



Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL – MG



ÍTALO ANTÔNIO FERNANDES

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS
PIPERIDINO-BENZODIOXOLA PLANEJADOS COMO
NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS
LEISHMANICIDAS**

Alfenas/MG
2013

ÍTALO ANTÔNIO FERNANDES

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS PIPERIDINO-BENZODIOXOLA
PLANEJADOS COMO NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS LEISHMANICIDAS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas
Orientador: Prof. Dr. Claudio Viegas Jr.
Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho.

**Alfenas/MG
2013**

Fernandes, Ítalo Antônio

Síntese e avaliação de derivados piperidino-benzodioxola planejados como novos candidatos a fármacos leishmanicidas / Ítalo Antônio Fernandes. - 2013.

99 f. -

Orientador: Claudio Viegas Junior

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Leishmaniose. 2. Química Farmacêutica. 3. Química Orgânica.
4. Piper. I. Viegas Junior, Claudio. II. Título.

CDD: 615.19

ÍTALO ANTÔNIO FERNANDES

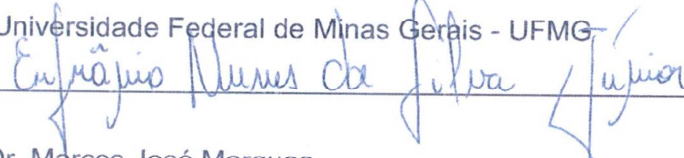
**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DE DERIVADOS PIPERIDINO-BENZODIOXOLA
PLANEJADOS COMO NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS
LEISHMANICIDAS**

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de mestrado apresentada, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de Concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 31/07/2013

Professor: Dr. Eufrânio Nunes da Silva Júnior

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Assinatura:  _____

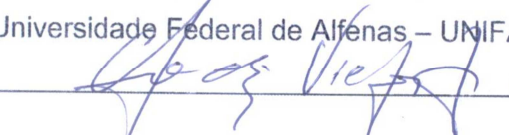
Professor: Dr. Marcos José Marques

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG

Assinatura:  _____

Professor: Dr. Claudio Viegas Junior - Orientador

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG

Assinatura:  _____

**Alfenas/MG
2013**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter conduzindo meu caminho ao longo destes dois anos, dando saúde, perseverança e sabedoria.

Ao meu orientador, Cláudio Viegas Junior, pelo grande apoio e orientação. Nas dificuldades, sempre presente, escutando e aconselhando. Pelo companheirismo e confiança, o meu muito obrigado.

Ao meu co-orientador, Diogo Teixeira Carvalho, pela receptividade, orientação e parceria. Obrigado pelos ensinamentos, conselhos e por estar sempre disposto a ajudar.

À Déh, não somente minha namorada, mas também amiga e companheira. Pelo seu imenso carinho e amor. Sempre e sempre, ao meu lado em todos os momentos apoiando e incentivando. Grande parte desta conquista pertence a ti. O meu muito obrigado, encarecidamente.

Aos meus pais, Ismênia e Antônio, por terem proporcionado toda esta oportunidade. Pela confiança, consideração e apoio. Pelo reconhecimento de todo o esforço e mérito alcançados. À minha eterna gratidão.

Aos meus sogros, Pílar e Carlos, pelo apoio, incentivo e acolhimento. À vocês, minha consideração e meu muito obrigado.

A todos meus amigos de "CP" pelo companheirismo e apoio, velhos companheiros, esta vitória é nossa!!! À todos os amigos de Lavras o meu muito obrigado.

A todos os amigos e colegas de bancada do LFGM pelos diversos momentos de alegria, incentivos e conselhos. Ao Isael, Jaque, Mari, Kris, Dani e Marília.

À toda a estrutura da Unifal-MG, professores, funcionários e laboratórios. Pela oportunidade de crescimento profissional.

RESUMO

As doenças parasitárias continuam sendo um sério desafio de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Dentre as diversas parasitoses existentes, pode-se destacar a leishmaniose, endêmica em vários países localizados nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre. Ainda hoje, milhões de pessoas adquirem a infecção e milhares vão a óbito devido às complicações da doença quando não diagnosticada e tratada corretamente. Pesquisas voltadas à busca de tratamentos mais efetivos e seguros de doenças consideradas de países que negligenciam tais são de suma importância, uma vez que a disponibilidade de medicamentos eficazes e seguros ainda é bastante limitada, além do setor da indústria farmacêutica não demonstrar disposição em investimentos. Diante destes fatos, o presente trabalho visou à obtenção de novos candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas, utilizando como modelo estrutural a piperina, uma amida natural com propriedades antileishmania. Assim, foram obtidos oito ésteres (**LFQM 138-145**), tendo em suas estruturas as subunidades benzodioxola e piperidínica, comuns à piperina (**6**). Além destes, dois carbamatos (**LFQM 146** e **LFQM 147**) também foram obtidos. Todos os compostos foram elucidados estruturalmente por técnicas de espectrometria (IV, RMN e EM), além de avaliados biologicamente *in vitro* frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* através do IC_{50} em μM . As substâncias mais ativas da série dos ésteres foram **LFQM 144**, **LFQM 145** e **LFQM 139**, com valores de IC_{50} de 41,06 μM , 42,83 μM e 51,58 μM , respectivamente. Para a série dos carbamatos, o mais ativo foi **LFQM 146** com $IC_{50} = 43,16 \mu M$, sendo equipotente aos dois compostos ésteres mais ativos **LFQM 144** e **LFQM 145**. Todos os compostos foram menos ativos que a anfotericina B ($IC_{50} = 5,08 \mu M$), utilizada como medicamento padrão nas análises. Os compostos mostraram baixo perfil de citotoxicidade ao serem avaliados pelo ensaio de MTT com monócitos humanos, sendo o éster **LFQM 145** o mais seguro dentre todos os sintetizados, com relação $CC_{50}/IC_{50} = 40,10$. Dessa forma, o perfil molecular destes compostos está sendo considerado de grande interesse, podendo levar através de otimizações estruturais futuras à descoberta de compostos mais ativos e seguros.

Palavras-chave: Piperina. Derivados piperidino-benzodioxola. Leishmaniose. Química Medicinal. Química Orgânica.

ABSTRACT

Parasitic diseases remain a serious public health challenge, especially in underdeveloped or developing countries. Among the various existing parasitosis, we can highlight that leishmaniasis is endemic in many countries located in tropical and subtropical regions of the globe. Even today, millions of people become infected and thousands will die as result of complications of the disease if not diagnosed and treated properly. Researches aimed at seeking more effective and safer treatments for diseases considered countries that neglect these are of paramount importance, since the availability of effective and safe medicines is still quite limited and also the pharmaceutical industry sector not demonstrate willingness to investments. Given these facts, the present work aimed at obtaining new candidate prototypes antileishmanial drugs, using as structural model piperine, an amide with natural antileishmanial properties. Thus, we obtained eight piperidine-benzodioxole esters (**LFQM 138-145**) presenting in their structures the piperidinic and benzodioxolic subunits, common to the compound model, piperine (**6**). In addition, two carbamates (**LFQM 146** and **LFQM 147**) were also obtained. All compounds had their structures elucidated by spectral techniques IR, NMR and MS. All compounds have been biologically evaluated *in vitro* against the *Leishmania amazonensis* promastigotes and values were expressed by IC_{50} in μM . The most active substances of the ester series were **LFQM 144**, **LFQM 145** and **LFQM 139**, with IC_{50} values of 41.06 μM , 42.83 μM and 51.58 μM , respectively. For the carbamate series, the most active was **LFQM 146** with $IC_{50} = 43.16 \mu\text{M}$, that was equipotent to the evaluated esters **LFQM 144** and **LFQM 145**. All compounds were less active than amphotericin B ($IC_{50} = 5.08 \mu\text{M}$) that was used as standard drug in the analysis. The compounds showed low toxicity in the MTT human cell viability assay and **LFQM 145** was considered the safer between all the synthesized compounds, with a relation $CC_{50}/IC_{50} = 40,10$. Thus, the molecular profile of these compounds is being considered of great interest and may lead future structural optimizations through the discovery of compounds most active and safe.

Keywords: Piperine. Piperidine-benzodioxole Derivatives. Leishmaniasis. Medicinal Chemistry. Organic Chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração do vetor (1), formas promastigotas (2) e amastigotas (3) de <i>Leishmania sp</i>	17
Figura 2: Ciclo biológico do parasita no inseto vetor e ser humano	18
Figura 3: Arsenal terapêutico empregado no tratamento da leishmaniose	22
Figura 4: Estruturas químicas da piperina e outras amidas naturais isoladas de <i>Piper sp</i>	23
Figura 5: Conjugados piperoil aminoácidos 13-27	24
Figura 6: Estruturas químicas de amidas naturais (28 e 29) de <i>Piper amalago</i> , derivado hidrogenado (30) e análogos sintéticos (31-37)	25
Figura 7: Esqueleto geral de uma chalcona	26
Figura 8: Estrutura química, fórmula molecular, massa molar e nomenclatura IUPAC do álcool benzil-piperidínico 45	32
Figura 9: Estrutura química, fórmula molecular, massa molar e nomenclatura IUPAC dos ésteres-alvo 42W₁₋₇ e 48	34
Figura 10: Estrutura química, fórmula molecular, massa molar e nomenclatura IUPAC dos carbamatos alvo	36
Figura 11: Estrutura química do MTT e monócitos humanos utilizados no ensaio de viabilidade celular	38
Figura 12: Mecanismo proposto para a reação de aminação reductiva para obtenção do composto 45	40
Figura 13: Espectro no IV (KBr) do composto 45	41
Figura 14: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do composto 45	42
Figura 15: Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) do composto 45	43
Figura 16: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto 45	44
Figura 17: Mecanismo proposto para a obtenção dos cloretos de acila 46W₁₋₇ e 47	45
Figura 18: Mecanismo proposto para a obtenção dos ésteres-alvo (série 42 e éster 48)	46
Figura 19: Espectro no IV (NaCl) do composto 42W₁	47
Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₁	48
Figura 21: Espectro de RMN de ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₁	49
Figura 22: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto 42W₁	50
Figura 23: Espectro no IV (NaCl) do composto 42W₂	51
Figura 24: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₂	52
Figura 25: Espectro de RMN de ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₂	53
Figura 26: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto 42W₂	54
Figura 27: Espectro no IV (NaCl) do composto 42W₃	55
Figura 28: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₃	56
Figura 29: Espectro de RMN de ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₃	57
Figura 30: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto 42W₃	58
Figura 31: Espectro no IV (NaCl) do composto 42W₄	59
Figura 32: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₄	60
Figura 33: Espectro de RMN de ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₄	61
Figura 34: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto 42W₄	62
Figura 35: Espectro no IV (NaCl) do composto 42W₅	63
Figura 36: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₅	64
Figura 37: Espectro de RMN de ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₅	65

Figura 38: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto 42W₅	66
Figura 39: Espectro no IV (KBr) do composto 42W₆	67
Figura 40: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₆	68
Figura 41: Espectro de RMN de ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₆	69
Figura 42: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto 42W₆	70
Figura 43: Espectro no IV (KBr) do composto 42W₇	71
Figura 44: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₇	72
Figura 45: Espectro de RMN de ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do composto 42W₇	73
Figura 46: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto 42W₇	74
Figura 47: Espectro no IV (KBr) do composto 48	75
Figura 48: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto 48	76
Figura 49: Espectro de RMN de ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do composto 48	77
Figura 50: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto 48	78
Figura 51: Mecanismo proposto para a obtenção dos carbamatos-alvo	79
Figura 52: Espectro no IV (NaCl) do composto 50R₁	80
Figura 53: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto 50R₁	81
Figura 54: Espectro de RMN de ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do composto 50R₁	82
Figura 55: Espectro no IV (NaCl) do composto 50R₂	83
Figura 56: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) do composto 50R₂	84
Figura 57: Espectro de RMN de ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do composto 50R₂	85

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Esquema para a obtenção dos derivados chalcônicos 40 e 41	26
Esquema 2: Planejamento estrutural dos compostos piperidino-benzodioxólicos (série 42), utilizando a piperina (6) como modelo estrutural	28
Esquema 3: Abordagem sintética para a obtenção dos derivados ésteres e carbamatos (série 42 , éster 48 e série 50)	30
Esquema 4: Esquema dos testes leishmanicidas contra as formas promastigota em placas de 24 poços.	37
Esquema 5: Esquema reacional para obtenção do composto 45	39
Esquema 6: Esquema reacional para a obtenção dos cloretos de acila	44
Esquema 7: Esquema reacional para a obtenção dos carbamatos-alvo (50R₁ e 50R₂)	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de IC ₅₀ (μM) para avaliação da atividade leishmanicida dos ésteres-alvo e carbamatos-alvo em comparação com a anfotericina B	86
Tabela 2: Valores de CC ₅₀ (μM) e CC ₉₀ (μM) para avaliação da viabilidade celular dos compostos LFQM 138-147	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ASTM – *American Society for Testing and Materials*
CC₅₀ – concentração citotóxica de 50% das células
CC₉₀ – concentração citotóxica de 90% das células
CC – cromatografia em coluna
CCD – cromatografia em camada delgada
CDC – centro de controle e prevenção de doenças
DCM – diclorometano
DMF – N,N-dimetilformamida
DMSO – dimetilsulfóxido
EM – espectrometria de massas
FM – fórmula molecular
Hz – hertz
IC₅₀ – concentração inibitória de 50% do alvo biológico
IC_{50-PRO} – concentração inibitória de 50% para formas promastigotas
IR – *infrared*
IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*
IV – infravermelho
J – constante de acoplamento
LC – leishmaniose cutânea
LMC – leishmaniose mucocutânea
LV – leishmaniose visceral
m/z – razão massa carga
MHz – mega-hertz
MM – massa molecular
MS – *mass spectrometry*
NMR – *nuclear magnetic resonance*
pH – potencial hidrogeniônico
RMN de ¹³C – ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio
sp – espécies
t.a. – temperatura ambiente
UV – ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Caracterização do agente etiológico	15
2.2 Ciclo biológico do parasita	17
2.3 Caracterização da doença	18
2.4 Arsenal terapêutico disponível	20
2.5 Compostos naturais, sintéticos e semissintéticos com atividade leishmanicida	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Generalidades	27
3.2 Rota sintética para os derivados ésteres e carbamatos (série 42, éster 48 e série 50) planejados como novos candidatos a protótipos leishmanicidas.....	28
3.2.1 Reação de aminação redutiva entre o piperonal (43) e o 4-piperidino-metanol (44) na presença de NaBH ₃ CN e ZnCl ₂	31
3.2.2 Reação de obtenção dos cloretos de acila por reação entre os respectivos ácidos carboxílicos e cloreto de oxalila	32
3.2.3 Reação de obtenção dos ésteres-alvo por reação do álcool 45 com cloretos de acila	33
3.2.4 Rota sintética para os derivados carbamatos (série 50) planejados como novos candidatos a protótipos leishmanicidas	35
3.2.4.1 Reação de obtenção dos carbamatos-alvo a partir do álcool benzil-piperidínico 45	35
3.3 Avaliação da atividade <i>in vitro</i> contra as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	36
3.4 Ensaio de viabilidade celular frente a monócitos humanos.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Química	39
4.2 Avaliação da atividade antileishmania	86
4.3 Avaliação da viabilidade celular	88
5 CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma parasitose causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Como a maioria das parasitoses que acometem o ser humano, a leishmaniose é considerada uma doença negligenciada, com recursos terapêuticos escassos e pouco eficientes, onde sua ocorrência é comum em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento^{1,2}.

Como a segunda principal causa de morte dentre as doenças parasitárias causadas por protozoários, a leishmaniose fica atrás apenas da malária. Estima-se que a cada ano 70.000 pessoas morrem em função da leishmaniose no mundo e que existem cerca de 350.000.000 sob o risco de adquirirem a infecção³.

A doença é transmitida pela picada de flebotomíneos, manifestando-se principalmente de três formas: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC). A forma visceral, na qual o indivíduo é infectado por *L. donovani*, também conhecida como calazar, é a mais severa e comumente fatal na ausência de tratamento. Com relação à forma cutânea, *L. major*, *L. donovani*, *L. tropica* e *L. aethiopica* são as espécies mais comumente associadas, enquanto que para a forma muco-cutânea o agente etiológico mais comum é *L. braziliensis*^{4,5}.

As manifestações clínicas são variadas, sendo associadas principalmente às diferenças antigênicas das diferentes espécies do gênero *Leishmania*, além de fatores genéticos e imunológicos dos hospedeiros⁶⁻⁸.

O tratamento disponível é ainda limitado a poucos fármacos, como miltefosina, anfotericina B e derivados, paromomicina e antimoniais pentaventes. O principal problema acerca do tratamento medicamentoso está na resistência intrínseca ou adquirida pelos protozoários³. Outros problemas envolvem a incidência de efeitos colaterais e toxicidade destes medicamentos⁹.

Considerada uma doença de notificação compulsória, a leishmaniose gera sérios problemas ao nosso setor de saúde pública. Os gastos anuais gerados com os tratamentos de pacientes infectados são de grandes proporções, mas ações efetivas e investimentos em pesquisas científicas para a busca de novos fármacos ou terapias para esta enfermidade ainda são tímidos.

Por ser uma doença com um vetor facilmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais, países localizados nestas regiões e com menor desenvolvimento socioeconômico são os mais afetados. O número crescente de cães e humanos infectados mostra a importância do desenvolvimento de uma terapia medicamentosa eficiente e acessível à população, no intuito de conter e controlar a disseminação do parasita.

Esta parasitose é considerada o principal problema de saúde pública em diversos países, na sua maioria países subdesenvolvidos, além de gerar inúmeros óbitos todos os anos por todo o mundo. O arsenal terapêutico atualmente disponível, além de restrito, gera uma série de efeitos adversos, comprometendo ainda mais a eficiência do tratamento.

Desta forma, pesquisas voltadas à busca de novas alternativas terapêuticas para esta parasitose são de suma importância, uma vez que indivíduos infectados ficam debilitados, impossibilitados ao trabalho e, em casos mais graves, levando ao óbito, além de gerarem gastos vultuosos ao sistema público de saúde.

A piperina (**6**, Figura 4) é um dos alcaloides mais abundantes em espécies vegetais do gênero *Piper*, sendo este um importante gênero dentro da família *Piperaceae*. De uma forma geral, este gênero é representado principalmente pelas pimentas. Em estudos *in vitro* frente à *L. donovani*, a piperina mostrou atividade inibitória contra promastigotas do parasita¹⁰. Em estudos mais recentes, derivados piperínicos tem sido avaliados mostrando atividade inibitória frente às formas epimastigotas e amastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi*¹¹. Ainda, segundo Ferreira e colaboradores¹², derivados piperínicos mostraram atividade leishmanicida frente à *L. amazonensis*.

Ao longo dos anos diversos estudos tem verificado uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas relacionadas à piperina (**6**), como anti-inflamatória¹³, ação de bloqueio da despolarização neuromuscular no músculo esquelético¹⁴, atividade antimicrobiana¹⁵ e antifúngica¹⁶, além da atividade antiprotozoária já mencionada.

Neste contexto, o trabalho em questão visou à obtenção de novos derivados ésteres e carbamatos piperidino-benzodioxólicos, planejados como candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas, estruturalmente relacionados à piperina (**6**). A expectativa é que os resultados obtidos até o momento possam gerar o conhecimento científico adequado à otimização do perfil farmacológico destas

substâncias, com padrão estrutural inédito e que o avanço do projeto possa levar descoberta de novas substâncias ativas e seguras para a terapêutica da leishmaniose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização do agente etiológico

A família *Trypanosomatidae*, agrupa cerca de 10 diferentes espécies pertencentes ao gênero *Leishmania* com importância significativa para a saúde pública¹⁷. Podemos citar *L. donovani*, *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* como exemplos de espécies de importância clínica para a leishmaniose, classificadas por diferentes características imunológicas, bioquímicas e moleculares¹⁸.

Em 1885, Cunningham relatou a observação de parasitas responsáveis por causar a posteriormente conhecida leishmaniose visceral em indivíduos na Índia. Em 1903, o agente etiológico da doença foi descrito por William Leishman e Charles Donovan. Leishman observou corpúsculos com cerca de 2 mm de diâmetro em preparações coletadas de um soldado inglês que havia contraído febre na Índia. Neste mesmo ano, Ross criou o gênero *Leishmania*, no qual foi inserida a *L. donovani*¹⁹.

Cerâmicas datadas de 400 a 900 anos d.C. mostram que a leishmaniose tegumentar trata-se de uma doença da antiguidade. Nestas obras, feitas por índios peruanos, são representadas mutilações de lábios e nariz, atualmente características da leishmaniose cutâneo mucosa²⁰.

No Brasil, o primeiro a observar a leishmaniose tegumentar foi Alexandre Cerqueira, em 1855, no estado da Bahia. Em 1895, foi relatada a doença na Itália, em cidadãos provenientes do estado de São Paulo, no Brasil. Em 1908, ocorreram inúmeros casos durante a construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, principalmente na cidade de Bauru, o que levou a doença a ser conhecida por úlcera de Bauru^{21, 22}.

Em 1909, Lindenberg identificou em lesões cutâneas de indivíduos trabalhadores de matas do interior de São Paulo formas do parasito idênticas à *L. tropica*. Porém, Gaspar Vianna considerou o parasito diferente e o denominou *L. braziliensis*, ficando assim conhecido o agente etiológico da úlcera de Bauru, também referida como ferida brava ou nariz de tapir²³.

Até a década de 70, atribuíam-se no Brasil, todos os casos de leishmaniose tegumentar à *L. braziliensis*. Com o aprimoramento de técnicas de identificação, outras seis espécies foram descritas e registradas como causadoras da doença²⁴:

- *Leishmania braziliensis*: espécie mais prevalente no homem, pode causar lesões cutâneas e mucosas. É encontrada em todas as zonas endêmicas do país, geralmente associada à presença de animais domésticos e transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos como *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia intermedia*, dentre outras²⁵.
- *Leishmania guyanensis*: causa principalmente lesões cutâneas e ocorre na margem norte do rio Amazonas, associado à edentados e marsupiais. Transmitido principalmente por *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia anduzei* e *Lutzomyia whitmani*²⁵.
- *Leishmania naiffi*: causa a doença de evolução benigna e está presente na Floresta Amazônica e nos estados do Pará e Amazonas. Tem o tatu como reservatório natural e seus principais vetores são *Lutzomyia squamiventris*, *Lutzomyia paraensis* e *Lutzomyia ayroza*²⁶.
- *Leishmania shawi*: tem como reservatórios animais silvestres como macacos e preguiças. Responsável por casos esporádicos no Amazonas e Pará e tem como vetor *Lutzomyia whitmani*²⁷.
- *Leishmania lainsoni*: encontrada apenas na Floresta Amazônica, sendo a paca seu reservatório natural e o vetor *Lutzomyia ubiquitalis*²⁸.
- *Leishmania amazonensis*: considerado o agente etiológico da leishmaniose tegumentar americana, incluindo a forma cutâneo difusa. Os roedores e marsupiais são seus reservatórios e os vetores *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia olmeca*²⁹.

No Brasil, o primeiro caso diagnosticado de leishmaniose visceral foi em 1936 por Evandro Chagas. No ano seguinte, Chagas e outros pesquisadores deram ao parasita o nome de *Leishmania donovani chagasi*³⁰.

2.2 Ciclo biológico do parasita

O parasita tem ciclo de vida digenético, alternando entre hospedeiros mamíferos e os insetos vetores. Os vetores são pequenos insetos, entre 1,5 a 2 mm de comprimento, principalmente encontrados nas regiões tropicais e subtropicais. Os dois gêneros de flebotomíneos de importância clínica são *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, sendo os únicos dois gêneros comprovadamente capazes de atuar como vetores nesta parasitose³¹.

Fora do hospedeiro vertebrado, o ciclo de vida deste parasita é restrito ao trato digestivo dos insetos vetores. O desenvolvimento no inseto vetor é iniciado quando fêmeas de flebotomíneos realizam o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados infectados, ingerindo assim macrófagos contendo amastigotas. Estas amastigotas possuem de 3–5 μm , são imóveis e arredondadas. As mudanças nas condições que ocorrem do hospedeiro vertebrado para o inseto vetor, como diminuição na temperatura e aumento no pH, irão desencadear a transformação e desenvolvimento morfológico deste parasita no trato digestivo do vetor. As formas amastigotas ingeridas pelo inseto transformam-se em promastigotas, sendo estas as formas infectivas para os hospedeiros vertebrados¹⁷.



Figura 1: ilustração do vetor (1), formas promastigotas (2) e amastigotas (3) de *Leishmania* sp.

(Adaptado de: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=315&sid=32>)

As formas promastigotas infectivas poderão ser introduzidas pelo inseto durante um novo repasto sanguíneo para um novo hospedeiro vertebrado não infectado. Quando fagocitadas por macrófagos no hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas transformam-se em amastigotas intracelulares aflageladas, multiplicam-se e progridem no hospedeiro causando a patologia, podendo abranger desde lesões cutâneas até a leishmaniose visceral que pode levar ao óbito se não tratada³².

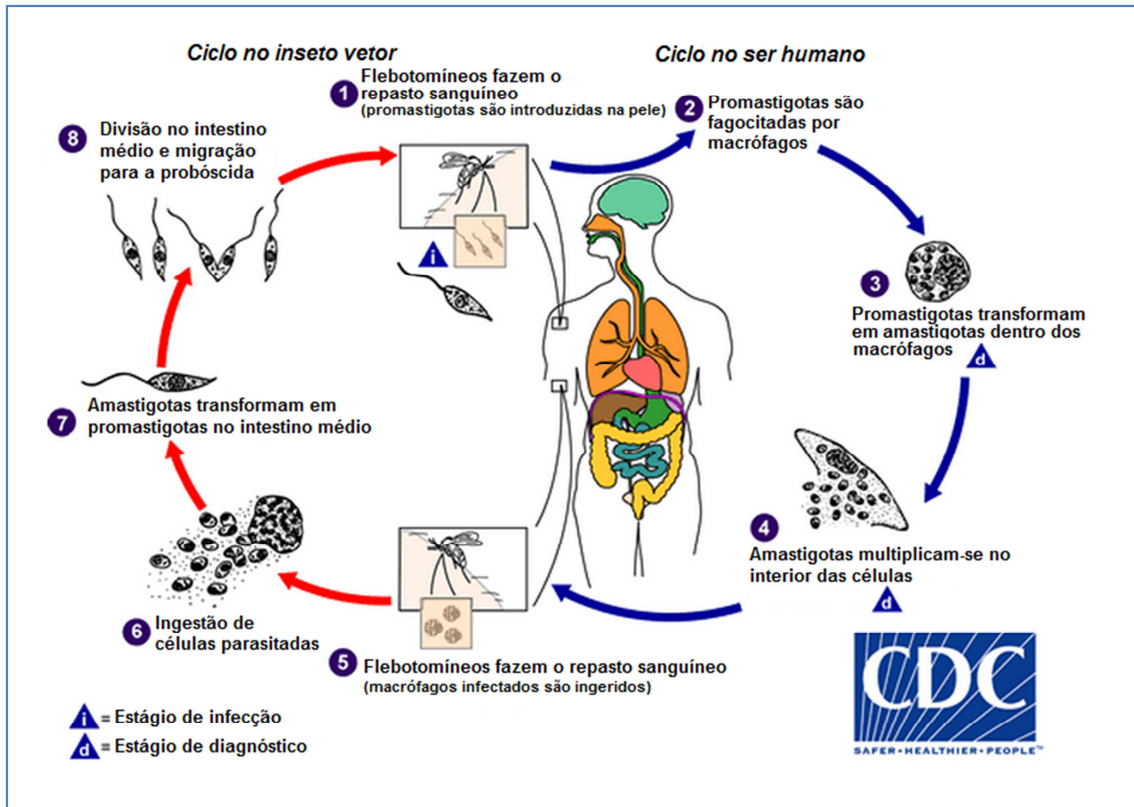


Figura 2: Ciclo biológico do parasita no inseto vetor e ser humano
(Adaptado de: <http://www.cdc.gov>)

2.3 Caracterização da doença

A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e o vetor são insetos conhecidos como flebotomíneos. Existem diferentes formas da leishmaniose que acometem as populações, sendo que as formas mais comuns são a leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral³³.

A leishmaniose é uma doença que ocorre na Ásia, Europa, África e Américas, sendo que neste último continente existem relatos que datam da época colonial. É considerada uma zoonose na maioria dos países sendo, no entanto, antroponótica na Índia. Em 1571, Pedro Pizarro relatou dizimação de peruanos por uma doença que desfigurava o nariz, mais tarde caracterizada como leishmaniose³⁴.

Atualmente, estima-se que a cada quatro anos ocorram de 1 a 1,5 milhão de novos casos da leishmaniose cutânea e cerca de 500 mil novos casos da leishmaniose visceral nas áreas endêmicas. Além disso, tem ocorrido um aumento significativo de novos casos fora de áreas endêmicas, devido às diferentes formas de deslocamentos das populações relacionadas às áreas endêmicas como, por

exemplo, turismo e imigração³⁵. Estima-se que existam mais de 12 milhões de pessoas infectadas pela leishmaniose em todo o mundo. Além disso, a cada ano surgem cerca de 2 milhões de novos casos e que 350 milhões de pessoas são consideradas em risco de adquirirem a infecção³⁶. Anualmente são registradas cerca de 70 mil mortes causadas pela leishmaniose em todo o mundo³⁷. A leishmaniose cutânea é endêmica em pelo menos 82 países, sendo considerada o principal problema de saúde pública³⁸.

Diferentes espécies de protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* podem causar duas diferentes formas de infecção para a doença. A primeira forma, chamada de tegumentar pode ser dividida em cutânea, mucocutânea e cutânea difusa, que geram feridas na pele em diferentes graus de intensidade e relacionadas ao estado imunológico do hospedeiro. A segunda forma, chamada de visceral, é considerada uma forma mais grave da doença que pode afetar diferentes órgãos internos no hospedeiro, como fígado, baço e medula óssea. Além dos seres humanos, animais como cachorros, marsupiais e roedores também são susceptíveis à infecção, sendo considerados importantes hospedeiros que auxiliam na disseminação da parasitose³⁹.

Diante dos dados supracitados, uma maior atenção tem sido voltada para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas que atuem contra a leishmaniose. Além de ser uma doença incapacitante e socioeconomicamente importante, a leishmaniose tem se tornado um modelo de infecções cutâneas causadas por parasitas e os estudos envolvendo esta parasitose contribuem para uma melhor compreensão das interações entre pele e parasita⁴⁰.

Na leishmaniose tegumentar, a manifestação clínica inicial caracteriza-se por uma pápula eritematosa, única ou múltipla, que evolui para uma ferida ulcerosa com borda elevada, contorno irregular, granulações recobertas ou não por exsudato purulento. Em cerca de 5% dos pacientes podem ocorrer envolvimento e comprometimento da mucosa nasal, palato, faringe, laringe e cordas vocais⁴¹.

A leishmaniose visceral apresenta-se clinicamente como uma doença crônica, caracterizada pela ocorrência de febre de longa duração e irregular, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, além de emagrecimento, edema e debilidade progressiva, o que pode levar a caquexia e óbito⁴². Nos últimos anos a

letalidade da leishmaniose visceral vem aumentando, sendo que em 2003 há registros de uma taxa de 6,7% de óbitos, subindo para 8,4% em 2004⁴³.

O diagnóstico inicial da doença é normalmente dado com base na avaliação dos sintomas e histórico do paciente. O problema deste diagnóstico inicial é a semelhança das manifestações clínicas da leishmaniose visceral com outras doenças como patologias linfoproliferativas e esquistossomose mansônica. O diagnóstico laboratorial é feito por ensaios sorológicos e exame parasitológico. Dentre os ensaios sorológicos, destaca-se o ensaio imunoadsorvente e o de imunofluorescência indireta. Já no exame parasitológico o material obtido por punção no órgão (leishmaniose visceral) ou raspagem da ferida (leishmaniose tegumentar) é examinado em lâminas para investigação da presença de amastigotas, podendo também ser inoculado em culturas ou animais. Pode-se também, utilizar como auxílio ao diagnóstico, a análise do hemograma e dosagem de proteínas. Dependendo da forma clínica, observa-se uma diminuição de hemácias, leucopenia com linfocitose e plaquetopenia. Observa-se também uma inversão da relação albumina/globulina⁴⁴.

2.4 Arsenal Terapêutico disponível

Em 1912, Vianna introduziu no Brasil o uso de antimoniais trivalentes para o tratamento da leishmaniose cutânea e mucocutânea. Já em 1915, na Itália, seu uso foi introduzido para o tratamento da leishmaniose visceral. Em 1922 a uréia estibamina foi introduzida como o primeiro de uma série de fármacos antimoniais pentavalentes, que permanecem como base do tratamento de todas as formas de leishmaniose. Devido à escassez de testes clínicos e possibilidade de toxicidade, a dose terapêutica determinada era diferente dentre os vários países. Com isto, nas décadas de 70 e 80 em cidades do Quênia e Índia, pacientes com leishmaniose visceral deixaram de responder ao tratamento e isolados do parasita mostraram resistência frente aos antimoniais. A necessidade de maior segurança terapêutica levou à busca de novos fármacos, levando ao desenvolvimento da anfotericina B (**1**, Figura 3) na forma lipossomal em 1996, da miltefosina (**3**, Figura 3) em 2004 e paromomicina em 2006 para o tratamento da leishmaniose visceral⁴⁵.

Por muito tempo, os fármacos antimoniais e a anfotericina B (**1**, Figura 3) foram largamente utilizados para o tratamento da leishmaniose. No entanto, o aumento da resistência e a alta toxicidade destes fármacos tem comprometido seu uso. Isto torna urgente a busca e prioridade na pesquisa por novas alternativas de tratamento para esta parasitose⁴⁶⁻⁴⁸.

Durante 75 anos, o estibogluconato de sódio (**2**, Figura 3), comercialmente conhecido como Pentostam[®], e o antimoniato de meglumina (**5**, Figura 3), comercialmente conhecido como Glucantime[®], foram utilizados como os fármacos de primeira linha no tratamento da leishmaniose. Ainda hoje representam um papel importante na terapêutica contra esta doença, porém a resistência a estes medicamentos tem se tornado muito alta em alguns países^{49, 50}.

A miltefosina (**3**, Figura 3) foi o primeiro medicamento oral contra leishmaniose. Seu uso foi recomendado em casos de leishmaniose cutânea difusa e cutânea causadas por *L. braziliensis*^{51,52}. Porém, estudos mostraram que este medicamento foi ineficaz contra *L. major*, *L. braziliensis* e *L. tropica*, que também é resistente aos antimoniais. Neste mesmo estudo, foi mostrado que a paromomicina foi eficiente contra leishmaniose cutânea causada por *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* e *L. panamensis*⁵³.

Outros medicamentos largamente utilizados na terapia como o isotionato de pentamidina (**4**, Figura 3) e anfotericina B (**1**, Figura 3) tem tido seu uso restrito devido aos altos custos e à toxicidade^{54,55}.

Portanto, o arsenal terapêutico ainda é muito restrito, sendo que os antimoniais pentavalentes permanecem como medicamentos de escolha. O Ministério da Saúde do Brasil recomenda uma dose de 10 a 20 mg/Kg/dia de glucantime intravenoso ou intramuscular, durante 20 dias como tratamento da forma cutânea. Após três meses, não havendo cicatrização completa, o tratamento deve ser repetido por mais 30 dias, antes da adoção de um medicamento de segunda escolha. A terapia com antimoniais gera uma vasta gama de efeitos colaterais, como por exemplo mialgia, náuseas, vômitos, febre, cefaléia, hepatite, pancreatite, insuficiência renal aguda, alterações isquêmicas e outros.

A anfotericina B (**1**, Figura 3) é o medicamento de segunda escolha, sendo o isotionato de pentamidina (**4**, Figura 3) uma terceira alternativa. O grande desafio das pesquisas por novos candidatos a fármacos contra leishmaniose é encontrar

uma opção tão eficaz quanto os antimoniais, mas que seja de fácil administração e baixa toxicidade⁵⁶.

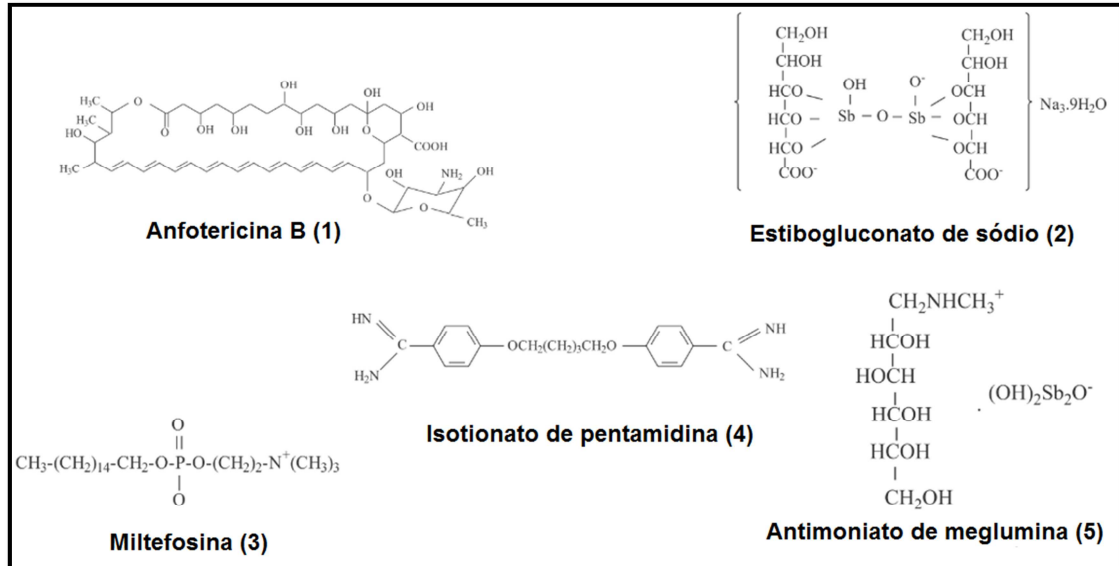


Figura 3: Arsenal terapêutico empregado no tratamento da leishmaniose

2.5 Compostos naturais, sintéticos e semissintéticos com atividade leishmanicida

A piperina (6, Figura 4) é um alcaloide encontrado em espécies do gênero *Piper*, como por exemplo, *Piper nigrum*, na qual representa o principal metabólito secundário⁵⁷. Este alcaloide está presente principalmente nos frutos desta planta, podendo ser extraído com rendimento de 3–7%⁵⁸. Algumas importantes atividades biológicas relatadas para a piperina incluem atividade nematocida⁵⁹, antidiarreica⁶⁰, hepatoprotetora⁶¹, anti-inflamatória e analgésica⁶². Além destas, existem relatos de atividades antioxidante e o uso no tratamento de Alzheimer^{63,64}. Existem ainda relatos na literatura de outras diversas atividades biológicas como antiepiléptica⁶⁵, aumento na biodisponibilidade de fármacos quando em co-administração⁶⁶ e antiparasitária⁶⁷. Nos últimos anos, a piperina e seus derivados tem sido estudados e avaliados quanto às suas atividades inibitórias contra as formas epimastigotas e amastigota de *Trypanosoma cruzi*⁶⁸ e promastigota de *Leishmania donovani*, onde através de estudos *in vitro* verificou-se que atividade da piperina, contra cepas desta espécie, foi comparável à atividade do isotionato de pentamidina (4, Figura 3), fármaco utilizado no tratamento da leishmaniose¹⁰. Outros alcalóides amídicos

naturais (7-12, Figura 4) também podem ser encontrados em espécies do gênero *Piper*^{69,70}.

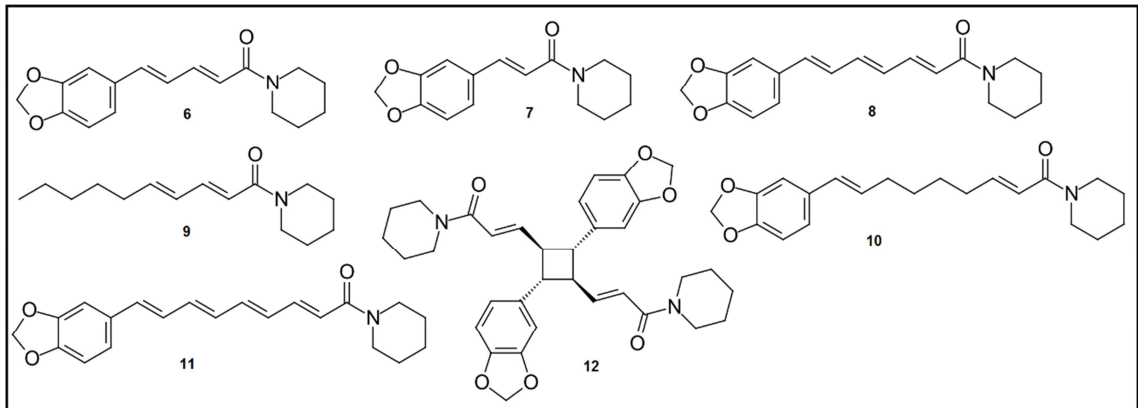


Figura 4: Estruturas químicas da piperina e outras amidas naturais isoladas de *Piper* sp.^{69, 70}

Tem sido demonstrado que ésteres de aminoácidos e amidas possuem atividade inibitória contra formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. mexicana*, tanto intracelular quanto isoladas. Estas amastigotas replicam-se dentro de fagolisossomos de macrófagos, onde sabe-se que ésteres de aminoácidos acumulam-se. O pH ácido destas organelas leva à ionização destes aminoácidos, que acumulados causam ruptura osmótica dos fagolisossomos, levando à morte das células infectadas. Os ésteres de aminoácidos são hidrolisados por enzimas do parasita no interior das amastigotas, levando ao acúmulo de aminoácidos livres matando o parasita⁷¹.

Singh e colaboradores⁷² realizaram a síntese de uma série de conjugados (13-27, Figura 5) partindo-se da hidrólise da piperina (6, Figura 4) e consequente obtenção do ácido carboxílico que foi reagido com diferentes aminoácidos. Estes análogos sintéticos foram avaliados frente a amastigotas e promastigotas de *L. donovani*. Todos os compostos sintetizados apresentaram atividade melhor do que o protótipo natural (6, Figura 4). A substância mais ativa da série foi o éster metil piperóil-valina (15, Figura 5), pertencente à série de conjugados ésteres metil-piperóílicos, com $IC_{50} = 75 \mu M$ contra amastigotas.

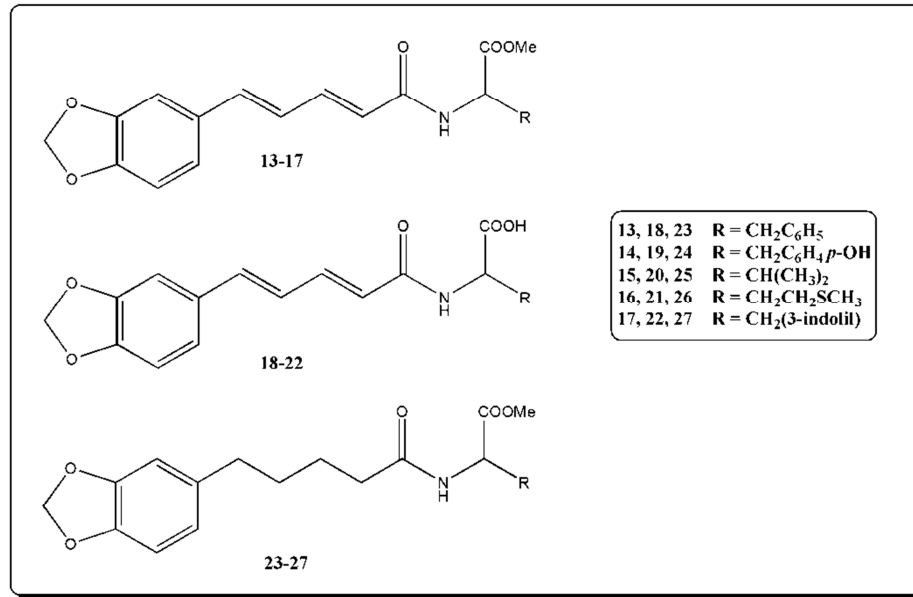


Figura 5: Conjugados piperoil aminoácidos 13-27

A avaliação de duas amidas (**28** e **29**, Figura 6) isoladas do extrato das folhas de *Piper amalago* contra formas amastigota e promastigota de *L. amazonenses*, além de um derivado obtido por hidrogenação (**30**, Figura 6) de um destes metabólitos e sete amidas sintéticas (**31-37**, Figura 6), revelou que os compostos amídicos naturais, foram os mais ativos $IC_{50} = 15-20 \mu M$, inibindo as duas formas do parasita. O derivado hidrogenado apresentou atividade similar contra amastigotas, sendo no entanto, pouco ativo contra promastigotas. Dentre as amidas sintéticas, a amida **32** demonstrou $IC_{50} = 20 \mu M$ e $IC_{50} = 25 \mu M$ contra amastigotas e promastigotas, respectivamente. As demais substâncias apresentaram atividade baixa, porém a amida **33** se mostrou seletiva contra amastigotas com $IC_{50} = 27 \mu M$ para estas formas evolutivas. Este estudo evidenciou a atividade antileishmania de *P. amalago*, o que pode ser útil no desenvolvimento de novos derivados ativos contra este parasita⁷³.

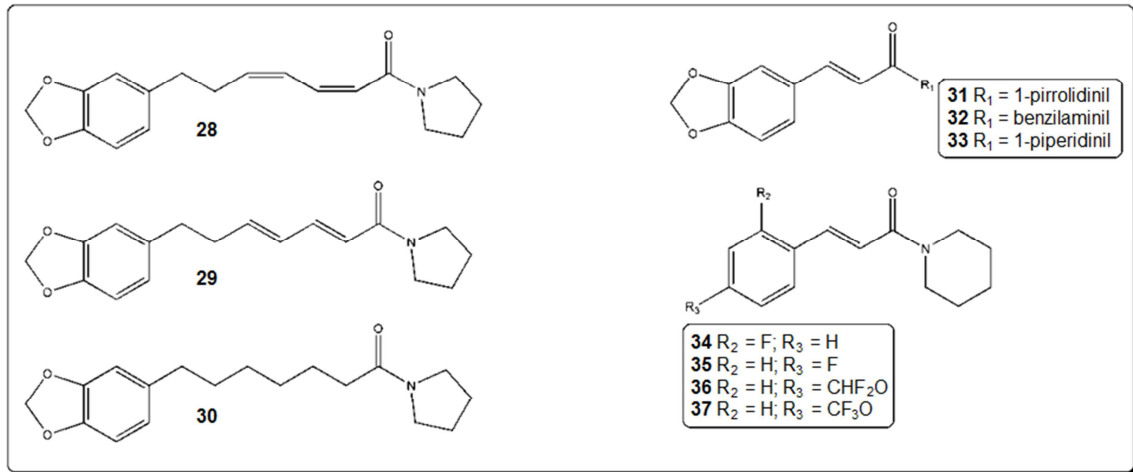


Figura 6: Estruturas químicas de amidas naturais (**28** e **29**) de *Piper amalago*, derivado hidrogenado (**30**) e análogos sintéticos (**31-37**)

O grupo dos flavonoides são compostos de grande ocorrência nas plantas, sendo as chalconas exemplos de flavonoides de cadeia aberta que possuem dois anéis aromáticos ligados a um grupo carbonílico (**38**, Figura 7) e dois átomos de carbono α,β -insaturados^{74,75}. As chalconas são compostos naturais considerados multialvo comparados a outros compostos descritos na literatura⁷⁶. Chalconas naturais, sintéticas e semissintéticas apresentam diferentes perfis farmacológicos, tais como atividades anti-inflamatória⁷⁷, tripanocida⁷⁸, antibacteriana⁷⁹, antiviral⁸⁰, antitumoral⁸¹, antimalária⁸² e antileishmania⁸³⁻⁸⁵.

A metodologia mais simples e comum para a síntese das chalconas é a condensação de Claisen-Schmidt, onde ocorre a reação entre um derivado da acetofenona com aldeídos aromáticos apropriados, usando metanol ou etanol como solvente e hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio como catalisador. A reação inicia-se com a desprotonação da cetona, onde o catalisador básico remove o hidrogênio alfa ácido da molécula para formar um carbânion que é estabilizado por ressonância. Ocorre o ataque nucleofílico do carbânion ao carbono carbonílico do aldeído, formando um íon alcóxido. Esse íon alcóxido é protonado por um dos hidrogênios da água gerando o produto da condensação e regenerando o catalisador básico. A formação da enona conjugada ocorre por desidratação quando um hidrogênio ácido é abstraído da posição alfa para resultar em um íon enolato, que elimina o grupo de saída $-OH$, formando a chalcona⁸⁶.

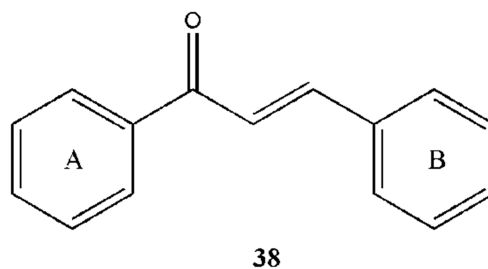
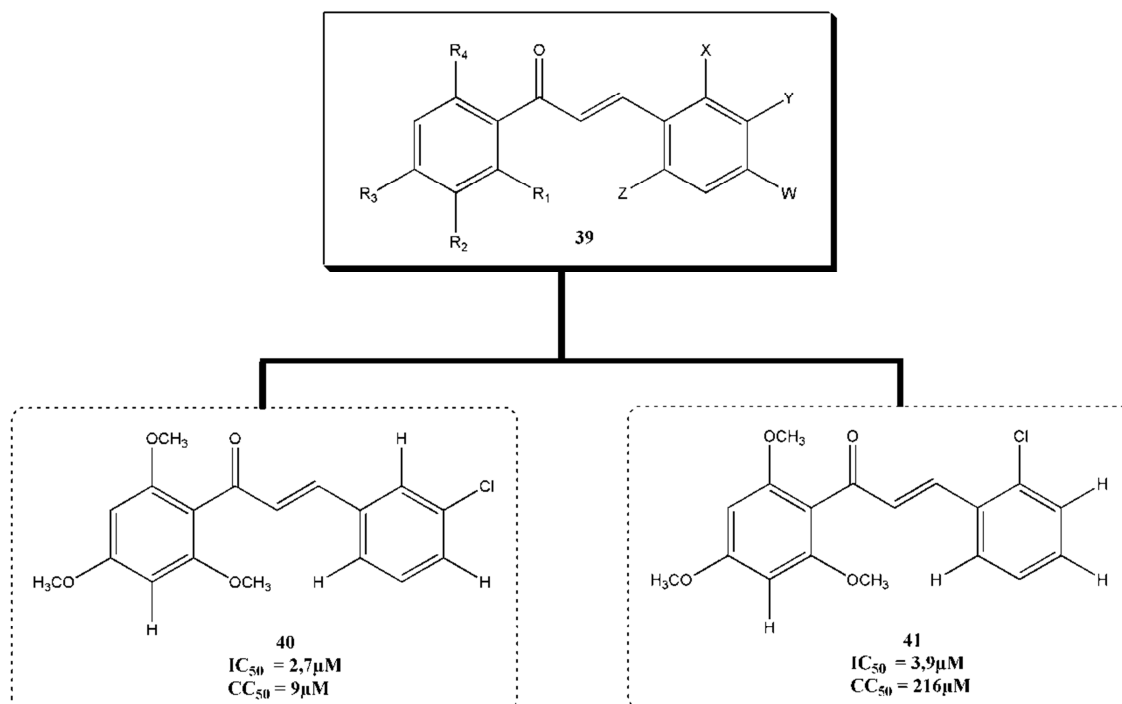


Figura 7: Esqueleto geral de uma chalcona

De acordo com Bello e colaboradores⁸⁷, derivados trimetoxi-chalcônicos foram avaliados quanto à atividade contra promastigotas de *L. braziliensis*. Os autores sintetizaram uma variedade de derivados chalcônicos com substituições em diferentes posições dos dois anéis benzênicos (**39**, Esquema 1), sendo que o derivado **41** apresentou resultados promissores com $IC_{50} = 3,9\mu M$ e bom perfil toxicológico *in silico* e *in vitro* com valor de $CC_{50} = 216 \mu M$, no entanto o derivado mais ativo foi **40** com $IC_{50} = 2,7\mu M$ e $CC_{50} = 9\mu M$, mostrando-se muito mais citotóxico. Além disso, o derivado **41** apresentou propriedades físico-químicas teóricas melhores que o isotionato de pentamidina (**4**, Figura 3) e anfotericina B (**1**, Figura 3), respeitando também a regra dos 5 de Lipinski, o que o torna um novo candidato a protótipo de fármaco promissor para o tratamento da leishmaniose.



Esquema 1: Obtenção dos derivados chalcônicos **40** e **41**

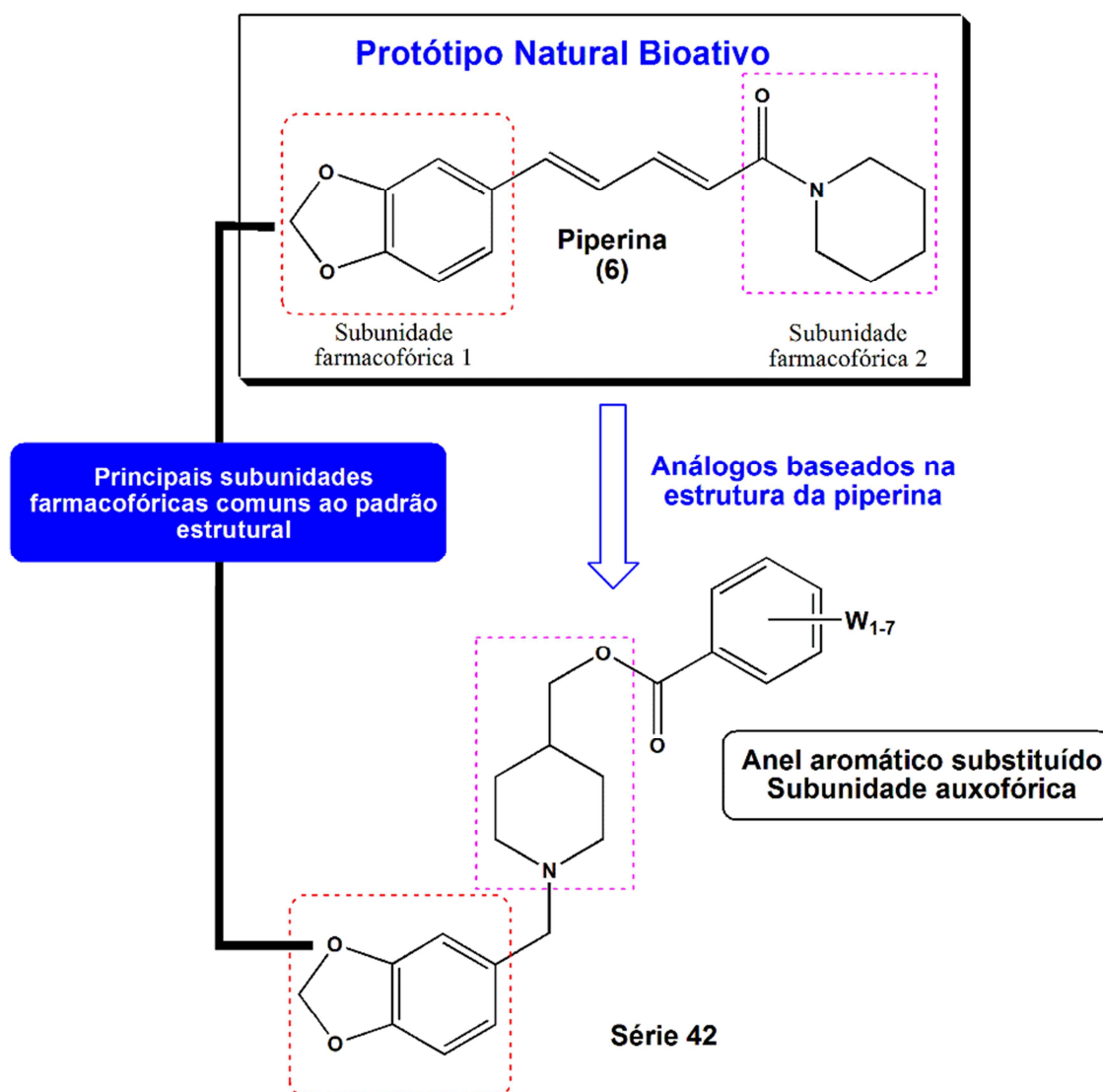
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Generalidades

- Os reagentes e solventes utilizados na rota sintética foram obtidos comercialmente e de grau analítico, adquiridos de empresas largamente conhecidas como Sigma-Aldrich[®], Merck[®] e Acros[®].
- Para o acompanhamento das reações foi utilizada cromatografia em camada delgada (CCD), empregando-se placas comerciais de alumina ou de gel de sílica 60 G Merck[®] com espessuras entre 0,20 - 0,25mm.
- A purificação das substâncias finais e intermediários de síntese foi realizada por cromatografia em coluna (CC) utilizando gel de sílica 60 [70 - 230 Mesh (0,063-0,200nm) ASTM], marca Merck[®], com empacotamento em colunas de vidro ou, de maneira análoga, gel de alumina neutra (Sigma-Aldrich[®]). Além de CC também foi empregada a purificação em placas preparativas utilizando-se gel de sílica 60, da marca Macherey-Nagel, reveladas no UV ($\lambda = 254\text{nm}$).
- Para a revelação das placas cromatográficas foi utilizada luz ultravioleta ($\lambda = 254\text{nm}$ ou 365nm), além de vapor de iodo sublimado e reagente de cloroiodoplatinato.
- As análises na região do infravermelho (IV) foram realizadas em Espectrômetro Shimadzu modelo Presting-21, localizado no Laboratório Interdisciplinar de Química (LabiQ) da UNIFAL-MG. As análises foram feitas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e cloreto de sódio (NaCl) e a unidade empregada foi número de onda (cm^{-1}).
- As análises por espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram realizadas na USP-Ribeirão Preto e UFSCar. A caracterização por RMN foi realizada em espectrofotômetro Bruker AVANCE III e a espectrometria de massas em espectrômetro Bruker micrOTOF-Q II.

3.2 Rota sintética para os derivados ésteres e carbamatos (série 42, éster 48 e série 50) planejados como novos candidatos a protótipos leishmanicidas

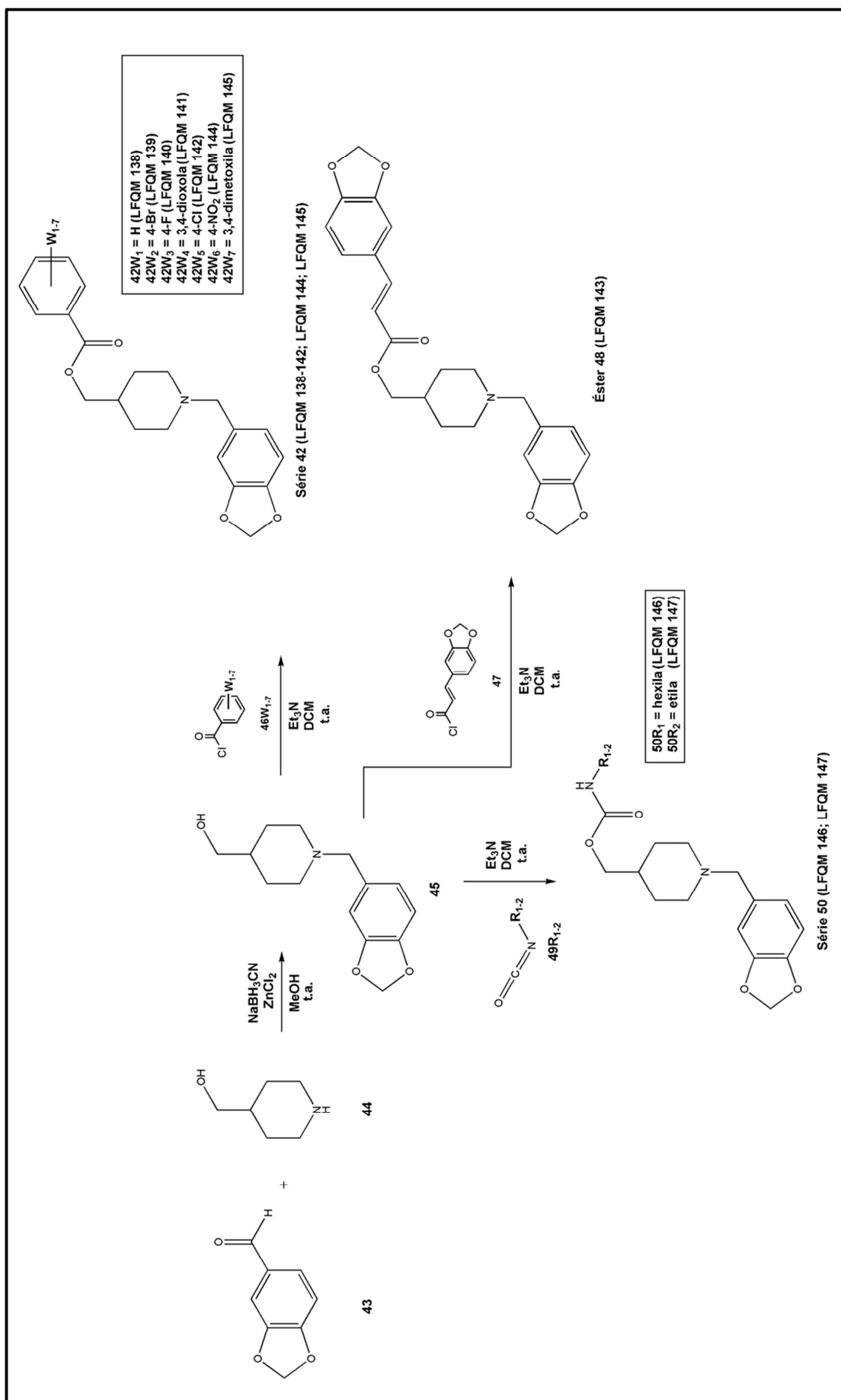
O objetivo central deste trabalho visou a síntese e avaliação biológica *in vitro* de uma série de ésteres piperidino-benzodioxólicos planejados como novos candidatos a fármacos leishmanicidas com base na estrutura química da piperina **6** (Esquema 2). Esta série inicial planejada foi ampliada com a síntese adicional de um éster e dois compostos carbamatos (Esquema 3).



Esquema 2. Planejamento estrutural dos compostos piperidino-benzodioxólicos (série 42), utilizando a piperina (**6**) como modelo estrutural

A rota sintética para obtenção dos derivados ésteres e carbamatos foi constituída de 2 etapas sintéticas em sequência (Esquema 3). Partindo-se do piperonal (**43**) e 4-piperidino-metanol (**44**) comerciais, foi realizada uma reação de aminação redutiva, catalisada por ZnCl_2 e na presença de cianoboroidreto de sódio (NaBH_3CN) em meio de metanol seco para obter-se o álcool benzil-piperidínico **45**. Numa etapa subsequente, o intermediário **45** foi submetido à reação de esterificação com diferentes cloretos de acila (**46W₁₋₇**) para gerar os ésteres-alvo **42W₁₋₇** (**LFQM 138-142**; **LFQM 144**; **LFQM 145**). De forma análoga, o derivado éster **48** (**LFQM 143**) do ácido (*E*)-3,4-metilenodioxo-cinâmico foi obtido por reação de **45** com o cloreto de ácido **47**, na presença de trietilamina (Et_3N) em meio de CH_2Cl_2 seco.

Os carbamatos **50R₁** e **50R₂** (**LFQM 146** e **LFQM 147**, respectivamente) foram obtidos por reação do álcool benzil-piperidínico, intermediário **45**, com isocianato de hexila e etila.



Esquema 3: Abordagem sintética para a obtenção dos derivados ésteres e carbamatos (série 42, éster 48 e série 50)

3.2.1 Reação de aminação reductiva entre o piperonal (**43**) e 4-piperidino-metanol (**44**) na presença de NaBH₃CN e ZnCl₂

O intermediário-chave **45** previsto na abordagem sintética proposta foi preparado por reação de aminação reductiva entre o piperonal (**43**) e 4-piperidino-metanol (**44**) comerciais, na presença de NaBH₃CN e ZnCl₂, em metanol seco, segundo as condições descritas Kim e colaboradores⁸⁸, com algumas modificações.

Procedimento para reação de obtenção do composto **45**:

Em um balão de 50 mL (balão A) foram adicionados o piperonal (**43**, 260,50 mg, 1,73 mmol) e 4-piperidino-metanol (**44**, 400,00 mg, 3,46 mmol, 2 eq.), seguidos de 2-3 mL de metanol seco sob agitação. Em outro balão de 50 mL (balão B), acrescentou-se NaBH₃CN (218,00 mg, 3,46 mmol, 2 eq.), ZnCl₂ (236,50 mg, 1,73 mmol, 1 eq.) e 2-3 mL de metanol seco. Para ambas as soluções o pH foi verificado e ajustado para 5, quando necessário, pela adição gota-a-gota de ácido acético glacial. Os balões foram vedados e mantidos sob atmosfera de N₂, sob agitação e temperatura ambiente por aproximadamente 90 minutos. A solução reacional do balão B foi então adicionada ao balão A, com auxílio de um funil de vidro. Novamente a atmosfera foi trocada por N₂, deixando-se reagir à temperatura ambiente e constante agitação por aproximadamente 36 horas. O acompanhamento da reação foi feito por CCD em alumina, revelando-se com reagente de iodocloroplatinato.

Terminada a reação, o pH do meio foi ajustado a 12 pela adição de solução aquosa de NaOH (20%, p/v) e o metanol foi evaporado sob pressão reduzida. Ao resíduo reacional, adicionou-se 20 mL de água destilada e extraiu-se com acetato de etila (4 x 30 mL). Os extratos orgânicos foram combinados, secos com MgSO₄ anidro, filtrados em papel filtro e o solvente foi retirado em rotaevaporador. O produto bruto foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando-se alumina como fase estacionária e acetato de etila como eluente para fornecer o álcool benzil-piperidínico **45** como um líquido incolor viscoso com rendimento de 95%.

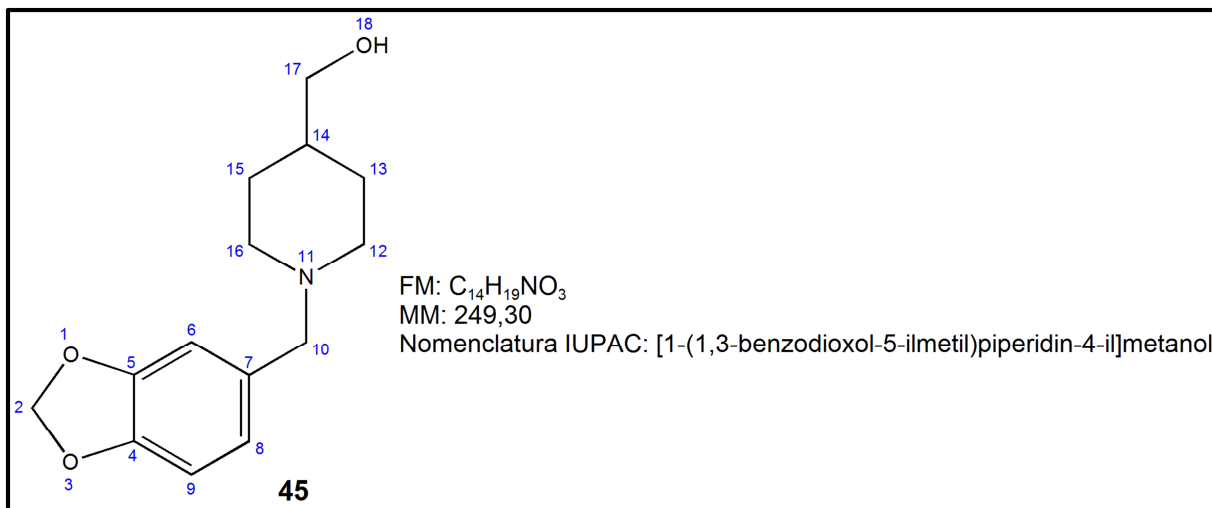


Figura 8: Estrutura química, fórmula molecular, massa molar e nomenclatura IUPAC do álcool benzil-piperidínico **45**

3.2.2 Reação de obtenção dos cloretos de acila por reação entre respectivos ácidos carboxílicos e cloreto de oxalila

As reações de esterificação para obtenção das substâncias-alvo foram realizadas entre o intermediário-chave **45** e cloretos de acila (**46W₁₋₇** e **47**, Esquema 3) adequadamente substituídos, obtidos a partir dos respectivos ácidos carboxílicos, segundo metodologia descrita por Ergün e colaboradores⁸⁹, com algumas modificações.

Procedimento para reação de obtenção dos cloretos de acila:

Em um balão de 50 mL foram dissolvidos 2 mmol do ácido carboxílico em 3-5 mL de CH₂Cl₂ previamente seco, adicionando-se em seguida 10 mmol de cloreto de oxalila recém-destilado. A mistura reacional foi mantida sob agitação constante, temperatura ambiente e atmosfera de N₂, seguido da adição de 2-3 gotas de DMF seco, deixando-se reagir por 30-45 minutos. Após a análise por CCD indicar o final da reação, o solvente foi evaporado e o resíduo reacional foi seco em linha de auto vácuo. O produto bruto foi utilizado, sem prévia purificação na etapa subsequente de esterificação.

3.2.3 Reação de obtenção dos ésteres-alvo por reação do álcool **45** com cloretos de acila

Os ésteres-alvo **42W₁₋₇** (LFQM 138-142; LFQM 144; LFQM 145) e **48** (LFQM 143) foram obtidos por reações de esterificação entre o álcool benzil-piperidínico **45** e diferentes cloretos de acila (**46W₁₋₇** e **47**), previamente preparados a partir dos respectivos ácidos carboxílicos substituídos, conforme descrito na literatura⁸⁹, com algumas modificações.

Procedimento para reação de obtenção da série **42** e éster **48**:

Em um balão de 50mL foram dissolvidos o cloreto de acila (2 eq.) em 3-5 mL de CH₂Cl₂ seco sob agitação. O balão foi devidamente vedado, sua atmosfera interna foi substituída por N₂ e deixou-se sob agitação e temperatura ambiente por cerca de 5 minutos. Adicionou-se então, 1,00 mmol do composto **45** dissolvido em 1-2 mL de CH₂Cl₂ seco, seguido de 2,50 mmol de trietilamina, deixando-se reagir à temperatura ambiente e agitação por 12-24 horas. Após a análise por CCD indicar o final da reação, a mistura reacional foi filtrada em papel filtro, lavou-se com CH₂Cl₂ (3 x 5 mL) e o solvente foi evaporado. O produto bruto foi redissolvido em 2-3 mL de CH₂Cl₂ e purificado em CC de gel de sílica ou placas preparativas utilizando como eluente misturas de AcOEt/CH₂Cl₂ em gradiente de polaridade. Os ésteres-alvo foram obtidos com rendimentos de 35-63%.

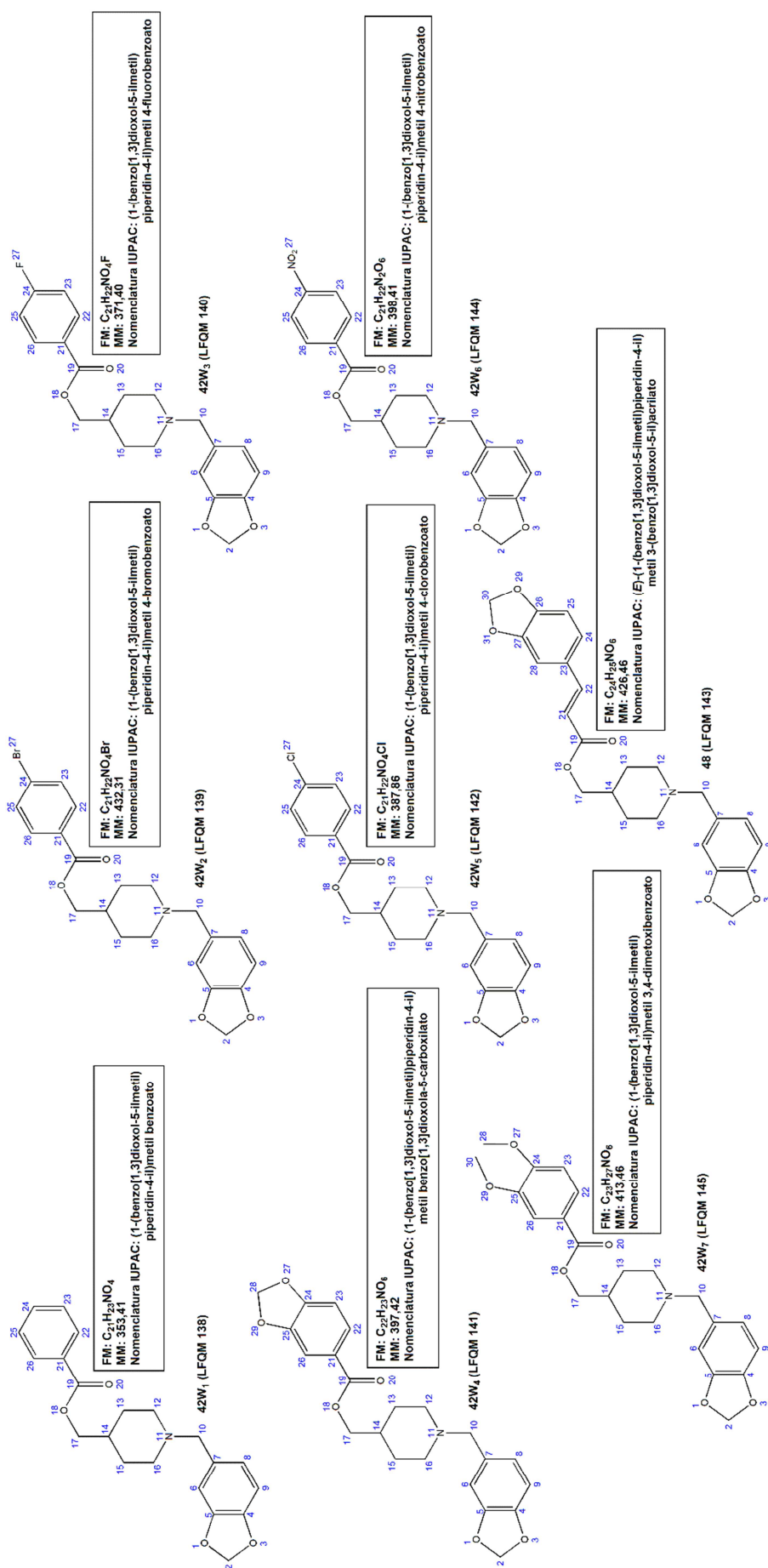


Figura 9: Estrutura química, fórmula molecular, massa molar e nomenclatura IUPAC dos ésteres-alvo 42W₁₋₇ e 48

3.2.4 Rota sintética para os derivados carbamatos (série 50) planejados como novos candidatos a protótipos leishmanicidas

Para ampliar a série de moléculas-alvo planejadas a partir da estrutura da piperina (**6**, Figura 4) e avaliar a eventual contribuição bioisostérica de uma função carbamato na atividade leishmanicida, dois derivados carbamatos foram também sintetizados. Estes derivados também poderiam ser interessantes, considerando sua possível maior estabilidade frente ao sistema enzimático do microrganismo em estudo, comparados aos análogos ésteres, que são mais facilmente hidrolisáveis. A preparação dos carbamatos **50R₁** (**LFQM 146**) e **50R₂** (**LFQM 147**) foi realizada em duas etapas sintéticas, a partir da reação do intermediário-chave **45** com os respectivos isocianatos comerciais (**49R₁** e **49R₂**, Esquema 3).

3.2.4.1 Reação de obtenção dos carbamatos-alvo a partir do álcool benzil-piperidínico **45**

Os carbamatos-alvo **50R₁** e **50R₂** foram obtidos por reação do intermediário-chave **45** com os isocianatos de hexila e etila (**49R₁** e **49R₂**, respectivamente, Esquema 3), conforme metodologia descrita por Roy e colaboradores⁹⁰, com algumas modificações.

Procedimento para reação de obtenção dos carbamatos de hexila (**50R₁**) e etila (**50R₂**):

Em um balão de 50mL, foi dissolvido 1,00 mmol do álcool **45** em 3-5 mL de CH₂Cl₂ recém destilado, sob agitação. O balão foi devidamente vedado e mantido sob atmosfera de N₂, adicionando-se em seguida 2,00 mmol do respectivo isocianato solubilizado em 1-2 mL de CH₂Cl₂ recém destilado. Na sequência, adicionou-se 2,00 mmol de trietilamina e deixou-se reagir à temperatura ambiente e constante agitação por 24-72 horas. A reação foi acompanhada por CCD, até consumo total do material de partida, quando o solvente foi evaporado em evaporador rotatório. O produto bruto foi purificado em CC utilizando gel de sílica como fase estacionária e misturas de AcOEt/CH₂Cl₂ em gradiente de polaridade. Os dois carbamatos **50R₁** e **50R₂** foram obtidos como sólidos, com rendimento de 85%

e 63%, respectivamente. Considerando o rendimento de 95% na obtenção do intermediário **45**, os carbamatos foram obtidos em rendimentos globais de 90% e 79%, respectivamente.

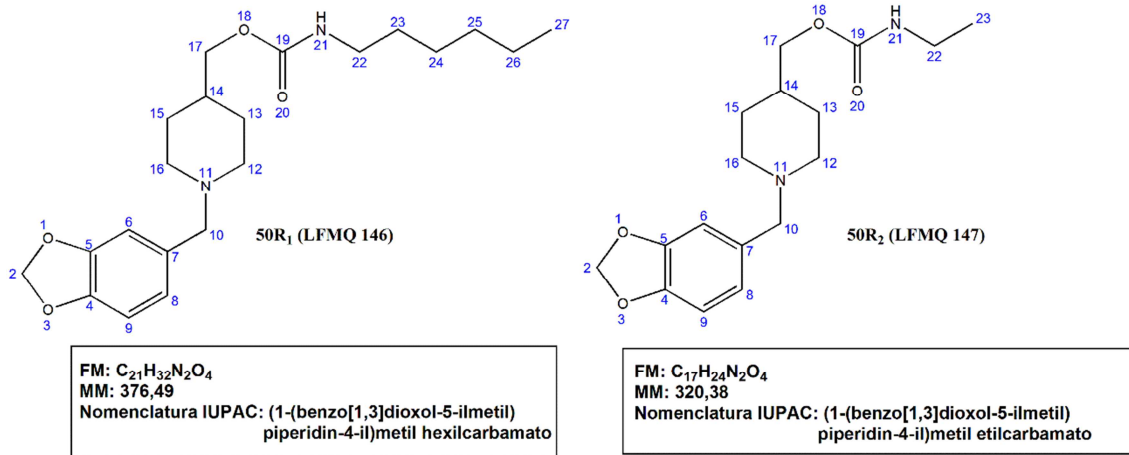


Figura 10: Estrutura química, fórmula molecular, massa molar e nomenclatura IUPAC dos carbamatos alvo

3.3 Avaliação da atividade *in vitro* contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*

























A avaliação da atividade leishmanicida foi realizada em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular da UNIFAL-MG, sob coordenação do Prof. Marcos José Marques.




Para a avaliação preliminar da atividade leishmanicida *in vitro* foram utilizadas as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Estas formas evolutivas foram mantidas em meio Schneider, suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa a 25°C. A execução dos testes foi feita transferindo-se promastigotas à razão de 1x10⁶ células/mL para placas de 24 poços e então adicionados os compostos em análise previamente solubilizados em DMSO (SIGMA®).

As concentrações dos compostos em análises utilizadas foram 0,10µg/mL; 1,00µg/mL; 5,00µg/mL; 10,00µg/mL; 20,00µg/mL e 40,00µg/mL. O DMSO foi usado como controle e Anfotericina B (SIGMA®) foi utilizada como medicamento de referência. Após 72 horas de incubação, os protozoários foram contados em câmara de Neubauer, os ensaios realizados em triplicata e em três ocasiões diferentes. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao

controle. As concentrações de inibição de 50% do crescimento (IC_{50-PRO}) de promastigotas foram determinadas por análise de regressão dos dados obtidos⁹¹.

O Esquema 4 a seguir mostra o esquema de pipetagem padronizado na execução dos testes biológicos *in vitro*.

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

-  Branco: promastigotas em meio de cultura
-  Controle: promastigotas + DMSO em meio de cultura
-  Teste: promastigotas + DMSO + compostos nas concentrações especificadas em meio de cultura

Esquema 4: Esquema dos testes leishmanicidas contra as formas promastigota de *L.amazonensis* em placas de 24 poços

3.4 Ensaio de viabilidade celular frente a monócitos humanos

A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT modificado com a utilização de monócitos humanos. Em microplacas de 96 poços foram adicionados, em cada poço, 90 μ L da suspensão celular ($2,4 \times 10^6$ células/mL) de monócitos humanos normais e 10 μ L de cada um dos compostos em diferentes concentrações. As microplacas foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 48 horas. Neste teste, as diferentes concentrações dos compostos utilizados foram 100; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95; 0,48; 0,24 e 0,06 μ g/mL. Após o período de incubação, a morfologia celular foi observada através da utilização de microscopia óptica. Então, foram adicionados 10 μ L do corante MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) na concentração de 5mg/mL e incubou-se novamente, nas mesmas condições empregadas anteriormente, por um período adicional de 4 horas. Após, foram adicionados 100 μ L de DMSO para a solubilização dos cristais de formazana. As placas foram agitadas por 5 minutos e a absorbância

de cada uma das amostras foi obtida utilizando-se leitor espectrofotométrico de microplacas em 560nm. O valor de absorbância obtido para as células controle, não tratadas, foi considerado como sendo 100% de viabilidade⁹². Os dados obtidos nas leituras foram analisados por regressão linear e expressos em valores de CC_{50} (concentração citotóxica para 50% das células) e CC_{90} (concentração citotóxica para 90% das células) em μM .

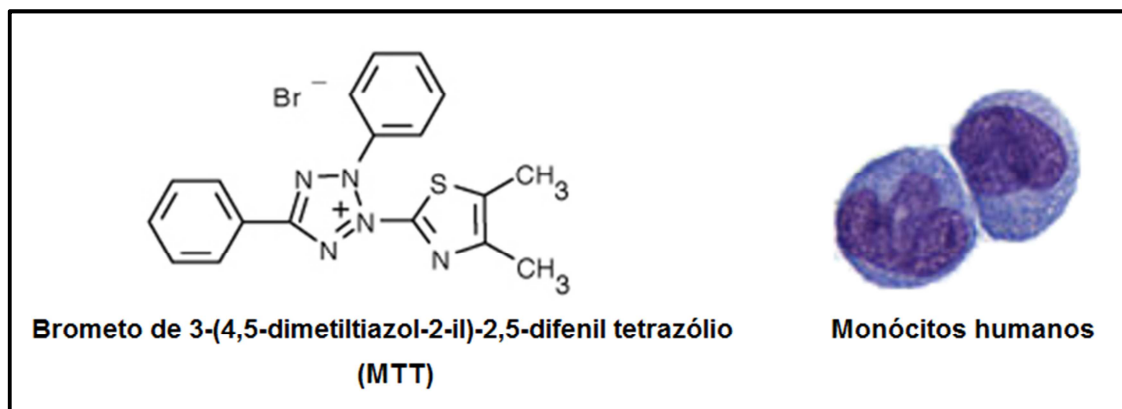
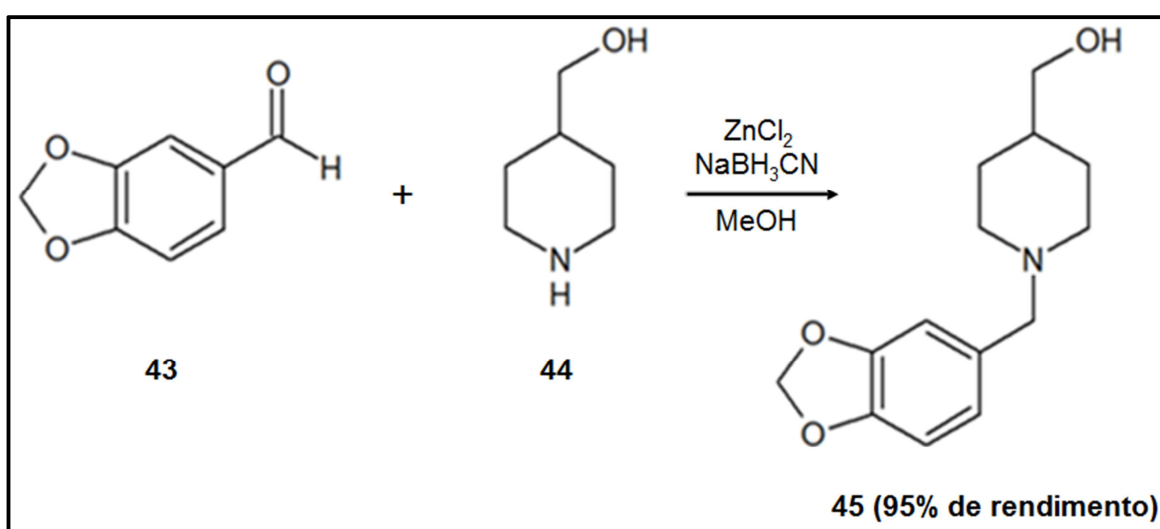


Figura 11: Estrutura química do MTT e monócitos humanos utilizados no ensaio de viabilidade celular

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Química

A execução da rota sintética proposta para obtenção das substâncias-alvo (série **42**, éster **48** e série **50**) envolveu a preparação de um intermediário-chave comum, o álcool benzil-piperidínico **45**. Este composto foi obtido por reação de aminação redutiva entre o piperonal (**43**) e 4-piperidino-metanol (**44**, Esquema 5), na forma de um líquido viscoso incolor, com rendimento de 95% após purificação.



Esquema 5: Esquema reacional para obtenção do composto **45**

Esta reação se caracteriza por uma primeira etapa de adição nucleofílica do 4-piperidino-metanol à carbonila do aldeído, gerando o intermediário hidróxi-amônio (**43-44a**, Figura 12) que ao sofrer desidratação leva à formação do ímíneo correspondente (**43-44c**, Figura 12). Numa etapa final, na presença do agente redutor (NaBH₃CN), ocorre redução do grupo ímíneo gerando o álcool benzil-piperidínico **45**.

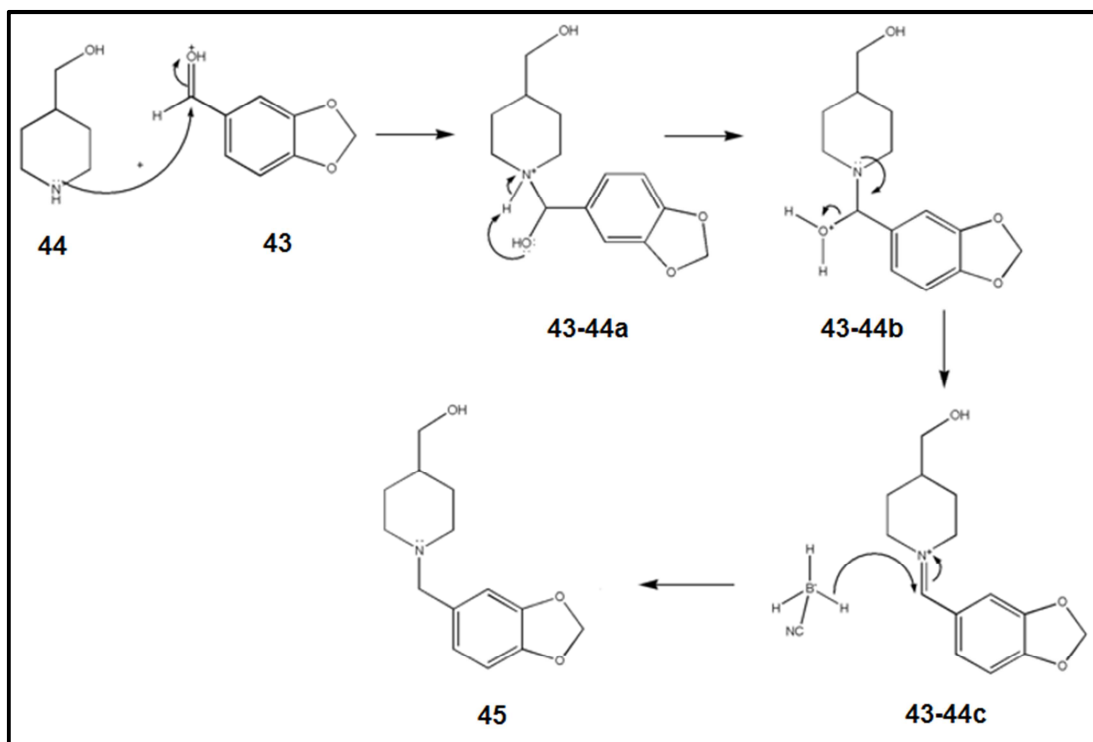


Figura 12: Mecanismo proposto para a reação de aminação redutiva para obtenção do composto **45**

A análise do álcool benzil-piperidínico **45** por espectrometria no IV (Figura 13) revelou a presença de bandas características em 3394 cm^{-1} relativas à deformação axial de $-\text{OH}$, bandas referentes a $-\text{CH}$ aromático (3070 cm^{-1} e 3032 cm^{-1}) e $-\text{CH}$ não aromático (2920 cm^{-1} e 2810 cm^{-1}) e de duas bandas fortes referentes à deformação axial do grupamento dioxola em 1039 cm^{-1} e 1244 cm^{-1} . Pode-se verificar também a presença de bandas de deformação axial de $-\text{CN}$ de amina e de $-\text{CO}$ do álcool entre 1300 e 1000 cm^{-1} , além da presença de bandas referentes à deformação axial de $\text{C}=\text{C}$ de aromático entre 1600 e 1465 cm^{-1} .

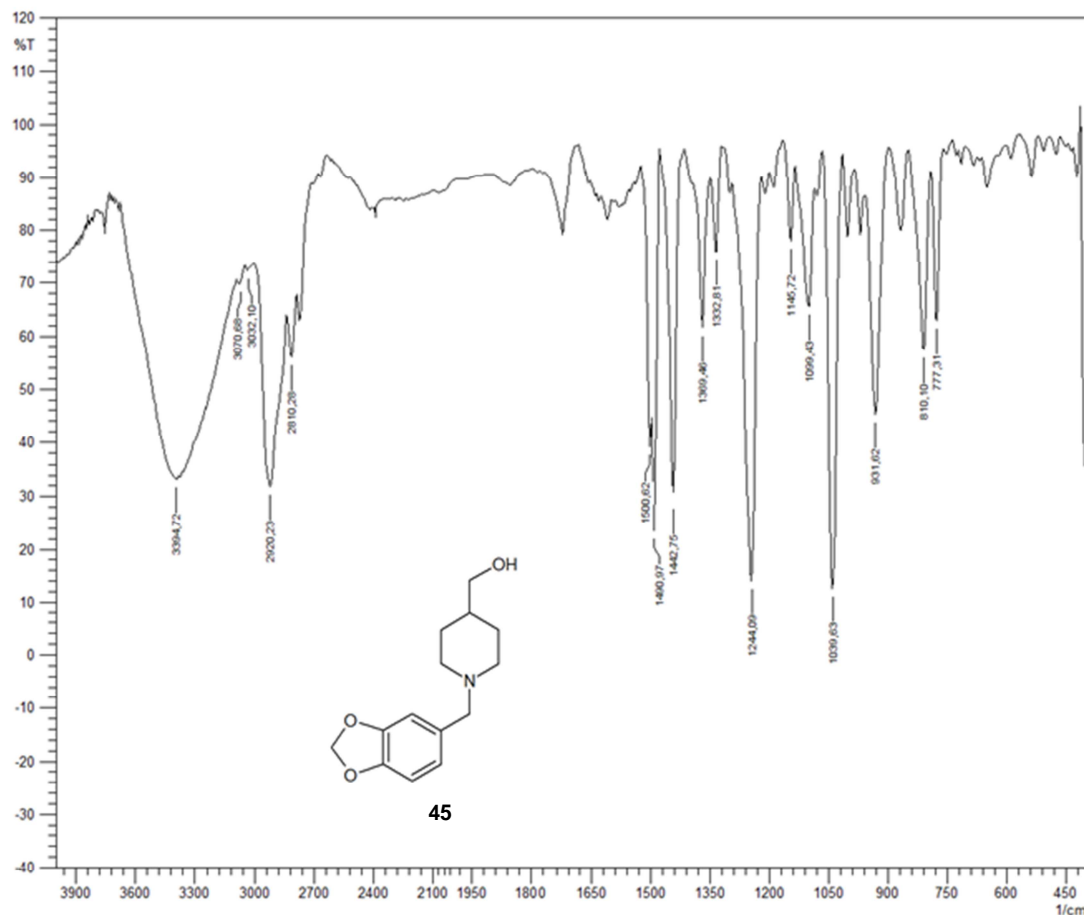


Figura 13: Espectro no IV (KBr) do composto **45**

No espectro de RMN de ^1H (Figura 14) foram observados 2 sinais mais desblindados, um simpleto em δ 6,79 referente a H-6 e um duplete centrado em δ 6,67 ($J = 1$ Hz), integrando para 2 hidrogênios, atribuído a H-8 e H-9. O simpleto em δ 5,86, integrando para 2H, foi atribuído ao grupo metileno do anel dioxola (H-2). Já o duplete centrado em δ 3,41 ($J = 10$ Hz) corresponde aos hidrogênios metilênicos (H-17) ligados ao grupo $-\text{OH}$, enquanto que o simpleto em δ 3,36 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-10). Os outros sinais do espectro são compatíveis com todos os hidrogênios do anel piperidínico, sendo o multiplete em δ 2,84 atribuído a H-12 e H-16 equatoriais, o duplo-triplete centrado em δ 1,89 relativo a H-12 e H-16 axiais, enquanto que o multiplete em δ 1,66 foi atribuído a H-13 e H-15 equatoriais e o multiplete em δ 1,22 a H-13 e H-15 axiais. Já o multiplete em δ 1,43 foi atribuído a H-14.

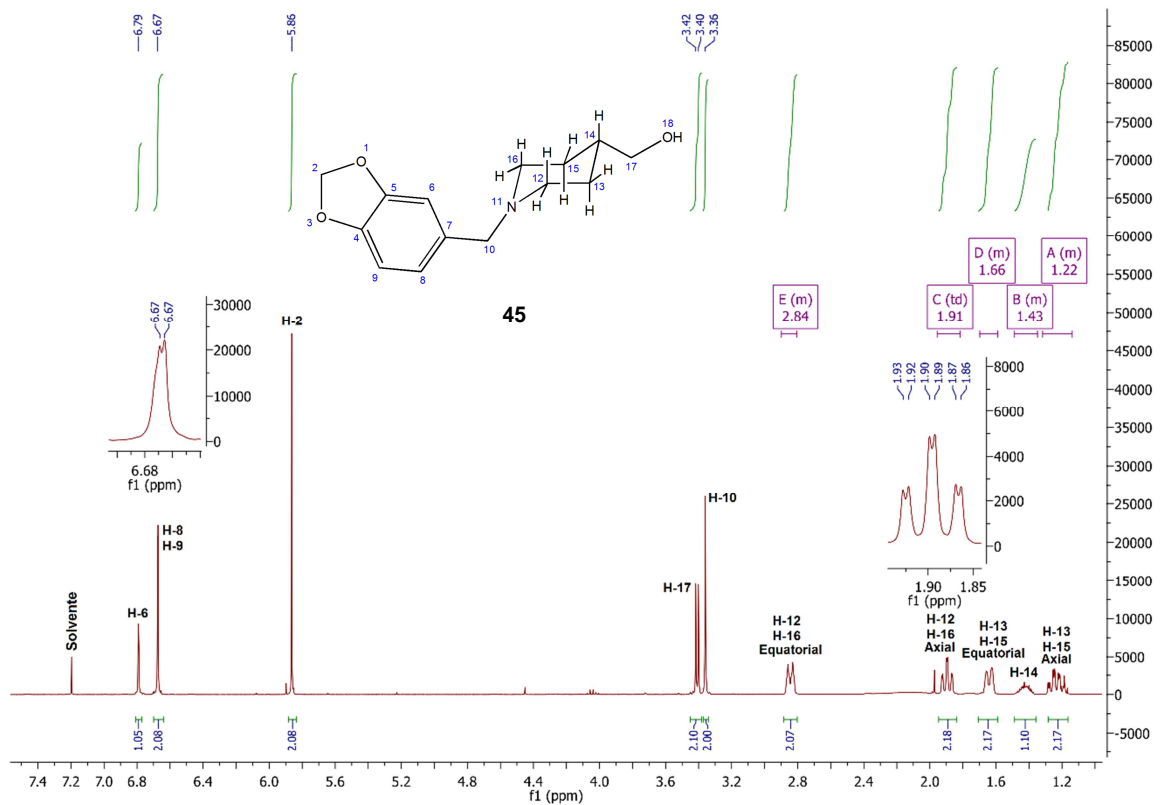


Figura 14: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **45**

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 15) pode-se verificar a presença de 12 sinais compatíveis com a estrutura do composto **45**. Verifica-se que os sinais de menor intensidade correspondem àqueles referentes a carbonos não hidrogenados uma vez que o mecanismo de relaxação spin-rede de ^{13}C é resultante das interações dipolo-dipolo com os hidrogênios ligados a ele. Dessa forma, aqueles carbonos que não estão ligados a átomos de hidrogênio possuem tempo de relaxação mais longo o que leva a sinais mais fracos⁹³.

Os 6 sinais mais desblindados foram atribuídos aos 6 carbonos aromáticos, sendo que em δ 147,59 e δ 146,63 foram identificados os sinais referentes aos carbonos aromáticos ligados ao grupo metilenodioxola (C-4 e C-5, respectivamente). Em δ 131,77 foi atribuído o carbono aromático ligado à subunidade metileno-piperidínica (C-7). Os três sinais restantes foram atribuídos aos 3 carbonos não substituídos do anel aromático em δ 122,45 (C-6), δ 109,70 (C-8) e δ 107,84 (C-9). Em δ 100,88 foi atribuído ao carbono metilênico (C-2) do grupo metilenodioxola, enquanto que em δ 67,76 foi identificado o sinal do grupo metileno-hidroxílico (C-17).

O sinal em δ 63,03 foi atribuído ao carbono metilênico-benzílico (C-10) e o sinal em δ 53,20 foi atribuído aos carbonos C-12 e C-16 do anel piperidínico, ligados diretamente ao átomo de nitrogênio. Por fim, o sinal em δ 38,46 foi atribuído a C-14 e em δ 28,60 aos carbonos metilênicos (C-13 e C-15).

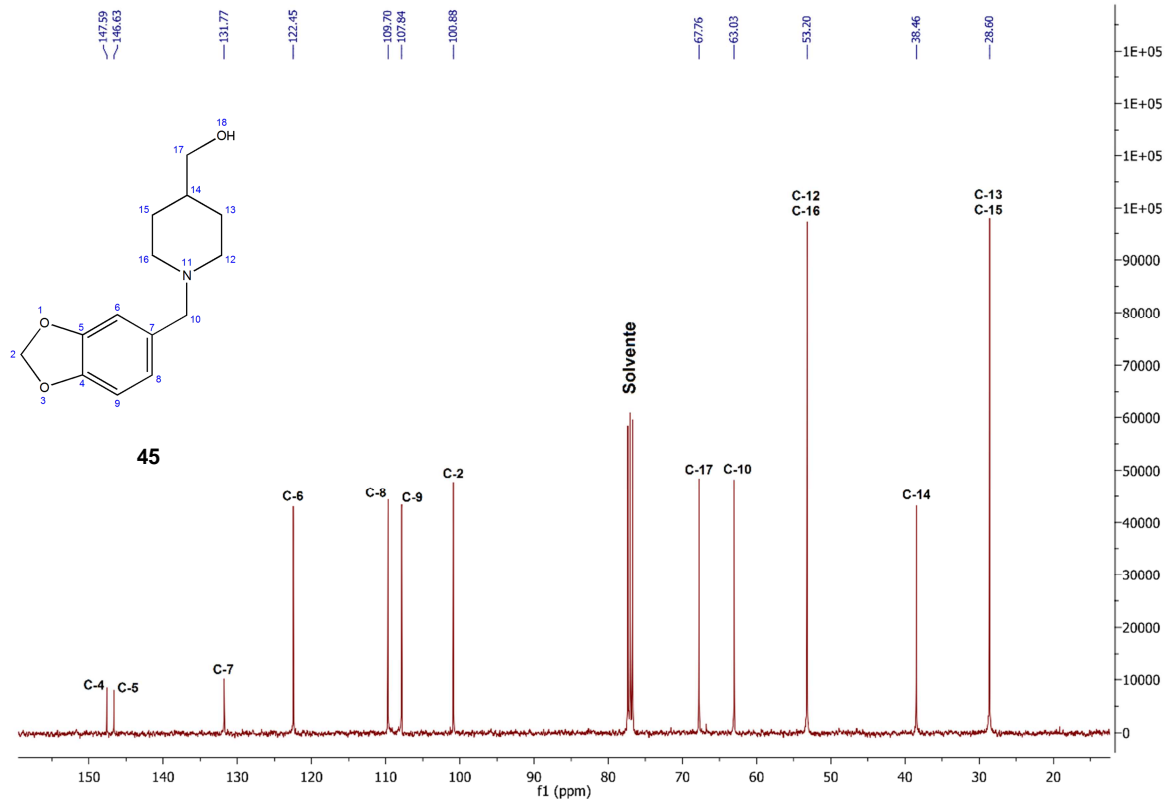


Figura 15: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto **45**

No espectro de massas de alta resolução do composto **45** (Figura 16) foi possível identificar o pico do íon molecular $[\text{M} + 1]$ com m/z 250,1438, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ ($\text{MM} = 249,30 \text{ g/mol}$), sendo portanto, compatível com a estrutura do álcool benzil-piperidínico **45**. Outros picos referentes aos principais fragmentos de **45** foram observados, salientando-se o pico com m/z 135,0455, correspondente à fragmentação da subunidade metilbenzodioxola e o pico com m/z 272,1254, correspondente ao íon molecular acrescido do sódio $[\text{M} + 23]^+$.

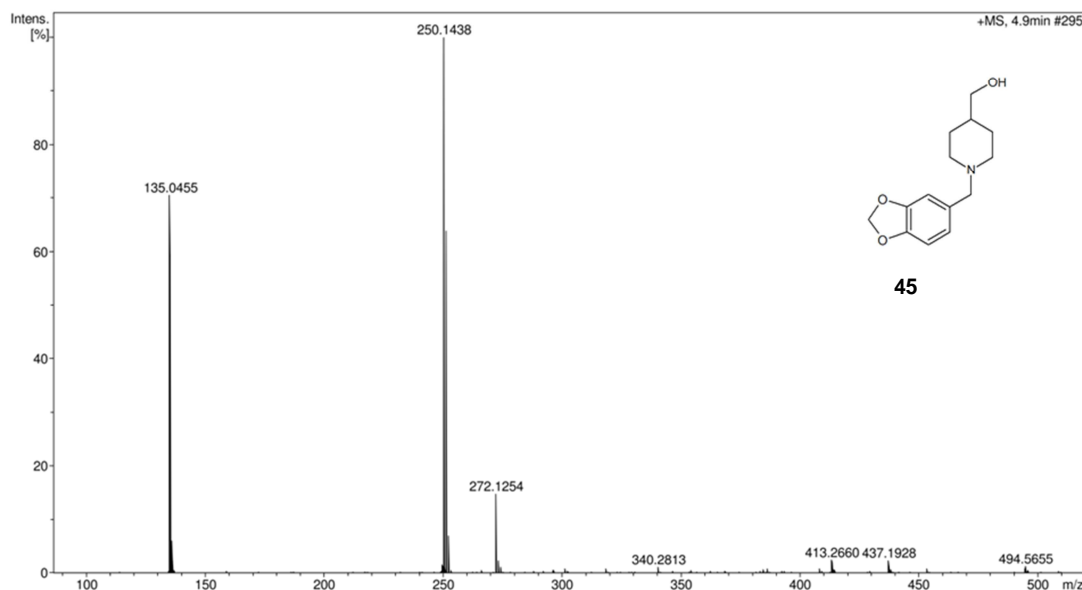
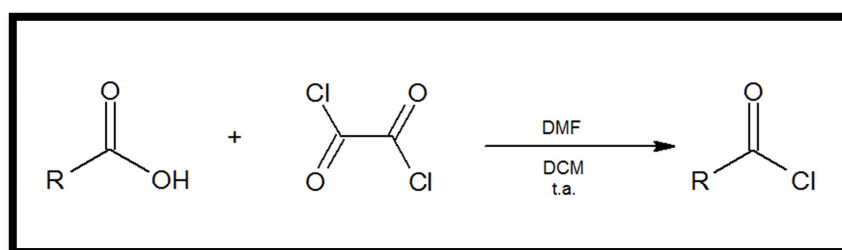


Figura 16: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto **45**

Uma vez obtido o intermediário-chave **45**, a próxima etapa seria a reação de esterificação com diversos ácidos benzóicos substituídos, que gerariam a diversidade estrutural esperada para a série-alvo. Considerando a baixa reatividade dos ácidos, optamos pela preparação prévia dos respectivos cloretos de acila para então, reagir com o álcool **45**. Desta forma, um conjunto de ácidos foram convertidos nos respectivos cloretos de acila por reação com cloreto de oxalila na presença de DMF como catalisador (Esquema 6) em rendimentos quantitativos.



Esquema 6: Esquema reacional para a obtenção dos cloretos de acila onde R=arila

Uma vez obtidos, os cloretos de acila foram reagidos imediatamente em uma segunda etapa reacional com o intermediário **45**, visando-se a obtenção dos ésteres propostos. A Figura 17 a seguir, mostra o mecanismo reacional para obtenção dos

cloretos de acila na presença de cloreto de oxalila. Pode-se notar que a reação tem início com o ataque nucleofílico da N,N-dimetilformamida (DMF, **51b**, Figura 17) ao cloreto de oxalila (**51a**, Figura 17), levando à eliminação de cloreto e formação de um aduto dimetilimíneo (**53**). Numa etapa subsequente, aduto (**53**) sofre ataque pelo Cl^- , gerando a espécie instável (**54**) que sofre rearranjo, levando à formação de CO, CO_2 e do aduto cloro-imíneo (**55**), espécie altamente eletrofílica. Esta espécie sofre então ataque nucleofílico do ácido carboxílico presente no meio, levando à formação de um intermediário cloroamino-éster (**56**), que sofre duas etapas subsequentes de eliminação para gerar ao final o derivado cloreto de acila (**46W₁₋₇** e **47**) e DMF.

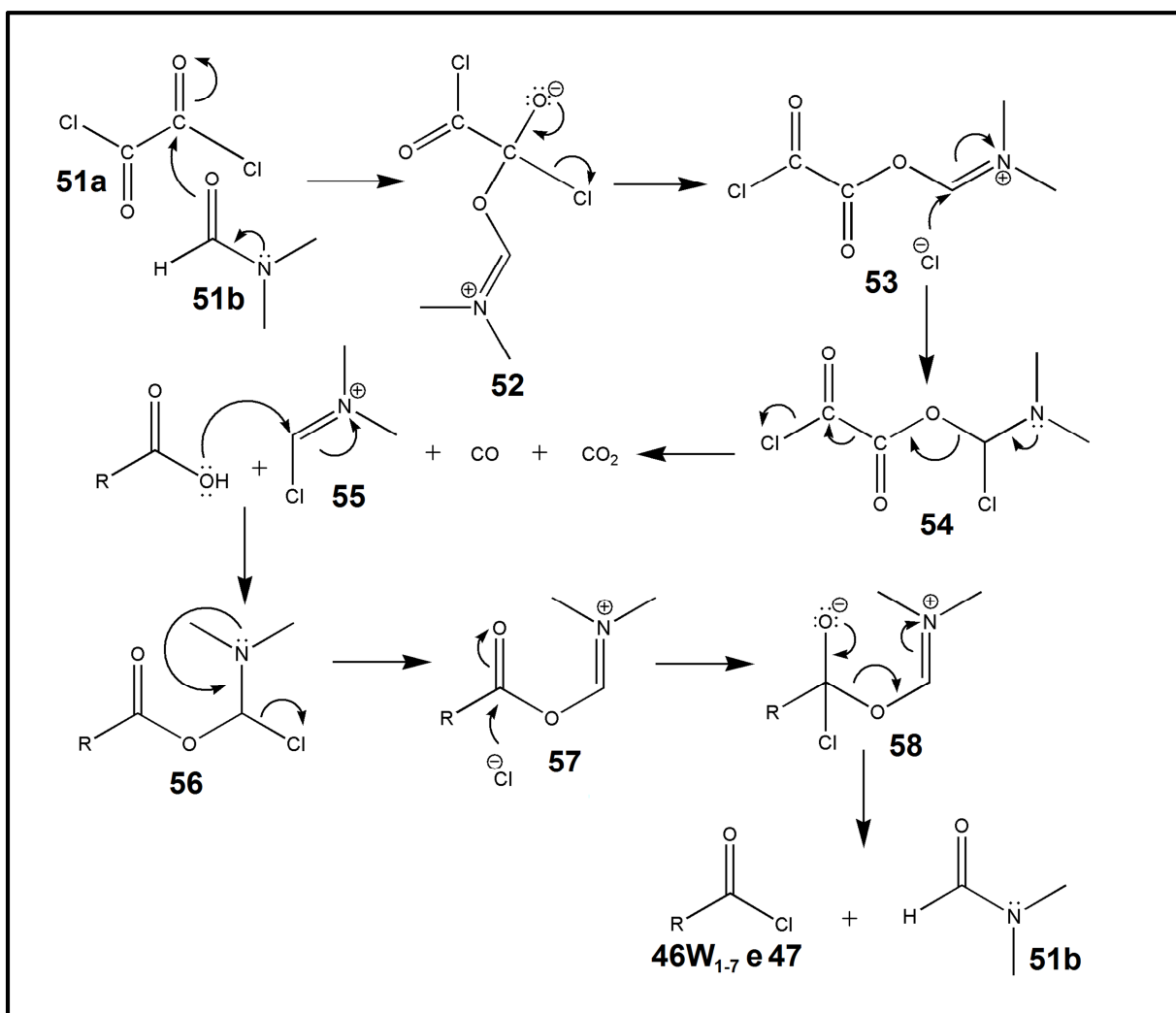


Figura 17: Mecanismo proposto para a obtenção dos cloretos de acila **46W₁₋₇** e **47**

Para a obtenção dos ésteres-alvo (série **42** e éster **48**), o intermediário-chave **45** foi reagido com os diferentes cloretos de acila (**46W₁₋₇** e **47**), cujo mecanismo

geral está mostrado na Figura 18. Numa primeira etapa ocorre um ataque nucleofílico do álcool **45** ao carbono carbonílico do cloreto de acila, levando à formação do derivado **45a**. Numa etapa subsequente ocorre eliminação de Cl^- , seguida de abstração de H^+ pela trietilamina em **45b**, gerando ao final os derivados ésteres correspondentes.

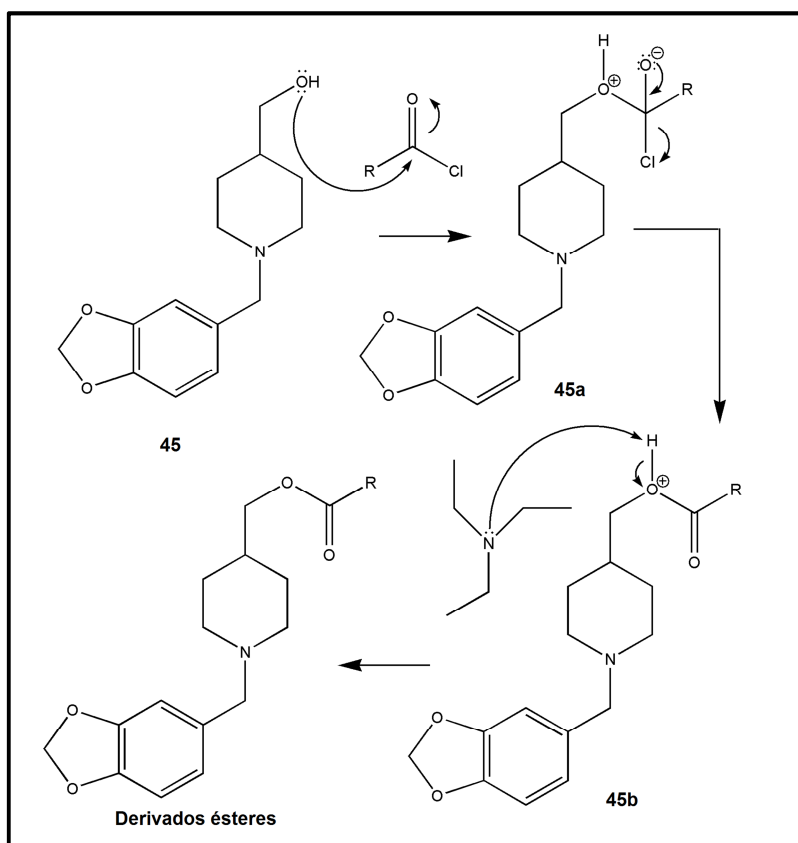


Figura 18: Mecanismo proposto para a obtenção dos ésteres-alvo (série **42** e éster **48**)

O éster **LFQM 138** (**42W₁**) apresentou-se como um líquido viscoso de coloração amarelo claro, obtido com rendimento de 39% após purificação. O rendimento global de obtenção do éster **42W₁** foi de 67%.

No espectro na região do IV do composto **42W₁** (Figura 19) pode-se identificar a presença de bandas referentes a $-\text{CH}$ aromático (3062 cm^{-1}) e $-\text{CH}$ não aromático (2924 cm^{-1} , 2804 cm^{-1} e 2765 cm^{-1}) e de duas bandas fortes referentes à deformação axial do grupamento dioxola em 1037 cm^{-1} e 1246 cm^{-1} . A ausência da banda de deformação axial de $-\text{OH}$, bem como o aparecimento da banda referente à deformação axial de C-O de função éster em 1273 cm^{-1} e a nítida presença da

banda forte referente à deformação axial de C=O em 1716 cm^{-1} , confirmaram a formação do éster desejado. Pode-se verificar também a presença de bandas referentes à deformação axial de C=C de aromático entre 1600 cm^{-1} e 1465 cm^{-1} .

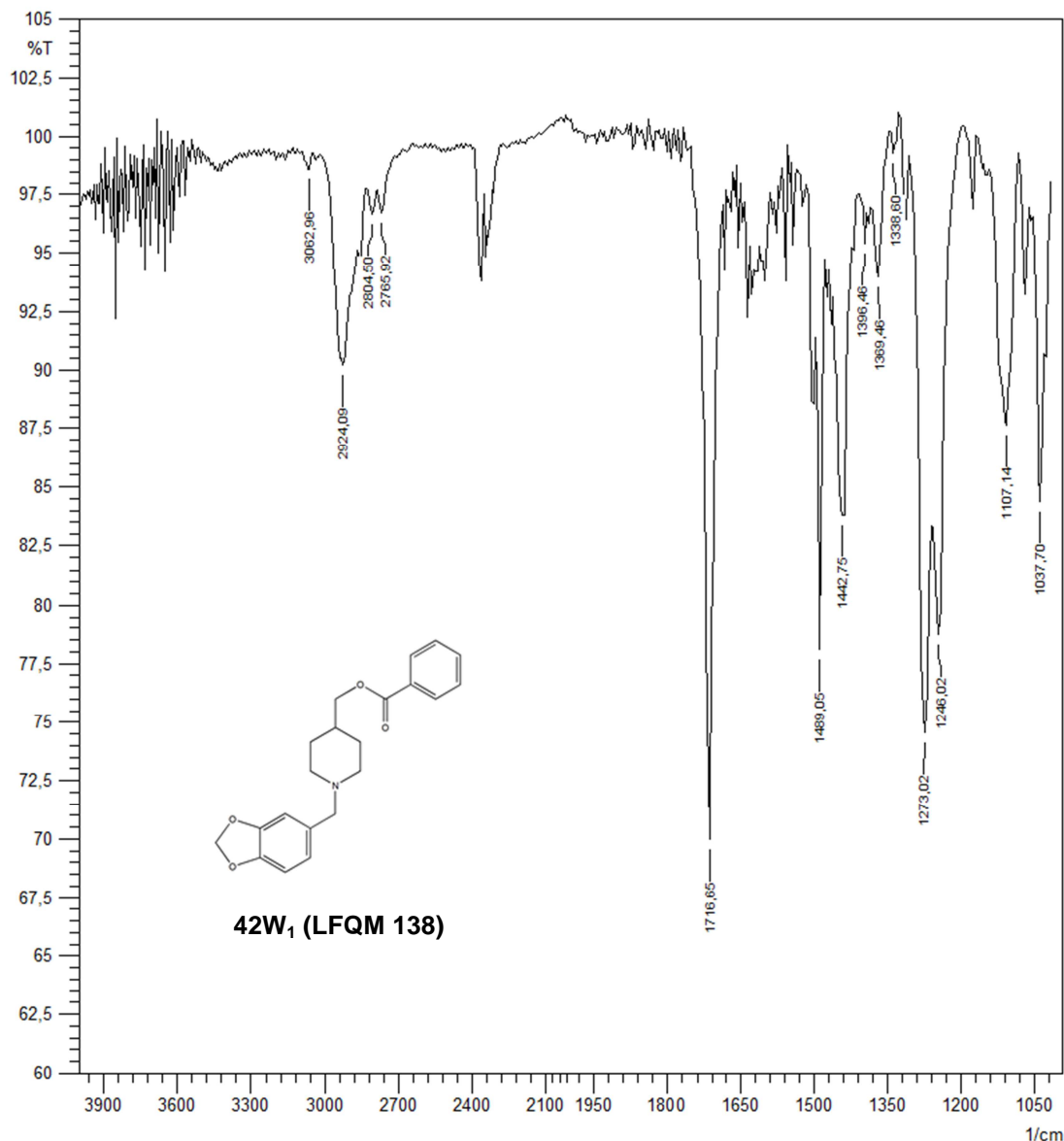


Figura 19: Espectro no IV (NaCl) do composto **42W₁**

No espectro de RMN de ^1H (Figura 20) foram observados dois sinais mais desblindados, um simpleto em δ 6,86 referente a H-6 e um duplete centrado em δ 6,76 ($J = 1,2\text{ Hz}$), integrando para dois hidrogênios, atribuído a H-8 e H-9. Observa-se também em δ 8,05 a presença do multiplete referente a H-24, enquanto que o multiplete em δ 7,41 é atribuído aos hidrogênios H-22, H-23, H-25 e H-26.

O simpleto em δ 5,94, integrando para 2H, foi atribuído ao grupo metileno do anel dioxola (H-2). Já o duplete centrado em δ 4,23 ($J = 12$ Hz) corresponde aos hidrogênios metilênicos (H-17) vizinhos ao grupo éster formado, enquanto que o simpleto em δ 3,48 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-10).

Os outros sinais do espectro são compatíveis com todos os hidrogênios do anel piperidínico, sendo o multiplete em δ 3,00 atribuído aos H-12 e H-16 equatoriais e o duplo-triplete em δ 2,05 é relativo aos H-12 e H-16 axiais, enquanto que o multiplete em δ 1,72 foi atribuído a H-13 e H-15 equatoriais e o multiplete em δ 1,20 a H-13 e H-15 axiais. Já o multiplete em δ 1,45 foi atribuído a H-14.

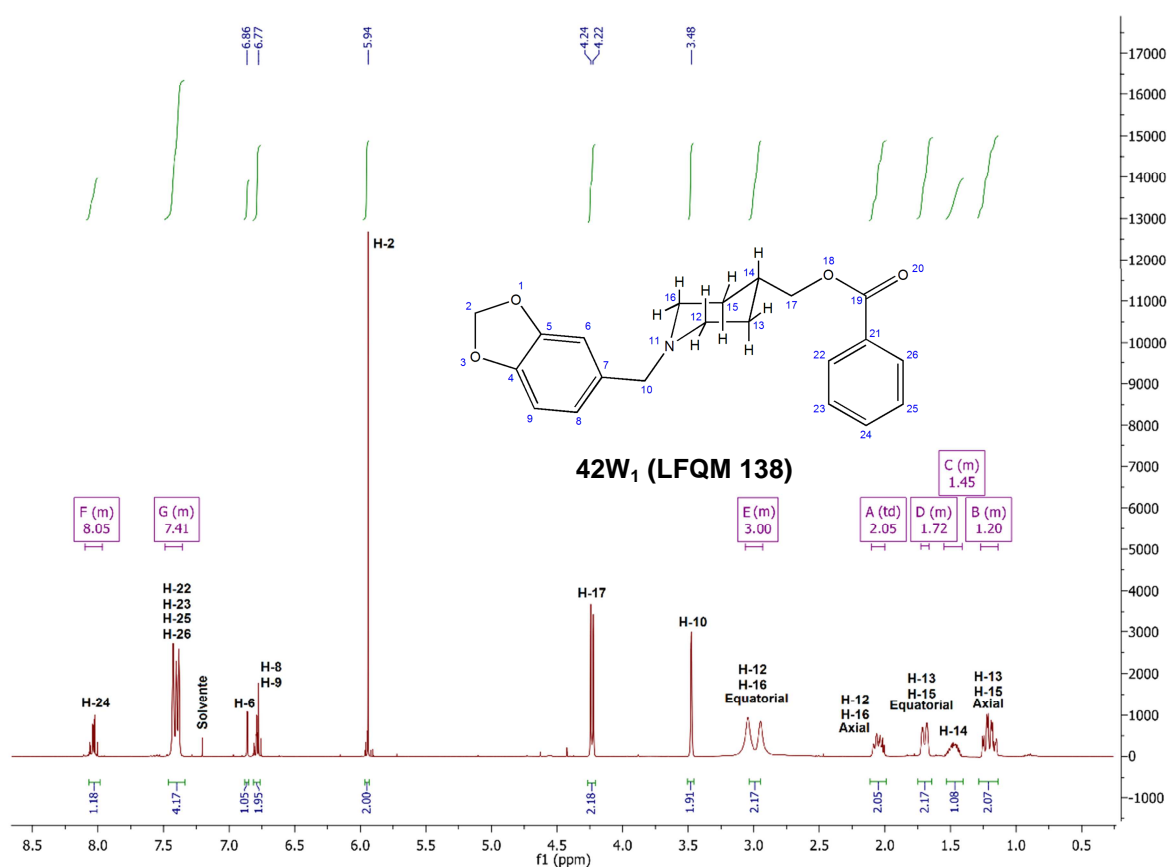


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto **42W₁**

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 21) pode-se verificar a presença de 17 sinais compatíveis com a estrutura do composto **42W₁**. Os 5 sinais mais desblindados foram atribuídos aos carbonos C-19 (δ 171,75), C-4 (δ 147,74), C-5 (δ 146,95), C-21 (δ 136,19) e C-7 (δ 135,13). O sinal em δ 129,54 foi atribuído a C-24, enquanto que o sinal em δ 128,33 foi atribuído a C-22 e C-26 e o sinal em

δ 127,02 a C-23 e C-25. O sinal em δ 120,40 refere-se ao C-6 e os sinais em δ 108,11 e δ 107,84 referem-se aos carbonos aromáticos restantes C-8 e C-9.

Em δ 100,93 foi atribuído ao carbono metilênico (C-2) do grupo metilenodioxola, enquanto que em δ 67,16 foi identificado o sinal do C-17. O sinal em δ 65,00 foi atribuído ao carbono metilênico-benzílico (C-10) e o sinal em δ 52,42 foi atribuído aos carbonos C-12 e C-16 do anel piperidínico ligados diretamente ao átomo de nitrogênio. Por fim, o sinal em δ 38,82 foi atribuído a C-14 e em δ 29,67 aos carbonos metilênicos (C-13 e C-15).

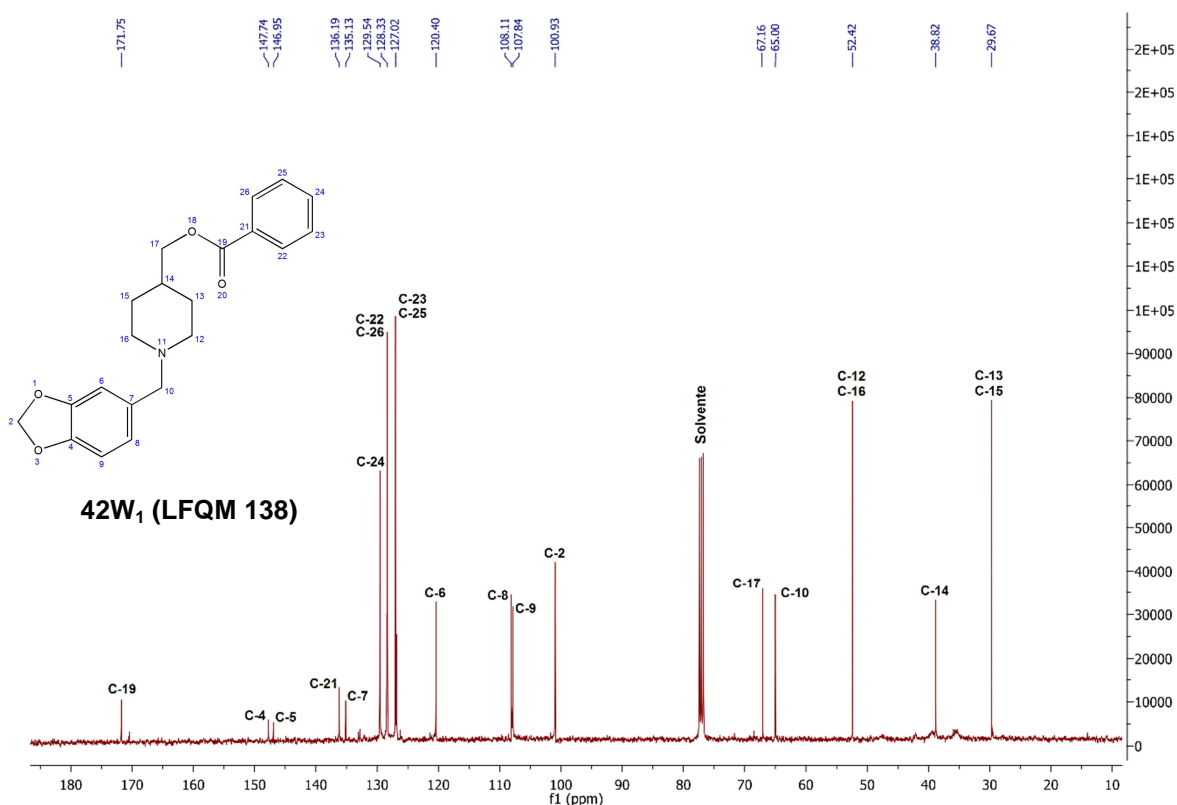


Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) do composto **42W₁**

No espectro de massas de alta resolução (Figura 22) do composto **42W₁** foi possível identificar o pico do íon molecular $[\text{M} + 1]$ com m/z 354,1702, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ (MM = 353,41 g/mol), sendo portanto, condizente com a estrutura do éster em questão.

Comparando-se a posição do pico m/z 135,0455 do espectro de massas do intermediário final **45** podemos verificar a semelhança com o pico de menor valor no

espectro do composto **42W₁**, apesar de seu valor não ter sido atribuído. Este pico indica a fragmentação da subunidade metilbenzodioxola.

Não se observa a presença do pico referente ao íon molecular acrescido do sódio no espectro.

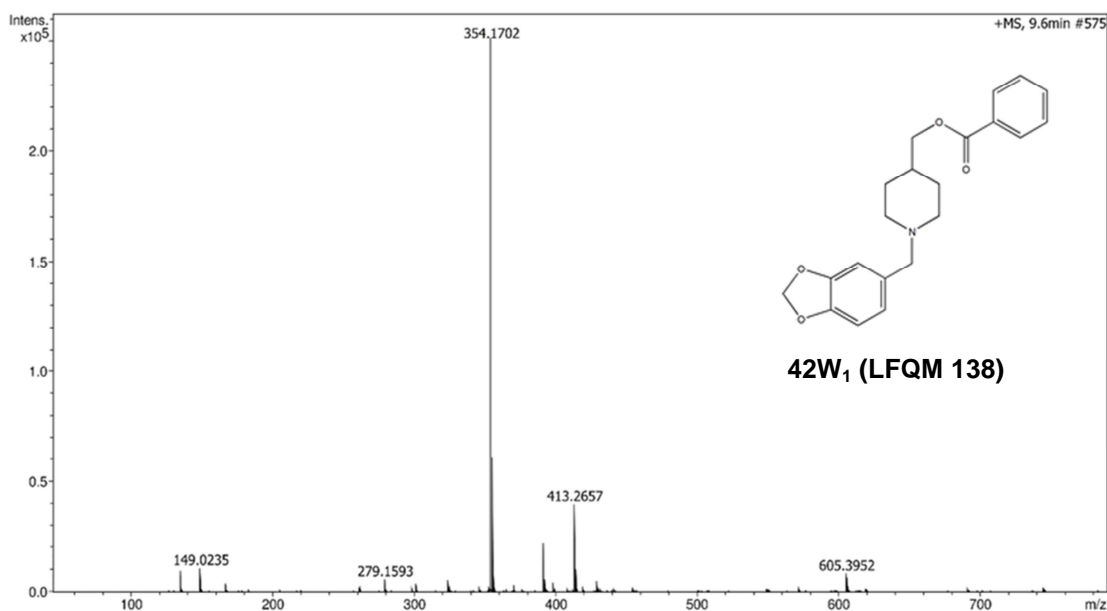


Figura 22: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto **42W₁**

O éster **LFQM 139 (42W₂)** apresentou-se como um líquido viscoso de coloração amarelo escuro, obtido com rendimento de 38% após purificação. O rendimento global de obtenção do éster **42W₂** foi de 66,5%.

No espectro na região do IV (Figura 23) do composto **42W₂** pode-se identificar a presença de bandas referentes a -CH aromático (3061 cm^{-1} e 3022 cm^{-1}) e -CH não aromático (2924 cm^{-1} e 2854 cm^{-1}), uma banda forte referente à deformação axial do grupamento dioxola em 1037 cm^{-1} e pode-se verificar um alargamento da banda forte em 1271 cm^{-1} que sugere a presença concomitante de duas bandas, sendo estas as bandas de deformação axial de C–O do grupo dioxola e de C–O de éster referente à formação desta função.

Com relação à função éster formada pode-se notar também a nítida presença da banda forte de deformação axial de C=O desta função orgânica em 1718 cm^{-1} , além da ausência da banda de deformação axial de –OH. Pode-se verificar também a presença de bandas referentes à deformação axial de C=C de aromático entre 1600 cm^{-1} e 1465 cm^{-1} .

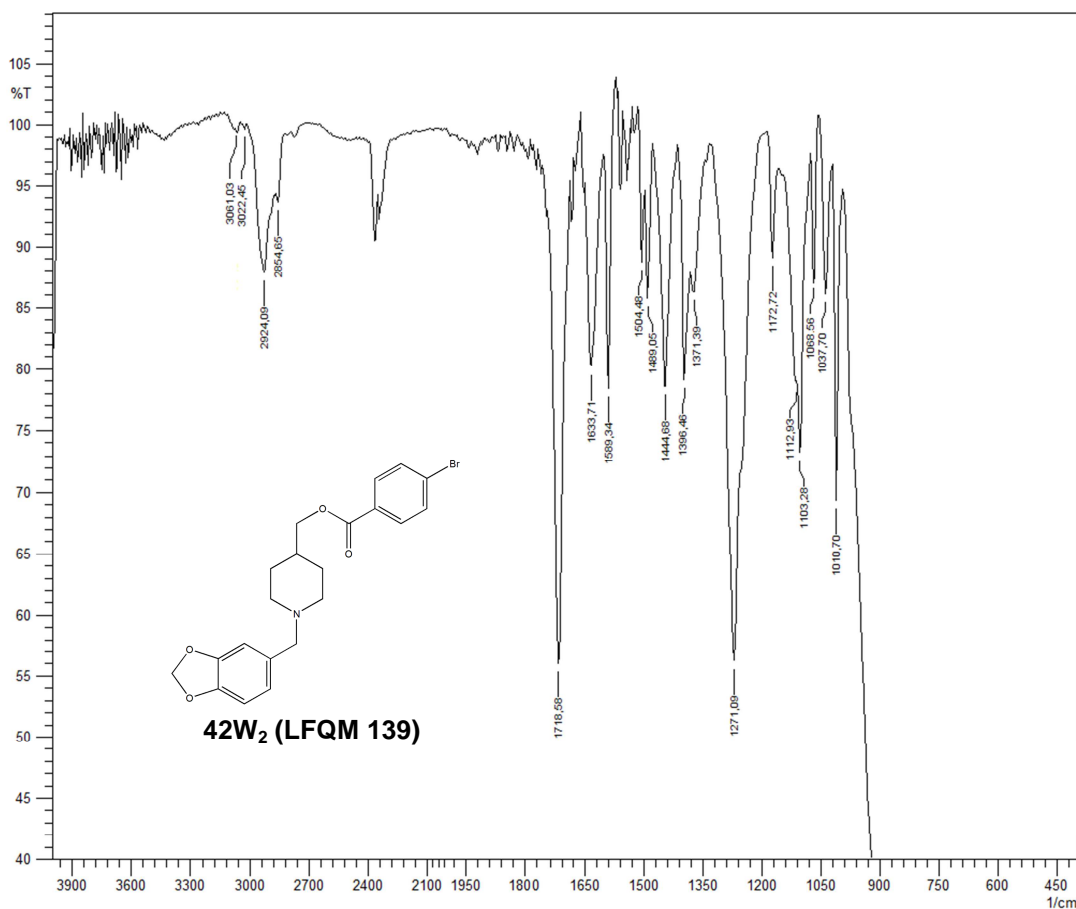


Figura 23: Espectro no IV (NaCl) do composto **42W₂**

No espectro de RMN de ^1H do éster **42W₂** (Figura 24), foi observada a presença de um simpleto em δ 6,83 referente a H-6 e um duplete centrado em δ 6,76 ($J = 1,2$ Hz), integrando para 2H, atribuído a H-8 e H-9. Tem-se também a presença de um duplete centrado em δ 7,54 ($J = 12$ Hz) referente aos hidrogênios aromáticos H-22 e H-26 e também outro duplete centrado em δ 7,29 ($J = 12$ Hz) referente aos outros dois hidrogênios aromáticos H-23 e H-25.

O simpleto em δ 5,99, integrando para 2H, foi atribuído ao grupo metileno do anel dioxola (H-2). Já o duplete centrado em δ 3,71 ($J = 12\text{Hz}$) corresponde aos hidrogênios metilênicos (H-17) vizinhos ao grupamento éster formado, enquanto que o simpleto em δ 3,42 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-10).

Os demais sinais do espectro são compatíveis com todos os hidrogênios do anel piperidínico, sendo o multiplete em δ 2,99 atribuído a H-12 e H-16 equatoriais, o duplo-triplete em δ 2,04 relativo a H-12 e H-16 axiais, enquanto que o multiplete em

δ 1,66 foi atribuído a H-13 e H-15 equatoriais e o multipeto em δ 1,25 a H-13 e H-15 axiais. Já o multipeto em δ 1,41 foi atribuído a H-14.

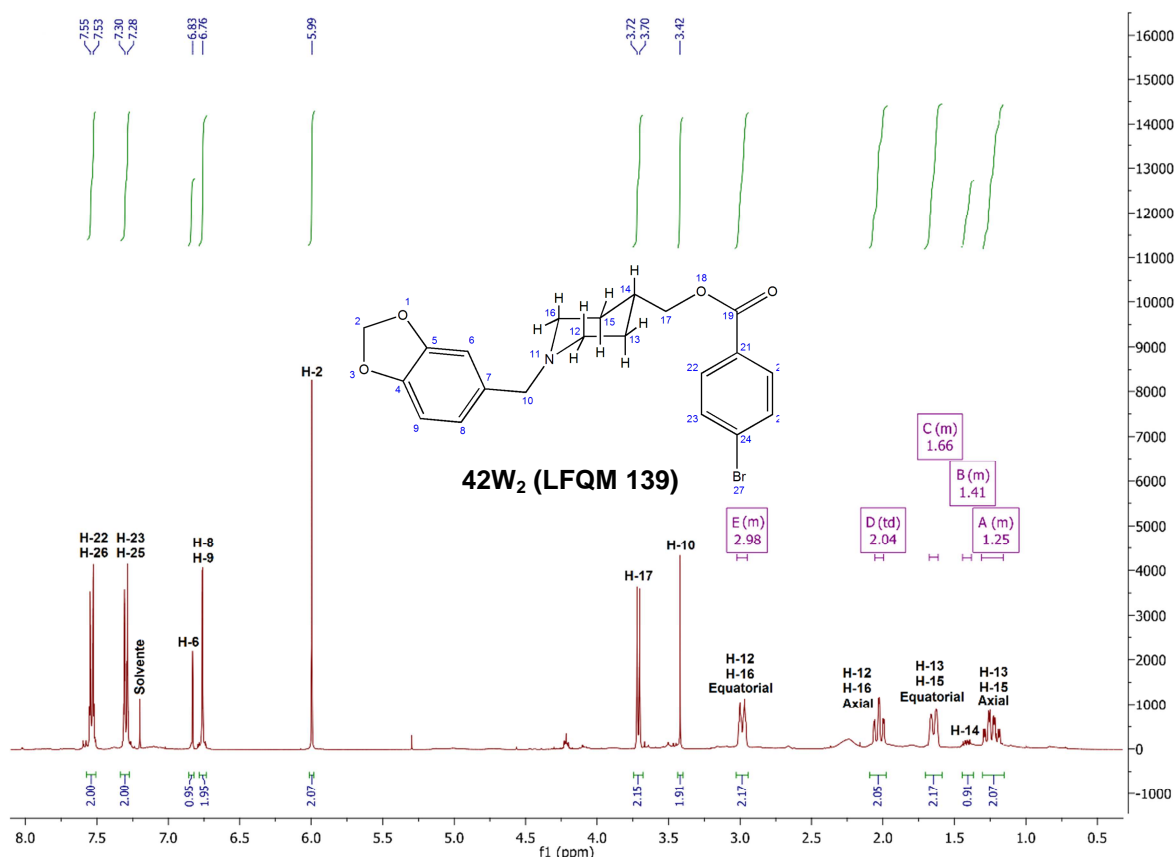


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto **42W₂**

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 25) pode-se verificar a presença de 17 sinais compatíveis com a estrutura do composto **42W₂**.

Os 4 sinais mais desblindados foram atribuídos aos carbonos C-19 (δ 170,53), C-4 (δ 149,35), C-5 (δ 148,28) e C-24 (δ 135,12). Os sinais em δ 130,86 e δ 123,71 foram atribuídos a C-21 e C-7, respectivamente. O sinal em δ 131,56 foi atribuído a C-22 e C-26, enquanto que o sinal em δ 128,79 é relativo aos carbonos C-23 e C-25. Os sinais em δ 122,22, δ 108,94 e δ 108,72 referem-se aos carbonos aromáticos restantes C-6, C-8 e C-9, respectivamente.

Em δ 101,79 foi atribuído ao carbono metilênico (C-2) do grupo metilenodioxola, enquanto que em δ 68,27 foi identificado o sinal de C-17. O sinal em δ 60,40 foi atribuído ao carbono metilênico-benzílico (C-10) e o sinal em δ 51,48 foi atribuído aos carbonos C-12 e C-16 do anel piperidínico ligados diretamente ao

átomo de nitrogênio. Por fim, o sinal em δ 35,39 foi atribuído a C-14 e em δ 29,65 aos carbonos metilênicos (C-13 e C-15).

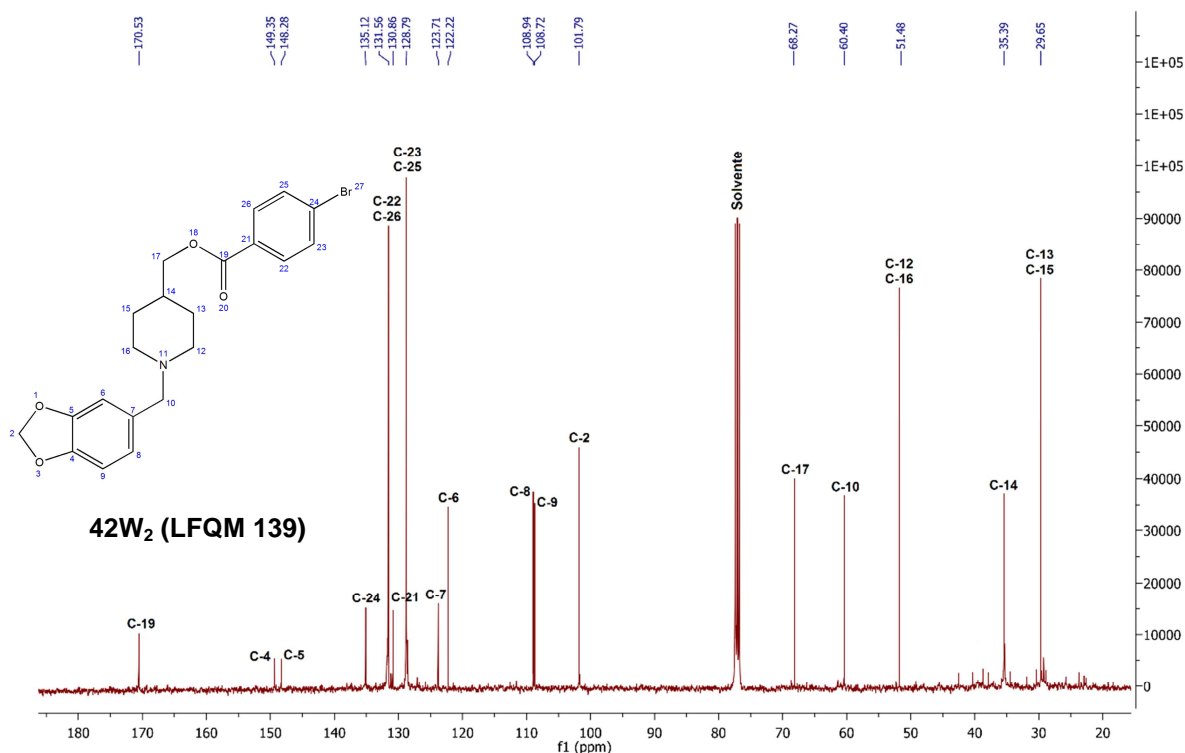


Figura 25: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) do composto **42W₂**

No espectro de massas de alta resolução (Figura 26) do composto **42W₂** foi possível identificar o pico do íon molecular $[\text{M}^+]$ com m/z 432,0812, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{Br}$ (MM = 432,30 g/mol), sendo portanto, condizente com a estrutura do éster **42W₂**.

Verifica-se a presença do pico com m/z 135,0419 indicando fragmentação da subunidade metilbenzodioxola. O pico referente ao íon molecular acrescido do sódio $[\text{M} + 23]^+$ não foi registrado no espectro.

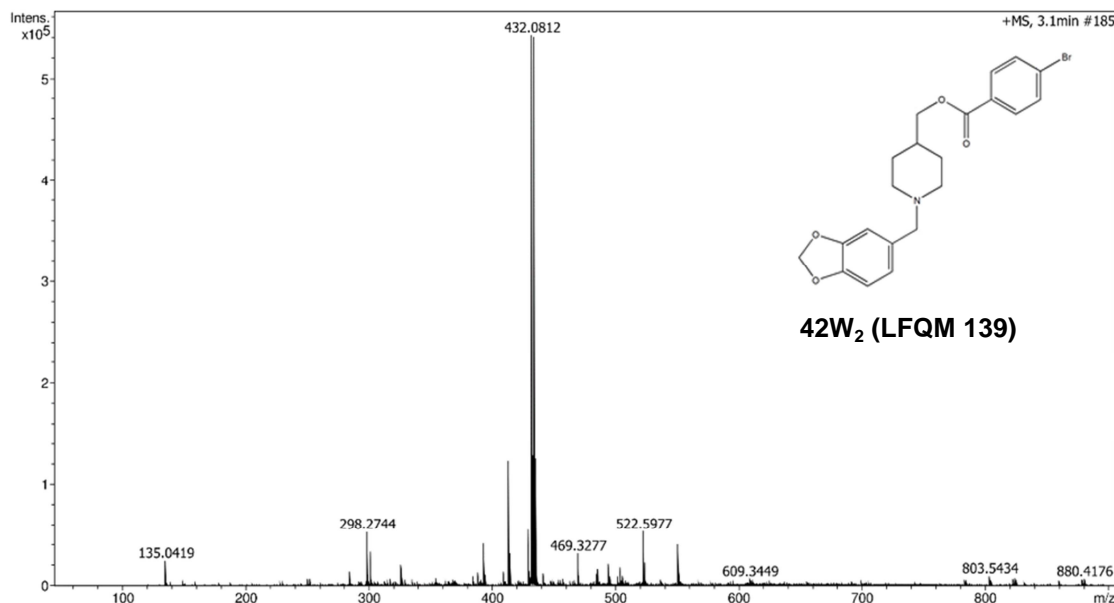


Figura 26: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto **42W₂**

O éster **LFQM 140** (**42W₃**) apresentou-se como um líquido viscoso de coloração amarelo escuro, obtido com rendimento de 40% após purificação. O rendimento global de obtenção do éster **42W₃** foi de 67,5%.

No espectro na região do IV do composto **42W₃** (Figura 27) pode-se identificar a presença de bandas referentes a –CH aromático (3070 cm⁻¹) e –CH não aromático (2937 cm⁻¹, 2804 cm⁻¹ e 2765 cm⁻¹) e de duas bandas fortes referentes à deformação axial do grupamento dioxola em 1037 cm⁻¹ e 1242 cm⁻¹. A ausência da banda de deformação axial de –OH, bem como o aparecimento da banda referente à deformação axial de C–O de função éster em 1278 cm⁻¹ e a nítida presença da banda forte referente à deformação axial de C=O em 1718 cm⁻¹, confirmaram a formação do éster desejado. Pode-se verificar também a presença de bandas referentes à deformação axial de C=C de aromático entre 1600 cm⁻¹ e 1465 cm⁻¹.

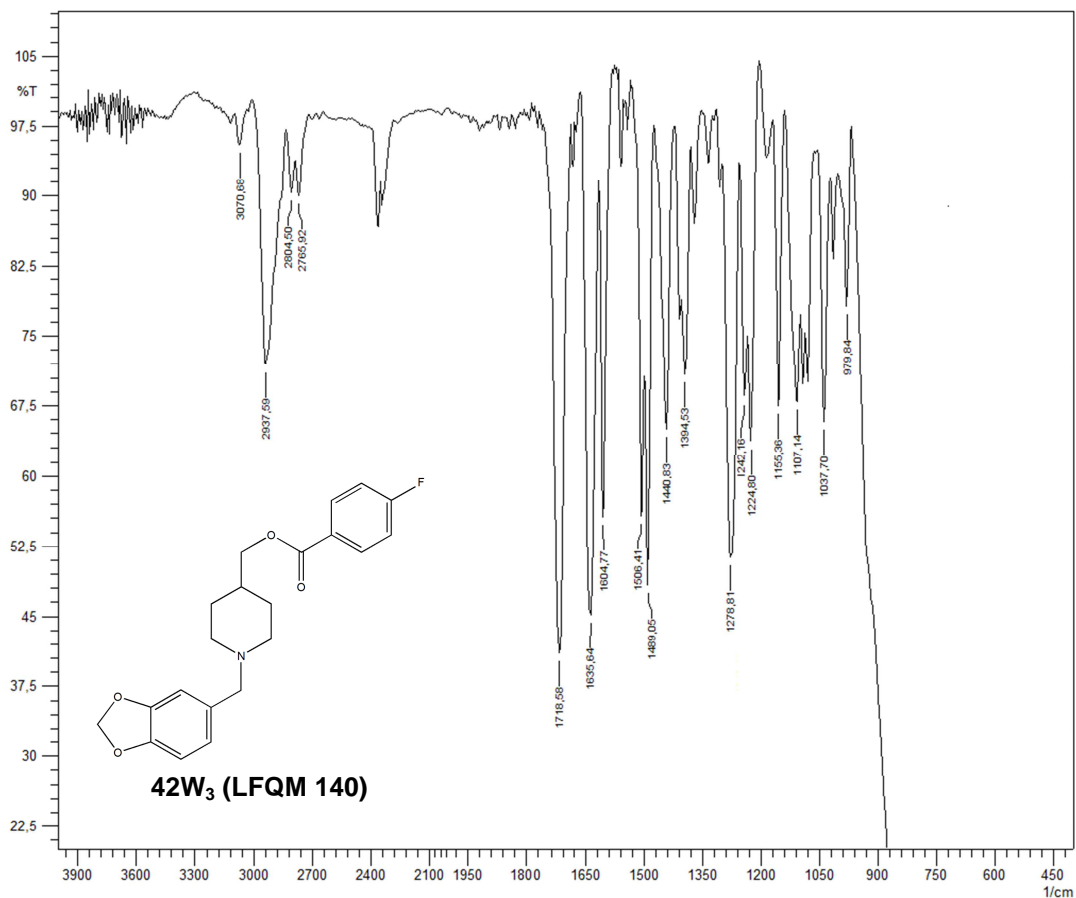


Figura 27: Espectro no IV (NaCl) do composto **42W₃**

No espectro de RMN de ^1H do éster **42W₃** (Figura 28), foi observada a presença de um simpleto em δ 6,90 referente a H-6 e um duplete centrado em δ 6,76 ($J = 1,2$ Hz), integrando para 2H, atribuído a H-8 e H-9. Tem-se também a presença de um multiplete em δ 7,44 referente aos hidrogênios aromáticos H-22 e H-26 e outro multiplete em δ 7,09 referente aos outros dois hidrogênios aromáticos H-23 e H-25.

O simpleto em δ 5,95, integrando para 2H, foi atribuído ao grupo metileno do anel dioxola (H-2). Já o duplete centrado em δ 4,19 ($J = 12$ Hz) corresponde aos hidrogênios metilênicos (H-17) vizinhos ao grupamento éster formado, enquanto que o simpleto em δ 3,53 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-10).

Os demais sinais do espectro são compatíveis com todos os hidrogênios do anel piperidínico, sendo o multiplete em δ 3,05 atribuído a H-12 e H-16 equatoriais, o duplo-triplete em δ 2,07 relativo a H-12 e H-16 axiais, enquanto que o multiplete em

δ 1,81 foi atribuído a H-13 e H-15 equatoriais e o multipeto em δ 1,24 a H-13 e H-15 axiais. Já o multipeto em δ 1,58 foi atribuído a H-14.

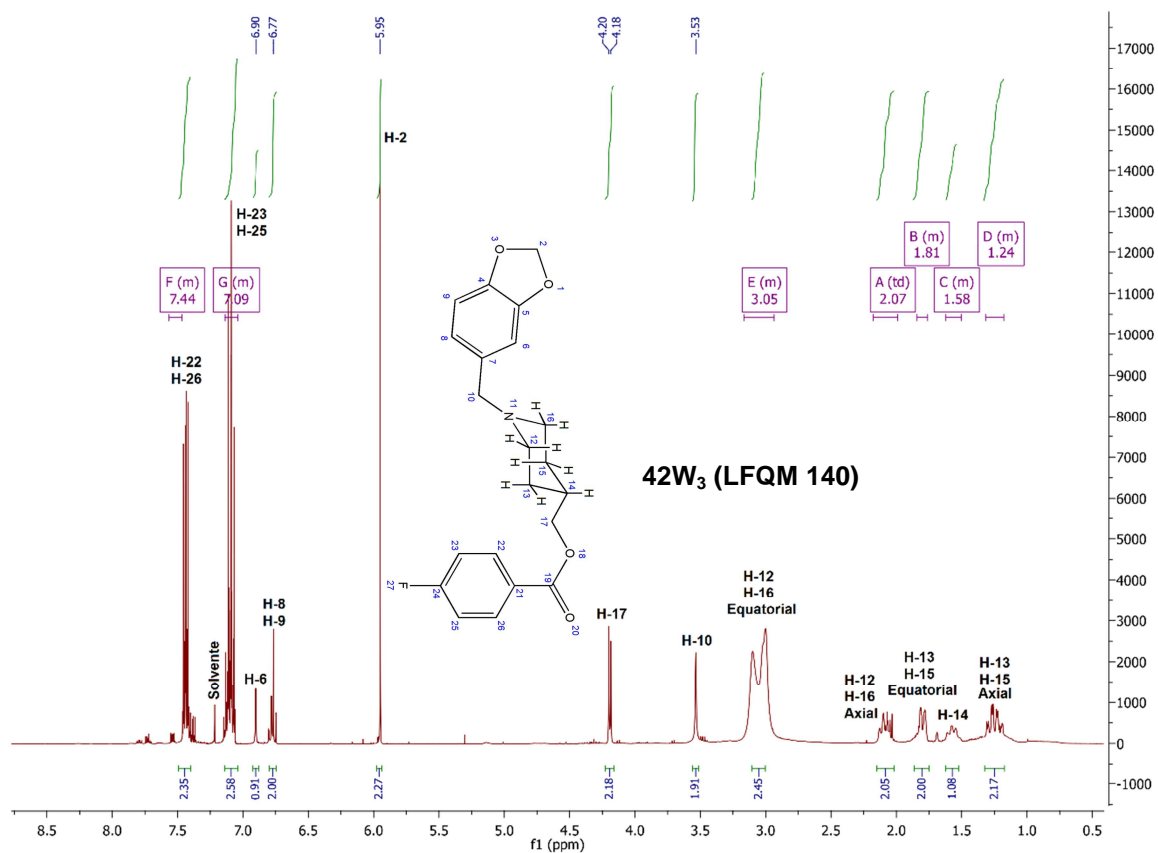


Figura 28: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto **42W₃**

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 29) pode-se verificar a presença de 20 sinais compatíveis com a estrutura do composto **42W₃**.

Os 6 sinais mais desblindados foram atribuídos aos carbonos C-24 (δ 170,66 e δ 162,04), C-19 (δ 164,52), C-4 (δ 147,70), C-5 (δ 146,97) e C-21 (δ 132,03). O sinal em δ 128,52 foi atribuído a C-7. Os sinais em δ 129,38 e δ 129,30 são relativos a C-22 e C-26, enquanto que os sinais em δ 115,47 e δ 115,25 foram atribuídos a C-23 e C-25. Os sinais em δ 122,77, δ 109,84 e δ 107,93 referem-se aos carbonos aromáticos restantes C-6, C-8 e C-9, respectivamente.

Em δ 100,96 foi atribuído ao carbono metilênico (C-2) do grupo metilenodioxola, enquanto que em δ 69,01 foi identificado o sinal de C-17. O sinal em δ 62,55 foi atribuído ao carbono metilênico-benzílico (C-10) e o sinal em δ 52,68 foi atribuído aos carbonos C-12 e C-16 do anel piperidínico ligados diretamente ao

átomo de nitrogênio. Por fim, o sinal em δ 35,18 foi atribuído a C-14 e em δ 28,34 aos carbonos metilênicos (C-13 e C-15).

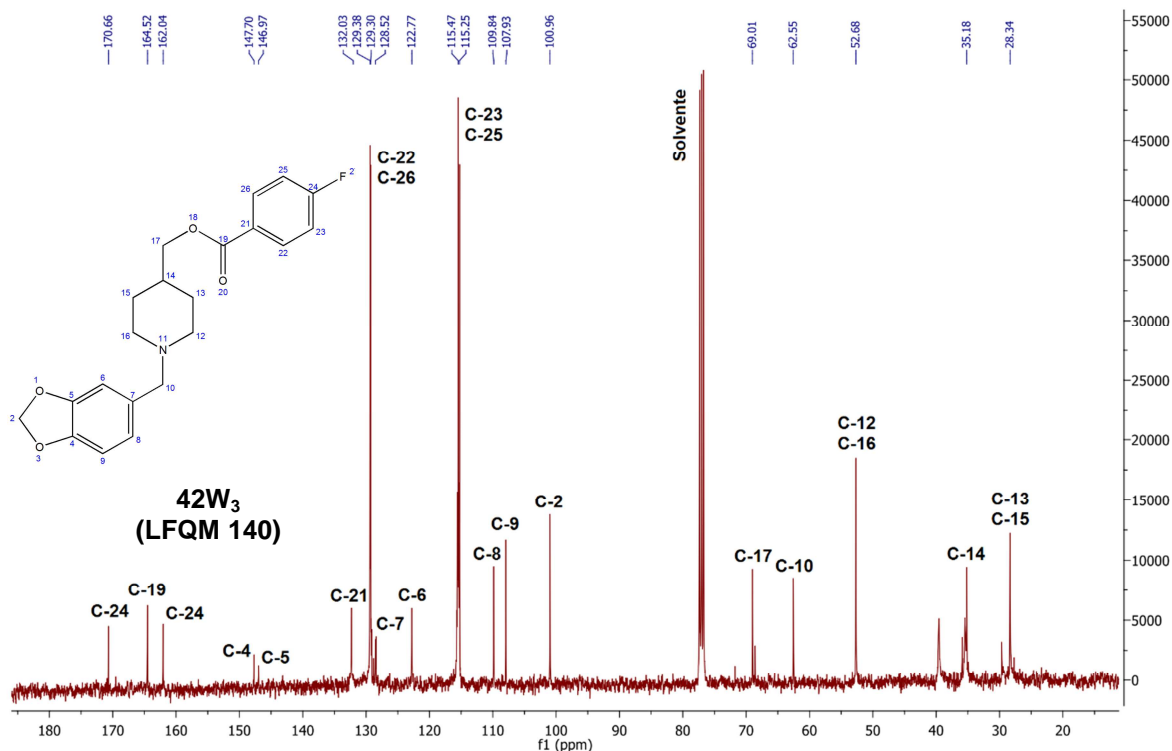


Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) do composto **42W₃**

No espectro de massas de alta resolução (Figura 30) do composto **42W₃** foi possível identificar o pico do íon molecular $[\text{M} + 1]$ com m/z 372,1630, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{F}$ ($\text{MM} = 371,40$ g/mol), sendo portanto, condizente com a estrutura do éster **42W₃**.

Verifica-se a presença do pico com m/z 135,0442 indicando fragmentação da subunidade metilbenzodioxola. O pico referente ao íon molecular acrescido do sódio $[\text{M} + 23]^+$ não foi registrado no espectro.

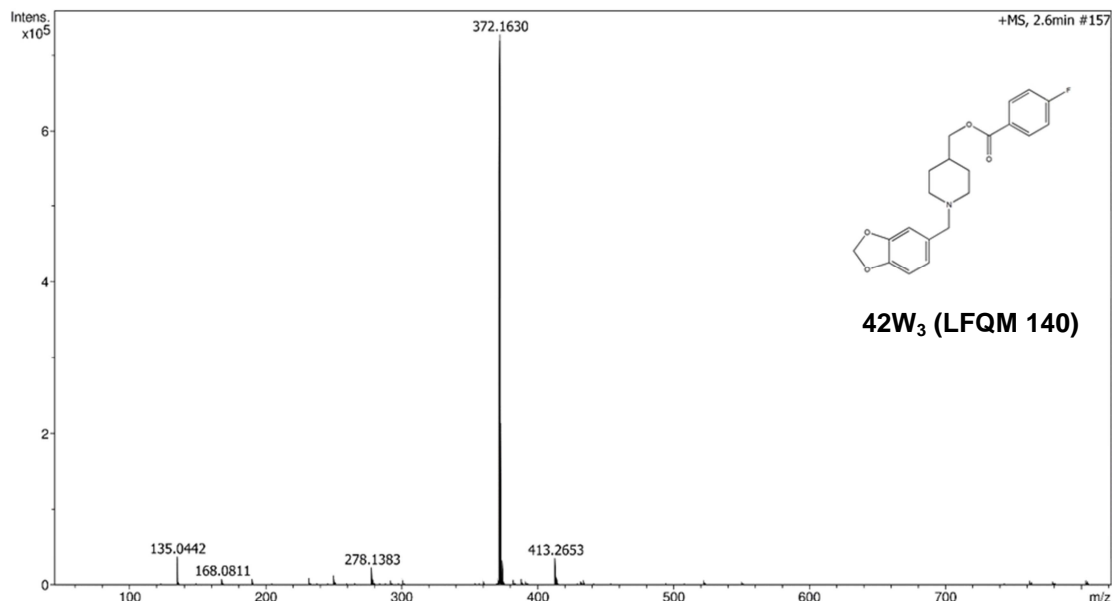


Figura 30: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto **42W₃**

O éster **LFQM 141 (42W₄)** apresentou-se como um sólido de coloração palha, obtido com rendimento de 63% após purificação. O rendimento global de obtenção do éster **42W₄** foi de 79%.

No espectro na região do IV do composto **42W₄** (Figura 31) pode-se identificar a presença de bandas referentes a -CH aromático (3074 cm^{-1}) e -CH não aromático (2912 cm^{-1} , 2804 cm^{-1} e 2765 cm^{-1}) e de duas bandas fortes referentes à deformação axial do grupamento dioxola em 1037 cm^{-1} e 1257 cm^{-1} . A ausência da banda de deformação axial de -OH , bem como o aparecimento da banda referente à deformação axial de C-O de função éster em 1280 cm^{-1} e a nítida presença da banda forte referente à deformação axial de C=O em 1708 cm^{-1} , confirmaram a formação do éster desejado. Pode-se verificar também a presença de bandas referentes à deformação axial de C=C de aromático entre 1600 cm^{-1} e 1465 cm^{-1} .

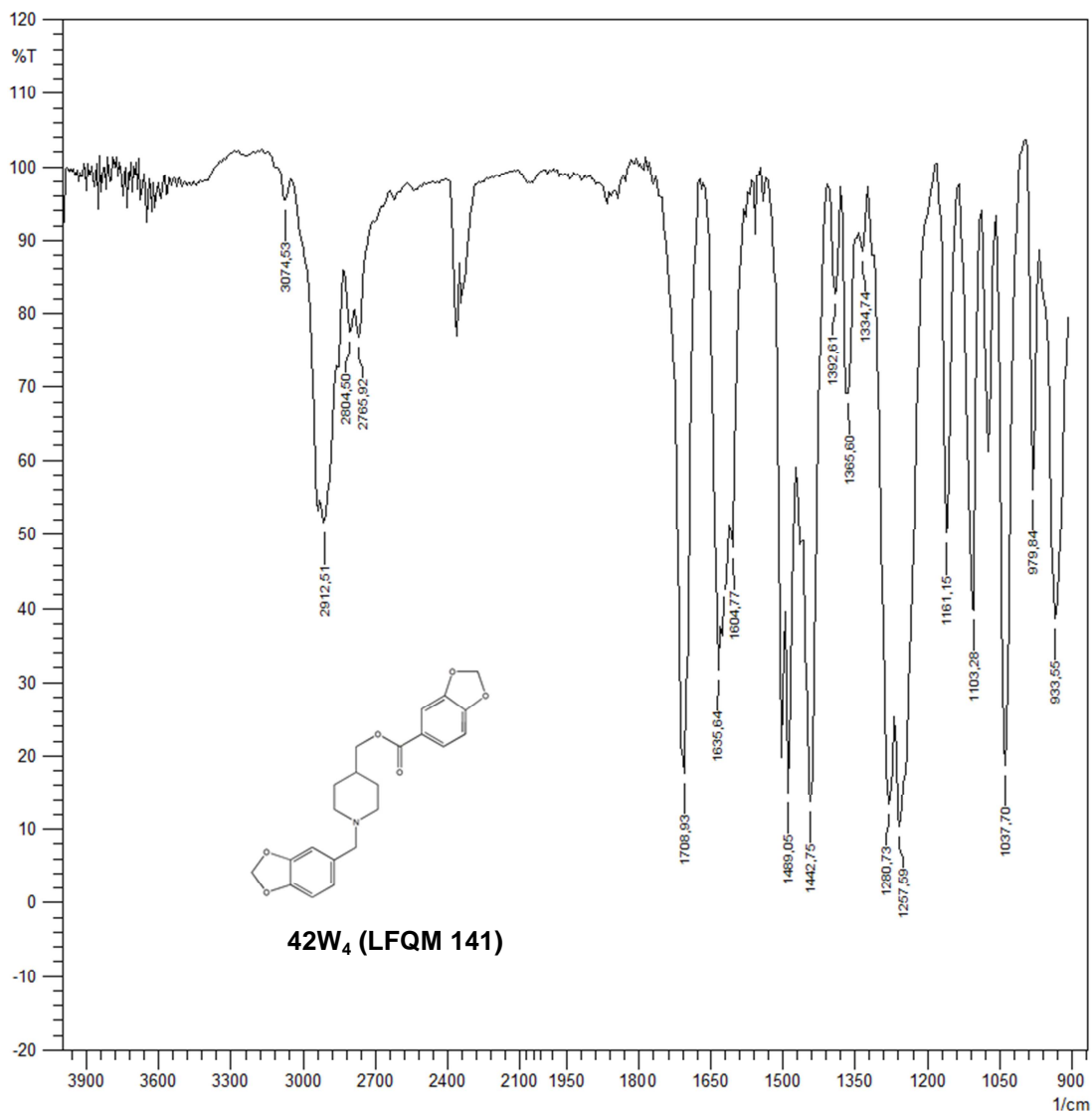


Figura 31: Espectro no IV (NaCl) do composto **42W₄**

No espectro de RMN de ^1H do éster **42W₄** (Figura 32), foi observada a presença de um simpleto em δ 6,90 referente a H-6 e um duplete centrado em δ 6,76 ($J = 1,2$ Hz), integrando para 2H, atribuído a H-8 e H-9. Tem-se também a presença de um duplete centrado em δ 7,64 ($J = 12$ Hz) referente aos hidrogênios aromáticos H-22 e H-23 e também um simpleto em δ 7,28 referente a H-26.

Os simpletos em δ 6,07 e δ 5,95 integrando para 2H cada sinal, foram atribuídos aos grupos metileno dos anéis dioxola (H-28 e H-2, respectivamente). O duplete centrado em δ 3,96 ($J = 12$ Hz) corresponde aos hidrogênios metilênicos (H-17) vizinhos ao grupamento éster formado, enquanto que o simpleto em δ 3,50 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-10).

Os demais sinais do espectro são compatíveis com todos os hidrogênios do anel piperidínico, sendo o multipletto em δ 2.85 atribuído a H-12 e H-16 equatoriais, o duplo-tripletto em δ 2,07 relativo a H-12 e H-16 axiais, enquanto que o multipletto em δ 1,80 foi atribuído a H-13 e H-15 equatoriais e o multipletto em δ 1,23 a H-13 e H-15 axiais. Já o multipletto em δ 1,59 foi atribuído a H-14.

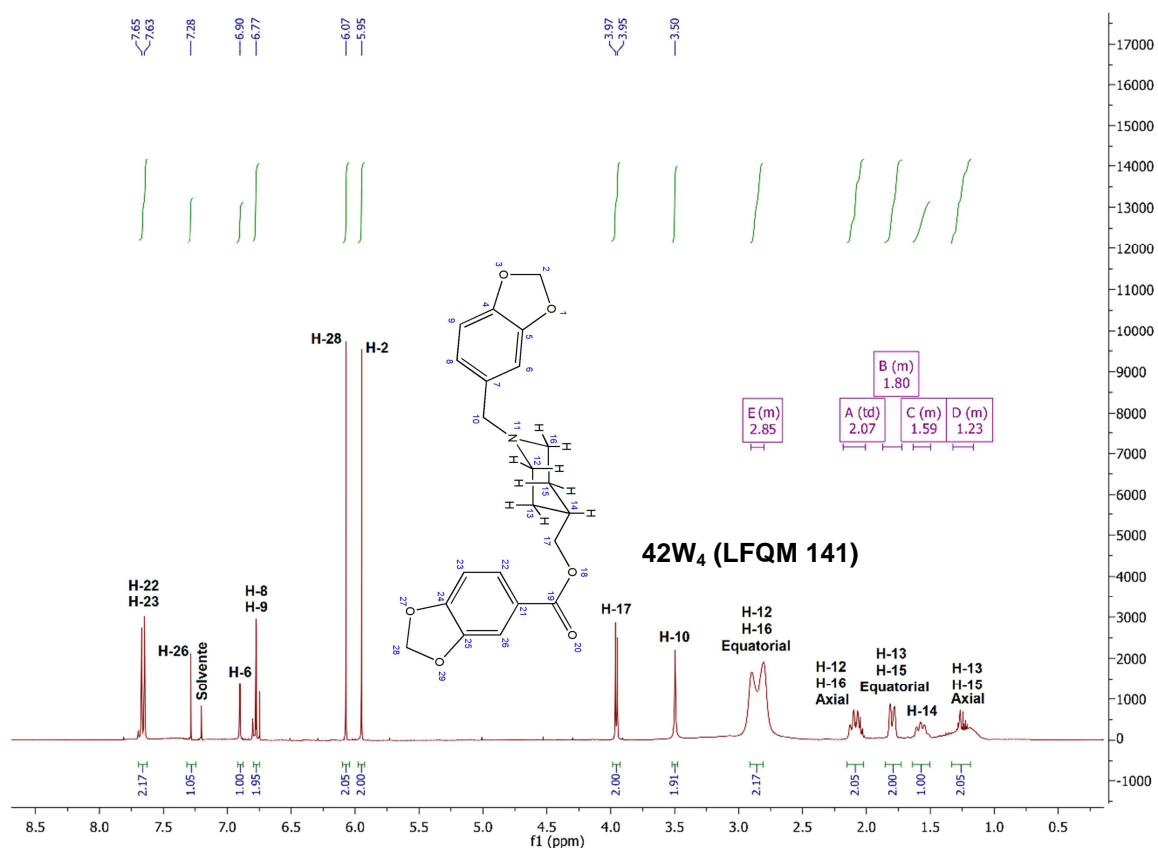


Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto **42W₄**

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 33) pode-se verificar a presença de 20 sinais compatíveis com a estrutura do composto **42W₄**.

Os 7 sinais mais desblindados foram atribuídos aos carbonos C-19 (δ 170,21), C-24 (δ 151,25), C-25 (δ 149,20), C-4 (δ 146,64), C-5 (δ 145,81), C-21 (δ 134,50) e C-7 (δ 127,27). Os sinais em δ 122,81 e δ 122,60 foram atribuídos a C-26 e C-6, respectivamente. O sinal em δ 115,56 foi atribuído a C-22, enquanto que o sinal em δ 111,05 foi atribuído a C-23. Já os sinais em δ 109,75 e δ 108,51 são referentes a C-8 e C-9, respectivamente.

Em δ 101,20 e δ 100,73 foram atribuídos aos carbonos metilênicos (C-28 e C-2, respectivamente) dos grupos metilenodioxola, enquanto que em δ 70,64 foi

identificado o sinal de C-17. O sinal em δ 62,82 foi atribuído ao carbono metilênico-benzílico (C-10) e o sinal em δ 53,15 foi atribuído aos carbonos C-12 e C-16 do anel piperidínico ligados diretamente ao átomo de nitrogênio. Por fim, o sinal em δ 35,32 foi atribuído a C-14 e em δ 28,39 aos carbonos metilênicos (C-13 e C-15).

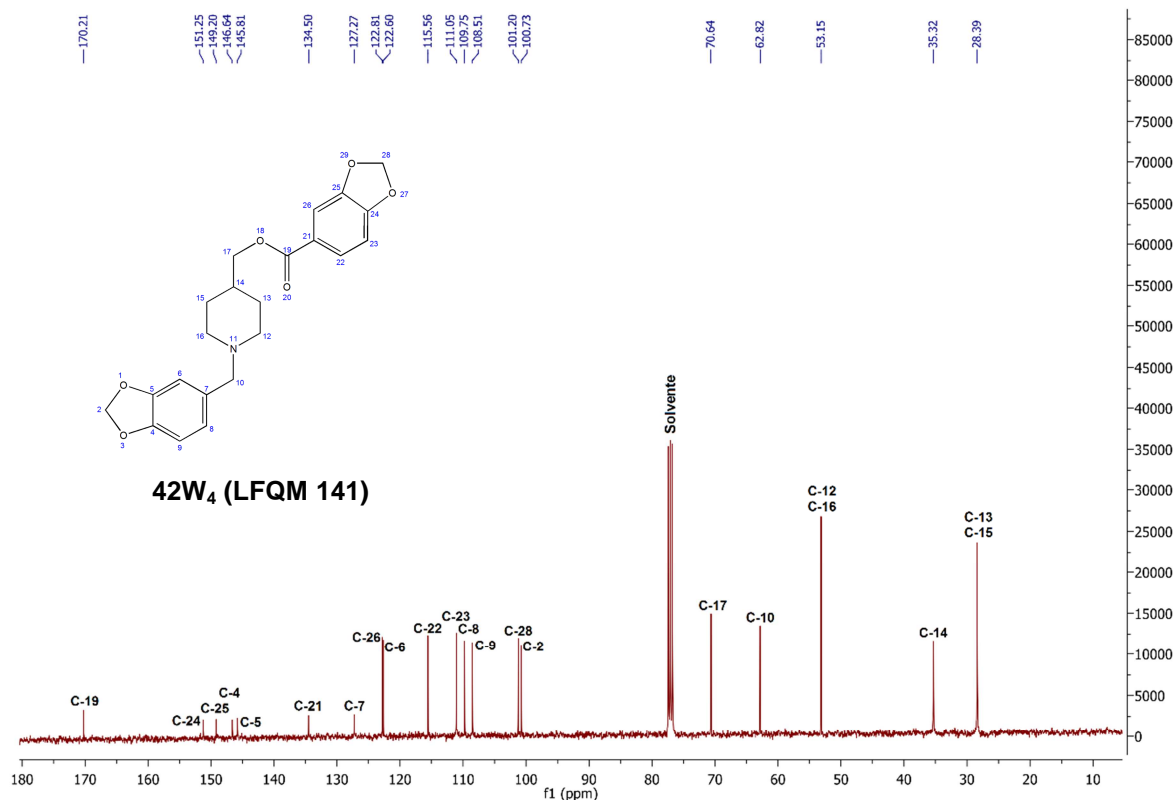


Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) do composto **42W₄**

No espectro de massas de alta resolução (Figura 34) do composto **42W₄** foi possível identificar o pico do íon molecular $[\text{M} + 1]$ com m/z 398,1605, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ ($\text{MM} = 397,42$ g/mol), sendo portanto, condizente com a estrutura do éster **42W₄**.

Verifica-se a presença do pico com m/z 135,0445 indicando fragmentação da subunidade metilbenzodioxola. O pico referente ao íon molecular acrescido do sódio $[\text{M} + 23]^+$ não foi registrado no espectro.

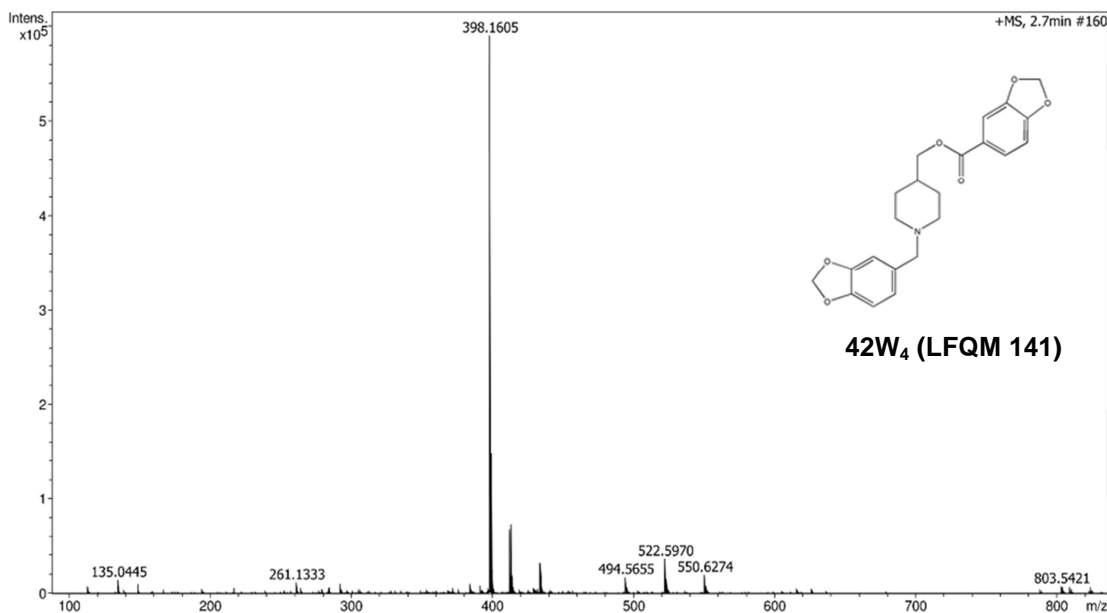


Figura 34: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto **42W₄**

O éster **LFQM 142 (42W₅)** apresentou-se como um líquido viscoso de coloração amarelo intenso, obtido com rendimento de 45% após purificação. O rendimento global de obtenção do éster **42W₅** foi de 70%.

No espectro na região do IV do composto **42W₅** (Figura 35) pode-se identificar a presença de bandas referentes a -CH aromático (3062 cm^{-1} e 3022 cm^{-1}) e -CH não aromático (2924 cm^{-1} e 2852 cm^{-1}) e de duas bandas fortes referentes à deformação axial do grupamento dioxola em 1037 cm^{-1} e 1244 cm^{-1} . A ausência da banda de deformação axial de -OH, bem como o aparecimento da banda referente à deformação axial de C-O do grupo éster em 1273 cm^{-1} e a nítida presença da banda forte referente à deformação axial de C=O de éster em 1720 cm^{-1} confirmaram a formação do éster desejado. Além disso, pode-se verificar também a presença de bandas referentes à deformação axial de C=C de aromático entre 1600 cm^{-1} e 1465 cm^{-1} .

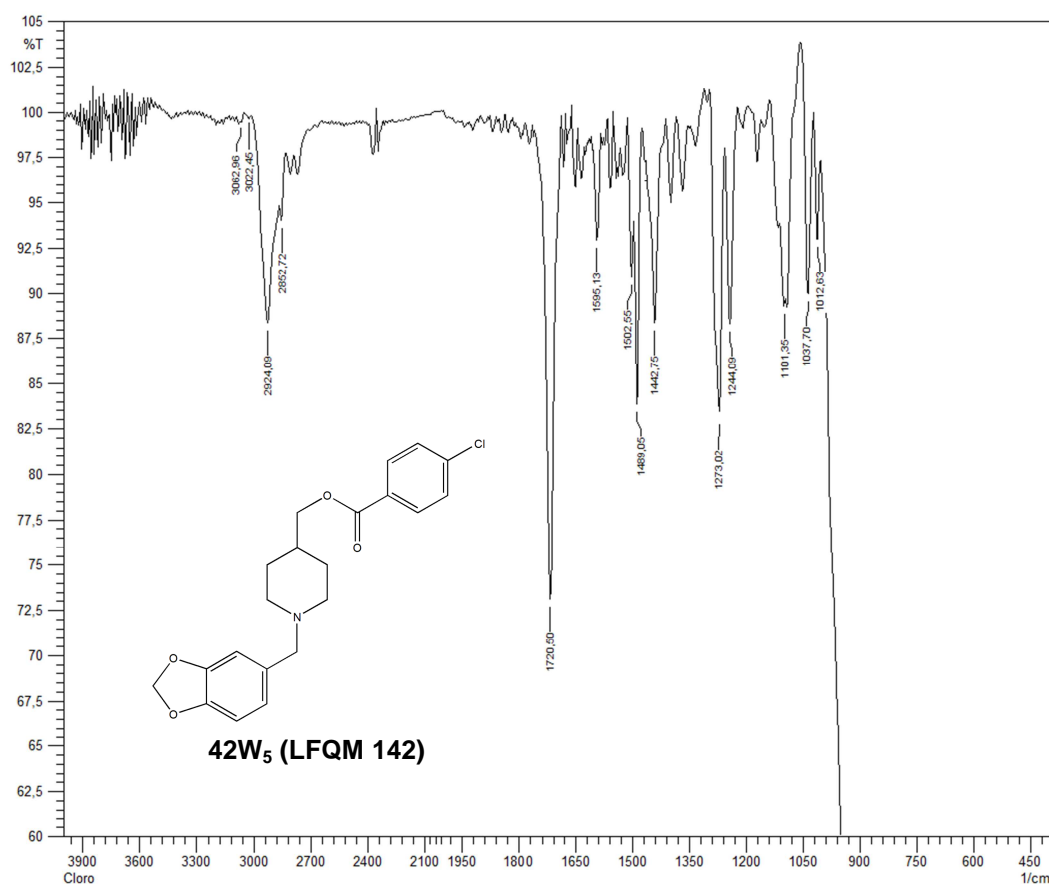


Figura 35: Espectro no IV (NaCl) do composto **42W₅**

No espectro de RMN de ^1H do éster **42W₅** (Figura 36), foi observada a presença de um simpleto em δ 6,88 referente a H-6 e um duplete centrado em δ 6,78 ($J = 1,2$ Hz), integrando para 2H, atribuído a H-8 e H-9. Tem-se também a presença de um duplete centrado em δ 8,03 ($J = 12$ Hz) referente aos hidrogênios aromáticos H-22 e H-26 e também outro duplete centrado em δ 7,45 ($J = 12$ Hz) referente aos outros dois hidrogênios aromáticos H-23 e H-25.

O simpleto em δ 5,96, integrando para 2H, foi atribuído ao grupo metileno do anel dioxola (H-2). Já o duplete em δ 4,09 ($J = 12$ Hz) corresponde aos hidrogênios metilênicos (H-17) vizinhos ao grupo éster formado, enquanto que o simpleto em δ 3,52 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-10).

Os demais sinais do espectro são compatíveis com todos os hidrogênios do anel piperidínico, sendo o multipletto em δ 3,02 atribuído a H-12 e H-16 equatoriais e o duplo-tripletto em δ 2,04 relativo a H-12 e H-16 axiais, enquanto que o multipletto

em δ 1,75 foi atribuído a H-13 e H-15 equatoriais e o multipeto em δ 1,22 a H-13 e H-15 axiais. Já o multipeto em δ 1,63 foi atribuído a H-14.

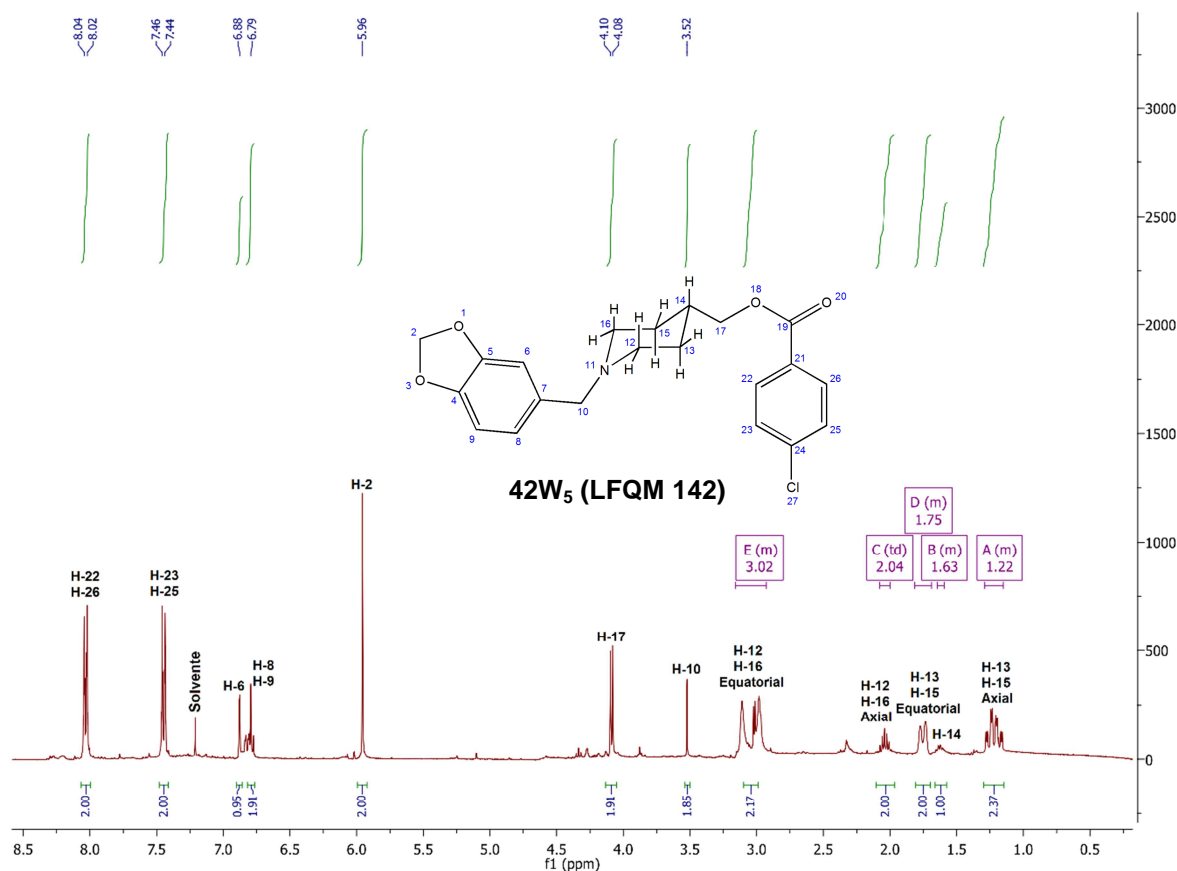


Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto **42W₅**

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 37) pode-se verificar a presença de 17 sinais compatíveis com a estrutura do composto **42W₅**.

Os 5 sinais mais desblindados foram atribuídos aos carbonos C-19 (δ 172,21), C-4 (δ 149,12), C-5 (δ 148,22), C-24 (δ 140,24) e C-21 (δ 131,58). O sinal em δ 128,87 foi atribuído a C-22 e C-26, enquanto que o sinal em δ 128,65 foi atribuído a C-23 e C-25. Em δ 127,79 tem-se o sinal referente ao C-7. Os sinais em δ 120,54, δ 108,24 e δ 107,91 referem-se aos carbonos aromáticos restantes C-6, C-8 e C-9, respectivamente.

Em δ 101,03 foi atribuído ao carbono metilênico (C-2) do grupo metilenodioxola, enquanto que em δ 71,80 foi identificado o sinal de C-17. O sinal em δ 65,33 foi atribuído ao carbono metilênico-benzílico (C-10) e o sinal em δ 57,75 foi atribuído aos carbonos C-12 e C-16 do anel piperidínico, ligados diretamente ao

átomo de nitrogênio. Por fim, o sinal em δ 39,63 foi atribuído a C-14 e em δ 27,72 aos carbonos metilênicos (C-13 e C-15).

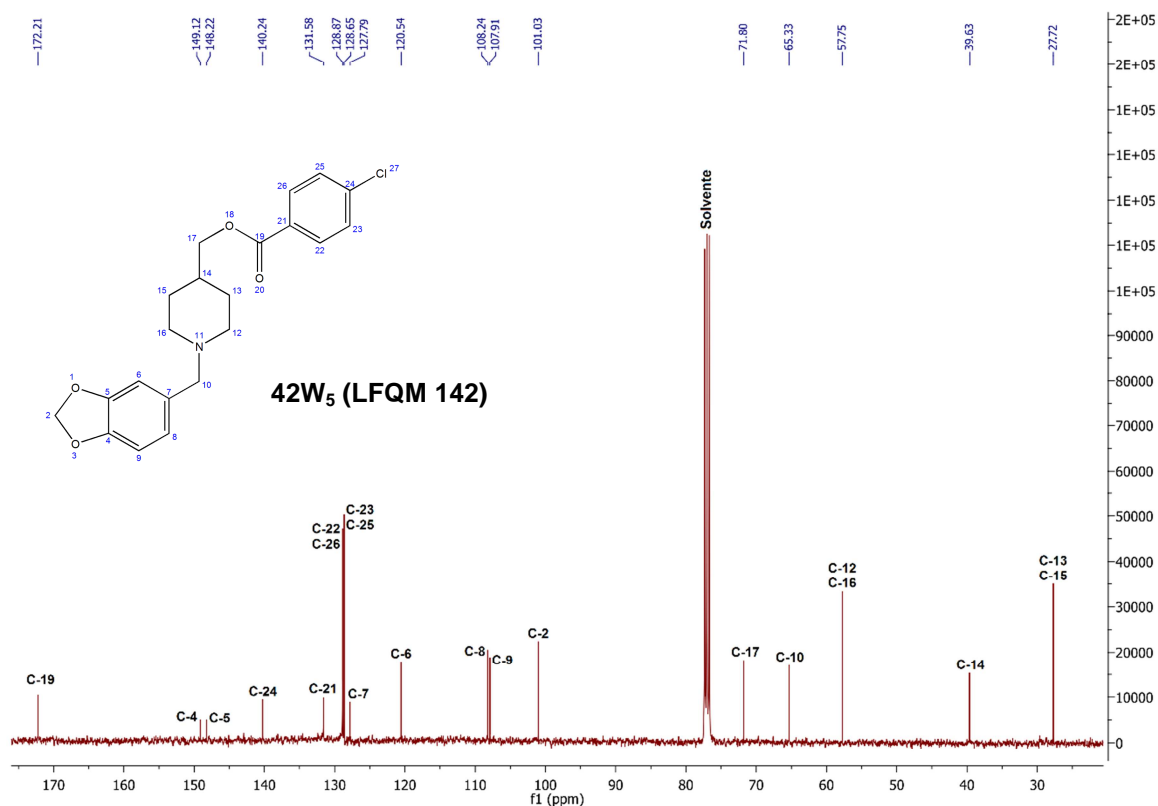


Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) do composto **42W₅**

No espectro de massas de alta resolução (Figura 38) do composto **42W₅** foi possível identificar o pico do íon molecular $[\text{M} + 1]$ com m/z 388,1321, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{Cl}$ (MM = 387,85 g/mol), sendo portanto, condizente com a estrutura do éster **42W₅**.

Outros picos referentes aos principais fragmentos de **42W₅** foram observados, salientando-se o pico com m/z 135,0451, correspondente à fragmentação da subunidade metilbenzodioxola e o pico correspondente ao íon molecular acrescido do sódio $[\text{M} + 23]^+$ com valor não atribuído no espectro, mas de aproximadamente m/z 410.

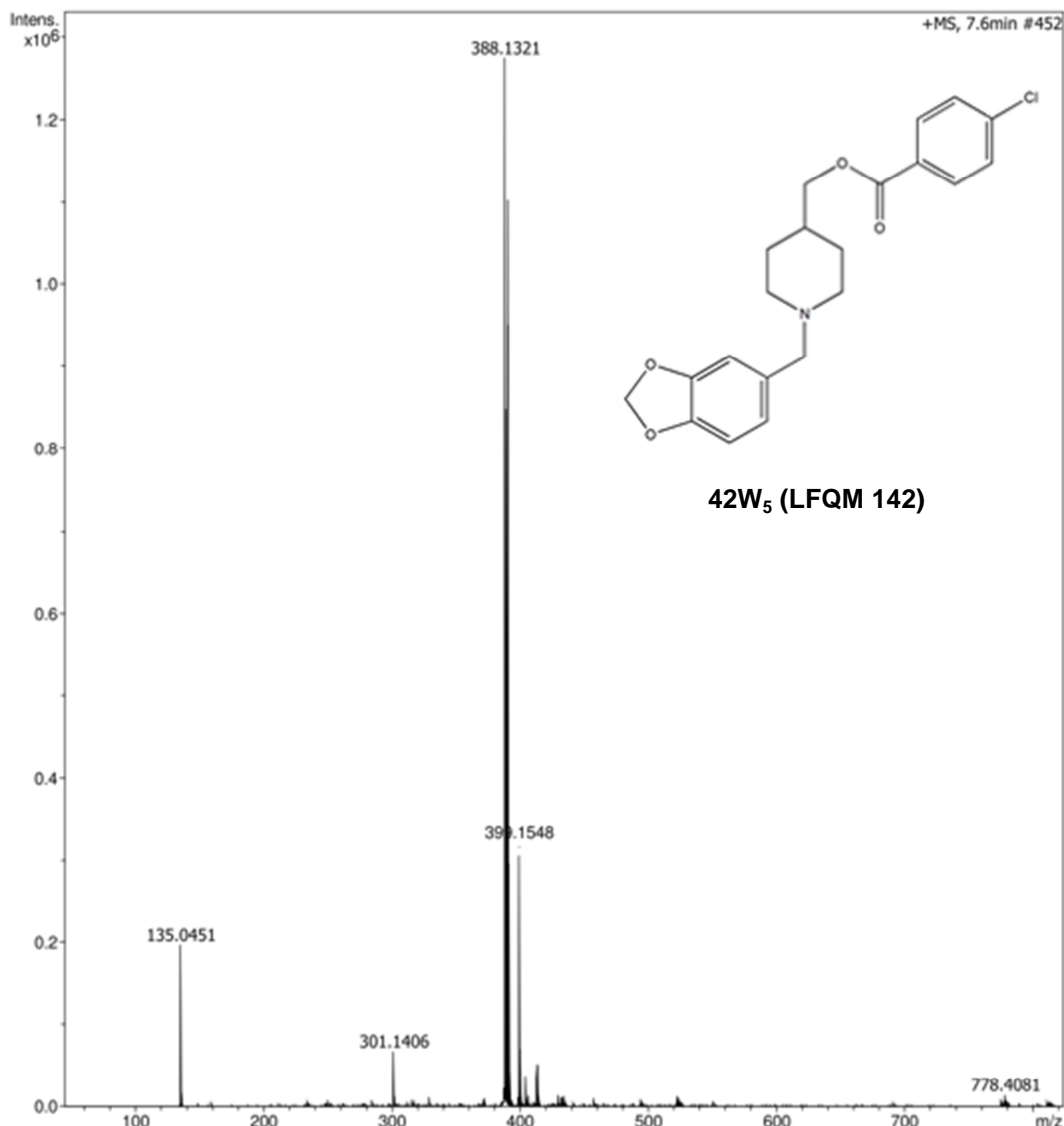


Figura 38: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto **42W₅**

O éster **LFQM 144 (42W₆)** apresentou-se como um sólido de coloração amarelada, obtido com rendimento de 35% após purificação. O rendimento global de obtenção do éster **42W₆** foi de 65%.

No espectro na região do IV do composto **42W₆** (Figura 39) pode-se identificar a presença de bandas referentes a $-\text{CH}$ aromático (3080 cm^{-1} e 3012 cm^{-1}) e $-\text{CH}$ não aromático (2926 cm^{-1} e 2860 cm^{-1}) e de duas bandas fortes referentes à deformação axial do grupamento dioxola em 1037 cm^{-1} e 1249 cm^{-1} . A presença do grupo $-\text{NO}_2$ pode ser verificada através das duas bandas fortes em 1350 cm^{-1} e 1525 cm^{-1} . A ausência da banda de deformação axial de $-\text{OH}$, bem como o

aparecimento da banda referente à deformação axial de C–O de função éster em 1298 cm^{-1} e a nítida presença da banda forte referente à deformação axial de C=O em 1722 cm^{-1} , confirmaram a formação do éster desejado. Pode-se verificar também a presença de bandas referentes à deformação axial de C=C de aromático entre 1600 cm^{-1} e 1465 cm^{-1} .

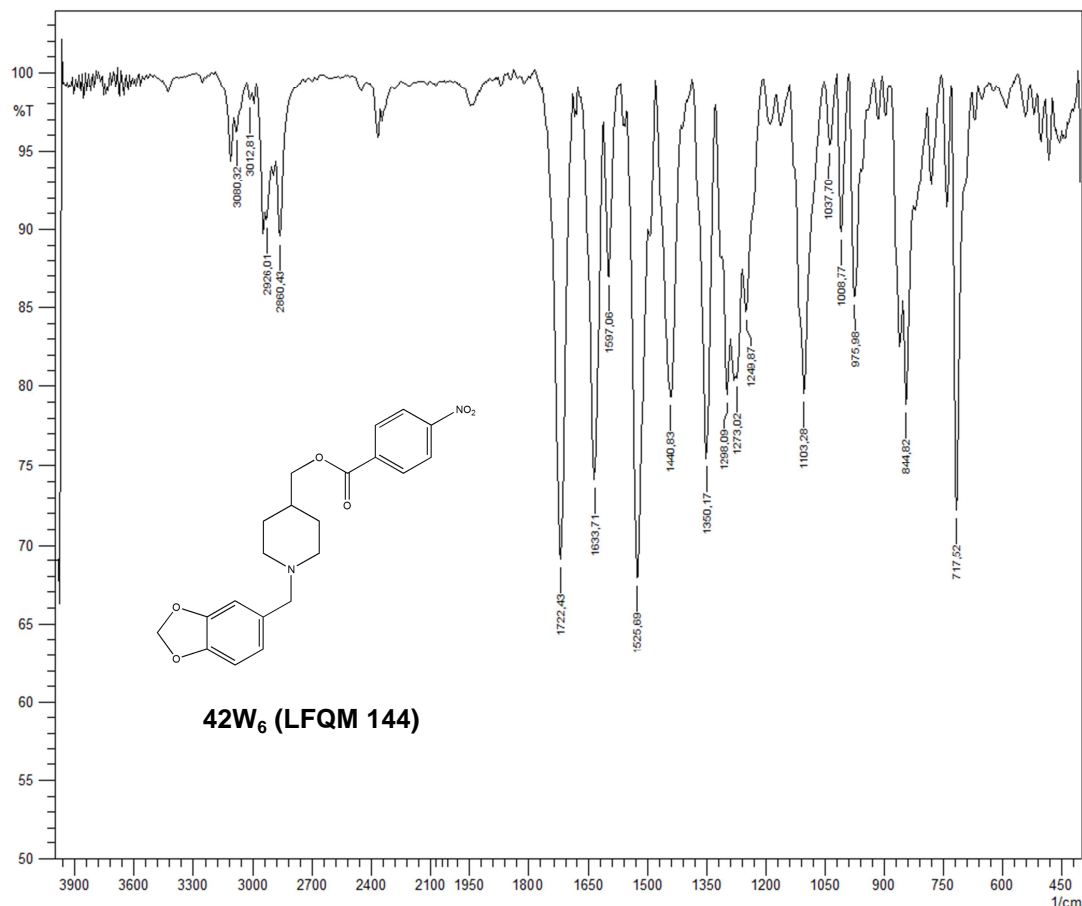


Figura 39: Espectro no IV (KBr) do composto **42W₆**

No espectro de RMN de ^1H do éster **42W₆** (Figura 40), foi observada a presença de um simpleto em δ 6,86 referente a H-6 e um duplete centrado em δ 6,77 ($J = 1,2\text{ Hz}$), integrando para 2H, atribuído a H-8 e H-9. Tem-se também a presença do multiplete mais desblindado em δ 8,26 referente aos hidrogênios aromáticos H-22, H-23, H-25 e H-26.

O simpleto em δ 5,95, integrando para 2H, foi atribuído ao grupo metileno do anel dioxola (H-2). Já o duplete centrado em δ 4,09 ($J = 12\text{ Hz}$) corresponde aos hidrogênios metilênicos (H-17) vizinhos ao grupamento éster formado, enquanto que o simpleto em δ 3,68 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-10).

Os demais sinais do espectro são compatíveis com todos os hidrogênios do anel piperidínico, sendo o multipletto em δ 3.09 atribuído a H-12 e H-16 equatoriais, o duplo-tripletto em δ 2,10 relativo a H-12 e H-16 axiais, enquanto que o multipletto em δ 1,90 foi atribuído a H-13 e H-15 equatoriais e o multipletto em δ 1,25 a H-13 e H-15 axiais. Já o multipletto em δ 1,59 foi atribuído a H-14.

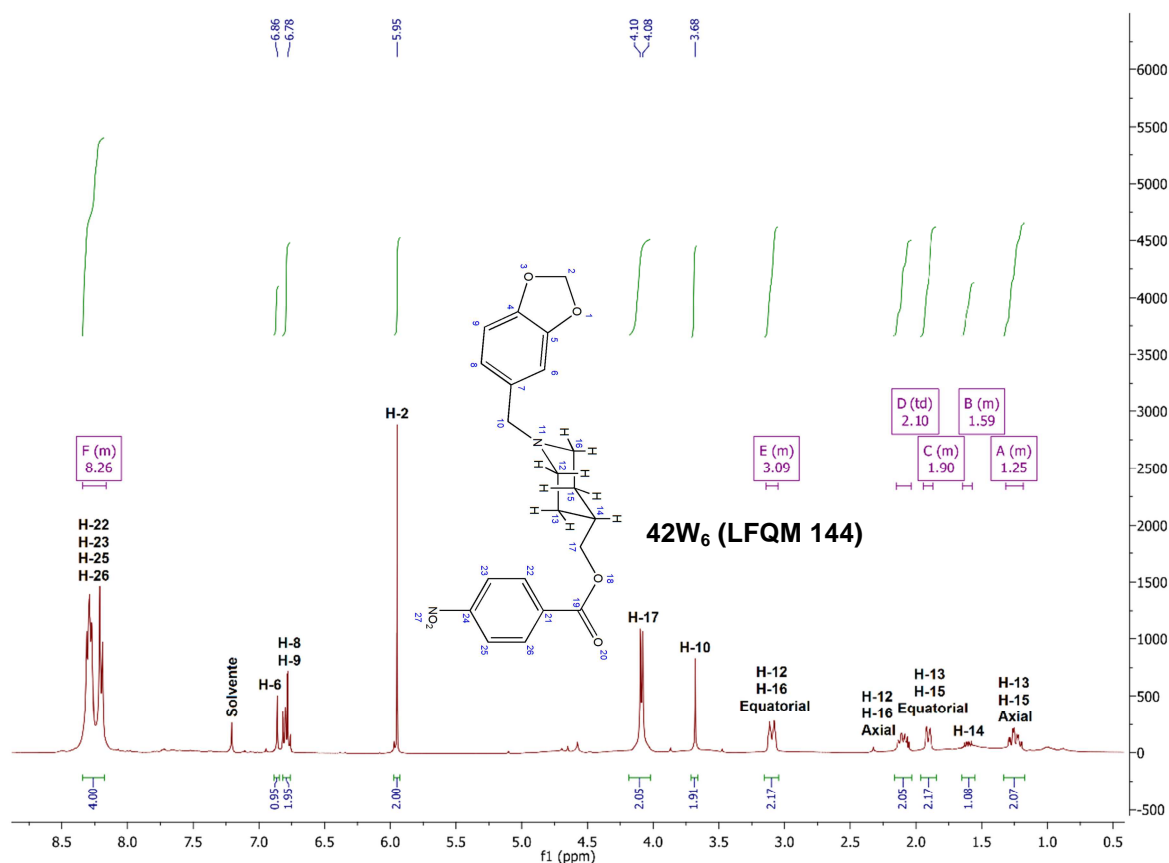


Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto **42W₆**

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 41) pode-se verificar a presença de 17 sinais compatíveis com a estrutura do composto **42W₆**.

Os 6 sinais mais desblindados foram atribuídos aos carbonos C-19 (δ 164,54), C-24 (δ 160,83), C-4 (δ 150,67), C-5 (δ 148,38), C-21 (δ 142,18) e C-7 (δ 135,31). O sinal em δ 130,70 foi atribuído a C-22 e C-26, enquanto que o sinal em δ 123,92 foi atribuído aos carbonos C-23 e C-25. Os sinais em δ 123,64, δ 108,18 e δ 107,85 referem-se aos carbonos aromáticos restantes C-6, C-8 e C-9, respectivamente.

Em δ 101,00 foi atribuído ao carbono metilênico (C-2) do grupo metilenodioxola, enquanto que em δ 69,23 foi identificado o sinal de C-17. O sinal em δ 67,26 foi atribuído ao carbono metilênico-benzílico (C-10) e o sinal em δ 47,34 foi atribuído aos carbonos C-12 e C-16 do anel piperidínico ligados diretamente ao átomo de nitrogênio. Por fim, o sinal em δ 35,73 foi atribuído a C-14 e em δ 28,46 aos carbonos metilênicos (C-13 e C-15).

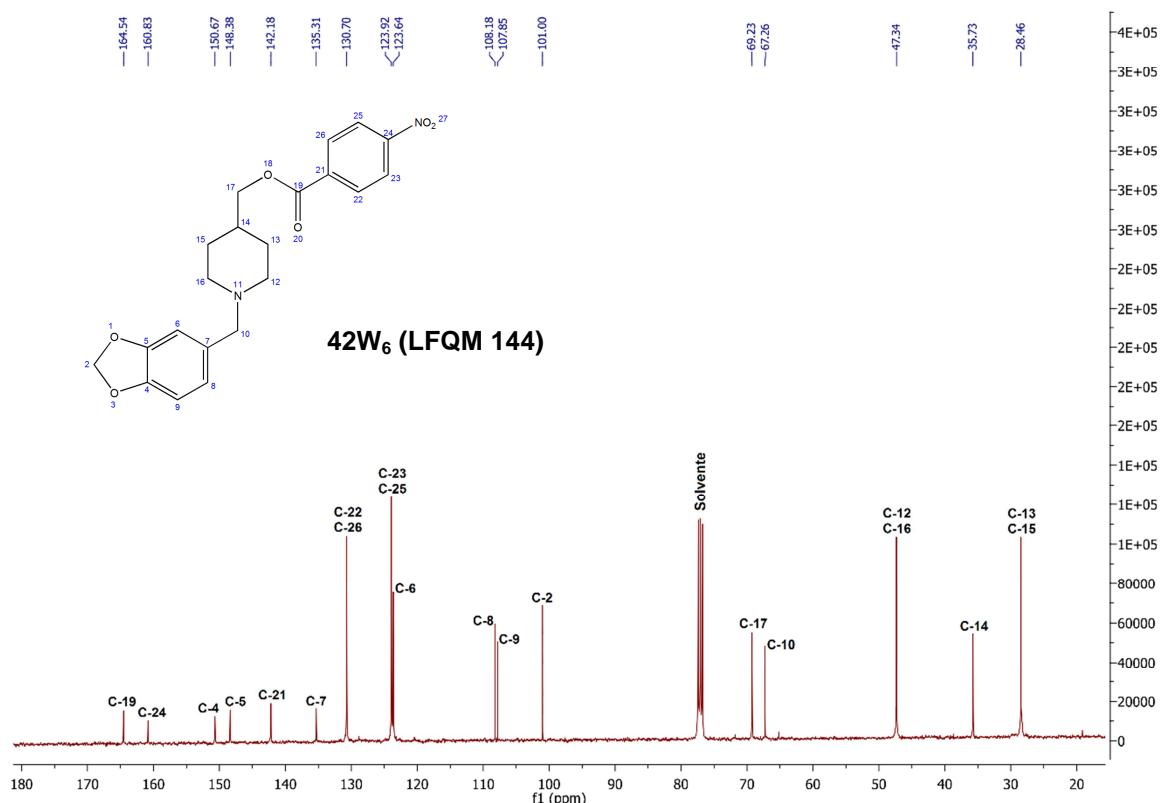


Figura 41: Espectro de RMN de ¹³C (200 MHz, CDCl₃) do composto **42W₆**

No espectro de massas de alta resolução (Figura 42) do composto **42W₆** foi possível identificar o pico do íon molecular [M + 1] com m/z 399,1296, compatível com a fórmula molecular C₂₁H₂₂N₂O₆ (MM = 398,41 g/mol), sendo portanto, condizente com a estrutura do éster **42W₆**.

Verifica-se a presença do pico com m/z 135,0425 indicando fragmentação da subunidade metilbenzodioxola. O pico referente ao íon molecular acrescido do sódio [M + 23]⁺ não foi registrado no espectro.

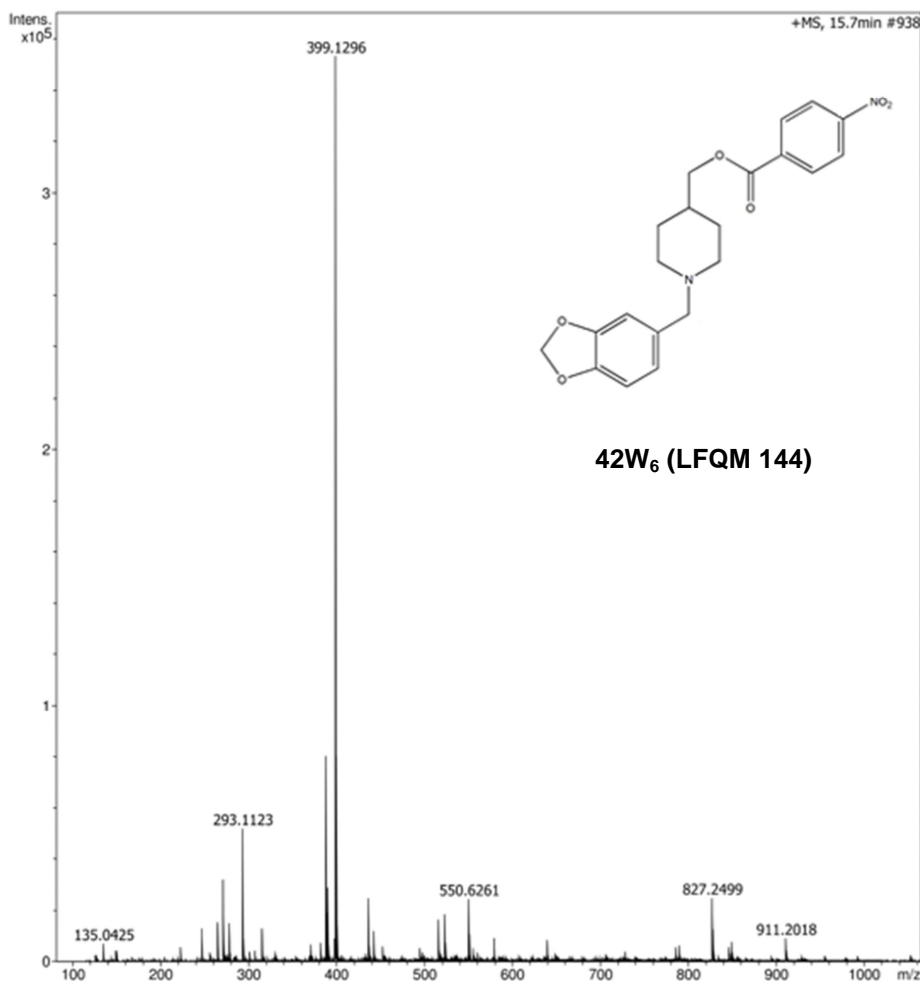


Figura 42: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto **42W₆**

O éster **LFQM 145 (42W₇)** apresentou-se como um sólido branco, obtido com rendimento de 43% após purificação. O rendimento global de obtenção do éster **42W₇** foi de 69%.

No espectro na região do IV do composto **42W₇** (Figura 43) pode-se identificar a presença de bandas referentes a –CH aromático (3080 cm⁻¹) e –CH não aromático (2937 cm⁻¹ e 2839 cm⁻¹) e de duas bandas fortes referentes à deformação axial do grupamento dioxola em 1024 cm⁻¹ e 1220 cm⁻¹. A ausência da banda de deformação axial de –OH, bem como o aparecimento da banda referente à deformação axial de C–O de função éster em 1271 cm⁻¹ e a nítida presença da banda forte referente à deformação axial de C=O em 1710 cm⁻¹, confirmaram a formação do éster desejado. Pode-se verificar também a presença de bandas referentes à deformação axial de

C=C de aromático entre 1600 cm^{-1} e 1465 cm^{-1} . Pode ser verificada ainda a presença de banda de deformação angular assimétrica de $-\text{CH}_3$ em 1446 cm^{-1} .

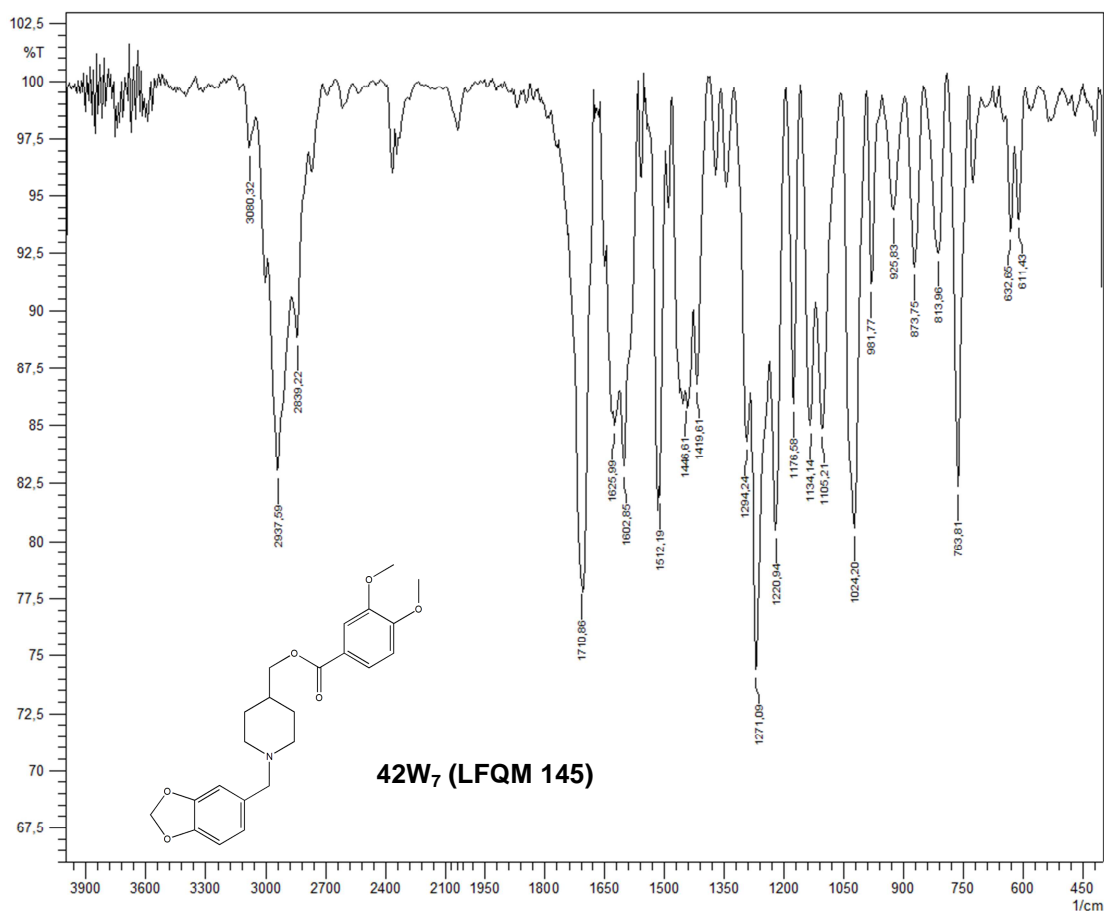


Figura 43: Espectro no IV (KBr) do composto **42W₇**

No espectro de RMN de ^1H do éster **42W₇** (Figura 44), foi observada a presença de um simpleto em δ 6,85 referente a H-6 e um sinal em δ 6,76, integrando para 2H, atribuído a H-8 e H-9. Tem-se também a presença de um duplo-dupletto centrado em δ 7,53 referente aos hidrogênios aromáticos H-22 e H-23 e um simpleto em δ 7,28 atribuído a H-26.

O simpleto em δ 5,94, integrando para 2H, foi atribuído ao grupo metileno do anel dioxola (H-2). Já o dupletto centrado em δ 4,21 ($J = 12\text{ Hz}$) corresponde aos hidrogênios metilênicos (H-17) vizinhos ao grupamento éster formado, enquanto que o simpleto em δ 3,61 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-10).

Pode-se verificar a presença do sinal em δ 3,92 referentes aos hidrogênios metílicos H-28 e H-30. Os demais sinais do espectro são compatíveis com todos os hidrogênios do anel piperidínico, sendo o multipletto em δ 3,09 atribuído a H-12 e

H-16 equatoriais, o duplo-triplete em δ 2,11 relativo a H-12 e H-16 axiais, enquanto que o multiplete em δ 1,81 foi atribuído a H-13 e H-15 equatoriais e o multiplete em δ 1,37 a H-13 e H-15 axiais. Já o multiplete em δ 1,60 foi atribuído a H-14.

Os sinais não atribuídos presentes na região de aromáticos podem ser devido a algum tipo de contaminação existente na amostra.

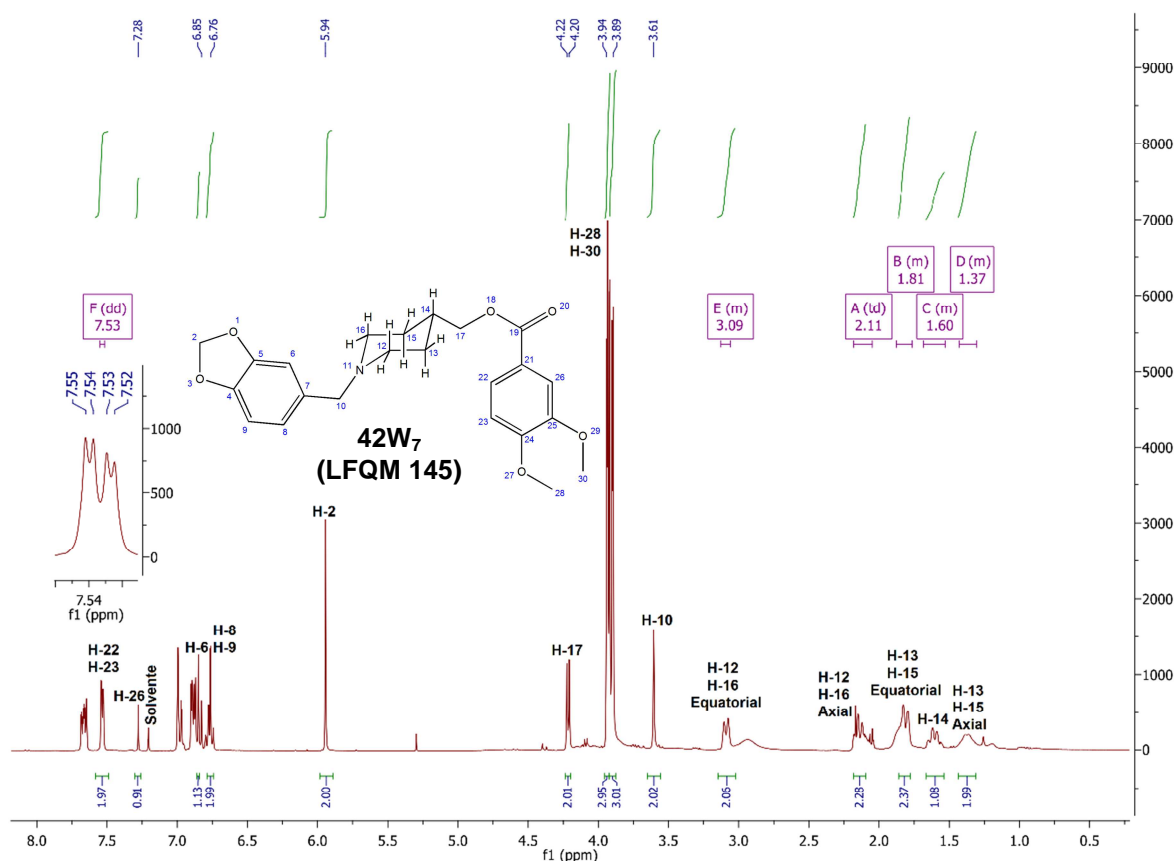


Figura 44: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto **42W₇**

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 45) pode-se verificar a presença de 20 sinais compatíveis com a estrutura do composto **42W₇**.

Os 6 sinais mais desblindados foram atribuídos aos carbonos C-19 (δ 166,32), C-24 (δ 153,15), C-25 (δ 150,24), C-4 (δ 147,73), C-5 (δ 147,14) e C-21 (δ 128,41). Em δ 122,73 tem-se o sinal atribuído a C-7.

Os sinais em δ 123,53 e δ 123,17 foram atribuídos a C-26 e C-6, respectivamente. O sinal em δ 112,04 foi atribuído a C-22, enquanto que o sinal em δ 110,29 foi atribuído a C-23. Já os sinais em δ 110,11 e δ 107,99 são referentes a C-8 e C-9, respectivamente.

Em δ 101,02 foi atribuído ao carbono metilênico (C-2) do grupo metilenodioxola, enquanto que em δ 68,42 foi identificado o sinal de C-17. O sinal em δ 62,14 foi atribuído ao carbono metilênico-benzílico (C-10) e os sinais em δ 56,03 e δ 55,98 correspondem aos carbonos C-28 e C-30. O sinal em δ 52,97 foi atribuído aos carbonos C-12 e C-16 do anel piperidínico ligados diretamente ao átomo de nitrogênio. Por fim, o sinal em δ 36,03 foi atribuído a C-14 e em δ 28,04 aos carbonos metilênicos (C-13 e C-15).

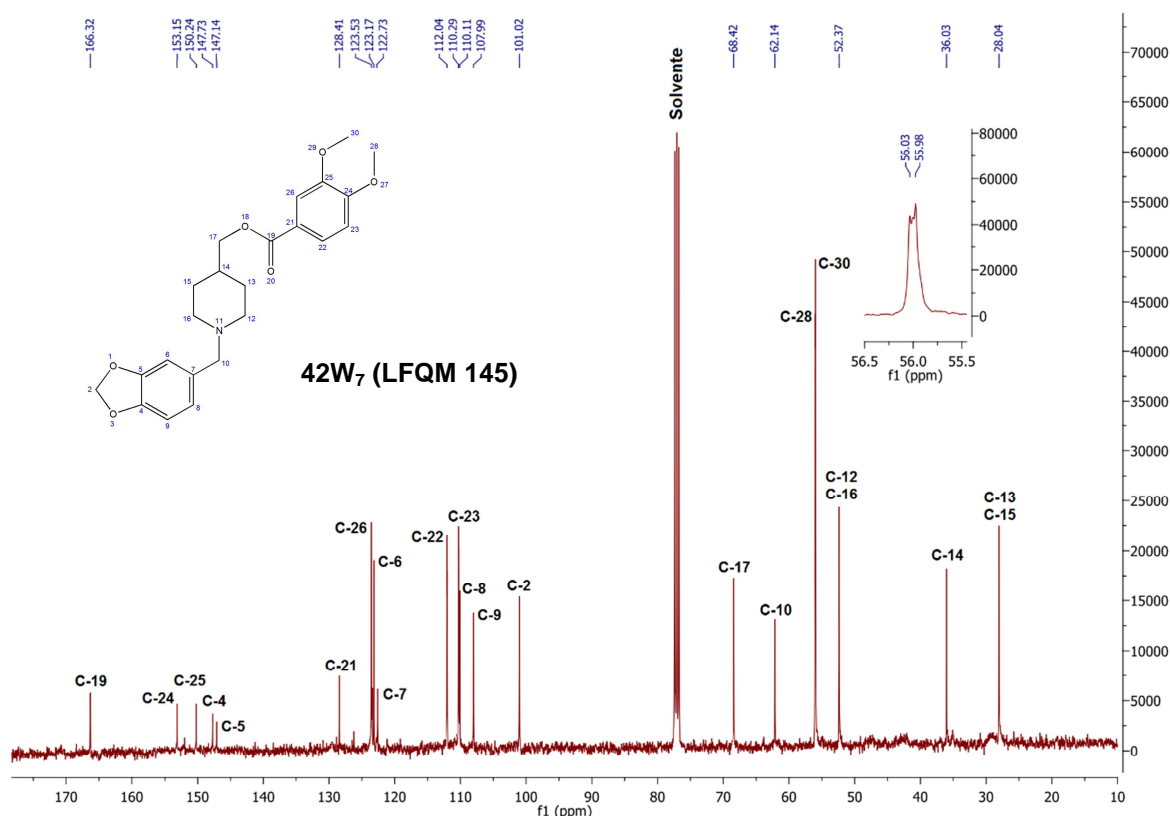


Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) do composto **42W₇**

No espectro de massas de alta resolução (Figura 46) do composto **42W₇** foi possível identificar o pico do íon molecular $[\text{M} + 1]$ com m/z 414,1911, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_6$ ($\text{MM} = 413,46$ g/mol), sendo portanto, condizente com a estrutura do éster **42W₇**.

Outros picos referentes aos principais fragmentos de **42W₇** foram observados, salientando-se o pico com m/z 135,0423, correspondente à fragmentação da subunidade metilbenzodioxola e pico correspondente ao íon molecular acrescido do

sódio $[M + 23]^+$ que apesar de seu valor não estar atribuído no espectro pode ser verificado em aproximadamente m/z 436.

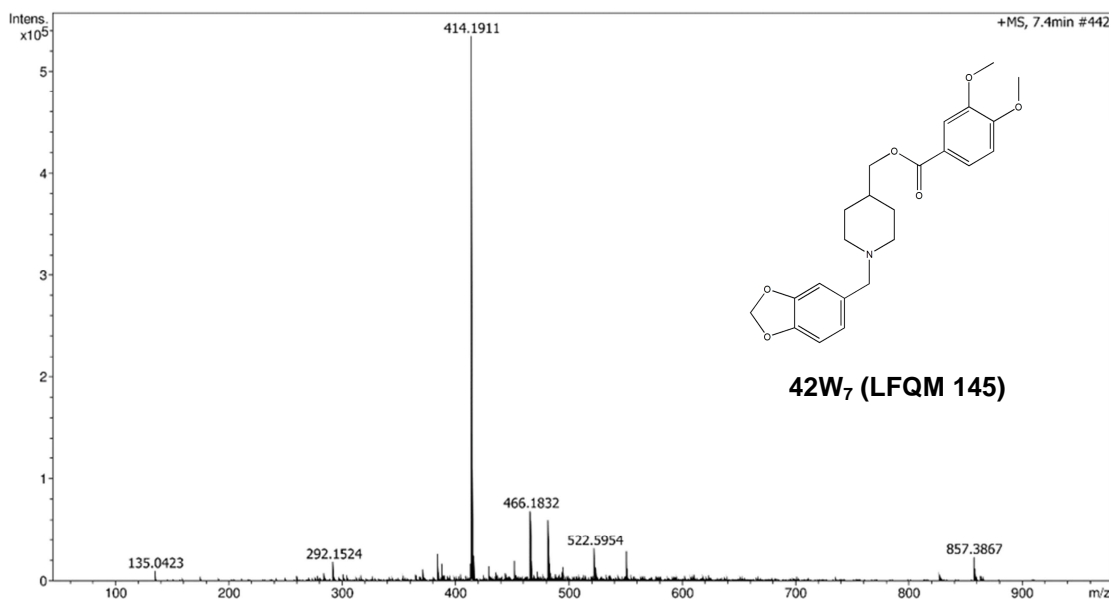


Figura 46: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto **42W₇**

O éster **LFQM 143 (48)** apresentou-se como um sólido amarelo claro, obtido com rendimento de 54% após purificação. O rendimento global de obtenção do éster **48** foi de 74,5%.

No espectro na região do IV do composto **48** (Figura 47) pode-se identificar a presença de bandas referentes a $-\text{CH}$ aromático (3061 cm^{-1}) e $-\text{CH}$ não aromático (2956 cm^{-1} e 2933 cm^{-1}) e de duas bandas fortes referentes à deformação axial do grupamento dioxola em 1037 cm^{-1} , sendo que a segunda banda pode ser verificada concomitantemente ao estiramento de $\text{C}-\text{O}$ de éster na banda larga em 1253 cm^{-1} . A ausência da banda de deformação axial de $-\text{OH}$, bem como a nítida presença da banda forte referente à deformação axial de $\text{C}=\text{O}$ em 1720 cm^{-1} , confirmaram a formação do éster desejado. Pode-se verificar também a presença de bandas referentes à deformação axial de $\text{C}=\text{C}$ de aromático entre 1600 cm^{-1} e 1465 cm^{-1} e bandas referentes ao estiramento de $\text{C}=\text{C}$ de alceno observadas em 1591 cm^{-1} e 1643 cm^{-1} .

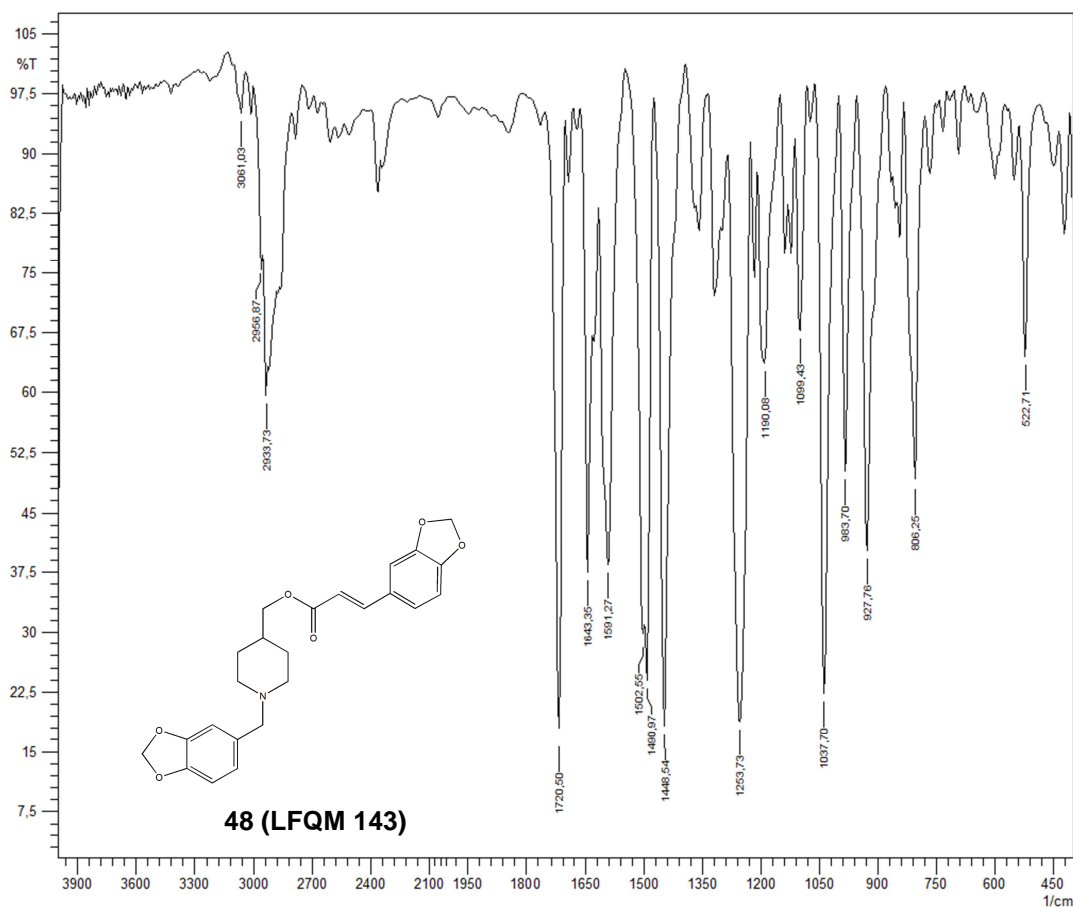


Figura 47: Espectro no IV (KBr) do composto **48**

No espectro de RMN de ^1H do éster **48** (Figura 48), foi observada a presença de um simpleto em δ 6,81 referente a H-6 e um sinal em δ 6,79, integrando para 2H, atribuído a H-8 e H-9. Tem-se também a presença de um duplete centrado em δ 7,58 ($J = 18$ Hz) referente ao hidrogênio H-22 e outro duplete centrado em δ 6,71 ($J = 18$ Hz) referente a H-21. O sinal em δ 7,02 foi atribuído a H-24 e H-25, enquanto que o simpleto em δ 7,26 refere-se a H-28.

Os simpletos em δ 5,99 e δ 5,96 integrando para 2H cada sinal, foram atribuídos aos grupos metileno dos anéis dioxola (H-30 e H-2, respectivamente). O duplete centrado em δ 4,09 ($J = 12$ Hz) corresponde aos hidrogênios metilênicos (H-17) vizinhos ao grupamento éster formado, enquanto que o simpleto em δ 3,50 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-10).

Os demais sinais do espectro são compatíveis com todos os hidrogênios do anel piperidínico, sendo o multiplete em δ 3,11 atribuído a H-12 e H-16 equatoriais, o duplo-triplete em δ 2,03 relativo a H-12 e H-16 axiais, enquanto que o multiplete em

δ 1,62 foi atribuído a H-13 e H-15 equatoriais e o multipeto em δ 1,23 a H-13 e H-15 axiais. Já o multipeto em δ 1,44 foi atribuído a H-14.

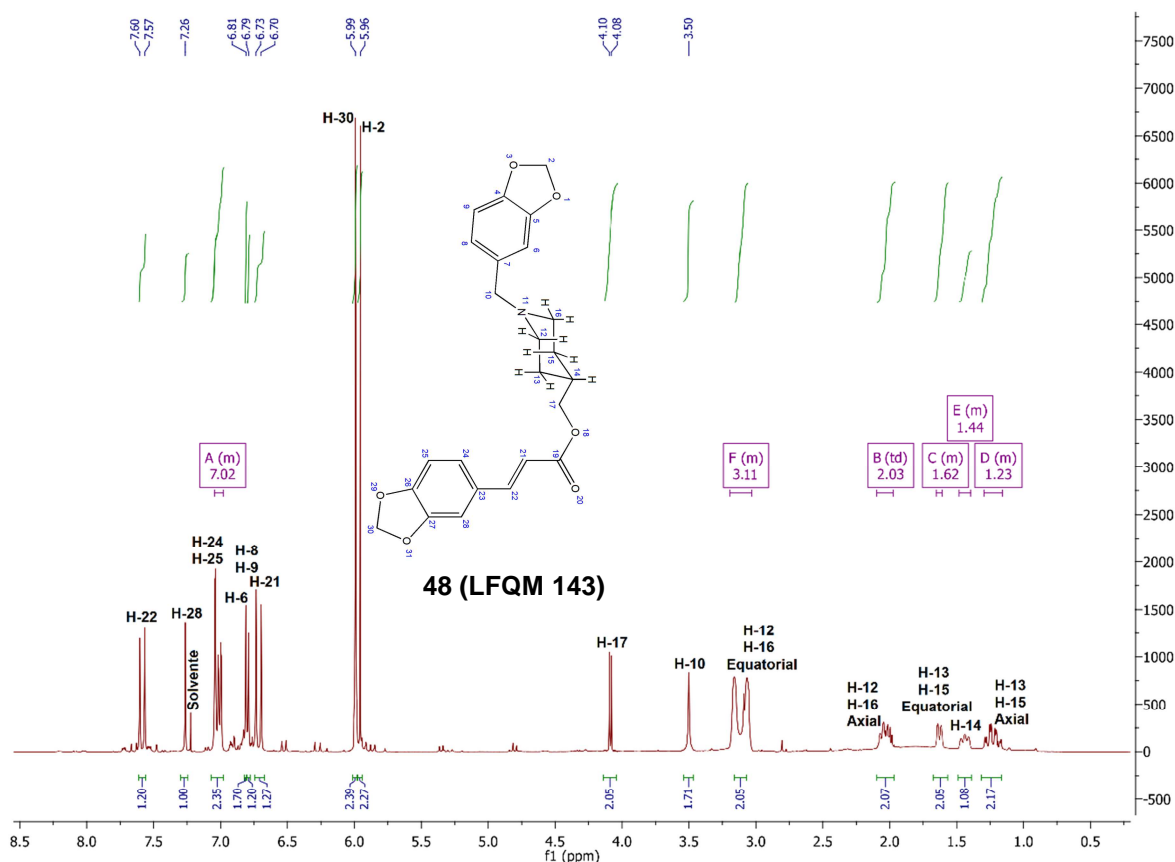


Figura 48: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto **48**

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 49) pode-se verificar a presença de 22 sinais compatíveis com a estrutura do composto **48**.

Os 5 sinais mais desblindados foram atribuídos aos carbonos C-19 (δ 166,88), C-26 (δ 148,95), C-27 (δ 148,21), C-4 (δ 147,45) e C-5 (δ 146,79). Em δ 133,00 e δ 129,81 tem-se os sinais atribuídos a C-7 e C-23, respectivamente.

O sinal em δ 142,18 foi atribuído C-22, enquanto que o sinal em δ 115,38 foi atribuído a C-21. Os sinais em δ 123,79 e δ 121,69 foram atribuídos a C-28 e C-6, respectivamente. Já os sinais em δ 110,36, δ 108,51, δ 107,91 e δ 106,39 foram atribuídos a C-24, C-25, C-8 e C-9, respectivamente.

Em δ 101,41 e δ 101,20 foram atribuídos aos carbonos metilênicos (C-30 e C-2, respectivamente) dos grupos metilendioxola, enquanto que em δ 71,59 foi identificado o sinal de C-17. O sinal em δ 64,40 foi atribuído ao carbono metilênico-benzílico (C-10). O sinal em δ 52,23 foi atribuído aos carbonos C-12 e C-16 do anel

piperidínico ligados diretamente ao átomo de nitrogênio. Por fim, o sinal em δ 35,96 foi atribuído a C-14 e em δ 27,83 aos carbonos metilênicos (C-13 e C-15).

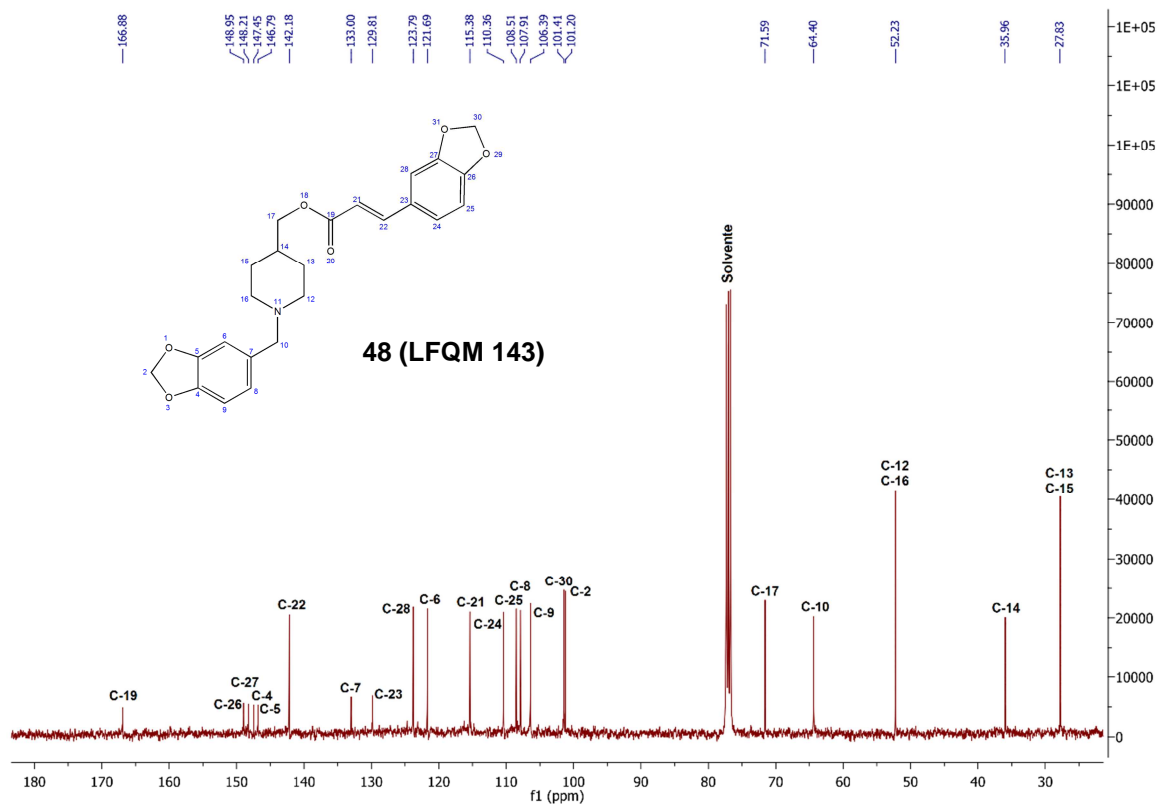


Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) do composto **48**

No espectro de massas de alta resolução (Figura 50) do composto **48** foi possível identificar o pico do íon molecular $[\text{M} + 1]$ com m/z 424,1720, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}_6$ ($\text{MM} = 423,46$ g/mol), sendo portanto, condizente com a estrutura do éster **48**.

Outros picos referentes aos principais fragmentos de **48** foram observados, salientando-se o pico com m/z 135,0425, correspondente à fragmentação da subunidade metilbenzodioxola e pico correspondente ao íon molecular acrescido do sódio $[\text{M} + 23]^+$ que apesar de seu valor não estar atribuído no espectro pode ser verificado em aproximadamente m/z 446.

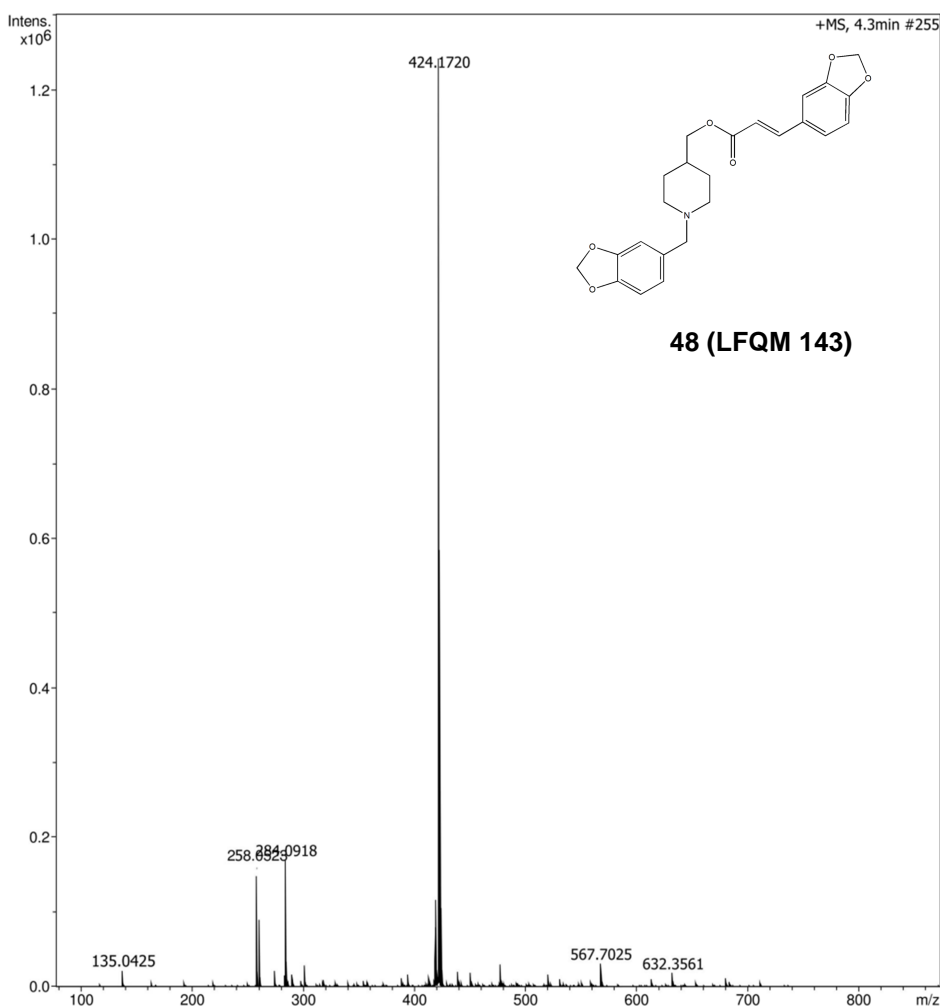
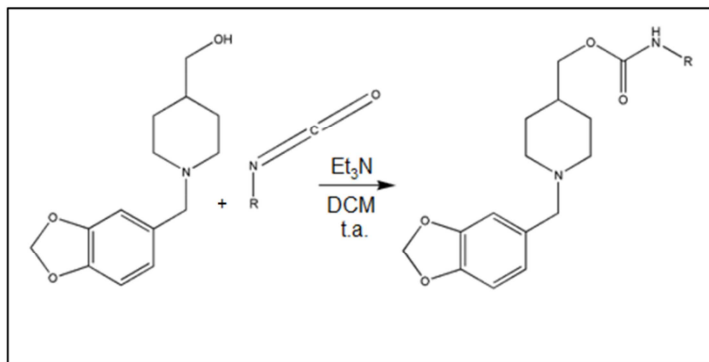


Figura 50: Espectro de massas obtido pela técnica de impacto de elétrons do composto **48**

Uma vez obtida a série dos ésteres originalmente planejada, decidimos pela preparação de dois outros derivados piperidino-benzodioxola, incluindo uma função carbamato. A escolha desta função está sustentada no fato de que carbamatos são mais resistentes à hidrólise e, portanto, mais estáveis no ambiente intracelular do que ésteres, além de serem dois grupos bioisostéricos⁹⁴. Para tanto, foram preparados os carbamatos de hexila (**50R₁**, **LFQM 146**) e etila (**50R₂**, **LFQM 147**), a partir do álcool benzil-piperidínico **45**, cujo esquema reacional é mostrado no Esquema 7.



Esquema 7: Esquema reacional para a obtenção dos carbamatos-alvo (**50R₁** e **50R₂**)

O mecanismo de formação destes carbamatos (Figura 51) envolve inicialmente um ataque nucleofílico do grupo hidroxila de **45** ao carbono eletrofílico do isocianato, levando à formação do aduto **45'**. Na sequência, a Et₃N atua como base abstraindo o hidrogênio ácido do oxônio, levando à formação do derivado **45''**, que sofre restabelecimento da ligação C=O, concomitante à transferência de H⁺ pelo ácido conjugado da trietilamina, gerando o carbamato desejado.

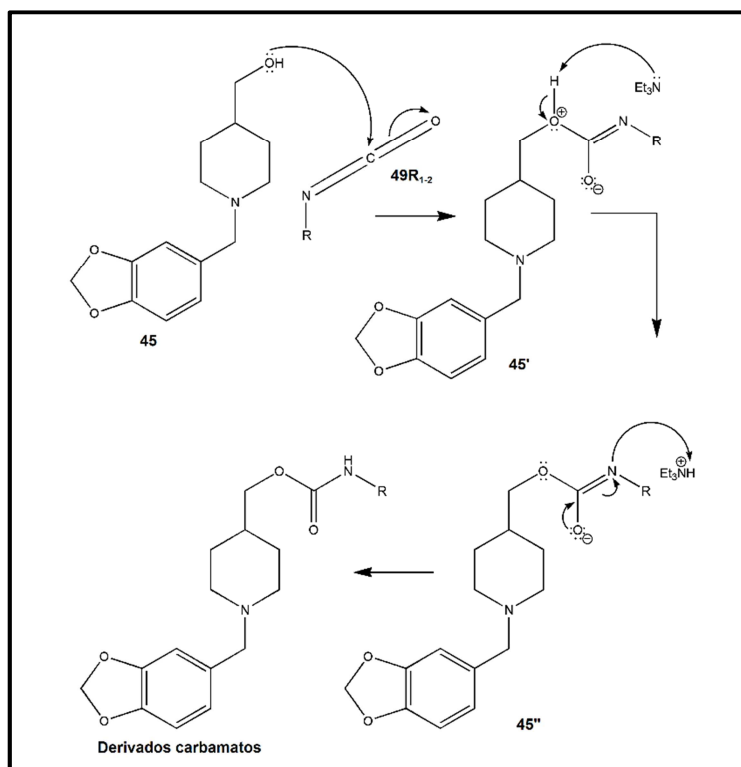


Figura 51: Mecanismo proposto para a obtenção dos carbamatos-alvo

O carbamato **LFQM 146 (50R₁)** apresentou-se como um sólido branco, obtido com rendimento de 85% após purificação em coluna cromatográfica. O rendimento global de obtenção do carbamato **50R₁** foi de 90%.

No espectro na região do IV do composto **50R₁** (Figura 52) pode-se identificar a presença de bandas referentes a –CH aromático (3062 cm⁻¹) e –CH não aromático (2927 cm⁻¹ e 2854 cm⁻¹) e de duas bandas fortes referentes à deformação axial do grupamento dioxola em 1039 cm⁻¹ e 1246 cm⁻¹. A ausência da banda de deformação axial de –OH, bem como a nítida presença da banda forte referente à deformação axial de C=O em 1714 cm⁻¹ e o surgimento da deformação axial de –NH de amida secundária em 3331 cm⁻¹ confirmaram a formação do carbamato desejado. Pode-se verificar também a presença de bandas referentes à deformação axial de C=C de aromático entre 1600 cm⁻¹ e 1465 cm⁻¹ e bandas referentes à deformação angular de –CH₂ e –CH₃ entre 1465 cm⁻¹ e 1370 cm⁻¹.

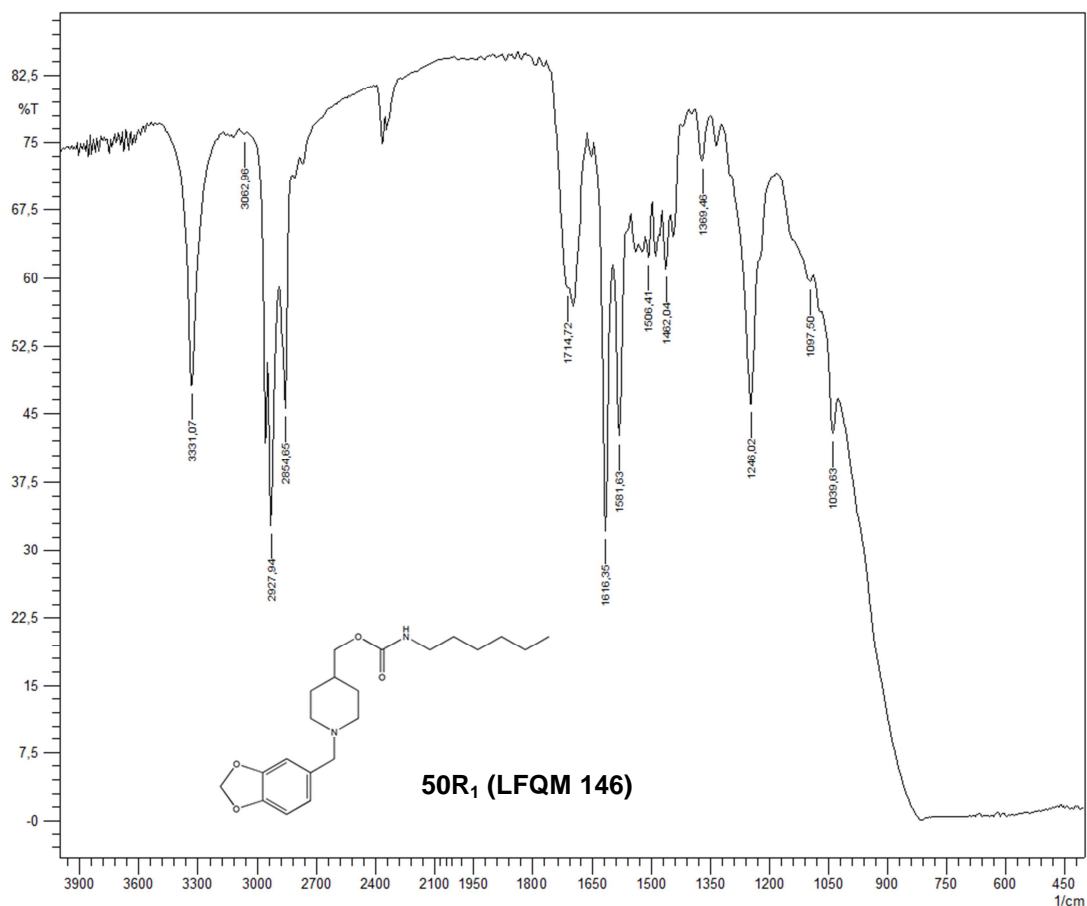


Figura 52: Espectro no IV (NaCl) do composto **50R₁**

No espectro de RMN de ^1H do carbamato **50R₁** (Figura 53), foi observada a presença de um simpleto em δ 6,87 referente a H-6 e um duplete centrado em δ 6,75 ($J = 1,8$ Hz), integrando para 2H, atribuído a H-8 e H-9.

O simpleto em δ 5,94 integrando para 2H, foi atribuído ao grupo metileno do anel dioxola (H-2). Verifica-se a presença do sinal referente ao hidrogênio H-21 do grupo $-\text{NH}$ em δ 4,71. O duplete centrado em δ 3,92 ($J = 12$ Hz) corresponde aos hidrogênios metilênicos (H-17) vizinhos ao grupamento carbamato formado, enquanto que o simpleto em δ 3,45 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-10).

Os demais sinais do espectro são compatíveis com todos os hidrogênios do anel piperidínico e do grupamento alifático ligado ao nitrogênio, sendo o quarteto em δ 3,15 atribuído a H-22, o multiplete em δ 2,92 atribuído a H-12 e H-16 equatoriais, o duplo-triplete em δ 2,02 relativo a H-12 e H-16 axiais, enquanto que o multiplete em δ 1,69 foi atribuído a H-13 e H-15 equatoriais. Por fim, os sinais em δ 1,48 e δ 1,32 foram atribuídos a H-13 axial, H-14, H-15 axial, H-23, H-24, H-25 e H-26. O tripleto mais blindado verificado no espectro em δ 0,89 foi atribuído a H-27.

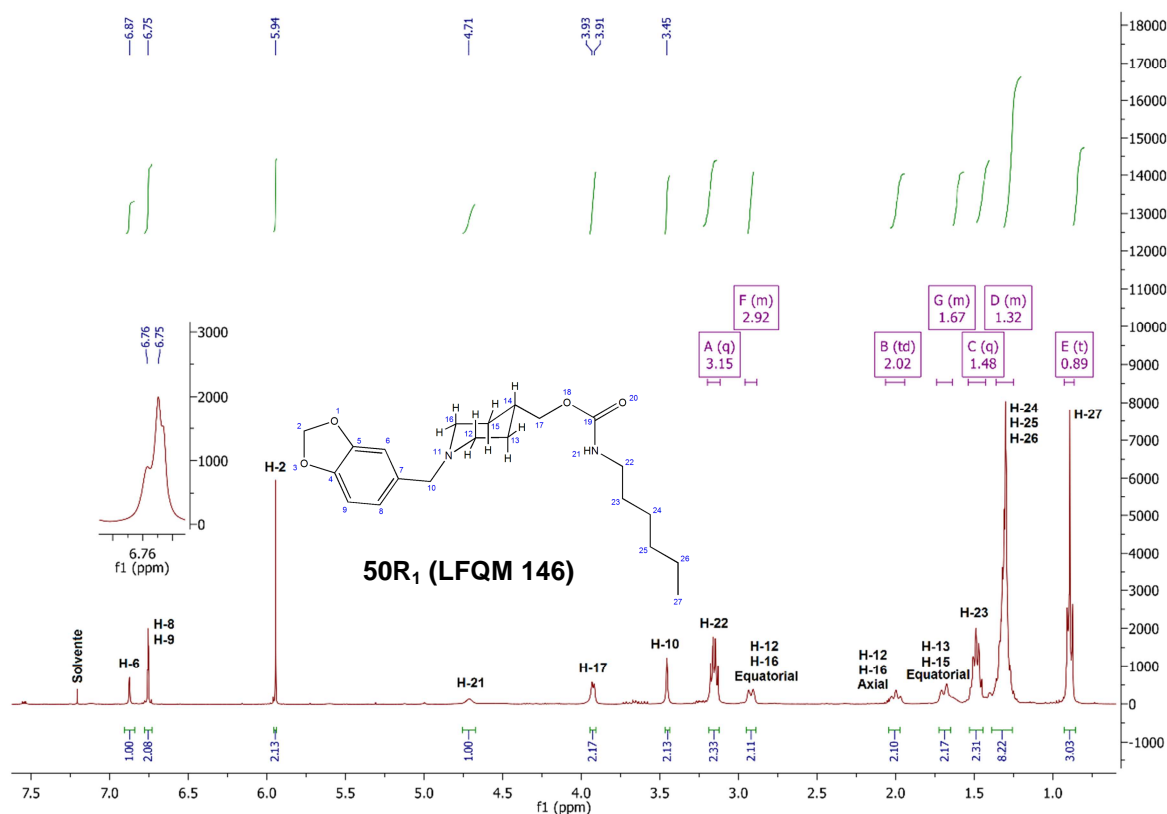


Figura 53: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto **50R₁**

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 54) pode-se verificar a presença de 21 sinais compatíveis com a estrutura do composto **50R₁**.

Os 4 sinais mais desblindados foram atribuídos aos carbonos C-19 (δ 156,72), C-4 (δ 147,62), C-5 (δ 146,68) e C-7 (δ 130,88). Os sinais em δ 122,38, δ 109,62 e δ 107,83 referem-se aos carbonos aromáticos restantes C-6, C-8 e C-9, respectivamente.

Em δ 100,86 foi atribuído ao carbono metilênico (C-2) do grupo metilenodioxola, enquanto que em δ 68,91 foi identificado o sinal de C-17. O sinal em δ 62,87 foi atribuído ao carbono metilênico-benzílico (C-10). O sinal em δ 52,95 foi atribuído aos carbonos C-12 e C-16 do anel piperidínico ligados diretamente ao átomo de nitrogênio. Por fim, o sinal em δ 35,53 foi atribuído a C-14 e em δ 28,58 aos carbonos metilênicos (C-13 e C-15).

Os sinais em δ 40,57, δ 31,54, δ 30,25, δ 26,57, δ 22,55 e δ 13,97 são referentes aos carbonos restantes presentes na estrutura e correspondentes à cadeia carbônica lateral ligada ao nitrogênio, sendo estes C-22, C-23, C-24, C-25, C-26 e C-27, respectivamente.

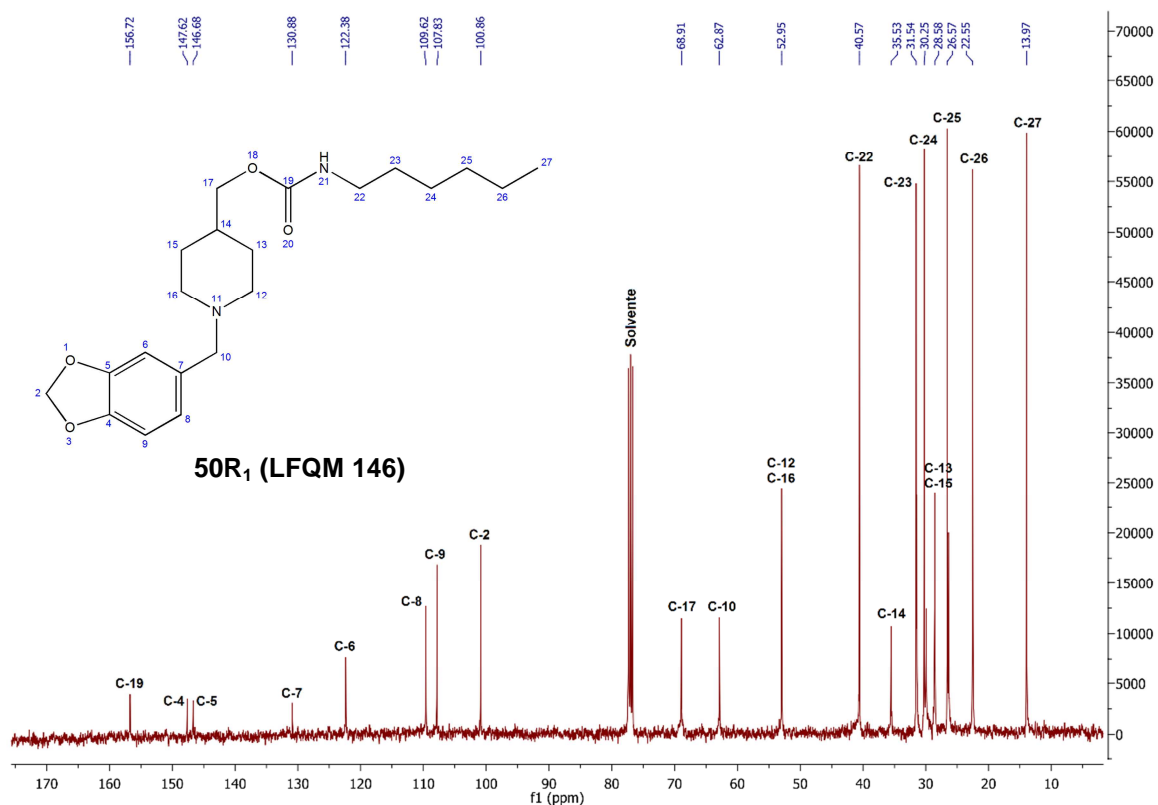


Figura 54: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) do composto **50R₁**

O carbamato **LFQM 147 (50R₂)** apresentou-se como um sólido branco, obtido com rendimento de 63% após purificação em coluna cromatográfica. O rendimento global de obtenção do carbamato **50R₂** foi de 79%.

No espectro na região do IV do composto **50R₂** (Figura 55) pode-se identificar a presença de bandas referentes a –CH aromático (3062 cm⁻¹) e –CH não aromático (2935 cm⁻¹, 2804 cm⁻¹ e 2765 cm⁻¹) e de duas bandas fortes referentes à deformação axial do grupamento dioxola em 1035 cm⁻¹ e 1246 cm⁻¹. A ausência da banda de deformação axial de –OH, bem como a nítida presença da banda forte referente à deformação axial de C=O em 1710 cm⁻¹ e o surgimento da deformação axial de –NH de amida secundária em 3336 cm⁻¹ confirmaram a formação do carbamato desejado. Pode-se verificar também a presença de bandas referentes à deformação axial de C=C de aromático entre 1600 cm⁻¹ e 1465 cm⁻¹ e bandas referentes à deformação angular de –CH₂ e –CH₃ entre 1465 cm⁻¹ e 1370 cm⁻¹.

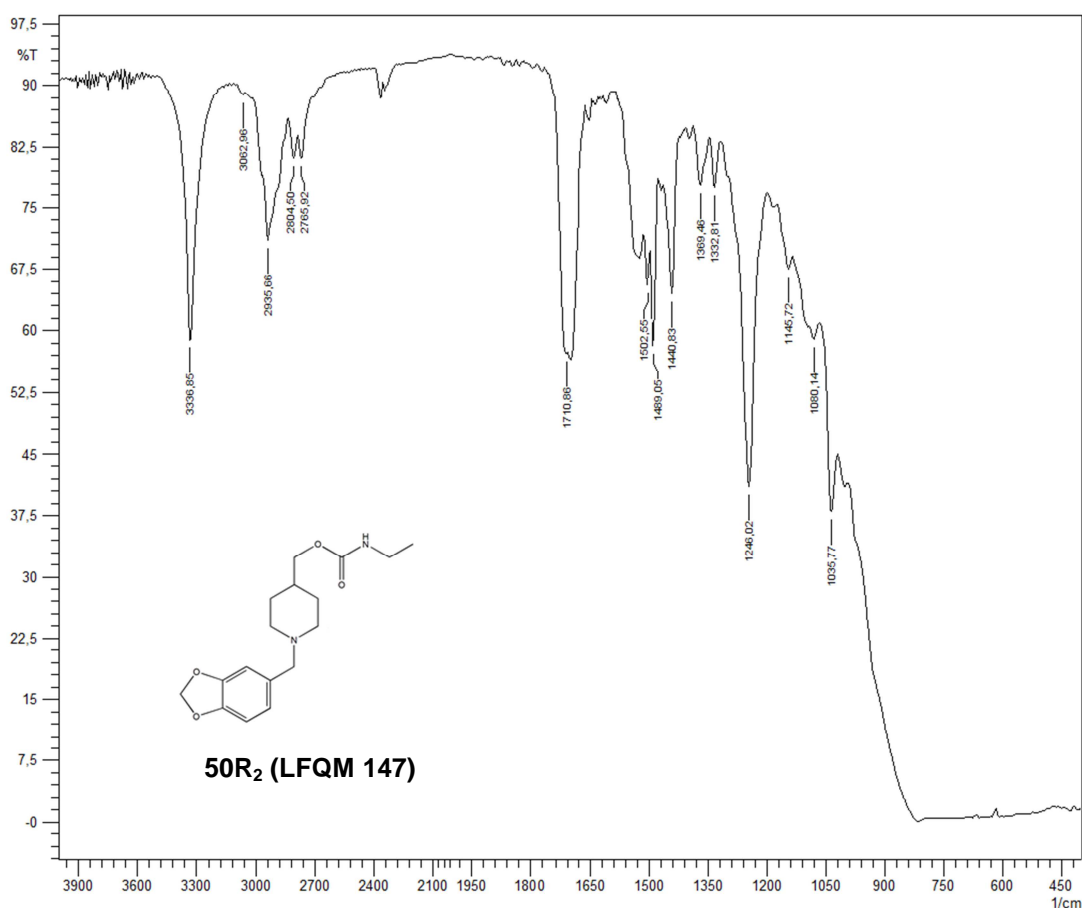


Figura 55: Espectro no IV (NaCl) do composto **50R₂**

No espectro de RMN de ^1H do carbamato **50R₂** (Figura 56), foi observada a presença de um simpleto em δ 6,86 referente a H-6 e um duplete centrado em δ 6,74 ($J = 1,8$ Hz), integrando para 2H, atribuído a H-8 e H-9.

O simpleto em δ 5,94 integrando para 2H, foi atribuído ao grupo metileno do anel dioxola (H-2). Verifica-se a presença do sinal referente ao hidrogênio H-21 do grupo $-\text{NH}$ em δ 4,70. O duplete centrado em δ 3,92 ($J = 12$ Hz) corresponde aos hidrogênios metilênicos (H-17) vizinhos ao grupamento carbamato formado, enquanto que o simpleto em δ 3,43 foi atribuído aos hidrogênios metilênicos benzílicos (H-10).

Os demais sinais do espectro são compatíveis com todos os hidrogênios do anel piperidínico e do grupamento alifático ligado ao nitrogênio, sendo o quinteto em δ 3,21 (integrando para 2H) atribuído a H-22, o multiplete em δ 2,90 atribuído a H-12 e H-16 equatoriais, o duplo-triplete em δ 1,97 relativo a H-12 e H-16 axiais, enquanto que o multiplete em δ 1,68 foi atribuído a H-13 e H-15 equatoriais e o multiplete em δ 1,37 a H-13 axial, H-15 axial e H-14.

O sinal mais blindado, um tripete centrado em δ 1,13, integrando para 3H, foi atribuído a H-23.

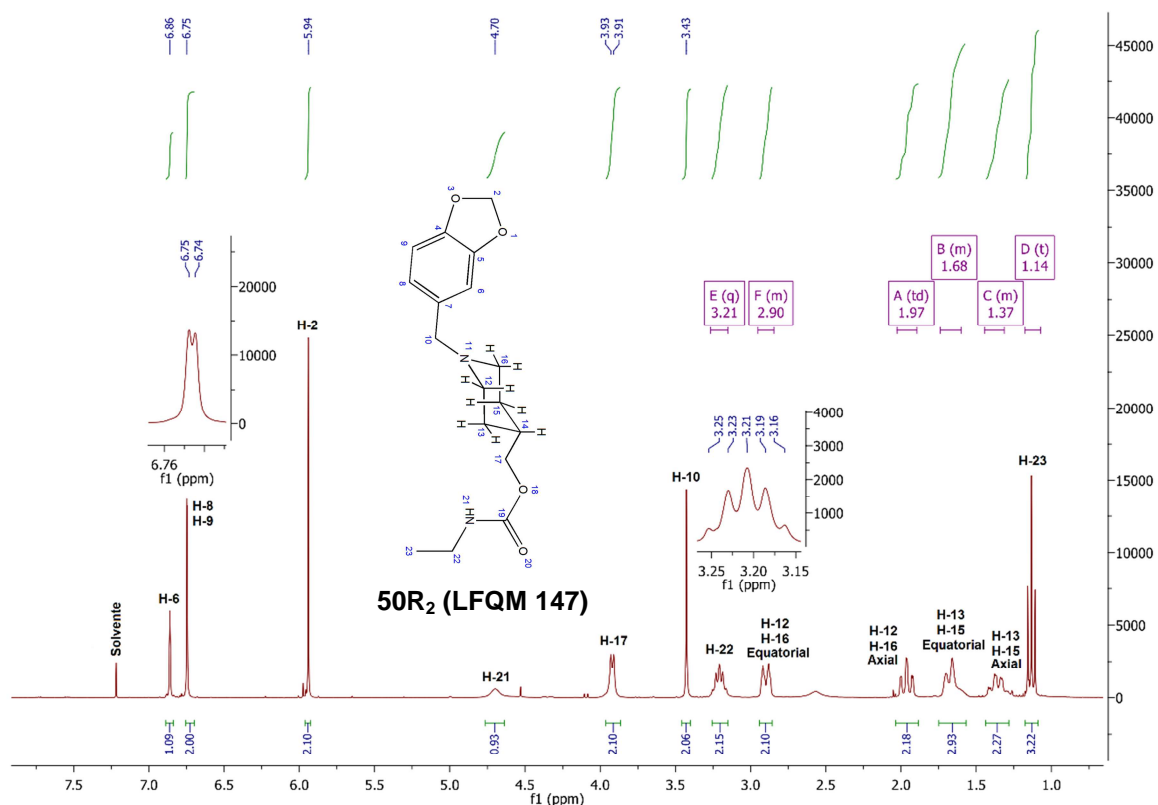


Figura 56: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) do composto **50R₂**

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 57) pode-se verificar a presença de 15 sinais compatíveis com a estrutura do composto **50R₂**.

Os 4 sinais mais desblindados foram atribuídos aos carbonos C-19 (δ 156,61), C-4 (δ 147,58), C-5 (δ 146,59) e C-7 (δ 132,11). Os sinais em δ 122,33, δ 109,61 e δ 107,82 referem-se aos carbonos aromáticos restantes C-6, C-8 e C-9, respectivamente.

Em δ 100,87 foi atribuído ao carbono metilênico (C-2) do grupo metilenodioxola, enquanto que em δ 68,98 foi identificado o sinal de C-17. O sinal em δ 62,98 foi atribuído ao carbono metilênico-benzílico (C-10). O sinal em δ 53,02 foi atribuído aos carbonos C-12 e C-16 do anel piperidínico ligados diretamente ao átomo de nitrogênio. Por fim, o sinal em δ 35,58 foi atribuído a C-14 e em δ 28,69 aos carbonos metilênicos (C-13 e C-15).

Os sinais em δ 35,80 e δ 15,27 são referentes aos dois carbonos restantes presentes na estrutura e correspondentes à cadeia carbônica lateral ligada ao nitrogênio, sendo estes C-22 e C-23, respectivamente.

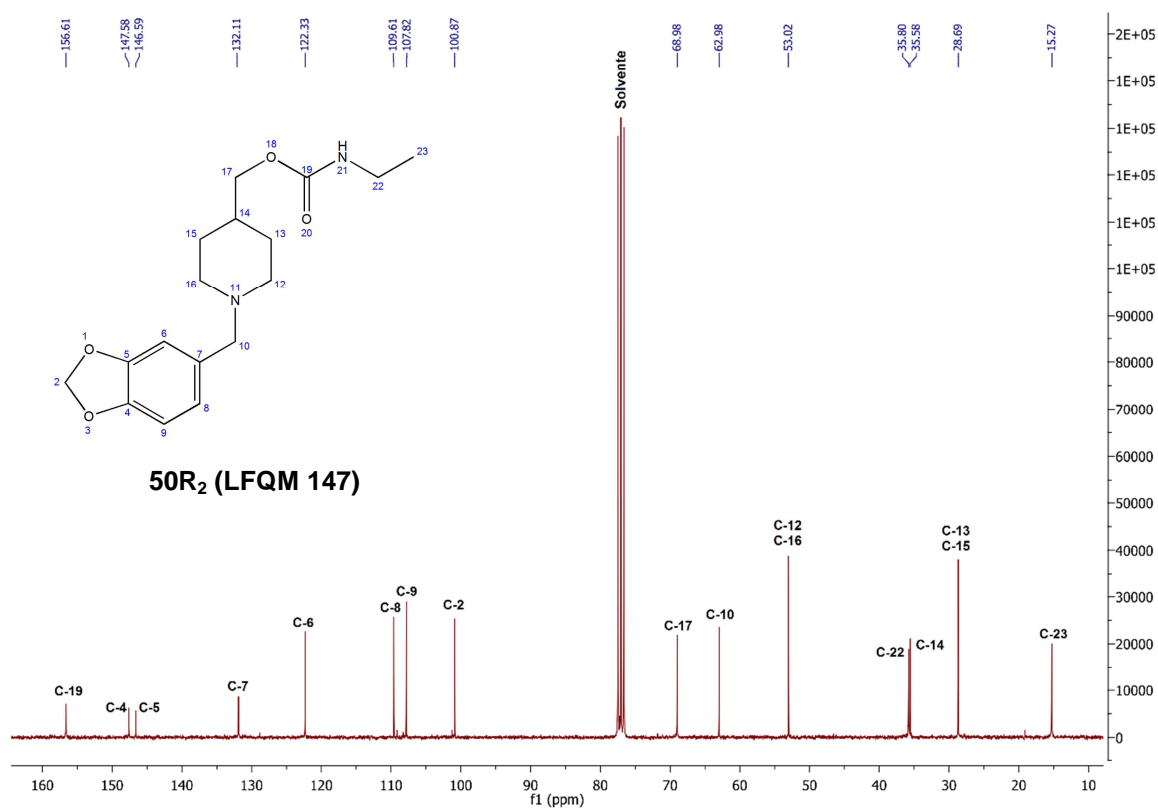


Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) do composto **50R₂**

4.2 Avaliação da atividade antileishmania

Todas as substâncias-alvo sintetizadas foram submetidas à avaliação da atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 1 e foram expressos em valores de IC₅₀ (μM), obtidos por regressão linear dos valores obtidos em triplicata, em comparação com a anfotericina B, utilizada como fármaco padrão.

Tabela 1- Valores de IC₅₀ (μM) para avaliação da atividade leishmanicida dos ésteres-alvo e carbamatos-alvo em comparação com a anfotericina B

Compostos	Valores de IC₅₀ (μM)
LFQM 138	54,04
LFQM 139	51,58
LFQM 140	101,91
LFQM 141	100,39
LFQM 142	>103,13
LFQM 143	93,44
LFQM 144	41,06
LFQM 145	42,83
LFQM 146	43,16
LFQM 147	>124,85
Anfotericina B	5,08

A análise dos dados da Tabela 1 evidenciou que todos os compostos avaliados frente às formas promastigotas do parasita foram menos ativos do que a anfotericina B. No entanto, pode-se verificar a presença de quatro ésteres que apresentaram valores de IC₅₀ promissores, sendo estes os compostos **LFQM 144** (IC₅₀ = 41,06 μM), **LFQM 145** (IC₅₀ = 42,83 μM), **LFQM 139** (IC₅₀ = 51,58 μM) e **LFQM 138** (IC₅₀ = 54,04 μM), sendo o **LFQM 144** o mais ativo da série dos ésteres. Apesar da série ser relativamente pequena, os dados sugerem que na subunidade éster, a presença de substituintes eletronegativos relativamente volumosos e capazes de serem aceptores de interações de H favorecem a atividade leishmanicida, como verificado para as substâncias **LFQM 144 (42W₆)** e **LFQM 145**

(**42W₇**), substituídos por grupos $-\text{NO}_2$ e 3,4-dimetoxila, respectivamente. Por outro lado, o derivado **LFQM 138 (42W₁)**, sem substituintes no anel aromático foi o quarto mais ativo da série, indicando que a substituição por grupos mais eletronegativos é importante, mas não farmacoforicamente determinante. Dentre os derivados substituídos por halogênio na posição *para* do anel aromático da função éster, o mais ativo foi **LFQM 139 (42W₂)**, substituído por $-\text{Br}$, que foi cerca de 2 vezes mais potente que os análogos substituídos por $-\text{F}$ ou $-\text{Cl}$.

Os resultados corroboram com o relatado por Bello⁹⁵, cujo trabalho mostrou que a presença do grupo nitro, com forte caráter retirador de elétrons por efeito indutivo e de ressonância, contribui na preservação da atividade leishmanicida de derivados metoxilados de chalconas estudados em programas de simulação computacional. No mesmo trabalho, é mostrado que grupos metoxila exerceram papel farmacoforicamente relevante na atividade dos compostos, devido principalmente à rigidez estrutural que estes grupos conferem à molécula, diminuindo sua liberdade conformacional.

O estudo realizado por Boeck⁹⁶ também com derivados chalcônicos, mostrou que a inserção de um átomo de bromo melhora a atividade leishmanicida, ação esta atribuída a um aumento na permeabilidade da molécula na membrana do parasita, o que pode justificar o efeito do bromo observado também no nosso estudo. Além disso, o mesmo trabalho mostra que a inserção de um grupo nitro contribui para a atividade e também para a baixa toxicidade do composto, condizendo com o que foi obtido no nosso trabalho.

Com relação aos carbamatos, **LFQM 146 (50R₁, IC₅₀ = 43,16 μM)**, foi o composto mais ativo. No entanto, o composto **LFQM 147 (50R₂, IC₅₀ > 124,85 μM)** não demonstrou atividade leishmanicida relevante, o que pode ser indicativo de uma contribuição hidrofóbica relevante à atividade destas substâncias.

Este conjunto de dados parece indicar que grupos relativamente eletronegativos e volumosos são farmacoforicamente relevantes para a atividade leishmanicida, quando utiliza-se uma função éster como subunidade estrutural ligada ao sistema piperidino-benzodioxola, a exemplo do derivado nitrado **LFQM 144 (42W₆)**. Porém, uma subunidade carbamoila, substituída por um grupo alquila, mais volumoso e capaz de realizar interações hidrofóbicas mais intensas demonstrou ser também um bom padrão estrutural, contribuindo para o aumento de potência da

série-alvo avaliada como evidenciado por **LFQM 146 (50R₁)**, que foi equipotente aos compostos ésteres **LFQM 144 (42W₆)** e **LFQM 145 (42W₇)**.

4.3 Avaliação da viabilidade celular

Diante dos resultados promissores de atividade leishmanicida, ambas as séries de compostos foram avaliadas quanto à citotoxicidade frente a monócitos humanos. Estes ensaios foram realizados sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho (UNIFAL-MG), cujos resultados estão mostrados na Tabela 2. Os dados indicaram toxicidades bastante baixas de todas as substâncias, expressas pelos valores de CC₅₀ e CC₉₀ relativamente elevados. A substância menos tóxica foi **LFQM 142** pois em nenhuma das doses de teste foi capaz de induzir morte celular, seguido dos derivados **LFQM 145** e **LFQM 147**. Com base na relação entre CC₅₀ e IC_{50-PRO}, verifica-se que mais uma vez os compostos **LFQM 145** e **LFQM 147** apresentaram os maiores valores (40,10 e 19,43, respectivamente), indicando serem os compostos mais seguros dentre todos os compostos avaliados. Os valores elevados de concentração citotóxica dos compostos avaliados condizem com o observado por Singh e colaboradores⁷², que ao sintetizarem e avaliarem ésteres de aminoácidos derivados da piperina obtiveram compostos ativos e pouco citotóxicos.

Tabela 2- Valores de CC₅₀ (µM) e CC₉₀ (µM) para avaliação da viabilidade celular dos compostos **LFQM 138-147**

Compostos	CC₅₀ (µM)	CC₉₀ (µM)	IS*(CC₅₀/IC₅₀)
LFQM 138	305,51	737,67	5,65
LFQM 139	207,73	444,07	4,02
LFQM 140	420,45	700,56	4,12
LFQM 141	362,41	657,57	3,61
LFQM 142	NT**	NT**	-
LFQM 143	950,11	1716,41	10,17
LFQM 144	355,87	641,83	8,66
LFQM 145	1717,62	3176,82	40,10
LFQM 146	142,91	465,94	3,31
LFQM 147	2426,02	4433,28	>19,43

*Índice de Seletividade

**Não tóxico nas concentrações testadas

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram sintetizadas 10 substâncias de padrão estrutural inédito, numa rota sintética divergente, em rendimentos globais de 65-90%, após 2 etapas reacionais.

A avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* levou à descoberta de 5 substâncias com bom perfil de atividade, sendo três, **LFQM 144** (**42W₆**, IC₅₀ = 41,06 µM), **LFQM 145** (**42W₇**, IC₅₀ = 42,83 µM) e **LFQM 146** (**50R₁**, IC₅₀ = 43,16 µM), muito promissoras. Estas substâncias foram cerca de 8 vezes menos ativas que a anfotericina B, fármaco padrão utilizado no tratamento da leishmaniose. Porém, a avaliação da viabilidade celular indicou que os derivados piperidino-benzenodioxola obtidos são todos pouco tóxicos frente à células humanas, sendo um importante dado para uma possível segurança terapêutica. O éster **LFQM 145** foi o composto que se mostrou mais seguro dentre todos os sintetizados com relação CC₅₀/IC₅₀ = 40,09.

Portanto, o conjunto de dados obtidos neste trabalho apontam para a descoberta de novas substâncias com atividade leishmanicida, pouco tóxicas e de fácil acesso sintético, que podem representar genuína inovação radical no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos úteis ao tratamento da leishmaniose. Estudos adicionais de mecanismo de ação e atividade contra formas amastigotas *in vitro* e *in vivo* deverão ser ainda realizados.

REFERÊNCIAS

- [1] WHO, World Health Organization. Control of Leishmaniasis. **WHO Technical Report Series**, 2010.
- [2] GONZALEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **The Cochrane Library**, v. 2, 2009.
- [3] CABALLERO, E. et al. Oxazolo[3,2-a]pyridine. A new structural scaffold for the reversal of multi-drug resistance in *Leishmania*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 6272–6275, 2012.
- [4] CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873–882, 2007.
- [5] COLER, R. N.; REED, S. G. Second generation vaccines against leishmaniasis. **Trends Parasitology**, v. 21, p. 244–249, 2005.
- [6] SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *brasiliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 423–431, 2009.
- [7] BLACKWELL, J. M. Tumour necrosis factor alpha and mucocutaneous leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 15, p. 73–76, 1999.
- [8] CASTELLUCCI, L. et al. IL6-174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, p. 519–527, 2007.
- [9] GRAEBIN, C. et al. Antiprotozoal agents: an overview. **Antiinfective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 345–366, 2009.
- [10] KAPIL, A. Piperine: A potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. **Planta Medica**, p. 59, p. 474, 1993.
- [11] FERREIRA, W. et al. Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: Chemical and biological studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2984–2991, 2008.

- [12] FERREIRA, C. et al. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 2155–2164, 2011.
- [13] LEE, K. B.; SHIN, K. H.; WAN, W. S. Central nervous system depressant and anti-inflammatory activity of piperine. **Archives of Pharmacological Research**, v. 1, p. 127–132, 1984.
- [14] UDOH, F. V.; LOT, T. Y.; BRAIDE, V. B. Effects of seed and leaf of *Piper guineense* on skeletal muscle activity in rat and frog. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 106–110, 1999.
- [15] NEGBENEBOR, C. A.; GODIYA, A. A.; IGENE, J. O. Evaluation of *Clarias anguillaris* treated with spice (*Piper guineense*) for washed mince and kamaboko-type product. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 12, p. 315–322, 1999.
- [16] NGANE, A. N.; BIYITI, L.; BOUCHET, P.; NKEGFACK, A.; ZOLO, P. H. A. Antifungal activity of *Piper guineense* of Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, p. 464–468, 2003.
- [17] DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, 2012.
- [18] CROAN, D. G.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 89, p. 149–159, 1997.
- [19] MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- [20] CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 1, p. 34–37, 2003.
- [21] BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: Histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004.
- [22] MOURA, A. P. V. **Avaliação histomorfológica das lesões de pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no município de Montes Claros**

– **MG**, 2009, 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG, 2009.

[23] SILVEIRA, F. T. et al. Pathology and pathogenesis of cutaneous leishmaniasis of man in the amazon region of Brazil caused by *Leishmania amazonensis*. **Acta Parasitology Turcica**, v. 21, p. 97–98, 1997.

[24] GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approach to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1169–1180, 2005.

[25] LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. **London Academic Press**, v. 1, p. 1–128, 1987.

[26] SHAW, J. J. The relationship of sand fly ecology to the transmission of leishmaniasis in South America with particular reference to Brazil. **Memoirs on Entomology International**. JFB (eds). Associated Publishers, 1999.

[27] SILVA, N. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana no estado do Acre, Brasil. **Revistas de Saúde Pública**, v. 33, p. 554–559, 1999.

[28] SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 239–251, 2004.

[29] LAINSON, R.; SHAW, J. J. A brief history of genus leishmania in the Americas with particular reference to Amazonian. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 44, p. 94–106, 1992.

[30] CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Medicina Tropical**. São Paulo: Atheneu, 2003.

[31] KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, p. 279–289, 1999.

[32] OLIVIER, M. et al. Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1377–1389, 2012.

- [33] CDC – **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/gen_info/faqs.html> Acesso em: 22 de abril 2013.
- [34] GOLDMAN, L. Pre-columbian leishmaniasis. **Archives of Dermatology**, v. 119, p. 540, 1983.
- [35] PAVLIA, A.; MALTEZOUB, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 1032–1039, 2010.
- [36] HESHAM, A.; KHALIL, H.; AYMAN, A. Molecular characterization of *Leishmania* infection in sand flies from Al-madinah Al-munawarah province, western Saudi Arabia. **Experimental Parasitology**, v. 134, p. 211–215, 2013.
- [37] BOGDAN, C. Leishmaniasis in rheumatology, haematology and oncology: epidemiological, immunological and clinical aspects and caveats. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 71, p. 60–66, 2012.
- [38] WHO, **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>> Acesso em: 22 de abril 2013.
- [39] GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1169–1180, 2005.
- [40] KAUTZ-NEU, K. et al. Dendritic cells in *Leishmania major* infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 201, p. 581–592, 2012.
- [41] BERMAN, J. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last ten years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 684–703, 1997.
- [42] BADARO, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral (calazar). **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, v.2, 1996.
- [43] Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas. Série A. **Normas e Manuais Técnicos**. 1. ed. Brasília, 2006.

[44] RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, p. 550–555, 2003.

[45] WHO, World Health Organization. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, p. 22 – 26, 2010.

[46] SAMPAIO, R. N. R.; MARSDEN, P. D. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime com anfotericina B lipossomal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 125–128, 1997.

[47] GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **The Indian Journal Medical Research**, v. 123, p. 439–454, 2006.

[48] MISHRA, B. B. et al. Fighting against leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential antileishmanial agents. **Mini reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 107–123, 2009.

[49] EL FADILE, K. et al. Modulation of gene expression in human macrophages treated with the antileishmania pentavalent antimonial drug sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 526–533, 2008.

[50] MISHRA, J.; SAXENA, A. SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1153–1169, 2007.

[51] BERMAN, J. J. Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 4, p. 1209–1216, 2008.

[52] SOTO, J. et al. Efficacy of miltefosine for bolivian cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 210–211, 2008.

[53] MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 5, p. 150–158, 2007.

[54] CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 502–508, 2003.

[55] BERMAN, J. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 397–401, 2003.

[56] ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos 10 anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 497–506, 2011.

[57] SEMLER, U.; GROSS, G. G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 1566–1567, 1988.

[58] IKAN, R. **Natural Products: A Laboratory Guide**, 2. ed. Academic Press, 1991.

[59] KIUCHI, F. et al. Isolation and identification of larvicidal principles in pepper. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, p. 1452–1465, 1988.

[60] BAJAD, S. et al. Antidiarrhoeal activity of piperine in mice. **Planta Medica**, v. 67, p. 284–287, 2001.

[61] KOUL, I. B.; KAPIL, A. Evaluation of the liver protective potential of piperine, an active principle of black and long peppers. **Planta Medica**, v. 59, p. 413–417, 1993.

[62] GUPTA, S. K. et al. Comparative antinociceptive, antiinflammatory and toxicity profile of nimesulide vs nimesulide and piperine combination. **Pharmacological Research**, v. 41, p. 657–662, 2000.

[63] CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 798–802, 2010.

[64] SELVENDIRAN, K. et al. Cytoprotective effect of piperine against benzo[a]pyrene induced lung cancer with reference to lipid peroxidation and antioxidant system in Swiss albino mice. **Fitoterapia**, v. 74, p. 109–115, 2003.

[65] LIU, G. Q. et al. Stimulation of serotonin synthesis in rat-brain after antiepilepsirine, antiepileptic piperine derivative. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n. 23, p. 3883–3886, 1984.

[66] BANO, G. et al. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, n. 6, p. 615–617, 1991.

[67] RAAJ, B. et al. Targetin of piperine intercalated in mannose-coated liposomes in experimental leishmaniasis. **Indian Journal of Biochemistry and Biopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 248–251, 1999.

[68] RIBEIRO, T. S. et al. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 3555–3558, 2004.

[69] PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597–673, 1997.

[70] TSUKAMOTO, S.; CHA, B. C.; OHTA, T. Dipiperamides A, B, and C: bisalkaloids from the white pepper *Piper nigrum* inhibiting CYP3A4 activity. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1667–1671, 2002.

[71] RABINOVITCH, M. Leishmanicidal activity of amino acid and peptide esters. **Parasitology Today**, v. 5, p. 299–303, 1989.

[72] SINGH, I. P. et al. Synthesis and antileishmanial activity of piperoyl-amino acid conjugates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3439–3445, 2010.

[73] CARRARA, V. S. et al. Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analog. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, doi: dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000022, 2013.

[74] AVILA, H. P. et al. Structure-activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9790–9794, 2008.

[75] CHIARADIA, L. D. et al. Synthesis and pharmacological activity of chalcones derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 cells stimulated by LPS: quantitative structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 658–667, 2008.

[76] CAVALLI, A. et al. Privileged structure-guided synthesis of quinazoline derivatives as inhibitors of trypanothione reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 3031–3035, 2009.

[77] MENG, C. Q. et al. Discovery of novel heteroaryl-substituted chalcones as inhibitors of TNF- α -induced VCAM-1 expression. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 6, p. 1513–1517, 2004.

[78] LUNARDI, F. et al. Trypanocidal and Leishmanicidal Properties of Substitution-Containing Chalcones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 1449–1451, 2003.

[79] NIELSEN, S. F. et al. Antibacterial chalcones--bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3047–3054, 2004.

[80] WU, J. H. et al. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus *Desmos*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 1813–1815, 2003.

[81] CABRERA, M. et al. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3356–3367, 2007.

[82] GO, M. L. et al. Antiplasmodial chalcones inhibit sorbitol-induced hemolysis of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3241–3245, 2004.

[83] ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R. et al. Synthesis, biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with potential antileishmanial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 373–383, 2009.

[84] BOECK, P. et al. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1538–1545, 2006.

[85] SALEM, M. M.; WERBOVETZ, K. A. Isoflavonoids and Other Compounds from *Psoralea argyrea* with Antiprotozoal Activities. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 43–49, 2006.

[86] VOGEL, A. I. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**. 5. ed. New York: John Wiley & Sons, 1989.

[87] BELLO, M. L. et al. Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure–

activity relationship (SAR). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 5046–5052, 2011.

[88] KIM, S. et al. Zinc-modified cyanoborohydride as a selective reducing agent. **Journal of Organic Chemistry**, v. 50, p. 1927–1932, 1985.

[89] ERGÜN, B. C. et al. Synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of simple aromatic esters of ferulic acid. **Archives of Pharmacological Research**, v. 34, n. 8, p. 1251–1261, 2011.

[90] ROY, K. K. et al. Lead optimization studies towards the discovery of novel carbamates as potent AChE inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 6313–6320, 2012.

[91] PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339–345, 2010.

[92] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

[93] SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

[94] BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2008.

[95] BELLO, M. L. **Derivados sintéticos da chalcona inibidores do crescimento de *Leishmania braziliensis*: modelagem molecular para o estudo da relação estrutura-atividade (SAR) e avaliação teórica do perfil físico-químico e toxicológico (*in silico*)**, 2010, 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

[96] BOECK, P. **Obtenção de moléculas bioativas a partir de substâncias naturais e sintéticas**, 2005, 233f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.