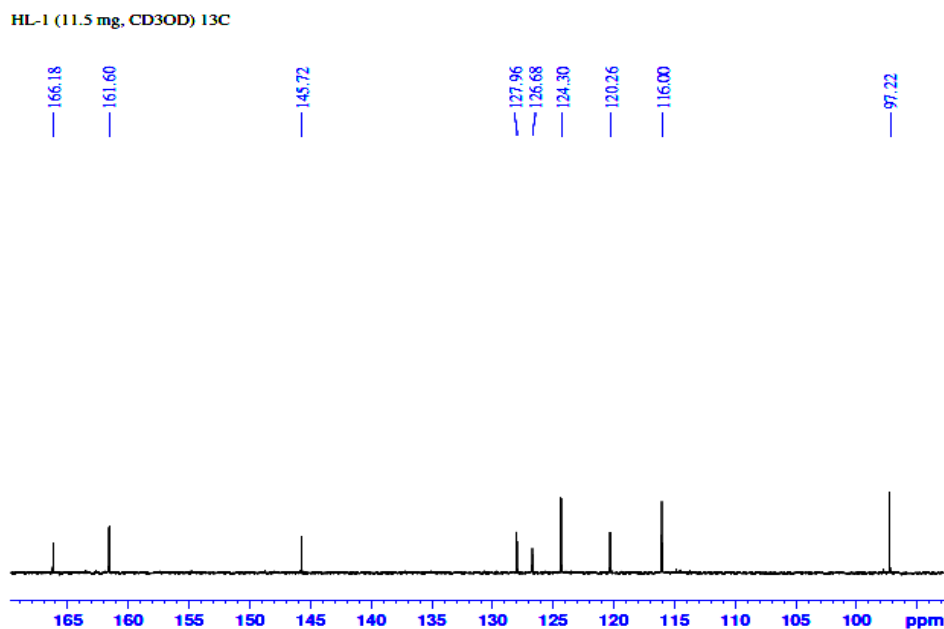
**Figura 97.** Ampliação de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) da região de carbonos alifáticos em metanol- $d_4$  do harmalol (27.3)

HL-1 (11.5 mg, CD3OD) 13C



Os outros sinais são referentes aos carbonos do anel indólico (Figura 98). Todas as atribuições foram comparadas com dados para a harmalina e são apresentados na tabela 14.

**Figura 98.** Ampliação de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) da região de carbonos aromáticos em metanol- $d_4$  do harmalol (27.3)



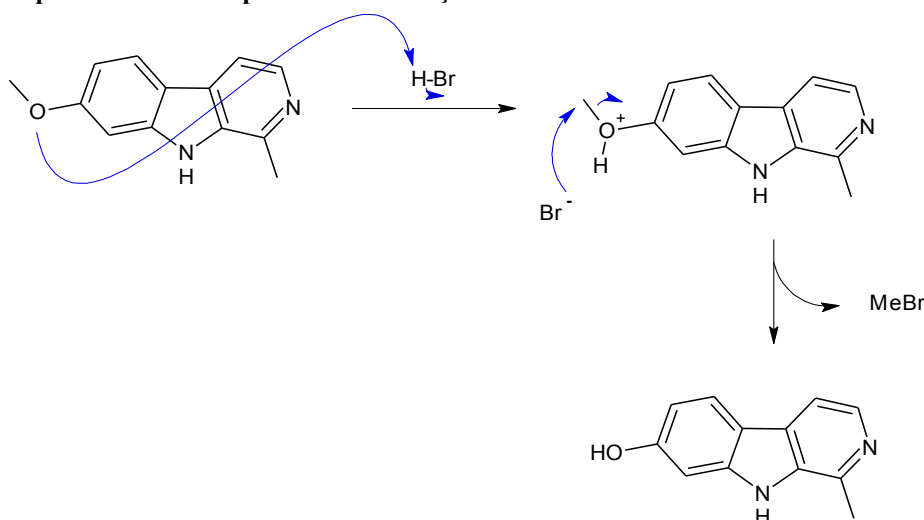
**Tabela 14**

Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do padrão harmalina (27) e do derivado harmalol (27.3)

N <sup>o</sup> H/C	RMN $^1\text{H}$	RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$	RMN $^{13}\text{C}$
	(27) Clorofórmio- $d_1$ $\delta$ (m, J Hz; n <sup>o</sup> H)	(27.3) Metanol- $d_4$ $\delta$ (m, J Hz; n <sup>o</sup> H)	(27) Clorofórmio- $d_1$ $\delta$	(27.3) Metanol- $d_4$ $\delta$
1	-	-	162,2	166,0
3	3,80 (t, J = 8,0; 2H)	3,88 (t, J = 8,75; 2H)	42,1	43,2
4	3,13 (t, J = 8,0; 2H)	3,21 (t, J = 8,75; 2H)	20,1	20,5
4a	-	-	119,4	120,1
4b	-	-	125,5	126,5
5	7,46 (d, J = 8,7; 1H)	7,55 (d, J = 9,4; 1H)	122,7	124,1
6	6,82 (dd, J = 8,7 e 2,1; 1H)	6,78 (m; 2H)	115,8	115,8
7	-	-	165,2	161,4
8	6,87 (d, J = 2,1; 1H)	6,78 (m; 2H)	94,2	97,1
8a	-	-	-	145,5
9a	-	-	-	127,8
Me	2,78 (s; 3H)	2,65 (s; 3H)	19,1	18,6
OMe	3,90, s, (3H)	-	56,0	-
N-H	11,54	11,62	-	-

A proposta mecanística para a formação dos derivados *O*-desmetilados ocorre, com a protonação do oxigênio, seguido do ataque do íon brometo ao carbono da metoxila.

**Figura 99. Proposta mecanística para *O*-desmetilação**



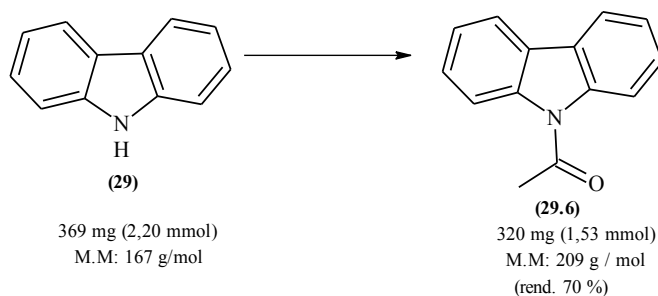
#### 5.4 REAÇÃO DE ACETILAÇÃO

A acetilação realizada neste trabalho segue procedimentos distintos para o carbazol e para os derivados  $\beta$ -carbolínicos, no caso do carbazol a acetilação levou à formação de uma amida e no caso do harmol, foi observado à formação de em ésteres.

##### 5.4.1 Acetilação do carbazol

A acetilação do carbazol foi realizada baseada em metodologia descrita por Nizami e colaboradores (2012). Na tentativa de se obter o produto acetilado as condições foram variadas como concentração dos reagentes, temperatura e tempo de reação.

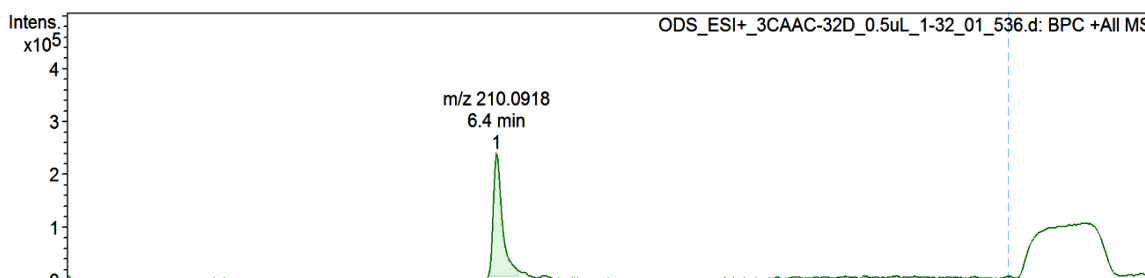
**Figura 100. Produto obtido a partir da acetilação do carbazol e o rendimento**



O produto obtido na reação foi o *N*-acetil-carbazol (**29.6**), com rendimento de 70 % (Figura 100) , a purificação levou a obtenção de um sólido branco cristalino, que foi

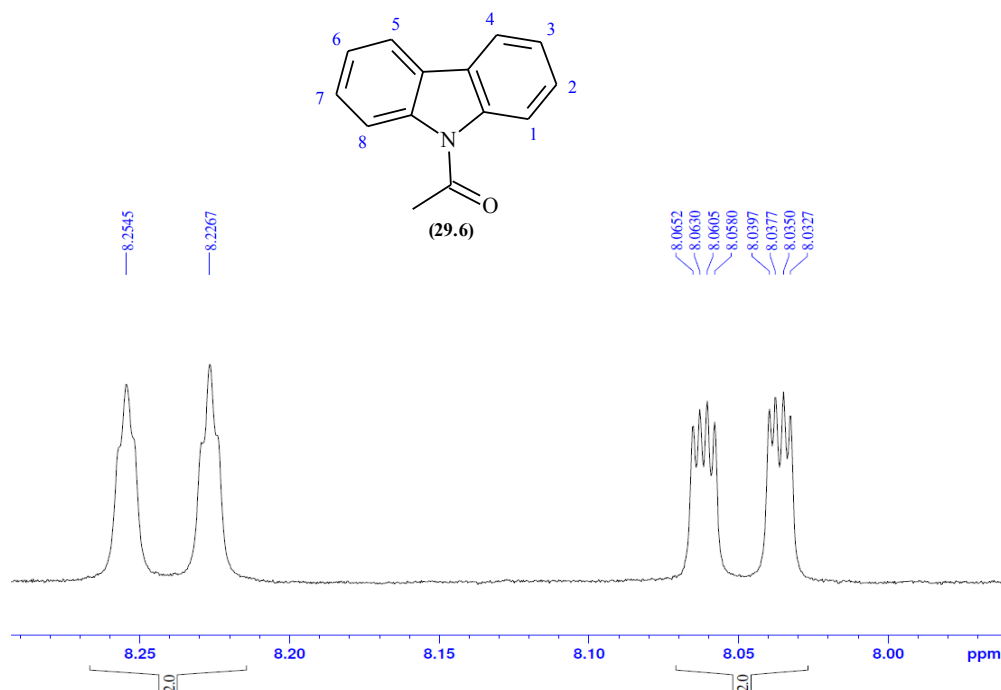
submetido a UFLC/HRMS-ESI (Figura 101). O cromatograma apresentou um íon aduto  $[M+H]^+$  com  $m/z$  210,0918 e  $t_r = 6,4$  min, condizente com a fórmula molecular de  $C_{14}H_{12}NO$  (valor teórico  $[M+H]^+$  210,0913;  $\Delta = 2,4$  ppm), confirmando que houve a monoacetilação do carbazol.

**Figura 101.** Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI do produto (29.6)



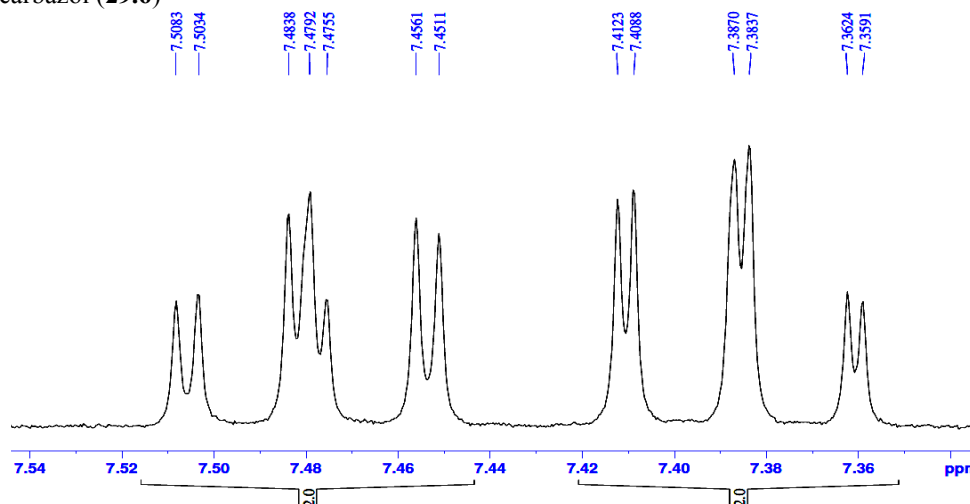
A caracterização estrutural foi confirmada através do RMN (ANEXO 49). Analisando a ampliação da região aromática do espectro de RMN de  $^1H$  foi possível observar no produto acetilado a simetria do anel carbazólico, com quatro sinais na região aromática, todos integrando para dois hidrogênios cada. Em  $\delta$  8,24 um duplete ( $d$ ) com  $J = 8,3$  Hz, atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-5 e em  $\delta$  8,04 duplo duplo duplete ( $ddd$ ) com  $J = 7,6, 1,5$  e  $0,7$  Hz, atribuídos a H-1 e H-8 (Figura 102)

**Figura 102.** Ampliação da região aromática do espectro de RMN de  $^1H$  (300 MHz) em metanol- $d_4$ , do produto *N*-acetil-carbazol (29.6)



Os multipletos em  $\delta$  7,50 - 7,45 e em  $\delta$  7,41 - 7,39, são referentes aos hidrogênios H-2+H7 e H-3+H6. O sinal da metila do grupo acil foi observado em  $\delta$  2,87 (s, 3H) (Figura 103).

**Figura 103.** Ampliação da região aromática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em metanol- $d_4$ , do produto *N*-acetil-carbazol (29.6)



No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foram observados oito sinais de carbonos, dois a mais do que o observado no carbazol, sendo eles o  $\delta$  27,89, característico de metila e o 172,51 referente a carbonila. Os outros sinais são referentes ao esqueleto carbazólico (ANEXO 50). Os dados foram de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram tabelados e são apresentados na tabela 15.

**Tabela 15**

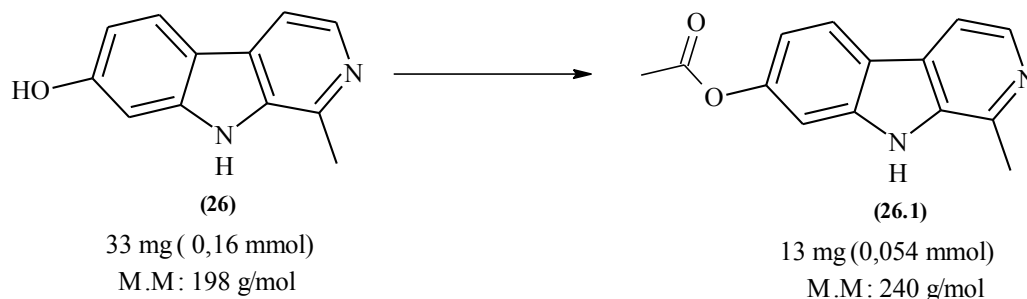
Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do carbazol (29) e do derivado *N*-acetil-carbazol (29.6)

Nº C/H	RMN $^1\text{H}$ (29) DMSO- $d_6$ $\delta$	RMN $^1\text{H}$ (300MHz, metanol- $d_4$ $\delta$ ; (m) J Hz; (nºH)	RMN $^{13}\text{C}$ (29) DMSO- $d_6$ $\delta$	RMN $^{13}\text{C}$ (29.6) metanol- $d_4$ $\delta$
1	7,47 (d, J = 8,1; 2H)	8,04 (ddd J = 7,6, 1,5 e 0,7	110,91	117,58
2	7,37 (ddd, J = 8,1; 6,8 e 1,4; 2H)	7,50-7,45 (m; 2H)	122,36	127,84
3	7,14 (ddd, J = 7,8; 6,8 e 0,9; 2H)	7,41-7,39 (m; 2H)	120,14	125,01
4	8,10; (d, J = 7,8 Hz; 2H)	8,24 (d, J = 8,3; 1H)	118,46	121,00
5	-	-	125,49	128,55
6	-	-	139,68	140,07
Me	-	2,87 (s; 3H)	-	27,89
C=O	-	-	-	172,51

### 5.4.2 Acetilação do harmol

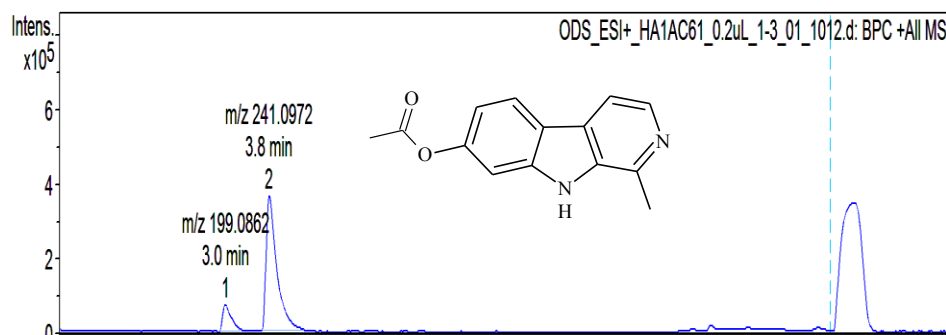
A acetilação foi realizada com anidrido acético em meio básico (piridina) (Figura 104).

**Figura 104.** Provável produto obtido a partir da acetilação do harmol (**26**)



A mistura reacional foi analisada em UFLC/HRMS-ESI (Figura 105). O produto apresentou  $[M+H]^+$   $m/z$  241,05, condizente com a fórmula molecular  $C_{14}H_{12}N_2O_2$ . Pelo cromatograma observam-se que ainda há resquícios do harmol  $[M+H]^+$   $m/z$  199,06.

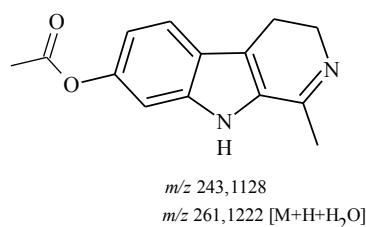
**Figura 105.** Cromatograma e espectro de massas UFLC/HRMS-ESI do *O*-acetil-harmol



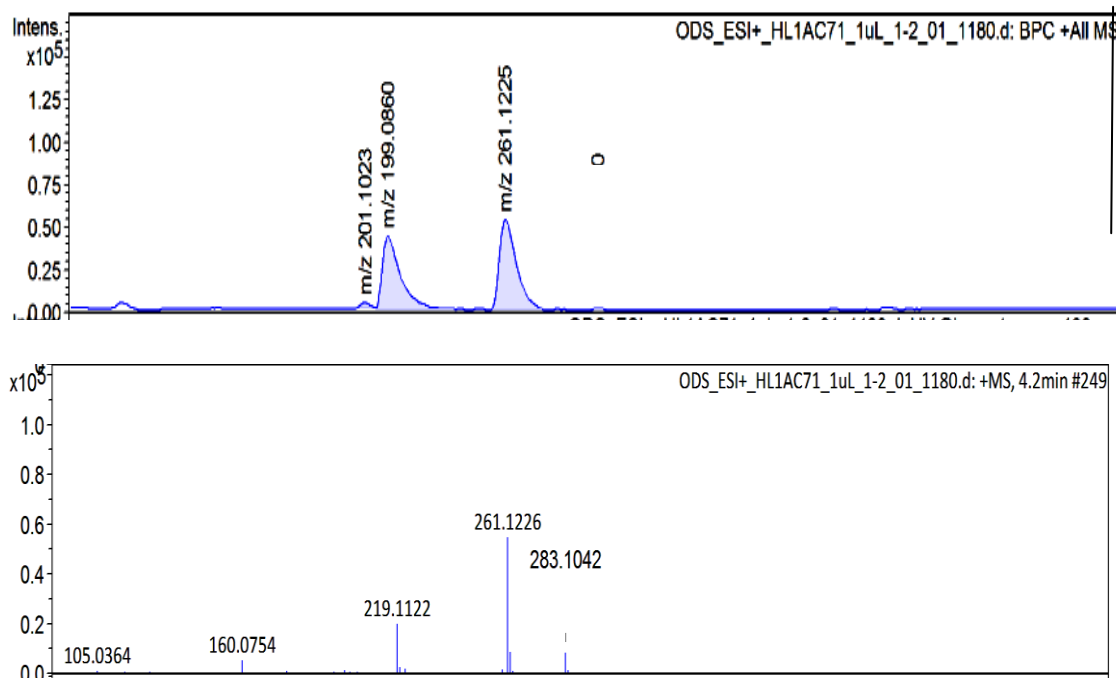
Na tentativa de purificar o produto, foi feita uma recristalização em  $CHCl_3$  à quente, mas o que se observou é que o produto se decompõem após aquecimento e volta a ser harmol (**26**). A purificação foi possível através da recristalização a frio em  $CHCl_3$  imersa em cubeta contendo pentano (CUNHA, 2008), logo após procedimento o sólido foi submetido a análise de CCD em AcOEt e observou-se o produto puro com  $R_f$  0,34 (13 mg, rend. 32%). No entanto o produto sofreu decomposição e por isso não foi possível determinar a estrutura po RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$ .

### 5.4.3 Acetilação do harmalol (HL1AC71):

Pelo UFLC/HRMS-ESI observou-se a presença de dois picos majoritários, além de resquícios do harmalol  $[M+H]^+$  201,1023 com  $[M+H]^+$   $m/z$  de 199,0860 indicando que houve a formação do harmol (**26**), um derivados da harmina, ou seja ocorreu a oxidação nos carbonos C-3 e C-4, outro pico apresentou  $[M+H]^+$   $m/z$  261,1225, referente à fórmula molecular  $C_{14}H_{14}N_2O_2 \cdot H_2O$  (valor teórico  $[M+H]^+$  261,1222,  $\Delta = 1,1$  ppm). Analisando o espectro de massas deste pico observa-se a presença de um fragmento com  $m/z$  219, 1122, cujo valor pode ser atribuído à fórmula  $C_{12}H_{14}N_2O_2 \cdot H_2O$  (valor teórico  $[M+H]^+$  219,1117,  $\Delta = 2,3$  ppm), indicando a perda do grupo acetil  $m/z$  43 u.



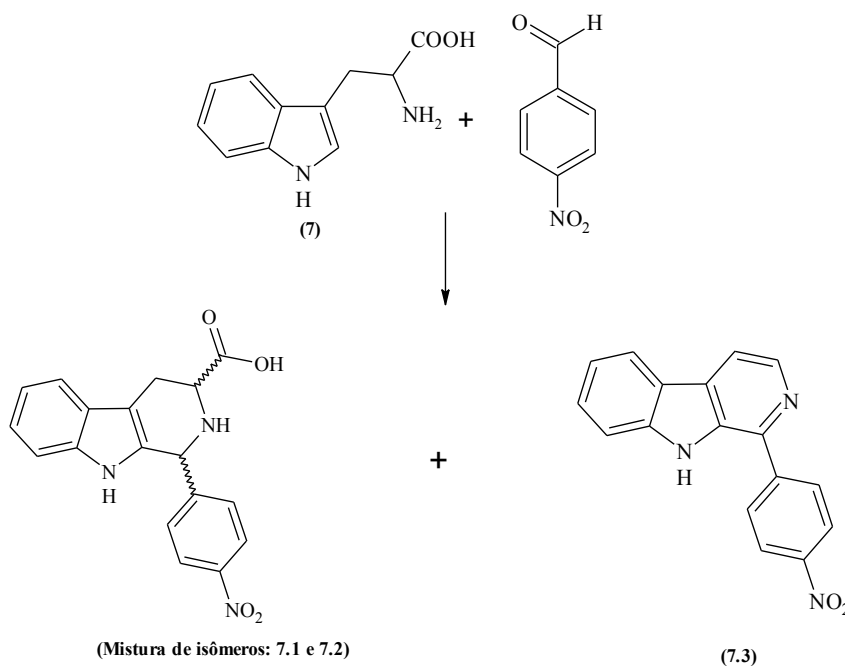
**Figura 106.** Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI da amostra HL-1-Ac e espectro de massas do pico  $[M+H]^+$   $m/z$  261,1226 e  $t_r = 4,2$  min



## 5.5 PREPARAÇÃO DE DERIVADOS $\beta$ -CARBOLÍNICOS A PARTIR DO TRIPTOFANO

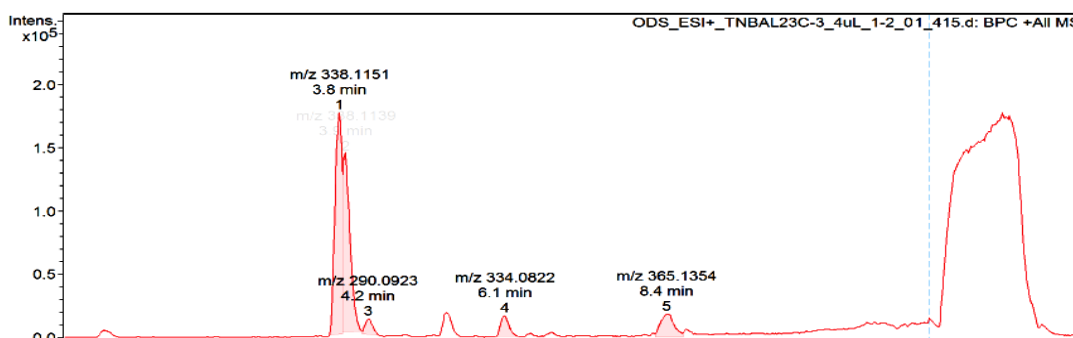
A partir do triptofano e de um aldeído ou cetona é possível obter derivados  $\beta$ -carbólicos pelo mecanismo de ciclização de Pictet-Spengler (Figura 107). A reação foi adaptada de metodologia descrita por Lan e colaboradores (2014).

**Figura 107.** Esquema com os produtos obtidos na ciclização de Pictet-Spengler



A mistura reacional foi analisada por UFLC/HRMS-ESI. Analisando o cromatograma é possível verificar a formação majoritária de dois produtos com massa similares e tempos de retenção diferentes:  $[M+H]^+$   $m/z$  338,1151 u ( $t_r = 3,8$  min.) e 338,1139 u ( $t_R = 3,9$  min.), consistente com a formação dos isômeros (Figura 108).

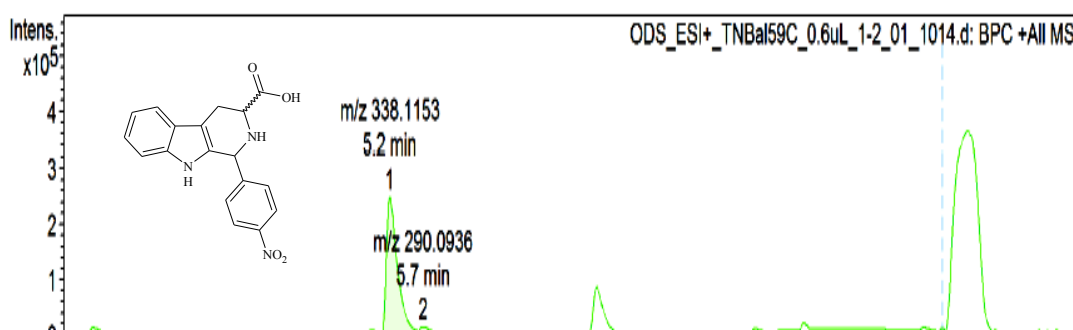
**Figura 108.** Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI da mistura reacional do produto formado a partir do triptofano





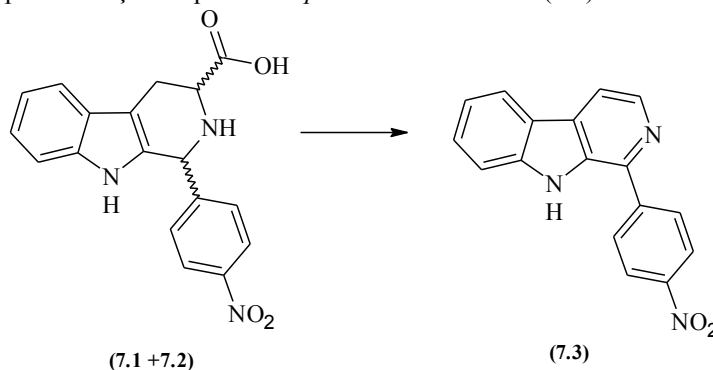
Após cromatografia de coluna em sílica *flash* foram obtidas 4 frações (TNBAL59A, TNBAL59B, TNBAL59C e TNBAL59D). Os cristais da fração TNBAL59C (15 mg) foram lavados com  $\text{CHCl}_3$  à frio varias vezes e o resultado foi o produto mais puro como pode ser observado na figura 109. O produto obtido foi analisado por UFLC/HRMS-ESI e apresentou resquícios do pico com  $m/z$  290,093, sendo majoritária a presença do pico  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  338,1153, referente à fórmula  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$  (valor teórico  $[\text{M}+\text{H}]^+$  338,1135;  $\Delta = 5,3$  ppm), indicando a formação do produto 1-*p*-nitro-fenil-3-carboxi-1,2,3,4-tetrahidro-harmano (11,3 mg). A estereoquímica e a caracterização por RMN do produto não definida.

**Figura 109.** Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI do produto (7.1 ou 7.2)



Para a etapa seguinte não foi necessário à separação dos isômeros, visto que a reação envolve a descboxilação do 1-*p*-nitro-fenil-3-carboxi-1,2,3,4-tetrahidro-harmano e a aromatização do anel piridínico. A partir de 200 mg da mistura reacional acima, foi obtido o produto 7.3 (Figura 110), o qual foi submetido a cromatografia de coluna em sílica *flash* e sistemas de solvente  $\text{CHCl}_3$  : MeOH (10:0 e 8:2).

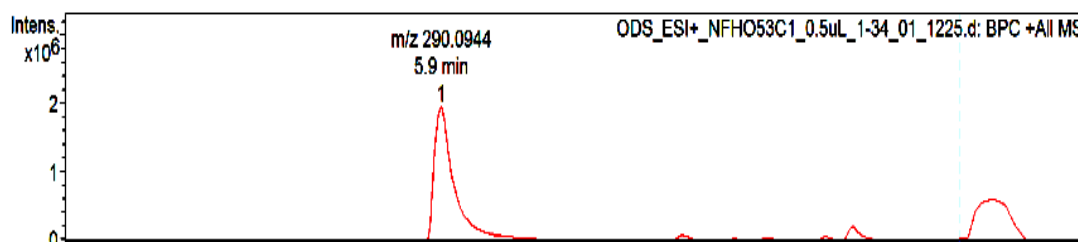
**Figura 110.** Esquema para obtenção do produto 1-*p*-nitrofenil- harmano (7.3)



A massa do produto obtida foi de 48,7 mg (0,16 mmol; rend 32%), ao ser analisado por UFLC/HRMS-ESI (Figura 111) foi observado o íon molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  290,0944,

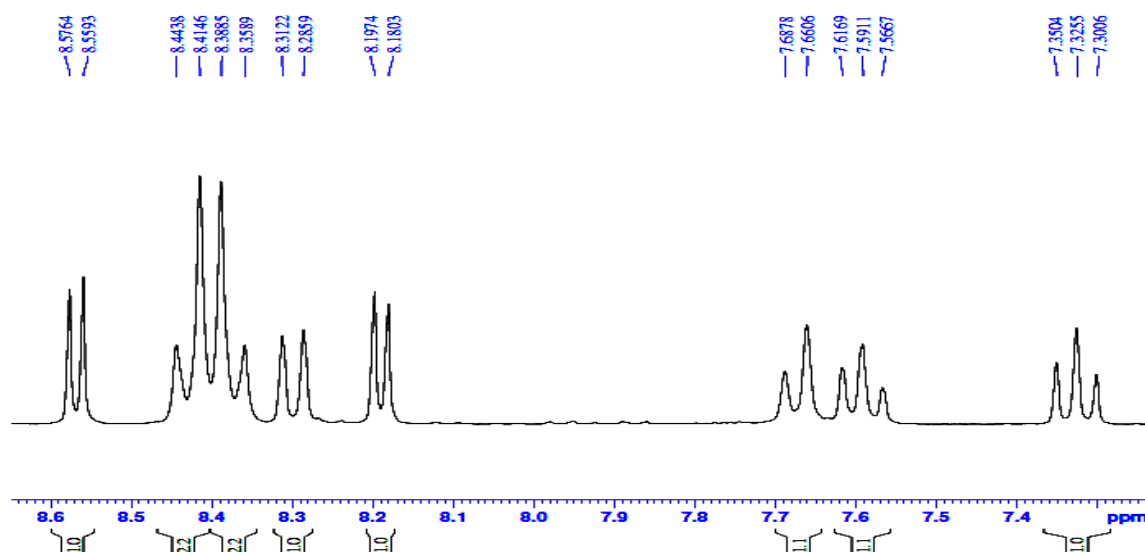
referente a fórmula  $C_{17}H_{12}N_3O_2$  (valor teórico  $[M+H]^+$  290,0924,  $\Delta = 6,9$  ppm), como era esperado. A elucidação estrutural do produto **7.3** foi realizada através de análise de RMN de  $^1H$  e de  $^{13}C$  unidimensional (ANEXOS 55 e 56) e os bidimensionais HSQC e HMBC (ANEXOS 57).

**Figura 111.** Cromatograma de UFLC/HRMS-ESI do produto (**7.3**)



Analisando a ampliação da região aromática são observados setes sinais de hidrogênios (Figura 112). Em  $\delta$  8,56 e 8,18 dois dubletos ( $d$ ) com  $J = 5,1$  Hz atribuídos aos hidrogênios piridínicos H-3 e H-4, respectivamente. Em  $\delta$  7,32 e 7,59 observam-se dois tripletos ( $t$ ) com  $J = 8,0$  Hz referentes a H-6 e H-5. Os hidrogênios H-5 e H-8 são dois dubletos ( $d$ ) com  $J = 8,0$  Hz, em  $\delta$  8,19 e 7,67. Todos com integral para um hidrogênio cada. Os sinais em  $\delta$  8,42 e 8,37 são dois dubletos ( $d$ ) sobrepostos com  $J = 8,8$  Hz e integração para 2H cada sinal, atribuídos aos hidrogênios do radical *p*-nitrofenil, sendo os hidrogênios vizinhos ao grupo nitro o sinal mais desblindado. Os dados são consistentes com o produto 1-*p*-nitro-fenil-harmano (**7.3**), com rendimento de 32 %.

**Figura 112.** Ampliação do RMN de  $^1H$  (300 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 1-*p*-nitrofenil- harmano



No espectro de carbono foram observados 15 sinais, os quais foram atribuídos com o auxílio dos espectros de HSQC (correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ,  $J'$ ) e HMBC (correlação a longa distância  $J^2$  e  $J^3$ ) (Figura 113) e as correlações observadas foram apresentadas na tabela 16.

Figura 113. Ampliação dos espectros de HSQC e HMBC em acetona- $d_6$  do produto 1-*p*-nitrofenil-harmano

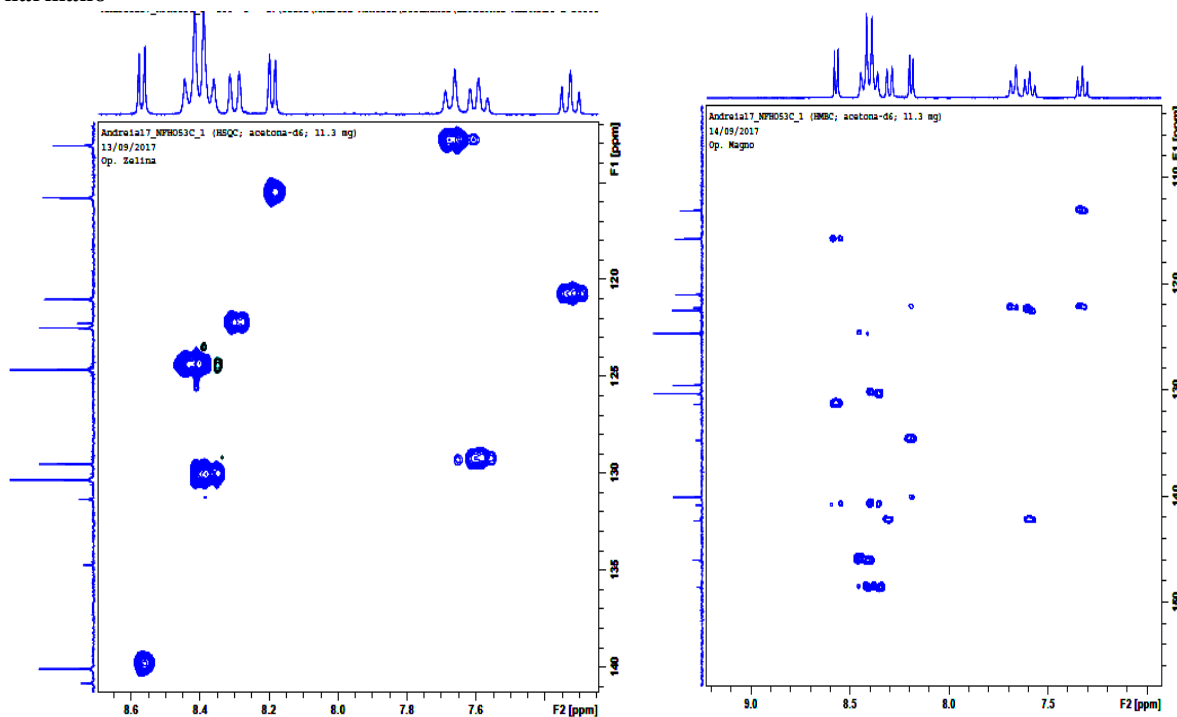
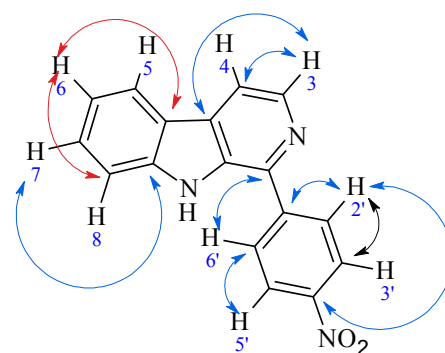


Tabela 16

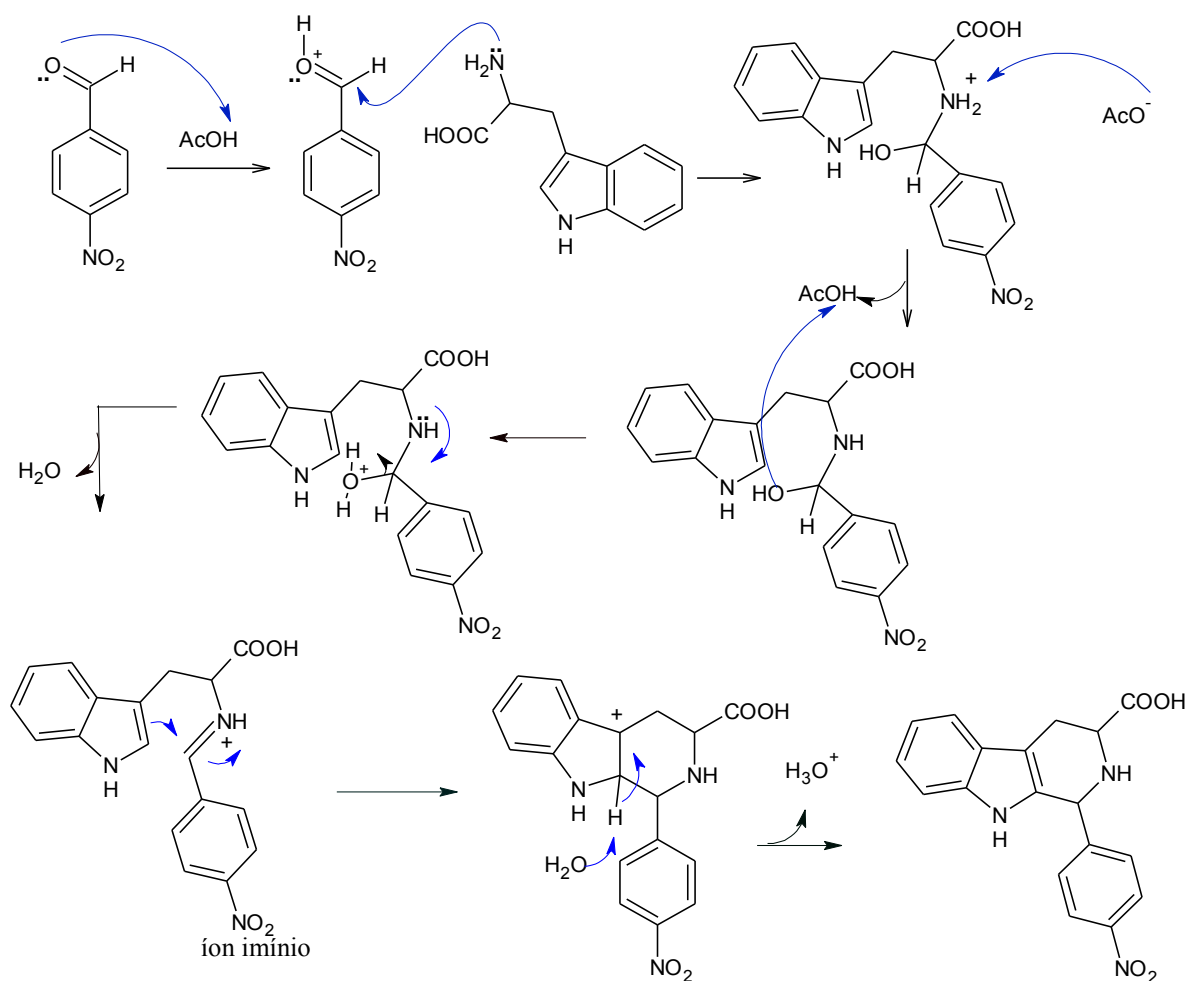
Correlações de HSQC e HMBC do produto 7.3

Nº	$^1\text{H}$ $\delta_{\text{H}}$	HSQC $\delta_{\text{C}}$	HMBC $\delta_{\text{C}}$
3	8,56	140,2	115,7 e 131,3
4	8,18	115,7	122,2, 134,7
5	8,29	122,4	142,2
6	7,32	120,9	113,0 e 122,2
7	7,59	129,5	122,4 e 142,2
8	7,67	113,0	122,2
2' e 6'	8,42	124,6	130,3, 146,0 e 148,5
3' e 5'	8,37	130,3	124,6, 140,0; 146,0 e 148,5



O mecanismo consiste na condensação da triptamina com o *p*-nitro-benzaldeído, a reação sob catálise ácida e formação do íon imínio. A ciclização do anel ocorre via mecanismo de substituição eletrofílica ao íon imínio.

**Figura 114.** Mecanismo de Pictet-Splenger



No total foram obtidos 23 derivados, dos quais 18 estruturas foram caracterizadas por RMN <sup>1</sup> e de <sup>13</sup>C e testados em ensaios *in vitro* contra *P.falciparum* e ensaios de citotoxicidade em células normais, além das substâncias comerciais.

## 5.6 TESTES *IN VITRO*

No total foram testados frente a cepas K1 multi-resistente K1 (MRA-159, MR4, ATCC Manassas Virgínia-EUA) de *P. falciparum* vinte e três substâncias, sendo cinco delas as substâncias comerciais, norharmano (**23**), harmina (**24**), harmano (**25**), harmalina (**27**), carbazol (**29**) e os 18 derivados (Tabela 17). Inicialmente foi realizado o screening nas concentrações de 5 e 50 mg/mL, os critérios utilizados para avaliação da atividade foram os

seguintes: inibição de 80 a 100 % foram consideradas ativas, 50 a 79 % parcialmente ativas e valores menores que 50 % inativas. O 1-nitrocarbazol e o 6-nitroharmano foram consideradas inativas no screening.

Os critérios adotados para atividade após o screening foram baseados na literatura de Alves (2016), no qual se assume que  $CI_{50}$  abaixo ou igual a 0,1  $\mu M$  são muito ativas, substâncias com valores entre 0,1-0,5  $\mu M$  são ativas, entre 5-20  $\mu M$  são moderadamente ativas e acima de 20  $\mu M$  são consideradas inativas.

Analisando os resultados de  $CI_{50}$  obtidos para substâncias comerciais, as mais ativas foram a harmalina ( $CI_{50}$  14,7  $\mu M$ ) e o norharmano ( $CI_{50}$  17,7  $\mu M$ ). Comparando o valor obtido para a harmalina que foi a substância comercial com menor  $CI_{50}$  e seu derivado harmalol ( $CI_{50}$  34,2  $\mu M$ ), observa-se que houve uma diminuição da atividade. O mesmo foi observado para o derivado *O*-desmetilado da harmina que apresentou ( $CI_{50}$  107,1  $\mu M$ ), sugerindo que a presença de um ligante mais volumoso nesta posição influencia positivamente a atividade. Assim como foi visto em trabalhos citados no levantamento bibliográfico que indica que a presença do grupo metoxi no anel benzênico do grupo indol é importante na ação antiparasitária (THONGTHOOM *et al.*, 2010; SCHUCK *et al.*, 2014).

Os derivados obtidos a partir do carbazol destaca-se o 3-nitrocarbazol, que apresentou  $CI_{50}$  de 8,87  $\mu M$ , valor quatro vezes menor do que o obtido para o carbazol. Os outros derivados sintetizados neste trabalho (29.1, 29.2, 29.3, 29.5 e 29.6) apresentam baixa atividade. De acordo com o levantamento e com o observado neste trabalho, os carbazóis de maneira geral são pouco ativos. Considerando isso o  $CI_{50}$  do 3-nitro-carbazol merece destaque em relação aos seus análogos. Outros derivados que tiveram sua atividade potencializada pelas modificações estruturais foram o sal de harmina e o *O*-acetil-harmina que apresentaram  $CI_{50}$  19,31 e 12,2  $\mu M$ , respectivamente. O 6-nitroharmina foi considerado inativo, no entanto seu valor de  $CI_{50}$  ficou bem próximo à linha de corte adotada neste trabalho. No caso do harmano dois de seus derivados sintéticos (25.1 e 25.2) apresentaram  $CI_{50}$  de 46,0 e 47,5  $\mu M$ , respectivamente, indicando que houve um aumento da atividade quando comparadas ao harmano ( $CI_{50}$  124,0  $\mu M$ ). O norharmano apresentou o  $CI_{50}$  dentro da classificação de atividade moderada, com  $CI_{50}$  17,7  $\mu M$ , contrariando os resultados descritos por Rao e colaboradores (2003), no qual a substância havia sido testada em cepas W2 (cloroquina resistentes) de *P.falciparum*. Os resultados contraditórios podem estar associados aos tipos de cepas diferentes, apesar de ambas serem cloroquina-resistentes ou aos parâmetros utilizados em cada teste.

Os derivados nitrados apresentaram valores de IC<sub>50</sub> bem variados não sendo possível traçar parâmetros para atribuir atividade em relação as modificações estruturais, já que estruturas similares apresentaram resultados bem diferentes entre si. De acordo com a literatura os sais das estruturas carbolínicas deveriam apresentar uma melhor atividade que as substâncias neutras. No caso deste trabalho foi observada uma pequena melhora, mas não para todos os derivados de sais frente as bases livres. Todos os resultados foram apresentados na tabela 17.

Os ensaios *in vitro* (*P. falciparum*) dos compostos comerciais: carbazol (**29**), harmina (**24**), harmalina (**27**), harmalina sal (HCl) (**27.4**), harmano (**25**), e dos derivados sintéticos: *N*-acetil-carbazol (**29.6**), harmina sal (**24.4**), harmol (**26**), harmano sal (**25.4**), harmalol (**27.4**), 9-(2,3-epoxy)-carbazol (**29.1**) e 9-(2,3 diidropil)-harmano (**25.1**), e os testes *in vivo* contra cepas NK65 de *P.berghei* dos padrões foram realizados por MSc. Hilkem Gomes Alves (2016), no Biotério Central do INPA, sob a supervisão de Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva. Foram testadas duas vias de administração a oral e a subcutânea. A inibição da parasitemia determinada no quinto e sétimo dia e o resultado observado foi: harmina (**24**) apresentou 47 % da supressão da parasitemia no 5º dia (via subcutânea) e o harmano (**25**) com 57 % de supressão, 5º dia (via oral), na dose de 50 mg/Kg/dia, sendo considerados moderadamente ativos, os outros padrões foram considerados inativos. Interessante neste caso foi resultado obtido para o harmano, que foi moderadamente ativo *in vivo*, no entanto nos ensaios *in vitro* foi considerado inativo (CI<sub>50</sub> 124 µM), mostrando que processos metabólicos ocorrido em organismos vivos pode alterar a atividade das substâncias. O contrário também foi observado em literaturas, nas quais substâncias extremamente ativas nos teste *in vitro* se mostraram inativas nos ensaios antimaláricos em roedores (MOLETTE, *et al.*, 2013; VAN BAELEN *et al.*, 2009; TAKASU *et al.*, 2005).

Quanto à toxicidade das substâncias estudadas neste trabalho, em geral todas apresentaram baixa toxicidade, com porcentagem de viabilidade maior que 50 % na concentração de 50 µg/mL. Todos os derivados tiveram uma boa viabilidade, exceto o 6-nitro-harmano (**25.3**) e o *O*-acetil-harmol (**26.1**), os quais valores de viabilidade abaixo de 25%.

Tabela 17

Ensaio *in vitro* de *P. falciparum* (K1) e viabilidade em células não tumorais e índice de seletividade

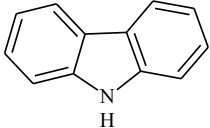
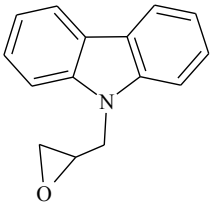
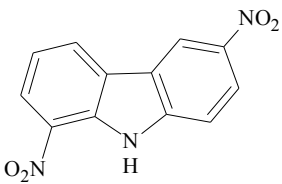
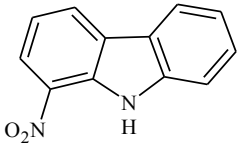
Nome/ Massa Molecular/ N°	Estrutura	IC <sub>50</sub> (μM)	%	IC <sub>50</sub> (μM)	IS	Classificação
		P.falciparum K1	Viabilidade MCR-5	(95 % IC)	K1	
Carbazol MM: 167 (29)		38,2*	-	> 1197,6*	> 31,3*	Inativa
9-(2,3-epoxy)- carbazol MM: 256 (29.1)		196,6*	-	> 896,9*	4,6*	Inativa
1,6-dinitro- carbazol MM: 257 (29.2)		203	87,9	n.d	n.d	Inativa
1-nitro-carbazol MM: 212 (29.3)		Inativa no screening	-	n.t	n.d	Inativa

Tabela 17

Ensaio *in vitro* de *P. falciparum* (K1) e viabilidade em células não tumorais e índice de seletividade (Cont.)

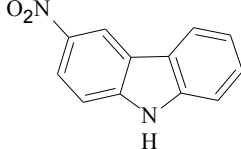
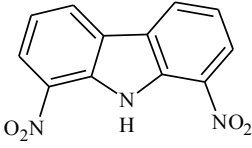
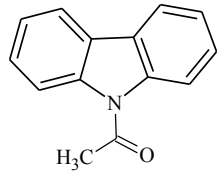
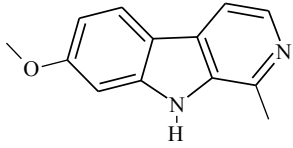
3-nitro-carbazol MM: 212 <b>(29.4)</b>		8,87	-	n.t	n.d	Ativa Moderadamente
1,8-dinitro-carbazol MM: 257 <b>(29.5)</b>		179	-	n.t	n.d	Inativa
<i>N</i> -acetil-carbazol MM: 209 <b>(29.6)</b>		65,0*	58,2	n.d	-	Inativa
Harmina MM: 212 <b>(24)</b>		22,6*	-	> 943,4*	41,7*	Inativa
Harmina.HCl MM: 248 <b>(24.4)</b>		19,31 (sal)*	n.t	n.t	n.d	Ativa Moderadamente



Tabela 17

Ensaio *in vitro* de *P. falciparum* (K1) e viabilidade em células não tumorais e índice de seletividade (Cont.)

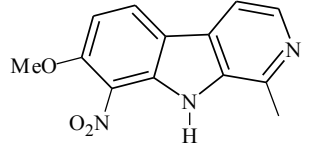
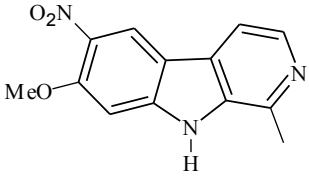
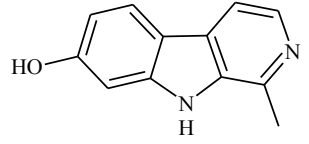
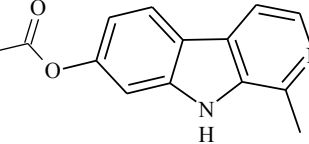
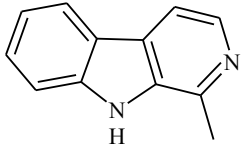
8-nitro-harmina MM: 257 <b>(24.2)</b>		59,9	69,6	n.d	n.d	Inativa
6-nitroharmina MM: 257 <b>(24.3)</b>		22,1	52,0	n.d	n.d	Inativa
Harmol MM: 198 <b>(26)</b>		107,1*	-	790,9*	7,4*	Inativa
O-acetil-harmol MM: 240 <b>(26.1)</b>		12,2	21,5	n.d	n.d	Ativa Moderadamente
Harmano MM: 182 <b>(25)</b>		124*	-	886,3*	7,1*	Inativa
Harmano.HCl MM: 219 <b>(25.4)</b>		122,4* (sal)	-	886,7*	7,6*	Inativa

Tabela 1718

Ensaio *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum*, viabilidade em células não tumorais e índice de seletividade (Cont.)

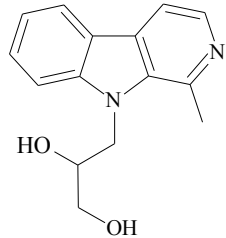
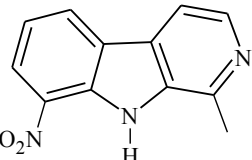
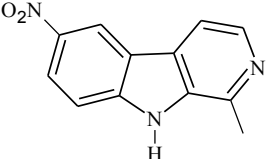
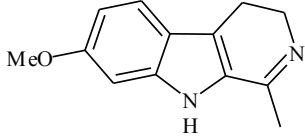
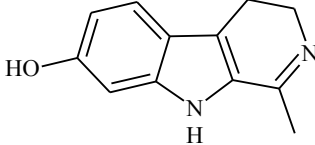
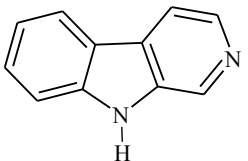
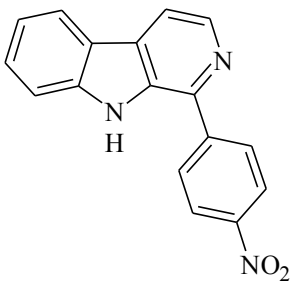
9-(2,3-diidropropil)- harmalo (25.1)		46,0	n.t	n.t	n.d	Inativa
8-nitro-harmalo MM: 228 (25.2)		47,5	19,4	n.d	n.d	Inativa
6-nitro-harmalo MM: 228 (25.3)		Inativo no screening	77,2	n.d	n.d	Inativa
Harmalina MM: 214 (27)		14,7*	-	847,2*	57,6*	Ativa Moderadamente
Harmalina.HCl MM: 286 (27.4)		16,6*		562,6*	33,9*	

Tabela 17

Ensaio *in vitro* da cepa K1 de *P. falciparum*, viabilidade em células não tumorais e índice de seletividade (Cont.)

Harmalol MM: 200 (27.3)		34,2*	-	967,5*	28,3*	I
Norharmano MM: 168 (23)		17,7	53,2	n.d	n.d	Ativa Moderadamente
1- <i>p</i> -nitro-fenil- harmano MM: 289 (7.3)		183	98,7	n.d	n.d	Inativa
Cloroquina difosfato	0,01	n.t	n.t	n.t	n.t	-

CI<sub>50</sub>: Concentração inibitória mediana;IS: índice de seletividade (CI<sub>50</sub> (fibroblastos humanos) / CI<sub>50</sub> (*P. falciparum*)).K1- cepas de *P. falciparum* cloroquina-resistente;

MRC-5: linhagem celular (fibroblastos humanos não tumorais).

Os critérios para atividade: CI<sub>50</sub> ≤ 0,1 μM (Muito ativa); 0,1 ≤ CI<sub>50</sub> ≤ 0,5 μM (Ativa); 5 ≤ CI<sub>50</sub> ≤ 20 μM (Moderadamente ativa); > 20 μM (Inativa).

n.t = não testado; n.d = não determinado.

\*Substâncias que foram testadas pela MSc. Hilkem Gomes Alves e os resultados fizeram parte do trabalho de dissertação (ALVES, 2016).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram sintetizados vinte e três compostos, sendo seis derivados do carbazol e o restante foi obtido das estruturas  $\beta$ -carbolínicas (seis derivados da harmina, três do harmano, dois do norharmano, três da harmalina e três do triptofano). Destas apenas 18 foram submetidas a ensaios *in vitro* contra *P.falciparum* (cepas K1) e citotóxicos (fibroblastos humanos). Foi obtida uma estrutura inédita na literatura, o produto 9-(2,3-dihidroxi)-harmano (**25.1**).

Os derivados do carbazol foram o 9-(2,3-epoxipropil)-carbazol (**29.1**) com rendimento de 53 %. Os derivados nitrados: 1,6-dinitro-carbazol (**29.2**), 1-nitro-carbazol (**29.3**), 3-nitro-carbazol (**29.4**) e o 1,8-dinitro-carbazol (**29.5**), cujos rendimentos foram de 25, 15, 4 e aproximadamente 1 %, respectivamente e o *N*-acetil-carbazol (**29.6**), cujo rendimento foi de 70 %. Os derivados da harmina foram o 6,8-dinitro-harmina, o 8-nitro-harmina (**24.2**) e o 6-nitro-harmina (**24.3**) com rendimentos de 0,8, 20 e 63 %, o harmol (**26**) com rendimento de 98 %, e o *O*-acetil-harmol apresentou rendimento de 70%, no entanto o produto formado é instável e a reação se torna reversível com o decorrer do tempo, e por fim o sal de HCl da harmina, obtido por borbulhamento de gás. Com rendimentos semelhantes aos derivados nitrados da harmina, foram obtidos os produtos a partir do harmano, o 8-nitro-harmano (**23.1**) (rend. 18%) e o majoritário 6-nitro-harmano (**23.2**) com rendimento de 44% do norharmano. Os produtos obtidos a partir do norharmano foram o 8-nitronorharmano, com rendimento de 13 % e o outro derivado mononitrado que não foi caracterizado por RMN. A partir da harmalina foram obtidos quatro derivados dos quais apenas o harmalol (**27.3**), produto da *O*-desmetilação com rendimento foi de 97 % foi caracterizado e testado. Já que os derivados da nitração sofreram oxidação dos carbonos insaturados C3 e C4, tornando-se derivados mono e dinitrado da harmina, ainda neste trabalho foram obtidos sais de HCl do harmano e de harmalina e a síntese do 1-*p*-fenil-harmano a partir do triptofano, com rendimento de 32 %.

Os resultados dos ensaios *in vitro* contra cepas de *P.falciparum* (K1) quando comparados os derivados com as substâncias comerciais, os dados mais promissores foram atribuído ao produto 3-nitrocarbazol, cuja atividade foi de  $CI_{50}$  8,87  $\mu$ M, o *O*-acetil-harmol ( $CI_{50}$  12,2  $\mu$ M) e o sal de harmina (HCl), com  $CI_{50}$  19,3  $\mu$ M, classificados com atividade moderada. O produto 6-nitro-harmina apresentou valor de  $CI_{50}$  22,1  $\mu$ M, valor próximo a linha de corte utilizada na classificação deste trabalho. Entre as substâncias comerciais destaca-se a atividade observada para harmalina e norharmano, os quais foram considerados

moderadamente ativos. Nos produtos O-desmetilados da harmina e harmalina observa-se que houve uma diminuição do potencial antimalárico, sugerindo que a presença da metila na posição 7 do anel b-carbolínico é importante na atividade. Os dois derivados do harmano: o 8-nitroharmano e o 9-(2,3-diidropil)-harmano, apesar de terem sido considerados inativos tiveram sua atividade potencializada, quando comparadas com o material de partida. Em geral as substâncias obtidas neste trabalho apresentaram baixa toxicidade em células normais com viabilidade maior que 50 %, exceto o exceto o 6-nitroharmano, o O-acetil-harmol e o sal de harmina, os quais valores de viabilidade abaixo de 25%.

### ATIVIDADE FUTURA

Foi aprovado em agosto de 2017, junto ao comitê de ética de uso de animais (CEUA/INPA) o projeto que permite a realização dos ensaios *in vivo* (nº do processo: 024/2017). Serão realizados os testes com cinco substâncias obtidas neste trabalho. Para realizar os testes *in vivo* foi necessário em média 100 mg de cada derivado. Esses materiais já foram sintetizados e em breve os ensaios iniciaram.

### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARBAB, I. A.; ABDUH, A. B.; ASPOLLAH, M.; ABDULLAH, R.; ABDELWAHAB, S. I.; MOHAN, S.; ABDELMAGEED, A.H.A. *Clausena excavata* Burm. f. (Rutaceae): A review of its traditional uses, pharmacological and phytochemical properties. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 5, p. 7177-7184, 2011.

ALECRIM, M. D. G. C.; ALECRIM, W.; MACÊDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, p. 67-68, 1999.

ANDRADE-NETO, V. F. D.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; SILVA, E. C. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C.; SILVA, L. F. R.; COSTA, M. R.; NUNOMURA, R. C.; NUNOMURA, S. M.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. D. G. C.; CHAVES, F. C. M.; VIEIRA, P. P. R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 359-366, 2007.

ANANDKUMAR, B.; BUCHI REDDY, R.; GANGAIAGH, L.; MADHUSUDHAN, G.; MUKKATILK. A New and Alternate Synthesis of Carvedilol: An Adrenergic receptor. *Der Pharma Chemica*, v. 3, p. 620-626, 2011.

ARZEL, E.; ROCCA, P.; GRELLIER, P.; LABAEID, M.; FRAPPIER, F.; GUERITTE, F.; GASPARD, C.; MARSAIS, F.; GODARD, A.; QUEGUINER, G. New synthesis of benzo-

delta-carbolines, cryptolepines, and their salts: *in vitro* cytotoxic, antiplasmodial, and antitrypanosomal activities of delta-carbolines, benzo-delta-carbolines, and cryptolepines. *Journal Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 949-60, 2001.

ASTULLA, A.; ZAIMA, K.; MATSUNO, Y.; HIRASAWA, Y.; EKASARI, W.; WIDYAWARUYANTI, A.; ZAINI, N. C.; MORITA, H. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. *Journal Natural Medicinal*, v. 62, p. 470-472, 2008.

ALVES, H. G.; **Avaliação antiplasmódica in vitro e in vivo de alcaloides indólicos e seus derivados**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

ALECRIM, M. G. C.; ALECRIM, W.; MACÊDO. Plasmodium vivax resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, p. 67-68, 1999.

BEGUM, S.; HASSAN, S. I.; SIDDIQUI, B. S. Synthesis and antimycobacterial activity of some beta-carboline alkaloids. *Natural Product Research*, v. 18, p. 341-7, 2004.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J.C.; ESTERRE, PH.; DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p. 45-54, 2005.

BERALDO, F. H.; GARCIA, C. R.; Products of tryptophan catabolism induce  $Ca^{2+}$  release and modulate the cell cycle of *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Journal of Pineal Research*, v. 39, p. 224-230, 2005.

BONAZZI, S.; BARBARAS, D.; PATINY, L.; SCOPELLITI, R.; SCHNEIDER, P.; COLE, S.; KAISER, M.; BRUN, R.; GADEMANN, K. Antimalarial and antitubercular nostocarboline and eudistomin derivatives: Synthesis, *in vitro* and *in vivo* biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 1464-1476, 2010

BONESI, S.; PONCE, M.A.; ERRA-BALSELLS. Study of Substituent Effect on  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR Spectra of Mono, Di and Poly Substituted Carbazoles. *Journal Heterocyclic Chemistry*, v. 42, p. 867-875, 2005.

BRASIL. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. Malária. 2017a. Disponível em: [https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1517\\_2017\\_10\\_26/casos\\_notificados\\_2017\\_regio\\_Amaznica](https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/MiniSivep1517_2017_10_26/casos_notificados_2017_regio_Amaznica). Acesso em: 09/11/2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial de Malária. Ministério da Saúde, 2005b. Disponível em: [http://bvsm.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria\\_diag\\_manual\\_final.pdf](http://bvsm.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria_diag_manual_final.pdf). Acesso em: 09/11/2017

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia Prático de tratamento da Malária no Brasil. Ministério da Saúde, 2010c. Disponível em: [http://bvsm.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_pratico\\_malaria.pdf](http://bvsm.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf). Acesso em: 13/09/2017.

CAREY, F.A.; SUNDBERG, R.J. *Advanced Organic Chemistry*, 7<sup>o</sup> ed., v. 2., New York, MacGraw-Hill, 2011.

CAO, R.; CHEN, Q.; HOU, X.; CHEN, H.; GUAN, H.; MA, Y.; PENG, W.; XU, A. Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted beta-carboline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 4613-23, 2004.

CAO, R.; CHEN, H.; PENG, W.; MA, Y.; HOU, X.; GUAN, H.; LIU, X.; XU, A. Design, synthesis and *in vitro* and *in vivo* antitumor activities of novel b-carboline derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, p. 991–1001, 2005.

CAO, R.; FAN, W.; GUO, L.; MA, Q.; ZHANG, G.; LI, J.; CHEN, X.; REN, Z.; QIU, L. Synthesis and structure-activity relationships of harmine derivatives as potential antitumor agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 60, p. 135-43, 2013.

CARDOSO, S. P. Nitração aromática: substituição eletrofílica ou reação com transferência de elétrons? *Química Nova*, vol. 24, p. 381-389, 2001.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION CDC. Disponível em <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. Acesso em 14/05/2016.

CHEN, Q.; CHAO, R.; CHEN, H.; HOU, X.; YAN, H.; ZHOU, S.; PENG, W.; XU, A. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *International Journal of Cancer*, v. 114, p. 675-682, 2005.

CHEN, Z.; CAO, R.; SHI, B.; GUO, L.; SUN, J.; MA, Q.; FAN, W.; SONG, H. Synthesis and biological evaluation of 1,9-disubstituted beta-carbolines as potent DNA intercalating and cytotoxic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 5127-37, 2011.

CLAYDEN J.; GREEVES, N.; WARREN, S. *Organic Chemistry*, ed. 2, editora OXFORD UK PRINT ON, 2012

COSTA, M.C.M; FIGUEIREDO, M.C; CAZENAVE, S.O.S. Ayahuasca: Uma abordagem toxicológica do uso ritualístico. *Rev. Psiq. Clin*, v. 32, p. 310-318, 2005

COX, E. D.; COOK, J. M. The Pictet-Spengler condensation: A new direction for an old reaction. *Chemical Reviews*, v.95, p.1797- 1842, 1995.

CORBALLY, R. P.; MEHTA, L, K.; PARRICK, J.; SHORT, E. L. Experimental and calculated <sup>13</sup>C chemical shifts for  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\delta$ -carbolines. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 38, p. 1034–1036, 2000.

CSUK, R.; BARTHEL, A.; RASCHKE, C. Convenient access to substituted acridines by a Buchwald–Hartwig amination. *Tetrahedron*, v. 60, p. 5737-5750, 2004.

CUNHA, S.; Métodos simples de formação de monocristal de substância orgânica para estudo estrutural por difração de Raios X. *Química Nova*, v. 31, p. 906-909, 2008

DRAČÍNSKÝ, M.; SEJBAL, J.; RYGEROVÁ, B.; STIBOROVÁ, M. An efficient modification of ellipticine synthesis and preparation of 13-hydroxyellipticine. *Tetrahedron Letters*, v. 48, p. 6893-6895, 2007.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach, 2°. ed. Ed.Wiley, 2002

DRUGBANK. Carprofen. 2016a. Disponível em: <  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00821> >. Acesso em: 02/06/2015.

DRUGBANK. Carvedilol. 2016b. Disponível em: <  
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01136> >. Acesso em: 02/06/2015.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G. D.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Química Nova*, v. 31, p. 1271-1278, 2008.

FRANCISCO, A. I.; VARGAS, M. D. Ferroquina: o antimalárico do futuro. *Revista Virtual de Química*, v. 2, p. 118-129, 2010.

FREDERICH, M.; HAYETTE, M. P.; TITS, M.; DE MOL, P.; ANGENOT, L. Reversal of chloroquine and mefloquine resistance in Plasmodium falciparum by the two monoindole alkaloids, icajine and isoretuline. *Planta Medica*, v. 67, p. 523-7, 2001.

FREDERICH, M.; TITS, M.; ANGENOT, L. Potential antimalarial activity of indole alkaloids. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, p. 11-9, 2008.

FREITAS, L. F.; CHAVES, G. C.; WANNMACHER, L.; CASTRO, C. G. S. O. Malária não complicada por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* no Brasil: evidências sobre fármacos isolados e associações medicamentosas empregados em esquemas terapêuticos recomendados pelo protocolo terapêutico oficial. *Caderno de Saúde Pública*, v. 23, p. 2285-2294, 2007

FIOT, J.; SANON, S.; AZAS, N.; MAHIOU, V.; JANSEN, O.; ANGENOT, L.; BALANSARD, G.; OLLIVIER, E. Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). *Journal Ethnopharmacol*, v. 106, p. 173-8, 2006.

FODOR, G.; NAGUBANDI, S. Correlation of the Von Braun, Ritter, Bischler-Napieralski, Beckmann and Schmidt reactions via nitrilium salt intermediates. *Tetrahedron* v.36, p.1279-1300, 1980.

GASTEL, J. A.; ROSEBOOM, P.H.; RINALDI, P.A.; WELLER, J. L.; KLEIN, D.C. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science*, v. 279, p. 1358-1360, 1998.

HERRAIZ, T.; GONZÁLEZ, D.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; ARÁN, V.J.; GUILLÉN, H.  $\beta$ -carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*, v.48, p.839-845, 2010.

HOCHMAN, G.; ARRETCHE, M.; MARQUES, E. Políticas Públicas no Brasil. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2007.

HSU, M.J.; CHAO, Y.; CHANG, Y.H.; HO, F.M.; HUANG, L.-J.; HUANG, Y.-L.; LUH, T.-Y.; CHEN, C.-P.; LIN, W.-W. Cell apoptosis induced by a synthetic carbazole compound LCY-2-CHO is mediated through activation of caspase and mitochondrial pathways. *Biochemical Pharmacology*, v. 70, p. 102-112, 2005.



JIMENEZ, J.; RIVERON-NEGRETE, L.; ABDULLAEV, F.; ESPINOSA-AGUIRRE, J.; RODRIGUEZ-ARNAIZ, R. Cytotoxicity of the beta-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays *in vitro*. *Exp Toxicol Pathol*, v. 60, p. 381-389, 2008.

KIMURA, T.; HOSOKAWA-MUTO, J.; ASAMI, K.; MURAI, T.; KUWATA, K. Synthesis of 9-substituted 2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole derivatives and evaluation of their anti-prion activity in TSE-infected cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 5675-9, 2011.

LAN, J. S.; XIE, S. S.; LI, S. Y.; PAN, L. F.; WANG, X. B.; KONG, L. Y. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-(beta-carboline) hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 6089-104, 2014.

LI, J.J., **Name Reactions: a collection of detailed reaction mechanism**, 3<sup>o</sup> ed., Editora Germany Springer, 2006.

YENJAI, C.; SCRIPONTAN, S.; PRACHACK, S.; KITTAKOOP, P.; JINTASIRIKUL, A.; TANTICHEROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Coumarins and Carbazoles with antiplasmodial activity from *Clausena harmandiana*. *Planta Medical Letters*, v. 66, p. 277-279, 2000.

MILLER, R. H.; OBUYA, C. O.; WANJA, E. W.; OGUTU, B.; WAITUMBI, J.; LUCKHART, S.; STEWART, V. A. Characterization of *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* in Western Kenya utilizing a novel species-specific real-time PCR assay. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 9, p. 3469, 2015.

MILEN, M.; ÁBRÁNYI-BALOGH, P. Synthesis of  $\beta$ -carbolines. *Chemistry Heterocyclic Compounds*, v. 52, p. 996-998, 2016

MONTOIA, A.; F., R.-E.-S. L.; TORRES, Z. E.; COSTA, D. S.; HENRIQUE, M. C.; LIMA, E. S.; VASCONCELLOS, M. C.; SOUZA, R. C.; COSTA, M. R.; GRAFOV, A.; GRAFOVA, I.; EBERLIN, M. N.; TADEI, W. P.; AMORIM, R. C.; POHLIT, A. M. Antiplasmodial activity of synthetic ellipticine derivatives and an isolated analog. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, p. 2631-4, 2014.

MOLETTE, J.; ROUTIER, J.; ABLA, N.; BESSON, D.; BOMBRUM, A.; BRUN, R.; BURT, H.; GEORGI, K.; KAISER, M.; NWAKA, S.; MUZARELLE, M.; SCHEER, A.; Identification and Optimization of an Aminoalcohol-Carbazole Series with Antimalarial Properties. *Medicinal Chemistry Letters*, v. 4, p. 1037-1041, 2013

MUDADU, M. S.; SINGH, A. N.; THUMMEL, R. P. Preparation and Study of 1,8-Di(pyrid-2'-yl)carbazoles. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 73, p. 6513-6520, 2008.

NANDY, B. C.; GUPTA, A. K.; MITTAL, A.; VYAS, V. Carbazole: its biological activity. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research, North America*, v. 3, p. 42-48, 2014.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. *Journal Immunol Methods*, n. 204, p. 205-208, 1997.

NIZAMI, S. A.; SA, K. P.; MARIHAL, S.; GURUMURTY, M. Research paper Hetroaryl Cyclization and Biological Evaluation of Some Synthesized. *Journal of Advanced Pharmaceutical Research*, v. 3, p. 14-19, 2012.

ONYEIBOR, O. O.; CROFT, S.L; DODSON, H.I.; FEIZ-HADDAD, M.; ENDRICK, H.; MILLINGTON, N.J.; PARAPINI, S.; PHILLIPS, R .M.; SEVILLE, S.; SHNYDER, .D.; TARAMELLI, D.; WRIGHT, C. W. Synthesis of Some Cryptolepine Analogues, Assessment of Their Antimalarial and Cytotoxic Activities, and Consideration of Their Antimalarial. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, p. 2701-2709, 2005.

PASSEMAR, C.; MARIETTE, S.; NJOMNANG, S.P; MARIE-DENISE, L.; ALAIN, A.; POUPAT, P.; BENOIT-VICAL, F. Indole and aminoimidazole moieties appear as key structural units in antiplasmodial molecules. *Phytomedicine*, v. 18, p. 1118-1125, 2011.

PEREIRA DA SILVA, L. H.; OLIVEIRA, V. E. G. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. *Ciencia e Saúde Coletiva*, v. 7, p. 49-63, 2002

PONCE, M. A e ERRA-BALSELLS , R. Synthesis and isolation of nitro-b-carbolines obtained by nitration of commercial b-carboline alkaloids. *Journal Heterocyclic Chemistry*, v. 38, p. 1071-1081, 2001.

RAO, K. V.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; SCHINAZI, R. F.; TEKWANI, B. L.; HAMANN, M. T. New manzamine alkaloids with activity against infectious and tropical parasitic diseases from an Indonesian sponge. *Journal Natural Product*, v. 66, p. 823-8, 2003.

RENIERS, J.; ROBERT, S.; FREDERICK, R.; MASEREEL, B.; VINCENT, S.; WOUTERS, J. Synthesis and evaluation of beta-carboline derivatives as potential monoamine oxidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 134-44, 2011.

RIBEIRO, RAMIRA FABIANA. Papel das quinases PfPK7, PfNEK2, PfMAP1 e PfelK1 na transdução de sinal de melatonina no desenvolvimento do ciclo celular intraeritrocítico de *Plasmodium falciparum*. 2010. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciência), Universidade de São Paulo. São Paulo. 2010.

ROCHA E SILVA, L. F.; MONTOIA, A.; AMORIM, R. C. N.; MELO, M. R.; HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; COSTA, M. R. F.; ANDRADE NETO, V. F.; COSTA, D. S.; DANTAS, G.; LAVRADO, J.; MOREIRA, R.; PAULO, A.; PINTO, A. C.; TADEI, W. P.; ZACARDI, R. S.; EBERLIN, M. N.; POHLIT, A. M. Comparative in vitro and in vivo antimalarial activity of the indole alkaloids ellipticine, olivacine, cryptolepine and a synthetic cryptolepine analog. *Phytomedicine*, v. 20, p. 71-76, 2012.

RODRIGUES JR, Manoel Trindade. **Síntese e atividade citotóxica, leishmanicida e sobre o sistema nervoso central de compostos b-carbolínicos**. 2009. Tese (doutorado em Química Orgânica), Instituto de Química- UNICAMP, Campinas, 2009.

RODRÍGUEZ-SANZ, A.; SANCHEZ-ALONSO, P.; BELLON, T.; ALAJARIN, R.; MARTINEZ-CABEZA, V.; SELGAS, R.; VAQUERO, J. J.; ALVAREZ-BUILLA, J. Synthesis and biological evaluation of pyridazino[1',6':1,2]pyrido[3,4-b]indolinium and pyridazino[1,6-a]benzimidazolium salts as anti-inflammatory agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 93, p. 83-92, 2015.

SÁ, I. M. A resistência à cloroquina e a busca de antimalaríais entre as décadas de 1960 e 1980. *História, ciência saúde-Manguinhos*, v. 18, p. 407-430, 2011.

SHI, B.; CAO, R.; FAN, W.; GUO, L.; MA, Q.; CHEN, X.; ZHANG, G.; QIU, L.; SONG, H. Design, synthesis and *in vitro* and *in vivo* antitumor activities of novel bivalent beta-carbolines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 60, p. 10-22, 2013.

SCHMIDT, A. W.; REDDY, K. R.; KNOLKER, H. J. Occurrence, Biogenesis, and Synthesis of Biologically Active Carbazole Alkaloids. *Chemical Reviews*, v. 112, p. 3193–3328, 2012.

SILVA, R.; HOCHMAN, G. Um método chamado Pinotti: sal medicamentoso, malária e saúde internacional (1952-1960). *História, Ciência, Saúde-Manguinhos*, v.18, p. 519-543, 2011.

SINGH, B.; KIM, S. L.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A.; SHAMSUL, S. S.; COX-SINGH, J.; THOMAS, A.; CONWAY, D. J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*, v. 363, 2004.

SNYDER, H.R.; STANLEY, M.P.; KATZ, L. The Synthesis of Derivatives of b-Carboline. III. The Nitration of Harman. *Journal American Chemistry Society*. v. 70, p. 222-225, 1948.

SONG, H.; LIU, Y., LIU, Y.; WANG, L.; WANG, Q. Synthesis and antiviral and fungicidal activity evaluation of  $\beta$ -carboline, dihydro-b-carboline, tetrahydro-b-carboline alkaloids and their derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, p. 1010-1018, 2014.

SCHUCK, DESIRÉE CIGARAN. Novos compostos sintéticos com ação no ciclo de vida de parasitas da malária humana, *Plasmodium falciparum*. 2013. 140 p. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013

SCHUCK, D.C.; JORDÃO, A. K.; NAKABASHI, M.; CUNHA, A. C.; FERREIRA, V. F.; GARCIA, C. R.S. Synthetic indole and melatonin derivatives exhibit antimalarial activity on the cell cycle of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 78, p. 375-382, 2014.

SULLIVAN, D. J.; GLUZMAN, I. Y.; RUSSEL, D. G.; GOLDBERG, D. E. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, v. 93, p. 11865–11870, 1996.

TA, T. H.; HISAM, S.; LANZA, M.; JIRAM, A. I.; ISMAIL, N.; RUBIO, J. M. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Malaria Journal*, v. 13, p. 1-7, 2014.

TAPAN KUMAR, B. Antimalarial Drug: From its Development to Deface. *Current Drug Discovery Technologies*, v. 12, p. 225-228, 2015.

TAKASU, K.; SHIMOGAMA, T.; SAIIN, C.; KIM, H.S.; WATAYA, Y.; BRUN, R.; IHARA, M. Synthesis and Evaluation of  $\beta$ -Carbolinium Cations as New Antimalarial Agents Based on p-Delocalized Lipophilic Cation (DLC) Hypothesis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, p. 653-661, 2005.

THONGTHOOM, T.; SONGSIANG, U.; PHAOSIRI, C.; YENJAI, C. Biological activity of chemical constituents from *Clausena harmandiana*. *Archives of Pharmacal Research*, v. 33, p. 675-680, 2010.

VAN BAELEN, G.; HOSTYN, S.; DHOOGHE, L.; TAPOLCSÁNYI, P.; MÁTYUS, P.; LEMIÈRE, G.; DOMMISSE, R.; KAISER, M.; BRUN, R.; COS, P.; MAES, L.; HAJÓS, G.; RIEDL, Z.; NAGY, I.; MAES, B. U. W.; PIETERS, L. Structure–activity relationship of antiparasitic and cytotoxic indoloquinoline alkaloids, and their tricyclic and bicyclic analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 7209-7217, 2009.

VAN BAELEN, G.; LEMIÈRE, G.L.F.; DOMMISSE, R.A.; MAES, B. U. W. Synthesis of 5-methyl-5H-pyrrolo[2,3-*c*]quinoline and 4-methyl-4H-pyrrolo[2,3-*c*]isoquinolone: two new unnatural D-ring stripped isomers of the cryptolepine series. *Arkivoc Journal*, v. VI, 174-182, 2009.

VOGEL, Arthur. I. *et al.* **Textbook of Practical Organic Chemistry**., 5 ed. Londres., Longman Scientific & Technical; New York: Wiley, 1996.

WATANABE, T., FUJII, S. O. N.; OHNO, H., Palladium-Catalyzed Direct Synthesis of Carbazoles via One-Pot *N*-Arylation and Oxidative Biaryl Coupling: Synthesis and Mechanistic Study. *Journal. Organic Chemistry*. v. 74, p. 4720–4726, 2009.

WAHBA, A. E.; HAMANN, M. T. Reductive *N*-Alkylation of Nitroarenes: A Green Approach for the *N*-Alkylation of Natural Products. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 77, p. 4578-4585, 2012.

OMS 2015. Emergency Response to Artemisinin Resistance in the Greater Mekong Subregion. 2013-2015. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241505321/en>>. Acesso em: 02/03/2016.

OMS. World Malaria Report 2016a. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 20/07/2017.

OMS. **Malaria: Containment of artemisinin resistance** 2016b. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/drug-resistance/en/>. Acesso: 20/07/2017

ZHANG, F.-F.; GAN, L.-L.; ZHOU, C.-H. Synthesis, antibacterial and antifungal activities of some carbazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, p. 1881-1884, 2010.

**Anexos**

**ANEXO 1. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para as substâncias comerciais  $\beta$ -carbolicinas e carbazol e comparação com dados da literatura.**

Nº C/H	RMN $^{13}\text{C}$ (Literatura)* $\delta$	RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$	RMN $^1\text{H}$ (Literatura)* $\delta$ ; (m, e $J$ (Hz), nºH)	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ ; (m, $J$ (Hz); nºH)
<b><u>Harmina</u></b>	(50 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	(75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	(200 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
1	-	-	-	-
3	137,76	140,03	8,14 ( <i>d</i> , $J = 5,3$ ; 1H)	8,14 ( <i>d</i> , $J = 5,6$ ; 1H)
4	111,94	112,40	7,79 ( <i>d</i> , $J = 5,3$ ; 1H)	7,71 ( <i>d</i> , $J = 5,6$ ; 1H)
4a	114,83	115,15	-	-
4b	127,20	129,45	-	-
5	122,62	122,77	8,04 ( <i>d</i> , $J = 8,6$ ; 1H)	8,92 ( <i>d</i> , $J = 8,7$ ; 1H)
6	109,06	110,29	6,83, ( <i>dd</i> , $J = 8,6$ e 2,1; 1H)	6,88 ( <i>dd</i> , $J = 8,7$ e 2,1; 1H)
7	160,07	161,31	-	-
8	94,57	94,65	7,00 ( <i>d</i> , $J = 2,1$ ; 1H)	6,98; ( <i>d</i> , $J = 2,1$ ; 1H)
8a	141,27	-	-	-
9a	134,53	135,77	-	-
Me	20,34	18,70	2,71 ( <i>s</i> ; 3H)	2,81 ( <i>s</i> ; 3H)
OMe	55,31	55,61	3,86 ( <i>s</i> ; 3H)	3,91 ( <i>s</i> ; 3H)
N-H	-	-	11,42 ( <i>s</i> ; 1H)	-
<b><u>Harmalina</u></b>	(50 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	(75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	(200 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	(300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
1	161,88	162,29	-	-
3	41,83	42,18	3,88 ( <i>m</i> ; 4H)	3,80 ( <i>t</i> , $J = 8,0$ ; 2H)
4	19,90	20,14	3,14 ( <i>m</i> ; 4H)	3,13 ( <i>t</i> ; $J = 8,0$ ; 2H)
4a	119,03	119,41	-	-
4b	125,54	125,56	-	-
5	122,21	122,73	7,42 ( <i>d</i> , $J = 8,9$ ; 1H)	7,46 ( <i>d</i> , $J = 8,7$ ; 1H)
6	115,75	115,88	6,80 ( <i>dd</i> , $J = 8,9$ e 1,9; 1H)	6,82 ( <i>dd</i> , $J = 8,7$ e 2,1; 1H)
7	164,57	165,26	-	-

8	94,04	94,21	7,04 ( <i>d</i> , $J=1,9$ ; 1H)	6,87 ( <i>d</i> $J=2,1$ ; 1H)
8a	144,20	-	-	-
9a	125,02	-	-	-
Me	19,05	19,13	2,99 ( <i>s</i> ; 3H)	2,76 ( <i>s</i> ; 3H)
OMe	55,70	56,03	3,83 ( <i>s</i> ; 3H)	3,76 ( <i>m</i> ; 3H)
N-H	-	-	11,54, <i>s</i>	-
<b>Harmano</b>	(150 MHz, DMSO)	(75 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	(600 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	(300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )
1	142,1	-	-	-
2	-	-	-	-
3	137,5	137,4	8,26 ( <i>d</i> , $J=5,5$ Hz)	8,18 ( <i>d</i> , $J=5,5$ Hz; 1H)
4	112,6	114,6	7,94 ( <i>d</i> , $J=5,5$ Hz)	7,81 ( <i>d</i> , $J=5,5$ Hz; 1H)
4a	126,9	-	-	-
4b	121,1	-	-	-
5	121,7	123,4	8,21 ( <i>d</i> , $J=7,7$ Hz)	8,07 ( <i>d</i> , $J=8,0$ Hz; 1H)
6	119,2	121,1	7,25 ( <i>t</i> , $J=7,7$ Hz)	7,27-7,22 ( <i>m</i> ; 1H)
7	127,8	130,1	7,55 ( <i>t</i> , $J=7,7$ Hz)	7,53 ( <i>d</i> , $J=4$ ; 2H)
8	111,9	113,1	7,65 ( <i>d</i> , $J=7,7$ Hz)	hidrogênios 7 e 8
8a	140,4	-	-	-
9a	134,5	-	-	-
Me	20,4	-	2,83 ( <i>s</i> )	2,81 ( <i>s</i> , 3H)
<b>Carbazol</b>	(25 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	(75 MHz, DMSO)	(100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	(300 MHz, DMSO)
1	110,59	110,91	7,42	7,47; ( <i>d</i> ) $J=8,1$ ; (2H)
2	123,44	122,36	7,42	7,37; ( <i>ddd</i> , $J=8,1$ ; 6,8 e 1,4; 2H)
3	120,35	120,14	7,24	7,14; ( <i>ddd</i> , $J=7,8$ ; 6,8 e 0,9; 2H)
4	119,50	118,46	8,08	8,10; ( <i>d</i> , $J=7,8$ Hz (2H)
5	125,86	125,49	-	-
6	139,56	139,68	-	-
N-H	-	-	8,03	11,23; ( <i>s</i> ); (1H)

<b>Norharmano</b>	(90 MHz, DMSO)	(75 MHz, DMSO)	(360 MHz, DMSO)	(300 MHz, DMSO)
1	134,0	133,9	8,95	8,92
2	-	-	-	-
3	138,0	137,8	8,48	8,33
4	114,6	114,5	7,99	8,11
4a	127,5	127,3	-	-
4b	120,6	120,4	-	-
5	121,7	121,6	8,15	8,24
6	119,2	119,0	7,31	7,24
7	128,1	127,9	7,57	7,55
8	111,9	111,9	7,55	7,63
8a	140,5	140,55	-	-
9a	136,0	135,9	-	-

\*Literaturas: Berrougui *et al.*, 2006 (harmina e harmalina); Ski *et al.*, 2000 (harmano); banco de dados Spectral Data for Organic Compounds (SDBS) (carbazol e norharmano) e Corbally *et al.*, 2000.





Current Data Parameters  
 NAME: Andrea\_HA\_101  
 EXPNO: 3  
 PROCNO: 1

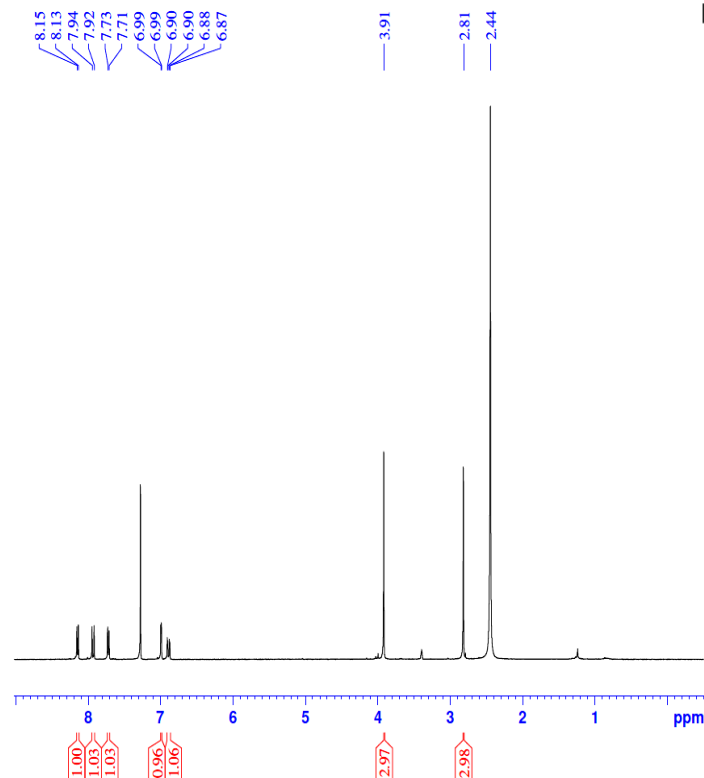
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_: 20131112  
 Time: 11:44  
 INSTRUM: FOURIER300  
 PROBHD: 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG: zgpg30  
 TD: 65536  
 SOLVENT: CDCl3  
 NS: 4096  
 DS: 4  
 SWH: 24414.063 Hz  
 FIDRES: 0.372529 Hz  
 AQ: 1.3421773 sec  
 RG: 501.187  
 FWH: 20.480 usec  
 DE: 10.00 usec  
 TE: 296.3 K  
 D1: 2.00000000 sec  
 D11: 0.03000000 sec  
 D31: 0.00000875 sec  
 D40: 0.02898005 sec  
 LA: 40  
 LS: 57  
 P32: 90.00 usec  
 TDO: 1

CHANNEL f1  
 SFO1: 75.4878687 MHz  
 NUC1: 13C  
 P1: 8.75 usec  
 PLW1: 50.00299835 W

CHANNEL f2  
 SFO2: 300.1812007 MHz  
 NUC2: 1H  
 CPDPRG2: waltz16  
 PCPD2: 90.00 usec  
 PLW2: 20.00000000 W  
 PLW12: 0.16806000 W  
 PLW13: 0.13613001 W

F2 - Processing parameters  
 SI: 32768  
 SF: 75.4803210 MHz  
 WDW: EM  
 SSB: 0  
 LB: 1.00 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.40

HA\_101\_(13 mg) 1H

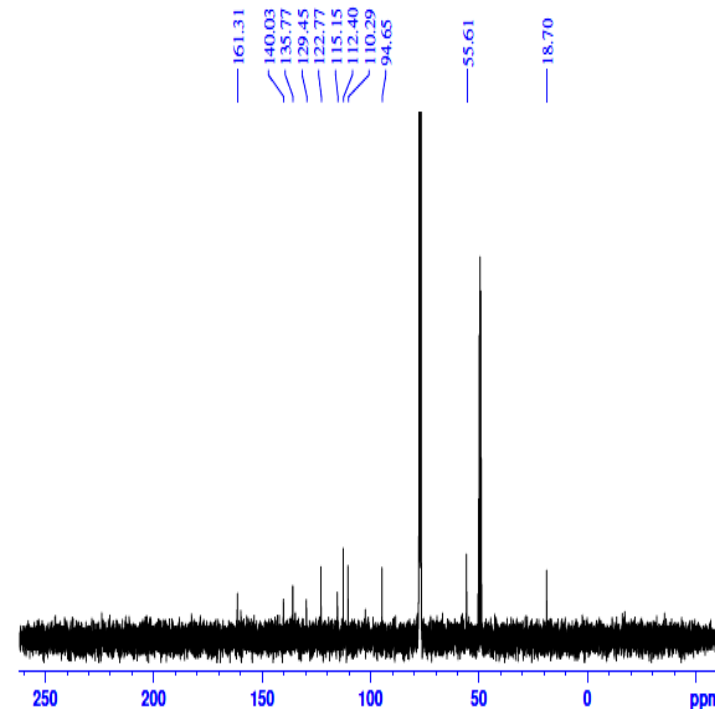


Current Data Parameters  
 NAME: Andrea\_HA\_101  
 EXPNO: 2  
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_: 20131112  
 Time: 11:19  
 INSTRUM: FOURIER300  
 PROBHD: 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG: zg30  
 TD: 65536  
 SOLVENT: CDCl3  
 NS: 32  
 DS: 8  
 SWH: 3051.758 Hz  
 FIDRES: 0.046566 Hz  
 AQ: 10.7374182 sec  
 RG: 147.414  
 DW: 163.840 usec  
 DE: 10.00 usec  
 TE: 296.7 K  
 D1: 1.00000000 sec  
 TDO: 1

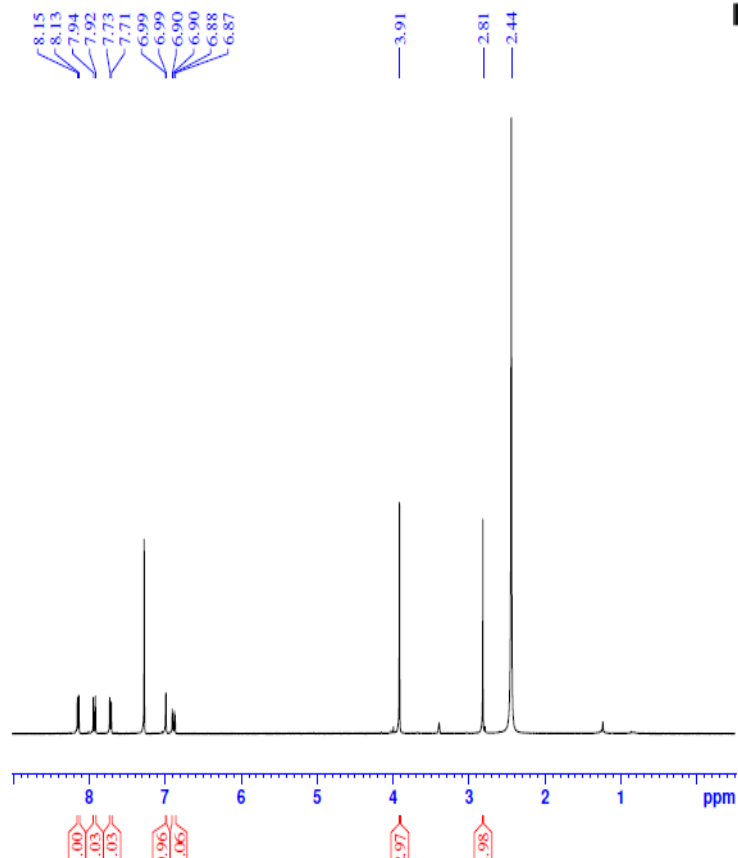
CHANNEL f1  
 SFO1: 300.1812007 MHz  
 NUC1: 1H  
 P1: 8.25 usec  
 PLW1: 20.00000000 W

F2 - Processing parameters  
 SI: 65536  
 SF: 300.1800000 MHz  
 WDW: EM  
 SSB: 0  
 LB: 0.30 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.00



ANEXO 2. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em clorofórmio- $d_1$  da harmina (24).

HA\_101\_(13 mg) 1H

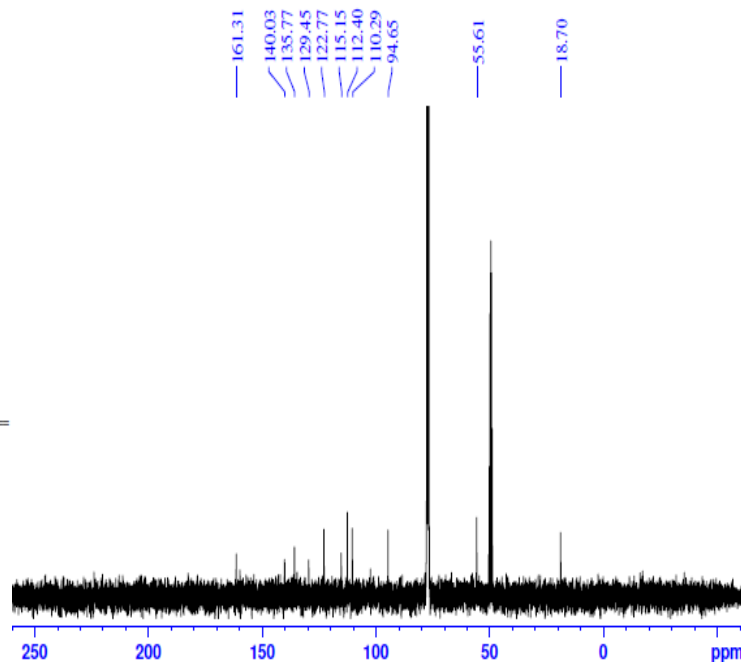


Current Data Parameters  
 NAME Andrea\_HA\_101  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20131112  
 Time 11:19  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 32  
 DS 8  
 SWH 3051.758 Hz  
 FIDRES 0.046566 Hz  
 AQ 10.7374182 sec  
 RG 147.414  
 DW 163.840 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 296.7 K  
 D1 1.0000000 sec  
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====  
 SFO1 300.1812007 MHz  
 NUC1 1H  
 P1 8.25 usec  
 PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 300.1800000 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00



Current Data Parameters  
 NAME Andrea\_HA\_101  
 EXPNO 3  
 PROCNO 1

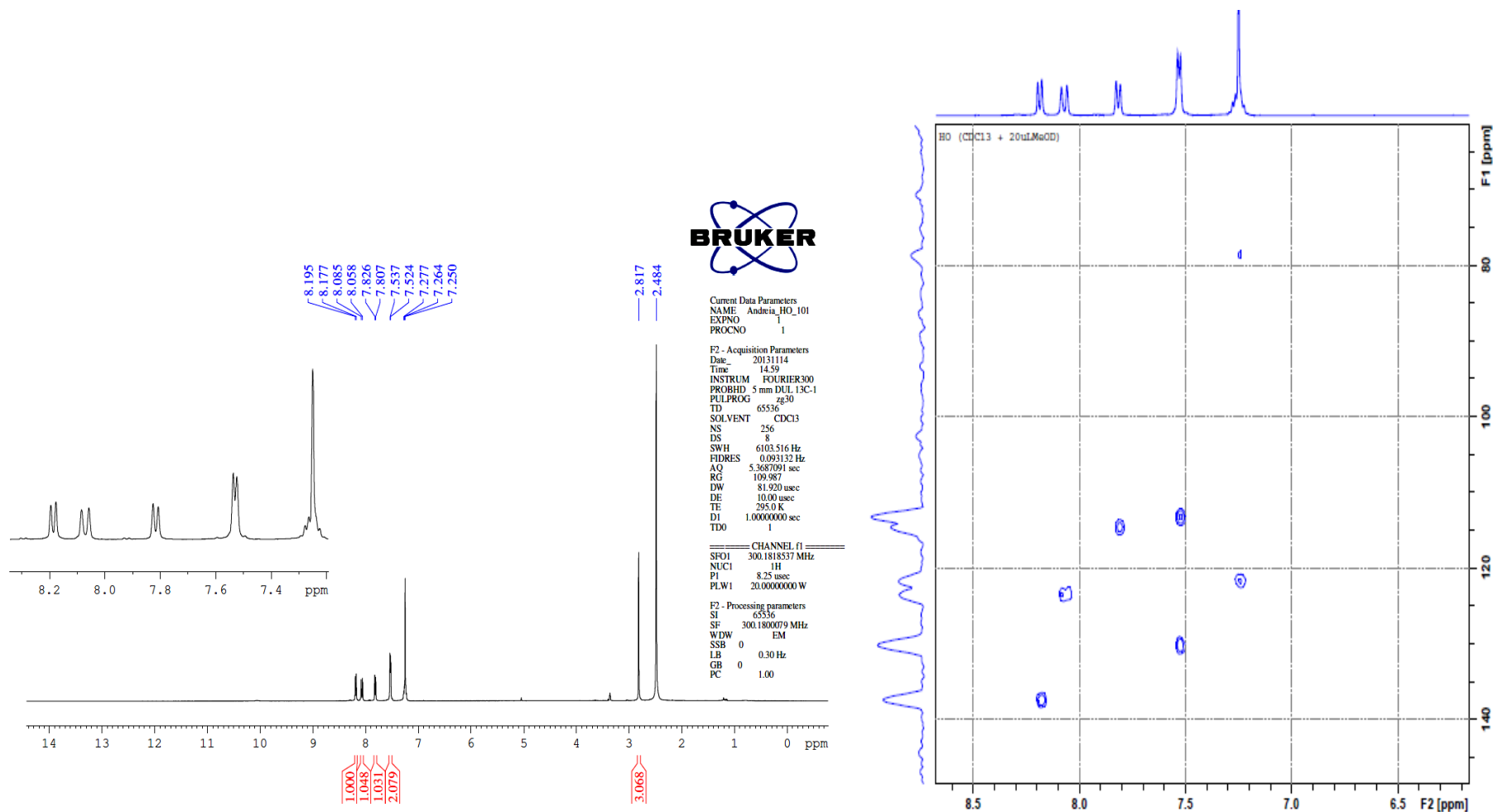
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20131112  
 Time 11:44  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 4096  
 DS 4  
 SWH 24414.063 Hz  
 FIDRES 0.372529 Hz  
 AQ 1.3421773 sec  
 RG 501.187  
 DW 20.480 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 296.3 K  
 D1 2.0000000 sec  
 D11 0.0300000 sec  
 D31 0.00000875 sec  
 D40 0.02898005 sec  
 L4 40  
 L5 57  
 P32 90.00 usec  
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====  
 SFO1 75.4878687 MHz  
 NUC1 13C  
 P1 8.75 usec  
 PLW1 50.00299835 W

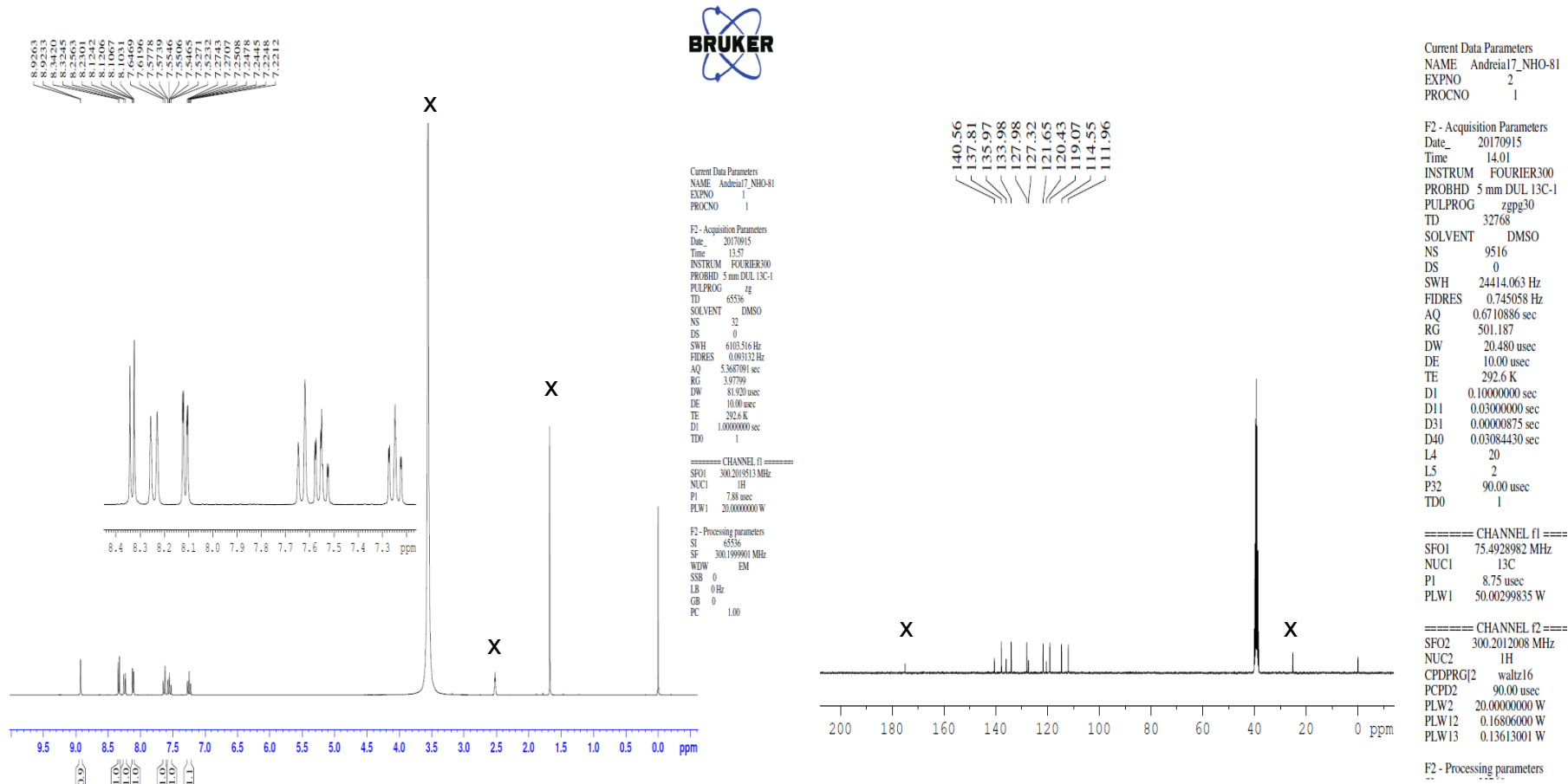
==== CHANNEL f2 =====  
 SFO2 300.1812007 MHz  
 NUC2 1H  
 CPDPRG2 waltz16  
 PCPD2 90.00 usec  
 PLW2 20.0000000 W  
 PLW12 0.1680000 W  
 PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 75.4803210 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

ANEXO 3. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) e espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz) em clorofórmio-*d*<sub>1</sub> da harmalina (27).

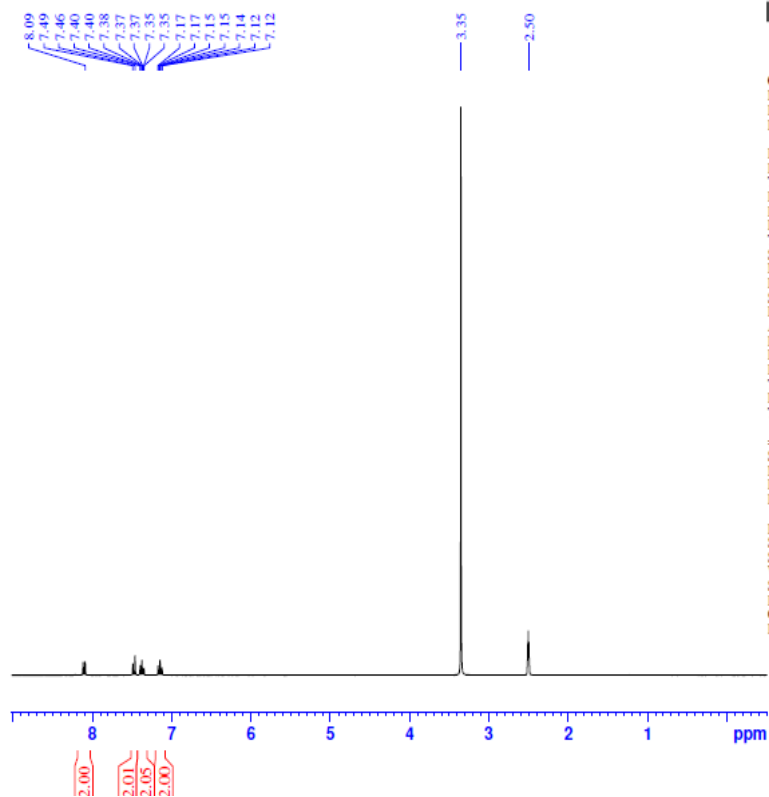


ANEXO 4. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e espectro HSQC em clorofórmio- $d_1$  do harmano (25).



ANEXO 5. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75MHz) em  $\text{DMSO}-d_6$  do norharmano (23).

CA\_101\_Andreia\_Adrian\_1H\_DMSO

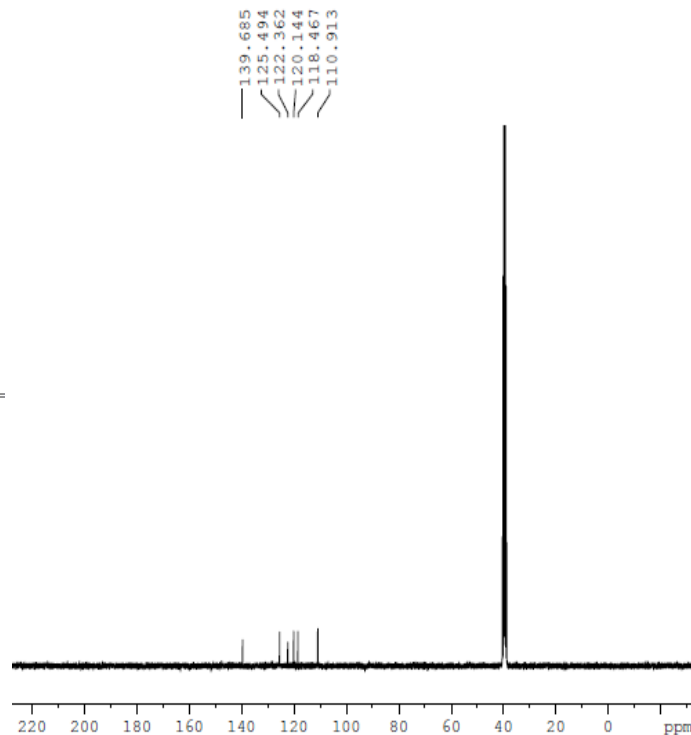


Current Data Parameters  
 NAME Andreia\_CA\_101  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20130822  
 Time 8.43  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zg30  
 TD 65536  
 SOLVENT DMSO  
 NS 16  
 DS 2  
 SWH 6103.516 Hz  
 FIDRES 0.093132 Hz  
 AQ 5.3687091 sec  
 RG 60.2081  
 DW 81.920 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 295.5 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TD0 1

==== CHANNEL f1 ====  
 SFO1 300.1818537 MHz  
 NUC1 1H  
 P1 8.25 usec  
 PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 300.1800000 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0.30 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00



Current Data Parameters  
 NAME Andreia\_CA\_101  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20130822  
 Time 9.40  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT DMSO  
 NS 2048  
 DS 4  
 SWH 24414.063 Hz  
 FIDRES 0.372529 Hz  
 AQ 1.3421773 sec  
 RG 501.187  
 DW 20.480 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 296.2 K  
 D1 2.00000000 sec  
 D11 0.03000000 sec  
 D31 0.00000875 sec  
 D40 0.02898005 sec  
 L4 40  
 L5 57  
 P32 90.00 usec  
 TD0 1

==== CHANNEL f1 ====  
 SFO1 75.4878687 MHz  
 NUC1 13C  
 P1 8.75 usec  
 PLW1 50.00299835 W

==== CHANNEL f2 ====  
 SFO2 300.1812007 MHz  
 NUC2 1H  
 CPDPRG2 waltz16  
 PCPD2 90.00 usec  
 PLW2 20.00000000 W  
 PLW12 0.16806000 W  
 PLW13 0.13613001 W

ANEXO 6. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em DMSO- $d_6$  do carbazol (29).

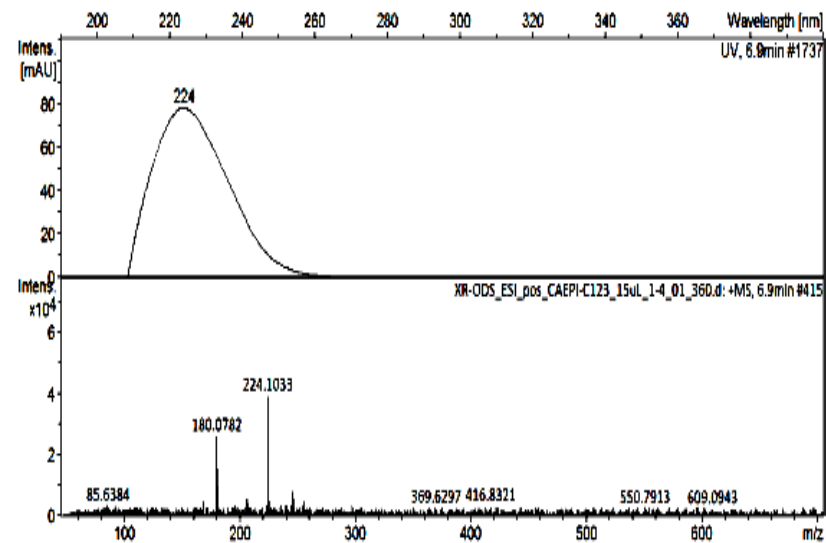
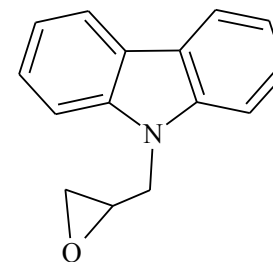
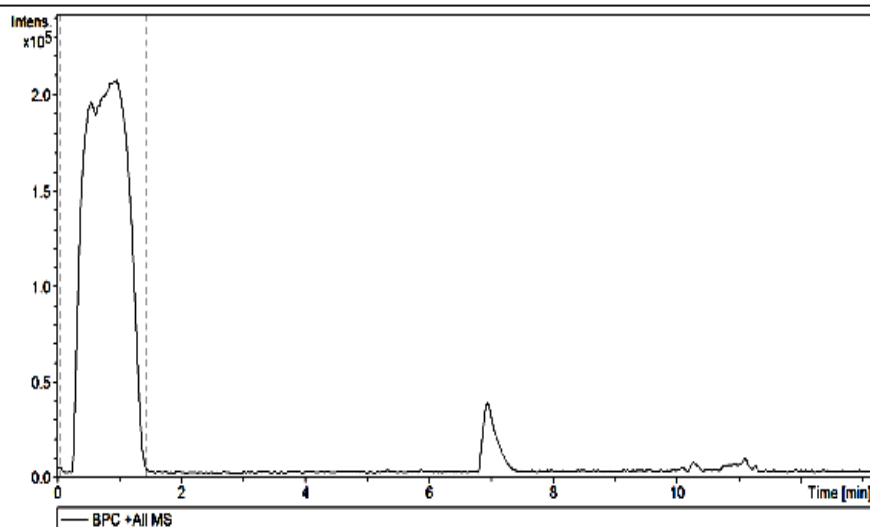
## Display Report

**Analysis Info**

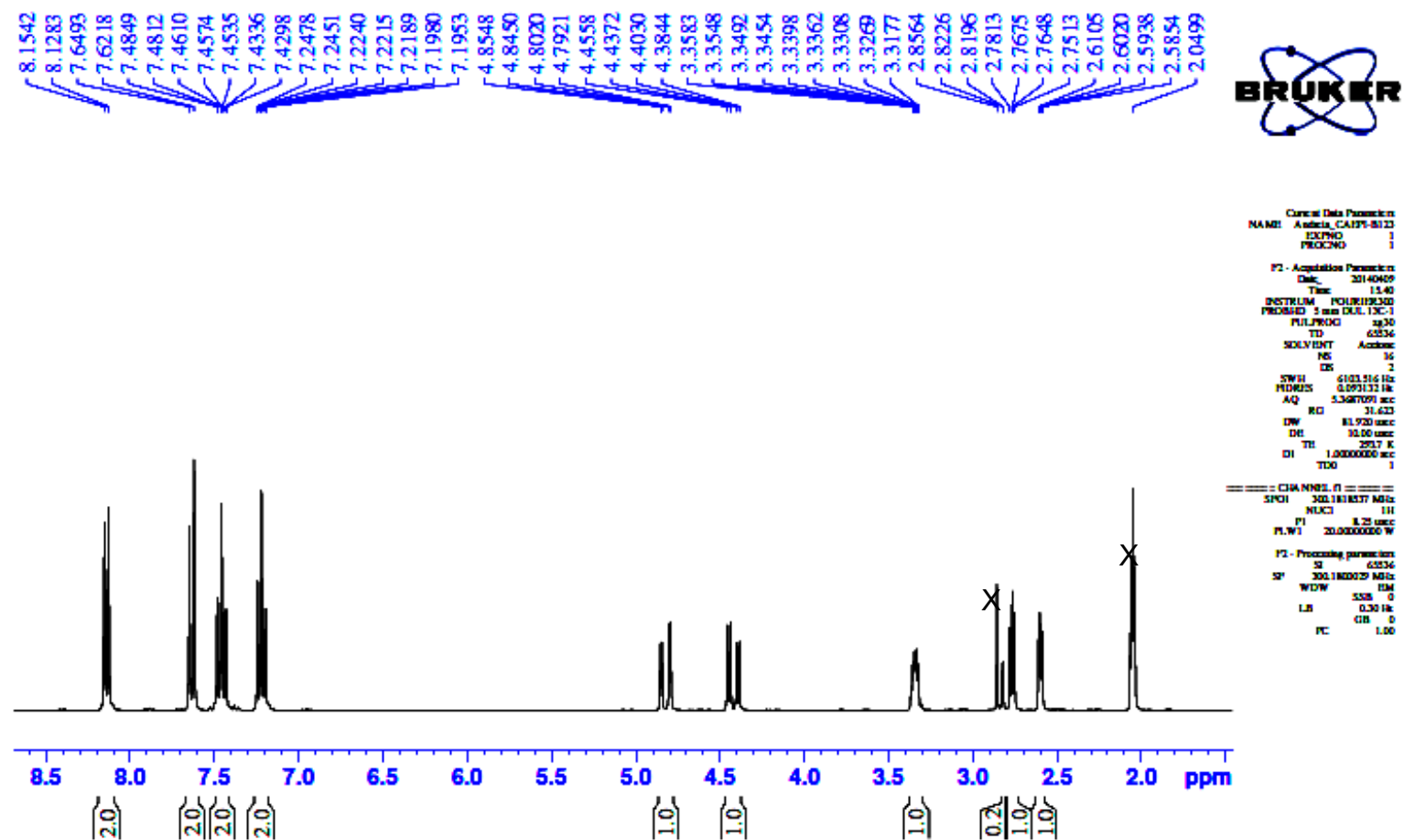
Analysis Name	E:\DOUTORADO\XR-ODS_ESI_pos_CAEPI-C123_15uL_1-4_01_360.d	Acquisition Date	09/04/2014 16:31:47
Method	carbolicos_pos_50-500.m	Operator	BDAL@DE
Sample Name	XR-ODS_ESI_pos_CAEPI-C123_15uL	Instrument	micrOTOF-Q II 228888.10431
Comment	XR-ODS shim-pack 2,0 u (50x2,0 mm) α/ split de 0,1 mL (MS) e 0,3mL (desc) C=0.1mg/mL; Solub= MeOH; P: = 3205psi; Flx: 0,4 uL/min. Inj = 15uL B = ACN(0.1%A.F) A = H2O(0.1%A.F) Conc de B%: 0-10: GRAD 15 - 100% 10-11: ISO 100% 11-13: GRAD 100 - 15%		

**Acquisition Parameter**

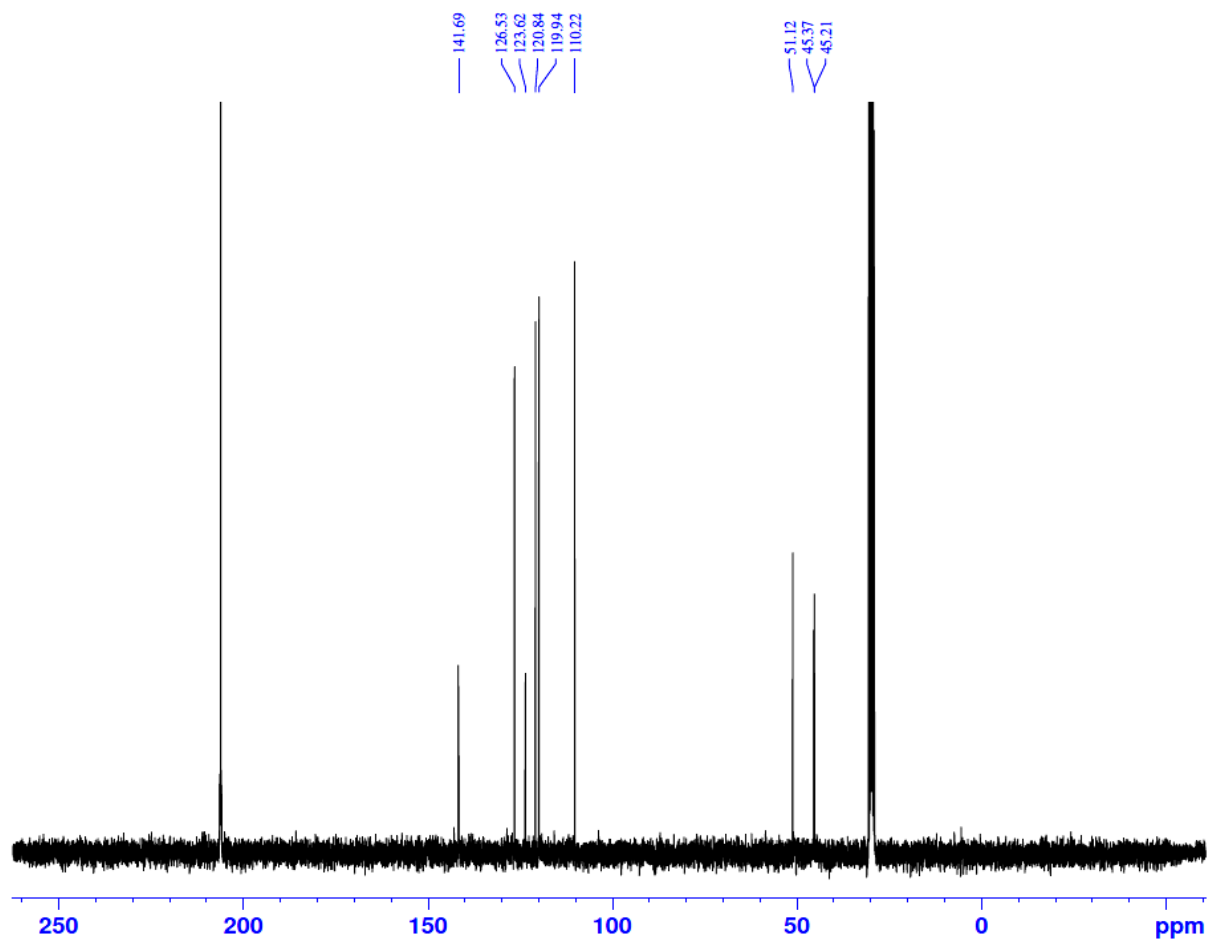
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	2.0 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	7.0 l/min
Scan End	1200 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



ANEXO 7. UFLC/HRMS-ESI do produto 9-(2,3-epoxipropil)-carbazol (29.1).



ANEXO 8. Espectro de RMN<sup>13</sup>C (75 MHz) em acetona-*d*<sub>6</sub> do produto 9-(2,3-epoxipropil)-carbazol (29.1).



Current Data Parameters  
NAME Andrea\_CAEP1-B123  
EXPNO 2  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20140409  
Time 15.44  
INSTRUM FOURIER300  
PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT Acetone  
NS 1064  
DS 4  
SWH 24414.063 Hz  
FIDRES 0.372529 Hz  
AQ 1.3421773 sec  
RG 501.187  
DW 20.480 usec  
DE 10.00 usec  
TE 294.0 K  
D1 2.00000000 sec  
D11 0.03000000 sec  
D31 0.00000875 sec  
D40 0.02898005 sec  
L4 40  
L5 57  
P32 90.00 usec  
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====  
SFO1 75.4878687 MHz  
NUC1 13C  
P1 8.75 usec  
PLW1 50.00299835 W

===== CHANNEL f2 =====  
SFO2 300.1812007 MHz  
NUC2 1H  
CPDPRG[2] waltz16  
PCPD2 90.00 usec  
PLW2 20.00000000 W  
PLW12 0.16806000 W  
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 75.4802581 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

ANEXO 9. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 9-(2,3-epoxipropil)-carbazol (29.1).

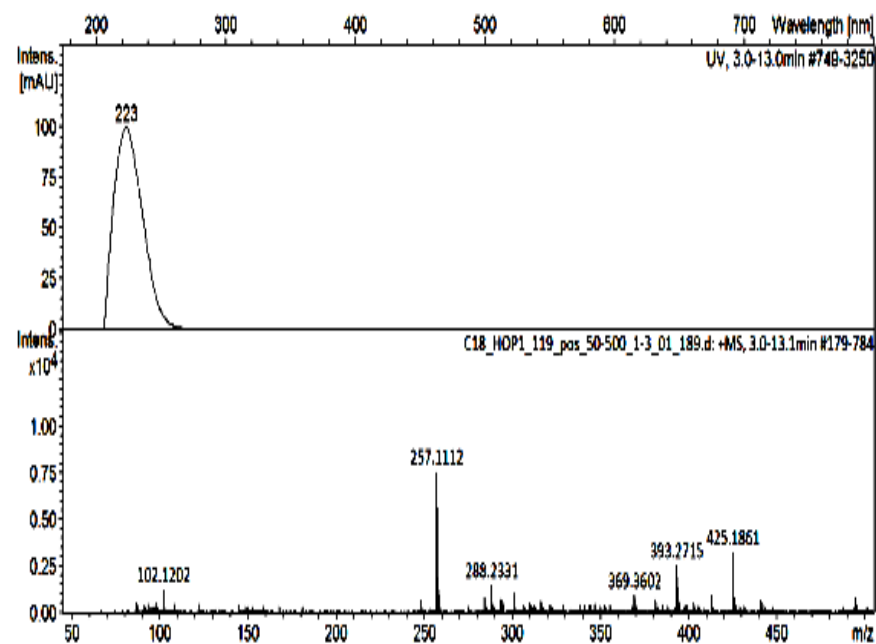
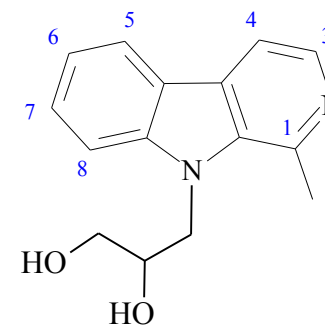
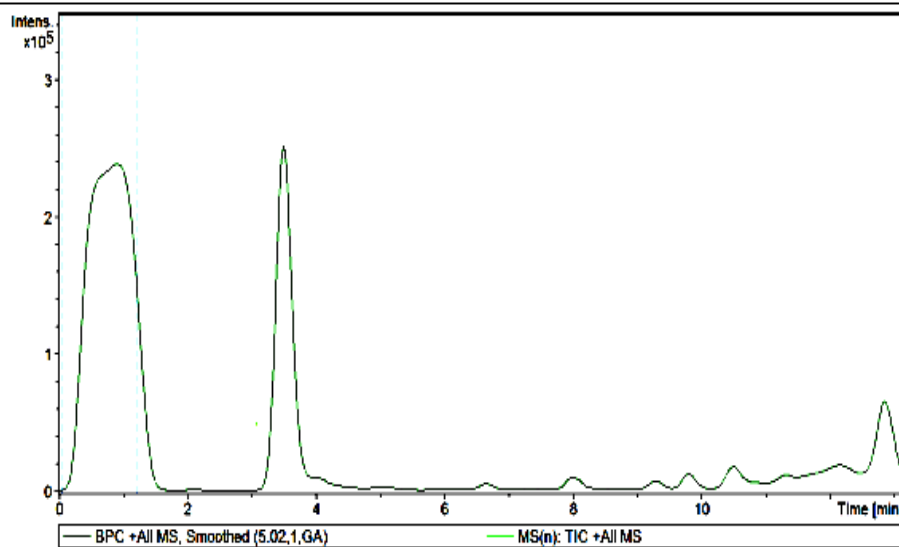


## Display Report

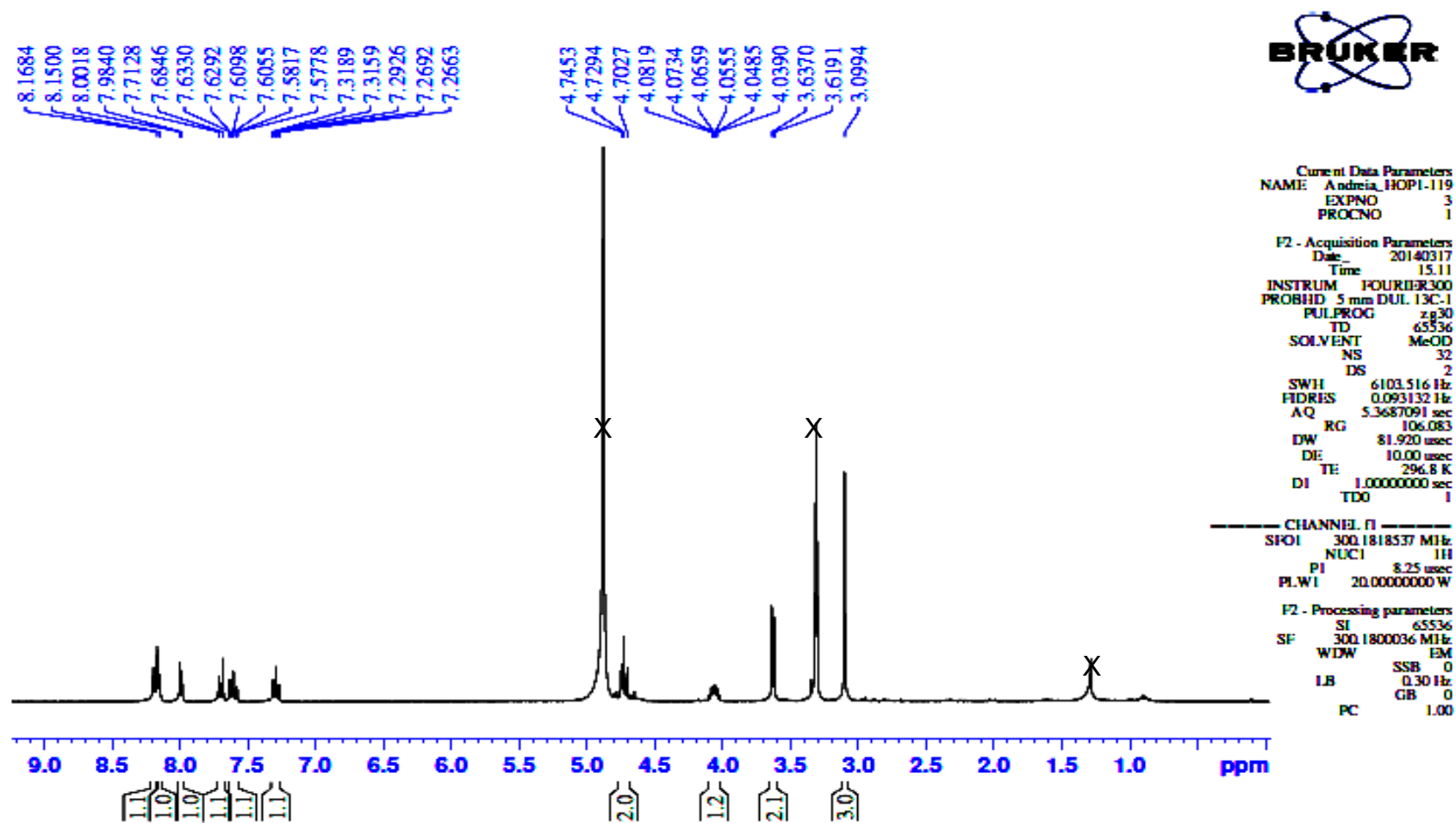
**Analysis Info** Acquisition Date 14/01/2014 16:10:43  
**Analysis Name** C:\Users\adrian\Documents\Andreia\Andreia\MS\MicroTOF\DOCTORADO\LC-MS\_ESI+IC18\_HOP1\_119\_pos\_50-500\_1-3\_01\_189.d  
**Method** carbolínicos\_pos\_50-500.m **Operator** BDAL@DE  
**Sample Name** C18\_HOP1\_119\_pos\_50-500 **Instrument** micrOTOF-Q II 228888.10431  
**Comment** Concentração = 0,3 mg/mL; Solubilidade = metanol; Pressão = 3898 psi; Fluxo: 0,4 uL/min.  
 Fase móvel: B = ACN(ác. form. 0.1%); A = H2O(ác. form. 0.1%)  
 Conc de B%:  
 0-10: GRAD 5 - 100%  
 10-11: ISO 100%  
 11-13: GRAD 100 - 5%

**Acquisition Parameter**

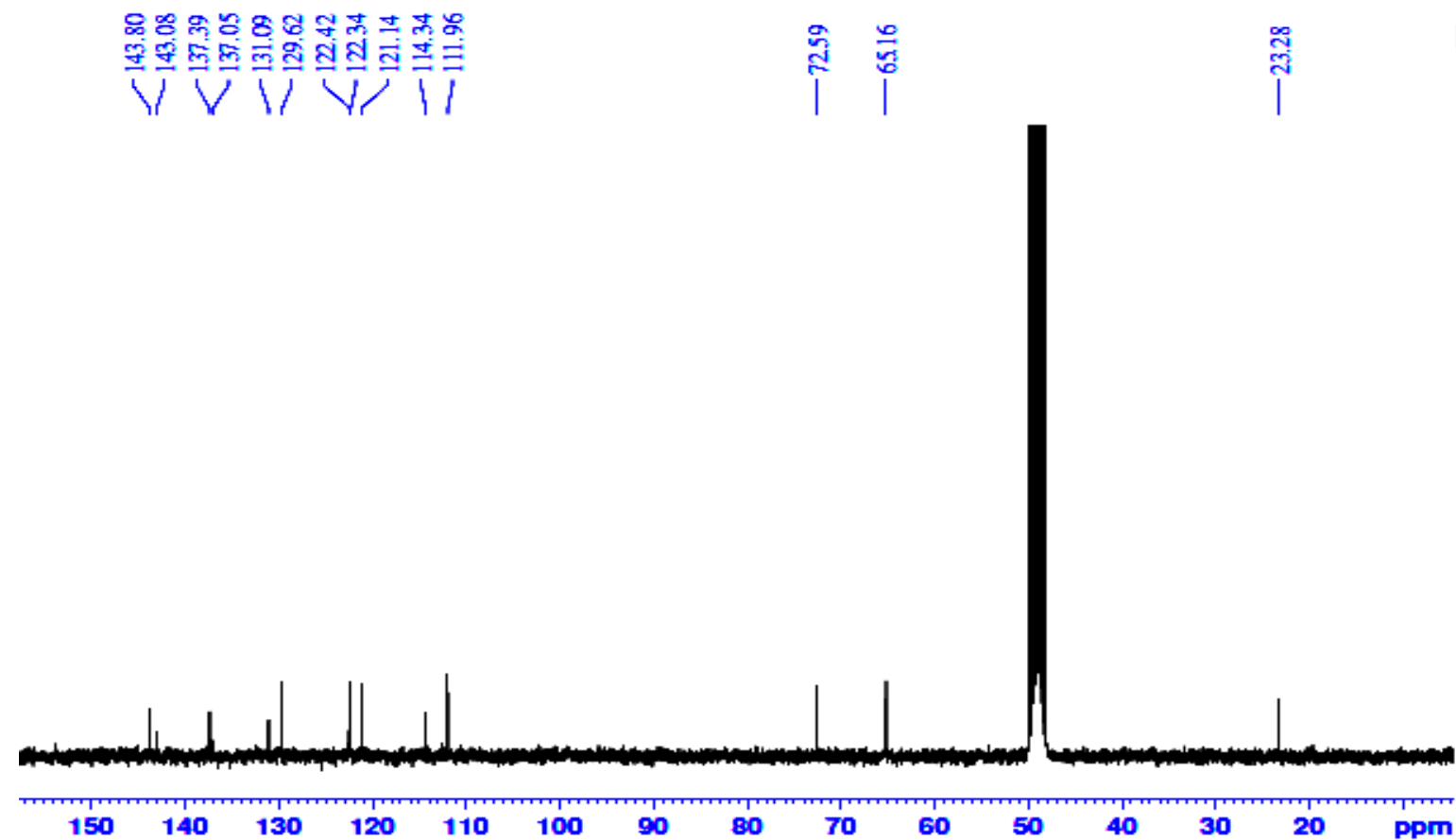
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	2.0 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	7.0 l/min
Scan End	1200 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



ANEXO 10. UFLC/HRMS-ESI do produto do produto 9-(2,3-dihidroxiopril)-harmano (25.1).



ANEXO 11. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em metanol- $d_4$  do produto 9-(2,3-dihidropropil)-harmano (25.1).



```

Current Data Parameters
NAME: Anexo 1201-119
EXPNO: 2
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_   20140314
Time    18.06
INSTRUM: zgpg30000
PROBHD: 5 mm QNP 1
PULPROG: zgpg30
TD       65536
SOLVENT: Me2O
NS       4556
DS       4
SWH      24414.000 Hz
FREQS    0.372230 Hz
AQ       1.3421773 sec
RG       501.187
DW       20.480 nsec
DE       10.00 nsec
TE       291.3 K
D1       2.0000000 sec
d11      0.0000000 sec
D31      0.0000005 sec
D40      0.0000005 sec
LA       40
LS       37
P32      90.00 nsec
T130     1

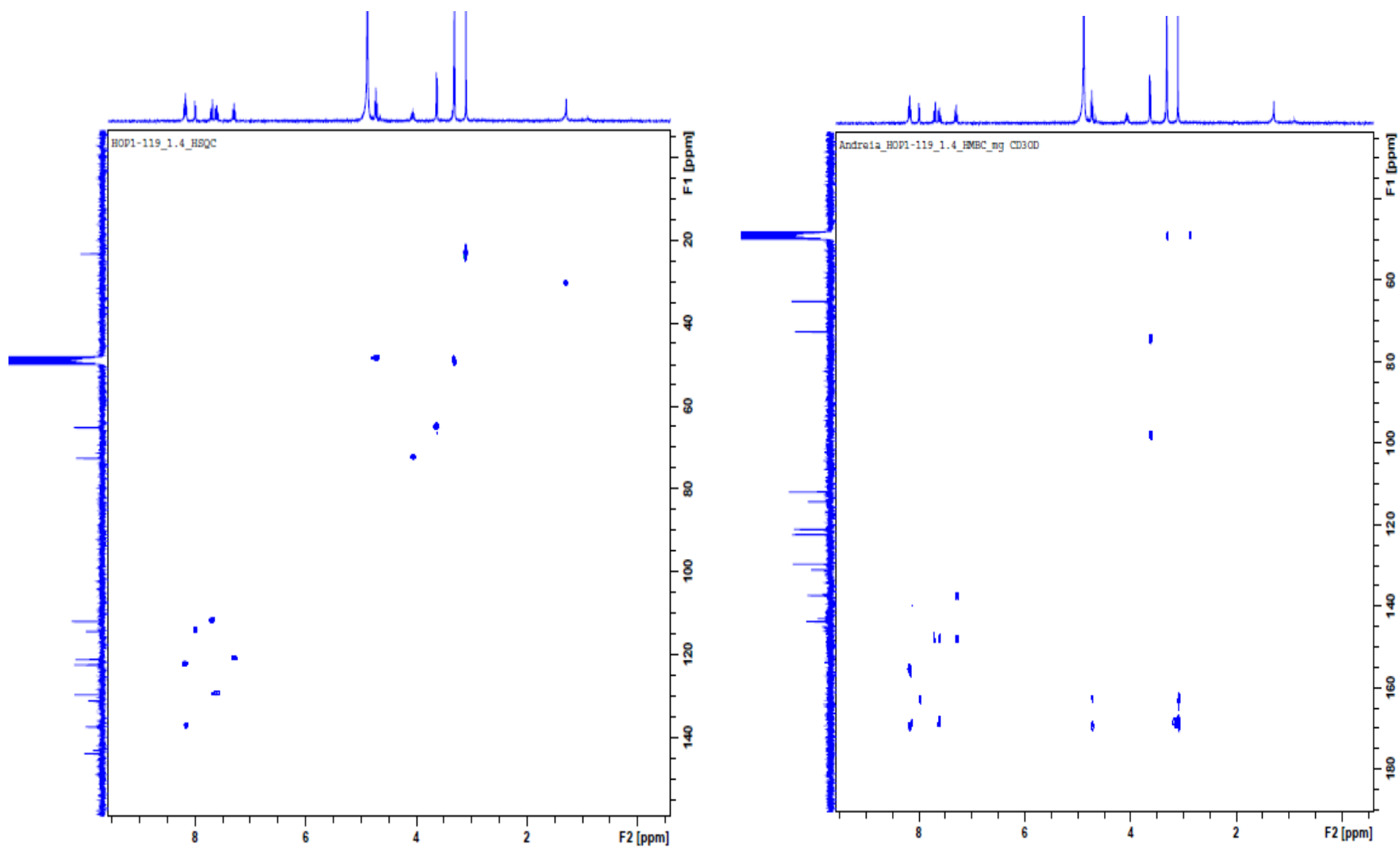
----- CHANNEL f1 -----
SFO1    75.487647 MHz
NUC1     13C
P1       8.75 nsec
PLW1     50.00000000 W

----- CHANNEL f2 -----
SFO2    300.1312007 MHz
NUC2     131
P2PROG12 zgpg30
waltz16
PCPD12   90.00 nsec
PLW12    20.00000000 W
PLW13    0.16800000 W
PLW14    0.13613001 W

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       75.4882146 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40

```

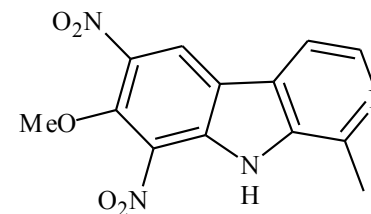
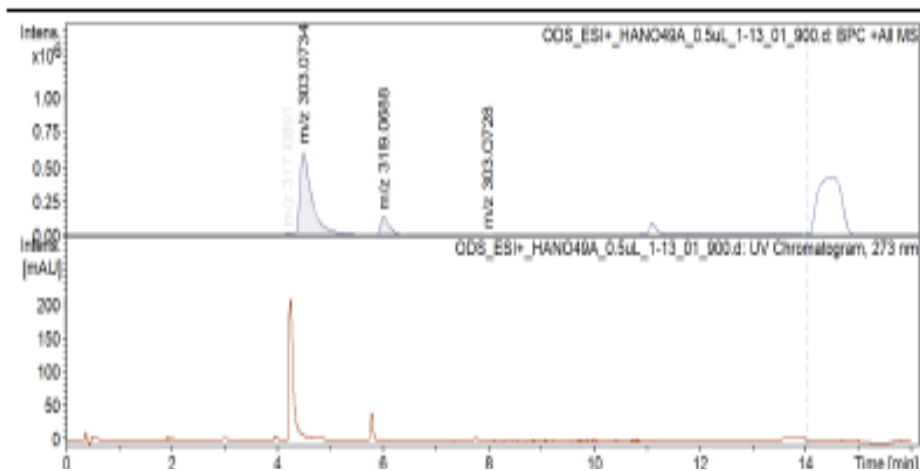
ANEXO 12. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em metanol- $d_4$  do produto 9-(2,3-diidropropil)-harmano (25.1).



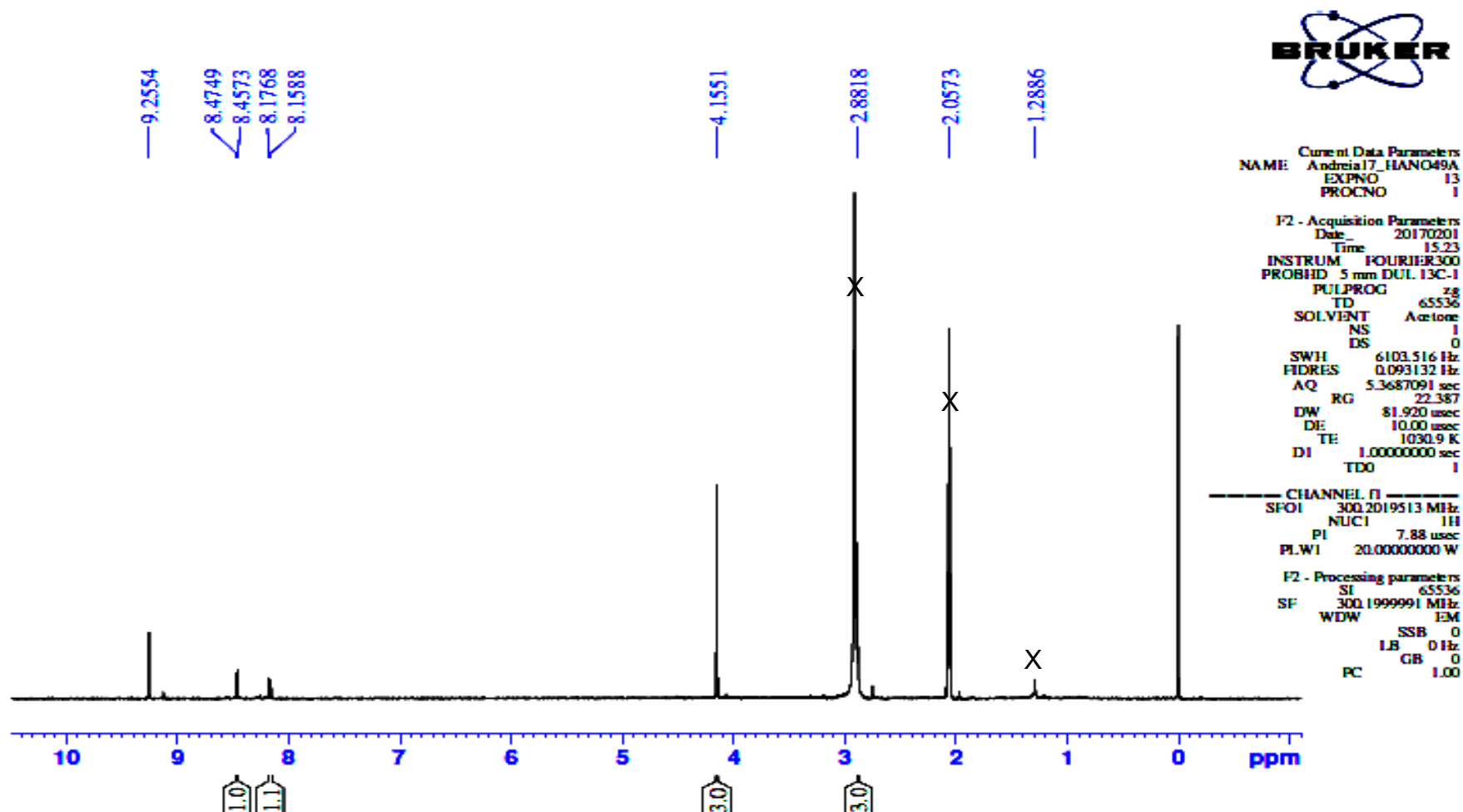
ANEXO 13. Espectro de HSQC (correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )  $J^1$  e espectro de HMBC (correlação a longa distância)  $J^2$  e  $J^3$  do produto 9-(2,3-dihidropropil)-harmano (25.1).

## Generic Display Report

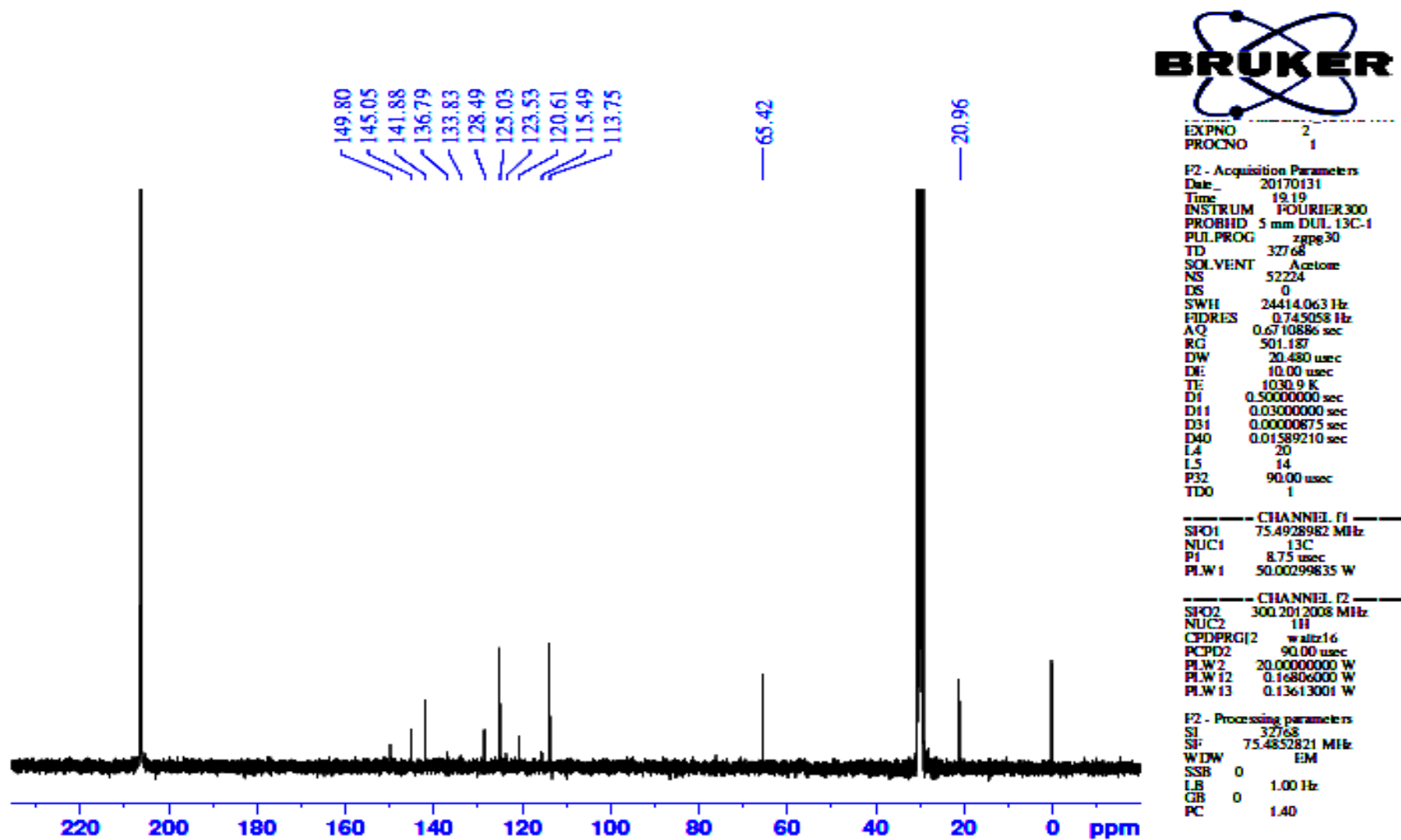
**Analysis Info** Acquisition Date 1/13/2017 12:03:14 PM  
**Analysis Name** D:\Data\Usuarios\2017\Adriano\Andrea M>Data\LC-MS\13-01-2017\ODS\_ESI+\_HANO49A\_0.5uL\_1-13\_01\_900.d  
**Method** Tune-Low\_ESI+\_Andrea\_noFocus\_100-900\_14-16min.m Operator BDAL@DE  
**Sample Name** ODS\_ESI+\_HANO49A\_0.5uL Instrument micrOTOF-Q  
**Comment** ODS 50x2,0  
 Flow: 0.4 mL/min (Split de 0,06 mL (MS) / 0,34 mL (desc)); P: 2685 psi; C=0,6 mg/mL (MeOH); (t)<sub>inj</sub>=0.5uL;  
 A(H<sub>2</sub>O+0,1% HCOOH) / B(ACN+0,1% HCOOH)  
 0-8m\_5-50%  
 8-10m\_50-100%  
 10-12m\_100%  
 12-14m\_100-5%  
 14-16m\_5%  
 Injetor: ACN  
 Calib.: HCOONa 10mM\_end



ANEXO 14. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do produto 6,8-dinitro-harmina (24.1).



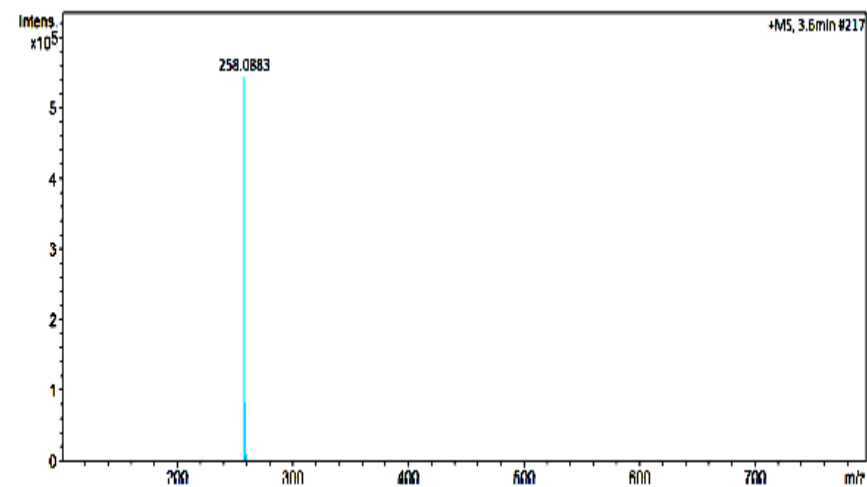
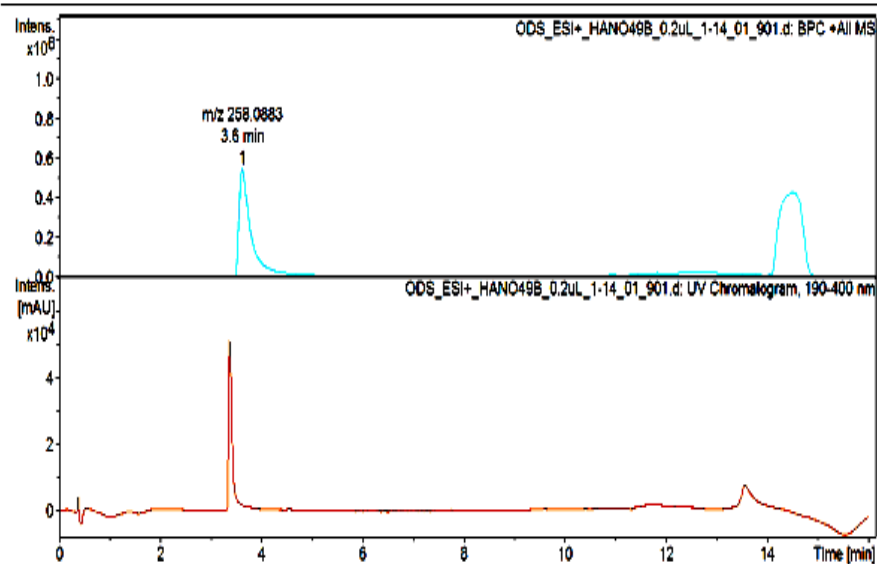
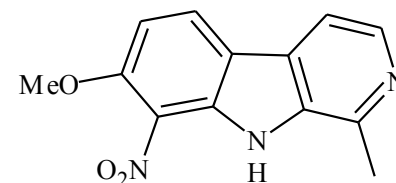
ANEXO 15. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 6,8-dinitroharmina (24.1).



ANEXO 16. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 6,8-dinitroharmina (24.1).

## Generic Display Report

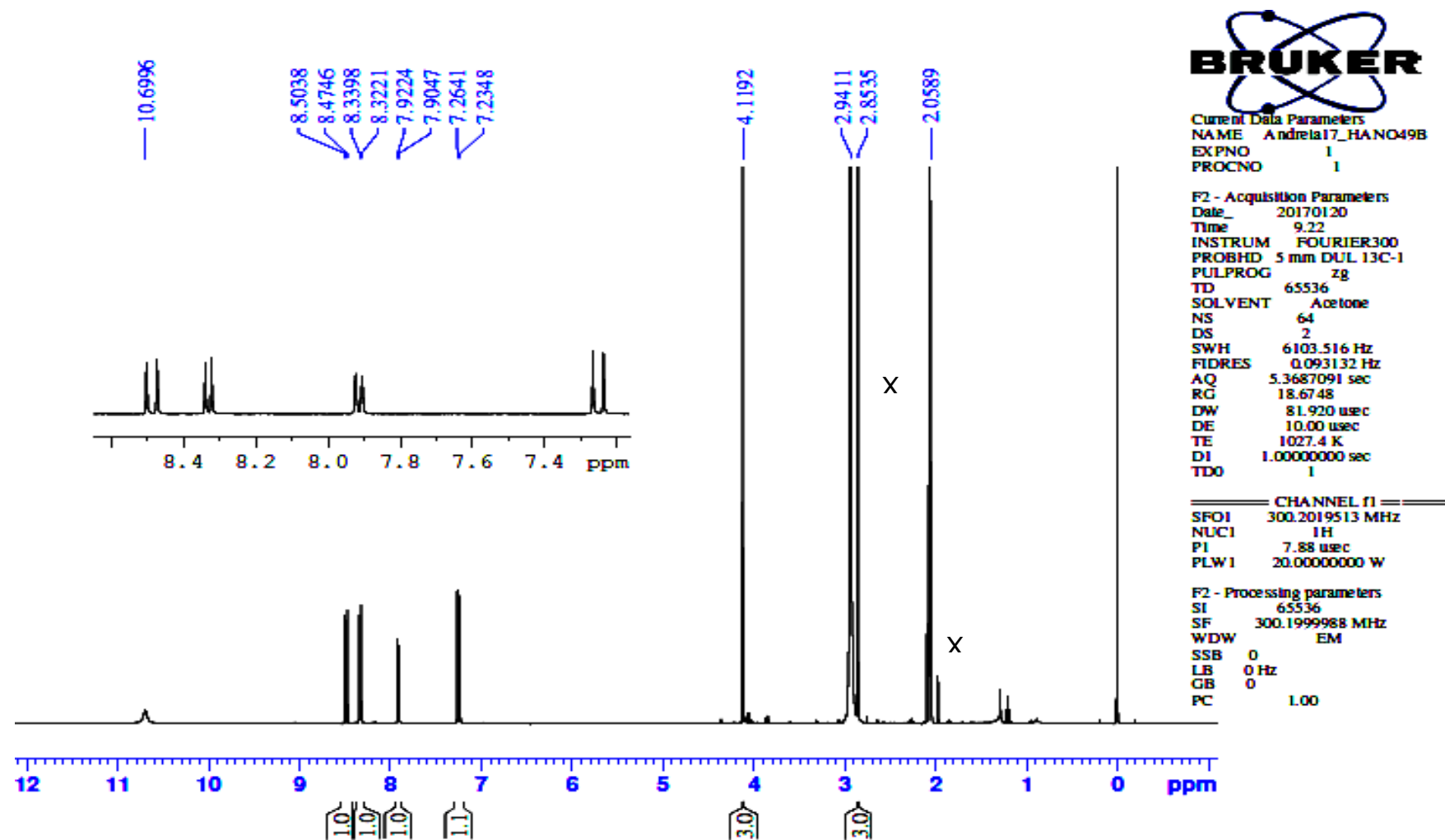
**Analysis Info** Acquisition Date 1/13/2017 12:20:55 PM  
 Analysis Name D:\Data\Usuarios\2017\Adrian\Andreia MIData\LC-MS\13-01-2017\ODS\_ESI+\_HANO49B\_0.2uL\_1-14\_01\_901.d  
 Method Tune-Low\_ESI+\_Andreia\_noFocus\_100-900\_14-16min.m Operator BDAL@DE  
 Sample Name ODS\_ESI+\_HANO49B\_0.2uL Instrument micrOTOF-Q  
 Comment ODS 50x2,0  
 Flx=0.4 mL/min[Split de 0,06 mL(MS)/0,34mL(desc)]; P:2685;psi;C=1,1mg/mL (MeOH:ACN1:1);Inj=0.2uL;  
 A(H2O+0.1%HCOOH)/B(ACN+0.1%HCOOH)  
 0-8m\_5-50%  
 8-10m\_50-100%  
 10-12m\_100%  
 12-14m\_100-5%  
 14-16m\_5%  
 injetor:ACN  
 Calib.:HCOONa 10mM\_end



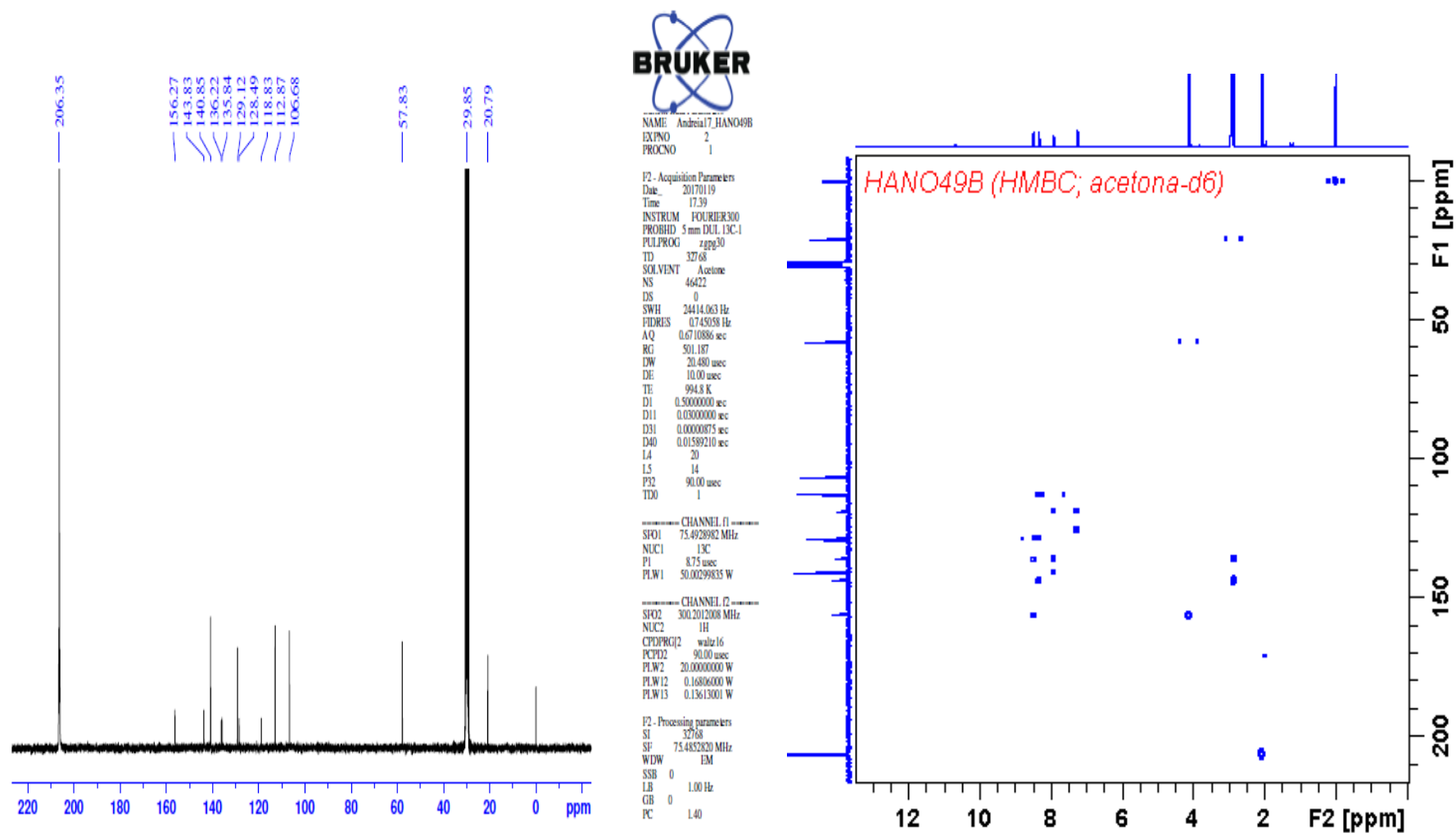
Bruker Compass DataAnalysis 4.2 printed: 1/13/2017 6:38:55 PM by: BDAL@DE Page 1 of 1

ANEXO 17. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do produto 8-nitroharmina (24.2).





ANEXO 18. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 8-nitroharmina (24.2).



ANEXO 19. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) e HMBC em acetona- $d_6$  do produto 8-nitroharmina (24.2).

## Generic Display Report

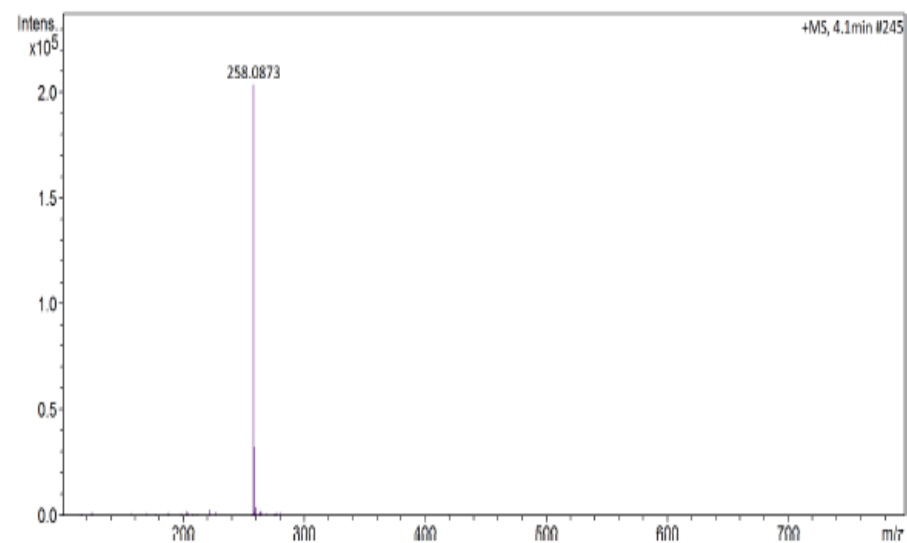
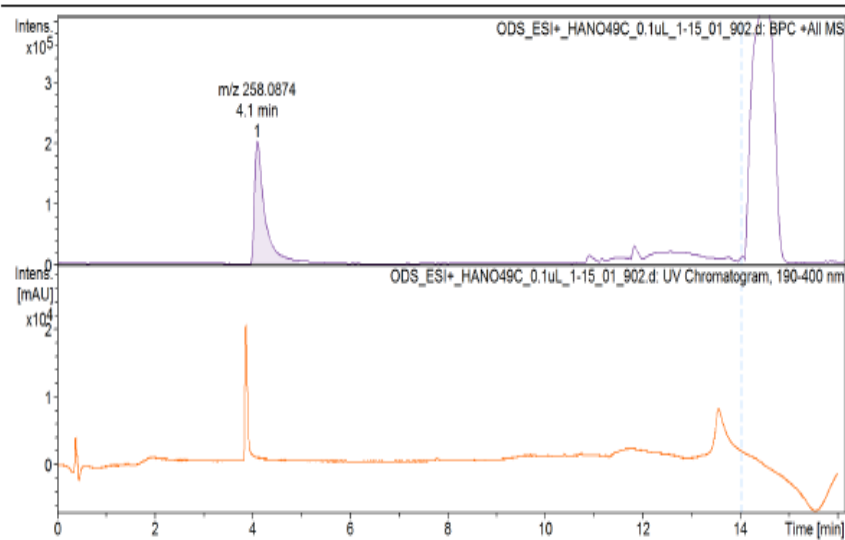
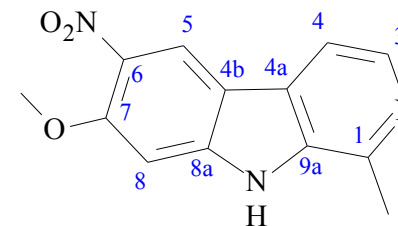
**Analysis Info** Acquisition Date 1/13/2017 12:48:42 PM

Analysis Name D:\Data\Usuarios\2017\Adrian\Andrea\MS\13-01-2017\ODS\_ESI+\_HANO49C\_0.1uL\_1-15\_01\_902.d

Method Tune-Low\_ESI+\_Andrea\_noFocus\_100-900\_14-16min.m Operator BDAL@DE

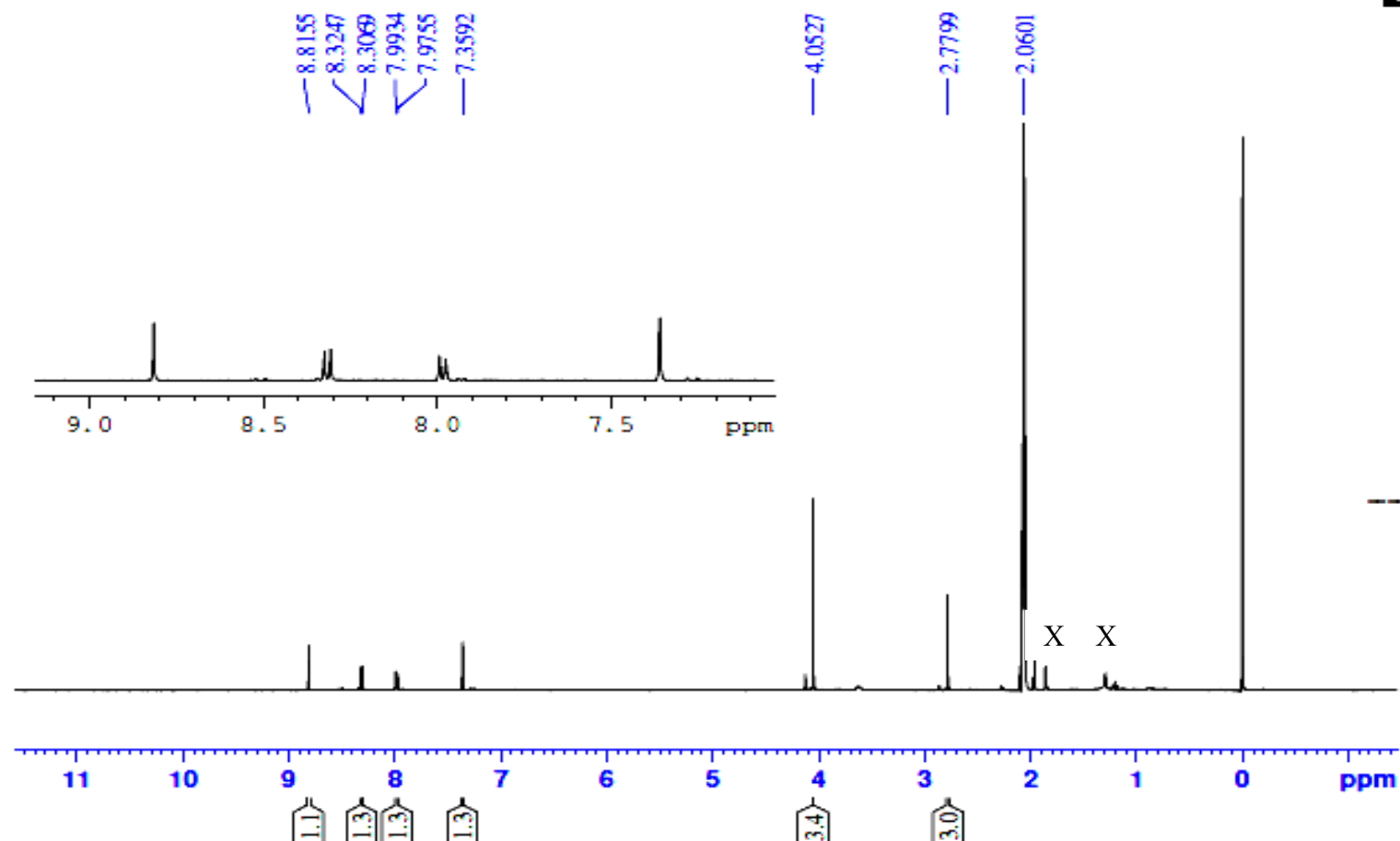
Sample Name ODS\_ESI+\_HANO49C\_0.1uL Instrument micrOTOF-Q

Comment ODS 50x2.0  
 Flx=0,4 mL/min[Split de 0,06 mL(MS)/0,34mL(desc)]; P:2685.psi;C=1,2mg/mL (MeOH:ACN1:1);Inj=0.2uL;  
 A(H2O+0.1%HCOOH)/B(ACN+0,1%HCOOH)  
 0-8m\_5-50%  
 8-10m\_50-100%  
 10-12m\_100%  
 12-14m\_100-5%  
 14-16m\_5%  
 injetor:ACN  
 Calib.:HCOONa 10mM\_end



**ANEXO 20. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do produto 6-nitroharmina (24.3).**

ANO49C (1H sup Giro;



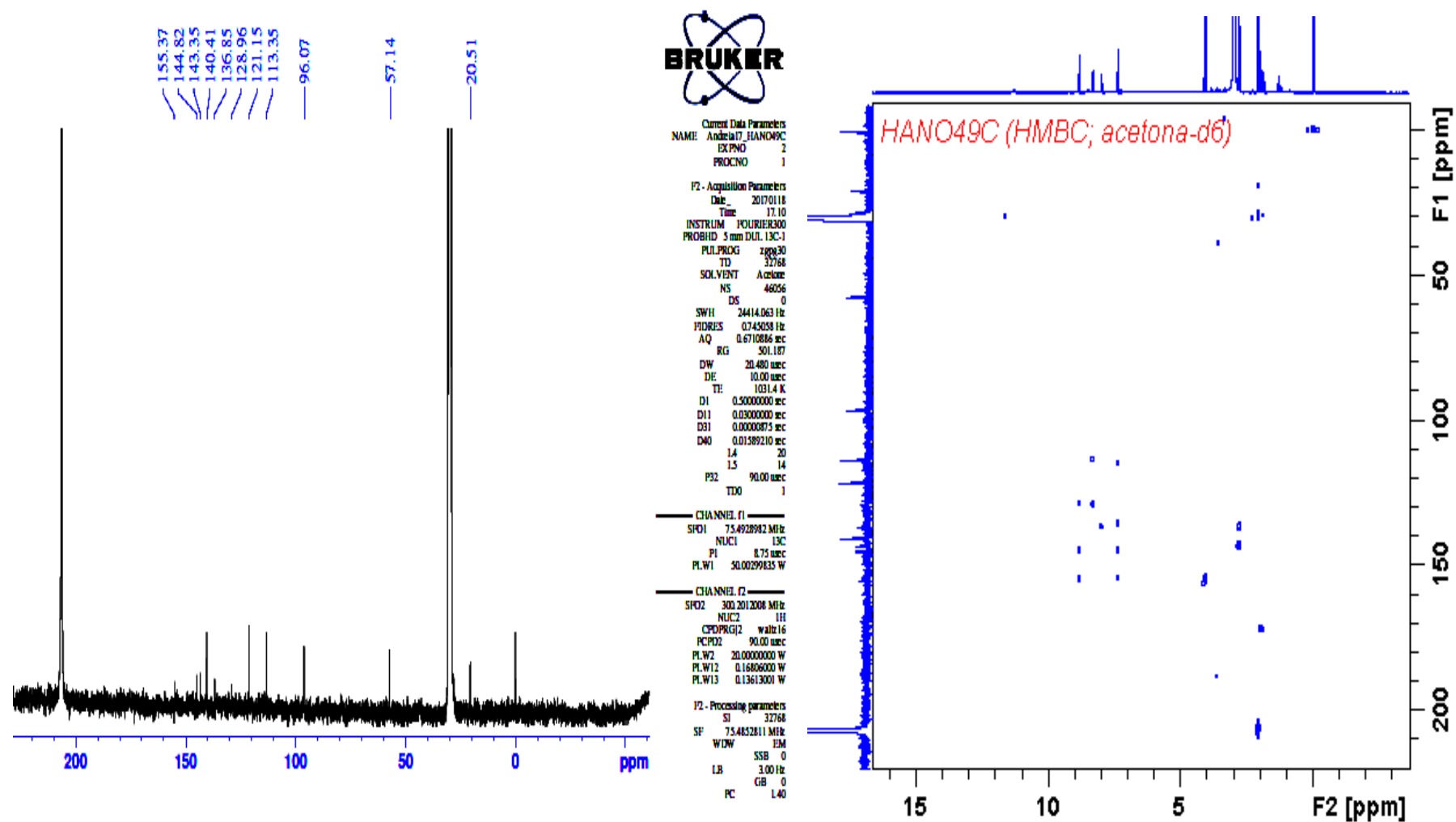
Current Data Parameters  
 NAME Andrea17\_HANO49C  
 EXPNO 11  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20170118  
 Time 15.58  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zgpgpr  
 TD 65536  
 SOLVENT Acetone  
 NS 64  
 DS 4  
 SWH 6103.516 Hz  
 FIDRES 0.093132 Hz  
 AQ 5.3687091 sec  
 RG 75.3865  
 DW 81.920 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 1026.5 K  
 D1 2.0000000 sec  
 D12 0.00002000 sec  
 P41 2000000.00 usec  
 TD0 1

----- CHANNEL f1 -----  
 SFO1 300.2008910 MHz  
 NUC1 1H  
 P1 7.88 usec  
 PLW1 20.0000000 W  
 PLW9 0.00001000 W

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 300.1999981 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

ANEXO 21. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) com supressão do sinal da água em acetona- $d_6$  do produto 6-nitroharmina (24.3).

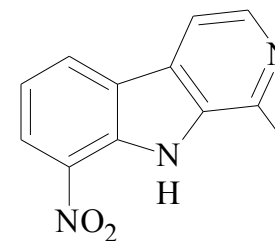


ANEXO 22. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de de HMBC em acetona- $d_6$  do produto 6-nitroharmina (24.3).

## Generic Display Report (all)

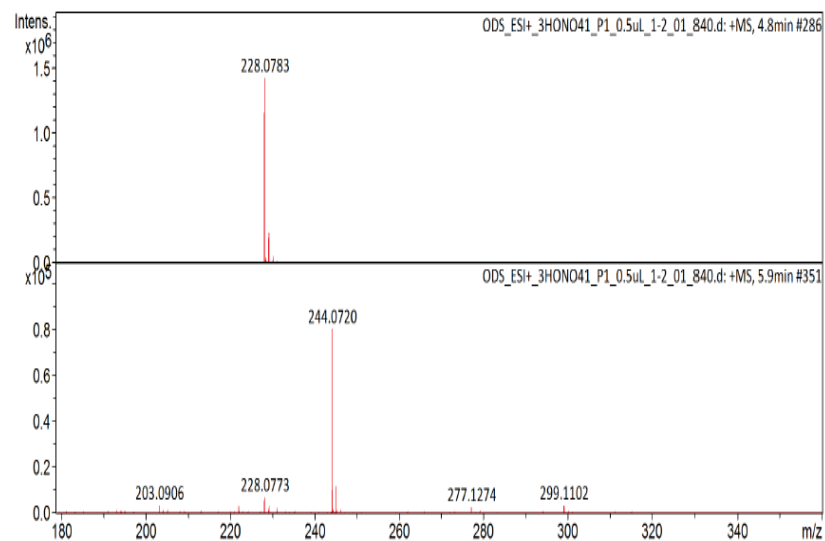
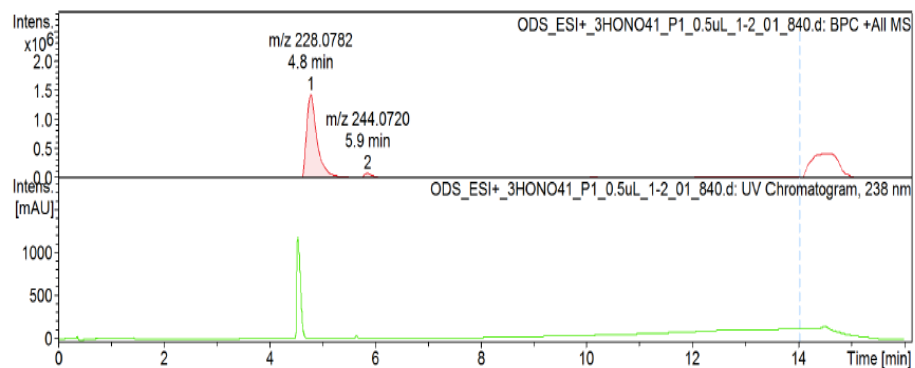
### Analysis Info

Acquisition Date 11/29/2016 12:55:24 PM  
 Analysis Name D:\Data\Usuarios\2016\Adrian\Andreia\Data\LC-MS\ODS\_ESI+\_3HONO41\_P1\_0.5uL\_1-2\_01\_840.d  
 Method Tune-Low\_ESI+\_Andreia\_noFocus\_50-900\_16min.m Operator BDAL@DE  
 Sample Name ODS\_ESI+\_3HONO41\_P1\_0.5uL Instrument micrOTOF-Q 228888.10431  
 Comment ODS 50x2,0mm  
 Flx=0,4 mL/min[Split de 0,06 mL(MS)/0,34mL(desc)]; P:2985psi;C=0,5mg/mL (ACN/MeOH\_1:1);Inj=0.5uL;  
 A(H2O+0.1%HCOOH)/B(ACN+0,1%HCOOH)  
 0-2m\_5%  
 2-11m\_5-100%  
 11-13m\_100%  
 13-14m\_100-5%  
 14-16m\_5%  
 injetor: MeOH:ACN(1:1)  
 Calib.:HCOONa 10mM\_end

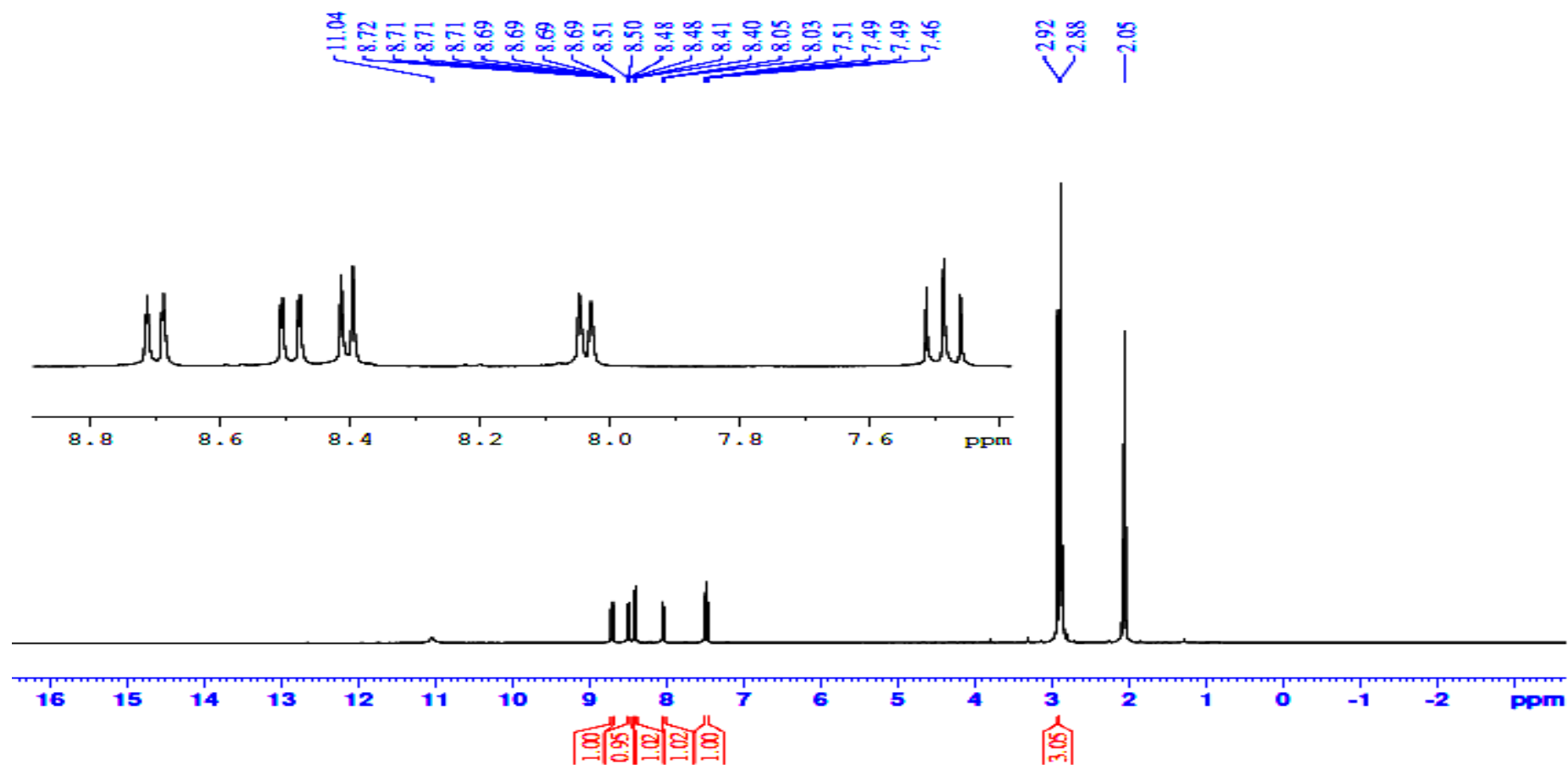


### Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	5.0 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	180 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	10.0 l/min
Scan End	900 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



**ANEXO 23. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do produto 8-nitroharmano (25.2).**



ANEXO 24. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 8-nitroharmano (25.2).



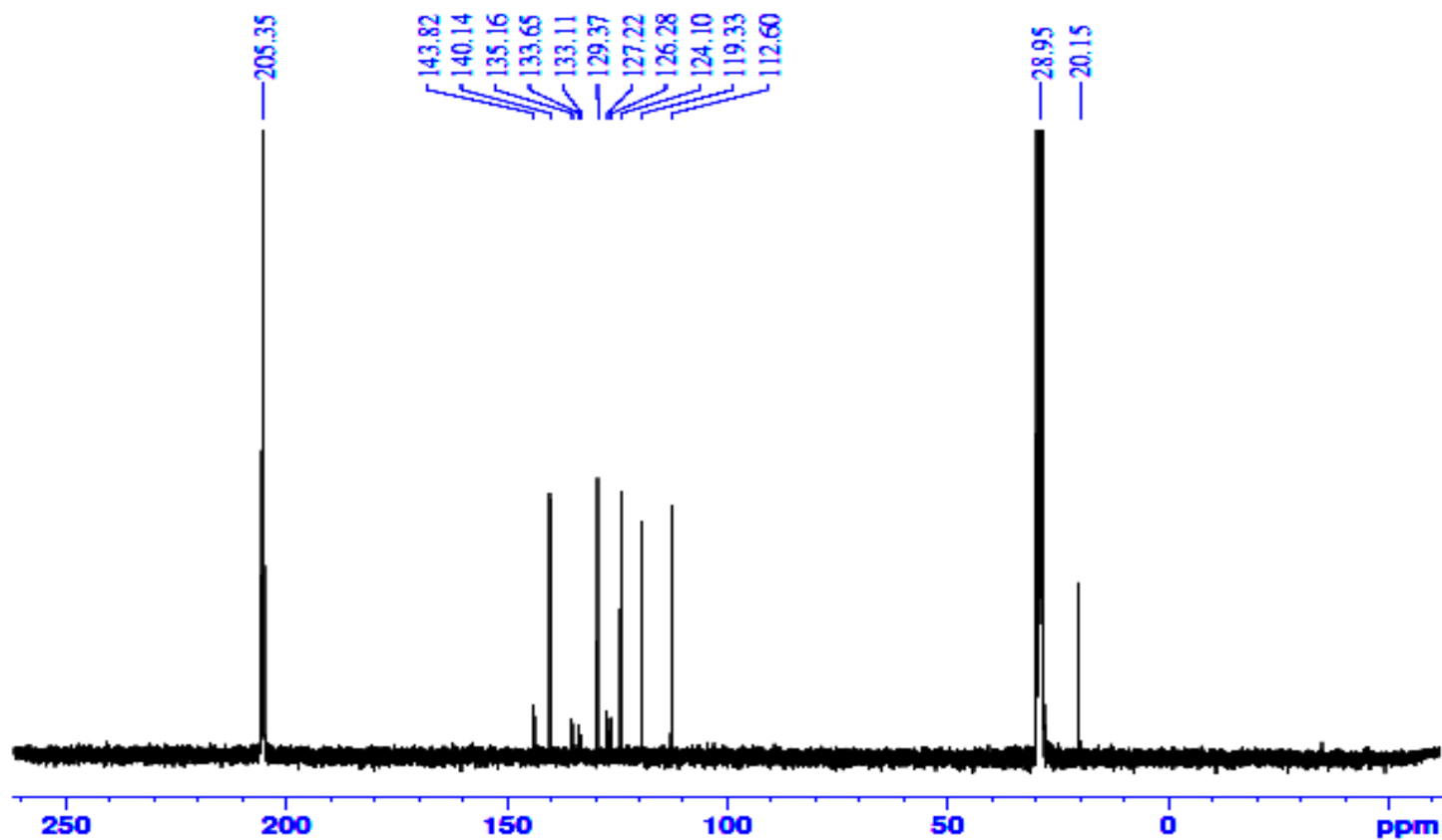
Current Data Parameters  
 NAME: Andreia\_310N041P1  
 EXPNO: 22  
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_: 20161213  
 Time: 17.26  
 INSTRUM: FOURIER300  
 PROBHD: 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG: zgpg30  
 TD: 32768  
 SOLVENT: Acetone  
 NS: 41984  
 DS: 0  
 SWH: 24414.063 Hz  
 FIDRES: 0.743058 Hz  
 AQ: 0.6710886 sec  
 RG: 501.187  
 DW: 20.480 usec  
 DE: 10.00 usec  
 TE: 292.9 K  
 D1: 0.60000002 sec  
 D11: 0.03000000 sec  
 D31: 0.00000875 sec  
 D40: 0.01215407 sec  
 L4: 20  
 L5: 17  
 P32: 90.00 usec  
 TD0: 1

----- CHANNEL f1 -----  
 SFO1: 75.4928982 MHz  
 NUC1: 13C  
 P1: 8.75 usec  
 PLW1: 50.00299835 W

----- CHANNEL f2 -----  
 SFO2: 300.2012008 MHz  
 NUC2: 1H  
 CPDPRG2: waltz16  
 PCPD2: 90.00 usec  
 PLW2: 20.00000000 W  
 PLW12: 0.16806000 W  
 PLW13: 0.13613001 W

F2 - Processing parameters  
 SI: 32768  
 SF: 75.4853500 MHz  
 WDW: EM  
 SSB: 0  
 LB: 1.00 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.40



ANEXO 25. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 8-nitroharmano (25.2).

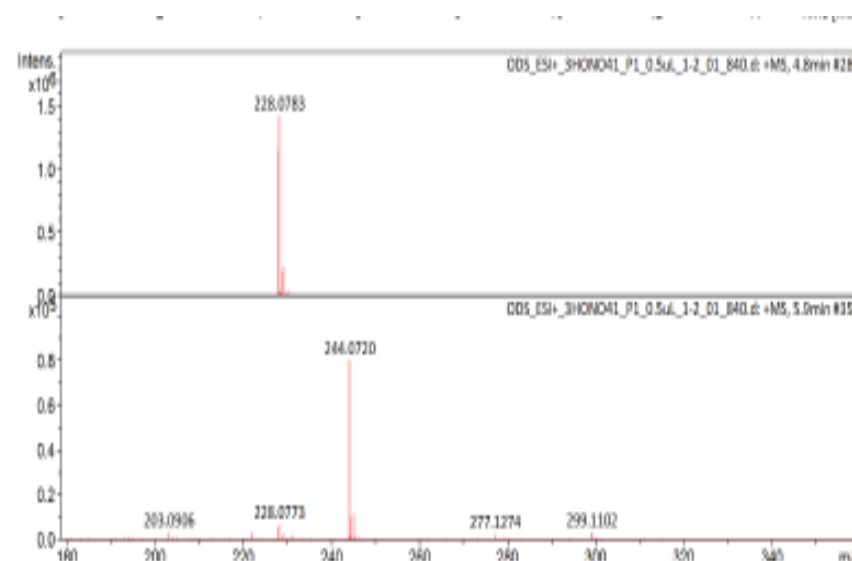
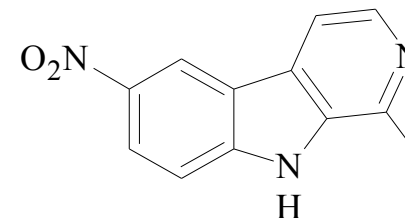
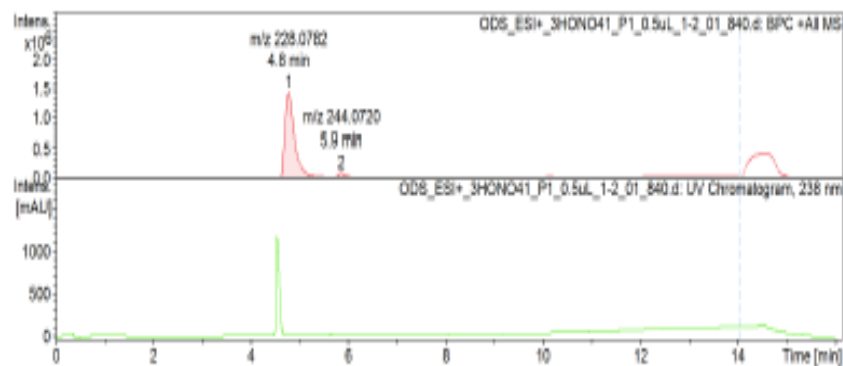


## Generic Display Report (all)

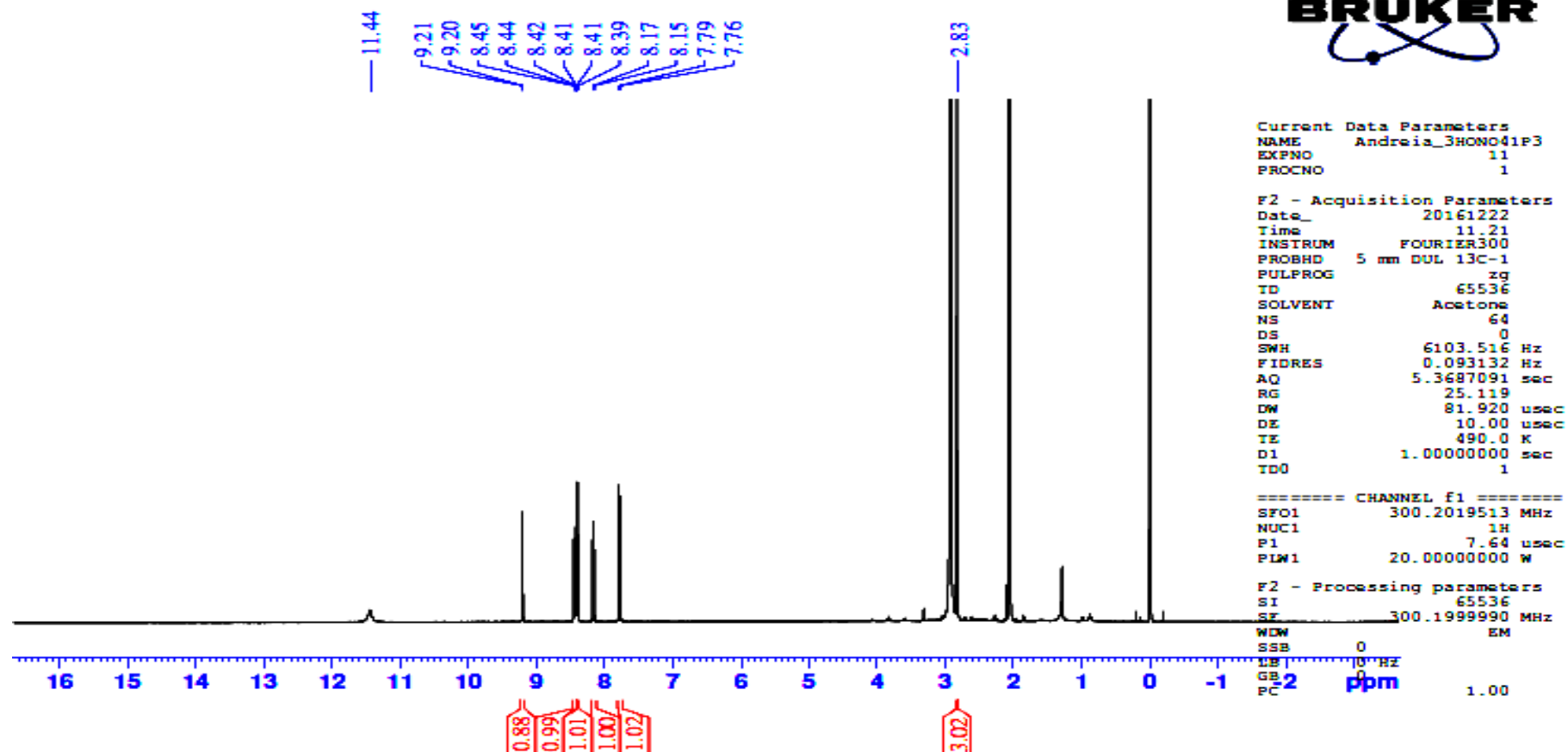
**Analysis Info** Acquisition Date 11/29/2016 12:55:24 PM  
**Analysis Name** D:\Data\Usuarios\2016\Adriano\Adriano\LC-MS\ODS\_ESI+\_3HONO41\_P1\_0.5uL\_1-2\_01\_840.d  
**Method** Tune-Low\_ESI+\_Andriano\_noFocus\_50-900\_16min.m Operator BDAL@DE  
**Sample Name** ODS\_ESI+\_3HONO41\_P1\_0.5uL Instrument microTOF-Q 228888.10431  
**Comment**  
 ODS 50x2,0mm  
 Flow: 0.4 mL/min [Split de 0.05 mL (MS)/0.34 mL (desc)]; P: 2985psi; C=0.5mg/mL (ACN/MeOH\_1:1); Inj=0.5uL;  
 A(H2O+0.1%HOOCOH)/B(ACN+0.1%HOOCOH)  
 0-2m\_5%  
 2-11m\_5-100%  
 11-13m\_100%  
 13-14m\_100-5%  
 14-16m\_5%  
 Injetor: MeOH:ACN(1:1)  
 Calib.: HCOONa 10mM\_end

### Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	5.0 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	180 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	10.0 V/min
Scan End	900 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

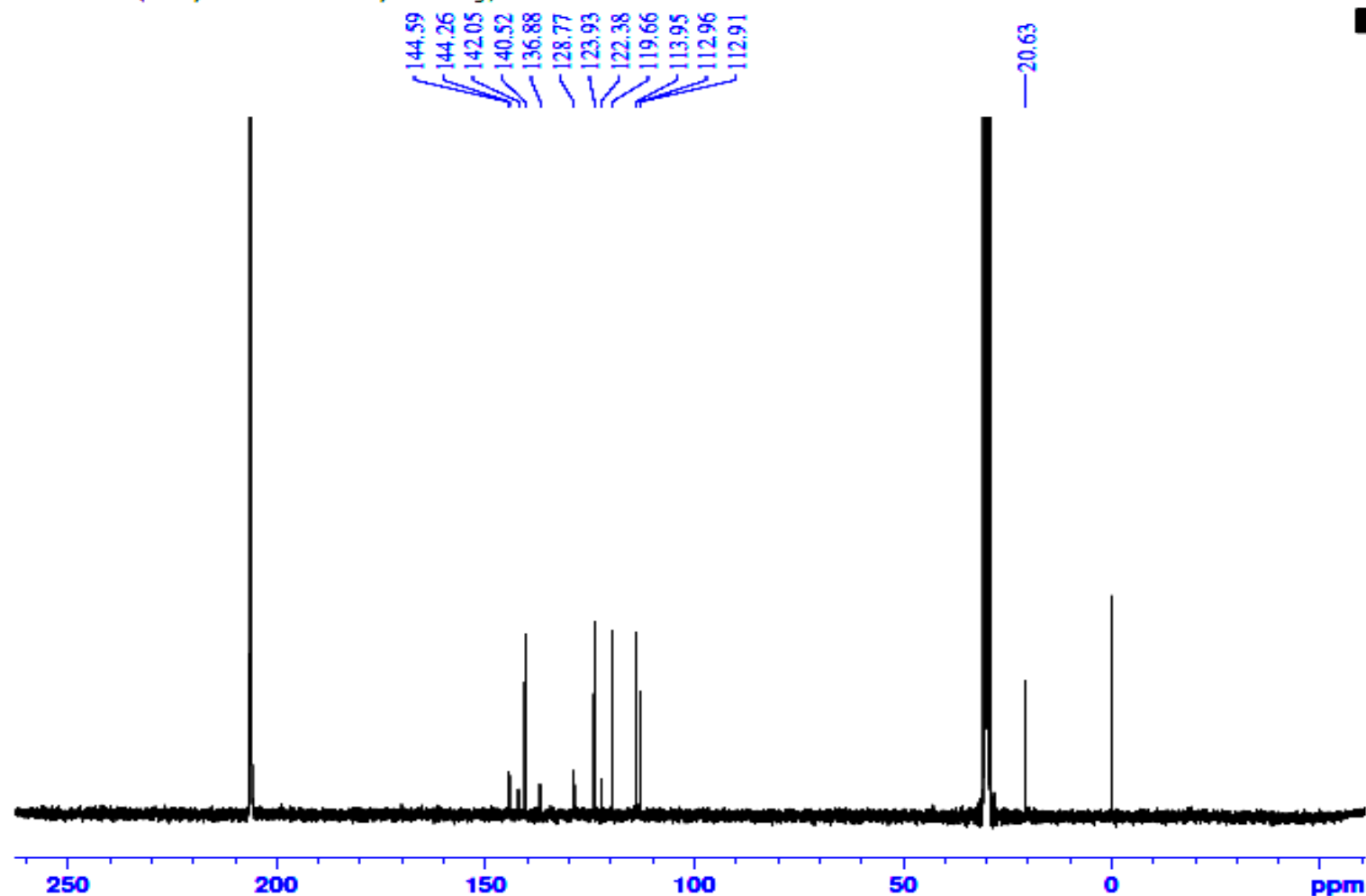


ANEXO 26. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do produto do produto 6-nitroharmano (25.3).



ANEXO 27. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 6-nitrohamano (25.3).

3HONO41P3 (13C; acetona-d6; 5.5mg)



Current Data Parameters  
NAME Andrea\_3HONO41P3  
EXPNO 2  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20161221  
Time 17.54  
INSTRUM FOUERIER300  
PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
PULPROG zgpg30  
TD 32768  
SOLVENT Acetone  
NS 51200  
DS 0  
SWH 24414.063 Hz  
FIDRES 0.745058 Hz  
AQ 0.6710886 sec  
RG 501.187  
DW 20.480 usec  
DE 10.00 usec  
TE 321.0 K  
D1 0.50000000 sec  
D11 0.03000000 sec  
D31 0.00000875 sec  
D40 0.01589210 sec  
L4 20  
L5 14  
P32 90.00 usec  
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----  
SFO1 75.4928982 MHz  
NUC1 13C  
P1 8.75 usec  
PLW1 50.00299835 W

----- CHANNEL f2 -----  
SFO2 300.2012008 MHz  
NUC2 1H  
CPDPRG2 waltz16  
PCPD2 90.00 usec  
PLW2 20.00000000 W  
PLW12 0.16806000 W  
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 75.4852822 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

ANEXO 28. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 6-nitro-harmano (9.3).

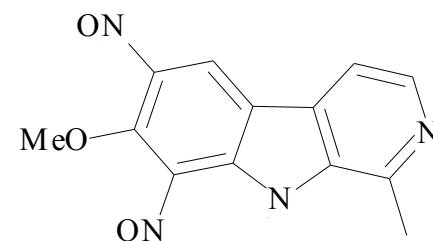
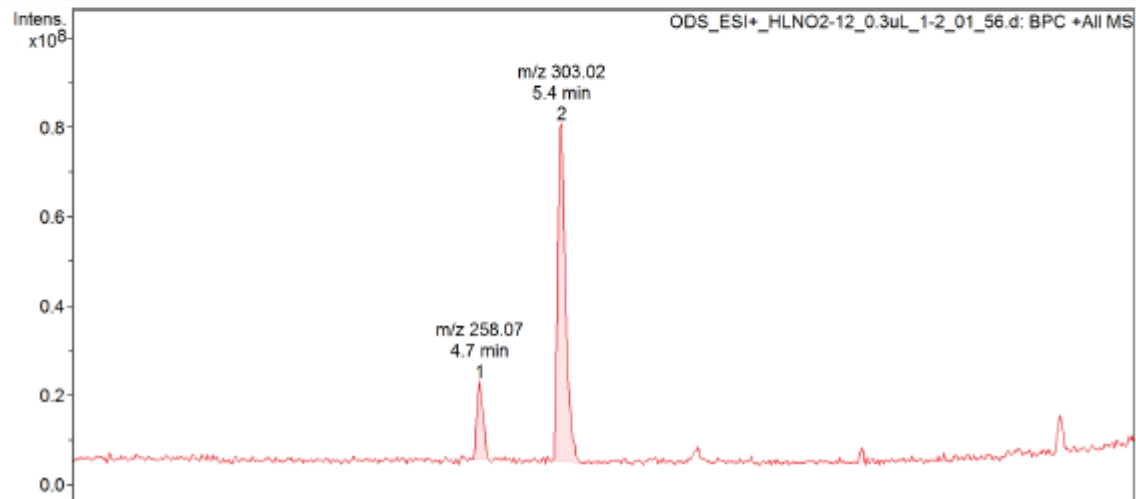
## Display Report

### Analysis Info

Acquisition Date 8/21/2015 11:58:15 AM  
 Analysis Name D:\Data\2015\Adrian\Andreia\Data\LC-MS\ODS\_ESI+\_HLNO2-12\_0.3uL\_1-2\_01\_56.d  
 Method 56.m Operator BDAL@DE  
 Sample Name ODS\_ESI+\_HLNO2-12\_0.3uL Instrument amaZon speed  
 Comment XR-ODS(2.0x50mm)  
 C=0.5mg/mL(MeOH/ACN\_1:2)  
 Flx=0.4mL/min;Inj=0.3uL;P=2790;split (0.33DSC/0.07MS)  
 A(H2O 0,1% AForm)/B(ACN 0,1% AForm)  
 0-2m:5%  
 2-11m:5-100%  
 11-12m:100%  
 12-13m:100-5%  
 13-15m:5%  
 Injtor:ACN  
 TARGET 300

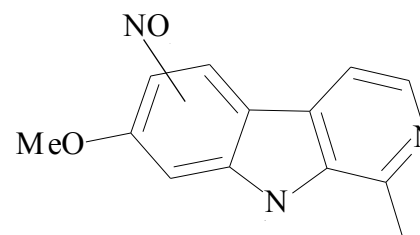
### Acquisition Parameter

Ion Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Alternating Ion Polarity	off
Mass Range Mode	Enhanced Resolution	Scan Begin	50 m/z	Scan End	900 m/z
Accumulation Time	1221 $\mu$ s	RF Level	55 %	Trap Drive	47.9
SPS Target Mass	300 m/z	Averages	5 Spectra	Auto MS/MS	off



(27.1)

MM = 302,24  
 [M+H] = 303



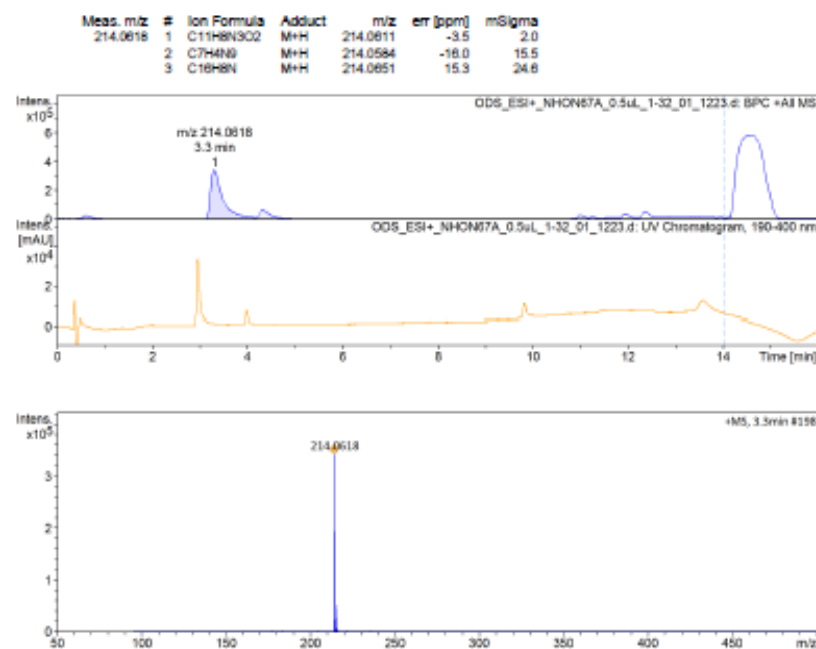
(27.2)

MM = 257,24  
 [M+H] = 258

ANEXO 29. Cromatogramas e espectros de massas de UFLC/HRMS-ESI dos produtos nitrados da harmalina.

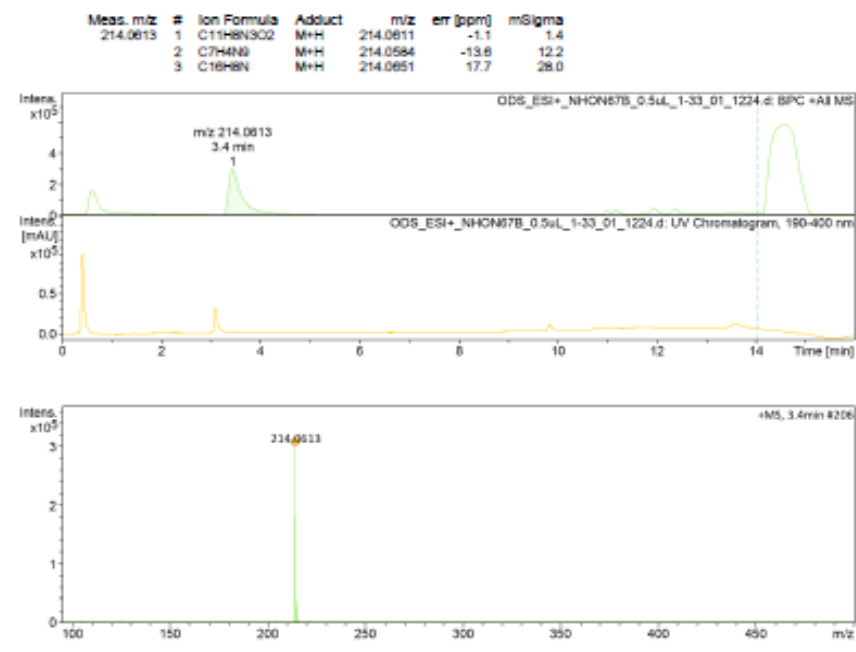
## Generic Display Report

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\Usuarios\2017\Adrián\Andrea M>Data\LC-MS\14-06-2017\ODS\_ESI+\_NHON67A\_0.5uL\_1-32\_01\_1223.d  
 Method Tune-Low\_ESI+\_Andrea\_noFocus\_100-900\_14-16min.m Operator BDAL@DE  
 Sample Name ODS\_ESI+\_NHON67A\_0.5uL Instrument microTOF-Q  
 Comment ODS 50x2.0  
 Flow:0.4 mL/min(Split de 0.06 mL/MS)/0.34mL(desc); P:2731psi(in)=1uL,T=30C  
 A:(H2O+0.1%HOOCOH)/B:(ACN+0.1%HOOCOH)  
 0-8m\_5%  
 8-10m\_5-50%  
 10-12m\_50-100%  
 12-14m\_100%  
 14-16m\_100-5%  
 Injetor:MeOH  
 Calib.:HCOONa 10mM\_end

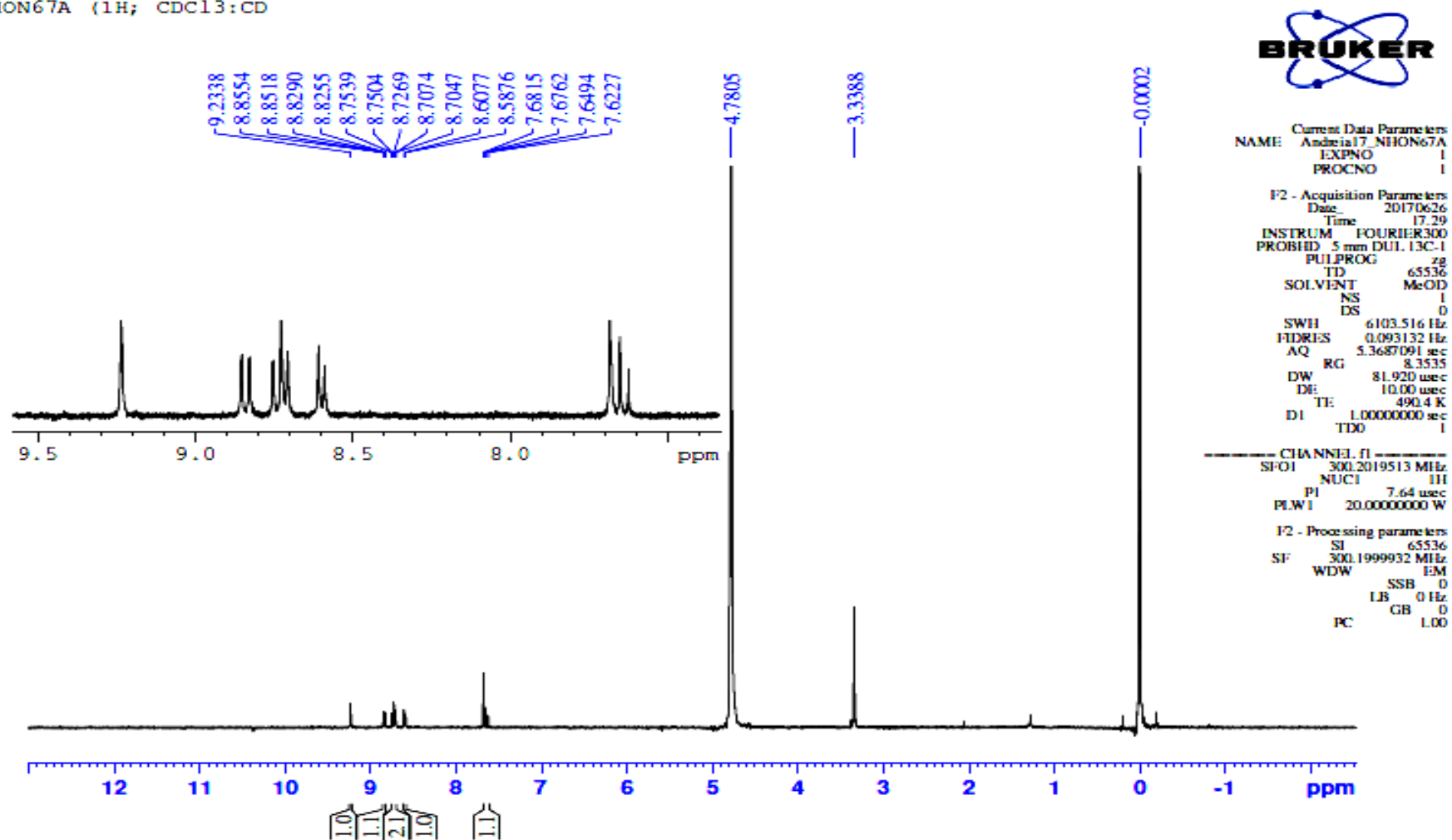


## Generic Display Report

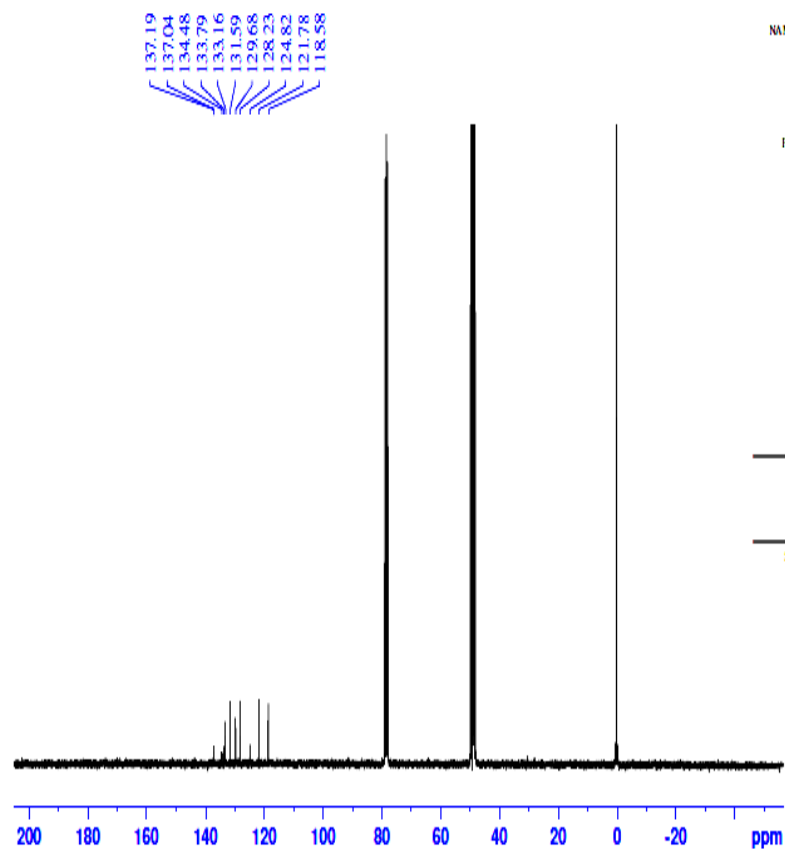
**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\Usuarios\2017\Adrián\Andrea M\Data\LC-MS\14-06-2017\ODS\_ESI+\_NHON67B\_0.5uL\_1-33\_01\_1224.d  
 Method Tune-Low\_ESI+\_Andrea\_noFocus\_100-900\_14-16min.m Operator BDAL@DE  
 Sample Name ODS\_ESI+\_NHON67B\_0.5uL Instrument microTOF-Q  
 Comment ODS 50x2.0  
 Flow:0.4 mL/min(Split de 0.06 mL/MS)/0.34mL(desc); P:2731psi(in)=1uL,T=30C  
 A:(H2O+0.1%HOOCOH)/B:(ACN+0.1%HOOCOH)  
 0-8m\_5%  
 8-10m\_5-50%  
 10-12m\_50-100%  
 12-14m\_100%  
 14-16m\_100-5%  
 Injetor:MeOH  
 Calib.:HCOONa 10mM\_end



ANEXO 30. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do produtos 8-nitronorharmano (23.1) e seu isômero (23.2).

NHON67A (1H; CDCl<sub>3</sub>:CDANEXO 31. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) em metanol-*d*<sub>4</sub>:clorofórmio-*d*<sub>1</sub> (1:1) do produto 8-nitronorharmano (23.1).

NHON67A (13C; CDCl3:CD3OD 1:



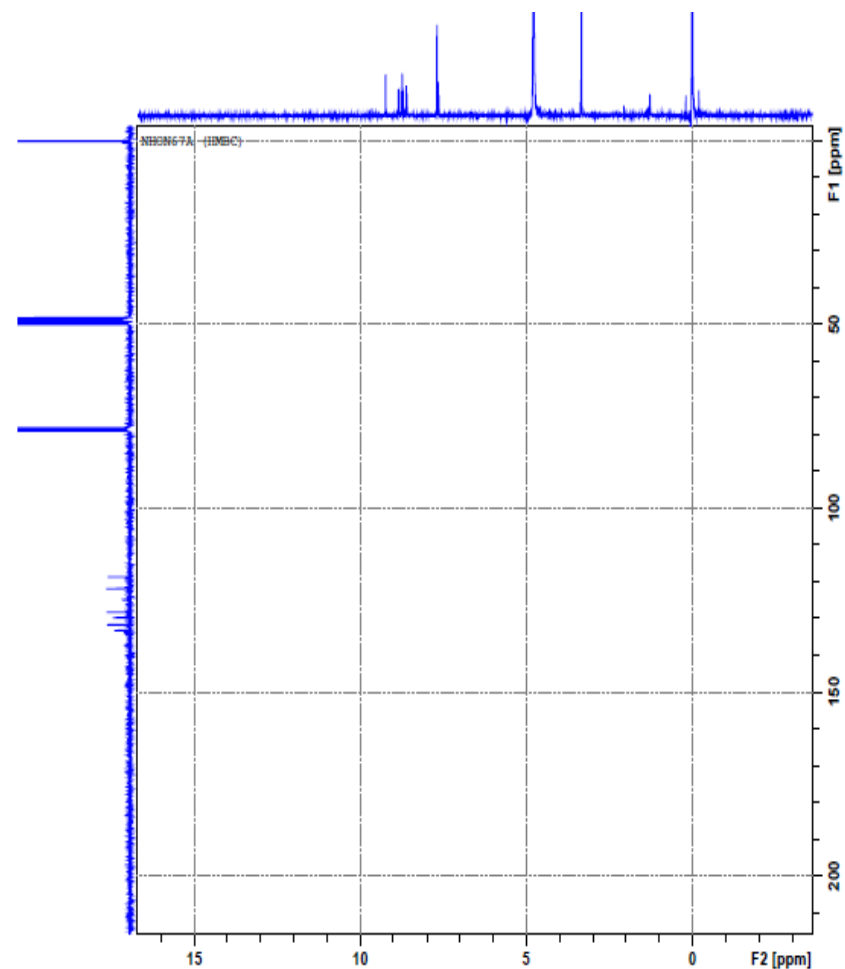
Current Data Parameters  
 NAME: Andra17\_NHON67A  
 EXPNO: 2  
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_: 20170626  
 Time: 17.41  
 INSTRUM: FOURIER300  
 PROBUID: 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG: zgpg30  
 TD: 32768  
 SOLVENT: MeOD  
 NS: 4883  
 DS: 0  
 SWH: 24414.063 Hz  
 FIDRES: 0.745058 Hz  
 AQ: 0.671086 sec  
 RG: 501.187  
 DW: 20.480 usec  
 DE: 10.00 usec  
 TE: 489.8 K  
 D1: 0.5000000 sec  
 D11: 0.0500000 sec  
 D31: 0.0000075 sec  
 D40: 0.01589210 sec  
 L4: 20  
 L5: 14  
 P32: 90.00 usec  
 TDO: 1

CHANNEL F1  
 SF01: 75.4928982 MHz  
 NUC1: 13C  
 P1: 8.75 usec  
 PLW1: 50.00299835 W

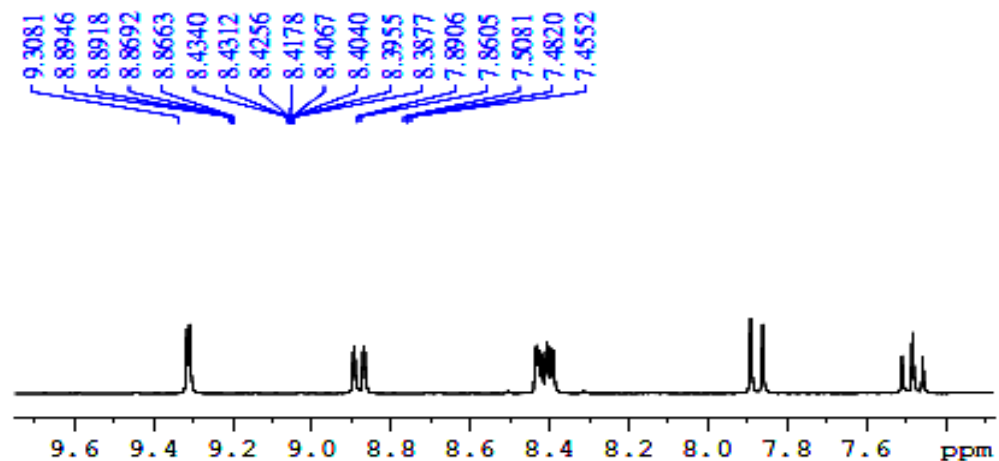
CHANNEL F2  
 SF02: 300.2012008 MHz  
 NUC2: 1H  
 CPDPRG2: waltz16  
 PCPD2: 90.00 usec  
 PLW2: 20.0000000 W  
 PLW12: 0.16806000 W  
 PLW13: 0.13613000 W

F2 - Processing parameters  
 SI: 32768  
 SF: 75.4852889 MHz  
 WDW: EM  
 SSB: 0  
 LB: 1.00 Hz  
 GB: 0  
 PC: L40



ANEXO 32. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em metanol- $d_4$ :clorofórmio- $d_1$  (1:1) do produto 8-nitronorharmano (23.1).

3CNO37B (1H SUP; DMSO)



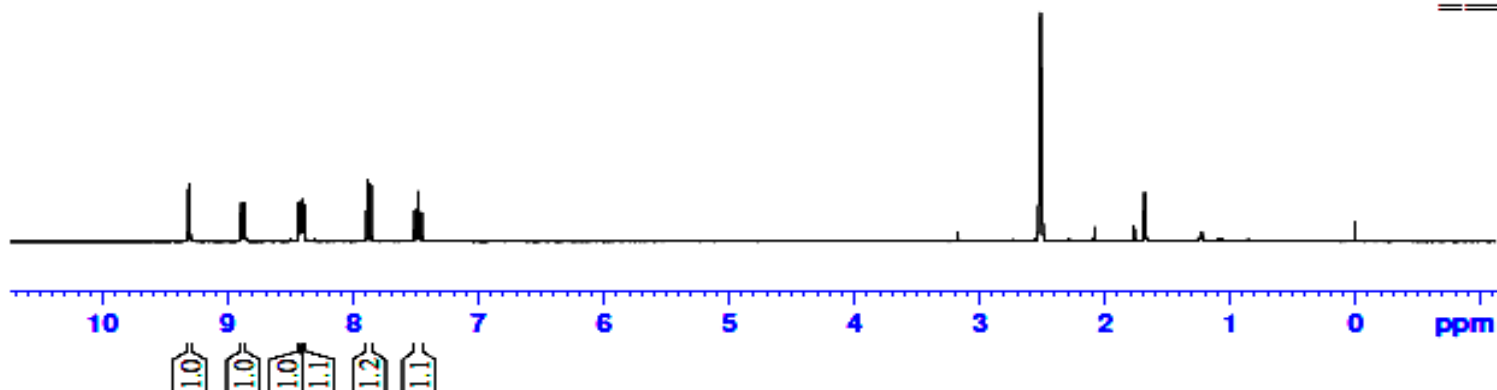
-0.0006

Current Data Parameters  
NAME Andreia17\_3CNO37B  
EXPNO 13  
PROCNO 1

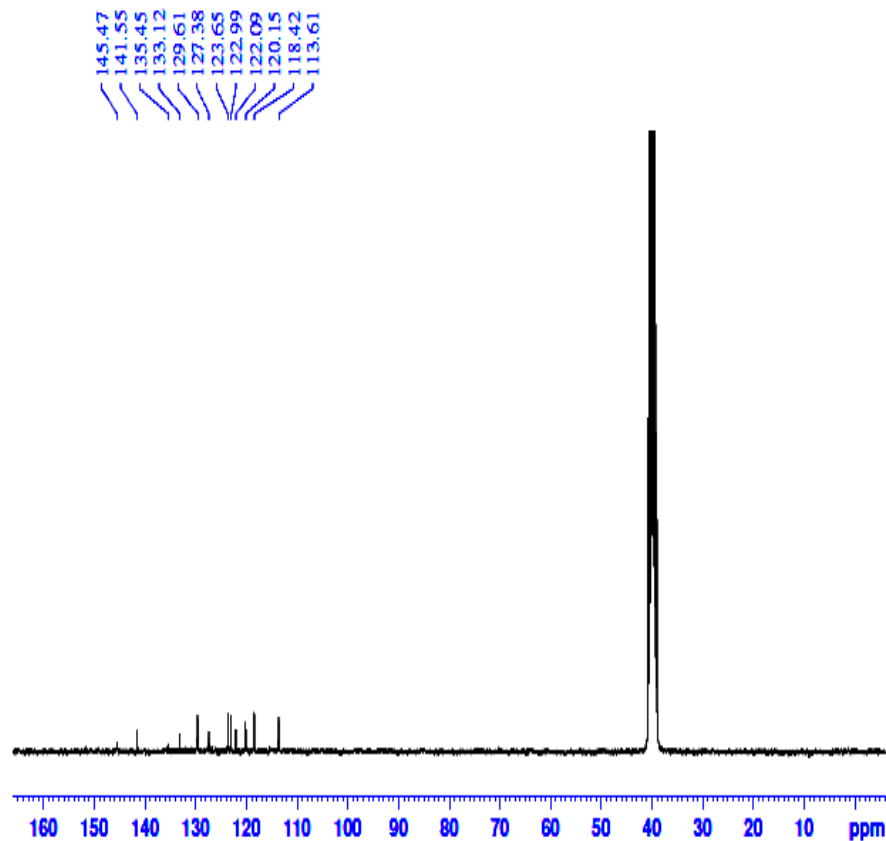
F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20170406  
Time 10.05  
INSTRUM FOURIER300  
PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
PULPROG zgpgpr  
TD 65536  
SOLVENT DMSO  
NS 64  
DS 4  
SWH 6103.516 Hz  
FIDRES 0.093132 Hz  
AQ 5.3687091 sec  
RG 127.287  
DW 81.920 usec  
DE 10.00 usec  
TE 1014.2 K  
D1 2.00000000 sec  
D12 0.00002000 sec  
P41 2000000.00 usec  
TDO 1

==== CHANNEL f1 ====  
SFO1 300.2010278 MHz  
NUC1 1H  
P1 7.88 usec  
PLW1 20.00000000 W  
PLW9 0.00001000 W

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 300.1999929 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00

ANEXO 33. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{DMSO-}d_6$  do produto 1,6- dinitrocarbazol (29.2).



3CNO37B (13C; DMSO-d<sub>6</sub>; 2,8 mg)

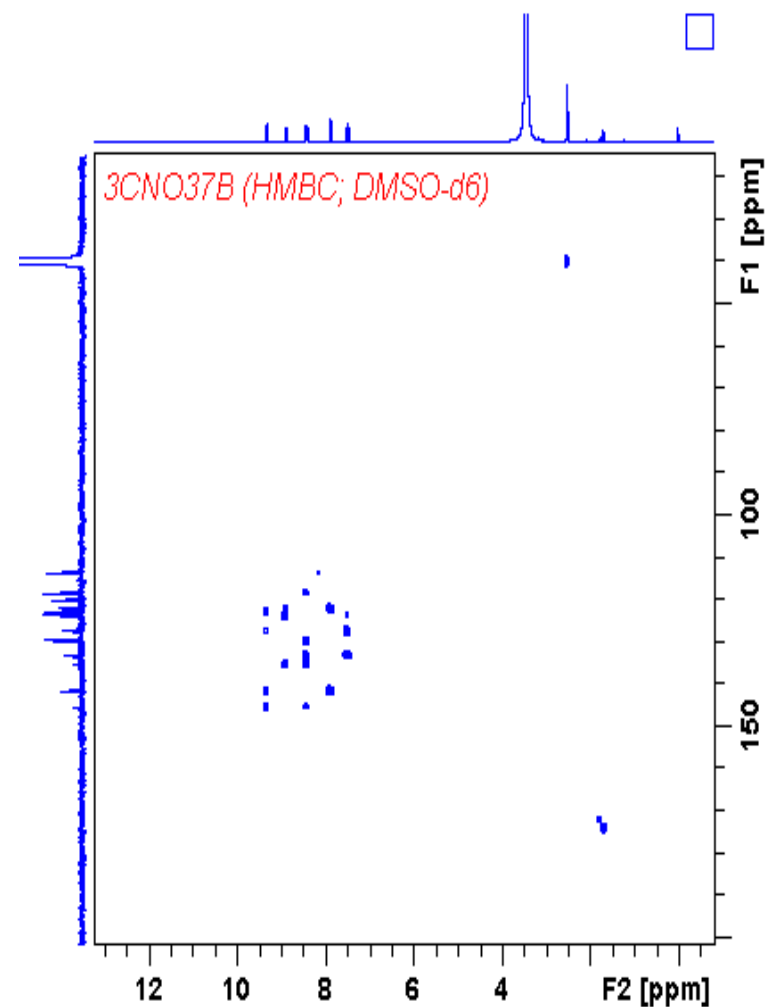
Current Data Parameters  
NAME: Andrela17\_3CNO37B  
EXPNO: 2  
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_: 20170403  
Time: 15.45  
INSTRUM: FOURIER300  
PROBHD: 5 mm DUL 13C-1  
PULPROG: zgpg30  
TD: 32768  
SOLVENT: DMSO  
NS: 38912  
DS: 0  
SWH: 24414.063 Hz  
FIDRES: 0.745038 Hz  
AQ: 0.6710886 sec  
RG: 501.187  
DW: 20.480 usec  
DE: 10.00 usec  
TE: 1014.8 K  
D1: 0.50000000 sec  
D11: 0.03000000 sec  
D31: 0.0000075 sec  
D40: 0.01589210 sec  
LA: 20  
LS: 14  
P32: 90.00 usec  
TDO: 1

CHANNEL f1  
SFO1: 75.4928982 MHz  
NUC1: 13C  
P1: 8.75 usec  
PLW1: 50.00299835 W

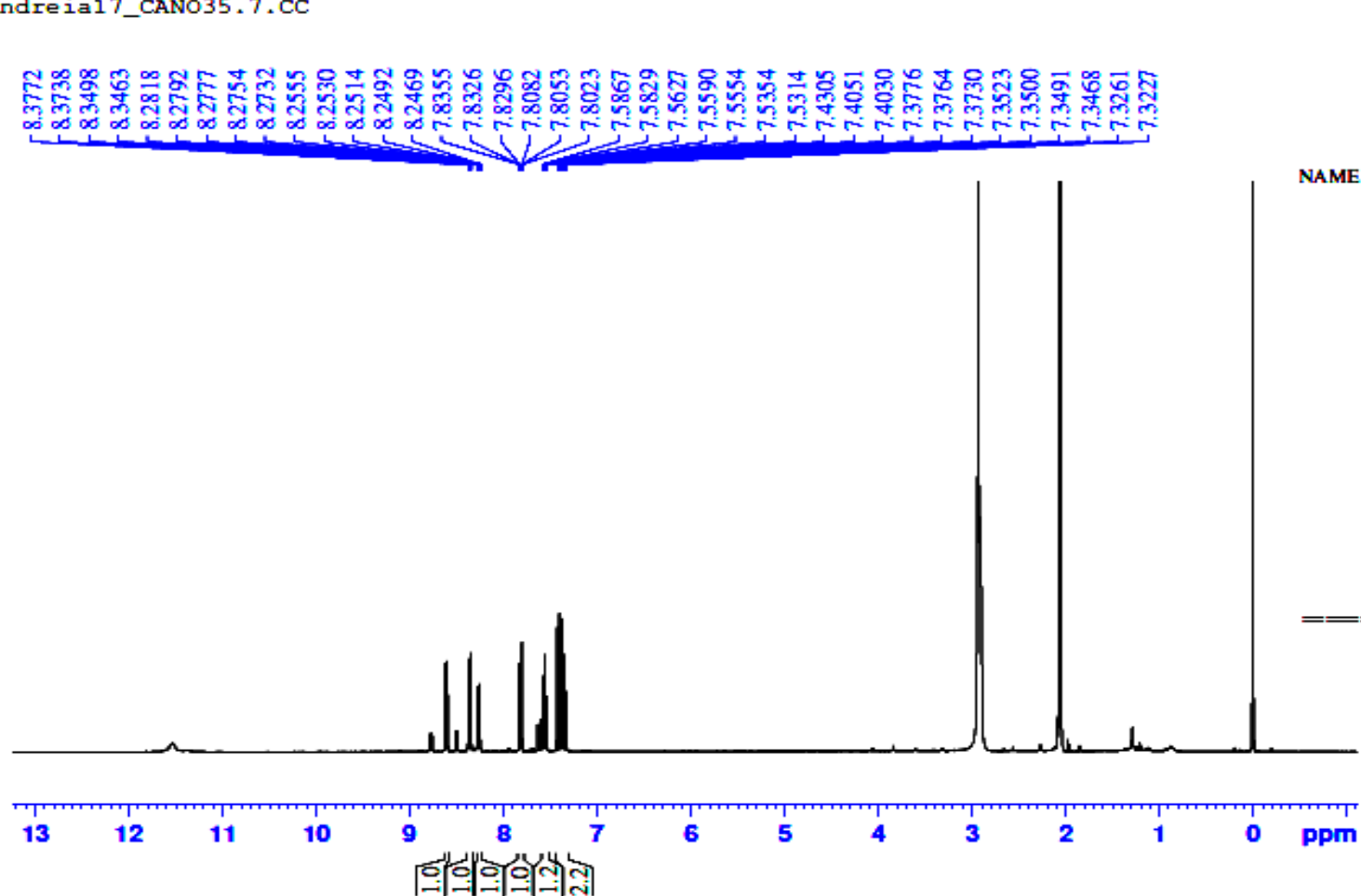
CHANNEL f2  
SFO2: 300.2012008 MHz  
NUC2: 1H  
CPCPRG2: waltz16  
PCPD2: 90.00 usec  
PLW2: 20.00000000 W  
PLW12: 0.16800000 W  
PLW13: 0.13613001 W

F2 - Processing parameters  
SI: 32768  
SF: 75.4853500 MHz  
WDW: EM  
SSB: 0  
LB: 3.00 Hz  
GB: 0  
PC: 1.40



ANEXO 34. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz) e HMBC em DMSO-d<sub>6</sub> do produto 1,6- dinitrocarbazol (29.2).

Andreia17\_CANO35.7.CC



Current Data Parameters  
 NAME Andreia17\_CANO35.7.CC1  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

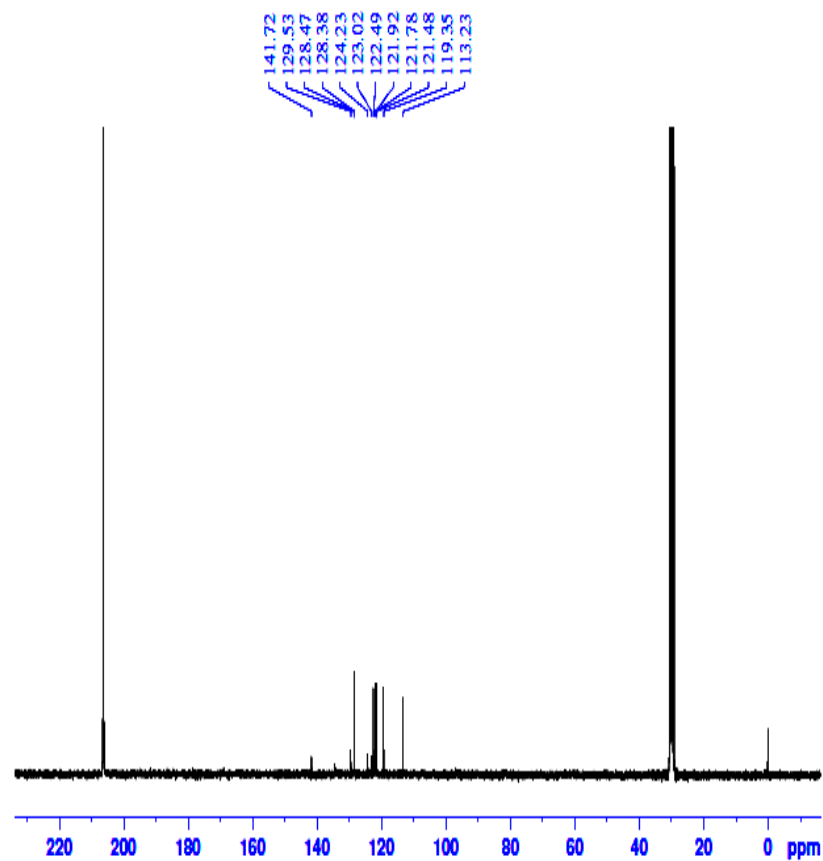
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20170904  
 Time 17.35  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zg  
 TD 65536  
 SOLVENT Acetone  
 NS 64  
 DS 2  
 SWH 6103.516 Hz  
 FIDRES 0.093132 Hz  
 AQ 5.3687091 sec  
 RG 23.4952  
 DW 81.920 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 292.3 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TD0 1

==== CHANNEL f1 =====  
 SFO1 300.2019513 MHz  
 NUC1 1H  
 P1 7.64 usec  
 PLW1 20.00000000 W

F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 300.1999989 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

ANEXO 35. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 1-nitrocarbazol (29.3).

Andreia17\_CAN035.7.CC1 (13C; ac



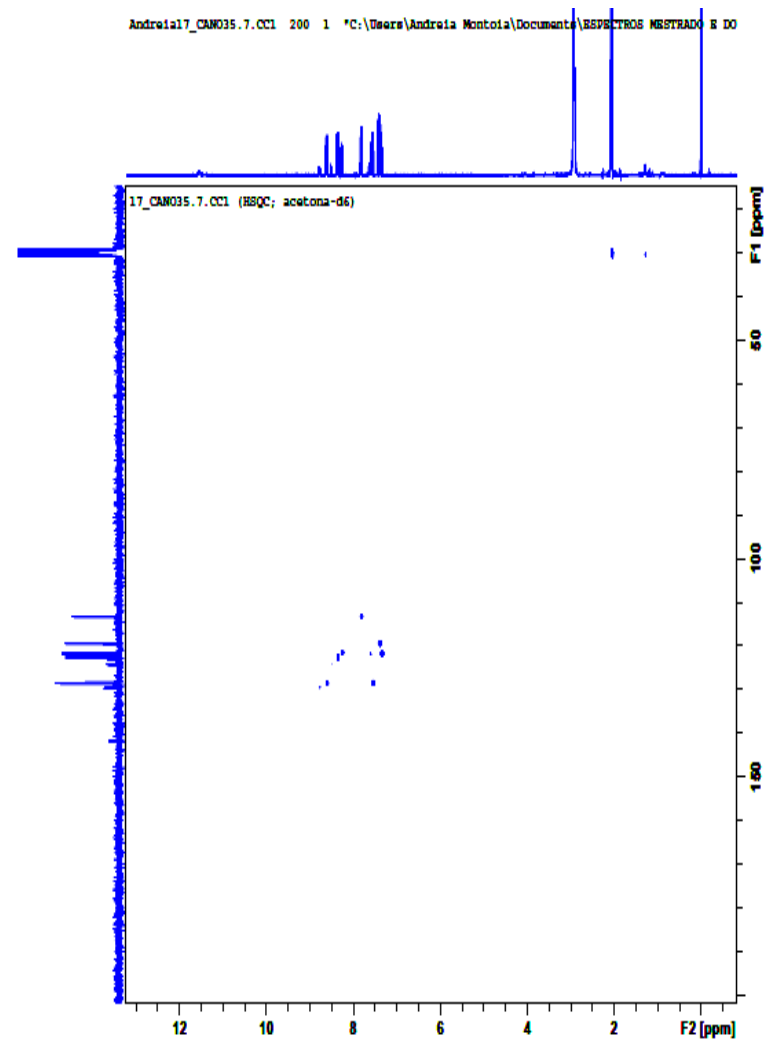
Current Data Parameters  
NAME: Andreia17\_CAN035.7.CC1  
EXPNO: 2  
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_: 20170905  
Time: 15.37  
INSTRUM: FOURIER300  
PROBHD: 5 mm DUL 13C-1  
PULPROG: zgpg30  
TD: 32768  
SOLVENT: Acetone  
NS: 5812  
DS: 0  
SWH: 24414.063 Hz  
FIDRES: 0.745258 Hz  
AQ: 0.6710886 sec  
RG: 501.187  
DW: 20.480 usec  
DE: 10.00 usec  
TE: 296.0 K  
D1: 0.5000000 sec  
D11: 0.0300000 sec  
D31: 0.0000085 sec  
D40: 0.01589210 sec  
L4: 20  
L5: 14  
P32: 90.00 usec  
TDD: 1

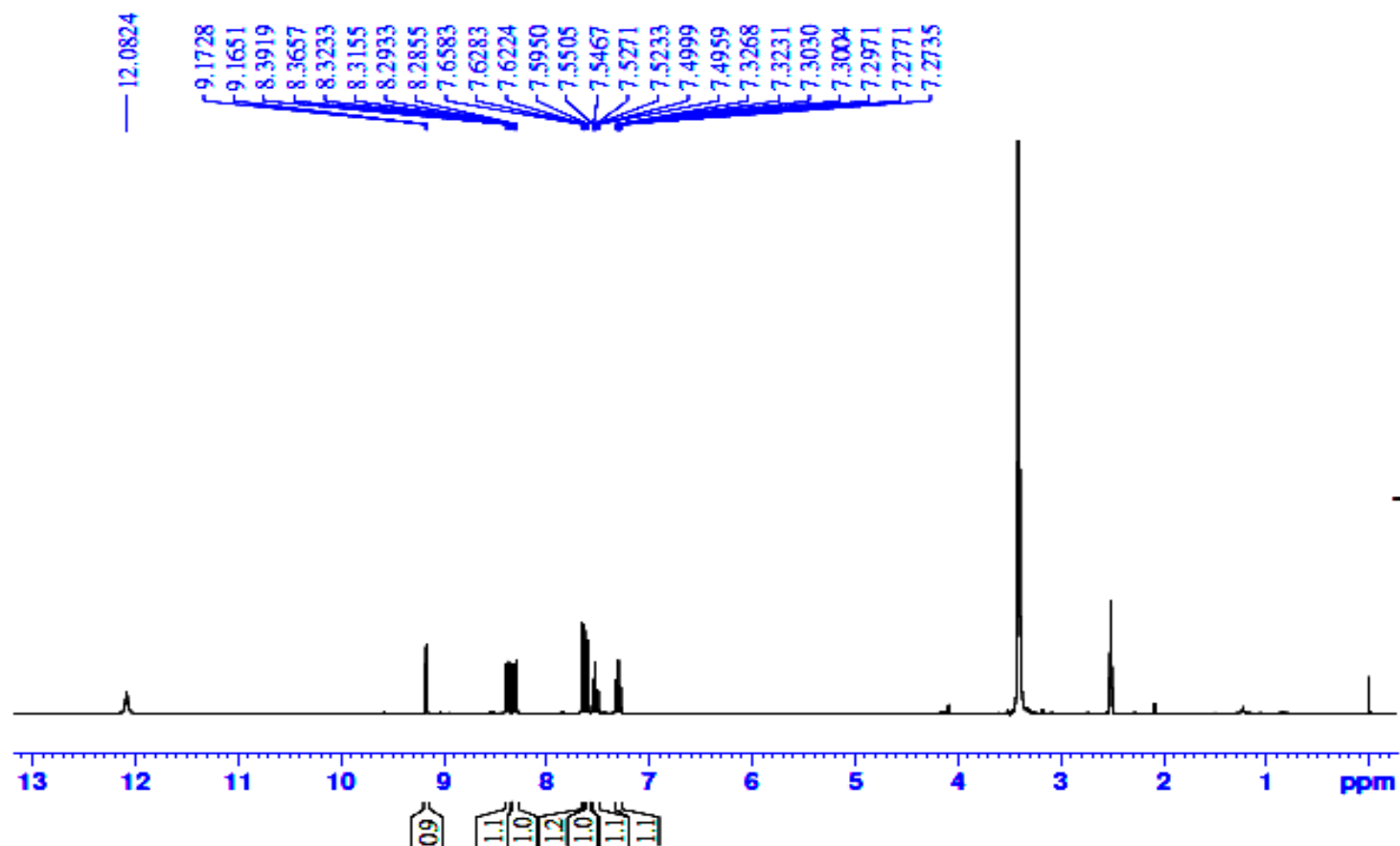
--- CHANNEL f1 ---  
SFO1: 75.4928912 MHz  
NUC1: 13C  
P1: 0.75 usec  
PLW1: 50.00299435 W

--- CHANNEL f2 ---  
SFO2: 300.2012008 MHz  
NUC2: 1H  
CPCPRG2: waltz16  
PCPD2: 90.00 usec  
PLW2: 20.0000000 W  
PLW12: 0.16806000 W  
PLW13: 0.13613001 W

F2 - Processing parameters  
SI: 32768  
SF: 75.4852816 MHz  
WDW: EM  
SSB: 0  
LB: 1.00 Hz  
GB: 0  
PC: 1.40

ANEXO 36. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) e HSQC em acetona- $d_6$  do produto 1-nitrocarbazol (29.3).

Andreia17\_CNO150.3 (1)



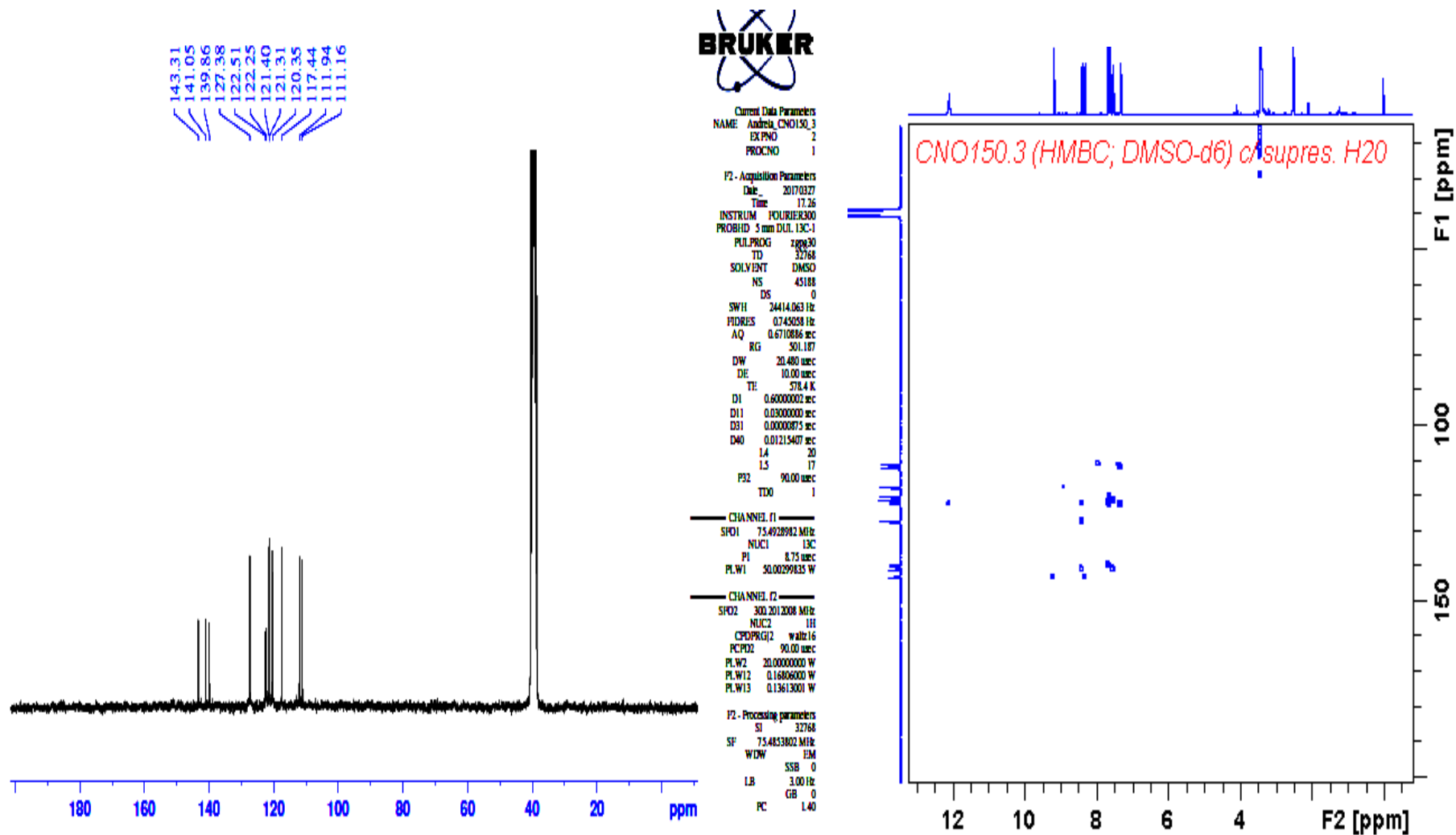
Current Data Parameters  
 NAME: Andreia\_CNO150\_3  
 EXPNO: 1  
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_: 20150603  
 Time: 15.36  
 INSTRUM: FOURIER300  
 PROBHD: 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG: zg  
 TD: 65536  
 SOLVENT: Acetone  
 NS: 32  
 DS: 0  
 SWH: 6103.516 Hz  
 FIDRES: 0.093132 Hz  
 AQ: 5.3687091 sec  
 RG: 31.623  
 DW: 81.920 usec  
 DE: 10.00 usec  
 TE: 294.4 K  
 D1: 1.00000000 sec  
 TDD: 1

CHANNEL f1  
 SFO1: 300.2019513 MHz  
 NUC1: 1H  
 P1: 7.75 usec  
 PLW1: 20.00000000 W

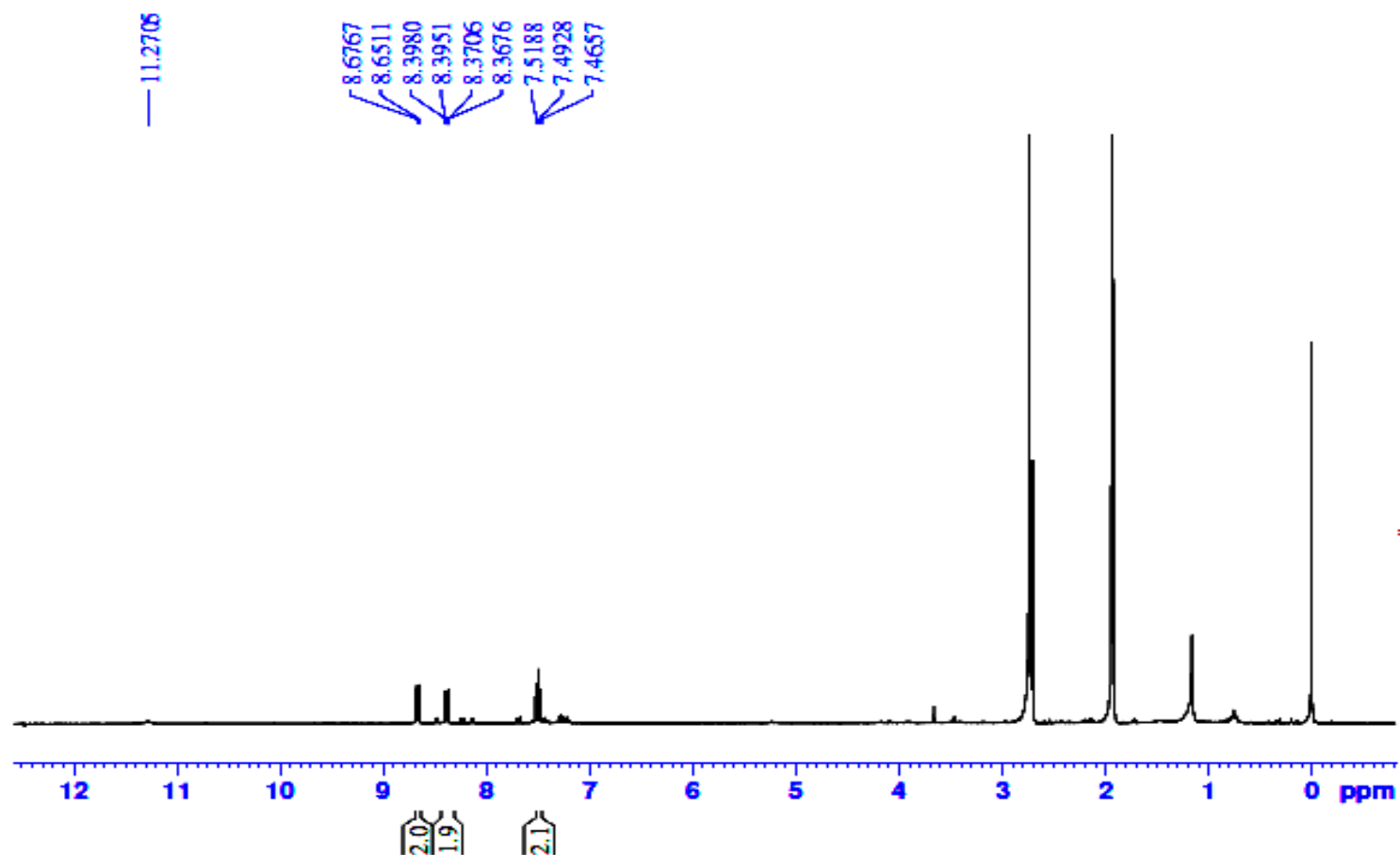
F2 - Processing parameters  
 SI: 65536  
 SF: 300.1999936 MHz  
 WDW: EM  
 SSB: 0  
 LB: 0 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.00

ANEXO 37. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 3-nitrocarbazol (29.4).



ANEXO 38. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) e HMBC em  $\text{DMSO-}d_6$  do produto 3-nitrocarbazol (29.4).

Andreia\_CNO150\_1 Acet



Current Data Parameters  
 NAME Andreia\_CNO150\_1  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20150603  
 Time 15.48  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zg  
 TD 65536  
 SOLVENT Acetone  
 NS 32  
 DS 0  
 SWH 6103.516 Hz  
 FIDRES 0.093132 Hz  
 AQ 5.3687091 sec  
 RG 31.623  
 DW 81.920 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 294.7 K  
 D1 1.00000000 sec  
 TD0 1

CHANNEL f1  
 SFO1 300.2019513 MHz  
 NUC1 1H  
 P1 7.75 usec  
 PLW1 20.00000000 W  
 F2 - Processing parameters  
 SI 65536  
 SF 300.2000395 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 0 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

ANEXO 39. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 1,8-dinitrocarbazol (29.5).

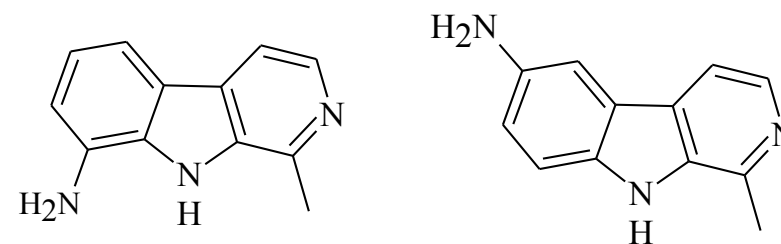
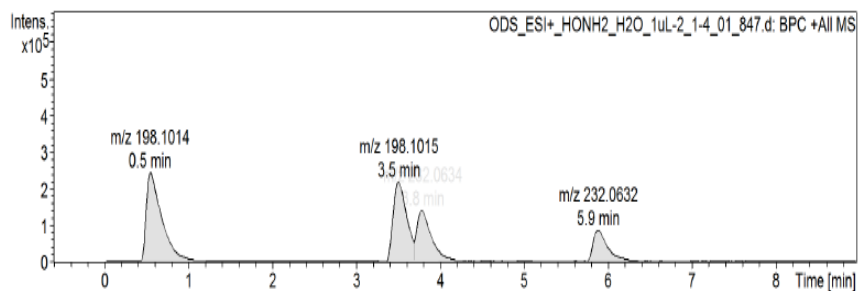
## Generic Display Report (all)

### Analysis Info

Acquisition Date 11/29/2016 3:49:43 PM  
 Analysis Name D:\Data\Usuarios\2016\Adrian\Andreia\Data\LC-MS\ODS\_ESI+\_HONH2\_H2O\_1uL-2\_1-4\_01\_847.d  
 Method Tune-Low\_ESI+\_Andreia\_noFocus\_50-900\_13-15min.m Operator BDAL@DE  
 Sample Name ODS\_ESI+\_HONH2\_H2O\_1uL-2 Instrument microTOF-Q 228888.10431  
 Comment ODS 50x2,0  
 Flx=0,4 mL/min[Split de 0,06 mL(MS)/0,34mL(desc)]; P2974;psi;C=0,5mg/mL (ACN/MeOH\_1:1);Inj=1uL;  
 A(H2O+0,1%HCOOH)B(ACN+0,1%HCOOH)  
 0-10m\_35%  
 10-11m\_35-100%  
 11-12m\_100%  
 12-13m\_100-5%  
 13-15m\_5%  
 injetor: MeOH:ACN(1:1)  
 Calib.:HCOONa 10mM\_end

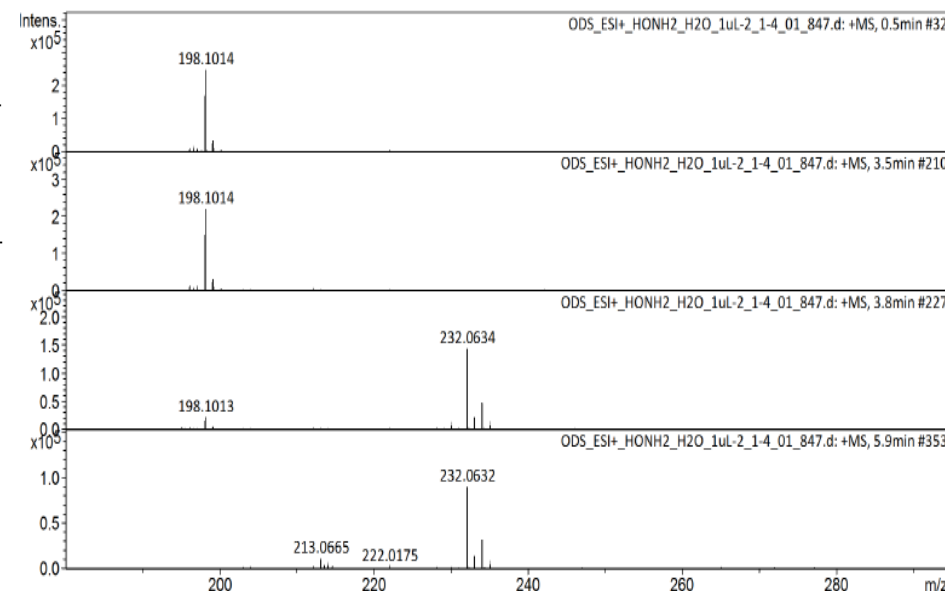
### Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	5.0 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	180 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	10.0 l/min
Scan End	900 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



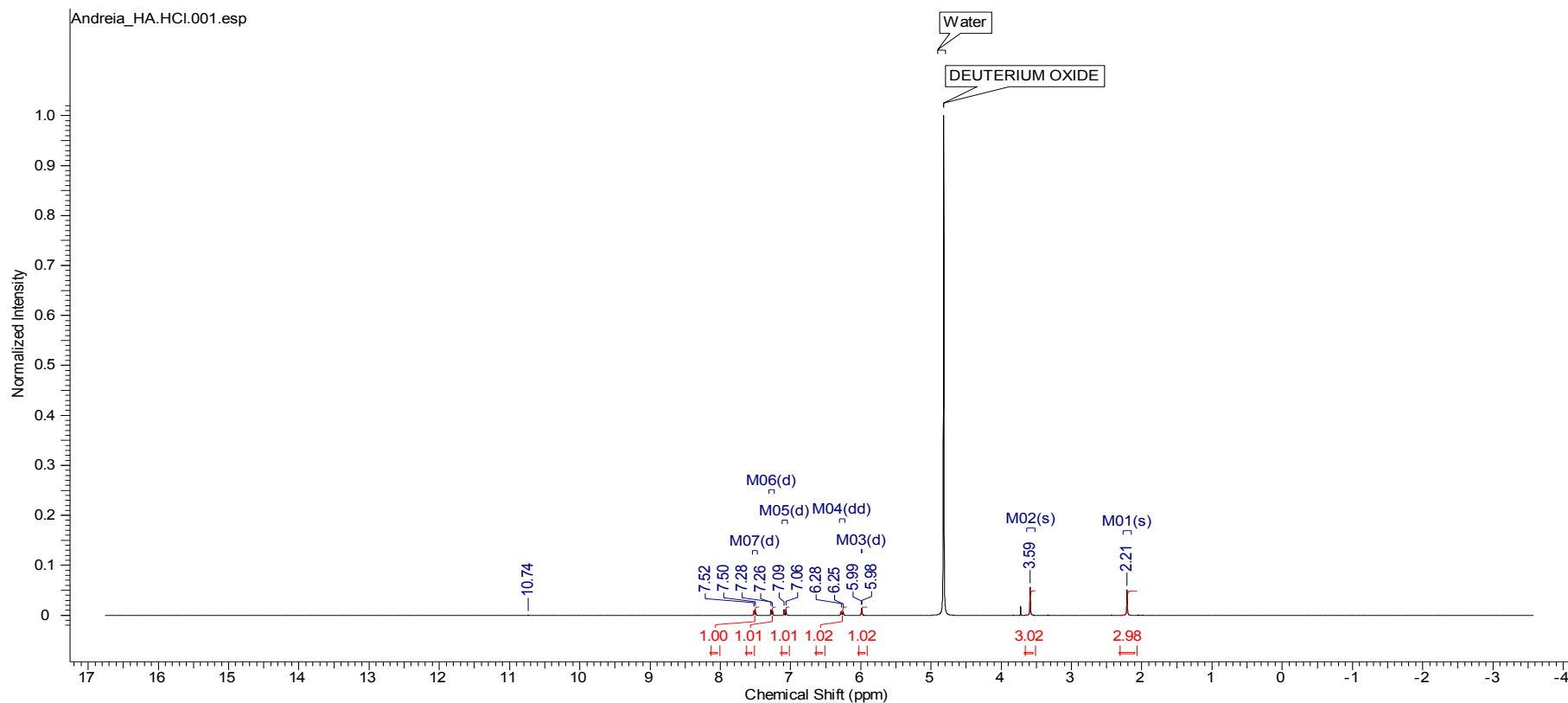
F.M: C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>

M.M: 197,2358



**ANEXO 40. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI da mistura reacional da reação de redução dos nitroarmanos.**

<b>Acquisition Time (sec)</b>	5.3687	<b>Comment</b>	HA.HCl (11.4 mg, D <sub>2</sub> O, 1H) Em 30/12/2015 Op. Zelina		<b>Date</b>	30 Dec 2015 11:55:44	
<b>Date Stamp</b>	30 Dec 2015 11:55:44						
<b>File Name</b>	C:\Users\Andreia Montoia\Documents\ESPECTROS MESTRADO E DOCTORADO\RMN LC MS\HA\Andreia_HA.HCl\1\fid						
<b>Frequency (MHz)</b>	300.20	<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	64	<b>Origin</b>	FOURIER300
<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Owner</b>	admin	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg
<b>Receiver Gain</b>	10.00	<b>SW(cyclical) (Hz)</b>	6103.52	<b>Solvent</b>	DEUTERIUM OXIDE		
<b>Spectrum Offset (Hz)</b>	1978.4700	<b>Spectrum Type</b>	STANDARD	<b>Sweep Width (Hz)</b>	6103.33	<b>Temperature (degree C)</b>	21.100



<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DEUTERIUM OXIDE) δ ppm 2.21 (s, 3 H) 3.59 (s, 3 H) 5.99 (d,  $J=1.49$  Hz, 1 H) 6.27 (dd,  $J=8.75, 1.68$  Hz, 1 H) 7.08 (d,  $J=8.75$  Hz, 1 H) 7.27 (d,  $J=6.15$  Hz, 1 H) 7.51 (d,  $J=6.15$  Hz, 1 H)

#### ANEXO 41. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz) da harmina.HCl em água- d<sub>2</sub>.

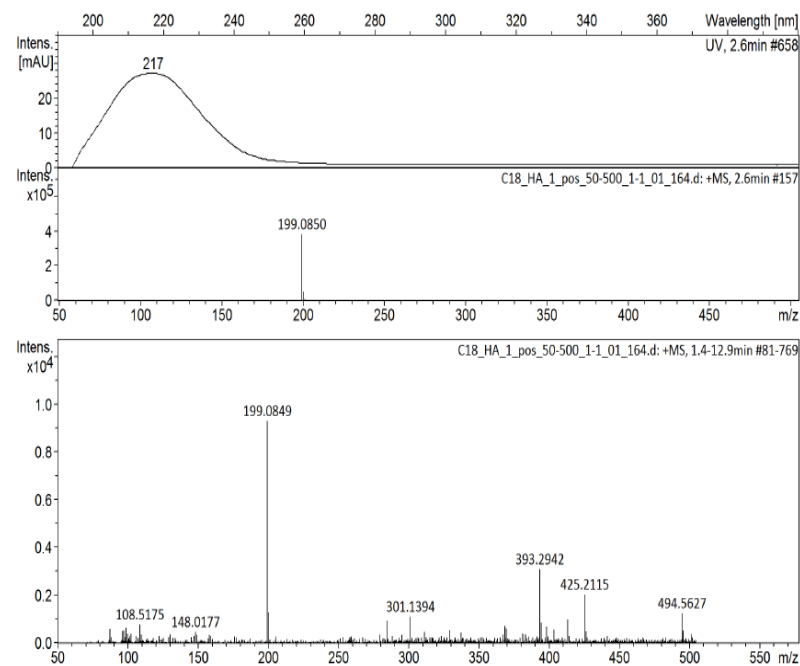
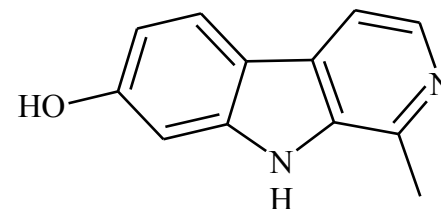
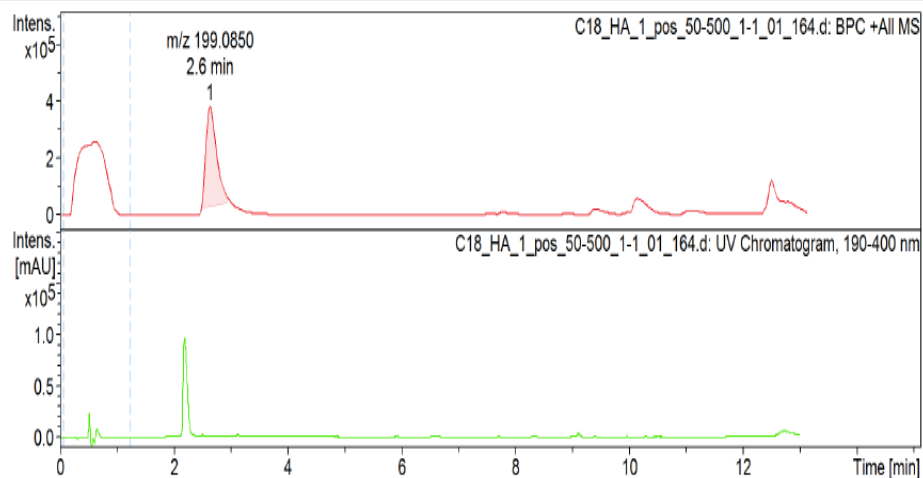


## Display Report

**Analysis Info**  
 Acquisition Date 08/01/2014 15:53:30  
 Analysis Name C:\Users\adrian\Documents\Andreia\Andreia\MS\MicroTOF\C18\_HA\_1\_pos\_50-500\_1-1\_01\_164.d  
 Method carbolínicos\_pos\_50-500.m Operator BDAL@DE  
 Sample Name C18\_HA\_1\_pos\_50-500 Instrument micrOTOF-Q II 228888.10431  
 Comment Concentração = 0,3 mg/mL; Solubilidade = metanol; Pressão = 3780 psi; Fluxo: 0,4 uL/min.  
 Fase móvel: B = ACN(ác. form. 0.1%); A = H2O(ác. form. 0.1%)  
 Conc de B%:  
 0-10: GRAD 10 - 100%  
 10-11: ISO 100%  
 11-12: GRAD 100 - 10%

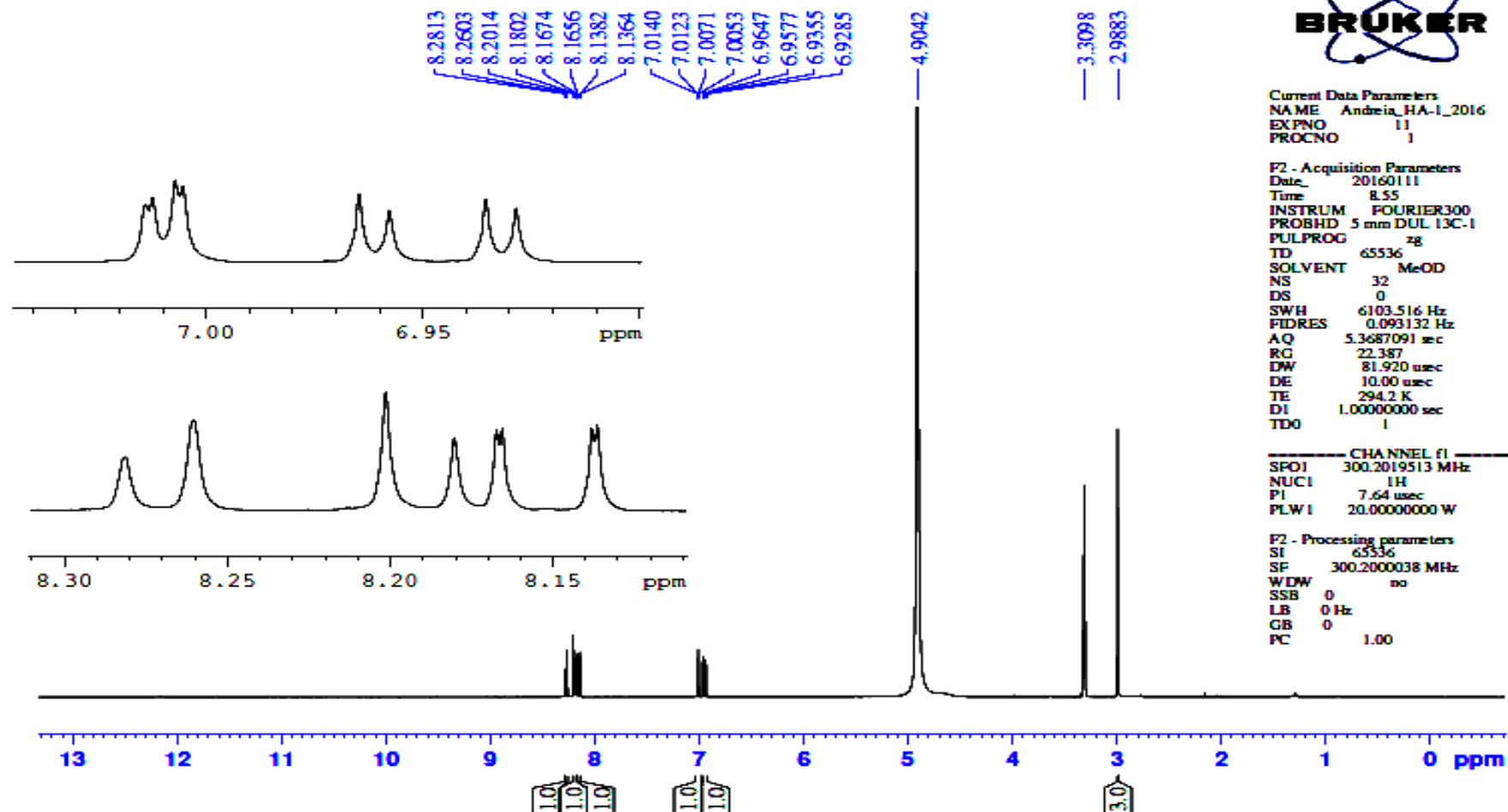
### Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	2.0 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	7.0 l/min
Scan End	1200 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



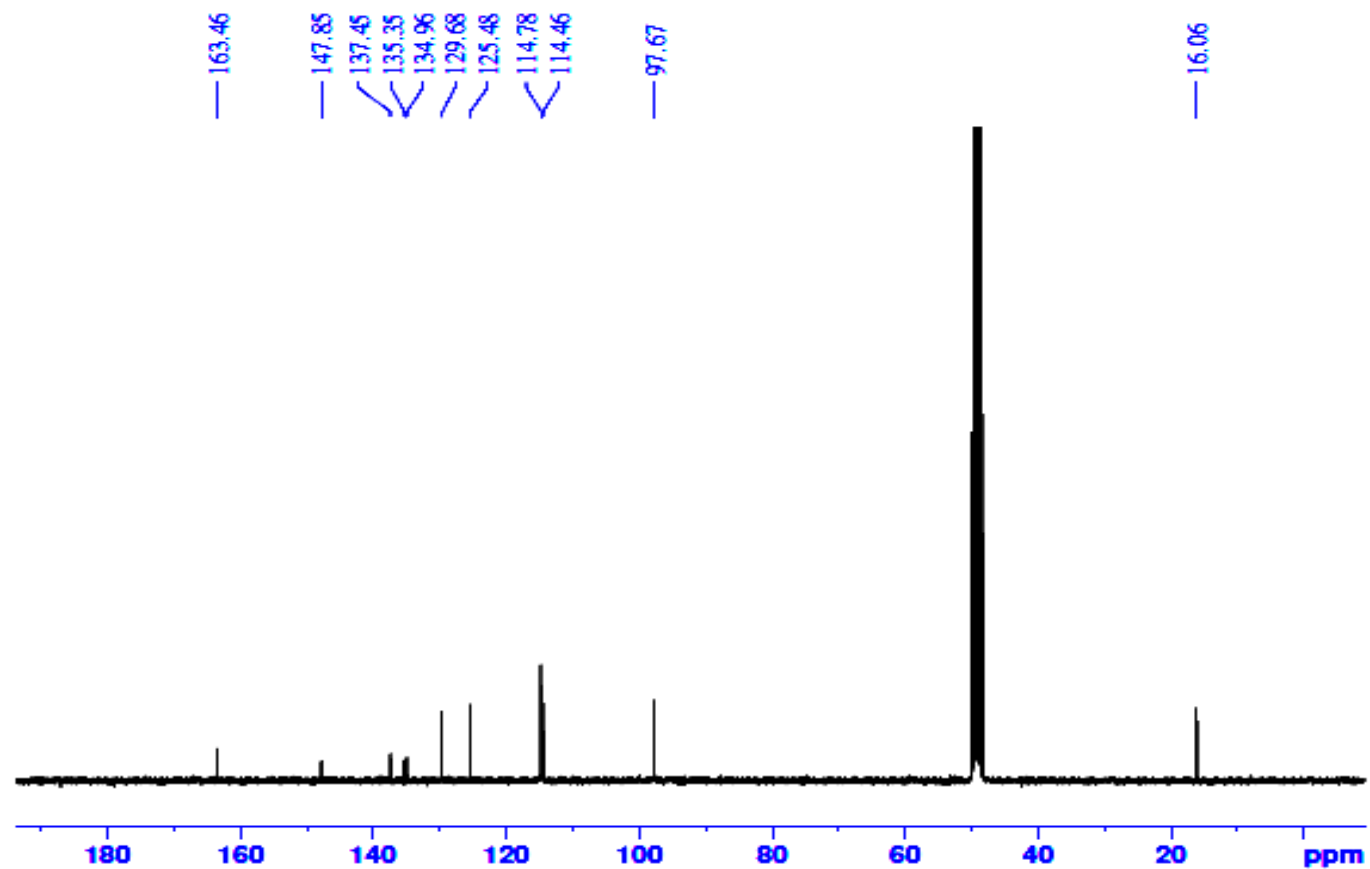
**ANEXO 42. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do harmol (26).**

Andreia\_HA-1\_2016 (CD3OD)



ANEXO 43. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em metanol- $d_4$  do produto harmol (26).

HA-1 (10 mg, CD3OD)



Current Data Parameters  
 NAME Andrea\_HA-1  
 EXPNO 2  
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20131218  
 Time 11.22  
 INSTRUM FOURIER300  
 PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG zgpg30  
 TD 65536  
 SOLVENT MeOD  
 NS 6422  
 DS 4  
 SWH 24414.063 Hz  
 FIDRES 0.372529 Hz  
 AQ 1.3421773 sec  
 RG 501.187  
 DW 20.480 usec  
 DE 10.00 usec  
 TE 965.1 K  
 D1 2.00000000 sec  
 D11 0.03000000 sec  
 D31 0.00000875 sec  
 D40 0.02898005 sec  
 LA 40  
 LS 57  
 P32 90.00 usec  
 TDO 1

----- CHANNEL F1 -----  
 SFO1 75.4878687 MHz  
 NUC1 13C  
 P1 8.75 usec  
 PLW1 50.00299835 W

----- CHANNEL F2 -----  
 SFO2 300.1812007 MHz  
 NUC2 1H  
 CPDPRG2 waltz16  
 PCPD2 90.00 usec  
 PLW2 20.00000000 W  
 PLW12 0.16806000 W  
 PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 75.4802039 MHz  
 WDW EM  
 SSB 0  
 LB 1.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.40

ANEXO 44. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em metanol- $d_4$  do produto harmol (26).

## Generic Display Report

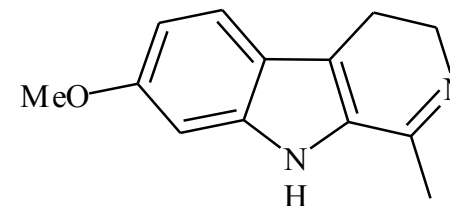
**Analysis Info** Acquisition Date 2/6/2017 3:02:36 PM

Analysis Name D:\Data\Usuarios\2017\Adrian\Andrea M\Data\LC-MS\06-02-2017\OD\_ESI+\_3HL1-52\_0.2uL\_1-5\_01\_937.d

Method Tune-Low\_ESI+\_Juliana\_noFocus\_100-900\_17-18min.m Operator BDAL@DE

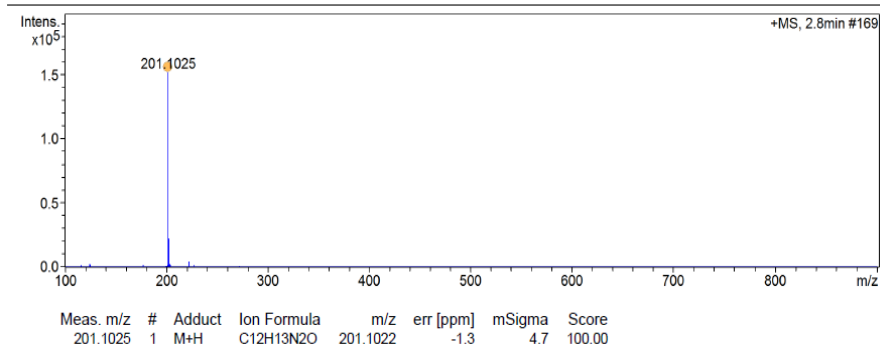
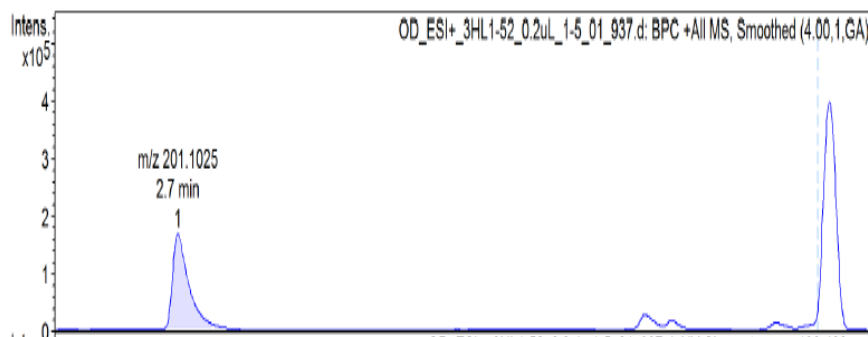
Sample Name OD\_ESI+\_3HL1-52\_0.2uL Instrument microTOF-Q

Comment ODS 50x2,0  
 Flx=0.4 mL/min[Split de 0,06 mL(MS)/0,34mL(desc)]; F=35C;P:2517;psi;C=1mg/mL (MeOH);inj=0.2uL;  
 A(H2O+0.1%HCOOH)/B(ACN+0,1%HCOOH)  
 0-10m\_5-50%  
 10-12m\_50-100%  
 12-14m\_100%  
 14-16m\_100-5%  
 16-18m\_5%  
 injetor:ACN  
 Calib.:HCOONa 10mM\_end



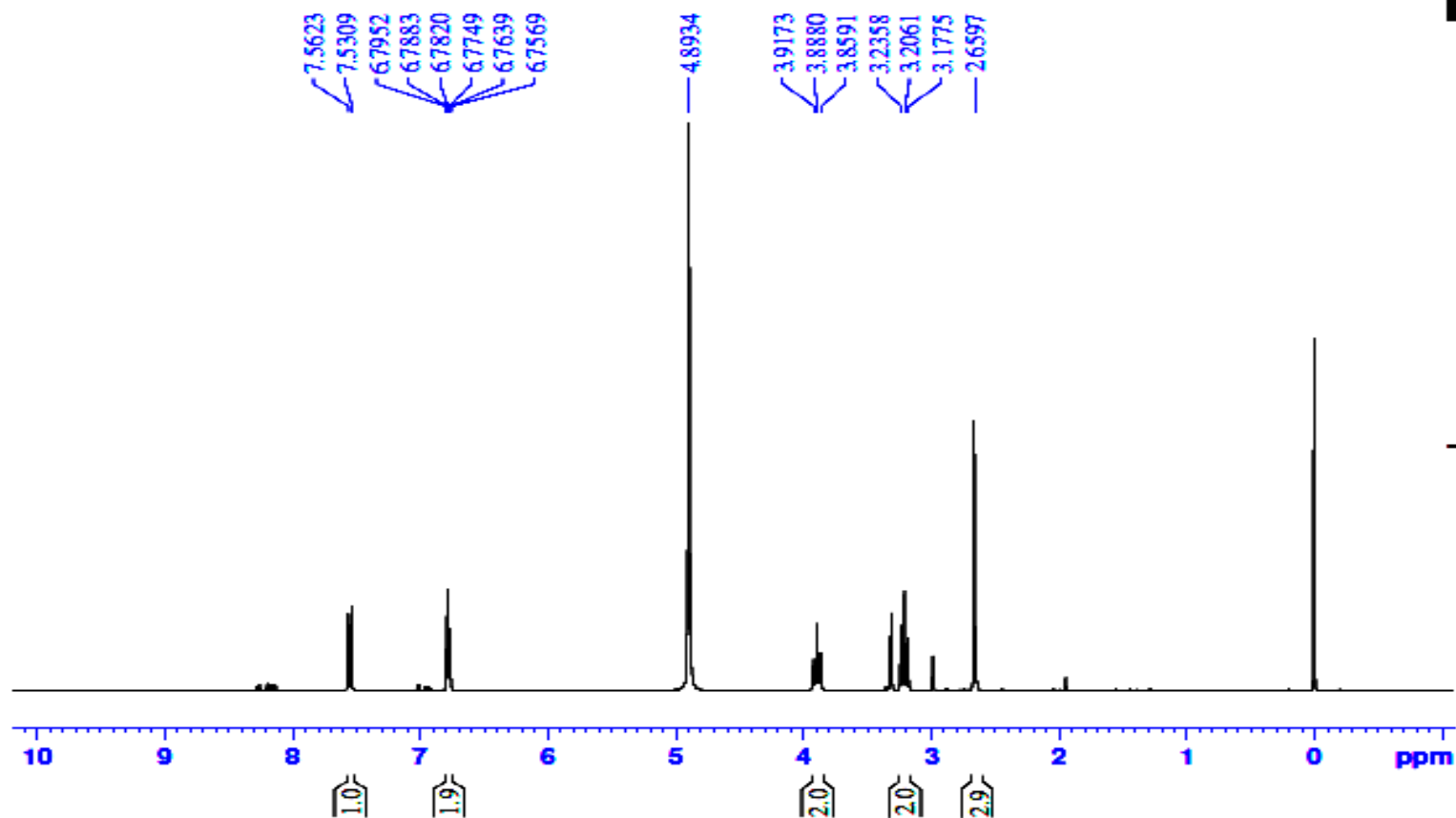
### Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	5.0 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	10.0 l/min
Scan End	900 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



**ANEXO 45. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do harmalol (27.3).**

Andreia17\_3HL1-52 (1H)



Current Data Parameters  
 NAME: Andreia17\_3HL1-52  
 EXPNO: 11  
 PROCNO: 1

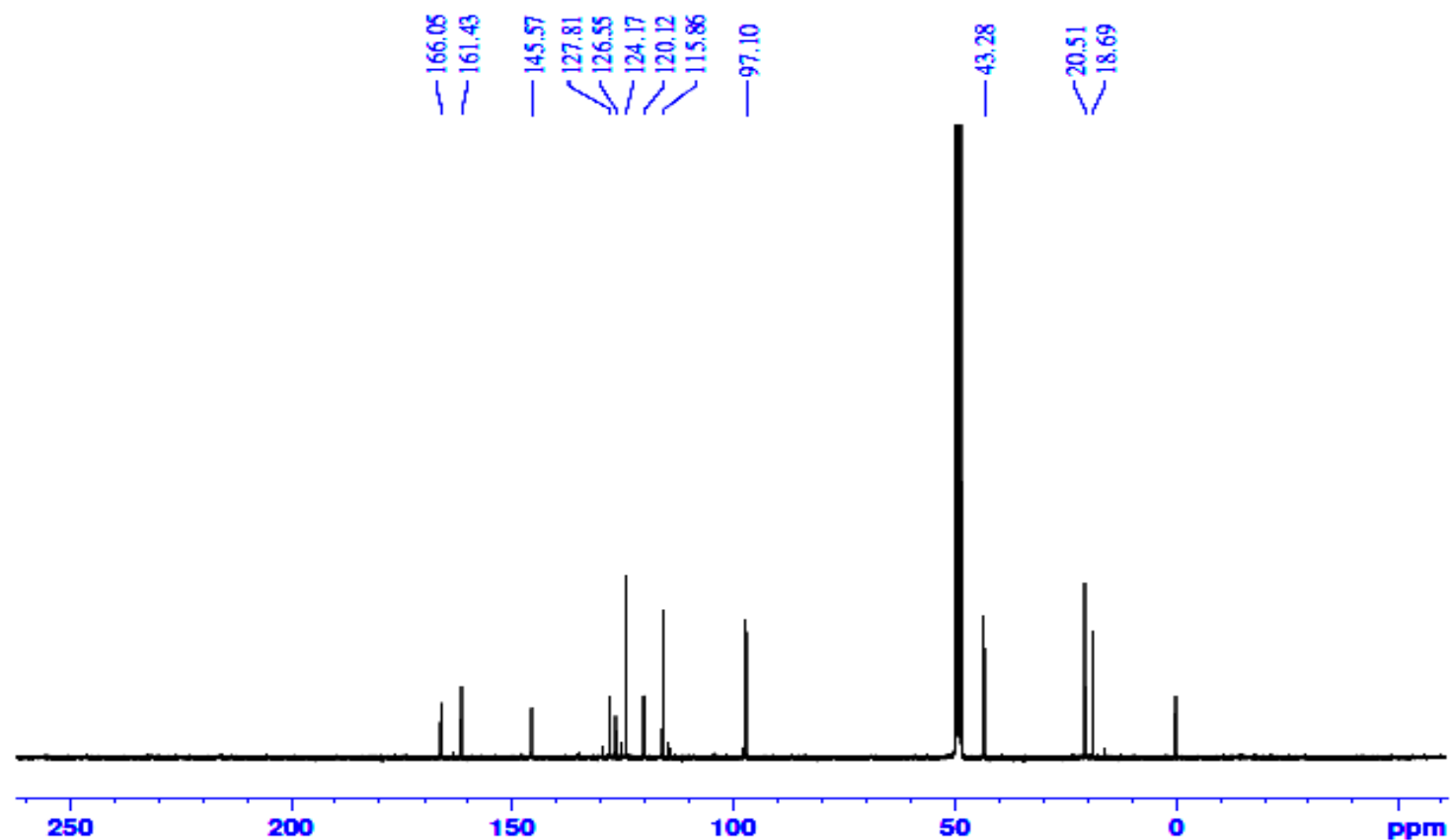
F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_: 20170417  
 Time: 17:51  
 INSTRUM: POUER1H2300  
 PROBHD: 5 mm DUL 13C-1  
 PULPROG: zg  
 TD: 65536  
 SOLVENT: MeOD  
 NS: 32  
 DS: 2  
 SWH: 6103.516 Hz  
 FIDRES: 0.093132 Hz  
 AQ: 5.3687091 sec  
 RG: 9.28097  
 DW: 81.920 usec  
 DE: 10.00 usec  
 TE: 300.1 K  
 D1: 1.0000000 sec  
 TDO: 1

CHANNEL f1  
 SFO1: 300.2019513 MHz  
 NUC1: 1H  
 P1: 7.64 usec  
 PLW1: 20.00000000 W

F2 - Processing parameters  
 SI: 65536  
 SF: 300.2000011 MHz  
 WDW: EM  
 SSB: 0  
 LB: 0 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.00

ANEXO 46. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em metanol- $d_4$  do produto harmalol (27.3).

Andreia17\_3HL1-52 (13C; MeOD; 1)



Current Data Parameters  
NAME: Andreia17\_3HL1-52  
EXPNO: 2  
PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20170323  
Time 18.10  
INSTRUM HCPURRR300  
PROBHD 5 mm DUL 13C-1  
PULPROG zgpg30  
TD 32768  
SOLVENT MeOD  
NS 40850  
DS 0  
SWH 24414.063 Hz  
FIDRES 0.745058 Hz  
AQ 0.6710886 sec  
RG 501.187  
DW 20.480 usec  
DE 10.00 usec  
TE 1033.0 K  
D1 0.60000002 sec  
D11 0.03000000 sec  
D31 0.00000875 sec  
D40 0.01215407 sec  
LA 20  
L5 17  
P32 90.00 usec  
TDO 1

--- CHANNEL f1 ---  
SFO1 75.4928230 MHz  
NUC1 13C  
P1 8.75 usec  
PLW1 50.00299835 W

--- CHANNEL f2 ---  
SFO2 300.2012008 MHz  
NUC2 131  
CPCPRG2 waltz16  
PCPD2 90.00 usec  
PLW2 20.00000000 W  
PLW12 0.16806000 W  
PLW13 0.13613001 W

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 75.4852429 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

ANEXO 47. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em metanol- $d_4$  produto harmalol (27.3).

## Generic Display Report

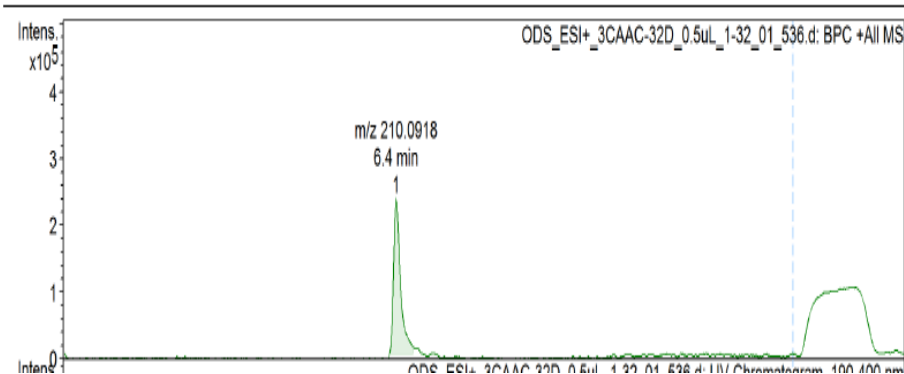
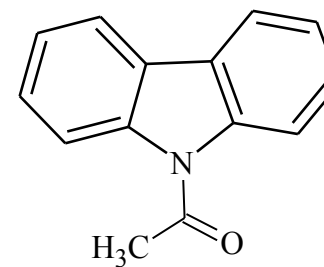
**Analysis Info** Acquisition Date 2/26/2016 11:17:20 AM

Analysis Name D:\Data\Usuarios\2016\Adrian\Andreia\Data\LC-MS\ODS\_ESI+\_3CAAC-32D\_0.5uL\_1-32\_01\_536.d

Method TuneLow\_ESI+\_Andreia\_noFocus\_50-900.m Operator BDAL@DE

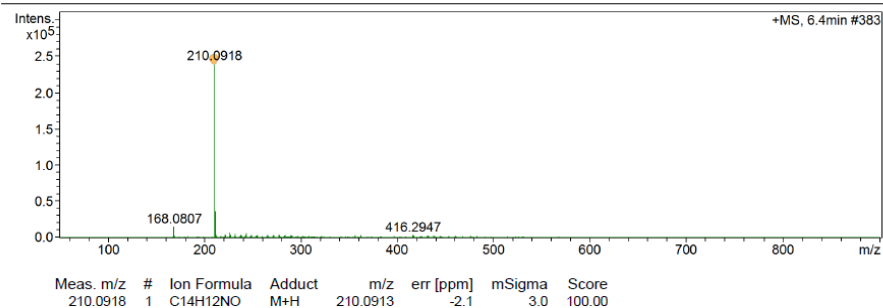
Sample Name ODS\_ESI+\_3CAAC-32D\_0.5uL Instrument micrOTOF-Q

Comment ODS 50x2,0mm  
 Flx=0,4 mL/min[Split de 0,06 mL(MS)/0,34mL(desc)]; P:3275psi;C=1,2mg/mL (ACN);Inj=1uL;  
 A(H2O+0.1%HCOOH)/B(ACN+0,1%HCOOH)  
 0-10m-20-100%  
 10-12m-100%  
 12-14m - 100-20%  
 14-16m - 20%  
 injetor: ACN  
 Calib.:HCOONa 10mM\_end



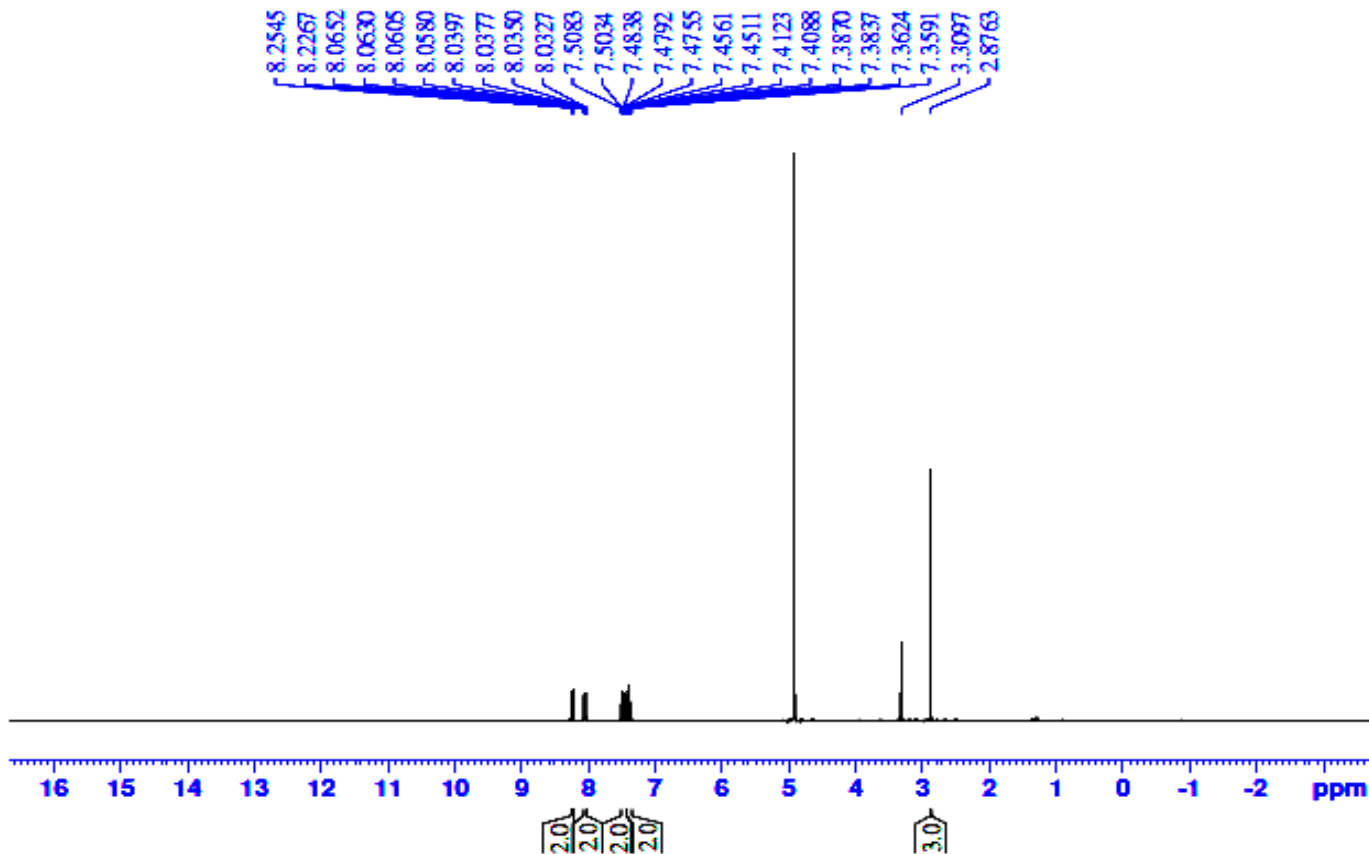
### Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	5.0 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	10.0 l/min
Scan End	900 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



**ANEXO 48. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do *N*-acetil-carbazol (29.6).**

CAAC-144-3\_ (CD3OD)



```

Current Data Parameters
NAME      Andrea_CAAC-14
EXPNO
PROCNO

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20150
Time      14
INSTRUM   FOURIER
PROBHD    5 mm DUL 13
PULPROG
TD         65
SOLVENT   Me
NS
DS
SWH        6103.516
FIDRES     0.093132
AQ         5.3687091
RG         56.
DW         81.920
DE         10.00
TE         546.
D1         1.0000000
TDO

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      300.2019513 MHz
NUC1
P1         7.88
PLW1      20.0000000

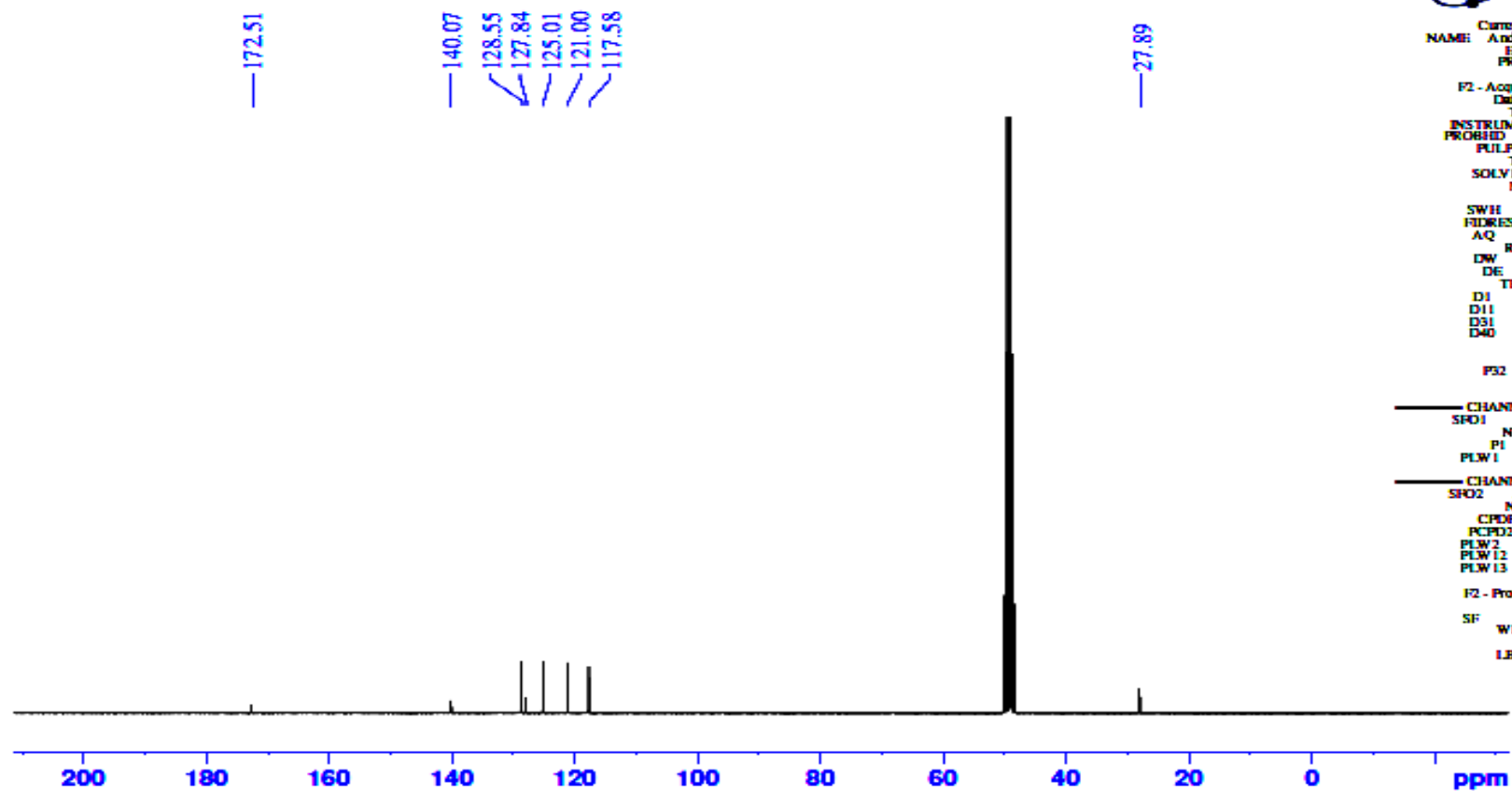
F2 - Processing parameters
SI         65
SF         300.2000024 MHz
WDW
SSB
LB         0
GB
PC

```

ANEXO 49. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em metanol- $d_4$  do produto *N*-acetil-carbazol (29.6).



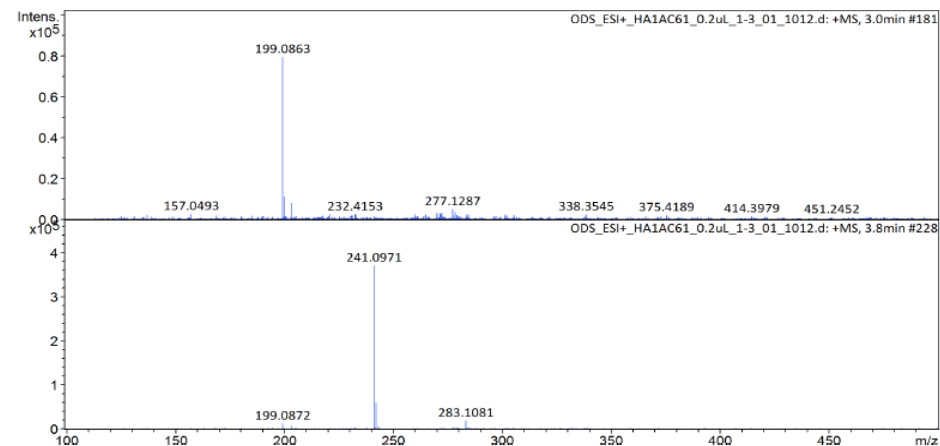
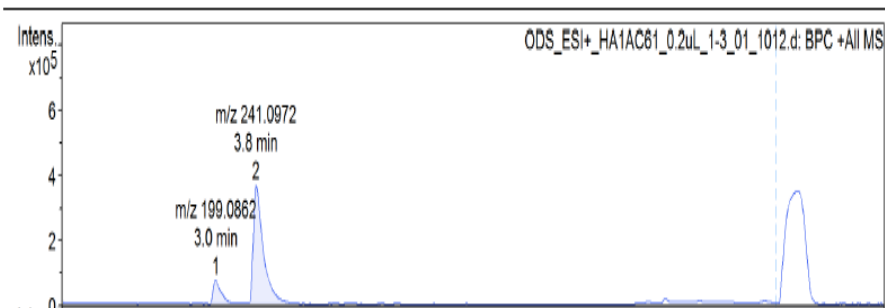
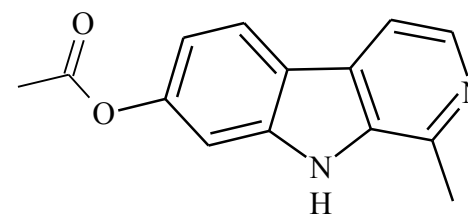
CAAC-144-3\_(13C, CD3OD)

ANEXO 50. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em metanol- $d_4$  do produto *N*-acetil-carbazol (29.6).

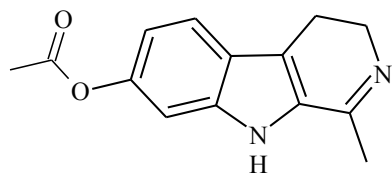
## Generic Display Report

### Analysis Info

Acquisition Date 3/22/2017 12:14:45 PM  
 Analysis Name D:\Data\Usuarios\2017\Adrian\Andreia MDData\LC-MS\22-03-2017\ODS\_ESI+\_HA1AC61\_0.2uL\_1-3\_01\_1012.d  
 Method Tune-Low\_ESI+\_Andreia\_noFocus\_100-900\_14-16min.m Operator BDAL@DE  
 Sample Name ODS\_ESI+\_HA1AC61\_0.2uL Instrument micrOTOF-Q  
 Comment ODS 50x2,0  
 Flx=0,4 mL/min(Split de 0,06 mL(MS)/0,34mL(desc)); P:2883psi;C=1mg/mL (ACN\_MeOH);Inj=0.2uL;T=30C  
 A(H2O+0.1%HCOOH)/B(ACN+0,1%HCOOH)  
 0-8m\_5-50%  
 8-10m\_50-100%  
 10-12m\_100%  
 12-14m\_100-5%  
 14-16m\_5%  
 injetor:ACN  
 Calib.:HCOONa 10mM\_end



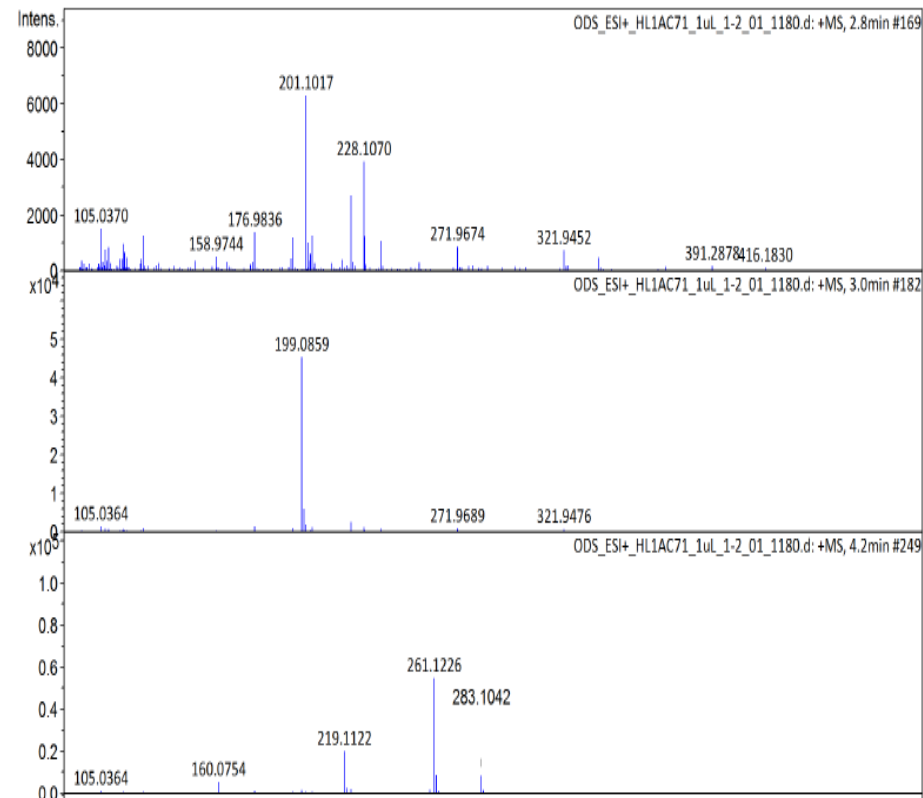
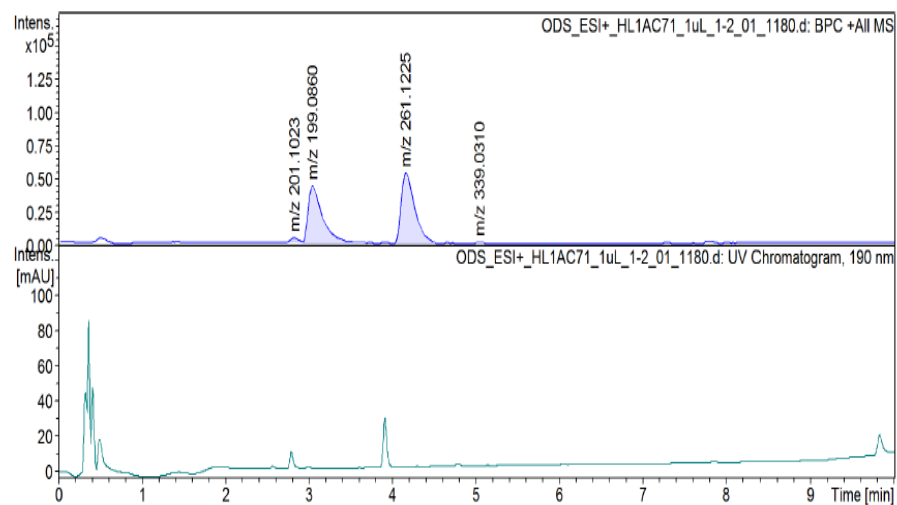
**ANEXO 51. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do *O*-acetil-harmol (26.1).**



$m/z$  243, 1128

$m/z$  261, 1222 [M+H+H<sub>2</sub>O]

### Generic Display Report (all)



**ANEXO 52. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do acetil-harmalol em mistura.**

## Generic Display Report

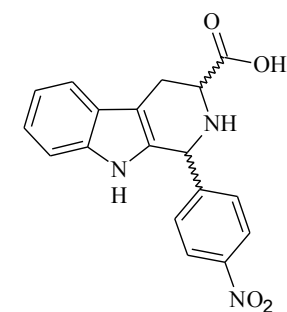
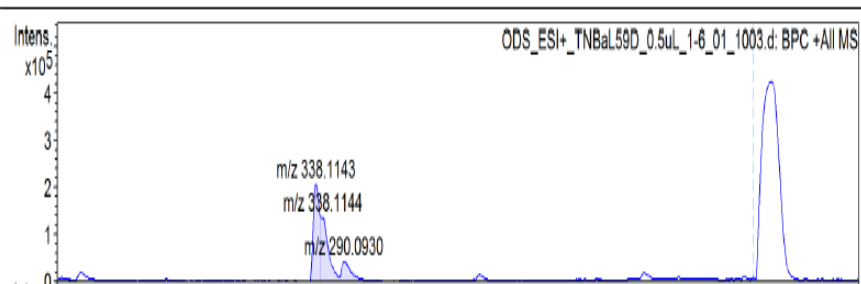
**Analysis Info** Acquisition Date 3/14/2017 12:22:10 PM

Analysis Name D:\Data\Usuarios\2017\Adrian\Andreia M\Data\LC-MS\14-03-2017\ODS\_ESI+ TNBaL59D\_0.5uL\_1-6\_01\_1003.d

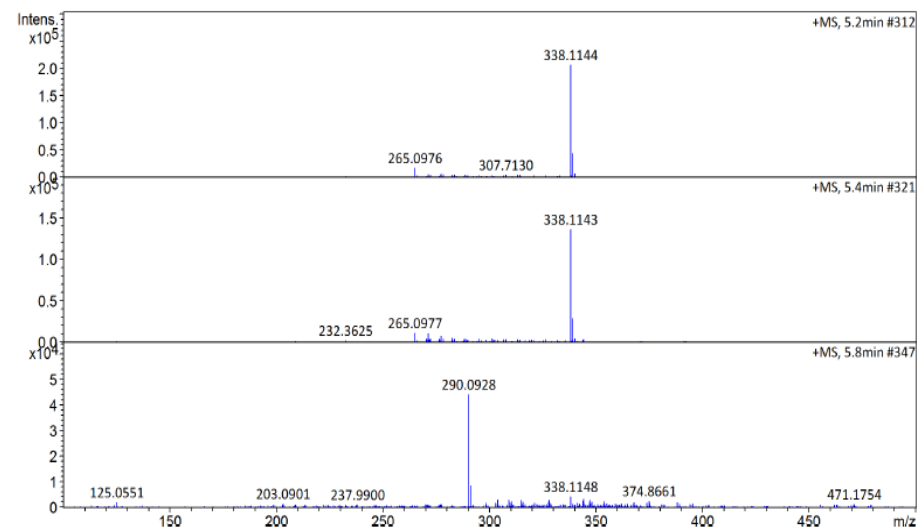
Method Tune-Low\_ESI+\_Andreia\_noFocus\_100-900\_14-16min.m Operator BDAL@DE

Sample Name ODS\_ESI+ TNBaL59D\_0.5uL Instrument micrOTOF-Q

Comment ODS 50x2,0  
 Flx=0,4 mL/min[Split de 0,06 mL(MS)/0,34mL(desc)]; P:2704psi;C = 1mg/mL (MeOH);Inj=0.5uL;T=30C  
 A(H2O+0.1%HCOOH)/B(ACN+0,1%HCOOH)  
 0-8m\_5-50%  
 8-10m\_50-100%  
 10-12m\_100%  
 12-14m\_100-5%  
 14-16m\_5%  
 injetor:ACN  
 Calib.:HCOONa 10mM\_end



(7.1 +7.2)

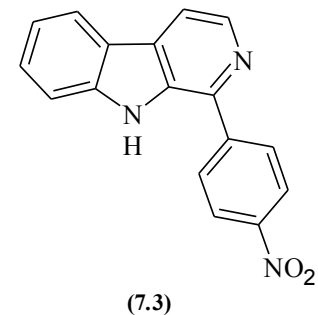


**ANEXO 53. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI da mistura de isômeros 7.1 e 7.2 (*R,S* 1-*p*-nitro-fenil-3-carboxi-1,2,3,4-tetrahidro-harmano).**

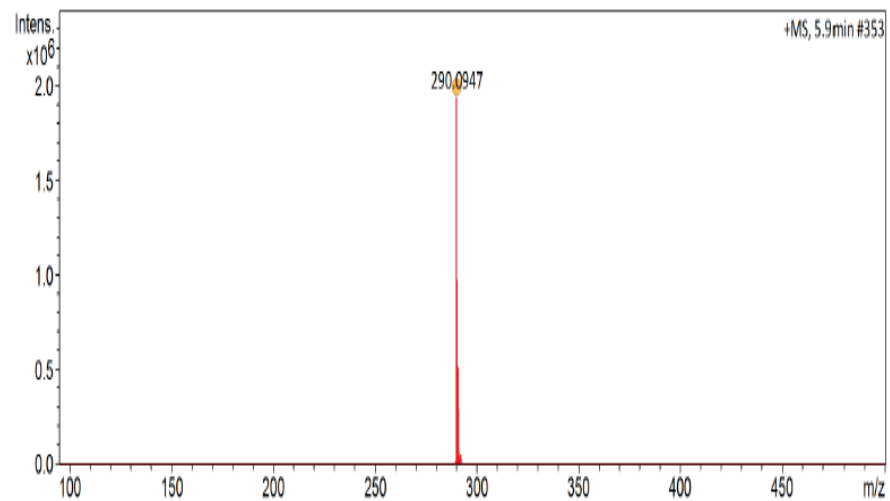
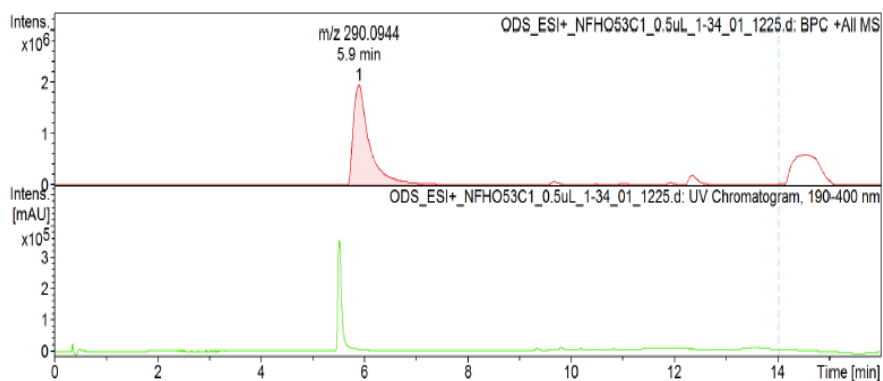
## Generic Display Report

## Analysis Info

Acquisition Date 6/14/2017 12:59:18 PM  
 Analysis Name D:\Data\Usuarios\2017\Adrian\Andreia M\Data\LC-MS\14-06-2017\ODS\_ESI+\_NFHO53C1\_0.5uL\_1-34\_01\_1225.d  
 Method Tune-Low\_ESI+\_Andreia\_noFocus\_100-900\_14-16min.m Operator BDAL@DE  
 Sample Name ODS\_ESI+\_NFHO53C1\_0.5uL Instrument micrOTOF-Q  
 Comment ODS 50x2,0  
 Fix=0,4 mL/min[Split de 0,06 mL(MS)/0,34mL(desc)]; P:2731psi;Inj=1uL;T=30C  
 A(H2O+0.1%HCOOH)/B(ACN+0.1%HCOOH)  
 0-8m\_5%  
 8-10m\_5-50%  
 10-12m\_50-100%  
 12-14m\_100%  
 14-16m\_100-5%  
 injetor:MeOH  
 Calib.:HCOONa 10mM\_end



Meas. m/z	#	Ion Formula	Adduct	m/z	err [ppm]	mSigma
290.0947	1	C22H12N	M+H	290.0964	6.1	11.8
	2	C17H12N3O2	M+H	290.0924	-7.8	38.6
	3	C10H16N3O7	M+H	290.0983	12.4	80.9



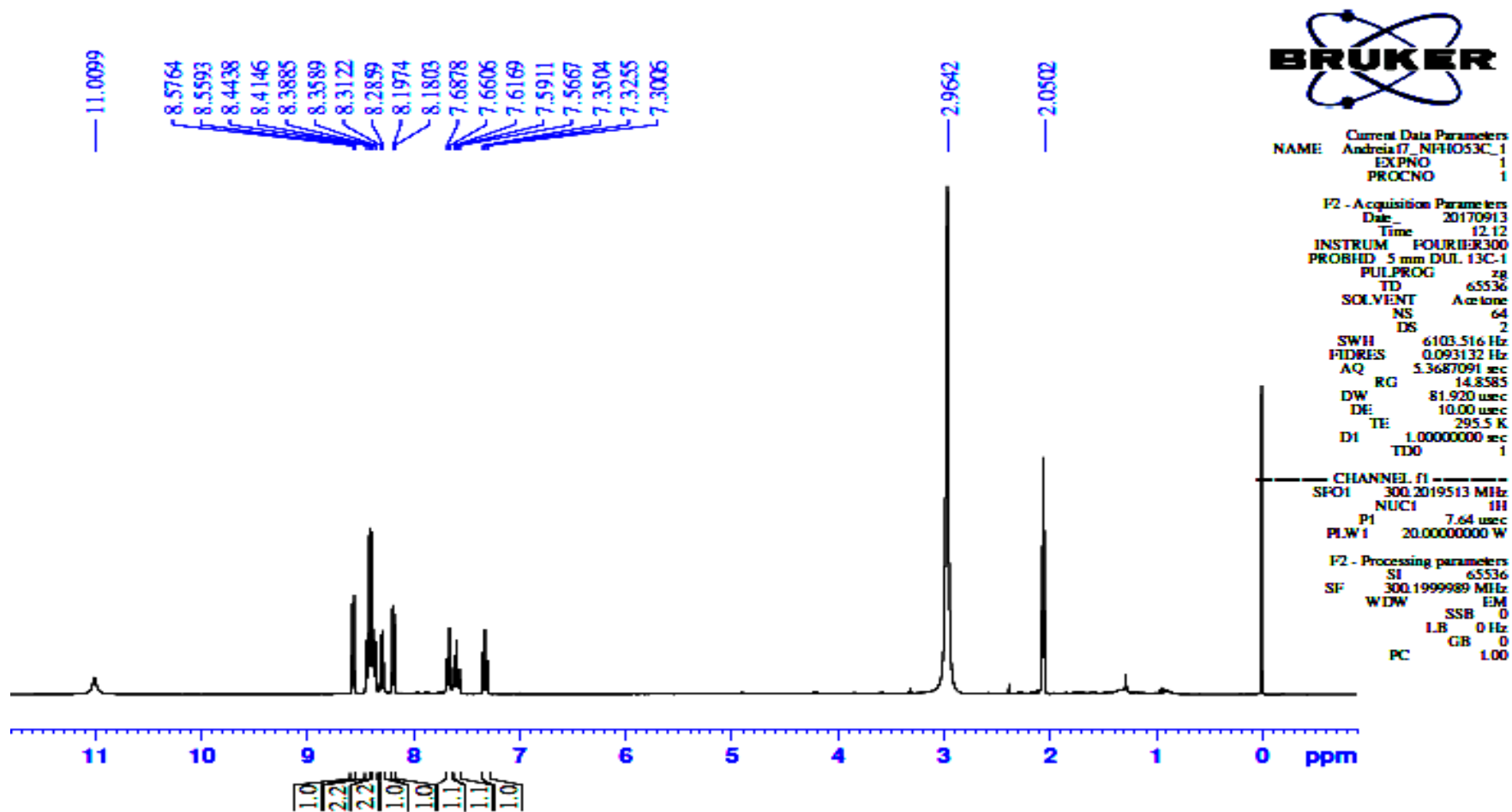
Bruker Compass DataAnalysis 4.2

printed: 6/15/2017 9:03:59 AM

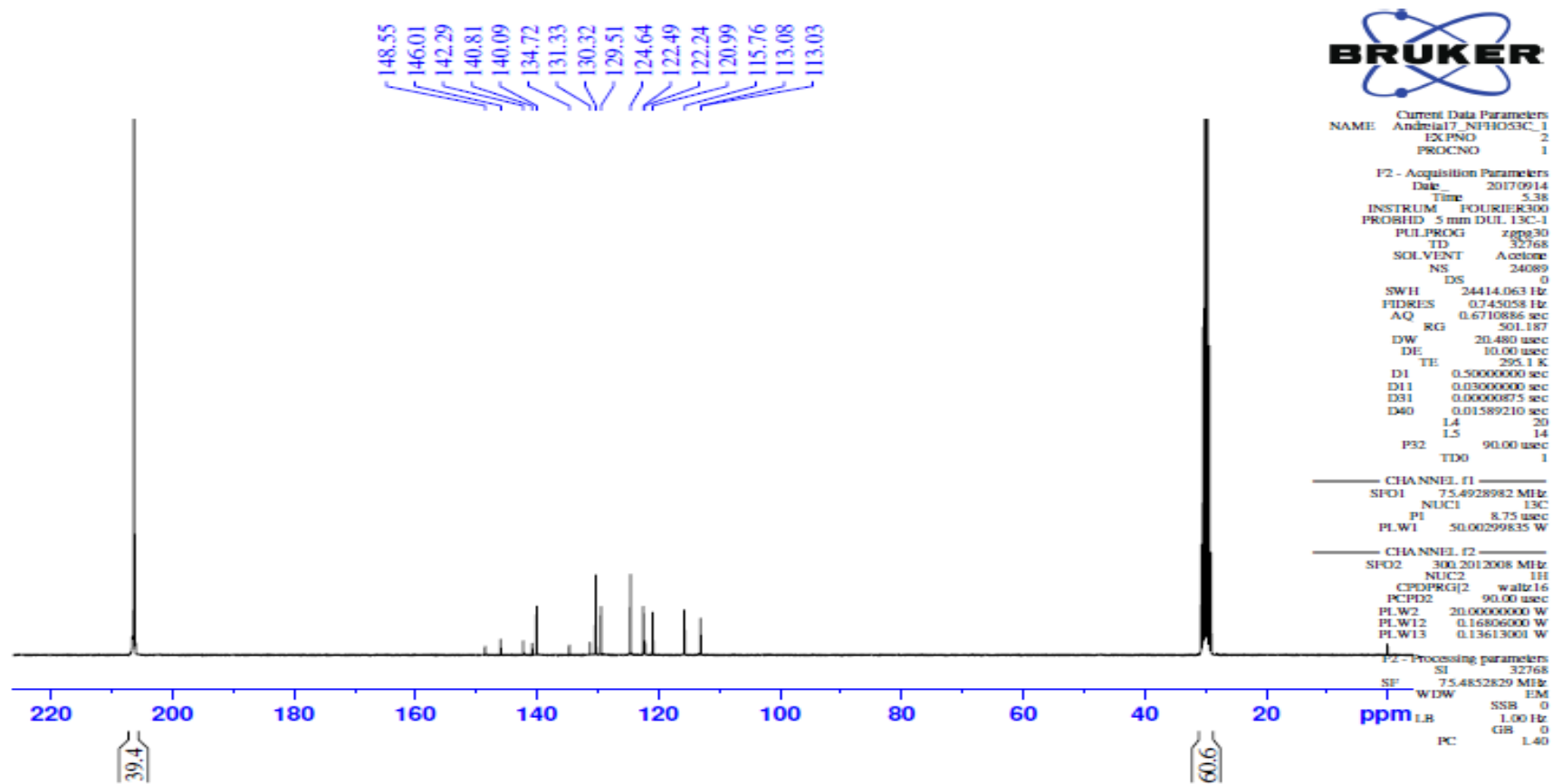
by: BDAL@DE

Page 1 of 1

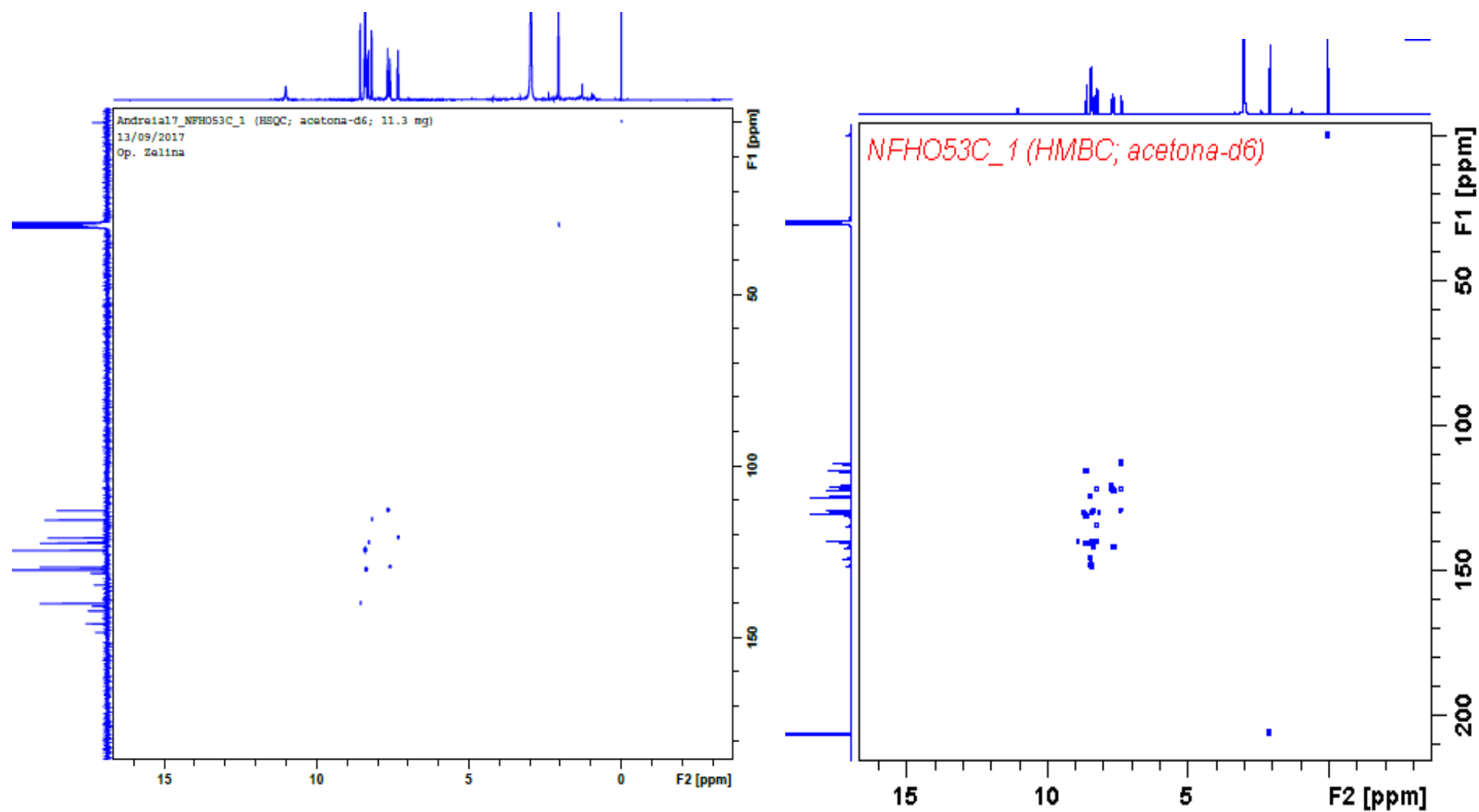
**ANEXO 54. Cromatograma e espectro de massas de UFLC/HRMS-ESI do produto 1-*p*-nitrofenil-harmano (7.3).**



ANEXO 55. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 1-*p*-nitrofenil-harmano (7.3).



ANEXO 56. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) em acetona- $d_6$  do produto 1-p-nitrofenil-harmano (7.3).



ANEXO 57. Espectros de HSQC e HMBC em acetona-d<sub>6</sub> do produto 1-p-nitrofenil-harmano (7.3).