

BIANCA FERREIRA DA SILVA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E
LEISHMANICIDA DE CINAMATOS DERIVADOS DA VANILINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586s
2018
Silva, Bianca Ferreira da, 1992-
Síntese e avaliação das atividades citotóxica e
leishmanicida de cinamatos derivados da vanilina / Bianca
Ferreira da Silva. – Viçosa, MG, 2018.
xx, 130 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Robson Ricardo Teixeira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Ácido cinâmico. 2. Ésteres. 3. Cinamatos. 4. Vanilina.
5. Hibridação. 6. Toxicologia. 7. Leishmania. 8. Esterificação.
9. Condensação. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547.59

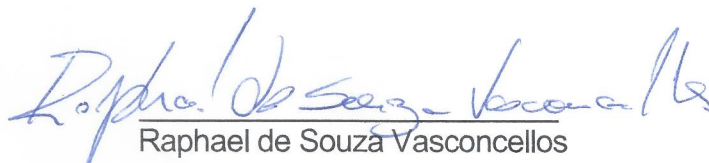
BIANCA FERREIRA DA SILVA


**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E
LEISHMANICIDA DE CINAMATOS DERIVADOS DA VANILINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 06 de agosto de 2018.


Patrícia Fontes Pinheiro


Raphael de Souza Vasconcellos


Róbson Ricardo Teixeira
(Orientador)

***Dedico essa dissertação aos meus queridos pais, Gilmara e Heberton,
a toda minha família e amigos.***

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim”.*

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades e superação dos momentos difíceis.

Aos meus amados pais, Gilmara e Heberton, pelo apoio e incentivo em todos os momentos, por acreditarem nos meus sonhos e por sempre se fazerem presentes. Toda minha caminhada só foi possível graças a dedicação e amor de vocês.

A toda minha família, meus avós, tios (as) e primos (as) agradeço pela torcida, orações e por estarem ao meu lado sempre.

A minha prima Marcela por me apoiar e acreditar em mim.

A todos os amigos conquistados ao longo desses anos em Viçosa obrigada por me mostrarem sempre o lado bom de tudo e por estarem comigo mesmo nas dificuldades! Ao Pedro, meu amigo do primeiro dia de graduação até os dias de hoje, pela parceria e apoio de todos esses anos. Às amigas do grupo “Prepara”, amigas que a química me deu, obrigada pelos muitos momentos de alegria e por compartilharmos tantos passos importantes em nossas vidas. À minha Xará pela parceria e sabedoria em me ajudar em todos os momentos, e por formamos com Gabi e Anni, o “Quarteto Fantástico”, amigas da Agroquímica, o meu muito obrigada por todo apoio e grande amizade nesses dois anos. Às meninas do grupo “Friends” obrigada por me receberem tão bem e por todos os encontros. Aos amigos Elyane e Wesley, agradeço pela amizade, por todas as palavras e incentivos nos momentos que mais precisava.

Às amigas de Divinópolis pela amizade de longa data e por se fazerem presentes mesmo à distância.

A todas as amigas de “repúblicas” de todos esses anos obrigada pelos momentos de felicidade, por estarem ao meu lado nos momentos necessitados e por se tomarem a minha segunda família em Viçosa.

Ao psicólogo Pedro Barat por todo acompanhamento neste último período.

Ao meu orientador Róbson Ricardo Teixeira pela oportunidade de trabalho, pelos incentivos, por toda paciência na orientação do mestrado e por todos os ensinamentos proporcionados, em suas palavras: “*Orgânica é bão demais!*”.

Aos companheiros do laboratório 428 por toda paciência e disposição para me ajudarem, e em especial um agradecimento ao grupo de pesquisa “Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos” por serem minha base durante a pesquisa, obrigada por tudo. À Deborah por todo apoio no trabalho e paciência em me ajudar nas

sínteses. E à Michelle, Poliana e Ana Paula por sempre me ajudarem no trabalho e me auxiliarem nas minhas dúvidas.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica agradeço por todo ensinamento, oportunidades e crescimento durante esses anos.

Ao pessoal da UFMG, Thaís Altoé e ao professor Cleiton Moreira da Silva pelos espectros de RMN realizados. Ao grupo de pesquisa do professor Gustavo Costa Bressan, em especial ao Raoni Siqueira pelo ensaio de citotoxicidade. Ao grupo de pesquisa do professor Wallace Pacienza Lima pelo ensaio de leishmanicida realizado. E a toda equipe técnica do Departamento de Química (UFV), em especial à Cristiane, por todo suporte prestado durante a pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, que rezaram e torceram por mim, os meus mais sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

Bianca Ferreira da Silva, filha de Gilmara Aparecida Ferreira Silva e Heberton da Silva, nasceu em Divinópolis, Minas Gerais, em 16 de junho de 1992.

Em 2010 ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde concluiu o curso de Bacharelado em Química em julho de 2016. Durante a graduação participou do Programa Ciência Sem Fronteiras na Alemanha, bolsista CAPES, no período de agosto de 2013 a fevereiro de 2015.

Em agosto de 2016 ingressou no Departamento de Química (DEQ) da UFV para o curso de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agroquímica, tendo como área de concentração Síntese de Agroquímicos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ESQUEMAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
CAPÍTULO 1	
APRESENTAÇÃO	1
1.1. DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS: DOS PRODUTOS NATURAIS À SÍNTESE	1
1.2. A VANILINA, SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E OS RECEPTORES TRPV1	3
1.3. O ÁCIDO CINÂMICO E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	6
1.4. A HIBRIDAÇÃO MOLECULAR NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	9
1.5. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	11
1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO 2	
SÍNTESE DE ÉSTERES CINAMATOS DERIVADOS DA VANILINA	17
2.1. INTRODUÇÃO	17
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.2.1. Generalidades metodológicas	19
2.2.2. Procedimentos Sintéticos	20
2.2.2.1. Síntese do ácido (<i>E</i>)-4-fluorocinâmico (1)	21
2.2.2.2. Síntese do ácido (<i>E</i>)-4-bromocinâmico (2)	22
2.2.2.3. Síntese do ácido (<i>E</i>)-2,3,4-trimetoxicinâmico (3)	23
2.2.2.4. Síntese do ácido (<i>E</i>)-4-clorocinâmico (4)	23
2.2.2.5. Síntese do ácido 3-fenilpropanóico (5)	25
2.2.2.6. Síntese do (<i>E</i>)-cinamato de 4-formil-2-metoxifenila	26
2.2.2.7. Síntese do (<i>E</i>)-4-fluorocinamato de 4-formil-2-metoxifenila	27

2.2.2.8.	Síntese do (<i>E</i>)-4-bromocinamato de 4-formil-2-metoxifenila.....	28
2.2.2.9.	Síntese do 3-fenilpropanoato de 4-formil-2-metoxifenila.....	29
2.2.2.10.	Síntese do (<i>E</i>)-3,4,5-trimetoxicinamato de 4-formil-2-metoxifenila	30
2.2.2.11.	Síntese do (<i>E</i>)-4-clorocinamato de 4-formil-2-metoxifenila	31
2.2.2.12.	Síntese do cinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila	32
	(<i>E</i>)-4-fluorocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila	35
	(<i>E</i>)-4-bromocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila.....	36
	(<i>E</i>)-4-clorocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila	36
	3-fenilpropanoato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila	37
2.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
2.4.	CONCLUSÕES.....	63
2.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS ÉSTERES CINAMATOS DERIVADOS DA VANILINA	66
3.1. INTRODUÇÃO.....	66
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	74
3.2.1. Linhagens celulares e cultura celular.....	74
3.2.2. Ensaio de citotoxicidade.....	74
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
3.4. CONCLUSÕES.....	77
3.5. REFERÊNCIAS	78

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS ÉSTERES CINAMATOS DERIVADOS DA VANILINA	81
4.1. INTRODUÇÃO.....	81
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	87
4.2.1. Parasitos	87
4.2.2. Preparo das soluções dos compostos 6-16 para avaliação da atividade leishmanicida.....	87
4.2.3. Avaliação da Atividade Leishmanicida dos compostos 6-16 contra as formas promastigota de <i>L. amazonensis</i>	87

4.2.4. Avaliação da atividade citotóxica dos compostos 6-16 frente a macrófagos	
87	
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
4.4. CONCLUSÕES.....	90
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	93
ANEXOS.....	95

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1:** Morfina, a primeira substância isolada a partir de uma planta medicinal.....2
- Figura 2:** Estruturas químicas do ácido acetilsalicílico e da penicilina.....2
- Figura 3:** Estrutura da vanilina e imagem da orquídea da espécie *Vanilla planifolia*.....4
- Figura 4:** Derivados da vanilina e suas respectivas atividades biológicas: antiviral (ZHANG *et al*, 2017), antiproliferativa (GOMEZ *et al*, 2014) e antibacteriana (GOVINDASAMI *et al*, 2011).....4
- Figura 5:** Estruturas dos compostos zingerone, eugenol e capsaicina.....5
- Figura 6:** Representação do receptor TRPV1, um receptor típico de vanilóides, ligado à molécula de capsaicina.....6
- Figura 7:** Estrutura molecular do ácido cinâmico e imagem da canela da espécie *Cinnamomum zeilanicum*, produto natural fonte de ácido cinâmico.....6
- Figura 8:** Derivados do ácido cinâmico e suas bioatividades.....7
- Figura 9:** Compostos derivados do ácido cinâmico que apresentaram atividade antitumoral.....8
- Figura 10:** Estrutura dos derivados anterpelin C, bacarina e drupanina encontrados no extrato de própolis.....8
- Figura 11:** Estrutura do salol, um híbrido molecular entre o ácido acetilsalicílico e o fenol.....9
- Figura 12:** Esquema hipotético dos tipos de Hibridação molecular. Adaptado no trabalho de Nepali & colaboradores (2014)10
- Figura 13:** Fármaco benorilato, um exemplo de um híbrido obtido através da Hibridação Molecular Droga-Droga.....10
- Figura 14:** Fármaco estramustina, resultado da hibridação entre a mostarda nitrogenada e o estradiol.....11
- ### CAPÍTULO 2
- Figura 15:** Reação de esterificação de Fischer.....17
- Figura 16:** Ésteres cinamatos oriundos da vanilina e derivados do ácido cinâmico sintetizados no presente trabalho.....19

Figura 17: Estrutura da droga antimalárica Lumefantrina. A ligação dupla destacada na estrutura foi formada via Condensação de Knoevenagel.....	40
Figura 18: Espectro no infravermelho (KBr) do composto 1	43
Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto 1	44
Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto 1	45
Figura 21: Reação de hidrogenação catalítica.....	46
Figura 22: Espectro no infravermelho (KBr) do composto 5	48
Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto 5	49
Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto 5	50
Figura 25: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 10	55
Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 10	56
Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 10	57
Figura 28: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 15	60
Figura 29: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 15	61
Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 15	62
CAPÍTULO 3	
Figura 31: Estruturas dos agentes quilantes ciclofosfamina e clorambucil.....	68
Figura 32: Estrutura do metotrexato, medicamento utilizando no tratamento de câncer.....	69
Figura 33: Compostos utilizados no tratamento terapêutico, que são produtos naturais ou foram originados destes (COSTA-LOTUFO et al, 2010).....	70
Figura 34: Exemplos de derivados do cinamaldeídos que possuem atividade antitumoral.....	71
Figura 35: Derivado do ácido cinâmico sintetizado por PONTIKI & colaboradores.....	72
Figura 36: Estrutura do BVAN08, um derivado da vanilina.....	73
Figura 37: Efeito dos cinamatos derivados da vanilina sobre a viabilidade celular da linhagem B16F10 (melanoma metastático murino).....	75
Figura 38: Efeito dos cinamatos derivados da vanilina sobre a viabilidade celular da linhagem (MDA-MB231) câncer de mama.....	76

Figura 39: Compostos formilados (6-11) dos cinamatos derivados da vanilina.....76

Figura 40: Compostos hidroxilados (12-16) dos cinamatos derivados da vanilina.....77

CAPÍTULO 4

Figura 41: O ciclo da espécie *Leishmania* no cão, no homem e nos flebotomíneos. Figura adaptada do trabalho de Esch & Petersen (2013).....82

Figura 42: À esquerda, fotos das lesões provocadas pela Leishmaniose Tegumentar, tipo cutânea. À direita, criança com Leishmaniose Visceral.....83

Figura 43: Compostos antimoniais pentavalentes que são utilizados no tratamento da leishmaniose.....84

Figura 44: Fármacos utilizados como segunda linha no tratamento da leishmaniose.....85

Figura 45: Derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade leishmanicida.....86

Figura 46: Derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade leishmanicida contra a espécie *L. (V) panamensis*.....86

Figura 47: Conversão da resazurina em resorufina.....88

LISTA DE ESQUEMAS

CAPÍTULO 2

Esquema 1: Análise retrossintética para o preparo dos cinamatos derivados da vanilina	18
Esquema 2: Condensação de Knoevenagel empregada na obtenção dos cinamatos 1-4	39
Esquema 3: Mecanismo de Condensação de Knoevenagel para formação dos derivados do ácido cinâmico	40
Esquema 4: Reação de hidrogenação do ácido cinâmico para a obtenção do derivado ácido 3-fenilpropanóico	46
Esquema 5: Reação de acoplamento entre o ácido cinâmico e seus derivados com a vanilina	51
Esquema 6: Mecanismo da Esterificação de Steglich	52
Esquema 7: Conversão do intermediário O-acil-uréia em N-acil-isouréia nas reações de acoplamento sem o catalisador DMAP.....	53
Esquema 8: Mecanismo de redução dos derivados ésteres cinamatos da vanilina com o reagente boridreto de sódio	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Estruturas dos ésteres cinamatos 13-16, tempos de reação e rendimentos das reações envolvidas na preparação destes compostos34

CAPÍTULO 3

Tabela 2: Taxas de incidência das localizações primárias, exceto pele não melanoma, por sexo, estimadas para 2016/2017, no Brasil67

Tabela 3: Origem e indicações terapêuticas dos compostos III-XIV (COSTA-LOTUFO *et al*, 2010)71

CAPÍTULO 4

Tabela 4: Avaliação da atividade anti-promastigota dos cinamatos derivados da vanilina89

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angström
AcOEt	Acetato de etila
ATR	Reflectância Total Atenuada
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
DCC	<i>N,N</i> -dicicloexilcarbodiimida
DHU	Dicicloexiluréia
DMAP	4- <i>N,N'</i> -dimetilaminopiridina
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
EtOH	Etanol
δ	Deslocamento químico
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
m	Multiplete
MHz	Megahertz
m/v	Massa/volume
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
P.A.	Para análise
ppm	Partes por milhão
Py	Piridina
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
T _f	Temperatura de fusão
v/v	Volume/volume

TEA

Trietilamina

RESUMO

DA SILVA, Bianca Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2018. **Síntese e avaliação das atividades citotóxica e leishmanicida de cinamatos derivados da vanilina.** Orientador: Róbson Ricardo Teixeira.

Os produtos naturais e seus derivados servem de inspiração para a prospecção e desenvolvimento de novos fármacos. Dentre a miríade de produtos naturais conhecidos, a vanilina e o ácido cinâmico (juntamente com seus derivados) são classes de compostos que apresentam um amplo espectro de bioatividades, atraindo a atenção de vários grupos de pesquisa. Uma estratégia muito utilizada para a obtenção de compostos que exibem atividade farmacológica é a hibridação molecular. O presente trabalho teve por objetivo sintetizar uma série de novos compostos híbridos entre a vanilina e derivados do ácido cinâmico e avaliar suas atividades citotóxica e leishmanicida. Para a síntese dos ésteres cinamatos derivados da vanilina, inicialmente realizou-se a preparação de diferentes derivados do ácido cinâmico, utilizando a reação de Condensação de Knoevenagel entre o ácido malônico e diferentes aldeídos benzílicos. Os ácidos foram obtidos com rendimentos variando de 59%-82%. Em seguida, a metodologia chave empregada para a obtenção dos ésteres consistiu na reação de Esterificação de Steglich entre a vanilina e os diferentes derivados do ácido cinâmico. Assim, um total de seis cinamatos (compostos **6-11**) foram obtidos com rendimentos variando de 54%-99%. Uma segunda série de cinamatos foi obtida (ésteres **12-16**) via redução do grupo formila dos compostos **6-8**, **10** e **11**. Todos os compostos sintetizados foram caracterizados via espectroscopia no IV e espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C . Os cinamatos sintetizados tiveram seus efeitos citotóxicos avaliados contra as linhagens de células cancerígenas melanoma metastático murino (B16F10) e adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231). Em geral, os compostos foram mais ativos contra a linhagem B16F10, sendo os compostos (*E*)-4-fluorocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila (**13**), (*E*)-4-bromocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila (**14**) e (*E*)-4-clorocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila (**15**) os mais ativos, inibindo a viabilidade celular em cerca de 50% na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A avaliação da atividade leishmanicida dos cinamatos derivados da vanilina contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* mostrou que os compostos inibiram a viabilidade celular dos parasitos com diferentes graus de eficiência, destacando-se o derivado (*E*)-4-bromocinamato de 4-formil-2-metoxifenila

(8), que foi o composto mais ativo (IC_{50} 10,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e aquele que também apresentou maior índice de seletividade ($IS = 11,5$). Os resultados obtidos com relação à avaliação biológica apontam para o fato de que as substâncias sintetizadas neste trabalho podem ser consideradas úteis como estruturas-modelo para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para a terapêutica do câncer e das leishmanioses.

ABSTRACT

DA SILVA, Bianca Ferreira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2018. **Synthesis and evaluation of the cytotoxicity and leishmanicide activities of cinnamates derived from vanillin.** Advisor: Róbson Ricardo Teixeira.

Natural products and their derivatives are an important source of organic compounds which are useful for the research and development of pharmaceutical drugs. Among a plethora of natural substances, vanillin and cinnamic acid (and their derivatives) have received attention of several research groups due to their various biological activities. In the search for new compounds endowed with pharmacological activities, a strategy that has been used is the molecular hybridization, which is based on the combination of two or more known bioactive pharmacophoric fragments by appropriate fusion into a single hybrid molecule. Within this context, the purpose of the present investigation was to synthesize new molecular hybrids from vanillin and cinnamic acid derivatives and evaluate their cytotoxic and leishmanicide activities. The synthesis of the hybrids started with the preparation of cinnamic acid derivatives which were obtained in 59%-82% yields via Knoevenagel condensation of malonic acid and different aldehydes. Then, the cinnamic acid derivatives were coupled with vanillin, using the Steglich esterification, affording six cinnamates (compounds **6-11**) in 54%-99% yields. Another series of cinnamates (esters **12-16**) were prepared by reducing of the formil group of compounds **6-8**, **10**, and **11**. All the synthesized compounds were characterized *via* NMR (^1H and ^{13}C) and IR spectroscopic techniques. Once synthesized, the cinnamates had their cytotoxic and leishmanicide activities evaluated. Concerning cytotoxic effects, the compounds were accessed against the cell lines B16F10 (murine metastatic melanome) and MDA-MB-231 (human breast adenocarcinoma). As a general trend, the B16F10 cell line was more sensitive to the evaluated compounds than MDA-MB-231. The cinnamates (*E*)-4-hydroxymethyl-2-methoxy phenyl 4-fluoro cinnamate (**13**), (*E*)-4-hydroxymethyl-2-methoxy phenyl 4-bromo cinnamate (**14**), and (*E*)-4-hydroxymethyl-2-methoxy phenyl 4-chlorocinnamate (**15**) were the most active substances inhibiting around 50% of B16F10 cell viability at $100\ \mu\text{mol L}^{-1}$. The evaluation of the leishmanicide activity of the cinnamates against the promastigote form of *Leishmania amazonensis* revealed that the compounds are capable of interfering with parasite proliferation with different degrees of efficiency. In this regard, compound (*E*)-4-formyl-2-methoxy phenyl 4-bromo cinnamate (**8**) was the most potent derivative ($\text{IC}_{50} = 10.8\ \mu\text{mol L}^{-1}$) and also

presented the highest selective index (SI = 11.5). Taken together, the results point to the fact that cinnamates derived from vanillin can be a useful scaffold toward the development of new chemical agents to the treatment of cancer and leishmaniasis.

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO

1.1. DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS: DOS PRODUTOS NATURAIS À SÍNTESE

A história da humanidade mostra que as plantas medicinais vêm sendo utilizadas no tratamento de diversas doenças e que o homem sempre buscou na natureza a melhoria da sua qualidade de vida. Em meados do século XVIII, surgiram os primeiros esforços no sentido de documentar o conhecimento relativo à farmacognosia, área do conhecimento que estuda os princípios ativos de origem naturais. Um dos trabalhos pioneiros da farmacognosia é o do médico e botânico francês Antoine Laurent de Jussieu que, por volta de 1789, realizou a classificação botânica de plantas florais (BARREIRO & FRAGA, 2015).

Neste contexto, vários outros estudos contribuíram de maneira significativa para o fortalecimento das bases científicas que propiciaram o avanço do conhecimento sobre o uso das plantas medicinais. Deste modo, surge no século XIX a química de produtos naturais, que era dedicada ao isolamento e purificação dos princípios ativos das plantas com propriedades terapêuticas (BARREIRO & FRAGA, 2015). O artigo publicado em 1817 pelo assistente farmacêutico alemão Fredrich Sertürner é apontado como o marco no que tange ao isolamento de compostos bioativos de plantas. Neste artigo, ele escreveu a respeito do isolamento a partir do ópio, da cristalização e das propriedades farmacológicas da morfina (**Figura 1**, p.2), um analgésico e agente indutor do sono. Este fato motivou a investigação de outras plantas medicinais, e durante as décadas seguintes do século XIX, muitas substâncias bioativas, principalmente alcalóides (por exemplo, quinina, cafeína, nicotina, codeína, atropina, colchicina, a cocaína, a capsaicina) foram isoladas a partir de suas fontes naturais (ANTANASOV *et al*, 2015).

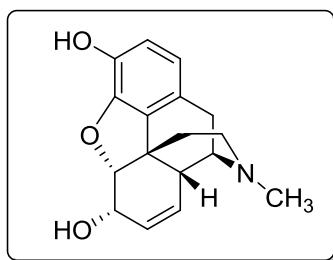


Figura 1: Morfina, a primeira substância isolada a partir de uma planta medicinal.

Posteriormente, com o crescente avanço da ciência, em especial da biologia e da química, começam a surgir atividades de pesquisa que podem ser consideradas precursoras da química medicinal. Ao mesmo tempo, ocorre o desenvolvimento das metodologias sintéticas, que proporcionam o preparo, parcial ou total de produtos naturais, cada vez mais complexos estruturalmente. Todos estes avanços pavimentaram o caminho para o uso crescente de substâncias orgânicas naturais e sintéticas como fármacos (BARREIRO & FRAGA, 2015).

A síntese orgânica permitiu a produção de fármacos com maior qualidade e menores custos. O primeiro composto sintético baseado em um produto natural foi o ácido acetilsalicílico (em azul, **Figura 2**) em 1853, que teve sua estrutura baseada na salicina, composto natural, que está presente em folhas da árvore do salgueiro. Em 1928 foi descoberta a penicilina (em vermelho, **Figura 2**), uma fármaco de ação antibiótica obtida a partir do fungo *Penicillium notatum*. Assim, inicia-se a era da descoberta de fármacos a partir de fontes microbianas e, também, o uso terapêutico de extratos e produtos naturais eram cada vez mais substituídos pelo uso de compostos sintéticos (ANTANASOV *et al*, 2015; BARREIRO & FRAGA, 2015).

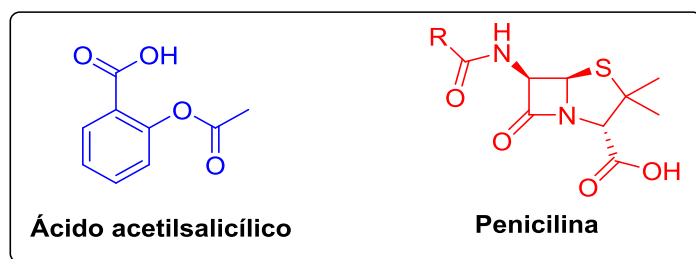


Figura 2: Estruturas químicas do ácido acetilsalicílico e da penicilina.

A Química Medicinal é responsável pelo desenvolvimento de fármacos; ela é o ramo da ciência voltado para a descoberta, identificação e preparação de novas moléculas com propriedades terapêuticas. A química medicinal também está envolvida no estudo do metabolismo celular, na interpretação de mecanismos de ação de fármacos a nível molecular e na construção das relações entre a estrutura química e

sua atividade farmacológica. Deste modo, a Química Medicinal é uma ciência multidisciplinar e abrange não só a química, como também as ciências biológica, médica e farmacêutica (LIMA, 2007).

A enorme diversidade química dos produtos naturais de origem vegetal, marinha ou de micro-organismos servem de desafio e inspiração para a Química Medicinal na busca e desenvolvimento de novos compostos bioativos. Compostos, estes, que podem ser derivados sintéticos ou semissintéticos dessas fontes naturais (VIEGAS, 2007).

1.2.A VANILINA, SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E OS RECEPTORES TRPV1

A vanilina, também denominada 4-hidroxi-3-metóxi-benzaldeído (**Figura 3**, p. 4), é um produto natural mundialmente conhecido devido às suas diversas aplicações e atividades biológicas. Naturalmente, ela é encontrada nas orquídeas (*Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona* e *Vanilla tahitiensis*); sinteticamente ela pode ser preparada a partir do guaicol ou eugenol (ZHANG *et al*, 2017; KUMAR *et al*, 2012). Da orquídea *V. planifolia* é obtida a baunilha, um dos condimentos mais caros do mundo e cujo o principal componente é a vanilina.

Os primeiros relatos a respeito do uso da baunilha são dos astecas (nativos do México), por volta de 1300, sendo à primeira civilização a usar e cultivar a baunilha para dar sabor às suas bebidas. Após o domínio dos astecas pelos espanhóis, a espécie *V. planifolia* foi levada para a Europa, onde seu cultivo foi aprimorado uma vez que no continente europeu não havia polinizador natural da planta, o que levou à descoberta da polinização artificial de flores da espécie vegetal (SINHA *et al*, 2008). O condimento baunilha sempre foi considerado um produto afrodisíaco, carminativo e estimulante. Os venezuelanos geralmente usam as vagens da planta *V. planifolia*, para o tratamento de febre e espasmo. Na Argentina ela é utilizada como antiespasmódico e afrodisíaco. No Palau, a baunilha é usada para curar dismenorreia, febre e histeria (DUKE *et al*, 2003). Também são conhecidos relatos em que a baunilha é empregada para proteger a pele contra os radicais livres (SINHA *et al*, 2008).

Devido ao seu cheiro agradável, a vanilina é um dos aromatizadores mais importante do mundo, e assim, é amplamente utilizada na indústria alimentícia e cosmética como aditivo para bebidas, comidas, velas, incenso, *pot-pourri*, fragrâncias,

perfumes e aromatizadores de ambiente (KUMAR *et al*, 2012; PACHECO & DAMASIO, 2010).



Figura 3: Estrutura da vanilina e imagem da orquídea da espécie *Vanilla planifolia*.

A vanilina também possui usos extensivos nas indústrias nutracêutica e farmacêutica. Na indústria farmacêutica ela é muito utilizada devido à sua estrutura química simples e facilidade de preparo bem como pelo fato dela e seus derivados apresentarem atividades biológicas importantes (**Figura 4**) tais como atividades antitumorais (JANTAREE *et al*, 2017), antioxidantes (TAI *et al*, 2011), antimicrobianas (GOVINDASAMI *et al*, 2011), antifúngicas (FITZGERALD *et al*, 2005), anti-inflamatórias (GALDANI *et al*, 2005), antimutagênicas (KESHAVA *et al*, 1998) e antiproliferativas (GOMEZ *et al*, 2014). Devido às suas propriedades antioxidante e antimicrobiana, bem como o interesse crescente da indústria alimentícia em utilizar compostos de origem natural, a vanilina representa uma fonte potencial de novos conservantes (SINHA, 2008).

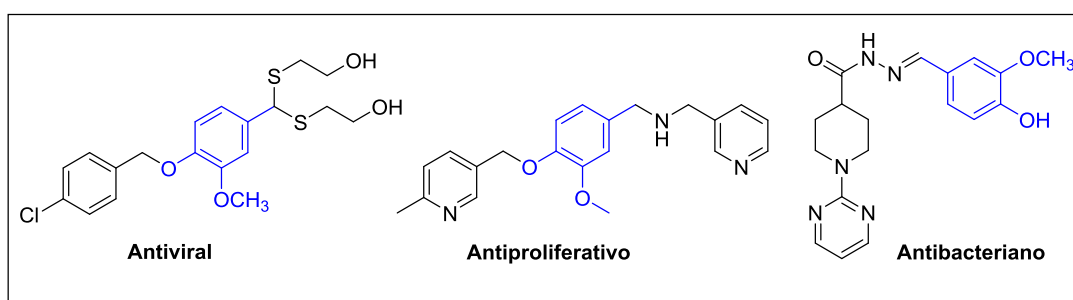


Figura 4: Derivados da vanilina e suas respectivas atividades biológicas: antiviral (ZHANG *et al*, 2017), antiproliferativa (GOMEZ *et al*, 2014) e antibacteriana (GOVINDASAMI *et al*, 2011).

Além da vanilina, existem outros compostos que são chamados de vanilóides, ou seja, compostos que possuem estrutura similar à vanilina. Alguns exemplos, cujas estruturas estão representadas na **Figura 5** (p.5) são a

capsaicina (substância picante da pimenta malagueta), o eugenol (presente no cravo e canela), e a zingerona (do gengibre). Estudos a respeito do efeito da capsaicina no sistema nervoso resultaram na descoberta do receptor de vanilóides TRPV1 (do inglês *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*, **Figura 6**, p. 6, que é uma proteína que nos humanos é expressa pelo gene TRPV e que desempenha um papel fundamental na detecção de estímulos. Esta proteína faz parte dos chamados canais iônicos. O receptor TRPV1 foi descrito em 1990 e clonado pela primeira vez em 1997 (SZALLAZI *et al*, 2007).

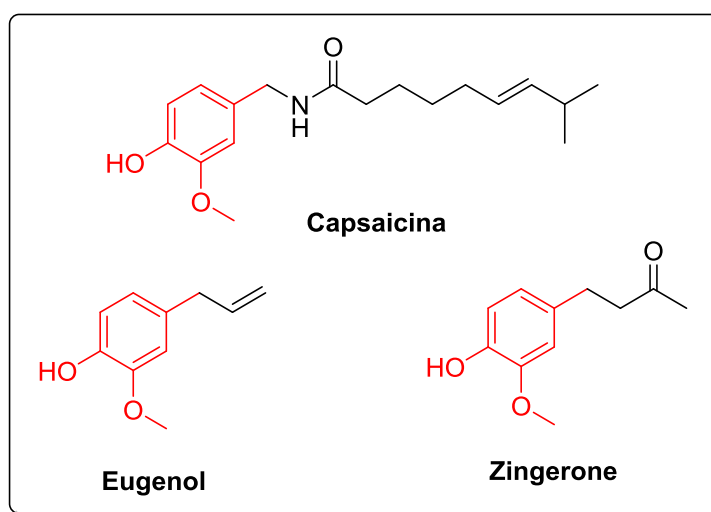


Figura 5: Estruturas dos compostos zingerone, eugenol e capsaicina.

Os receptores TRPV1 encontram-se no sistema nervoso central e periférico e estão envolvidos na transmissão e modulação da dor bem como na integração de diversos estímulos dolorosos. A validação do receptor TRPV1 como um alvo terapêutico tem motivado a busca por novas drogas visando o desenvolvimento de antagonistas ativos da proteína receptora. Os antagonistas endógenos que atuam no TRPV1 podem fornecer uma contribuição importante para certas condições de dor crônica, como dor inflamatória, enxaqueca, dor secundária intratável do câncer, AIDS ou diabetes. Além disso, estudos recentes indicam que os antagonistas de TRPV1 podem ser úteis no tratamento de distúrbios tais como incontinência urinária, tosse crônica e síndrome do intestino irritável. Os resultados destes estudos apontam o TRPV1 como um alvo importante para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios. E a falta de medicamentos eficazes para o tratamento de muitas dessas condições destaca a necessidade de uma investigação mais

aprofundada sobre o potencial terapêutico dos antagonistas do TRPV1 (GHUNTORPE *et al*, 2007; MESSEGUER *et al*, 2006; SZALLAZI *et al*, 2007).

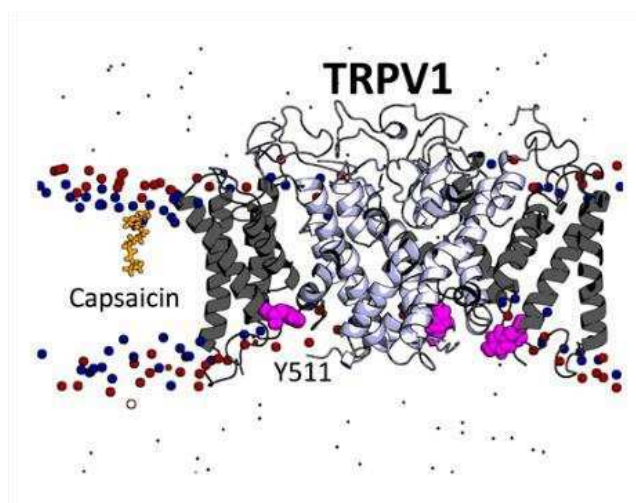


Figura 6: Representação do receptor TRPV1, um receptor típico de vanilóides, ligado à molécula de capsaicina.

Fonte: <https://www.bioch.ox.ac.uk/aspsite/printable.asp?pageid=1037>

1.3. O ÁCIDO CINÂMICO E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Outro produto natural que apresenta diversas aplicações e atividades biológicas é o ácido cinâmico, também denominado ácido 3-fenilprop-2-enóico (**Figura 7**). Este consiste em um ácido carboxílico aromático de ocorrência natural, cuja estrutura molecular é normalmente encontrada na forma *trans*. Ele pertence ao grupo das auxinas, hormônios vegetais responsáveis por regular o crescimento e a diferenciação celular, e alguns de seus derivados desempenham um importante papel na defesa da planta contra o ataque de pragas (NIERO, 2010).

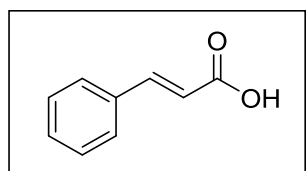


Figura 7: Estrutura molecular do ácido cinâmico e imagem da canela da espécie *Cinnamomum zeylanicum*, produto natural fonte de ácido cinâmico.

O termo cinâmico deriva da canela (**Figura 7**, p. 6), uma fonte natural do ácido cinâmico, que é uma especiaria obtida pela parte interna da casca do tronco da espécie vegetal *Cinnamomum zeilanicum* e muito utilizada na culinária como condimento e aromatizante (PINTO, 2013). Além de agente aromatizante, a canela é utilizada pelo homem desde a antiguidade por suas propriedades estimulantes, carminativas, anti-sépticas e inseticidas. A casca de várias espécies de *Cinnamomum* contém quantidades consideráveis de (*E*)-cinamaldeído, um aldeído volátil responsável pelo sabor pungente, doce e quente da canela (GUZMAN, 2014).

O ácido cinâmico e seus derivados também são encontrados em grãos de café, chá, mate, cacau, maçãs e peras, frutas silvestres, frutas cítricas, uva, legumes, espinafre, beterraba, alcachofra, batata, tomate, aipo, fava e cereais (CLIFFORD, 1999). Estes compostos também apresentam um amplo espectro de importantes atividades biológicas tais como atividades antioxidante (KIM *et al.*, 2006; HUSSAIN *et al.*, 2014), antibacteriana (THEODOROU *et al.*, 1987; CHIRIAC *et al.*, 2005), antitumoral (EKMEKCIOGLU *et al.*, 1998), antifúngica (SADEGH *et al.*, 2013), antimalárica (KANAANI e GINSBURG, 1992), efeito citotóxico contra várias linhagens de células tumorais (LEE *et al.*, 2003) e efeitos fitotóxicos (LEE *et al.*, 2006; DELLAGREGA *et al.*, 2008, ABE *et al.*, 2012; NISHIKAWA *et al.*, 2013). Na **Figura 8** estão representados alguns derivados do ácido cinâmico com suas respectivas propriedades terapêuticas (SOVA, 2012; SHARMA, 2011).

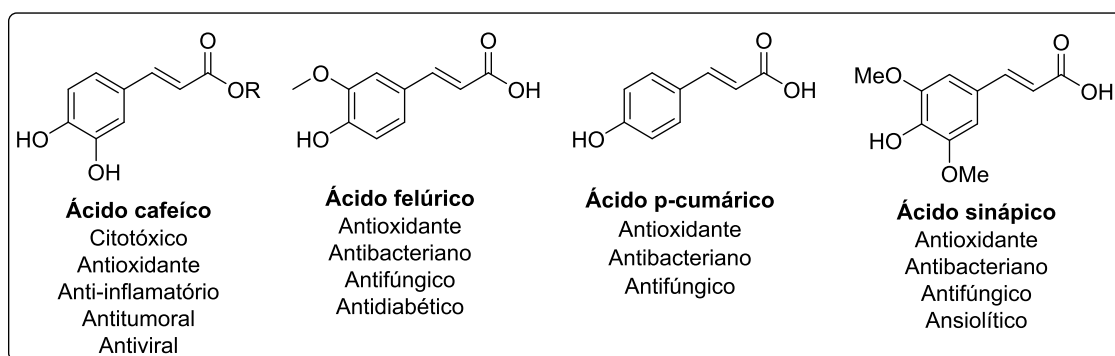


Figura 8: Derivados do ácido cinâmico e suas bioatividades.

Quimicamente, os ácidos cinâmicos oferecem três sítios reativos principais: substituição no anel fenílico, adição à insaturação e reações que envolvam a funcionalidade do ácido carboxílico (BALTAS & BELVAL, 2011). Devido a estes aspectos químicos, juntamente com a sua baixa toxicidade para o homem e associado ao seu largo espectro de bioatividades, os derivados do ácido cinâmico desempenham um papel importante na pesquisa por moléculas como potenciais fármacos (SHARMA,

2011). Os derivados cinâmicos são objeto de estudos principalmente como agente anticancer, como por exemplo os compostos I e II da **Figura 9**. Em estudos realizados por Baltas & Belval (2011), o composto I apresentou atividade contra as linhagens leucemia murinho L1210 e de carcinoma KB-3-1. Já o composto II exibiu atividade antitumoral *in vivo* de 50% contra o carcinoma KB-3-1 em comparação com a acronina – agente antineoplástico.

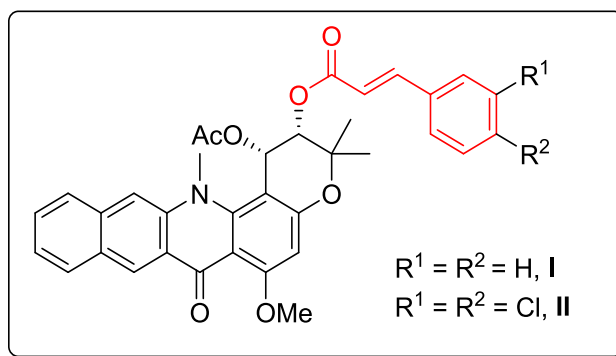


Figura 9: Compostos derivados do ácido cinâmico que apresentaram atividade antitumoral.

Um produto alimentício que possui uma variedade de derivados do ácido cinâmico em sua composição e que vem sendo utilizada como medicamento popular pelo homem é a propólis (AKAO *et al*,2003). No extrato etanólico da propólis brasileira são encontrados os derivados artepelin C, bacarina e drupanina (**Figura 10**) (BALTAS & BELVAL, 2011). Todos estes três compostos exibem notável atividade contra o câncer de cólon e linhagens celulares de leucemia. O artepelin C apresenta atividade antitumoral pela indução de apoptose em linhagens celulares de câncer humano *in vitro* e *in vivo* (AKAO *et al*, 2003).

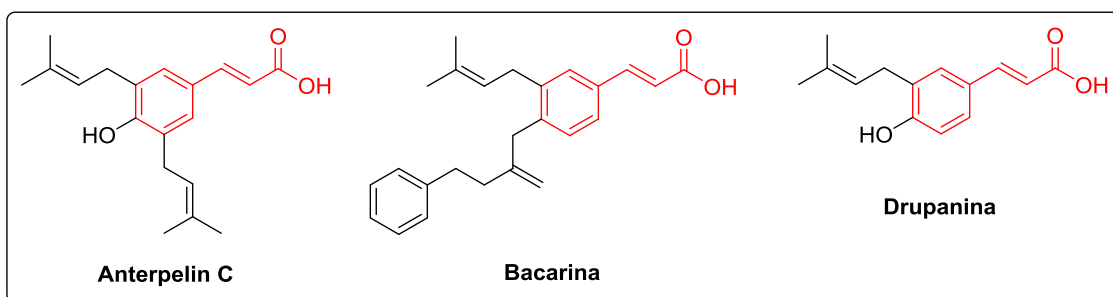


Figura 10: Estrutura dos derivados artepelin C, bacarina e drupanina encontrados no extrato de propólis.

1.4.A HIBRIDAÇÃO MOLECULAR NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

A hibridação é um assunto bastante estudado dentro da Química Medicinal e é definida como a junção covalente de dois ou mais fragmentos, que apresentam atividades terapêuticas já conhecidas, em uma única estrutura molecular. O intuito é obter uma molécula híbrida com afinidade e eficácia biológica melhorada quando comparado com os fragmentos separados, ou ainda, para contrabalançar os efeitos colaterais conhecidos dos fármacos originais. A hibridação é um novo conceito em *design* e desenvolvimento de fármacos para a construção de protótipos que exibam alguma atividade farmacológica (ARAÚJO *et al*, 2015; NEPALI *et al*, 2014).

A primeira estratégia de hibridização molecular foi realizada por Marcelli Nencki, na Suíça, em 1883, quando realizou a síntese do salol (**Figura 11**). Este foi obtido através da esterificação do ácido salicílico com fenol, originando o salicilato de fenila. A tentativa era melhorar o sabor do ácido salicílico, composto que possui atividade antipirética, porém de sabor muito desagradável. O híbrido foi obtido e também demonstrou capacidade em combater a febre. O salol sofre hidrólise no intestino delgado, liberando lentamente o ácido salicílico e também o fenol, que possui ação bactericida (ALMEIDA, 2014).

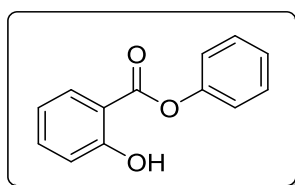
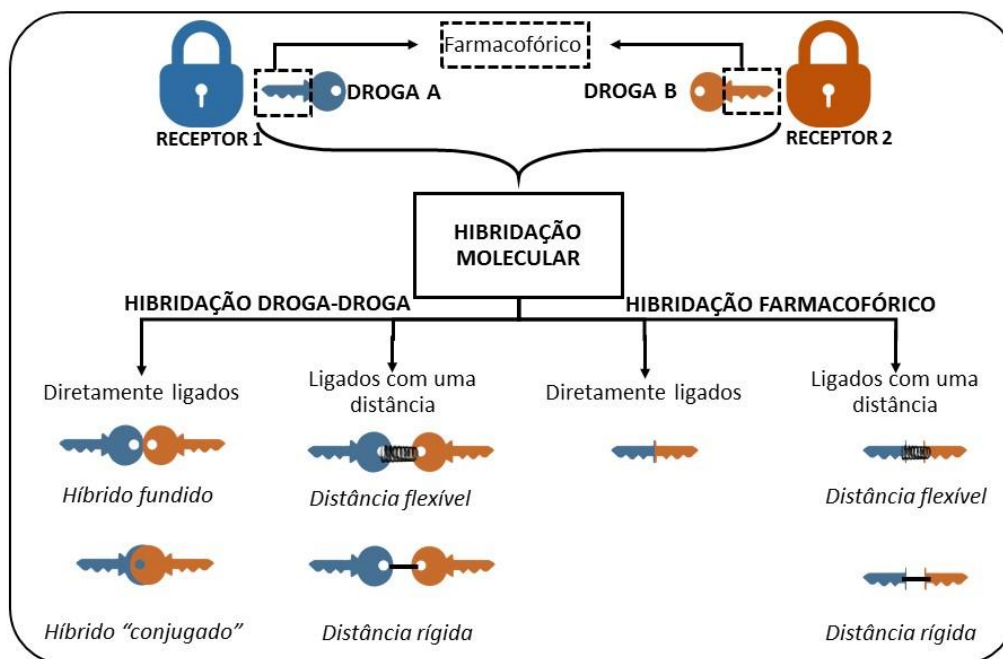


Figura 11: Estrutura do salol, um híbrido molecular entre o ácido acetilsalicílico e o fenol.

Na hibridação molecular, segundo Nepali *et al* (2014), tem-se, basicamente, duas formas de unir as moléculas bioativas e obter o híbrido, que é a molécula resultante de interesse. A união pode ocorrer entre fármacos distintos (Hibridação Droga-Droga) ou entre grupos farmacofóricos de fármacos distintos (Hibridação Farmacofórica). Na **Figura 12**, p.10, está ilustrado um esquema dos dois tipos de hibridação.



Híbrido formado através da Hibridação Molecular Droga- Droga:



Figura 12: Esquema hipotético dos tipos de Hibridação molecular. Adaptado no trabalho de Nepali & colaboradores (2014).

O medicamento benorilato (**Figura 13**) é um exemplo de um híbrido obtido através da Hibridação Droga-Droga. Este fármaco possui atividades como anti-inflamatório, analgésico e antipirético, e é obtido por meio da junção entre o paracetamol (analgésico e antipirético) e o cloreto do ácido acetilsalicílico, um derivado do ácido acetilsalicílico (anti-inflamatório, analgésico e antipirético). (ARAÚJO *et al*, 2015; NEPALI *et al*, 2014).

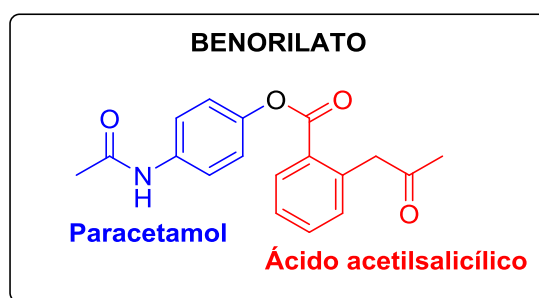


Figura 13: Fármaco benorilato, um exemplo de um híbrido obtido através da Hibridação Molecular Droga-Droga.

A aplicação da hibridação molecular permitiu também o desenvolvimento do fármaco estramustina (**Figura 14**, p. 11), que foi desenhado a partir da hibridação entre a mostarda nitrogenada e uma molécula de estradiol, este fármaco é utilizado para o

tratamento do carcinoma metastático e/ou progressivo da próstata. A estramustina é um medicamento anticâncer eficaz, porém devido a sua baixa solubilidade, uma das alternativas é utilizar o sal correspondente, fosfato de estramustina para administração via oral (BC Cancer Agency Cancer Drug Manual, 2014). Os seus efeitos, basicamente, são supressão da dinâmica dos microtúbulos, interferindo assim na mitose da célula cancerígena, e desencadeadora de apoptose celular (BISSINGER *et al*, 2013). Na literatura, são descritos vários estudos de desenvolvimento de fármacos que utilizam a hibridação molecular.

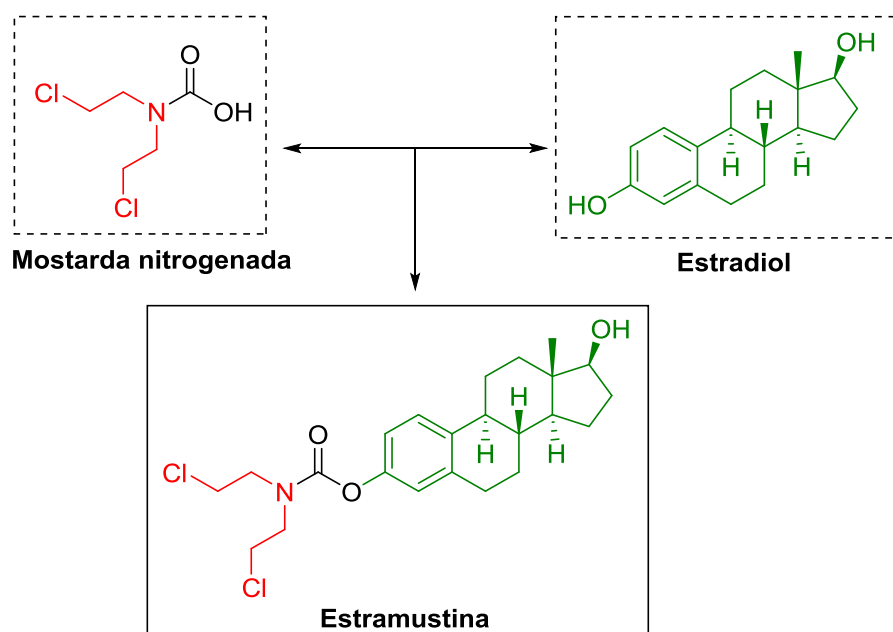


Figura 84: Fármaco estramustina, resultado da hibridação entre a mostarda nitrogenada e o estradiol.

1.5. OBEJETIVOS E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Na indústria farmacêutica busca-se, continuamente, o desenvolvimento de novos produtos químicos. Novos compostos são prospectados para o tratamento de diversas doenças que acometem o homem. Além disso, objetiva-se encontrar compostos que possam ser administrados em dosagens que causem o menor número possível de efeitos colaterais aos pacientes.

Diante do exposto e considerando as diferentes atividades biológicas mencionadas anteriormente para a vanilina e o ácido cinâmico, bem como a constante busca das indústrias farmacêutica por novos produtos, o presente trabalho objetivou a síntese de uma série de ésteres cinamatos derivados da vanilina (compostos híbridos

entre a vanilina e derivados do ácido cinâmico) e a avaliação de suas atividades citotóxica e leishmanicida. Conforme será visto a frente, a síntese dos compostos será descrita no Capítulo 2, enquanto a avaliação das atividades citotóxica e leishmanicida dos compostos sintetizados serão descritas, respectivamente, nos Capítulos 3 e 4.

1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M.; NISHIKAWA, K.; FUKUDA, H.; NAKANISHI, K.; TAZAWA, Y.; TANIGUCHI, T.; PARK, S.; HIRADATE, S.; FUJII, Y.; OKUDA, K.; SHINDO, M. Key structural features of cis-cinnamic acid as an allelochemical. *Phytochemistry*, v. 84, p. 56-67, 2012.
- AKAO, Y.; MARUYAMA, H.; MATSUMOTO, K.; OHGUCHI, K.; NISHIZAWA, K.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; NOZAWA, Y. Cell Growth Inhibitory Effect of Cinnamic Acid Derivatives from Propolis on Human Tumor Cell Lines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 26, p. 1057-1059, 2003.
- ALMEIDA, T. B. *Síntese de novos híbridos moleculares a partir de um derivado da piperina e anéis tetraidropiranos com potencial atividade antinociceptiva*. 2014. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba.
- ANTASANOV, G. A.; WALTENBERG, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCHA, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, v. 33, p. 1582–1614, 2015.
- ARAÚJO, C. R. M.; FILHO, C. A. L.; SANTOS, V. L. A.; MAIA, G. L. A.; GONSALVES, A. A. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de Paracetamol e Sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder®. *Química Nova*, v. 38, p. 868-873, 2015.
- BALTAS, M.; BELVAL, F. B. Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents - A Review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 1672-1703, 2011.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal: As bases moleculares para ação dos fármacos* [recurso eletrônico]. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

- BC Cancer Agency Cancer Drug Manual. DRUG NAME: Estramustine. Revised: 2014. Disponível em: < http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/Drug%20Index/Estramustine_monograph_1April2014.pdf >. Acesso em: 20 de Setembro de 2018.
- BISSINGER, R.; MODICANO, P.; FRAUENFELD, L.; LANG, E.; JACOBI, J.; FAGGIO, C.; LANG, F. Estramustine-Induced Suicidal Erythrocyte Death. *Cellular Physiology Biochemistry*, v. 32, p. 1426-1436, 2013.
- CHIRIAC, C. I.; TANASA, F.; ONCIU, M. A novel approach in cinnamic acid synthesis: direct synthesis of cinnamic acids from aromatic aldehydes and aliphatic carboxylic acids in the presence of boron tribromide. *Molecules*, v. 10, p. 481-487, 2005.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, p. 362-372, 1999.
- DELLAGREGA, M.; PURCARO, R.; PREVITERA, L.; ZARRELLI, A. Phenyl cinnamate derivatives from *Oxalis pes-caprae*. *Chemistry & Biodiversity*, v. 5, p. 2408-2414, 2008.
- DUKE, J.A. *Handbook of Medicinal Spice*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- EKMEKCIOGLU, C.; FEYERTAG, J.; MARKTLY, W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. *Cancer letters*, v. 128, p. 137-144, 1998.
- FITZGERALD, D. J.; STRATFORD, M.; GASSON, M. J.; NARBAD, A. Structure-function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1769-1775, 2005.
- GALGANI, J. E.; NUNEZ, B.; VIDELA, L. A.; Vanillin suppresses Kupffer cell-related colloidal carbon-induced respiratory burst activity in isolated perfused rat liver: antiinflammatory implications. *Food & Function*, v. 3, p. 1319-1323, 2012.
- GOMEZ, R. C.; KEPPNER-WITTER, S.; HIEKE, M.; LANGE, L.; SCHNEIDER, G.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; PROCHAK, E.; SPÄNKUCH, B. Vanillin-derived antiproliferative compounds influence Plk1 activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, p. 5063-5069, 2014.
- GOVINDASAMI, T.; PANDEY, A.; PALANIVELU, N.; PANDEY, A. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Biologically Important Vanillin

- Related Hydrazone Derivatives. *International Journal of Organic Chemistry*, v. 1, p. 71-77, 2011.
- GUNTHORPE, M. J.; HANNAN, S. L.; SMART, D.; JERMAN, J. C.; ARPINO, S.; SMITH, G. D.; BROUGH, S.; WRIGHT, J.; EGERTON, J.; LAPPIN, S. C.; HOLLAND, V. A.; WINBORN, K.; THOMPSON, M.; RAMI, H. K.; RANDALL, A.; DAVIS, J. B. Characterization of SB-705498, a Potent and Selective Vanilloid Receptor-1 (VR1/TRPV1) Antagonist That Inhibits the Capsaicin-, Acid-, and Heat-Mediated Activation of the Receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 321, p. 1183-1192, 2007.
- GUZMAN, J. D. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules*, v.19, p. 19292-19349, 2014.
- JANTAREE, P.; LIRDPRAPAMONGKOL, K.; KAEWSRI, W.; THONGSORNKLEEB, C.; CHOOWONGKOMON, K.; ATJANASUPPAT, K.; RUCHIRAWAT, S.; SVASTI, J. Homo-dimers of vanillin and apocynin decrease metastatic potential of human cancer cells by inhibiting the FAK/PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, p. 2299–2306, 2017.
- KANAANI, J., GINSBURG, H. Effects of cinnamic acid derivatives on in vitro growth of Plasmodium falciparum and on the permeability of the membrane of malaria-infected erythrocytes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, p. 1102-1108, 1992.
- KESHAVA, C.; KESHAVA, N.; WHONG, W.-Z.; NATH, J.; ONG, T.-M. Inhibition of methotrexate-induced chromosomal damage by vanillin and chlorophyllin in V79 cells. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, v. 17, p. 313-326, 1998.
- KIM, K. -H.; TSAO, R.; YANG, R.; CUI, S. W. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, v. 95, p. 466-473, 2006.
- KUMAR, r.; SHARMA, P. K.; MISHRA, P. S. A Review on the Vanillin derivatives showing various Biological activities. *International Journal of PharmTech Research*, v.4, p 266-279, 2012.
- LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. *Química Nova*, v. 30, p. 1456-1468, 2007.
- LEE, Y.; KUO, H.; CHU, C.; WANG, C.; LIN, W.; TSENG, T. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced

- apoptosis of C6 glioma cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 66, p. 2281-2289, 2003.
- LEE, J. G.; LEE, B. Y.; LEE, H. J. Accumulation of phytotoxic organic acids in reused nutrient solution during hydroponic cultivation of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae*, v. 110, p. 119-128, 2006.
- MESSEGUER, A.; PLANELLS-CASES, R.; FERRER-MONTIEL, A. Physiology and Pharmacology of the Vanilloid Receptor. *Current Neuropharmacology*, v. 4, p. 1-15, 2006.
- NIERO, E. L. O. *Efeitos de ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanona humanos: avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta*. 2010. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NISHIKAWA, K.; FUKUDA, H.; ABE, M.; NAKANISHI, K.; TANIGUCHI, T.; NOMURA, T.; YAMAGUCHI, C.; HIRADATE, S.; FUJII, Y.; OKUDA, K.; SHINDO, M. Substituent effects of cis-cinnamic acid analogues as plant growth inhibitors. *Phytochemistry*, v. 96, p. 132-147, 2013.
- NEPALI, K.; SHARMA, S.; SHARMA, M.; BEDI, P. M. S.; DHAR, K. L. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 77, p. 422-487, 2014.
- PINTO, P. A.; MATA, G. R.; BOTELHO, N. C.; VIANA, L. M. *Uso do óleo de canela Cinnamomum zeylanicum Breyne na abordagem de conteúdos experimentais de química orgânica*. In: 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo – Águas de Lindóia, 2012.
- SADEGHI, M.; ZOLFAGHARI, B.; SENATORE, M.; LANZOTTI, V. Antifungal cinnamic acid derivatives from Persian leek (*Allium ampeloprasum* Subsp. *Persicum*). *Phytochemistry Letters*, v. 6, p. 360-363, 2013.
- SINHA, A.; SHARMA, U. K.; SHARMA, N. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 59, p. 299-326, 2008.
- SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 3, p. 403-423, 2011.

- SOVA, M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 749-767, 2012.
- SZALLASI, A.; CORTRIGHT, D. N.; BLUM, C. A.; EID, S. R. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 6, p. 357–372, 2007.
- TAI, A.; SAWANO, T.; YAZAMA, F.; ITO, H. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochim. Biophys. Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*. 2011, 1810, 170–177.
- THEODOROU, M. K.; GASCOYNE, D. J.; AKIN, D. E.; HARTLEY, R. D. Effect of phenolic acids and phenolics from plant cell walls on rumenlike fermentation in consecutive batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 1046-1050, 1987.
- VIEGAS-JUNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, v.14 p., 1829-1852, 2007.
- ZHANG, J.; ZHAO, L.; ZHU, C.; WU, Z.; ZHANG, G.; GAN, X.; LIU, D.; PAN, J.; HU, D.; SONG, B. Facile Synthesis of Novel Vanillin Derivatives Incorporating a Bis(2-hydroxyethyl)dithioacetal Moiety as Antiviral Agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, p. 4582–4588, 2017.

CAPÍTULO 2

SÍNTESE DE ÉSTERES CINAMATOS DERIVADOS DA VANILINA

2.1. INTRODUÇÃO

No Capítulo 1 desta dissertação, descreveu-se que o objetivo do presente trabalho foi a síntese de híbridos moleculares derivados da vanilina e do ácido cinâmico para subsequente avaliação das atividades citotóxica e leishmanicida destes derivados. Os compostos sintetizados correspondem a ésteres cinamatos.

Levando-se em conta a preparação de ésteres, algumas metodologias podem ser citadas. Uma metodologia clássica é a esterificação de Fischer, que corresponde à reação de um ácido carboxílico com um álcool, catalisada por ácidos. Neste processo, a hidroxila do ácido carboxílico será substituída - *via* Substituição Nucleofílica Acílica - pelo grupo alcoxila do álcool (**Figura 15**). O catalisador ácido nesta transformação tem o papel de tornar a carbonila mais eletrofílica e, conseqüentemente, mais suscetível ao ataque nucleofílico do álcool. Devido à desidratação de álcoois terciários na presença de ácidos, esta reação pode ser realizada apenas com álcoois primários e secundários (CLAYDEN *et al*, 2001).

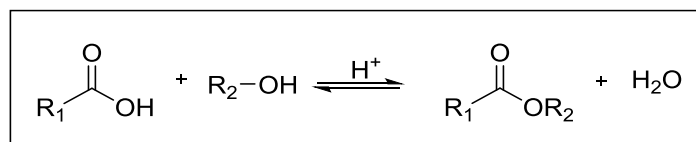


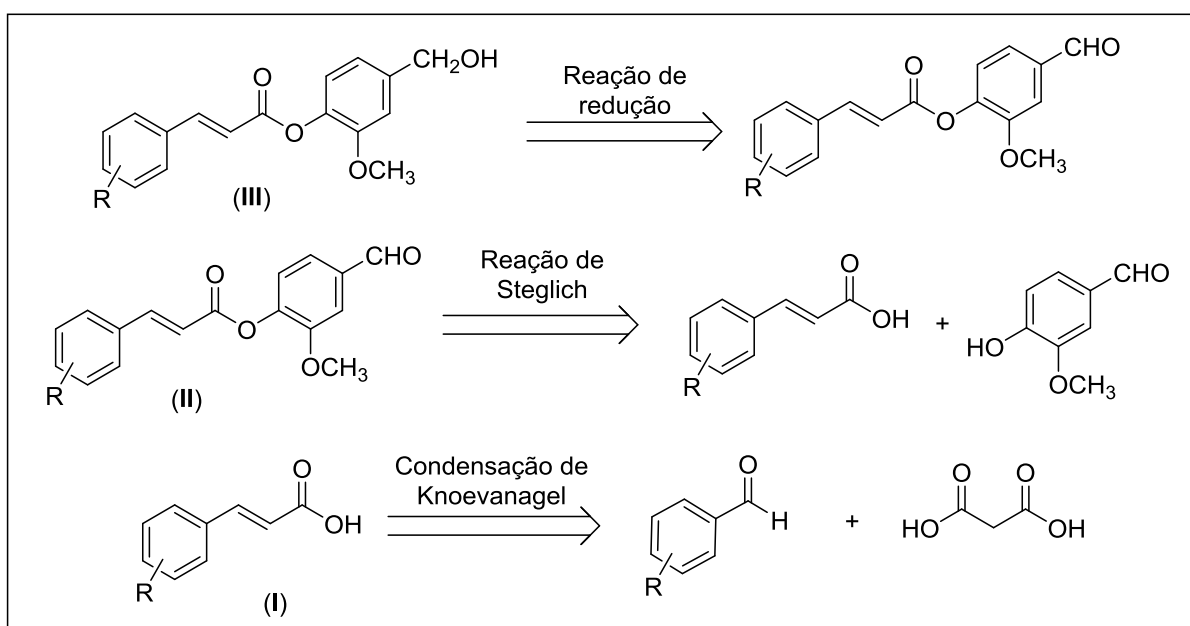
Figura 15: Reação de esterificação de Fischer.

Para formação de ésteres, também podem ser utilizados haletos de ácidos (haletos de acila). Neste caso, o haleto de acila reage, por meio de uma reação de Substituição Nucleofílica Acílica, com um álcool na presença de uma base formando assim o éster correspondente, a base presente tem o papel de remover o próton do intermediário tetraédrico, após o ataque do álcool à carbonila. Na reconstituição da carbonila, o haleto é eliminado, uma vez que este é uma base mais fraca (e, portanto, melhor grupo abandonador) que o íon alcóxido proveniente do álcool (CLAYDEN *et al*, 2001).

Outro método de esterificação que merece destaque é a reação de ácidos carboxílicos e álcoois formando ésteres na presença de DCC (*N,N*-

dicicloexilcarbodiimida). Esse tipo de esterificação, também conhecida como Esterificação de Steglich, foi descrita por Wolfgang Steglich em 1978 e é uma adaptação de um método usado para a formação de amidas por meio de DCC. A Esterificação de Steglich emprega o DCC como reagente de acoplamento e a 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador (NEISES & STEGLICH, 1978).

Neste capítulo serão descritas as etapas envolvidas na preparação dos ésteres de estrutura geral **II** e **III** derivados do ácido cinâmico (**Esquema 1**). A etapa chave envolvida na preparação dos ésteres correspondeu à Esterificação de Steglich. Outras reações, reações de Knoevenagel e reações de redução utilizando o NaBH₄, também foram empregadas para o preparo dos cinamatos derivados da vanilina. Conforme apresentado no **Esquema 1**, planejou-se a obtenção dos derivados **III** via redução dos compostos de estrutura geral **II** com NaBH₄. A obtenção dos compostos de estrutura **II** foi planejada por meio da reação de Steglich entre a vanilina e diferentes derivados do ácido cinâmico. E a reação de Condensação de Knoevenagel foi escolhida para a síntese dos derivados do ácido cinâmico.



Esquema 1: Análise retrossintética para o preparo dos cinamatos derivados da vanilina.

Na **Figura 16**, p.19 estão representados os ésteres cinamatos derivados da vanilina e os derivados do ácido cinâmico que foram sintetizados neste trabalho.

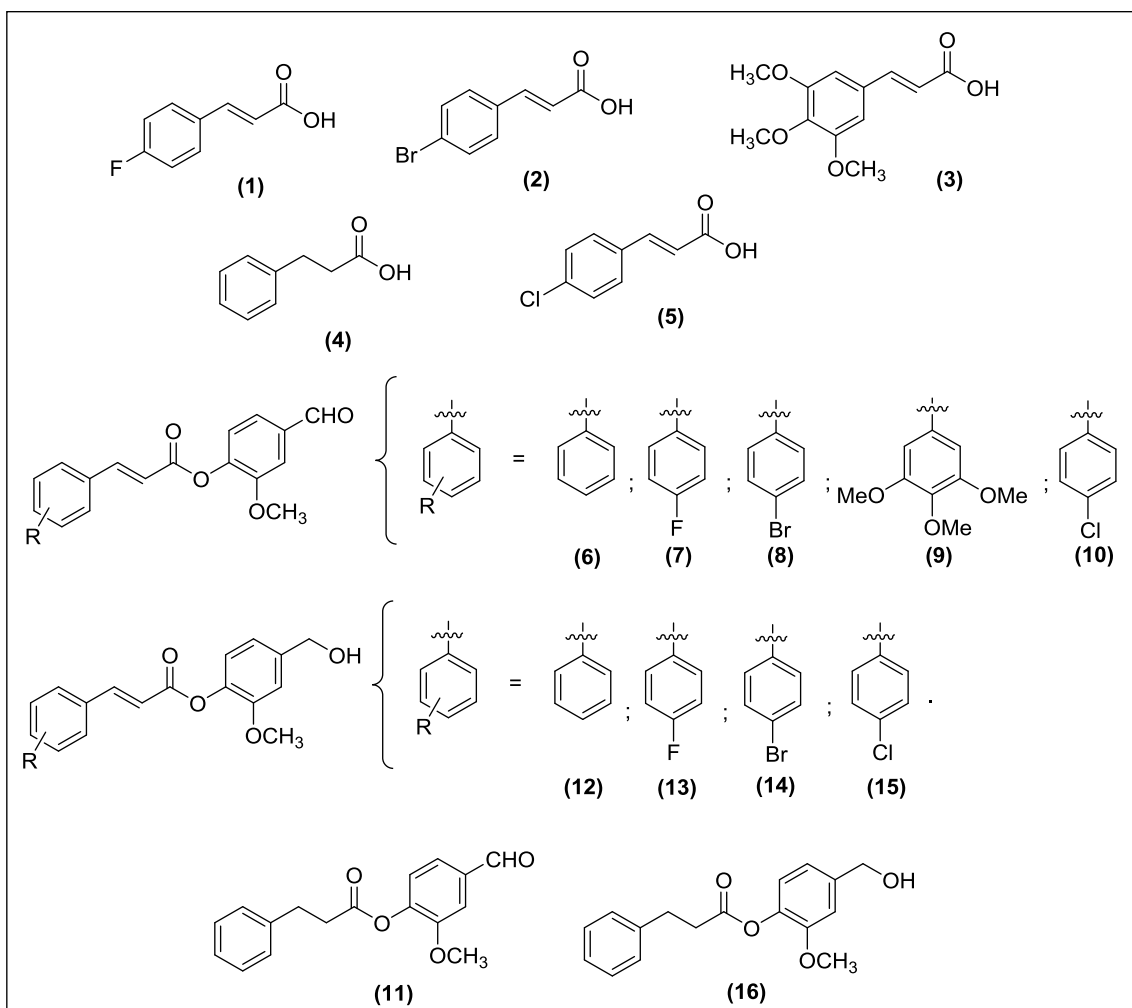


Figura 16: Estruturas dos derivados do ácido cinâmico (**1-5**) e ésteres cinamatos oriundos da vanilina (**6-16**) sintetizados no presente trabalho.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Generalidades metodológicas

Foram utilizados reagentes de grau P.A. para as sínteses dos compostos. Piperidina, ácido cinâmico, ácido malônico, 4-fluorobenzaldeído, 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, 4-bromobenzaldeído, 4-clorobenzaldeído, *N,N*-dicicloexilcarbodiimida (DCC), 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP), Pd/C, boridreto de sódio, cloreto de sódio, ácido cítrico foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e utilizados sem prévia purificação. Ácido clorídrico, acetona, cloreto de sódio, éter etílico, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, piridina e vanilina foram adquiridos da F Maia (Charqueadas, SP, Brasil). Etanol foi adquirido da LS Chemicals (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Acetato de etila,

diclorometano e hexano foram adquiridos da Êxodo Científica (Sumaré, SP, Brasil).

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se placas cromatográficas de sílica-gel impregnadas sobre alumínio. Após a eluição as placas de CCD foram observadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) e reveladas com solução de permanganato de potássio (3 g de KMnO_4 , 20 g de K_2CO_3 , 5 mL de NaOH 5% m/v, 300 mL de água).

As separações em coluna cromatográfica foram realizadas usando-se sílica-gel (70-230 mesh), como fase estacionária. Os solventes utilizados como eluentes foram usados sem prévia purificação.

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos empregando-se a técnica reflectância total atenuada (ATR) em equipamento Varian 660 ou por meio de pastilhas de KBr em espectrofotômetro PERKIN ELMER SPECTRUM 1000.

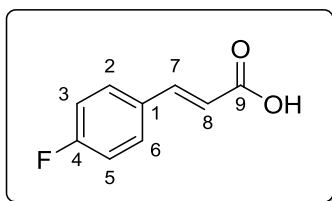
Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 300 MHz ou 400MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 75 MHz ou 100 MHz) foram obtidos nos espectrômetros VARIAN MERCURY 300 (para os espectros de ^1H 300 MHz e ^{13}C 75 MHz) e Bruker (para os espectros de ^1H 400 MHz e ^{13}C 100 MHz). Foram utilizados como solventes o clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e dimetilsulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$) deuterados. As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF-302 e não foram corrigidas.

A numeração empregada nas estruturas e utilizada nas descrições das informações referentes aos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C não correspondem àquelas recomendadas pela nomenclatura IUPAC.

2.2.2. Procedimentos Sintéticos

2.2.2.1. Síntese do ácido (*E*)-4-fluorocinâmico (1)



(1)

Os procedimentos descritos a seguir foram baseados no trabalho publicado por Tomaz (2015).

A um balão de fundo redondo (25,0 mL) foram adicionados ácido malônico (1,37 g; 13,0 mmol), 4-fluorobenzaldeído (0,900 g; 7,25 mmol) e piridina (5,00 mL). A mistura de reação foi mantida sob agitação magnética por 5 minutos e após esse período adicionou-se piperidina (1,00 mL; 13,0 mmol). A mistura resultante foi mantida sob agitação e refluxo por um período de 48 horas e o término da reação foi evidenciado por CCD. A mistura de reação foi, então, vertida em banho de gelo e adicionaram-se lentamente 10,0 mL de solução de ácido clorídrico (1:1 $v v^{-1}$). Em seguida, foi realizada uma filtração a vácuo (em funil sinterizado) da mistura resultante. O resíduo foi lavado com porções de água gelada (4 x 5,00 mL) e purificado por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando-se como eluente uma mistura de acetato de etila-hexano (1:2 $v v^{-1}$). O composto **1** foi obtido como um sólido amarelo-claro com 62% de rendimento (0,743 g; 4,47 mmol).

Característica: sólido amarelo-claro.

CCD: $R_f = 0,76$ (acetato de etila-hexano 2:1 $v v^{-1}$).

T_f: 207,0-209,0 °C (**T_f literatura:** 208,0–210,0 °C; RASSCHAERT & SLOOTMAEKERS, 1996).

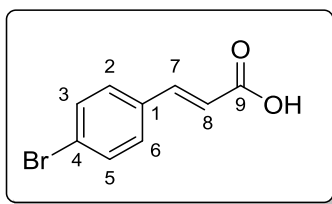
IV (KBr) ν_{max} : 3330-2030 (banda larga), 3036, 2974, 2840, 2608, 1690, 1627, 1228, 1158, 828. O espectro é apresentado na Figura 18, p. 43.

RMN de 1H (300 MHz, CD_3OD) δ : 6,43 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz; H-8); 7,14 (t, 2H, $J = 8,7$ Hz; H-3/H-5); 7,62-7,67 (m, 3H, H-2/H-6/H-7). O espectro é apresentado na Figura 19, p. 44.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ : 115,5 (d, $J_{\text{C-F}} = 22,5$ Hz; C-3/C-5); 118,0 (C-8); 130,0 (d, $J_{\text{C-F}} = 8,3$ Hz; C-2/C-6); 130,9 (d, $J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz; C-1); 143,4 (C-7); 163,8 (d, $J_{\text{C-F}} = 248,3$ Hz; C-4); 168,6 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 20, p. 45.

Os derivados do ácido cinâmico **2** e **3** foram sintetizados empregando a mesma metodologia descrita para a preparação do composto **1**. As estruturas dos compostos **2** e **3** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

2.2.2.2. Síntese do ácido (*E*)-4-bromocinâmico (**2**)



(2)

Característica: sólido branco, obtido com 59% de rendimento (0,139 g; 0,61 mmol) a partir de 0,233 g do ácido malônico (0,610 mmol), 0,190 g do 4-bromobenzaldeído (1,03 mmol), 0,20 mL de piperidina (2,03 mmol). A reação foi realizada em 5,00 mL de piridina e permaneceu sob refluxo por 48 horas. O composto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com acetato de etila-hexano (2:1 $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$).

CCD: $R_f = 0,80$ (acetato de etila-hexano 2:1 $\text{v}\cdot\text{v}^{-1}$).

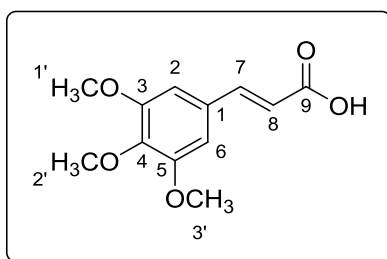
T_f: 264,0–265,0 °C ($T_{f \text{ literatura}}$: 264,0–266,0 °C; MIKROYANNIDIS *et al*, 2003).

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3630–2750 (banda larga), 2830, 1896, 1692, 1622, 1227, 814 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura 48 do Anexo, p. 95.

RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 6,52 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz; H-8); 7,44 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz; H-3/H-5); 7,55 (d, 2H, $J = 16,1$ Hz; H-7); 7,68 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz; H-2/H-6). O espectro é apresentado na Figura 49 do Anexo, p. 96.

RMN de ^{13}C (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 120,5 (C-8); 129,3 (C-3/C-5); 130,3 (C-2/C-6); 133,6 (C-4); 135,1 (C-1); 142,8 (C-7); 167,7 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 50 do Anexo, p. 97.

2.2.2.3. Síntese do ácido (*E*)-2,3,4-trimetoxicinâmico (3)



(3)

Característica: sólido branco, obtido com 61% de rendimento (0,455 g; 1,90 mmol) a partir de 0,647 g do ácido malônico (6,20 mmol), 600,0 mg do 2,3,4-trimetóxi-benzaldeído (3,10 mmol), 0,60 mL de piperidina (6,11 mmol). A reação foi realizada em 5,00 mL de piridina e permaneceu sob refluxo por 48 horas. O composto foi purificado em cromatografia em coluna de sílica gel eluída com acetato de etila-hexano (2:1 $v v^{-1}$).

CCD: $R_f = 0,61$ (acetato de etila-hexano 2:1 $v v^{-1}$).

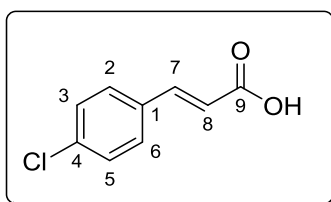
T_f: 215,3–219,0 °C (T_f literatura: 216,0 -217,0 °C; MACPHILLAMY *et al*, 1955).

IV (KBr) $\bar{\nu}_{max}$: 3330-2090 (banda larga), 3000, 2836, 2654, 1689, 1627, 1584, 1121, 827 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura 51 do Anexo, p. 98.

RMN de 1H (300 MHz, CD_3OD) δ : 3,78 (s, 3H, H-2'); 3,87 (s, 6H, H-1'/H-3'); 6,44 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz; H-8); 6,92 (s, 2H; H-2/H-6); 7,60 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz; H-7). O espectro é apresentado na Figura 52 do Anexo, p. 99.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ : 55,3 (C-1'/C-3'); 59,7 (C-2'); 105,3 (C-2/C-6); 117,4 (C-8); 130,2 (C-1); 139,8 (C-4); 144,9 (C-7); 153,4 (C-3/C-5); 168,8 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 53 do Anexo, p. 100.

2.2.2.4. Síntese do ácido (*E*)-4-clorocinâmico (4)



(4)

O procedimento sintético descrito a seguir foi baseado no trabalho publicado por Tomaz (2015).

A um balão de fundo redondo (25,0 ml) foram adicionados ácido malônico (0,302 g; 2,96 mmol), 4-clorobenzaldeído (0,220 g; 1,56 mmol), piridina (5,00 mL) e piperidina (2,50 mL; 2,93 mmol). O balão contendo a mistura resultante foi inserido na cavidade do aparelho de micro-ondas. Utilizou-se o método pré-programado do equipamento CEM Discover System. O método consiste da utilização de refluxo, agitação magnética e irradiação da mistura de reação por vinte minutos utilizando a potência de 150 W. A mistura da reação foi então vertida em banho de gelo e adicionaram-se lentamente 10,0 mL de ácido clorídrico (1:1 $v v^{-1}$). Em seguida foi realizada uma filtração a vácuo (em funil sinterizado) da mistura resultante. O resíduo foi lavado com porções de água gelada (4 x 5,00 mL). Após lavagem, o resíduo foi purificado por recristalização utilizando como solvente diclorometano-etanol (1:1 $v v^{-1}$). O composto **4** foi obtido como um sólido branco com 82% de rendimento (0,083 mg; 0,450 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,56$ (acetato de etila-hexano 2:1 $v v^{-1}$).

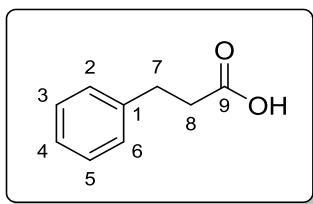
T_f: 241,2–242,0 °C ($T_{f \text{ literatura}}$: 240,0 – 242,0 °C; CHIEFARI *et al*, 1987).

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3430-1980 (banda larga), 2928, 2850, 1902, 1701, 1630, 1488, 821 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura 54 do Anexo, p. 101.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6,53 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz; H-8); 7,50-7,63 (m, 5H; H-2/H-3/H-5/H-6/H-7). O espectro é apresentado na Figura 55 do Anexo, p. 102.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 120,9 (C-8); 123,8 (C-4); 130,5 (C-3/C-5); 132,2 (C-2/C-6); 134,0 (C-1); 142,7 (C-7); 168,0 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 56 do Anexo, p. 103.

2.2.2.5. Síntese do ácido 3-fenilpropanóico (5)



(5)

O procedimento sintético descrito a seguir foi baseado no trabalho publicado por Barbosa *et al* (2009).

A um balão bitubulado de 50 mL, contendo uma barra de agitação e sob atmosfera de hidrogênio, foram adicionados 0,300 g de ácido cinâmico (2,02 mmol) e 0,620 g de Pd/C e 8,00 mL de etanol. A mistura permaneceu sob agitação por 4 horas e 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período, a análise da mistura por CCD comprovou que o material de partida havia sido completamente consumido. A mistura de reação foi filtrada para remoção do catalisador de paládio e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. Posteriormente, o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando-se como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila (2:1 $v v^{-1}$) e concentrada sob pressão reduzida. O composto **5** foi obtido como um sólido branco com 94% de rendimento (0,304 g; 1,89 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,26$ (hexano-acetato de etila 2:1 $v v^{-1}$).

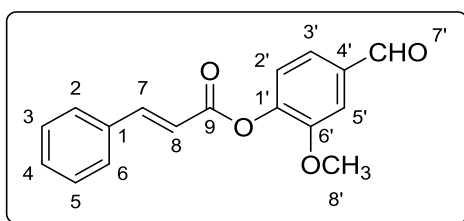
T_f: 43,3 - 44,0 °C ($T_{f \text{ literatura}}$: 47 - 49 °C; HOLMES & LIGHTNER, 1995).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3400-2110 (banda larga), 3025, 2932, 1692, 1601, 1495, 1453, 1426, 1406, 1299, 1212, 1082, 926, 784, 753, 722, 697, 559, 531, cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura 22, p. 48.

RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ : 2,58 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz; H-7); 2,89 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz; H-8); 7,13 - 7,27 (m, 5H; H2/H-3/H-4/H-5/H-6). O espectro é apresentado na Figura 23, p. 49.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ : 30,8 (C-7); 35,5 (C-8); 126,0 (C-4); 128,1 (C-2/C-6); 128,3 (C-3/C-5); 140,9 (C-1); 175,5 ($-\text{COOH}$). O espectro é apresentado na Figura 24, p. 50.

2.2.2.6. Síntese do (E)-cinamato de 4-formil-2-metoxifenila



(6)

A um balão de fundo redondo (50,0 mL), contendo uma barra de agitação magnética, foram adicionados 0,401 g (2,60 mmol) da vanilina (4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído), 10,0 mL de diclorometano, 0,355 g (2,40 mmol) de ácido cinâmico, 0,536 g (2,60 mmol) de dicianidrido de dicicloexilcarbodiimida (DCC) e 0,0308 g (0,252 mmol) de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP). A mistura resultante permaneceu sob agitação magnética por 50 minutos à temperatura ambiente. Após este período, confirmou-se por análise CCD que o reagente limitante (o ácido cinâmico) havia sido consumido. Em seguida, a mistura de reação foi filtrada e a fase orgânica resultante foi lavada com solução aquosa 10% m/v de ácido cítrico (2 x 10,0 mL), água (15,0 mL) e solução saturada de NaCl (15,0 mL). Reservou-se a fase orgânica e a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando-se como eluente hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v^v). O composto **6** foi obtido em 68% de rendimento (0,459 g; 1,63 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: R_f = 0,84 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v^v).

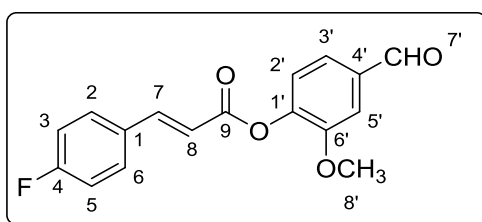
T_f: 90,2 - 92 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3065, 3012, 2926, 2836, 2737, 1724, 1699, 1595, 1499, 1422, 1391, 1307, 1265, 1201, 1131, 1115, 1029, 994, 972, 761, 731, 710, 683 cm⁻¹. O espectro é apresentado na Figura 57 do Anexo, p. 104.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,90 (s, 3H; -OCH₃); 6,66 (d, 1H, *J* = 15,9 Hz; H-8); 7,30 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz; H-2'); 7,41-7,58 (m, 7H; H-2/H-3/H-4/H-5/H-6/H-3'/H-5'); 7,89 (d, 1H, *J* = 15,9 Hz; H-7); 9,95 (s, 1H; -CHO). O espectro é apresentado na Figura 58 do Anexo, p. 105.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 56,1 (-OCH₃); 110,8 (C-5'); 116,3 (C-8); 123,5 (C-3'); 124,7 (C-2'); 128,3 (C-2/C-6); 129,0 (C-3/C-5); 130,8 (C-4); 134,0 (C-4'); 135,1 (C-1); 145,0 (C-1'); 147,3 (C-7); 152,1 (C-6'); 164,2 (C-9); 191,0 (-CHO). O espectro é apresentado na Figura 59 do Anexo, p. 106.

2.2.2.7. Síntese do (*E*)-4-fluorocinamato de 4-formil-2-metoxifenila



(7)

A um balão de fundo redondo (50,0 mL) contendo uma barra de agitação magnética foram adicionados 0,308 g (2,02 mmol) da vanilina, 10,0 mL de diclorometano, 0,300 g (1,80 mmol) do ácido (*E*)-4-fluorocinâmico (**1**), 0,420 g (2,03 mmol) de dicianidrido de dicicloexilcarbodiimida (DCC) e 0,0310 g (0,254 mmol) de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP). A mistura resultante permaneceu sob agitação magnética por 50 minutos à temperatura ambiente. Após este período, confirmou-se por análise CCD que o reagente limitante (ácido (*E*)-4-fluorocinâmico) havia sido consumido. Em seguida, a fase orgânica foi lavada com solução de hidróxido de sódio 2,00 mol L⁻¹ (3 x 20 mL). Reservou-se a fase orgânica resultante e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos, e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando-se como eluente hexano-acetato de etila (1:1 v^v-1), obtendo-se a substância **7**, em 69% de rendimento (0,379 g; 0,114 mmol).

Característica: sólido amarelo.

CCD: R_f = 0,74 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v^v-1).

T_f: 96,6 – 98,1 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3264, 2924, 2852, 1734, 1699 1633, 1597, 1500, 1416, 1394, 1268, 1227, 1114, 1029, 965, 828, 809, 731, 630, 586, 506 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura 60 do Anexo, p. 107.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,90 (s, 3H; $-\text{OCH}_3$); 6,58 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz; H-8); 7,11 (t, 2H, $J = 8,4$ Hz; H-3/H-5); 7,29 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz; H-2'); 7,48-7,60 (m, 4H; H-2/H-6/H-3'/H-5'); 7,85 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz; H-7); 9,96 (s, 1H; $-\text{CHO}$). O espectro é apresentado na Figura 61 do Anexo, p. 108.

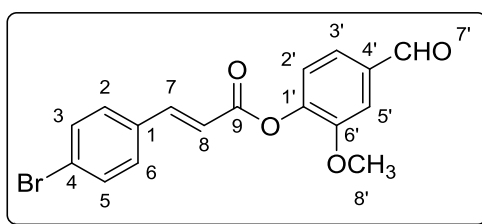
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 56,1 ($-\text{OCH}_3$); 110,8 (C-5'); 116,2 (d, $J = 21,8$ Hz; C-3/C-5)*; 123,5 (C-3'); 124,7 (C-2'); 130,3 (d, $J = 8,3$ Hz; C-2/C-6)**; 135,1 (C-1); 144,9 (C-1'); 145,9 (C-7); 152,0 (C-6'); 164,1 (C-9); 164,2 ($J_{\text{C-F}} = 251,3$ Hz; C-4); 191,0 ($-\text{CHO}$). O espectro é apresentado na Figura 62 do Anexo, p. 109.

*O sinal de C-8 está sobreposto ao duplete associado aos carbonos C-3/C-5.

**O sinal de C-1 está sobreposto ao duplete relativo aos carbonos C-2/C-6.

Para a síntese dos derivados do ácido cinâmico **8** e **11** empregou-se a mesma metodologia descrita para a preparação do composto **7**. A seguir, estão descritas as informações referentes a estas reações.

2.2.2.8. Síntese do (*E*)-4-bromocinamato de 4-formil-2-metoxifenila



(8)

Característica: sólido branco, obtido com 91% de rendimento (0,160 g; 0,443 mmol) a partir de 88,0 mg de vanilina (0,578 mmol), 0,100 g de ácido (*E*)-4-bromocinâmico (**2**) (0,441 mmol), 99,0 mg de dicitlohexilcarbodiimida (DCC) (0,480 mmol), 9,00 mg de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,0736 mmol). A reação permaneceu sob agitação por 50 minutos. O composto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v v^{-1}).

CCD: $R_f = 0,79$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 $v v^{-1}$).

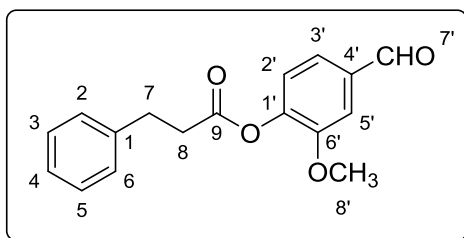
T_f: 126 – 127,9 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3520, 3272, 2936, 2899, 1729, 1603, 1511, 1452, 1417, 1381, 1283, 1266, 1188, 1152, 1113, 1060, 1026, 996, 952, 918, 832, 779, 715, 693. O espectro é apresentado na Figura 63 do Anexo, p. 110.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,85 (s, 3H; -OCH₃); 6,93 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz; H-8); 7,57 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz; H-5'); 7,60-7,65 (m, 4H; H-2'/H-3'/H-3/H-5); 7,76 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz; H-2/H-6); 7,84 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz; H-7); 9,97 (s, 1H; -CHO). O espectro é apresentado na Figura 64 do Anexo, p. 111.

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 56,5 (-OCH₃); 112,3 (C-5'); 117,7 (C-8); 124,0 (C-3'); 124,2 (C-2'); 124,9 (C-4); 131,0 (C-2/C-6); 132,4 (C-3/C-5); 133,4 (C-4'); 133,40 (C-4'); 135,5 (C-1); 144,6 (C-1'); 146,2 (C-7); 152,0 (C-6'); 164,1 (C-9); 192,4 (-CHO). O espectro é apresentado na Figura 65 do Anexo, p. 112.

2.2.2.9. Síntese do 3-fenilpropanoato de 4-formil-2-metoxifenila



(11)

Característica: sólido branco, obtido com 67% de rendimento (0,204 g; 0,717 mmol) a partir de 0,150 g de vanilina (0,986 mmol), 0,165 g de ácido 3-fenilpropanóico (**5**) (1,10 mmol), 227,0 mg de dicianidimetilcarbodiimida (DCC) (1,10 mmol), 12,2 mg de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,0998 mmol). A reação permaneceu sob agitação por 50 minutos. O composto foi purificado em cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-diclorometano (1:1 $v v^{-1}$).

CCD: $R_f = 0,83$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 $v v^{-1}$).

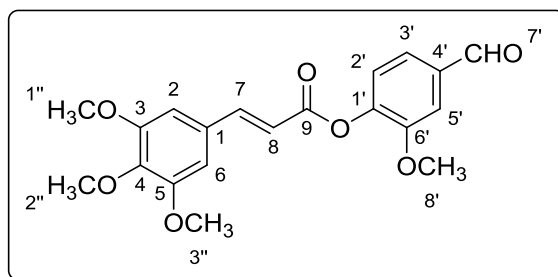
T_f: 47,5 – 49 °C ($T_{f \text{ literatura}}$: 46 - 47 °C; DIKUSAR, 2006).

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 2926, 2843, 2743, 1761, 1681, 1595, 1499, 1420, 1389, 1360, 1271, 1184, 1113, 1026, 939, 871, 752, 734, 701, 641 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura 69 do Anexo, p. 116.

RMNH ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,91-2,97 (m, 2H; H-7); 3,07-3,12 (m, 2H; H-8); 3,85 (s, 3H; $-\text{OCH}_3$); 7,14 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz; H-2'); 7,24-7,33 (m, 5H; H-2/H-3/H-4/H-5/H-6); 7,44 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-5'); 7,46-7,48 (m, 1H; H-3'); 9,93 (s, 1H; $-\text{CHO}$). O espectro é apresentado na Figura 70 do Anexo, p. 117.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 30,8 (C-7); 35,4 (C-8); 56,0 ($-\text{OCH}_3$); 110,7 (C-5'); 123,3 (C-3'); 124,7 (C-2'); 126,4 (C-4); 128,3 (C-2/C-6); 128,5 (C-3/C-5); 135,1 (C-4'); 140,0 (C-1); 144,9 (C-1'); 151,9 (C-6'); 170,0 (C-9); 191,0 ($-\text{CHO}$). O espectro é apresentado na Figura 71 do Anexo, p. 118.

2.2.2.10. Síntese do (*E*)-3,4,5-trimetoxicinamato de 4-formil-2-metoxifenila



(9)

A um balão de fundo redondo (50,0 mL) contendo uma barra de agitação magnética foram adicionados 0,142 g (0,93 mmol) da vanilina, 10,0 mL de diclorometano, 0,200 g (0,839 mmol) de ácido (*E*)-2,3,4-trimetoxicinâmico (**3**), 0,193 g (0,935 mmol) de dicianilcarbodiimida (DCC) e 0,0120 g (0,098 mmol) de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP). A mistura resultante permaneceu sob agitação magnética por 50 minutos à temperatura ambiente. Após este período, confirmou-se por análise CCD que todo material de partida (ácido (*E*)-2,3,4-trimetoxicinâmico) havia sido consumido. Em seguida, a mistura de reação foi resfriada no congelador por um período de 24h. A seguir realizou uma filtração através de uma camada de Celite, lavada com diclorometano gelado. A fase orgânica resultante foi, então, lavada com solução de hidróxido de potássio 5,00 mol L⁻¹ (3 x 20 mL), seca com sulfato de sódio

anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando-se como eluente hexano-acetato de etila-éter etílico (5:1:1 $v v^{-1}$), obtendo-se a substância **9** em 99% de rendimento (0,310 g; 0,832 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,74$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 $v v^{-1}$)

T_f: 178,4 – 180,1 °C.

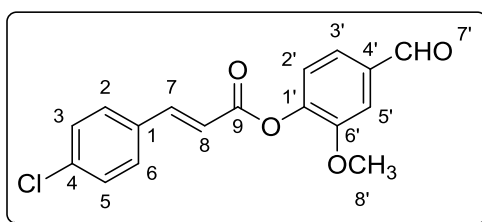
IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3324, 2927, 2849, 1713, 1624, 1582, 1505, 1452, 1418, 1224, 1189, 1122, 1004, 982, 842, 821, 780, 643 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura 66 do Anexo, p. 113.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 3,91 (s, 12H; -OCH₃); 6,58 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz; H-8); 6,83 (s, 2H; H-2/H-6); 7,31 (d, $J = 7,6$ Hz; 1H; H-2'); 7,51-7,53 (m, 2H; H-3'/H-5'); 7,81 (d, 1H, $J = 15,6$ Hz; H-7); 9,97 (s, 1H; -CHO). O espectro é apresentado na Figura 67 do Anexo, p. 114.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 33,9 (C-2''); 56,2 (C-1'', C-3''); 61,0 (C-8'); 105,6 (C-2/C-6); 110,8 (C-5'); 115,5 (C-8); 123,5 (C-3'); 124,8 (C-2'); 129,5 (C-1); 135,2 (C-4); 140,6 (C-4'); 145,0 (C-1'); 147,3 (C-7); 152,1 (C-6'); 153,5 (C-3/C-5); 164,3 (C-9); 191,0 (-CHO). O espectro é apresentado na Figura 68 do Anexo, p. 115.

Para a síntese do derivado **10** empregou-se a mesma metodologia descrita para a preparação do composto **9**. A seguir estão descritas as informações referentes a este composto.

2.2.2.11. Síntese do (E)-4-clorocinamato de 4-formil-2-metoxifenila



(10)

Característica: sólido branco, obtido com 54% de rendimento (0,0990 g; 0,312 mmol) a partir de 0,109 g de vanilina (0,718 mmol), 0,100 g de ácido (*E*)-4-clorocinâmico (**4**) (0,548 mmol), 130,9 mg de dicianoetilcarbodiimida (DCC) (0,634 mmol), 10,6 mg de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,0867 mmol). A reação permaneceu sob agitação por 50 minutos. O composto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila-éter etílico (5:1:1 *v/v/v*).

CCD: $R_f = 0,83$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 *v/v/v*).

T_f: 113,8 – 115,2 °C.

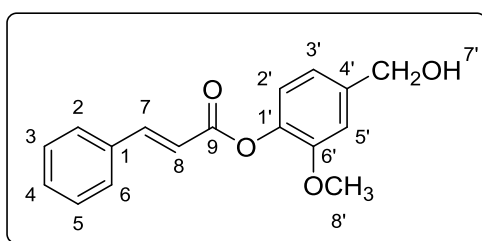
IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 2926, 2856, 1736, 1685, 1631, 1596, 1491, 1466, 1424, 1396, 1265, 1200, 1115, 1086, 964, 812, 760, 731 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura 25, p. 55.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,91 (s, 3H; -OCH₃); 6,63 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz; H-8); 7,30 (d, 1H, *J* = 8,1 Hz; H-2'); 7,38-7,41 (m, 2H; H-3'/H-5'); 7,49-7,54 (m, 4H; H-2/H-3/H-5/H-6); 7,84 (d, 1H, *J* = 16,2 Hz; H-7); 9,96 (s, 1H; -CHO). O espectro é apresentado na Figura 26, p. 56.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 56,1 (-OCH₃); 110,8 (C-5'); 116,9 (C-8); 123,4 (C-3'); 124,7 (C-2'); 129,3 (C-2/C-6); 129,5 (C-3/C-5); 132,4 (C-4); 135,2 (C-4'); 136,8 (C-1); 144,9 (C-1'); 145,8 (C-7); 152,0 (C-6'); 164,0 (C-9); 191,0 (-CHO). O espectro é apresentado na Figura 27, p. 57.

Para a síntese dos compostos **12** a **16**, que será apresentada a seguir, algumas das reações descritas acima foram repetidas, quando necessário, para obtenção de quantidades de massas adicionais.

2.2.2.12. Síntese do cinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila



(12)

A um balão de fundo redondo de 50,0 mL foram adicionados o cinamato de 4-formil-2-metoxifenila (0,102 g; 0,361 mmol) e 5,00 mL de etanol. A mistura foi magneticamente agitada por 30 minutos até completa dissolução do éster. Em seguida, adicionou-se à mistura de reação, gota-a-gota, uma solução de boridreto de sódio (0,0220 g; 0,593 mmol) dissolvido em 10,0 mL de água gelada. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por uma hora. Após este período, constatou *via* CCD, que todo material de partida (o éster cinamato) havia sido completamente consumido. Em seguida, adicionaram-se 20,0 mL de água destilada e mistura resultante foi deixada sob agitação por 10 minutos. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 $v v^{-1}$), obtendo-se assim o composto **12** com 95% de rendimento (91,1 mg; 0,320 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,45$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 $v v^{-1}$).

T_f: 85,5 – 87,9 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{max}$: 3500, 3259, 2942, 2839, 1706, 1632, 1603, 1511, 1468, 1449, 1419, 1331, 1310, 1283, 1260, 1204, 1149, 1113, 1061, 1027, 973, 762, 708 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura 72 do Anexo, p. 119.

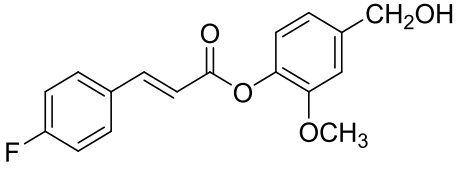
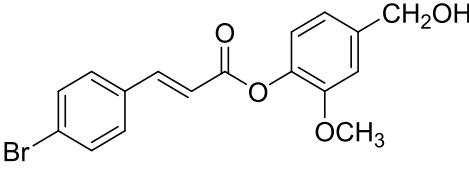
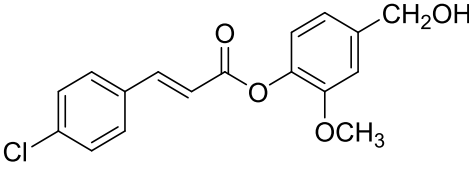
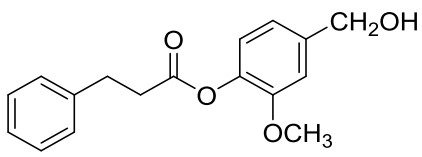
RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ : 3,84 (s, 3H; -OCH₃); 4,68 (s, 2H; -CH₂OH); 6,66 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz; H-8); 6,92-7,10 (m, 3H; H-2'/H-3'/H-5'); 7,40-7,60 (m, 5H; H-2/H-3/H-4/H-5/H-6); 7,87 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz; H-7). O espectro é apresentado na Figura 73 do Anexo, p. 120.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 55,9 (-OCH₃); 65,0 (-CH₂OH); 111,0 (C-5'); 116,9 (C-8); 118,9 (C-3'); 122,8 (C-2'); 128,3 (C-2/C-6); 128,9 (C-3/C-5); 130,6 (C-4); 134,2 (C-1'); 139,0 (C-1); 139,9 (C-4'); 146,6 (C-7); 151,2 (C-6'); 165,0 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 74 do Anexo, p. 121.

Os compostos **13-16** foram obtidos empregando-se a mesma metodologia descrição para a obtenção de **12**. Na **Tabela 1** (p. 34) são apresentadas as estruturas

dos ésteres **13-16**, bem como os rendimentos obtidos nas reações de preparação destes e os tempos de reação.

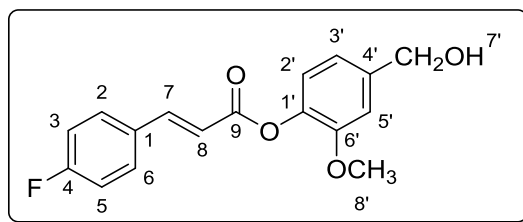
Tabela 1: Estruturas dos ésteres cinamatos 13-16, tempos de reação e rendimentos das reações envolvidas na preparação destes compostos.

Composto	Tempo de reação	Rendimento
 <p>(13)</p>	1h	72%
 <p>(14)</p>	3h	55,7%*
 <p>(15)</p>	3h	82%
 <p>(16)</p>	1h	83%

* Este rendimento foi baseado na conversão da reação.

As estruturas dos compostos **13-16** são suportadas pelos dados descritos a seguir.

(E)-4-fluorocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila



(13)

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,33$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 vv^{-1}).

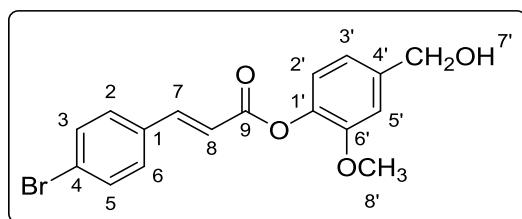
T_f: 102 – 103,1 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{max}$: 3600-3100 (banda larga), 3051, 3391, 3277, 2946, 2846, 1703, 1634, 1596, 1504, 1417, 1314, 1283, 1150, 1113, 1026, 976, 828, 507 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura 75 do Anexo, p. 122.

RMNH ¹H (300MHz, CDCl₃) δ : 3,84 (s, 3H; -OCH₃); 4,68 (s, 2H; -CH₂OH); 6,58 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz; H-8); 6,94 (dd, 1H, $J_1 = 7,8$ Hz e $J_2 = 1,8$ Hz; H-3'); 7,04-7,13 (m, 5H; H-2/H-3/H-5/H-6); 7,55-7,59 (m, 2H; H-2'/H-5'); 7,83 (d, 1H, $J = 16,1$ Hz; H-7). O espectro é apresentado na Figura 76 do Anexo, p. 123.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 55,9 (-OCH₃); 65,0 (-CH₂OH); 111,0 (C-5'); 116,1 ($J_{C-F} = 21,8$ Hz; C-3/C-5); 116,6 ($J_{C-F} = 2,3$ Hz; C-7); 118,9 (C-3'); 122,7 (C-2'); 130,1 ($J_{C-F} = 8,3$ Hz; C-2/C-6); 130,4 ($J_{C-F} = 3,8$ Hz; C-1); 139,0 (C-8); 139,9 (C-1'); 145,2 (C-4'); 151,2 (C-6'); 163,6 ($J_{C-F} = 187,5$ Hz; C-4); 165,7 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 77 do Anexo, p. 124.

(E)-4-bromocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila



(14)

Característica: sólido branco

CCD: $R_f = 0,38$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 w^{-1})

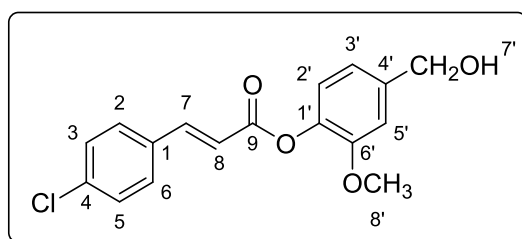
T_f: 95,8 – 98,2 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{max}$: 3600-3350 (banda larga), 3441, 2936, 2850, 1709, 1637, 1505, 1256, 1152, 1023, 817, 489 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura 78 do Anexo, p. 125.

RMNH ¹H (400MHz, CDCl₃) δ : 3,85 (s, 3H; -OCH₃); 4,69 (s, 2H; -CH₂OH); 6,65 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz; H-8); 6,82-6,95 (m, 1H; H-5'); 7,05-7,09 (m, 2H; H-2'/H-3'); 7,44 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz; H-2/H-6); 7,55 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz; H-3/H-5); 7,80 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz; H-7). O espectro é apresentado na Figura 79 do Anexo, p. 126.

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ : 55,9 (-OCH₃); 65,0 (-CH₂OH); 111,0 (C-5'); 117,6 (C-8); 118,9 (C-3'); 122,7 (C-2'); 124,9 (C-4); 129,6 (C-2/C-6); 132,2 (C-3/C-5); 133,1 (C-1'); 138,9 (C-1); 139,9 (C-4'); 145,1 (C-7); 151,2 (C-6'); 164,7 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 80 do Anexo, p. 127.

(E)-4-clorocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila



(15)

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,22$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 w^{-1}).

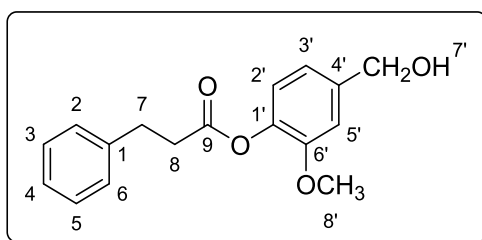
T_f: 133,1 – 134,5 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3650-3100 (banda larga), 2936, 2873, 1730, 1634, 1592, 1508, 1491, 1310, 1267, 1200, 1145, 1090, 822, 734 cm⁻¹. O espectro é apresentado na Figura 28, p. 60.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 3,84 (s, 3H; -OCH₃); 4,69 (s, 2H; -CH₂OH); 6,63 (d, 1H, *J* = 16,0 Hz; H-8); 6,94 (dd, 1H, *J*₁ = 8,0 Hz e *J*₂ = 2 Hz; H-3'); 7,05-7,09 (m, 2H; H-2'/H-5'); 7,38 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz; H-2/H-6); 7,51 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz; H-3/H-5); 7,82 (d, 1H, *J* = 16,0 Hz; H-7). O espectro é apresentado na Figura 29, p. 61.

RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃) δ : 55,9 (-OCH₃); 65,0 (-CH₂OH); 111,0 (C-5'); 117,5 (C-8); 118,9 (C-3'); 122,7 (C-2'); 129,2 (C-2/C-6); 129,4 (C-3/C-5); 132,7 (C-4); 136,5 (C-1'); 138,9 (C-1); 139,9 (C-4'); 145,1 (C-7); 151,2 (C-6'); 164,7 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 30, p. 62.

3-fenilpropanoato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila



(16)

Característica: sólido branco.

CCD: R_f = 0,46 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v⁻¹).

T_f: 50,0 – 52,0 °C.

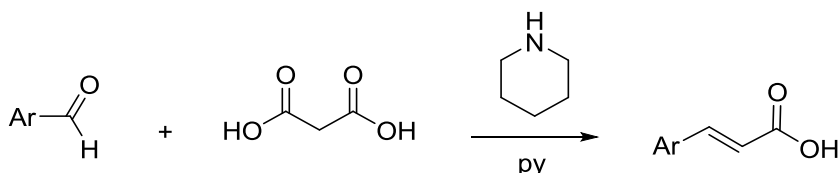
IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3600-2100 (banda larga), 3272, 2936, 2899, 1729, 1511, 1283, 1266, 1152, 1113, 1026, 832, 715, 693 cm⁻¹. O espectro é apresentado na Figura 81 do Anexo, p. 128.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,88-2,93 (m, 2H; H-7); 3,06-3,11 (m, 2H; H-8); 3,78 (s, 3H; -OCH₃); 4,64 (s, 2H; -CH₂OH); 6,86-6,99 (m, 3H; H-2'/H-3'/H-5'); 7,23-7,35 (m, 5H; H-2/H-3/H-4/H-5/H-6). O espectro é apresentado na Figura 82 do Anexo, p. 129.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 30,9 (C-7); 35,5 (C-8); 55,8 (-OCH₃); 64,9 (-CH₂OH); 111,0 (C-5'); 118,9 (C-3'); 122,6 (C-2'); 126,3 (C-4); 128,3 (C-2/C-6); 128,5 (C-3/C-5); 138,9 (C-1'); 139,9 (C-4'); 140,2 (C-1); 151,1 (C-6'); 171,1 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 83 do Anexo, p. 130.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento do presente trabalho teve início com a preparação dos derivados do ácido cinâmico **1-4** por meio da reação de Condensação de Knoevenagel entre o ácido malônico e diferentes aldeídos benzílicos (**Esquema 2**).



- 1: Ar = 4 - fluorofenila
- 2: Ar = 4 - bromofenila
- 3: Ar = 3,4,5 - trimetoxifenila
- 4: Ar = 4 - clorofenila

Esquema 2: Condensação de Knoevenagel empregada na obtenção dos cinamatos **1-4**.

O processo de Condensação de Knoevenagel foi descrito, pela primeira vez, pelo químico alemão Emil Knoevenagel em 1894. O processo envolve a reação de condensação aldólica entre um composto carbonílico e outro composto contendo um grupo metileno ativado (um grupo metileno ligado a grupos retiradores de elétrons, como -CN, -COOR, -COR, entre outros), formando assim um produto com uma ligação dupla carbono-carbono. Nesta reação, ácidos carboxílicos α,β -insaturados são formados quando o ácido malônico é utilizado. Comumente, a Condensação de Knoevenagel é catalisada por bases como aminas, amidas e seus correspondentes sais (FERREIRA, 2016; SMITH & MARCH, 2007).

A Condensação de Knoevenagel é muito utilizada na síntese de compostos orgânicos bioativos, uma vez que a partir dela é possível obter ligações carbono-carbono funcionalizadas. Um exemplo de sua aplicação é a síntese da Lumefantrina, uma droga antimalárica que foi sintetizada em 1977 e possui como etapa chave a Condensação de Knoevenagel (**Figura 17**, p. 40) (FERREIRA, 2016; SMITH & MARCH, 2007).

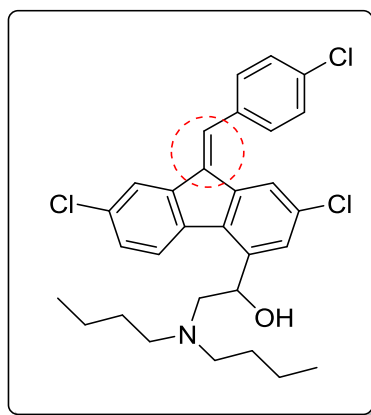
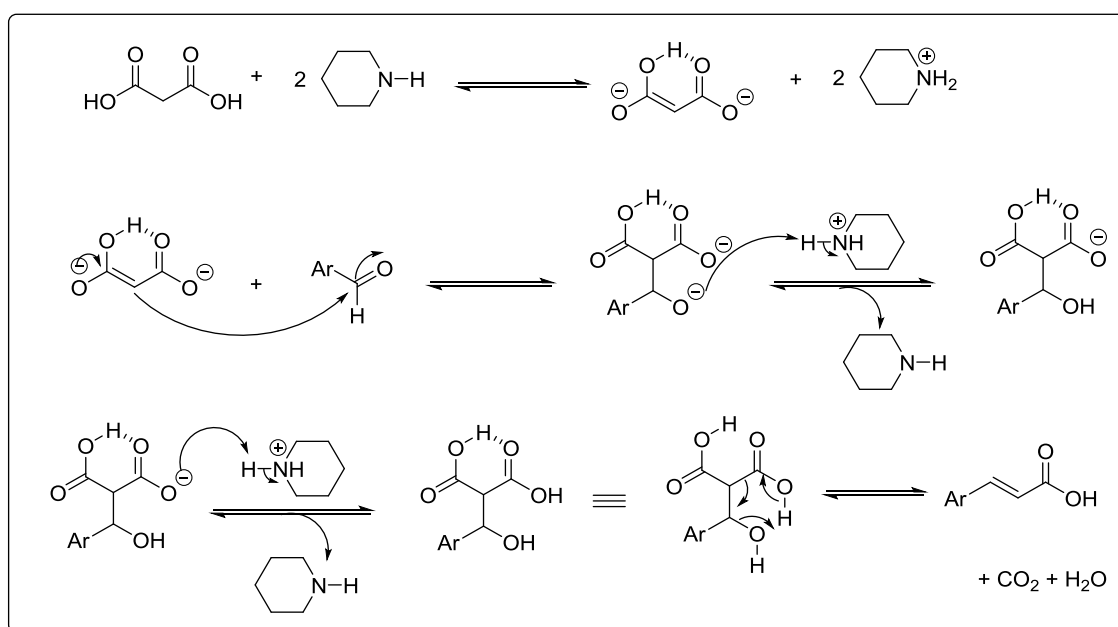


Figura 17: Estrutura da droga antimalárica Lumefantrina. A ligação dupla destacada na estrutura foi formada via Condensação de Knoevenagel.

A partir da condensação de Knoevenagel, os compostos **1-4** foram obtidos com rendimentos variando entre 59% e 82%. Para a síntese dos ácidos **1-3**, utilizou-se aquecimento convencional enquanto que o composto **4** foi obtido empregando-se irradiação de micro-ondas. As duplas insaturações dos produtos **1-4** foram obtidos com estereoquímica *trans*, característica estrutural esta confirmada pela espectroscopia de ^1H RMN. O **Esquema 3** a seguir descreve as etapas envolvidas na conversão dos aldeídos aromáticos e do ácido malônico nos correspondentes ácidos **1-4**.



Esquema 3: Mecanismo de Condensação de Knoevenagel para formação dos derivados do ácido cinâmico.

Conforme apresentado no **Esquema 3**, a reação envolve, inicialmente, a formação de um ânion enolato estabilizado por ligação de hidrogênio, a partir do ácido

malônico e da piperidina. Na etapa seguinte, o enolato ataca o aldeído, realizando assim uma Adição Nucleofílica à carbonila, resultando na formação do aduto aldol após processos de protonação. Por fim, através de um mecanismo cíclico, ocorre a etapa de descarboxilação. Nesta etapa, produtos insaturados contendo duplas com estereoquímica *E* ou *Z* podem ser gerados. Porém, o estado de transição que possui menor energia é aquele que leva ao produto com geometria *E* (CLAYDEN *et al*, 2001; FERREIRA, 2016).

O composto **1**, obtido com 62% de rendimento a partir da Condensação de Knoevenagel entre o ácido malônico e o 4-fluorobenzaldeído, possui, no espectro no IV (**Figura 18**, p. 43), uma banda larga de absorção entre 3330-2030 cm⁻¹ que corresponde ao estiramento da ligação O-H do grupo carboxila. A banda em 1690 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento da ligação C=O e a banda em 1627 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento C=C correspondente à dupla ligação. Já a banda em 1228 cm⁻¹ caracteriza o estiramento assimétrico de =C-O e a banda em 828 cm⁻¹ corresponde à deformação angular fora do plano de ligações C-H do anel aromático.

No espectro de RMN ¹H do composto **1** (**Figura 19**, p. 44) foi observado um duplete em δ_H 6,43, integrado para um átomo de hidrogênio e cuja constante de acoplamento é $J = 16,2$ Hz, corresponde ao hidrogênio H-8. O valor da constante de acoplamento, devido ao acoplamento dos hidrogênios H-7 e H-8, confirma a estereoquímica *E* da dupla instauração. O tripleto ($J = 8,7$ Hz) em δ_H 7,14, integrado para dois átomos hidrogênios, foi atribuído aos átomos de hidrogênios H-3 e H-5. Os demais hidrogênios, H-2/H-6/H-7, correspondem ao multiplete observado em δ_H 7,62-7,67.

No espectro de RMN ¹³C do composto **1** (**Figura 20**, p. 45), o sinal em δ_C 168,6 foi atribuído ao carbono da carbonila. O duplete em δ_C 163,8, correspondente ao átomo de carbono aromático mais desblindado, foi atribuído ao átomo de carbono C-4, uma vez que este está diretamente ligado ao átomo de flúor, sendo este um retirador de elétrons por efeito indutivo. A constante de acoplamento deste duplete é $J = 248,3$ Hz. O sinal em δ_C 143,4 foi atribuído ao átomo C-7. Já o átomo de carbono C-8 é no espectro em δ_C 118,0. Os demais carbonos aromáticos correspondem aos dupletos em δ_C 115,5 ($J = 22,5$ Hz; C-3/C-5), em δ_C 130,0 ($J = 8,3$ Hz; C-2 e C-6) e em δ_C 130,9 ($J = 3,0$ Hz; C-1). Cabe destacar que os dados espectroscópicos de RMN de ¹H e ¹³C obtidos para o composto **1** estão em completo acordo com dados descritos na

literatura. Neste trabalho todos os demais dados obtidos também foram comparados com os dados descritos por Pavia *et al* (2015).

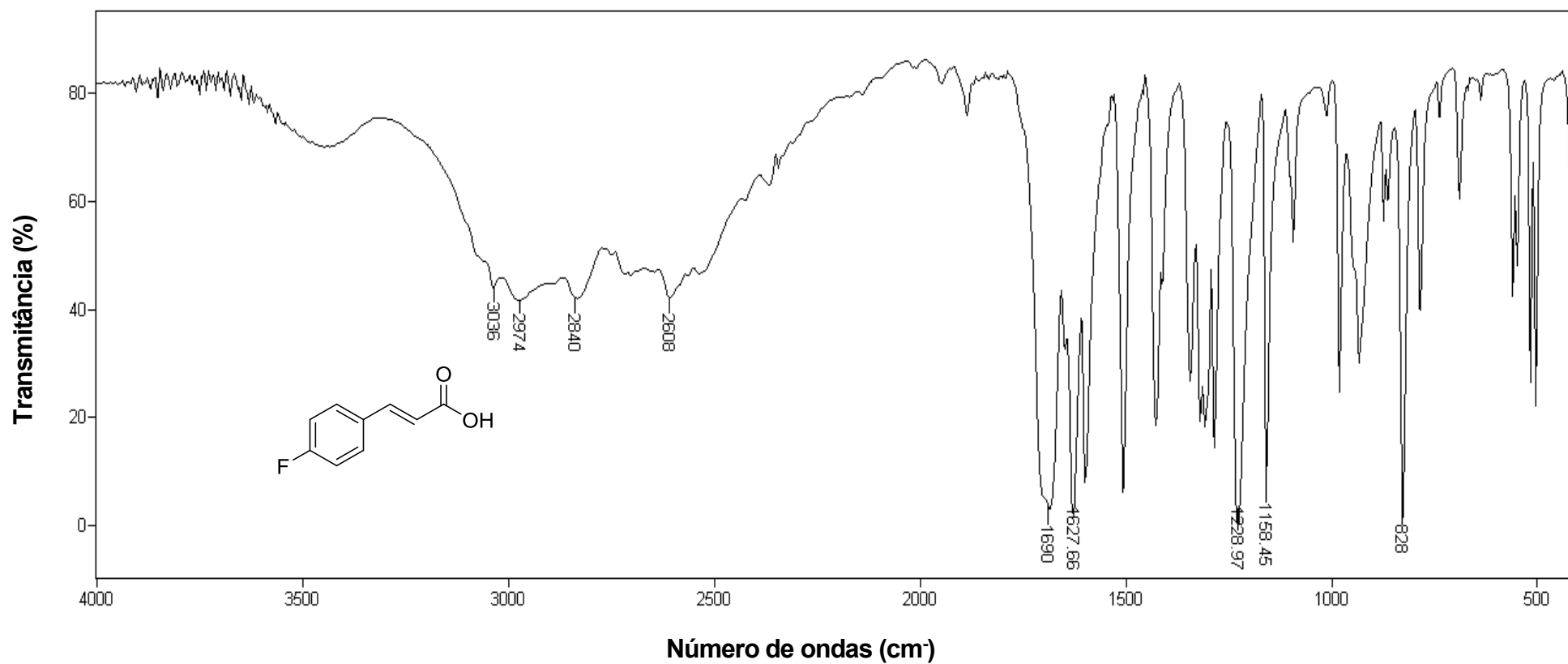


Figura 18: Espectro no infravermelho (KBr) do composto 1.

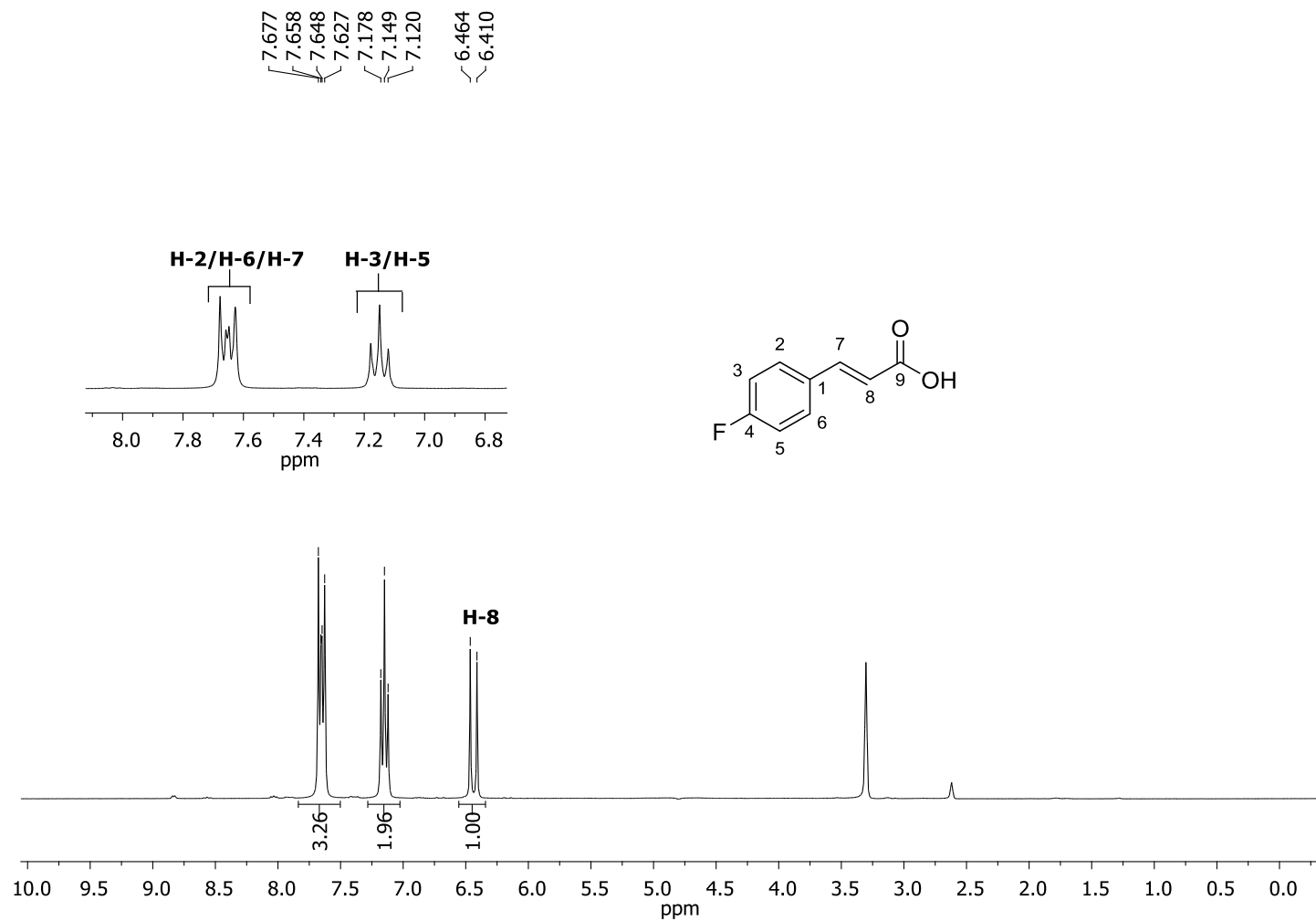


Figura 19: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **1**.

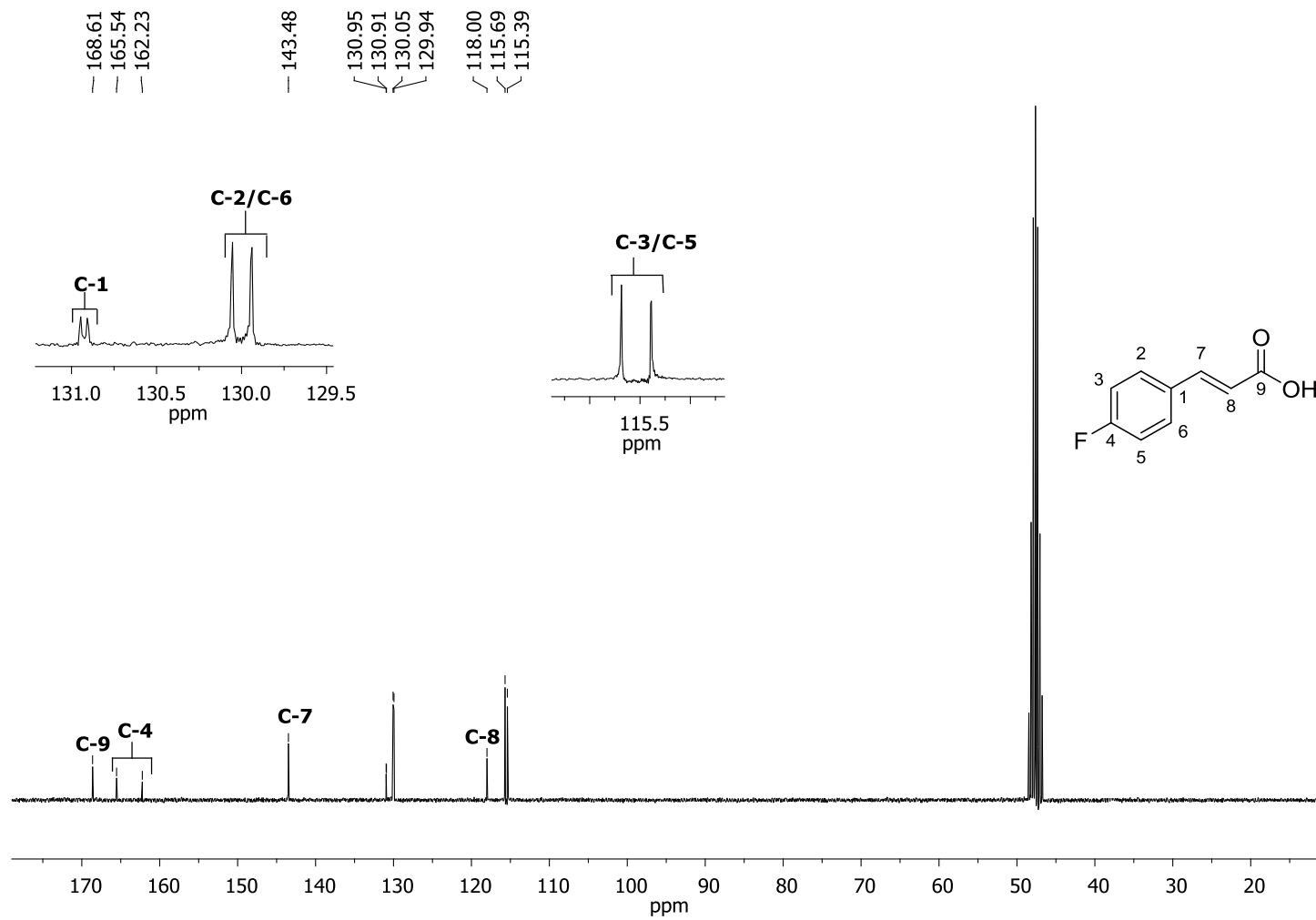
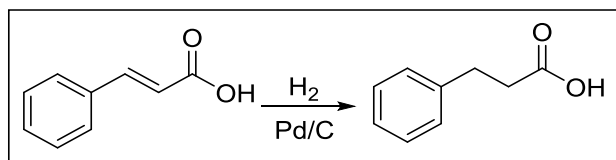


Figura 20: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto 1.

Devido à maior disponibilidade do ácido cinâmico e com o intuito de comparar as bioatividades dos derivados deste ácido contendo ligações duplas com as bioatividades dos derivados que não a possuem, procedeu-se à redução do ácido cinâmico. Nesse sentido, o derivado **5** foi preparado, com 95% de rendimento a partir da hidrogenação catalítica do ácido cinâmico (**Esquema 4**). O catalisador utilizado foi paládio sobre carbono.



Esquema 4: Reação de hidrogenação do ácido cinâmico para a obtenção do derivado ácido 3-fenilpropanóico.

O mecanismo de hidrogenação catalítica não é completamente entendido. O que se conhece até o momento é que, na primeira etapa do processo, o gás hidrogênio é adsorvido à superfície do catalisador metálico (**1ª Etapa da Figura 21**). Na **2ª Etapa** a ligação H-H do H₂ é clivada e substituída por duas novas ligações fracas metal-hidrogênio (Pd-H). Nesta etapa, o alceno sobrepõe seus orbitais com os orbitais vazios do metal, provocando a quebra da ligação dupla e formando as duas novas ligações carbono-metal. Em seguida (**3ª Etapa**), os hidrogênios são transferidos aos carbonos que faziam parte da ligação C=C; este processo de adição ocorre de maneira *sin*, uma vez que os hidrogênios são adicionados à mesma face da ligação dupla. Por fim, ocorre a liberação do alceno a partir da superfície metálica (DIAS, *et al.*, 2012).

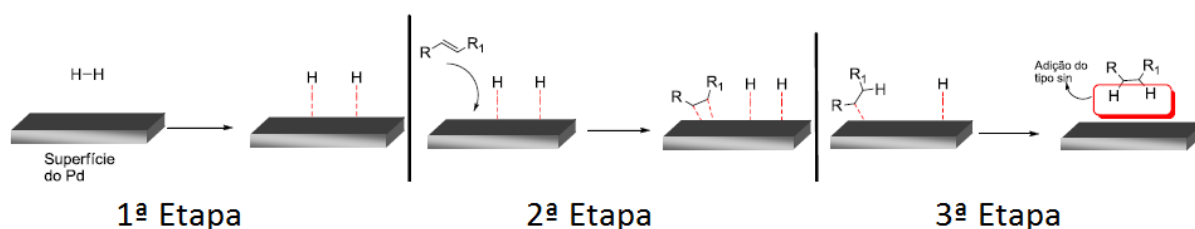


Figura 21: Reação de hidrogenação catalítica.

Fonte: DIAS *et al.*, 2012.

O composto **5**, obtido a partir da hidrogenação catalítica do ácido cinâmico, apresentou no espectro no IV (**Figura 22**, p. 48) uma banda larga observada em 3400-2110 cm⁻¹ indicando a presença do grupo hidroxila da

função ácido carboxílico. Já a banda intensa em 1692 cm^{-1} foi atribuída ao grupo carbonila. As bandas em 1495 , 1453 e 1426 cm^{-1} correspondem aos estiramentos da ligação C=C de anel aromático enquanto que a banda em 2932 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento assimétrico da ligação C-H dos carbonos com hibridização sp^3 .

No espectro de RMN de ^1H do composto **5** (**Figura 23**, p. 49) foram observados sinais para os átomos de hidrogênios aromáticos em $\delta_{\text{H}} 7,13-7,27$ (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6) como um multiplete. O tripleto em $\delta_{\text{H}} 2,58$ ($J = 7,8\text{ Hz}$) e integrado para dois hidrogênios foi atribuído ao átomo de hidrogênio H-7. O outro tripleto, em $\delta_{\text{H}} 2,89$ ($J = 7,8\text{ Hz}$), também integrado para dois hidrogênios corresponde ao átomo de hidrogênio H-8.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **5** (**Figura 24**, p. 50) o sinal observado em $\delta_{\text{C}} 175,5$ foi atribuído ao grupo carbonila. Os sinais para os átomos de carbono aromáticos foram observados em $\delta_{\text{C}} 126,0$ (C-4); $128,1$ (C-2, C-6); $128,3$ (C-3, C-5) e $140,9$ (C-1). Os demais sinais correspondem aos átomos de carbono C-7 e C-8 com hibridização sp^3 , observados no espectro em $\delta_{\text{C}} 30,8$ e $35,5$ respectivamente.

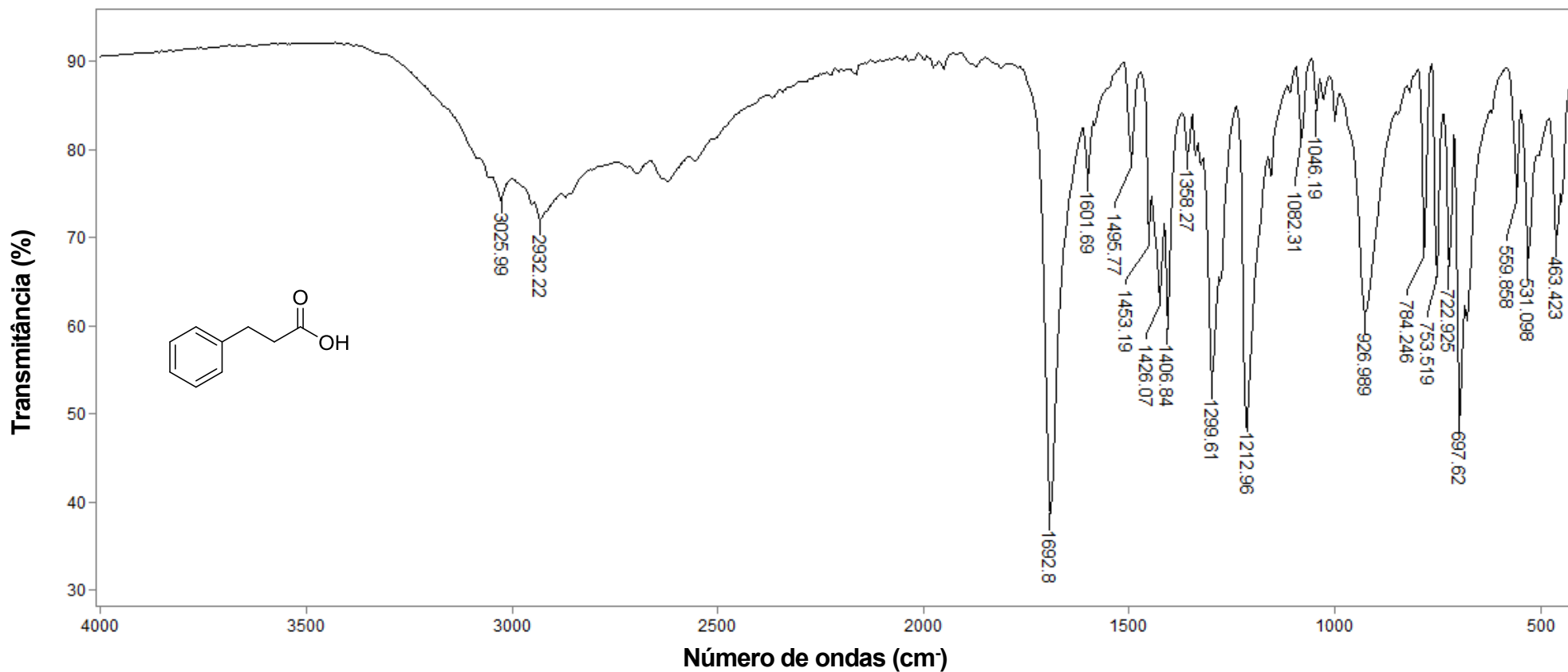


Figura 22: Espectro no infravermelho (KBr) do composto 5.

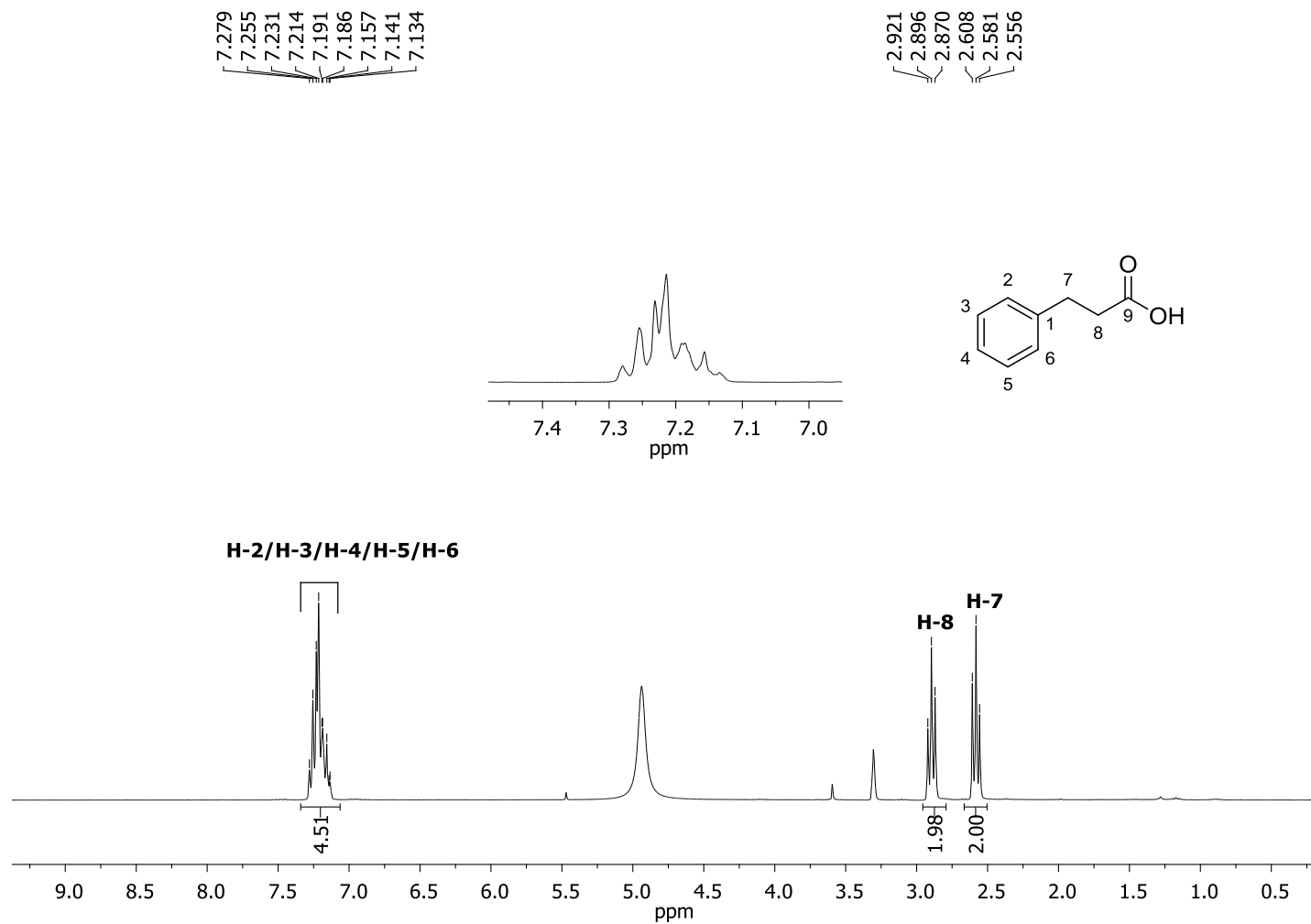


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **5**.

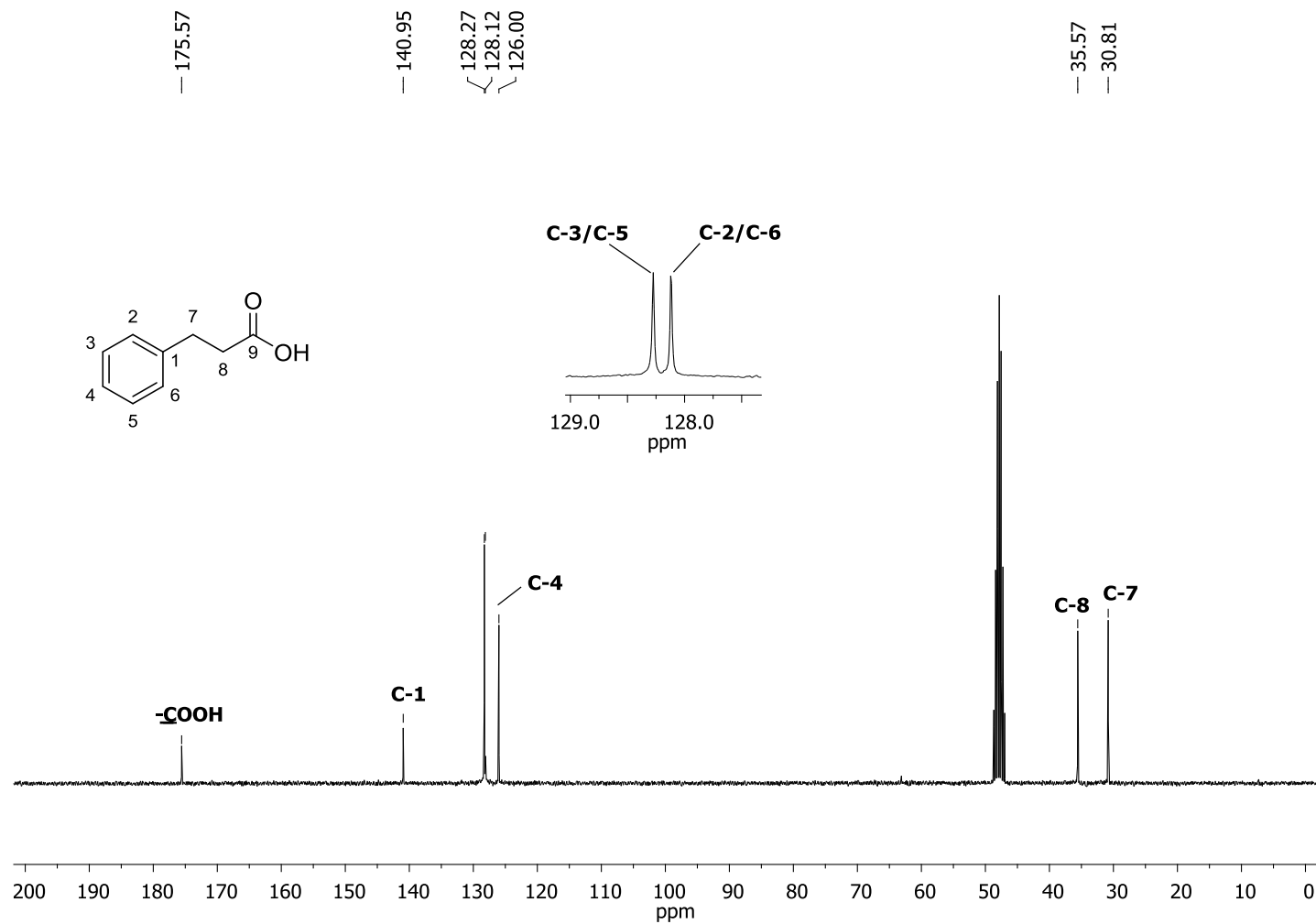
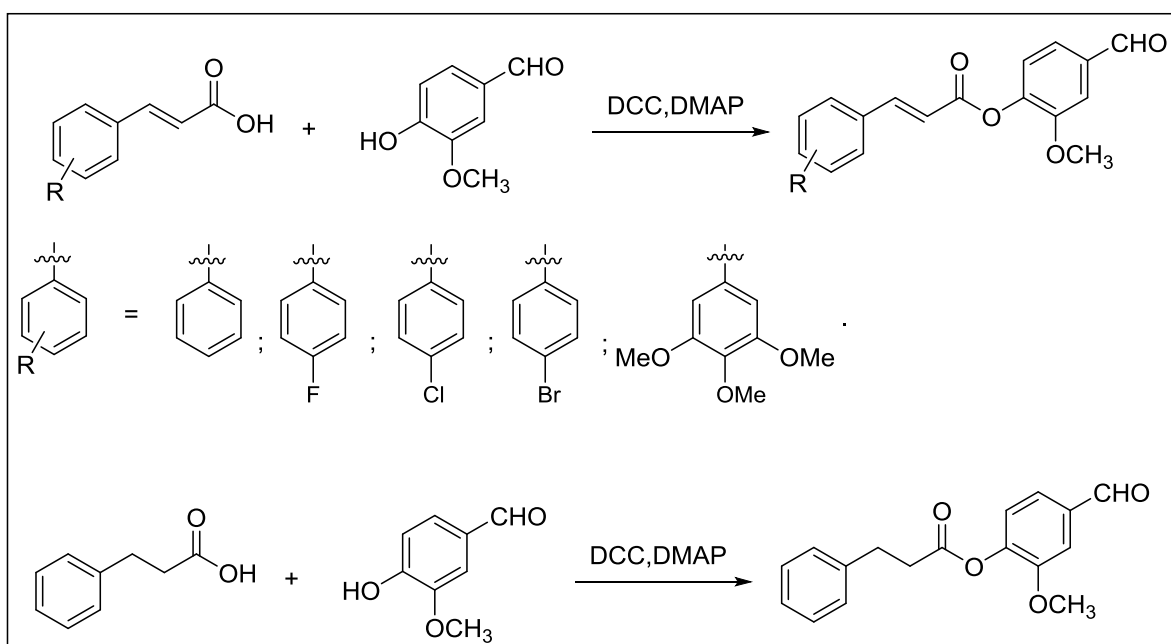


Figura 24: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **5**.

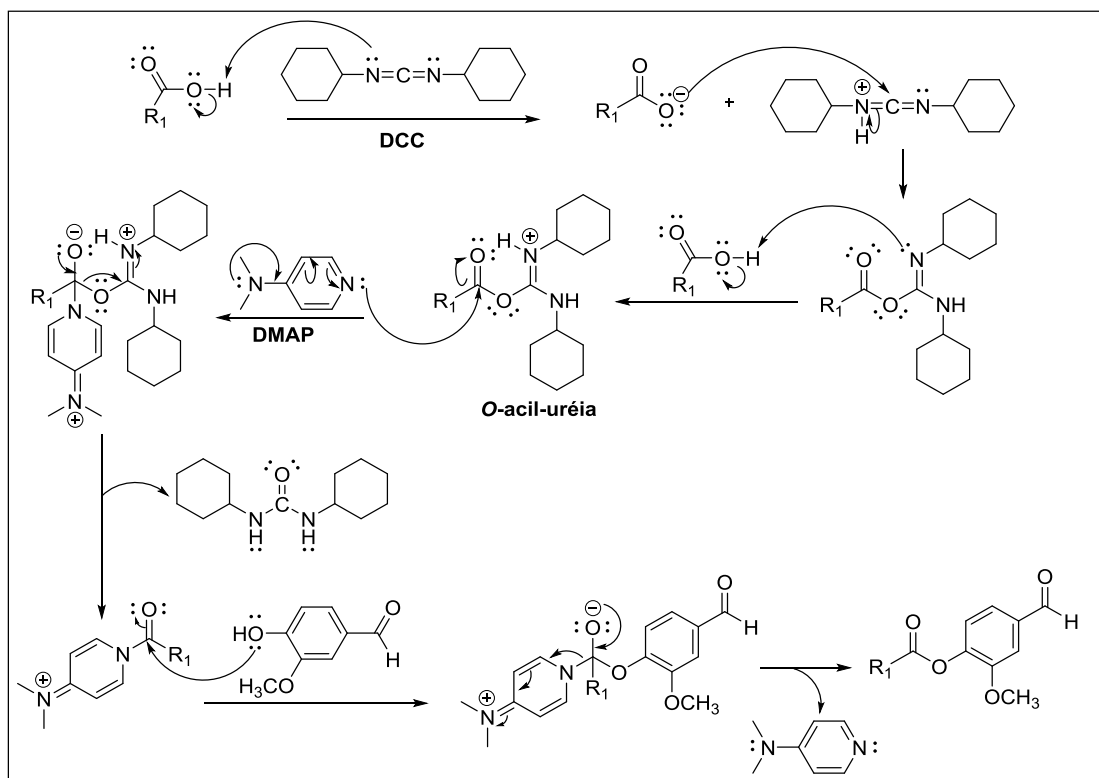
Uma vez sintetizados, os ácidos cinâmicos e seus derivados foram submetidos à reação de Esterificação de Steglich com a vanilina para obtenção dos ésteres cinamatos da vanilina (**Esquema 5**). Essa reação de esterificação foi a metodologia empregada neste trabalho, pois apresenta diversas vantagens em relação a outras metodologias de esterificação, já que este tipo de reação não necessita de haleto de acila reativo, o solvente empregado não precisa ser anidro, apresenta tempos de reação curto e não necessita de aquecimento (LUTJEN *et al*, 2018).



Esquema 5: Reação de acoplamento entre o ácido cinâmico e seus derivados com a vanilina.

A esterificação de Steglich foi descrita pela primeira vez por Wolfgang Steglich em 1978, em um artigo intitulado “*Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids*”. Esta reação foi uma adaptação de um método de amidação com a dicicloexilcarbodiimida (DCC). Nesta variação, além de utilizar o DCC como reagente de acoplamento, utiliza-se também a 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador e o acoplamento pode ser realizado entre ácidos carboxílicos com álcoois ou tioálcoois (NEISES, 1978).

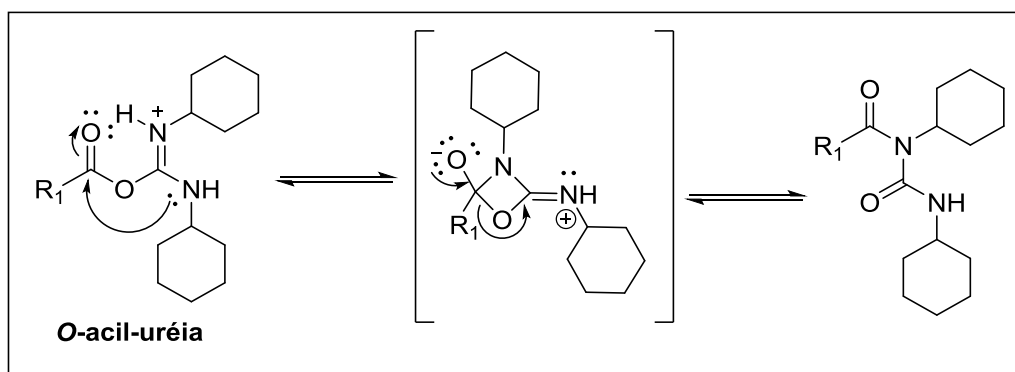
O mecanismo proposto para o processo de Esterificação de Steglich consiste nas etapas que estão representadas no **Esquema 6** (p. 52) a seguir.



Esquema 6: Mecanismo da Esterificação de Steglich.

Neste acoplamento, o DCC é responsável por tornar a hidroxila do ácido carboxílico um melhor grupo abandonador e, assim, susceptível ao ataque de um nucleofílico. Com isso, a primeira etapa desta reação consiste na protonação de um dos nitrogênios do DCC pelo ácido carboxílico. Dessa forma, o DCC terá um carbono mais eletrofílico, que será atacado pelo ânion carboxilato, formando o intermediário *O*-acil-isouréia. Este intermediário formado sofre uma nova protonação e, conseqüentemente, pode sofrer um ataque nucleofílico da DMAP. No meio reacional estão presentes a DMAP e o álcool, mas nessa etapa será a DMAP que fará o ataque nucleofílico, uma vez que, este é um melhor nucleófilo. A amida correspondente é gerada e ocorre eliminação da dicicloexiluréia. A 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP) tem duas funções nesta reação: além de atuar como catalisador, ela é responsável por impedir o rearranjo 1,3 do intermediário *O*-acil-isouréia, resultando na formação da *N*-acil-isouréia, sendo esta última não reativa frente ao álcool (**Esquema 6**). O uso da DMAP impede esta reação paralela uma vez que esta base substitui o grupo *O*-acil-isouréia, forma um intermediário mais reativo e, portanto, aumenta o rendimento da esterificação. Esta nova espécie, que não sofre rearranjo, será posteriormente atacada pelo grupo hidroxila levando à formação do éster. Deste modo, na última etapa da proposta mecanística, o grupo hidroxila da vanilina atacará o carbono da carbonila do

intermediário reativo (**Esquema 7**), seguido da recomposição da carbonila, regenerando assim o catalisador e formando a ligação éster (DE ALMEIDA, 2014).



Esquema 7: Conversão do intermediário O-acil-uréia em N-acil-isouréia nas reações de acoplamento sem o catalisador DMAP.

Os ésteres **6-11** (**Figura 16**, p. 19) foram obtidos por meio da esterificação de Steglich, que foi realizada em condições brandas e com tempos de reação relativamente curtos. As substâncias foram obtidas como sólidos com rendimentos variando entre 54% e 99% após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel.

No espectro de IV do composto **10** (**Figura 25**, p. 55), a banda de absorção em 1736 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C=O da carbonila de éster, enquanto a banda em 1685 cm^{-1} refere-se ao estiramento do grupo carbonila de aldeído. A banda em 2856 cm^{-1} corresponde ao estiramento típico de $-\text{CH}_3$ da ligação O- CH_3 . Banda de ligação do anel aromático presente em 812 cm^{-1} para o estiramento da ligação =C-H, e em 1596 cm^{-1} para o estiramento da ligação C=C. A banda em 964 cm^{-1} correspondente ao estiramento de ligações C-H de alquenos *trans* conjugados à carbonila.

No espectro de RMN ^1H do composto **10** (**Figura 26**, p. 56) o sinal de simpleto em $\delta_{\text{H}} 3,91$ foi integrado para três hidrogênios e atribuído aos hidrogênios da metóxila ($-\text{OCH}_3$). O duplete em $\delta_{\text{H}} 6,63$ ($J = 16,2\text{ Hz}$) integrado para um hidrogênio foi atribuído ao H-8, o mesmo duplete foi observado em $\delta_{\text{H}} 7,84$ ($J = 16,2\text{ Hz}$) também integrado para um hidrogênio e foi atribuído ao H-7. O valor da constante de acoplamento, devido ao acoplamento dos hidrogênios H-7 e H-8, confirma a estereoquímica *E* da dupla instauração. Os hidrogênios aromáticos foram observados em $\delta_{\text{H}} 7,49-7,54$ (H-2, H-3, H-5, H-6) como multiplete, $\delta_{\text{H}} 7,38-7,41$ (H-3', H-5') também como multiplete e em $\delta_{\text{H}} 7,30$ (H-2') como um duplete com constante de acoplamento típica de acoplamento

orto $J = 8,1$ Hz. E o hidrogênio do aldeído $-CHO$, sendo este o mais desblindado devido à carbonila, foi atribuído ao simpleto em $\delta_H 9,96$.

No espectro de RMN ^{13}C do composto **10** (Figura 27, p. 57) o sinal em $\delta_C 56,1$ corresponde ao carbono metilênico. O carbono sp^2 C-8 foi atribuído ao sinal $\delta_C 116,9$, já o sinal em $\delta_C 145,8$ foi atribuído ao outro carbono sp^2 C-7, este mais desblindado por estar vizinho a carbonila. O sinal correspondente ao carbono da carbonila do éster está em $\delta_C 164,0$. E para o grupo carbonila do aldeído o sinal foi atribuído em $\delta_C 191,0$. Os demais carbonos aromáticos foram atribuídos, respectivamente, aos seguintes sinais: $\delta_C 110,8$ (C-5'), $123,4$ (C-3'), $124,7$ (C-2'), $129,3$ (C-2, C-6), $129,5$ (C-3, C-5), $132,4$ (C-4), $135,2$ (C-4'), $136,8$ (C-1), $144,9$ (C-1') e $152,0$ (C-6').

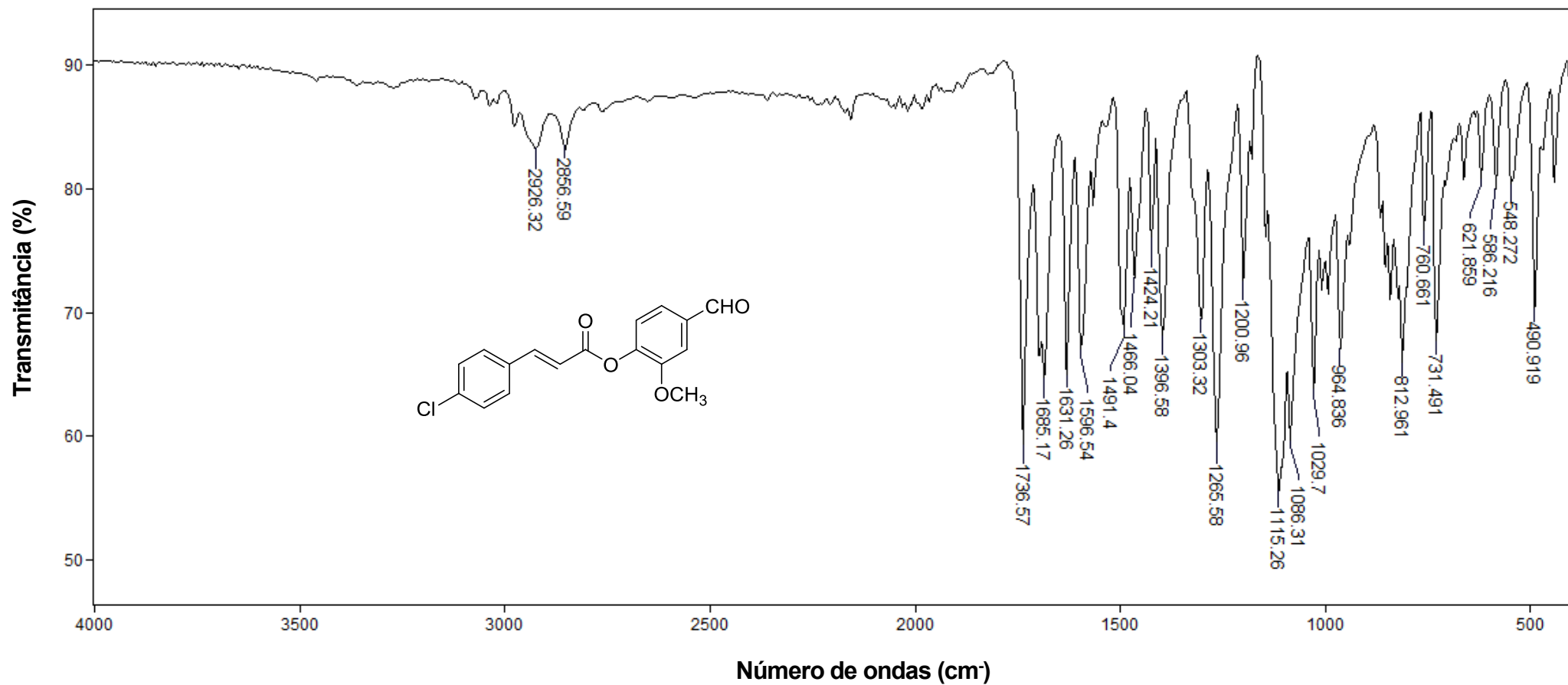


Figura 25: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 10.

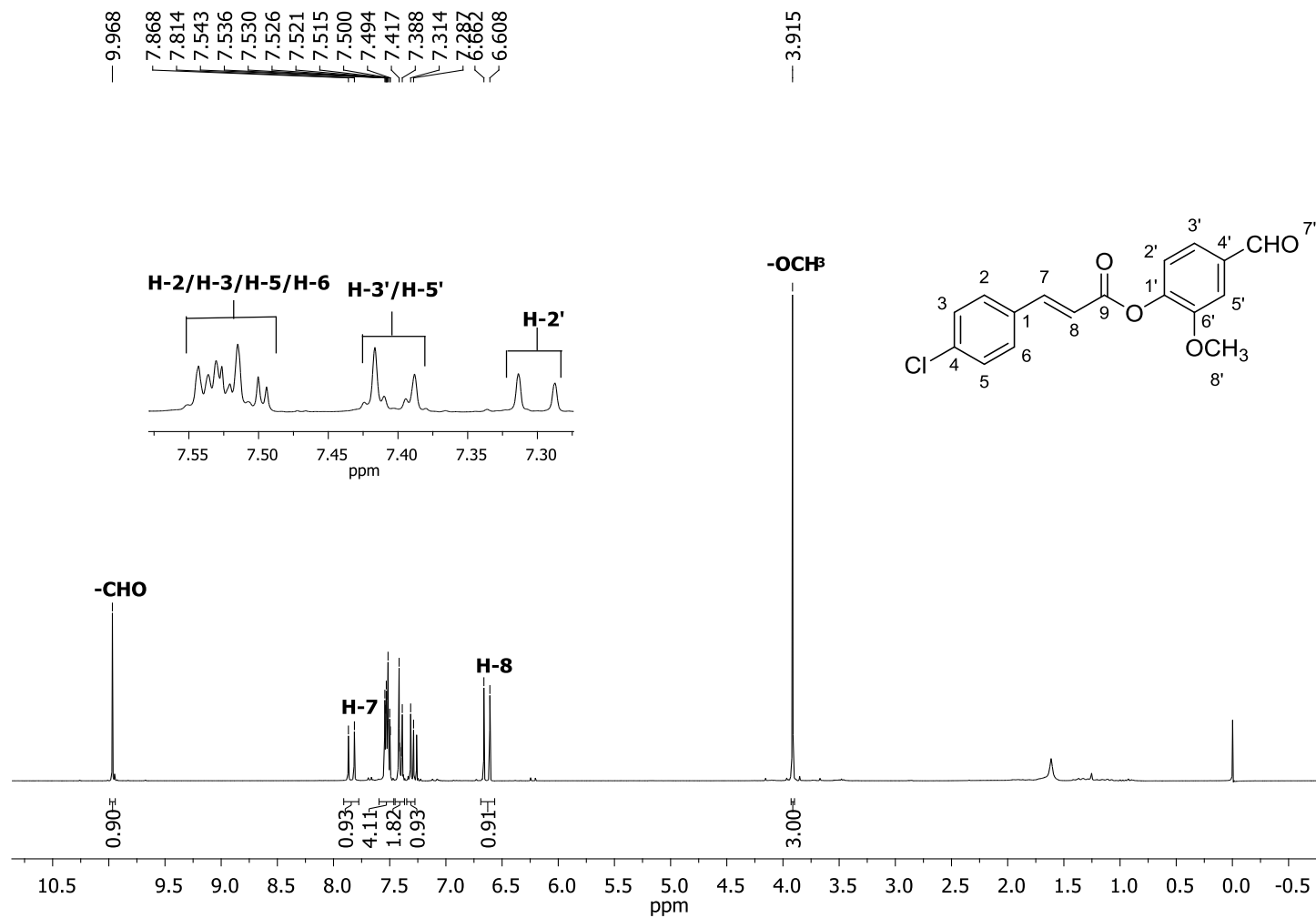


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **10**.

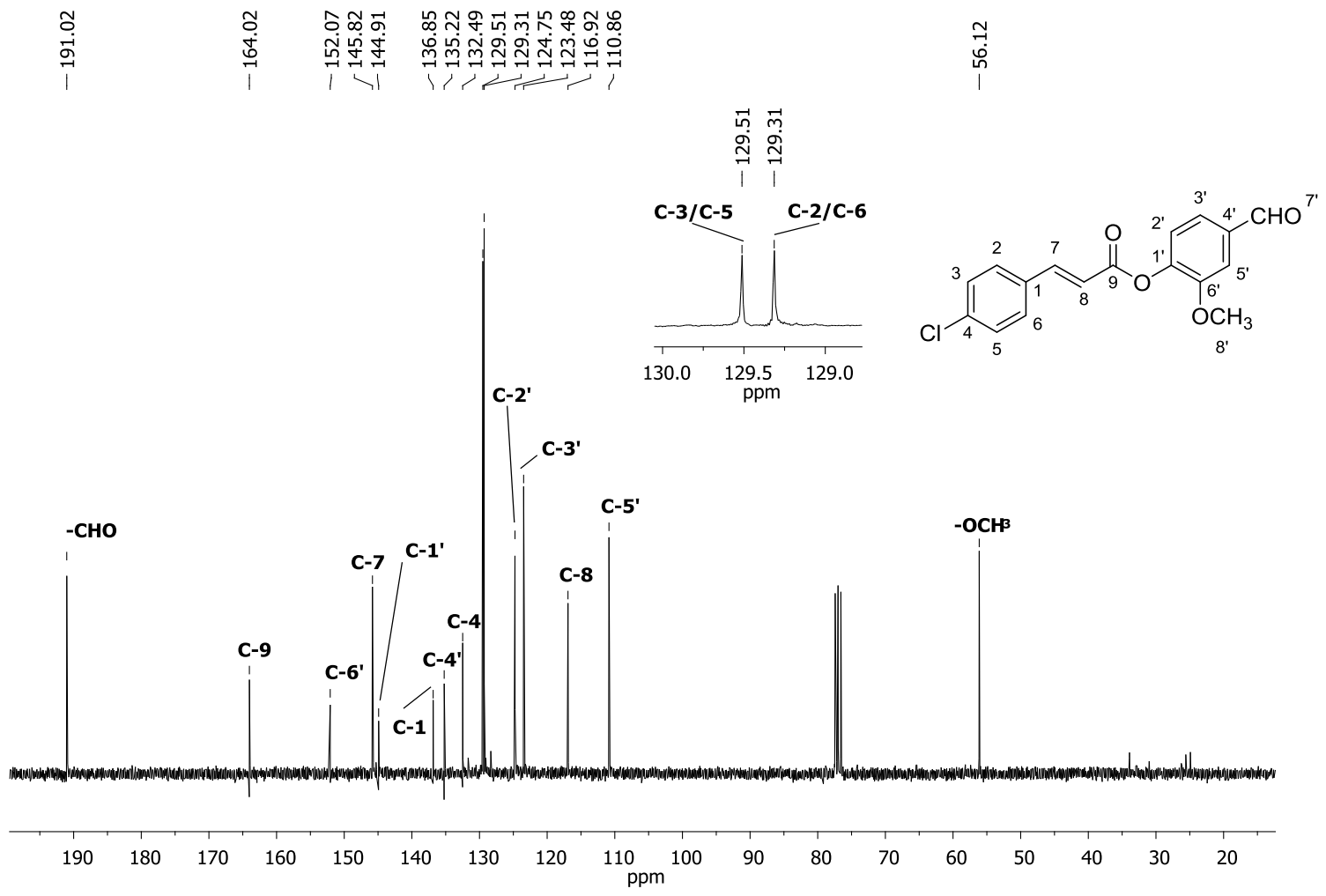
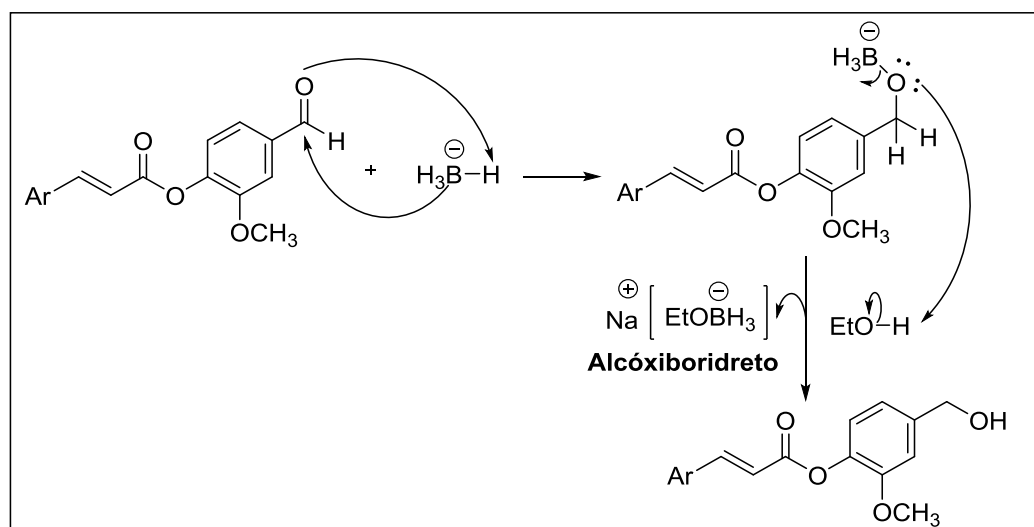


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 10.

A etapa final deste trabalho, considerando a síntese de substâncias, consistiu na conversão dos derivados **6**, **7**, **8**, **10** e **11**, via reação com boridreto de sódio (NaBH_4), nos correspondentes álcoois. Este é um reagente de redução seletivo, uma vez que reduz aldeídos e cetonas, porém não reduz ésteres e ácidos carboxílicos. A redução de ésteres e ácidos carboxílicos utilizando boridretos, exige reagentes mais específicos, como por exemplo o boridreto de lítio (LiBH_4), que é um reagente redutor mais forte (ZWEIFEL, 2007).

O mecanismo de redução dos derivados ésteres cinamatos da vanilina é apresentado no **Esquema 8**. Esta reação deve ser realizada em solvente prótico, neste caso o etanol foi o solvente utilizado. A etapa chave desse mecanismo é a transferência do hidreto do boro ao carbono. A carga negativa em desenvolvimento no oxigênio é protonada pelo hidrogênio do álcool, formando o produto reduzido correspondente; e, o alcóxido resultante é imediatamente adicionado ao boro, formando o subproduto o ânion alcóxiboridreto, um agente redutor que é capaz de prosseguir a reação de redução (CLAYDEN *et al*, 2001).



Esquema 8: Mecanismo de redução dos derivados ésteres cinamatos da vanilina com o reagente boridreto de sódio.

Os derivados **12-16** foram obtidos com rendimentos que variaram de 56% a 95% (após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel) e condições brandas.

O composto **15** foi obtido como um sólido branco em 81,5% de rendimento após purificação. No espectro de IV do composto do composto **15** (**Figura 28**, p. 60) a banda larga em $3650\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento da ligação O-H do álcool primário. Banda em 1730 cm^{-1} atribuiu-se a carbonila de éster. A banda em 1090 cm^{-1}

corresponde ao estiramento da ligação C-O-C do radical O-CH₃. Já as bandas de ligação do anel aromático estão presentes, respectivamente, em 822 cm⁻¹ para o estiramento da ligação C-H, e em 1508 cm⁻¹ e para o estiramento da ligação C-C. A banda em 2873 cm⁻¹ refere-se ao estiramento da ligação de C_{sp}³-H. E a banda em 1634 cm⁻¹ correspondente a ligações C=C de alquenos *trans* conjugados à carbonila.

No espectro de RMN ¹H do composto **15** (**Figura 29**, p. 61) o simpleto em δ_{H} 3,84 e integrado para três hidrogênios foi atribuído aos hidrogênios da metóxila (-OCH₃). Já os hidrogênios H-8' (-CH₂OH), também ligado a um carbono sp³, foram atribuídos ao simpleto em δ_{H} 4,69 e integrado para dois hidrogênios. O duplo duplete observado em δ_{H} 6,94, integrado para um átomo de hidrogênio e cujas constantes de acoplamento são $J_1 = 8,0$ Hz e $J_2 = 2,0$ Hz, corresponde ao hidrogênio aromático H-3'. Os demais hidrogênios aromáticos foram observados em δ_{H} 7,05-7,09 (H-2', H-5') como multiplete, em δ_{H} 7,38 (H-2, H-6) como duplete ($J = 8,4$ Hz) e em δ_{H} 7,51 (H-3/H-5) também como duplete ($J = 8,4$ Hz). O duplete presente em δ_{H} 6,63 ($J = 16,0$ Hz) e integrado para um hidrogênio foi atribuído ao hidrogênio H-8. Nesse mesmo espectro, observa-se outro duplete em δ_{H} 7,82 ($J = 16,0$ Hz) igualmente integrado para um hidrogênio e atribuído ao átomo de hidrogênio H-7.

No espectro de RMN ¹³C do composto **15** (**Figura 30**, p. 62) o sinal em δ_{C} 55,9 foi atribuído ao carbono metilênico -OCH₃. O carbono sp³ ligado a hidroxila da função álcool teve seu sinal atribuído em δ_{C} 65,0. O carbono sp² C-8 foi atribuído ao sinal δ_{C} 117,5, já o sinal em δ_{C} 145,1 corresponde ao outro carbono sp² C-7 mais desblindado por estar vizinho a carbonila. O sinal correspondente ao carbono da carbonila do éster foi atribuído em δ_{C} 164,7. Os demais carbonos aromáticos foram atribuídos, respectivamente, aos seguintes sinais: δ_{C} 111,0 (C-5'), 118,9 (C-3'), 122,7 (C-2'), 129,2 (C-2, C-6), 129,4 (C-3, C-5), 132,7 (C-4), 136,5 (C-1'), 138,9 (C-1), 139,9 (C-4') e 151,2 (C-6').

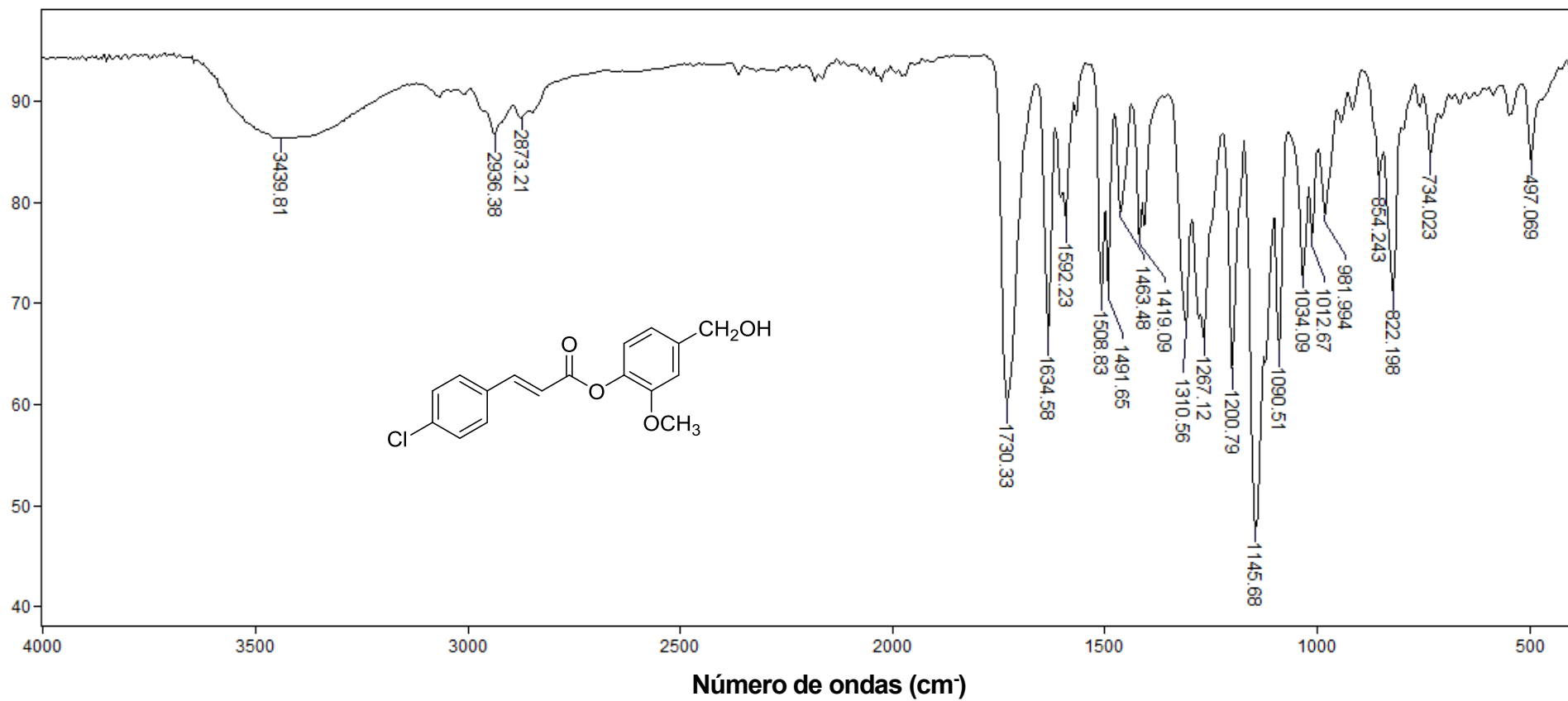


Figura 28: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 15.

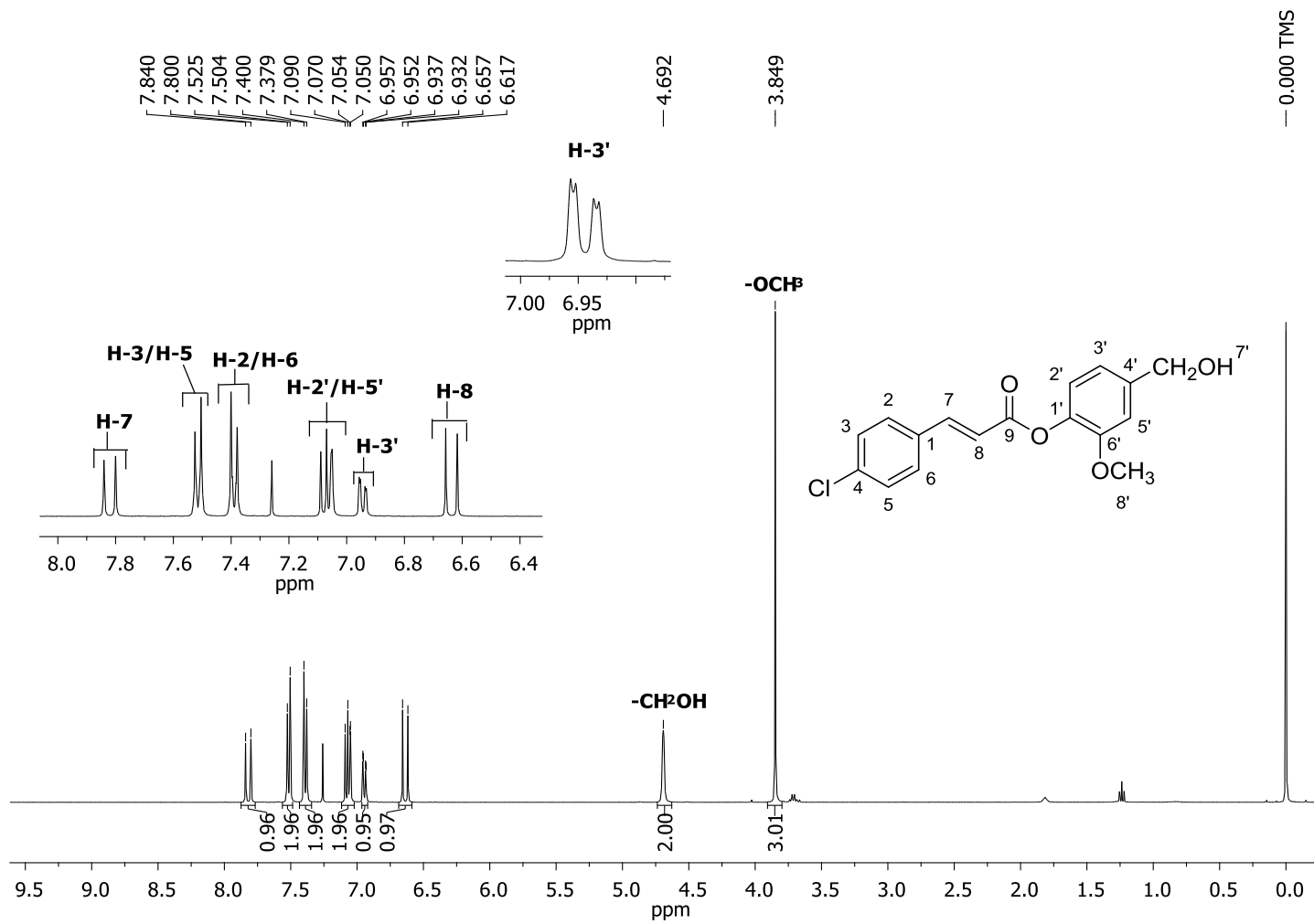


Figura 29: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **15**.

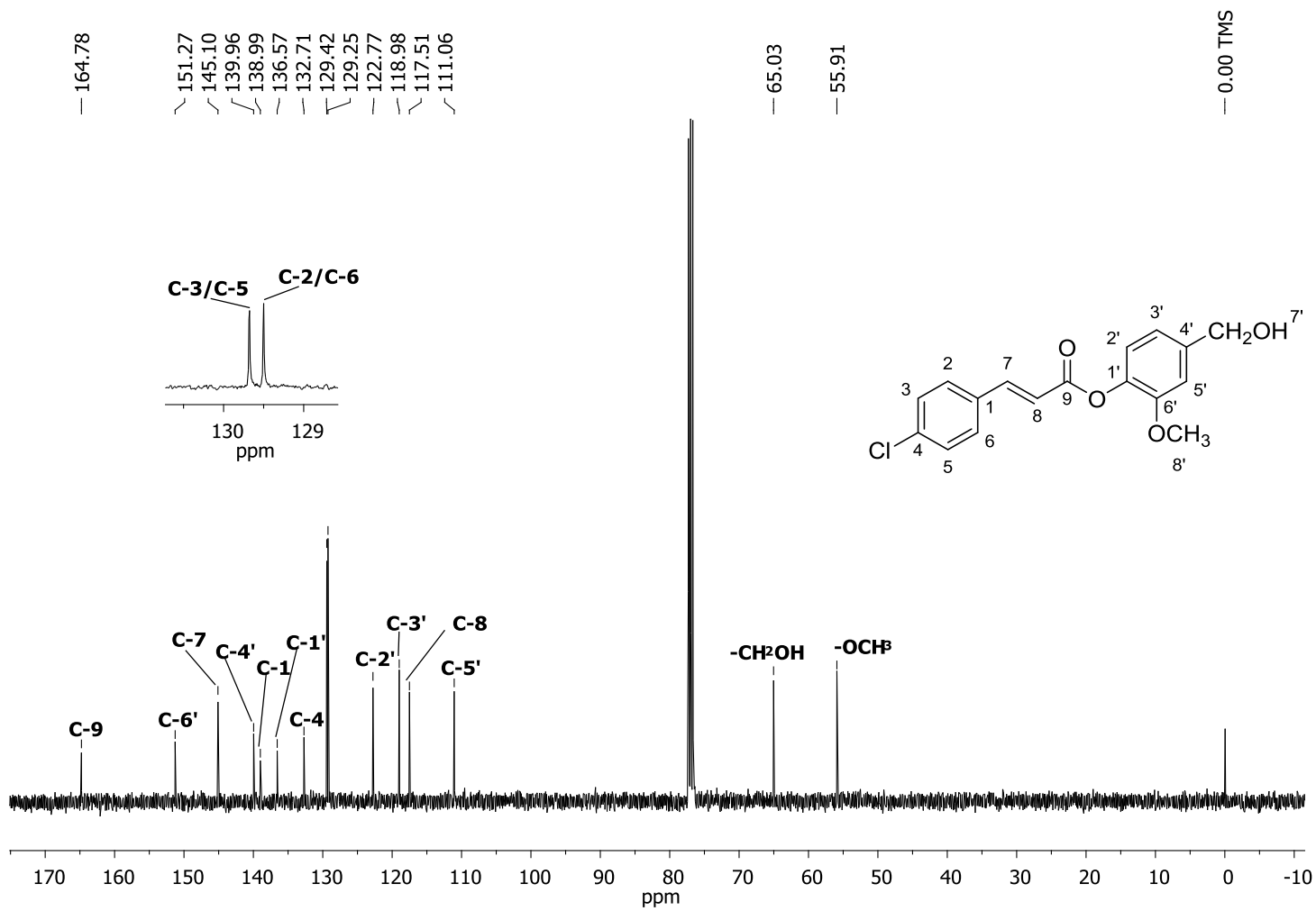


Figura 30: Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto 15.

A tentativa de redução do composto **9** com NaBH₄, por razões não compreendidas, resultou na formação de uma mistura complexa da qual não foi possível isolar o álcool correspondente com pureza satisfatória.

2.4. CONCLUSÕES

Neste capítulo foram descritas as etapas envolvidas na síntese dos cinamatos derivados da vanilina. Um total de 16 compostos foram obtidos, sendo 10 deles inéditos. As estruturas destes compostos foram confirmadas pela espectroscopia no infravermelho e de RMN. De modo geral, as substâncias foram obtidas com rendimento sinteticamente úteis e as metodologias empregadas foram a Condensação de Knoevenagel, a Esterificação de Steglich e processos de redução.

Nos capítulos seguintes serão descritos os resultados quanto à avaliação das bioatividades citotóxica e leishmanicida dos compostos sintetizados.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, L. C. A.; NOGUEIRA, L. B.; MALTHA, C. R. Á.; TEIXEIRA, R. R.; SILVA, A. A. Synthesis and Phytogrowth Properties of Oxabicyclic Analogues Related to Helminthosporin. *Molecules*, v. 14, p. 160-173, 2009.
- CHEN, D. D.; ZHANG, B. LIU, X.; LI, X.; YANG, X.; ZHOU, L. Bioactivity and structure–activity relationship of cinnamic acid derivatives and its heteroaromatic ring analogues as potential high-efficient acaricides against *Psoroptes cuniculi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 28, p. 1149–1153, 2018.
- CHIEFARI, J.; GALANOPOULOS, S.; JANOWSKI, W. K.; KERR, D. I. B.; PRAGER, R. H. The synthesis of phosphonabaclofen, an antagonist of baclofen. *Australian journal of chemistry*, v. 40, p. 1511-1518, 1987.
- CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. *Organic Chemistry*. Oxford University Press: United Kingdom, 2001.
- DE ALMEIDA, T. B. *Síntese de novos híbridos moleculares a partir de um derivado da piperidina e anéis tetraidopiranos com potencial atividade antinociceptiva*. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

- DIAS, F. R. F.; FERREIRA, V. F.; CUNHA, A. C. Uma visão dos diferentes tipos de catálise em síntese orgânica. *Revista Virtual de Química*, v. 4, p. 840-871, 2012.
- DIKUSAR, E. A. New Esters of Vanillin and Vanillal with Some Alkane- and Arenecarboxylic Acids. *Russian Journal of Applied Chemistry*, v. 79, p. 1035-1037, 2006.
- FERREIRA, J. M. G. O. *Otimização da reação de Knoevenagel em sistema binário etanol: água*. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- HOLMES, D. L.; LIGHTNER, D. A. Synthesis and acidity constants of $^{13}\text{C}_2\text{H}$ -labelled mono and dipyrrole carboxylic acids. Pka from ^{13}C -NMR. *Tetrahedron*, v. 51, p. 1607-1622, 1995.
- LUTJEN, A. B.; QUIRK, M. A.; BARBERA, A. M.; KOLONKO, E. M. Synthesis of (*E*)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2018, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.04.007>.
- MACPHILLAMY, H. B.; DORFMAN, L.; HUEBNER, C. F., SCHLITTLER, E., ANDRÉ, A. S. Rauwolfia Alkaloids. XVIII. On the constitution of deserpidine and reserpine. *Journal of the American Chemical Society*, v. 77, p. 1071-1072, 1955.
- MARCH, J.; SMITH, M. B. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*. Wiley Interscience: New Jersey, 2007. Chapter 16, p. 1358-1363.
- MIKROYANNIDIS, J. A.; SPILIOPOULOS, I. K.; KASIMIS, T. S.; KULKARNI, A. P.; JENEKHE, S. A. Synthesis, photophysics, and electroluminescence of conjugated poly (*p*-phenylenevinylene) derivatives with 1,3, 4-oxadiazoles in the backbone. *Macromolecules*, v. 36, p. 9295-9302, 2003.
- NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie*, v. 7, p. 522-524 1978.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. *Introdução à Espectroscopia [tradução]*. 2ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- RASSCHAERT, A. W. J.; SLOOTMAEKERS, P. J. A re-examination of the selectivity in the Friedel-crafts chalcone synthesis. *Bulletin de la Societe Chimique de Belgique*, v. 75, p. 459-465, 1966.
- TOMAZ, D. C. *Síntese de cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranona e prospecção de bioatividades*. 2015. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ZWEIFEL, G. S.; NANTZ, M. H. *Modern Organic Synthesis: An Introduction*. Printed in the United States of America: New York, 2007. Chapter 4, p. 106-109.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS ÉSTERES CINAMATOS DERIVADOS DA VANILINA

3.1. INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) define Câncer como sendo o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças que podem afetar qualquer parte do corpo e que são caracterizadas pelo crescimento desordenado de células. Outros termos utilizados são tumores malignos e neoplasias (INCA, 2017). Além da rápida multiplicação de células anormais, que crescem acima de seus limites habituais, essas células podem invadir outras partes do corpo e se espalharem para outros órgãos; esse último estágio do câncer é conhecido como metástase. A metástase é uma das principais causas de morte por câncer (World Health Organization, 2018).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015, segundo dados da *World Health Organization*. No Brasil, o INCA estima que em 2016/2017, a ocorrência de novos casos de câncer foi de 596.070 para cada um desses anos. As taxas de incidência de diferentes tipos de câncer estão apresentadas na **Tabela 2**, p. 67. De acordo com esses dados, o câncer de próstata é o que mais acomete os homens, enquanto que o câncer de mama feminino é o tumor mais frequente entre as mulheres.

Tabela 2: Taxas de incidência das localizações primárias, exceto pele não melanoma, por sexo, estimadas para 2016/2017, no Brasil. Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2017.

Homens		Mulheres	
Próstata	61,82	Mama feminina	56,20
Traqueia, brônquios e pulmões	17,49	Cólon e reto	17,10
Cólon e reto	16,84	Colo do útero	15,85
Estômago	13,04	Traqueia, brônquios e pulmões	10,54
Cavidade oral	11,27	Estômago	7,37
Esôfago	8,04	Corpo do útero	6,74
Bexiga	7,26	Ovário	5,95
Laringe	6,43	Glândula tireoide	5,70
Leucemias	5,63	Linfoma não Hodgkin	4,88
Sistema Nervoso Central	5,50	Sistema Nervoso Central	4,68
Linfoma não Hodgkin	5,27	Leucemias	4,38
Pele melanoma	3,03	Cavidade oral	4,21
Linfoma de Hodgkin	1,46	Esôfago	2,76
Glândula tireoide	1,08	Pele melanoma	2,59
		Bexiga	2,39
		Laringe	0,94
		Linfoma de Hodgkin	0,93

O tumor de mama é o segundo tipo mais frequente no mundo e o câncer mais comum entre as mulheres (INCA, 2017), representando, no ano de 2012, 25% do total de casos de câncer (exceto os casos de pele não melanoma) no mundo, com aproximadamente 1,7 milhões de novos casos naquele ano. Em geral, é a quinta causa de morte por câncer (522.000 óbitos) e a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres (World Health Organization, 2018).

Outro tipo de câncer também de elevada incidência é o câncer da pele, que corresponde a 33% de todos os diagnósticos desta doença no Brasil, sendo registrados cerca de 180 mil novos casos a cada ano (INCA, 2017). O tipo mais comum, o câncer da pele não melanoma, tem letalidade baixa. Ele é provocado pelo crescimento anormal e descontrolado das células que compõem a pele, podendo ser classificado em dois tipos: os carcinomas basocelulares e os espinocelulares. Entretanto, o mais agressivo é o câncer de pele melanoma, apesar de mais raro - representa 3% das neoplasias malignas no País - é o mais letal, pois possui alta possibilidade de metástese. O melanoma é um tipo de câncer que tem origem nos melanócitos, células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2017).

Os três principais tipos de tratamento do câncer são a radioterapia, a cirurgia e a quimioterapia, sendo a quimioterapia a alternativa mais comumente utilizada. A

técnica cirúrgica pode levar à remoção de tumores com eficácia, se não houver metástase. A radioterapia (geralmente utiliza raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios-X e até prótons e mésons pi negativos) é usada comumente em conjunto com a cirurgia. O tratamento por radiação possui grandes chances de diminuir tumores, diminuir a recorrência e a chance de metástase. Entretanto, é um tratamento que possui limitações, como a localização do câncer e a dose da radiação, além de possuir efeitos colaterais (DE ALMEIDA, 2015).

A quimioterapia é o tratamento que utiliza substâncias químicas e o seu principal objetivo é eliminar as células neoplásicas, preservando as normais. Porém, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, atuando tanto sobre células malignas quanto normais (DE ALMEIDA, 2015). O tratamento quimioterápico teve seu advento em 1943, quando Louis Goodman e Alfred Gilman utilizaram o gás de mostarda para tratar um paciente com Linfoma não-Hodgkin e demonstraram pela primeira vez que a quimioterapia pode induzir a regressão do tumor (CHABNER & JUNIOR, 2005). Este agente serviu de modelo para uma longa série de agentes semelhantes e mais eficazes (chamados agentes alquilantes), como o clorambucil e a ciclofosfamida, cujas as estruturas estão representadas na **Figura 31** (DE VITA & CHU, 2008).

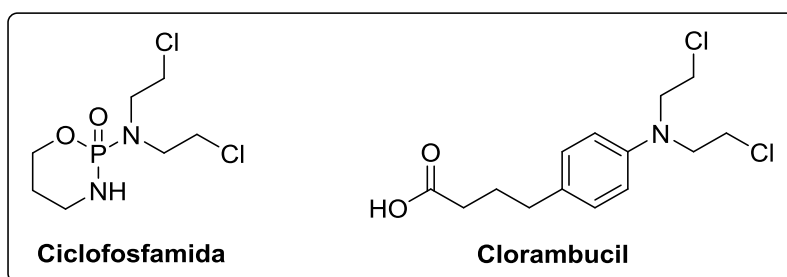


Figura 31: Estruturas dos agentes quilantes ciclofosfamida e clorambucil.

Após a descoberta da mostarda nitrogenada, Sidney Farber demonstrou que a aminopterina, um composto relacionado à vitamina do ácido fólico, produzia remissões de leucemia aguda em crianças portadora da doença. A aminopterina bloqueia uma reação química necessária para a replicação do DNA das células cancerígenas, ela inibe a diidrofolato redutase, uma enzima necessária para a síntese de nucleotídeos e aminoácidos. Assim, reduz a síntese de DNA, impedindo o crescimento e multiplicação dessas células, e consequentemente o crescimento do tumor. Essa droga foi o antecessor do metotrexato (**Figura 32**, p. 69), uma droga de tratamento contra o câncer utilizada até os dias atuais. Desde então, outros pesquisadores descobriram drogas

que bloqueiam diferentes funções no crescimento e replicação celular, iniciando assim, a era da quimioterapia (ATAÍDE *et al*, 2003; DE VITA & CHU, 2008; *The American Cancer Society medical and editorial content team*, 2014;).

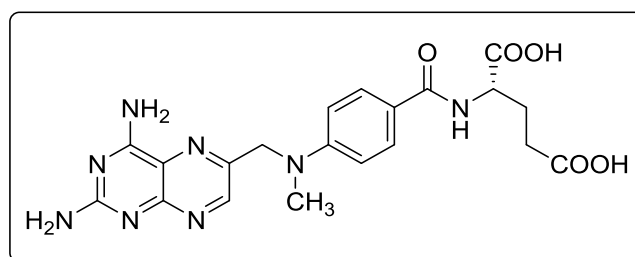


Figura 32: Estrutura do metotrexato, medicamento utilizado no tratamento de câncer.

Na busca por medicamentos para o tratamento de câncer, os produtos naturais possuem grande relevância. Dos compostos anticâncer introduzidos na terapêutica no século passado, mais de 60% destes tem alguma relação com os produtos naturais. Dentre estes se destacam a vimblastina (**III**, Velban[®]), vincristina (**VI**, Oncovin[®]), vindesina (**V**, Eldisine[®]) e vinorelbina (**VI**, Navelbine[®]); o paclitaxel (**VII**, Taxol[®]), docetaxel (**VIII**, Taxotere[®]); a podofilotoxina (**IX**); o etoposídeo (**X**, Etopophos[®]), teniposídeo (**XI**, Vumon[®]); a camptotecina (**XII**) o topotecano (**XIII**, Hycamtin[®]) e irinotecano (**XIV**, Camptosar[®]). Na **Figura 33**, p. 70, estão apresentadas as estruturas dos compostos terapêuticos citados e na **Tabela 3**, p. 71, as indicações terapêuticas e origem destes compostos (COSTA-LOTUFO *et al*, 2010).

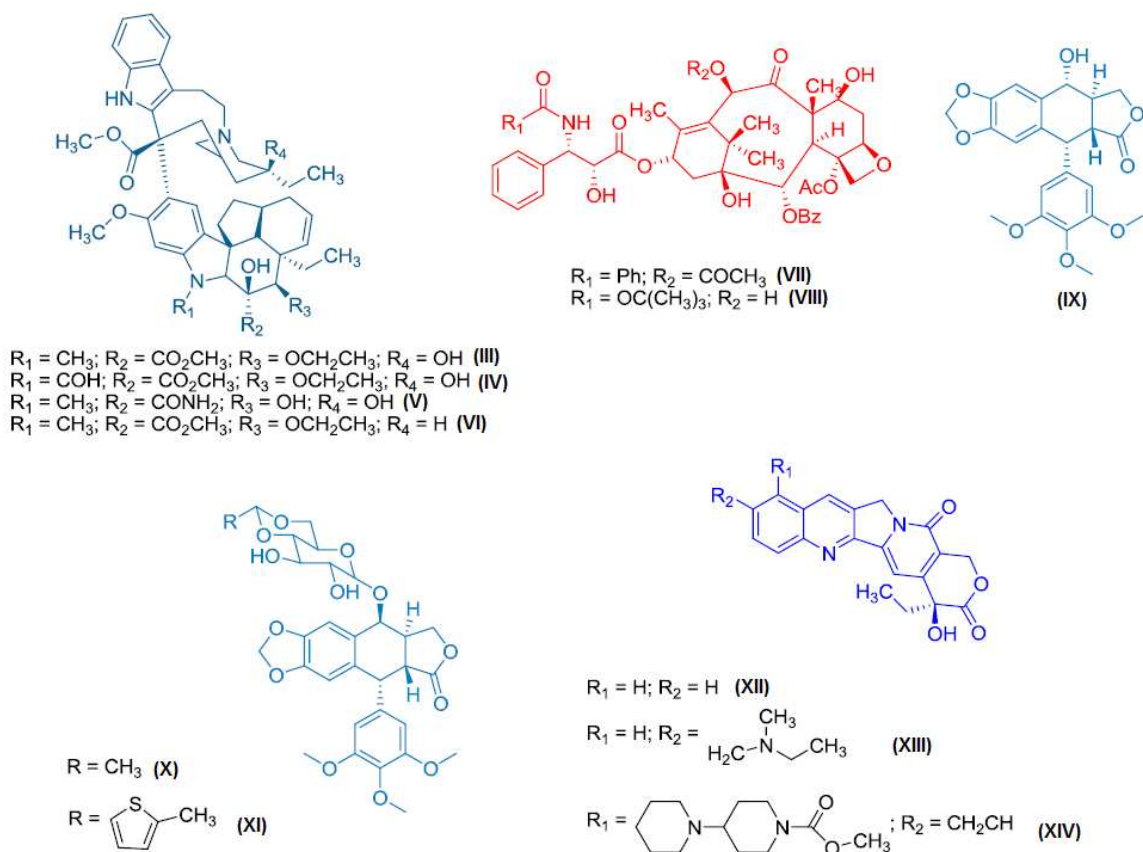


Figura 33: Compostos utilizados no tratamento terapêutico, que são produtos naturais ou foram originados destes (COSTA-LOTUFO et al, 2010).

Tabela 3: Origem e indicações terapêuticas dos compostos III-XIV (COSTA-LOTUFO *et al*, 2010).

Fármaco	Fonte	Indicação Terapêutica
vimblastina (III), vincristina (IV), vindesina (V) e vinorelbina (VI)	<i>Catharanthus roseus</i>	Leucemia linfoblástica aguda; câncer de testículo; doença de Hodking
paclitaxel (VII) , docetaxel (VIII)	<i>Taxus brevifolia</i>	Câncer de mama
podofilotoxina (IX), etoposídeo (X) e teniposídeo (XI)	<i>Podophyllum peltatum</i>	Câncer de Pulmão; ovário e testículo, Leucemia linfocítica aguda
Camptotecina (XII), topotecano (XIII) e irinotecano (XIV)	<i>Camptotheca accuminata</i>	Câncer de colón

Dentre os produtos naturais, aqueles que possuem a fração cinamófila têm recebido atenção devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas e baixa toxicidade. Os derivados do ácido *trans*-cinâmico, isolados de fontes vegetais ou sintetizados, têm sido investigados devido às suas propriedades antitumorais (BALTAS & BEVAL, 2011; PONTIKI *et al*, 2014). Recentemente, atividades antitumorais de vários derivados cinamaldeídos e do ácido cinâmico foram exploradas por diferentes grupos de pesquisa. Como exemplo, os compostos 2-hidroxicinamaldeído e o análogo 2-benzoiloxicinamaldeído (**Figura 34**), que induzem a apoptose em células cancerígenas (HAN *et al*, 2004).

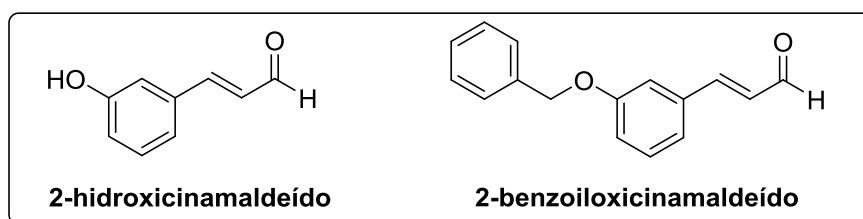


Figura 34: Exemplos de derivados do cinamaldeídos que possuem atividade antitumoral.

Pontiki *et al* (2014) sintetizaram novos derivados do ácido cinâmico utilizando reações de Condensação de Knoevenagel, e avaliaram a citotoxicidade destes compostos frente a diversos tipos de linhagens de células tumorais. Dentre os compostos sintetizados, o composto ácido 4-bromo-5-fenilpenta-2,4-dienóico (**Figura 35**, p. 72) foi o que apresentou melhor atividade cancerígena contra as linhagens de

câncer HT-29 (câncer do cólon), A-549 (câncer de pulmão), OAW- 42 (câncer de ovário), MDA-MB-231 (câncer de mama) e HeLa (células imortais do câncer cervical) (PONTIKI *et al*, 2014).

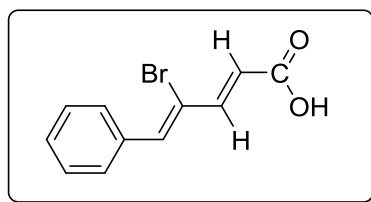


Figura 35: Derivado do ácido cinâmico sintetizado por Pontiki *et al* (2014).

Outro produto natural que tem atraído o interesse de diversos pesquisadores é a vanilina, que também se mostra promissora na busca de novos fármacos anticancerígenos (LIRDPRAPAMONGKOL *et al*, 2005). Em um trabalho publicado recentemente por Bezerra *et al* (2016), foram reunidas várias publicações reportando a atividade antioxidante, ação antitumoral e potencial terapêutico da vanilina no tratamento e prevenção do câncer. Alguns estudos já relataram a toxicidade oral do consumo da vanilina, nos quais altos níveis de vanilina foram consumidos por ratos por longos períodos sem efeitos adversos (LIRDPRAPAMONGKOL *et al*, 2005). Além disso, já foi demonstrado que a vanilina inibe a mutagênese (SHAUGHNESSY *et al*, 2001), apresenta efeito quimiopreventivo em modelos de carcinogênese em ratos (AKAGI *et al*, 1995) e tem potencial como agente para o tratamento da doença da anemia falciforme (ABRAHAM *et al*, 1991).

Um derivado da vanilina que atualmente foi relatado por ativar diferentes vias de morte celular em células cancerígenas é o BVAN08 (**Figura 36**, p. 73). Este composto apresenta atividade antiproliferativa e induz a apoptose em células de hepatoma e leucemia (YAN *et al*, 2007; ZHANG *et al*, 2011). Além disso, recentemente, também foi demonstrado que o BVAN08 exibe um potente efeito antiproliferativo nas células do carcinoma espinocelular de esôfago ESCC (TE-1 e ECA-109), onde o composto induz a parada mitótica e o desalinhamento cromossômico nas células do ESCC. O BVAN08 também é capaz de aumentar a sensibilidade dessas células no tratamento com a radioterapia. Sendo, portanto, este um possível fármaco promissor na terapêutica do carcinoma espinocelular de esôfago juntamente com a radioterapia (GU *et al*, 2018).

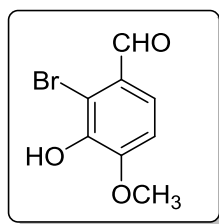


Figura 36: Estrutura do BVAN08, um derivado da vanilina.

Embora um grande número de novos fármacos antineoplásicos foram desenvolvidos nos últimos anos, o câncer continua a ser uma causa recorrente de morte em todo o mundo (KERRU *et al*, 2017). O desenvolvimento de drogas anticancerígenas para alvos cada vez mais específicos e menos prejudiciais às células normais reúne vários pesquisadores de várias áreas (CHABNER & ROBERTS JR, 2005). A busca por novas alternativas medicamentosas para melhorar a eficácia no tratamento de doenças neoplásicas se faz necessária, pois vários tumores ainda não dispõem de terapêutica adequada. Outro fator preocupante é a morbidade associada aos quimioterápicos já utilizados. A descoberta de drogas antineoplásicos de fácil administração e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas pelos pesquisadores da área (LOTUFO *et al*, 2010). Dentro deste contexto, uma das estratégias utilizadas nessa busca por novas drogas anticancerígenas é a hibridação molecular. As drogas anticâncer híbridas são de grande interesse terapêutico, uma vez que a presença de dois ou mais farmacóforos em uma única unidade podem aumentar seu sinergismo biológico, e, também sua capacidade de inibir mais de um alvo biológico. A abordagem híbrida molecular, recentemente, resultou em vários novos compostos com atividade anticancerígena e seletividade aprimoradas com efeitos colaterais reduzidos (KERRU *et al*, 2017).

Dentro dessa perspectiva e considerando as atividades citotóxicas dos derivados do ácido cinâmico bem como da vanilina já descritos na literatura, além da grande recorrência do câncer de mama em mulheres e também a baixa eficácia terapêutica no tratamento do câncer de pele melanoma, descrevem-se neste capítulo a avaliação do efeito citotóxico dos compostos **6-16** contra as linhagens de célula tumoral melanona B16F10 e adenocarcinoma de mama MDA-MB-231.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Linhagens celulares e cultura celular

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram B16F10 (melanoma metastático murino) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama). A linhagem B16F10 foi gentilmente cedida pela Dra. Anésia Aparecida dos Santos (Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil) e a linhagem MDA-MB-231 foi gentilmente cedida pela Dra. Sandra Martha Gomes Dias (Laboratório Nacional de Biociências, Campinas, São Paulo, Brasil). Para o cultivo celular, utilizou-se o meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*, Sigma) pH 7,2 suplementado com 100 U/mL de penicilina (Sigma), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma) e 10% v/v de soro fetal bovino (SFB, LGC Bio). As células foram crescidas em suspensão utilizando garrafas de 75, 150 e 300 cm², mantidas em atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO₂.

3.2.2. Ensaio de citotoxicidade

Para avaliação da atividade citotóxica dos compostos, as células foram contadas em câmaras de *neubauer*, ressuspendidas em meio RPMI 1640 (10% v/v SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e incubadas em placa de 96 poços de fundo chato, na densidade de 10.000 células/poço (B16F10) e 25.000 célula/poço (MDA-MB-231), mantidas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂ para adaptação das células. Os compostos foram avaliados na concentração de 100 µmol L⁻¹ por 48 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂. Como veículo foi utilizado o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração 0,4% v/v. Para verificação do efeito citotóxico, foi adicionado a cada poço 10 µL do reagente MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, Sigma) na concentração 5 mg/mL e incubou-se novamente a 37 °C por 4 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido, o formazan foi ressuspendido em 100 µL de DMSO e a leitura de absorbância no comprimento de onda de 540 nm foi realizada em leitora automática de microplacas (Biotek Sinergy HT). Para os cálculos da viabilidade e preparo dos gráficos utilizaram-se os programas Microsoft Excel e *Prism5*.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos **6-16** foram submetidos a ensaios biológicos para a avaliação de suas atividades citotóxicas contra a linhagem de B16F10 (melanoma metastático murino) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama). As atividades citotóxicas dos compostos foram avaliadas segundo o método MTT. O método MTT é um dos métodos mais utilizados para analisar a proliferação e a viabilidade celular. Ele consiste em um método colorimétrico rápido. Basicamente, a metodologia envolve a redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que é solúvel em água, em cristais de formazan que é insolúvel. Estes cristais formados são de cor azul e ao serem dissolvidos absorvem na região do visível, podendo desta forma ser quantificados por espectrofotometria. A redução do MTT é feita através de desidrogenases celulares, que só é ativa em células metabolicamente ativas (viáveis) portanto pode-se avaliar a capacidade redutora da célula através deste método (MOSMANN, 1983; KUETE *et al*, 2017). As linhagens celulares foram tratadas com os compostos a uma concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 48 horas. Os resultados obtidos são apresentados nas **Figuras 37 e 38**, p. 76.

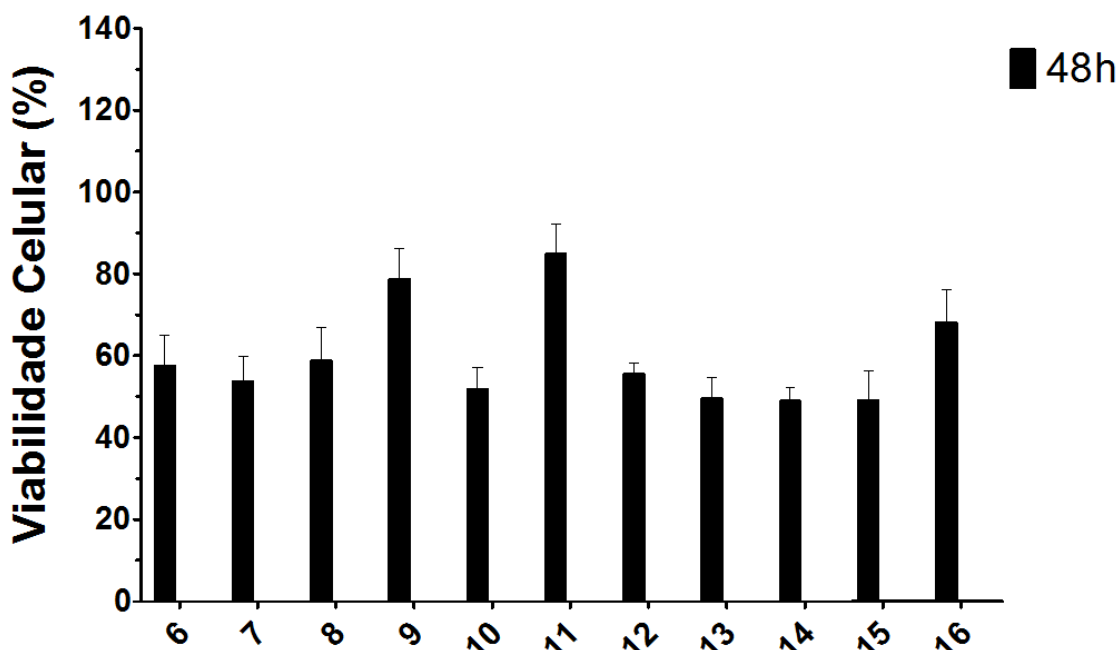


Figura 37: Efeito dos cinamatos derivados da vanilina sobre a viabilidade celular da linhagem B16F10 (melanoma metastático murino).

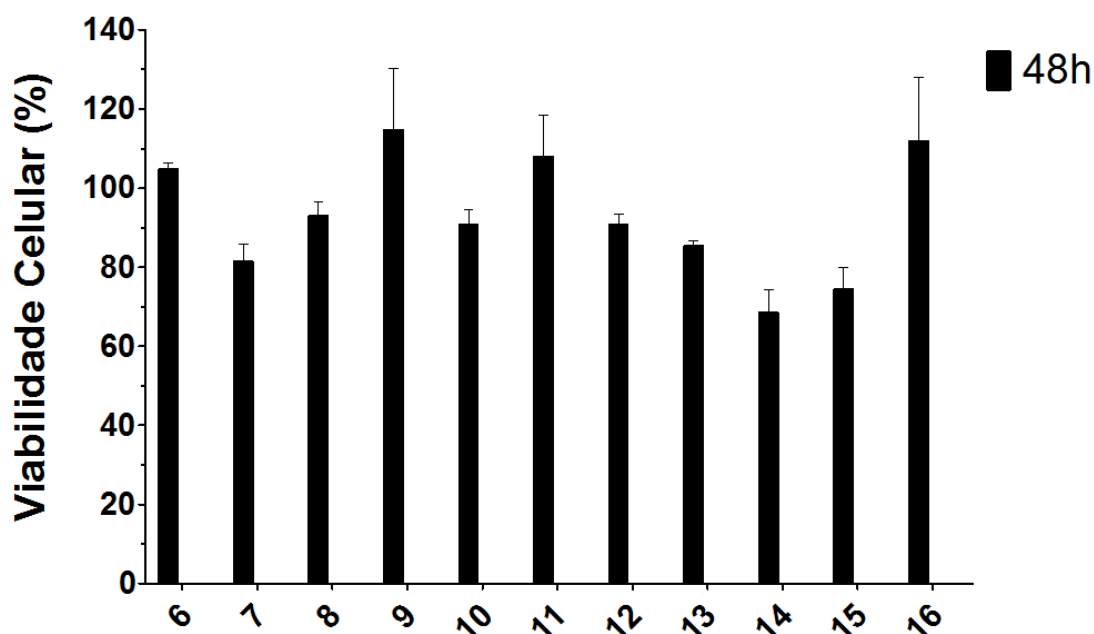


Figura 38: Efeito dos cinamatos derivados da vanilina sobre a viabilidade celular da linhagem (MDA-MB231) câncer de mama.

No caso da linhagem do melanoma (B16F10) e considerando os compostos que possuem o grupo formila (-CHO) em suas estruturas (compostos **6-11**, **Figura 39**), observa-se que os derivados **9**, **11** e **16** (composto **16**, **Figura 40**, p. 77) foram aqueles que apresentaram menor eficiência em inibir a viabilidade celular. O derivado **9** possui o grupo 3,4,5-trimetoxifenila como constituinte da porção cinamoíla, indicando que este tipo de unidade estrutural não é benéfico, em termos de inibição de viabilidade celular da linhagem B16F10 para derivados cinamatos da vanilina. Comparando-se os compostos **6** e **11**, há uma indicação de que a dupla ligação da porção derivado do ácido cinâmico é importante em termos e atividade biológica uma vez que a redução da viabilidade celular do composto **11** (cerca de 10%) é inferior àquela relacionada ao composto **6** (cerca de 40%).

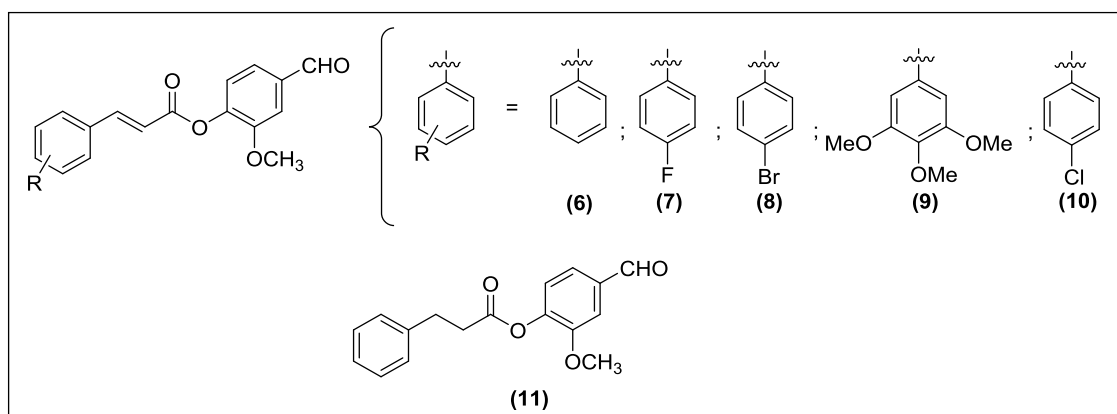


Figura 39: Compostos formilados (**6-11**) dos cinamatos derivados da vanilina.

Comparando-se os compostos formilados (**6**, **7**, **8** e **10**, **Figura 39**, p. 76) e os compostos hidroxilados (**12**, **13**, **14** e **15**, **Figura 40**) e que apresentam a dupla instauração na porção cinamoíla, nota-se que não há grandes diferenças em termos das porcentagens de inibição da viabilidade celular apresentadas por estes compostos. Destacando que os derivados **13**, **14** e **15**, compostos hidroxilados e contendo halogênios ligados ao anel aromático da porção cinamoíla, inibiram cerca de 50% da viabilidade celular.

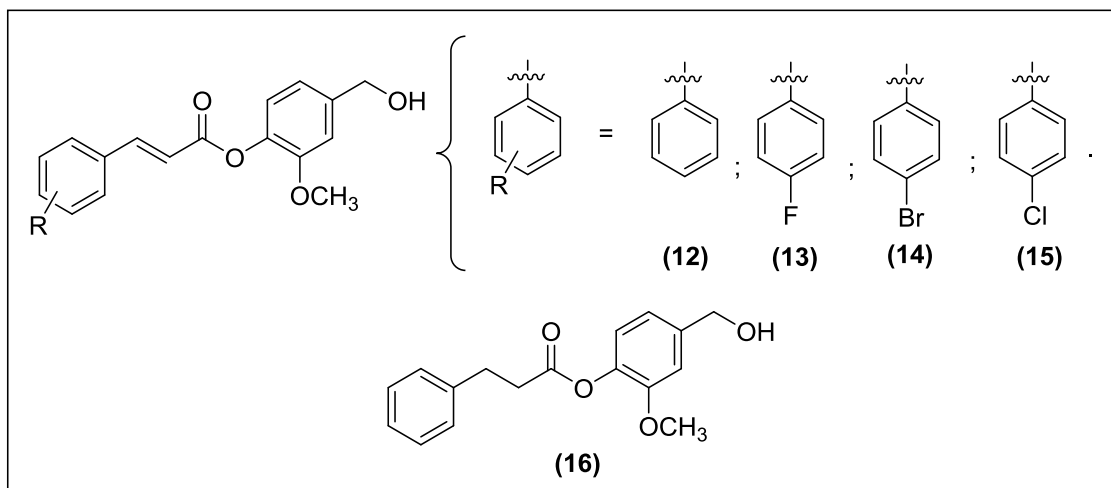


Figura 40: Compostos hidroxilados (**12-16**) dos cinamatos derivados da vanilina.

No que tange a linhagem celular do câncer de mama (MDA-MB231), percebe-se que ela possui menor sensibilidade aos compostos sintetizados do que as células B16F10. Contudo, pode-se observar que, em geral, os compostos que possuem o grupo hidroxila e átomos de halogênio no anel aromático da porção cinamoíla, compostos **14** e **15**, foram aqueles que apresentaram maior atividade (**Figura 38**, p. 76), inibindo a viabilidade celular em torno de 30%.

3.4. CONCLUSÕES

A avaliação da atividade citotóxica dos derivados **6-16** frente às linhagens celulares B16F10 (melanoma metastático murino) e MDA-MB231 (câncer de mama) mostraram que os compostos são mais ativos contra a linhagem B16F10. Considerando esta linhagem celular, os resultados mostram que em termos de citotoxicidade, a presença da dupla ligação na porção cinamoíla é importante. Outra característica estrutural que melhora a atividade biológica é a presença de átomos de halogênios ligados ao anel aromático da porção cinamoíla. Dentre os compostos

avaliados, demonstrou-se que os mais ativos, a saber, **13**, **14** e **15**, inibiram a viabilidade celular em cerca de 50%.

3.5. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, D. J.; MEHANNA, A. S.; WIREKO, F. C.; WHITNEY, J.; THOMAS, R. P.; ORRINGER, E. P. Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia. *Blood*, v. 77, p. 1334–1341, 1991.
- AKAGI, K.; HIROSE, M.; HOSHIYA, T.; MIZOGUCHI, Y.; ITO, N.; SHIRAI, T. Modulating effects of ellagic acid, vanillin and quercetin in a rat medium term multi-organ carcinogenesis model. *Cancer Letters*, v. 94, p. 113–121, 1995.
- ATAÍDE, D. S. T.; ESMANHOTO, L. D. K.; HELMER, K. A.; GUERRA, I. R. C.; GUIMARÃES, C. C. G.; MORITZ, S. Ulceration of psoriatic plaques – cutaneous adverse effects of high dose methotrexate in psoriasis: a report of three cases. *Anais brasileiros de Dermatologia*, v. 78 (6), p. 749-753, 2003.
- BALTAS, M.; BELVAL, F. B. Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents - A Review. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 1672-1703, 2011.
- BEZERRA, D. P.; SOARES, A. K.; DE SOUSA, D. P. Overview of the role of vanillin on redox status and Cancer development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p. 1-9, 2016.
- CHABNER, B. A.; ROBERTS JR, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews*, v. 5, p. 65-72, 2005.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual Química*, v. 2, p. 47-58, 2010.
- DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v. 28, p. 118-129, 2005.
- DE VITA, V. T.; CHU, E. A History of Cancer Chemotherapy. *American Association for Cancer Research*, v. 21, p. 8643-8653, 2008.

- GU, M.; LI, M.; GAO, D.; LIU, L.; LANG, Y.; YANG, S.; OU, H.; HUANG, B.; ZHOU, P.; SHANG, Z. The vanillin derivative 6-bromine-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde induces aberrant mitotic progression and enhances radio-sensitivity accompanying suppression the expression of PLK1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 348, p. 76–84, 2018.
- HAN, D. C.; LEE, M. Y.; SHIN, K. D.; JEON, S. B.; KIM, J. M.; SON, K. H.; KIM, H. C.; KIM, H. M.; KWON, B. M. 2'-benzoyloxycinnamaldehyde induces apoptosis in human carcinoma via reactive oxygen species. *Journal Biological Chemistry*, v. 279, p. 6911–6920, 2004.
- INCA. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; organização Mario Jorge Sobreira da Silva. – 3. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: Inca, 2017. Disponível: < www.inca.gov.br>. Acesso em: 11 de Julho de 2018.
- KERRU, N.; SINGH, P.; KOORBANALLY, N.; RAJ, R.; KUMAR, V. Recent advances (2015-2016) in anticancer hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 142, p. 179-212, 2017.
- KUETE, V.; KARAOSMANOGLU, O.; SIVAS, H. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*. Chapter 10: Anticancer Activities of African, p. 271-297. Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases, 2017.
- LIRDPRAPAMONGKOL, K.; SAKURAI, H.; KAWASAKI, N.; CHOOA, M.; SAITOH, Y.; AOZUKAA, Y.; SINGHIRUNNUSORN, P.; RUCHIRAWAT, S.; SVASTI, J.; SAIKI, I. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 25, p. 57–65, 2005.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; LITINAS, K.; GEROMICHALOS, G. Novel Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidant and Anticancer Agents: Design, Synthesis and Modeling Studies. *Molecules*, v. 19, p. 9655-9674, 2014.
- SHAUGHNESSY, D. T.; SETZER, R. W.; DEMARINI, D. M. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104

is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. *Mutation Research*, v. 480–481, p. 55–69, 2001.

Sociedade Brasileira de Dermatologia. Câncer de pele. 2017. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/cancer-da-pele/64/>>. Acesso em: 11 de Julho de 2018.

The American Cancer Society medical and editorial content team. 2014. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/cancer-treatment-chemo.html>>. Data de acesso: 11 de Julho de 2018.

World Health Organization. Fonte: Cancer Fact sheet N°297". February 2018. Disponível: < <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/physical-activity>>. Acesso em: 11 de Julho de 2018.

Yan, Y.Q., Zhang, B., Wang, L., Xie, Y.H., Peng, T., Bai, B., Zhou, P.K. Induction of apoptosis and autophagic cell death by the vanillin derivative 6-bromine-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde is accompanied by the cleavage of DNA-PKcs and rapid destruction of c-Myc oncoprotein in HepG2 cells. *Cancer Letters*, v. 252, p. 280–289, 2007.

ZHANG, B.; HUANG, B.; GUAN, H.; ZHANG, S. M.; XU, Q. Z.; HE, X. P.; LIU, X. D.; WANG, Y.; SHANG, Z. F.; ZHOU, P. K. Proteomic profiling revealed the functional networks associated with mitotic catastrophe of HepG2 hepatoma cells induced by 6-bromine-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 252, p. 307–317, 2011.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS ÉSTERES CINAMATOS DERIVADOS DA VANILINA

4.1. INTRODUÇÃO

Segundo a OMS, leishmanioses são um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de parasitos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. No geral, os parasitos são transmitidos aos hospedeiros mamíferos, inclusive o homem, pela picada de flebotomíneos (também chamados de mosquito-palha) infectados (MARTINS & LIMA, 2013). As pessoas infectadas pelo parasito não necessariamente desenvolvem algum sintoma em sua vida, podendo apenas ser o hospedeiro da espécie. Já o termo leishmaniose se refere ao fato do indivíduo ficar doente devido à infecção por *Leishmania*.

Leishmaniose é uma doença que afeta, de modo geral, a população mais carente ao redor do mundo e está associada à desnutrição, ao deslocamento populacional, às condições precárias de moradia, ao baixo sistema imunológico do hospedeiro e à falta de recursos financeiros. Anualmente, o número de novos casos de leishmaniose ao redor do mundo é estimado entre 700.000 a 1 milhão e que o número de óbitos decorrentes das doenças seja de 20.000 a 30.000 (WHO a, 2018).

O modo de transmissão de leishmaniose (**Figura 41**, p. 82) começa a partir da picada da fêmea do flebotomíneo no homem ou animal. A partir daí o parasito, na sua forma promastigota, é transferido para a corrente sanguínea do mamífero, onde é fagocitado por uma célula saudável, passando para sua fase amastigota. Ainda dentro da célula, o parasito se multiplica por meio da divisão binária. Após algum tempo, os parasitos causam a lise da célula e começam a se espalhar infectando outras células, momento no qual o paciente começa a exibir os sintomas. O ciclo então é completado quando outra fêmea do flebotomíneo pica o mamífero contaminado. Dentro do mosquito, os parasitos na forma amastigota são transformados novamente na forma promastigota, podendo então infectar outros hospedeiros (BLANCO & NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017; ESCH & PETERSON, 2013).

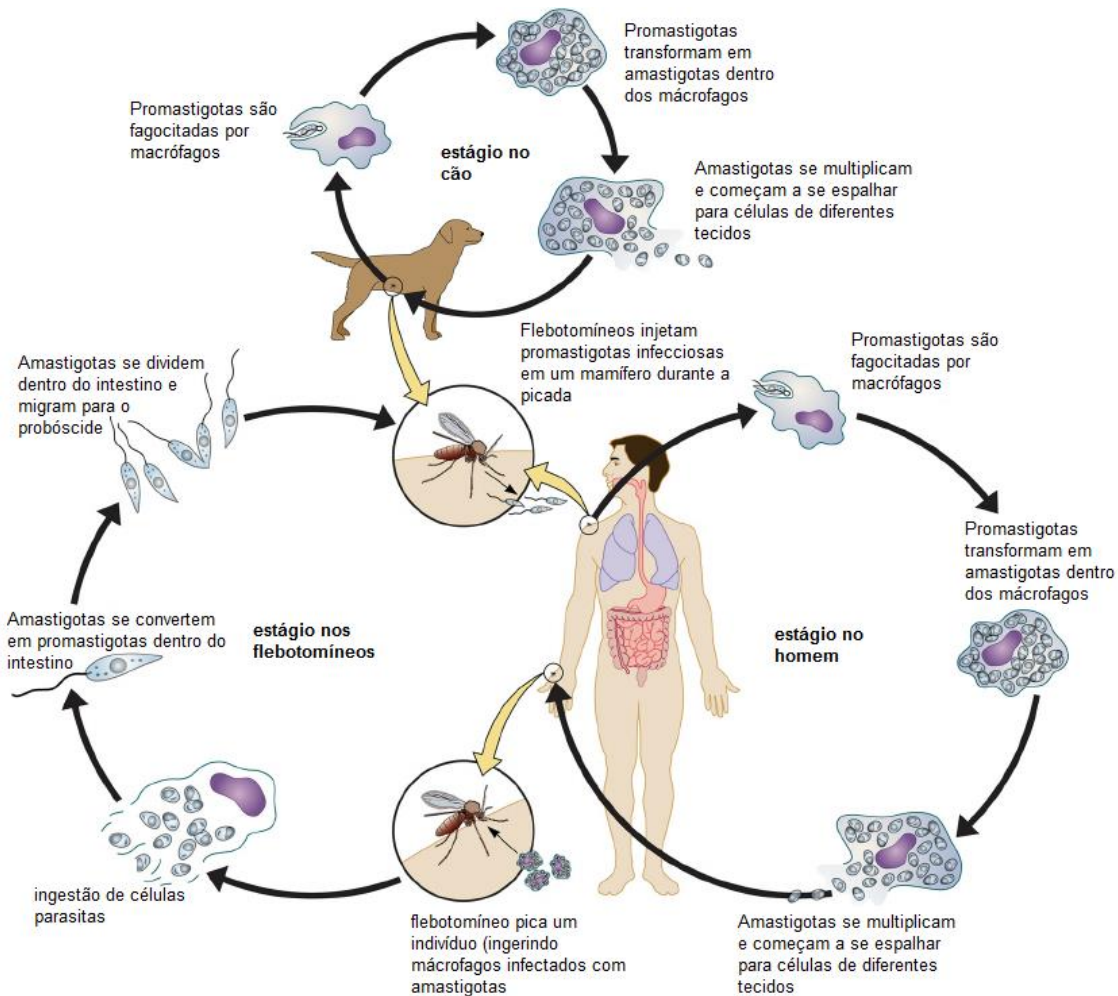


Figura 41: O ciclo da espécie *Leishmania* no cão, no homem e nos flebotomíneos. Figura (traduzida) do trabalho de Esch & Petersen (2013).

Leishmaniose é considerada uma doença com elevada mortalidade (BLANCO & NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017). De modo geral, as doenças causadas pela *Leishmania* se dividem em Leishmaniose Tegumentar (LT), uma doença infecciosa, não contagiosa, que afeta a pele e as mucosas, e Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar, que é o tipo mais grave, pois se trata de uma doença infecciosa generalizada, afetando órgãos internos como fígado e baço, causando esplenomegalia e hepatomegalia (RITA *et al*, 2016). Na LV, intensas hemorragias e severas anemias provocadas pelo caso clínico podem acarretar a morte dos pacientes (BLANCO & NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017). Já a doença causada pela LT se manifesta sob duas formas: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM), essa última também conhecida como mucocutânea, que podem apresentar diferentes manifestações clínicas (PORTAL MS). Na **Figura 42**, p.83, estão apresentadas fotos de pessoas com a doença de Leishmaniose Tegumentar e Leishmaniose Visceral.



Figura 42: À esquerda, fotos das lesões provocadas pela Leishmaniose Tegumentar, tipo cutânea

(Fonte: <http://leishmanioses.blogspot.com/2010/02/forma-cutanea.html>).

À direita, criança com Leishmaniose Visceral

(Fonte: <http://medifoco.com.br/leishmaniose-visceral-calazar/>).

De acordo com os dados da *Global Health Observatory* (GHO), em 2015, 56 países endêmicos de LV e 59 países endêmicos de LC tiveram seus dados a respeito da doença reunidos; 95% dos casos globais de LV foram relatados em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Os 10 países com o maior número de casos de LC reportados em 2015 foram Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, República Árabe da Síria, Tunísia e Iêmen, que juntos respondem por 87% da incidência mundial relatada de LC (WHO b, 2018).

Leishmaniose visceral humana (LV) está entre as mais importantes doenças negligenciadas no Brasil e constitui um grave problema de saúde pública devido a sua ampla distribuição geográfica, ao elevado número de casos e à gravidade de suas formas clínicas (RITA *et al*, 2016). Na América do Sul, de acordo com os dados da Organização Pan-Americana da Saúde, no ano de 2016, 96% dos casos de leishmaniose visceral ocorreram no Brasil. Nesse mesmo ano, 17 países endêmicos reportaram 48.915 casos de LV. Os maiores números de registros foram feitos no Brasil (12.690), na Colômbia (10.966), Nicarágua (5.423) e no Peru (7.271) que juntos representaram 74,3% do total de casos na América (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE).

Para o tratamento de leishmaniose algumas terapias e medicamentos são utilizados. A terapêutica é fundamental para se evitar a mortalidade causada pela LV e

reduzir a morbidade provocada pelas lesões desfigurantes nas formas mais graves de LT. Os fármacos mais utilizados no tratamento, sendo estes os fármacos de primeira linha, são compostos antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e o *N*-metil antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), cujas estruturas estão representadas na **Figura 43** (FUMAGALLI, 2012). Porém, esses compostos além de provocarem efeitos colaterais devido a sua alta toxicidade, eles nem sempre são eficazes devido à resistência de parasitos a esses fármacos (MARTINS & LIMA, 2013).

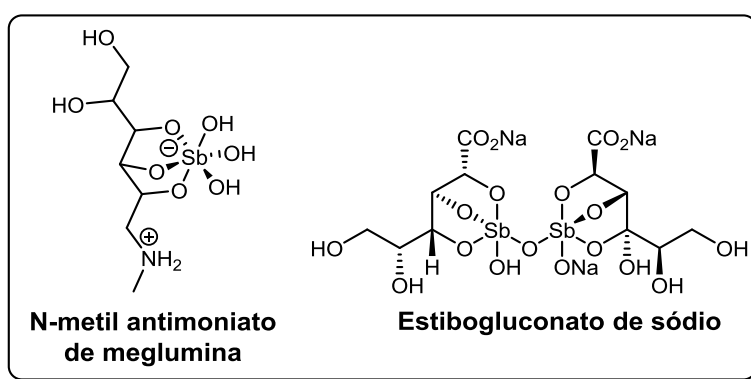


Figura 43: Compostos antimoniais pentavalentes que são utilizados no tratamento da leishmaniose.

Uma alternativa é utilizar a Anfotericina B (**Figura 44**, p. 85), um composto que foi isolado da bactéria *Streptomyces nodosus*. Apesar de muito eficaz e ser uma alternativa aos compostos antimoniais pentavalentes, a Anfotericina B também apresenta alta toxicidade, podendo causar febre com tremores, disfunção renal e até a morte, sendo necessário o acompanhamento do paciente em um hospital durante o seu uso (BLANCO & NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017). Sua eficácia no tratamento pode ser acentuada na forma de composições lipossomais; no entanto, o custo elevado desta formulação da Anfotericina B, comparado aos outros fármacos utilizados, é um aspecto desfavorável pois torna-se inacessível para populações menos favorecidas economicamente. Outros compostos que são utilizados como segunda linha no tratamento de leishmaniose são a pentamidina, paromomicina, miltefosina (**Figura 44**, p. 85) (MARTINS & LIMA, 2013).

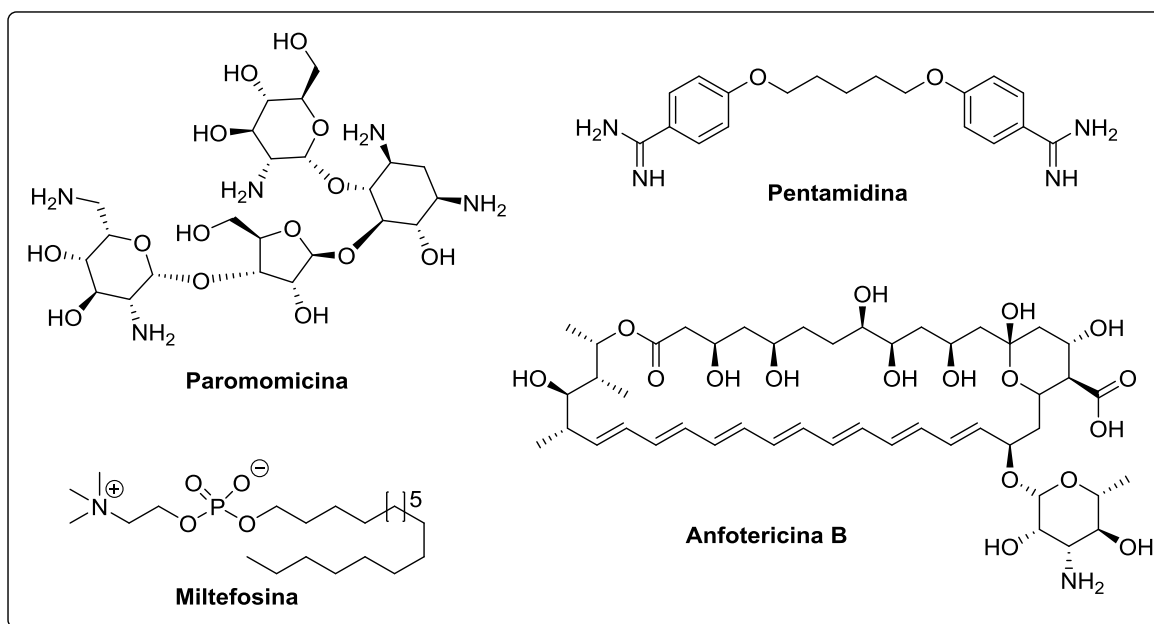


Figura 44: Fármacos utilizados como segunda linha no tratamento da leishmaniose.

Estudos voltados para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos eficazes para o tratamento de leishmaniose e com menor toxicidade para o hospedeiro, tem resultado na descoberta de um número variado de compostos com atrativas atividades contra os parasitos de leishmania (BLANCO & NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017). Dentre estas investigações, estudos relatando a atividade leishmanicida de alguns derivados do ácido cinâmico já foram realizados, como a investigação descrita por Cabanillas *et al* (2010) a respeito dos três ésteres (estruturas **XV**, **XVI** e **XVII** da **Figura 45**, p. 86) do ácido caféico que foram isolados de folhas de *Piper sanguineispicum*. Estes cinamatos apresentaram atividade contra a forma amastigota de *Leishmania amazonensis* com IC₅₀ de 2,0, 10 e 1,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Na **Figura 45** estão ainda representadas as estruturas do éster alquílico do ácido cafeico (**XVIII**), que foi ativo contra a forma amastigota de *Leishmania panamensis* (RADTKE *et al*, 2003) e do ácido rosmarínico (**XIX**, **Figura 45**, p. 86) que exibiu atividade leishmanicida contra a forma amastigota de *Leishmania major* e *Leishmania donovani* (IC₅₀ de 59,2 e 74,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente) (OTERO *et al*, 2014).

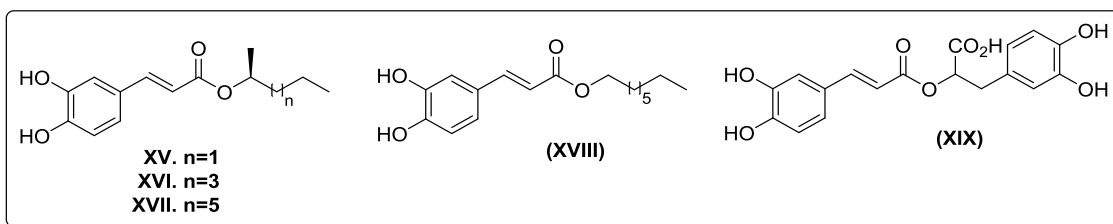


Figura 45: Derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade leishmanicida.

Em um estudo recentemente publicado, Otero *et al* (2017) sintetizaram doze híbridos entre o ácido cafeico e o triclosano, onde oito desses compostos (estruturas estão apresentadas na **Figura 46**) apresentaram atividade leishmanicida contra a espécie *L. (V) panamensis*, sendo que as substâncias **XXI** e **XXIII** foram as que mostraram maior atividade contra a espécie, exibindo valores de IC₅₀ de 3,82 e 11,65 μmol L⁻¹, respectivamente (OTERO *et al*, 2017).

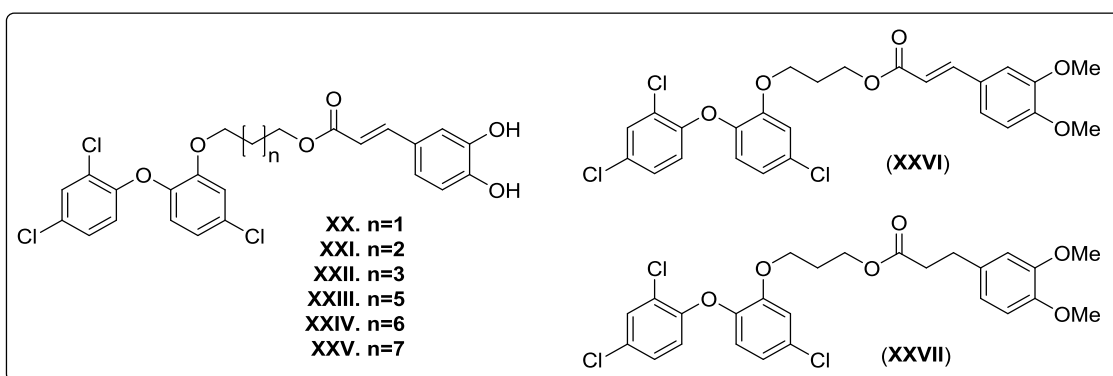


Figura 46: Derivados do ácido cinâmico que apresentam atividade leishmanicida contra a espécie *L. (V) panamensis*.

Dentre as espécies de *Leishmania* presentes no Brasil, as espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são as mais comuns. Elas são responsáveis por causar Leishmaniose Tegumentar, também conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana americana (LTA). Além da sua ampla distribuição pelo território nacional, suas dificuldades no diagnóstico e tratamento, bem como a ocorrência de formas clínicas graves, colocam essa doença como uma das endemias mais preocupantes na saúde pública do país (DORVAL *et al*, 2006).

Diante deste contexto e visando identificar novos compostos que possam ser úteis na terapêutica de leishmaniose, no presente capítulo estão descritos os

resultados da avaliação da atividade leishmanicida dos cinamatos derivados da vanilina contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Parasitos

Para avaliação da atividade leishmanicida dos compostos **6-16** (Figura 17, p. 19), foi utilizada a espécie *Leishmania amazonensis* WT (P-4). Promastigotas de *L. Braziliensis* foram cultivadas em meio 199, suplementado com 10% de soro fetal bovino a 26 °C. Salienta-se que quando as células foram tratadas com soluções dos cinamatos derivados da vanilina, a concentração de soro foi igual a 5%.

4.2.2. Preparo das soluções dos compostos 6-16 para avaliação da atividade leishmanicida

As substâncias **6-16** foram, inicialmente, dissolvidas em DMSO obtendo-se uma solução de concentração 100 mmol L⁻¹. Este procedimento não foi aplicado à substância **9** devido à menor solubilidade deste derivado em DMSO. Neste caso, o composto **9** foi dissolvido em DMSO obtendo-se uma solução de concentração 85 mmol L⁻¹. As soluções dos compostos **6-16** foram apropriadamente diluídas de modo que soluções nas concentrações de 0,1; 10; 100; 1000 µmol L⁻¹ dos compostos foram obtidas.

4.2.3. Avaliação da Atividade Leishmanicida dos compostos 6-16 contra as formas promastigota de *L. amazonensis*

Promastigotas de *L. amazonensis* WT (P-4) foram plaqueados em placas de 96 poços (5x10⁵ *Leishmanias*/mL) e tratadas com diferentes concentrações dos compostos 6-16 [0,1; 1; 10; 100, 1000 µmol L⁻¹] por 72 h. Decorrido este período, a viabilidade do parasito foi avaliada fluorimetricamente (555 nm – 585 nm) por meio do método Alamar Blue. Os experimentos foram realizados em triplicadadata e o cálculo do IC₅₀ foi feito por análise de regressão logarítmica realizada no GraphPad Prism 5.0.

4.2.4. Avaliação da atividade citotóxica dos compostos 6-16 frente a macrófagos

Células de macrófagos BMDM (5x10⁵/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações dos compostos 6-16 [0,1; 1; 10; 100,

1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$] por 72 h. Decorrido este período, a viabilidade do parasito foi avaliada fluorimetricamente por meio do método Alamar Blue. Os experimentos foram realizados em triplicatas e o cálculo do CC_{50} (concentração citotóxica 50%) foi feito por análise de regressão logarítmica realizada no GraphPad Prism 5.0.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (5×10^5 *Leishmanias*/mL) foram cultivadas na presença de concentração variadas [0,1; 1; 10; 100; 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$] dos cinamatos derivados da vanilina **6-16** por 72h e a viabilidade celular foi avaliada por Alamar Blue. A pentamidina foi utilizada como controle positivo nos testes anti-promastigotas por ser altamente ativa, com ausência total de promastigotas nos poços de maiores concentrações em apenas 24 após a incubação com o fármaco.

O ensaio colorimétrico avaliado por Alame Blue, o qual representa um método simples e quantitativo de medida para a proliferação celular, viabilidade e citotoxicidade consiste na utilização do corante indicador denominado resazurina. A resazurina é uma substância azul, não tóxica, solúvel em água e que muda de cor devido à atividade celular. As enzimas produzidas por células que crescem ativamente convertem a resazurina à sua forma rosa fluorescente, resorufina (**Figura 47**). A produção de resorufina é proporcional à atividade metabólica da célula. Embora esta mudança de cor seja visível, geralmente é monitorado por instrumentos que medem com precisão mudanças na absorção ou fluorescência (RÓLON *et al.*, 2006).

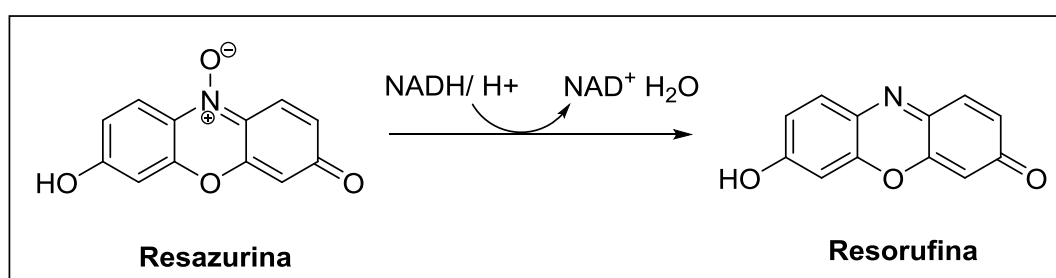


Figura 47: Conversão da resazurina em resorufina.

Os valores de IC_{50} da atividade antipromastigosta para todos os compostos **6-16** foram determinados e os resultados estão apresentados na **Tabela 4**, p.89.

Tabela 4: Avaliação da atividade anti-promastigota dos cinamatos derivados da vanilina

Composto	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	CC ₅₀	IS*
	<i>L. amazonensis</i>	(μmol L ⁻¹)	
6	14,9	33,0 ± 0,07	2,2
7	13,5	97,3 ± 0,05	7,2
8	10,8	124,3 ± 0,09	11,5
9	48,6	521,5 ± 0,2	10,7
10	11,3	38,6 ± 0,2	3,4
11	35,1	258,5 ± 0,2	7,4
12	29,7	26,4 ± 0,1	0,9
13	17,2	23,4 ± 0,1	1,4
14	15,9	22,3 ± 0,1	1,4
15	18,5	23,3 ± 0,1	1,2
16	260,7	152,1 ± 0,1	0,6
Pentamidina	0,2	-	-

*IS = Índice de seletividade determinado pela expressão CC₅₀/IC₅₀

A partir da análise dos resultados apresentados na **Tabela 4**, nota-se que todos os compostos avaliados apresentaram menor eficiência em inibir a viabilidade celular da forma promastigota de *L. amazonensis* comparada ao fármaco comercial pentamidina. Os valores de IC₅₀ dos compostos **6-16** podem ser agrupados do seguinte modo: i) compostos que apresentam valores de IC₅₀ abaixo de 20 μmol L⁻¹, correspondendo aos derivados **6, 8, 14, 7, 13, 10, 15**; ii) compostos que possuem valores de IC₅₀ maiores que 20 μmol L⁻¹ e inferiores a 50 μmol L⁻¹, associado aos compostos **9, 11 e 12**; iii) compostos com valores de IC₅₀ acima de 50 μmol L⁻¹, neste caso o composto **16**.

Os dados da **Tabela 4** revelam que o composto mais ativo, o derivado **8** (IC₅₀ 10,8 μmol L⁻¹), foi também aquele que apresentou maior índice de seletividade (IS = 11,5). O valor do índice de seletividade indica que o composto é 11,5 vezes mais tóxico para o parasito do que para as células de macrófagos. De acordo com Orme & Colaboradores (2001), um composto pode ser considerado promissor como um candidato a fármaco se seu índice de seletividade é igual ou superior a 10. Neste tocante, o composto **8** atende a este critério. Outra substância que apresentou um bom

índice de seletividade foi a substância **9**, embora sua eficácia contra os parasitos de *L. amazonensis* seja 4,5 vezes menor comparada ao composto **8**. Embora frente aos parasitos de *L. amazonensis* dos compostos **8** e **10** sejam equipotentes, a toxicidade do composto **10** contra células foi mais acentuada, resultando em um menor índice de seletividade. Dentre os derivados contendo o grupo formila (-CHO), aqueles que apresentaram maior eficácia contra os parasitos foram os derivados halogenados **7**, **8** e **10**. Este resultado aponta para o aumento da atividade biológica da atividade leishmanicida com a introdução de átomos de halogênios no anel aromático da porção cinamoíla do derivado. Comparando-se os derivados **6** e **11**, percebe-se que a presença da ligação dupla na porção cinamoíla resulta em um aumento da atividade biológica. Levando-se em conta os compostos **6** e **16**, percebe-se que a redução da dupla instauração e do grupo formila resultaram em um composto que pode ser considerado inativo contra *L. amazonenses*.

4.4. CONCLUSÕES

Os resultados da avaliação da atividade leishmanicida de uma série de cinamatos derivados da vanilina mostraram que eles são capazes de inibir a viabilidade celular dos parasitos de *L. amazonenses* com diferentes graus de eficiência. Em termos de estrutura-atividade, os resultados apontam para o fato de que a introdução de átomos de halogênio no anel aromático da porção cinamoíla tomam os compostos mais efetivos contra a forma promastigota de *L. amazonensis*. Identificou-se um derivado (substância **8**) que apresentou índice de seletividade maior que 10, um valor importante em termos de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, além de um valor de IC₅₀ relativamente baixo. Embora estudos complementares envolvendo as formas amastigotas necessitem ser realizados, os resultados encontrados são encorajadores em termos de utilização de híbridos moleculares do ácido cinâmico e da vanilina como um *scaffold* que possa ser explorado em termos de pesquisa e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da leishmaniose.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. *Revista Virtual de Química*, v. 9, p. 861-873, 2017.

- CABANILLAS, B.; LE LAMER, A. C.; CASTILLO, D.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ODONNE, G.; BOURDY, G.; MOUKARZEL, B.; SAUVAIN, M.; FABRE, N. Caffeic Acid Esters and Lignans from *Piper sanguineispicum*. *Journal of Natural Products*, v. 73, p. 1884-1890, 2010.
- DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A. C. C.; ALVES, T. P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, p. 43-46, 2006.
- ESCH, K. J.; PETERSON, C. A. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, p. 58–85, 2013.
- FUMAGALLI, M. A. C. *Proteção contra a infecção por Leishmania (Leishmania) amazonensis por imunização de camundongos (BALB/c) com proteínas ribossomais de Leishmania sp.* 2012. Tese (Doutorado em Medicina Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MARTINS, G. A. S.; LIMA, M. D. Leishmaniose: do diagnóstico ao tratamento. *Enciclopédia Biosfera*, v. 9, p. 2556-2569, 2013.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Informe Epidemiológico das Américas, *Informe de Leishmanioses*, nº 6, Fevereiro, 2018. Disponível em: <www.paho.org>. Acesso em: 18 de julho 2018.
- ORME, I.; SECRIST, J.; ANATHAN, S.; KWONG, C.; MADDRY, J.; REYNOLDS, R.; POFFENBERGER, A.; MICHAEL, M.; MILLER, L.; KRAHENBUH, J.; ADAMS, L.; BISWAS, A.; FRANZBLAU, S.; ROUSE, D.; WINFIELD, D.; BROOKS, J. Tuberculosis Drug Screening Program. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 45, p. 1943-1946, 2001.
- OTERO, E.; GARCÍA, E.; PALACIOS, G.; YEPES, L. M.; CARDA, M.; AGUT, R.; VÉLEZ, I. D.; CARDONA, W. I.; ROBLEDO, S. M. Triclosan-caffeic acid hybrids: Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 141, p. 73-83, 2017.
- OTERO, E.; ROBLEDO, S. M.; DÍAZ, S.; CARDA, M.; MUÑOZ, D.; PAÑOS, J.; VÁLEZ, I. D.; CARDONA, W. Synthesis and leishmanicidal activity of cinnamic acid

esters: structure–activity relationship. *Medicinal Chemistry Research*, v. 23, p. 1378-1386, 2014.

PORTAL MS. Portal Ministério Público da Saúde. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-diarreica-aguda/situacao-epidemiologica/954-saude-de-a-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11325-informacoes-tecnicas>>. Acesso em: 18 de julho 2018.

RADTKE, O. A.; FOO, L. Y.; LU, Y.; KIDERLEN, A. F.; KOLODZIEJ, H. Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on interleukin-6, interferon and tumour necrosis factor-alpha-release in RAW 264.7 cells. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 58, p. 395-400, 2003.

RITA, F. S.; SANTOS, C. S.; MORAIS, M. A. *Leishmaniose no Brasil: aspectos ambientais e seus impactos sobre a saúde*. In: XIII Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas. Poços de Caldas, 2016.

RÓLON, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, v. 99, p. 103-107, 2006.

WHO a. World Health Organization. Leishmaniasis: the global trend, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 18 de julho 2018.

WHO b. World Health Organization. Leishmaniasis: the global trend, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 18 de julho 2018.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento do presente trabalho resultou na obtenção de dezesseis compostos, sendo que dez deles (**6-9** e **12-16**) ainda não haviam sido descritas na literatura. As substâncias foram preparadas empregando-se reações de Condensação de Knoevenagel, Esterificação de Steglich e processos de redução. De modo geral, os compostos foram obtidos com rendimentos sinteticamente úteis. Os cinamatos derivados da vanilina **6-16** foram submetidos a testes de avaliação de citotoxicidade contra as linhagens celulares de melanoma metastático murino (B16F10) e adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231). Em geral, os derivados foram mais efetivos em inibir a viabilidade celular da linhagem B16F10 e os compostos (*E*)-4-fluorocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila (**13**), (*E*)-4-bromocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila (**14**) e (*E*)-4-clorocinamato de 4-hidroximetil-2-metoxifenila (**15**) foram os mais ativos, inibindo a viabilidade celular em cerca de 50%. No que se refere aos testes de avaliação da atividade leishmanicida dos mesmos compostos, o derivado (*E*)-4-bromocinamato de 4-formil-2-metoxifenila (**8**) foi o mais ativo (IC_{50} 10,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$), apresentando o maior índice de seletividade ($IS = 11,5$). Desde modo, demonstrou-se que híbridos moleculares derivados da junção da vanilina e do ácido cinâmico (e derivados deste) podem ser úteis no que tange ao desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento do câncer e de leishmaniose. Como perspectivas, planeja-se o aprofundamento das investigações com relação às atividades citotóxica e leishmanicida. Com respeito à atividade citotóxica, buscar-se-á a investigação do efeito dos compostos mais ativos nos processos de migração, proliferação e invasão celular. Estes processos são muito importantes com relação ao processo de metástase em câncer. Nosso grupo de pesquisa vem colaborando proficuamente com os grupos de pesquisa dos professores Gustavo Costa Bressan (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV) e Mariana Machado Neves (Departamento de Biologia Geral, UFV) e estudos relacionados à avaliação dos processos supracitados em modelo de melanoma murino têm sido desenvolvidos. Assim, uma vez que derivados cinamatos foram ativos contra células de melanoma murino, tem-se a possibilidade de dar continuidade ao estudo sobre os efeitos dos cinamatos derivados da vanilina em modelo de melanoma. Além disso, ensaios de avaliação da atividade leishmanicida dos compostos contra a forma amastigota de *Leishmania amazonensis* também serão realizados. Dependendo dos resultados

obtidos, tem-se também a possibilidade de que estudos *in vivo* sejam conduzidos para ambas as atividades investigadas. Planeja-se ainda a avaliação das atividades fungicida e antiviral (contra os vírus DENK, ZIKA e West Nile) dos cinamatos sintetizados. Por fim, deve ser destacado que modificações moleculares podem ser planejadas de modo a produzir derivados mais ativos e este é um caminho que, certamente, será explorado no futuro.

ANEXOS

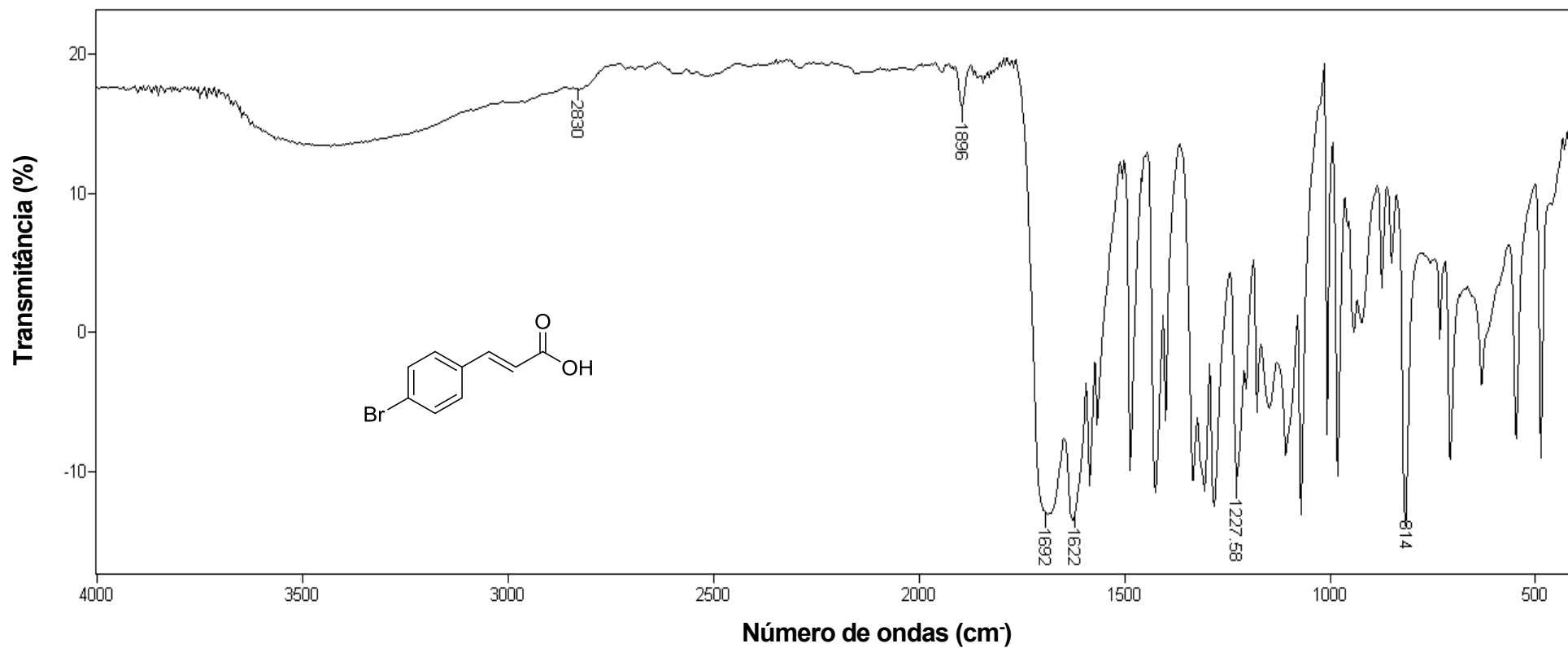


Figura 48: Espectro no infravermelho (KBr) do composto 2.

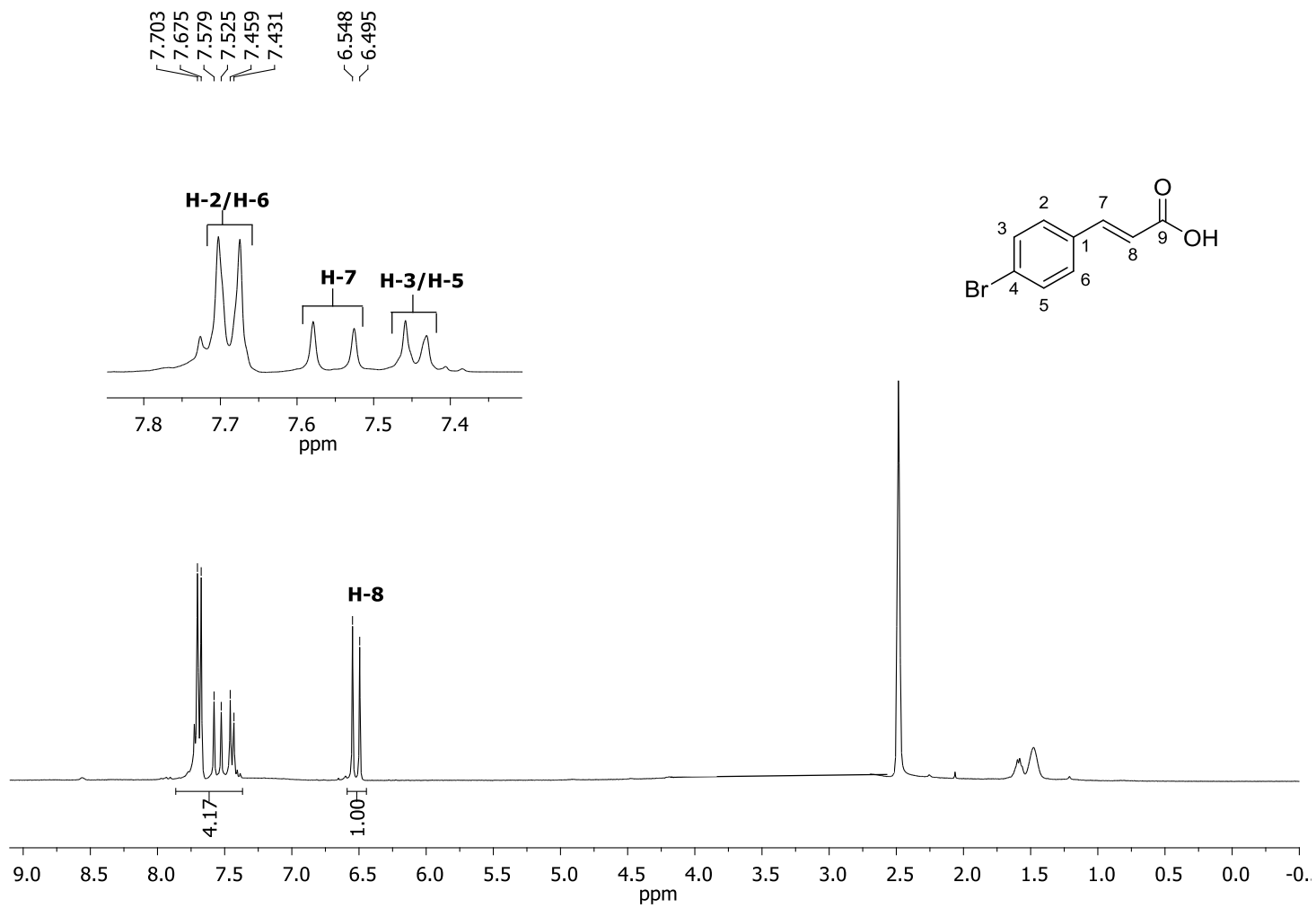


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **2**.

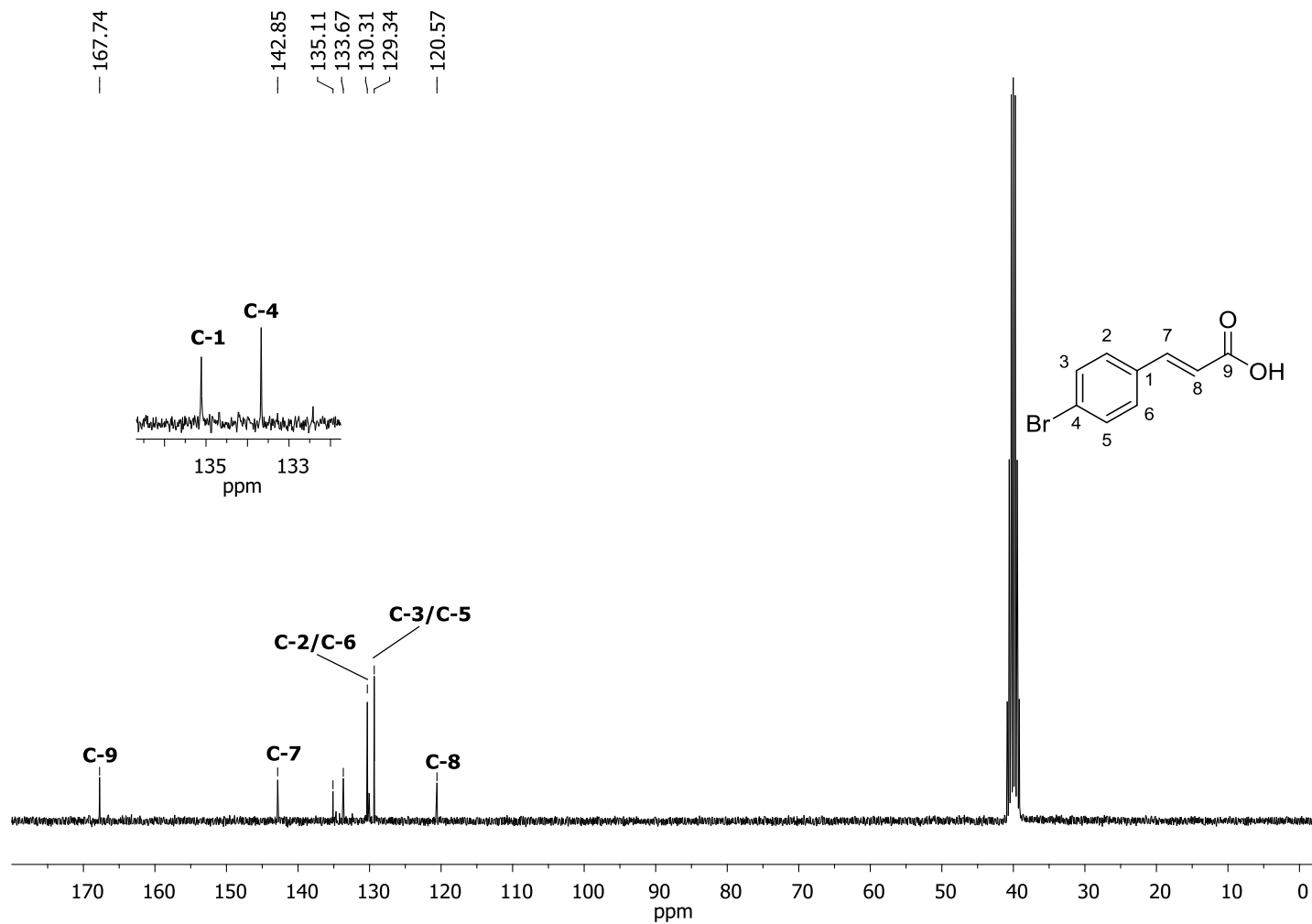


Figura 50: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **2**.

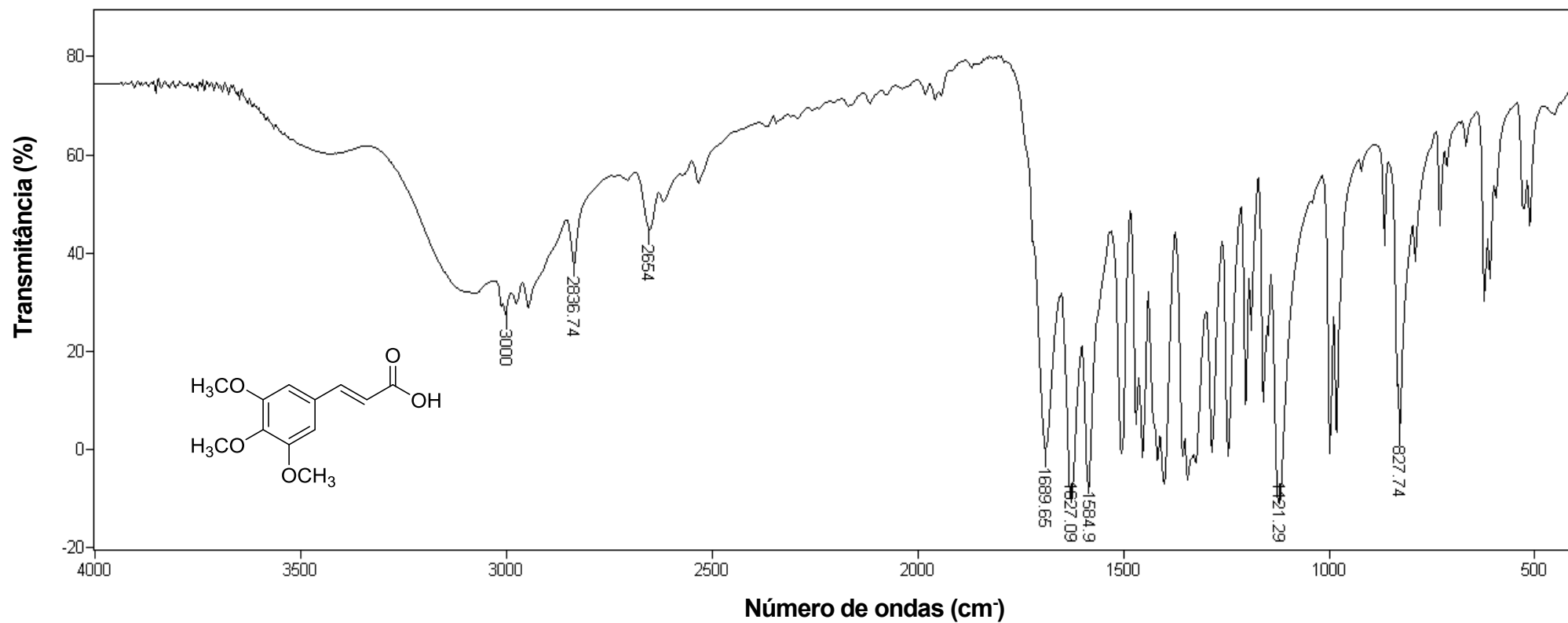


Figura 51: Espectro no infravermelho (KBr) do composto 3.

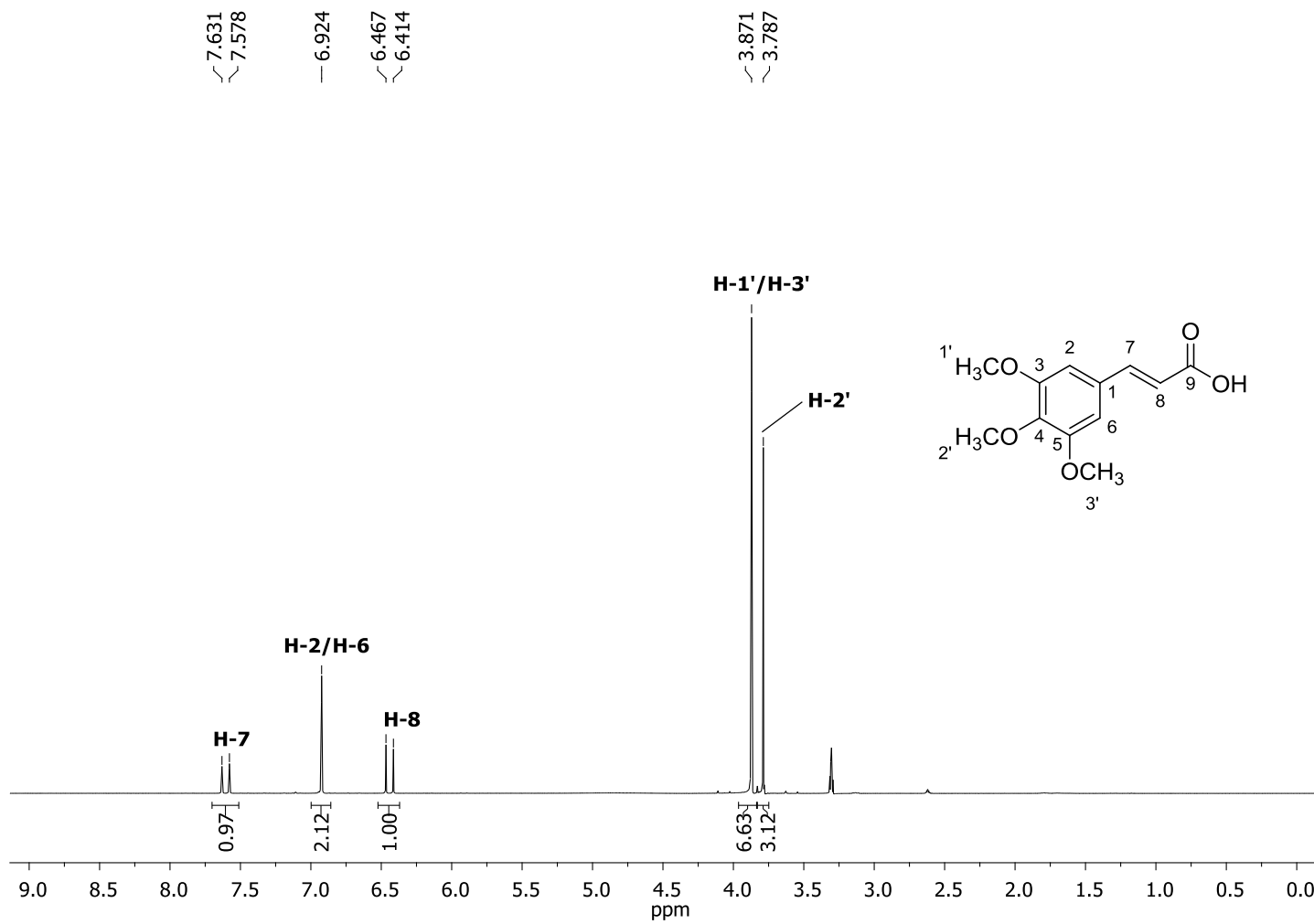


Figura 52: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **3**.

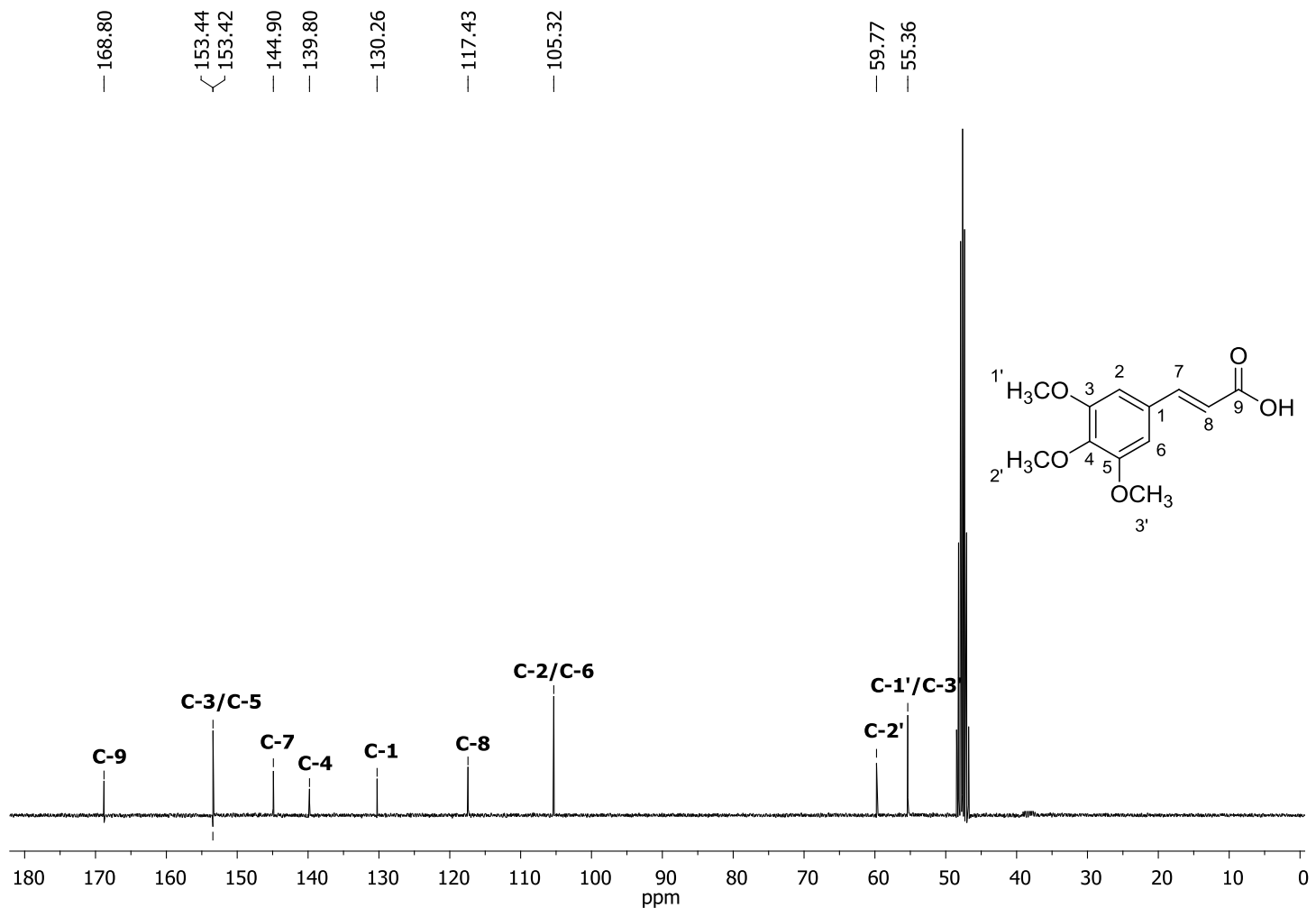


Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **3**.

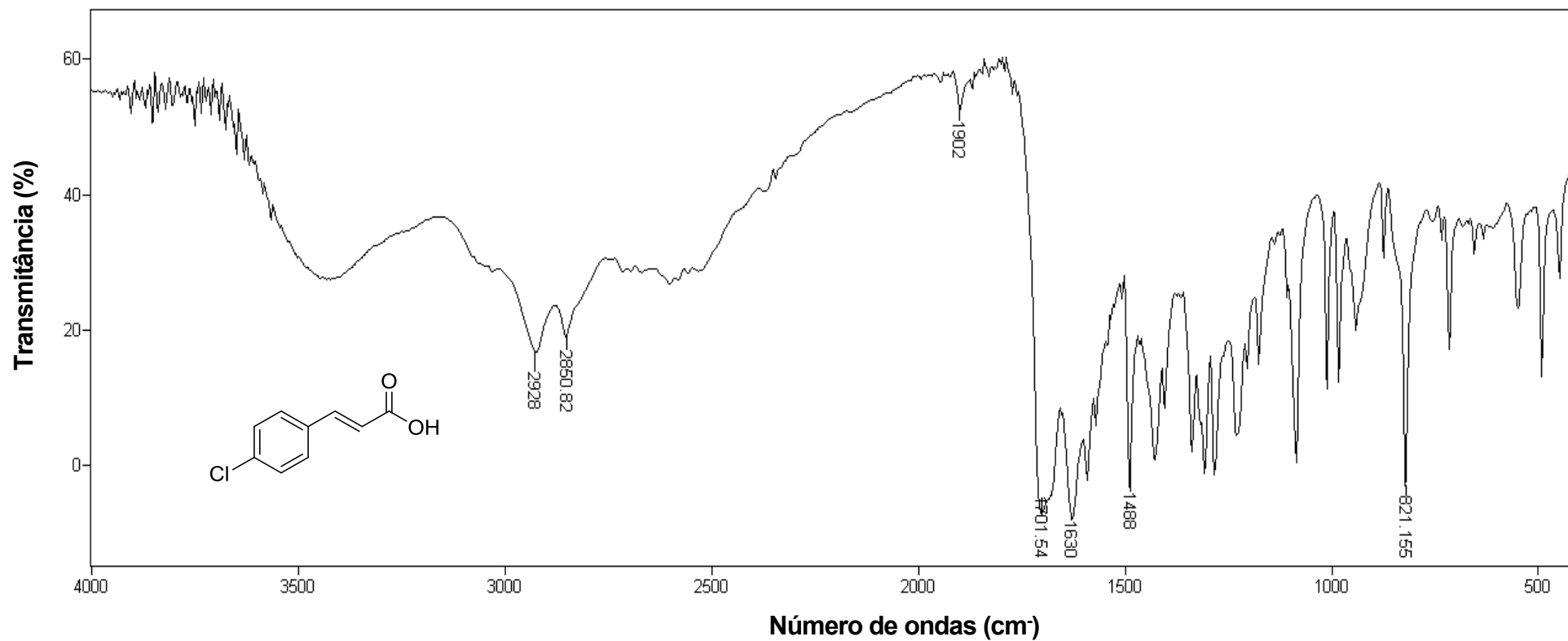


Figura 54: Espectro no infravermelho (KBr) do composto 4.

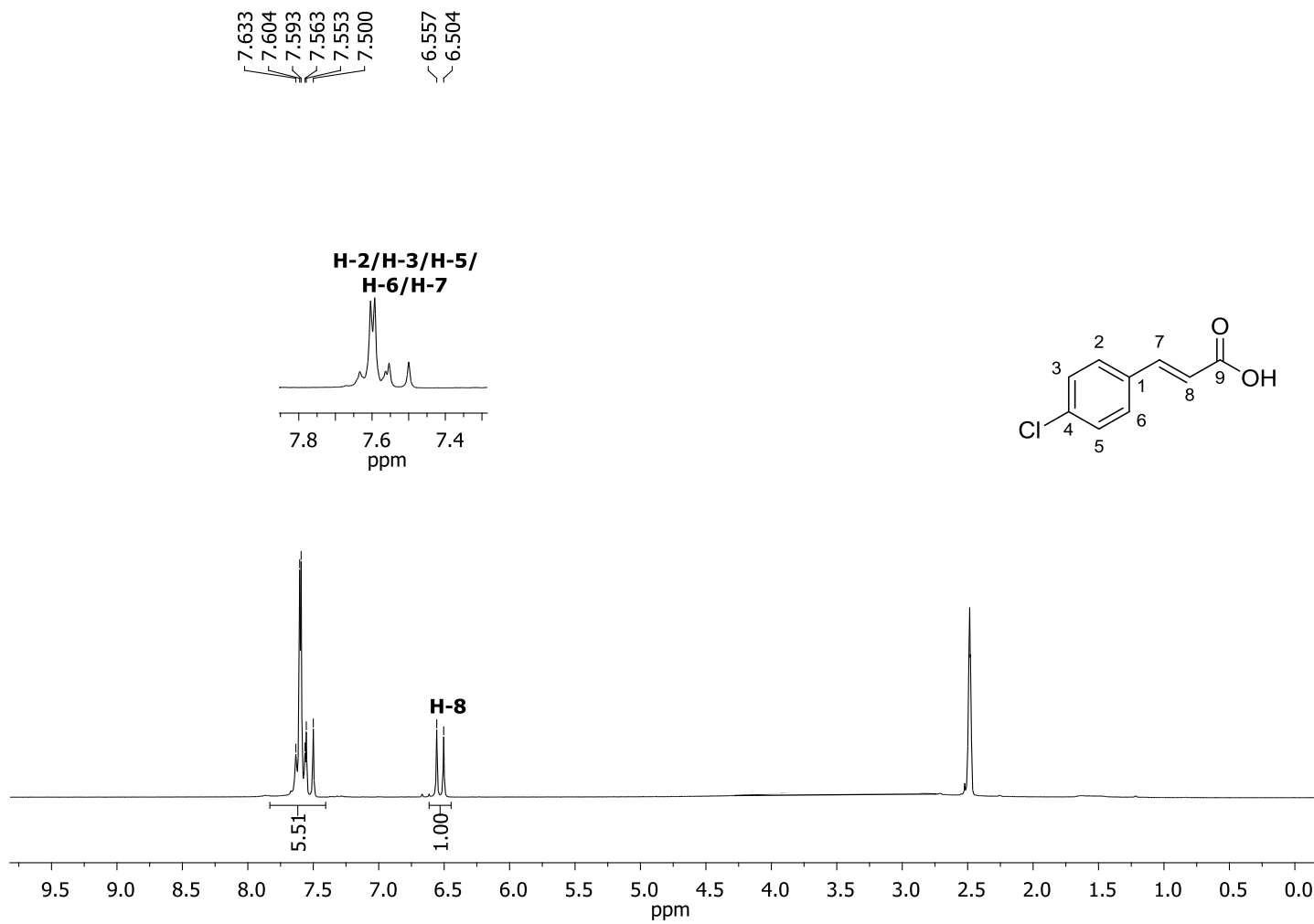


Figura 55: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **4**.

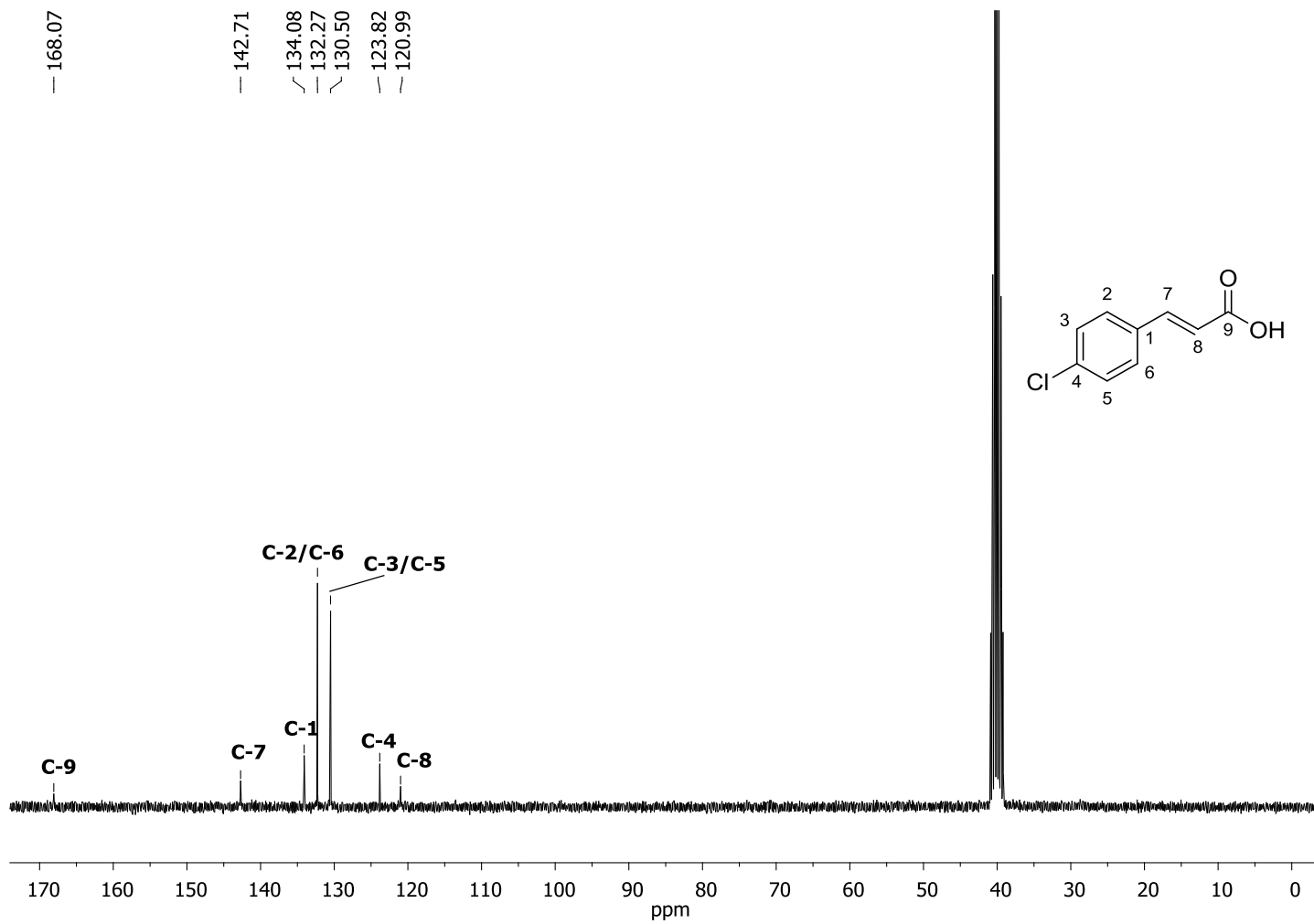


Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **4**.

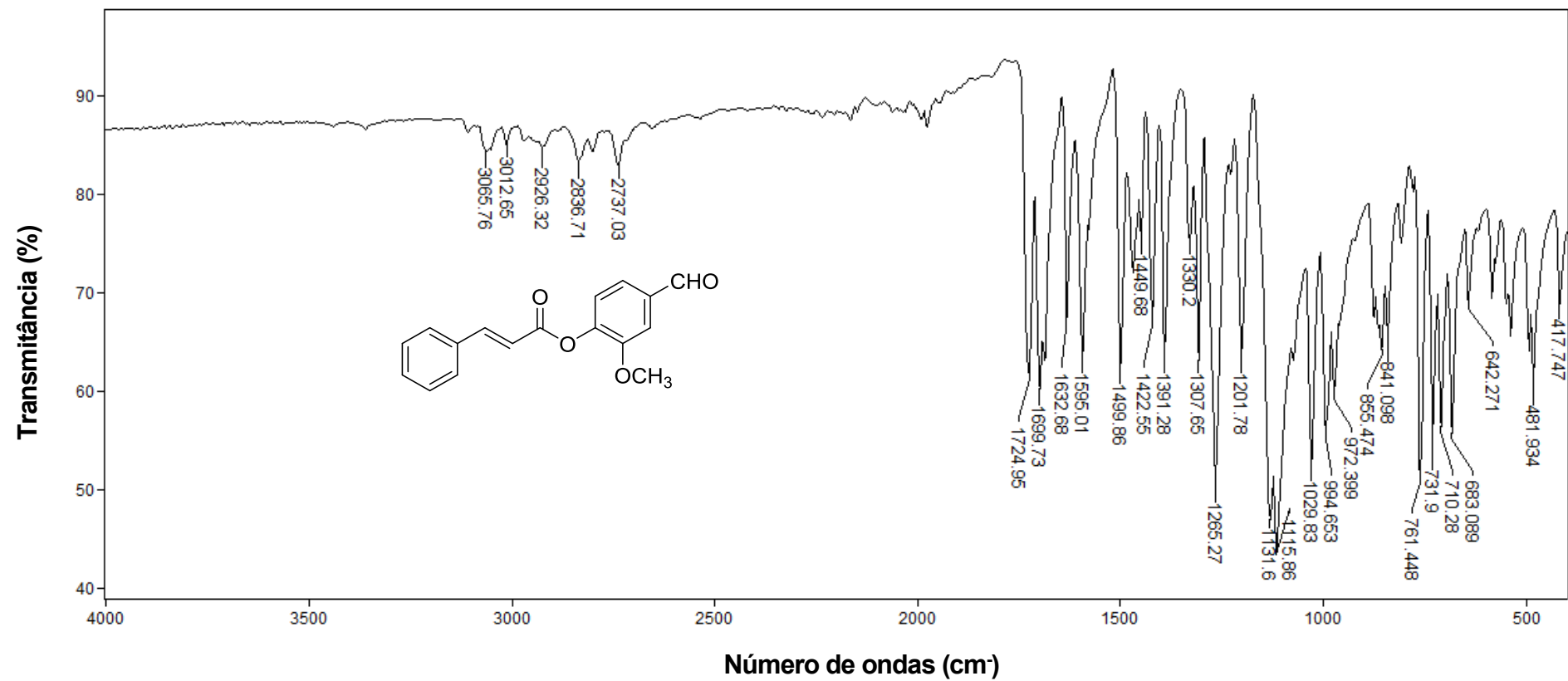


Figura 57: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 6.

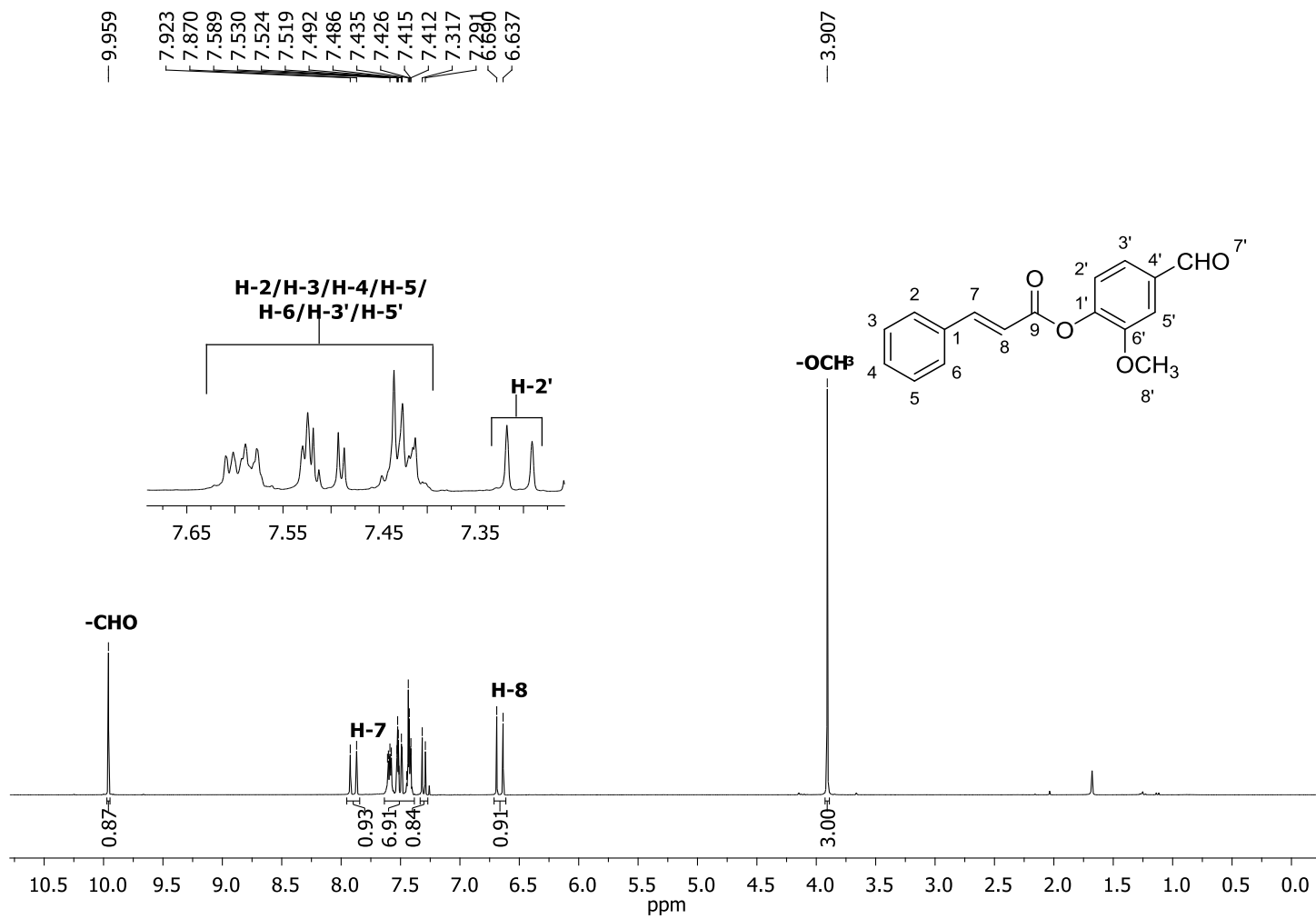


Figura 58: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **6**.

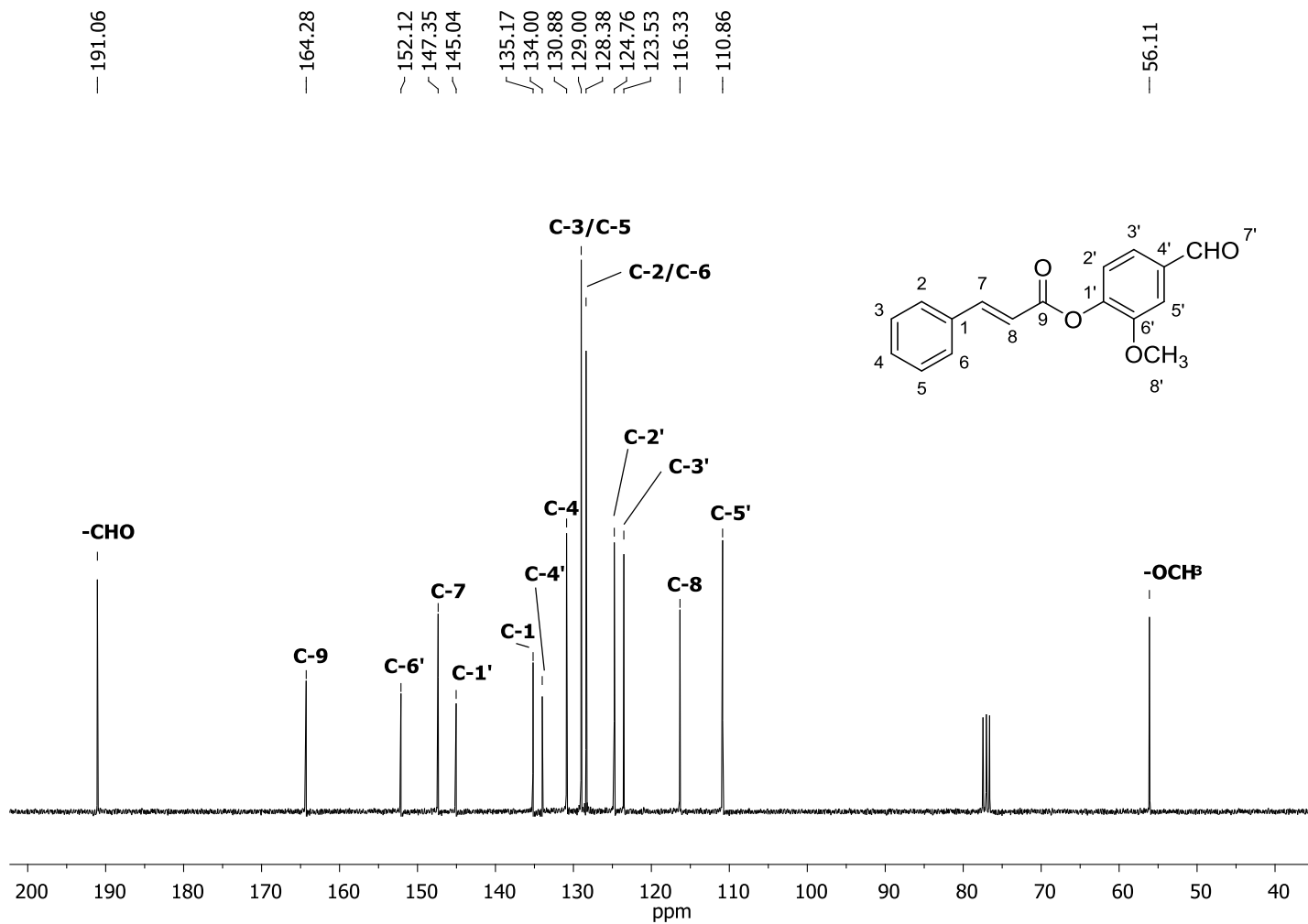


Figura 59: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 6.

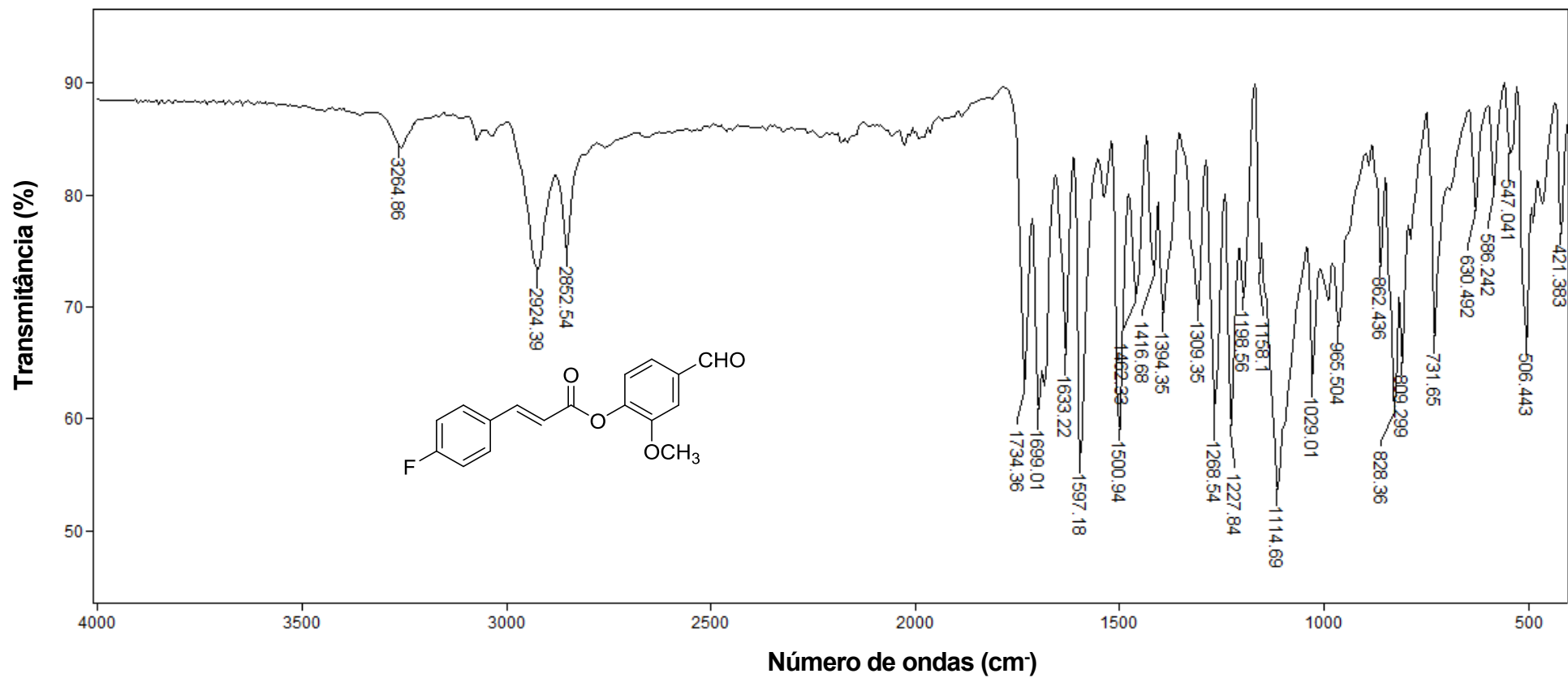


Figura 60: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 7.

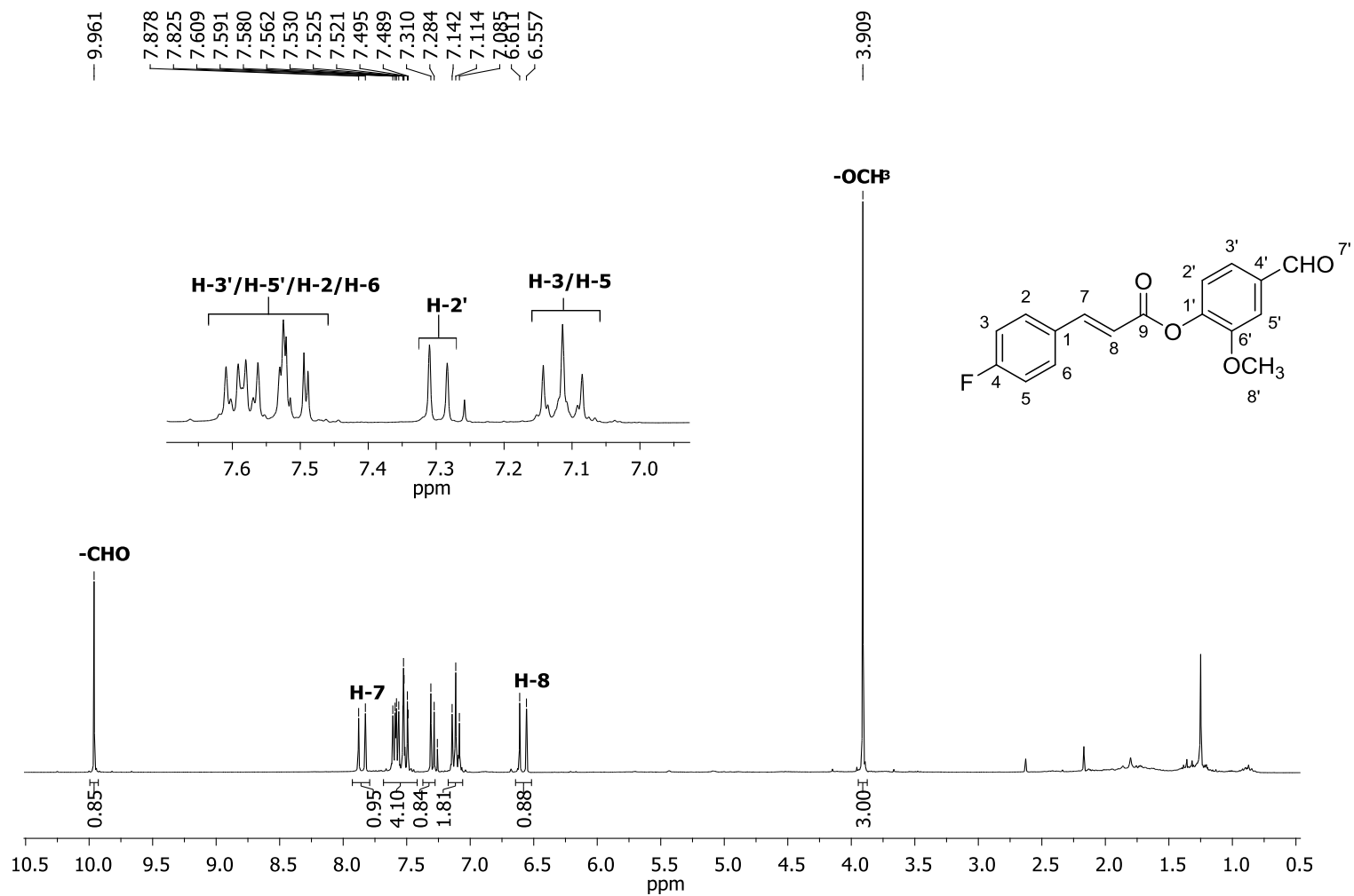


Figura 61: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto 7.

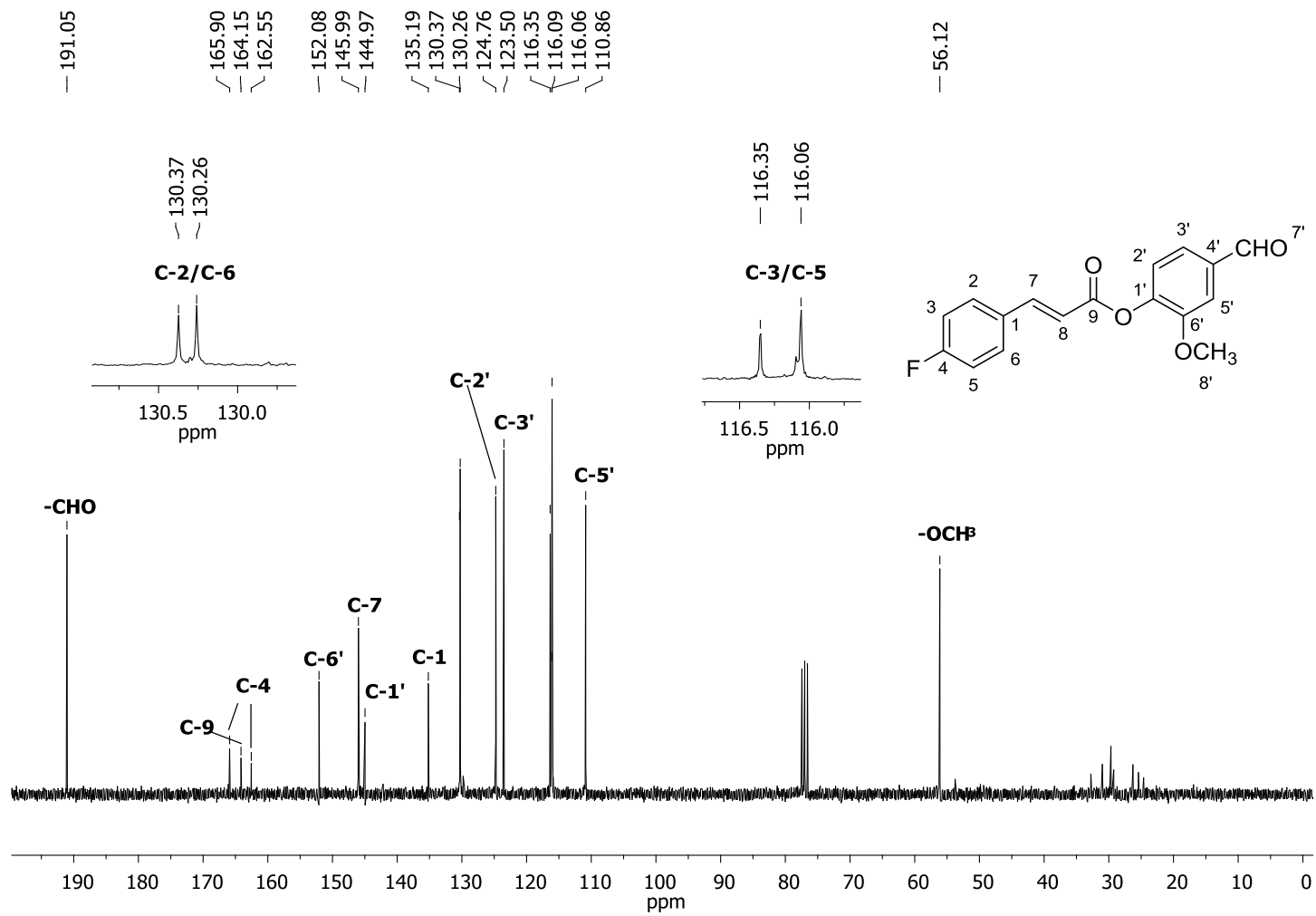


Figura 62: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 7.

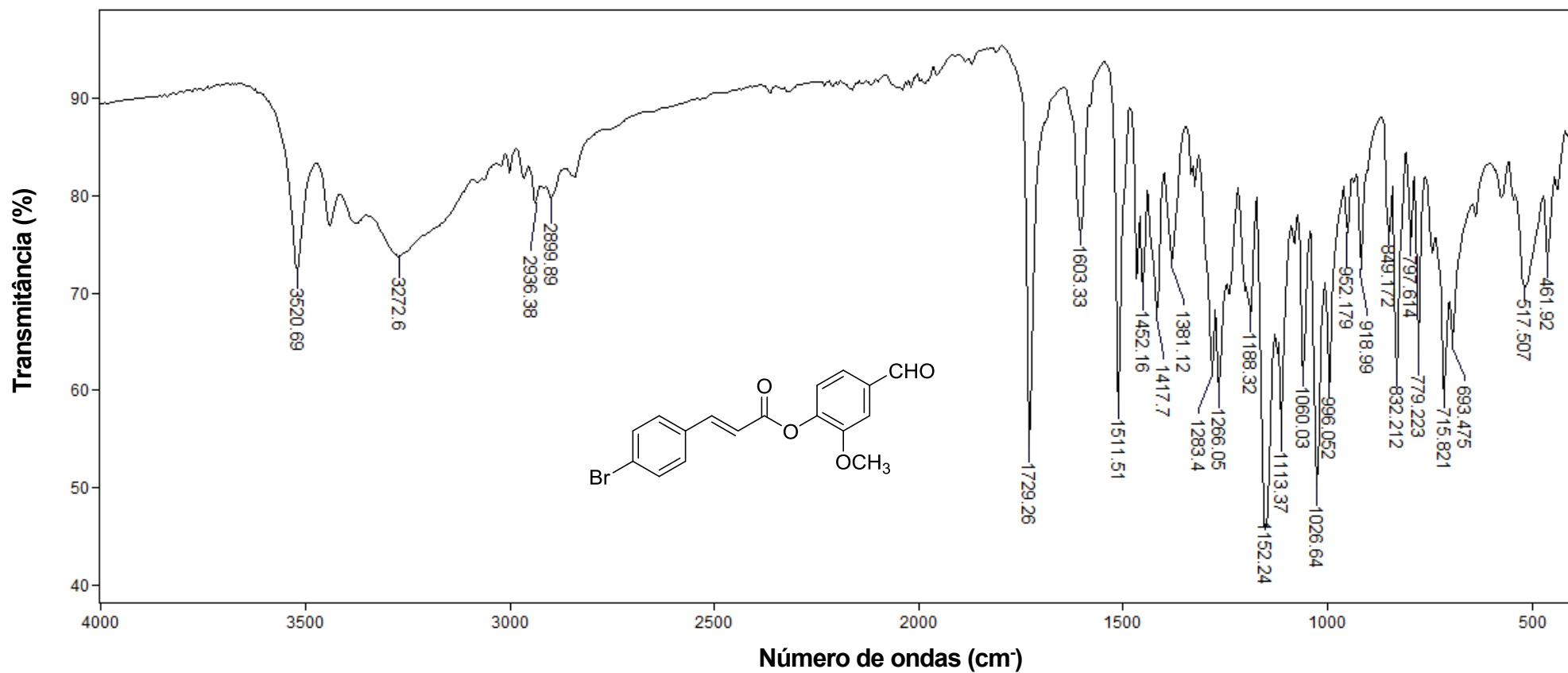


Figura 63: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 8.

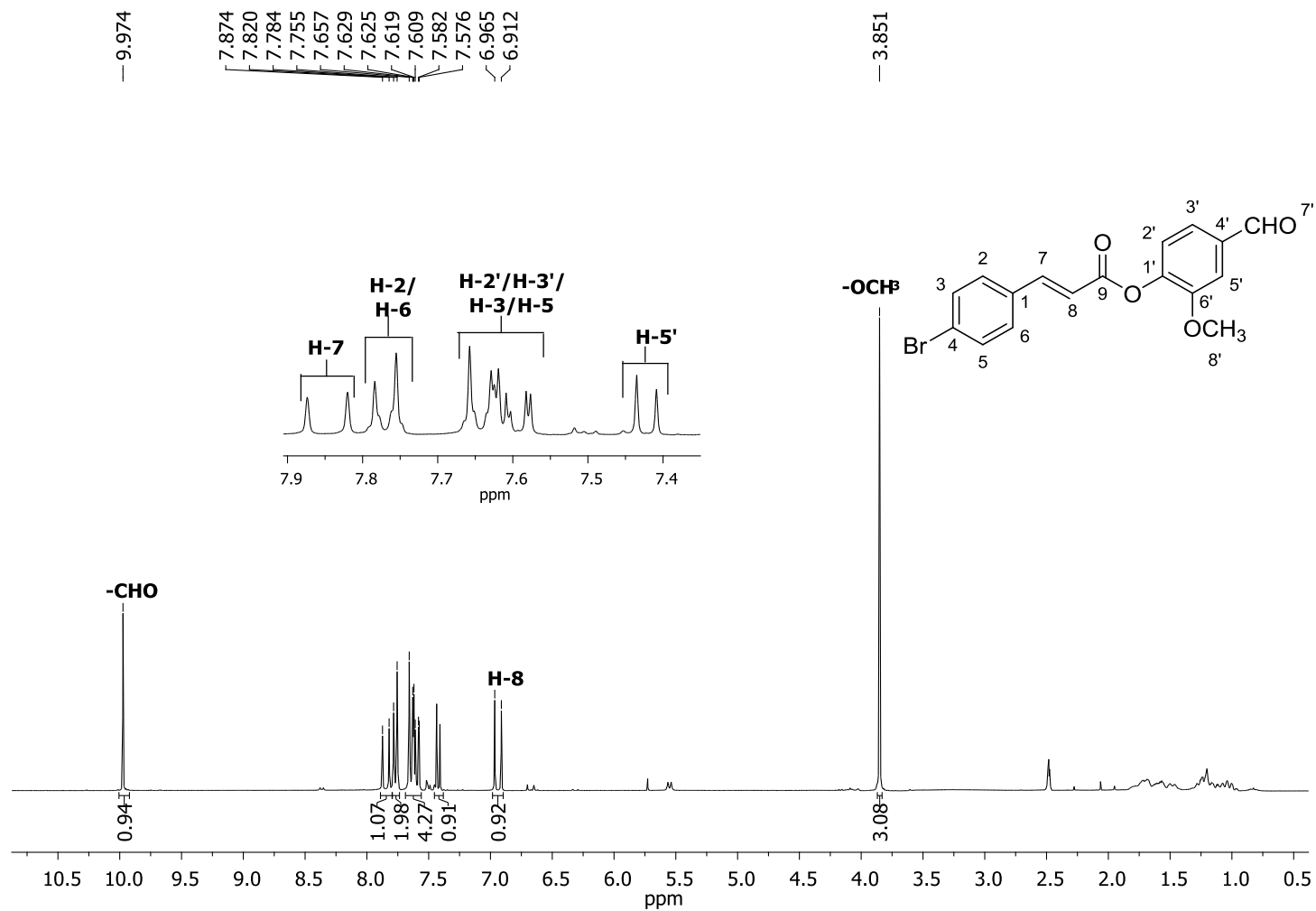


Figura 64: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **8**.

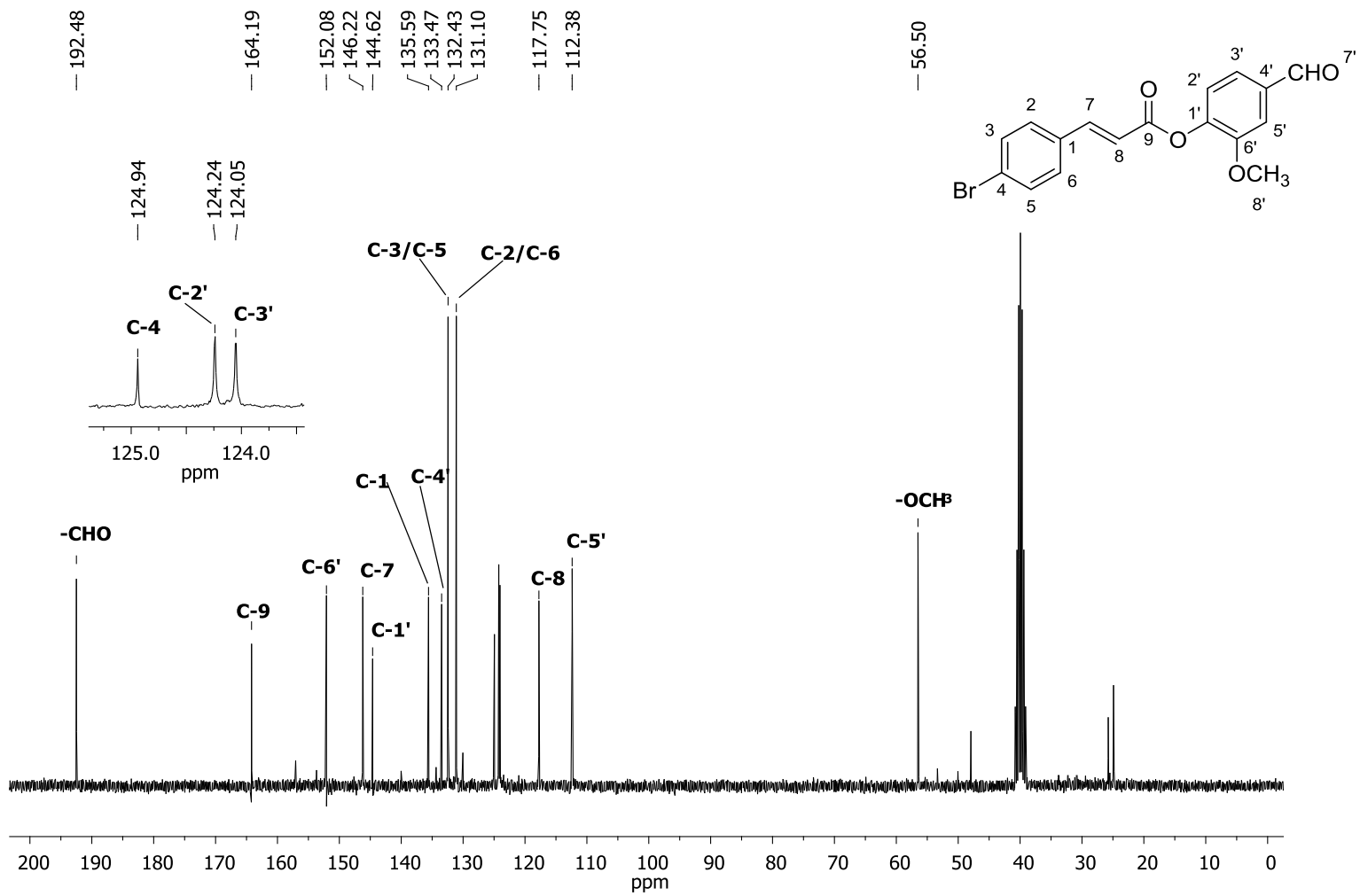


Figura 65: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do composto **8**.

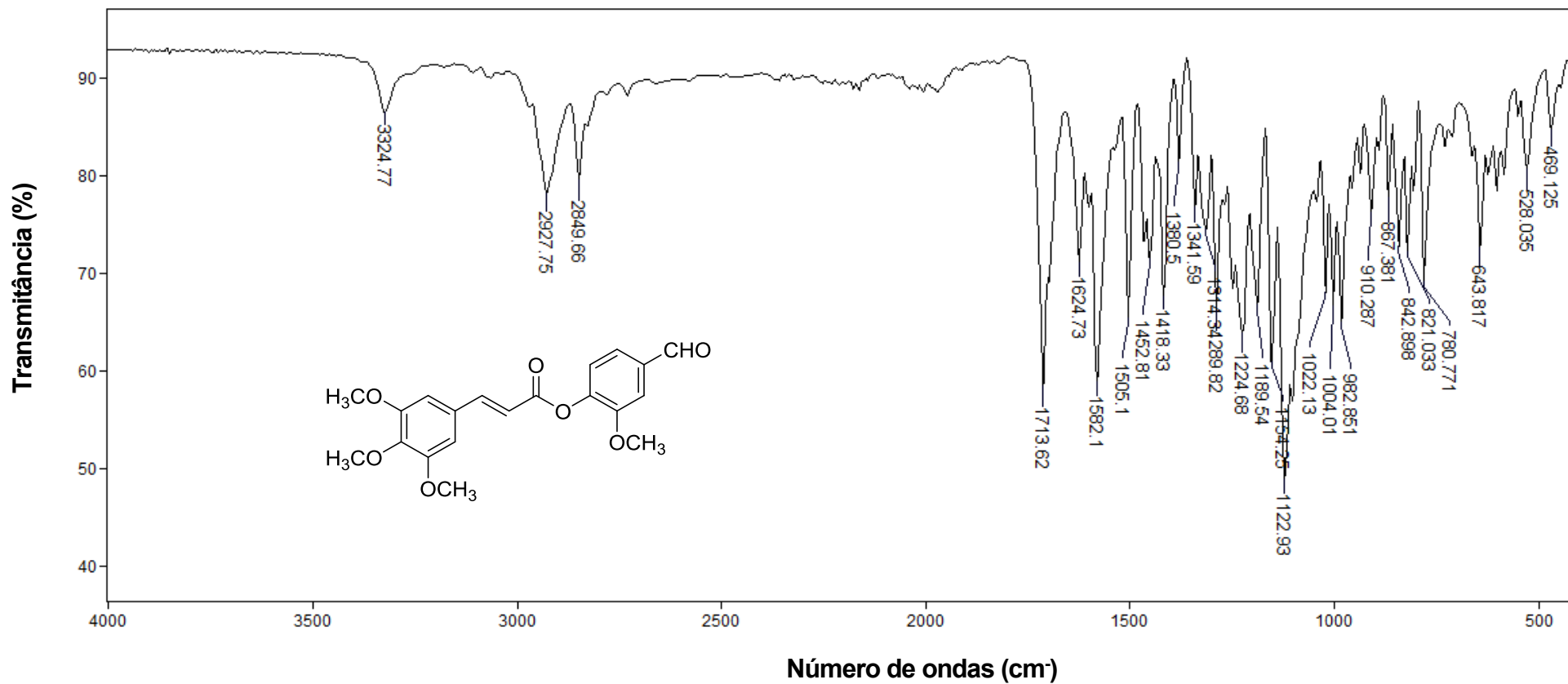


Figura 66: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 9.

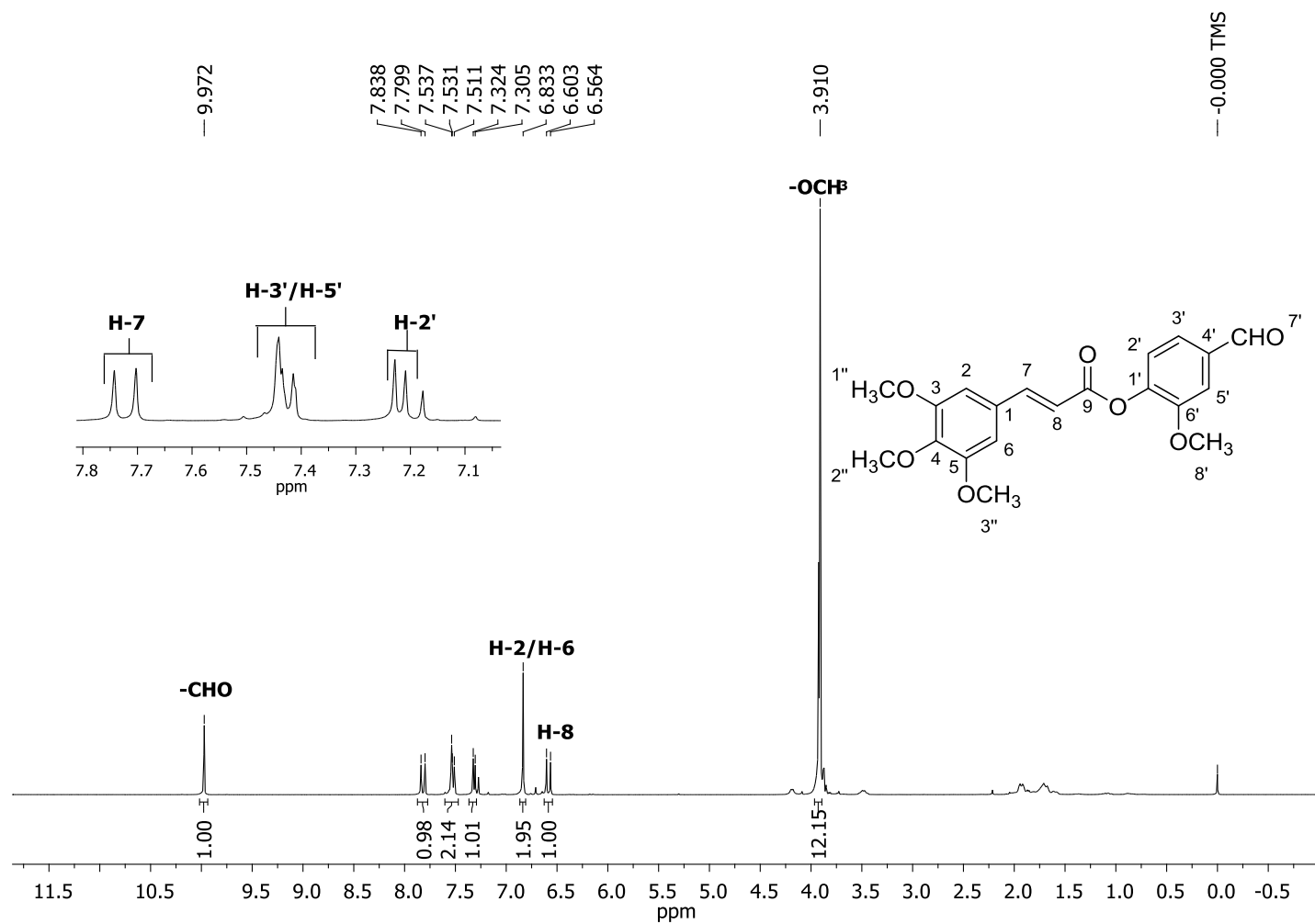


Figura 67: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **9**.

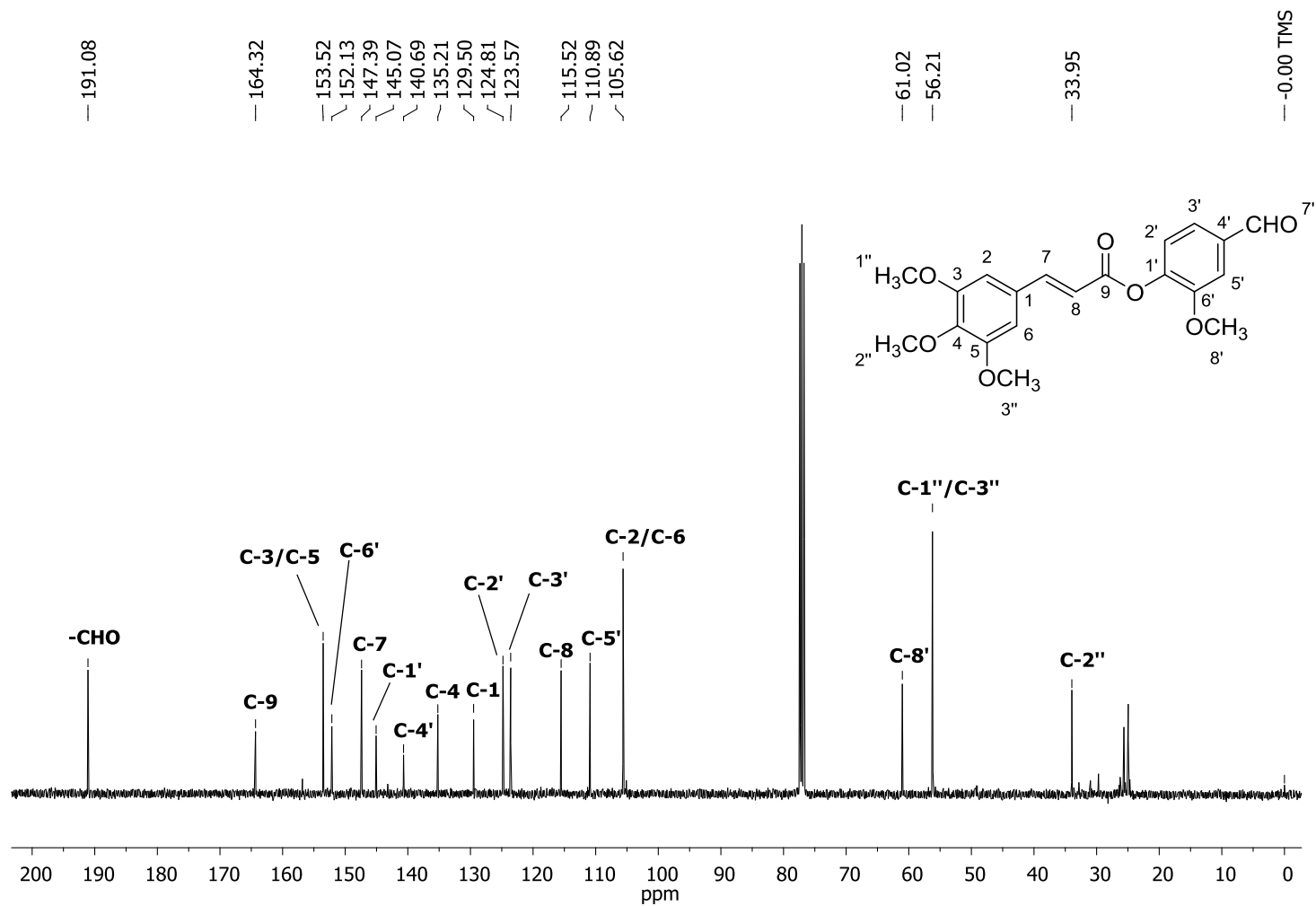


Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 9.

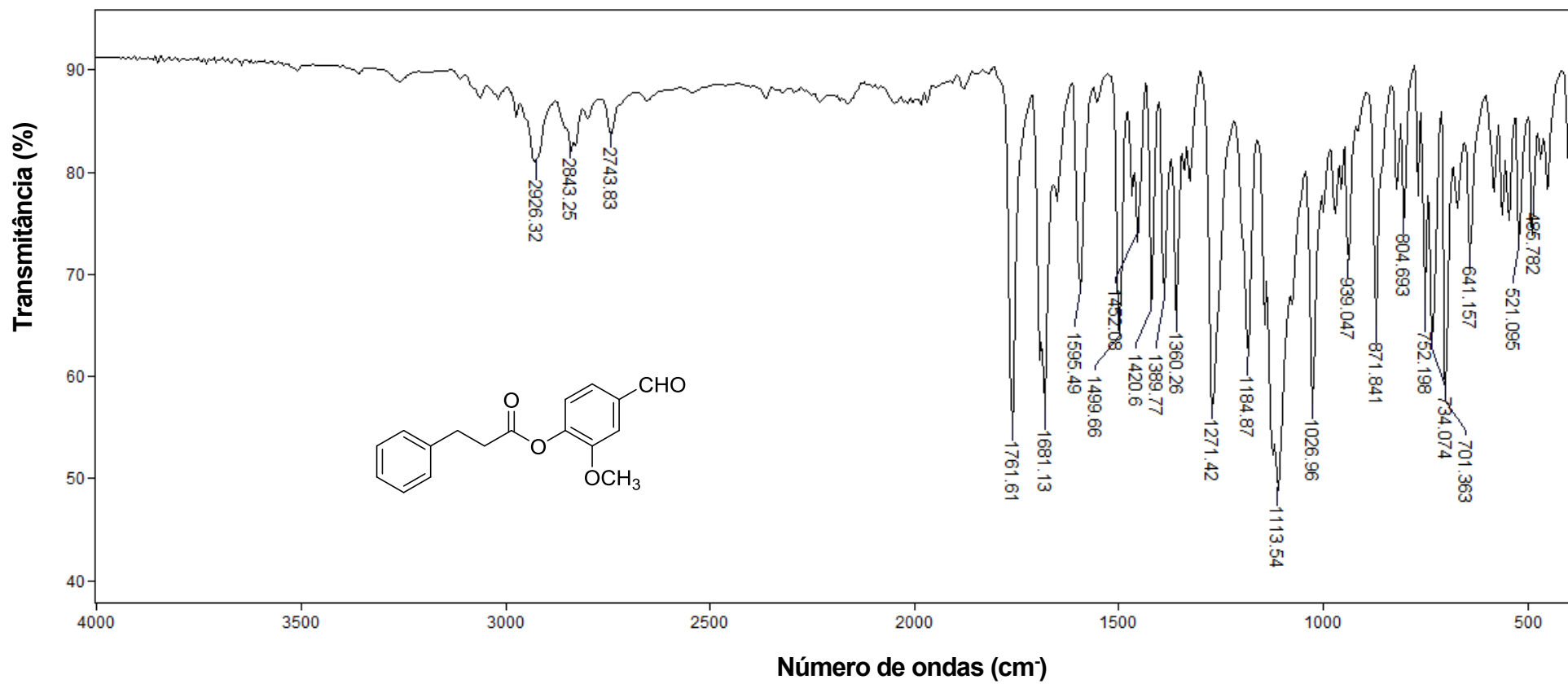


Figura 69: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 11.

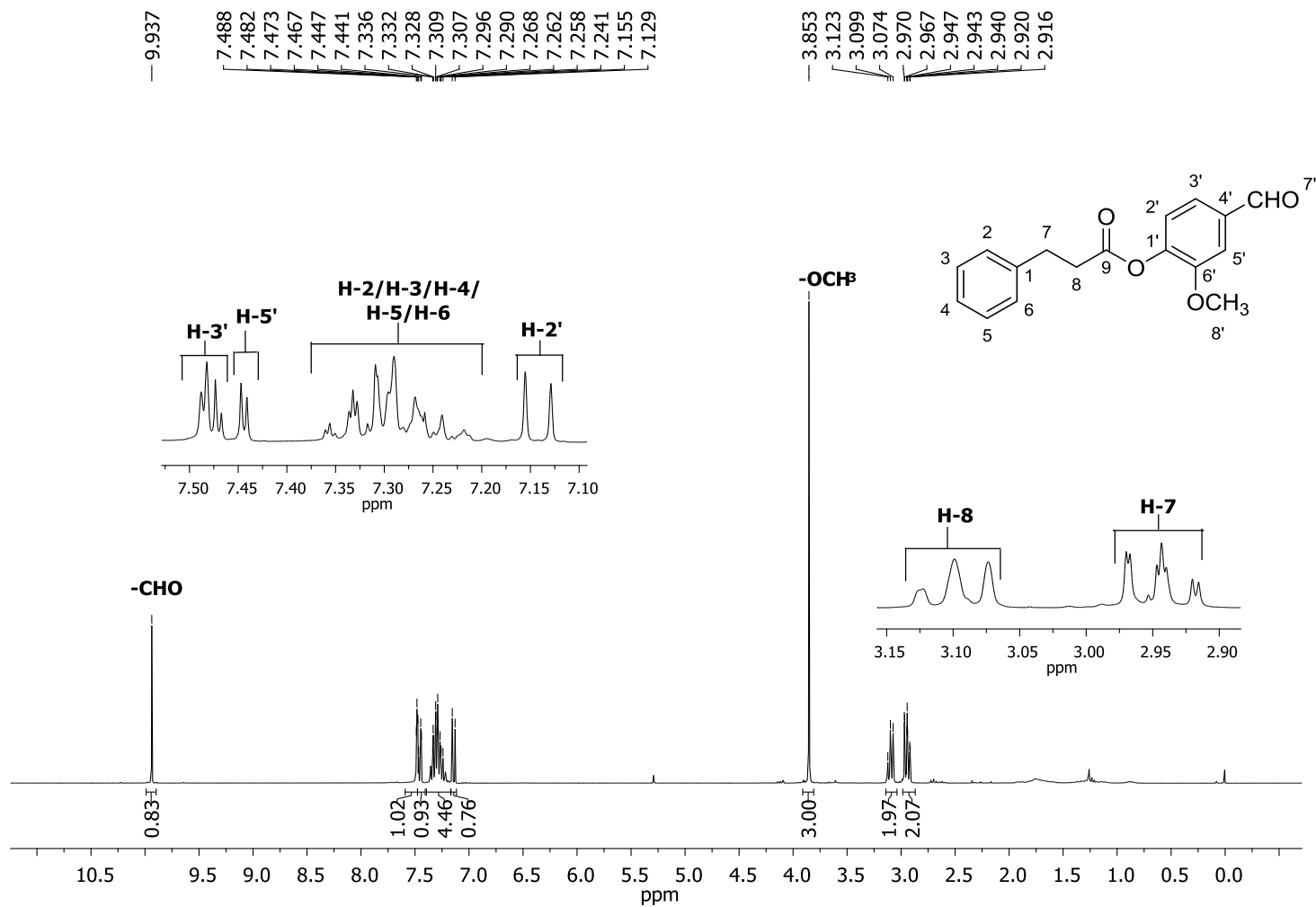


Figura 70: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **11**.

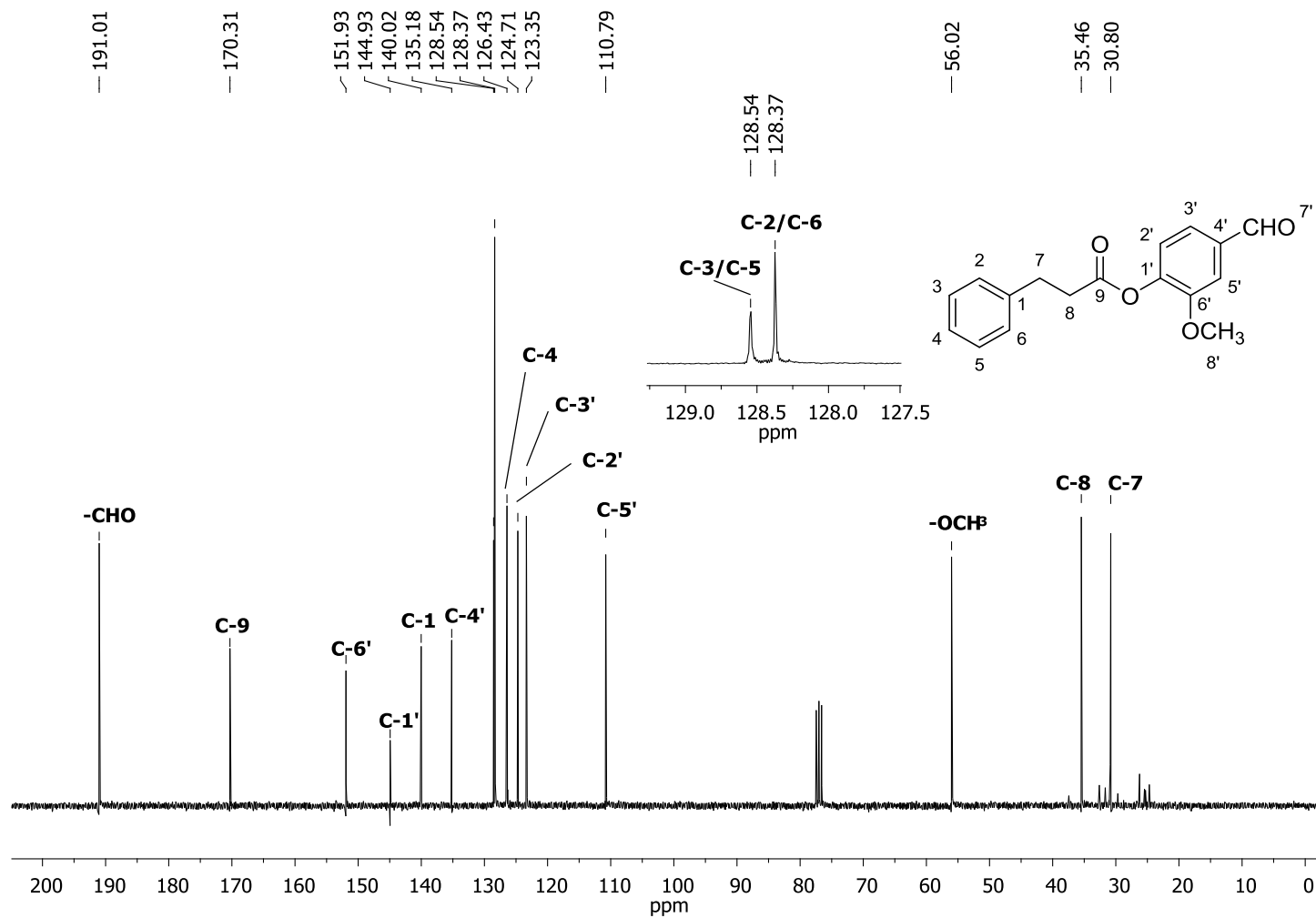


Figura 71: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 11.

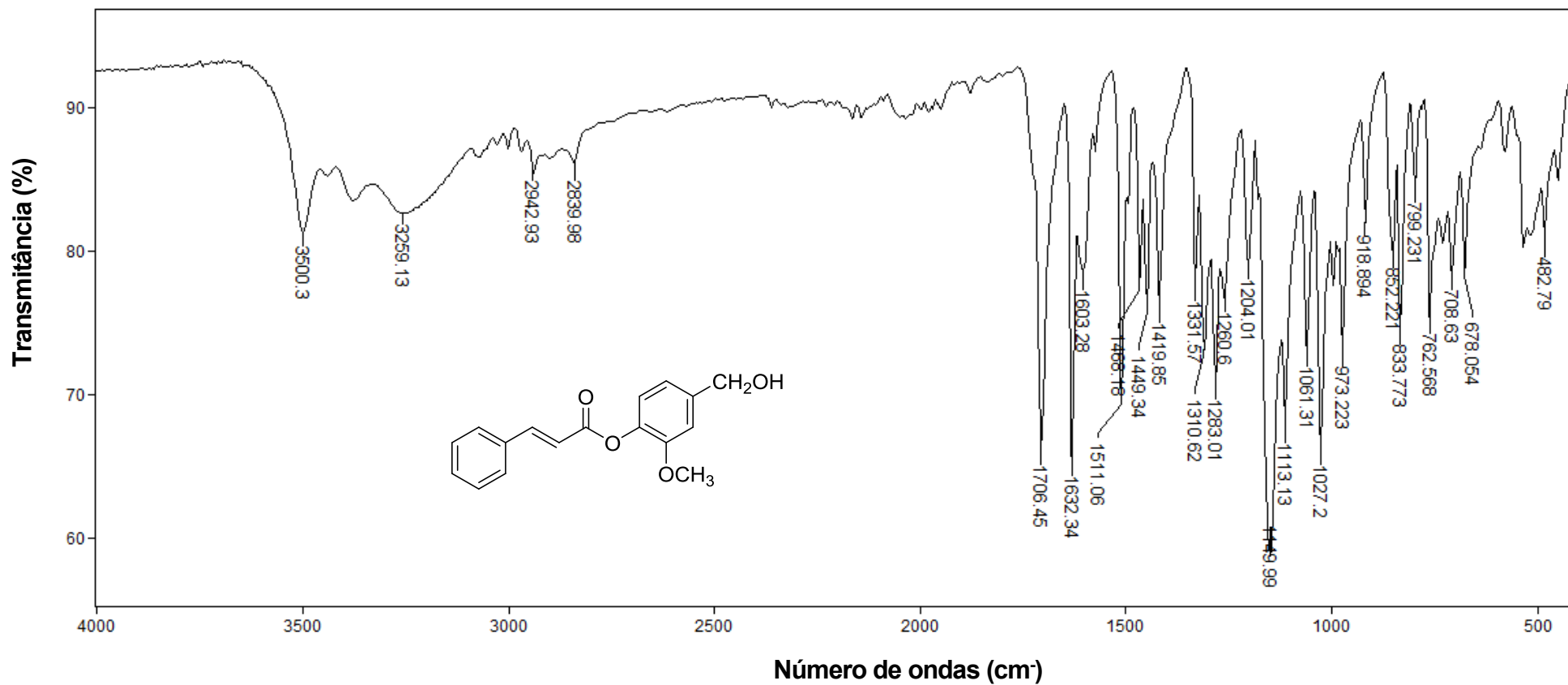


Figura 72: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 12.

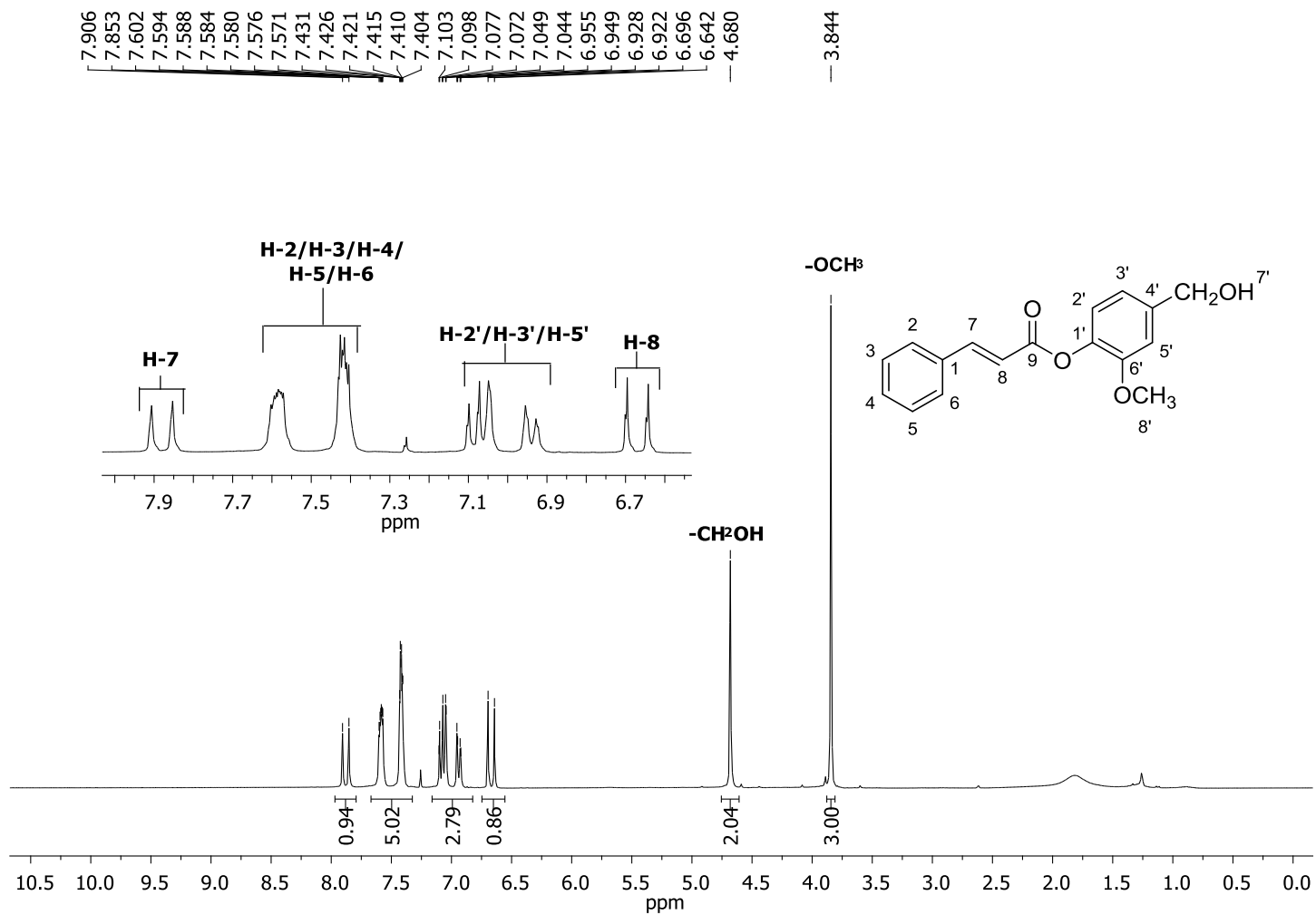


Figura 73: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **12**.

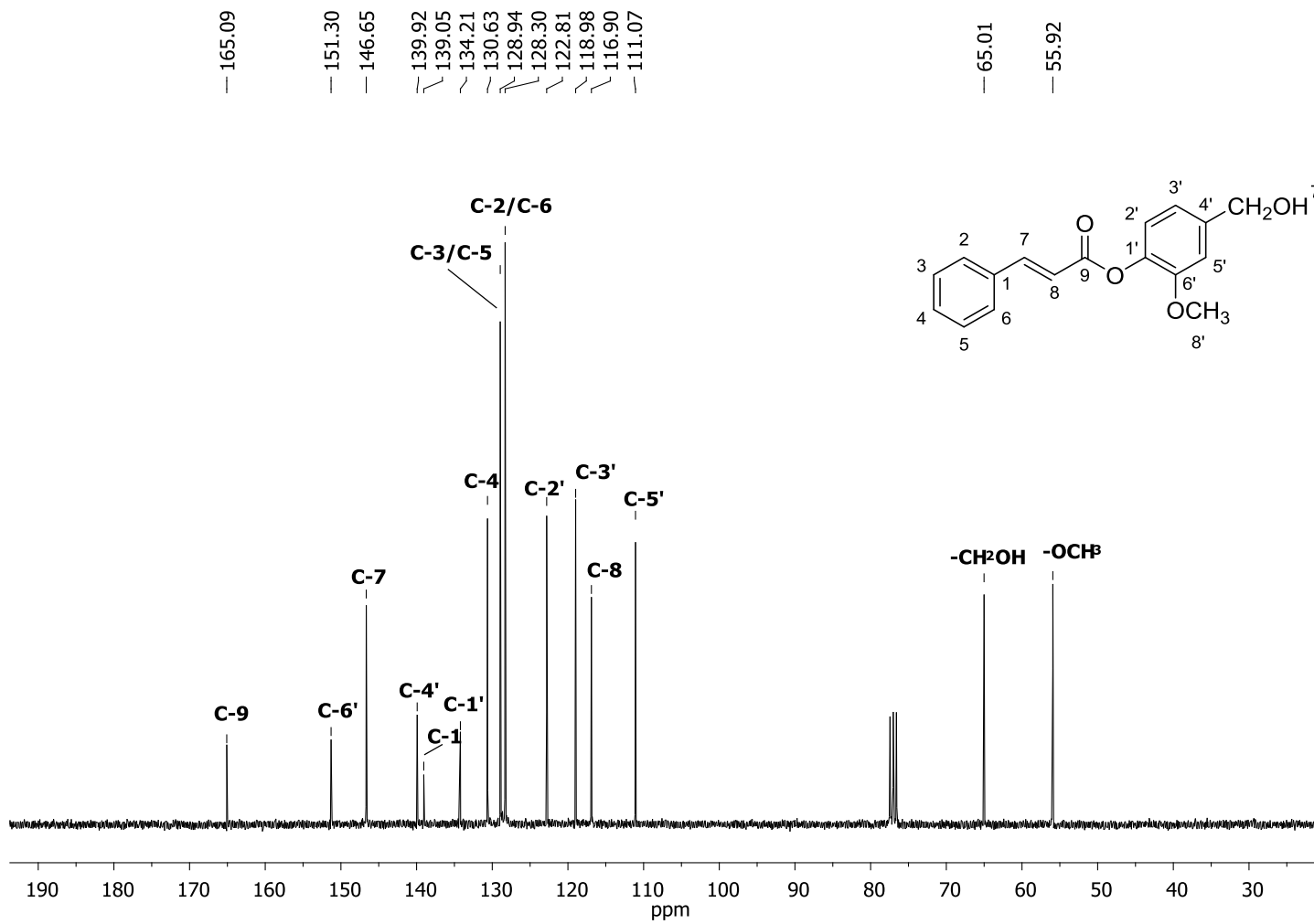


Figura 74: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 12.

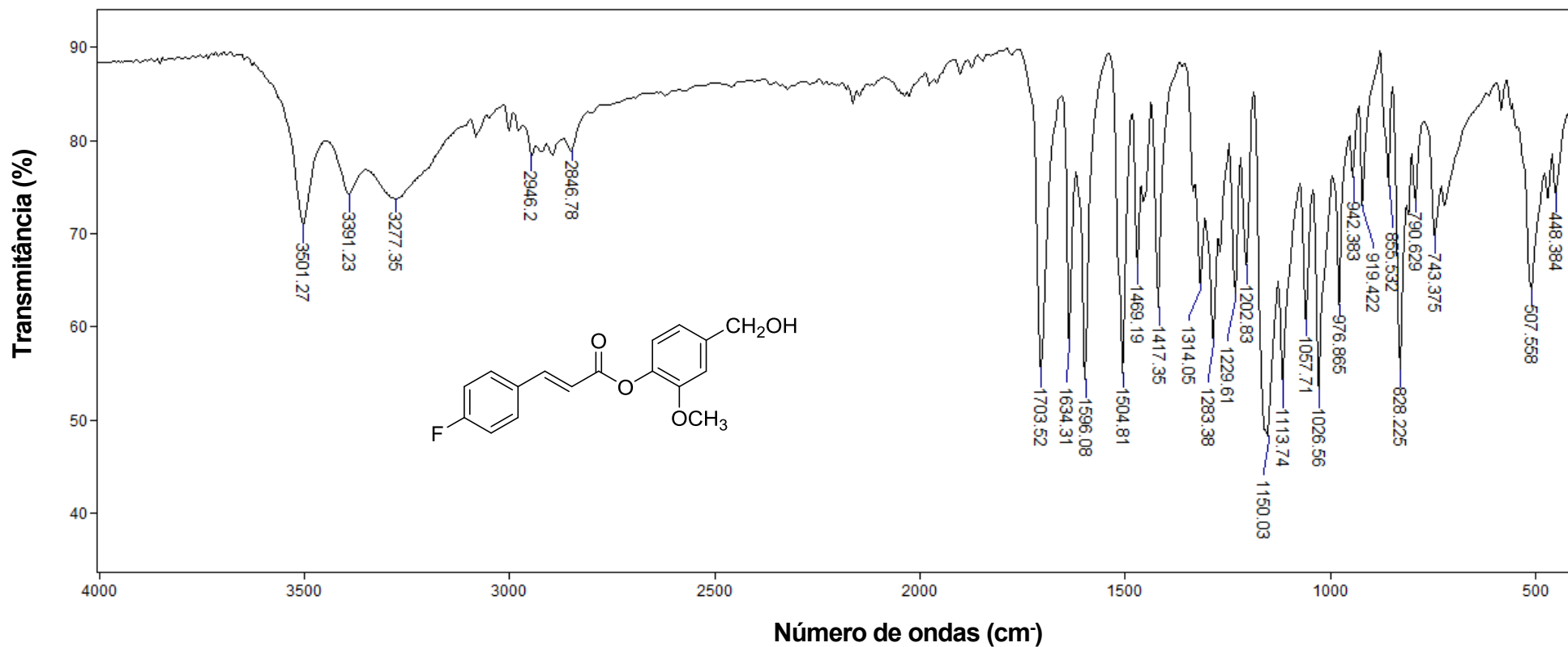


Figura 75: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 13.

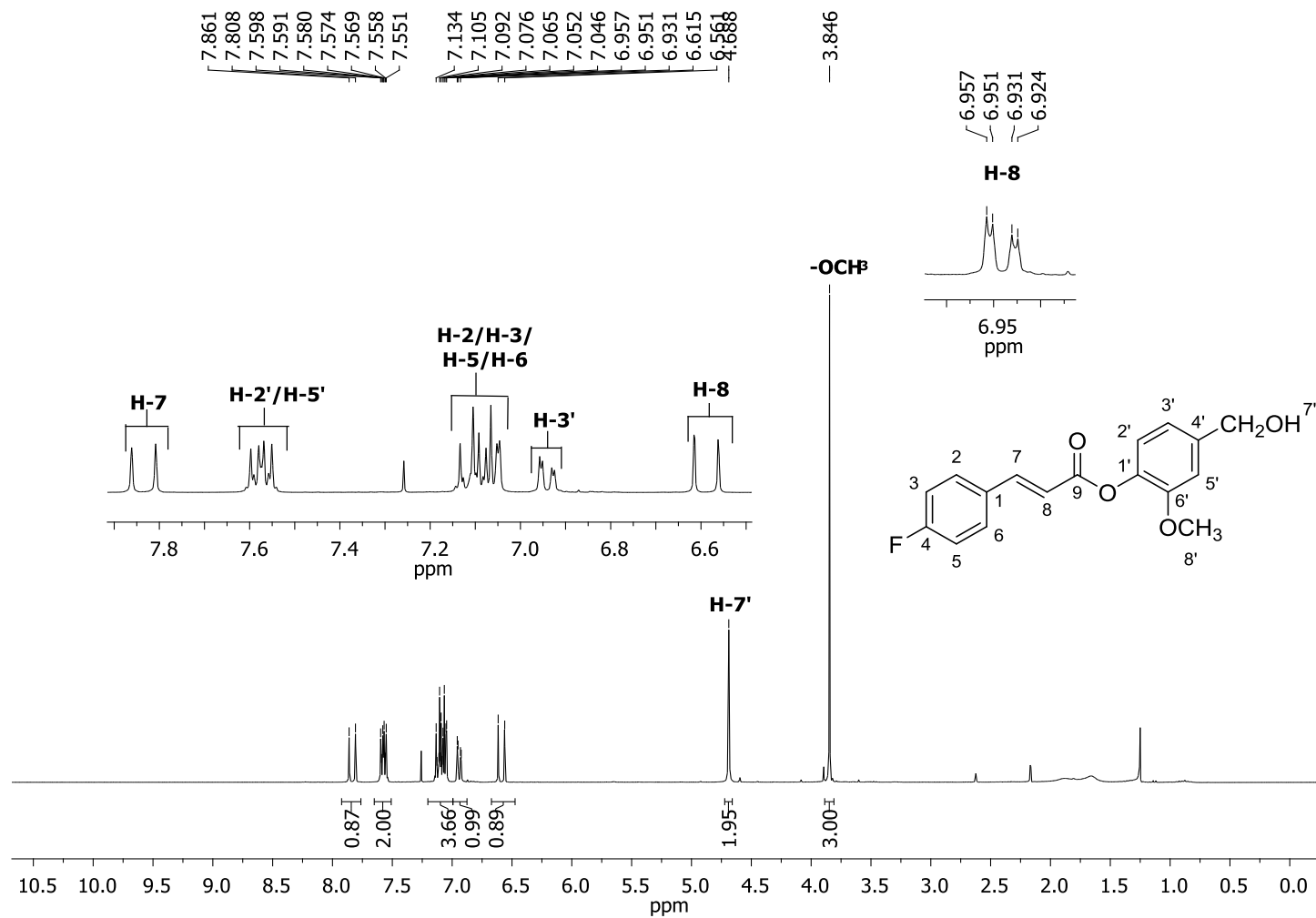


Figura 76: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **13**.

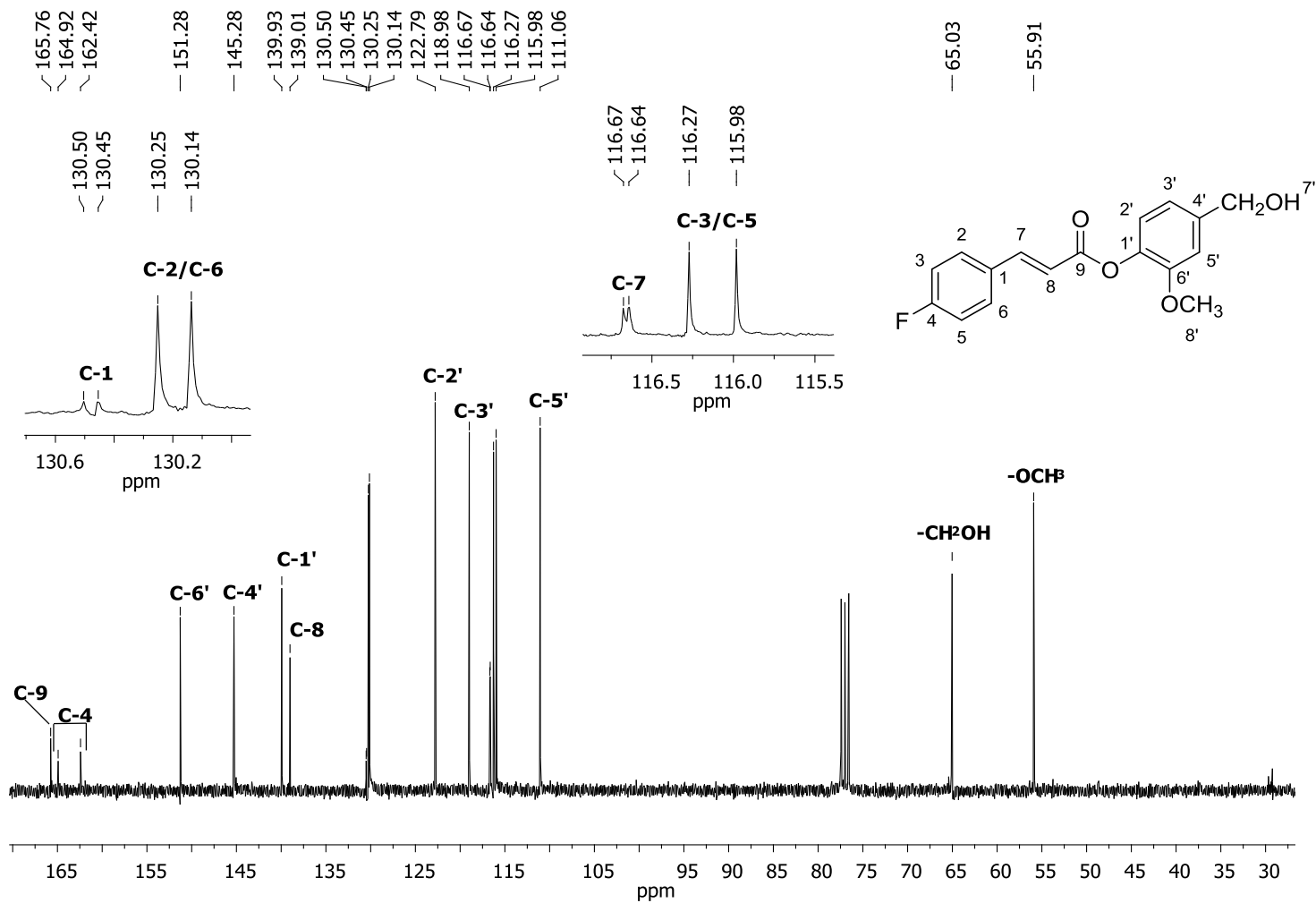


Figura 77: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 13.

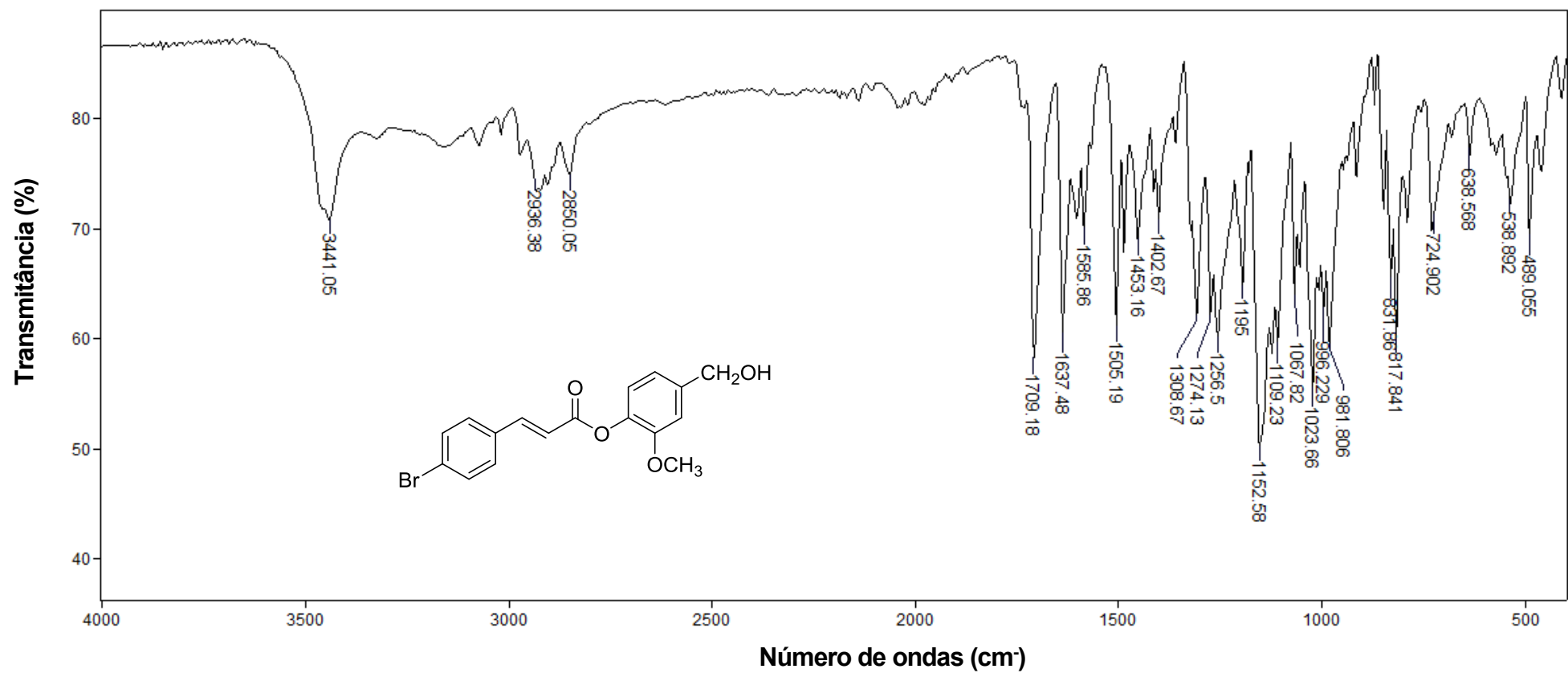


Figura 78: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 14.

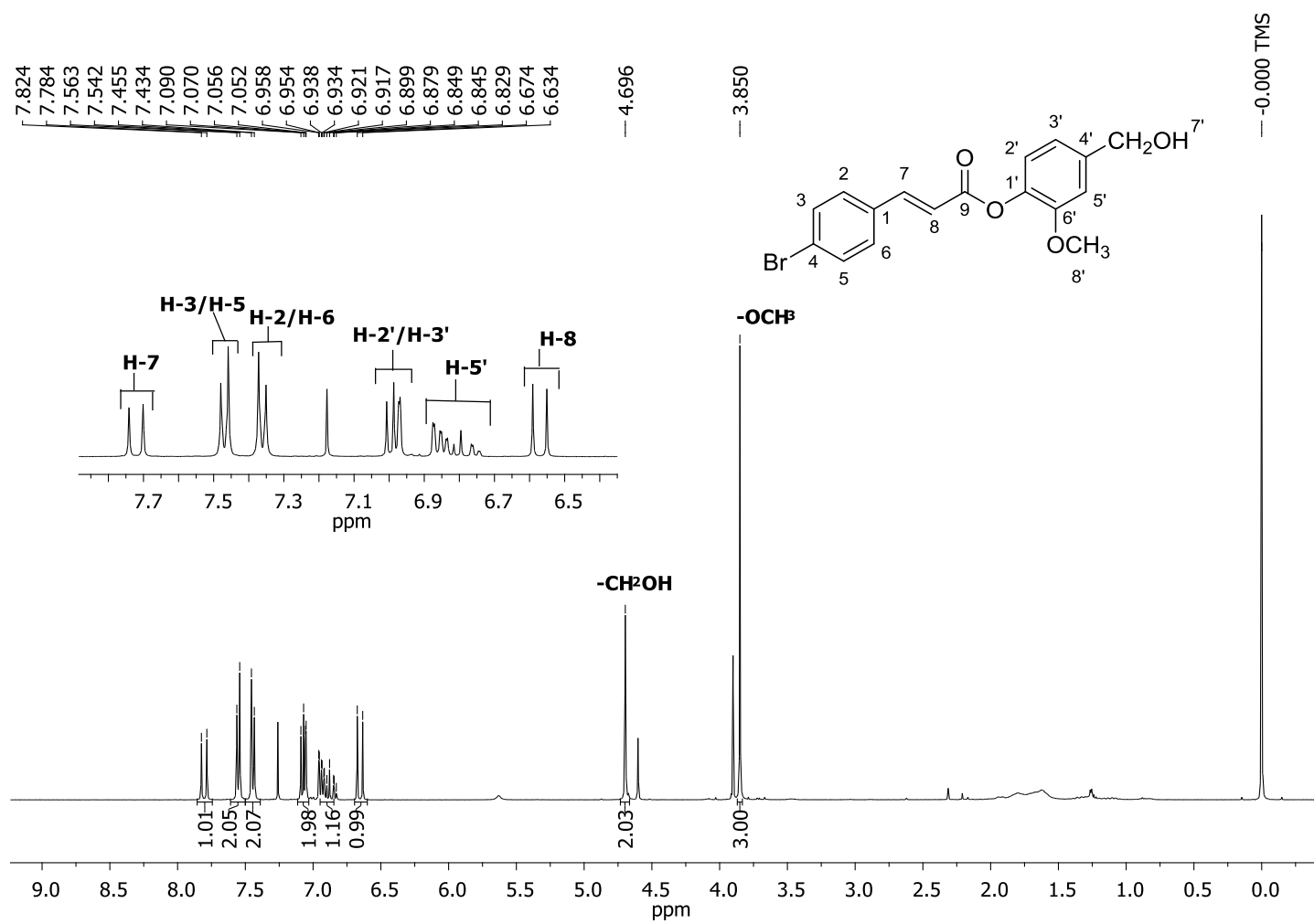


Figura 79: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto 14.

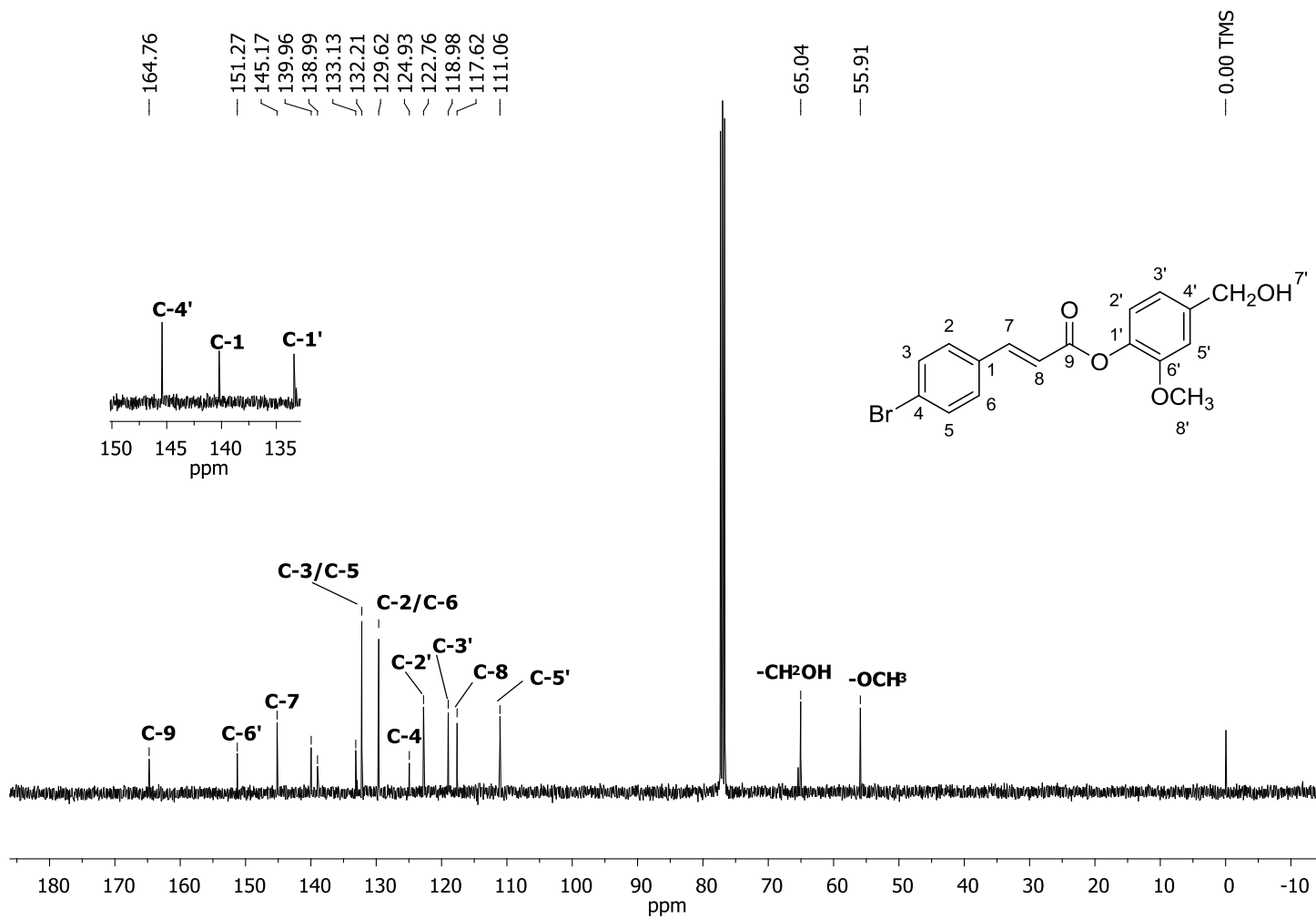


Figura 80: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 14.

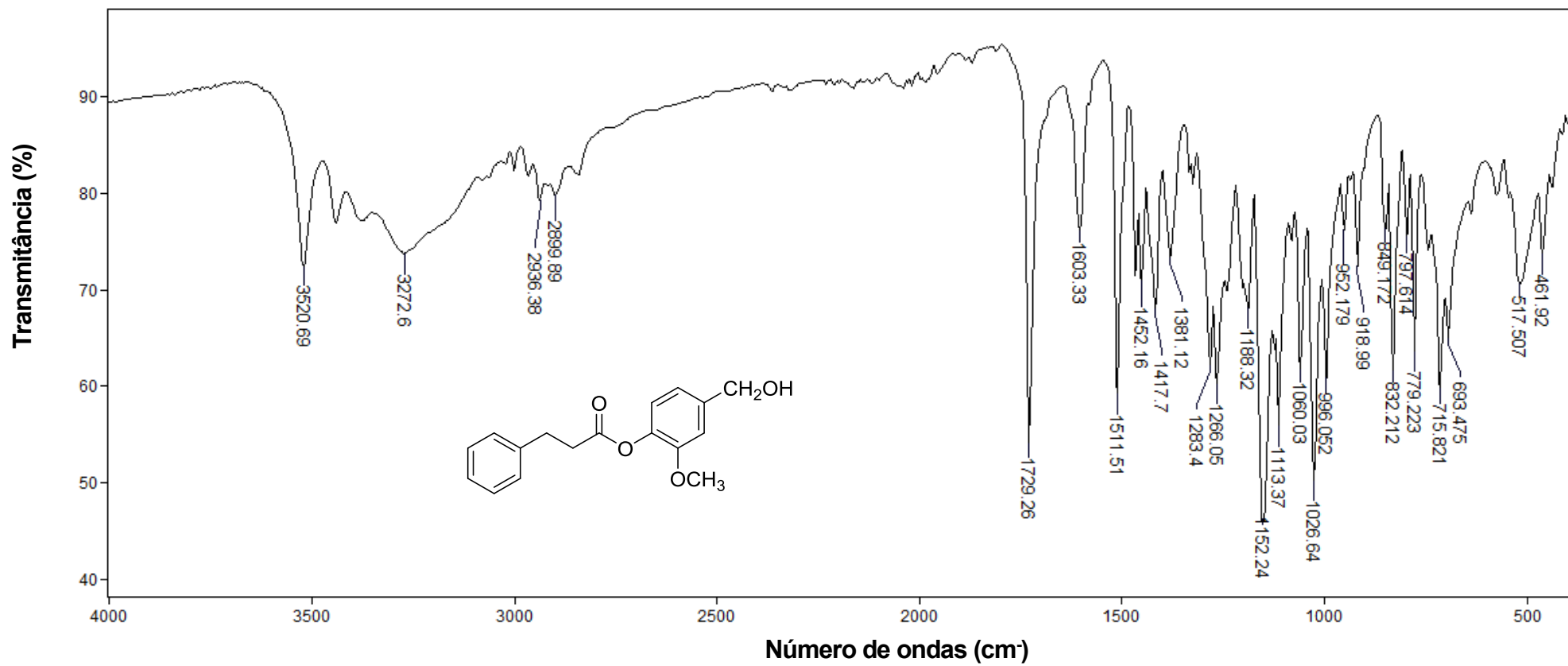


Figura 81: Espectro no infravermelho (ATR) do composto 16.

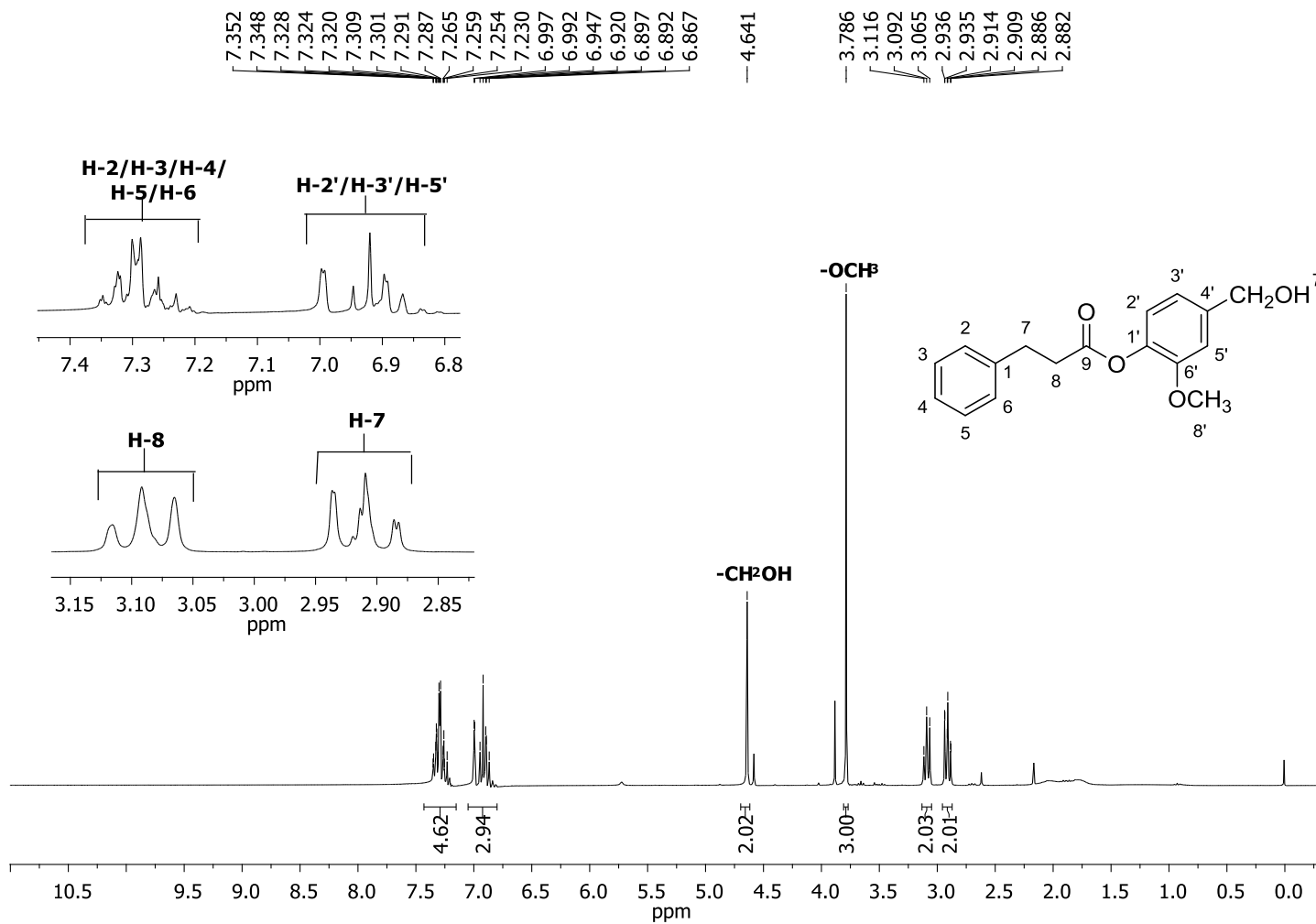


Figura 82: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto 16.

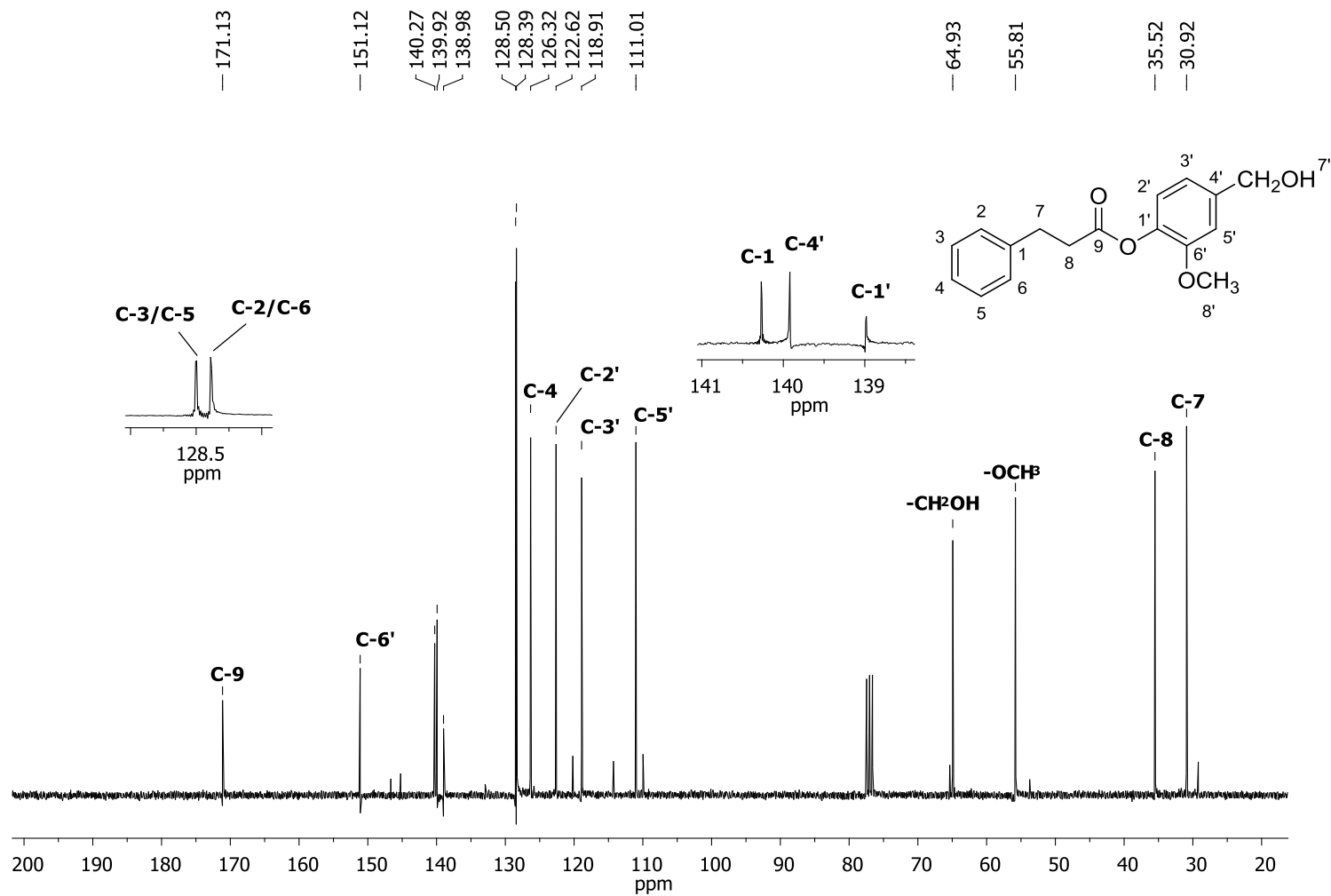


Figura 83: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 16.