

MICHELLE PEIXOTO RODRIGUES

**DIAMIDAS INSPIRADAS NO SRPIN 340 E ÉSTERES CINAMATOS: SÍNTESES E
PROSPECÇÃO DE BIOATIVIDADES**

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

Coorientador: Giovanni Wilson Amarante

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

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

T

R696d
2019

Rodrigues, Michelle Peixoto, 1990-
Diamidas inspiradas no SRPIN 340 e ésteres cinamatos :
sínteses e prospecção de bioatividades / Michelle Peixoto
Rodrigues. – Viçosa, MG, 2019.
500 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Róbson Ricardo Teixeira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Atividade biológica. 2. Ácido cinâmico. 3. Cinamatos.
4. Azalactonas. 5. Diamidas.
6. (N-[2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil) fenil]isonicotinamida.
7. Síntese orgânica. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547.042

MICHELLE PEIXOTO RODRIGUES

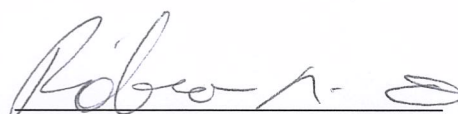
DIAMIDAS INSPIRADAS NO SRPIN 340 E ÉSTERES CINAMATOS: SÍNTESES E PROSPECÇÃO DE BIOATIVIDADES

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: 13 de dezembro de 2019.

Assentimento:


Michelle Peixoto Rodrigues
Autora


Róbson Ricardo Teixeira
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda a proteção e força.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

Ao meu orientador Róbson Ricardo Teixeira, pela amizade, carinho, paciência, pelos inúmeros ensinamentos, por toda a dedicação, entusiasmo, apoio, atenção e confiança no meu trabalho. Agradeço a compreensão pelas diversas vezes que foi necessário o meu afastamento por motivos de saúde.

Ao meu coorientador Giovanni Wilson Amarante, por todo o auxílio durante o desenvolvimento do meu projeto, por estar sempre disponível para tirar dúvidas mesmo estando em outra instituição.

Aos meus pais Carlos e Waldeth e ao meu irmão Marco Túlio, por todo o amor, carinho e incentivo. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, por me ajudarem com as minhas restrições alimentares, por todas as lágrimas enxugadas e pelos sorrisos compartilhados.

À Deborah, Poliana, Dayana, Ângela, Lorena, Maria Cecília, Livia e Ana Paula pela amizade, apoio e por tornarem esses anos de pós-graduação mais divertidos.

Aos integrantes do Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos (GSPCB), por todos os anos de troca de conhecimentos, pelo convívio agradável e momentos de descontração.

Aos médicos Fabrício Costa Bandeira, Virgínia Vinha Zanuncio e Flávio Augusto Barros Gilberti, por toda a atenção, dedicação e paciência.

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

***“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei
sobre ombros de gigantes”. (Isaac Newton)***

RESUMO

RODRIGUES, Michelle Peixoto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2019. **Diamidas inspiradas no SRPIN 340 e ésteres cinamatos: Sínteses e prospecção de bioatividades.** Orientador: Róbson Ricardo Teixeira. Coorientador: Giovanni Wilson Amarante.

Os derivados do ácido cinâmico assim como as amidas são classes de compostos que apresentam um amplo espectro de bioatividades, desempenhando papel importante na pesquisa e no desenvolvimento de novos compostos bioativos. O presente trabalho teve por objetivo sintetizar uma série de diamidas inspiradas no SRPIN 340 (*N*-[2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil) fenil]isonicotinamida), um inibidor ATP-competitivo, altamente seletivo na inibição de quinases SRPKs (SRPK1 e SRPK2, *serine arginine protein kinases*), bem como a síntese de uma série de ésteres cinamatos. As diamidas foram avaliadas com relação às suas atividades antitumoral, inseticida, tripanocida e leishmanicida. Com respeito aos ésteres cinamatos, foram investigados o efeito protetor em ensaio de desequilíbrio redox induzido por H₂O₂ em células de glioma, a atividade antitumoral e antimetastática frente às células B16F10. As reações chaves envolvidas na obtenção desses compostos consistiram nas reações de abertura do anel azalactônico por anilinas, catalisadas pelo (±)-ácido canforsulfônico, no caso das diamidas e na reação de esterificação de Steglich para os cinamatos. Os compostos sintetizados foram caracterizados via espectroscopia no IV, espectroscopia de RMN de ¹H e de ¹³C e espectrometria de massas de alta resolução. As vinte e duas diamidas sintetizadas **9a-9k** e **10a-10k** foram avaliadas em relação aos seus efeitos citotóxicos contra as linhagens celulares HeLa e HepG2. Os resultados mostraram que sete delas (**10a**, **10f**, **10g**, **10h**, **10i**, **10j**, **10k**) foram capazes de reduzir a viabilidade celular em mais de 80% na concentração de 100 µmol L⁻¹. Porém, estas sete amidas também apresentaram citotoxicidade para a linhagem não tumoral HEK293. Os compostos **10f** e **10g** foram aqueles que apresentaram menores efeitos citotóxicos contra a linhagem não tumoral. Considerando a avaliação da atividade citotóxica dos cinamatos **13a-13r** contra as células B16-F10, foi observado que o composto **13q** foi capaz de inibir a viabilidade celular em aproximadamente 60%, apresentado valor de IC₅₀ = 60,28 µmol L⁻¹. Também foram realizados testes de viabilidade celular de células Vero após tratamento com ácido cinâmico e os cinamatos **13a-13r**. Os

resultados demonstraram que para o composto mais ativo, **13q**, a viabilidade celular foi superior a 80% na menor concentração avaliada (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). No ensaio de migração celular, os ésteres **13l**, **13p** e **13q** demonstraram potencial em reduzir o processo de migração celular. No ensaio de investigação da atividade leishmanicida das diamidas foi observado que, de modo geral, os compostos foram menos citotóxicos em relação ao fármaco comercial anfotericina B. Já em comparação ao SRPIN 340, os compostos **9d** e **9e** mostraram efeito superior em promastigotas de *L. braziliensis*; porém estes também foram tóxicos frente aos macrófagos. A avaliação da atividade inseticida das diamidas demonstrou que estes possuem baixa toxicidade para as moscas de *Drosophila suzukii* em relação ao produto comercial utilizado como controle positivo (imidacloprida). No ensaio de avaliação da atividade tripanocida das diamidas inspiradas no SRPIN 340 observou-se que o composto **9j** em ensaio *in vitro* exibiu valores de IC_{50} promissores, sendo considerado um excelente candidato para avaliação de atividade anti-*T. cruzi* *in vivo*, uma vez que possui índice de seletividade igual a 74,4. Os cinamatos **13a**, **13b**, **13c** e **13f** em ensaio de desequilíbrio redox induzido por H_2O_2 mostraram atividade protetora em células de glioma, sendo capazes de melhorar a viabilidade das células U87. Desta forma, observa-se que o presente trabalho culminou na síntese de compostos biologicamente ativos que podem ser utilizados como estruturas modelos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diferentes doenças. Embora a atividade inseticida contra *D. Suzuki* tenha sido não satisfatória, vislumbra-se que modificações nas estruturas das diamidas possam potencializar seus efeitos inseticidas.

Palavras-chave: Síntese orgânica. SRPIN 340. Diamidas. Azalactonas. Ácido cinâmico. Cinamatos. Bioatividades.

ABSTRACT

RODRIGUES, Michelle Peixoto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2019. **SRPIN 340-inspired diamides and cinnamates esters: Synthesis and prospection of bioactivities**. Adviser: Róbson Ricardo Teixeira. Co-adviser: Giovanni Wilson Amarante.

Cinnamic acid derivatives and amides are important classes of compounds that have a broad spectrum of bioactivities. These substances play an important role in the research and development of new bioactive compounds. In the present investigation, a series of diamides and esters cinnamates were synthesized. The diamides were inspired on the SRPIN 340 (also known as *N*-[2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl) phenyl] isonicotinamide), a highly selective ATP-competitive inhibitor of SRPKs kinases (SRPK1 and SRPK2, *serine arginine protein kinases*). The diamides were evaluated for their antitumor, insecticidal, trypanocidal and leishmanicidal activities. The ester cinnamates, in turn, were assessed concerning their protective effects on hydrogen peroxide-mediated redox imbalance in glioma cells, antitumor activity, and antimetastatic against B16F10 cells. The key reactions involved in the preparation of these compounds consisted of Brønsted acid-catalyzed azlactone ring-opening, in the case of diamides, and the Steglich esterification reaction for cinnamates. The synthesized compounds were characterized by IR spectroscopy, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, and high-resolution mass spectrometry. Twenty-two synthesized diamides **9a-9k** and **10a-10k** were evaluated for their cytotoxic effects against HeLa and HepG2 cell lines. The results showed that seven of them (**10a**, **10f**, **10g**, **10h**, **10i**, **10j**, **10k**) were able to reduce cell viability by more than 80% at $100\ \mu\text{mol L}^{-1}$. However, these seven amides also showed cytotoxicity on the non-tumor lineage HEK293. Compounds **10f** and **10g** were those with the lowest cytotoxic effects against non-tumor lineage. Considering cytotoxic activity evaluation of cinnamates **13a-13r** against B16-F10 cells, it was observed that compound **13q** was able to inhibit cell viability by approximately 60%, $\text{IC}_{50} = 60,28\ \mu\text{mol L}^{-1}$. Vero cell viability was also investigated after treatment with cinnamic acid and cinnamates **13a-13r**. The results showed that for the most active compound **13q**, cell viability was higher than 80% at the lowest concentration evaluated ($100\ \mu\text{mol L}^{-1}$). In the cell migration assay, esters **13l**, **13p**, and **13q** demonstrated the potential to reduce cell migration. In the leishmanicidal activity assay of diamides, it was noticed that, in

general, the compounds were less cytotoxic compared to the commercial drug amphotericin B. In comparison to SRPIN 340, compounds **9d** and **9e** showed superior effect against *Leishmania braziliensis* promastigotes; however, they were also toxic to macrophages. The evaluation of the insecticidal activity of diamides showed that they have low toxicity to *Drosophila suzukii* flies in comparison to the commercial product imidaclopride. In the trypanocidal activity assay of SRPIN 340-inspired diamides, it was observed that compound **9j**, *in vitro*, showed promising IC₅₀ values and a selective index of 74,4 and it is considered an excellent candidate for evaluation of anti-*T.cruzi* activity *in vivo*. Cinnamates **13a**, **13b**, **13c** and **13f** in H₂O₂-induced redox imbalance assay showed protective activity on glioma cells, being able to improve the viability of U87 cells. Thus, it is observed that the present work culminated in the synthesis of biologically active compounds that can be used as lead compounds for the development of new drugs for the treatment of different diseases. Although the insecticidal activity against *D. Suzuki* was unsatisfactory, it is expected that changes in the diamide structures may potentiate its insecticidal effects.

Keywords: Organic synthesis. SRPIN 340. Diamides. Azlactones. Cinnamic acid. Cinnamates. Bioactivities.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 - Estrutura do paclitaxel e da 10-desacetilbacatina-III	20
Figura 1.2 - Estrutura do ácido cinâmico	22
Figura 1.3 - Estruturas de derivados do ácido cinâmico	23
Figura 1.4 - Estrutura dos cinamatos cafeato de benzila, cafeato de fenetila e cafeato de cinamila	23
Figura 1.5 - Estrutura dos compostos <i>N</i> -acil-2-ariletilaminas e <i>N</i> -acil-3-coumarilaminas, e dos fármacos metformina e glibenclamida	24
Figura 1.6 - Estrutura de alguns fármacos e agroquímicos que contém o grupo amida	26
Figura 1.7 - Estrutura do derivado do ácido cinâmico contendo o núcleo 1,2,3-triazólico que apresentou atividade antimetastática (LIMA <i>et al.</i> , 2018)	29
Figura 1.8 - Estruturas do SRPIN340 e SRPIN340#17	29
Figura 1.9 - Estrutura geral dos cinamatos e das diamidas sintetizadas	30

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 - Estrutura geral das azalactonas	38
Figura 2.2 - Representação dos sítios eletrofílicos e pró-nucleofílico das azalactonas	39
Figura 2.3 - Estruturas das diamidas sintetizadas	42
Figura 2.4 - Estruturas dos derivados do ácido cinâmico sintetizados	43
Figura 2.5 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 3b	116
Figura 2.6 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 3b	117
Figura 2.7 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 3b	118
Figura 2.8 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 4b	120
Figura 2.9 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 4b	121
Figura 2.10 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 4b	122
Figura 2.11 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 7a	126
Figura 2.12 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 7a	127
Figura 2.13 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 7a	128
Figura 2.14 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 8a	131
Figura 2.15 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 8a	132
Figura 2.16 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 9h	136
Figura 2.17 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 9h	137
Figura 2.18 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 9h	138
Figura 2.19 - Espectro de massas de alta resolução do composto 9h	139
Figura 2.20 - Unidade assimétrica do composto 9h	141
Figura 2.21 - Cadeia unidimensional formada no empacotamento cristalino do composto 9h	142
Figura 2.22 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 13h	153
Figura 2.23 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 13h	154
Figura 2.24 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 13h	155

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 - Estrutural geral dos derivados do ácido cinâmico que foram sintetizados e do composto mais ativo que apresentou atividade antimetastática (LIMA <i>et al.</i> , 2018)	164
Figura 3.2 - Viabilidade das células B16-F10 após tratamento com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do ácido cinâmico e dos ésteres cinamatos por 48 h. AC: ácido cinâmico	170
Figura 3.3 - Derivados do ácido cinâmico que exibiram as menores porcentagens de viabilidade celular frente à linhagem celular B16-F10	171
Figura 3.4 - Valores de IC_{50} e do coeficiente de determinação (R^2) para os derivados do ácido cinâmico mais ativos nos ensaios de avaliação da viabilidade celular frente às células B16-F10	171
Figura 3.5 - Viabilidade das células Vero após tratamento com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do ácido cinâmico e dos ésteres cinamatos por 48 h. AC: ácido cinâmico	172
Figura 3.6 - Migração celular de células B16-F10 após tratamento com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do ácido cinâmico e dos ésteres cinamatos por 24 h. AC: ácido cinâmico	173
Figura 3.7 - Diamidas mais efetivas em inibir o crescimento das células HeLa e HepG2	175

CAPÍTULO 4

Figura 4.1 - Formas clínicas da leishmaniose humana	181
Figura 4.2 - Estruturas dos quimioterápicos utilizados no tratamento da leishmaniose	183
Figura 4.3 - Estruturas dos peptídeos (diamidas) que apresentaram os maiores valores de porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas contra <i>L. amazonenses</i>	184
Figura 4.4 - Estruturas dos SRPIN340#9 e do SRPIN340#19	185
Figura 4.5 - Efeito dos compostos SRPIN340#9 (denominado 9) e SRPIN340#19 (denominado 19) isolados e combinados. A) Porcentagem de macrófagos infectados e B) Número de amastigotas para cada 100 células (TEIXEIRA, 2018)	186
Figura 4.6 - Análise do efeito dos compostos na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contra macrófagos RAW 264.7	189
Figura 4.7 - Análise do efeito dos compostos na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contra promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	190

CAPÍTULO 5

Figura 5.1 - Fêmea e macho de <i>Drosophila suzukii</i> , respectivamente	195
Figura 5.2 - Estrutura dos inseticidas comerciais flubendiamida (diamida ftálica), clorantraniliprole e ciantraniliprole (diamidas antranílicas). Nas estruturas dos inseticidas estão destacadas as porções derivadas do ácido ftálico (em vermelho na estrutura da flubendiamida) e do ácido antranílico (em azul nas estruturas do clorantraniliprole e ciantraniliprole). As estruturas dos ácidos o-ftálico e o-antranílico também são apresentadas	197
Figura 5.3 - Estrutura das diamidas antranílicas sintetizadas por Liu e colaboradores (2019)	198
Figura 5.4 - Estrutura do composto mais ativo na menor concentração avaliada contra <i>Plutella xylostella</i> conforme descrito por Feng e colaboradores (2011)	199

Figura 5.5 - Mortalidades de adultos de *Drosophila suzukii* em bioensaio de ingestão/contato por 24h de exposição. Insetos considerados mortos quando não conseguiam se locomover duas vezes a distância do próprio corpo após estímulo. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. C- = controle negativo (solução aquosa 20% m v⁻¹ de açúcar e 5% v v⁻¹ de DMSO). C+ = controle positivo (imidacloprida) **200**

CAPÍTULO 6

Figura 6.1 - Doença de Chagas: (a) agente etiológico, o parasito *T. cruzi*; (b) barbeiro, o inseto vetor; (c) transmissão por vetor; (d) transmissão de mãe para filho; (e) transmissão por transfusões de sangue ou transplantes de órgãos sem o devido controle; (f) transmissão por ingestão oral de alimentos contaminados **205**
 Figura 6.2 - Estruturas dos fármacos Benzonidazol e Nifurtimox **206**
 Figura 6.3 - Estrutura do derivado tiazólico **k** contendo o grupamento amida que apresentou eficácia contra *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (ÁLVAREZ *et al.*, 2015) **207**
 Figura 6.4 - Estruturas das diamidas inspiradas no SRPIN340 que mostraram maior ação tripanocida **213**

CAPÍTULO 7

Figura 7.1 - Estrutura do derivado do ácido cinâmico (**m**) que exibiu atividade contra as linhagens HBMEC-2 e SH-SY5Y em ensaio de lesão induzida por H₂O₂ descrita por Zhang *et al.*, 2019 **221**
 Figura 7.2 - Estrutura do ácido ferúlico **221**
 Figura 7.3 - Estrutura do ácido caféico **222**
 Figura 7.4 - Viabilidade das células U87 após tratamento com 50 µmol L⁻¹ dos ésteres cinamatos **223**
 Figura 7.5 - Viabilidade das células U87 após tratamento com 100 µmol L⁻¹ dos ésteres cinamatos **223**
 Figura 7.6 - Viabilidade das células U87 após tratamento com 150 µmol L⁻¹ dos ésteres cinamatos **224**
 Figura 7.7 - Viabilidade das células 3T3 após tratamento com 50 µmol L⁻¹ dos ésteres cinamatos **225**
 Figura 7.8 - Viabilidade das células 3T3 após tratamento com 100 µmol L⁻¹ dos ésteres cinamatos **225**
 Figura 7.9 - Viabilidade das células 3T3 após tratamento com 150 µmol L⁻¹ dos ésteres cinamatos **226**
 Figura 7.10 - Viabilidade celular após as células U87 serem pré-tratadas com os cinamatos **13a-13j** na concentração de 50 µmol L⁻¹ por 2 h. Em seguida, foi adicionado H₂O₂ 100 µmol L⁻¹ por 3 h. C+ = DMSO + H₂O₂, C- = DMSO **227**
 Figura 7.11 - Viabilidade celular após as células U87 serem pré-tratadas com os cinamatos **13a-13c**, **13f-13h** e **13j** na concentração de 100 µmol L⁻¹ por 2 h. Em seguida, foi adicionado H₂O₂ 100 µmol L⁻¹ por 3 h. C+ = DMSO + H₂O₂, C- = DMSO **227**
 Figura 7.12 - Viabilidade celular após as células U87 serem pré-tratadas com os cinamatos **13a-13c**, **13f-13g** e **13j** na concentração de 150 µmol L⁻¹ por 2 h. Em seguida, foi adicionado H₂O₂ 100 µmol L⁻¹ por 3 h. C+ = DMSO + H₂O₂, C- = DMSO **228**

LISTA DE ESQUEMAS

CAPÍTULO 2

Esquema 2.1 - Exemplo geral da esterificação de Fischer	40
Esquema 2.2 - Exemplo de reação de Mitsunobu	40
Esquema 2.3 - Exemplo de S_N2 com haletos	41
Esquema 2.4 - Exemplo geral da reação de esterificação de Steglich	41
Esquema 2.5 - Etapas envolvidas na preparação das anilinas 4a-4k	113
Esquema 2.6 - Proposta de mecanismo para a obtenção dos compostos 3a-3k usando-se a piperidina como exemplo	114
Esquema 2.7 - Etapas envolvidas na preparação dos aminoácidos benzoilados 7a e 7b	123
Esquema 2.8 - Proposta de mecanismo que explica a obtenção dos aminoácidos benzoilados 7a e 7b	123
Esquema 2.9 - Reação envolvida na preparação das azalactonas 8a e 8b	129
Esquema 2.10 - Proposta de mecanismo que explica a obtenção das azalactonas 8a e 8b	129
Esquema 2.11 - Rota sintética empregada na preparação das diamidas	133
Esquema 2.12 - Ciclo catalítico proposto para a ativação das azalactonas seguida por um ataque nucleofílico	134
Esquema 2.13 - Proposta de síntese para os ésteres cinamatos contendo o anel azalactônico	148
Esquema 2.14 - Síntese de ésteres cinamatos por meio da reação de Steglich	148
Esquema 2.15 - Proposta mecanística para a obtenção do composto 13a	149
Esquema 2.16 - Conversão da <i>O</i> -acil-isoureia em <i>N</i> -acil-isoureia em reações lentas na ausência de DMAP	150
Esquema 2.17 - Condições de reação que foram utilizadas na tentativa de síntese dos cinamatos contendo o anel azalactônico via adição do tipo Michael	156

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 - Estrutura geral das diamidas avaliadas por Aliabadi e colaboradores (2010) e valores de IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) dos compostos mais ativos.....	27
Tabela 1.2 - Atividade antiproliferativa das amidas sintetizadas por Vitorovic-Todorovic e colaboradores (2013)	28

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 - Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos compostos 3a-3k	47
Tabela 2.2 - Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos compostos 4a-4k	58
Tabela 2.3 - Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos compostos 7a e 7b	67
Tabela 2.4 - Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos compostos 8a e 8b	70
Tabela 2.5 - Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos compostos 9a-9k e 10a-10k	73
Tabela 2.6 - Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos cinamatos 13a-13p	98
Tabela 2.7 - Constantes de celeridade e determinação estrutural da substância 9h determinada por DRXM	143
Tabela 2.8 - Comprimentos de ligação (Å) para 9h determinada por DRXM	144
Tabela 2.9 - Ângulos de ligação (°) da substância 9h determinada por DRXM	145
Tabela 2.10 - Ângulos torsionais (°) da substância 9h determinada por DRXM	146

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 - Valores de IC ₅₀ para as linhagens celulares HL60, Jurkat e Nalm6 do SRPIN340 e dos três derivados mais ativos	166
Tabela 3.2 - Viabilidade (%) das células cancerígenas HeLa e HepG2, após 48 horas de exposição às diamidas e ao SRPIN 340 (média±desvio padrão)	173
Tabela 3.3 - Viabilidade (%) da célula não tumoral da linhagem HEK293, após 48 horas de exposição aos compostos derivados do SRPIN340 (média±desvio padrão)	176

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 - Valores de IC ₅₀ obtidos após incubação por 48 h	184
Tabela 4.2 - Valores de IC ₅₀ das amidas SRPIN340#9 e SRPIN340#19	185

CAPÍTULO 6

Tabela 6.1 - Valores de IC ₅₀ do composto mais ativo (I) e do fármaco comercial benzonidazol avaliados contra formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	208
--	-----

Tabela 6.2 - Resultados da avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> em células L929 infectadas com cepa Tulahuen transfectada com β -galactosidase, citotoxicidade em células L929 e índice de seletividade	211
--	------------

LISTA DE ABREVIATURAS

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
$\text{DMSO-}d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
J	Constante de acoplamento escalar
CCD	Cromatografia em camada delgada
DCC	<i>N,N</i> -dicicloexilcarbodiimida
DMAP	4- <i>N,N'</i> -dimetilaminopiridina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ACS	($\pm$)-ácido canforsulfônico
s	Simpleto
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
t	Tripleto
q	Quarteto
t_{ap}	Tripleto aparente
d_{ap}	Dupleto aparente
q_{ap}	Quarteto aparente
dl	Dupleto largo
sl	Simpleto largo
m	Multipleto
δ	Deslocamento químico
Hz	Hertz
t.a.	Temperatura ambiente
T_f	Temperatura de fusão
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
R_f	Fator de retenção
MHz	Megahertz
P. A.	Para análise
v/v	Volume/volume
Å	Angström

DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
ppm	Partes por milhão
DRMX	Difração de raios X de monocristal
DHU	Dicicloexiluréia
DMF	Dimetilformamida
SRPKs	<i>Serine arginine protein kinases</i>
Bn	Benzil
ERO	Espécies reativas do oxigênio

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO	19
1.1 - PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS	19
1.2 - ÁCIDO CINÂMICO COMO UMA PLATAFORMA PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	21
1.3 - AMIDAS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	24
1.4 - JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO	28
1.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

CAPÍTULO 2

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES CINAMATOS E DAS DIAMIDAS	37
2.1 - ORGANOCATÁLISE	37
2.2 - AZALACTONAS E SUA IMPORTÂNCIA SINTÉTICA	38
2.3 - CONSIDERAÇÕES SOBRE METODOLOGIAS SINTÉTICAS PARA A OBTENÇÃO DE ÉSTERES	39
2.4 - MATERIAL E MÉTODOS	44
2.4.1 - Generalidades Metodológicas	44
2.4.2 - Procedimentos sintéticos	45
2.4.2.1 - Síntese da <i>N</i> -(4-bromofenil)-2-nitro-4-(trifluorometil)anilina	45
2.4.2.2 - Síntese da <i>N</i> -4-(bromofenil)-4-(trifluorometil)benzeno-1,2-diamina	56
2.4.2.3 - Síntese do ácido 2-benzamido-3-fenilpropanóico	65
2.4.2.4 - Síntese do 4-benzil-2-feniloxazol-5(4 <i>H</i>)-ona	68
2.4.2.5 - Síntese da <i>N</i> -(1-((2-((4-bromofenil)amino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)benzamida	71
2.4.2.6 - Síntese do cinamato de benzila	96
2.4.3 - Difração de raios X por monocristal (DRXM)	111
2.5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
2.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DAS DIAMIDAS E DOS ÉSTERES CINAMATOS E INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIMETASTÁTICO DOS CINAMATOS.....	161
3.1 - INTRODUÇÃO	161
3.2 - MATERIAL E MÉTODOS	167
3.2.1 - Metodologia utilizada nos bioensaios envolvendo os ésteres derivados do ácido cinâmico	167
3.2.1.1 - Linhagens celulares e cultura celular	167
3.2.1.2 - Ensaio de avaliação de citotoxicidade	167
3.2.1.3 - Ensaio de avaliação de viabilidade celular	167
3.2.1.4 - Ensaio de migração celular (<i>wound healing</i>)	168
3.2.2 - Metodologia utilizada no ensaio de avaliação da citotoxicidade das diamidas 9a-9k e 10a-10k	168
3.2.2.1 - Linhagens celulares e cultura celular	168
3.2.2.2 - Ensaio de Viabilidade Celular	169
3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	169
3.3.1 - Avaliação de bioatividades dos cinamatos	169

3.3.2 - Avaliação da citotoxicidade das diamidas	173
3.4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS DIAMIDAS INSPIRADAS NO SRPIN340	180
4.1 - INTRODUÇÃO	180
4.2 - MATERIAL E MÉTODOS	186
4.2.1 - Determinação da Viabilidade Celular	186
4.2.2 - Obtenção dos macrófagos e avaliação da citotoxicidade	187
4.2.3 - Manutenção dos parasitos	188
4.2.4 - Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	188
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	189
4.4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	190

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DAS DIAMIDAS	194
5.1 - INTRODUÇÃO	194
5.2 - MATERIAL E MÉTODOS	199
5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	200
5.4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	201

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DAS DIAMIDAS INSPIRADAS NO SRPIN340	204
6.1 - INTRODUÇÃO	204
6.2 - MATERIAL E MÉTODOS	208
6.2.1 - Ensaio com <i>T. cruzi</i> transfectado com β -galactosidase	208
6.2.2 - Avaliação de citotoxicidade	209
6.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	210
6.4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	214

CAPÍTULO 7

EFEITO PROTETOR DOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO NO DESEQUILÍBRIO REDOX INDUZIDO POR H ₂ O ₂ EM CÉLULAS DE GLIOMA	218
7.1 - INTRODUÇÃO	218
7.2 - MATERIAL E MÉTODOS	222
7.2.1 - Ensaio de avaliação de citotoxicidade	222
7.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	223
7.4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	229

CONSIDERAÇÕES FINAIS	232
----------------------------	-----

PERSPECTIVAS	234
--------------------	-----

ANEXO I	235
---------------	-----

ANEXO II	316
----------------	-----

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO

1.1 PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

As diversas espécies de plantas, animais, microorganismos e organismos marinhos biossintetizam uma enorme variedade de compostos orgânicos (por exemplo, ácidos graxos, alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides, dentre outros) conhecidos como metabólitos secundários. Eles consistem em uma importante fonte de substâncias que vêm desempenhando papel vital no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (LI e LOU, 2017; GUO, 2017).

Desde tempos imemoriais, as propriedades terapêuticas das plantas são conhecidas. Misturas ou extratos concentrados de plantas eram utilizados pelo homem como forma de aliviar sintomas e tratar doenças que o acometem (THOMFORD *et al.*, 2018). Por exemplo, no Antigo Egito o alho era utilizado no tratamento de distúrbios cardíacos e circulatórios e dores eram tratadas com mandrágora (*Mandragora officinarum*) (FARAG *et al.*, 2015). Na história da Mesopotâmia é relatado o uso de óleos das plantas medicinais *Commiphora myrrha* e *Cedrus sp*, sendo essas ainda hoje utilizadas para tratar tosse, resfriados e inflamações (VALLI *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2012). Também existem registros do uso da maconha (*Cannabis sativa*), babosa (*Aloe vera*) e outras plantas para o tratamento de diversas doenças (CALIXTO e SIQUEIRA JR, 2008).

Os princípios ativos presentes nas plantas medicinais, e responsáveis pela atividade farmacológica, não eram conhecidos até o século XIX, quando os químicos buscaram desenvolver métodos para purificar e isolar estes princípios ativos. O primeiro registro de um composto isolado de uma planta corresponde à morfina, isolada por Friedrich Serturnern em 1806 a partir da papoula (*Papaver somniferum*). Posteriormente, foram relatados o isolamento de diversas outras substâncias como, quinina, atropina, cafeína, ácido acetilsalicílico, dentre outros (DIAS *et al.*, 2012; ATANASOV *et al.*, 2015).

Alguns compostos presentes na natureza podem ser utilizados diretamente como fármacos; já outros necessitam de modificações estruturais a fim de favorecer sua absorção e distribuição no organismo humano e até mesmo para potencializar o

seu efeito. Em alguns casos o isolamento de um composto ativo de sua fonte natural torna-se inviável, devido à baixa quantidade que se consegue extrair da planta. Este é o caso, por exemplo, do paclitaxel (Taxol[®], Ontax[®]) (Figura 1.1), um fármaco que possui atividade contra o câncer de mama e leucemia. O paclitaxel pode ser extraído da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*). Para se extrair 1 kg de paclitaxel, são necessários 10 toneladas de cascas de *T. brevifolia*, o que representa cerca de 3000 árvores. Essa quantidade de paclitaxel é suficiente para tratar apenas 500 pacientes durante um ano. Levando-se em conta a elevada incidência do câncer, essa quantidade é obviamente insuficiente para atender a demanda terapêutica. Considerando que *T. brevifolia* possui crescimento bastante lento (a espécie leva de 100 a 200 anos para atingir a maturidade) e encontra-se em processo de extinção, trata-se, portanto, de um método inviável para a obtenção do paclitaxel para fins de comercialização. Diferentes rotas sintéticas foram desenvolvidas para a obtenção deste importante fármaco. Destacam-se processos de semi-síntese que empregam a molécula 10-desacetilbacatina-III como material de partida para a preparação do paclitaxel. A 10-desacetilbacatina-III (Figura 1.1) é encontrada em folhas da árvore *Taxus baccata* (CRAGG e NEWMAN, 2013; DE SOUZA, 2004).

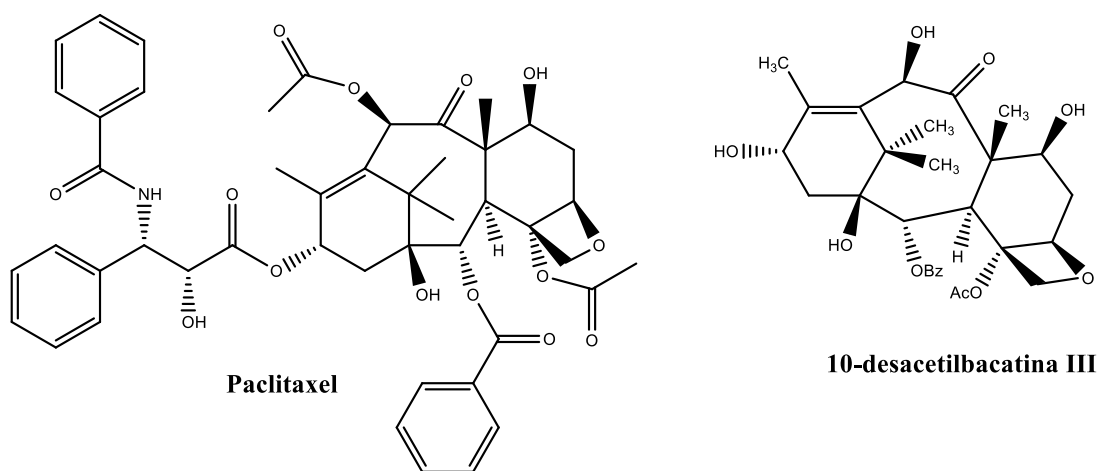


Figura 1.1 - Estrutura do paclitaxel e da 10-desacetilbacatina-III.

Além da desvantagem citada acima, em alguns casos compostos naturais podem degradar rapidamente e também podem apresentar elevada volatilidade. Deste modo, a maioria dos compostos obtidos de fontes naturais requerem modificações estruturais para potencializar suas propriedades farmacodinâmicas. A

síntese orgânica surge então como uma estratégia extremamente útil para contornar estes problemas.

A síntese da ureia, obtida por meio do aquecimento do cianato de amônio, por Friedrich Wöhler em 1828, marcou o início da síntese orgânica. Essa síntese derrubou a teoria de que os compostos orgânicos somente seriam obtidos a partir de organismos vivos, a conhecida Teoria da Força Vital. A partir desse acontecimento vieram à síntese do ácido acético por Kolbe em 1845, a síntese do acetileno por Berthelot em 1856 e a síntese do ácido salicílico em 1860 por Kolbe-Schmitt. Desde então a síntese orgânica passou por enormes avanços (NICOLAOU, 2014).

Grande parte dos fármacos disponíveis no mercado são produtos naturais ou análogos destes, planejados e desenvolvidos por química sintética. Uma das formas de sintetizar a molécula de interesse consiste na semi-síntese, onde o composto é isolado de sua fonte natural e posteriormente modificado por meio de processos químicos. Outra maneira seria planejar a sua obtenção exclusivamente via rota sintética. A evolução para as sínteses atuais envolvendo moléculas estruturalmente mais complexas, como o paclitaxel, sintetizado por Holton e Nicolaou em 1994, se deve ao desenvolvimento de novas técnicas e metodologias sintéticas que ocorreram no século XX. Atualmente o químico contemporâneo pode obter a preparação de praticamente qualquer molécula orgânica, desde que disponíveis tempo e recursos suficientes (KHAN, 2018).

Diante das diversas atividades farmacológicas efetivas descritas na literatura para os produtos naturais e moléculas inspiradas nestes, tem se tornado cada vez mais crescente o planejamento de metodologias sintéticas que busquem o desenvolvimento de compostos bioativos. Em particular, o grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, tem aprofundado suas pesquisas em moléculas derivadas do ácido cinâmico e amidas.

1.2 ÁCIDO CINÂMICO COMO UMA PLATAFORMA PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

O ácido cinâmico (Figura 1.2, pg. 22) consiste em um ácido aromático encontrado em diversas plantas superiores. Tipicamente, esse ácido ocorre na

natureza na forma *trans*. Ele pertence à classe das auxinas, que são reconhecidos como hormônios vegetais de regulação do crescimento e diferenciação celular. A atividade citotóxica do ácido cinâmico e derivados é conhecida por séculos. Estudos revelam que o ácido cinâmico é um importante agente antiproliferativo, inibindo a síntese de DNA de células em crescimento (DE *et al.*, 2011).

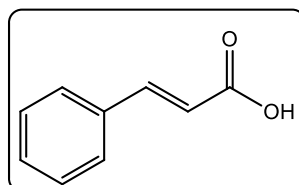


Figura 1.2 – Estrutura do ácido cinâmico.

Derivados do ácido cinâmico são encontrados no café, na maçã, frutos cítricos, cereais, dentre outras fontes (CLIFFORD, 1999) e desempenham papel importante como intermediários para a produção de diferentes fármacos (SHARMA, 2011). O ácido cinâmico e seus derivados apresentam um amplo espectro de importantes atividades biológicas, dentre elas atividade antifúngica (TAWATA *et al.*, 1996; SADEGH *et al.*, 2013), antibacteriana (CHIRIAC *et al.*, 2005), antioxidante (KIM *et al.*, 2006; HUSSAIN *et al.*, 2014; CHUNG e SHIN, 2007; SOVA *et al.*, 2012), antidiabética (HAFIZUR *et al.*, 2015), antimalárica (WIESNER *et al.*, 2001), leishmanicida (OTERO *et al.*, 2014), além do efeito citotóxico contra várias linhagens de células tumorais (LEE *et al.*, 2003; DE *et al.*, 2011).

Derivados do ácido cinâmico (Figura 1.3, pg. 23), como o ácido caféico, ácido ferúlico e ácido clorogênico, foram capazes de inibir o comportamento invasivo de células de adenocarcinoma de pulmão humano (TSAI *et al.*, 2013).

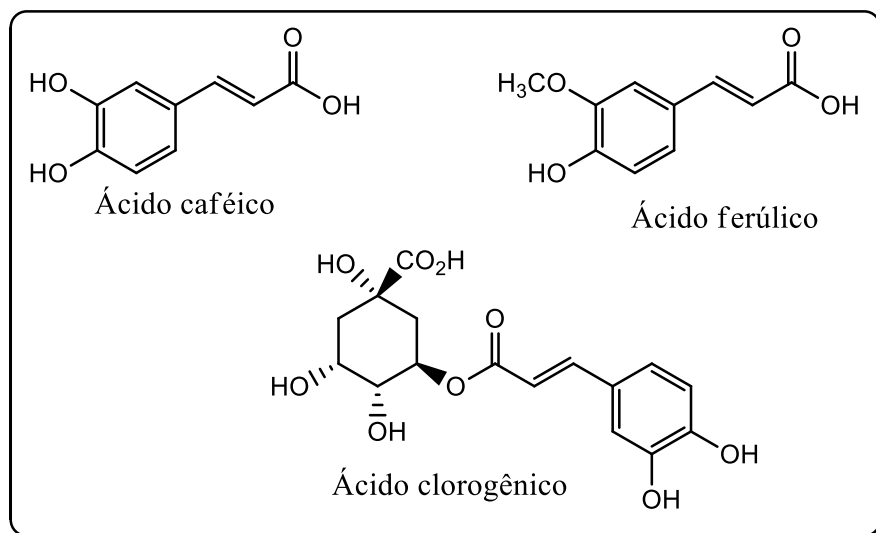


Figura 1.3 – Estruturas de derivados do ácido cinâmico.

Banskota e colaboradores (2002) descreveram o cafeato de benzila, cafeato de fenetila e cafeato de cinamila (Figura 1.4), isolados da própolis Holandesa, como potenciais agentes antiproliferativos contra carcinoma do cólon, 26-L5, com valores de EC_{50} respectivamente de 0,288, 1,76 e 0,114 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

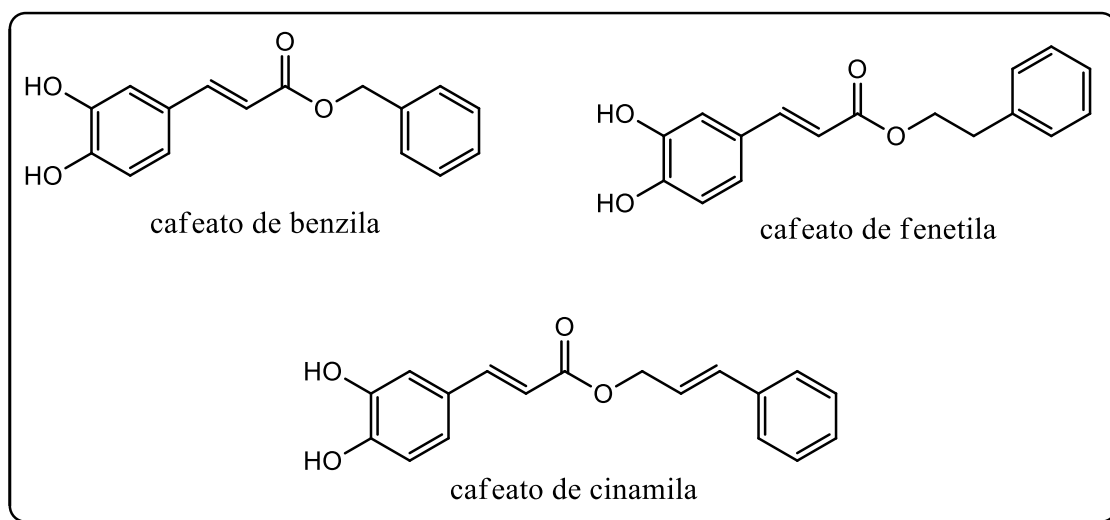


Figura 1.4 – Estrutura dos cinamatos cafeato de benzila, cafeato de fenetila e cafeato de cinamila.

Dwivedi e colaboradores (2008) sintetizaram e avaliaram a atividade anti-hiperglicêmica de amidas derivadas do ácido cinâmico. Foi relatado que os compostos *N*-acil-2-ariletilaminas e *N*-acil-3-coumarilaminas (Figura 1.5, pg. 24)

podem baixar os níveis de glicose no sangue em 30,7% e 23,3%, respectivamente, na SLM (sacarose carregada), e até 25,6% e 25,4%, respectivamente, na modelo de STZ (modelos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina). Comparando com os fármacos, a metformina e a glibenclamida (Figura 1.5) podem reduzir os níveis de glicose no sangue em até 12,9% e 33,7% no SLM e até 20,5% e 25,5% no modelo de STZ, respectivamente. Assim, os resultados encontrados para os compostos sintetizados são bastante significativos e promissores.

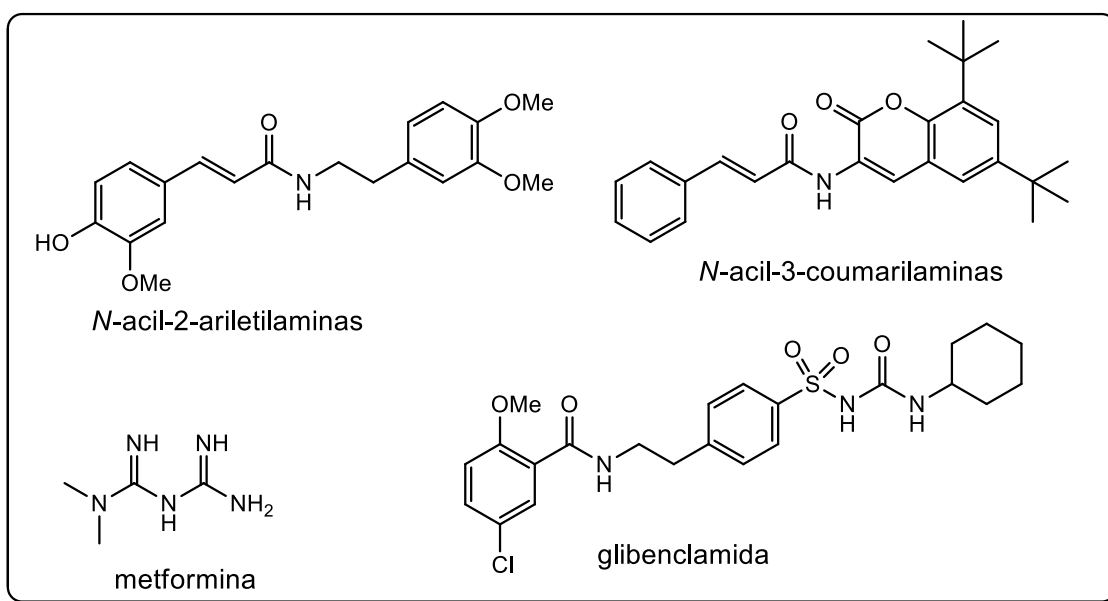


Figura 1.5 – Estrutura dos compostos *N*-acil-2-ariletilaminas e *N*-acil-3-coumarilaminas, e dos fármacos metformina e glibenclamida.

Assim como o ácido cinâmico e seus derivados, as amidas constituem unidades estruturais importantes na busca por moléculas bioativas, conforme será visto adiante.

1.3 AMIDAS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O grupamento amida é uma unidade estrutural encontrada em uma miríade de moléculas bioativas (LANIGAN e SHEPPARD, 2013). A ligação amida é o grupo funcional mais fundamental na elaboração e composição de sistemas biológicos, como por exemplo, proteínas e peptídeos. Esta funcionalidade é um importante elemento estrutural encontrado nas estruturas de vários herbicidas inibidores da fotossíntese, em inúmeros produtos naturais, polímeros e em vários fármacos.

Pesquisas recentes estimam que a ligação amida esteja presente em aproximadamente 25% dos fármacos existentes e que aproximadamente 33% dos novos candidatos a fármacos contenham o grupamento amida. Devido à ampla ocorrência deste grupamento funcional, as reações de amidação representam uma das transformações mais comumente realizadas na síntese de fármacos (LI e SZOSTAK, 2018; ACOSTA-GUZMÁN *et al.*, 2018). Além de sua vasta aplicação farmacológica, umas das vantagens em sintetizar compostos que contenham esta funcionalidade incluem a sua estabilidade, alta polaridade e diversidade conformacional (RENUKA e GAYATHRI, 2018).

Diversos são os exemplos de substâncias contendo o grupo amida que são comercializados pelas indústrias farmacêutica e agroquímica. A atorvastatina (Figura 1.6, pg. 26) é o fármaco mais vendido em todo o mundo desde 2003 e utilizado no controle dos níveis de colesterol no sangue. A amida cíclica diltiazem (Figura 1.6, pg. 26) bloqueia o canal de cálcio sendo empregada no tratamento da angina e hipertensão. A valsartana (Figura 1.6, pg. 26) bloqueia os receptores da angiotensina II e sua principal indicação é para tratamento da hipertensão arterial (VALEUR e BRADLEY, 2009). O mesilato de imatinibe (Figura 1.6, pg. 26) é usado no tratamento de certos tipos de câncer, como leucemia mieloide crônica. Mencionam-se ainda o analgésico paracetamol (Figura 1.6, pg. 26), o ansiolítico e anticonvulsivante diazepam (Figura 1.6, pg. 26), o anestésico local lidocaína (Figura 1.6, pg. 26), dentre vários outros fármacos. Os herbicidas diuron e propanil (Figura 1.6, pg. 26), o fungicida boscalida (Figura 1.6, pg. 26) e o inseticida flubendiamida (Figura 1.6, pg. 26) são importantes agroquímicos comerciais. Atividade anti-inflamatória (ZHONG *et al.*, 2009; BAI *et al.*, 2018), antialérgica (BAN *et al.*, 1998), antitumoral (ONNIS *et al.*, 2008), antimalárica (PEÑA *et al.*, 2012), antiproliferativa (HRANJEC *et al.*, 2013), antimicrobiana (NARASIMHAN *et al.*, 2004), citotóxica (ALIABADI *et al.*, 2010) e antiviral (LAN *et al.*, 2017; HAO *et al.*, 2012) também são descritas na literatura para compostos contendo o grupo amida.

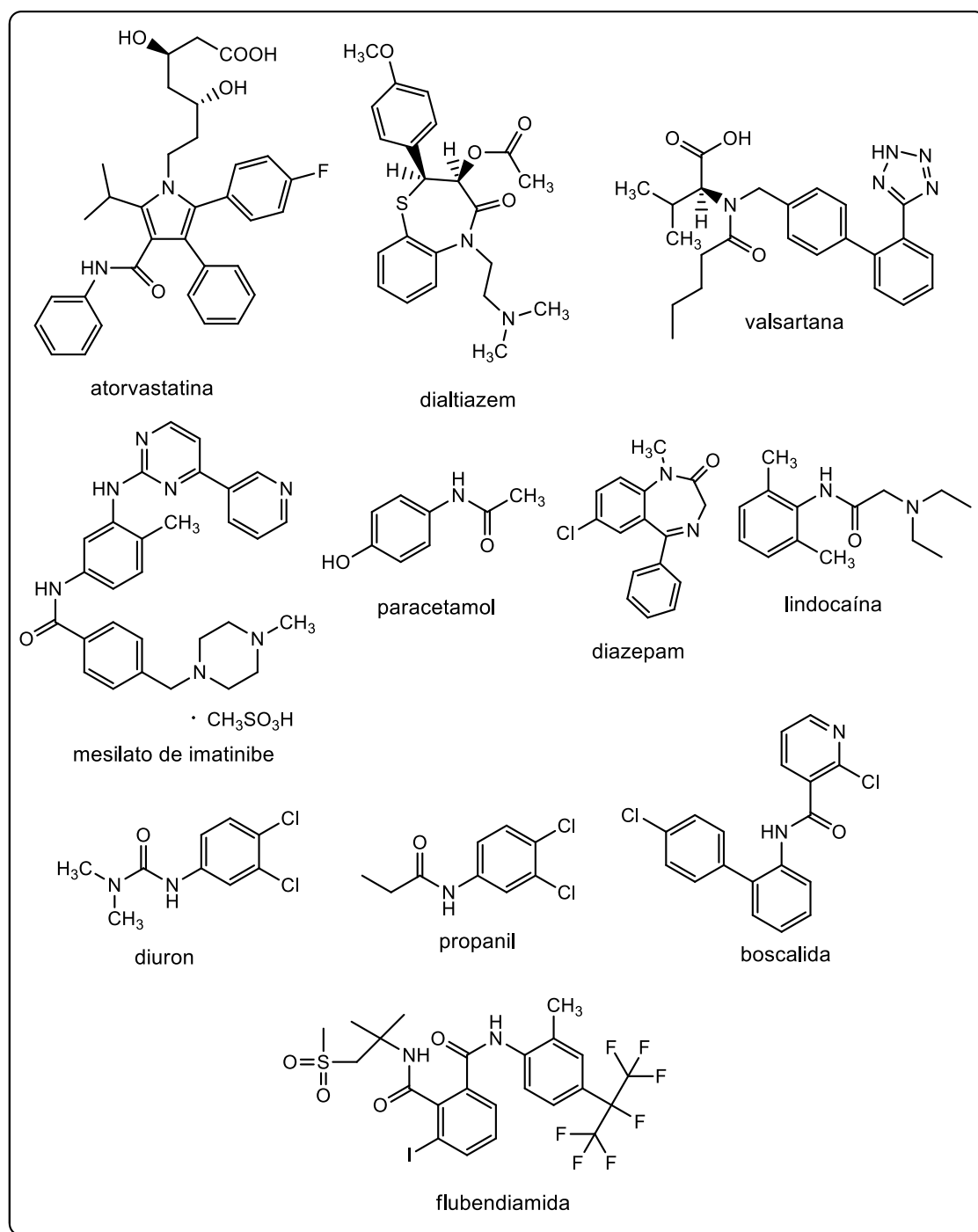
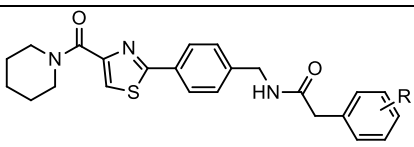


Figura 1.6 – Estrutura de alguns fármacos e agroquímicos que contém o grupo amida.

Aliabadi e colaboradores (2010) sintetizaram uma série de diamidas e a atividade citotóxica destas foi avaliada contra três linhagens celulares cancerígenas, sendo estas T47D (câncer da mama), Caco-2 (câncer colorretal) e HT-29 (câncer do cólon). Conforme apresentado na tabela seguinte (Tabela 1.1, pg. 27), observa-se que o composto contendo o grupo fluoro na posição 3 do anel benzílico mostrou

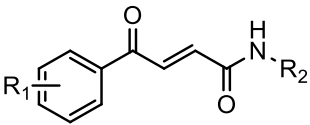
atividade citotóxica contra todas as linhagens celulares avaliadas. Os compostos contendo o grupo metoxila nas posições 2 e 4 do anel benzílico também apresentaram importantes dados de citotoxicidade. Enquanto o composto contendo o grupo metoxila ligado à posição 2 demonstrou atividade contra as linhagens celulares HT-29 e T47D, o composto contendo o grupo 4-metoxila apresentou atividade contra as células Caco-2, com valor de $IC_{50} = 4,18 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 1.1 – Estrutura geral das diamidas avaliadas por Aliabadi e colaboradores (2010) e valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) dos compostos mais ativos.

				IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
R	Caco-2	HT-29	T47D			
3-F	9,87	22,5	4,62			
2-OCH ₃	-	9,92	15,3			
4-OCH ₃	4,18	-	-			

A atividade antiproliferativa de vinte e nove amidas foi relatada por Vitorovic-Todorovic e colaboradores (2013). As amidas foram avaliadas contra três linhagens celulares, a saber, HeLa, FemX e K562. Os compostos mostraram atividade antiproliferativa em concentrações micromolares de um dígito a submicromolares. Alguns compostos apresentaram atividade submicromolar contra todas as três linhagens de células examinadas (Tabela 1.2, pg. 28).

Tabela 1.2 – Atividade antiproliferativa das amidas sintetizadas por Vitorovic-Todorovic e colaboradores (2013).

		IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)		
R ₁	R ₂	HeLa	FemX	K562
2,5-Me	Ph	0,74	0,62	0,34
2,4- <i>i</i> -Pr	Ph	0,68	0,59	0,38
2,4- <i>i</i> -Pr	3,5-OMe-Ph	0,83	0,95	0,71
2,4- <i>i</i> -Pr	4- <i>i</i> -Pr-Ph	0,75	0,78	0,39
2,3,5,6-Me	3,5-OMe-Ph	0,86	0,65	0,55

1.4 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Os “lead compounds” consistem em moléculas com propriedades farmacológicas ou bioquímicas promissoras podendo ser utilizados como estruturas modelos para o desenvolvimento de novos fármacos. Estes compostos requerem modificações estruturais a fim de adquirirem propriedades terapêuticas ideais como, por exemplo, maior eficácia, especificidade, biodisponibilidade e menor toxicidade (SHARMA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018).

Dados da literatura demonstram que o ácido cinâmico e as amidas são importantes compostos de partida para o planejamento racional de novos fármacos, e por este motivo vem sendo alvos de pesquisas constantes em todo o mundo.

Em 2015, Rodrigues sintetizou 26 derivados do ácido cinâmico contendo o núcleo 1,2,3-triazólico e suas atividades citotóxica e antimetastática, como também atividade leishmanicida foram avaliadas. No que se refere à atividade antimetastática, os compostos foram submetidos a bioensaios *in vitro* para investigar como eles agem sobre o comportamento metastático do melanoma murino. O composto mais potente foi o cinamato de 3-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propila (Figura 1.7, pg. 29), apresentando significativa atividade antimetastática contra células B16-F10, sendo capaz de suprimir a migração celular em aproximadamente 86% (LIMA *et al.*, 2018). Esses resultados motivaram a síntese de uma série de derivados cinamatos descritos neste trabalho.

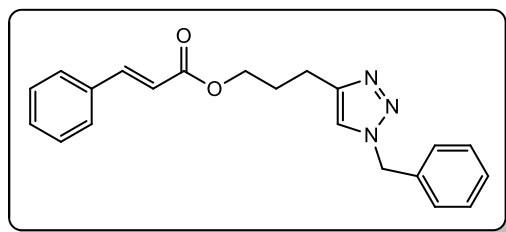


Figura 1.7 – Estrutura do derivado do ácido cinâmico contendo o núcleo 1,2,3-triazólico que apresentou atividade antimetastática (LIMA *et al.*, 2018).

A síntese das diamidas relatadas no presente trabalho foi inspirada pela investigação desenvolvida por Barros em 2014, que buscou sintetizar análogos ao SRPIN 340 (Figura 1.8). O SRPIN 340 é um inibidor ATP-competitivo, altamente seletivo na inibição de quinases SRPKs (SRPK1 e SRPK2, *serine arginine protein kinases*). Essas quinases fosforilam os domínios ricos em serina e arginina das proteínas SR (JANG *et al.*, 2008). A desregulação na atividade de quinases SRPKs tem-se apresentado como um relevante fator na promoção de proliferação celular em vários cânceres humanos, sugerindo que são alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (SIQUEIRA *et al.*, 2017). Os ensaios de avaliação da citotoxicidade do inibidor de SRPKs SRPIN 340 e vinte e dois derivados desse demonstraram que dez substâncias foram capazes de inibir a viabilidade celular das linhagens HL60 e/ou Jurkat. Os valores de IC_{50} para as linhagens HL60 e Jurkat dos compostos que apresentaram efeitos citotóxicos mais pronunciados variaram de 11,1-44,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 21,9-82,23 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O composto mais ativo, SRPIN340#17 (Figura 1.8), apresentou valor de $IC_{50} = 11,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (HL60).

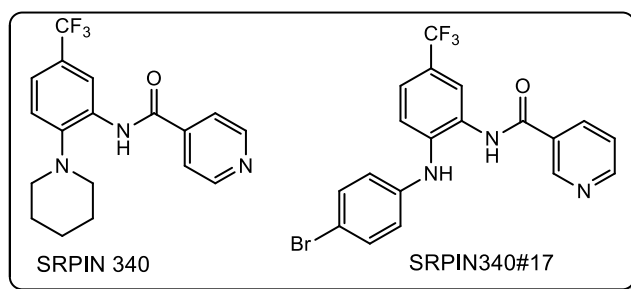


Figura 1.8 – Estruturas do SRPIN340 e SRPIN340#17.

Assim, considerando as atividades biológicas já descritas na literatura para o ácido cinâmico e o SRPIN340, e o crescente aumento no número de pacientes portadores de doenças que ainda não possuem tratamentos efetivos como, por exemplo, o câncer, leishmaniose e a doença de chagas, observa-se a necessidade de prospecção de novas moléculas que sejam mais eficazes, mais seletivas e que possuam menores efeitos colaterais.

Deste modo, o presente trabalho objetivou a síntese e caracterização de derivados do ácido cinâmico (Figura 1.9) bem como diferentes diamidas inspiradas na estrutura do SRPIN340 (Figura 1.9). Descreve-se ainda a avaliação da atividade antitumoral, leishmanicida e tripanocida das diamidas; a avaliação da atividade antitumoral e antimetastática dos cinamatos; a investigação do efeito protetor dos cinamatos em ensaio de desequilíbrio redox induzido por H_2O_2 em células de glioma; e devido à similaridade existente entre a descoberta e desenvolvimento de fármacos e agroquímicos, também foi avaliada a atividade inseticida das diamidas inspiradas no SRPIN340.

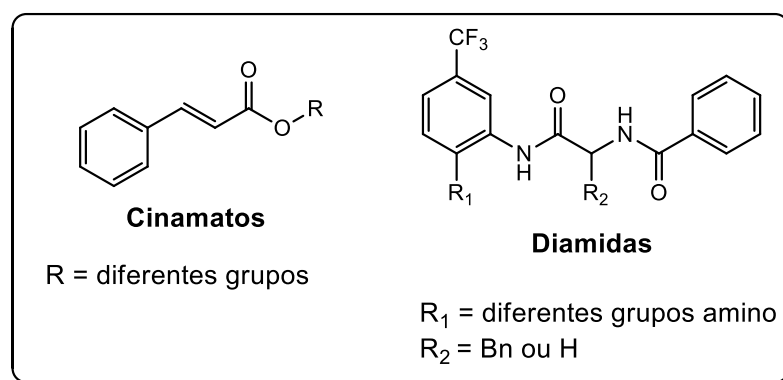


Figura 1.9 – Estrutura geral dos cinamatos e das diamidas sintetizadas.

As estruturas dos compostos sintetizados e biologicamente avaliados serão apresentadas no Capítulo 2.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-GUZMÁN, P.; MATEUS-GÓMEZ, A.; GAMBA-SÁNCHEZ, D. Direct Transamidation Reactions: Mechanism and Recent Advances. **Molecules**, v. 23, p. 2382, 2018.

- ALIABADI, A.; SHAMSA, F.; OSTAD, S. N.; EMAMI, S.; SHAFIEE, A.; DAVOODI, J.; FOROUMADI, A. Synthesis and biological evaluation of 2-phenylthiazole-4-carboxamide derivatives as anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5384-5389, 2010.
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E-M.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1582-1614, 2015.
- BAI, R.; SUN, J.; LIANG, Z.; YOON, Y.; SALGADO, E.; FENG, A.; OUM, Y.; XIE, Y.; SHIM, H. Anti-inflammatory hybrids of secondary amines and amide-sulfamide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 195-205, 2018.
- BAN, M.; TAGUCHI, H.; KATSUSHIMA, T.; AOKI, S.; WATANABE, A. Novel Antiallergic Agents. Part I: Synthesis and Pharmacology of Pyrimidine Amide Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 1057–1067, 1998.
- BANSKOTA, A. H.; NAGAOKA, T.; SUMIOKA, L. Y.; TEZUKA, Y.; AWALE, S.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 67-73, 2002.
- BARROS, M. V. A. **Síntese e avaliação da atividade citotóxica e do efeito sobre o transporte fotossintético de elétrons de trifluorometil-aril-amidas**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.
- CHIRIAC, C.I.; TANASA, F.; ONCIU, M. A Novel Approach in Cinnamic Acid synthesis: Direct Synthesis of Cinnamic Acids from Aromatic Aldehydes and Aliphatic Carboxylic Acids in the Presence of Boron Tribromide. **Molecules**, v. 10, p. 481-487, 2005.

- CHUNG, H. S.; SHIN, J. C. Characterization of antioxidant alkaloids and phenolic acids from anthocyanin-pigmented rice (*Oryza sativa* cv. *Heugjinjubyeo*). **Food Chemistry**, v. 104, p. 1670-1677, 2007.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 362-372, 1999.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- DE, P.; BALTAS, M.; BELVAL, F.B. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents – A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1672-1703, 2011.
- DE SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, p. 308-312, 2004.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Molecules**, v. 2, p. 303-336, 2012.
- DWIVEDI, A. P.; KUMAR, S.; VARSHNEY, V.; SINGH, A. B.; SRIVASTAVA, A. K.; SAHU, D. P. Synthesis and antihyperglycemic activity of novel *N*-acyl-2-arylethylamines and *N*-acyl-3-coumarylamines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 2301–2305, 2008.
- FARAG, M.; MOHAMMED, M. S.; FOUAD, I.; AHMED, W. J.; MOHAMED, M. S. The role of natural products in drug discovery and development. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 1-12, 2015.
- GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, p. 119-136, 2017.
- HAFIZUR, R. M.; HAMMED, A.; SHUKRANA, M.; RAZA, S. A.; CHISHTI, S.; KABIR, N.; SIDDIQUI, R. A. Cinnamic acid exerts anti-diabetic activity by improving glucose tolerance *in vivo* and by stimulating insulin secretion *in vitro*. **Phytomedicine**, v. 22, p. 297-300, 2015.
- HAO, L-H.; LI, Y-P.; HE, W-Y.; WANG, H-Q.; SHAN, G-Z.; JIANG, J-D.; LI, Y-H.; LI, Z-R. Synthesis and antiviral activity of substituted bisaryl amide compounds as novel influenza virus inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 117-124, 2012.

- HRANJEC, M.; SOVIC, I.; RATKAJ, I.; PAVLOVIC, G.; ILIC, N.; VALJALO, L.; PAVELIC, K.; PAVELIC, S. K.; KARMINSKI-ZAMOLA, G. Antiproliferative potency of novel benzofuran-2-carboxamides on tumour cell lines: Cell death mechanisms and determination of crystal structure. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 111-119, 2013.
- HUSSAIN, S.H.; LATIF, A.; COX, R. J.; SIMPSON, T. J.; ALI, M.; ARFAN, M.; UDDIN, G. Phytochemicals from the aerial parts of *Ligularia thomsonii* and their radical scavenging activity. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 6-10, 2014.
- JANG, S-W.; YANG, S-J.; EHLÉN, A.; DONG, S.; KHOURY, H.; CHEN, J.; PERSSON, J. L.; YE, K. SRPK2 Promotes Leukemia Cell Proliferation by Phosphorylating Acinus and Regulating Cyclin A1. **Cancer Research**, v. 68, p. 4559-4570, 2008.
- KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 739–753, 2018.
- KIM, K-H.; TSAO, R.; YANG, R.; CUI, S. W. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chemistry**, v. 95, p. 466–473, 2006.
- LAN, X.; XIE, D.; YIN, L.; WANG, Z.; CHEN, J.; ZHANG, A.; SONG, B.; HU, D. Novel α,β -unsaturated amide derivatives bearing α -amino phosphonate moiety as potential antiviral agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p. 4270–4273, 2017.
- LANIGAN, R. M.; SHEPPARD, T. D. Recent Developments in Amide Synthesis: Direct Amidation of Carboxylic Acids and Transamidation Reactions. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 33, p. 7453-7465, 2013.
- LEE, Y.; KUO, H.; CHU, C.; WANG, C.; LIN, W.; TSENG, T. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cell. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 2281-2289, 2003.
- LI, G.; LOU, H-X. Strategies to diversify natural products for drug discovery. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, p. 1255-1294, 2017.
- LI, G.; SZOSTAK, M. Highly selective transition-metal-free transamidation of amides and amidation of esters at room temperature. **Nature Communications**, v. 9, p. 1-8, 2018.

- LIMA, G. D. A.; RODRIGUES, M. P.; MENDES, T. A. O.; MOREIRA, G. A.; SIQUEIRA, R. P.; DA SILVA, A. M.; VAZ, B. G.; FIETTO, J. L. R.; BRESSAN, G. C.; MACHADO-NEVES, M.; TEIXEIRA, R. R. Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions. **Toxicology in Vitro**, v. 53, p. 1–9, 2018.
- NARASIMHAN, B.; BELSARE, D.; PHARANDE, D.; MOURYA, V.; DHAKE, A. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 827–834, 2004.
- NICOLAOU, K C. Organic synthesis: the art and science of replicating the molecules of living nature and creating others like them in the laboratory. **Proceedings of the Royal Society A**, v. 470, p. 1-17, 2014.
- ONNIS, V.; COCCO, M. T.; LILLIU, V.; CONGIU, C. Synthesis and evaluation of antitumoral activity of ester and amide derivatives of 2-arylamino-6-trifluoromethyl-3-pyridinecarboxylic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2367–2378, 2008.
- OTERO, E.; ROBLEDO, S. M.; DÍAZ, S.; CARDA, M.; MUÑOZ, D.; PAÑOS, J.; VÉLEZ, I. D.; CARDONA, W. Synthesis and leishmanicidal activity of cinnamic acid esters: structure–activity relationship. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, p. 1378-1386, 2014.
- PEÑA, S.; SCARONE, L.; MANTA, E.; STEWART.; YARDLEY, V.; CROFT, S.; SERRA, G. Synthesis of a *Microcystis aeruginosa* predicted metabolite with antimalarial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 4994–4997, 2012.
- RENUKA, M. K.; GAYATHRI, V. Synthesis of secondary amides by direct amidation using polymer supported copper(II) complex. **Polyhedron**, v. 148, p. 195–202, 2018.
- RODRIGUES, M. P. **Síntese e avaliação de bioatividades de derivados do ácido cinâmico contendo o núcleo 1,2,3-triazólico**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

- SADEGHI, M.; ZOLFAGHARI, B.; SENATORE, M.; LANZOTTI, V. Antifungal cinnamic acid derivatives from Persian Leek (*Allium ampeloprasum* Subsp. *Persicum*). **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 360-363, 2013.
- SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M. Abordagem didática para o desenvolvimento de moléculas bioativas: regra dos cinco de lipinski e preparação de heterociclo 1,3,4-oxadiazol em forno de micro-ondas doméstico. **Química Nova**, v. 41, p. 110-115, 2018.
- SIQUEIRA, R. P.; BARROS, M. V. A.; BARBOSA, E. A. A.; ONOFRE, T. S.; GONÇALVES, V. H. S.; PEREIRA, H. S.; JÚNIOR, A. S.; DE OLIVEIRA, L. L.; ALMEIDA, M. R.; FIETTO, J. L. R.; TEIXEIRA, R. R.; BRESSAN, G. C. Trifluoromethyl arylamides with antileukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 134, p. 97-109, 2017.
- SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 403-423, 2011.
- SHARMA, V.; SHARMA, P. C.; KUMAR, V. A mini review on pyridoacridines: Prospective lead compounds in medicinal chemistry. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 63-71, 2015.
- SOVA, M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 749-767, 2012.
- TAWATA, S.; TAIRA, S.; KOBAMOTO, N.; ZHU, J.; ISHIHARA, M.; TOYAMA, S. Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, p. 909-910, 1996.
- THOMFORD, N. E.; SENTHEBANE, D. A.; ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; MAROYI, A.; DZOBO, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 1578-1606, 2018.
- TSAI, C-M.; YEN, G-C.; SUN, F-M.; YANG, S-F.; WENG, C-J. Assessment of the Anti-invasion Potential and Mechanism of Select Cinnamic Acid Derivatives on Human Lung Adenocarcinoma Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, p. 1890-1900, 2013.

- VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 606-631, 2009.
- VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; FURLAN, M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 35, p. 2278-2287, 2012.
- VITOROVIC-TODOROVIC, M. D.; ERIC-NIKOLIC, A.; KOLUNDZIJA, B.; HAMEL, E.; RISTIC, S.; JURANIC, I. O.; DRAKULIC, B. J. (*E*)-4-Aryl-4-oxo-2-butenic acid amides, chalcone-arylacrylic acid chimeras: Design, antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 40-50, 2013.
- WIESNER, J.; MITSCH, A.; WIBNER, P.; JOMAA, H.; SCHLITZER, M. Structure–Activity Relationships of Novel Anti-Malarial Agents. Part 2: Cinnamic Acid Derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 423–424, 2001.
- ZHONG, G-X.; HU, J-Q.; ZHAO, K.; CHEN, L-L.; HU, W-X.; QIU, M-Y. Synthesis and biological evaluation of amide derivatives of diflunisal as potential anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 516–519, 2009.

CAPÍTULO 2

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ÉSTERES CINAMATOS E DAS DIAMIDAS

2.1 ORGANOCATÁLISE

A organocatálise pode ser definida como um processo no qual reações orgânicas são aceleradas por catalisadores livres de metal, sendo estes constituídos por moléculas orgânicas de baixa massa molecular e geralmente constituídas por C, H, O, N, S e P (NIELSON *et al.*, 2011; AMARANTE e COELHO, 2009). O organocatalisador pode ser aquiral ou quiral e sua utilização vem se destacando ao longo dos anos como uma eficiente ferramenta, especialmente em catálise assimétrica, induzindo a enantio e a diastereosseletividade em diferentes reações orgânicas.

O interesse na organocatálise se deve a algumas vantagens, tais como a estabilidade e simplicidade dos catalisadores, baixo custo, facilidade de manipulação, baixa toxicidade, além das reações serem realizadas em condições mais brandas e permitirem o desenvolvimento de rotas sintéticas mais curtas, o que confere um grande benefício quando comparado com os catalisadores metálicos. Os organocatalisadores podem ainda serem facilmente preparados, quando não são disponíveis comercialmente. Atualmente, pesquisadores e indústrias têm buscado meios de remediar os impactos ambientais ocasionados pelo uso de reagentes químicos, de forma que metodologias que considerem os princípios da química verde, como a utilização de um organocatalisador livre de metal, trazem inegáveis benefícios para o meio ambiente (PATEL *et al.*, 2018; SHAIKH, 2014).

Os organocatalisadores podem ser classificados por meio de interações com o substrato ou "modo de ação", separados em catálise covalente (aminocatalisadores e base de Lewis) e catálise não covalente (ácido e base de Brønsted, ligações de hidrogênio e transferência de fase) (BRIÈRE *et al.*, 2012). Na catálise covalente, uma nova ligação covalente entre o organocatalisador e o substrato é formada, levando a uma forte interação entre eles, com alta energia de ativação (35 a 135 kcal mol⁻¹). No caso de interações não-covalentes entre o substrato e o catalisador, a ativação do substrato ocorre via ligação fraca, apresentando baixa energia de ativação (RICCI, 2014).

2.2 AZALACTONAS E SUA IMPORTÂNCIA SINTÉTICA

Os compostos heterocíclicos são de grande importância tanto para a indústria farmacêutica quanto para a agroquímica. Com respeito aos produtos farmacêuticos, mais de 90% dos novos medicamentos contém pelo menos um anel heterocíclico em sua estrutura (DIDEHBAN *et al.*, 2018). Como exemplo de composto heterocíclico pode-se citar as oxazolonas, um nome geral atribuído a um oxazol com um grupo cetona (SHARMA *et al.*, 2015).

As oxazolonas são intermediários importantes para a síntese de diversos compostos como amidas, aminoácidos, peptídeos, corantes e compostos biologicamente ativos, consistindo de um importante grupo farmacofórico para o desenvolvimento de novos fármacos (MOHAMED *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2006).

As azalactonas (Figura 2.1) caracterizam-se por possuírem a porção oxazolona e representam uma importante classe de aminoácidos protegidos. São conhecidas por apresentarem atividades antifúngicas, analgésica, antidiabética, antibacterianas e anti-inflamatórias (ÁVILA *et al.*, 2015; RATHORE e SAH, 2015; EL-MEKABATY, 2013). Além disso, são precursoras de uma variedade de alvos sintéticos como, por exemplo, utilizadas na síntese de novos sistemas heterocíclicos altamente substituídos, aminoácidos estruturalmente complexos e muitos produtos naturais, sendo também úteis na produção de compostos hormonais sintéticos e utilizadas em um número variado de transformações orgânicas. Outra vantagem em utilizar azalactonas como substratos em diferentes reações é que pelo menos um centro de quiralidade será formado (SALAMI-RANJBARAN *et al.*, 2014; MISTRY e DESAI, 2005; LI *et al.*, 2015; ÁVILA *et al.*, 2013).

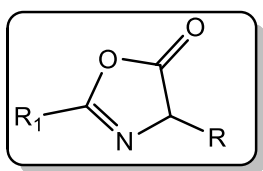


Figura 2.1 – Estrutura geral das azalactonas.

As azalactonas exibem dois sítios eletrofílicos (posições 2 e 5) e um sítio pró-nucleofílico na posição 4 (Figura 2.2, pg. 39). São moléculas que possuem elevada reatividade, sendo que o átomo de carbono na posição 4 (Figura 2.2, pg. 39) pode

ser submetido a reações de alquilação, alilação, benzilação e adição de Michael. Assim, as azalactonas são excelentes nucleófilos, e esse fato é devido, principalmente, a presença de um hidrogênio α altamente enolizável (PINHEIRO *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2015; DE CASTRO *et al.*, 2016). Devido à forte propriedade eletrofílica do grupo carbonila da oxazolona, a reação de abertura do anel azalactônico por nucleófilos ocorre rapidamente para formar aminoácidos (SALAMI-RANJBARAN *et al.*, 2014).

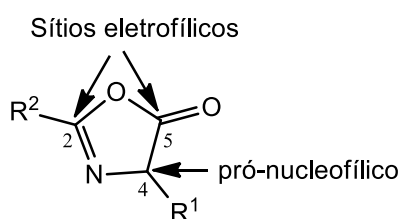


Figura 2.2 – Representação dos sítios eletrofílicos e pró-nucleofílico das azalactonas.

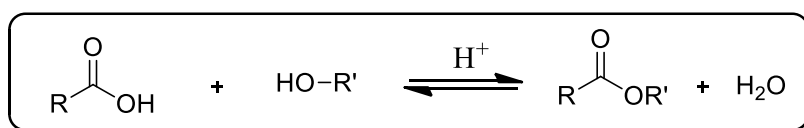
2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE METODOLOGIAS SINTÉTICAS PARA A OBTENÇÃO DE ÉSTERES

Os ésteres constituem uma classe de compostos amplamente encontrados na natureza e são conhecidos por apresentarem odor agradável, podendo ser encontrados em alimentos como frutas, óleo de soja, manteiga, margarina, azeite de oliva, dentre outros. A síntese de ésteres, reação comumente conhecida como esterificação, desempenha um papel importante na produção de aromas e fragrâncias, solventes, plastificantes, pesticidas, herbicidas e novos fármacos, fato esse que tem despertado o interesse de muitos setores da indústria (ALI *et al.*, 2007).

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para a obtenção de ésteres, sendo o método mais comum sua origem a partir de ácidos carboxílicos. Dentre essas reações pode-se destacar a esterificação de Fischer, esterificação de Steglich, reação de Mitsunobu e substituição nucleofílica (S_N2) com haletos. Além destas reações, destacam-se também aquelas referentes à utilização de anidridos e cloretos de ácido como materiais de partida em reações com álcoois. Um dos objetivos deste trabalho consistiu na síntese de ésteres a partir de um ácido

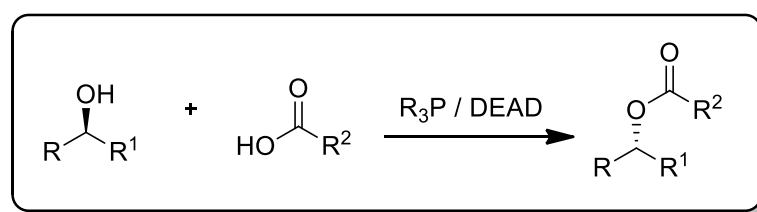
carboxílico e diferentes álcoois, será apresentado a seguir uma breve discussão sobre essas reações.

A reação de esterificação de Fischer (Esquema 2.1) ocorre entre um ácido carboxílico e um álcool, sob condições de aquecimento e na presença de um catalisador ácido. Essa reação foi descrita por Emil Fischer e Arthur Speier em 1895, e é uma típica reação na qual produtos e reagentes estão em equilíbrio (VAFAGEZADEH e FATTABI, 2015).



Esquema 2.1 – Exemplo geral da esterificação de Fischer.

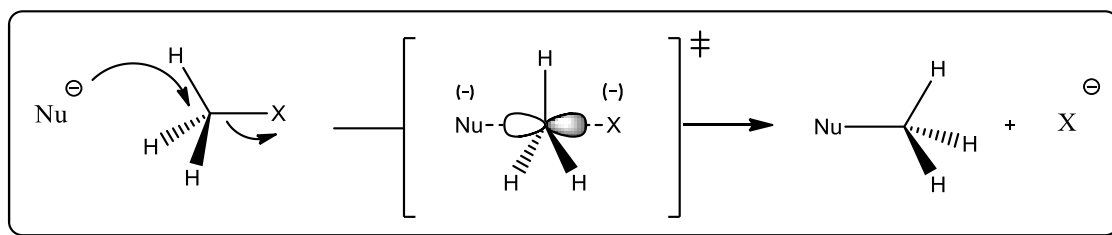
A reação de Mitsunobu (Esquema 2.2) permite a conversão de álcoois primários e secundários em uma variedade de grupos funcionais, como os ésteres. Para isso é necessária a presença de uma triálquil ou triaril fosfina e um dialquil azodicarboxilato, como o DEAD (dietil azodicarboxilato) ou (DIAD) diisopropil azodicarboxilato. O nucleófilo empregado deve ser ácido, visto que um dos reagentes (DEAD ou DIAD) deve ser protonado durante o percurso da reação para evitar reações secundárias. Trata-se de uma reação que, geralmente, ocorre com elevada estereosseletiva e com inversão da configuração estereoquímica do centro do carbono do álcool (SWAMY *et al.*, 2009; BUT e TOY, 2007).



Esquema 2.2 – Exemplo de reação de Mitsunobu.

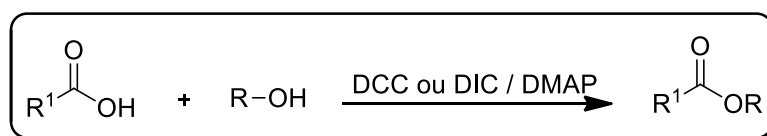
Na substituição nucleofílica ($\text{S}_{\text{N}}2$) com haletos (Esquema 2.3, pg. 41) a reação se processa em uma única etapa. Nesta reação, o nucleófilo aproxima-se do substrato com um ângulo de 180° em relação ao grupo abandonador. Esta aproximação minimiza a repulsão estérica e eletrônica entre substrato e nucleófilo. Ao final da reação tem-se a mudança de configuração do átomo de carbono que é o

alvo do ataque nucleofílico, a saída do grupo abandonador e a formação da ligação carbono-nucleófilo (SMITH e MARCH, 2007).



Esquema 2.3 – Exemplo de S_N2 com haletos.

A reação de esterificação de Steglich (Esquema 2.4) foi descrita por Wolfgang Steglich em 1978 e consiste, basicamente, no uso de um reagente de acoplamento, como o DCC (*N,N*-dicicloexilcarbodiimida), e da 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador da reação. Outro reagente de acoplamento que também é comumente empregado na esterificação de Steglich é a diisopropilcarbodiimida (DIC). A principal função do agente de acoplamento consiste em tornar o grupo hidroxila da função ácido carboxílico um bom grupo abandonador, permitindo sua substituição. É importante ressaltar que um dos maiores problemas desta reação é a eliminação da DHU (dicicloexiluréia), formada na reação quando se utiliza o DCC, durante a purificação do produto desejado (LUTJEN *et al.*, 2018).



Esquema 2.4 – Exemplo geral da reação de esterificação de Steglich.

Assim, dentro deste contexto, serão mostrados neste capítulo os processos sintéticos que culminaram na obtenção de diamidas, via reação de abertura do anel azalactônico catalisada pelo ácido canforsulfônico, bem como de ésteres derivados do ácido cinâmico obtidos por meio da esterificação de Steglich. Alguns dos compostos preparados foram escolhidos para a descrição de características estruturais.

As estruturas dos compostos sintetizados bem como a numeração utilizada para identificá-los ao longo deste trabalho são apresentadas nas Figuras 2.3 e 2.4 (pg. 42 e 43).

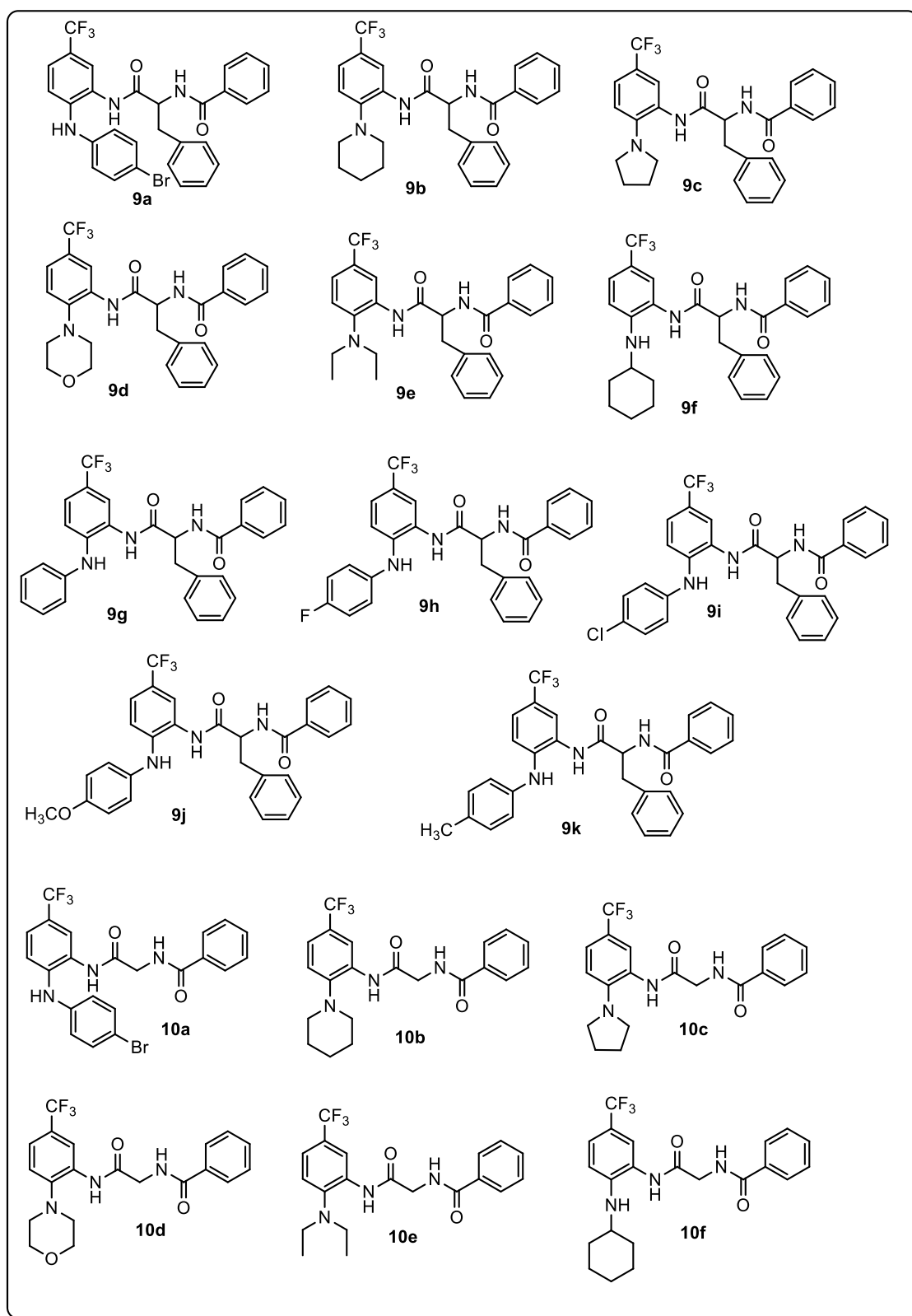


Figura 2.3 - Estruturas das diamidas sintetizadas.

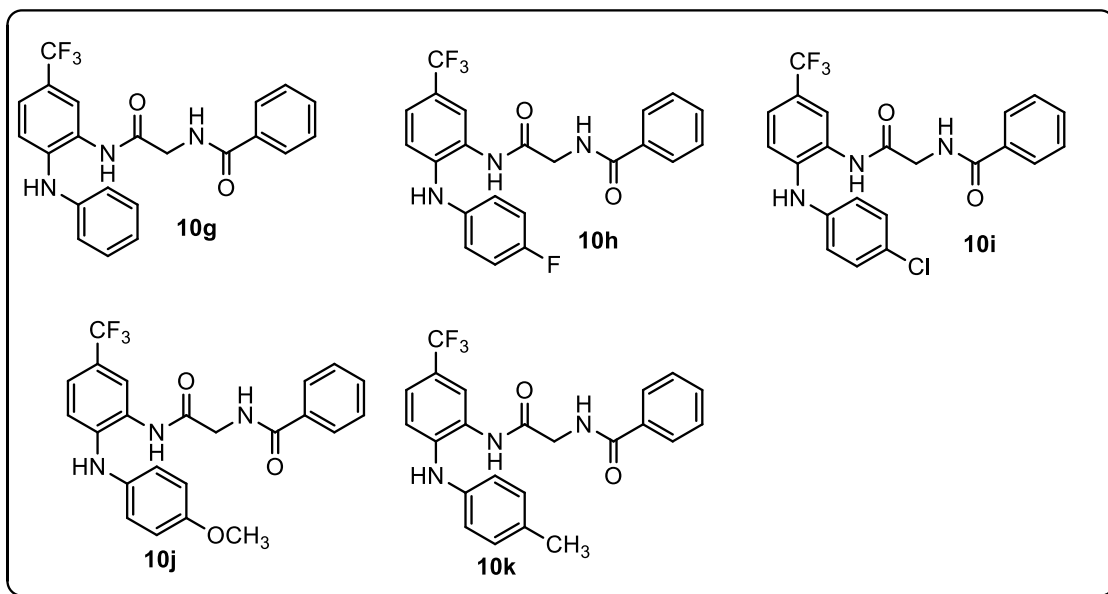


Figura 2.3 – Cont.

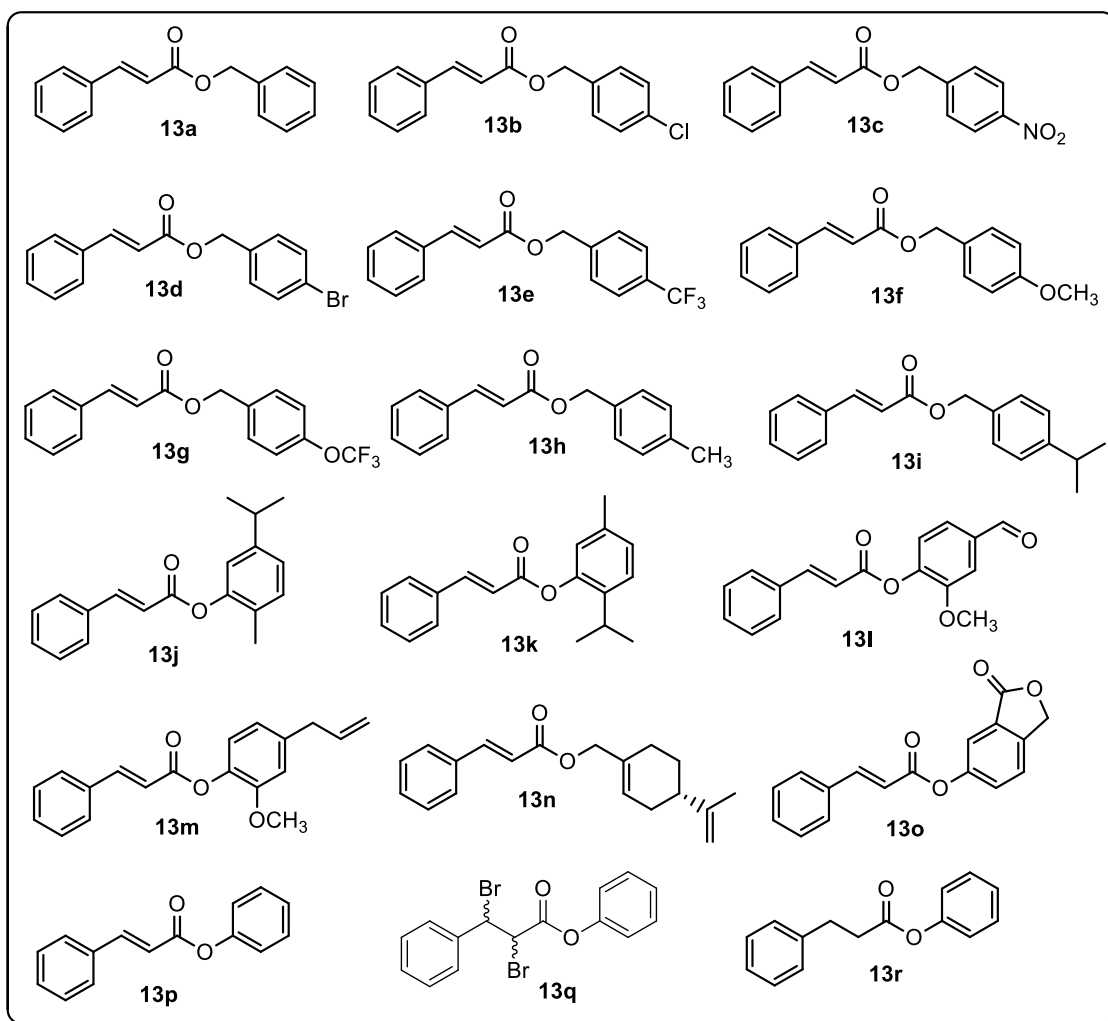


Figura 2.4 - Estruturas dos derivados do ácido cinâmico sintetizados.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Generalidades Metodológicas

Na síntese dos compostos foram utilizados reagentes de grau P. A.

Álcool benzílico, álcool 4-nitrobenzílico, álcool 4-bromobenzílico, álcool 4-clorobenzílico, álcool 4-trifluorometoxibenzílico, álcool 4-trifluorometilbenzílico, álcool 4-metoxibenzílico, álcool 4-metilbenzílico, álcool 4-isopropilbenzílico, álcool perfílico, carvacrol, eugenol, vanilina, timol, ácido cinâmico, *N,N*-dícicloexilcarbodiimida (DCC), 4-*N,N'*-dimetilaminopiridina (DMAP), diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), glicina, fenilalanina, ácido canforsulfônico, 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometil)benzeno, 4-bromoanilina, piperidina pirrolidina, morfolina, dietilamina, cicloexilamina, anilina, 4-cloroanilina, 4-fluoroanilina, *p*-anisidina, *p*-toluidina e cloreto de benzoíla foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). Ácido clorídrico, acetonitrila, hidróxido de sódio, cloreto de estanho (II) anidro e bicarbonato de sódio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Cloreto de sódio e sulfato de sódio foram adquiridos da Fmaia (Belo Horizonte, Brasil).

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

As separações em colunas foram feitas utilizando-se sílica-gel (70 - 230 mesh) como fase estacionária. Os solventes utilizados como eluentes foram destilados.

A secagem do diclorometano foi feita adicionando-se peneira molecular 4Å ao solvente. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente e sob atmosfera de nitrogênio. Após este período, o solvente foi filtrado sob atmosfera de nitrogênio e armazenado em um frasco âmbar contendo peneira molecular 4Å.

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

Os espectros no infravermelho foram obtidos empregando-se a técnica reflectância total atenuada (ATR) em equipamento Varian 660-IR com acessório GladiATR.

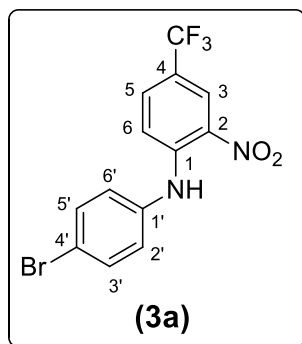
Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 300 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 75 MHz) foram obtidos em espectrômetro VARIAN MERCURY 300. Espectros de RMN também foram obtidos (RMN de ^1H , 400 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 100 MHz) em espectrômetro Bruker. Para a aquisição dos espectros, foram utilizados como solventes clorofórmio (CDCl_3), dimetilsulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$) e metanol (CD_3OD) deuterados. As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em aparelho Q-Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Germany).

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

2.4.2 Procedimentos sintéticos

2.4.2.1 Síntese da *N*-(4-bromofenil)-2-nitro-4-(trifluorometil)anilina



A um balão de fundo redondo (50,0 mL) foram adicionados 1,81 g (10,5 mmol) de 4-bromoanilina, 3,00 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF) e 0,670 mL (4,78 mmol) de 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometil)benzeno (**1**) a 0 °C. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 4 horas. Após este período, adicionou-se à mistura 8,00 mL de água destilada e a mistura resultante foi transferida para um funil de separação. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4x25,0 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e a fase orgânica resultante foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de

sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O sólido resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (5:1 v/v), resultando na obtenção da substância **3a** com 87% de rendimento (1,50 g; 4,16 mmol).

Característica: sólido alaranjado.

CCD: $R_f = 0,78$ (hexano-acetato de etila 5:1 v/v).

T_f = 89,5-89,9 °C.

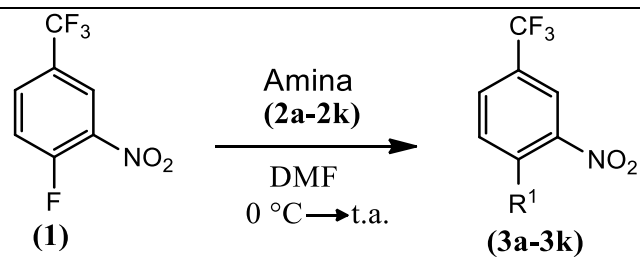
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3348, 3103, 1636, 1571, 1528, 1487, 1431, 1320, 1251, 1147, 1070, 1012. O espectro é apresentado na Figura 1 do Anexo II, pg. 317.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 7,15-7,26 (m, 3H, H-2'/H-6' e H-6); 7,54-7,60 (m, 3H, H-5 e H-3'/H-5'); 8,50 (s, 1H, H-3); 9,63 (sl, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 2 do Anexo II, pg. 318.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 116,7 (C-4'); 120,1(q, $J_{C-F} = 34,1$ Hz, C-4); 120,2 (C-6); 123,5 (q, $J_{C-F} = 269,5$ Hz, CF₃); 125,0 (q, $J_{C-F} = 4,2$ Hz, C-3); 126,9 (C-2'/C-6'); 132,1 (q, $J_{C-F} = 3,0$ Hz, C-5); 132,4 (C-2); 133,4 (C-3'/C-5'); 136,9 (C-1'); 145,0 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 3 do Anexo II, pg. 319.

Os compostos **3b-3k** foram sintetizados empregando-se a mesma metodologia descrita para a preparação do composto **3a**. Na Tabela 2.1 (pg. 47) estão descritas as informações relativas às reações que foram realizadas para a preparação dos nitrocompostos **3a-3k**.

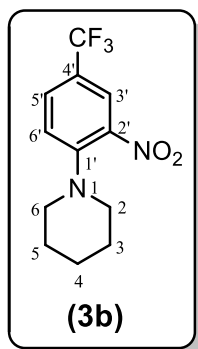
Tabela 2.1 - Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos compostos **3a-3k**



Composto	Volume de 1 (mL)	Amina/ Quantidade utilizada	Volume de DMF (mL)	Tempo de reação (h)	Massa de produto obtida (g)	Rendimento (%)
3a	0,670	4-bromo anilina/1,81 g	3,0	4,0	1,50	87
3b	0,670	piperidina/1,50 mL	2,5	1,5	1,19	91
3c	1,05	pirrolidina/1,75 mL	2,0	4,0	1,89	97
3d	1,05	morfolina/1,30 mL	3,0	4,5	2,01	97
3e	1,05	dietilamina/1,65 mL	3,0	2,0	1,93	98
3f	1,00	cicloexilamina/2,30 mL	5,0	1,0	1,67	81
3g	0,750	anilina/1,50 g	3,0	4,0	1,40	93
3h	0,800	4-fluoro anilina/1,90 g	3,0	3,5	1,60	93
3i	0,670	4-cloro anilina/1,83 g	2,5	4,0	1,35	89
3j	0,670	4-metoxi anilina/1,47 g	2,5	2,0	1,40	94
3k	0,670	4-metil anilina/1,28 g	2,5	1,5	1,35	95

As estruturas dos compostos **3b-3k** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

1-[2-nitro-4-(trifluorometil)fenil]piperidina



Característica: sólido alaranjado purificado via recristalização empregando metanol como solvente.

CCD: $R_f = 0,40$ (hexano-acetato de etila 16:1 v/v).

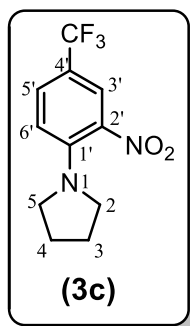
$T_f = 50,1-50,7\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 2939, 2868, 2827, 1622, 1561, 1528, 1494, 1449, 1387, 1324, 1297, 1260, 1233, 1212, 1149, 1116, 1080, 1064. O espectro é apresentado na Figura 2.5, pg. 116.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,61-1,75 (m, 6H, H-3/H-4/H-5); 3,12 (t, 4H, $J = 5,3$ Hz, H-2 e H-6); 7,14 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-6'); 7,60 (dd, 1H, $J = 2,3$ Hz e $J = 8,7$ Hz, H-5'); 8,03 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz, H-3'). O espectro é apresentado na Figura 2.6, pg. 117.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 24,0 (C-4); 25,8 (C-3/C-5); 52,3 (C-2/C-6); 120,6 (C-6'); 120,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,1$ Hz, C-4); 123,7 (q, $J_{\text{C-F}} = 269,6$ Hz, CF_3); 124,6 (q, $J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-3'); 130,1 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,3$ Hz, C-5'); 139,8 (C-2'); 148,8 (C-1'). O espectro é apresentado na Figura 2.7, pg. 118.

1-[2-nitro-4-(trifluorometil)fenil]pirrolidina



Característica: sólido alaranjado purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (5:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,45$ (hexano-acetato de etila 5:1 v/v).

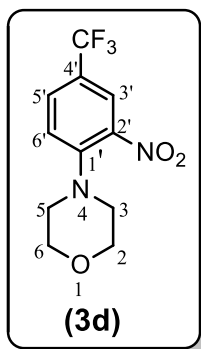
$T_f = 52,3-53,8$ °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 2976, 2872, 1622, 1555, 1504, 1429, 1389, 1323, 1269, 1150, 1103, 1074. O espectro é apresentado na Figura 4 do Anexo II, pg. 320.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,99-2,03 (m, 4H, H-3/H-4); 3,23-3,27 (m, 4H, H-2/H-5); 6,95 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, H-6'); 7,53 (dd, 1H, $J = 2,4$ Hz e $J = 9,0$ Hz, H-5'); 7,99 (sl, 1H, H-3'). O espectro é apresentado na Figura 5 do Anexo II, pg. 321.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 25,8 (C-3/C-4); 50,9 (C-2/C-5); 116,4 (C-6'); 117,1 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,2$ Hz, C-4'); 124,0 (q, $J_{\text{C-F}} = 269,0$ Hz, CF_3); 124,7 (q, $J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-3'); 129,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,2$ Hz, C-5'); 135,9 (C-2'); 144,4 (C-1'). O espectro é apresentado na Figura 6 do Anexo II, pg. 322.

4-[2-nitro-4-(trifluorometil)fenil]morfolina



Característica: óleo alaranjado purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (3:1 v/v).

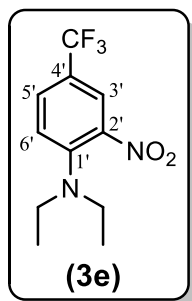
CCD: $R_f = 0,27$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 2968, 2858, 1713, 1622, 1533, 1323, 1275, 1252, 1235, 1168, 1110, 1083, 1044. O espectro é apresentado na Figura 7 do Anexo II, pg. 323.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,13 (t_{ap} , 4H, $J = 4,7$ Hz, H-3/H-5); 3,84 (t, 4H, $J = 4,7$ Hz, H-2/H-6); 7,16 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-6'); 7,68 (dd, 1H, $J = 2,3$ Hz e $J = 8,7$ Hz, H-5'); 8,05 (sl, 1H, H-3'). O espectro é apresentado na Figura 8 do Anexo II, pg. 324.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 51,4 (C-3/C-5); 66,6 (C-2/C-6); 120,6 (C-6'); 122,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,2$ Hz, C-4'); 123,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 270,3$ Hz, CF_3); 124,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,9$ Hz, C-3'); 130,5 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,3$ Hz, C-5'); 141,0 (C-2'), 148,1 (C-1'). O espectro é apresentado na Figura 9 do Anexo II, pg. 325.

***N,N*-dietil-2-nitro-4-(trifluorometil)anilina**



Característica: óleo alaranjado purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (8:1 v/v).

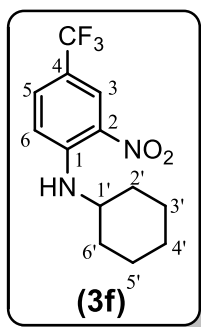
CCD: $R_f = 0,55$ (hexano-acetato de etila 8:1 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 2980, 2939, 2877, 1622, 1531, 1323, 1258, 1114, 1083. O espectro é apresentado na Figura 10 do Anexo II, pg. 326.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,16 (t, 6H, $J = 7,1$ Hz, 2CH_3); 3,26 (q, 4H, $J = 7,1$ Hz, 2CH_2); 7,14 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, H-6'); 7,56 (dd, 1H, $J = 2,0$ Hz e $J = 8,6$ Hz, H-5'); 7,96 (sl, 1H, H-3'). O espectro é apresentado na Figura 11 do Anexo II, pg. 327.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 12,6 (2CH_3); 46,1 (2CH_2); 119,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,0$ Hz, C-4'); 120,6 (C-6'); 123,8 (q, $J_{\text{C-F}} = 269,3$ Hz, CF_3); 124,5 (q, $J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-3'); 129,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,3$ Hz, C-5'); 139,8 (C-2'); 146,7 (C-1'). O espectro é apresentado na Figura 12 do Anexo II, pg. 328.

N-cicloexil-2-nitro-4-(trifluorometil)anilina



Característica: sólido amarelo purificado via recristalização empregando metanol como solvente.

CCD: $R_f = 0,10$ (hexano).

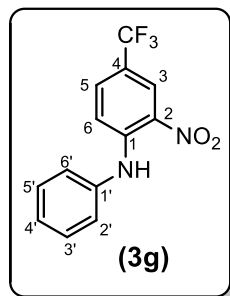
T_f = 79,3-80,2 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 3366, 3115, 2932, 2861, 1634, 1572, 1530, 1436, 1412, 1325, 1261, 1245, 1228, 1188, 1152, 1112, 1063. O espectro é apresentado na Figura 13 do Anexo II, pg. 329.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,31-2,07 (m, 10H, H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'); 3,51-3,61 (m, 1H, H-1'); 6,95 (d, 1H, $J = 9,3$ Hz, H-6); 7,56 (dd, 1H, $J = 2,1$ Hz e $J = 9,3$ Hz, H-5); 8,34 (dl, 1H, $J = 6,3$ Hz, NH); 8,45 (dl, 1H, $J = 1,2$ Hz, H-3). O espectro é apresentado na Figura 14 do Anexo II, pg. 330.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 24,6 (C-3'/C-5'); 25,6 (C-4'); 32,7 (C-2'/C-6'); 51,5 (C-1'); 115,1 (C-6); 117,0 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,1$ Hz, C-4); 123,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 269,0$ Hz, CF_3); 125,4 (q, $J = 4,3$ Hz, C-3); 130,7 (C-2); 132,1 (q, $J = 3,0$ Hz, C-5); 146,3 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 15 do Anexo II, pg. 331.

***N*-fenil-2-nitro-4-(trifluorometil)anilina**



Característica: sólido alaranjado purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (5:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,41$ (hexano-acetato de etila 5:1 v/v).

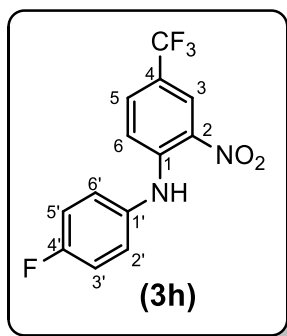
T_f = 82,6-83,5 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3344, 3101, 1633, 1572, 1528, 1494, 1422, 1324, 1255, 1146, 1070. O espectro é apresentado na Figura 16 do Anexo II, pg. 332.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,22-7,35 (m, 4H, H-2'/H-6'/H-4' e H-6); 7,45-7,55 (m, 3H, H-5 e H-3'/H-5'); 8,51 (s, 1H, H-3); 9,72 (sl, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 17 do Anexo II, pg. 333.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 116,6 (C-6/C-4'); 119,3 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,0$ Hz, C-4); 123,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 269,2$ Hz, CF_3); 124,7 (q, $J_{\text{C-F}} = 4,3$ Hz, C-3); 125,2 (C-2'/C-6'); 126,9 (C-2); 130,0 (C-3'/C-5'); 131,7 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,1$ Hz, C-5); 137,5 (C-1'); 145,3 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 18 do Anexo II, pg. 334.

***N*-(4-fluorofenil)-2-nitro-4-(trifluorometil)anilina**



Característica: sólido alaranjado purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (5:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,40$ (hexano-acetato de etila 5:1 v/v).

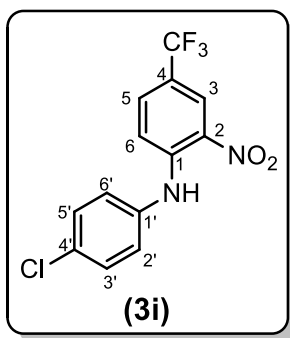
$T_f = 81,4-82,0\text{ }^\circ\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3346, 3103, 1634, 1573, 1504, 1434, 1412, 1321, 1257, 1149, 1101, 1077. O espectro é apresentado na Figura 19 do Anexo II, pg. 335.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,08 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, H-6); 7,14-7,30 (m, 4H, H-2'/H-3'/H-5'/H-6'); 7,54 (dd, 1H, $J = 2,4$ Hz e $J = 9,0$ Hz, H-5); 8,50 (s, 1H, H-3); 9,61 (sl, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 20 do Anexo II, pg. 336.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 116,3 (C-6); 117,0 (d, $J_{\text{C-F}} = 22,4$ Hz, C-3' e C-5'); 119,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,3$ Hz, C-4); 123,3 (q, $J_{\text{C-F}} = 269,5$ Hz, CF_3); 124,7 (q, $J_{\text{C-F}} = 4,3$ Hz, C-3); 127,6 (d, $J_{\text{C-F}} = 8,6$ Hz, C-2'/C-6'); 131,8 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,1$ Hz, C-5); 133,4 (d, $J_{\text{C-F}} = 3,2$ Hz, C-1'); 145,7 (C-1); 161,3 (d, $J_{\text{C-F}} = 246,0$ Hz, C-4'). O espectro é apresentado na Figura 21 do Anexo II, pg. 337.

***N*-(4-clorofenil)-2-nitro-4-(trifluorometil)anilina**



Característica: sólido alaranjado purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (6:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,49$ (hexano-acetato de etila 6:1 v/v).

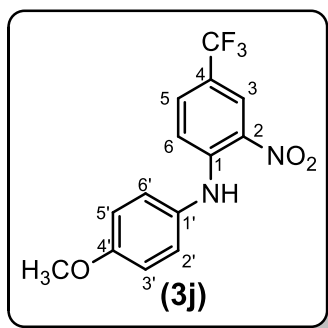
$T_f = 85,0-85,5\text{ }^\circ\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3348, 3101, 1636, 1572, 1528, 1490, 1434, 1320, 1251, 1149, 1081, 1015. O espectro é apresentado na Figura 22 do Anexo II, pg. 338.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,17-7,25 (m, 3H, H-2'/H-6' e H-6); 7,42-7,46 (m, 2H, H-3'/H-5'); 7,56 (dd, 1H, $J = 2,3$ Hz e $J = 9,2$ Hz, H-5); 8,51 (sl, 1H, H-3); 9,63 (sl, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 23 do Anexo II, pg. 339.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 116,4 (C-4'/C-6); 119,8 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,2$ Hz, C-4); 123,3 (q, $J_{\text{C-F}} = 269,6$ Hz, CF_3); 124,8 (q, $J_{\text{C-F}} = 4,3$ Hz, C-3); 126,4 (C-2'/C-6'); 130,2 (C-3'/C-5'); 131,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,2$ Hz, C-5); 132,3 (C-2); 136,1 (C-1'); 144,9 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 24 do Anexo II, pg. 340.

***N*-(4-metoxifenil)-2-nitro-4-(trifluorometil)anilina**



Característica: sólido vermelho purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,51$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

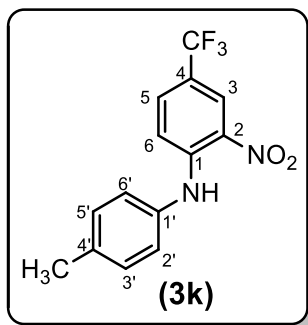
T_f = 88,5-89,3 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 3351, 3103, 3012, 2954, 2837, 1634, 1573, 1505, 1441, 1324, 1242, 1141, 1097. O espectro é apresentado na Figura 25 do Anexo II, pg. 341.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,86 (s, 3H, OCH_3); 6,97-7,06 (m, 3H, H-3'/H-5' e H-6); 7,19-7,21 (m, 2H, H-2'/H-6'); 7,49 (dd, 1H, $J = 2,3$ Hz e $J = 9,2$ Hz, H-5); 8,49 (sl, 1H, H-3); 9,60 (sl, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 26 Anexo II, pg. 342.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 55,5 (OCH_3); 115,2 (C-3'/C-5'); 116,5 (C-6); 118,7 (q, $J_{\text{C-F}} = 34,2$ Hz, C-4); 123,5 (q, $J_{\text{C-F}} = 269,3$ Hz, CF_3); 124,7 (q, $J_{\text{C-F}} = 4,3$ Hz, C-3); 127,4 (C-2'/C-6'); 129,9 (C-2); 131,3 (C-1'); 131,6 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,1$ Hz, C-5); 146,4 (C-1); 158,6 (C-4'). O espectro é apresentado na Figura 27 do Anexo II, pg. 343.

N-(4-metilfenil)-2-nitro-4-(trifluorometil)anilina



Característica: sólido alaranjado purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,51$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

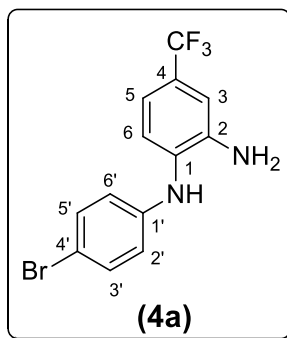
$T_f = 113,7-114,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 3348, 3101, 3034, 2926, 2866, 1636, 1572, 1507, 1411, 1322, 1252, 1106, 1080. O espectro é apresentado na Figura 28 do Anexo II, pg. 344.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,35 (s, 3H, CH_3); 7,13 (d, 1H, $J = 8,8\text{ Hz}$, H-6); 7,25 (d, 2H, $J = 8,4\text{ Hz}$, H-2' e H-6'); 7,25 (d, 2H, $J = 8,0\text{ Hz}$, H-3' e H-5'); 7,73 (dd, 1H, $J = 2,2\text{ Hz}$ e $J = 9,0\text{ Hz}$, H-5); 8,36 (d_{ap} , 1H, $J = 1,2\text{ Hz}$, H-3); 9,76 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 29 do Anexo II, pg. 345.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 21,0 (CH_3); 117,2 (q, $J_{\text{C-F}} = 33,4\text{ Hz}$, C-4); 117,9 (C-6); 124,1 (q, $J_{\text{C-F}} = 269,0\text{ Hz}$, CF_3); 124,5 (q, $J_{\text{C-F}} = 4,3\text{ Hz}$, C-3); 126,0 (C-2'/C-6'); 130,6 (C-3'/C-5'); 132,0 (C-4'); 132,1 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,0\text{ Hz}$, C-5); 135,9 (C-2); 136,3 (C-1'); 145,8 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 30 do Anexo II, pg. 346.

2.4.2.2 Síntese da *N*-4-(bromofenil)-4-(trifluorometil)benzeno-1,2-diamina



A um balão de fundo redondo (100 mL) foram adicionados 7,60 mL (91,7 mmol) de ácido clorídrico concentrado, 5,65 g (25,0 mmol) de cloreto de estanho, 20,0 mL de metanol e 1,40 g (3,88 mmol) de 1-[2-nitro-4-(trifluorometil)]fenil]piperidina (**3a**) a 0 °C. A mistura de reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 46 horas. Após este período, a mistura foi neutralizada com solução de NaOH até pH aproximadamente igual a 10 e transferida para um funil de separação. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (4x80,0 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e a fase orgânica resultante foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio, 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 (5:1 v/v), obtendo-se a substância **4a** com 79% de rendimento (1,01 g; 3,05 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,25$ (hexano-acetato de etila 5:1 v/v).

T_f = 123,5-123,8 °C.

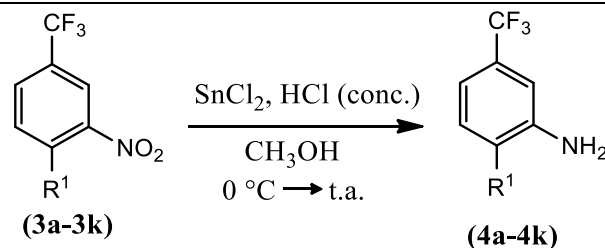
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3469, 3384, 1592, 1518, 1485, 1436, 1386, 1335, 1249, 1154, 1106. O espectro é apresentado na Figura 31 do Anexo II, pg. 347.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,73 (sl, 2H, NH₂); 5,39 (sl, 1H, NH); 6,72 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H-2'/H-6'); 7,01-7,05 (m, 2H, H-3 e H-5); 7,16 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,34 (d_{ap}, 2H, $J = 9,0$ Hz, H-3'/H-5'). O espectro é apresentado na Figura 32 do Anexo II, pg. 348.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 113,0 (C-4'); 113,6 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz, C-3); 117,0 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,9$ Hz, C-5); 118,6 (C-2'/C-6'); 121,9 (C-6); 124,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 270,2$ Hz, CF_3); 126,7 (q, $J_{\text{C-F}} = 32,3$ Hz, C-4); 132,5 (C-3'/C-5'); 132,7 (C-2); 139,5 (C-1); 142,7 (C-1'). O espectro é apresentado na Figura 33 do Anexo II, pg. 349.

Os compostos **4b-4k** foram sintetizados empregando-se a mesma metodologia descrita para a preparação do composto **4a**. Na Tabela 2.2 (pg. 58) estão descritas as informações relativas às reações que foram realizadas para a preparação dos compostos **4a-4k**.

Tabela 2.2 - Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos compostos **4a-4k**

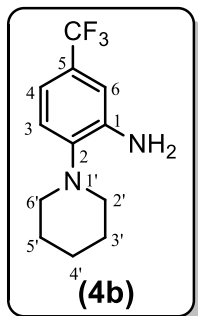


Composto	Nitrocomposto/ massa (g)	Massa de SnCl ₂ (g)	Volume de HCl concentrado (mL)	Volume de metanol (mL)	Tempo de reação (h)	Massa de produto (g)	Rendimento (%)
4a	3a /1,40	5,65	7,60	20,0	46	1,01	79
4b	3b /1,10	5,85	7,90	15,0	42	0,76	78
4c	3c /1,80	10,0	13,0	20,0	7	1,22	77
4d	3d /1,82	8,95	15,0	20,0	42	1,58	94
4e	3e /1,80	10,0	13,5	20,0	24	1,07	67
4f	3f /1,60	8,10	11,0	20,0	42	0,80	56
4g	3g /1,35	7,58	10,0	18,0	42	0,93	77
4h*	3h /1,24	6,48	8,50	15,0	41	ND	ND
4i	3i /1,25	6,24	8,20	15,0	43	0,88	78
4j*	3j /1,33	6,73	8,80	15,0	48	ND	ND
4k*	3k /1,00	5,34	7,00	12,0	24	ND	ND

* Os compostos não foram purificados devido a formação de uma mistura complexa de produtos, com valores de R_f muito próximos, o que dificultou o processo de separação por cromatografia em coluna de sílica gel. Assim, estas aminas não purificadas foram utilizadas na etapa subsequente de preparação das correspondentes diamidas. ND: não determinado.

As estruturas dos compostos **4b-4k** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil)anilina



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (11:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,48$ (hexano-acetato de etila 11:1 v/v).

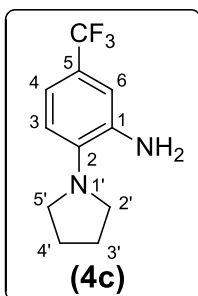
T_f = 50,0-50,5 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3453, 3356, 2950, 2866, 2805, 1611, 1590, 1513, 1470, 1440, 1380, 1328, 1289, 1257, 1228, 1205, 1160, 1104, 1065. O espectro é apresentado na Figura 2.8, pg. 120.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,60-1,75 (m, 6H, H-3'/H-5' e H-4'); 2,87 (sl, 4H, H-2'/H-6'); 4,11 (sl, 2H, NH₂); 6,93-7,03 (m, 3H, H-3/H-4/H-6). O espectro é apresentado na Figura 2.9, pg. 121.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 24,5 (C-4'); 26,9 (C-3'/C-5'); 52,5 (C-2'/C-6'); 111,5 (q, $J_{C-F} = 3,5$ Hz, C-6); 115,5 (q, $J_{C-F} = 4,0$ Hz, C-4); 119,7 (C-3); 124,7 (q, $J_{C-F} = 270,0$ Hz, CF₃); 126,1 (q, $J_{C-F} = 31,9$ Hz, C-5); 141,8 (C-2); 143,5 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 2.10, pg. 122.

2-(pirrolidin-1-il)-5-(trifluorometil)anilina



Característica: óleo violáceo purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (12:1 v/v).

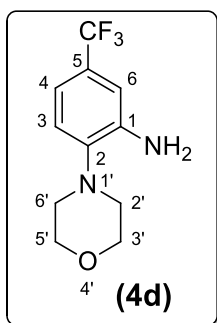
CCD: $R_f = 0,68$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3440, 3356, 2970, 2877, 2823, 1711, 1618, 1517, 1439, 1328, 1245, 1149, 1106. O espectro é apresentado na Figura 34 do Anexo II, pg. 350.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,91-1,97 (m, 4H, H-3'/H-4'); 3,09-3,13 (m, 4H, H-2'/H-5'); 3,92 (s, 1H, NH); 6,92-6,98 (m, 3H, H-3/H-4/H-6). O espectro é apresentado na Figura 35 do Anexo II, pg. 351.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 24,4 (C-3'/C-4'); 50,7 (C-2'/C-5'); 112,1 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-6); 115,8 (q, $J_{\text{C-F}} = 4,1$ Hz, C-4); 117,8 (C-3); 124,84 (q, $J_{\text{C-F}} = 269,6$ Hz, CF_3); 124,82 (q, $J_{\text{C-F}} = 31,8$ Hz, C-5); 140,8 (C-1 e C-2). O espectro é apresentado na Figura 36 do Anexo II, pg. 352.

2-morfolino-5-(trifluorometil)anilina



Característica: sólido branco obtido sem necessidade de métodos de purificação.

CCD: $R_f = 0,48$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

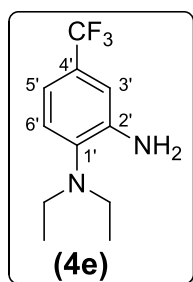
$T_f = 130,6\text{-}131,1$ °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3431, 3338, 2827, 2823, 1621, 1515, 1448, 1331, 1257, 1218, 1153, 1099. O espectro é apresentado na Figura 37 do Anexo II, pg. 353.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,95 (t, 4H, $J = 4,7$ Hz, H-2'/H-6'); 3,87 (t, 4H, $J = 4,7$ Hz, H-3'/H-5'); 6,96-7,05 (m, 3H, H-3/H-4/H-6). O espectro é apresentado na Figura 38 do Anexo II, pg. 354.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 51,2 (C-2'/C-6'); 67,6 (C-3'/C-5'); 111,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz, C-6); 115,7 (q, $J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-4); 119,8 (C-3); 124,6 (q, $J_{\text{C-F}} = 270,0$ Hz, CF_3); 126,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 32,0$ Hz, C-5); 141,7 (C-1 e C-2). O espectro é apresentado na Figura 39 do Anexo II, pg. 355.

***N,N*-dietil-4-(trifluorometil)benzeno-1,2-diamina**



Característica: óleo amarelo purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (12:1 v/v).

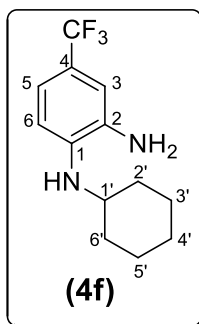
CCD: $R_f = 0,22$ (hexano-acetato de etila 30:1 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx.}}(\text{cm}^{-1})$: 3469, 3363, 2973, 2934, 2870, 2827, 1616, 1594, 1514, 1441, 1384, 1335, 1294, 1261, 1233, 1164, 1120. O espectro é apresentado na Figura 40 do Anexo II, pg. 356.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 0,99 (t, 6H, $J = 7,1$ Hz, 2CH_3); 2,99 (q, 4H, $J = 7,1$ Hz, 2CH_2); 4,19 (sl, 2H, NH_2); 6,95-6,97 (m, 2H, H-3' e H-5'); 7,05 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-6'). O espectro é apresentado na Figura 41 do Anexo II, pg. 357.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 12,3 (2CH_3); 46,6 (2CH_2); 111,3 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz, C-3'); 114,6 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,9$ Hz, C-5'); 122,6 (C-6'); 126,2 (CF_3); 126,3 (q, $J_{\text{C-F}} = 31,8$ Hz, C-4'); 139,9 (C-2'); 143,7 (C-1'). O espectro é apresentado na Figura 42 do Anexo II, pg. 358.

1-*N*-cicloexil-4-(trifluorometil)benzeno-1,2-diamina



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (14:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,25$ (hexano-acetato de etila 14:1 v/v).

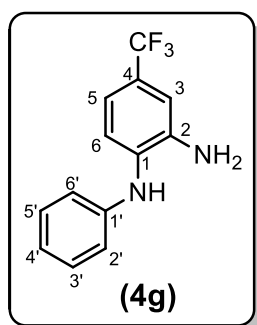
T_f = 71,6-72,0 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3421, 3350, 2929, 2855, 1626, 1602, 1528, 1471, 1441, 1362, 1324, 1300, 1241, 1218, 1146, 1107, 1085. O espectro é apresentado na Figura 43 do Anexo II, pg. 359.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,21-2,10 (m, 10H, H-2'/H-6', H-3'/H-5' e H-4'); 3,25-3,37 (m, 4H, NH₂, NH e H-1'); 6,66 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-6); 6,93 (d_{ap}, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-3); 7,09 (dd, 1H, $J = 1,8$ Hz e $J = 8,4$ Hz, H-5). O espectro é apresentado na Figura 44 do Anexo II, pg. 360.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 25,1 (C-3'/C-5'); 26,1 (C-4'); 33,4 (C-2'/C-6'); 51,8 (C-1'); 110,9 (C-6); 113,9 (q, $J_{C-F} = 3,6$ Hz, C-3); 118,6 (q, $J_{C-F} = 4,1$ Hz, C-5); 119,3 (q, $J_{C-F} = 32,1$, C-4); 125,2 (q, $J_{C-F} = 268,9$ Hz, CF₃); 133,3 (C-2); 140,0 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 45 do Anexo II, pg. 361.

N-fenil-4-(trifluorometil)benzeno-1,2-diamina



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (3:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,34$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

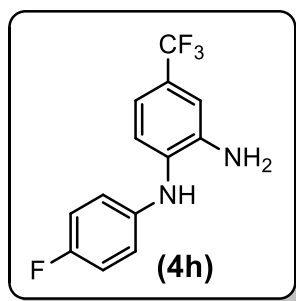
$T_f = 101,7-102,5\text{ }^\circ\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3444, 3365, 3311, 1624, 1594, 1516, 1423, 1333, 1246, 1164, 1097. O espectro é apresentado na Figura 46 do Anexo II, pg. 362.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,51 (sl, 2H, NH_2); 5,29 (sl, 1H, NH); 6,87-7,03 (m, 5H, H-2'/H-6'/H-3/H-5/H-6); 7,19-7,31 (m, 3H, H-3'/H-4'/H-5'). O espectro é apresentado na Figura 47 do Anexo II, pg. 363.

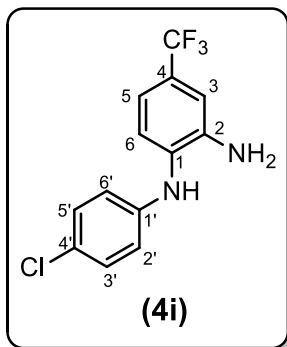
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 113,0 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,8\text{ Hz}$, C-3); 116,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,9\text{ Hz}$, C-5); 117,1 (C-2'/C-6'); 120,9 (C-4'); 121,1 (C-6); 124,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 269,9\text{ Hz}$, CF_3); 125,9 (q, $J_{\text{C-F}} = 32,1\text{ Hz}$, C-4); 129,5 (C-3'/C-5'); 133,1 (C-2); 139,7 (C-1); 143,3 (C-1'). O espectro é apresentado na Figura 48 do Anexo II, pg. 364.

N-(4-fluorofenil)-4-(trifluorometil)benzeno-1,2-diamina



O composto não foi purificado devido a formação de uma mistura complexa de produtos, com valores de R_f muito próximos, o que dificultou o processo de separação por cromatografia em coluna de sílica gel. Assim, esta amina não purificada foi utilizada na etapa subsequente, o que não prejudicou a preparação da correspondente diamida.

***N*-(4-clorofenil)-4-(trifluorometil)benzeno-1,2-diamina**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (3:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,26$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

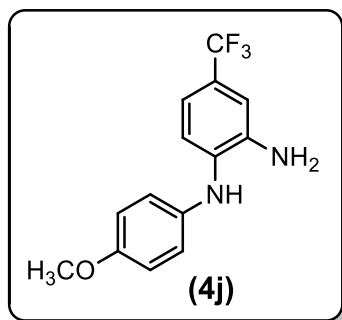
T_f = 106,3-107,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3431, 3352, 3294, 1624, 1587, 1522, 1434, 1337, 1239, 1110, 1086. O espectro é apresentado na Figura 49 do Anexo II, pg. 365.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,49 (sl, 2H, NH₂); 5,32 (sl, 1H, NH); 6,75-6,80 (m, 2H, H-5 e H-6); 6,99-7,02 (m, 2H, H-2' e H-6'); 7,14-7,23 (m, 3H, H-3'/H-5'/H-3). O espectro é apresentado na Figura 50 do Anexo II, pg. 366.

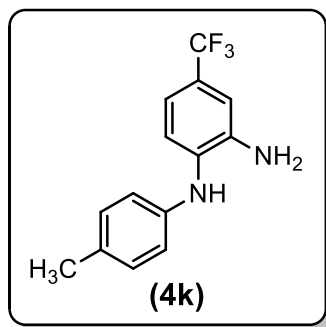
RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 113,1 (q, $J_{C-F} = 3,8$ Hz, C-3); 116,4 (q, $J_{C-F} = 3,9$ Hz, C-5); 118,0 (C-2'/C-6'); 121,6 (C-6); 124,2 (q, $J_{C-F} = 269,9$ Hz, CF₃); 125,5 (C-4'); 126,5 (q, $J_{C-F} = 32,2$ Hz, C-4); 129,4 (C-3'/C-5'); 132,4 (C-2); 139,9 (C-1); 142,1 (C-1'). O espectro é apresentado na Figura 51 do Anexo II, pg. 367.

***N*-(4-metoxifenil)-4-(trifluorometil)benzeno-1,2-diamina**



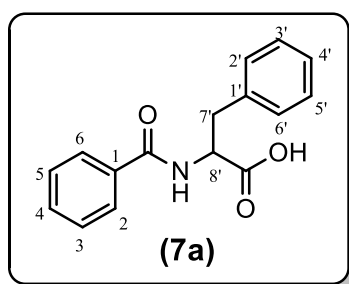
O composto não foi purificado devido a formação de uma mistura complexa de produtos, com valores de R_f muito próximos, o que dificultou o processo de separação por cromatografia em coluna de sílica gel. Assim, esta amina não purificada foi utilizada na etapa subsequente, o que não prejudicou a preparação da correspondente diamida.

***N*-(4-metilfenil)-4-(trifluorometil)benzeno-1,2-diamina**



O composto não foi purificado devido a formação de uma mistura complexa de produtos, com valores de R_f muito próximos, o que dificultou o processo de separação por cromatografia em coluna de sílica gel. Assim, esta amina não purificada foi utilizada na etapa subsequente, o que não prejudicou a preparação da correspondente diamida.

2.4.2.3 Síntese do ácido 2-benzamido-3-fenilpropanóico



A um balão de fundo redondo (100 mL) foram adicionados 5,00 mL de acetonitrila, 15,0 mL de água destilada, 0,500 g (3,00 mmol) de fenilalanina **5a** e 0,480 g (1,20 mmol) de hidróxido de sódio a 0 °C. Em seguida adicionou-se cloreto de benzoíla **6** (0,500 mL; 3,15 mmol) gota a gota. Após a adição completa do cloreto de benzoíla, a mistura de reação permaneceu sob agitação magnética a temperatura ambiente por mais duas horas. Após o término da reação, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida para remoção de acetonitrila e em seguida

neutralizada com ácido clorídrico concentrado. O sólido formado foi filtrado e posteriormente recristalizado em uma mistura de hexano-acetato de etila (1:1 v/v), resultando na obtenção da substância **7a** em 76% de rendimento (0,617 g; 2,30 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,16$ (hexano-acetato de etila 1:2 v/v).

T_f = 175,4-176,5 °C.

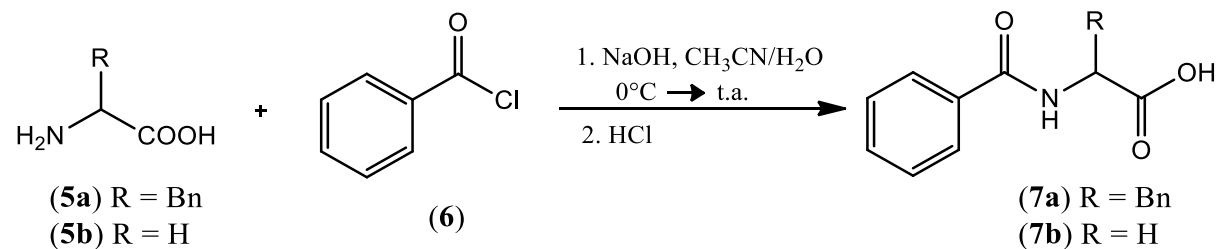
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3527, 3340, 3028, 2910, 1714, 1634, 1518, 1490, 1240, 1190. O espectro é apresentado na Figura 2.11, pg. 126.

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,02-3,22 (m, 2H, H-7'); 4,57-4,65 (m, 1H, H-8'); 7,14-7,32 (m, 5H, H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'); 7,41-7,53 (m, 3H, H-3/H-4/H-5); 7,78 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, H-2 e H-6); 8,71 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, NH); 12,8 (sl, 1H, COOH). O espectro é apresentado na Figura 2.12, pg. 127.

RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 36,7 (C-7'); 54,7 (C-8'); 126,8 (C-4'); 127,8 (C-2/C-6); 128,6 (C-3/C-5); 128,7 (C-3'/C-5'); 129,5 (C-2'/C-6'); 131,8 (C-4); 134,3 (C-1); 138,6 (C-1'); 166,8 (C=O); 173,7 (COOH). O espectro é apresentado na Figura 2.13, pg. 128.

Para a síntese do aminoácido benzoilado **7b**, empregou-se a mesma metodologia descrita para a preparação do composto **7a**. Na Tabela 2.3 (pg. 67) estão descritas as informações referentes às reações de preparação dos compostos **7a** e **7b**.

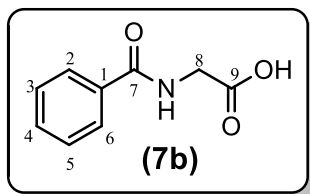
Tabela 2.3 - Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos compostos **7a** e **7b**



Composto	Aminoácido/ massa (g)	Massa de cloreto de benzoíla (g)	Massa de NaOH (g)	Volume de acetonitrila (mL)	Volume de água (mL)	Tempo de reação (h)	Massa de produto obtida (g)	Rendimento (%)
7a	Fenilalanina/0,500	0,443	0,480	5,0	15,0	2,5	0,617	76
7b	Glicina/0,500	0,983	1,07	15,0	45,0	2,5	1,00	84

A estrutura do composto **7b** é suportada pelos dados apresentados a seguir.

Ácido 2-benzamidoetanóico



Característica: sólido branco purificado por recristalização utilizando acetona.

CCD: $R_f = 0,20$ (hexano-acetato de etila 1:2 v/v).

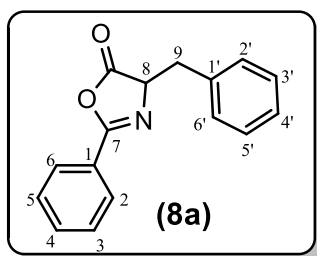
$T_f = 184,2-185,3$ °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3336, 3072, 2935, 1740, 1599, 1554, 1489, 1256, 1177. O espectro é apresentado na Figura 52 do Anexo II, pg. 368.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3,93 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, H-8); 7,48 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, H-3 e H-5); 7,55 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz, H-4); 7,88 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-2 e H-6); 8,85 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, NH); 12,6 (sl, 1H, COOH). O espectro é apresentado na Figura 53 do Anexo II, pg. 369.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 41,7 (C-8); 127,7 (C-2/C-6); 128,8 (C-3/C-5); 131,9 (C-4); 134,3 (C-1); 166,9 (C-7); 171,8 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 54 do Anexo II, pg. 370.

2.4.2.4 Síntese do 4-benzil-2-feniloxazol-5(4H)-ona



A um balão de duas vias de 25,0 mL, previamente flambado e sob atmosfera inerte contendo N_2 , adicionaram-se 0,432 g (1,61 mmol) de ácido 2-benzamido-3-fenilpropanóico (**7a**) e 12,0 mL de diclorometano anidro. Em seguida o sistema foi colocado em banho de gelo e adicionou-se 0,324 g (1,69 mmol) de cloridrato de 1-

etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida (EDC). A mistura de reação permaneceu sob agitação magnética por 1 hora e posteriormente a solução foi lavada com água gelada (7x20,0 mL). A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Não foi necessário purificação, obtendo-se a substância **8a** com 89% de rendimento (0,359 g; 1,43 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,49$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

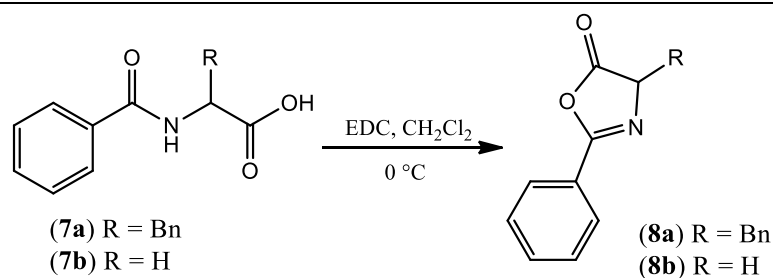
$T_f = 64,4-65,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,21 (dd, 1H, $J = 14,0\text{ Hz}$ e $J = 6,6\text{ Hz}$, H-9a); 3,40 (dd, 1H, $J = 14,0\text{ Hz}$ e $J = 5,0\text{ Hz}$, H-9b); 4,71 (dd, 1H, $J = 6,6\text{ Hz}$ e $J = 5,0\text{ Hz}$, H-8); 7,23-7,30 (m, 5H, H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'); 7,44-7,49 (m, 2H, H-3 e H-5); 7,54-7,59 (m, 1H, H-4); 7,93-7,96 (m, 2H, H-2 e H-6). O espectro é apresentado na Figura 2.14, pg. 131.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 37,3 (C-9); 66,5 (C-8); 125,8 (C-1); 127,2 (C-4'); 127,9 (C-2 e C-6); 128,4 (C-3' e C-5'); 128,7 (C-3 e C-5); 129,6 (C-2' e C-6'); 132,7 (C-4); 135,4 (C-1'); 161,7 (C-7); 177,5 (C=O). O espectro é apresentado na Figura 2.15, pg. 132.

Para a síntese da azalactona **8b**, empregou-se a mesma metodologia descrita para a preparação do composto **8a**. Na Tabela 2.4 (pg. 70) estão descritas as informações referentes a esta reação.

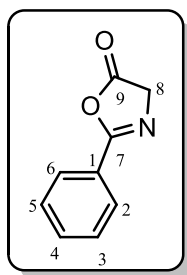
Tabela 2.4 - Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos compostos **8a** e **8b**



Composto	Arlaminoácido/ massa (g)	Massa de EDC (g)	Tempo de reação (h)	Massa de produto (g)	Rendimento (%)
8a	7a /0,432	0,324	1	0,359	89
8b	7b /0,400	0,449	1	0,300	84

A estrutura do composto **8b** é suportada pelos dados apresentados a seguir.

2-feniloxazol-5-(4H)-ona



(**8b**)

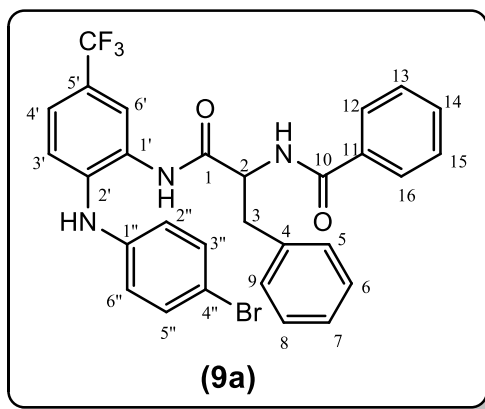
Característica: sólido alaranjado.

$T_f = 89,3-90,1\text{ }^{\circ}\text{C}$

CCD: $R_f = 0,48$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 4,31 (s, 2H, H-8); 7,40 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-3 e H-5); 7,50 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-4); 7,90 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-2 e H-6). O espectro é apresentado na Figura 55 do Anexo II, pg. 371.

2.4.2.5 Síntese da *N*-(1-((2-((4-bromofenil)amino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)benzamida



O procedimento descrito a seguir foi baseado no trabalho publicado por Pereira e colaboradores (2014).

Em um frasco de 5,0 mL previamente flambado e sob atmosfera de N₂ foram adicionados 0,100 g (0,398 mmol) de 4-benzil-2-feniloxazol-5(4*H*)-ona (**8a**) e 9,25 mg (0,0398 mmol) de (±)-ácido canforsulfônico (ACS). Em seguida adicionou-se 0,138 g (0,418 mmol) de *N*-4-(bromofenil)-4-(trifluorometil)benzeno-1,2-diamina **4a** dissolvida em 1,00 mL de diclorometano anidro. A mistura de reação foi mantida à temperatura ambiente, sem agitação magnética, e sob atmosfera de N₂ por 3 minutos. A reação foi monitorada por CCD e após o término da reação a mistura foi diluída em diclorometano (10,0 mL) e lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (5,00 mL). 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 (3:1 v/v), obtendo-se a substância **9a** com 78% de rendimento (0,180 g; 0,309 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: R_f = 0,25 (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

T_f = 206,4-207,2 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3317, 3082, 3032, 2926, 1681, 1632, 1545, 1513, 1486, 1331, 1242, 1157, 1109, 1073. O espectro é apresentado na Figura 56 do Anexo II, pg. 372.

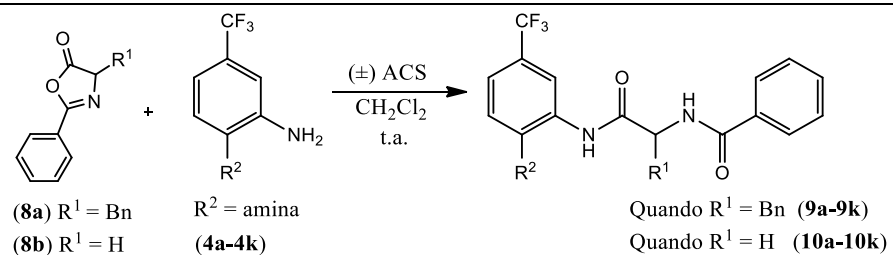
RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 3,06-3,20 (m, 2H, H-3); 4,75-4,83 (m, 1H, H-2); 7,01 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-2'' e H-6''); 7,16-7,75 (m, 14H, H-3'/H-4'/H-6'/H-3''/H-5''/H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-13/H-14/H-15 e NH); 7,81 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, H-12 e H-16); 8,79 (d, 1H, $J = 6,9$ Hz, NH); 9,73 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 57 do Anexo II, pg. 373.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 36,9 (C-3); 56,4 (C-2); 112,9 (C-4''); 117,9 (C-3'); 120,7 (C-2''/C-6''); 121,0 (q, $J_{\text{C-F}} = 32,1$ Hz, C-5'); 123,1 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-6'); 123,6 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz, C-4'); 124,8 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}} = 269,3$ Hz, CF_3); 126,8 (C-7); 127,9 (C-14); 128,0 (C-12/C-16); 128,6 (C-13/C-15); 128,7 (C-6/C-8); 129,7 (C-5/C-9); 132,0 (C-1'); 132,4 (C-3''/C-5''); 134,0 (C-11); 138,4 (C-4); 140,7 (C-2'); 142,0 (C-1''); 167,5 (C-10); 171,6 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 58 do Anexo II, pg. 374.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M-H] $^+$: Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{O}_2\text{N}_3\text{BrF}_3$, 580,08475; encontrado: 580,08661. O espectro é apresentado na Figura 59 do Anexo II, pg. 375.

Para a síntese das diamidas **9b-9k** e **10a-10k** empregou-se a mesma metodologia descrita para a preparação do composto **9a**. Na Tabela 2.5 (pg. 73) estão descritas as informações referentes a estas reações.

Tabela 2.5 - Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos compostos **9a-9k** e **10a-10k**



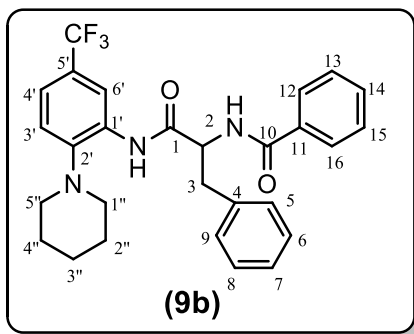
Composto	Azalactona/ massa (mg)	Trifluorometilaril anilina/ massa (mg)	Massa de ACS (mg)	Tempo de reação (min)	Massa de produto (mg)	Rendimento (%)
9a	8a /100	4a /138	9,25	03	180	78
9b	8a /100	4b /102	9,25	05	144	73
9c	8a /120	4c /116	11,1	20	179	93
9d	8a /85	4d /88	7,87	15	150	89
9e	8a /126	4e /122	12,0	15	204	84
9f	8a /100	4f /108	9,24	01	152	75
9g	8a /170	4g /179	15,7	01	292	86
9h	8a /180	4h /203	17,0	04	283	76
9i	8a /120	4i /144	11,1	06	221	86
9j	8a /140	4j /165	13,0	06	166	71

Tabela 2.5 – Cont.

Composto	Azalactona massa (mg)	Trifluorometilaril anilina/ massa (mg)	Massa de ACS (mg)	Tempo de reação (min)	Massa de produto (mg)	Rendimento (%)
9k	8a/120	4k/134	11,0	03	206	83
10a	8b/58	4a/124	8,29	03	125	71
10b	8b/117	4b/186	16,8	01	203	69
10c	8b/110	4c/165	16,0	15	185	70
10d	8b/120	4d/193	17,3	15	212	70
10e	8b/140	4e/212	20,2	20	258	75
10f	8b/147	4f/247	21,2	10	276	72
10g	8b/140	4g/230	20,2	50	297	83
10h	8b/120	4h/211	17,3	02	221	69
10i	8b/114	4i/212	16,4	02	231	73
10j	8b/115	4j/212	16,6	60	253	80
10k	8b/110	4k/191	16,0	10	237	81

As estruturas dos compostos **9b-9k** e **10a-10k** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

***N*-(1-oxo-3-fenil-1-((2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)amino)propan-2-il)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,35$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

$T_f = 157,1-157,9\text{ }^{\circ}\text{C}$.

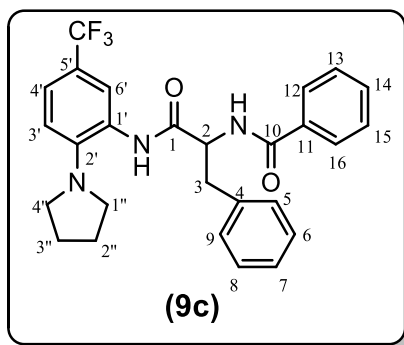
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3288, 3066, 2935, 2808, 1685, 1642, 1530, 1436, 1334, 1261, 1117, 1026. O espectro é apresentado na Figura 60 do Anexo II, pg. 376.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1,32-1,54 (m, 6H, H-2''/H-3''/H-4''); 2,64-2,74 (m, 4H, H-1'' e H-5''); 3,11-3,17 (m, 2H, H-3); 4,94-5,00 (m, 1H, H-2); 7,15-7,57 (m, 10H, H-3'/H-4'/H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-13/H-14/H-15); 7,86 (d, 2H, $J = 7,6\text{ Hz}$, H-12 e H-16); 8,53 (s, 1H, H-6'); 9,01 (d, 1H, $J = 7,6\text{ Hz}$, NH); 9,37 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 61 do Anexo II, pg. 377.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 23,8 (C-3''); 25,9 (C-2'' e C-4''); 36,6 (C-3); 53,0 (C-1'' e C-5''); 56,4 (C-2); 116,6 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,6\text{ Hz}$, C-6'); 121,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 3,7\text{ Hz}$, C-4'); 121,7 (C-3'); 123,3 (q, $J_{\text{C-F}} = 270,0\text{ Hz}$, CF_3); 124,6 (q, $J_{\text{C-F}} = 31,7\text{ Hz}$, C-5'); 126,8 (C-1'); 127,9 (C-12/C-16); 128,7 (C-13/C-15); 128,8 (C-6/C-8); 129,6 (C-5/C-9); 132,2 (C-7); 133,3 (C-14); 133,8 (C-11); 138,6 (C-4); 147,3 (C-2'); 167,1 (C-10); 170,8 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 62 do Anexo II, pg. 378.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$: Calculado para $C_{28}H_{28}O_2N_3F_3$, 496,22119; encontrado: 496,22119. O espectro é apresentado na Figura 63 do Anexo II, pg. 379.

***N*-(1-oxo-3-fenil-1-((2-(pirrolidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)amino)propan-2-il)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,18$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

T_f = 219,4-219,8 °C.

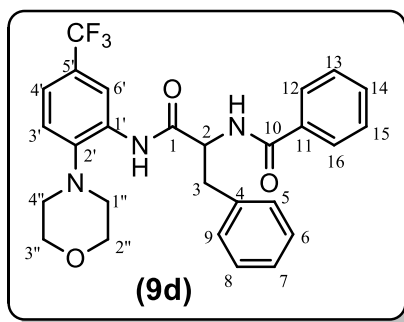
IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm⁻¹): 3292, 3066, 2939, 2812, 1687, 1642, 1530, 1436, 1334, 1261, 1117, 1026. O espectro é apresentado na Figura 64 do Anexo II, pg. 380.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1,76 (m, H-2'' e H-3''); 3,09-3,24 (m, 6H, H-1''/H-4''/H-3); 4,87-4,93 (m, 1H, H-2); 6,87 (d_{ap}, 1H, $J = 8,8$ Hz, H-3'); 7,18-7,55 (m, 10H, H-4'/H-6'/H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-13/H-14/H-15); 7,85 (d_{ap}, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-12 e H-16); 8,79 (d_{ap}, 1H, $J = 8,0$ Hz, NH); 9,66 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 65 do Anexo II, pg. 381.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 25,4 (C-2'' e C-3''); 37,1 (C-3); 50,2 (C-1'' e C-4''); 55,9 (C-2); 115,7 (C-3'); 117,5 (q, $J_{C-F} = 32,1$ Hz, C-5'); 123,9 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,7$ Hz, C-6'); 124,4 (C-7); 125,6 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,2$ Hz, C-4'); 126,8 (C-1'); 127,9 (C-12 e C-16); 128,0 (q_{ap}, $J_{C-F} = 269,0$ Hz, CF₃); 128,6 (C-13 e C-15); 128,7 (C-6 e C-8); 129,8 (C-5 e C-9); 131,9 (C-14); 134,3 (C-11); 138,6 (C-4); 147,9 (C-2'); 166,9 (C-10); 171,4 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 66 do Anexo II, pg. 382.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$: Calculado para $C_{27}H_{26}O_2N_3F_3$, 482,20554; encontrado: 482,20510. O espectro é apresentado na Figura 67 do Anexo II, pg. 383.

***N*-(1-((2-morfolino-5-(trifluorometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,20$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

T_f = 161,7-162,4 °C.

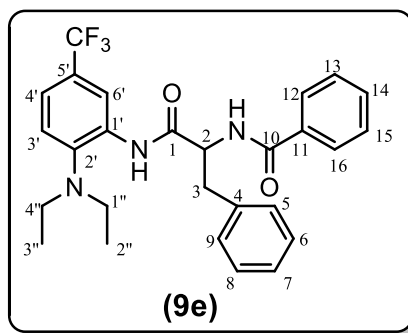
IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm⁻¹): 3288, 3062, 2960, 2827, 1682, 1639, 1530, 1434, 1329, 1255, 1112, 1074. O espectro é apresentado na Figura 68 do Anexo II, pg. 384.

RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,78 (t_{ap} , 4H, $J = 4,2$ Hz, H-1'' e H-4''); 3,12-3,18 (m, 2H, H-3); 3,62 (t_{ap} , 4H, $J = 4,2$ Hz, H-2'' e H-3''); 4,92-4,98 (m, 1H, H-2); 7,18-7,55 (m, 10H, H-3'/H-4'/H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-13/H-14/H-15); 7,85 (d, $J = 7,6$ Hz, H-12 e H-16); 8,44 (s, 1H, H-6'); 9,01 (d, $J = 8,0$ Hz, NH); 9,43 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 69 do Anexo II, pg. 385.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 36,4 (C-3); 51,8 (C-1'' e C-4''); 56,4 (C-2); 66,4 (C-2'' e C-3''); 117,6 (q_{ap} , $J_{C-F} = 3,7$ Hz, C-6'); 121,5 (C-3'); 121,7 (q_{ap} , $J_{C-F} = 3,5$ Hz, C-4'); 124,7 (q, $J_{C-F} = 269,9$ Hz, $\underline{C}F_3$); 124,8 (q, $J_{C-F} = 31,6$ Hz, C-5'); 126,9 (C-1'); 127,9 (C-12 e C-16); 128,7 (C-13 e C-15); 128,9 (C-6 e C-8); 129,7 (C-5 e C-9); 132,3 (C-7); 133,1 (C-14); 133,7 (C-11); 138,6 (C-4); 146,3 (C-2'); 167,2 (C-10); 170,9 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 70 do Anexo II, pg. 386.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$: Calculado para $C_{27}H_{26}O_3N_3F_3$, 498,20045; encontrado: 498,20026. O espectro é apresentado na Figura 71 do Anexo II, pg. 387.

***N*-(1-((2-(dietilamino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: R_f = 0,25 (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

T_f = 155,9-156,2 °C.

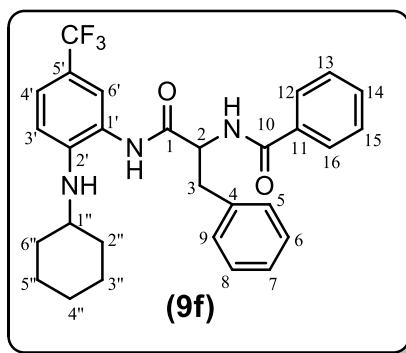
IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm⁻¹): 3311, 3062, 2976, 2823, 1662, 1629, 1530, 1434, 1332, 1265, 1119, 1078. O espectro é apresentado na Figura 72 do Anexo II, pg. 388.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0,76 (t, 6H, J = 7,2 Hz, H-2'' e H-3''); 2,82 (q, 4H, J = 6,9 Hz, H-1'' e H-4''); 3,11-3,18 (m, 1H, H-3a); 3,36-3,40 (m, 1H, H-3b); 4,90-4,95 (m, 1H, H-2); 7,16-7,58 (m, 10H, H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-13/H-14/H-15/H-4'/H-3'); 7,85 (d, 2H, J = 7,2 Hz, H-12/H-16); 8,61 (s, 1H, H-6'); 9,06 (d, 1H, J = 7,6 Hz, NH); 9,68 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 73 do Anexo II, pg. 389.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 12,2 (C-2'' e C-3''); 36,1 (C-3); 47,8 (C-1'' e C-4''); 56,4 (C-2); 115,7 (q, J_{C-F} = 3,7 Hz, C-6'); 120,7 (q, J_{C-F} = 3,6 Hz, C-4'); 124,7 (C-3'); 124,71 (q_{ap}, J_{C-F} = 270,2 Hz, C-F₃); 125,4 (q, J_{C-F} = 31,5 Hz, C-5'); 126,8 (C-1'); 127,8 (C-12 e C-16); 128,7 (C-13 e C-15); 128,8 (C-6 e C-8); 129,5 (C-5 e C-9); 132,2 (C-7); 133,9 (C-14); 136,0 (C-11); 138,7 (C-4); 143,7 (C-2'); 167,4 (C-10); 170,6 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 74 do Anexo II, pg. 390.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M-H]^-$: Calculado para $C_{27}H_{28}O_2N_3F_3$, 482,20554; encontrado: 482,20677. O espectro é apresentado na Figura 75 do Anexo II, pg. 391.

***N*-(1-((2-(ciclohexilamino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,41$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

T_f = 232,6-233,2 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm^{-1}): 3386, 3240, 3062, 2929, 2852, 1679, 1632, 1535, 1491, 1443, 1327, 1255, 1114, 1067. O espectro é apresentado na Figura 76 do Anexo II, pg. 392.

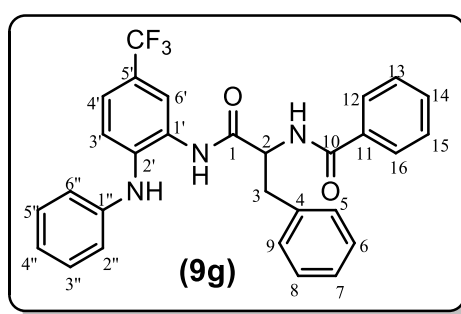
RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1,14-1,38 (m, 6H, H-3''/H-4''/H-5''); 1,58-1,93 (m, 5H, H-1''/H-2''/H-6''); 3,14-3,18 (m, 2H, H-3); 4,68-4,73 (m, 1H, H-2); 5,18 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, NH); 6,76 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-3'); 7,08-7,57 (m, 10H, H-4'/H-6'/H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-13/H-14/H-15); 7,89 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-12 e H-16); 8,89 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, NH); 9,57 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 77 do Anexo II, pg. 393.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 24,8 (C-3'' e C-5''); 25,9 (C-4''); 32,7 (C-2'' e C-6''); 37,0 (C-3); 50,7 (C-2); 56,7 (C-1''); 110,7 (C-3'); 114,8 (q, $J_{C-F} = 32,0$ Hz, C-5'); 124,4 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,7$ Hz, C-6'); 124,9 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,8$ Hz, C-4'); 125,5 (q_{ap}, $J_{C-F} = 268,3$ Hz, CF_3); 126,9 (C-1'); 128,0 (C-12 e C-16); 128,6 (C-13 e C-15); 128,7 (C-6 e

C-8); 129,8 (C-5 e C-9); 132,0 (C-14); 134,0 (C-11); 138,3 (C-4); 146,2 (C-2'); 167,5 (C-10); 171,5 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 78 do Anexo II, pg. 394.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M-H]^-$: Calculado para $C_{29}H_{30}O_2N_3F_3$, 508,22119; encontrado: 508,22212. O espectro é apresentado na Figura 79 do Anexo II, pg. 395.

***N*-(1-oxo-3-fenil-1-((2-(fenilamino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)propan-2-il)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (3:1 v/v).

CCD: R_f = 0,22 (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

T_f = 206,3-207,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm⁻¹): 3336, 3221, 3062, 3032, 1677, 1622, 1532, 1489, 1328, 1254, 1107, 1070. O espectro é apresentado na Figura 80 do Anexo II, pg. 396.

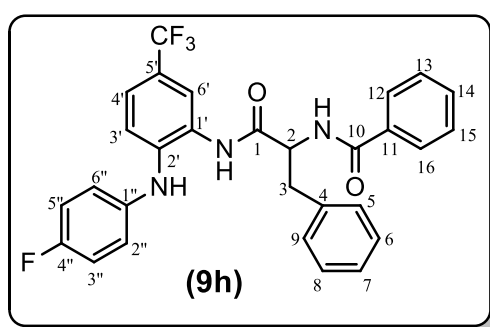
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,12-3,22 (m, 2H, H-3); 4,79-4,85 (m, 1H, H-2); 6,97-7,57 (m, 16H, H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-2"/H-3"/H-4"/H-5"/H-6"/H-13/H-14/H-15/H-3'/H-4'/NH); 7,65 (s, 1H, H-6'); 7,86 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-12/H-16); 8,87 (d, 1H, J = 6,8 Hz, NH); 9,80 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 81 do Anexo II, pg. 397.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 37,0 (C-3); 56,5 (C-2); 116,4 (C-3'); 119,6 (C-2" e C-6"); 119,9 (q, J_{C-F} = 32,0 Hz, C-5'); 122,3 (C-4"); 123,4 (q_{ap}, J_{C-F} = 3,7 Hz, C-6'); 123,8 (q_{ap}, J_{C-F} = 3,7 Hz, C-4'); 125,0 (q_{ap}, J_{C-F} = 269,0 Hz, CF₃); 126,8 (C-1'); 126,9 (C-7); 128,0 (C-12 e C-16); 128,6 (C-13 e C-15); 128,7 (C-3" e C-5"); 129,8 (C-5 e

C-9); 132,0 (C-14); 134,1 (C-11); 138,4 (C-4); 141,8 (C-2'); 142,2 (C-1''); 167,5 (C-10); 171,6 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 82 do Anexo II, pg. 398.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M-H]^-$: Calculado para $C_{29}H_{24}O_2N_3F_3$, 502,17424; encontrado: 502,17555. O espectro é apresentado na Figura 83 do Anexo II, pg. 399.

***N*-(1-((2-((4-fluorofenil)amino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (3:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,23$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

T_f = 202,2-202,8 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm⁻¹): 3327, 3209, 3066, 3034, 1677, 1622, 1535, 1504, 1437, 1328, 1215, 1108, 1070. O espectro é apresentado na Figura 2.16, pg. 136.

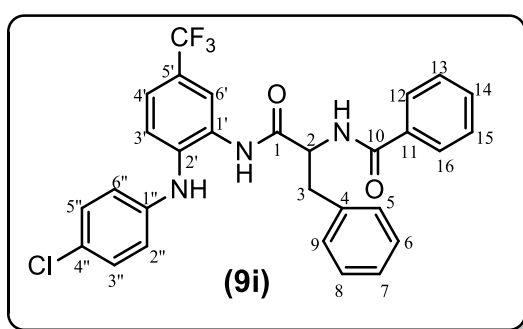
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,12-3,23 (m, 2H, H-3); 4,79-4,84 (m, 1H, H-2); 7,15-7,54 (m, 15H, H-3'/H-4'/H-2''/H-3''/H-5''/H-6''/H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-13/H-14/H-15 e NH); 7,63 (s, 1H, H-6'); 7,84-7,86 (m, 2H, H-12 e H-16); 8,88 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, NH); 9,78 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 2.17, pg. 137.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 37,0 (C-3); 56,5 (C-2); 115,6 (C-3'); 116,4 (d, $J_{C-F} = 22,3$ Hz, C-3'' e C-5''); 119,6 (q, $J_{C-F} = 32,0$ Hz, C-5'); 122,1 (d, $J_{C-F} = 22,3$ Hz, C-2'' e C-6''); 123,5 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,6$ Hz, C-6'); 123,9 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,6$ Hz, C-4'); 125,0 (q, $J_{C-F} = 269,2$ Hz, CF₃); 126,4 (C-1'); 126,9 (C-7); 128,0 (C-12/C-16); 128,6 (C-13/C-15); 128,7 (C-6/C-8); 129,8 (C-5/C-9); 132,0 (C-14); 134,1 (C-11); 138,36 (C-4);

138,42 (d, $J_{C-F} = 2,2$ Hz, C-1''); 142,4 (C-2'); 158,1 (d, $J_{C-F} = 237,1$ Hz, C-4''); 167,5 (C-10); 171,6 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 2.18, pg. 138.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M-H]⁻: Calculado para C₂₉H₂₃O₂N₃F₄, 520,16481; encontrado: 520,16558. O espectro é apresentado na Figura 2.19, pg. 139.

***N*-(1-((2-((4-clorofenil)amino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (3:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,26$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

$T_f = 205,4-206,6\text{ }^{\circ}\text{C}.$

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ (cm⁻¹): 3302, 3032, 1672, 1632, 1517, 1488, 1436, 1329, 1253, 1106, 1073. O espectro é apresentado na Figura 84 do Anexo II, pg. 400.

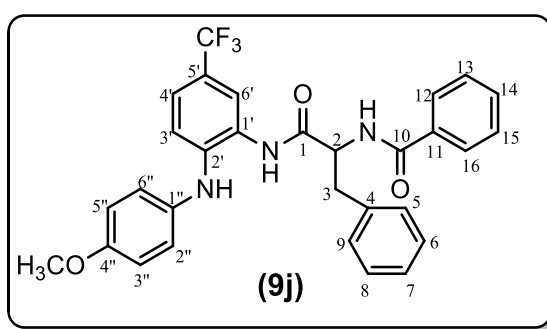
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3,12-3,21 (m, 2H, H-3); 4,79-4,84 (m, 1H, H-2); 7,09 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-2'' e H-6''); 7,19-7,65 (m, 13H, H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-3''/H-5''/H-13/H-14/H-15/H-3'/H-4'/NH); 7,79 (s, 1H, H-6'); 7,84 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-12 e H-16); 8,86 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, NH); 9,78 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 85 do Anexo II, pg. 401.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 37,0 (C-3); 56,4 (C-2); 117,7 (C-3'); 120,4 (C-2" e C-6"); 120,9 (q, $J_{\text{C-F}}$ = 32,0 Hz, C-5'); 123,1 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}}$ = 3,7 Hz, C-6'); 123,8 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}}$ = 4,1 Hz, C-4'); 124,9 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}}$ = 269,2 Hz, CF₃); 126,9 (C-1'); 127,8 (C-7); 128,0 (C-12 e C-16); 128,6 (C-13 e C-15); 128,7 (C-6 e C-8); 129,6 (C-5 e C-9); 129,8 (C-

3'' e C-5''); 132,0 (C-14); 134,1 (C-11); 138,4 (C-4); 140,9 (C-2'); 141,6 (C-1''); 167,5 (C-10); 171,6 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 86 do Anexo II, pg. 402.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M-H]^-$: Calculado para $C_{29}H_{23}O_2N_3F_3Cl$, 536,13526; encontrado: 536,13673. O espectro é apresentado na Figura 87 do Anexo II, pg. 403.

***N*-(1-((2-((4-metoxifenil)amino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (3:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,23$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

$T_f = 218,5-219,5$ °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm^{-1}): 3336, 3219, 3186, 3066, 2935, 2841, 1677, 1615, 1531, 1509, 1439, 1328, 1258, 1102, 1069. O espectro é apresentado na Figura 88 do Anexo II, pg. 404.

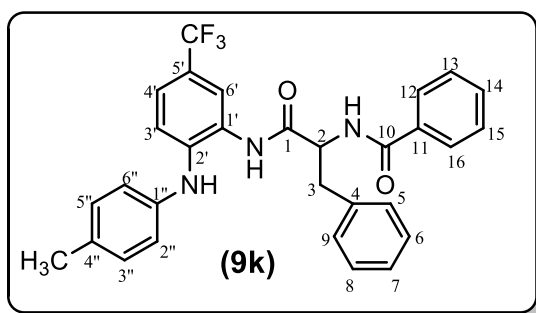
RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3,14-3,25 (m, 2H, H-3); 4,80-4,85 (m, 1H, H-2); 6,92 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-3'' e H-5''); 7,07 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-3'); 7,12 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-2'' e H-6''); 7,19-7,56 (m, 11H, H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-13/H-14/H-15/H-4'/H-6'/NH); 7,86 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-12 e H-16); 8,87 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, NH); 9,72 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 89 do Anexo II, pg. 405

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 37,1 (C-3); 55,7 (OCH_3); 56,5 (C-2); 113,8 (C-3'); 115,2 (C-3'' e C-5''); 118,2 (q, $J_{C-F} = 32,0$ Hz, C-5'); 123,6 (C-2'' e C-6''); 123,8 (C-6'); 124,1 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,2$ Hz, C-4'); 124,9 (C-1'); 125,1 (q_{ap}, $J_{C-F} = 271,4$ Hz, CF_3);

126,9 (C-7); 128,0 (C-12 e C-16); 128,6 (C-13 e C-15); 128,7 (C-5 e C-9); 129,8 (C-6 e C-8); 132,0 (C-14); 134,2 (C-11); 134,4 (C-1''); 138,4 (C-4); 143,9 (C-2'); 155,9 (C-4''); 167,6 (C-10); 171,6 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 90 do Anexo II, pg. 406.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M-H]^-$: Calculado para $C_{30}H_{26}O_3N_3F_3$, 532,18480; encontrado: 532,18602. O espectro é apresentado na Figura 91 do Anexo II, pg. 407.

***N*-(1-oxo-3-fenil-1-((2-(*p*-tolilamino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)propan-2-il)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v/v).

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

T_f = 214,8-215,3 °C.

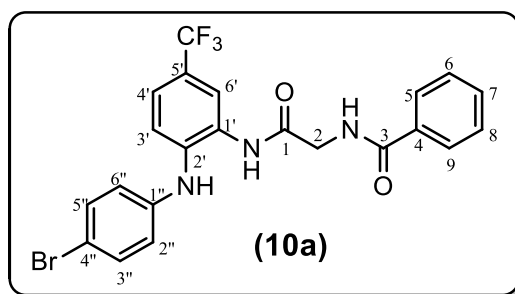
IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm^{-1}): 3346, 3219, 3186, 3066, 3024, 2926, 2862, 1673, 1616 1534, 1433, 1328, 1246, 1100, 1069. O espectro é apresentado na Figura 92 do Anexo II, pg. 408.

RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,27 (s, 3H, CH_3); 3,13-3,23 (m, 2H, H-3); 4,78-4,84 (m, 1H, H-2); 7,05 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2' e H-6''); 7,15 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3' e H-5''); 7,20-7,56 (m, 12H, H-5/H-6/H-7/H-8/H-9/H-13/H-14/H-15/H-3'/H-4'/H-6'/NH); 7,86 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-12 e H-16); 8,87 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, NH); 9,75 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 93 do Anexo II, pg. 409.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 20,9 ($\underline{\text{CH}_3}$); 37,0 (C-3); 56,5 (C-2); 115,1 (C-3'); 119,1 (q, $J_{\text{C-F}} = 32,1$ Hz, C-5'); 120,6 (C-2'' e C-6''); 123,6 (q_{ap} , $J_{\text{C-F}} = 3,6$ Hz, C-6'); 123,9 (q_{ap} , $J_{\text{C-F}} = 3,6$ Hz, C-4'); 125,0 (q_{ap} , $J_{\text{C-F}} = 268,9$ Hz, $\underline{\text{CF}_3}$); 125,9 (C-1'); 126,9 (C-7); 128,0 (C-12 e C-16); 128,6 (C-13 e C-15); 128,7 (C-6 e C-8); 129,8 (C-5 e C-9); 130,3 (C-3'' e C-5''); 131,8 (C-14); 132,0 (C-4''); 134,1 (C-11); 138,4 (C-4); 139,3 (C-1''); 142,7 (C-2'); 167,5 (C-10); 171,6 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 94 do Anexo II, pg. 410.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M-H}]^-$: Calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{N}_3\text{F}_3$, 516,18989; encontrado: 516,19075. O espectro é apresentado na Figura 95 do Anexo II, pg. 411.

***N*-(2-((2-((4-bromofenil)amino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (1:1 v/v).

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

T_f = 191,4-192,1 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 3419, 3336, 3249, 3084, 3039, 1677, 1643, 1521, 1484, 1433, 1347, 1217, 1161, 1099. O espectro é apresentado na Figura 96 do Anexo II, pg. 412.

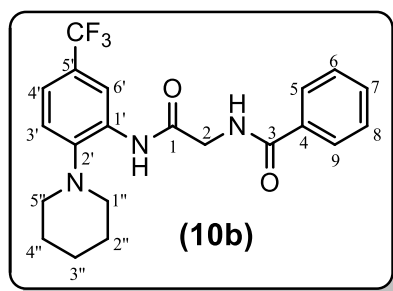
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 4,12 (d, 2H, $J = 5,6$ Hz, 2H-2); 7,06 (d_{ap} , 2H, $J = 8,8$ Hz, H-2'' e H-6''); 7,37 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-3'); 7,42 (dd, 1H, $J = 2,0$ Hz e $J = 8,8$ Hz, H-4'); 7,36-7,58 (m, 5H, H-6/H-8/H-3''/H-5'' e $\underline{\text{NH}}$); 7,85-7,93 (m, 4H, H-5/H-7/H-

9/H-6'); 8,94 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH); 9,67 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 97 do Anexo II, pg. 413.

RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 43,9 (C-2); 112,9 (C-4''); 117,6 (C-3'); 120,88 (C-2'' e C-6''); 120,89 (q, $J_{\text{C-F}} = 32,0$ Hz, C-5'); 122,7 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}} = 3,3$ Hz, C-6'); 123,2 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}} = 3,2$ Hz, C-4'); 124,9 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}} = 269,3$ Hz, CF_3); 127,8 (C-5 e C-9); 127,9 (C-7); 128,8 (C-6 e C-8); 132,0 (C-1'); 132,5 (C-3'' e C-5''); 134,2 (C-4); 140,4 (C-2'); 142,1 (C-1''); 167,4 (C-3); 169,3 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 98 do Anexo II, pg. 414.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M-H}]^-$: Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}_3\text{F}_3\text{Br}$, 490,03780; encontrado: 490,03877. O espectro é apresentado na Figura 99 do Anexo II, pg. 415.

***N*-(2-oxo-2-((2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)amino)etil)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,33$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

T_f = 162,7-163,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 3356, 3330, 3076, 2941, 2827, 1679, 1646, 1518, 1471, 1436, 1333, 1261, 1126, 1099. O espectro é apresentado na Figura 100 do Anexo II, pg. 416.

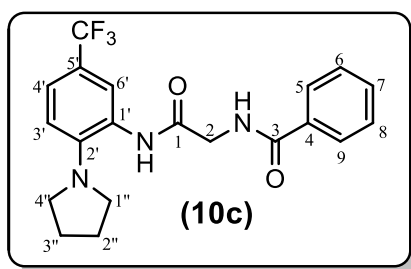
RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 1,27-1,30 (m, 2H, H-3''); 1,39-1,44 (m, 4H, H-2'' e H-4''); 2,68 (t, 4H, $J = 5,0$ Hz, H-1'' e H-5''); 4,14 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, 2H-2); 7,34 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-3'); 7,41 (dd, 1H, $J = 1,8$ Hz e $J = 8,2$ Hz, H-4'); 7,51-7,62 (m, 3H,

H-6/H-7/H-8); 7,99 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-5 e H-9); 8,57 (s, 1H, H-6'); 9,26-9,28 (m, 2H, 2NH). O espectro é apresentado na Figura 101 do Anexo II, pg. 417.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 23,7 (C-3''); 25,9 (C-2'' e C-4''); 44,8 (C-2); 53,1 (C-1'' e C-5''); 116,0 (q_{ap} , $J = 3,8$ Hz, C-6'); 121,2 (q_{ap} , $J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz, C-4'); 121,9 (C-3'); 124,7 (q, $J_{\text{C-F}} = 270,1$ Hz, CF_3); 124,8 (q, $J_{\text{C-F}} = 31,6$ Hz, C-5'); 127,9 (C-5 e C-9); 128,9 (C-6 e C-8); 132,3 (C-7); 133,4 (C-1'); 133,5 (C-4); 146,9 (C-2'); 167,3 (C-3); 168,9 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 102 do Anexo II, pg. 418.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M-H}]^-$: Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_3\text{F}_3$, 404,15859; encontrado: 404,15938. O espectro é apresentado na Figura 103 do Anexo II, pg. 419.

***N*-(2-oxo-2-((2-(pirrolidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)amino)etil)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,15$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

$T_f = 186,9\text{-}187,3$ °C.

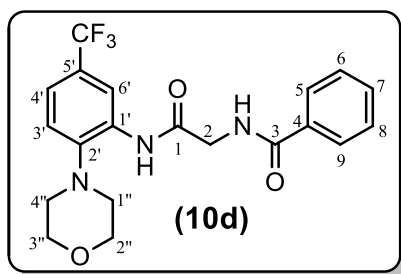
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 3342, 3259, 3066, 2983, 2833, 1670, 1640, 1541, 1433, 1331, 1274, 1156, 1084. O espectro é apresentado na Figura 104 do Anexo II, pg. 420.

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1,81-1,84 (m, 4H, H-2'' e H-3''); 3,28 (t, 4H, $J = 6,2$ Hz, H-1'' e H-4''); 4,07 (d, 2H, $J = 6,0$ Hz, 2H-2); 6,89 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, H-3'); 7,36 (dd, 1H, $J = 1,8$ Hz e $J = 8,6$ Hz, H-4'); 7,48-7,58 (m, 4H, H-6/H-7/H-8 e H-6'); 7,92 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-5 e H-9); 8,91 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, NH); 9,51 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 105 do Anexo II, pg. 421.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 25,4 (C-2'' e C-3''); 43,7 (C-2); 50,3 (C-1'' e C-4''); 115,8 (C-3'); 117,6 (q, $J = 32,0$ Hz, C-5'); 123,8 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}} = 3,6$ Hz, C-6'); 124,6 (C-1'); 125,3 (q, $J_{\text{C-F}} = 268,8$ Hz, CF_3); 125,5 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz, C-4'); 127,8 (C-5 e C-9); 128,8 (C-6 e C-8); 131,9 (C-7); 134,3 (C-4); 147,8 (C-2'); 167,1 (C-3); 169,2 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 106 do Anexo II, pg. 422.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_3\text{F}_3$, 392,15859; encontrado: 392,15795. O espectro é apresentado na Figura 107 do Anexo II, pg. 423.

***N*-(2-((2-morfolino-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (1:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,20$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

T_f = 179,9-180,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 3357, 3302, 3082, 2929, 2858, 1659, 1616, 1520, 1437, 1336, 1259, 1109, 1070. O espectro é apresentado na Figura 108 do Anexo II, pg. 424.

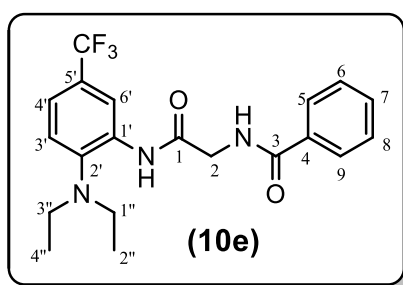
RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,78 (t, 4H, $J = 4,6$ Hz, H-1'' e H-4''); 3,54 (t, 4H, $J = 4,6$ Hz, H-2'' e H-3''); 4,13 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, CH_2); 7,38 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-3'); 7,45 (dd, 1H, $J = 1,8$ Hz e $J = 8,6$ Hz, H-4'); 7,51-7,60 (m, 3H, H-6/H-7/H-8); 7,95-7,98 (m, 2H, H-5 e H-9); 8,49 (s, 1H, H-6'); 9,24 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH); 9,30 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 109 do Anexo II, pg. 425.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 44,8 (C-2); 51,8 (C-1'' e C-4''); 66,4 (C-2'' e C-3''); 117,0 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}} = 2,7$ Hz, C-6'); 121,5 (q_{ap}, $J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz, C-4'); 121,7 (C-3'); 124,7 (q, $J_{\text{C-F}} = 270,1$ Hz, CF_3); 125,0 (q, $J_{\text{C-F}} = 31,6$ Hz, C-5'); 127,8 (C-5 e C-9);

129,0 (C-6 e C-8); 132,4 (C-7); 133,1 (C-1'); 133,6 (C-4); 145,9 (C-2'); 167,4 (C-3); 168,9 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 110 do Anexo II, pg. 426.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M-H]^-$: Calculado para $C_{20}H_{20}O_3N_3F_3$, 406,13785; encontrado: 406,13871. O espectro é apresentado na Figura 111 do Anexo II, pg. 427.

***N*-(2-((2-(dietilamino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,17$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

$T_f = 73,7-74,4$ °C.

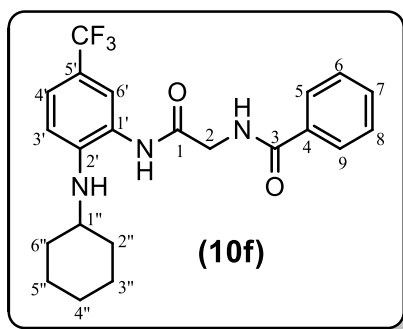
IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm⁻¹): 3454, 3284, 3062, 2974, 2823, 1666, 1647, 1529, 1460, 1332, 1211, 1113, 1065. O espectro é apresentado na Figura 112 do Anexo II, pg. 428.

RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 0,74 (t, 6H, $J = 7,0$ Hz, 3H-2'' e 3H-4''); 2,79 (q, 4H, $J = 7,2$ Hz, 2H-1'' e 2H-3''); 4,11 (d, 2H, $J = 5,6$ Hz, 2H-2); 7,41-7,42 (m, 2H, H-3' e H-4'); 7,51-7,62 (m, 3H, H-6/H-7/H-8); 7,94-7,96 (m, 2H, H-5 e H-9); 8,59 (s, 1H, H-6'); 9,32 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, NH); 9,61 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 113 do Anexo II, pg. 429.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 12,2 (C-2'' e C-4''); 44,7 (C-2); 47,9 (C-1'' e C-3''); 115,3 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,6$ Hz, C-6'); 120,7 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,6$ Hz, C-4'); 124,7 (q, $J_{C-F} = 270,2$ Hz, CF_3); 124,8 (C-3'); 125,5 (q, $J_{C-F} = 31,6$ Hz, C-5'); 127,7 (C-5 e C-9); 128,9 (C-6 e C-8); 132,3 (C-7); 133,8 (C-4); 135,9 (C-1'); 143,6 (C-2'); 167,5 (C-3); 168,7 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 114 do Anexo II, pg. 430.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M-H]^-$: Calculado para $C_{20}H_{22}O_2N_3F_3$, 392,15859; encontrado: 392,15968. O espectro é apresentado na Figura 115 do Anexo II, pg. 431.

***N*-(2-((2-(ciclohexilamino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v/v).

CCD: R_f = 0,12 (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

T_f = 172,9-173,3 °C.

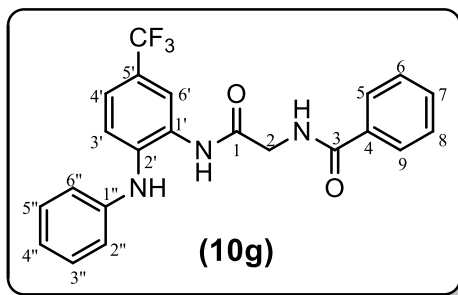
IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm^{-1}): 3375, 3323, 3066, 2934, 2862, 1687, 1649, 1528, 1486, 1333, 1221, 1106, 1070. O espectro é apresentado na Figura 116 do Anexo II, pg. 432.

RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1,17-1,41 (m, 6H, H-3''/H-4''/H-5''); 1,61-1,95 (m, 5H, H-1''/H-2''/H-6''); 4,05 (d, 2H, J = 5,6 Hz, 2H-2); 5,32 (d, 1H, J = 8,0 Hz, NH); 6,78 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H-3'); 7,32-7,59 (m, 5H, H-6/H-7/H-8/H-4'/H-6'); 7,94 (d, 2H, J = 7,2 Hz, H-5 e H-9); 9,01 (t, 1H, J = 5,4 Hz, NH); 9,43 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 117 do Anexo II, pg. 433.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 25,0 (C-3'' e C-5''); 26,0 (C-4''); 32,8 (C-2'' e C-6''); 44,1 (C-2); 51,0 (C-1''); 110,8 (C-3'); 114,9 (q, J_{C-F} = 32,0 Hz, C-5'); 122,7 (C-1'); 124,0 (q_{ap}, J_{C-F} = 3,4 Hz, C-6'); 124,5 (q_{ap}, J_{C-F} = 3,8 Hz, C-4'); 125,5 (q, J_{C-F} = 268,1 Hz, CF₃); 127,8 (C-5 e C-9); 128,8 (C-6 e C-8); 132,0 (C-7); 134,2 (C-4); 145,7 (C-2'); 167,5 (C-3); 169,2 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 118 do Anexo II, pg. 434.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M-H]^-$: Calculado para $C_{22}H_{24}O_2N_3F_3$, 418,17424; encontrado: 418,17511. O espectro é apresentado na Figura 119 do Anexo II, pg. 435.

***N*-(2-oxo-2-((2-(fenilamino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)etil)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (1:1 v/v).

CCD: R_f = 0,27 (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

T_f = 173,2-173,8 °C.

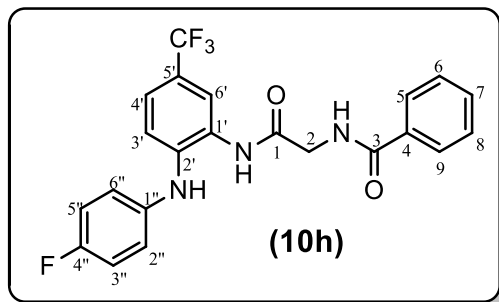
IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm⁻¹): 3375, 3223, 3066, 2939, 1689, 1643, 1593, 1535, 1488, 1328, 1254, 1107, 1071. O espectro é apresentado na Figura 120 do Anexo II, pg. 436.

RMN de 1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 4,14 (d, 2H, J = 5,6 Hz, 2H-2); 6,98-7,80 (m, 12H, H-6/H-7/H-8/H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/H-6''/H-3'/H-4'/H-6'/NH); 7,94 (d, 2H, J = 6,8 Hz, H-5 e H-9); 8,94 (t, 1H, J = 5,6 Hz, NH); 9,67 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 121 do Anexo II, pg. 437.

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 43,9 (C-2); 116,3 (C-3'); 119,8 (C-2'' e C-6''); 119,9 (q, J_{C-F} = 32,0 Hz, C-5'); 122,3 (C-4''); 123,1 (q_{ap}, J_{C-F} = 3,2 Hz, C-6'); 123,4 (q_{ap}, J_{C-F} = 3,7 Hz, C-4'); 125,0 (q, J_{C-F} = 269,1 Hz, $\underline{C}F_3$); 126,9 (C-1'); 127,8 (C-5 e C-9); 128,8 (C-6 e C-8); 129,8 (C-3'' e C-5''); 131,9 (C-7); 134,3 (C-4); 141,5 (C-2'); 142,2 (C-1''); 167,4 (C-3); 169,3 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 122 do Anexo II, pg. 438.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M-H]^-$: Calculado para $C_{22}H_{18}O_2N_3F_3$, 412,12729; encontrado: 412,12851. O espectro é apresentado na Figura 123 do Anexo II, pg. 439.

***N*-2-((2-((4-fluorofenil)amino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (1:1 v/v).

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

T_f = 170,3-170,8 °C.

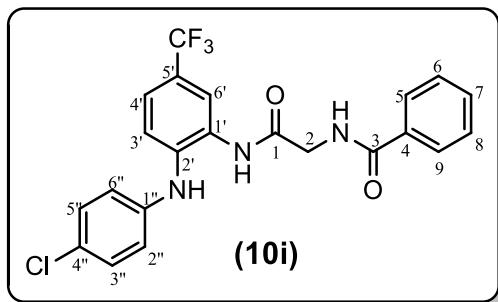
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3434, 3335, 3211, 3053, 2968, 1681, 1643, 1530, 1509, 1433, 1349, 1214, 1158, 1096. O espectro é apresentado na Figura 124 do Anexo II, pg. 440.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ : 4,14 (d, 2H, $J = 5,6$ Hz, H-2); 7,18-7,57 (m, 9H, H-2''/H-3''/H-5''/H-6''/H-3'/H-4'/H-6'/H-7/NH); 7,76 (d, 2H, $J = 9,6$ Hz, H-6 e H-8); 7,92 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-5 e H-9); 8,94 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, NH); 9,64 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 125 do Anexo II, pg. 441.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*6) δ : 43,9 (C-2); 115,5 (C-3'); 116,3 (d, $J = 22,2$ Hz, C-3'' e C-5''); 119,6 (q, $J_{C-F} = 32,0$ Hz, C-5'); 122,3 (d, $J = 7,9$ Hz, C-2'' e C-6''); 123,2 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,1$ Hz, C-6'); 123,5 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,4$ Hz, C-4'); 125,0 (q, $J = 269,0$ Hz, CF₃); 126,5 (C-1'); 127,8 (C-5 e C-9); 128,8 (C-6 e C-8); 131,9 (C-7); 134,3 (C-4); 138,5 (d, $J = 2,2$ Hz, C-1''); 142,2 (C-2'); 158,1 (d, $J = 237,0$ Hz, C-4''); 167,4 (C-3); 169,3 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 126 do Anexo II, pg. 442.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M-H]⁺: Calculado para C₂₂H₁₇O₂N₃F₄, 430,11786; encontrado: 430,11872. O espectro é apresentado na Figura 127 do Anexo II, pg. 443.

***N*-(2-((2-((4-clorofenil)amino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,17$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

T_f = 185,9-186,5 °C.

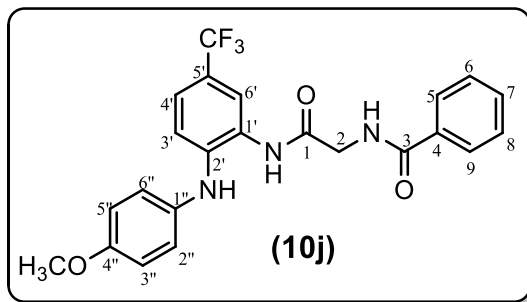
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3421, 3336, 3248, 3088, 2931, 1678, 1642, 1523, 1484, 1350, 1221, 1161, 1098. O espectro é apresentado na Figura 128 do Anexo II, pg. 444.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4,13 (d, 2H, $J = 5,6$ Hz, 2H-2); 7,12 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-2'' e H-6''); 7,33-7,59 (m, 7H, H-6/H-8/H-3''/H-5''/H-3'/H-4'/NH); 7,84-7,92 (m, 4H, H-5/H-7/H-9/H-6'); 8,94 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH); 9,66 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 129 do Anexo II, pg. 445.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 43,9 (C-2); 117,4 (C-3'); 120,8 (q_{ap}, $J_{C-F} = 32,0$ Hz, C-5'); 120,9 (C-2'' e C-6''); 122,8 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,0$ Hz, C-6'); 123,3 (q_{ap}, $J_{C-F} = 2,6$ Hz, C-4'); 124,9 (q, $J_{C-F} = 269,2$ Hz, CF₃); 125,3 (C-1'/C-4''); 127,8 (C-5 e C-9); 128,8 (C-6 e C-8); 129,6 (C-3'' e C-5''); 132,0 (C-7); 134,2 (C-4); 140,6 (C-2'); 141,6 (C-1''); 167,4 (C-3); 169,3 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 130 do Anexo II, pg. 446.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M-H]⁻: Calculado para C₂₂H₁₇O₂N₃F₃Cl, 446,08831; encontrado: 446,08958. O espectro é apresentado na Figura 131 do Anexo II, pg. 447.

***N*-2-((2-((4-metoxifenil)amino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxoetil)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (1:1,5 v/v).

CCD: $R_f = 0,39$ (hexano-acetato de etila 1:1,5 v/v).

T_f = 146,5-147,8 °C.

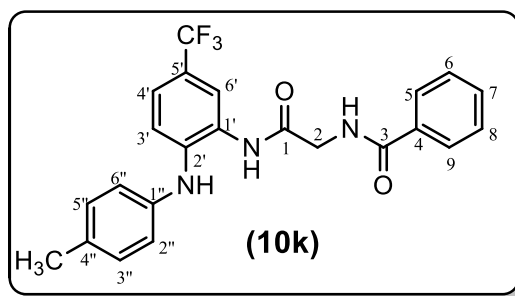
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3316, 3062, 3005, 2939, 2841, 1669, 1640, 1531, 1506, 1416, 1329, 1257, 1106, 1071. O espectro é apresentado na Figura 132 do Anexo II, pg. 448.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3,76 (s, 3H, OCH₃); 4,15 (d, 2H, $J = 5,6$ Hz, H-2); 6,97 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-3'' e H-5''); 7,06 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-3'); 7,13 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-2'' e H-6''); 7,34 (dd, 1H, $J = 1,8$ Hz e $J = 8,6$ Hz, H-4'); 7,48-7,59 (m, 5H, H-6/H-7/H-8/H-6'/NH); 7,93 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-5 e H-9); 8,94 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH); 9,60 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 133 do Anexo II, pg. 449.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 43,9 (C-2); 55,7 (OCH₃); 113,7 (C-3'); 115,2 (C-3'' e C-5''); 118,2 (q, $J_{C-F} = 32,0$ Hz, C-5'); 123,5 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,3$ Hz, C-6'); 123,805 (C-2'' e C-6''); 125,0 (C-1'); 126,5 (C-4'); 127,8 (C-5 e C-9); 128,8 (C-6 e C-8); 129,2 (CF₃); 131,9 (C-7); 134,3 (C-4); 134,4 (C-1''); 143,7 (C-2'); 155,9 (C-4''); 167,4 (C-3); 169,3 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 134 do Anexo II, pg. 450.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M-H]⁻: Calculado para C₂₃H₂₀O₃N₃F₃, 442,13785; encontrado: 442,13851. O espectro é apresentado na Figura 135 do Anexo II, pg. 451.

***N*-(2-oxo-2-((2-(*p*-tolilamino)-5-(trifluorometil)fenil)amino)etil)benzamida**



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (1:1 v/v).

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

T_f = 162,3-163,4 °C.

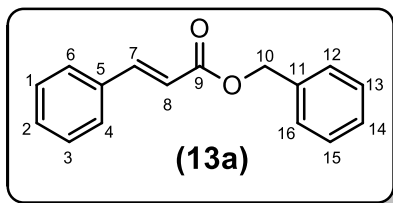
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3375, 3321, 3066, 2922, 2862, 1690, 1644, 1578, 1533, 1486, 1330, 1230, 1154, 1073. O espectro é apresentado na Figura 136 do Anexo II, pg. 452.

RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*6) δ : 2,28 (s, 3H, CH₃); 4,14 (d, 2H, $J = 5,6$ Hz, H-2); 7,06 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2'' e H-6''); 7,16 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-3'' e H-5''); 7,23 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-3'); 7,36 (dd, 1H, $J = 1,6$ Hz e $J = 8,8$ Hz, H-4'); 7,48-7,72 (m, 5H, H-6'/H-6/H-7/H-8/NH); 7,92 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz, H-5 e H-9); 8,94 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, NH); 9,63 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 137 do Anexo II, pg. 453.

RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*6) δ : 20,9 (CH₃); 43,9 (C-2); 115,1 (C-3'); 119,1 (q, $J_{C-F} = 32,0$ Hz, C-5'); 120,8 (C-2'' e C-6''); 123,3 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,8$ Hz, C-6'); 123,5 (q_{ap}, $J_{C-F} = 3,5$ Hz, C-4'); 125,1 (q, $J = 268,9$ Hz, CCF₃); 126,1 (C-1'); 127,8 (C-5 e C-9); 128,8 (C-6 e C-8); 130,3 (C-3'' e C-5''); 131,8 (C-4''); 131,9 (C-7); 134,3 (C-4); 139,3 (C-1''); 142,4 (C-2'); 167,4 (C-3); 169,3 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 138 do Anexo II, pg. 454.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M-H]⁻: Calculado para C₂₃H₂₀O₂N₃F₃, 426,14294; encontrado: 426,14407. O espectro é apresentado na Figura 139 do Anexo II, pg. 455.

2.4.2.6 Síntese do cinamato de benzila



O procedimento descrito a seguir foi baseado no trabalho publicado por Sova e colaboradores (2006).

A um balão de fundo redondo (50,0 mL) foram adicionados 0,297 g (2,75 mmol) de álcool benzílico (**12a**), 12,0 mL de diclorometano, 0,370 g (2,5 mmol) de ácido cinâmico (**11**), 0,567 g (2,75 mmol) de dicicloexilcarbodiimida (DCC) e 0,0301 g (0,25 mmol) de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP). A mistura de reação permaneceu sob agitação magnética por 40 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 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), obtendo-se a substância **13a**, em 63% de rendimento (0,374 g; 1,57 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,52$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

$T_f = 33,1-33,6\text{ }^{\circ}\text{C}$.

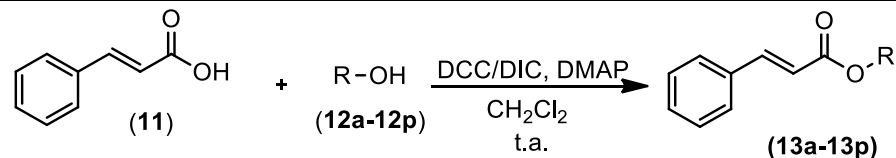
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 3084, 3032, 2968, 2897, 1703, 1634, 1574, 1494, 1371, 1312, 1152. O espectro é apresentado na Figura 140 do Anexo II, pg. 456.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 5,27 (s, 2H, H-10); 6,50 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16,2\text{ Hz}$, H-8); 7,35-7,54 (m, 10H, H-1/H-2/H-3/H-4/H-6/H-12/H-13/H-14/H-15/H-16); 7,75 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 16,2\text{ Hz}$, H-7). O espectro é apresentado na Figura 141 do Anexo II, pg. 457.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 66,3 (C-10); 117,9 (C-8); 128,1 (C-12/C-16); 128,5 (C-2/C-14); 128,6 (C-1/C-3); 128,9 (C-12/C-16); 130,3 (C-4/C-6); 134,4 (C-5); 136,1 (C-11); 145,1 (C-7); 166,7 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 142 do Anexo II, pg. 458.

Para a síntese dos cinamatos **13b-13p** empregou-se a mesma metodologia descrita para a preparação do composto **13a**. Na Tabela 2.6 (pg. 98) estão descritas as informações referentes a estas reações.

Tabela 2.6 – Informações sobre as reações conduzidas para preparação dos cinamatos **13a-13p**



R-OH = álcool, fenol
ou isobenzofuranona

Composto	Massa de ácido cinâmico (g)	Composto hidroxilado/ massa (g)	Massa de DCC/DIC (g)	Massa de DMAP (g)	Tempo de reação	Massa de produto (g)	Rendimento (%)
13a	0,370	12a /0,297	0,567	0,0301	40 min	0,374	63
13b	0,370	12b /0,392	0,567	0,0301	40 min	0,402	59
13c*	0,370	12c /0,421	0,347	0,0301	4h	0,481	68
13d	0,370	12d /0,514	0,567	0,0301	40 min	0,444	56
13e	0,370	12e /0,484	0,567	0,0301	55 min	0,467	61
13f	0,370	12f /0,380	0,567	0,0301	1h	0,409	61
13g	0,370	12g /0,528	0,567	0,0301	40 min	0,515	64

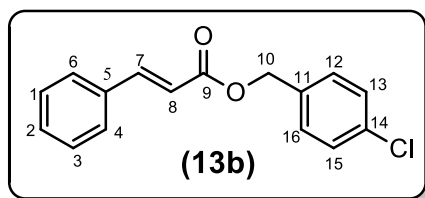
Tabela 2.6 – Cont.

Composto	Massa de ácido cinâmico (g)	Composto hidroxilado/ massa (g)	Massa de DCC/DIC (g)	Massa de DMAP (g)	Tempo de reação	Massa de produto (g)	Rendimento (%)
13h	0,296	12h /0,269	0,454	0,0245	45 min	0,363	72
13i	0,370	12i /0,413	0,567	0,0301	35 min	0,525	75
13j	0,253	12j /0,282	0,388	0,021	2h	0,214	45
13k	0,222	12k /0,248	0,340	0,0180	4h	0,220	53
13l	0,349	12l /0,400	0,536	0,0290	1h	0,560	84
13m	0,050	12m /0,061	0,077	0,004	40 min	0,066	67
13n	0,200	12n /0,227	0,307	0,016	30 min	0,248	65
13o	0,100	12o /0,090	0,136	0,007	5h	0,138	82
13p	0,258	12p /0,370	0,567	0,030	40 min	0,460	82

*Apenas na síntese deste composto foi utilizado o DIC como reagente de acoplamento.

As estruturas dos compostos **13b-13p** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

Cinamato de 4-clorobenzila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,53$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

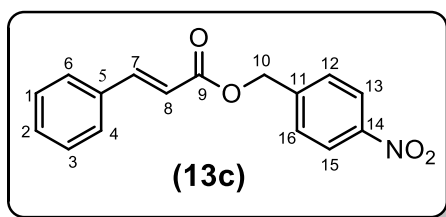
T_f = 61,5-62,1 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3057, 2935, 2887, 2121, 1706, 1633, 1574, 1493, 1312, 1282, 1171, 1090. O espectro é apresentado na Figura 143 do Anexo II, pg. 459.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 5,22 (s, 2H, H-10); 6,48 (d, 1H, $J_{trans} = 16,0$ Hz, H-8); 7,35 - 7,39 (m, 8H, H-1/H-2/H-3/H-12/H-13/H-15/H-16); 7,51 - 7,53 (m, 2H, H-4/H-6); 7,73 (d, 1H, $J_{trans} = 16,0$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura 144 do Anexo II, pg. 460.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 65,5 (C-10); 117,6 (C-8); 128,1 (C-4/C-6); 128,8 (C-13/C-15); 128,9 (C-1/C-3); 129,6 (C-12/C-16); 130,4 (C-2); 134,1 (C-14); 134,3 (C-11); 134,6 (C-5); 145,4 (C-7); 166,6 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 145 do Anexo II, pg. 461.

Cinamato de 4-nitrobenzila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,31$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

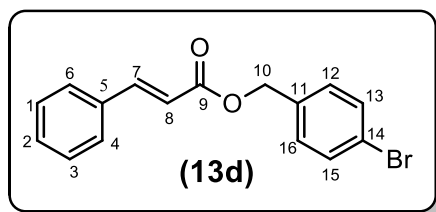
$T_f = 114,5-115,7\text{ }^\circ\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3111, 3066, 2964, 2846, 1706, 1630, 1513, 1446, 1374, 1342, 1205, 1154. O espectro é apresentado na Figura 146 do Anexo II, pg. 462.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 5,34 (s, 2H, H-10); 6,51 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15,9\text{ Hz}$, H-8); 7,39 -7,41 (m, 3H, H-1/H-2/H-3); 7,52- 7,58 (m, 4H, H-4/H-6/H-12/H-16); 7,76 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15,9\text{ Hz}$, H-7); 8,23 (d, 2H, $J = 8,4\text{ Hz}$, H-13/ H-15). O espectro é apresentado na Figura 147 do Anexo II, pg. 463.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 64,7 (C-10); 117,1 (C-8); 123,8 (C-13/C-15); 128,2 (C-4/C-6); 128,3 (C-12/C-16); 128,9 (C-1/C-3); 130,6 (C-2/C-5); 134,1 (C-11); 143,4 (C-5); 146,0 (C-7); 147,7 (C-14); 166,4 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 148 do Anexo II, pg. 464.

Cinamato de 4-bromobenzila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,46$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

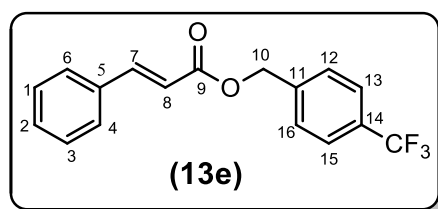
$T_f = 77,3-77,8\text{ }^\circ\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3057, 2974, 2939, 2885, 2117, 1704, 1633, 1574, 1489, 1369, 1311, 1282, 1167, 1067. O espectro é apresentado na Figura 149 do Anexo II, pg. 465.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 5,20 (s, 2H, H-10); 6,48 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-8); 7,29 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-12/H-16); 7,38-7,40 (m, 3H, H-1/H-2/H-3); 7,50-7,53 (m, 4H, H-13/H-15/H-4/H-6); 7,74 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura 150 do Anexo II, pg. 466.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 65,5 (C-10); 117,6 (C-8); 122,3 (C-14); 128,1 (C-4/C-6); 128,9 (C-1/C-3); 129,9 (C-12, C-16); 130,4 (C-2); 131,7 (C-13/C-15); 134,3 (C-11); 135,1 (C-5); 145,4 (C-7); 166,6 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 151 do Anexo II, pg. 467.

Cinamato de 4-(trifluorometil)benzila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,43$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

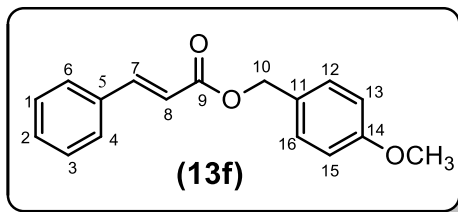
$T_f = 47,4-47,8$ °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{max}$ (cm^{-1}): 3062, 3032, 2929, 2117, 1713, 1633, 1578, 1450, 1327, 1207, 1154, 1106, 1065. O espectro é apresentado na Figura 152 do Anexo II, pg. 468.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 5,31 (s, 2H, H-10); 6,51 (d, 1H, $J_{trans} = 16,1$ Hz, H-8); 7,39-7,41 (m, 3H, H-2/H-12/H-16); 7,52-7,54 (m, 4H, H-1/H-3/H-4/H-6); 7,65 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, H-13 /H-15); 7,76 (d, 1H, $J_{trans} = 16,1$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura 153 do Anexo II, pg. 469.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 65,3 (C-10); 117,4 (C-8); 124,0 (q, $J_{C-F} = 270,4$ Hz, CF_3); 125,5 (q, $J_{C-F} = 3,8$ Hz, C-13/ C-15); 128,1 (C-2/C-4/C-6); 128,9 (C-1/C-3); 130,4 (q, C-14, $J_{C-F} = 32,3$ Hz); 130,5 (C-12/C-16); 134,2 (C-5); 140,1 (C-11); 145,7 (C-7); 166,5 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 154 do Anexo II, pg. 470.

Cinamato de 4-metoxibenzila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,51$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

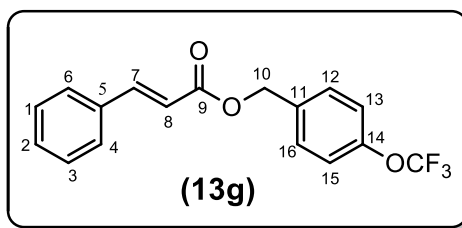
T_f = 62,3-63,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3047, 2995, 2931, 2833, 2117, 1892, 1700, 1641, 1574, 1513, 1452, 1369, 1306, 1247, 1167, 1033. O espectro é apresentado na Figura 155 do Anexo II, pg. 471.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,82 (s, 3H, OCH₃); 5,2 (s, 2H, H-10); 6,48 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-8); 6,93 (d_{ap}, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-13/H-15); 7,36-7,52 (m, 7H, H-1/H-2/H-3/H-4/H-6/H-12/H-16); 7,73 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura 156 do Anexo II, pg. 472.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 55,3 (C-10); 66,2 (C-14); 114,0 (C-13/C-15); 118,1 (C-8); 128,1 (C-4/C-6); 128,2 (C-2); 128,9 (C-1/C-3); 130,1 (C-12/C-16); 130,27 (C-11); 134,4 (C-5); 145,0 (C-7); 159,7 (C-14); 166,8 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 157 do Anexo II, pg. 473.

Cinamato de 4-(trifluorometoxi)benzila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,48$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

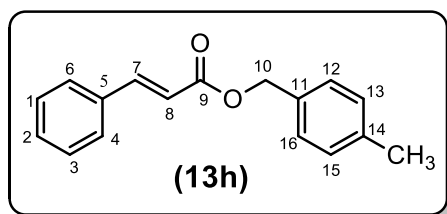
T_f = 34,0-35,1 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3066, 2964, 2931, 2121, 1969, 1708, 1634, 1506, 1451, 1370, 1309, 1262, 1143, 1011. O espectro é apresentado na Figura 158 do Anexo II, pg. 474.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 5,25 (s, 2H, H-10); 6,49 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15,9$ Hz, H-8); 7,23 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-13/H-15); 7,38-7,40 (m, 3H, H-1/H-2/H-3); 7,45 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-12/H-16); 7,52-7,55 (m, 2H, H-4/H-6); 7,75 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura 159 do Anexo II, pg. 475.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 65,3 (C-10); 117,6 (C-8); 120,4 (q, $J_{\text{C-F}} = 255,7$ Hz, OCF_3); 121,0 (C-13/C-15); 128,1 (C-4/C-6); 128,9 (C-1/C-3); 129,7 (C-12/C-16); 130,4 (C-2); 134,2 (C-11); 134,8 (C-5); 145,5 (C-7); 149,1 (C-14); 166,6 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 160 do Anexo II, pg. 476.

Cinamato de 4-metilbenzila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,47$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

T_f = 40,3-41,6 °C.

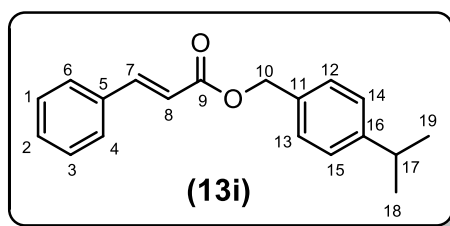
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3049, 3022, 2920, 2856, 2121, 1702, 1638, 1570, 1446, 1373, 1308, 1282, 1173. O espectro é apresentado na Figura 2.22, pg. 153.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,38 (s, 3H, CH_3); 5,23 (s, 2H, H-10); 6,49 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15,9$ Hz, H-8); 7,21 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, H-13/H-15); 7,33 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, H-

12/H-16); 7,38-7,40 (m, 3H, H-1/H-2/H-3); 7,51-7,54 (m, 2H, H-4/H-6); 7,74 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura 2.23, pg. 154.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 21,2 (CH_3); 66,3 (C-10); 118,0 (C-8); 128,1 (C-12/C-16); 128,4 (C-4/C-6); 128,9 (C-1/C-3); 129,3 (C-13/C-15); 130,3 (C-2); 133,1 (C-11); 134,4 (C-5); 138,1 (C-14); 145,0 (C-7); 166,8 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 2.24, pg. 155.

Cinamato de 4-isopropilbenzila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,52$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

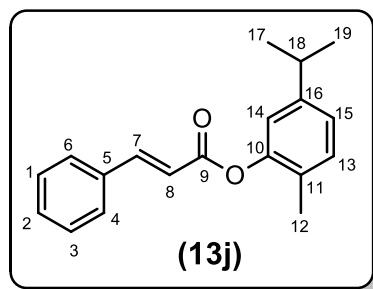
$T_f = 38,1-38,5$ °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 3053, 2958, 2926, 2858, 2121, 1708, 1636, 1510, 1453, 1382, 1311, 1202, 1159, 1057. O espectro é apresentado na Figura 161 do Anexo II, pg. 477.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,28 (d_{ap} , 6H, $J = 6,9$ Hz, H-18/H-19); 2,94 (sept, 1H, $J = 6,9$ Hz, H-17); 5,25 (s, 2H, H-10); 6,51 (d, 1H, H-8, $J_{\text{trans}} = 15,9$ Hz); 7,27 (d_{ap} , 2H, H-12/H-13, $J = 6,9$ Hz); 7,37-7,39 (m, 5H, H-1/H-2/H-3/H-14/H-15); 7,52-7,54 (m, 2H, H-4/H-6) 7,75 (d, H-7, $J_{\text{trans}} = 15,9$ Hz). O espectro é apresentado na Figura 162 do Anexo II, pg. 478.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 24,0 (C-18/C-19); 33,9 (C-17); 66,4 (C-10); 118,0 (C-8); 126,7 (C-14/C-15); 128,1 (C-12/C-13); 128,6 (C-4/C-6); 128,9 (C-1/C-3); 130,3 (C-2); 133,4 (C-5); 134,4 (C-11); 145,1 (C-7); 149,1 (C-16); 166,9 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 163 do Anexo II, pg. 479.

Cinamato de 5-isopropil-2-metilfenila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,58$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

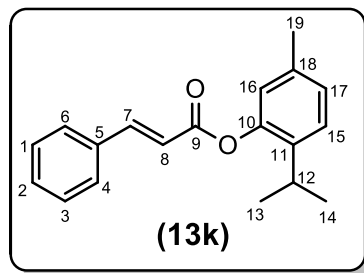
T_f = 62,8-64,3 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3062, 3032, 2960, 2926, 2868, 2023, 1721, 1628, 1578, 1497, 1448, 1308, 1237, 1138. O espectro é apresentado na Figura 164 do Anexo II, pg. 480.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 1,28 (d, 6H, $J = 6,9$ Hz, H-17/H-19); 2,21 (s, 3H, H-12); 2,93 (sept, 1H, $J = 6,8$ Hz, H-18); 6,70 (d, 1H, $J_{trans} = 15,9$ Hz, H-8); 6,97 (s, 1H, H-14); 7,06 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-15); 7,20 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-13); 7,44 (m, 3H, H-1/H-2/H-3); 7,61 (m, 2H, H-4/H-6); 7,92 (d, 1H, $J_{trans} = 16,2$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura 165 do Anexo II, pg. 481.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 15,9 (C-12); 24,0 (C-17/C-19); 33,6 (C-18); 117,2 (C-8); 119,8 (C-14); 124,2 (C-15); 127,4 (C-11); 128,3 (C-4/C-6); 129,0 (C-1/C-3); 130,7 (C-13); 130,9 (C-2); 134,2 (C-5); 146,5 (C-7); 148,1 (C-16); 149,3 (C-10); 165,2 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 166 do Anexo II, pg. 482.

Cinamato de 2-isopropil-5-metilfenila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,55$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

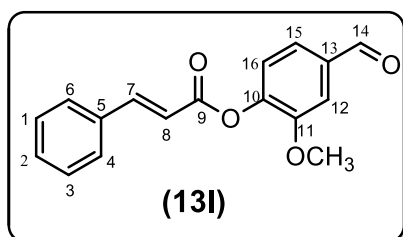
$T_f = 65,4-67,13\text{ }^{\circ}\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3057, 3024, 2960, 2922, 2852, 2117, 1724, 1637, 1505, 1448, 1308, 1242, 1144, 1080. O espectro é apresentado na Figura 167 do Anexo II, pg. 483.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,24 (d, 6H, $J = 6,9$ Hz, H-13/H-14); 2,35 (s, 3H, H-19); 3,07 (sept, 1H, $J = 6,9$ Hz, H-12); 6,69 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15,9$ Hz, H-8); 6,92 (s, 1H, H-16); 7,06 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-17); 7,24 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-15); 7,43-7,45 (m, 3H, H-1/H-2/H-3); 7,60-7,63 (m, 2H, H-4/H-6); 7,90 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15,9$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura 168 do Anexo II, pg. 484.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 20,8 (C-19); 23,1 (C-13/C-14); 27,2 (C-12); 117,3 (C-8); 122,8 (C-16); 126,5 (C-17); 127,1 (C-15); 128,3 (C-4/C-6); 129,0 (C-1/C-3); 130,6 (C-2); 134,2 (C-5); 136,6 (C-18); 137,2 (C-11); 146,4 (C-7); 148,0 (C-10); 165,6 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 169 do Anexo II, pg. 485.

Cinamato de 4-formil-2-metoxifenila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,47$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

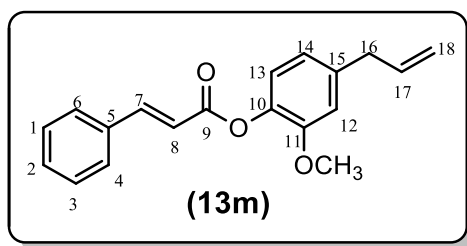
$T_f = 91,5-92,6\text{ }^\circ\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3059, 3012, 2929, 2852, 2738, 2117, 1979, 1725, 1701, 1633, 1595, 1500, 1423, 1391, 1307, 1265, 1132, 1029. O espectro é apresentado na Figura 170 do Anexo II, pg. 486.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,91 (s, 3H, OCH_3); 6,67 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15,9\text{ Hz}$, H-8); 7,31 (d, 1H, $J = 7,8\text{ Hz}$, H-16); 7,42-7,61 (m, 7H, H-1/H-2/H-3/H-4/H-6/H-12/H-15); 7,90 (d, 1H, $J_{\text{trans}} = 15,9\text{ Hz}$, H-7); 9,96 (s, 1H, H-14). O espectro é apresentado na Figura 171 do Anexo II, pg. 487.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 56,1 (OCH_3); 110,8 (C-12); 116,3 (C-8); 123,5 (C-15); 124,8 (C-16); 128,4 (C-4/C-6); 129,0 (C-1/C-3); 130,9 (C-2); 134,0 (C-13); 135,2 (C-5); 145,0 (C-10); 147,4 (C-7); 152,1 (C-11); 164,3 (C-9); 191,1 (C-14). O espectro é apresentado na Figura 172 do Anexo II, pg. 488.

Cinamato de 4-alil-2-metoxifenil



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,59$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

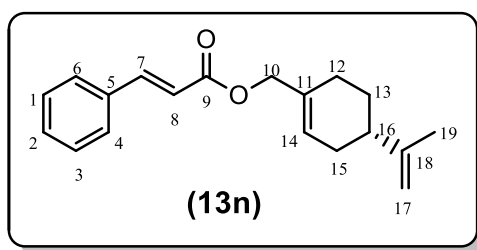
$T_f = 79,5-80,6\text{ }^\circ\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3059, 3003, 2935, 2843, 1731, 1636, 1602, 1507, 1462, 1449, 1305, 1264, 1122, 1031. O espectro é apresentado na Figura 173 do Anexo II, pg. 489.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,40 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-16); 4,82 (s, 2H, OCH_3); 5,09-5,15 (m, 2H, H-18); 5,98 (ddt_{ap}, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,6$ Hz, 1H, H-17); 6,67 (d, 1H, $J_{trans} = 16,0$ Hz, H-8); 6,78-6,82 (m, 2H, H-12 e H-14); 7,03 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-13); 7,40-7,59 (m, 5H, H-1/H-2/H-3/H-4/H-6); 7,87 (d, 1H, $J_{trans} = 16,0$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura 174 do Anexo II, pg. 490.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 40,2 (C-16); 55,9 (OCH_3); 112,8 (C-12); 116,2 (C-8); 117,1 (C-18); 120,7 (C-14); 122,7 (C-13); 128,3 (C-4 e C-6); 129,0 (C-1 e C-3); 130,6 (C-2); 134,3 (C-5); 137,1 (C-17); 138,0 (C-15); 139,0 (C-10); 146,5 (C-7); 151,0 (C-11); 165,2 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 175 do Anexo II, pg. 491.

Cinamato de (S)-(4-(prop-1-en-2-il)ciclohex-1-en-1-il)metil



Característica: óleo incolor purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (4:1 v/v).

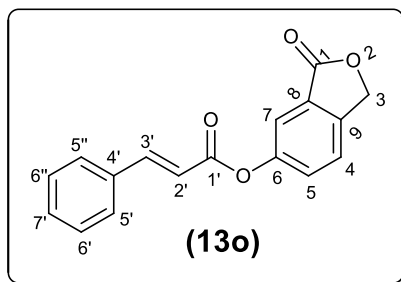
CCD: $R_f = 0,51$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 3062, 2968, 2925, 2837, 2118, 1710, 1636, 1578, 1496, 1450, 1307, 1280, 1158. O espectro é apresentado na Figura 176 do Anexo II, pg. 492.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,85-2,21 (m, 7H, H-12/H-13/H-15/H-16); 4,61 (sl, 2H, H-10); 4,73-4,74 (m, 2H, H-17); 5,82 (sl, 1H, H-14); 6,47 (d, 1H, $J_{trans} = 16,0$ Hz, H-8); 7,36-7,40 (m, 3H, H-1/H-2/H-3); 7,52-7,54 (m, 2H, H-4/H-6); 7,70 (d, 1H, $J_{trans} = 16,0$ Hz, H-7). O espectro é apresentado na Figura 177 do Anexo II, pg. 493.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 20,8 (C-19); 26,5 (C-12); 27,3 (C-13); 30,5 (C-15); 40,9 (C-16); 68,5 (C-10); 108,8 (C-17); 118,1 (C-8); 125,9 (C-14); 128,1 (C-4/C-6); 128,9 (C-1/C-3); 130,3 (C-2); 132,7 (C-11); 134,4 (C-5); 144,9 (C-7); 149,6 (C-18); 166,9 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 178 do Anexo II, pg. 494.

Cinamato de 3-oxo-1,3-diidroisobenzofuran-5-ila



Característica: sólido branco purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (3:1 v/v).

CCD: $R_f = 0,30$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

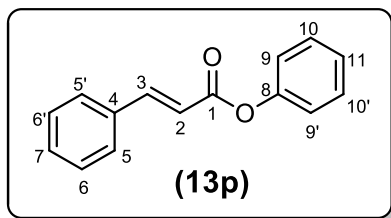
$T_f = 171,9-172,4\text{ }^\circ\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): 3074, 2928, 2852, 1755, 1725, 1633, 1577, 1481, 1451, 1158, 1138. O espectro é apresentado na Figura 179 do Anexo II, pg. 495.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 5,33 (s, 2H; H-3); 6,64 (d, 1H, $J = 16\text{ Hz}$; H-2'); 7,43-7,72 (m, 8H; H-5'', H-5', H-7, H-6'', H-7', H-6', H-5, H-4); 7,90 (d, 1H, $J = 16\text{ Hz}$; H-3'). O espectro é apresentado na Figura 180 do Anexo II, pg. 496.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 69,5 (C-3); 116,3 (C-2'); 118,8 (C-7); 123,1 (C-5); 127,2 (C-4); 128,2 (C-8); 128,4 (C-5', C-5''); 129,0 (C-6', C-6''); 131,0 (C-7'); 133,8 (C-4'); 143,6 (C-9); 147,6 (C-3'); 151,4 (C-6); 165,0 (C-1'); 170,2 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 181 do Anexo II, pg. 497.

Cinamato de fenila



Característica: sólido branco purificado por recristalização utilizando-se etanol como solvente.

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

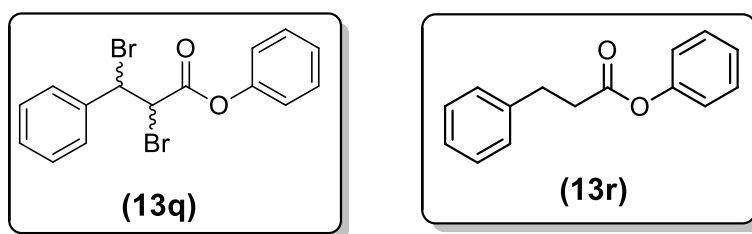
$T_f = 73,9-75,3\text{ }^\circ\text{C}$.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): 3058, 2932, 1727, 1637, 1588, 1484, 1449, 1204, 1145, 910. O espectro é apresentado na Figura 182 do Anexo II, pg. 498.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 6,73 (d, 2H, *J* = 16 Hz; H-2); 7,68-7,14 (m, 10H; H-5, H-6, H-7, H-6' H-5', H-9, H-10, H-11, H-10', H-9'); 7,87 (d, 2H, *J* = 16 Hz; H-3). O espectro é apresentado na Figura 183 do Anexo II, pg. 499.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 116,8 (C-2), 121,3 (C-9, C-9'), 125,4 (C-11), 128,0 (C-5, C-5'), 128,6 (C-6, C-6'), 129,0 (C-7), 134,1 (C-4), 146,5 (C-3), 150,9 (C-8), 165,5 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 184 do Anexo II, pg. 500.

A síntese e caracterização dos compostos 2,3-dibromofenilpropanoato de fenila (**13q**) e fenil 3-fenilpropanoato (**13r**) foi descrita por LIMA (2014).



2.4.3 Difração de raios X por monocristal (DRXM)

O espécime cristalino isolado do composto **9h** foi submetido à análise por DRXM em temperatura ambiente (296 ± 1 K) em um difratômetro APEX II QUAZAR Bruker AXS™. Este difratômetro possui um detector por área, monocromador de espelhos em multicamadas, microfonte de raios X I μ S™ equipada com dupla fonte de todos selados, sendo uma de cobre e outra de molibdênio. Para a coleta de dados utilizou-se fonte de molibdênio, MoK α (λ = 0,71073 Å).

Em um primeiro momento, o espécime isolado teve a monocristalinidade verificada em um microscópio com polarizador e analisador acoplados. Tal amostra foi submetida à pré-coleta para determinação da cela unitária antes da coleta completa de dados. Os parâmetros de cela foram determinados a partir de um conjunto de 36 imagens capturadas em modo de varredura em ω sob rotação de 0,5° e tempo de exposição ao feixe de raios X de 10 segundos.

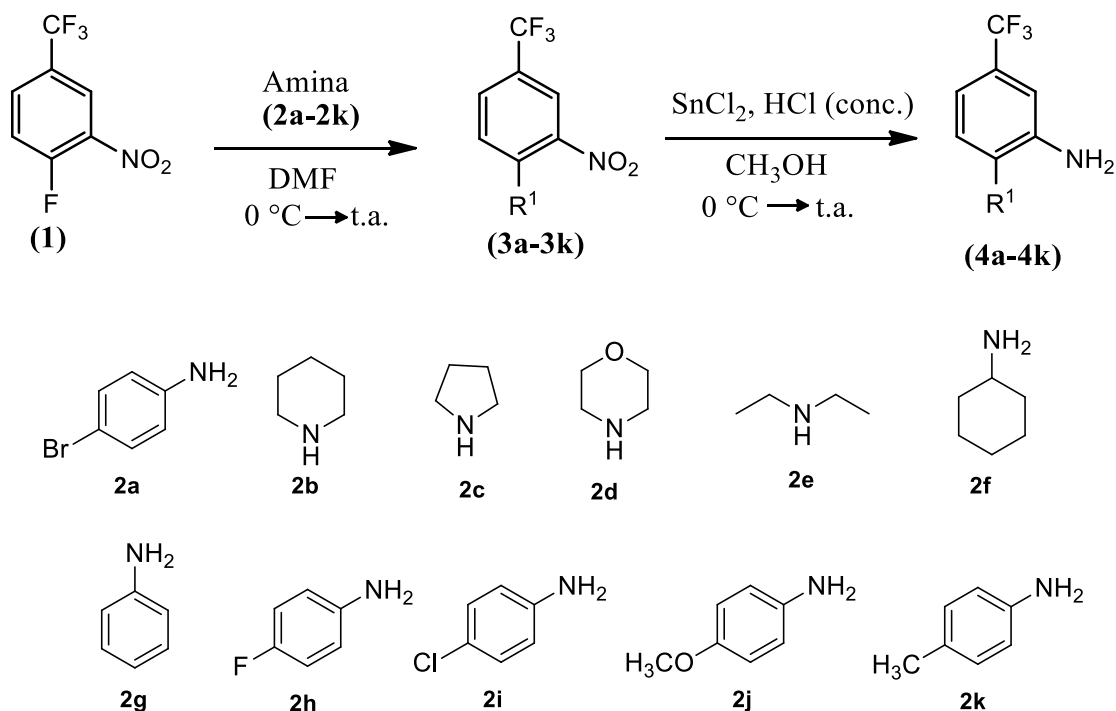
A coleta das intensidades da amostra **9h** (conjunto completo de dados) envolveu técnicas de varredura em ϕ e em ω , com tempo de exposição ao feixe de

raios X de 20 segundos em todas as resoluções. A estratégia de coleta das reflexões foi calculada com uma redundância igual a 3 para reflexões cujos índices remetem a uma resolução de 0,78 Å, com uma razão entre reflexões coletáveis e possíveis de serem coletadas (completeza) de 100% para esta resolução. Após a coleta dos dados completos, as reflexões foram indexadas, integradas e corrigidas por fatores de escala físicos e geométricos, e cristalográficos, devido às equivalências por simetria do sistema do grupo de ponto. Assim, foi possível obter reflexões independentes que foram utilizadas para determinação do grupo espacial, solução e refinamento da estrutura. Todo procedimento descrito foi realizado com auxílio dos programas Bruker Saint e SADABS.

Os métodos diretos foram utilizados para resolver a estrutura usando o programa SIR2004. Na solução obtida, os átomos de flúor, oxigênio, nitrogênio e carbono foram localizados em mapa de densidade eletrônica calculado por síntese de Fourier usando o programa anterior. A estrutura foi refinada usando o programa SHELXL-97. O método dos mínimos quadrados de matriz completa foi utilizado para todos os ciclos de refinamentos, e as diferenças entre os fatores de estrutura observados e calculados, em F^2 , foram minimizados. Estes programas foram acessados por meio da interface de programas de cristalografia WinGX. Parâmetros anisotrópicos de deslocamento térmico foram refinados para os átomos não-hidrogenóides. Posições fixas e parâmetros térmicos isotrópicos fixos [$U_{iso}(H) = 1,2U_{eq}(C \text{ ou } N)$] foram adotados para os átomos de hidrogênio acompanhando as posições dos carbonos e nitrogênios aos quais foram ligados.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

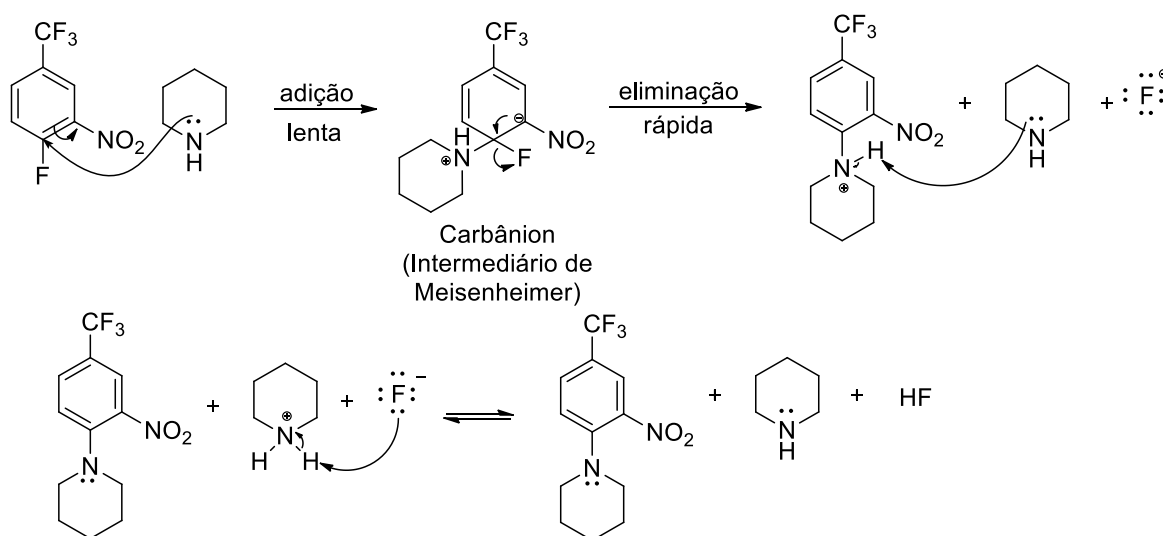
O desenvolvimento do presente trabalho teve início com a preparação das anilinas **4a-4k** conforme apresentado no Esquema 2.5 (pg. 113). Para isto, primeiramente foi realizada a reação de substituição nucleofílica aromática entre **1** e diferentes aminas **2a-2k**. Em seguida, os nitrocompostos **3a-3k** foram reduzidos, na presença de SnCl_2/HCl , às correspondentes anilinas **4a-4k** (Esquema 2.5, pg. 113). Conforme será apresentado mais adiante, estas anilinas foram posteriormente utilizadas como nucleófilos para realizar a abertura do anel azalactônico.



Esquema 2.5 – Etapas envolvidas na preparação das anilinas **4a-4k**.

Os nitrocompostos sintetizados foram obtidos com rendimentos que variaram de 81% a 98% após purificação por recristalização ou por cromatografia em coluna de sílica gel. Uma vez sintetizadas, estas substâncias foram caracterizadas via espectroscopia no infravermelho e espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . Os dados experimentais que caracterizam os compostos **3a-3k** estão descritos na seção 2.4.2.1 (pg. 45-55).

O Esquema 2.6 (pg. 114) contém uma proposta de mecanismo de reação que explica a obtenção dos compostos **3a-3k** via reação de substituição nucleofílica aromática. Tomando-se como amina a piperidina, a primeira etapa consiste no ataque nucleofílico do par de elétrons não ligante do átomo de nitrogênio ao carbono eletrofílico do anel aromático do composto **1**, levando a formação de um intermediário de carga negativa (intermediário de Meisenheimer). Como a aromaticidade do anel é rompida, esta é a etapa lenta do mecanismo proposto. O intermediário de Meisenheimer formado é rico em elétrons e estabilizado pelos grupos retiradores de elétrons NO_2 e CF_3 . O segundo passo, etapa rápida, consiste na eliminação do átomo de flúor, com restituição da aromaticidade do anel e formação do produto de substituição.



Esquema 2.6 – Proposta de mecanismo para a obtenção dos compostos **3a-3k** usando-se a piperidina como exemplo. Fonte: BARROS, 2014.

A seguir, será discutida a caracterização de um dos nitrocompostos sintetizados. Os demais possuem caracterização semelhante e seus espectros são apresentados no Anexo.

No espectro no infravermelho do composto **3b** (Figura 2.5, pg. 116) a banda de absorção em 2939 corresponde à vibração de estiramento da ligação =C-H do anel aromático. As bandas em 2868 e 2827 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento assimétrico de ligação C-H dos carbonos sp^3 . As bandas em 1622, 1561, 1494 e 1449 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento das ligações C=C do anel aromático. As bandas em 1528 e 1324 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo nitro, respectivamente. O estiramento da ligação C-F resultou em uma banda de absorção em 1116 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^1H do composto **3b** (Figura 2.6, pg. 117) os hidrogênios metilênicos H-3, H-4 e H-5 foram observados como um multipeto integrado para seis hidrogênios em δ_{H} 1,61-1,75. Um tripleto em δ_{H} 3,12, integrado para quatro hidrogênios, foi atribuído aos outros hidrogênios metilênicos (H-2 e H-6) e possui constante de acoplamento $J = 5,3$ Hz. O duplete em δ_{H} 7,14, integrado para um hidrogênio, corresponde ao hidrogênio (H-6') e possui constante de acoplamento $J = 8,7$ Hz. Em δ_{H} 7,60, tem-se um duplete duplo com constantes de acoplamento $J = 2,3$ Hz e $J = 8,7$ Hz, integrado para um hidrogênio e que foi atribuído ao hidrogênio H-5'. O valor da constante de acoplamento $J = 8,7$ Hz confirma o acoplamento *orto*

de H-5' com o hidrogênio vizinho H-6'. Outro duplete em δ_{H} 8,03, também integrado para um hidrogênio, corresponde ao hidrogênio H-3' e possui valor de constante de acoplamento $J = 2,3$ Hz, uma vez que este valor é igual a um dos valores de constante de acoplamento obtidos para H-5', confirma-se o acoplamento *meta* de H-3' com H-5'.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **3b** (Figura 2.7, pg. 118) os sinais em δ_{C} 24,0, 25,8 e 52,3 correspondem aos carbonos metilênicos C-4, C-3/C-5 e C-2/C-6, respectivamente. Com exceção dos carbonos C-1' e C-2', os demais carbonos do anel aromático foram observados como quartetos e seus valores de constantes de acoplamento encontrados estão em acordo com os descritos na literatura. A observação desses quartetos se deve ao acoplamento dos carbonos com os átomos de flúor do grupo CF_3 . Já os carbonos C-2' e C-1' aparecem mais desblindados em δ_{C} 139,8 e δ_{C} 148,8, respectivamente.

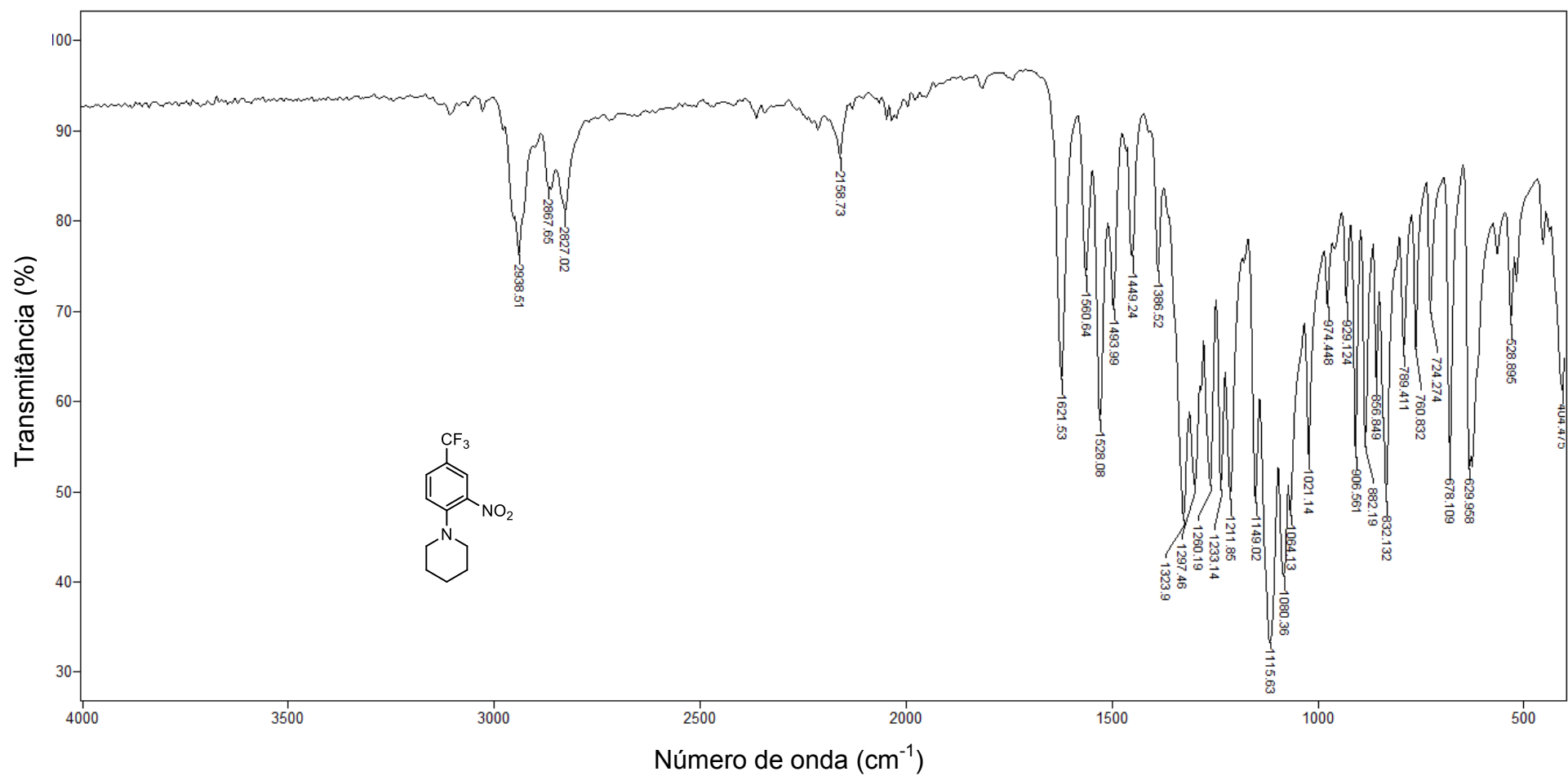


Figura 2.5 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3b**.

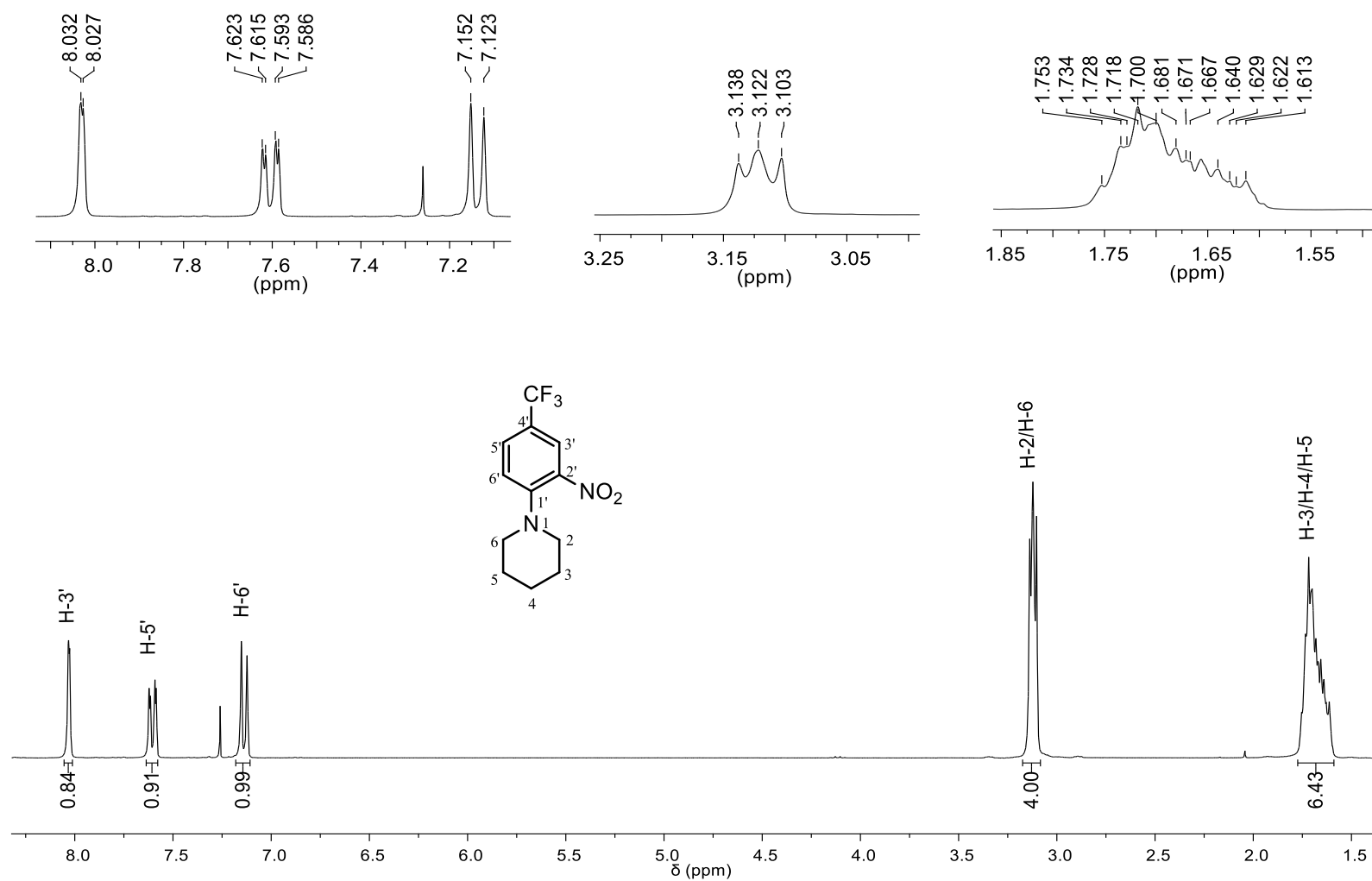


Figura 2.6 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3b**.

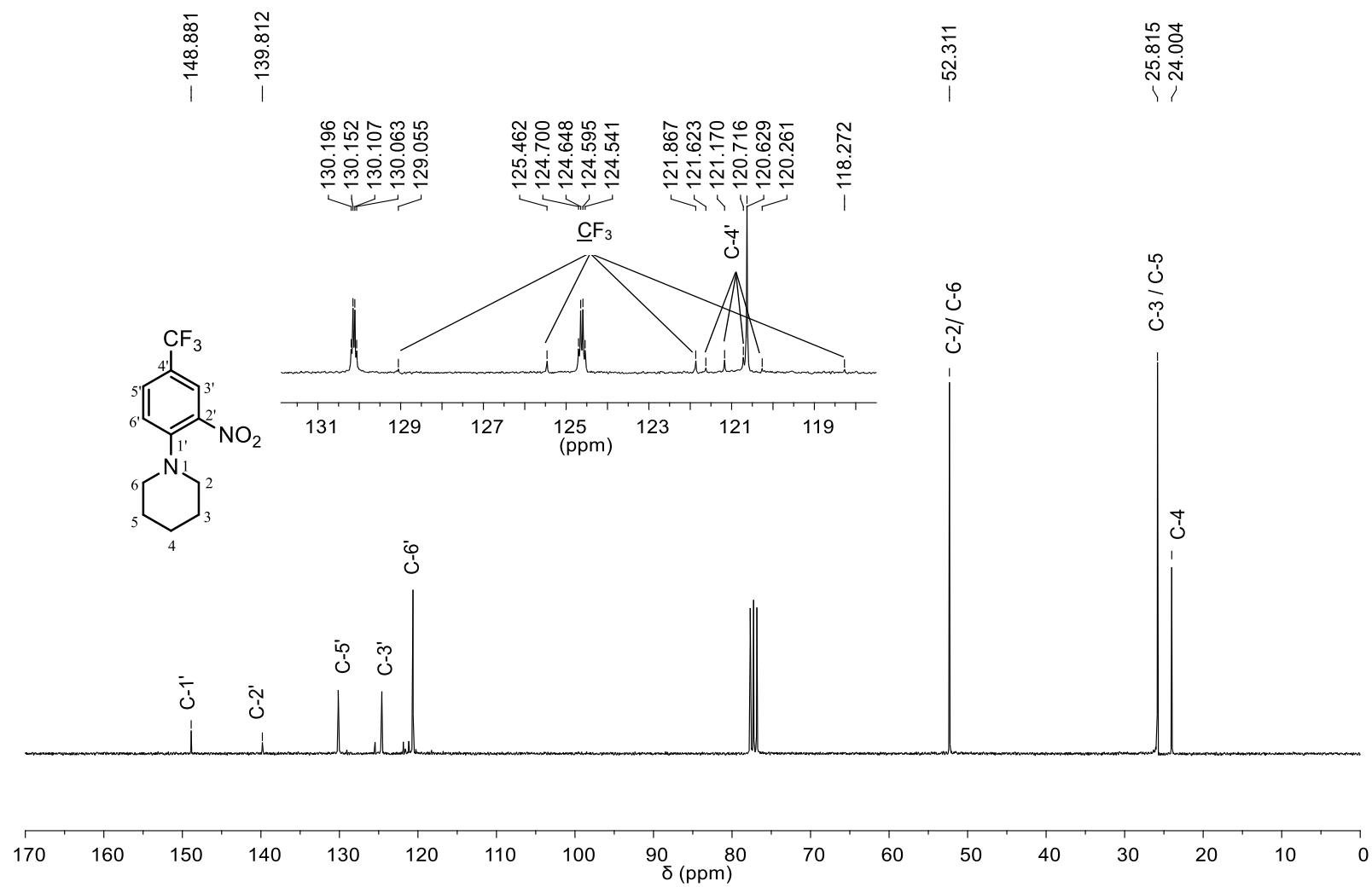


Figura 2.7 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **3b**.

A redução dos nitrocompostos **3a-3k**, utilizando cloreto de estanho em meio ácido, resultou na obtenção das anilinas em rendimentos que variaram de 56% a 94% após purificação em coluna de sílica gel. Uma vez sintetizadas, estas substâncias foram caracterizadas via espectroscopia no infravermelho e espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . Os dados experimentais que caracterizam os compostos **4a-4k** estão descritos na seção 2.4.2.2 (pg. 56-65).

A seguir, será discutida a caracterização de uma das anilinas sintetizadas. As demais possuem caracterização semelhante e seus espectros são apresentados no Anexo.

No espectro no infravermelho do composto **4b** (Figura 2.8, pg. 120) as bandas de absorção em 3453 e 3356 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo NH_2 , respectivamente. As demais bandas de absorção possuem atribuições semelhantes a do composto nitrado **3b**.

No espectro de RMN de ^1H do composto **4b** (Figura 2.9, pg. 121) os sinais em δ_{H} 1,60-1,75 e δ_{H} 2,87, integrados para seis e quatro hidrogênios respectivamente, correspondem aos hidrogênios metilênicos do grupo piperidinila. O simpleto largo em δ_{H} 4,11, integrado para dois hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios do grupo amino. Em δ_{H} 6,93-7,03 tem-se um multipeto, integrado para três átomos de hidrogênio, referente aos hidrogênios do anel aromático (H-3, H-4 e H-6).

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **4b** (Figura 2.10, pg. 122) observa-se que o número de sinais apresentados no espectro está de acordo com a estrutura de **4b** e as atribuições são similares àquela do composto nitrado **3b**.

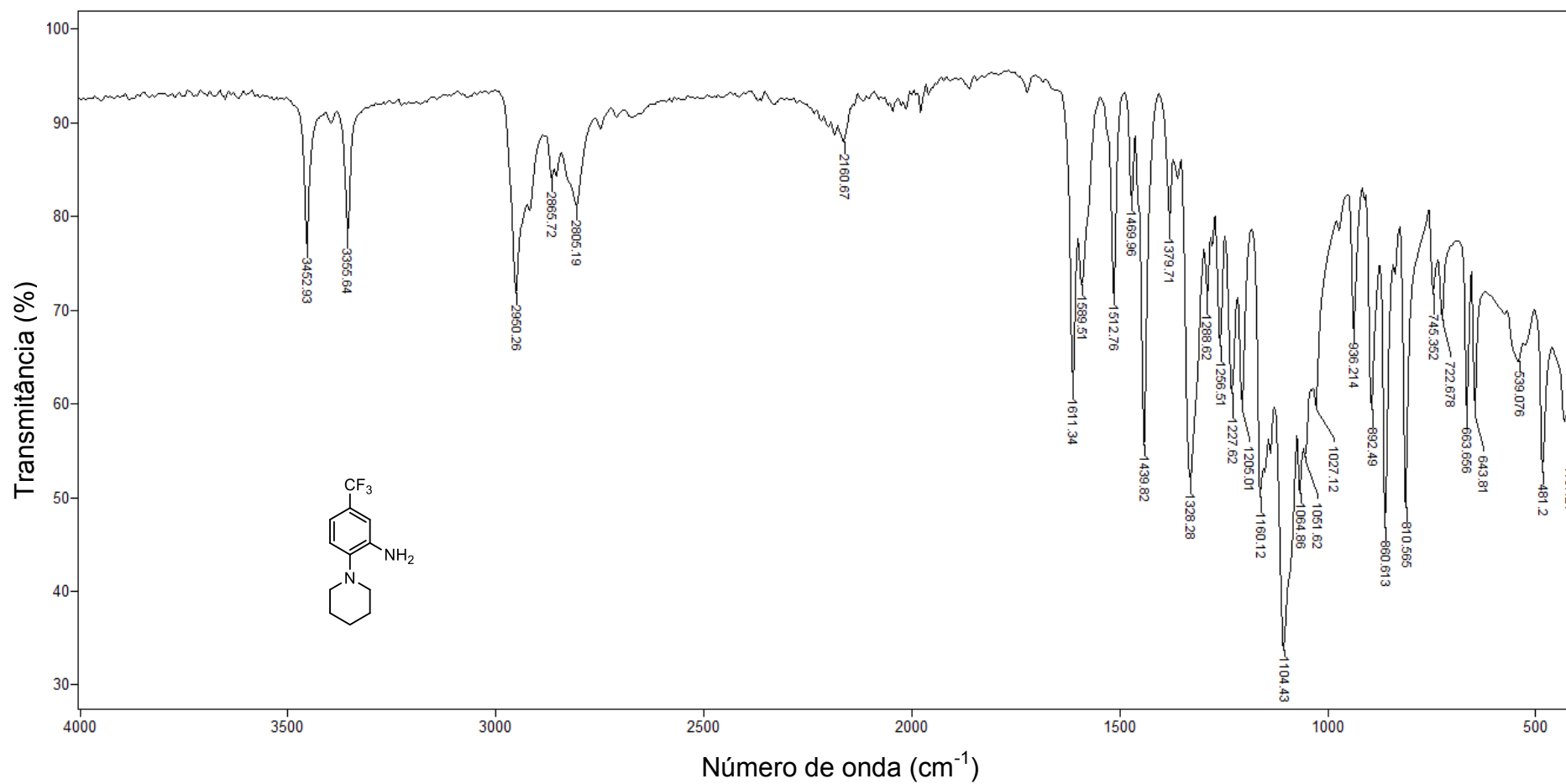


Figura 2.8 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4b**.

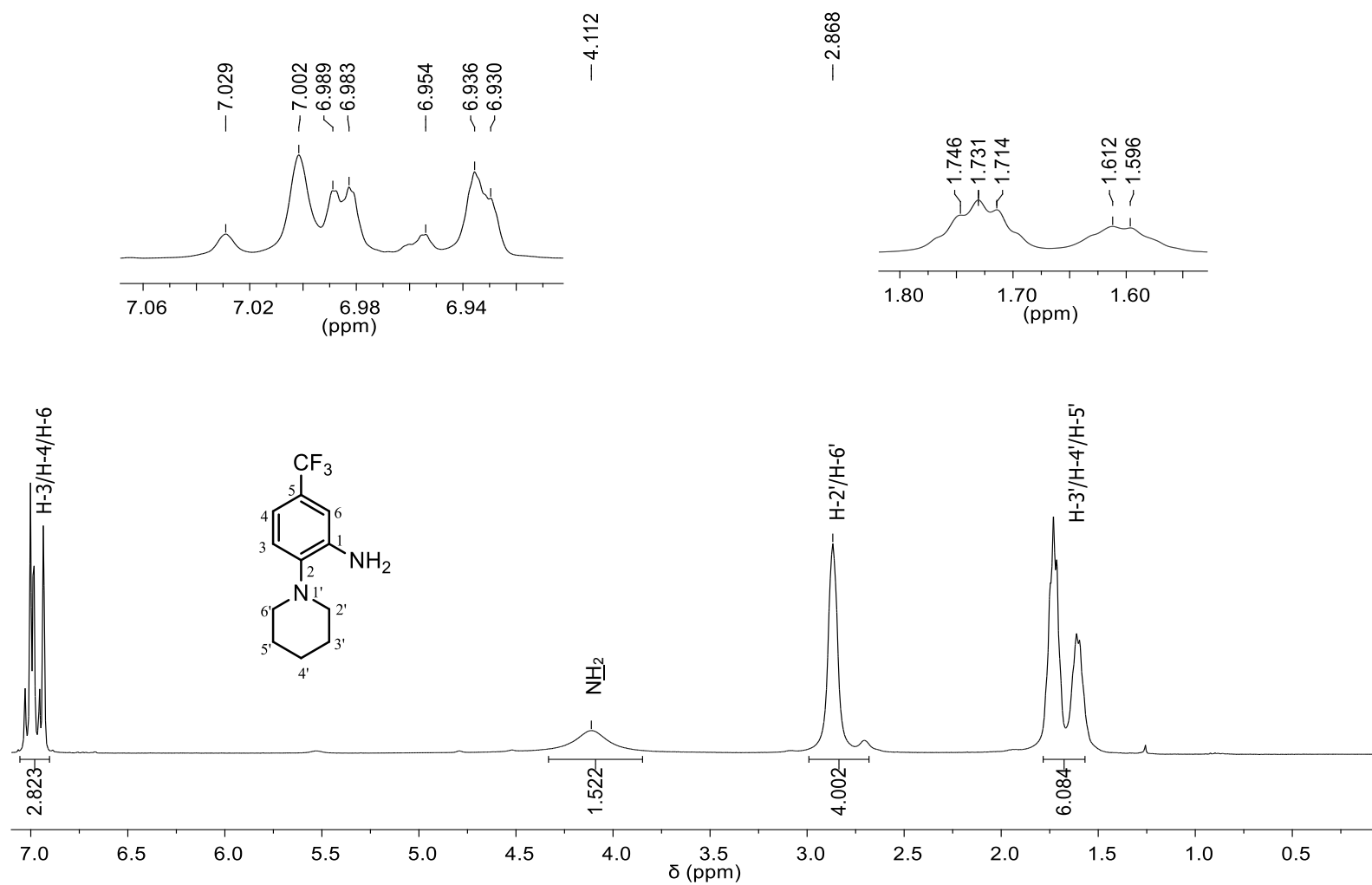


Figura 2.9 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **4b**.

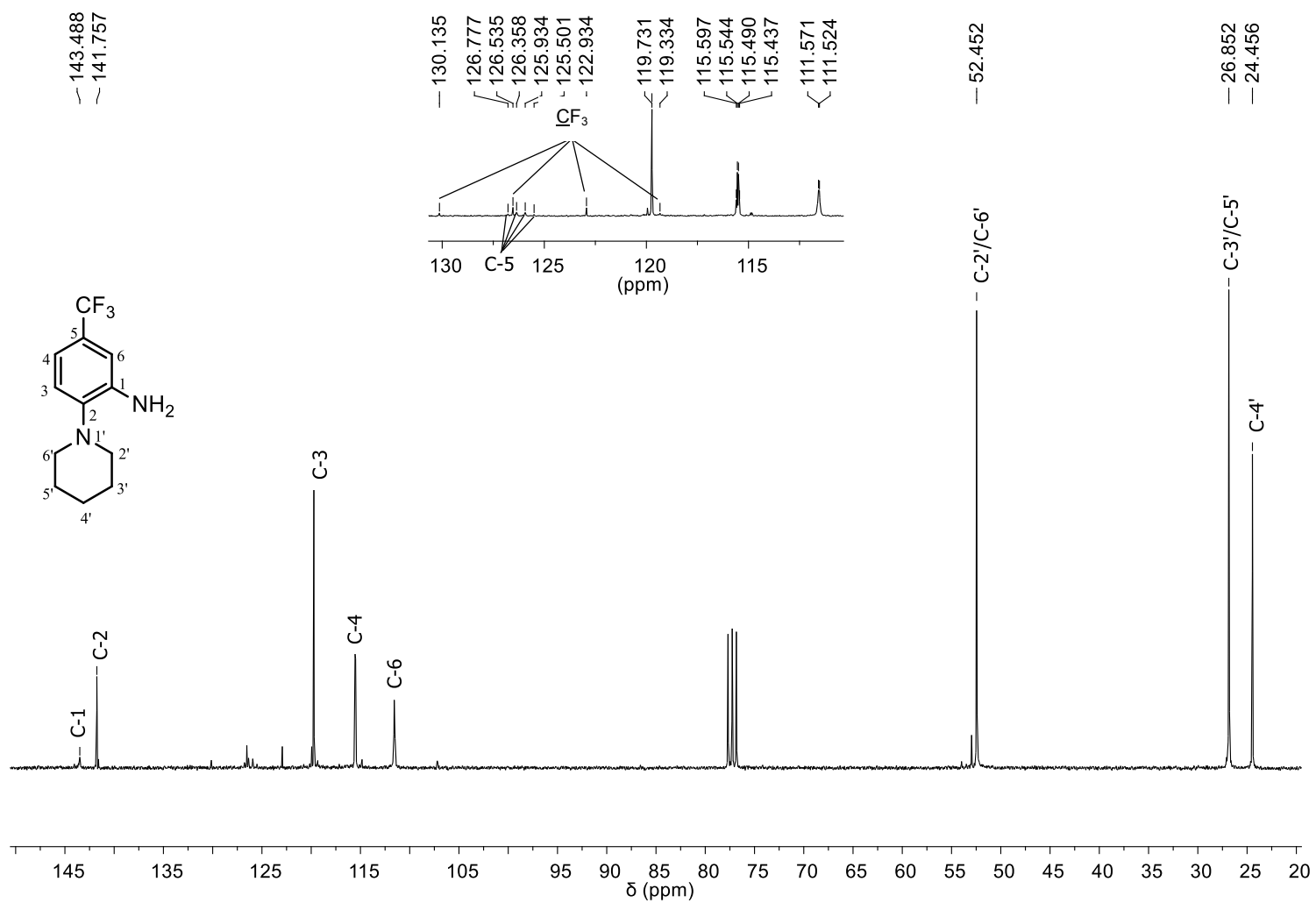
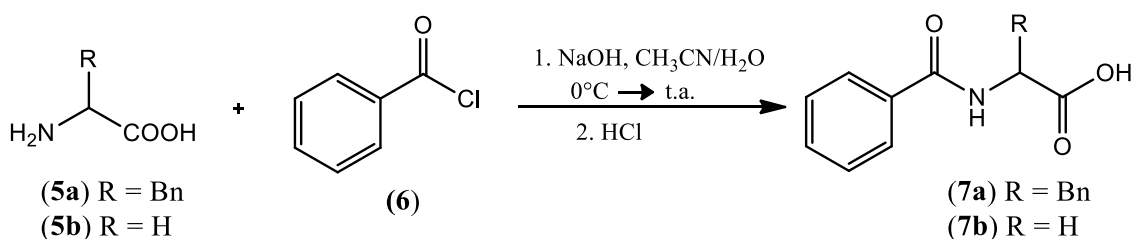


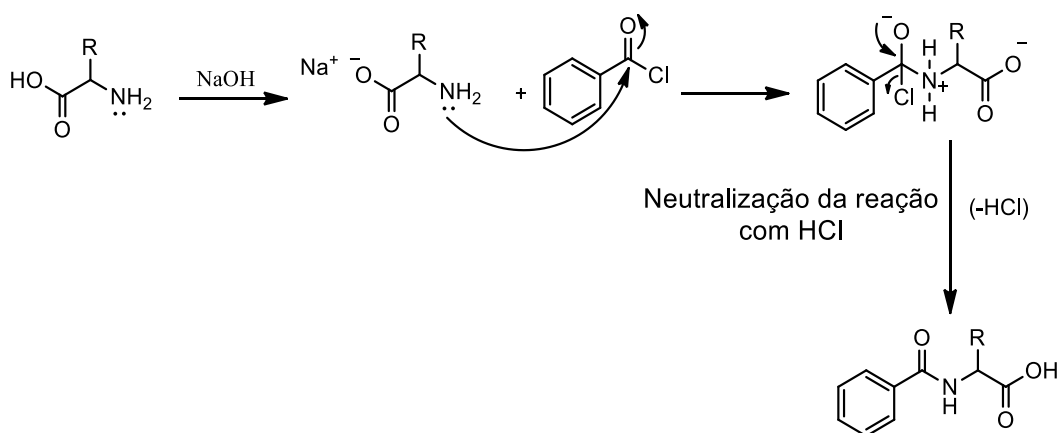
Figura 2.10 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **4b**.

Para a síntese das azalactonas **8a-8b**, foi necessária a preparação dos aminoácidos benzoilados **7a** e **7b**. Os aminoácidos foram obtidos por meio da adição lenta de cloreto de benzoíla (**6**) a uma solução contendo o aminoácido (**5a** ou **5b**), hidróxido de sódio e uma mistura de água/acetonitrila (Esquema 2.7). Posteriormente, a reação foi neutralizada com ácido clorídrico concentrado, levando a formação dos aminoácidos benzoilados **7a** e **7b**, com rendimentos de 76% e 84%, respectivamente, após purificação por recristalização.



Esquema 2.7 – Etapas envolvidas na preparação dos aminoácidos benzoilados **7a** e **7b**.

O Esquema 2.8 contém o mecanismo de reação que explica a obtenção dos compostos **7a** e **7b** via reação de benzoilação dos aminoácidos. Como a reação ocorre em meio básico primeiramente temos a abstração do hidrogênio ácido do grupo carboxila, com posterior ataque nucleofílico do par de elétrons não ligante do grupo NH_2 ao carbono carbonílico do cloreto de benzoíla. Na etapa final tem-se a neutralização da reação com HCl , levando à formação dos aminoácidos benzoilados.



Esquema 2.8 – Proposta de mecanismo que explica a obtenção dos aminoácidos benzoilados **7a** e **7b**.

Uma vez sintetizadas, estas substâncias foram caracterizadas via espectroscopia no infravermelho e espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . Os dados experimentais que caracterizam os compostos **7a** e **7b** estão descritos na seção 2.4.2.3 (pg. 65-68).

A seguir, será discutida a caracterização de um dos aminoácidos benzoilados sintetizados.

No espectro no infravermelho do composto **7a** (Figura 2.11, pg. 126) a banda de estiramento da ligação OH do grupo ácido carboxílico aparece em 3527 cm^{-1} . A banda de absorção aguda em 3340 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação N-H. A banda de absorção em 3028 cm^{-1} corresponde as vibrações de estiramento da ligação $=\text{C-H}$ dos anéis aromáticos. A banda de absorção em 2910 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento assimétrico de ligação C-H dos carbonos sp^3 . O estiramento típico da ligação C=O do grupo ácido carboxílico aparece como uma banda intensa em 1714 cm^{-1} e a banda de absorção referente ao estiramento da ligação C=O do grupo amida é observada em 1634 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^1H do composto **7a** (Figura 2.12, pg. 127) os hidrogênios H-7' e H-8' foram observados como multipletos em δ_{H} 3,02-3,22 (integrado para dois hidrogênios) e δ_{H} 4,57-4,65 (integrado para um hidrogênio). O multiplete em δ_{H} 7,14-7,32, integrado para cinco hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios do anel benzílico (H-2'/H-3'/H-4'/H-5' e H-6'). Os hidrogênios H-3/H-4 e H-5 do anel aromático, próximo do grupamento amida, também foram observados como um multiplete em δ_{H} 7,41-7,53. Em δ_{H} 7,78 tem-se um duplete integrado para dois hidrogênios, referentes aos hidrogênios aromáticos H-2 e H-6 e com constante de acoplamento $J = 8,1\text{ Hz}$. Este valor de constante de acoplamento é típico para acoplamento de hidrogênios em posição *orto* e está de acordo com a literatura (PAVIA, pg.139, 2010). Um duplete em δ_{H} 8,71, integrado para um hidrogênio e com constante de acoplamento $J = 8,1\text{ Hz}$, foi atribuído ao nitrogênio do grupo NH. O aparecimento deste duplete ocorre devido ao acoplamento com o hidrogênio vizinho H-8'. O simpleto largo em δ_{H} 12,8 corresponde ao hidrogênio do grupo carboxila.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **7a** (Figura 2.13, pg. 128) os sinais em δ_{C} 36,7 e δ_{C} 54,7 correspondem, respectivamente, aos carbonos C-7' e C-8'. Os sinais em δ_{C} 166,8 e 173,7 foram atribuídos aos carbonos carbonílicos do grupo

amida e do grupo carboxila, respectivamente. Os demais sinais correspondem aos carbonos dos anéis aromáticos.

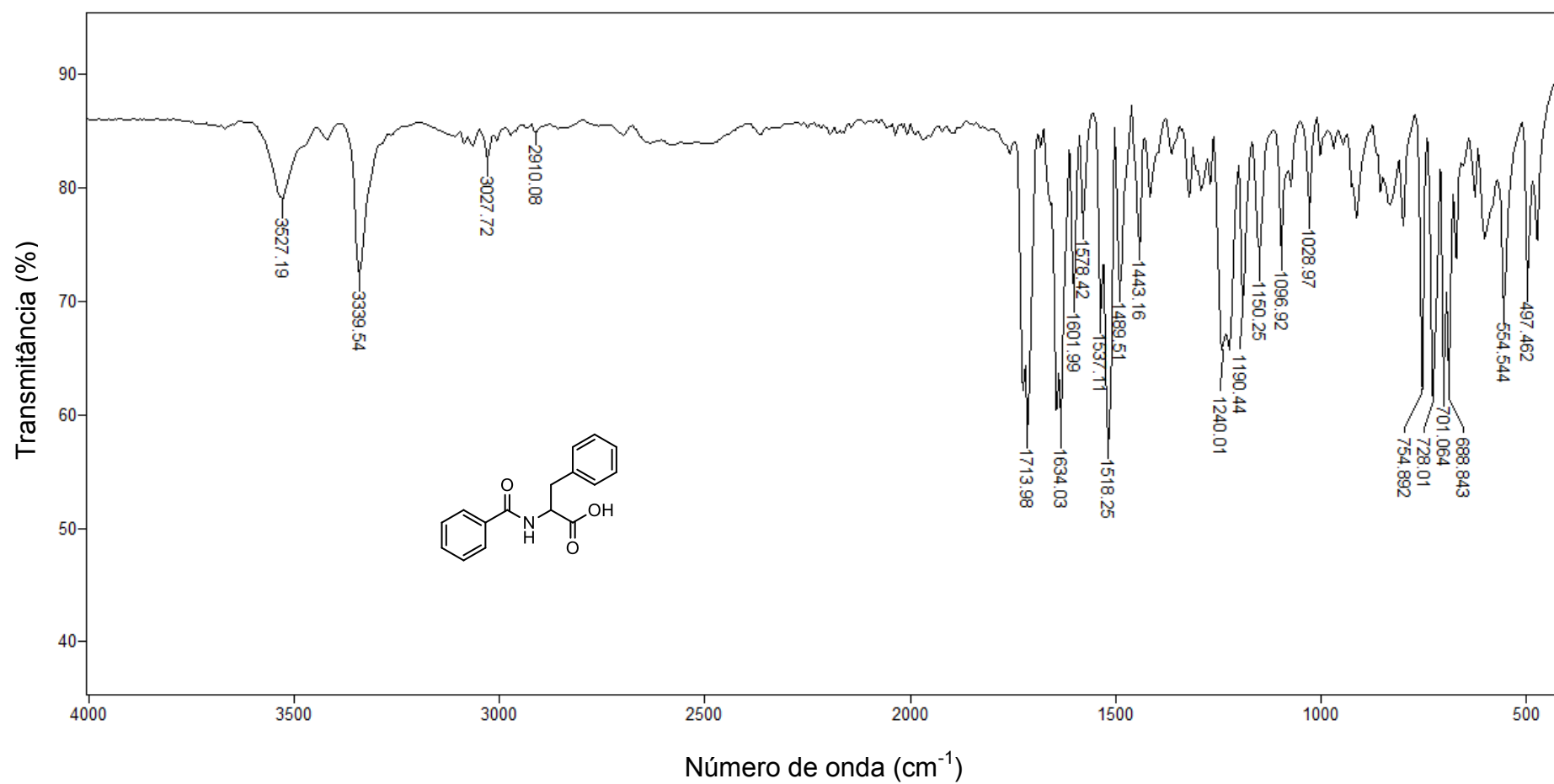


Figura 2.11 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7a**.

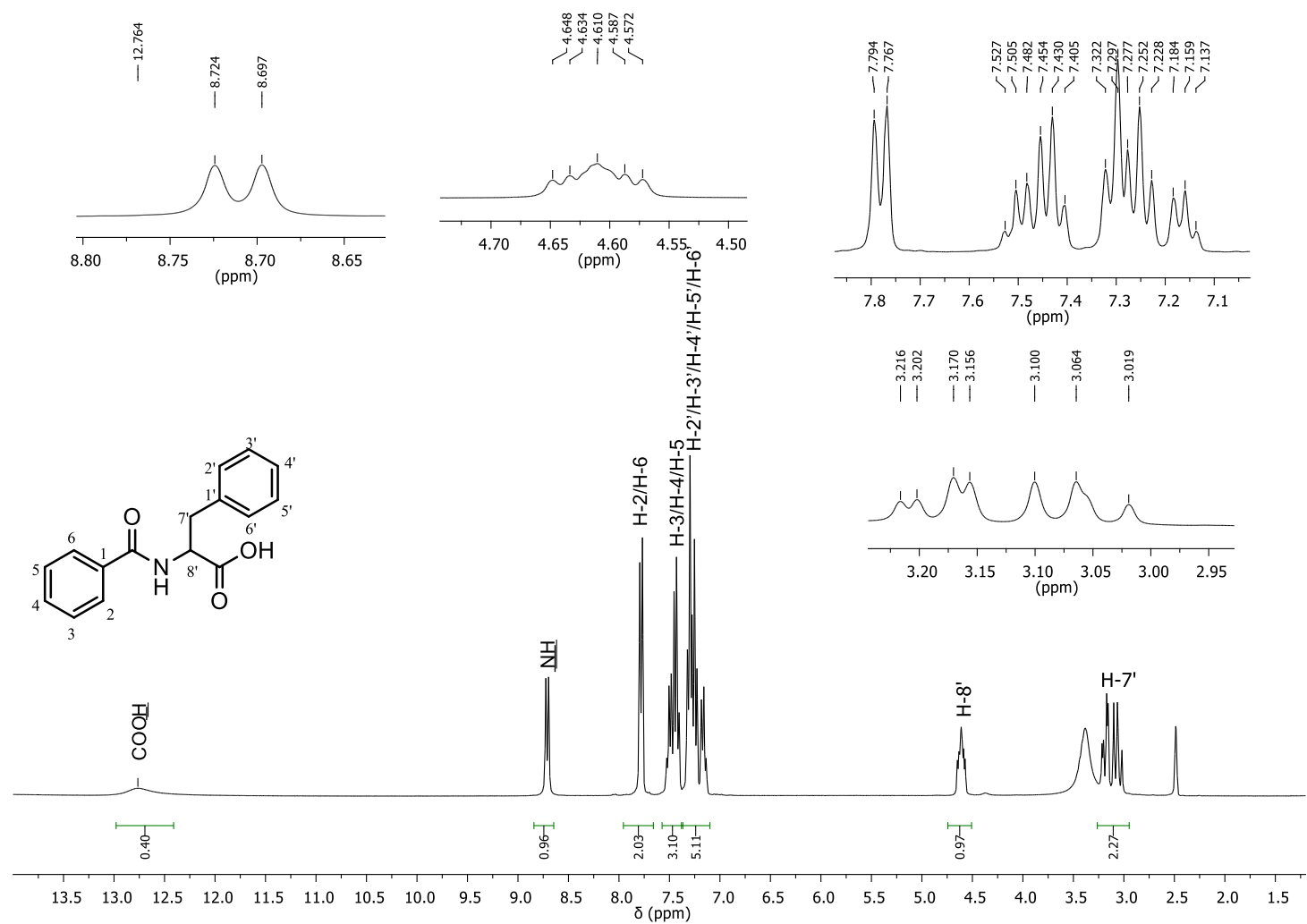


Figura 2.12 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) do composto **7a**.

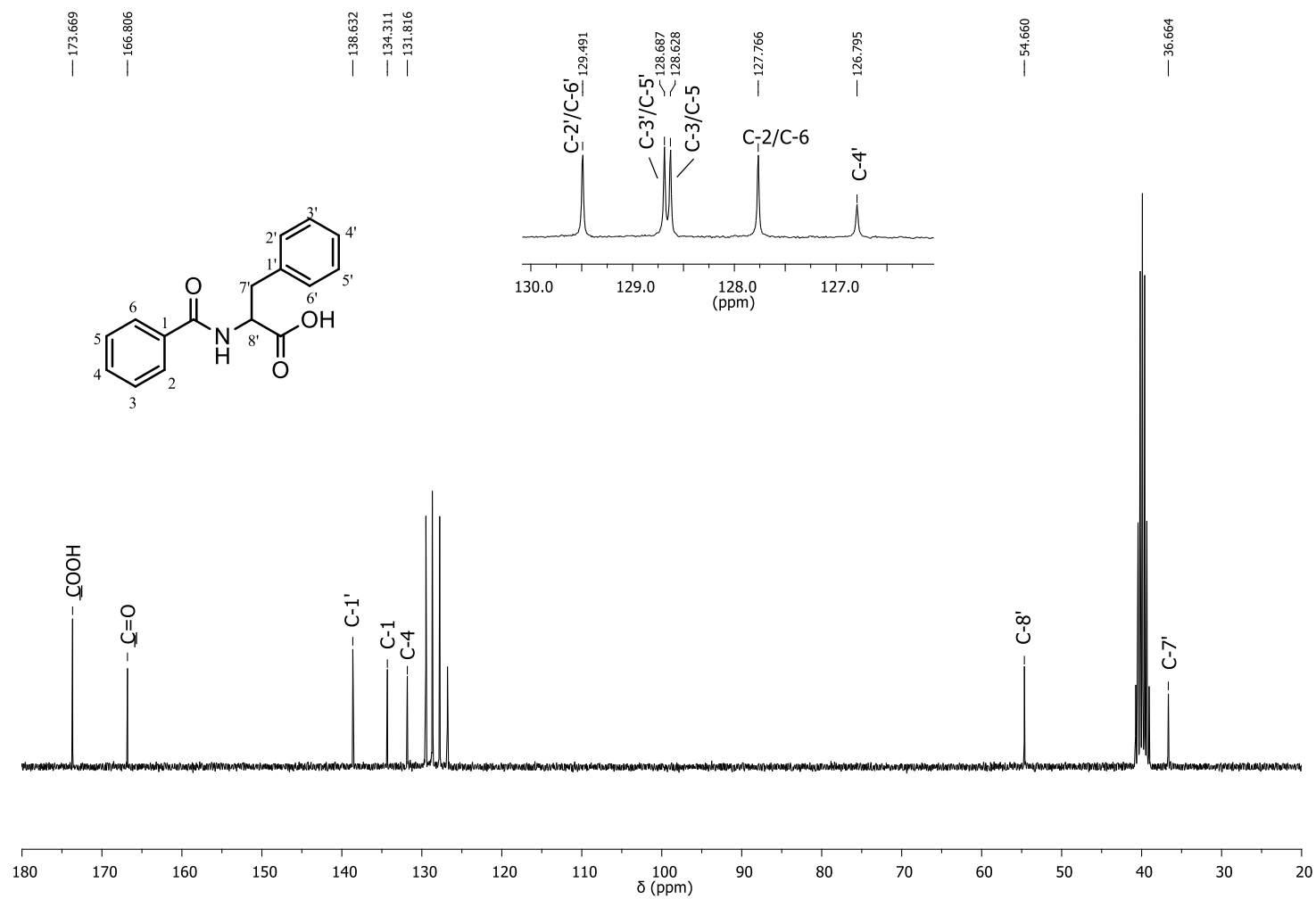
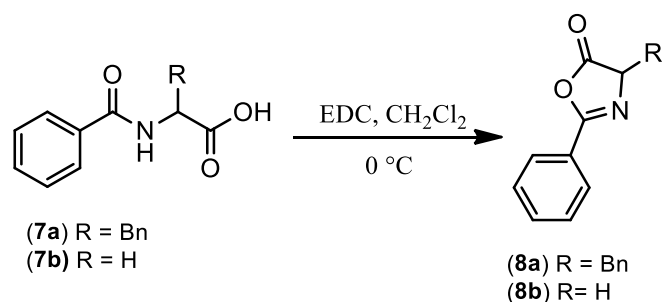


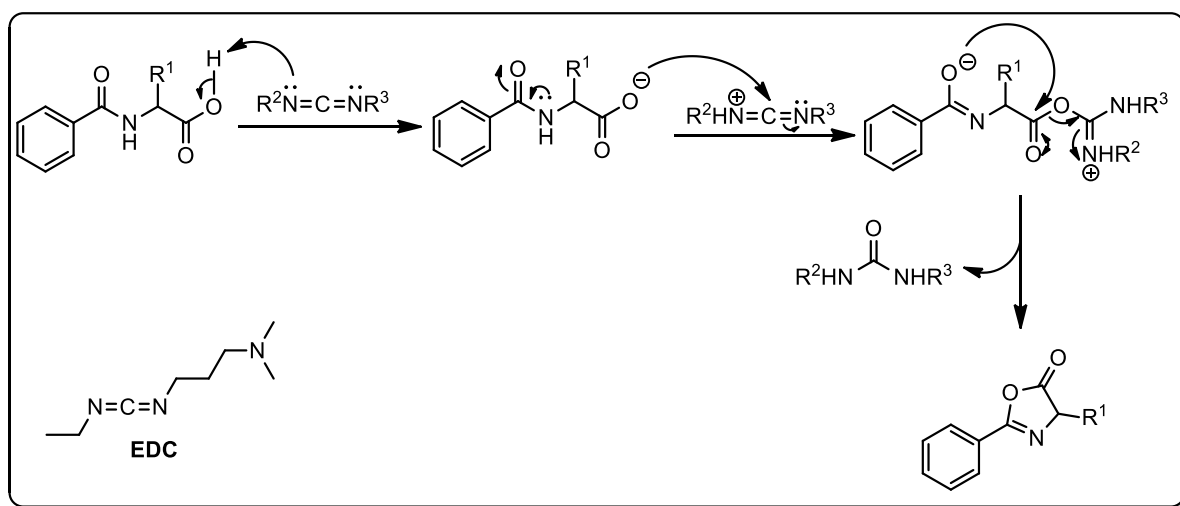
Figura 2.13 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) do composto **7a**.

Para a síntese das azalactonas **8a** e **8b**, os aminoácidos benzoilados **7a** e **7b** foram submetidos a uma reação de ciclização intramolecular, utilizando o EDC como reagente ativador do grupo carboxílico (Esquema 2.9). Após o final da reação, a fase orgânica foi lavada exaustivamente com água, a fim de retirar excesso de EDC que porventura tenha permanecido no meio reacional. As azalactonas **8a** e **8b** foram obtidas com bons rendimentos (89% e 84%, respectivamente), não sendo necessária purificação por coluna de sílica gel.



Esquema 2.9 – Reação envolvida na preparação das azalactonas **8a** e **8b**.

O Esquema 2.10 contém o mecanismo de reação que explica a obtenção dos compostos **8a** e **8b** via reação de ciclização intramolecular mediada pelo EDC. A principal função do EDC consiste em tornar o grupo hidroxila da função ácido carboxílico um bom grupo abandonador, permitindo sua substituição.



Esquema 2.10 – Proposta de mecanismo que explica a obtenção das azalactonas **8a** e **8b**.

Os dados experimentais que caracterizam os compostos **8a** e **8b** estão descritos na seção 2.4.2.4 (pg. 68-70). A seguir, será discutida a caracterização de uma das azalactonas sintetizadas.

No espectro de RMN de ^1H do composto **8a** (Figura 2.14, pg. 131) os hidrogênios diastereotópicos (H-9a e H-9b) foram observados como dupletos duplos em δ_{H} 3,21 e δ_{H} 3,40 respectivamente, ambos integrados para um átomo de hidrogênio. Um dos valores de constante de acoplamento obtido para esses dois sinais, $J = 14,0$ Hz, é um típico valor de acoplamento geminal diastereotópico e está de acordo com a literatura (PAVIA, pg. 223, 2010). O outro duplete duplo em δ_{H} 4,71, integrado para um hidrogênio e com constantes de acoplamento $J = 6,6$ Hz e $J = 5,0$ Hz, foi atribuído ao hidrogênio do estereocentro. Esses valores de constante de acoplamento determinados confirmam o acoplamento de H-8 com H-9a e H-8 com H-9b. Os demais sinais são atribuídos aos hidrogênios aromáticos.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **8a** (Figura 2.15, pg. 132) o sinal em δ_{C} 37,3 corresponde ao carbono metilênico C-9. O sinal referente ao estereocentro é observado em δ_{C} 66,5. O carbono C-7 do anel azalactônico aparece mais desblindado em δ_{C} 161,7. O carbono da carbonila foi atribuído em δ_{C} 177,5. Os demais sinais correspondem aos carbonos dos anéis aromáticos.

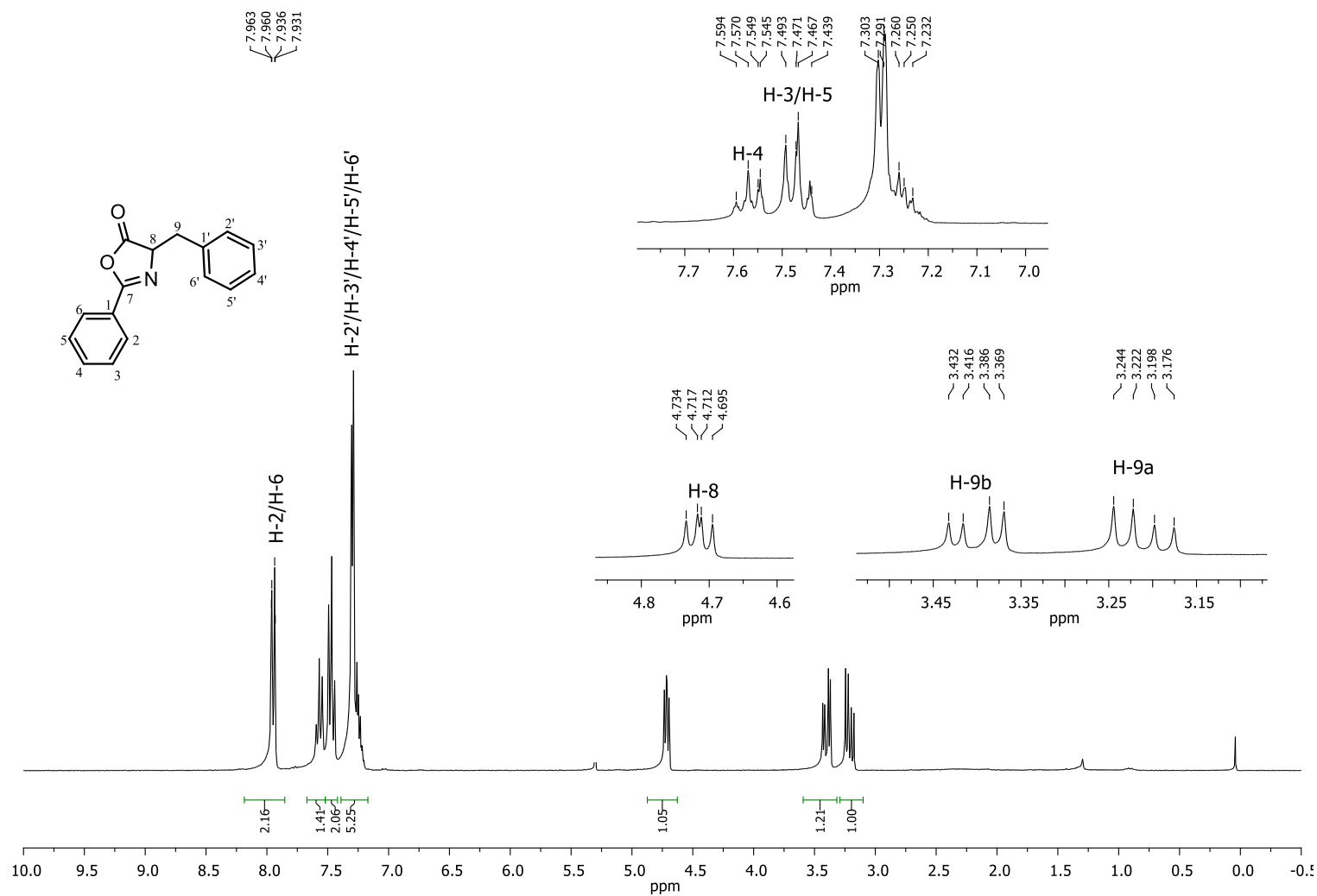


Figura 2.14 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **8a**.

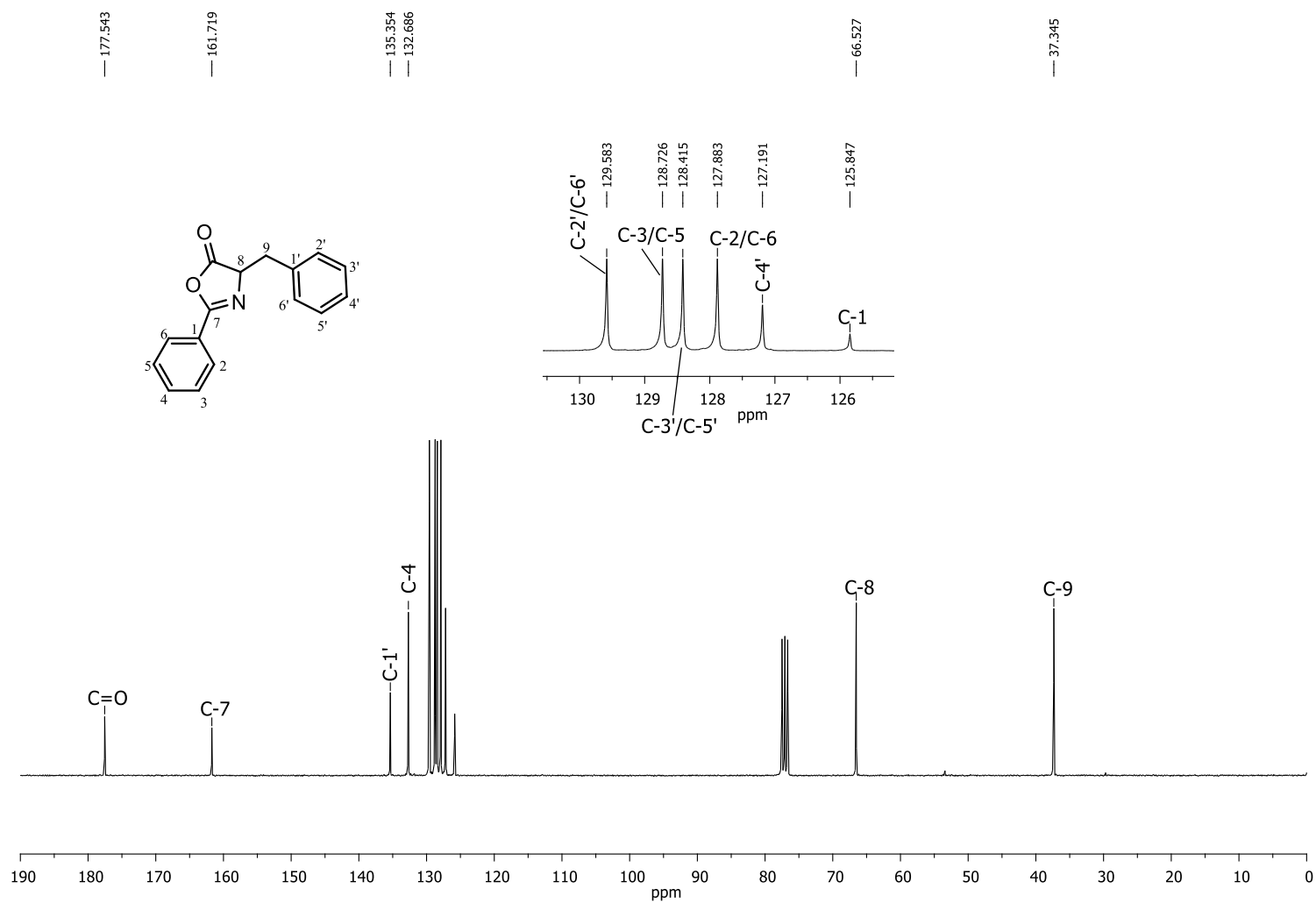
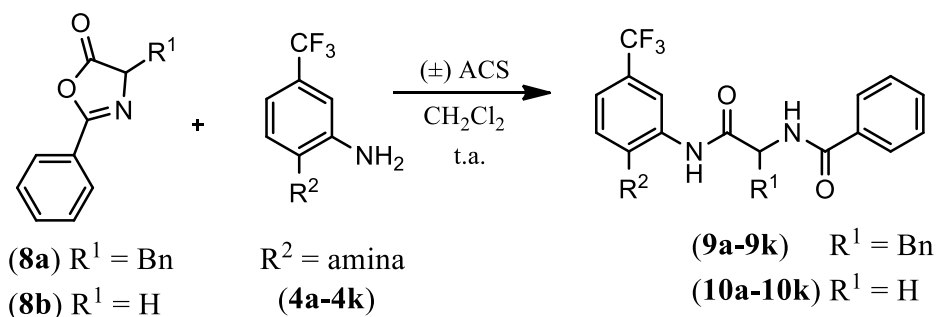


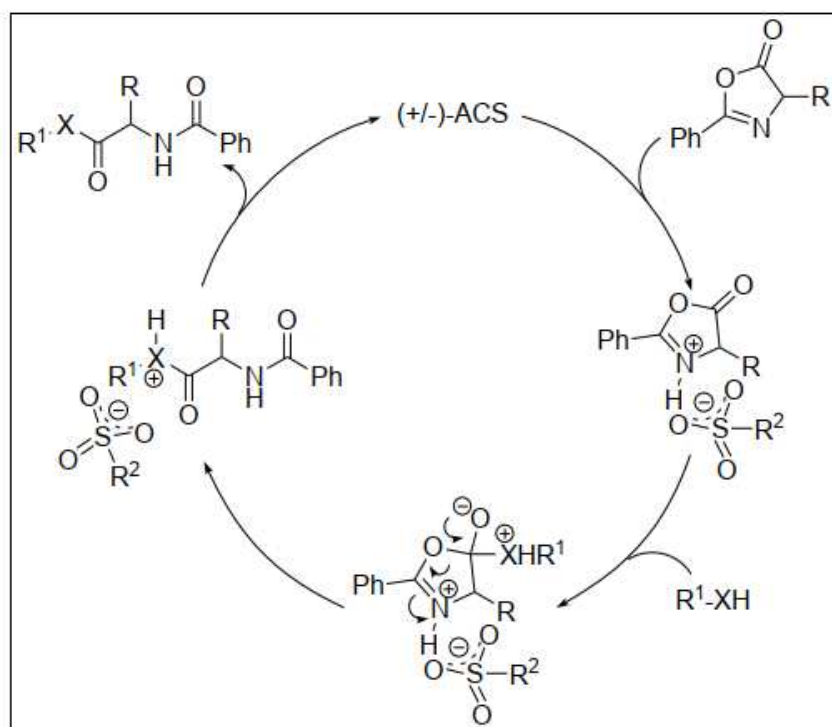
Figura 2.15 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **8a**.

As anilinas previamente sintetizadas **4a-4k** foram utilizadas como nucleófilos para realizar a abertura do anel das azalactonas **8a** e **8b**, resultando na formação das diamidas **9a-9k** e **10a-10k** (Esquema 2.11). O ácido canforsulfônico foi utilizado como catalisador desta reação e não foi necessário agitação magnética. A aplicação desta reação culminou na síntese das diamidas em tempos reacionais relativamente curtos, variando de 1 minuto à uma hora. As diamidas foram obtidas com rendimentos que variaram de 69% a 93%, após purificação em coluna de sílica gel.



Esquema 2.11 - Rota sintética empregada na preparação das diamidas.

Pereira e colaboradores em 2014 utilizaram espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear com marcação isotópica para estudar o ciclo catalítico dessa reação de abertura do anel azalactônico. No experimento realizado com água deuterada foi observado que não houve troca de hidrogênio por deutério, ou seja, não houve incorporação de átomo de deutério na estrutura do produto final, indicando que o ACS é responsável pela etapa de protonação e desprotonação. Deste modo, foi proposto pelos autores que a azalactona é ativada pelo organocatalisador (±) ACS *via* N-protonação com formação de um intermediário de emparelhamento de íons, e esta interação diminui a energia de todo o sistema. Posteriormente ocorre o ataque do nucleófilo (anilinas) ao carbono carbonílico, resultando na abertura do anel azalactônico e consequentemente formação das diamidas de interesse e restituição do organocatalisador. No esquema 2.12 (pg. 134) é apresentado o ciclo catalítico proposto.



Esquema 2.12 – Ciclo catalítico proposto para a ativação das azalactonas seguida por um ataque nucleofílico. Fonte: Pereira *et al.*, 2014.

A síntese das diamidas foi planejada de modo a avaliar o efeito dos diferentes grupos R¹ e R² sobre as atividades biológicas que seriam avaliadas.

Uma vez sintetizadas, estas substâncias foram caracterizadas via espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C e massas de alta resolução. Os dados experimentais que caracterizam os compostos **9a-9k** e **10a-10k** estão descritos na seção 2.4.2.5 (pg. 71-95).

A seguir será discutida a caracterização de uma das diamidas sintetizadas. As outras possuem caracterização semelhante e seus espectros são apresentados no Anexo.

No espectro no infravermelho do composto **9h** (Figura 2.16, pg. 136) as bandas de absorção em 3327 e 3209 cm⁻¹ foram atribuídas aos estiramentos das ligações N-H. Os estiramentos das ligações C=O dos grupos amida são observadas em 1677 cm⁻¹ e em 1622 cm⁻¹.

No espectro de RMN de ¹H do composto **9h** (Figura 2.17, pg. 137) os hidrogênios H-3 e H-2 foram observados como multipletos em δ_H 3,12-3,23 (dois hidrogênios) e δ_H 4,79-4,84 (um hidrogênio). O simpleto em δ_H 7,63, integrado para

um hidrogênio, foi atribuído ao hidrogênio aromático H-6'. O multiplete em δ_H 7,84-7,86, integrado para dois hidrogênios, corresponde aos hidrogênios H-12 e H-16. O sinal referente ao hidrogênio do grupo NH, diretamente ligado ao átomo C-2, aparece como um duplete em δ_H 8,88, integrado para um hidrogênio e com constante de acoplamento $J = 7,2$ Hz. Novamente, a observação deste duplete ocorre devido ao acoplamento deste hidrogênio com o hidrogênio vizinho H-2. O sinal do outro NH do grupo amida é observado em δ_H 9,78, como um simpleto integrado para um hidrogênio. Os demais hidrogênios aromáticos e o hidrogênio do grupo amina estão relacionados ao mutiplete em δ_H 7,15-7,54, integrado para quinze átomos de hidrogênio.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **9h** (Figura 2.18, pg. 138) os sinais em δ_c 37,0 e δ_c 56,5 correspondem respectivamente aos carbonos C-3 e C-2. O átomo de carbono C-5' foi observado como um quarteto em δ_c 119,6 com valor de constante de acoplamento de 32,0 Hz. Os quartetos esperados para os carbonos C-4', C-6' e do carbono do grupo trifluorometil não se mostraram completamente resolvidos no espectro, o que dificultou a determinação do deslocamento químico para estes sinais. Mesmo assim foi possível calcular as constantes de acoplamento e os valores encontrados estão em acordo com os descritos na literatura (PRETSCH *et al.*, 1989). Os sinais para os átomos de carbono C-1' e C-3' não foram observados como quartetos uma vez que, os valores das constantes de acoplamento são pequenos. Os sinais referentes aos átomos de carbono C-3''/C-5'', C-2''/C-6'' e C-4'' aparecem como dupletos, devido ao acoplamento destes carbonos com o átomo de flúor, e os valores obtidos para as constantes de acoplamento estão em acordo com os descritos na literatura (PRETSCH *et al.*, 1989). Os sinais em δ_c 167,5 e 171,6 foram atribuídos aos carbonos carbonílicos dos grupos amida. Os demais sinais correspondem aos carbonos dos anéis aromáticos.

No espectro de massas de alta resolução do composto **9h** (Figura 2.19, pg. 139) observa-se o pico referente à $[\text{M-H}]^-$ em m/z 520,16558, valor este similar ao esperado ($m/z = 520,16481$).

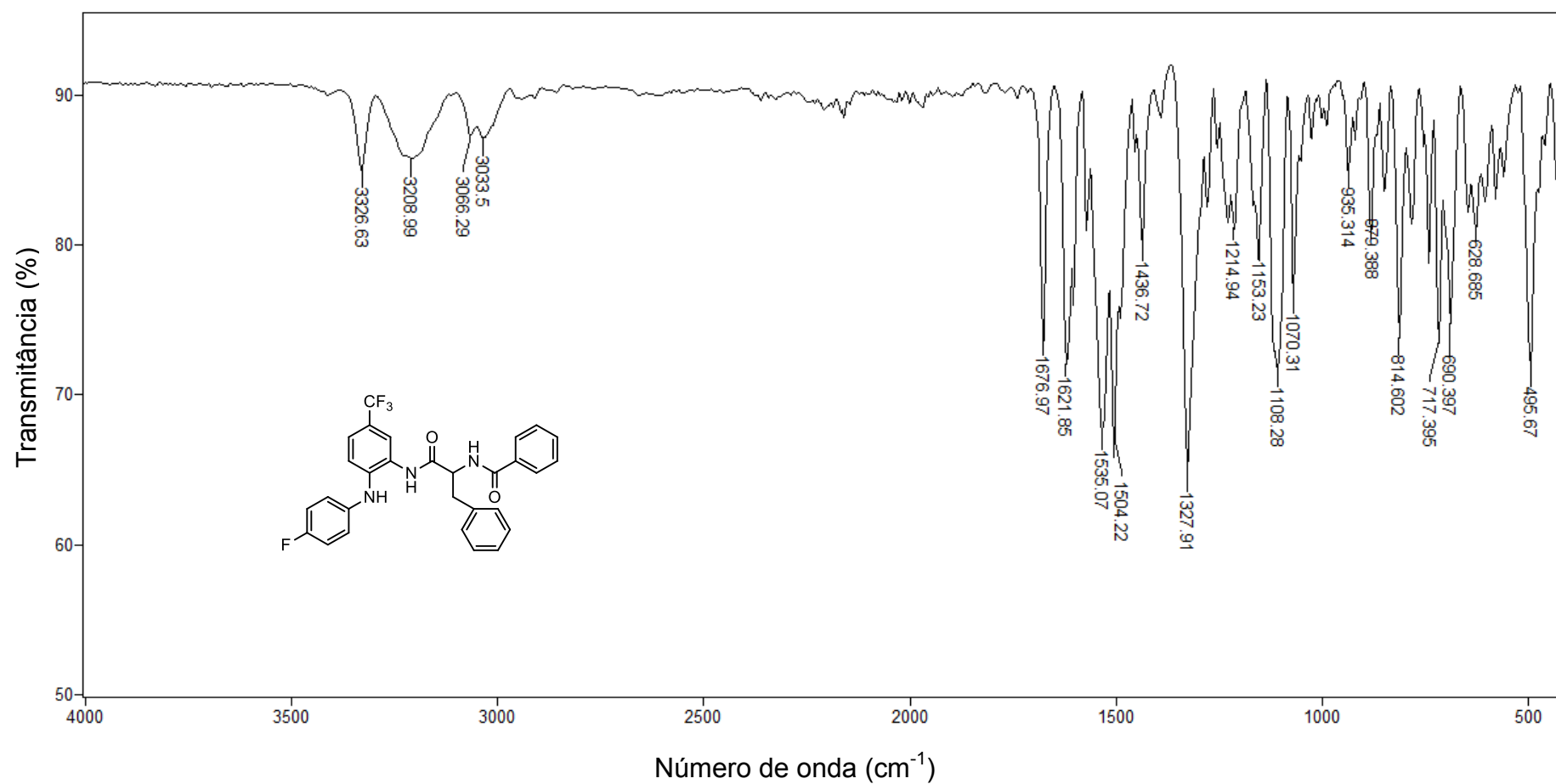


Figura 2.16 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9h**.

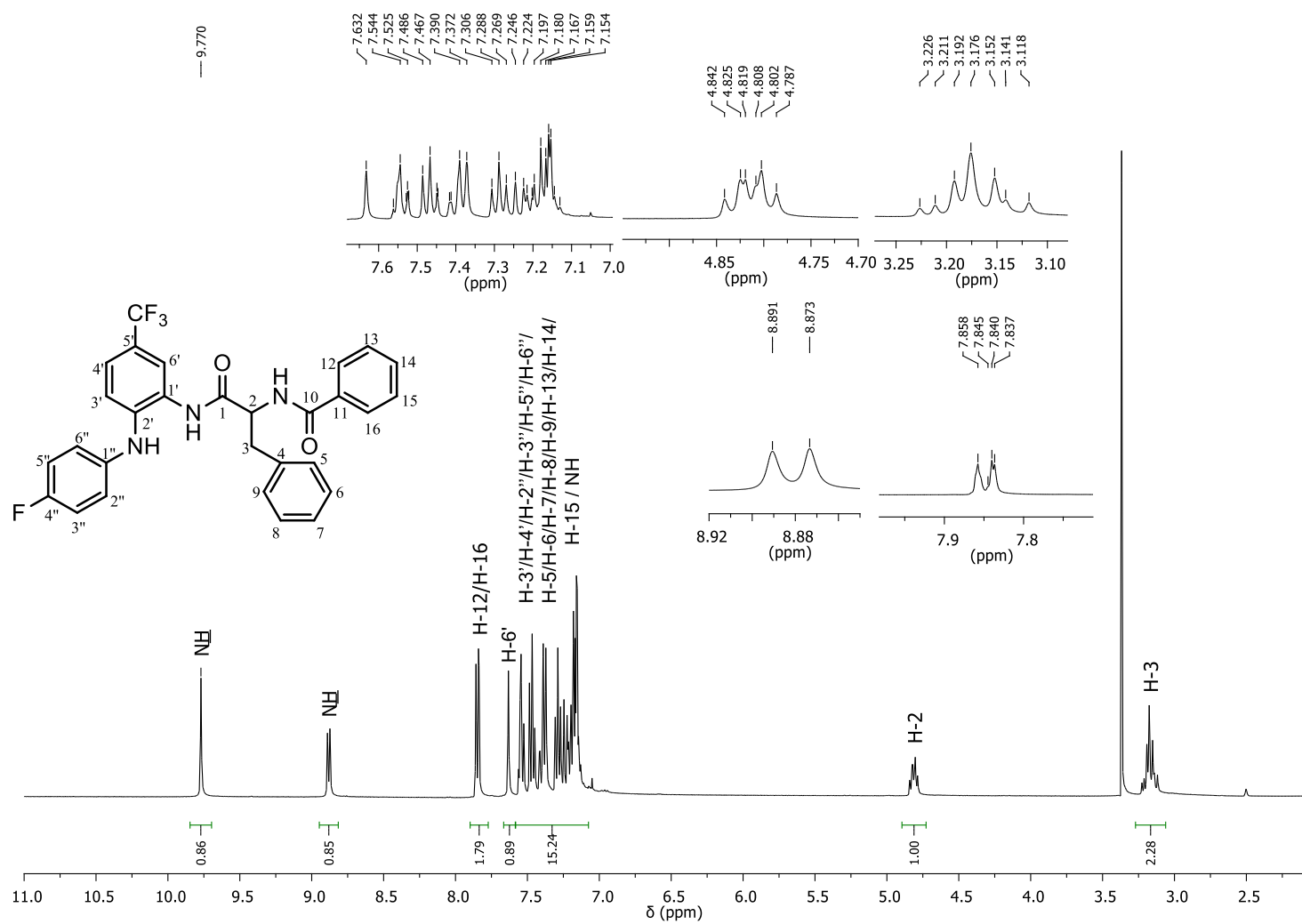


Figura 2.17 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **9h**.

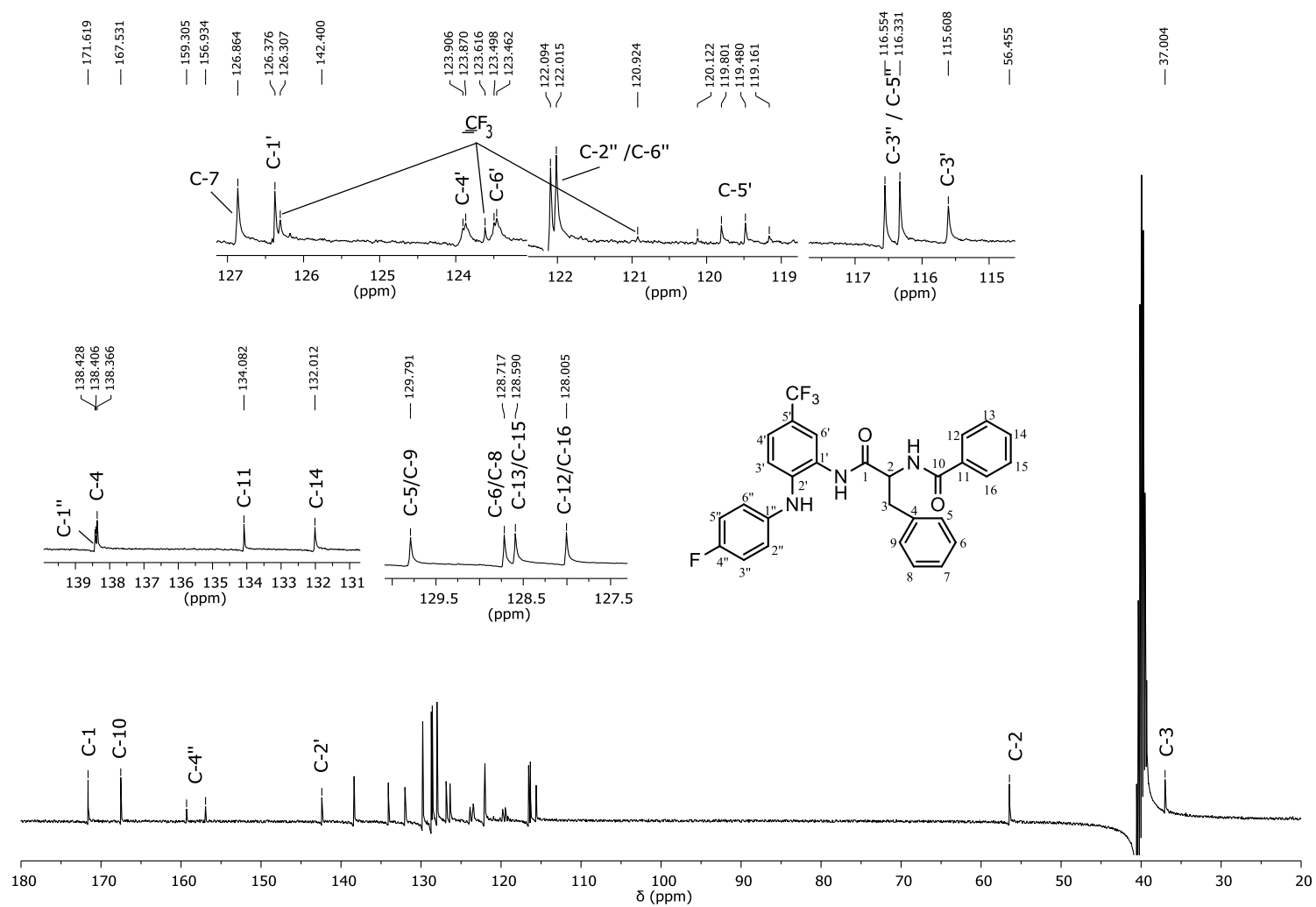


Figura 2.18 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9h**.

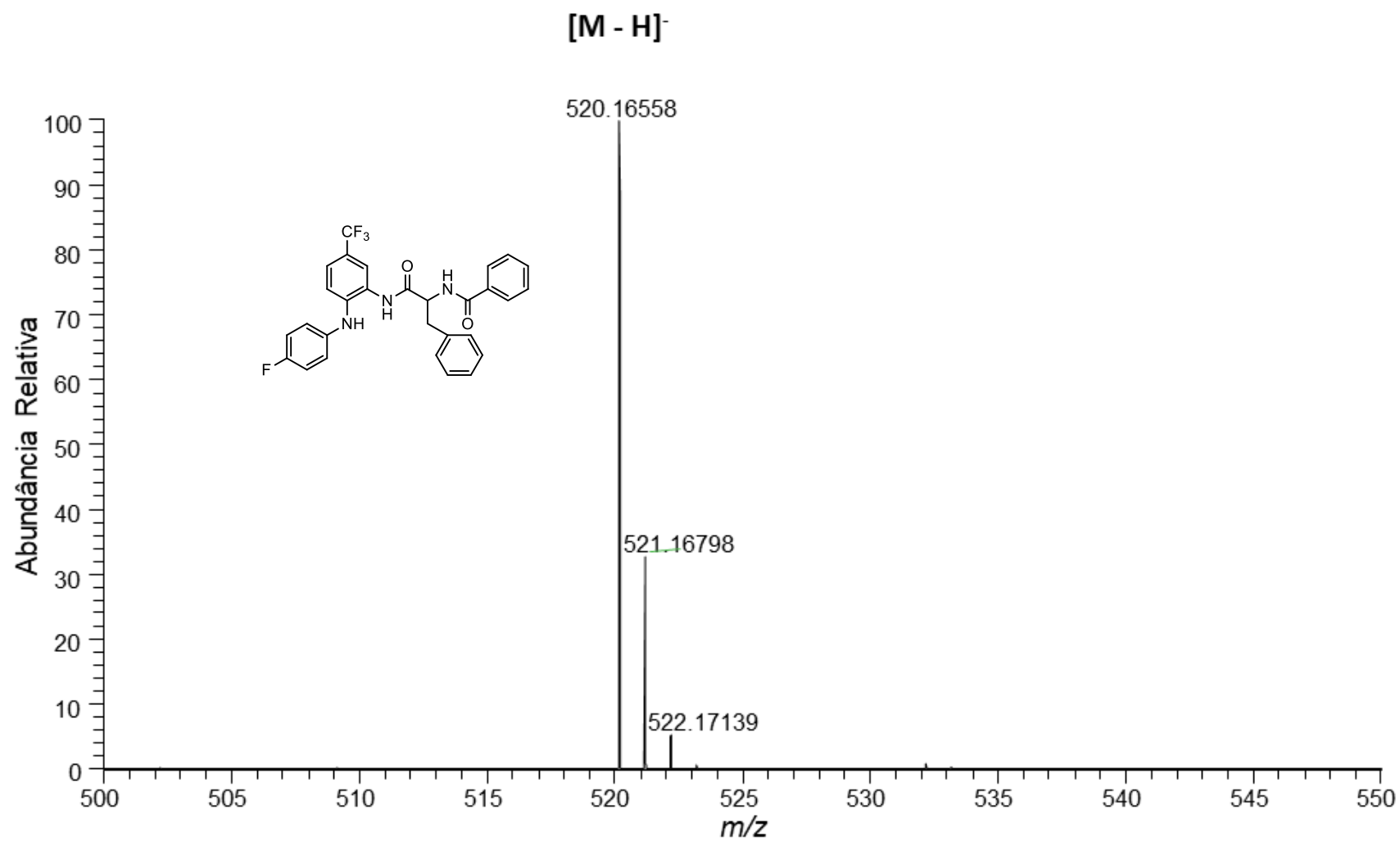


Figura 2.19 – Espectro de massas de alta resolução do composto **9h**.

O composto **9h** foi submetido à análise de difração de raios X de monocristal (DRXM). A unidade assimétrica do composto **9h** é mostrada na Figura 2.20 (pg. 141), enquanto que um sumário da coleta e processamento dos dados é exibido na Tabela 2.7 (pg. 143), juntamente com os parâmetros estatísticos do refinamento. Comprimentos e ângulos de ligação e ângulos torsionais são mostrados nas Tabelas 2.8 (pg. 144), 2.9 (pg. 145), e 2.10 (pg. 146), respectivamente.

O composto **9h** cristalizou no grupo espacial monoclinico $P2_1/c$, com uma molécula cristalograficamente independente. A molécula pode ser descrita por duas porções difenílicas conectadas por uma ponte amídica. Há ausência de coplanaridade dentro de cada porção difenílica, o que pode ser constatado pelos ângulos calculados entre os planos médios quadráticos ajustados para os átomos de carbono dos anéis aromáticos ($38,79^\circ$ entre as fenilas dissustituídas e $62,90^\circ$ entre as monossustituídas). A ponte amídica supracitada também é inclinada em relação a todos os anéis aromáticos, com ângulos entre o plano formado pelos seus átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio e os supracitados planos dos anéis aromáticos rotulados como A, B, C e D (Figura 2.20, pg. 141) de $80,74^\circ$, $67,46^\circ$, $65,58^\circ$ e $88,43^\circ$, respectivamente. A estrutura intramolecular do composto **9h** é adicionalmente estabilizada por uma ligação de hidrogênio entre o grupo amino conectando as duas fenilas dissustituídas A e B e a carbonila pertencente à cadeia espaçadora das fenilas monossustituídas C e D, configurando, assim, em uma conexão adicional não covalente entre as duas partes moleculares. O empacotamento cristalino é estabilizado principalmente por ligações de hidrogênio clássicas, em que os dois grupos amídicos atuam como doadores para ambas carbonilas de moléculas vizinhas na rede cristalina. Isto origina cadeias unidimensionais robustas de moléculas relacionadas por simetria de inversão que se alternam infinitamente ao longo do eixo cristalográfico *b* (Figura 2.21, pg. 142).

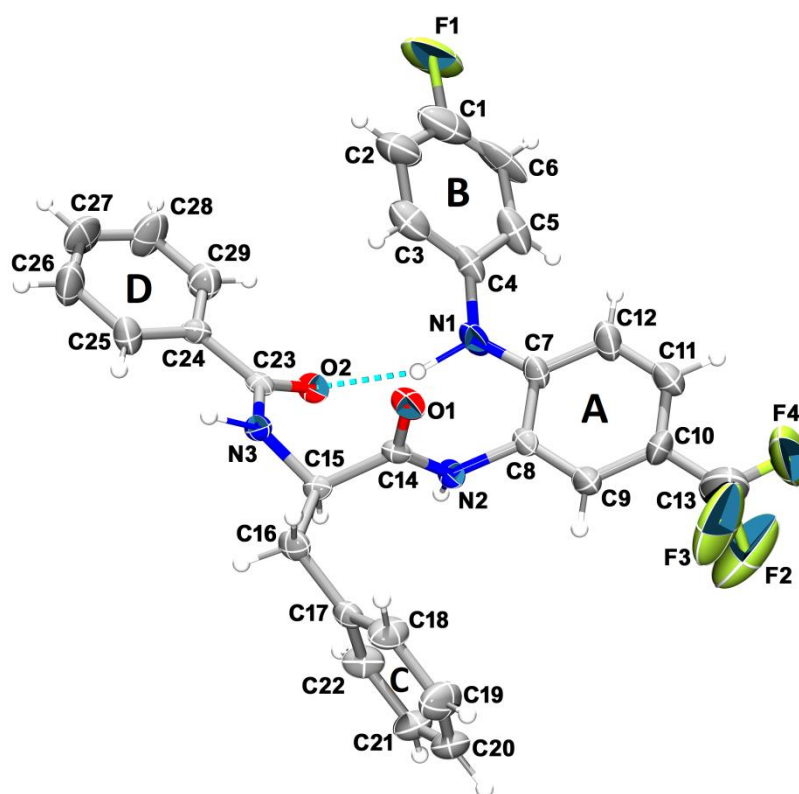


Figura 2.20 - Unidade assimétrica do composto **9h**. Átomos não hidrogenóides são representados por elipsóides a uma probabilidade de 30% e são rotulados arbitrariamente. A rotulagem dos anéis aromáticos também é mostrada. Átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário. A linha pontilhada azul representa a ligação de hidrogênio intramolecular.

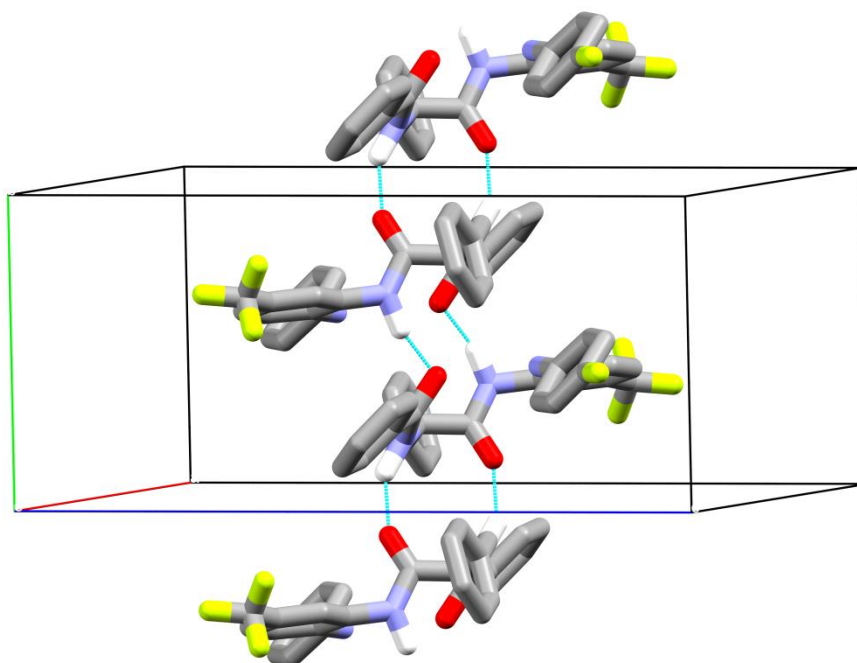


Figura 2.21 - Cadeia unidimensional formada no empacotamento cristalino do composto **9h**. Somente os átomos de hidrogênio envolvidos nas interações intermoleculares (linhas pontilhadas azuis) são exibidos. Cores dos eixos cristalográficos: *a* – vermelha; *b* – verde; *c* – azul.

Tabela 2.7 - Constantes de cela e determinação estrutural da substância **9h** determinada por DRXM

Fórmula mínima		$C_{29}H_{23}F_4N_3O_2$
Massa molar da fórmula mínima (g/mol)		521,5
Dimensões do cristal (mm ³)		0,20 x 0,10 x 0,08
Sistema cristalino		Monoclínico
Grupo espacial		P2 ₁ /c
Z / Z'		4/1
Temperatura (K)		273(2)
Dimensões da cela	<i>a</i> (Å)	14.026(7)
unitária	<i>b</i> (Å)	9.126(4)
	<i>c</i> (Å)	21.115(10)
	α (°)	90
	β (°)	91.101(12)
	γ (°)	90
Volume da cela unitária (Å ³)		2702(2)
Densidade calculada (g/cm ³)		1.282
Coeficiente de absorção μ (mm ⁻¹)		0.100
Intervalo em θ (°)		2,393 – 24,981
Intervalo dos	<i>h</i>	-16 a 16
índices		
	<i>k</i>	-10 a 10
	<i>l</i>	-25 a 25
Reflexões coletadas		28487
Reflexões independentes		4720
Índice de simetria (R_{int})		0.3610
Completeza para $\theta_{máx.}$		99.4
F_{000}		1080
Parâmetros refinados		343
Qualidade do ajuste sobre F^2		1.037
Índice residual para $I > 2\sigma(I)$		0.1306
Índice residual ponderado para todos os dados		0.3481
$\Delta\rho_{máx} / \Delta\rho_{mín}$ (e/Å ³)		0,248 / -0,285

Tabela 2.8 – Comprimentos de ligação (Å) para **9h** determinada por DRXM

O2	C23	1,248(8)
O1	C14	1,214(8)
N2	C14	1,341(9)
N2	C8	1,416(9)
N3	C23	1,343(9)
N3	C15	1,467(8)
C23	C24	1,483(10)
C14	C15	1,524(10)
C15	C16	1,515(9)
N1	C7	1,366(10)
N1	C4	1,411(11)
C17	C18	1,354(10)
C17	C22	1,363(10)
C17	C16	1,496(10)
C7	C12	1,377(11)
C7	C8	1,386(11)
C8	C9	1,376(11)
C24	C29	1,370(11)
C24	C25	1,376(10)
C22	C21	1,377(12)
C18	C19	1,412(12)
C25	C26	1,423(12)
C4	C3	1,395(13)
C4	C5	1,406(12)
F1	C1	1,376(18)
C29	C28	1,362(12)
C11	C10	1,351(13)
C11	C12	1,353(12)
C21	C20	1,318(13)
C9	C10	1,384(12)
C10	C13	1,407(14)
C3	C2	1,375(15)
C26	C27	1,315(14)
C28	C27	1,367(14)
C20	C19	1,350(13)
C6	C1	1,323(19)
C6	C5	1,375(17)
C1	C2	1,33(2)
F2	C13	1,315(15)
F4	C13	1,247(13)
F3	C13	1,292(14)

Tabela 2.9 – Ângulos de ligação (°) da substância **9h** determinada por DRXM

C14	N2	C8	122,2(6)
C23	N3	C15	119,0(6)
O2	C23	N3	120,3(7)
O2	C23	C24	120,8(8)
N3	C23	C24	118,8(7)
O1	C14	N2	123,2(7)
O1	C14	C15	121,7(7)
N2	C14	C15	115,0(7)
N3	C15	C16	109,2(6)
N3	C15	C14	110,7(6)
C16	C15	C14	111,6(6)
C7	N1	C4	125,4(8)
C18	C17	C22	115,5(8)
C18	C17	C16	121,0(8)
C22	C17	C16	123,4(8)
N1	C7	C12	124,3(9)
N1	C7	C8	116,9(8)
C12	C7	C8	118,8(9)
C9	C8	C7	120,6(8)
C9	C8	N2	119,7(8)
C7	C8	N2	119,6(8)
C29	C24	C25	119,7(9)
C29	C24	C23	118,2(8)
C25	C24	C23	122,1(8)
C17	C16	C15	114,1(6)
C17	C22	C21	122,3(9)
C17	C18	C19	122,6(8)
C24	C25	C26	116,6(9)
C3	C4	C5	116,0(11)
C3	C4	N1	118,4(9)
C5	C4	N1	125,4(11)
C28	C29	C24	122,1(10)

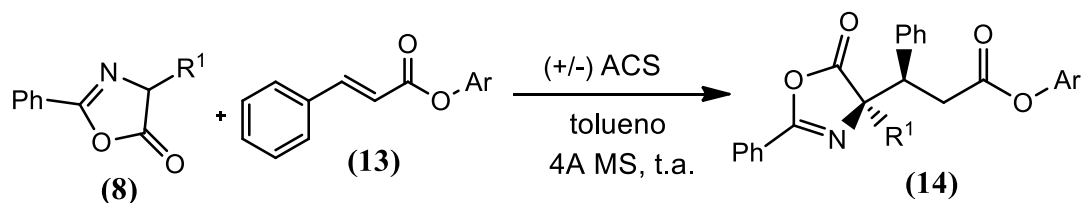
Tabela 2.10 – Ângulos torsionais (°) da substância **9h** determinada por DRXM

C15	N3	C23	O2	-6,6(10)
C15	N3	C23	C24	172,5(6)
C8	N2	C14	O1	-3,7(12)
C8	N2	C14	C15	175,2(7)
C23	N3	C15	C16	-167,1(6)
C23	N3	C15	C14	69,7(8)
O1	C14	C15	N3	51,8(9)
N2	C14	C15	N3	-127,1(7)
O1	C14	C15	C16	-70,0(9)
N2	C14	C15	C16	111,1(7)
C4	N1	C7	C12	-15,9(14)
C4	N1	C7	C8	163,8(8)
N1	C7	C8	C9	179,9(7)
C12	C7	C8	C9	-0,4(12)
N1	C7	C8	N2	-1,6(11)
C12	C7	C8	N2	178,1(7)
C14	N2	C8	C9	100,1(9)
C14	N2	C8	C7	-78,5(10)
O2	C23	C24	C29	-10,7(11)
N3	C23	C24	C29	170,2(7)
O2	C23	C24	C25	167,0(7)
N3	C23	C24	C25	-12,1(11)
C18	C17	C16	C15	121,4(8)
C22	C17	C16	C15	-56,4(10)
N3	C15	C16	C17	174,4(6)
C14	C15	C16	C17	-62,9(9)
C18	C17	C22	C21	2,1(12)
C16	C17	C22	C21	180,0(8)
C22	C17	C18	C19	-2,9(13)
C16	C17	C18	C19	179,1(8)
C29	C24	C25	C26	0,4(12)
C23	C24	C25	C26	-177,3(8)
C7	N1	C4	C3	-125,0(10)
C7	N1	C4	C5	61,1(13)
C25	C24	C29	C28	-0,1(14)
C23	C24	C29	C28	177,7(9)
C17	C22	C21	C20	-0,8(15)
C10	C11	C12	C7	-2,2(16)
N1	C7	C12	C11	-178,1(9)
C8	C7	C12	C11	2,2(14)
C7	C8	C9	C10	-1,3(13)
N2	C8	C9	C10	-179,8(8)
C12	C11	C10	C9	0,5(17)
C12	C11	C10	C13	-177,8(13)

Tabela 2.10 - Continuação

C8	C9	C10	C11	1,3(15)
C8	C9	C10	C13	179,7(12)
C5	C4	C3	C2	-0,7(14)
N1	C4	C3	C2	-175,2(10)
C24	C25	C26	C27	-1,6(16)
C24	C29	C28	C27	1,0(17)
C22	C21	C20	C19	0,3(16)
C25	C26	C27	C28	3(2)
C29	C28	C27	C26	-2(2)
C21	C20	C19	C18	-1,1(16)
C17	C18	C19	C20	2,5(15)
C1	C6	C5	C4	-1(2)
C3	C4	C5	C6	0,5(14)
N1	C4	C5	C6	174,6(10)
C5	C6	C1	C2	3(3)
C5	C6	C1	F1	-177,6(10)
C6	C1	C2	C3	-3(3)
F1	C1	C2	C3	177,4(12)
C4	C3	C2	C1	1,8(19)
C11	C10	C13	F4	12(3)
C9	C10	C13	F4	-166,6(18)
C11	C10	C13	F3	136,8(16)
C9	C10	C13	F3	-41(2)
C11	C10	C13	F2	-111,0(16)
C9	C10	C13	F2	71(2)

Além da síntese e avaliação de bioatividades de diamidas, um dos objetivos deste trabalho foi buscar viabilizar a síntese de derivados do ácido cinâmico a partir da reação de adição do tipo Michael catalisada por um ácido de Brønsted, o (+/-)-ácido canforsulfônico (ACS), entre cinamatos (**13**) e diferentes azalactonas (**8**), que deveriam levar a formação dos ésteres derivados do ácido cinâmico contendo o anel azalactônico de estrutura geral (**14**) (Esquema 2.13, pg. 148).



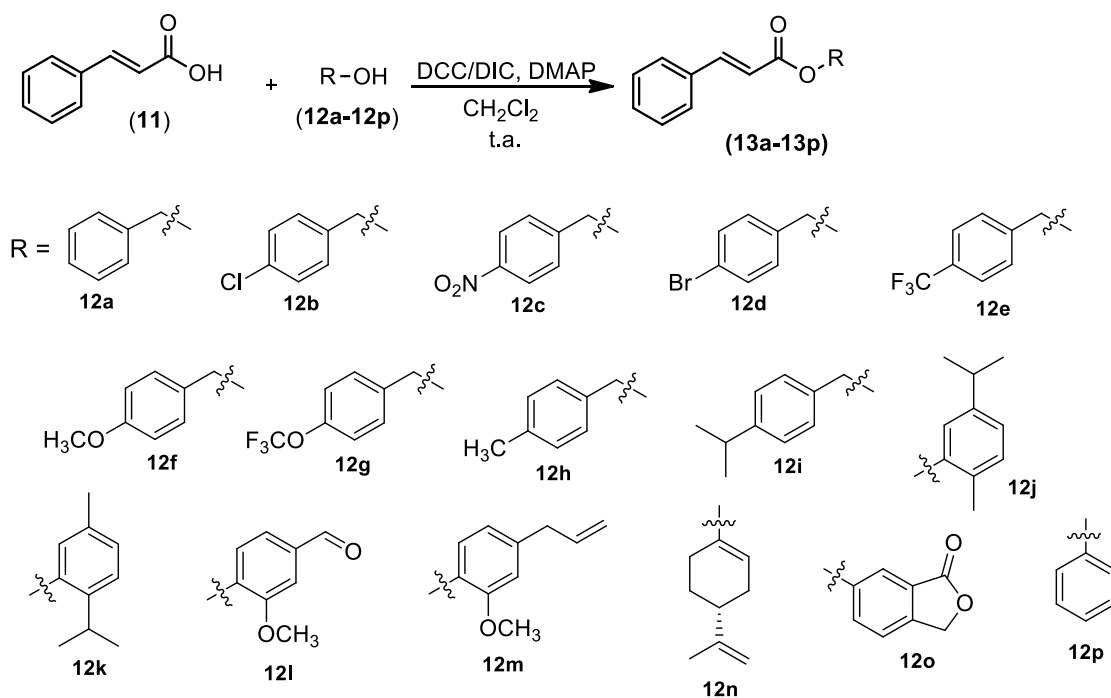
Onde: R¹ = Bn, H

Ar = diferentes grupos aromáticos

Esquema 2.13 – Proposta de síntese para os ésteres cinamatos contendo o anel azalactônico.

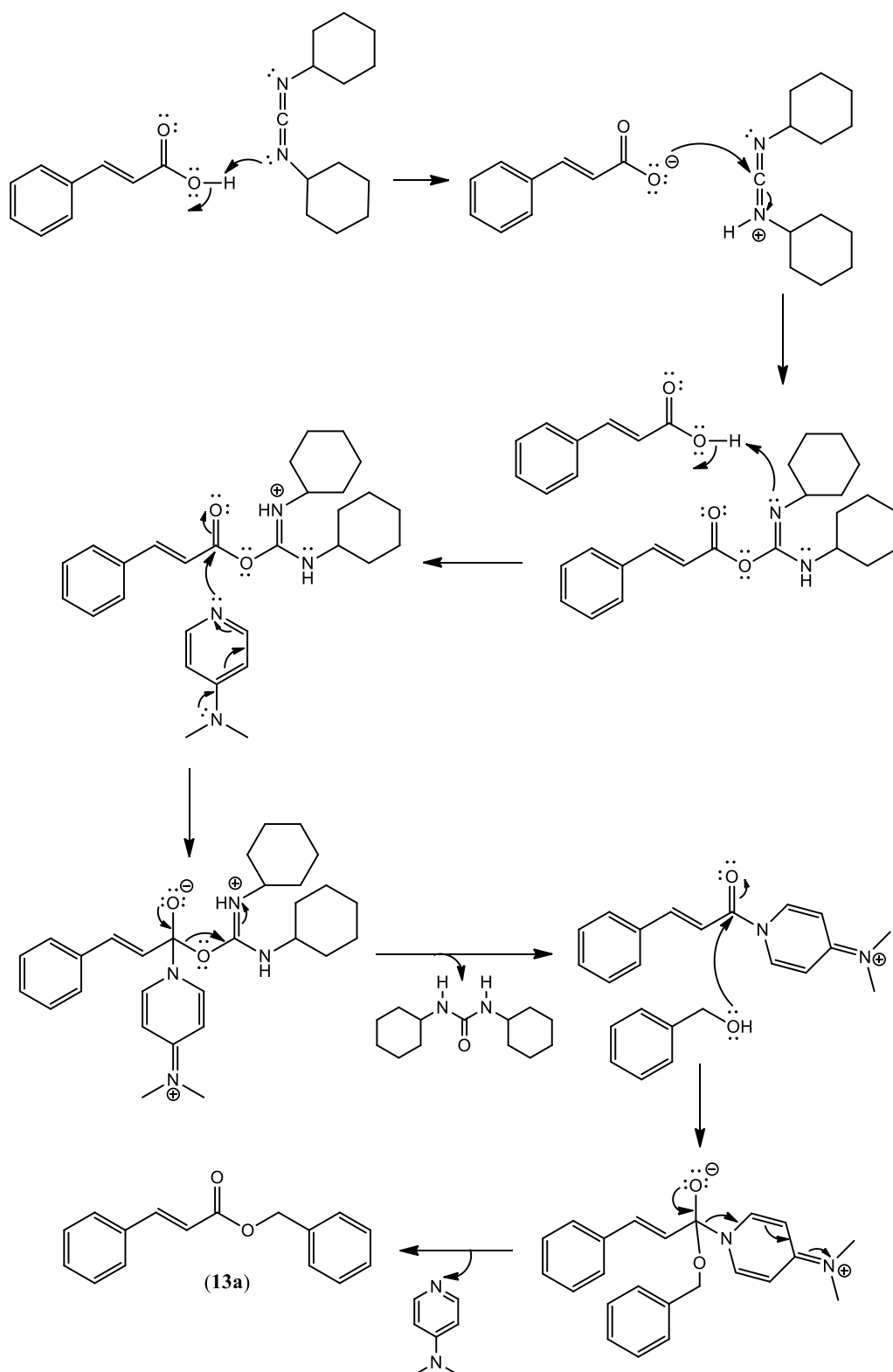
A inspiração para o desenvolvimento desta reação foi baseada no trabalho descrito por Ávila e colaboradores (2013) o qual reportou a adição do tipo Michael diastereosseletiva de azalactonas a enonas, catalisada pelo (±)-ácido canforsulfônico. Considerando estas premissas, foi preparada uma série de ésteres cinamatos.

Os cinamatos de estrutura **13a-13p** foram preparados via reação de esterificação de Steglich entre o ácido cinâmico (**11**) e diferentes compostos hidroxilados **12a-12p** (Esquema 2.14).



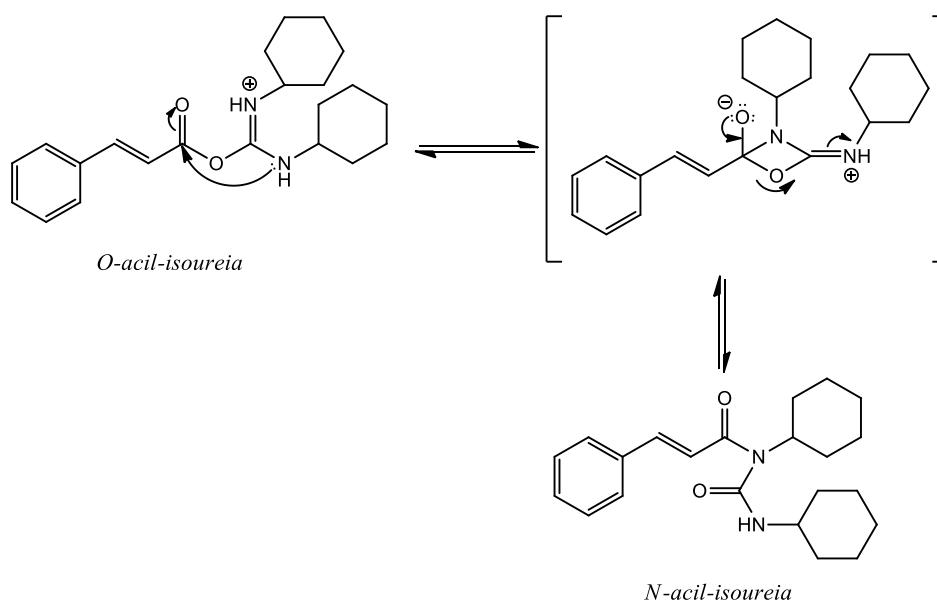
Esquema 2.14 – Síntese de ésteres cinamatos por meio da reação de Steglich.

O Esquema 2.15 contém o mecanismo de reação que explica a obtenção de **13a** via esterificação de Steglich.



Esquema 2.15 – Proposta mecanística para a obtenção do composto **13a**.

A primeira etapa desta reação consiste na protonação de um dos nitrogênios do DCC pelo ácido carboxílico. O DCC, agora contendo um carbono extremamente eletrofílico, é atacado pelo ânion carboxilato dando origem a *O*-acil-isoureia. 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 dicicloexilureia (DHU). Quando a esterificação é lenta, uma reação paralela pode ocorrer na forma de um rearranjo 1,3 do intermediário *O*-acil-isoureia, resultando na obtenção da *N*-acil-isoureia que não reage com o álcool (Esquema 2.16). Porém, a adição da DMAP impede esta reação paralela, pois esta base substitui o grupo *O*-acil-isoureia como grupo abandonador, formando a nova espécie acilante. Esta nova espécie, que não sofre rearranjo, será posteriormente atacada pelo álcool levando a formação do éster (DE ALMEIDA, 2014; LUTJEN *et al.*, 2018).



Esquema 2.16 – Conversão da *O*-acil-isoureia em *N*-acil-isoureia em reações lentas na ausência de DMAP.

A aplicação da esterificação de Steglich permitiu a síntese dos ésteres **13a-13p** em condições brandas e com tempos de reação relativamente curtos. As substâncias **13a-13p** foram obtidas com rendimentos que variaram de 45% a 84% após purificação em coluna de sílica gel.

Uma vez sintetizadas, estas substâncias foram caracterizadas via espectroscopia no infravermelho e espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C . Os dados experimentais que caracterizam os compostos **13a-13p** estão descritos na seção 2.4.2.6 (pg. 96-111).

A seguir, será discutida a caracterização de um dos ésteres sintetizados. Os outros possuem caracterização semelhante e seus espectros são apresentados no Anexo.

No espectro no infravermelho do composto **13h** (Figura 2.22, pg. 153) as bandas de absorção em 3049 e 3022 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento da ligação $=\text{C-H}$ dos anéis aromáticos. As bandas de absorção em 2920 e 2856 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento assimétrico de ligação C-H dos carbonos sp^3 . O estiramento típico da ligação C=O do grupo éster aparece como uma banda intensa em 1702 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^1H do composto **13h** (Figura 2.23, pg. 154) observa-se um sinal em δ_{H} 2,38 na forma de um simpleto, integrado para três hidrogênios, correspondente aos átomos de hidrogênio do grupo metila (CH_3). Outro simpleto é observado em δ_{H} 5,23, integrado para dois hidrogênios, referente aos hidrogênios metilênicos H-10. O duplete em δ_{H} 6,49, integrado para um hidrogênio, foi atribuído ao hidrogênio H-8 e possui constante de acoplamento $J_{\text{trans}} = 15,9$ Hz. Esse é o valor típico de constante de acoplamento para átomos de hidrogênio *trans* em uma ligação dupla (PAVIA, pg. 134, 2010). Observa-se ainda no espectro de **13h** outro duplete em δ_{H} 7,74, também integrado para um hidrogênio e com constante de acoplamento $J_{\text{trans}} = 15,9$ 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. Em δ_{H} 7,21 tem-se um duplete, integrado para dois hidrogênios e com constante de acoplamento $J = 7,8$ Hz, atribuído aos hidrogênios H-13 e H-15. Outro duplete também integrado para dois hidrogênios e com constante de acoplamento idêntico ao duplete anterior ($J = 7,8$ Hz) é observado em δ_{H} 7,33, correspondente aos hidrogênios H-12 e H-16. Este fato confirma o

acoplamento dos átomos em posição *orto* H-12 com H-13 e H-15 com H-16. Os demais sinais correspondem aos hidrogênios do anel fenila.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **13h** (Figura 2.24, pg. 155) os sinais observados em δ_{C} 21,2 e δ_{C} 66,3 foram atribuídos aos carbonos sp^3 CH_3 e C-10. O carbono C-8 foi observado em δ_{C} 118,0, mais blindado em relação ao C-7 (δ_{C} 145,0). Este fato se deve, novamente, à diminuição da densidade eletrônica em C-7, pelos mesmos motivos citados na atribuição do espectro de hidrogênio anteriormente. O carbono da carbonila foi atribuído em δ_{C} 166,8. Os demais sinais correspondem aos carbonos dos anéis aromáticos.

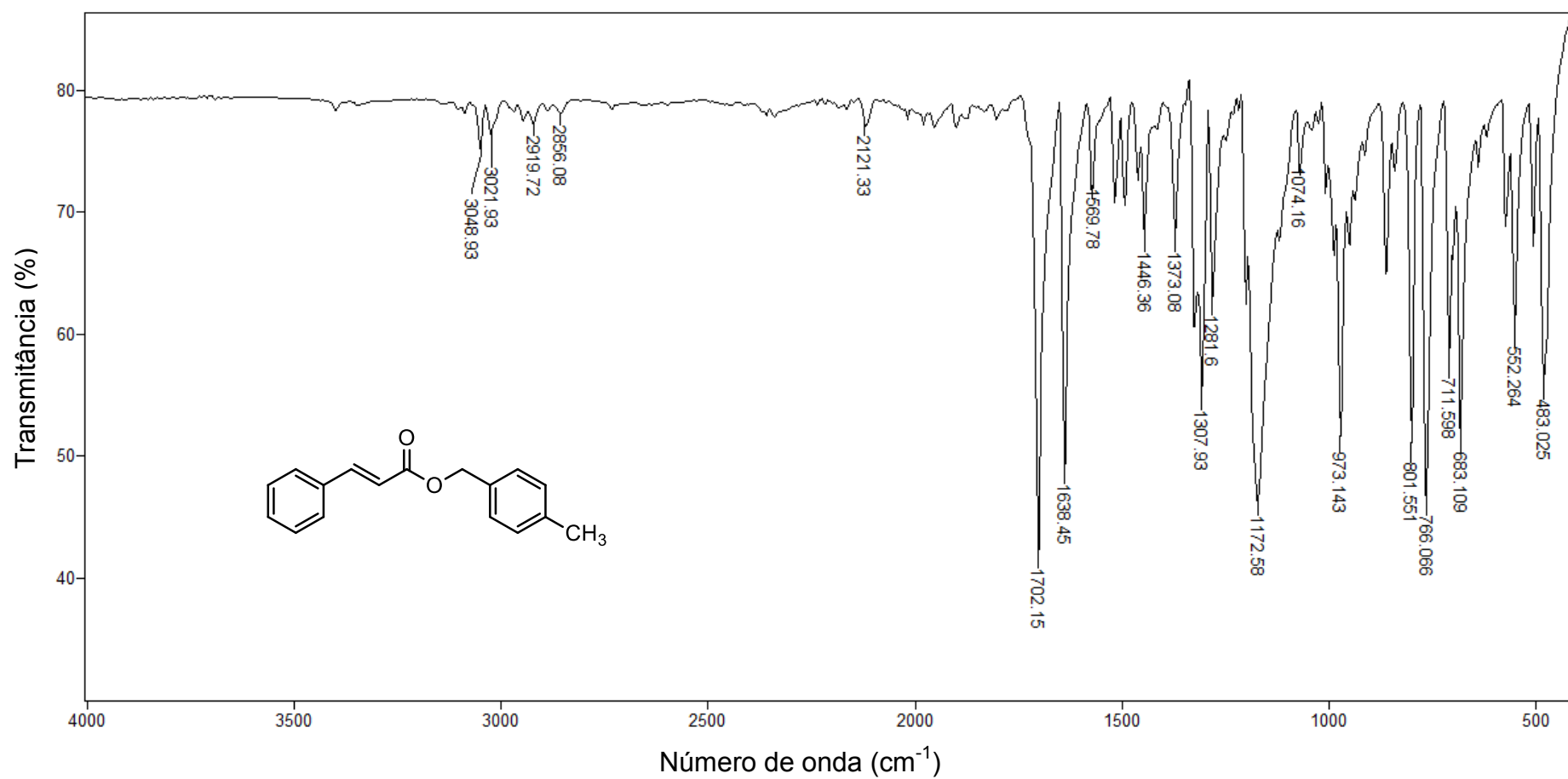


Figura 2.22 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13h**.

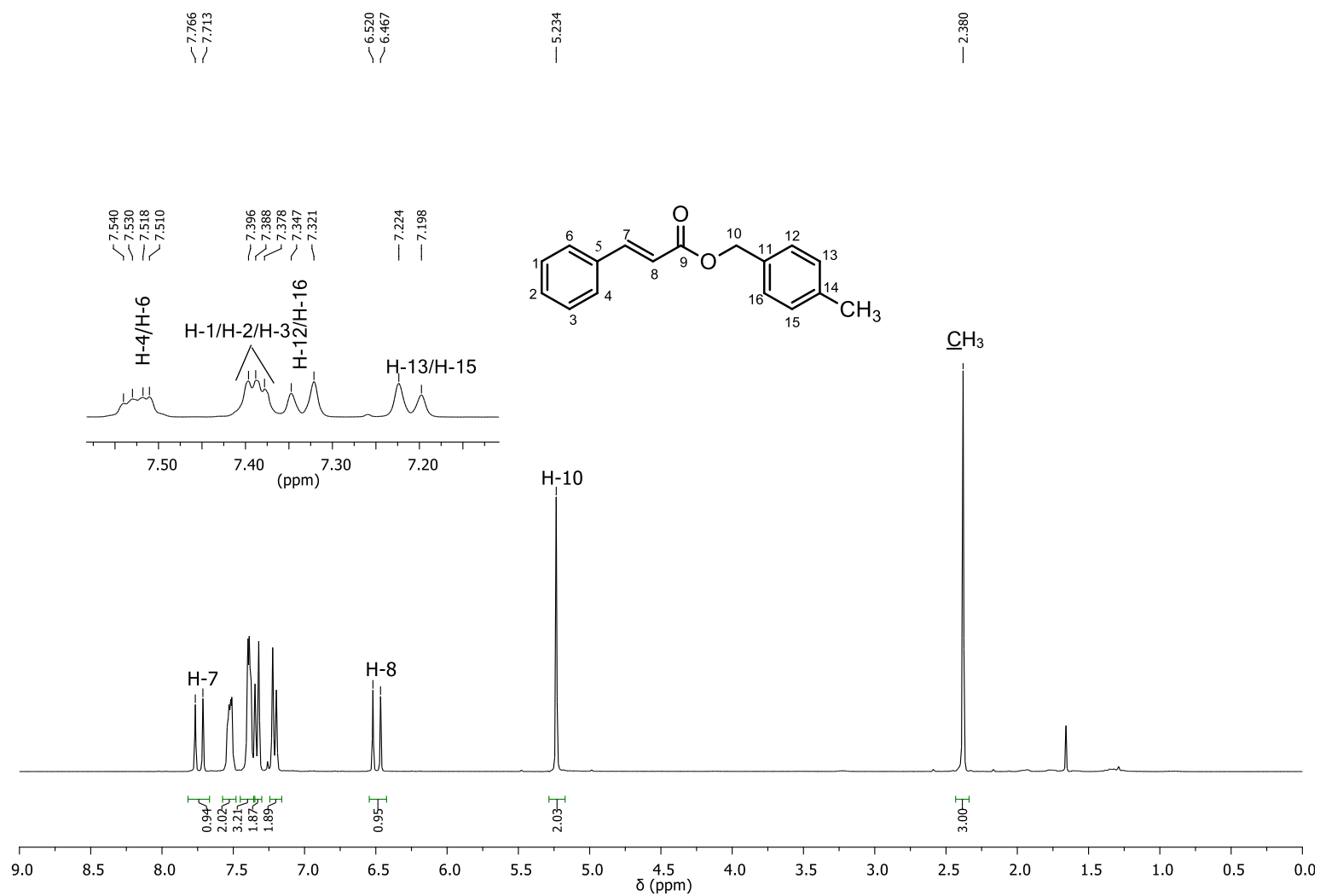


Figura 2.23 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **13h**.

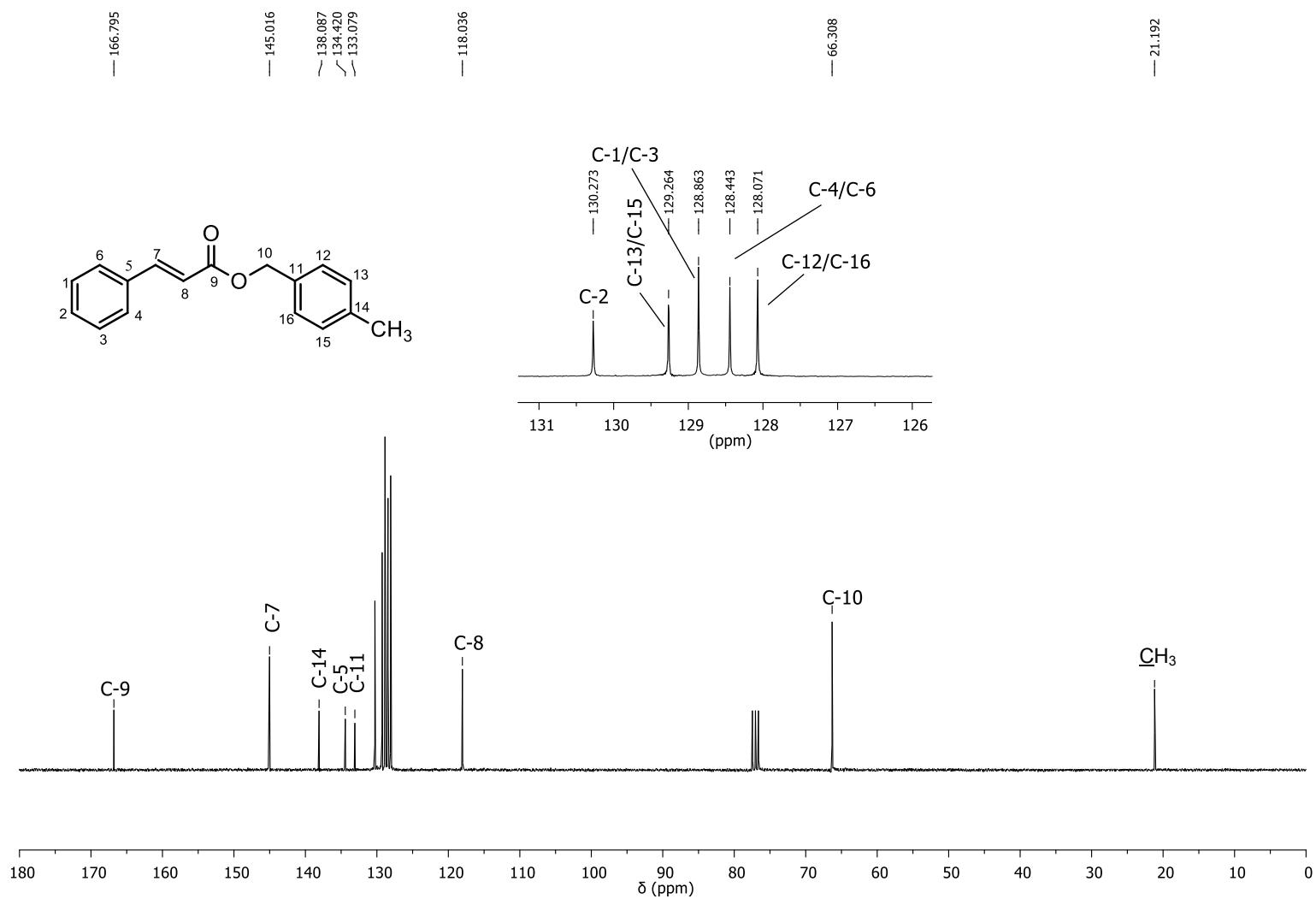
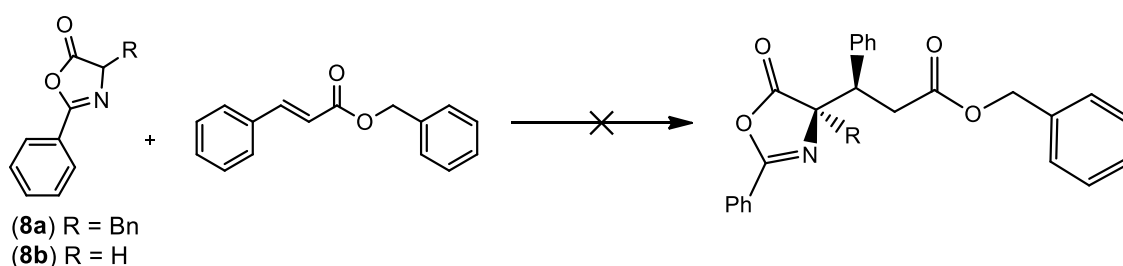


Figura 2.24 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **13h**.

Após a síntese dos cinamatos, foram testadas diferentes condições de reação (Esquema 2.17) buscando a preparação de ésteres cinamatos contendo o anel azalactônico. Entretanto não houve formação de quaisquer quantidades de produto mesmo após três dias de reação, aquecimento, agitação, troca de solvente e mudança de catalisador. Além do (±) ácido canforsulfônico foram testados também os catalisadores cloreto de zirconila e niobato de sódio. Os solventes testados foram diclorometano e tolueno, e as reações foram conduzidas a temperatura ambiente e a 80 °C (Esquema 2.17).



- Condições testadas: -Solventes: Diclorometano e Tolueno
 - Catalisadores: ACS, $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, NaNbO_3
 - Sem agitação magnética e com agitação magnética
 - Reações conduzidas a temperatura ambiente e sob aquecimento.

Esquema 2.17 – Condições de reação que foram utilizadas na tentativa de síntese dos cinamatos contendo o anel azalactônico via adição do tipo Michael.

Diante da falta de sucesso na obtenção dos cinamatos contendo o anel azalactônico e considerando relatos de atividade antitumoral e antimetastática de ésteres cinamatos, incluindo uma investigação conduzida por nosso grupo de pesquisa (LIMA *et al.*, 2018), optou-se por avaliar as atividades biológicas dos ésteres sintetizados. Cumpre ressaltar que dados da literatura demonstram que estruturas simples de derivados do ácido cinâmico podem apresentar bioatividades bastante interessantes (DE *et al.*, 2011).

Nos capítulos seguintes serão descritos os resultados encontrados no que tange à avaliação de bioatividades das diamidas e dos cinamatos sintetizados.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, S. H.; TARAKMAH, A.; MERCHANT, S. Q.; AL-SHHAFF, T. Synthesis of esters: Development of the rate expression for the Dowex 50 Wx8-400 catalyzed esterification of propionic acid with 1-propanol. **Chemical Engineering Science**, v. 62, p. 3197–3217, 2007.
- AMARANTE, G. W.; COELHO, F. Reações de organocatálise com aminas quirais. Aspectos mecanísticos e aplicações em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 32, p. 469-481, 2009.
- ÁVILA, E. P.; JUSTO, R. M. S.; GONÇALVES, V. P.; PEREIRA, A. A.; DINIZ, R.; AMARANTE, G. W. Chiral Brønsted Acid-Catalyzed Stereoselective Mannich-Type Reaction of Azlactones with Aldimines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 80, p. 590–594, 2015.
- ÁVILA, E. P.; DE MELLO, A. C.; DINIZ, R.; AMARANTE, G. W. Brønsted Acid Catalyzed Highly Diastereoselective Michael-Type Addition of Azlactones to Enones. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 1, p. 1881–1883, 2013.
- BARROS, M. V. A. **Síntese e avaliação da atividade citotóxica e do efeito sobre o transporte fotossintético de elétrons de trifluorometil-aril-amidas**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- BRIÈRE, J-F.; OUDEYER, S.; DALLA, V.; LEVACHER, V. Recent advances in cooperative ion pairing in asymmetric organocatalysis. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 1696–1707, 2012.
- BUT, T. Y. S.; TOY, P. H. The Mitsunobu Reaction: Origin, Mechanism, Improvements, and Applications. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 2, p. 1340–1355, 2007.
- DE, P.; BALTAS, M.; BELVAL, F.B. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents – A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1672-1703, 2011.
- DE ALMEIDA, T. B. **Sínteses de novos híbridos moleculares a partir de um derivado da piperina e anéis tetraidropiranos com potencial atividade antinociceptiva**. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 61, 2014.

- DE CASTRO, P. P.; CARPANEZ, A. G.; AMARANTE, G. W. Azlactone Reaction Developments. **Chemistry - A European Journal**, v. 22, p. 10294–10318, 2016.
- DIDEHBAN, K.; VESSALLY, E.; SALARY, M.; EDJLALI, L.; BABAZADEH, M. Synthesis of a variety of key medicinal heterocyclic compounds via chemical fixation of CO₂ onto o-alkynylaniline derivatives. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 23, p. 42–50, 2018.
- EL-MEKABATY, A. Erlenmeyer azlactones: Synthesis, reactions and biological activity. **International Journal of Modern Organic Chemistry**, v. 2, p. 40-66, 2013.
- KHAN, K. M.; MUGHAL, U. R.; KHAN, M. T. H.; ZIA-ULLAH, PERVEEN, S.; CHOUDHARY, M. I. Oxazolones: New tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 6027-6033, 2006.
- LI, G.; SUN, W.; LI, J.; JIA, F.; HONG, L.; WANG, R. Organocatalytic enantioselective formal arylation of azlactones using quinones as the aromatic partner. **Chemical Communications**, v. 51, p. 11280-11282, 2015.
- LI, W.; WANG, J. Lewis Base Catalyzed Aerobic Oxidative Intermolecular Azide–Zwitterion Cycloaddition. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, p. 14186-14190, 2014.
- LIMA, A. M. A. **Síntese e avaliação das atividades citotóxica e fungicida de isobenzofuranonas e de derivados do ácido cinâmico**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- LIMA, G. D. A.; RODRIGUES, M. P.; MENDES, T. A. O.; MOREIRA, G. A.; SIQUEIRA, R. P.; DA SILVA, A. M.; VAZ, B. G.; FIETTO, J. L. R.; BRESSAN, G. C.; MACHADO-NEVES, M.; TEIXEIRA, R. R. Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions. **Toxicology in Vitro**, v. 53, p. 1–9, 2018.
- LUTJEN, A. B.; QUIRK, M. A.; BARBERA, A. M.; KOLONKO, E. M. Synthesis of (*E*)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 5291–5298, 2018.

- MISTRY, R. N.; DESAI, K. R. Studies on Synthesis of Some Novel Heterocyclic Azlactone Derivatives and Imidazolinone Derivatives and their Antimicrobial Activity. **E-Journal of Chemistry**, v. 2, p. 42-51, 2005.
- MOHAMED, L. W.; EL-BADRY, O. M.; EL-ANSARY, A.; ISMAEL, A. Design & synthesis of novel oxazolone & triazinone derivatives and their biological evaluation as COX-2 inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 72, p. 3080-314, 2017.
- NIELSON, M.; WORGULL, D.; ZWEIFEL, T.; GSCHWEND, B.; BERTELSEN, S.; JORGENSEN, K. A. Mechanisms in aminocatalysis. **Chemical Communications**, v. 47, p. 632–649, 2011.
- PATEL, P.; NANDI, S.; MENAPARA, T.; BIRADAR, A. V.; NAGARALE, R. K.; KHAN, N. H.; KURESHY, K. I. Glycoluril: A heterogeneous organocatalyst for oxidation of alcohols and benzylic sp³ carbons. **Applied Catalysis A**, v. 565, p. 127–134, 2018.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, p. 134, 139 e 223, 2010.
- PEREIRA, A. A.; DE CASTRO, P. P.; DE MELO, A. C.; FERREIRA, B. R. V.; EBERLIN, M. N.; AMARANTE, G. W. Brønsted acid catalyzed azlactone ring opening by nucleophiles. **Tetrahedron**, v. 70, p. 3271-3275, 2014.
- PINHEIRO, D. L. J.; NIELSEN, D. U.; AMARANTE, G. W.; SKRYDSTRUP. Pd-catalyzed carbonylative α -arylation of azlactones: A formal four-component coupling route to α,α -disubstituted amino acids. **Journal of Catalysis**, v. 364, p. 366-370, 2018.
- PRETSCH, E.; CLERC, T.; SEIBL, J.; SIMON, W. **Tables of spectral data for structure determination of organic compounds**. 2. ed. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, p. C245, 1989.
- RATHORE, R.; SAH, P. Synthesis and biological activity of some newly synthesized piperaziny azlactone derivatives. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 5, p. 1152-1159, 2015.
- RICCI, A. Asymmetric Organocatalysis at the Service of Medicinal Chemistry. *International Scholarly Research Notices: Organic Chemistry*, v. 2014, p. 1-29, 2014.
- SALAMI-RANJBARAN, E.; KHOSROPOUR, A. R.; MOHAMMADPOOR-BALTORK, I. A domino approach for the synthesis of naphtho[2,1-*b*]furan-2(1*H*)-ones from azlactones. **Tetrahedron**, v. 70, p. 9268-9273, 2014.

- SHAIKH, I. R. Organocatalysis: Key Trends in Green Synthetic Chemistry, Challenges, Scope towards Heterogenization, and Importance from Research and Industrial Point of View. **Journal of Catalysts**, v. 2014, p. 1-35, 2014.
- SHARMA, N.; BANERJEE, J.; SHRESTHA, N.; CHAUDHURY, D. A review on oxazolone, it's method of synthesis and biological activity. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 964-987, 2015.
- SICIGNANO, M.; LITTA, A. D.; SCHETTINI, R.; DE RICCARDIS, F.; PIERRI, G.; TEDESCO, C.; IZZO, I.; SALA, G. D. Highly Diastereoselective Crown Ether Catalyzed Arylogous Michael Reaction of 3-Aryl Phthalides. **Organic Letters**, v. 19, p. 4383-4386, 2017.
- SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's advanced organic chemistry. Reactions, mechanisms, and structure**. 6. ed., New Jersey: John Wiley & Sons, p. 426, 2007.
- SOVA, M.; PERDIH, A.; KOTNIK, M.; KRISTAN, K.; RIZNER, T. L.; SOLMAJER, T.; GOBEC, S. Flavonoids and cinnamic acid esters as inhibitors of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: A synthesis, QSAR and modelling study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 7404-7418, 2006.
- SWAMY, K. C. K.; KUMAR, N. N. B.; BALARAMAN, E.; KUMAR, K. V. P. P. Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 2551–2651, 2009.
- VAFAEEZADEH, M.; FATTAHI, A. DFT investigations for "Fischer" esterification mechanism over silica-propyl-SO₃H catalyst: Is the reaction reversible? **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1071, p. 27–32, 2015.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DAS DIAMIDAS E DOS ÉSTERES CINAMATOS E INVESTIGAÇÃO DO EFEITO ANTIMETASTÁTICO DOS CINAMATOS

3.1 INTRODUÇÃO

Segundo definição do INCA (Instituto Nacional do Câncer) o câncer consiste de um conjunto de mais de 100 doenças que são caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo ainda disseminar para outras áreas do corpo, em um processo conhecido como metástase. A metástase é a principal causa de morte relacionada ao câncer, principalmente devido à dificuldade de tratamento com cirurgia convencional ou radioterapia, o que se deve a localização anatomicamente difusa das células cancerosas nos diferentes órgãos. Além disso, a resistência das células tumorais aos quimioterápicos é uma causa importante de fracasso do tratamento em pacientes com câncer em fase metastática (INCA, 2019; XU *et al.*, 2018).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e estima-se que tenha sido responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. Dados estatísticos revelam que cerca de 17 milhões de novos casos ocorram a cada ano. Dentre estes, os cânceres de pulmão, próstata, colo retal, estômago e fígado são os mais incidentes na população masculina, enquanto mama, colo-retal, pulmão, colo do útero e o câncer de tireoide são os mais comuns entre as mulheres (WHO; CHENG *et al.*, 2018).

O carcinoma hepatocelular é o tipo mais comum de câncer de fígado e consiste de uma neoplasia maligna agressiva com elevado índice de mortalidade. É uma doença que se manifesta com grande frequência em pessoas portadoras de doenças hepáticas crônicas, como a cirrose. A hepatite viral crônica, hepatite B ou infecção por hepatite C, e o consumo excessivo de álcool são os principais fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (BALOG *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2013).

O adenocarcinoma de colo do útero é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo. Para o ano de 2018 foram estimados 569.847 novos casos e por volta de 311.365 mortes relacionados a este tipo de câncer ao

redor do mundo. Cerca de 80% das mortes relacionadas ao câncer do colo do útero ocorrem em países de baixa renda com ineficientes medidas de triagem. O papilomavírus humano (HPV) é o principal agente causador do deste tipo de câncer. Porém, o risco de desenvolvê-lo pode ser reduzido ao realizar rastreamento de rotina e vacinação contra o vírus HPV (COHEN *et al.*, 2019; PORRAS *et al.*, 2018).

O melanoma é o tipo mais agressivo de câncer de pele e possui elevado potencial de se tornar metastático. Ele tem origem nos melanócitos, as células que produzem melanina, e pode aparecer em qualquer parte do corpo, na pele ou mucosas, na forma de manchas, pintas ou sinais. Já em pessoas negras, o seu aparecimento ocorre geralmente nas áreas claras do corpo do indivíduo, como nas palmas das mãos e parte inferior dos pés. No estágio inicial, o melanoma se desenvolve apenas na camada mais baixa da epiderme, a camada basal, o que facilita a remoção cirúrgica e a cura do tumor. Nos estágios mais avançados, ele penetra na derme levando a lesões mais profundas e espessas, aumentando a possibilidade de desenvolvimento de metástase, o que dificulta o processo de cura do paciente. O melanoma maligno metastático possui um mau prognóstico; estima-se que o tempo de sobrevida esteja entre 5,3-10,0 meses, dependendo do estágio da doença. Segundo o INCA, 2.920 novos casos de melanoma foram previstos entre os homens, para o Brasil, no ano de 2018. Entre as mulheres esse número é ainda maior, por volta de 3.340 novos casos (INCA, 2018; SALEH, 2018).

Os principais métodos para o tratamento do câncer incluem a radioterapia, quimioterapia e cirurgia, ou ainda a combinação desses meios terapêuticos (ZHANG *et al.*, 2019).

Dentre esses métodos, a cirurgia, quando indicada, é na maioria dos casos a escolha preferencial dos pacientes, visto que existe nesse método a esperança de que ocorra a retirada total ou pelo menos parcial do tumor. Quando o tumor é detectado precocemente, o ato cirúrgico pode ter finalidade curativa. Entretanto, existem alguns riscos associados à realização da cirurgia como dor crônica após a cirurgia, desenvolvimento de infecções, hemorragia, danos aos tecidos próximos e indução do aumento da disseminação de células cancerígenas para a circulação (TOHME *et al.*, 2017).

A radioterapia utiliza diferentes formas de radiação ionizante para o tratamento do câncer. Seu objetivo consiste em destruir ou inibir o crescimento de

células anormais que formam o tumor. Esse tratamento apresenta alguns efeitos colaterais, como mielossupressão parcial, reações adversas na pele e danos locais irreversíveis a macromoléculas biológicas, como DNA e proteínas. Além disso, dependendo do local onde o tumor se encontra, a radiação pode gerar danos em tecidos saudáveis (ZHANG *et al.*, 2019).

O objetivo da quimioterapia é destruir as células neoplásicas (células cancerígenas), preservando as normais. O tratamento é realizado com medicamentos quimioterápicos que podem ser administrados por via intravenosa, por via oral, intramuscular, subcutânea, intracranial ou por meio tópico (INCA). Um dos grandes problemas relacionado ao uso de quimioterápicos refere-se ao desenvolvimento de resistência de células tumorais aos fármacos utilizados (LIU *et al.*, 2019). Além deste fato, a quimioterapia apresenta diversos efeitos colaterais tais como supressão da medula óssea, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, perda de cabelo, náuseas e vômitos, diarreia, maior susceptibilidade a infecções, dentre outros (ROSAS *et al.*, 2013).

Embora o diagnóstico precoce e o tratamento terapêutico ajudem a controlar a doença e em alguns casos promover a cura, ainda é necessário o desenvolvimento de outros métodos para prevenir e tratar o câncer, uma vez que a resistência primária ou secundária a todas as terapias irá ocorrer em algum momento do tratamento (GOVINDARAJAN, 2018). Deste modo, é necessária a continuidade de pesquisas que busquem a descoberta e promovam o desenvolvimento de novas drogas que possam impedir a proliferação celular e induzir a apoptose, inibir a mobilidade das células cancerígenas e que, além disso, possuam menores efeitos colaterais, maior seletividade e diminuam o processo de resistência (VIDENOVIC *et al.*, 2018).

Entre muitas substâncias naturais potencialmente úteis que vem sendo investigadas como quimioterápicos alternativos no tratamento do câncer, pode-se citar o ácido cinâmico e seus derivados. Recentemente, a atividade antimetastática de uma série de derivados do ácido cinâmico contendo o núcleo 1,2,3-triazólico (Figura 3.1, pg. 164) foi avaliada *in vitro* frente às células de melanoma cutâneo murino B16-F10. Dezenove dos vinte e seis derivados sintetizados suprimiram significativamente a migração de células B16-F10 na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo que dez destes compostos suprimiram a

migração celular em pelo menos 50% em relação ao controle. Esses dez compostos foram, subsequentemente, avaliados na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo que somente o composto cinamato de 3-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propila (Figura 3.1) suprimiu significativamente a migração celular (cerca de 86%). Este cinamato também foi capaz de inibir os processos de proliferação, invasão, adesão e colonização das células B16-F10. Diante dos resultados experimentais observados *in vitro*, concluiu-se que o composto cinamato de 3-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propila foi eficiente na redução do potencial metastático das células B16-F10 (LIMA *et al.*, 2018).

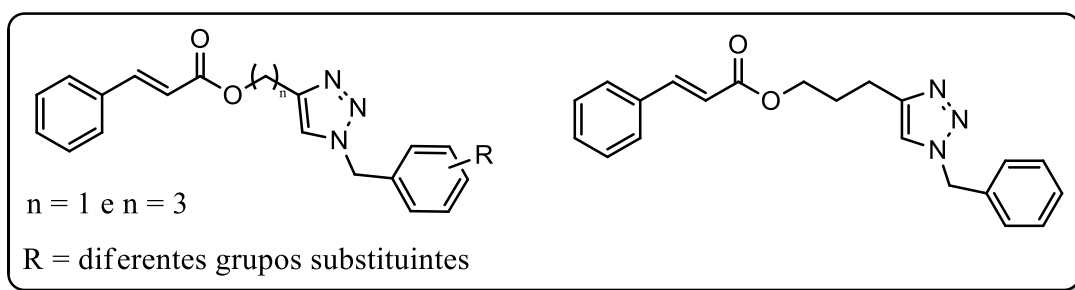


Figura 3.1 – Estrutural geral dos derivados do ácido cinâmico que foram sintetizados e do composto mais ativo que apresentou atividade antimetastática (LIMA *et al.*, 2018).

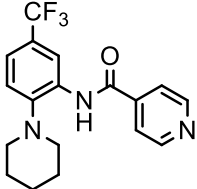
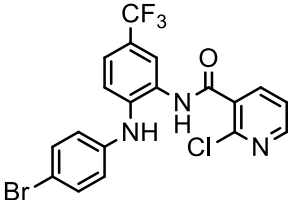
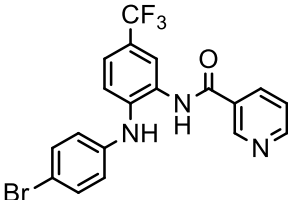
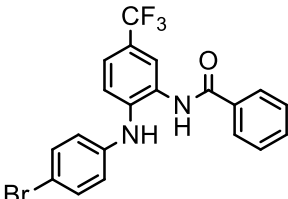
O *splicing* é um processo que resulta na remoção seletiva dos íntrons e na junção dos éxons imediatamente após a transcrição do RNA. No processo conhecido como *splicing* alternativo, uma mesma molécula de pré-RNA sofre diversas possibilidades de combinações resultando na síntese de proteínas distintas a partir de um único gene (CZUBATY e PIEKIEŁKO-WITKOWSK, 2017).

As SRPKs representam uma família de cinases que é responsável pela fosforilação das proteínas SR e por regular os fatores de *splicing* alternativo. Quando o *splicing* alternativo é prejudicado, o funcionamento de genes-chaves que controlam a proliferação, migração e apoptose é afetado (OGAWA e HAGIWARA, 2012). A superexpressão e a desregulação da atividade das cinases SRPK1 e SRPK2 são fatores importantes na promoção da proliferação celular em vários cânceres, como a leucemia (SIQUEIRA *et al.*, 2015).

O SRPIN340, *N*-[2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil) fenil]isonicotinamida, consiste em um derivado da isonicotinamida que inibe seletivamente as cinases SRPK1 e o SRPK2. O tratamento de células de leucemia com SRPIN340 resulta na diminuição da viabilidade celular, indução de apoptose e alterações no *splicing* alternativo de MAP cinases, VEGF e FAS. Além disso, o SRPIN340 pode inibir a tumorigênese *in vivo* (CZUBATY e PIEKIEŁKO-WITKOWSK, 2017). Deste modo, observa-se que a inibição das SRPKs pode controlar a proliferação de células tumorais.

Siqueira e colaboradores em 2017 descreveram a síntese e avaliação da atividade antileucêmica de vinte e dois derivados do SRPIN340. Alguns desses derivados apresentaram efeitos citotóxicos superiores contra as linhagens de células de leucemia mielóide e linfóide em comparação com o SRPIN340. Os melhores resultados foram obtidos para os três compostos apresentados na Tabela 3.1 (pg. 166), com valores de IC₅₀ variando entre 6,0 e 35,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Esses derivados do SRPIN340 também foram capazes de desencadear a apoptose e autofagia. Dentre os compostos avaliados, o composto *N*-[2-(4-bromofenilamino)-5-(trifluorometil)fenil]nicotinamida foi mais eficiente que o SRPIN340 em inibir o estado de fosforilação intracelular das proteínas SR, bem como a expressão das isoformas oncogênicas de MAP2K1, MAP2K2, VEGF e RON.

Tabela 3.1 – Valores de IC₅₀ para as linhagens celulares HL60, Jurkat e Nalm6 do SRPIN340 e dos três derivados mais ativos

Composto	IC ₅₀		
	HL60	Jurkat	Nalm6
 SRPIN340	38,3 ± 8,7	75,4 ± 5,7	70,6 ± 5,0
	14,2 ± 0,9	20,6 ± 4,0	35,7 ± 1,0
	8,5 ± 0,2	17,8 ± 1,1	17,0 ± 1,0
	11,8 ± 0,4	33,8 ± 1,8	6,0 ± 2,4

Dessa forma, considerando as atividades antitumorais já descritas na literatura para os derivados do ácido cinâmico, bem como de amidas derivadas do SRPIN340, descrevem-se neste capítulo os resultados da avaliação do efeito antitumoral dos compostos **9a-9k**, **10a-10k** e **13a-13r** bem como os resultados da avaliação da atividade antimetastática dos cinamatos **13a-13r**.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Metodologia utilizada nos bioensaios envolvendo os ésteres derivados do ácido cinâmico

3.2.1.1 Linhagens celulares e cultura celular

Células de linhagem tumorigênica do tipo melanoma murino B16-F10, e não tumorigênica Vero foram cultivadas no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos (LBCB) da Universidade Federal de Viçosa. Todo o procedimento de cultivo foi realizado em condições assépticas, utilizando-se capela de fluxo laminar e material esterilizado e descartável. As culturas celulares foram mantidas em meio RPMI 1640, pH 7,2 (Gibco, Invitrogen, CA, USA) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (10% SFB), penicilina (1%), estreptomicina (1%) a 37 °C, sob tensão de 5% de tensão de CO₂. Antes da realização de cada experimento, as células foram removidas das garrafas de cultivo, centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI 1640, sendo suplementadas com SFB e contadas em câmara de Neubauer.

3.2.1.2 Ensaio de avaliação de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade e seletividade dos compostos **13a-13r**, foram utilizadas as linhagens celulares tumorigênica B16-F10 e não tumorigênica Vero. Para tal, foi empregado o teste do MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*]. Somente os compostos que apresentaram os melhores valores de IC₅₀ frente à linhagem B16-F10 e significativa seletividade foram submetidos aos demais ensaios.

3.2.1.3 Ensaio de avaliação de viabilidade celular

As linhagens celulares tumorais B16-F10 (1x10⁴ células/poço) e Vero (8x10⁴ células/poço) foram incubadas em placas de 96 poços, por 24 horas a 37 °C e 5% de tensão de CO₂. Cada poço continha 100 µL de meio RPMI completo e 100 µL da solução dos compostos em diferentes concentrações (100 e 200 µmol L⁻¹), diluídos em meio RPMI com 10% de SFB e 0,4% de DMSO (v/v, Sigma). Após 48 h de incubação, MTT (5 mg mL⁻¹, Sigma) foi adicionado aos poços. Após 4 h a 37 °C, a solução de MTT foi removida e 100 µmol L⁻¹ de DMSO por poço foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada a 540

nm em um leitor de microplaca (SpectraMax M5, Molecular Devices). Os resultados foram normalizados considerando os poços tratados com 0,4% de DMSO (controle). Para os cálculos da viabilidade celular foi utilizado o programa Microsoft Excel e para determinação dos valores de IC₅₀ para os compostos mais ativos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.1.

3.2.1.4 Ensaio de migração celular (*wound healing*)

Células B16-F10 foram semeadas em placas de cultura de 24 poços na concentração de 1×10^5 células (100 μ L por poço) em meio RPMI 1640 (10% SFB), por 24 h para completa aderência celular à placa e formação de uma monocamada confluyente de células. Com o auxílio de uma ponteira (P200), uma fenda de células foi raspada da placa e o meio foi descartado. Em seguida, foi acrescido meio RPMI 1640 (2% SFB) a cada poço e as células foram tratadas com o éster cinamato selecionado na concentração de 50 μ mol L⁻¹ ou com o veículo (0,4%, DMSO). Imagens digitais de cada fenda foram capturadas na objetiva de 10X, usando um microscópio de luz invertido conectado a uma câmera digital, no tempo 0 h e 24 h após a adição do composto. As distâncias médias de migração das células foram obtidas a partir da mensuração de cinco medidas transversais aleatórias, de uma borda a outra da fenda. Cada análise foi realizada em triplicata. As quantificações foram realizadas utilizando-se o software Paint 6.2.

3.2.2 Metodologia utilizada no ensaio de avaliação da citotoxicidade das diamidas 9a-9k e 10a-10k

3.2.2.1 Linhagens celulares e cultura celular

As linhagens celulares humanas utilizadas foram HeLa (adenocarcinoma de colo do útero), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e HEK293 (célula embrionária de rim – linhagem não tumoral). Para o cultivo, utilizou-se meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*, Sigma) pH 7,2 suplementado com 100 U mL⁻¹ de penicilina (Sigma), 100 μ g mL⁻¹ de estreptomicina (Sigma) e 10% v/v de soro fetal bovino (SFB, LGC Bio). As células foram crescidas em suspensão utilizando garrafas de 75 e 300 cm², mantidas em atmosfera com 95% de umidade e 5% de tensão de CO₂.

3.2.2.2 Ensaio de Viabilidade Celular

Para avaliação da atividade citotóxica das diamidas **9a-9k** e **10a-10k**, as células foram contadas em câmaras de *neubauer*, ressuspendidas em meio RPMI 1640 (10% v/v SFB, 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina) e incubadas em placa de 96 poços de fundo chato, na densidade de 10.000 células por poço, por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂ para adaptação das células. As diamidas foram avaliadas na concentração de 100 µmol L⁻¹ por 48 horas de incubação a 37 °C e 5% de tensão de CO₂. Como veículo foi utilizado DMSO na concentração de 0,4% v/v. Para verificação do efeito citotóxico, foi adicionado a cada poço 10 µL do reagente MTT na concentração de 5 mg mL⁻¹ e incubou-se novamente a 37 °C por 4 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido, o formazan foi ressuspendido em 100 µL de DMSO e a leitura de absorbância no comprimento de onda de 540 nm foi realizada em leitora automática de microplacas (Biotek Sinergy HT). Para os cálculos da viabilidade foi utilizado o programa Microsoft Excel.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Avaliação de bioatividades dos cinamatos

No teste de avaliação da viabilidade celular das células B16-F10 frente aos cinamatos e ao ácido cinâmico (controle positivo), observou-se que a conversão do ácido cinâmico em ésteres cinamatos resultou em substâncias com maior efeito citotóxico frente a esta linhagem celular, com exceção dos compostos **13h**, **13n** e **13r** que apresentaram viabilidade celular superior ao controle positivo (Figura 3.2, pg. 170).

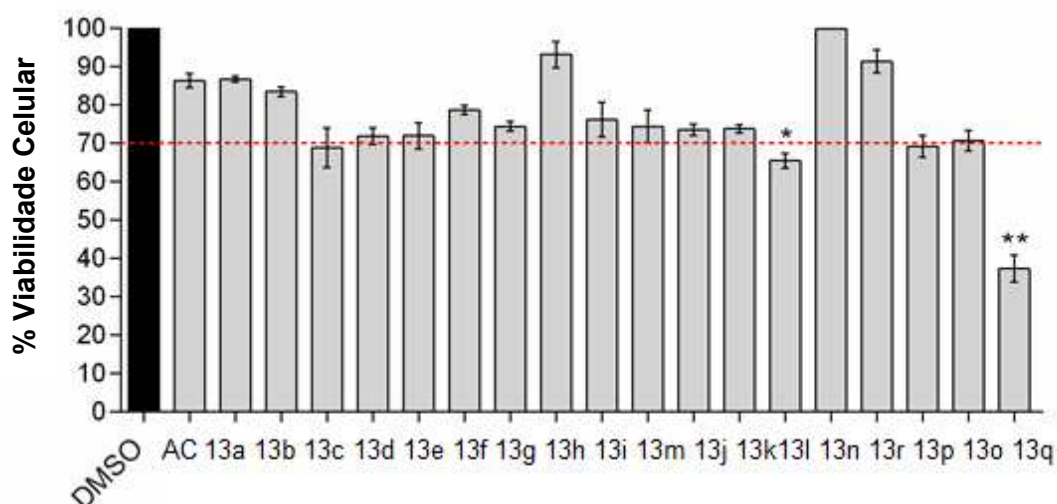


Figura 3.2 - Viabilidade das células B16-F10 após tratamento com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ do ácido cinâmico e dos ésteres cinamatos por 48 h. AC: ácido cinâmico.

Conforme apresentado na Figura 3.2, os compostos que diminuíram a viabilidade celular em porcentagem menor ou igual a 70% foram os compostos **13c**, **13l**, **13p** e **13q**, (Figura 3.3, pg. 171) e estes foram selecionados para determinação dos valores de IC_{50} para a bioatividade avaliada. Três destes compostos possuem a similaridade de terem sido obtidos a partir da reação do ácido cinâmico com a vanilina e o fenol. Este fato possivelmente indica que a porção derivada destes fenóis resulta em menor viabilidade celular e consequentemente maior efeito citotóxico sobre a linhagem B16-F10 em relação aos compostos benzilados. Além disso, os compostos **13p** e **13q** diferem estruturalmente apenas na dupla ligação, sendo o composto **13q** preparado via reação de bromoção. Desta forma, como a adição de átomos de bromo na dupla ligação acíclica culminou em significativa redução da viabilidade celular, pode-se sugerir que o átomo de bromo seja responsável por este incremento na atividade citotóxica. Outro fator a ser mencionado é que o composto **13r**, obtido através da reação de hidrogenação de **13p**, mostrou aumento da viabilidade celular em relação ao ácido cinâmico. Assim, quando este composto é comparado ao ácido cinâmico conclui-se que a dupla ligação acíclica provavelmente é um importante fator para a atividade citotóxica.

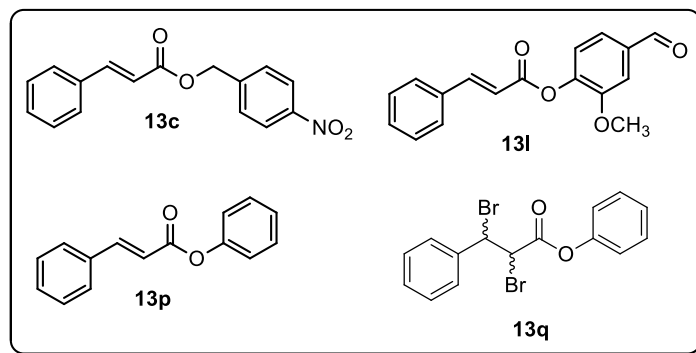


Figura 3.3 – Derivados do ácido cinâmico que exibiram as menores porcentagens de viabilidade celular frente à linhagem celular B16-F10.

Para a determinação dos valores de IC_{50} , células B16-F10 foram tratadas com concentrações crescentes ($0-200 \mu\text{mol L}^{-1}$) de cada um dos compostos durante 48 horas. Os valores de IC_{50} calculados para os quatro compostos mais ativos demonstraram que dois deles possuem valores abaixo de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. O composto **13q** apresentou o melhor resultado com valor de $IC_{50} = 60,28 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 3.4).

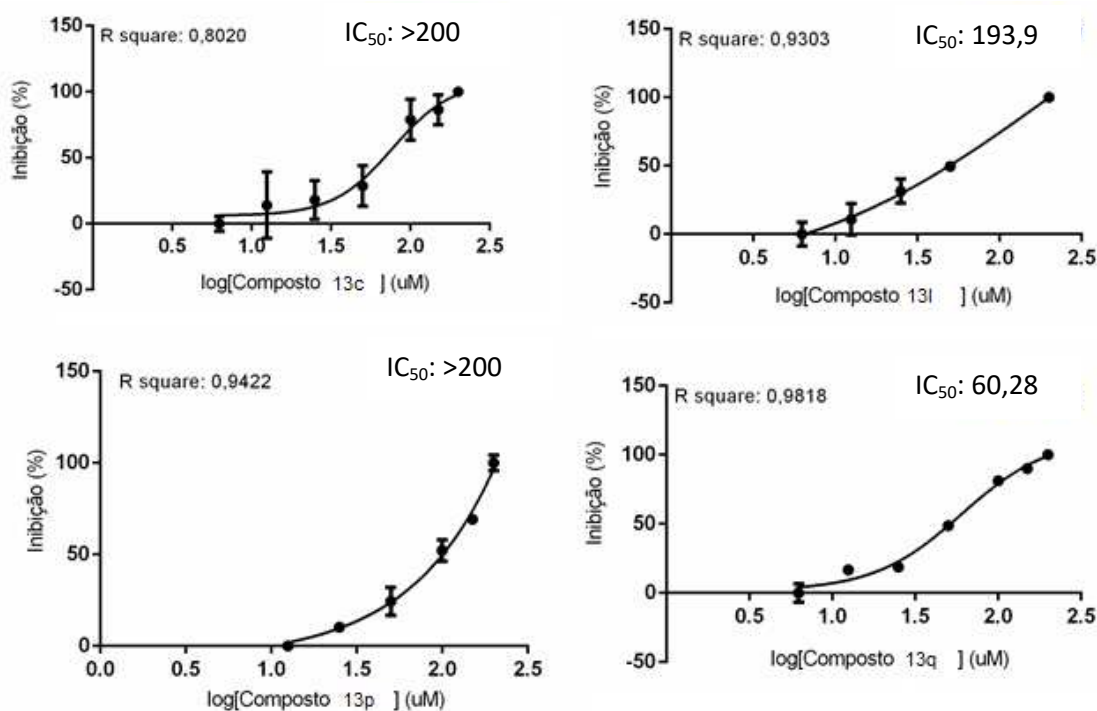


Figura 3.4 - Valores de IC_{50} e do coeficiente de determinação (R^2) para os derivados do ácido cinâmico mais ativos nos ensaios de avaliação da viabilidade celular frente às células B16-F10.

Foi realizado também o teste de viabilidade celular contra a linhagem celular não tumoral Vero. Para isto, células renais semelhantes a fibroblasto Vero foram tratadas com os compostos **13a-13r** nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, por 48 h (Figura 3.5). Na menor concentração avaliada, todos os compostos apresentaram porcentagem de viabilidade celular superior a 70%. Apesar do composto **13q** ter apresentado maior atividade citotóxica contra células B16-F10, na maior concentração utilizada ele possui maior citotoxicidade para células Vero em relação aos demais cinamatos avaliados. Entretanto, na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ demonstrou viabilidade celular superior a 80%.

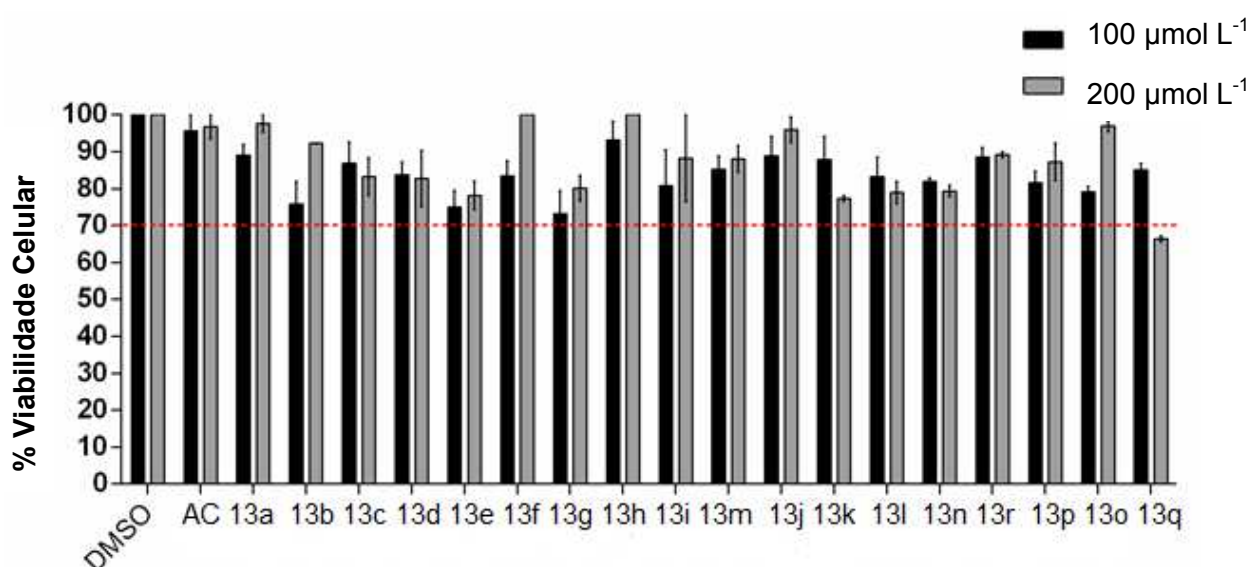


Figura 3.5 - Viabilidade das células Vero após tratamento com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do ácido cinâmico e dos ésteres cinamatos por 48 h. AC: ácido cinâmico.

No ensaio de migração celular, as células B16-F10 foram tratadas com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada composto durante 24 h. Na Figura 3.6 (pg. 173) observa-se que oito (**13c**, **13f**, **13i**, **13m**, **13n**, **13l**, **13p**, **13q**) dos dezoito compostos avaliados apresentaram porcentagens de migração celular igual ou inferior ao ácido cinâmico. Dentre esses, o **13l**, **13p** e **13q** foram aqueles que apresentaram os melhores resultados para a atividade avaliada. Outros ensaios como proliferação, invasão, adesão e colonização ainda são necessários para verificar o potencial desses compostos em reduzir o processo de metástase em células B16-F10.

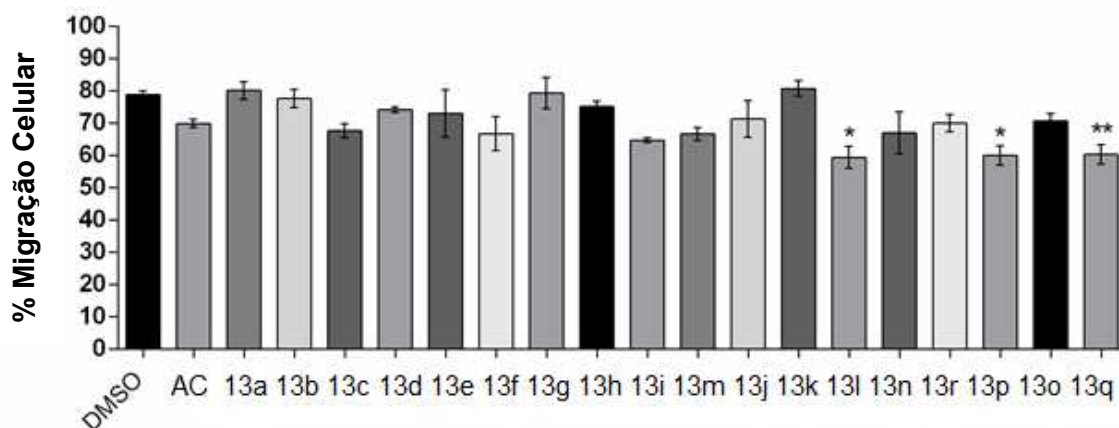


Figura 3.6 – Migração celular de células B16-F10 após tratamento com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do ácido cinâmico e dos ésteres cinamatos por 24 h. AC: ácido cinâmico.

3.3.2 Avaliação da citotoxicidade das diamidas

As diamidas **9a-9k** e **10a-10k** foram avaliadas na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em triplicata. As linhagens celulares humanas utilizadas foram a HeLa (adenocarcinoma de colo do útero), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e HEK293 (célula embrionária de rim – linhagem não tumoral). O SRPIN340 foi utilizado como controle positivo. Os resultados de avaliação da viabilidade celular são apresentados na Tabela 3.2 (pg. 173-174).

Tabela 3.2 - Viabilidade (%) das células cancerígenas HeLa e HepG2, após 48 horas de exposição às diamidas e ao SRPIN 340 (média±desvio padrão)

Composto	% Viabilidade Celular	% Viabilidade Celular
	HeLa	HepG2
9a	70,62±0,811	71,04±3,849
9b	102,3±7,456	78,83±6,236
9c	98,23±6,043	96,16±2,997
9d	76,33±1,57	70,27±2,956
9e	76,70±1,66	83,73±4,951
9f	98,96±5,755	85,83±4,148
9g	83,68±3,104	68,38±4,373
9h	49,85±2,354	52,37±1,583
9i	90,53±3,987	81,69±0,45
9j	71,68±3,864	92,87±3,99
9k	68,92±2,291	79,95±2,466
10a	10,23±0,156	7,415±0,465

Tabela 3.2 – Cont.

Composto	% Viabilidade Celular	% Viabilidade Celular
	HeLa	HepG2
10b	84,59±1,004	72,88±3,987
10c	85,04±1,673	77,29±2,507
10d	88,89±1,507	70,58±1,783
10e	101,3±5,417	85,88±1,302
10f	16,61±0,911	7,817±0,062
10g	13,64±0,056	8,148±0,098
10h	11,21±1,147	7,595±0,053
10i	9,867±0,314	7,802±0,239
10j	16,25±0,336	8,523±0,082
10k	16,72±0,832	10,74±0,8
SRPIN340	26,17±2,175	64,83±1,96

Conforme observado na Tabela 3.2, das vinte e duas diamidas avaliadas, sete (**10a**, **10f**, **10g**, **10h**, **10i**, **10j**, **10k**) reduziram a viabilidade celular em mais de 80% (Figura 3.7, pg. 175). Para a linhagem celular HeLa, o melhor resultado foi obtido para o composto **10i**, que foi capaz de inibir a viabilidade celular em aproximadamente 90%. Para a outra linhagem celular avaliada, HepG2, observa-se maior sensibilidade a esses sete compostos, resultando em efeitos citotóxicos mais pronunciados. Cabe destacar que essas sete diamidas exibiram resultados de inibição da viabilidade celular superiores ao SRPIN340 sendo, portanto mais citotóxicos do que o controle positivo.

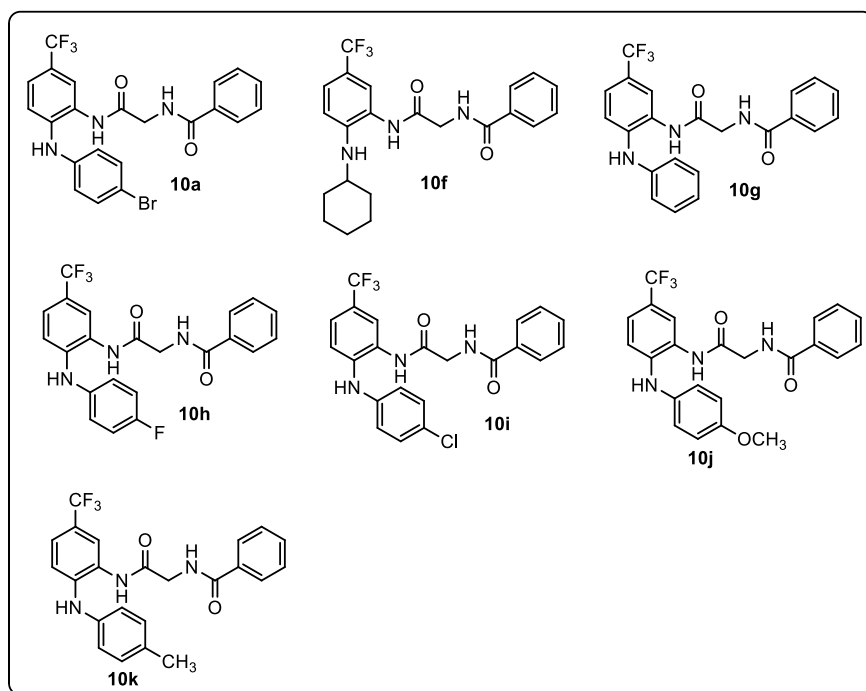


Figura 3.7 – Diamidas mais efetivas em inibir o crescimento das células HeLa e HepG2.

Com relação às estruturas químicas desses compostos mais ativos, observa-se que possuem como característica estrutural comum a presença de uma amina secundária ($\text{R}^1\text{-NH-R}^2$). Além disso, estes apresentam em comum o fato de possuírem um grupo metileno ($-\text{CH}_2$) conectando os dois grupamentos amida.

Uma comparação estrutural pode também ser feita com os compostos sintetizados por Barros em 2014, onde os compostos mais ativos correspondem aqueles que possuem a presença do grupo 4-bromofenila. Deste modo, nota-se novamente a importância da ligação N-H do grupo amina na atividade citotóxica dos compostos avaliados, sugerindo que esta ligação é uma unidade estrutural essencial e que deve estar presente nas estruturas dos análogos ao SRPIN340 para que estes venham a apresentar promissoras atividades biológicas.

As diamidas também foram avaliadas contra a linhagem não tumoral HEK293, a fim de verificar a seletividade dos compostos. Os resultados referentes à viabilidade celular para esta célula são apresentados na Tabela 3.3 (pg. 176).

Tabela 3.3 - Viabilidade (%) da célula não tumoral da linhagem HEK293, após 48 horas de exposição aos compostos derivados do SRPIN340 (média±desvio padrão)

Composto	% Viabilidade Celular
	HEK293
9a	96,38±3,992
9b	94,62±3,463
9c	96,85±2,276
9d	90,01±0,805
9e	95,22±5,091
9f	94,36±4,882
9g	96,25±2,732
9h	77,20±9,488
9i	96,77±2,275
9j	87,89±5,507
9k	94,78±6,856
10a	13,24±1,617
10b	95,15±6,101
10c	96,98±2,412
10d	90,90±5,729
10e	94,85±6,861
10f	41,10±11,44
10g	51,44±25,34
10h	28,89±6,787
10i	16,49±5,581
10j	22,78±1,253
10k	28,71±9,114
SRPIN340	75,51±5,895

Apesar dos compostos **10a**, **10h**, **10i**, **10j** e **10k** terem apresentado elevado efeito inibitório sobre a viabilidade das células avaliadas HeLa e HepG2, estes possuem também citotoxicidade elevada para a linhagem não tumoral. Já as diamidas **10f** e **10g** demonstraram serem menos tóxicas para a célula HEK293 e, portanto, apresentam maior seletividade. A seletividade é um fator importante no que tange à descoberta e desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento do câncer.

Um dos maiores desafios atualmente consiste em desenvolver novos medicamentos em dosagem segura e eficaz sem causar toxicidade sistêmica. Uma estratégia que vindo sendo utilizada por pesquisadores para diminuir ou até mesmo erradicar a toxicidade em células humanas normais é o nanoencapsulamento. As nanocápsulas são capazes de manter ou até mesmo ampliar a ação de moléculas

terapêuticas, podendo ainda aumentar a biodisponibilidade e minimizar os efeitos colaterais, uma vez que os nanocarreadores atuam transportando o fármaco e o liberando de maneira progressiva e controlada nos tecidos doentes (LOMBARDO *et al.*, 2019; KUMARI *et al.*, 2014).

Devido ao sucesso relacionado ao uso de nanocarreadores já está sendo realizado o nanoencapsulamento dos sete compostos mais ativos (**10a**, **10f**, **10g**, **10h**, **10i**, **10j**, **10k**), a fim de verificar se esta estratégia seria útil para diminuir a toxicidade desses compostos contra células humanas não tumorigênicas. Espera-se que este processo reduza a citotoxicidade contra a linhagem não tumoral, e desta forma possamos dar continuidade a investigação das atividades citotóxicas *in vitro* e *in vivo* das diamidas.

3.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALOG, J.; VICTOR, D.; ASHAM, E. H.; BURROUGHS, S. G.; BOKTOUR, M.; SAHARIA, A.; LI, X.; GHOBRIAL, R. M.; Jr, H. P. M. Hepatocellular carcinoma: a review. **Journal of Hepatocellular Carcinoma**, v. 3, p. 41-53, 2016.
- BARROS, M. V. A. **Síntese e avaliação da atividade citotóxica e do efeito sobre o transporte fotossintético de elétrons de trifluorometil-aril-amidas**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- CHENG, B.; YUAN, W-E.; SU, J.; LIU, Y.; CHEN, J. Recent advances in small molecule based cancer immunotherapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 582-598, 2018.
- COHEN, P. A.; JHINGRAN, A.; OAKNIN, A.; DENNY, L. Cervical Cancer. **Seminar**, v. 393, p. 169-182, 2019.
- CZUBATY, A.; PIEKIEŁKO-WITKOWSKA, A. Protein kinases that phosphorylate splicing factors: Roles in cancer development, progression and possible therapeutic options. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 91, p. 102–115, 2017.
- GOMES, M. A.; PRIOLLI, D. G.; TRALHÃO, J. G.; BOTELHO, M. F. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 59, p. 514-524, 2013.

- GOVINDARAJAN, M. Amphiphilic glycoconjugates as potential anti-cancer chemotherapeutics. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1208-1253, 2018.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em 26 de outubro de 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>. Acesso em: 26 de outubro de 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, disponível em: <https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/quimioterapia>. Acesso em: 13 de dezembro de 2018.
- KUMARI, A.; SINGLA, R.; GULIANI, A.; YADAV, S. K. Nanoencapsulation for drug delivery. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 265-286, 2014.
- LIMA, G. D. A.; RODRIGUES, M. P.; MENDES, T. A. O.; MOREIRA, G. A.; SIQUEIRA, R. P.; DA SILVA, A. M.; VAZ, B. G.; FIETTO, J. L. R.; BRESSAN, G. C.; MACHADO-NEVES, M.; TEIXEIRA, R. R. Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions. **Toxicology in Vitro**, v. 53, p. 1–9, 2018.
- LIU, D.; LI, X.; CHEN, X.; SUN, Y.; TANG, A.; LI, Z.; ZHENG, J.; SHI, M. Neural regulation of drug resistance in cancer treatment. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1871, p. 20–28, 2019.
- LOMBARDO, D.; KISELEV, M. A.; CACCAMO, M. T. Smart nanoparticles for drug delivery application: development of versatile nanocarrier platforms in biotechnology and nanomedicine. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, p. 1-26, 2019.
- OGAWA, Y.; HAGIWARA, M. Challenges to congenital genetic disorders with “RNA-targeting” chemical compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 134, p. 298–305, 2012.
- PORRAS, G. O. R.; NOGUEDA, J. C.; CHACÓN, A. P. Chemotherapy and molecular therapy in cervical câncer. **Reports of practical oncology and radiotherapy**, v. 23, p. 533-539, 2018.
- ROSAS, M. S. L.; SILVA, B. N. M.; PINTO, R. G. M. P.; SILVA, B. V.; SILVA, R. A.; GUERRA, L. R.; SOARES, G. C. M. T.; CASTRO, H. C.;

- LIONE, V. O. F. Incidência do câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 243-265, 2013.
- SALEH, J. Murine models of melanoma. **Pathology - Research and Practice**, v. 214, p. 1235-1238, 2018.
- SIQUEIRA, R. P.; BARBOSA, E. A. A.; POLÊTO, M. D.; RIGHETTO, G. L.; SERAPHIM, T. V.; SALGADO, R. L.; FERREIRA, G. J.; BARROS, M. V. A.; DE OLIVEIRA, L. L.; LARANJEIRA, A. B. A.; ALMEIDA, M. R.; JÚNIOR, A. S.; FIETTO, J. L. R.; KOBARG, J.; DE OLIVEIRA, E. B.; TEIXEIRA, R. R.; BORGES, J. C.; YUNES, J. A.; BRESSAN, G. C. Potential antileukemia effect and structural analyses of srpk inhibition by n-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide (SRPIN340). **PLos ONE**, v. 10, p. 1-21, 2015.
- SIQUEIRA, R. P.; BARROS, M. V. A.; BARBOSA, E. A. A.; ONOFRE, T. S.; GONÇALVES, V. H. S.; PEREIRA, H. S.; JÚNIOR, A. S.; DE OLIVEIRA, L. L.; ALMEIDA, M. R.; FIETTO, J. L. R.; TEIXEIRA, R. R.; BRESSAN, G. C. Trifluoromethyl arylamides with antileukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 134, p. 97-109, 2017.
- TOHME, S.; SIMMONS, R. L.; TSUNG, A. Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases. **Cancer Research**, v. 77, p. 1548-1552, 2017
- VIDENOVIC, M.; MOJSIN, M.; STEVANOVIC, M.; OPSENICA, I.; SRDIC-RAJIC, T.; SOLAJA, B. Benzothiazole carbamates and amides as antiproliferative species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 1096-1114, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 04 de novembro de 2018.
- XU, H.; LIU, X.; LE, W. Recent advances in microfluidic models for cancer metastasis research. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 105, p. 1-6, 2018.
- ZHANG, D.; LV, P.; ZHOU, C.; ZHAO, Y.; LIAO, X.; YANG, B. Cyclodextrin-based delivery systems for cancer treatment. **Materials Science & Engineering C**, v. C96, p. 872-886, 2019.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS DIAMIDAS INSPIRADAS NO SRPIN340

4.1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e são transmitidas aos seres humanos através da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas (BURZA *et al.*, 2018). Estes protozoários apresentam um ciclo biológico digenético (heteróximo), alternando entre a forma promastigota móvel exclusivo de um hospedeiro invertebrado e a forma amastigota não móvel que reside em um hospedeiro vertebrado de mamíferos (CYSNE-FINKELSTEIN *et al.*, 2018; ZAIDI *et al.*, 2017).

A leishmaniose é responsável por 12 milhões de pessoas infectadas no mundo, com uma média de 2 a 2,5 milhões de novas infecções anualmente. Além disso, 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair esta doença em pelo menos 98 países em desenvolvimento na África, no Sudeste Asiático e nas Américas (DE SOUZA *et al.*, 2018; GITARI *et al.*, 2018). Trata-se de uma doença tropical negligenciada, que consiste de um grupo diversificado de doenças transmissíveis que prevalecem em populações de baixa renda e em condições tropicais e subtropicais (KAPIL *et al.*, 2018).

As manifestações clínicas diversas da leishmaniose são resultantes da interação entre o tipo de espécie infectante e da resposta imune do hospedeiro. As três principais formas clínicas da leishmaniose (Figura 4.1, pg. 181) incluem a leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral (ou calazar) (PACE, 2014).

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, pode se manifestar com uma ou mais lesões cutâneas nas áreas do corpo expostas a picadas do flebotomíneo, apresentando diferentes manifestações clínicas (AL-KAMEL, 2017). Por volta de 95% dos casos da leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas. Estima-se que entre 600 a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente em todo o mundo (WHO, 2019). Com relação ao Brasil, a principal espécie responsável pela leishmaniose cutânea é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, com cerca de 26.000 novos casos humanos registrados a cada ano (TONELLI *et al.*,

2017). Essa espécie é encontrada em todas as zonas endêmicas do país, sendo transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos como *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia intermedia*, dentre outras (GONTIJO e DE CARVALHO, 2003).

A leishmaniose mucocutânea ataca as mucosas e a pele, os pacientes sofrem com ulcerações desfigurantes progressivas acometendo nariz, nasofaringe e laringe. Estas ulcerações podem ocorrer meses ou anos após o primeiro episódio de leishmaniose cutânea (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

A leishmaniose visceral é a forma clínica mais séria e fatal da doença, capaz de afetar órgãos como fígado, baço, linfonodos e intestinos. Consiste em uma doença crônica e sistêmica e que quando não tratada, pode evoluir para o óbito em mais de 95% dos casos. Ela é considerada um sério problema de saúde pública em várias regiões do mundo, onde entre 50 a 90 mil novos casos são estimados para ocorrer anualmente, e cerca de 2 milhões de pessoas encontram-se em risco de contrair essa doença. Dos doze países das Américas afetados pela leishmaniose visceral em 2015, o Brasil registrou 96% desses casos, cerca de 3289, com 268 óbitos (HERRERA *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2018; PELLISARI *et al.*, 2011; WHO).



Figura 4.1 – Formas clínicas da leishmaniose humana.

Fontes: http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/leishmaniose_cut_nea.htm. Acesso em: 11 de dezembro de 2018;

<https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/Mucocutaneous.htm>. Acesso em: 11 de dezembro de 2018;

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=en. Acesso em: 11 de dezembro de 2018.

A ausência de vacinas efetivas para humanos torna o uso de quimioterápicos não apenas importante para tratar os pacientes com leishmaniose, mas também para controlar a disseminação da doença.

Os quimioterápicos disponíveis para o tratamento da leishmaniose incluem os antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) e o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) (Figura 4.2, pg. 183), que ainda são os medicamentos mais utilizados no tratamento da leishmaniose em muitos países, principalmente nos mais pobres. Outros fármacos que também são utilizados correspondem às formulações lipídicas da anfotericina B, paromomicina, miltefosina e pentamidina (Figura 4.2, pg. 183), que podem ser utilizadas individualmente ou em combinação e tem-se tornado as drogas de escolha nas últimas décadas principalmente para prevenir o desenvolvimento de resistência e aumentar a eficácia do tratamento. Apesar da existência desses fármacos, eles possuem suas desvantagens e toxicidades particulares. Eles não são ideais devido aos diversos efeitos colaterais apresentados pelos pacientes durante o tratamento que incluem pancreatite, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, efeito teratogênico. Além disso, observa-se ainda o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos. Os medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose também podem apresentar baixa eficácia (em alguns casos) e custos elevados (VIJAYAKUMARA e DAS, 2018; ORYAN e AKBARI, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2018). Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento de novos compostos leishmanicidas com mecanismos de ação alternativos e eficientes para tratar esta doença. Neste tocante, amidas vêm sendo avaliadas conforme exemplificado a seguir.

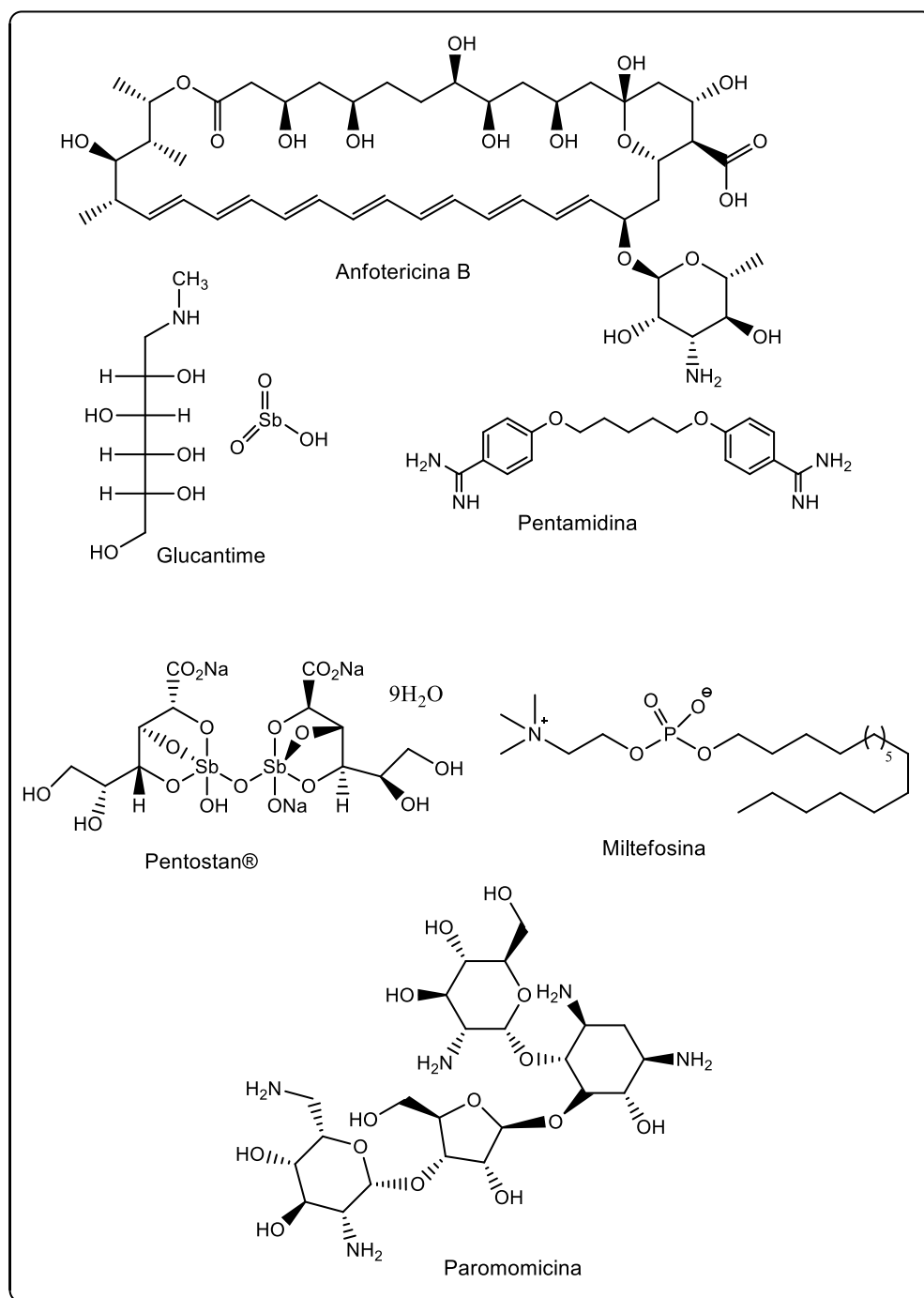


Figura 4.2 – Estruturas dos quimioterápicos utilizados no tratamento da leishmaniose.

Previdi e colaboradores (2019) sintetizaram treze diamidas e avaliaram a atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 24 h e 48 h de tratamento. Foram selecionados sete compostos que inibiram o crescimento de *L. amazonensis* em mais de 50% para determinar seus valores de IC₅₀. Para isto, as diamidas **a**, **b**, **c**, **d**, **e**, **f** e **g** (Figura 4.3, pg. 184)

foram avaliadas *in vitro* nas concentrações 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após incubação por 48 h contra formas promastigotas de *L. amazonenses*. Os valores de IC_{50} obtidos para esses sete compostos variaram de 2,6 a 72 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo os melhores resultados obtidos para as diamidas **b**, **c** e **f** (IC_{50} 2,6-7,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$), conforme apresentado na Tabela 4.1.

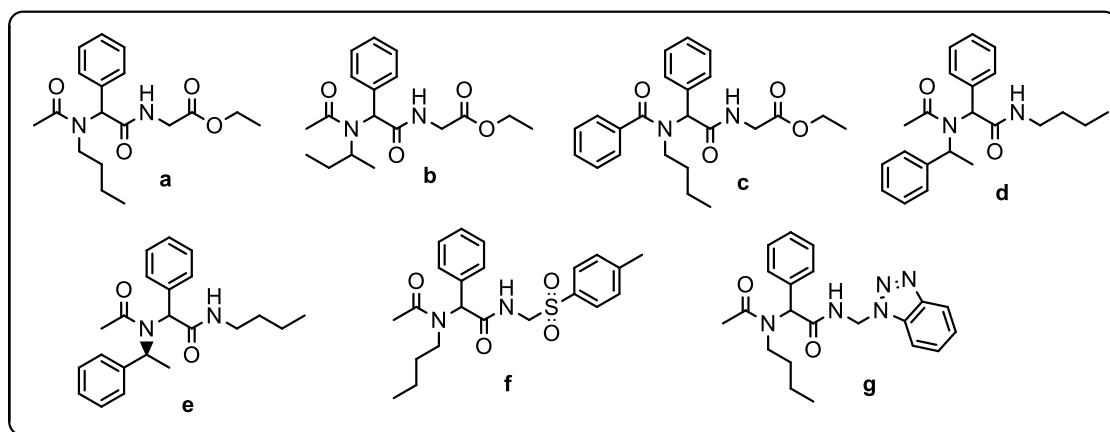


Figura 4.3 – Estruturas dos peptóides (diamidas) que apresentaram os maiores valores de porcentagem de inibição do crescimento de formas promastigotas contra *L. amazonenses*.

Tabela 4.1 – Valores de IC_{50} obtidos após incubação por 48 h (PREVIDI *et al.*, 2019)

Composto	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol L}^{-1}$
a	60,60 $\pm$ 0,39
b	2,80 $\pm$ 0,38
c	2,61 $\pm$ 0,42
d	59,03 $\pm$ 0,54
e	72,00 $\pm$ 0,48
f	7,90 $\pm$ 0,42
g	13,35 $\pm$ 0,40

Compostos derivados do SRPIN340 tem sido alvo de estudo de sua atividade leishmanicida. Teixeira em 2018 determinou os valores de IC_{50} para o **SRPIN340#9** e **SRPIN340#19** (Figura 4.4, pg. 185) contra macrófagos RAW 264.7 e promastigotas. Os valores obtidos para o derivado **SRPIN340#19**, tanto em macrófagos quanto em promastigotas, foram menores do que os obtidos para o

SRPIN340#9 (Tabela 4.2). Foram realizados também experimentos de infecção de macrófagos por *L. braziliensis*, *in vitro*, utilizando os compostos separados e combinados. O tratamento com os compostos na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ resultou na redução da porcentagem de células infectadas e no número de amastigotas intracelulares para ambos compostos, sendo que o **SRPIN340#19** apresentou os melhores resultados. Já a combinação dos compostos não demonstrou incremento na atividade, obtendo-se resultados semelhantes ao do **SRPIN340#19** (Figura 4.5, pg. 186).

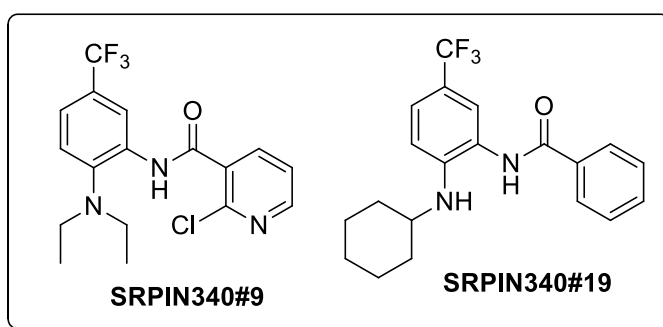


Figura 4.4 – Estruturas dos **SRPIN340#9** e do **SRPIN340#19**.

Tabela 4.2 – Valores de IC_{50} das amidas **SRPIN340#9** e **SRPIN340#19** (TEIXEIRA, 2018)

Composto	IC_{50} contra macrófagos RAW 264.7	IC_{50} contra promastigotas
SRPIN340#9	$82,41 \pm 1,01$	$57,35 \pm 1,10$
SRPIN340#19	$61,81 \pm 1,06$	$23,46 \pm 1,03$

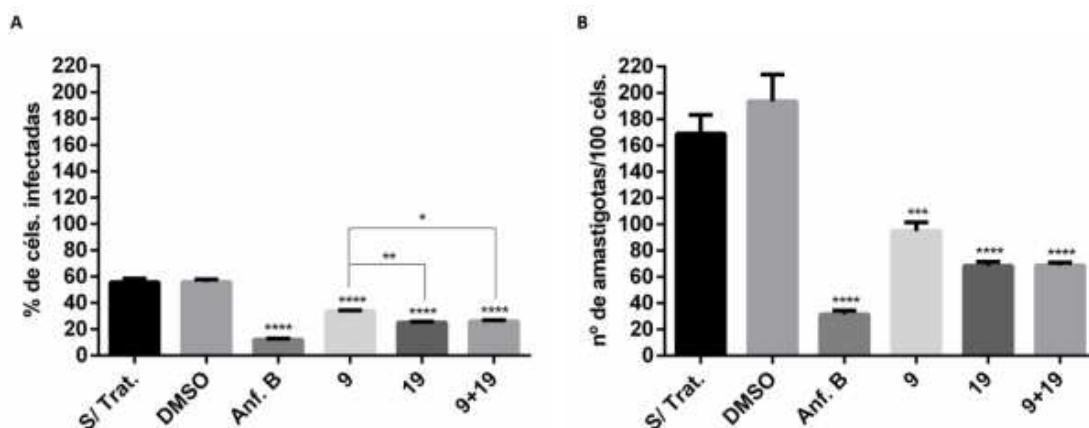


Figura 4.5 – Efeito dos compostos **SRPIN340#9** (denominado **9**) e **SRPIN340#19** (denominado **19**) isolados e combinados. A) Porcentagem de macrófagos infectados e B) Número de amastigotas para cada 100 células (TEIXEIRA, 2018).

Diante da necessidade de desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento da leishmaniose e levando-se em conta estudos prévios descritos na literatura com respeito à avaliação da atividade leishmanicida tanto de diamidas quanto de análogos ao SRPIN340, são descritos neste capítulo os resultados obtidos com respeito à avaliação da atividade leishmanicida das diamidas **9a-9k** e **10a-10k** inspiradas no SRPIN340.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Determinação da Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular foi feita a partir da redução da resazurina (Alamar blue) 1 mmol L^{-1} em PBS (MIKUS e STEVERDING., 2000; O'BRIEN *et al.*, 2000; BOPP e LETTIERI, 2008; RAMPERSAD, 2012; DINIZ, 2013; KULSHRESTHA *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2015). Após os tratamentos foram realizadas leituras colorimétricas em comprimentos de 570 nm e 600 nm no SpectraMax® M5 (Molecular Devices).

A redução da resazurina foi calculada a partir da seguinte equação: Redução = $[A_{570} - (A_{600} \times R0)]$, onde A_{570} representa a absorbância da resazurina em 570 nm de uma dada condição (tratamentos ou controles), A_{600} representa a absorbância da resazurina em 600 nm na mesma condição e R0 é um fator de correção obtido de acordo com a equação $R0 = \text{Meio}_{570} / \text{Meio}_{600}$. Nessa equação, Meio_{570} representa a

absorbância da resazurina em 570 nm dos poços contendo somente o meio de cultura e Meio_{600} representa a absorbância da resazurina em 600 nm dos mesmos poços. Os poços contendo células, sem tratamento, são considerados como viabilidade máxima (100%), e os demais foram transformados (em porcentagem) a partir do valor de redução obtido.

4.2.2 Obtenção dos macrófagos e avaliação da citotoxicidade

O teste de citotoxicidade em macrófagos da linhagem Raw.264.7 foi realizado em placa de 96 poços. Inicialmente os macrófagos cultivados em garrafas de cultivo de 50 mL por 3-4 dias foram liberados da parede da garrafa com o auxílio de espalhador de células (*Kasvi* 25 cm) e contados em câmara de Neubauer (diluição de 50X a 100X com azul de tripan) a fim de se determinar a concentração de células por mL. Os testes foram realizados de modo que a ação dos compostos fosse analisada no tempo de 24 h.

As vinte e duas diamidas **9a-9k** e **10a-10k** inspiradas no SRPIN340 foram analisadas. Os compostos foram diluídos em DMSO 100% (dimetilsulfóxido PA) na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Após contagem das células, foram plaqueados 1×10^5 macrófagos por poço. Em seguida, foram adicionados 0,2 μL de solução de cada composto, em quadruplicata, a fim de que a concentração final do composto em cada poço fosse de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Em poços específicos para os controles foram adicionados 2,5 μL de anfotericina B ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$), 2 μL de DMSO (100%) de modo que a concentração em cada poço atingisse a concentração máxima de 1% de DMSO (bem como para o caso dos compostos sendo avaliados). Além destes, também foram feitos os controles sem tratamento (macrófagos + meio RPMI completo) e o controle com somente Meio RPMI completo por poço. Todos os testes e controles foram realizados em quadruplicata para um volume final de 200 μL por poço.

Após a montagem das placas, estas foram lacradas e incubadas em estufa de CO_2 a 37 °C. Após 23 h, cada placa foi retirada da estufa e foram adicionados 20 μL de resazurina na concentração de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e em seguida a placa voltou para estufa de CO_2 por mais 1 h. Completadas as 24 h em estufa de CO_2 , as placas foram levadas para leitura em espectrofotômetro de microplacas da *Spectramax* M5, em 570 e 600 nm, lidas por 3 horas em intervalos de 1 hora.

4.2.3 Manutenção dos parasitos

As formas promastigotas de *L. braziliensis* da cepa M2904 GFP foram mantidas em garrafas de cultivo de 10 mL em meio Grace's completo (Grace's Insect Medium, Sigma), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) acrescido de *L*-glutamina (2 mmol L^{-1} Serva Electrophoresis & Life Science Products, NY, USA) e penicilina ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ – USB Corporations, Cleveland, OH, USA) a pH 6,5, filtrado em membrana $0,22 \text{ } \mu\text{m}$, mantidos sob incubação em estufa de B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Os repiques foram realizados a cada quatro dias para a manutenção de células viáveis.

4.2.4 Avaliação da atividade leishmanicida em promastigotas de *L. braziliensis*

Partindo-se de um cultivo de quatro dias, transferiu-se seu conteúdo de uma garrafa com 10 mL de cultura, para uma garrafa de 400 mL e adicionaram-se mais 300 mL de meio Grace's completo, a fim de se expandir a concentração de parasitos por mL. Após quatro dias de crescimento, as células foram transferidas para tubos de fundo cônico de 50 mL e levadas a centrifugação em 3000 rpm, por 10 minutos a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 5 mL de meio Grace's completo e realizou-se contagem em Câmara de Neubauer. Em sequência à contagem, promastigotas foram plaqueadas na concentração de 4×10^6 leishmanias/poço. Em seguida os compostos **9a-9k** e **10a-10k** foram adicionados de modo que em cada poço, para um volume final de $200 \text{ } \mu\text{L}$, a concentração do composto fosse de $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. As placas, então, foram lacradas e transferidas para incubação em estufa de B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os compostos foram avaliados somente no período de 24 h. Após 23 h de incubação, adicionaram-se $20 \text{ } \mu\text{L}$ de resazurina na concentração de $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e retornaram para a estufa por mais 1 h. As placas, então, foram lidas em espectrofotômetro de placas da *Spectramax* M5, em 570 e 600 nm, lidas por 3 horas em intervalos de 1 h, na qual voltavam para a estufa. A viabilidade celular foi calculada como descrito anteriormente.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ação dos compostos foi avaliada inicialmente contra macrófagos e os resultados demonstraram que as diamidas **9b**, **9j**, **9k**, **10b**, **10d**, **10f**, **10g**, **10h** e **10k** não exibiram toxicidade para os macrófagos, apresentando taxa de sobrevivência igual ou superior a 80%, sendo alguns destes resultados superiores ao obtido para o controle positivo (SRPIN340 e anfotericina B). De todos estes compostos, destaca-se a diamida **9k** que favoreceu o crescimento de macrófagos em aproximadamente 180%. Já os compostos **9e**, **9g**, **9h**, **9i**, **10a**, **10c**, **10e**, **10j** foram tóxicos para os macrófagos no ensaio de 24 h, com valores de porcentagem de sobrevivência abaixo de 60% (Figura 4.6).

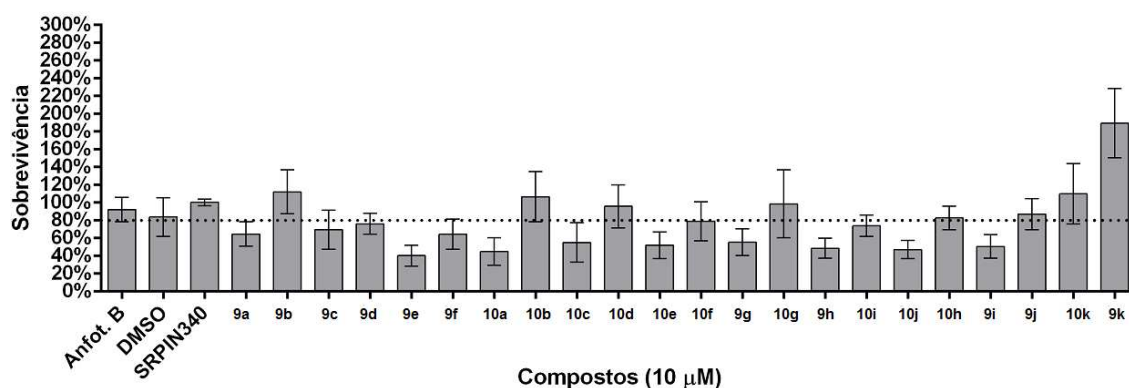


Figura 4.6 – Análise do efeito dos compostos na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ contra macrófagos RAW 264.7.

Segundo Öhnstedt e colaboradores (2019) os macrófagos são importantes para a cicatrização adequada de feridas, uma vez que estes sofrem alterações fenotípicas durante o processo de cicatrização, e deste modo mudam o fenótipo de pró-inflamatório para um fenótipo regulador que promove a restauração tecidual. Com base nesses dados e visto que o composto **9k** foi capaz de estimular o crescimento de macrófagos, este pode ser um candidato para a formulação de uma pomada para a cicatrização de lesões resultantes da manifestação da leishmaniose cutânea. Entretanto, são necessários ensaios biológicos para confirmar esta hipótese.

No ensaio de citotoxicidade em promastigotas de *L. braziliensis* observa-se que todos os compostos avaliados apresentaram taxa de sobrevivência acima de 20%, sendo, portanto menos citotóxicos em relação ao fármaco anfotericina B.

Porém, algumas das diamidas demonstraram maior toxicidade em relação ao SRPIN340 para as formas promastigotas. Apesar dos compostos **9d** (40,14%) e **9e** (38,67%) terem exibido maior citotoxicidade para a forma promastigota estes também foram tóxicos para os macrófagos após 24 h (Figura 4.7).

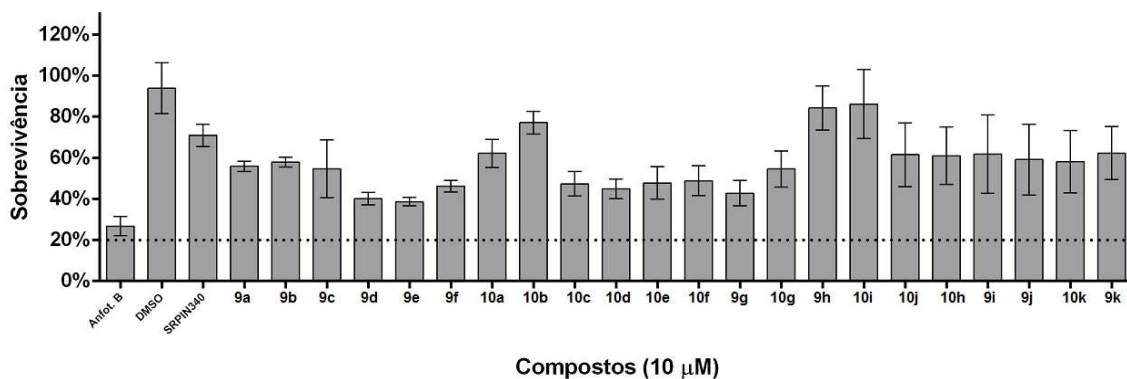


Figura 4.7 - Análise do efeito dos compostos na concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contra promastigotas de *L. braziliensis*.

Os compostos foram avaliados somente em 24 h tanto para a forma promastigota quanto em macrófagos. Outros ensaios estão sendo realizados em maiores tempos de exposição aos compostos, por 48 h ou 72 h. Experimentos com amastigotas também já estão em andamento.

4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-KAMEL, M. A. N. Leishmaniasis and Malignancy: A Review and Perspective. **Clinical Skin Cancer**, v. 2, p. 54-58, 2017.
- BOPP, S. K. e LETTIERI, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. **BMC Pharmacol**, v. 8, p. 8, 2008.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, p. 951-970, 2018.
- CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873-882, 2007.

- CYSNE-FINKELSTEIN, L.; SILVA-ALMEIDA, M.; PEREIRA, B. A. S.; CHARRET, K. S.; BERTHO, A. L.; BASTOS, L. S.; PINTO, L. O.; JUNIOR, F. O. R. O.; PEREIRA, M. C. S.; ALVES, C. R. Evidence of Subpopulations with Distinct Biological Features Within a *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strain. **Protist**, v. 169, p. 107-121, 2018.
- DE SOUZA, A.; MARINS, D. S. S.; MATHIAS, S. L.; MONTEIRO, L. M.; YUKUYAMA, M. N.; SCARIM, C. B.; LOBENBERG, R.; BOU-CHACRA, N. A. Promising nanotherapy in treating leishmaniasis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, p. 421–431, 2018.
- DINIZ, L. F. **Avaliação do efeito do tratamento com benznidazol em combinação com derivados azólicos na infecção por Trypanosoma cruzi**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.
- GITARI, J. W.; NZOU, S. M.; WAMUNYOKOLI, F.; KINYERU, E.; FUJII, Y.; KANEKO, S.; MWAU, M. Leishmaniasis recidivans by *Leishmania tropica* in Central Rift Valley Region in Kenya. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 74, p. 109–116, 2018.
- GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. R. Leishmanione Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.
- HERRERA, G.; HIGUERA, A.; PATINO, L. H.; AYALA, M. S. RAMÍREZ, J. D. Description of *Leishmania* species among dogs and humans in Colombian Visceral Leishmaniasis outbreaks. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 64, p. 135–138, 2018.
- KAPIL, S.; SINGH, P. K.; SILAKARI, O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 339-367, 2018.
- KULSHRESTHA, A.; BHANDARI, V.; MUKHOPADHYAY, R.; RAMESH, V.; SUNDAR, S.; MAES, L.; DUJARDIN, J. C.; ROY, S.; SALOTRA, P. Validation of a simple resazurin-based promastigote assay for the routine monitoring of miltefosine susceptibility in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Parasitology Research**, v. 112, p. 825-828, 2013.

- MIKUS, J.; STEVERDING, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. **Parasitology International**, v. 48, p. 265-269, 2000.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.
- ÖHNSTEDT, E.; TOMENIUS, H. L.; VÅGESJÖ, E.; PHILLIPSON, M. The discovery and development of topical medicines for wound healing. **Expert opinion on drug discovery**, v. 14, p. 485-497, 2019.
- ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, p. 925–932, 2016.
- PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. S10-S18, 2014.
- PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; DE SOUZA-GOMES, M. L.; JÚNIOR, F. E. F. L. Treatment of visceral leishmaniasis and american cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, p. 107-110, 2011.
- PREVIDI, D.; RODRIGUES, S.; COELHO, M. G.; CANDIDO, A. C. B. B.; MAGALHÃES, L. G.; DONATE, P. M. Synthesis and Antileishmanial Activity of Some Functionalized Peptoids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 1334-1340, 2019.
- RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Basel)**, v.12, p.12347-12360, 2012.
- TEIXEIRA, L. F. **Serine-arginine protein kinases (srpks) como potencial alvo de fármacos em *Leishmania braziliensis***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- TONELLI, G. B.; TANURE, A.; REGO, F. D.; CARVALHO, G. M. L.; STUMPP, R.; ÁSSIMOS, G. R.; CAMPOS, A. M.; LIMA, A. C. V. M. R.; GONTIJO, C. M. F.; PAZ, G. F.; FILHO, J. D. A. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in wild small mammals in ecotourism area of Brazil. **Plos One**, v. 12, p. 1-10, 2017.
- VIJAYAKUMARA, S.; DAS, P. Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 181, p. 95–104, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 09 de julho de 2019.

XU, M.; McCANNA, D. J.; SIVAK, J. G. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. **Journal Pharmacological Toxicological Methods**, v. 71, p. 1-7, 2015.

ZAIDI, A.; SINGH, K. P.; ALI, V. *Leishmania* and its quest for iron: An update and overview. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 211, p. 15–25, 2017.

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DAS DIAMIDAS

5.1 INTRODUÇÃO

O contínuo crescimento populacional de seres humanos resultou no aumento da demanda por fibras e alimentos. Para garantir estes produtos em quantidade e qualidade suficiente para suprir a demanda da população, tornou-se necessária o emprego de agroquímicos.

Os agroquímicos vem sendo utilizados pelo homem desde a antiguidade, sendo conhecidos relatos de romanos e gregos a respeito do uso de arsênico e enxofre para controlar insetos (STETTER e LIEB, 2000).

A utilização de agroquímicos reduz consideravelmente as perdas causadas por insetos, plantas daninhas e fungos patogênicos. Estes patógenos e pragas são responsáveis pela redução de até 30% no rendimento das culturas em todo o mundo (SHANG *et al.*, 2019). Apesar de sua importância, no final da década de 1950 observou-se que a utilização de forma indiscriminada destes agentes de controle de pragas na agricultura resultava em problemas ambientais tais como rápida evolução de resistência dos organismos alvos aos agroquímicos, contaminação do lençol freático e acúmulo de resíduos em plantas, no solo, animais e, principalmente, em tecidos humanos, colocando em risco a saúde dos agricultores (VELASCO e CAPANEMA, 2006). Porém, os agroquímicos continuam sendo uma ferramenta extremamente importante para o controle de diversas pragas e doenças na agricultura.

Embora importantes avanços tenham sido alcançados no controle químico de diversas pragas, existe uma demanda contínua por novos produtos mais seletivos, com diferentes mecanismos de ação, mais ativos e que causem menor impacto ambiental (DUKE, 2010).

Além dos fatores citados anteriormente, o surgimento crescente de novos insetos, plantas daninhas e fungos torna necessária a busca por novas moléculas a fim de controlar esses organismos (BARBOSA, 2004). A mosca *Drosophila suzukii* é um exemplo de uma nova praga que tem se disseminado rapidamente por países da Europa e das Américas.

Drosophila suzukii, também comumente denominada de Drosófila de asa manchada ou mosca da cereja, é um inseto de tamanho médio, com comprimento de corpo de 2 a 3 mm, possui olhos vermelhos e cor corporal variando entre marrom e amarelo. Os machos podem ser facilmente reconhecidos pela presença de manchas escuras nas asas enquanto que as fêmeas não possuem esta característica e apresentam um ovopositor grande e serrilhado (Figura 5.1) (DREVES *et al.*, 2009).



Figura 5.1 – Fêmea e macho de *Drosophila suzukii*, respectivamente.

Fonte: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/33744019/como-combater-a-praga-do-morango-drosophila-suzukii>. Acesso em: 10/10/2019.

Esta praga possui alta capacidade reprodutiva, um ciclo de vida curto, inimigos naturais limitados e sua oviposição pode chegar a 25 ovos por dia, dependendo da temperatura. A temperatura é um fator importante no desempenho reprodutivo da *D. suzukii*, a praga costuma estar mais ativa em temperaturas amenas, 20 a 25 °C, e sua atividade diminui em temperaturas fora dessa faixa (DA SILVA *et al.*, 2019; ASPLEN *et al.*, 2015).

D. suzukii foi primeiramente descrita em 1931 por Matsumura e relatada como praga em 1939 por Kanzawa no Japão. Desde 2008 tem se estabelecido como uma praga devastadora e invasiva na América do Norte e Europa. Por se tratar de um inseto políforo vem ocasionando grandes danos econômicos em frutíferas, principalmente em pequenos frutos de casca fina como o morango, cereja, uva, ameixa, caqui, amora, framboesa, mirtilo (*blueberry*) e o figo (ANDREAZZA *et al.*, 2017; ANDREAZZA *et al.*, 2016; JAPOSHVILI *et al.*, 2018).

O primeiro registro desta praga no Brasil ocorreu em 2013. Frutos de morangueiros do Município de Vacaria, Rio Grande do Sul, foram danificados ocorrendo prejuízo de até 30% na produção. Além do Sul do país, na região Sudeste, especificamente em São Paulo, a mosca *D. suzukii* foi encontrada em frutas de mirtilo comercializadas em um centro atacadista. Em Minas Gerais e no Rio de Janeiro foi observada em campos de morango e em um trecho de Mata Atlântica nativa, respectivamente. Há registros também na região Central, Brasília, onde esta espécie foi localizada em uma reserva natural de cerrado (BENITO *et al.*, 2016; ANDREAZZA *et al.*, 2017).

Os danos ocasionados pela *D. suzukii* são classificados em primário e secundário. No primário, pelo fato das fêmeas possuírem um ovopositor serrilhado, elas são capazes de penetrar na epiderme de frutas de casca fina, depositando posteriormente os ovos sob a cicatriz da oviposição. Em seguida, ocorre o desenvolvimento larval (três ínstaras) onde se alimentam da polpa do fruto, levando ao colapso do tecido da fruta. Os danos secundários às frutas podem ocorrer posteriormente ao dano primário, uma vez que após a formação de orifícios de oviposição as frutas ficam expostas a outros patógenos, como bactérias, leveduras e fungos. Além disso, outras espécies de drosófilas podem se associar aos danos já ocasionados pela *D. suzukii* acelerando a decomposição do fruto, o que impede o seu consumo e comercialização e resultando, conseqüentemente, em prejuízos econômicos (ASPLEN *et al.*, 2015; KINJO *et al.*, 2014).

Diante dos diversos problemas ocasionados pela *D. suzukii* que foram descritos anteriormente, e o fato de ainda não existir registro de inseticida eficiente em seu controle, observa-se a necessidade de realizar pesquisas que objetivem a busca por novos inseticidas para o controle desta espécie. Porém, um dos grandes desafios relacionado à prospecção de novos inseticidas para esta mosca consiste na resistência das larvas aos pesticidas, uma vez que estão bem protegidas sob a casca do fruto (CARRAU *et al.*, 2018).

Na pesquisa por compostos químicos eficientes que possam vir a atuar como inseticidas comerciais destaca-se a classe das diamidas. As diamidas consistem na mais nova classe de agentes de proteção de cultura que possuem ação contra insetos fitófagos, sendo capazes de controlar um amplo espectro de pragas, além de serem eficientes no combate de organismos alvo, possuírem perfil toxicológico

satisfatório e apresentarem baixa toxicidade para as espécies de mamíferos (GNAMM *et al.*, 2012; TEIXEIRA e ANDALORO, 2013; LIU *et al.*, 2016).

Atualmente as diamidas são caracterizadas em antranílicas e derivadas do ácido ftálico. O primeiro inseticida da classe das diamidas registrado consistiu na flubendiamida (Figura 5.2), derivada do ácido ftálico e desenvolvida por Nihon Nohyaku juntamente com a Bayer. Posteriormente à descoberta desta diamida, os compostos clorantraniliprole e ciantraniliprole (Figura 5.2), derivados do ácido antranílico, passaram a ser comercializados pelas empresas DuPont e Syngenta (CUI *et al.*, 2017; TEIXEIRA e ANDALORO, 2013).

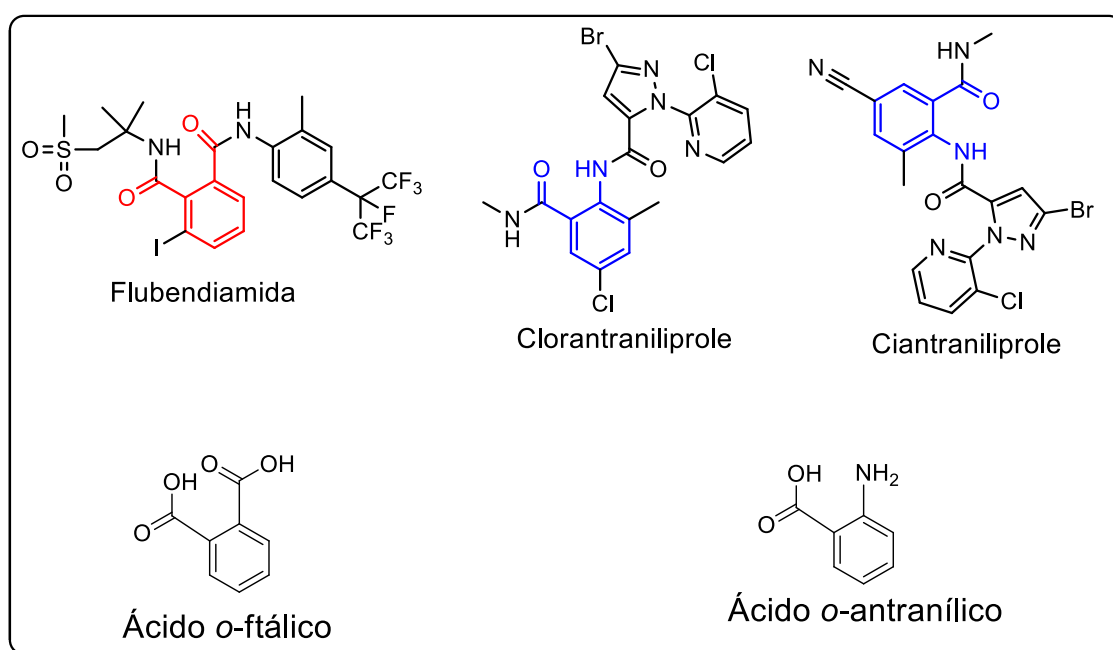


Figura 5.2 – Estrutura dos inseticidas comerciais flubendiamida (diamida ftálica), clorantraniliprole e ciantraniliprole (diamidas antranílicas). Nas estruturas dos inseticidas estão destacadas as porções derivadas do ácido ftálico (em vermelho na estrutura da flubendiamida) e do ácido antranílico (em azul nas estruturas do clorantraniliprole e ciantraniliprole). As estruturas dos ácidos o-ftálico e o-antranílico também são apresentadas.

Com relação ao mecanismo de ação das diamidas, sabe-se que o inseticida aplicado é absorvido e chega até o conjunto de fibras musculares do inseto se ligando aos receptores de rianodina (RyR). Em seguida, a diamida ativa os receptores de rianodina, resultando na liberação descontrolada de reservas de cálcio do retículo sarcoplasmático no citoplasma. Uma vez que o cálcio está envolvido em

vários processos celulares ocorre, consequentemente, a interrupção da alimentação, letargia, paralisia contrátil e morte dos insetos (CUI *et al.*, 2017; AGROBAYER, 2019).

Devido à eficiência e seletividade das diamidas, diversos pesquisadores ao redor do mundo tem buscado a obtenção de novos compostos químicos que possuam esta unidade estrutural. Descrevem-se abaixo alguns exemplos publicados.

Li e colaboradores em 2019 realizaram a síntese de novas diamidas antranílicas e avaliaram suas atividades inseticidas. Os resultados demonstraram que grande parte das diamidas apresentou moderada a significativa atividade contra a lagarta oriental (*Mythimna separata*) e a mariposa diamante (*Plutella xylostella*). Os compostos **(h)** e **(i)** (Figura 5.3) exibiram 100% de atividade larvica na concentração de 1 mg L⁻¹, resultado este semelhante ao obtido para o controle positivo (clorantraniliprole) nesta mesma concentração. Na avaliação contra a mariposa de diamante, o composto **(i)** exibiu 60% de atividade inseticida na concentração de 0,01 mg L⁻¹, demonstrando maior eficácia em comparação ao controle positivo.

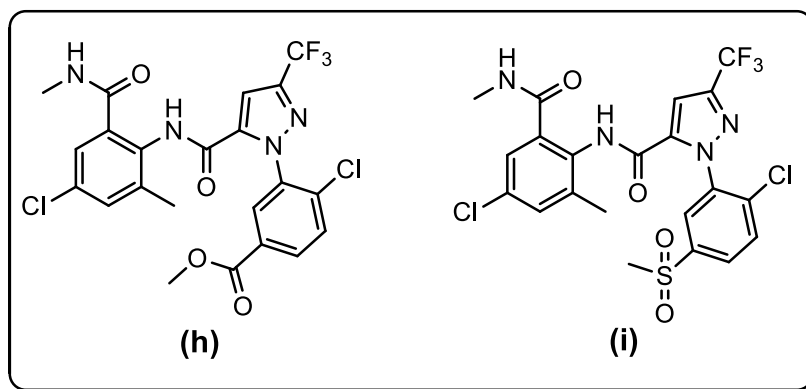


Figura 5.3 – Estrutura das diamidas antranílicas sintetizadas por Liu e colaboradores (2019).

Em 2011, Feng e colaboradores descreveram a síntese de 31 novas diamidas ftálicas e concomitantemente a avaliação de suas atividades inseticidas contra *Plutella xylostella*. Na maior concentração avaliada, 100 µg mL⁻¹, cinco desses compostos apresentaram mortalidade de 100%. Já na concentração de 10 µg mL⁻¹ o composto **(j)** (Figura 5.4, pg. 199) foi o que apresentou maior taxa de mortalidade

(91%). Porém, este valor foi inferior ao obtido pelo inseticida comercial flubendiamida (100% de mortalidade).

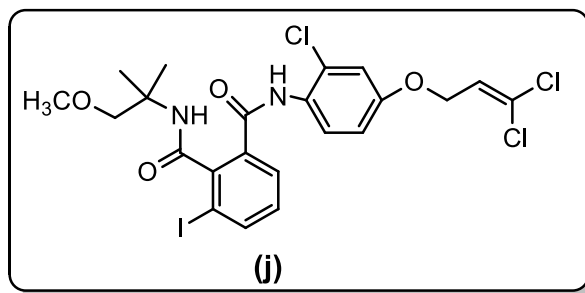


Figura 5.4 – Estrutura do composto mais ativo na menor concentração avaliada contra *Plutella xylostella* conforme descrito por Feng e colaboradores (2011).

Conforme observado neste capítulo, as diamidas têm emergido como uma importante classe de inseticidas. Dentro deste contexto e buscando encontrar um novo ingrediente ativo capaz de atuar no controle da mosca *D. suzukii*, realizou-se a avaliação da atividade inseticida das diamidas sintetizadas no presente trabalho.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação da atividade inseticida das 20 diamidas (**9a-9k**; **10a-10g**, **10i** e **10k**) contra *D. suzuki*, realizou-se o bioensaio de ingestão/contato. Primeiramente, as diamidas foram diluídas em água destilada (20% m v⁻¹ de açúcar) e dimetilsulfóxido (5% v v⁻¹) na concentração de 1000 ppm. Como controle positivo, foi utilizada uma substância de efeito inseticida conhecido (imidacloprida) na mesma concentração; como controle negativo foi utilizada solução aquosa 20% m v⁻¹ de açúcar e 5% v v⁻¹ de DMSO. Em seguida, um rolete de algodão foi colocado em cada frasco de vidro de 200 mL (n=4) e embebido com 1,8 mL de cada composto diluído, cada frasco foi vedado com uma espuma e recebeu 25 moscas cada. O bioensaio foi conduzido em condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), fotoperíodo (12:12 h claro/escuro) e humidade (55 ± 10%). Após 24 h, a mortalidade dos insetos foi avaliada (por exemplo, insetos que não conseguiam se locomover duas vezes a distância do próprio corpo após estímulo foram considerados mortos).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio de avaliação da atividade inseticida das diamidas (**9a-9k**; **10a-10g**, **10i** e **10k**) contra *D. suzukii* foi realizado em quadruplicata e os dados da porcentagem de mortalidade estão expressos em média. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.5. Observa-se que as diamidas avaliadas apresentaram menor toxicidade para as moscas de *D. suzukii* em relação ao produto comercial utilizado como controle positivo (imidacloprida). Das diamidas avaliadas os compostos **10a**, **10e** e **10f** foram os que exibiram maior potencial inseticida, com valores de porcentagem de mortalidade média de $(9,92 \pm 2,04)$, $(9,05 \pm 2,38)$ e $(9,53 \pm 0,63)$, respectivamente.

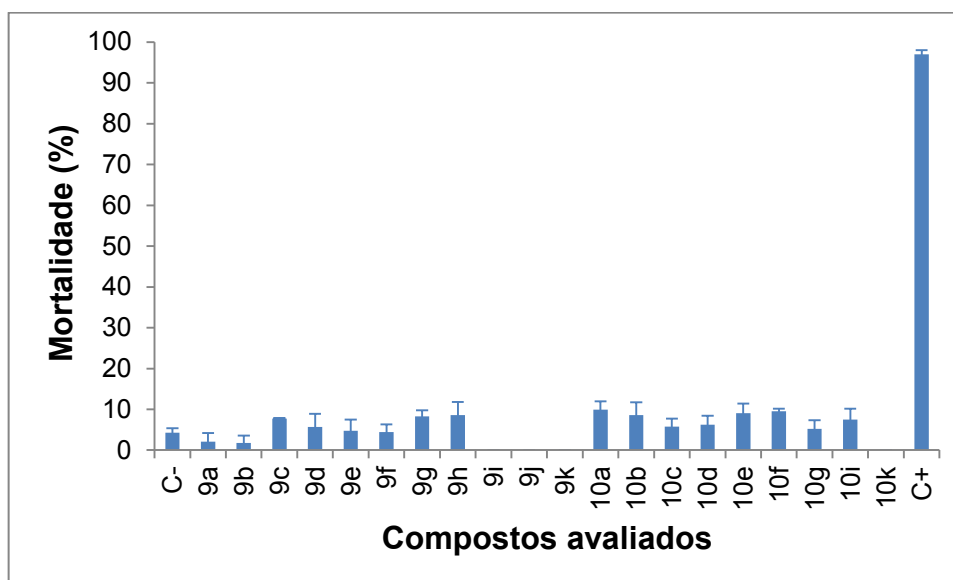


Figura 5.5 - Mortalidades de adultos de *Drosophila suzukii* em bioensaio de ingestão/contato por 24h de exposição. Insetos considerados mortos quando não conseguiam se locomover duas vezes a distância do próprio corpo após estímulo. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. C- = controle negativo (solução aquosa 20% m v⁻¹ de açúcar e 5% v v⁻¹ de DMSO). C+ = controle positivo (imidacloprida).

Os resultados não permitiram estabelecer uma correlação entre estrutura química e atividade inseticida dos compostos, o que poderia auxiliar na investigação

de possíveis alterações nas estruturas das diamidas sintetizadas levando ao aumento da eficácia destes sobre *D. suzukii*.

Apesar dos resultados não terem sido expressivos é importante ressaltar que não existem registros na literatura sobre a avaliação inseticida de diamidas inspiradas na substância SRPIN340. Há apenas um registro de atividade agroquímica de moléculas análogas ao SRPIN340, que foi descrito por Teixeira e colaboradores em 2017, e trata da avaliação *in vitro* do efeito das amidas sintetizadas sobre o transporte de elétrons fotossintético.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho impulsionam a continuação de pesquisas por moléculas com maior potencial inseticida. Tomando como inspiração cita-se o artigo publicado por Jeschke e Nauen em 2008. Neste trabalho descreve-se todo o processo envolvido na otimização estrutural para a obtenção do inseticida comercial imidacloprida. Inicialmente foi avaliada a atividade inseticida do composto 2-(dibromonitrometil)-3-metilpiridina e este demonstrou baixo efeito inseticida contra moscas domésticas (*Musca domestica* L.) e pulgões de ervilha (*Acyrtosiphum pisum* Harris). A partir da estrutura deste heterociclo foram realizadas inúmeras modificações estruturais, sendo necessária a síntese de cerca de 2000 compostos para chegar à obtenção do inseticida imidacloprida.

Este capítulo retrata o primeiro ensaio inseticida para diamidas inspiradas na estrutura do composto SRPIN340. A partir desses resultados, modificações nas estruturas das diamidas podem ser racionalizadas com a finalidade de obtenção de moléculas mais ativas.

5.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROBAYER, 2019. Disponível em: <https://www.agro.bayer.com.br/conteudos/news-ucket/2019/01/15/11/42/como-funcionam-as-diamidas>. Acesso em: 10/10/2019.

ANDREAZZA, F.; BERNARDI, D.; BOTTON, M.; NAVA, D. E. *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in Peaches: is it a problem? **Scientia Agricola**, v. 74, p. 489-491, 2016.

ANDREAZZA, F.; BERNARDI, D.; DOS SANTOS, R. S. S.; GARCIA, F. R. M.; OLIVEIRA, E. E.; BOTTON, M.; NAVA, D. E. *Drosophila suzukii* in Southern

- Neotropical Region: Current Status and Future Perspectives. **Neotropical Entomology**, v. 46, p. 591-605, 2017.
- ASPLEN et al. Invasion biology of spotted wing Drosophila (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. **Journal of Pest Science**, v. 88, p. 469-494, 2015.
- BARBOSA, L. C. A. **Os Pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: Editora UFV, p. 55, 2004.
- BENITO, N. P.; DA SILVA, M. L.; DOS SANTOS, R. S. S. Potential spread and economic impact of invasive *Drosophila suzukii* in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 571-578, 2016.
- CARRAU, T.; HIEBERT, N.; VILCINSKAS, A.; LEE, K-Z. Identification na characterization of natural viroses associated with the invasive insect pest *Drosophila suzukii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 154, p. 74-78, 2018.
- CUI, F.; CHAI, T.; QIAN, L.; WANG, C. Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 169, p. 107-116, 2017.
- DA SILVA, C. S. B.; PARK, K. R.; BLOOD, R. A.; WALTON, V. M. Intraspecific Competition Affects the Pupation Behavior of Spotted-Wing Drosophila (*Drosophila suzukii*). **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-9, 2019.
- DREVES, A. J.; WALTON, V.; FISHER, G. A New Pest Attacking Healthy Ripening Fruit in Oregon. **Spotted wing Drosophila: *Drosophila suzukii* (Matsumura)**. **EM 8991**, 2009. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/083e/67e10224fd70f64bf991b869732ae9d2075d.pdf>. Acesso em: 10/10/2019.
- DUKE, S. O. Herbicide and pharmaceutical relationships. **Weed Science**, v. 58, p. 334-339, 2010.
- FENG, M-L.; LI, Y-F.; ZHU, H-J.; NI, J-P.; XI, B-B.; ZHAO, L. Design, synthesis, insecticidal activity and structure–activity relationship of 3,3-dichloro-2-propenyloxy-containing phthalic acid diamide structures. **Pest Management Science**, v. 68, p. 986-994, 2012.

- JASPOSHVILI, G.; DZNELADZE, N.; KIRKITADZE, G.; KISS, B.; KAYDAN, M. B. A new and dangerous pest for the Caucasus – *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae). **Annals of Agrarian Science**, v. 16, p. 464-465, 2018.
- JESCHKE, P.; NAUEN, R. Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry. **Pest Management Science**, v. 64, p. 1084-1098, 2008.
- KINJO, H.; KUNIMI, Y.; NAKAI, M. Effects of temperature on the reproduction and development of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 49, p. 297-304, 2014.
- LI, F-Y.; WANG, Y-H.; LIU, J-B.; LI, Y-X.; LI, Z-M. Synthesis, insecticidal evaluation and mode of action of novel anthranilic diamide derivatives containing sulfur moiety as potential ryanodine receptor activators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 769-776, 2019.
- LIU, Y.; LEI, C.; XU, X-Y.; SHAO, X-S.; LI, Z.; Design, synthesis and insecticidal activity of biphenyl-diamide. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, p. 321-324, 2016.
- SHANG, X-F.; ZHAO, Z-M.; LI, J-C.; YANG, G. Z.; LIU, Y-Q.; DAI, L-X.; ZHANG, Z-J.; YANG, Z-G.; MIAO, X-L.; YANG, C-J.; ZHANG, J-Y. Insecticidal and antifungal activities of *Rheum palmatum* L. anthraquinones and structurally related compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 508-520, 2019.
- STETTER, J.; LIEB, F. Innovation in crop protection: Trends in research. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, p. 1724-1744, 2000.
- TEIXEIRA, L. A.; ANDALORO, J. T. Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, p. 76-78, 2013.
- TEIXEIRA, R. R.; BARROS, M. V. A.; BRESSAN, G. C.; SIQUEIRA, R. P.; DOS SANTOS, F. S.; BERTAZZINI, M.; KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C.; FORLANI, G. Synthesis, theoretical studies, and effect on the photosynthetic electron transport of trifluoromethyl arylamides. **Pest Management Science**, v. 73, p. 2360-2371, 2017.
- VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L.; **O setor de agroquímicos. BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, p. 69-96, 2006.

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DAS DIAMIDAS INSPIRADAS NO SRPIN340

6.1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, consiste em uma doença parasitária causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Figura 6.1, pg. 205). Em 1909, o agente etiológico, o vetor e o modo de ação desta doença foram descritos pelo brasileiro Carlos Chagas que também nomeou o agente etiológico *T. cruzi* em homenagem ao seu mentor, Oswaldo Cruz (NUNES *et al.*, 2013).

A doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada, e embora seja endêmica em vinte e um países da América Latina (WHO, 2017), ela se tornou, nas últimas décadas, um problema global devido ao crescente movimento migratório (SCHIMUNIS e YADON, 2010; MOURE *et al.*, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2019), estima-se que 6-7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas e que 75 milhões estejam em risco de infecção, principalmente nos países latino-americanos.

Uma das principais formas de transmissão da doença de Chagas, aproximadamente 80%, ocorre por meio da picada de insetos triatomíneos hematófagos infectados. *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são espécies conhecidas como barbeiro (Figura 6.1, pg. 205), e consistem nos transmissores mais comuns. Durante ou imediatamente após os insetos se alimentarem do sangue do hospedeiro, esses depositam fezes sobre a pele, eliminando nelas a forma infectante, tripomastigota metacíclica, do *T. cruzi*. O ato de coçar o local da picada ou o contato da mão infectada em mucosas (olhos e boca), por exemplo, pode resultar em penetração dos protozoários que interagem com o sistema monofagocitário, se multiplicam e eventualmente atingem a corrente sanguínea do hospedeiro. Outras formas de transmissão da doença incluem a transfusão de sangue, recepção de órgãos transplantados de doadores infectados, ingestão de alimentos contaminados com fezes de barbeiros infectados e a

transmissão congênita (de mãe para filho) (FIDALGO *et al.*, 2018; NUNES *et al.*, 2013; GUARNER, 2019; FIOCRUZ).

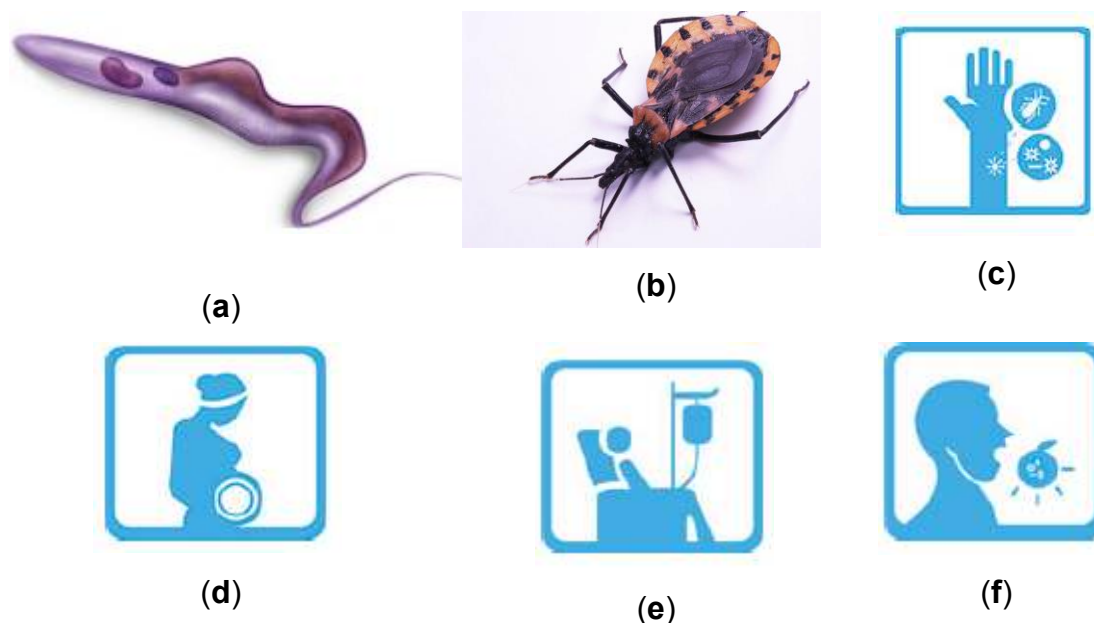


Figura 6.1 – Doença de Chagas: (a) agente etiológico, o parasito *T. cruzi*; (b) barbeiro, o inseto vetor; (c) transmissão por vetor; (d) transmissão de mãe para filho; (e) transmissão por transfusões de sangue ou transplantes de órgãos sem o devido controle; (f) transmissão por ingestão oral de alimentos contaminados.

Fontes: <https://drauziovarella.uol.com.br/doencas-e-sintomas/doenca-de-chagas/>. Acesso em: 20/11/2019; <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>. Acesso em: 20/11/2019.

Na região Norte do Brasil, o consumo de frutos contaminados com *T. cruzi*, como por exemplo, o açaí e a cana-de-açúcar (maceração de barbeiros com o fruto), é a principal causa de transmissão por via oral (FUJITA *et al.*, 2019). Este modo de transmissão resulta em curso clínico mais grave e maior taxa de mortalidade (ANTUNES *et al.*, 2016).

A doença de Chagas se divide em duas fases: a fase aguda e a fase crônica. Durante a fase aguda, que pode evoluir naturalmente para a fase crônica, geralmente os pacientes permanecem assintomáticos ou podem apresentar sintomas clínicos não específicos (PRATA, 2001), retardando o diagnóstico e consequentemente o tratamento (ORTIZ *et al.*, 2019). Em sua fase crônica, a

doença de Chagas pode se apresentar sobre a forma indeterminada (sem sinais e sintomas), forma cardíaca, forma intestinal ou ainda forma mista. A forma cardíaca é de destaque, pois pode ocasionar alterações cardíacas graves como cardiopatia chagásica crônica na qual há arritmias, bradicardia, edemas e pode ocasionar morte súbita. A forma intestinal acomete principalmente esôfago e cólon causando diminuição da motilidade, secreção e absorção nos órgãos, dificultando a alimentação, nutrição e eliminação de fezes dos acometidos. A forma mista envolve ocorrência das formas clínicas cardíaca e intestinal simultaneamente (PRATA, 2001; RASSI Jr *et al.*, 2010).

Devido às sérias consequências das manifestações da fase crônica desta patologia, fica evidente a necessidade da intervenção terapêutica logo nos primeiros sintomas da doença, a fim de combater o parasito, impedir a progressão da doença e evitar a transmissão para indivíduos saudáveis. Atualmente, existem apenas dois fármacos para o tratamento da doença de Chagas, o benzonidazol e o nifurtimox (Figura 6.2). Entretanto estes são eficazes apenas na fase aguda e fase crônica recente (até 10 anos pós-infecção) da doença, enquanto a grande maioria dos casos é diagnosticada já na fase crônica tardia. Além da eficácia limitada, ambos os fármacos apresentam efeitos colaterais importantes. O nifurtimox pode causar anorexia, alterações psíquicas, náuseas, vômitos e ocasionalmente cólicas intestinais. Já o benzonidazol pode gerar hipersensibilidade, dermatites, edema generalizado, linfadenopatia, depressão da medula óssea, púrpura trombocitopênica, além da manifestação mais grave, a saber, parestesia e polineurite dos nervos periféricos. Somado a isso, existem evidências de resistência natural de cepas do parasito ao tratamento com esses medicamentos (COURA e CASTRO, 2002; BRENER *et al.*, 1976; FILARDI e BRENER, 1987; ANDRADE e MAGALHÃES, 1997; DE LANA *et al.*, 1998; REVOLLO *et al.*, 1998; TOLEDO *et al.*, 2002).

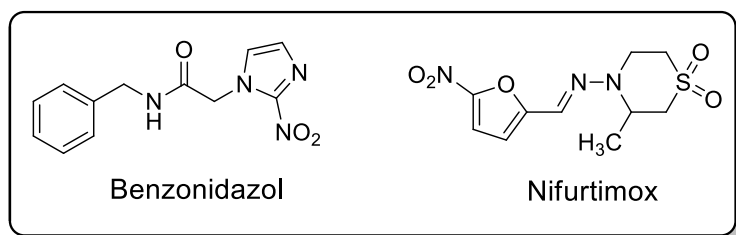


Figura 6.2 – Estruturas dos fármacos Benzonidazol e Nifurtimox.

Devido aos problemas relacionados às alternativas terapêuticas disponíveis atualmente para o tratamento da doença de Chagas, aliado ao fato de ainda não existir uma vacina eficiente para o seu controle, torna-se necessário à busca por novos compostos mais eficazes, com menores efeitos colaterais e mais seletivos para serem empregados no seu tratamento. Ao longo deste trabalho foram abordadas as diversas aplicações biológicas das amidas, e desta forma pode-se pensar na utilização de compostos que contenham esta porção estrutural como possíveis agentes tripanocidas. Trabalhos científicos que suportam essa hipótese são apresentados a seguir.

Álvarez e colaboradores em 2015 sintetizaram derivados tiazólicos contendo o grupamento amida e avaliaram o seu efeito contra *T. cruzi*. Os resultados *in vitro* demonstraram que o composto **k** (Figura 6.3) apresentou elevada atividade contra epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas intracelulares e excelente seletividade. Nos ensaios *in vivo* foi observado que **k** foi capaz de reduzir a parasitemia no sangue de camundongos de maneira tão eficaz quanto o fármaco benzonidazol. Desta forma, este derivado tiazólico pode ser considerado um promissor candidato a quimioterápico para o tratamento da doença de Chagas.

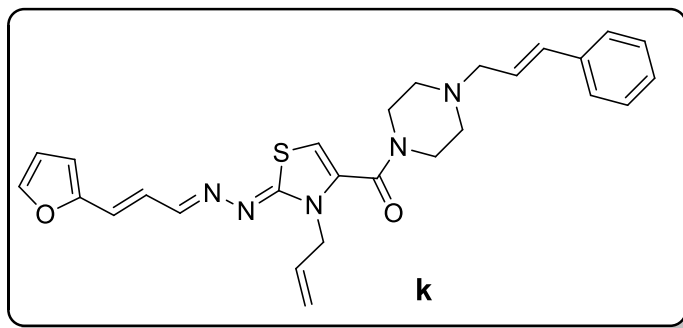
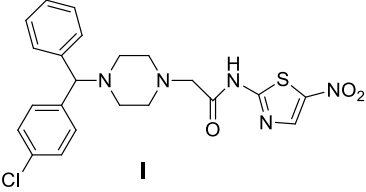
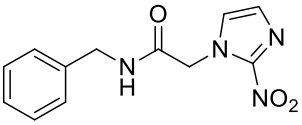


Figura 6.3 – Estrutura do derivado tiazólico **k** contendo o grupamento amida que apresentou eficácia contra *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (ÁLVAREZ *et al.*, 2015).

Em 2016, Papadopoulou e colaboradores também realizaram a síntese de tiazóis contendo porções amida e avaliaram a atividade destes compostos contra *T. cruzi*. Apenas um dos derivados, o composto (**l**), apresentou efeito promissor contra formas amastigotas de *T. cruzi*, demonstrando ser 4 vezes mais potente que o medicamento benzonidazol, conforme pode ser observado na Tabela 6.1 (pg. 208).

Tabela 6.1 – Valores de IC₅₀ do composto mais ativo (I) e do fármaco comercial benzonidazol avaliados contra formas amastigotas de *T. cruzi* (PAPADOPOULOU *et al.*, 2015)

Composto	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)
 I	0,571
 Benzonidazol	2,20

Diante da necessidade do desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas e levando em conta os relatos da literatura de avaliação da atividade tripanocida de amidas, são descritos neste capítulo os resultados obtidos com respeito à avaliação desta atividade para as diamidas **9a-9k** e **10a-10k**.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Ensaio com *T. cruzi* transfectado com β-galactosidase

Para avaliar a atividade das substâncias **9a-9k** e **10a-10k** foi feita uma triagem inicial adicionando cada composto a um meio com células infectadas por *T. cruzi*. Os compostos foram diluídos em DMSO 1% e a concentração utilizada para esta avaliação inicial foi de 20 μg mL⁻¹. O ensaio se baseia no descrito por Romanha e colaboradores (2010), modificado e padronizado na plataforma de ensaios pré-clínicos de triagem de drogas anti-*Trypanosoma cruzi* (PlaBio Tc) (RPT11F) do Instituto René Rachou, Fiocruz Minas Gerais.

Para tal, 1x10⁴ células da linhagem L929 (fibroblastos de camundongo) foram semeadas em placas de estireno de 96 poços em meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich) suplementado e incubadas por 24 h a 37 °C para permitir a adesão das

células. Após aderidas, as células foram infectadas na proporção 1:10 com tripomastigotas da cepa Tulahuen transfectados com β -galactosidase (BUCKNER *et al*, 1996; BETTIOL *et al*, 2009). As células foram mantidas em presença de parasitos por 2 h e após este período elas foram lavadas com solução de PBS (tampão fosfato-salino) e mantidas a 37 °C em estufa sob tensão de 5% de CO₂ por 48 h para a multiplicação da forma amastigota intracelular.

Após 48 h foram adicionadas as substâncias **9a-9k** e **10a-10k** (cada composto na concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e as culturas foram novamente incubadas em estufa por 96 h a 37 °C. Após este período, o sobrenadante foi removido, acrescentou-se um novo meio de cultura RPMI sem vermelho de fenol, e adicionou-se o substrato vermelho de clorofenol β -D-galactopiranosídeo (CPRG, Roche) para a enzima transfectada em *T.cruzi*. Procedeu-se a novo período de incubação em estufa (37 °C e 5% de tensão de CO₂) por 20 h. Por fim, realizou-se leitura em espectrofotômetro a 570 nm.

A partir dessa primeira triagem, compostos com indicativo de atividade tripanocida foram selecionados. O ensaio descrito anteriormente foi repetido para maior número de concentrações dos compostos ativos, utilizando-se da interpolação linear para determinação da concentração efetiva para eliminar 50% da infecção celular (IC₅₀) em relação às células infectadas não tratadas.

6.2.2 Avaliação de citotoxicidade

Células da linhagem L929 (1×10^4) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h em meio RPMI, em estufa sob tensão de 5% de CO₂ a 37 °C, para adesão. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e os compostos avaliados foram adicionados em diferentes concentrações e as células foram novamente incubadas por 96 h. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi removido e em cada poço foram adicionados 20 μL de solução 1 mmol L⁻¹ do corante Alamarblue[®] (Invitrogen, Thermofisher) e as células foram novamente incubadas por cerca de 6 h. Ao término deste período, procedeu-se à leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 570 e 600 nm. Como controles foram utilizados o fármaco de referência (benzonidazol) nas mesmas concentrações que as demais substâncias, meio de cultura (controle não tratado) e solução de KCl 3

mol L⁻¹ como controle de morte celular. A porcentagem de inibição da proliferação celular induzida pelas substâncias foi calculada utilizando-se a equação seguinte:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado} / A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle+}] \times 100$$

onde A570 corresponde à absorbância a 570nm; A600 corresponde à absorbância a 600nm; Controle + é o poço contendo células, meio de cultivo celular e Alamarblue, na ausência do fármaco; e R0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (C-), ou seja, apenas meio de cultura e Alamarblue[®] na ausência de células [R0 = (A570/A600) C-].

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relativos às avaliações das atividades tripanocida e citotóxica em células L929 das diamidas **9a-9k** e **10a-10k** são apresentadas na Tabela 6.2 (pg. 211-212). Nesta mesma tabela também são apresentados os índices de seletividade.

Tabela 6.2 - Resultados da avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* em células L929 infectadas com cepa Tulahuen transfectada com β -galactosidase, citotoxicidade em células L929 e índice de seletividade

Substância	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Atividade ¹ (%)	IC ₅₀ sobre o parasita ² ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	IC ₅₀ sobre L929 ³ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Índice de Seletividade ⁴
9a	20	11	Inativo	-	-
	10				
9b	20	58	13,9 $\pm$ 5,5	> 80	> 5,8
	10	22			
	5	13			
9c	20	68	5,9	> 160	> 27,1
	10	68			
	5	46			
9d	20	16	Inativo	-	-
9e	20	3	Inativo	-	-
9f	20	12	Inativo	-	-
9g	20	32	> 20	-	-
	10	21			
9h	20	82	10	> 320	> 32
	10	50			
9i	20	6	Inativo	-	-
9j	20	90	4,3	> 320	> 74,4
	10	75			
	5	64			
9k	20	38	> 20	-	-
	10	27			

Tabela 6.2 – Cont.

Substância	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Atividade ¹ (%)	IC ₅₀ sobre o parasita ² ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	IC ₅₀ sobre L929 ³ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Índice de Seletividade ⁴
	20	100			
10a	10	91	9,3 $\pm$ 3,5	< 40	< 4,3
	5	13			
10b	20	4	Inativo	-	-
10c	20	0	Inativo	-	-
10d	20	9	Inativo	-	-
10e	20	21	Inativo	-	-
10f	20	32			
	10	12	> 20	-	-
	20	62			
10g	10	34	11,5 $\pm$ 4,4	44	3,8
	5	0			
10h	20	99*			
	10	48	10,4	> 20	> 1,9
	20	100			
10i	10	83	7,5	< 40	< 5,3
	5	16			
10j	20	83			
	10	18	14,9	> 20	> 1,3
	20	79			
10k	10	49	12,4 $\pm$ 2,3	< 40	< 3,2
	5	21			
Benzonidazol					
Valores médios padronizados	3,81 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	-	3,81 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	2.381 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	625

¹ Porcentagem de redução das formas amastigotas e tripomastigotas sob ação do composto.

² Concentração do composto que reduz em 50% o crescimento parasitário.

³ Concentração do composto que induz 50% de morte celular.

⁴ IC₅₀ do composto sobre as células dividido pelo IC₅₀ do composto sobre o parasita.

Os valores de IC₅₀ foram calculados através de interpolação linear.

※ ~ 100% de morte das células hospedeiras L929.

Observa-se que dez das diamidas inspiradas no SRPIN340 (**9b**, **9c**, **9h**, **9j**, **10a**, **10g**, **10h**, **10i**, **10j** e **10k**) apresentaram valor de IC₅₀ (sobre o parasita) menor do que 15 µmol L⁻¹. Dentre estes, os compostos **9c**, **9h** e **9j** exibiram os resultados mais promissores com valores de IC₅₀ = 4,3 µmol L⁻¹, IC₅₀ = 10,0 µmol L⁻¹ e IC₅₀ = 5,9 µmol L⁻¹. Na avaliação da citotoxicidade sobre L929, estes compostos exibiram valores de IC₅₀ de 160 µmol L⁻¹ (**9c**) e 320 µmol L⁻¹ (**9h** e **9j**). Comparando estes resultados com os obtidos para o controle positivo, o fármaco benzonidazol, percebe-se que as diamidas **9c**, **9h** e **9j** são menos eficazes. Entretanto, **9j** apresentou o maior valor de índice de seletividade (IS = 74,4) em relação a todas as diamidas avaliadas.

Com relação às estruturas químicas dessas três diamidas mais ativas (Figura 6.4), constata-se que estas apresentam em comum o fato de possuírem um grupo metileno (-CH₂) conectando os dois grupamentos amida. Outra observação é que o composto mais promissor, **9j**, possui o grupo 4-metoxifenila em sua estrutura, indicando que possivelmente este grupo possa ser responsável pelo incremento na atividade anti-*T. cruzi*.

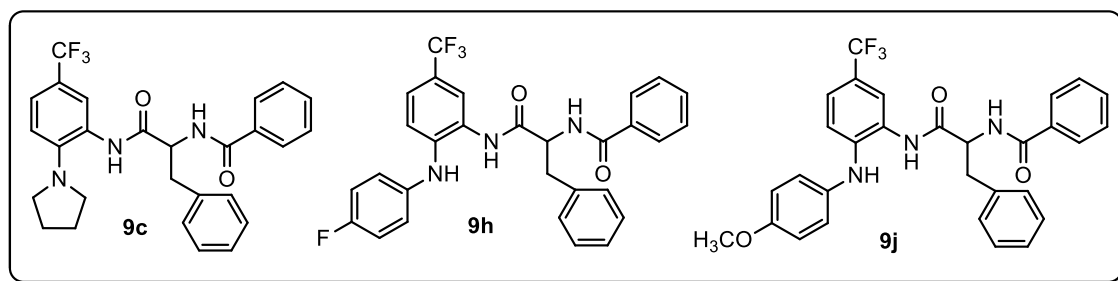


Figura 6.4 – Estruturas das diamidas inspiradas no SRPIN340 que mostraram maior ação tripanocida.

O índice de seletividade das substâncias avaliadas foi obtido calculando a razão entre o valor de IC₅₀ do ensaio de citotoxicidade e o valor de IC₅₀ obtido no ensaio de avaliação da atividade tripanocida contra *T. cruzi* transfectado com β -galactosidase (concentração da substância que elimina o número de parasitas em 50%). Esse índice avalia o quão seletivo um fármaco é para o seu alvo sem causar toxicidade às células do hospedeiro. Sendo considerado promissor para avaliações *in vivo* aqueles compostos com IS>50 (ROMANHA *et al*, 2010). Deste modo, os resultados obtidos indicam que o composto **9j** possui potencial para avaliação de atividade anti-*T.cruzi in vivo* e consiste em um excelente candidato para o desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento da doença de Chagas. Embora o composto **9j** tenha apresentado menor eficácia comparada ao fármaco benzonidazol, os testes *in vivo*, a serem futuramente realizados, podem demonstrar que **9j** possui número reduzido de problemas comparado ao benzonidazol. Além disso, como abordado no Capítulo 3 o nanoencapsulamento do composto **9j** também poderá resultar em melhoria da seletividade e em aumento da eficácia deste composto sobre *T. cruzi*.

6.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVAREZ, G.; VARELA, J.; CRUCES, E.; FERNÁNDEZ, M.; GABAY, M.; LEAL, S. M.; ESCOBAR, P.; SANABRIA, L.; SERNA, E.; TORRES, S.; THIEL, F.; YALUFF, G.; DE BILBAO, N. I. V.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Identification of a new amide-containing thiazole as a drug candidate for treatment of Chagas' Disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, p. 1398-1404, 2015.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 27–35, 1997.
- ANTUNES, A. F.; MADURO, S. G.; PEREIRA, B. V. M.; BARBOSA, M. G. V.; GUERRA, J. A. O.; FERREIRA, J. M. B. B. Cardiopatia crônica após tratamento de doença de Chagas aguda oral. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, p. 184-186, 2016.
- BETTIOL, E.; SAMANOVIC, M.; MURKIN, A. S.; RAPER, J.; BUCKNER, F.; RODRIGUEZ, A. Identification of Three Classes of Heteroaromatic Compounds

- with Activity against Intracellular *Trypanosoma cruzi* by Chemical Library Screening. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, p. e384-e396, 2009.
- BRENER, Z.; COSTA, C. A. G.; CHIARI, C. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 18, p. 450–455, 1976.
- BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L. M. J.; FLAMME, A. C. L.; VOORHIS, W. C. V. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against *Trypanosoma cruzi* Using Parasites Expressing β -Galactosidase. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, v. 40, p. 2592-2597, 1996.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3–24, 2002.
- DE LANA, M.; PINTO, A. D. S.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; NOËL, S.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: Compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 20–25, 1998.
- ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, p. 119-134, 2019.
- FIDALGO, A. S. O. B. V.; DA COSTA, A. C.; DA SILVA FILHO, J. D.; CÂNDIDO, D. S.; FREITAS, E. C.; PEREIRA, L. S.; DE ANDRADE, M. C.; GOMES, K. C. M. S.; BEZERRA, C. M.; OLIVEIRA, M. F. Insect vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 174-182, 2018.
- FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 755–759, 1987.
- FUJITA, D. M.; NASCIMENTO, M. S.; JÚNIOR, H. F. A. The oral transmission of chagas disease in Brazil: New food supplies and travel experience. **Acta Tropica**, v. 197, p. 105038-105039, 2019.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). Disponível em: <http://www.fiocruz.br/portalachagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=11>. Acesso em: 28/10/2019.
- GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, p. 164-169, 2019.

- MOURE, Z.; SULLEIRO, E.; INIESTA, L.; GUILLEN, C.; MOLINA, I.; ALCOVER, M. M.; RIERA, C.; PUMAROLA, T.; FISA, R. The challenge of discordant serology in Chagas disease: The role of two confirmatory techniques in inconclusive cases. **Acta Tropica**, v. 185, p. 144-148, 2018.
- NUNES, M. C. P.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L. Chagas Disease an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, p. 767-776, 2013.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 28/10/2019.
- ORTIZ, J. V.; PEREIRA, B. V. M.; COUCEIRO, K. N.; DA SILVA e SILVA, M. R. H.; DORIA, S. S.; DA SILVA, P. R. L.; DE LIRA, E. F.; GUERRA, M. G. V. B.; GUERRA, J. A. O.; FERREIRA, J. M. B. B. Avaliação Cardíaca na Fase Aguda da Doença de Chagas com Evolução Pós-Tratamento em Pacientes Atendidos no Estado do Amazonas, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 112, p. 240-246, 2019.
- PAPADOPOULOU, M. V.; BLOOMER, W. D.; ROSENZWEIG, H. S.; WILKINSON, S. R.; SZULAR, J.; KAISER, M. Antitrypanosomal activity of 5-nitro-2-aminothiazole-based compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 117, p. 179-186, 2016.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 92-100, 2001.
- RASSI Jr, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas Disease. **Seminars**, v. 375, p. 1388-1402,
- REVOLLO, S.; OURY, B.; LAURENT, J. P.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; CARRIÈRE, V.; NOËL, S.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: Impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. **Experimental Parasitology**, v. 89, p. 30–39, 1998.
- ROMANHA, A. J.; DE CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. N. C.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B. *et al.* In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 233-238, 2010.

- ROQUERO, I.; CANTIZANI, J.; COTILLO, I.; MANZANO, M. P.; KESSLER, A.; MARTÍN, J. J.; McNAMARA, C. W. Novel chemical starting points for drug discovery in leishmaniasis and Chagas disease. **IJP: Drugs and Drug Resistance**, v. 10, p. 58-68, 2019.
- SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, p. 14–21, 2010.
- TOLEDO, M. J. D. O.; DE LANA, M.; CARNEIRO, C. M.; BAHIA, M. T.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VELOSO, V. M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; TAFURI, W. L. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. **Experimental Parasitology**, v. 100, p. 161-172, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas Disease (American Trypanosomiasis)**. 4. ed. Elsevier Ltd, 2017.

CAPÍTULO 7

EFEITO PROTETOR DOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO NO DESEQUILÍBRIO REDOX INDUZIDO POR H₂O₂ EM CÉLULAS DE GLIOMA

7.1 INTRODUÇÃO

A respiração celular é um processo de fundamental importância para um grande número de seres vivos. Nele, o oxigênio (O₂) é empregado para oxidar compostos orgânicos, ocorrendo produção de energia para o metabolismo celular. Porém, há também a formação de radicais livres e/ou espécies reativas não radicalares, denominadas espécies reativas do oxigênio (ERO), como, por exemplo, o ânion superóxido (O₂^{•-}), radicais hidroxila (OH[•]) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (LU *et al.*, 2018).

As espécies reativas do oxigênio são subprodutos comuns do metabolismo celular aeróbico e em baixas ou moderadas concentrações são importantes para atividades fisiológicas como a sinalização celular intracelular e homeostase, morte celular, defesa imunológica contra patógenos, e regulação da diferenciação celular, migração e proliferação. Entretanto, sua produção excessiva resulta em danos tais como injúria tecidual e, em altas concentrações, danifica organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (KATERJI *et al.*, 2019; MIRONCZUK-CHODAKOWSKA *et al.*, 2018; DA SILVA e GONÇALVES, 2010).

As células possuem um sistema de defesa contra ERO em condições aeróbicas. Entretanto quando acontece um desequilíbrio entre a produção de substâncias oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidantes, ocorre aumento excessivo de ERO ou enfraquecimento dos mecanismos de defesa dos antioxidantes, processo este conhecido como desequilíbrio redox. Sabe-se que fatores como luz ultravioleta, radiações ionizantes, poluentes, metais pesados e medicamentos quimioterápicos estão relacionados ao aumento na produção de ERO (LIGUORI *et al.*, 2018; ZAVATTI *et al.*, 2019; PIZZINO *et al.*, 2017).

Muitos dos radicais livres são instáveis e altamente reativos. A alta reatividade desses radicais se deve a presença de pelo menos um elétron desemparelhado na sua camada eletrônica mais externa. Desta forma, nas células do corpo humano sucessivas reações oxidativas podem ocorrer durante o desequilíbrio redox, uma vez que as espécies radicais livres se tornam estáveis ao adquirirem elétrons de

uma variedade de biomoléculas vitais para a função celular e tecidual tais como lipídeos, ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos. Este fato, por sua vez, resulta em danos nessas moléculas, nas células e no DNA. Além disso, trabalhos publicados demonstram que o desequilíbrio redox está envolvido em distúrbios neurodegenerativos como, por exemplo, a doença de Alzheimer e Parkinson, esclerose múltipla, envelhecimento, diabetes, desordens metabólicas, doenças cardiovasculares, artrite reumatoide e câncer (LU *et al.*, 2018; BURTON e JAUNIAUX *et al.*, 2011; KATERJI *et al.*, 2019).

Das espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) constitui uma das mais reativas, de maior instabilidade (vida média de 10^{-9} segundos), extremamente deletéria ao organismo e, portanto, considerado o radical com maior potencial de ocasionar danos oxidativos. Como resultado, pode ocorrer alteração da função biológica das membranas celulares e das proteínas, além de danos no DNA que levam ao desenvolvimento de mutações. Com respeito às demais espécies reativas, o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) é o principal produto das ERO, pois as demais espécies são formadas a partir deste radical. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, ele está relacionado a lesões biológicas secundárias. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécie não radicalar, também possui elevada reatividade e possui vida longa, está envolvido na formação do radical hidroxila através da reação de Fenton ou Haber-Weiss e possui capacidade de atravessar membranas celulares tornando-se potencialmente tóxico para as células (BARBOSA *et al.*, 2010).

Diante do exposto, é nítida a importância dos mecanismos de defesa antioxidantes, visto que possuem a finalidade de controlar a produção excessiva de espécies reativas de forma a reduzir os danos ocasionados pelo desequilíbrio redox. Estes antioxidantes são classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os primeiros incluem enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSHPx), enquanto que os não enzimáticos correspondem aos antioxidantes de origem dietética como por exemplo vitaminas C e E, zinco, selênio, carotenóides e glutathione (NIMSE e PAL, 2015).

Dados da literatura demonstram que as células cancerígenas são caracterizadas por níveis mais elevados de ERO do que as células normais. As espécies reativas de oxigênio estão relacionadas ao aumento da atividade metabólica, ativação de oncogenes, disfunção mitocondrial, aumento da sinalização

celular e mutações no DNA, desempenhando papel importante nas fases de iniciação, promoção e progressão do câncer (LIOU e STORZ, 2010).

Com relação aos tipos de câncer que podem ser ocasionados pelo desequilíbrio redox cita-se o glioma, principal tumor cerebral primário incidente na população adulta e que apresenta um mau prognóstico. Apesar dos diversos tratamentos clínicos disponíveis para o tratamento do glioma como a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia direcionada e imunoterapia, a taxa de reincidência do tumor é grande, mesmo em pacientes que obtiveram o diagnóstico na fase inicial da doença. A cirurgia em muitos casos auxilia apenas no aumento da sobrevida dos pacientes. Os resultados negativos ao tratamento quimioterápico se devem a resposta diferencial do tumor a quimioterapia, a resistência celular e a diminuição da liberação dos medicamentos devido à barreira hematoencefálica. Métodos terapêuticos eficazes para o glioma ainda permanecem um grande desafio (CHEN, 2019; RINALDI *et al.*, 2016).

Na busca por melhores abordagens terapêuticas para o glioma, pesquisas atuais têm enfatizado seus estudos nos fatores moleculares e genéticos que estão associados ao desenvolvimento e progressão deste câncer cerebral. É de conhecimento que o desequilíbrio redox está relacionado na patogênese de uma variedade de doenças cerebrais (TORREGROSSA *et al.*, 2019).

O cérebro apresenta poucos sistemas de defesas antioxidantes e por este motivo é mais susceptível ao desequilíbrio redox em relação aos outros tecidos. O cérebro pode metabolizar de forma eficiente o radical superóxido; entretanto, a eliminação do peróxido de hidrogênio não ocorre com a mesma eficácia, resultando em acúmulo. Grandes quantidades de H_2O_2 são preocupantes, uma vez que no cérebro existem quantidades significativas de ferro e cobre, metais estes que podem catalisar a formação do radical hidroxila resultando em indução da peroxidação lipídica (ATUKEREN, 2011).

Diante da elevada resistência das células cancerosas aos quimioterápicos, se torna necessário o desenvolvimento de novas moléculas com diferentes mecanismos de ação e maior eficácia.

Em trabalhos publicados, o ácido cinâmico e seus derivados aparecem como moléculas que atuam contra o processo de desequilíbrio redox. Zhang e colaboradores em 2019 descreveram a síntese de 42 derivados do ácido cinâmico e

a avaliação da função neurológica e proteção neurovascular. O efeito dos compostos sobre a viabilidade da linhagem celular do endotélio microvascular do cérebro humano (HBMEC-2) e da linhagem celular do neuroblastoma humano (SH-SY5Y) foi avaliado em ensaios de indução de estresse oxidativo por H_2O_2 . Dentre os compostos avaliados o **m** (Figura 7.1) foi o que exibiu melhores resultados, com valores de EC_{50} iguais a $3,26 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a linhagem HBMEC-2 e $2,41 \mu\text{mol L}^{-1}$ para SH-SY5Y, sendo ainda capaz de bloquear a apoptose, manter a integridade morfológica celular e proteger a função fisiológica das mitocôndrias.

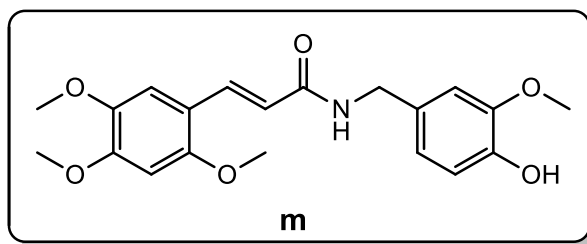


Figura 7.1 – Estrutura do derivado do ácido cinâmico (**m**) que exibiu atividade contra as linhagens HBMEC-2 e SH-SY5Y em ensaio de lesão induzida por H_2O_2 descrita por Zhang *et al.*, 2019.

Em 2017, Ren e colaboradores investigaram o efeito neuroprotetor do ácido ferúlico (Figura 7.2) contra lesões cerebrais induzidas por isquemia e reperfusão em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Dados obtidos demonstraram que o ácido ferúlico apresenta potencial em reduzir significativamente o comprometimento da memória e a apoptose neural do hipocampo, além de proteger células PC-12 (células derivadas de uma linhagem clonal de feocromocitoma que apresentam características de neurônios) contra espécies reativas de oxigênio.

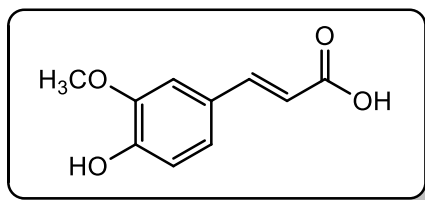


Figura 7.2 – Estrutura do ácido ferúlico.

O ácido caféico (Figura 7.3, pg. 222) consiste em um antioxidante importante exibindo efeito protetor contra os danos no DNA ocasionados pelas espécies

reativas do oxigênio. Em trabalho publicado por Li e colaboradores em 2015 foi demonstrado que o ácido caféico na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ aumentou a viabilidade de células L-02 do fígado humano, reduziu os níveis de ERO e consequentemente diminuiu a extensão de quebras de fita dupla do DNA em ensaio induzido por H_2O_2 .

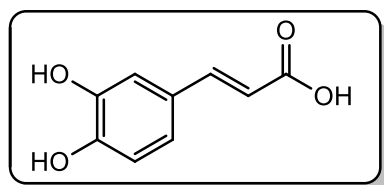


Figura 7.3 – Estrutura do ácido caféico.

Diante da necessidade de desenvolver novos quimioterápicos para o tratamento do glioma, e tendo em vista que o desequilíbrio redox está relacionado ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, neste capítulo foi avaliado o efeito protetor dos derivados do ácido cinâmico no desequilíbrio redox induzido por H_2O_2 em células de glioma

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Ensaio de avaliação de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos **13a-13j**, foram utilizadas as células da linhagem U-87 (Glioma Maligno de Uppsala 87) e não tumorigênica 3T3 (fibroblastos de embrião de camundongo). Para tal, foi empregado o teste de MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*]. A viabilidade celular foi baseada na capacidade das células viáveis de reduzirem o MTT ao sal de formazan colorido. As células de glioma e de fibroblastos foram pré-tratadas por 2 h com os cinamatos **13a-13j** nas concentrações de 50, 100 e $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ em placas de 96 poços ($2,5 \times 10^4$ células/poço). Após o tratamento o desequilíbrio redox foi induzido com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 3 horas. Para verificar a viabilidade celular, o MTT ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) foi adicionado aos poços e as placas incubadas por 12 h a 37°C em estufa incubadora de células. Após esse período, o dodecil sulfato de sódio (SDS) foi utilizado por 2 horas para solubilizar o sal de formazan. Finalmente, a absorvância foi medida a 570 nm com um leitor de microplacas VICTOR (Multidetector VICTOR™ X3, Perkin Elmer).

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente dez dos ésteres cinamatos (**13a-13j**) sintetizados neste trabalho foram avaliados em células da linhagem U87, com o propósito de analisar a toxicidade destes compostos e, deste modo, selecionar os cinamatos que seriam subsequentemente submetidos a ensaio de indução de desequilíbrio redox. Os compostos foram avaliados nas concentrações de 50, 100 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os dados obtidos são apresentados nas Figuras 7.4, 7.5 e 7.6.

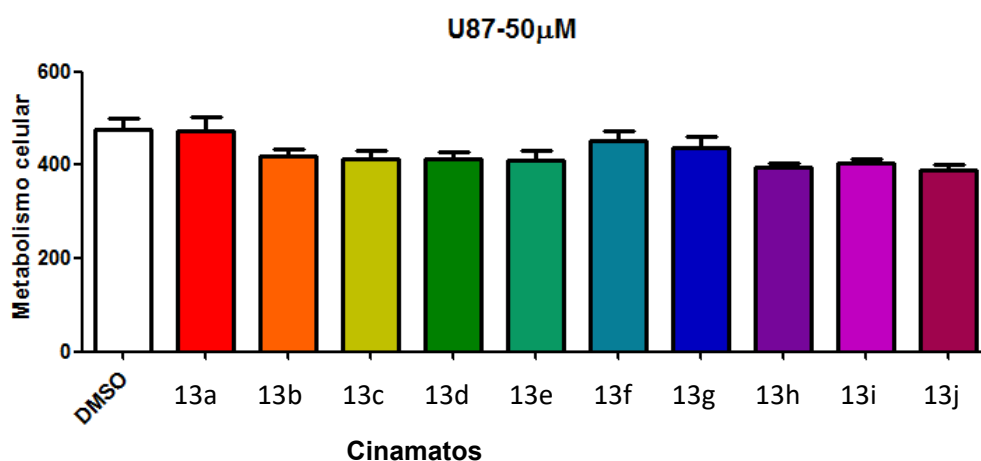


Figura 7.4 - Viabilidade das células U87 após tratamento com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos ésteres cinamatos.

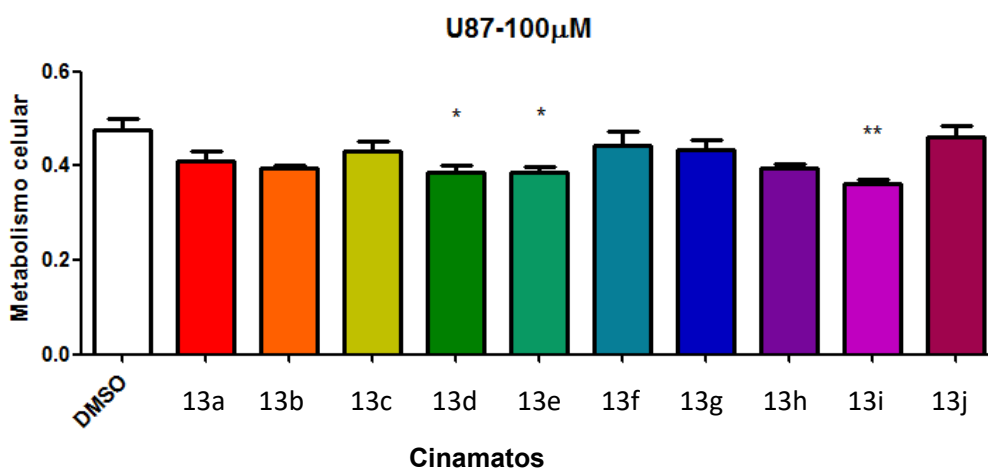


Figura 7.5 - Viabilidade das células U87 após tratamento com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos ésteres cinamatos.

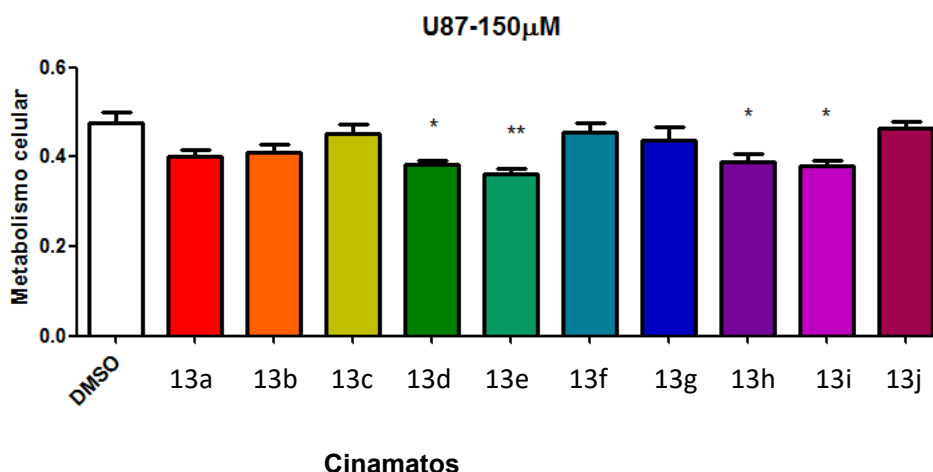


Figura 7.6 - Viabilidade das células U87 após tratamento com 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos ésteres cinamatos.

Na menor concentração avaliada, 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, foi observado que nenhum dos derivados do ácido cinâmico demonstrou toxicidade contra as células de glioma (Figura 7.4, pg. 223). No ensaio com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 7.5, pg. 223) os cinamatos que apresentaram menores valores de viabilidade celular em relação ao veículo (DMSO) foram **13d**, **13e** e **13i** e, portanto, foram considerados tóxicos para a linhagem avaliada. O ensaio na maior concentração, 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$, demonstrou que os compostos **13d**, **13e**, **13h** e **13i** foram tóxicos para a célula de glioma, exibindo menores valores de viabilidade celular em relação aos demais compostos e ao controle negativo (Figura 7.6).

Em seguida, os mesmos ensaios foram realizados para avaliação da toxicidade dos compostos em linhagem não tumorigênica (3T3). Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 7.7 (pg. 225), 7.8 (pg. 225) e 7.9 (pg. 226). Novamente, na menor concentração não foi observado toxicidade de nenhum dos derivados do ácido cinâmico contra as células 3T3 (Figura 7.7, pg. 225). Em 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apenas o cinamato **13i** foi tóxico para as células (Figura 7.8, pg. 225). No ensaio com a concentração de 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$, os compostos **13f** e **13i** reduziram a viabilidade celular das células 3T3 em relação ao controle negativo (Meio + veículo (DMSO)) e, portanto foram considerados tóxicos (Figura 7.9, pg. 226).

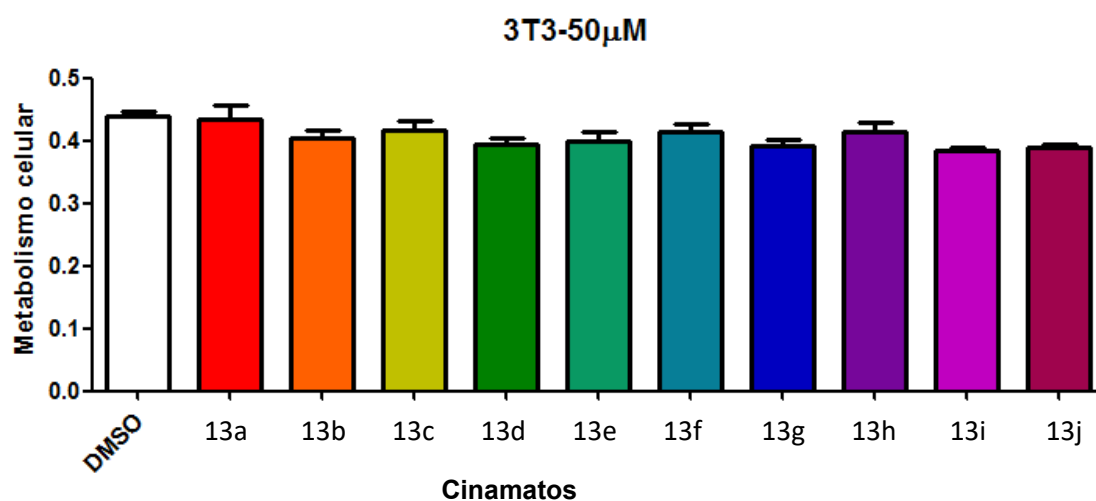


Figura 7.7 - Viabilidade das células 3T3 após tratamento com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos ésteres cinamatos.

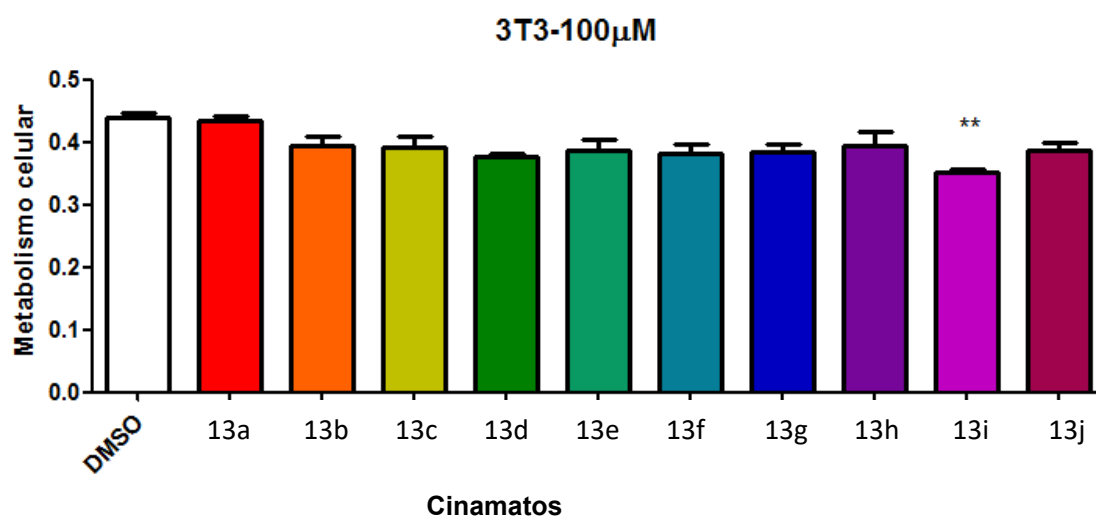


Figura 7.8 - Viabilidade das células 3T3 após tratamento com 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos ésteres cinamatos.

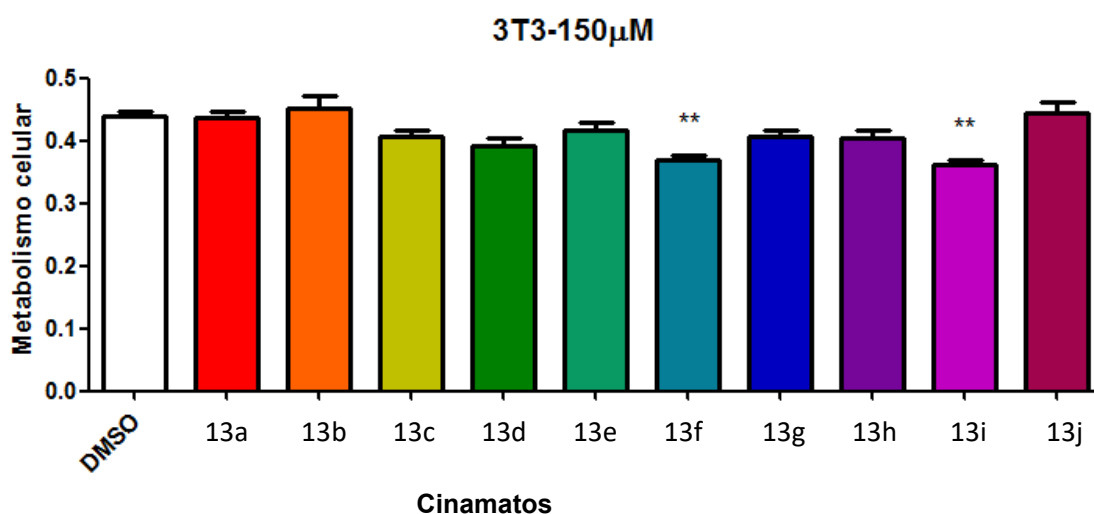


Figura 7.9 - Viabilidade das células 3T3 após tratamento com 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos ésteres cinamatos.

Os derivados do ácido cinâmico que exibiram toxicidade nos experimentos prévios foram excluídos dos testes de indução do desequilíbrio redox. Estes ensaios avaliaram, através do teste de MTT, a capacidade dos compostos derivados do ácido cinâmico de proteger as células, mantendo ou aumentando a viabilidade celular após a indução da produção de espécies reativas de oxigênio com H_2O_2 por 3 horas.

Na Figura 7.10 (pg. 227) observa-se que os compostos **13a**, **13b** e **13f**, na concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, foram capazes de melhorar a viabilidade das células de glioma – U87 após o desequilíbrio redox induzido, demonstrando maior efeito protetor contra espécies reativas em relação ao tratamento das células com peróxido na ausência dos derivados do ácido cinâmico ($\text{DMSO} + \text{H}_2\text{O}_2$).

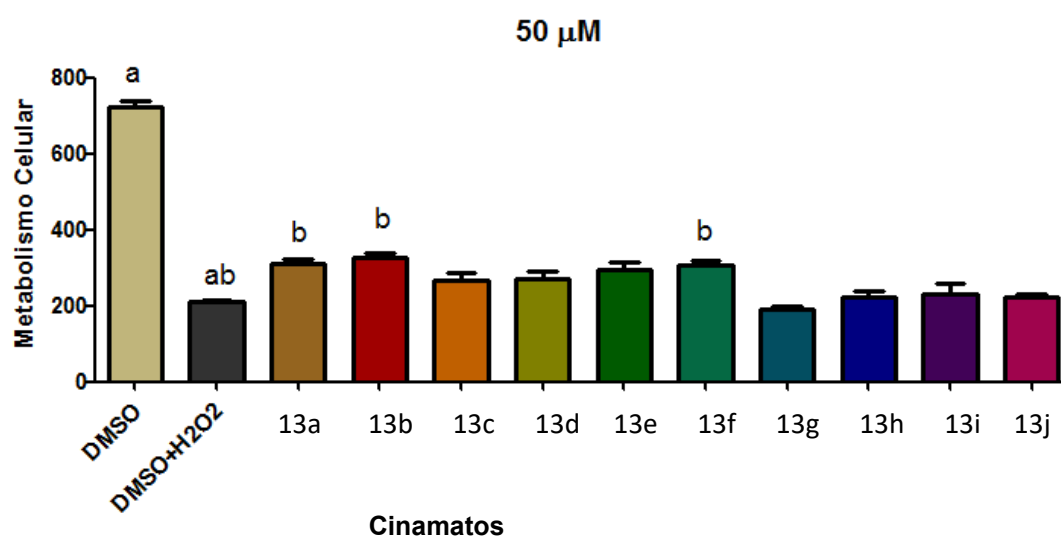


Figura 7.10 – Viabilidade celular após as células U87 serem pré-tratadas com os cinamatos **13a-13j** na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 h. Em seguida, foi adicionado H_2O_2 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 3 h. C+ = DMSO + H_2O_2 , C- = DMSO.

No ensaio com $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, os compostos **13a** e **13c** foram os mais efetivos em aumentar a viabilidade celular em comparação ao controle (DMSO + H_2O_2), com valores de porcentagem de viabilidade de 43,33% e 40%, respectivamente (Figura 7.11).

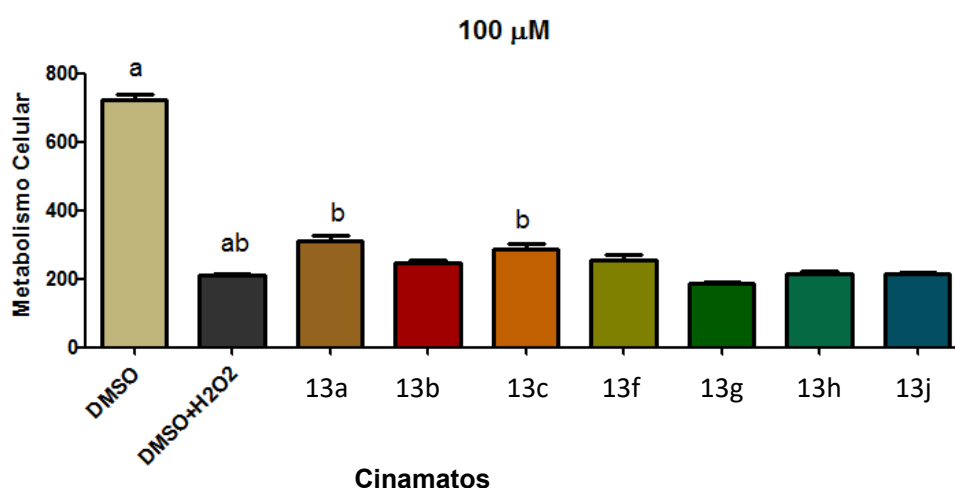


Figura 7.11 – Viabilidade celular após as células U87 serem pré-tratadas com os cinamatos **13a-13c**, **13f-13h** e **13j** na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 h. Em seguida, foi adicionado H_2O_2 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 3 h. C+ = DMSO + H_2O_2 , C- = DMSO.

E por fim, no experimento realizado com $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ os compostos **13a**, **13b** e **13c** foram os que apresentaram maiores valores de viabilidade celular no experimento de indução do desequilíbrio redox na presença de H_2O_2 em células U87 (Figura 7.12).

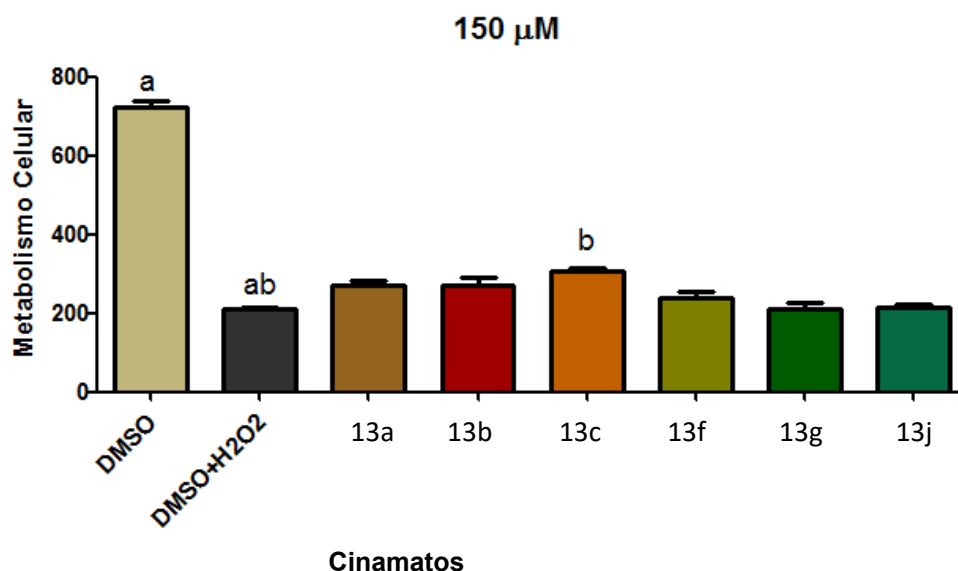


Figura 7.12 – Viabilidade celular após as células U87 serem pré-tratadas com os cinamatos **13a-13c**, **13f-13g** e **13j** na concentração de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 2 h. Em seguida, foi adicionado H_2O_2 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 3 h. C+ = DMSO + H_2O_2 , C- = DMSO.

Os resultados obtidos neste capítulo são significativos, uma vez que os ésteres cinamatos **13a**, **13b**, **13c** e **13f** em diferentes concentrações foram capazes de melhorar a viabilidade celular, e deste modo mostraram atividade protetora no desequilíbrio redox induzido em culturas de células de glioma (U87). A partir desses resultados podem ser realizadas modificações nas estruturas dos derivados do ácido cinâmico, a fim de obter compostos com maior efeito protetor. No que se refere à atividade neuroprotetora dados da literatura trazem que a presença de grupos hidroxilas na porção aromática dos derivados do ácido cinâmico resultam em maior ação dos compostos contra ERO. Cabe destacar que os cinamatos avaliados neste presente trabalho são estruturalmente simples, e desta forma a continuação da investigação pode levar ao desenvolvimento de quimioterápicos alternativos para o tratamento do glioma.

7.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATUKEREN, P. The impact of redox balance in brain tumors. **Molecular Targets of CNS Tumors**, s/v, p. 663-674, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/molecular-targets-of-cns-tumors/the-impact-of-redox-balance-in-brain-tumors>. Acesso em: 14/11/2019.
- BARBOSA, K.B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative Stress. **Best practice & research clinical obstetrics na gynaecology**, v. 25, p. 287-299, 2011.
- CHEN, W.; LEI, C.; LIU, P.; GUO, X.; KONG, Z.; WANG, Y.; DAI, C.; WANG, Y.; MA, W.; WANG, Y. Progress and Prospects of Recurrent Glioma: A Recent Scientometric Analysis of the Web of Science in 2019. **World Neurosurgery**, s/v, p. E1-E13, 2019.
- DA SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas de oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, p. 994-1002, 2010.
- KATERJI, M.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: research applications in the cancer field. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1-29, 2019.
- LI, Y.; CHEN, L. J.; JIANG, F.; YANG, Y.; WANG, X. X.; ZHANG, Z.; LI, Z.; LI, L. Caffeic acid improves cell viability and protects against DNA damage: involvement of reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, p. 502-508, 2015.
- LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; BULLI, G.; ARAN, L.; DELLA-MORTE, D.; GARGIULO, G.; TESTA, G.; CACCIATORE, F.; BONADUCE, D.; ABETE, P. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. 13, p. 757-772, 2018.
- LIU, G-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in câncer. **Free radical research**, v. 44, p. 1-31, 2010.
- LU, J.; WANG, Z.; CAO, J.; CHEN, Y.; DONG, Y. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, p. 1-18, 2018.

- MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A, M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in medicinal sciences**, v. 68, p. 68-78, 2018.
- NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RCS Advances**, v. 5, p. 27986-28006, 2015.
- PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-13, 2017.
- REN, Z.; ZHANG, R.; LI, Y.; LI, Y.; YANG, Z.; YANG, H. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms in vitro and in vivo. **International journal of molecular medicine**, v. 40, p. 1444-1456, 2017.
- RINALDI, M.; CAFFO, M.; MINUTOLI, L.; MARINI, H.; ABBRITTI, R. V.; SQUADRITO, F.; TRICHILO, V.; VALENTI, A.; BARRESI, V.; ALTAVILLA, D.; PASSALACQUA, M.; CARUSO, G. ROS and Brain Gliomas: An Overview of Potential and Innovative Therapeutic Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 984-999, 2016.
- SOZIO, P.; CERASA, L. S.; LASERRA, S.; CACCIATORE, I.; CORNACCHIA, C.; DI FILLIPO, E. S.; FULLE, S.; FONTANA, A.; DI CRESCENZO, A.; GRILLI, M.; MARCHI, M.; DI STEFANO, A. Memantine-sulfur containing antioxidant conjugates as potential prodrugs to improve the treatment of Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 187-198, 2013.
- TORREGROSSA, F.; AGUENNOUZ, M.; LA TORRE, D.; SFACTERIA, A.; GRASSO, G. Role of Erythropoietin in Cerebral Glioma: An Innovative Target in Neuro-Oncology. **World neurosurgery**, s/v, p. 346-355, 2019.
- ZAVATTI, V.; BUDMAN, H.; LEGGE, R. L.; TAMER, M. Impact of oxidative stress on protein production by *Bordetella pertussis* for vaccine production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 151, p. 107359-107367, 2019.
- ZHANG, W-X.; WANG, H.; CUI, H-R.; GUO, W-B.; ZHOU, F.; CAI, D-S.; XU, B.; JIA, X-H.; HUANG, X-M.; YANG, Y-Q.; CHEN, H-S.; QI, J-C.; WANG, P-L.; LEI, H-M. Design, synthesis and biological evaluation of cinnamic acid derivatives with

synergetic neuroprotection and angiogenesis effect. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, p. 111695-111711, 2019.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram descritas as etapas envolvidas na síntese de vinte e duas diamidas e de dezesseis ésteres derivados do ácido cinâmico. Para tal objetivo empregaram-se reações de substituição nucleofílica aromática, reação de redução, benzoilação de aminoácidos, ciclização intramolecular, abertura de anel catalisada por um ácido de Brønsted e reações de esterificação. As vinte e duas diamidas sintetizadas são inéditas e foram preparadas através da reação de abertura do anel azalactônico por trifluorometilarilanilinas, catalisada pelo ($\pm$)-ácido canforsulfônico, utilizando condições brandas de reação, não sendo necessária agitação magnética e os compostos foram obtidos com tempos de reação curtos e com bons rendimentos. A aplicação da reação de esterificação de Steglich culminou na síntese dos ésteres cinamatos **13a-13p** com rendimentos satisfatórios. Estes cinamatos foram preparados com o objetivo de serem utilizados como materiais de partida para a síntese de derivados do ácido cinâmico contendo o anel azalactônico via reação de adição do tipo Michael. Entretanto, não se obteve sucesso e os compostos almejados não foram obtidos. Apesar deste fato, a avaliação biológica desses ésteres não foi inviabilizada uma vez que, diversos artigos científicos demonstram que compostos estruturalmente simples apresentam diversas atividades biológicas.

Os ensaios de avaliação da citotoxicidade das diamidas contra as linhagens celulares HeLa e HepG2 demonstraram que os compostos **10a**, **10f**, **10g**, **10h**, **10i**, **10j**, **10k** reduziram a viabilidade celular em mais de 80%. Entretanto, cinco destas diamidas também apresentaram citotoxicidade elevada para a linhagem não tumoral (HEK293). Já os compostos **10f** e **10g** demonstraram maior seletividade, com maiores valores de viabilidade celular para a linhagem celular não tumoral avaliada.

No teste de avaliação da viabilidade celular das células B16-F10 frente aos cinamatos, a maioria dos compostos sintetizados apresentou efeito citotóxico superior ao ácido cinâmico (controle positivo). Valores de IC_{50} foram calculados para os quatro compostos mais ativos, sendo o menor resultado obtido para o composto **13q** ($IC_{50} = 60,28 \mu\text{mol L}^{-1}$). A viabilidade celular de células Vero após tratamento com ácido cinâmico e seus derivados também foi avaliada, e na menor concentração ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), os cinamatos apresentaram viabilidade celular superior a 70%. No ensaio de migração celular os ésteres **13l**, **13p** e **13q** demonstraram os menores valores de porcentagem de migração celular.

No ensaio de avaliação da atividade leishmanicida das diamidas, nove delas não exibiram toxicidade contra macrófagos. Em promastigotas de *L. braziliensis*, de modo geral, os compostos foram menos citotóxicos em relação ao fármaco comercial anfotericina B, porém em comparação ao SRPIN340 os compostos **9d** e **9e** mostraram maior citotoxicidade.

A investigação da atividade inseticida das diamidas demonstrou que estes possuem baixa toxicidade para as moscas de *D. suzukii* em relação ao produto comercial utilizado como controle positivo (imidacloprida). Entretanto, trata-se de um primeiro estudo realizado com diamidas inspiradas no SRPIN340 e, deste modo, modificações estruturais podem resultar na melhoria da atividade inseticida desses compostos.

No ensaio de avaliação da atividade tripanocida das diamidas inspiradas no SRPIN340, observou-se que o composto **9j** possui valor de índice de seletividade maior do que 50. Segundo a literatura este valor o seleciona para o para avaliação de atividade anti-*T. cruzi* *in vivo*, consistindo em um excelente candidato para o desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento da doença de Chagas. Menciona-se que o nanoencapsulamento deste composto poderá culminar no aumento da seletividade.

A atividade protetora de dez dos cinamatos sintetizados neste trabalho foi avaliada em ensaio de desequilíbrio redox induzido por H₂O₂ em células de glioma. Os resultados obtidos indicam que os compostos **13a**, **13b**, **13c** e **13f** foram capazes de melhorar a viabilidade das células U87. Modificações estruturais podem ser realizadas com a finalidade de obter compostos mais ativos.

Cabe ressaltar que apesar das inovações científicas e tecnológicas ainda é grande o número de pessoas em todo o mundo que são portadoras de doenças graves, a maioria dessas são crônicas e não possuem um tratamento efetivo estabelecido. Doenças como as citadas ao longo deste trabalho e outras como a diabetes, doenças cardiovasculares, renais e neurodegenerativas, dentre outras, tem sido responsável pela morte de muitos pacientes ao longo dos anos. Esses fatos mostram a importância da continuação de pesquisas que busquem tratamentos alternativos para essas patologias.

O processo de descoberta de novos fármacos é complexo, longo e de alto custo. Apesar das dificuldades, a química orgânica sintética tem-se mostrado

extremamente fundamental para o planejamento, desenvolvimento e descoberta de novos compostos mais eficazes, mais seletivos e com menor potencial em desenvolver resistência.

Deste modo, o projeto desenvolvido se mostra de grande relevância para a sociedade, uma vez que as investigações aqui descritas culminaram na obtenção de compostos biologicamente ativos, e que podem ser utilizados como estruturas modelos para o desenvolvimento de moléculas ainda mais eficazes.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas, todas as diamidas que foram sintetizadas neste trabalho já estão sendo submetidas a ensaios *in vitro* para avaliar o efeito inibitório sobre o transporte de elétrons fotossintético. Será realizado também o nanoencapsulamento dos sete compostos mais ativos contra as linhagens HeLa e HepG2, para verificar se este procedimento auxiliará no aumento da seletividade desses compostos. Com respeito à avaliação da atividade leishmanicida será realizado ainda ensaio contra formas amastigotas de *L. braziliensis* e ensaio de cicatrização de feridas com o composto **9k**. O composto mais ativo do ensaio tripanocida, **9j**, terá ainda sua atividade anti-*T.cruzi* avaliada *in vivo*, e será realizado o nanoencapsulamento desta diamida a fim de aumentar a sua seletividade.

Os ésteres cinamatos serão avaliados com respeito aos seus efeitos contra o processo de invasão das células B16-F10, de modo que se tenha uma melhor avaliação do efeito antimetastático desses compostos. Pretende-se também realizar a investigação do efeito neuroprotetor dos cinamatos no desequilíbrio redox mediado por peróxido de hidrogênio em neurônios hipocampusais.

Planeja-se ainda a divulgação dos resultados obtidos neste trabalho por meio de artigos científicos e apresentação de trabalhos em congressos.

ANEXO I

(Artigos publicados, depósito de patente e capítulo de livro)

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMETASTÁTICA E LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO

1. INTRODUÇÃO

Os anéis de natureza heterocíclica constituem unidades comumente encontradas nas estruturas de grande parte dos fármacos comercializados. Estima-se que mais de 90% dos novos medicamentos contém pelo menos um anel heterocíclico em suas estruturas (DUA *et al.*, 2011).

Os heterociclos apresentam um amplo espectro de importantes atividades biológicas. Isso se deve, principalmente, à diversidade no tamanho dos anéis, permutações estruturais, e à grande variedade de interações intermoleculares (tais como ligação de hidrogênio, interações de *pi-stacking*, Van Der Waals e interações hidrofóbicas) que eles são capazes de realizar, permitindo que estes se liguem às proteínas de diversas maneiras (PEARCE, 2017).

Na busca por candidatos a fármacos, observa-se que a inclusão de porções heterocíclicas nas estruturas de substâncias bioativas resulta em alterações de suas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas, como por exemplo, a lipofilicidade, polaridade, solubilidade em água e capacidade de realizar ligações de hidrogênio (GOMTSYAN, 2012). Alterações destas propriedades podem resultar em compostos com melhoria significativa da atividade biológica sendo investigada. Dentro deste contexto, os químicos orgânicos sintéticos vem desenvolvendo novas metodologias para a obtenção de substâncias heterocíclicas.

Os 1,2,3-triazóis são compostos de origem exclusivamente sintética, constituindo uma das mais investigadas classes de compostos heterocíclicos devido às diversas propriedades farmacológicas exibidas por eles (BOZOROV *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2019). Nos últimos anos tem sido crescente o número de publicações envolvendo a síntese de compostos contendo esta porção heterocíclica. Muitas dessas pesquisas têm buscado conectar dois grupos farmacofóricos levando a formação de moléculas bifuncionais (PETROVA *et al.*, 2015).

A hibridação molecular é uma estratégia de conjugação de porções farmacofóricas de diferentes substâncias bioativas em uma única molécula, levando a formação de um novo composto híbrido com bioatividade aprimorada, em comparação aos compostos originais (ARAÚJO *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2011).

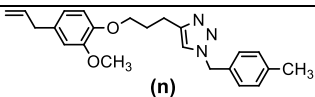
Moléculas híbridas possuem múltiplos mecanismos de ação, e deste modo apresentam potencial em reduzir os efeitos colaterais e a resistência dos medicamentos em uso para o tratamento de diversas doenças. A junção dos 1,2,3-triazóis com outros grupos farmacofóricos pode resultar em novos híbridos com toxicidade reduzida, espectro biológico mais amplo e melhor eficácia contra doenças que apresentam elevada resistência aos medicamentos atualmente comercializados (XU *et al.*, 2019).

Das diversas metodologias sintéticas descritas na literatura para a obtenção de 1,2,3-triazóis, aquela que vem sendo mais utilizada nos últimos anos consiste na reação “click”, também conhecida como CuAAC (reação de cicloadição (C) entre um Alcino (A) e uma azida (A), catalisada por cobre (Cu)). Esta transformação descoberta em 2001 por Sharpless e Meldal é, tipicamente, uma reação rápida, estereoespecífica e que possui elevado rendimento (CSUK *et al.*, 2019). Na metodologia desenvolvida por Sharpless e colaboradores, o sulfato de cobre pentaidratado atua como fonte de cobre(II) e o ascorbato de sódio exerce o papel de gerar *in situ* a espécie catalítica cobre(I). Geralmente nestas reações utiliza-se um sistema bifásico água/solvente, onde a água possui papel fundamental solubilizando sais inorgânicos e o ascorbato de sódio, além de ter a capacidade de preservar o acetilato de Cu(I) em seu estado reativo (HEIN e FOKIN, 2010).

O grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos (GSPCB) do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa tem utilizado, com sucesso, a reação “click”, sintetizando compostos bioativos com elevados rendimentos e em curto tempo reacional. Descrevem-se abaixo alguns trabalhos publicados recentemente.

Teixeira e colaboradores em 2018 sintetizaram uma série de vinte e seis derivados do eugenol contendo porções 1,2,3-triazol e avaliaram a atividade leishmanicida desses compostos. O mais ativo foi o composto **n**, exibindo valor de $IC_{50} = 7,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A avaliação de **n** contra amastigotas resultou em valor de $IC_{50} = 1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ e sua citotoxicidade contra células de macrófagos apresentou valor de $IC_{50} = 211,9 \mu\text{mol L}^{-1}$. Desta forma, o composto **n** demonstrou ser mais eficiente que os fármacos comerciais Glucantime e Pentamidina, conforme pode ser observado na Tabela A1 (pg. 238).

Tabela A1 – Atividade leishmanicida de **n** contra formas promastigotas e amastigotas intracelular de *L. amazonenses* e citotoxicidade contra macrófagos.

Composto	Promastigotas IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Amastigotas IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Macrófagos LD ₅₀ (μmol L ⁻¹)
 (n)	7,4 ± 0,8	1,6 ± 0,2	211,9 ± 2,3
Glucantime	Nd	45,5 ± 1,6	75,5 ± 2,6
Pentamidina	4,2 ± 0,4	1,8 ± 0,2	8,5 ± 0,6

Em 2019, Teixeira e colaboradores descreveram a síntese de vinte e dois derivados do nerol contendo a unidade 1,2,3-triazol, bem como a avaliação da citotoxicidade destes derivados contra as linhagens celulares cancerígenas (HL60, Nalm6, Jurkat e B16F10). Dos compostos avaliados o mais ativo foi **o** (Figura A1), apresentando atividade antiproliferativa contra células Jurkat e reduzindo a migração de células B16-F10.

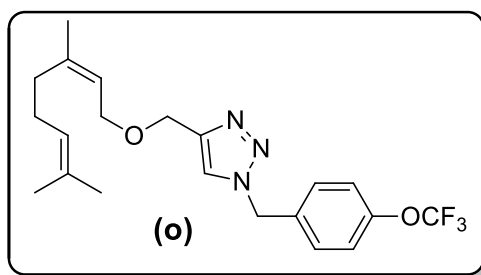


Figura A1 – Estrutura do derivado do nerol com maior atividade contra células Jurkat e maior potencial em reduzir a migração de células B16F10.

Desta forma, observa-se que a reação “click” vem sendo utilizada com êxito pelo GSPCB, resultando na síntese de compostos com significativas atividades leishmanicida e citotóxica.

Outro composto vem sendo utilizado pelo GSPCB como uma estrutura modelo na busca por novos agentes terapêuticos é o ácido cinâmico. Nesse sentido e considerando os resultados alcançados com respeito à funcionalização de compostos com o grupo 1,2,3-triazol, Rodrigues (2015) sintetizou uma série de vinte e seis derivados do ácido cinâmico contendo a unidade estrutural 1,2,3 triazol (Figura A2, pg. 239). O efeito inibitório dos compostos sintetizados sobre a

viabilidade de células leucêmicas da linhagem Nalm6 e HL60 foi avaliado e observou-se que cinco desses compostos apresentaram atividade citotóxica moderada contra Nalm6. Com respeito à linhagem HL60, nove derivados do ácido cinâmico diminuíram a viabilidade celular em até 75% na maior concentração avaliada ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Com base nestes resultados alcançados, decidiu-se dar continuidade à investigação do efeito destes derivados do ácido cinâmico com respeito à atividade antimetastática contra células de melanoma (B16F10), uma vez que a literatura relata o efeito antimetastático de derivados do ácido cinâmico contra linhagens de células tumorais. Os resultados alcançados com essa investigação culminaram na publicação de um artigo científico na revista *Toxicology in Vitro* em 2018. Para mais informações a respeito deste trabalho, deve-se consultar o artigo na página 241.

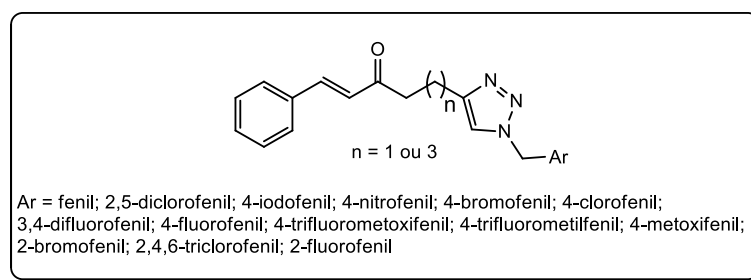


Figura A2 – Estrutura geral dos derivados do ácido cinâmico contendo o núcleo 1,2,3-triazólico sintetizados por RODRIGUES (2015).

Ainda com relação aos derivados do ácido cinâmico de estrutura geral mostrada na Figura A2, investigou-se a atividade destes compostos contra *Leishmania braziliensis*. Vinte e um dos compostos sintetizados foram avaliados na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ contra as formas promastigotas extracelulares e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. Os derivados 1,2,3-triazólicos do ácido cinâmico foram avaliados juntamente com outros derivados do mesmo ácido mas contendo uma porção isobenzofuranona. Os resultados desta investigação resultaram na publicação de um artigo na revista *European Journal of Medicinal Chemistry*. Essa investigação também culminou no depósito de uma patente e tanto o artigo quanto a patente são apresentados nas páginas 250 e 264, respectivamente.

Outra publicação alcançada durante a realização de meu treinamento em nível de doutorado consiste no capítulo de livro intitulado “Bis-Azides”, aceito para publicação pela Editora Nova Science Publishers. Este capítulo de livro é apresentado na página 294.

ARTIGO I: ATIVIDADE ANTIMETASTÁTICA DOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO CONTENDO PORÇÕES 1,2,3-TRIAZÓLICAS

Toxicology in Vitro 53 (2018) 1–9



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit



Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions



Graziela Domingues de Almeida Lima^{a,1}, Michelle Peixoto Rodrigues^{b,1},
Tiago Antônio de Oliveira Mendes^c, Gabriela Alves Moreira^c, Raoni Pais Siqueira^c,
Adalberto Manoel da Silva^d, Boniek Gontijo Vaz^e, Juliana Lopes Rangel Fietto^c,
Gustavo Costa Bressan^{c,*}, Mariana Machado-Neves^{a,*}, Róbson Ricardo Teixeira^{b,*}

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^c Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^d Instituto Federal de Educação de Ciência e Tecnologia Catarinense, Araquari, Santa Catarina, Brazil

^e Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Cinnamic acid
1,2,3-triazoles
Antimetastatic
Melanoma
Click chemistry
Gelatinases
Matrix metalloproteinase
Virtual molecular docking

ABSTRACT

It is herein described the preparation and evaluation of antimetastatic activity of twenty-six cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions. The compounds were prepared using as the key step the Copper (I)-catalyzed azide (A)-alkyne (A) cycloaddition (C) (CuAAC reaction), also known as click reaction, between alkynylated cinnamic acid derivatives and different benzyl azides. The reactions were carried in CH₂Cl₂/H₂O (1:1 v/v) at room temperature, and the triazole derivatives were obtained in yields ranging from 73%–99%. Reaction times varied from 5 to 40 min. The identity of the synthesized compounds was confirmed by IR and NMR (¹H and ¹³C) spectroscopic techniques. They were then submitted to *in vitro* bioassays to investigate how they act over metastatic behavior of murine melanoma. The most potent compound, namely 3-(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl cinnamate (9a), showed significant antimetastatic and antiproliferative activities against B16-F10 cells. In addition, gelatin zymography and molecular docking analyses pointed to the fact that this compound has potential to interact with matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and MMP-2, which are directly involved in melanoma progression. Therefore, these findings suggest that cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions may have potential for development of novel candidates for controlling malignant metastatic melanoma.

1. Introduction

Malignant melanoma is an extremely aggressive and metastatic cancer presenting the highest rate of mortality among skin cancers. In fact, < 10% of patients with metastatic melanoma survive up to 10 years after the diagnosis (Bhatia et al., 2009). Malignant melanoma can be cured by surgical intervention in its early stages, but this approach is practically inefficient in its metastatic stage (Gray-Schopfer et al., 2007; Elias et al., 2010). In this case, treatment is extremely difficult due to the metastatic melanoma resistance to existing therapies. This resistance is related to the complex cell signaling pathways modulating the proliferation and ability of tumor cells to escape from apoptotic processes during metastasis (Gray-Schopfer et al., 2007;

Hanahan and Weinberg, 2011; Siegel et al., 2015; Agaësse et al., 2017). As the process of tumor cells dissemination involves several events until the establishment of a secondary tumor site, such as cellular detachment, migration, invasion, and adhesion, as well as cell colonization and growth, these steps represent important therapeutic targets (Kumar and Weaver, 2009; Guan, 2015). Hence, there is an urgent need to discover new therapies for improving the current therapeutic strategies and, consequently, the survival of cancer patients (Elias et al., 2010).

Natural products have been explored as a source of compounds for drug discovery. Between 1981 and 2002, about 60% of the new drugs developed for cancer treatments were derived from natural products (Gullo et al., 2006; Lam, 2007; Harvey, 2008; Schmidt et al., 2008; Dias et al., 2012). Compounds currently used in clinical cancer

* Corresponding authors.

E-mail addresses: gustavo.bressan@ufv.br (G.C. Bressan), mariana.mneves@ufv.br (M. Machado-Neves), robsonr.teixeira@ufv.br (R.R. Teixeira).

¹ These authors contributed equally to this work

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.015>

Received 2 April 2018; Received in revised form 25 June 2018; Accepted 20 July 2018

Available online 23 July 2018

0887-2333/ © 2018 Published by Elsevier Ltd.

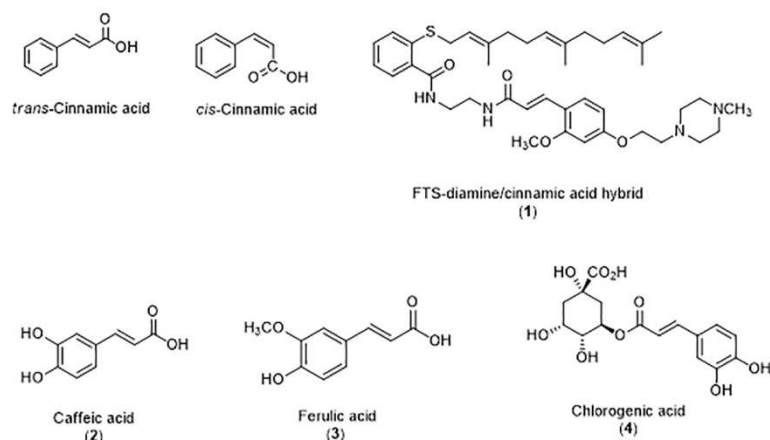


Fig. 1. Structures of cinnamic acid and some derivatives.

chemotherapy, such as paclitaxel, etoposide, teniposide, and camptothecin are examples of drugs based on the natural product pool (Ali et al., 2014).

The cinnamic acid (Fig. 1) consists of an aromatic acid found in several higher plants. Typically, it occurs in nature in *trans*-geometry, and belongs to a class of plant hormones regulating cell growth and differentiation known as auxins. This acid and its derivatives play an important role as intermediates in the production of other important compounds, such as styrenes and stilbenes (Sharma et al., 2011). It has been demonstrated that cinnamic acid derivatives display several activities including antifungal, antibacterial, and anti-inflammatory (Chiriac et al., 2005).

The antimetastatic effect of cinnamic acid derivatives against tumor cell lines has also been demonstrated (Yen et al., 2011; Tsai et al., 2013; Ling et al., 2015). For instance, *trans* and *cis* forms of cinnamic acid exhibited anti-migratory activity against human lung adenocarcinoma cells (Yen et al., 2011). A farnesyl thiosialicylic acid (FTS)-diamine/cinnamic acid hybrid (1, Fig. 1) also showed significant anti-migratory activity against colon carcinoma cells (Ling et al., 2015). Moreover, other derivatives of cinnamic acid, such as caffeic acid (2), ferulic acid (3) and chlorogenic acid (4), were capable of inhibiting the invasive behavior of human lung adenocarcinoma cells (Tsai et al., 2013).

In this framework, we describe herein the synthesis of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions. The Copper(I)-catalyzed azide (A)-alkyne (A) cycloaddition (C) (CuAAC reaction), also known as click reaction, between cinnamates having terminal triple bonds and different benzyl azides corresponded to the key step of the synthetic route designed to obtain the twenty-six cinnamic acid derivatives containing triazolic portions. Additionally, the antimetastatic activity of the derivatives was screened against B16-F10 melanoma cell line. For that, the effects on cell proliferation and colony formation were assessed using the most efficient compound found in this study. Finally, gelatin zymography analyzes pointed to the fact that this compound has the potential to reduce the matrix metalloproteinases (MMP) -9 and -2 activities, and the docking studies demonstrated that this compound have good score and docking affinity with these enzymes.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and synthetic procedures

Solvents were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Commercially available pent-4-yn-1-ol, prop-2-yn-1-ol, benzyl alcohols, triethyl amine, dimethyl sulfoxide (DMSO), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-*N,N'*-dimethylaminopyridine (DMAP), sodium ascorbate, sodium azide and copper(II) sulfate pentahydrate were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used without further purification. Details concerning the preparation of the compounds investigated herein can be found in the supplementary material.

2.2. Biological evaluation

2.2.1. Cell culture and culture conditions

Metastatic melanoma cells (B16-F10) were kindly provided by Dr. Anésia Aparecida dos Santos (Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brazil). Embryonic fibroblasts cell line (NIH3T3) was kindly provided by Dr. Leandro Licursi de Oliveira (Department of General Biology, UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil). The African green monkey kidney cell line (Vero) was kindly provided by Dr. Juliana Lopes Rangel Fietto (Department of Biochemistry and Molecular Biology, UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brazil). Cell lines were grown in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil), 100 µg mL⁻¹ of streptomycin, and 100 units mL⁻¹ of penicillin (Sigma) at pH 7.2 and 37 °C under 5% CO₂ atmosphere.

2.2.2. Cell viability assay

Cell viability was determined with the MTT ((3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide; Sigma). B16-F10 cells were seeded onto 96-well plates at a concentration of 1×10^4 cells/well. Each well contained 100 µL of complete RPMI medium and 100 µL of each compound solution at different concentrations (0–200 µmol L⁻¹). The compounds **8a–8m** and **9a–9m** were diluted in RPMI medium with 10% FBS plus 0.4% v/v DMSO (Sigma). After 48 h of culture, MTT (5 mg mL⁻¹; Sigma) was added to each well, and incubated for 4 h at 37 °C. The MTT solution was then removed, and DMSO at 100 µL/well was added to solubilize the formazan.

Absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader (SpectraMax M5, Molecular Devices, California, USA). Results were normalized considering the cultures treated with 0.4% DMSO (control), and the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated according to Siqueira et al. (2015).

2.2.3. Cell migration assay

The wound-healing assay is a method widely used to study directional cell migration *in vitro*, which mimics cell migration during wound healing *in vivo* (Rodriguez et al., 2005). Thus, it was conducted to evaluate the ability of cinnamic acid derivatives to inhibit cell migration, based on a previous published methodology (Liang et al., 2007; Anasamy et al., 2017) with modifications. B16-F10 cells were seeded onto 24-well plate at a concentration of 2×10^5 cells/well, and allowed to reach full confluence after incubation overnight at 37 °C under 5% CO_2 atmosphere. Monolayers were then wounded using a sterile 200 μ L pipette tip. Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) to remove detached cells, and then treated with compounds **8a–8m** and **9a–9m** at the concentration of $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. The compounds with inhibitory effect on cell migration were tested at the concentration of $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. DMSO (0.4% v/v) was used as control. Photos of the wound were taken using an inverted microscope (EVOS fl, Life Technologies, Canada). Wound closure rates were then calculated quantitatively as the difference between wound width at 0 and 24 h. Results were expressed as percentage of cell migration.

2.2.4. Cell proliferation assay

B16-F10 cells were seeded onto 6-well plates at a concentration of 1×10^5 cells/well in the presence of $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ compound **9a**. Additionally, untreated cells were used as control using DMSO (0.4% v/v). The effect of the compound on cell growth was evaluated by trypan blue (Invitrogen, São Paulo, Brazil) dye exclusion. After 24, 48, and 72 h, cells were loaded on a hemocytometer to obtain the viable cell count (Pietraszek et al., 2013).

2.2.5. Cell invasion assay

This assay was carried out using transwell inserts with pore diameter of 8 μm (Millicell, Ireland) based on protocols previously described (Chen, 2005; Hulkower and Herber, 2011) with modifications. Briefly, 60 μL of matrigel (BD Biosciences) diluted in serum free medium (1:12) was added to the upper chambers, and incubated for 1 h at 37 °C to gel formation. Thereafter, B16-F10 cells at 1×10^5 cells/well were diluted in serum free medium and treated with compound **9a** at different concentrations (12.50, 25 and $50 \mu\text{mol L}^{-1}$) for 1 h. Cells were then seeded onto the upper surface, whereas a medium containing 10% FBS was added in the lower surface. After 24 h of incubation, filter inserts were removed from the wells. The cells on the upper surface of the filter were wiped with a cotton swab. The cells that invaded the lower surface were fixed with methanol for 10 min, stained with 0.5% toluidine blue solution (Sigma), and then counted under a microscope using ten randomly chosen fields/ group. DMSO-vehicle treatment at 0.4% (v/v) was used as control. Results were expressed as percentage of cell migration.

2.2.6. Cell-matrix adhesion assay

After treatment with 12.50, 25 and $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ of compound **9a** for 30 min, the cells (5×10^4 cells/well) were seeded onto 96-well matrigel-coated plates, and incubated overnight at 37 °C under 5% CO_2 atmosphere. Non-adherent cells were removed by gentle washing with PBS. The adherent cells on the plate were measured by MTT assay.

2.2.7. Clonogenic assay

For clonogenic assay, B16-F10 melanoma cells (1000 cells per well) were seeded onto a 6-well plate and incubated overnight at 37 °C under 5% CO_2 atmosphere. Subsequently, exhausted medium was changed with fresh medium containing 12.50, 25 and $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ of compound

9a. Culture treatment was carried out for 24 h and the cells were cultured for 14 days with growth medium replaced at every two days. On the 15th d, colonies were fixed with methanol, stained with 0.5% toluidine blue solution, and finally counted (Mao et al., 2016). Results were expressed as percentage of untreated control cultures.

2.2.8. Cytotoxicity on non-tumor cell lines

The cytotoxicity of compound **9a** was tested on two non-tumor cell lines. Cell NIH3T3 (1×10^4 cells/well) and Vero (3×10^4 cells/well) were seeded onto 96-well plates, and cell viability was determined by MTT assay previously described (Pietraszek et al., 2013).

2.2.9. Hemolysis assay

This assay was used to determine the compatibility of erythrocytes to compound **9a**. Blood was collected from a five healthy C57BL/6J male mice, centrifuged at 700 g for 10 min, washed three times with 0.9% saline solution (m/v), and resuspended in the same buffer to prepare 2% red blood cell suspension (Xu et al., 2017). Subsequently, different concentrations ($0–100 \mu\text{mol L}^{-1}$) of the compound **9a** were incubated with the suspension at 37 °C. The red blood cells were also incubated with saline solution (0.9% m/v) and triton (1% v/v) as negative and positive control, respectively. After 2 h, the samples were centrifuged for 10 min at 700g and it was determined the release of hemoglobin by photometric analysis at 540 nm. The described procedures above are in agreement with the ethical principles of animal research adopted by the Animal Ethics Committees (CEUA protocol number 27/2015).

2.2.10. Predicting ADMET properties of **9a**

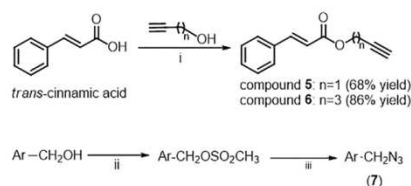
In order to predict ADMET (Absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity) properties of compound **9a**, it was utilized the pkCSM approach which uses graph-based signatures to develop predictive models of central ADMET properties for drug development (Pires et al., 2015). Herein, it was evaluated the *in silico* ADMET characteristics of compound **9a** using the freely accessible web server <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsml/prediction> and the SMILES O=C(OCCCC1=CN(CC2=CC=CC=C2)N=N1) \C=C\C1=CC=CC=C1 related to compound **9a**.

2.2.11. Gelatin zymography

B16-F10 cells were incubated with 50, 100 and $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ compound **9a** for 24 h. The media were then collected and centrifuged at 1500 rpm for 6 min at 4 °C to remove cells debris. The cell-free supernatant was mixed with a 4 $\times$ non reducing sample buffer and electrophoresis was performed using precast gel (10% polyacrylamide and 0.1% gelatin as a protease substrate). Following electrophoresis, the gel was washed twice in 2.5% Triton X-100 for 1 h to remove sodium dodecyl sulfate (SDS), subsequently washed in an activation buffer containing $CaCl_2$ and incubated in this buffer at 37 °C for 18 h. The gel was, then, stained with Coomassie blue R-250 (0.125% Coomassie blue R-250, 50% methanol, and 10% acetic acid) followed by destaining (methanol/acetic acid/water, 40/10/50, v/v) (Lee et al., 2015). The protein content was determined according to the method described by Bradford using BSA as a standard (Bradford, 1976).

2.2.12. Computational simulation of the interaction between compound **9a** and MMP-9 and -2

Molecular docking analyses of the synthesized compounds **8a–8** and **9a–9m** were simulated to determine the relative affinity with MMP-9 and MMP-2 enzymes using AutoDock Vina release 1.1.2 (Trott and Olson, 2010). The crystal structure of MMP-9 (PDB ID: 1L6J) and MMP-2 (PDB ID: 1QIB) was extracted from Protein Data Bank. The activity site of enzymes was identified by selection of amino acids within 12 Å radius from zinc ions that participate of the catalytic mechanism. The 3D structures of all compounds were drawn, optimized and protonate using MarvinSketch software (Chemaxon®). Binding



Ar = phenyl, 2,5-dichlorophenyl, 4-iodophenyl, 4-nitrophenyl, 4-bromophenyl, 4-chlorophenyl, 3,4-difluorophenyl, 4-fluorophenyl, 4-trifluoromethoxyphenyl, 4-trifluoromethylphenyl, 4-methoxyphenyl, 2,4,6-trichlorophenyl, 2-bromophenyl, 2-fluorophenyl

Fig. 2. Synthesis of esters **5** and **6**, and azides **7**. Reagents and conditions: (i) DCC, DMAP (10 mol%), CH_2Cl_2 , r.t.; (ii) Et_3N , $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, CH_2Cl_2 , -50°C ; (iii) NaN_3 , DMSO, r.t.

energy was estimated using Auto Docking Tools implemented in PyRx platform. Docked structures were visualized and edited using PyMOL software.

2.3. Statistical analysis

All numeric data were done in three independent replicates. The values were expressed as mean $\pm$ standard error mean (S.E.M). Statistical analyses were performed using Microsoft Excel (Microsoft Office Software), and GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.). Statistical analyses were submitted to one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

3. Results and discussion

3.1. Synthesis

The synthesis of cinnamic acid derivatives containing triazole portions required the preparation of esters **5** and **6**, as well as a series of azides **7** (Fig. 2). Thus, the Steglich esterification (Sova et al., 2006) between *trans*-cinnamic acid and different alcohols afforded compounds **5** and **6** in good yields (68% and 83%, respectively) after purification by silica gel column chromatography. Azides **7** were prepared from the corresponding benzylic alcohols (Fig. 2) using a methodology previously described (Borgati et al., 2013).

The click reaction between esters **5** and **6** and azides **7** (Fig. 3) afforded the desired cinnamic acid derivatives **8a–8m** and **9a–9m** in yields ranging from 73% to 99%. Further details concerning the structures of the synthesized compounds and characterization of them can be found in the supplementary material.

It should be mentioned that the synthesis of these compounds was planned in order to evaluate the influence of different benzyl groups (attached to the triazole ring), as well as the size of the aliphatic carbon chain (connecting the cinnamic acid portion and the triazole functionality) on biological responses.

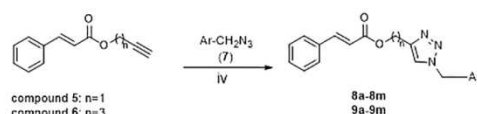


Fig. 3. Reagents and conditions: (iv) sodium ascorbate (40 mol%), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 mol%), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v), r.t.

3.2. Cinnamic acid derivatives reduce metastatic potential of B16-F10 cells

Migration is an important step in cancer metastasis, and cancer cells have a strong migration behavior (Shtivelman et al., 2014; Astin et al., 2010). In order to examine the effect of the synthesized compounds **8a–8m** and **9a–9m** on B16-F10 cell migration, we performed wound-healing assays in the presence of compounds to evaluate the cell motility. In this assay, we used the concentration of $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ considering that all compounds had low cytotoxicity based on IC_{50} (data not shown). Nineteen of the twenty-six derivatives synthesized significantly suppressed B16-F10 cell migration at $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (**8a**, **8b**, **8f**, **8h**, **8i**, **8j**, **8l**, **8m**, **9a**, **9b**, **9c**, **9d**, **9e**, **9g**, **9h**, **9i**, **9k**, **9l** and **9m**) compared to vehicle-treated cells (0.4% DMSO) (Fig. 4A and B). Moreover, compounds **8a**, **8b**, **8l**, **8m**, **9a**, **9c**, **9e**, **9h**, **9l** and **9m** were the most active in suppressing B16-F10 cell migration in at least 50% compared to control. Thereafter, it was evaluated the anti-migratory efficacy of these ten most effective derivatives at $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 4C). In this case, only compound **9a** significantly suppressed the cell migration in approximately 86% ($p \leq .0001$) in comparison with the control (Fig. 4D). Therefore, compound **9a** (Fig. 4E) was chosen for further experiments.

In addition to migration, B16-F10 cells may close the scratch by cell proliferation. Based on that, we also evaluated the effect of compound **9a** on the proliferative activity. Our findings revealed that compound **9a** significantly impaired B16-F10 cell proliferation at $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ in a time-dependent manner (Fig. 4F). Taking these findings together, we may suggest that the compound **9a** was able to suppress cell migration and proliferation.

Invasion and cell adhesion are also key steps in melanoma metastasis. Thus, the development of compounds with anti-invasive and anti-adhesive properties is of potential interest (Shtivelman et al., 2014). Herein, we also evaluated the effect of compound **9a** on the invasion and adhesion of metastatic B16-F10 cells. B16-F10 cell invasion decreased after 24 h of treatment with compound **9a** at 12.5 (52.3%), 25 (64.2%) and 50 (76%) $\mu\text{mol L}^{-1}$ compared to vehicle-treated cells (0.4% DMSO) (Fig. 5A and B). Similarly, cell adhesion was significantly decreased at 25 (8.6%) and 50 (32.2%) $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 5C). This remarkable activity of compound **9a** over the metastatic behavior of melanoma is in agreement with other studies that previously reported antimetastatic activity for cinnamic acid derivatives against human lung adenocarcinoma and colon carcinoma cells (Yen et al., 2011; Tsai et al., 2013; Ling et al., 2015).

Finally, the colony formation assay was performed (Franken et al., 2006) to investigate whether cinnamic acid derivative **9a** could influence the colony-formation of B16-F10 cells. The colony-forming activity of B16-F10 cells was suppressed after treatment with compound **9a** at 12.5 (25.5%), 25 (20.6%) and 50 (93.1%) $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 6), with a reduction in the number of colonies when compared to vehicle-treated cells (0.4% DMSO).

Altogether, we may suggest that the compound **9a** was efficient in reducing metastatic potential of B16-F10 cells *in vitro*. The endpoints tested herein, including cell migration, proliferation, invasion, adhesion, and colonization, have been described as pivotal steps in the metastasis process *in vivo* (Kumar and Weaver, 2009; Guan, 2015). For instance, mouse models have been widely used for unraveling the complex interactions involved in the metastatic cascade, as well as for testing potential therapies against tumor cell migration (Gómez-Cuadrado et al., 2017). In this context, our findings could be considered a baseline for the study of the efficiency of cinnamic acid derivatives in animal model.

3.3. Effect of compound 9a in non-tumor cell and erythrocyte viability

Herein, we evaluated the cytotoxicity of compound **9a** over non-tumoral cell lineages, as well as primary erythrocytes, since it has proved to be a promising antimetastatic agent. Vero and fibroblast

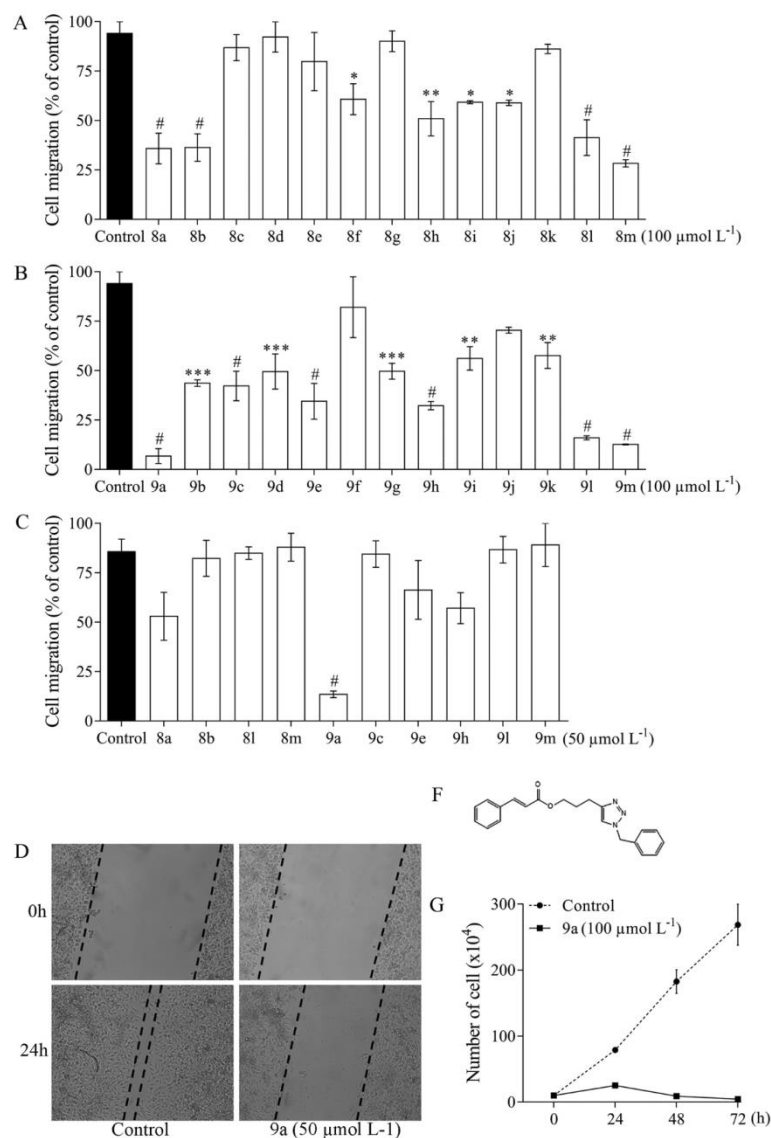


Fig. 4. Effect of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions on wound healing and proliferation of B16-F10 melanoma cells *in vitro*. (A and B) B16-F10 cells were wounded with a pipette tip and then treated with 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of each synthesized compound for 24 h. (C) B16-F10 cells were wounded and treated for 24 h with 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of the most active compounds as determined in (A and B). (D) Photos of the wound were taken at 0 and 24 h after treatment with 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of compound 9a under 100 $\times$ magnitude microscope. (E) Chemical structure of compound 9a. (F) Trypan blue dye exclusion assay of compound 9a on the proliferation of B16-F10 cells. Mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ou # $p < 0.0001$ versus control (0.4% DMSO) by Dunnett's test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

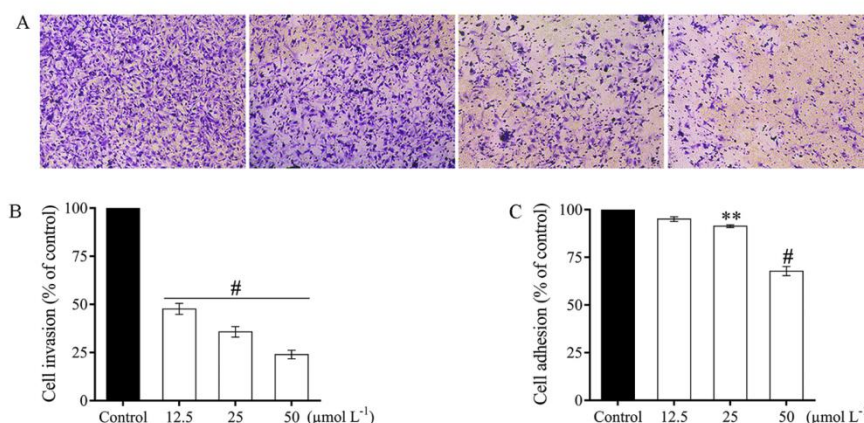


Fig. 5. Effect of compound **9a** on invasion and adhesion of B16-F10 melanoma cells *in vitro*. (A) Photomicrography represents the cells invasion through matrigel coating (100 x magnification). (B) The bar graphs represent invasive cell number that was treated with 12.5, 25 and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of compound **9a** for 24 h. (C) The bar graph represents the adhered cell number that was treated with 12.5, 25, and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of compound **9a** for 12 h. Mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ versus control (0.4% DMSO) by Dunnett's test.

(NIH3T3) cells were slightly sensitive to the compound **9a** at 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 7A). Moreover, there was no indicative of hemolysis for treatments with the derivative at different concentrations (Fig. 7B).

The slightly sensitivity of fibroblasts to the compound **9a** may also indicate that it is not a skin sensitizer (Tomankova et al., 2011). The *in silico* ADMET analysis, in addition, revealed that derivative **9a** has no ability to induce allergic contact dermatitis, and relatively low skin permeability (Table S2).

Moreover, this analysis showed that the most active derivative does not violate the Lipinsky's rules of five (Lipinski, 2000), and therefore this compound is drug like. The prediction of absorption indicated that the compound **9a** has a high percentage of intestinal absorption, especially if orally administered. In the kidney, the compound **9a** is not an organic cation transporter 2 substrate, and it is potentially filtrated and partially reabsorbed in renal tubules. This result is important for determining dosing rates to achieve steady-state concentrations. With

respect to its toxicity, the compound **9a** is not a mutagenic compound and, therefore, may not act as a carcinogen. Although it is not a skin sensitizer, the compound **9a** may be associated with disrupted normal hepatic function (Table S2). The latter, in turn, can be verified in studies using animal models. Collectively, these findings indicate that compound **9a** seems to be non-toxic agent, enabling its application in more advanced *in vivo* studies.

3.4. Gelatin zymography and molecular docking help to understand the activity suppress of MMP -2 and -9 by compound **9a**

It is well documented that MMP-9 and -2 are directly involved in melanoma progression (van den Oord et al., 1997; Hofmann et al., 2000; Kondratiev et al., 2008; Zhang et al., 2017). Both MMP enzymes are capable of degrading components from basement membranes. For that reason, they are probably related to the metastasis steps in

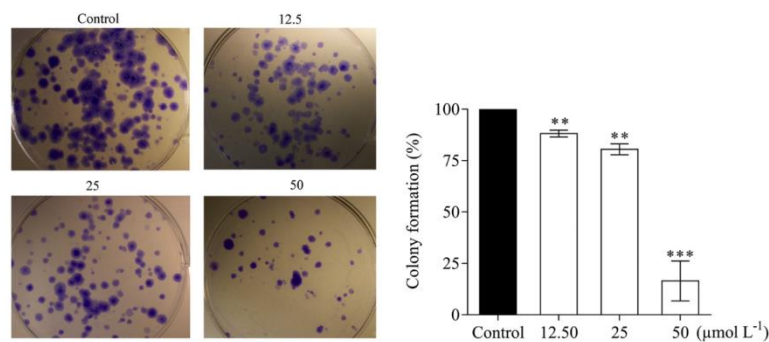


Fig. 6. Effect of compound **9a** on colony formation of B16-F10 melanoma cells *in vitro*. Photomicrography showing the formation of B16-F10 colonies after treatment with 12.5, 25 and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of compound **9a** for 14 days. After that, the colonies were fixed with methanol, stained with toluidine blue solution and counted. Bar graphs represent the colony number that were formed after 14 d of treatment with compound **9a** at 12.5, 25 and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ versus control (0.4% DMSO) by Dunnett's test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

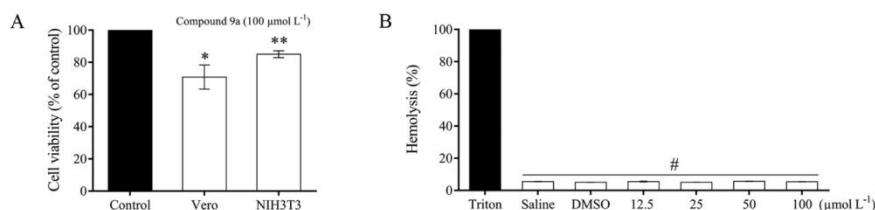


Fig. 7. Cytotoxic effects of compound **9a** on non-neoplastic cell lines and erythrocytes viability. (A) Vero (African green monkey kidney cell) and NIH3T3 (Embryonic fibroblasts) cells were exposed to 100 µmol L⁻¹ compound **9a** for 48 h. (B) Graphical of hemolysis assay. Mean ± S.E.M. **p* < 0.01 versus control (0.4% DMSO), and #*p* < 0.0001 versus control (Triton) by Dunnett's test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

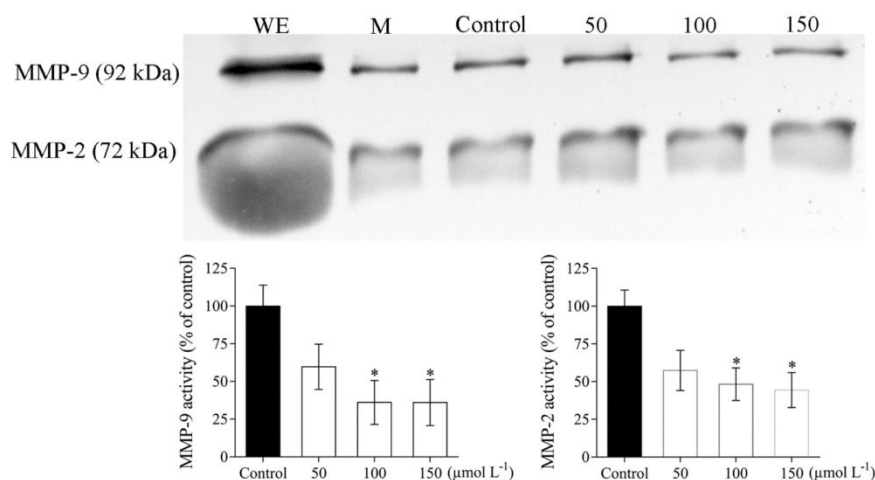


Fig. 8. Representative gelatin zymogram showing the effects of compound **9a** on matrix metalloproteinase (MMP)-9 and -2 activities in treated B16-F10 melanoma cells. Cells were incubated with 0 (Control), 50, 100 and 150 µmol L⁻¹ of compound **9a** for 24 h. The density of each band was quantified by densitometric analysis. Fetal bovine serum was used as weight standard (WE). M: medium. Mean ± S.E.M. **p* < .01 versus control (0.4% DMSO) by Dunnett's test.

melanoma (Hofmann et al., 2000; Gu et al., 2016). In this context, MMPs are important targets for the development of new drugs with antimetastatic activity. Cinnamic acid and its derivatives have demonstrated to be inhibitors of the MMPs activities (Yen et al., 2011; Tsai et al., 2013; Ling et al., 2015; Gopi Krishna Reddy and Satyanarayana, 2016). In the current study, B16-F10 cells were treated with compound **9a** for 24 h and analyzed by gelatin zymography in order to clarify whether the MMP-9 and -2 are related to the anti-metastatic behavior of this compound. Our results showed that MMP-9 activity was suppressed after treatment with compound **9a** at 100 (64.26%) and 150 (63.85%) µmol L⁻¹ compared to vehicle-treated cells (0.4% DMSO; Fig. 8). Similarly, MMP-2 activity was suppressed by compound **9a** at 100 (48.75%) and 150 (43.90%) µmol L⁻¹ (Fig. 8). These findings are in accordance to previous reports revealing the cinnamic acid and its derivatives ability to inhibit the activities of MMP-9 and -2 in tumor cells, as well as their capability of adhesion, migration, and invasion (Chiriac et al., 2005; Ali et al., 2014).

In order to shed light on the way that compound **9a** interacts with the aforementioned metalloproteinases, this compound, the cinnamic acid (Yen et al., 2011), and their derivatives that activity on MMP-9 and -2 have been previously described (Tsai et al., 2013) were anchored with human MMP-9 (PDB-ID: 1L6J) and -2 (PDB-ID: 1QIB). Those

MMPs are directly involved in the progression of melanoma and indicates a poor prognosis (Hofmann et al., 2000; Gu et al., 2016). The anchorage investigation showed that compound **9a** displayed the best predicted binding affinity values for MMP-9 (−8.2 kcal/mol) and -2 (−8.6 kcal/mol) (Table 1).

The binding region of compound **9a** with MMP-9 (Fig. 9A) and -2 (Fig. 9C) is predicted to match to the active site, as well as observed for the cinnamic acid and their derivatives. As shown in Fig. 9B, the

Table 1
Predicted binding affinities of compound **9a**, cinnamic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, and caffeic acid to matrix metalloproteinase (MMP)-9 and -2 by Autodock Vina program.

Compounds	MMP-9 (PDB-ID:1L6J)	MMP-2 (PDB-ID:1QIB)
	Bond energy (kcal/mol)	Bond energy (kcal/mol)
9a	−8.2	−8.6
Cinnamic acid	−6.7	−6.5
Ferulic acid	−6.2	−6.9
Chlorogenic acid	−6.8	−6.5
Caffeic acid	−5.8	−7.6

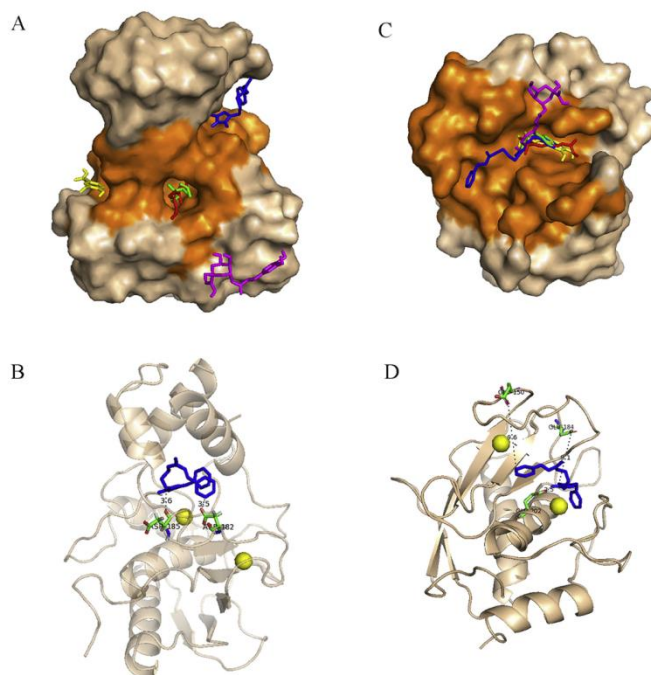


Fig. 9. Molecular interactions of compound **9a**, cinnamic acid, and its derivatives with the active site (orange) of matrix metalloproteinases (MMP)-9 and -2. (A) Docking of compound **9a** (blue), cinnamic acid (green), ferulic acid (red), chorogenic acid (magenta), caffeic acid (yellow) with MMP-9. (B) Docking view showing compound **9a** bond interaction of ligands with residues in the active site of MMP-9. Important residues Asp182 and Asp185 (green) of MMP-9 interaction between compound **9a** (blue). (C) Docking of compound **9a** (blue), cinnamic acid (green), ferulic acid (red), chorogenic acid (magenta), caffeic acid (yellow) with MMP-2. (D) Docking view showing the compound **9a** bond interaction of ligands with residues in the active site of MMP-2. Important residues Glu 150, Glu184 and Glu202 (green) of MMP2 interaction between compound **9a** (blue). Zinc ion indicated in yellow (B, D). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

compound **9a** has potential to interact with catalytic aspartate residues Asp182 and Asp185 of MMP-9 with distance of 3.5 Å and 3.6 Å, respectively. The Fig. 9D showed that compound **9a** in the docking model interacts with catalytic glutamate residues, Glu150, Glu184 and Glu202 of MMP-2 with distance of 9.6 Å, 9.1 Å and 2.2 Å, respectively.

Our results revealed that compound **9a** is effective in inhibiting the metastatic behavior of B16-F10 melanoma cells. Furthermore, the prediction of molecular binding indicated that the inhibitory ability of this compound is mainly related to its interaction with MMP-9 and MMP-2. Similarly, previous studies have shown that cinnamic acid derivatives are potent inhibitors of MMPs (Zhang et al., 2006; Yen et al., 2011; Melo and Qsar, 2012; Tsai et al., 2013; Ling et al., 2015; Gopi Krishna Reddy and Satyanarayana, 2016). The reason for this inhibitory activity has been ascribed to the presence of heteroatoms (especially the hydroxyl group) in these compounds. The heteroatoms are capable of establishing hydrogen bonds with the proteins. In addition, the π electrons present in this compound facilitate interactions with hydrophobic regions of the MMP-9 and -2 (Zhang et al., 2006; Yen et al., 2011; Melo and Qsar, 2012; Tsai et al., 2013; Ling et al., 2015; Gopi Krishna Reddy and Satyanarayana, 2016).

4. Conclusions

In the present study, twenty-six cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions were synthesized and submitted to *in vitro* bioassays to investigate their activity over the metastatic behavior of murine melanoma. The most potent compound **9a**, a 1,2,3-triazolic-cinnamic acid derivative containing a benzyl group attached to the triazolic portion, presented significant antimetastatic activity against B16-F10 melanoma cells. The molecular docking simulation contributes

to understanding our *in vitro* experimental results, demonstrating that compound **9a** has binding affinity with MMP-9 and -2. Therefore, our findings suggest that cinnamic acid derivatives containing a 1,2,3-triazolic portion may represent a scaffold to be explored towards the development of novel candidates for controlling malignant metastatic melanoma.

Acknowledgements

This work was supported by the Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [grant number 88887.124145/2014-00 to RRT], Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant number 448455/2014-5 to MMN], and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) [grant number APQ-02957-17 to RRT, and APQ-02514-16 to MMN]. The funders had no involvement in the study design, in the collection, analysis or interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the article for publication. The authors also thank CNPq, FAPEMIG and CAPES for the fellowships to students and researchers involved in this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.015>.

References

Agaïsse, G., Barbolat-Boutrand, L., El Kharbili, M., Berthier-Vergnes, O., Masse, I., 2017.

- p53 targets TSPAN8 to prevent invasion in melanoma cells. *Oncogene* 6, e309.
- Ali, M., Abul Farah, M., Al-Hemaid, F., Abou-Tarboush, F., 2014. *In vitro* cytotoxicity screening of wild plant extracts from Saudi Arabia on human breast adenocarcinoma cells. *Genet. Mol. Res.* 13, 3981–3990.
- Anasamy, T., Thy, C.K., Lo, K.M., Chee, C.F., Yeap, S.K., Kamalideghnan, B., Chung, L.Y., 2017. Tribenzyltin carboxylates as anticancer drug candidates: effect on the cytotoxicity, motility and invasiveness of breast cancer cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* 125, 770–783.
- Astin, J.W., Batson, J., Kadir, S., Charlet, J., Persad, R.A., Gillatt, D., Oxley, J.D., Nobes, C.D., 2010. Competition amongst Eph receptors regulates contact inhibition of locomotion and invasiveness in prostate cancer cells. *Nat. Cell Biol.* 12, 1194–1204.
- Bhatia, S., Tykodi, S.S., Thompson, J.A., 2009. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park, NY)* 23, 488–496.
- Borgatti, T.F., Alves, R.B., Teixeira, R.R., Freitas, R.P.D., Perdigão, T.G., Silva, S.F.D., Santos, A.A.D., Bastidas, A.D.O., 2013. Synthesis and phytotoxic activity of 1, 2, 3-triazole derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* 24, 953–961.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Chen, H.-C., 2005. Boyden chamber assay. In: *Cell Migration*. Springer, pp. 15–22.
- Chiriac, C., Tanasa, F., Onciu, M., 2005. A novel approach in cinnamic acid synthesis: direct synthesis of cinnamic acids from aromatic aldehydes and aliphatic carboxylic acids in the presence of boron tribromide. *Molecules* 10, 481–487.
- Dias, D.A., Urban, S., Roessner, U., 2012. A historical overview of natural products in drug discovery. *Meta* 2, 303–336.
- Elias, E.G., Hasskamp, J.H., Sharma, B.K., 2010. Biology of human cutaneous melanoma. *Cancers* 2, 165–189.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Van Bree, C., 2006. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat. Protoc.* 1, 2315–2319.
- Gómez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B., Bruntton, V.G., 2017. Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis. Model Mech.* 10 (9), 1061–1074.
- Gopi Krishna Reddy, A., Satyanarayana, G., 2016. Metal-free domino one-pot decarboxylative cyclization of cinnamic acid esters: synthesis of functionalized indanes. *J. Org. Chem.* 81, 12212–12222.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., Marais, R., 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851–857.
- Gu, L., Li, X., Ran, Q., Kang, C., Lee, C., Shen, J., 2016. Antimetastatic activity of novel ruthenium(III) pyridine complexes. *Cancer Med.* 5, 2850–2860.
- Guan, X., 2015. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin.* B 5, 402–418.
- Gullo, V.P., McAlpine, J., Lam, K.S., Baker, D., Petersen, F., 2006. Drug discovery from natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 523–531.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Harvey, A.L., 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* 13, 894–901.
- Hofmann, U.B., Westphal, J.R., van Muijen, G.N., Ruiters, D.J., 2000. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 115, 337–344.
- Hulkower, K.L., Herber, R.L., 2011. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics* 3, 107–124.
- Kondratiev, S., Gnep, D.R., Yakirevich, E., Sabo, E., Annino, D.J., Rebeiz, E., Laver, N.V., 2008. Expression and prognostic role of MMP2, MMP9, MMP13, and MMP14 matrix metalloproteinases in sinonasal and oral malignant melanomas. *Hum. Pathol.* 39, 337–343.
- Kumar, S., Weaver, V.M., 2009. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 113–127.
- Lam, K.S., 2007. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol.* 15, 279–289.
- Lee, H., Pyo, M.-J., Bae, S.K., Heo, Y., Kim, C.G., Kang, C., Kim, E., 2015. Improved therapeutic profiles of PLA2-free bee venom prepared by ultrafiltration method. *Toxicol. Res.* 31, 33–40.
- Liang, C.-C., Park, A.Y., Guan, J.-L., 2007. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat. Protoc.* 2, 329.
- Ling, Y., Zhao, X., Li, X., Wang, X., Yang, Y., Wang, Z., Wang, X., Zhang, J., Zhang, Y., 2015. Novel FTS-diamine/cinnamic acid hybrids inhibit tumor cell proliferation and migration and promote apoptosis via blocking Ras-related signaling *in vitro*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 75, 381–392.
- Lipinski, C.A., 2000. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharm. Toxicol. Methods* 44, 235–249.
- Mao, S.-W., Chen, H., Yu, L.-F., Lv, F., Xing, Y.-J., Liu, T., Xie, J., Tang, J., Yi, Z., Yang, F., 2016. Novel 3,4-seco bile acid diamides as selective anticancer proliferation and migration agents. *Eur. J. Med. Chem.* 122, 574–583.
- Melo, E.B.D., Qsar, A., 2012. Study of matrix metalloproteinases type 2 (MMP-2) inhibitors with cinnamoyl pyrrolidine derivatives. *Sci. Pharm.* 80, 265–282.
- Pietraszek, K., Brézillon, S., Perreau, C., Malicka-Blaszkiewicz, M., Maquart, F.-X., Wegrowski, Y., 2013. Lumican-derived peptides inhibit melanoma cell growth and migration. *PLoS One* 8, e76232.
- Pires, D.E., Blundell, T.L., Ascher, D.B., 2015. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* 14, 4066–4072.
- Rodriguez, L.G., Wu, X., Guan, J.L., 2005. Wound-healing assay. In: Guan, J.L. (Ed.), *Cell Migration. Methods in Molecular Biology*. Vol 294 Humana Press.
- Schmidt, B., Ribnický, D.M., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu, W.T., Raskin, L., 2008. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism* 57, S3–S9.
- Sharma, A., Prasad, D., Singh, R.K., 2011. Journal of chemical and pharmaceutical research. *J. Chem.* 3, 424–431.
- Shivelman, E., Davies, M.A., Hwu, P., Yang, J., Lotem, M., Oren, M., Flaherty, K.T., Fisher, D.E., 2014. Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget* 5, 1701–1752.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2015. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.* 65, 5–29.
- Siqueira, R.P., Barbosa, É.D.A.A., Polito, M.D., Righetto, G.L., Seraphim, T.V., Salgado, R.L., Ferreira, J.G., Dde Andrade Barros, M.V., Dde Oliveira, L.L., Laranjeira, A.B.A., 2015. Potential antileukemia effect and structural analyses of SRPK inhibition by N-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl) phenyl) isonicotinamide (SRP340). *PLoS One* 10, e0134882.
- Sova, M., Perdih, A., Kotnik, M., Kristan, K., Rižner, T.L., Solmajer, T., Gobec, S., 2006. Flavonoids and cinnamic acid esters as inhibitors of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: a synthesis QSAR and modelling study. *Bioorganic Med. Chem.* 14, 7404–7418.
- Tomankova, K., Kejlova, K., Binder, S., Daskova, A., Zapletalova, J., Bendova, H., Kolarova, H., Jirova, D., 2011. *In vitro* cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. *Toxicol. in Vitro* 25, 1242–1250.
- Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455–461.
- Tsai, C.-M., Yen, G.-C., Sun, F.-M., Yang, S.-F., Weng, C.-J., 2013. Assessment of the anti-invasion potential and mechanism of select cinnamic acid derivatives on human lung adenocarcinoma cells. *Mol. Pharm.* 10, 1890–1900.
- van den Oord, J.J., Paemen, L., Opdenakker, G., de Wolf-Peters, C., 1997. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. *Am. J. Pathol.* 151, 665–670.
- Xu, T., Chi, B., Gao, J., Chu, M., Fan, W., Yi, M., Xu, H., Mao, C., 2017. Novel electrochemical immune sensor based on Hep-PGA-PPy nanoparticles for detection of α -fetoprotein in whole blood. *Anal. Chim. Acta* 977, 36–43.
- Yen, G.-C., Chen, Y.-L., Sun, F.-M., Chiang, Y.-L., Lu, S.-H., Weng, C.-J., 2011. A comparative study on the effectiveness of cis- and trans-form of cinnamic acid treatments for inhibiting invasive activity of human lung adenocarcinoma cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 44, 281–287.
- Zhang, L., Zhang, J., Fang, H., Wang, Q., Xu, W., 2006. Design, synthesis and preliminary evaluation of new cinnamoyl pyrrolidine derivatives as potent gelatinase inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* 14, 8286–8294.
- Zhang, T., Suryawanshi, Y.R., Szymczyna, B.R., Essani, K., 2017. Neutralization of matrix metalloproteinase-9 potentially enhances oncolytic efficacy of tanapox virus for melanoma therapy. *Med. Oncol.* 34, 129.

ARTIGO II: ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO

European Journal of Medicinal Chemistry 183 (2019) 111688



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 μ M 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 (**9i**) were the most effective presenting over 80% toxicity on *L. braziliensis* amastigotes. While compound **5c** is a cinnamate with an isobenzofuranone portion, **9g** and **9i** 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.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111688>

0223-5234/© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

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(3*H*)-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**.

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.

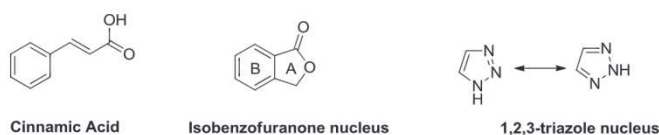
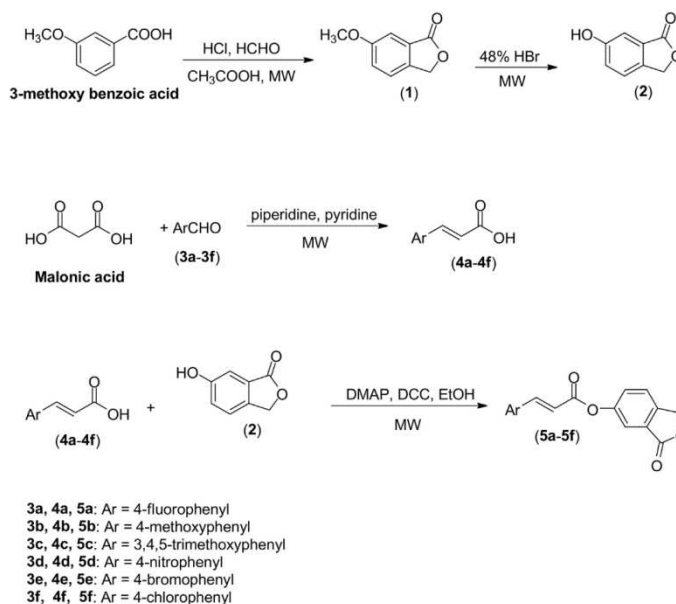


Fig. 1. Chemical structures of compounds mentioned in the text.



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.

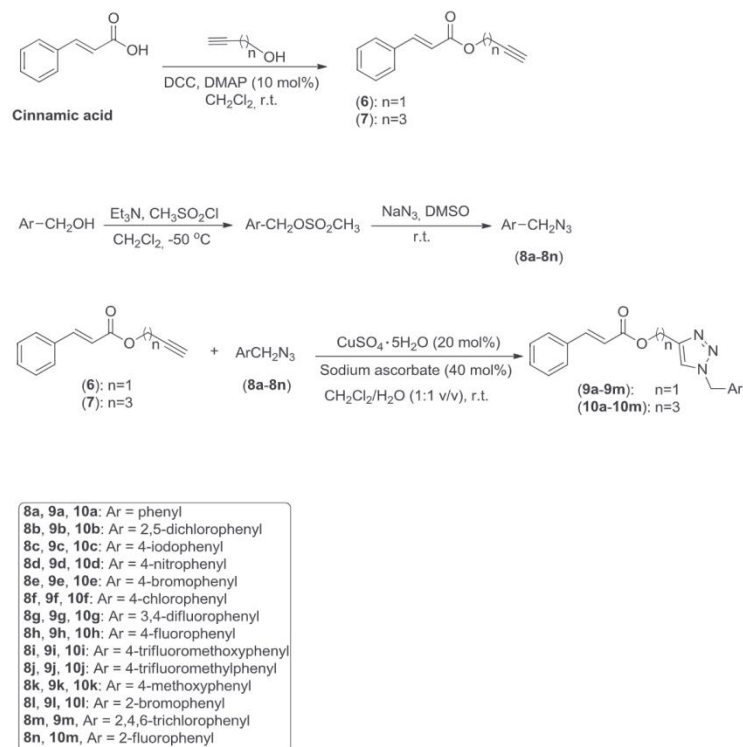
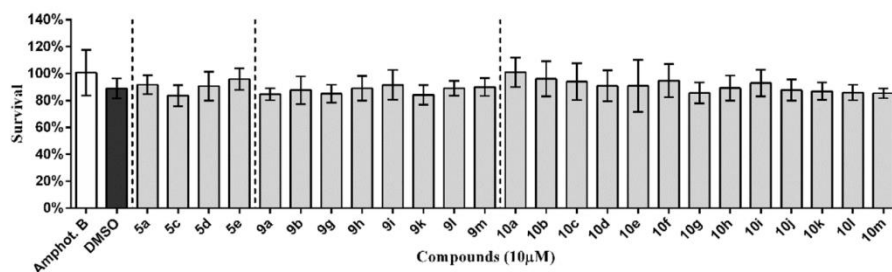
Scheme 2. Synthesis of ester cinnamates **9a–9m** and **10a–10m**.

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 $\mu\text{g/mL}$) 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

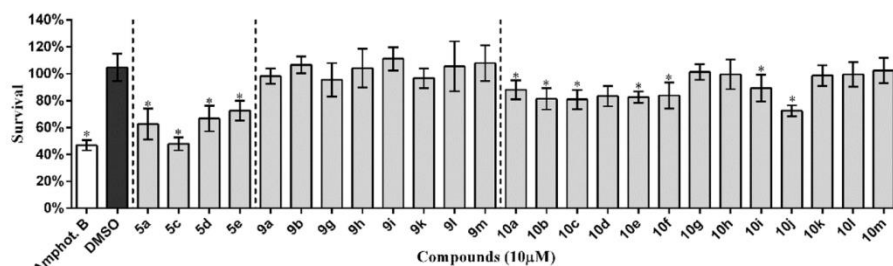


Fig. 3. Leishmanicidal activity against the promastigotes of *L. braziliensis*. Promastigotes from log phase were treated during 48 h with each compound and the rate of survival was evaluated by resazurin method. Each bar shows the mean of percentage of survival of promastigotes and the respective standard 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 µg/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 ($p \leq 0.05$).

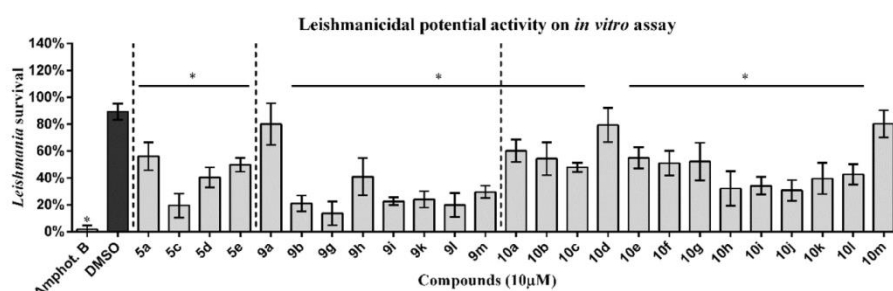


Fig. 4. Leishmanicidal activity against the *L. braziliensis* intracellular amastigotes. Promastigotes at log growth phase were used to infect macrophages. After the establishment of the infection, the cultures were treated for 48 h with each compound. Then, the macrophages were lysed and the released 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 µg/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.

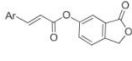
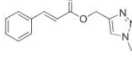
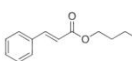
3. Material and methods

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	 5a: Ar = 4-fluorophenyl 5c: Ar = 3,4,5-trimethoxyphenyl 5d: Ar = 4-nitrophenyl 5e: Ar = 4-bromophenyl
5c	80.47	
5d	59.54	
5e	50.14	
Leishmanicidal activity		
9a	19.91	 9a: Ar = phenyl 9b: Ar = 2,5-dichlorophenyl 9g: Ar = 3,4-difluorophenyl 9h: Ar = 4-fluorophenyl 9i: Ar = 4-trifluoromethoxyphenyl 9k: Ar = 4-methoxyphenyl 9l: Ar = 2,4,6-trichlorophenyl 9m: Ar = 2-bromophenyl
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	 10a: Ar = phenyl 10b: Ar = 2,5-dichlorophenyl 10c: Ar = 4-iodophenyl 10d: Ar = 4-nitrophenyl 10e: Ar = 4-bromophenyl 10f: Ar = 4-chlorophenyl 10g: Ar = 2,4,6-trichlorophenyl 10h: Ar = 4-fluorophenyl 10i: Ar = 4-trifluoromethoxyphenyl 10j: Ar = 4-trifluoromethylphenyl 10k: Ar = 4-methoxyphenyl 10l: Ar = 2-bromophenyl 10m: Ar = 2-fluorophenyl
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-d₆ 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

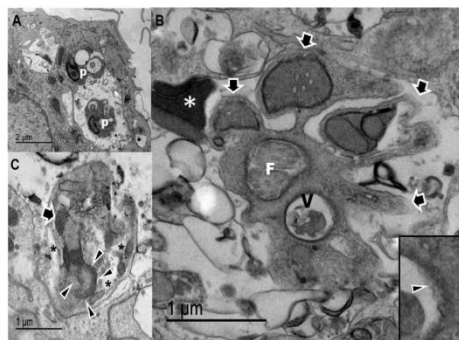


Fig. 5. Transmission electron microscopy of DMSO (A) and **5c**-treated (B, C) cultures. Control macrophages presented parasites (p) with well-preserved structure and electron density. **5c**-treated parasite within parasitophorous vacuole displaying large lobules (B, arrows) with cytoplasmic core containing 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 electro-lucent areas were also observed (black asterisks).

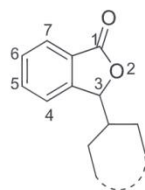


Fig. 6. General structures of isobenzofuranones investigated by Pereira et al. [37] as leishmanicidal compounds.

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 sodium, 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3500–3200 (broad band), 2980, 2600, 1688, 1625, 1227, 820. ^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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 2970–2760 (broad band), 1886, 1692, 1622, 1227, 814. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.49 (d, 1H, J_{trans} = 16.1 Hz), 7.43 (d, 2H, J = 8.3 Hz), 7.54 (d, 2H, J_{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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 2928–2520 (broad band), 1902, 1701, 1630, 1400, 821. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.51 (d, 1H, J_{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 $\times$ 6.00 mL), distilled water (5.00 mL) and brine (10.0 mL). The aqueous phase was then extracted with ethyl acetate (3 $\times$ 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3026, 2932, 1767, 1740, 1636, 1238, 829. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.42 (s, 2H), 6.87 (d, 1H, J_{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 $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FO}_4$, 299.0720; found: 299.0719. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{FNaO}_4$, 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 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_{trans} = 15.9 Hz), 7.00 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 7.58–7.78 (m, 5H), 7.84 (d, 1H, J_{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 $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_5$, 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 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_{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 $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_7$, 371.1131; found: 371.1127. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NaO}_7$, 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 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_{trans} = 16.2 Hz), 7.72–7.63 (m, 3H), 8.09 (d, 1H, J_{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 $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{NO}_6$, 326.0665; found: 326.0668. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{NaNO}_6$, 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3028, 2926, 2852, 1752, 1715, 1264, 811. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 5.42 (s, 2H), 7.94 (d, 1H, J_{trans} = 16.1 Hz), 7.78–7.60 (m, 7H), 7.86 (d, 1H, J_{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 $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{BrO}_4$, 358.9919; found: 358.9918. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{NaBrO}_4$, 380.9738; found: 380.9738. HRMS ($M + K^+$): Calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{NO}_6$, 326.0665; found: 326.0668. HRMS ($M + K^+$): Calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{KBrO}_4$, 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 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_{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 $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClO}_4$, 315.0424; found: 315.0421. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{NaClO}_4$, 337.0244; found: 337.0236. HRMS ($M + K^+$): Calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{NO}_6$, 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 MgSO₄, 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, CDCl₃) δ : 2.51 (t, 1H, *J* = 2.5 Hz), 4.82 (d, 2H, *J* = 2.5 Hz), 6.47 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz), 7.38–7.40 (m, 3H), 7.51–7.55 (m, 2H), 7.75 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) 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, CDCl₃) 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*_{trans} = 16.0 Hz), 7.37–7.40 (m, 3H), 7.51–7.54 (m, 2H), 7.69 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) 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 CuSO₄·5H₂O (0.0270 g, 0.108 mmol). The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature for 30 min. Subsequently, saturated Na₂CO₃ 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 MgSO₄, 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, CDCl₃) δ : 5.36 (s, 2H), 5.62 (s, 2H), 6.43 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz), 7.17–7.51 (m, 8H), 7.67–7.73 (m, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) 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 (M + H⁺): Calculated for C₁₉H₁₆Cl₂N₃O₂, 388.0620; found: 388.0607. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₁₉H₁₅Cl₂NaN₃O₂; 410.0439; found: 410.0412. HRMS (M + K⁺): Calculated for C₁₉H₁₅Cl₂KN₃O₂, 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 ¹³C). 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, CDCl₃) δ : 5.33 (s, 2H), 5.52 (s, 2H), 6.42 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz), 7.29–7.48 (m, 10H), 7.57 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, *J*_{trans} = 16.0 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) 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 (M + H⁺): Calculated for C₁₉H₁₈N₃O₂, 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, DMSO-*d*₆) δ : 5.25 (s, 2H), 5.55 (s, 2H), 6.59 (d, 1H, *J*_{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). ¹³C NMR (75 MHz, 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 (M + H⁺): Calculated for C₁₉H₁₇IN₃O₂, 446.0365; found: 446.0354. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₁₉H₁₆IN₃O₂; 468.0185; found: 468.0178. HRMS (M + K⁺): Calculated for C₁₉H₁₆IKN₃O₂, 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, DMSO-*d*₆) δ : 5.28 (s, 2H), 5.78 (s, 2H), 6.59 (d, 1H, *J*_{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). ¹³C NMR (75 MHz, 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 (M + H⁺): Calculated for C₁₉H₁₇N₄O₄, 365.1250; found: 365.1232. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₁₉H₁₆NaN₄O₄; 387.1069; found: 387.1059. HRMS (M + K⁺): Calculated for C₁₉H₁₆KN₄O₄, 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, DMSO-*d*₆) δ : 5.24 (s, 2H), 5.58 (s, 2H), 6.63 (d, 1H, *J*_{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). ¹³C NMR (75 MHz, 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 (M + H⁺): Calculated for C₁₉H₁₇BrN₃O₂, 398.0504; found: 398.0495. HRMS (M + Na⁺): Calculated for C₁₉H₁₆BrN₃O₂; 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 $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{O}_2$, 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, CDCl_3) 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, CDCl_3) 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 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$, 365.1211; found: 365.1193. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$, 378.1030; found: 387.1011. HRMS ($M + K^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$, 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, CDCl_3) 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, CDCl_3) 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 $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{FN}_3\text{O}_2$, 338.1305; found: 338.1296. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{O}_2$, 360.1124; found: 360.1119. HRMS ($M + K^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{O}_2$, 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, CDCl_3) 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, CDCl_3) 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 $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$, 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 $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$, 388.1273; found: 388.1263. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$, 410.1092; found: 410.1068. HRMS ($M + K^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$, 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, CDCl_3) 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, CDCl_3) 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 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3$, 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, CDCl_3) 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, CDCl_3) 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 $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 398.0504; found: 398.0493. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 420.0324; found: 420.0315. HRMS ($M + K^+$): Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 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, CDCl_3) 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, CDCl_3) 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, 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), 5.48 (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, CDCl_3) 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 $C_{21}H_{21}N_3O_2$, 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). 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 ($M + H^+$): 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 ($M + H^+$): 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 ($M + H^+$): 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 ($M + H^+$): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_2$, 366.1618; found: 366.1611. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_2$, 388.1437; found: 388.1424. HRMS ($M + K^+$): 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 μL /well of cell suspension (2.5×10^5 cells/mL) or 200 μL /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 leishmanicidal 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 Fiocruz 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] C.M. Skrab, 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. Prophi, 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. Shydykiv, 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.C. 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. Abolahi, 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. Korosec, M. Sova, S. Turk, N. Kraševac, 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 *Emeritella* 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 hyalinalis*, 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. Guilardi, 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. Montazati, O. Askari-Khorasani, E. Abdollahi, H. Sadeghi-Aliabadi, F. Mortazaeinezhad, A. Sahebkar, Phytochemical analysis and cytotoxicity evaluation of *Kelussia odoratissima* mozaif, *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* Mozaif 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 Rossimiriã 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 (azolylphenyl)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. Csuk, 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. Tributinio, 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-acylhydrazones derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 2051–2059.
 - [50] D.V. Demchuk, A.V. Samet, N.B. Chernysheva, V.I. Ushkarov, G.A. Stashina, I.D. Konyushkin, M.M. Raihstat, S.I. Firgang, A.A. Philchenkov, M.P. Zavelevich, I.M. Kuiaeva, 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 combretastatins 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. Perdihi, M. Kotnik, K. Kristan, T.L. Rizer, 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. Borgati, R.B. Alves, R.R. Teixeira, R.P. De Freitas, T.G. Perdigão, 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. Brennard, 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. Picard, 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.

**DEPÓSITO DE PATENTE: Composições à base de derivado do ácido cinâmico
com atividade leishmanicida e uso**



17/09/2019 870190092973
15:54
29409161905149823

**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

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

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

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

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

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

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****PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

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

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 Erly 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 Peticionamento Eletrônico 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 Peticionamento Eletrônico 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 Petição Eletrônica 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, Icarai

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 Peticionamento Eletrônico 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 Amazônia, 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 NACIONAL

DILMA VANA ROUSSEFF
Presidente da República

GLEISI HÉLINA HOFFMANN
Ministra de Estado Chefe da Casa Civil

FERNANDO TOLENTINO DE SOUSA VIEIRA
Diretor-Geral da Imprensa Nacional

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

SEÇÃO 1

Publicação de atos normativos

SEÇÃO 2

Publicação de atos
relativos a pessoal da
Administração Pública Federal

SEÇÃO 3

Publicação de contratos,
editais, avisos e memorandos

JORGE LUIZ ALENCAR GUERRA
Coordenador-Geral de Publicação e Divulgação

ALEXANDRE MIRANDA MACHADO
Coordenador de Editoração e
Divulgação Eletrônica dos Jornais Oficiais

FRANCISCO 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> ou assinaturas@in.gov.br
SEI, Quadra 6, Lote 600, CEP 70011-900, Brasília - DF
FONE: (061) 3311-0000
FAX: (061) 3311-0000

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 CIRÍACO 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,

ALÍOMAR ARAPIRACA DA SILVA do cargo de Chefe do Escritório Especial em Almirante, 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 Almirante, 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/SGSP, publicada no DOU nº 22, de 01/02/2010, referente à concessão de aposentadoria do ex-servidor, matrícula ABIN nº 007036, incluir 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 9.830/99.

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/PROCI, de 13 de fevereiro de 2009, resolve:

Nº 362 - DISPENSAR, a pedido,

o Cb PMDF WILSON 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 INDIÍ, com base no art. 152, da Lei 8.112, de 11 de dezembro de 1990, e considerando o que consta do Processo Administrativo nº 00406.0014432012-05, resolvem:

Art. 1º Promove-se por 60 (sessenta) dias o prazo para conclusão dos trabalhos da Comissão de Processo Administrativo Disciplinar nº 00406.000324/2012-27, designada pela Portaria Conjunta CGAU/PGF/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 União
MARCELO DE SIQUEIRA FREITAS
Procurador-Geral Federal

MARTA 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 00407.004953/2012-45, resolve:

Nº 725 - DESIGNAR

DANIELE PLÁCIDO LENGUEIRER, Procurador Federal, matrícula Sisppe nº 1585426, para exercer a função de Chefe de Setor de Divisão 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 Sisppe nº 0934712, da função de Chefe de Seção de Cobrança e Recuperação de Créditos, código FG-1, da Procuradoria Regional 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 Sisppe nº 1480151, para exercer a função de Chefe de Seção de Cobrança e Recuperação de Créditos, código FG-1, da Procuradoria Regional Federal em Campinas/SP.



DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

República Federativa do Brasil - Imprensa Nacional

Em circulação desde 1º de outubro de 1862

Ano LVI Nº 94

Brasília - DF, quarta-feira, 20 de maio de 2015



SEÇÃO

2

Sumário

	PÁGINA
Atos do Poder Executivo	1
Presidência da República	1
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	5
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação	7
Ministério da Cultura	7
Ministério da Defesa	8
Ministério da Educação	14
Ministério da Fazenda	35
Ministério da Integração Nacional	45
Ministério da Justiça	46
Ministério da Pesca e Aquicultura	48
Ministério da Previdência Social	49
Ministério da Saúde	49
Ministério das Comunicações	51
Ministério das Relações Exteriores	51
Ministério de Minas e Energia	52
Ministério do Desenvolvimento Agrário	52
Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome	53
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior	53
Ministério do Esporte	53
Ministério do Meio Ambiente	53
Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão	54
Ministério do Trabalho e Emprego	55
Ministério do Turismo	57
Ministério dos Transportes	57
Conselho Nacional do Ministério Público	58
Ministério Público da União	58
Tribunal de Contas da União	60
Poder Legislativo	60
Poder Judiciário	61
Edições e Arquivos	70

Atos do Poder Executivo

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

DECRETOS DE 19 DE MAIO DE 2015

A PRESIDENTA DA REPÚBLICA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, caput, inciso XXV, da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 16, caput, inciso I, da Lei nº 5.540, de 28 de novembro de 1968, resolve:

Páginas	Distrito Federal	Demais Estados
de 02 a 25	R\$ 0,30	R\$ 1,80
de 26 a 75	R\$ 0,50	R\$ 2,00
de 80 a 155	R\$ 1,10	R\$ 2,60
de 160 a 250	R\$ 1,50	R\$ 3,00
de 255 a 500	R\$ 3,00	R\$ 4,50

Acima de 500 páginas = preço de tabela mais excedente de páginas multiplicado por R\$ 0,0107

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, Petição 870 (2015) de 20/05/2015, página 11/39

NOMEAR

ÂNGELA MARIA PAIVA CRUZ, Professora da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, para exercer o cargo de Reitora da referida Universidade, com mandato de quatro anos.

Brasília, 19 de maio de 2015; 194ª da Independência e 127ª da República.

DILMA ROUSSEFF
Luz Cláudio Costa

A PRESIDENTA DA REPÚBLICA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 84, caput, inciso XXV, da Constituição, e tendo em vista o disposto no art. 16, caput, inciso I, da Lei nº 5.540, de 28 de novembro de 1968, resolve:

NOMEAR

NILDA DE FÁTIMA FERREIRA SOARES, Professora da Universidade Federal de Viçosa, para exercer o cargo de Reitora da referida Universidade, com mandato de quatro anos.

Brasília, 19 de maio de 2015; 194ª da Independência e 127ª da República.

DILMA ROUSSEFF
Luz Cláudio Costa

Presidência da República

DESPACHOS DA PRESIDENTA DA REPÚBLICA

ADVOCACIA-GERAL DA UNIÃO

Exposição de Motivos

Nº 19, de 13 de maio de 2015. Afastamento do País do Advogado-Geral da União, com fins, no período de 20 a 24 de maio de 2015, inclusive trânsito, com destino a Washington, D.C., Estados Unidos da América, para proferir palestra na Conferência Courts and the Rule of Law in Democratic Brazil. Autoriza. Em 19 de maio de 2015.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

Exposição de Motivos

Nº 20, de 14 de maio de 2015. Afastamento do País do Ministro de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação, com fins, no período de 25 a 29 de maio de 2015, inclusive trânsito, com destino a Washington, D.C., Estados Unidos da América, para participar da IV Reunião da Comissão Mista Brasil-Estados Unidos de Cooperação Científica e Tecnológica, de Fórum de Inovação organizado pelo Conselho Empresarial Brasil-Estados Unidos e de reuniões no Banco Interamericano de Desenvolvimento, na Administração Nacional de Aeronáutica e do Espaço, nos Institutos Nacionais de Saúde e no Museu Smithsonian. Autoriza. Em 19 de maio de 2015.

MINISTÉRIO DA FAZENDA

Exposição de Motivos

Nº 56, de 14 de abril de 2015. Alteração do afastamento do País do Ministro de Estado da Fazenda, objeto do despacho publicado no Diário Oficial da União de 10 de abril de 2015, Seção 2, página 1, para fazer constar o período de 14 a 22 de abril de 2015, mantidas as demais condições. Ciente. Em 19 de maio de 2015.

CASA CIVIL

PORTARIAS DE 19 DE MAIO DE 2015

CONTROLADORIA-GERAL DA UNIÃO

O MINISTRO 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 911 - NOMEAR

RENATO DE LIMA FRANÇA, para exercer o cargo de Assessor Especial da Secretaria-Executiva da Controladoria-Geral da União, código DAS 102.5.

ALORZIO MERCADANTE OLIVA

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO

O MINISTRO 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 912 - EXONERAR

RAILDY AZEVEDO COSTA MARTINS do cargo de Assessora Especial de Controle Interno do Ministério do Desenvolvimento Agrário, código DAS 102.5.

Nº 913 - NOMEAR

LUCIMAR CEVALLOS MIJAN, para exercer o cargo de Assessora Especial de Controle Interno do Ministério do Desenvolvimento Agrário, código DAS 102.5.

ALORZIO MERCADANTE OLIVA

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR

O MINISTRO 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 914 - EXONERAR, a pedido,

HELDER SILVA CHAVES do cargo de Assessor Especial da Secretaria-Executiva da Câmara de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 102.5.

Nº 915 - NOMEAR

FERNANDO DE MAGALHÃES FURLAN, para exercer o cargo de Assessor Especial da Secretaria-Executiva da Câmara de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 102.5.

Nº 916 - EXONERAR

ALEXANDRE COMIN do cargo de Diretor do Departamento de Competitividade Industrial da Secretaria do Desenvolvimento da Produção do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 101.5, a partir de 1º de abril de 2015.

Nº 917 - NOMEAR

IGOR NOGUEIRA CALVET, para exercer o cargo de Diretor do Departamento de Competitividade Industrial da Secretaria do Desenvolvimento da Produção do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, código DAS 101.5.

ALORZIO MERCADANTE OLIVA

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 antroponoses 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 antimoniatos pentavalentes (Sb^{5+}). Entre eles, o antimoniato 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 μ M). 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 μ g / 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 μ M). *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 μ g / mL) e a barra preta (controle negativo) representa células tratadas com DMSO na mesma concentração utilizada na diluição dos compostos (0,1%). *Diferença estatística 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 ($[\text{M}]^+$, $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$).

- 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)** $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 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 ^{13}C (75 MHz, CD_3OD)** 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 ($[\text{M}]^+$, $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$).

- *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 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 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 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 ¹³C (75 MHz, CD₃OD) 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: ([M]⁺ 238, C₁₂H₁₄O₅).

- 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) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3026, 2932, 1767, 1740, 1636, 1238, 829 cm^{-1} .

58. RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) 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, $J_1 = 8,4$ Hz; $J_2 = 2,1$ 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 ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 70,5 (C-2); 116,5 (d, $J_{\text{C-F}}=21,8$; 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, $J_{\text{C-F}}=3,1$ Hz; C-4'); 131,6 (d, $J_{\text{C-F}}=8,7$ Hz; C-5', C-9'); 145,1 (C-8); 146,1 (C-3'); 151,2 (C-5); 164,2 (d, $J_{\text{C-F}}=248,3$ 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 uma 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 x 10⁵ células/mL). Os resultados estão apresentados na 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 µg / 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 OsO₄ a 1%, K₃ [Fe (CN)₆] a 0,8% e CaCl₂ 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, anidrido 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 IC_{50} 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 μ M, 40 μ M, 30 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M e 1 μ M. 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) (μ M)	IC_{50} Raw 264.7 macrófago (48 horas) (μ M)	IC_{50} <i>L. braziliensis</i> forma amastigota (48 horas) (μ M)	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.

79. 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 IC₅₀ 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

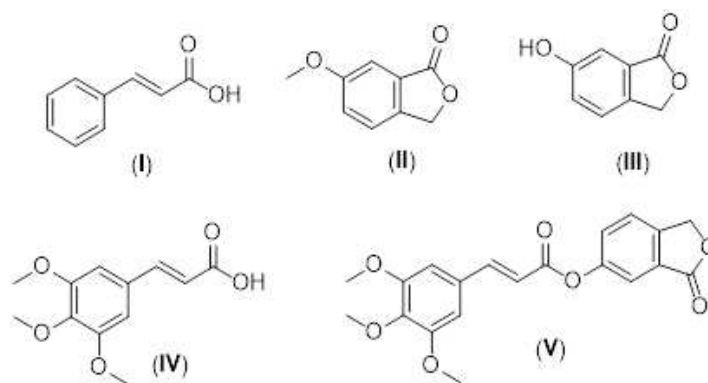


Figura 1

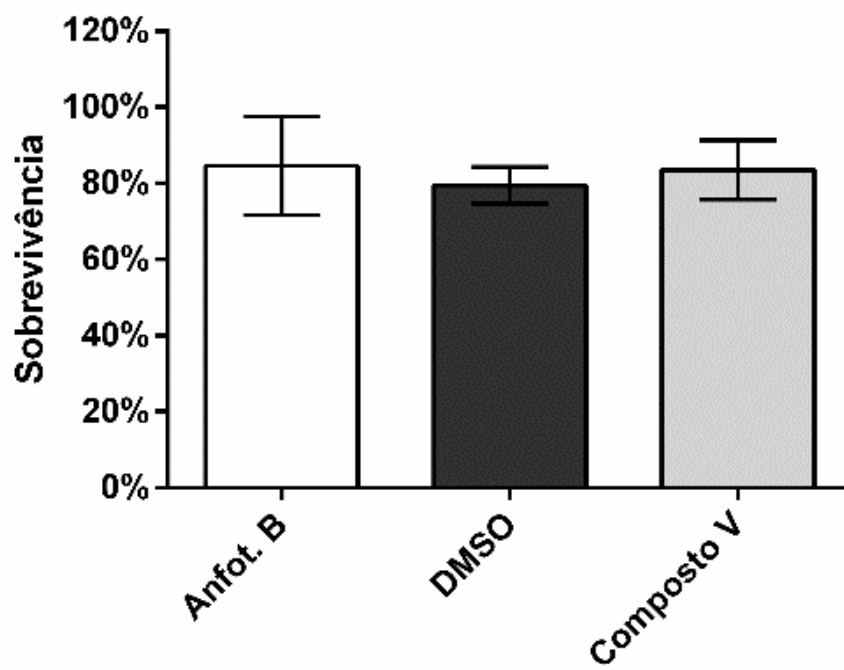


Figura 2

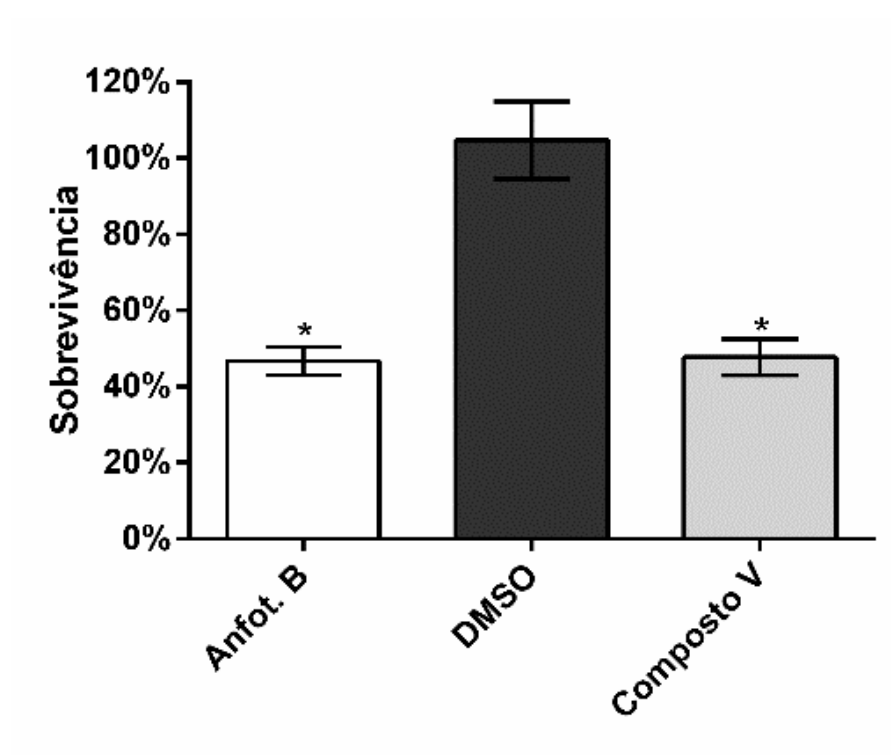


Figura 3

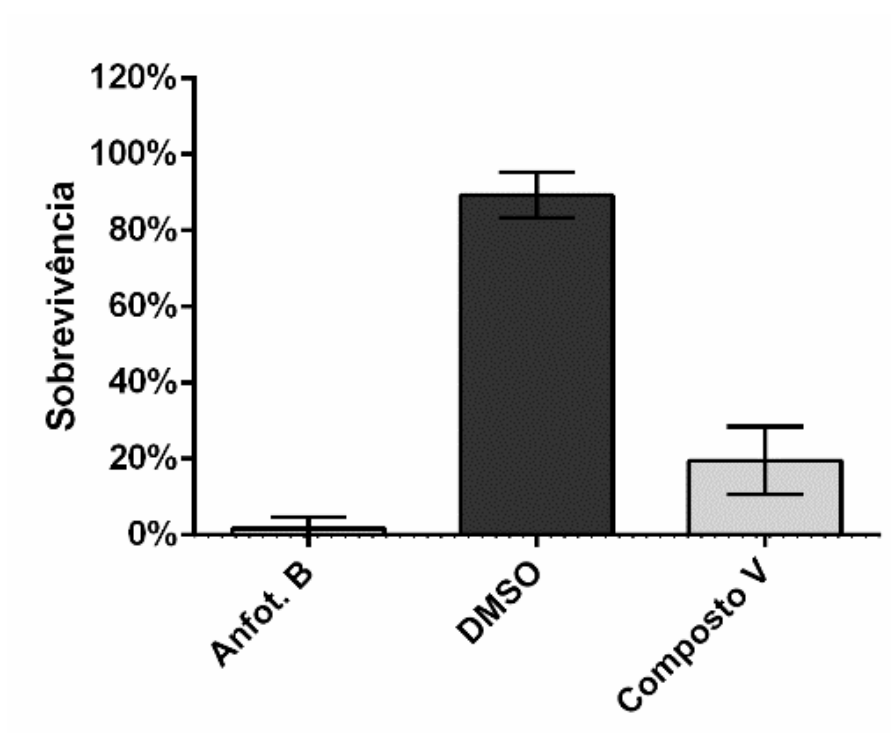


Figura 4

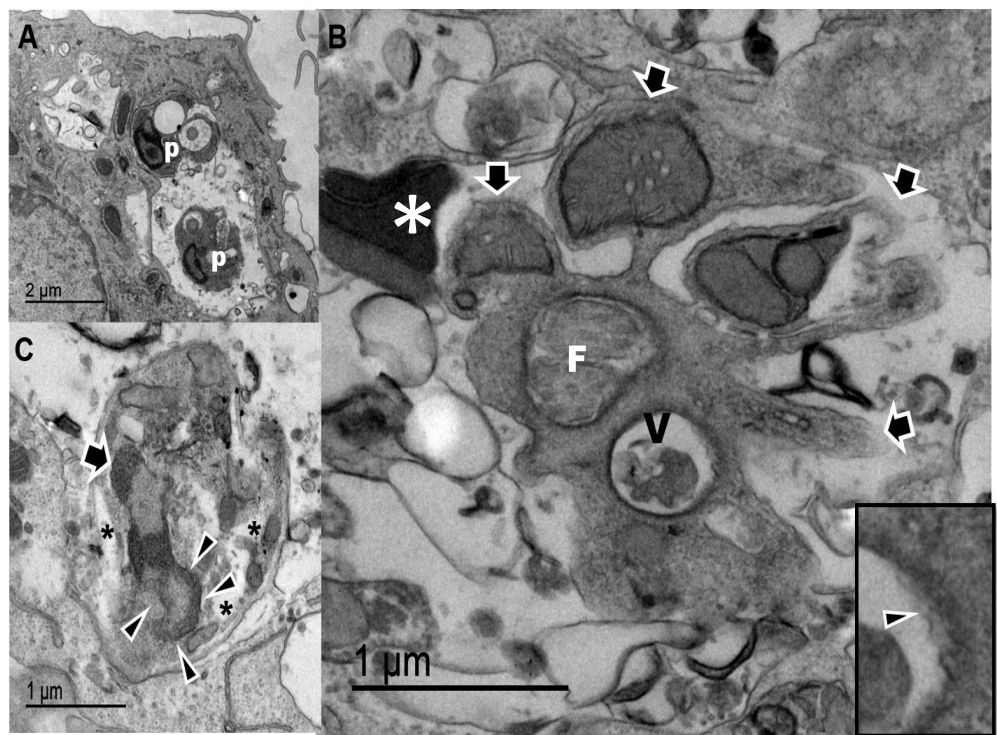


Figura 5

CAPÍTULO DE LIVRO: BIS-AZIDES

Carta de aceite

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 Thomaz¹, 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 ($-N_3$) 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.

Keywords: Azides, organic Azides, Bis-Azides

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

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

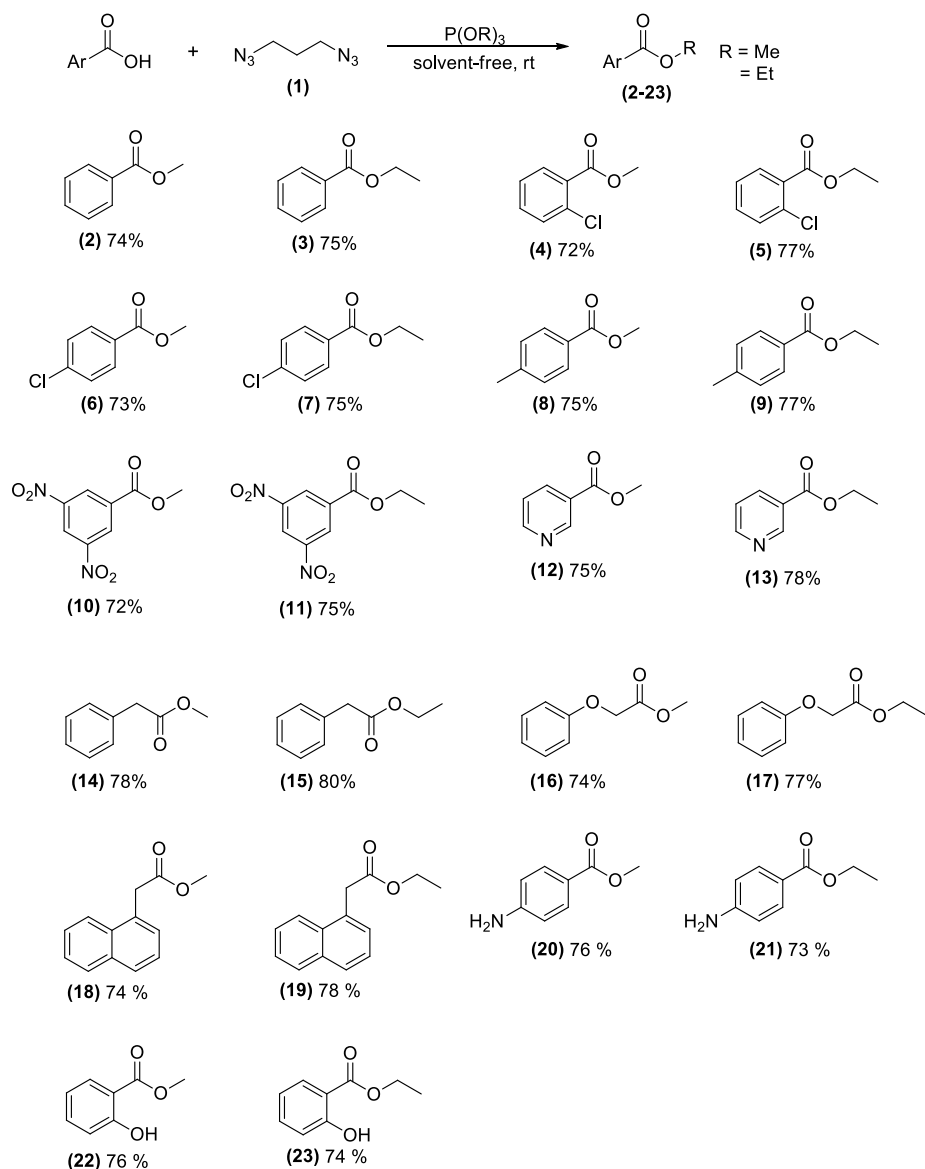
The esterification is an important process in organic chemistry. Esters can be prepared using mineral acids, a variety of activating agents, and several catalysts [10]. Ponnuswam and co-authors found that the combination of bis-azides with trialkyl phosphites or triphenyl phosphine is an alternative 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].

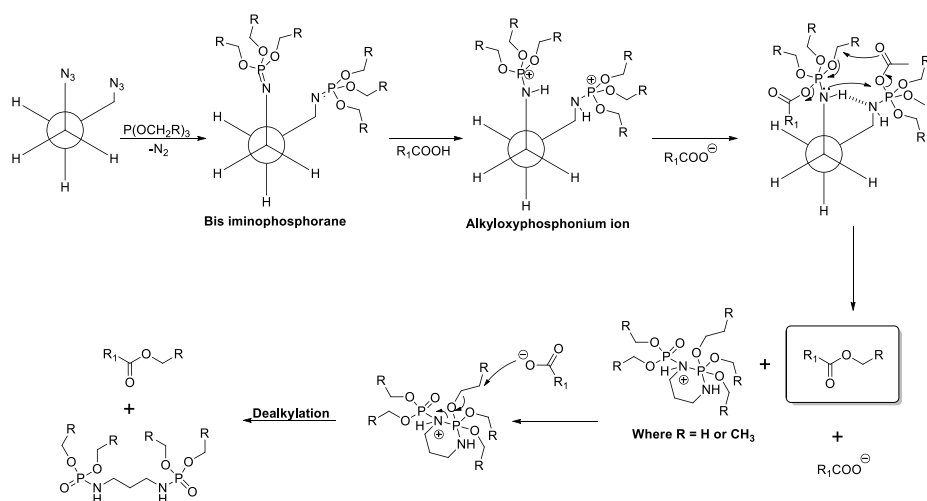
The inconvenience of the aforementioned method is that the phosphites must be prepared before running the esterification. Considering this, it was hypothesized that the trialkylphosphites could be replaced by triphenylphosphine. In fact, the reaction of bis-azide (1) with carboxylic acids in the presence 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].

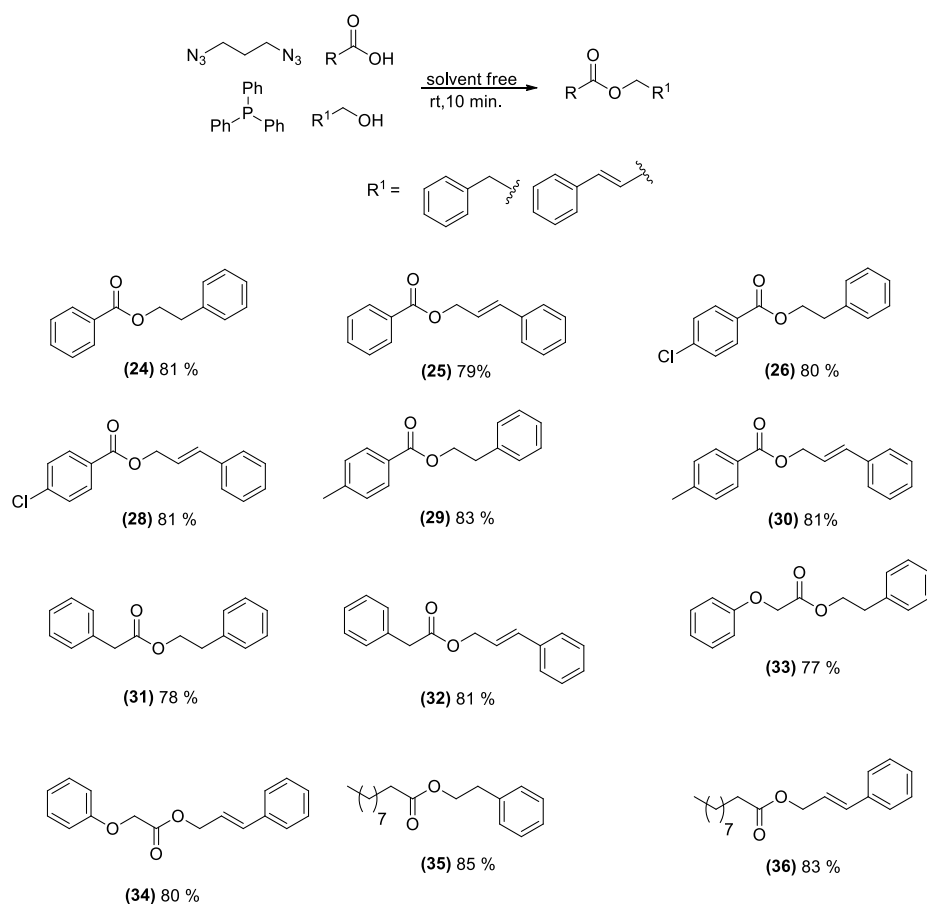
The chemistry of 3,3-diazidoenones (38) has been recently investigated [12]. These compounds can be prepared from the corresponding 3,3-dichlorovinyl ketones (37) which, in turn, can be made from 1,1-dichloroethene and acyl chlorides (Scheme 5).



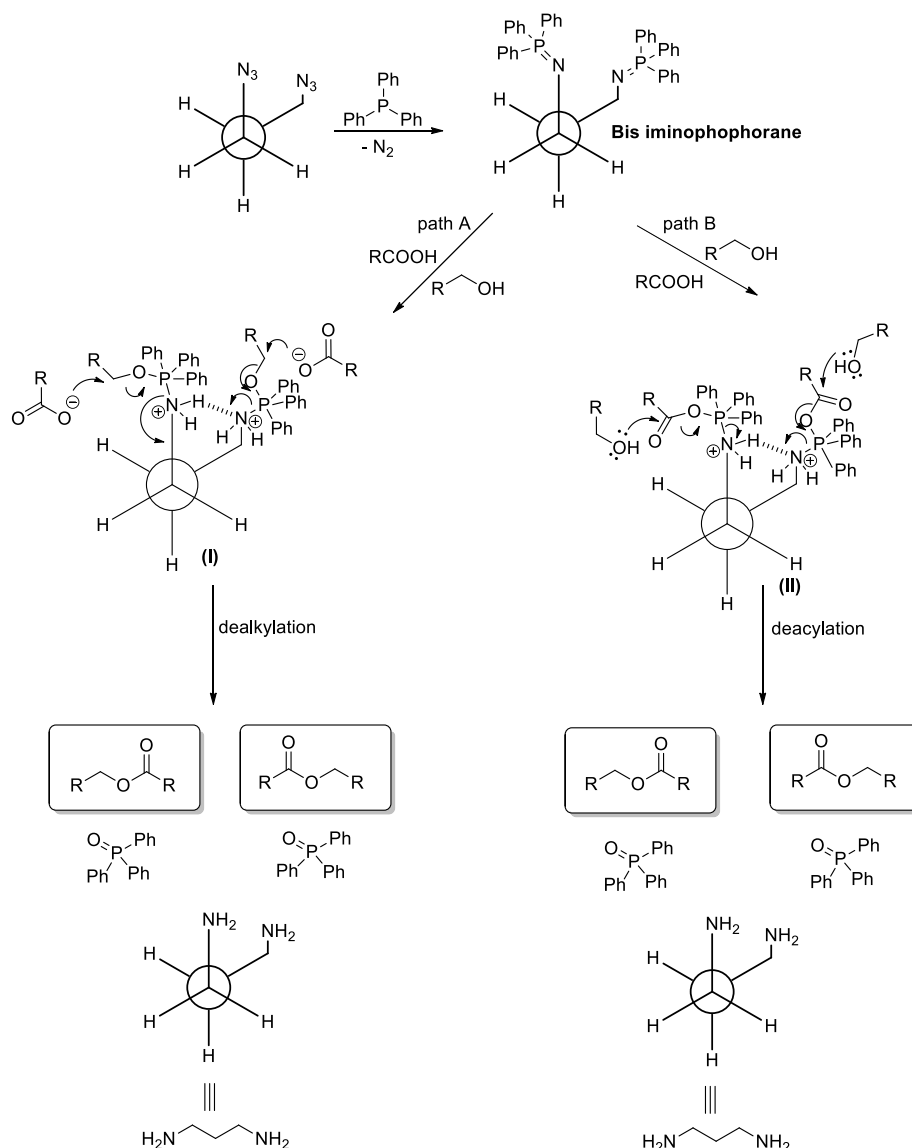
Scheme 1. Preparation of esters from bis-azide (1) and trimethyl or triethyl phosphites. Reaction conditions: 1,3-diazidopropane (1) (0.5 mmol), trimethyl phosphite/triethyl phosphite (1.0 mmol) and carboxylic acid (1.0 mmol) were stirred at room temperature for 20 min.



Scheme 2. Proposed mechanism for the esterification using trialkylphosphites.

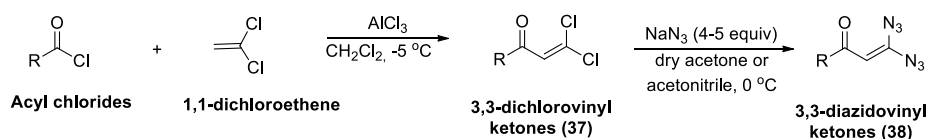


Scheme 3. Preparation of esters (24)-(36). Reaction conditions: To a mixture of triphenylphosphine (1.0 mmol), 2-phenylethanol/cinnamyl alcohol (1.0 mmol) and carboxylic acid (1.0 mmol), 1,3-diazidopropane (1) (0.5 mmol) was added slowly in a drop wise manner (to avoid accumulation of azide) and the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



Scheme 4. Proposed mechanism for esterification using triphenylphosphine.

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 N_2 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)

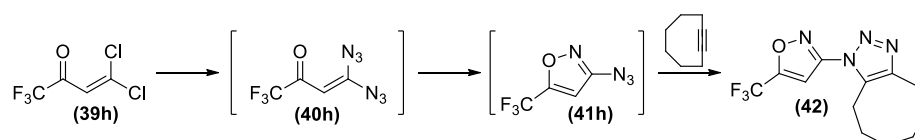
Table 2. Formation of azidoisoxazoles in ionic liquids

Compound	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)

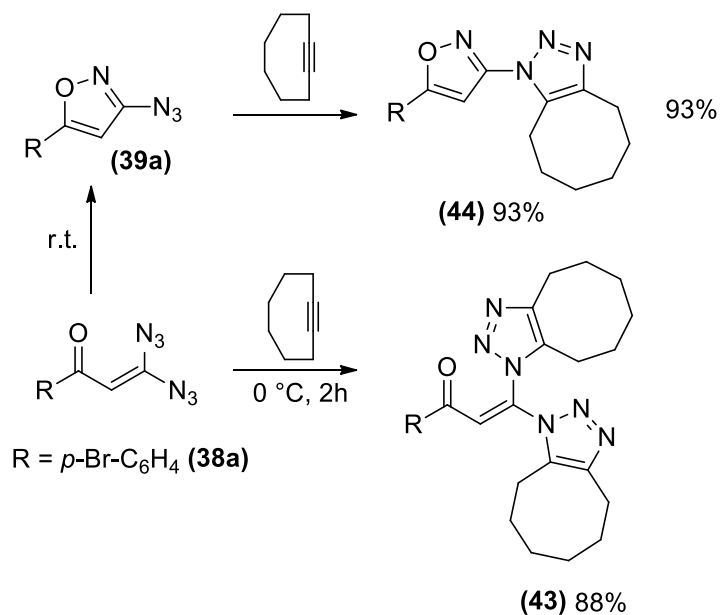
Starting ketone	R	Time for the conversion of (40) to (41), h	Yield of (41) (%)
37e	CH ₃ CH ₂ CH ₂	36.0 (40e)	30 (41e)
37f	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂	40.0 (40f)	36 (41f)
38g	(CH ₃) ₂ CBr	1.5 (40g)	36 (41g)
39h	CF ₃	1.0 (40h)	40 (41h)

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 difficult 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).



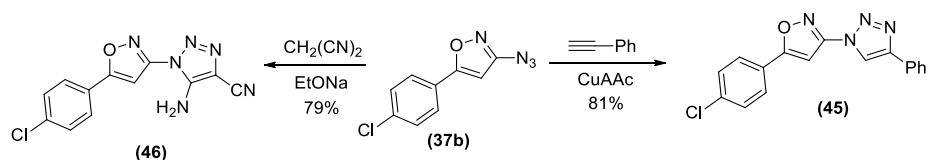
Scheme 6. Trapping reaction of compound (41h) with cyclooctyne.

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].



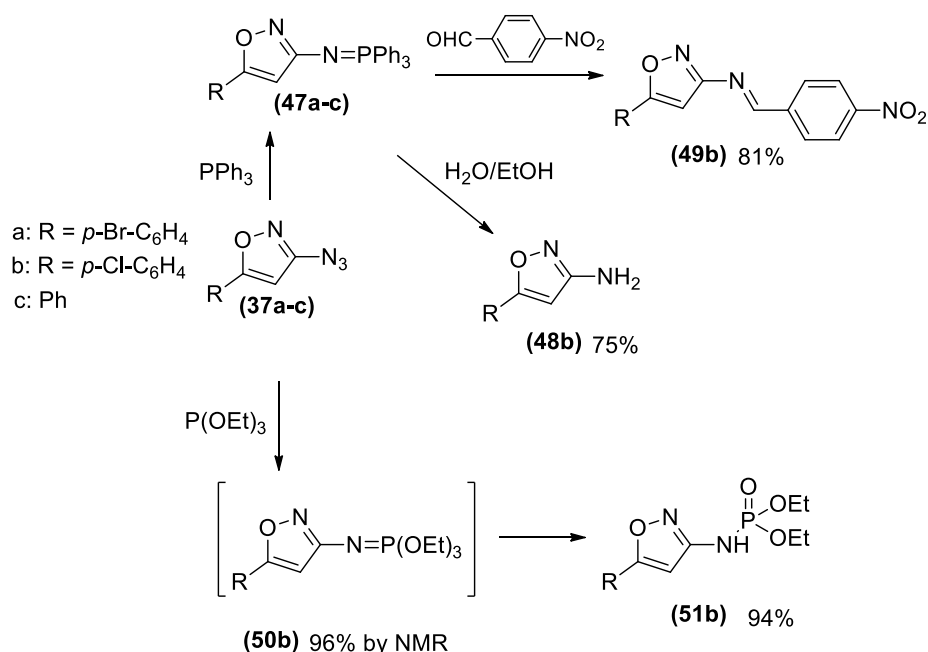
Scheme 7. Preparation of 1,2,3-triazoles from 3,3-diazidoenone (38a).

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).

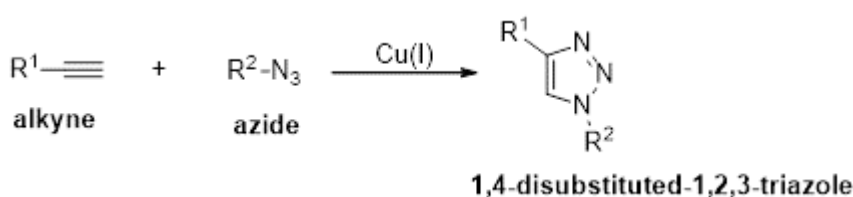
To further demonstrate their synthetic utility, azidoisoxazoles (39a-c) were converted in the phosphorous and nitrogen derivatives shown in Scheme 9.



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).



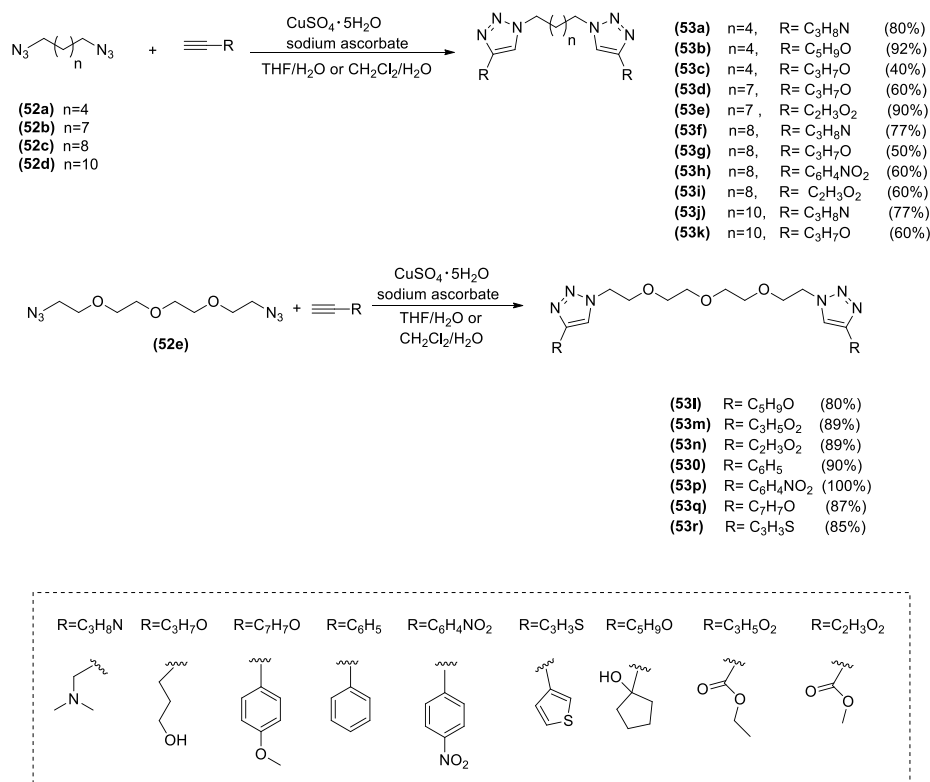
Scheme 10. General scheme of the CuAAC reaction.

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 IC_{50} values obtained for each compound as follows:

$$\text{SI} = \text{IC}_{50} \text{ Y} / \text{IC}_{50} \text{ X},$$

Where $\text{IC}_{50} \text{ X}$ is the IC_{50} value obtained for the MDA-MB 231 and TOV-21G cell lines and $\text{IC}_{50} \text{ Y}$ is the IC_{50} 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

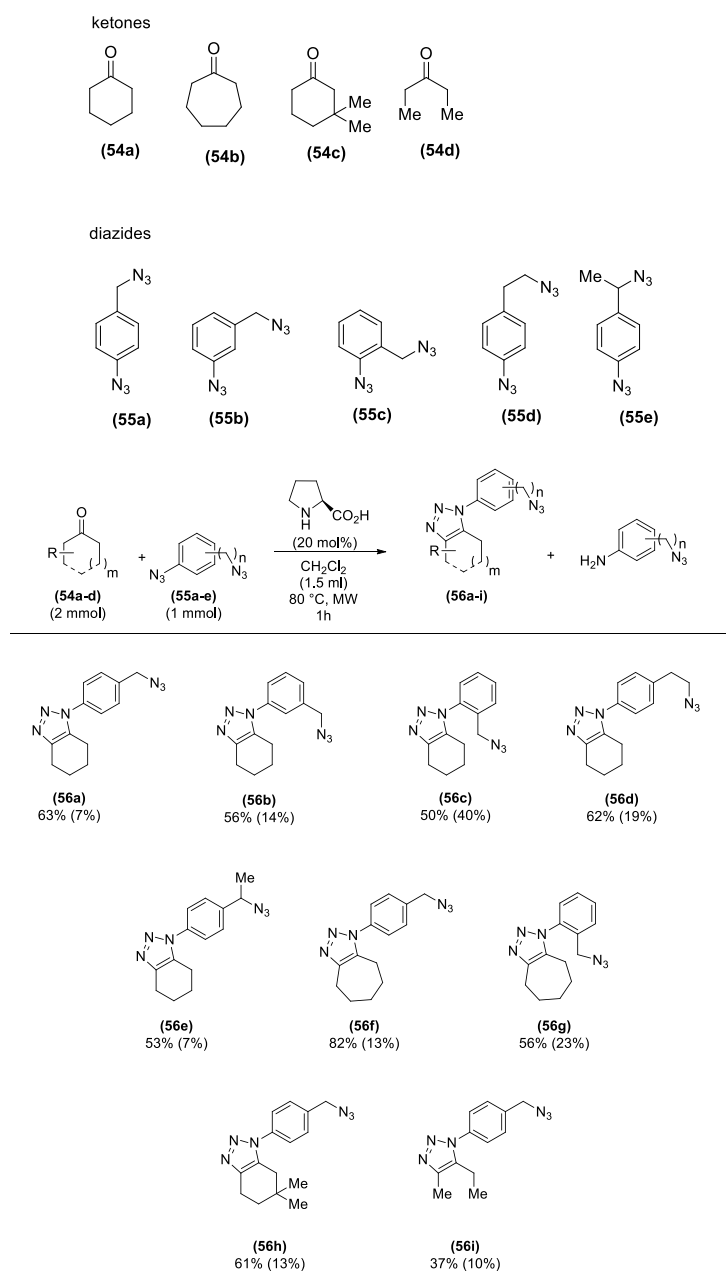
IC₅₀ = the compound concentration that reduced cell viability by 50%.

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.

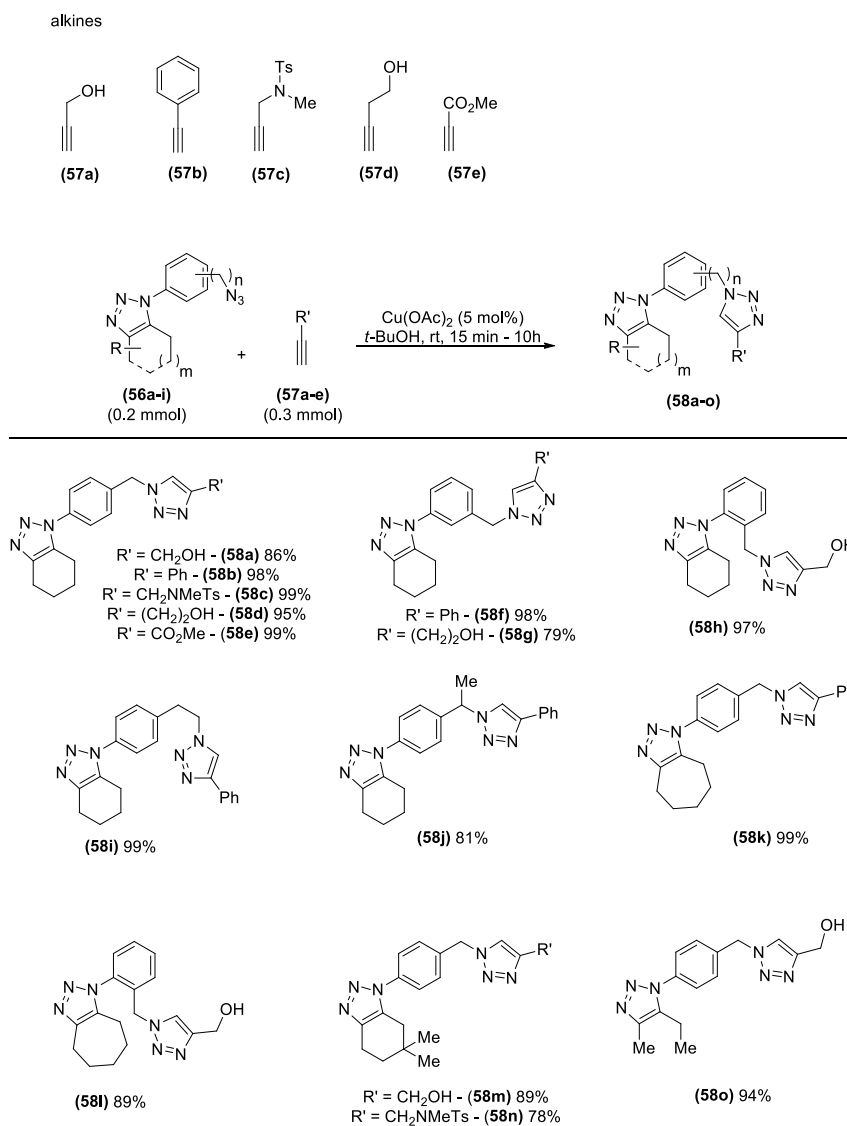
The synthetic strategy used for the preparation of compounds (53a-53r) has also been recently utilized by other researchers [31].

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.



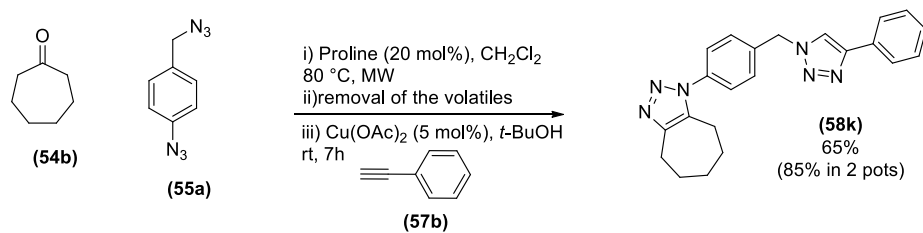
Scheme 12. Organoclick step of the organoclick-click sequence reported by Bressy and co-workers [32].

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].

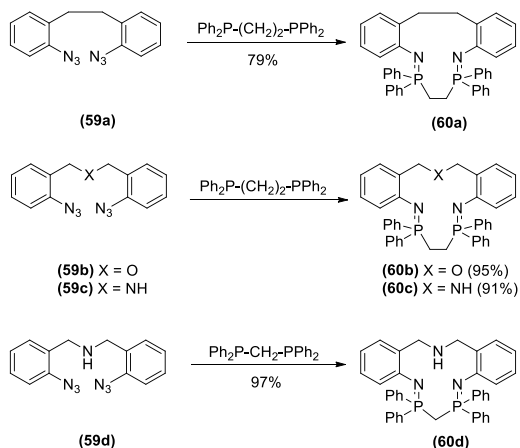
A one-pot procedure was also developed. In this case, the monoazide intermediate was not isolated (Scheme 14).



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

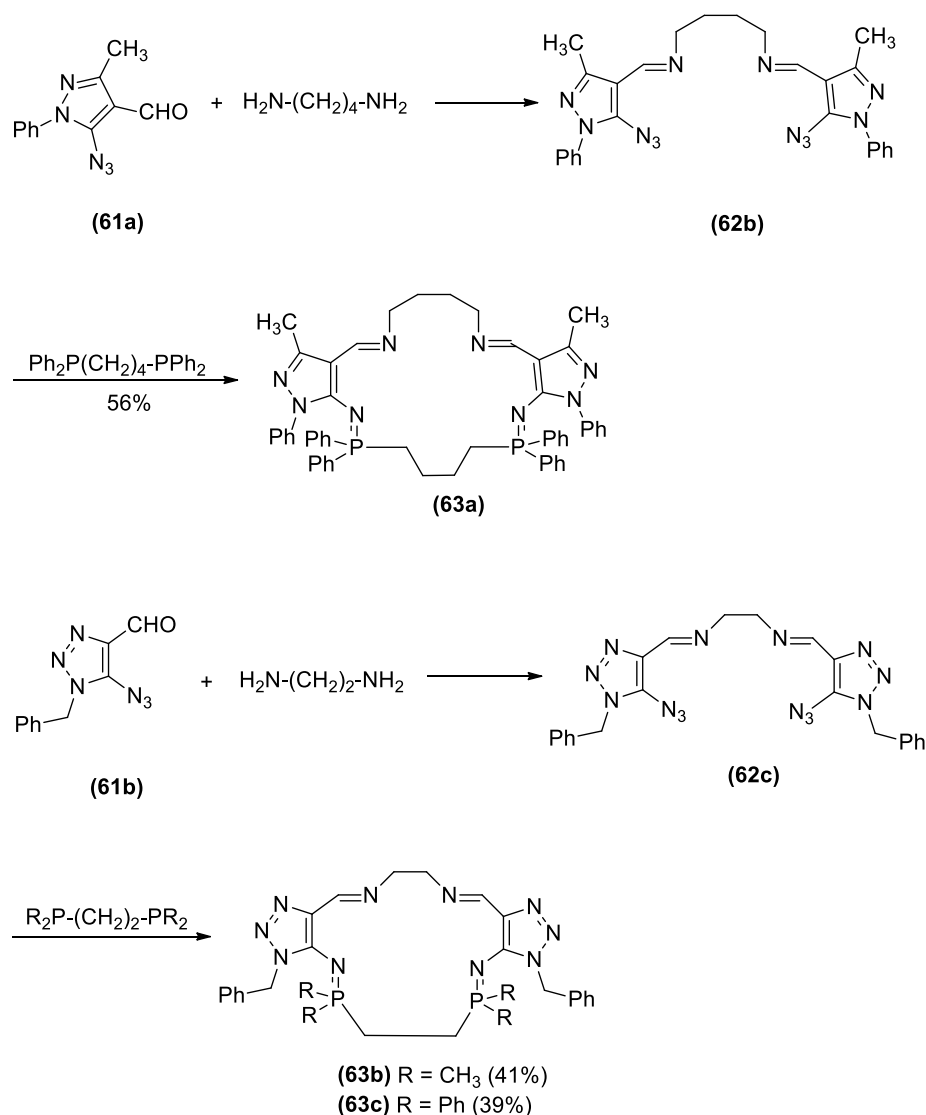
SYNTHESIS OF FUNCTIONALIZED MACROCYCLES

Macrocycles bis-iminophosphoranes can be efficiently synthesized via Staundinger 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].

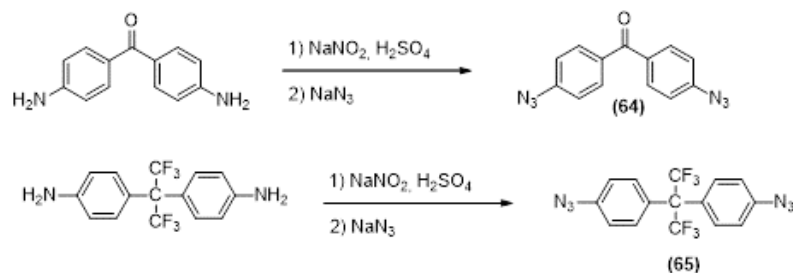
Variations of this reaction were developed (Scheme 16). Starting from aldehydes (61a-b), the imines (62a-b) were obtained and treated with bisphosphines affording the macrocycles (63a-c) with moderate yields.



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.



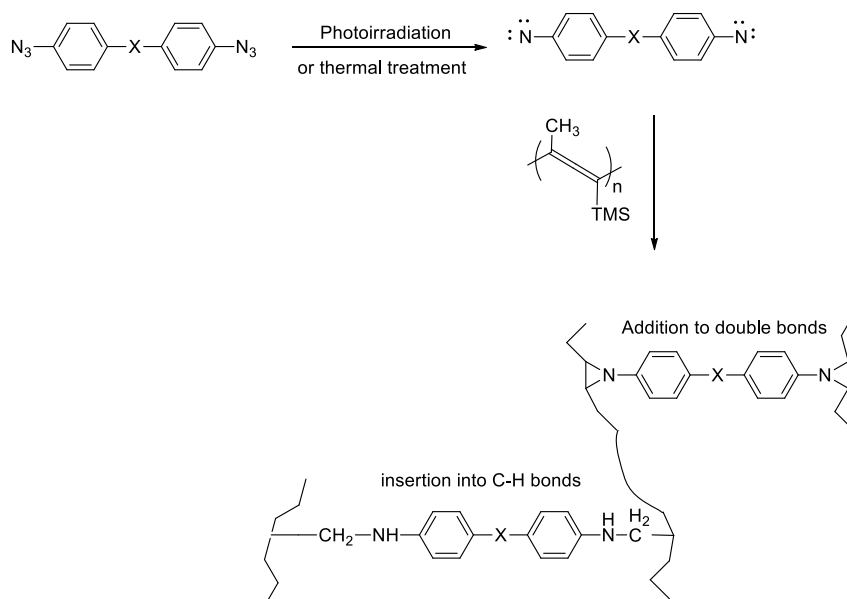
Scheme 17. Synthesis of bis-azides (64) and (65).

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).

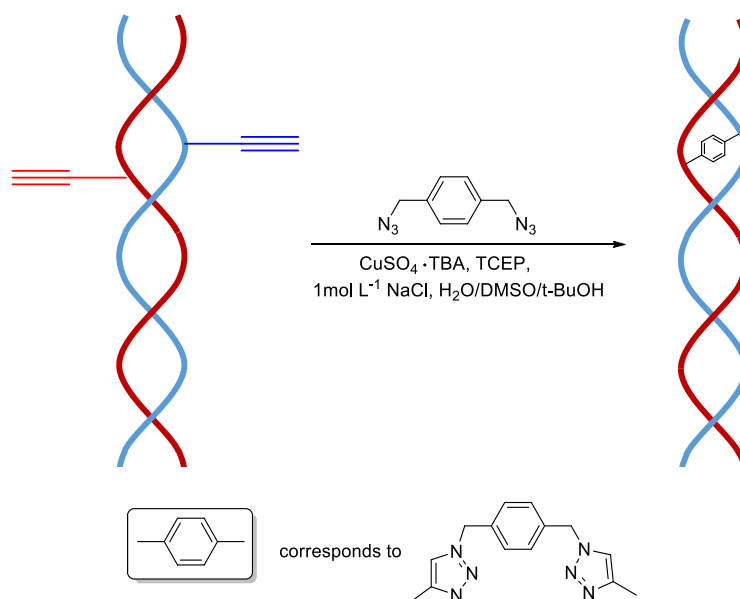
The cross-linked films were tested for the N₂ and O₂ gas permeability. It was found that the cross-linked polymers were less permeable than PTMSP (66) [34].

PREPARATION OF CROSS-LINKED DNA

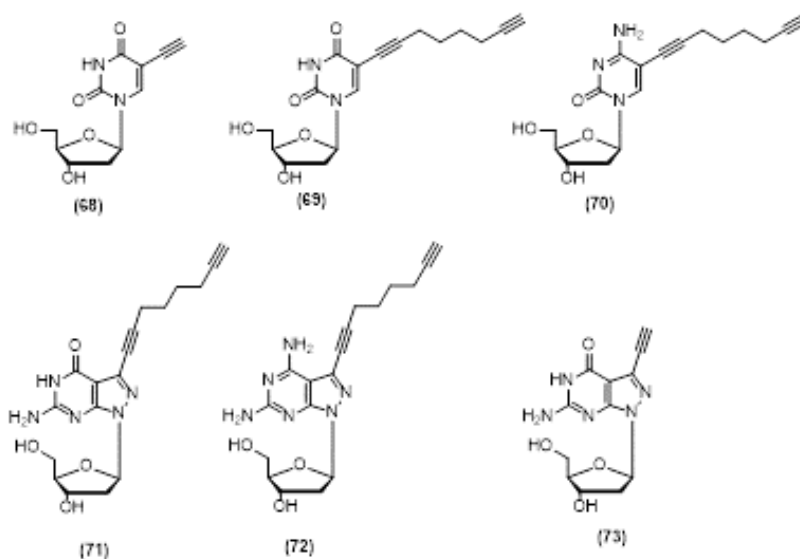
In this last section, it is pointed out that heterodimeric interstrand cross-linked DNA was obtained by Xiong and Seella [35]. Their approach involved a double-click reaction between preformed oligonucleotide duplexes and the bis azide (67) (Scheme 19).



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 regioselective 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). Recent 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] Dügçdü, E., Ünlüer, D., Çelik, F., Sancak, K., Karaoğlu, S. A. & Özel, A. (2016). 1,2,3-bis-triazole 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 DNA: 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.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, C. R. M.; FILHO, C. A. L.; SANTOS, V. L. A.; MAIA, G. L. A.; GONSALVES, A. A. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder®. **Química Nova**, v. 38, p. 868-873, 2015.
- BARBOSA, T. P.; SOUSA, S. C. O.; AMORIM, F. M.; RODRIGUES, Y. K. S.; DE ASSIS, P. A. C.; CALDAS, J. P. A.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. L. A. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 4250-4256, 2011.
- BOZOROV, K.; ZHAO, J.; AISA, H. A. 1,2,3-Triazole-containinghybridsasleadsinmedicinalchemistry:Arecent overview. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 3511-3531, 2019.
- DUA, R.; SHRIVASTAVA, S.; SONWANE, S. K.; SRIVASTAVA, S. K. Pharmacological significance of synthetic heterocycles scaffold: A Review. **Advances in Biological Research**, v. 5, p. 120-144, 2011.
- GOMTSMAN, A. Heterocycles in drugs and drug discovery. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 48, p. 7-10, 2012.
- HEIN, J. E.; FOKIN, V. V. Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 1302-1315, 2010.
- PEARCE, S. The importance of heterocyclic compounds in anti-cancer drug design. **Drug Discovery World Summer**, s/v, p. 66-70, 2017.
- PETROVA, K. T.; POTEWAR, T. M.; CORREIA-DA-SILVA, P.; BARROS, M. T.; CALHELHA, R. C.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Antimicrobial and cytotoxic activities of 1,2,3-triazole-sucrose derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 417, p. 66-71, 2015.
- RODRIGUES, M. P. **Síntese e avaliação de bioatividades de derivados do ácido cinâmico contendo o núcleo 1,2,3-triazólico**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

- TEIXEIRA, R. R.; GAZOLLA, P. A. R.; DA SILVA, A. M.; BORSODI, M. P. G.; BERGMANN, B. R.; FERREIRA, R. S.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; LIMA, W. P. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 274-286, 2018.
- TEIXEIRA, R. R.; DA SILVA, A. M.; SIQUEIRA, R. P.; GONÇALVES, V. H. S.; PEREIRA, H. S.; FERREIRA, R. S.; COSTA, A. V.; DE MELO, E. B.; PAULA, F. R.; FERREIRA, M. M. C.; BRESSAN, G. C. Synthesis of Nerol Derivatives Containing a 1,2,3-Triazole Moiety and Evaluation of Their Activities against Cancer Cell Lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 541-561, 2019.
- XU, Z.; ZHAO, S-J.; LIU, Y. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms and structure-activity relationships. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 183, p. 1-37, 2019.

ANEXO II
(Datos espectroscópicos)

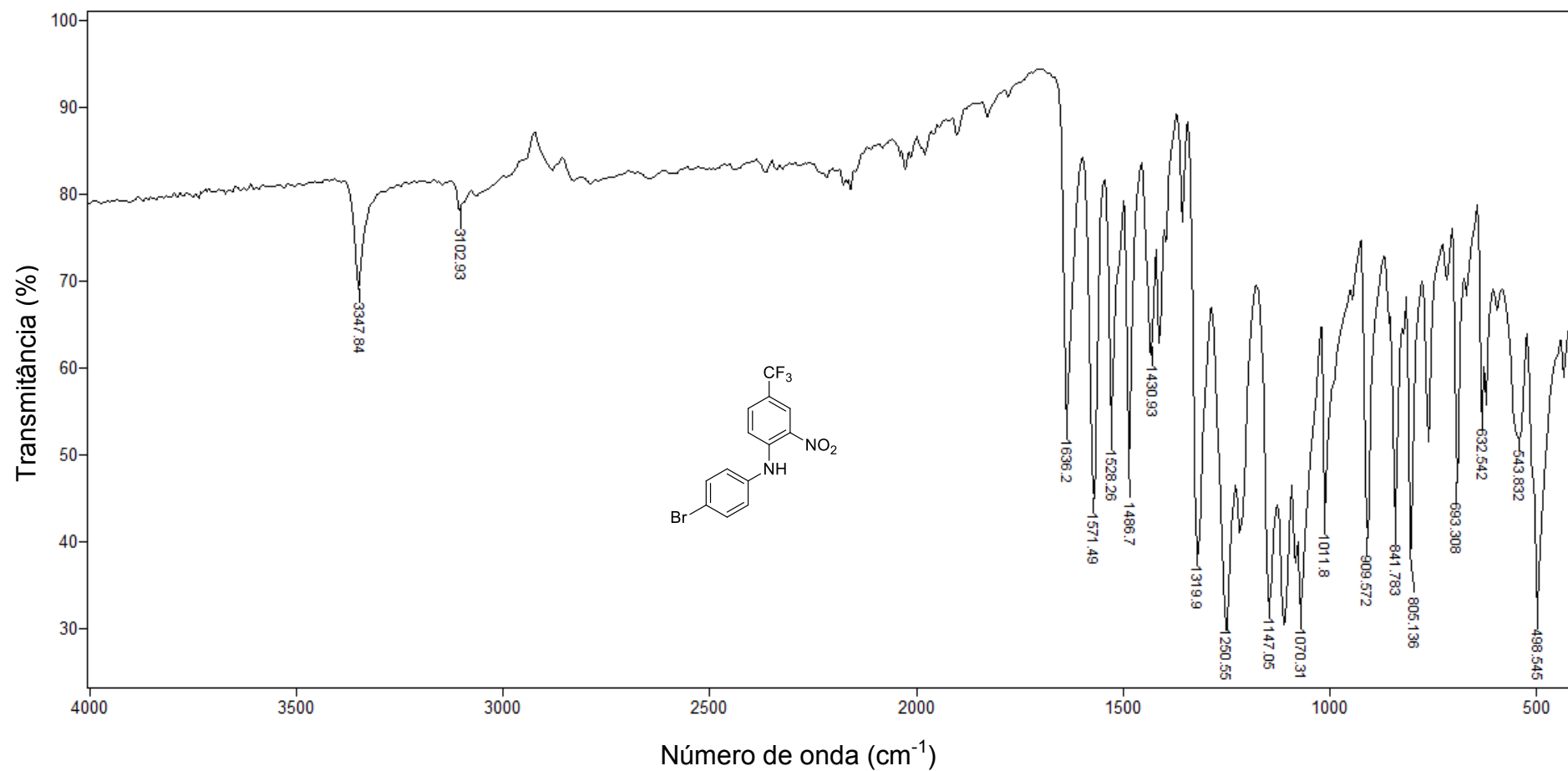


Figura 1 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3a**.

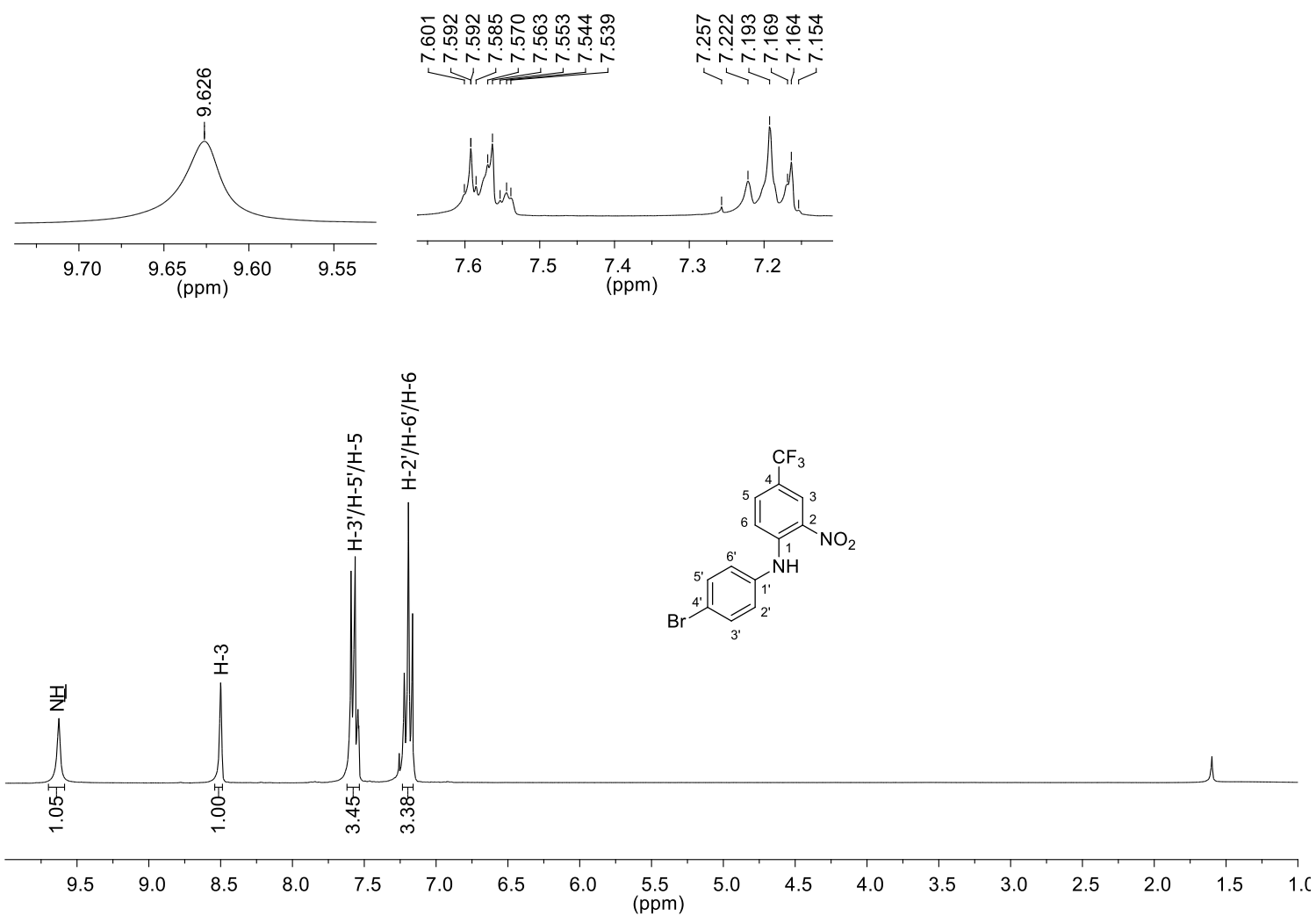


Figura 2 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3a**.

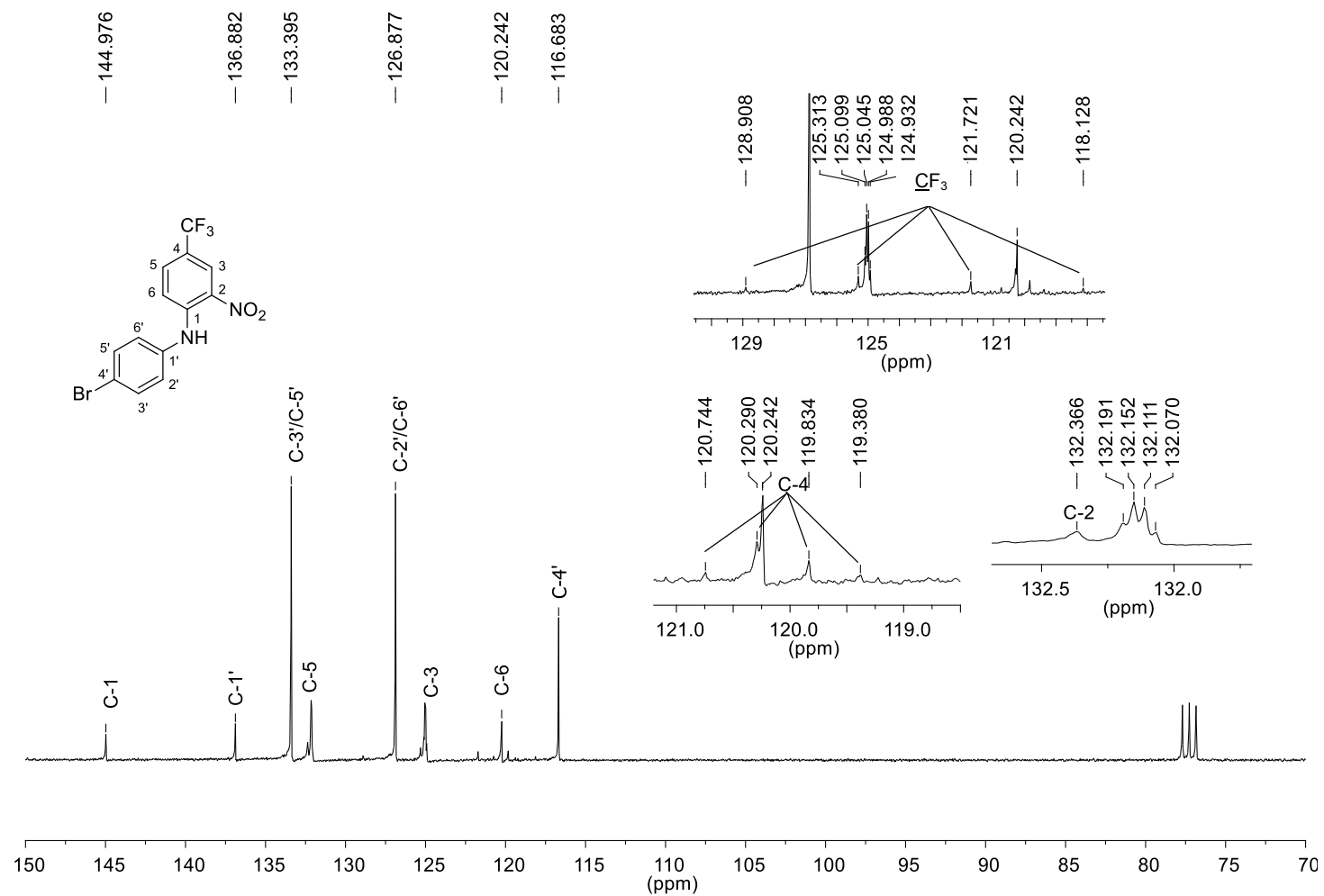


Figura 3 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **3a**.

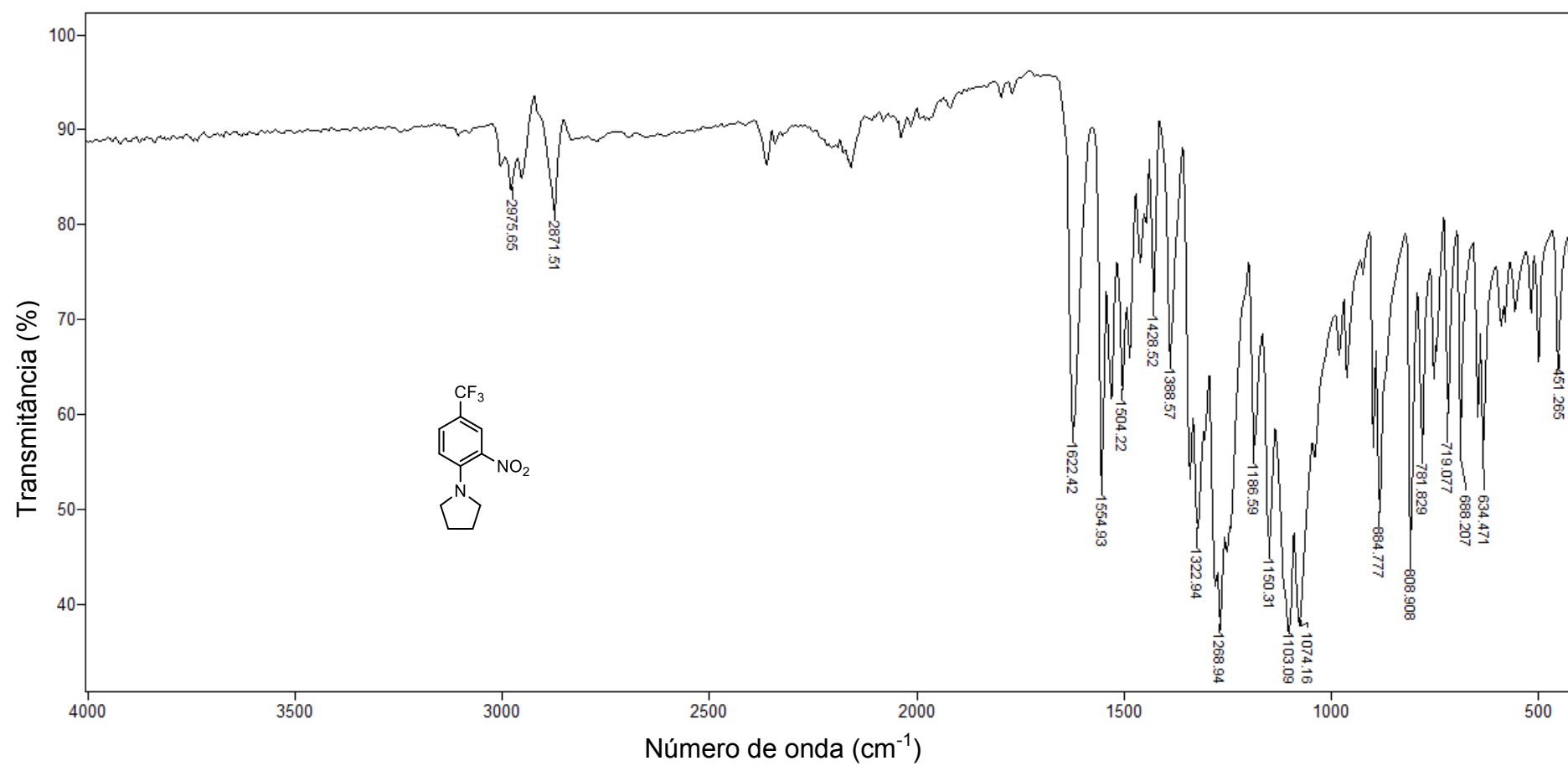


Figura 4 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3c**.

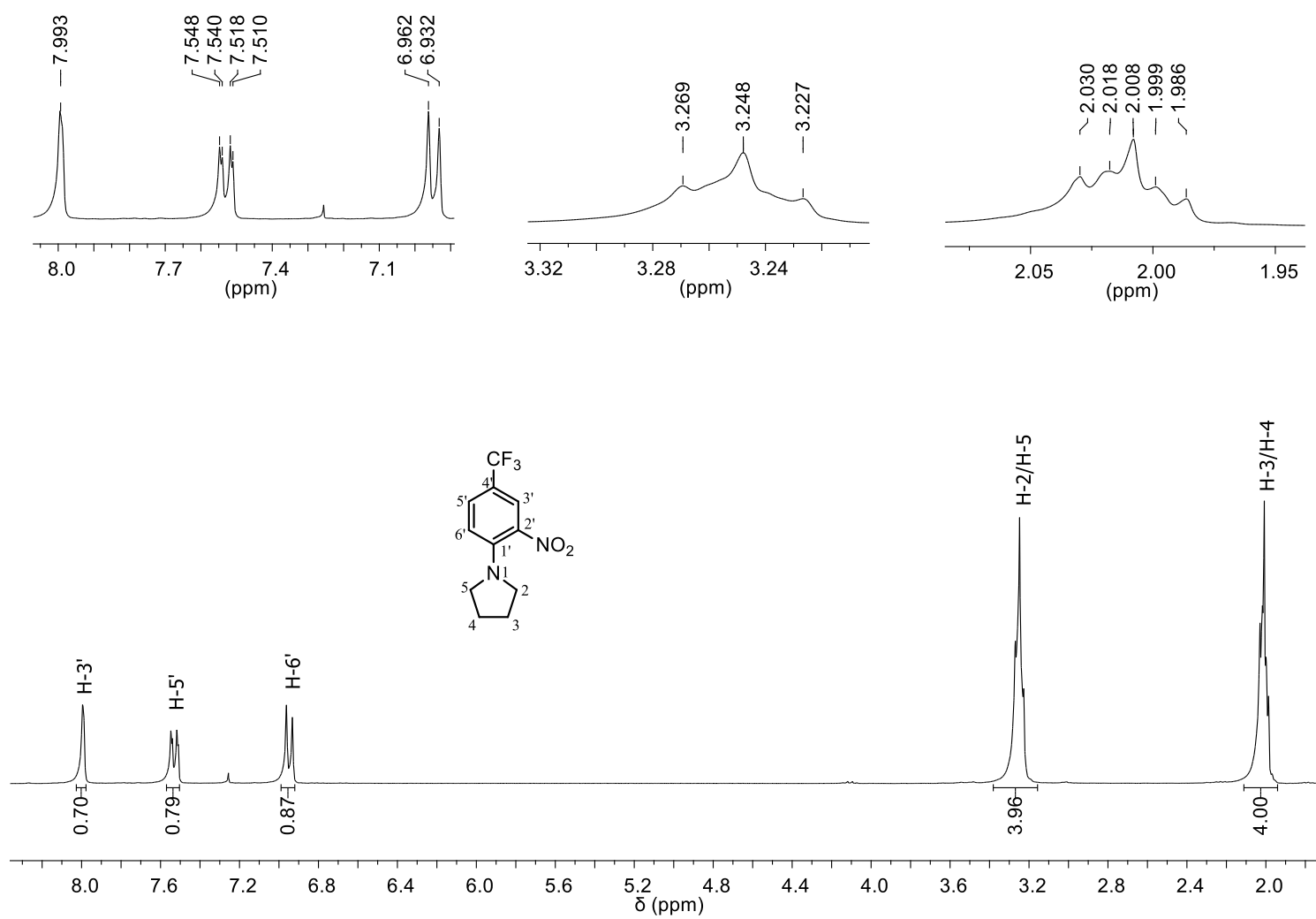


Figura 5 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3c**.

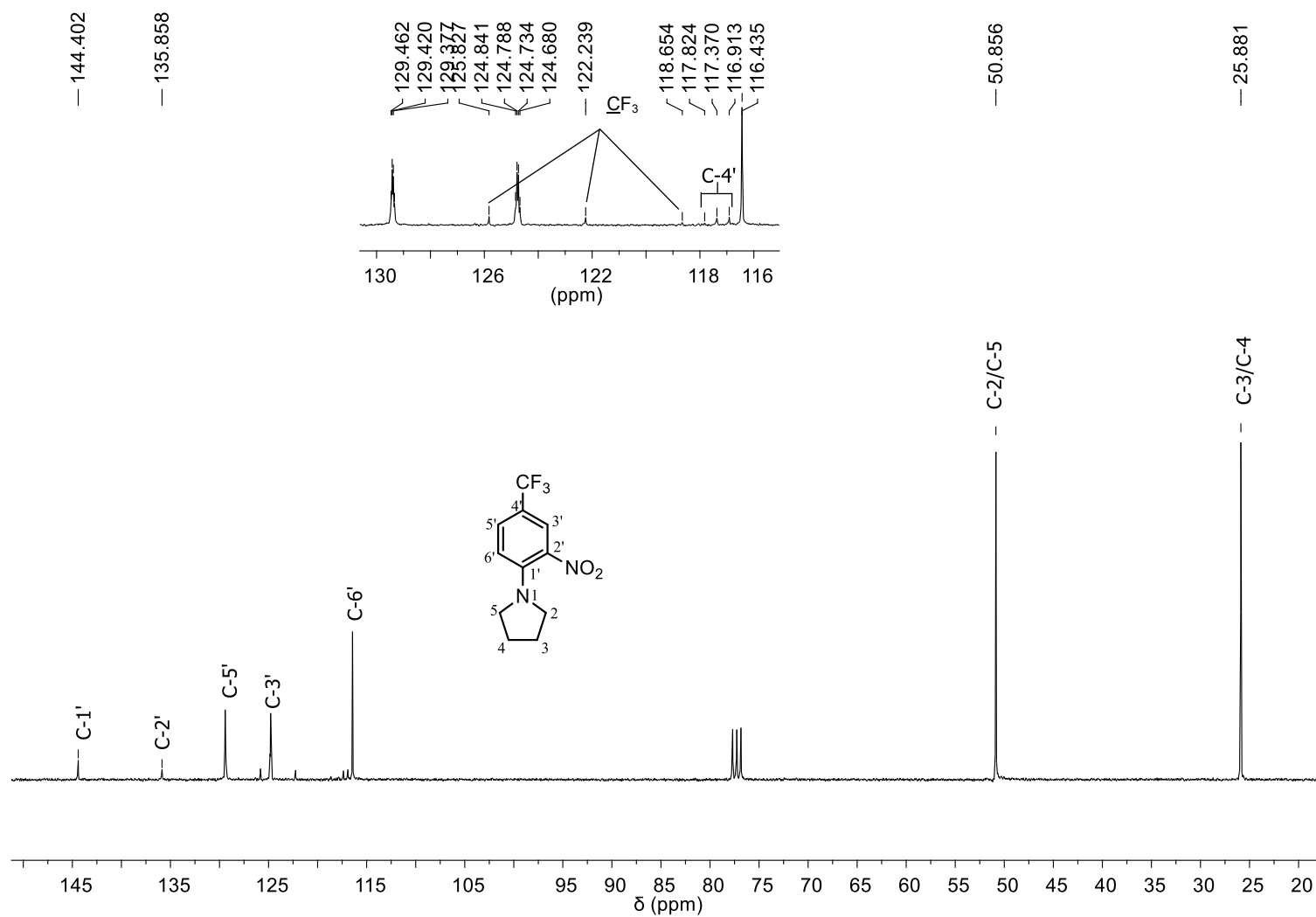


Figura 6 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **3c**.

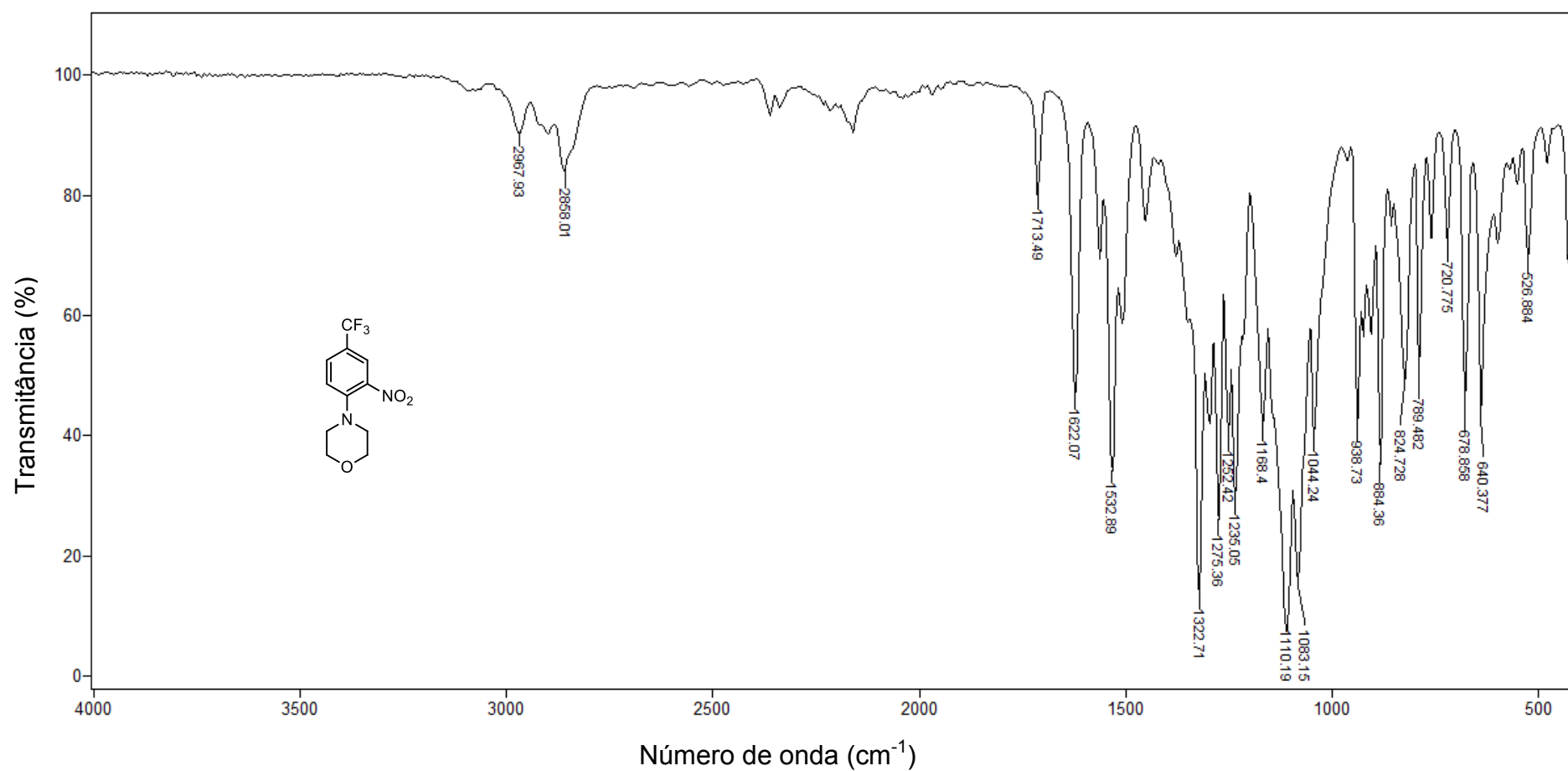


Figura 7 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3d**.

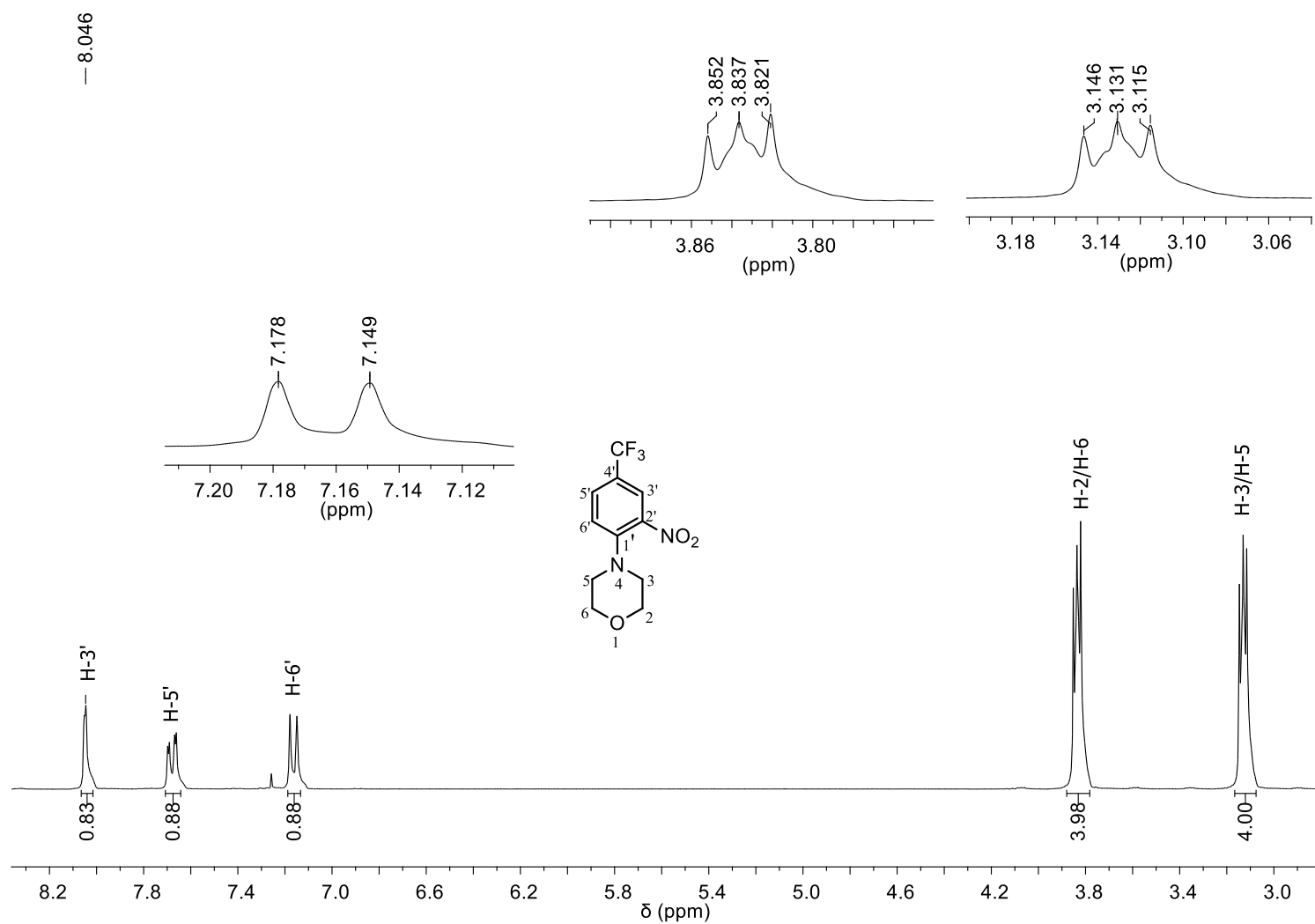


Figura 8 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3d**.

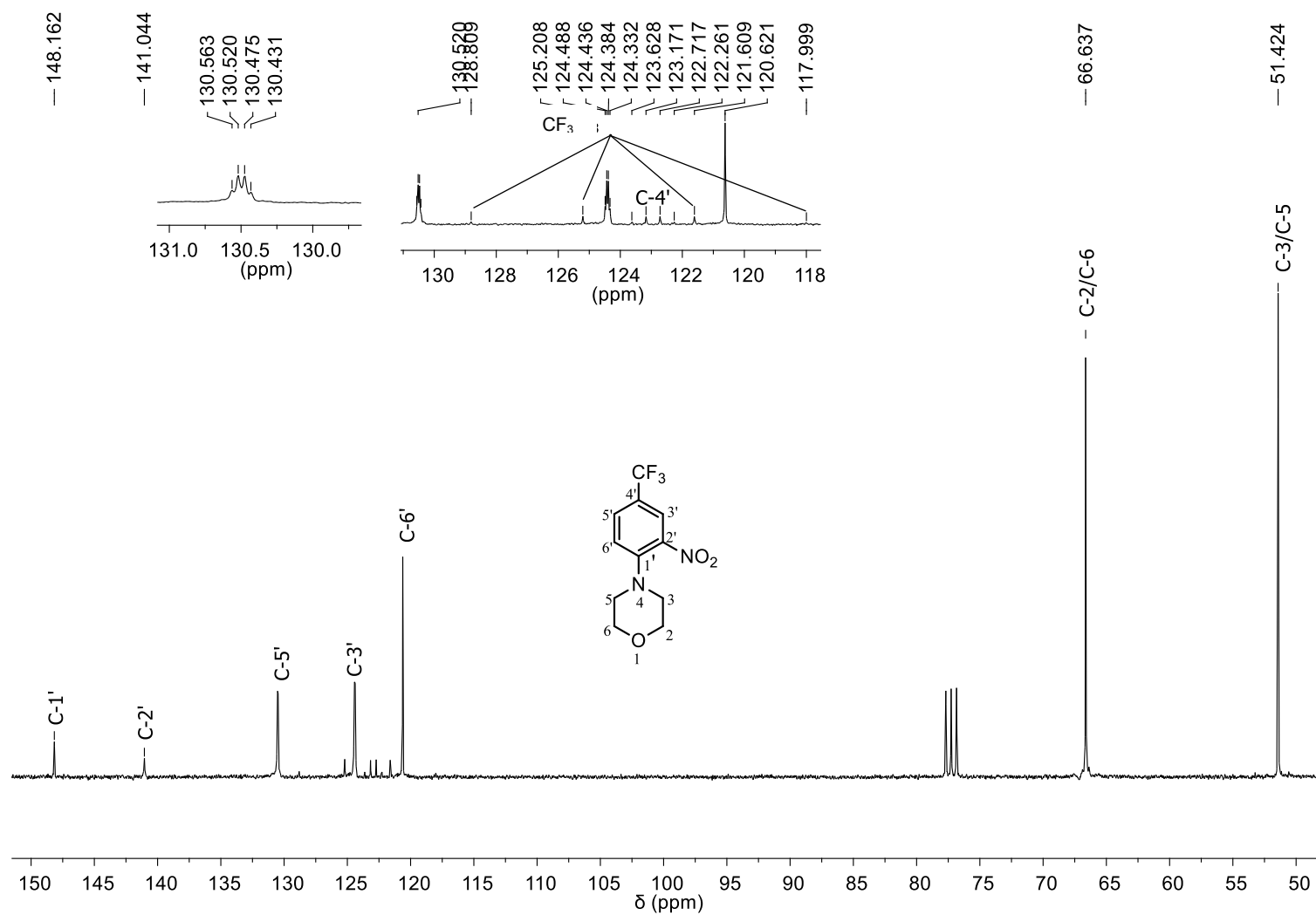


Figura 9 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **3d**.

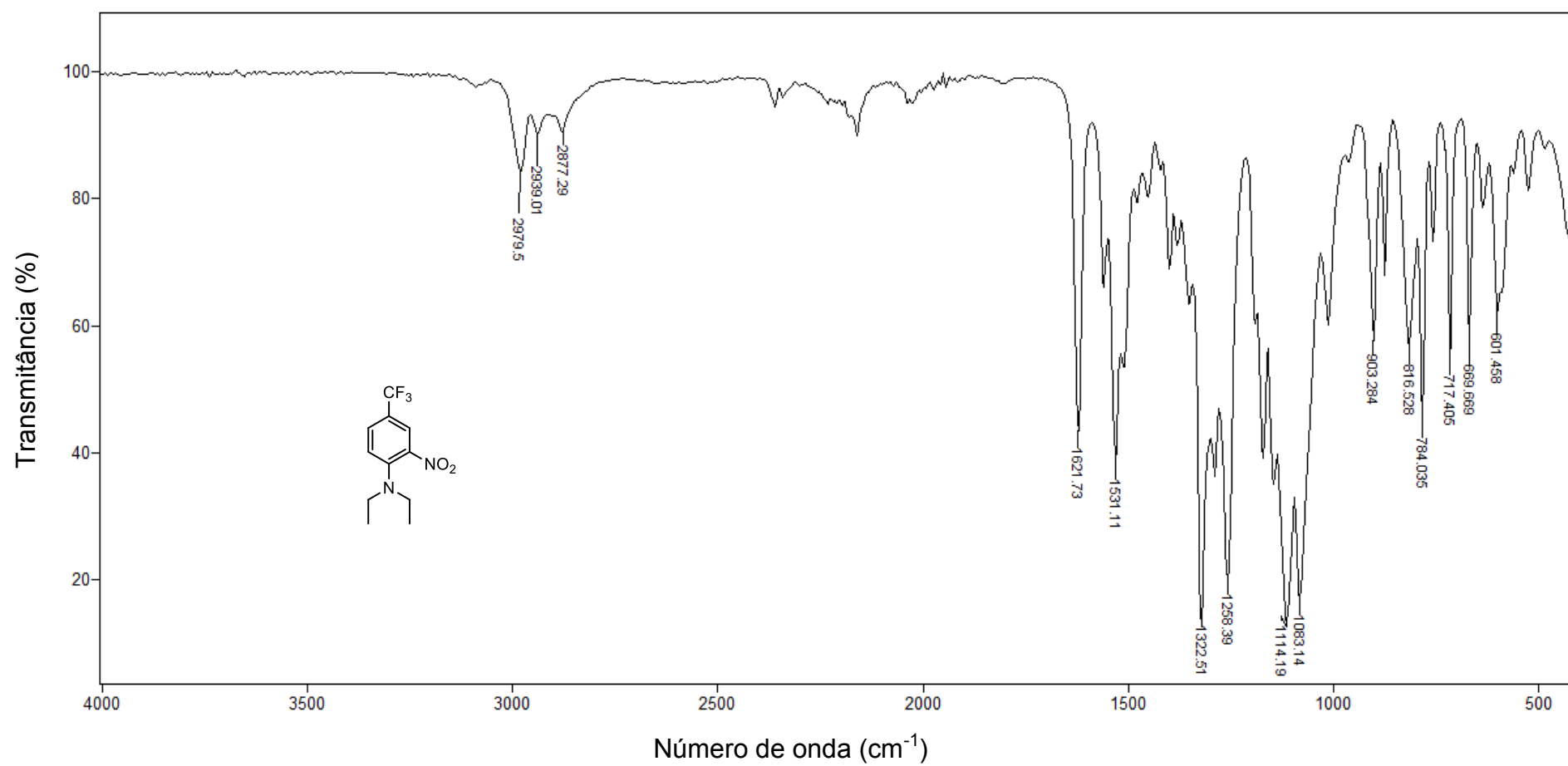


Figura 10 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3e**.

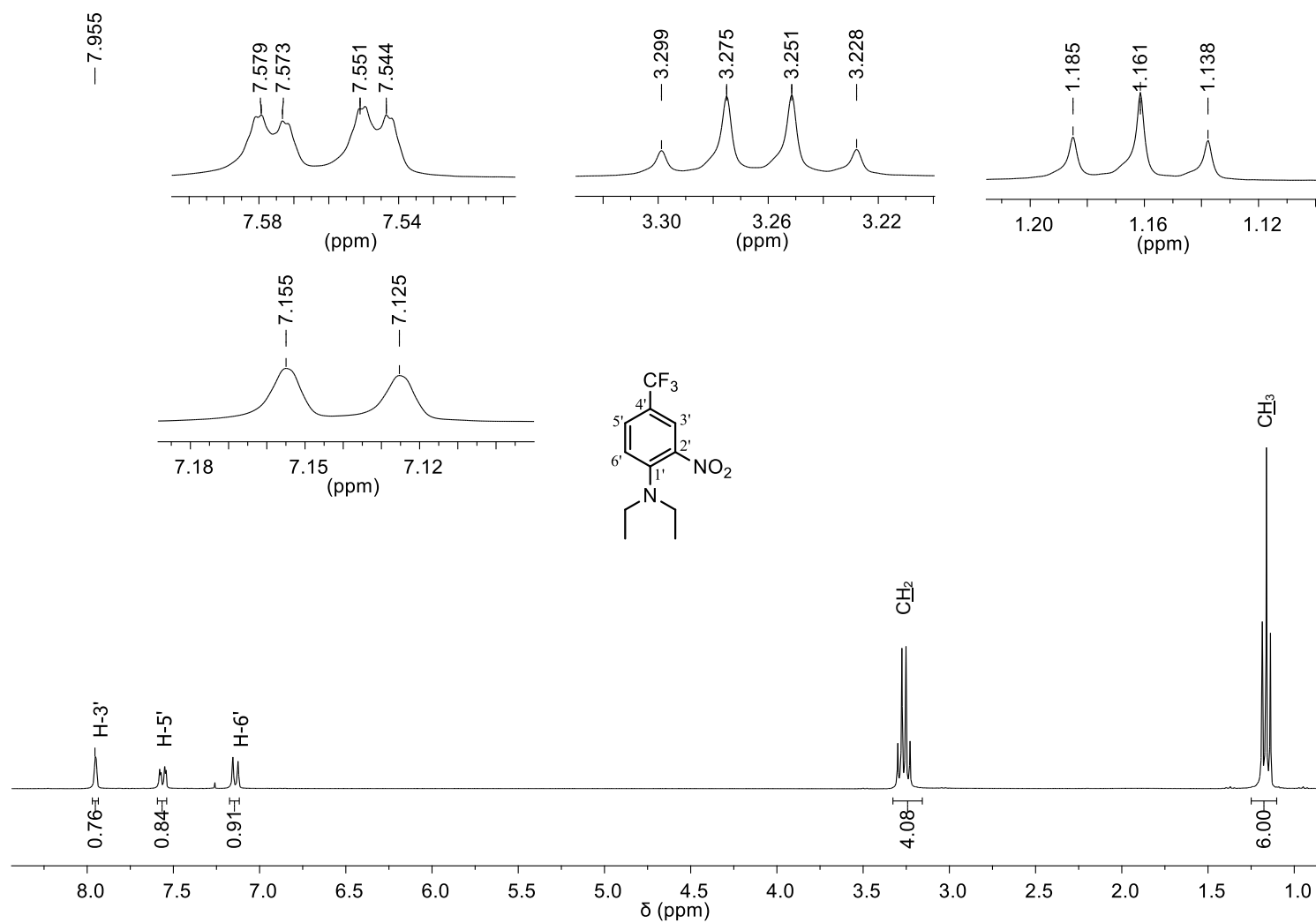


Figura 11– Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3e**.

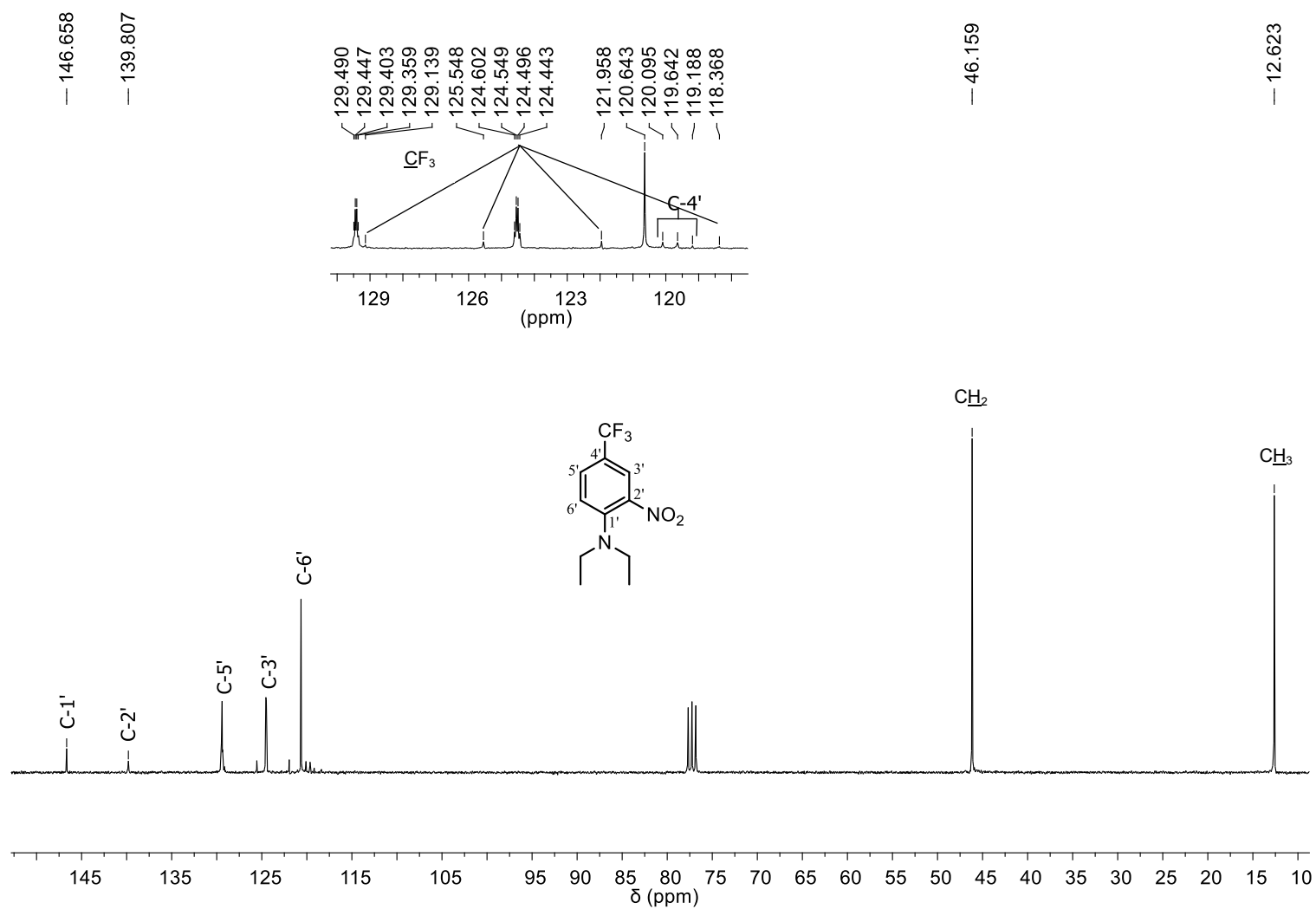


Figura 12 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **3e**.

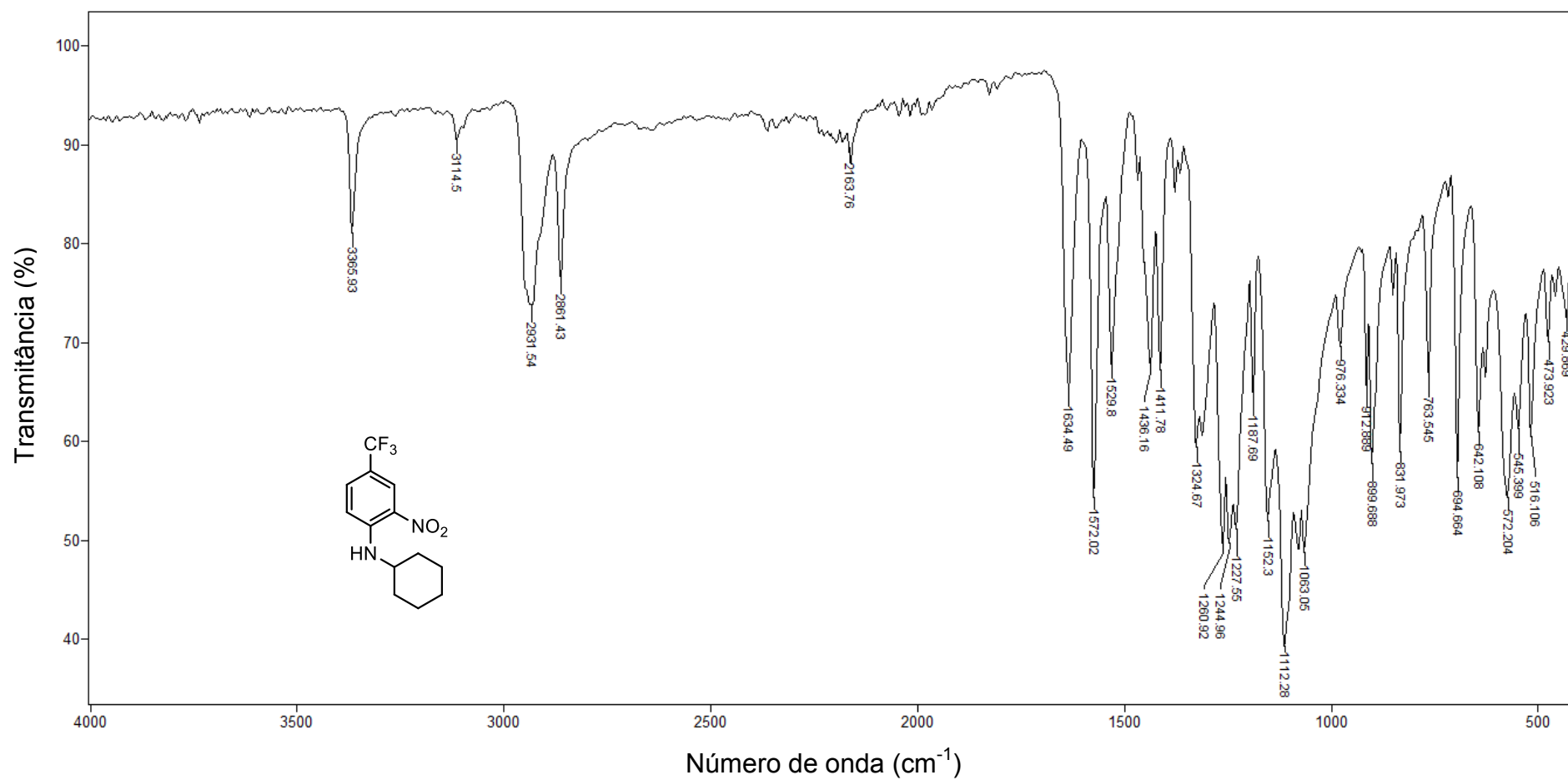


Figura 13 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3f**.

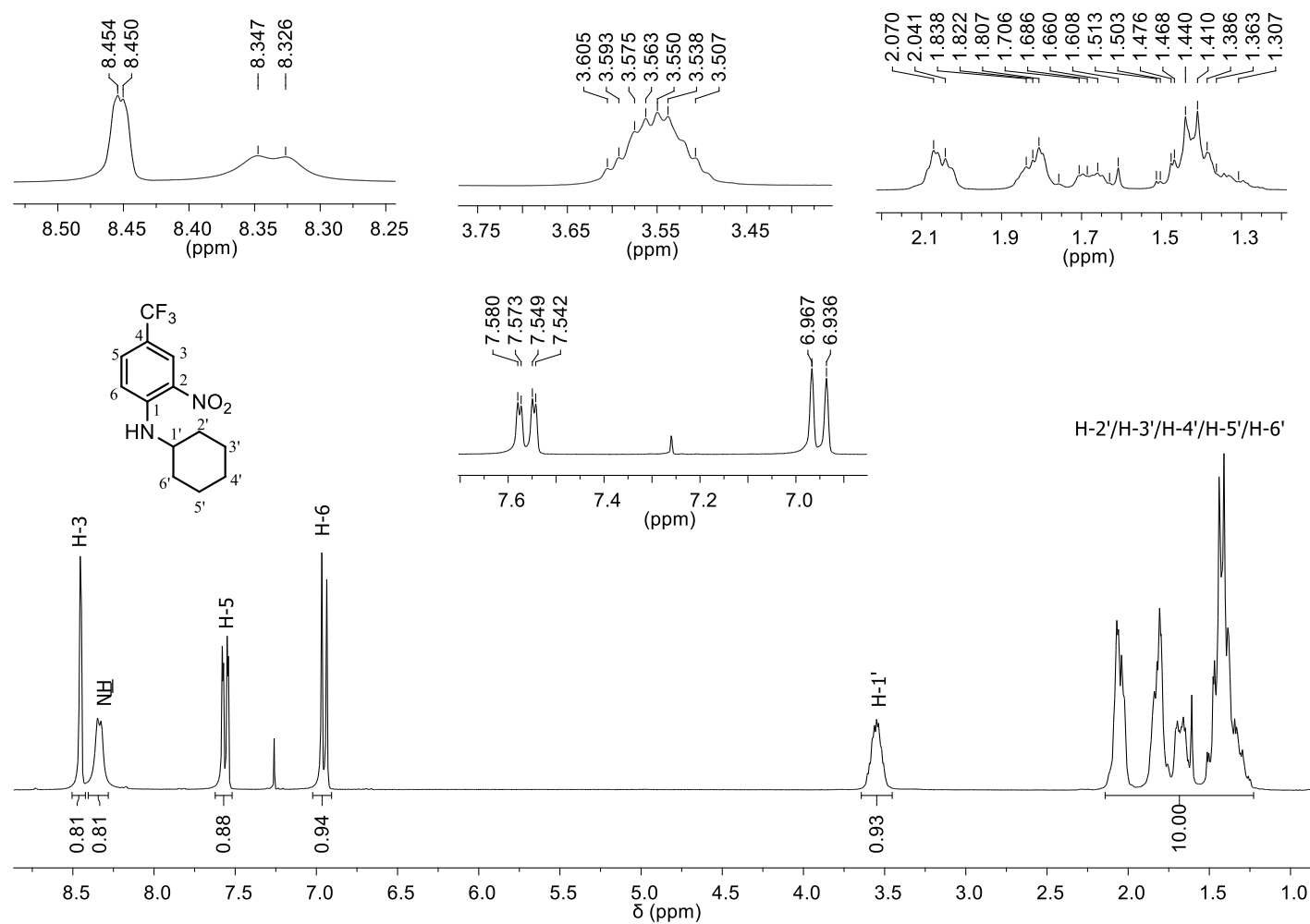


Figura 14 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3f**.

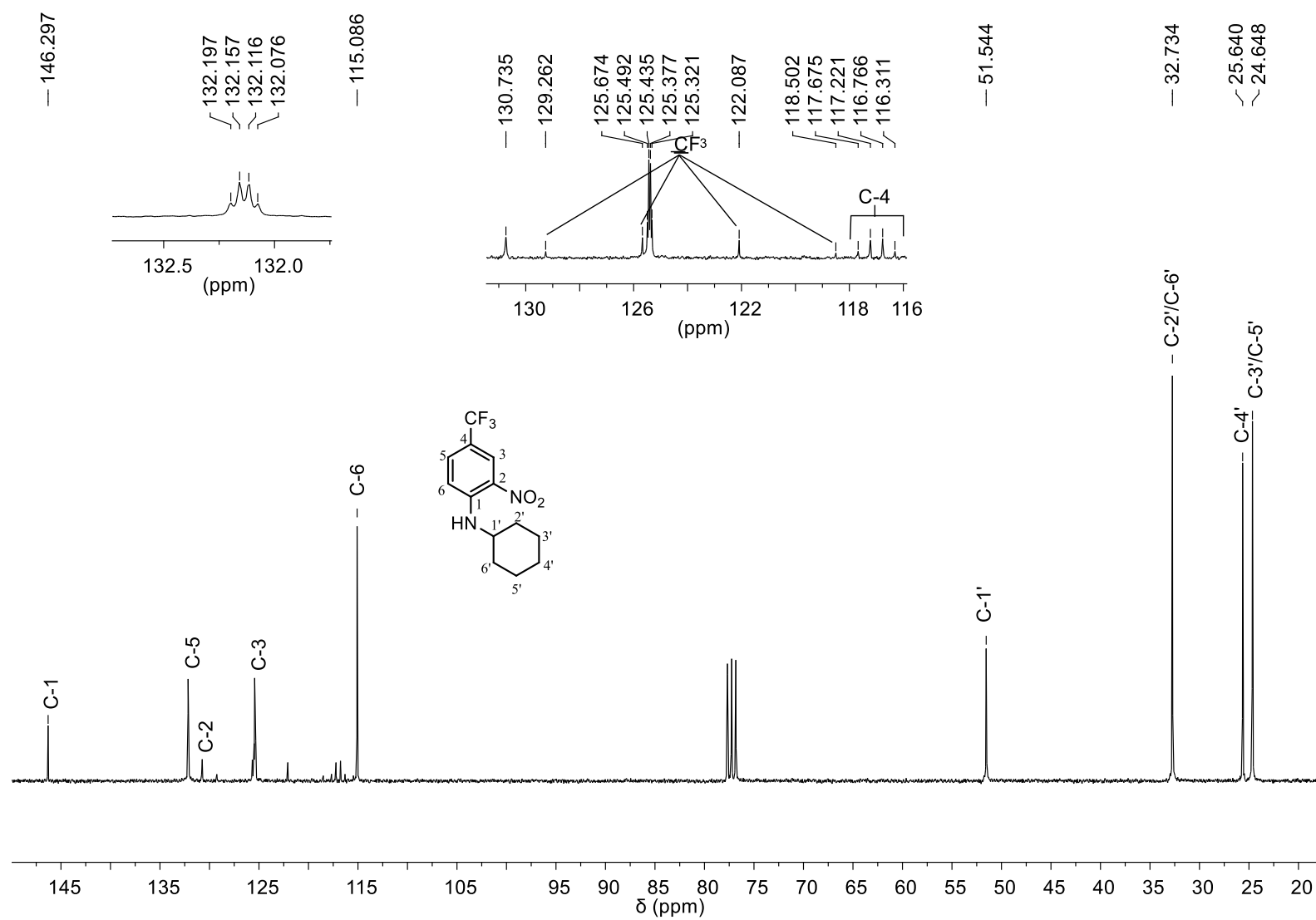


Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **3f**.

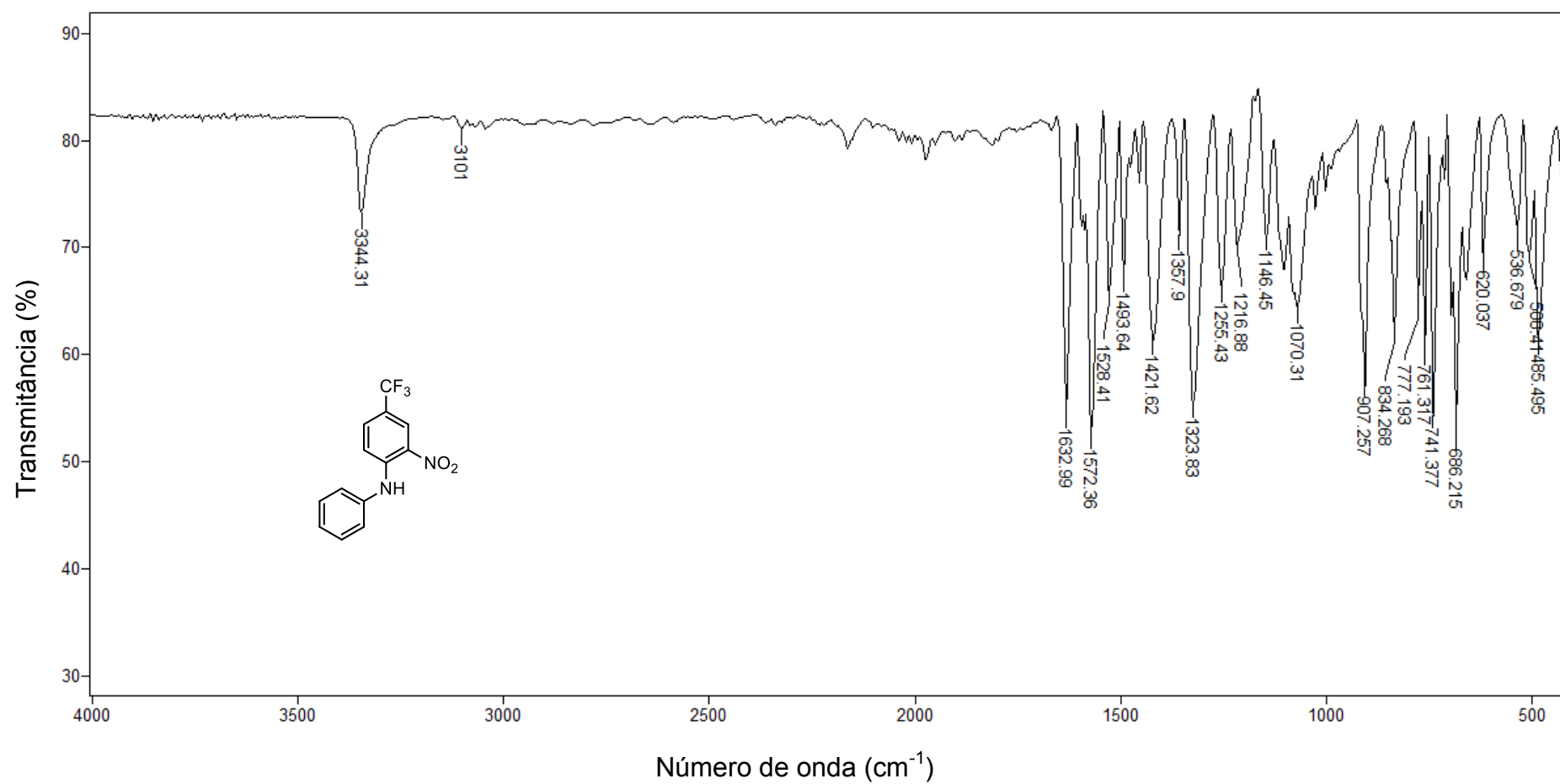


Figura 16 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3g**.

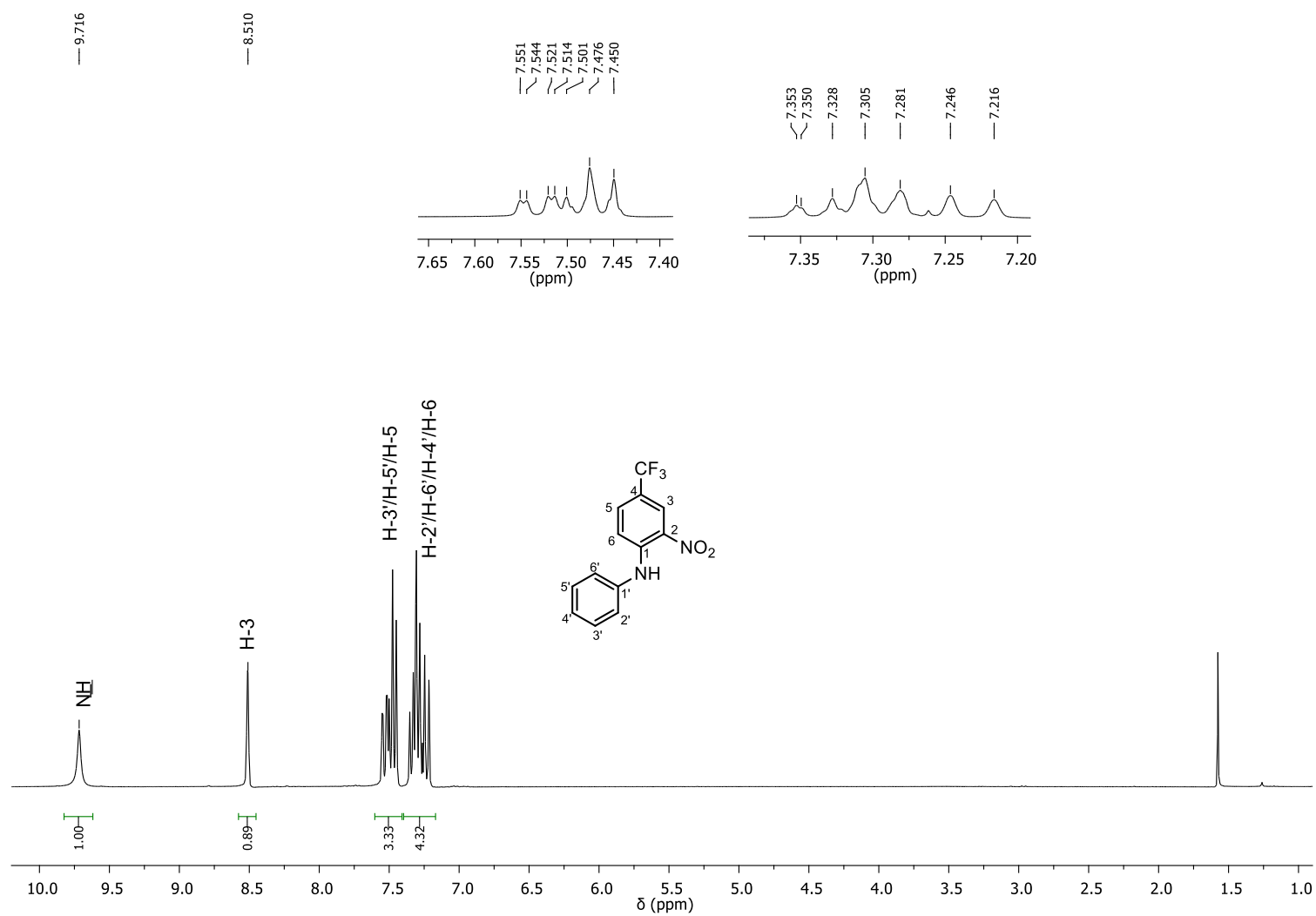


Figura 17 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3g**.

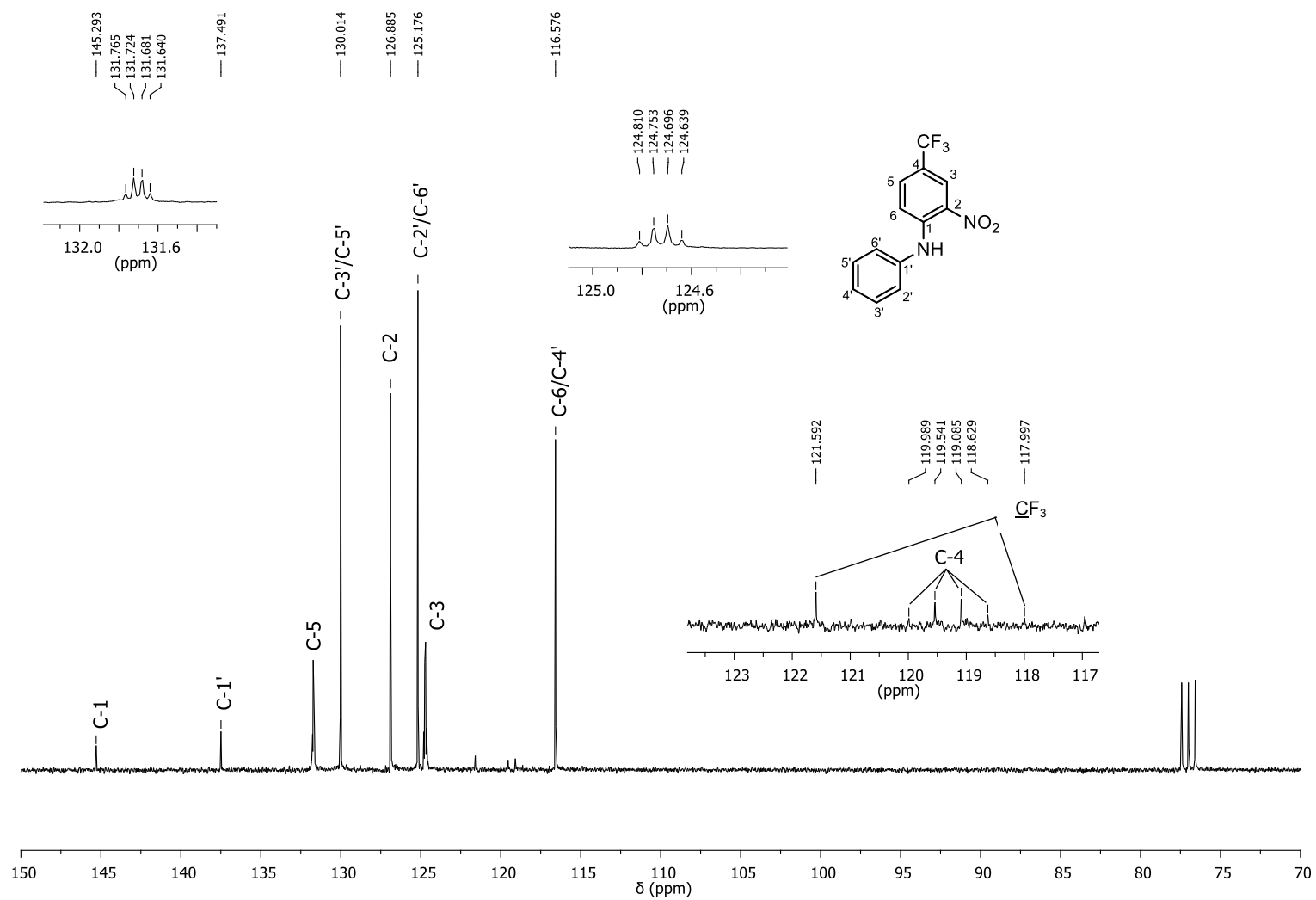


Figura 18 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **3g**.

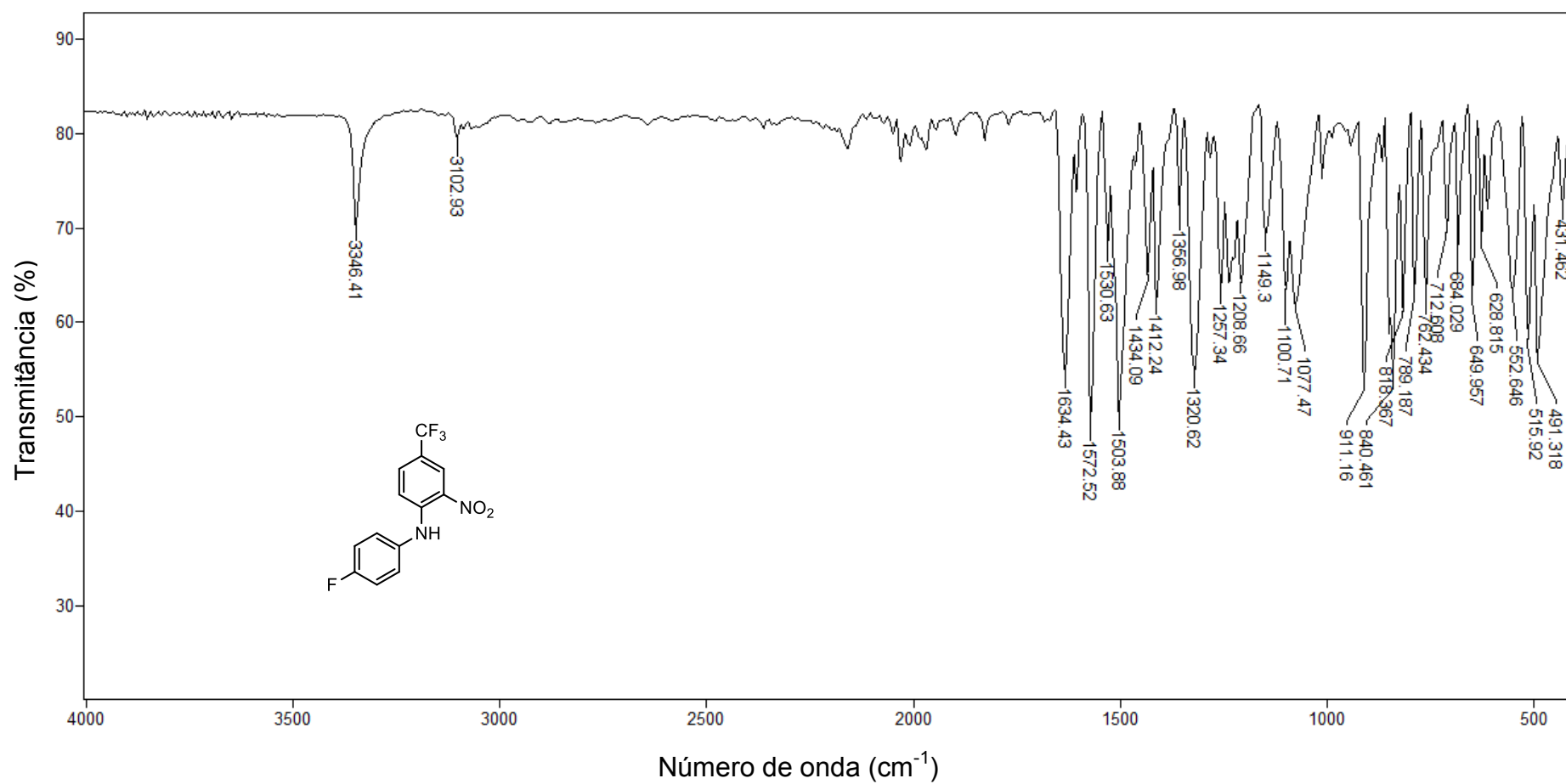


Figura 19 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3h**.

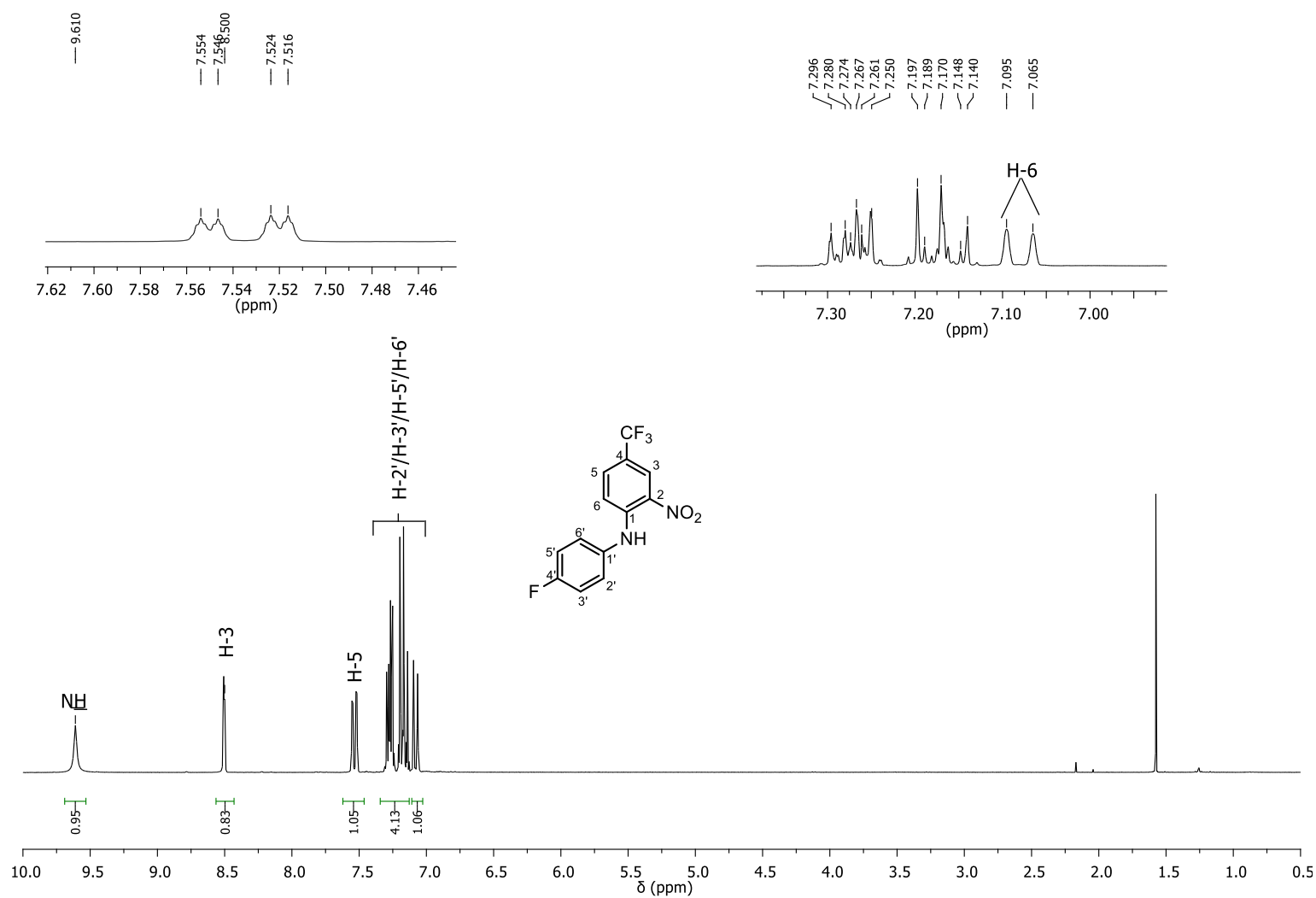


Figura 20 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **3h**.

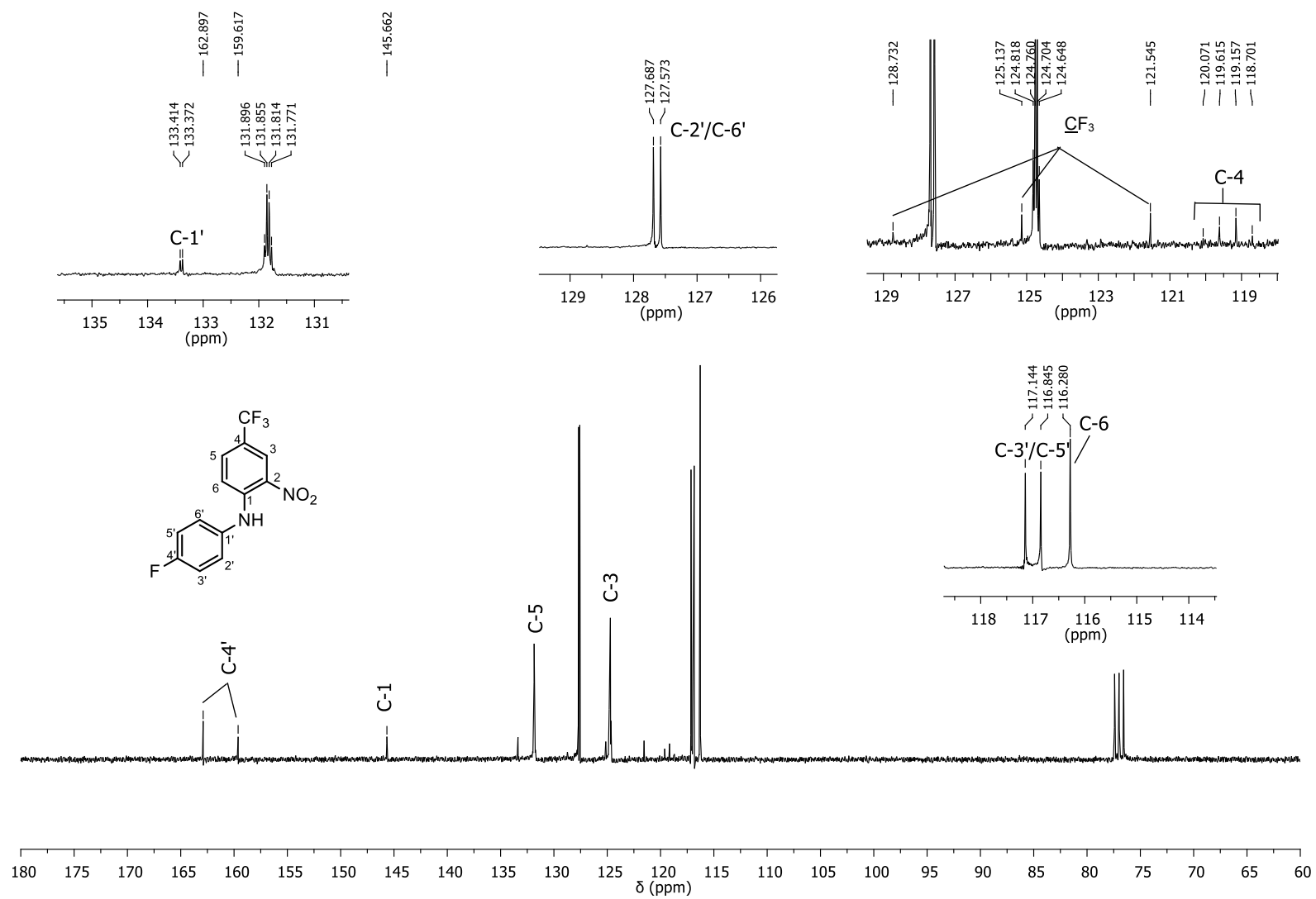


Figura 21 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **3h**.

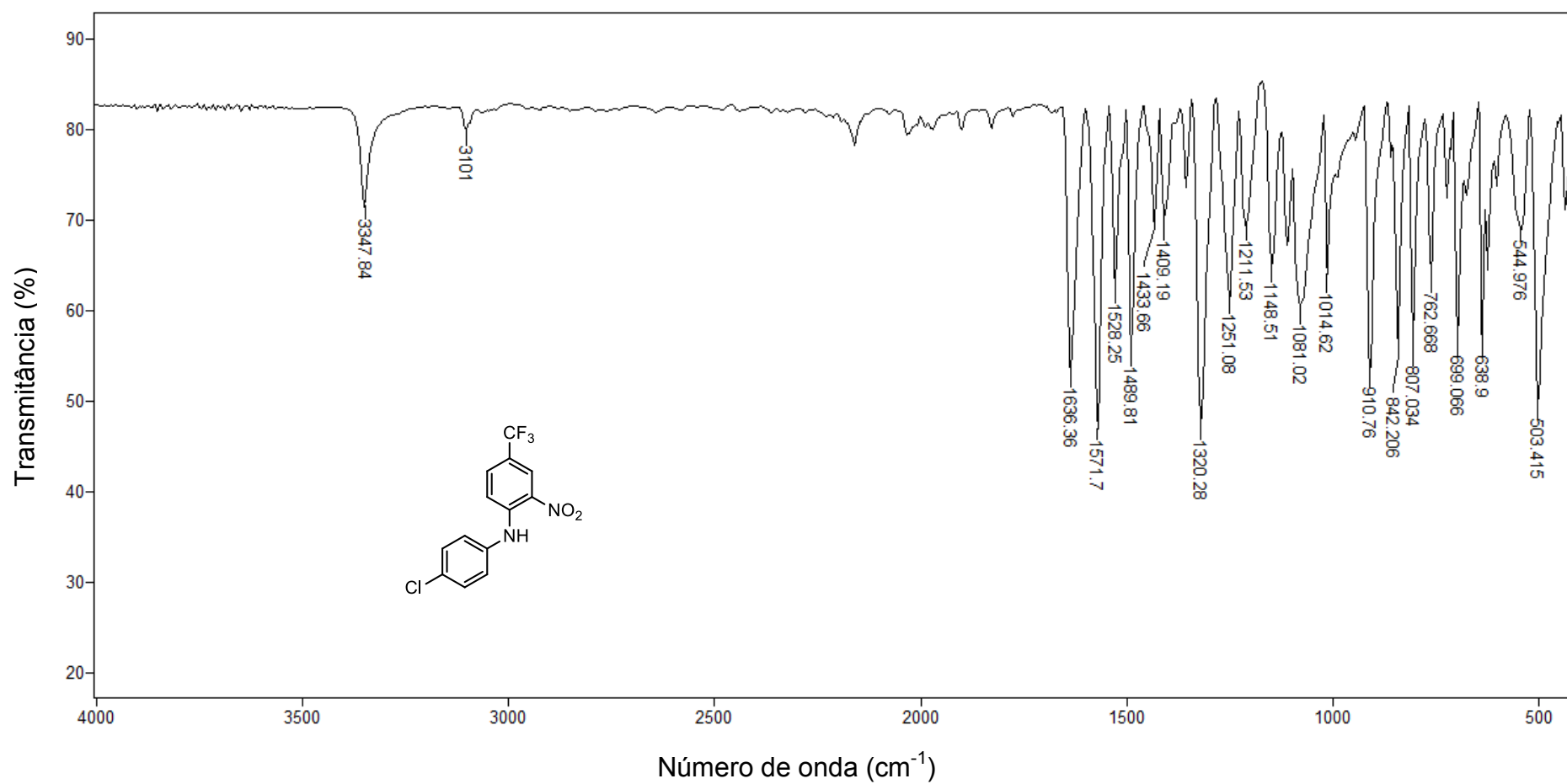


Figura 22 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3i**.

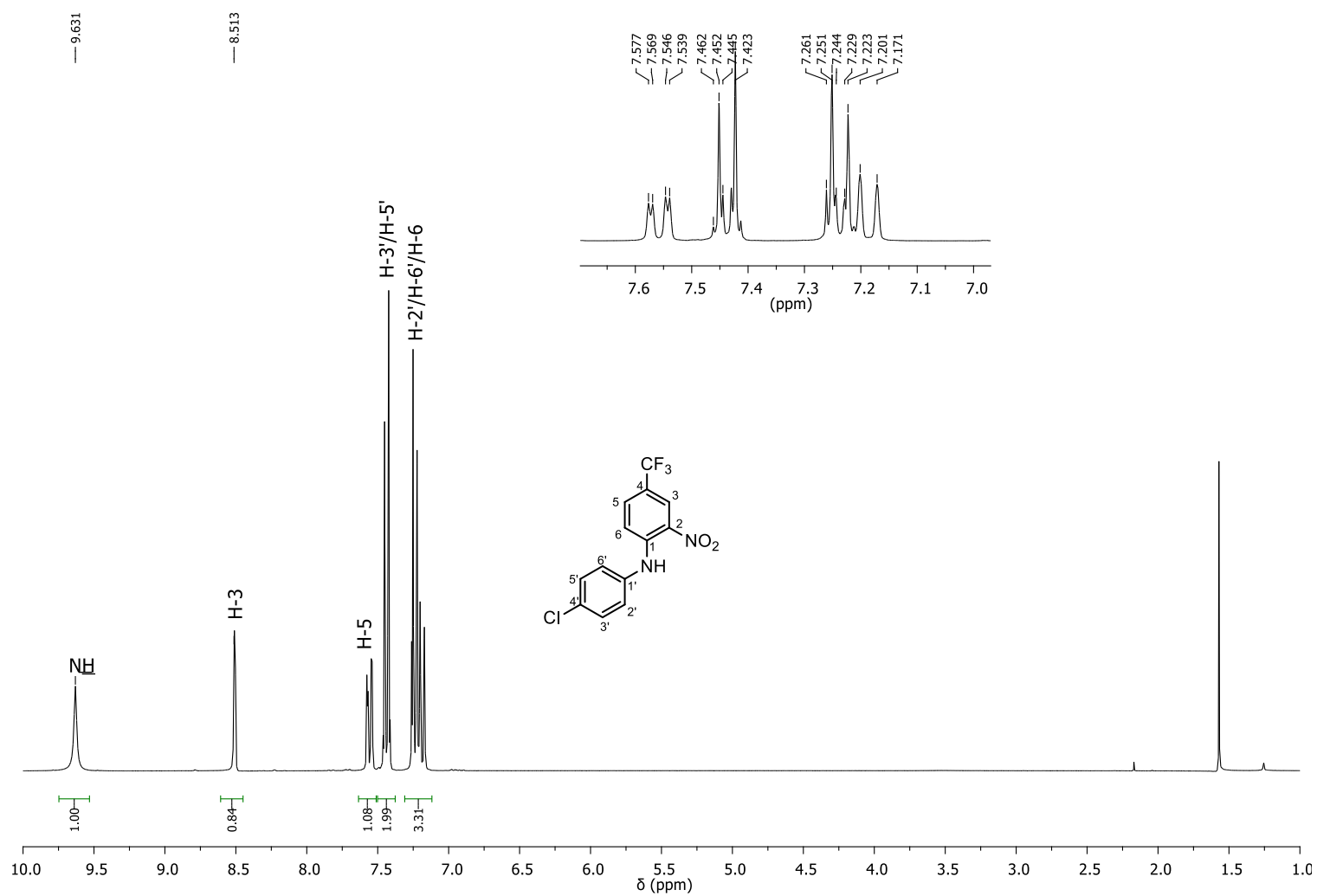


Figura 23 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3i**.

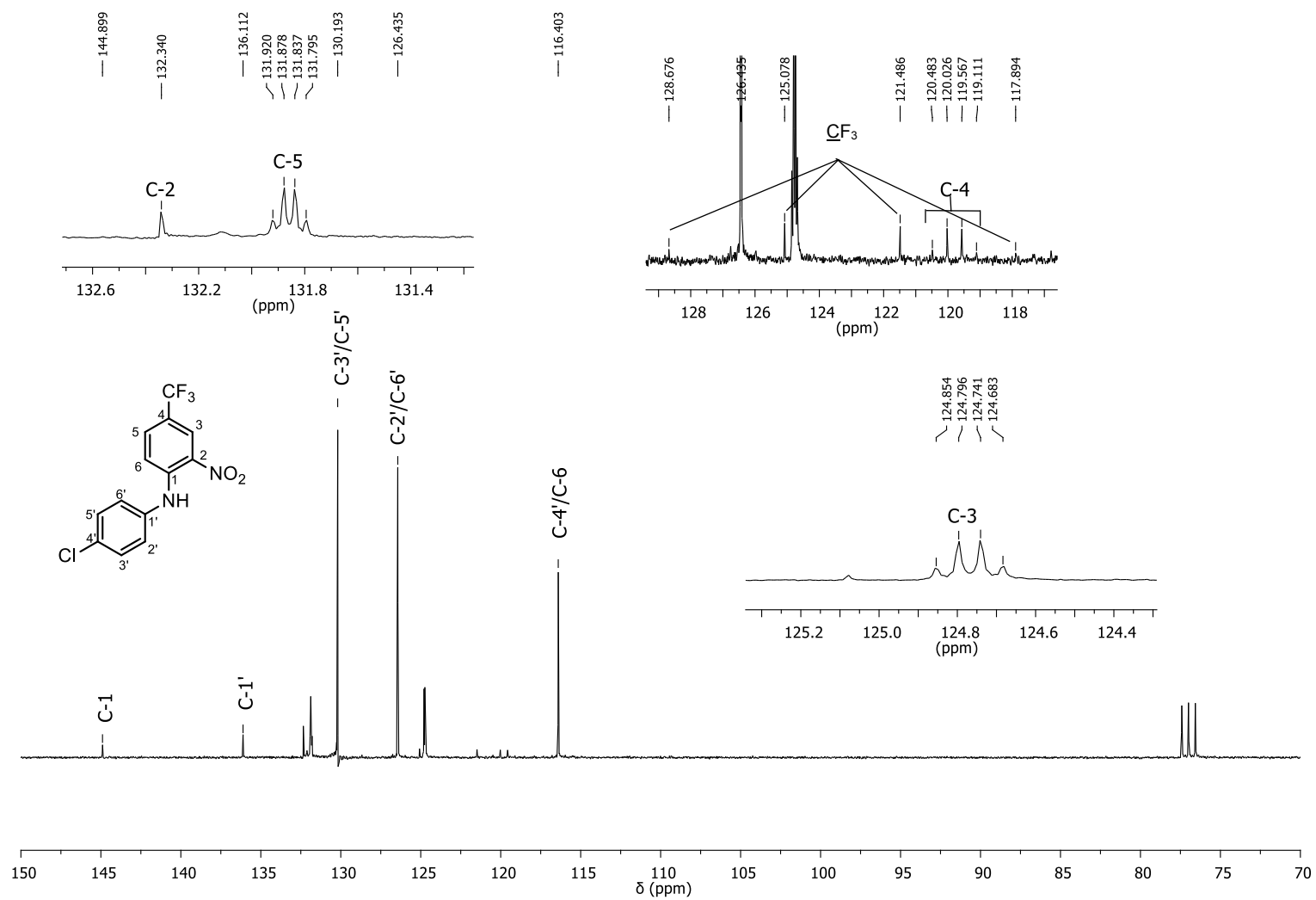


Figura 24 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **3i**.

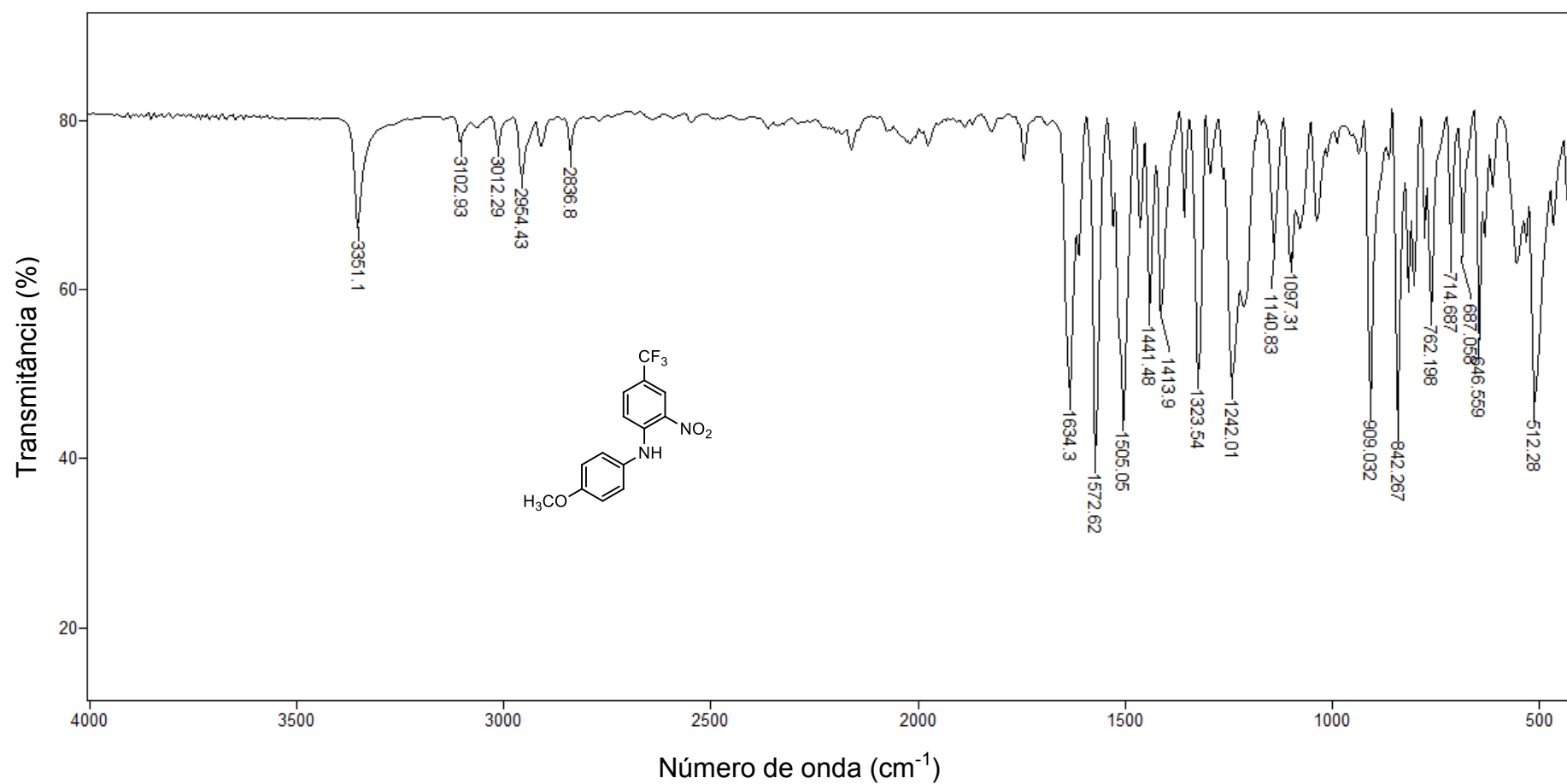


Figura 25 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3j**.

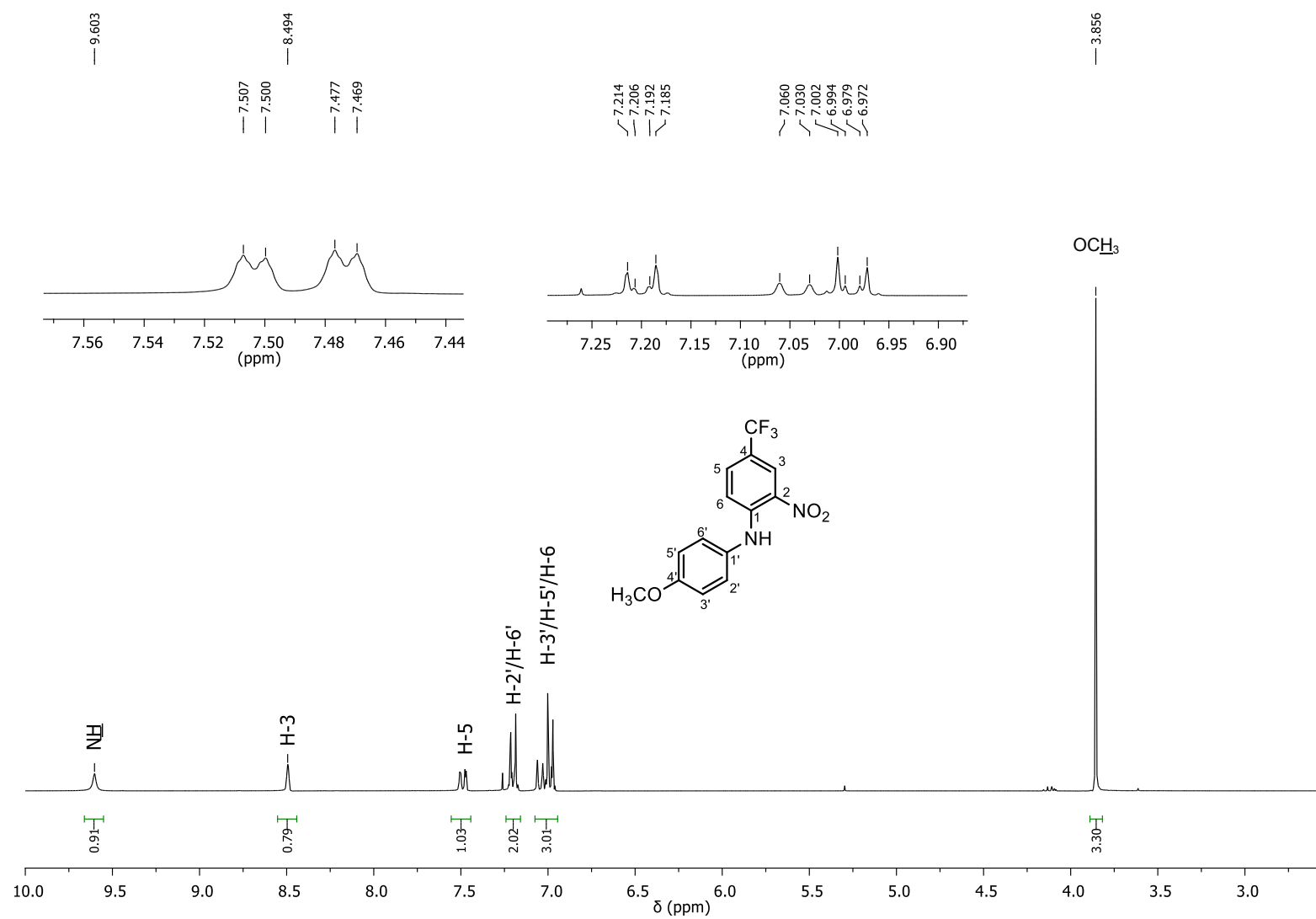


Figura 26 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **3j**.

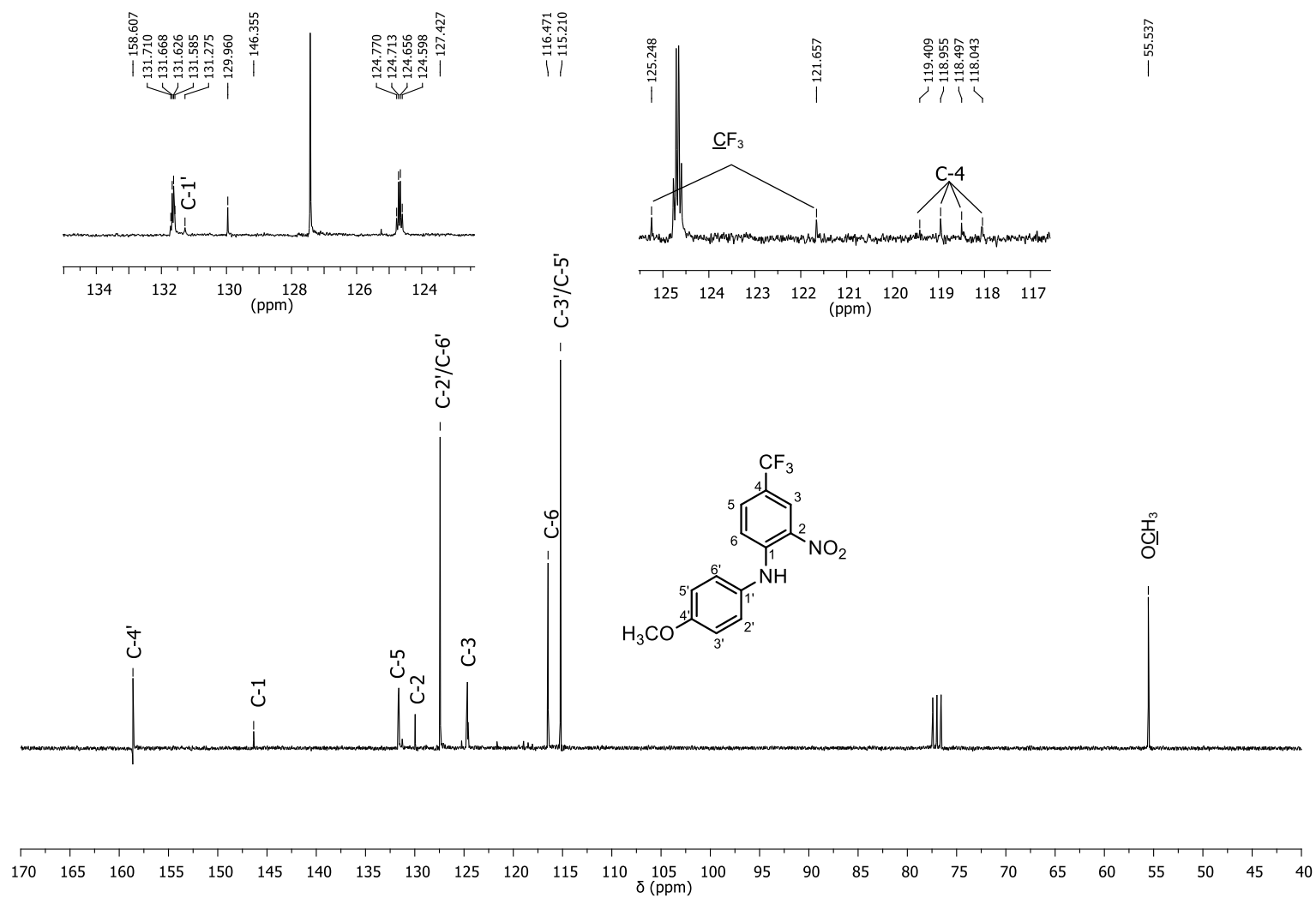


Figura 27 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **3j**.

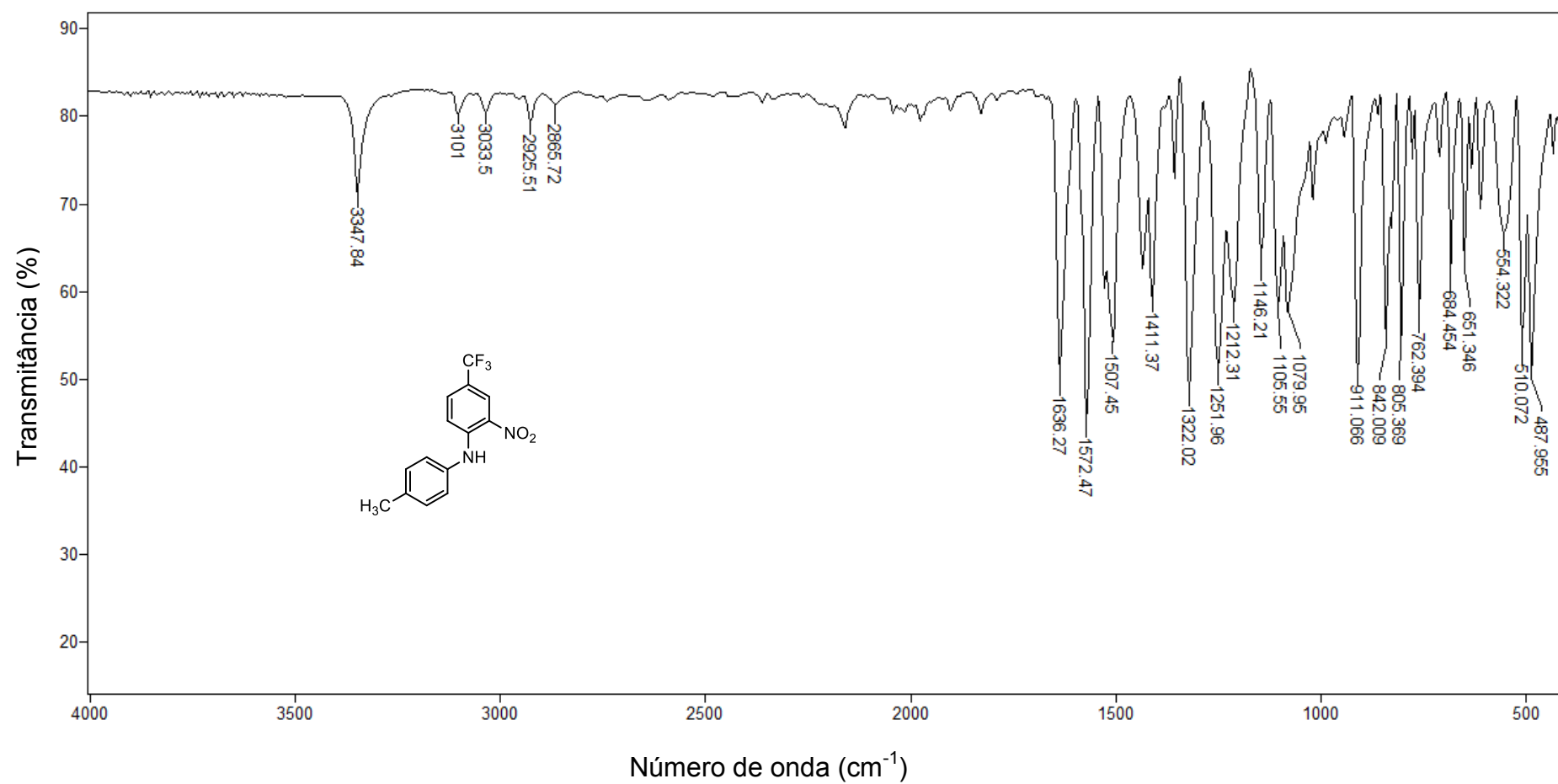


Figura 28 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3k**.

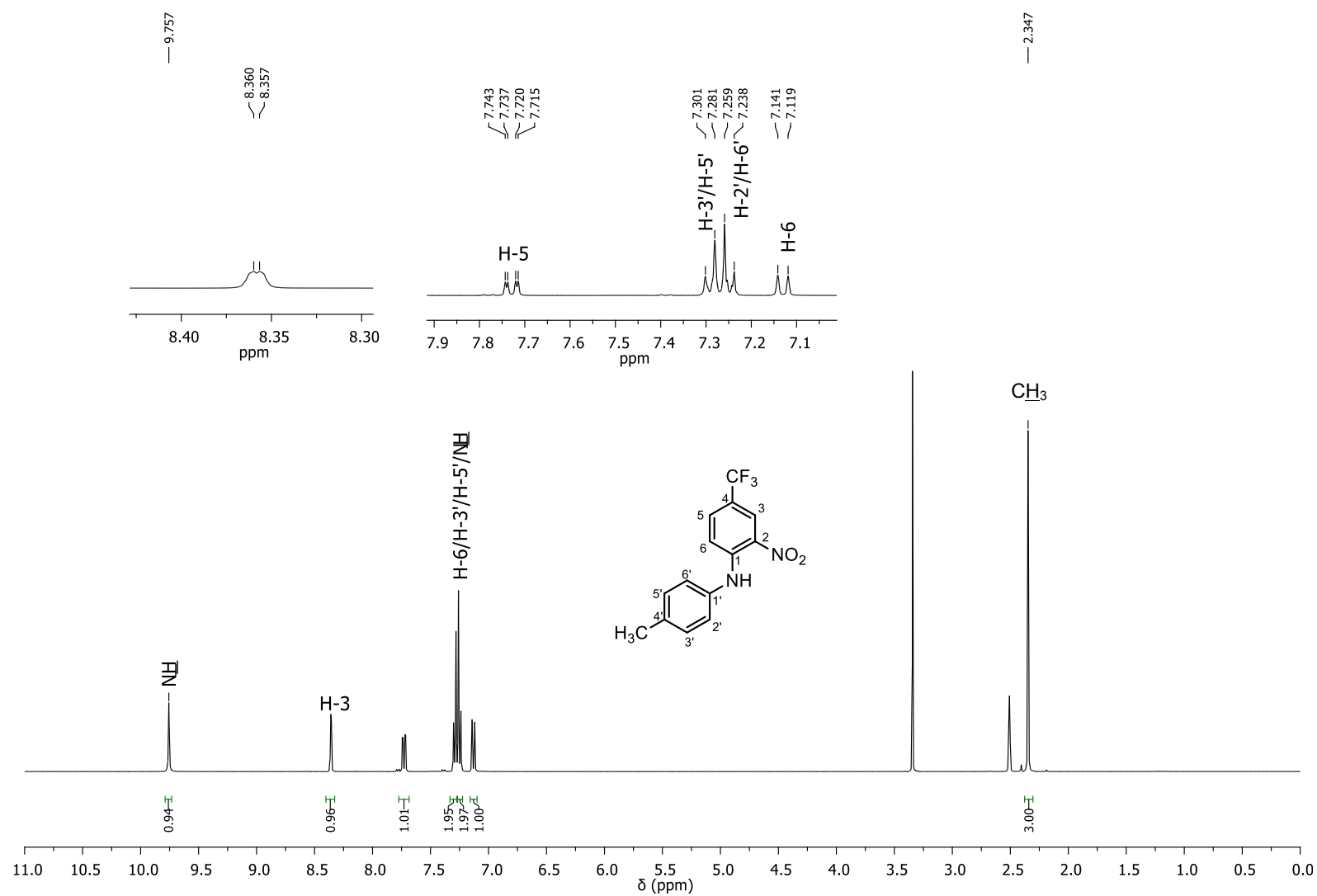
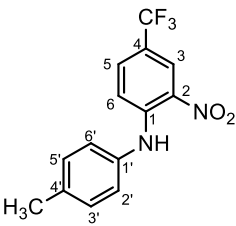


Figura 29 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **3k**.



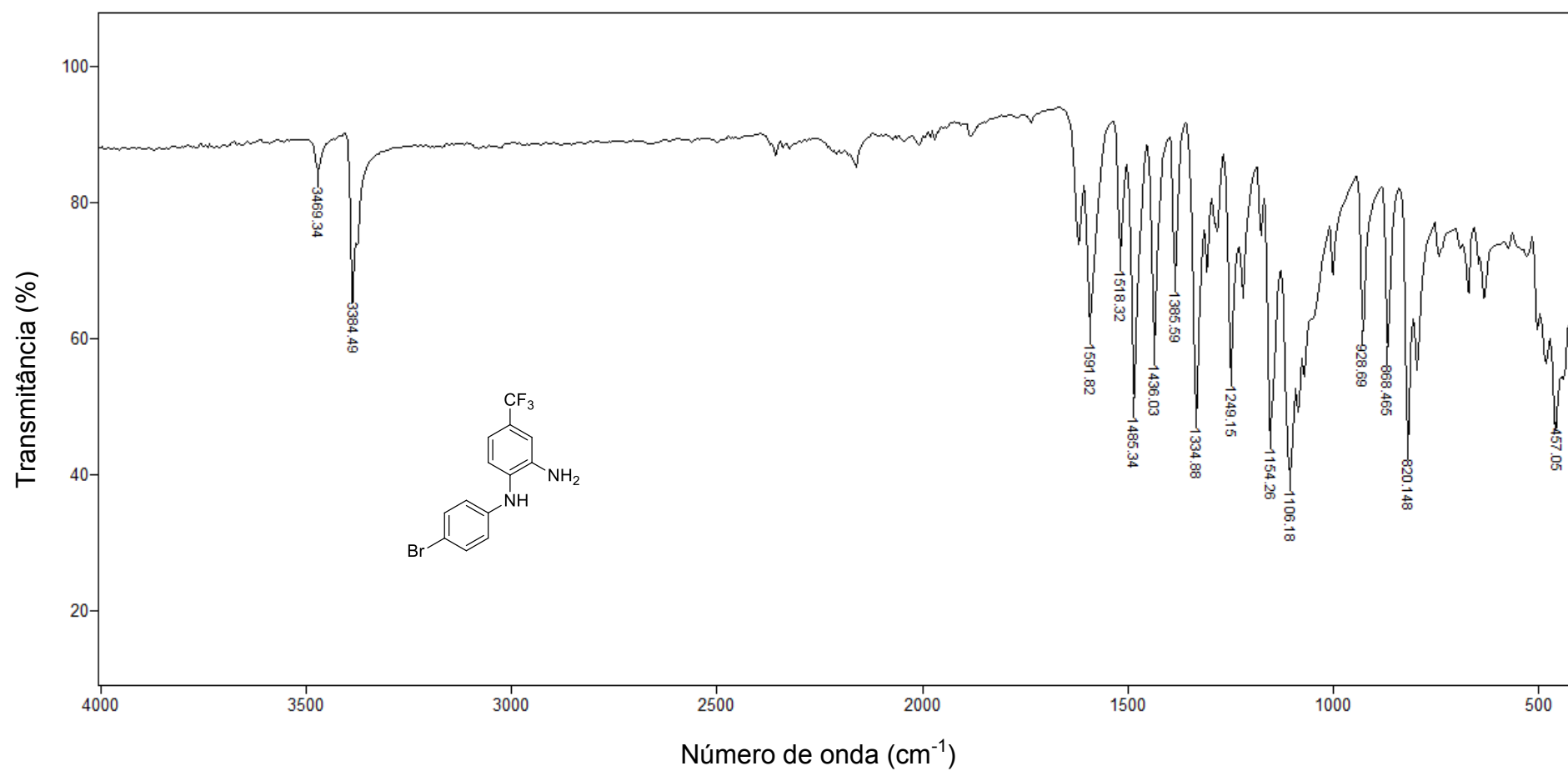


Figura 31 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4a**.

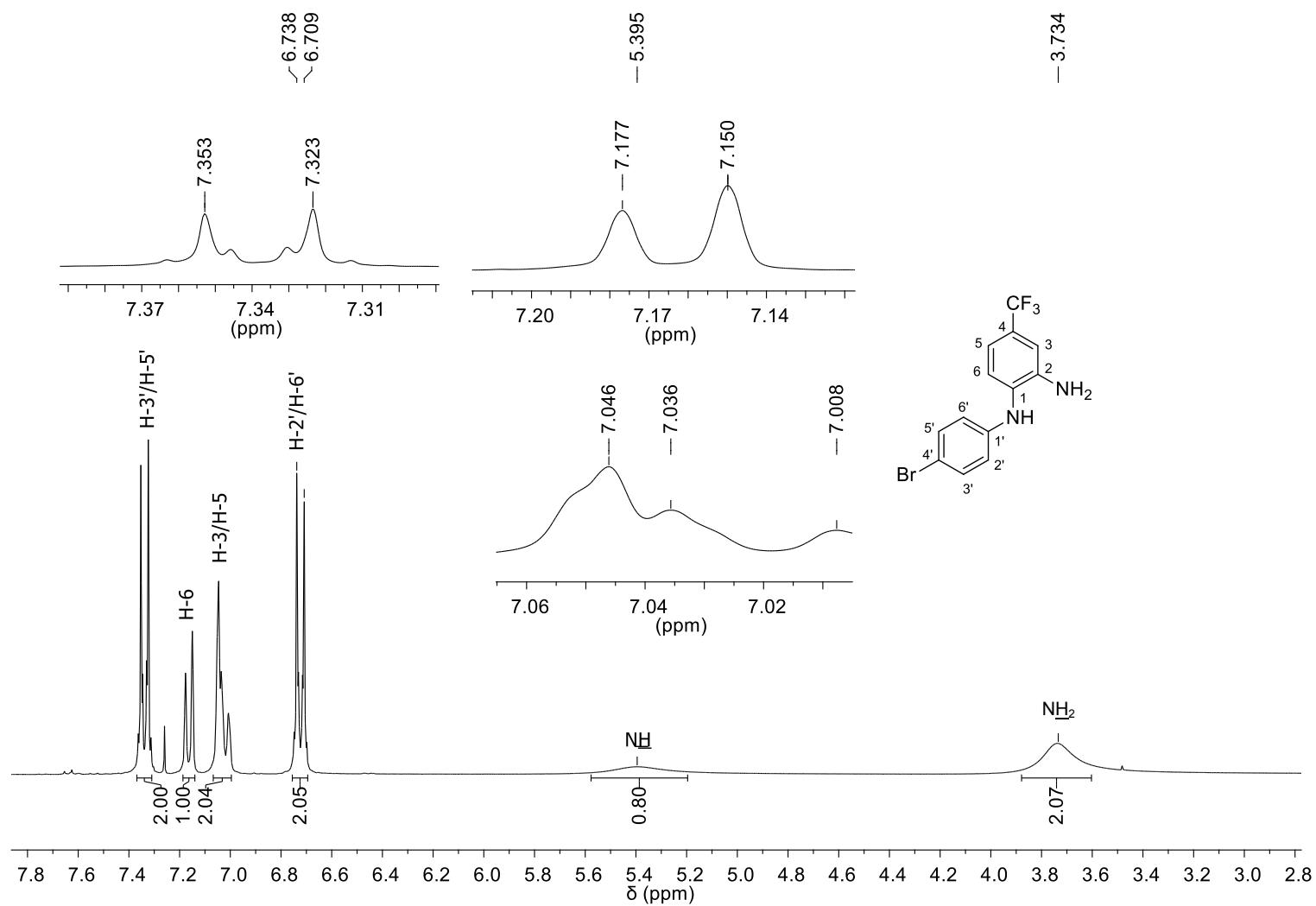


Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **4a**.

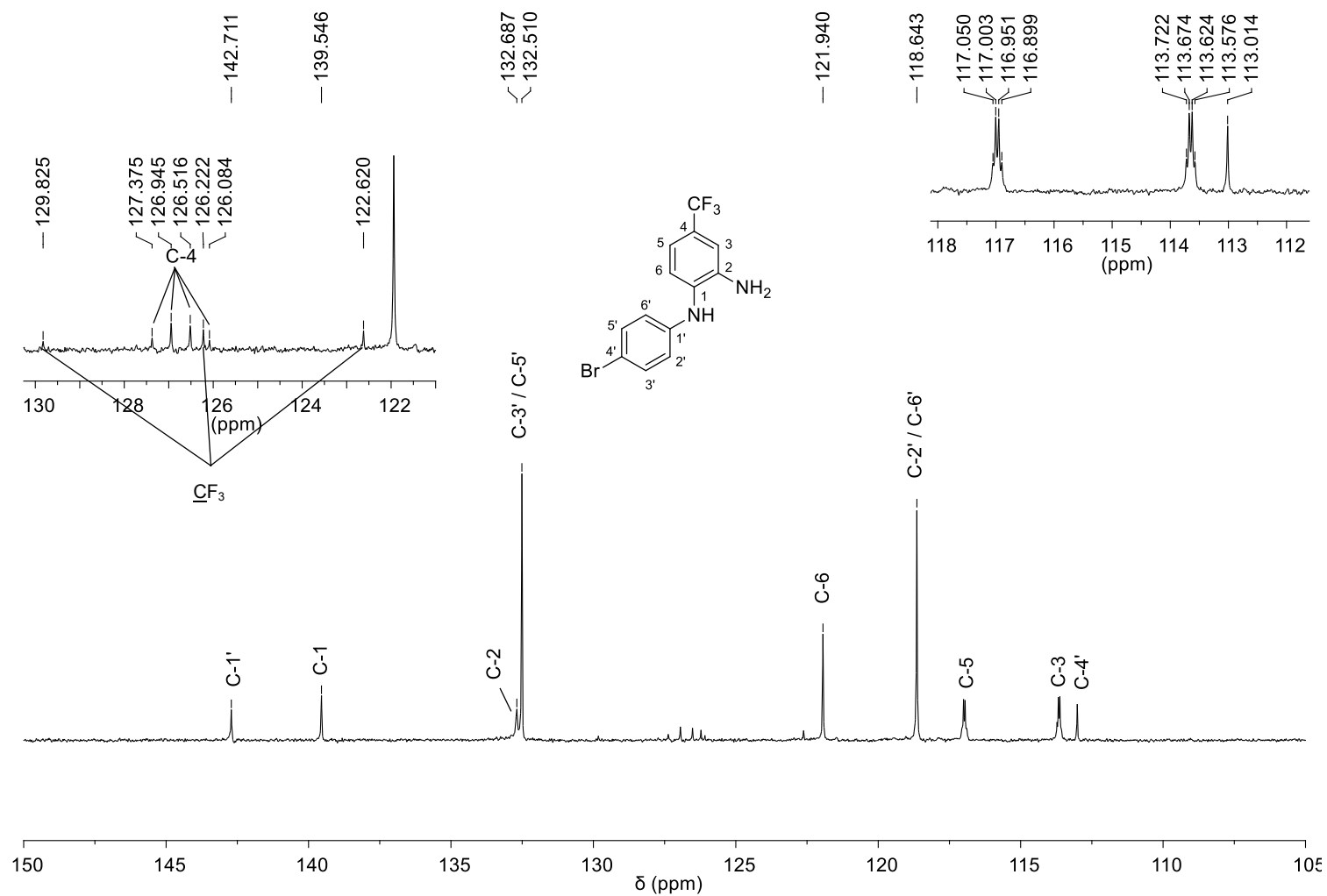


Figura 33 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **4a**.

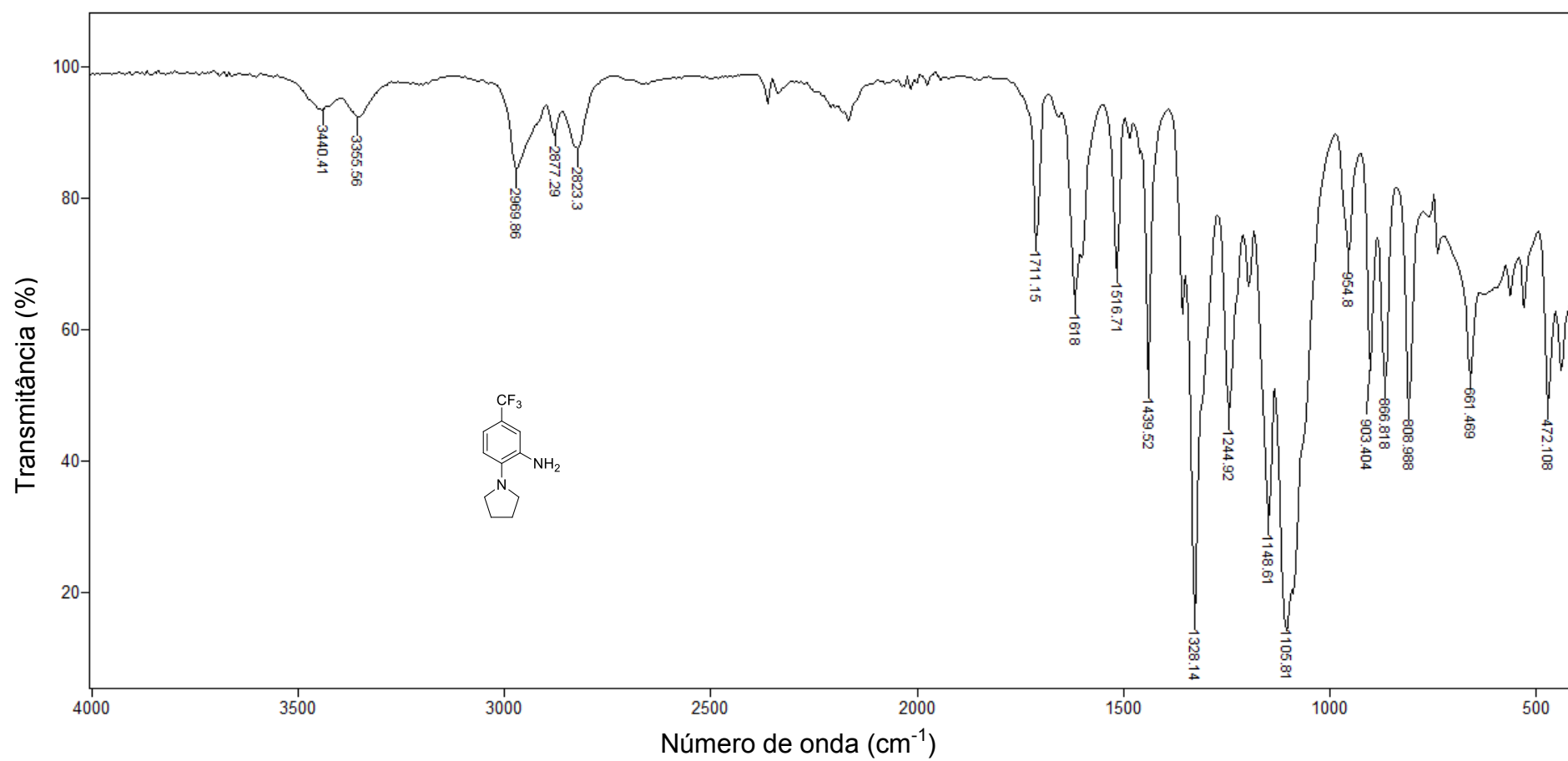


Figura 34 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4c**.

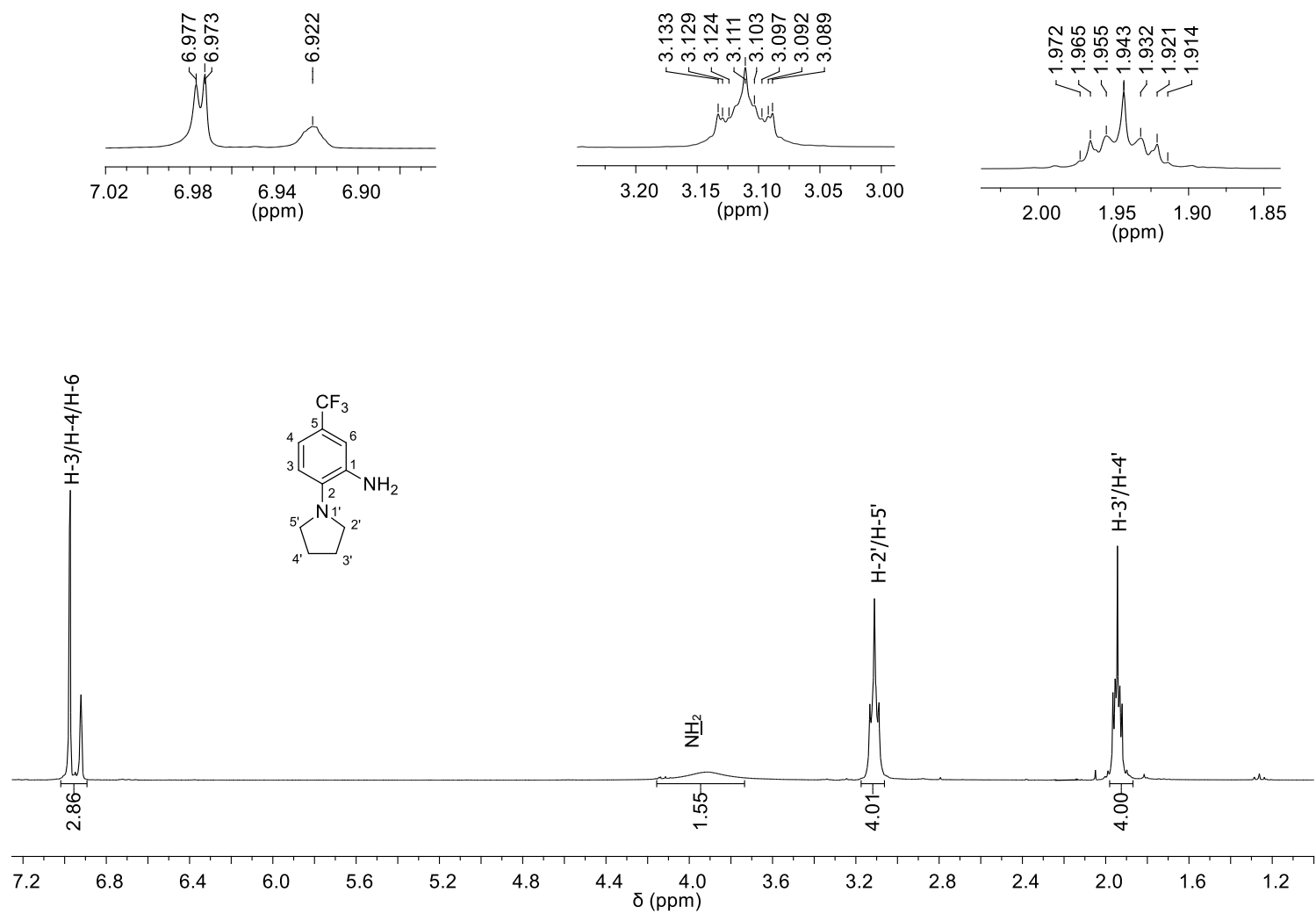


Figura 35 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **4c**.

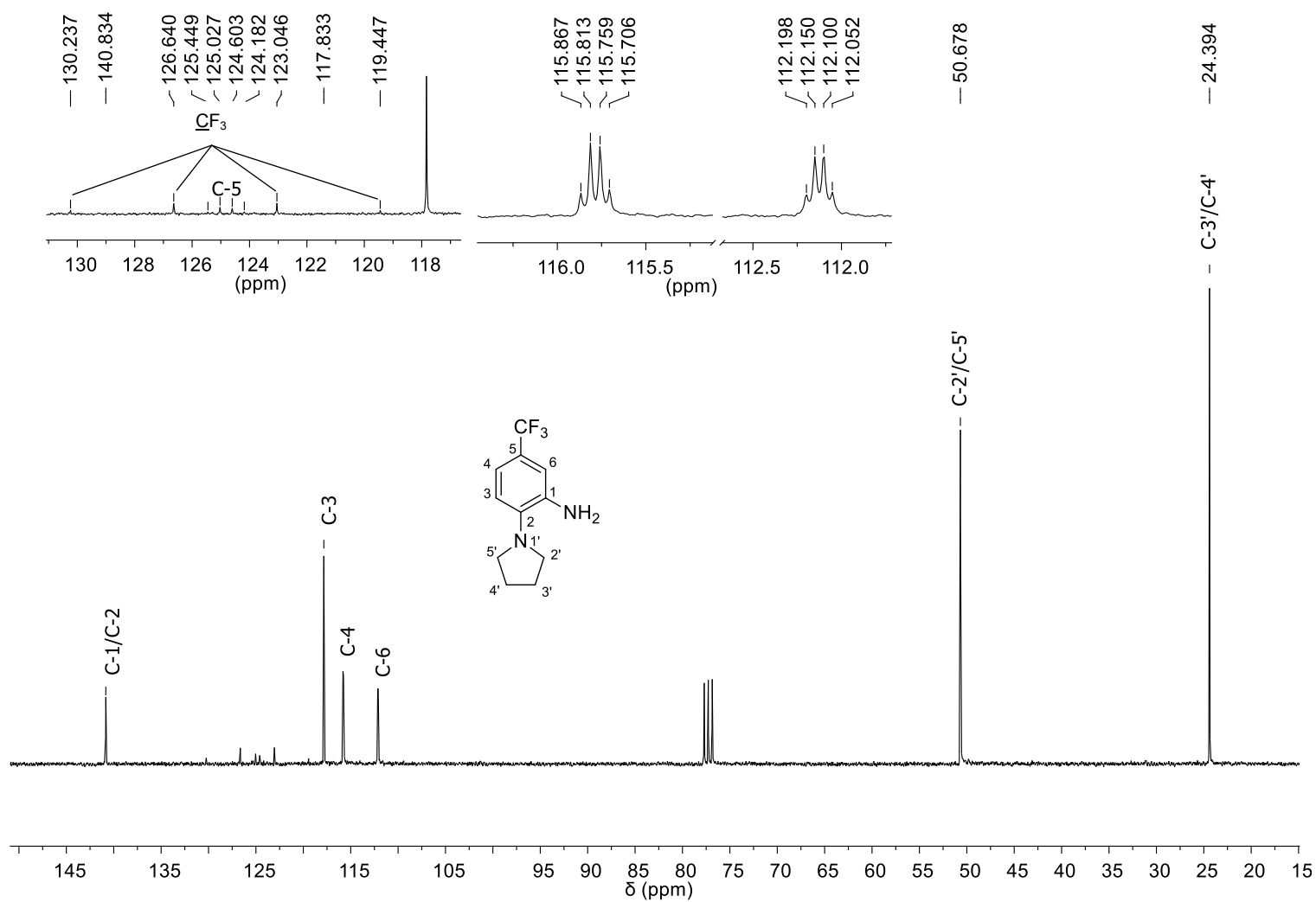


Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **4c**.

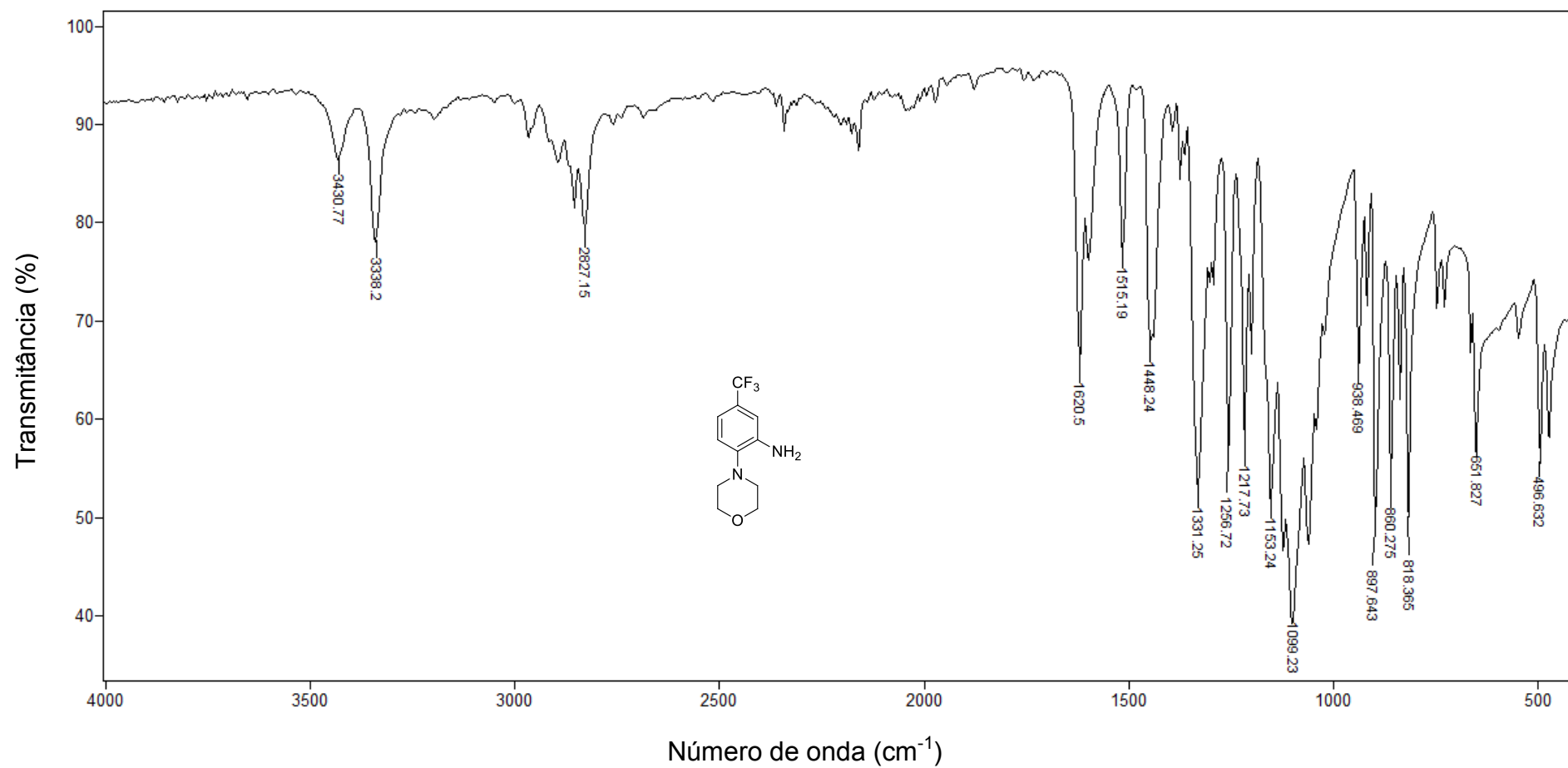


Figura 37 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4d**.

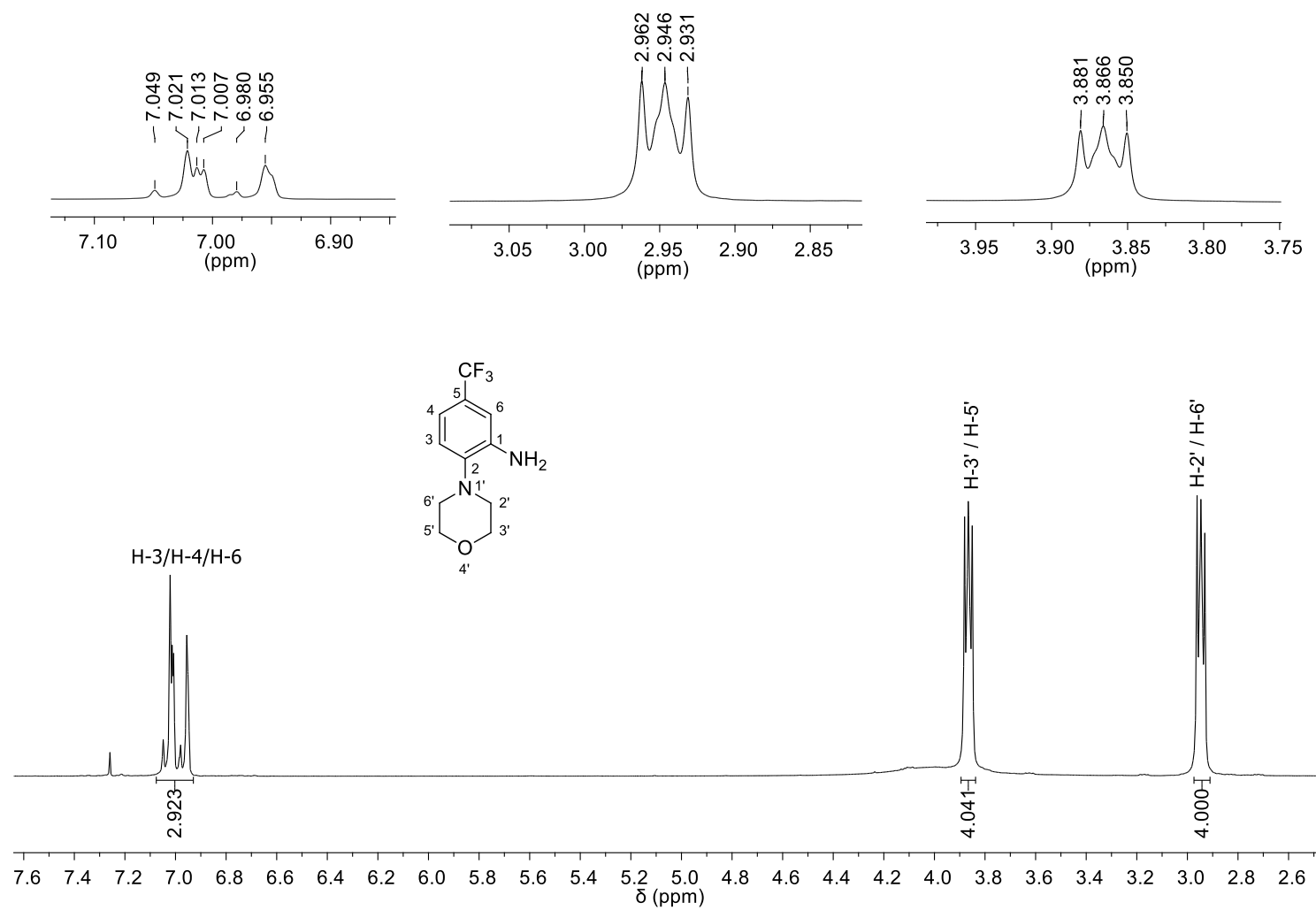


Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **4d**.

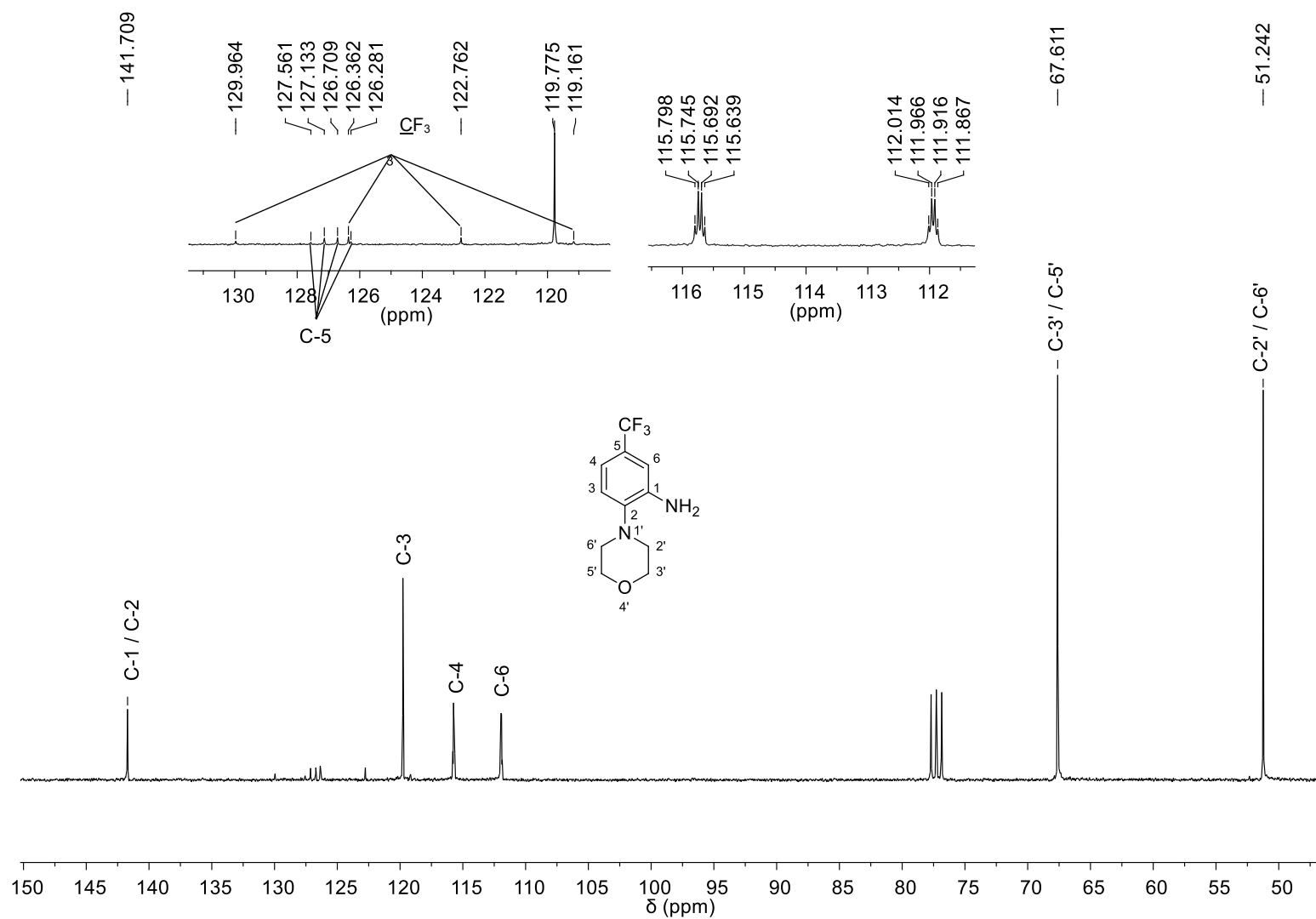


Figura 39 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **4d**.

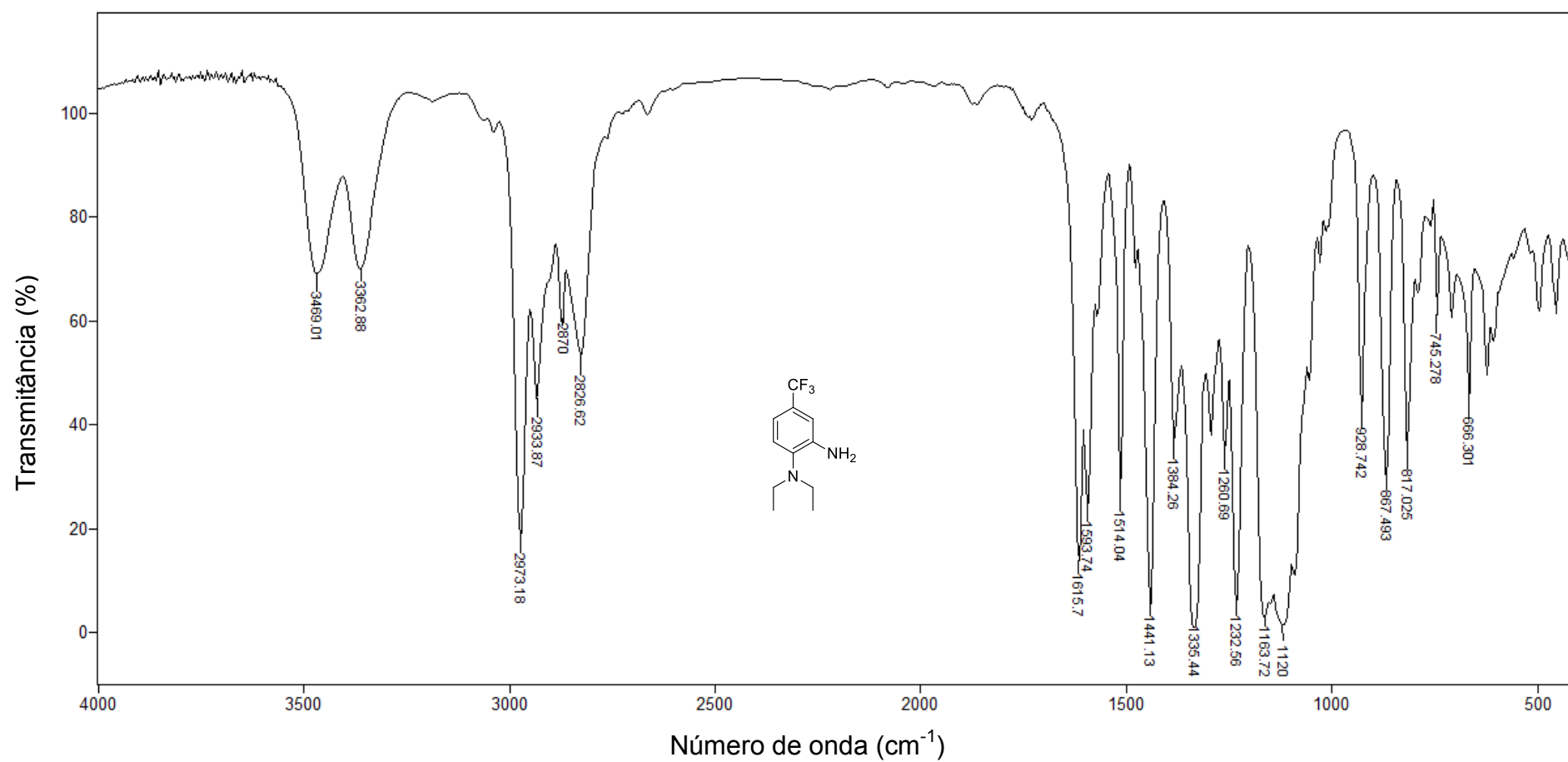


Figura 40 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4e**.

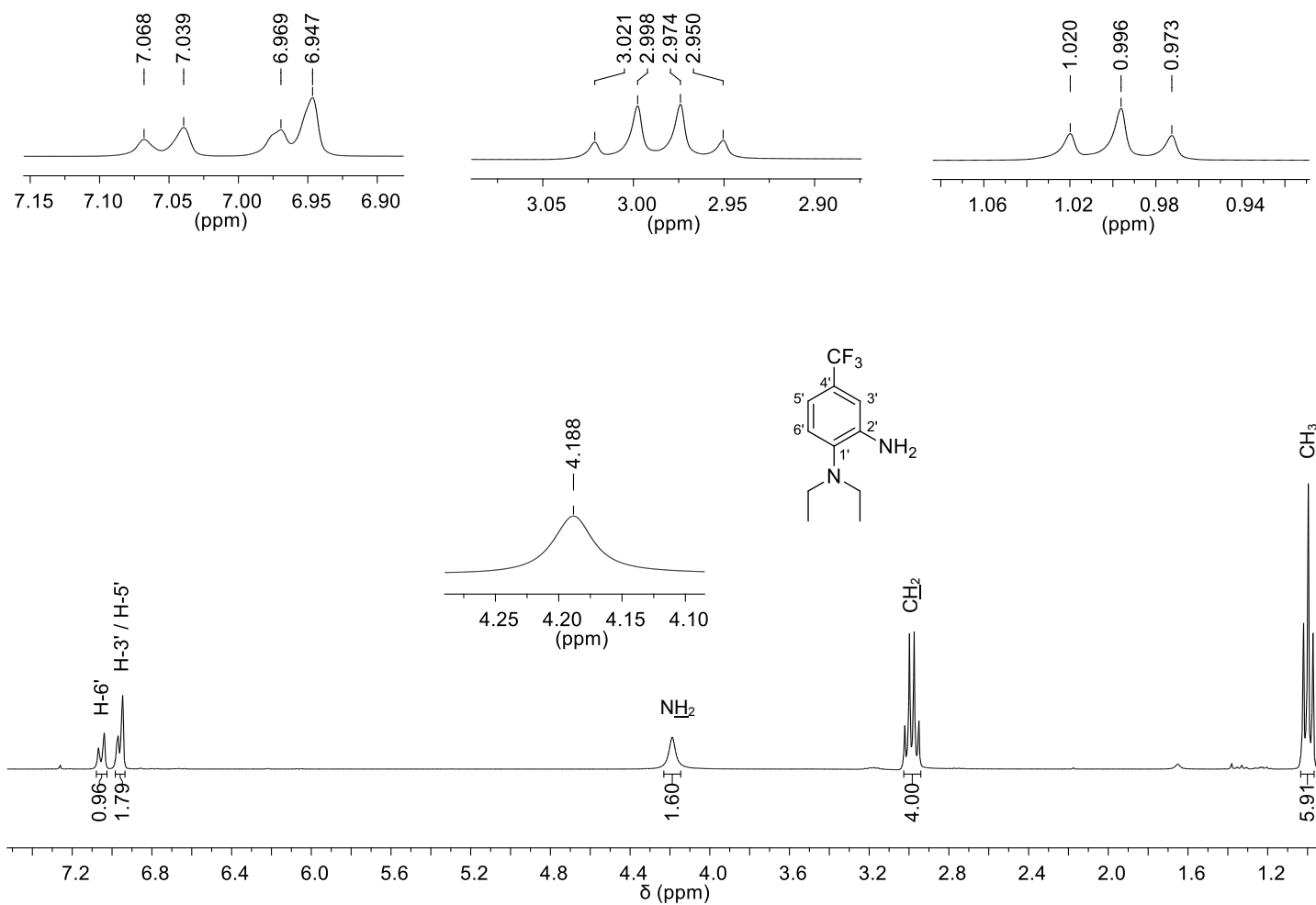


Figura 41 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **4e**.

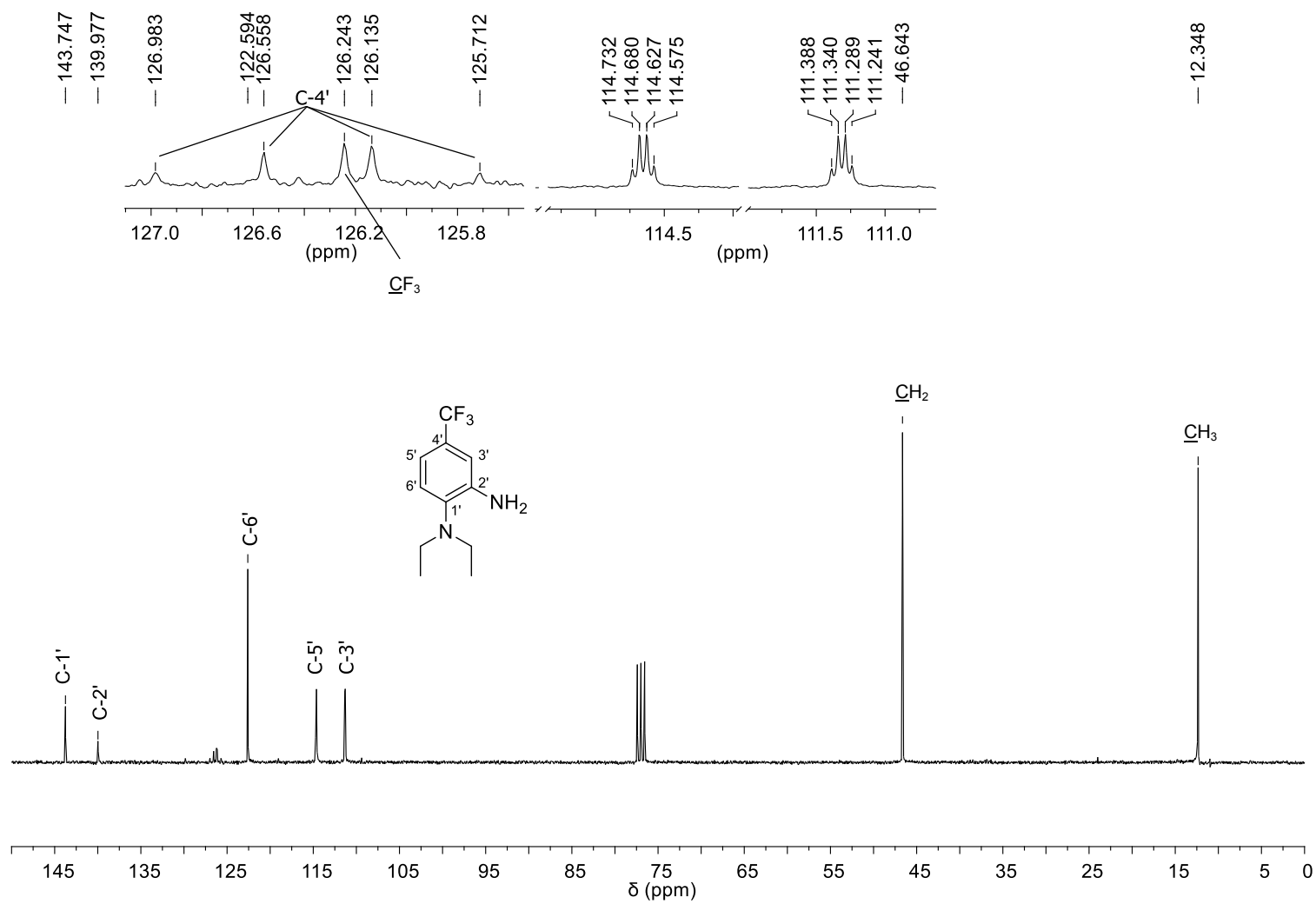


Figura 42 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **4e**.

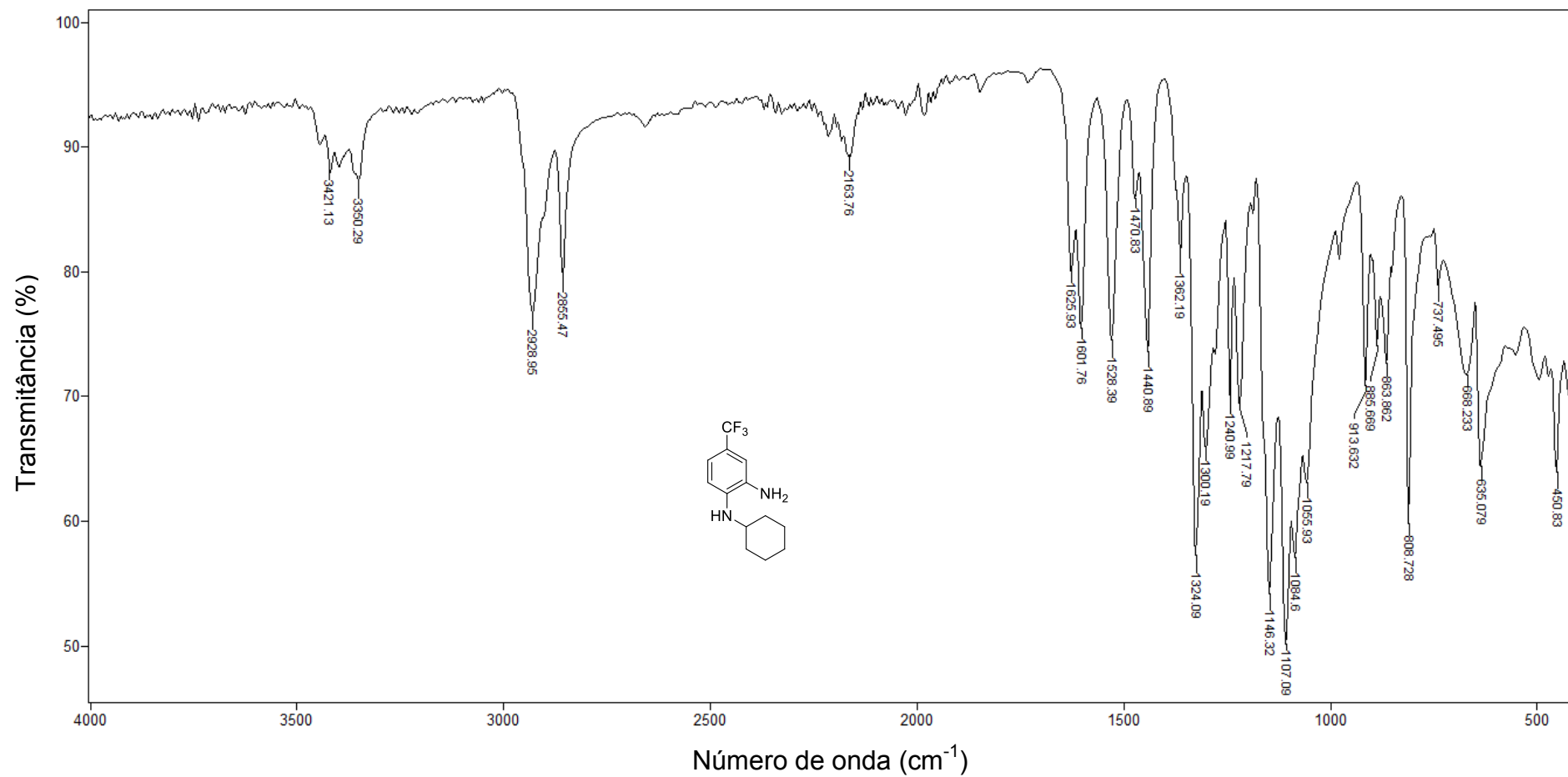


Figura 43 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4f**.

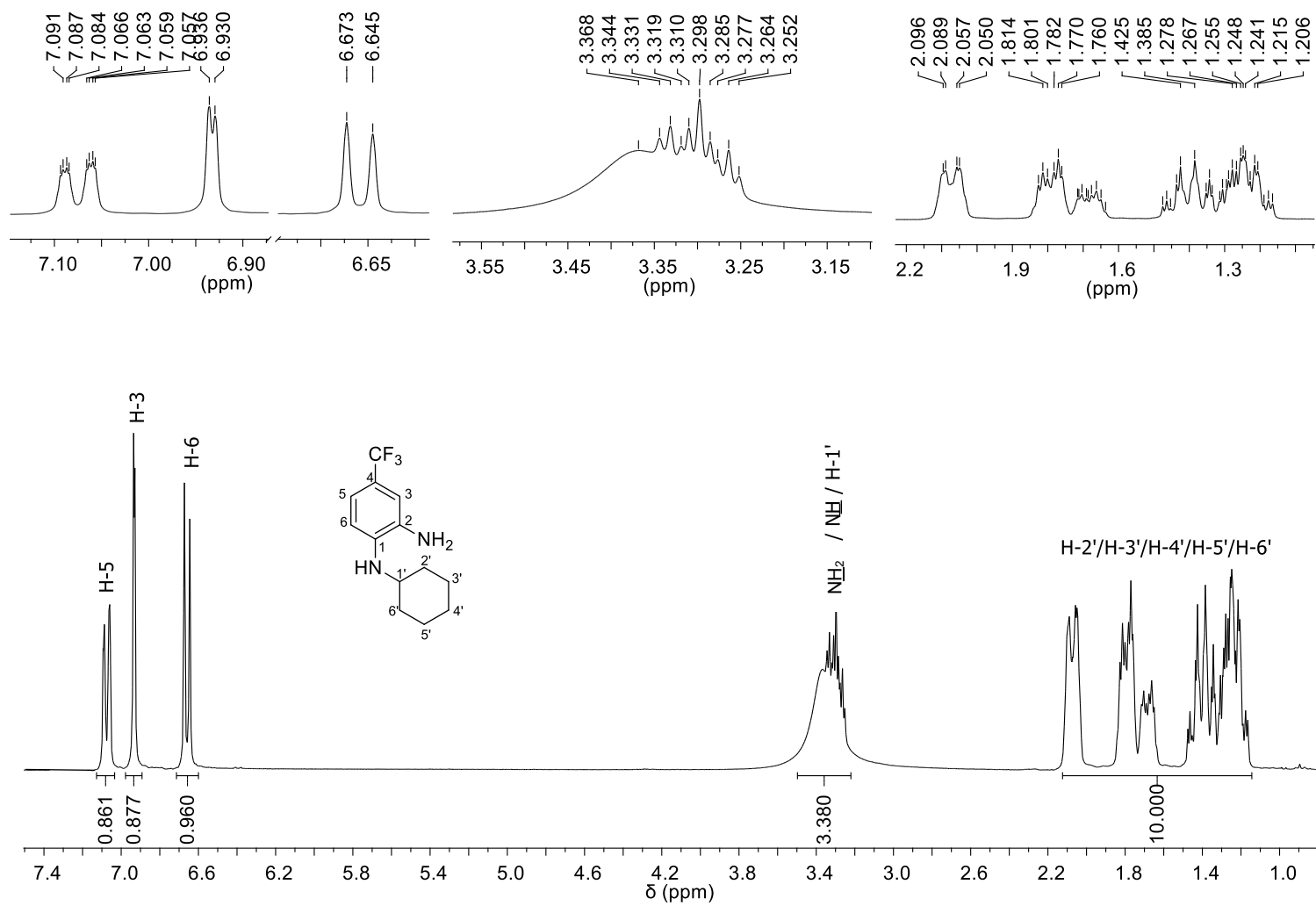


Figura 44 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **4f**.

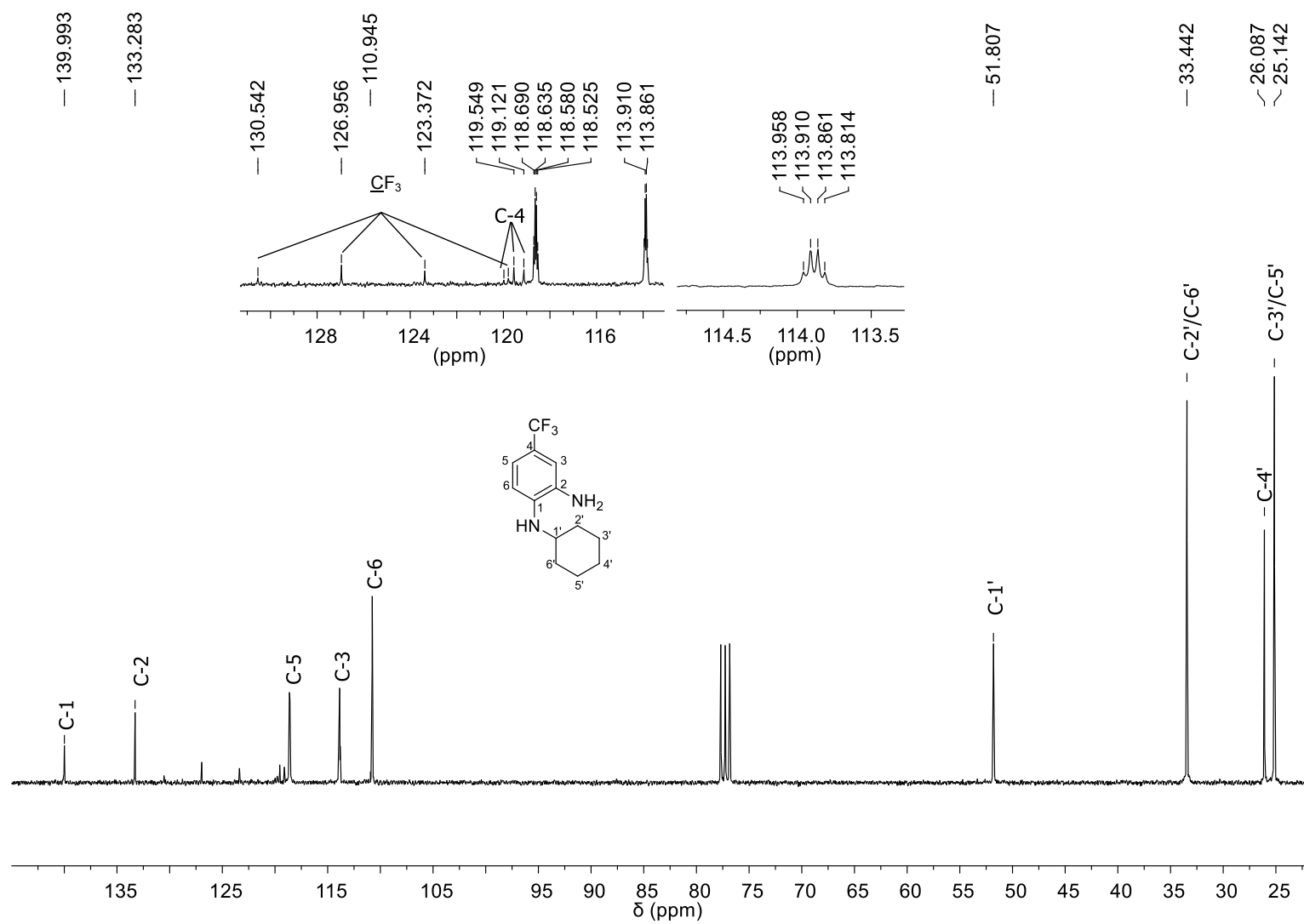


Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **4f**.

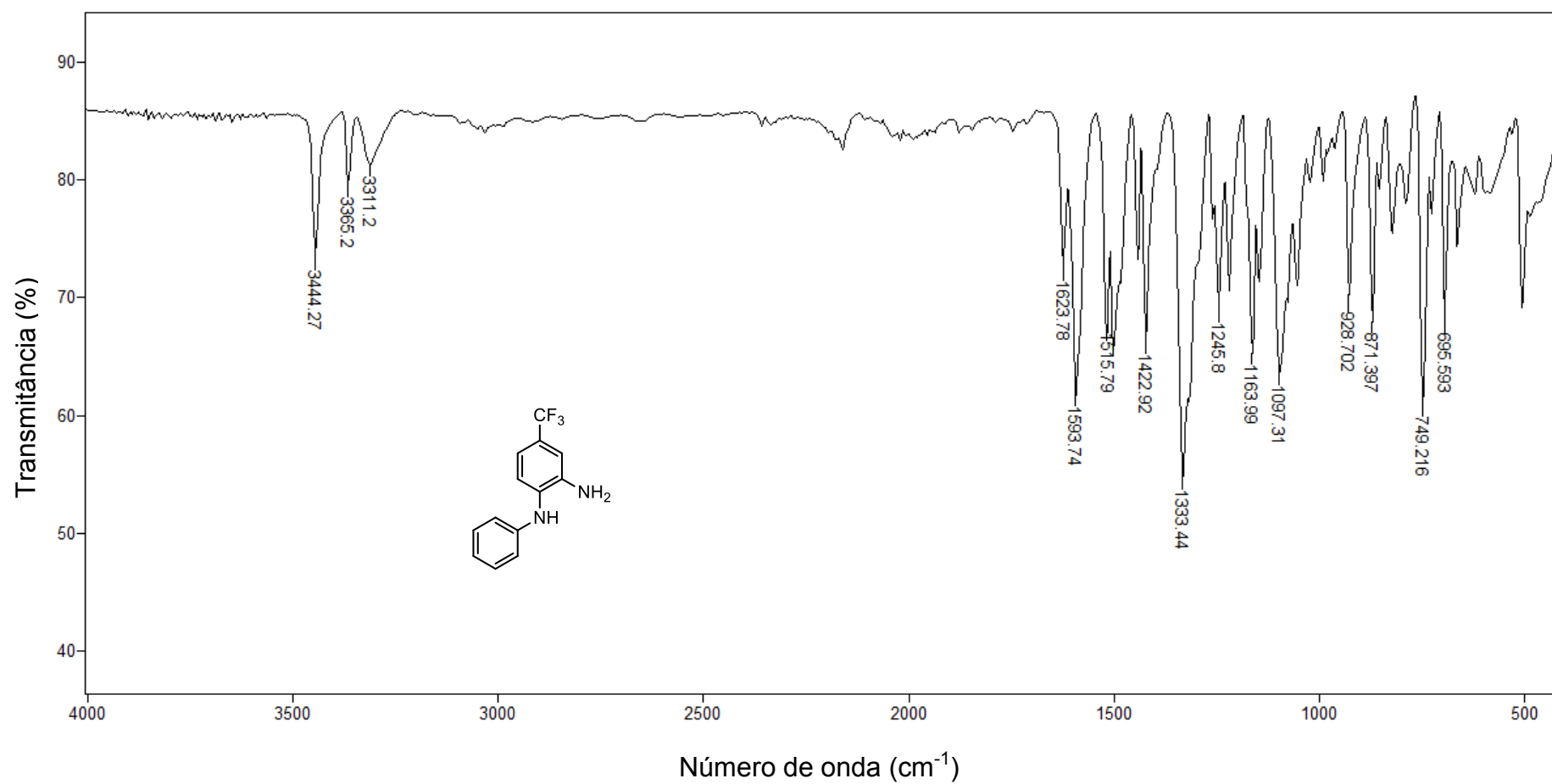


Figura 46 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4g**.

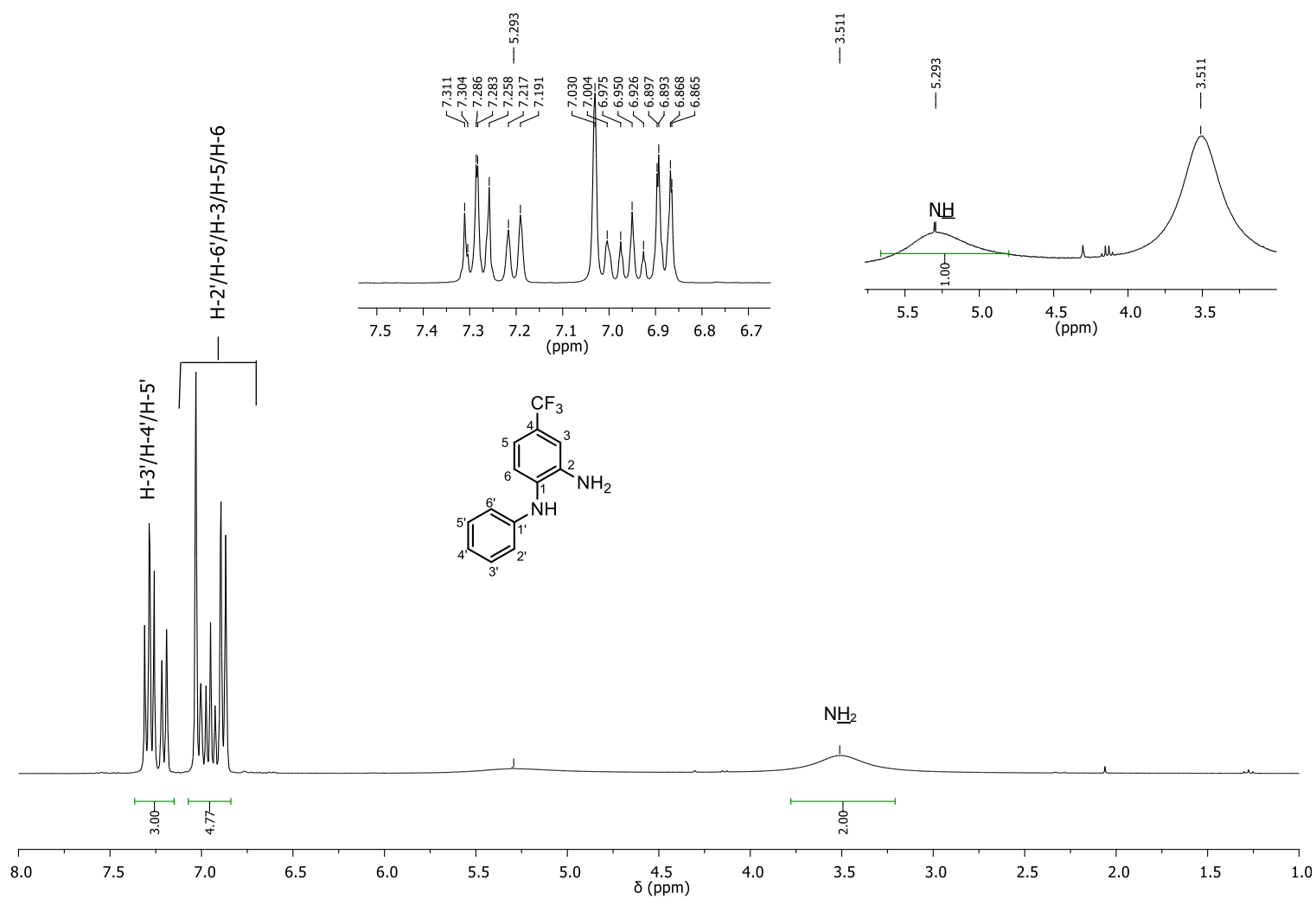
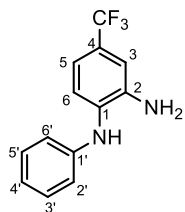


Figura 47 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **4g**.



364

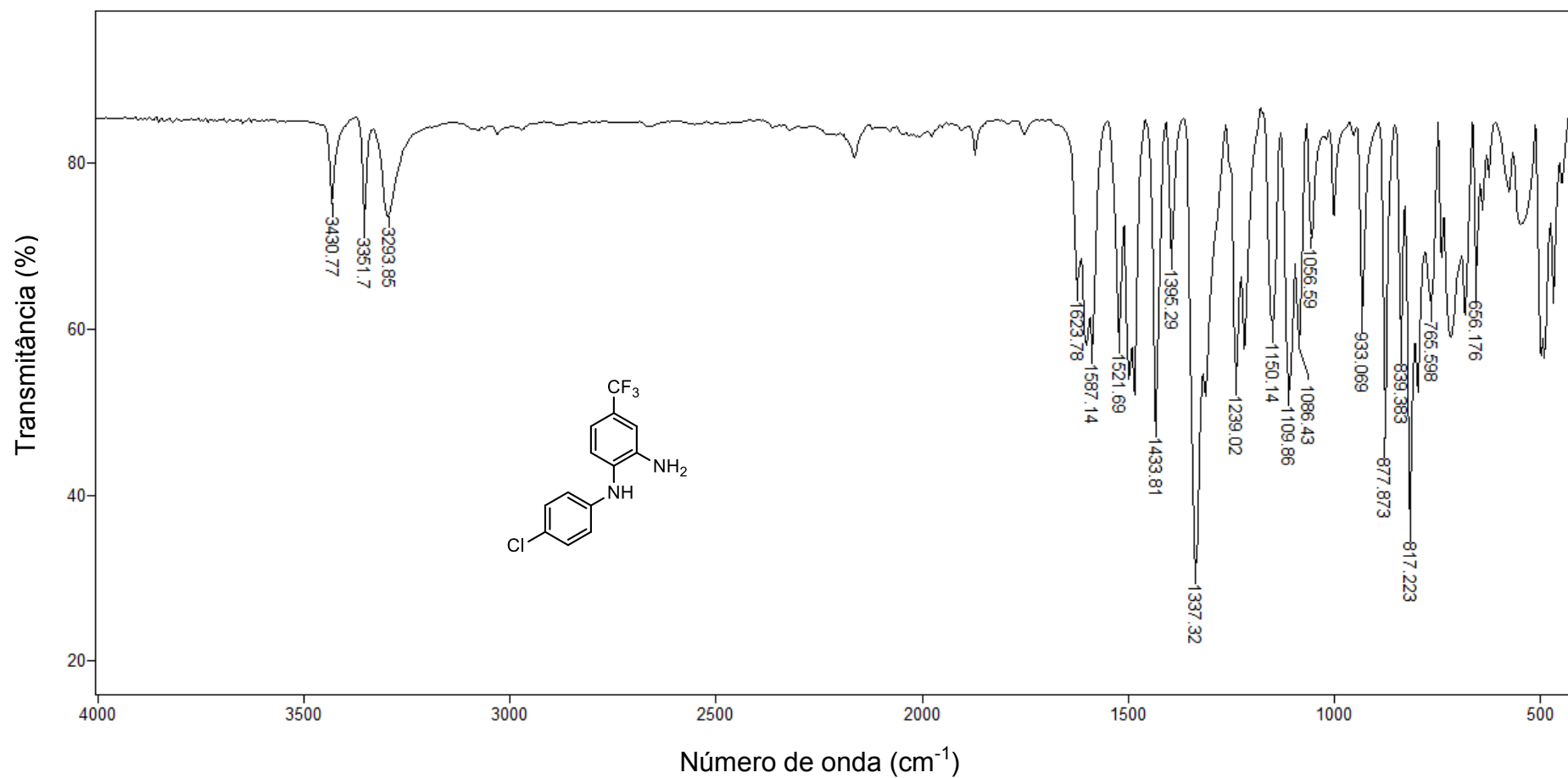


Figura 49 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4i**.

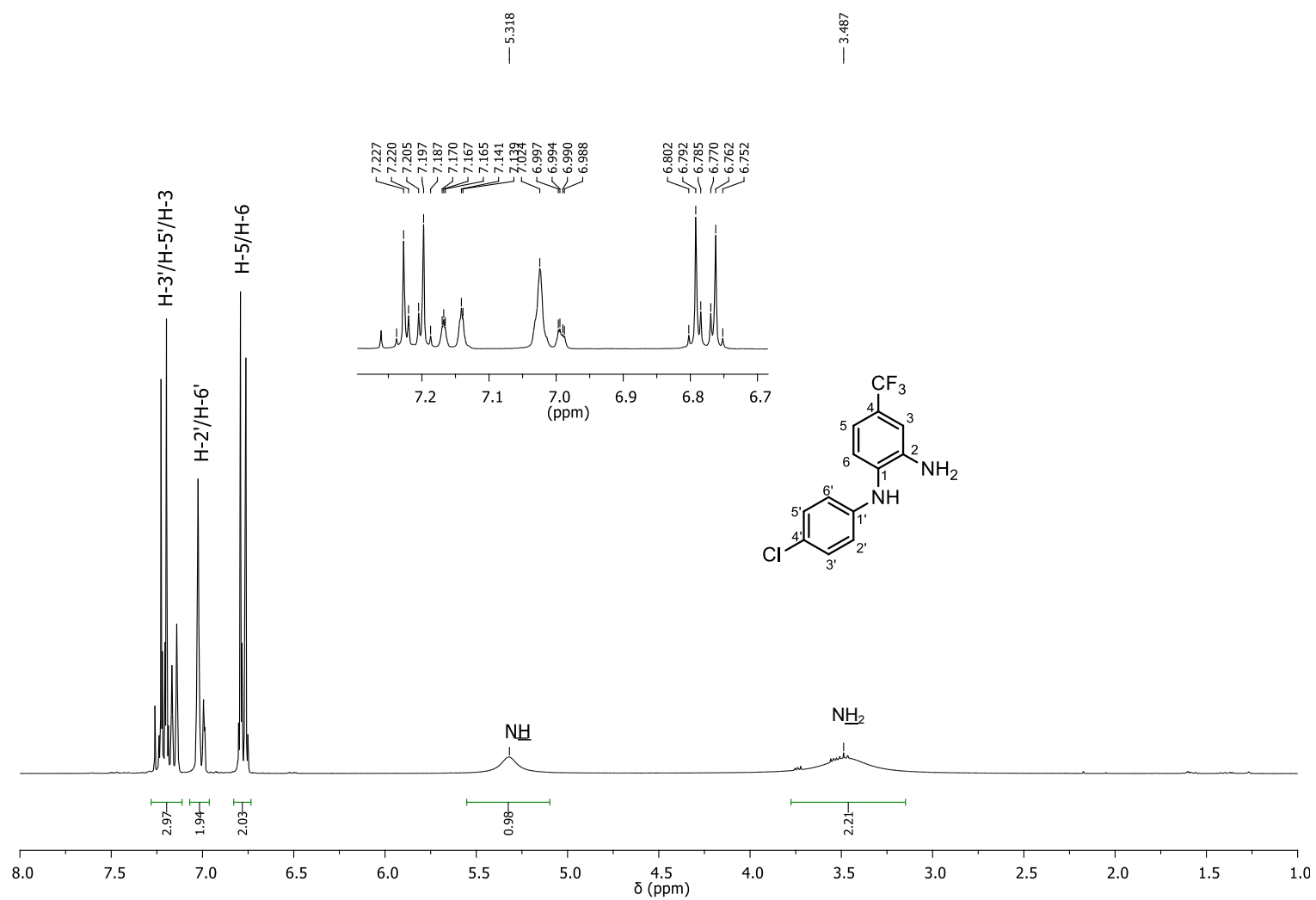


Figura 50 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **4i**.

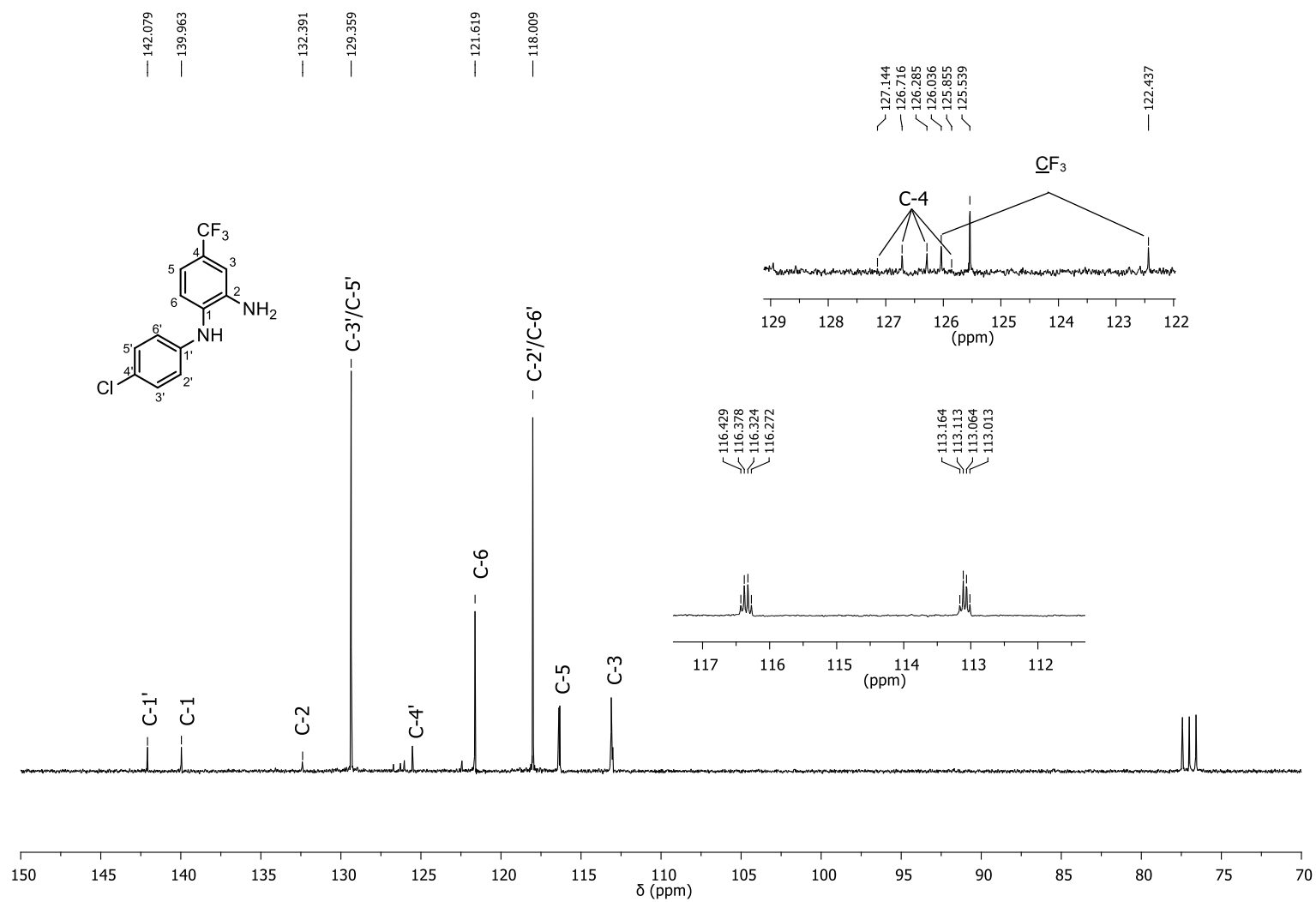


Figura 51 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **4i**.

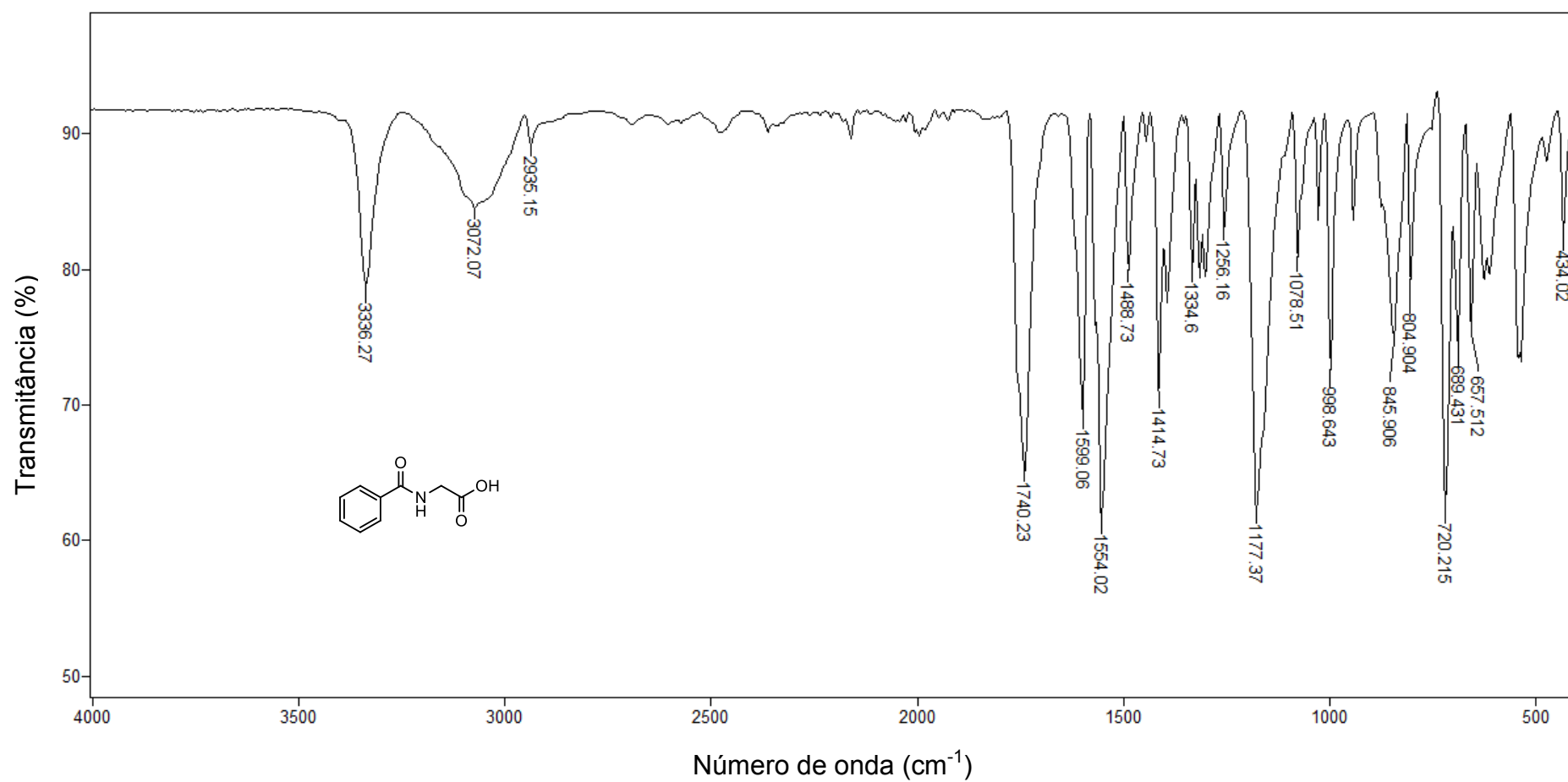


Figura 52 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7b**.

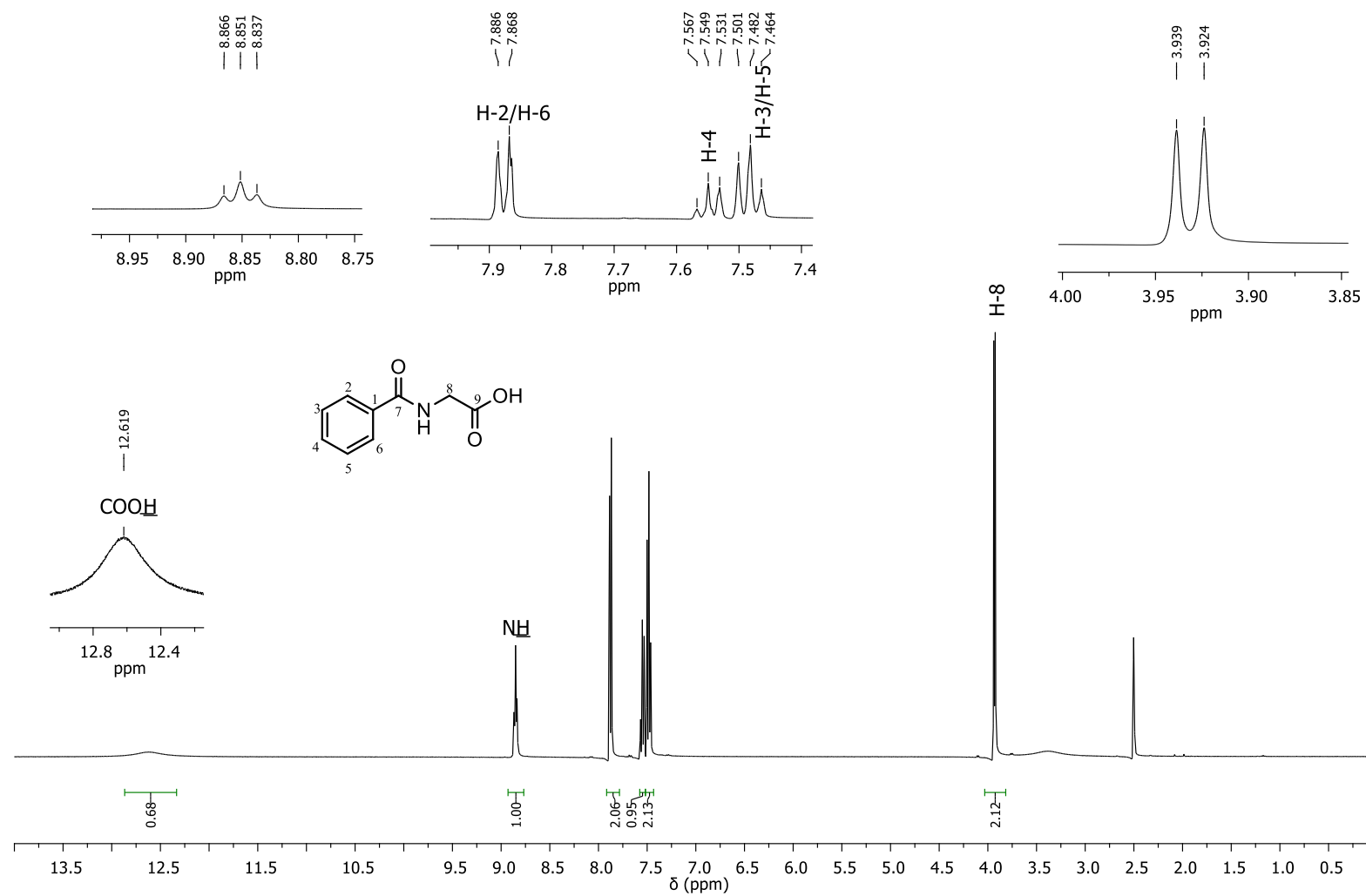


Figura 53 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **7b**.

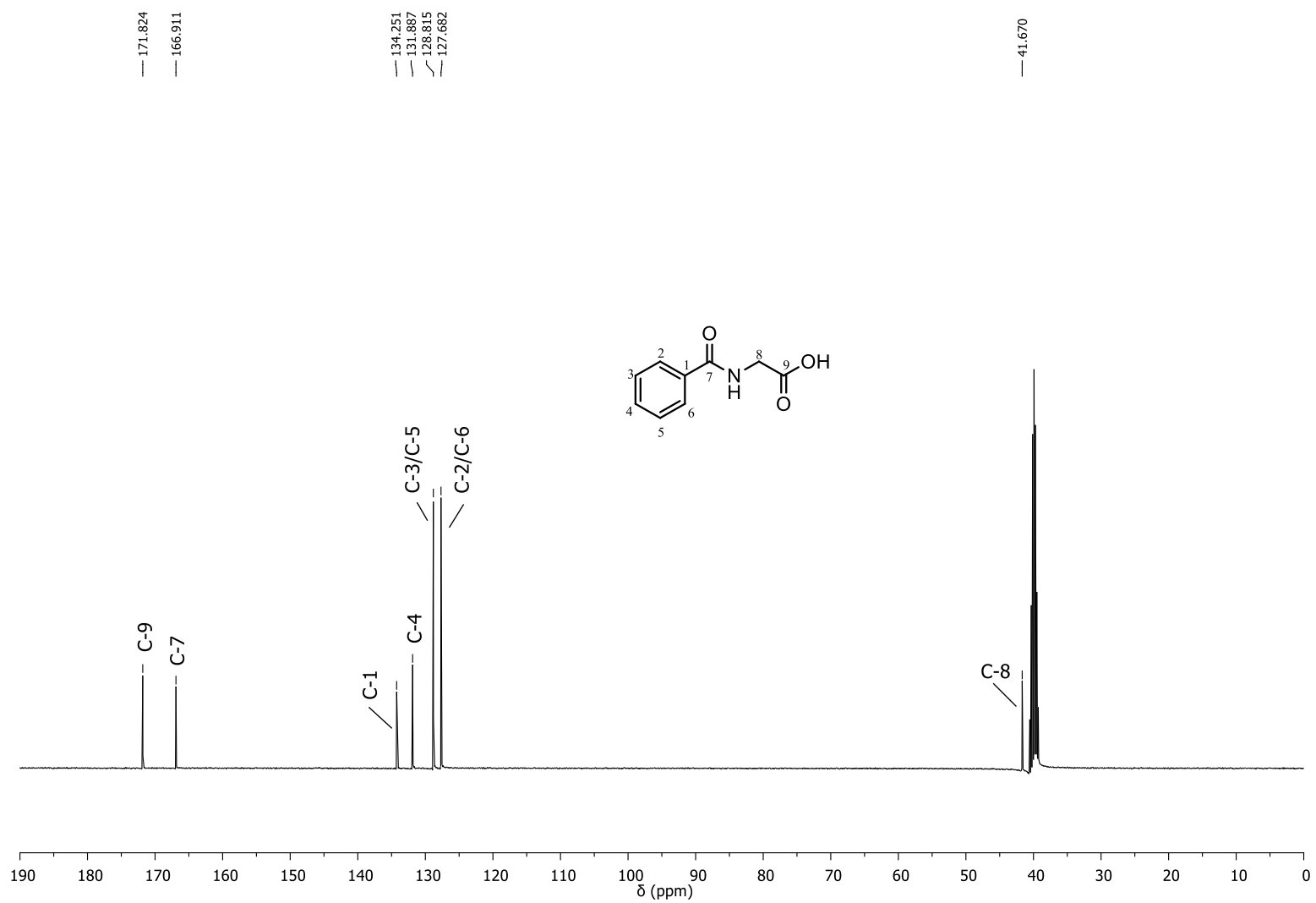


Figura 54 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **7b**.

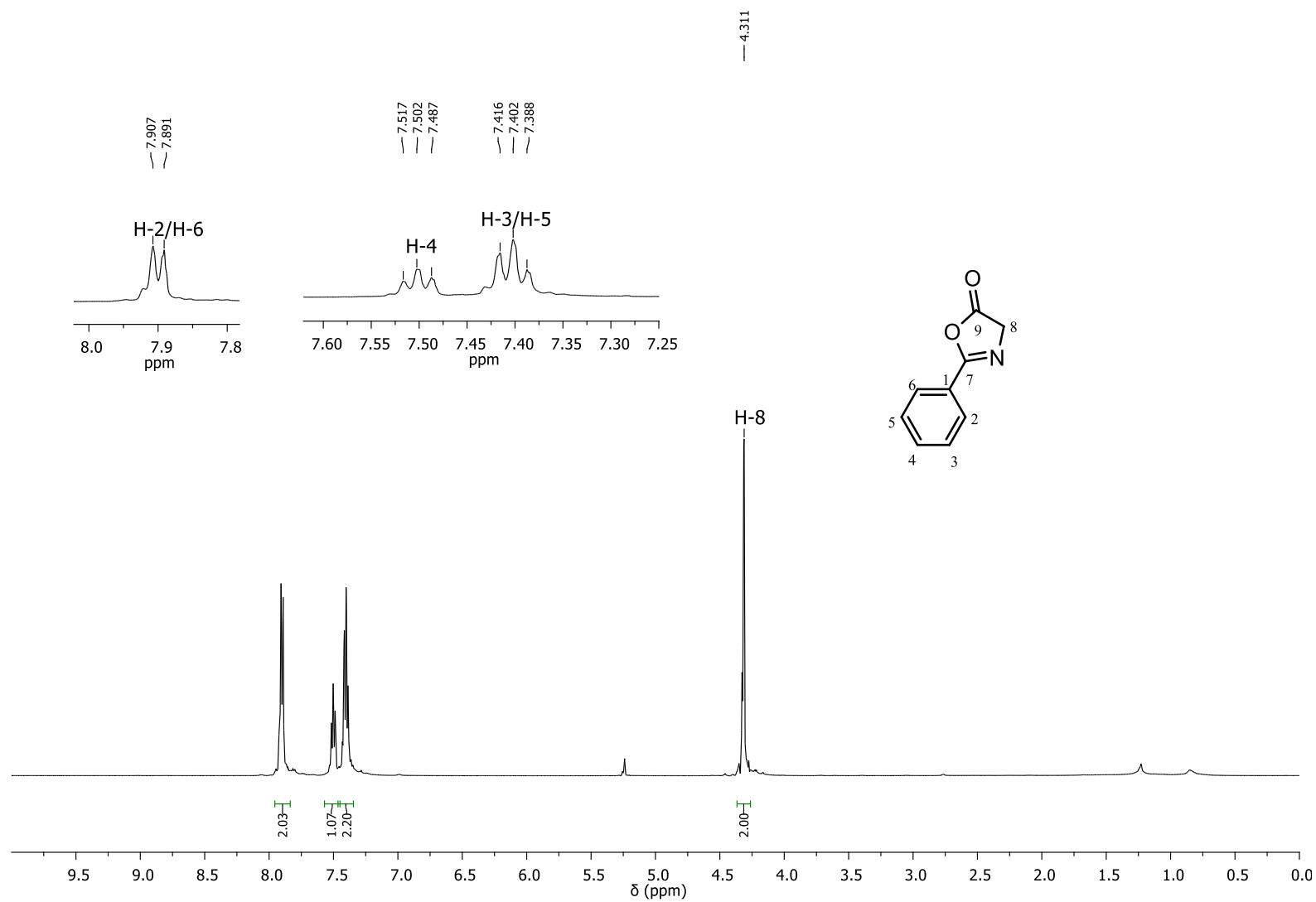


Figura 55 – Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **8b**.

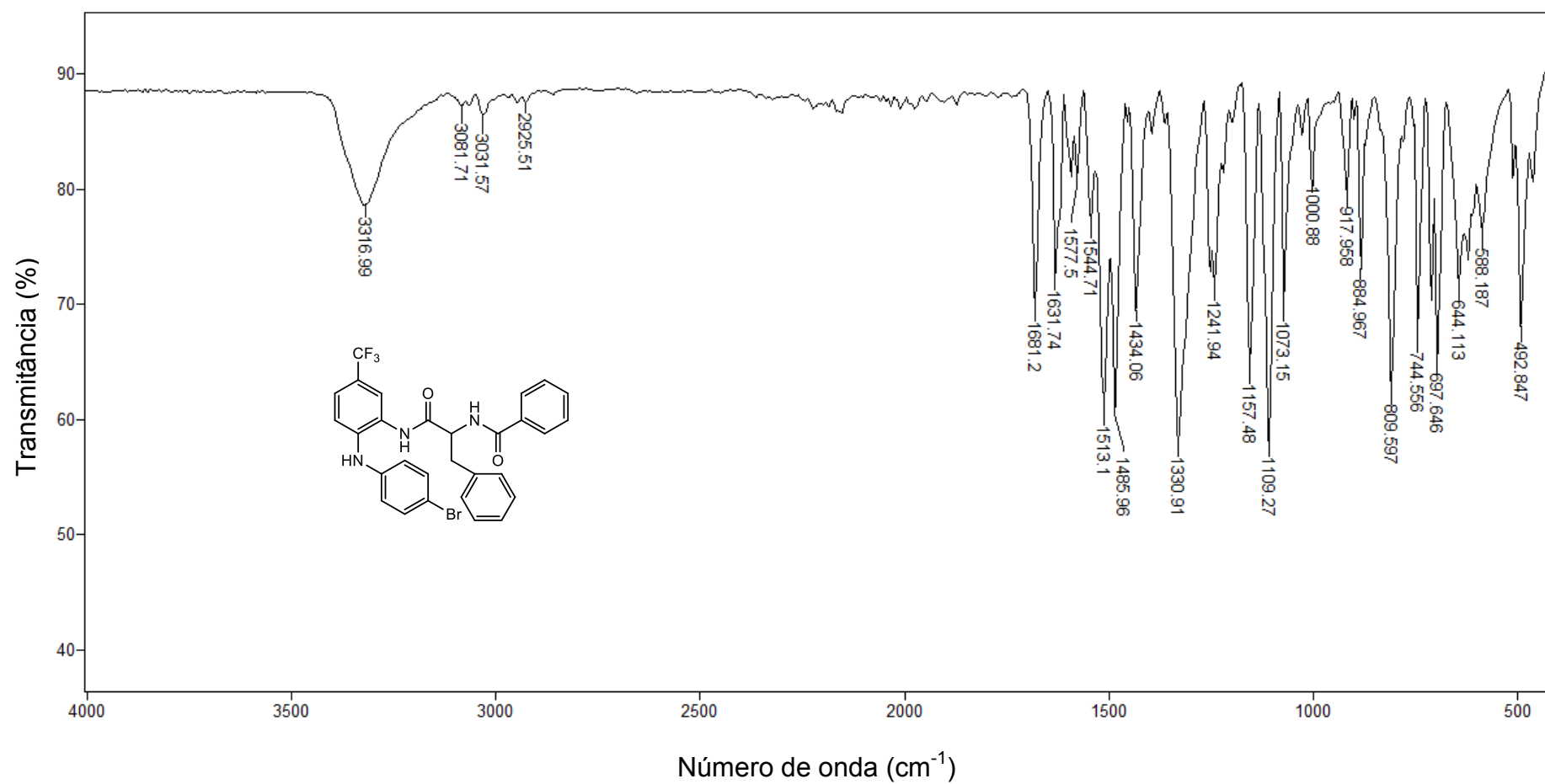


Figura 56 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9a**.

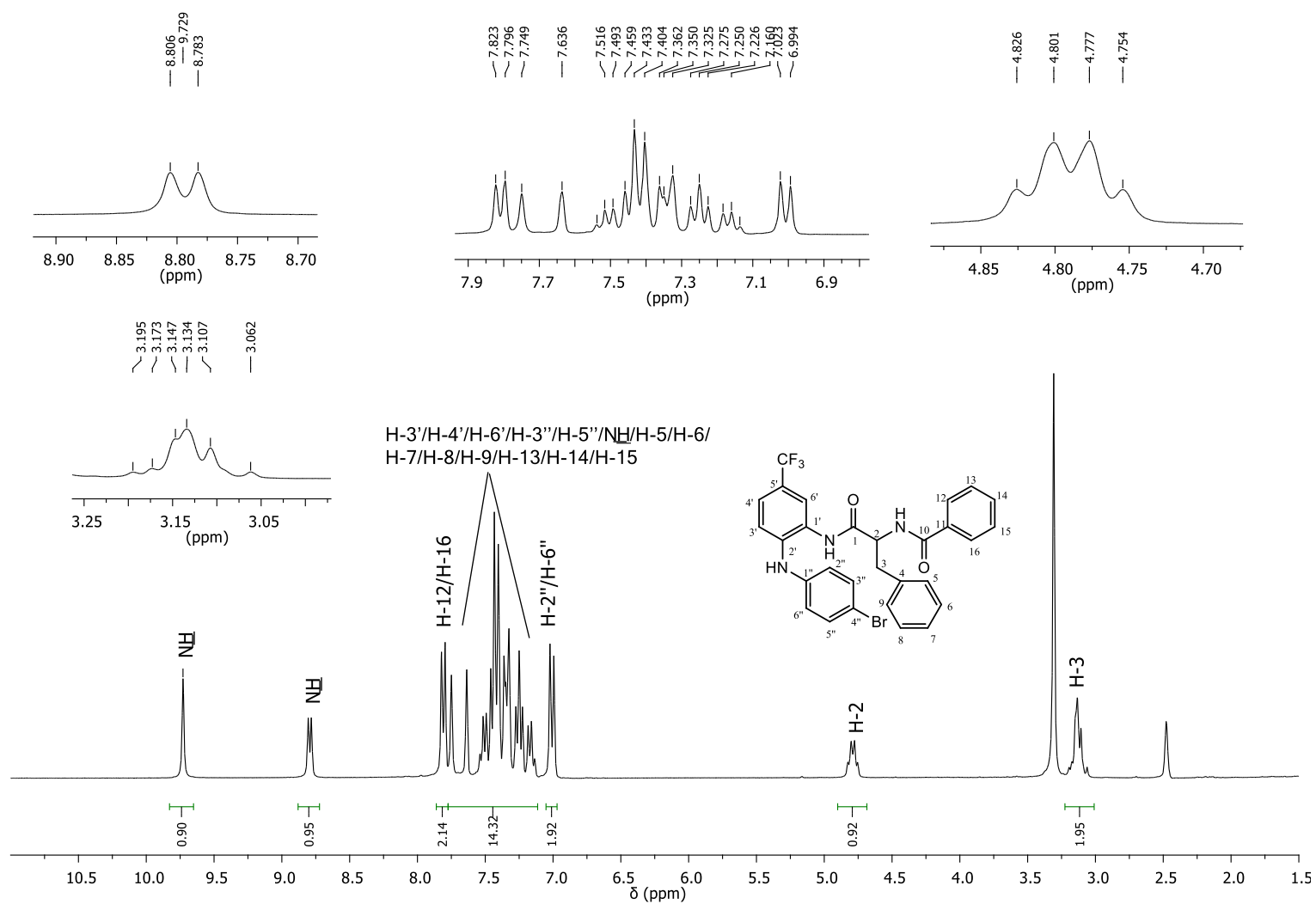


Figura 57 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **9a**.

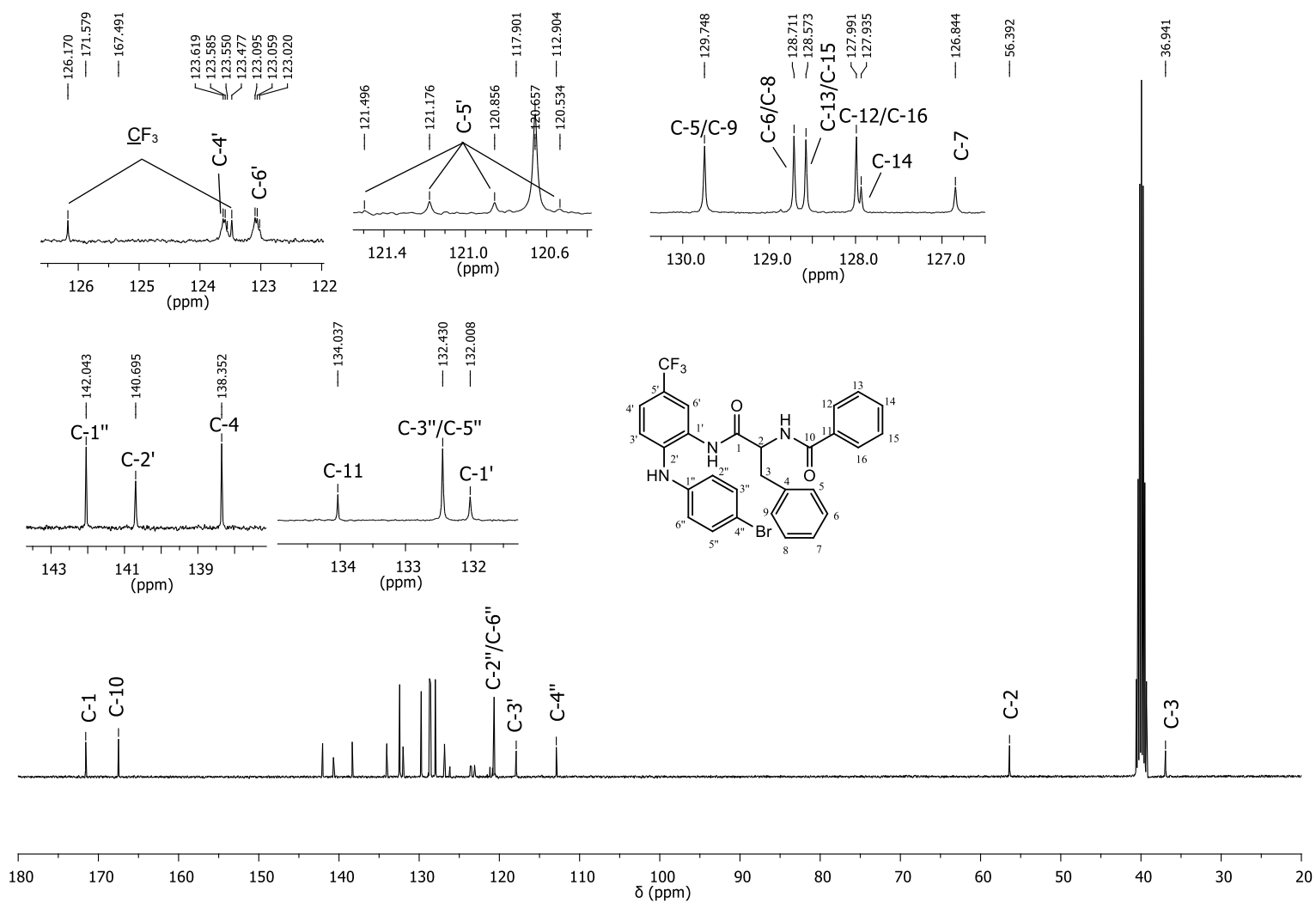


Figura 58 - Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **9a**.

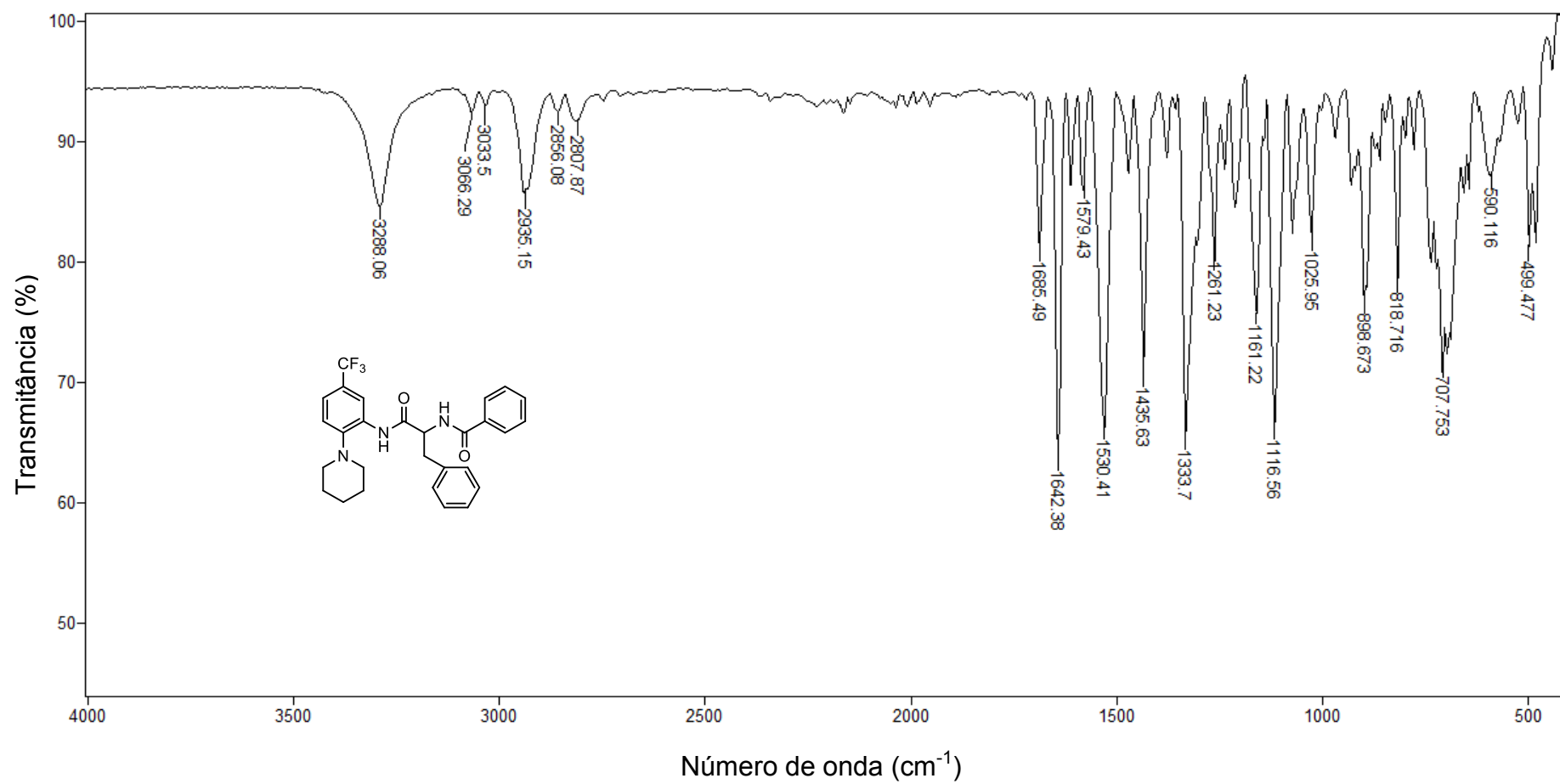


Figura 60 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9b**.

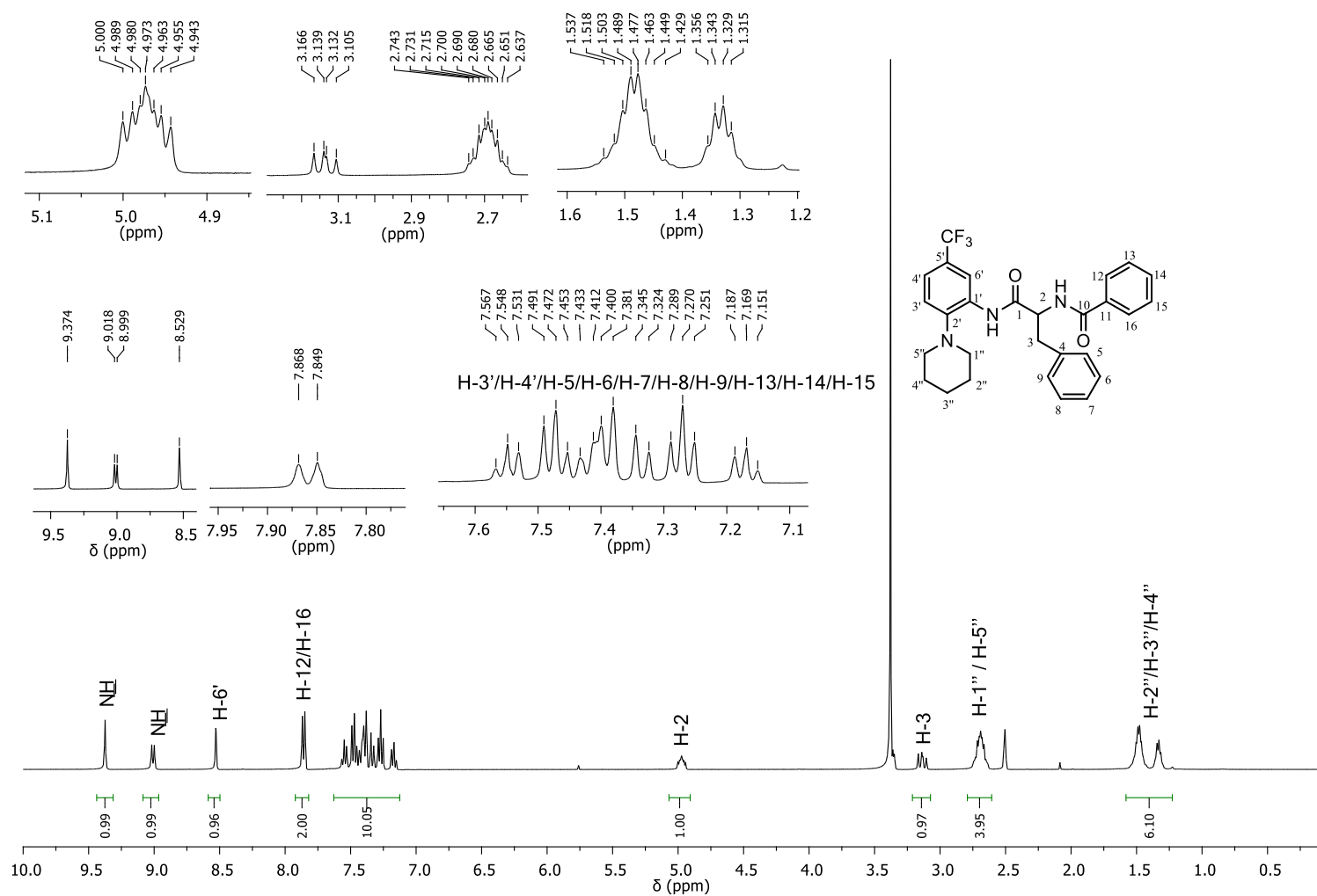


Figura 61 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9b**.

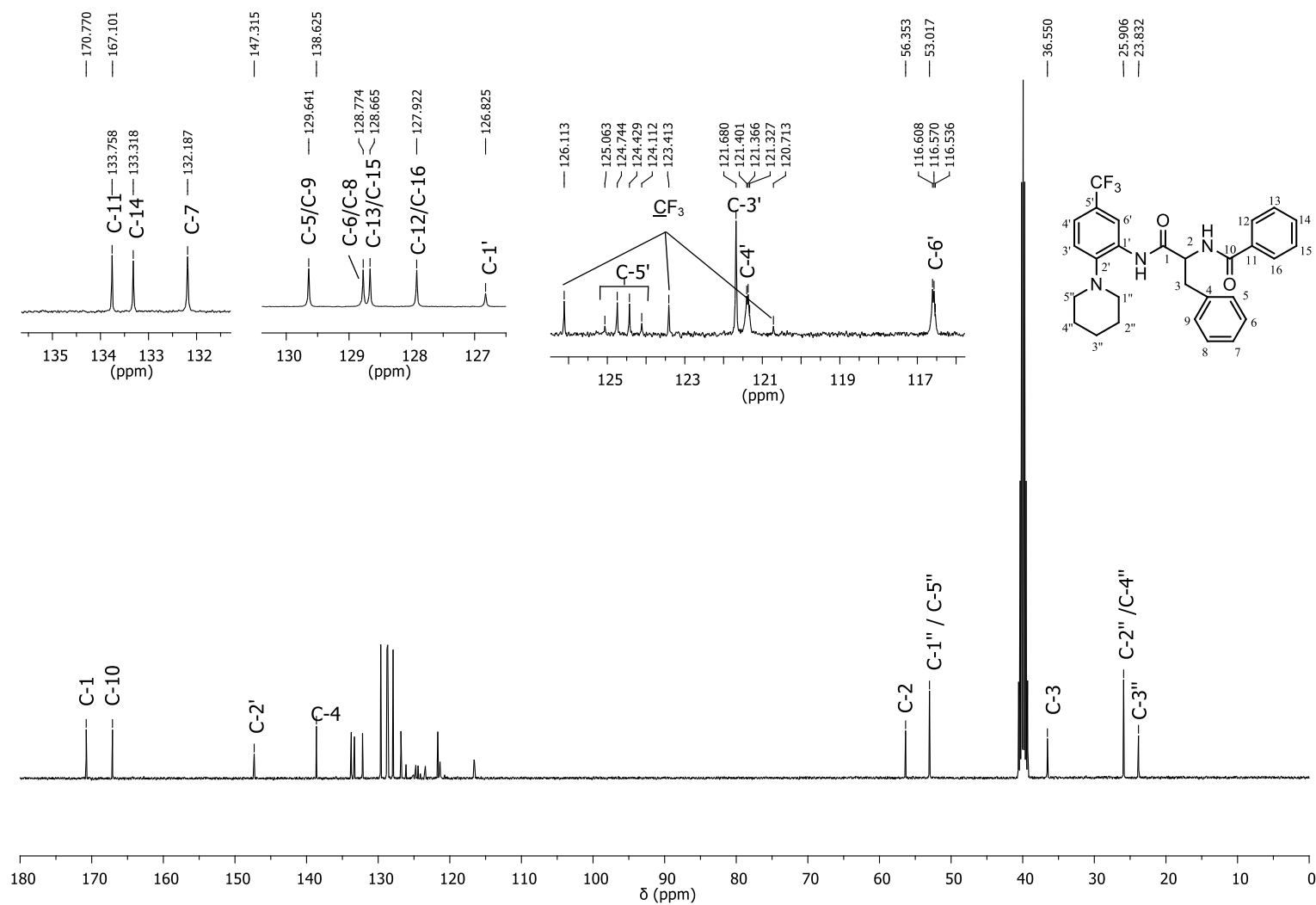


Figura 62 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9b**.

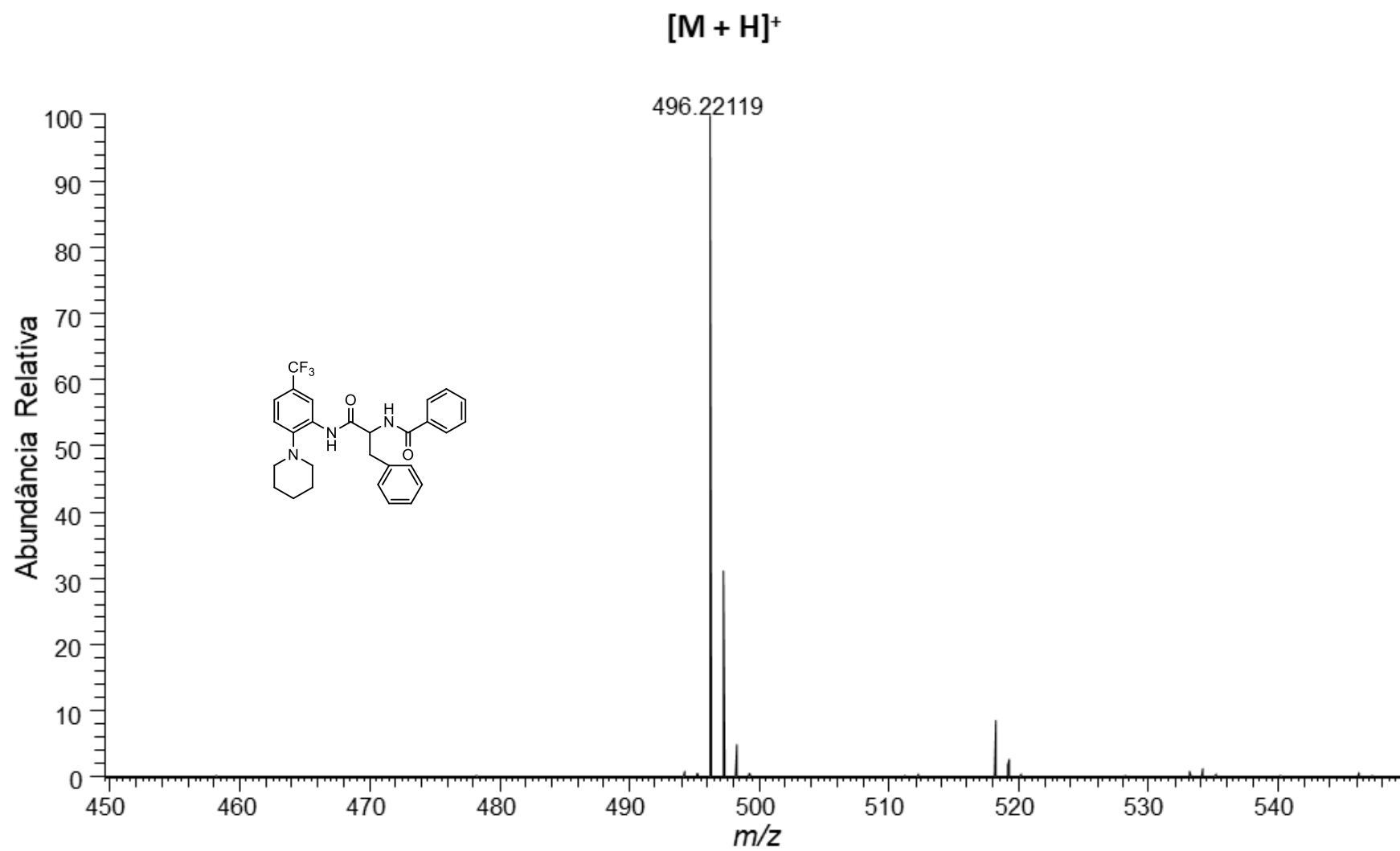


Figura 63 – Espectro de massas de alta resolução do composto **9b**.

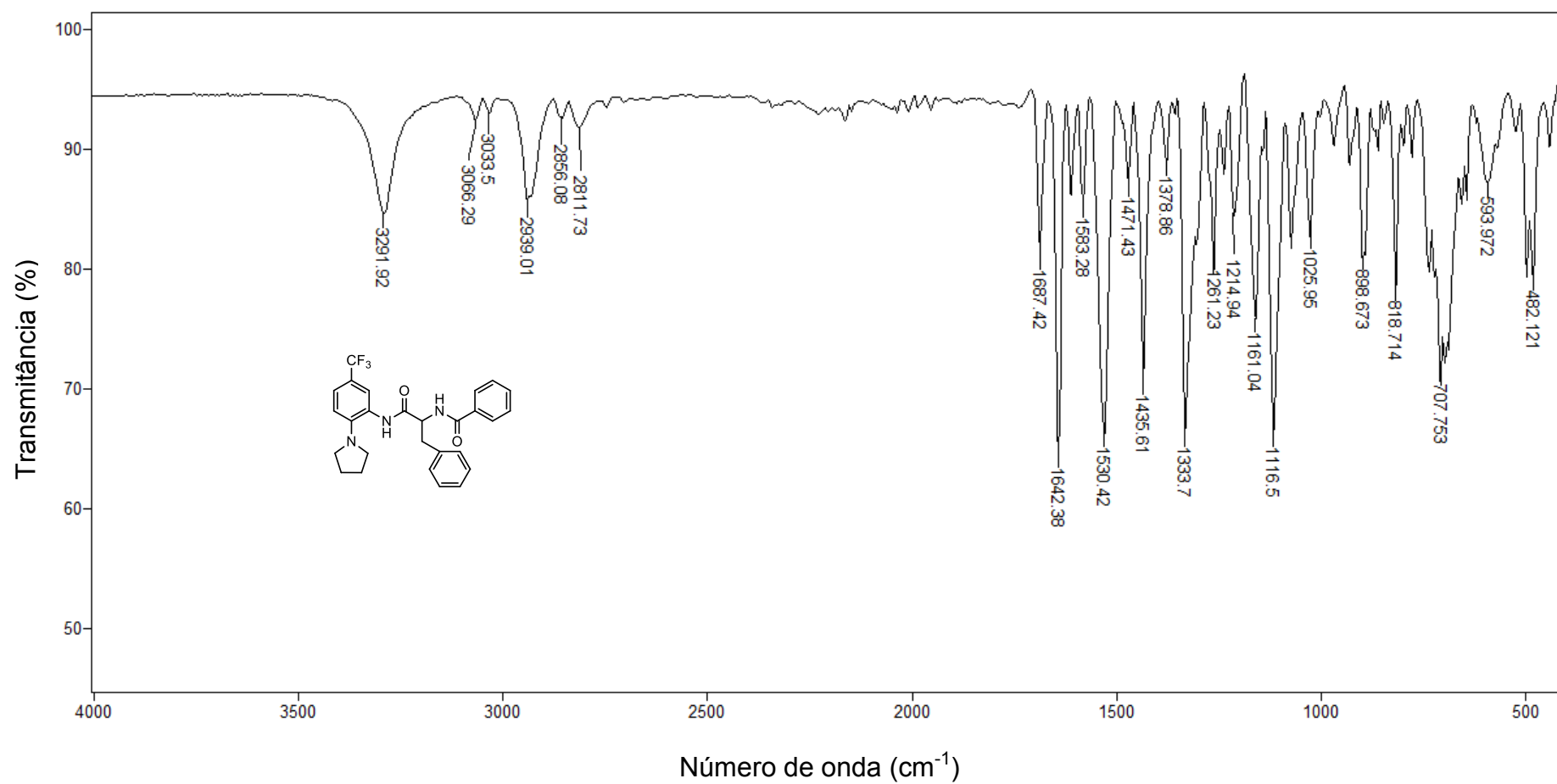


Figura 64 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9c**.

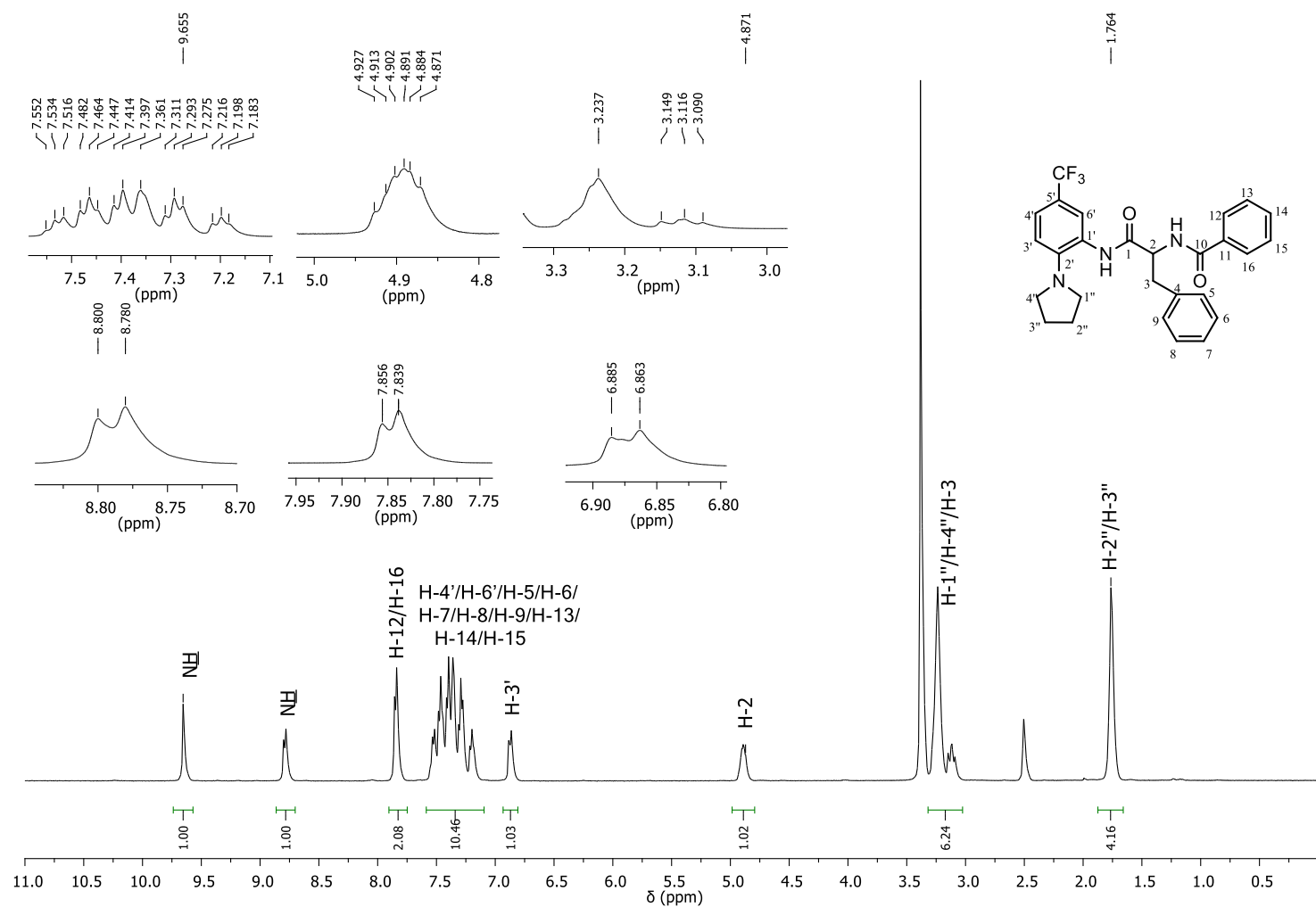


Figura 65 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **9c**.

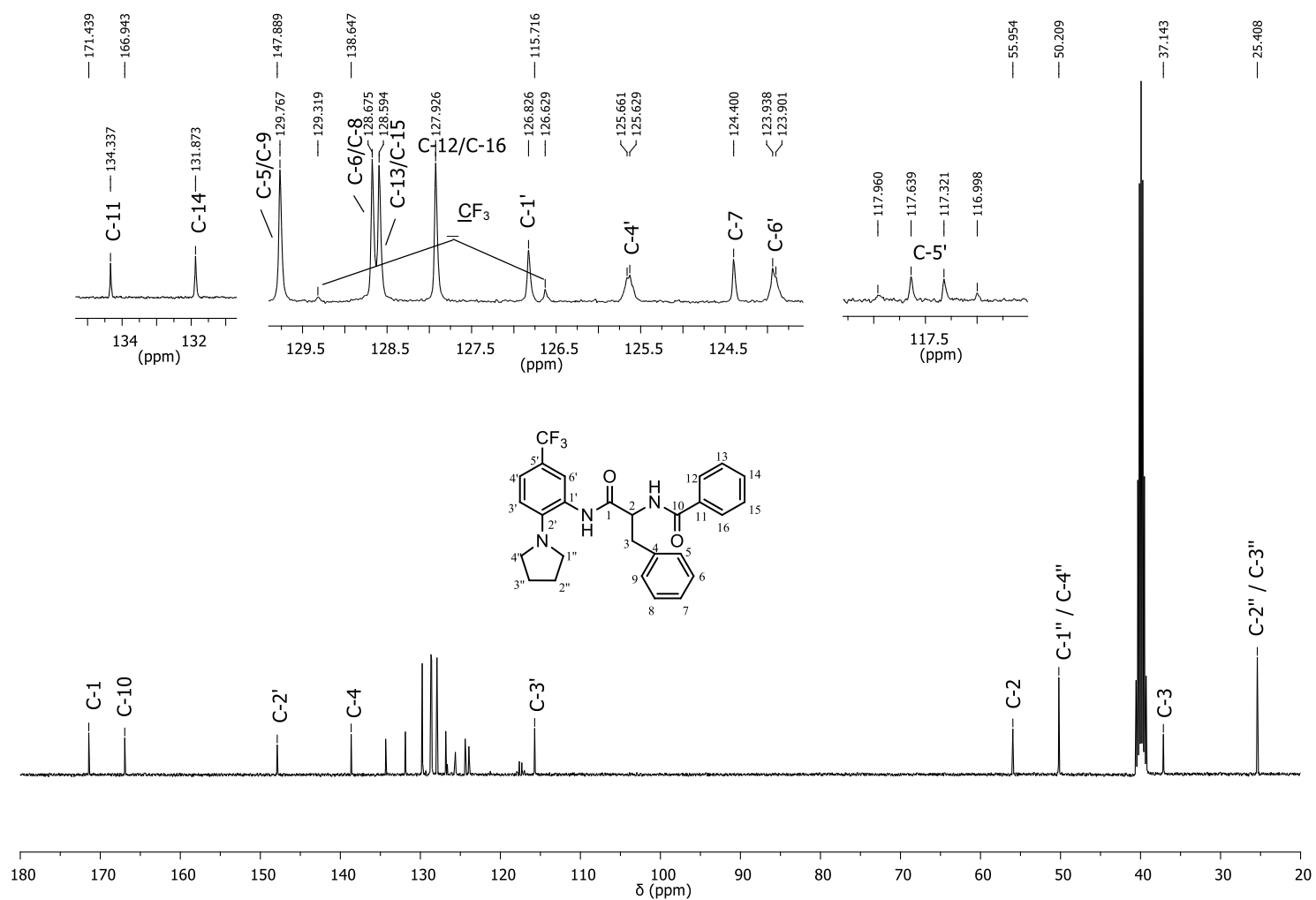


Figura 66 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9c**.

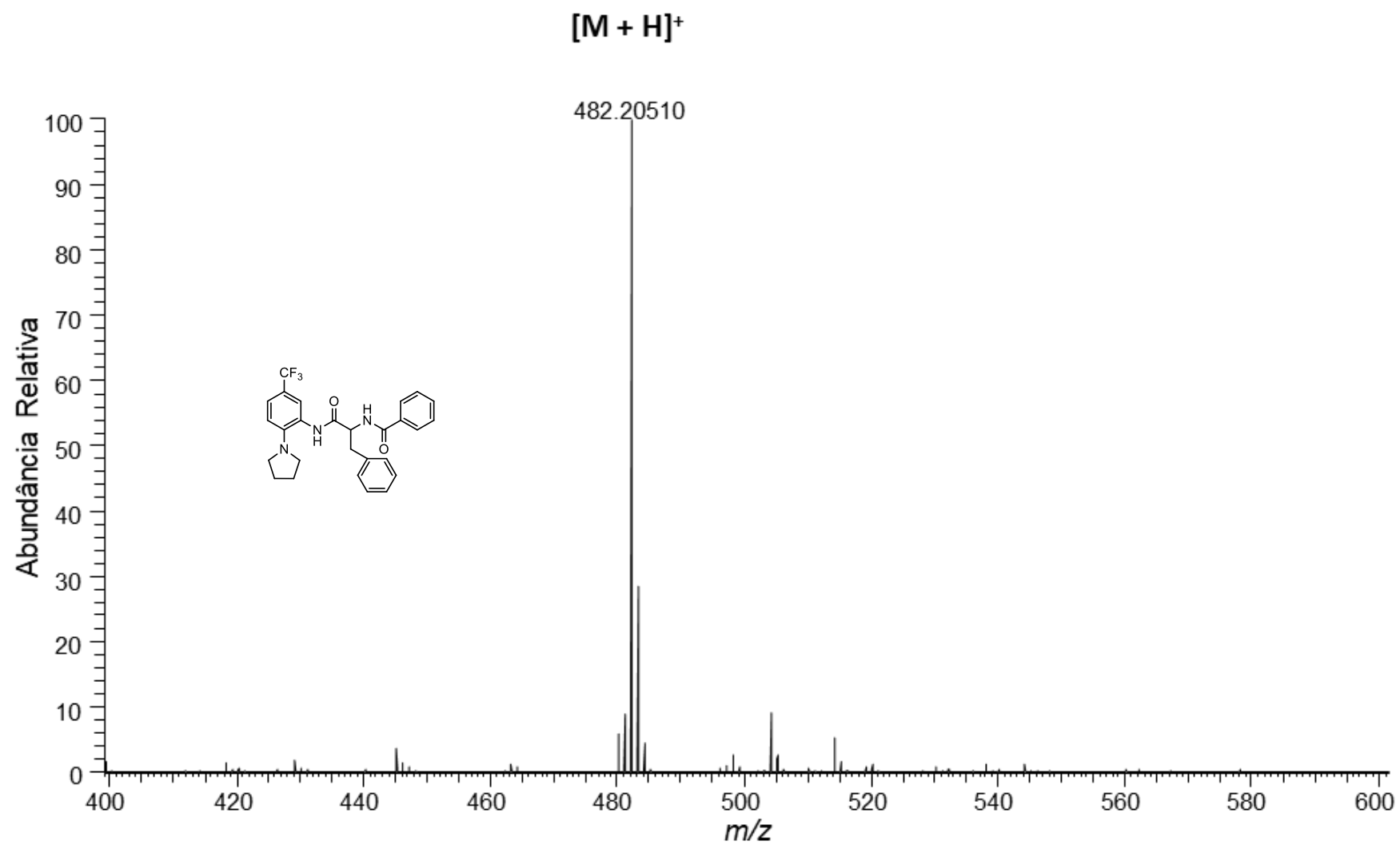


Figura 67 – Espectro de massas de alta resolução do composto **9c**.

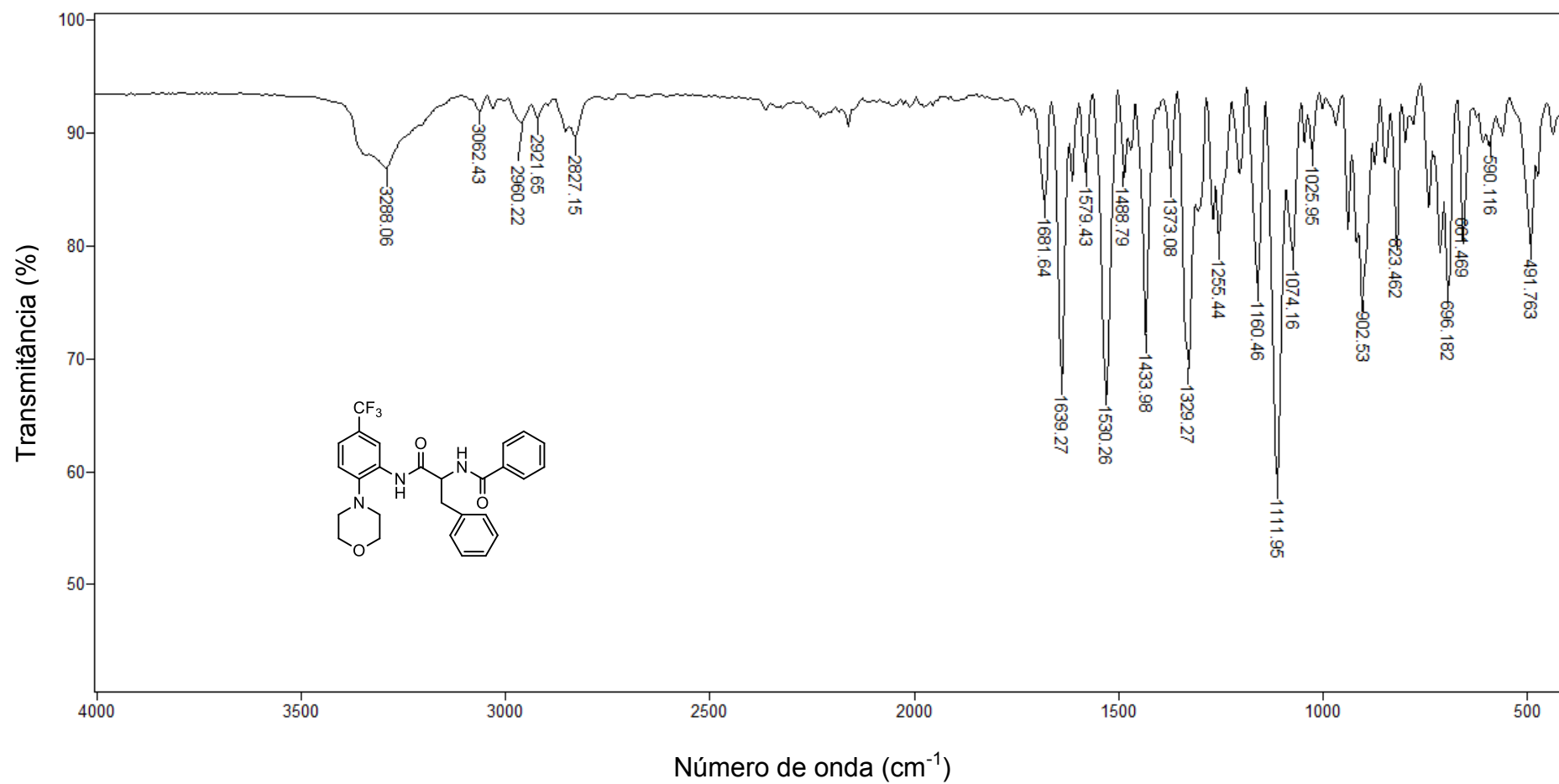


Figura 68 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9d**.

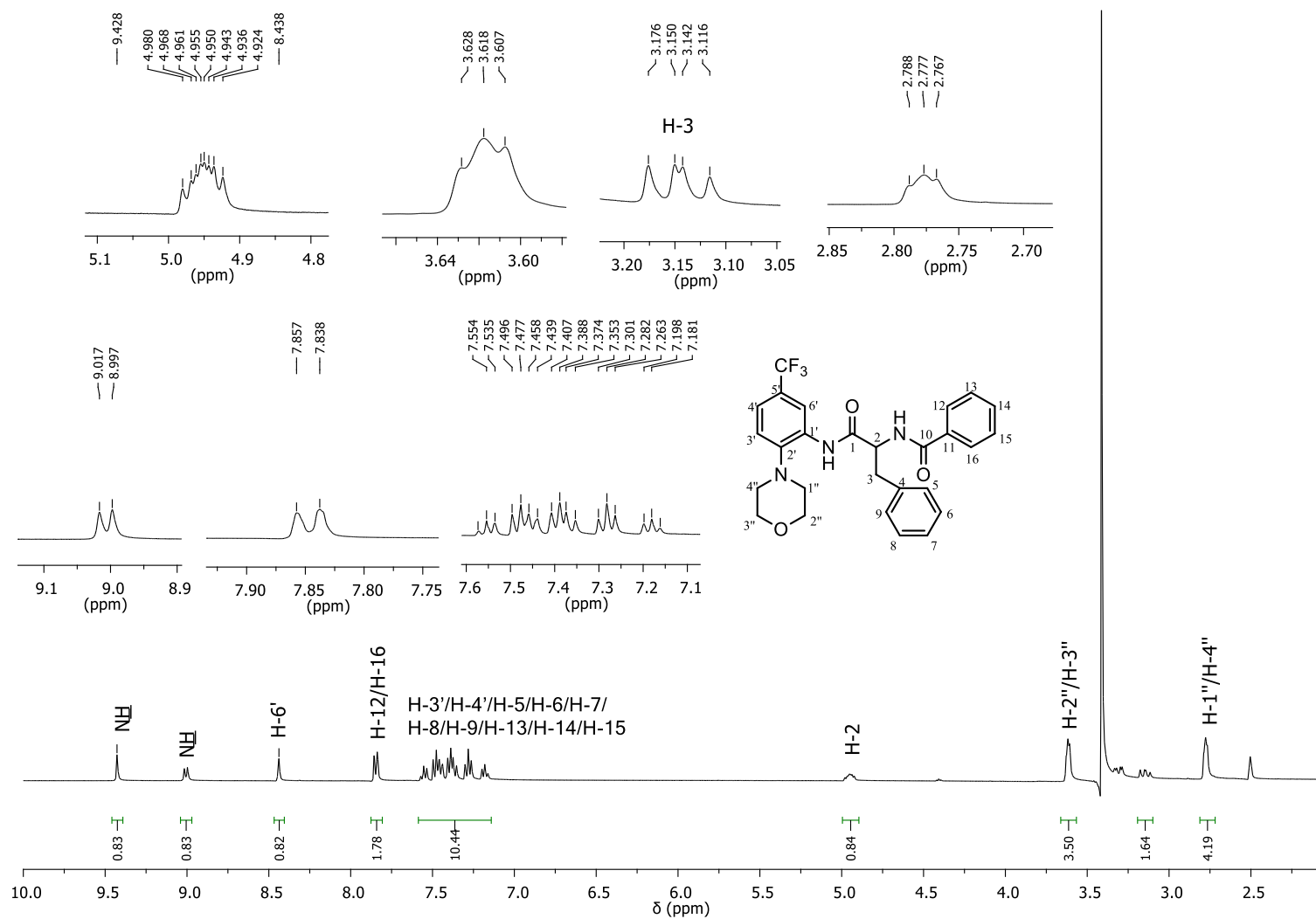


Figura 69 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9d**.

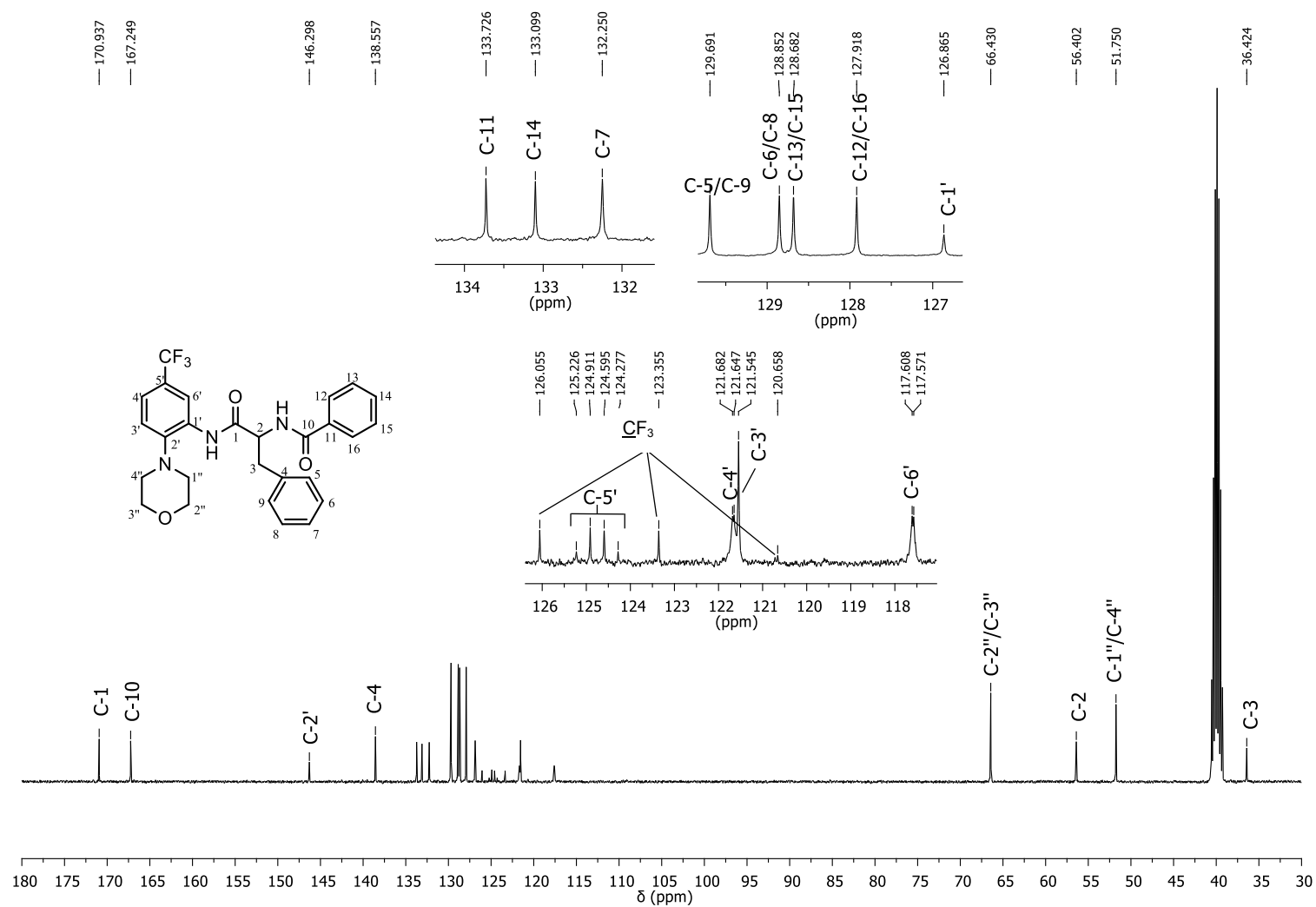


Figura 70 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **9d**.

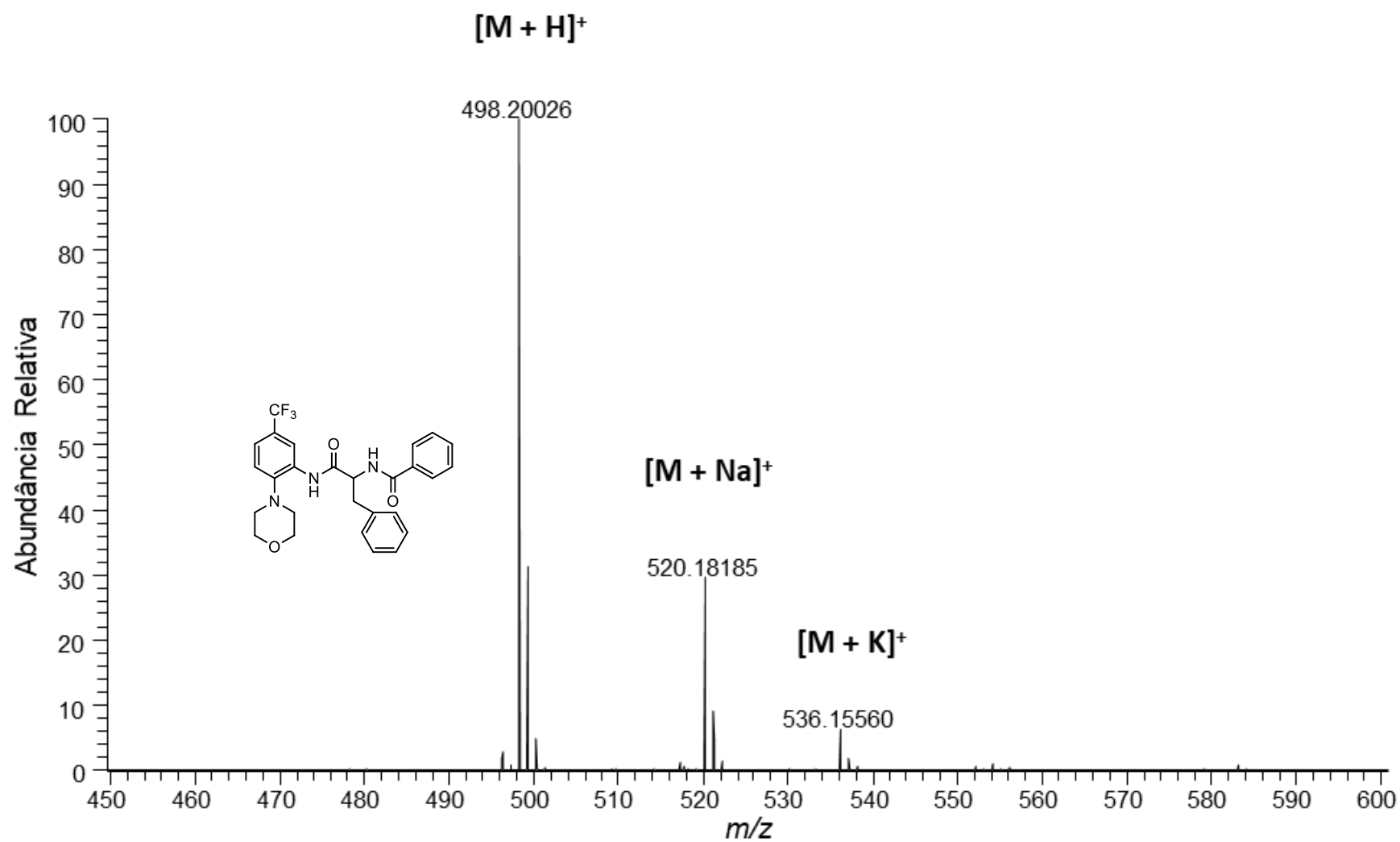


Figura 71 – Espectro de massas de alta resolução do composto **9d**.

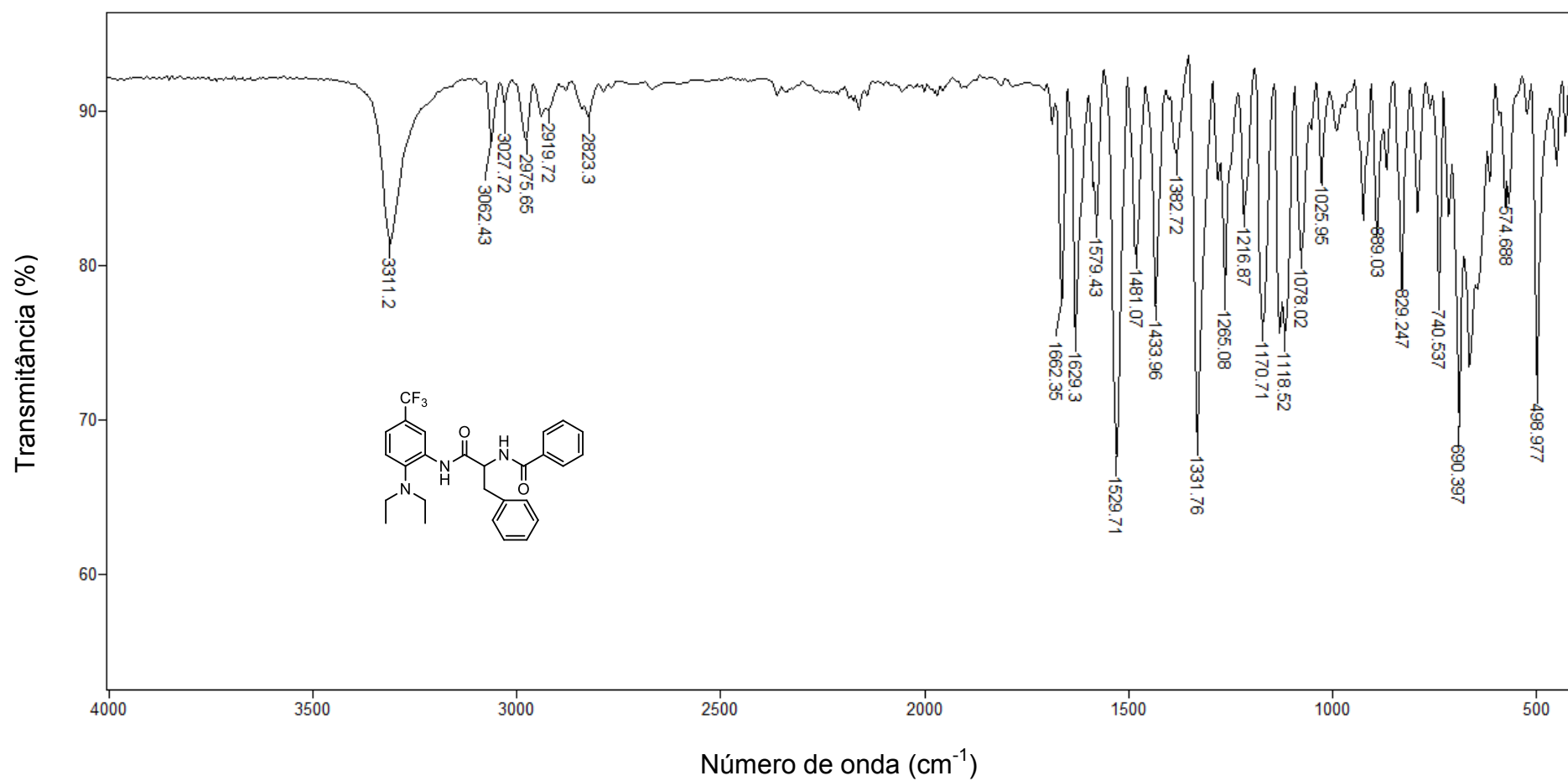


Figura 72 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9e**.

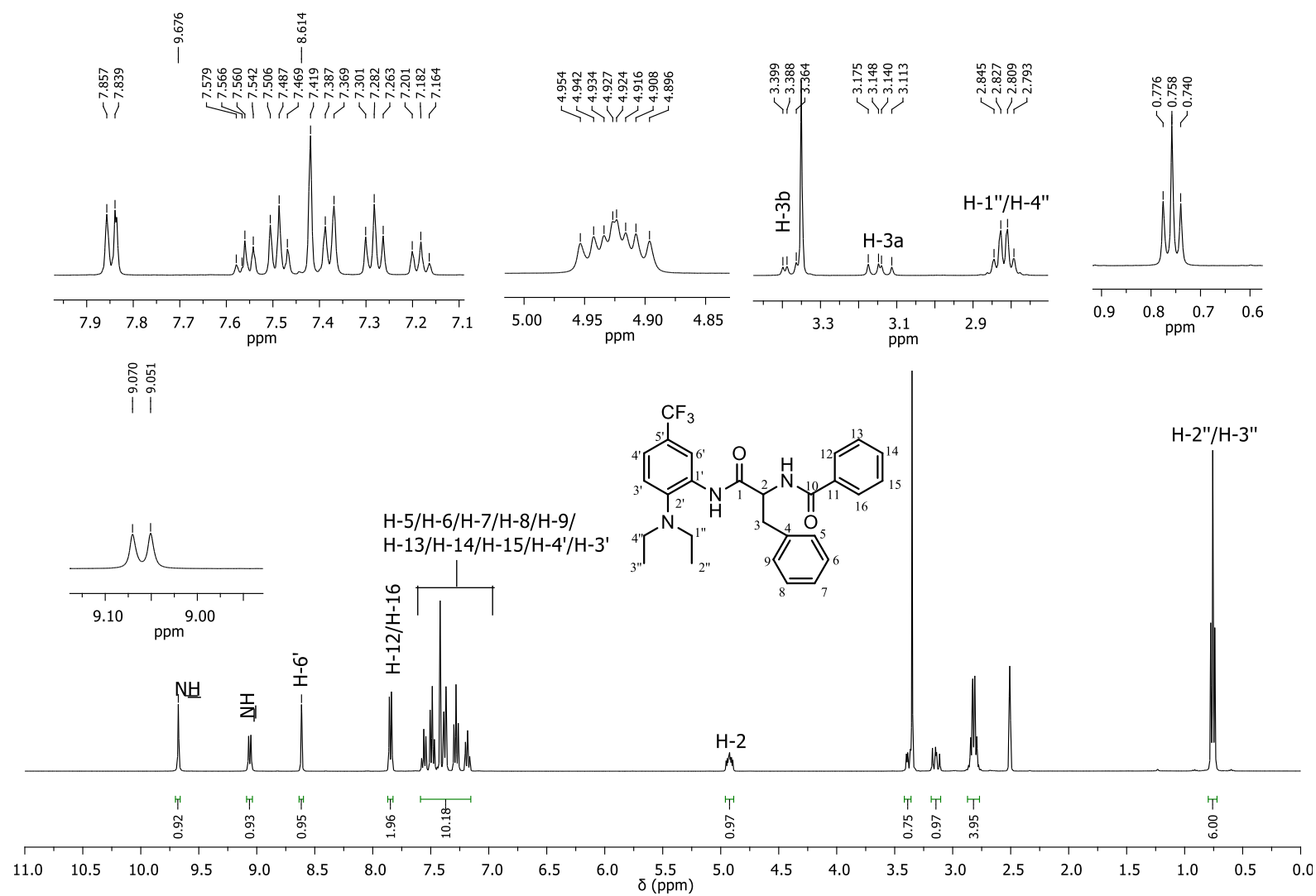


Figura 73 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9e**.

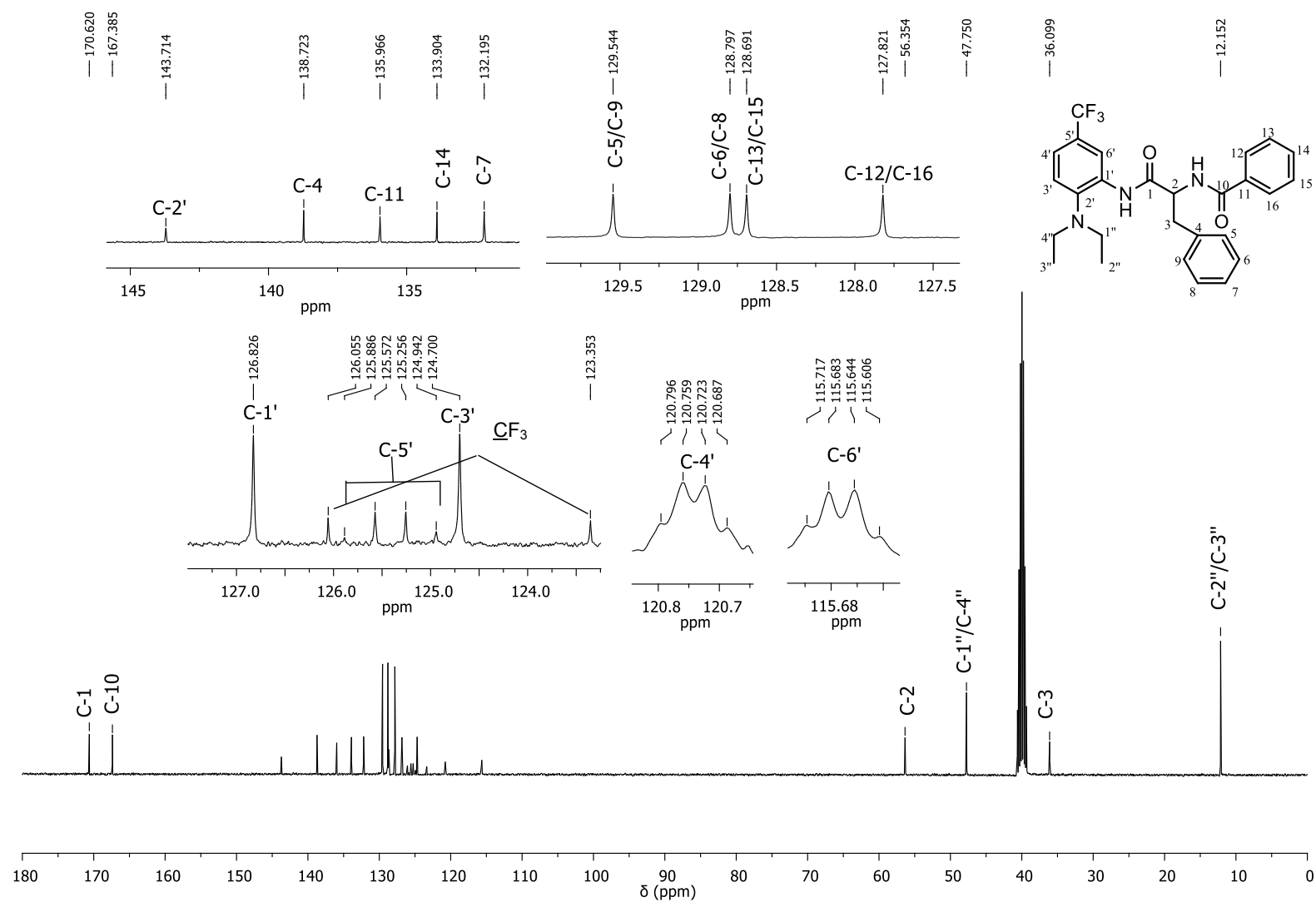


Figura 74 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9e**.

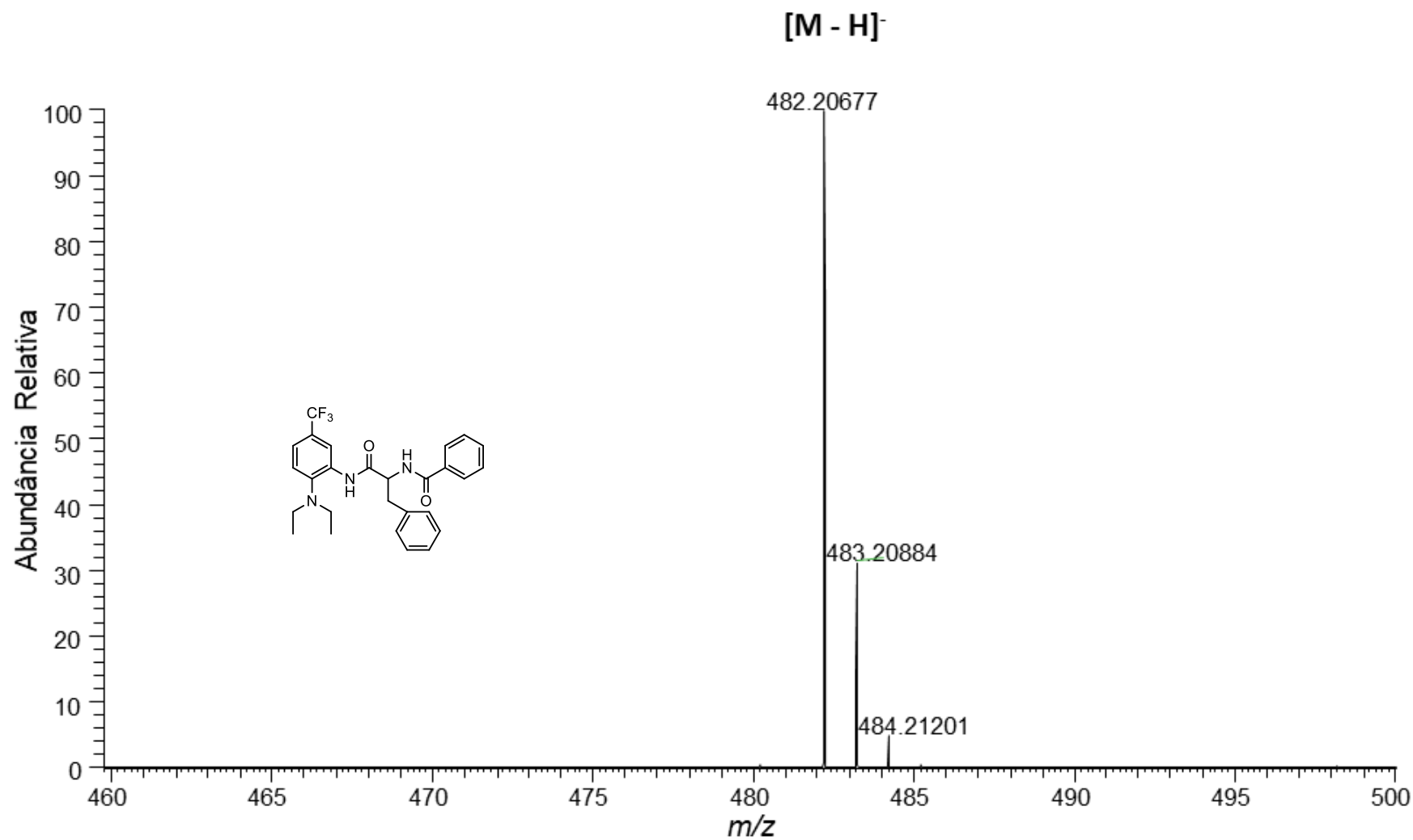


Figura 75 – Espectro de massas de alta resolução do composto **9e**.

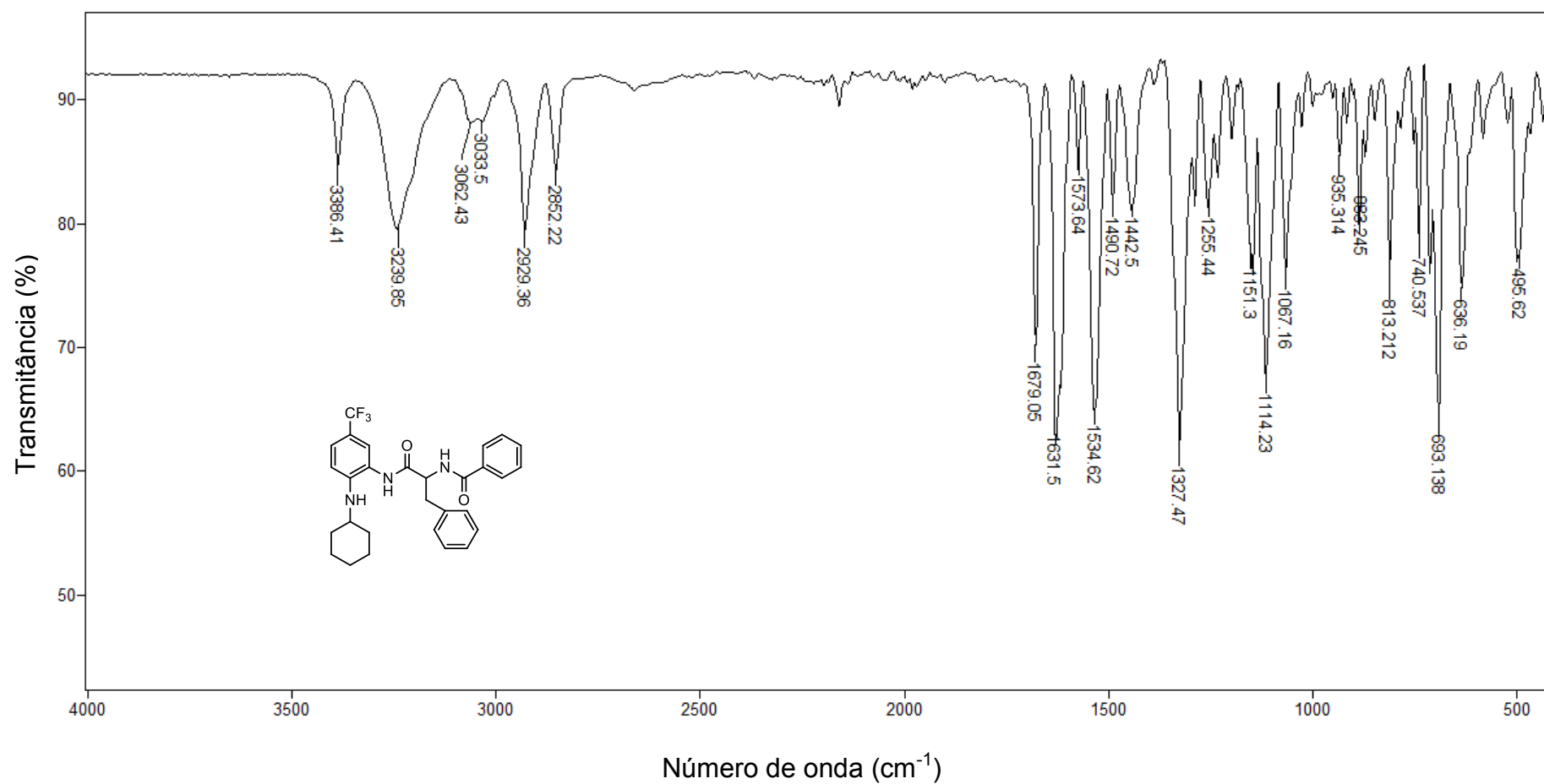


Figura 76 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9f**.

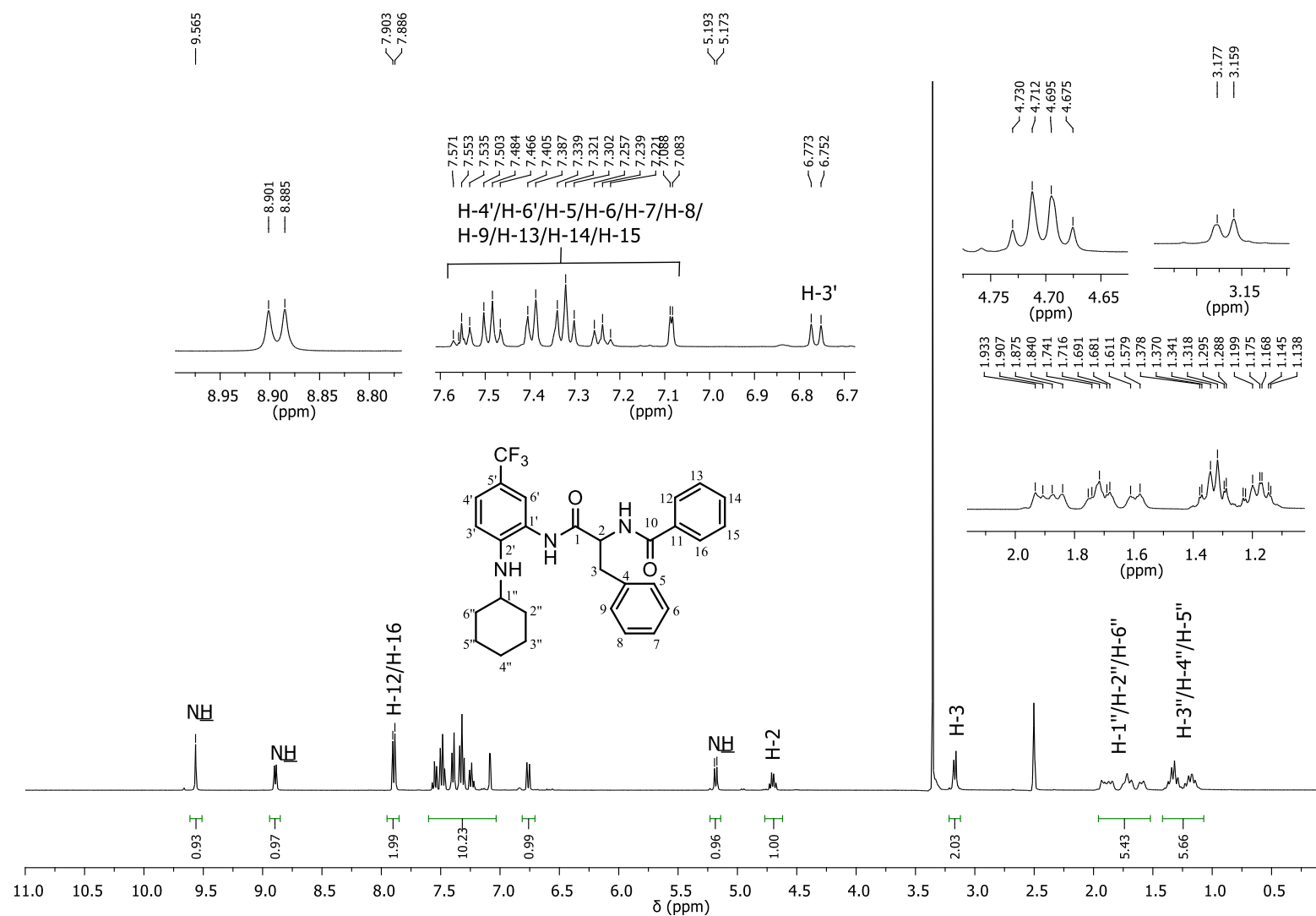


Figura 77 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **9f**.

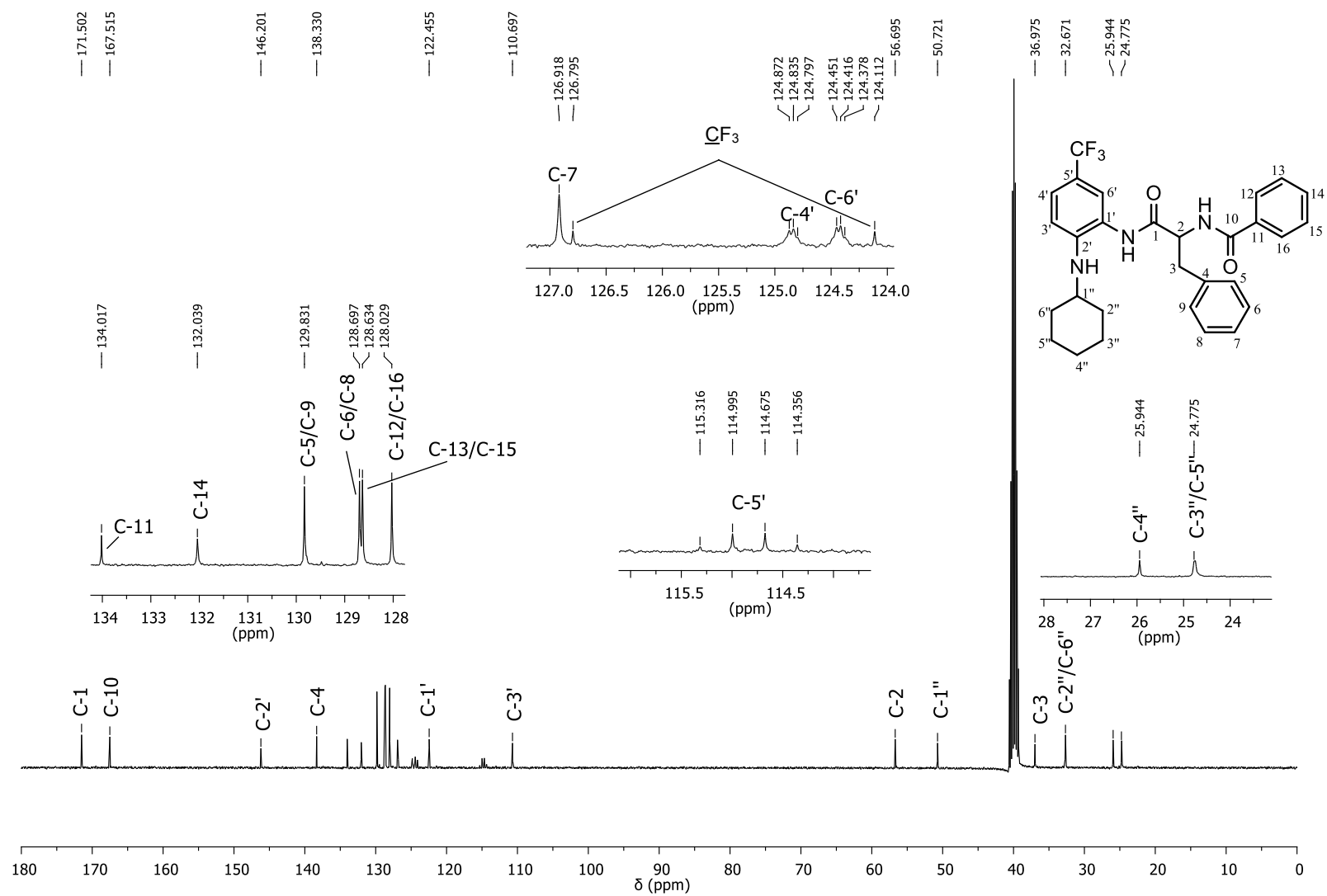


Figura 78 - Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **9f**.

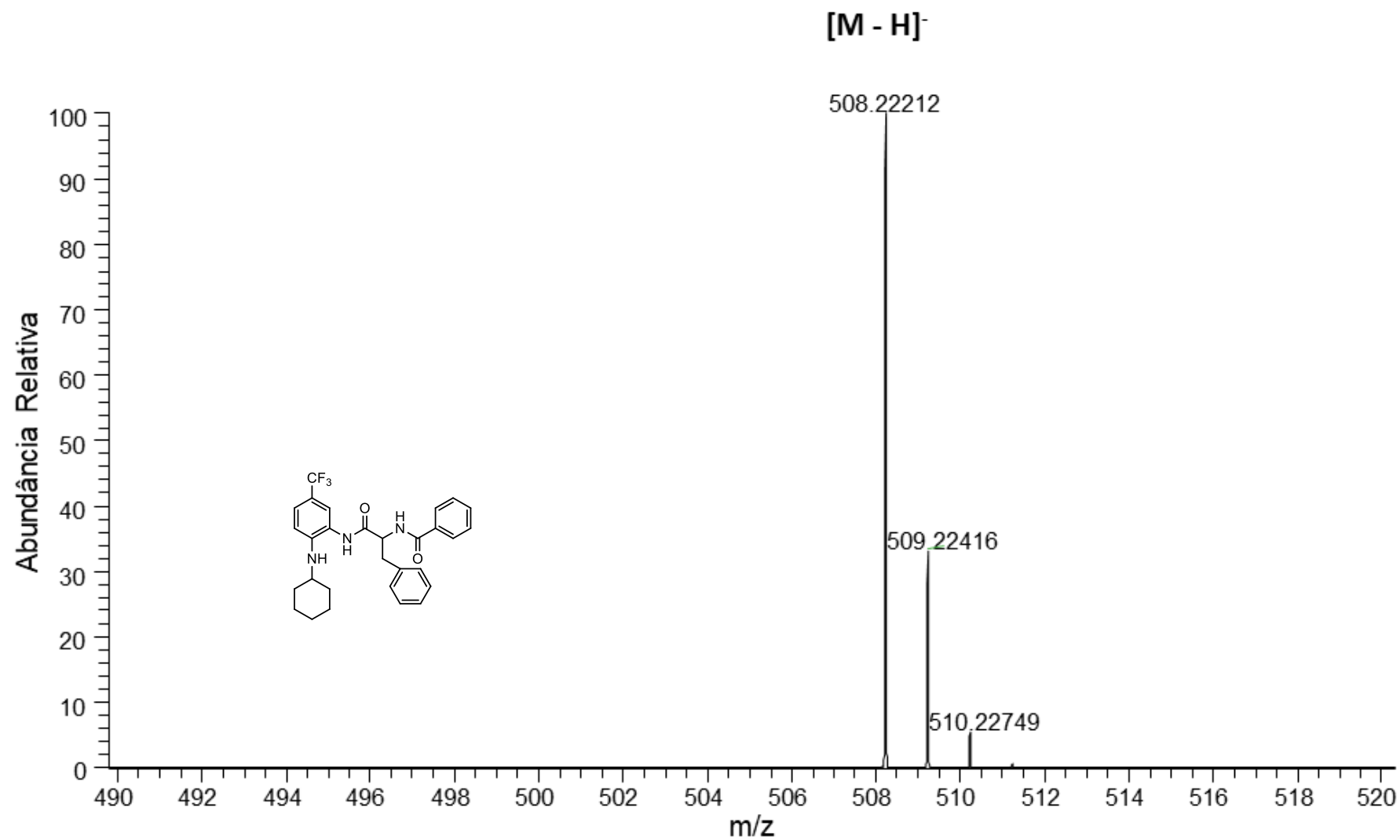


Figura 79 – Espectro de massas de alta resolução do composto **9f**.

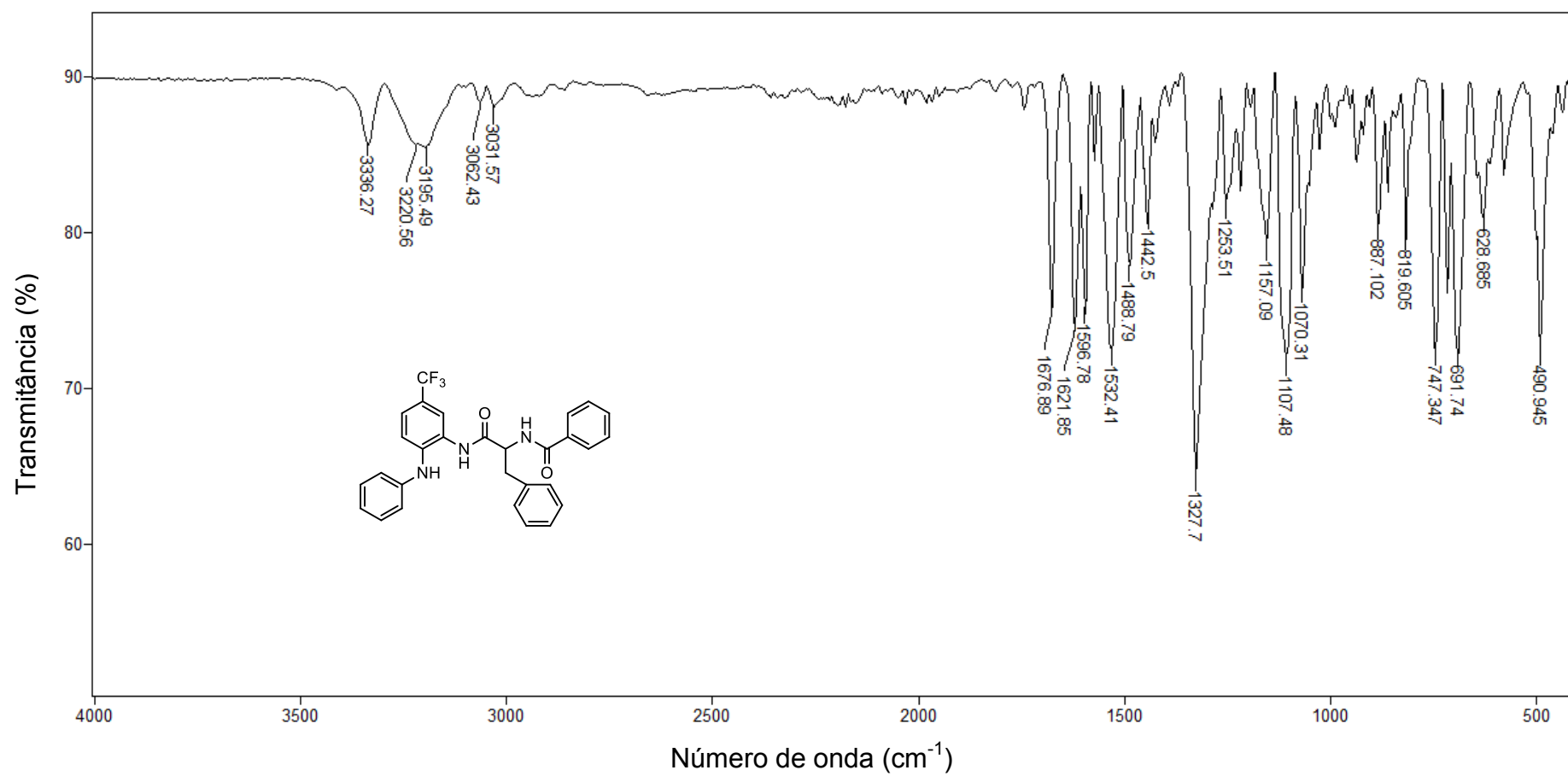


Figura 80 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9g**.

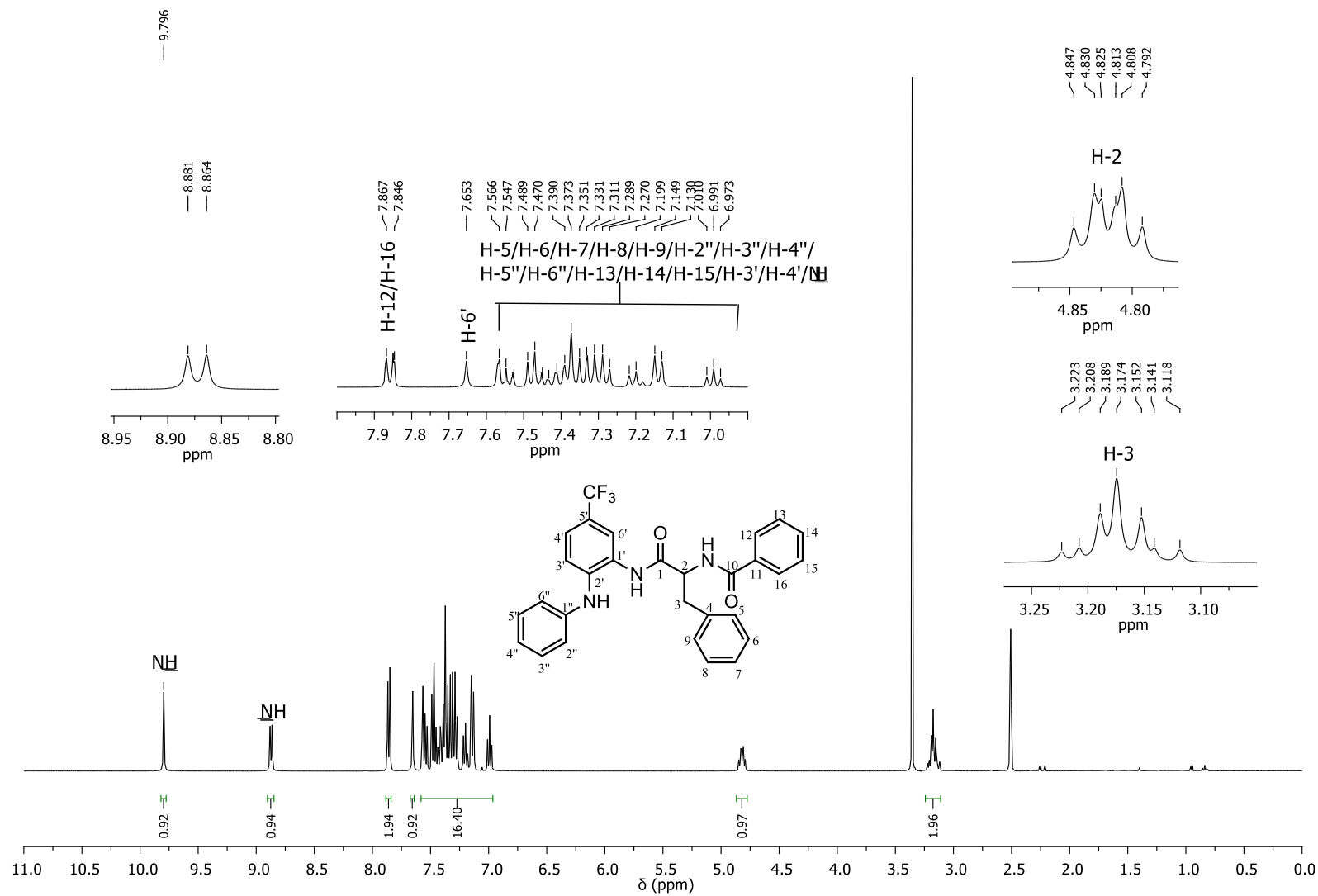


Figura 81 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9g**.

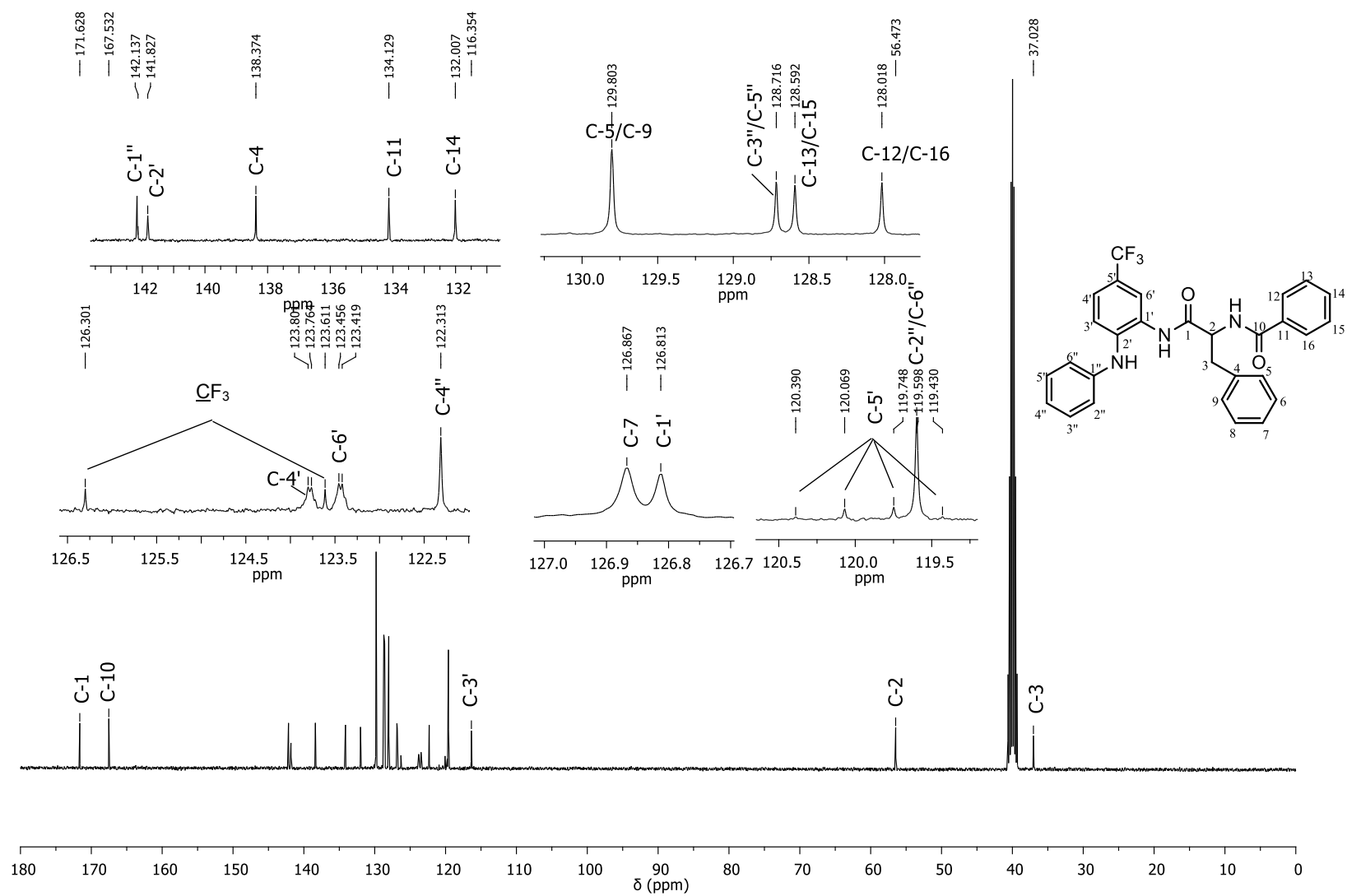


Figura 82 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9g**.

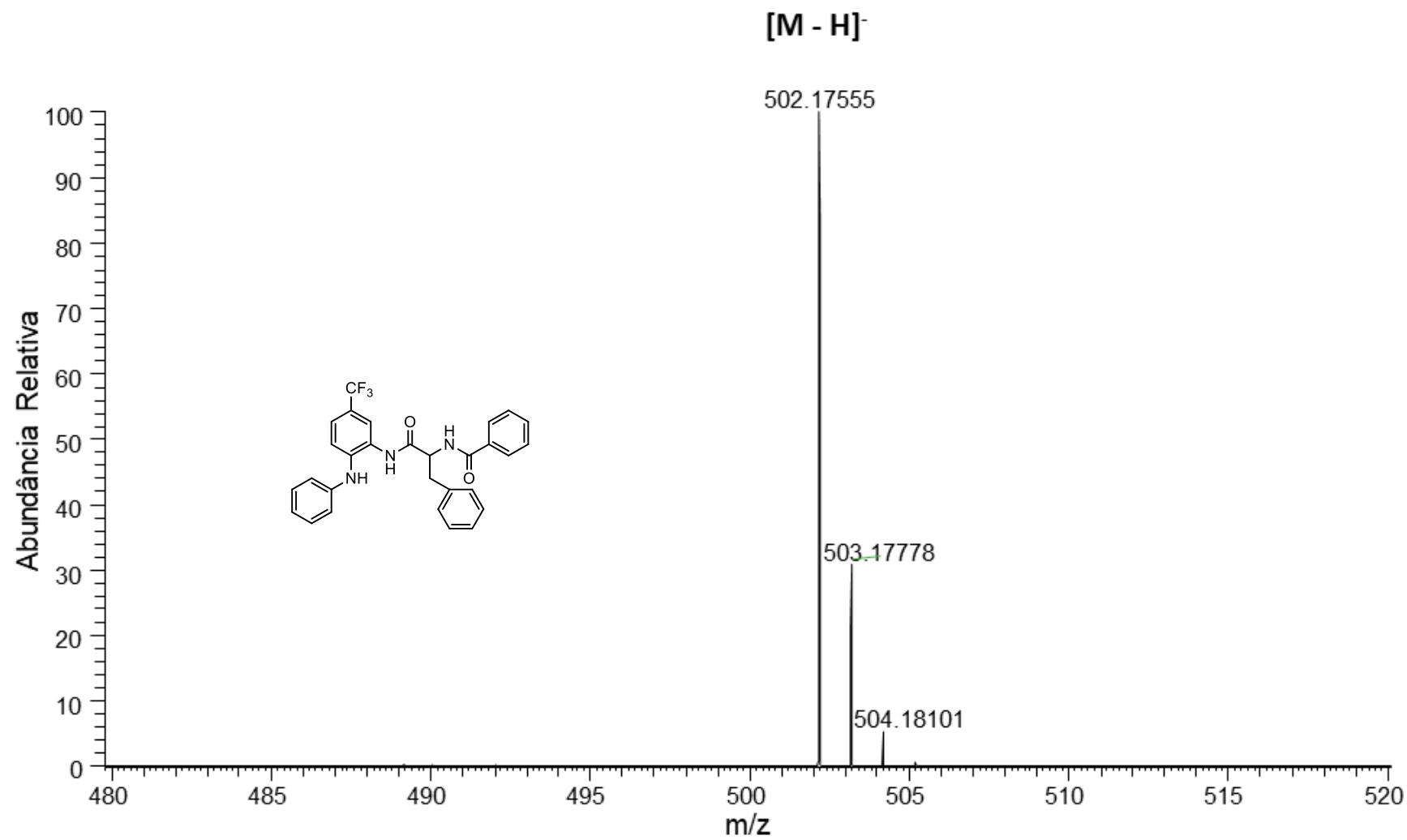


Figura 83 – Espectro de massas de alta resolução do composto **9g**.

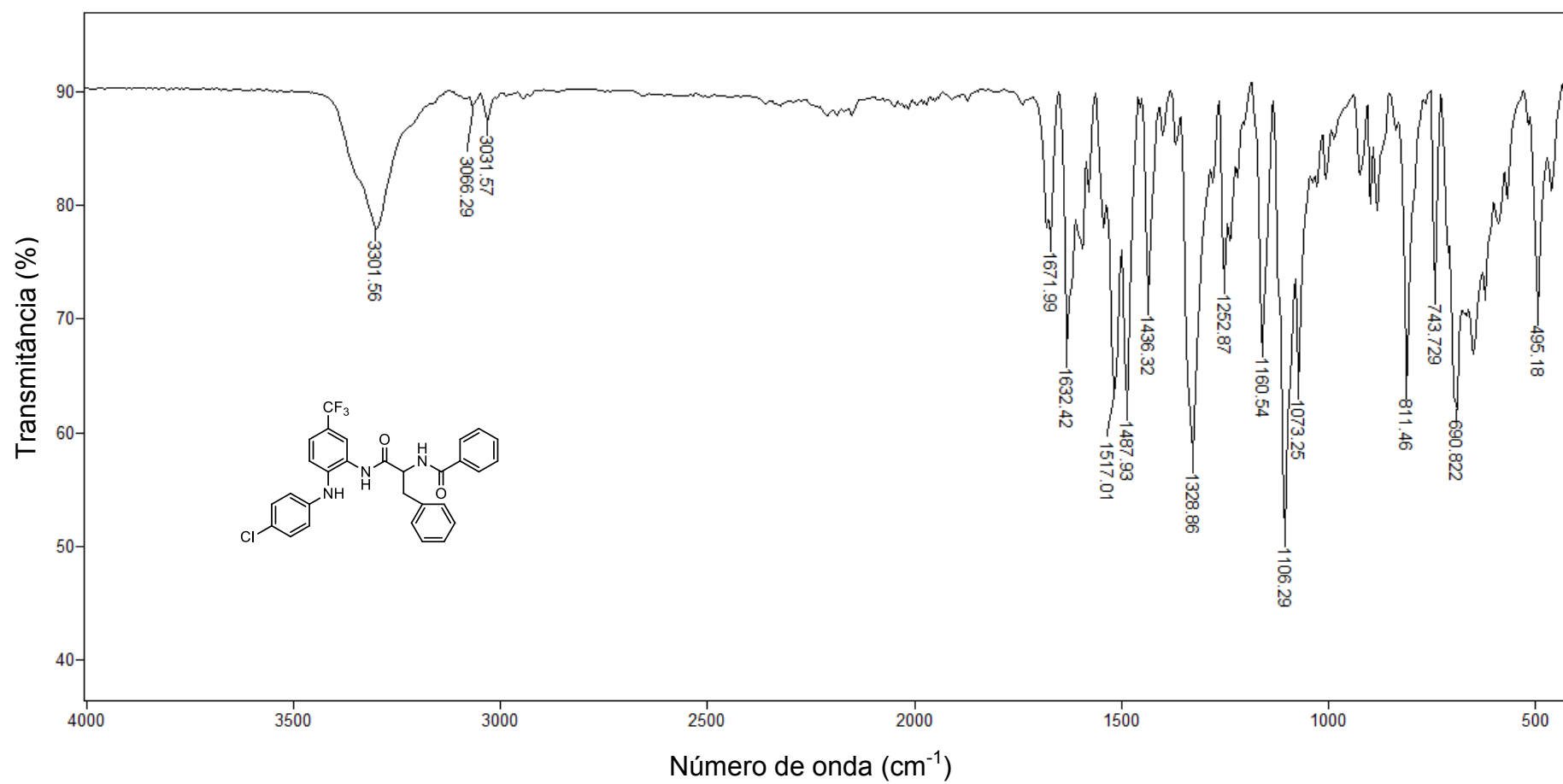


Figura 84 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9i**.

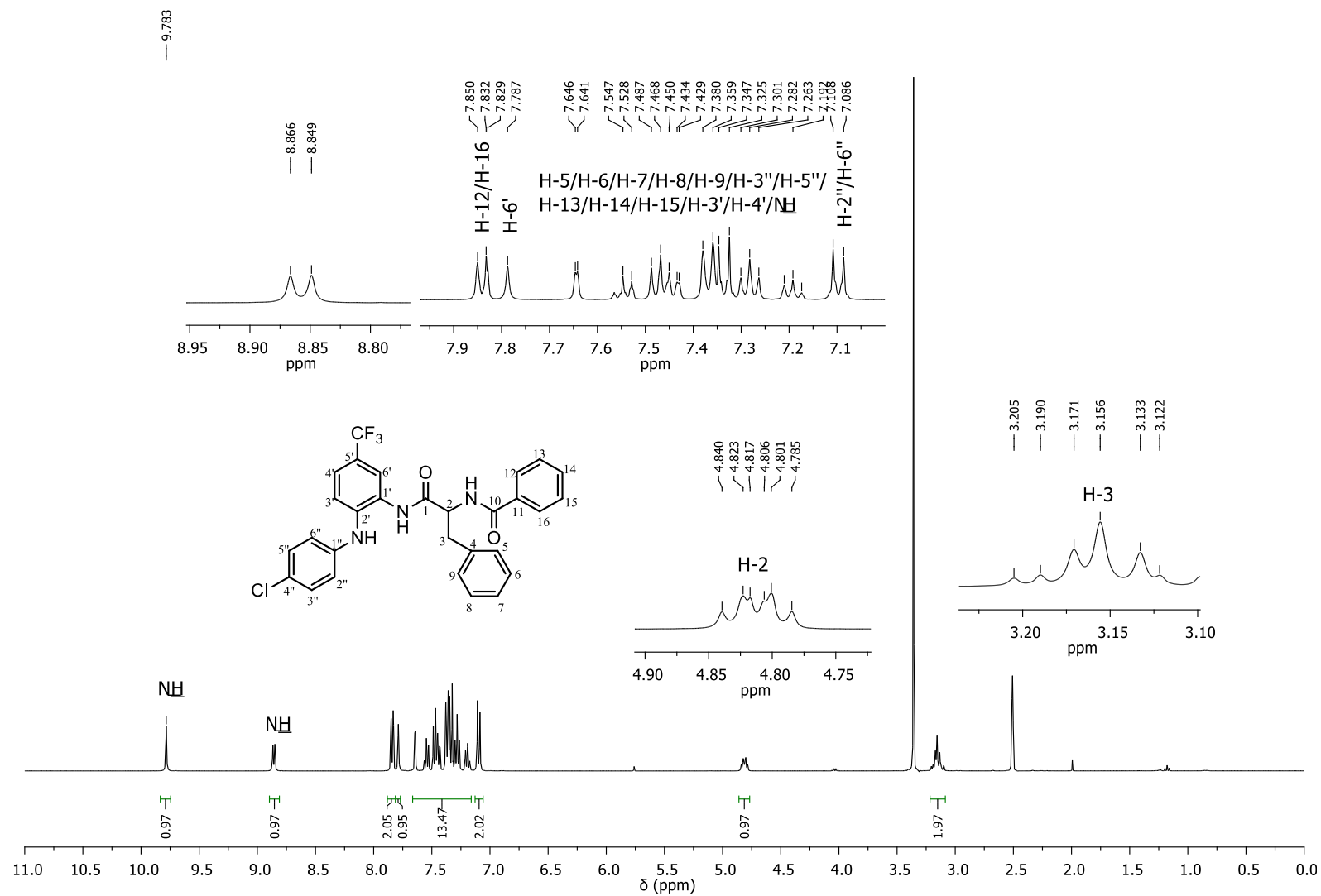


Figura 85 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9i**.

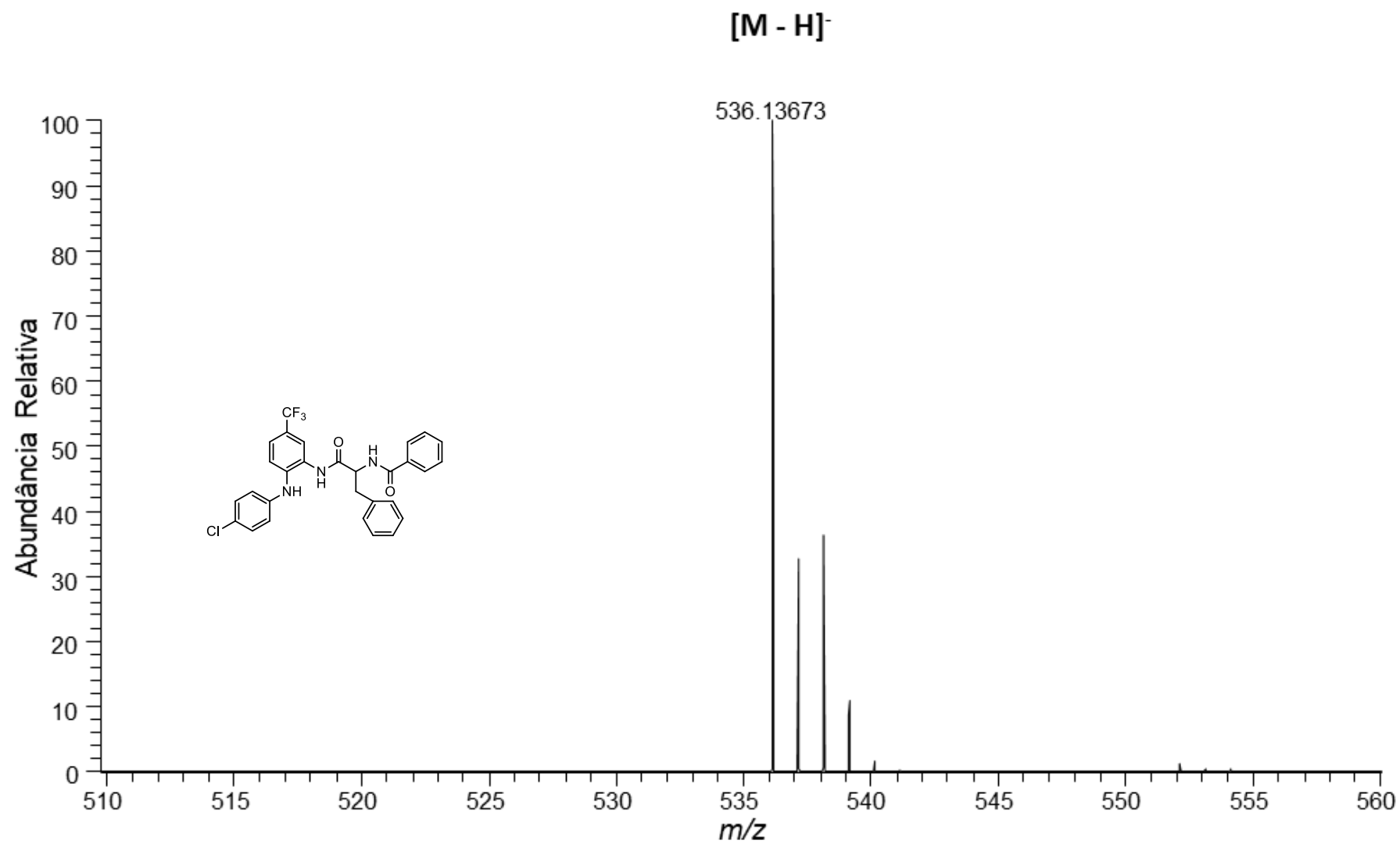


Figura 87 – Espectro de massas de alta resolução do composto **9i**.

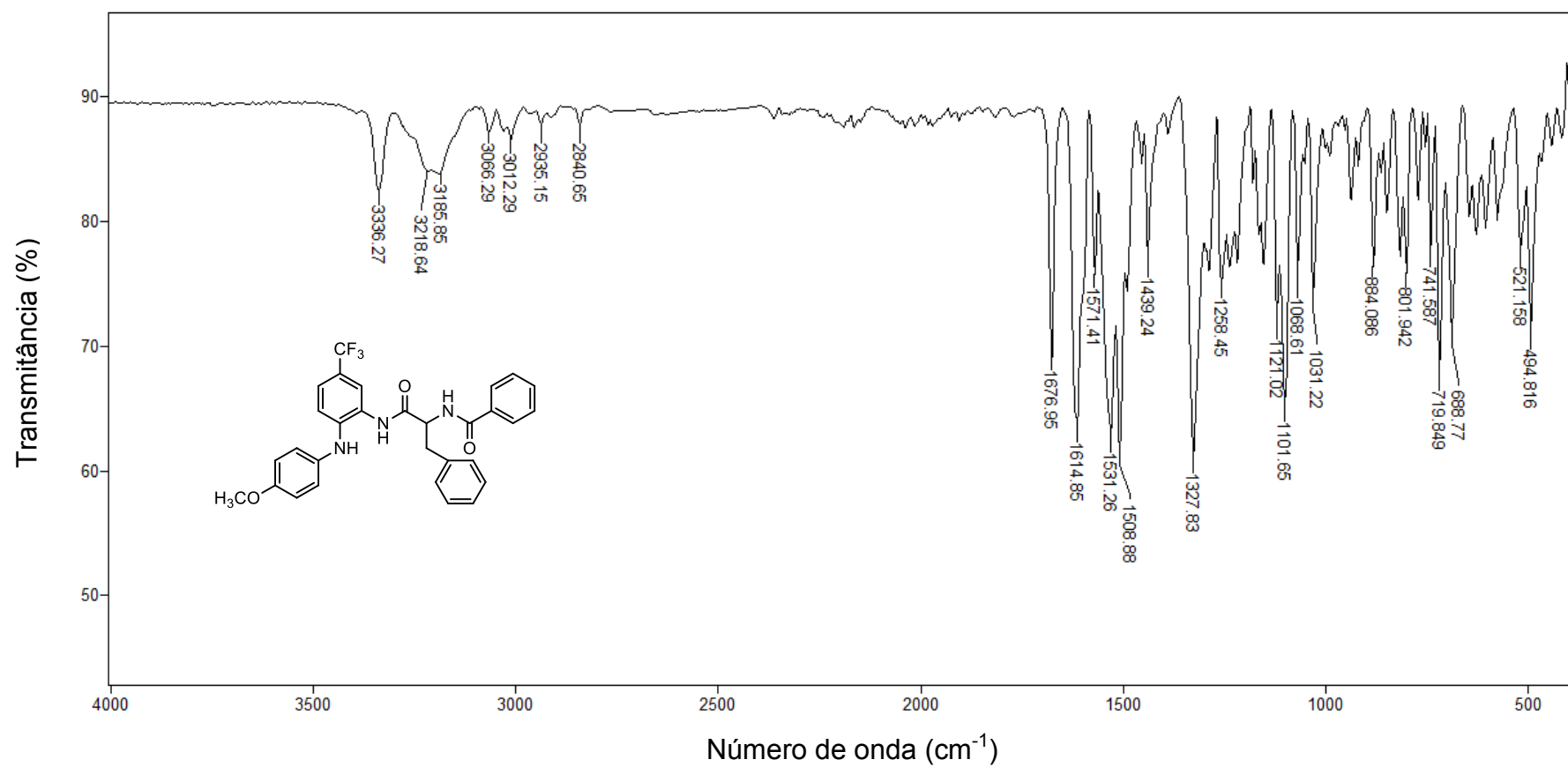


Figura 88 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9j**.

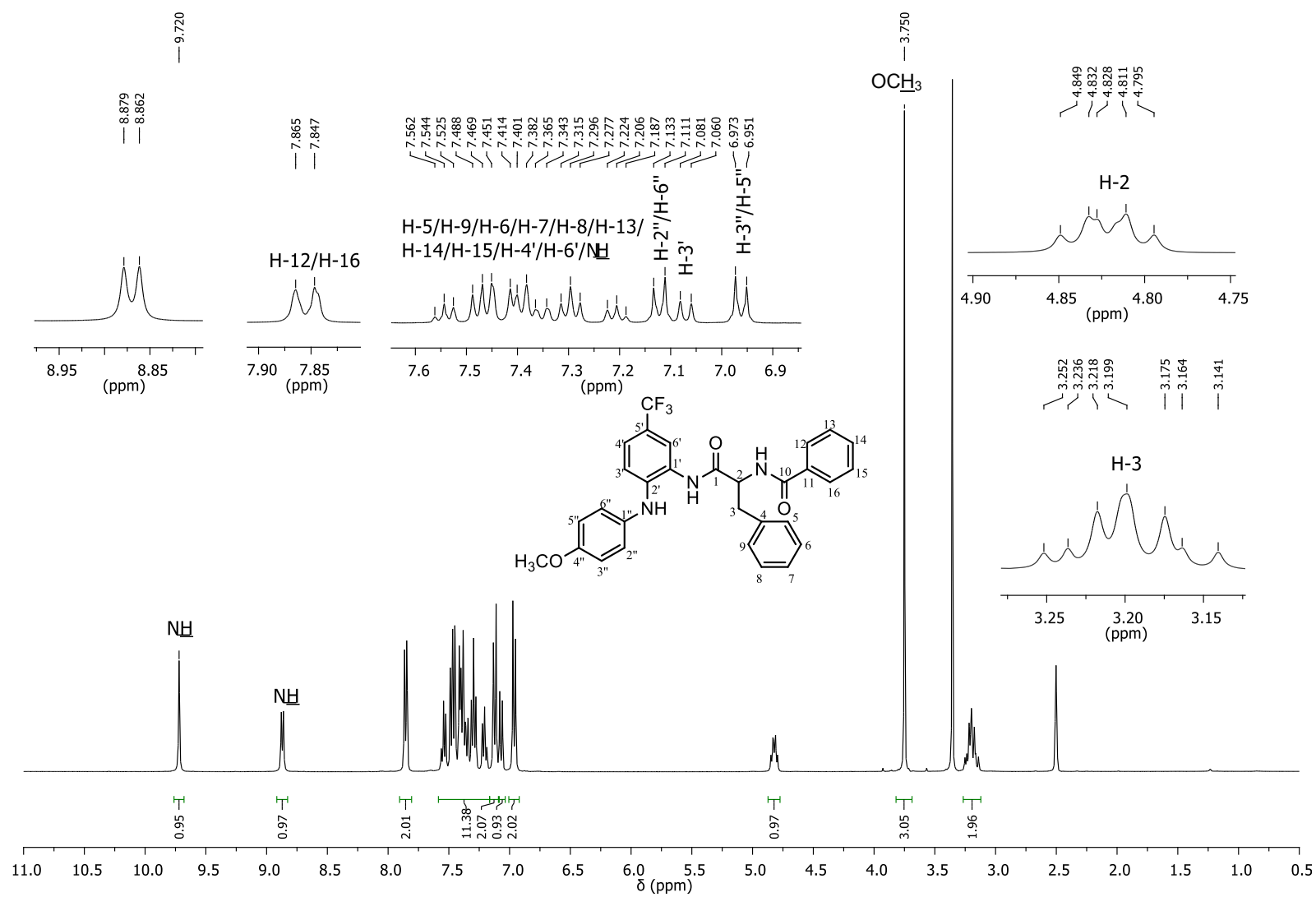


Figura 89 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **9j**.

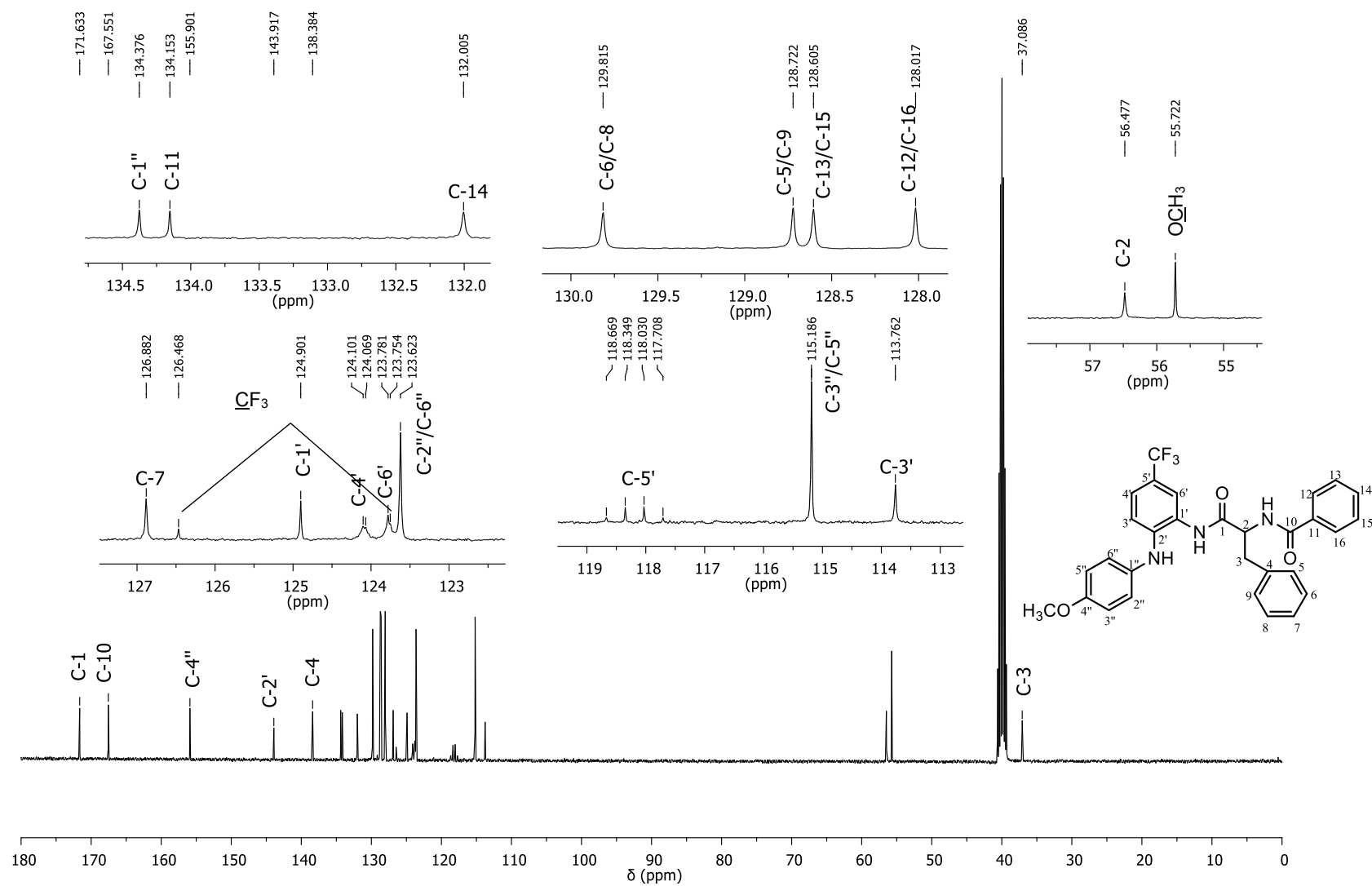


Figura 90 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9j**.

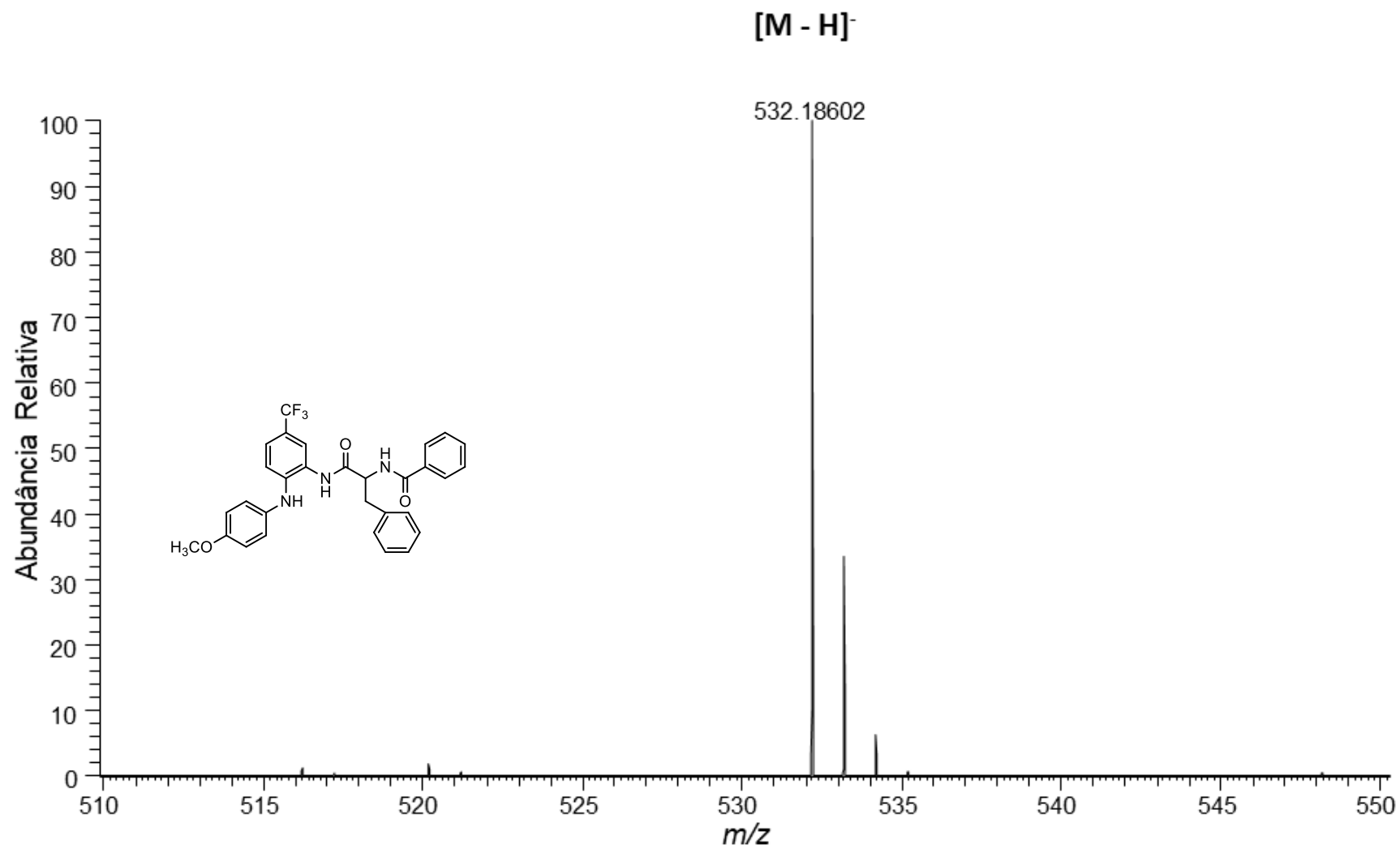


Figura 91 – Espectro de massas de alta resolução do composto **9j**.

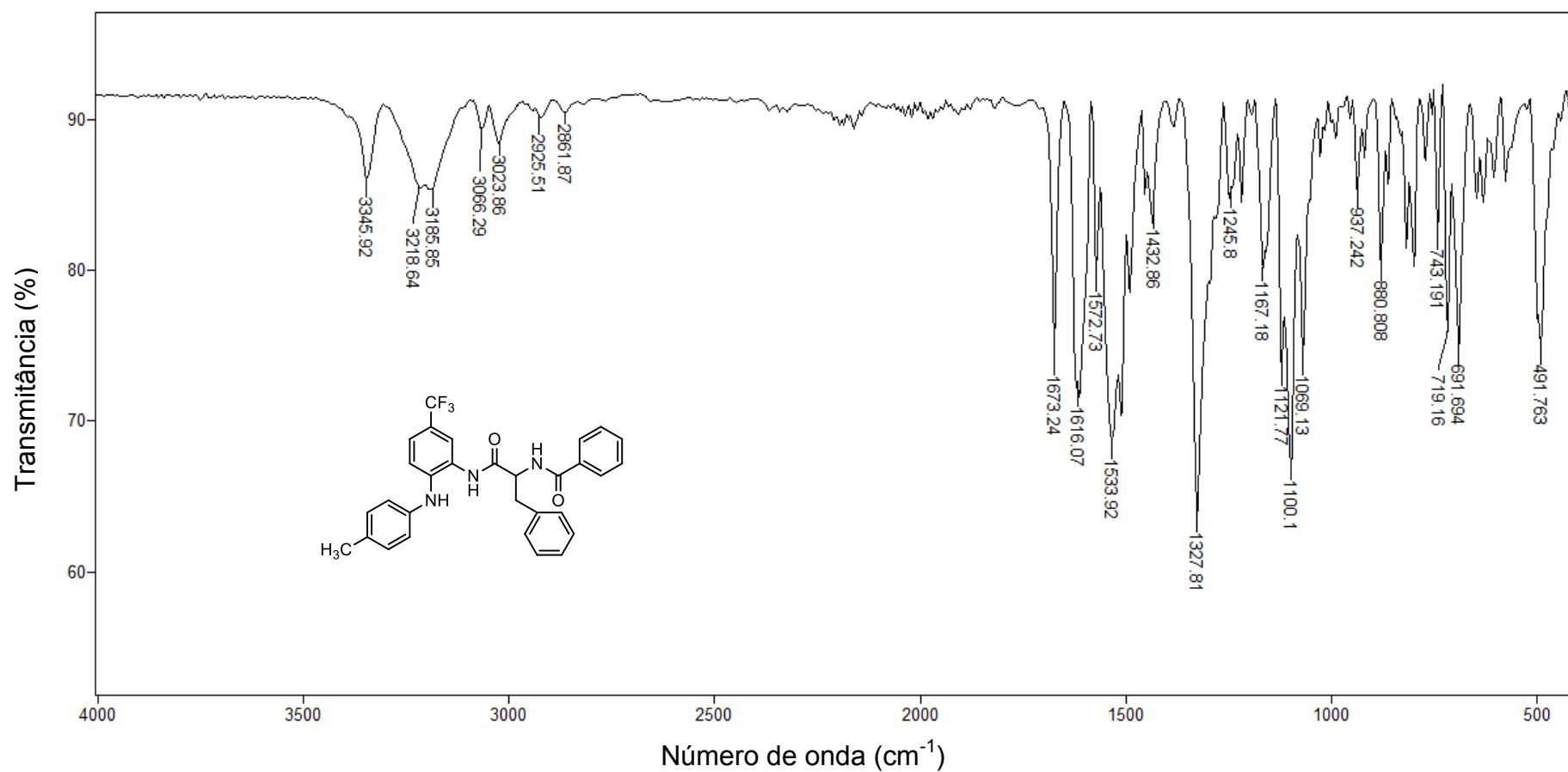


Figura 92 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9k**.

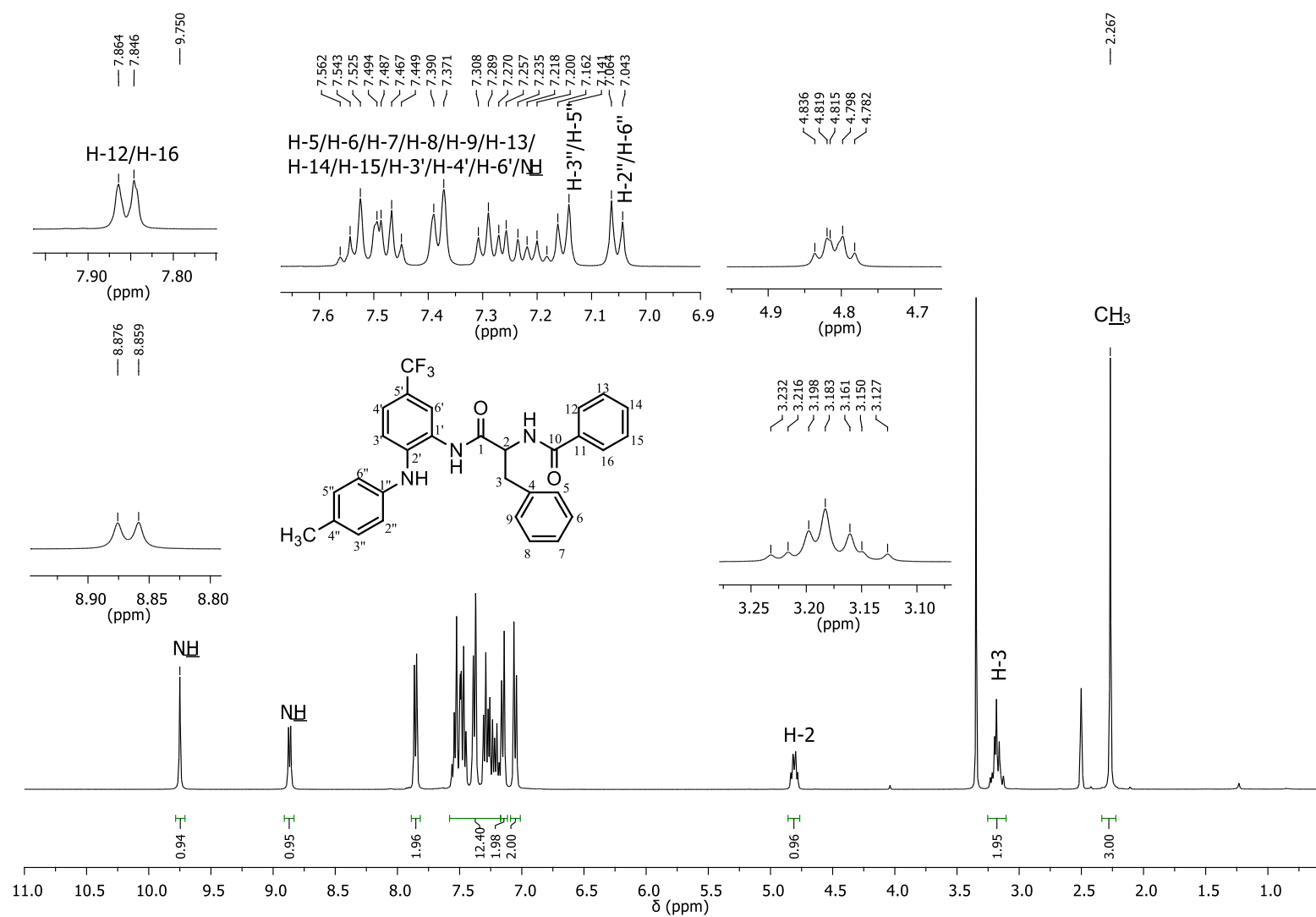


Figura 93 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **9k**.

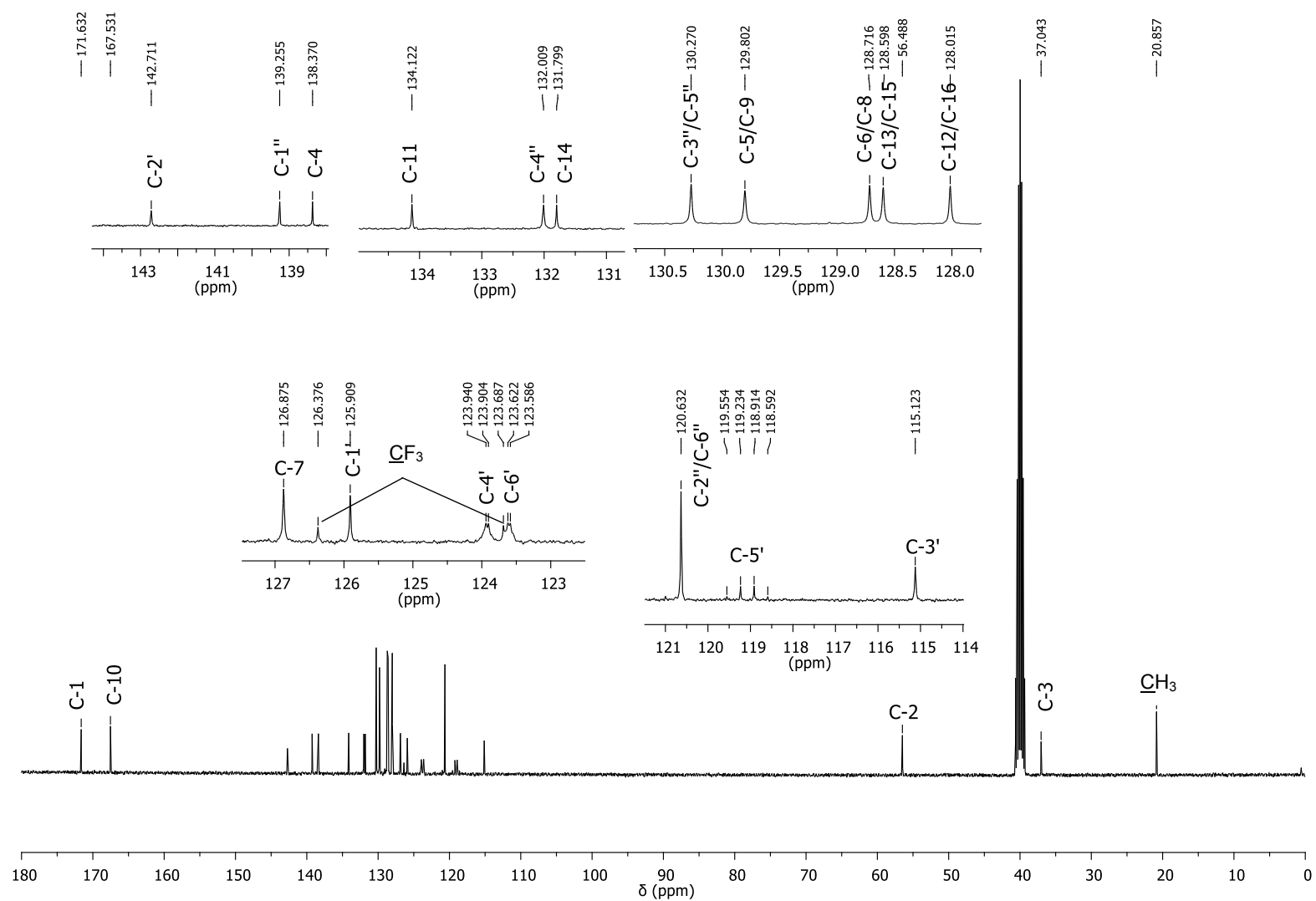


Figura 94 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **9k**.

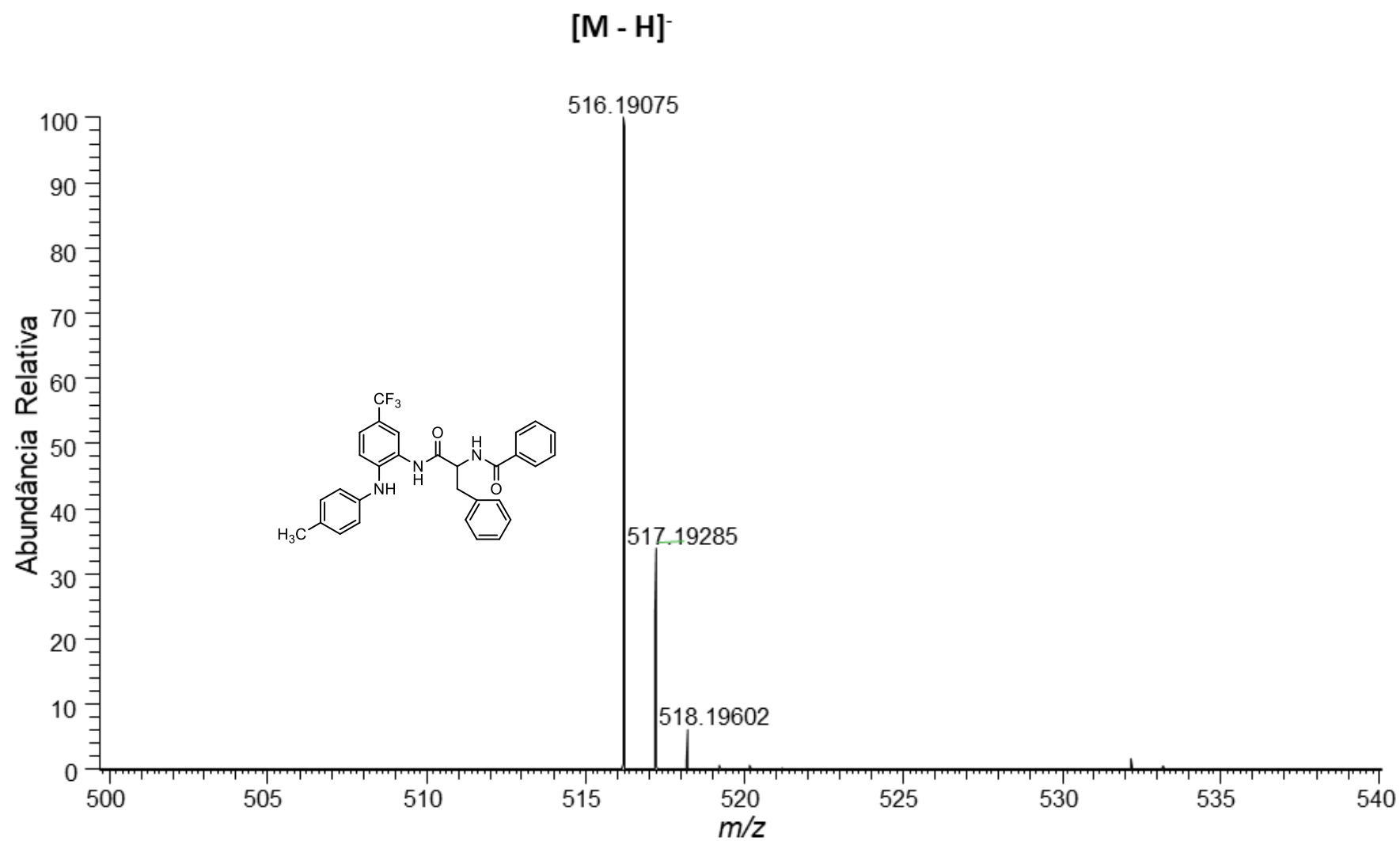


Figura 95 – Espectro de massas de alta resolução do composto **9k**.

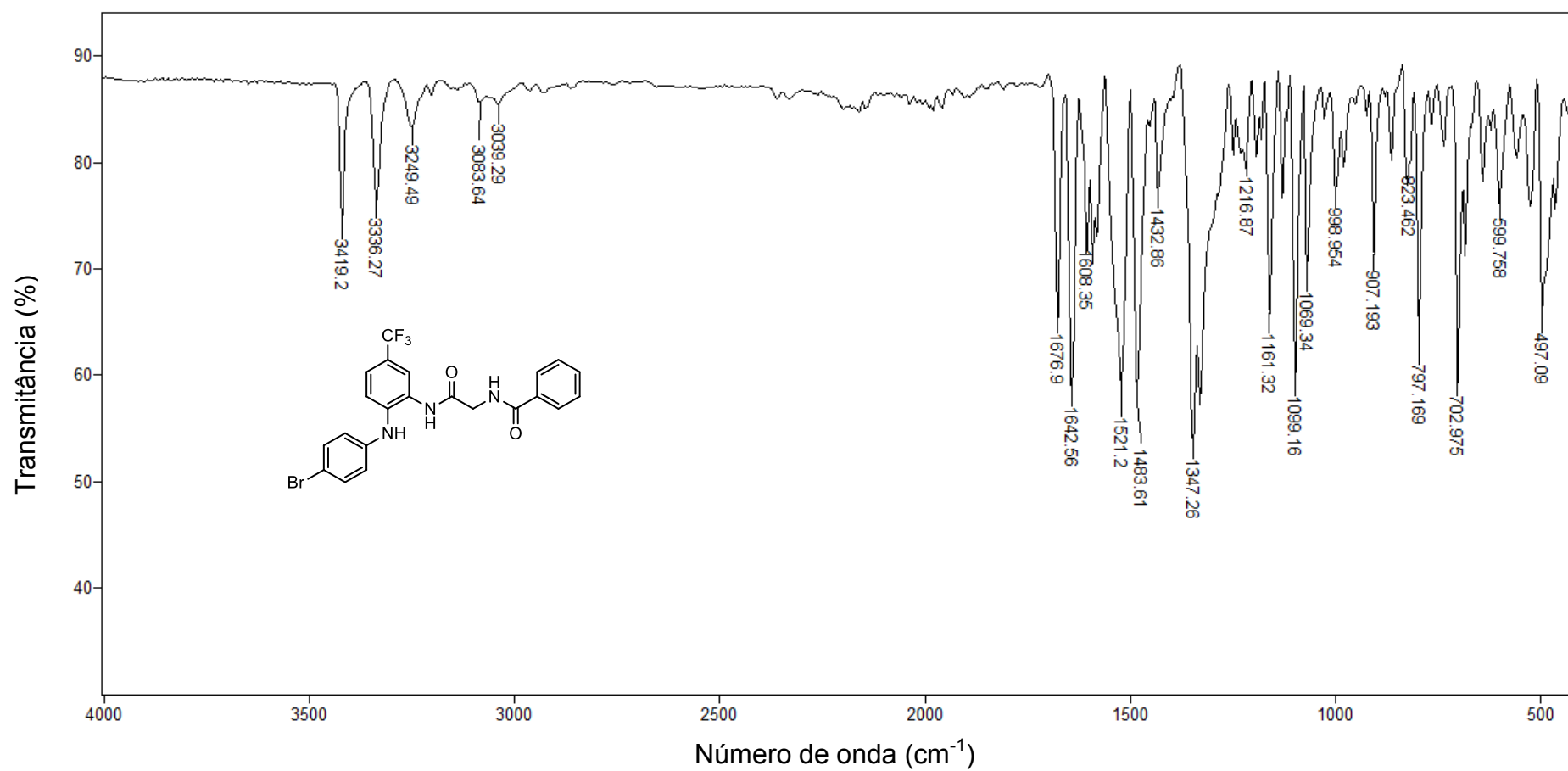


Figura 96 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10a**.

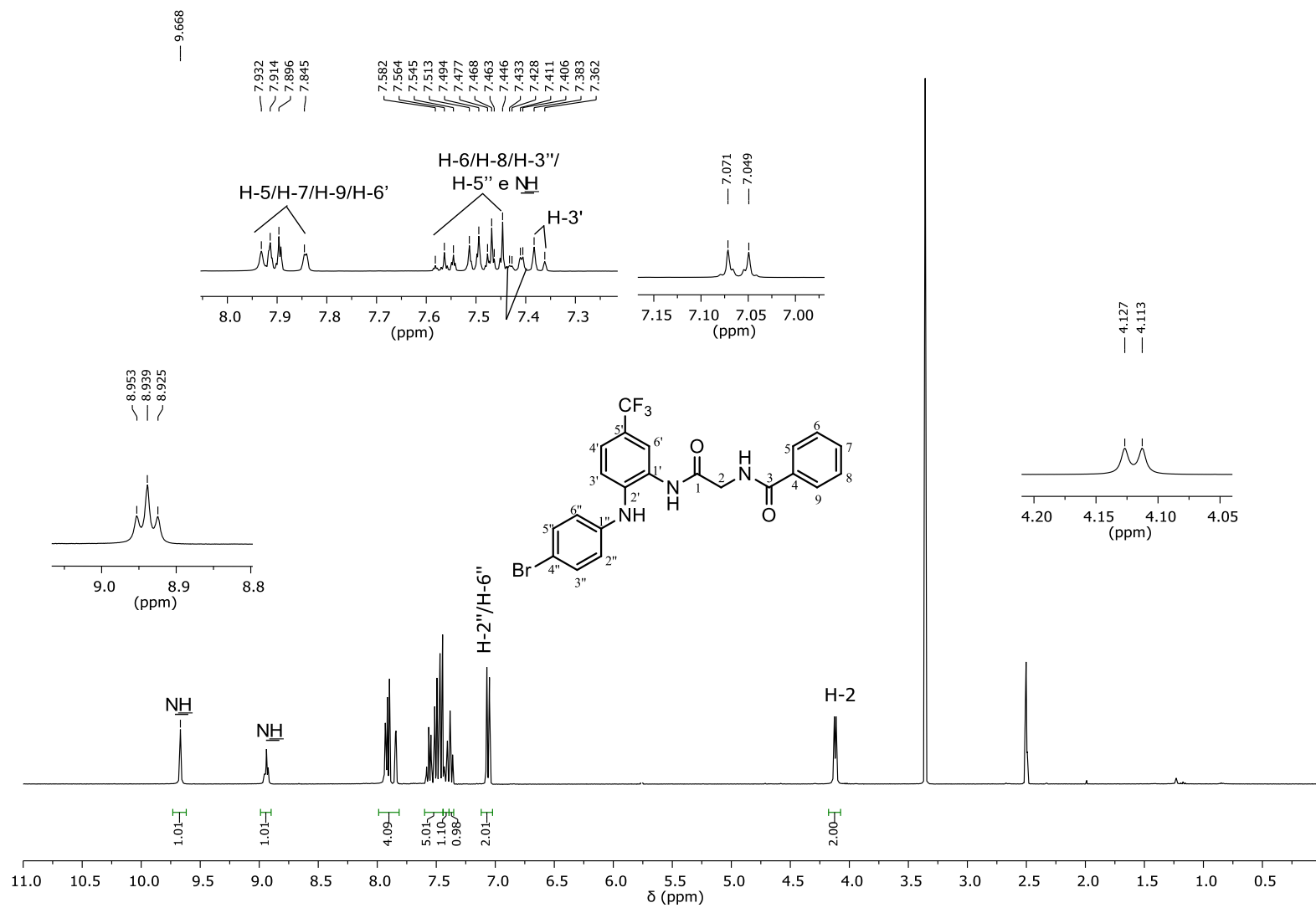


Figura 97 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **10a**.

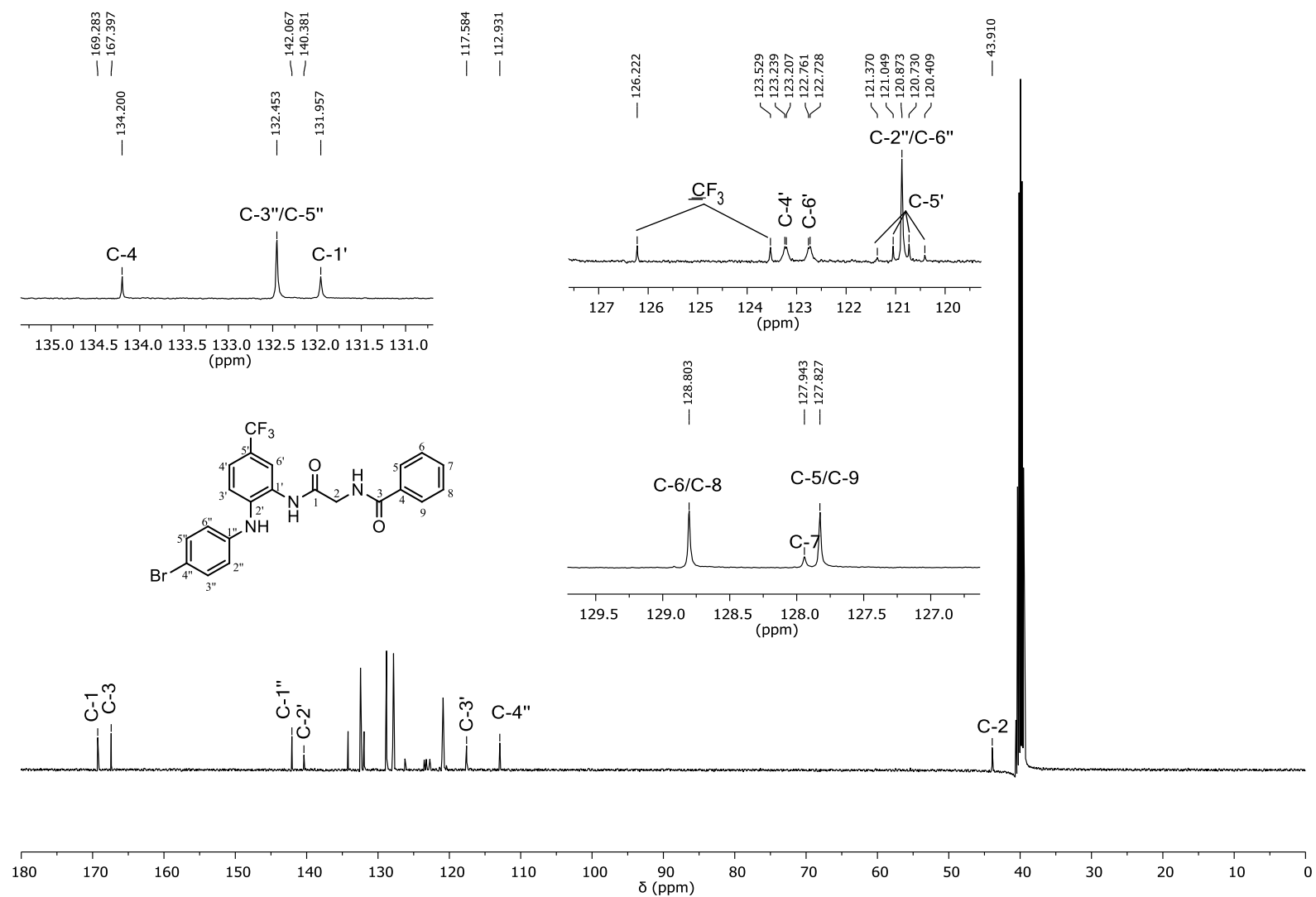


Figura 98 - Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) do composto **10a**.

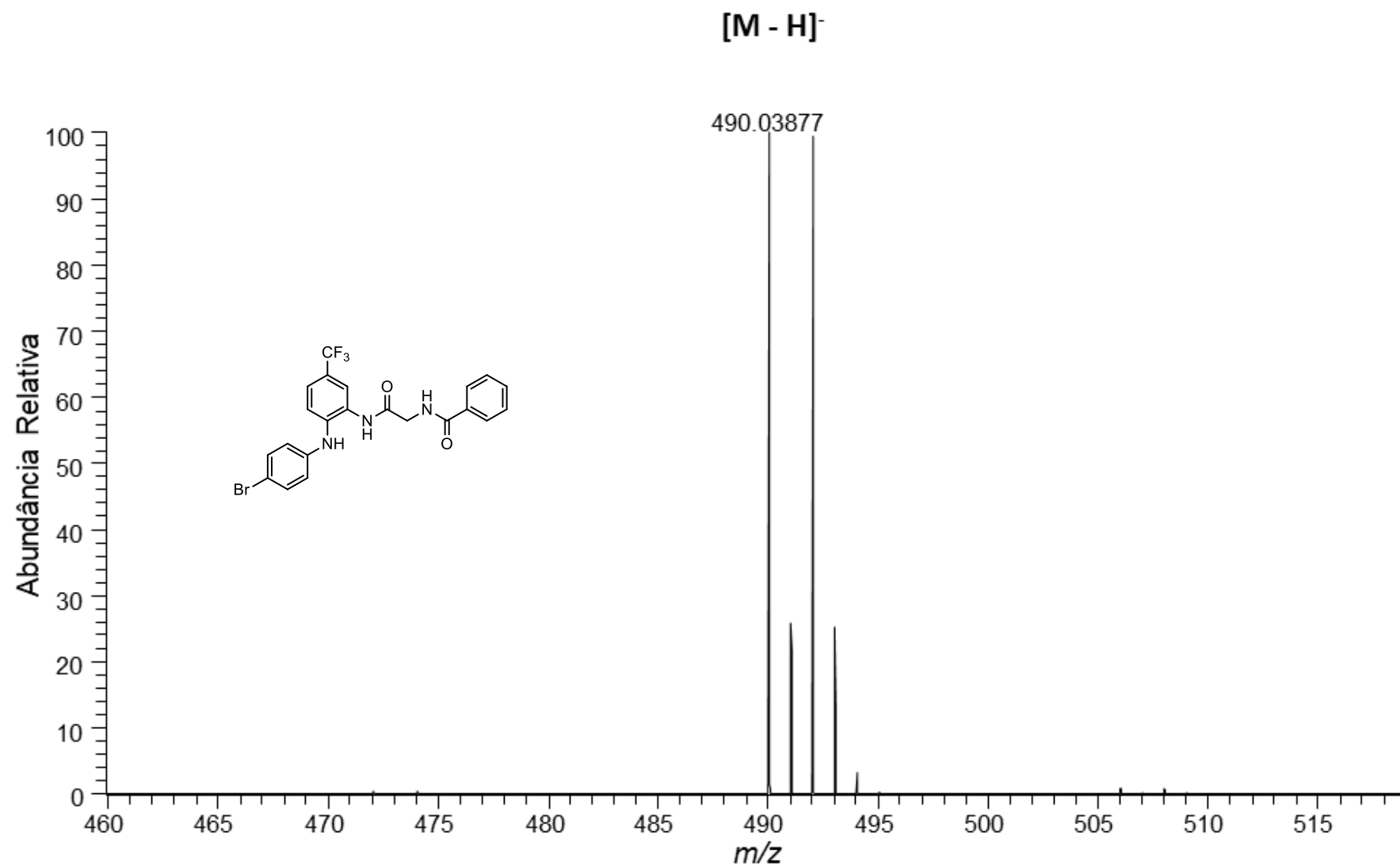


Figura 99 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10a**.

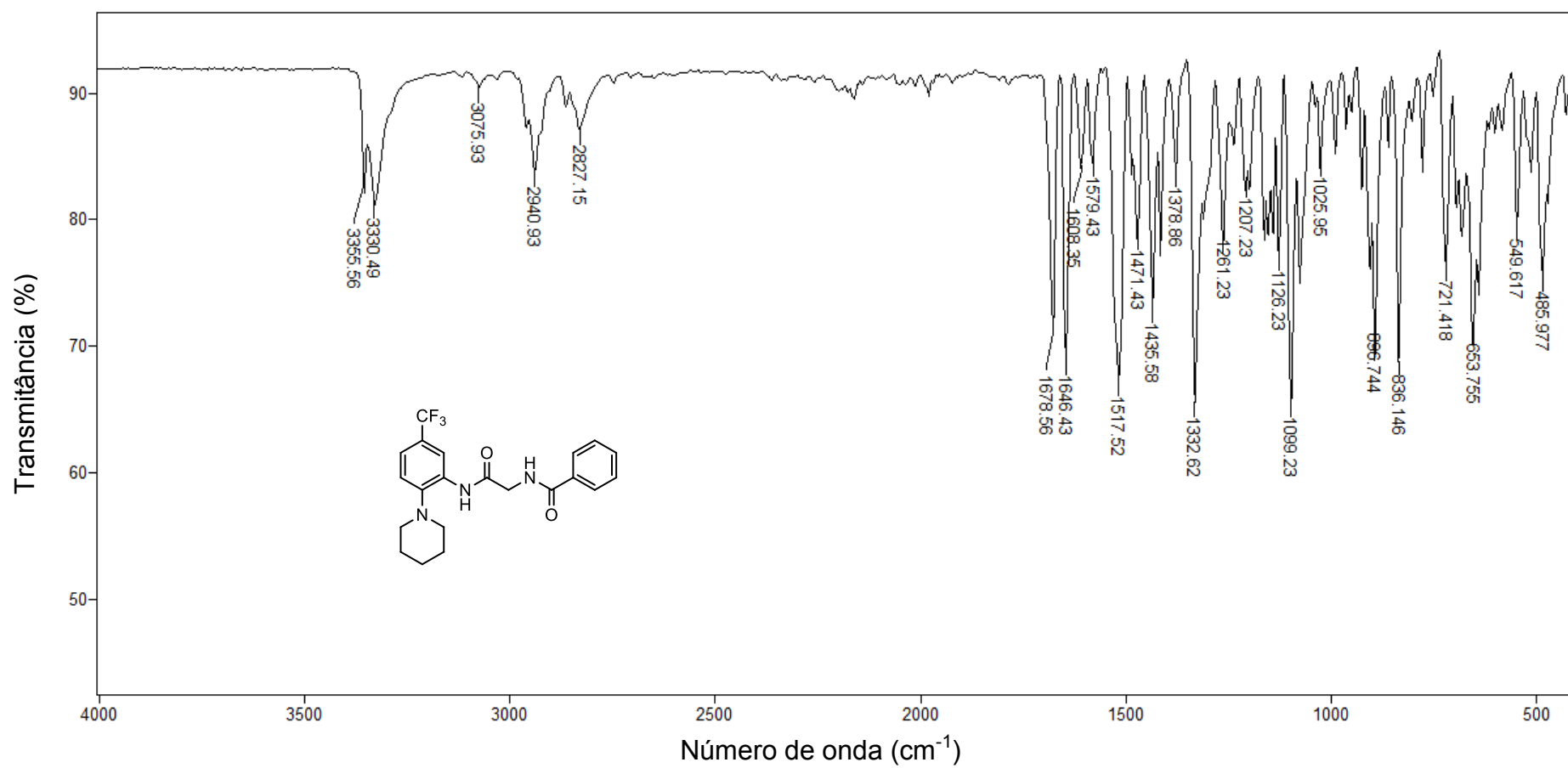


Figura 100 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10b**.

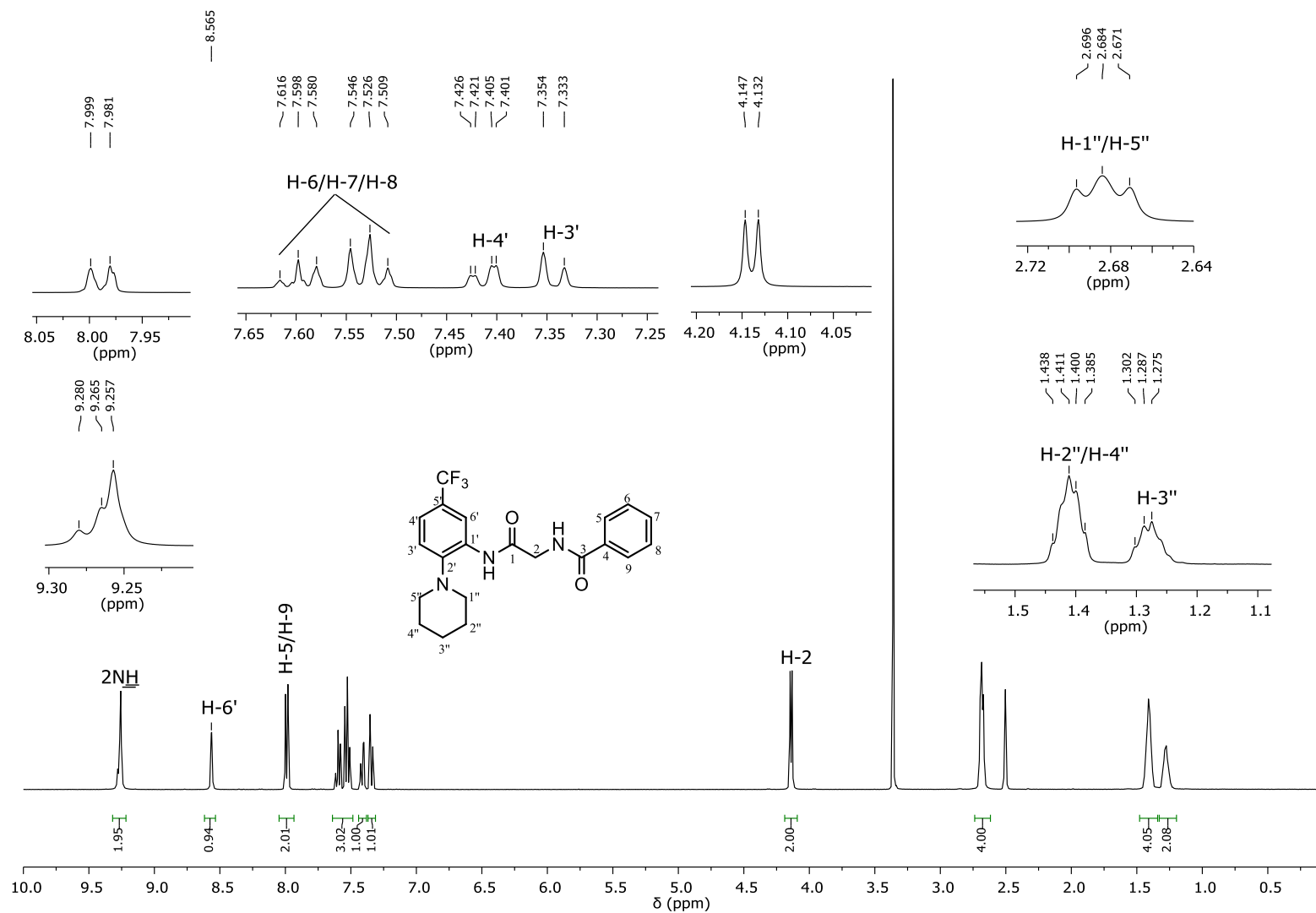


Figura 101 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10b**.

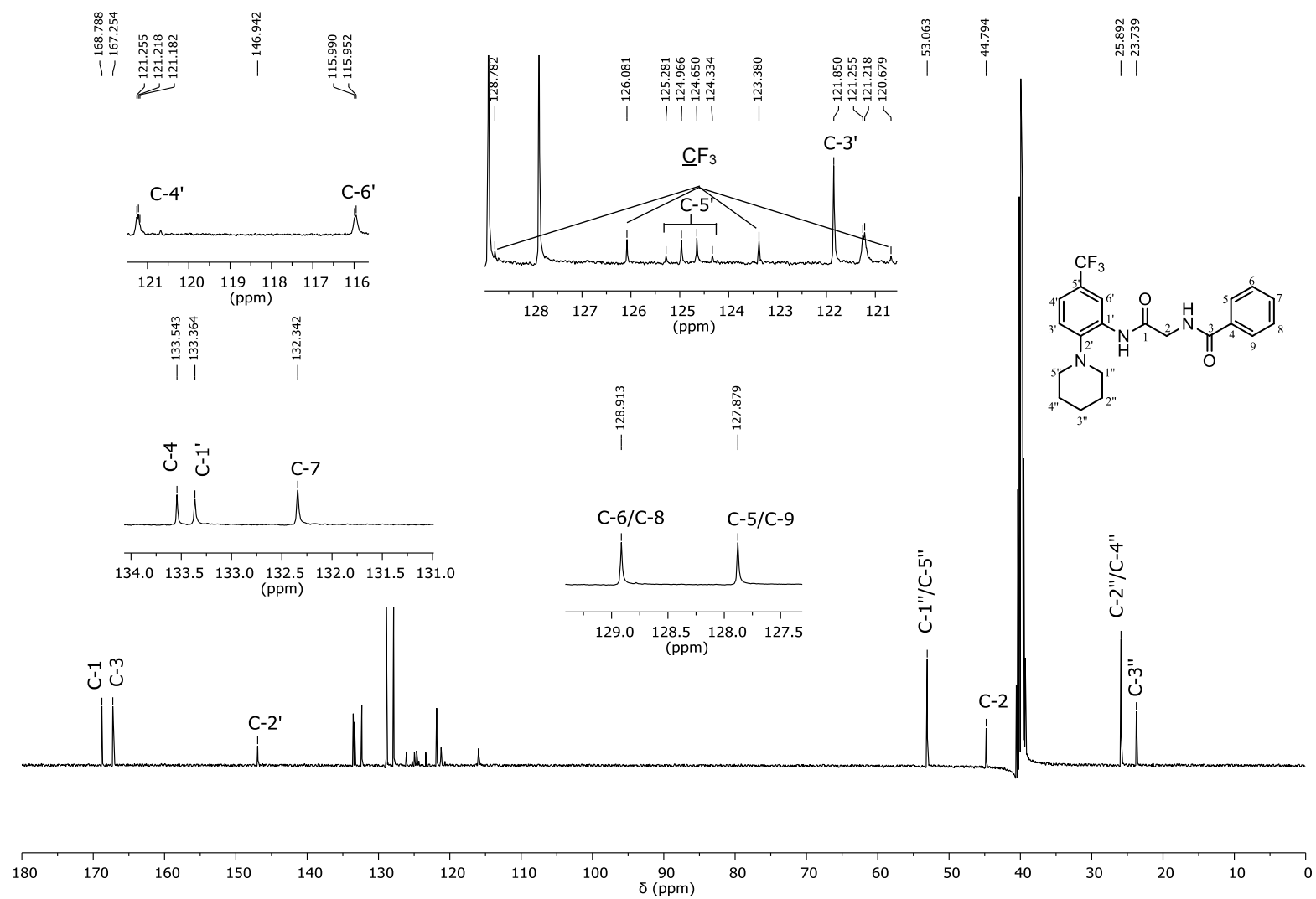


Figura 102 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10b**.

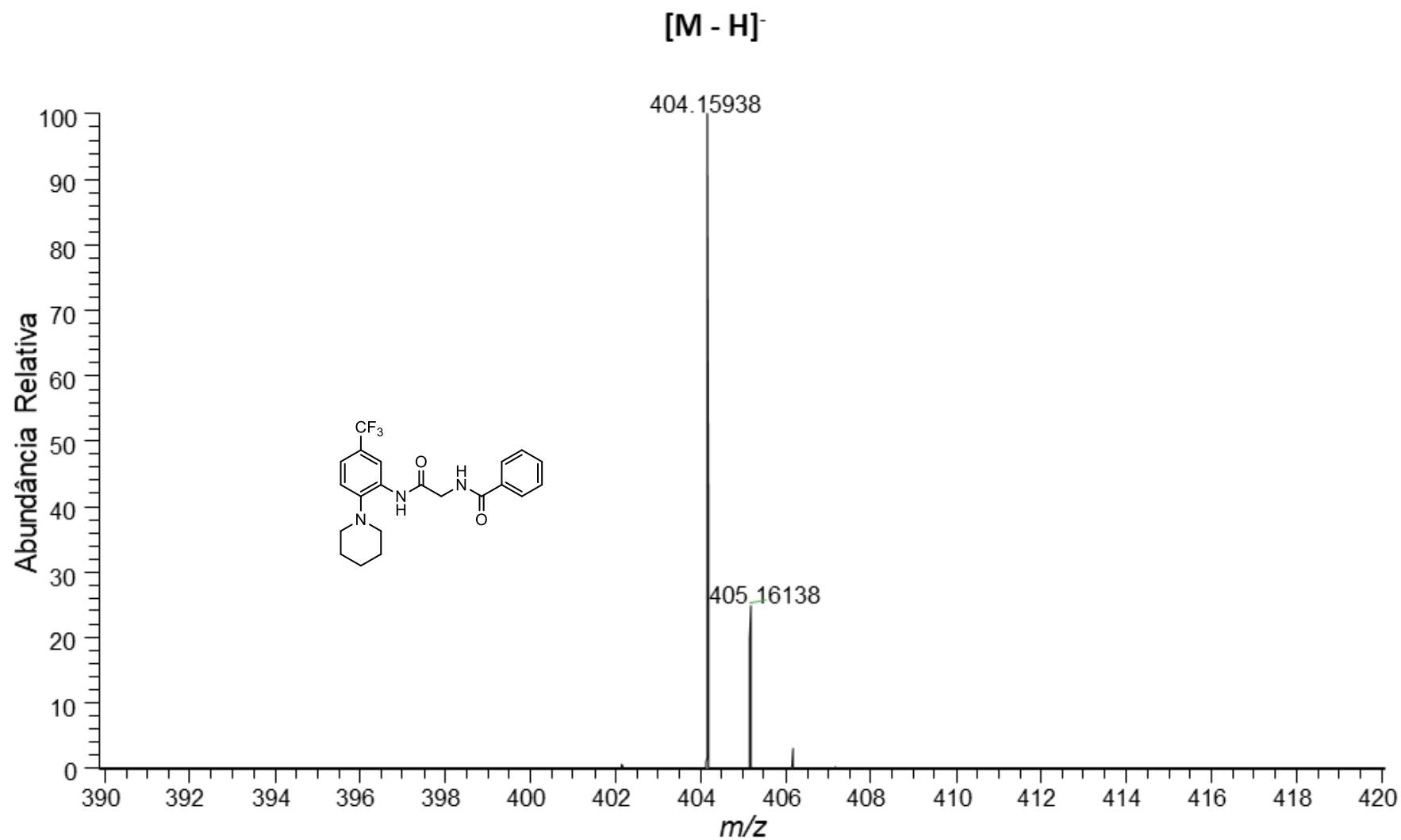


Figura 103 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10b**.

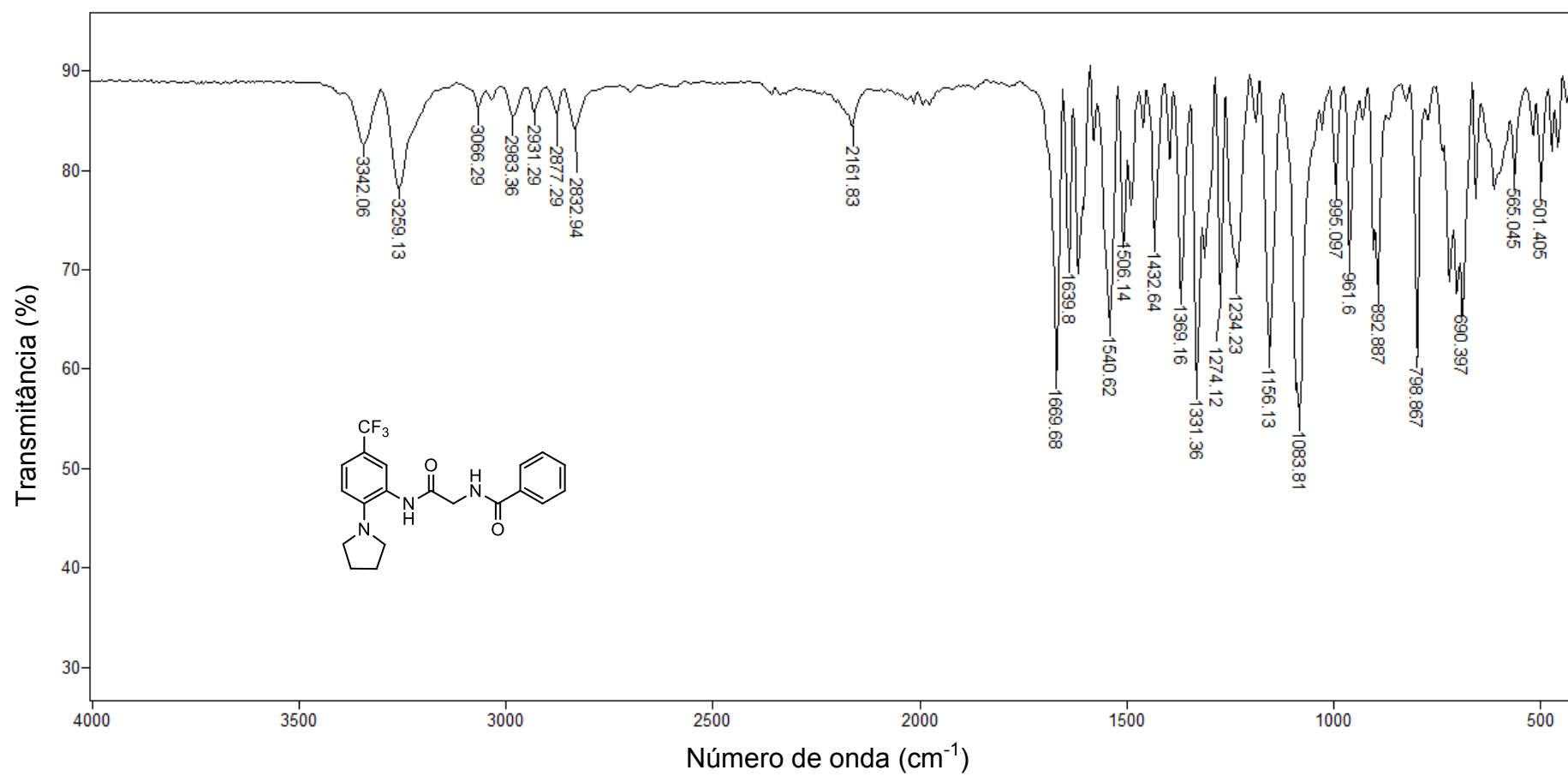


Figura 104 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10c**.

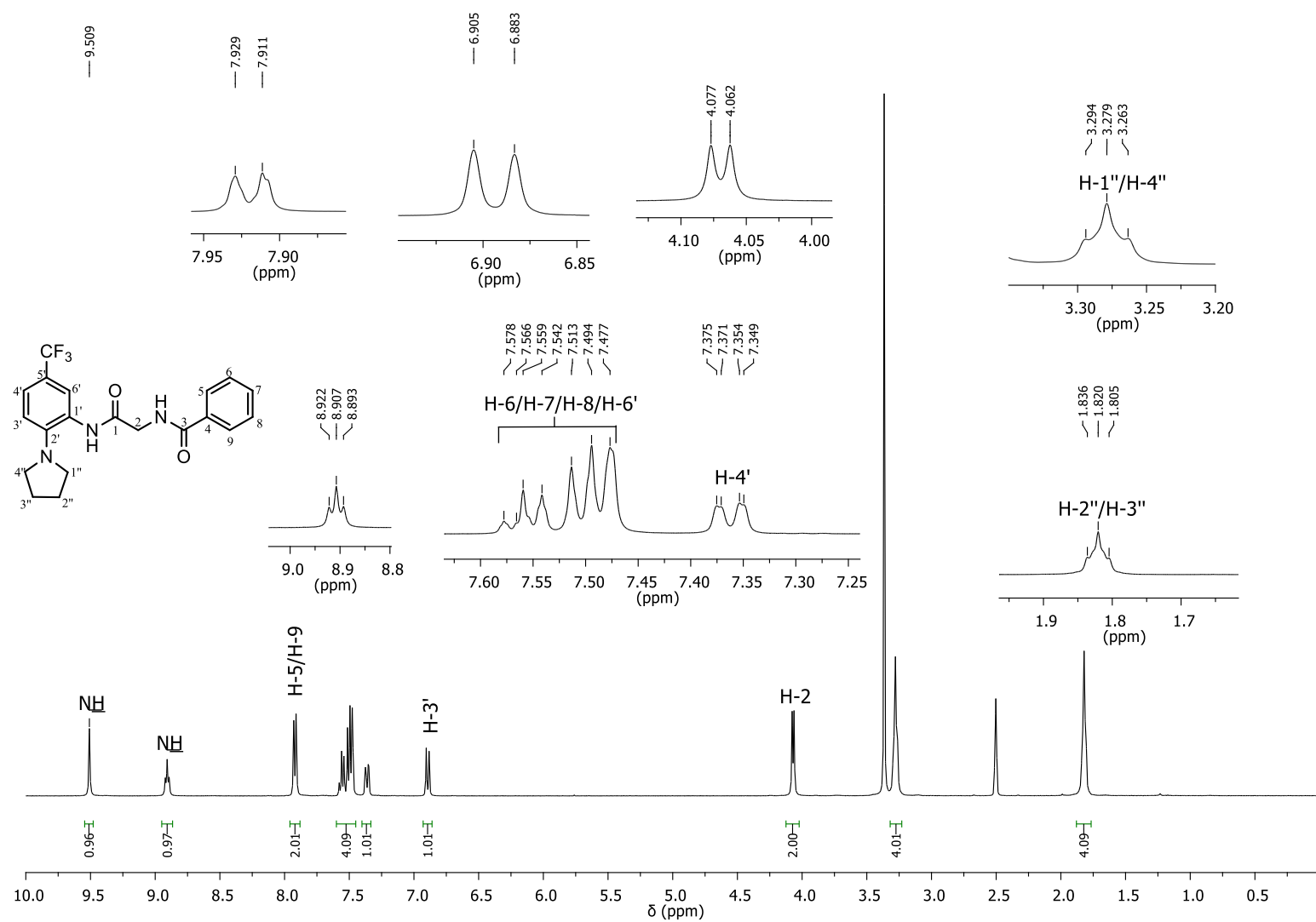


Figura 105 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10c**.

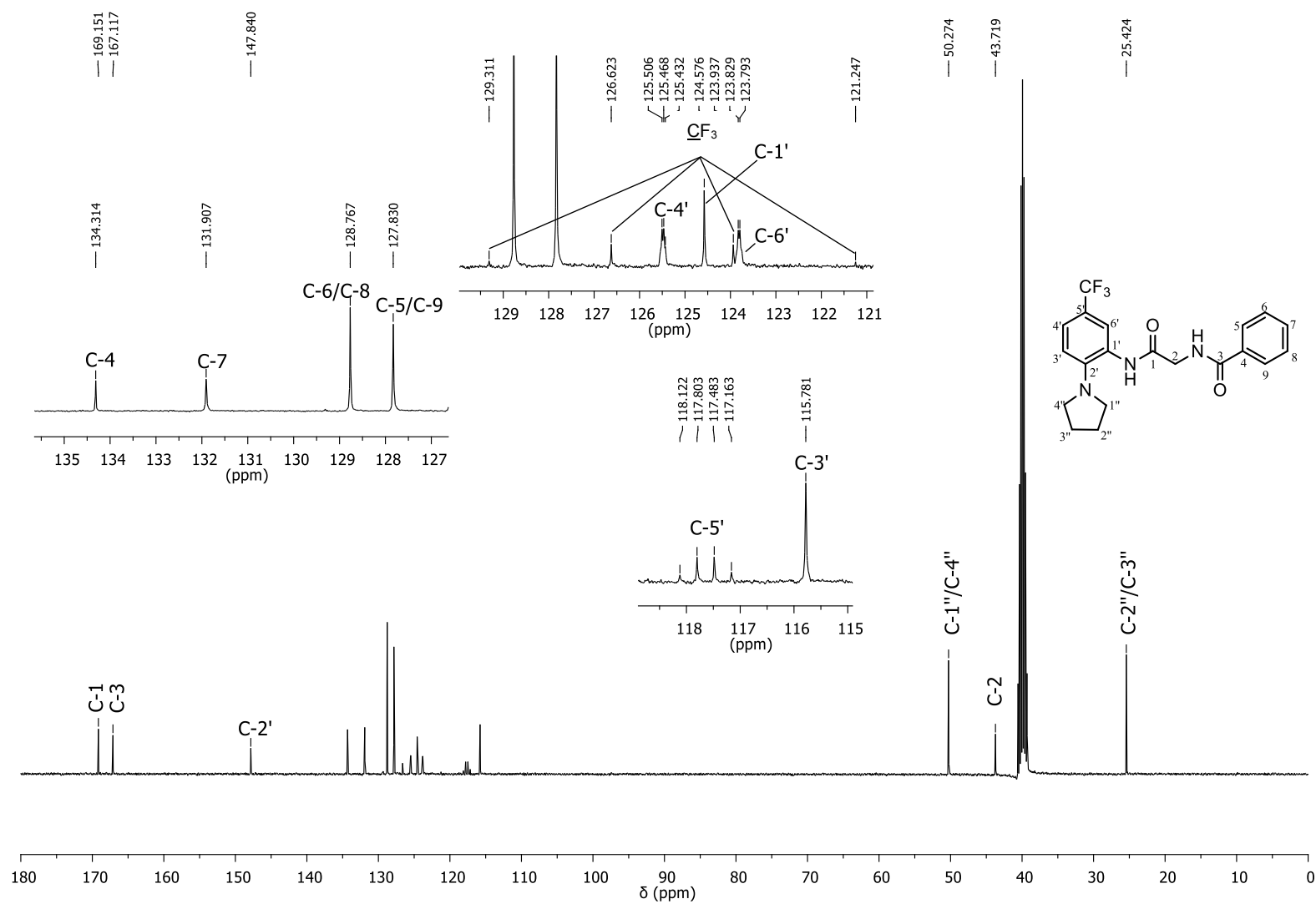


Figura 106 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10c**.

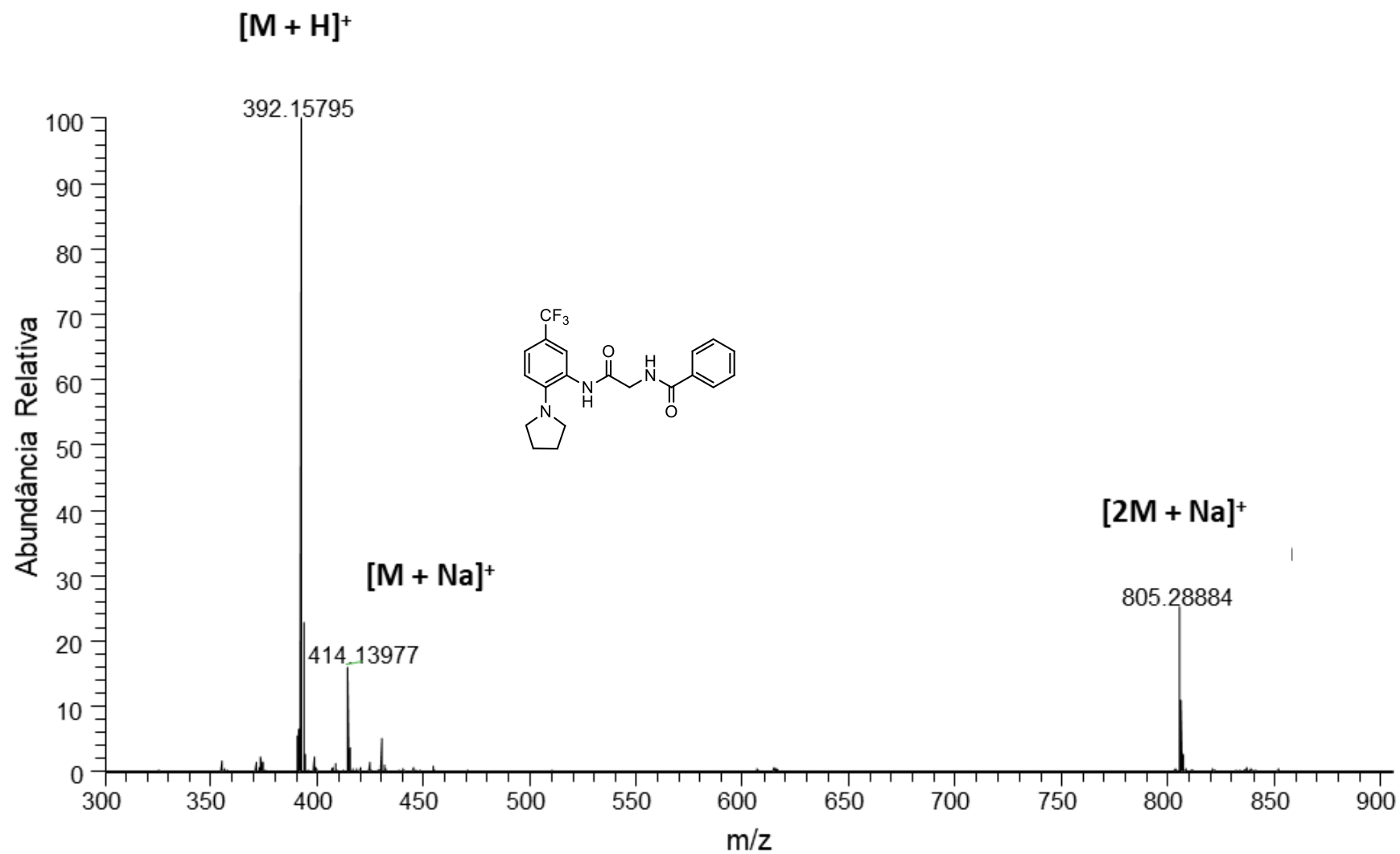


Figura 107 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10c**.

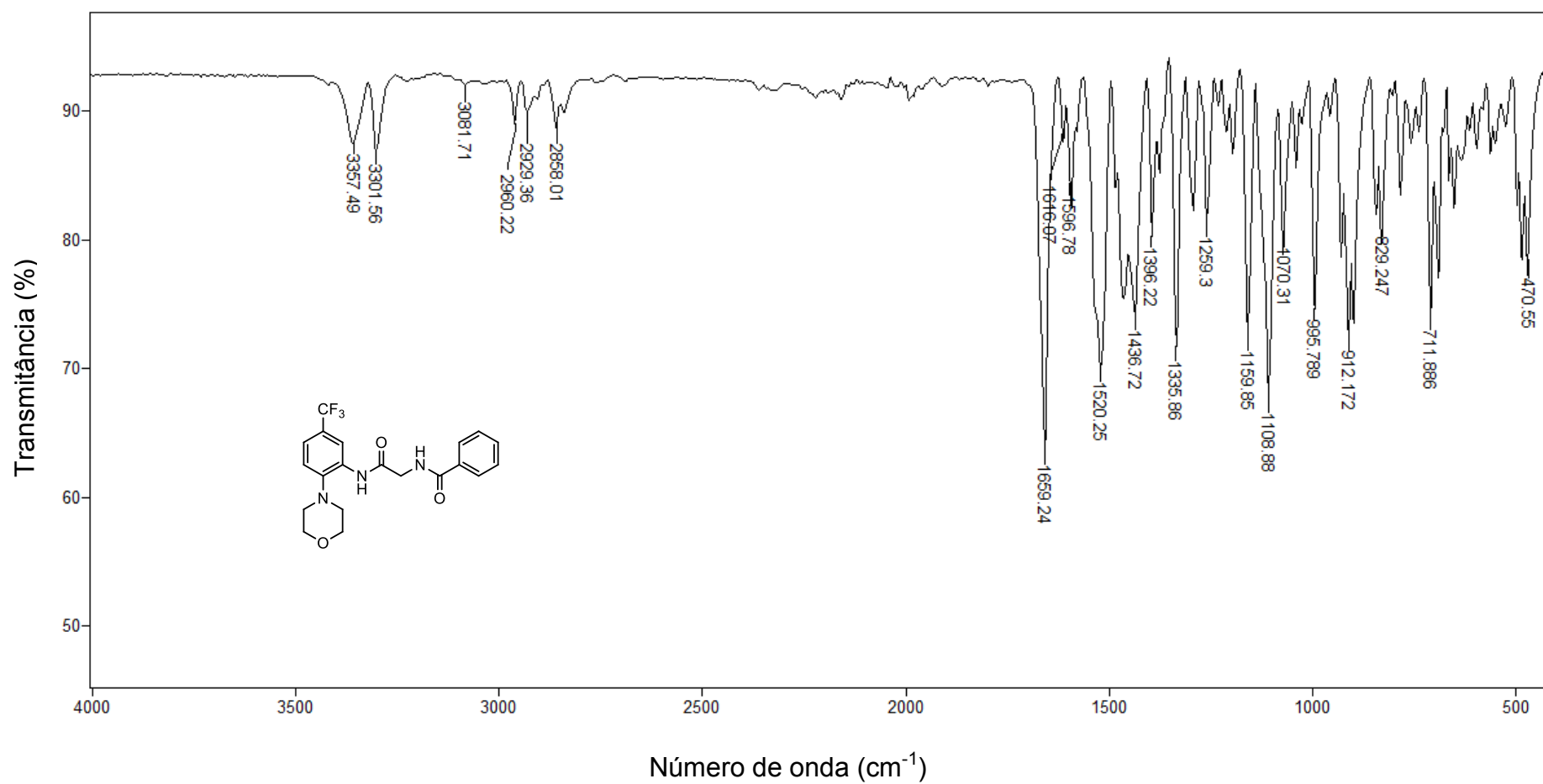


Figura 108 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10d**.

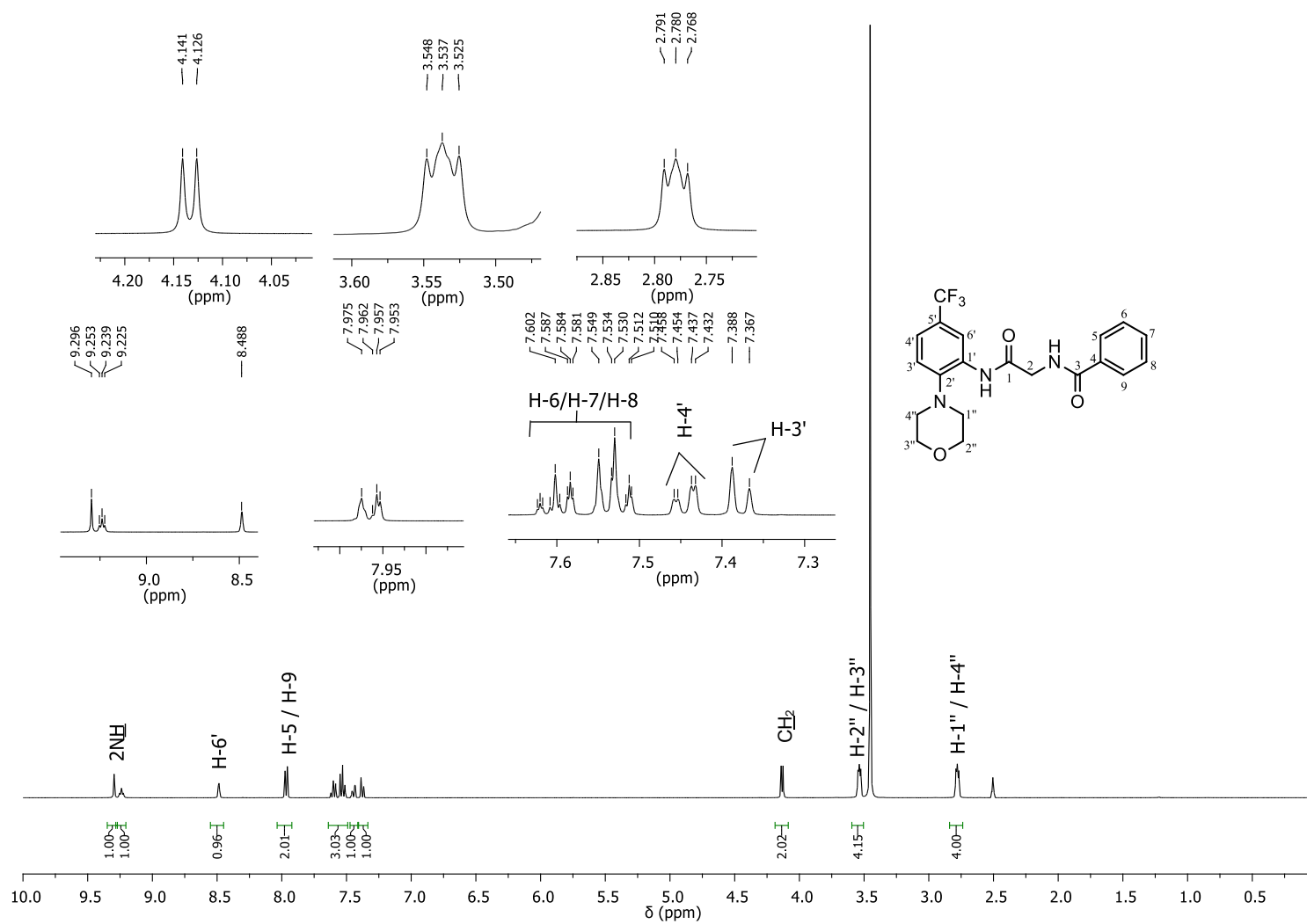


Figura 109 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10d**.

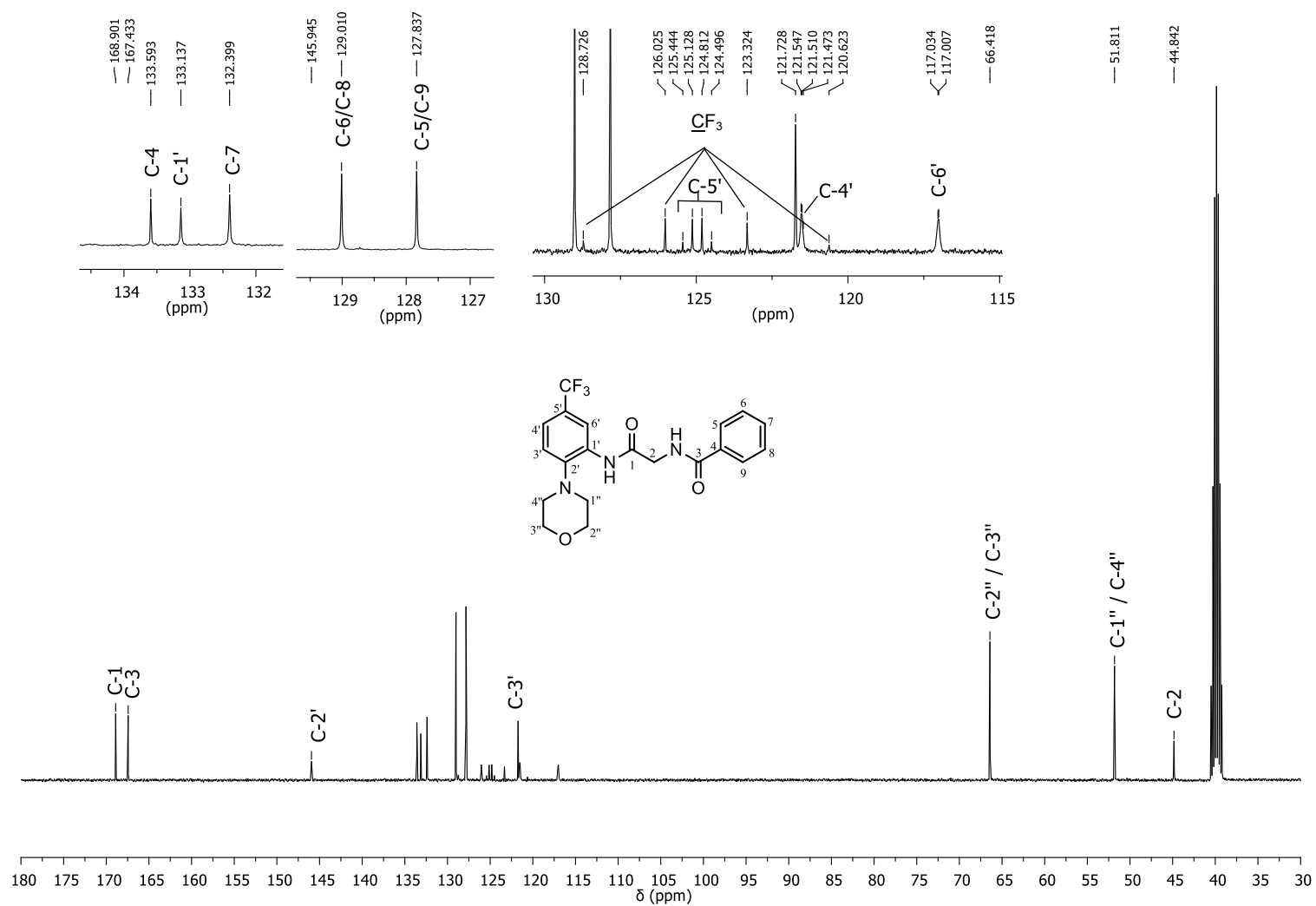


Figura 110 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10d**.

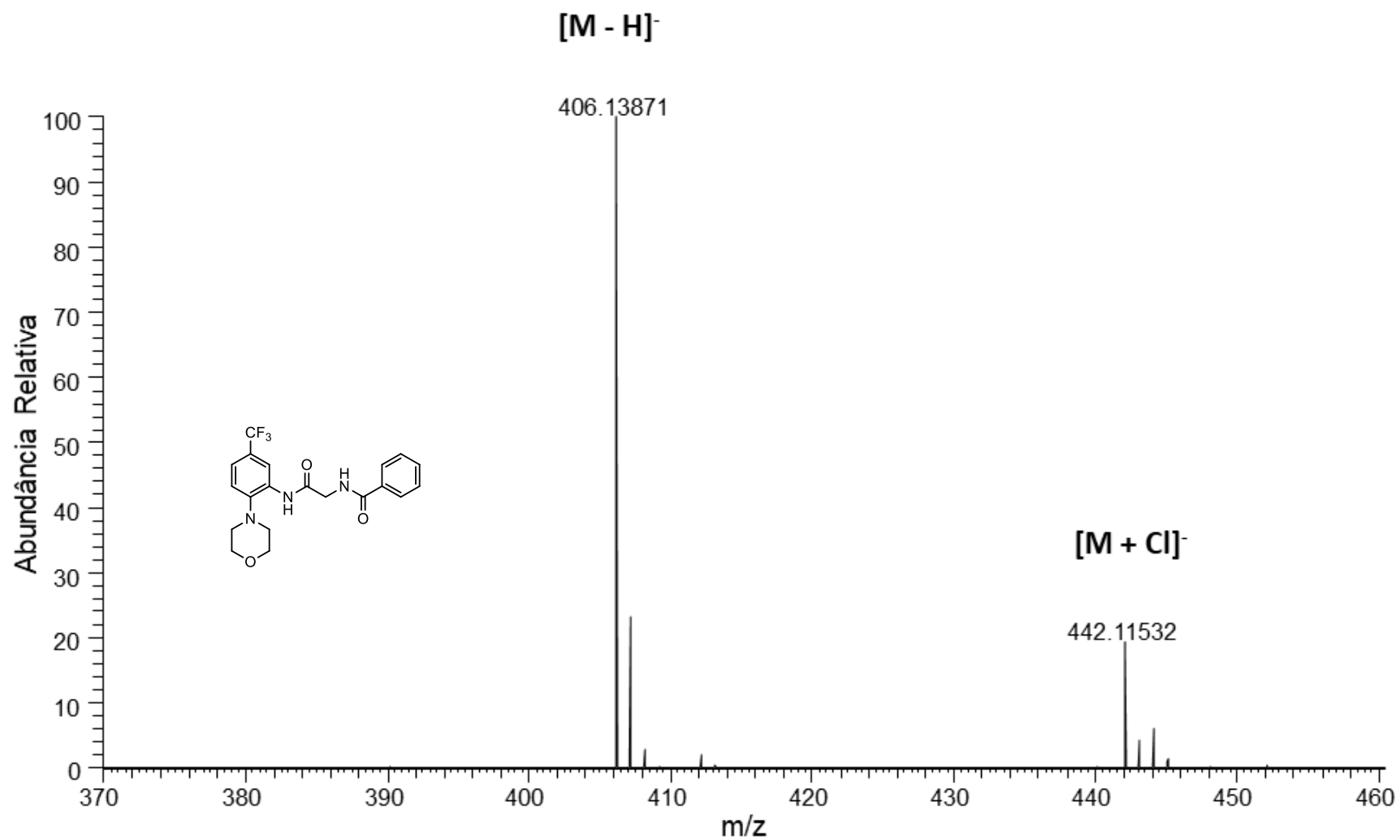


Figura 111 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10d**.

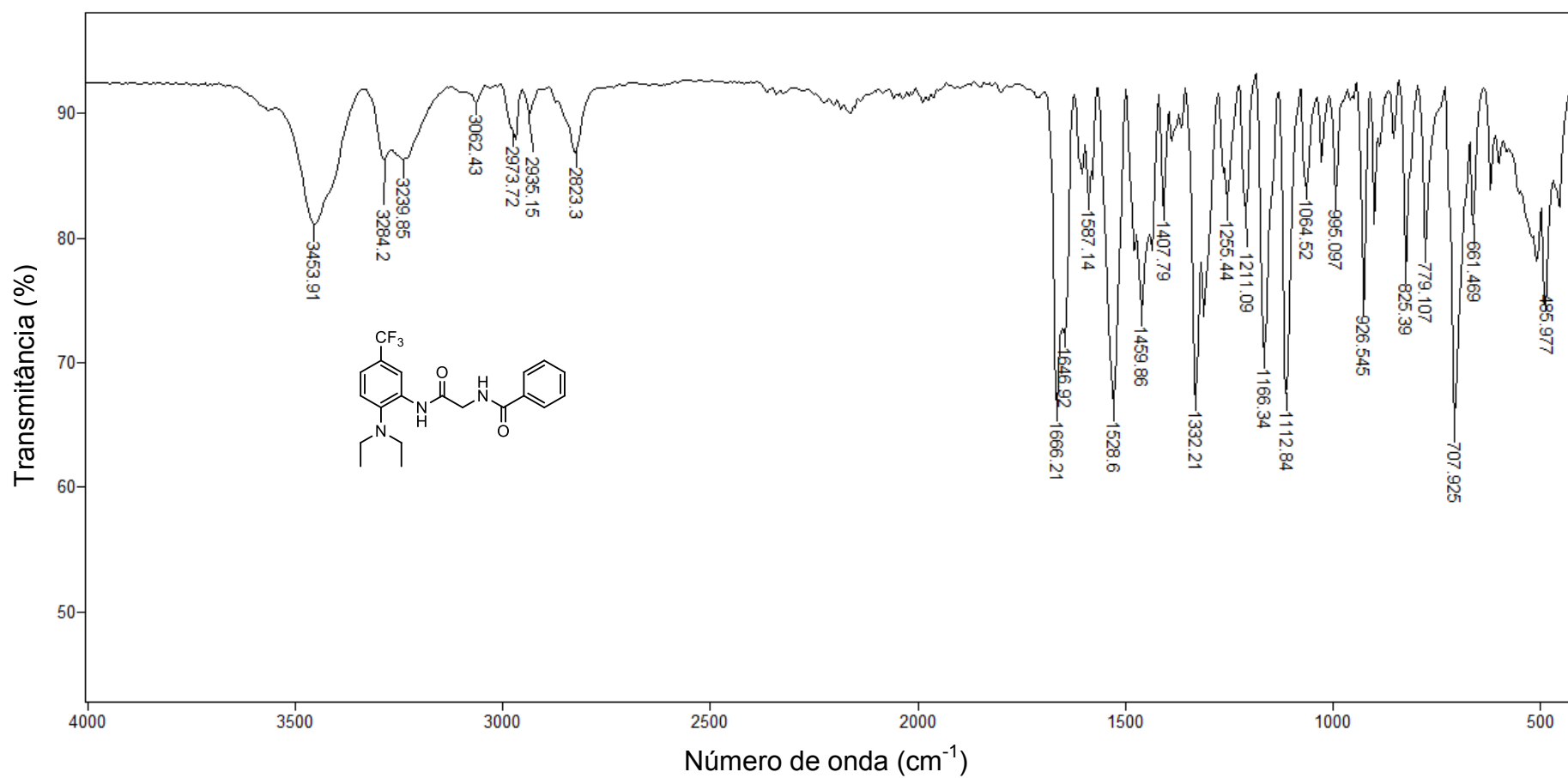


Figura 112 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10e**.

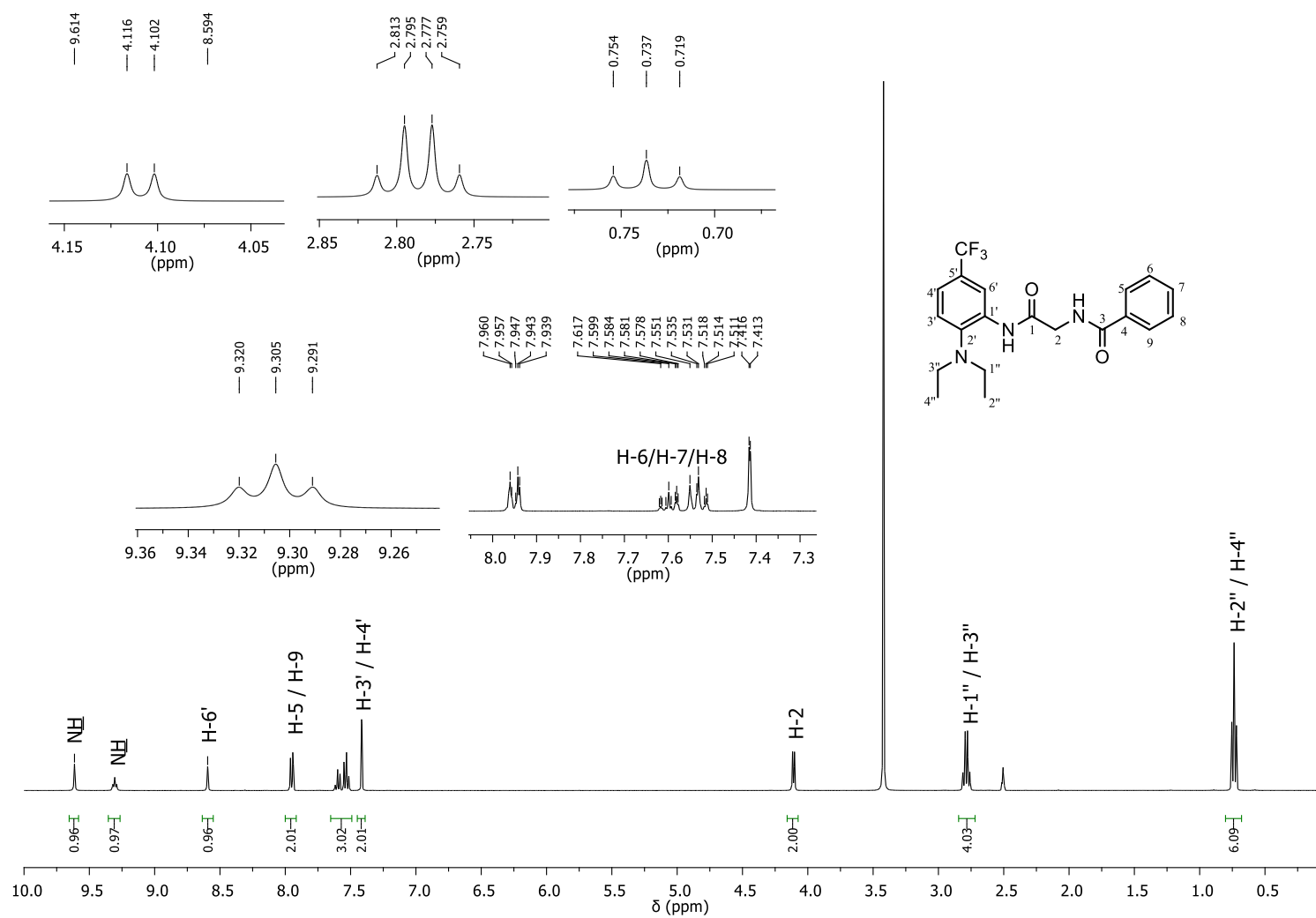


Figura 113 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **10e**.

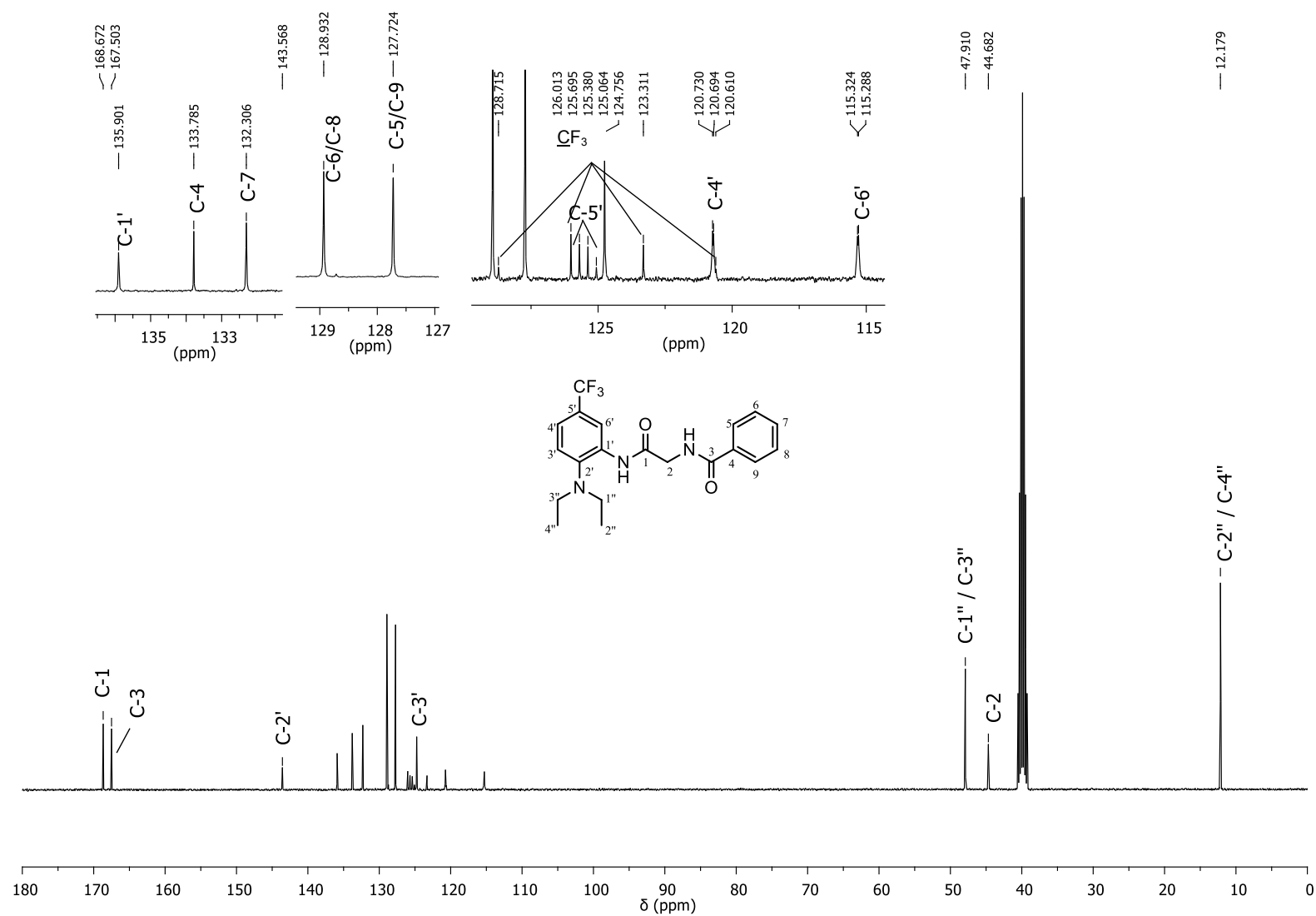


Figura 114 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10e**.

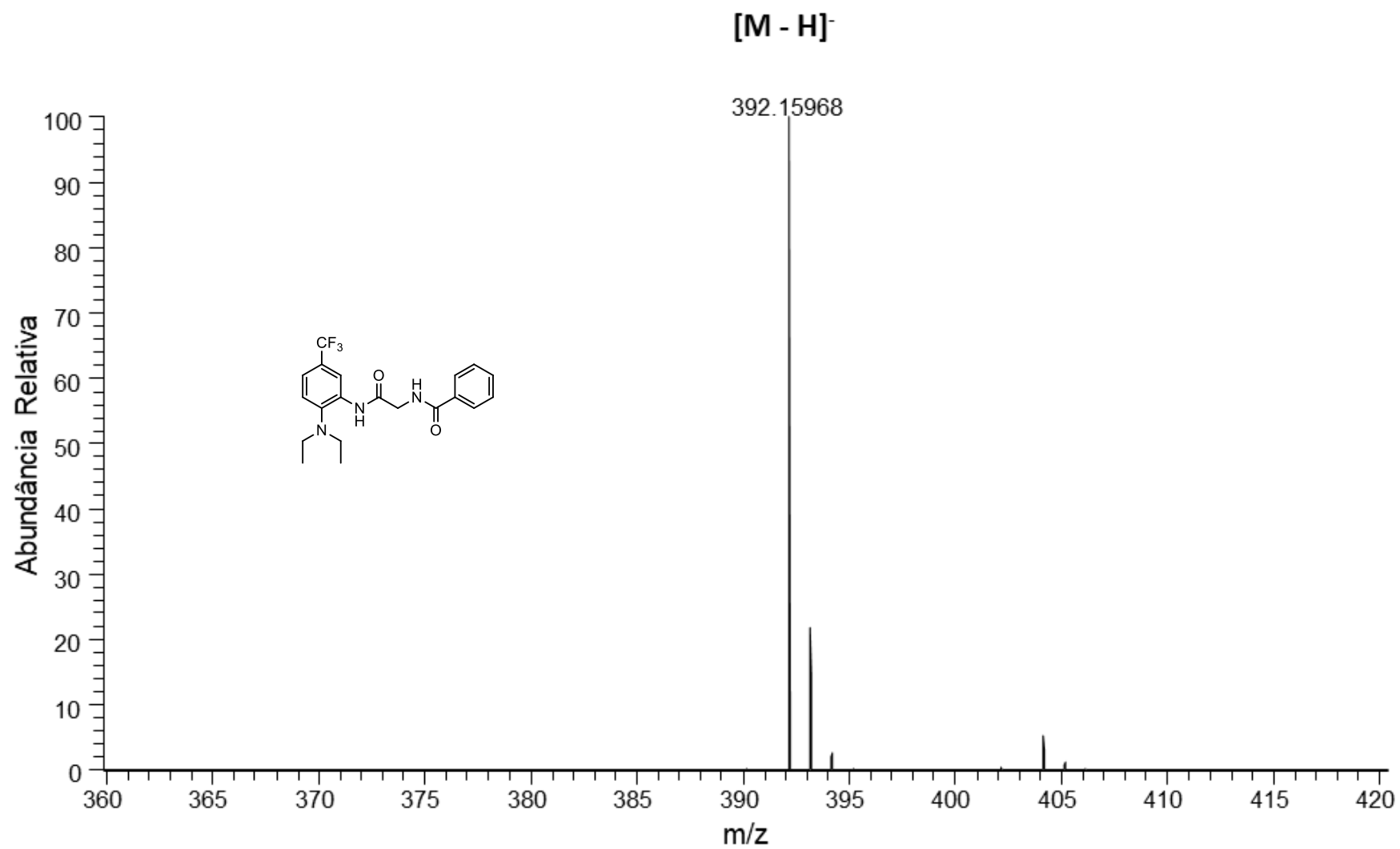


Figura 115 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10e**.

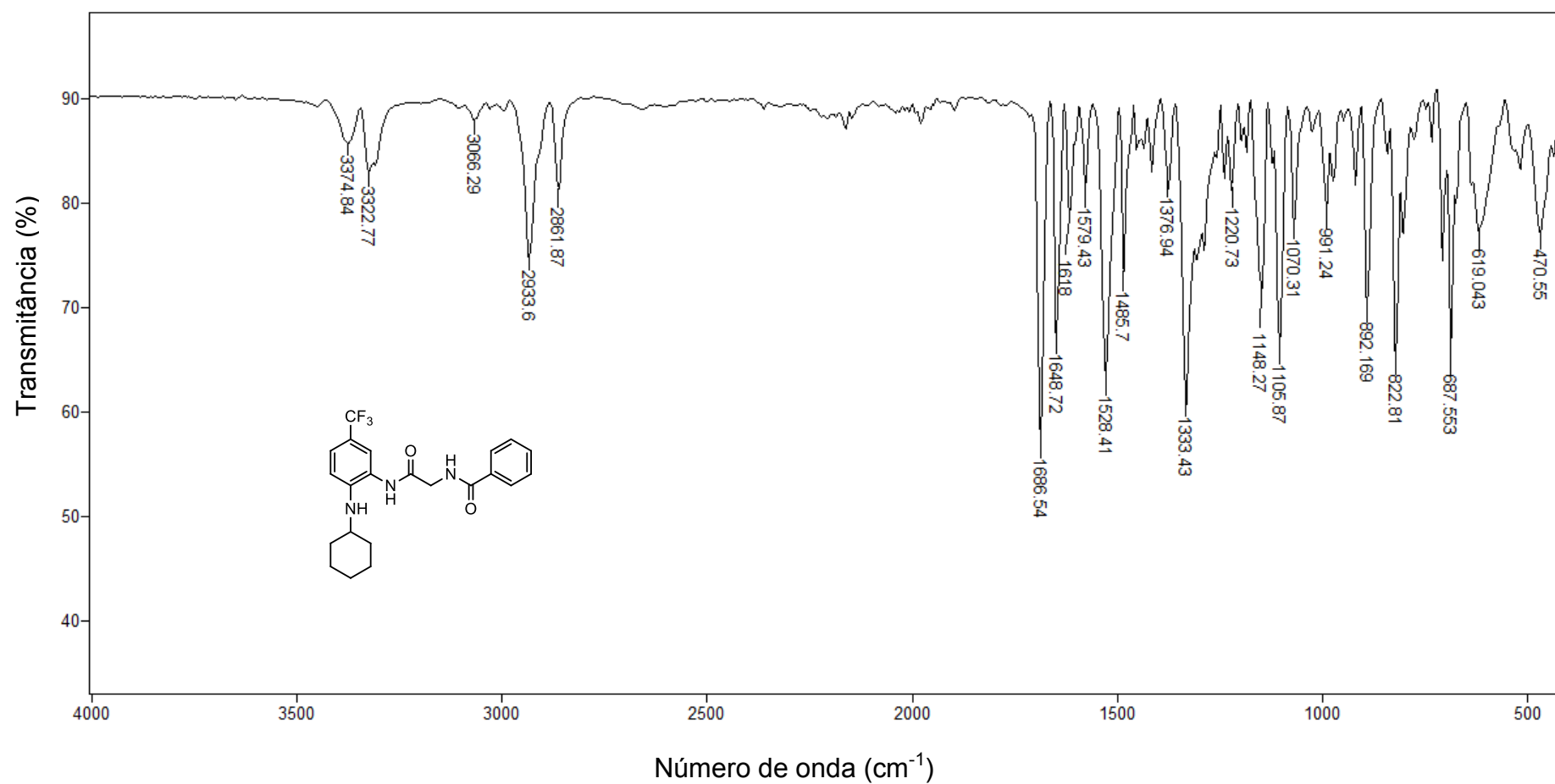


Figura 116 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10f**.

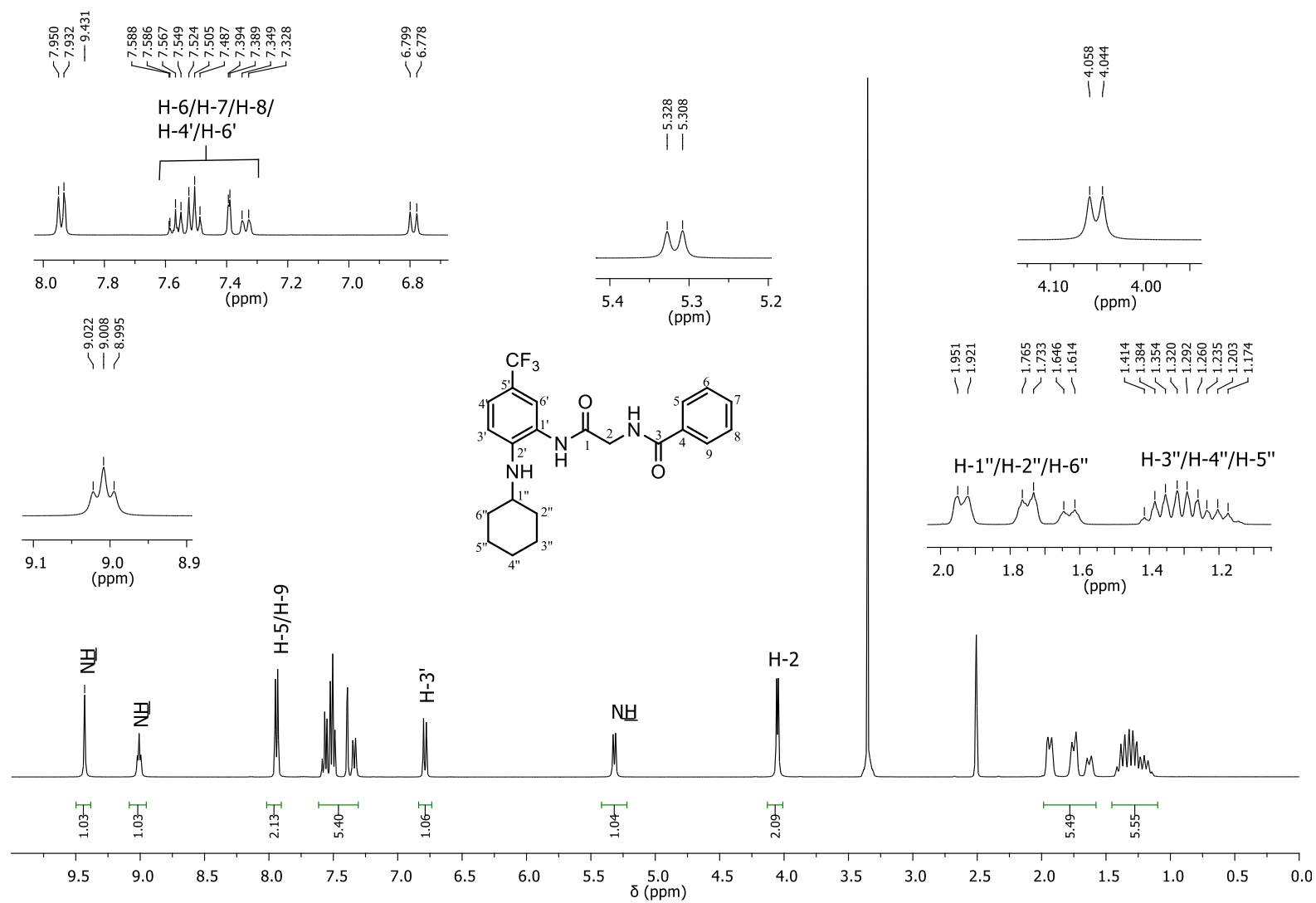


Figura 117 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10f**.

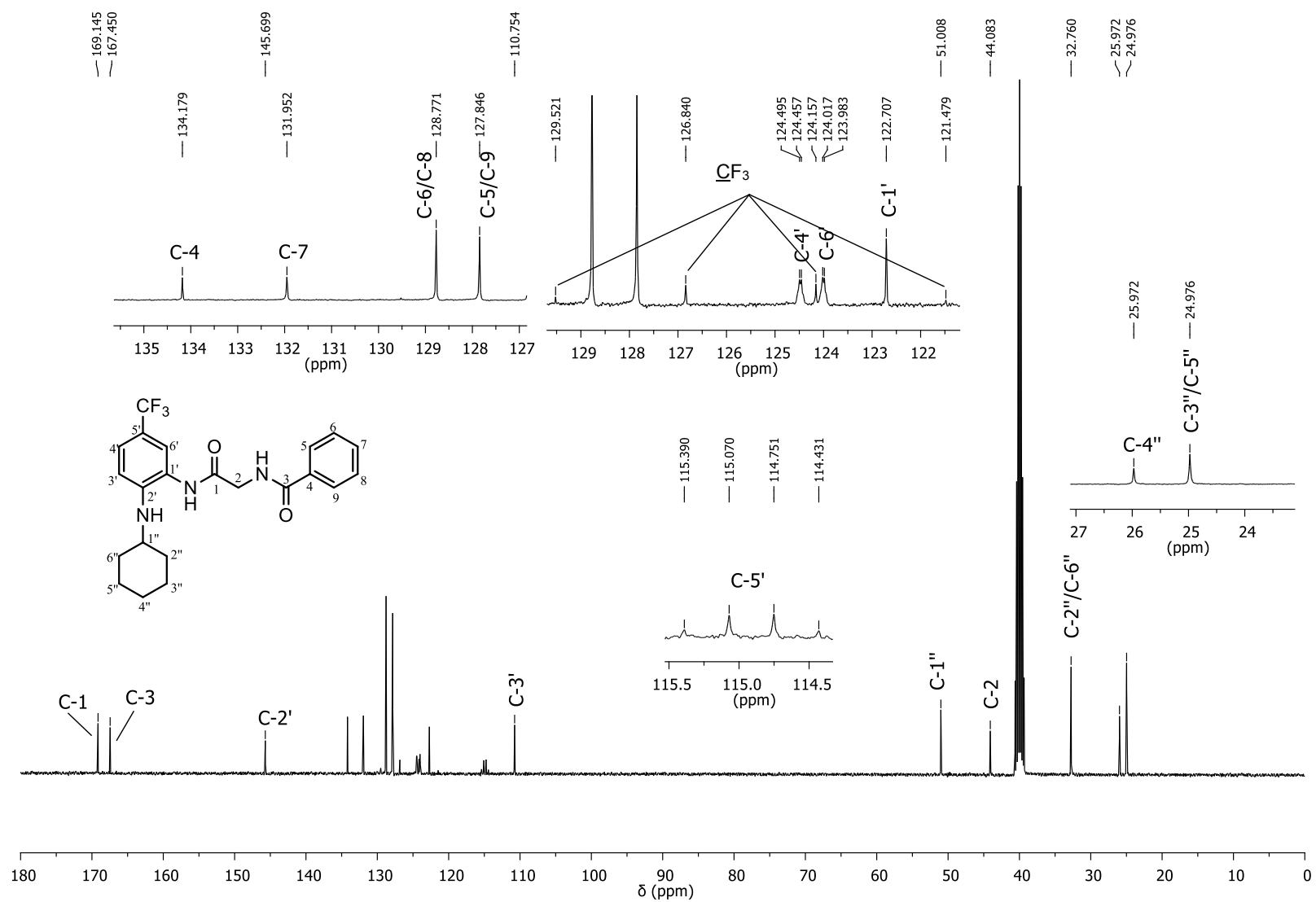


Figura 118 - Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **10f**.

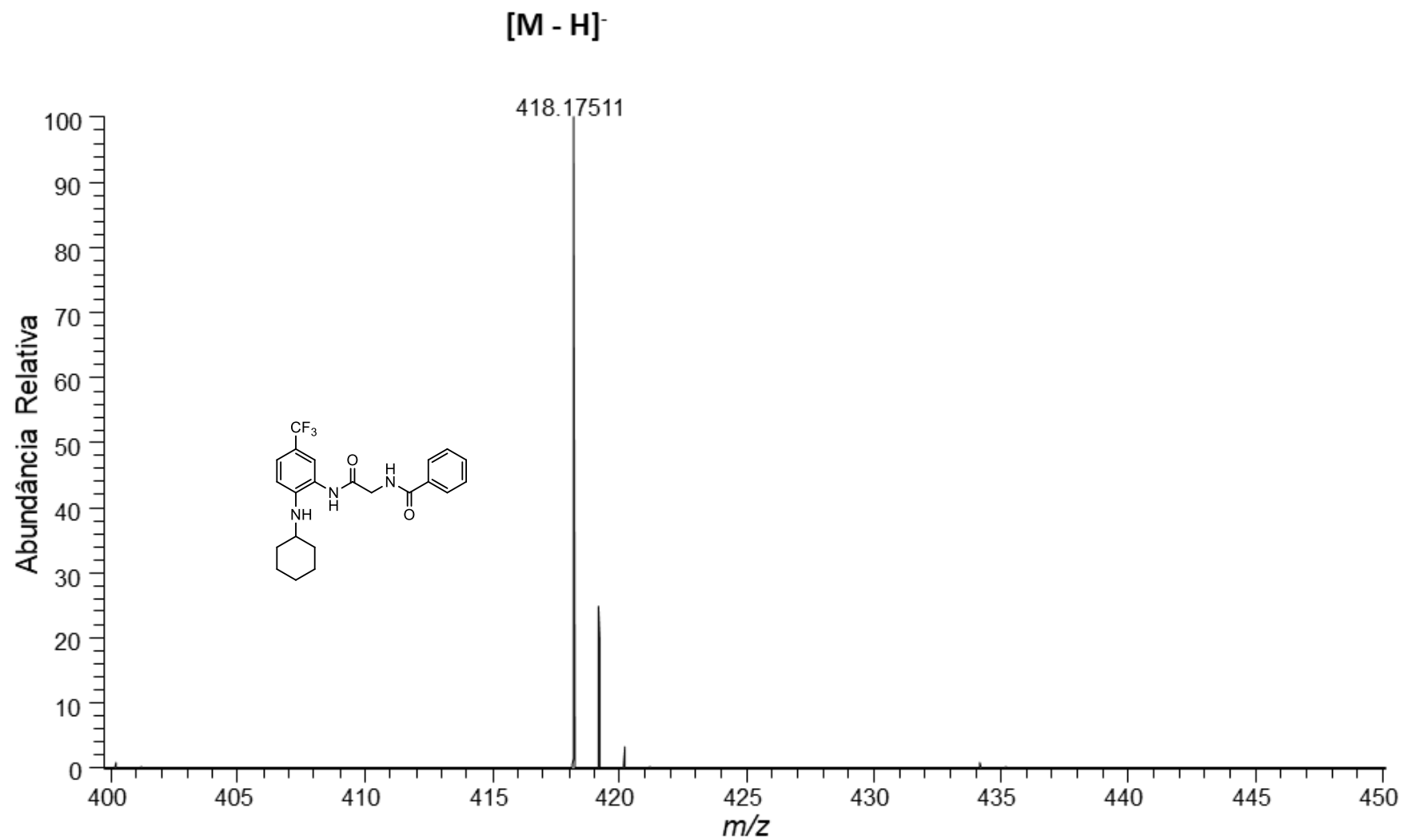


Figura 119 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10f**.

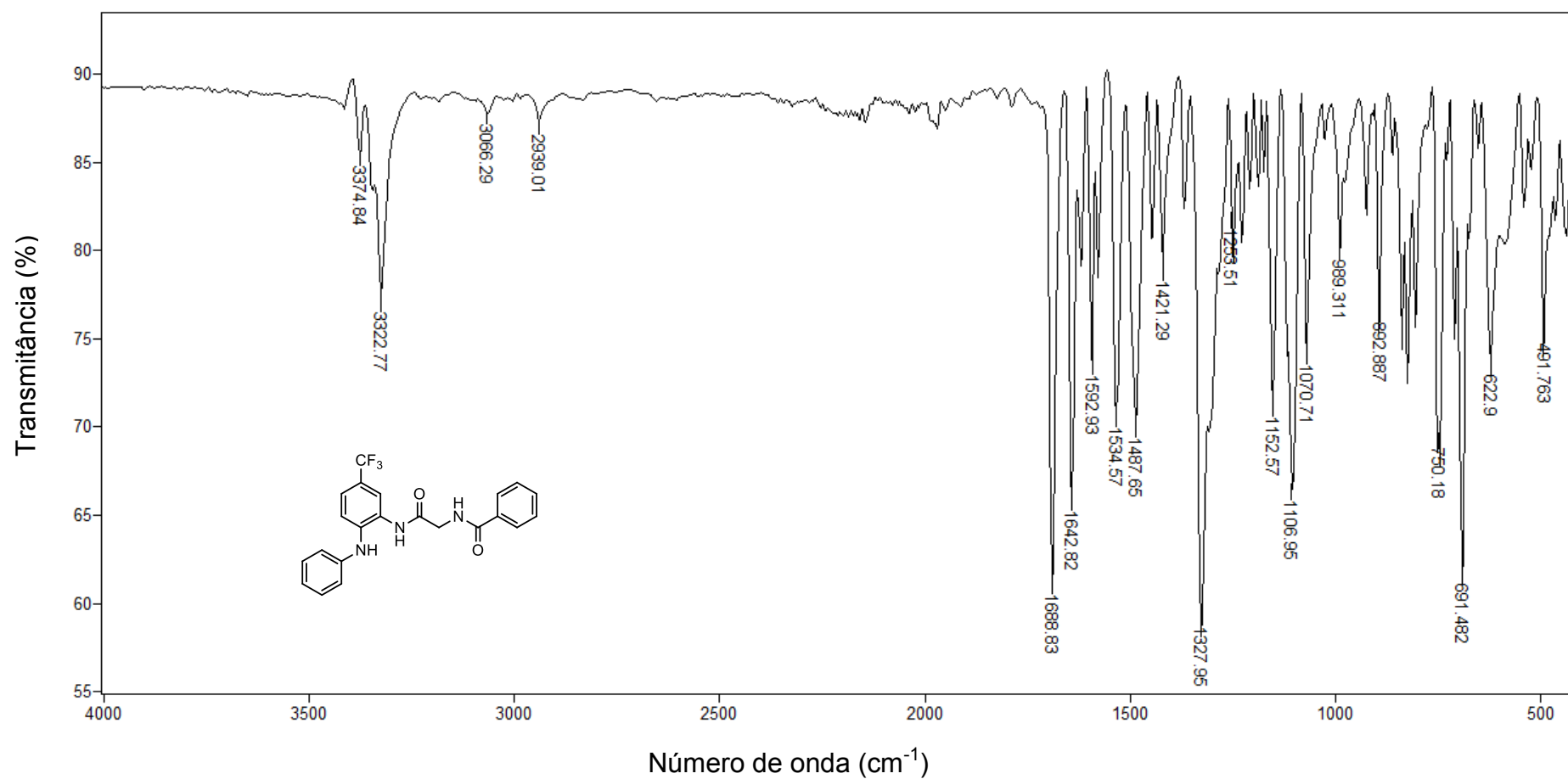


Figura 120 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10g**.

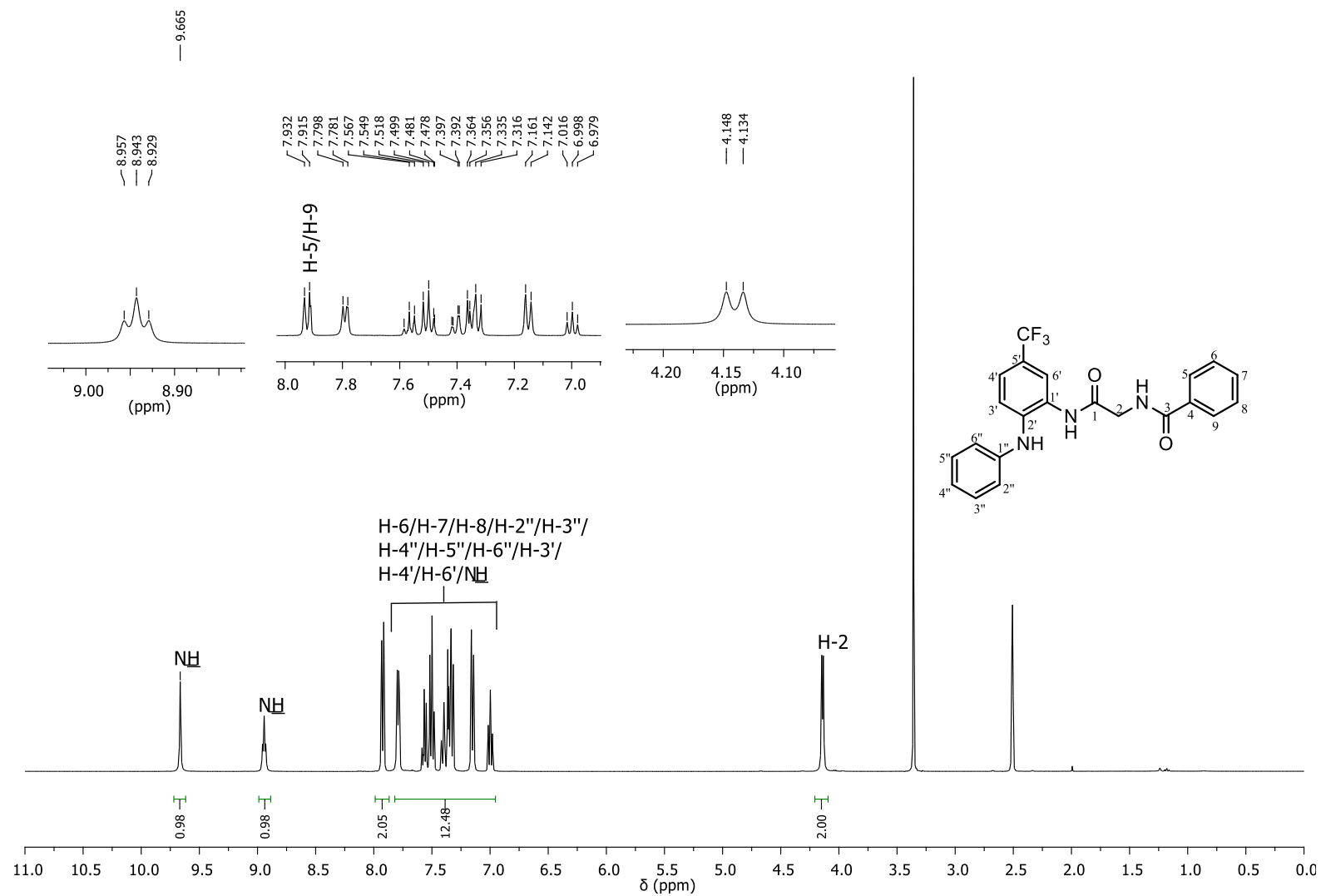


Figura 121 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **10g**.

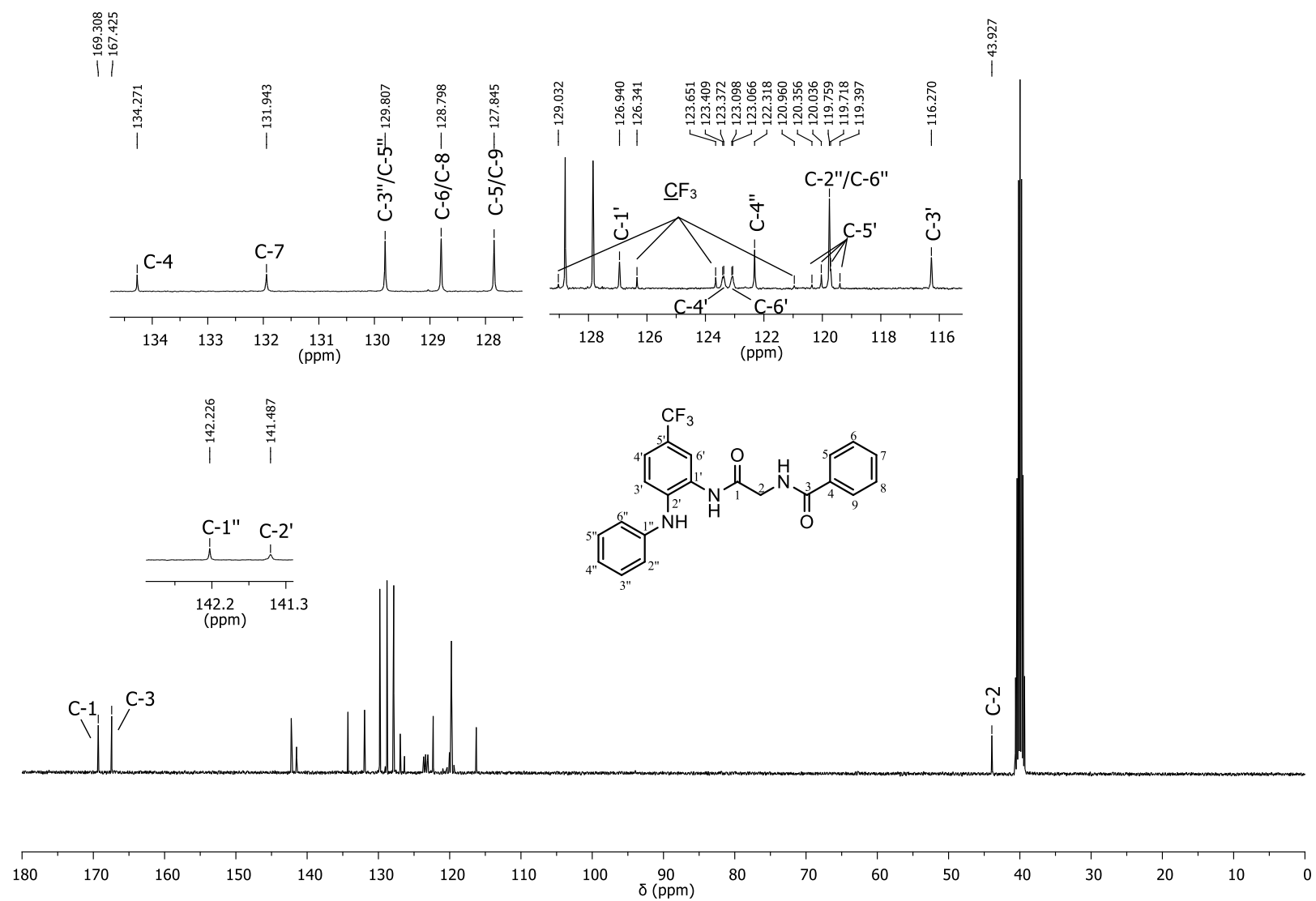


Figura 122 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10g**.

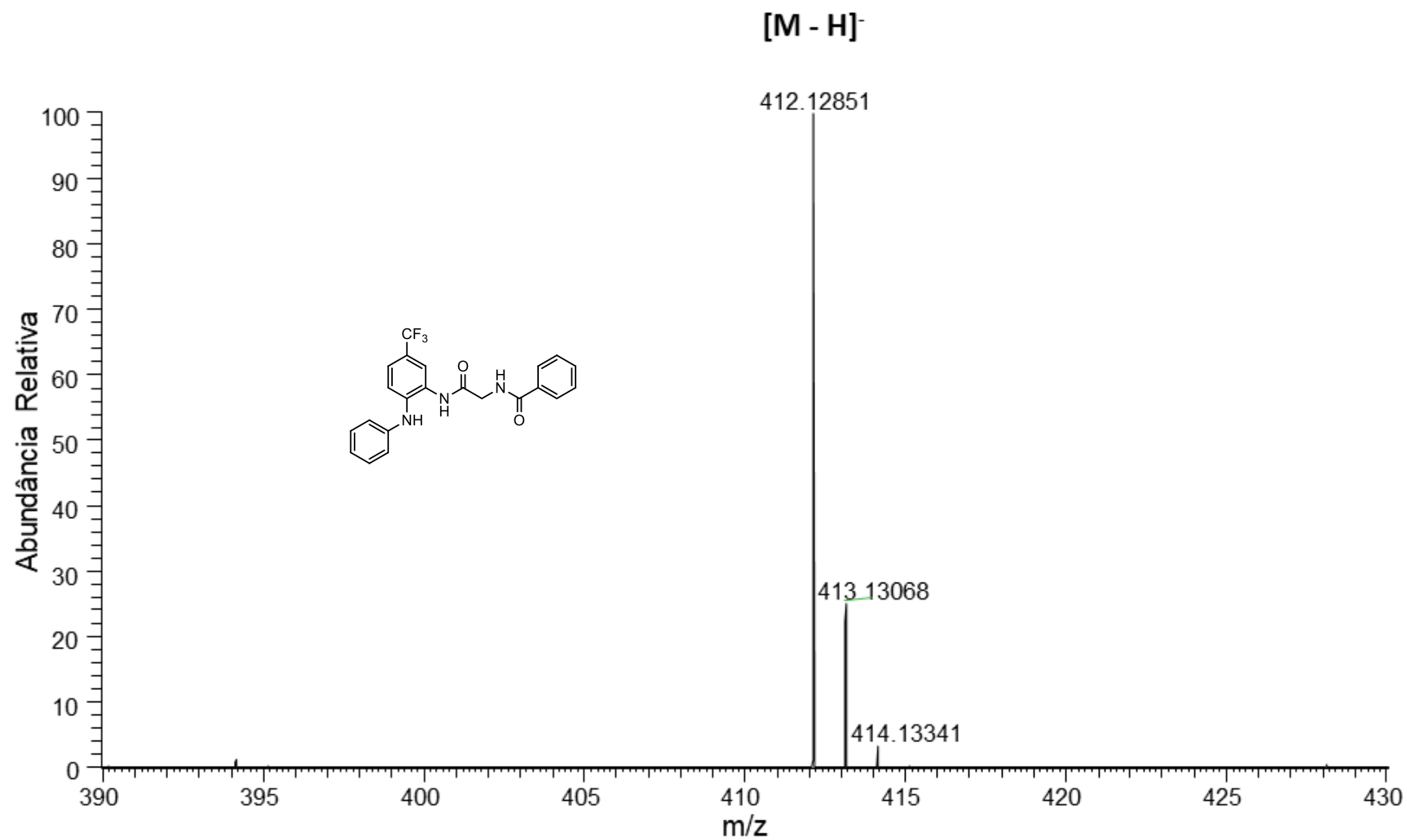


Figura 123 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10g**.

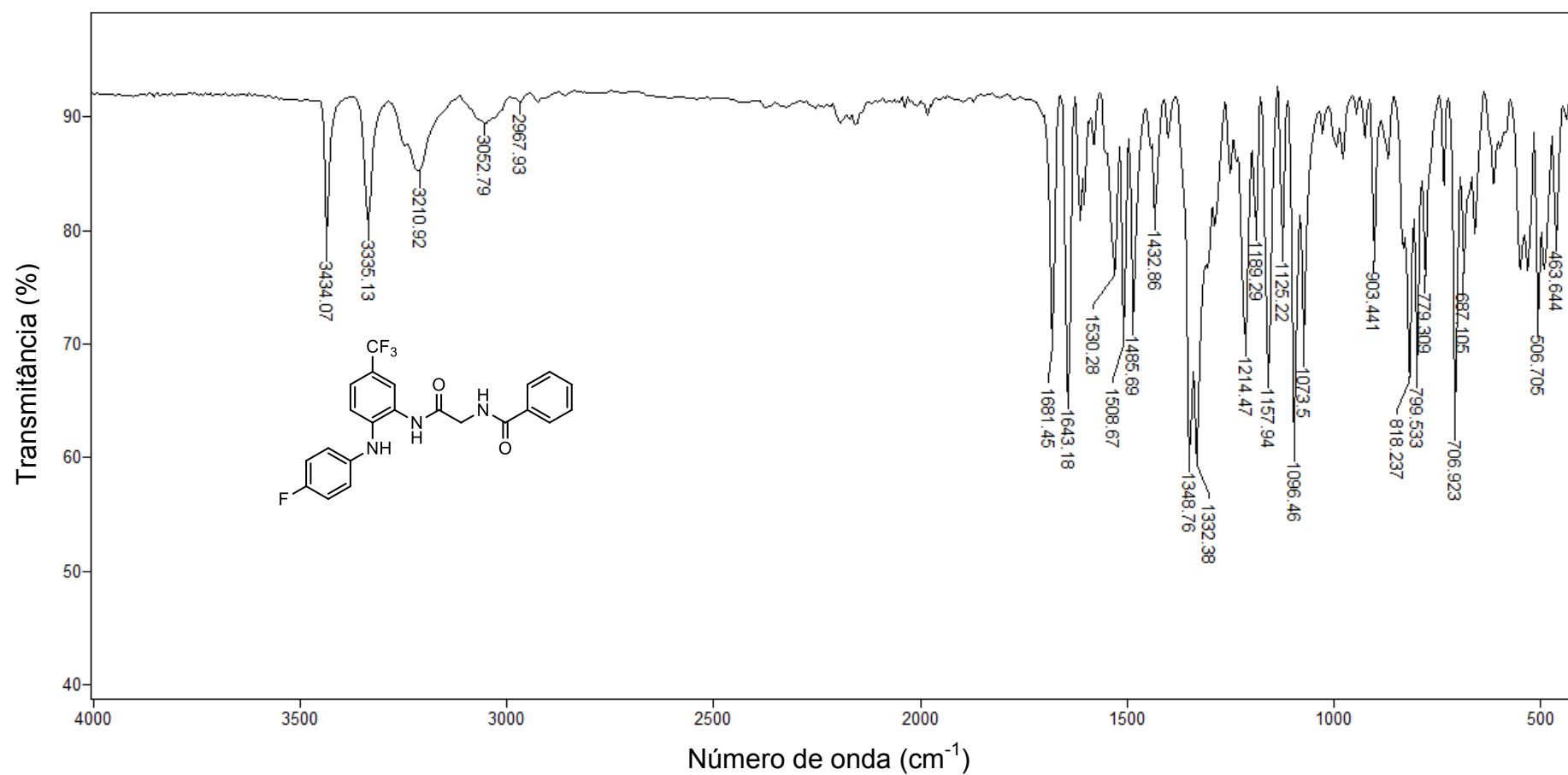


Figura 124 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10h**.

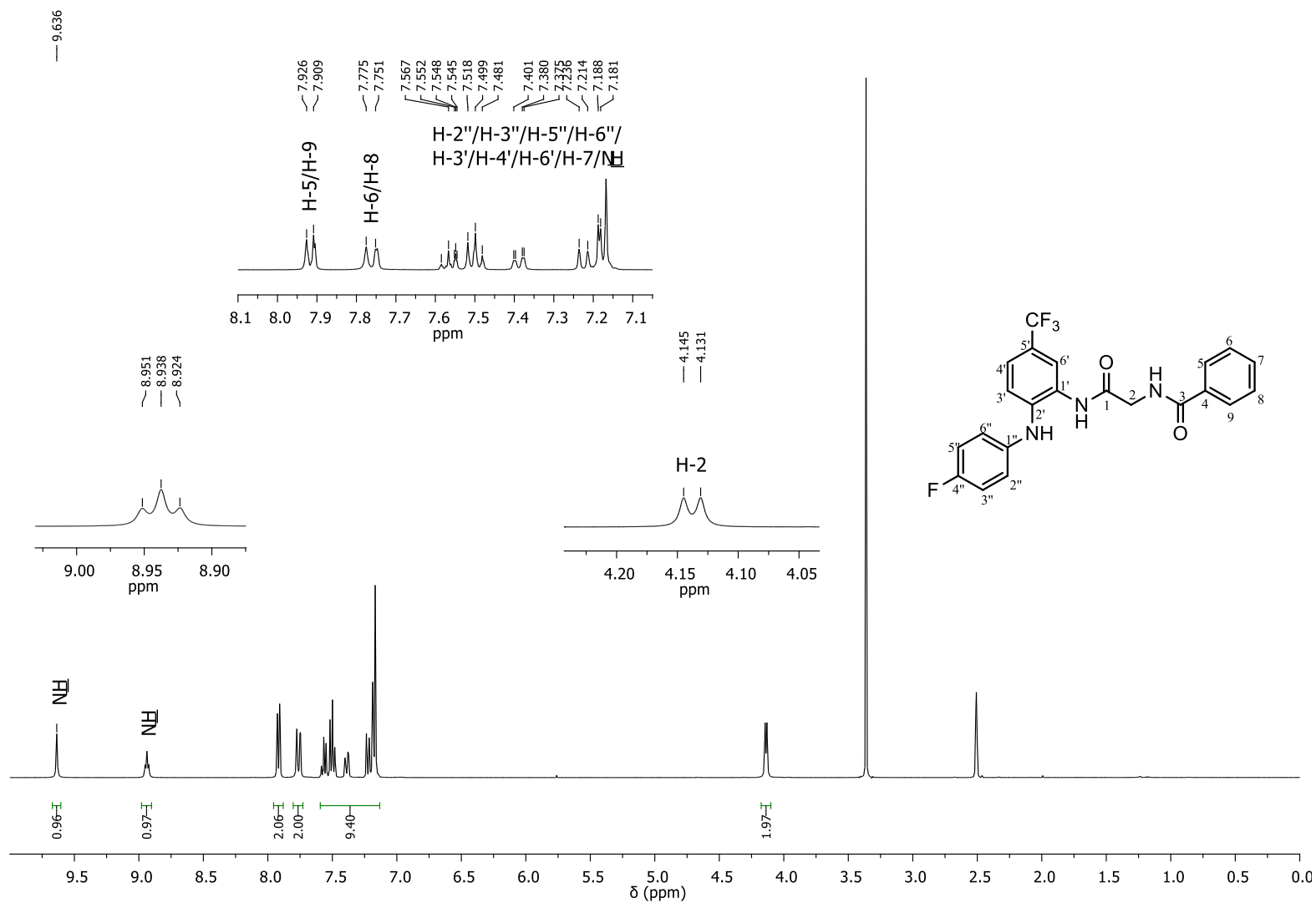


Figura 125 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) do composto **10h**.

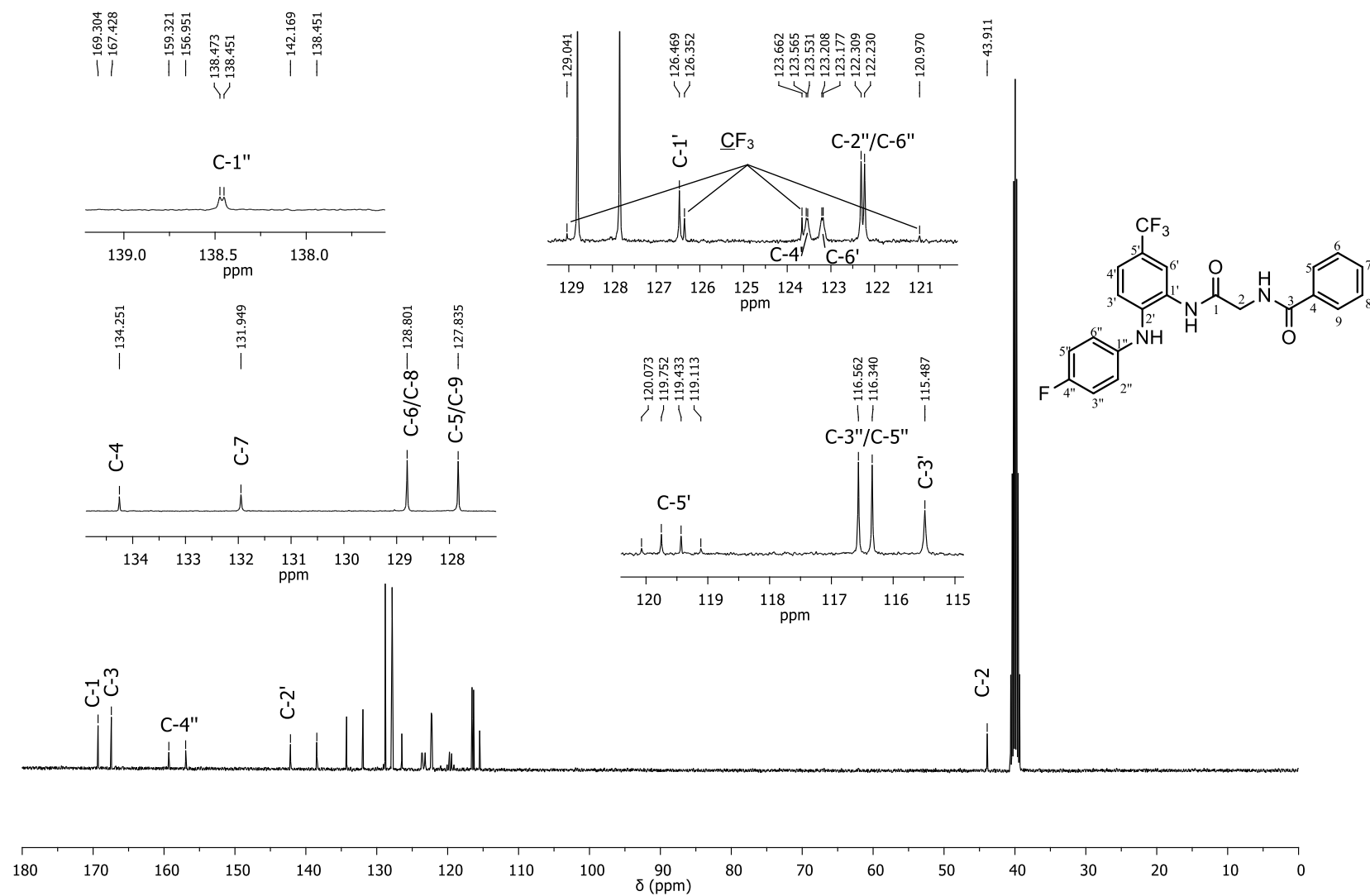


Figura 126 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10h**.

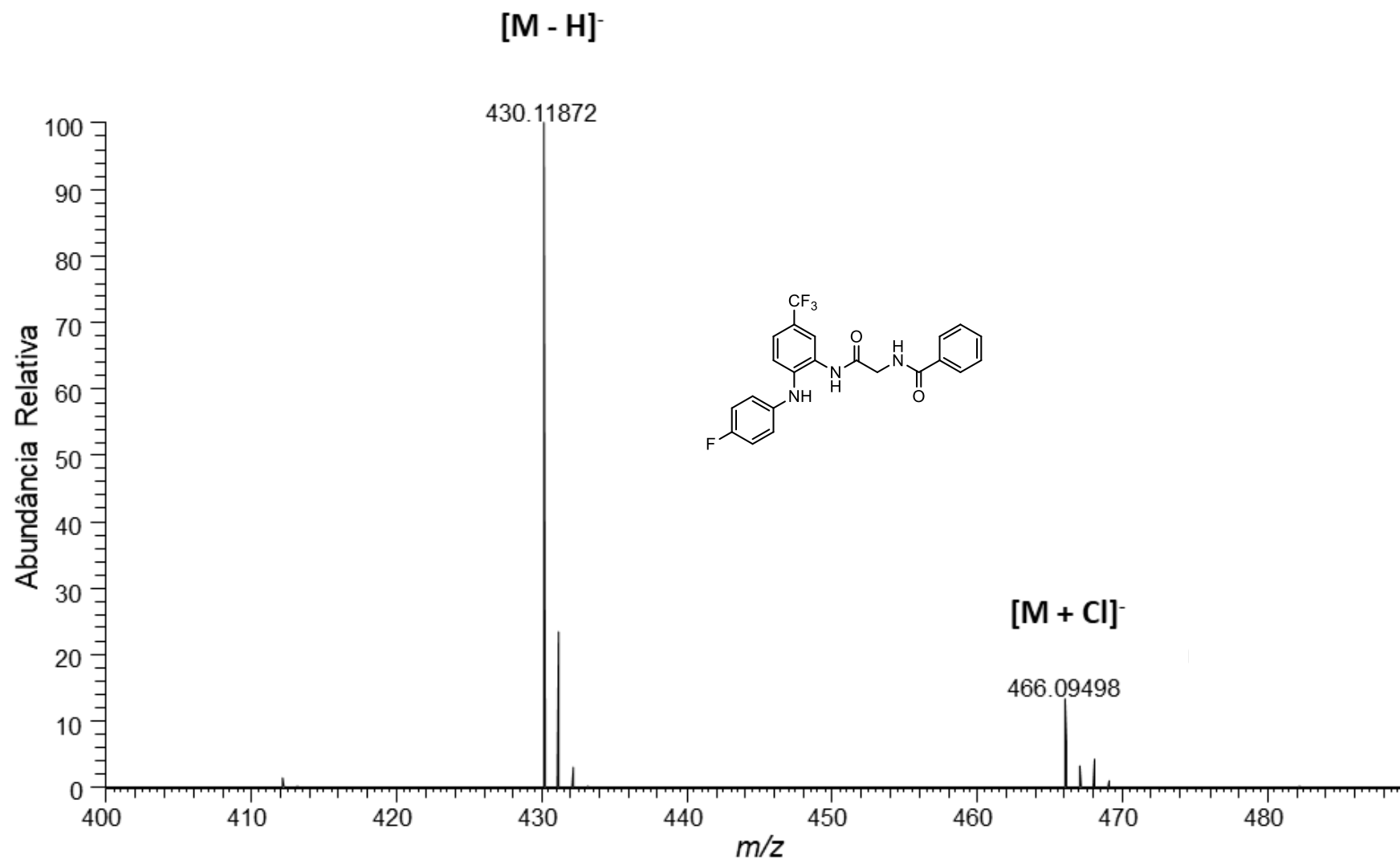


Figura 127 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10h**.

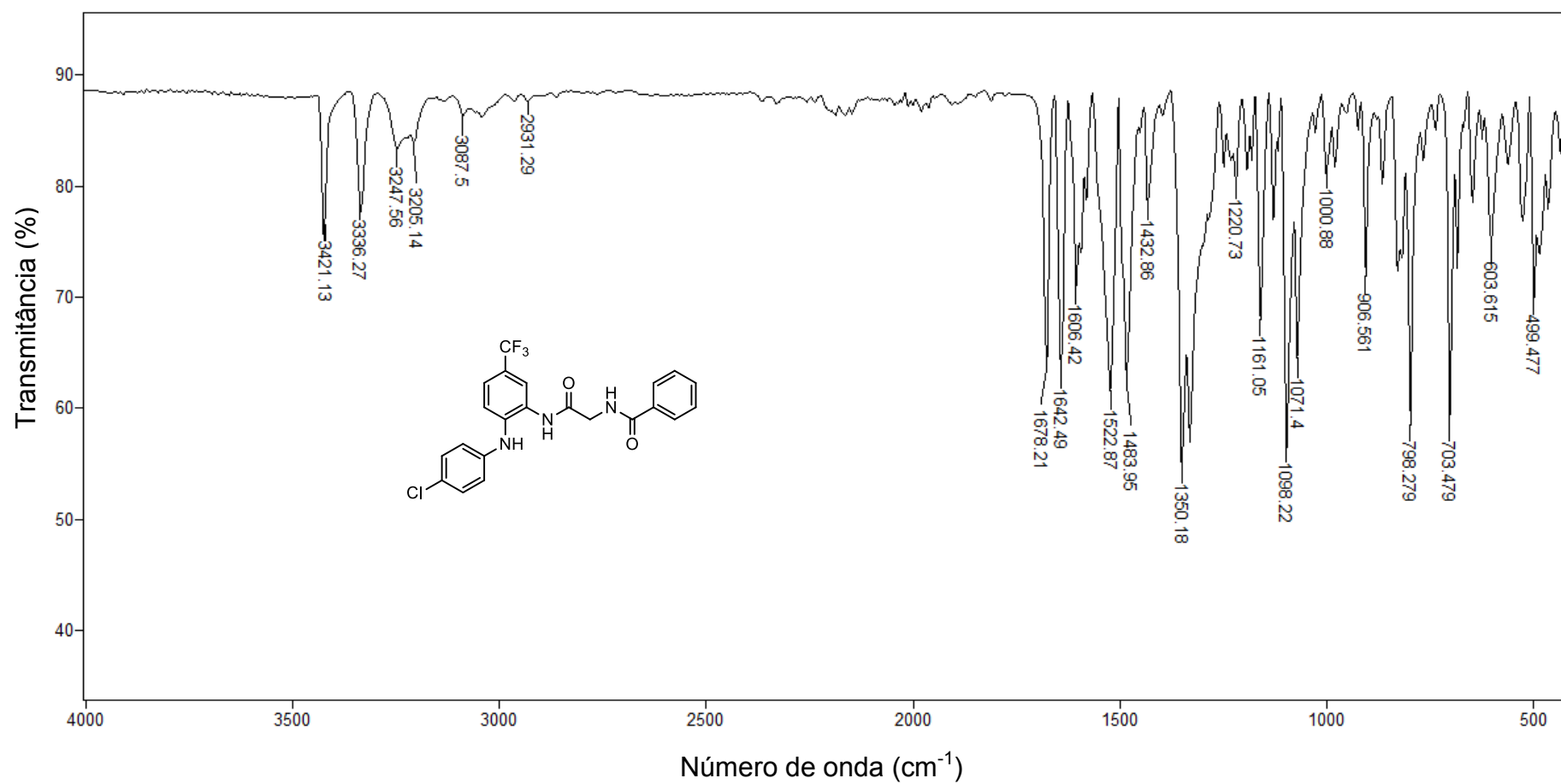


Figura 128 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10i**.

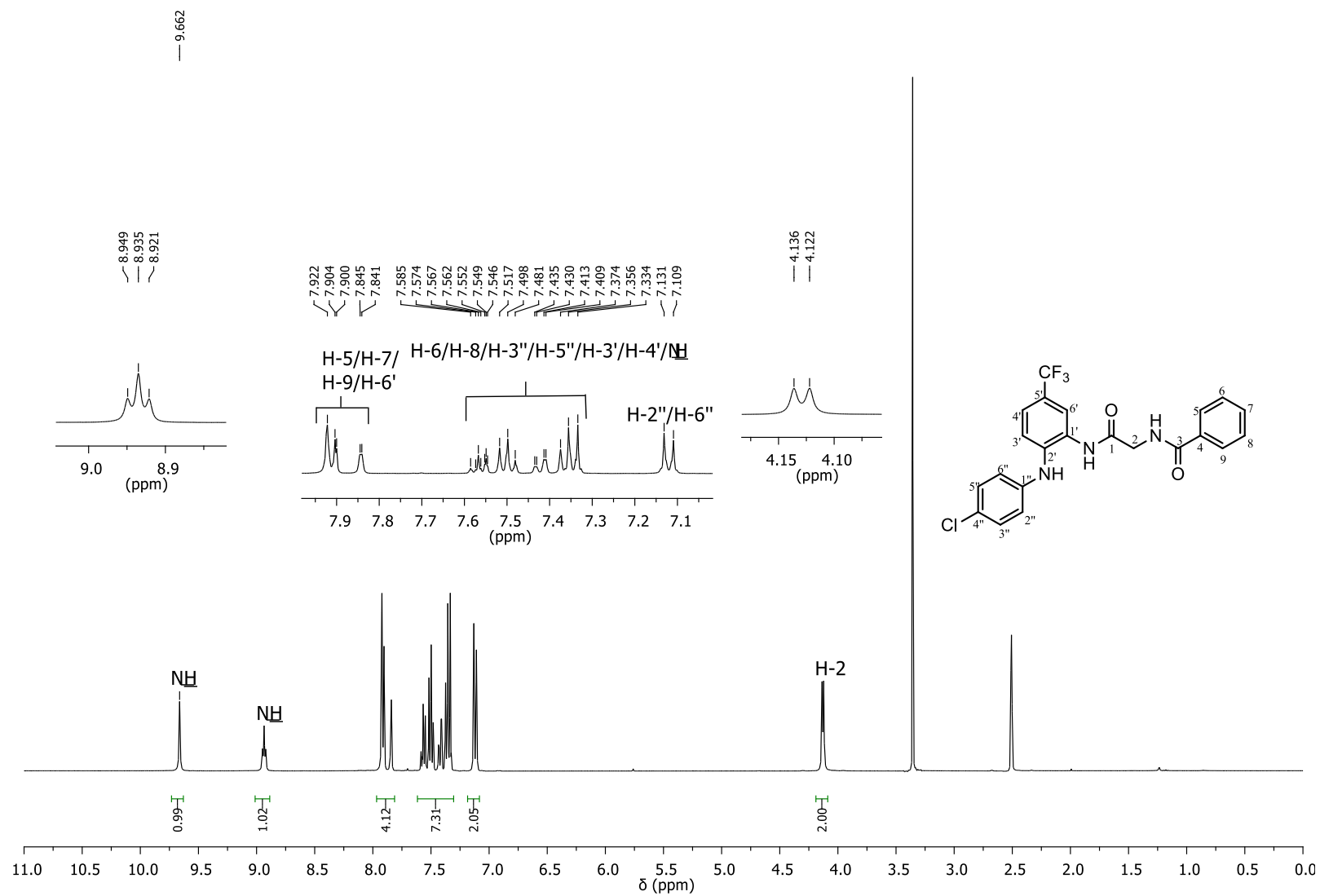


Figura 129 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **10i**.

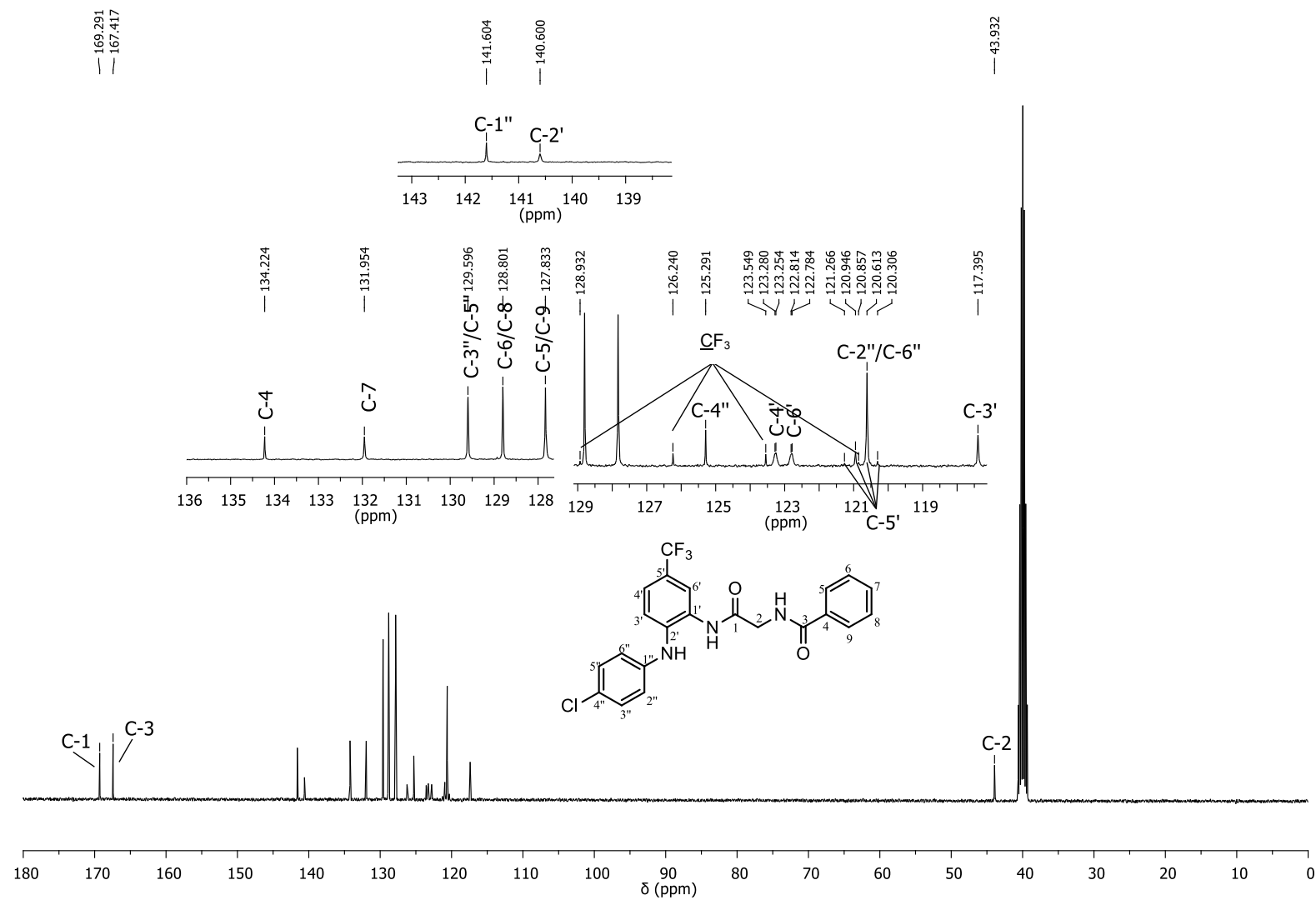


Figura 130 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10i**.

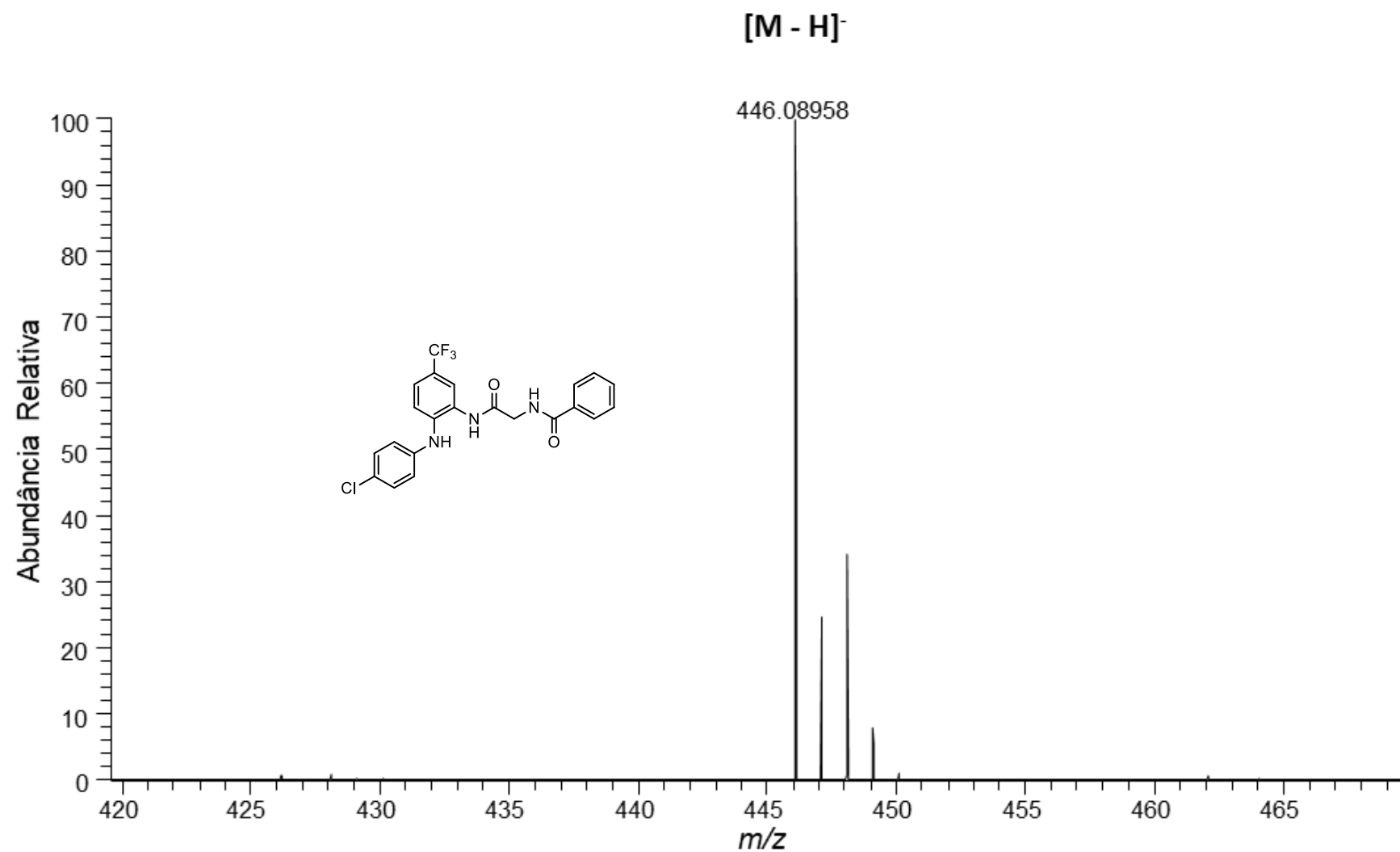


Figura 131 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10i**.

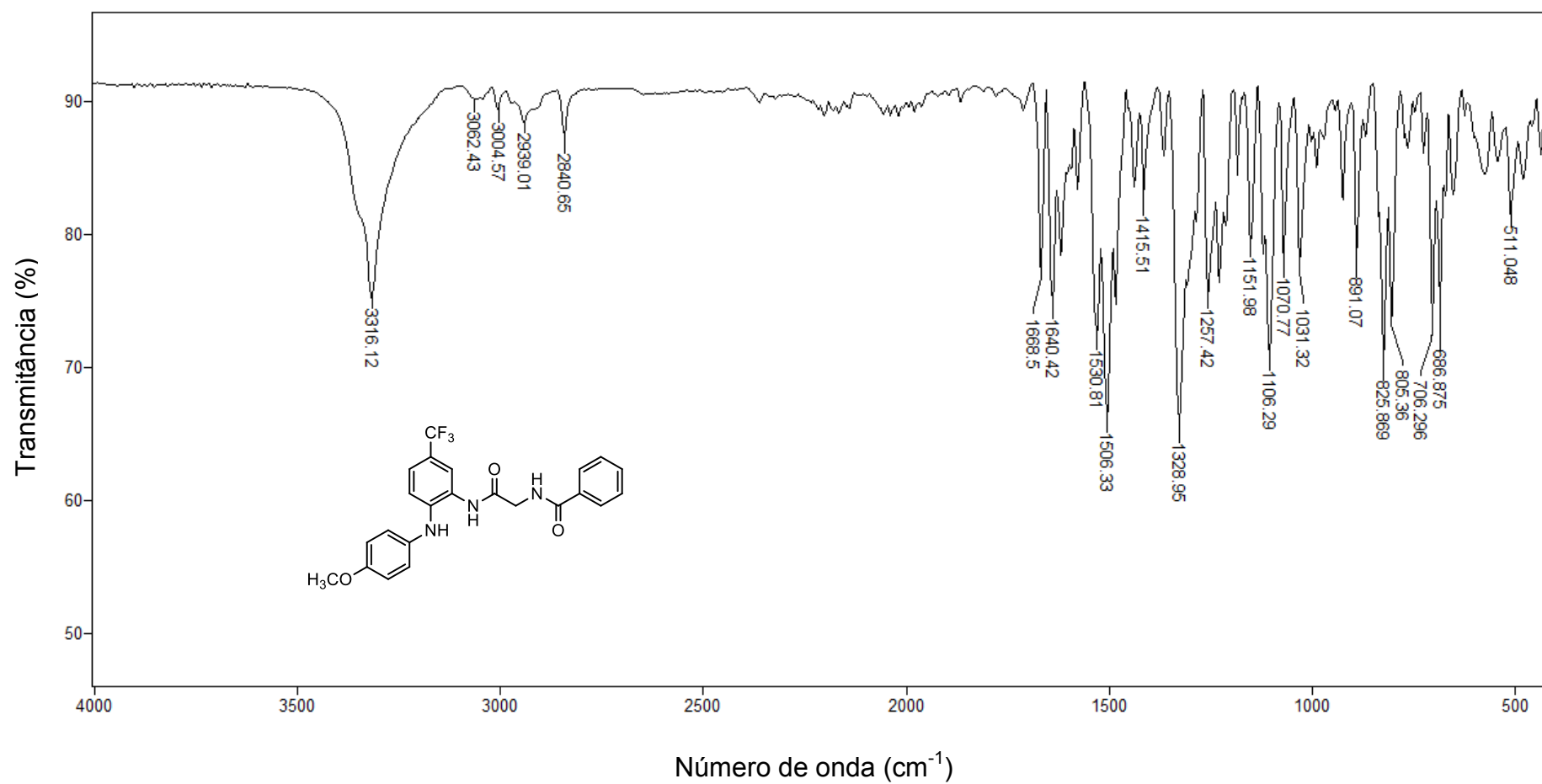


Figura 132 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10j**.

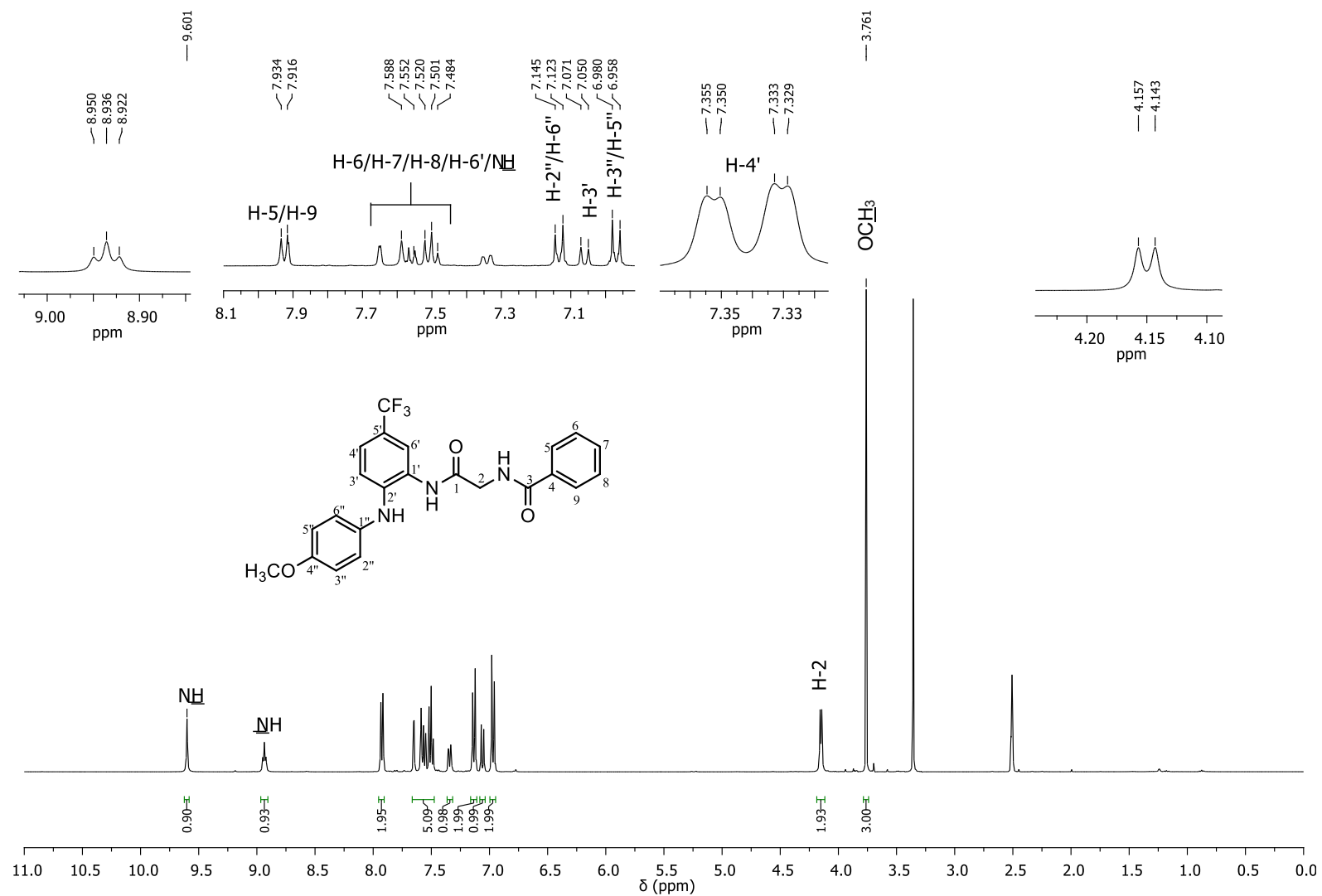


Figura 133 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **10j**.

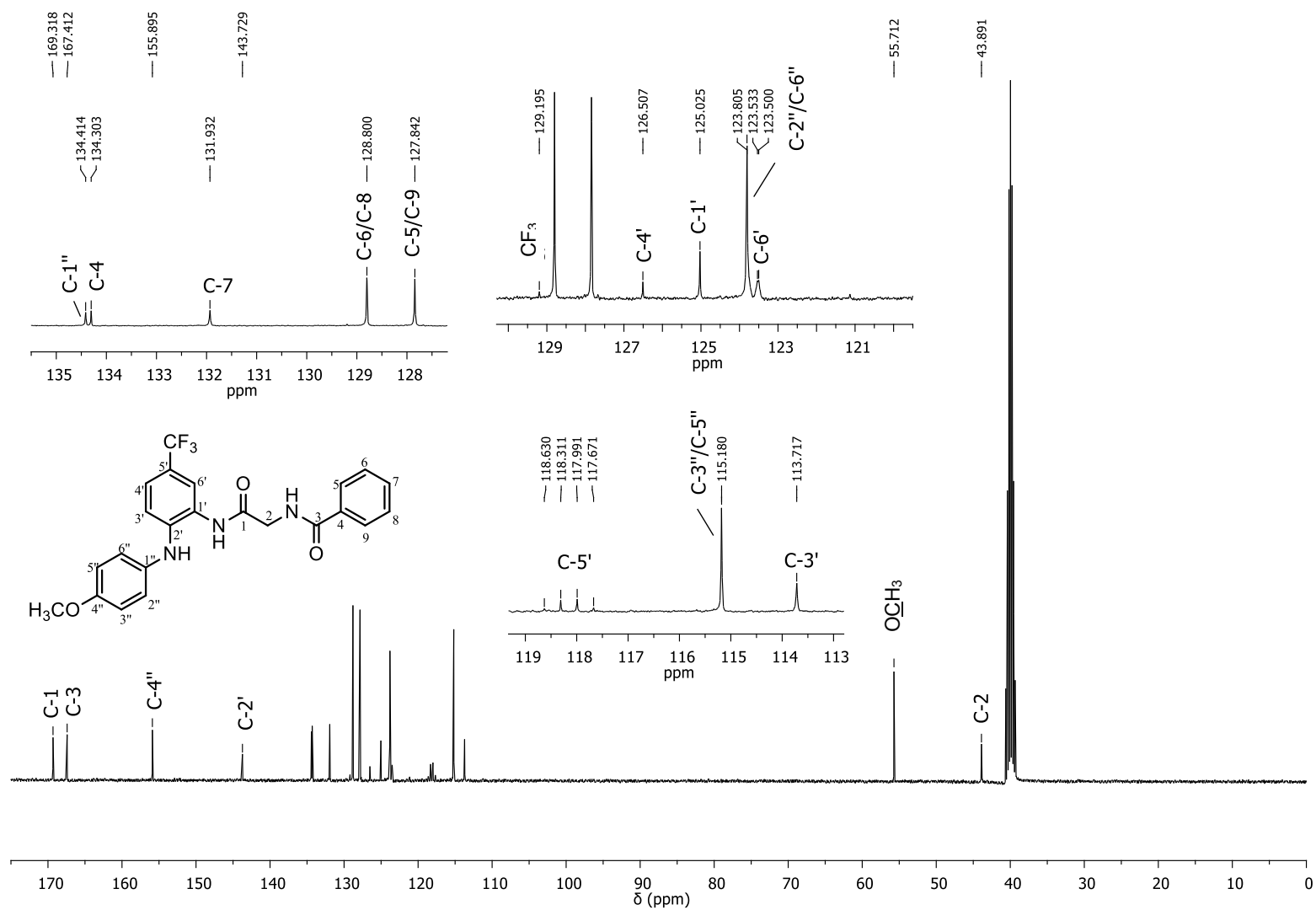


Figura 134 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10j**.

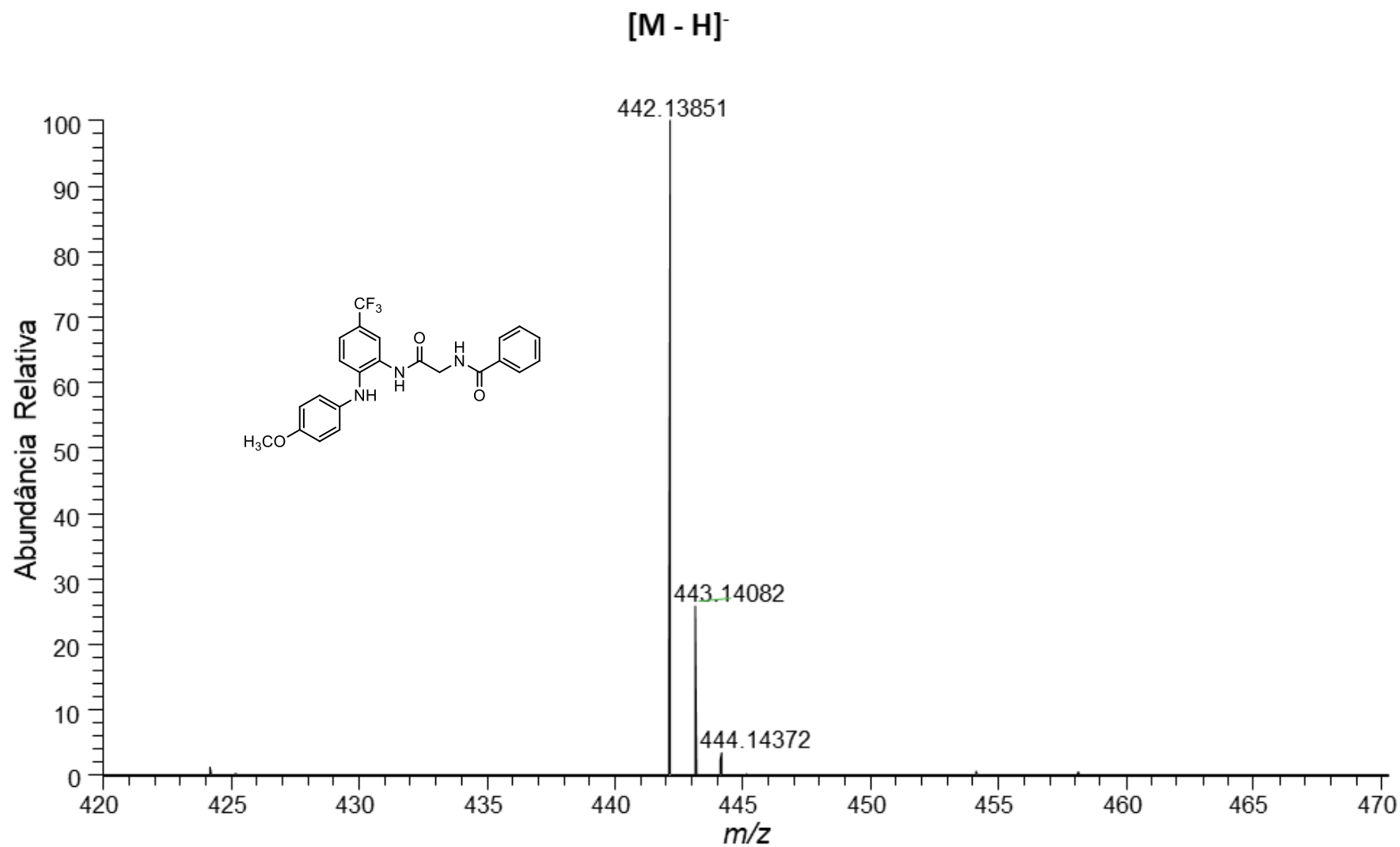


Figura 135 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10j**.

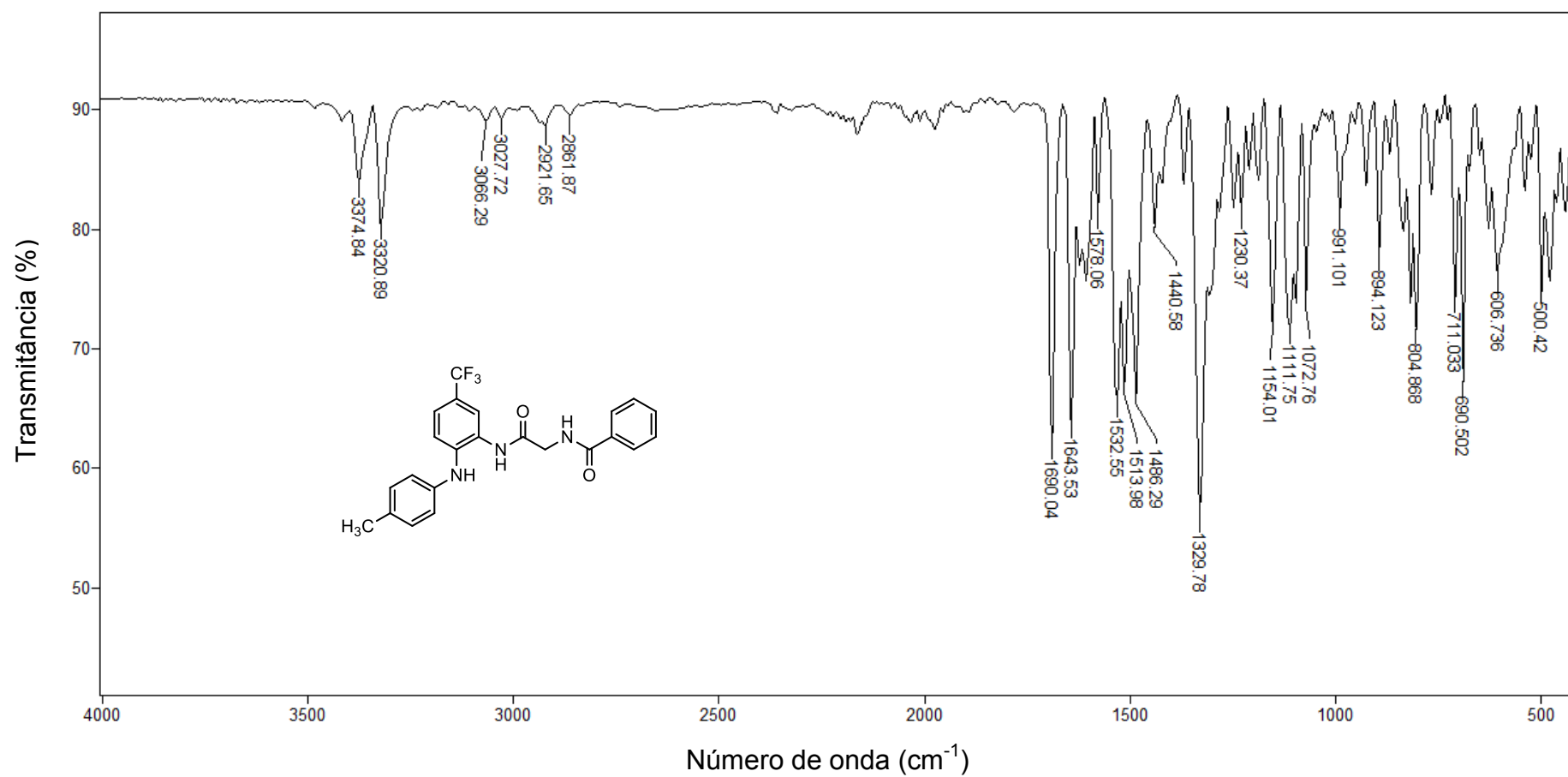


Figura 136 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10k**.

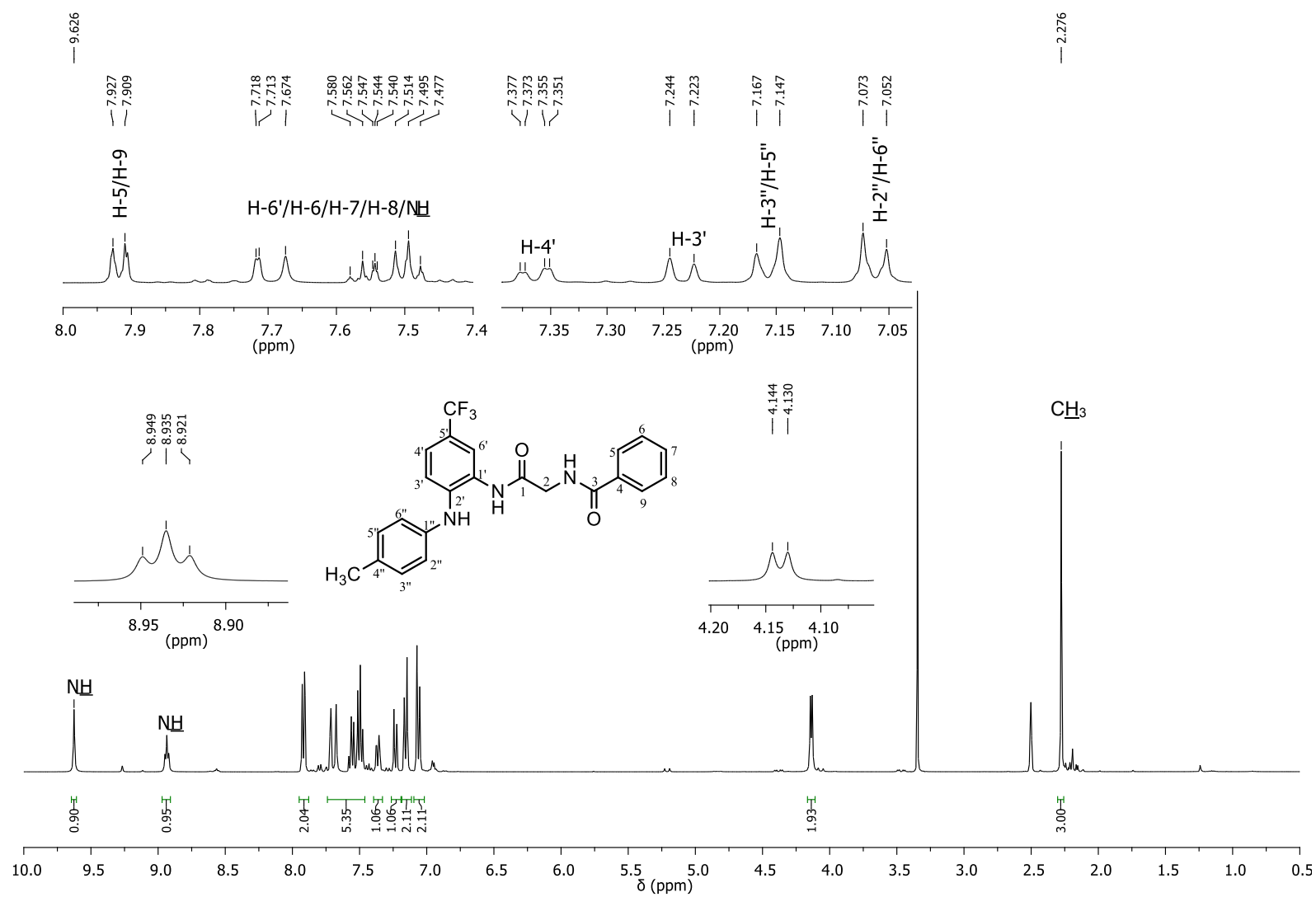


Figura 137 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) do composto **10k**.

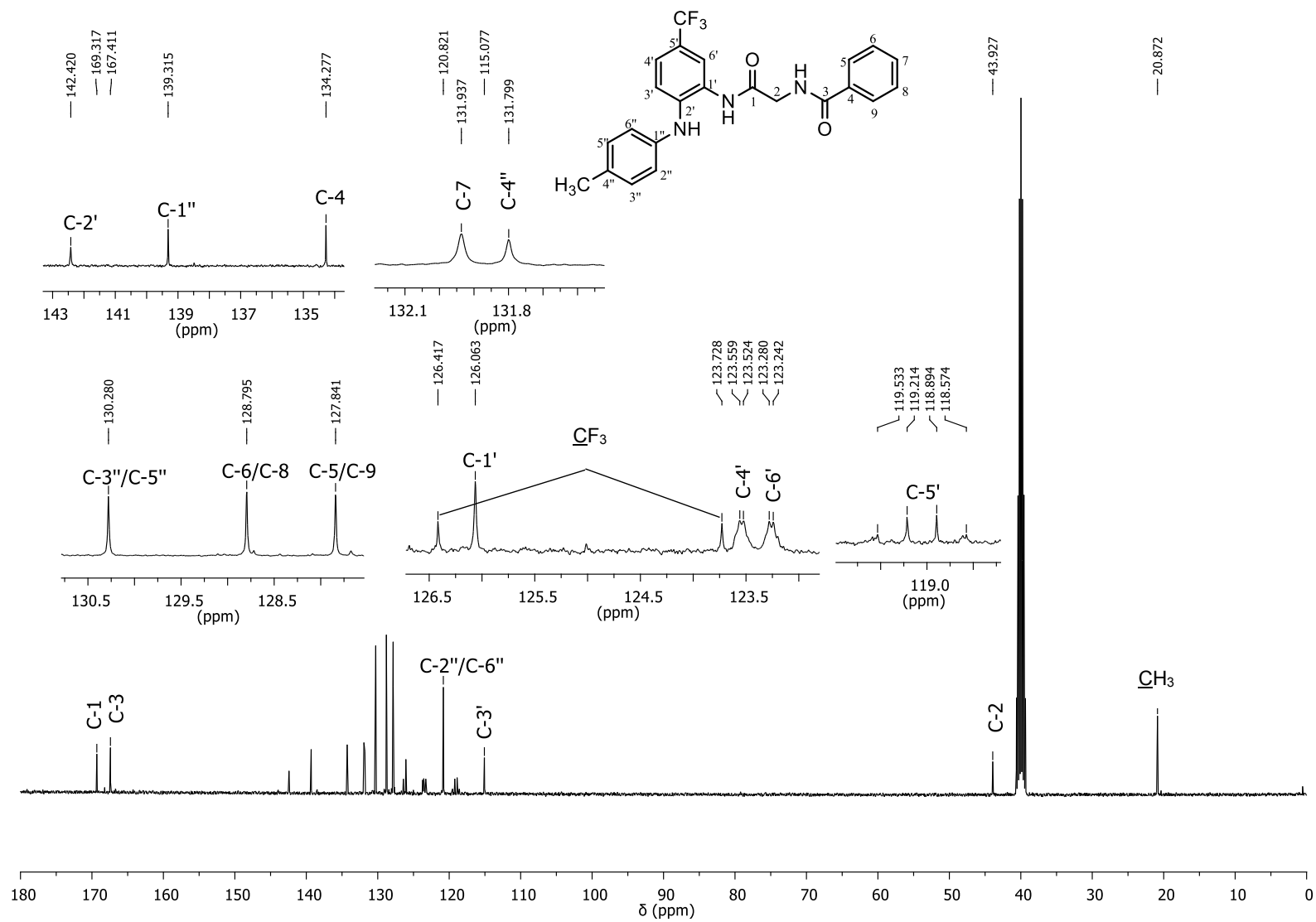


Figura 138 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **10k**.

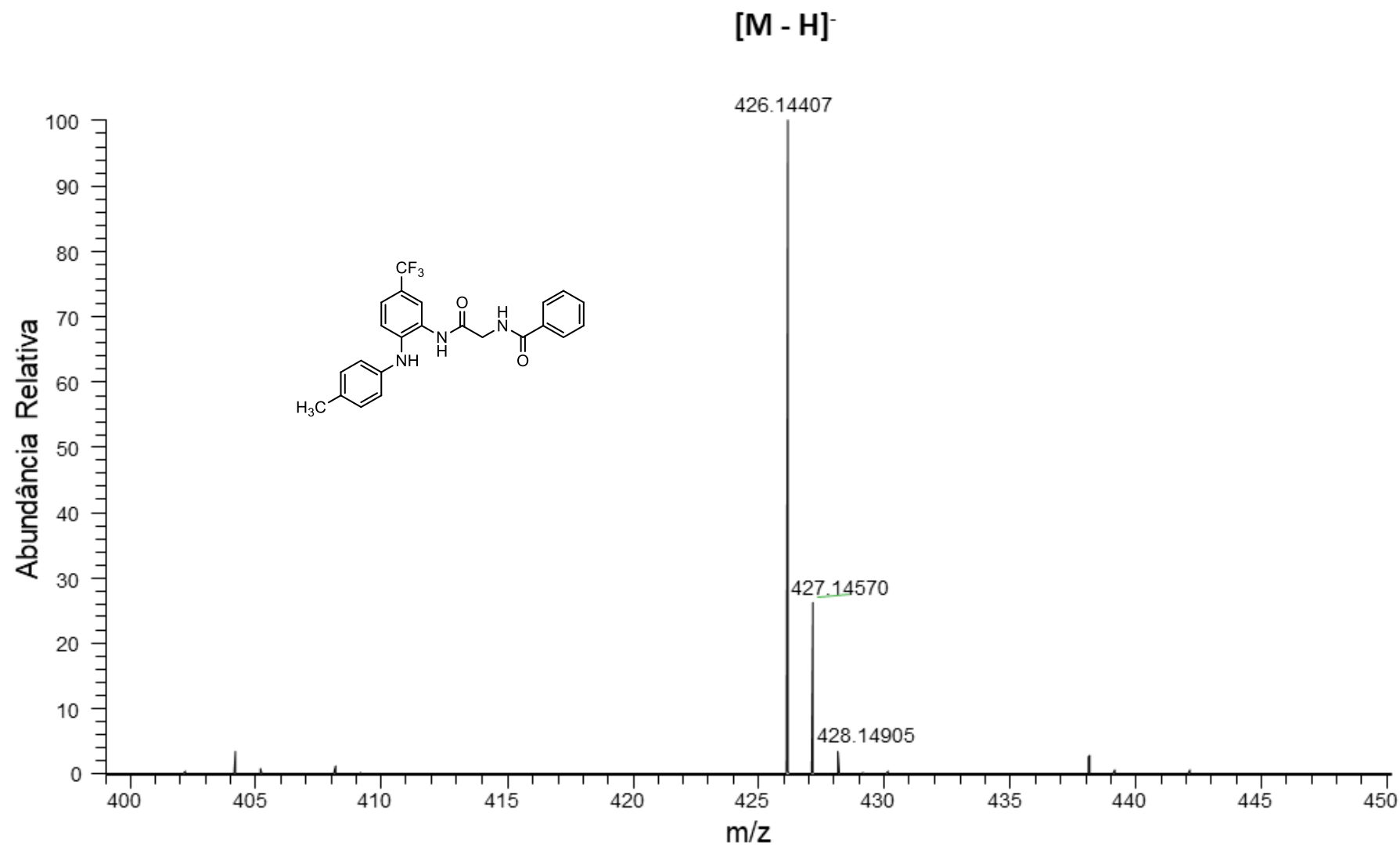


Figura 139 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10k**.

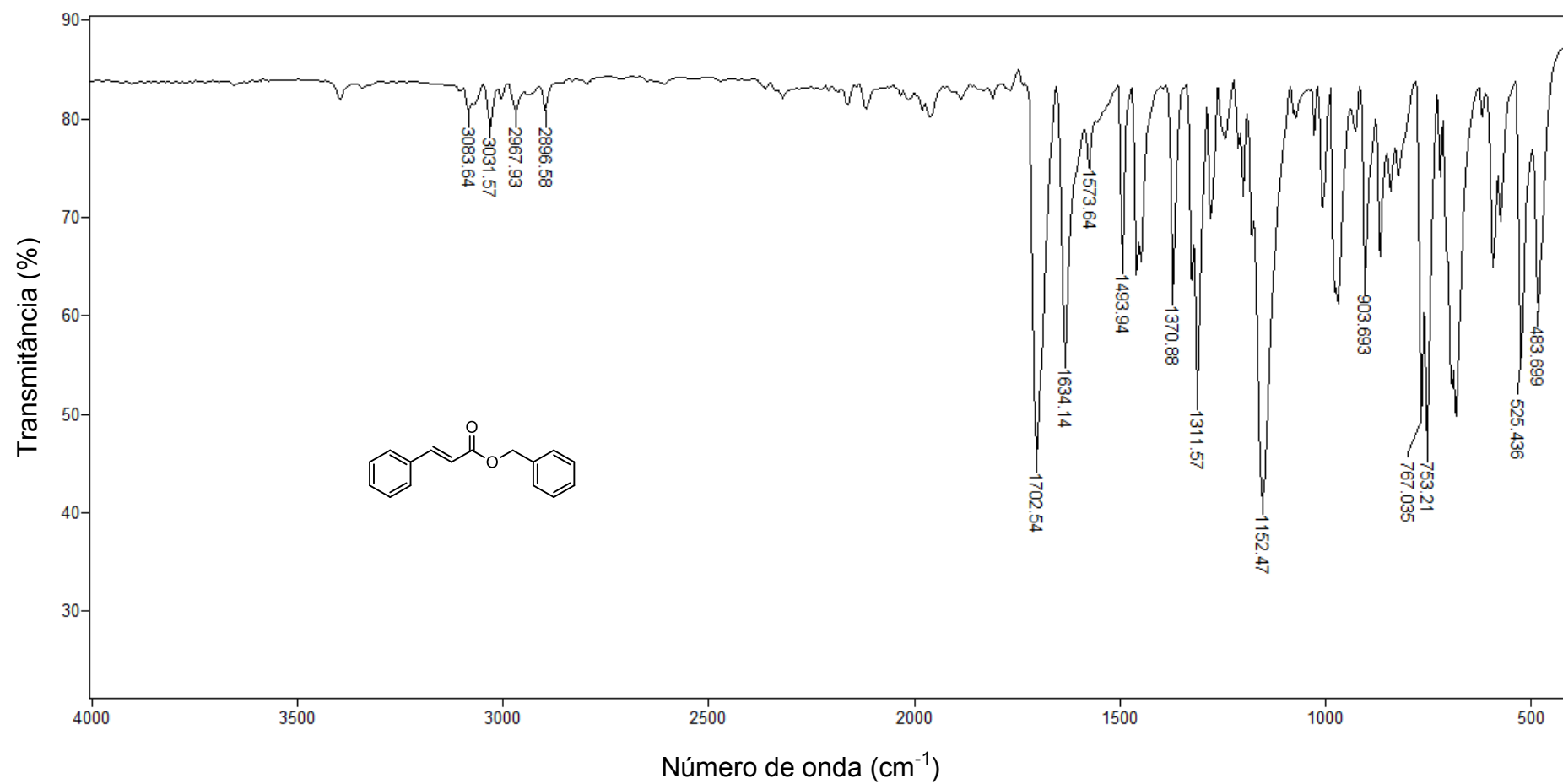


Figura 140 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13a**.

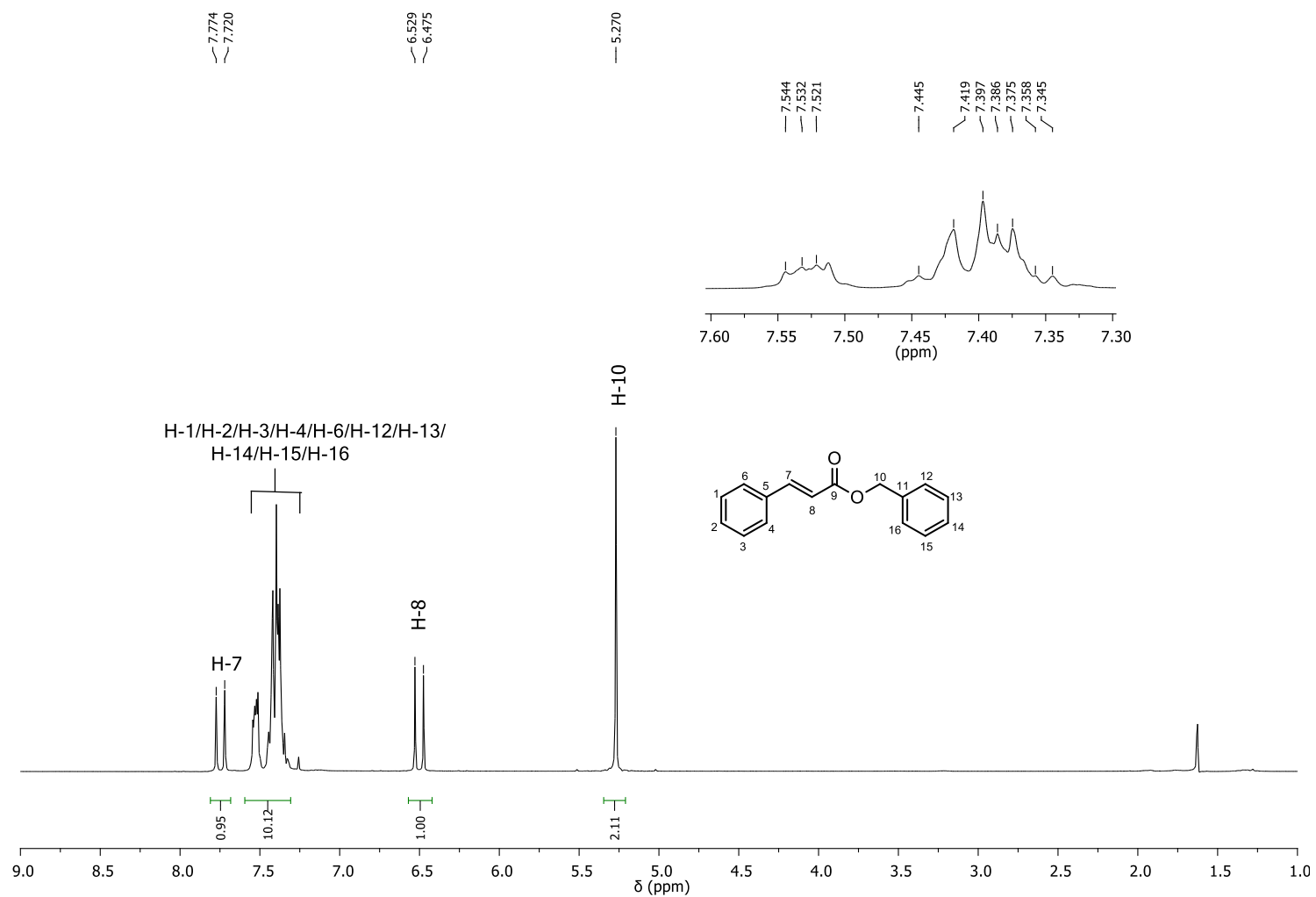


Figura 141 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **13a**.

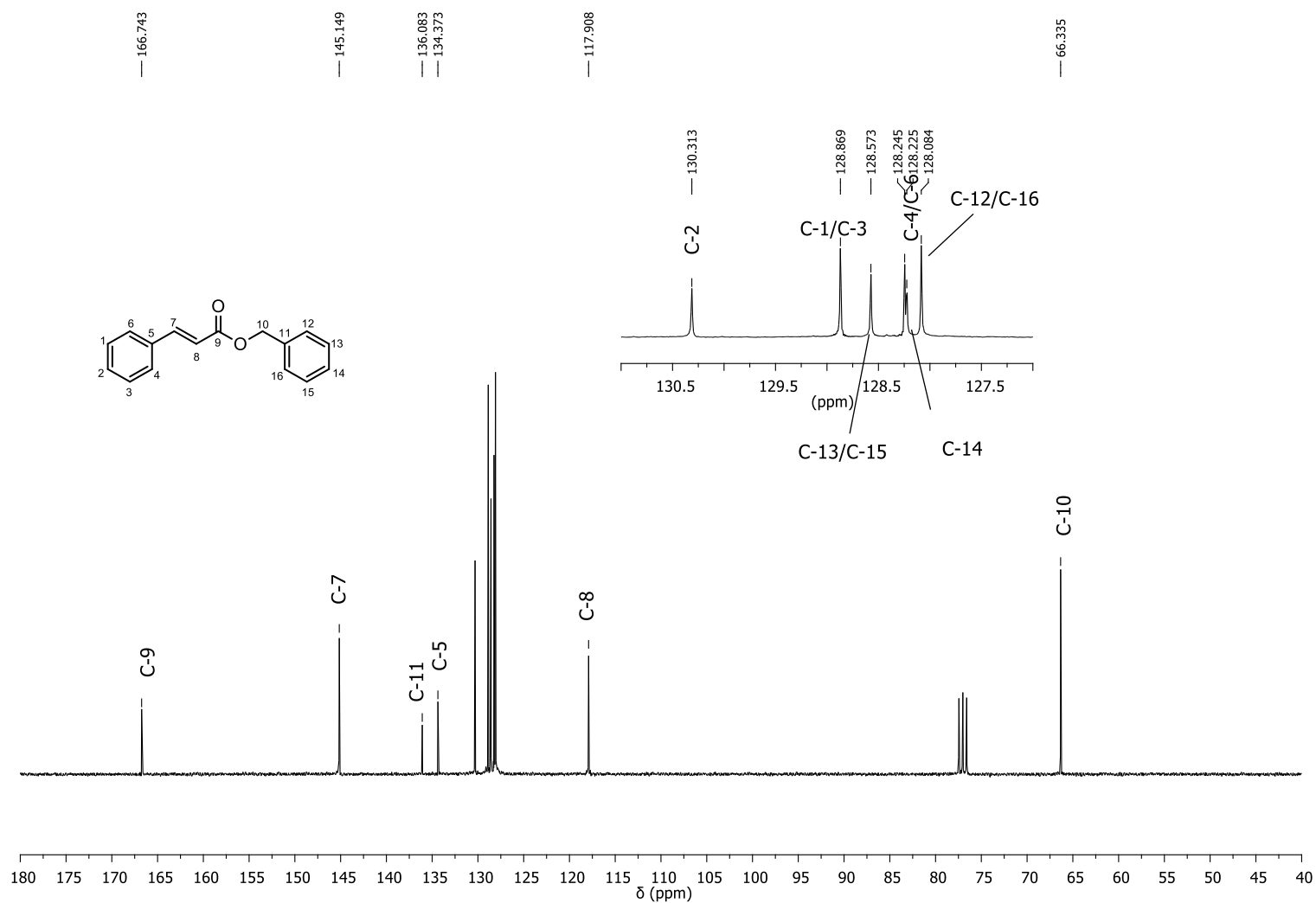


Figura 142 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13a**.

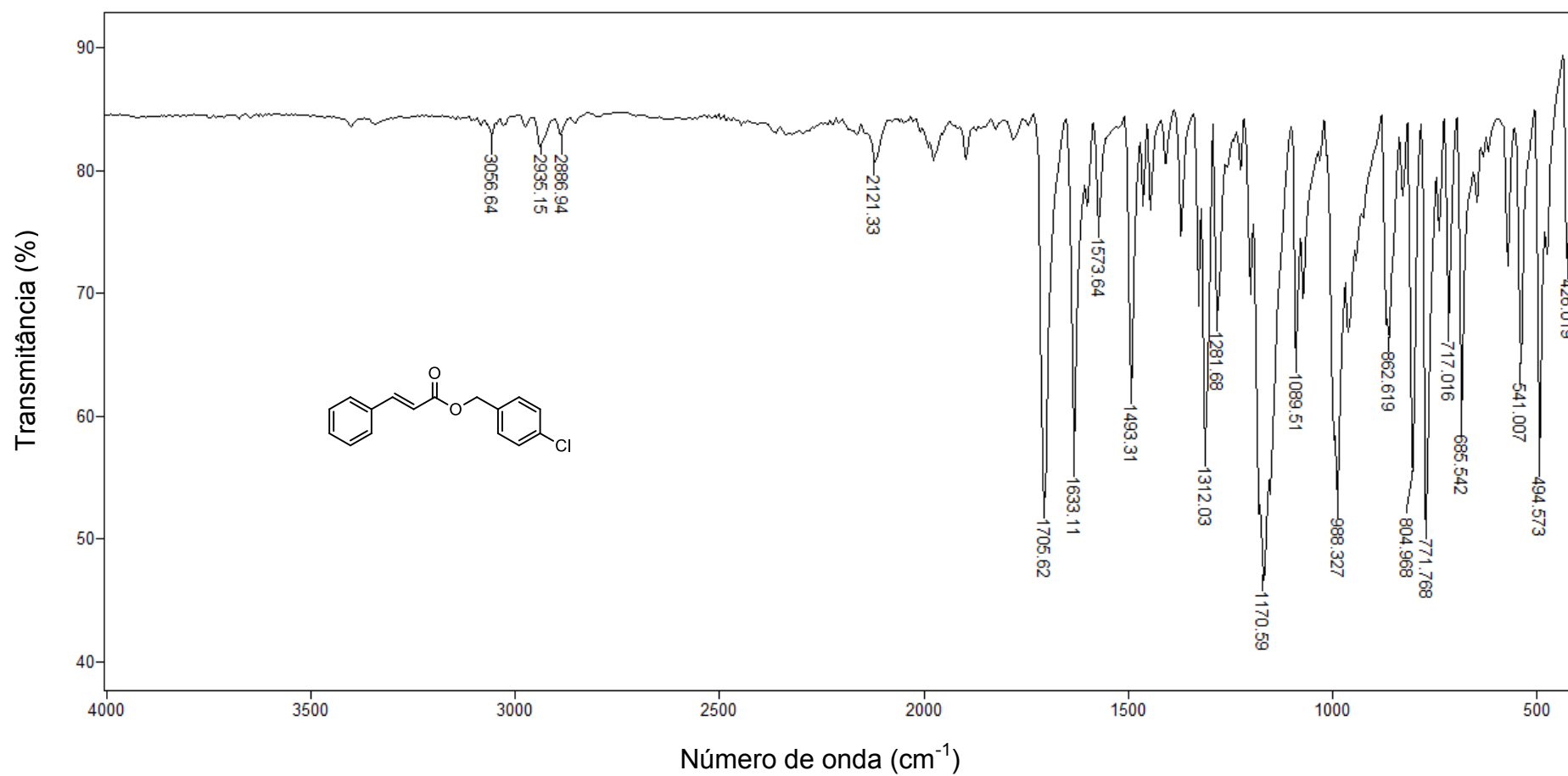


Figura 143 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13b**.

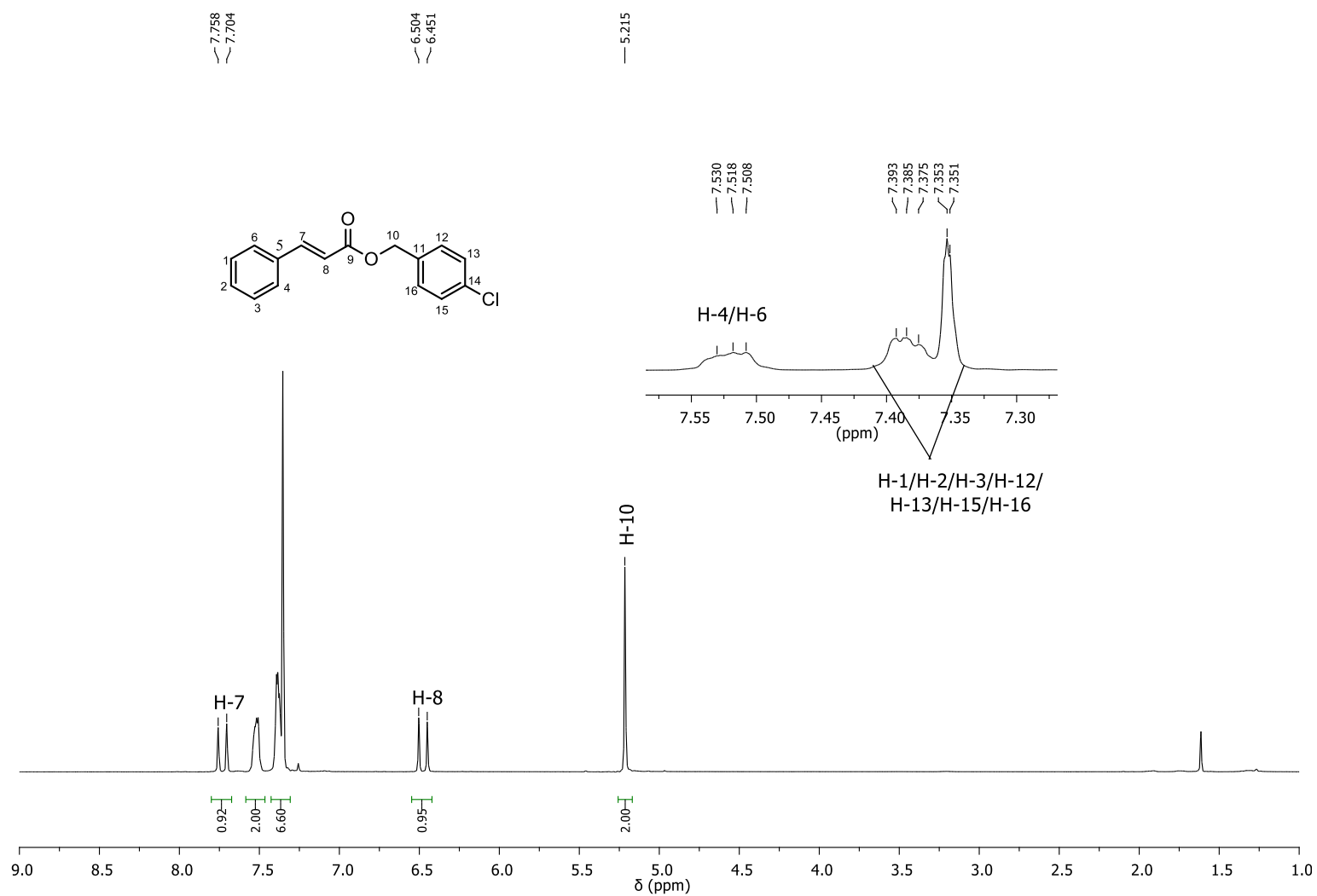


Figura 144 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl₃) do composto **13b**.

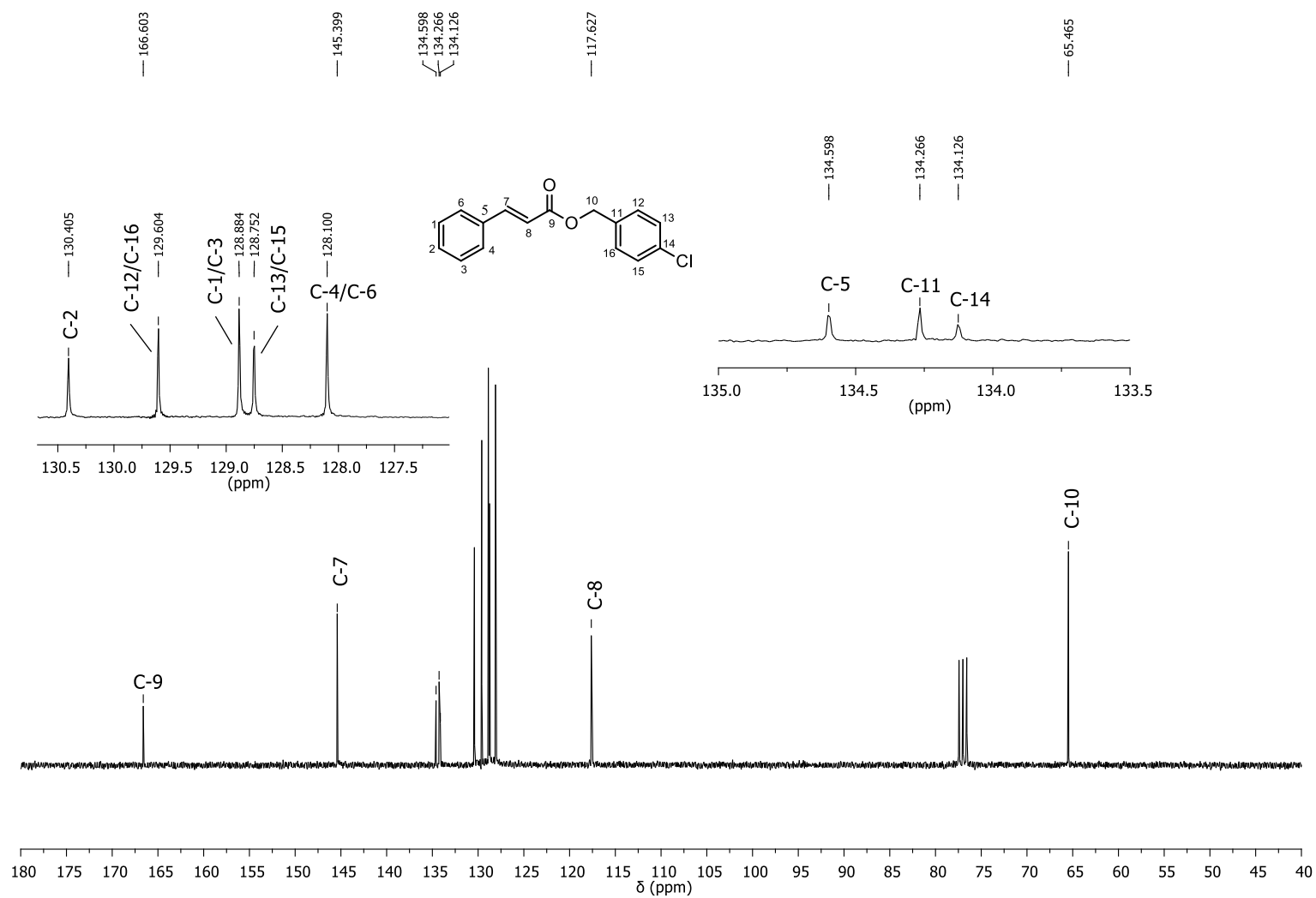


Figura 145 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13b**.

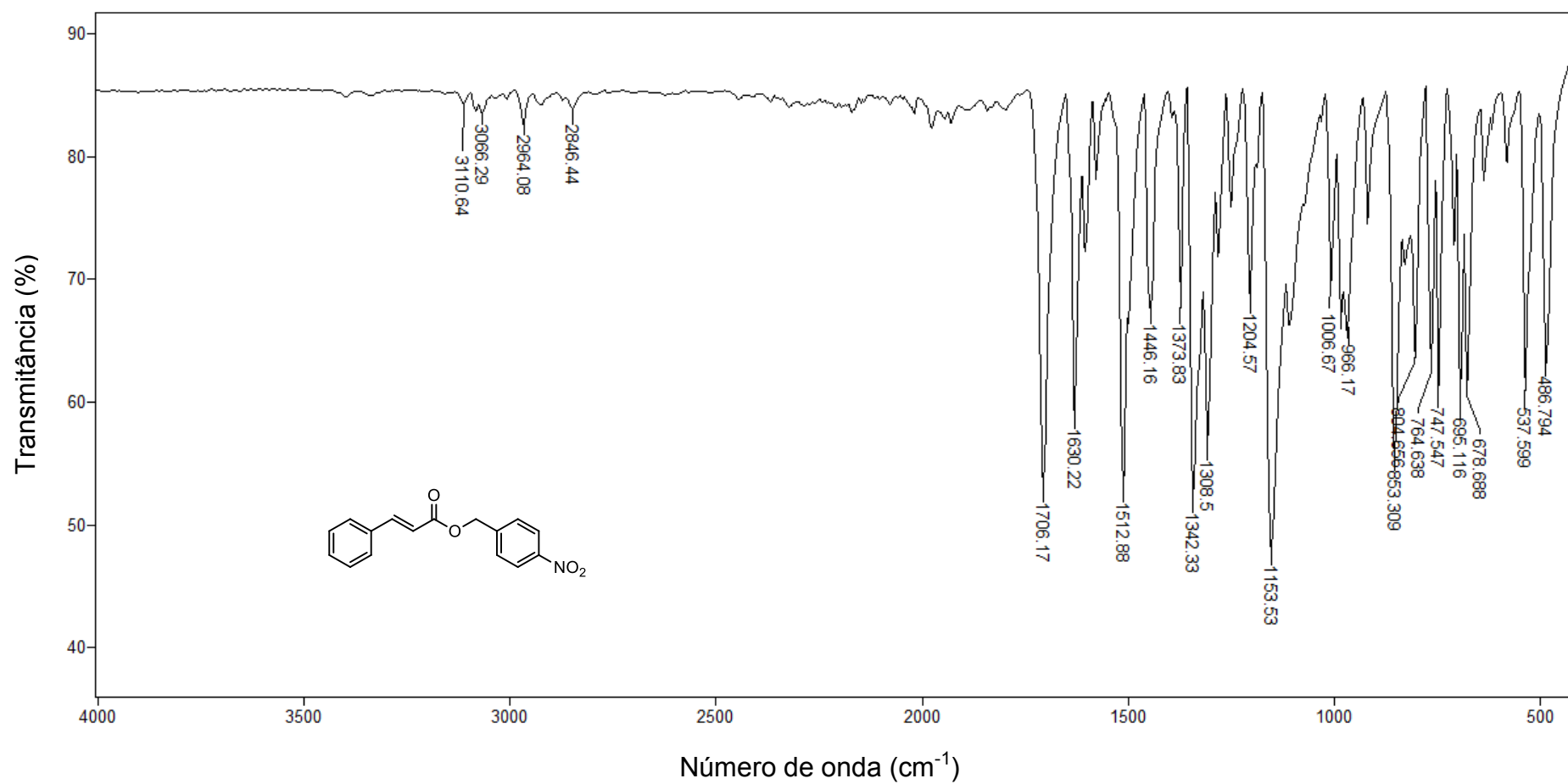


Figura 146 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13c**.

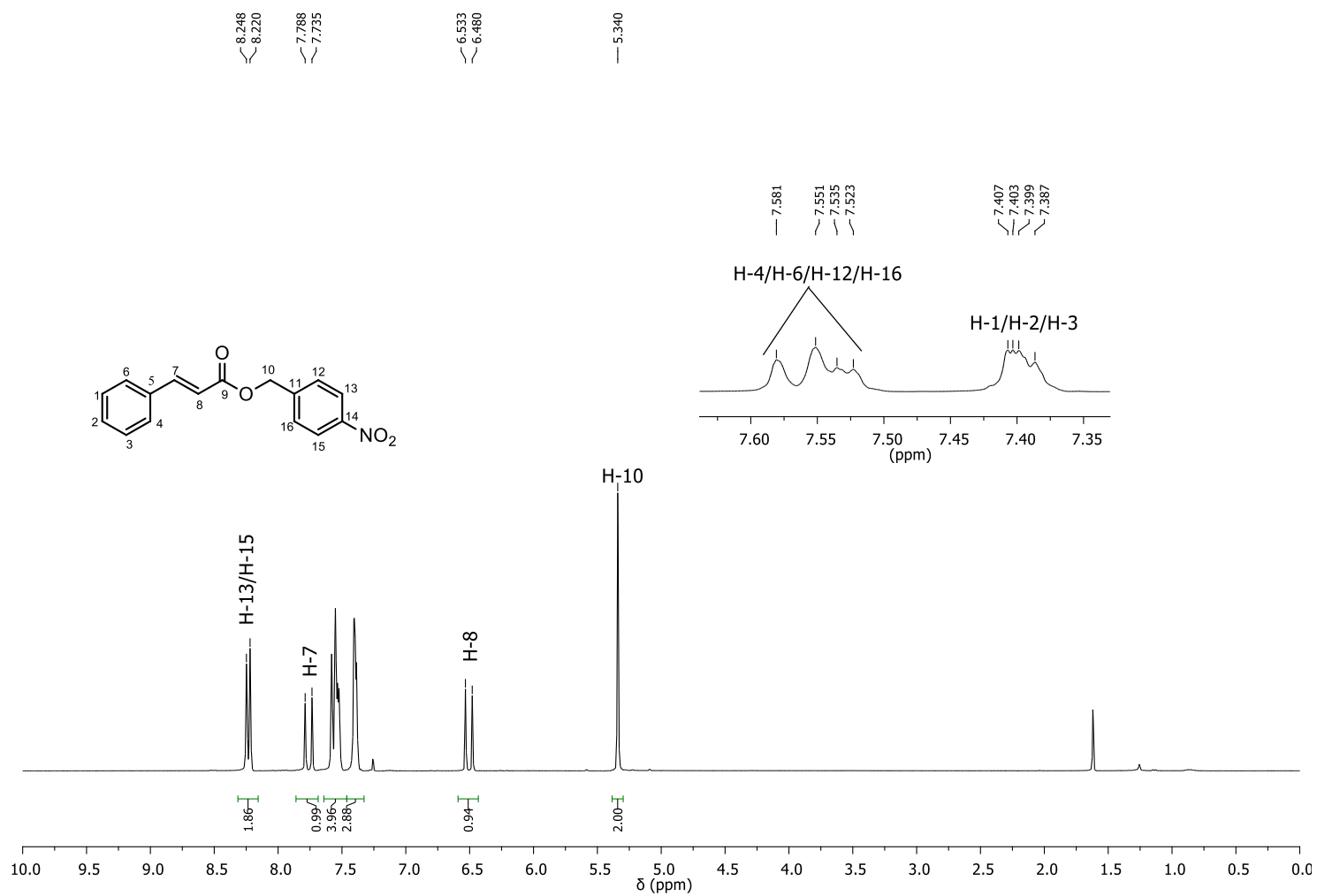


Figura 147 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **13c**.

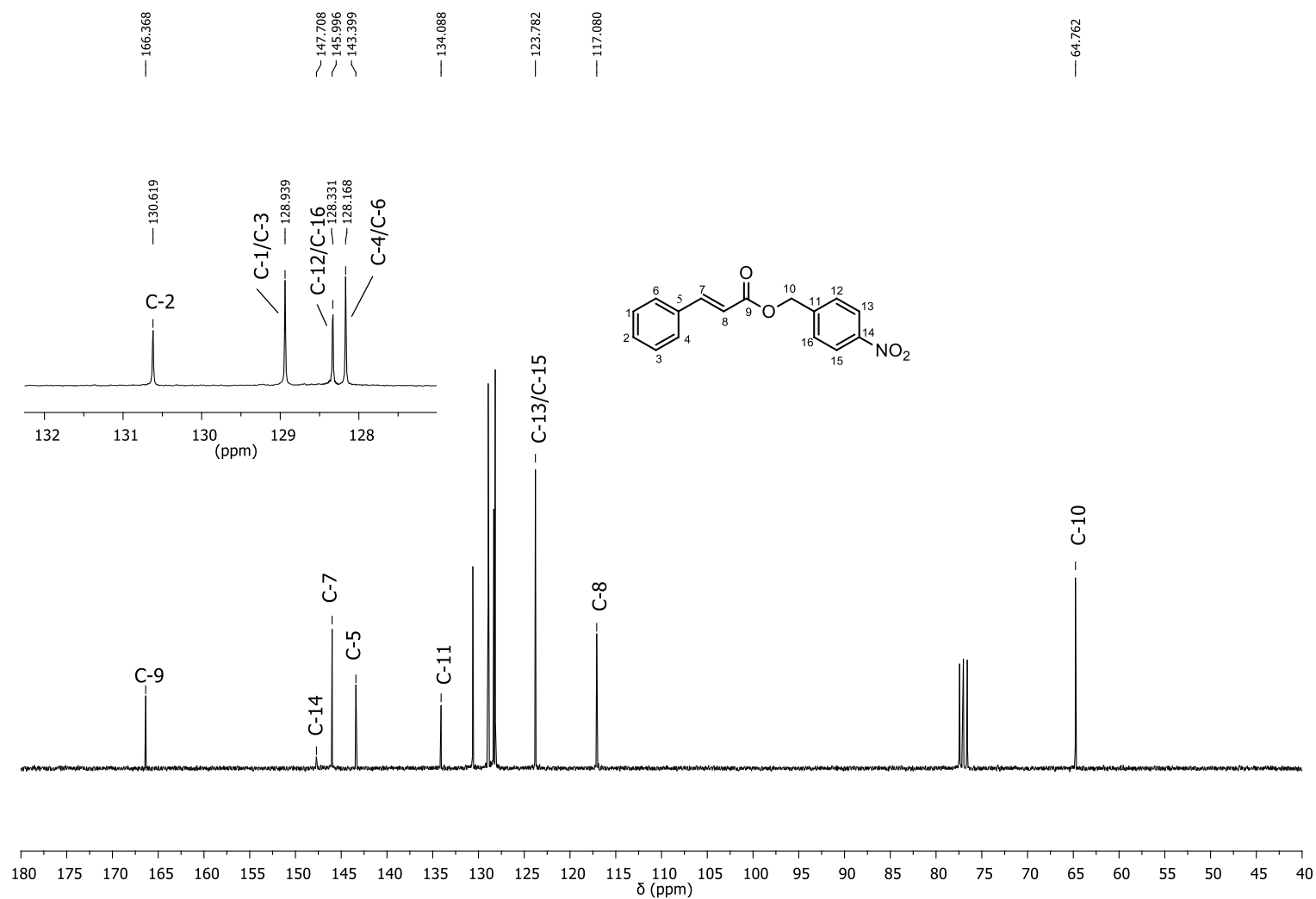


Figura 148 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13c**.

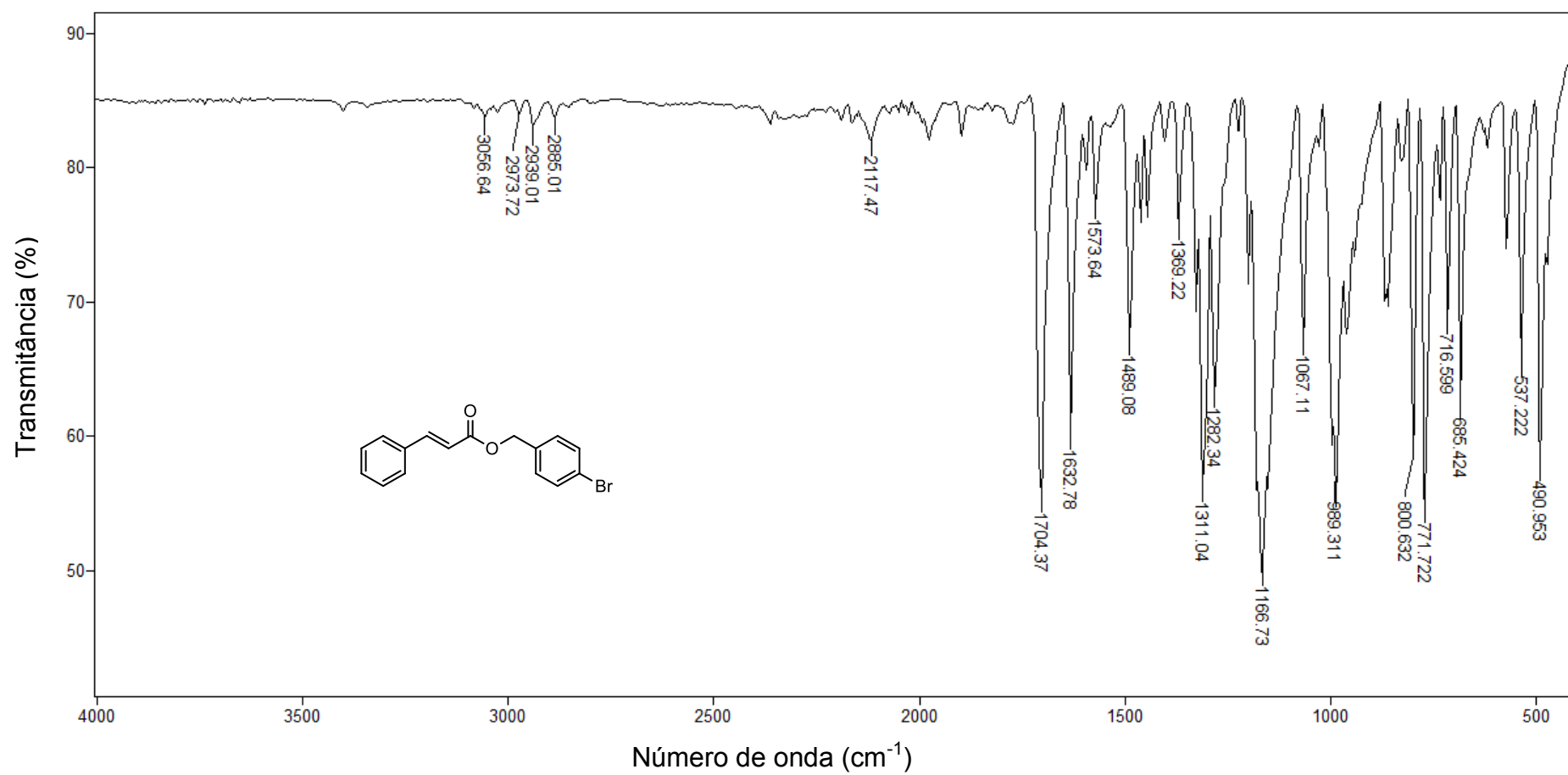


Figura 149 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13d**.

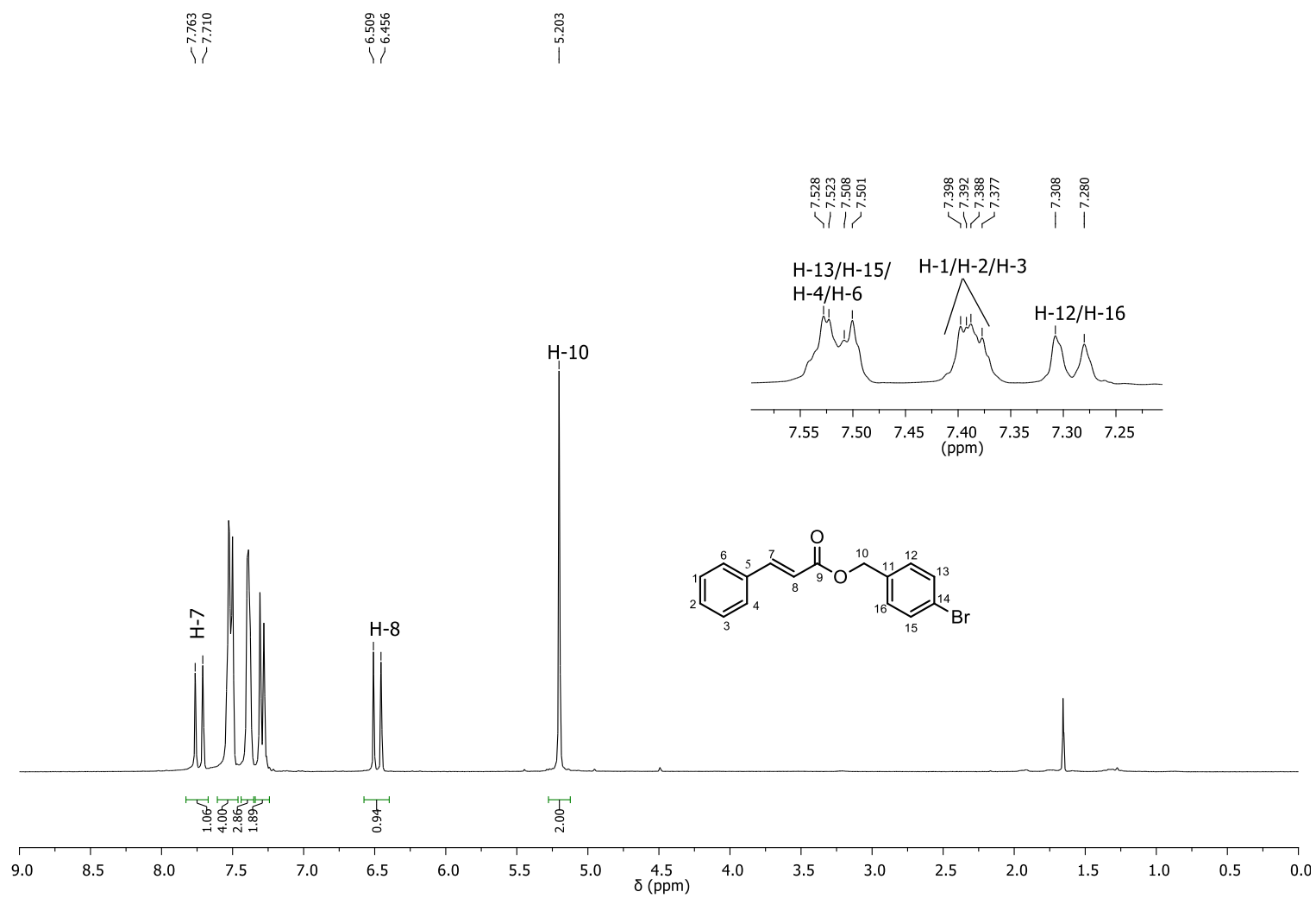


Figura 150 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **13d**.

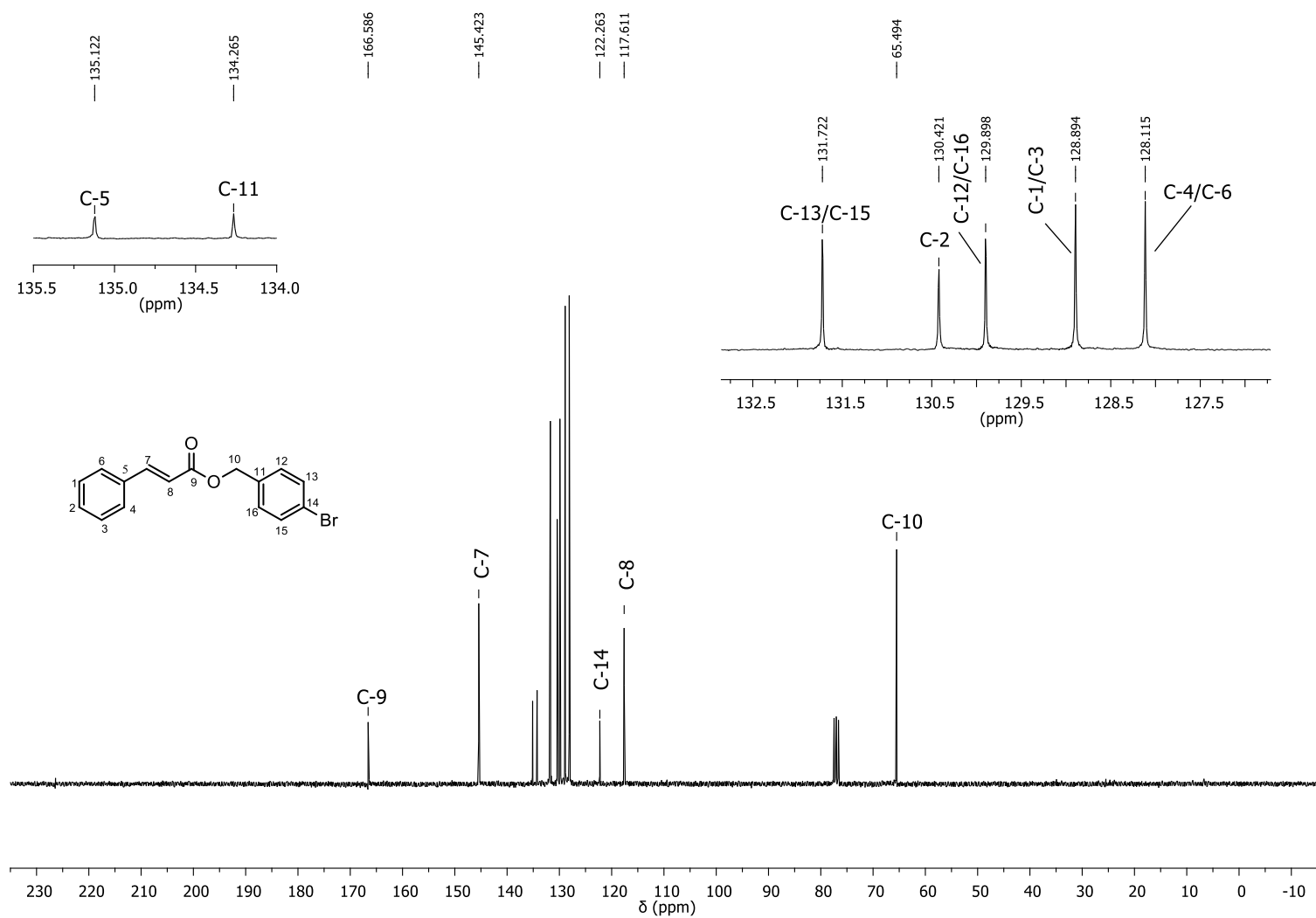


Figura 151 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13d**.

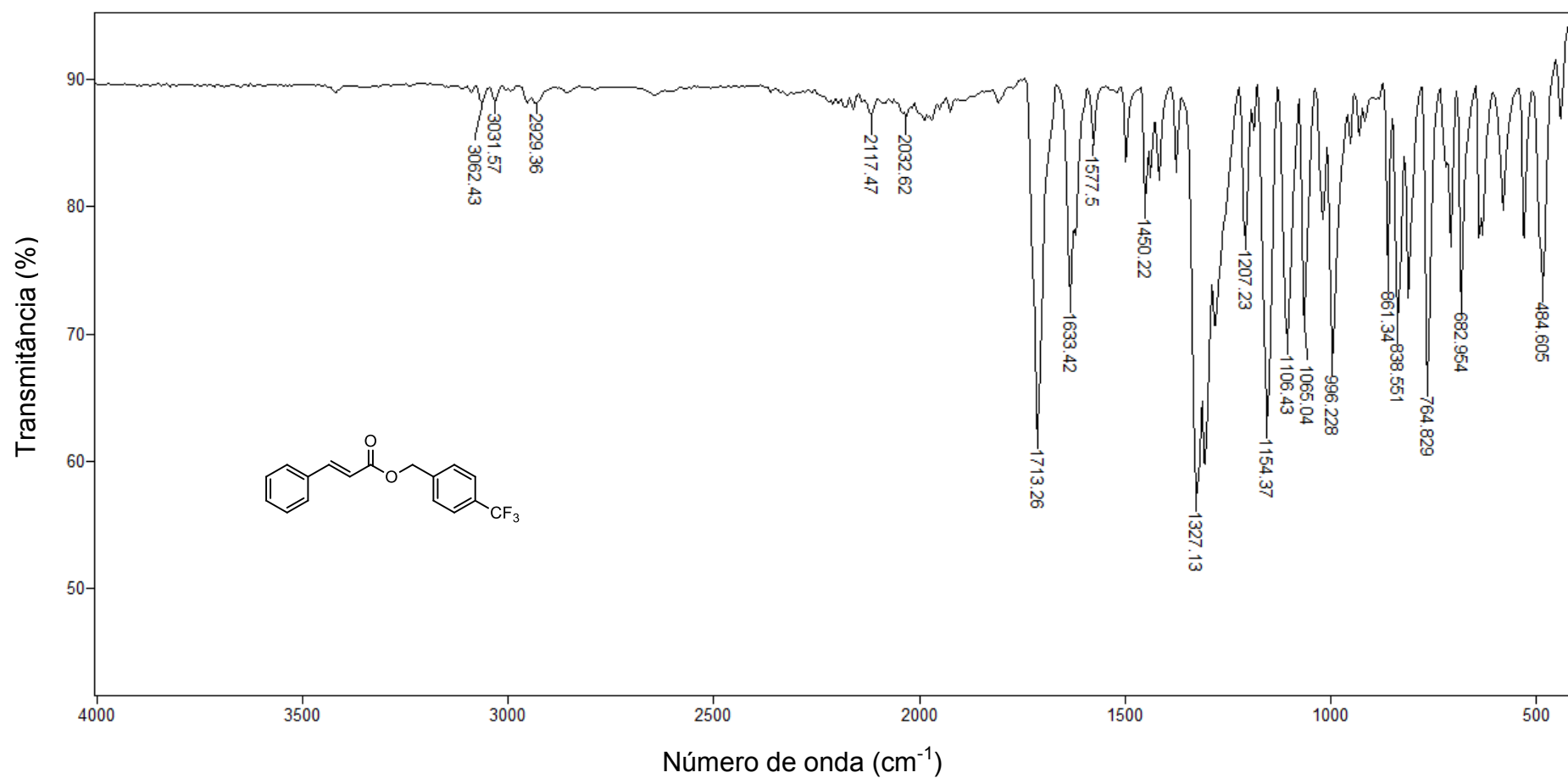


Figura 152 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13e**.

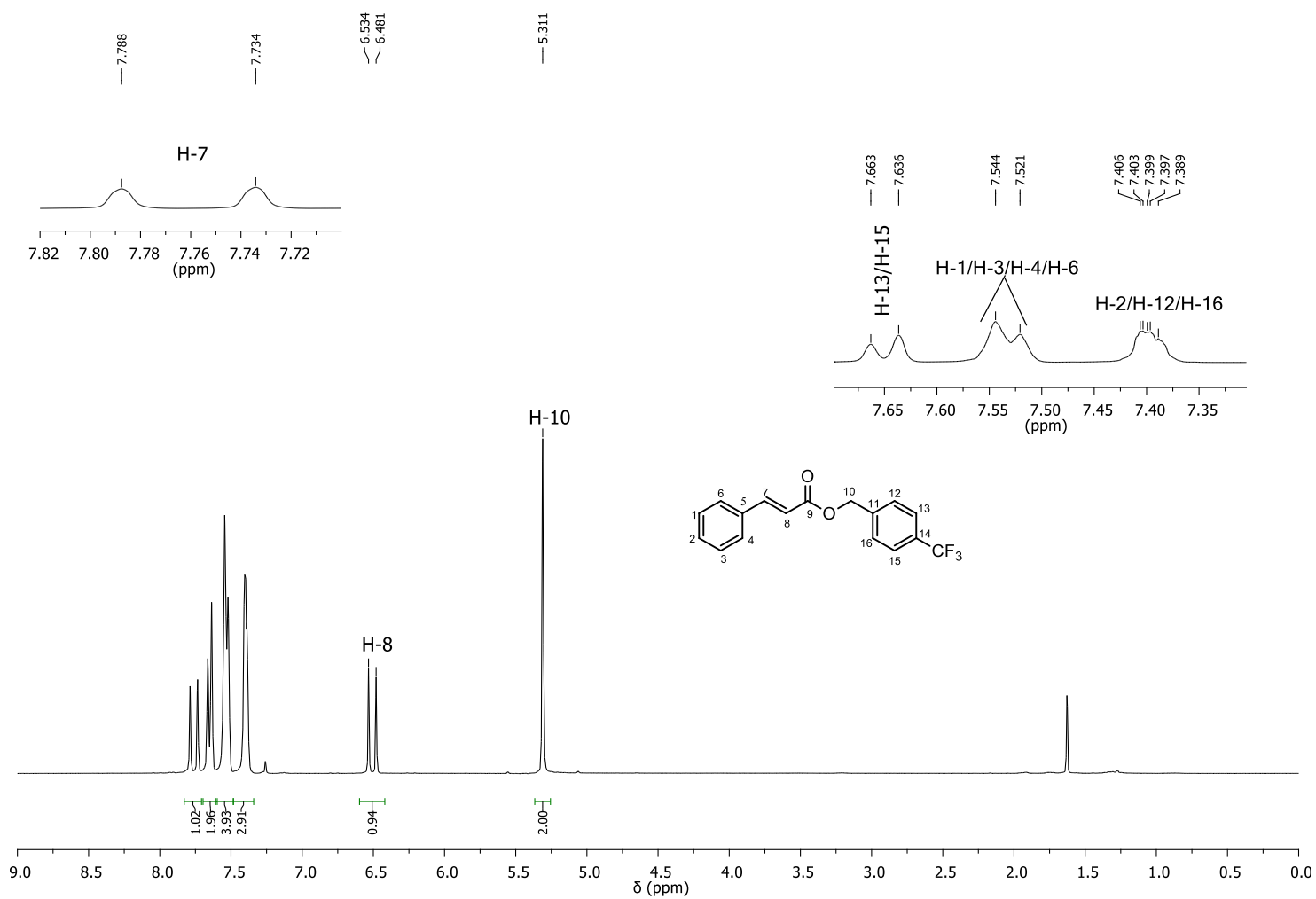


Figura 153 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **13e**.

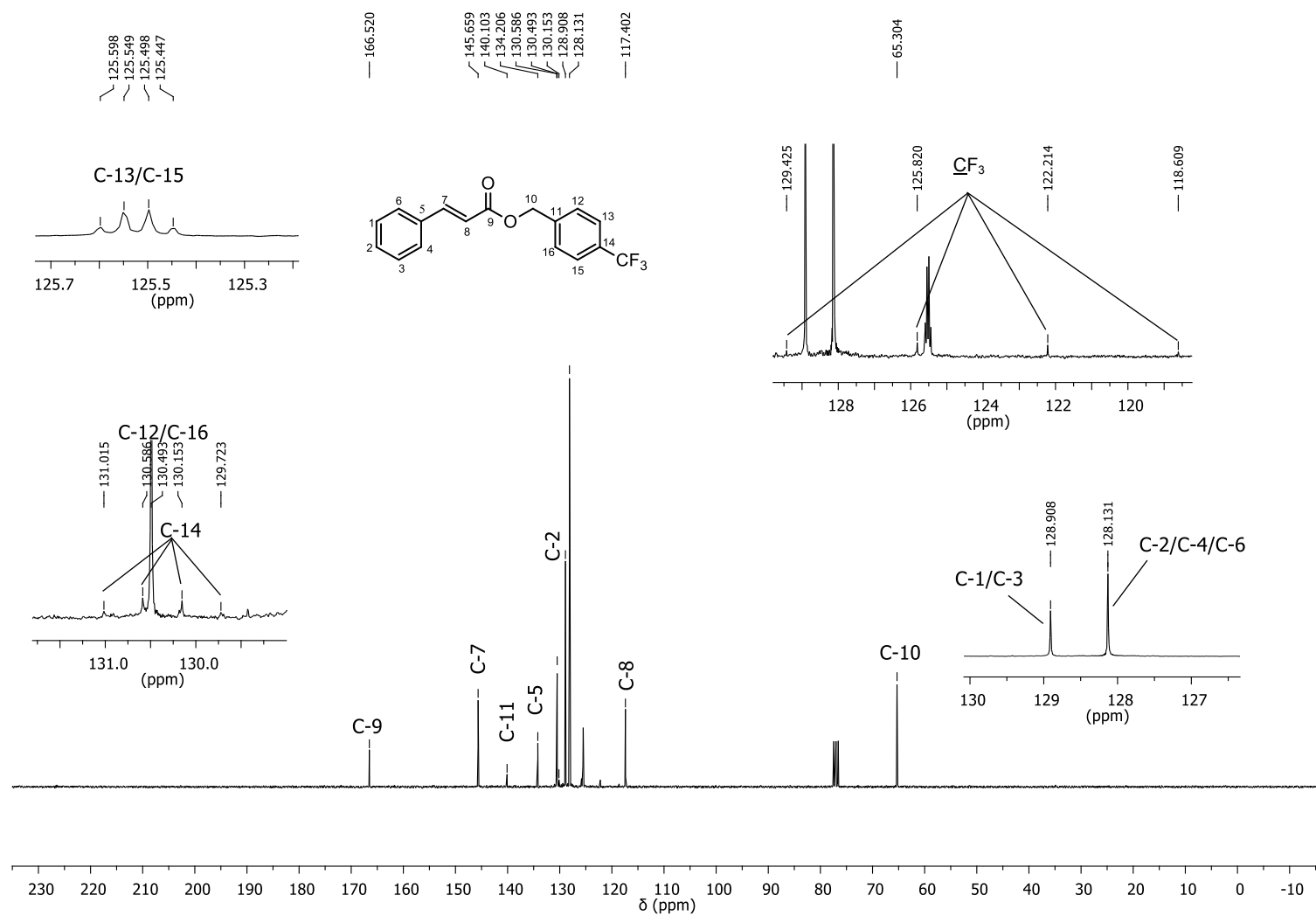


Figura 154 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13e**.

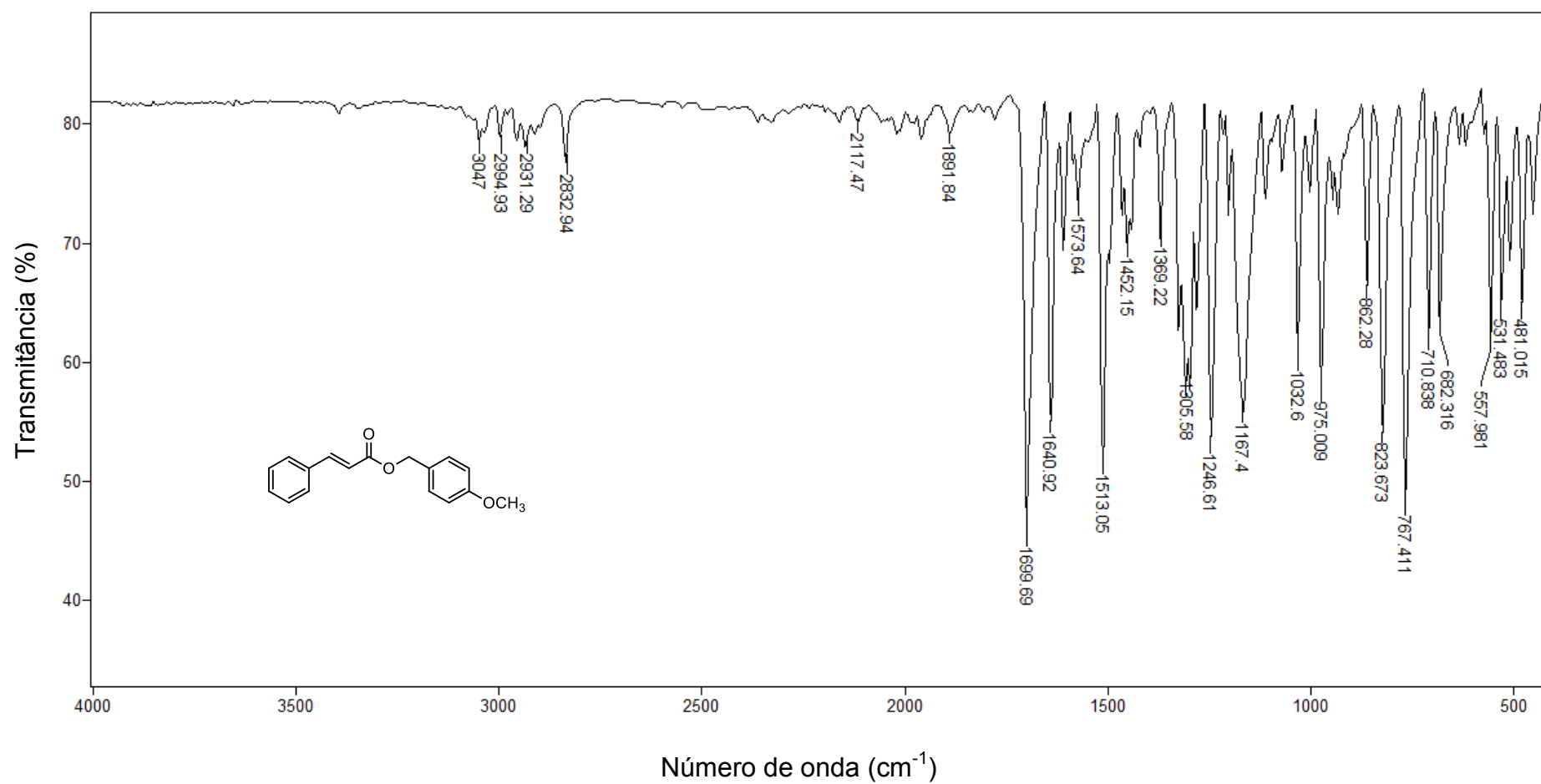


Figura 155 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13f**.

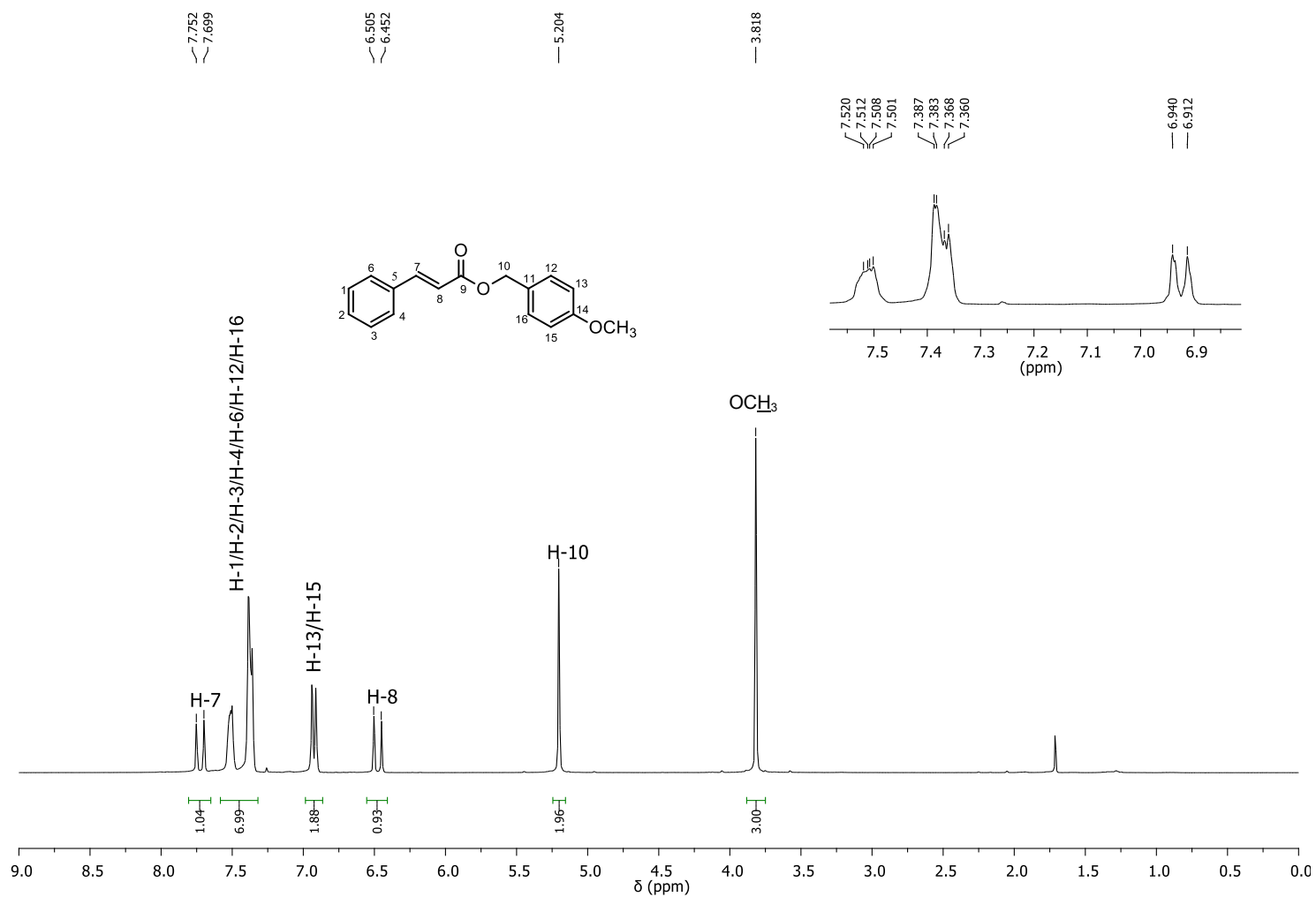


Figura 156 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **13f**.

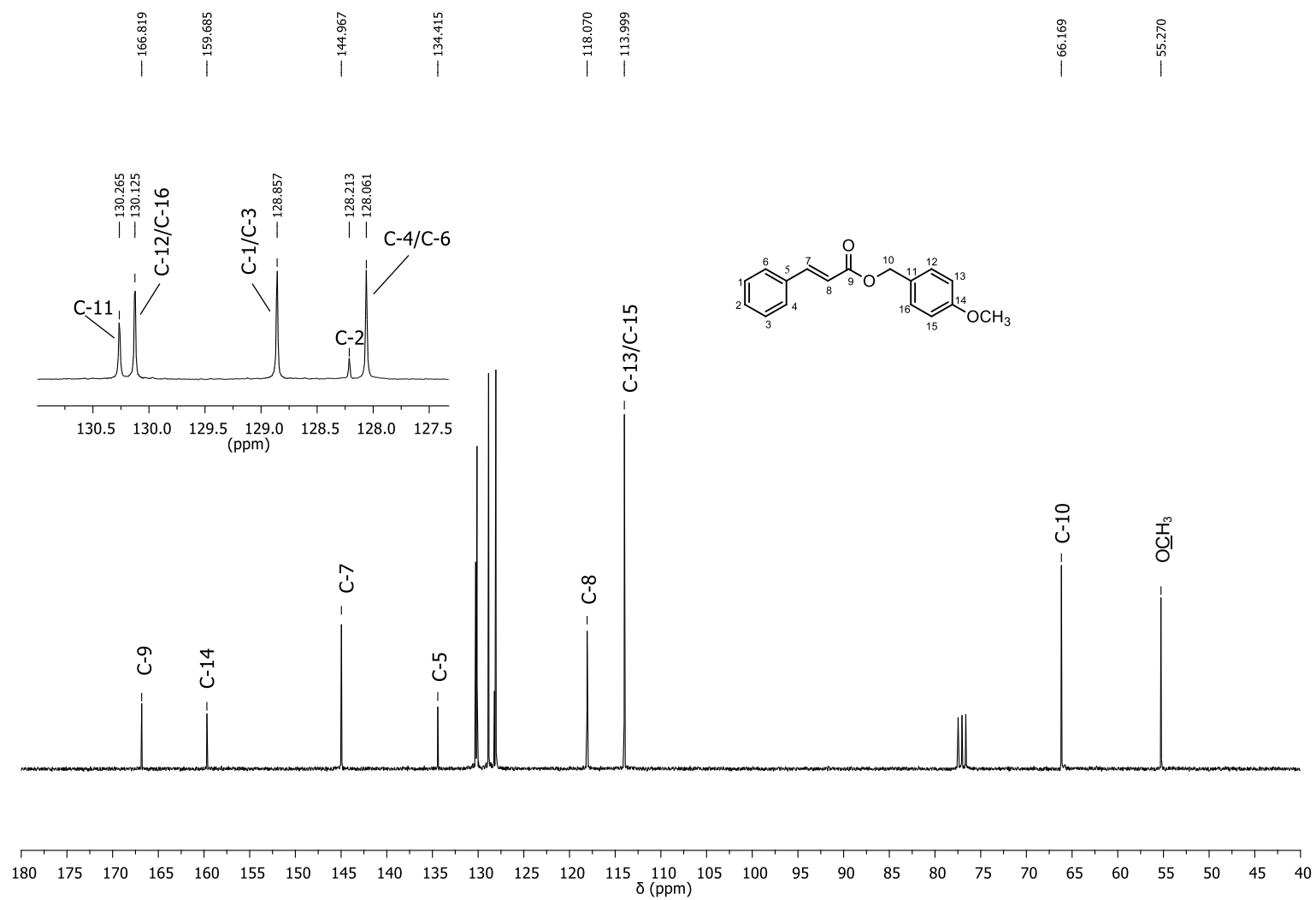


Figura 157 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13f**.

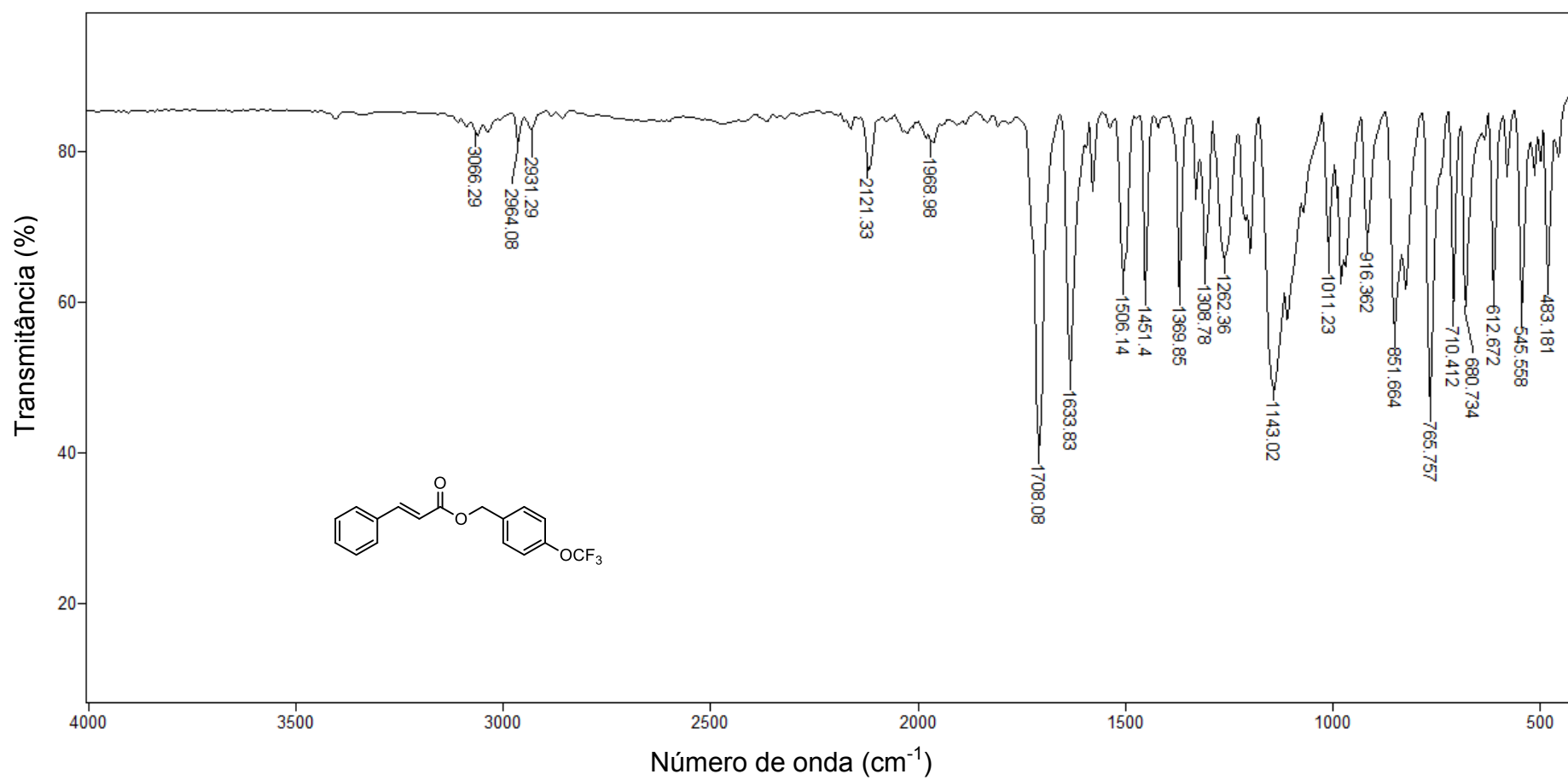


Figura 158 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13g**.

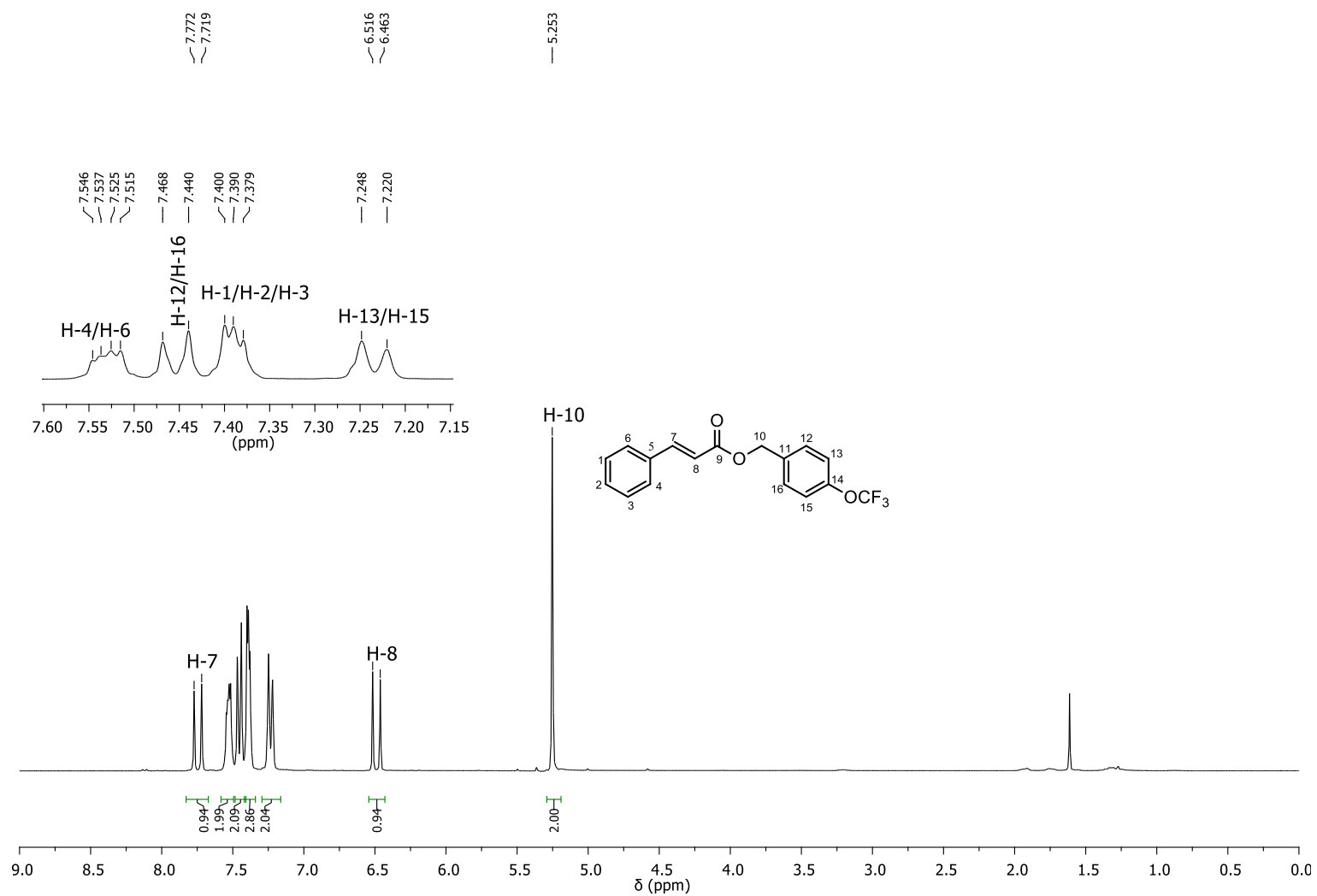


Figura 159 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **13g**.

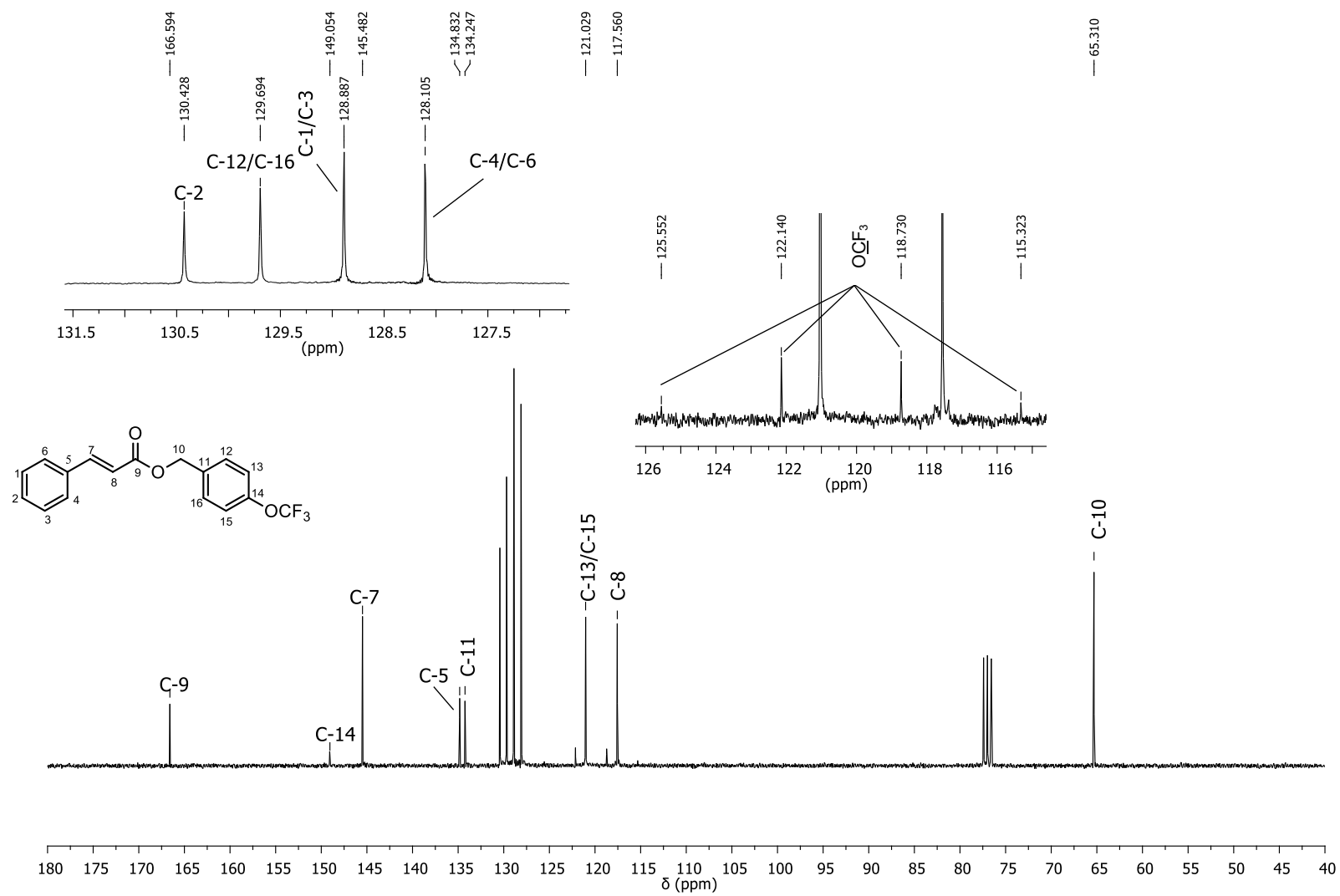


Figura 160 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **13g**.

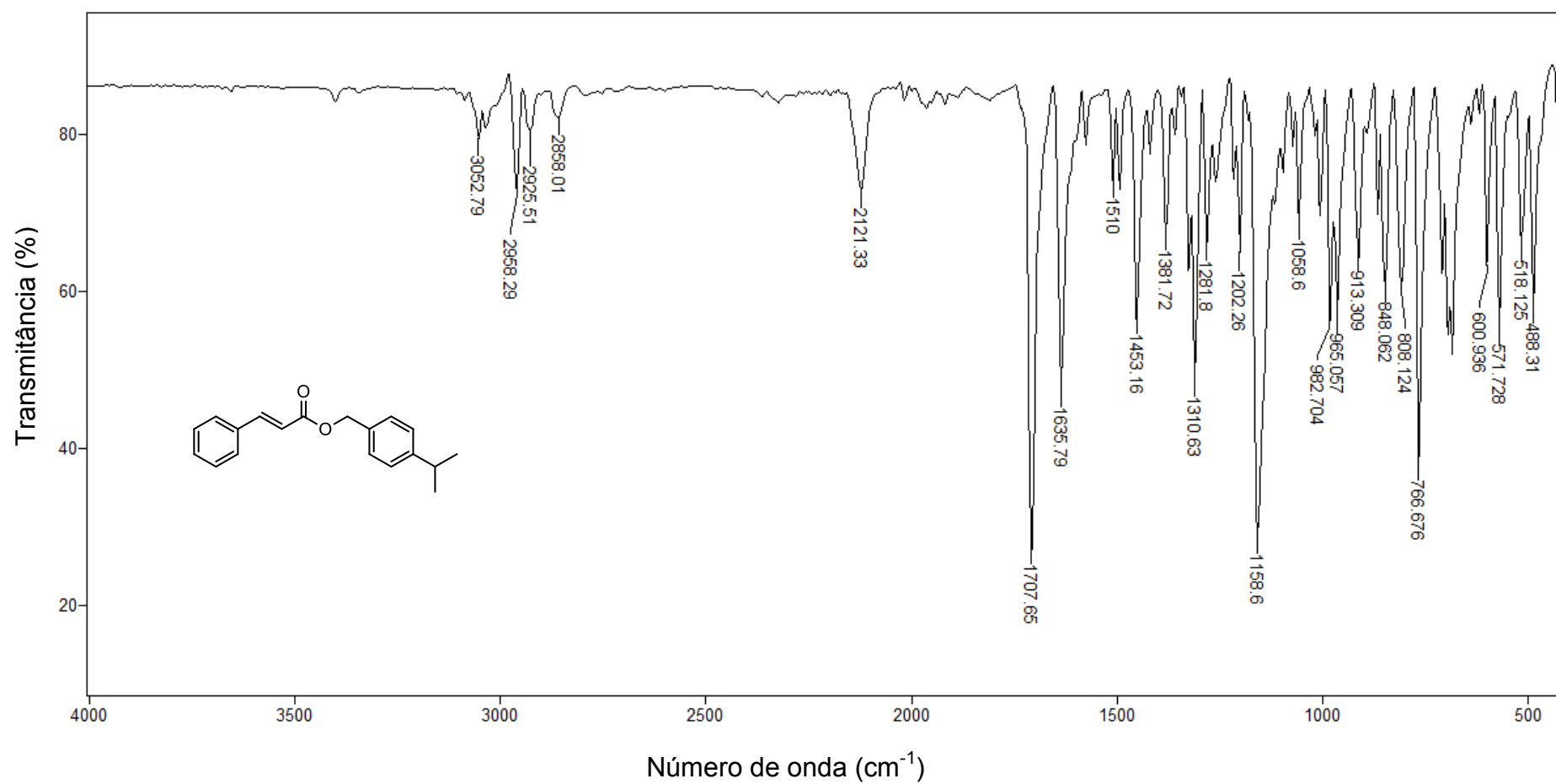


Figura 161 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13i**.

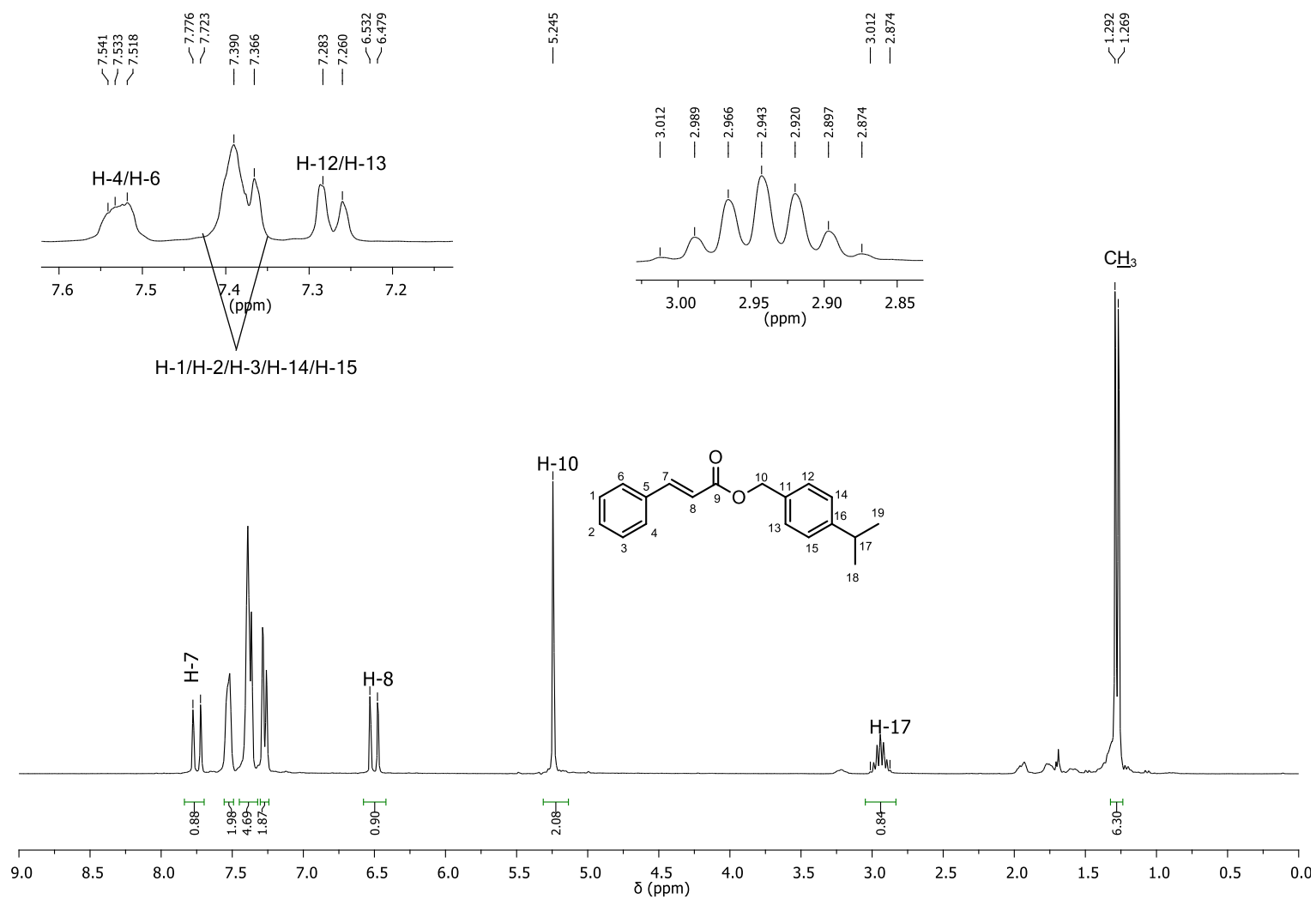


Figura 162 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **13i**.

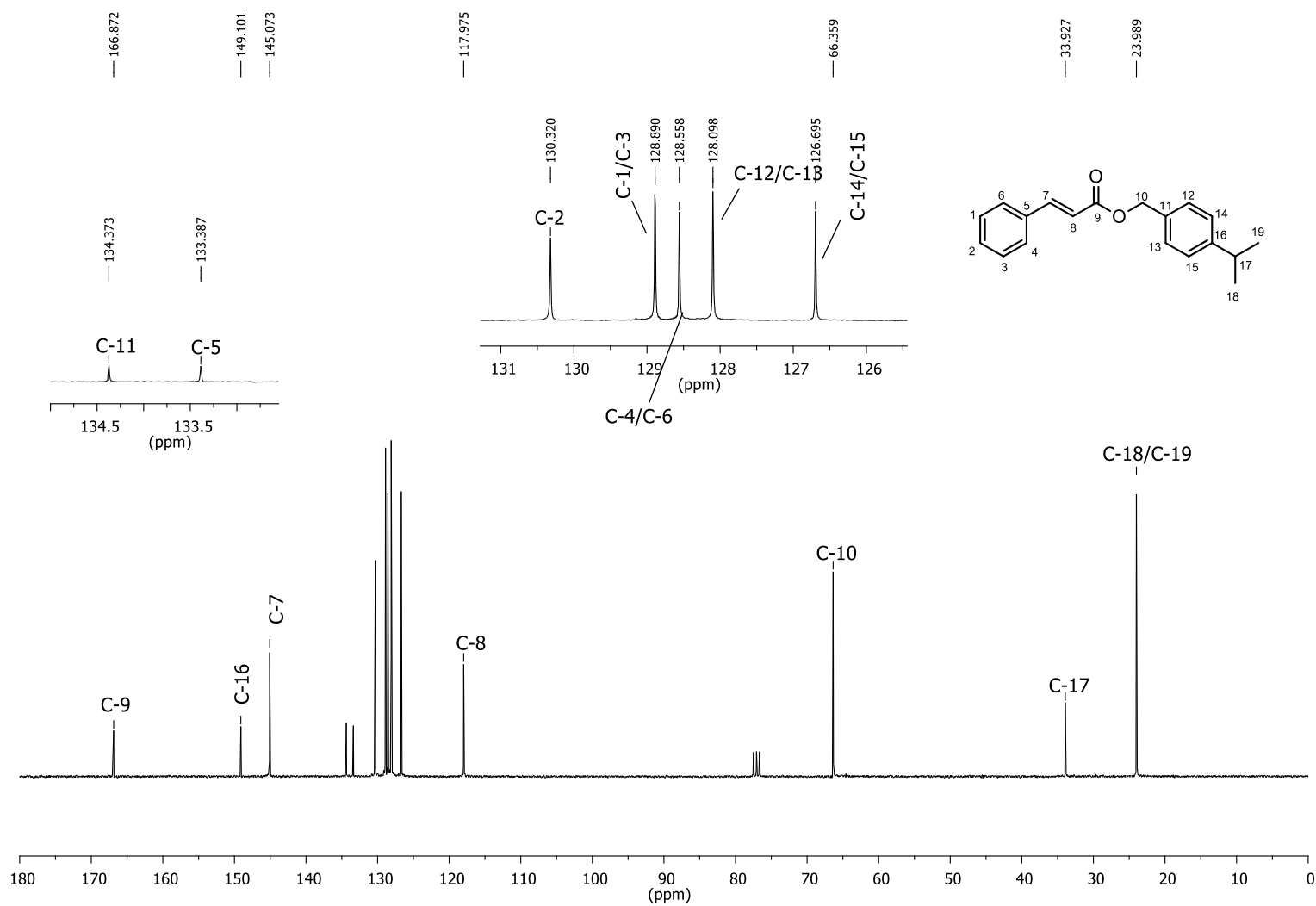


Figura 163 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13i**.

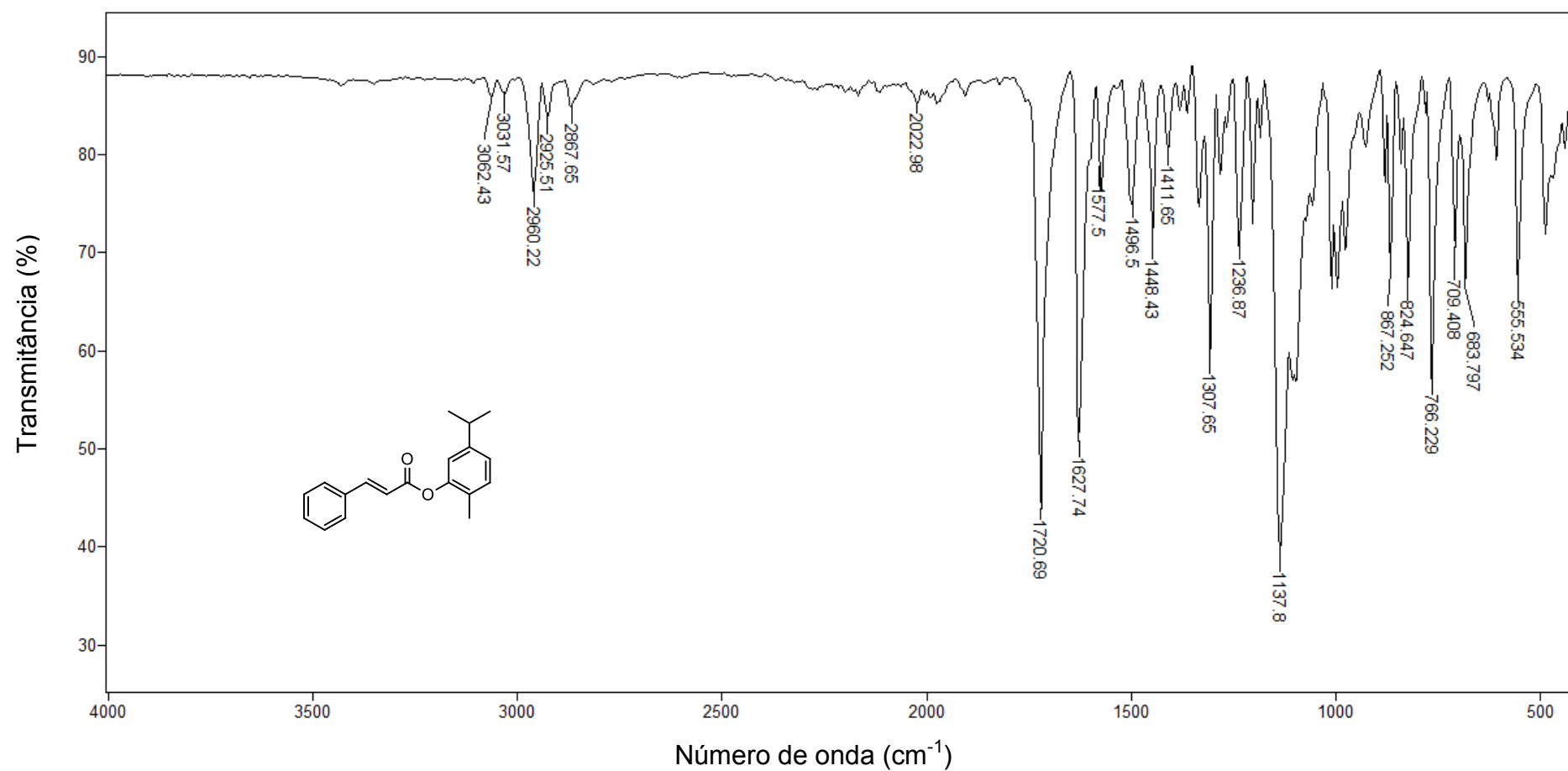


Figura 164 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13j**.

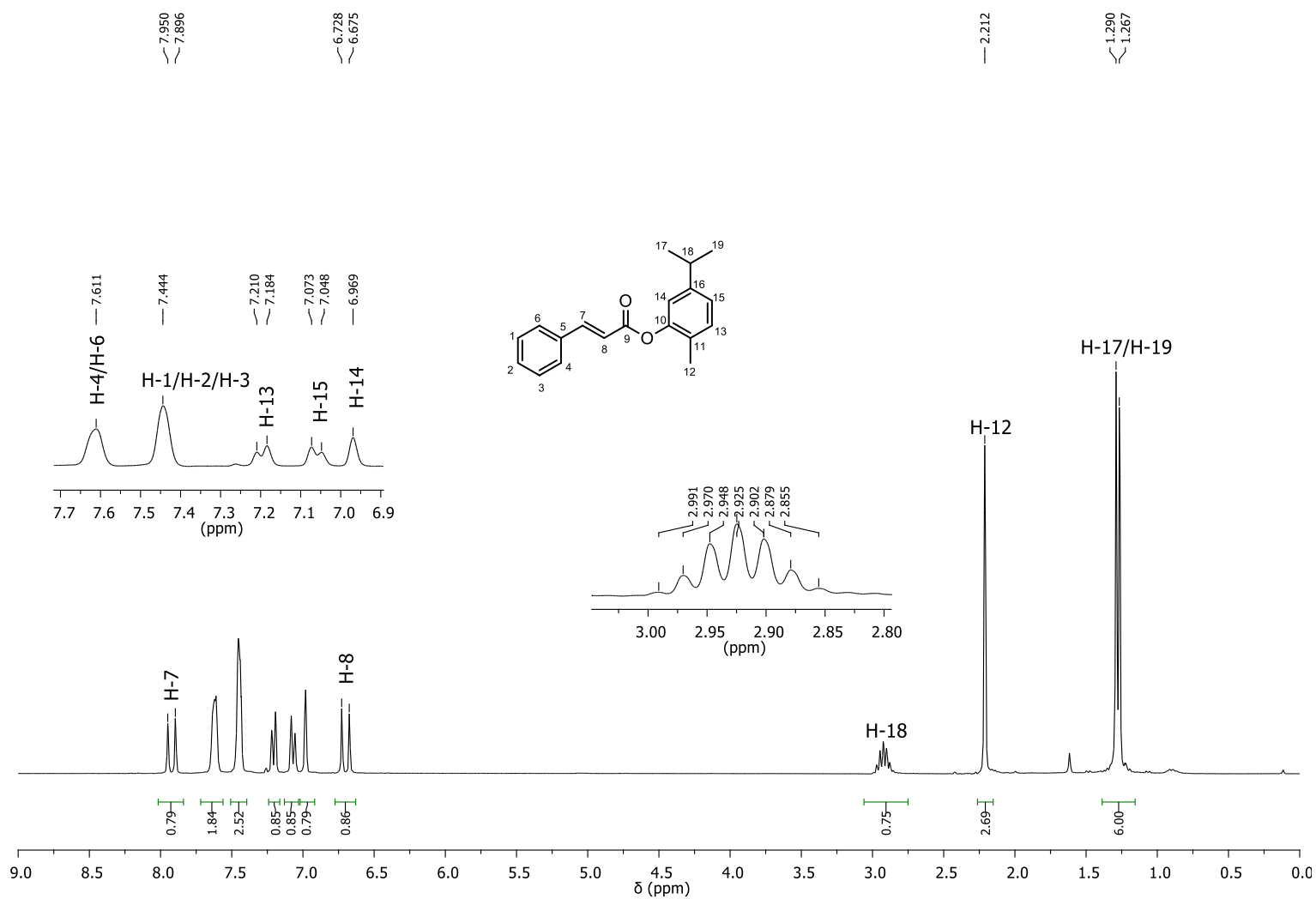


Figura 165 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **13j**.

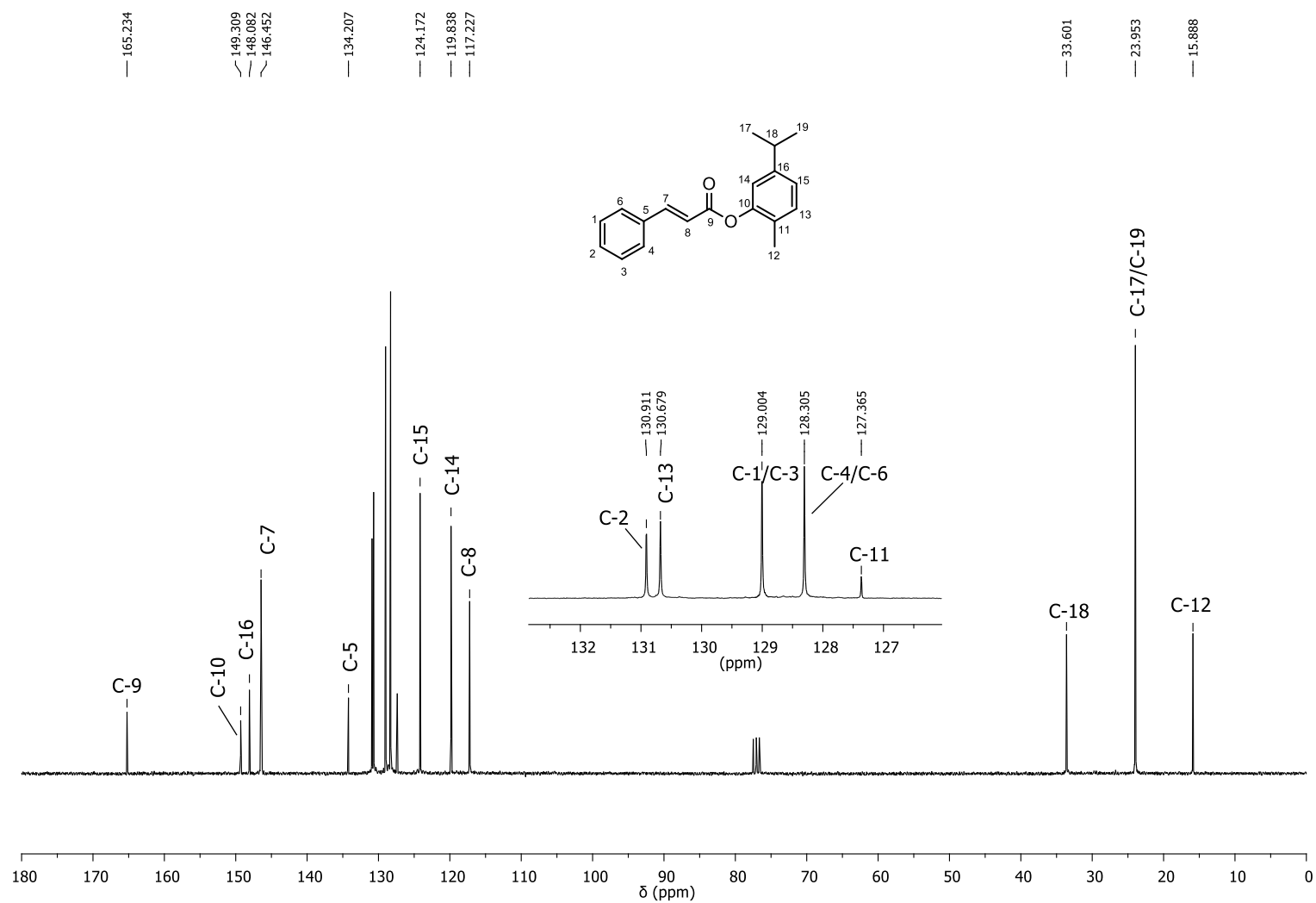


Figura 166 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13j**.

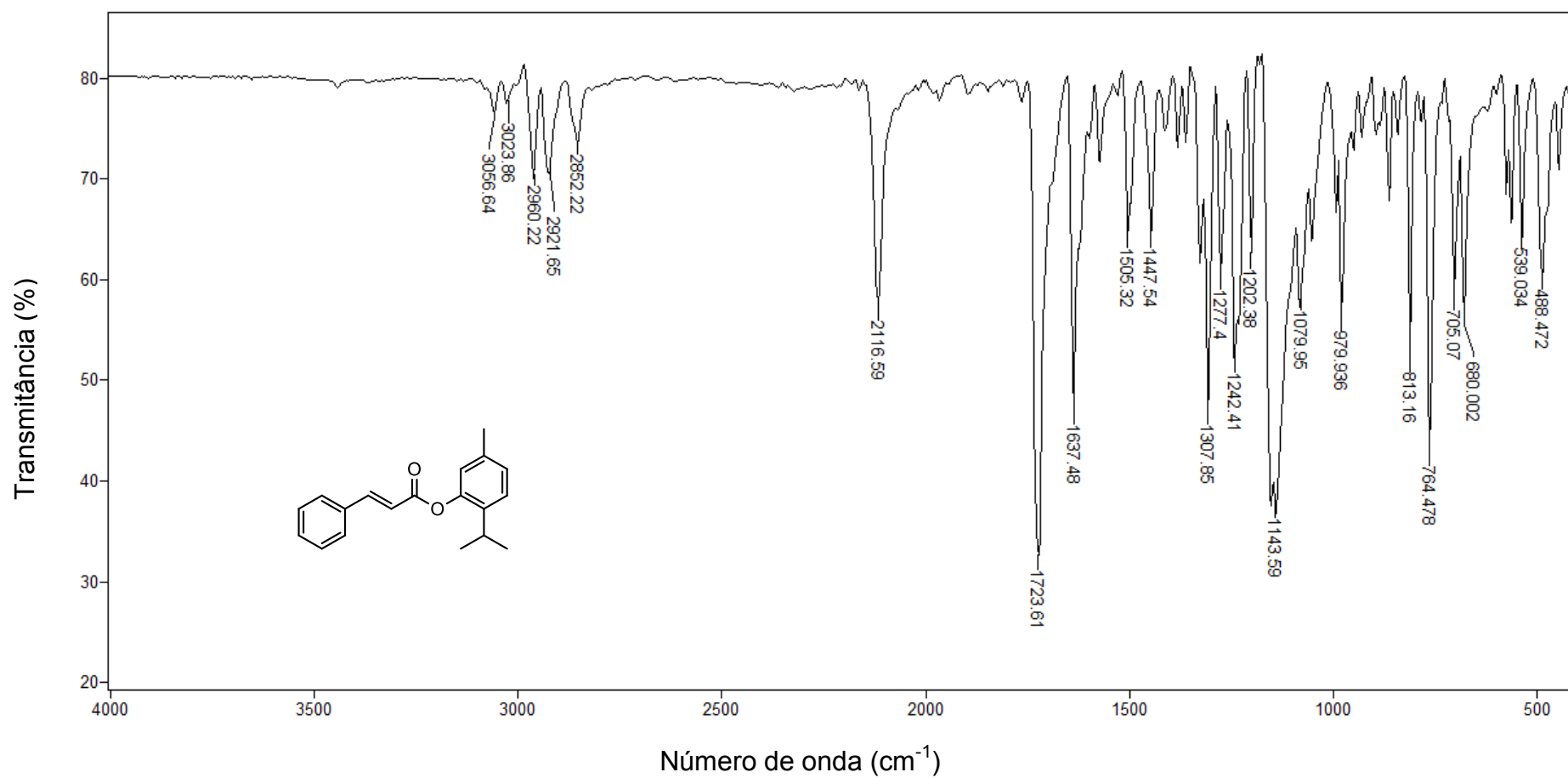


Figura 167 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13k**.

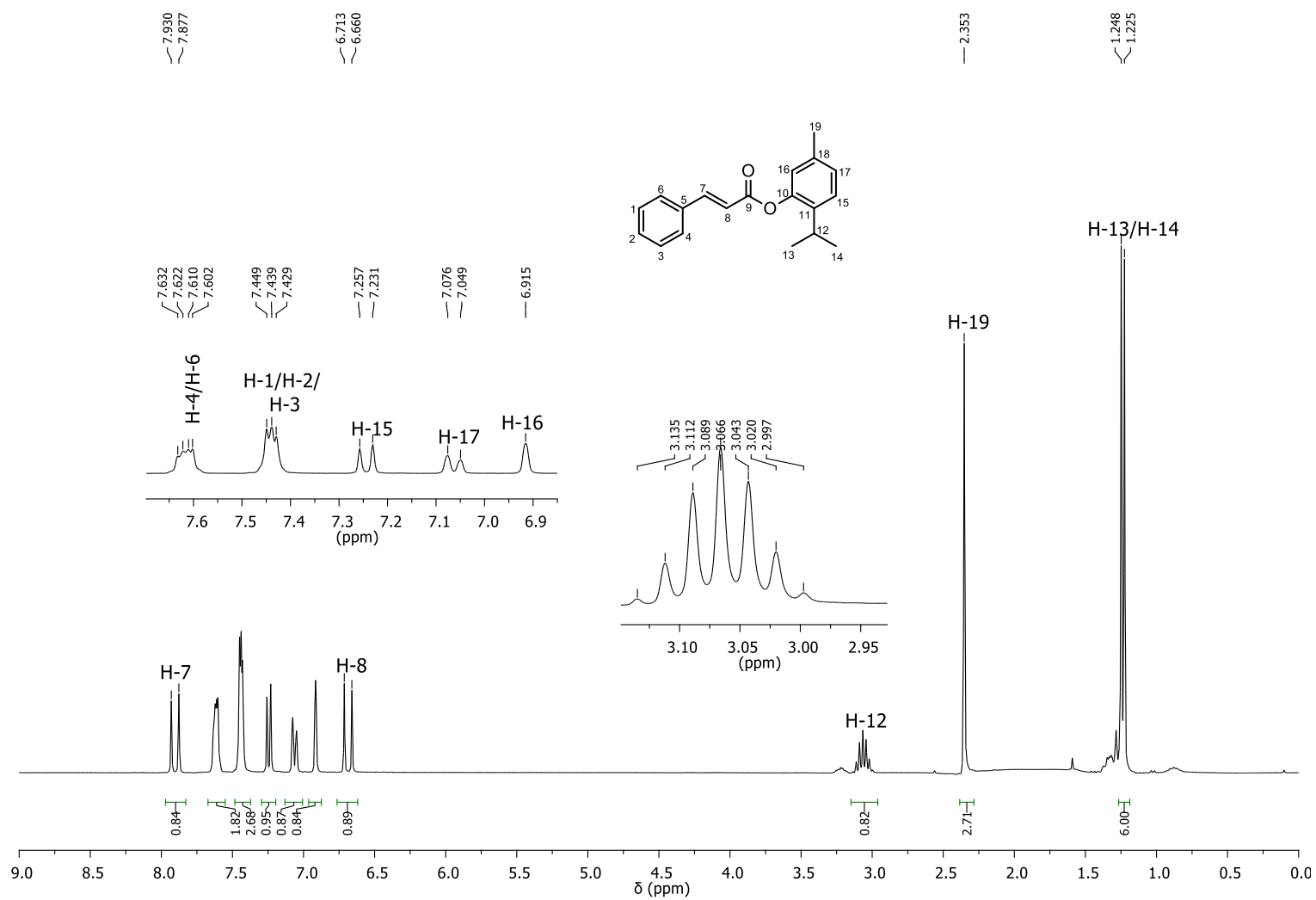


Figura 168 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **13k**.

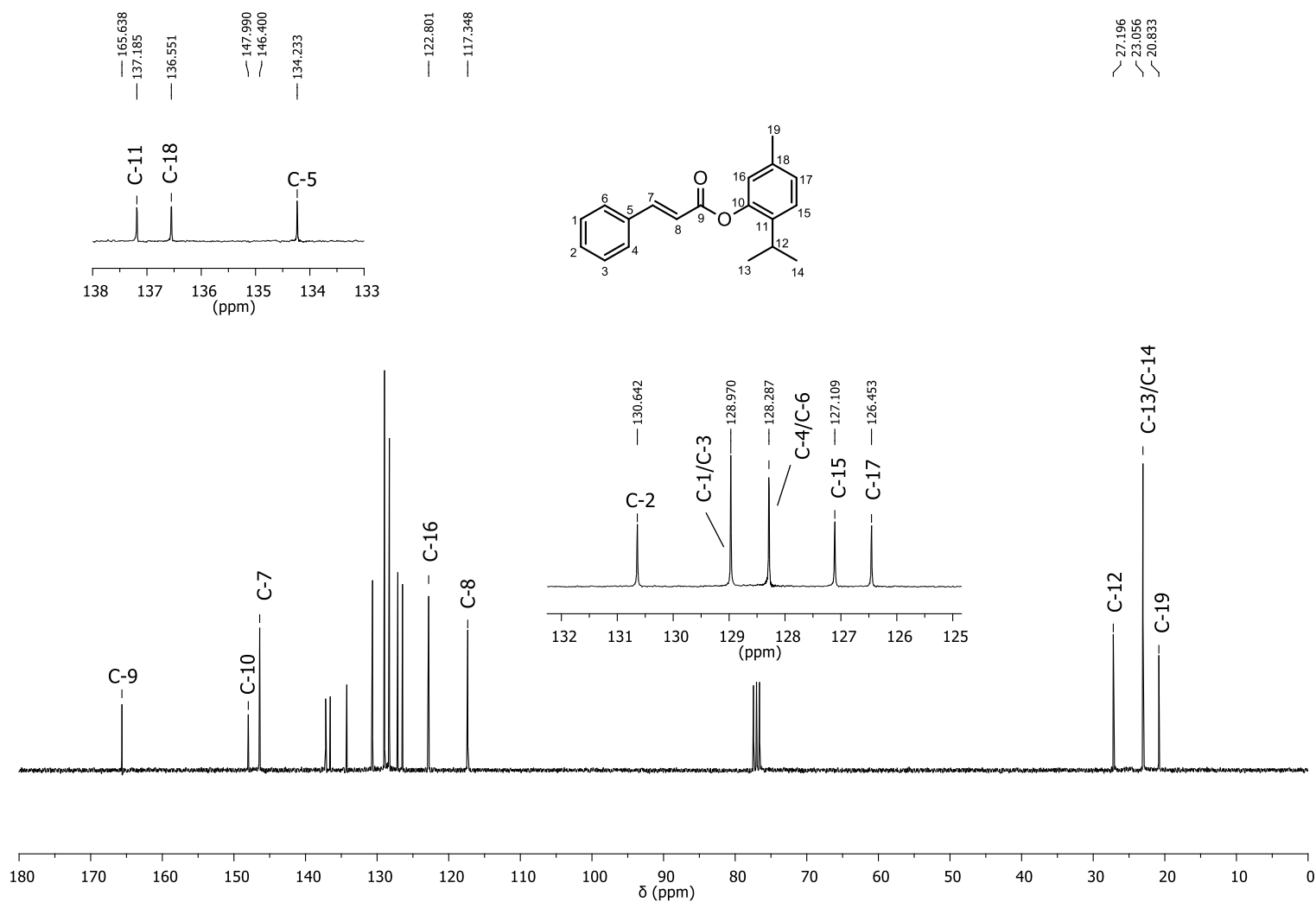


Figura 169 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13k**.

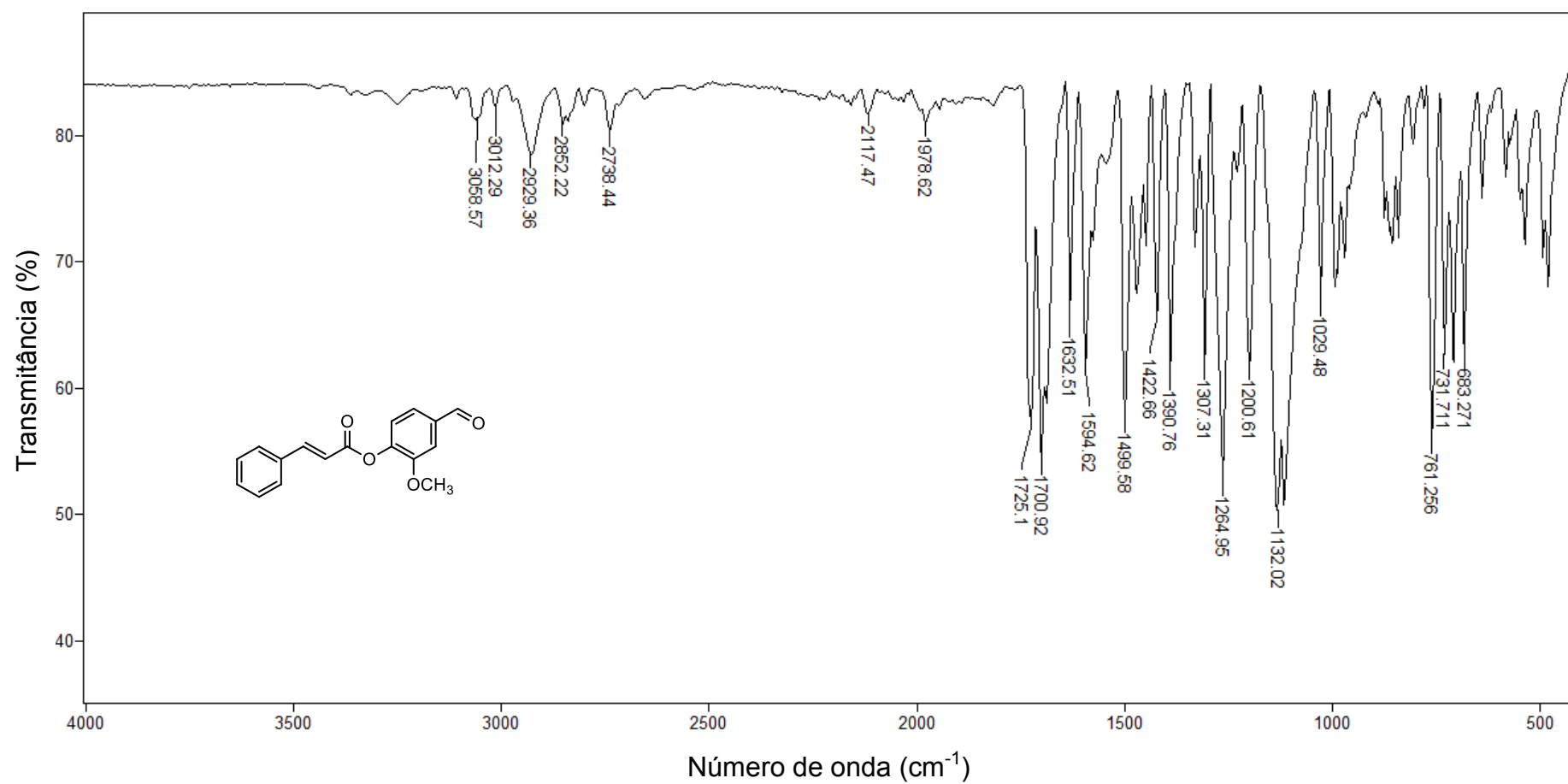


Figura 170 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13I**.

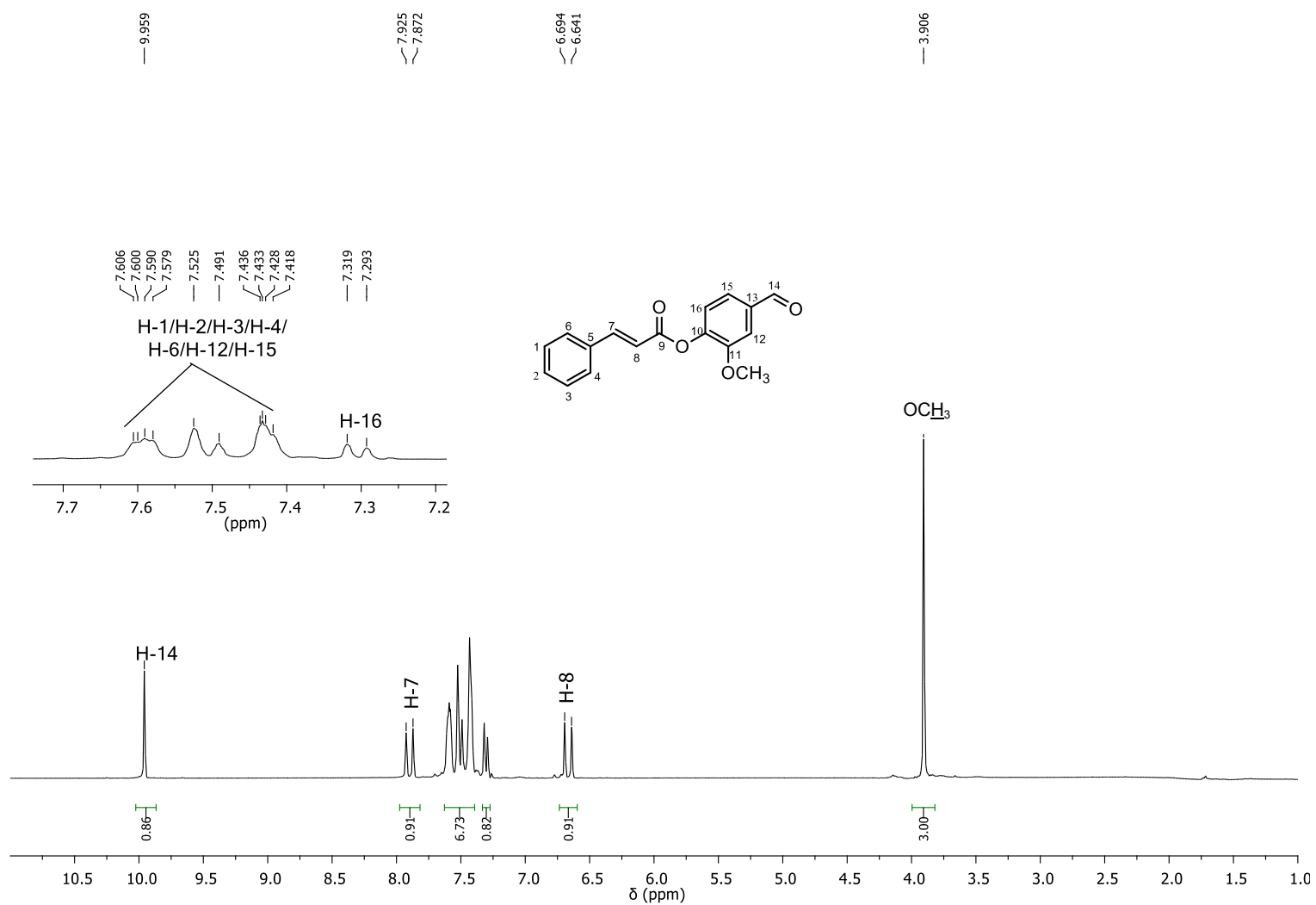


Figura 171 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **13I**.

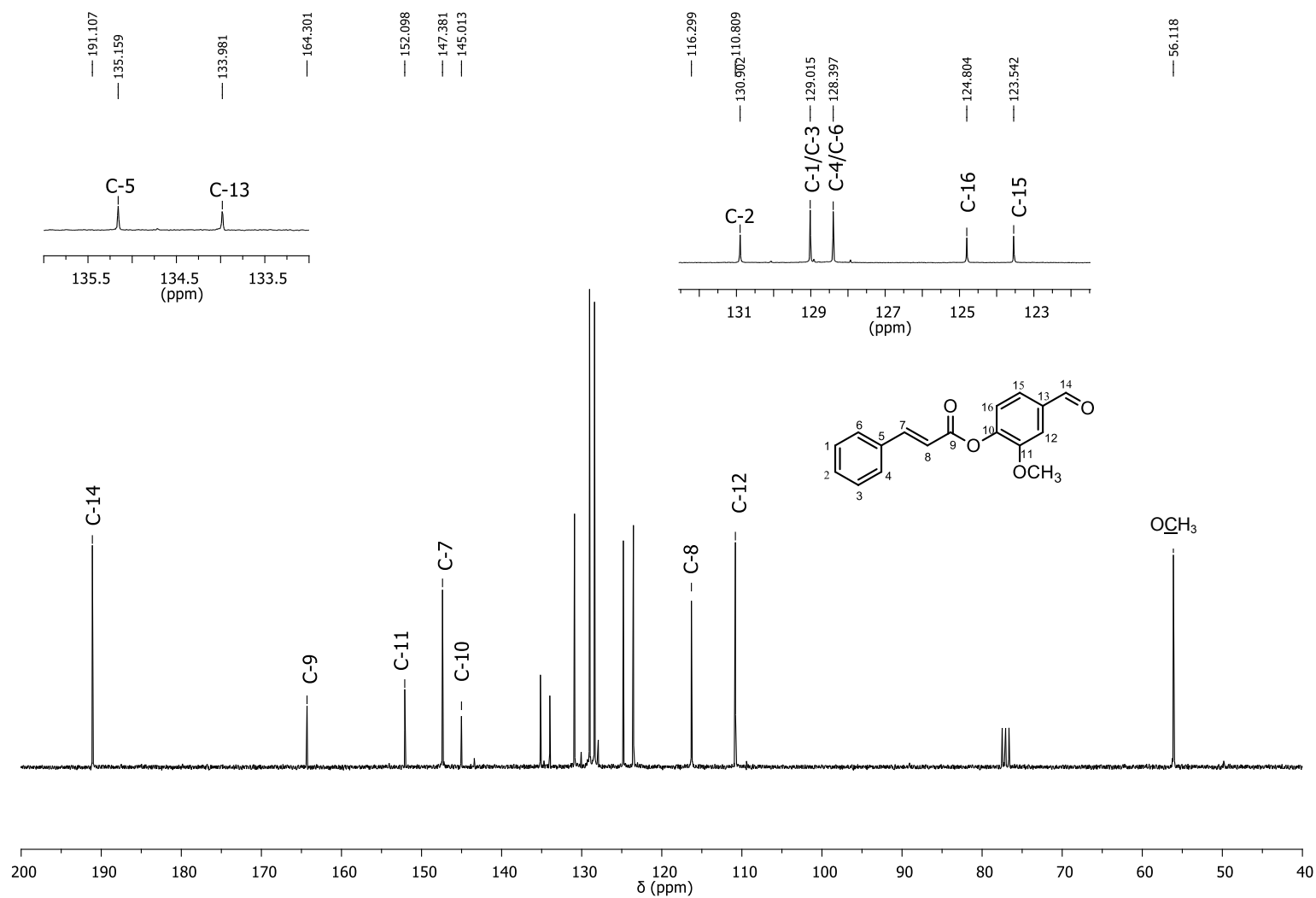


Figura 172 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13l**.

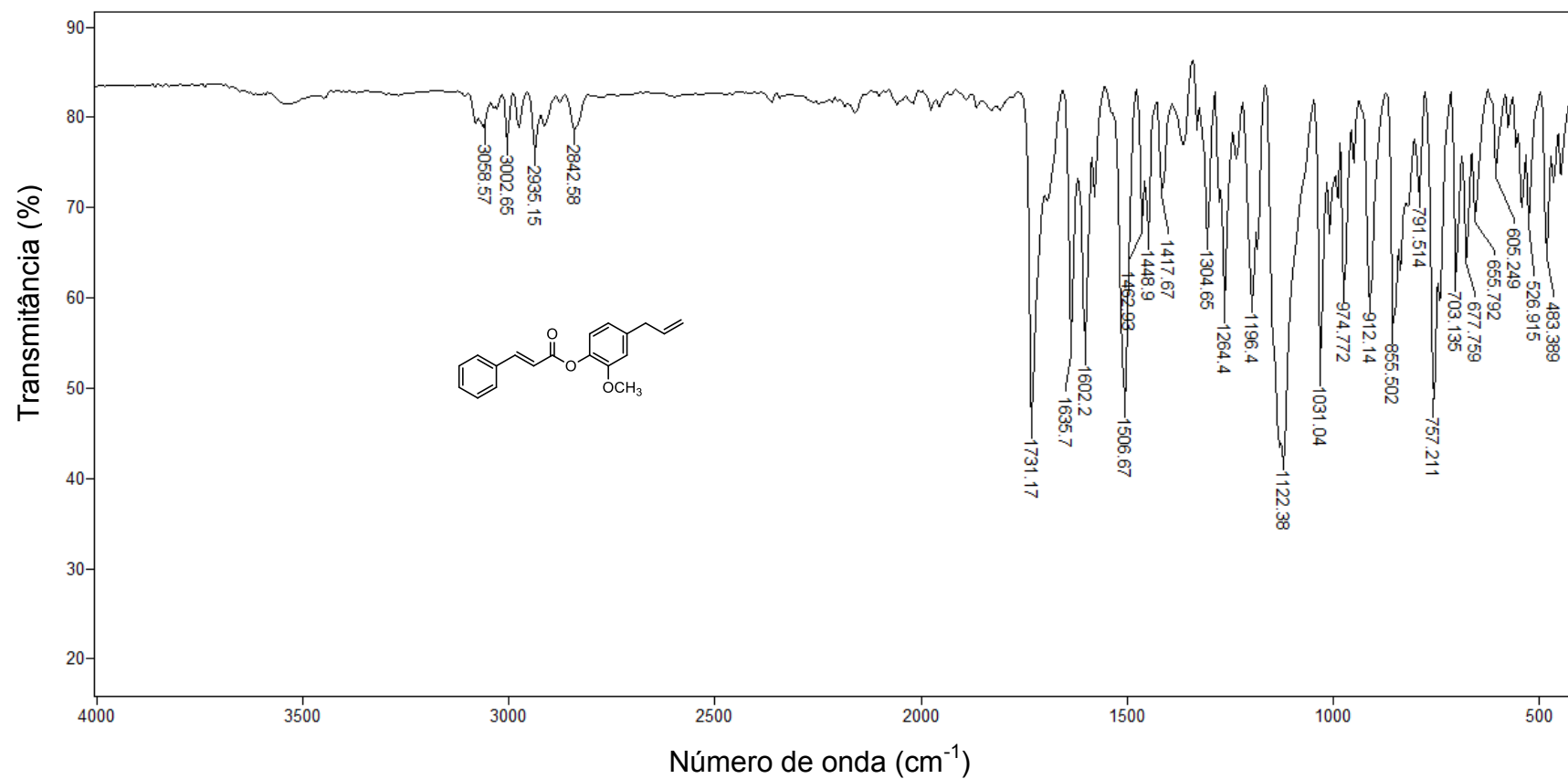


Figura 173 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13m**.

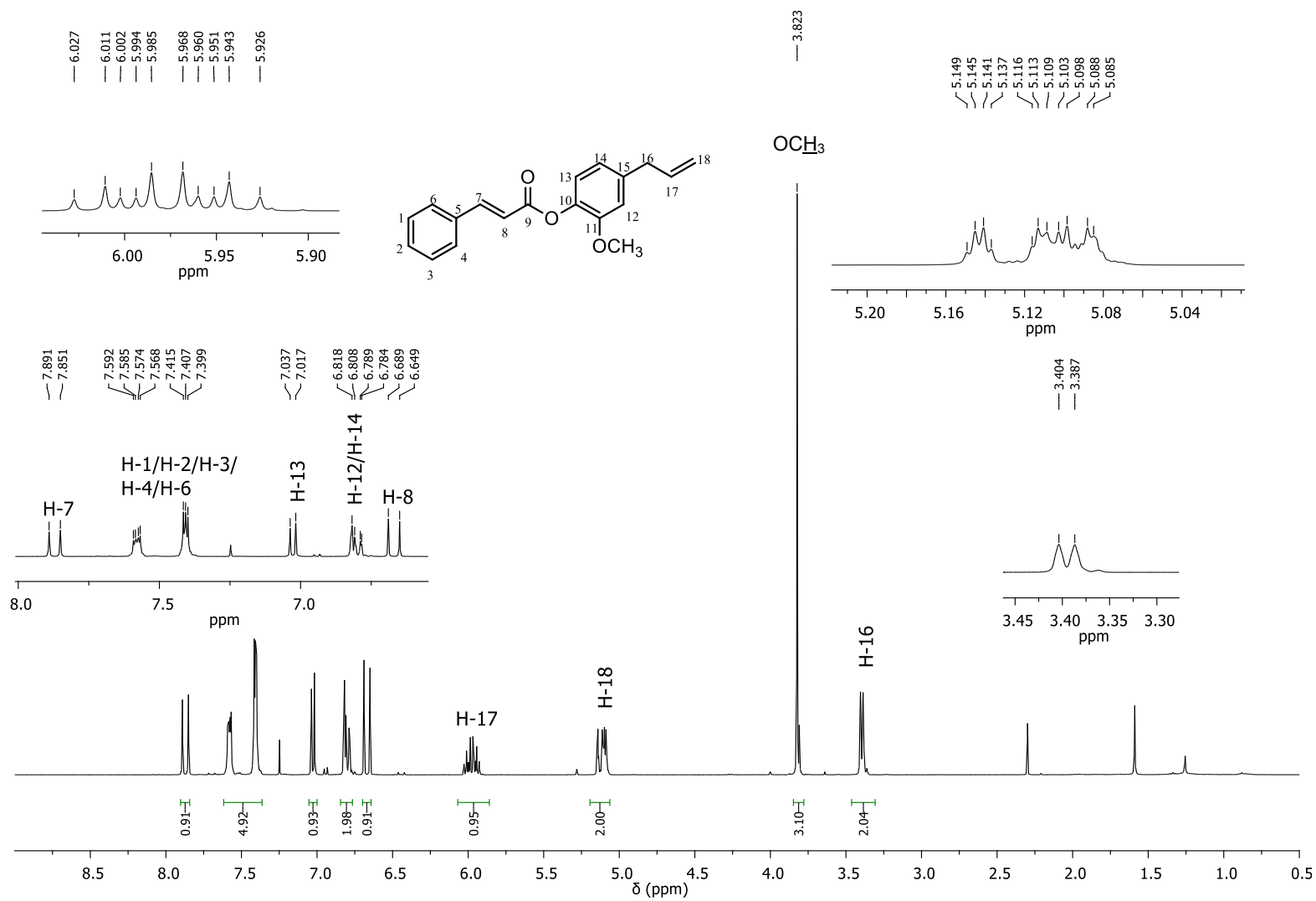


Figura 174 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **13m**.

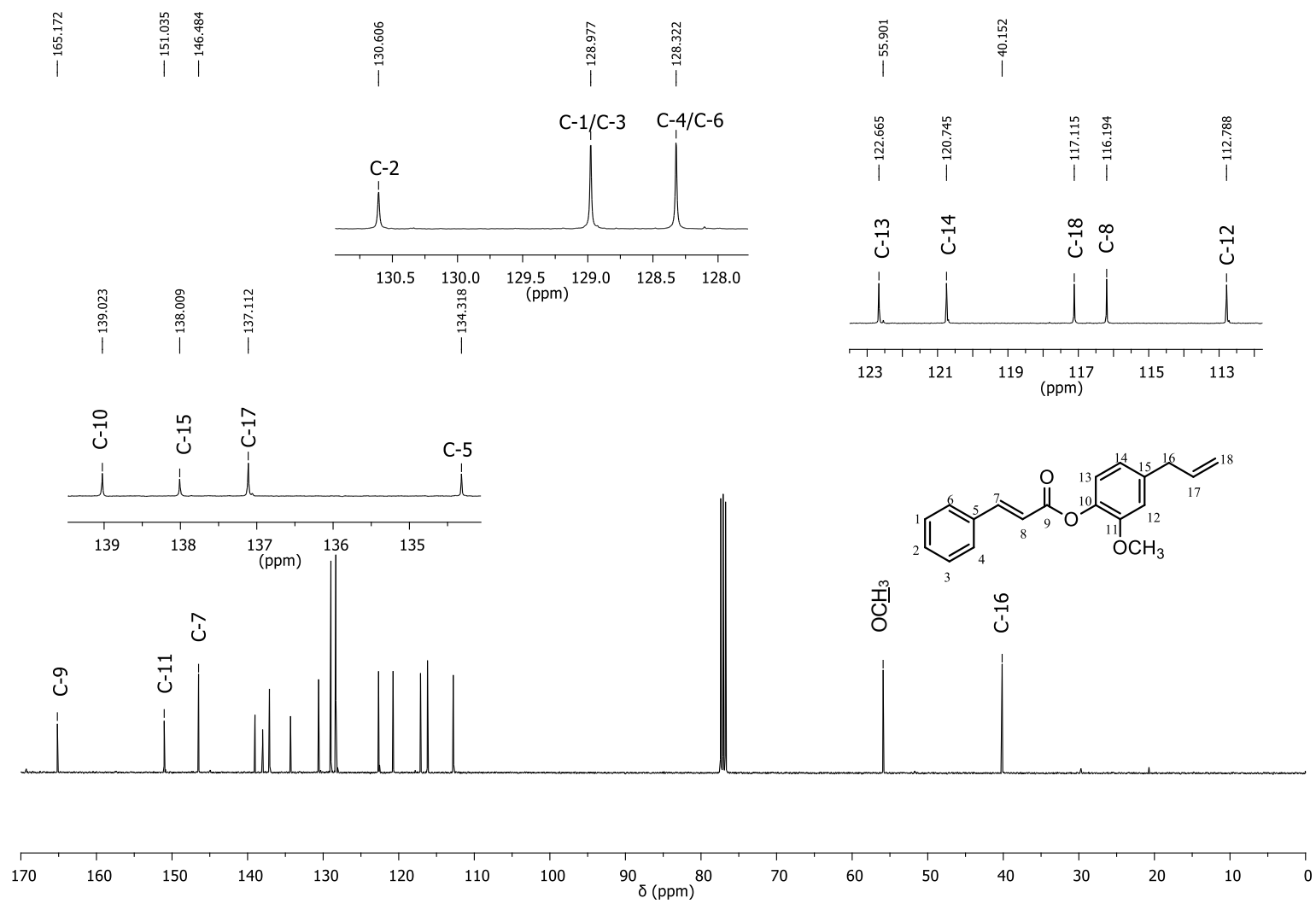


Figura 175 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **13m**.

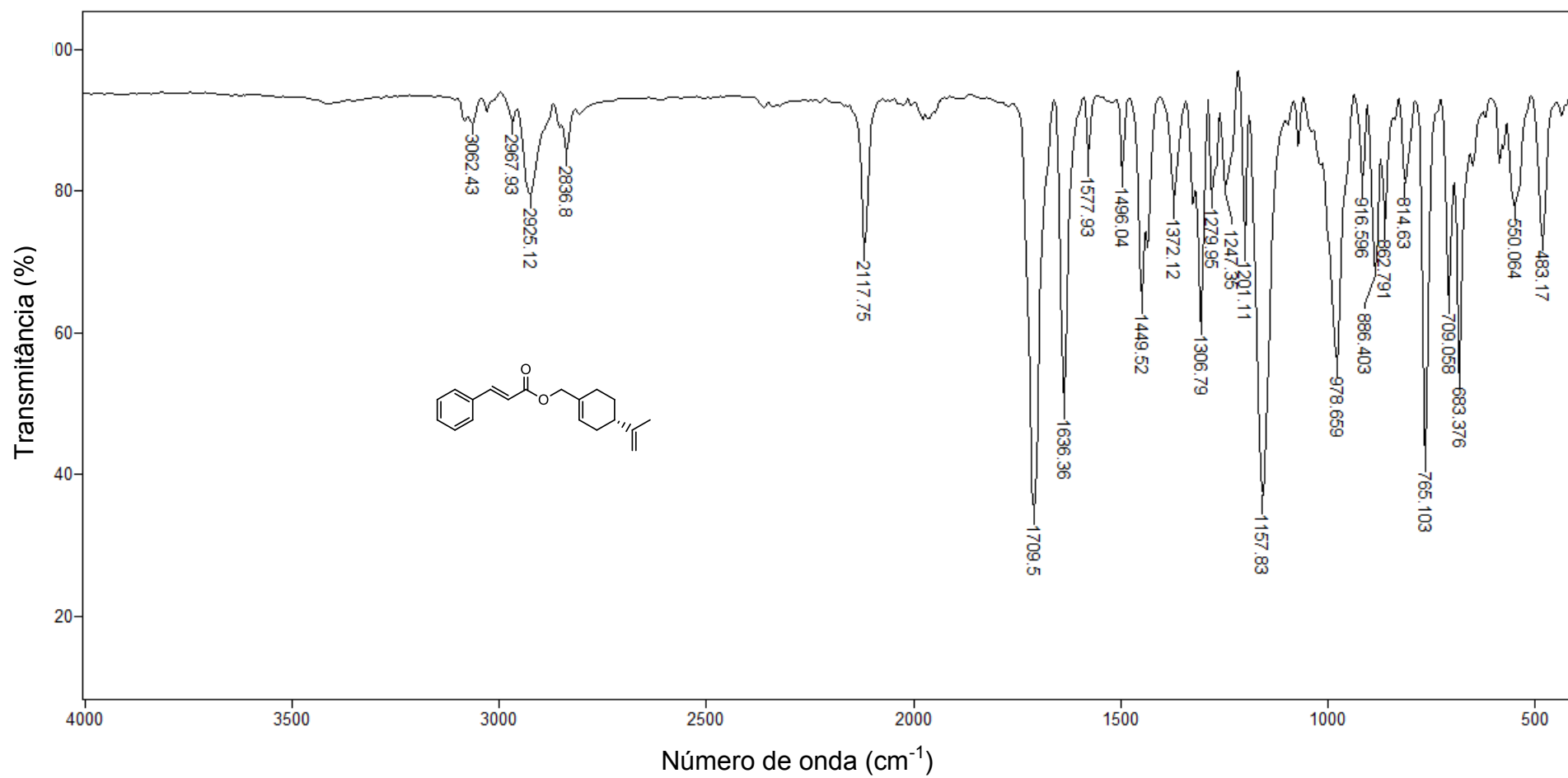


Figura 176 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13n**.

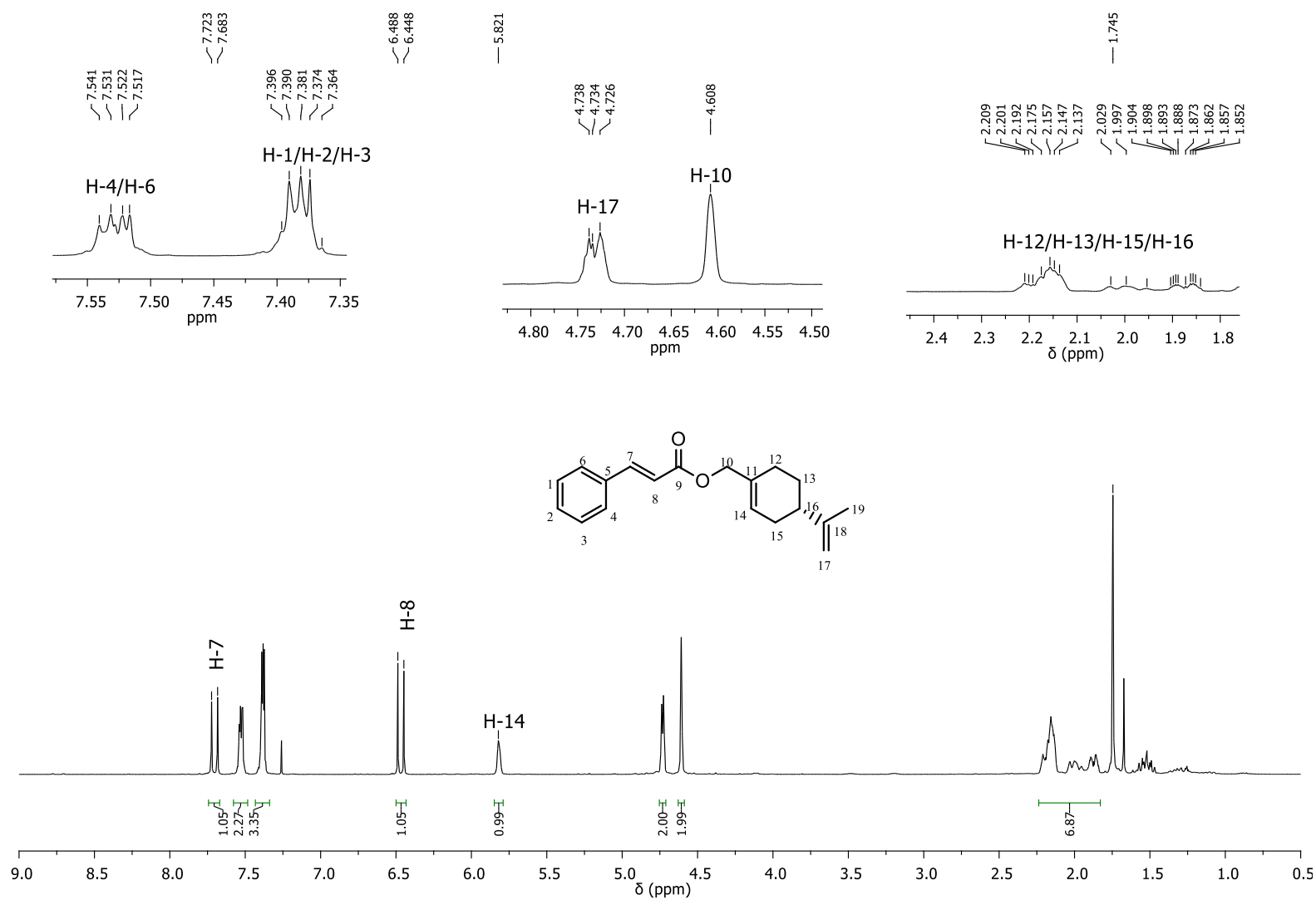


Figura 177 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **13n**.

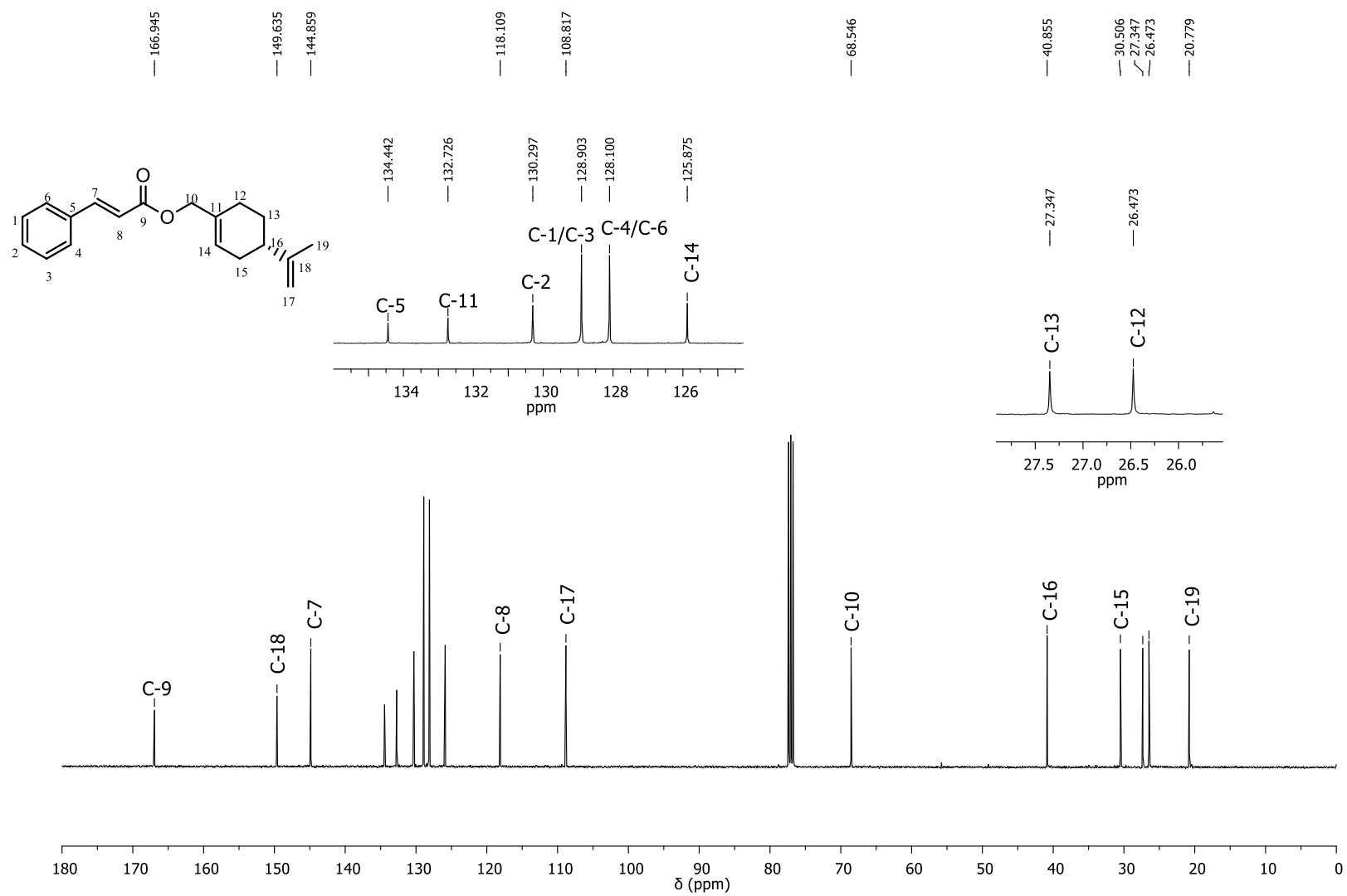


Figura 178 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **13n**.

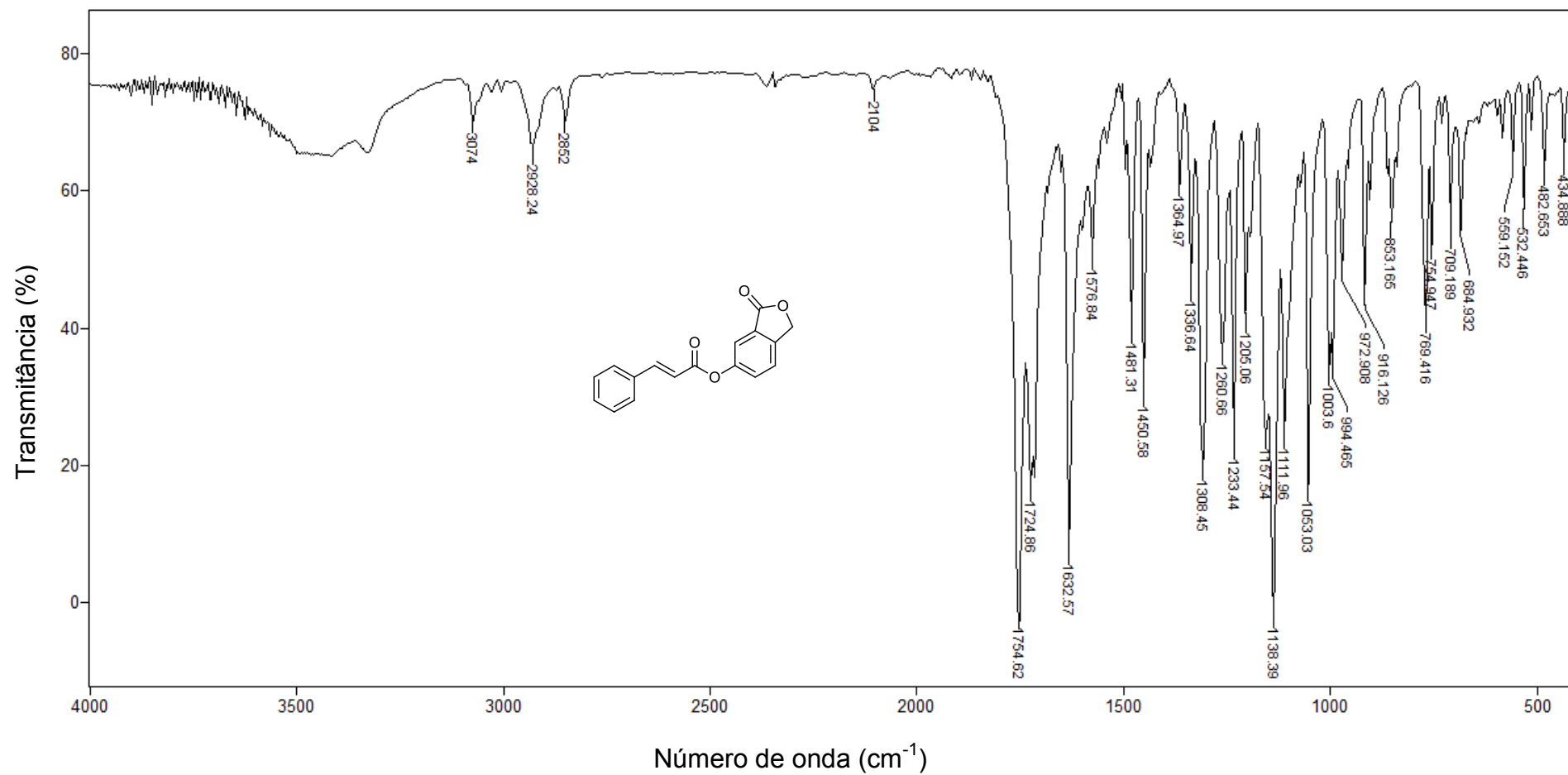


Figura 179 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto **13o**.

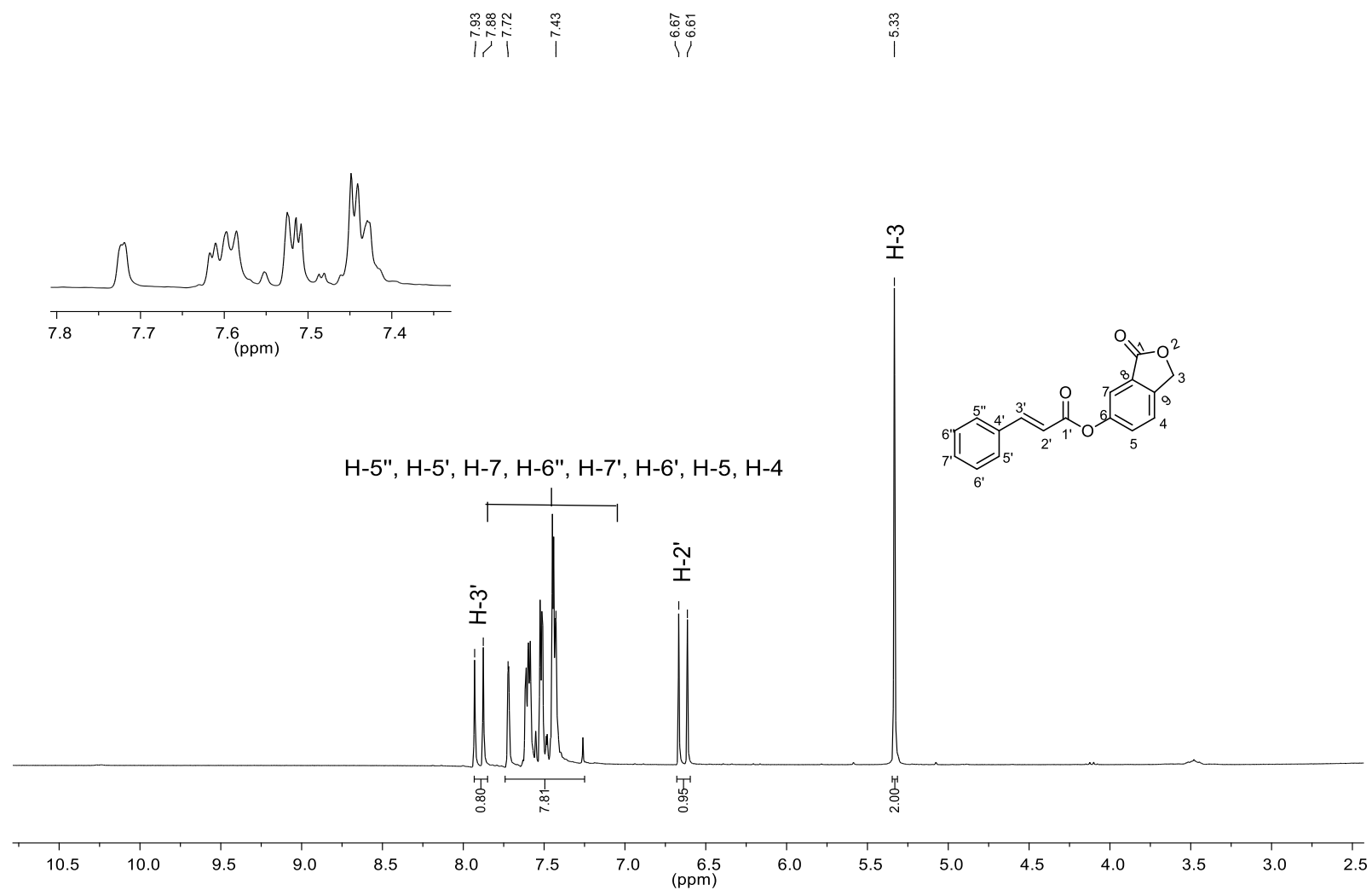


Figura 180 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **13o**.

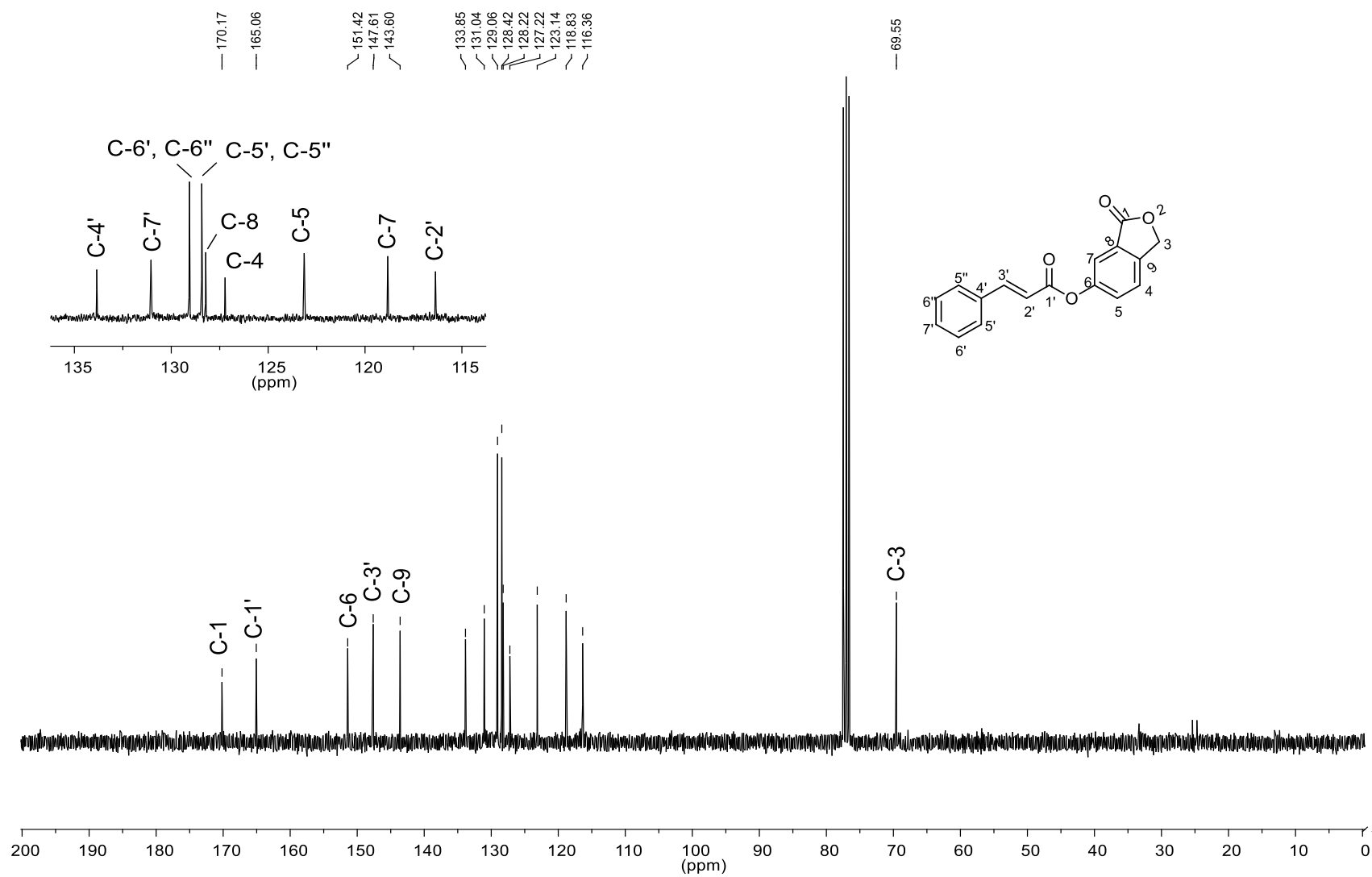


Figura 181 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13o**.

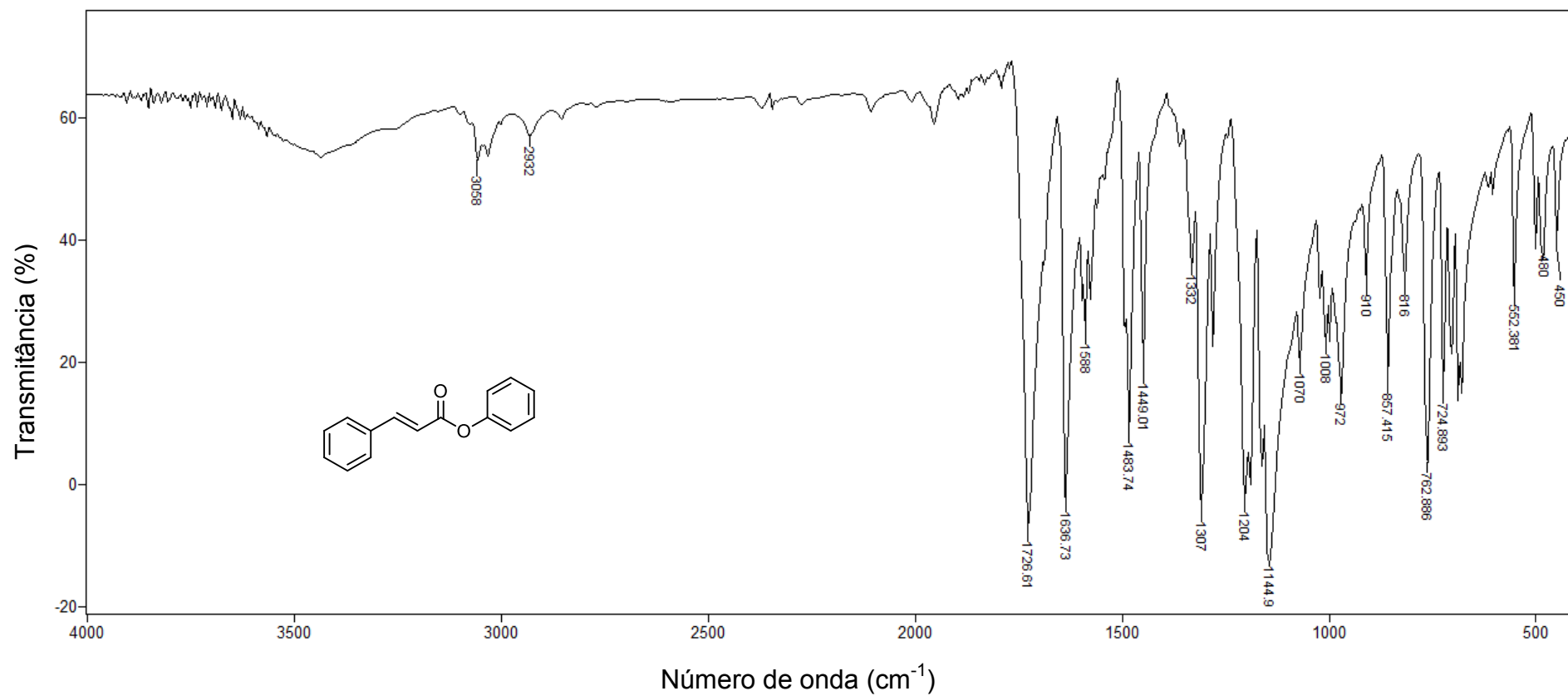


Figura 182 - Espectro no infravermelho (KBr) do composto **13p**.

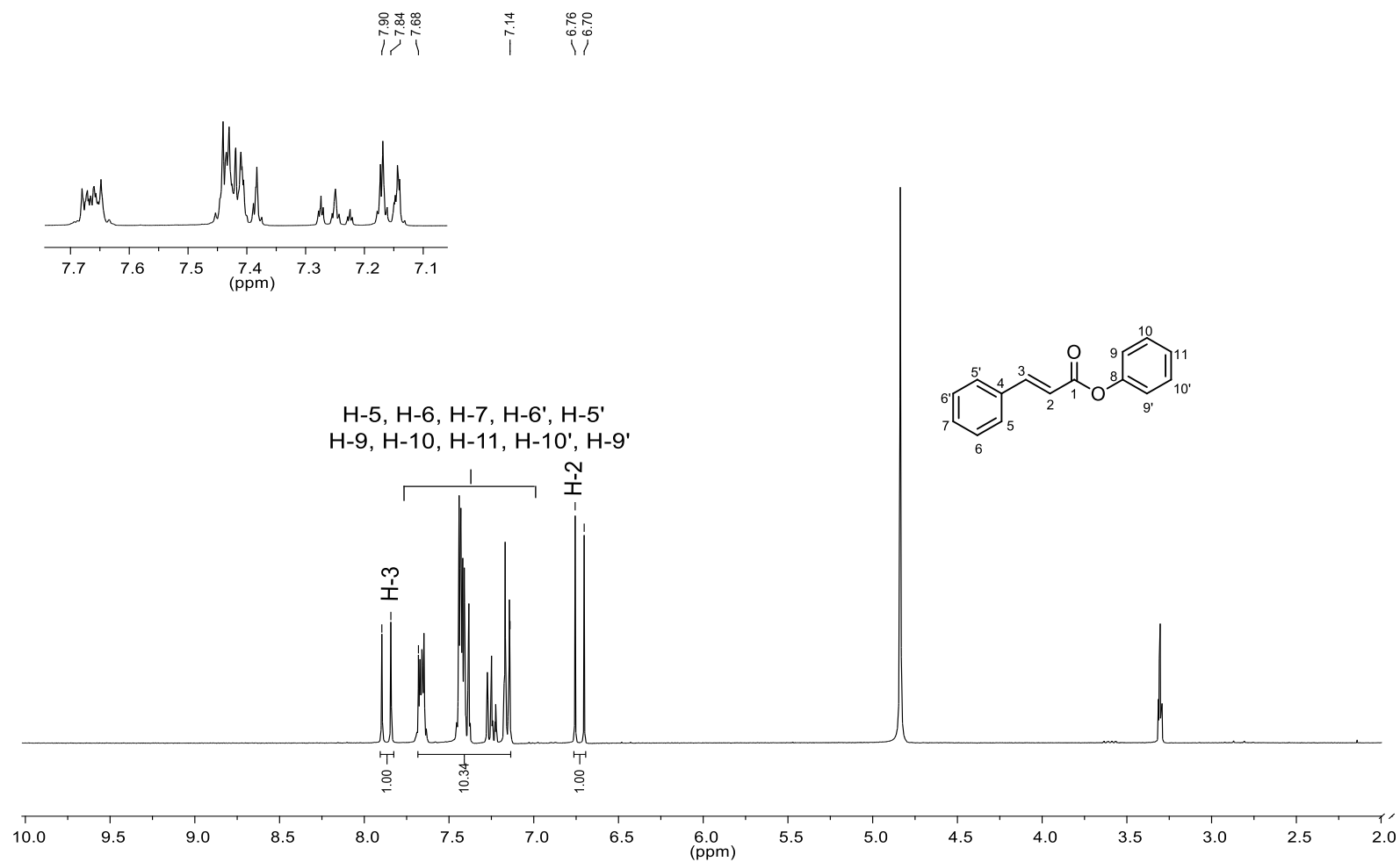


Figura 183 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) do composto **13p**.

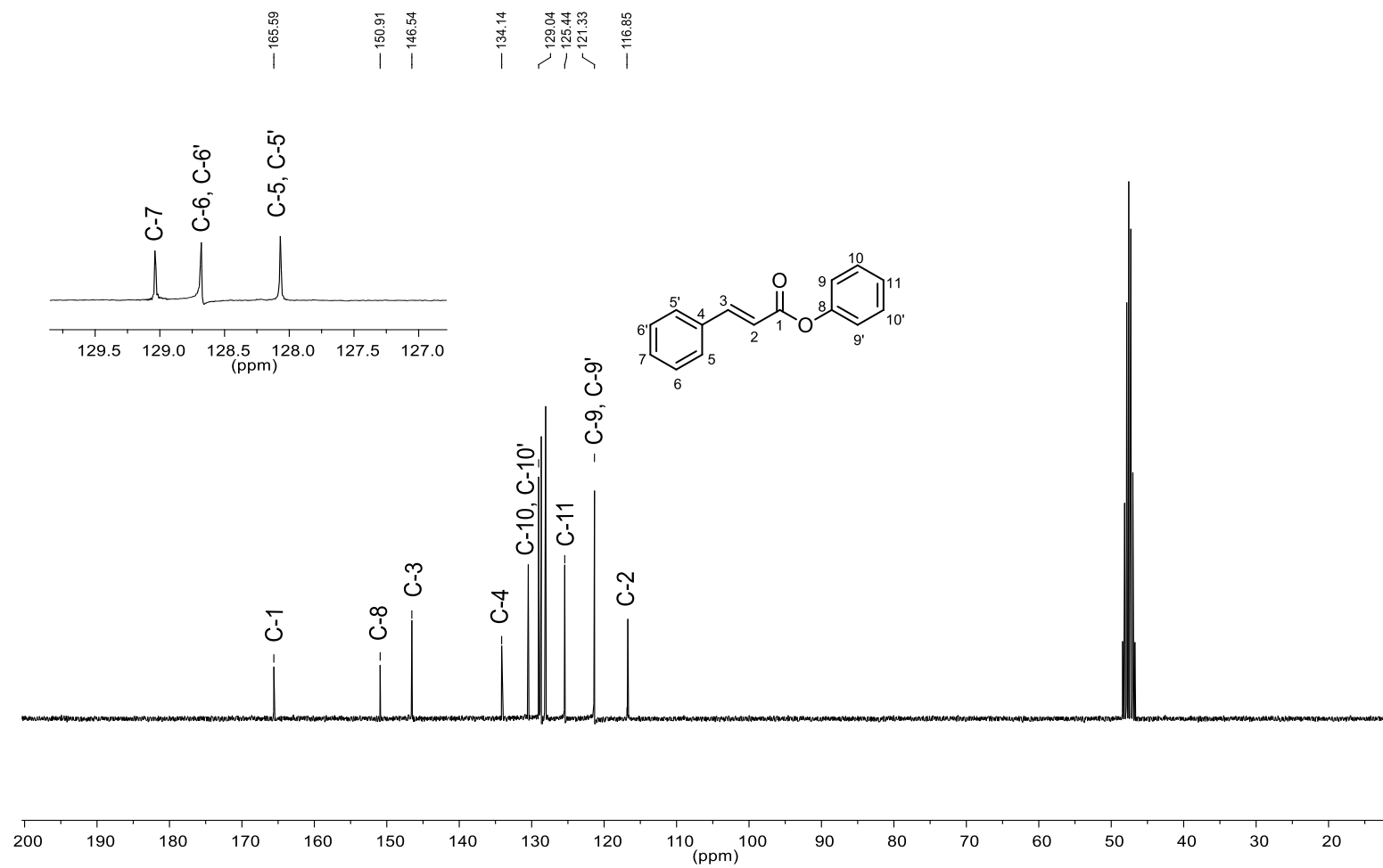


Figura 184 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) do composto **13p**.