

DEBORAH CAMPOS TOMAZ

**SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO E
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES LEISHMANICIDA E
ANTITUMORAL**

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

Orientador: Róbson Ricardo Teixeira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

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

T

Tomaz, Deborah Campos, 1989-
T655s Síntese de derivados do ácido cinâmico e avaliação das
2019 atividades leishmanicida e antitumoral / Deborah Campos
Tomaz. – Viçosa, MG, 2019.
172 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Inclui anexos.

Orientador: Robson Ricardo Teixeira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Ácido cinâmico. 2. Isobenzofuranona. 3. Sulfonamida.
4. 1,2,3-triazol. 5. Atividade biológica. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed.547.042

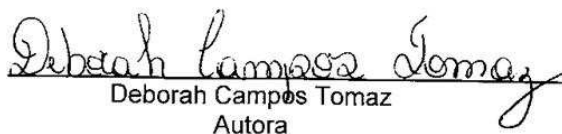
DEBORAH CAMPOS TOMAZ


**SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO E
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES LEISHMANICIDA E
ANTITUMORAL**

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

APROVADA: 22 de novembro de 2019.

Assentimento:


Deborah Campos Tomaz
Autora


Róbson Ricardo Teixeira
Orientador

Dedico essa tese aos meus queridos pais, Antônio e Neuza, que sempre me guiaram e incentivaram.

Ao meu irmão David, pela amizade e por sempre me incentivar a alcançar meus objetivos.

Ao meu namorado Lucas, pela amizade, companheirismo e por ser uma grande inspiração em minha vida

Aos meus amigos.

E a todos que sempre torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais pelo carinho, apoio e exemplo. O agradecimento é pequeno diante da grandeza de vocês que sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis, com incondicional carinho e dedicação.

Ao meu querido irmão, que sempre me incentivou a prosseguir.

Ao meu namorado, companheiro e amigo para todos os momentos, que sempre me incentivou e apoiou.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

Ao professor Róbson Ricardo Teixeira, pela dedicação, amizade, boa vontade, exacerbada paciência em atender às inúmeras dúvidas, por acalantar-me em momentos de aflição, e pelo incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos os meus amigos e familiares de Ponte Nova e Viçosa. Agradeço a todos pela torcida.

À professora Mariana Machado Neves (Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa - Viçosa) e ao seu grupo de pesquisa pela realização dos ensaios de citotoxicidade. Em particular, o meu agradecimento à doutoranda Juliana pelo apoio, esclarecimentos de dúvidas e amizade.

Aos amigos (as) e colegas do grupo de pesquisa GSPCB – Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos - pela colaboração, amizade e por deixarem o ambiente de trabalho muito mais agradável e prazeroso.

Aos demais colegas do laboratório 428, pela grande colaboração, por todos os favores prontamente prestados, pelo convívio divertido e alegre. E a todos os amigos e familiares que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

TOMAZ, Deborah Campos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2019. **Síntese de Derivados do Ácido Cinâmico e Avaliação das Atividades Leishmanicida e Antitumoral.** Orientador: Róbson Ricardo Teixeira.

O ácido cinâmico (e seus derivados), as porções isobenzofuranona, sulfonamida e 1,2,3-triazol, possuem várias bioatividades de interesse farmacológico. Assim, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar uma série de derivados do ácido cinâmico e avaliar as atividades leishmanicida e citotóxica. Os compostos sintetizados têm em estruturas as porções: cinamoíla 1,2,3-triazol, isobenzofuranona, e sulfonamida. Utilizando a reação de Knoevenagel, foram preparados os ácidos 4-fluorocinâmico, 4-metoxicinâmico, 3,4-dimetoxicinâmico, 3,4,5-trimetoxicinâmico, 4-bromocinâmico, 4-clorocinâmico e 4-nitrocinâmico todos apresentando estereoquímica *E*, confirmado pela espectroscopia de RMN de hidrogênio, com relação à dupla ligação. Os ácidos foram obtidos com rendimentos variando entre 71% e 95% e as reações foram realizadas empregando tanto aquecimento convencional quanto irradiação de microondas. Os cinamatos foram preparados via reação de Steglich entre os derivados do ácido cinâmico e os álcoois propargílico e pent-4-in-1-ol com rendimentos variando de 20% a 84%; e também, entre os derivados do ácido cinâmico e isobenzofuran-1(3*H*)-ona com rendimentos variando de 54% a 76%. A utilização da reação "Click" permitiu a síntese dos derivados do ácido cinâmico contendo o núcleo 1,2,3-triazol com rendimentos de 8 e 17%, respectivamente. A combinação de derivados do ácido cinâmico com grupos isobenzofuranona ou triazol resultou em compostos com atividade importante contra *L. braziliensis*, destacando-se o composto (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato. Imagens em microscopia eletrônica deste composto indicam autofagia, apoptose e presumivelmente necrose. Resultado este protegido em depósito de patente cujo número de processo é: BR1020190193441. Os ensaios de avaliação de citotoxicidade contra a linhagem B16-F10 na concentração de 100 µM revelaram que a maior atividade relaciona-se aos compostos contendo porções oxigenadas e um átomo de bromo.

Palavras-chave: Cinâmico. Isobenzofuranona. Sulfonamida. 1,2,3-triazol. Bioatividades.

ABSTRACT

TOMAZ, Deborah Campos, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2019. **Synthesis of Cinnamic Acid Derivatives and Evaluation of Leishmanicidal and Antitumor Activities.** Advisor: Róbson Ricardo Teixeira.

Cinnamic acid (and its derivatives), isobenzofuranone, sulfonamide and 1,2,3-triazole moieties have various bioactivities of pharmacological interest. Thus, the present work aimed to synthesize a series of cinnamic acid derivatives and to evaluate leishmanicidal and cytotoxic activities. The synthesized compounds have general structures where the moieties are: cinnamoyl, 1,2,3-triazole, isobenzofuranone, and sulfonamide. Using the Knoevenagel reaction, 4-fluorocinnamic acid, 4-methoxycinnamic acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid, 3,4,5-trimethoxycinnamic acid, 4-bromocinnamic acid, 4-chlorocinnamic acid and 4-nitrocinnamic acid were prepared, all confirmed by stereochemistry using proton NMR spectroscopy regarding the double bond. The acids were obtained with yields ranging from 71% to 95% and the reactions were performed using both conventional heating and microwave irradiation. Cinnamates were prepared via the Steglich reaction between cinnamic acid derivatives and propargylic and pent-4-yn-1-ol alcohols in yields ranging from 20% to 84%; and also among cinnamic acid derivatives and isobenzofuran-1 (3*H*)-one in yields ranging from 54% to 76%. The use of the Click reaction allowed the synthesis of the cinnamic acid derivatives containing the 1,2,3-triazole nucleus in yields of 8 and 17%, respectively. The combination of cinnamic acid derivatives with isobenzofuranone or triazole groups resulted in compounds with important activity against *L. braziliensis*, especially compound (E)-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl- (3,4,5-trimethoxy) cinnamate. Electron microscopy images of this compound indicate autophagy, apoptosis and presumably necrosis. This result has been protected as a patent deposit whose case number is: BR1020190193441. Cytotoxicity assays for the 100 μ M B16-F10 strain revealed that the highest activity was related to compounds containing oxygenated moieties and a bromine atom.

Keywords: Cinnamic. Isobenzofuranone. Sulfonamide. 1,2,3-triazole. Bioactivities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura do ácido cinâmico (1). A dupla ligação apontada pela seta apresenta, tipicamente, configuração <i>trans</i> no ácido cinâmico e seus derivados encontrados na natureza.....	12
Figura 1.2 - Fontes naturais como a canela, o café e a maçã onde o ácido cinâmico (1) é encontrado.....	13
Figura 1.3 - Exemplos de derivados do ácido cinâmico bioativos.....	14
Figura 1.4 - Estrutura básica de uma isobenzofuranona.....	16
Figura 1.5 - Estrutura da porção sulfonamida utilizada neste trabalho.....	16
Figura 1.6 - Exemplos de estrutura de triazóis.....	17
Figura 2.1 - Fêmea do inseto vetor flebotomíneo. Os insetos geralmente não ultrapassam 0,5 cm de comprimento. Possuem pernas longas e delgadas, o corpo densamente piloso. Quando em repouso, mantêm a posição característica, com asas entreabertas e levantadas. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE.....	21
Figura 2.2 - Ciclo de transmissão do parasito causador da leishmaniose (Adaptado da referência 65).....	22
Figura 2.3 - Casos confirmados de leishmaniose tegumentar no Brasil no ano de 2017. Fonte: Ministério da Saúde/SVS.....	24
Figura 2.4 - Fármacos que têm sido empregados no tratamento das leishmanioses..	25
Figura 3.1 - Estrutura de alguns agentes alquilantes.....	41
Figura 3.2 - Estrutura de alguns quimioterápicos empregados no tratamento do câncer.....	42
Figura 3.3 - Estruturas dos compostos tanchinona IIA (7) e o ginsenosídeo Rg1 (8)...	43
Figura 3.4 - Estrutura geral dos derivados do ácido cinâmico investigados por Zhang e colaboradores e do derivado que apresentou maior atividade antiproliferativa e inibitória enzimática.....	44
Figura 3.5 – Estrutura das amidas 11-14 e do ácido kójico. A porção cinamoíla é destacada em vermelho. As amidas possuem como característica estrutural comum a presença de um ou dois grupos hidroxila ligados à porção aromática da porção cinamoíla.....	45
Figura 3.6 - Estrutura do CAPE (15) e ácido romarínico (16).....	47
Figura 3.7 - Estrutura do composto 17. Este derivado do ácido cinâmico contendo um fragmento 1,2,3-triazol destacado em vermelho possui significativa atividade antimetastática e antiproliferativa contra células B16F-10.....	47
Figura 3.8 - Espectro no infravermelho (ATR) para o composto 29.....	72
Figura 3.9 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) para o composto 29.....	73
Figura 3.10 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) para o composto 29.....	74
Figura 3.11 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto 34.....	76
Figura 3.12 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto 34.	77
Figura 3.13 - Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ /DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto 35.....	83
Figura 3.14 - Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄ /DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto 35.....	84
Figura 3.15- Compostos avaliados contra as células B16-F10.....	87
Figura 3.16- Efeito citotóxico dos compostos triazólicos derivados da cinâmico contra a linhagem B16-F10 na concentração de 100 µM.....	87

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 3.1 - Plano sintético idealizado para a síntese dos compostos de estrutura geral (I). Estão destacados na estrutura de I as porções cinamoíla (em azul), 1,2,3-triazol (em vermelho) e sulfonamida (verde).....	48
Esquema 3.2 - Mecanismo proposto envolvido formação dos compostos 18-24 . Ar = 4-fluorofenila (18); 3,4,5-trimetoxifenila (19); 3,4-dimetoxifenila (20); 4-bromofenila (21); 4-clorofenila (22); 4-nitrofenila (23).....	62
Esquema 3.3 - Proposta mecanística para a formação dos compostos 24-33	68
Esquema 3.4 - Conversão da O-acil-isouréia em N-acil-isouréia em reações lentas na ausência de DMAP.....	69
Esquema 3.5 - Preparação da 4-azidobenzenesulfonamida (34). A sulfanilamida foi tratada com azida de sódio e nitrito de terc-butila em álcool <i>t</i> -butílico. A reação foi conduzida à temperatura ambiente e resultou na obtenção do composto 34 em 63% de rendimento.....	75
Esquema 3.6 - Reação entre uma azida orgânica (estrutura geral mostrada em vermelho) e um alcino terminal (estrutra geral mostrada em azul) na presença de Cu(I) forma exclusivamente o regioisômero 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído. O anel 1,2,3-triazol é destacado em verde.....	78
Esquema 3.7 - Reação de Huisgen entre uma azida orgânica e um alcino terminal. A reação corresponde a um processo térmico de cicloadição 1,3-dipolar e forma uma mistura de compostos 1,2,3-triazol regioisoméricos.....	79
Esquema 3.8 - Ciclo catalítico proposto para a reação CuAAC.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações relativas às reações realizadas para a preparação dos compostos 24 a 33	65
Tabela 2 - Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 29 obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

DCC	<i>N,N</i> -dicicloexilcarbodiimida
DIC	<i>N,N</i> - diisopropilcarbodiimida
DMAP	4- <i>N,N'</i> -dimetilaminopiridina
Å	Angström
AC	Aquecimento Convencional
ATR	Reflectância Total Atenuada
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
δ	Deslocamento químico
Hz	Hertz
IM	Irradiação de micro-ondas
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
m	Multiplete
MHz	Megahertz
m/v	Massa/volume
P.A.	Para análise
ppm	Partes por milhão
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
s	Simpleto
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
T _f	Temperatura de fusão
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: APRESENTAÇÃO	12
1.1 Ácido cinâmico e derivados: fontes de inspiração para o desenvolvimento de novos princípios bioativos	12
1.2 Derivados do ácido cinâmico e bioatividades.....	13
1.3 Associação de fragmentos bioativos: uma importante estratégia na busca de novos compostos e prospecção de suas bioatividades.....	15
1.4 Motivação deste trabalho	18
CAPÍTULO 2: SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO CONTENDO AS PORÇÕES ISOBENZOFURANONA E 1,2,3 TRIAZOL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	20
2.1 Leishmaniose.....	20
2.2 Formas Clínicas e Tratamento.....	22
CAPÍTULO 3: SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO CONTENDO AS PORÇÕES 1,2,3 TRIAZOL E SULFONAMIDA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	40
3.1 O Câncer.....	40
3.2 Ácido cinâmico e derivados como fonte de inspiração para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos	43
3.3 Material e métodos.....	49
3.3.1 Generalidades Metodológicas	49
3.3.2 Procedimentos Sintéticos.....	50
3.3.2.1 Síntese de ácidos cinâmicos substituídos	50
3.3.2.2 Síntese de ésteres cinamatos exemplificado pela síntese do (<i>E</i>)-cinamato de prop-2-inila (24)	51
3.3.2.3 (<i>E</i>)-Cinamato de pent-4-inila	52
3.3.2.4 (<i>E</i>)-3,4,5-Trimetoxicinamato de prop-2-inila	53
3.3.2.5 (<i>E</i>)-3,4,5-Trimetoxicinamato de pent-4-inila	53
3.3.2.6 (<i>E</i>)-3,4-Dimetoxicinamato de prop-2-inila	54
3.3.2.7 (<i>E</i>)-4-Fluorocinamato de prop-2-inila.....	55
3.3.2.8 (<i>E</i>)-4-Fluorocinamato de pent-4-inila.....	55
3.3.2.9 (<i>E</i>)-4-Bromocinamato de prop-2-inila	56
3.3.2.10 (<i>E</i>)-4-bromocinamato de pent-4-inila.....	57
3.3.2.11 (<i>E</i>)-4-Clorocinamato de prop-2-inila	58
3.3.3.1 Síntese da 4-azidobenzenosulfonamida.....	59
3.3.3.2 Síntese do (<i>E</i>)- Cinamato de (1-(4-sulfamoilfenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il) metil60	
3.3.3.3 (<i>E</i>)- Cinamato de (1-(4-sulfamoilfenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)metil 3-(3,4,5)-trimetoxifenil	61
3.4 Resultados e discussão	62
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	85
3.5.1 MATERIAL E MÉTODOS	85
3.5.2 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)	85
3.5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
ANEXO I.....	89
ANEXO II.....	119
Depósito de Patente intitulado: Composições à base de derivado do ácido cinâmico com atividade leishmanicida e uso.....	119
Relatório descritivo.....	131
ANEXO III.....	151
CAPÍTULO DE LIVRO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....	151

CAPÍTULO 1: APRESENTAÇÃO

1.1 Ácido cinâmico e derivados: fontes de inspiração para o desenvolvimento de novos princípios bioativos

O ácido cinâmico (1) (Figura 1.1) consiste em um ácido carboxílico aromático de ocorrência natural, presente em plantas superiores. Esta substância e seus derivados são normalmente encontrados na natureza com a configuração *trans* com respeito à dupla ligação ligada diretamente ao grupo carboxila.

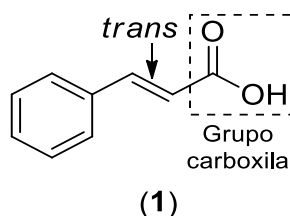


Figura 1.1 - Estrutura do ácido cinâmico (1). A dupla ligação apontada pela seta apresenta, tipicamente, configuração *trans* no ácido cinâmico e seus derivados encontrados na natureza.

Trata-se de uma substância pertencente 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 microrganismos e insetos¹. Em termos de biossíntese, o ácido cinâmico é resultante da desaminação da fenilalanina nos tecido vegetais². Ele possui estrutura cristalina e é solúvel em vários solventes orgânicos.

O termo “cinâmico” deriva-se da especiaria canela (*Cinnamomum zeilanicum*) que tem sido usada pela humanidade desde a antiguidade. Os derivados do ácido cinâmico (1) ocorrem amplamente em plantas superiores, distribuídos nos tecidos vegetais, em particular contribuindo com a cor, o sabor e a adstringência de frutos³.

¹ NIERO, E. L. D. O. Efeitos de ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanomas humanos: avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, p. 39, 2010.

² HOSKINS, J. A. The occurrence, metabolism and toxicity of cinnamic acid and related compounds. **Journal of Applied Toxicology**, v. 4, n. 6, p. 283-292, 1984.

³ SWANSON, B.G. TANNINS AND POLYPHENOLS. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, p. 5729–5733, 2003.

As principais aplicações na indústria destes compostos incluem a fabricação de aromas, corantes e produtos farmacêuticos. No tocante aos aromas, seu principal uso é para a produção de seus ésteres metílicos, etílicos e benzílicos. Ésteres estes também são importantes componentes na indústria de perfumes. Na Figura 1.2 estão apresentadas algumas fontes naturais do ácido cinâmico (1).

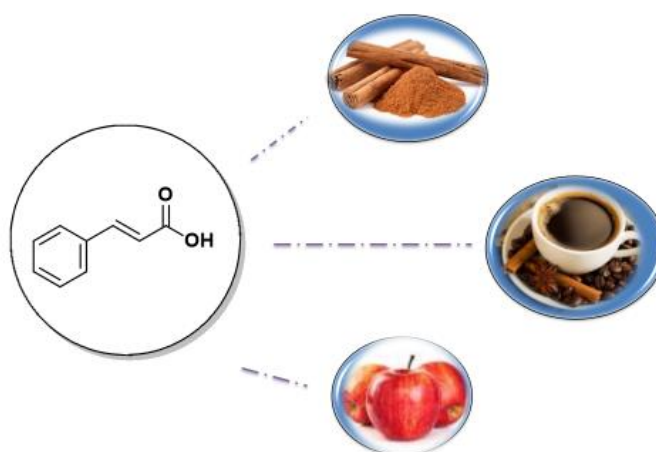


Figura 1.2 - Fontes naturais como a canela, o café e a maçã onde o ácido cinâmico (1) é encontrado.

1.2 Derivados do ácido cinâmico e bioatividades

Derivados do ácido cinâmico, alguns deles mostrados na Figura 1.3 (compostos 2-6), também são encontrados em diversos produtos de origem vegetal como café, maçãs, frutos cítricos, cereais^{3,4} e apresentam importantes bioatividades tais como

⁴ CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362-372, 1999.

antioxidante,⁵ antibacteriana⁶, fitotoxicidade,⁷ atividade antifúngica,⁸ leishmanicida⁹, além de efeitos citotóxicos contra várias linhagens de células tumorais¹⁰.

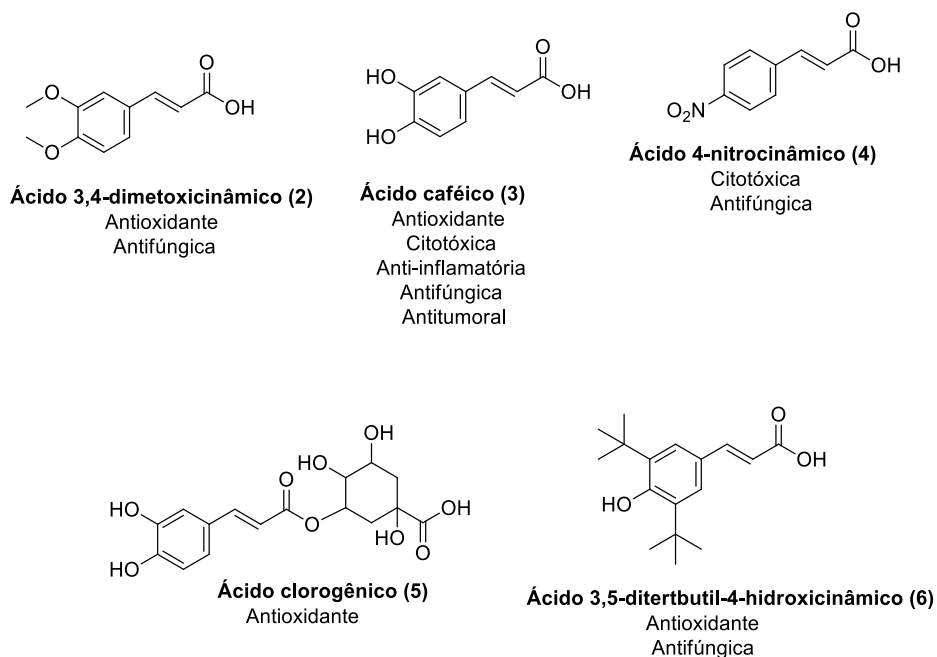


Figura 1.3 - Exemplos de derivados do ácido cinâmico bioativos.

⁵ SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 8, p. 749-767, 2012.

⁶ NARASIMHAN, B. *et al.* Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 827-834, 2004.

⁷ DELLAGRECA, M. *et al.* Phenyl Cinnamate Derivatives from *Oxalis pes-caprae*. **Chemistry & biodiversity**, v. 5, n. 11, p. 2408-2414, 2008.

⁸ TAWATA, S. *et al.* Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 60, n. 5, p. 909-910, 1996.

⁹ DA SILVA, E. R. *et al.* Cinnamic acids derived compounds with antileishmanial activity target *Leishmania amazonensis* arginase. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 93, n. 2, p. 139-146, 2019.

¹⁰ GRUNBERGER, D. *et al.* Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, v. 44, n. 3, p. 230-232, 1988.

Outra característica importante do ácido cinâmico e derivados de origem natural é a baixa toxicidade que estes compostos apresentam para mamíferos¹¹. Devido as suas bioatividades e reduzida toxicidade, o ácido cinâmico e seus derivados vem sendo sistematicamente investigados resultando na obtenção de novas substâncias com diferentes aplicações farmacológicas^{5,12,13,14,15,16,17,18} e agroquímicas^{19,20,21}.

1.3 Associação de fragmentos bioativos: uma importante estratégia na busca de novos compostos e prospecção de suas bioatividades

Na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos e agroquímicos uma abordagem utilizada é a associação de dois ou mais fragmentos bioativos. Neste caso cria-se uma nova substância, de estrutura molecular química única, ou híbrido²², e que pode apresentar melhoria de atividade biológica em relação aos fragmentos bioativos isolados. Neste contexto três atrativos fragmentos bioativos que podem ser considerados são: isobenzofuranona, sulfonamida e 1,2,3-triazol. A seguir serão abordados brevemente cada um dos fragmentos mencionados.

Vários compostos de origem sintética e natural possuem em sua estrutura um anel γ -lactônico fundido a um anel de benzeno (Figura 1.4). Essas substâncias,

¹¹ LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 301–311, 2008.

¹² GUZMAN, J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19292-19349, 2014.

¹³ GAIKWAD, N.; NANDURI, S.; MADHAVI, Y.V. Cinnamamide: An insight into the pharmacological advances and structure–activity relationships. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 181, p. 111561, 2019.

¹⁴ ZHANG, W. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of cinnamic acid derivatives with synergetic neuroprotection and angiogenesis effect. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, p. 111695, 2019.

¹⁵ SANTOS, A. P. D. A. D. *et al.* Antiprotozoal action of synthetic cinnamic acid analogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 6, p. 849-853, 2018.

¹⁶ SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 403–423, 2011.

¹⁷ ALAM, M. A. *et al.* Hydroxycinnamic acid derivatives: A potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. **Nutrition and Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2016.

¹⁸ BEZERRA, D. P. *et al.* Antiproliferative effects of two amides, piperine and pipartine, from Piper species. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 60, n. 7–8, p. 539–543, 2005.

¹⁹ VISHNOI, S.; AGRAWAL, V.; KASANA, V. K. Synthesis and structure-activity relationships of substituted cinnamic acids and amide analogues: A new class of herbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 8, p. 3261–3265, 2009.

²⁰ KOROŠEC, B. *et al.* Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 955–966, 2014.

²¹ BUXTON, T. *et al.* Insecticidal activities of cinnamic acid esters isolated from *Ocimum gratissimum* L. and *Vitellaria paradoxa* Gaertn leaves against *Tribolium castaneum* Hebst (Coleoptera: Tenebrionidae). **Pest Management Science**, in press, 2019.

²² VIEGAS-JUNIOR, C. *et al.* Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

denominadas de isobenzofuranonas ou fitalidas, apresentam importantes atividades biológicas dentre elas: antifúngica,²³ efeito sobre o transporte de elétrons fotossintético,²⁴ antiplaquetária,²⁵ leishmanicida²⁶ e atividade citotóxica.²⁷ Além de apresentarem importantes atividades biológicas, as isobenzofuran-1(3*H*)-onas são sinteticamente úteis e vêm sendo utilizadas como blocos construtoras em síntese orgânica^{28,29}.

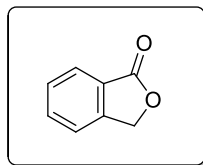


Figura 1.4 - Estrutura básica de uma isobenzofuranona.

As sulfonamidas são caracterizadas pela presença de grupos R-SO₂-NR'R". As variações dos grupos (R, R' e R") produzem compostos com diferentes propriedades físico-químicas e bioatividades. Na Figura 1.5 está representada o fragmento sulfonamida contendo uma porção aromática. Conforme será descrito adiante, no presente trabalho buscou-se a síntese de substâncias contendo este fragmento sulfonamida.

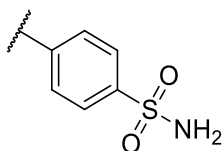


Figura 1.5 - Estrutura da porção sulfonamida utilizada neste trabalho.

Cumprir destacar que sulfonamidas são uma classe de substâncias que apresentam uma variedade de atividades biológicas, tais como atividade

²³ STROBEL, G. *et al.* Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, n. 2, p. 179-183, 2002.

²⁴ TEIXEIRA, R. R. *et al.* Synthetic analogues of the natural compound cryphonectric acid interfere with photosynthetic machinery through two different mechanisms. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 23, p. 5540-5549, 2013.

²⁵ MA, F. *et al.* Antiplatelet activity of 3-butyl-6-bromo-1 (3*H*)-isobenzofuranone on rat platelet aggregation. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 33, n. 1, p. 64-73, 2012.

²⁶ BRISSOW, E. R. *et al.* 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum-92C*, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 1823-1830, 2017.

²⁷ LOGRADO, L. P. L. *et al.* Synthesis and cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3480-3489, 2010.

²⁸ MAL, D.; PAHARI, P. Recent advances in the Hauser annulation. **Chemical reviews**, v. 107, n. 5, p. 1892-1918, 2007.

²⁹ KARMAKAR, R.; PAHARI, P.; MAL, D. Phthalides and phthalans: Synthetic methodologies and their applications in the total synthesis. **Chemical reviews**, v. 114, n. 12, p. 6213-6284, 2014.

antibacteriana^{30,31}, inibição enzimática específica^{32,33,34,35}, leishmanicida^{36,37}, citotóxica^{38,39,40,41} entre tantas outras^{42,43}.

Os compostos de natureza heterocíclica são de incontestável importância com respeito ao desenvolvimento de fármacos e agroquímicos. A grande maioria dos princípios ativos comercializados pelas indústrias farmacêutica e agroquímica possuem pelo menos um anel heterocíclico em suas estruturas. Dentre as diferentes classes de heterociclos, os triazóis (1,2,3-triazol e 1,2,4-triazol, Figura 1.6) são caracterizados por apresentarem 3 átomos de nitrogênio e 2 átomos de carbono unidos formando um anel de cinco membros (Figura 1.6).



Figura 1.6 - Exemplos de estrutura de triazóis.

³⁰ SEYDEL, J. K. *et al.* Quantitative structure-pharmacokinetic relationships derived on antibacterial sulfonamides in rats and its comparison to quantitative structure-activity relationships. **Journal of medicinal chemistry**, v. 23, n. 6, p. 607-613, 1980.

³¹ NAAZ, F. *et al.* Molecular modeling, synthesis, antibacterial and cytotoxicity evaluation of sulfonamide derivatives of benzimidazole, indazole, benzothiazole and thiazole. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 3414-3428, 2018.

³² BOUCHAIN, G.; DELORME, D. Novel Hydroxamate and Anilide Derivatives as Potent Histone Deacetylase Inhibitors: Synthesis and Antiproliferative Evaluation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 22, p. 2359-2372, 2005.

³³ SEO, W. D. *et al.* Sulfonamide chalcone as a new class of α -glucosidase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 24, p. 5514-5516, 2005.

³⁴ WALTER, M. F. *et al.* Sulfone COX-2 inhibitors increase susceptibility of human LDL and plasma to oxidative modification: Comparison to sulfonamide COX-2 inhibitors and NSAIDs. **Atherosclerosis**, v. 177, n. 2, p. 235-243, 2004.

³⁵ BOURAIS, I. *et al.* Investigation of sulfonamides inhibition of carbonic anhydrase enzyme using multiphotometric and electrochemical techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 96, p. 23-29, 2017.

³⁶ DAS, P. *et al.* Activity of a novel sulfonamide compound 2-nitro-N-(pyridin-2-ylmethyl)benzenesulfonamide against *Leishmania donovani*. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 1753, 2016.

³⁷ DA ROSA, R. *et al.* Synthesis and biological evaluation of isoxazolyl-sulfonamides: A non-cytotoxic scaffold active against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* and Herpes Simplex Virus. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 20, p. 3381-3384, 2018.

³⁸ BAVADI, M.; NIKNAM, K.; SHAHRAKI, O. Novel pyrrole derivatives bearing sulfonamide groups: Synthesis in vitro cytotoxicity evaluation, molecular docking and DFT study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1146, p. 242-253, 2017.

³⁹ GUL, H. I. *et al.* New anticancer drug candidates sulfonamides as selective hCA IX or hCA XII inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 77, p. 411-419, 2018.

⁴⁰ ACOSTA-RANGEL, A. *et al.* Sulfonamides degradation assisted by UV, UV/H₂O₂ and UV/K₂S₂O₈: Efficiency, mechanism and byproducts cytotoxicity. **Journal of Environmental Management**, v. 225, n. 08, p. 224-231, 2018.

⁴¹ CANAKCI, D. *et al.* Synthesis and cytotoxic activities of novel copper and silver complexes of 1,3-diaryltriazene-substituted sulfonamides. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 110-116, 2019.

⁴² GOMES, J. R. B.; GOMES, P. Gas-phase acidity of sulfonamides: Implications for reactivity and prodrug design. **Tetrahedron**, v. 61, n. 10, p. 2705-2712, 2005.

⁴³ LAVANYA, R. Sulphonamides: A Pharmaceutical Review. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 6, n. 21, p. 03, 2017.

Em particular, os 1,2,3-triazóis (Figura 1.6) são substâncias heteroaromáticas, de origem exclusivamente sintética, com três átomos de nitrogênio vicinais, e que apresentam seis elétrons π . Eles podem ser prontamente sintetizados (vide Capítulo 3 para uma descrição mais pormenorizada a este respeito), são estáveis sob condições oxidativas e redutivas, são resistentes à hidrólise e degradação enzimática. Os 1,2,3-triazóis podem ser utilizadas para efetuar a conexão de dois fragmentos bioativos. Eles podem realizar ligações de hidrogênio e interações π stacking⁴⁴.

Além disso, compostos contendo a unidade estrutural 1,2,3-triazol possuem um vasto número de bioatividades⁴⁵, tais como anti-HIV⁴⁶, anticâncer⁴⁷, leishmanicida⁴⁸ entre tantas outras^{49,50,51,52,53,54}. Todas essas características descritas para os 1,2,3-triazóis tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa nesta classe de compostos.

1.4 Motivação deste trabalho

Considerando as diversas bioatividades descritas para os fragmentos isobenzofuranona (**7**), sulfonamida (**8**) e 1,2,3-triazol (**9**), buscou-se a associação destes com porções cinamoíla (derivadas do ácido cinâmico) para criação de novos

⁴⁴ DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 30–54, 2017.

⁴⁵ KHARB, R.; SHARMA, P. C.; YAR, M. S. Pharmacological significance of triazole scaffold. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 1–21, 2011.

⁴⁶ ZHU, Y. *et al.* A novel and efficient asymmetric synthesis of anti-HIV drug maraviroc. **Synthetic Communications**, v. 49, n. 13, p. 1721–1728, 2019.

⁴⁷ PRAGATHI, Y. J. *et al.* Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel 2-(4-Arylsubstituted-1H,2,3-triazol-1-yl)-N-(4-[2-(thiazol-2-yl)benzo[d]thiazol-6-yl]phenyl)acetamide Derivatives as Potent Anticancer Agents. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 89, n. 5, p. 1009–1014, 2019.

⁴⁸ PORTA, E. O. J. *et al.* Click chemistry decoration of amino sterols as promising strategy to developed new leishmanicidal drugs. **Steroids**, v. 79, p. 28–36, 2014.

⁴⁹ GOMES, J. R. B.; GOMES, P. Gas-phase acidity of sulfonamides: implications for reactivity and prodrug design. **Tetrahedron**, v. 61, n. 10, p. 2705–2712, 2005.

⁵⁰ LIN, D. *et al.* The Hsp90 inhibitor 17-allylamide-17-demethoxygeldanamycin induces apoptosis and differentiation of Kasumi-1 harboring the Asn822Lys KIT mutation and down-regulates KIT protein level. **Leukemia Research**, v. 30, n. 5, p. 575–582, 2005.

⁵¹ DA SILVA, F. D.C. *et al.* Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 373–383, 2009.

⁵² KÜÇÜKGÜZEL, G.; ÇIKLA-SÜZGÜN, P. Recent advances bioactive 1,2,4-triazole-3-thiones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 830–870, 2015.

⁵³ KHAN, S. I. *et al.* Synthesis, QSAR and anticandidal evaluation of 1,2,3-triazoles derived from naturally bioactive scaffolds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, p. 246–254, 2015.

⁵⁴ FARÈS, F. *et al.* Preparation of new gem-difluoro heterocyclic-fused 1,2,3-triazole derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 3, p. 292–296, 2018.

compostos híbridos. Realizada a síntese, buscou-se a avaliação das bioatividades leishmanicida e citotóxica..

Serão abordados nos capítulos 2 e 3 deste trabalho a síntese de derivados do ácido cinâmico contendo as porções supracitadas e avaliação das atividades leishmanicida e citotóxica destes compostos. De forma a contextualizar as bioatividades avaliadas, são descritas de forma breve e introdutória relevantes aspectos relacionados a leishmaniose (Capítulo 2) e ao câncer (Capítulo 3). Também será abordada a relação existente entre os problemas relacionados aos fármacos disponíveis como forma de tratamento e a necessidade de pesquisas objetivando a descoberta de novos princípios ativos no tocante à leishmaniose e ao câncer melanoma.

CAPÍTULO 2: SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO CONTENDO AS PORÇÕES ISOBENZOFURANONA E 1,2,3 TRIAZOL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

2.1 Leishmaniose

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define doenças tropicais negligenciadas (DTNs) como sendo aquelas associadas à pobreza e que se disseminam com mais facilidade nas regiões tropicais do planeta. São causadas por agentes infecciosos ou parasitas e são particularmente endêmicas em países subdesenvolvidos, afetando aproximadamente 1,7 bilhão de pessoas ao redor do mundo⁵⁵. Essas enfermidades também apresentam indicadores inaceitáveis e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle.

As DTNs incapacitam ou matam milhões de pessoas ao redor do mundo anualmente e representam um importante problema de saúde pública. Apesar das DNTs terem uma elevada incidência, elas afetam principalmente as populações mais carentes que não possuem recursos para adquirir os medicamentos empregados no tratamento destas enfermidades.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica 17 doenças como DTNs, e dentre estas a doença de Chagas, a doença do sono e a leishmaniose são as três DTNs com as maiores taxas de mortalidade.^{56,57,58}

⁵⁵ WHO, <https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 14 de Março de 2019.

⁵⁶ REIS, L. L. *et al.* Leishmaniose visceral e sua relação com fatores climáticos e ambientais no Estado do Tocantins, Brasil, 2007 a 2014. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, n. 1, p. 1–14, 2019.

⁵⁷ WILLIAMS, D. J. *et al.* Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 12–14, 2019.

⁵⁸ HOTEZ, P. J. *et al.* “Rapid impact” 10 years after: The first “decade” (2006–2016) of integrated neglected tropical disease control. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. 1–6, 2018.

A Leishmaniose é o nome designado a um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*^{59,60 61} e transmitidas ao homem por meio da picada de fêmeas infectadas dos insetos vetores flebotomíneos (Figura 2.1)^{62,63}.



Figura 2.1 - Fêmea do inseto vetor flebotomíneo. Os insetos geralmente não ultrapassam 0,5 cm de comprimento. Possuem pernas longas e delgadas, o corpo densamente piloso. Quando em repouso, mantêm a posição característica, com asas entreabertas e levantadas. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE.

As fêmeas do inseto vetor flebotomíneo infectam-se quando sugam o sangue de um mamífero e ingerem macrófagos infectados com a forma amastigota de *Leishmania*. No intestino dos flebotomíneos, os parasitos se diferenciam em promastigotas (a forma flagelada), e, se multiplicam dentro dos macrófagos. As formas promastigotas se transformam em promastigotas procíclicas. Estas se multiplicam e se diferenciam em promastigotas metacíclicas, que por sua vez migram para a faringe do inseto vetor onde poderão ser transmitidas pela picada a um hospedeiro (Figura 2.2).⁶⁴

⁵⁹ DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

⁶⁰ ALVES, F. *et al.* Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–30, 2018.

⁶¹ MAIA-ELKHOURY, A. N. *et al.* Visceral leishmaniasis in Brazil : trends and challenges Leishmaniose visceral no Brasil : evolução e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941–2947, 2008.

⁶² SHUKLA, A. K. *et al.* Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2208–2218, 2010.

⁶³ DORLO, T. P. C. *et al.* Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

⁶⁴ NAIR, V.; GEORGE, T. G. A novel synthesis of α -azidocinnamates, α -azido- α,β -unsaturated ketones and β -azidostyrenes mediated by cerium(IV) ammonium nitrate. **Tetrahedron Letters**, v. 41, n. 17, p. 3199–3201, 2000.

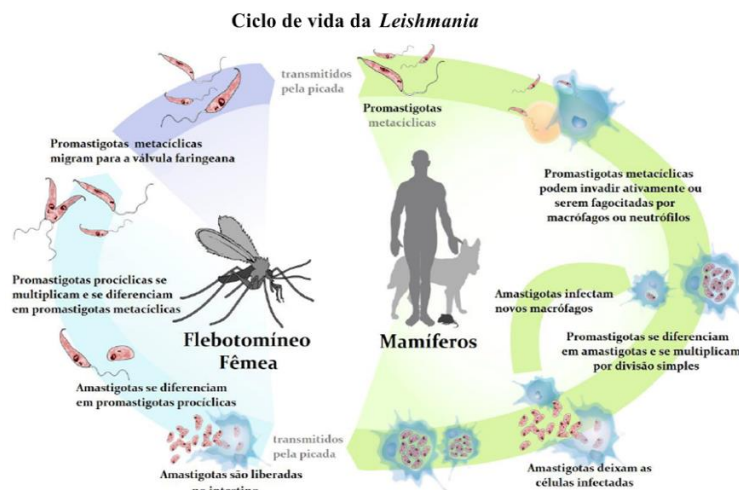


Figura 2.2 - Ciclo de transmissão do parasito causador da leishmaniose (Adaptado da referência 65).

Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas. Estas diferenciam-se nos macrófagos em amastigotas e multiplicam-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo a liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação para outros tecidos como linfonodos, fígado, baço e medula óssea⁶⁵.

2.2 Formas Clínicas e Tratamento

As leishmanioses possuem um amplo espectro de manifestações clínicas, e estão associadas às distintas espécies de *Leishmania* bem como com a resposta imune do indivíduo. Elas podem ser divididas em dois grupos: a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral Americana (LVA), também conhecida como calazar, sendo esta forma a mais grave da doença.⁶⁶ A LTA, por sua vez, é subdividida em leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucocutânea (LMC) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD).

A LC é a manifestação mais comum e é tida como uma forma benigna da leishmaniose, apresentando acometimento da pele com lesões ulceradas indolores, únicas ou múltiplas, com base eritematosa e infiltrada, associada a bordas bem delimitadas e elevadas. O fundo da ferida é avermelhado e com granulações, com tendência a uma boa resposta utilizando-se o tratamento padrão com medicamentos

⁶⁵ STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.

⁶⁶ DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, p. 491–502, 2009.

antimoniais⁶⁷. Apesar de não letal, é importante ressaltar que a LC pode causar incapacidade e deixar cicatrizes permanentes que levam ao estigma e ao preconceito social.

Na LMC, as infecções podem comprometer o trato respiratório ou digestivo alto, atingindo o nariz, nasofaringe, cavidade oral e laringe. As lesões da mucosa nasal iniciam-se por ulcerações do septo nasal, com grande potencial destrutivo e mutilante⁶⁸.

Entre as formas menos comuns da LTA, a LCD caracteriza-se por lesões nodulares e infiltrações cutâneas, que em geral não cicatrizam⁶⁹. A *Leishmania amazonensis* é a espécie determinante da LCD, estando associada a outras manifestações clínicas incluindo LC, LMC, leishmaniose visceral e tegumentar pós-calazar⁷⁰.

No Brasil, a LT é uma das afecções dermatológicas que merece grande atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos nos campos social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. A LT apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras como pode ser observado na Figura 2.3 a seguir.

⁶⁷ DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D.F.H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

⁶⁸ HANDLER, M. Z. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 897–908, 2015.

⁶⁹ HASHIGUCHI, Y. *et al.* Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: Clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Tropical Medicine and Health**, v. 44, n. 1, p. 1–9, 2016.

⁷⁰ CHRISTENSEN, S. M. *et al.* Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007152, 2018.



Figura 2.3 - Casos confirmados de leishmaniose tegumentar no Brasil no ano de 2017. Fonte: Ministério da Saúde/SVS.⁷¹

No Brasil, a leishmaniose visceral encontra-se disseminada em 17 estados das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. A ampliação da área de distribuição geográfica da AIDS e sua extensão para camadas mais pobres da população e, por outro lado, a crescente urbanização da leishmaniose visceral faz supor que a prevalência da coinfeção LVA/AIDS venha a aumentar ainda mais nos próximos anos⁷².

O tratamento das leishmanioses é realizado por medicamentos que, na sua grande maioria, são de alto custo, aplicação injetável diária, apresentando muitos efeitos colaterais e longos tempos de tratamento.⁷³ Segundo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral do Ministério da Saúde (2017)²⁵, no Brasil o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) vem sendo utilizado desde a década de 1940. Outras drogas também têm sido empregadas no tratamento das leishmanioses, entre as quais se destacam a anfotericina B, iquimode, sitamaquina, pentamidina, paromicina e miltefosina (Figura 2.4).^{74,75}

⁷¹ DATASUS, < tabnet.datasus.gov.br>. Acesso em: 02 de Outubro de 2019.

⁷² RATH, S. *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

⁷³ GUERIN, P. J. *et al.* Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

⁷⁴ CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502–508, 2003.

⁷⁵ OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4–5, p. 257–266, 2004.

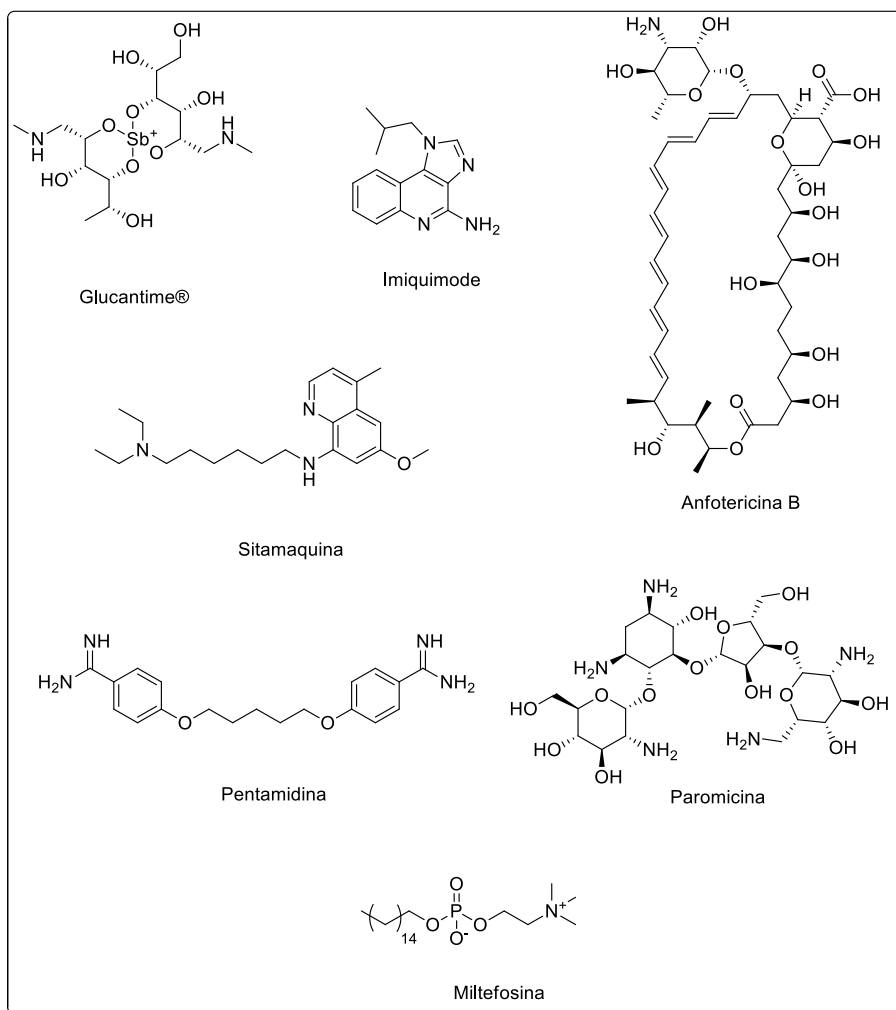


Figura 2.4 - Fármacos que têm sido empregados no tratamento das leishmanioses.

Os problemas supracitados relacionados aos fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses motivam pesquisas objetivando a descoberta de novos princípios ativos que contornem ou minimizem estes problemas. Dentro deste contexto, um dos objetivos do presente trabalho correspondeu à síntese e avaliação da atividade leishmanicida de derivados do ácido cinâmico. Os aspectos vinculados ao desenvolvimento desta investigação são descritos no manuscrito apresentado a seguir e que foi publicado no ano de 2019 na revista científica *European Journal of Medicinal Chemistry*.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis*



Michelle Peixoto Rodrigues^{a,1}, Deborah Campos Tomaz^{a,1}, Luciana Ângelo de Souza^{b,1}, Thiago Souza Onofre^{b,c,1}, Wemerson Aquiles de Menezes^b, Juliana Almeida-Silva^d, Ana Márcia Suarez-Fontes^d, Márcia Rogéria de Almeida^b, Adalberto Manoel da Silva^e, Gustavo Costa Bressan^b, Marcos André Vannier-Santos^d, Juliana Lopes Rangel Fietto^b, Róbson Ricardo Teixeira^{a,*}

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil^c Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Campus São Paulo, São Paulo, SP, Brazil^d Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil^e Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense, Araquari, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2019

Received in revised form

21 August 2019

Accepted 6 September 2019

Available online 9 September 2019

Keywords:

Cinnamic acid derivatives

Leishmanicidal activity

Leishmania braziliensis

Isobenzofuranone

1,2,3-Triazole

ABSTRACT

Leishmania braziliensis is one of the pathogenic agents of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. There are no validated vaccines to prevent the infection and the treatment relies on drugs that often present severe side effects, which justify the efforts to find new potential antileishmanial drugs. An alternative to promote the discovery of new drugs would be the association of different chemical groups of bioactive compounds. Here we describe the synthesis and bioactivity evaluation against *L. braziliensis* of cinnamic acid derivatives possessing isobenzofuranone and 1,2,3-triazole functionalities. We tested 25 compounds at 10 μM concentration against extracellular promastigotes and intracellular amastigotes during macrophage infection. Most compounds were more active against amastigotes than to promastigotes. The derivatives (*E*)-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl-(3,4,5-trimethoxy) cinnamate (**5c**), (1-(3,4-difluorobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9g**), and (1-(2-bromobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9l**) were the most effective presenting over 80% toxicity on *L. braziliensis* amastigotes. While compound **5c** is a cinnamate with an isobenzofuranone portion, **9g** and **9l** are triazolic cinnamic acid derivatives. The action of these compounds was comparable to amphotericin B used as positive control. Ultrastructural analysis revealed that **5c**-treated parasites showed impaired cytokinesis and apoptosis triggering. Taken together, these results highlight the potential of cinnamic acid derivatives in development of novel anti-leishmanial drugs.

© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis encompasses a group of important tropical neglected parasitic diseases [1]. They are caused by several pathogenic protozoa species of *Leishmania* genus and are transmitted to humans through the bite of infected female phlebotomine sand flies. There are four main clinical manifestations of leishmaniasis known as cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), visceral infection

(VL, also known as kala-azar) and post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) [2,3].

The absence of effective vaccines for humans makes the use of chemotherapeutics not only important to treat the patients with leishmaniasis, but also to control the spread of the disease. There is no single treatment to all forms of the infection and even though there are different possibilities of treatment, they can not be effective to achieve the cure and can also lead to undesired side effects [4–6]. The treatment of leishmaniasis can be done with pentavalent antimonials, namely *N*-methylglucamine antimoniate (Glucantime[®]) and sodium stibogluconate (Pentostan[®]), which are the first-line drugs of choice in Brazil. Other drugs that are also used

* Corresponding author.

E-mail address: robsonr.teixeira@ufv.br (R.R. Teixeira).¹ These authors contributed equally to this work.

as a second alternative correspond to amphotericin B and pentamidine. However, these drugs show limited efficacy causing serious side effects, associated to renal and cardiac toxicity [7,8]. For these reasons, the development of new drugs for leishmaniasis is a pressing demand, preferably employing compounds effective in low concentrations, non-toxic and selective against the parasite.

Natural products have served as important source of novel useful compounds that have been used directly as medicinal agents [9], as model compounds for synthetic or semisynthetic structure modifications and optimization [10,11], as biochemical and/or pharmacological probes [12,13], and as source of inspiration for generations of synthetic organic medicinal chemists [14,15].

Cinnamic acid is a natural aromatic carboxylic acid, composed of a phenyl ring substituted with an acrylic acid group, which commonly occurs in the *trans* configuration (Fig. 1). This phenylalanine deaminated product, found in plant tissues, has a long history of human use as a component of plant-derived essences and flavoring [16]. Cinnamic acid and its ester derivatives exhibit a broad spectrum of biological activities, including anti-inflammatory [17,18], antimicrobial [19,20], antifungal [21–23], antioxidant [24] and anticarcinogenic [25–27]. It has been shown that these compounds have significant leishmanicidal activity [28].

A class of compounds called isobenzofuranones, also commonly termed as phthalides and isobenzofuran-1(3H)-ones, are characterized by a bicyclic nucleus (Fig. 1) derived from the fusion of a γ -lactone (ring A) with a benzene (ring B). Phthalides are widely present in plants, fungi and liverworts, and exhibit a broad spectrum of biological activities, including antifungal [29,30], antimicrobial [31], insecticidal [32], cytotoxic [33–35], anti-inflammatory [36], and leishmanicidal [37,38].

Heterocyclic compounds are of great importance for the pharmaceutical industry since about 90% of the new drugs possess at least one heterocyclic ring in their structures [39–42]. There are reports of the usefulness of heterocycles in the treatment of diseases since antiquity, such as quinine, used in the 16th century to prevent and treat malaria. The 1,2,3-triazoles (Fig. 1) are heterocycles of synthetic origin and with a wide range of applications [43]. They exhibit a broad variety of biological activities, including anti-HIV [44], antimicrobial [45], antibacterial [46], leishmanicidal [47,48], antiplatelet [49], antiproliferative [50], trypanocidal [51,52], antitumoral [53], among others.

Considering the need to develop new compounds potentially useful, and with lower undesired effects for the treatment of leishmaniasis, this paper describes the synthesis of cinnamic acid derivatives containing isobenzofuranone and 1,2,3-triazole portions and the evaluation of their activities against *Leishmania (Viannia) braziliensis* which is the main causative agent of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in New World.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of cinnamic acid derivatives

The synthesis of cinnamates **5a–5f** (Scheme 1) required the preparation of isobenzofuranone **2** and cinnamic derivatives **4a–4f**.

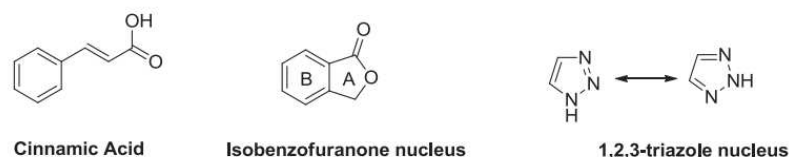


Fig. 1. Chemical structures of compounds mentioned in the text.

Substance **2** was obtained in two steps from 3-methoxy benzoic acid. This carboxylic acid was initially treated with HCl, HCHO, CH₃COOH under microwave irradiation. This procedure afforded isobenzofuranone **1** in 80% yield after purification by silica gel column chromatography. The demethylation of **1** with 48% HBr gave the hydroxylated isobenzofuranone **2** in 54% yield. The cinnamic acid derivatives **4a–4f** were prepared via microwave assisted Knoevenagel condensation of malonic acid and different aromatic aldehydes **3a–3f**. Finally, the cinnamates containing the isobenzofuranone nucleus **5a–5f** were synthesized using the microwave assisted Steglich esterification between cinnamic acid derivatives **4a–4f** and hydroxylated isobenzofuranone **2**. The esters **5a–5f** were obtained in yields ranging from 54 to 76% within 40–45 min.

To prepare the cinnamates containing triazolic portions, it was required the synthesis of esters **6** and **7** as well as a series of azides **8** (Scheme 2). Thus, the Steglich esterification [54] between the cinnamic acid and different alcohols afforded compounds **6** and **7** in good yields (68 and 83%, respectively) after purification by silica gel column chromatography. The azides **8** were prepared from the corresponding benzylic alcohols utilizing methodology previously described [55]. The click reaction corresponded to the key step involved in the synthesis of cinnamates containing triazolic functionalities **9a–9m** and **10a–10m**. Hence, the reactions between esters **6** and **7** and azides **8** afforded the cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions in yields ranging from 73 to 99% (Scheme 2).

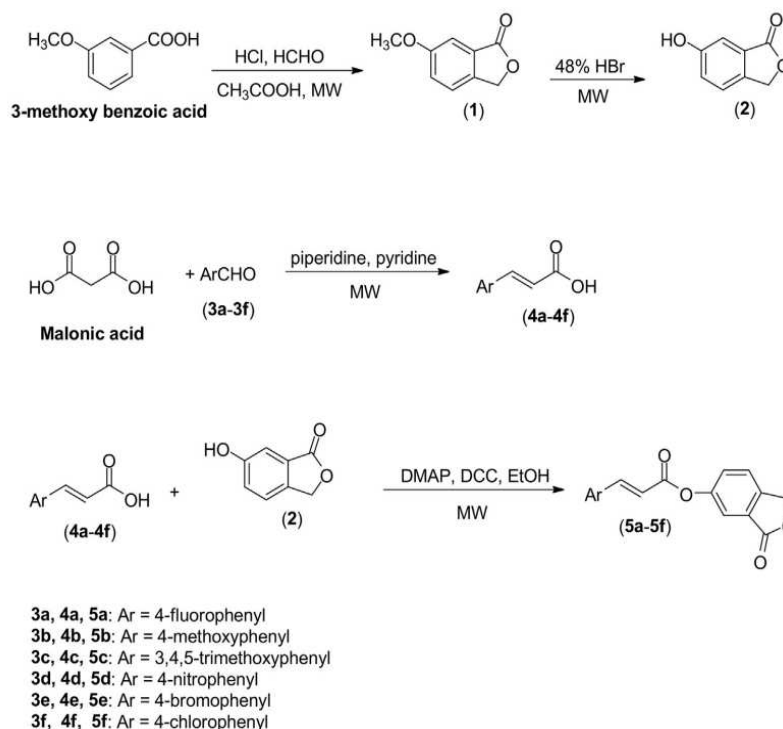
2.2. Evaluation of cytotoxicity of cinnamic acid derivatives

To be used in biological assays, all the cinnamic acid derivatives were suspended in aqueous solution containing 5% DMSO and then diluted with RPMI to 10 μ M (the DMSO final concentration corresponded to 0.1%). The solubilization of the compounds was evaluated by light microscopy. Those compounds that formed crystals, namely **5b**, **5f**, **9c**, **9d**, **9e**, **9f**, and **9j**, were considered insoluble and they were not used in the following assays.

Macrophages are the main host cells of *Leishmania* and so are used in the evaluation of *in vitro* infection assays with *L. braziliensis*. Thus, all the soluble compounds were evaluated for their cytotoxicity on macrophages using the resazurin viability assay and the results are shown as survival rates after 48 h of treatment with the compounds (Fig. 2). Amphotericin B was used as anti-leishmanial control drug. As expected, the amphotericin B (3.125 μ g/mL) and the negative control (0.1% DMSO) were not toxic to macrophages. In addition, as highlighted by the absence of significant differences between the controls and cinnamic acid derivatives, the evaluated compounds were not toxic to macrophages at 10 μ M concentration.

2.3. Evaluation of leishmanicidal effect of cinnamic acid derivatives against *L. braziliensis*

The first strategy used during the investigation of leishmanicidal effects of new compounds is the *in vitro* assessment of them against different developmental forms of *Leishmania* parasites.



Scheme 1. Synthesis of cinnamic acid derivatives 5a–5f.

Consequently, we tested the leishmanicidal activity of the compounds against total promastigote forms of *L. braziliensis*, the insect dwelling stage. The assays were done using the resazurin method and the results are shown in Fig. 3 as survival levels in relation to DMSO. The compounds 5a and 5c–e, which are derivatives containing an isobenzofuranone portion, displayed significant leishmanicidal activity against promastigote forms. Also, 10a–f and 10i–j, which are derivatives containing triazolic portions, also displayed leishmanicidal activity, albeit presenting lower efficiency as compared to the derivatives containing the isobenzofuranone moiety. Interestingly, the series of compounds 9a–b, 9g–i, and 9k–m did not present leishmanicidal activity against promastigotes, as compared with negative control. The synthesis of the compounds 9a–9m and 10a–10m was planned so that the influence on the leishmanicidal activity of different benzylic groups attached to triazole ring as well as the length of the chain connecting the triazole ring to the cinnamic acid portion could be assessed. The evaluation of leishmanicidal activity against promastigote forms revealed that the length of the connecting chain is important since derivatives 9a–b, 9g–i, and 9k–m, presenting a shorter connecting carbon chain, were ineffective against *L. braziliensis* promastigote form.

Then, the next step was to evaluate the action of the compounds against intracellular amastigotes of *L. braziliensis* during *in vitro* macrophage infection. Fig. 4 shows the rate of survival of the parasite after 48 h of treatment with the compounds. It is possible to observe that several compounds were significantly active against intracellular amastigotes with different levels. In general, the effectiveness of the compounds against the amastigote forms was higher than on promastigotes (Fig. 3). The most active compounds against the amastigote forms were 5c, 9b, 9g, 9i, 9k, 9l, 9m (Fig. 4).

In general, the cinnamic acid derivatives 9b, 9g, 9i, 9k, 9l and 9m showed better results than the others. Even though this series of compounds did not show good results against promastigote forms (Fig. 2), it was very effective against intracellular form of *L. braziliensis*. The highest activity corresponded to compound 9g that presented 86% of toxicity on *Leishmania* amastigote forms. Table 1 highlights the activity of the compounds on intracellular amastigotes.

Since compounds 5c and 9g were non-toxic to macrophages and displayed the most significant leishmanicidal effect upon *L. braziliensis* intracellular amastigotes, they were selected to be used in further assays. Thus, the IC₅₀ for the activities of these compounds against *Leishmania* promastigote, macrophage, and intracellular amastigote form were determined. For promastigote forms, the IC₅₀ of 5c and 9g were, respectively, 7.58 μM and 3.05 μM. Considering macrophages, IC₅₀ values were over 80 μM for both compounds (Table 2). In the infection assays, the IC₅₀ of 9g was undetermined (the compound was tested at different concentrations but the data were not consistent enough to lead to IC₅₀), although in the screening assays its efficacy against intracellular amastigotes was superior to 80% at 10 μM (Fig. 4 and Table 1). In contrast, the IC₅₀ of 5c was determined as being equal to 8.27 μM. Thus, it is possible to infer that the compound 5c is more effective against intracellular amastigotes than 9g. This conclusion is based on the fact that the behavior of 9c at different concentrations was not consistent with its previous action at the 10 μM screening assay. The Selectivity Index (SI) is an indication of how much a compound is most effective against the parasite over the host mammalian cells. The higher the SI, the more selective the drug is on the parasite and less toxic to mammalian cells. For 5c, the SI is greater than 9.67.

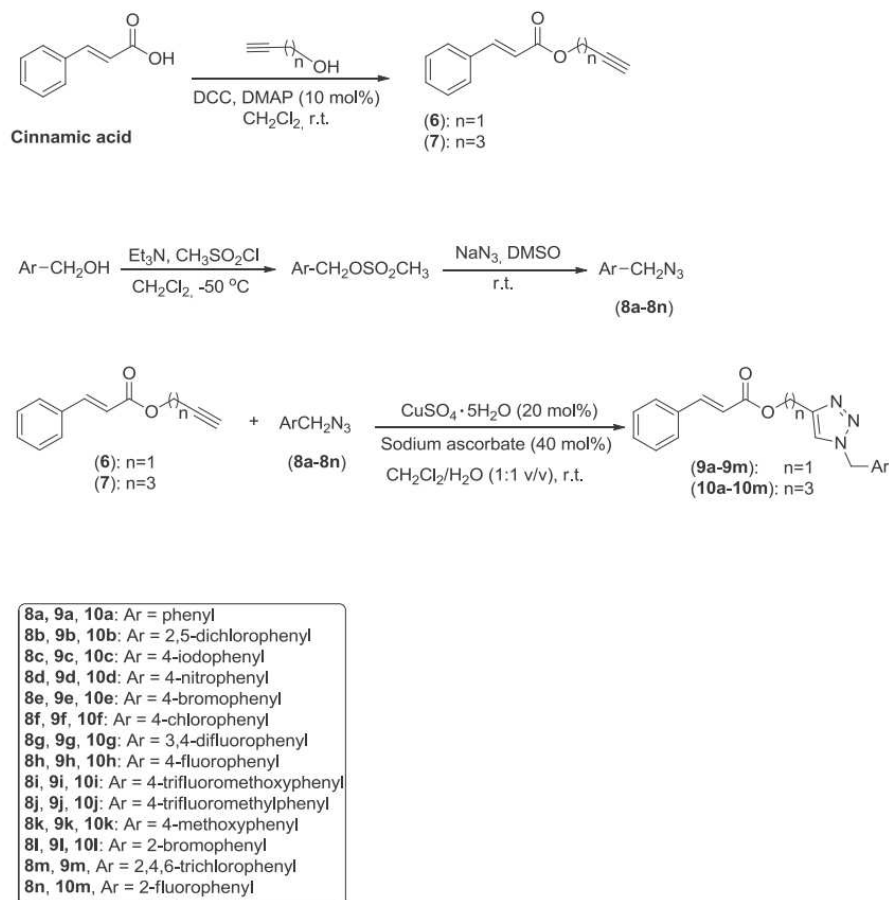
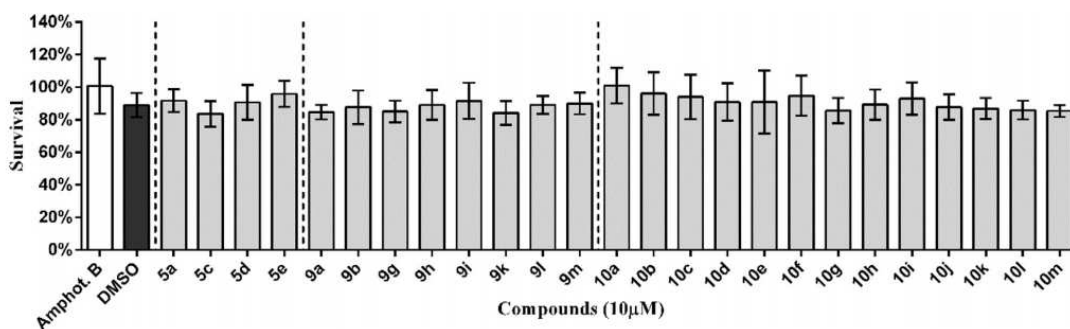
Scheme 2. Synthesis of ester cinnamates **9a–9m** and **10a–10m**.

Fig. 2. Evaluation of cytotoxicity of compounds upon macrophage cells. Each bar shows the mean of percentage of survival of macrophage cells determined by the resazurin viability assay with respective standard deviation. Each mean represents the results from three independent experiments that were performed with internal quadruplicates. The open bar (positive control) represents cells treated with amphotericin B (3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the closed bar (negative control) represents cells treated with DMSO at the same concentration used on dilution of compounds (0.1%). All data were statistically evaluated in relation to the control samples by One-way ANOVA, with post-test of Dunnett's post-test ($p \leq 0.05$) and no significant differences were observed.

Considering that during the natural infection only intracellular amastigotes are important to maintenance of the infection, we proceed only with compound **5c** and evaluated the ultrastructural effects of it on the macrophage infection. Ultrastructural

approaches may be useful in the elucidation of antiparasitic agent mechanisms of action [56,57]. Transmission electron microscopy analysis of infected macrophage cultures (Fig. 5) indicates that contrary to DMSO-treated cells, **5c**-treated parasites displayed

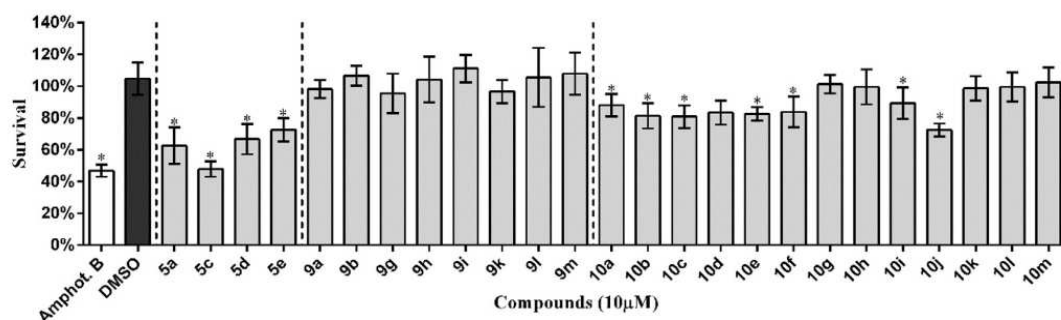


Fig. 3. Leishmanicidal activity against the promastigotes of *L. braziliensis*. Promastigotes from log phase were treated during 48 h with each compound and the rate of survival was evaluated by resazurin method. Each bar shows the mean of percentage of survival of promastigotes and the respective standard deviation. The results are at least two or three independent experiments, performed with internal quadruplicates. The open bar (positive control) represents cells treated with amphotericin B (3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the closed bar (negative control) represents cells treated with DMSO at the same concentration used on dilution of derivatives (0.1%). *Means statically difference from negative control by One-way ANOVA, with Dunnett's post-test ($p \leq 0.05$).

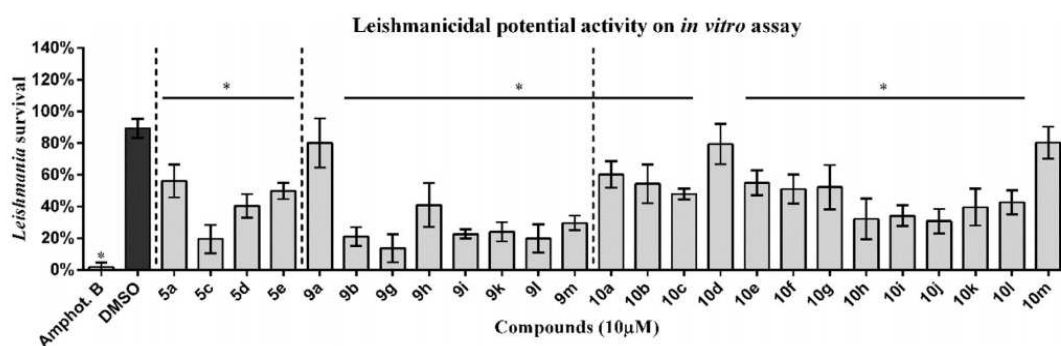


Fig. 4. Leishmanicidal activity against the *L. braziliensis* intracellular amastigotes. Promastigotes at log growth phase were used to infect macrophages. After the establishment of the infection, the cultures were treated for 48 h with each compound. Then, the macrophages were lysed and the released amastigotes were cultivated until their differentiation to promastigotes which were subsequently quantitated by resazurin method. Each bar shows the mean of percentage of viable promastigotes \pm standard deviation. The results are at least two or three independent experiments that were performed with internal quadruplicate. The open bar (positive control) represents cells treated with amphotericin B (3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the closed bar (negative control) represents cells treated with DMSO at the same concentration used in the dilution of derivatives (0.1%). *Indicates statically difference from negative control by One-way ANOVA, with Dunnett's post-test ($p \leq 0.05$).

lobulated cell bodies, which may be due to the truncated cytokinesis, as reported in vinblastine-treated *L. amazonensis* [58]. Images indicating autophagy, apoptosis and presumably necrosis were also observed. Autophagy may comprise an escape mechanism under stress conditions as well as to cause parasite cell death and it also be associated to apoptosis in *Leishmania* [59,60]. These processes may be related to necrotic cell death in *Trypanosoma cruzi* [61] as necrosis may follow apoptosis onset [62]. The electrolucent areas seem to indicate loss of cytoplasmic content *i.e.* necrosis. Thus, the compound **5c** may have impaired the cell cycle and induced autophagy, ensuing triggered programmed cell death machineries.

Previously, our group demonstrated leishmanicidal activity of isobenzofuranones containing aromatic and alicyclic functionalities as represented by general structure shown in Fig. 6. However, those compounds presented leishmanicidal action at 100 μM and the decreasing in the concentration drastically reduced the leishmanicidal effect [37]. It should be noticed that those phthalides previously evaluated by us presented functionalization at position C-3 of the isobenzofuranone nucleus.

In the present work, functionalization made at C-6 position of the isobenzofuranone nucleus, namely introduction of cinnamoyl groups, rendered compounds with significant leishmanicidal activity at ten times lower concentration (10 μM) in comparison with

the phthalides previously reported by us [37]. In other words, the functionalized isobenzofuranones herein described are ten-fold more potent. This means that isobenzofuranone as well as cinnamic acid derivatives may comprise lead compounds in the research and development of leishmanicidal agents. It should be mentioned that Pereira et al. [37] used the isobenzofuranones against *Leishmania infantum*; thus isobenzofuranones could be *per se* effective against other species.

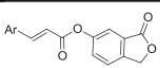
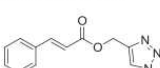
3. Material and methods

3.1. Synthesis

3.1.1. Generalities

Solvents and formaldehyde 37% (w/v) aqueous solution were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Piperidine, 48% (w/v) HBr, 3-methoxybenzoic acid, malonic acid, 4-chlorobenzaldehyde, 4-methoxybenzaldehyde, 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde, 4-nitrobenzaldehyde, 4-bromobenzaldehyde, 4-chlorobenzaldehyde, pent-4-yn-1-ol, prop-2-yn-1-ol, triethyl amine, dimethyl sulfoxide (DMSO), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-*N,N'*-dimethylaminopyridine (DMAP), *trans*-cinnamic acid, mesylate chloride, benzyl alcohol, 4-nitrobenzyl alcohol, 4-bromobenzyl alcohol, 2,5-

Table 1
Relationship between the toxicity on *Leishmania* intracellular amastigotes and chemical structures of the compounds.

Compound	% toxicity*	Structure
5a	43.87	
5c	80.47	
5d	59.54	
5e	50.14	
Leishmanicidal activity		
9a	19.91	
9b	78.98	
9g	86.32	
9h	59.10	
9i	77.39	
9k	76.00	
9l	80.12	
9m	70.38	
Leishmanicidal activity		
10a	39.73	
10b	45.74	
10c	52.07	
10d	20.58	
10e	45.10	
10f	49.01	
10g	47.85	
10h	67.84	
10i	65.84	
10j	69.24	
10k	60.48	
10l	57.32	
10m	19.67	
Leishmanicidal activity		

*Amphotericin B: 98.25%; DMSO: 10.71%.

Table 2
IC₅₀ of different activities of compounds **5c** and **9g** on *L. braziliensis*.

Compound	IC ₅₀ <i>L. braziliensis</i> promastigote forms (48 h) (μM)	IC ₅₀ Raw 264.7 macrophage (48 h) (μM)	IC ₅₀ Infection Assay (48 h) (μM)	Selectivity index (SI)
5c	7.58	>80	>8.27	>9.67
9g	3.05	>80	N*	N*

Compounds were tested at the concentrations of 80 μM, 40 μM, 30 μM, 20 μM, 10 μM, 5 μM, 2.5 μM and 1 μM for IC₅₀ determination after 48 h by resazurin method. Assay controls were amphotericin B (positive control) and DMSO (negative control). The IC₅₀ was calculated using GraphPad Prism Version 5.0. For each test, three independent experiments were performed in quadruplicates. N* = Not determined.

dichlorobenzyl alcohol, 2,4,6-trichlorobenzyl alcohol, 4-chlorobenzyl alcohol, 3,4-difluorobenzyl alcohol, 4-fluorobenzyl alcohol, 4-trifluoromethoxybenzyl alcohol, 4-trifluoromethylbenzyl alcohol, 4-methoxybenzyl alcohol, 4-iodobenzyl alcohol, 2-bromobenzyl alcohol, 2-fluorobenzyl alcohol, sodium ascorbate, sodium azide and copper (II) sulfate pentahydrate were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used without further purification. The NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 300 instrument (Varian, Palo Alto, CA, US) at 300 MHz (¹H) and 75 MHz (¹³C), respectively, using CDCl₃ or DMSO-*d*₆ as solvents. The ¹H NMR data are presented as follows: chemical shift (δ) in ppm, multiplicity, number of protons, *J* values in Hertz (Hz). Multiplicities are indicated by the following abbreviations: s (singlet), d (doublet), dd (double of doublets), t (triplet), m (multiplet), q (quartet), quint (quintet), td (double of triplets), *d*_{ap} (apparent doublet), *t*_{ap} (apparent triplet). For fluorine-containing derivatives, the multiplicity of some carbon signals are described along with *J* values in Hertz. IR spectra were obtained using Varian 660-IR equipped with GladiATR (Varian, Palo Alto, CA, US) scanning from 4000 to 500 cm⁻¹. Melting points were determined using a MQAPF-302 melting point apparatus (Microquímica, Santa Catarina, Brazil) and are uncorrected. The progress of the reactions was monitored by thin layer chromatography (TLC). Flash column chromatography was performed using silica gel (60–230 mesh).

High resolution mass spectra were recorded on a Q-Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Germany). The spectra were acquired using the following conditions. Ionization source: Electron spray (+) and (-); Spray voltage: 3.5 kV; Capillary temperature: 275 °C; Sheath gas: 5 (arbitrary units); Auxiliary gas: 0 (arbitrary units). For the mass spectrometry analyses, the samples were prepared as follows: a mass of 1 mg of the compound to be analyzed was dissolved in 1 mL of acetonitrile. Then, the solution was diluted with 1 mL of methanol so that the final concentration corresponded to 1 ppm. The resulting solution was directly injected in the Q-Exactive equipment at 5 μL min⁻¹. The spectra were recorded in full MS mode.

3.1.2. Procedure for synthesis of 6-methoxyisobenzofuran-1(3H)-one (**1**)

To a 100 mL round bottom flask, it was added 3-methoxybenzoic acid (5.00 g, 32.9 mmol), 3.50 mL of aqueous solution of formaldehyde (37% w/v), 5.50 mL of concentrated HCl, and 12.0 mL of acetic acid. The flask containing the mixture was inserted at the cavity of the CEM Discover System microwave apparatus and the pre-programmed method of the equipment was used for an open system with magnetic stirring for 20 min at 150 W power. After this period, the TLC analysis of the reaction mixture showed that 3-methoxybenzoic acid had been completely consumed. The

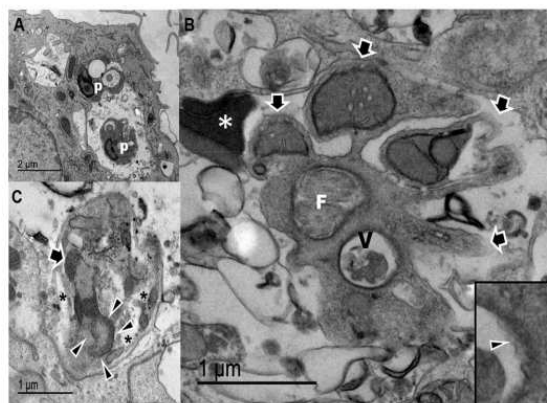


Fig. 5. Transmission electron microscopy of DMSO (A) and **5c**-treated (B, C) cultures. Control macrophages presented parasites (p) with well-preserved structure and electron density. **5c**-treated parasite within parasitophorous vacuole displaying large lobules (B, arrows) with cytoplasmic core containing organelles such as mitochondria, radiating from the central cell body, indicated by the flagellar pocket with two flagella (F). A vesicle containing amorphous material (V) presumably may comprise an autophagosome for the presence of multiple membranes (inset arrowhead) as well as cytoplasmic contents. Electron dense structures (white asterisk) at the cell periphery consist of detached fragments of pycnotic chromatin; parasite attached to the parasitophorous vacuole in a **5c**-treated macrophage (C) The nucleus is unusually-shaped (arrowheads) with evidence of initial pycnosis (arrow). Some electrolucent areas were also observed (black asterisks).

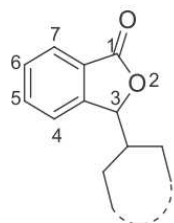


Fig. 6. General structures of isobenzofuranones investigated by Pereira et al. [37] as leishmanicidal compounds.

volume of the solution was then reduced on rotary evaporator and a saturated potassium bicarbonate solution was added (pH 6.0). The aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 × 30.0 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic phase was dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by recrystallization using acetone as the solvent. The compound **1** was obtained in 80% yield (4.31 g, 26.3 mmol). White solid, m.p. 118.0–119.5 °C, TLC: $R_f = 0.31$ (hexane-ethyl acetate 2:1 v/v), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3481, 3085, 2953, 2848, 1754, 1620, 1277, 1247, 1054, 1018, 992, 725, 692, 545 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.86 (s, 3H), 5.26 (s, 2H), 7.22–7.38 (m, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 55.7, 69.5, 107.4, 122.8, 123.0, 126.9, 138.8, 160.5, 171.2.

3.1.3. Synthesis of 6-hydroxyisobenzofuran-1(3H)-one (**2**)

Compound **1** (0.600 g, 3.65 mmol) was added to a 50.0 mL flask followed by addition of 7.00 mL of HBr (48% w/v) and the mixture was submitted to microwave irradiation (20 min at 200 W) similar to what was described for compound **1**. The volume of the solution was then reduced in a rotary evaporator. Hydrobromic acid (HBr) was neutralized with sodium bicarbonate saturated solution. The

resulting mixture was transferred to a separatory funnel and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 × 30.0 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound **2** was obtained in 54% yield (0.297 g, 1.98 mmol). White solid, m.p. 197.1–198.7 °C, TLC: $R_f = 0.26$ (hexane-ethyl acetate 2:1 v/v), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3214 (broad band), 1722, 1598, 1505, 1449, 1227, 1192, 1055, 773, 539 cm^{-1} . ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) δ : 5.25 (s, 2H), 7.15–7.18 (m, 2H), 7.40 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ : 70.1, 109.6, 122.7, 123.2, 126.5, 138.3, 158.6, 172.5.

3.1.4. General procedure for the synthesis of cinnamic acid derivatives **4a–4f**

A 25 mL round-bottom flask was charged with 1.37 g (13.2 mmol) of malonic acid, an aldehyde (6.60 mmol, compounds **3a–3f**, Scheme 1), pyridine (5.00 mL), and piperidine (1.00 mL, 13.0 mmol). The resulting mixture was submitted to microwave irradiation (20 min at 150 W), similar to compounds **1** and **2**. Then, the mixture was poured into an ice bath and 10.0 mL of HCl 16 M. The resulting mixture was vacuum filtered on sintered funnel. The residue was washed with portions of cold water (4 × 5.00 mL). All the cinnamic acid derivatives **4a–4f** were purified by silica gel column chromatography. The structures of the compounds are supported by the following data.

3.1.5. Data for (E)-4-fluorocinnamic acid (**4a**)

White solid, obtained in 95% yield, m.p. 207.0–209.0 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (1:2 v/v), TLC: $R_f = 0.35$ (hexane-ethyl acetate 1:2 v/v), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3500–3200 (broad band), 2980, 2600, 1688, 1625, 1227, 826. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.44 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15.9$ Hz), 7.14 (t, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.68–7.63 (m, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 115.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.8$ Hz), 117.9, 129.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 8.3$ Hz), 130.0 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.8$ Hz), 143.4, 163.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 248.3$ Hz), 168.6.

3.1.6. Data for (E)-4-methoxycinnamic acid (**4b**)

White solid, obtained in 87% yield, m.p. 174.0–177.2 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (1:2 v/v), TLC: $R_f = 0.35$ (hexane-ethyl acetate 1:2 v/v), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3602–3200 (broad band), 2938, 2842, 1680, 1598, 1252, 826. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 3.83 (s, 3H), 6.34 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15.9$ Hz), 6.96 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.55 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.62 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15.9$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 54.5, 114.1, 115.4, 127.0, 129.5, 144.6, 161.6, 169.1.

3.1.7. Data for (E)-(3,4,5)-trimethoxycinnamic acid (**4c**)

White solid, obtained in 81% yield, m.p. 215.3–219.0 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (1:2 v/v), TLC: $R_f = 0.30$ (hexane-ethyl acetate 1:2 v/v), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3134–2905 (broad band), 2836, 2654, 1689, 1627, 1684, 1121, 827. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 3.78 (s, 3H), 3.87 (s, 6H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.2$ Hz), 6.92 (s, 2H), 7.60 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.2$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 52.2, 59.8, 105.3, 117.3, 130.1, 139.8, 144.9, 153.6, 169.2.

3.1.8. Data for (E)-4-nitrocinnamic acid (**4d**)

White solid, obtained in 71% yield, m.p. 284.3–285.9 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (1:2 v/v), TLC: $R_f = 0.30$ hexane/ethyl acetate (1:2 v/v), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3100–2500 (broad band), 1692, 1526, 1349, 847. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.68 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.2$ Hz), 7.62–8.13 (m, 5H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 124.1, 124.3, 129.7, 141.2, 141.6, 148.4, 167.3.

3.1.9. Data for (E)-4-bromocinnamic acid (**4e**)

White solid, obtained in 84% yield, m.p. 264.0–265.0 °C purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (1:2 v/v), TLC: $R_f = 0.30$ hexane/ethyl acetate (1:2 v/v), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2970–2760 (broad band), 1886, 1692, 1622, 1227, 814. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.49 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.1$ Hz), 7.43 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.54 (d, 2H, $J_{\text{trans}} = 16.1$ Hz), 7.65 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 20.7, 129.7, 130.3, 133.6, 135.0, 143.0, 167.6.

3.1.10. Data for (E)-4-chlorocinnamic acid (**4f**)

White solid, obtained in 77% yield, m.p. 241.2–242.0 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (1:2 v/v), TLC: $R_f = 0.30$. IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2928–2520 (broad band), 1902, 1701, 1630, 1400, 821. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.51 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15.9$ Hz), 7.49–7.59 (m, 5H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 120.7, 123.8, 130.5, 132.2, 134.0, 142.7, 167.7.

3.1.11. General procedure for the microwave-assisted synthesis of cinnamates **5a–5f**

To a 25.0 mL round-bottom flask, it was added 1.00 mmol of a cinnamic acid derivative (**4a–4f**), along with 6-hydroxyisobenzofuran-1(3H)-one (**2**) (0.459 g, 2.20 mmol), DCC (0.460 g, 2.20 mmol), DMAP (0.0200 g, 0.200 mmol), and 12.0 mL of methanol. Then, the reaction mixture was submitted to microwave irradiation (40 min at 200 W). After this time, the resulting mixture was filtered and washed with an aqueous solution of citric acid 10% (w/v) (2 × 6.00 mL), distilled water (5.00 mL) and brine (10.0 mL). The aqueous phase was then extracted with ethyl acetate (3 × 15.0 mL). The organic extracts were combined and the organic phase was dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting material was purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-dichloromethane-ethyl acetate (3:2:1 v/v). The structures of the compounds **5a–5f** are supported by the following data.

3.1.12. Data for (E)-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl-(4-fluoro)-cinnamate (**5a**)

Yellow solid, obtained in 71% yield, m.p. 189.1–193.6 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/dichloromethane/ethyl acetate (3:2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.40$ (hexane-dichloromethane-ethyl acetate (3:2:1 v/v)), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3026, 2932, 1767, 1740, 1636, 1238, 829. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.42 (s, 2H), 6.87 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.30 (t, 2H, $J = 9.0$ Hz), 7.62 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz and $J = 2.1$ Hz), 7.60–7.60 (m, 2H), 7.87–7.92 (m, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 70.5, 116.5 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.8$ Hz), 117.1 (d, $J = 2.3$ Hz), 118.4, 124.7, 126.8, 128.8, 130.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.1$ Hz), 131.6 (d, $J_{\text{C-F}} = 8.7$ Hz), 145.1, 146.1, 151.2, 164.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 248.3$ Hz), 165.7, 170.3. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₇H₁₂FO₄, 299.0720; found: 299.0719. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₁₇H₁₁FO₄: 321.0539; found: 321.0542.

3.1.13. Data for (E)-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl-(4-methoxy)-cinnamate (**5b**)

White solid, obtained in 76% yield, m.p. 244.0–247.1 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/dichloromethane/ethyl acetate (3:2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.35$ (hexane-dichloromethane-ethyl acetate (3:2:1 v/v)), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2934, 2848, 1756, 1728, 1604, 1136, 822. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.81 (s, 3H), 5.41 (s, 1H), 6.68 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15.9$ Hz), 7.00 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.58–7.78 (m, 5H), 7.84 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15.9$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 55.8, 70.2, 55.7, 114.5, 115.0, 124.5, 126.7, 126.9, 128.9, 130.9, 144.8, 147.1, 151.5, 162.1, 165.4, 170.2. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₈H₁₅O₅, 311.0919;

found: 311.0914.

3.1.14. Data for (E)-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl-(3,4,5-trimethoxy)-cinnamate (**5c**)

White solid, obtained in 66% yield, m.p. 221.0–222.1 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/dichloromethane/ethyl acetate (3:2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.35$ (hexane-dichloromethane-ethyl acetate (3:2:1 v/v)), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3062, 2944, 2840, 1768, 1720, 1632, 1130, 838. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.67 (s, 1H), 3.90 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 6.92 (d, 2H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.17 (s, 2H), 7.60–7.84 (m, 4H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 55.8, 70.2, 55.7, 114.5, 115.0, 124.5, 126.7, 126.9, 128.9, 130.9, 144.8, 147.1, 151.5, 162.1, 165.4, 170.2. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₂₀H₁₉O₇, 371.1131; found: 371.1127. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₂₀H₁₈NaO₇: 393.0950; found: 393.0949.

3.1.15. Data for (E)-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl-(4-nitro)-cinnamate (**5d**)

Yellow solid, obtained in 54% yield, m.p. 290.0–292.0 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/dichloromethane/ethyl acetate (3:2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.40$ (hexane-dichloromethane-ethyl acetate (3:2:1 v/v)), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3074, 2923, 2851, 1752, 1726, 1520, 1146, 842. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.43 (s, 2H), 7.12 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.2$ Hz), 7.72–7.63 (m, 3H), 8.09 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.2$ Hz), 8.10 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz), 8.27 (d, 2H, $J = 8.9$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 70.3, 118.2, 121.5, 124.4, 124.7, 126.6, 128.7, 130.1, 140.5, 144.4, 145.2, 148.8, 151.3, 164.6, 170.3. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₇H₁₂NO₆, 326.0665; found: 326.0668. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₁₇H₁₁NaNO₆: 348.0484; found: 348.0479.

3.1.16. Data for (E)-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl-(4-bromo)-cinnamate (**5e**)

White solid, obtained in 75% yield, m.p. 273.4–272.0 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/dichloromethane/ethyl acetate (3:2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.40$ (hexane-dichloromethane-ethyl acetate (3:2:1 v/v)), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3028, 2926, 2852, 1752, 1715, 1264, 811. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.42 (s, 2H), 7.94 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.1$ Hz), 7.78–7.60 (m, 7H), 7.86 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.1$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 70.1, 118.1, 118.4, 124.6, 124.8, 126.7, 128.7, 130.9, 132.4, 133.5, 145.3, 146.3, 151.2, 165.4, 170.4. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₇H₁₂BrO₄, 358.9919; found: 358.9918. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₁₇H₁₁NaBrO₄: 380.9738; found: 380.9738. HRMS (M + K⁺): Calculated for C₁₇H₁₂NO₆, 326.0665; found: 326.0668. HRMS (M + K⁺): Calculated for C₁₇H₁₁KBrO₄: 396.9478; found: 396.9465.

3.1.17. Data for (E)-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl-(4-chloro)-cinnamate (**5f**)

White solid, obtained in 69% yield, m.p. 260.1–264.2 °C purified by silica gel column chromatography eluted with hexane/ethyl acetate (3:2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.26$ (hexane-dichloromethane-ethyl acetate (3:2:1 v/v)), IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3062, 3030, 2968, 2852, 1753, 1715, 1057, 816. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.42 (s, 2H), 6.92 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15.9$ Hz), 7.51 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.62 (dd, 1H, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.1$ Hz), 7.69–7.75 (m, 3H), 7.83–7.91 (m, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 70.4, 118.0, 118.4, 124.7, 126.7, 128.6, 129.4, 130.8, 133.1, 135.9, 145.0, 145.2, 151.4, 165.5, 170.5. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₇H₁₂ClO₄, 315.0424; found: 315.0421. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₁₇H₁₁NaClO₄: 337.0244; found: 337.0236. HRMS (M + K⁺): Calculated for C₁₇H₁₂NO₆, 326.0665; found: 326.0668.

3.1.18. General procedure for the synthesis of cinnamates **6** and **7**, exemplified by the synthesis of prop-2-yn-1-yl cinnamate (**6**)

Propargyl alcohol (0.300 g, 5.35 mmol) was added to a 50 mL round-bottom flask containing 25.0 mL of dichloromethane, 0.720 g (4.86 mmol) of cinnamic acid, 1.10 g (5.35 mmol) of DCC and 0.0594 g (0.486 mmol) of DMAP. After 25 min of stirring at room temperature, the reaction mixture was filtered and the resulting solution washed with 10% citric acid (2×20.0 mL), water (15.0 mL) and brine (30.0 mL). The resulting organic phase was reserved and the aqueous phase was extracted with dichloromethane (3×20.0 mL). The organic extracts were combined, and the resulting organic phase was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting material was purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (4:1 v/v). The described procedure afforded compound **6** in 68% yield (0.613 g, 3.30 mmol). Yellow oil, TLC: $R_f = 0.41$ (hexane-ethyl acetate 4:1 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3291, 3062, 2919, 2852, 2127, 1713, 1634, 1446, 1307, 1152. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.51 (t, 1H, $J = 2.5$ Hz), 4.82 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz), 6.47 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.38–7.40 (m, 3H), 7.51–7.55 (m, 2H), 7.75 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 52.0, 74.9, 77.8, 117.0, 128.2, 128.9, 130.5, 134.1, 145.9, 166.0.

Pent-4-yn-1-yl cinnamate (**7**) was prepared as described for **6**. The structure of **7** is supported by the following data.

Yellow oil, obtained in 86% yield, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (6:1 v/v), TLC: $R_f = 0.53$ (hexane-ethyl acetate 6:1 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3296, 3058, 2926, 2118, 1707, 1636, 1446, 1308, 1160. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.90–2.00 (m, 3H), 2.35 (td, 2H, $J_1 = 7.0$ Hz and $J_2 = 2.6$ Hz), 4.32 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 6.44 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.37–7.40 (m, 3H), 7.51–7.54 (m, 2H), 7.69 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 15.3, 27.7, 63.0, 69.0, 83.1, 117.9, 128.1, 128.9, 130.3, 134.4, 144.9, 166.9.

3.1.19. Synthesis of compounds **9a**, **9c–9m**, **10a–10m**, exemplified by the synthesis of (1-(2,5-dichlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9b**)

To a 10.0 mL round-bottom flask, it was added 2,5-(dichloro)benzyl azide (0.109 g, 0.540 mmol), water (1.00 mL), dichloromethane (1.00 mL), sodium ascorbate (0.0427 g, 0.216 mmol), prop-2-yn-1-yl cinnamate (**6**) (0.100 g, 0.540 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0270 g, 0.108 mmol). The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 30 min. Subsequently, saturated Na_2CO_3 solution (10.0 mL) was added and the resulting mixture was extracted with dichloromethane (3×20.0 mL). The organic extracts were combined, and the resulting organic phase was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting material was purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v). The described procedure gave compound **9b** in 87% yield (0.181 g, 0.466 mmol). White solid, m.p. 97.9–98.4 °C, TLC: $R_f = 0.58$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3113, 3073, 2974, 1713, 1634, 1493, 1304, 1146. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 5.36 (s, 2H), 5.62 (s, 2H), 6.43 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.17–7.51 (m, 8H), 7.67–7.73 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 51.0, 57.6, 117.4, 124.1, 128.1, 128.9, 130.2, 130.4, 130.5, 131.0, 131.6, 133.5, 133.8, 134.2, 143.5, 145.6, 166.7. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$, 388.0620; found: 388.0607. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{NaN}_3\text{O}_2$, 410.0439; found: 410.0412. HRMS ($\text{M} + \text{K}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{KN}_3\text{O}_2$, 426.0178; found: 426.0166.

Compounds **9a**, **9c–9m** and **10a–10m** were prepared from the corresponding azides and cinnamates (**6** or **7**) as described for compound **9b**. All the compounds were fully characterized by IR and NMR (^1H and ^{13}C). Structures of the remaining compounds are

supported by the following data.

3.1.20. Data for (1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9a**)

White solid, obtained in 98% yield, m.p. 123.6–124.5 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.28$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3117, 3053, 2948, 1707, 1637, 1577, 1493, 1160. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 5.33 (s, 2H), 5.52 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.29–7.48 (m, 10H), 7.57 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 54.2, 57.6, 117.4, 123.7, 128.10, 128.14, 128.8, 128.9, 129.1, 130.4, 134.2, 134.4, 143.4, 145.5, 166.7. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$, 320.1399; found: 320.1390.

3.1.21. Data for (1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9c**)

White solid, obtained in 81% yield, m.p. 200.8–201.7 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.33$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3132, 3080, 3025, 2967, 1709, 1632, 1576, 1482, 1304, 1160. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 5.25 (s, 2H), 5.55 (s, 2H), 6.59 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.12 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.39–7.41 (m, 3H), 7.62–7.69 (m, 3H), 7.73 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 8.19 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 52.8, 57.7, 94.7, 118.2, 125.3, 128.8, 129.3, 130.7, 130.9, 134.4, 136.1, 138.0, 142.8, 145.4, 166.3. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{IN}_3\text{O}_2$, 446.0365; found: 446.0354. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{IN}_3\text{O}_2$, 468.0185; found: 468.0178. HRMS ($\text{M} + \text{K}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{IKN}_3\text{O}_2$, 483.9924; found: 483.9910.

3.1.22. Data for (1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9d**)

White solid, obtained in 85% yield, m.p. 194.1–195.0 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.18$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3127, 3083, 2966, 2852, 1704, 1625, 1523, 1433, 1341, 1154. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 5.28 (s, 2H), 5.78 (s, 2H), 6.59 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.39–7.41 (m, 3H), 7.55 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.63–7.68 (m, 3H), 8.21 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 8.28 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 52.5, 57.7, 118.2, 124.3, 125.6, 128.8, 129.3, 129.6, 130.9, 134.4, 142.9, 143.6, 145.4, 147.9, 166.3. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_4$, 365.1250; found: 365.1232. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{NaN}_4\text{O}_4$, 387.1069; found: 387.1059. HRMS ($\text{M} + \text{K}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{KN}_4\text{O}_4$, 403.0809; found: 403.0786.

3.1.23. Data for (1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9e**)

White solid, obtained in 94% yield, m.p. 182.0–183.2 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.30$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3136, 3082, 2922, 2852, 1706, 1632, 1577, 1486, 1305, 1162. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 5.24 (s, 2H), 5.58 (s, 2H), 6.63 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.28 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.39–7.41 (m, 3H), 7.57 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.63–7.71 (m, 3H), 8.25 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 52.5, 57.7, 118.0, 121.9, 125.5, 128.9, 129.4, 130.7, 131.0, 132.2, 134.3, 135.8, 142.7, 145.5, 166.3. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 398.0504; found: 398.0495. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{BrNaN}_3\text{O}_2$, 420.0324; found: 420.0319.

3.1.24. Data for (1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9f**)

White solid, obtained in 78% yield, m.p. 171.2–172.6 °C, purified

by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.37$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3139, 3058, 2922, 2852, 1709, 1632, 1577, 1486, 1305, 1160. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.24 (s, 2H), 5.60 (s, 2H), 6.63 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.33–7.71 (m, 10H), 8.25 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 52.5, 57.7, 118.0, 125.5, 128.9, 129.2, 129.4, 130.4, 131.0, 133.4, 134.3, 135.4, 142.7, 145.5, 166.3. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₉H₁₇ClN₃O₂, 354.1009; found: 354.1002.

3.1.25. Data for (1-(3,4-difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9g**)

White solid, obtained in 77% yield, m.p. 149.7–150.8 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.28$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3132, 3064, 2968, 1710, 1632, 1518, 1434, 1282, 1160. ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.34 (s, 2H), 5.48 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.00–7.21 (m, 3H), 7.36–7.40 (m, 3H), 7.48–7.51 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 53.1 (d, $J_{\text{C-F}} = 1.3$ Hz), 57.6, 117.2–118.2 (m), 117.3, 123.7, 124.3 (dd, $J_{\text{C-F}} = 3.7$ Hz and $J_{\text{C-F}} = 6.5$ Hz), 128.1, 128.9, 130.5, 131.3 (dd, $J_{\text{C-F}} = 4.0$ Hz and $J_{\text{C-F}} = 5.6$ Hz), 134.1, 143.7, 145.6, 148.8–152.3 (m), 166.7. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₉H₁₆F₂N₃O₂, 365.1211; found: 365.1193. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₁₉H₁₅F₂NaN₃O₂; 378.1030; found: 387.1011. HRMS (M + K⁺): Calculated for C₁₉H₁₅F₂KN₃O₂, 394.0769; found: 394.0747.

3.1.26. Data for (1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9h**)

White solid, obtained in 88% yield, m.p. 132.3–133.2 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.25$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3138, 3085, 2966, 1711, 1634, 1508, 1433, 1218, 1167. ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.33 (s, 2H), 5.49 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.1$ Hz), 7.06 (t_{ap}, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.25–7.51 (m, 7H), 7.57 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.1$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 53.5, 57.6, 116.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 21.7$ Hz), 117.4, 123.6, 128.1, 128.9, 130.0 (d, $J_{\text{C-F}} = 8.5$ Hz), 130.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 3.1$ Hz), 130.5, 134.2, 143.5, 145.6, 162.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 247.0$ Hz), 166.7. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₉H₁₇FN₃O₂, 338.1305; found: 338.1296. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₁₉H₁₆FN₃O₂; 360.1124; found: 360.1119. HRMS (M + K⁺): Calculated for C₁₉H₁₆FN₃O₂; 376.0864; found: 376.0847.

3.1.27. Data for (1-(4-(trifluoromethoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9i**)

White solid, obtained in 89% yield, m.p. 159.6–160.3 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.38$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3135, 3058, 2964, 1709, 1634, 1507, 1451, 1218, 1140. ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.34 (s, 2H), 5.53 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.22 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.32 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.36–7.38 (m, 3H), 7.48–7.51 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 53.3, 57.6, 117.4, 120.3 (q, $J_{\text{C-F}} = 256.2$ Hz), 121.6, 123.7, 128.1, 128.9, 129.6, 130.5, 133.1, 134.1, 143.6, 145.6, 149.5, 166.7. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₂₀H₁₇F₃N₃O₃, 404.1222; found: 404.1207.

3.1.28. Data for (1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9j**)

White solid, obtained in 87% yield, m.p. 174.0–174.8 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.40$ (hexane-ethyl acetate-

dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3133, 3084, 2966, 1709, 1632, 1579, 1496, 1319, 1153, 1102. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.26 (s, 2H), 5.73 (s, 2H), 6.64 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.39–7.41 (m, 3H), 7.51 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.63–7.71 (m, 3H), 7.74 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 8.31 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 52.6, 57.7, 118.0, 124.5 (q, $J_{\text{C-F}} = 270.6$ Hz), 125.7, 126.2 (q, $J_{\text{C-F}} = 3.8$ Hz), 128.9, 128.9, 129.2, 129.4, 131.0, 134.3, 141.0, 142.8, 145.5, 166.4. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₂₀H₁₇F₃N₃O₂, 388.1273; found: 388.1263. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₂₀H₁₆F₃NaN₃O₂; 410.1092; found: 410.1068. HRMS (M + K⁺): Calculated for C₂₀H₁₆F₃KN₃O₂, 426.0832; found: 426.0807.

3.1.29. Data for (1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9k**)

White solid, obtained in 79% yield, m.p. 94.2–95.6 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.41$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3125, 3014, 2842, 1719, 1640, 1610, 1510, 1433, 1244, 1156. ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 3.79 (s, 3H), 5.31 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 6.89 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.24 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.36–7.50 (m, 5H), 7.53 (s, 1H), 7.68 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 53.8, 55.3, 57.7, 114.5, 117.5, 123.4, 126.3, 128.1, 128.9, 129.7, 130.4, 134.2, 143.2, 145.5, 160.0, 166.7. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₂₀H₂₀N₃O₃, 350.1505; found: 350.1490.

3.1.30. Data for (1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9l**)

White solid, obtained in 86% yield, m.p. 76.7–78.2 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.48$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3104, 3058, 2971, 2923, 1695, 1626, 1453, 1440, 1244. ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.35 (s, 2H), 5.67 (s, 2H), 6.43 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.17–7.63 (m, 9H), 7.67–7.72 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 53.8, 57.6, 117.4, 123.5, 124.0, 128.1, 128.2, 128.9, 130.4, 130.5, 133.2, 133.9, 134.2, 143.3, 145.5, 166.7. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₉H₁₇BrN₃O₂, 398.0504; found: 398.0493. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₁₉H₁₆BrNaN₃O₂; 420.0324; found: 420.0315. HRMS (M + K⁺): Calculated for C₁₉H₁₆BrKN₃O₂, 436.0063; found: 436.0055.

3.1.31. Data for (1-(2,4,6-trichlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl cinnamate (**9m**)

White solid, obtained in 99% yield, m.p. 122.8–124.1 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.48$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3148, 3083, 2925, 2850, 1697, 1632, 1548, 1437, 1313, 1167. ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 5.32 (s, 2H), 5.80 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.38–7.49 (m, 7H), 7.63 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 48.5, 57.5, 117.4, 123.6, 128.1, 128.6, 128.8, 128.9, 130.4, 134.2, 136.4, 137.3, 143.0, 145.5, 166.7.

3.1.32. Data for 3-(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (**10a**)

White solid, obtained in 73% yield, m.p. 68.1–69.5 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.26$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3062, 2935, 1705, 1634, 1552, 1450, 1309, 1163; ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ : 2.09 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.48 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz), 7.24–7.53 (m, 11H), 7.66 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ : 22.3, 28.4, 54.0, 63.6, 118.0, 120.8, 128.0, 128.1, 128.6, 128.9, 129.1, 130.3, 134.3, 134.8,

144.8, 147.4, 167.0. HRMS ($M + H^+$): Calculated for $C_{21}H_{22}N_3O_2$, 348.1712; found: 348.1707.

3.1.33. Data for 3-(1-(2,5-dichlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (10b)

White solid, obtained in 80% yield, m.p. 94.3–95.3 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.48$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3116, 3067, 2940, 1703, 1632, 1577, 1461, 1320, 1166. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.12 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.87 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.26 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.58 (s, 2H), 6.43 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.11–7.54 (m, 9H), 7.67 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 22.3, 28.4, 50.8, 63.6, 118.0, 121.3, 128.1, 128.9, 129.9, 130.2, 130.3, 130.9, 131.4, 133.5, 134.3, 144.8, 147.6, 167.0. HRMS ($M + H^+$): Calculated for $C_{21}H_{20}Cl_2N_3O_2$, 416.0933; found: 416.0907.

3.1.34. Data for 3-(1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (10c)

White solid, obtained in 77% yield, m.p. 97.5–98.3 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.37$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3112, 3063, 2904, 2852, 1707, 1636, 1546, 1446, 1280, 1166. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.09 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.42 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 6.99 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.25 (s, 1H), 7.38–7.70 (m, 8H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 22.2, 28.3, 53.4, 63.6, 94.4, 117.9, 120.8, 128.0, 128.9, 129.7, 130.3, 134.3, 134.5, 138.2, 144.8, 147.6, 166.9. HRMS ($M + H^+$): Calculated for $C_{21}H_{21}IN_3O_2$, 474.0678; found: 474.0671.

3.1.35. Data for 3-(1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (10d)

White solid, obtained in 73% yield, m.p. 63.8–65.2 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.14$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3139, 2946, 2913, 2853, 1707, 1631, 1524, 1450, 1343, 1309, 1159. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.11 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.86 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.25 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.60 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.35–7.50 (m, 8H), 7.65 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 8.20 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 22.2, 28.3, 53.0, 63.5, 117.9, 121.2, 124.3, 128.0, 128.5, 128.9, 130.4, 134.3, 141.9, 144.9, 147.9, 148.0, 166.9. HRMS ($M + H^+$): Calculated for $C_{21}H_{21}N_4O_4$, 393.1563; found: 393.1553.

3.1.36. Data for 3-(1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (10e)

Yellow solid, obtained in 74% yield, m.p. 101.7–102.9 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.58$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3112, 3056, 2954, 2905, 2848, 1708, 1637, 1545, 1446, 1283, 1166. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.09 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.43 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.12 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz), 7.25 (s, 1H), 7.38–7.50 (m, 7H), 7.66 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 22.2, 28.3, 53.3, 63.6, 117.9, 120.8, 122.8, 128.0, 128.9, 129.6, 130.3, 132.2, 133.8, 134.3, 144.8, 147.6, 166.9. HRMS ($M + H^+$): Calculated for $C_{21}H_{21}BrN_3O_2$, 426.0817; found: 426.0802.

3.1.37. Data for 3-(1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (10f)

Yellow solid, obtained in 76% yield, m.p. 58.2–59.4 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl

acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.34$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3117, 3060, 2967, 2904, 2851, 1706, 1638, 1545, 1490, 1283, 1167. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.08 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.23 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.45 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.18 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.25 (s, 1H), 7.32 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.36–7.51 (m, 5H), 7.66 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 22.2, 28.3, 53.2, 63.6, 117.9, 120.8, 128.0, 128.9, 129.3, 130.3, 133.3, 134.3, 134.7, 144.8, 147.6, 166.9. HRMS ($M + H^+$): Calculated for $C_{21}H_{21}ClN_3O_2$, 382.1322; found: 382.1302.

3.1.38. Data for 3-(1-(3,4-difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (10g)

White solid, obtained in 80% yield, m.p. 69.5–70.3 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.18$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3099, 3053, 2956, 2931, 2858, 1701, 1634, 1520, 1447, 1312, 1160. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.10 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.84 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.25 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.44 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 6.97–7.19 (m, 3H), 7.28 (s, 1H), 7.37–7.39 (m, 3H), 7.50–7.52 (m, 2H), 7.66 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 22.2, 28.3, 52.9 (d, $J_{C-F} = 1.3$ Hz), 63.5, 117.0–118.1 (m), 117.9, 120.8, 124.0 (dd, $J_{C-F} = 3.8$ Hz and $J_{C-F} = 6.6$ Hz), 128.0, 128.9, 130.3, 131.8 (dd, $J_{C-F} = 4.0$ Hz and $J_{C-F} = 5.6$ Hz), 134.3, 144.9, 147.7, 148.7–152.2 (m), 166.9. HRMS ($M + H^+$): Calculated for $C_{21}H_{19}F_2N_3O_2$, 384.1524; found: 384.1513.

3.1.39. Data for 3-(1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (10h)

White solid, obtained in 82% yield, m.p. 75.9–76.8 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.18$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3132, 3066, 2944, 1703, 1632, 1509, 1313, 1219, 1157. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.09 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.45 (s, 2H), 6.41 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.04 (t_{ap} , 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.22–7.53 (m, 8H), 7.66 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 22.2, 28.3, 53.3, 63.6, 116.1 (d, $J_{C-F} = 21.6$ Hz), 117.9, 120.7, 128.0, 128.9, 129.8 (d, $J_{C-F} = 8.4$ Hz), 130.3, 130.7 (d, $J_{C-F} = 3.3$ Hz), 134.3, 144.8, 147.5, 162.8 (d, $J_{C-F} = 246.5$ Hz), 166.9. HRMS ($M + H^+$): Calculated for $C_{21}H_{21}FN_3O_2$, 366.1618; found: 366.1608.

3.1.40. Data for 3-(1-(4-(trifluoromethoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (10i)

White solid, obtained in 84% yield, m.p. 73.8–75.0 °C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.37$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3126, 3068, 2993, 2949, 1706, 1634, 1508, 1449, 1160. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.10 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.84 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.25 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.49 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.20 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.27–7.51 (m, 8H), 7.67 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 22.2, 28.3, 53.1, 63.6, 117.9, 120.3 (q, $J_{C-F} = 256.1$ Hz), 120.8, 121.5, 128.0, 128.9, 129.4, 130.3, 133.5, 134.3, 144.9, 147.8, 149.3, 167.0. HRMS ($M + H^+$): Calculated for $C_{22}H_{21}F_3N_3O_3$, 432.1535; found: 432.1522.

3.1.41. Data for 3-(1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (10j)

White solid, obtained in 79% yield, m.p. 97.3–98.2 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.25$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/cm^{-1}$: 3116, 3063, 2954, 1708, 1638, 1447, 1324, 1121. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 2.10 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz),

2.85 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 4.25 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.56 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{trans} = 16.1$ Hz), 7.29–7.69 (m, 11H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.2, 28.3, 53.3, 63.5, 117.9, 121.0, 123.8 (q, $J_{C-F} = 270.6$ Hz), 126.1 (q, $J_{C-F} = 3.7$ Hz), 128.0, 128.1, 128.9, 130.3, 130.9 (q, $J_{C-F} = 32.6$ Hz), 134.3, 138.8, 144.9, 147.8, 167.0. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$, 416.1586; found: 416.1580.

3.1.42. Data for 3-(1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (**10k**)

White solid, obtained in 78% yield, m.p. 87.3–88.6 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.28$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/\text{cm}^{-1}$: 3101, 3054, 3006, 2949, 2831, 1707, 1638, 1509, 1434, 1243, 1167. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1.95 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.70 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.70 (s, 3H), 4.15 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz), 5.43 (s, 2H), 6.61 (d, 1H, $J_{trans} = 16.1$ Hz), 6.89 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.24 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.39–7.41 (m, 3H), 7.60–7.71 (m, 3H), 7.87 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 22.0, 28.5, 52.7, 55.5, 63.9, 114.5, 118.5, 122.3, 128.6, 128.8, 129.3, 129.9, 130.9, 134.4, 144.9, 146.7, 159.5, 166.7. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3$, 378.1818; found: 378.1802.

3.1.43. Data for 3-(1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (**10l**)

Yellow oil, obtained in 84% yield, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.33$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/\text{cm}^{-1}$: 3136, 3059, 3027, 2953, 2855, 1703, 1634, 1573, 1443, 1309, 1165. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.10 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.85 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.25 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.62 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.10–7.62 (m, 10H), 7.67 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.3, 28.4, 53.7, 63.6, 118.0, 121.2, 123.3, 128.1, 128.2, 128.9, 130.2, 130.26, 130.28, 133.1, 134.3, 134.4, 144.8, 147.4, 166.9. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 426.0817; found: 426.0808.

3.1.44. Data for 3-(1-(2-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (**10m**)

White solid, obtained in 75% yield, m.p. 45.5–46.3 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (2:1 v/v), TLC: $R_f = 0.35$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\bar{\nu}_{max}/\text{cm}^{-1}$: 3125, 3061, 2948, 1710, 1636, 1490, 1313, 1166. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.09 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.83 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.54 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz), 7.07–7.53 (m, 10H), 7.66 (d, 1H, $J_{trans} = 16.0$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.3, 28.4, 47.5 (d, $J_{C-F} = 4.4$ Hz), 63.7, 115.8 (d, $J_{C-F} = 21.1$ Hz), 118.0, 120.9 (d, $J_{C-F} = 1.5$ Hz), 122.1 (d, $J_{C-F} = 14.7$ Hz), 124.8 (d, $J_{C-F} = 3.7$ Hz), 128.1, 128.9, 130.3, 130.5 (d, $J_{C-F} = 3.3$ Hz), 130.8 (d, $J_{C-F} = 8.2$ Hz), 134.4, 144.8, 147.5, 160.5 (d, $J_{C-F} = 246.3$ Hz), 167.0. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_2$, 366.1618; found: 366.1611. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_2$: 388.1437; found: 388.1424. HRMS ($\text{M} + \text{K}^+$): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{FKN}_3\text{O}_2$, 404.1177; found: 404.1168.

3.2. Biological assays

3.2.1. Mammalian cells and parasite strain

RAW 264.7 macrophages (host cells) were kept in RPMI medium (RPMI-1640, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37 °C in a humid atmosphere containing 5% of CO_2 . *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 promastigotes were maintained in Grace's medium (Grace's Insect Cell Culture Medium, Gibco® by Life Technologies™, Grand Island, NY, USA) at 25 °C. Both media were supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (LGC Biotecnologia, SP, Brazil), L-

glutamine (2 mM – Serva Electrophoresis & Life Science Products, NY, USA) and penicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – USB Corporation, OH, USA).

3.2.2. General procedure for the dilution of cinnamic acid derivatives

All cinnamic acid derivatives were dissolved in DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) to obtain a concentration of 10 mM. Then, these solutions were diluted with sterilized ultrapure water to prepare 0.5 mM solutions. The solutions were stored at –20 °C until use.

3.2.3. General procedures for assessment of host cell cytotoxicity

The toxicity to RAW 264.7 macrophages was evaluated by the measure of cell viability using the resazurin method [63]. The cytotoxicity to macrophage was carried out in 96 well microplate seeding 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ of cell suspension (2.5×10^5 cells/mL) or 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ of supplemented RPMI medium (blank control). Four internal controls were used in the assays, namely 1) the blank control with supplemented RPMI medium, 2) the control of macrophages without treatment, 3) the control of the known leishmanicidal compound amphotericin B (3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and 4) the DMSO control added to macrophages at same concentration used in the dilution of compounds (0.1%). The cinnamic acid derivatives were assayed at 10 μM final concentration. All compounds were evaluated in quadruplicates. The resazurin reduction was calculated as previously described [63]. Experiments were performed independently three times in quadruplicates.

The IC_{50} of the compounds **5c** and **9g** on macrophages were obtained, since these compounds showed the best results in the screening tests. Assays were done as described above, except for the number of macrophages/well that was 5×10^4 . Compounds were tested at the following concentrations: 80 μM , 40 μM , 30 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM , 2.5 μM , 1 μM . Positive and negative controls were amphotericin B and DMSO, respectively, at the concentrations mentioned above. The assays were repeated three times in quadruplicates.

3.2.4. General procedures for assessment of cinnamic acid derivatives against promastigotes

Promastigotes viability was measured using the resazurin method as previously reported [63]. Positive and negative controls were amphotericin B and DMSO, respectively, as mentioned above.

The IC_{50} of compounds **5c** and **9g** against *L. braziliensis* promastigotes were also determined, since these compounds showed the best results in the screening tests. Assays were done as described above. The IC_{50} were calculated using GraphPad Prism Version 5.0.

3.2.5. General procedures for assessment of cinnamic acid derivatives on macrophages infected by *L. braziliensis*

The action of compounds against intracellular leishmanial amastigotes during macrophage infection was assayed using the resazurin method [63]. The assays were repeated three times in quadruplicates.

The IC_{50} of **5c** and **9g** in macrophages infection assay were calculated, since these compounds showed the best results in the screening tests. Assays were done as described above, except for the number of macrophages/well, which was 1×10^5 . The ratio 15:1 *Leishmania*/macrophages was maintained. Compounds were tested as described above. The IC_{50} were calculated using GraphPad Prism Version 5.0.

3.2.6. Selectivity index

The selectivity index (SI) for each compound was calculated according to the following equation.

$$SI = \frac{IC_{50} \text{ calculated against macrophages}}{IC_{50} \text{ calculated in the infection assay}}$$

3.2.7. Statistical analyses

The identification of outliers of percentage values of each control or treatment was analyzed by ROUT method ($Q=1\%$) on GraphPad Prism (v 6.01). After that, each assay was repeated at least three times until met the following two parameters: a) obtaining at least two replicates with statistically equal means by t-student test or One-way ANOVA, with Tukey post-test, both $p \leq 0.05$; b) the replicates met the normality test (Gaussian distribution) of D'Agostino-Pearson. After selecting the data, each treatment was compared with DMSO control by One-way ANOVA, with post-test of Dunnett ($p \leq 0.05$).

3.2.8. Ultrastructure assay

The macrophages infection assay by *L. braziliensis* was done as previously described [63]. After 48 h of treatment with the compounds, the samples were washed 3 times in PBS and then fixed with 1% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, overnight at 4 °C. The samples were then washed 3 times in sodium cacodylate buffer to remove the fixative and post-fixed in 1% OsO₄, 0.8% K₃[Fe(CN)₆] and 5 mM CaCl₂ in the same buffer. Samples dehydration was performed in graded acetone (15–100%), and the samples were imbed, in epoxy resin PolyBed (PolyScience Inc.), which was polymerized at 60 °C for 48 h. Ultrathin sections were stained with 7% uranyl acetate and 4% lead nitrate aqueous solutions and were examined at an analytical transmission electron microscope JEOL- JEM-1011 [64].

4. Conclusions

The combination of cinnamic acid derivatives with isobenzofuranone or triazole groups resulted in compounds with important activity against *L. braziliensis*. Concerning the combination isobenzofuranone and cinnamic acid, it was demonstrated that functionalization at C-6 of isobenzofuranone nucleus afforded more active compounds than other isobenzofuranones described by us. In addition, it seems that oxygenated functionality at the aromatic ring of cinnamic acid portion has a beneficial effect in terms of leishmanicidal activity. Taking the combination cinnamic and triazole, the majority of the active derivatives are halogenated at the aromatic ring of the triazole portion. This structural feature, regarding leishmanicide activity, seems to be important for the second aforementioned combination. Our results open new frontiers to the development of novel leishmanicidal drugs highlighting that the addition of two different bioactive chemical groups could lead to interesting bioactive compounds.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Focruz for financial support, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for JLRF, TSO and MAVS fellowships. This study was sponsored, in part, by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Grant Code 001.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111688>.

References

- [1] WHO, 2017, Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance, *Wkly. Epidemiol.* 92 (2017) 557–565. Rec. No. 38.
- [2] D. Pace, Leishmaniasis, *J. Infect.* 69 (Supplement 1) (2014) S10–S18.
- [3] N.K. Copeland, N.E. Aronson, Leishmaniasis: treatment updates and clinical practice guidelines review, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 28 (2015) 426–437.
- [4] WHO, Fact sheets - World health day 2014 - vector-borne diseases, Available online. <http://www.euro.who.int/en/media-centre/sections/fact-sheets/2014/03/fact-sheets-world-health-day-2014-vector-borne-diseases/fact-sheet-dengue-in-the-who-european-region>. (Accessed 8 March 2019).
- [5] S.M. Skraba, R.B. Pedrosa, A. Fiorini, F.R. Rosado, S.M.A. Aristides, M.V.C. Lonardoni, J.J.V. Teixeira, T.G.V. Silveira, Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of Leishmania (Viannia) braziliensis, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78 (2014) 411–417.
- [6] A.P. Dagnino, F.M.C. De Barros, G.V. Ccana-Ccapatinta, J.S. Prophiro, G.L. Von Poser, P.R.T. Romão, Leishmanicidal activity of lipophilic extracts of some *Hypericum* species, *Phytomedicine* 22 (2015) 71–76.
- [7] C.M.F. Gontijo, M.N. Melo, Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas, *Rev. Bras. Epidemiol* 7 (2004) 338–349.
- [8] N. Vallavoju, A. Ugrinov, J. Sivaguru, M.B.J. Atkinson, A.N. Sokolov, S. Mariappan, M.T. Mwangi, M.C. Tiedman, M. Sakamoto, F. Yagishita, A. Saito, A. Unosawa, T. Mino, T. Fujita, R. Maeda, T. Wada, A. Kusaka, T. Mori, M. Iwamoto, Y. Inoue, Y. Chen, Y. Liu, O. Shvydkiv, S.B. Tan, K. Nolan, N. Hoffmann, A. Youssef, T. Ito, E. Nishiuchi, Y. Inoue, T. Mori, Plant natural products with leishmanicidal activity, *Chem. Commun.* 46 (2011) 6554–6556.
- [9] M. Cr. M. Sn, Natural products in drug discovery and development, *J. Nat. Prod.* 3864 (1997) 52–60.
- [10] G.M. Cragg, D.J. Newman, Natural products: a continuing source of novel drug leads, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2013) 3670–3695.
- [11] F.E. Regnier, P. Press, L.E. Manzer, F. Bellesia, M. Structures, F. Jour, P.P. Data, D.C. Supports, R. Cited, S. Metallic, C. Obtained, P.E. Dentz, *Methods for Making and Using Novel Semi-synthetic Small Molecules for the Treatment Parasitic Disease*, vol 53, United States Pat, 2016.
- [12] R. Duval, C. Duplais, Fluorescent natural products as probes and tracers in biology, *Nat. Prod. Rep.* 34 (2017) 161–193.
- [13] T. Rodrigues, D. Reker, P. Schneider, G. Schneider, Counting on natural products for drug design, *Nat. Chem.* 8 (2016) 531–541.
- [14] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 2004–2021.
- [15] J. Genovino, D. Sames, L.G. Hamann, B.B. Touré, Accessing drug metabolites via transition-metal catalyzed C–H oxidation: the liver as synthetic inspiration, *Angew. Chem. Int. Ed.* 55 (2016) 14218–14238.
- [16] J.A. Hoskins, The occurrence, metabolism and toxicity of cinnamic acid and related compounds, *J. Appl. Toxicol.* 4 (1984) 283–292.
- [17] B. Orlikova, N. Legrand, J. Panning, M. Dicato, M. Diederich, Anti-inflammatory and anticancer drugs from nature, in: V. Zappia, S. Panico, G.L. Russo, A. Budillon, F. Della Ragione (Eds.), *Adv. Nutr. Cancer, Springer Berlin Heidelberg*, Berlin, Heidelberg, 2014, pp. 123–143.
- [18] O. Taofiq, R.C. Calhelha, S. Heleno, L. Barros, A. Martins, C. Santos-Buelga, M.J.R.P. Queiroz, I.C.F.R. Ferreira, The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives, *Food Res. Int.* 76 (2015) 821–827.
- [19] M. Beyki, S. Zhavah, S.T. Khalili, T. Rahmani-Cherati, A. Abollahi, M. Bayat, M. Tabatabaei, A. Mohsenifar, Encapsulation of Mentha piperita essential oils in chitosan-cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*, *Ind. Crops Prod.* 54 (2014) 310–319.
- [20] G. Laverty, A.P. McCloskey, S.P. Gorman, B.F. Gilmore, Anti-biofilm activity of ultrashort cinnamic acid peptide derivatives against medical device-related pathogens, *J. Pept. Sci.* 21 (2015) 770–778.
- [21] B. Korošec, M. Sova, S. Turk, N. Kraševc, M. Novak, L. Lah, J. Stojan, B. Podobnik, S. Berne, N. Zupanec, M. Bunc, S. Gobec, R. Komel, Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53), *J. Appl. Microbiol.* 116 (2014) 955–966.
- [22] T.C. Lima, A.R. Ferreira, D.F. Silva, E.O. Lima, D.P. de Sousa, Antifungal activity of cinnamic acid and benzoic acid esters against *Candida albicans* strains, *Nat. Prod. Res.* 6419 (2017) 1–4.
- [23] A.M. Alberto, P.C. Dorian, Synthesis, characterization, thermal behavior, and antifungal activity of La(III) complexes with cinnamates and 4-methoxyphenylacetate, *J. Rare Earths* 31 (2013) 1106–1113.
- [24] D. Chavarria, T. Silva, D. Martins, J. Bravo, T. Summavielle, J. Garrido, F. Borges, Exploring cinnamic acid scaffold: development of promising neuroprotective lipophilic antioxidants, *Medchemcomm* 6 (2015) 1043–1053.
- [25] F.L. Hakkim, M. Miura, N. Matsuda, A.S. Alharassi, G. Guillemin, M. Yamauchi, G. Arivazhagan, H. Song, An in vitro evidence for caffeic acid, rosmarinic acid and trans cinnamic acid as a skin protectant against γ -radiation, *Int. J. Low*

- Radiat. (9) (2014) 305–316.
- [26] W.-M. Zhang, M. Xing, T.-T. Zhao, Y.-J. Ren, X.-H. Yang, Y.-S. Yang, P.-C. Lv, H.-L. Zhu, Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of cinnamic acid derivatives with pyrazole moieties as novel anticancer agents, *RSC Adv.* 4 (2014) 37197–37207.
- [27] B. Zhu, B. Shang, Y. Li, Y. Zhen, Inhibition of histone deacetylases by trans-cinnamic acid and its antitumor effect against colon cancer xenografts in athymic mice, *Mol. Med. Rep.* 13 (2016) 4159–4166.
- [28] L. Monzote, W.H. Perera Córdova, M. García, A. Piñón, W.N. Setzer, In-vitro and in-vivo activities of phenolic compounds against cutaneous leishmaniasis, *Rec. Nat. Prod.* 10 (2016) 269–276.
- [29] X.L. Yang, S. Zhang, Q.B. Hu, D.Q. Luo, Y. Zhang, Phthalide derivatives with antifungal activities against the plant pathogens isolated from the liquid culture of *Pestalotiopsis photiniae*, *J. Antibiot.* 64 (2011) 723–727.
- [30] N. Katoh, T. Nakahata, S. Kuwahara, Synthesis of novel antifungal phthalides produced by a wheat rhizosphere fungus, *Tetrahedron* 64 (2008) 9073–9077.
- [31] T. Saito, T. Itabashi, D. Wakana, H. Takeda, T. Yaguchi, K.I. Kawai, T. Hosoe, Isolation and structure elucidation of new phthalide and phthalane derivatives, isolated as antimicrobial agents from *Emericella* sp. IFM57991, *J. Antibiot.* 69 (2016) 89–96.
- [32] G.C. Resende, E.S. Alvarenga, T.A. de Araújo, J.N. Campos, M.C. Pincanço, Toxicity to *Diaphania hyalinata*, selectivity to non-target species and phytotoxicity of furanones and phthalide analogues, *Pest Manag. Sci.* 72 (2016) 1772–1777.
- [33] A.F. Maia, R.P. Siqueira, F.M. de Oliveira, J.G. Ferreira, S.F. da Silva, C.A.D. Caiuby, L.L. de Oliveira, S.O. de Paula, R.A.C. Souza, S. Guillard, G.C. Bressan, R.R. Teixeira, Synthesis, molecular properties prediction and cytotoxic screening of 3-(2-aryl-2-oxoethyl) isobenzofuran-1(3H)-ones, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 26 (2016) 2810–2816.
- [34] R.R. Teixeira, G.C. Bressan, W.L. Pereira, J.G. Ferreira, F.M. de Oliveira, D.C. Thomaz, Synthesis and antiproliferative activity of C-3 functionalized isobenzofuran-1(3H)-ones, *Molecules* 18 (2013) 1881–1896.
- [35] A.A. Momtazi, O. Askari-Khorasgani, E. Abdollahi, H. Sadeghi-Aliabadi, F. Mortazaeinezhad, A. Sahebkar, Phytochemical analysis and cytotoxicity evaluation of *Kelussia odoratissima* mozaiff, *JAMS J. Acupunct. Meridian Stud.* 10 (2017) 180–186.
- [36] J.W. Chung, R.J. Choi, E.-K. Seo, J.-W. Nam, M.-S. Dong, E.M. Shin, L.Y. Guo, Y.S. Kim, Anti-inflammatory effects of (*Z*)-ligustilide through suppression of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B activation pathways, *Arch Pharm. Res. (Seoul)* 35 (2012) 723–732.
- [37] W.L. Pereira, R. De Souza Vasconcellos, C. Mariotini-Moura, R.S. Gomes, R. De Cássia Firmino, A.M. Da Silva, A.S. Júnior, G.C. Bressan, M.R. Almeida, L.C.C. Afonso, R.R. Teixeira, J.L.R. Fietto, D.J. McPhee, The antileishmanial potential of C-3 functionalized isobenzofuranones against *Leishmania* (*Leishmania*) *Infantum* Chagasi, *Molecules* 20 (2015) 22435–22444.
- [38] K.P. Kheirabadi, S.S. Dehkordi, P. Kheibari, Effect of *Kelussia odoratissima* Mozaiff essential oil on promastigote form of *Leishmania major* (in vitro), *J. Herb. Med. Pharmacol.* 4 (2015) 10–14.
- [39] R. Dua, S. Shrivastava, S.K. Sonwane, S.K. Srivastava, Pharmacological significance of synthetic heterocycles scaffold: a review, *Adv. Biol. Res.* 5 (2011) 120–144.
- [40] J.A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry*, fifth ed., Wiley, United Kingdom, 2010, p. 689.
- [41] L.D. Quin, J.A. Tyrell, *Fundamentals of Heterocyclic Chemistry – Importance in Nature and in the Synthesis of Pharmaceuticals*, Wiley, New Jersey, United States, 2010, p. 327.
- [42] C. Lamberth, J. Dinges (Eds.), *Bioactive Heterocyclic Compound Classes: Pharmaceuticals*, Wiley-VCH Verlag & Co., Weinheim, Germany, 2012, p. 378.
- [43] L. Baptista de Oliveira Freitas, F. Armini Ruela, G. Rocha Pereira, R. Brondi Alves Rossimiriari Pereira de Freitas, The “click” reaction in the synthesis of 1,2,3-triazoles: chemical aspects and applications, *Quim. Nova* 34 (2011) 1791–1804.
- [44] F. de C. da Silva, M.C.B.V. de Souza, I.L.P. Frugulhetti, H.C. Castro, S.L.D.O. Souza, T.M.L. de Souza, D.Q. Rodrigues, A.M.T. Souza, P.A. Abreu, F. Passamani, C.R. Rodrigues, V.F. Ferreira, Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 373–383.
- [45] H. Gallardo, G. Conte, F. Bryk, M.C.S. Lourenço, M.S. Costac, V.F. Ferreira, Synthesis and evaluation of 1-alkyl-4-phenyl-[1,2,3]-triazole derivatives as antimycobacterial agent, *J. Braz. Chem. Soc.* 18 (2007) 1285–1291.
- [46] M.J. Genin, D.A. Allwine, D.J. Anderson, M.R. Barbachyn, D.E. Emmert, S.A. Garmon, D.R. Graber, K.C. Grega, J.B. Hester, D.K. Hutchinson, J. Morris, R.J. Reischer, C.W. Ford, G.E. Zurenko, J.C. Hamel, R.D. Schaadt, D. Stapert, B.H. Yagi, Substituent effects on the antibacterial activity of nitrogen-carbon-linked (azolyphenyl)oxazolidinones with expanded activity against the fastidious gram-negative organisms *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 953–970.
- [47] D.R. Hernández, L.C.A. Barbosa, A.J. Demuner, A.N. Perez, S.R. Ferreira, R.T. Fujiwara, R.M. de Almeida, L. Heller, R. Cstak, Leishmanicidal and cytotoxic activity of hederagenin-bis-triazolyl derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 140 (2017) 624–635.
- [48] R.R. Teixeira, P.A.R. Gazolla, A.M. da Silva, M.P.G. Borsodi, B.R. Bergmann, R.S. Ferreira, B.G. Vaz, G.A. Vasconcelos, W.P. Lima, Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities, *Eur. J. Med. Chem.* 146 (2018) 274–286.
- [49] A.C. Cunha, J.M. Figueiredo, J.L.M. Tributino, A.L.P. Miranda, H.C. Castro, R.B. Zingali, C.A.M. Fraga, M.C.B.V. De Souza, V.F. Ferreira, E.J. Barreiro, Antiplatelet properties of novel N-substituted-phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 2051–2059.
- [50] D.V. Demchuk, A.V. Samet, N.B. Chernysheva, V.I. Ushkarov, G.A. Stashina, L.D. Konyushkin, M.M. Raihstat, S.I. Firgang, A.A. Philchenkov, M.P. Zavelevich, L.M. Kuiuava, V.F. Chekhun, D.Y. Blokhin, A.S. Kiselyov, M.N. Semenova, V.V. Semenov, Synthesis and antiproliferative activity of conformationally restricted 1,2,3-triazole analogues of combretastatin in the sea urchin embryo model and against human cancer cell lines, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 738–755.
- [51] I. Carvalho, P. Andrade, V.L. Campo, P.M.M. Guedes, R. Sesti-Costa, J.S. Silva, S. Schenkman, S. Dedola, L. Hill, M. Rejzek, S.A. Nepogodiev, R.A. Field, “Click chemistry” synthesis of a library of 1,2,3-triazole-substituted galactose derivatives and their evaluation against *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 2412–2427.
- [52] E.N. da Silva, R.F.S. Menna-Barreto, M. do C.F.R. Pinto, R.S.F. Silva, D.V. Teixeira, M.C.B.V. de Souza, C.A. De Simone, S.L. De Castro, V.F. Ferreira, A.V. Pinto, Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*, *Eur. J. Med. Chem.* 43 (2008) 1774–1780.
- [53] E.H.G. da Cruz, C.M.B. Hussene, G.G. Dias, E.B.T. Diogo, I.M.M. de Melo, B.L. Rodrigues, M.G. da Silva, W.O. Valença, C.A. Camara, R.N. de Oliveira, Y.G. de Paiva, M.O.F. Goulart, B.C. Cavalcanti, C. Pessoa, E.N. da Silva Júnior, 1,2,3-triazole-, arylamino- and thio-substituted 1,4-naphthoquinones: Potent antitumor activity, electrochemical aspects, and bioisosteric replacement of C-ring-modified lapachones, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 1608–1619.
- [54] M. Sova, A. Perdih, M. Kotnik, K. Kristan, T.L. Rižner, T. Solmajer, S. Gobec, Flavonoids and cinnamic acid esters as inhibitors of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: a synthesis, QSAR and modelling study, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 7404–7418.
- [55] T.F. Borgatti, R.B. Alves, R.R. Teixeira, R.P. De Freitas, T.G. Perdígão, S.F. Da Silva, A.A. Dos Santos, A. De Jesús, O. Bastidas, Synthesis and phytotoxic activity of 1,2,3-triazole derivatives, *J. Braz. Chem. Soc.* 24 (2013) 953–961.
- [56] R.F. Menna-Barreto, K. Salomão, A.P. Dantas, R.M. Santa-Rita, M.J. Soares, H.S. Barbosa, S.L. de Castro, Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study, *Micron* 40 (2009) 157–168.
- [57] M.A. Vannier-Santos, S.L. de Castro, Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill, *Curr. Drug Targets* 10 (2009) 246–260.
- [58] V.M. Borges, U.G. Lopes, W. de Souza, M.A. Vannier-Santos, Cell structure and cytokinesis alterations in multidrug-resistant *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Parasitol. Res.* 95 (2005) 90–96.
- [59] A. Brennand, E. Rico, P.A. Michels, Autophagy in trypanosomatids, *Cells* 1 (2012) 346–371.
- [60] L.M.R. Antinarelli, S. de Oliveira, P.V.Z. Capriles, J. Gameiro, E.A. Britta, C.V. Nakaura, W.P. Lima, A.D. da Silva, E.S. Coimbra, Antileishmanial activity of a 4-hydrazinoquinoline derivative: induction of autophagy and apoptosis-related processes and effectiveness in experimental cutaneous leishmaniasis, *Exp. Parasitol.* 195 (2018) 78–86.
- [61] D.O. dos Anjos, E.S.S. Alves, V.T. Gonçalves, S.S. Fontes, M.L. Nogueira, A.M. Suarez-Fontes, J.B.N. da Costa, F. Rios-Santos, M.A. Vannier-Santos, Effects of a novel β -lapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 6 (2016) 207–219.
- [62] P. Paquet, G.E. Pieard, Toxic epidermal necrolysis: revisiting the tentative link between early apoptosis and late necrosis (review), *Int. J. Mol. Med.* 19 (2007) 3–10.
- [63] M.S. Bastos, L.A. Souza, T.S. Onofre, A.S. Júnior, M.R. Almeida, G.C. Bressan, J.L. Fietto, Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp *Leishmania braziliensis* and its application as an alternative method for drug screening in vitro, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112 (2017) 155–159.
- [64] M.A. Vannier-Santos, U. Lins, Cytochemical techniques and energy-filtering transmission electron microscopy applied to the study of parasitic protozoa, *Biol. Proced. Online* 3 (2001) 8–18.

CAPÍTULO 3: SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO CONTENDO AS PORÇÕES 1,2,3 TRIAZOL E SULFONAMIDA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL

3.1 O Câncer

O termo neoplasia (do grego *neo* = novo e *plasis* = proliferação celular) refere-se à uma “proliferação anormal do tecido, que foge parcial ou totalmente ao controle do organismo e tende à autonomia e à perpetuação, com efeitos agressivos sobre o homem”⁷⁶. As neoplasias podem ser benignas ou malignas. As primeiras (também denominadas tumores benignos) são caracterizadas pelo crescimento das células de forma organizada, geralmente lento, expansivo e apresentam limites bem nítidos. Estas neoplasias se caracterizam também por não invadirem os tecidos vizinhos, mas podem provocar a compressão de órgãos e tecidos adjacentes. O lipoma (que tem origem no tecido gorduroso), o mioma (que tem origem no tecido muscular liso) e o adenoma (tumor benigno das glândulas) são exemplos de tumores benignos⁷⁸.

As neoplasias malignas ou câncer representam a segunda causa de mortalidade (15,1%) no Brasil, superadas apenas pelas doenças cardiovasculares (31,6%). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, estima-se que, para o ano de 2020, aproximadamente 15 milhões de novos casos surgirão ao redor do mundo, sendo que 70% dos pacientes estarão vivendo em países com menos de 5% dos recursos destinados a controlar a doença⁷⁹.

A palavra câncer vem do grego *karkínos*, que quer dizer caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, que viveu entre 460 e 377 A.C. Trata-se uma doença que acomete o homem há mais de 3 mil anos antes de Cristo uma vez que ela já foi detectada em múmias egípcias⁷⁷. Conforme definido pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2019) em sua página na internet:

“Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo”⁷⁸.

⁷⁶ SILVA, R. C. F. D. Memória Iconográfica do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 63, n. 3, p. 203–218, 2019.

⁷⁷ MARTINS, G. B.; DA HORA, S. S. Desafios à integralidade da assistência em cuidados paliativos na pediatria oncológica do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 63, n. 1, p. 29-37, 2017.

⁷⁸ INCA, <www.inca.gov.br>. Acesso em: 03 de Março de 2019.

Há ainda os antimetabólitos como, por exemplo a capecitabina (comercialmente Xeloda[®], Figura 3.2), que afetam as células inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA. Deste modo, eles impedem a multiplicação e função normais da célula. Os antibióticos (como a doxorrubicina, comercialmente Adriamycin[®], Figura 3.2), constituem um grupo de substâncias com estrutura química variada que atuam de forma não específica sobre o ciclo celular. Por último, mencionam-se os inibidores mitóticos, como o docetaxel (comercialmente Taxotere[®], Figura 3.2) que podem paralisar a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, interferindo dessa forma, na dinâmica dos microtúbulos e interrompendo a divisão celular.⁸¹

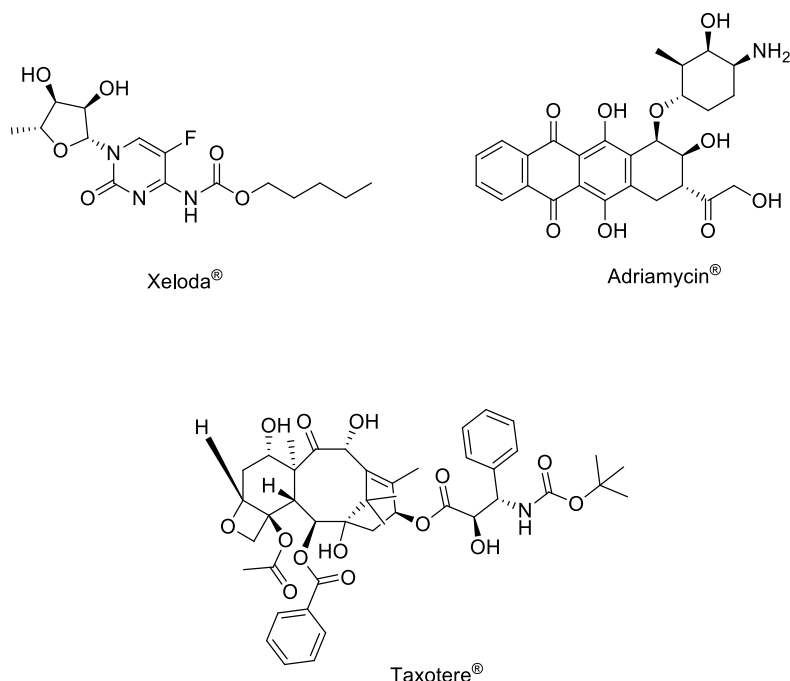


Figura 3.2 - Estrutura de alguns quimioterápicos empregados no tratamento do câncer.

Embora importantes avanços tenham sido obtidos com respeito ao tratamento quimioterápico do câncer, os medicamentos que se destinam a esta finalidade apresentam problemas importantes relacionados ao seu uso dentre eles os efeitos colaterais (diarréia, vômito, fraqueza, queda de cabelo, tonteadas dentre outros), a falta de especificidade para células tumorais, além de serem considerados tóxicos para

⁸¹ CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, n. 1, p. 65–72, 2005.

células normais. Além disso, à ineficiência dos fármacos em relação aos diferentes tipos de câncer, bem como o aumento do aparecimento de linhagens resistentes a estes medicamentos são aspectos também bastante preocupantes⁸². Considerando este cenário, é de relevância a busca por novas drogas que venham a suplantar os problemas relacionados com os quimioterápicos atualmente empregados no tratamento do câncer. Como fonte de inspiração para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos tomou-se neste trabalho o ácido cinâmico e seus derivados. Será relatado a seguir alguns trabalhos presentes na literatura, assim como resultados promissores alcançados em nosso grupo de pesquisa recentemente.

3.2 Ácido cinâmico e derivados como fonte de inspiração para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos

Na pesquisa por quimioterápicos alternativos para o tratamento do câncer, o ácido cinâmico (**1**) e seus derivados vêm sendo investigados. Por exemplo, Li e colaboradores⁸² relataram que o ácido cinâmico (**1**), a tanchinona IIA (**7**) e o ginsenosídeo Rg1 (**8**), foram administrados contra as células de osteossarcoma MG-63 — a forma histológica mais comum de câncer ósseo primário — sendo observada a diminuição da expressão de nucleoplasmidica em matriz nuclear em associação com translocação de nucleoplasmina induzida do nucléolo ao nucleoplasma e citoplasma.

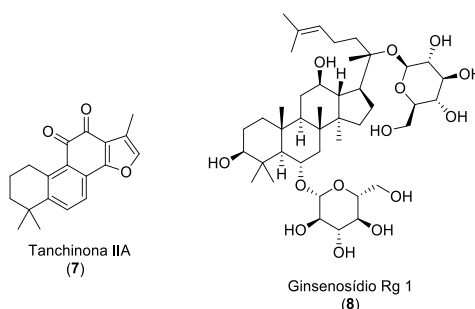


Figura 3.3 - Estruturas dos compostos tanchinona IIA (**7**) e o ginsenosídeo Rg1 (**8**).

⁸² SHI, S. L. *et al.* Nuclear matrix protein, prohibitin, was down-regulated and translocated from nucleus to cytoplasm during the differentiation of osteosarcoma MG-63 cells induced by ginsenoside Rg1, cinnamic acid, and tanshinone IIA (RCT). *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 108, n. 4, p. 926–934, 2009.

Zhang e colaboradores⁸³ sintetizaram derivados do ácido cinâmico de estrutura geral **9** e suas atividades biológicas foram avaliadas quanto à inibição de EGFR (uma proteína transmembrana associada com crescimento e sobrevivência celular), HER-2 (uma proteína que promove o crescimento das células mamárias) e antiproliferação de células tumorais. Em particular, o derivado dimetoxilado **10** (Figura 3.4) foi o que apresentou a maior atividade inibitória contra o fator de crescimento do receptor epidérmico (EGFR) com $IC_{50}=0,21 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $IC_{50}=1,08 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a enzima HER-2. Com relação à atividade antiproliferativa, em que foi medida a inibição de crescimento das linhagens celulares MCF-7 e B16-F10, os valores de IC_{50} foram de $0,30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $0,44 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

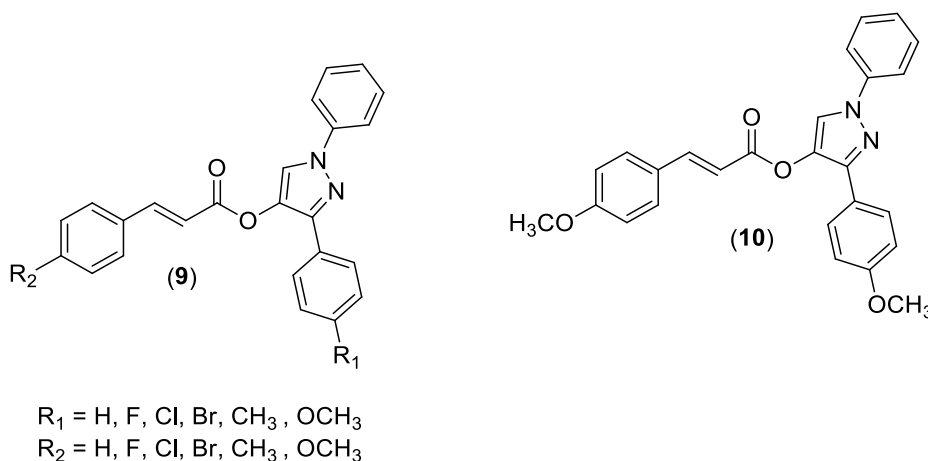


Figura 3.4 - Estrutura geral dos derivados do ácido cinâmico investigados por Zhang e colaboradores e do derivado que apresentou maior atividade antiproliferativa e inibitória enzimática.

Recentemente, Ullah e colaboradores⁸⁴ realizaram um estudo de docagem molecular envolvendo a interação de amidas derivadas do ácido cinâmico e a enzima tirosinase. Foi determinado que as amidas **11**, **12**, **13** e **14** (Figura 3.5) se ligam ao sítio ativo da tirosinase com maior afinidade que o ácido kójico, um composto com propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas e antioxidantes conhecidas. Estas amidas inibiram a melanogênese e a atividade da tirosinase de forma mais potente que o ácido kójico em células de melanoma B16-F10 estimuladas com α -MSH de

⁸³ ZHANG, W. M. *et al.* Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of cinnamic acid derivatives with pyrazole moieties as novel anticancer agents. **RSC Advances**, v. 4, n. 70, p. 37197-37207, 2014.

⁸⁴ ULLAH, S. *et al.* Synthesis of cinnamic amide derivatives and their anti-melanogenic effect in α -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 161, p. 78–92, 2019.

maneira dose-dependente. α -MSH, β -MSH e γ -MSH são hormônios peptídicos secretados de melanótrofos na glândula pituitária. Uma função representativa do α -MSH é a pigmentação na pele. A forte correlação entre a atividade da tirosinase e o conteúdo de melanina sugere que o efeito antimelanogênico das amidas é devido à atividade inibidora da tirosinase. Considerando as amidas **11-14** que apresentaram melhores efeitos inibitórios frente à tirosinase e efeito antimelanogênico contra as células B16-F10, percebe-se que elas possuem como característica comum a presença de um ou dois grupos hidroxila ligados à porção aromática do grupo cinamoíla. Os resultados descritos por Ullah e colaboradores apontam para o potencial destas quatro amidas derivadas do ácido cinâmico como novos e potentes inibidores da tirosinase.

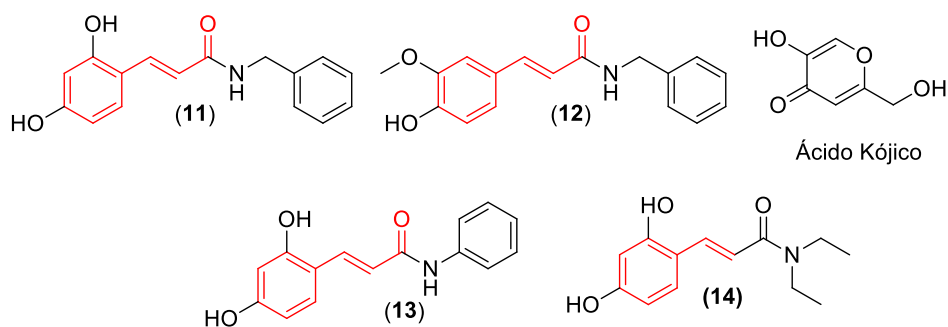


Figura 3.5 – Estrutura das amidas **11-14** e do ácido kójico. A porção cinamoíla é destacada em vermelho. As amidas possuem como característica estrutural comum a presença de um ou dois grupos hidroxila ligados à porção aromática da porção cinamoíla.

Ekmekcioglu e colaboradores⁸⁵, investigaram o efeito do ácido cinâmico (**1**) na proliferação celular e nos marcadores de diferenciação alcalina fosfatase, sacarase e aminopeptidase N em células de adenocarcinoma do cólon humano (Caco-2). O estudo revelou que o ácido cinâmico (**1**) (2,5-8,0 mM) é um agente antiproliferativo e inibidor da síntese de DNA das células em crescimento. O efeito antiproliferativo foi observado após 2 horas de tratamento com ácido cinâmico (**1**) na concentração de 8,0 mM. Os valores máximos de inibição ocorreram após 8 h de tratamento. As atividades de sacarase e aminopeptidase N foram estimuladas sob tratamento com ácido cinâmico (**1**) (4,0-8,0 mM), enquanto a atividade da fosfatase alcalina foi inibida

⁸⁵ EKMEKCIOGLU, C.; FEYERTAG, J.; MARKTL, W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. *Cancer Letters*, v. 128, n. 2, p. 137–144, 1998.

em células pós-confluência (8,0 mM). Efeitos similares nas atividades enzimáticas foram observadas em células não proliferativas. No entanto, os níveis intracelulares de cAMP diminuíram significativamente após 1 h de tratamento, sugerindo que o ácido cinâmico (**1**) induz os seus efeitos nas atividades enzimáticas em parte modulando a via de sinalização de cAMP (Adenosina cíclica Monofosfato) é reconhecido como um regulador universal da função celular em organismos incluindo amebas, plantas e humanos⁸⁶. Neste trabalho, os mecanismos que resultaram na inibição do crescimento tumoral não foram definitivamente esclarecidos. No entanto, foi possível relacionar que o ácido cinâmico (**1**) exerce parcialmente seus efeitos antiproliferativos pela inibição da isoprenilação da proteína, ou seja, pela adição de porções que garantem aumento da hidrofobicidade, que por sua vez, inibe a transdução do sinal mitogênico. É também descrito na literatura que alguns análogos do ácido cinâmico atuam como inibidores da proteína tirosina quinase, resultando em inibição do crescimento de células tumorais.

O ácido caféico (**3**) (ácido 3,4-dihidroxicinâmico, Figura 1.3, pg. 15) é um importante derivado do ácido cinâmico (**1**). A maioria dos compostos análogos ao ácido caféico existe sob a forma de ésteres, tais como o CAPE — Fenil éster do ácido caféico (**15**), o ácido rosmarínico (**16**) (Figura 3.6) e o ácido clorogênico (**5**) (Figura 1.3, pg. 15). Estes compostos também exibem múltiplas propriedades biológicas. Chu e colaboradores⁸⁷ demonstraram que o ácido caféico e o CAPE possuem propriedades anticancerígenas, imunomoduladoras, antiinflamatórias e antioxidantes. Estudos elaborados por Singh e colaboradores⁸⁸ sugeriram que o CAPE é um inibidor específico do NF-κB. O NF-κB (factor nuclear kappa B) é um complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição. NF-κB pode ser encontrado em quase todos os tipos de células animais e está envolvido na resposta celular a estímulos como o estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, oxidação de LDL e antígenos virais e bacterianos⁸⁹. Foi demonstrado pelos autores a supressão significativa via lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico durante a

⁸⁶ SEREZANI, C. H. *et al.* Cyclic AMP. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 127–132, 2008.

⁸⁷ CHUU, Chih P. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. **Cancer Prevention Research**, v. 5, n. 5, p. 788–797, 2012.

⁸⁸ SINGH, S. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 17, p. 9090–9095, 2002.

⁸⁹ GILMORE, T. D. The Rel/NF-κB signal transduction pathway: Introduction. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6842–6844, 1999.

inflamação. O ácido caféico apresentou potente atividade inibitória contra a promoção tumoral e a formação de 5-hidroximetil-2-desoxiuridina induzida por 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Entretanto, um estudo desenvolvido por Li e colaboradores⁹⁰ também demonstrou potencial inibitório de (15) contra a síntese de DNA, RNA e proteína em células cancerígenas HeLa cultivadas.

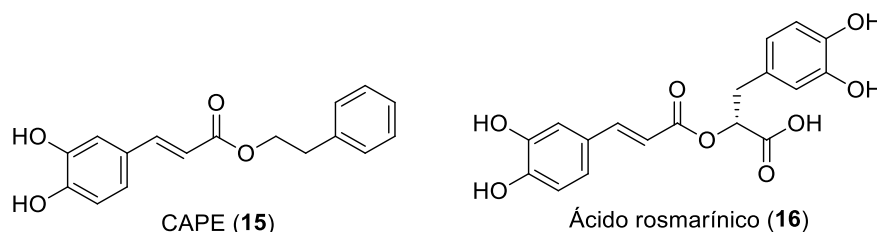


Figura 3.6 - Estrutura do CAPE (15) e ácido rosmarínico (16).

Um estudo recente desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa e Síntese de Compostos Bioativos da Universidade Federal de Viçosa (GSPCB-UFV) em colaboração com o Grupo de Pesquisa da Professora Mariana Machado Neves mostrou que o derivado do ácido cinâmico (17), apresentando uma porção 1,2,3-triazol (Figura 3.7), apresentou significativas atividades antimetastática e antiproliferativa contra as células de melanoma B16-F10.⁹¹

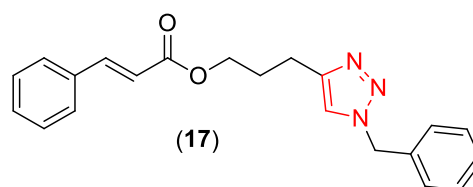


Figura 3.7 - Estrutura do composto 17. Este derivado do ácido cinâmico contendo um fragmento 1,2,3-triazol destacado em vermelho possui significativa atividade antimetastática e antiproliferativa contra células B16F-10.

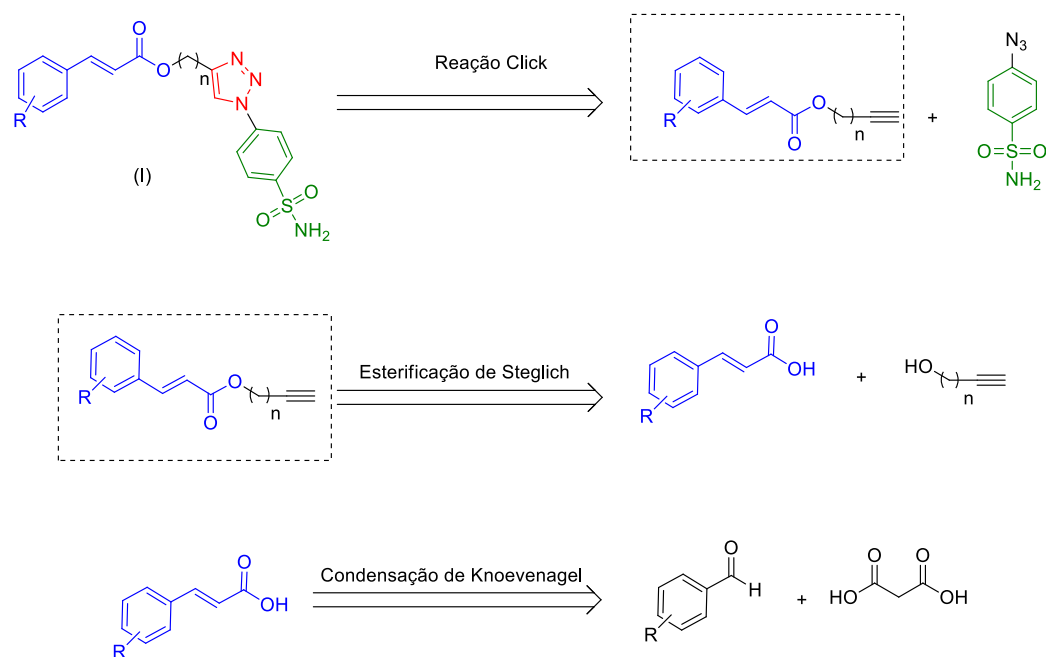
Os resultados alcançados neste estado sugerem que derivados do ácido cinâmico contendo porções 1,2,3-triazol apresentam potencial para o desenvolvimento de novos fármacos contra o câncer melanoma metastático. Tal

⁹⁰ LI, W. *et al.* Biological activity evaluation and structure-activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 19, p. 6085–6088, 2012.

⁹¹ LIMA, G. D. D. A. *et al.* Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1, 2, 3-triazolic portions. **Toxicology in Vitro**, v. 53, p. 1-9, 2018.

aspecto é importante uma vez que o câncer de pele é um dos mais frequentes no Brasil e corresponda a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país e o melanoma representa 4% das neoplasias malignas do órgão. O câncer melanoma é o tipo mais grave, responsável por 80% das mortes por câncer de pele, devido à sua alta possibilidade de provocar metástase (disseminação do câncer para outros órgãos)⁹². Assim, o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos para o tratamento deste tipo de neoplasia maligna é de relevância.

Considerando as premissas apresentadas anteriormente, um dos objetivos do presente trabalho foi dar continuidade ao estudo que vem sendo desenvolvido no GSPCB-UFV com respeito à síntese e a avaliação da citotoxicidade de compostos derivados do ácido cinâmico. Neste sentido, é importante destacar que inicialmente o planejamento era preparar uma série de derivados do ácido cinâmico apresentando a estrutural geral I mostrada no Esquema 3.1. Neste mesmo esquema está apresentado o plano sintético que foi idealizado para a obtenção dos derivados de estrutura I.



Esquema 3.1 - Plano sintético idealizado para a síntese dos compostos de estrutura geral (I). Estão destacados na estrutura de I as porções cinamoíla (em azul), 1,2,3-triazol (em vermelho) e sulfonamida (verde).

A proposta era preparar derivados do ácido cinâmico contendo grupos 1,2,3-triazol e sulfonamida. A conexão de três fragmentos, a saber cinamoíla (em azul),

⁹² SMITH, J. G. Review Article. *International Review of Applied Economics*, v. 18, n. 1, p. 123–126, 2004.

triazol (em vermelho) e sulfonamida (em verde) (Esquema 3.1) para geração de derivados de estrutura geral I foi inspirada nos diversos relatos de atividade citotóxica^{93,94,95,96} contra linhagens celulares de câncer relacionados ao ácido cinâmico e derivados (conforme apresentado anteriormente), bem como aos 1,2,3-triazols^{97,98} e sulfonamidas^{99,100}. No entanto, conforme será discutido adiante, a tentativa de obtenção dos compostos de estrutura geral I não foi bem sucedida.

No Esquema 3.1 mostrado anteriormente, está destacada por um quadrado pontilhado a estrutura geral de ésteres cinamatos. Estes ésteres foram preparados objetivando a obtenção de derivados de estrutura geral I. Uma vez que estes compostos são derivados de ácidos cinâmico e, conforme descrito anteriormente, um dos objetivos deste trabalho foi continuar a explorar a citotoxicidade de derivados do ácido cinâmico, estes ésteres foram também avaliados contra células B16-F10 e os resultados também serão discutidos neste capítulo.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Generalidades Metodológicas

Foram utilizados reagentes de grau P.A. para as sínteses dos compostos. Piperidina, solução de BBr₃ 1,0 mol L⁻¹ em diclorometano, ácido 3-metoxibenzoico, ácido malônico, 4-fluorobenzaldeído, 4-metoxibenzaldeído, 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, 4-nitrobenzaldeído, 4-bromobenzaldeído, 4-clorobenzaldeído, *N,N*-dicicloexilcarbodiimida (DCC), 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP), cloreto de sódio e ácido cítrico, foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e

⁹³ BAVADI, M.; NIKNAM, K.; SHAHRAKI, O. Novel pyrrole derivatives bearing sulfonamide groups: Synthesis in vitro cytotoxicity evaluation, molecular docking and DFT study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1146, p. 242-253, 2017

⁹⁴ GUL, H. I. *et al.* New anticancer drug candidates sulfonamides as selective hCA IX or hCA XII inhibitors. **Bioorganic chemistry**, v. 77, p. 411-419, 2018.

⁹⁵ ACOSTA-RANGEL, A. *et al.* Sulfonamides degradation assisted by UV, UV/H₂O₂ and UV/K₂S₂O₈: Efficiency, mechanism and byproducts cytotoxicity. **Journal of environmental management**, v. 225, p. 224-231, 2018.

⁹⁶ CANAKCI, D. *et al.* Synthesis and cytotoxic activities of novel copper and silver complexes of 1, 3-diaryltriazenesubstituted sulfonamides. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 34, n. 1, p. 110-116, 2019.

⁹⁷ KHARB, R.; SHARMA, P. Chander; YAR, M. S. Pharmacological significance of triazole scaffold. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 26, n. 1, p. 1-21, 2011.

⁹⁸ KÜÇÜKGÜZEL, Ş. G.; ÇIKLA-SÜZGÜN, P. Recent advances bioactive 1, 2, 4-triazole-3-thiones. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 830-870, 2015.

⁹⁹ BANO, S. *et al.* Synthesis and biological evaluation of some new 2-pyrazolines bearing benzene sulfonamide moiety as potential anti-inflammatory and anti-cancer agents, **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5763-5768, 2011.

¹⁰⁰ IRFAN, A. *et al.* a Therapeutic Journey of Sulfonamide Derivatives As Potent Anti-Cancer Agents : a Review, v. 7, n. 4, p. 257-270, .

utilizados sem prévia purificação. Acetona, ácido acético, ácido clorídrico, dimetilsulfóxido, metanol, acetato de etila, cloreto de sódio, solução de formaldeído 37% m v⁻¹, bicarbonato de sódio, bicarbonato de potássio e etanol foram adquiridos da F Maia (Rio de Janeiro, 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 KMnO₄, 20 g de K₂CO₃, 5 mL de NaOH 5% m/v, 300 mL de água).

As separações em coluna cromatográfica foram realizadas empregando-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 utilizando-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) e de carbono (RMN de ¹³C, 75 MHz) foram obtidos em um espectrômetro VARIAN MERCURY 300. Foram utilizados como solventes o clorofórmio (CDCl₃), metanol (CD₃OD) e dimetilsulfóxido (DMSO-*d*₆) deuterados.

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

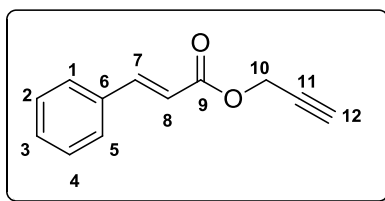
3.3.2 Procedimentos Sintéticos

3.3.2.1 Síntese de ácidos cinâmicos substituídos

Os ácidos 4- fluorocinâmico (**18**), 3,4,5-trimetoxicinâmico (**19**), 3,4-dimetoxicinâmico (**20**), 4-bromocinâmico (**21**), 4-clorocinâmico (**22**) e 4-nitrocinâmico (**23**) foram sintetizados a partir da Condensação de Knoevenagel entre ácido malônico e apropriados aldeídos, conforme descrito por Tomaz¹⁰¹. Todos estes ácidos cinâmicos substituídos foram obtidos com estereoquímica (*E*) com respeito à dupla insaturação diretamente ligada ao grupo carboxila.

¹⁰¹ TOMAZ, D. C. Síntese de cinamatos contendo o núcleo isobenzofuranone e prospecção de bioatividades. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa, p.138, 2015.

3.3.2.2 Síntese de ésteres cinamatos exemplificado pela síntese do (*E*)-cinamato de prop-2-inila (**24**)



(**24**)

A um balão de fundo redondo (50,0 mL) foram adicionados 0,300 g (5,35 mmol) de álcool propargílico, 25,0 mL de diclorometano, 0,720 g (4,86 mmol) de ácido cinâmico (**1**), 1,10 g (5,35 mmol) de dicitloexilcarbodiimida (DCC) e 0,0594 g (0,486 mmol) de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP). A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética por 25 minutos à temperatura ambiente. Após o término da reação que foi evidenciado por CCD, a mistura reacional foi filtrada e a solução resultante lavada com solução aquosa 10% de ácido cítrico (2 x 20,0 mL), água (15,0 mL) e solução saturada de NaCl (30,0 mL). Reservou-se a fase orgânica resultante e a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 20,0 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 eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v v⁻¹), obtendo-se a substância em 65% de rendimento (0,586 g; 3,30 mmol).

Característica: óleo amarelo.

CCD: $R_f = 0,41$ (hexano-acetato de etila 4:1 v v⁻¹).

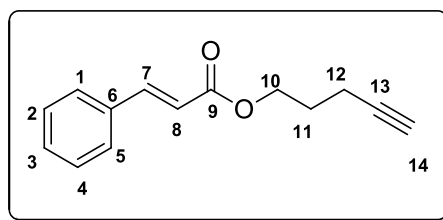
IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3303, 2930, 2962, 1720, 1640, 1171, 975, 768, 628. O espectro é apresentado na Figura S1 do anexo.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,52 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-12); 4,82 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-10); 6,47 (d, 1H, $J_{trans} = 16,0$ Hz, H-8); 7,35-7,42 (m, 3H, H-3/H-4/H-5); 7,50-7,56 (m, 2H, H-2/H-6); 7,75 (d, 1H, $J_{trans} = 16,0$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura S2 do anexo.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 52,0 (C-10); 74,9 (C-12); 77,8 (C-11), 117,0 (C-8); 128,2 (C-1/C-5), 128,9 (C-2/C-4), 130,6 (C-3), 134,1 (C-6), 146,0 (C-7), 166,1 (C-9). O espectro é apresentado na Figura S3 do anexo.

Para a síntese dos cinamatos **25-33** do ácido cinâmico contendo grupos alquinila empregou-se a mesma metodologia descrita para a preparação do composto **24**. Na Tabela 1 (pg.66) estão descritas as informações referentes às estas reações. As estruturas dos compostos **25-35** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

3.3.2.3 (E)-Cinamato de pent-4-inila



(25)

Característica: óleo amarelo.

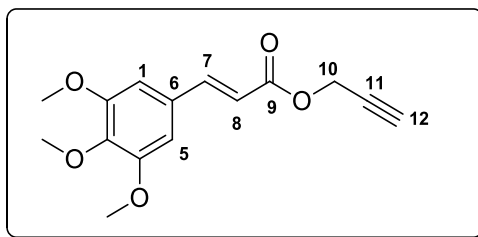
CCD: $R_f = 0,53$ (hexano-acetato de etila 6:1 v v⁻¹).

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3293, 2953, 2929, 2124, 1707, 1633, 1160, 980, 765 cm⁻¹. O espectro é apresentado na Figura S4 do anexo I.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,90-2,00 (m, 3H, H-11/H-14); 2,35 (td, 2H, $J_1 = 7,0$ Hz e $J_2 = 2,6$ Hz, H-12); 4,32 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz, H-10); 6,44 (d, 1H, $J_{trans} = 16,0$ Hz, H-8); 7,35-7,41 (m, 3H, H-3/H-4/H-5); 7,50-7,56 (m, 2H, H-2/H-6); 7,69 (d, 1H, $J_{trans} = 16,0$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura S5 do anexo I.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 15,3 (C-12); 27,7 (C-11); 63,0 (C-10); 69,0 (C-14); 83,1 (C-13); 117,9 (C-8); 128,1 (C-1/C-5); 128,9 (C-2/C-4); 130,3 (C-3); 134,4 (C-6); 144,9 (C-7); 166,9 (C-9). O espectro é apresentadona Figura S6 do anexo I.

3.3.2.4 (*E*)-3,4,5-Trimetoxicinamato de prop-2-inila



(26)

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,54$ (hexano-dicloro-acetato de etila 2:1:1 v v⁻¹).

T_f: 284,0-286,0 °C.

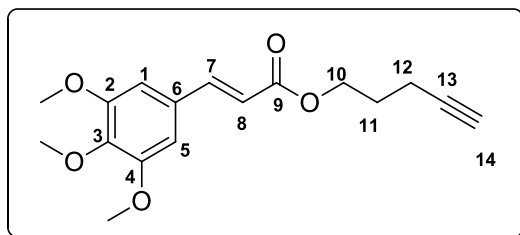
IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3338, 3305, 3263, 2965, 2926, 2166, 1698, 1580, 1245, 1126, 630 cm⁻¹.

¹. O espectro é apresentado na Figura S7 do anexo I.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,51 (Salargado, 1H, H-12); 3,88 (s, 9H, H-13, H-14, H-15); 4,80 (Salargado, 2H, H-10); 6,39 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-8); 6,75 (s, 2H, H-1/H-5); 7,65 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura S8 do anexo I.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 52,0 (C-14); 56,1 (C-13/C-15); 60,9 (C-12); 74,9 (C-11); 105,3 (C-1/C-5); 116,2 (C-8); 129,6 (C-6); 140,3 (C-3); 145,9 (C-7); 153,40 (C-2/C-4); 165,9 (C-9). O espectro é apresentado na Figura S9 do anexo I.

3.3.2.5 (*E*)-3,4,5-Trimetoxicinamato de pent-4-inila



(27)

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,43$ (hexano-dicloro-acetato de etila 2:1:1 v v⁻¹).

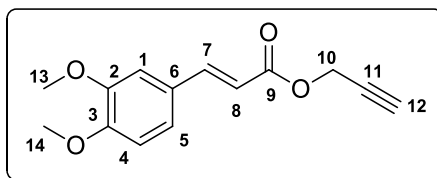
T_f: 292,0-295,0 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3275, 2977, 2941, 2828, 2160, 1692, 1248, 1123, 819, 652 cm⁻¹. O espectro é apresentado na Figura S10 do anexo I.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,90-2,00 (m, 3H, H-12, H-14); 2,35 (td, 2H, $J_1 = 7,0$ Hz e $J_2 = 2,5$ Hz, H-11); 3,86 (s, 3H, H-15); 3,88 (s, 6H, H-14/H-16), 4,31 (t, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-10); 6,34 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-8); 6,75 (s, 2H, H-1, H-5); 7,60 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura S11 do anexo I.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 15,1 (C-12); 27,9 (C-11); 56,3 (C-14/C-16); 61,0 (C-15); 63,0 (C-10); 69,0 (C-14); 83,0 (C-13); 105,1 (C-1/C-5); 117,1 (C-8); 129,8 (C-6); 140,4 (C-3); 144,8 (C-7); 153,3 (C-2/C-4); 166,8 (C-9). O espectro é apresentado na Figura S12 do anexo I.

3.3.2.6 (*E*)-3,4-Dimetoxicinamato de prop-2-inila



(28)

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,50$ (hexano-dicloro-acetato de etila 3:1:1 v v $^{-1}$).

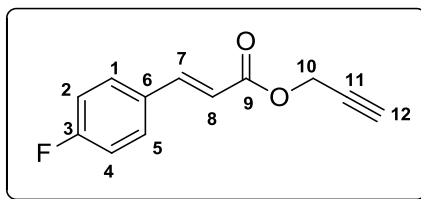
T_f : 244,0-246,0 $^{\circ}\text{C}$.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3334, 3254, 3081, 2965, 2938, 2169, 1674, 1508, 1245, 1138, 810 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura S13 do anexo I.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,50 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-12); 3,91 (s, 6H, H-13/H-14); 4,81 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-10); 6,33 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-8); 6,87 (d, $J = 8,4$ Hz, H-4); 7,05 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-1); 7,11 (dd, $J = 8,4$ Hz, $J = 1,8$ Hz, H-5) 7,68 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura S14 do anexo I.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 52,0 (C-13); 55,8 (C-14); 55,9 (C-10); 74,6 (c-12), 77,8 (C-11), 109,7 (C-1); 111,2 (C-4); 114,8 (C-8); 112,8 (C-5); 126,9 (C-5); 145,9 (C-7); 149,4 (C-3); 151,6 (C-2); 166,4 (C-9). O espectro é apresentado na Figura S15 do anexo I.

3.3.2.7 (E)-4-Fluorocinamato de prop-2-inila



(29)

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,40$ (hexano-dicloro-acetato de etila 3:1:1 v v⁻¹).

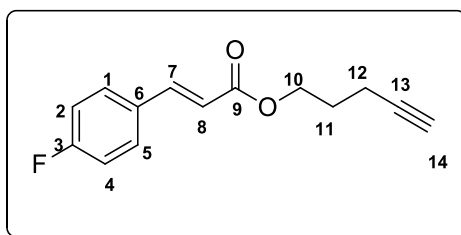
T_f: 274,0-276,0 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3299, 3069, 2953, 2115, 1710, 1511, 1165, 828, 628, 511 cm⁻¹. O espectro é apresentado na Figura 3.8 .

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,52 (t_{ap}, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-12); 4,48 (d_{ap}, $J = 2,3$ Hz, 2H, H-10); 6,39 (d, 2H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-8); 7,08 (t, $J = 8,4$ Hz, 4H, H-2/H-4); 7,52 (dd, 2H, $J = 8,4$ Hz, $J_{H-F} = 6,0$ Hz, H-1, H-5); 7,71 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura 3.9.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 52,1 (C-10); 74,9 (C-12); 77,7 (C-11); 116,7 (d, $J_{C-F} = 21,8$ Hz; C-2/ C-4); 116,7 (C-8); 130,1 (d, $J_{C-F} = 8,6$ Hz; C-1/C-5); 130,4 (d, $J_{C-F} = 3,3$ Hz; C-6); 144,6 (C-7); 164,0 (d, $J_{C-F} = 250,5$ Hz; C-4); 165,9 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 3.10.

3.3.2.8 (E)-4-Fluorocinamato de pent-4-inila



(30)

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,50$ (hexano-dicloro-acetato de etila 3:1:1 v v⁻¹).

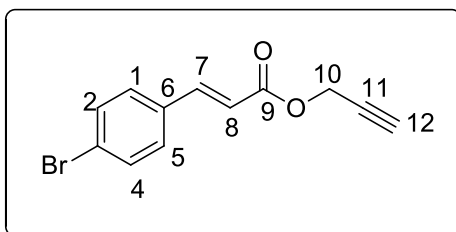
T_f: 278,0-281,0 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3287, 3060, 2948, 2110, 1705, 1508, 1160, 819, 620, 511 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura S19 do anexo I.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,90-2,00 (m, 2H, H-12, H-14); 2,35 (dt, 2H, $J = 7,1$ Hz, $J = 2,6$ Hz, H-11); 4,31 (t, $J = 6,3$ Hz, H-10); 6,36 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, H-8); 7,08 (t, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-2/H-4); 7,51 (dd, 1H, $J = 8,4$ Hz, $J = 5,6$ Hz); 7,65 (d, 1H, $J = 16,0$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura S20 do anexo I.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 15,3 (C-12); 27,7 (C-11); 63,1 (C-10); 69,0 (C-14); 82,7 (C-13); 116,0 (d, $J_{\text{C-F}} = 21,8$ Hz; C-2/C-4); 116,0 (d, $J_{\text{C-F}} = 8,5$ Hz; C-2/ C-4); 117,7 (d, $J_{\text{C-F}} = 2,3$, C-8); 129,9 (d, $J_{\text{C-F}} = 8,5$ Hz; C-1/C-5); 130,6 (d, $J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz; C-6); 143,5 (C-7); 163,8 ($J_{\text{C-F}} = 244,7$ Hz, C-9); 166,8 (C-9). O espectro é apresentado na Figura S21 do anexo I.

3.3.2.9 (*E*)-4-Bromocinamato de prop-2-inila



(31)

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,40$ (hexano-dicloro-acetato de etila 3:1:1 v v $^{-1}$).

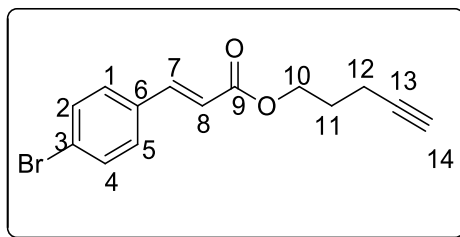
T_f: 234,0-239,0 $^{\circ}\text{C}$.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3335, 3296, 3263, 2965, 2920, 2130, 1707, 1636, 1305, 1165, 983, 816, 682 cm^{-1} . O espectro é apresentado na Figura S22 do anexo I.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,52 (s, 1H, H-12); 4,81 (s, 2H, H-10); 6,44 (d, 2H, $J = 15,9$ Hz, H-8); 7,39 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-1/H-5); 7,53 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2/H-4); 7,67 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura S23 do anexo I.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 165,8 (C-9); 144,5 (C-7); 133,0 (C-6); 132,2 (C-2/C-4); 129,5 (C-1/ C-5); 124,8 (C-3); 117,6 (C-8); 77,6 (C-11), 75,0 (C-12), 52,1 (C-10). O espectro é apresentado na Figura S24 do anexo I.

3.3.2.10 (*E*)-4-bromocinamato de pent-4-inila



(32)

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,50$ (hexano-dicloro-acetato de etila 3:1:1 v v⁻¹).

T_f: 242,0-246,0 °C.

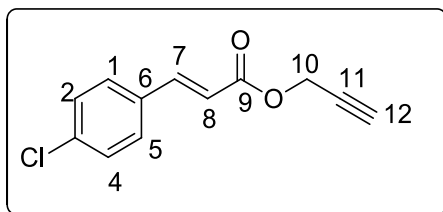
IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3299, 3081, 2956, 2917, 2121, 1704, 1639, 1312, 1177, 828, 640 cm⁻¹.

O espectro é apresentado na Figura S25 do anexo I.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,90 – 2,00 (m, 3H, H-12, H-14); 2,315 (dt, $J = 7,00$ Hz, $J = 2,5$ Hz, H-11); 4,31 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-10); 6,42 (d, 2H, $J = 15,9$ Hz, H-8); 7,38 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2/H-4); 7,52 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-1/H-5); 7,62 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura S26 do anexo I.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 15,3 (C-12); 27,6 (C-11); 63,2 (C-10); 69,1 (C-14); 83,0 (C-13); 118,6 (C-8); 124,6 (C-3); 129,4 (C-1/C-5); 132,1 (C-2/ C-4); 133,2 (C-6); 143,4 (C-7); 166,6 (C-9). O espectro é apresentado na Figura S27 do anexo I.

3.3.2.11 (E)-4-Clorocinamato de prop-2-inila



(33)

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,35$ (hexano-dicloro-acetato de etila 3:1:1 v v⁻¹).

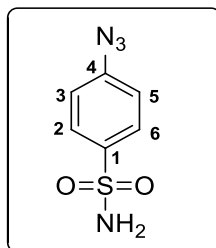
T_f: 224,0-226,0 °C.

IV (KBr) $\bar{\nu}_{\max}$: 3299, 3251, 3087, 2950, 2017, 2124, 1710, 1630, 1310, 1087, 819, 488 cm⁻¹. O espectro é apresentado na Figura S28 do anexo I.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,51 (s, 1H, H-12); 4,81 (s, 2H, H-10); 6,43 (d, 2H, $J = 15,9$ Hz, H-8); 7,37 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-1/H-5); 7,46 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2/H-4); 7,69 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura S28.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 165,8 (C-9); 144,5 (C-7); 136,5 (C-6); 132,6 (C-3); 129,3 (C-1/ C-5); 129,2 (C-2/C-4); 117,5 (C-8); 77,6 (C-11); 75,0 (C-12); 52,1 (C-10). O espectro é apresentado na Figura S30 do anexo I.

3.3.3.1 Síntese da 4-azidobenzenosulfonamida



(34)

A um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados azida de sódio (78,0 mg; 1,20 mmol; 3,00 equiv.) e 2,00 mL de água destilada, sendo a mistura resultante submetida a agitação magnética até completa solubilização do sal. À solução resultante, adicionaram-se 211 μ L de álcool *t*-butílico, sulfonilamida (0,400 mmol, 1,00 equiv.) e nitrito de *t*-butila (1,60 mmol; 4,00 equiv.). A mistura foi agitada à temperatura ambiente e o desenvolvimento da reação monitorado por CCD. Terminada a reação (48 horas), a mistura foi transferida para um funil de separação e foi extraída com acetato de etila (3 x 20,0 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e a fase orgânica resultante foi lavada com solução saturada de NaCl (15,0 mL) seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório resultando na obtenção do composto (36) com rendimento de 63% (0,69 mg; 3,50 mmol) que não foi submetido a nenhum processo subsequente de purificação¹⁰².

Característica: sólido amarelo.

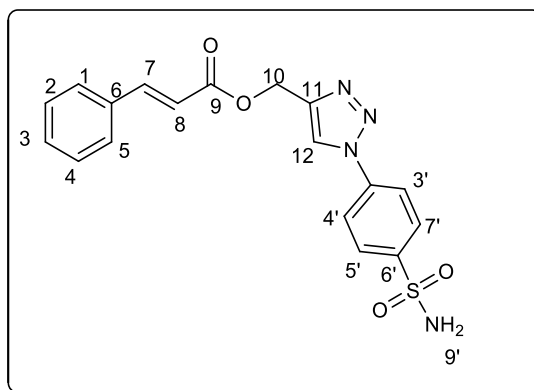
CCD: $R_f = 0,68$ (hexano-acetato de etila 1:1 v v⁻¹).

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7,28 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3/H-5); 7,36 (Salgado, 2H, -NH₂); 7,82 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2/H-6). O espectro é apresentado na Figura 3.11.

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 119,9 (C-3/C-5); 128,0 (C-2/C-6); 140,9 (C-1), 143,4 (C-4). O espectro é apresentado na Figura 3.12.

¹⁰² CARTA, F. *et al.* Fluorescent sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors incorporating 1, 2, 3-triazole moieties: kinetic and X-ray crystallographic studies. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 24, n. 2, p. 104-112, 2016.

3.3.3.2 Síntese do (*E*)- Cinamato de (1-(4-sulfamoilfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il) metil



(35)

A um balão de fundo redondo de 10,0 mL contendo 0,740 g (0,375 mmol) de 4-aminobenzenosulfonil azida foi adicionado 1,00 mL de água, 1,00 mL de diclorometano, 0,029 g (0,150 mmol) de ascorbato de sódio e 0,069 g (0,375 mmol) de (*E*) cinamato de prop-2-inila (**24**). A seguir foi adicionado 0,019 (0,075 mmol) de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. A mistura reacional foi agitada vigorosamente a temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por CCD. Terminado a reação, uma solução saturada de Na_2CO_3 (10,0 mL) foi adicionada e a solução resultante foi extraída com diclorometano (3 x 20,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos, e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano- diclorometano- acetato de etila (1:1:2 v/v), obtendo-se a substância em 17% de rendimento (0,026g; 0,06 mmol).

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,68$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

T_f: 256,0-259,0 °C

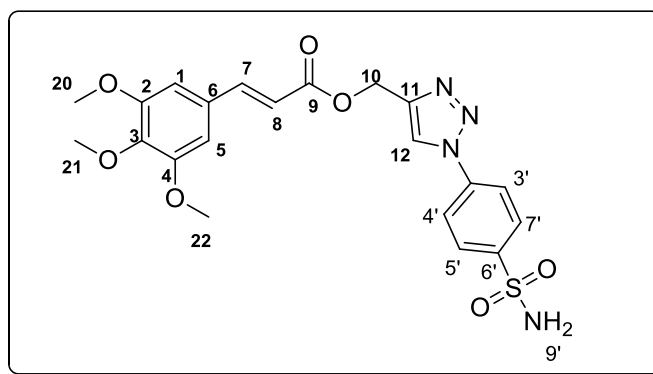
RMN de ¹H (300 MHz, MeOH-*d*₄/DMSO-*d*₆) δ : 8,80 (s, H-12); 8,07 (d, $J=8,7$ Hz, H-1'/H-5'); 8,00 (d, $J=8,7$ Hz, H-2'/H-4', H-9'); 8,01 (s, H-9'); 7,64 (d, 1H, $J = 16,4$ Hz, H-7); 7,59-7,62 (m, 2H, H-1 /H-5); (m, 3H, H-2 /H-3/H-4); 6,53 (d, 1H, $J = 16,4$ Hz, H-8); 5,34 (s, 2H, H-10); 3,66 (s, 2H, H-10). Espectro apresentado na Figura Figura 3.13.

RMN de ¹³C (75 MHz, MeOH-*d*₄/DMSO-*d*₆) δ : 166,3 (C-9); 145,5(C-11); 144,1(C-7); 143,9(C-6'); 139,0(C-3'); 134,2(C-6); 130,7(C-3); 129,0 (C-1' / C-5'); 128,4 (C-2/ C-4);

127,9 (C-1/ C-5);123,1(C-12).; 120,5(C-2'/C-4'); 117,5 (C-8); 57,1 (C-10). .Espectro apresentado na Figura 3.14

O composto (*E*)- Cinamato de (1-(4-sulfamoilfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metill 3-(3,4,5)-trimetoxifenil de metila (**36**) foi sintetizado empregando-se metodologia similar àquela empregada para a síntese do compostos (**35**). A estrutura do éster (**36**) é suportada pelos seguintes dados.

3.3.3.3 (*E*)- Cinamato de (1-(4-sulfamoilfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metill 3-(3,4,5)-trimetoxifenil



(36)

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,38$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

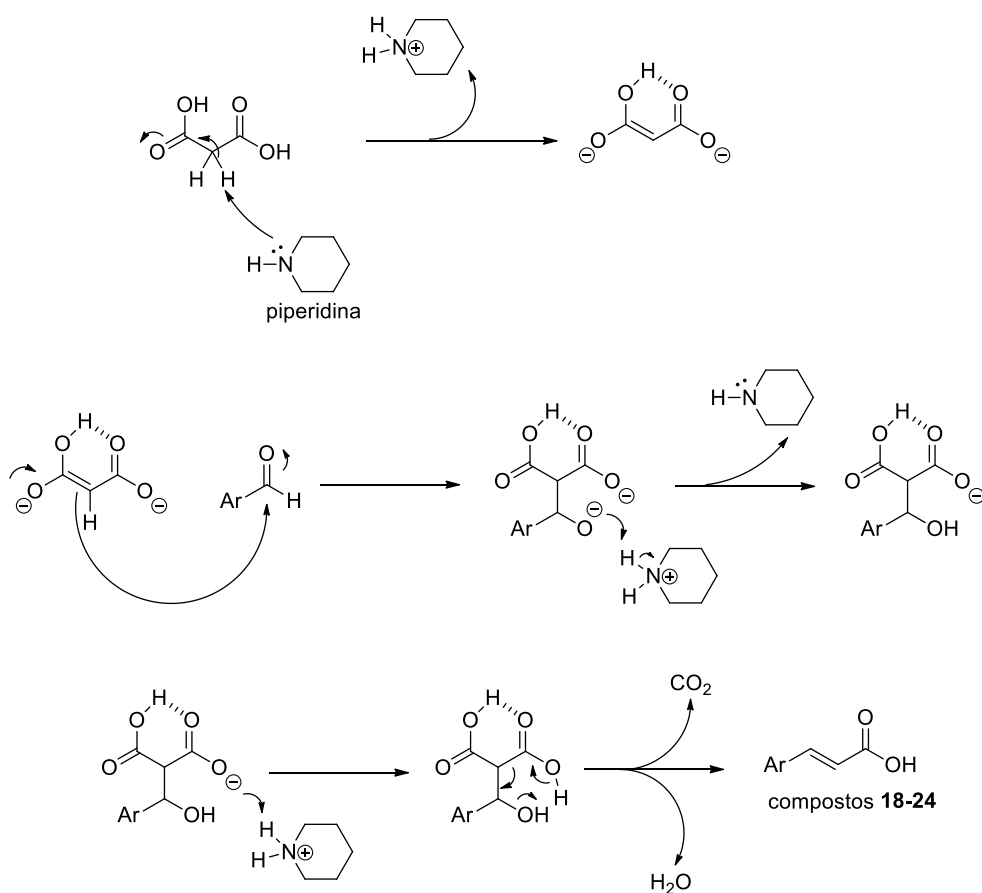
Tf = 235,8–236,0 °C.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6,92 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-3'/H-5'); 7,72 (s, 1H, H-7'); 7,86-7,92 (m, 4H, H-2/H-3/H-4/H-5); 8,50 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-2'/H-6'); 10,86 (s, 1H, OH). O espectro é apresentado na Figura S31 do anexo I.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 116,4 (C-3'/C-5'); 123,1 (C-2); 123,2 (C-5); 125,0 (C-1'); 125,6 (C-8); 135,8 (C-3); 135,9 (C-4); 138,0 (C-2'/C-6'); 139,6 (C-1); 142,0 (C-6); 146,7 (C-7'); 163,7 (C-4'); 189,4 (C-9); 190,4 (C-7). O espectro é apresentado Figura S32 do anexo I.

3.4 Resultados e discussão

A preparação de ácidos cinâmicos substituídos correspondeu à primeira etapa do desenvolvimento desta parte do trabalho. Estes ácidos foram preparados via Condensação de Knoevenagel, catalisadas por piperidina, entre o ácido malônico e diferentes aldeídos aromáticos conforme descrito por Tomaz¹⁰². O mecanismo proposto¹⁰³ envolvido na preparação destes compostos é mostrada no Esquema 3.2.



Esquema 3.2 - Mecanismo proposto envolvido formação dos compostos **18-24**. Ar = 4-fluorofenila (**18**); 3,4,5-trimetoxifenila (**19**); 3,4-dimetoxifenila (**20**); 4-bromofenila (**21**); 4-clorofenila (**22**); 4-nitrofenila (**23**).

Como pode ser observado inicialmente é formado o ânion enolato, cuja deslocalização e ligação de hidrogênio intramolecular tornam-o estável. No Esquema

¹⁰³ CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**, . Oxford University Press, p.330, 2001.

3.2, priorizou-se por mostrar a remoção do hidrogênio alfa à carbonila pela base piperidina. Porém, cumpre ressaltar que esta mesma base remove os hidrogênios ácidos dos grupos carboxila. O enolato formado, reage com o aldeído aromático contendo diferentes substituintes resultando em um aldol. Finalmente, ocorre a etapa de descarboxilação, que pode ocorrer através de um mecanismo cíclico, resultando na formação dos derivados do ácido cinâmico 4- fluorocinâmico (**18**), 3,4,5-trimetoxicinâmico (**19**), 3,4-dimetoxicinâmico (**20**), 4-bromocinâmico (**21**), 4-clorocinâmico (**22**) e 4-clorocinâmico (**23**), com a configuração *trans* com respeito à dupla ligação ligada diretamente ao grupo carboxila.

Tendo sido sintetizados, estes ácidos carboxílicos foram submetidos a reações de esterificação para a preparação de cinamatos contendo grupos alquinila. Conforme mostrado no Esquema 3.1 (pg. 49), o plano sintético para a obtenção dos compostos de estrutura geral **I** previa a reação entre estes ésteres e uma sulfonamida contendo um grupo azida (-N₃). Dentre os métodos descritos na literatura para promover a reação entre um ácido carboxílico e um álcool, optou-se por utilizar a esterificação de Steglich, uma vez que esta metodologia já vem sendo empregada, com grande sucesso, em diferentes trabalhos desenvolvidos pelo GSPCB-UFV.

Esta metodologia foi descrita primeiramente por Wolfgang Steglich em 1978¹⁰⁴ e consiste em uma adaptação do método de obtenção de amidas utilizando DCC. A esterificação de Steglich utiliza como reagente de acoplamento a *N,N*-dicicloexilcarbodiimida (DCC) e a 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina como catalisador¹⁰⁵. Esta reação ocorre geralmente em temperatura ambiente e utiliza diclorometano como solvente. Outro reagente de acoplamento que também é comumente empregado na esterificação de Steglich é a diisopropilcarbodiimida (DIC)^{106,107,108}.

Inicialmente, buscou-se a preparação do composto **29** empregando-se a reação de Steglich entre a o álcool propargílico e ácido fluorocinâmico (**18**), promovida por

¹⁰⁴ PASSO, J. A. Síntese e caracterização de novos polímeros liquid-cristalinos de cadeia lateral derivados do heterocíclico 2-isoxazolínico 3,5-dissubstituído. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 215,2012.

¹⁰⁵ ZWEIFEL, G. S.; NANTZ, Michael H.; SOMFAI, P. **Modern organic synthesis: an introduction**. John Wiley & Sons, p.416, 2017.

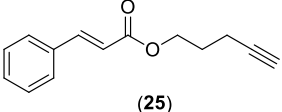
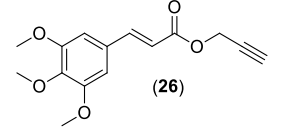
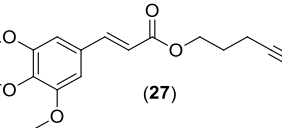
¹⁰⁶ HRDINA, R.; MÜLLER, C. E.; SCHREINER, P. R., Kinetic resolution of trans-cycloalkane-1,2-diols via Steglich esterification. **Chemical Communications**, v. 46, n. 15, p. 2689–2690, 2010.

¹⁰⁷ WENDE, R C. *et al*, The Enantioselective Dakin-West Reaction. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 55, n. 8, p. 2719–2723, 2016.

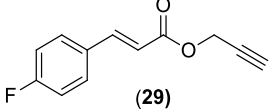
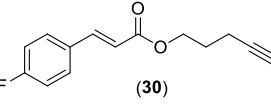
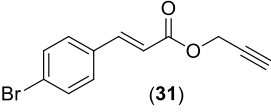
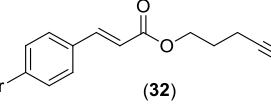
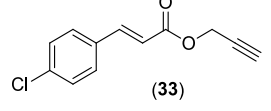
¹⁰⁸ DE LA TORRE, A. F. *et al*, An efficient cyclization of lapachol to new benzo[h]chromene hybrid compounds: a stepwise vs. one-pot esterification-click (CuAAC) study. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 19591–19599, 2018.

DCC e conduzida em DMF sob condições de refluxo. O composto 21 foi obtido com 55% de rendimento após 24 horas de reação. Tentativas de elevar o rendimento alterando-se as condições de reação (por exemplo, aumento da concentração do ácido, aumento da quantidade de DCC, utilização de solventes como diclorometano e acetonitrila) não resultaram em aumento da eficiência do processo. Os cinamatos **24-33** foram preparados com rendimentos variando de 20 a 84% e com tempos de reação que variaram de 25 minutos a 2 dias. As informações relacionadas à preparação destes ésteres estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Informações relativas às reações realizadas para a preparação dos compostos **24** a **33**.

Cinamato	Ácido cinâmico (1) e derivados (18-23) massa (g); mmol;	Álcool propargílico e pent-4-in-1-ol massa (g); mmol;	DCC massa (g), mmol	DMAP massa (g), mmol	Tempo de reação (minutos)	Rendimento (%)	Maasa Obtida (mg)
 (25)	(1) (0,720; 4,86)	Álcool pent-4-in-1-ol (0,460; 5,35)	(1,10; 5,35)	(0,0594; 0,486)	25	84	0,878
 (26)	(19) (0,289; 1,22)	Álcool propargílico (0,075 ; 1,34)	(1,10; 5,35)	(0,0594; 0,486)	240	25	0,084
 (27)	(19) (0,289; 1,22)	Álcool pent-4-in-1-ol (0,115 ; 1,34)	(1,10; 5,35)	(0,0594; 0,486)	1440	44	0,164
 (28)	(23) (0,254; 1,22)	Álcool propargílico (0,075 ; 1,34)	(1,10; 5,35)	(0,0594; 0,486)	1440	22	0,066

Continuação Tabela 1 – Informações relativas às reações realizadas para a preparação dos compostos **24** a **33**

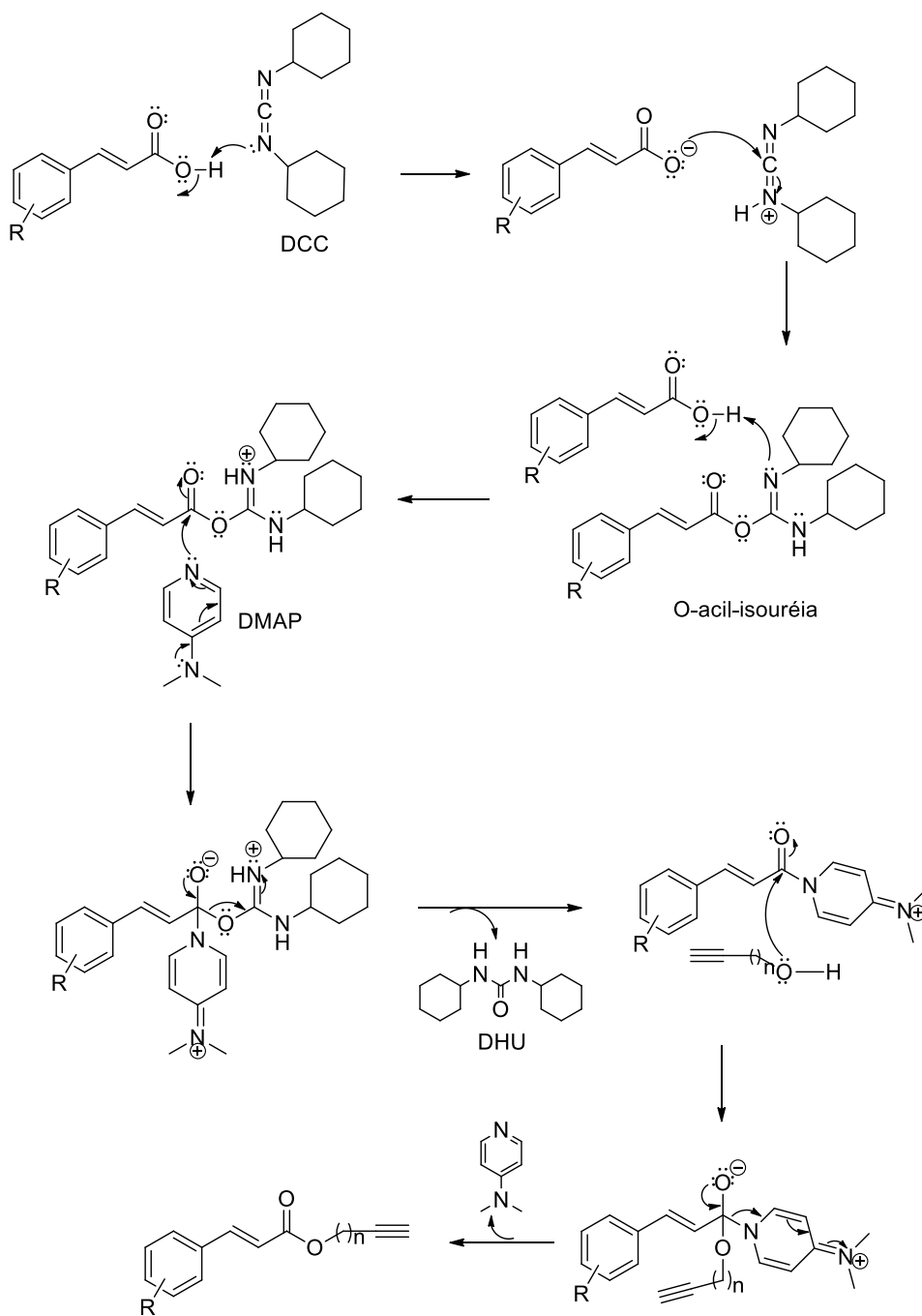
 <p>(29)</p>	(18)	Álcool propargílico	(1,10; 5,35)	(0,0594; 0,486)	1440	55	0,137
	(0,404; 1,22)	(0,300; 5,35)					
 <p>(30)</p>	(18)	Álcool pent-4-in-1-ol	(1,10; 5,35)	(0,0594; 0,486)	2880	44	0,125
	(0,404; 1,22)	(0,115 ; 1,34)					
 <p>(31)</p>	(21)	Álcool propargílico	(1,10; 5,35)	(0,0594; 0,486)	2880	27	0,087
	(0,559; 1,22)	(0,075 ; 1,34)					
 <p>(32)</p>	(21)	Álcool pent-4-in-1-ol	(1,10; 5,35)	(0,0594; 0,486)	2880	44	0,157
	(0,559; 1,22)	(0,115 ; 1,34)					
 <p>(33)</p>	(22)	Álcool propargílico	(1,10; 5,35)	(0,0594; 0,486)	2880	20	0,054
	(0,450; 1,22)	(0,075 ; 1,34)					

O Esquema 3.3 contém o mecanismo de reação que explica a obtenção dos ésteres **24-33** via esterificação de Steglich. Neste processo, a reação entre o grupo hidroxila e a DCC resulta na formação de um melhor grupo de saída, o que permite a substituição da hidroxila do grupo carboxila.

A primeira etapa desta reação consiste na protonação de um dos nitrogênios da DCC pelo ácido carboxílico. A DCC, agora contendo um carbono extremamente eletrofílico, é atacado pelo ânion carboxilato dando origem à *O*-acil-isouréia. Após uma nova protonação, este intermediário sofre, então, um novo ataque nucleofílico do DMAP, uma vez que este é um nucleófilo mais forte do que o álcool, resultando na formação da amida reativa e eliminação da dicitcloexiluréia (DHU) (Esquema 3.3). Quando a esterificação é lenta, uma reação paralela pode ocorrer na forma de um rearranjo 1,3 do intermediário *O*-acil-isouréia, resultando na obtenção da *N*-acil-isouréia que não reage com o álcool (Esquema 3.4)

Porém, a adição da DMAP diminui a ocorrência desta reação paralela, pois esta base substitui o grupo *O*-acil-isouréia como grupo abandonador, formando a nova espécie acilante. Esta nova espécie, que não sofre rearranjo, será posteriormente atacada pelo álcool levando a formação do éster¹⁰⁹.

¹⁰⁹ DE ALMEIDA, T. B. Sínteses de novos híbridos moleculares a partir de um derivado da piperina e anéis tetraidropiranos com potencial atividade antinociceptiva. Dissertação, Universidade Federal da Paraíba, p. 61, 2014.



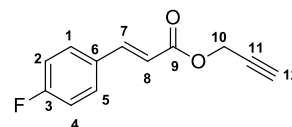
Esquema 3.3 - Proposta mecanística para a formação dos compostos **24-33**.

átomos de hidrogênio *trans* em uma ligação dupla (PAVIA, 2010). Observa-se ainda no espectro de **29** outro duplete em $\delta_{\text{H}} 7,71$, também integrado para um hidrogênio e com constante de acoplamento $J_{\text{trans}} = 16$ Hz, correspondente ao hidrogênio H-7, confirmando assim a estereoquímica da ligação dupla e o acoplamento de H-7 com o átomo vizinho H-8. O hidrogênio H-7 é observado com deslocamento químico maior do que H-8 devido à deslocalização de elétrons da ligação dupla acíclica com o grupo carbonila, diminuindo assim a densidade eletrônica nessa região e desblindando mais o hidrogênio H-7 em relação a H-8. Os hidrogênios H-3 e H-5 foram observados como um tripleto em $\delta_{\text{H}} 7,08$ devido ao acoplamento com os átomos de flúor e com os átomos de hidrogênio H-2 e H-4. O sinal para H-1 e H-5 foi observado em $\delta_{\text{H}} 7,52$ como um duplo duplete ($J = 8,4$ Hz, $J_{\text{H-F}} = 6,0$ Hz) integrado para dois átomos de hidrogênio.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 3.10) o sinal observado em $\delta_{\text{C}} 52,1$ foi atribuído ao carbono metilênico (C-10). Os sinais em $\delta_{\text{C}} 74,9$ e $\delta_{\text{C}} 77,7$ correspondem aos carbonos *sp* C-12 e C-11, respectivamente. O carbono C-8 foi observado em $\delta_{\text{C}} 116,7$ mais blindado em relação ao C-7 ($\delta_{\text{C}} 144,6$). Este fato se deve novamente a diminuição da densidade eletrônica no C-7 pelos mesmos motivos citados anteriormente. O carbono da carbonila C-9 foi atribuído em $\delta_{\text{C}} 165,9$. Os demais sinais correspondem aos carbonos do anel aromático, que foram observados como dupletos devido aos acoplamentos carbono-flúor. Os valores das constantes para estes acoplamentos estão em acordo com aqueles descritos na literatura (Tabela 1). Interessantemente, o sinal para o átomo C-8 também foi observado como um duplete, o que foi também atribuído a um acoplamento a longa distância com o átomo de flúor.

Tabela 2 - Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 29 obtidos neste trabalho e os dados descritos na literatura

Atribuição	δ	J (Hz)	J^* (Hz)	Mult.	Mult.*
C-6	130,6	3,3	3,2	d	d
C-2/C-4	116,0	21,8	21 Hz	d	d
C-1/C-5	130,1	8,6 Hz	7,8 Hz	d	d
C-4	164,0	244,7 Hz	245,1 Hz	d	d



*Valores descritos na literatura¹¹⁰ para os valores de acoplamento C-F.

¹¹⁰ EVANS, D. F. The relative signs of fluorine NMR spin coupling constants by double irradiation. **Molecular Physics**, v. 5, n. 2, p. 183-187, 1962.

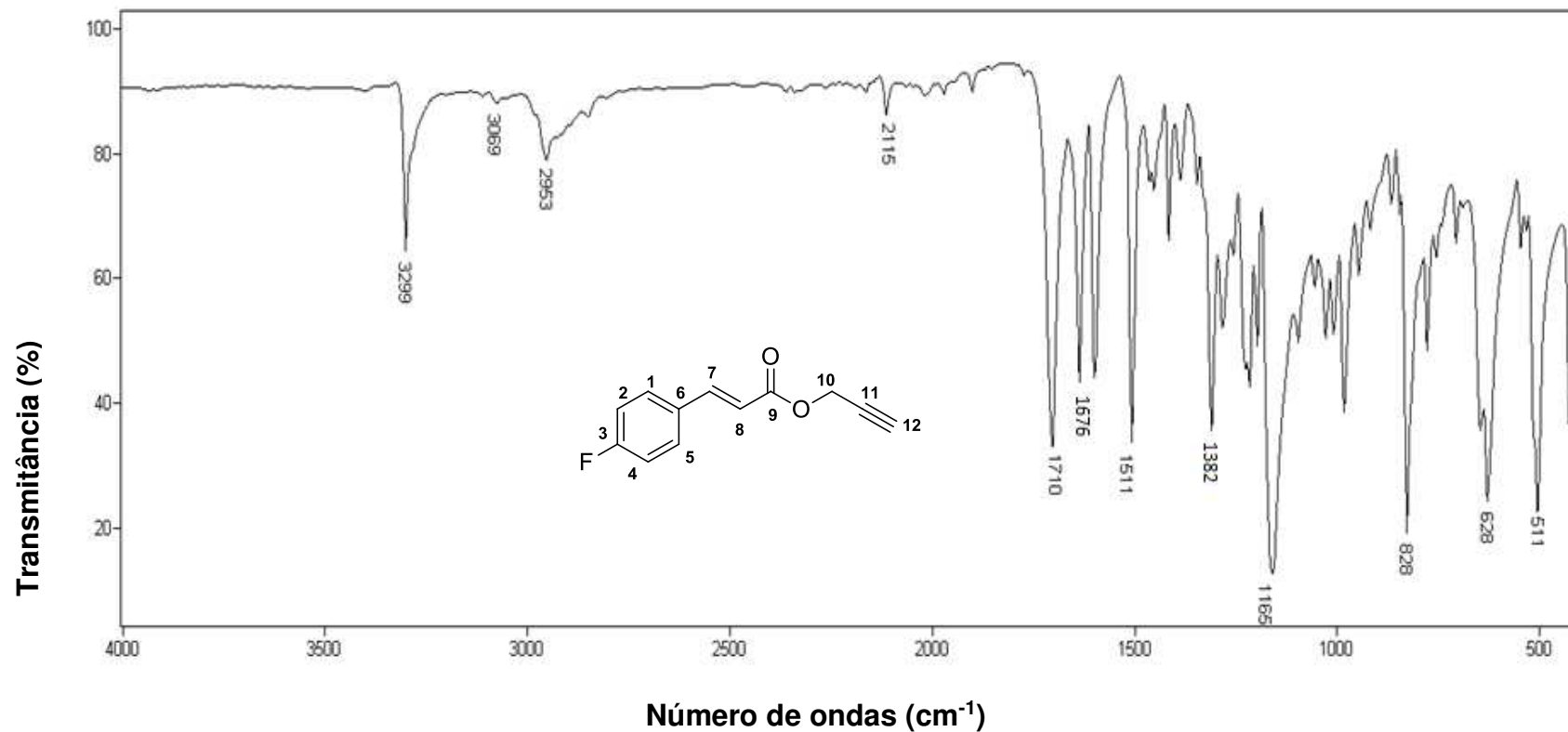


Figura 3.8 - Espectro no infravermelho (ATR) para o composto **29**.

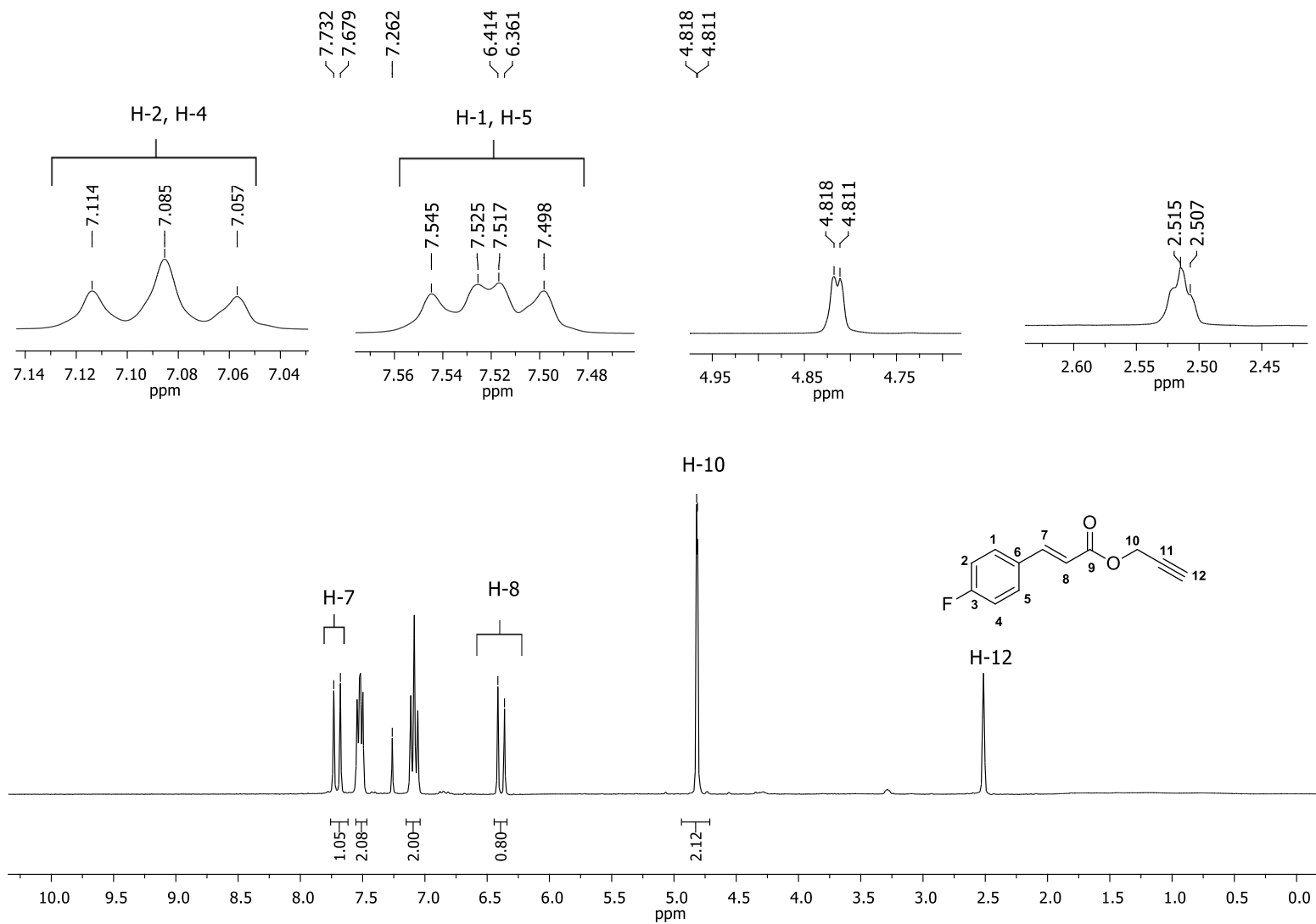


Figura 3.9 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) para o composto **29**.

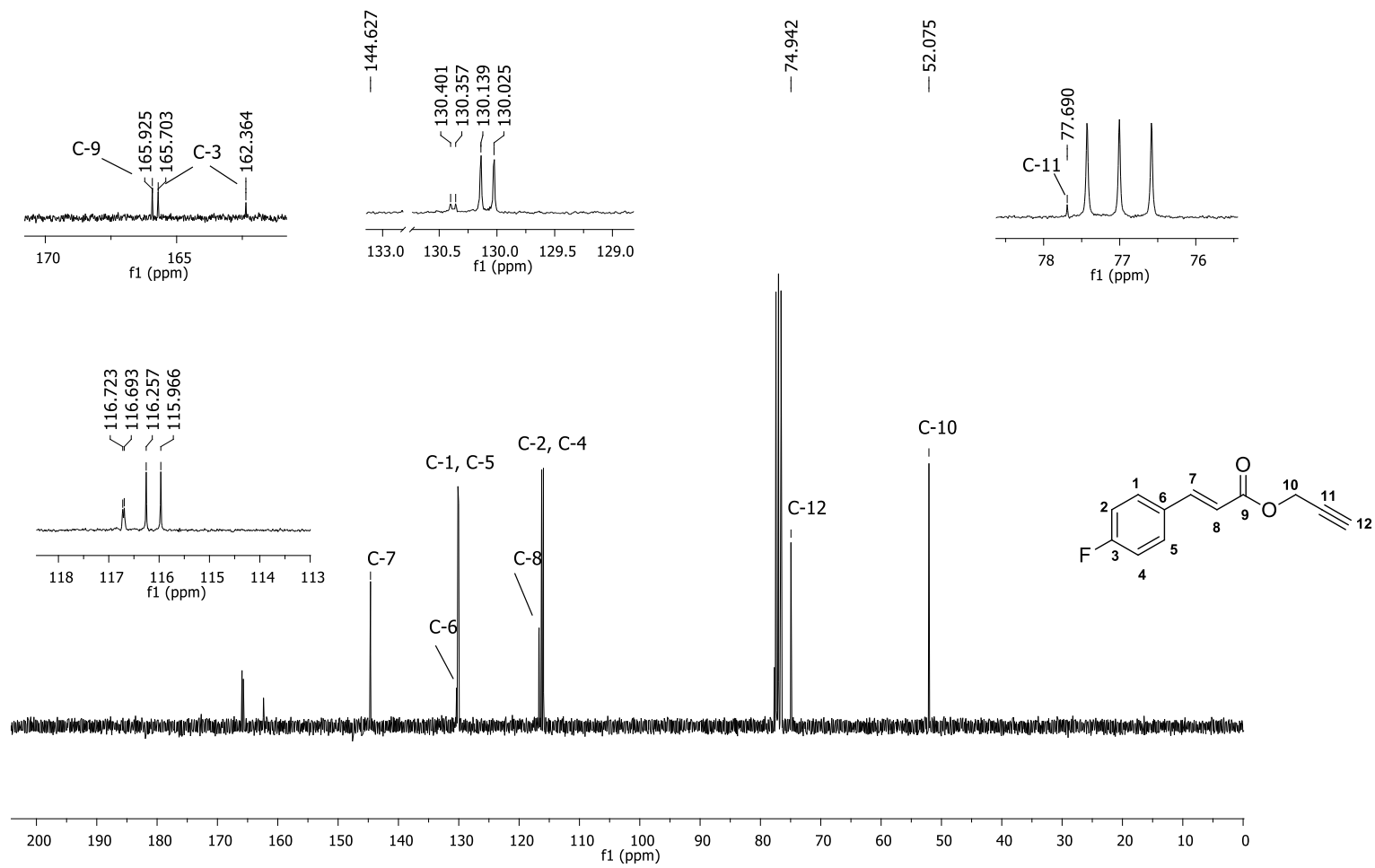
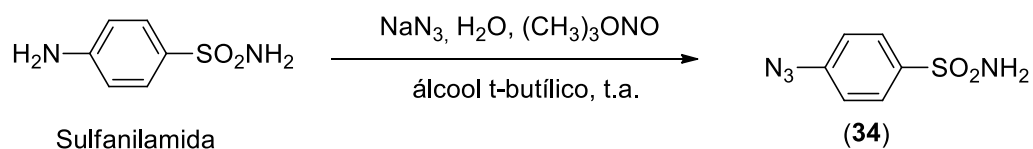


Figura 3.10 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para o composto **29**.

De posse dos ésteres cinamatos **24-33** e tendo em vista o plano sintético apresentado no Esquema 2.1, procedeu-se à síntese da 4-azido benzenosulfonamida (**34**), que foi obtida em 63% de rendimento, a partir do tratamento da 4-aminosulfonamida (sulfanilamida) com nitrito de *terc*-butila e azida de sódio¹⁰³ (Esquema 3.5).



Esquema 3.5 - Preparação da 4-azidobenzenesulfonamida (**34**). A sulfanilamida foi tratada com azida de sódio e nitrito de *terc*-butila em álcool *t*-butílico. A reação foi conduzida à temperatura ambiente e resultou na obtenção do composto 34 em 63% de rendimento.

Uma vez sintetizada, esta substância foi caracterizada via espectroscopia de RMN. No espectro de RMN de ¹H do composto **34** (Figura 3.11) o simpleto alargado em observado em δ_{H} 7,36, integrado para dois hidrogênios, corresponde aos hidrogênios do grupamento amino (-NH₂). Os dupletos em δ_{H} 7,28 e δ_{H} 782, ambos integrados para dois hidrogênios, referem-se aos hidrogênios do anel aromáticos H-3/H-5 e, H-2/H-6, respectivamente.

No espectro de RMN de ¹³C do composto **34** (Figura 3.12) o sinal observado em δ_{C} 119,9 foi atribuído aos carbonos C-3/C-5. Já os sinais em δ_{C} 128,1; δ_{C} 140,9 e δ_{C} 143,3 correspondem, respectivamente, aos carbonos C-2/C-6; C-1; C-4.

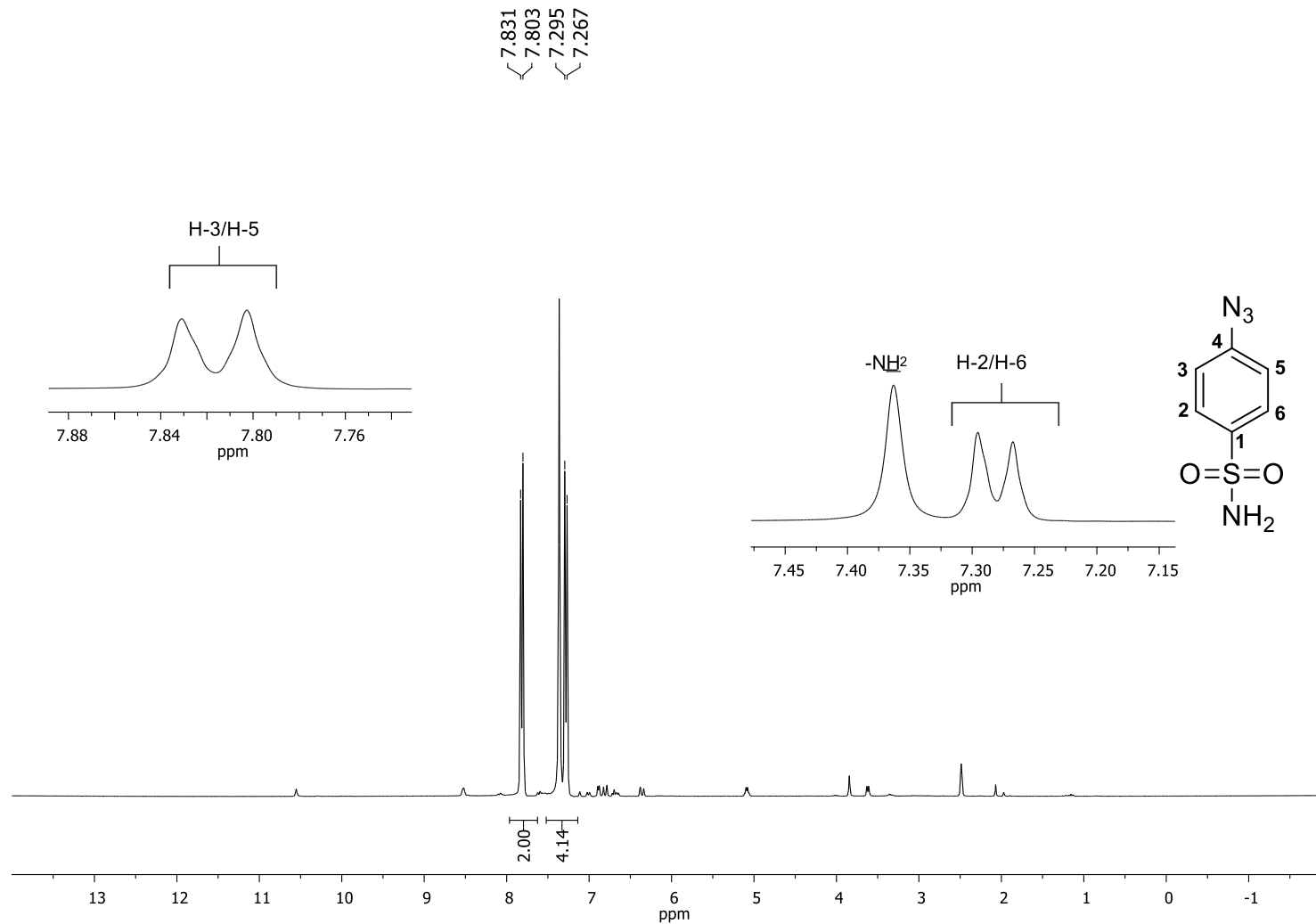


Figura 3.11 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) para o composto **34**

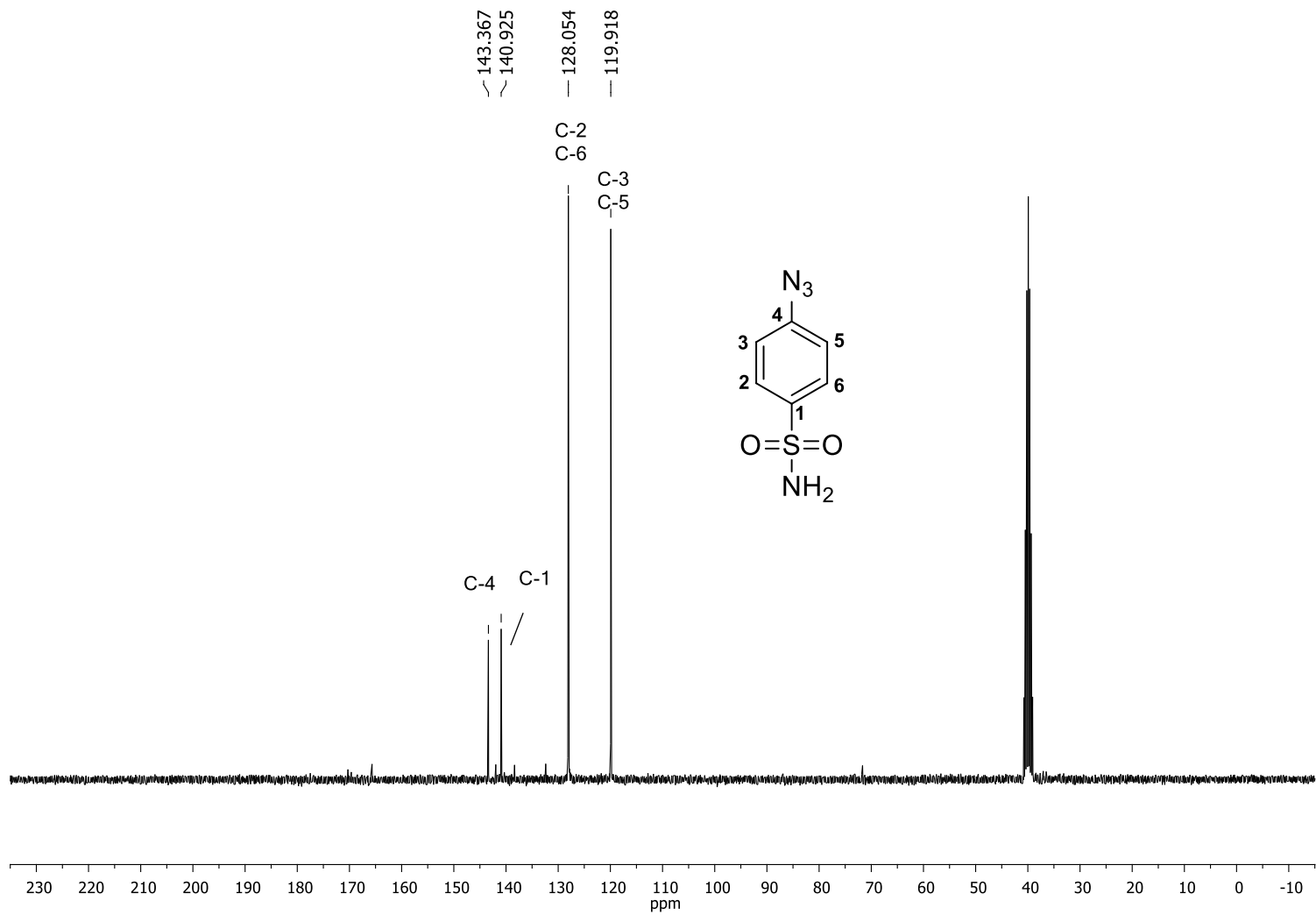
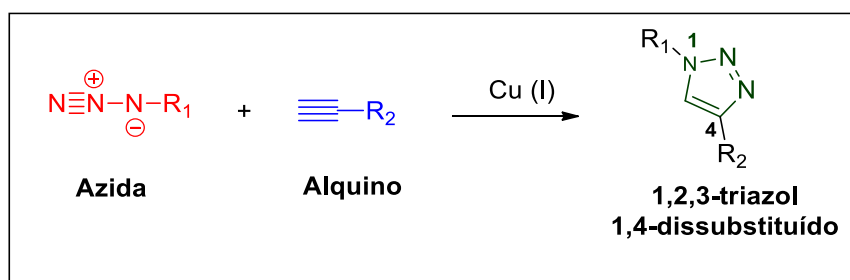


Figura 3.12 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) para o composto **34**.

A última etapa prevista no plano sintético mostrado no Esquema 3.1 (pg. 49) para a obtenção de derivados **I** correspondeu à união de ésteres derivados do ácido cinâmico contendo porções alquinilas ao composto **34**. A reação CuAAC (reação de cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino terminal e uma azida catalisada por cobre(I)) foi a transformação pensada para fazer a união entre os ésteres e a azida **34**.

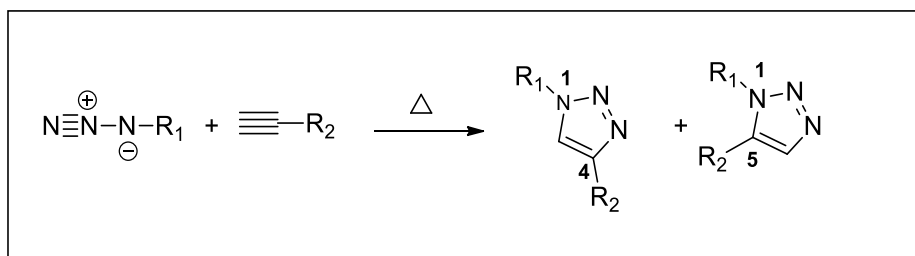
A reação CuAAC ou simplesmente reação “click” como é também conhecida na literatura, é um processo amplamente utilizado para a síntese de compostos contendo anéis 1,2,3-triazólicos. Neste processo um alcino terminal reage com uma azida, na presença de Cu(I), resultando na produção de derivados 1,2,3-triazólicos 1,4-disubstituídos (Esquema 3.6).



Esquema 3.6 - Reação entre uma azida orgânica (estrutura geral mostrada em vermelho) e um alcino terminal (estrutura geral mostrada em azul) na presença de Cu(I) forma exclusivamente o regioisômero 1,2,3-triazol 1,4-disubstituído. O anel 1,2,3-triazol é destacado em verde.

O trabalho pioneiro de Rolf Huisgen demonstrou que alquinos terminais¹¹¹ sofrem cicloadição térmica 1,3-dipolar com azidas orgânicas. O processo descrito por Huisgen (Esquema 3.7) apresenta como problemas o fato da reação ser lenta, produzir uma mistura de regioisômeros 1,4 e 1,5-substituídos e requerer elevada temperatura.

¹¹¹ HUISGEN, R.; SZEIMIES, G.; MÖBIUS, L. 1.3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen. *Chemische Berichte*, v. 100, n. 8, p. 2494-2507, 1967.



Esquema 3.7 - Reação de Huisgen entre uma azida orgânica e um alcino terminal. A reação corresponde a um processo térmico de cicloadição 1,3-dipolar e forma uma mistura de compostos 1,2,3-triazol regioisoméricos

Sharpless¹¹² e Meldal¹¹³ demonstraram independentemente em 2002 uma nova versão da reação de Huisgen. Neste caso, a transformação ocorre por um caminho catalisado por cobre(I) com um aumento na taxa de velocidade na ordem de 7 vezes, resultando na formação exclusiva do regioisômero 1,4-disubstituído (Esquema 3.6) e em condições brandas. A reação CuAAC é um dos melhores exemplos do que se conhece como processo “click” e, por isso, a reação CuAAC é também denominada na literatura como reação “click”¹¹⁴. Reações “click” possuem, como características o fato de: i) serem reações rápidas; ii) corresponderem a processos estereoespecíficas; iii) os produtos serem de fácil purificação; iv) serem transformações termodinamicamente favoráveis; v) serem realizadas sem solventes ou em solventes atóxicos; v) não necessitarem de precauções especiais como a utilização de solventes anidros e atmosfera inerte.

Embora diferentes fontes de cobre possam ser empregadas nas reações CuAAC, tipicamente a transformação é realizada na presença de CuSO₄ e ascorbato de sódio. Neste caso, o cobre(II) é reduzido *in situ* pelo sal ascorbato de sódio resultando na formação da espécie catalítica Cu(I). A proposta de ciclo catalítico mais amplamente aceita atualmente para explicar a formação dos 1,2,3-triazóis em reações CuAAC entre

¹¹² DEMKO, Z. P.; SHARPLESS, K. B. A click chemistry approach to tetrazoles by Huisgen 1, 3-dipolar cycloaddition: Synthesis of 5-sulfonyl tetrazoles from azides and sulfonyl cyanides. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, n. 12, p. 2110-2113, 2002.

¹¹³ TORNØE, C. W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 9, p. 3057–3064, 2002.

¹¹⁴ HE, Y. T.; YANG, H. N.; YAO, Z. J. Sharpless AD strategy towards the γ -methyl butenolide unit of acetogenins: Enantioselective synthesis of butenolide I and II with mosquito larvicidal activity. **Tetrahedron**, v. 58, n. 43, p. 8805–8810, 2002.

alcinos terminais e azidas orgânicas, catalisadas por Cu(I), é apresentada no Esquema 3.8. Cálculos computacionais indicam que a complexação π entre o Cu(I) e o alcino terminal (estrutura II no Esquema 3.8) diminui o pKa do hidrogênio para 9,8 unidades, o que possibilita a desprotonação em um sistema aquoso sem a necessidade de se adicionar base, facilitando a formação do acetilato de cobre (III). Após a formação do acetilato de cobre, ocorre a complexação com a azida, gerando o complexo azida-acetilato (IV). A proporção 1:1 de azida/alcino no intermediário (IV) foi sugerida experimentalmente por Sun e Wu¹¹⁵ por meio da investigação da reação empregando a espectroscopia no infravermelho. Neste intermediário o cobre tem um efeito sinérgico nos sítios reativos, tornando o nitrogênio terminal da azida mais eletrofílico e o carbono do tipo β -vinilidênico mais nucleofílico, o que favorece o ataque para formação do metalociclo (V). Esta etapa, que é endotérmica e define a regioespecificidade da reação, tem energia de ativação (E_a) calculada de aproximadamente 15 kcal mol^{-1} , que é menor do que a E_a para a reação não catalisada (cerca de 26 kcal mol^{-1}). Isto explica o grande aumento da velocidade da reação quando comparado com o processo térmico^{116,117,118}. Embora o metalociclo (5) tenha sido proposto em vários trabalhos com apenas uma espécie metálica diversos pesquisadores sugerem que a ciclização ocorra com dois centros metálicos. Em seguida, ocorre a contração do anel por uma associação transanular do par de elétrons não ligantes do N-1 com o orbital antiligante de C-5 fornecendo o triazolila de cobre (VI). Este intermediário pode ser isolado quando estão presentes grupos protetores volumosos nos substratos. Na última etapa do mecanismo ocorre a protonação do intermediário triazolila de cobre (VI) com a formação do produto final (VII) e regeneração do catalisador. Esta protonação pode ocorrer por meio da

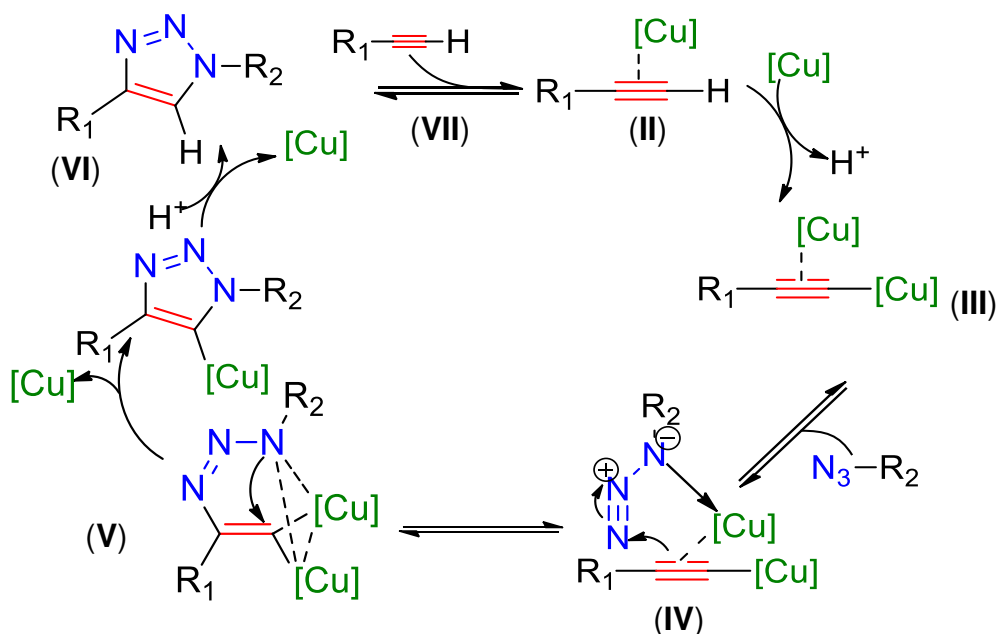
¹¹⁵ SUN, S.; WU, P. Mechanistic insights into Cu(I)-catalyzed azide-alkyne “click” cycloaddition monitored by real time infrared spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 114, n. 32, p. 8331–8336, 2010.

¹¹⁶ MELDAL, M. P.; TORNØE, C. W. Cu-Catalyzed Azide – Alkyne Cycloaddition Cu-Catalyzed Azide - Alkyne Cycloaddition. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 8, p. 2952–3015, 2017.

¹¹⁷ WILLIAMS, J. M. *et al.* A new general method for preparation of N-methoxy-N-methylamides. Application in direct conversion of an ester to a ketone. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 31, p. 5461–5464, 1995.

¹¹⁸ FOKIN, V. V. *et al.* Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 1, p. 210–216, 2005.

interação com uma base protonada ou com o próprio solvente, porém a presença de outros eletrófilos pode levar à formação de 1,2,3-triazóis-1,4,5-trissubstituídos¹¹⁹.



Esquema 3.8 - Ciclo catalítico proposto para a reação CuAAC.

Conforme mencionado anteriormente, a reação CuAAC foi escolhida para fazer a conexão entre os compostos **24-33** e a azida **34**. Embora na literatura seja descrito que esta reação é capaz de conectar duas moléculas de forma muito simples e com altos rendimentos, esta não foi a realidade encontrada quando se buscou realizar reações CuAAC entre as substâncias **24-33** e a azida **34**. Na prática deparou-se com longos tempos de reação e rendimentos baixos. A utilização da reação CuAAC permitiu a síntese dos derivados do ácido cinâmico contendo o núcleo 1,2,3-triazol **35** e **36** com rendimentos de 8 e 17%, respectivamente. Para a preparação desses compostos foram empregados os ésteres **24** e **26**. Tentativas de obtenção de derivados 1,2,3-triazol a partir de outros

¹¹⁹ FREITAS, L. B. D. O. *et al.* A reação “click” na síntese de 1,2,3-triazóis : Aspectos químicos e aplicações. *Química Nova*, v. 34, n. 10, p. 1791–1804, 2011.

ésteres cinamatos se mostraram infrutífera. No momento que este texto está sendo redigido, não se tem uma explicação plausível para os fatos experimentais observados descritos acima com respeito às dificuldades encontradas com respeito às reações CuAAC.

Considerando o composto **35**, no seu espectro de RMN de ^1H (Figura 3.13) observa-se um simpleto em δ_{H} 8,80 relacionado ao hidrogênio H-12 do anel 1,2,3-triazol. Os sinais para os hidrogênios aromáticos H-1'/H-5' e H-2'/H-4' foram observados como dois dupletos com deslocamentos químicos próximos (δ_{H} 8,07 para H-5'/H-7' e δ_{H} 8,00 para H-3'/H-4'). Estes dupletos apresentam constante de acoplamento igual a 8,7 Hz, um valor típico para átomos de hidrogênio acoplados em *orto* em um anel benzênico. O sinal para H-7 é observado como um duplete em δ_{H} 7,64, apresentando constante de acoplamento igual a 16,4 Hz. Os hidrogênios aromáticos H-1 a H-5 são observados como multipletos em δ_{H} 7,59-7,62 (para H-1 e H-5) e δ_{H} 7,34-7,37 para H-2, H-3 e H-4. O sinal para H-8 é observado como um duplete em δ_{H} 6,57 e apresentando constante de acoplamento igual a 16,4 Hz. Por fim, os hidrogênios metilênicos H-10 são observados como um simpleto em δ_{H} 5,34. O sinal para os hidrogênios aromáticos H-1/H-5 é observado como um simpleto em δ_{H} 6,91. Já os hidrogênios metilênicos H-10 são observados como um simpleto em δ_{H} 5,34. Por fim, os hidrogênios aromáticos do anel ligado ao grupo sulfonamida foram observados como um simpleto alargado e integrado para quatro hidrogênios em δ_{H} 8,01.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **35** (Figura 3.14), o número de sinais observados é compatível com a estrutura do composto. O sinal para o grupo carbonila da função éster é observado em δ_{C} 166,2, enquanto que o sinal para o carbono metilênico é observado em δ_{C} 57,1. Os carbonos aromáticos da porção triazólica são observados em δ_{C} 123,1 (C-12) e δ_{C} 145,4 (C-11). Já os carbonos C-7 e C-8 da dupla instauração ligada ao grupo carbonila ocorrem, respectivamente, em δ_{C} 144,2 e δ_{C} 117,5. Os demais sinais observados no espectro correspondem aos carbonos aromáticos dos anéis benzênicos presentes na estrutura de **35**.

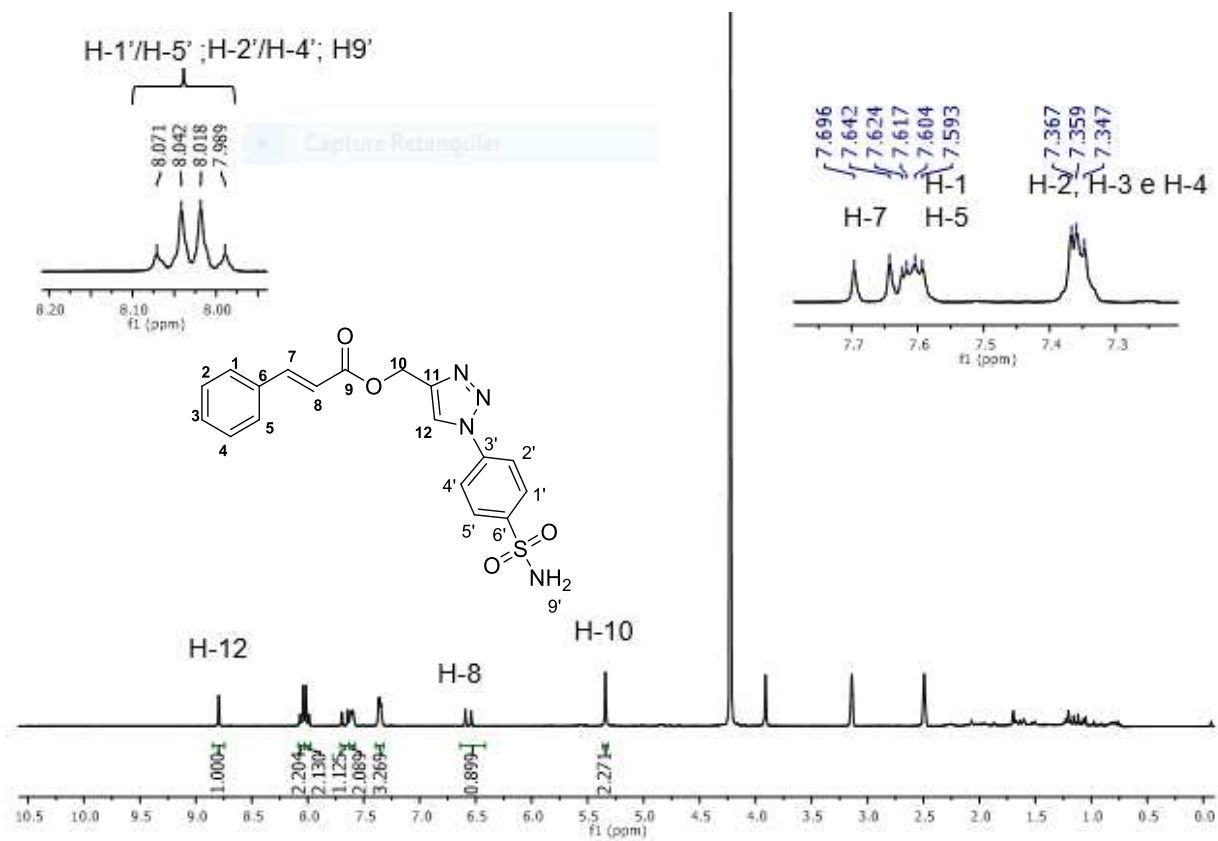


Figura 3.13 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{MeOH-}d_4/\text{DMSO-}d_6$) para o composto **35**

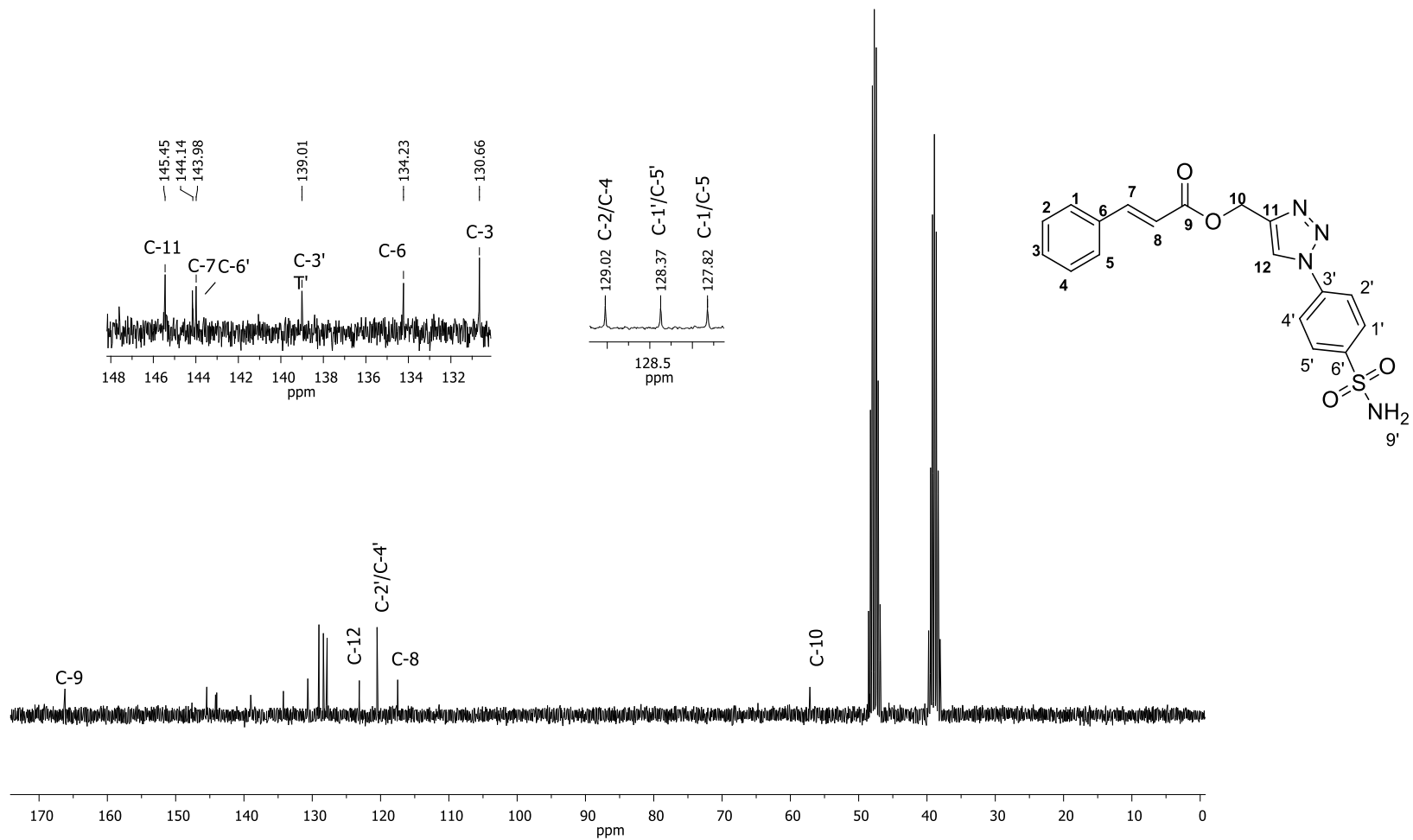


Figura 3.14 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, MeOH- d_4 /DMSO- d_6) para o composto **35**.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Avaliou-se o efeito citotóxico dos compostos derivados do ácido cinâmico (Figura 3.15) contra a linhagem celular B16-F10 (melanoma murino).

3.5.1 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio de avaliação da citotoxicidade dos compostos derivados do ácido cinâmico (Figura 3.15) foi realizado em colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Gustavo Costa Bressan do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV e da Professora Dra. Mariana Machado Neves do Departamento de Biologia Geral. As linhagens utilizadas nos testes foram a B16-F10 (melanoma murino), disponíveis no banco de células do Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos (LBCB) da Universidade Federal de Viçosa, onde também ocorreu o cultivo das linhagens. Os procedimentos experimentais foram conduzidos em condições assépticas, em capela de fluxo laminar com lâmpada ultravioleta e utilizando material estéril. As culturas celulares foram contadas em câmaras de *neubauer* mantidas em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), pH 7,2, suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB 10%), 100 g mL⁻¹ de penicilina e 100 g mL⁻¹ de estreptomicina a 37 °C sob tensão de 5% de CO₂.

3.5.2 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

A atividade citotóxica dos compostos **24-27**, **29-33** foram avaliadas segundo o método MTT. O ensaio baseia-se na medida da atividade de desidrogenases mitocondriais, isto é, analisa o nível de funcionalidade da célula e não de sua estrutura. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é avaliada pela redução do brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio (MTT), um sal de coloração amarela e solúvel em água levando ao composto formazan que é um sal de coloração azul e insolúvel em água pela atividade enzimática succinildesidrogenase presente na mitocôndria no citoplasma de células viáveis. Dessa forma, a redução do

MTT à formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular¹²⁰. As linhagens celulares B16-F10 (1×10^4 células) foram empregadas no meio de cultura RPMI 1640 (10% SFB) por 24 horas na densidade de 10.000 células/poço a 37 °C e 5% de CO₂ para adaptação das células. Os compostos foram avaliados na mol L⁻¹ por 48 horas de incubação a 37 °C e sob tensão de 5% de CO₂. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma) na concentração 5 mg mL⁻¹ foram adicionados a cada poço, sendo as células incubadas novamente a 37 °C por 4 horas. Posteriormente, a Carmoximetilcelulose (CMC, controle). A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 540 nm utilizando espectrofotômetro com leitura automática de microplacas (Biotek Sinergy HT). Como veículo e controle negativo foi utilizado a Carmoximetilcelulose na concentração 0,25% v/v, sendo considerado como 100% de viabilidade celular. Para os cálculos da viabilidade celular utilizou-se o programa Microsoft Excel e para construção dos gráficos utilizou-se o programa *Prism* 6.1.

3.5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos (Fig 3.15) foram avaliados, na concentração de 100 µmol L⁻¹, contra as linhagens celulares B16-F10 (melanoma murino) por meio do teste MTT.

¹²⁰ DE ALBUQUERQUE, C. A. C.; VEIGA, C. B.; WERNKE, A. Análise dos efeitos do ácido p-cumárico de eugenia catharinensis em embriões de *G. Domesticus* tratados com acetato de chumbo/Analysis of effects of eugenia catharinensis p-cumaric acid in embryos of *G. Domesticus* treated with lead acetate. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 8, p. 11909-11926, 2019.

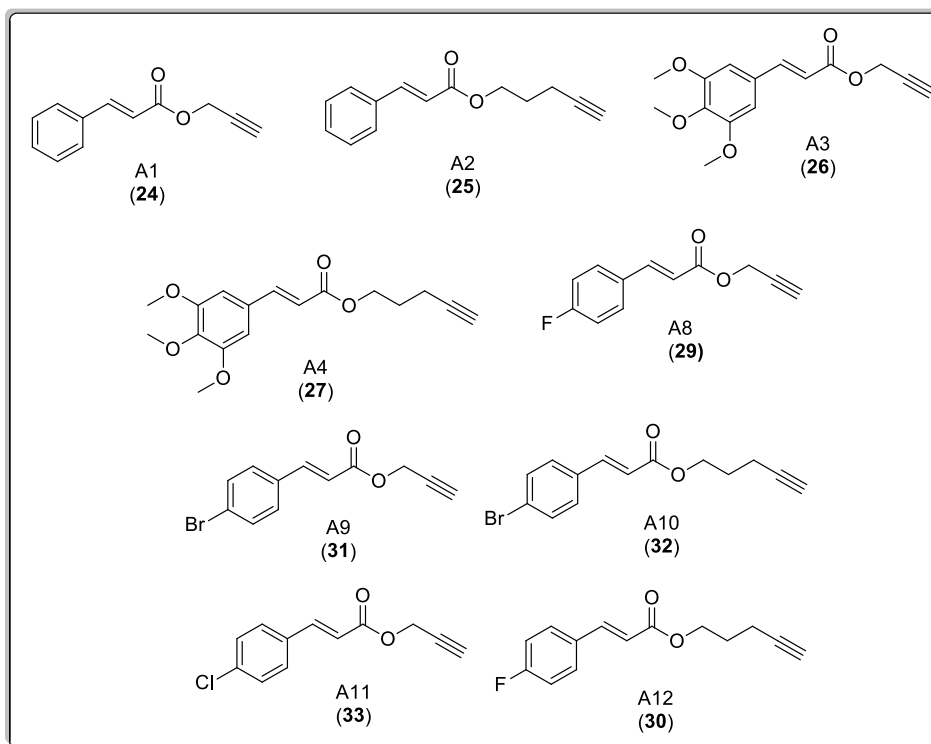


Figura 3.15- Compostos avaliados contra as células B16-F10.

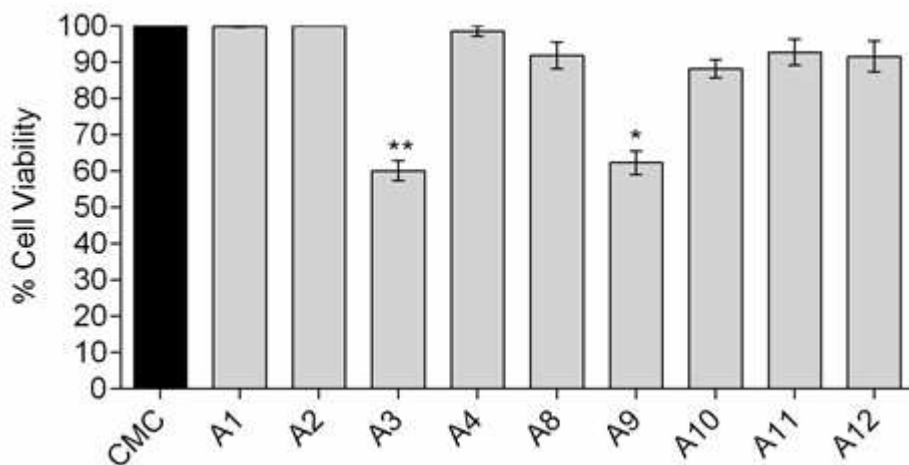


Figura 3.16- Efeito citotóxico dos compostos triazólicos derivados da cinâmico contra a linhagem B16-F10 na concentração de 100 µM.

Os compostos **A3** e **A9** (Fig 3.16) estão entre os mais ativos nos ensaios realizado contra as duas linhagens celulares. Como característica comum, estes compostos possuem em suas estruturas os substituintes trimetoxilato e o átomo de bromo,

sugerindo que a presença destes é um fator importante para potencializar a atividade citotóxica dos compostos avaliados.

Um dos maiores desafios encontrados foi em relação à solubilidade dos compostos. Foram testados diferentes controles negativos como DMSO, proteína de fazina de azobactérias, β -ciclodextrina, γ -Cyclodextrin e a carboximetilcelulose. Esta última foi nossa escolha, sendo muito utilizada como espessante, estabilizante em emulsões, alimentos, cosméticos etc. No entanto, não foi alcançada solubilidade total em relação a alguns compostos. Os desafios recorrentes da solubilidade são amplamente descritos na literatura, e tratam-se de extensos trabalhos que podem envolver modificações físicas e químicas do fármaco e outros métodos como redução do tamanho de partícula, engenharia de cristais, formação de sal, dispersão sólida, uso de surfactante, complexação e assim por diante.¹²¹ A seleção do método de melhoria da solubilidade também é descrita na literatura dependendo da propriedade do composto ativo, do local de absorção sugerindo que a solubilidade parcial possa ser um meio de investigação para alcançar-se melhoras nas condições de solubilidade.

¹²¹ SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, n. 100 mL, p. 1–10, 2012.

ANEXO I
DADOS ESPECTROSCÓPICOS

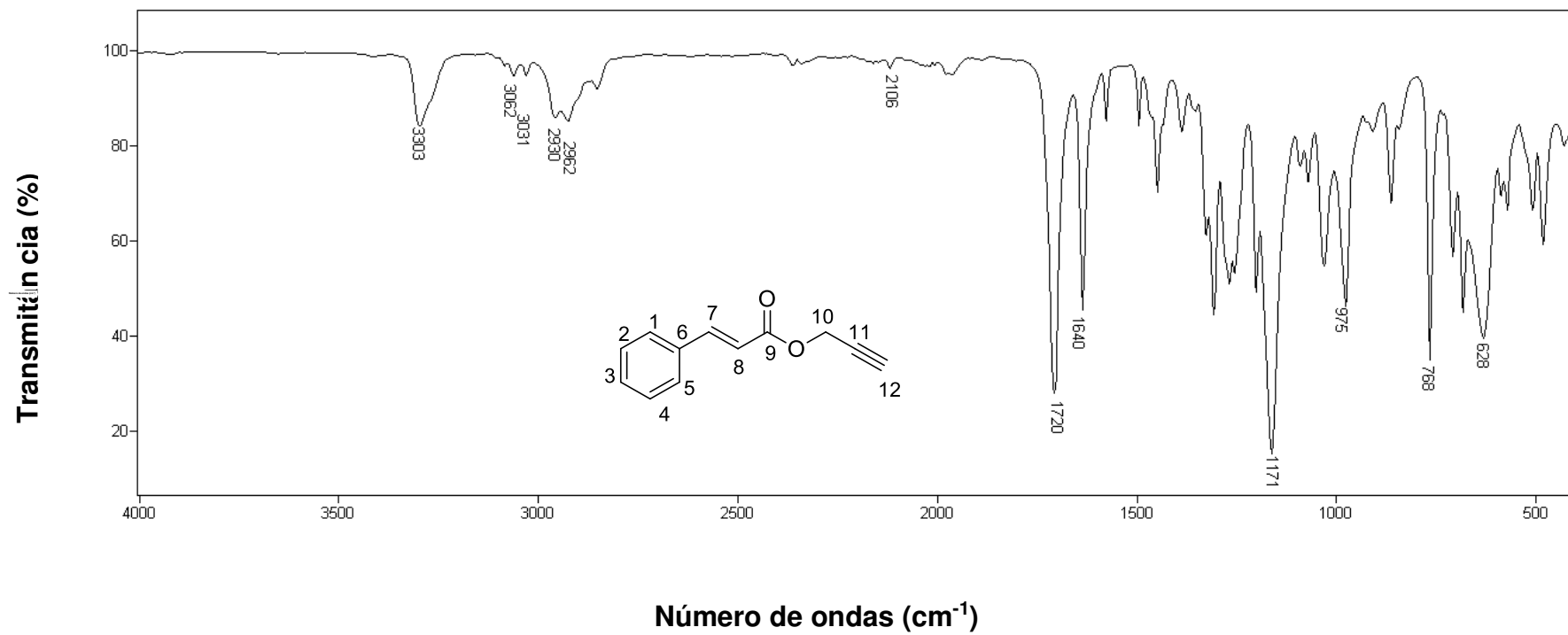


Figura S1 - Espectro no infravermelho (ATR) para o composto **24**.

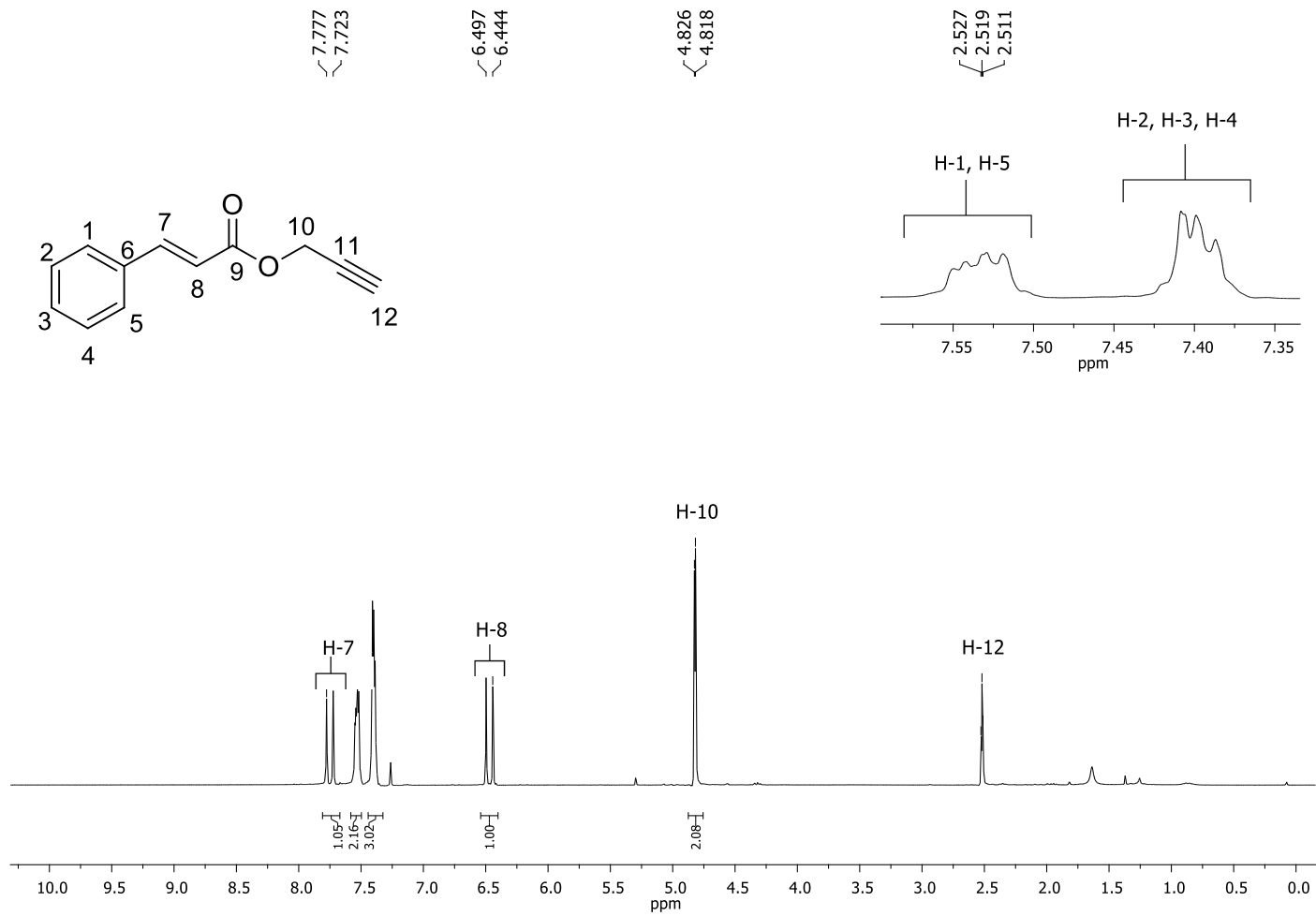


Figura S2 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) para o composto **24**.

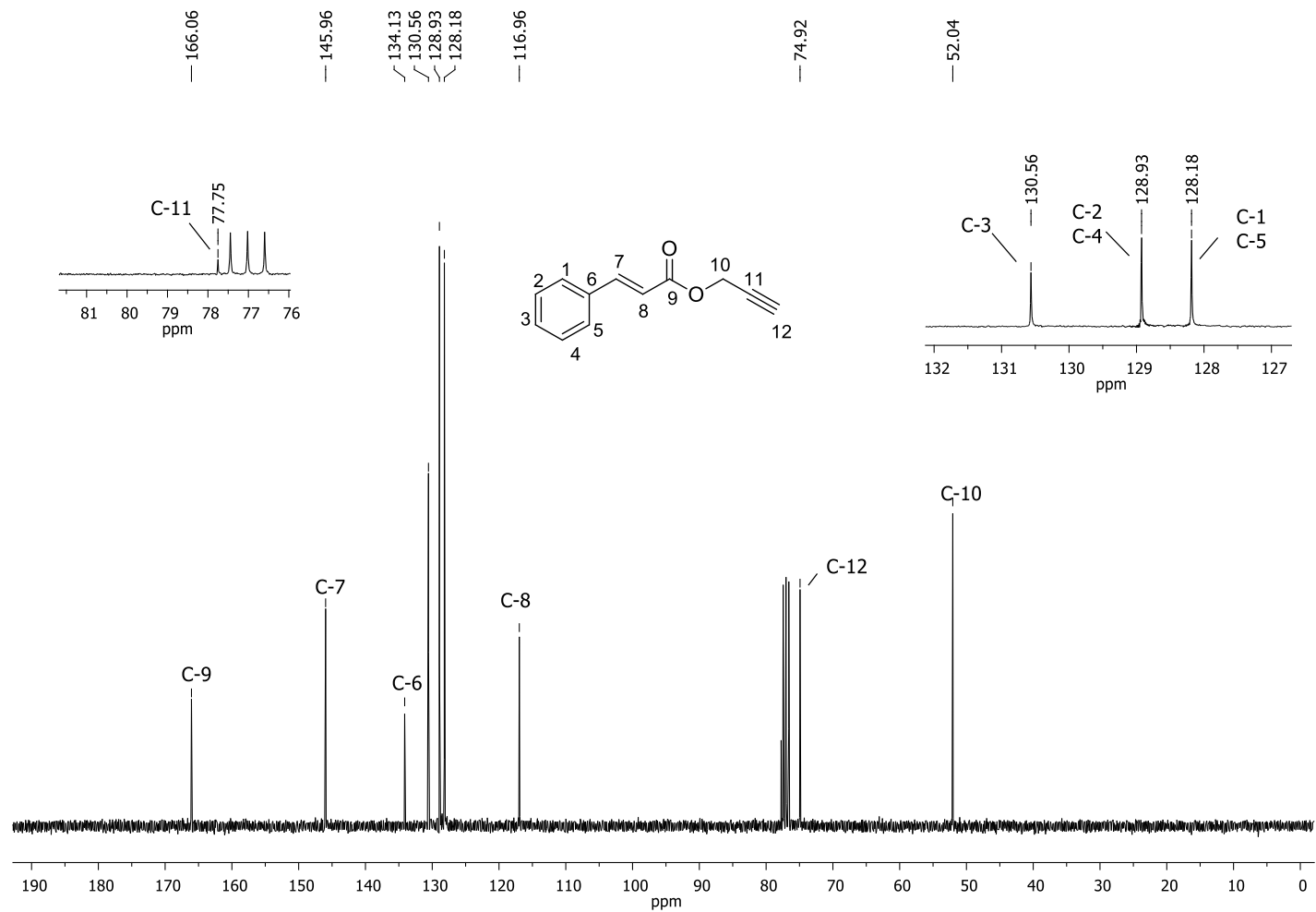


Figura S3 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **24**.

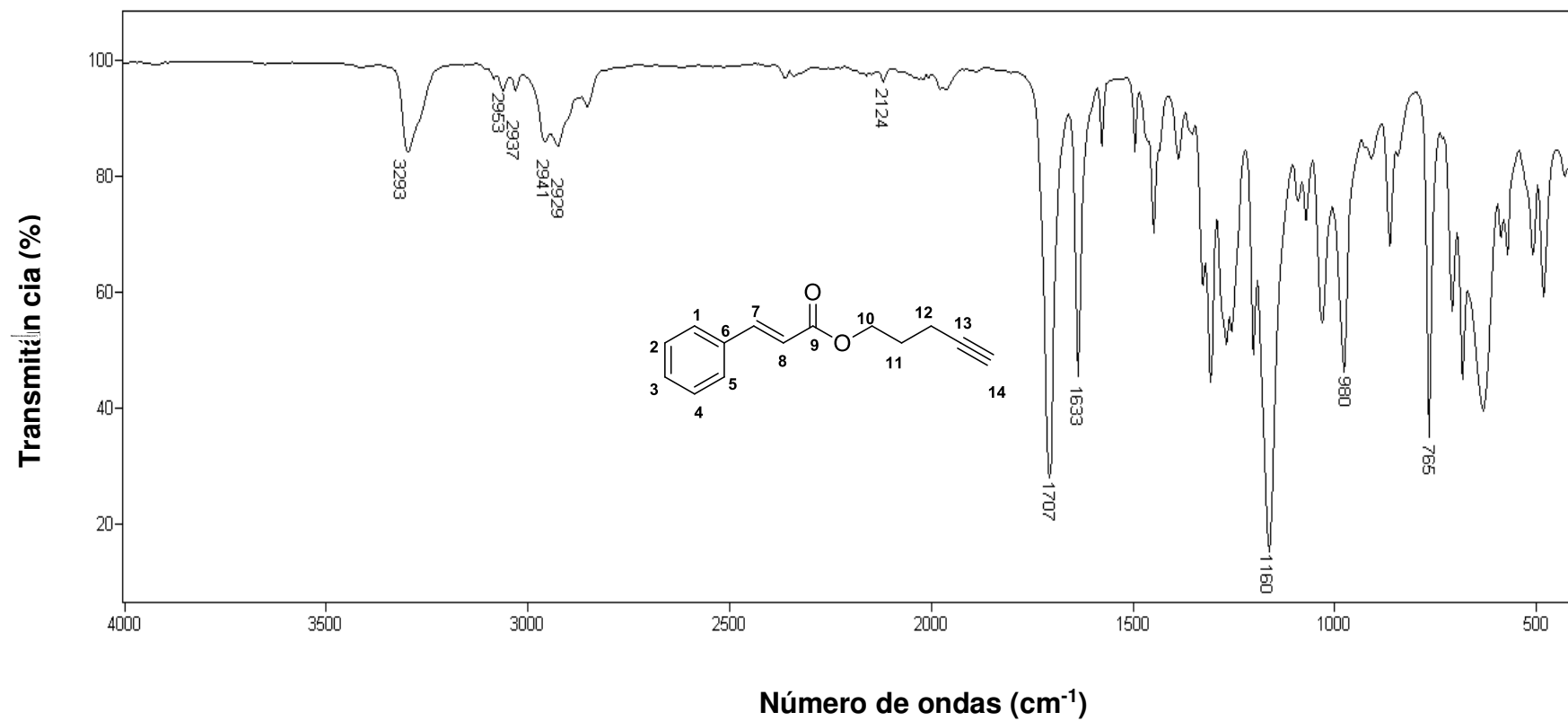


Figura S4 - Espectro no infravermelho (ATR) para o composto **25**.

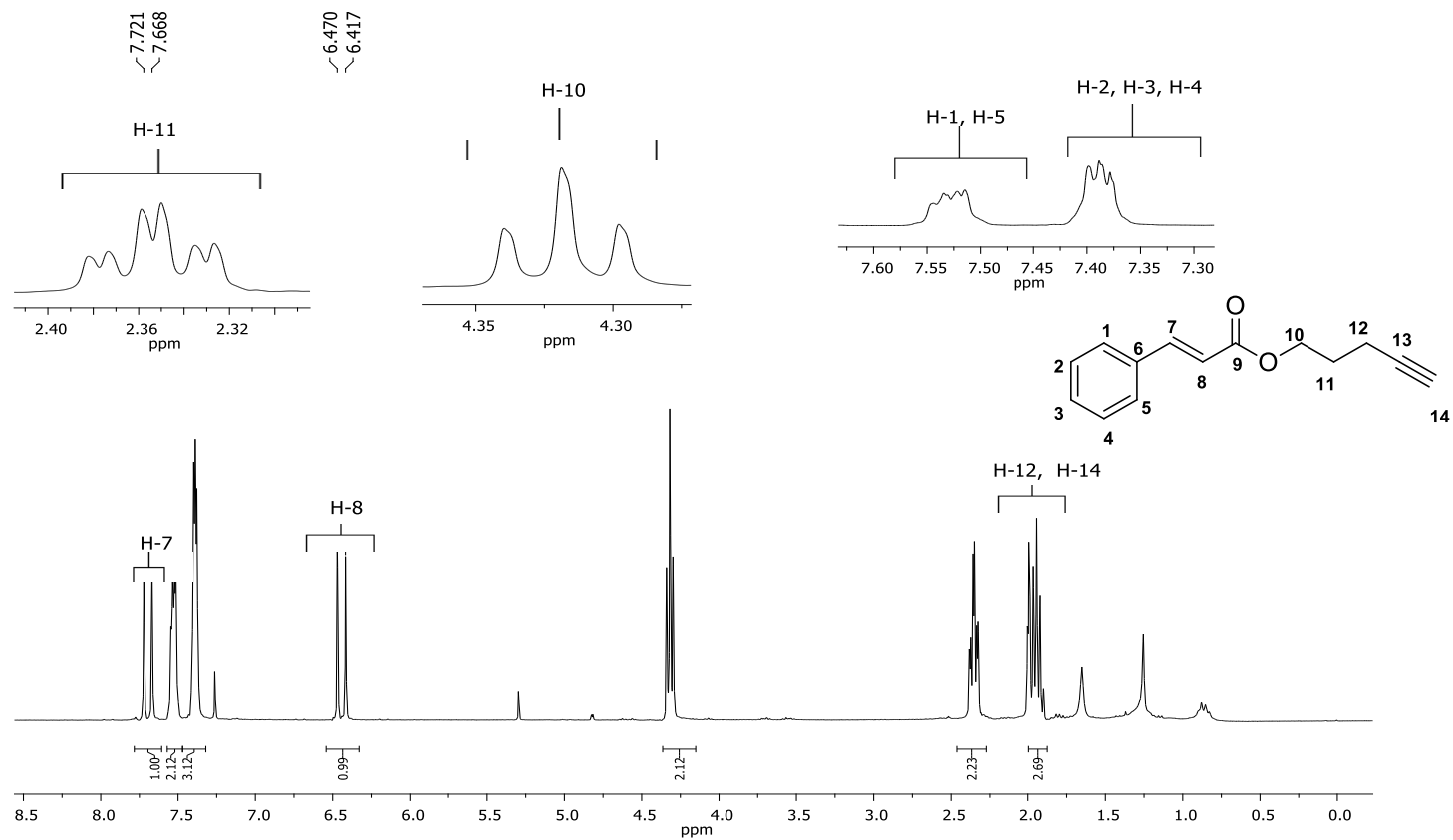


Figura S5 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) para o composto **25**.

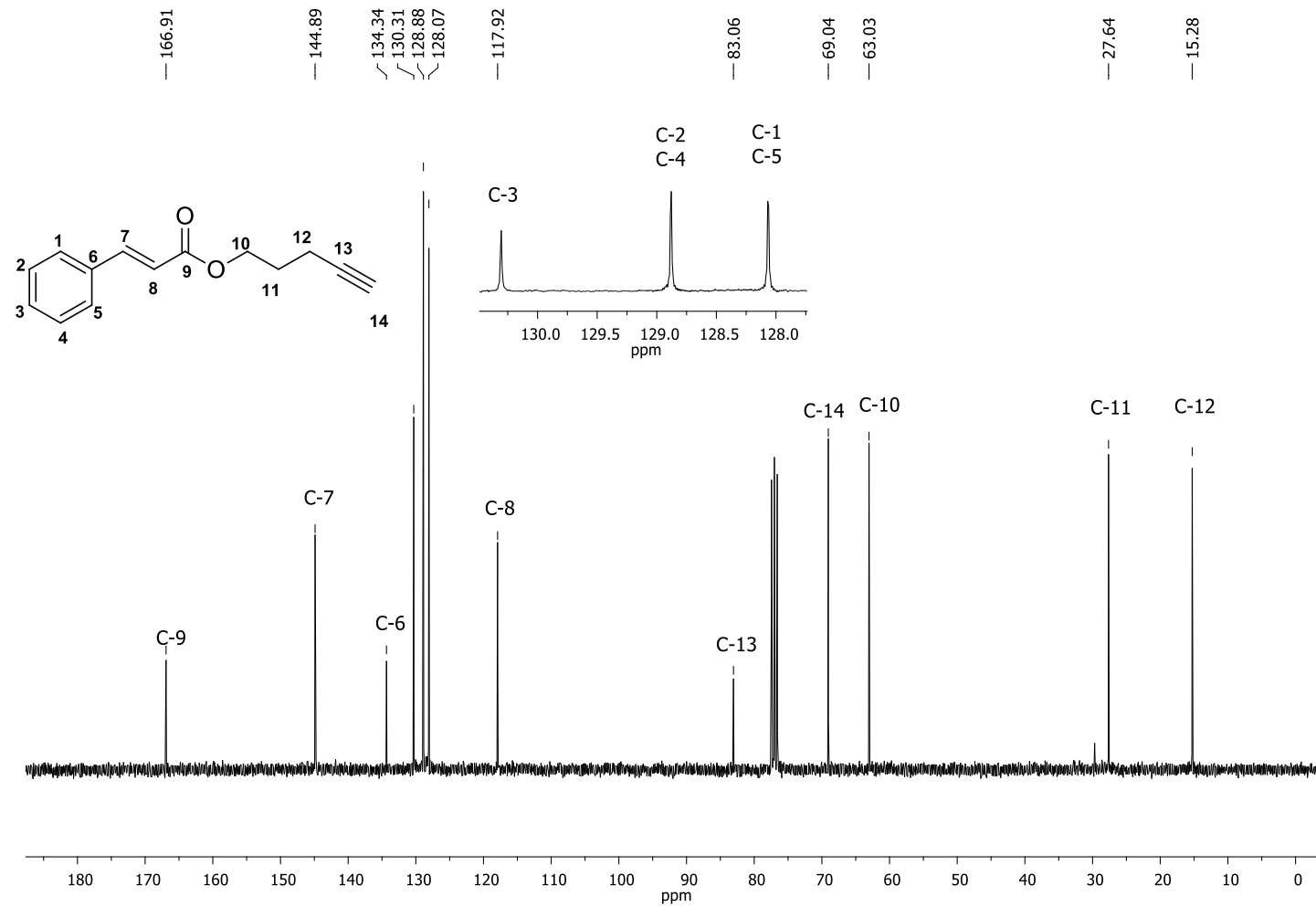


Figura S6 - Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) do composto **25**.

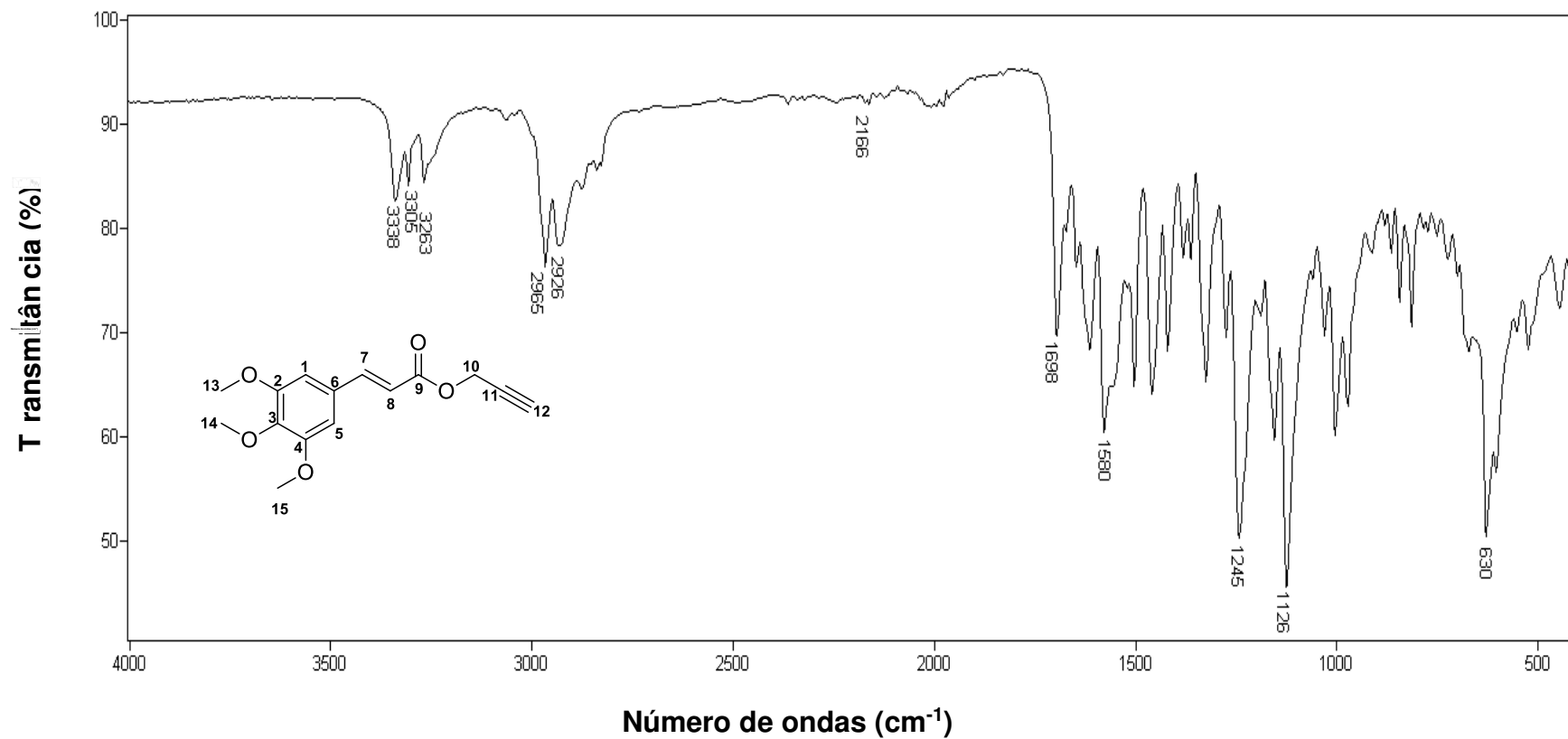


Figura S7 - Espectro no infravermelho (ATR) para o composto 26.

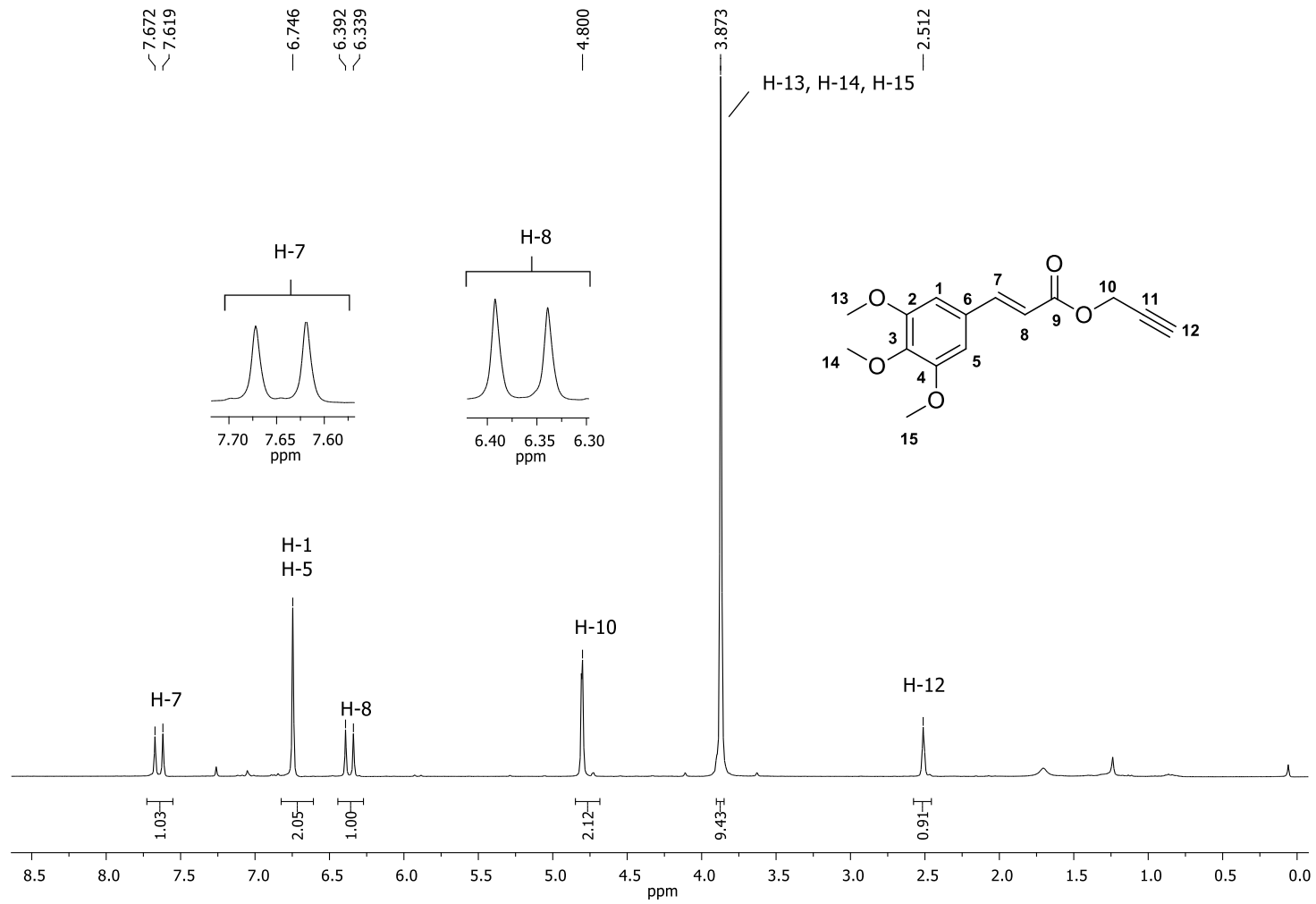


Figura S8 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **26**.

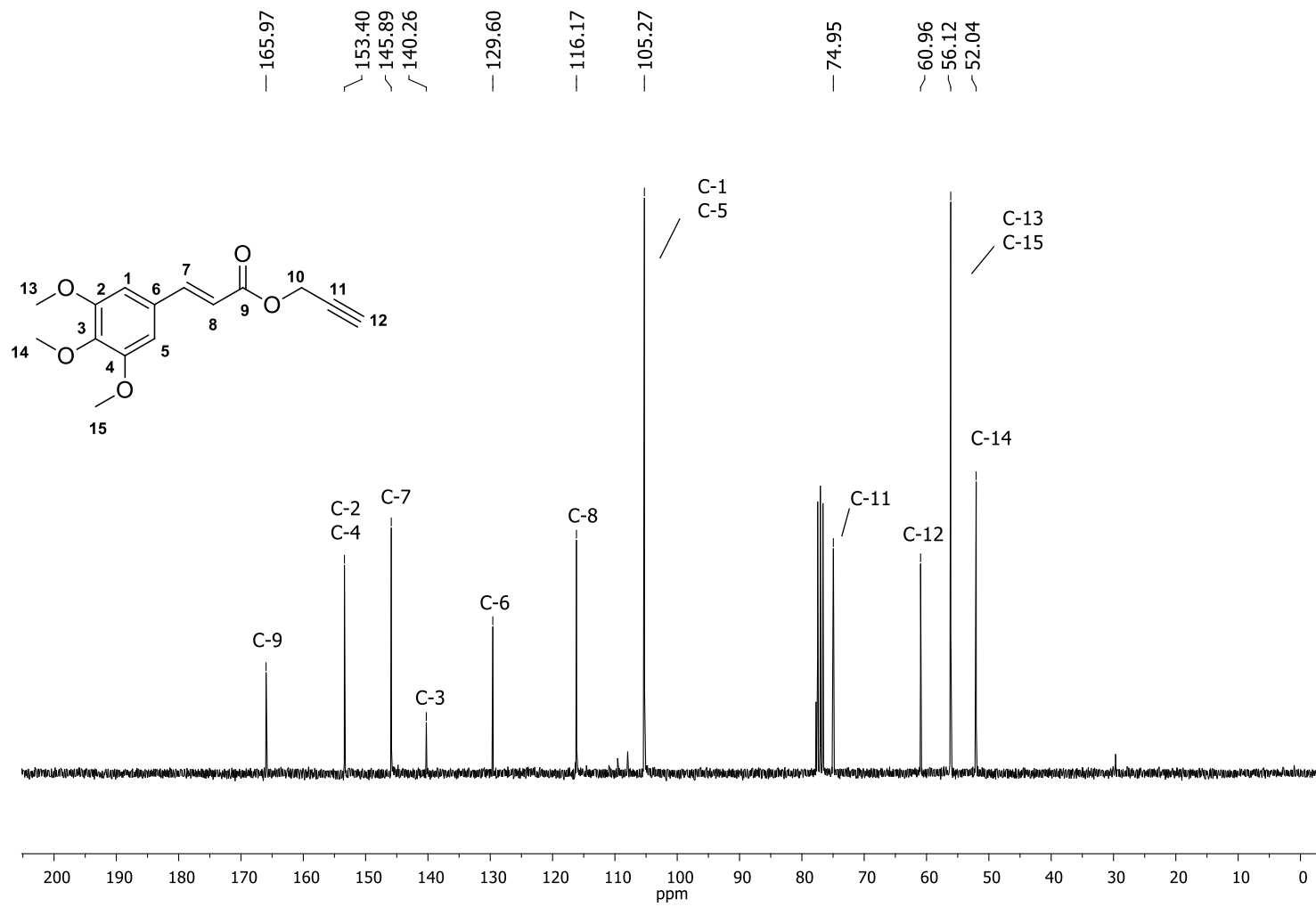


Figura S9 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **26**.

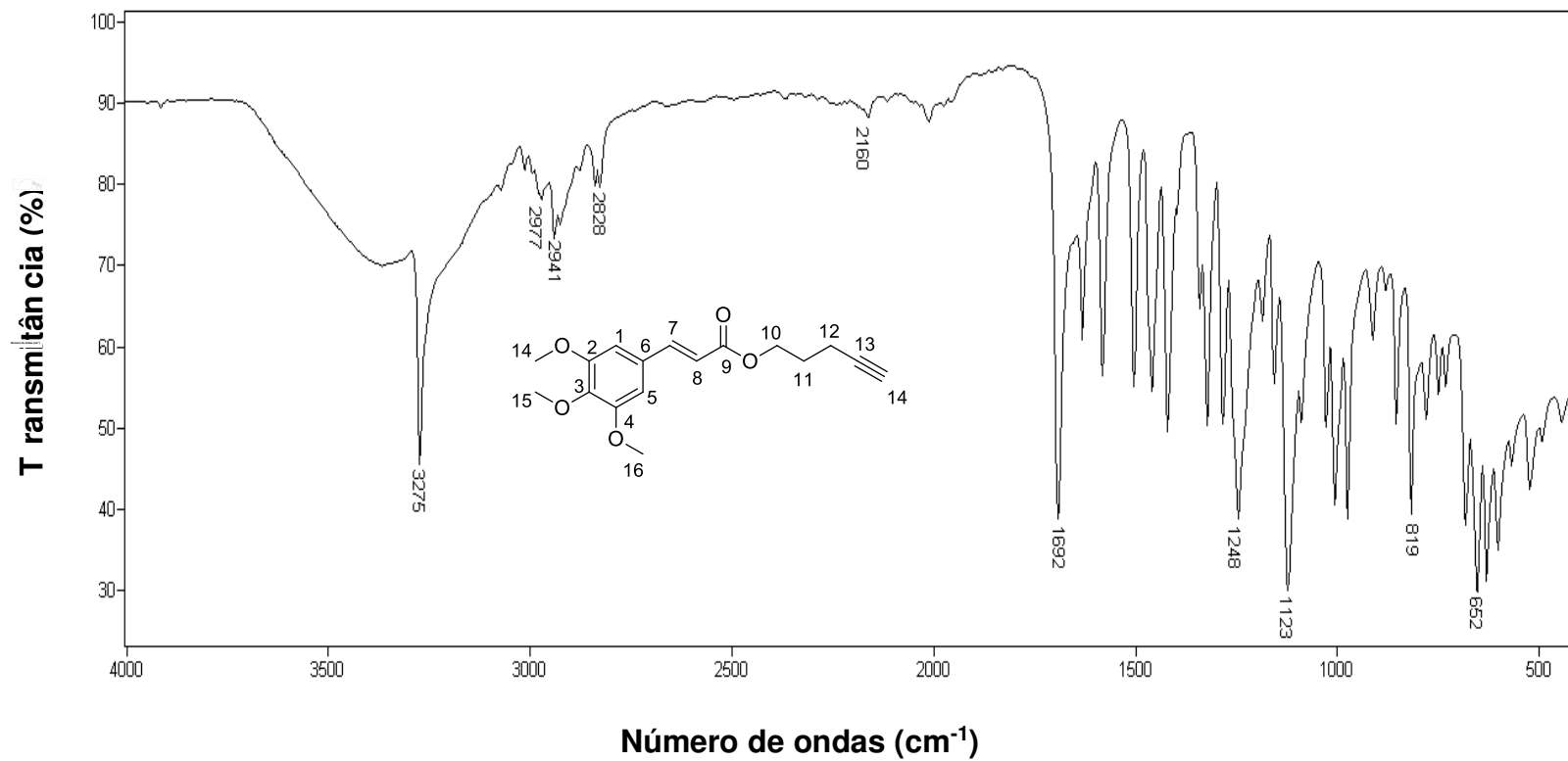


Figura S10 - Espectro no infravermelho (ATR) para o composto **27**.

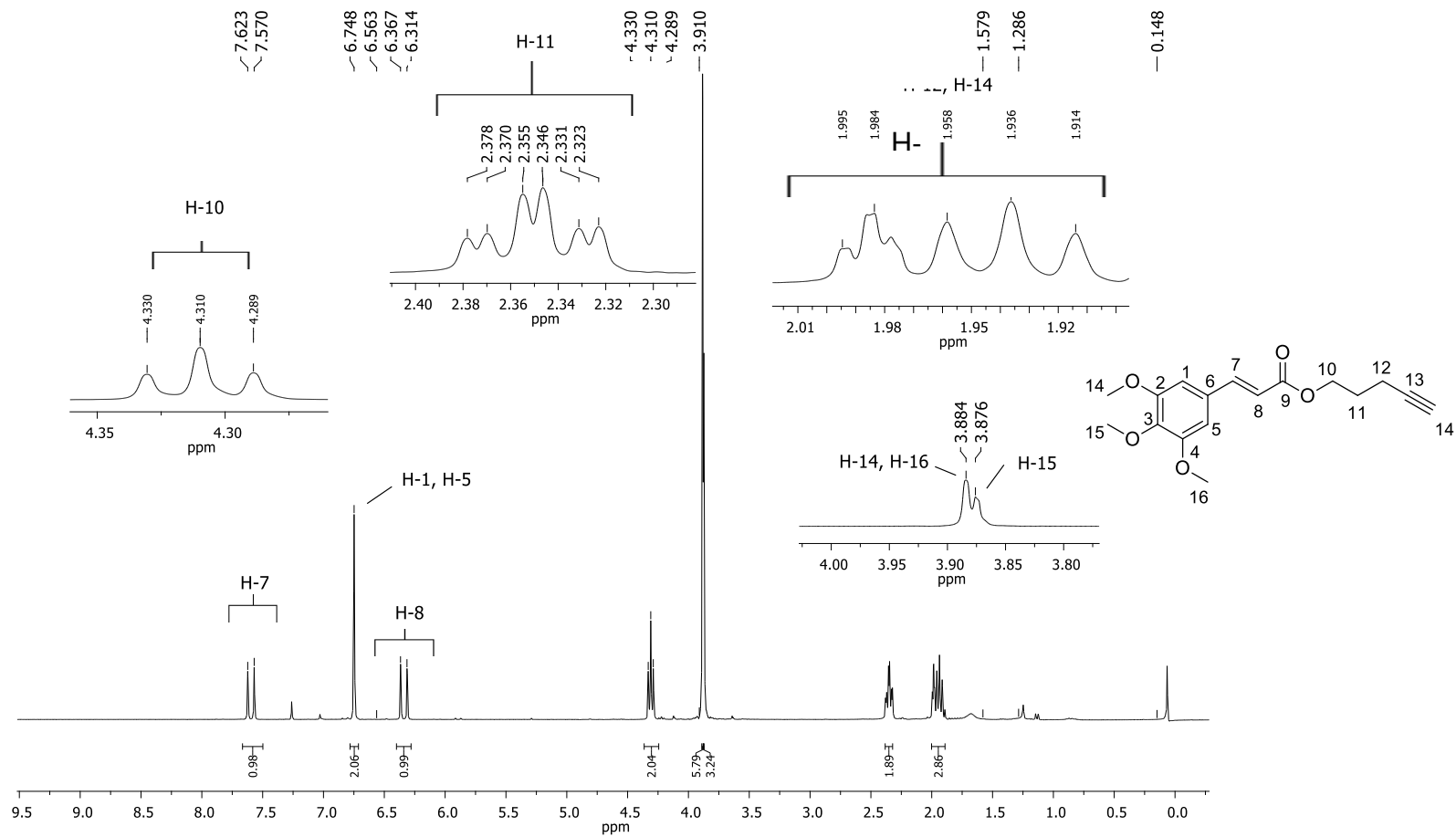


Figura S11 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **27**.

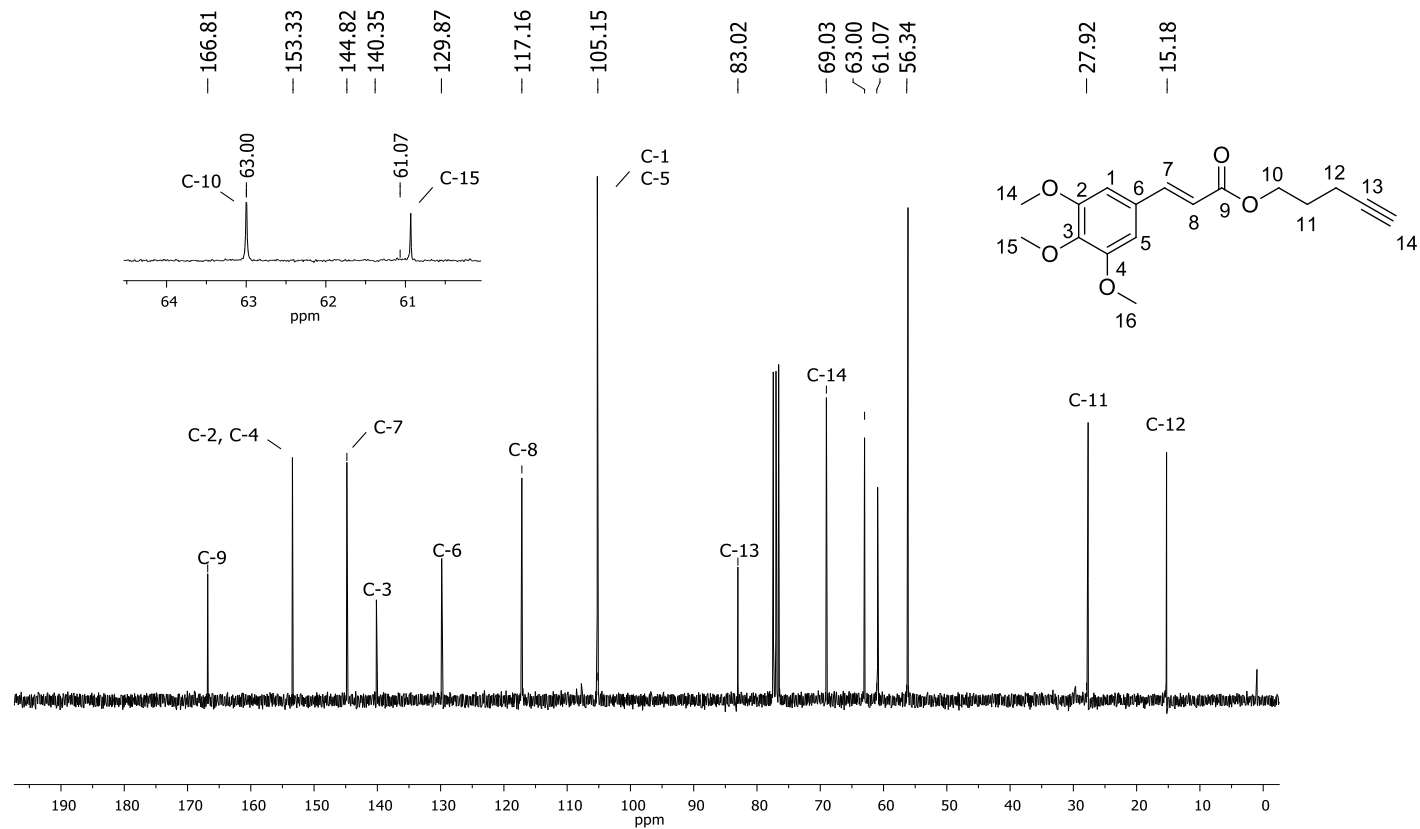


Figura S12 - Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) do composto **27**.

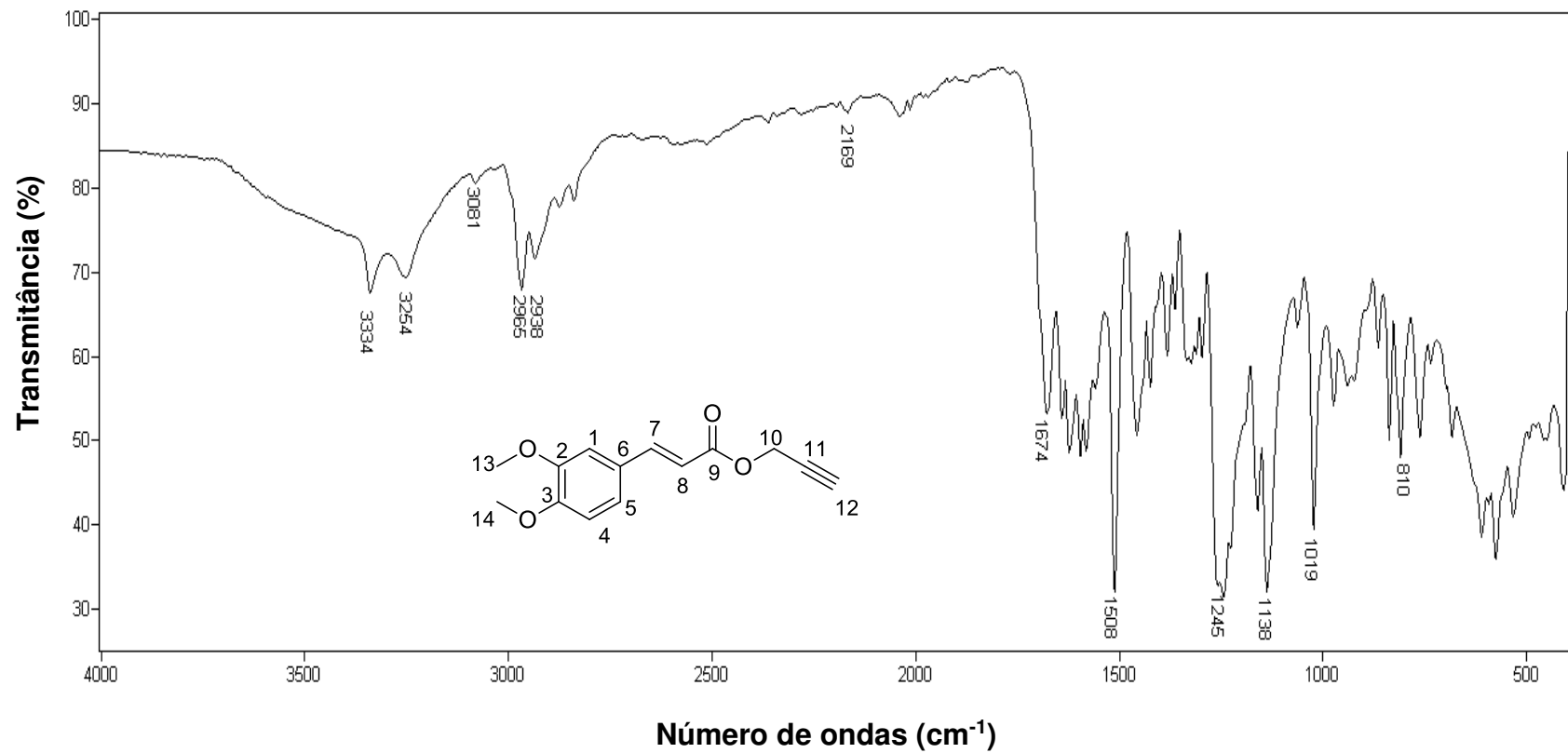


Figura S13 - Espectro no infravermelho (ATR) para o composto 28.

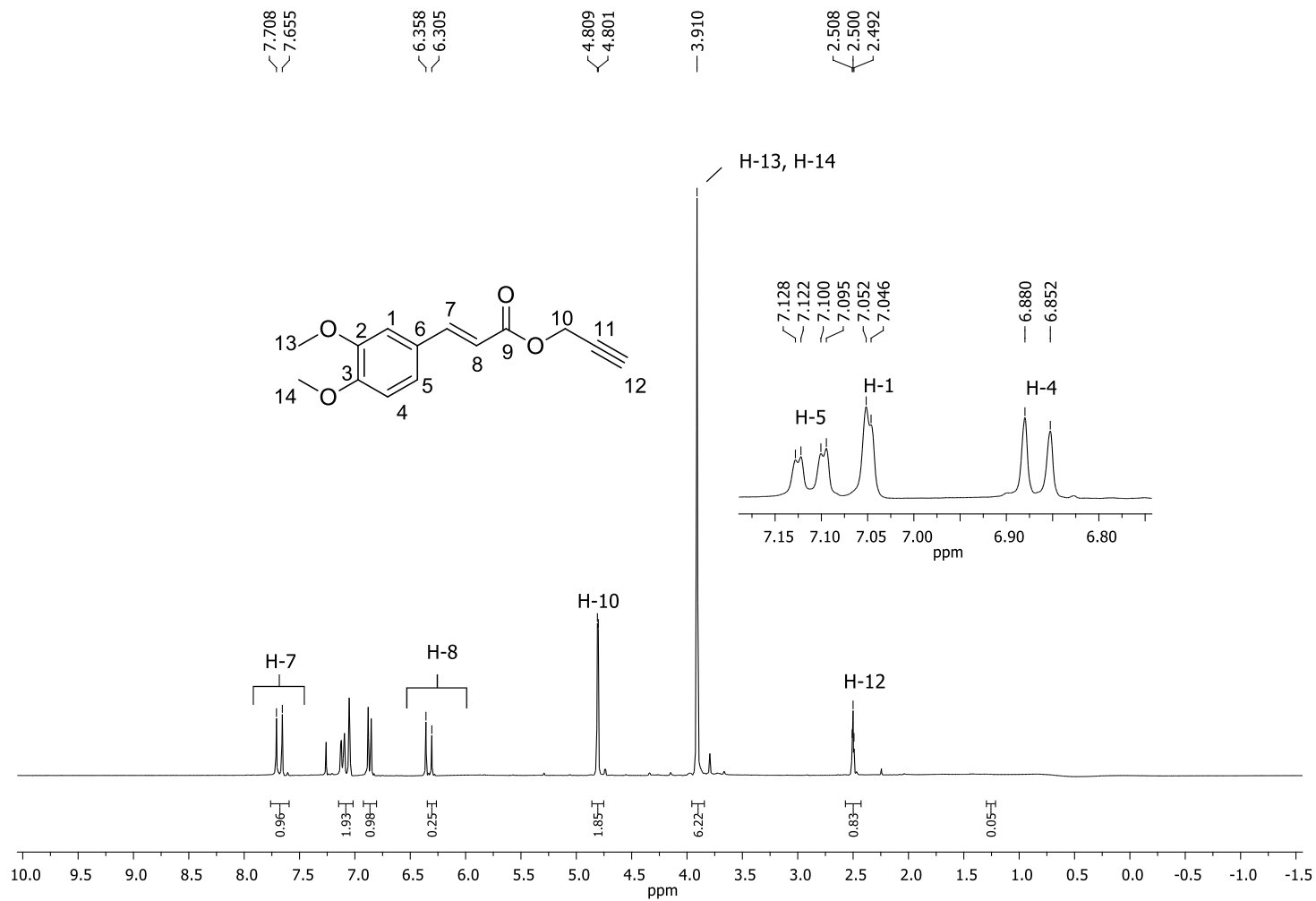


Figura S14 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **28**.

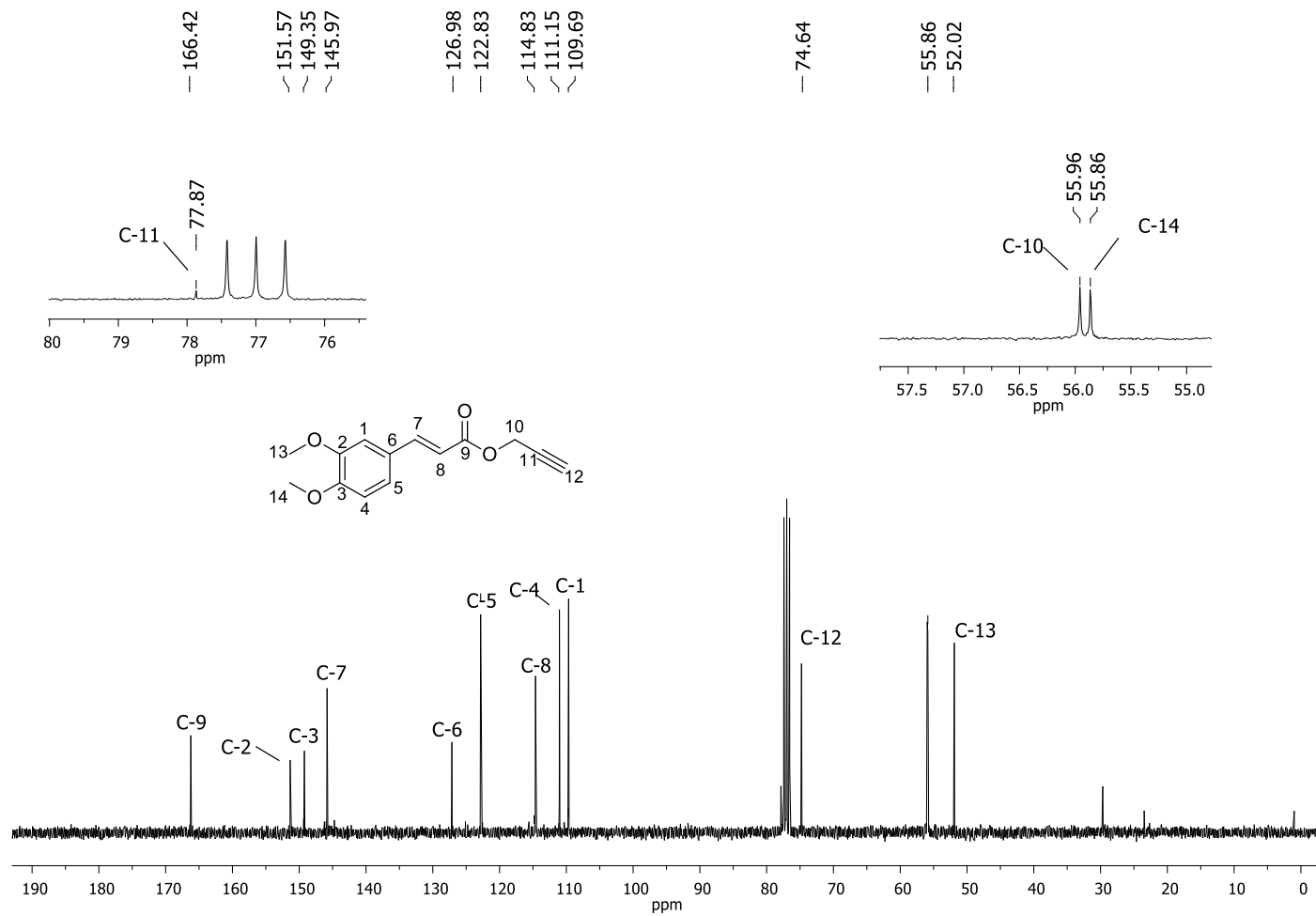


Figura S15 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **28**.

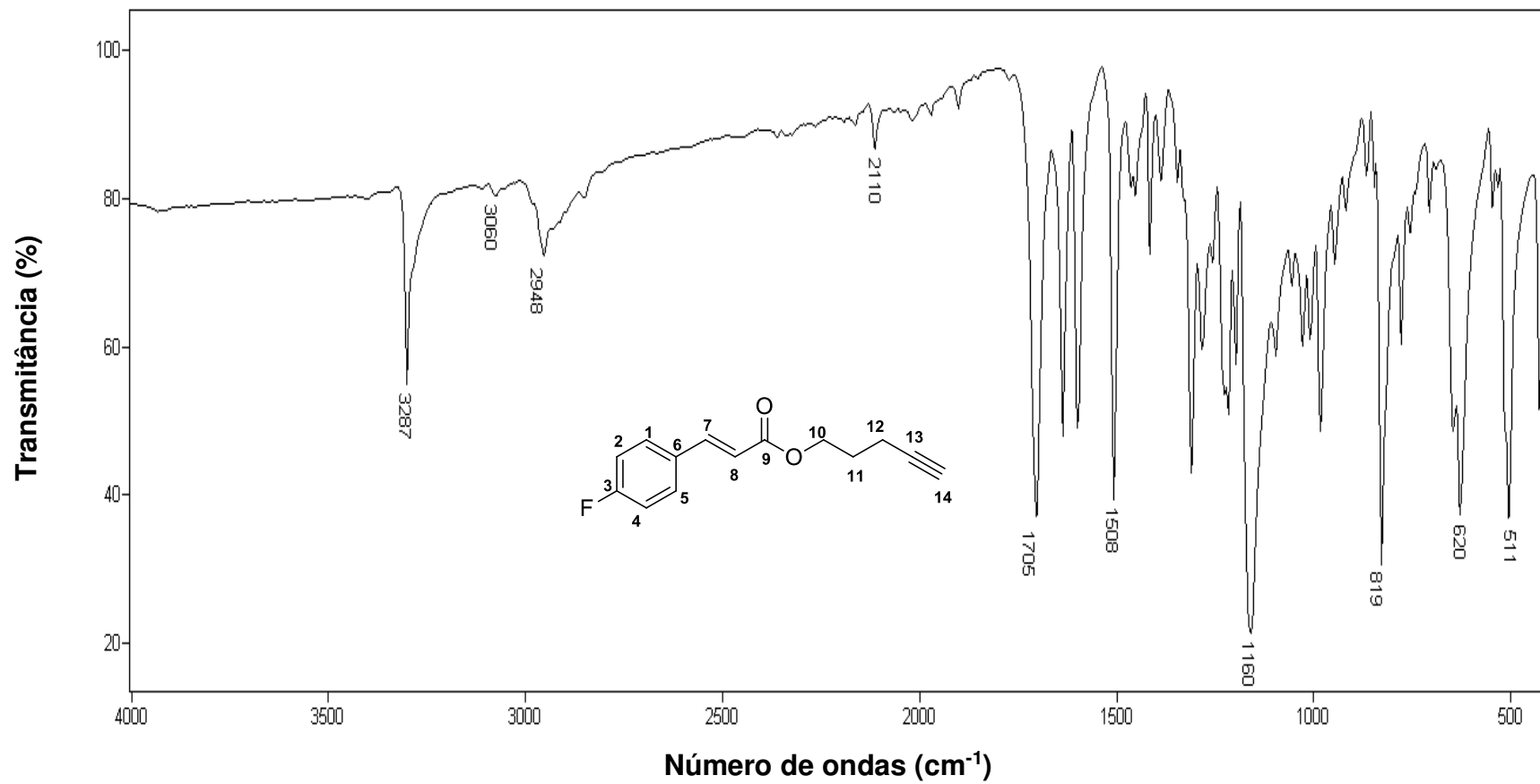


Figura S19 - Espectro no infravermelho (ATR) para o composto **30**.

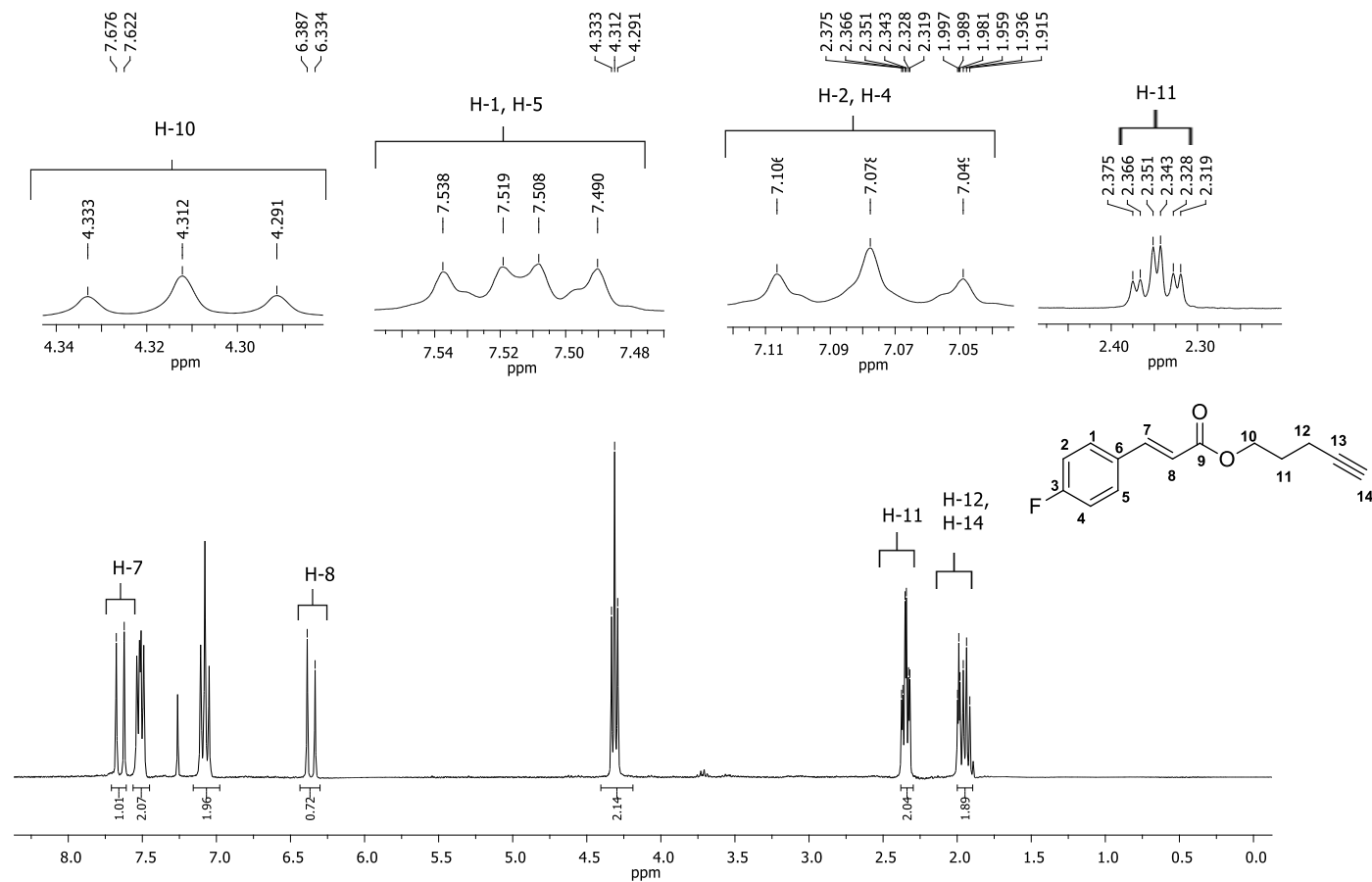


Figura S20 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **30**.

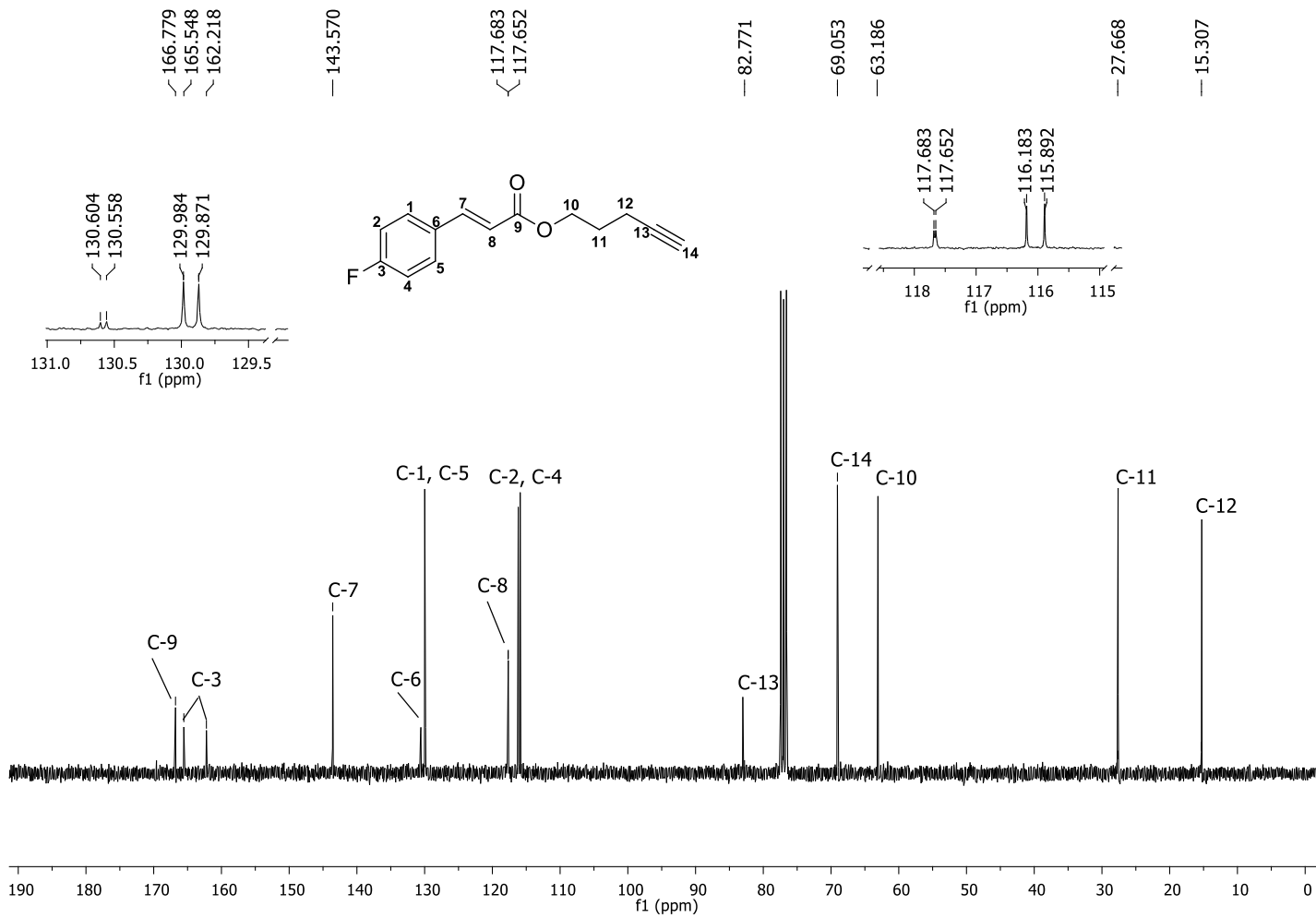


Figura S21 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **30**.

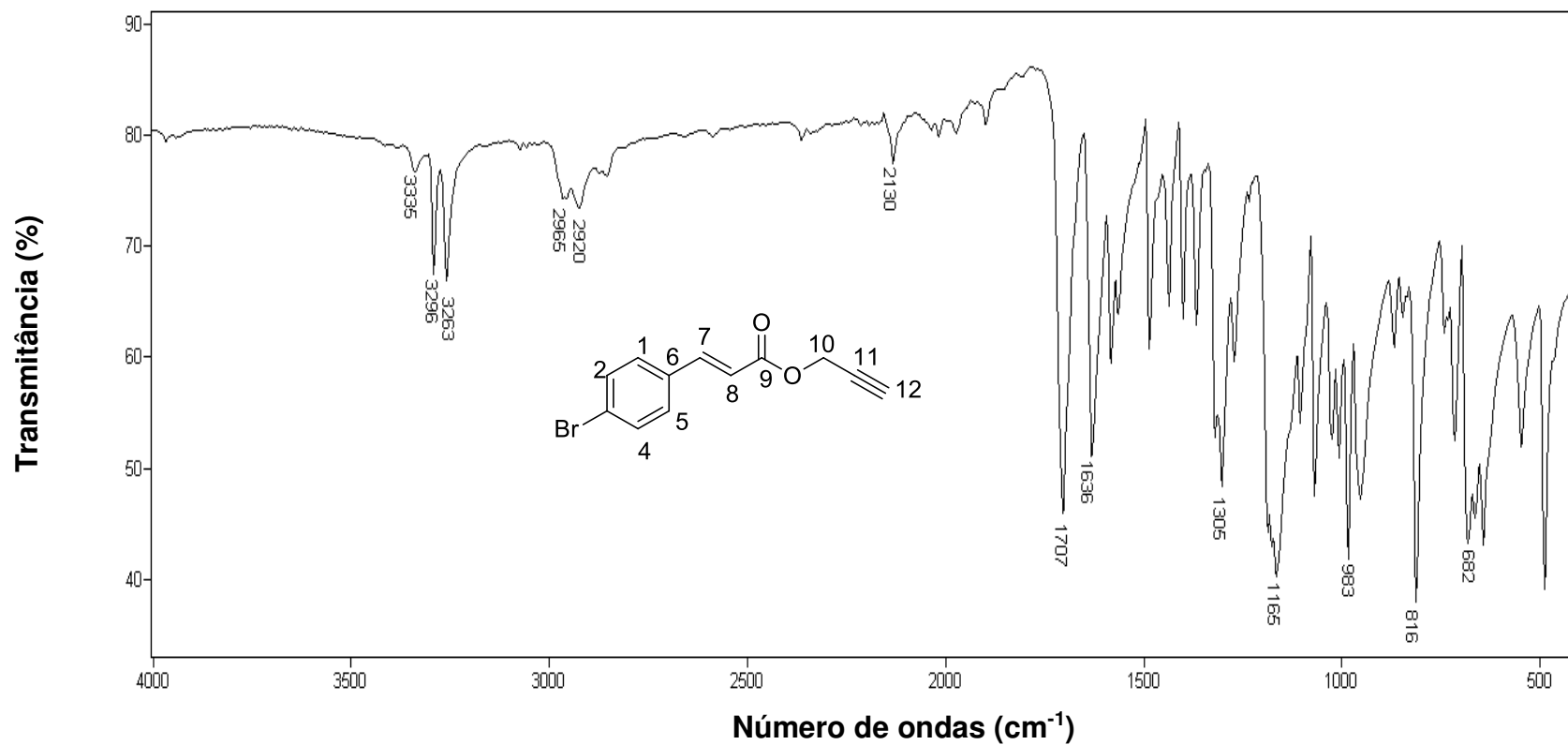


Figura S22 - Espectro no infravermelho (ATR) para o composto 31.

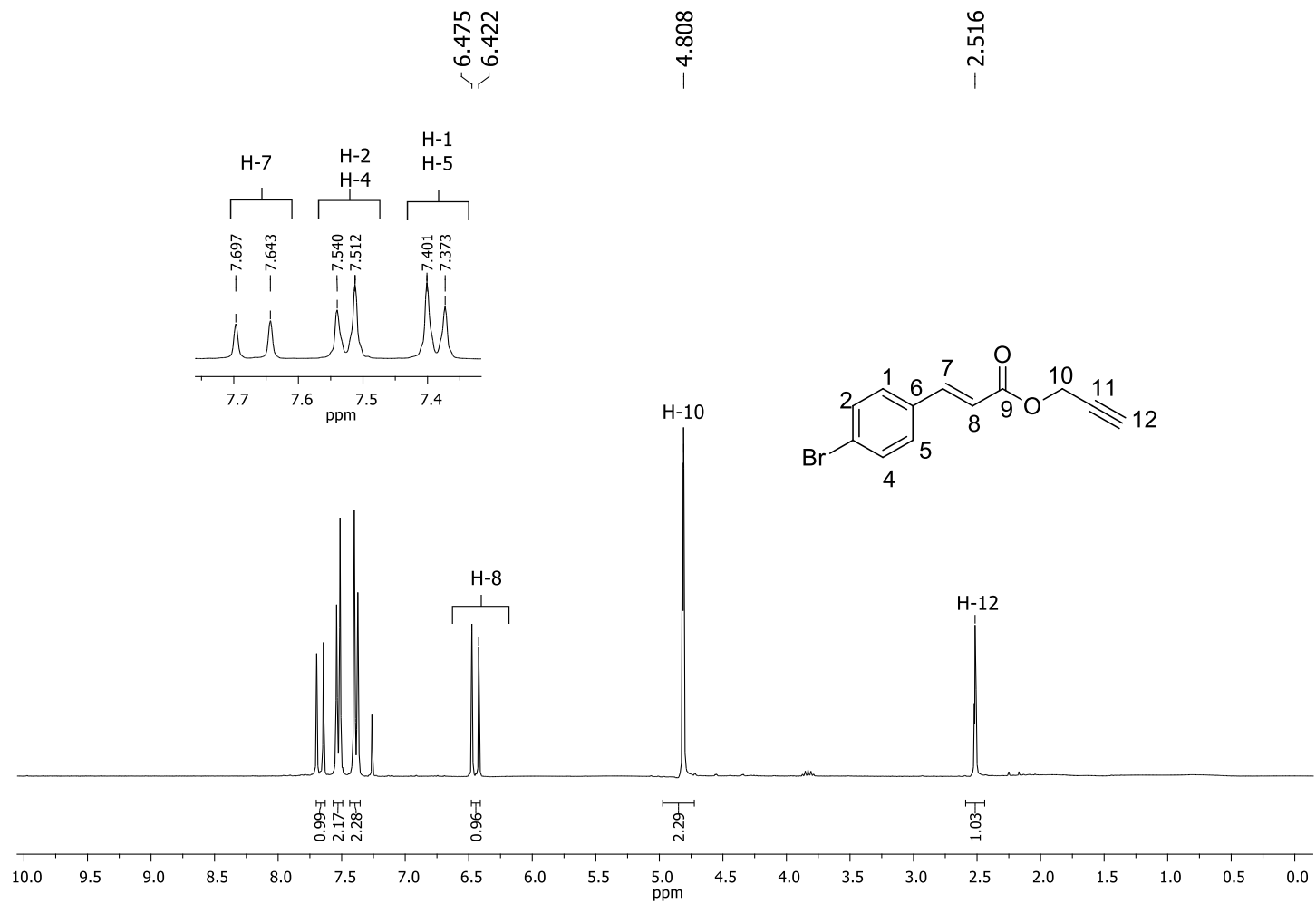


Figura S23- Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **31**.

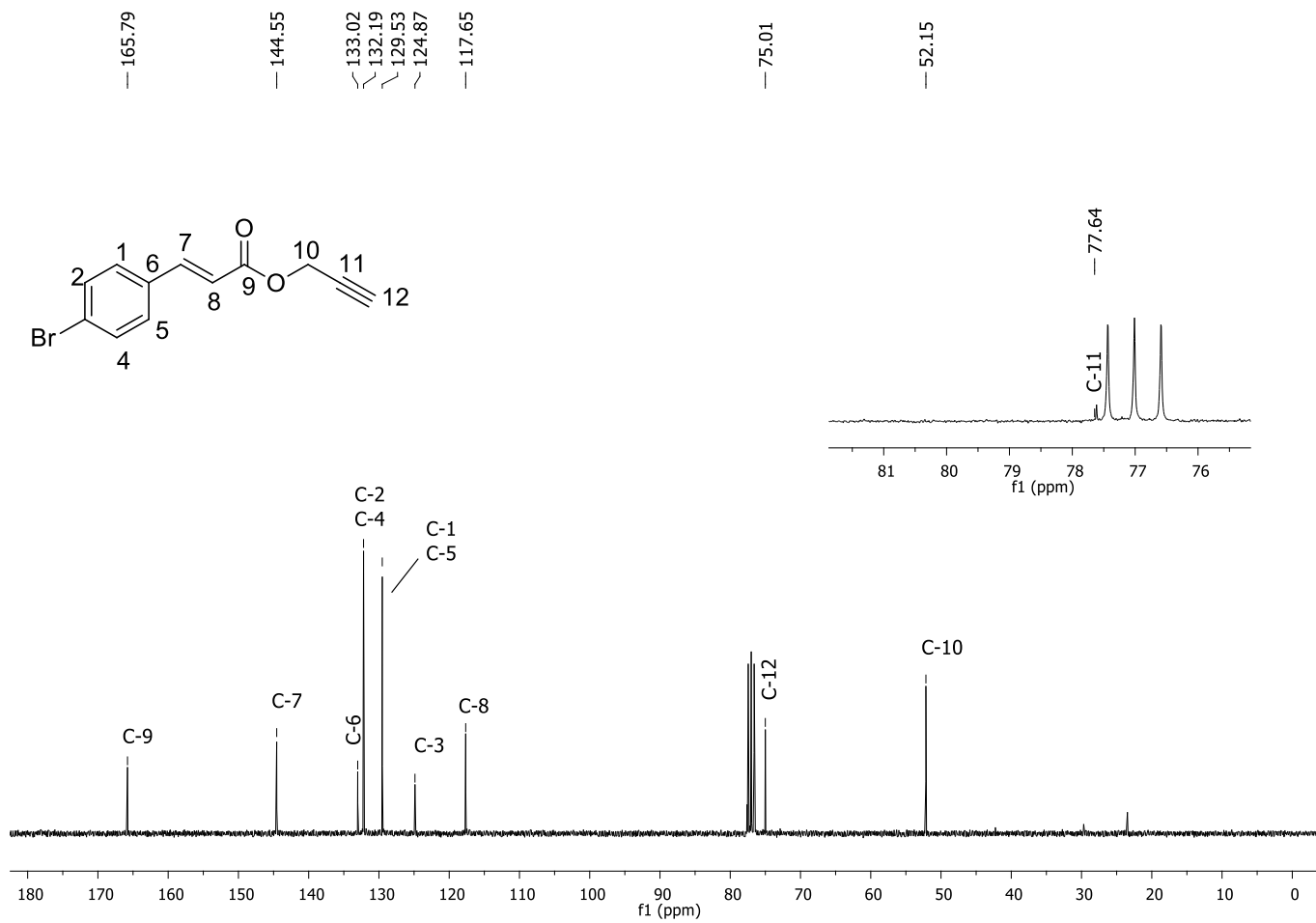


Figura S24 - Espectro de RMN de ¹H (75 MHz, CDCl₃) do composto **31**.

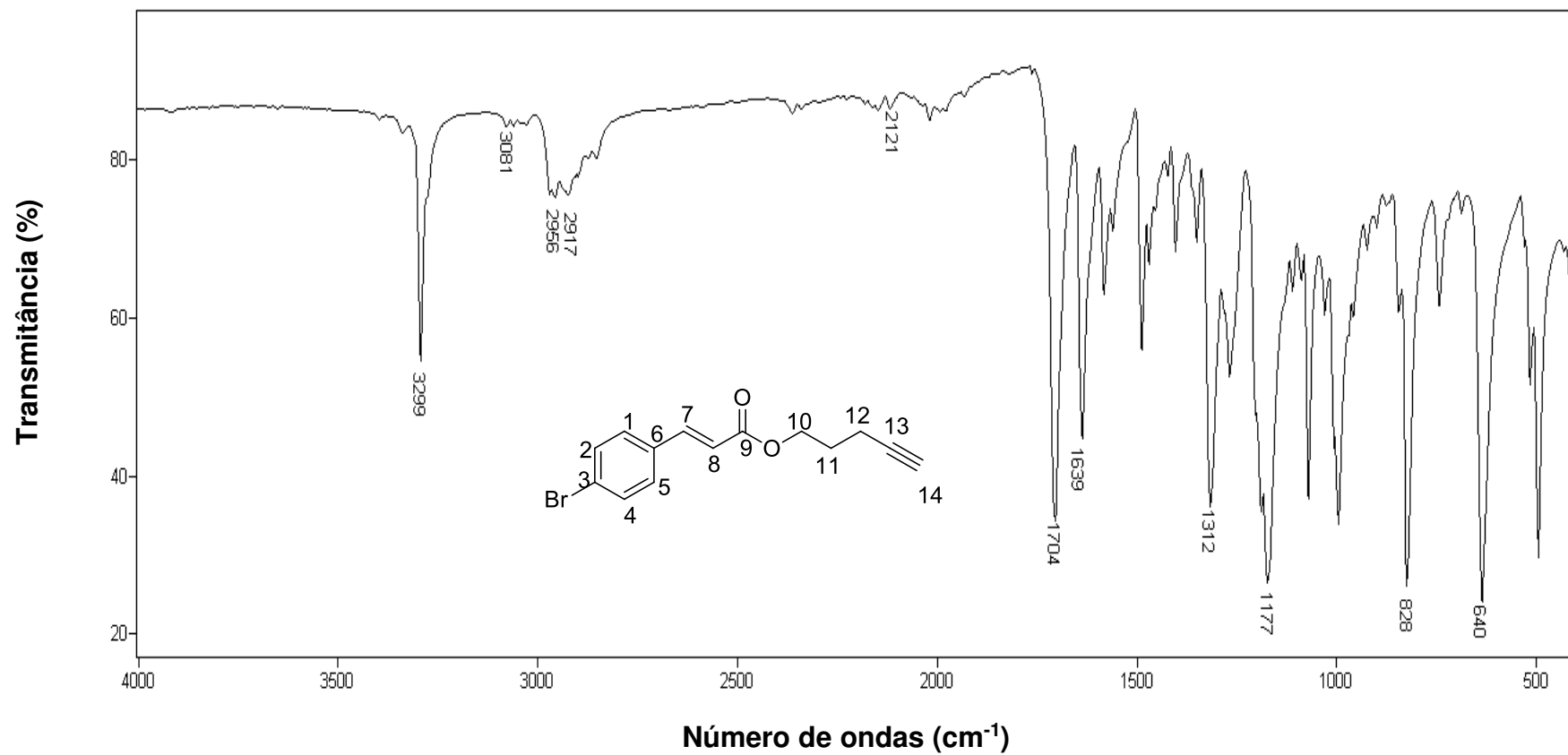


Figura S25 - Espectro no infravermelho (ATR) para o composto 32.

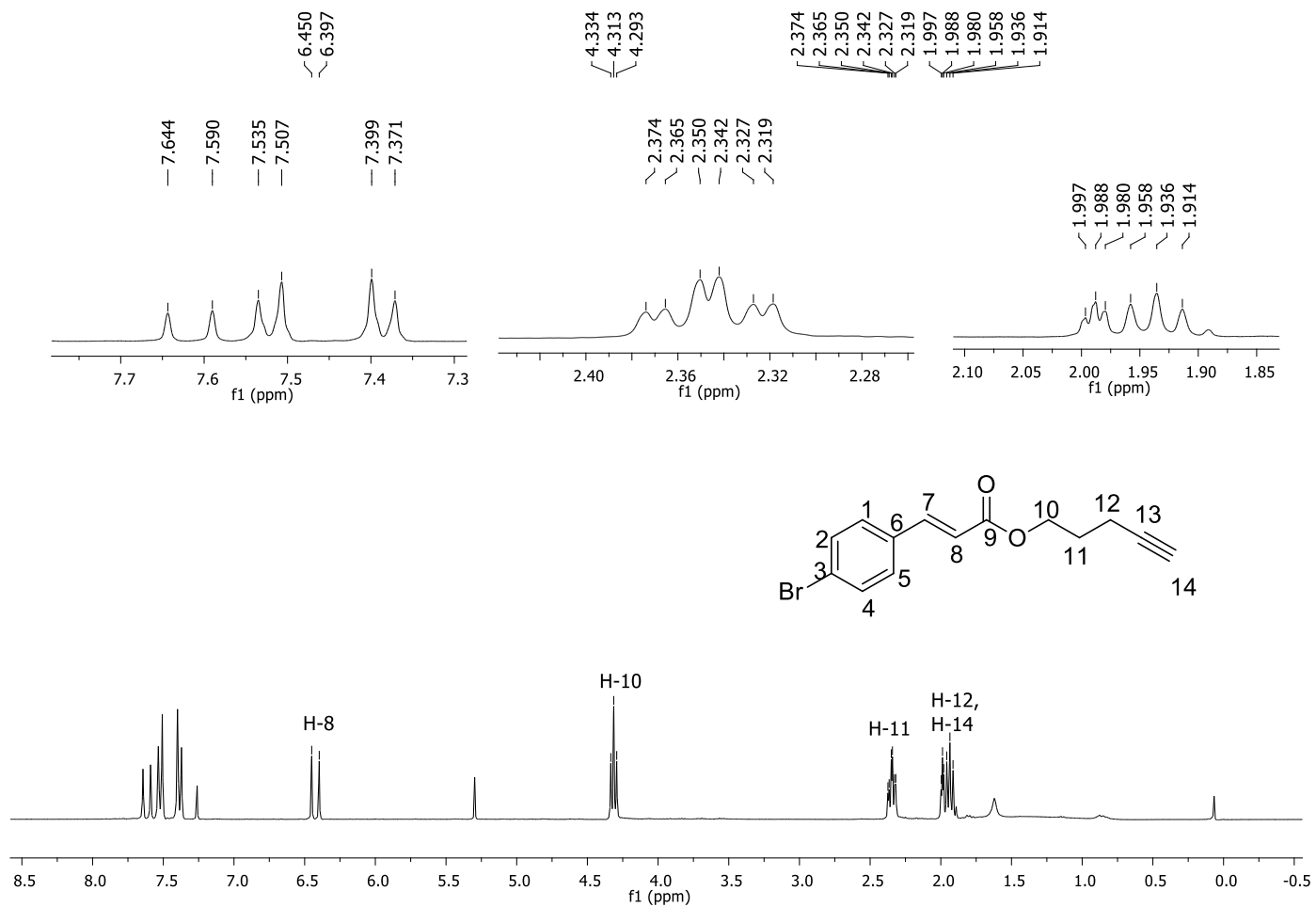


Figura S26 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **32**.

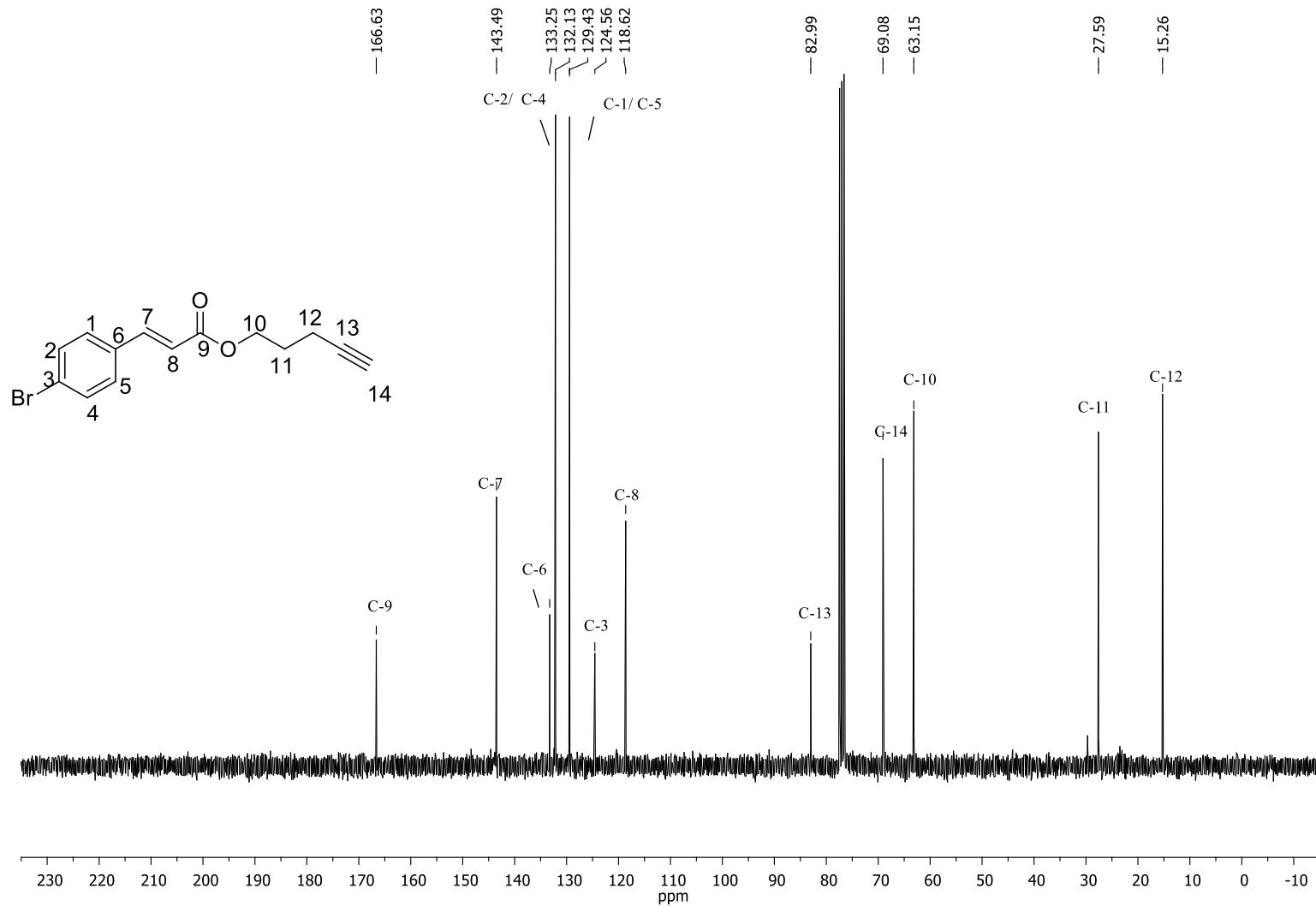


Figura S27 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **32**.

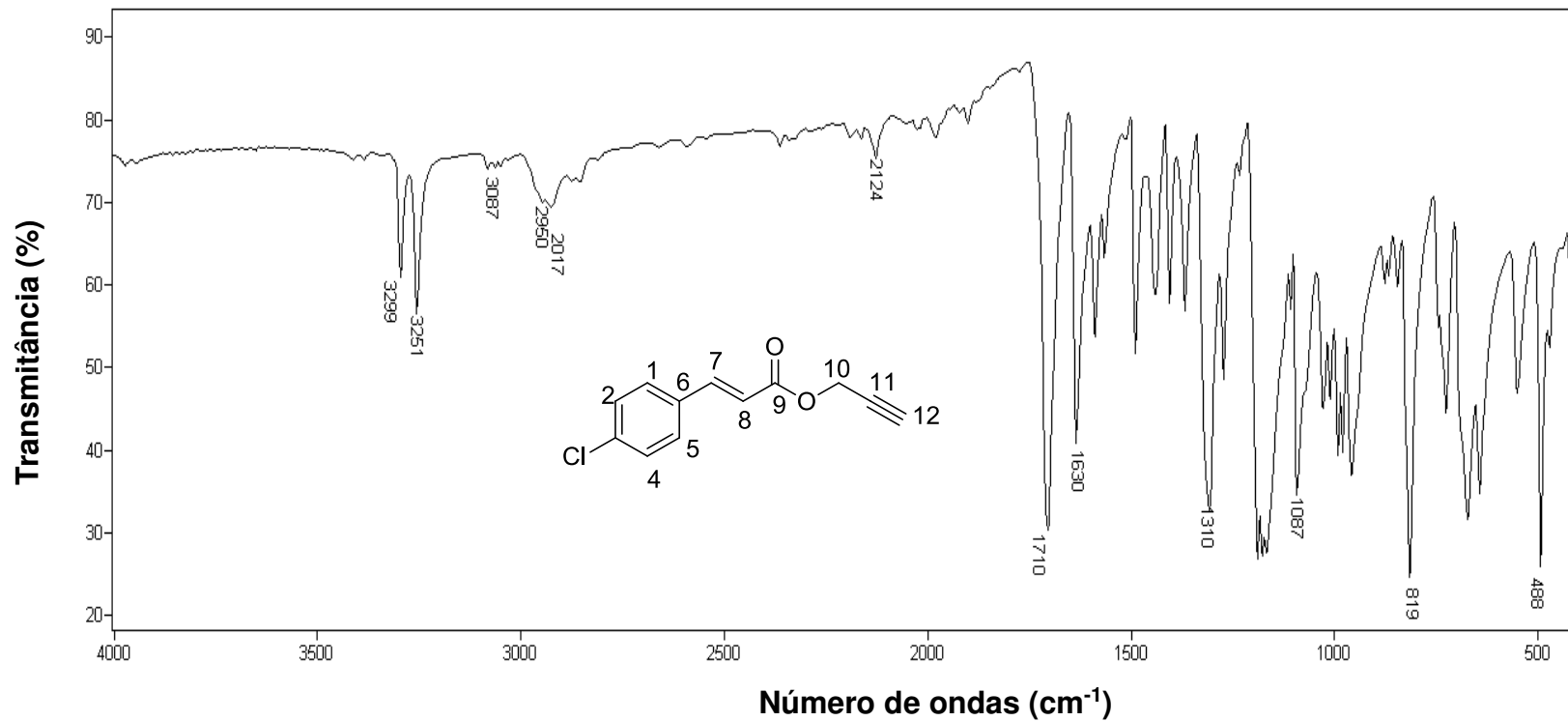


Figura S28 – Espectro no infravermelho (ATR) para o composto **33**.

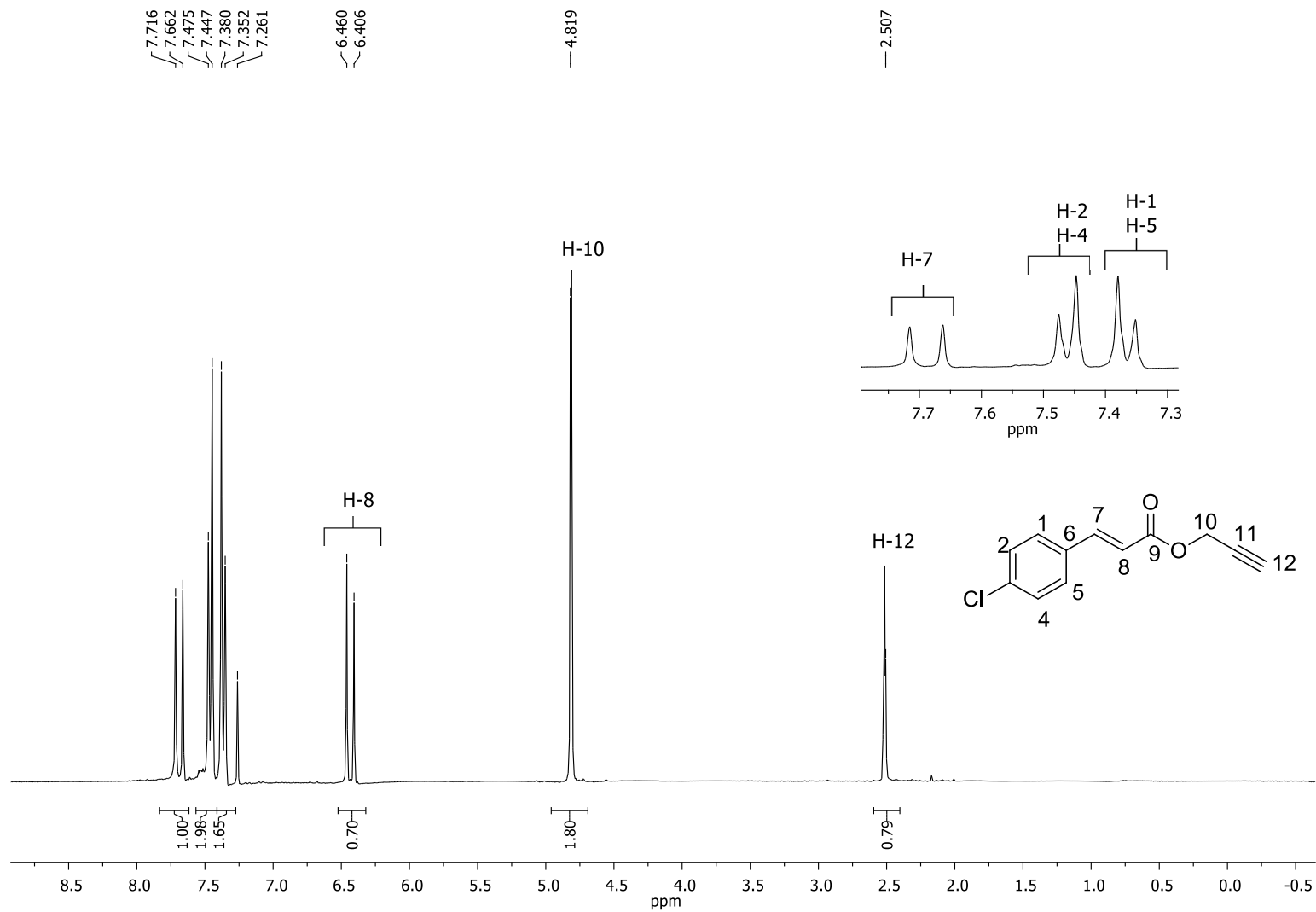


Figura S29 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **33**.

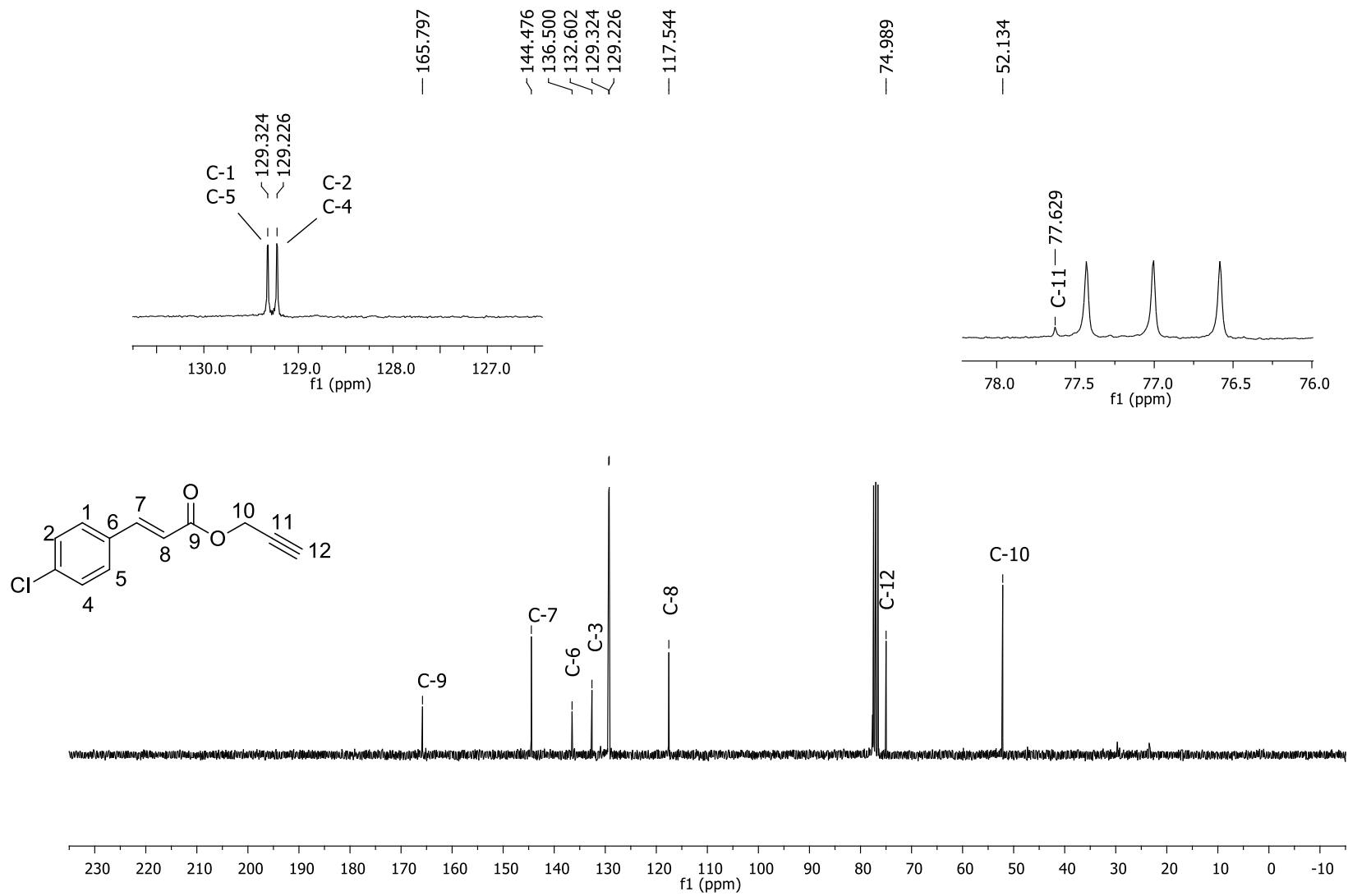


Figura S30 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **32**.

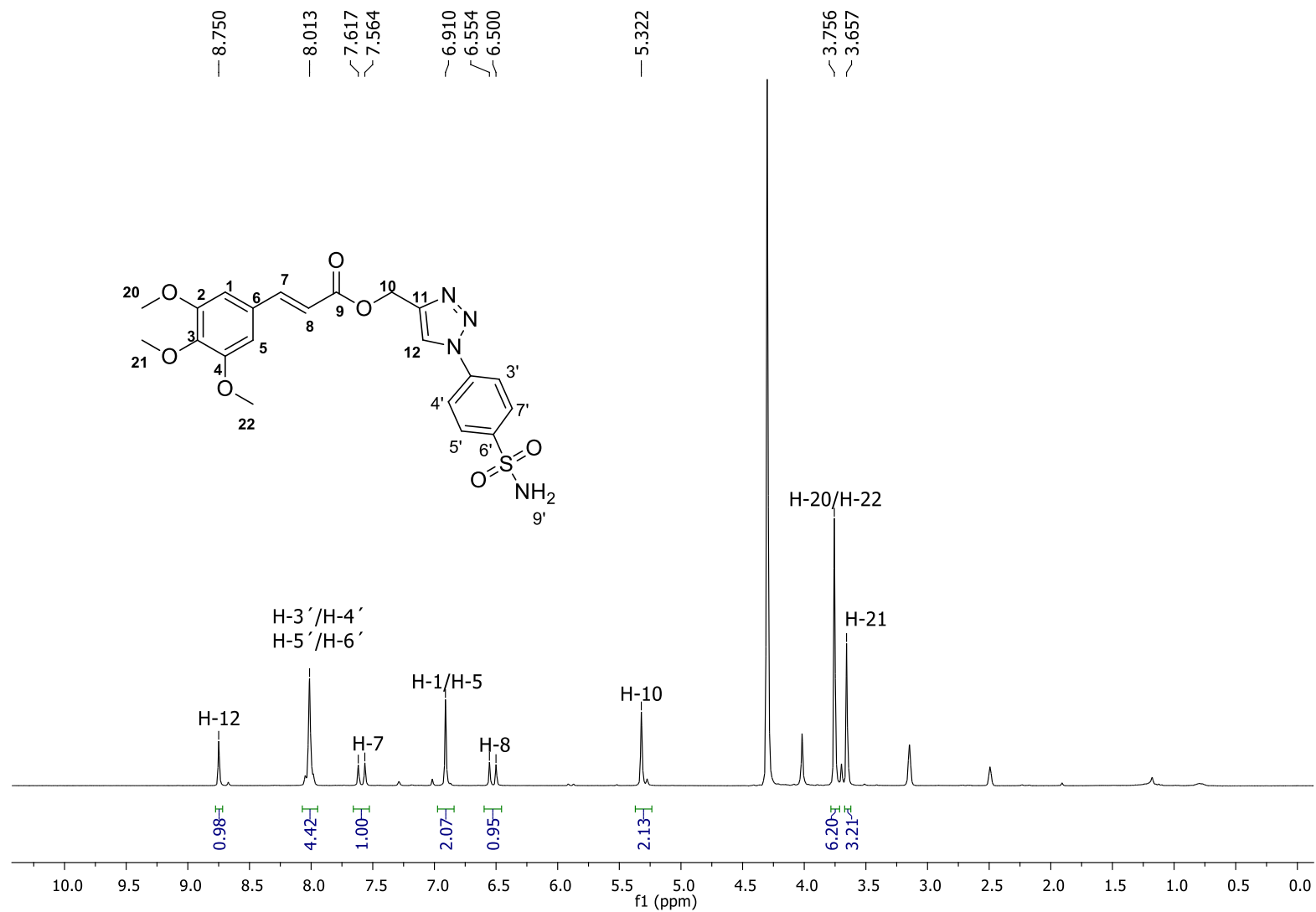


Figura S31 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, MeOH-d₄/DMSO-d₆) para o composto **36**.

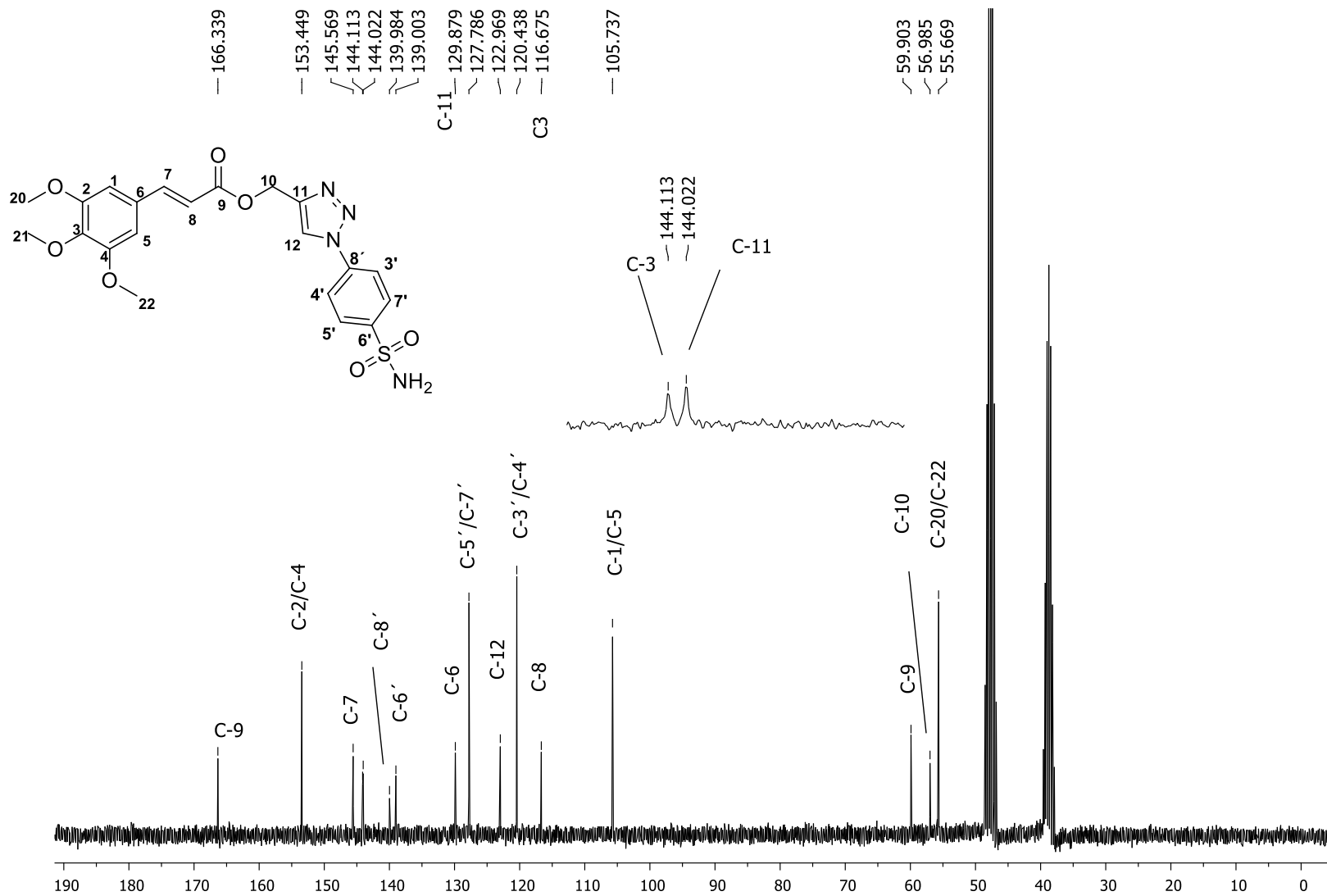


Figura 2.17 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{MeOH-}d_4/\text{DMSO-}d_6$) para o composto **36**.

ANEXO II

**Depósito de Patente intitulado: Composições à base de derivado do ácido cinâmico com atividade leishmanicida e
USO**

(Número do Processo: BR 10 2019 019344 1)



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2019 019344 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25944455000196

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Campus UFV, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, sala 04.

Cidade: Vicosá

Estado: MG

CEP: 36570-900

País: Brasil

Telefone: (31) 3612 2334

Fax:

Email: propriedadeintelectual@ufv.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Composições à base de derivado do ácido cinâmico com atividade leishmanicida e uso

Resumo: A presente invenção refere-se às composições que contenham (E)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato, um composto derivado do ácido cinâmico contendo o núcleo isobenzofuranona. Tal composto apresenta atividade contra as formas promastigota e amastigota da *Leishmania braziliensis*, e pode ser aplicado no campo da química medicinal. A invenção também refere-se ao uso do composto na elaboração de fármacos utilizados na terapia antileishmania.

Figura a publicar: 5

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 10

Nome: RÓBSON RICARDO TEIXEIRA
CPF: 72345888687
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Rua Cláudio Manuel, 471, Bairro Inconfidência
Cidade: Viçosa
Estado: MG
CEP: 36576-298
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: robsonr.teixeira@ufv.br

Inventor 2 de 10

Nome: GUSTAVO COSTA BRESSAN
CPF: 05653437697
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Professor do ensino superior
Endereço: Rua Olinda Martins D'Antonino 324, apto 302, Bairro Liberdade
Cidade: Viçosa
Estado: MG
CEP: 36576-264
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email: gustavo.bressan@ufv.br

Inventor 3 de 10

Nome: JULIANA LOPES RANGEL FIETTO

CPF: 88979881649

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua João Lopes Rosado, nº176, Bairro Quinta dos Guimarães

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36570-420

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: jufietto@ufv.br

Inventor 4 de 10

Nome: DEBORAH CAMPOS TOMAZ

CPF: 09937411696

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Professor Eryl Dias Brandão, 340, Barrinha

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36574-446

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: deborah.tomaz@outlook.com

Inventor 5 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 17/09/2019 às 15:54, Petição 870190092973

Nome: ALEX RAMOS DE AGUIAR

CPF: 08100886652

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Avenida Joaquim Lopes de Faria, n° 446, apto 701, Santo Antônio

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36576-001

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: alex.aguiar45@gmail.com

Inventor 6 de 10

Nome: MICHELLE PEIXOTO RODRIGUES

CPF: 10181491630

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Aristeu Fernandes, n 536, São José

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36574-374

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: michellepr90@hotmail.com

Inventor 7 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 17/09/2019 às 15:54, Petição 870190092973

Nome: LUCIANA ÂNGELO DE SOUZA

CPF: 08645420627

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua dos Estudantes, nº 270, apto 401, Centro

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36570-081

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: luciana.angelosz@gmail.com

Inventor 8 de 10

Nome: THIAGO SOUZA ONOFRE

CPF: 05808032440

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Primeiro de Março, 213/82, Vila Clementino

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 04044-040

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: thiagosonofre@gmail.com

Inventor 9 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 17/09/2019 às 15:54, Petição 870190092973

Nome: WEMERSON AQUILES DE MENEZES

CPF: 06929970670

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Pelotas, 400, apto 303, Bairro Jardim Panorama

Cidade: Ipatinga

Estado: MG

CEP: 35164-244

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: drson23@hotmail.com

Inventor 10 de 10

Nome: MARCOS ANDRÉ VANNIER DOS SANTOS

CPF: 78375061700

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Tenente Mesquita, 45, apto 1902, bloco 1, Icaraí

Cidade: Niterói

Estado: RJ

CEP: 24220-060

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: marcos.vannier@ioc.fiocruz.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU - comprovante pag.pdf
Procuração	Procuração-DOU-UFV.pdf
Relatório Descritivo	Relatório descritivo v6.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Desenhos.pdf
Resumo	Resumo.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 17/09/2019 às 15:54, Petição 870190092973

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 17/09/2019 às 15:54, Petição 870190092973.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
REITORIA

Campus Universitário - Viçosa, MG - 36570-000 - Telefone: (31) 3899-2100 - E-mail: reitoria@ufv.br

PROCURAÇÃO

OUTORGANTE: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, pessoa jurídica de direito público, criada pelo Poder Público Federal, na forma de fundação pública de cunho educacional, com sede na Avenida P.H. Rolfs, s/n, campus Universitário, Viçosa - Minas Gerais, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 25.944.455/0001-96, neste ato representada por sua Reitora, Profª. Nilda de Fátima Ferreira Soares, brasileira, portadora da Carteira de Identidade de nº MG 1.516.297, expedida pela SSP/MG, inscrita no CPF sob o nº 423.581.916-04;

OUTORGADO: AFONSO SÉRGIO CORRÊA DE FARIA, brasileiro, casado, servidor público federal da carreira de Procurador Jurídico Federal, inscrito no CPF sob o nº: 137.424.346-91 e OAB/MG nº 21.972, com domicílio legal na Procuradoria Jurídica junto à Universidade Federal de Viçosa, localizada à Avenida P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa - Minas Gerais, CEP 36.570-900;

PODERES: A **OUTORGANTE** confere ao **OUTORGADO** os poderes contidos na cláusula "AD NEGOTIA", objetivando representar a Universidade Federal de Viçosa junto ao **INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL - INPI**, com poderes amplos e gerais, podendo o **OUTORGADO**: assinar formulários e termos de autorização para cópia, promover, perante autoridade competente, prova ou contraprova pertinentes à titularidade de direitos de propriedade industrial e, ainda, tudo o mais que se fizer necessário para o bom e fiel cumprimento do presente mandato, podendo substabelecer, no todo ou em parte, a presente procuração, que terá a validade de 03 (três) anos.

Viçosa, 12 de setembro de 2018.


Nilda de Fátima Ferreira Soares
Reitora





MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

A MINISTRA DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 14 do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 704 - EXONERAR, a pedido,

PAULO AUGUSTO MALTA MOREIRA do cargo de Procurador-Chefe da Procuradoria Federal junto à Universidade Federal de Viçosa, código CD-3, a partir de 14 de julho de 2012.

Nº 705 - NOMEAR

AFONSO SÉRGIO CORRÊA DE FARIA, para exercer o cargo de Procurador-Chefe da Procuradoria Federal junto à Universidade Federal de Viçosa, código CD-3.

Nº 706 - NOMEAR

IRACI DE OLIVEIRA VAZ, para exercer o cargo de Procuradora-Chefe da Procuradoria Federal junto à Universidade Federal Rural de Amazonas, código CD-3.

GLEISI HOFFMANN

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA

A MINISTRA DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 14 do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 707 - NOMEAR

ORLANDO MAGALHÃES DA CUNHA, para exercer o cargo de Diretor de Programa da Secretaria-Executiva do Ministério da Justiça, código DAS 101.5.

GLEISI HOFFMANN

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
CASA CIVIL
IMPRESA NACIONALDILMA VANA ROUSSEFF
Presidenta da RepúblicaGLEISI HELENA HOFFMANN
Ministra de Estado Chefe da Casa CivilFERNANDO TOLENTINO DE SOUSA VIEIRA
Diretor-Geral da Imprensa NacionalDIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO
SEÇÃO 1

Publicação de atos normativos

SEÇÃO 2
Publicação de atos relativos a pessoal da Administração Pública FederalSEÇÃO 3
Publicação de contratos, editais, avisos e notificaçõesJORGE LUIZ ALENCAR GUERRA
Coordenador-Geral de Publicação e DivulgaçãoALEXANDRE ABRANDA MACHADO
Coordenador de Edição e Divulgação Eletrônica dos Jornais OficiaisFRANCISCO DAS CHAGAS PINTO
Coordenador de Produção

A Imprensa Nacional não possui representantes autorizados para a comercialização de assinaturas impressas e eletrônicas

<http://www.in.gov.br> ouvidoria@in.gov.br
SEL, Quarta 6, Lote 000, CEP 71611-900, Brasília - DF
CNPJ: 04.710.410/0001-00
Fones: (0800) 725.6787

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/infancia/infancia.html>, sob o número de acesso 1239.

MINISTÉRIO DAS CIDADES

A MINISTRA DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 14 do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 708 - EXONERAR

VIVIANA SIMON do cargo de Diretora do Departamento de Articulação Institucional da Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental do Ministério das Cidades, código DAS 101.5.

Nº 709 - NOMEAÇÃO

ERNANI CIRIACO DE MIRANDA, para exercer o cargo de Diretor do Departamento de Articulação Institucional da Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental do Ministério das Cidades, código DAS 101.5.

Nº 710 - NOMEAR

YURI RAFAEL DELLA GIUSTINA, para exercer o cargo de Diretor do Departamento de Políticas de Acessibilidade e Planejamento Urbano da Secretaria Nacional de Acessibilidade e Programas Urbanos do Ministério das Cidades, código DAS 101.5.

GLEISI HOFFMANN

MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO,
ORÇAMENTO E GESTÃO

A MINISTRA DE ESTADO CHEFE DA CASA CIVIL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso de suas atribuições e tendo em vista o disposto no art. 14 do Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

Nº 711 - EXONERAR, a pedido,

ALIJOMAR ARAPIRACA DA SILVA do cargo de Chefe do Escritório Especial em Altamira, Estado do Pará, da Secretaria do Programa de Aceleração do Crescimento do Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, código DAS 101.5, a partir de 15 de agosto de 2012.

Nº 712 - NOMEAR

CLEIDE ANTONIA DE SOUZA, para exercer o cargo de Chefe do Escritório Especial em Altamira, Estado do Pará, da Secretaria do Programa de Aceleração do Crescimento do Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, código DAS 101.5.

GLEISI HOFFMANN

SECRETARIA EXECUTIVA

PORTARIA Nº 207, DE 27 DE AGOSTO DE 2012

O SECRETÁRIO EXECUTIVO DA CASA CIVIL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso da competência que lhe foi subdelegada pelo inciso I do art. 14 da Portaria nº 590, de 13 de junho de 2007, da Ministra de Estado Chefe da Casa Civil da Presidência da República, e tendo em vista o disposto no Decreto nº 4.734, de 11 de junho de 2003, resolve

NOMEAR

CARLOS HENRIQUE DE AZEVEDO MOREIRA para exercer o cargo de Assessor na Subchefia de Articulação e Monitoramento da Casa Civil da Presidência da República, código DAS 102.4.

BETO FERREIRA MARTINS VASCONCELOS

GABINETE DE SEGURANÇA INSTITUCIONAL
AGÊNCIA BRASILEIRA DE INTELIGÊNCIA
SECRETARIA DE PLANEJAMENTO ORÇAMENTO
E ADMINISTRAÇÃO
DEPARTAMENTO DE GESTÃO DE PESSOAL

RETIFICAÇÃO

Na Portaria nº 14/DGP/SP/04/ABIN/OS/PR, publicada no DOU nº 22, de 01/02/2010, referente à concessão de aposentadoria do ex-servidor, matrícula Abin nº 007036, inclua na fundamentação legal a menção ao "inciso III, do artigo 3º, da Emenda Constitucional nº 47/2005".

Publicada de acordo com o Art. 9º, da Lei 9.883/09.

SECRETARIA EXECUTIVA

PORTARIAS DE 27 DE AGOSTO DE 2012

O SECRETÁRIO EXECUTIVO DO GABINETE DE SEGURANÇA INSTITUCIONAL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, no uso da subdelegação de competência que lhe foi conferida pelo art. 14 da Portaria nº 9 - GSI/PR/CA, de 13 de fevereiro de 2009, resolve

Nº 362 - DISPENSAR, a pedido,

o Cb PMDF WIBSAN LUIZ DE PAULA de exercer a função de AUXILIAR, código GR 1, na Secretaria de Segurança Presidencial do Gabinete de Segurança Institucional da Presidência da República, a partir de 23 de agosto de 2012.

Nº 363 - DESIGNAR

os militares a seguir relacionados para exercerem a função de AUXILIAR, código GR 1, no Escritório de Representação II da Secretaria de Segurança Presidencial do Gabinete de Segurança Institucional da Presidência da República.

- Cb Ex HAMILTON DOS SANTOS SILVA;
- Cb Ex VITOR DOS SANTOS FLORENTIN; e
- Cb Ex MILTON PEREIRA GOMES JUNIOR.

Nº 364 - DESIGNAR

o 3º Sgt Ex ROBERTO TOSHIHIRO TANNO para exercer a função de AUXILIAR, código GR 1, na Secretaria de Segurança Presidencial do Gabinete de Segurança Institucional da Presidência da República.

ANTONIO SÉRGIO GEROMEL

ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO
CORREGEDORIA-GERAL DA ADVOCACIA
DA UNIÃO

PORTARIA CONJUNTA Nº 189, DE 20 DE AGOSTO DE 2012

O CORREGEDOR-GERAL DA ADVOCACIA DA UNIÃO, O PROCURADOR-GERAL FEDERAL e a PRESIDENTE DA FUNDAÇÃO NACIONAL DO INDRIO, com base no art. 152, da Lei 8.112, de 11 de dezembro de 1990, e considerando o que consta do Processo Administrativo nº 00406.001443/2012-05, resolvem:

Art. 1º Promove por 60 (sessenta) dias o prazo para conclusão dos trabalhos da Comissão de Processo Administrativo Disciplinar nº 00406.00324/2012-27, designada pela Portaria Conjunta CUGAUPGF/FUNAI nº 131, de 11 de junho de 2012, publicada no Boletim de Serviço de 22 de junho de 2012.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

ADEMAR PASSOS VEIGA
Corregedor-Geral da Advocacia da UniãoMARCELO DE SIQUEIRA FREITAS
Procurador-Geral FederalMARTA MARIA DO AMARAL AZEVEDO
Presidente da Fundação Nacional do Índio

SECRETARIA-GERAL DE CONSULTORIA

PORTARIAS DE 24 DE AGOSTO DE 2012

O SECRETÁRIO-GERAL DE CONSULTORIA DA ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO, no uso das atribuições que lhe foram delegadas pela Portaria nº 1.663, de 2 de dezembro de 2009, do Advogado-Geral da União, e considerando o que consta do Processo nº 00407.004933/2012-45, resolve

Nº 725 - DESIGNAR

DANIELE PLACIDO LENGROBER, Procuradora Federal, matrícula Sipe nº 1585426, para exercer a função de Chefe de Setor de Dívida Ativa das Autarquias e Fundações Públicas, código FG-2, no Escritório de Representação da Procuradoria Regional Federal da 2ª Região, na cidade de Volta Redonda/RJ.

O SECRETÁRIO-GERAL DE CONSULTORIA DA ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO, no uso das atribuições que lhe foram delegadas pela Portaria nº 1.663, de 2 de dezembro de 2009, do Advogado-Geral da União, e considerando o que consta do Processo nº 00407.004951/2012-27, resolve

Nº 726 - DISPENSAR

PAULO SÉRGIO BUENO, Técnico do Seguro Social, matrícula Sipe nº 0934712, da função de Chefe de Seção de Cobrança e Recuperação de Créditos, código FG-1, da Procuradoria Seccional Federal em Campinas/SP.

O SECRETÁRIO-GERAL DE CONSULTORIA DA ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO, no uso das atribuições que lhe foram delegadas pela Portaria nº 1.663, de 2 de dezembro de 2009, do Advogado-Geral da União, e considerando o que consta do Processo nº 00407.004951/2012-27, resolve

Nº 727 - DESIGNAR

VINÍCIUS CAMATA CANDELLO, Procurador Federal, matrícula Sipe nº 1480151, para exercer a função de Chefe de Seção de Cobrança e Recuperação de Créditos, código FG-1, da Procuradoria Seccional Federal em Campinas/SP.

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.

Relatório descritivo

Composições à base de derivado do ácido cinâmico com atividade leishmanicida e uso

CAMPO DA INVENÇÃO

1. A presente invenção refere-se às composições que contenham (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato, um composto derivado do ácido cinâmico contendo o núcleo isobenzofuranona. Tal composto apresenta atividade contra as formas promastigota e amastigota da *Leishmania braziliensis*, e pode ser aplicado no campo da química medicinal. A invenção também refere-se ao uso do composto na elaboração de fármacos utilizados na terapia antileishmania.

ESTADO DA TÉCNICA

2. As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. (MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, v. 466, p. 235–245, 2017.).

3. A leishmaniose tegumentar (LT) tem ampla distribuição mundial e no Continente Americano há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, a LT é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e

também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico.

4.O tratamento das leishmanioses é limitado, principalmente em função das poucas drogas terapêuticas disponíveis com alguma eficácia comprovada, as quais são na sua grande maioria de aplicação injetável diária, apresentando muitos efeitos colaterais e longos tempos de tratamento (PONTE-SUCRE, Alicia; GAMARRO, Francisco; DUJARDIN, Jean Claude; *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017).

5.O tratamento da leishmaniose é baseado na utilização de medicamentos que possuem metais pesados tóxicos conhecidos como antimônios pentavalentes (Sb^{5+}). Entre eles, o antimônio de meglumina, e o estibogluconato de sódio foram introduzidos como quimioterápicos na década de 40, sendo atualmente as principais drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses. (RATH, Susanne *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. Química Nova, 2003). Um aspecto extremamente importante da presente invenção é que ela é livre de metais pesados.

6.Visto que a evolução clínica da leishmaniose causada por *Leishmania braziliensis* é imprevisível, pois observa-se a ausência de resposta mesmo em doses elevadas (ZULFIQAR, Bilal; SHELPER, Todd B.; AVERY, Vicky M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. Drug Discovery Today, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017) a formulação e o uso de novos compostos ativos faz-se necessário.

7.Os produtos naturais vêm sendo explorados, desde os primórdios da medicina, para o tratamento de diversas doenças que acometem os seres humanos. Neste sentido, a natureza fornece muitos modelos moleculares (*lead structures*) que fundamentaram estudos que contemplam atividade contra a leishmaniose

(POLONIO, Tilman; EFFERTH, Thomas. Leishmaniasis: drug resistance and natural products. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 22, n. 3, p. 277-286, 2008).

8.O ácido cinâmico, um produto natural, consiste em um ácido aromático, proveniente de plantas superiores e sua estrutura molecular é normalmente encontrada na forma *trans*. Seus derivados apresentam importantes bioatividades tais como antioxidante (POZDNYAKOV, D. I. *et al.* Antioxydant and Endotheliotropic Properties 4-Hydroxy-3, 5-Di-Tret-Butyl Cinnamic Acid under Conditions of Experimental Brain Ischemia. *Journal of Young Pharmacists*, v. 10, n. 2, p. 193, 2018), antibacteriana (DHAMI, Anamika *et al.* Chemical composition, antioxidant, in vitro anti-inflammatory and antibacterial activity of seeds essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC. Collected from two different altitudes of Kumaun region, Uttarakhand. *IJCS*, v. 6, n. 6, p. 363-370, 2018), fitotoxicidade (LI, Xiu-zhuang *et al.* Caffeic acid derivatives as growth inhibitors of *Setaria viridis*: structure-activity relationships and mechanisms. *Phytochemistry Letters*, v. 20, p. 208-213, 2017), atividade antifúngica (LIMA, Tamires C. *et al.* Antifungal activity of cinnamic acid and benzoic acid esters against *Candida albicans* strains. *Natural Product Research*, v. 32, n. 5, p. 572-575, 2018), além de efeitos citotóxico (WANG, Rui *et al.* Design and synthesis of the novel oleanolic acid-cinnamic acid ester derivatives and glycyrrhetic acid-cinnamic acid ester derivatives with cytotoxic properties. *Bioorganic chemistry*, p. 102951, 2019) e leishmanicida (GLASER, Jan *et al.* Antileishmanial and cytotoxic compounds from *Valeriana wallichii* and identification of a novel nepetolactone derivative. *Molecules*, v. 20, n. 4, p. 5740-5753, 2015).

9.A presente invenção apresenta composições que contenham o composto (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato, sintetizado por meio da esterificação de Steglich. Esta metodologia primeiramente descrita por Wolfgang Steglich em 1978 (NEISES, Bernhard; STEGLICH, Wolfgang. Simple

method for the esterification of carboxylic acids. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 17, n. 7, p. 522-524, 1978) é uma reação amplamente utilizada para a síntese de ésteres a partir de ácidos carboxílicos e álcoois. Embora eficiente e suave, a reação é comumente realizada usando sistemas solventes clorados ou amida, que são perigosos para a saúde humana e para o meio ambiente. As composições da presente invenção utilizam a acetonitrila, um solvente considerado mais “verde” e menos perigoso, reagentes de fácil acesso, baixo custo e bom rendimento reacional.

10. Em buscas realizadas em bancos de patentes relacionados ao ácido cinâmico e seus derivados, evidenciam, principalmente, o uso nos campos da medicina e agroquímica. Trabalhos envolvendo atividade leishmanicida também foram encontrados.

11. O documento de patente WO2017161093A1 descreve o uso de compostos análogos ao ácido caféico, um composto derivado do ácido cinâmico que apresenta atividade contra a tuberculose. No entanto, a utilização desse composto não foi avaliada contra a leishmaniose apesar de haver referências na literatura que sugerem potencial atividade leishmanicida para compostos derivados do ácido caféico, um derivado do ácido cinâmico que possui uma estrutura diferente se comparado à presente invenção. (GLASER, Jan *et al.* Antileishmanial lead structures from nature: Analysis of structure-activity relationships of a compound library derived from caffeic acid bornyl ester. *Molecules*, v. 19, n. 2, p. 1394-1410, 2014.)

12. O documento de patente CN108250156A descreve a obtenção de derivados do ácido cinâmico contendo o núcleo oxadiazina que apresentam atividade pesticida. A síntese dos compostos, no entanto, é realizada por meio de seis etapas, o dobro de etapas necessárias para a síntese do composto final se comparada com o (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato da presente invenção e além disso, foi necessário o uso de atmosfera

inerte no meio reacional. O número de etapas sintéticas é fundamental para o processo de desenvolvimento de uma molécula biologicamente ativa. Afeta o rendimento global e gera resíduos. É importante ressaltar que foi avaliada somente a atividade pesticida. Não há avaliação sobre a atividade leishmanicida.

13.O documento de patente EP3259991A1 descreve o uso fungicida de extratos de *Myroxylon balsamum (L.) Harms*, também conhecido como Bálsamo do Peru, que contém em sua composição ésteres derivados do ácido cinâmico. Estes, são produtos naturais produzidos em quantidades extremamente pequenas. Além disso o efeito fungicida é obtido através do efeito sinérgico dos constituintes do extrato, não sendo possível, avaliar individualmente o efeito fungicida dos derivados do ácido cinâmico. Neste aspecto, o presente pedido apresenta composições que contém um composto, advindo de síntese orgânica, sendo este uma forma prática de se obter quantidades suficientes de determinadas substâncias, e somado a isso, traz também a possibilidade de sintetizar moléculas que não ocorrem naturalmente inspiradas em produtos naturais.

14.O documento de patente US9115106B2 descreve a utilização do 5-hidroxi-2-hidroximetil- γ -pirona, um metabólito secundário obtido de fungos *Aspergillus* contra *Leishmania amazonenses*. O principal mecanismo de ação deste agente é a ativação da atividade microbicida das células hospedeiras, através do aumento da produção de superóxido, do número de lipossomas, da polimerização do filamento de actina, microtúbulos e aumento do espalhamento, típico de células ativadas. O processo de obtenção de compostos através de extratos de plantas requer grande quantidade destas. Além disso, as ações necessárias para transformar uma planta medicinal em droga vegetal consistem em aperfeiçoar as condições de cultivo, controle de pragas, colheita na fase e época ideal, seleção e padronização das plantas colhidas, desinfecção das partes vegetais, estabilização e secagem, divisão, controle de qualidade, exame botânico e análises por testes químicos e físicos (BANDARANAYAKE, Wickramasinghe M. et

al. Quality control, screening, toxicity, and regulation of herbal drugs. Modern Phytomedicine, p. 25-57, 2006). Foi utilizado o extrato obtido a partir de um fungo, o que limita o processo como um todo. A extração de produtos naturais ocorre em quantidade diminutas e exige grandes quantidades do material a ser extraído. A síntese orgânica, utilizada na presente invenção é uma poderosa ferramenta na obtenção e uso de um composto que apresenta atividade contra a leishmaniose.

15.A presente invenção pertence ao campo da química medicinal, e refere-se a composições que contenham (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato, derivado do ácido cinâmico contendo núcleo isobenzofuranona contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania braziliensis*, podendo as composições contendo tal composto ser utilizada como modelo para a indústria farmacêutica no que tange ao desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento da leishmaniose, já que, o tratamento da leishmaniose atualmente é limitado, principalmente em função das poucas drogas terapêuticas disponíveis com alguma eficácia comprovada, as quais são na sua grande maioria de aplicação injetável diária, apresentando muitos efeitos colaterais e longos tempos de tratamento.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

16.Figura 1: Composto (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato (V), com atividade leishmanicida, e demais compostos utilizados em sua síntese: ácido cinâmico (I), 6-metoxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (II), 6-hidroxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona (III) e ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (IV).

17.Figura 2: Avaliação da citotoxicidade do composto V sobre macrófagos. Cada barra mostra a média da percentagem de sobrevivência dos macrófagos, determinada pelo ensaio de viabilidade da resazurina com respectivo desvio padrão. Cada média representa os resultados de três experimentos independentes que foram realizados em quadruplicata. A barra branca (controle

positivo) representa células tratadas com anfotericina B (3,125 µg / mL), a barra preta (controle negativo) representa células tratadas com DMSO na mesma concentração utilizada na diluição do composto (0,1%) e a barra cinza representa células tratadas com composto V (10 µM). Todos os dados foram estatisticamente avaliados em relação ao controle negativo por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas.

18.Figura 3: Atividade leishmanicida contra promastigotas extracelulares de *L. braziliensis*. Promastigotas da fase logarítmica foram tratadas durante 48 horas com cada composto e a taxa de sobrevivência foi avaliada pelo método da resazurina. Cada barra mostra a média da porcentagem de sobrevivência de promastigotas e o respectivo desvio padrão. A barra branca (controle positivo) representa as células tratadas com anfotericina B (3,125 µg / mL), a barra preta (controle negativo) representa células tratadas com DMSO na mesma concentração utilizada na diluição dos compostos (0,1%) e a barra cinza representa células tratadas com composto V (10 µM). *Diferença significativa do controle negativo pela One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnett de ($p \leq 0,05$).

19.Figura 4. Atividade leishmanicida contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. Após o estabelecimento da infecção, as culturas infectadas foram tratadas por 48 h com cada composto. Em seguida, os macrófagos foram analisados e os amastigotas liberados foram cultivados até a diferenciação dos amastigota em promastigotas e, posteriormente, quantificados pelo método da resazurina. Cada barra mostra a média da porcentagem de promastigotas viáveis com o respectivo desvio padrão. Os resultados são de pelo menos dois experimentos independentes que foram realizados com quadruplicata. A barra branca (controle positivo) representa células tratadas com anfotericina B (3,125 µg / mL) e a barra preta (controle negativo) representa células tratadas com DMSO na mesma concentração utilizada na diluição dos compostos (0,1%). *Diferença

estática do controle negativo por One-way ANOVA, com pós-teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

20. Figura 5: Microscopia eletrônica de transmissão de culturas tratadas com DMSO (A) e (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato (B, C). Macrófagos de controle apresentaram parasitas (P) com estrutura bem preservada e densidade eletrônica. Parasita tratada com composto V dentro do vacúolo parasitóforo exibindo grandes lóbulos (B, setas) com núcleo citoplasmático contendo organelas como mitocôndrias, irradiando do corpo celular central, indicado pela bolsa flagelar com dois flagelos (F). Uma vesícula contendo material amorfo (V) presumivelmente compreende um autofagossomo para a presença de múltiplas membranas (ponta de flecha inserida) bem como conteúdo citoplasmático. Parasita ligado ao vacúolo parasitóforo em macrófagos tratados com composto V (C). Estruturas eletrodensas (asterisco branco) na periferia celular consistem em fragmentos destacados de cromatina picnótica; O núcleo é de forma incomum (cabeças de setas) com evidência de picnose inicial (seta). Algumas áreas eletrolucentes também foram observadas (asteriscos pretos).

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

21. A presente invenção refere-se às composições que contenham (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato (V), e seu uso leishmanicida. O composto é derivado do ácido cinâmico (I) contendo o núcleo isobenzofuranona (III). As composições propostas apresentam atividade contra as formas promastigota e amastigota da *Leishmania braziliensis*.

Síntese do (E)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato (V)

- *Síntese da 6-metoxiisobenzofuran-1(3H)-ona (II)*

22. A primeira etapa da síntese envolveu a reação de *orto*-alquilação do ácido 3-metoxibenzoico, resultando na obtenção da 6-metoxiisobenzofuran-1(3H)-ona (II) como

um sólido branco.

Metodologia de preparo e caracterização da 6-metoxiisobenzofuran-1(3H)-ona (II)

23.A um balão de fundo redondo de 50,0-100,0 mL foram adicionados o ácido 3-metoxibenzoico (3,0-5,0 g) juntamente com (2,0-5,0 mL) de solução aquosa de formaldeído (37% m/v), 5,0-10,0 mL de HCl concentrado e 8,0-10,0 mL de ácido acético. O balão contendo a solução resultante foi inserido na cavidade do aparelho de micro-ondas. Para o aquecimento da mistura, utilizou-se o método pré-programado do aparelho de micro-ondas utilizado para o propósito de síntese orgânica. Aparelho este que permite a realização de reações de síntese orgânica com segurança, com controle preciso de temperatura, pressão e campo magnético submetido. O método consiste da utilização de refluxo, agitação magnética e irradiação da mistura de reação por vinte minutos utilizando a potência 100-150 W. Decorrido este período, a análise da mistura de reação por CCD mostrou que o ácido 3-metoxibenzoico havia sido completamente consumido. O volume da solução foi, então, reduzido em evaporador rotativo e em seguida foi adicionada 10,0-30,0 mL de solução saturada de bicarbonato de potássio até pH 5-6. A fase aquosa resultante foi extraída com acetato de etila (20,0-30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos. A fase orgânica resultante foi seca com 0,5 - 2,0 g de sulfato de sódio, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por recristalização utilizando como solvente acetona e caracterizado por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) e espectrometria de massas.

24.*Dados Espectroscópicos*

25.CCD: $R_f=0,31$ (hexano/acetato de etila 2:1 v/v).

26. T_f : 118,0-119,5°C

27.IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3481, 3085, 2953, 2848, 1754, 1620, 1277, 1247, 1054, 1018, 992, 725, 692, 545 cm^{-1} .

28.RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,86 (s, 3H; $-\text{OCH}_3$); 5,26 (s, 2H; H-3); 7,22-7,38 (m, 3H; H-4, H-5, H-7).

29.RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 55,7 ($-\text{OCH}_3$); 69,5 (C-3); 107,4 (C-7); 122,8 (C-5);

123,0 (C-4); 126,9 (C-8); 138,8 (C-9); 160,5 (C-6); 171,2 (C-1).

30.CG-MS *m/z*: 164 ($[M]^+$, $C_{10}H_{10}O_2$).

- *Síntese da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona (III)*

31.A 6-metoxiisobenzofuran-1(3H)-ona (II) foi submetida a posterior reação de desmetilação resultando na formação da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona (III) como descrito abaixo:

Metodologia de preparo e caracterização da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona (III)

32.A um balão de 50,0-100,0 mL adicionou-se o composto (I) (0,1-0,6 g). Em seguida foram adicionados 5,0-7,0 mL de HBr (48% m/v). O balão contendo a solução resultante foi inserido na cavidade do aparelho de micro-ondas. Para irradiação da mistura, utilizou-se o método pré-programado do aparelho de micro-ondas utilizado para o propósito de síntese orgânica. O método consiste da utilização de refluxo, agitação magnética e irradiação da mistura de reação por vinte minutos utilizando a potência de 100-150 W. O volume da solução foi, então, reduzido em evaporador rotativo e em seguida foi adicionada solução saturada de bicarbonato de potássio até pH aproximadamente 6. A mistura resultante foi transferida para um funil de separação e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (20,0-30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida e caracterizado por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN 1H e ^{13}C) e espectrometria de massas.

33.Dados Espectroscópicos

34.Característica: sólido branco.

35.CCD: $R_f=0,26$ (hexano/acetato de etila 2:1 v/v).

36.Tf: 197,1-198,7°C

37.IV (ATR) $\bar{\nu}$ max: 3214 (banda larga), 1722, 1598, 1505, 1449, 1227, 1192, 1055, 773, 539 cm^{-1} .

38.RMN de 1H (300 MHz, CD_3OD) δ : 5,25 (s, 2H; H-3); 7,15-7,18 (m, 2H; H-5, H-7); 7,40

(d, 1H, J=9,0 Hz; H-4).

39.RMN de 13C (75 MHz, CD₃OD) δ : 70,1 (C-3); 109,6 (C-7); 122,7 (C-5); 123,2 (C-4); 126,5 (C-8); 138,3 (C-9); 158,6 (C-6); 172,5 (C-1).

40.CG-MS m/z: 150 ([M]⁺, C₉H₈O₂).

- *Síntese do 3,4,5-trimetoxicinamato (IV)*

41.O 3,4,5-trimetoxicinamato (IV), um derivado do ácido cinâmico (I), foi preparado através do 3,4,5-trimetoxibenzaldeído e ácido malônico, disponíveis comercialmente, como descrito a seguir:

Metodologia de preparo e caracterização do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (IV)

42.A um balão de fundo redondo 25,0-50,0 mL foram adicionados, ácido malônico (1,0-2,0 g); 3,4,5-trimetoxibenzaldeído 0,1-1,0 g em piridina (5,0-10,0 ml). Adicionou-se então piperidina (1,0-5,0 mL). O balão contendo a solução resultante foi inserido na cavidade do aparelho de microondas. Utilizou-se o método pré-programado do aparelho de microondas utilizado para o propósito de síntese orgânica. O método consiste da utilização de refluxo, agitação magnética e irradiação da mistura de reação por vinte minutos utilizando a potência de 150-200W. A mistura da reação foi então vertida em banho de gelo e adicionou-se lentamente 10,0-20,0 mL de ácido clorídrico (1:1 v/v). A mistura resultante foi filtrada a vácuo em funil sinterizado. O resíduo foi lavado com porções de água gelada (4 x 5,0-10,0 mL).

43.*Dados Espectroscópicos*

44.Característica: sólido branco.

45.CCD: R_f=0,30 (hexano-acetato de etila 1:2 v/v).

46.Tf: 215,3–219,0°C

47.IV (KBr) $\bar{\nu}$ max: 3134-2905 (banda larga), 2836, 2654, 1689, 1627, 1684, 1121, 827 cm⁻¹.

48.RMN de 1H (300 MHz, CD₃OD) δ : 3,78 (s, 3H, H-11); 3,87 (s, 6H, H-10, H-12); 6,42 (d, 1H, J=16,2 Hz; H-8); 6,92 (s, 2H; H-2, H-6); 7,60 (d, 1H, J=16,2 Hz; H-7).

49.RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ : 52,2 (C-10, C-12); 59,8 (C-11); 105,3 (C-2, C-6); 117,3 (C-8); 130,1 (C-1); 139,8 (C-4); 144,9 (C-7); 153,6 (C-3, C-5); 169,2 (C-9).

50.CG-MS m/z: ($[\text{M}]^+$ 238, $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$).

- *Síntese do (E)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)- cinamato (V)*

51.Foi realizada a esterificação de Steglich entre a 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona (III) e o 3,4,5-trimetoxicinamato (IV) como descrito na metodologia a seguir:

Metodologia de preparo e caracterização do (E)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)- cinamato (V)

52.A um balão de fundo redondo de 20,0-30,0 mL, contendo uma barra de agitação magnética foram adicionados 0,1-0,3 g de ácido (E)-3,4,5-trimetoxicinâmico, 0,3-0,4 g da 6-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona (II), 0,2-0,4 g de DCC e 0,01-0,02 g de DMAP e 10,0-15,0 mL de metanol. O balão contendo a solução resultante foi inserido na cavidade do aparelho de micro-ondas. Utilizou-se o método pré-programado do aparelho de micro-ondas utilizado para o propósito de síntese orgânica para um sistema aberto com agitação magnética durante 40 minutos a uma potência de 100-200 W. Após este tempo a mistura resultante foi filtrada e lavada com uma solução aquosa de 10% m/v de ácido cítrico (2,0-10,0 mL), água destilada (5,0-10,0 mL) e solução saturada de NaCl (5,0-10,0 mL). Em seguida a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (5,0-20,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna e caracterizado por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C). O composto (E)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato (V) foi obtido com 66% de rendimento.

53.*Dados Espectroscópicos*

54.Característica: sólido branco

55.CCD: $R_f=0,40$ (hexano/diclorometano/acetato de etila 3:2:1 v/v).

56.Tf: 189,1-193,6°C.

57.IV (KBr) $\bar{\nu}$ max: 3026, 2932, 1767, 1740, 1636, 1238, 829 cm⁻¹.

58.RMN de 1H (300 MHz, DMSO-d6) δ : 5,42 (s, 2H; H-2); 6,87 (d, 1H, J=16,0 Hz; H-2'); 7,30 (t, 2H, J=9,0 Hz, H-6', H-8'); 7,62 (dd, 1H, J1=8,4 Hz; J2=2,1 Hz, H-4); 7,60-7,60 (m, 2H; H-3', H-3); 7,87-7,92 (m, 3H; H-6,H-5',H-9').

59.RMN de 13C (75 MHz, DMSO-d6) δ : 70,5 (C-2); 116,5 (d, JC-F=21,8; C-6', C-8'); 117,1 (d, J=2,3 Hz; C-2'); 118,4 (C-6); 124,7 (C-3); 126,8 (C-4); 128,8 (C-7); 130,9 (d, JC-F=3,1Hz; C-4'); 131,6 (d, JC-F=8,7 Hz; C-5', C-9'); 145,1 (C-8); 146,1 (C-3'); 151,2 (C-5); 164,2 (d, JC-F=248,3 Hz; C-7'); 165,7 (C-1'); 170,3 (C-1).

Composições

60.As composições caracterizam por conter o (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato (V), associado a antioxidantes, conservantes, estabilizantes, polímeros, entre outras substâncias farmacêutica e farmacologicamente aceitáveis na elaboração de compostos com atividade leishmanicida, para uso no tratamento da leishmaniose.

EXPERIMENTO DE DEMONSTRAÇÃO

Ensaio Biológico

61.Para o bioensaio, foi determinada a toxicidade do (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato (V) contra as formas promastigota e amastigota da *Leishmania* braziliensis.Os resultados estão apresentados nas Figuras 2 e 3 deste documento.

62.O composto derivado de ácido cinâmico (V) foi dissolvido em dimetilsulfóxido para obter uma concentração de 10 mM. A solubilização dos compostos foi avaliada por microscopia de luz. Posteriormente a solução foi diluída com água ultrapura esterilizada para o preparo de suma solução 0,5 mM. Armazenou-se no freezer a -20°C até o uso.

63.A toxicidade para macrófagos RAW 264,7 (células hospedeiras) foi avaliada pela medida da viabilidade celular usando o método da resazurina (M.S. Bastos, L. A. Souza, T. S. Onofre, A.S. Júnior, M.R. Almeida, G.C. Bressan, J.L. Fietto, Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp *Leishmania braziliensis* and its application as an alternative method for drug screening in vitro, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.112, p. 155-159, 2017). A citotoxicidade para macrófagos foi realizada em microplaca de 96 poços, semeando 200 µL / poço de suspensão de células ($2,5 \times 10^5$ células/mL). Os resultados estão apresentados nas Figura 4 deste documento.

64.Quatro controles internos foram utilizados nos ensaios, a saber: 1) Branco com meio RPMI suplementado; 2) Controle de macrófagos sem tratamento; 3) Controle do composto leishmanicida conhecido, Anfotericina B ($3,125 \mu\text{g} / \text{mL}$); e 4) O controle de DMSO adicionado aos macrófagos na mesma concentração utilizada na diluição dos compostos (0,1%), como mostra a Figura 4.

65. O composto foi avaliado três vezes em quadruplicata (Figura 4). A redução da resazurina foi calculada conforme descrito por Diniz (M.A. Vannier-Santos, U. Lins, Cytochemical techniques and energy-filtering transmission electron microscopy applied to the study of parasitic protozoa, Biol. Proc. Online, 3 (2001), 8-18).

66. Para avaliação morfológica dos efeitos do composto, após 48 horas de tratamento, as amostras foram lavadas 3 vezes em tampão PBS e depois fixadas com glutaraldeído a 1%, paraformaldeído a 4%, tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, durante a noite a 4°C. Lavou-se 3 vezes em tampão de cacodilato de sódio para remover o fixador e, então, pós-fixadas em OsO_4 a 1%, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 0,8% e CaCl_2 5 mM no mesmo tampão. A desidratação das amostras foi realizada em acetona graduada (15-100%), e as amostras foram imersas em resina constituída de polímeros, anidrido de ácido succínico, anídrido metílico de Nadic e 2,4, 6- tris-dimetilaminometilfenol, utilizada como meio de inclusão para análise,

polimerizada a 60°C por 48 horas. Seções ultrafinas foram coradas com soluções aquosas de acetato de uranila a 7% e nitrato de chumbo a 4%, e, foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão analítico JEOL-JEM-1011 (VANNIER-SANTOS, Marcos A.; LINS, Ulysses. *Cytochemical techniques and energy-filtering transmission electron microscopy applied to the study of parasitic protozoa*. *Biological procedures online*, v. 3, n. 1, p. 8, 2001), como mostra a Figura 5.

67. O IC₅₀ do (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato contra a forma promastigotas foi calculado através de programa de análise estatísticas e construção de gráficos.

68. O composto foi testado tal nas seguintes concentrações: 80 µM, 40 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM e 1 µM. Controles positivos e negativos, Anfotericina B e DMSO, respectivamente, nas mesmas concentrações citadas anteriormente. A proporção 15:1 de *Leishmania*/macrófagos foi fixada. A análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a p<0,05.

69. O índice de seletividade (IS) foi calculado de acordo com a seguinte equação.

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ calculado contra macrófagos}}{IC_{50} \text{ calculado no teste de infecção}}$$

IC ₅₀ <i>L. braziliensis</i> forma promastigota (48 horas) (µM)	IC ₅₀ Raw 264.7 macrófago (48 horas) (µM)	IC ₅₀ <i>L. braziliensis</i> forma amastigota (48 horas) (µM)	Índice de seletividade (IS)
7,58	> 80	8,27	> 9,67

70. O Índice de Seletividade (IS) é uma indicação de quanto um composto é mais eficaz contra o parasita em vez das células dos mamíferos hospedeiros. Quanto maior o IS, mais seletiva é a droga no parasita e menos tóxica para as células de mamíferos. Para o do (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-

cinamato o IS é maior que 9,67, o que indica maior eficácia e segurança para posterior tratamento *in vivo*.

71. Em seguida, o próximo passo foi avaliar a ação dos compostos contra amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* durante a infecção *in vitro* de macrófagos. A Figura 4 mostra a taxa de sobrevivência do parasita após 48 horas de tratamento com os compostos.

72. Abordagens ultraestruturas são indispensáveis na elucidação dos mecanismos de ação dos agentes antiparasitários (MENNA-BARRETO, Rubem FS *et al.* Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron*, v. 40, n. 2, p. 157-168, 2009). A análise de microscopia eletrônica de transmissão de culturas de macrófagos infectados (Figura 5) indica que, contrariamente às células tratadas com DMSO, corpos celulares lobulados exibidos tratados com o (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato, que podem ser devidos à citocinese truncada, como relatado em *L. amazonensis* tratada com vimblastina (BORGES, Valeria de Matos *et al.* Cell structure and cytokinesis alterations in multidrug-resistant *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology research*, v. 95, n. 2, p. 90-96, 2005).

73. Imagens indicando autofagia, apoptose e presumivelmente necrose também foram observadas (Figura 5). A autofagia pode compreender um mecanismo de escape sob condições de estresse, bem como causar morte celular parasitária e também estar associada à apoptose em *Leishmania* (BRENNAND, Ana; RICO, Eva; MICHELS, Paul AM. Autophagy in trypanosomatids. *Cells*, v. 1, n. 3, p. 346-371, 2012; ANTINARELLI, Luciana Maria Ribeiro *et al.* Antileishmanial activity of a 4-hydrazinoquinoline derivative: Induction of autophagy and apoptosis-related processes and effectiveness in experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental parasitology*, v. 195, p. 78-86, 2018).

74.Esses processos podem estar relacionados ao mecanismo relacionado à morte celular necrótica como ocorre em *Trypanosoma cruzi* (DOS ANJOS, Danielle Oliveira *et al.* Effects of a novel β -lapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, v. 6, n. 3, p. 207-219, 2016), já que a necrose pode ocorrer após o início da apoptose (PAQUET, Philippe; PIERARD, Gerald E. Toxic epidermal necrolysis: revisiting the tentative link between early apoptosis and late necrosis. International journal of molecular medicine, v. 19, n. 1, p. 3-10, 2007).

75.As áreas eletrolucentes (Figura 5) indicam perda de conteúdo citoplasmático, isto é, necrose. Assim, o composto (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato atua inibindo o ciclo celular e induzido autofagia, resultando em mecanismos de morte celular programada.

76.A combinação de um derivado do ácido cinâmico com o grupo isobenzofunanona resultou em um composto com importante atividade contra a *Leishmania braziliensis*.

77.Os resultados da presente invenção abrem novas fronteiras para o desenvolvimento de novas drogas leishmanicidas.

CONCLUSÃO

78.O tratamento da leishmaniose atualmente é limitado, principalmente em função das poucas drogas terapêuticas disponíveis com alguma eficácia comprovada, as quais são na sua grande maioria de aplicação injetável diária, possuem metais pesados em sua composição e apresentam muitos efeitos colaterais e longos tempos de tratamento.

Neste contexto, torna-se extremamente importante a busca por novas composições, livres de metais pesados, contendo compostos que apresentam boa

eficácia e baixo custo. A presente invenção traz valores de IC_{50} do (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi)-cinamato contra as formas promastigotas e amastigotas iguais a 7,58 e 8,27, respectivamente, além de seletividade (IS) maior do que 9,67, o que indica grande eficácia do composto contra o parasita, indicando assim, a grande viabilidade no uso e na composição contendo o (*E*)-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il-(3,4,5-trimetoxi) - cinamato. Os resultados obtidos apresentaram boa viabilidade técnica industrial por apresentarem boa eficácia para a indústria farmacêutica no que tange o tratamento da leishmaniose.

Desenhos

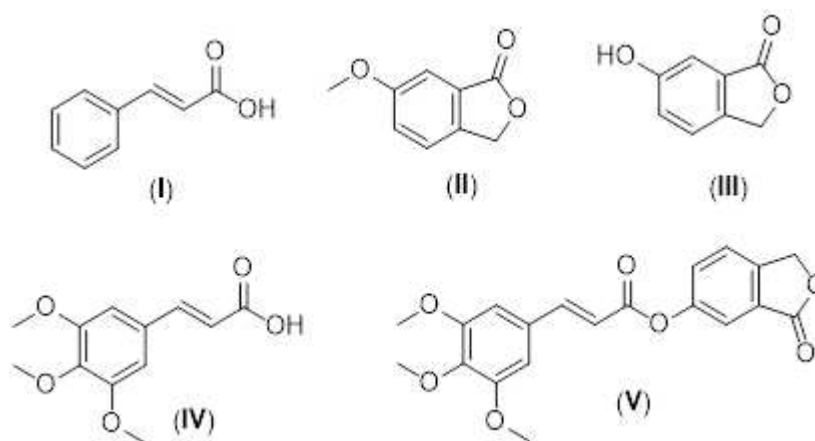


Figura 1

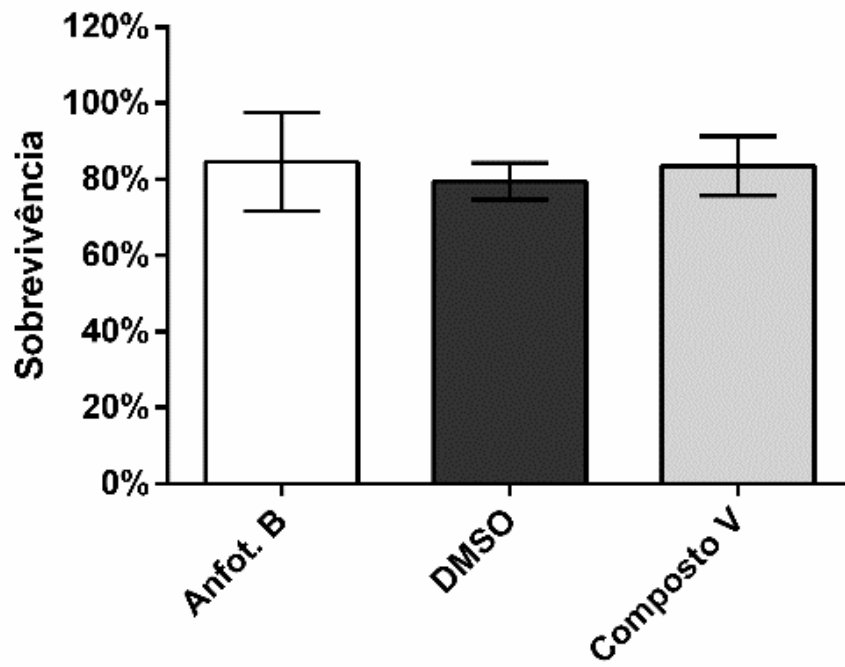


Figura 2

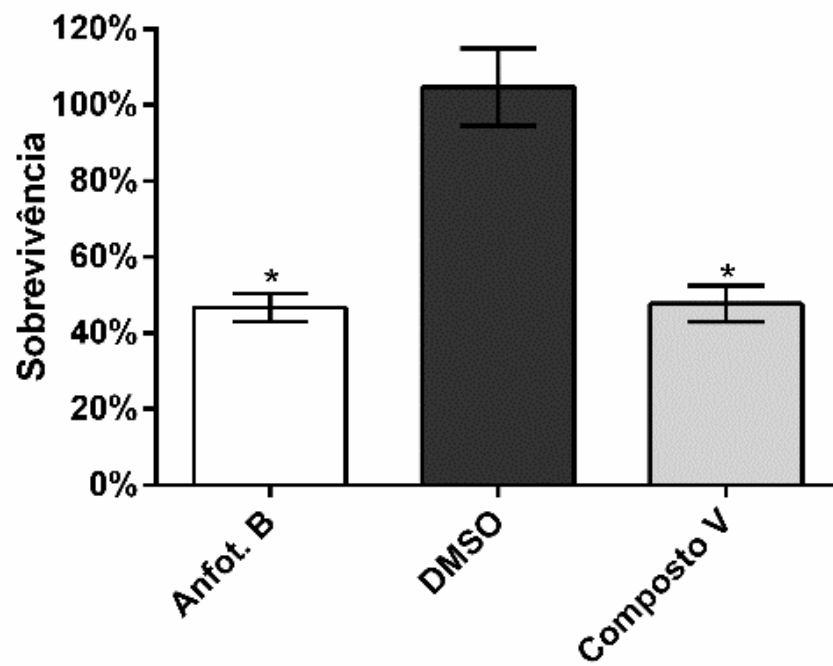


Figura 3

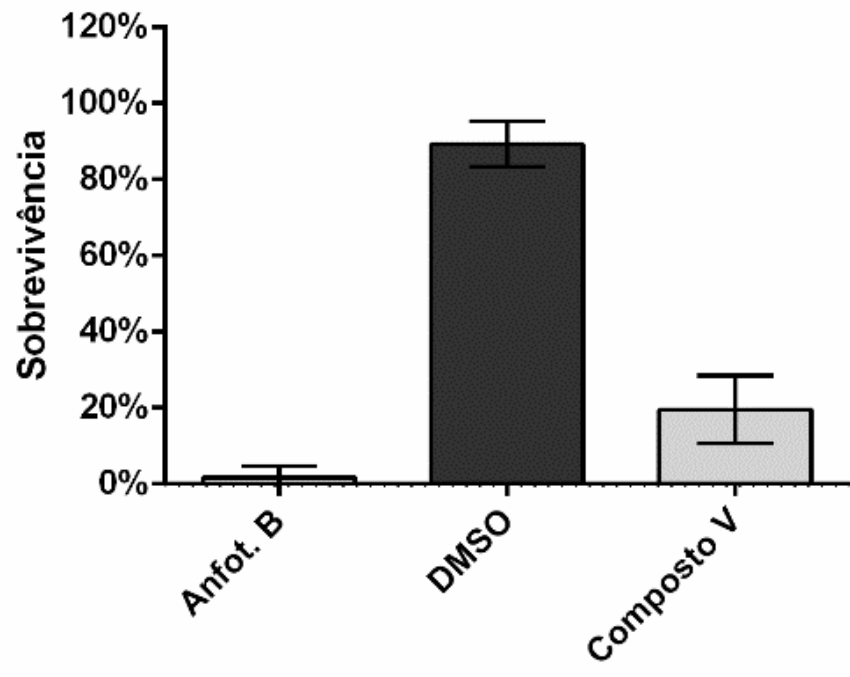


Figura 4

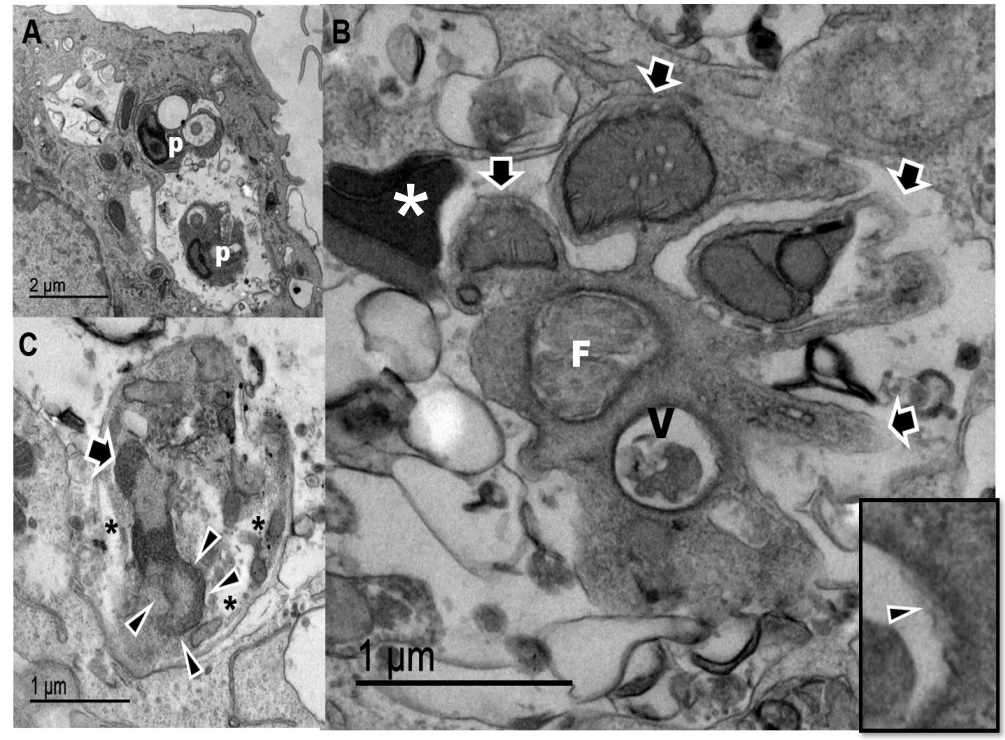


Figura 5

ANEXO III
CAPÍTULO DE LIVRO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Chapter ID: _61294_
Chapter Title: Bis-Azides

-
Book ID: _17736_
Book Title: Advances in Chemistry Research. Volume 59

Dear Dr. Teixeira,

Good day. We acknowledge receipt of, and thank you for your chapter.

We are happy to let you know that the above-mentioned book has entered the Page Proof stage of production. Your chapter is confirmed as accepted for publication unless it is determined that it requires English editing or if original source files for any of the figures or graphics are missing, of which you will be notified. Please see the attached Nova requirements for revision of your chapter. Please ensure your chapter is in full compliance with these requirements before returning your completed page proofs.

Sincerely,

Sarah Kearns
Page Proofs Department

Nova Science Publishers, Inc.
415 Oser Avenue, Suite N
Hauppauge, NY 11788 USA
Tel: 1-631-231-7269 | Fax: 1-631-231-8175
Web: <<http://www.novapublishers.com/>>www.novapublishers.com | Email:
<<mailto:pageproofs@novapublishers.com>>pageproofs@novapublishers.com

Bis-Azides

Róbson R. Teixeira^{1,}, PhD;*
Deborah Campos Tomaz¹, MD;
Sara Maria Ribeiro de Sousa¹, MD;
Ana Paula Martins de Souza¹, MD;
Michelle Peixoto Rodrigues¹, MD;
Alex Ramos de Aguiar¹, PhD;
Adilson Vidal Costa², PhD;
Fabiola Suelen dos Santos³, MD;
and Rossimíriam Pereira de Freitas³, PhD

¹Chemistry Department, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais State, Brazil

² Physics and Chemistry Department, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo State, Brazil

³Chemistry Department, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais State, Brazil

Abstract

Organic azides are an important and versatile class of chemical compounds. They present industrial, academic, and biological applications. In addition, they can be obtained from a variety of synthetic methods. The present book chapter will focus specifically on bis-azides, *i.e.*, organic compounds presenting two azido (-N₃) groups in their structures. The utility of them is going to be covered in synthetic group transformation, polymer chemistry, in the preparation of bioactive compounds, in click chemistry, and in the synthesis of cross-linked DNA.

* Corresponding Author address: Email: robsonr.teixeira@ufv.br.

Keywords: Azides, organic Azides, Bis-Azides

Introduction

Organic azides are an important and versatile class of chemical compounds [1]. They present industrial applications [2], are biologically active substances [3], and present great synthetic utility in conjunction with their easy accessibility via several synthetic routes [3-5].

The history of organic azides goes back to 1864 when the German chemist Peter Griss, who first prepared the diazonium salts [6, 7], obtained aryl azides from the reaction of arenediazonium perbromides with ammonia [8]. Later on, Theodor Curtius found that the treatment of benzoyl hydrazine with nitrous acid afforded benzoyl azide. Alkaline hydrolysis of benzoyl azide gave sodium azide which, in turn, by acidification resulted in the formation of hydrazoic acid (HN_3). In Curtius' laboratory, a procedure was also developed for the preparation of alkyl azides via the treatment of alkyl iodides with AgN_3 . He also discovered that the reaction of benzoyl azide with hot ethanol gave rise to *N*-phenylcarbamate [8]. The conversion of acyl azides to the corresponding carbamates is known as The Curtius Rearrangement and it is one step involved in the general method that converts carboxylic acids to amines [9]. Since these initial studies, azides have attracted the attention of several researchers.

The present book chapter will focus specifically on bis-azides, *i.e.*, organic compounds presenting two azido ($-\text{N}_3$) groups in their structures. It is going to be covered the utility of them in polymer chemistry, synthetic group transformation, in the preparation of bioactive compounds, in click chemistry, and in the synthesis of cross-linked DNA. It is not our intention to make an exhaustive description of all aspects related to bis-azides.

Functional Interconversion Employing Bis-Azides

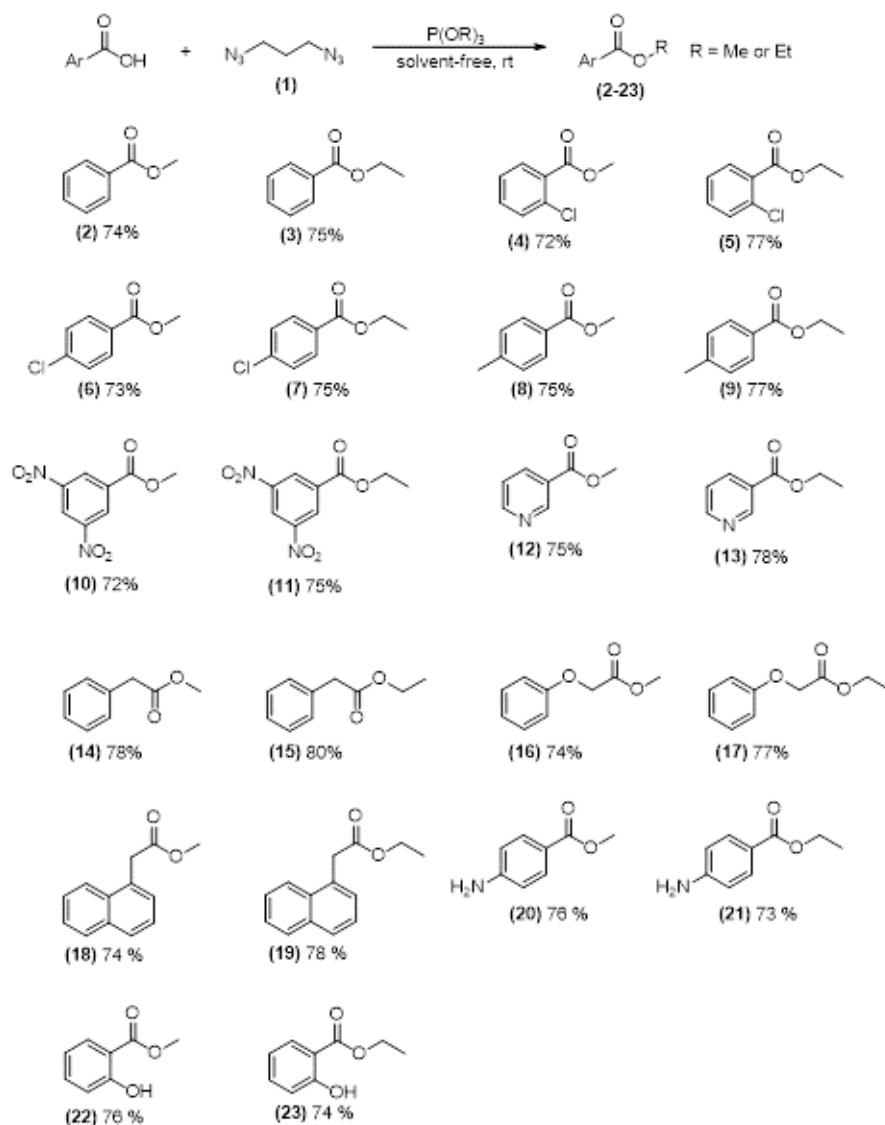
The esterification is an important process in organic chemistry. Esters can be prepared using mineral acids, a variety of activating agents, and several catalysts [10]. Ponnuswam and co-authors found that the combination of bis-azides with trialkyl phosphites or triphenyl phosphine is an alternative method for the preparation of esters [11]. Thus, treatment of carboxylic acids with 1,3-diazidopropane (1) in the presence of triethyl phosphite or trimethyl phosphite afforded methyl or ethyl esters (2-23) in good yields (Scheme 1). Reactions were carried out at room temperature and under solvent free condition.

The proposed mechanism for this reaction is depicted in Scheme 2 [11].

The inconvenience of the aforementioned method is that the phosphites must be prepared before running the esterification. Considering this, it was hypothesized that the trialkylphosphites could be replaced by triphenylphosphine. In fact, the reaction of bis-azide (1) with carboxylic acids in the presence of triphenylphosphine and an alcohol afforded esters with good yields, as shown in Scheme 3.

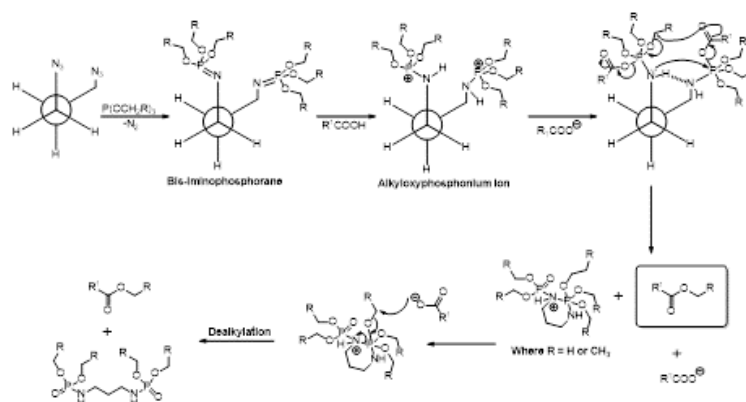
The proposed mechanism for the formation of esters (24)-(36) is presented in Scheme 4 [11].

The chemistry of 3,3-diazidoenones (38) has been recently investigated [12]. These compounds can be prepared from the corresponding 3,3-dichlorovinyl ketones (37) which, in turn, can be made from 1,1-dichloroethene and acyl chlorides (Scheme 5).

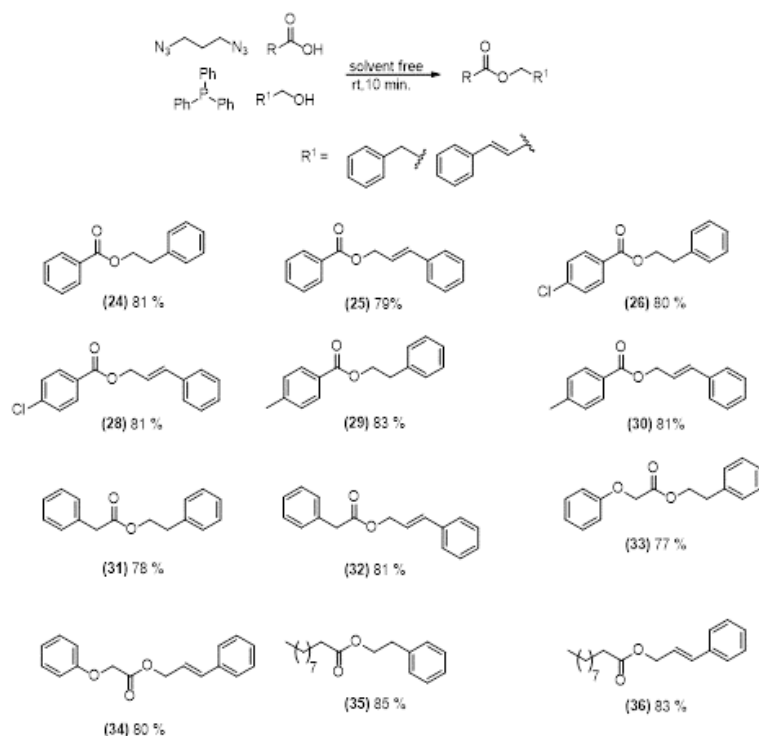


Scheme 1. Preparation of esters from bis-azide (1) and trimethyl or triethyl phosphites. Reaction conditions: 1,3-diazidopropane (1) (0.5 mmol), trimethyl phosphite/triethyl

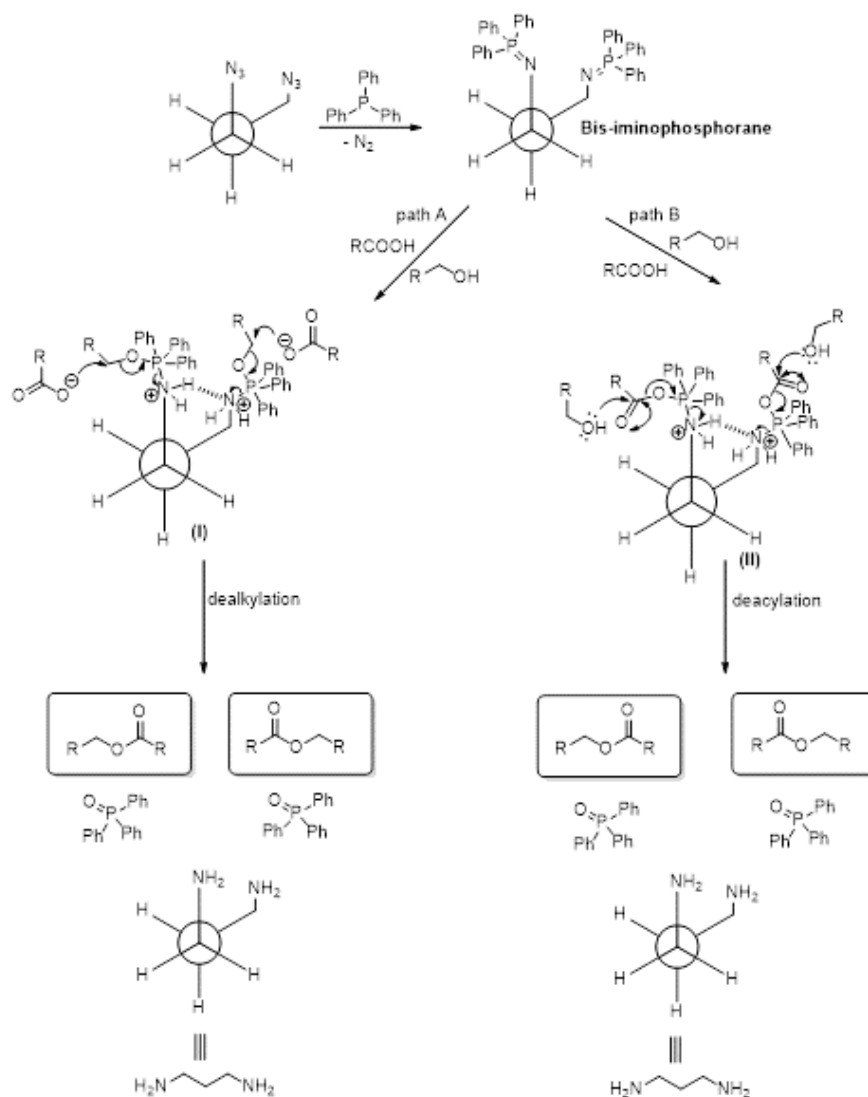
phosphite (1.0 mmol) and carboxylic acid (1.0 mmol) were stirred at room temperature for 20 min.



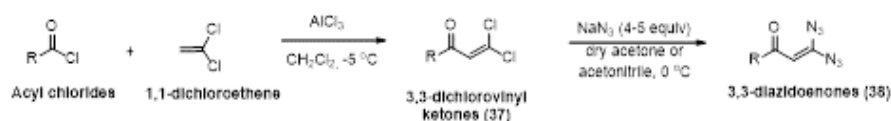
Scheme 2. Proposed mechanism for the esterification using trialkylphosphites.



Scheme 3. Preparation of esters (24)-(36). Reaction conditions: To a mixture of triphenylphosphine (1.0 mmol), 2-phenylethanol/cinnamyl alcohol (1.0 mmol) and carboxylic acid (1.0 mmol), 1,3-diazidopropane (1) (0.5 mmol) was added slowly in a drop wise manner (to avoid accumulation of azide) and the mixture was stirred at room temperature for 10 min.



Scheme 4. Proposed mechanism of the formation of esters from azides using triphenylphosphine.



Scheme 5. Preparation of 3,3-diazidoenones (38).

The formation of 3,3-diazidoenones (38) was evidenced by NMR spectroscopy. It was found that these compounds can undergo cyclization to afford azido isoxazoles (39). This process can be understood considering the nucleophilic attack of carbonyl oxygen on the nitrogen atom accompanied by N₂ release. For dichlorovinyl ketones with aromatic portions, the azidoisoxazoles were obtained in yields ranging from 52%-62%. (Table 1). The reactions were carried out at room temperature in acetonitrile. The fastest conversion

of (37d) was associated with the presence of the electron withdrawing group (-NO₂) in the aromatic ring [12].

The conversion of 3,3-diazidovinyl ketones in azidoisoxazoles were also performed in ionic liquids. This was done in order to find more environmentally friendly alternatives to the traditional organic solvents. As can be seen in Table 2, the azidoisoxazoles were obtained in good yields and the best ones were obtained running the reactions in [emin]⁺[OTf]⁻.

The formation of azidoisoxazoles from dichlorovinyl ketones with aliphatic portions was also investigated and the results are depicted in Table 3.

Table 1. Formation of azidoisoxazoles (39a-d)

Starting ketone	Ar	Time for the conversion of (37a-d) to (38a-d), h	Yield of (39) (%)
37a	4-Br-C ₆ H ₄	2.5 (38a)	62 (39a)
37b	4-Cl-C ₆ H ₄	3.0 (38b)	56 (39b)
37c	Ph	4.0 (38c)	52 (39c)
37d	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	1.5 (38d)	61 (39d)

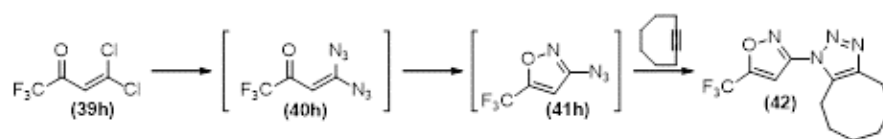
Table 2. Formation of azidoisoxazoles in ionic liquids

Compo und	Yield of compounds (39a-c)			
	[bmin] ⁺ [BF ₄] ⁻	[emin] ⁺ [OTf] ⁻	[hmin] ⁺ [PF ₃ (C ₂ F ₅) ₃] ⁻	[bmpyrr] ⁺ [PF ₃ (C ₂ F ₅) ₃] ⁻
39a	70	74	62	57
39b	67	74	63	58
39c	65	75	N/A	N/A

Table 3. Preparation of azidoisoxazoles (41e-h)

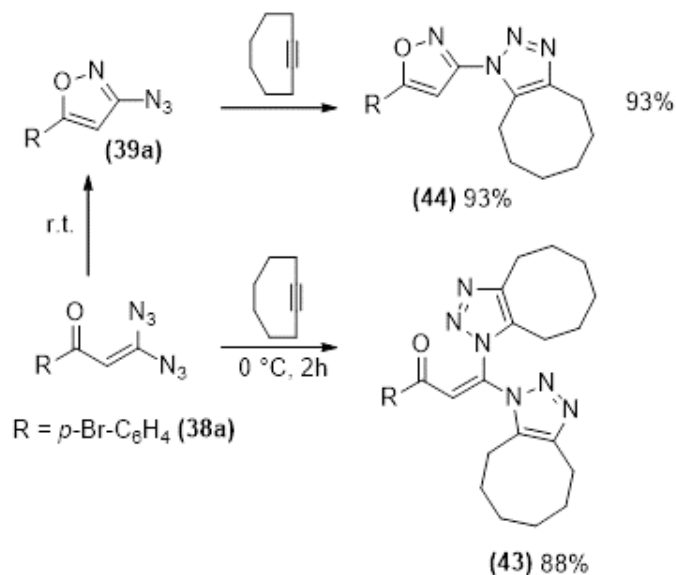
Starting ketone	R	Time for the conversion of (40) to (41), h	Yield of (41) (%)
37e	CH ₃ CH ₂ CH ₂	36.0 (40e)	30 (41e)
37f	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂	40.0 (40f)	36 (41f)
38g	(CH ₃) ₂ CBr	1.5 (40g)	36 (41g)
39h	CF ₃	1.0 (40h)	40 (41h)

The yields of the azidoisoxazoles (41e-h) were lower compared to the compounds (39a-d). This fact was ascribed to side reaction to form oligomeric products. It is likely that enolization of the ketones is responsible for this behavior. Another possibility is the high volatility of compounds (41e-h) that have low molecular weight. This fact made the isolation of azidoisoxazoles (41e-h) in pure form a difficulty task. In fact, it was not possible to isolate compound (41h) with good purity. Its formation was confirmed by trapping the azidoisoxazole, via strain promoted alkyne-azide cycloaddition (SPAAC) [13, 14], with cyclooctyne and forming adduct (42) (Scheme 6).



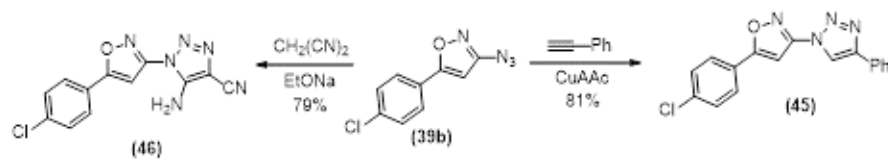
Scheme 6. Trapping reaction of compound (41h) with cyclooctyne.

The 3,3-diazidoenones can also react with cyclooctyne to afford 1,2,3-triazoles as exemplified in Scheme 7 for the reaction of divinyl ketone (38a) resulting in the bis-1,2,3-triazole (43) in 88% yield. When the reaction was warmed to promote the conversion of (38a) in azidoisoxazole (39a), subsequent addition of cyclooctyne resulted in the formation of (44) in 93% yield [12].



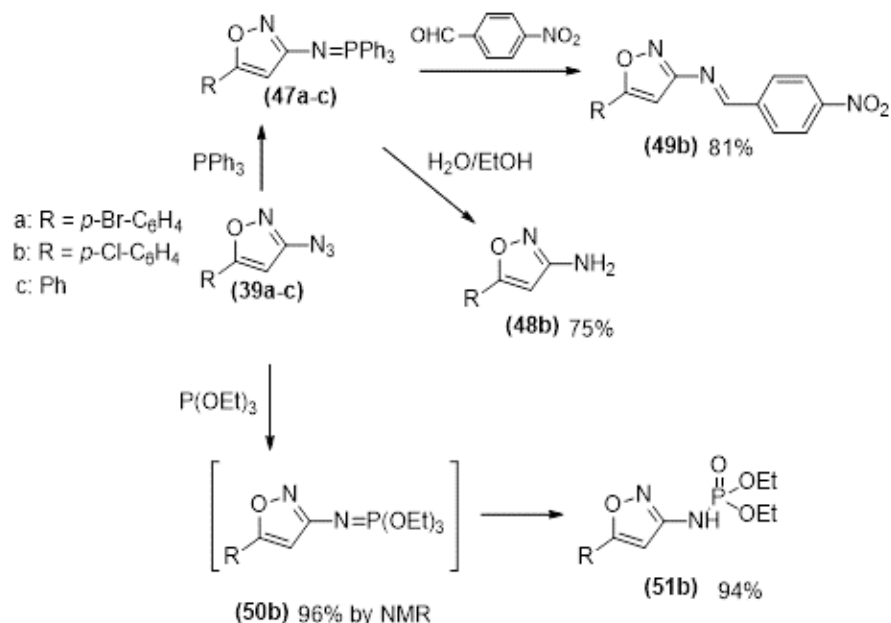
Scheme 7. Preparation of 1,2,3-triazoles from 3,3-diazidoenone (38a).

The azidoisoxazoles are synthetically useful compounds. They can be converted in 1,2,3-triazoles via CuAAC reactions (vide infra for a more detailed discussion regarding this reaction) as exemplified in Scheme 8 for the conversion of (39b) in compound (45). Compound (39b) was also converted in 1,4,5-tribstituted-1,2,3-triazole (46) by reacting it with malodinitrile and sodium etoxide.



Scheme 8. Conversion of isoxazole (39b) into compounds (45) and (46).

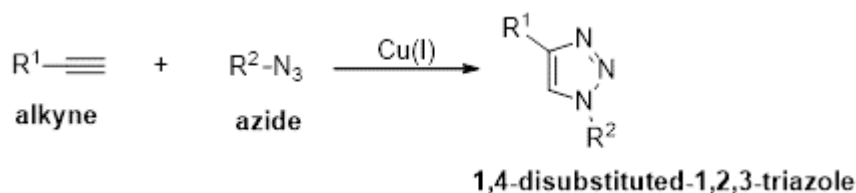
To further demonstrate their synthetic utility, azidoisoxazoles (39a-c) were converted in the phosphorous and nitrogen derivatives shown in Scheme 9.



Scheme 9. Conversion of azidoisoxazoles in nitrogen and phosphorus derivatives.

Bis-Azides and CuAAC Reaction

Azides have been widely used in the Copper(I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC), also known as click reaction [15-18]. In this transformation, an alkyne and an azide react to afford 1,4-disubstituted-1,2,3-triazole derivatives. The process is catalyzed by copper(I) species (Scheme 10).



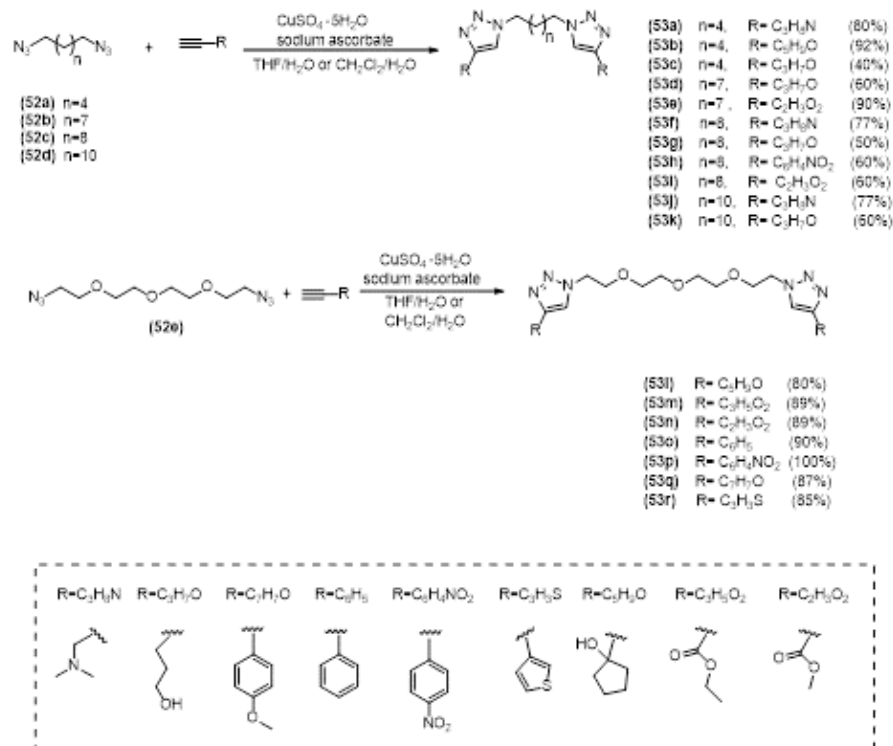
Scheme 10. General scheme of the CuAAC reaction.

This important transformation has found applications in the preparation of pharmaceuticals, agrochemicals, in material sciences, in carbohydrate chemistry, among others [19-28].

As expected, bis-azides can be engaged in CuAAC chemistry. The review by Abu-Orabi [29] shows several examples of the use of bis-azides in click chemistry.

More recently, Freitas and co-workers [30] synthesized a series of novel symmetric 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles via double CuAAC from aliphatic bis-azides (52a-d) and a tetraethylene glycol bis-azide derivative (52e). The eighteen derivatives (53a-53r) were

obtained with good to excellent yields (Scheme 11) and had their cytotoxicity evaluated *in vitro* against human breast adenocarcinoma (MDA-MB 231) and ovarian adenocarcinoma (TOV-21G).



Scheme 11. Synthesis of symmetrical 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles (53a-53r).

The MTT cytotoxic assay revealed that the most active compounds were (53j) and (53q). The latter was more active against MDA-MB 231 cell line comparable to the standard drug doxorubicin (used as positive control). It is important to mention that both compounds exhibited better selectivity index than the positive control (Table 4). The Selectivity Index (SI) of cytotoxicity was calculated based on the IC₅₀ values obtained for each compound as follows:

$$SI = IC_{50} Y / IC_{50} X,$$

where IC₅₀ X is the IC₅₀ value obtained for the MDA-MB 231 and TOV-21G cell lines and IC₅₀ Y is the IC₅₀ value obtained for WI-26VA4, the human non-tumor cell line used as a reference.

Table 4. Results of the cytotoxicity evaluation of compounds (53j) and (53q) against MDA-MB231 (human breast adenocarcinoma),

TOV-21G (ovarian adenocarcinoma), and WI-26VA

(non-tumor human cell line)

Compound	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) ± SD			Selective Index (SI)	
	MDA-MB 231	TOV-21G	WI-26VA	MDA-MB 231	TOV-21G
53j	28.83 ± 14.20	7.29 ± 3.63	69.36 ± 15.76	2.41	9.51
53q	5.07 ± 1.75	31.64 ± 9.40	24.03 ± 6.78	4.74	0.76
Doxorubicine	7.22 ± 0.77	3.68 ± 2.78	1.67 ± 1.73	0.23	0.45

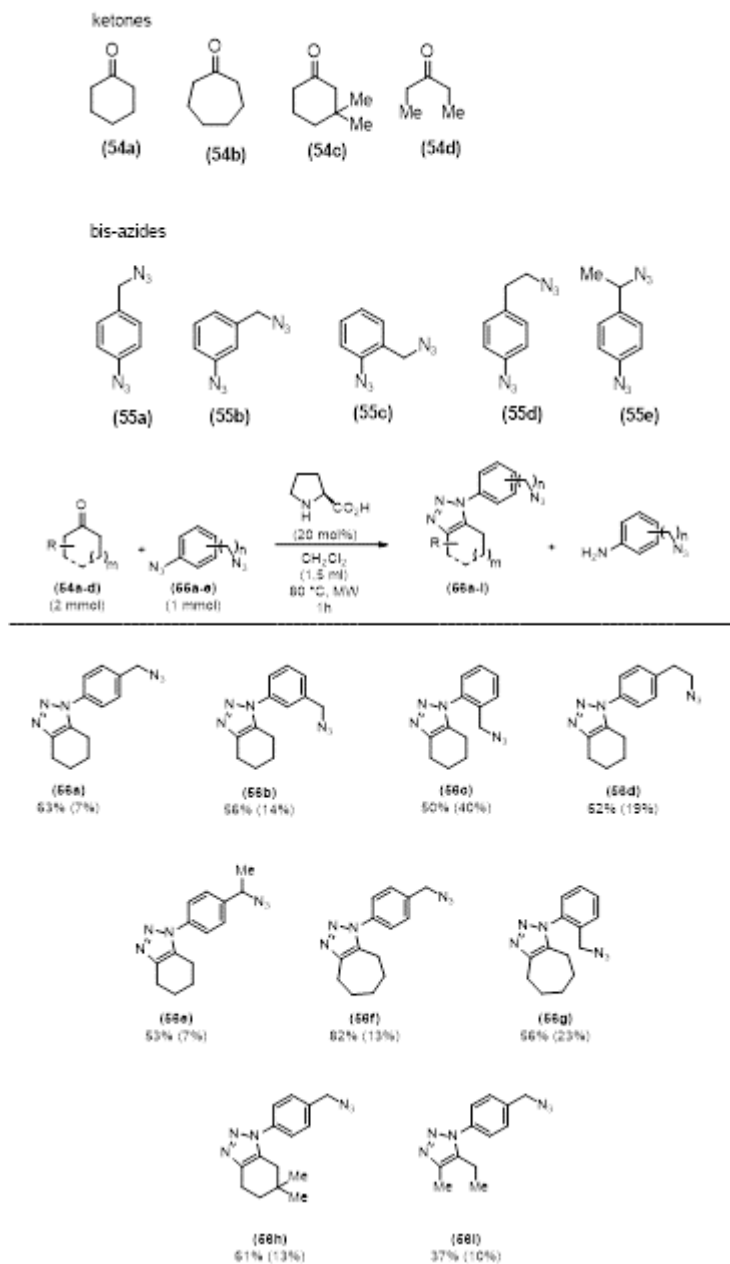
IC₅₀ = the compound concentration that reduced cell viability by 50%.

SD = standard deviation.

These compounds induced apoptosis in both tested cell lines, as assessed by BrdU assay. The findings suggested that these structurally simple compounds may be promising prototypes for antitumoral agents.

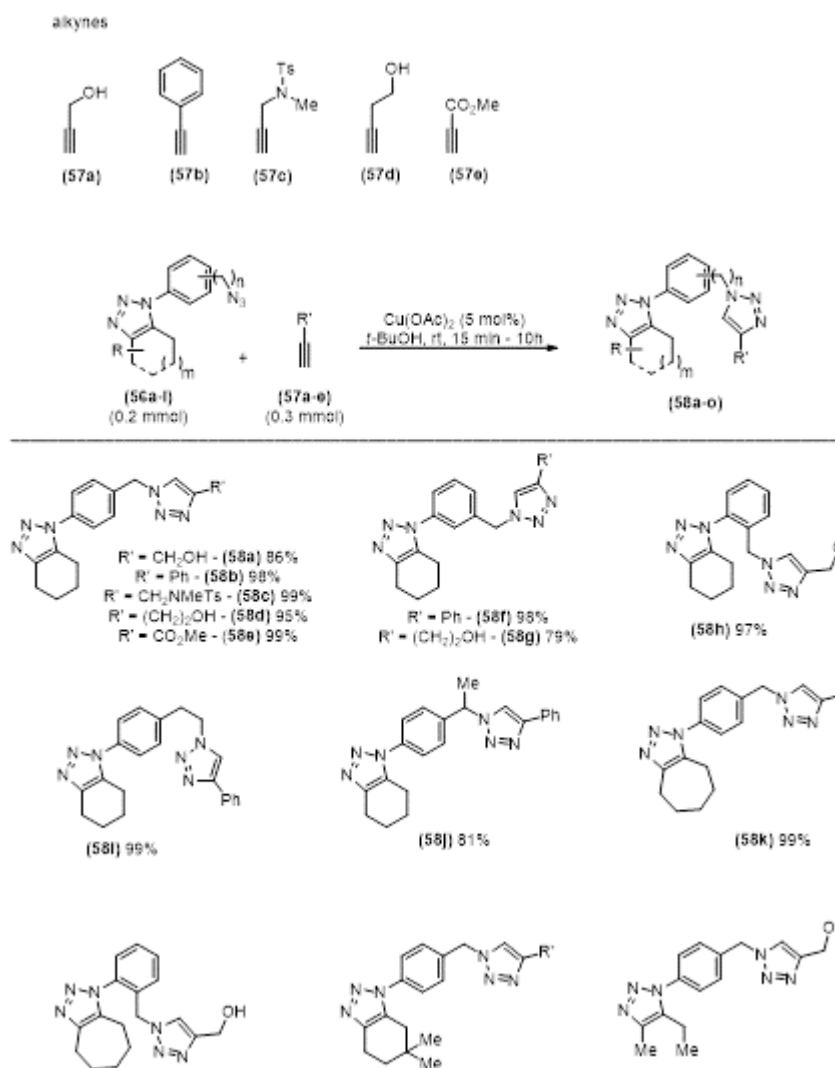
The synthetic strategy used for the preparation of compounds (53a-53r) has also been recently utilized by other researchers [31].

The synthesis of unsymmetrical bis-triazoles via organoclick-click sequence was examined by Bressy and co-workers [32]. The organoclick step combined a ketone and an unsymmetrical bis-azide in the presence of proline as the organocatalyst as shown in Scheme 12. This approach afforded the monotriazoles in moderate to good yields. It was noticed the formation of azidonilines resulting from a selective reduction of the aromatic azide function and the obtained yields for them are shown between parentheses in Scheme 12.



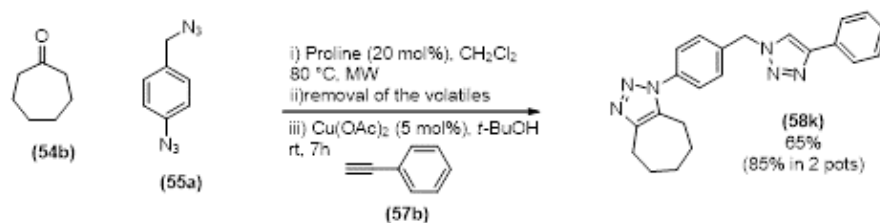
Scheme 12. Organoclick step of the organoclick-click sequence reported by Bressy and co-workers [32].

With the compounds (56a-i) in hands, they were submitted to CuAAC reaction (click chemistry) with different alkynes giving rise to the bis-triazoles (Scheme 13).



Scheme 13. Click step of the organoclick-click sequence reported by Bressy and co-workers [32].

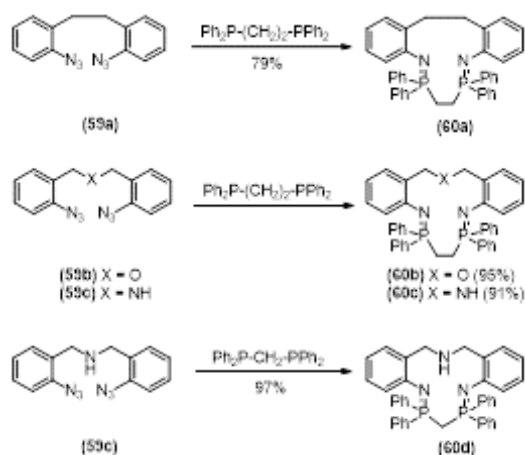
A one-pot procedure was also developed. In this case, the monoazide intermediate was not isolated (Scheme 14).



Scheme 14. One pot procedure for the preparation of bis-1,2,3-triazoles.

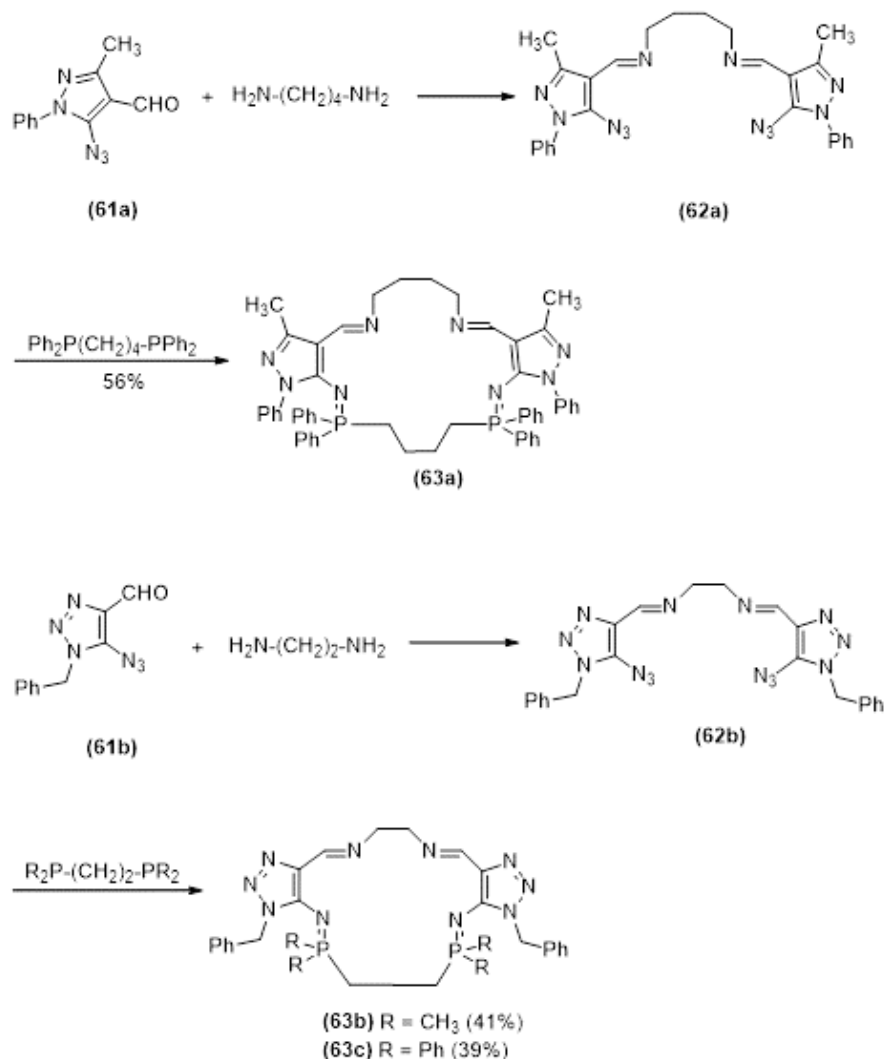
Synthesis of Functionalized Macrocycles

Macrocycles bis-iminophosphanes can be efficiently synthesized via Staudinger reaction between bis-azides and bis-phosphines as shown in Scheme 15 [33]. Thus, the bis-azide (59a) was converted in cyclic compound (60a) in 79% yield. The incorporation of heteroatoms in the chain connecting the aromatic rings did not decrease the yield of the cyclic products (preparation of compounds 60b-60d).



Scheme 15. Synthesis of functionalized macrocycles by means of reaction of bis-azides and bis-phosphines [33].

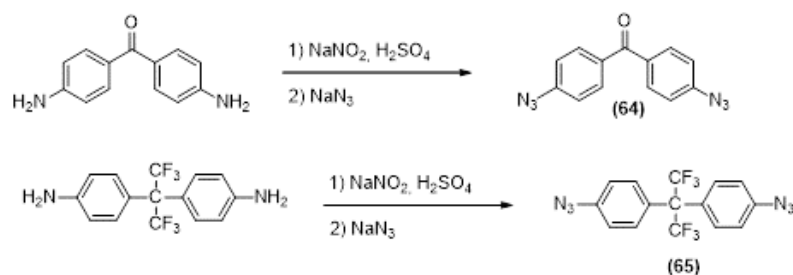
Variations of this reaction were developed (Scheme 16). Starting from aldehydes (61a-b), the imines (62a-b) were obtained and treated with bisphosphines affording the macrocycles (63a-c) with moderate yields.



Scheme 16. Synthesis of macrocycles (63a-c) via imine formation followed by Staudinger reaction [33].

Use of Bis-Azides in Polymer Chemistry

Poly(1-trimethylsilyl-1-propyne) [PTMSP] is a high free volume glassy polymer and presents extraordinary gas permeability. Cross-linkable films of PTMSP were obtained from toluene solutions composed of PTMSP and either 4,4-diazidobenzophenone (64) or 4,4'-(hexafluoroisopropylidene)diphenyl azide (65). The preparation of these bis-azides was accomplished via diazotization followed by treatment of the diazonium salt with sodium azide as shown in Scheme 17.



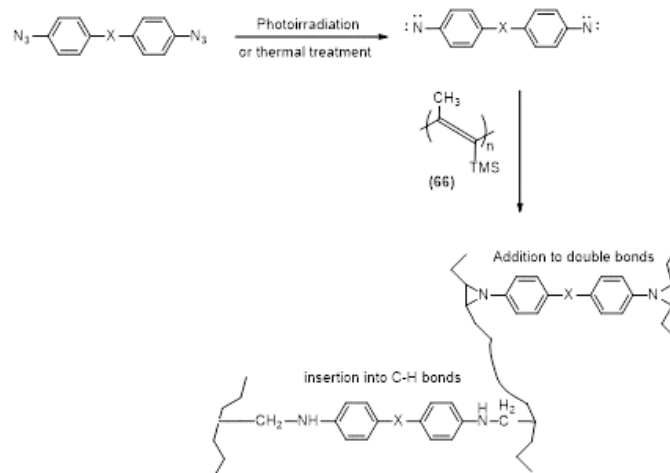
Scheme 17. Synthesis of bis-azides (64) and (65).

The films were cross-linked via UV-irradiation at room temperature or thermal annealing at 180 °C. The formation of the films can be understood considering that photoirradiation or thermal treatment of azides leads to the loss of nitrogen and the formation of nitrene. This, in turn, can add to double bonds of PTMSP (66) to give aziridines or insert into C-H bonds to give amines (Scheme 18).

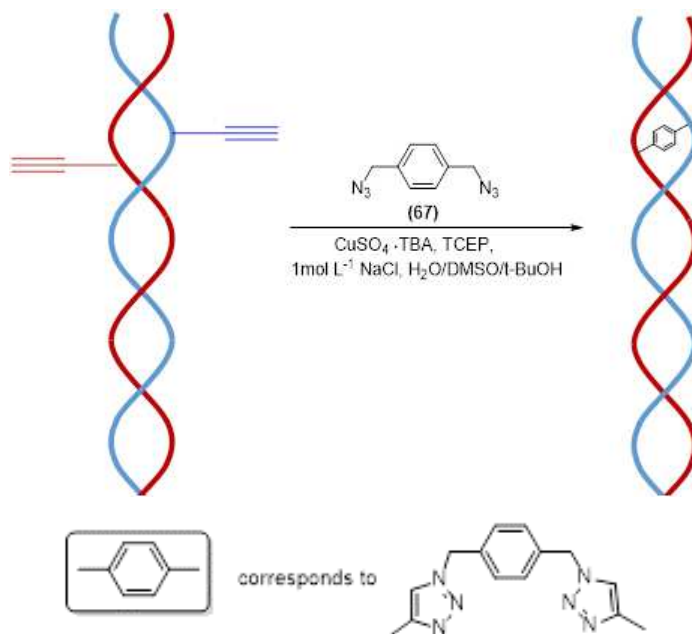
The cross-linked films were tested for the N₂ and O₂ gas permeability. It was found that the cross-linked polymers were less permeable than PTMSP (66) [34].

Preparation of Cross-Linked DNA

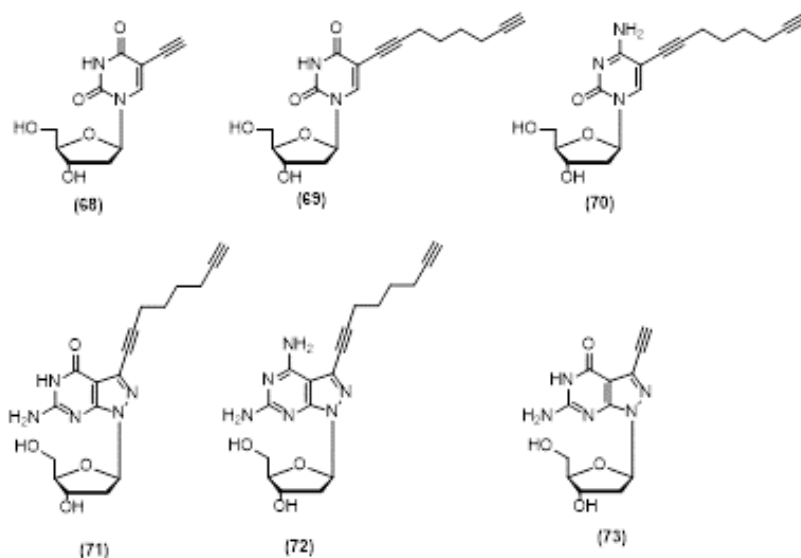
In this last section, it is pointed out that heterodimeric interstrand cross-linked DNA was obtained by Xiong and Seella [35]. Their approach involved a double-click reaction between preformed oligonucleotide duplexes and the bis azide (67) (Scheme 19).



Scheme 18. Formation of the cross-linked PTMSP films.



Scheme 19. Construction of heterodimeric interstrand cross-linked DNA via double-click reaction.



Scheme 20. Alkynylated nucleotides utilized in the preparation of oligonucleotide duplexes.

The structures of alkynylated nucleotides (68-73), used in the preparation of oligonucleotide duplexes, which were utilized in the double click-reaction, are shown in Scheme 20.

It was found that the stability of cross-linked DNA depends on the linker length and the site of modification. It was worth to mention that cross-linked DNA may be helpful in cancer therapy [36].

Concluding Remarks

This book chapter covered several reports showing the utility of bis-azides. The usefulness of this class of compounds was demonstrated in functional group interconversion, in polymer chemistry, in the preparation of macrocycles, and in the formation of biomolecules. So far, the bis-azides have been mainly applied in the CuAAC reaction (also known as click chemistry). There are other reports in the literature related to the use of bis-azides. However, as previously mentioned, it was not our intention to make an exhaustive discussion concerning bis-azides. Finally, it is possible to anticipate that many other applications of this class of versatile compounds will be described in the future.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgment

One of us (RRT) are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support.

References

- [1] Bräse, S., Banert, K. (Eds). (2010). *Organiz azides: Synthesis and applications*. John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, 507 pages.
- [2] Haase, J. (2010). *Large scale and usage of azides*. In: *Organiz azides – Synthesis and applications*. John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, 29-52.
- [3] Bräse, S., Gil, C., Knepper, K., & Zimmermann. (2005). Organic azides: an exploding diversity of a unique class of compounds. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 5188-5240.
- [4] Scriven, E. F. & Turnbull, K. (1988). Azides: Their preparation and synthetic uses. *Chemical Reviews*, 88, 297-368.
- [5] Tanimoto, H. & Kakiuchi, K. Recent applications and developments of organic azides in total synthesis of natural products. *Natural Product Communications*, 8, 1021-1034.
- [6] Heines, S. V. (1958). Peter Griess – Discoverer of diazo compounds. *Journal of Chemical Education*, 35, 187-191.
- [7] Yates, E. & Yates, A. (2016). Johann Peter Griess FRS (1829-88): Victorian brewer and synthetic dye chemist. *Notes and Records*, 70, 65-81.
- [8] Huisgen, R. & München. (2010). *Foreword*. In: *Organiz azides – Synthesis and applications*. John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, xiii-xv.
- [9] Kürti, L. & Czakó, B. (2005). *Strategic applications of named reactions in organic synthesis*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 116-117.

- [10] Otera, J. & Nishikido, J. (2010). *Esterification: Methods, reactions, and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Second Edition, Germany.
- [11] Dinesh, M., Archana, S., Ranganathan, R., Sathishkumar, M. & Ponnuswamy, A. (2015). Bis-azide-triphenylphosphine as a reagent for esterification at room temperature. *Tetrahedron*, *56*, 6975-6979.
- [12] Lemport, P. S., Smolyar, I. V., Khrustalev, V. N., Roznyatovsky, V. A., Popov, A. V., Kobelevskaya, V. A., Rozentsveig, I. B. & Nenajdenko, V. G. (2019). 3,3-diazidoenones – new types of highly reactive bis-azides. Preparation and synthetic transformations. *Organic Chemistry Frontiers*, *6*, 335-341.
- [13] Wittig, G. & Krebs, A. (1961). Zur existenz niedergliedriger cycloalane, I. *Chemische Berichte*, *94*, 3260-3275.
- [14] Sletten, E. M. & BERTOZZI, C. R. (2013). From mechanism to mouse: A tale of two bioorthogonal reactions. *Accounts of Chemical Research*, *44*, 666-676.
- [15] Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, *40*, 2004-2021.
- [16] Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3] triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry*, *67*, 3057-3064.
- [17] Meldal, M. & Tornøe. (2008). Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chemical Reviews*, *106*, 2952-3015.
- [18] de Oliveira Freitas, L. B., Ruela, F. A., Pereira, G. R., Alves, R. B. & Freitas, R. P. (2011). The “click” reaction in the synthesis of 1,2,3-triazoles: Chemical aspects and applications. *Química Nova*, *34*, 1791-1804.
- [19] Dheer, D., Singh, V. & Shankar, R. (2017). Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorganic Chemistry*, *71*, 30-54.
- [20] Tron, G. C., Pirali, T., Billington, R. A., Canonico, P. L., Sorba, G. & Genazzani, A. (2007). Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Medicinal Research Reviews*, *28*, 278-308.
- [21] Meghani, N. M., Amin, H. H. & Lee, B. -J. (2017). Mechanistic applications of click chemistry for pharmaceutical drug discovery and drug delivery. *Drug Discovery Today*, *22*, 1604-1619.
- [22] Borgati, T. F., Alves, R. B., Teixeira, R. R., Freitas, R. P., Perdigão, T. G., da Silva, S. F., dos Santos, A. A. & Bastidas, A. J. O. (2013). Synthesis and phytotoxicity activity of 1,2,3-triazole derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *24*, 953-961.
- [23] Xi, W., Scott, T. F., Klaxin, C. J. & Bowman, C. (2017). Click chemistry in materials science. *Advanced Functional Materials*, *24*, 2572-2590.
- [24] Kushwaha, D., Dwivedi, P., Kuanar, S. K. & Tiwari, V. K. (2013). Click reaction in carbohydrate chemistry: Recent developments and future perspective. *Current Organic Synthesis*, *2013*, 90-135.
- [25] Liang, L. & Astruc, D. (2011). The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, *255*, 2933-2945.
- [26] Tăbăcaru, A., Furdui, B., Ghinea, I. O., Cârâc, G. & Dinică, R. M. (2017). Recente advances in click chemistry reactions mediated by transition metal based systems. *Inorganica Chimica Acta*, *455*, 329-349.
- [27] Moses, J. E. & Moorhouse, A. D. (2007). The growing applications of click chemistry. *Chemistry Society Reviews*, *36*, 1249-1262.
- [28] Kolb, H. C. & Sharpless, K. B. (2003). The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, *8*, 1128-1137.
- [29] Abu-Orbai, S. T. (2002). 1,3-dipolar cycloaddition reactions of substituted benzyl azides with acetylenic compounds. *Molecules*, *7*, 302-314.

- [30] Reis, W. J., Moreira, P. O. L., Alves, R. B., Oliveira, H. H. M., Silva, L. M., Varotti, F. P., Freitas, R. P. (2018). Novel symmetrical 1,4-disubstituted-bis-1,2,3-triazoles: Synthesis by double CuAAC and cytotoxicity evaluation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *18*, 1475-1482.
- [31] Dügcdü, E., Ünlüer, D., Çelik, F., Sancak, K., Karaoğlu, S. A. & Özel, A. (2016). 1,2,3-bistriazole derivatives via 'click chemistry' and their biological evaluation. *Molecules*, *21*, 659, doi:10.3390/molecules21050659].
- [32] Belkheira, M., El Abed, D., Pons, J. -M. & Bressy, C. (2018). Chemoselective organoclick-click sequence. *Synthesis*, *50*, 4254-4262.
- [33] Molina, P., Arques, M. A. A., Sánchez-Andrada, P., Vidal A. & Vinader, M. V. (1997). Na eficiente preparation of macrocycles containing two tetra-coordinate phosphorus atoms. *Journal of Organometallic Chemistry*, *529*, 121-125.
- [34] Jia, J. & Baker, G. L. (1998). Cross-linking of poly[1-(trimethylsilyl)-1-propyne] membranes using bis (aryl azides). *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, *36*, 959-968.
- [35] Xiong, H. & Seela, F. (2012). Croos-linked DNAs: Site-selective "click" ligation in duplexes with bis-azides and stability changes caused by internal croos-links. *Bioconjugate Chemistry*, *23*, 1230-1243.
- [36] Carrette, L. L., Gyssels, E., De Laet, N. & Madder, A. (2016). Furan oxidation based croos-linking: a new approach for the study and targeting nucleic acid and protein interactions. *Chemical Communication*, *28*, 1539-1554.