

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO (UFRRJ)
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
TRYPANOSOMA CRUZI DE NOVOS HÍBRIDOS MOLECULARES DA
PIPERINA E NITAZOXANIDA.**

Luiz Henrique de Carvalho Oliveto

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
TRYPANOSOMA CRUZI DE NOVOS HÍBRIDOS MOLECULARES DA
PIPERINA E NITAZOXANIDA.**

LUIZ HENRIQUE DE CARVALHO OLIVETO

*Sob a Orientação do Professor
Marco Edilson Freire de Lima
e Co-orientação do professor
Cedric Stephan Graebin*

*Dissertação submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de
Pós-graduação em Química, Área de Concentração em
Química.*

**Seropédica, RJ
Junho de 2024**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveto, Luiz Henrique de Carvalho, 1994-
048p PLANEJAMENTO, SÍNTSE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTI-TRYPANOSOMA CRUZI DE NOVOS HÍBRIDOS MOLECULARES
DA PIPERINA E NITAZOXANIDA. / Luiz Henrique de
Carvalho Oliveto. - Rio de Janeiro, 2024.
170 f.: il.

Orientador: Marco Edilson Freire de Lima.
Coorientador: Cedric Stephan Graebin.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, PPGQ/Mestrado em Química,
2024.

1. Acoplamento de Amida. 2. Doença de Chagas. 3.
Piperina. 4. Nitazoxanida. 5. Trypanosoma cruzi. I.
Lima, Marco Edilson Freire de, 1965-, orient. II.
Graebin, Cedric Stephan , 1981-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
PPGQ/Mestrado em Química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

LUIZ HENRIQUE DE CARVALHO OLIVETO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/06/2024

Marco Edilson Freire de Lima. Dr.UFRRJ (Orientador)

Eduardo Hillmann Wanderlind (IQ-UFRRJ)

Gustavo Henrique Goulart Trossini Dr. USP

TERMO N° 456/2024 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 27/06/2024 14:51)

EDUARDO HILLMANN WANDERLIND
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ####925#7

(Assinado digitalmente em 27/06/2024 12:27)

MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: ####587#8

(Assinado digitalmente em 02/07/2024 11:07)

GUSTAVO HENRIQUE GOULART TROSSINI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: #### ####.378 ##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: 456, ano: 2024, tipo: TERMO, data de emissão: 27/06/2024 e o código de verificação: 8d3b91f60c

AGRADECIMENTOS

Dedico essa dissertação, primeiramente, à ciência, visto que seus avanços permitiram que meu pai estivesse presente na defesa de dissertação de seu filho mais novo. Posteriormente, dedico ao meu falecido gato Tom, o qual muito me motivara, nos momentos mais difíceis de minha vida, a continuar.

Aos meus pais, Mariângela e Pietro, agradeço-os incontestavelmente por ter me possibilitado caminhar e me tirado das possibilidades nefastas que o não estudar poderia ter me causado. Também aos meus irmãos, André e Pedro, por sempre estarem presentes nos melhores e piores momentos da minha vida, sendo o que sempre foram, meus amigos mais próximos. À minha cunhada, Danielle, à minha avó, Leda e ao meu sobrinho, Arthur, muito obrigado por tudo! Aos meus padrinhos, Aida e Ivan, o meu muito obrigado por sempre estarem comigo, ligarem e se importarem com seu sobrinho, mesmo estando ausente, por todo esse tempo que me acolheram, e sei que ainda continuarão acolhendo, assim como meus primos, Marcello e Nathalia.

Ao dedicar minha dissertação à ciência, muito se diz também aos caminhos que percorremos na ciência, que segue menosprezada pela sociedade, com o pouco investimento e o muito sucateamento, o que leva a muitos desistirem, não de forma a ser julgada, de se fazer ciência ou de se fazer ciência no Brasil. E aqui cabe uma dedicatória especial ao meu orientador, professor Marco Edilson, por ter acreditado em mim, em meu momento mais complicado, e aceitado tomar as rédeas do meu projeto, algo que jamais esquecerei. Também não posso esquecer de agradecer ao meu coorientador, professor Cedric, por ter me aberto as portas à ciência!

Aos amigos que fiz durante toda minha vida, Fábio, Luiza, Paula, Rodrigo e Rômulo, que sempre se mostraram fundamentais quando eu precisei chorar, desabafar, rir e, principalmente, conversar.

E novamente, em se tratando dos caminhos da ciência, tanto na graduação quanto no mestrado, aos amigos que fiz que, apesar de muitos, é impossível de não os mencionar nominalmente. Aos da graduação, Átila e Leonidas, que permanecemos sempre jogando nossos jogos de tabuleiro! Aos da iniciação científica, Lucas, Marina, Nathalia e Larissa. Aos que fiz durante o mestrado, Aylla, Felipe, Mariele e Lorrany. E, por último, mas não menos importante, aos que conviveram no laboratório 48B, LaQuiMed e LaQuiMel, da UFRRJ, comigo durante todo esse processo, Afonso, Ana Beatriz, Ana Paula, Andressa, Fábio, Jayane, Jorge, Lucas,

Gabriel Amaral, Gabriel Fulgêncio, Gabriel Teles (espero não ter esquecido algum Gabriel), Gabriela, Rafael e Thiago, obrigado por aturarem (?) meus momentos!

Aos técnicos da Central Analítica da UFRRJ, em especial ao Edivaldo e Vinícius, por realizarem meus ensaios de FT-IR e RMN, tal como à professora Rosane, tanto por coordenar a central como por ser uma professora incrível que sempre nos deu todo apoio no laboratório.

Aos membros da banca pelo aceite do convite para participar da banca e apontar o que é possível melhorar neste trabalho.

Aos órgãos de fomento, CAPES, FAPERJ e CNPq pelo auxílio financeiro às pesquisas, sendo o último, também, por fornecer minha bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A doença de Chagas (DC) é uma doença tropical negligenciada (DTN), causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A DC possui diferentes formas de contágio, sendo a principal delas a vetorial, através da picada de insetos da família Reduviidae (subfamília Triatominae). Contudo, a transmissão pode se dar ainda de forma vertical, da mãe para o filho, através da placenta ou da amamentação; por transfusão sanguínea; através de acidentes de laboratório; ou por via oral, também chamada de transmissão à distância, que se dá através do consumo *in natura* de alimentos contendo insetos contaminados. O *T. cruzi* possui um ciclo evolutivo complexo, apresentando três formas evolutivas distintas (epimastigota, amastigota e tripomastigota). A evolução da infecção se divide em três fases: a fase aguda, a indeterminada e a fase crônica. Nesta última ocorrem danos, principalmente, do trato digestório e do sistema cardíaco, em aproximadamente 30% dos pacientes infectados. Dados recentes da literatura evidenciam uma nova forma de amastigota, o amastigota dormente, que se aloja em células de tecidos profundos e pouco vascularizados, formando ninhos, sendo aptos a reiniciar o ciclo da doença a qualquer momento. Estima-se que a doença atinja de 6 a 8 milhões de pessoas em todo o Mundo e que cause aproximadamente 50 mil mortes. Há apenas dois fármacos que são utilizados no tratamento dos pacientes chagásicos: o nitroimidazol, benznidazol, e o derivado nitrofurânico, nifurtimox. Devido a efeitos genotóxicos o uso do nifurtimox foi descontinuado no Brasil, restando apenas o benznidazol como alternativa terapêutica para a quimioterapia da doença de Chagas. Os fármacos citados não demonstram atividade efetiva na fase crônica da infecção, o que aponta para a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que atendam aos pacientes chagásicos crônicos. Um produto de origem natural que apresenta uma boa atividade *in vitro* frente ao *T. cruzi* é a amida piperina. Esta amida pode ser isolada em rendimentos que variam de 3 a 10%, a partir dos frutos secos de *Piper nigrum* (pimenta-do-reino). A estrutura química da piperina pode ser dividida em três subunidades principais, sendo elas: um anel aromático trissubstituído; um dieno conjugado, espaçador, com quatro carbonos; além de uma fração do tipo amida-piperidinil. Diferentes abordagens já foram empregadas, visando a melhor compreensão da relação estrutura-atividade (REA) da piperina, que levaram à preparação de diferentes famílias de derivados desta importante amida natural. Neste trabalho, propomos a utilização da estratégia de hibridação molecular da piperina com o núcleo nitro-tiazol, farmacóforo presente na estrutura do fármaco antiparasitário nitazoxanida (Annita®). Dados da literatura demonstram que nitro-heterociclos interferem no equilíbrio redox da célula do parasito, que sendo mais sensível à presença de espécies radiculares de oxigênio e nitrogênio, são mais afetadas por eles do que as células de mamíferos. Assim, os compostos planejados têm grande potencial de apresentarem toxicidez seletiva frente a células do parasito. Resultados preliminares, extremamente promissores, obtidos *in vitro* frente a amastigotas de *T. cruzi* (cepa tulahuen LaCZ, C2C3) de um híbrido piperina- nitazoxanida sintetizado neste trabalho, validam a estratégia de planejamento molecular preconizada. Os híbridos foram preparados em rendimento entre 24 e 47%, através de reação de acoplamento entre ácidos carboxílicos e amidas, em presença HATU. Os testes em *T. cruzi* demonstraram-se positivos, com destaque ao híbrido principal, LOP-04, que apresentou resultado de IC₅₀ na casa de 2 micromolar. Houve destaque de outros dois compostos, ME-04 e ME-05, ambos demonstraram bons índices de seletividade, 18,40 e 17,58, respectivamente. O conjunto de dados obtidos permitiu traçar um estudo de REA buscando compreender quais porções das moléculas planejadas contribuíram para a atividade tripanocida.

Palavras-chave: Acoplamento de amida, Doença de Chagas, Piperina

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a neglected tropical disease (NTD) caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. CD has various modes of transmission, with the primary one being vectorial, through the bite of insects from the Reduviidae family (subfamily Triatominae). However, transmission can also occur vertically from mother to child, through the placenta or breastfeeding, by blood transfusion, laboratory accidents, or orally, also known as distant transmission, through consuming raw food containing contaminated insects. *T. cruzi* has a complex life cycle, presenting three distinct evolutive forms (epimastigote, amastigote, and trypomastigote). The progression of the infection is divided into three phases: acute, indeterminate, and chronic. In the chronic phase, damage occurs mainly to the digestive tract and the cardiac system in approximately 30% of infected patients. Recent literature data have revealed a new form of amastigote, the dormant amastigote, which lodges in cells of deep and poorly vascularized tissues, forming nests and being capable of restarting the disease cycle at any time. It is estimated that the disease affects 6 to 8 million people worldwide and causes approximately 50,000 deaths. There are only two drugs used in the treatment of Chagas disease patients: nitroimidazole, benznidazole, and the nitrofuran derivative, nifurtimox. Due to genotoxic effects, the use of nifurtimox has been discontinued in Brazil, leaving only benznidazole as a therapeutic alternative for the chemotherapy of Chagas disease. These drugs do not show effective activity in the chronic phase of the infection, highlighting the need to develop new therapeutic alternatives for chronic Chagas disease patients. The amide piperine is a natural product that shows good *in vitro* activity against *T. cruzi*. This amide can be isolated in yields ranging from 3 to 10% from the dried fruits of *Piper nigrum* (black pepper). The chemical structure of piperine is divided into three main subunits: a trisubstituted aromatic ring, a conjugated diene spacer with four carbons, and a piperidinyl amide fraction. Different approaches have been employed to better understand the structure-activity relationship (SAR) of piperine, leading to the preparation of different families of derivatives of this essential natural amide. In this work, we propose using the molecular hybridization strategy of piperine with the nitro-thiazole nucleus, a pharmacophore present in the structure of the antiparasitic drug nitazoxanide (Annita®). Literature data demonstrate that nitro-heterocycles interfere with the redox balance of the parasite cell, which, being more sensitive to the presence of radical oxygen and nitrogen species, is more affected by them than mammalian cells. Thus, the planned compounds have great potential to present selective toxicity against parasite cells. Auspicious preliminary results obtained *in vitro* against amastigotes of *T. cruzi* (strain Tulahuen LaCZ, C2C3) of a piperine-nitazoxanide hybrid synthesized in this work validate the proposed molecular design strategy. The hybrids were prepared in yields ranging from 24 to 47% through a coupling reaction between carboxylic acids and amides in the presence of HATU. The tests in *T. cruzi* showed positive results, highlighting the main hybrid, LOP-04, which presented an IC₅₀ result in the range of 2 µM. Two other compounds, ME-04 and ME-05, also showed good selectivity indices, 18.40 and 17.58, respectively. The data set obtained allowed us to understand and outline an SAR study to analyze which portions of the molecules contributed to their antitrypanosomal activity.

Keywords: Amide Coupling, Chagas Disease, Piperine

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de IC₅₀ do fármaco utilizado atualmente, da piperina e dos análogos testados (RIBEIRO, 2004).....	11
Tabela 2 – Derivados pipéricos	37
Tabela 3 – Derivados metileno-dióxi-cinâmicos.....	38
Tabela 4 – Derivados metileno-dióxi-benzoicos	39
Tabela 5 – Derivados sem grupo metileno-dióxi	39
Tabela 6 – Derivados nitrosos	40
Tabela 7 – Atribuições do espectro de infravermelho	48
Tabela 8 – Resultados dos ensaios biológicos	52

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

Figura 1 – Ciclo de vida do protozoário <i>T. cruzi</i> em mamíferos (RASSI, 2010), traduzido pelo autor.	.2
Figura 2 – Fluxo migratório da doença de Chagas, mostrando a prevalência de migração nos Estados Unidos e Europa. Fonte: Fiocruz.br.....	3
Figura 3 – Molécula do insumo farmacêutico ativo (IFA) dos fármacos benznidazol (1) e nifurtimox (2).	4
Figura 4 – Intermediários reativos causados pela ação das nitro-redutases. Fonte: PETERSON & WILLIE, 2014.....	4
Figura 5 – Extratos latino-americanos com atividade anti <i>T. cruzi</i> . Fonte: GARCÍA-HUERTAS & CARDONA-CASTRO, 2021, adaptado.....	5
Figura 6 – Principais alvos bioquímicos do <i>T. cruzi</i> . Fonte: GARCÍA-HUERTAS & CARDONA-CASTRO, 2021, adaptado.....	6
Figura 7 – Natureza dos fármacos de aprovados entre 1981 e 2019. Fonte: NEWMANN & CRAGG, 2020, adaptado.	8
Figura 8 – Pimenta-do-reino e estrutura da piperina.....	9
Figura 9 – Derivados análogos à piperina (RIBEIRO et al., 2004).	11
Figura 10 – Função amida.	13
Figura 11 – Estrutura do fármaco nitazoxanida (Annita®).	14
Figura 12 – Hibridização molecular. Fonte: LI et al., 2020, adaptado.	15
Figura 13 – Representação da gênese do venetoclax. Fonte: BANCET et al, 2020, adaptado.....	16
Figura 14 – Propostas do mecanismo de ação do nitazoxanida. Fonte: HOFFMAN et al., 2007. Adaptado.	18
Figura 15 – Estrutura geral de um cloreto de acila ou cloreto ácido.	19
Figura 16 – Reagentes de ativação de carboxilas de ácido.	19
Figura 17 – Reação geral para a formação de amidas por cloretos ácidos.	20
Figura 18 – Estrutura do reagente de acoplamento HATU.	21
Figura 19 – Intermediário reativo. Fonte: JOULLIÉ & LASSEN, 2020, adaptado.	21
Figura 20 – Esquema reacional geral da formação de amidas com HATU.....	21
Figura 21 – Estrutura do T3P®.	22
Figura 22 - Número de trabalhos usando o T3P® na janela de tempo 2012-2023 pelo Google Scholar.	22
Figura 23 – Planejamento molecular para a preparação dos híbridos piperina-nitazoxanida.....	24
Figura 24 – Análise retro-sintética para a preparação dos novos híbridos planejados.	26
Figura 25 - Mecanismo da hidrólise da piperina.	27

Figura 26 – Princípio da vinologia aplicado ao híbrido piperina-nitazoxanida: planejamento de uma série de análogos.....	28
Figura 27 - Mecanismo da condensação de Knoevenagel, modificada por Doebner. Fonte: VAN BEURDEN, 2020.....	29
Figura 28 - Mecanismo da oxidação de aldeído através do reagente de Jones. Fonte: RODIG, 1990. ..	30
Figura 29 - Mecanismo de formação dos amido-ésteres através de um cloreto de ácido (Carey, 2014).	31
Figura 30 - Mecanismo de formação dos amido-ácidos por saponificação dos respectivos ésteres, seguido de neutralização do meio. Fonte: POLANYL & SZABO, 1934.....	32
Figura 31 - Mecanismo de hidrogenação.....	33
Figura 32 - Mecanismo de formação das diamidas utilizando o reagente de acoplamento T3P®. Fonte: SURESHBABU et al., 2013.....	34
Figura 33 – Efeito de ressonância, retirador de elétrons do anel triazol substituído pelo grupamento nitro.	35
Figura 34 - Mecanismo de formação das diamidas através do reagente de acoplamento HATU. Fonte: SHONE et al., 2023. Adaptado.	36
Figura 35 - Estrutura do composto LOP-04.....	41
Figura 36 - Espectro RMN de ^1H para o composto LOP-04.....	42
Figura 37 - Espectro RMN HSQC para o composto LOP-04.....	43
Figura 38 – Ilustração da porção do anel piperidínico da molécula LOP-04.	44
Figura 39 - Espectro RMN ^1H do composto LOP-03.	45
Figura 40 - Espectro RMN ^1H do composto LOP-03 ampliado entre 6,855 a 6,910 ppm.	45
Figura 41 - Espectro RMN de ^{13}C para o composto LOP-04.....	46
Figura 42 - Espectro de infravermelho do composto LOP-04, ampliado entre as regiões de 400-1750 cm^{-1}	47
Figura 43 - Espectro de infravermelho do composto LOP-04, ampliado entre as regiões de 1750-4000 cm^{-1}	48
Figura 44 – Dados da cromatografia líquida do composto LOP-04.....	49
Figura 45 – Espectro de massas do composto LOP-04.....	49
Figura 46 – Espectro de massas da maior impureza do composto LOP-04.	50
Figura 47 – Ilustração da maior impureza do composto LOP-04, tal como a sua massa exata.	50
Figura 48 – Estruturas do derivado reduzido da nitozoxanida e do precursor 2-amino-5-nitroimidazol.	53
Figura 49 – Compostos submetidos aos ensaios biológicos.	53
Figura 50 – Reação de hidrólise da piperina.....	55

Figura 51 – Reação de oxidação através de Reagente de Jones para a obtenção do ácido benzo[D][1,3]dioxol-5.....	57
Figura 52 – Etapa da formação dos amido-ácidos saturados.	60
Figura 53 – Reação de acoplamento de amida utilizando do reagente T3P®.	60
Esquema 1 – Reação de hidrólise da piperina.	55
Esquema 2 – Hidrólise da antiepilepsirina.	56
Esquema 3 – Etapa da formação do amido-ester.	58
Esquema 4 – Etapa da formação dos amido-ácidos.	59
Esquema 5 – Etapa da formação dos amido-ácidos saturados	60
Esquema 6 - Etapa do acoplamento de amida.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- 24MST** - *Sterol 24-C-methyltransferase* (*Esterol 24-C-metiltransferase*)
- ADME** – Absorção, distribuição, metabolização e excreção
- ALH** – Aceptor de Ligação de Hidrogênio
- ATR** – *Attenuated total reflectance* (Reflectância total atenuada)
- BCL-2** - *B-cell lymphoma 2* (Linfoma 2 em células B)
- CCD** – Cromatografia em Camada Delgada
- CDCl₃** - Clorofórmio Deuterado
- CoA** – Coenzima A
- CPRG** – Clorofenol β-galactopiranosídeo
- CYP51** - *Cytochrome P450 14a-sterol demethylases* (*Citocromo P450 lanosterol 14a-desmetilase*)
- DC** – Doença de Chagas
- DCM** – Dicloro-metano
- DIPEA** - *N,N-diisopropiletilamina*
- DLH** – Doador de Ligação de Hidrogênio
- DMF** – *N,N-dimetilformamida*
- DNA** - *deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- EDTA** – Etileno-diamino acético
- EM** – Espectrometria de massa
- ESI** – *Electrospray ionisation* (ionização por eletrospray)
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- FTIR** – *Fourier-transform infrared* (infravermelho com transformada de Fourier)
- HATU** - *Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium* (Hexafluorofosfato Azabenzotriazol Tetrametil Urônio)
- HMG-CoA-R** - *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase* (*3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase*)
- HPLC** – *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta performance)
- IFA** – Ingrediente Farmacêutico Ativo
- IS** – Índice de seletividade
- LaQuiMed** - Laboratório de Química Medicinal
- LC-MS** – *Liquid chromatography – Mass spectrum* (Cromatografia líquida – Espectro de massas)
- MHz** - Megahertz
- NADH** - *Nicotinamide adenine dinucleotide* (Nicotinamida adenina dinucleotídeo)
- OSC** - *Oxidosqualene cyclases* (*Oxidoesqualeno-ciclase*)
- PDH** – *Pyruvate dehydrogenase* (*Piruvato desidrogenase*)
- PF** – Ponto de fusão
- PFOR** - *Pyruvate ferredoxin oxidoreductase* (*Piruvato-ferroxidina oxidorredutase*)
- PPGQ** – Programa de pós-graduação em química
- PQ** – Pavilhão de Química

- QSAR** - *Quantitative structure–activity relationship models* (Modelos de REA Quantitativos)
- REA** – Relação Estrutura Atividade
- RMN** - Ressonância magnética nuclear
- RNA** – *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)
- SFB** – Soro fetal bovino
- SOD** – *Superoxide dismutase* (Superóxido dismutase)
- SQLE** – *Squalene epoxidase* (*Esqualeno-epoxidase*)
- SQS** - *Squalene synthase* (*Esqualeno-sintase*)
- TEA** – Trietil-amina
- THF** – Tedrahidro furano
- TPP** – Trifenil fosfato
- TR** – Tripanotioma redutase
- TMS** - Tetrametilsilano
- UFRRJ** – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
- UK** – United Kingdom (Reino Unido)

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. DOENÇA DE CHAGAS: 114 ANOS E AINDA DESAFIADORA.....	1
1.2. PRODUTOS NATURAIS, UMA ALTERNATIVA VIÁVEL	7
1.3. A PIPERINA E SUAS VARIADAS FUNÇÕES.....	8
1.4. AS AMIDAS E SUA IMPORTÂNCIA NA QUÍMICA MEDICINAL.....	12
1.5. FERRAMENTAS DE PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS	14
1.6. NITOZOXANIDA E ANEIS IMIDAZÓLICOS	16
1.7. ACOPLAMENTO DE AMIDAS, A REUNIÃO DE TODA ESSA INFORMAÇÃO.....	18
1.7.1. FORMAÇÃO ATRAVÉS DE CLORETOSS ÁCIDOS.....	19
1.7.2. FORMAÇÃO DE AMIDAS ATRAVÉS DO REAGENTE DE ACOPLAMENTO HATU	20
1.7.3. FORMAÇÃO DE AMIDAS ATRAVÉS DO REAGENTE T3P®	21
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	23
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
2.2. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1. OBTENÇÃO DOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	26
3.1.1. ÁCIDO PIPÉRICO	26
3.1.1.1. PRINCÍPIO DA VINOLOGIA EM QUÍMICA MEDICINAL	27
3.1.2. ÁCIDO METILENODIÓXI-CINÂMICO E DO ÁCIDO 5-FENILPENTA-2,4-DIENOICO	28
3.1.3. ÁCIDO METILENODIÓXI-BENZOICO	29
3.2. SÍNTESE GERAL DOS AMIDO ÉSTERES	30
3.2.1. SÍNTESE ATRAVÉS DE CLORETO DE ACILA	30
3.3. HIDRÓLISE DE ÉSTERES	32
3.3.1 SÍNTESE GERAL DOS AMIDO-ÁCIDOS	32
3.4. HIDROGENAÇÃO	32
3.4.1 PRODUÇÃO DO AMIDO ÁCIDO PIPÉRICO SATURADO	32

3.5. SÍNTESE DE AMIDAS PELO USO DO REAGENTE DE ACOPLAMENTO T3P®.....	33
3.6. SÍNTESE DE AMIDAS PELO USO DO REAGENTE DE ACOPLAMENTO HATU.....	35
3.6.1. ACOPLAMENTO DO 2-AMINO-5-NITROTIAZOL	36
3.7. COMPOSTOS SINTETIZADOS E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....	37
3.7.1. COMPOSTOS SINTETIZADOS	37
3.7.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL – RMN	41
3.7.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL – INFRAVERMELHO	46
3.7.4. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL – LC-MS	49
3.8. RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	50
4. MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1. SÍNTESSES.....	54
4.1.1. PREPARAÇÃO DOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	55
4.1.1.1. SÍNTESE DO ÁCIDO (2E,4E)-5-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)PENTA-2,4-DIENÓICO (ÁCIDO PIPÉRICO)	55
4.1.1.2. SÍNTESE DO ÁCIDO (E)-3-(BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)ACRÍLICO E DO ÁCIDO (2E,4E)-5-FENIL-PENTA-2,4-DIENOICO	56
4.1.1.3. SÍNTESE DO ÁCIDO BENZO[D][1,3]DIOXOL-5	56
4.1.2. PREPARAÇÃO DOS AMIDO-ÉSTERES	57
4.1.2.1. SÍNTESE DO ACOPLAMENTO DOS ÁCIDOS COM O ISONIPECOTATO DE ETILA, [(2E,4E)-5-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)PENTA-2,4-DIENOIL]PIPERIDINA-4-CARBOXIETILA.....	57
4.1.3. PREPARAÇÃO DOS AMIDO-ÁCIDOS	58
4.1.3.1. PROCEDIMENTO GERAL PARA A HIDRÓLISE DOS AMIDO-ÉSTERES.....	58
4.1.3.2. HIDROGENAÇÃO DO AMIDO-ÁCIDO, SÍNTESE DO ÁCIDO 1-(5-(BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)PENTANOIL)PIPERIDINA-4-CARBOXÍLICO	60
4.1.5. PROCEDIMENTO GERAL PARA O ACOPLAMENTO DE AMIDAS VIA HATU	61
4.2. ENSAIO BIOLÓGICO	63
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

7. ANEXOS	74
 7.1. ANEXO II - RMN DO ^1H, RMN DO ^{13}C E FTIR	74
 7.2. ANEXO II – LC-MS E GRÁFICOS DE DOSE RESPOSTA	72

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. DOENÇA DE CHAGAS: 114 ANOS E AINDA DESAFIADORA

A doença de Chagas (também conhecida como tripanossomíase americana) é uma enfermidade causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae). Apesar de estudos em DNA de múmias da América do Sul indicarem que a doença aflige a humanidade há pelo menos 9 mil anos, a sua descoberta e caracterização, feita pelo médico e cientista Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, se deu apenas em 1909 (CHAGAS, 1909). O trabalho de Chagas é dito como único em se tratando da história da medicina, levando em conta o amplo detalhamento, desde a identificação do vetor e descrição dos ciclos do agente etiológico em diferentes hospedeiros, até o detalhamento das fases da doença, divididas em fase aguda e fase crônica (RASSI *et al.*, 2010).

É possível determinar sua forma de contágio em dois mecanismos principais, os primários e os secundários. Os casos de transmissão por mecanismos secundários, ocorrem por ingestão de alimento malcozido (inclusive, uma das principais formas de contágio por animais silvestres), transmissão sexual, acidentes laboratoriais e casos isolados, no geral. Dentre os mecanismos primários, além de transfusão sanguínea, placentária, transmissão congênita e, principalmente, por seus vetores (COURA, 2015). Os três vetores mais importantes da doença são os insetos *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triadoma dimidiata* (RASSI *et al.*, 2010), apesar de também ser encontrado em outros insetos das famílias *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (popularmente conhecidos como barbeiros, no Brasil). As variáveis mais importantes para a infecção por vetor são que o inseto deve estar contaminado pelo parasita, sua excreta seja no momento de seu repasto (alimentação sanguínea) e a intensidade das feridas causadas, visto que para a infecção se instalar é necessário que, por conta da irritabilidade de suas feridas, o hospedeiro definitivo se coce e carreie as excretas contaminadas pelo parasita à corrente sanguínea por via da ferida causada, também pode ocorrer essa passagem pelas mucosas do indivíduo. Ao chegar na corrente sanguínea em forma de tripomastigotas, o parasita invade diferentes tipos celulares e se diferencia em amastigota, que se multiplica por fissão binária e espalha-se pelos tecidos, formando pseudocistos que, quando rompidos, causam a inflamação e, posteriormente, a necrose. Por fim, os amastigotas que se diferenciam por tripomastigotas, rompem a membrana celular e infectam novas células (COURA, 2003). Essa fase da doença é caracterizada pela fase aguda, que costuma não exibir sintomas característicos além de febre, sendo que em aproximadamente 70% dos pacientes não exibem sintomas clínicos. Apesar de mais raros, pode haver sintomas mais específicos, tais como alargamento

do fígado, baço e/ou glândulas linfáticas, edemas subcutâneos (chagomas de inoculação), e em caso de transmissão pela mucosa ocular, a marca da Romaña (RASSI *et al.*, 2010).

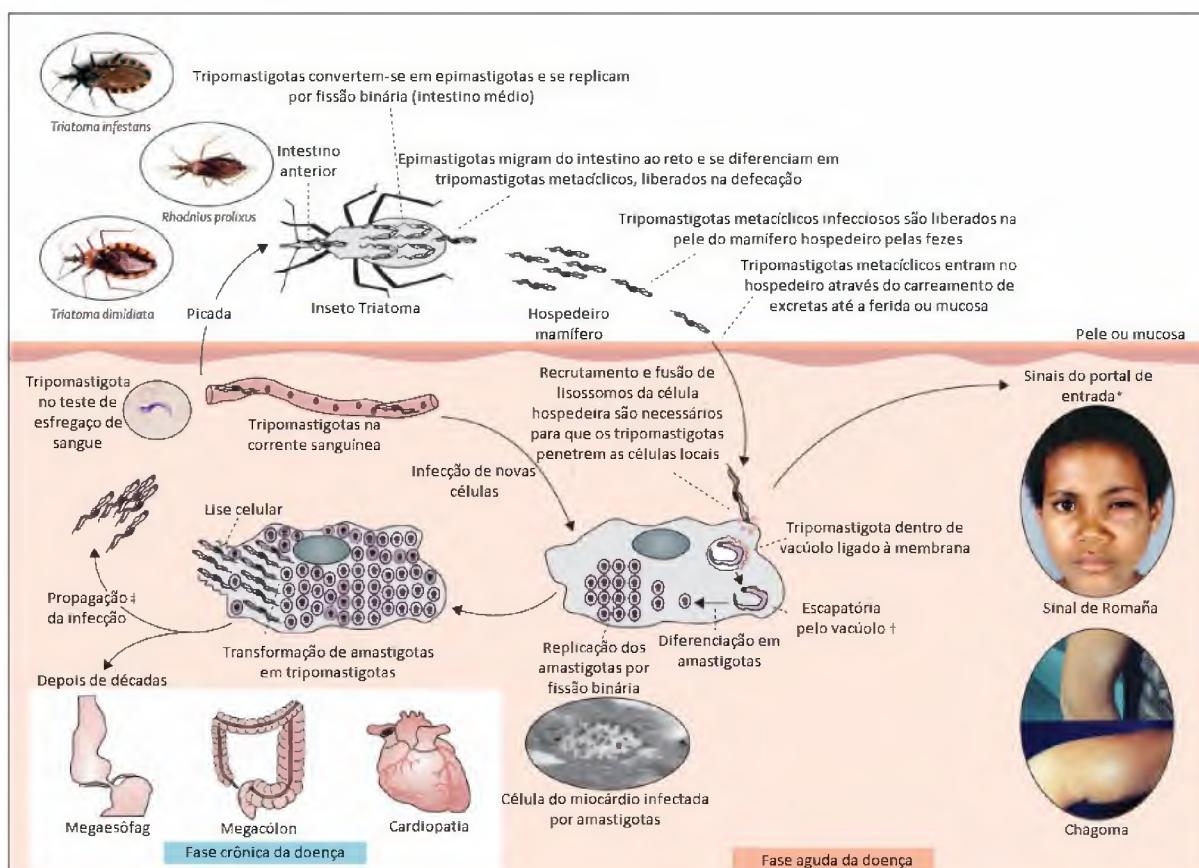


Figura 1 – Ciclo de vida do protozoário *T. cruzi* em mamíferos (RASSI, 2010), traduzido pelo autor.

Toda a problemática se dá pela natureza silenciosa da doença que, mesmo após os sintomas brandos, pode não ser descoberta a tempo. A fase aguda da doença costuma durar entre 4 e 8 semanas, a partir desse período, o paciente se encontra numa fase indeterminada, onde não é possível verificar o parasito na corrente sanguínea, ou seja, já está bem estabelecido no organismo, principalmente nos músculos cardíacos e digestórios, onde, em cerca de uma a três décadas, aproximadamente 30% dos pacientes começam a desenvolver sintomas mais agravantes, evoluindo então para a fase crônica da doença, que na maioria dos casos leva o paciente ao óbito (BERN, 2015; WHO, 2023).

Um novo problema apontado em relação a uma cura é que, em 2017, foi descoberta uma nova forma de amastigota no ciclo de vida do parasito, o amastigota dormente, que pode permanecer por longos períodos em pacientes no estado crônico da doença, podendo a qualquer momento reiniciar a infecção. Ainda sobre os amastigotas dormentes, foi percebido que eles podem se alojar em astrócitos (células do sistema nervoso que sustentam os neurônios), formando ninhos, o que dificulta ainda mais o desenvolvimento de um fármaco contra a doença,

visto que a barreira hematoencefálica tende a bloquear passagem de moléculas pequenas (MARTÍN-ESCOLANO *et al.*, 2022; MASOCHA & KRISTENSSON, 2012).

Os novos cenários de uma doença que parecia ser apenas um problema regional assustam, levando em conta que, de acordo com estatísticas recentes, é estimado de 6 a 8 milhões de infectados no mundo o que causa aproximadamente 50 mil mortes ao ano, sendo que a doença abrange em torno de 65 a 100 milhões de pessoas em áreas de risco. (LIDANI *et al.*, 2019; PAHO, 2020). Apesar de ainda ser um problema majoritário da América Latina, observa-se um avanço no número de casos autóctones nos Estados Unidos que, ainda sendo um número que chega a centenas, já começa a preocupar a comunidade científica local (LYNN *et al.*, 2020). Dentre outros problemas apontados, é de se destacar que devido ao fluxo migratório de latino-americanos, sendo o segundo maior do mundo em números, a doença conseguiu se espalhar ainda mais, infectando pacientes em outros países, como mostrado no mapa da Figura 2, onde foi observado uma prevalência de casos causados por transfusão de sangue, casos congênitos e transplante de órgãos, levando a doença a ser uma ameaça global (LIDANI *et al.*, 2019).

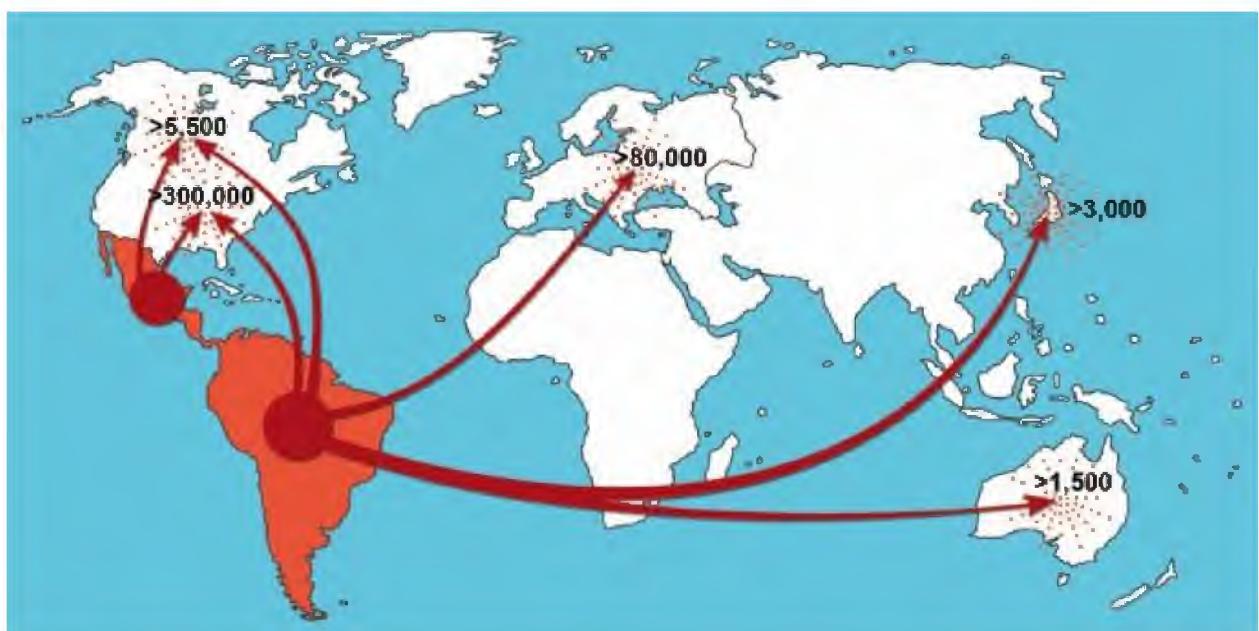


Figura 2 – Fluxo migratório da doença de Chagas, mostrando a prevalência de migração nos Estados Unidos e Europa. Fonte: Fiocruz.br.

Corrobora-se com a preocupação atual da ciência com a doença o fato de que, utilizando o banco de dados do Google Scholar, observa-se que em 100 anos desde a caracterização da doença (1909-2009), o número de artigos publicados com o termo *Chagas disease* equivale com o número de artigos dos últimos 12 anos (2010-2022). Tal fato se repete quando se pesquisa o mesmo termo no banco de artigos da Pubmed, onde no período de 64 anos (1945 é

o primeiro ano o qual o termo *Chagas disease* é mencionado), encontram-se 10,387 mil artigos contra 10,933 artigos no período de 2010-2022 (Google Scholar; Pubmed, 2023).

A maior complicação em relação ao tratamento da doença é porque os fármacos existentes, benznidazol e nifurtimox (Figura 3), apesar de o último ter sua comercialização interrompida na América do Sul por conta de seus efeitos genotóxicos, têm efeito apenas na fase aguda da doença. Como mencionado anteriormente, a natureza silenciosa da doença, em boa parte dos casos, impede com que o diagnóstico seja dado a tempo de ser possível perceber a infecção ainda na fase aguda. Uma adversidade dos fármacos em questão é que além de não fazerem o efeito desejável na fase crônica da doença, seus efeitos adversos costumam piorar o quadro clínico do paciente, sendo tais efeitos, perda de peso, náuseas, vômito, insônia, depressão, perda de memória, sonolência e intolerância hepática (JANNIN & VILLA, 2007).

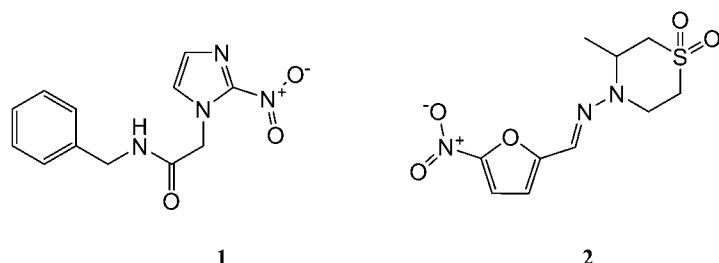


Figura 3 – Molécula do insumo farmacêutico ativo (IFA) dos fármacos benznidazol (**1**) e nifurtimox (**2**).

Apesar de não se saber tudo sobre o mecanismo de ação dos dois fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, foi percebido que ambos agem como pró-fármacos, onde o grupo nitro é ativado por uma nitro-redutase dependente de NADH tipo 1, convertida em um grupo amina, o que forma radicais livres intermediários e metabólitos eletrofílicos no parasito, causando a toxicidade para o mesmo. A Figura 4 aponta os principais intermediários reativos formados pela ação das nitro-redutases em nitroimidazois (PATTERSON & WYLLIE, 2014).

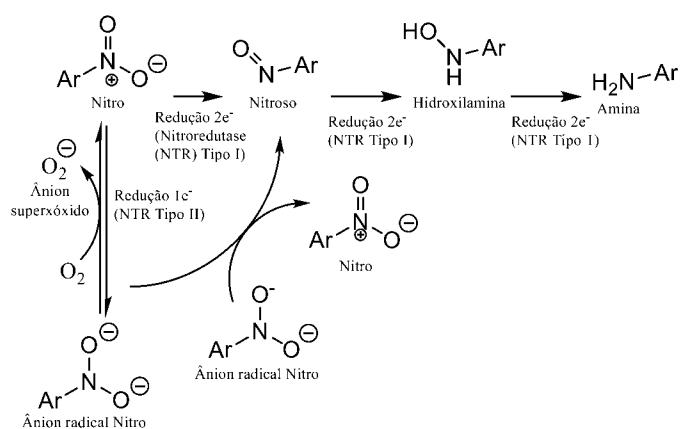


Figura 4 – Intermediários reativos causados pela ação das nitro-redutases. Fonte: PATTERSON & WYLLIE, 2014.

Atualmente as propostas para se chegar a um novo tratamento passam por reposicionamento de fármacos (TRINDADE *et al.*, 2021), mudanças da ministração dos fármacos já utilizados (TORRICO *et al.*, 2018) ou até a procura por produtos naturais (LAZARIN-BIDÓIA *et al.*, 2022), porém, nos dois primeiros casos, nenhum conseguiu inibir a infecção crônica ou ainda não chegaram a estágios de triagem avançados. Para o caso de produtos naturais foi percebido que, apesar de ter se encontrado boa atividade de determinados extratos de plantas contra o parasito (Figura 5), não houve continuidade no estudo da maioria dos extratos mais promissores, o que dificulta a busca por novos fármacos (GARCÍA-HUERTAS & CARDONA-CASTRO, 2021).



Figura 5 – Extratos latino-americanos com atividade anti *T. cruzi*. Fonte: GARCÍA-HUERTAS & CARDONA-CASTRO, 2021, adaptado.

Entender os alvos bioquímicos do parasito é importante para que se busque uma solução, mitigando os efeitos adversos de um possível tratamento, e até viabilizando formas mais rápidas de se conseguir o objetivo. A Universidade de Dundee (*University of Dundee* Center for Interdisciplinary Research and *Wellcome Trust Biocentre*-Scotland, UK) estabeleceu critérios para a avaliação de alvos terapêuticos de doenças negligenciadas, tais como evidências genéticas e químicas de que o alvo é essencial ao indivíduo; sítio ativo possível de ser modulado por algum tipo de fármaco; reduzir a toxicidade em humanos de tal forma que não haja homólogos humanos (sítios ativos parecidos com o alvo do parasito) ou pelo menos que não

haja homólogos humanos essenciais; e, por último, que o alvo não tenha isoformas (proteínas similares originadas de um único gene) conhecidas, a fim de evitar o desenvolvimento de resistência ao fármaco (GARCÍA-HUERTAS & CARDONA-CASTRO, 2021).

Portanto, formas de se modular sítios ativos são pensadas diariamente além das que remetem ao “um alvo, um fármaco”. Uma nova técnica envolvendo hibridação molecular é a possibilidade de alcançar dois alvos com apenas um fármaco, sendo eles em proteínas distintas ou não, aumentando assim a possibilidade de sucesso do novo composto, diminuindo a possibilidade de desenvolvimento de resistência do parasito a um novo fármaco, além de reduzir seus efeitos adversos no organismo do paciente. No caso da doença de Chagas, há diversos alvos bioquímicos conhecidos, sendo alguns dos principais ilustrados na Figura 6 (GARCÍA-HUERTAS & CARDONA-CASTRO, 2021).

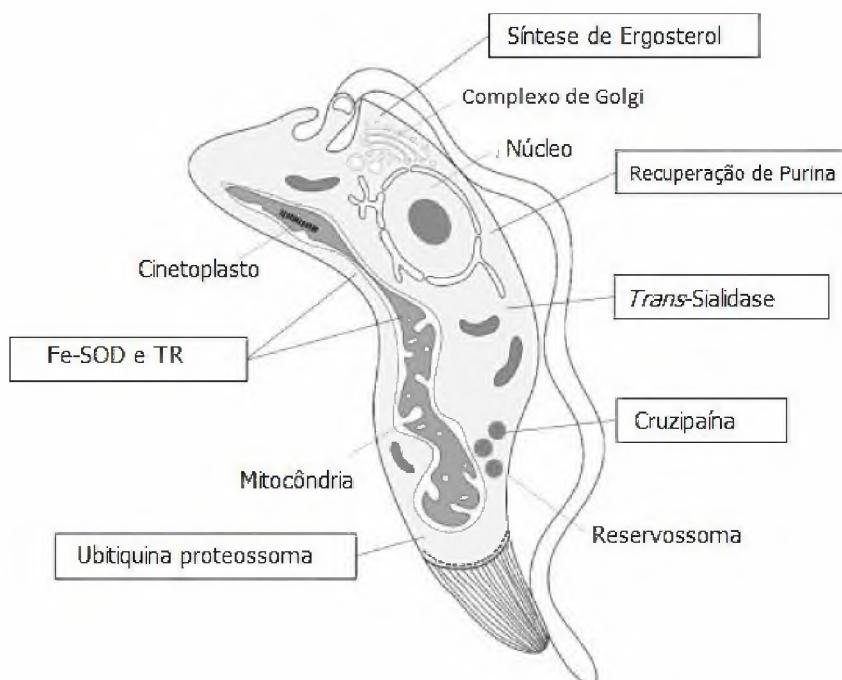


Figura 6 – Principais alvos bioquímicos do *T. cruzi*. Fonte: GARCÍA-HUERTAS & CARDONA-CASTRO, 2021, adaptado.

A síntese de ergosterol é um mecanismo do parasito necessário para a integridade da membrana celular e localizado no citoplasma, interior mitocondrial e membrana glicossomal. O que difere a produção de esterol humana com a do parasito é que os humanos produzem colesterol, ou seja, conferindo um dos principais critérios mencionados anteriormente. As enzimas identificadas desse mecanismo são as citocromo P450 lanosterol 14 α -desmetilase (CYP51), esqualeno-sintase (SQS), esqualeno-epoxidase (SQLE), oxidoesqualeno-ciclagase (OSC), esterol 24-C-metiltransferase (24MST) e 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA-R), sendo a CYP51 a mais estudada dentre elas. Outras enzimas também são bem

pesquisadas, no caso, envolvendo o sistema imune do parasito, tais como a cruzipaína e a *trans-sialidase*. A cruzipaína (cruzaína em sua forma cristalizada) é encontrada em ambas as três formas evolutivas do *T. cruzi*, epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas, sendo amplamente presentes na superfície dos amastigotas. A cruzipaína é responsável pela nutrição do parasito, pelos mecanismos de invasão e evasão do hospedeiro e pelas etapas de diferenciação do ciclo de vida do parasito. Dentre as principais, também podem ser destacadas as tripanotiona redutase (TR) e o ferro-superóxido dismutase (SOD), as quais agem contra o estresse oxidativo na célula do parasito (GARCÍA-HUERTAS & CARDONA-CASTRO, 2021).

Munido dos atuais conhecimentos sobre o parasito e a doença, faz-se interessante utilizar do maior número de técnicas possíveis, anteriormente mencionadas, tais como os conhecimentos de produtos naturais para realizar hibridizações moleculares, entender os possíveis sítios terapêuticos do parasito e utilizar-se das descobertas feitas através da modelagem e ancoragem molecular, o que leva a um maior conhecimento do porquê buscar determinados grupos ou funções orgânicas que aparentam ter um efeito sobre a doença de Chagas, pondo fim a essa enfermidade milenar e de números expressivos em termos de morbidade e impactos econômicos.

1.2. PRODUTOS NATURAIS, UMA ALTERNATIVA VIÁVEL

Um grupo de artigos muito conhecido para quem trabalha com produtos naturais são os levantamentos realizados por Newmann e Cragg, nos quais os autores relacionam, em determinadas faixas de tempo, fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), a agência reguladora dos Estados Unidos. No último levantamento, publicado em 2020, os autores observam que, dentre os 1881 fármacos aprovados entre 1981 até 2019, 18,9% são derivados de modificação estrutural, outros 25,7% são sintéticos, mas mimetizam ou têm grupos farmacofóricos baseados em produtos naturais, 3,8% são definidos como, de fato, produtos naturais e 0,8% são misturas botânicas de concentrações pré-definidas. Ou seja, 48,7% dos 1881 fármacos têm participação direta ou indireta de produtos naturais, sendo os 51,3% (951) restantes divididos entre vacinas, macromoléculas biológicas e produtos eminentemente sintéticos, o que demonstra a extensa importância atual dos produtos de origem natural, no desenvolvimento de alternativas terapêuticas de combate a diferentes tipos de enfermidades. O gráfico contendo os dados é representado pela Figura 7 (NEWMANN & CRAGG, 2020).

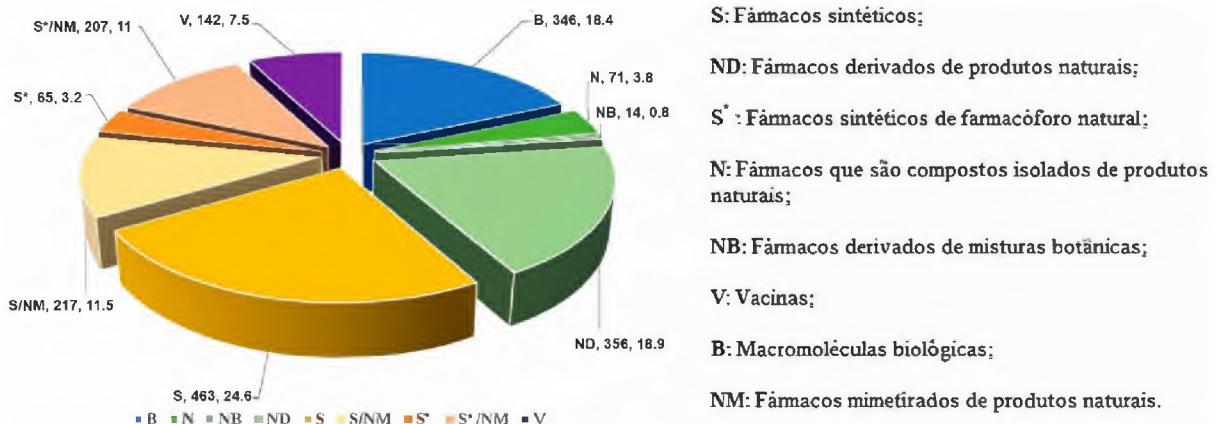


Figura 7 – Natureza dos fármacos de aprovados entre 1981 e 2019. Fonte: NEWMANN & CRAGG, 2020, adaptado.

Uma das grandes vantagens de se utilizar produtos naturais no desenvolvimento de fármacos é que, uma boa parte destes compostos apresentam algum tipo ação biológica, ligando-se a proteínas ou modulando enzimas em suas plantas, por exemplo, de origem. Assim, é de se esperar que essas mesmas moléculas apresentem algum tipo de ação também em proteínas humanas. De fato, muitos produtos naturais exibem melhores características de ligação a biorreceptores, quando comparados com moléculas de origem sintética (LAHLOU, 2013; MÜLLER-KUHRT, 2003).

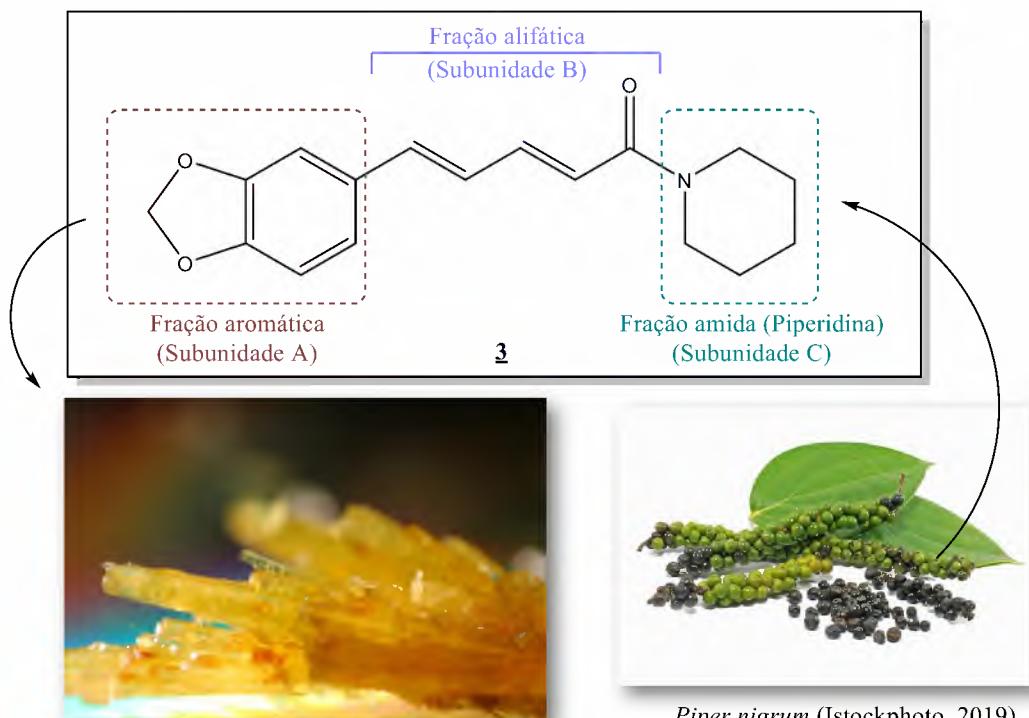
Em se tratando de antiparasitários, dos 20 fármacos aprovados no período de 1981 a 2019, 2 são produtos naturais, outros 7 são derivados de produtos naturais e outros 3 são fármacos sintéticos de planejados a partir de farmacóforos naturais, ou seja, 60% dos fármacos antiparasitários liberados no período são influenciados por, ou são de fato, produtos naturais, sendo os outros 30% sintéticos e os últimos 10% vacinas (NEWMANN & CRAGG, 2020).

Especificamente, em se tratando do *T. cruzi*, um produto natural que apresentou bons resultados contra o parasita foi a amida natural piperina, isolada dos frutos secos de *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), exibindo valor de concentração inibitória para 50% dos parasitas (IC_{50}) na faixa de μM , ou seja, bons resultados de toxicidade frente ao parasito nas formas epimastigota e amastigota. Os parasitos tratados com concentrações sub-letais de piperina apresentaram alterações ultra-estruturais sugestivas de interferência no mecanismo de citocinese do parasita. (RIBEIRO *et al.*, 2004; FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2008).

1.3. A PIPERINA E SUAS VARIADAS FUNÇÕES

A piperina é uma amida natural e, biologicamente, é um dos principais compostos presente nos frutos da planta *Piper nigrum*, ou pimenta-do-reino, um condimento cosmopolita, sendo uma das pimentas mais utilizadas no mundo (SPENCE, 2024). Sua composição varia por

cada uma das plantas pertencentes à família *Piperaceae*, e se encontra em torno de 2% a 9% da composição nos frutos das trepadeiras da pimenta-do-reino (TIWARI *et al.*, 2020). Costuma-se dividir sua molécula em três subunidades, sendo a primeira (subunidade A) constituída por uma fração aromática dissubstituída; seguido por uma cadeia alifática insaturada (subunidade B) e, por fim, a fração amida piperidinil (subunidade C) (Figura 8) (FERREIRA *et al.*, 2012).



Cristais de piperina (defitra, 2013, disponível em deviantart.com)

Figura 8 – Pimenta-do-reino e estrutura da piperina.

Estudos recentes disponibilizados no Banco Corporativo de Dados Estatísticos da Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas (FAOStat, 2020, acessado em 2023), o Brasil encontra-se como segundo maior produtor mundial de pimenta-do-reino, apresentando cerca de 15% da produção mundial ou quase 115 mil toneladas de pimenta do reino, importando em média 47,5% desse montante ao ano (FAOStat, 2020, acessado em 2023; MONITORMERCANTIL, 2022, acessado em 2023).

Além de um conhecido efeito potencializador de absorção de fármacos, a piperina exibiu em diversos estudos funções anticancerígenas, antidiabéticas, antiobesidade, cardioprotetoras, anti-envelhecimento, antimicrobiana (tal como antiparasitária), antialérgica, imunomoduladora, anti-inflamatória, hepatoprotetora. Tais efeitos têm sido amplamente estudados, não só pela literatura antiga, como também as atuais, visando entender o mecanismo de ação que esta substância tem sobre determinados alvos biológicos, a exemplo de suas propriedades anticancerígenas, onde já se tem descrito uma diminuição do crescimento tumoral, pois impede

o ciclo celular, causando apoptose, reduz níveis de peroxidação lipídica (que causa stress oxidativo, devido à formação de radicais livres, nocivos à célula) e proteínas carboniladas (o aumento da produção de tais proteínas foi observado em pacientes com doenças como Alzheimer, câncer de mama, diabetes entre outras) e ainda há mecanismos conhecidos ainda mais específicos, como relatam Dong e Thamalingam em seus respectivos artigos (UL HAQ *et al.*, 2020; DE SOUZA *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2015; THARNALINGAM *et al.*, 2016; KOSTELECKA *et al.*, 2024).

A porção aromática da piperina (1,3-benzodioxola) é frequentemente associada a mecanismos antidepressivos e antimicrobianos. Para o caso de antimicrobianos, Tavares e colaboradores testaram a atividade de diversos alcaloides da planta *Zanthoxylum tho.folium* e descobriram, através de um estudo de relação estrutura-atividade (REA), que grupos metoxila nas mesmas posições onde ficaria o grupo metilenodióxi levaram a uma drástica redução da atividade antibacteriana (TAVARES *et al.*, 2014).

Se por um lado não há tantos estudos de REA para a porção aromática, a porção do anel piperidínico é amplamente estudada, seja como um conector, seja em determinadas funções biológicas. Um estudo importante que embasa este trabalho indica que o anel piperidínico abre portas para uma gama de possibilidades ao se acoplar determinados grupos, a fim de se obter um incremento na atividade anti *T. cruzi* em sua forma amastigota (SIJM *et al.*, 2021).

Ainda mais importante para o presente trabalho é o demonstrado pelo artigo de Ribeiro e colaboradores, onde foram testados, além da própria piperina, diferentes análogos e derivados com ação anti-amastigotas de *T. cruzi*. Analisando os diversos compostos presentes na Figura 9 e suas atividades descritas na Tabela 1, é possível traçar a REA de compostos benzodioxólicos com e sem anel piperidínico (RIBEIRO *et al.*, 2004).

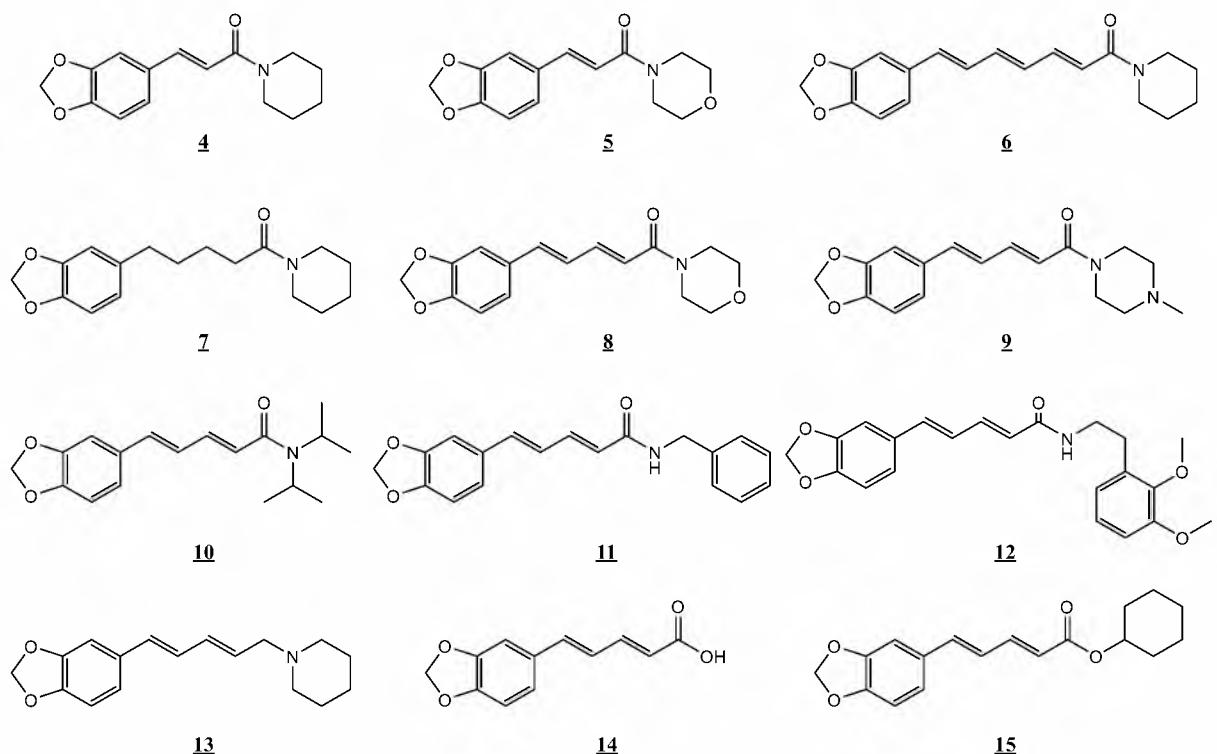


Figura 9 – Derivados análogos à piperina (RIBEIRO *et al.*, 2004).

Como é possível observar, além da variação de grupos funcionais (amina em 13, ácido carboxílico em 14 e éster em 15), foram testados maiores e menores espaçadores alifáticos, diferentes grupos a fim de substituir o anel piperidínico, tais como anéis aromáticos com e sem o grupo dimetóxi (compostos 11 e 12, respectivamente), nitrogênio terciário (composto 10), variações do anel piperidínico contendo mais um hetero átomo (compostos 5 e 8), sendo esse oxigênio ou nitrogênio (substituído, como visto no composto 9) e um cicloexano (composto 15).

Tabela 1 – Valores de IC₅₀ do fármaco utilizado atualmente, da piperina e dos análogos testados (RIBEIRO, 2004).

Composto	^a IC ₅₀ em epimastigotas (μM)	IC ₅₀ em amastigotas (μM)
Benznidazol (1)	2,20	2,58
Piperina (3)	7,36	4,91
4	>96,52	^b NT
5	>95,78	NT
6	10,67	7,40
7	19,41	11,52
8	56,13	5,71
9	>83,33	NT
10	14,85	7,77
11	>81,43	NT
12	>65,61	NT

Composto	^a IC ₅₀ em epimastigotas (μM)	IC ₅₀ em amastigotas (μM)
13	17,49	9,63
14	>114,67	NT
15	>83,33	NT

^aConcentração inibitória para morte de 50% dos indivíduos; ^bNão testados.

Reunindo todas estas informações, é possível concluir que o anel piperidínico se mostrou importante para a atividade anti-parasitária, tanto contra epimastigotas quanto para amastigotas de *T. cruzi*, como é possível observar nos compostos 6, 7 e 13 ou, de ao menos um nitrogênio trissubstituído, como é possível observar em 10. É possível também substituir o anel pirimidínico por um anel morfolínico, porém, neste caso, seria mais difícil a formação de híbridos mais complexos, visto que nesse caso a posição do átomo na estratégia proposta de hibridação estaria ocupado pelo oxigênio. Outra observação é que espaçadores muito curtos (2 carbonos em ressonância) não apresentam um efeito positivo sobre a atividade, como podemos observar em 4 e 5, tais compostos apresentaram baixa atividade anti-*T. cruzi*, quando se comparados aos análogos mais espaçados (4 carbonos em ressonância), ou seja, a própria piperidina e o composto 8, respectivamente.

De posse de todas estas afirmações é prudente observar que o grupo funcional amida é importante para a atividade no parasito, visto que o análogo éster apresentou baixa atividade, ou seja, faz-se de grande importância fazer uma análise dos grupos funcionais e investigar o motivo desse aumento de atividade.

1.4. AS AMIDAS E SUA IMPORTÂNCIA NA QUÍMICA MEDICINAL

A amida (Figura 10) é uma função orgânica que consiste em uma carbonila ligada diretamente a um nitrogênio. É dito que tal grupo funcional tem uma importância crítica na química medicinal, um dos motivos se dá ao fato de ser um grupo que forma ligações de hidrogênios, algo que não ocorre de maneira tão boa em ésteres, por exemplo, visto que há dois sítios para a realização de ligação de hidrogênio em amidas, um na carbonila e outro no nitrogênio, que podem atuar, respectivamente, como acceptor de ligação de hidrogênio (ALH) e doador de ligação de hidrogênio (DLH), a depender do tipo de amida a ser tratada, como no caso de amidas primárias e secundárias. Adicionalmente, é interessante notar que a porção amina do grupo não é capaz de agir como um ALH, visto que seu papel na ressonância da função impossibilita tal capacidade, aumentando a rigidez conformacional, que pode aumentar ou diminuir as ligações de hidrogênio (KUMARI *et al.*, 2020).

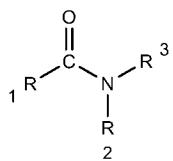


Figura 10 – Função amida.

Outro fator importante é que o grupamento amida é um dos grupos de maior ocorrência na estrutura de biomoléculas, visto que estão presentes em peptídeos e proteínas, permitindo interações por ligações de hidrogênio com as tais biomoléculas, de forma geral e, portanto, sendo fundamental em seu processo de modulação biológica (KUMARI *et al.*, 2020; NELSON & COX, 2004).

Em se tratando de síntese orgânica, a reação de formação de amidas (que será abordado em detalhes posteriormente) é a reação de maior interesse na química medicinal de acordo com dados da literatura (2014), apresentada em cerca de 50% dos textos e, inclusive, ultrapassando a síntese de heterociclos na literatura antiga (1984), ao qual prevalecia como a mais citada por cerca de 30% dos textos (BROWN & BOSTRÖM, 2023).

Um estudo de análise das reações utilizadas em candidatos a fármaco demonstrou que, em 128 candidatos, mais de 90% das moléculas pequenas (massa molecular menor que 550, seguindo as regras de Lipinsky) contém ao menos um átomo de nitrogênio. Outro ponto interessante é que o nitrogênio se encontra também como o átomo de maior interesse em síntese envolvendo inserção de heteroátomos em estruturas orgânicas, visto que, no mesmo estudo, em 196 sínteses, 112 (57%) são responsáveis por uma *N*-substituição, tal como é, também, o átomo mais presente em formações de heterociclos, sendo observado em 54 (92%) de 63 casos de formação. Também foi observado que em 84 (66%) candidatos havia-se feito reações de *N*-acilação para amidas. O que torna o grupo funcional ainda mais atrativo aos olhos da química medicinal é observar que de 53 fármacos de moléculas pequenas que excederam 1 bilhão de dólares em vendas em 2003, 9 (17%) continham ao menos uma porção amida em suas estruturas. Focando ainda em sua síntese, observou-se que das 84 amidas, 37 (44%) foram sintetizadas por via de um cloreto ácido (ácido carboxílico ativado), outras 21 (25%) por reação de acoplamento de amidas, 11 (13%) a partir de anidridos mistos, 9 (11%) partindo de carbonil diimidazol e os demais 6 (7%) sofrem outras sínteses de números menos expressivos, que não foram especificadas no artigo (CAREY *et al.*, 2006).

A utilização de amidas na química medicinal é bem ampla, demonstrando ações antimicrobianas, analgésicas e anti-inflamatórias, inseticidas, antitumorais, fibrinolíticas (prevenção de formação de coágulos sanguíneos) e anticonvulsivas (KAMAL *et al.*, 2021).

Um importante caso de uma amida com heterociclo, unindo os dois mais atrativos interesses da síntese orgânica, é encontrado na nitazoxanida, princípio ativo presente no medicamento Annita® (Figura 11), tendo sua função antiparasitária bem embasada pela literatura e sendo o principal fármaco contra parasitas que causam infecções do trato intestinal e do estômago. O mecanismo de ação do fármaco se dá pela inibição da enzima piruvado ferroxidina oxirreducetase (PFOR), na maioria dos casos, sendo desconhecido no caso de helmintos. Outros usos associados ao fármaco são como antivirais, o qual sugere-se que o mecanismo de ação esteja relacionado à ativação da quinase por RNA, ativando a síntese de interferons (proteínas de sinalização celular) aumentando a resposta imunológica e, também, há uso antitumoral, atribuídos a mecanismos de autofagia, anticitocinas, inibição de c-Myc e produção de interleucinas (FOX & SARAVOLATZ, 2005; LIRA *et al.*, 2021; SHIGYO *et al.*, 2016; FAN-MINOUE *et al.*, 2013; HONG *et al.*, 2012).

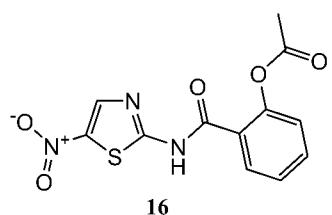


Figura 11 – Estrutura do fármaco nitazoxanida (Annita®).

É interessante notar, também, que há um outro grupo de grande interesse na estrutura da Annita®, o grupo nitro-tiazol, o qual será abordado em outro tópico deste trabalho. reunindo estas informações com o que foi discutido sobre a estrutura e os grupos de interesse da amida natural piperina, faz-se interessante sintetizar compostos que possam vir a ter o maior número de grupos com características medicinais similares, na tentativa de se atingir um ou mais sítios bioquímicos. Para atingir tal objetivo, é necessário com que se entenda sobre mecanismos de planejamento racional de fármacos, tal como o utilizado neste trabalho, a hibridação molecular, que será o tema do próximo tópico.

1.5. FERRAMENTAS DE PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

Novas técnicas vêm sendo desenvolvidas pela indústria farmacêutica, de modo geral, para que se haja uma maior diversidade na criação de bibliotecas químicas, tais como o uso de computadores para a predição e simulação de interações fármaco-receptor (ancoramento molecular), ou processos de triagens farmacológicas automatizadas. Relacionando-se tais técnicas, podem ser formuladas diversas novas, tal como o desenvolvimento de fármacos baseado em fragmentos, que propõe identificar fragmentos *hits* em compostos a fim de potencializar seu efeito ou até mitigar efeitos adversos. Nesse universo, utilizam-se duas

principais técnicas, o *scc,fold hopping*, baseado em “trazer” tais fragmentos a uma molécula que tenha parâmetros mais próximos a um fármaco conhecido, e a hibridização molecular (ou ligação de fragmentos), a qual se utiliza de conhecimentos de mais de um fragmento com o intuito de sintetizar um fármaco que possa atuar em mais de um sítio bioquímico que pode ser, inclusive, em outra proteína, potencializando os efeitos medicinais (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007 & LI, 2020).

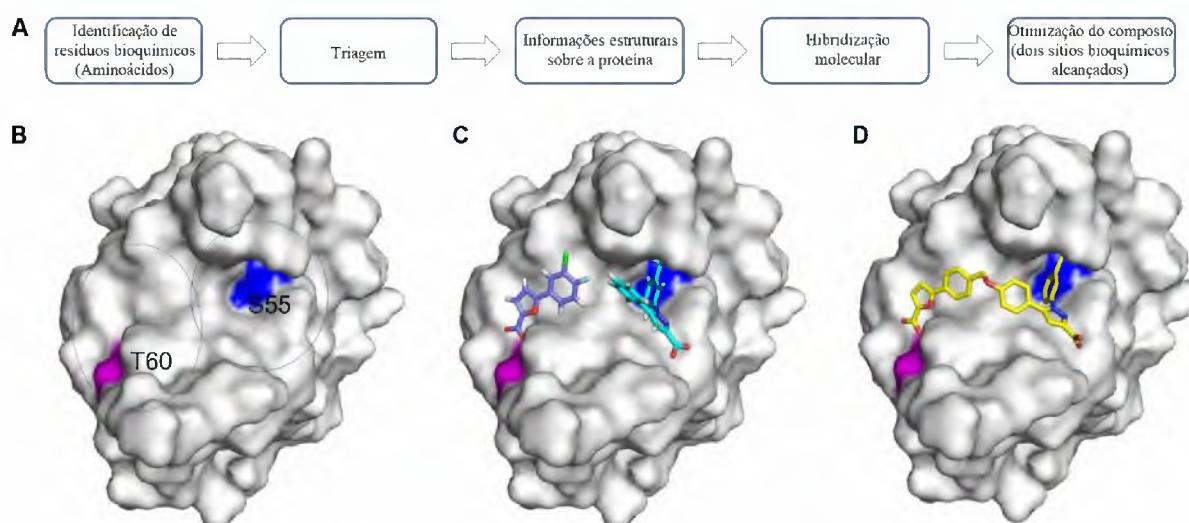


Figura 12 – Hibridização molecular. Fonte: LI *et al.*, 2020, adaptado.

Outra possibilidade quando tratamos de hibridização molecular é que a mesma molécula pode atuar em sítios bioquímicos distintos de diferentes proteínas, sendo uma porção interagindo com uma proteína A e outra com uma proteína B, por exemplo. Ou seja, tal atividade se demonstra interessante por dificultar mecanismos de mutações que um patógeno possa apresentar futuramente. São casos semelhantes as combinações de fármaco, porém, com a possibilidade de determinada porção da molécula potencializar a outra (GONTIJO *et al.*, 2020).

Viegas-Junior e colaboradores discutem em seu artigo de revisão sobre a possibilidade de potencialização da atividade de fármacos através do emprego da estratégia de hibridização molecular, principalmente quando se conhece as propriedades físico-químicas, farmacológicas, toxicidade e mecanismo de ação dos fragmentos envolvidos no processo, o que leva à possibilidade de traçar uma rota de preparação de uma extensa biblioteca de derivados. Outro bom uso da hibridização molecular é quando se modula o fármaco para que a outra porção anule um efeito adverso indesejável. Dentre os casos conhecidos, o artigo cita casos de sucesso entre agentes cardio-ativos, antitumorais, analgésicos, anti-inflamatórios, antitrombóticos, anti-infecciosos, antidiabéticos e neuroativos (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2007).

Um caso conhecido é o do fármaco aprovado em 2016 pela *Food and Drug Administration* (FDA), venetoclax, ilustrado na Figura 13, que é um inibidor seletivo de BCL-2 (importante regulador de apoptose). Quando tal gene é danificado, causa *down-regulation* no mecanismo de apoptose da célula, levando a um aumento tumoral drástico. O venetoclax foi otimizado a partir da estrutura de outro composto, navitoclax, que foi sintetizado a partir de dois fragmentos moleculares, identificados através de estudos de relação estrutura-atividade (BANCET *et al.*, 2020).

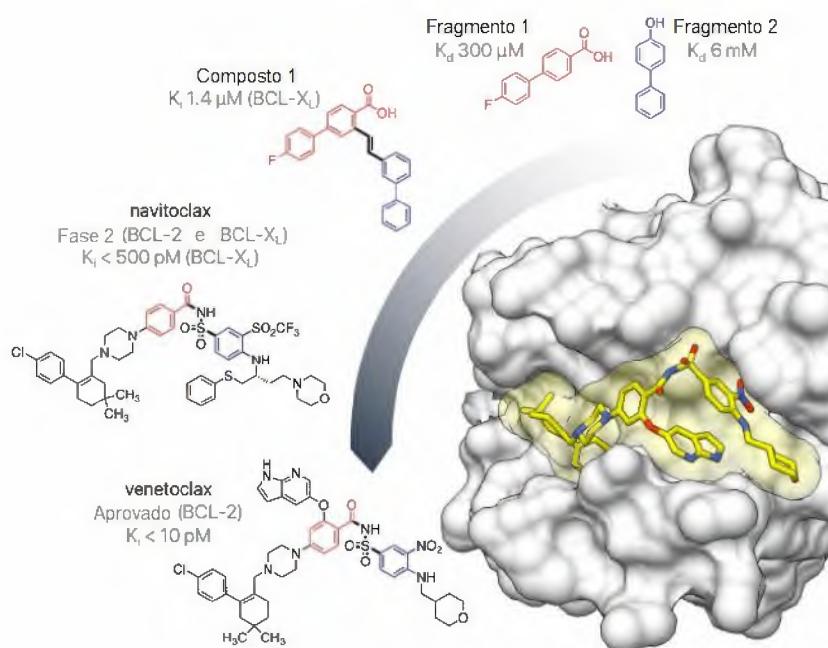


Figura 13 – Representação da gênese do venetoclax. Fonte: BANCET et al, 2020, adaptado.

Percebe-se então a importante função que a estratégia de hibridação molecular pode ter na atuação de uma molécula em sítios bioquímicos, seja em potencializar o efeito, melhorar as propriedades físico-químicas ou até em anular efeitos indesejáveis, tornando-a mais seletiva ao que se deseja. Trazer essa importante estratégia aos antiparasitários pode resultar em uma gama de possibilidades mais efetivas, e é nesse ponto onde a nitazoxanida está colocada no presente trabalho.

1.6. NITOZOXANIDA E ANEIS IMIDAZÓLICOS

Como brevemente explicado no capítulo 1.4, o nitazoxanida (Figura 11) é de extremo interesse no presente trabalho, principalmente pelo seu grupo farmacofórico, o nitrotiazol. Sabe-se de seu potente teor como agente antiparasitário, como dito anteriormente, porém, um estudo realizado por Arce-Fonseca e colaboradores indicou a possibilidade de o fármaco ser reposicionado como um possível anti-chagásico, onde observaram que, apesar de um índice de

sobrevida de cobaias menor que o encontrado com o benznidazol (83%), o fármaco é capaz de inibir a parasitemia da DC durante a fase aguda, pois observou-se que os níveis de parasitemia diminuíram, a produção de anticorpos foi induzida e preveniu parcialmente o dano histopatológico. O que se discute é que as cobaias não mostraram efeitos adversos muito preocupantes que se não os de perda de peso, porém, tais efeitos são mais toleráveis em humanos, visto que o perfil do fármaco já é bem conhecido e comprovadamente seguro, o que fez o grupo, inclusive, propor a possibilidade de se utilizar os fármacos benznidazol e nitazoxanida em conjunto (ARCE-FONSECA *et al.*, 2023).

Um estudo mais antigo, de 2009, ainda sobre o nitazoxanida, indicou que uma concentração de 18,735 µM foi o suficiente para inibir 50% da população de *T. cruzi* *in vitro*, demonstrando-se uma potência maior, inclusive, que o próprio benznidazol para cepa MHOM/México/1994/Ninoa (CHAN-BACAB *et al.*, 2009).

Maya e colaboradores pesquisaram o mecanismo de ação de imidaziois em *T. cruzi*, observando diversas cepas, constatou-se que os 5-nitroimidaziois converteram-se à sua forma nitrosa, tornando-se escavadores de tióis, o que impossibilita a desintoxicação pela ação da enzima tripanotiona redutase, por não ser mais possível reduzir espécies de dissulfeto (MAYA *et al.*, 2002).

Mais especificamente, quando se trata do nitazoxanita, o seu mecanismo de ação em bactérias e protozoários anaeróbicos se trata em inibir a enzima PFOR. Um estudo comprovou através de testes em microrganismos anaeróbicos que não apresentam a enzima PFOR e em organismos exclusivamente aeróbicos que utilizam a enzima piruvato desidrogenase (PDH) para reduzir o piruvato que em ambos os casos, o nitazoxanida foi ineficaz, em contrapartida, em organismos que dependentes da PFOR, uma dose terapêutica foi o necessário para inibir a enzima e causar a morte dos microrganismos. Os autores relatam que, através de RMN e espectrometria de massas, foi possível analisar que não houve alteração química do nitazoxanida, ou seja, seu grupo nitro não foi reduzido, porém, ocorreu uma desprotonação do nitrogênio amídico e o par de elétrons livre desse nitrogênio foi capaz de reagir de duas possíveis maneiras, como representado na Figura 14 (HOFFMAN *et al.*, 2007).

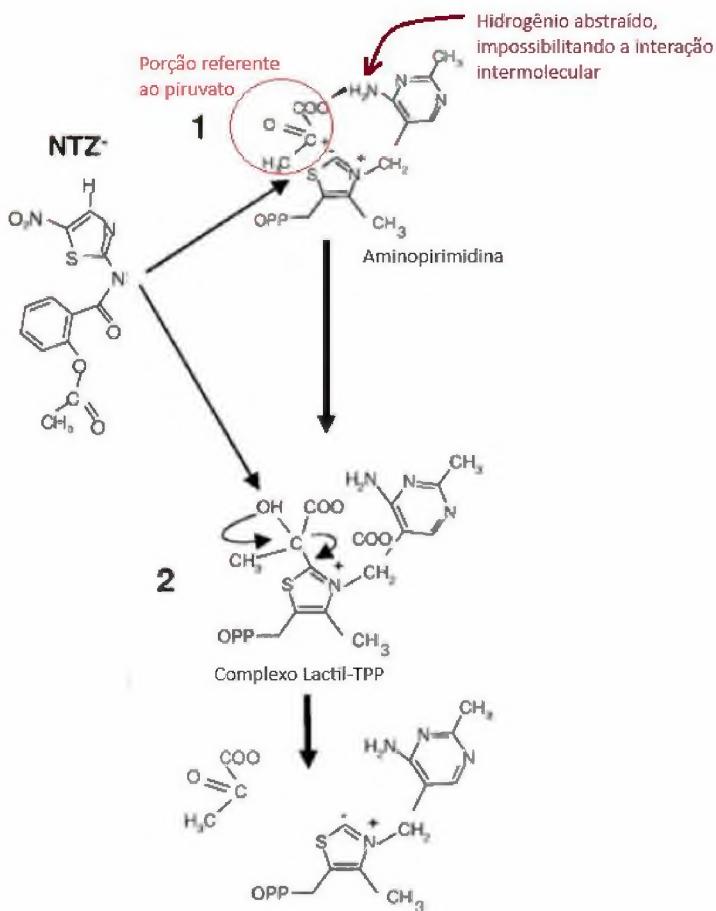


Figura 14 – Propostas do mecanismo de ação do nitazoxanida. Fonte: HOFFMAN *et al.*, 2007. Adaptado.

Ou o par de elétrons do nitrogênio amídico abstraiu o próton da amina da aminopirimidina, impedindo a interação do piruvato com a aminopirimidina, bloqueando a formação do complexo lactil-TPP; ou o par de elétrons do nitrogênio se protonou no complexo e promoveu a dissociação do complexo, liberando piruvato ao meio. Contudo, acredita-se que o primeiro caminho seja mais plausível, vista que a descarboxilação acontece rapidamente após a formação do complexo lactil-TPP (HOFFMAN *et al.*, 2007).

Ou seja, a já conhecida atividade do fármaco nitozoxanida no *T. cruzi* auxiliada ao conhecimento de como agem os nitroimidazóis, permitem conjecturarmos sobre a possibilidade de que análogos de nitroimidazóis. Como os nitrotiazóis, também ajam sobre os mesmos alvos bioquímicos, resta verificar se poderia ou não apresentar uma maior atividade e, mais ainda, como seria possível obter tal híbrido, o que será discutido no capítulo seguinte.

1.7. ACOPLAGAMENTO DE AMIDAS, A REUNIÃO DE TODA ESSA INFORMAÇÃO

A ligação amídica é uma das ligações químicas mais fundamentais e mais difundidas na natureza, estando ligada às propriedades de uma vasta gama de moléculas orgânicas, como

polímeros e materiais, incluindo peptídeos e proteínas, que são os principais receptores biológicos e ligantes endógenos. (GREENBERG *et al.*, 2002)

Como dito anteriormente, as diversas reações de amida se encontram como a reação de maior interesse pela química medicinal e, mais especificamente, as duas reações que mais apresentam respaldo nesta categoria são as reações de formação de amida através de um cloreto ácido e a formação de amida através da reação de acoplamento de amidas auxiliada por um reagente específico, neste trabalho, o enfoque será através do sal de urônio, HATU.

1.7.1. FORMAÇÃO ATRAVÉS DE CLORETO ÁCIDOS

As reações envolvendo cloretos de acila (apresentados genericamente na Figura 15) são amplamente conhecidas e, para gerar tais substâncias que atuam como intermediários, utilizase reagentes que promovam a ativação de carbonila, sendo eles, principalmente, o cloreto de tionila (17), cloreto de oxalila (18), tricloreto de fósforo (19), oxicloreto de fósforo (20) ou pentacloreto de fósforo (21), todos representados na Figura 16 (MONTALBETTI & FALQUE, 2005).

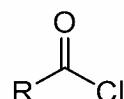


Figura 15 – Estrutura geral de um cloreto de acila ou cloreto ácido.

Dentre os problemas da reação, encontram-se a formação de gases tóxicos, sendo eles principalmente ácido clorídrico (HCl) e, no caso do cloreto de oxalila, ainda há a formação de monóxido de carbono (CO), ou seja, são reações que, dependendo de seu tamanho, precisam ser feitas com extrema cautela, com o uso de sistemas de exaustão de gases muito eficientes (MONTALBETTI & FALQUE, 2005).

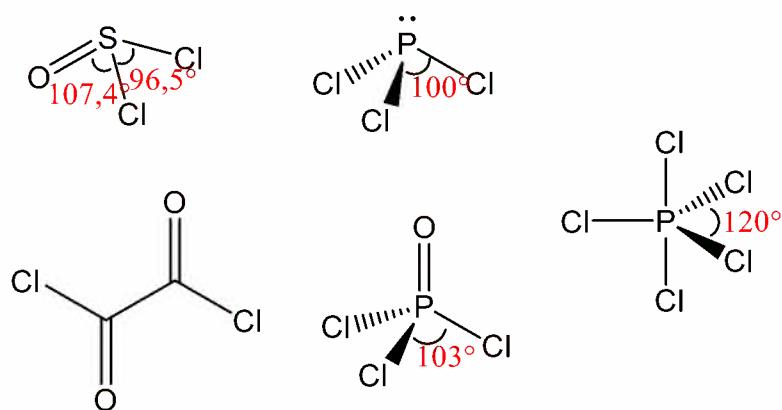


Figura 16 – Reagentes de ativação de carboxilas de ácido.

Há também a reatividade do cloreto formado com a água, portanto, a reação deve ser feita em meio anidro a fim de se evitar a possível hidrólise do cloreto de acila. Outra limitação

que envolve a síntese de compostos mais complexos se dá a um alto nível de subprodutos formados, tais como ativar outras carboxilas que não a de um ácido carboxílico, clivagem, racemização (principalmente para o caso de aminoácidos) e até formação de anidridos *N*-carboxílicos. Além disso, a formação de HCl no processo pode levar à formação de diferentes produtos de decomposição (MONTALBETTI & FALQUE, 2005).

Após a formação do cloreto ácido, cuidados precisam ser feitos para não expor a reação ao ambiente, evitando contato com ar atmosférico, para que assim possa ser feita a reação que originará a amida, todos os processos precisam ser feitos em solventes secos e atmosfera o mais inerte possível. Para isso, também é necessária uma base inerte, geralmente aminas terciárias para que não ocorram subprodutos e reajam com o ácido clorídrico formado, evitando que a amina a qual pretende-se converter à amida não faça esse papel. A reação, de forma geral, é ilustrada na Figura 17 (MONTALBETTI & FALQUE, 2005).

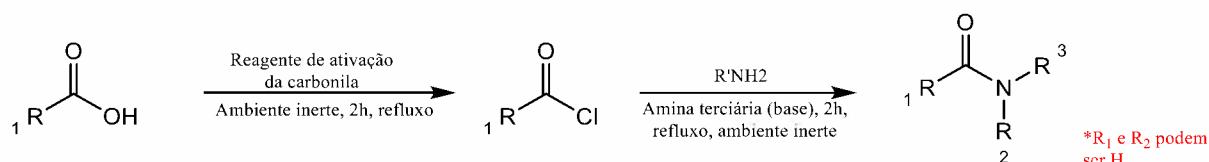
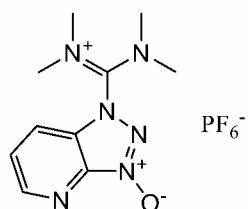


Figura 17 – Reação geral para a formação de amidas por cloreto ácido.

1.7.2. FORMAÇÃO DE AMIDAS ATRAVÉS DO REAGENTE DE ACOPLAMENTO HATU

O sal de urônio HATU (do inglês: *Hexafluorophosphate Azabenzonitriazole Tetramethyl Uronium*), 22, ilustrado na Figura 18, foi desenvolvido por Louis A. Carpino em 1993 através do 1-Hidróxi-7-Azabenzotriazol, ou HOAt (CARPINO, 1993). Os sais de urônio agem nos ácidos carboxílicos formando uma espécie do tipo éster, altamente reativo, para que este intermediário possa então reagir com as aminas correspondentes levando à formação das respectivas amidas. É importante citar que a reatividade do éster intermediário é primordial para que a reação possa prosseguir. Dentre as vantagens de se sintetizar amidas através desse método, encontra-se a não formação de gases danosos ao ambiente, também há a seletividade em ácidos carboxílicos, gerando menos subprodutos e possibilitando uma menor racemização (JOUILLIÉ & LASSEN, 2010).



17

Figura 18 – Estrutura do reagente de acoplamento HATU.

É descrito que uma das possibilidades dos sais de urônio serem tão efetivos em reações de acoplamento seja por conta de seu intermediário, um éster 7-azabenzotriazol-1-il (23, Figura 19), sendo eles bem reativos de forma geral, provavelmente por conta de uma catálise intramolecular. Sais de urônio também são mais estáveis em soluções de DMF e sob atmosfera inerte, tal como em baixas temperaturas (JOULLIÉ & LASSEN, 2010).

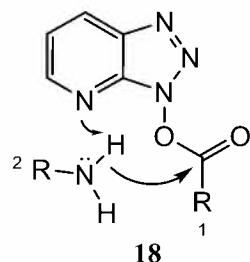


Figura 19 – Intermediário reativo. Fonte: JOULLIÉ & LASSEN, 2020, adaptado.

As reações podem ser feitas em modo *one-pot*, ou seja, em apenas uma etapa, tendo cuidado de não permitir a entrada de ar atmosférico, e não costumam ser muito demoradas. Outra vantagem é que permitem a possibilidade de atuar em moléculas que contenham mais carbonilas, visto que são bem seletivos em ácidos carboxílicos. Apresentam bons rendimentos e seu processo de purificação não costuma exigir cromatografia, visto que boa parte de seus subprodutos são eliminados durante o processo de *workup* da reação, devido à solubilidade em água. A reação geral da síntese de amidas pode ser vista na Figura 20 (JOULLIÉ & LASSEN, 2010).

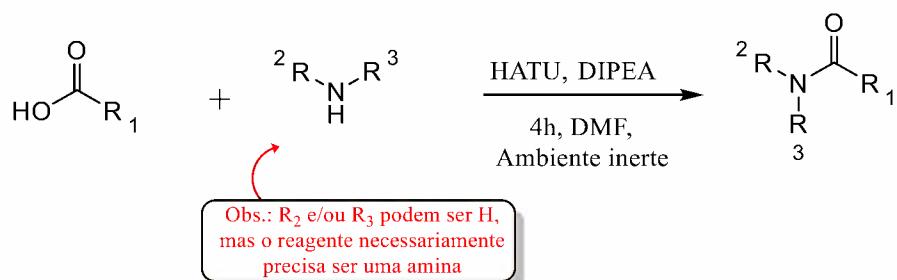
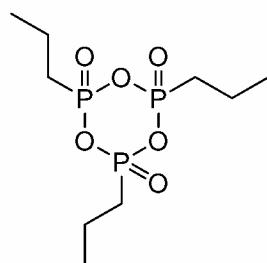


Figura 20 – Esquema reacional geral da formação de amidas com HATU.

1.7.3. FORMAÇÃO DE AMIDAS ATRAVÉS DO REAGENTE T3P®

O anidrido de ácido propano fosfônico (T3P®), mostrado Figura 21, é um reagente introduzido na síntese de peptídeos desde 1980 e, desde então, descobriu-se uma extensa aplicabilidade para o reagente, tais como reagente de desidratação, síntese de heterociclos, reações de oxidação e rearranjo. Como a base da reação para a formação de peptídeos é a mesma

que a do acoplamento de amidas, é possível se utilizar da técnica para o projetado neste trabalho (SURESHBABU, *et al.*, 2013).



19

Figura 21 – Estrutura do T3P®.

Um ponto a ser destacado desse reagente de acoplamento é que se trata de um reagente solúvel em água, o que o torna uma reação limpa, tanto para o excesso de reagente quanto para os possíveis subprodutos (WAGHMARE *et al.*, 2014).

Utilizando-se um banco de dados como o Google Scholar, observou-se uma ampla utilização do reagente após seu uso em larga escala para síntese de acoplamento de amida, observa-se que de 2012 até o começo do ano de 2023 (abril), o gráfico é ilustrado na Figura 22:

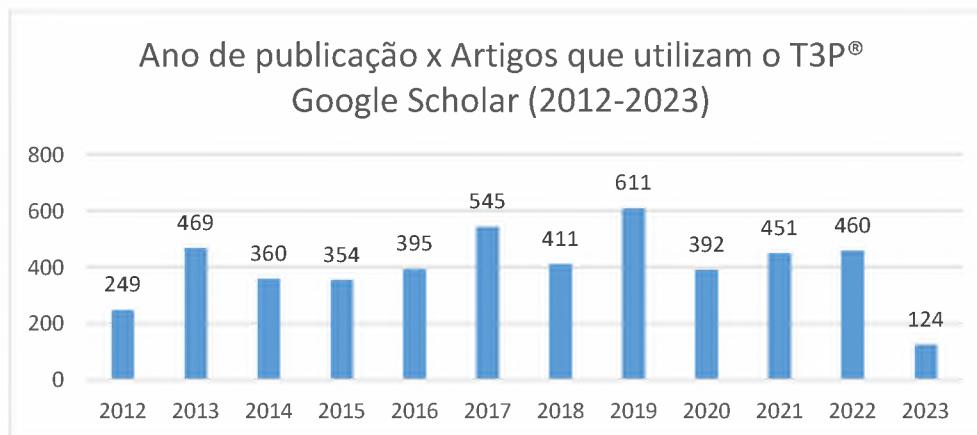


Figura 22 - Número de trabalhos usando o T3P® na janela de tempo 2012-2023 pelo Google Scholar.

Portanto, a reunião das informações sobre a importância das amidas, havendo os grupos selecionados para compor as moléculas planejadas e sabendo como chegarmos a elas, é possível então dar um ponto de partida às sínteses, de uma forma embasada.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Motivados pela clara necessidade de se desenvolver novas alternativas eficazes para a quimioterapia da doença de Chagas, buscamos neste trabalho investigar a atividade anti-*T. cruzi* de uma série de compostos planejados, utilizando a hibridação molecular como principal ferramenta de modificação estrutural (VIEGAS-JUNIOR *et al.*, 2004). Nesse planejamento utilizaremos uma abordagem que envolve o acoplamento da amida natural piperina com o fragmento nitrotiazólico presente no fármaco nitazoxanida, que possui reconhecida atividade antiparasitária. Esta abordagem se sustenta nas observações, anteriormente descritas em trabalhos do nosso grupo, que descreveram o efeito anti-*T. cruzi* da amida natural piperina, que exerce sua atividade anti-parasitária, principalmente, através da interferência direta no mecanismo de citocinese do parasito (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2008). Assim, a partir do planejamento molecular preconizado, planejou-se novas estruturas híbridas, tendo a reação de amidação como etapa-chave para a introdução do núcleo nitrotiazol da nitazoxanida. É descrito que este fragmento atua desestabilizando o equilíbrio redox celular, devido a sucessivas reduções intracelulares, que geram espécies tóxicas, que se acumulam no interior da célula do parasito (MAYA *et al.*, 2002). Desta forma, os derivados planejados poderão conjugar os mecanismos de ação da piperina e da nitazoxanida, sendo potencialmente ativos contra o *T. cruzi*. A estratégia sintética de planejamento molecular (Figura 23) envolve o acoplamento do ácido pipérico e análogos (p.ex., os ácidos metilenodioxi-cinâmico e metilenodioxi-benzóico) com um anel piperidínico funcionalizado com uma carboxila de ácido, que funcionará como um conector para a porção nitrotiazólica. Esse acoplamento da porção proveniente da estrutura da piperina, com o nitro-heterociclo ocorrerá através de reações de amidação, as quais serão avaliadas para a escolha da abordagem que melhor se adequa ao sistema planejado. Pretende-se com isso relacionar as alterações estruturais com a atividade tripanocida observada para os novos derivados obtidos, permitindo um estudo de REA para esta nova série de derivados.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Assim, entre nossos objetivos, está a síntese da nova série de híbridos (Figura 23), suas caracterizações (IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C e EM), bem como a avaliação do perfil de toxicidade

e atividade antiparasitária dos mesmos frente a amastigotas do *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4 LacZ) e citotoxicidade, frente a células de mamíferos (o que permitirá calcularmos o índice de seletividade para os novos compostos).

2.2. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

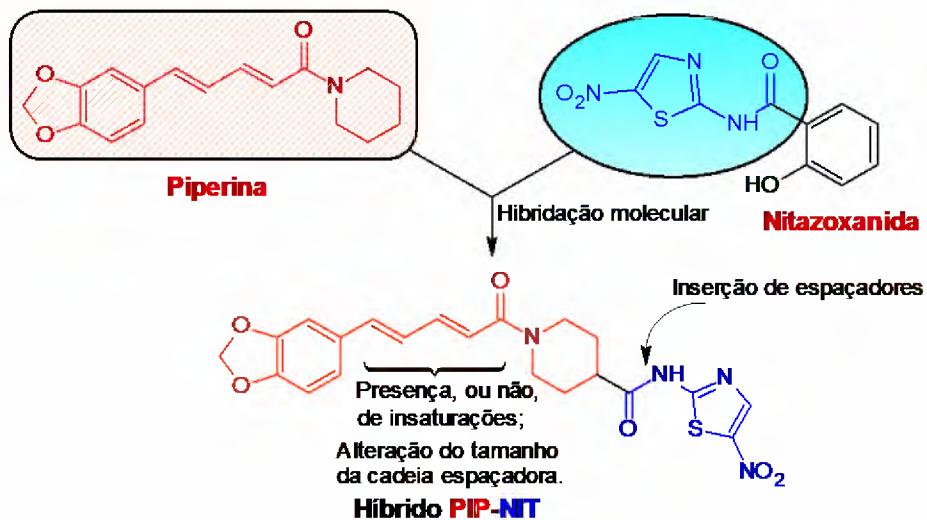


Figura 23 – Planejamento molecular para a preparação dos híbridos piperina-nitazoxanida.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a preparação da nova molécula híbrida entre a piperina e a nitazoxanida foi desenhada a análise retrosintética mostrada na Figura 24. Por desconexão da ligação C-N da amida secundária na estrutura do híbrido piperina-nitazoxanida (desconexão a), evidenciam-se dois fragmentos: o intermediário contendo o anel piperidínico adequadamente funcionalizado com uma carboxila e o 2-amino-5-nitro-tiazol (disponível comercialmente). Cabe ressaltar que a etapa de construção da amida secundária presente no híbrido pretendido, deve ser realizada através da utilização de metodologias mais seletivas de ativação da carboxila de ácido, visto haver neste intermediário uma função amida terciária, que pode reagir com reagentes eletrofílicos comumente utilizados na preparação de cloretos de ácido (p.ex., SOCl_2 ou cloreto de oxalila) (MOHAMMADKHANI & HERAVI, 2019). Por desconexão da ligação C-N da amida terciária presente no intermediário com o anel piperidínico funcionalizado (desconexão b), evidencia-se o ácido pipérico como seu precursor, através de uma reação de amidação deste com isonipecotato de etila (comercial). Por sua vez, o ácido pipérico é convenientemente preparado através de uma etapa de interconversão de grupos funcionais (I.G.F.) (WARREN & WYATT, 2008), envolvendo a reação de hidrólise básica da amida natural piperina, seguida de neutralização do meio, para formação do ácido livre. A amida natural, precursora do híbrido planejado, pode ser facilmente isolada dos frutos secos de *Piper nigrum* (pimenta-do-reino), através da metodologia originalmente descrita por Ikan (IKAN, 1991), adaptada em nosso grupo de pesquisa (VELEZ *et al.*, 2024).

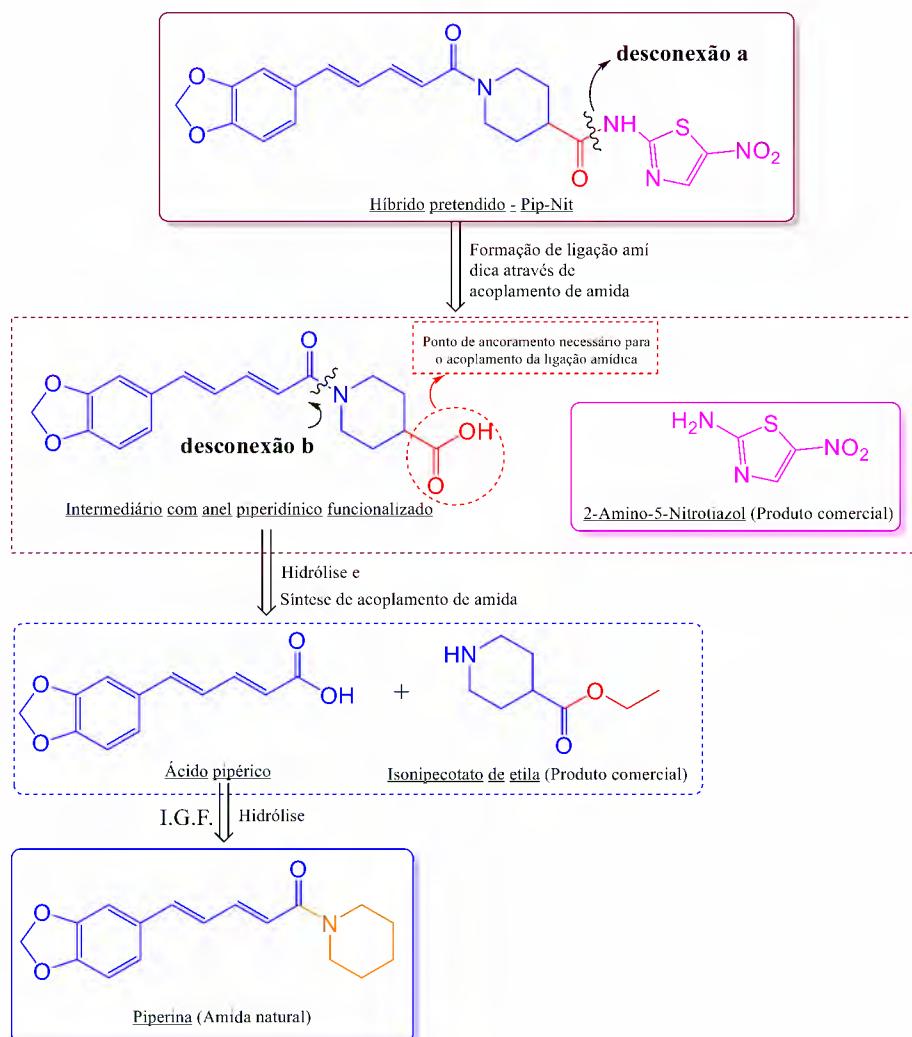


Figura 24 – Análise retrosintética para a preparação dos novos híbridos planejados.

3.1. OBTENÇÃO DOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

3.1.1. ÁCIDO PIPÉRICO

A etapa de preparação do ácido pipérico envolve uma reação de hidrólise básica da piperina (**3**), que estava à disposição do laboratório, já extraída através dos frutos da *Piper nigrum* e purificada. Amidas são mais resistentes à hidrólise básica quando comparado aos ésteres, portanto é necessária uma base forte, aquecimento em refluxo e um bom tempo de reação. A reação costuma demorar, em média, 24 horas para a completa conversão da amida ao respectivo carboxilato.

Na primeira etapa ocorre uma adição nucleofílica, através de um ataque da hidroxila da base forte na carbonila da amida a ser hidrolisada, formando o intermediário tetraédrico (**20**). Após esta etapa, ocorre um ataque dos pares de elétron do nitrogênio amídico ao próton do solvente (etanol), liberando piperidina (**21**). Forma-se então o carboxilato (**22**) que, após acidificação do meio, converteu-se ao ácido pipérico (**23**), precipitando-se. É importante que a

hidrólise, para o caso de amidas, seja realizada em presença de um excesso de base forte (hidróxido de potássio). A reação ocorre sob refluxo, seguindo o método sugerido por Wansri e colaboradores (2002). É possível observar o mecanismo na Figura 25.

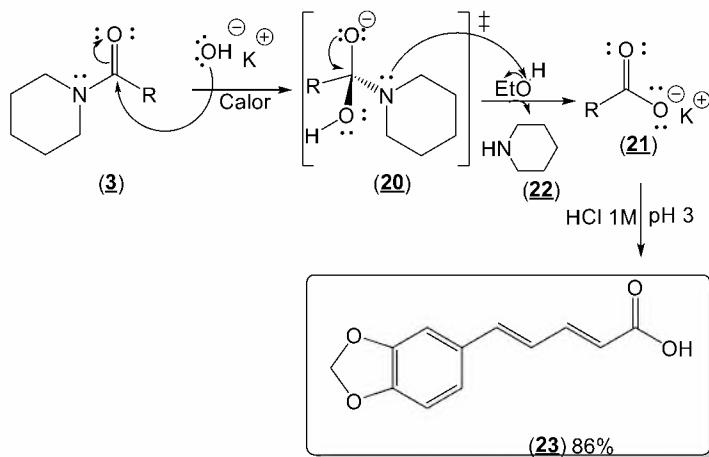


Figura 25 - Mecanismo da hidrólise da piperina.

3.1.1.1. PRINCÍPIO DA VINOLOGIA EM QUÍMICA MEDICINAL

Para um melhor estudo de REA, derivados com espaçadores de diferentes números de carbonos foram preparados, neste caso os homólogos vinílicos inferiores (ou seja, com menor número de ligações C=C). Em química orgânica, vinilologia envolve a transmissão de efeitos eletrônicos através de um sistema de ligações duplas conjugadas (CASIRAGHI *et al.*, 2000). O conceito foi introduzido em 1926 por Ludwig Claisen para explicar as propriedades ácidas da formilacetona e dos cetoaldeídos relacionados (CLAISEN, 1926). Sua forma adjetiva, p.ex.: derivado vinílico, é usada para descrever grupos funcionais nos quais as porções padrão do grupo são separadas por uma ligação dupla carbono-carbono. Devido à transmissão de efeitos eletrônicos através da conjugação, os grupos funcionais vinílicos geralmente possuem reatividade ou propriedades químicas análogas, quando comparados com o grupo funcional original. Consequentemente, em química medicinal, a vinilologia é uma estratégia útil para o desenho de coleções de análogos, dos quais pode-se prever o comportamento de sistemas que são estruturalmente semelhantes, mas contêm diferentes ligações C=C que são conjugadas aos grupos funcionais anexados (ZHAO *et al.*, 2023). Assim, em relação ao híbrido piperina-nitazoxanida, o derivado cinâmico X seria seu análogo (ou homólogo) vinílico inferior. O derivado benzóico Y seria o análogo vinílico inferior do cinâmico X (e vice-versa) (Figura 26).

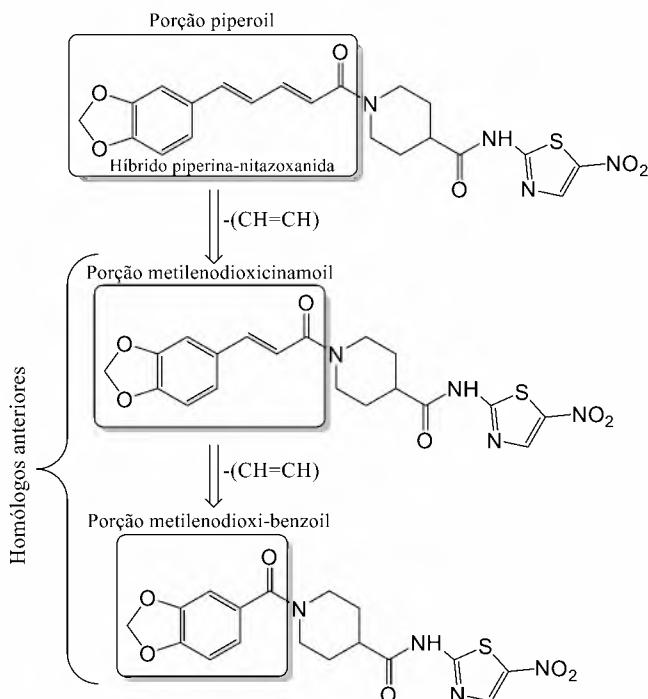


Figura 26 – Princípio da vinilologia aplicado ao híbrido piperina-nitazoxanida: planejamento de uma série de análogos.

3.1.2. ÁCIDO METILENODIÓXI-CINÂMICO E DO ÁCIDO 5-FENILPENTA-2,4-DIENOICO

Os processos após a obtenção dos ácidos carboxílicos metilenodioxi-cinâmico e do 5-fenilpenta-2,4-dienoico foram análogos aos preparados para os derivados pipéricos. Para se pensar nessa síntese, optou-se pela condensação de Knoevenagel, modificada por Doebner, utilizando-se piperonal, para o caso do ácido (29) e do cinamaldeído para o caso do ácido (30) (representados genericamente em 27), e ácido malônico (24). A reação de condensação é catalisada e dissolvida pela piridina (25). A piridina age também como base, gerando o enolato (26). Tal intermediário realiza uma adição nucleofílica ao íon imínio do aldeído (27), fornecendo o hidróxi-ácidomalônico (28) que, através da perda de CO₂ e água, através de uma eliminação descarboxilativa anti-periplanar, gera o produto desejado (29) ou (30), ou seja, os ácidos de arranjo (*E*), de maneira estereoseletiva. Na Figura 27 encontra-se a proposta do mecanismo para esta etapa (VAN BEURDEN, 2020).

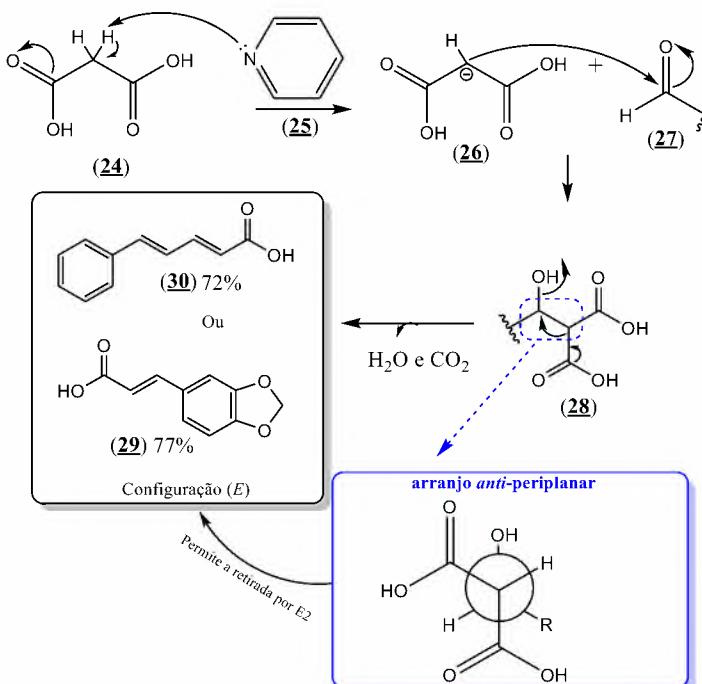


Figura 27 - Mecanismo da condensação de Knoevenagel, modificada por Doebner. Fonte: VAN BEURDEN, 2020.

3.1.3. ÁCIDO METILENODIÓXI-BENZOICO

Como visto no planejamento da Figura 26, outro análogo planejado foi o derivado metilenodióxi-benzóico, no qual não havia espaçador entre a porção aromática e o anel piperidínico, então, para realizar essa síntese, partiu-se da oxidação do piperonal (comercial), através de uma reação de oxidação com reagente de Jones (RODIG, 1990).

A reação começa após um ataque do par de elétrons livres do oxigênio da água, provida do meio em que o reagente de Jones está diluído, à carbonila do aldeído (representado genericamente em 24), formando o intermediário (31) através de adição. Tal intermediário é desprotonado, consolidando o intermediário (32) e protonado, formando o hidrato (33). A segunda etapa consiste em um ataque do par de elétrons livres de uma das hidroxilas do hidrato, ao reagente de Jones (34), formando o intermediário (35). Após um último ataque do par de elétrons livres do oxigênio de uma molécula de água ao hidrogênio mais ácido desse último intermediário, a ligação entre o oxigênio do hidrato ao cromo se rompe, restituindo a ligação pi e formando o derivado (36). O mecanismo da reação está presente na Figura 28 (RODIG, 1990).

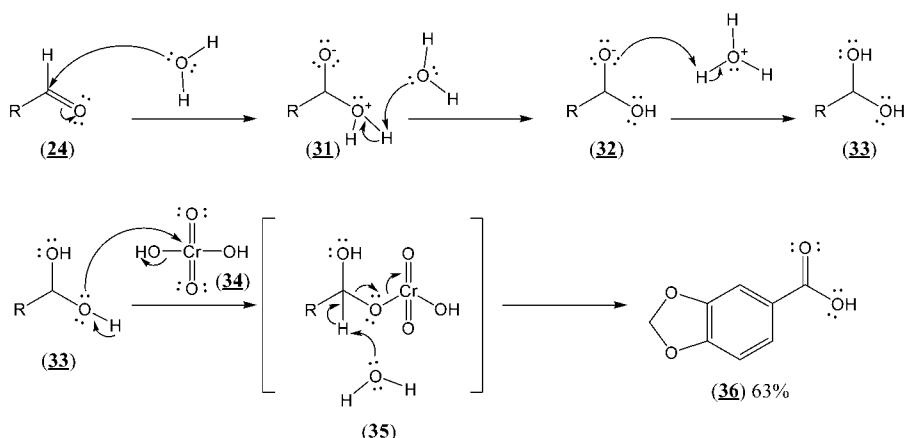


Figura 28 - Mecanismo da oxidação de aldeído através do reagente de Jones. Fonte: RODIG, 1990.

3.2. SÍNTSE GERAL DOS AMIDO ÉSTERES

3.2.1. SÍNTSE ATRAVÉS DE CLORETO DE ACILA

Para a primeira reação de amidação, nas quais a reação se faz sobre ácidos carboxílicos com apenas uma carbonila, optou-se pela preparação dos respectivos cloretos de ácido, tanto por ser relativamente mais barato e apresentar bons rendimentos, como também pela formação, neste caso, de subprodutos voláteis, o que torna a reação limpa. A reação de formação do cloreto de acila, embora seja uma reação que deva ser conduzida em meio anidro e forme ácido clorídrico, é uma reação já bem masterizada pelo grupo, o que a torna menos difícil de se controlar, necessitando certos cuidados, tal como ter controle do ambiente inerte e preenchendo um sistema de *trap* (sistema capaz de captar os gases antes que possam chegar à bomba) em um rota-evaporador, neutralizando todo o ácido clorídrico formado. Tomadas as devidas precauções, é possível se executar a reação com tranquilidade. A seguir, encontra-se uma breve discussão sobre o mecanismo da formação de cloretos de acila pela ação do cloreto de oxalila, que envolve uma reação do tipo SN_{Ac} (SOLOMON'S, 2016).

Incialmente, para a formação do cloreto de acila (43), é acrescentado o ácido (representado genericamente em 37) e o cloreto de oxalila (38), que por estar em excesso também age como solvente dessa primeira etapa. Após de uma adição nucleofílica, através do ataque do par de elétrons do oxigênio carbonílico em uma das carbonilas do cloreto de oxalila, há a formação do oxo-enolato (39), retirando o íon cloreto, formando o intermediário do tipo anidrido protonado (40). O íon cloreto realiza então um ataque nucleofílico na carbonila ativada desse intermediário, produzindo um hidróxi-oxoacetato (41), que perde CO e CO_2 e íon cloreto, já formando o cloreto de acila, que se encontra em sua forma protonada (42). O íon cloreto acaba por abstrair um próton do íon oxônio, produzindo assim o cloreto ácido desejado.

Na etapa seguinte, utilizou-se um excesso da amina isonipecotato de etila (**43**) para a formação da amida desejada. Este excesso de amina é necessário para que ocorra a neutralização do HCl liberado no processo. Alternativamente, pode-se utilizar TEA como base, principalmente no caso de aminas de alto custo, ou mesmo de difícil preparação. Outro ponto importante é a adição de solvente anidro (DCM anidro). Primeiramente, nesta segunda etapa de SN_{Ac} , ocorre uma reação de adição, através do ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio da amina (**44**) ao carbono da carbonila do cloreto de ácido, formando o intermediário tetraédrico (**45**) o qual, após abstração de um próton do N por outra molécula de amina (ou pela TEA adicionada ao meio) gera o intermediário (**46**). Posteriormente a essa etapa, o íon cloreto é eliminado, formando assim o produto desejado (**47**). É possível observar o mecanismo da reação na Figura 29.

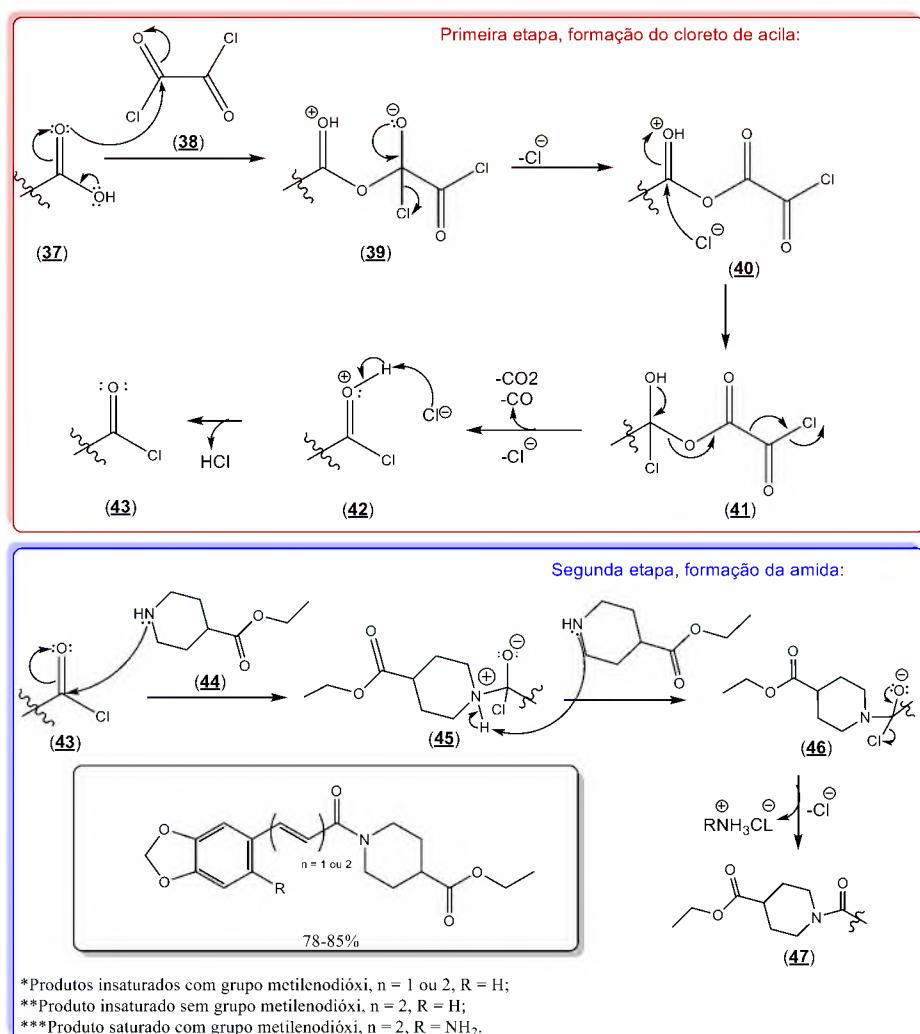


Figura 29 - Mecanismo de formação dos amido-ésteres através de um cloreto de ácido (Carey, 2014).

3.3. HIDRÓLISE DE ÉSTERES

3.3.1 SÍNTESE GERAL DOS AMIDO-ÁCIDOS

Como mencionado anteriormente, a hidrólise básica de ésteres (reação de saponificação) é uma reação mais rápida quando comparada com a de amidas. Isso se deve ao menor caráter ácido do ácido de Lewis do carbono carbonílico da amida, por conta da ressonância dos pares de elétrons do nitrogênio, dificultando que ocorra um ataque nucleofílico na carbonila amídica. Portanto, escolheu-se o procedimento reacional com hidróxido de lítio, utilizando-se uma mistura 1:1:1 em volume de THF, metanol e água (Carey, 2014). Tal reação não requer maiores cuidados, além da agitação constante até que os reagentes sejam consumidos, o que pode durar entre 4 e 24 horas, dependendo da estrutura do éster.

O mecanismo é bem simples, onde o par de elétrons da hidroxila ataca quimiosseletivamente a carbonila do amido-éster (**48**), formando um intermediário tetraédrico (**49**) que regenera a sua dupla ligação com o oxigênio, expulsando o grupamento alcóxido. Posteriormente, ocorre uma desprotonação do amido-ácido (**50**) pelo alcóxido, por ser este uma espécie mais básica, gerando então o carboxilato (**51**), produto da reação de saponificação. Ao ter o meio acidificado até pH 3, ocorre protonação de (**51**), fornecendo o amido-ácido, que precipita no meio. O mecanismo da saponificação é mostrado na Figura 30 (POLANYL & SZABO, 1934).

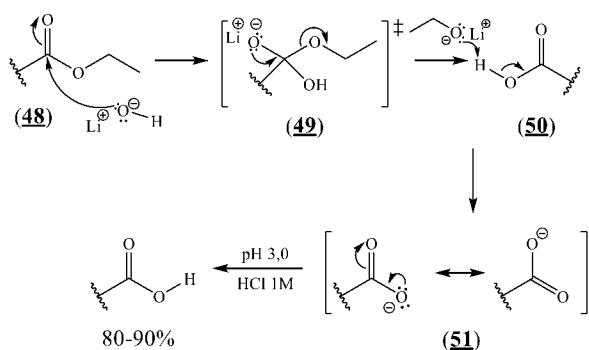


Figura 30 - Mecanismo de formação dos amido-ácidos por saponificação dos respectivos ésteres, seguido de neutralização do meio. Fonte: POLANYL & SZABO, 1934.

3.4. HIDROGENAÇÃO

3.4.1 PRODUÇÃO DO AMIDO ÁCIDO PIPÉRICO SATURADO

Liberdade conformacional está diretamente associada às propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). Apesar de hoje ser considerada simplificada, a regra de Lipinski, com os adendos de Veber, estipula que um fármaco deve ter 10 ou menos ligações rotáveis, que Veber denomina como cada ligação simples, excluindo-se as ligações com nitrogênio, visto que há uma grande barreira rotacional (VEBER *et al.*, 2002; CARON *et*

al. 2020). Um aumento de rigidez, seja por ciclização, ligações intramoleculares (queladas), alquilações ou rigidificações costuma ser altamente estudado na literatura, geralmente trazendo bons resultados, especialmente em se tratando de seletividade com o alvo terapêutico (PINHEIRO *et al.*, 2019).

Porém, no desenvolvimento recente de fármacos, muitos candidatos a fármacos estão se utilizando de moléculas grandes e flexíveis e, uma das propriedades que suporta esses estudos recentes, é que o cálculo de LogP para moléculas flexíveis não consegue descrever bem a lipofilicidade de tais compostos (ERMONDI *et al.*, 2019).

Ou seja, faz-se importante testar os limites da regra de 5 de Lipinski e ter a comparação dos produtos de menor rigidez com os de maior rigidez, a fins de verificar o quanto a flexibilidade das ligações, que conferem uma maior liberdade conformacional, podem interferir na ligação entre o alvo terapêutico e a molécula.

Para a flexibilização dos compostos, foi realizada uma reação de hidrogenação das ligações duplas da cadeia insaturada da piperina, a fim de se obter um derivado com maior liberdade conformacional, e expandir os conceitos de REA do projeto. A reação de saturação foi feita em atmosfera de hidrogênio, em presença de catalisador de paládio sobre carbono (10%). A reação em si não requer muitos cuidados que não observar o esvaziamento do balão contendo o gás hidrogênio e, também, evitar qualquer fonte de combustão para que não ocorra acidentes. A reação de hidrogenação pode ser observada na Figura 31.

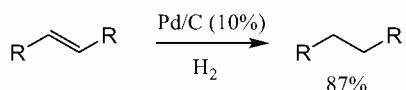


Figura 31 - Mecanismo de hidrogenação.

3.5. SÍNTSE DE AMIDAS PELO USO DO REAGENTE DE ACOPLAGEM T3P®

Uma das abordagens deste trabalho foi observar a síntese dos produtos via reagente de acoplamento T3P®. Tal reagente fora utilizado tanto no ácido pipérico quanto no ácido pipérico funcionalizado com o anel piperidínico.

O mecanismo se dá, inicialmente, por meio do ataque do par de elétrons do nitrogênio da amina terciária (que não participará do acoplamento em si, representada em **52**), no caso, optou-se por DIPEA, ao hidrogênio do ácido carboxílico. Posteriormente, o par de elétrons livres do carboxilato formado (**53**) ataca o fósforo do reagente T3P® (**19**), que por sua vez, tem a quebra de seu ciclo (**54**). Então, por conta do caráter eletropositivo da carbonila do composto formado após o ataque anterior, o par de elétrons do nitrogênio da amina primária (que

participará do processo de acoplamento, representada em **(55)**) pode atacá-la, formando **(56)**. Por fim, o composto formado é desprotonado pelo par de elétrons livres do nitrogênio da amina terciária, resultando nos produtos mostrados na imagem. É possível observar o mecanismo da reação na Figura 32 (SURESHBABU *et al.*, 2013).

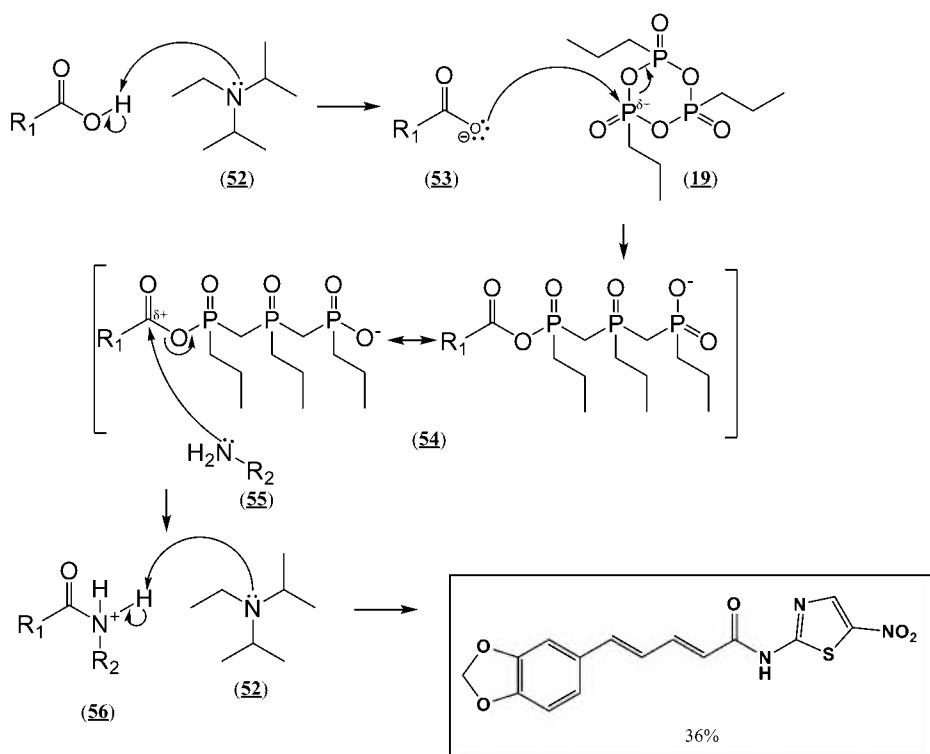


Figura 32 - Mecanismo de formação das diamidas utilizando o reagente de acoplamento T3P®. Fonte: SURESHBABU *et al.*, 2013.

É importante salientar que as sínteses com os ácidos carboxílicos contendo o anel piperidínico funcionalizado não se mostraram viáveis, isso porque o produto não se formou. A literatura demonstra que a reação do T3P® com a amina 2-amino-5-nitro-tiazol se mostra pouco reativa, apresentando 36% de rendimento (ODINGO *et al.*, 2017), isso se soma ao fato das reações dos ácidos sem o anel piperidínico funcionalizado realizadas neste trabalho abarcarem em torno de 35% de rendimento. E, por fim, o que se viu na literatura sobre reações de T3P® em reagentes que portam o anel piperidínico também demonstrarem rendimento em cerca de 40% (KERSTIN *et al.*, 2023). Acredita-se que a soma da pouca reatividade da amina, devido ao efeito retirador de elétrons do anel triazólico substituído pelo grupamento nitro (Figura 33), com os efeitos estérico do anel piperidínico, somados, sejam o motivo do porquê a reação não for eficaz.

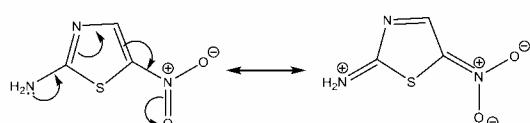


Figura 33 – Efeito de ressonância, retirador de elétrons do anel triazol substituído pelo grupamento nitro.

3.6. SÍNTESE DE AMIDAS PELO USO DO REAGENTE DE ACOPLAMENTO HATU

Sabendo-se da possibilidade de formação de diversos subprodutos com o uso do cloreto de oxalila, incluindo intermediários do tipo do reagente de Vilsmeler-Haack (MOHAMMADKHANI & HERAVI, 2019), foi necessário se pensar numa metodologia alternativa para ativação da segunda carboxila de ácido presente na estrutura. A solução foi a utilização da reação mediada por um sal de urônio, o HATU (17). A vantagem de tal método é que, além de ser uma reação extremamente específica frente a ácidos carboxílicos, seus subprodutos são retirados facilmente com lavagens aquosas, tendo em vista a natureza iônica da maior parte deles (AL-WARHI *et al.*, 2010; ROBERT, 2022). É importante salientar que o processo de preparação da segunda, também da terceira, quando se fez necessário, amida da estrutura foi executado após a etapa de hidrólise dos amido-ésteres obtidos na etapa anterior, como será explicado posteriormente. Tal reação foi também utilizada da produção de alguns amido-ésteres, na intenção de se aumentar a cadeia alifática entre o amino-nitrotiazol e o anel piperidínico.

Percebeu-se que a reação funciona melhor em meio anidro gerando melhores rendimentos e menos intermediários perceptíveis por CCD. Portanto, todo o procedimento foi executado com o objetivo de se otimizar a reação. Observou-se que, em média, a conversão durava cerca de 4 horas. O meio reacional foi solubilizado com DMF anidro e houve adição de DIPEA (52, Figura 34). Os demais reagentes são os amido-ácidos, a amina correspondente (58), o ativador HATU.

Inicialmente a DIPEA (52) age desprotonando o ácido carboxílico (57), formando o carboxilato (58). O par de elétrons do oxigênio do carboxilato ataca o carbocátion do HATU, demonstrado em (17), que é retirado do restante da cadeia, formando um triazolpirimidinolato (59) e o diamino acetato (60). Posteriormente, o par de elétrons livre do oxigênio da porção amino-enolato realiza o ataque nucleofílico à carbonila do diamino-acetato, que se desprende do restante da cadeia, gerando tetrametiluréia (61) como subproduto e o intermediário triazolpirimidin-acetato (62). Por fim, o par de elétrons da amina (63) ataca a carbonila desse intermediário, produzindo um intermediário complexo (64) que, após uma condensação, forma o subproduto triazolpiridinol (65) e o produto desejável (amida), como descrito na Figura 34 (SHONE *et al.* 2023).

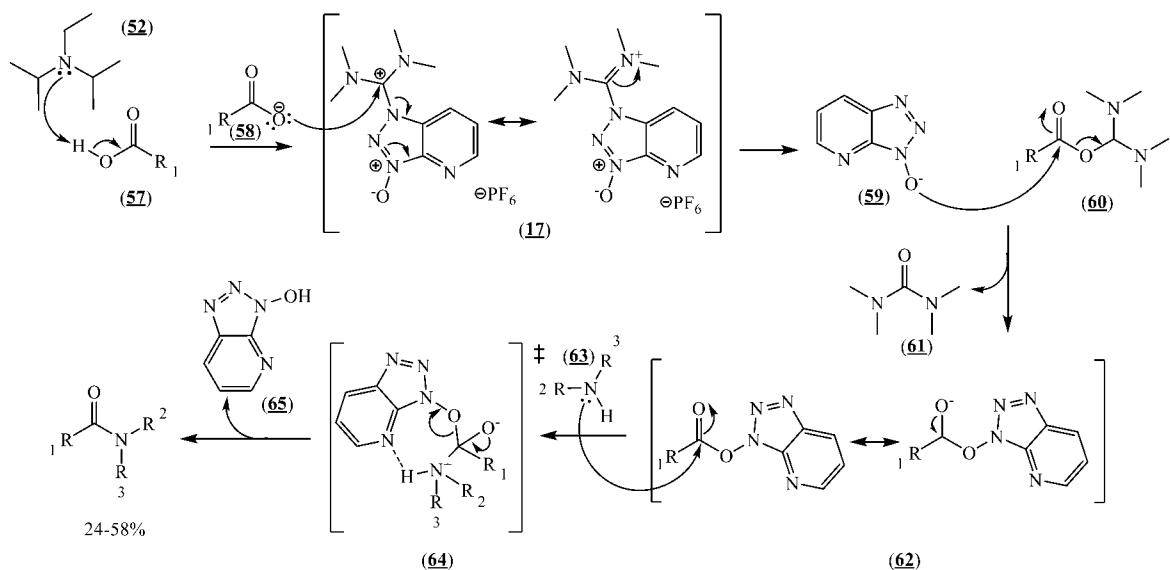


Figura 34 - Mecanismo de formação das diamidas através do reagente de acoplamento HATU. Fonte: SHONE *et al.*, 2023. Adaptado.

3.6.1. ACOPLAMENTO DO 2-AMINO-5-NITROTAZOL

Apesar do acoplamento dessa amina ser feita através da síntese com o auxílio do sal de urônio HATU, houve necessidade de adaptações no procedimento experimental e ajustes para que a reação funcionasse a contento. A principal questão envolve a baixa reatividade do grupo -NH_2 posicionado numa relação 1,3 com o grupamento nitro do núcleo tiazol (2-amino-5-nitrotiazol, Figura 33). Esta amina primária, aromática, tem sua basicidade/nucleofilicidade comprometidas, principalmente, pelo efeito retirador de elétrons do grupamento NO_2 no heterociclo, e sua posicionamento entre os átomos de enxofre e nitrogênio (posição 2 do anel).

Os rendimentos baixos (em torno de 10%) obtidos na primeira tentativa da reação, a princípio, indicou o desafio proposto, visto que já se perdia muito reagente até chegar à etapa do acoplamento, porém, dentre as tentativas de otimizar a reação, percebeu-se alguns fatores que poderiam, se adequadamente observados, propiciar um incremento na formação do produto desejado:

- Certificar-se que o solvente (DMF) em atmosfera inerte, para isso, acoplou-se um balão de nitrogênio ao septo contendo o solvente 20 minutos antes da reação;
- Armazenar os reagentes já pesados na geladeira para que se evitasse uma possível degradação (principalmente do HATU);
- Realizar a reação inteiramente em banho de gelo, o principal fator que amenizou o aparecimento de subprodutos na CCD;

- Utilização de ligeiro excesso da amina em questão (cerca de 10%). Excessos maiores que 10% não foram adequados, pelo fato de a amina não ser de fácil remoção nas etapas de isolamento e recristalização;
- Não deixar o mesmo balão de nitrogênio não mais que meia hora no septo, sempre trocando, visto que os poros da borracha do balão permitem trocas com o ar atmosférico, levando umidade ao ambiente inerte do balão;
- Utilizar um excesso de DIPEA para que a catálise da reação ocorra de maneira mais eficiente.

Ao final de todos esses cuidados, percebeu-se, além de uma reação com o rendimento satisfatório, também uma maior facilidade em sua purificação.

3.7. COMPOSTOS SINTETIZADOS E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

As seguintes tabelas são referentes aos produtos já sintetizados e, com exceção do LOP-09, todos caracterizados até o momento. Observa-se bons rendimentos com exceção do acoplamento de amidas, mas tal fato é explicado por haver uma amida bem impedida, o que naturalmente dificulta a reação de acontecer.

3.7.1. COMPOSTOS SINTETIZADOS

Tabela 2 – Derivados pipéricos

CÓDIGO	FORMA ESTRUTURAL	REND.	PF (°C)
LOP-01		86%	217
LOP-02		73%	Oleoso
LOP-03		80%	185-186
LOP-04		24%	226 (degrad.)

CÓDIGO	FORMA ESTRUTURAL	REND.	PF (°C)
LOP-05		87%	Oleoso
LOP-06		45%	188 (degrad.)
LOP-07		40%	225 (degrad.)
LOP-08		58%	145
LOP-09		88%	130
LOP-10		42%	195 (degrad.)

Tabela 3 – Derivados metileno-dióxi-cinâmicos

CÓDIGO	FORMA ESTRUTURAL	REND.	PF (°C)
LOC-01		77%	238 (degrad.)
LOC-02		78%	60 (produto quase oleoso)

CÓDIGO	FORMA ESTRUTURAL	REND.	PF (°C)
LOC-03		80%	200
LOC-04		37%	230 (degrad.)
LOC-05		40%	240 (degrad.)
LOC-06		43%	-

Tabela 4 – Derivados metileno-dióxi-benzoicos

CÓDIGO	FORMA ESTRUTURAL	REND.	PF (°C)
LOB-01		63%	228
LOB-05		40%	170 (degrad.)

Tabela 5 – Derivados sem grupo metileno-dióxi

CÓDIGO	FORMA ESTRUTURAL	REND.	PF (°C)
ME-01		72%	166

CÓDIGO	FORMA ESTRUTURAL	REND.	PF (°C)
ME-02		80%	Oleoso
ME-03		86%	150
ME-04		43%	200 (degrad.)
ME-05		40%	140 (degrad.)
ME-06		45%	145 (degrad.)

Tabela 6 – Derivados nitrosos

CÓDIGO	FORMA ESTRUTURAL	REND.	PF (°C)
NIT-01		Cedido pelo LAB	183
NIT-02		85%	Oleoso
NIT-03		90%	-

CÓDIGO	FORMA ESTRUTURAL	REND.	PF (°C)
NIT-04		37%	-
NIT-05		43%	-

3.7.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL – RMN

Para a identificação dos compostos foram empregadas técnicas de elucidação estrutural de RMN do ^1H e RMN do ^{13}C , que serão descritas.

Apenas os resultados para a molécula LOP-04 (Figura 35) serão discutidos, visto que o. O espectro de RMN do ^1H pode ser visualizado na Figura 36, enquanto o espectro RMN do ^{13}C , será visualizado na Figura 41.

- **LOP-04**

^1H -RMN (500 MHz, DMSO-d6): 1,53 (2H), 1,92 (2H), 2,74 (1H), 2,86 (1H), 3,15 (1H), 4,13 (1H), 4,44 (1H), 6,04 (2H), 6,70 (1H), 6,89 (1H), 6,92 (1H), 6,95 (1H), 6,98 (1H), 7,17 (1H), 7,24 (1H), 8,63 (1H), 13,16 (1H).

^{13}C -RMN: 41,92, 105,96, 101,77, 109,02, 120,93, 123,04, 126,03, 132,55, 138,45, 142,26, 142,66, 143,18, 148,26, 148,41, 162,29, 164,97, 176,56.

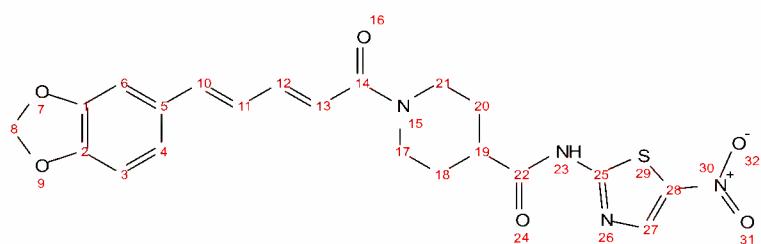


Figura 35 - Estrutura do composto LOP-04.

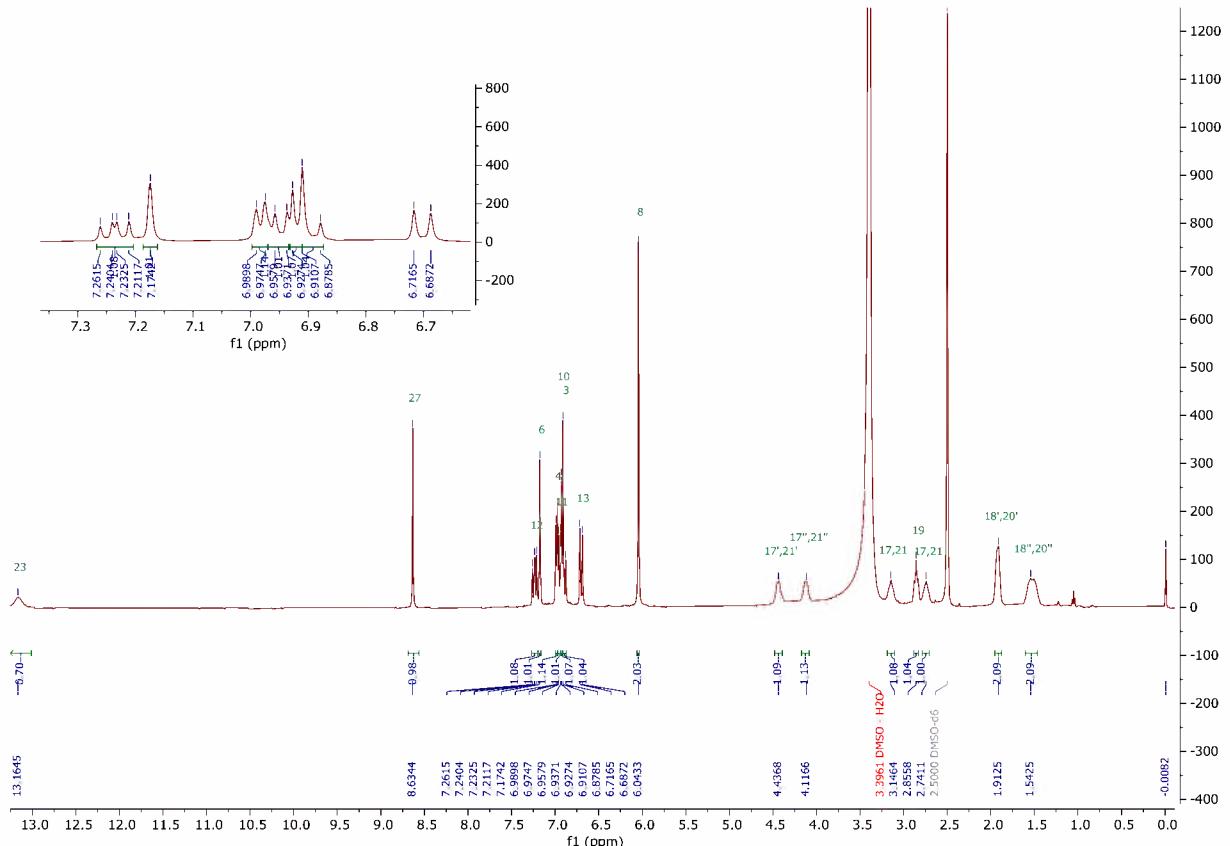


Figura 36 - Espectro RMN de ^1H para o composto LOP-04.

Primeiramente, é importante citar que os sinais de solvente não se encontraram em abundância, principalmente porque o maior deles, equivalente a 0,15 H em 1,05 ppm é relativo à DIPEA, ou seja, 12 hidrogênios são responsáveis por uma área de 0,15 H, totalizando algo em torno de 1% de impureza. Tal quantidade mais uma vez se comprava quando é analisado o outro sinal de DIPEA, em 2,63 para 0,06 H, que seriam equivalentes a 4 hidrogênios do composto. A outra impureza foi resquício de DMF (menos de 1%) e os demais sinais de impureza foram observados serem do solvente utilizado na análise, sendo eles em 1,22 ppm, 2,50 ppm (DMSO) e 3,40 ppm (água no DMSO).

Confirma-se haver o anel piperidínico quando é possível observar 4 sinais em torno de 2,74 e 4,43 ppm (1H cada), esses sinais pequenos se devem às posições pseudo equatorial e axial que os hidrogênios dos carbonos laterais (17 e 21) ao nitrogênio do anel se encontram. Outro ponto interessante do espectro é notarmos os sinais que está em sua região aromática (entre 6 a 9 ppm) que, por mais que haja 4 hidrogênios próximos entre 6,89 e 6,98 ppm, teoricamente impedindo uma leitura mais assertiva do espectro, percebe-se que, em termos do cálculo de J, é bem possível estimar qual hidrogênio pertence ao carbono, visto que os hidrogênios mais (10) e menos (13) deslocados mostraram sinais bem distantes dos demais e, por isso, foi possível calcular seus acoplamentos J e perceber, pela distância dos sinais da

“floresta” aromática, qual era acoplado a estes. Por final, há o fator que comprava que a última etapa da síntese foi bem-sucedida, o hidrogênio singlet, mais desprotegido da região aromática. Esse hidrogênio representado pelo número 27, em 8,63 ppm, está próximo a um grupo retirador por indução de elétrons e em ressonância com o anel heterociclo de cinco átomos, também está próximo a outro grupo retirador eletrônico, o NO₂, o que explica seu deslocamento alto, algo que não aparecia nos precursores. Resta apenas a identificação dos hidrogênios dos carbonos 3, 4, 10 e 11.

A falta de acúmulo de massa no experimento 2D impossibilitou o reconhecimento dos hidrogênios dos carbonos 3, 4, 10 e 11, porém, mostrou todos os hidrogênios do anel piperidínico, demonstrando que, no caso dos hidrogênios dos carbonos 21 e 17, os mais e menos deslocados se encontram no mesmo carbono enquanto os intermediários se encontram em outro, o que é possível observar na Figura 37.

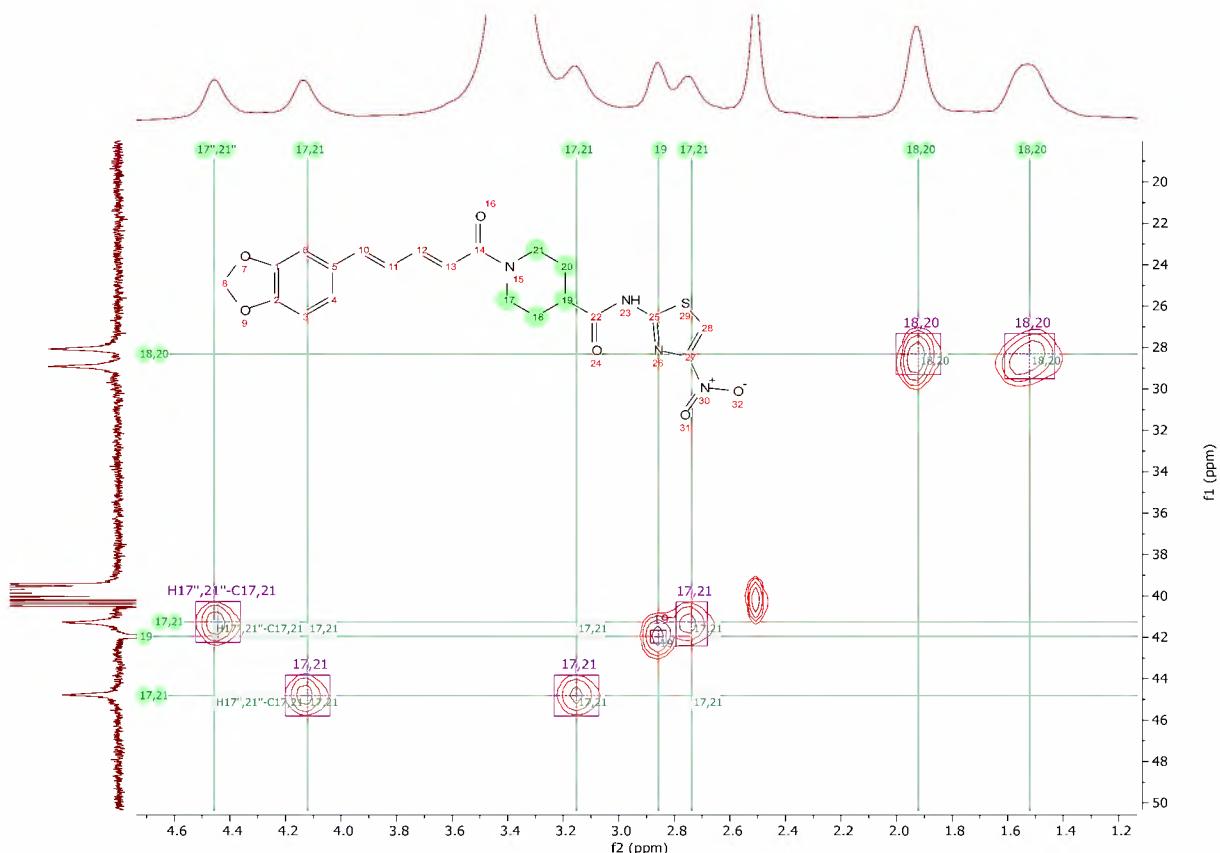


Figura 37 - Espectro RMN HSQC para o composto LOP-04.

Ou seja, como se vê na simulação 3D da molécula, mostrada a seguir (Figura 38), os grupos pseudo equatoriais próximos ao nitrogênio encontram efeitos estéricos pelo hidrogênio da dupla ligação, como exemplo, ou o oxigênio da carbonila do aldeído, o que explicaria eles serem os mais deslocados, enquanto os axiais, os menos deslocados. A divisão em quatro sinais não acontece, contudo, dividem-se em dois sinais, um mais e um menos deslocado, sendo um

hidrogênio mais deslocado para o carbono mais deslocado e um hidrogênio menos deslocado para um carbono mais deslocado, o que acontece também com o carbono menos deslocado, totalizando 4 hidrogênios.

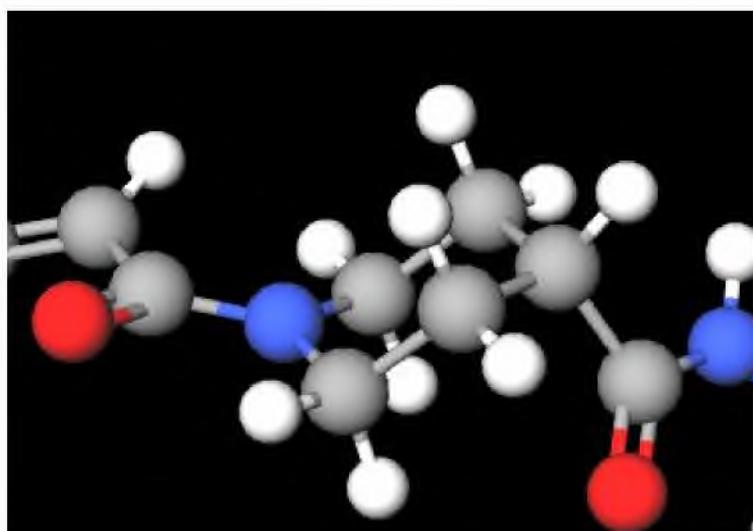


Figura 38 – Ilustração da porção do anel piperidínico da molécula LOP-04.

Para a identificação dos hidrogênios 3, 4, 10 e 11, optou-se por utilizar o RMN de seu precursor ácido carboxílico (Figura 39), onde claramente entre 7,00 e 6,94 ppm encontra-se um duplo dupletos referente ao hidrogênio 11 foi encontrado e tal fato se confirma por conta de suas constantes J apresentarem um valor igual ao do acoplamento J do hidrogênio do carbono 12 e um igual ao hidrogênio do carbono 10, sendo, respectivamente 10,6 Hz (aproximadamente) e 15,4 Hz (aproximadamente).

Restam apenas diferenciar os hidrogênios 3 e 4 que, por si só, é uma tarefa tão difícil só por analisar o deslocamento através do cálculo teórico, onde o hidrogênio do carbono 4 se mostraria mais deslocado. Porém, uma outra forma de visualizar é observando o achatamento dos picos dos sinais entre 7,01 e 7,03 ppm, o que representa um acoplamento J em meta com o hidrogênio do carbono 6, algo em torno de 1 a 2 Hz.

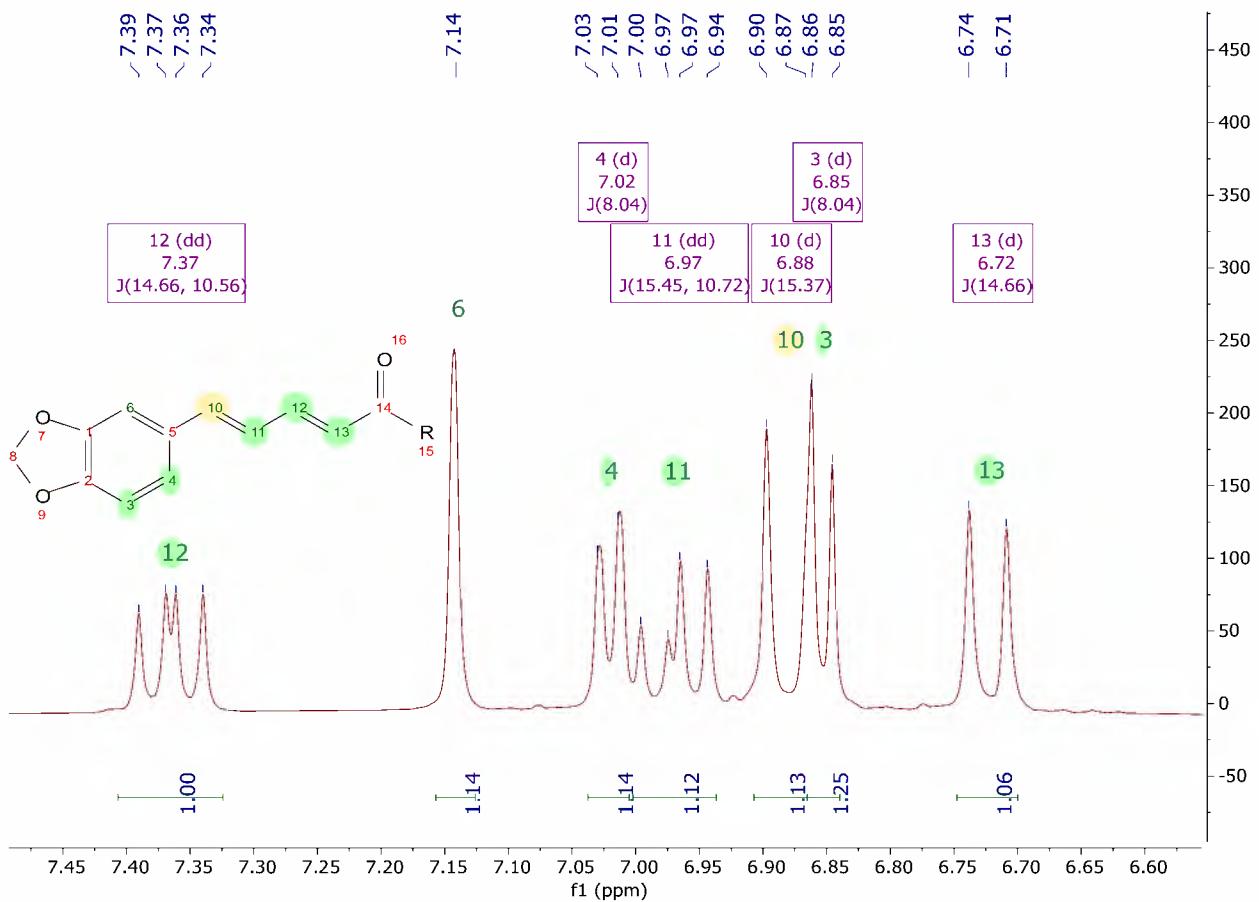


Figura 39 - Espectro RMN ^1H do composto LOP-03.

Apesar de o posicionamento encontrado do hidrogênio do carbono 10 apresentar estranho, é de se destacar que o sinal estendido de 6,857 ppm a 6,870 ppm encontra uma “corcova”, o que indica haver um segundo sinal sobreposto ao sinal maior (Figura X). Tal fato também se comprova com os valores de integração, onde visivelmente o sinal maior apresenta mais hidrogênios do que poderia ter, observável na Figura 40.

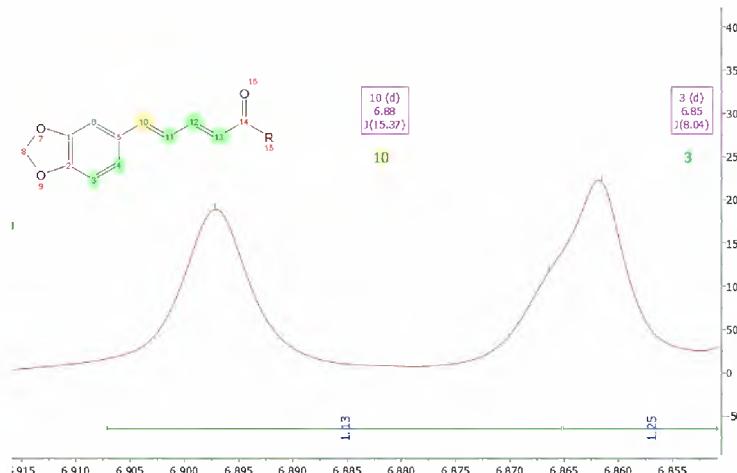


Figura 40 - Espectro RMN ^1H do composto LOP-03 ampliado entre 6,855 a 6,910 ppm.

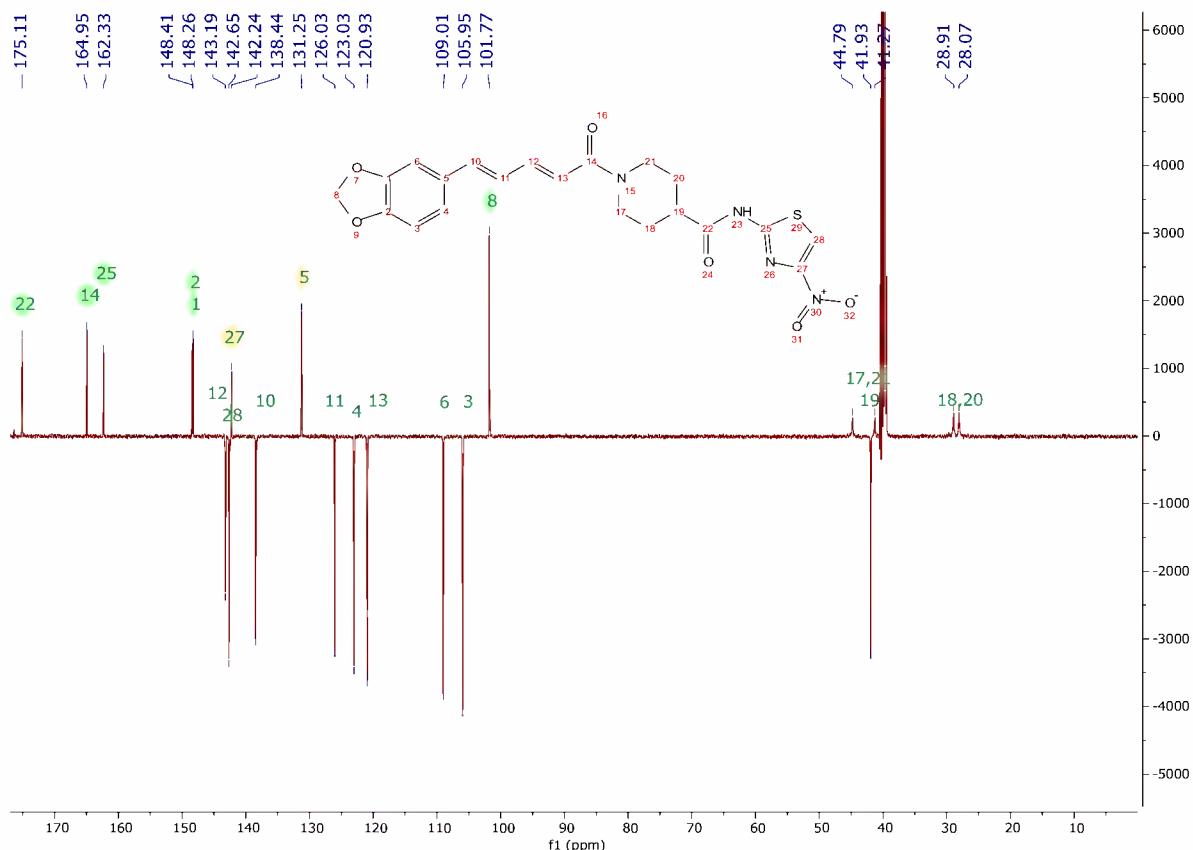


Figura 41 - Espectro RMN de ^{13}C para o composto LOP-04.

Para a análise de RMN do ^{13}C (Figura 41), a começar pelos hidrogênios dos carbonos referentes ao anel piperidínico, é perceptível que, apesar de os sinais estarem pequenos, todos os carbonos foram encontrados, sendo os 18 e 20 referentes aos sinais menos deslocados encontrados (28,07 e 28,91 ppm), o 19 referente a 41,93 ppm e os 17 e 21 aos sinais de 41,27 e 44,79 ppm. Uma curiosidade é que os carbonos 1 e 2 se encontram em sinais bem semelhantes, só sendo possível identificá-los com uma expansão, sendo eles encontrados em 148,26 e 148,41 ppm. Os fatores que comprovam a última reação bem-sucedida, no caso do RMN do ^{13}C são tanto o fato de haver um carbono bem desprotegido, próximo à região das carbonilas, que não se refere a uma carbonila, sendo esse o carbono 25, encontrado em 162,29 ppm e seu alto deslocamento se deve ao fato do efeito induutivo retirador de elétrons tanto de dois nitrogênios como, em segundo plano, do enxofre, e há também de ser considerada a contribuição da ressonância nesse heterociclo, que confere ainda uma maior deslocalização de elétrons nesse específico carbono.

3.7.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL – INFRAVERMELHO

A análise do espectro de infravermelho, também do composto LOP-04, será dividida em duas sessões, visto que não ficaria agradável observar em apenas uma imagem todos as bandas de absorção. O espectro fora comparado com os reagentes de partida (LOP-03 e a amina

2-amino-5-nitro-tiazol) e o ácido carboxílico simplificado (LOP-01) a fim de que pudesse se excluir ou afirmar algumas análises, visto que é esperado que algumas bandas apareçam com número de onda semelhantes aos dos seus precursores. A região entre 400 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} não é algo tão concreto, apesar das semelhanças com o seu precursor (LOP-03), não é possível ter convicção a qual vibração de estiramento ou dobramento pertence a qual grupamento nessa determinada região, portanto, há bandas não catalogadas a uma vibração específica. A Figura 42 representa a região de número de onda entre 400 e 1750 cm^{-1} , enquanto a Figura 43 entre 1750 e 3950 cm^{-1} .

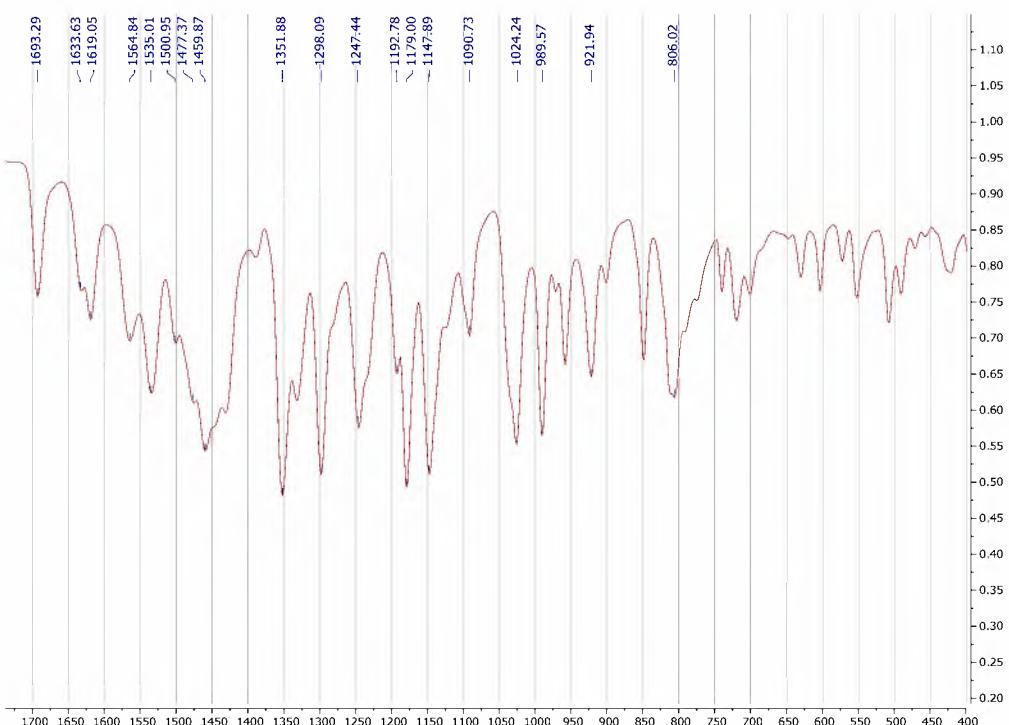


Figura 42 - Espectro de infravermelho do composto LOP-04, ampliado entre as regiões de 400 - 1750 cm^{-1} .

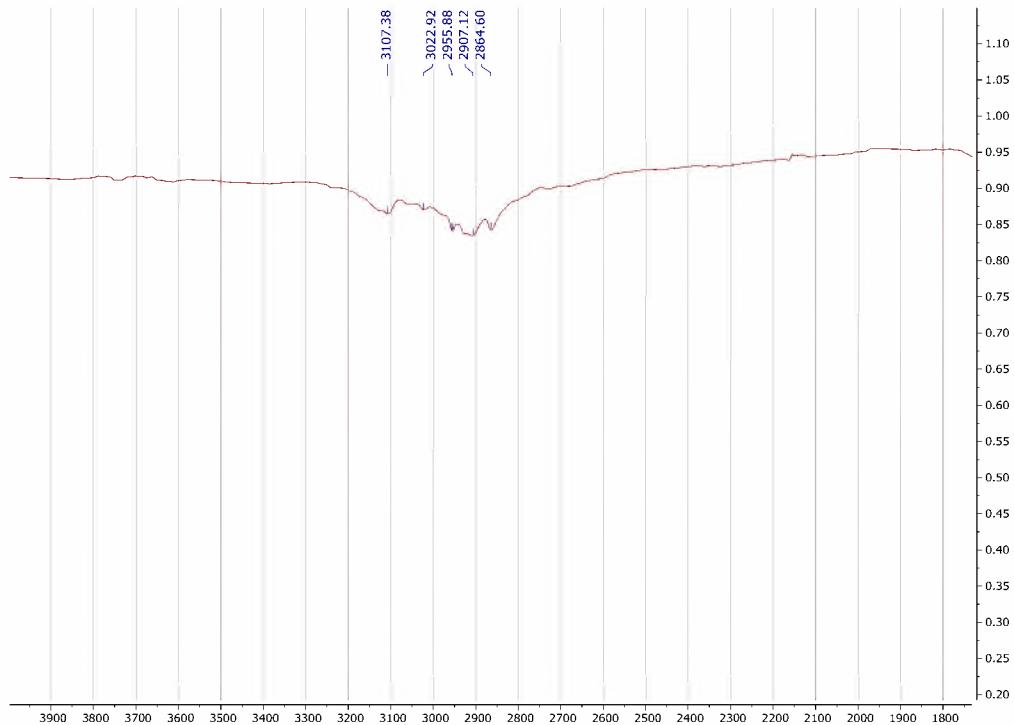


Figura 43 - Espectro de infravermelho do composto LOP-04, ampliado entre as regiões de 1750-4000 cm⁻¹.

Tendo em vista a não necessidade de discutir cada banda em específica, uma tabela com cada atribuição será disponibilizada nessa sessão (Tabela 7).

Tabela 7 – Atribuições do espectro de infravermelho

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuições
3107.38	Estiramento assimétrico N-H (amida secundária)
3022.92	Estiramento assimétrico C=C trans
2955.88	Estiramento assimétrico C-H2
2907.12	Estiramento simétrico C-H2
2864.60	Estiramento assimétrico CH
1693.29	Estiramento C=O de amida secundária
1633.63	Estiramento C=C de sistema conjugado a anel aromático
1619.05	Estiramento C=O de amida terciária
1564.84	Dobramento N-H
1535.01	Estiramento assimétrico N-O de grupo nitro
1500.95	Vibração de esqueleto do anel aromático
1477.37	Dobramento C-H2
1459.87	Vibração de esqueleto do anel aromático
1351.88	Estiramento simétrico N-O de grupo nitro
1298.09	Estiramento C-O assimétrico associado a um anel aromático (1)
1247.44	Estiramento C-O assimétrico associado a um anel aromático (2)
1192.78	Estiramento C-N para amida secundária
1179.00	Estiramento C-N para amida terciária (primeira banda)
1147.89	Estiramento C-N para amida terciária (segunda banda)
1090.73	Estiramento C-O simétrico associado a um anel aromático (1)
1024.24	Dobramento C-H de dupla ligação em trans
989.57	Dobramento C-H de dupla ligação em trans
921.94	Dobramento CH anel aromático 1,2,4 substituído (primeira banda)
806.02	Dobramento CH anel aromático 1,2,4 substituído (segunda banda)

3.7.4. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL – LC-MS

O espectro de massas acoplado à cromatografia líquida (LC-MS) permitiu não só a confirmação da massa do produto (LOP-04) como também analisar sua pureza, o qual se encontrou 95,67% puro, como observado na Figura 44.

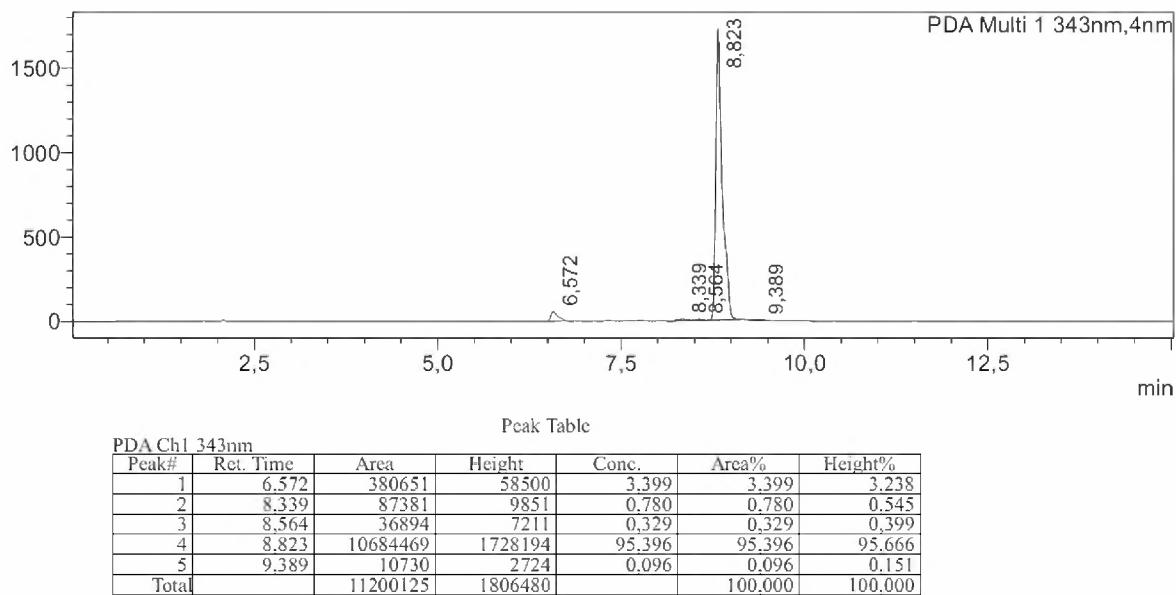


Figura 44 – Dados da cromatografia líquida do composto LOP-04.

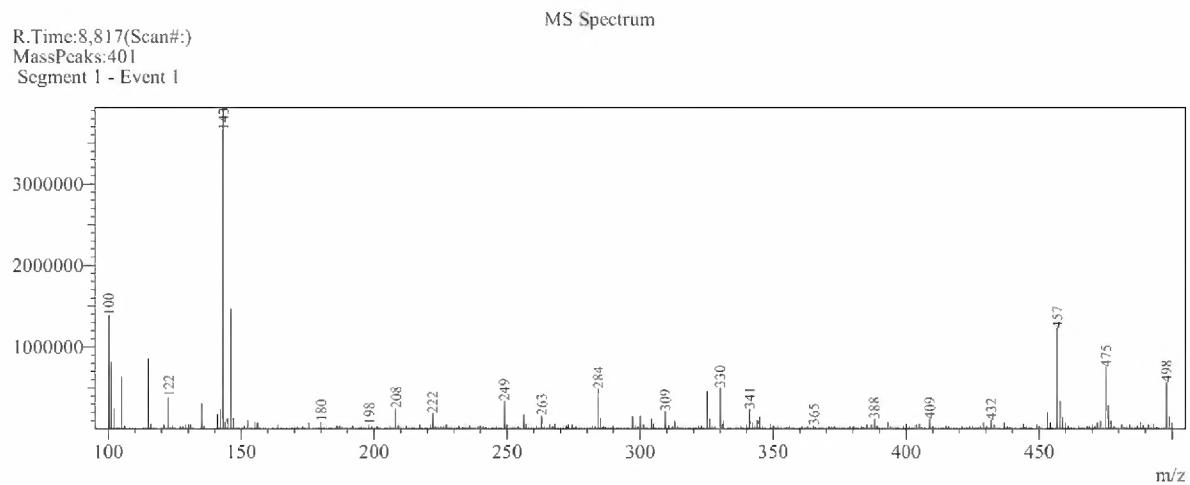


Figura 45 – Espectro de massas do composto LOP-04.

É importante salientar que, por motivos de a coluna ter apresentado alguma impureza, que se repetiu em todas as análises do dia, o pico em 143 m/z deve ser excluído. Contudo, o pico em 457 m/z (em modo positivo) é o que representa a massa do produto LOP-04, de 456 unidades de massa (U.M.), observado na Figura 45. Outro ponto importante a se analisar, é a impureza principal, a qual apresentou cerca de 3,4%. Tal impureza se deve ao seguinte espectro (Figura 46):

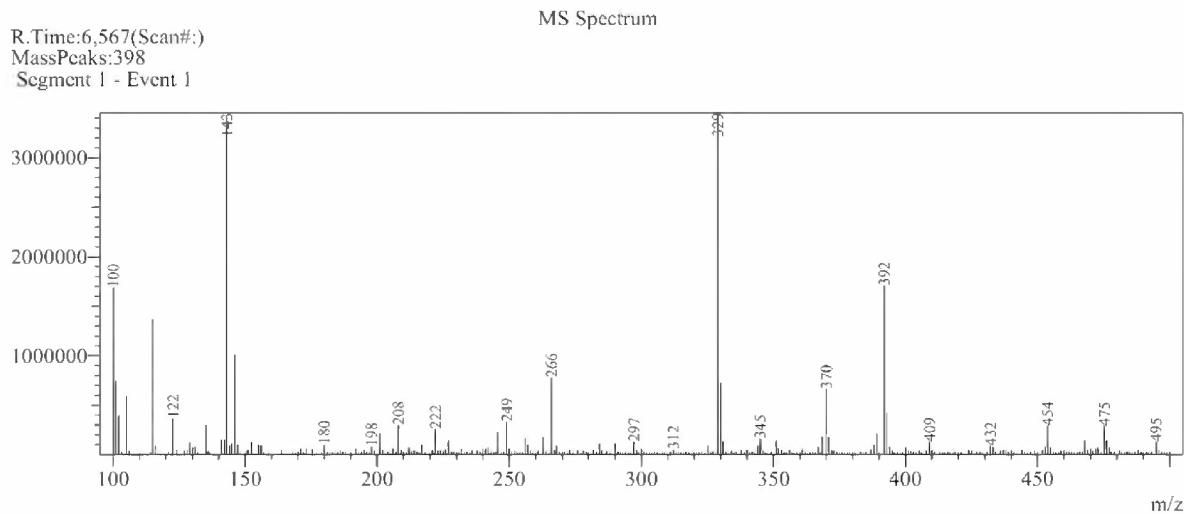
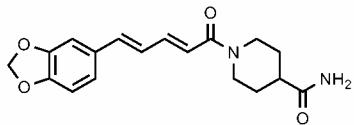


Figura 46 – Espectro de massas da maior impureza do composto LOP-04.

O pico em 329 ($m+1$) no minuto 6,567 se deve a um curioso fato de o acoplamento não ter finalizado em parte das moléculas, portanto, gerando um intermediário que, ao término da reação, na etapa de purificação via extração, reagiu com o cloreto de amônio (utilizado a fins de retirar o excesso de base da reação) e formou a amida sem o núcleo nitro-tiazólico funcionalizado (Figura 47), ou seja:



Exact Mass: 328,14

Figura 47 – Ilustração da maior impureza do composto LOP-04, tal como a sua massa exata.

3.8. RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

Analizando os resultados dos compostos submetidos aos ensaios biológicos (Figura 49) é possível trazer diversas considerações à tona.

Juntamente aos compostos sintetizados, foram testados o benznidazol (fármaco de referência), a nitazoxanida e a piperina (para fins de comparação com os híbridos sintetizados). Foi também testada a nitazoxanida em sua forma reduzida (Figura 48).

Comparando os valores de IC_{50} observados (Tabela 8) e as estruturas dos híbridos, poderemos comparar em partes o que será analisado, começando, primeiramente, da importância do grupo metileno-dióxi, o que será denominado de porção (A). Os dois compostos sintetizados sem essa porção se saíram melhores em seletividade que os demais, de fato, apresentando uma seletividade de até 18,40 (ME-04). Não necessariamente torna o grupamento uma função ruim, porém, a piora na seletividade frente a melhora na atividade parece não fazer sentido investir em tal grupamento. Um outro ponto é que ME-05 tem enorme similaridade com

os fármacos de referência, tanto benznidazol quanto a nitazoxanida, o que pode ter se refletido em muito à sua potência de forma geral, facilitando a alocação no sítio ativo de funcionamento.

Sobre a distância entre o anel aromático e a função, que será denominada de porção (B), é possível citar em dois testes, tanto em LOP-04 ante LOC-04 quanto em LOP-07 ante LOC-05, onde, comparando-se as duas primeiras, observou-se um aumento expressivo de quase 5 vezes na atividade em *cruzi*, porém tal atividade também se apresentou maior nas LLC-MK2, indicando um aumento de duas vezes em citotoxicidade. Se essas variações forem postas na balança, o aumento da cadeia se apresentou como melhor opção, visto o índice de seletividade pouco maior que duas vezes na molécula de maior cadeia. E comparando as LOP-07 e LOC-05, tal afirmação não pôde ser dada, visto que os resultados se diferiram para atividade em *cruzi* de forma marginal e a citotoxicidade se apresentou melhor por cerca de duas vezes na molécula de menor cadeia, o que nos leva a acreditar que tal distância só pode ser levada em conta se for associada à porção do anel piperidínico. Ainda sobre a porção (B), é possível destacar a insaturação de cadeia entre LOP-04 e LOP-06, onde, com exceção da citotoxicidade marginalmente maior, o composto insaturado (LOP-04) apresentou uma atividade antitripanossomial 4 vezes superior, o que por si só seria o suficiente para destacar a importância da insaturação da cadeia.

Portanto, tentando concluir o que fora dito anteriormente, a porção do anel piperidínico (C), a afirmação direta pode ser dada comparando os compostos LOP-04 ante LOP-07, LOC-04 ante LOC-05 e ME-04 ante ME-05. Diretamente, em se tratando de atividade anti *cruzi*, é possível afirmar que a porção (C) se destacou, apresentando resultados superiores a 25 vezes quando comparados LOP-04 à LOP-07 e o mesmo se repetiu em LOC-04 comparado à LOC-05, embora essa diferença observada não tenha sido tão grande quanto a anterior. O caso um tanto curioso fica entre ME-04 e ME-05, as duas moléculas sem a porção (A), que exibiram resultados semelhantes com uma leve superioridade tanto em citotoxicidade quanto em atividade antitripanossomial, porém, não o suficiente para afirmar a superioridade da porção (C). Acredita-se que a semelhança de ME-05, sem a porção (C), com os fármacos de referência tenha sido o principal motivo dessa influência, ou seja, provavelmente pela facilidade de alocação com o sítio ativo, porém, ainda assim se demonstra interessante inserir a porção (C) em futuros protótipos.

Apesar de não haver comparação direta entre a inserção ou não do grupamento NO₂ no anel aromático, é possível observar uma certa similaridade entre NIT-05 e LOP-07 que, apesar de haver diferenças na porção (B) entre uma ser saturada e a outra insaturada, a qual a insaturada

teria uma certa vantagem de antemão, teoricamente, ainda assim apresentou resultados inexpressivos, o que indica que a inserção de tal grupamento não muito difere em questões de atividade. Infelizmente não foi possível determinar a influência de NIT-04 que, apesar de reduzido o grupo para NH₂, não pôde ser testada, mas poderia elucidar melhor tal questão.

Pode se observar, também, comparando os compostos sintetizados com os dois fármacos usados como referências, que LOP-04, ME-04 e ME-05 obtiveram ótimos resultados, visto o seu valor de IC₅₀ frente a amastigotas de *T. cruzi* estar bem próxima ao IC₅₀ do benznidazol, principalmente quando se trata de LOP-04, que demonstrou resultados ainda melhores. O índice de seletividade de LOP-04 apresentou um resultado promissor, visto que tal seletividade é duas vezes maior do que a seletividade exibida pelo precursor natural, a amida piperina, e 3 vezes maior que a nitazoxanida, o mesmo pôde ser observado, de forma ainda mais interessante, em ME-04 e ME-05, principalmente quando se trata de citotoxicidade contra atividade tripanossomial, demonstrando serem possíveis candidatas ao desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas ao tratamento da doença de Chagas.

Foram elaborados gráficos de dose respostas, que se encontram no anexo, na seção II, páginas e. e f.

Tabela 8 – Resultados dos ensaios biológicos

	Avaliação frente as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> (Tulahuen C2C4-LacZ)	IC ₅₀ (µM)	Avaliação citotóxica frente as células	Índice de Seletividade (IS)
			LLC-MK2	
LOP-04	2,09 ± 0,12	22,12 ± 3,2		10,56
LOP-06	8,821	34,06		3,86
LOP-07	>50	>100		-
LOC-04	9,55	42,67		4,46
LOC-05	48,14	>200		-
ME-04	7,02± 0,12	129,22± 2,3		18,40
ME-05	7,35± 0,10	129,22± 2,3		17,58
NIT-05	>100	>200		-
Piperina	18,07 ± 1,24	117 ± 6,54		6,47
Nitazoxanida	4,24 ± 0,32	12,82 ± 4,9		3,02
Nitazoxanida-NH ₂ *	5,01 [#]	10,09 [#]		2,01
2-amino-5-nitrotiazol	>50@	>50@		---
Benznidazol**	2,20 ± 0,28	>200		---

*derivado reduzido da nitazoxanida, já disponível no laboratório.

**fármaco de referência para o tratamento da doença de Chagas.

[#]resultados observados em um experimento único, sem tratamento estatístico (necessita de repetições). @maior que a maior concentração testada.

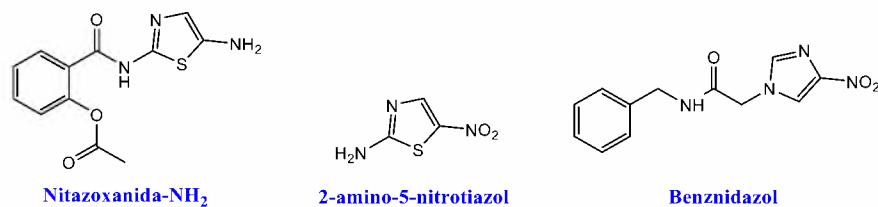


Figura 48 – Estruturas do derivado reduzido da nitozoxanida e do precursor 2-amino-5-nitroimidazol.

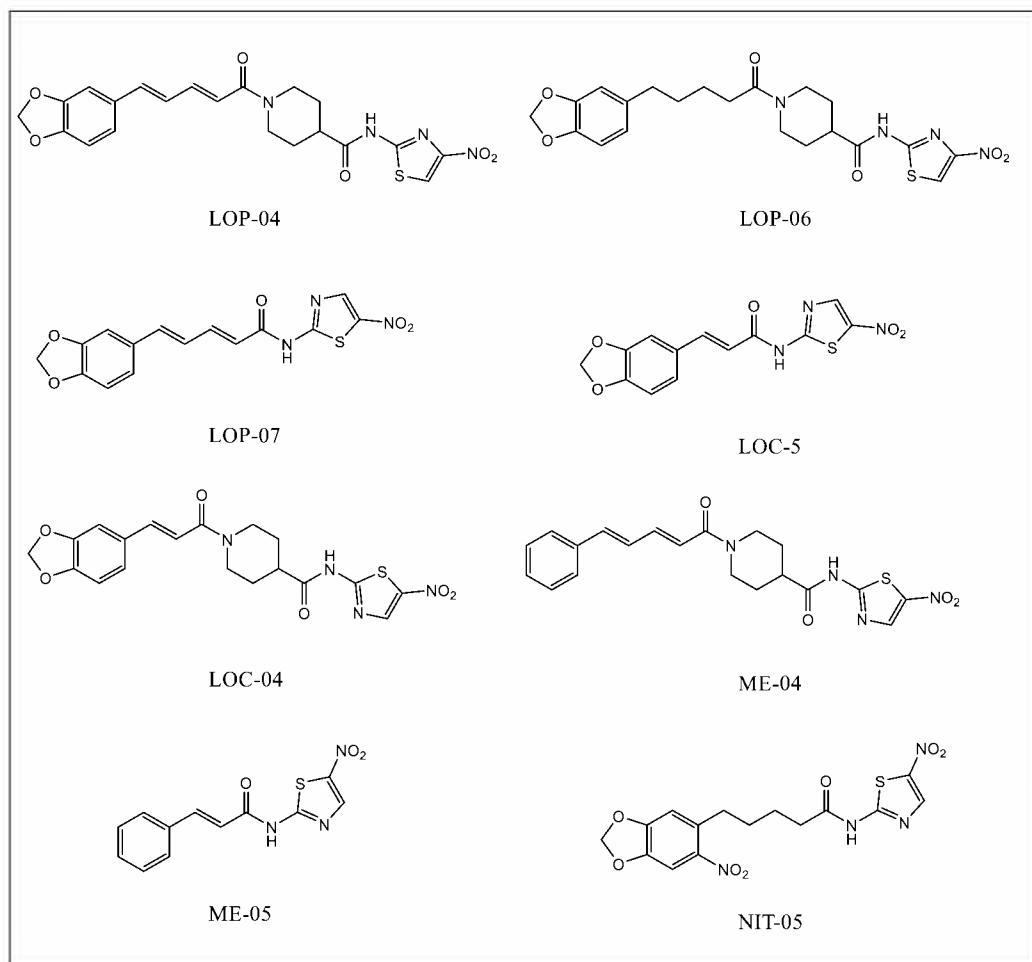


Figura 49 – Compostos submetidos aos ensaios biológicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As reações foram realizadas no Laboratório de Química Medicinal (LaQuiMed) do Instituto de Química (Laboratório 48b), situado no Pavilhão de Química (PQ) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Posteriormente à preparação dos intermediários e produtos finais, foram empregadas as técnicas de análise e determinação estrutural, dentre elas cromatografia em camada delgada (CCD) e ressonância magnética nuclear (RMN).

Para a ressonância magnética nuclear, as análises de ^1H e ^{13}C foram realizadas em aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (Central Analítica Multusuário do Instituto de Química da UFRRJ), operando a 500 MHz e 400 MHz, respectivamente, para os núcleos do ^1H , e 125 e 100 MHz, respectivamente, para os núcleos do ^{13}C . As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

Para os espectros na região do Infravermelho (IV ou FT-IR) foram obtidos no espectrofotômetro da marca Bruker, modelo Vertex 70 (PPGQ-UFRJ), utilizando a técnica de ATR. Os valores das absorções observadas foram representados em número de onda, e a unidade utilizada foi o centímetro recíproco (cm^{-1}).

Para os espectros de massa com ionização por electrospray (ESI) foram obtidos no cromatógrafo em fase líquida acoplado ao espectrofotômetro de massas HPLC-MS 2020 da Shimadzu (PPGQ – UFRRJ). Condições de análise: Coluna Kromasil, C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μm); Fase móvel: água + 0,1% HCOOH e acetonaítrila+0,1% HCOOH (em gradiente); Fluxo 1,0 mL/min; ESI: modo positivo.

4.1. SÍNTESES

Para as análises, sínteses e purificações:

- Cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (camada de 0,2 mm), da marca Merck para o acompanhamento por CCD das reações;
- Solventes: acetato de etila, *N,N*-dimetilformamida, diclorometano, etanol e metanol, entre outros, fornecidos pela Sigma-Aldrich e/ou Neon;
- Sílica gel flash padrão (mesh 60), para a purificação em coluna cromatográfica, da marca Sorbent Technologies;
- No caso de reações anidras, é importante salientar que os processos de secagem, tanto da vidraria como dos solventes utilizados, foram feitos, tal como todos os

procedimentos que necessitam atmosfera inerte, com o auxílio de bexigas de nitrogênios (N_2) acopladas a um septo.

4.1.1. PREPARAÇÃO DOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

No início da execução deste trabalho, o laboratório já dispunha de quantidades adequadas da amida natural piperina, isolada e purificada a partir dos frutos secos de *Piper nigrum*. O isolamento e a purificação do produto natural foram realizados através de metodologia já descrita na literatura e otimizada em outros trabalhos do LaQuiMed-UFRJ.

4.1.1.1. SÍNTESE DO ÁCIDO (2E,4E)-5-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)PENTA-2,4-DIENÓICO (ÁCIDO PIPÉRICO)

Num balão de 500 mL de capacidade, equipado com barra de agitação magnética e condensador de refluxo, foi colocado 5,00 g de piperina. Sobre a amida natural foram então adicionados 100 mL de metanol, seguidos de 100 mL de uma solução etanólica 20% m/v de hidróxido de potássio. A solução resultante foi refluxada durante 24 horas e a evolução da reação de hidrólise básica foi acompanhada por CCD.

Após o término da reação, a mistura foi resfriada até atingir a temperatura ambiente onde, posteriormente, a suspensão resultante foi concentrada com o auxílio de um sistema de rota-evaporador. O resíduo sólido foi dissolvido em água quente, num Bécher (cerca de 100 mL de água, ou o suficiente para solubilizar todo o sólido). A solução aquosa do carboxilato do ácido piperínico foi então transferida para um funil de separação e extraída por 3 vezes com 20 mL de éter etílico. Sobre a fase aquosa foi então gotejada uma solução 1 M de ácido clorídrico, até atingir o pH 3, quando ocorre a precipitação de todo ácido pipérico, na forma de um sólido amarelo escuro que, por fim, foi filtrado e lavado com o auxílio de água gelada (3,3 g, 86% de rendimento) (WANSRI *et al.*, 2022). O produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise e os dados obtidos estão de acordo com os descritos na literatura (FERREIRA, 2006). P_f^{obs} : 216°C; $P_f^{lit.}$: 216-217°C (IKAN, 1991). Os dados espectroscópicos e espectrométricos utilizados na caracterização do produto obtido encontram-se no anexo I (Pgs. 1-3). O método reacional está descrito na Figura 50.

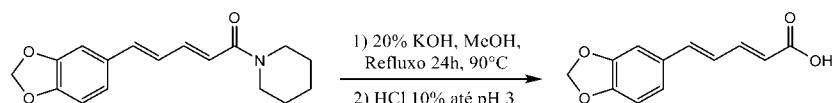
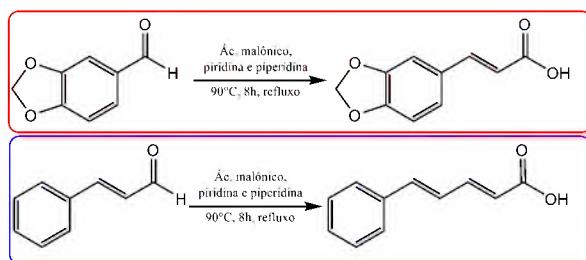


Figura 50 – Reação de hidrólise da piperina.

4.1.1.2. SÍNTESE DO ÁCIDO (E)-3-(BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)ACRÍLICO E DO ÁCIDO (2E,4E)-5-FENIL-PENTA-2,4-DIENOICO

Seguindo o processo experimental de Silva (2002), em um balão foram transferidos 2 g (13,3 mmol) de piperonal, 3 g (26,6 mmol) de ácido malônico. Tal mistura foi dissolvida em 6 mL de piridina, e 0,1 mL (1 mmol) de piperidina. Um magneto foi adicionado ao balão e o balão foi lacrado com um septo. O sistema foi colocado sob um agitador magnético com aquecimento e preso a uma garra. A reação ocorreu em banho maria a 90°C para a ocorrência de refluxo por 8 horas. Terminada a reação, o sistema foi colocado em ebulação (com o septo removido e com a ajuda de um exaustor ligado) por cerca de 30 minutos, até observar uma diminuição do volume de aproximadamente 60% do meio reacional. Uma solução aquosa de ácido clorídrico 10% foi vertida na solução para neutralizar a piridina em excesso, o que resultou na precipitação do ácido carboxílico em forma de um produto branco, que foi filtrado e lavado com água gelada e éter etílico e, por fim, secado ao ar livre, obtendo-se 1,94 g (78% de rendimento). O método reacional pode ser visto no Esquema 1 (SILVA *et al.*, 2002). Pf_{obs} : decompõe a 240°C; $PF_{lit.}$: decompõe entre 242-244°C (guidechem.com). As proporções foram mantidas para a síntese do ácido 5-fenil-penta-2,4-dienoico, com a diferença de que em vez do aldeído piporonal, utilizou-se o cinamaldeído. O ácido após recristalizado apresentou cristais na forma agulha brancos. Pf_{obs} : 166°C; $PF_{lit.}$: entre 165-166°C. Os dados espectroscópicos e espectrométricos utilizados na caracterização do produto obtido encontram-se no anexo I (Pgs. 27, 28 e 29, para LOC-01 e 48, 49 e 50, para ME-01).



Esquema 1 – Condensação de Knoevenagel modificada por Doebner para a síntese da antiepilepsirina (vermelho) e do ácido 5-fenil-penta-2,4-dienoico.

4.1.1.3. SÍNTESE DO ÁCIDO BENZO[D][1,3]DIOXOL-5

A um balão foram dissolvidos 2,0 g (13,3 mmol) de piperonal em 10 mL de acetona e posto em banho de gelo. Uma solução de Reagente de Jones (2,8 M CrO₃ em H₂SO₄ fora preparada anteriormente) e pingada gota-a-gota ao meio reacional. O acompanhamento da reação aconteceu pela mudança de coloração pois, visto que houve a oxidação do Cr⁺⁶ (laranja) para o verde Cr⁺³ (verde), houve indicativo do término da reação, restando apenas eliminar o

excesso de Reagente de Jones com álcool isopropílico. À reação foi vertida água gelada o que culminou na formação do precipitado, que após ser filtrado se apresentou na coloração bege e, após realizada uma CCD, verificou sua pureza. Caso não estivesse pura, realizou-se uma extração aquosa com KOH 20% e acetato. Após a lavagem, a fase aquosa foi acidificada até pH 3,0 e o precipitado lavado sob pressão reduzida. Houve um rendimento de 63%. Pf_{obs} : 229°C; $PF_{lit.}$: entre 229-231°C (ALDRICH, 2024). O método reacional está apresentado na Figura 51. Os dados espectroscópicos e espectrométricos utilizados na caracterização do produto obtido encontram-se no anexo I (Pgs. 45, 46 e 47).



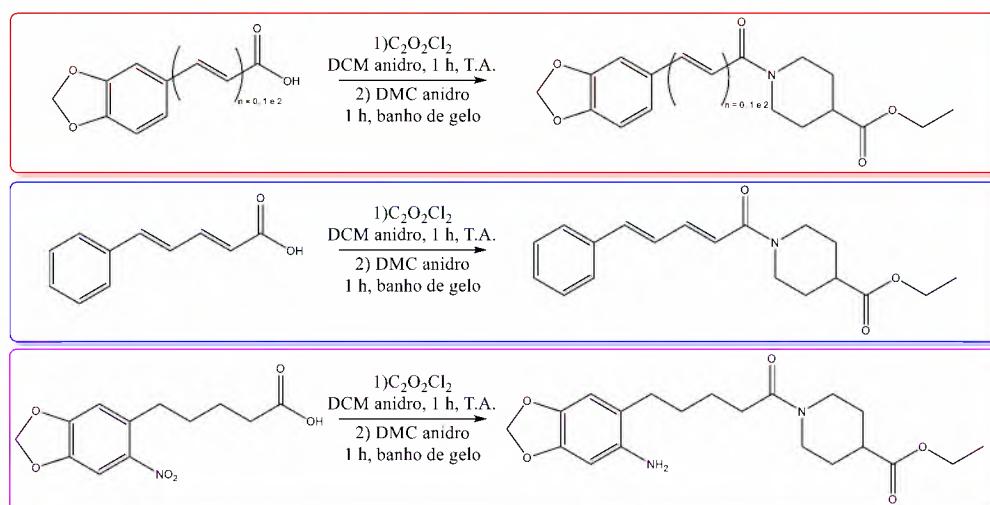
Figura 51 – Reação de oxidação através de Reagente de Jones para a obtenção do ácido benzo[D][1,3]dioxol-5.

4.1.2. PREPARAÇÃO DOS AMIDO-ÉSTERES

4.1.2.1. SÍNTESE DO ACOPLAMENTO DOS ÁCIDOS COM O ISONIPECOTATO DE ETILA, [(2E,4E)-5-(1,3-BENZODIOXOL-5-IL)PENTA-2,4-DIENOIL]PIPERIDINA-4-CARBOXIETILA

A um balão de 25 mL de capacidade (seco em estufa a 120°C por 24h), equipado com barra de agitação magnética e septo de borracha, mantido sob atmosfera de N₂ seco, foram adicionados 100 mg (0,458 mmol) do ácido pipérico e 0,8 mL de cloreto de oxalila (20 mmol). A evolução da reação foi acompanhada por CCD, de forma indireta, através da esterificação instantânea de uma pequena alíquota do cloreto de ácido com metanol. A reação foi terminada em 30 minutos e após o término, o excesso de cloreto de oxalila é removido com o auxílio de um rota-evaporador. O resíduo obtido é dissolvido em 5 mL DCM anidro, sob atmosfera inerte e em banho de gelo, seguido da adição de 0,22 mL (1,02 g/mL, 1,374 mmol) do isonipecotato de etila. Uma determinada quantidade do solvente seco (diclorometano) foi transferida ao balão até a total solubilização do ácido pipérico, com o auxílio de uma seringa. Em aproximadamente 30 minutos de reação foi feita uma CCD comparado o produto, produto + ácido carboxílico e ácido carboxílico para que pudesse ser conferida a total consumação do reagente, sendo necessário utilizar vanilina/ácido sulfúrico, visto a proximidade encontrada dos FRs (fator de retenção) do reagente e produto. Por fim, o conteúdo do balão foi secado novamente com o auxílio de um rota-evaporador e o sólido formado foi solubilizado em acetado de etila para a realização de uma extração, primeiramente com uma solução aquosa 5% v/v de ácido clorídrico e posteriormente com água destilada. A fase orgânica foi secada em sulfato de sódio anidro e filtrada com um funil de vidro e um filtro, e o resto do solvente foi evaporado com o auxílio do

rota-evaporador. A substância final foi um produto oleoso, amarelado e seu método reacional se encontra no Esquema 2. O produto obtido para n=2 encontrou-se em forma de um óleo amarelado (120 mg, 73% de rendimento). O produto obtido para n=1 encontrou-se em forma de um sólido, quase óleo, esbranquiçado, apresentando 78% de rendimento. O produto obtido para n=0 encontrou-se em forma oleosa esbranquiçada com 83% de rendimento. O produto para o caminho “azul” apresentou rendimento de 80% e se encontrou-se em forma oleosa amarelada. O produto para o caminho “roxo” apresentou rendimento de 85%, oleoso e coloração amarelada escura.



Esquema 2 – Etapa da formação dos amidos-esteres.

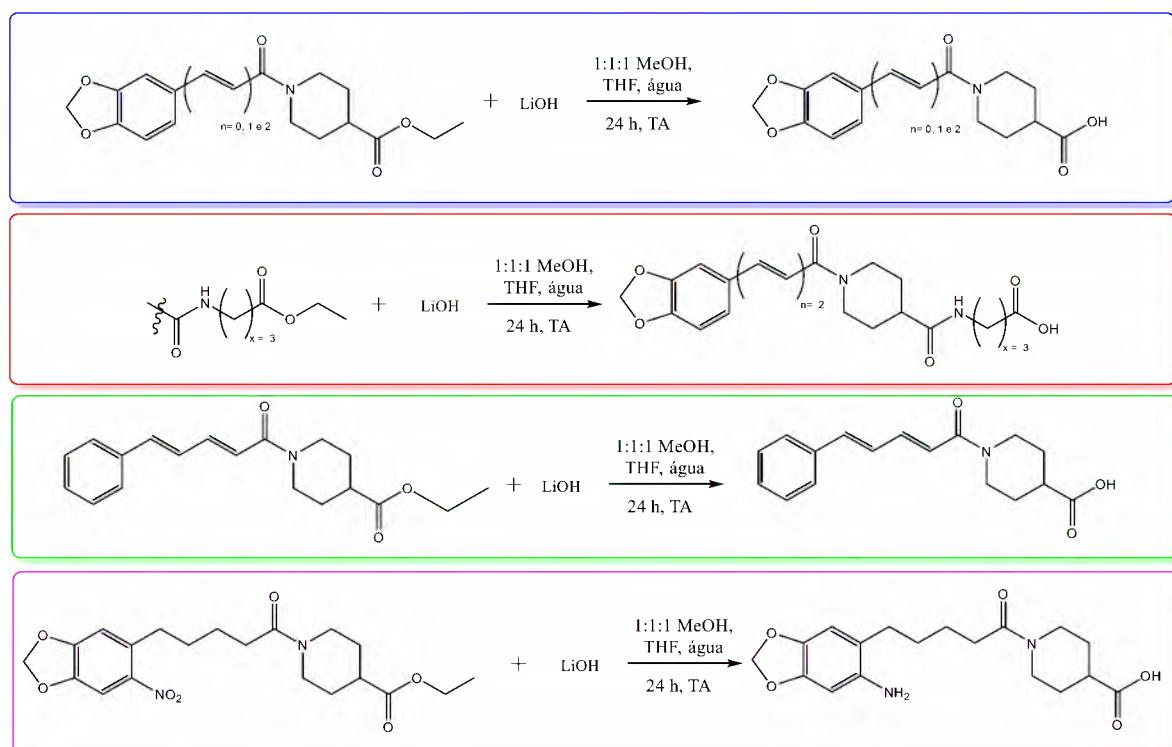
Os dados espectroscópicos e espectrométricos utilizados na caracterização do produto obtido encontram-se no anexo I (Pgs. 4, 5 e 6, para LOP-02, pgs. 32, 33 e 34 para LOC-02, pgs. 53, 54 e 55 para ME-02 e pgs. 64 e 65 para NIT-02).

4.1.3. PREPARAÇÃO DOS AMIDO-ÁCIDOS

4.1.3.1. PROCEDIMENTO GERAL PARA A HIDRÓLISE DOS AMIDO-ÉSTERES

A um *vial* contendo 100 mg (0,280 mmol) do amido-éster anterior, foram adicionados 2 mL de uma mistura 1:1:1 em volume de metanol, THF e água como solvente e um magneto. Posteriormente, 35,3 mg (0,840 mmol) de hidróxido de lítio (LiOH) foram adicionados ao vial. O recipiente foi posto sob um agitador magnético em temperatura ambiente e acoplado a uma garra. Após 24 horas de reação, observou-se o término da reação, prosseguindo para a próxima etapa. Fora adicionado ao recipiente uma solução de concentração 5% de ácido clorídrico até o pH 3, quando possível obter o produto em forma de precipitado ou, em não sendo possível e havendo impurezas, prosseguiu-se para a extração orgânica.

Para a extração, utilizou-se uma solução 1 M de ácido clorídrico, cerca de 10 mL e a solução foi lavada com acetato de etila por diversas vezes até se observar a purificação por CCD. Logo em seguida houve a lavagem da combinação das frações orgânicas de acetato de etila com uma solução salina saturada. Essa combinação foi colocada em sulfato de sódio anidro, passando por uma filtragem através de um funil de vidro com um filtro acoplado e, por fim, secada com o auxílio de um sistema de rota-evaporador. O produto obtido para o caminho azul e n=2, um sólido amarelo escuro, foi de 77,7 mg (83% de rendimento). Para n=1, um sólido também amarelado com 78% de rendimento. Para n=0, um sólido esbranquiçado com 87% de rendimento. Para o produto seguindo o caminho “vermelho”, observou-se um sólido amarelado bem solúvel em água, obtendo-se 80% de rendimento. Para o produto seguindo o caminho “verde”, observou-se um sólido amarelado com 86% de rendimento. E para o produto seguindo o caminho “roxo”, observou-se um sólido amarelo bem escuro, apresentando 90% de rendimento. O método reacional se encontra no Esquema 3.



Esquema 3 – Etapa da formação dos amido-ácidos.

Os dados espectroscópicos e espectrométricos utilizados na caracterização do produto obtido encontram-se no anexo I: (Pgs. 7, 8 e 9, para LOP-03, pgs. 24, 25 e 26 para LOP-09, pgs. 35, 36 e 37 para LOC-03, pgs. 56 e 57 para ME-03 e 66 e 67 para NIT-03).

4.1.3.2. HIDROGENAÇÃO DO AMIDO-ÁCIDO, SÍNTESE DO ÁCIDO 1-(5-(BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)PENTANOIL)PIPERIDINA-4-CARBOXÍLICO

Para a hidrogenação do amido-ácido, a um balão de 50 mL, foram adicionados 50 mg (0,152 mmol) do amido-ácido a ser hidrogenado, 35 mg de Pd/C 10%, etanol para solubilizar a mistura e um magneto. O balão foi lacrado com o auxílio de um septo. O sistema foi posto sobre um agitador magnético e, ao septo, fora acoplado um balão contendo hidrogênio (H_2) com uma agulha longa o suficiente para se chegar ao meio reacional, sempre trocando o balão, quando esvaziasse, por cerca de 4 horas. Após o término da reação, acompanhada por CCD, a suspensão final foi filtrada com terra de infusórios sob pressão reduzida, gerando, após remoção dos voláteis, 44 mg (87%) de um produto oleoso, claro e transparente. A reação de hidrogenação se encontra descrita na Figura 52.

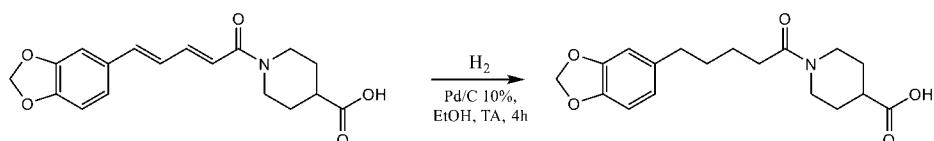


Figura 52 – Etapa da formação dos amido-ácidos saturados.

Os dados espectroscópicos e espectrométricos utilizados na caracterização do produto obtido encontram-se no anexo I (pags. 13, 14 e 15).

4.1.4. PROCEDIMENTO GERAL PARA O ACOPLAMENTO DE AMIDAS VIA T3P®

Em um balão previamente passado pelo processo de secagem para reação anidra, foram adicionados a amina 2-amino-5-nitro-tiazol (1,02 equivalente), o ácido pipérico (50 mg, 1 equivalente) e dissolvidos em 2,0 mL de dicloro-metano anidro. Posteriormente, adicionou-se a esse balão quantidade o suficiente de 3 equivalentes de trietilamina e 1,5 equivalentes do reagente T3P® ao mesmo balão. Após uma hora de reação, verificou-se através de TLC o desaparecimento dos reagentes e, portanto, iniciou-se o processo de término da reação, o qual resumiu-se em finalizar com uma solução aquosa de bicarbonato e separar as fases através de funil de separação. A fase orgânica foi lavada com uma solução 10% de cloreto de amônia, a fim de eliminar o restante de amina e, por fim, água destilada. Observou-se um rendimento de 30% do produto, pouco inferior ao método utilizando HATU.

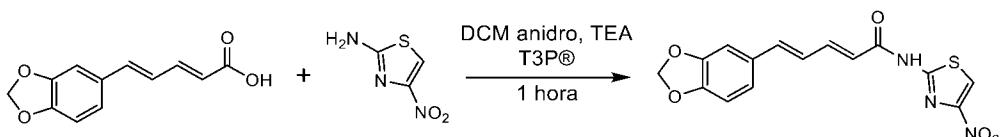


Figura 53 – Reação de acoplamento de amida utilizando do reagente T3P®.

4.1.5. PROCEDIMENTO GERAL PARA O ACOPLAMENTO DE AMIDAS VIA HATU

A um balão de 50 mL, mantido sob atmosfera inerte e meio anidro, contendo um magneto sob as mesmas condições, foram adicionados 80 mg (0,24 mmol) do amido-ácido LOP-3 juntamente a 99 mg de HATU (0,26 mmol), e 37,7 mg (0,26 mmol) do 2-Amino-5-nitrotiazol. O balão foi fechado com um septo, contendo uma bexiga de nitrogênio. A esse mesmo balão, já sob agitação em banho de gelo, foram inseridos 2 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF), seguidos de 0,8 mL de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA).

Após cerca de 3 horas a reação terminou para cada um dos derivados, sendo realizada, em seguida e uma extração. O meio reacional foi solubilizado em acetato de etila e foi utilizada, inicialmente, uma solução aquosa de cloreto de amônio 5%, lavando-o exaustivamente até não se observar mais impurezas via CCD. Após essa etapa, utilizou-se uma solução aquosa 5% de bicarbonato de sódio, também exaustivamente, seguido de uma solução 10% de cloreto de lítio para se ter certeza da eliminação de todo o DMF da solução. Por fim, lavou-se uma vez com solução salina saturada. A camada orgânica foi seca com sulfato de sódio, filtrada e evaporada por um sistema de rota-evaporador.

A reação de acoplamento se encontra descrita no Esquema 4. Os produtos em A (azul), referentes aos: LOP-04 (27 mg, 24% de rendimento), LOC-04 (26 mg, 37% de rendimento) e LOP-06 saturado com 2 espaçadores (27 mg, 45% de rendimento) encontraram-se amarelados e, após recristalizar, em forma de um pó amarronzado, com exceção de LOP-06, que se encontrou amarelado.

Os produtos referenciados em B (vermelho), LOP-08 com 3 espaçadores, (38,9 mg, 58% de rendimento) foi encontrado em forma de um sólido amarelado e LOP-10, um sólido marrom escuro com 42% de rendimento.

Os produtos referenciados em C (verde), com 0 espaçador (LOB-05), com 1 espaçador (LOC-05) e 2 espaçadores (LOP-7) encontraram-se amarelados e apresentaram rendimento que variaram de 39 a 42%.

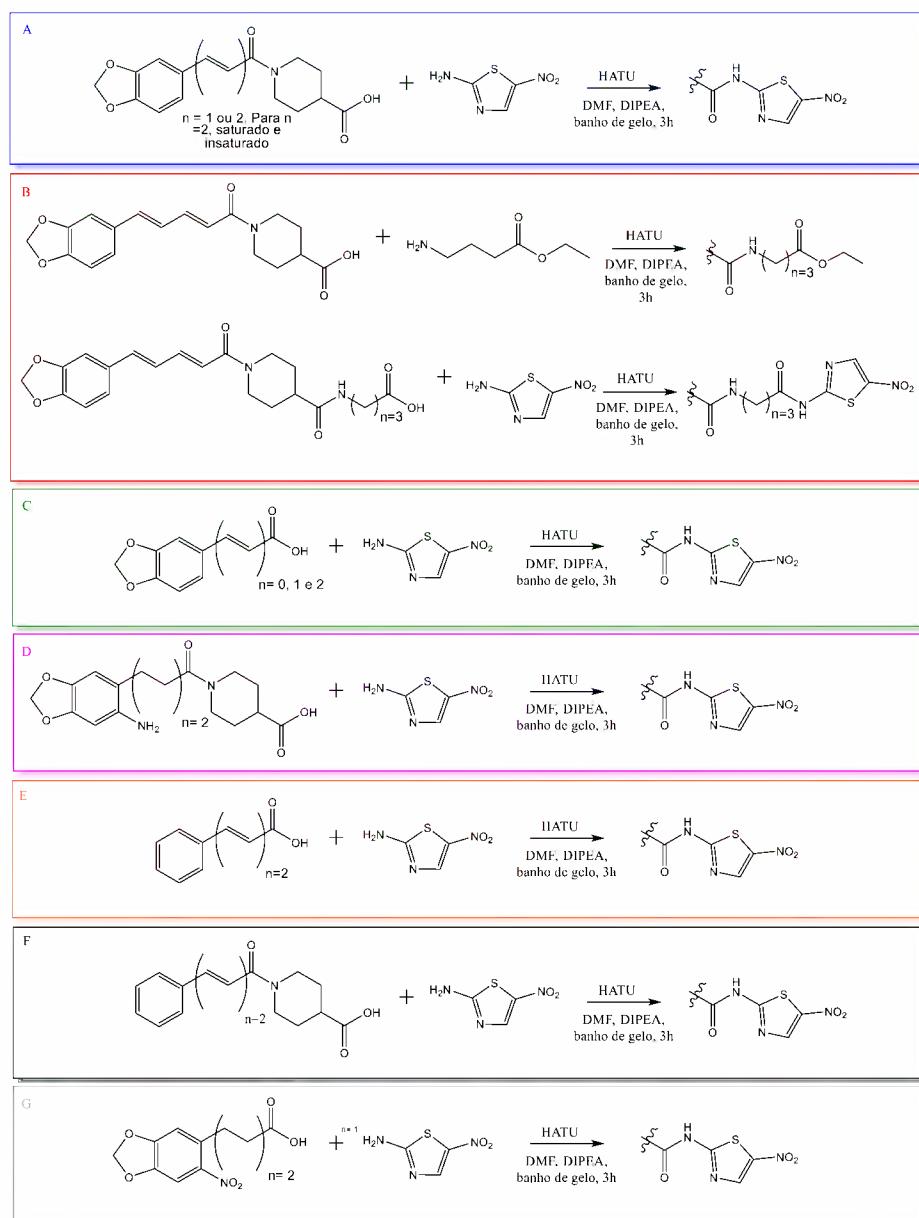
O produto em D (roxo) apresentou uma coloração marrom, NIT-05, e obteve um rendimento de 37%.

Os produtos referenciados em E (laranja) apresentaram, com 0 espaçador (ME-05) encontrou-se como um sólido de cor amarela com 45% de rendimento.

O produto referenciado em F (preto) apresentou-se em um sólido marrom e obteve 37% de rendimento.

O produto referenciado em G (cinza) apresentou-se em um sólido preto e obteve 42% de rendimento.

Os dados espectroscópicos e espetrométricos utilizados na caracterização do produto obtido encontram-se no anexo I, para: LOP-04 (Pgs. 10-12), LOP-06 (Pgs. 16-18), LOP-07 (Pgs. 19 e 20), LOP-08 (Pgs. 21-23), LOP-10 (Pgs. 27 e 28), LOC-04 (Pgs. 38-40) e LOC-05 (Pgs. 41 e 42), LOC-06 (Pgs. 43 e 44), LOB-05 (Pgs. 48 e 49), ME-04 (Pgs. 58 e 60), ME-05 (Pgs. 60 e 61), ME-06 (Pgs. 62 e 63), NIT-04 (Pgs. 68 e 69) e NIT-05 (Pgs. 70 e 71).



Esquema 4 - Etapa do acoplamento de amida.

4.2. ENSAIO BIOLÓGICO

- Para a avaliação anti-*T. cruzi***

A avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* das moléculas obtidas neste trabalho foi realizada pelo doutorando Afonso Santine M. M. Velez, no Instituto de Veterinária - UFRRJ, no Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária, sob a supervisão da Profa Débora Decoté-Ricardo de Lima.

- Cultivo de LLC-MK2**

As células LLC-MK2 (ATCC) são fibroblastos que apresentam morfologia epitelial e foram isoladas do rim de macacos rhesus (*Macaca mulata*). As células foram mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) completo, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), em estufa a 37°C com controle de umidade e sob atmosfera a 5% de CO₂. O inóculo foi obtido pelo tratamento da monocamada de células com solução aquosa de 0,25% m/v de tripsina e 1 mM de ácido etileno-diamino acético (EDTA) por 5 min. Passagens na proporção de 1:6 do volume do inóculo foram realizadas a cada 4-5 dias.

- Cultivo de *T. cruzi* na forma tripomastigota**

Células LLC-MK2 com 50% de confluência em garrafas de cultura de 175 cm² de área de cultivo (T-175) foram infectadas com 5×10^7 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Tulahuen C2C4 LacZ, transfetada com plasmídeo de *Escherichia coli* para a expressão citoplasmática da enzima beta-galactosidase (βGal) (BUCKNER et al., 1996). Foi utilizado meio DMEM com 2% SFB. Após 24h, o meio foi removido e a monocamada de células lavada com tampão fosfato-salino (pH 7,2) (PBS). Meio DMEM com 2% SFB foi adicionado à cultura e renovado a cada 2 dias. Formas tripomastigotas foram recolhidas do sobrenadante entre o 5º e 10º dias após a infecção, e separadas de células não aderidas por centrifugação diferencial.

- Soluções estoques das misturas**

As soluções estoques dos compostos utilizados nos ensaios biológicos, foram obtidos pela solubilização destes em dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 30 e 50 mM. As concentrações utilizadas nos ensaios foram obtidas por meio da diluição seriada das soluções estoque preparadas para cada mistura. As diluições foram realizadas no próprio meio de cultura do experimento, de forma que a concentração máxima de DMSO presente nas culturas de células não ultrapassasse 0,3% v/v.

- Atividade tripanocida contra *T. cruzi***

Em uma placa de 96 poços transparente, foi adicionada uma suspensão de 2×10^4 células LLC-MK2 (ATCC) em meio DMEM + 2% SFB. As células foram incubadas a 37°C (5% CO₂)

por 3 h e em seguida lavadas com PBS para remoção de células não aderidas. Uma suspensão contendo 5×10^5 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Tulahuen C2C4 LacZ, que expressa a enzima β -galactosidase, foi adicionada às células, seguindo-se incubação a 37°C (5% CO₂) por 20 h para estabelecimento da infecção. Os parasitos não internalizados foram removidos por três lavagens sucessivas com PBS, seguindo-se tratamento com diluições seriadas dos compostos em concentrações decrescentes (50-0,51 μ M) em triplicatas, pré-diluídos em DMEM + 2% SFB. Controles não tratado, veículo (0,3% v/v DMSO) e branco (sem adição de parasitos) foram incluídos no experimento. Benzonidazol foi utilizado em diluição seriada como controle positivo. Adicionaram-se então 30 μ L de solução 0,5 mM do substrato vermelho de clorofenol β -galactopiranosídeo (CPRG) em PBS com 0,9% v/v Igepal CA-630. Após incubação por 1,5 h a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm com auxílio de um leitor de placas.

- **Citotoxicidade contra células LLC-MK2**

Em uma placa de 96 poços transparente, foi adicionada uma suspensão de 2×10^4 células LLC-MK2 (ATCC) em meio DMEM + 2% SFB. As células foram incubadas a 37°C (5% CO₂) por 20 h e em seguida lavadas com PBS para remoção de células não aderidas. As células foram tratadas com diluições seriadas dos compostos em concentrações decrescentes (100-1 μ M) em triplicatas, pré-diluídos em DMEM + 2% SFB. Controles não tratado, veículo (0,3% v/v DMSO) e branco (sem adição de células) foram incluídos no experimento. Após incubação por 48 h o sobrenadante foi removido e a monocamada de células lavada com PBS, renovando-se o meio de cultura em seguida. Adicionaram-se então 20 μ L de solução 3,0 mM de sal de MTT, seguindo-se incubação por mais 1,5 h. O sobrenadante foi então removido e os cristais de formazana de MTT dissolvidos pela adição de 100 μ L/poço de DMSO. Após incubação por 1,5 h para dissolução dos cristais de MTT ao abrigo da luz e 37°C, a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm com auxílio de um leitor de placas.

- **Tratamento estatístico de dados**

Os dados de absorbância foram convertidos em valores de viabilidade relativa à média do controle veículo, descontados da média do controle branco, conforme a fórmula abaixo:

$$V(\%) = \frac{Abs - M_B}{M_V - M_B}$$

$V(\%)$ = Viabilidade em %

Abs = Leitura de absorbância em determinado poço

M_B = Média da absorbância da triplicata do **Controle Branco**

M_V = Média da absorbância da triplicata do **Controle Veículo**

Os valores de percentuais foram inseridos no software GraphPad Prism 7, onde foram realizados os cálculos estatísticos e gerados os gráficos apresentados. Para os cálculos da concentração inibitória do crescimento em 50% (CI_{50}) foi utilizado o modelo padrão do software de regressão não linear para valor de concentração de inibidor *versus* resposta normalizada com inclinação variável. Os resultados finais para os valores de CI_{50} foram obtidos pela média de ao menos 3 experimentos independentes. Para os testes de significância estatística foi utilizada a análise de variância simples *one-way* ANOVA. Os gráficos de dose respostas se encontram no anexo, na seção II, páginas e. e f.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Levando em consideração os resultados dos ensaios biológicos do composto LOP-04, que é a base do projeto, ou seja, análogo direto da piperina, é possível afirmar que o planejamento estrutural foi validado, visto que houve morte de 50% de *T. cruzi* a uma concentração de 2 micromolar. Foi possível discutir e correlacionar a estrutura-atividade dos compostos testados em ensaios biológicos, discutindo as interferências das porções de cada molécula, a exemplo de ser melhor para os híbridos conterem ou não determinados grupos, como o metilenodióxi, o anel piperidínico, presença maior ou menor de insaturações, ou até a interferência de insaturações.

Destacaram-se outras 2 moléculas, sendo elas: ME-04 e ME-05, ambas apresentando um valor baixo para IC₅₀, de 7,02 e 7,35 micromolar, respectivamente e uma baixa citotoxicidade frente a células de mamíferos, frente as quais ambas apresentaram IC₅₀ de 129,22 micromolar.

As sínteses e metodologias de síntese propostas foram assertivas, à medida que foi possível reproduzi-las com resultados satisfatórios. Apesar de a síntese das amidas ter um baixo rendimento (variando entre 24 e 47%), por conta da baixa reatividade dos reagentes, optou-se por um método menos poluente e com menos risco de se perder reagentes por degradação ou redução não pretendida.

Certamente, o acoplamento de amidas pelo reagente HATU é uma forma eficaz de se sintetizar amidas a partir de um ácido carboxílico, tal como o reagente T3P®, apesar de esse último não ter demonstrado resultado no acoplamento dos compostos mais impedidos (compostos contendo o anel piperidínico) com o reagente menos reativo (2-amino-5-nitrotiazol).

As perspectivas para este trabalho envolvem o aprofundamento dos ensaios *in vitro* das moléculas que não foram submetidas quando analisar a viabilidade de submeter as moléculas mais ativas testadas a ensaios biológicos, como pôde-se observar em LOP-04, ME-04 e ME-05. A síntese de outros compostos, analisando a interferência acerca de grupos retiradores e doadores eletrônicos na porção aromática, além de outras formas de espaçadores entre o anel piperidínico e a porção nitro-tioimidazólica também são planejamentos futuros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-WARHI, T. I.; AL-HAZIMI, H. M. A.; EL-FAHAM, A. Recent development in peptide coupling reagents. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 97–116, 2012.
- ARCE-FONSECA, M. et al. Nitazoxanide: A drug repositioning compound with potential use in Chagas disease in a Murine model. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 6, 2023.
- BALLARD, T. E. et al. Synthesis and antimicrobial evaluation of nitazoxanide-based analogues: identification of selective and broad spectrum activity. **ChemMedChem**, v. 6, n. 2, p. 362–377, 2011.
- BANCET, A. et al. Fragment linking strategies for structure-based drug design. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 20, p. 11420–11435, 2020.
- BERN, C. Chagas' disease. **The New England journal of medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.
- Brasil ganha terreno como exportador de pimenta.** Disponível em: <<https://monitormercantil.com.br/brasil-ganha-terreno-como-exportador-de-pimenta/>>. Acesso em: 4 jul. 2023.
- BROWN, D. G.; BOSTRÖM, J. Analysis of past and present synthetic methodologies on medicinal chemistry: Where have all the new reactions gone?: Miniperspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 59, n. 10, p. 4443–4458, 2016.
- BUCKNER et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing *beta*-galactosidase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, 1996.
- CAREY, J. S. et al. Analysis of the reactions used for the preparation of drug candidate molecules. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 4, n. 12, p. 2337–2347, 2006.
- CARON, G. et al. Flexibility in early drug discovery: focus on the beyond-Rule-of-5 chemical space. **Drug discovery today**, v. 25, n. 4, p. 621–627, 2020.
- CARPINO, L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 10, p. 4397–4398, 1993.
- CASIRAGHI, G. et al. The vinylogous aldol reaction: A valuable, yet understated Carbon–Carbon bond-forming maneuver. **Chemical reviews**, v. 100, n. 6, p. 1929–1972, 2000.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.
- Chagas disease.** Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>. Acesso em: 4 jul. 2023.

Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Disponível em: <[>](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 4 jul. 2023.

CHAN-BACAB, M. J.; HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G. Nitazoxanide, tizoxanide and a new analogue [4-nitro-N-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)benzamide; NTB] inhibit the growth of kinetoplastid parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*) in vitro. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 6, p. 1292–1293, 2009.

CHAWLA, P. A.; SHOME, A.; JHA, K. T. Hexafluorophosphate azabenzotriazole tetramethyl uronium (HATU): A unique cross-coupling reagent. **SynOpen**, v. 07, n. 04, p. 566–569, 2023.

CLAISEN, L. Zu den *O*-Alkylderivaten des Benzoyl-acetons und den aus ihnen entstehenden Isoxazolen. (Entgegnung an Hrn. O. Weygand.). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)**, v. 59, n. 2, p. 144–153, 1926.

COURA, J. R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciencia e cultura**, v. 55, n. 1, p. 30–33, 2003.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

Crystal of piperine. Disponível em: <[>](https://www.deviantart.com/defitra/art/Crystal-of-Piperine-362331514). Acesso em: 4 jul. 2023.

DASILVA, E. et al. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against promastigotes and amastigotes. **European journal of medicinal chemistry**, v. 37, n. 12, p. 979–984, 2002.

DE SENA M. PINHEIRO, P. et al. The use of conformational restriction in medicinal chemistry. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 19, n. 19, p. 1712–1733, 2019.

DE SOUZA G. V. M. A. et al. Piper nigrum ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 189, p. 139–147, 2016.

DONG, Y.; HUIHUI, Z.; LI, C. Piperine inhibit inflammation, alveolar bone loss and collagen fibers breakdown in a rat periodontitis model. **Journal of periodontal research**, v. 50, n. 6, p. 758–765, 2015.

ERMONDI, G. et al. Experimental lipophilicity for beyond rule of 5 compounds. **Future drug discovery**, v. 1, n. 1, 2019.

FAN-MINOGUE, H. et al. A c-Myc activation sensor-based high-throughput drug screening identifies an antineoplastic effect of nitazoxanide. **Molecular cancer therapeutics**, v. 12, n. 9, p. 1896–1905, 2013.

FERREIRA, W. S. et al. Piperina, seus Análogos e Derivados: Potencial como Antiparasitários. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 208–224, 2012.

FERREIRA, W. S. Utilização da piperina como protótipo na síntese de novos anti-chagásicos da classe das 1,3,4- tiadiazólio-2- fenilaminidas. 2006. 197 p. **Dissertação** (Mestre em Ciências, Química Orgânica) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Seropédica, Rio de Janeiro.

FOX, L. M.; SARAVOLATZ, L. D. Nitazoxanide: a new thiazolidine antiparasitic agent. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 40, n. 8, p. 1173–1180, 2005.

FRANCIS CAREY, E. **Advanced organic chemistry**. Nova Iorque, NY, USA: Springer, 2014.

FREIRE-DE-LIMA, L. et al. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. **Parasitology research**, v. 102, n. 5, p. 1059–1067, 2008.

GARCÍA-HUERTAS, P.; CARDONA-CASTRO, N. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. **Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]**, v. 142, n. 112020, p. 112020, 2021.

GREENBERG, A.; BRENEMAN, C. M.; LIEBMAN, J. F. **The amide linkage: Structural significance in chemistry, biochemistry, and materials science**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2000.

GONTIJO, V. S. et al. Molecular Hybridization as a tool in the design of multi-target directed drug candidates for neurodegenerative Diseases. **Current neuropharmacology**, v. 18, n. 5, p. 348–407, 2020.

HAQ, I.-U. et al. Piperine: A review of its biological effects. **Phytotherapy research: PTR**, v. 35, n. 2, p. 680–700, 2021.

HOFFMAN, P. S. et al. Antiparasitic drug Nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 868–876, 2007.

HONG, S. K. et al. Nitazoxanide suppresses IL-6 production in LPS-stimulated mouse macrophages and TG-injected mice. **International immunopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 23–27, 2012.

IKAN, R. **Natural products: A laboratory guide**. 2. ed. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1992.

Instituto Oswaldo Cruz. Disponível em:
<<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=891&sid=32>>. Acesso em: 4 jul. 2023.

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas disease treatment. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 95–97, 2007.

JOULLIÉ, M. M.; LASSEN, K. M. Evolution of amide bond formation. **ARKIVOC**, v. 2010, n. 8, p. 189, 2010.

KAMAL, M. et al. **Amide as a potential pharmacophore for drug designing of novel anticonvulsant compounds. Chemistry of Biologically Potent Natural Products and Synthetic Compounds** Wiley, , 15 jun. 2021. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1002/9781119640929.ch11>>

KERSTIN, V. G. *et al.*; CALICO LIFE SCIENCES LLC [US]; ABBVIE INC [US]. WO2023019166A1. Patente depositada em: 10/08/2022. Publicada em: 16/02/2023.

KOSTELECKA, K. et al. An overview of the spices used for the prevention and potential treatment of gastric cancer. **Cancers**, v. 16, n. 8, p. 1611, 2024.

KUMARI, S. et al. Amide bond bioisosteres: Strategies, synthesis, and successes. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 21, p. 12290–12358, 2020.

LAHLOU, M. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacology & pharmacy**, v. 04, n. 03, p. 17–31, 2013.

LAZARIN-BIDÓIA, D. et al. Natural compounds based chemotherapeutic against Chagas disease and leishmaniasis: mitochondrion as a strategic target. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e220396, 2022.

LI, Q. Application of fragment-based drug discovery to versatile targets. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 180, 2020.

LIDANI, K. C. F. et al. Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. **Frontiers in public health**, v. 7, p. 166, 2019.

LIRA, B. S. DE M. M. et al. Nitazoxanida: aspectos gerais, sistemas de liberação e potencial de reposicionamento da molécula. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e42610111766, 2021.

LYNN, M. K. et al. Contemporary autochthonous human Chagas disease in the USA. **Acta tropica**, v. 205, n. 105361, p. 105361, 2020.

MARTÍN-ESCOLANO, J. et al. An updated view of the Trypanosoma cruzi life cycle: Intervention points for an effective treatment. **ACS infectious diseases**, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 2022.

MASOCHA, W.; KRISTENSSON, K. Passage of parasites across the blood-brain barrier. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 202–212, 2012.

MAYA, J. D. et al. Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives. **Biochemical pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 999–1006, 2003.

- MOHAMMADKHANI, L.; HERAVI, M. M. Oxalyl chloride: A versatile reagent in organic transformations. **ChemistrySelect**, v. 4, n. 20, p. 6309–6337, 2019.
- MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827–10852, 2005.
- MÜLLER-KUHRT, L. Putting nature back into drug discovery. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 602, 2003.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4. ed. Basingstoke, England: Palgrave Macmillan, 2004.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.
- ODINGO, J. et al. In vitro evaluation of novel nitazoxanide derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS omega**, v. 2, n. 9, p. 5873–5890, 2017.
- PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 6, p. 289–298, 2014.
- PHOTOGRAPHER. **Fresh green piper nigrum isolated on white background**. Disponível em: <<https://www.istockphoto.com/br/foto/nigrum-verde-fresco-do-piper-isolado-no-fundo-branco-gm1148634928-310257947>>. Acesso em: 4 jul. 2023.
- POLANYI, M.; SZABO, A. L. On the mechanism of hydrolysis. The alkaline saponifications of amyl acetate. **Transactions of the Faraday Society**, v. 30, n. 0, p. 508, 1934.
- RASSI, A., Jr; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.
- RIBEIRO, T. S. et al. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of Trypanosoma cruzi. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, n. 13, p. 3555–3558, 2004.
- ROBERT, E. G. L. **How to get rid of DMF from the organic layer**. Disponível em: <<https://www.epfl.ch/labs/lcso/wp-content/uploads/2022/02/DMF-removal.pdf>>. Acesso em: 7 jun. 2024.
- RODIG, O. R.; BELL, C. E.; CLARK, A. K. **Organic chemistry laboratory: Standard and microscale experiments**. [s.l.] Saunders College Publishing, 1990.
- SHIGYO, K. et al. Efficacy of nitazoxanide against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2834–2837, 2013.
- SIJM, M. et al. Structure Activity Relationship of N-Substituted Phenylhydropyrazolones Against Trypanosoma cruzi Amastigotes. **Frontiers in chemistry**, v. 9, 2021.
- SOLOMONS. **Organic chemistry 12e**. Nashville, TN, USA: John Wiley & Sons, 2016.

SURESHBABU, V. et al. Propanephosphonic acid anhydride (T3P®) - A benign reagent for diverse applications inclusive of large-scale synthesis. **Synthesis**, v. 45, n. 12, p. 1569–1601, 2013.

TAVARES, L. DE C. et al. Structure-activity relationship of benzophenanthridine alkaloids from Zanthoxylum rhoifolium having antimicrobial activity. **PLoS one**, v. 9, n. 5, p. e97000, 2014.

THARMALINGAM, N. et al. Piperine treatment suppresses Helicobacter pylori toxin entry in to gastric epithelium and minimizes β -catenin mediated oncogenesis and IL-8 secretion in vitro. **American journal of translational research**, v. 8, n. 2, p. 885–898, 2016.

TIWARI, A.; MAHADIK, K. R.; GABHE, S. Y. Piperine: A comprehensive review of methods of isolation, purification, and biological properties. **Medicine in drug discovery**, v. 7, n. 100027, p. 100027, 2020.

TORRICO, F. et al. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet infectious diseases**, v. 18, n. 4, p. 419–430, 2018.

TRINDADE, J. D. S. et al. Drug repurposing for Chagas disease: In vitro assessment of nimesulide against Trypanosoma cruzi and insights on its mechanisms of action. **PLoS one**, v. 16, n. 10, p. e0258292, 2021.

VAN BEURDEN, K. et al. The Knoevenagel reaction: a review of the unfinished treasure map to forming carbon–carbon bonds. **Green chemistry letters and reviews**, v. 13, n. 4, p. 349–364, 2020.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.

VELEZ, A. et al. Seasoning to kill: The example of the natural amide piperine and its potential in the design of new antiparasitic drugs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2024.

VIEGAS-JUNIOR, C. et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

WAGHMARE, A. A.; HINDUPUR, R. M.; PATI, H. N. Propylphosphonic anhydride (T3P®): An expedient reagent for organic synthesis. **Review journal of chemistry**, v. 4, n. 2, p. 53–131, 2014.

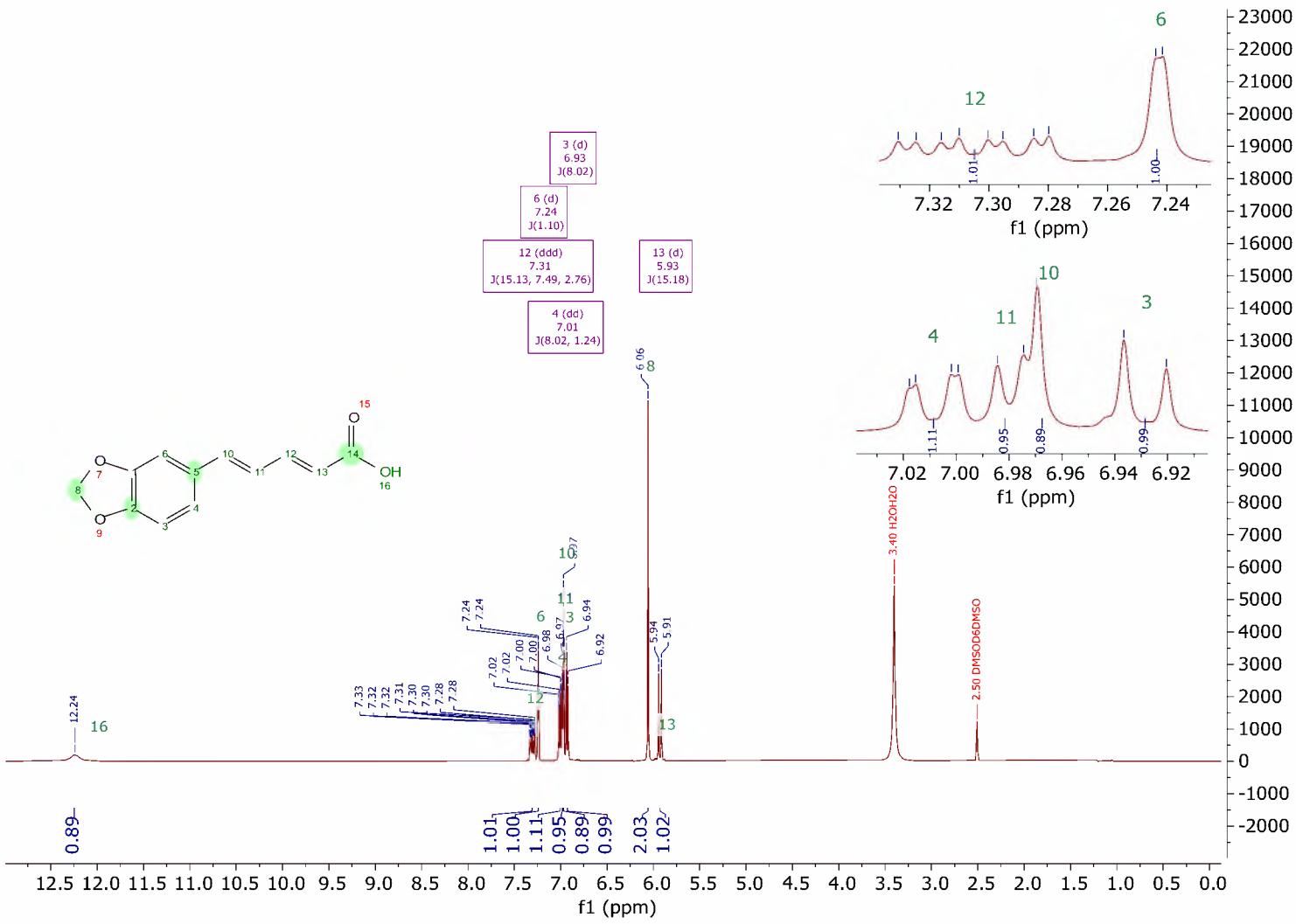
WANSRI, R. et al. Semi-synthesis of N-aryl amide analogs of piperine from *Piper nigrum* and evaluation of their antitrypanosomal, antimarial, and anti-SARS-CoV-2 main protease activities. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 9, p. 2841, 2022.

WARREN, S.; WYATT, P. **Organic Synthesis: The Disconnection Approach**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.

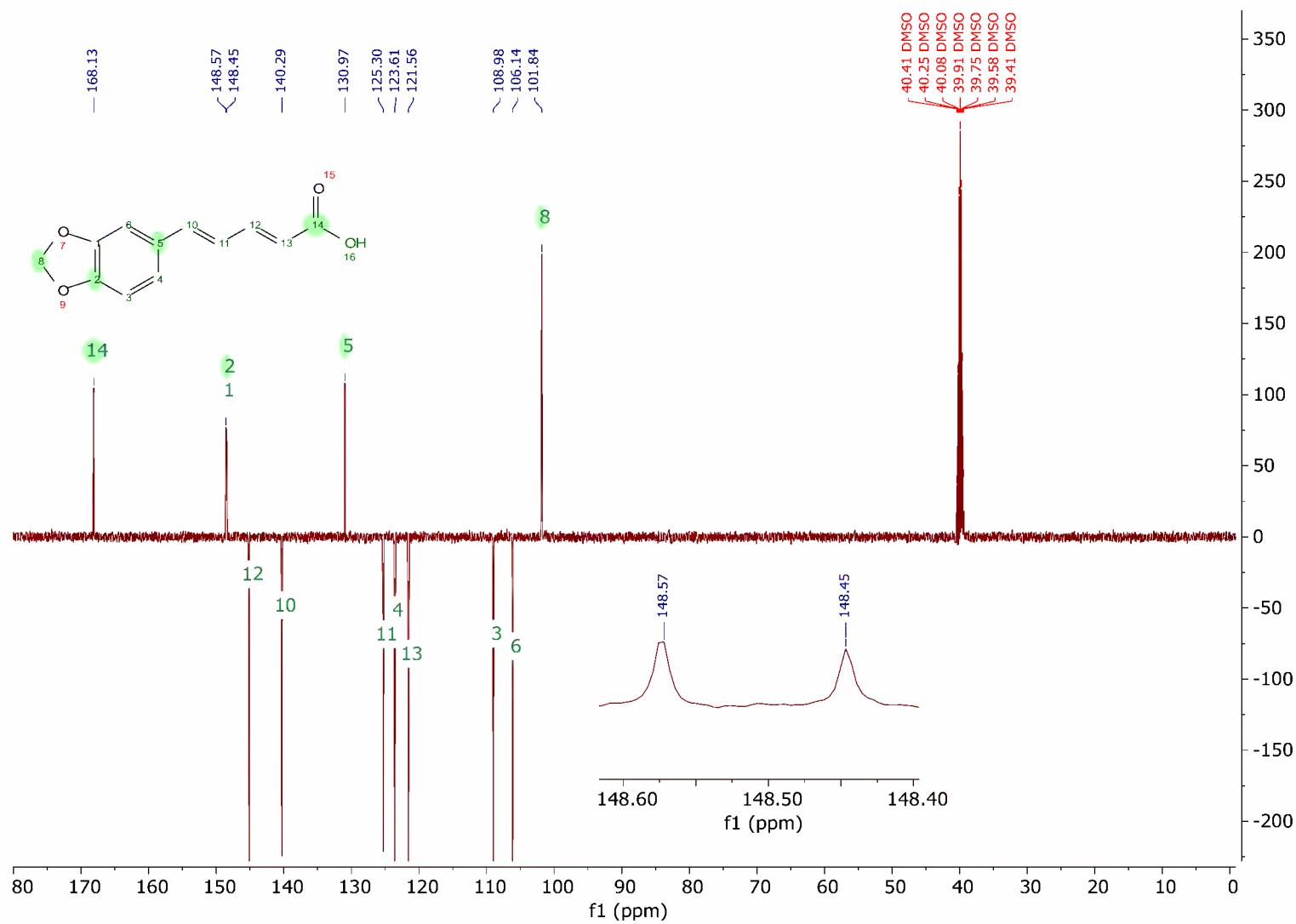
ZHAO, W. et al. Design, synthesis, and pharmacology of new triazole-containing quinolinones as CNS active agents. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 28, n. 4, p. 1987, 2023.

7. ANEXOS

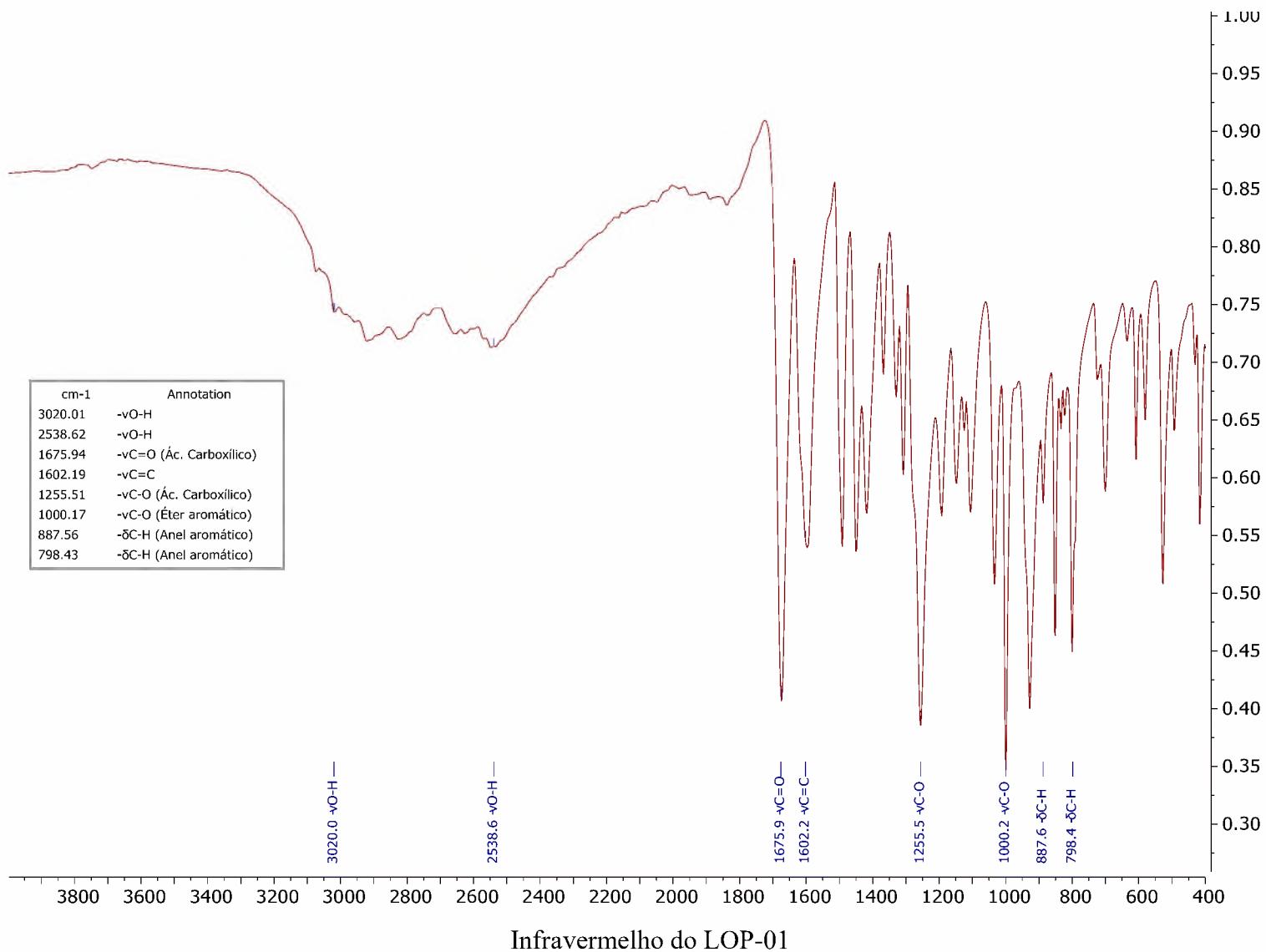
7.1. ANEXO II - RMN DO ^1H , RMN DO ^{13}C E FTIR

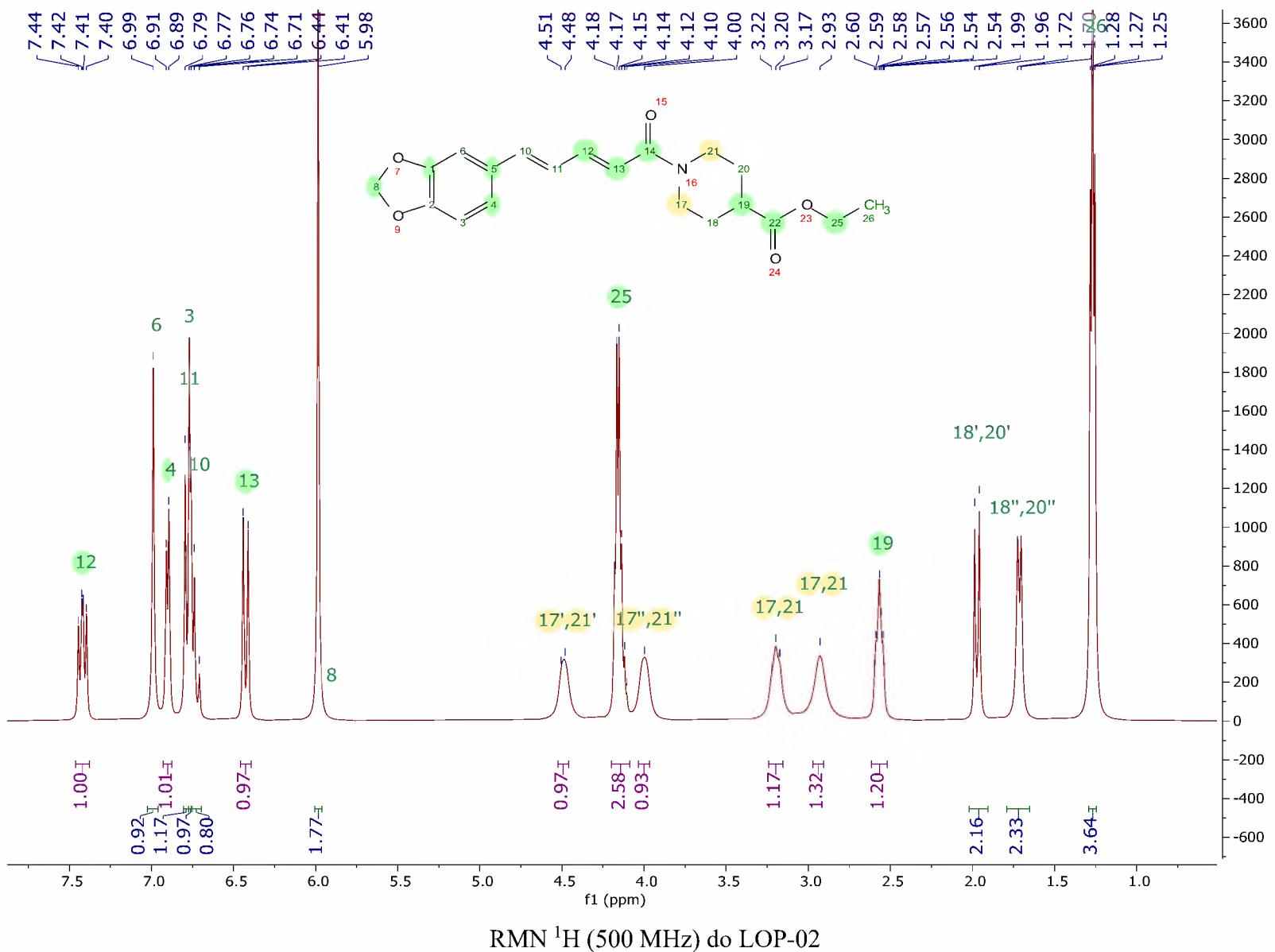


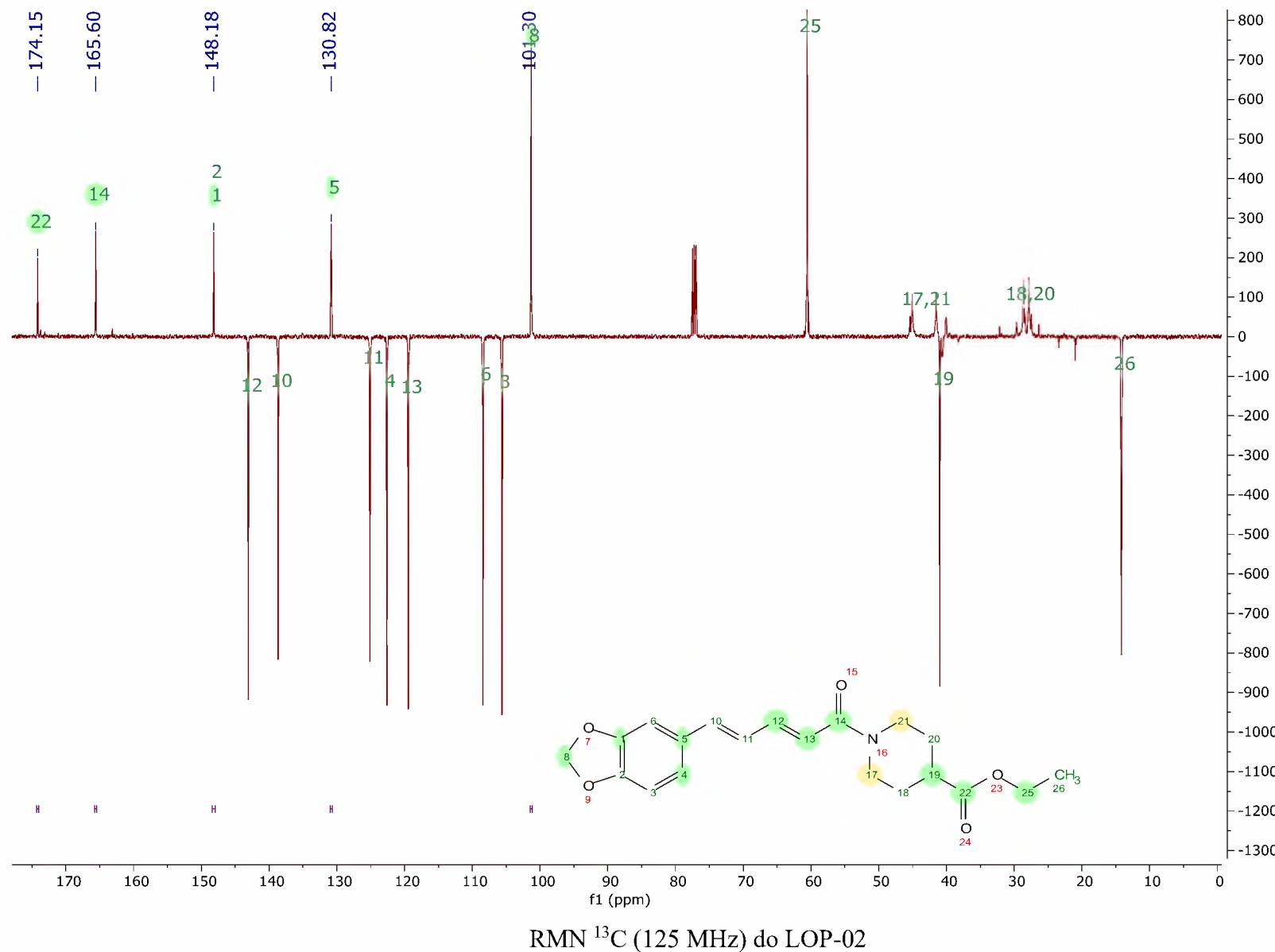
RMN ^1H (500 MHz) do LOP-01

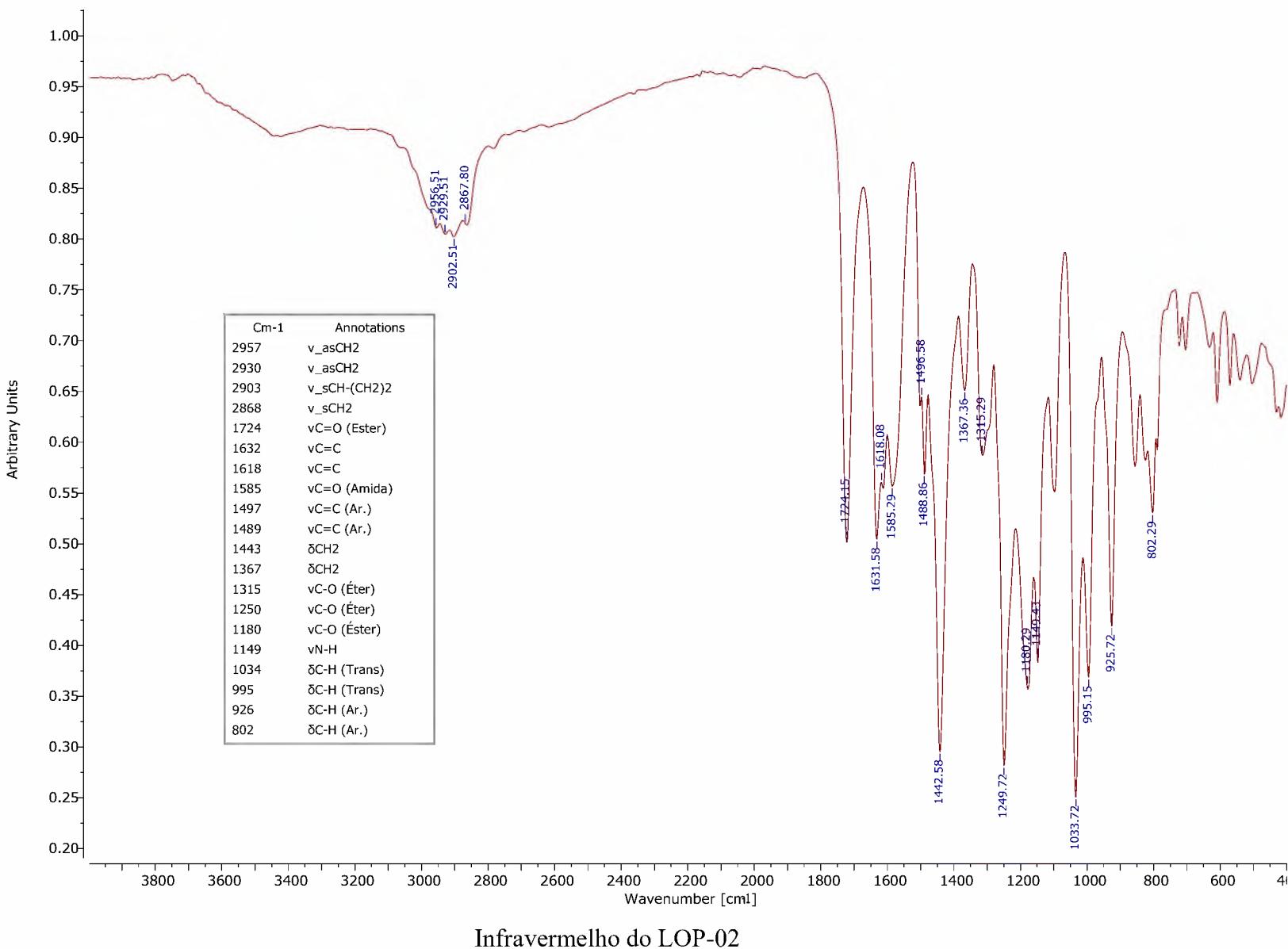


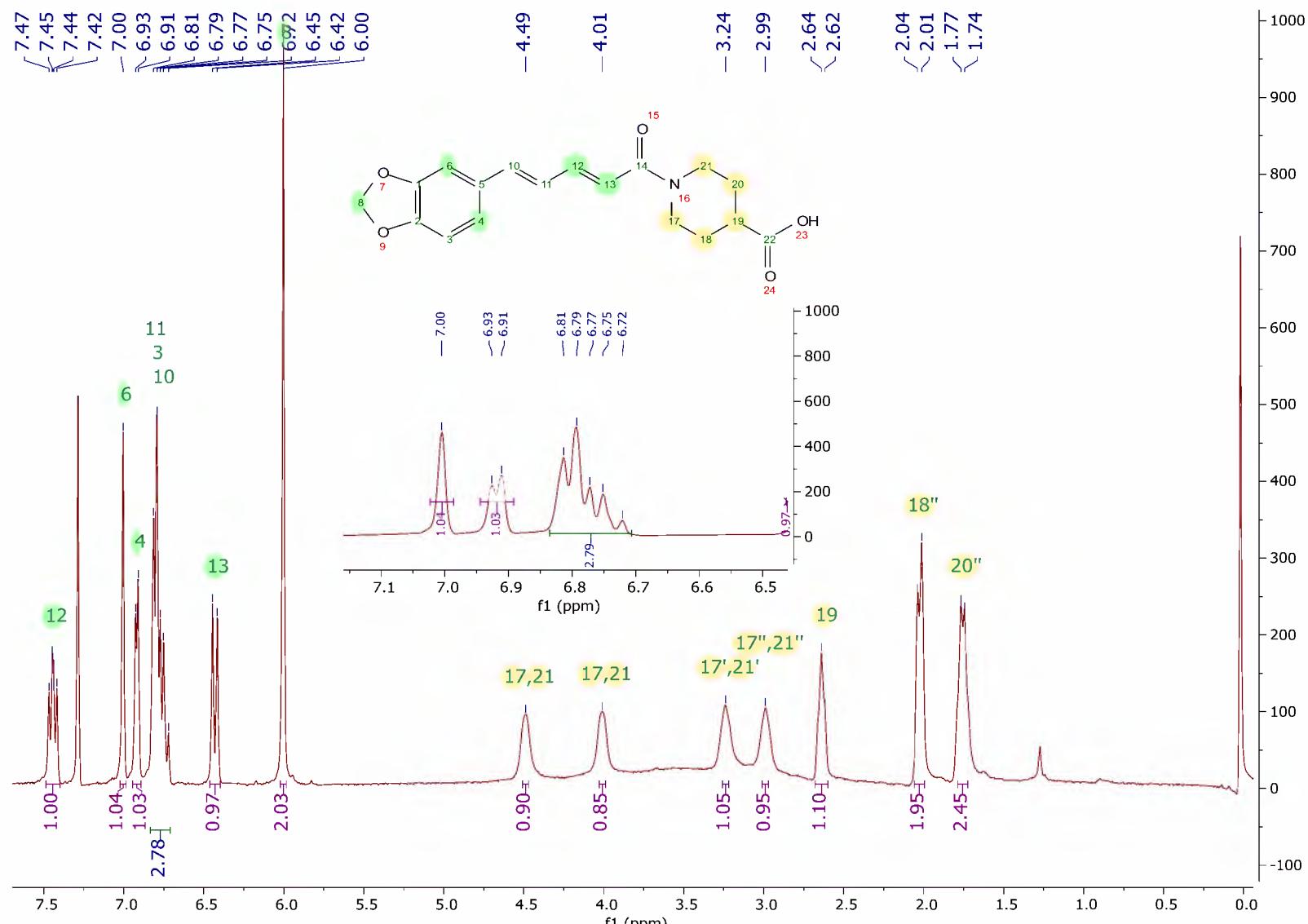
RMN ^{13}C (125 MHz) do LOP-01



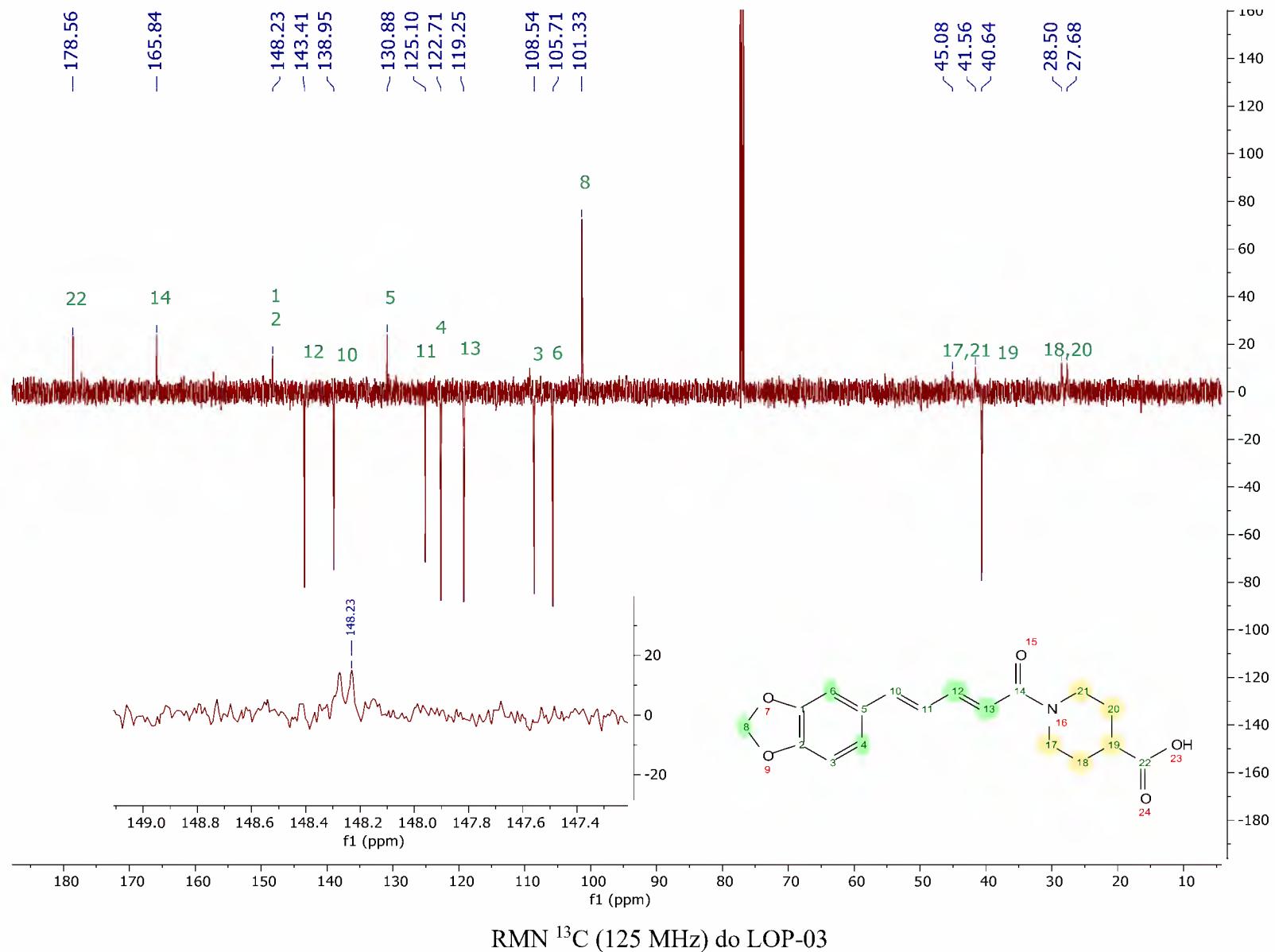


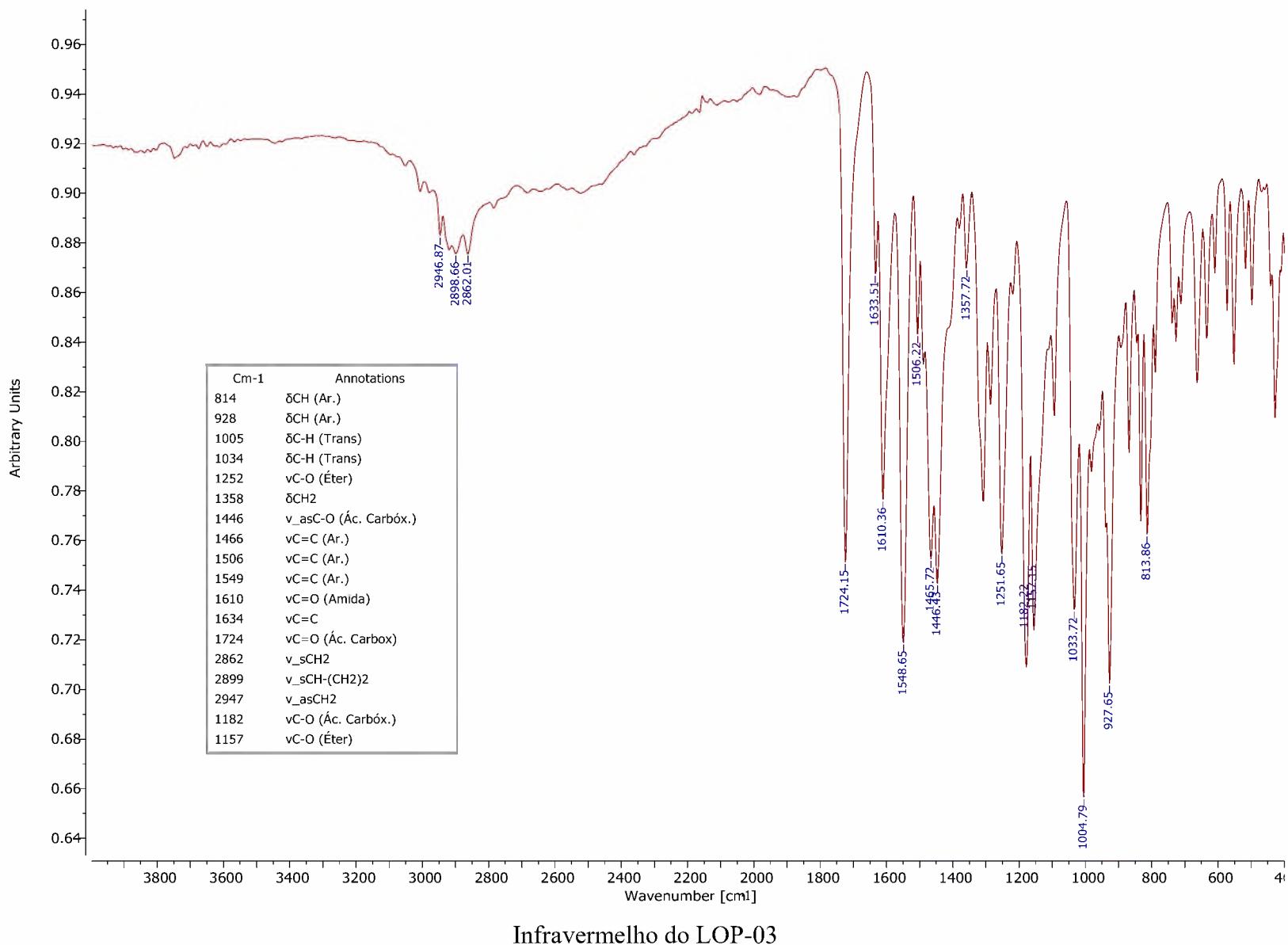


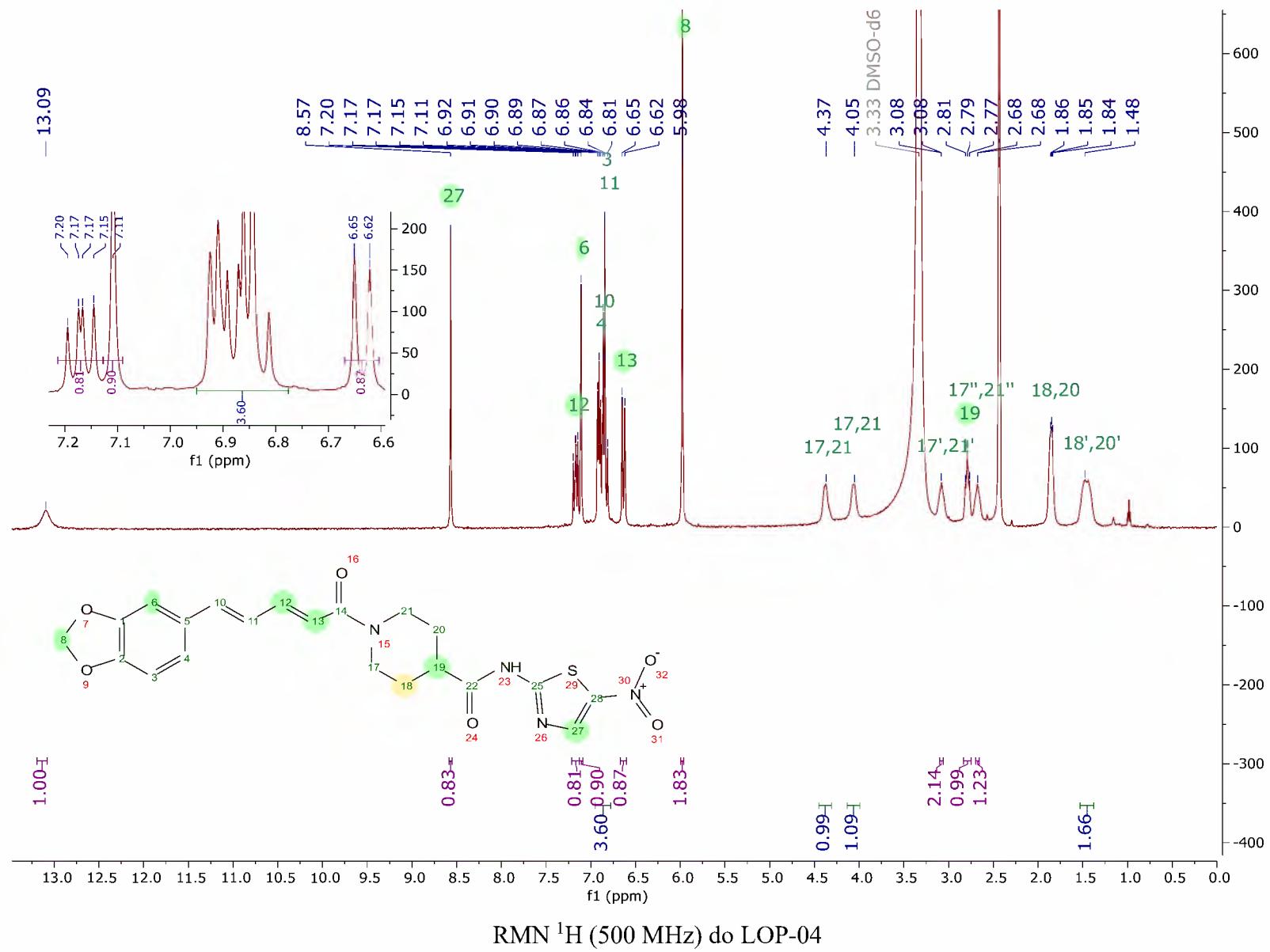


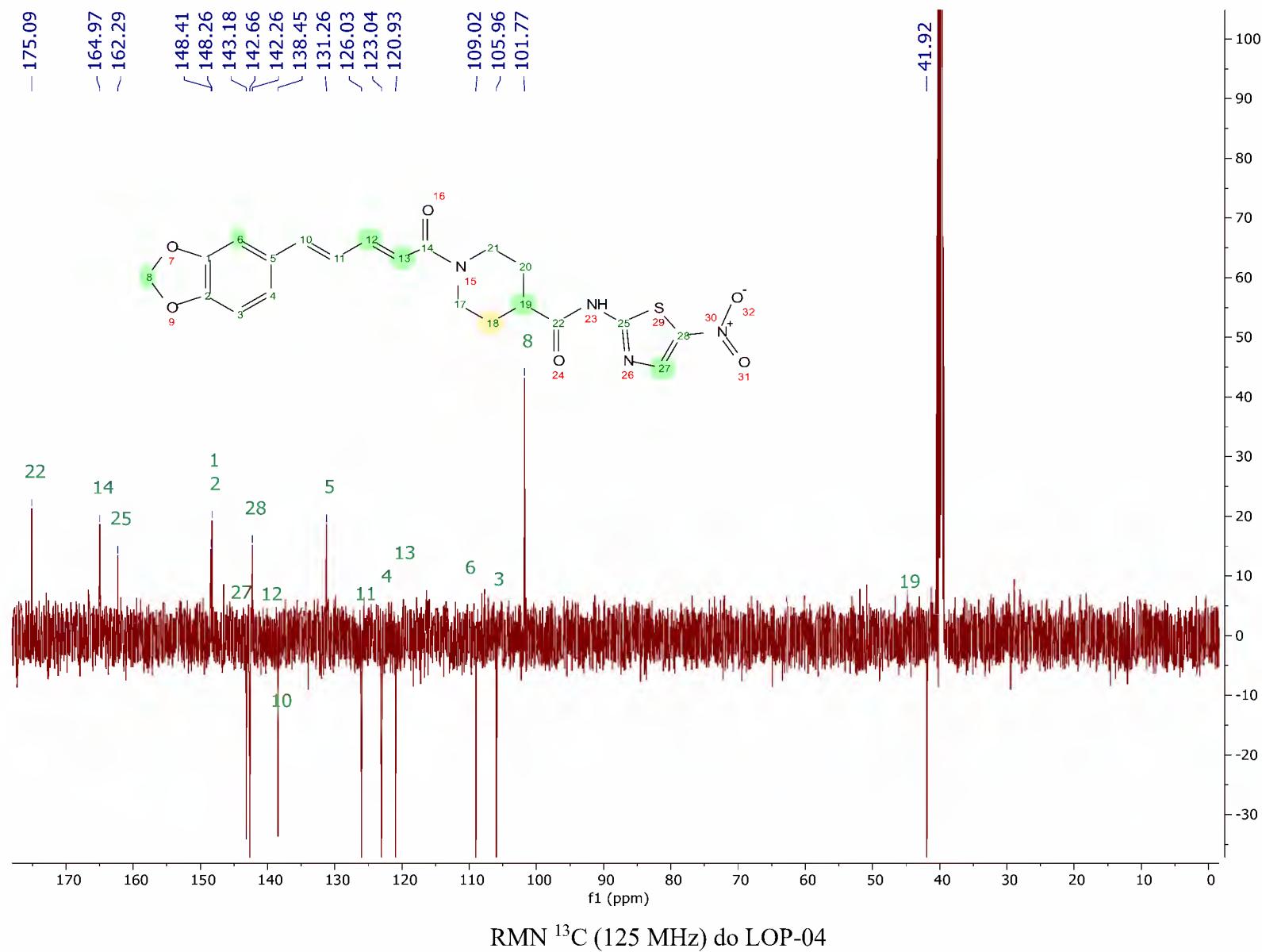


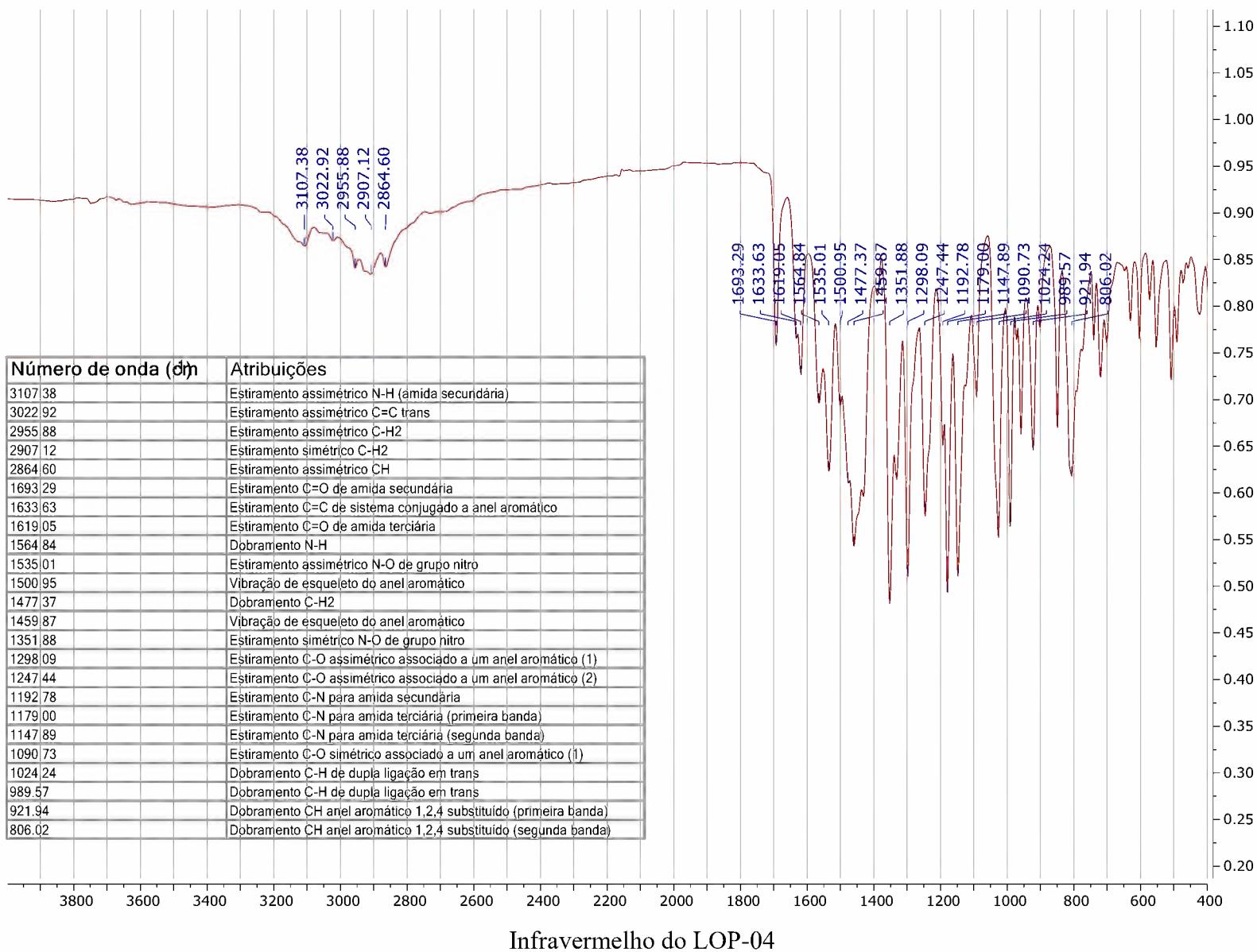
RMN ^1H (500 MHz) do LOP-03

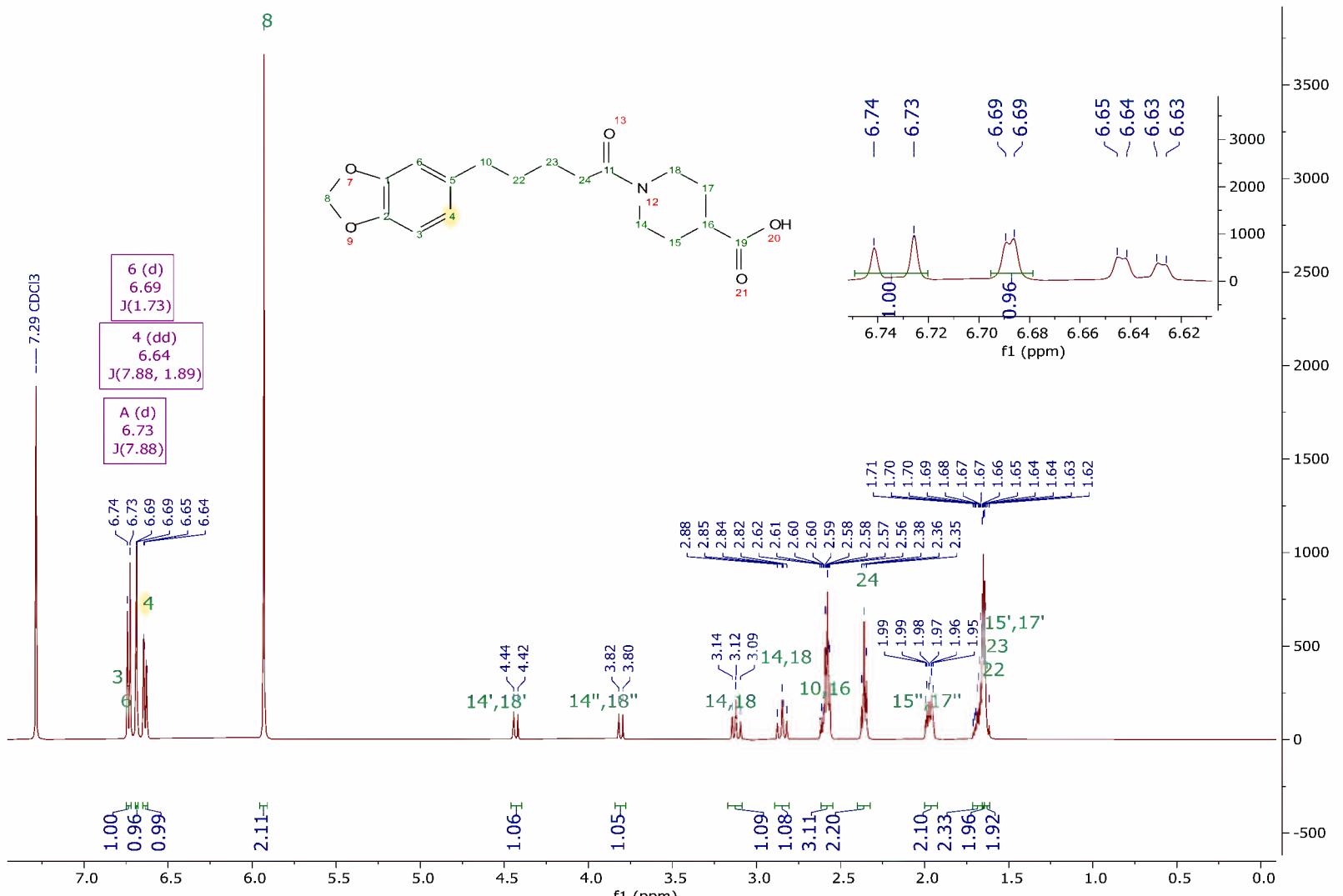


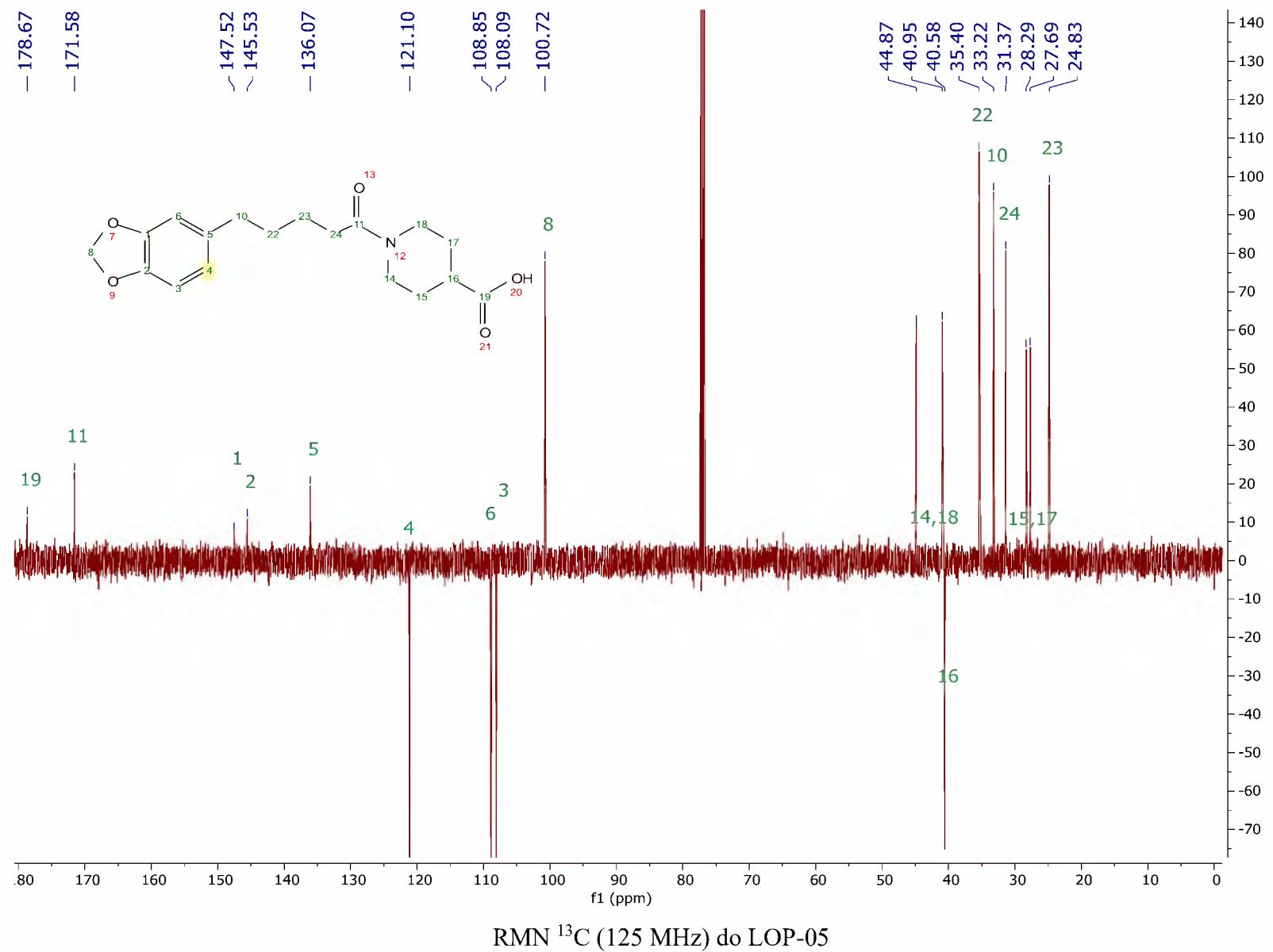


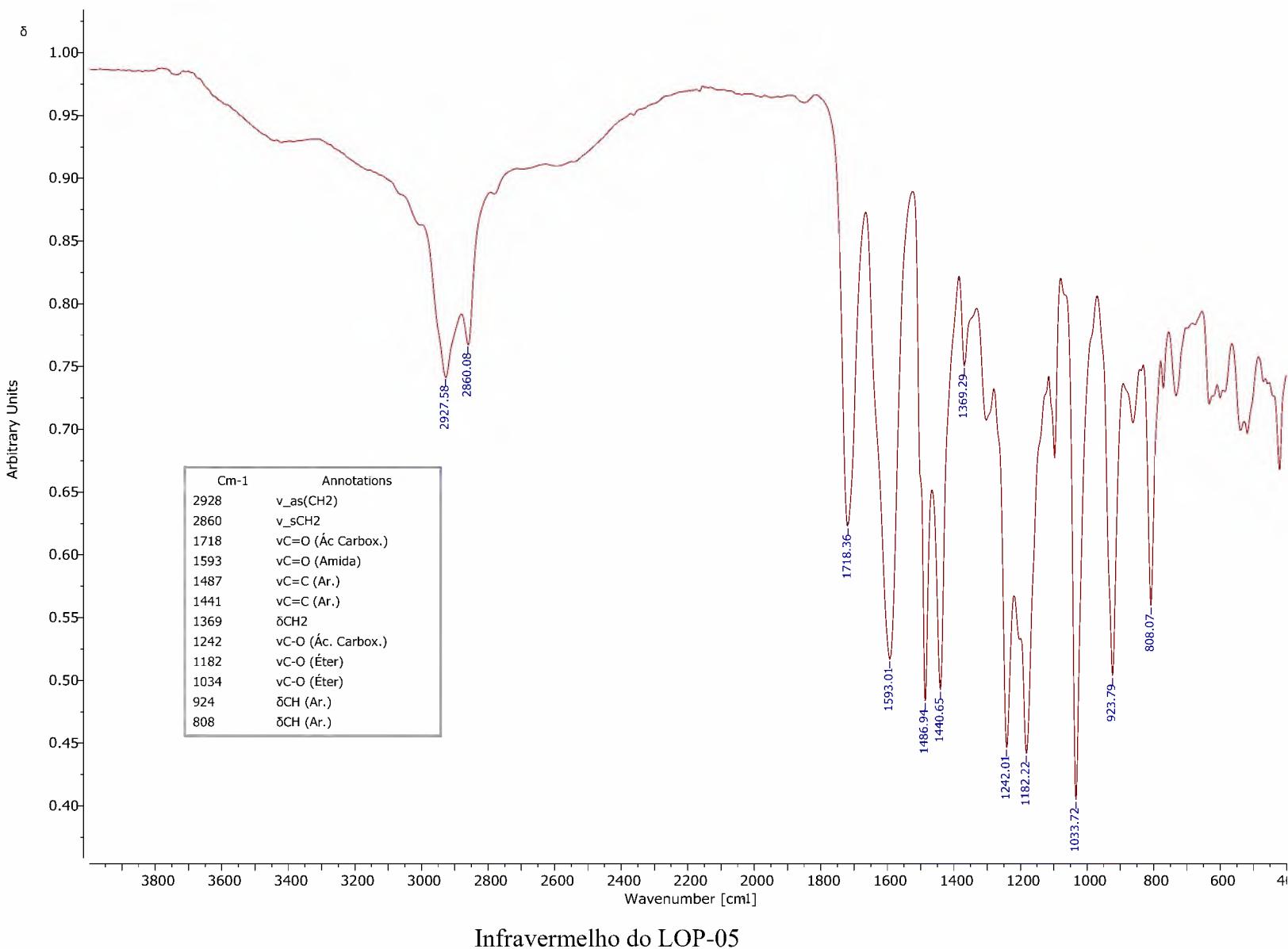


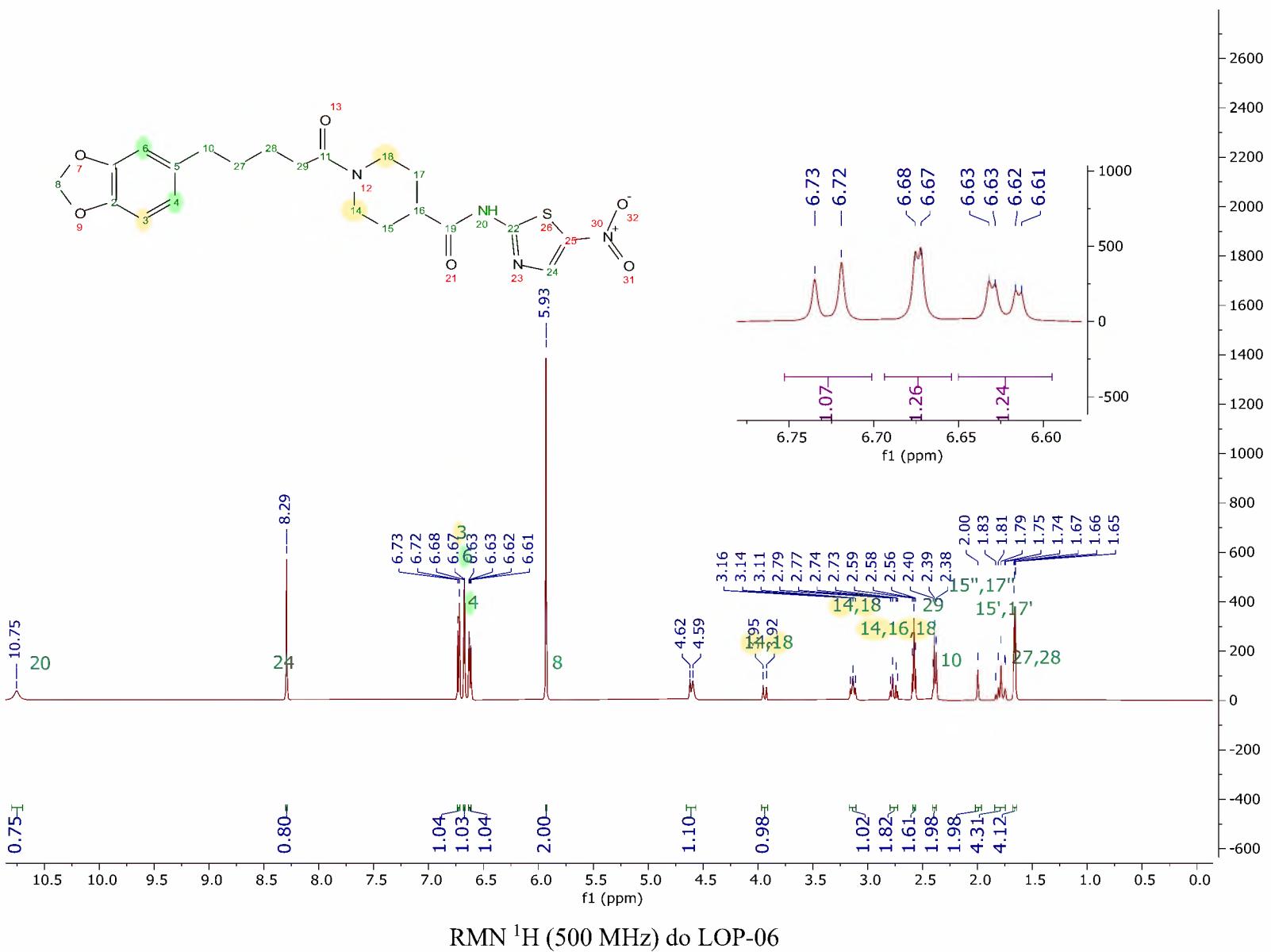


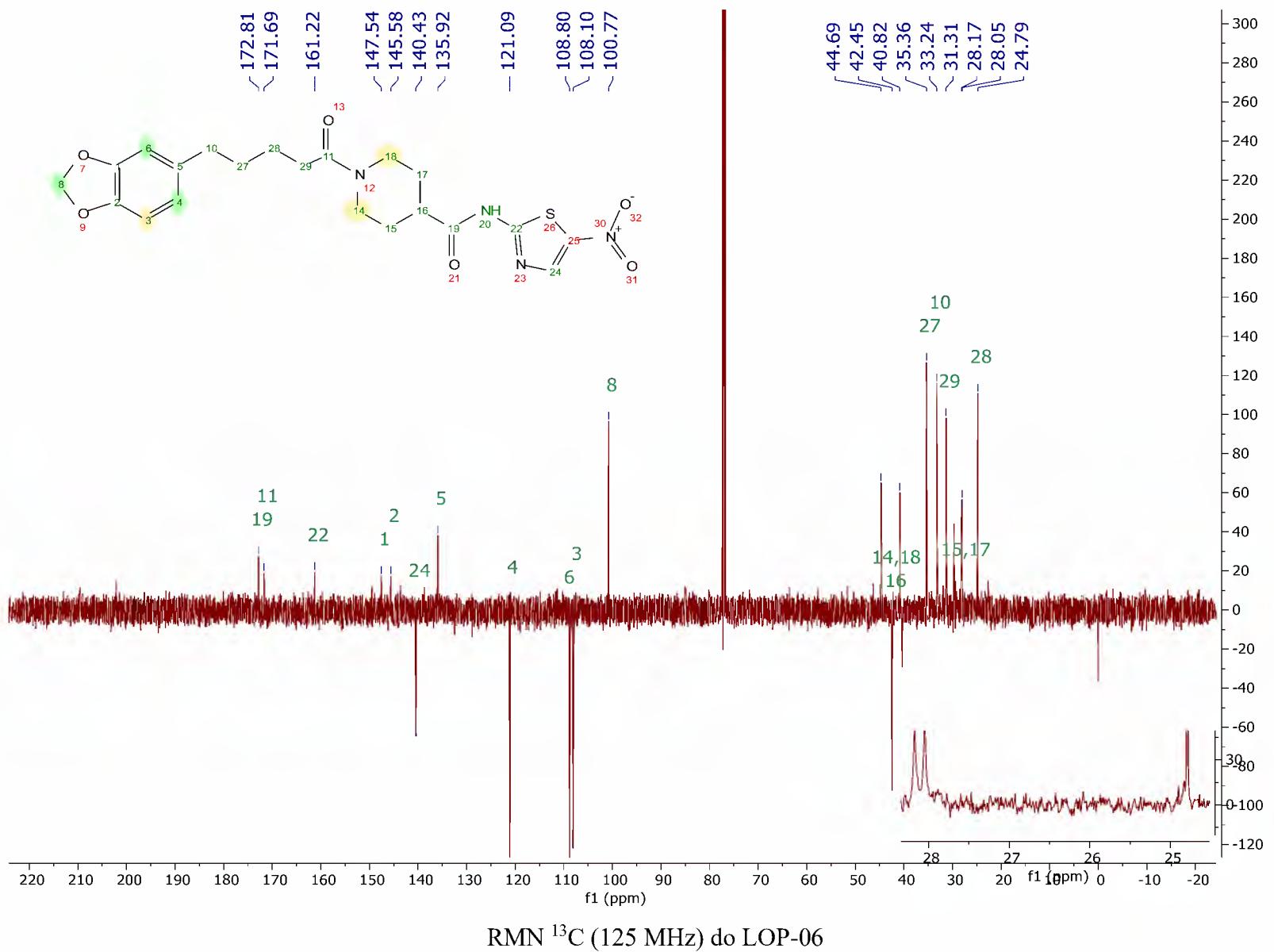


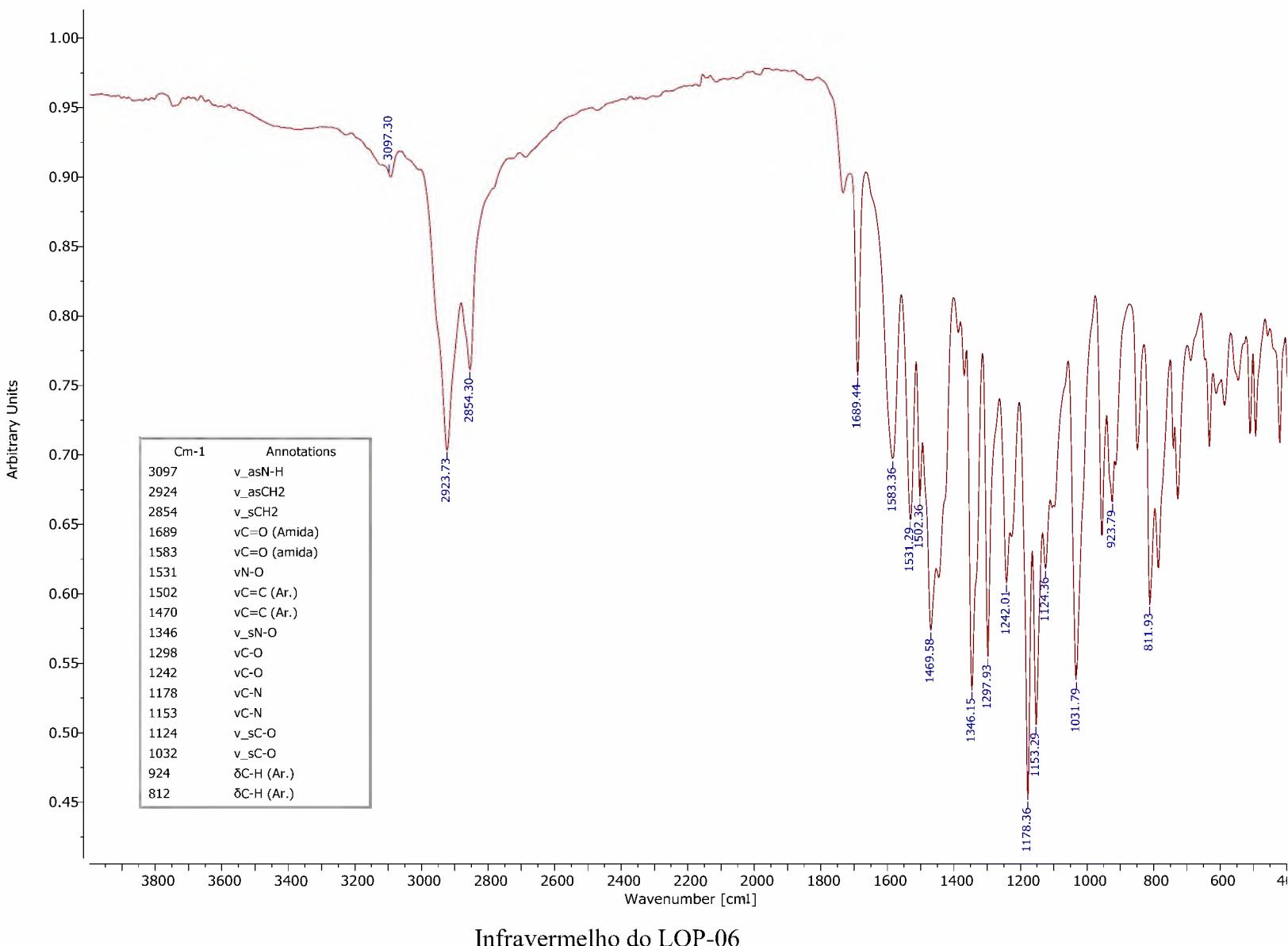




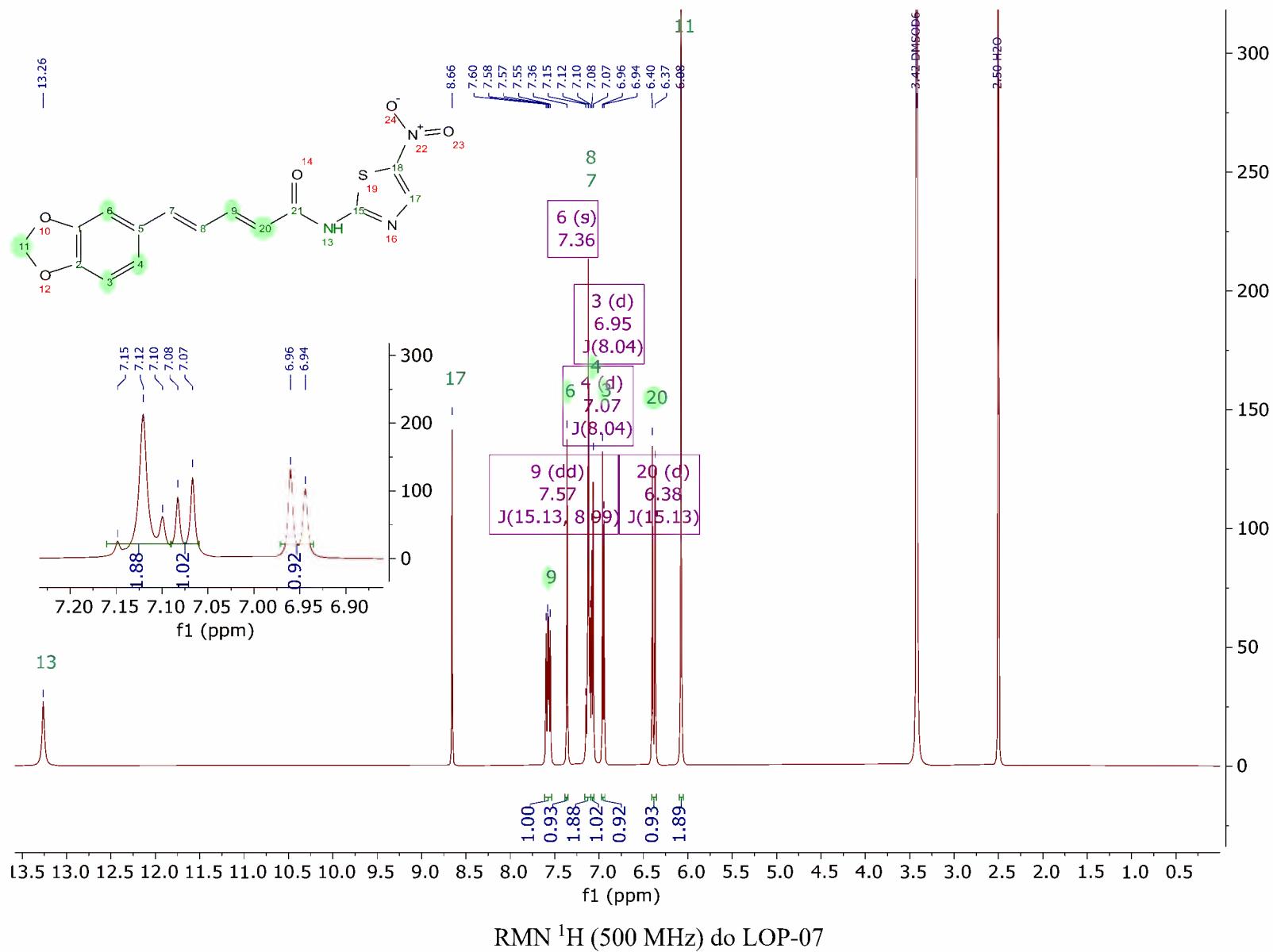


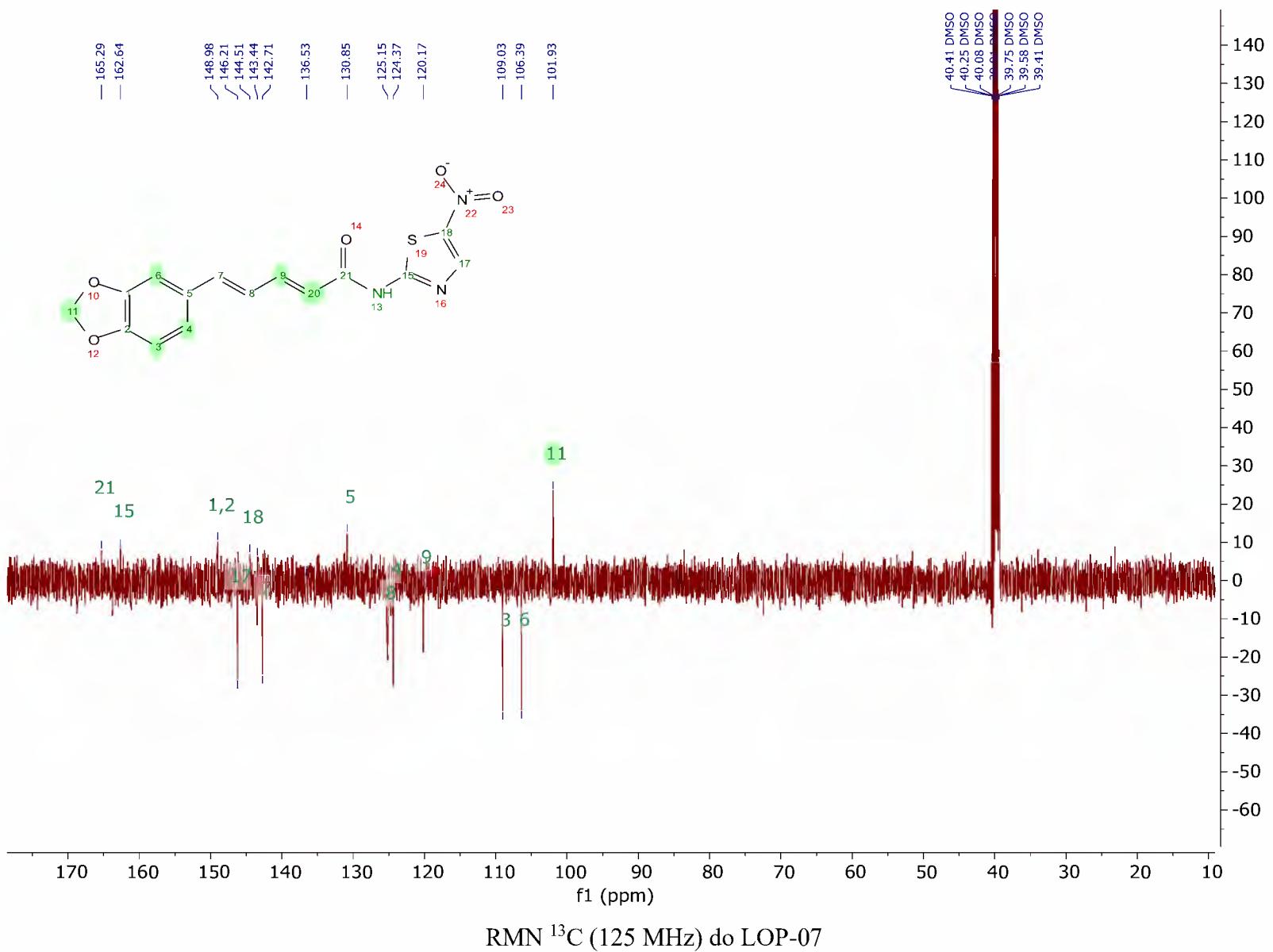


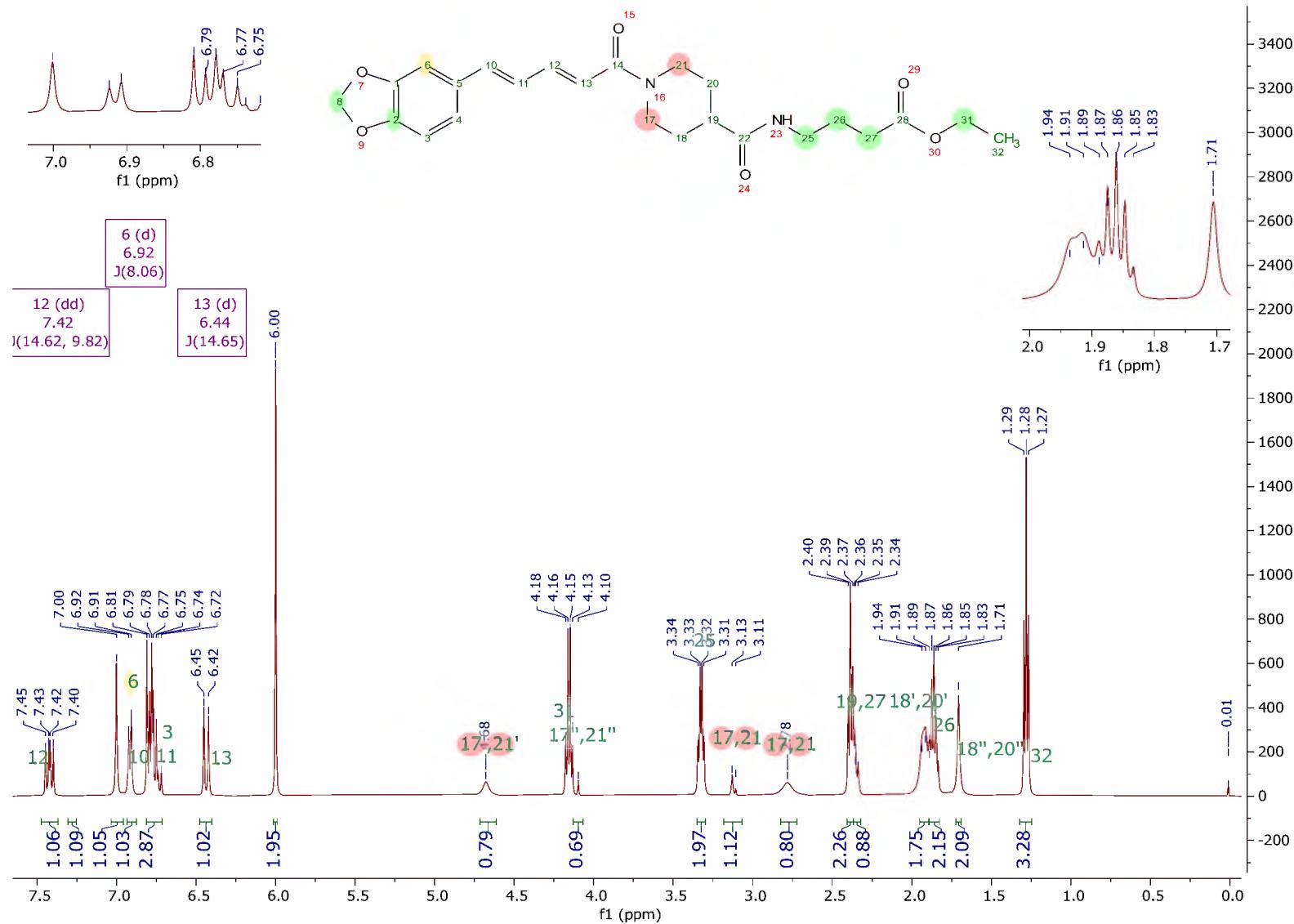




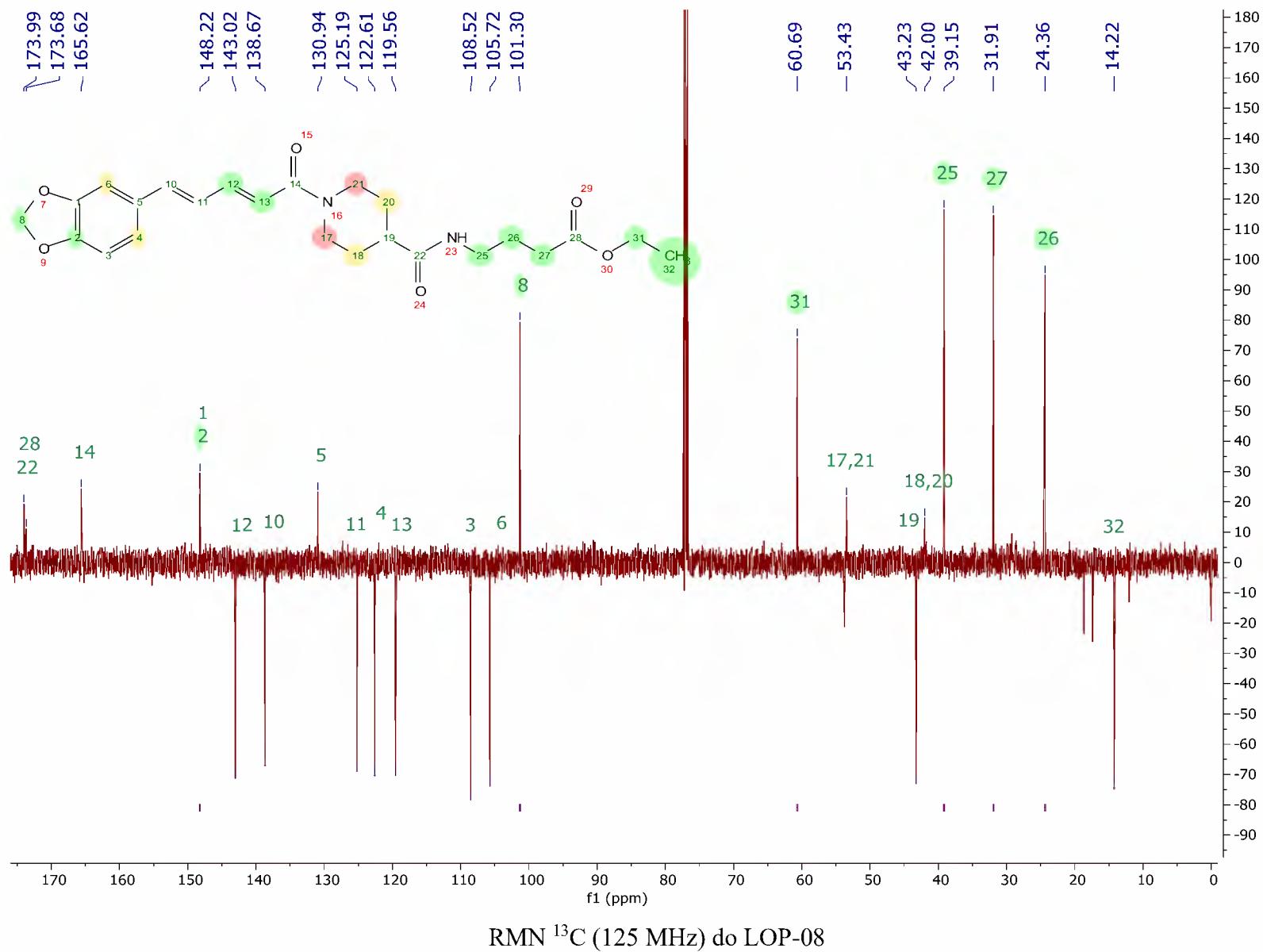
Infravermelho do LOP-06

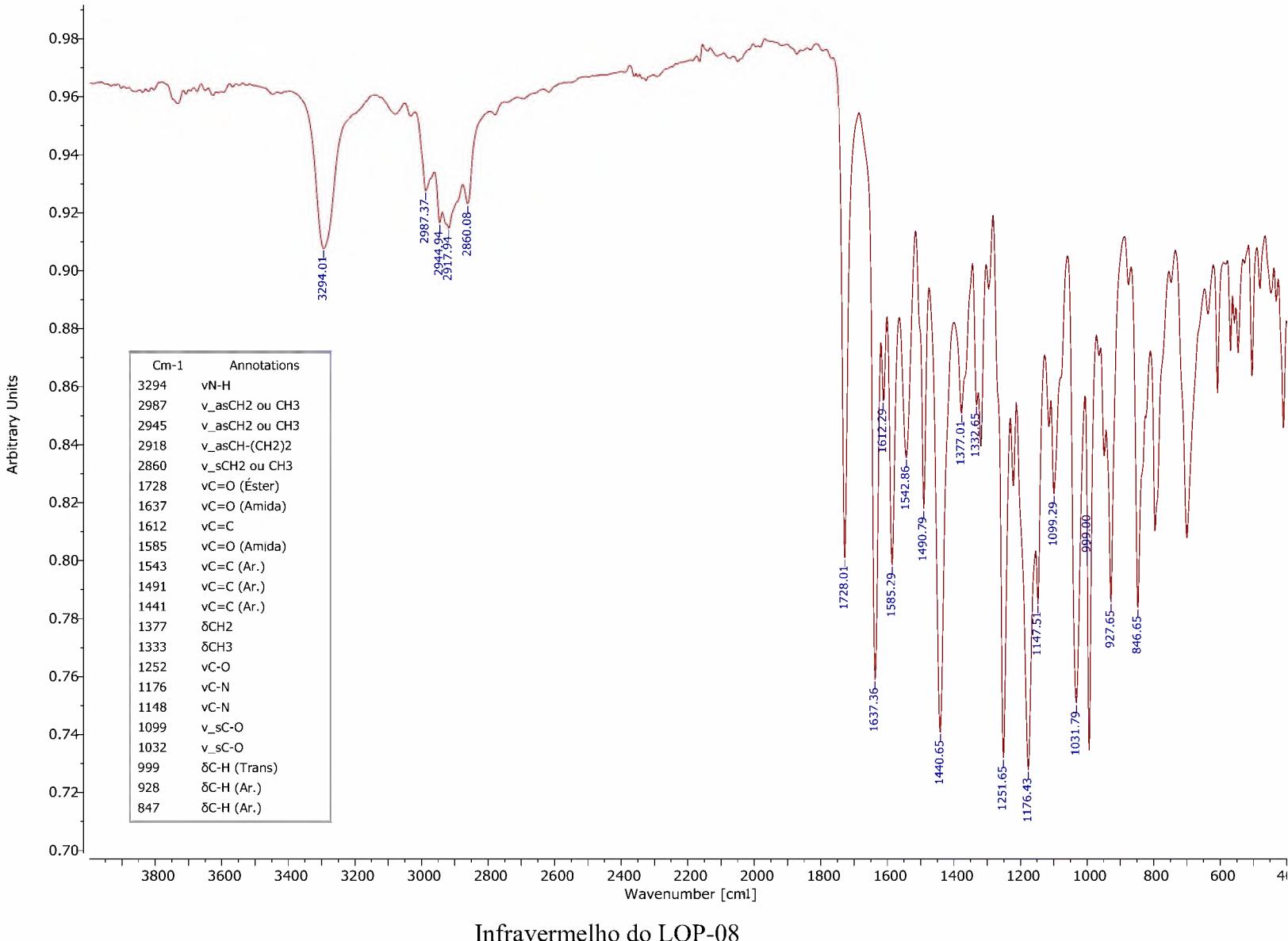


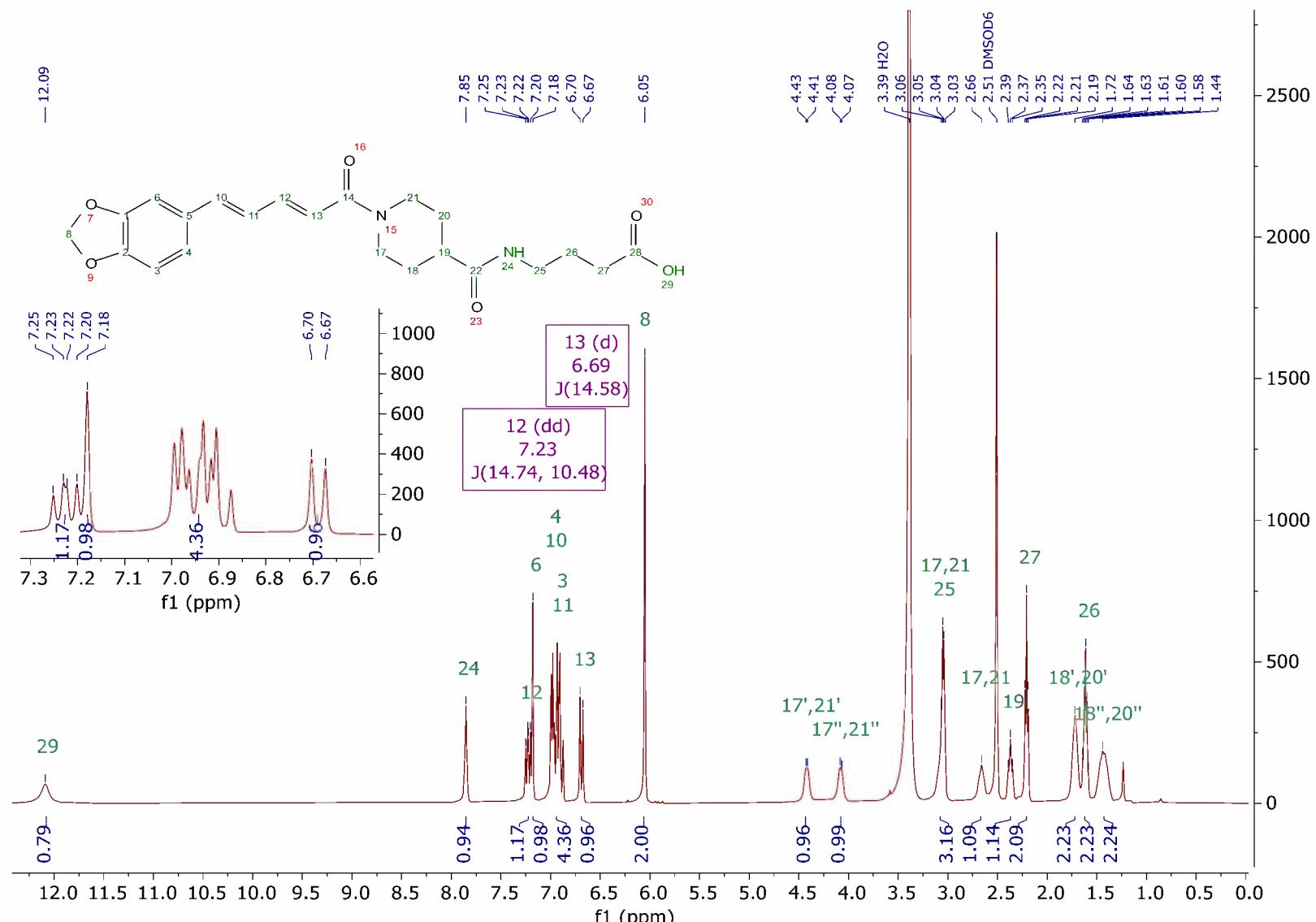




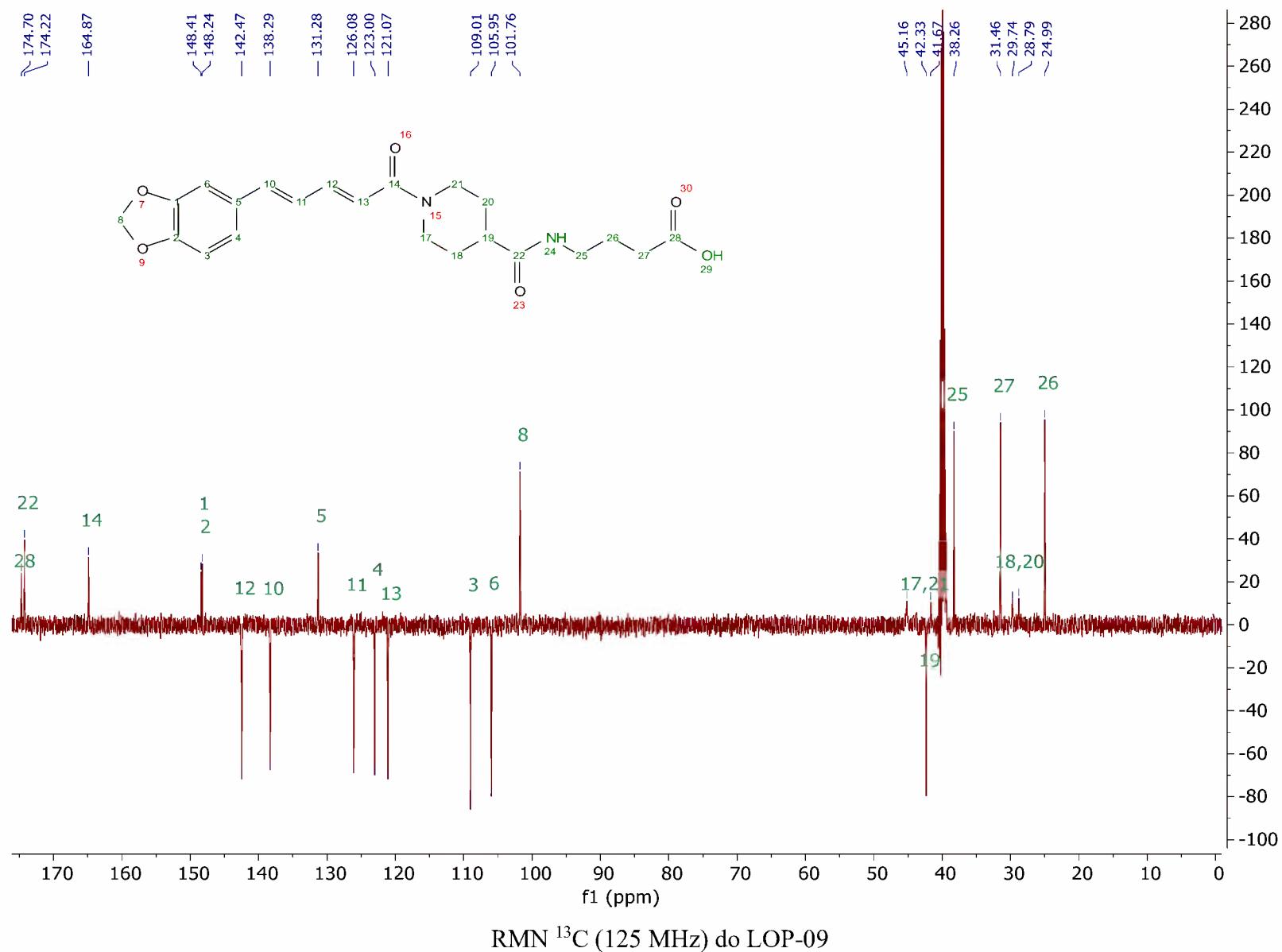
RMN ^1H (500 MHz) do LOP-08

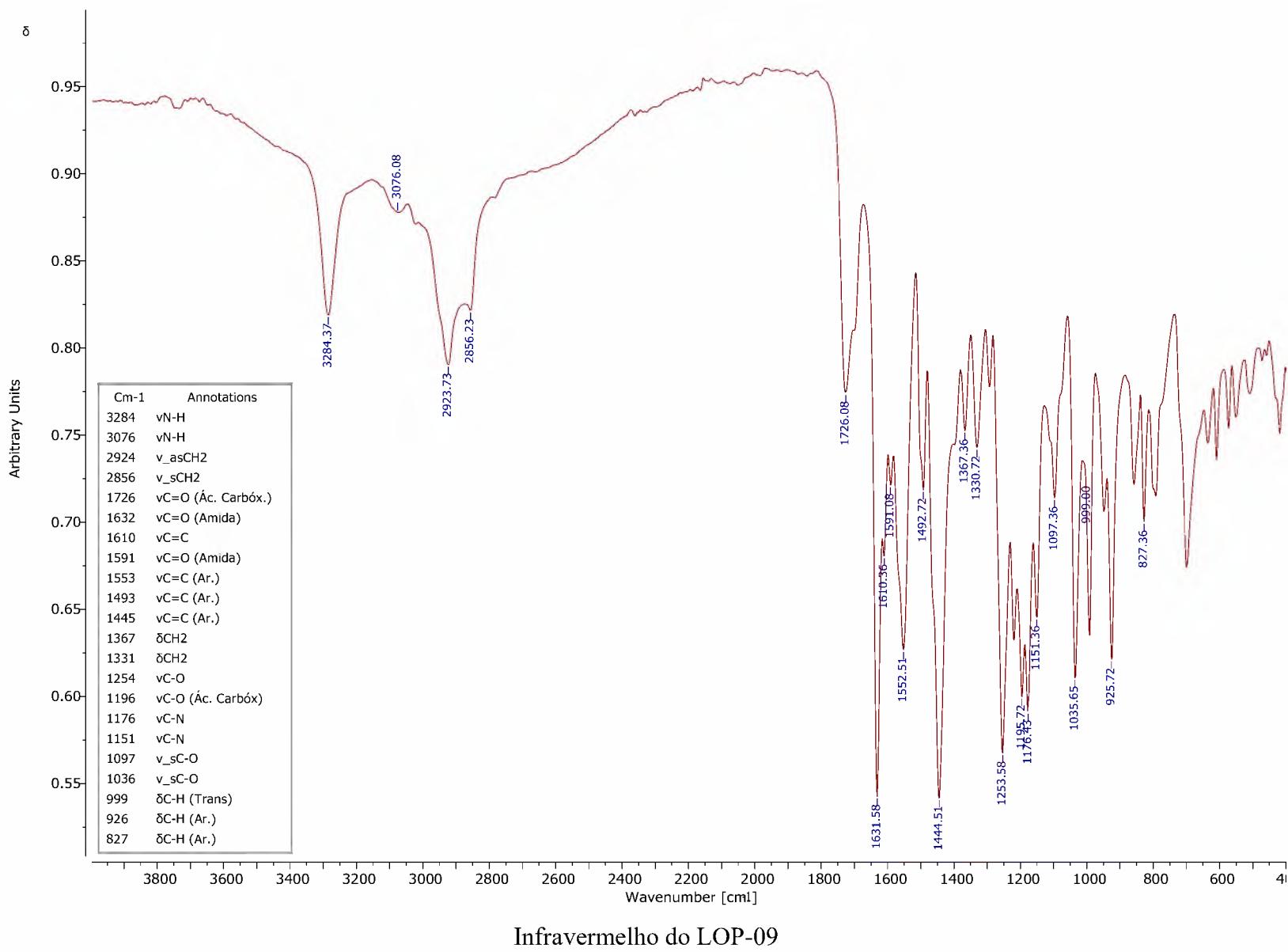


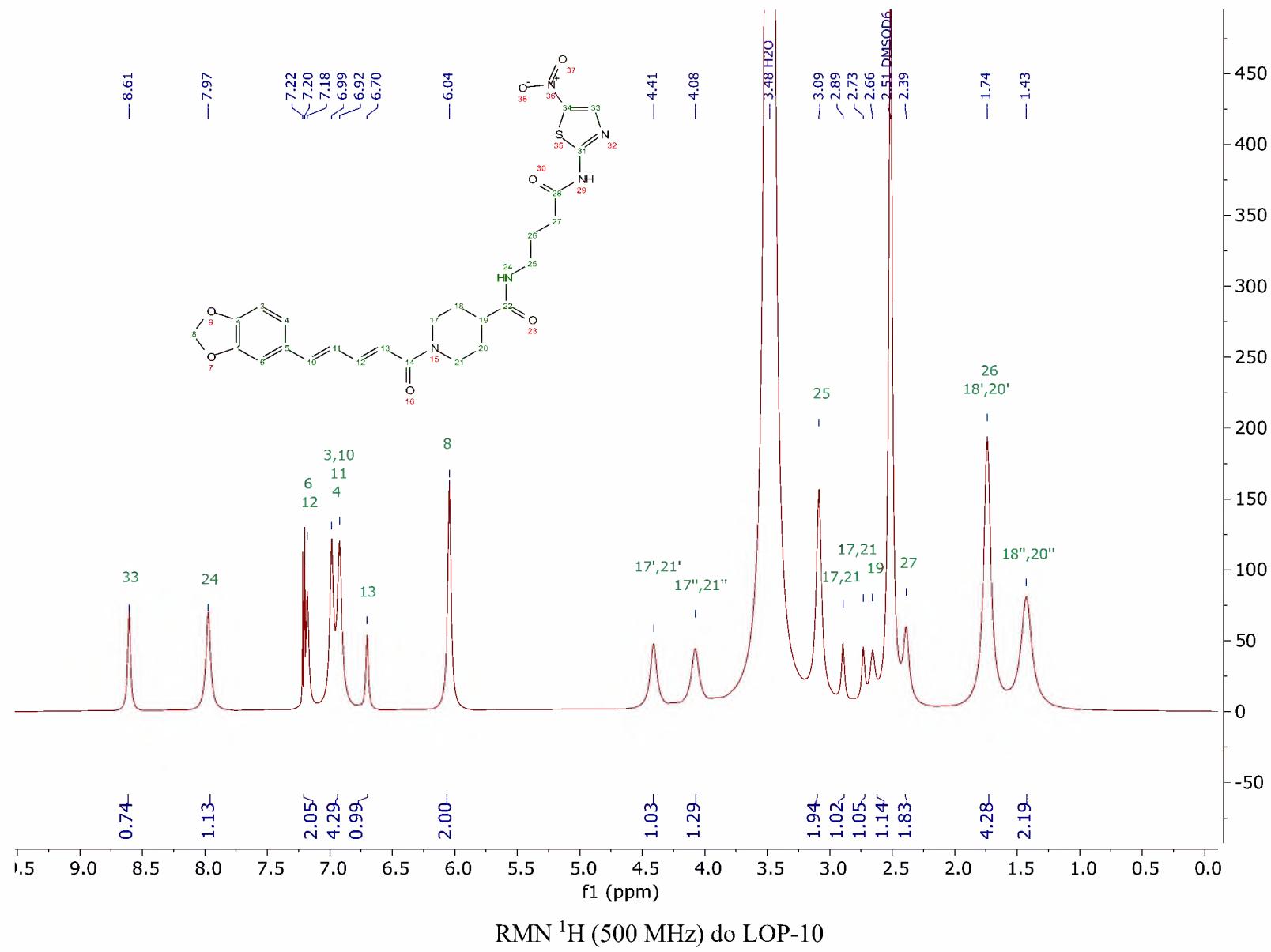


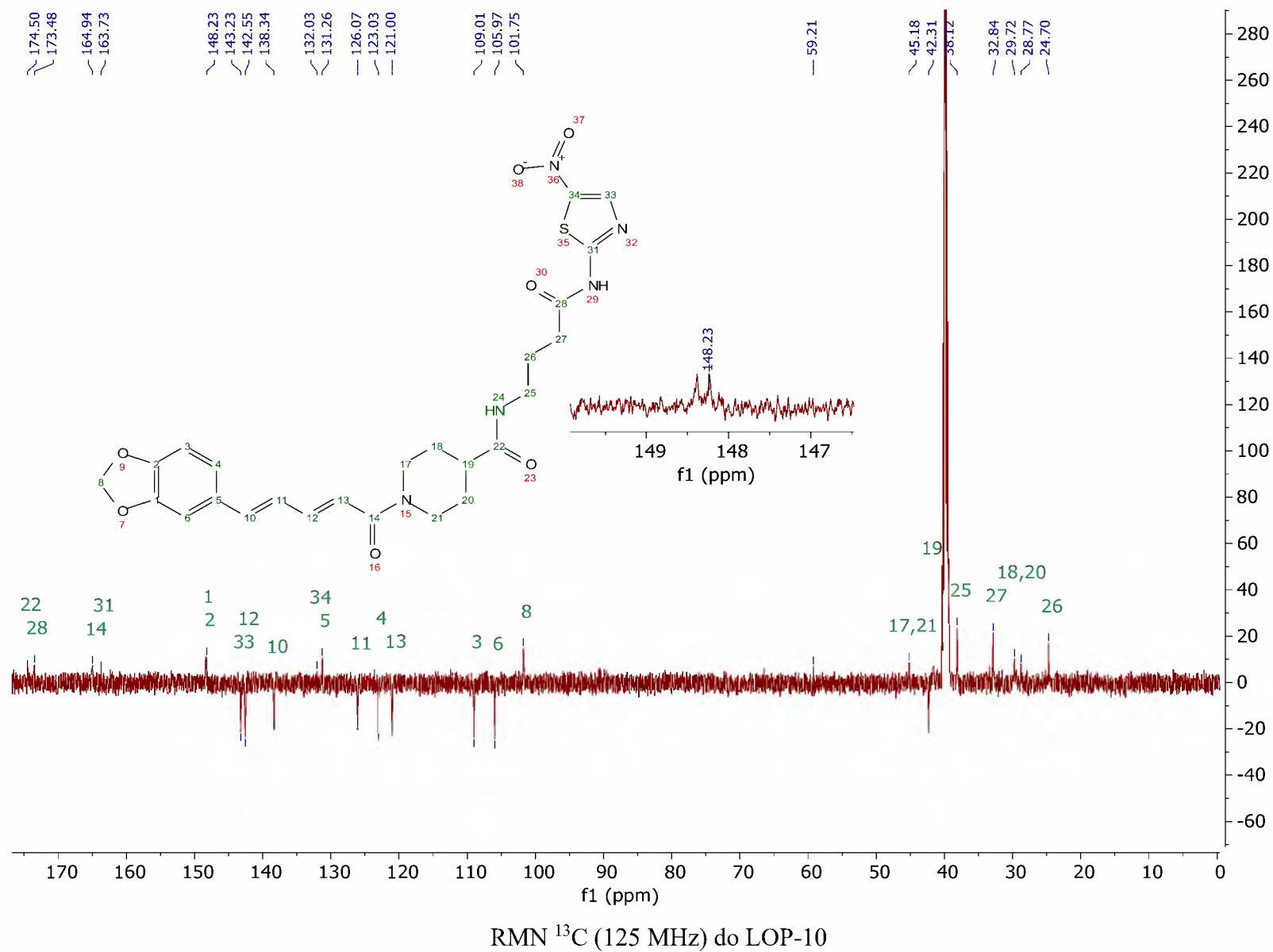


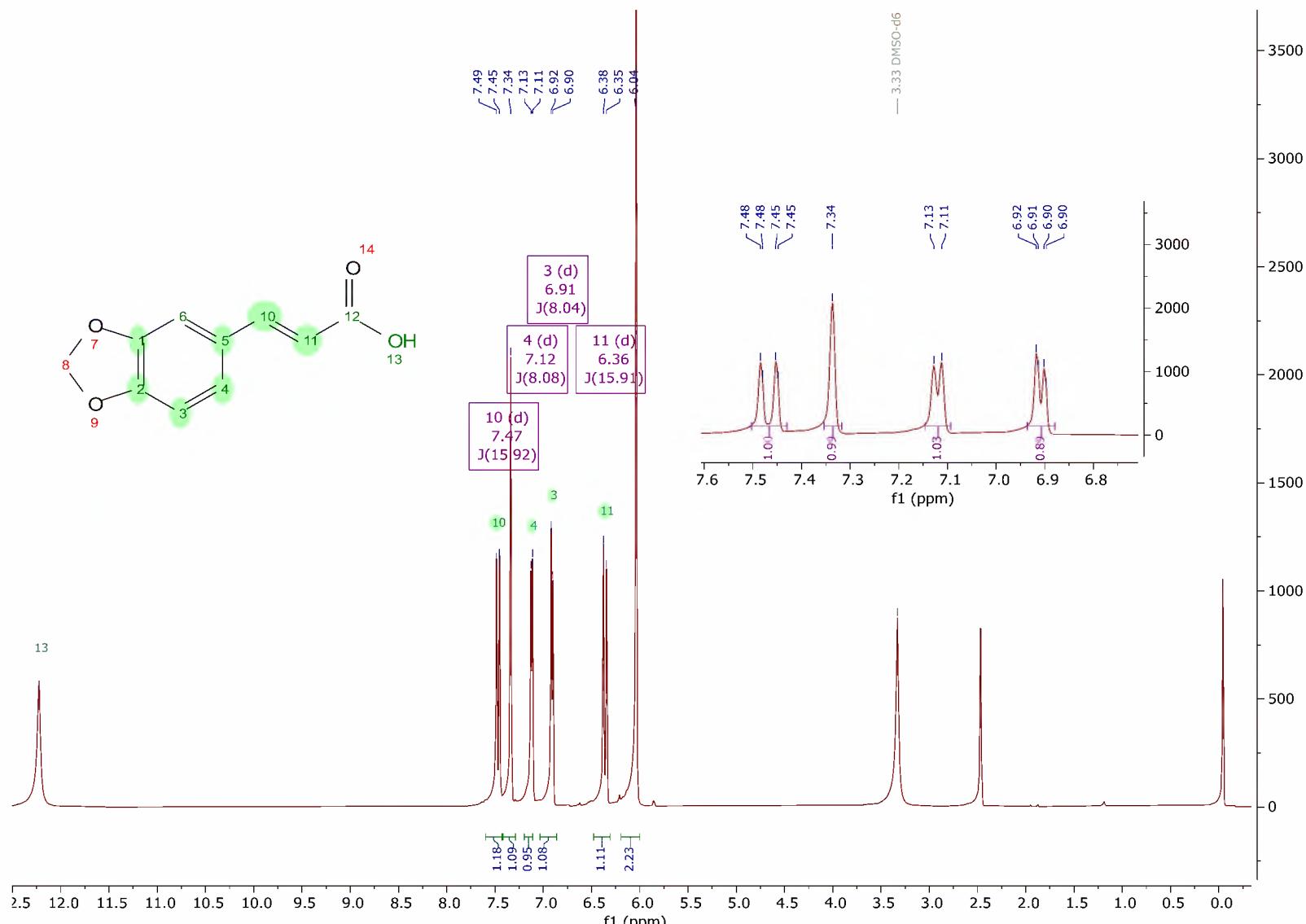
RMN ^1H (500 MHz) do LOP-09



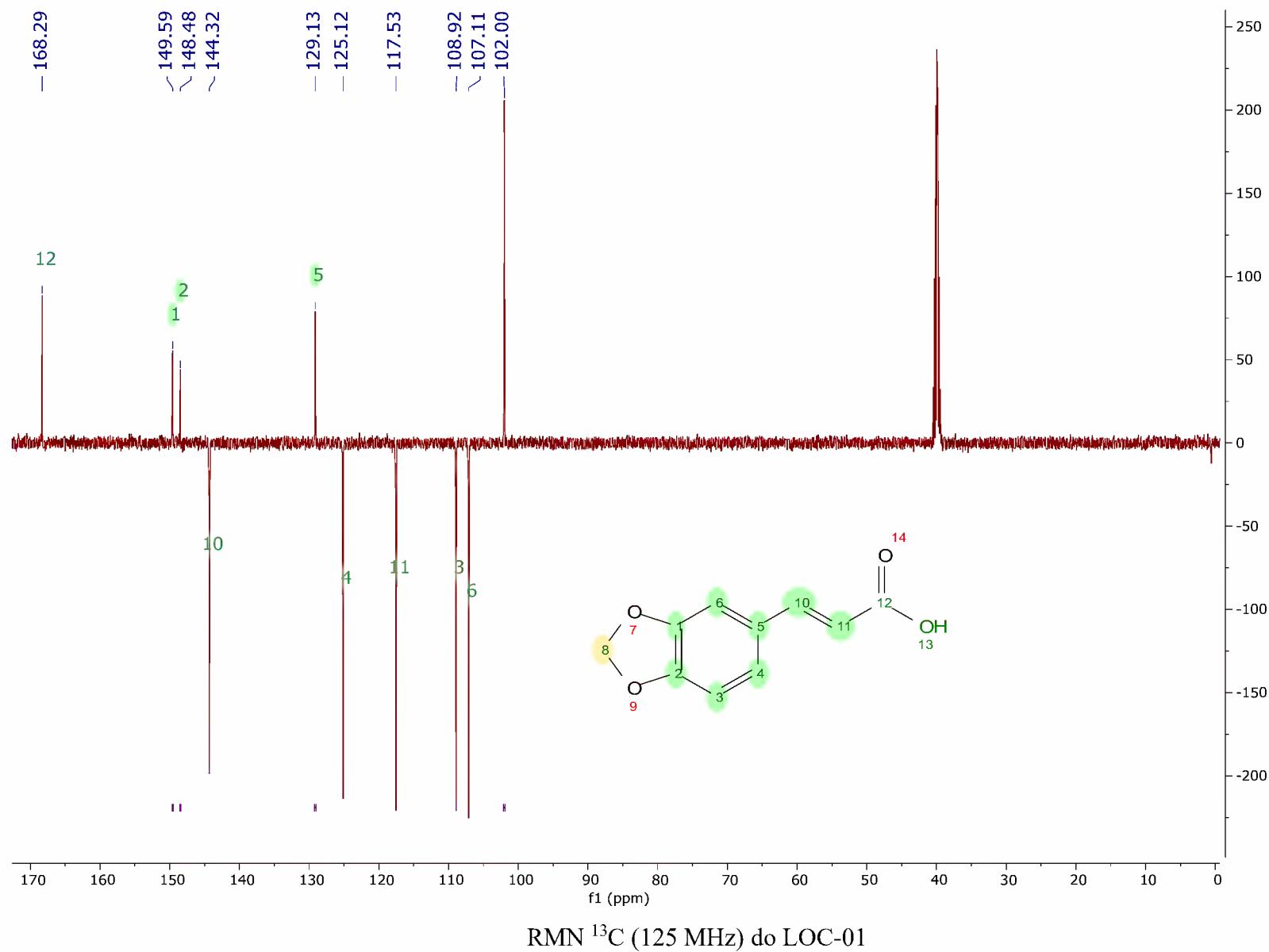


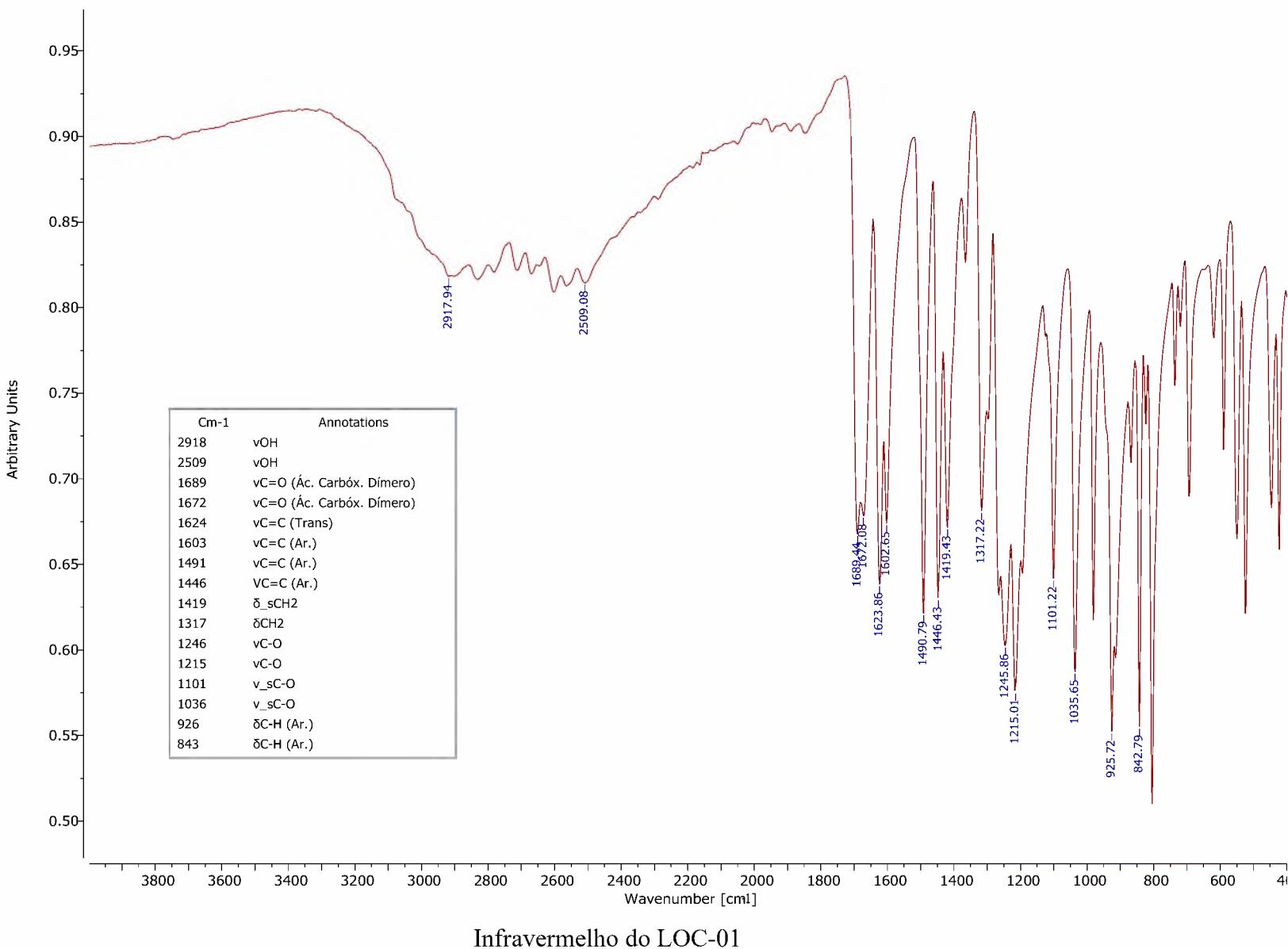


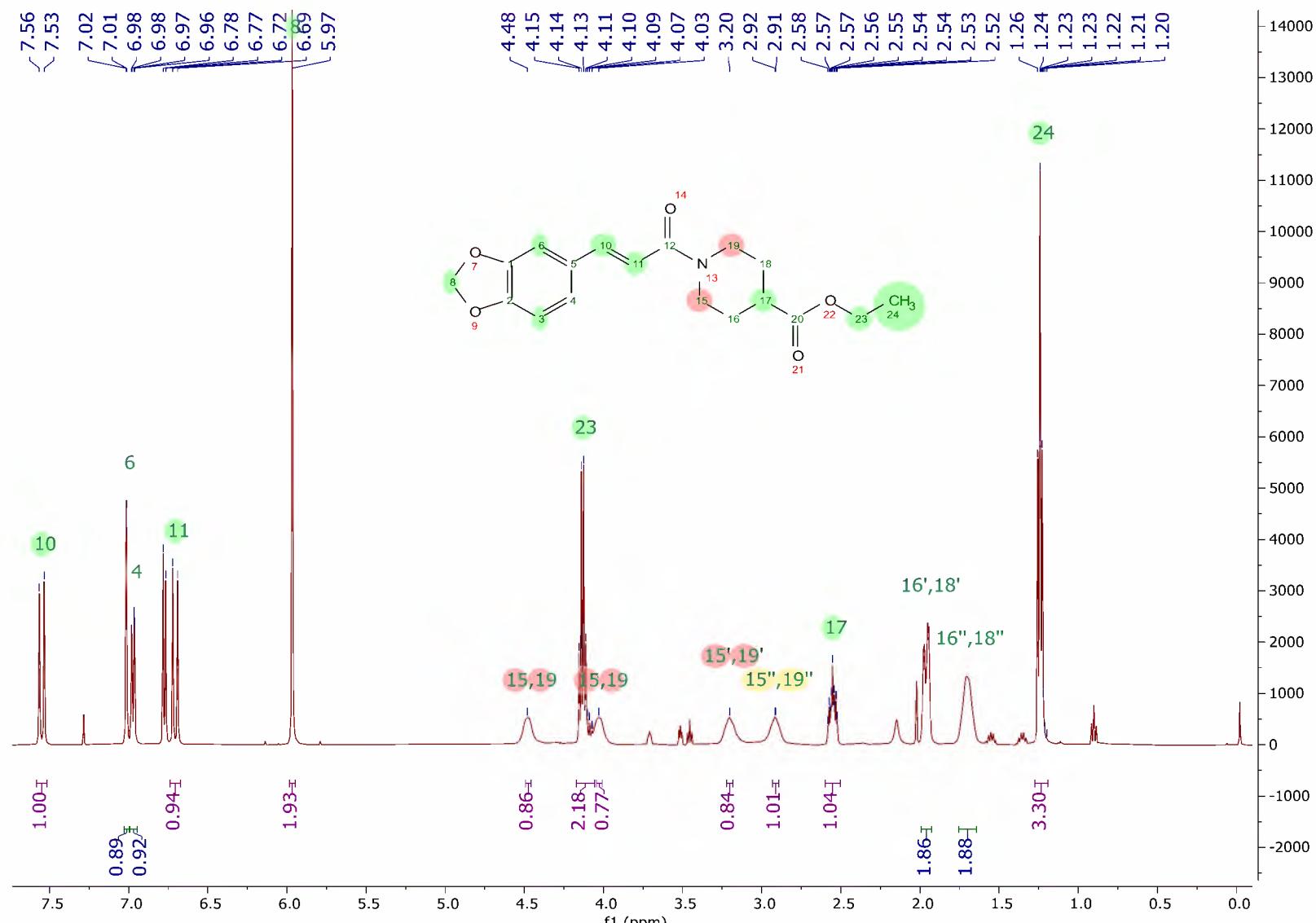




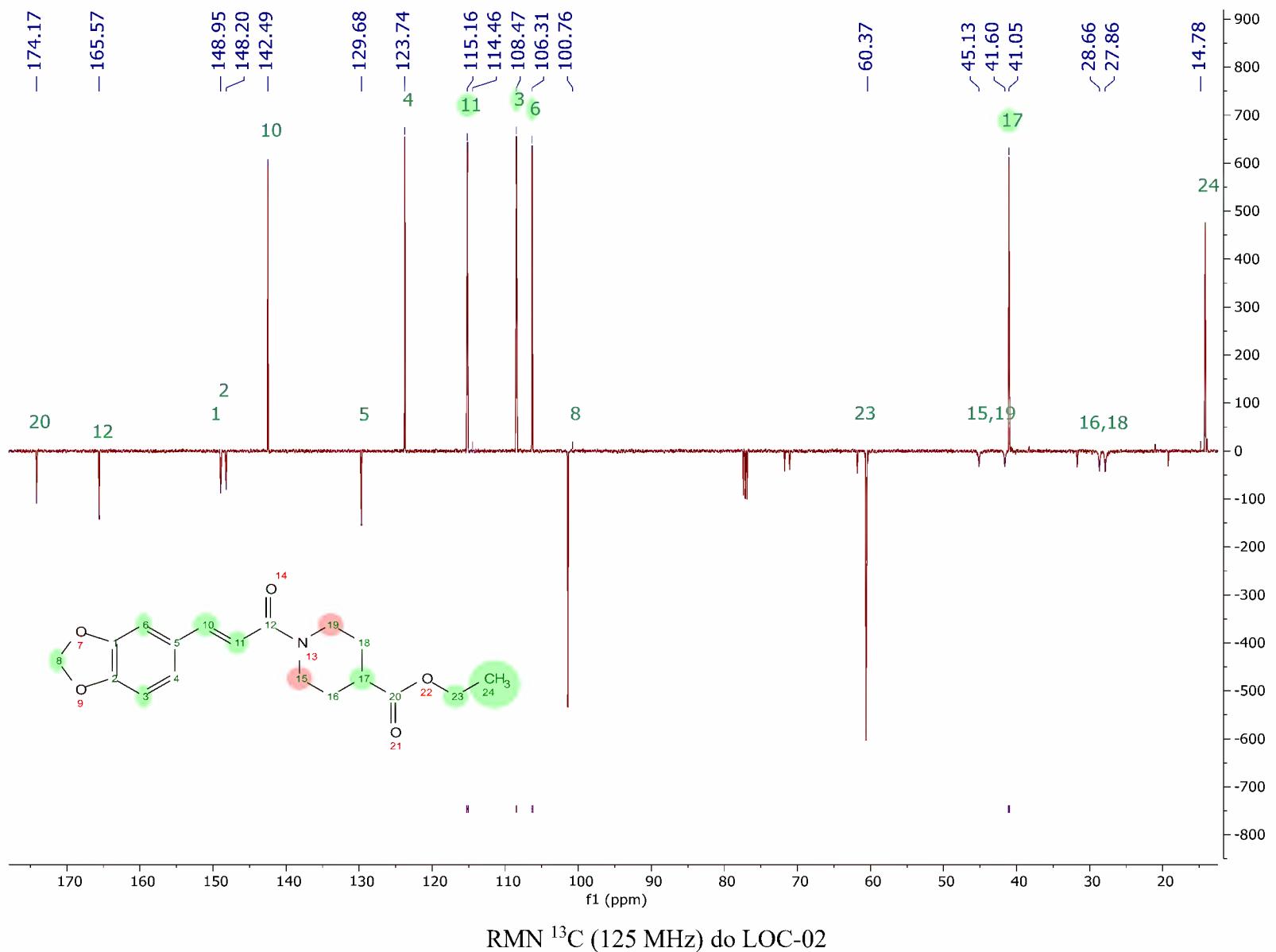
RMN ^1H (500 MHz) do LOC-01

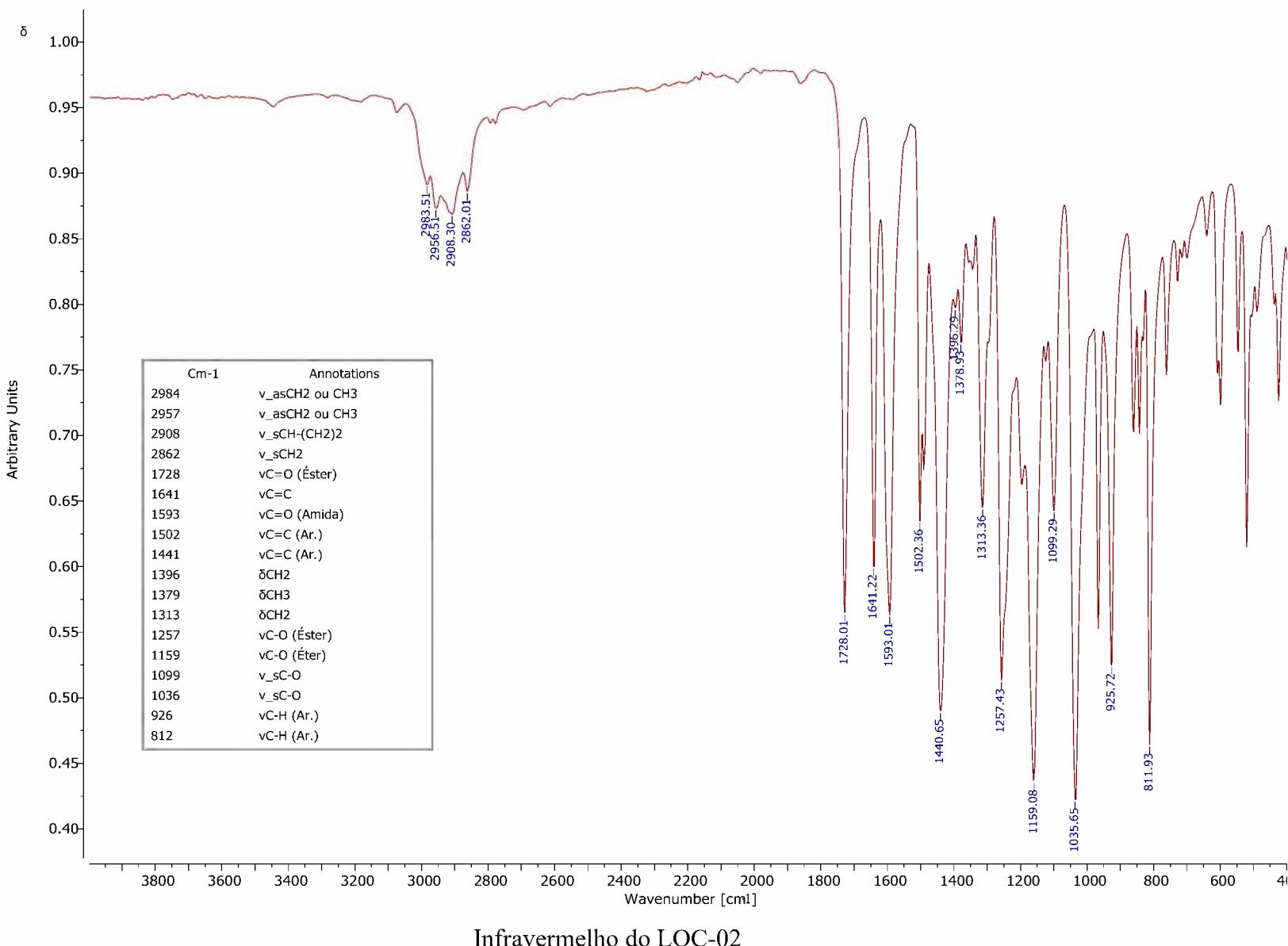




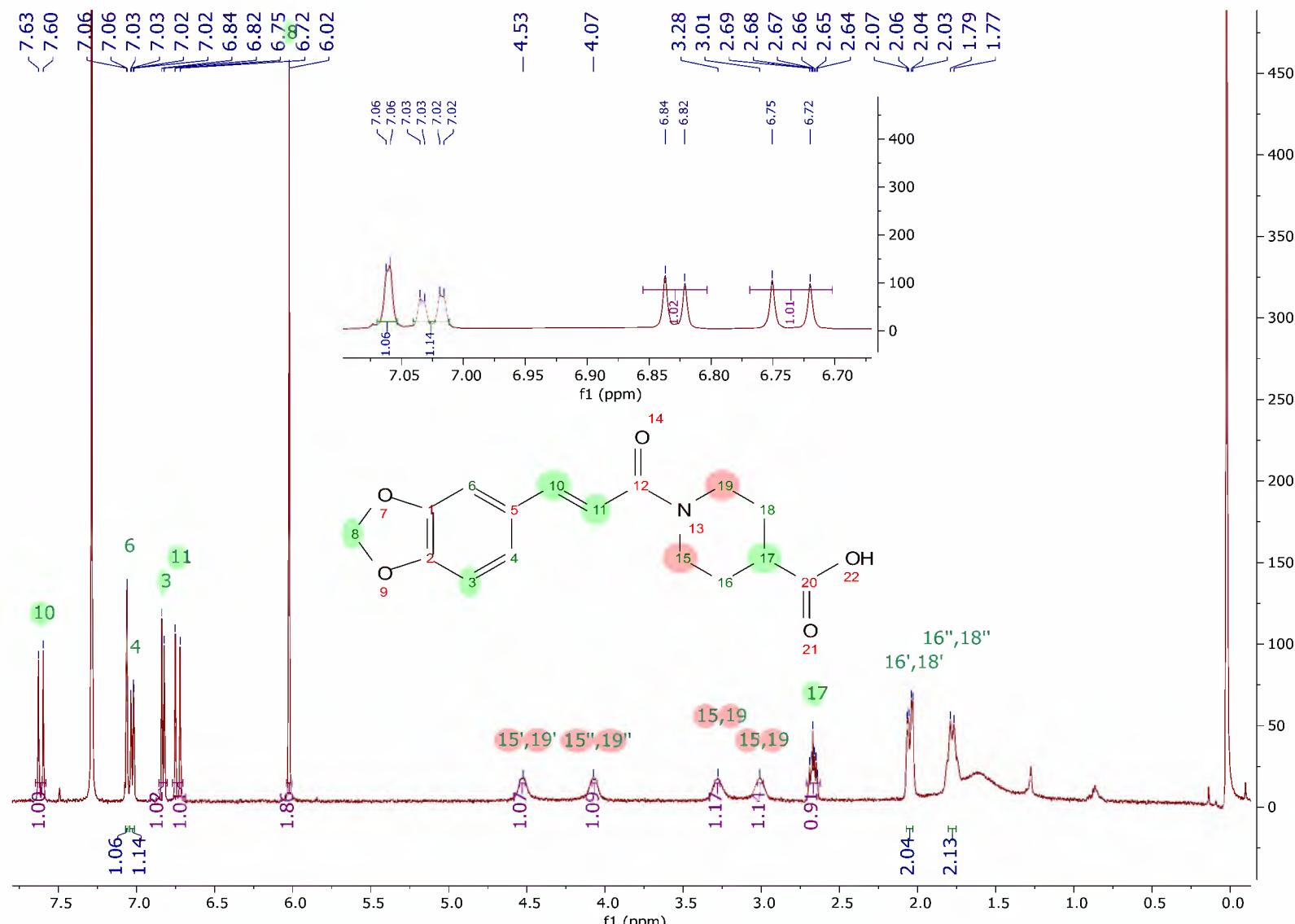


RMN ^1H (500 MHz) do LOC-02

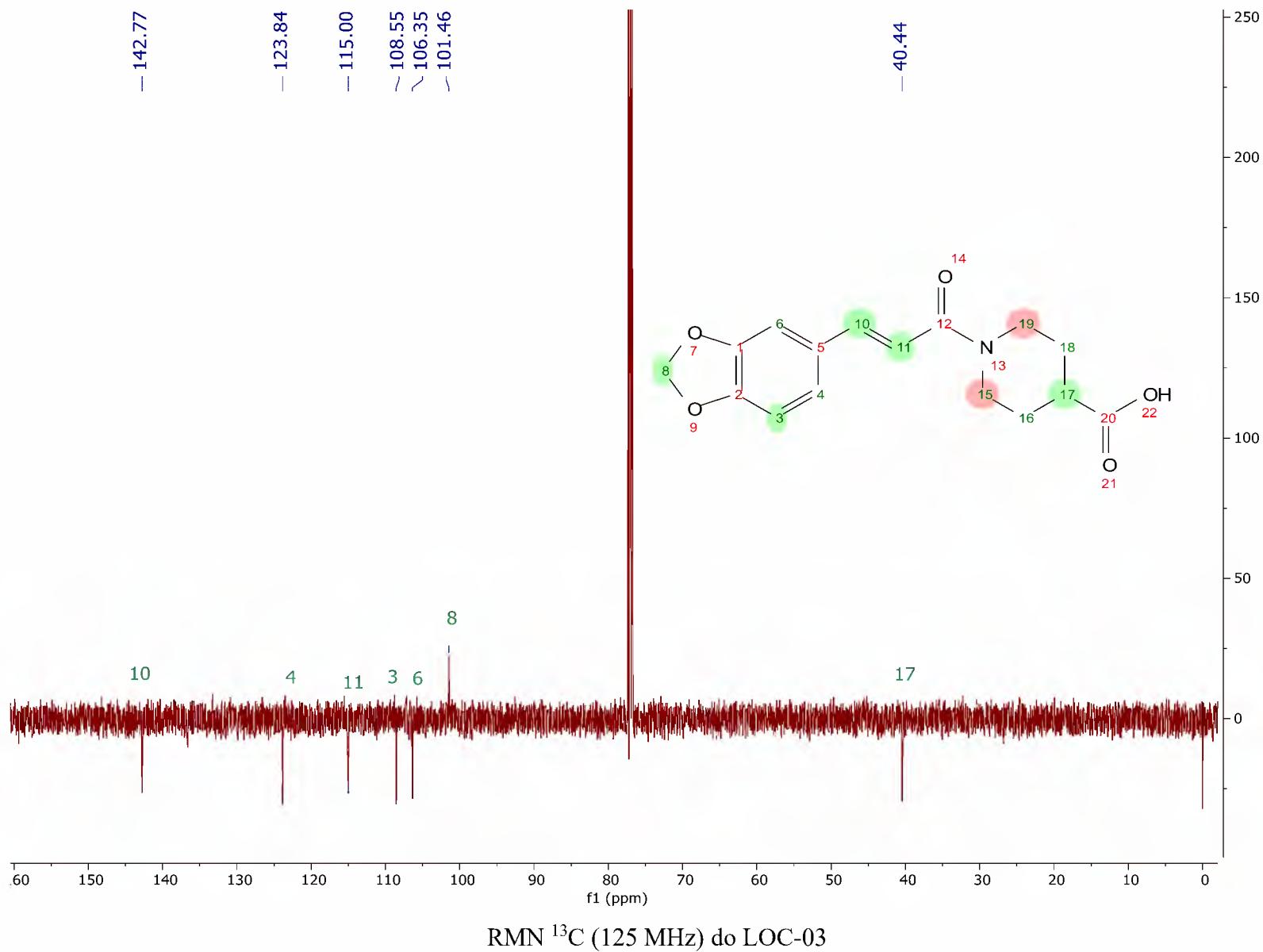


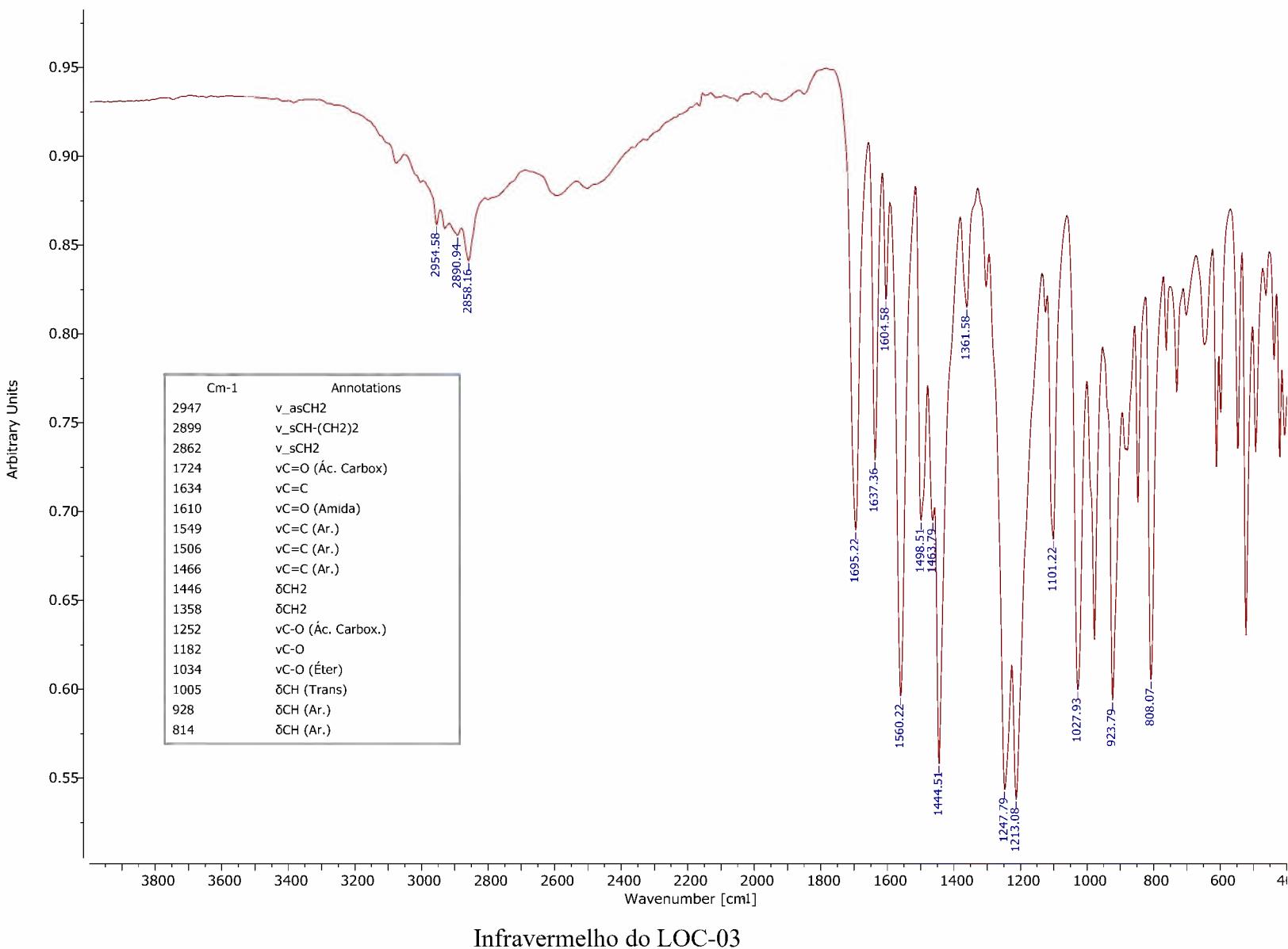


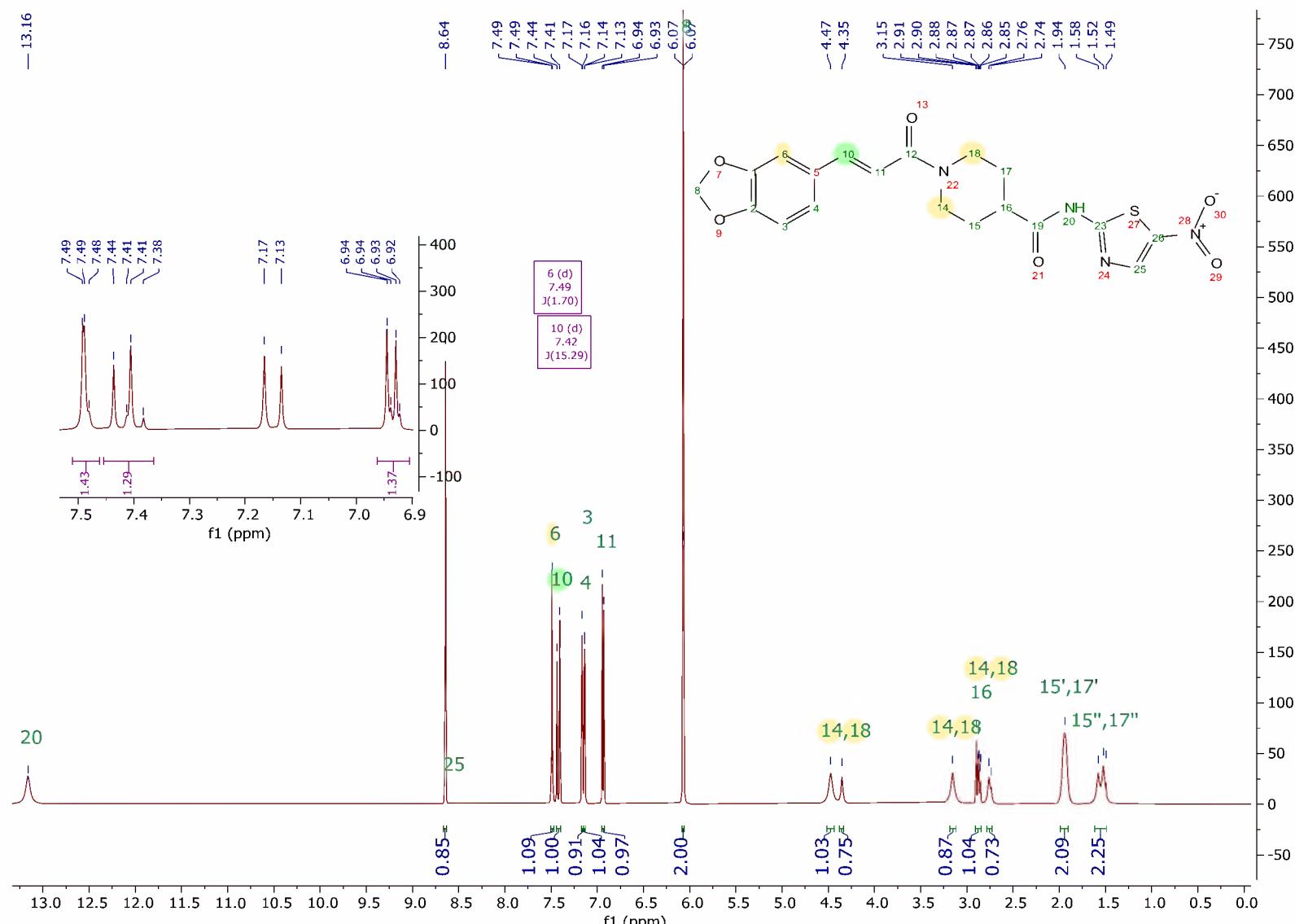
Infravermelho do LOC-02

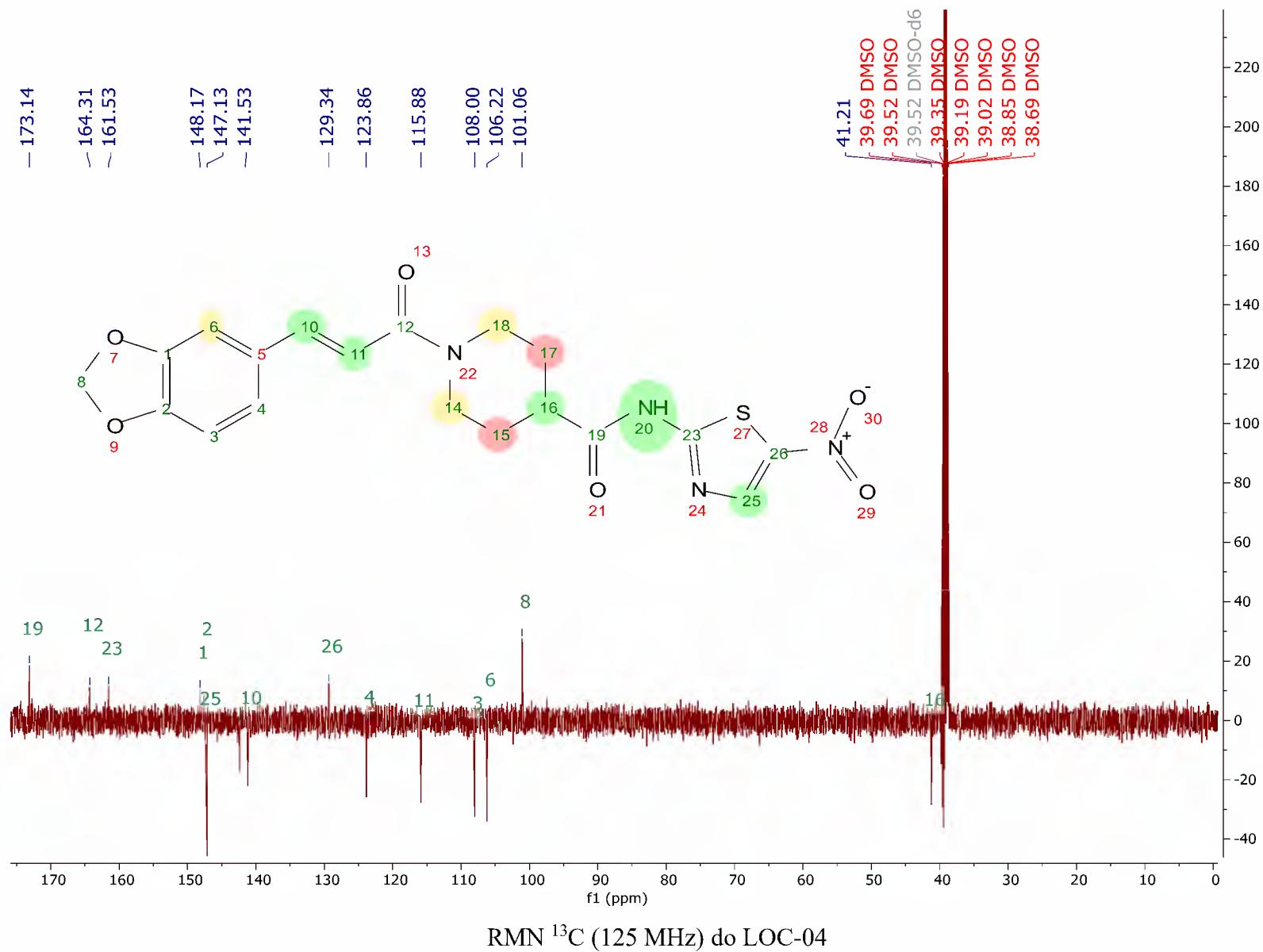


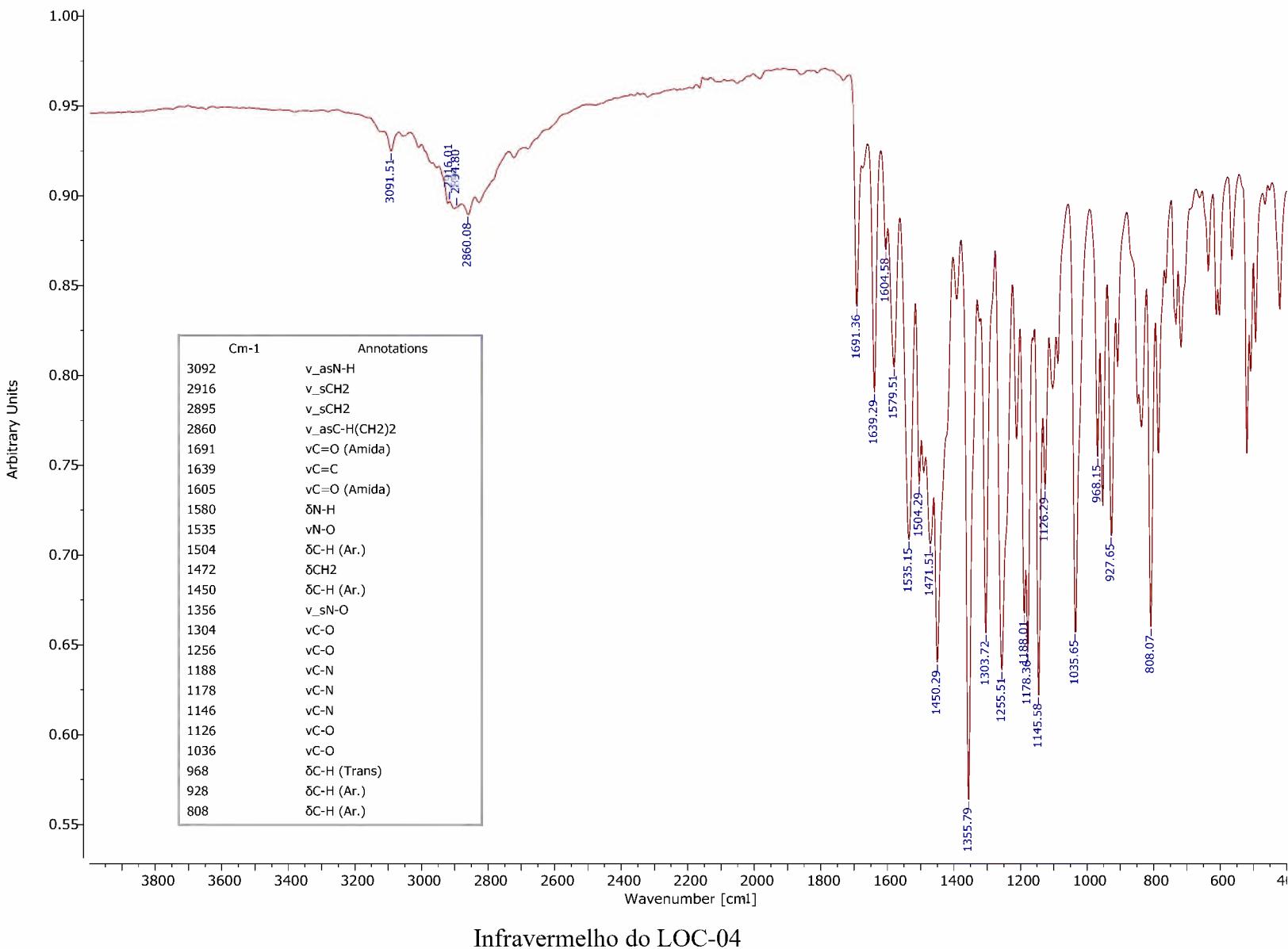
RMN ^1H (500 MHz) do LOC-03

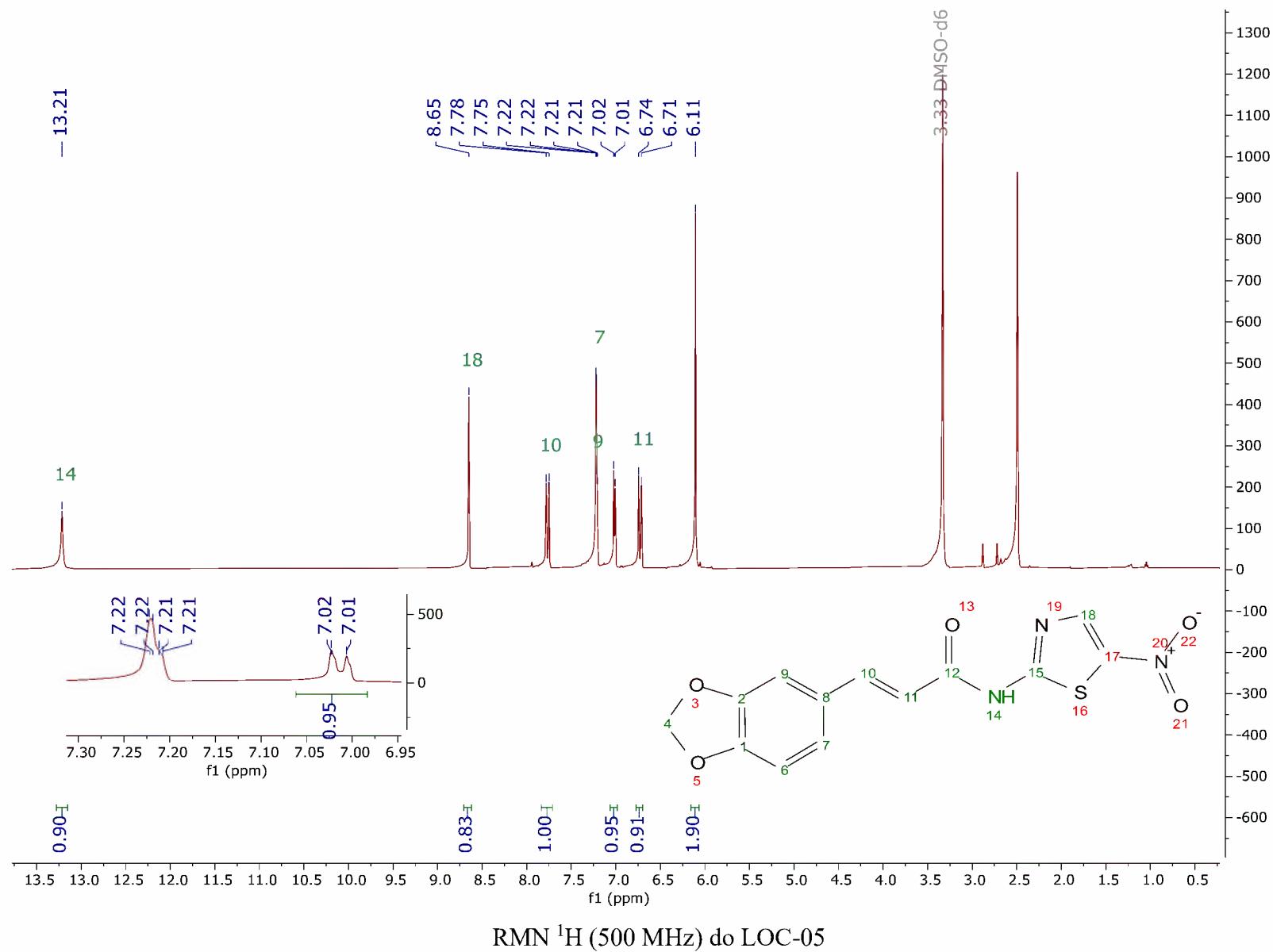


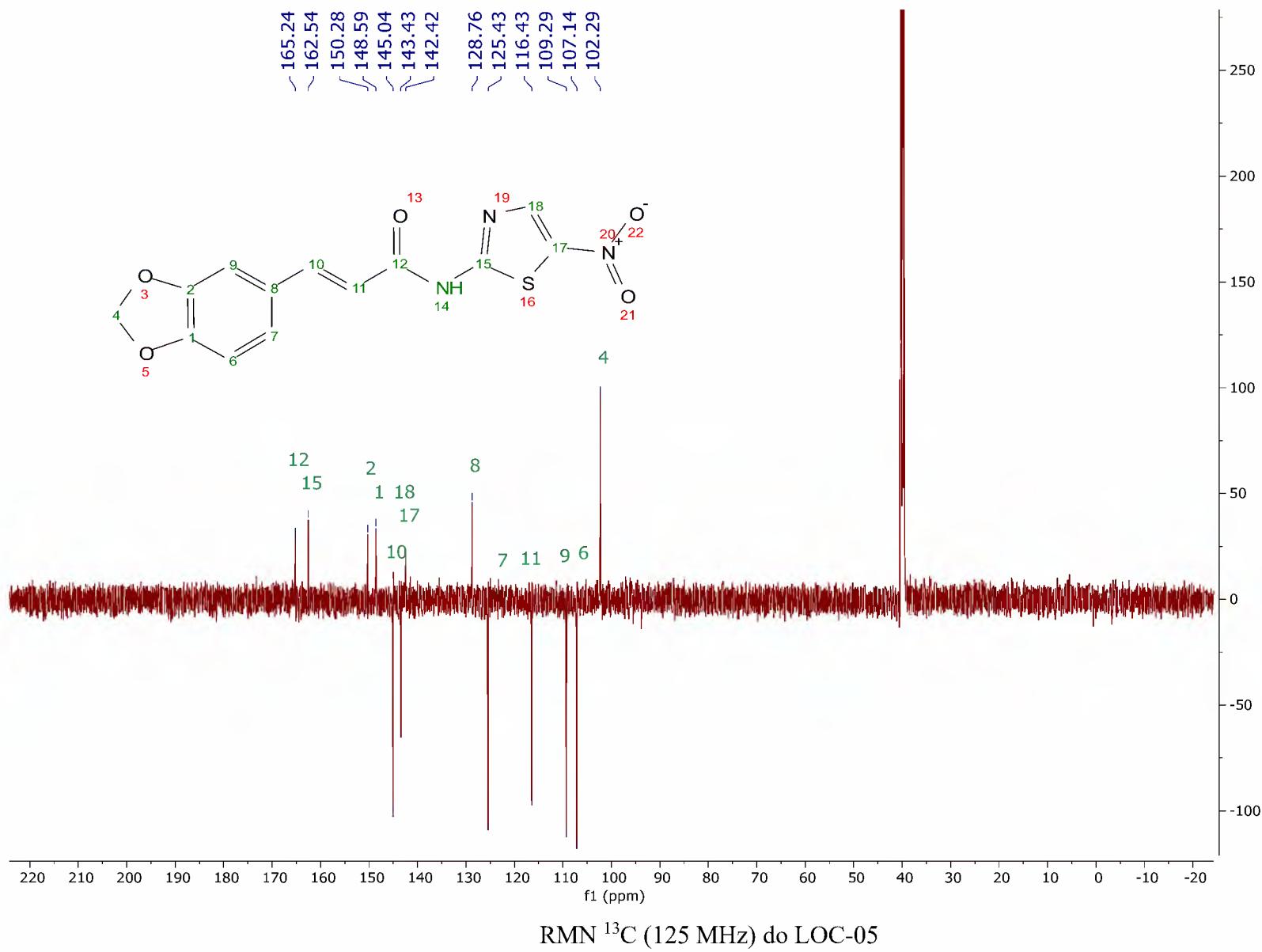


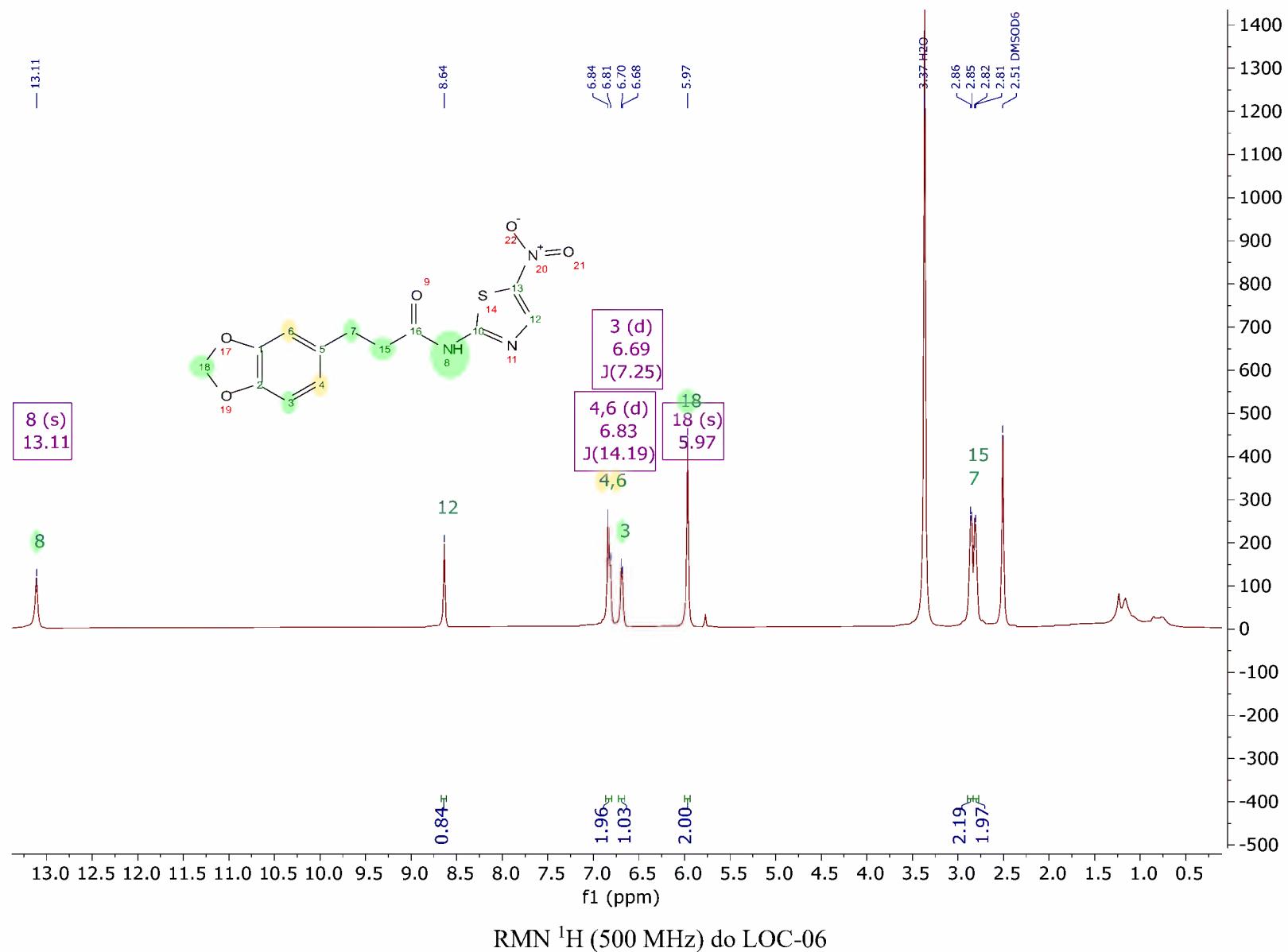


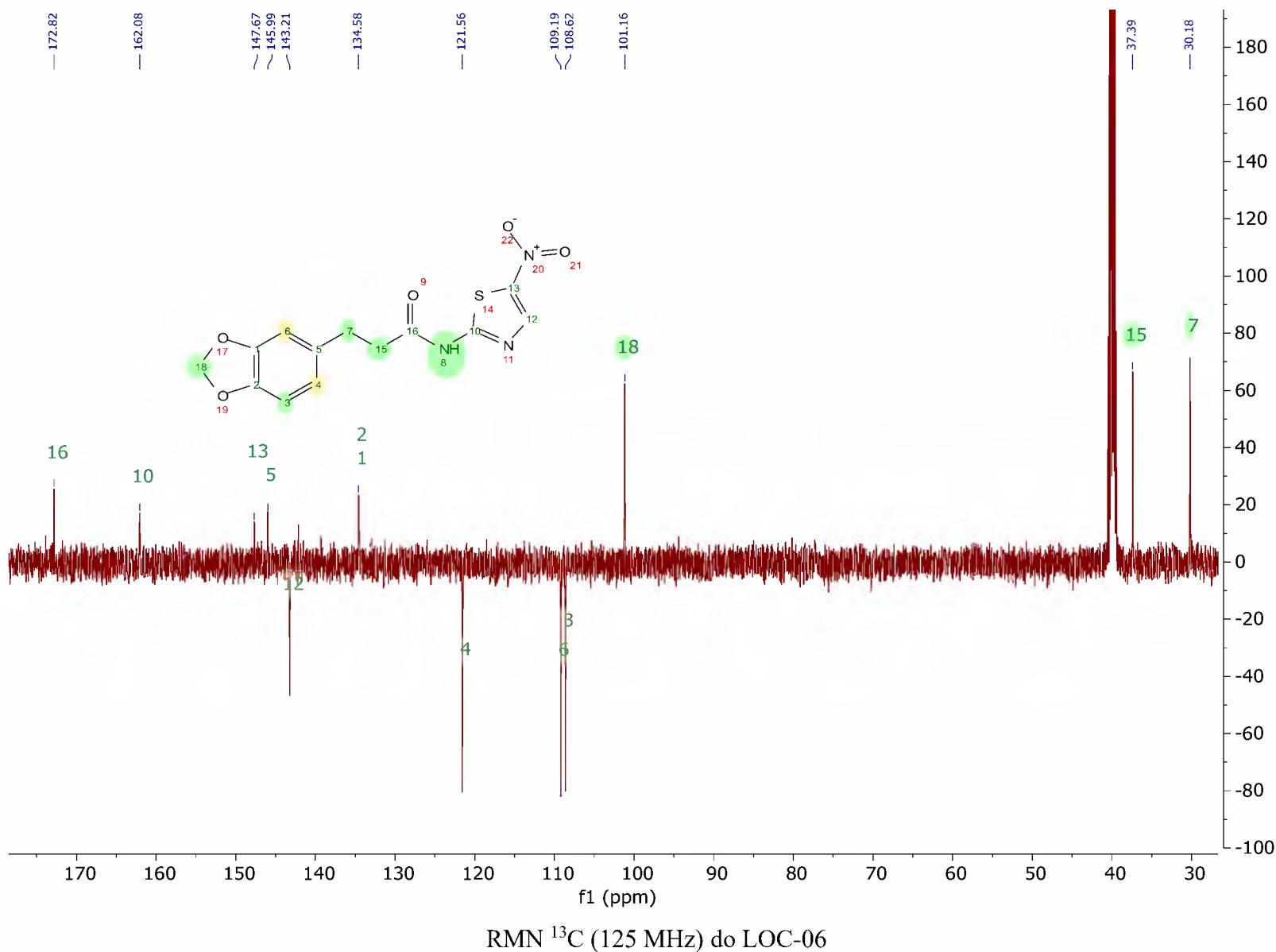


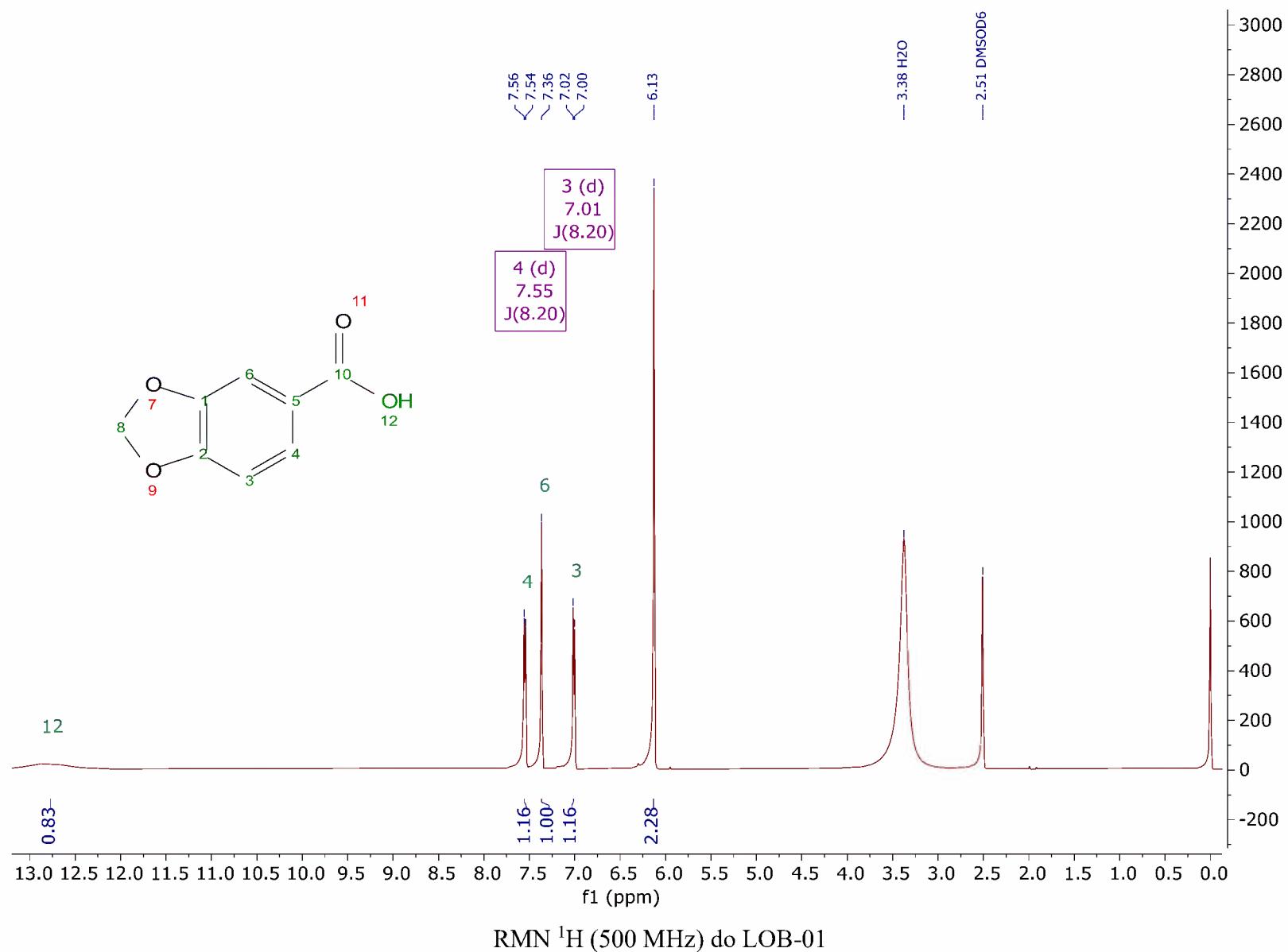


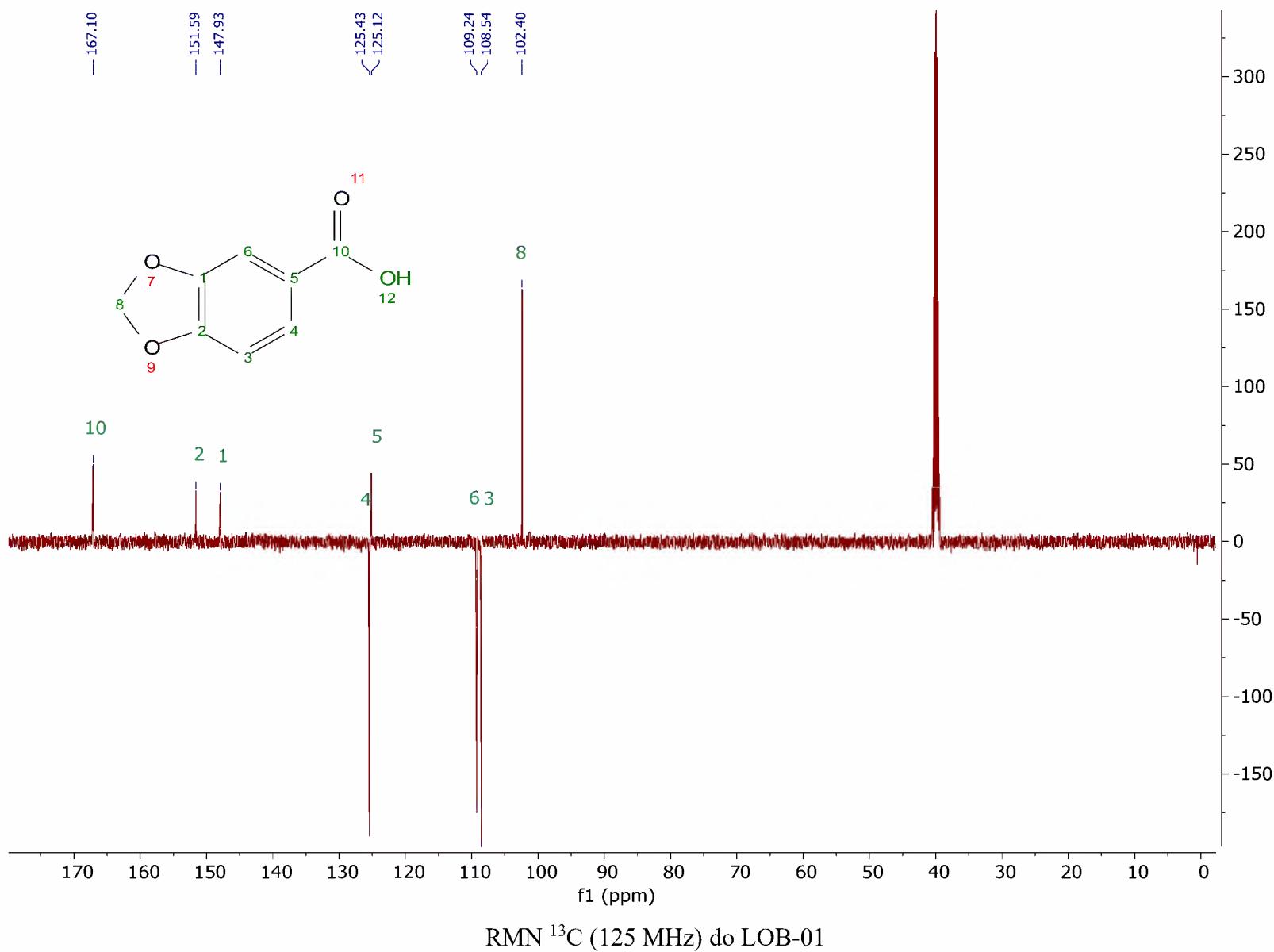


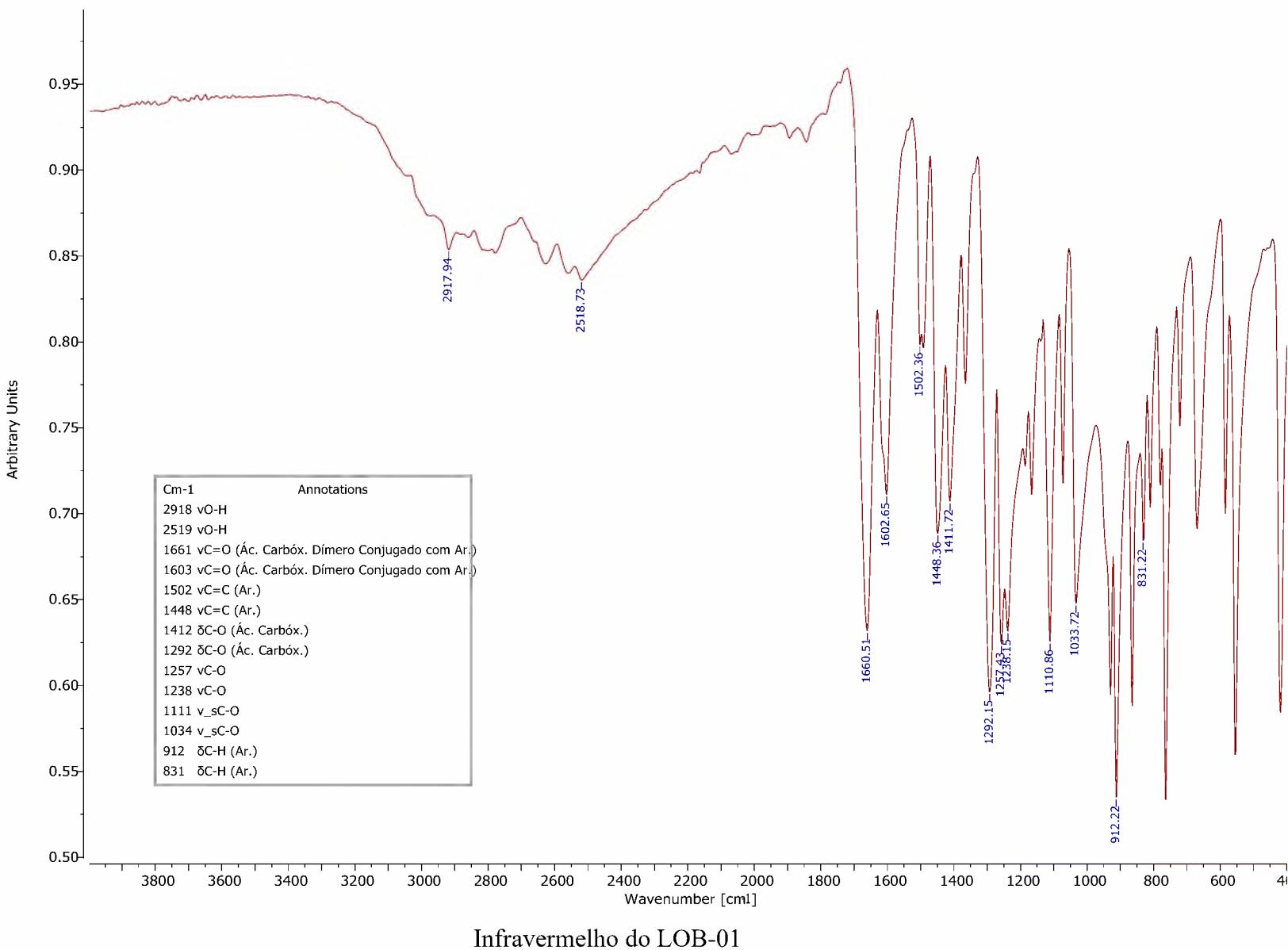


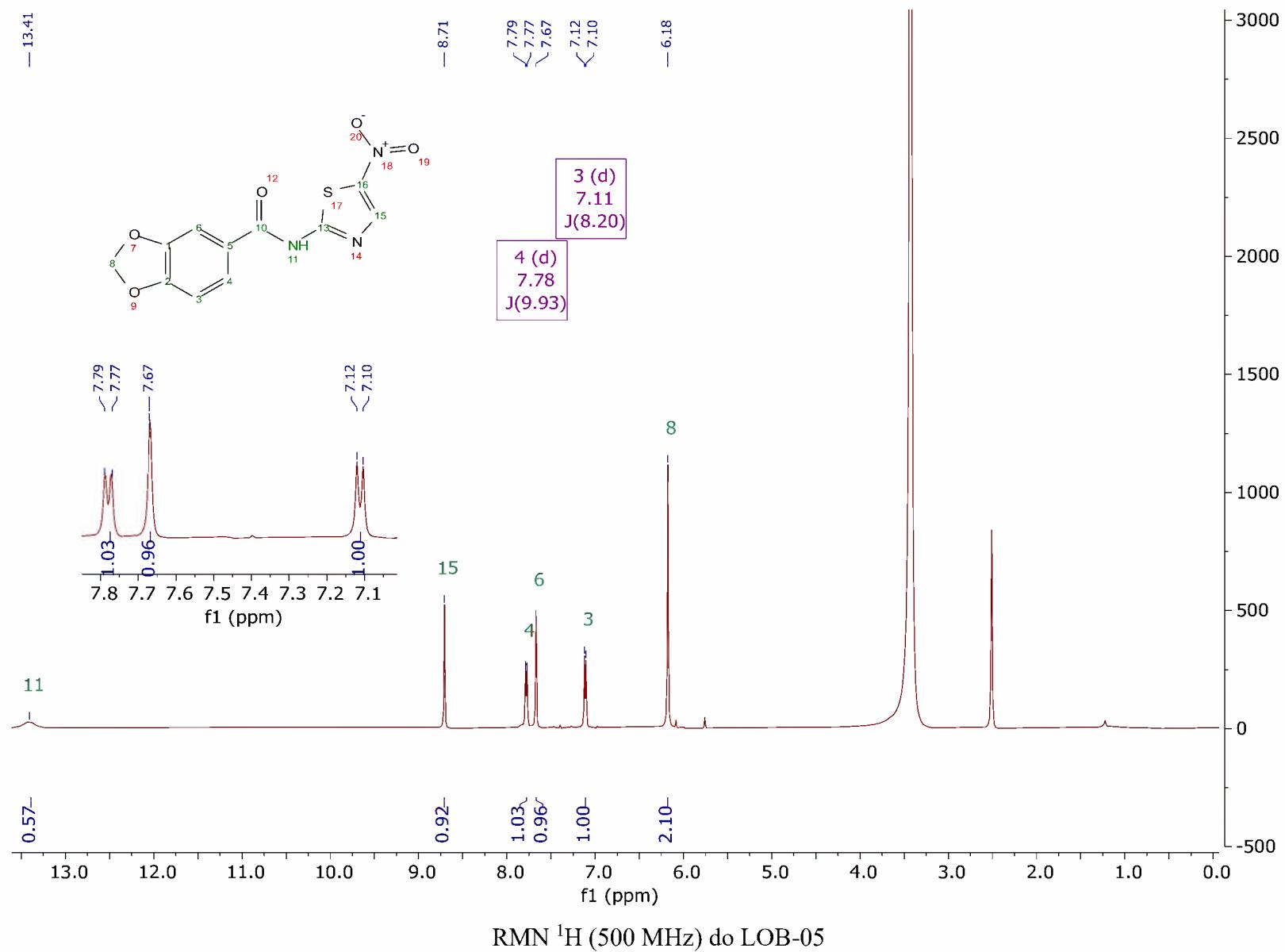


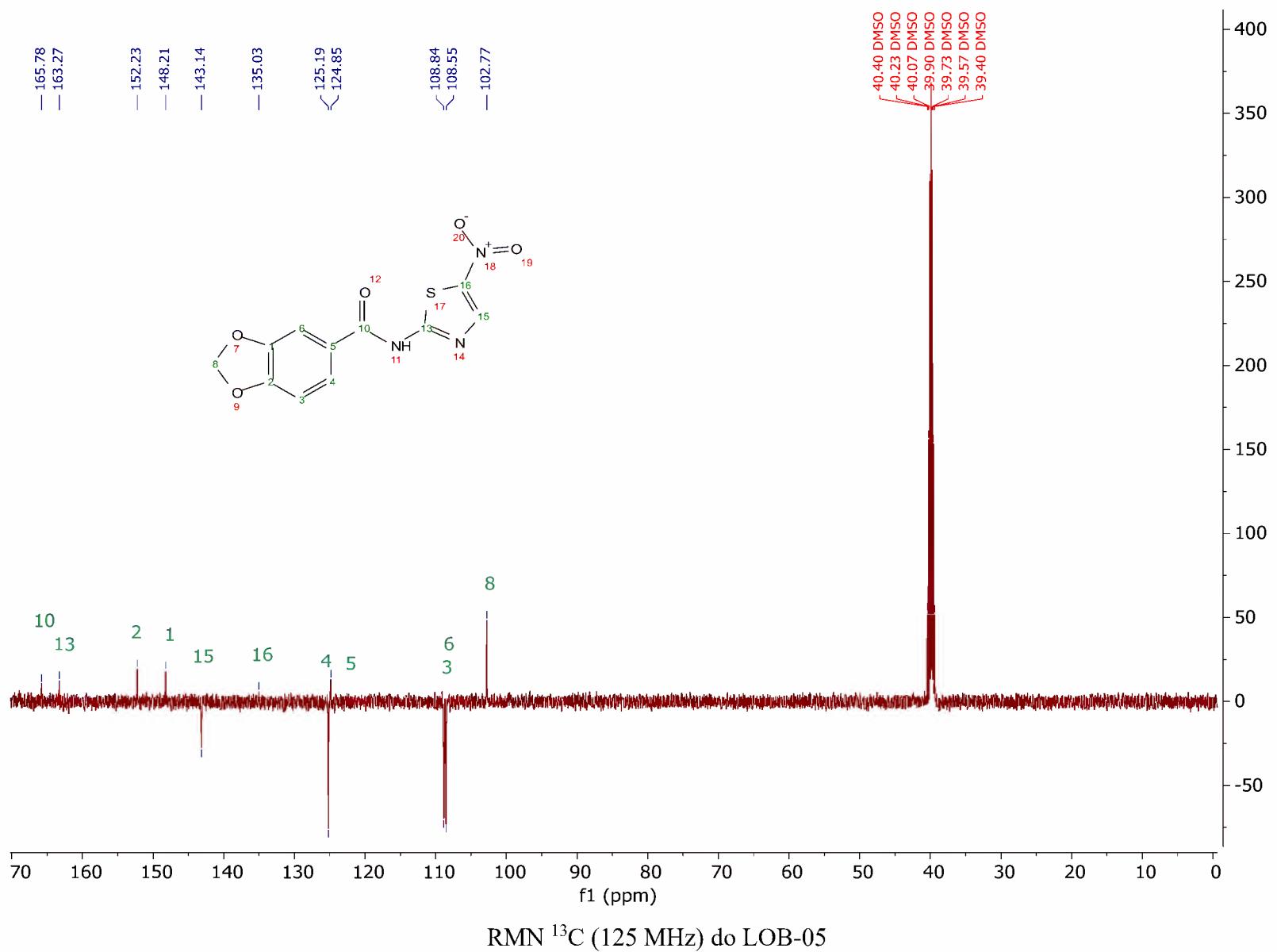


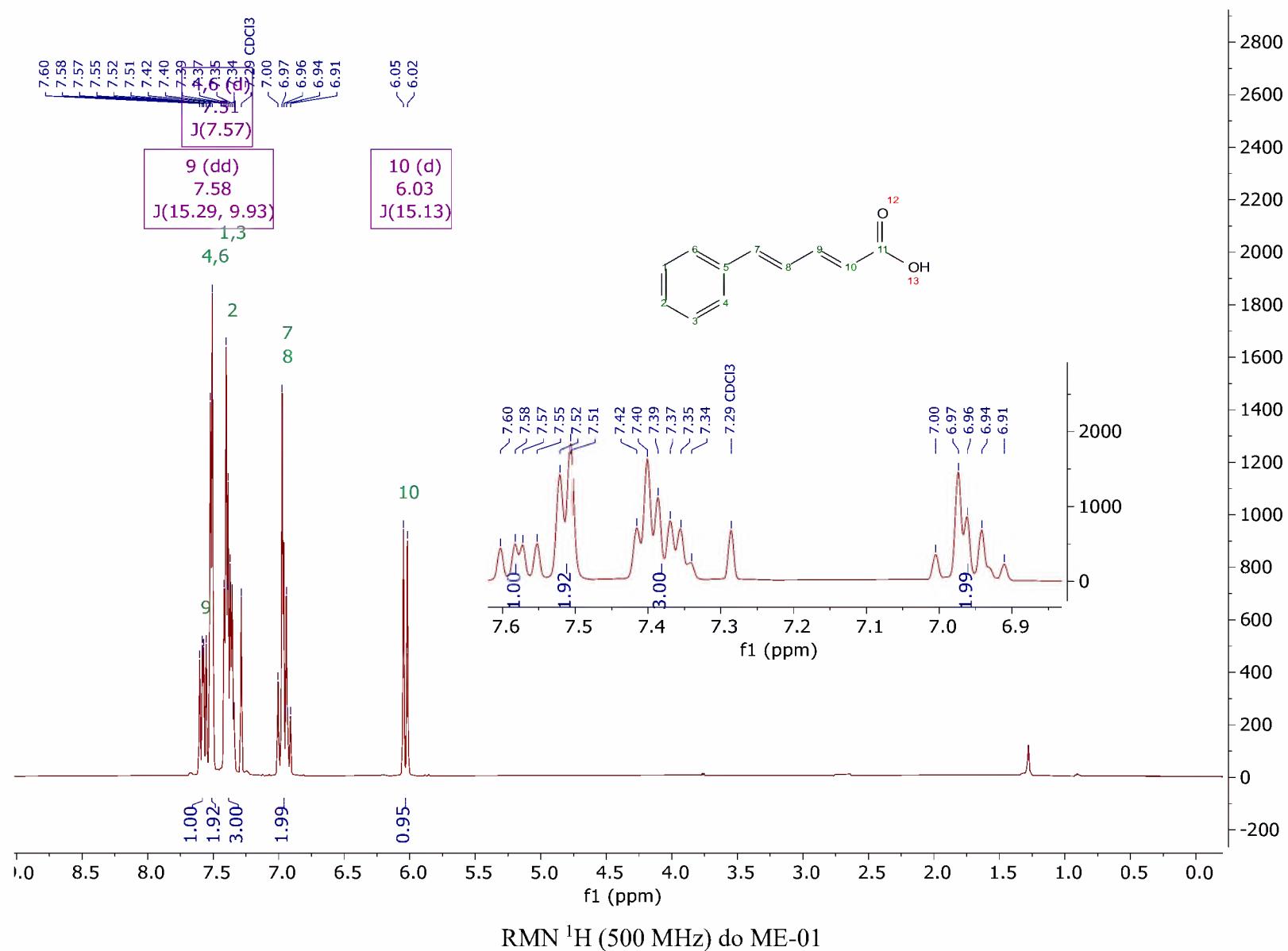


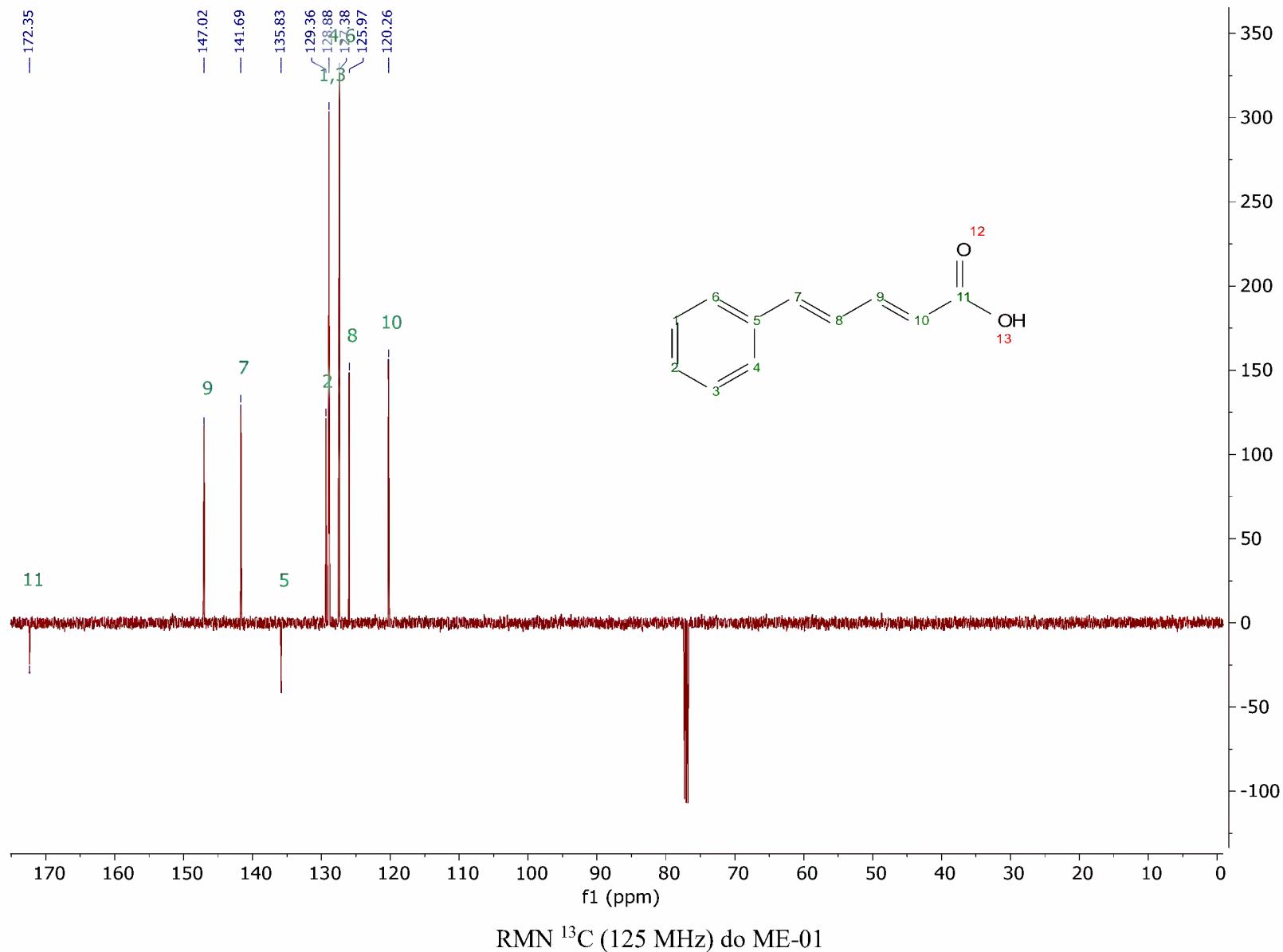


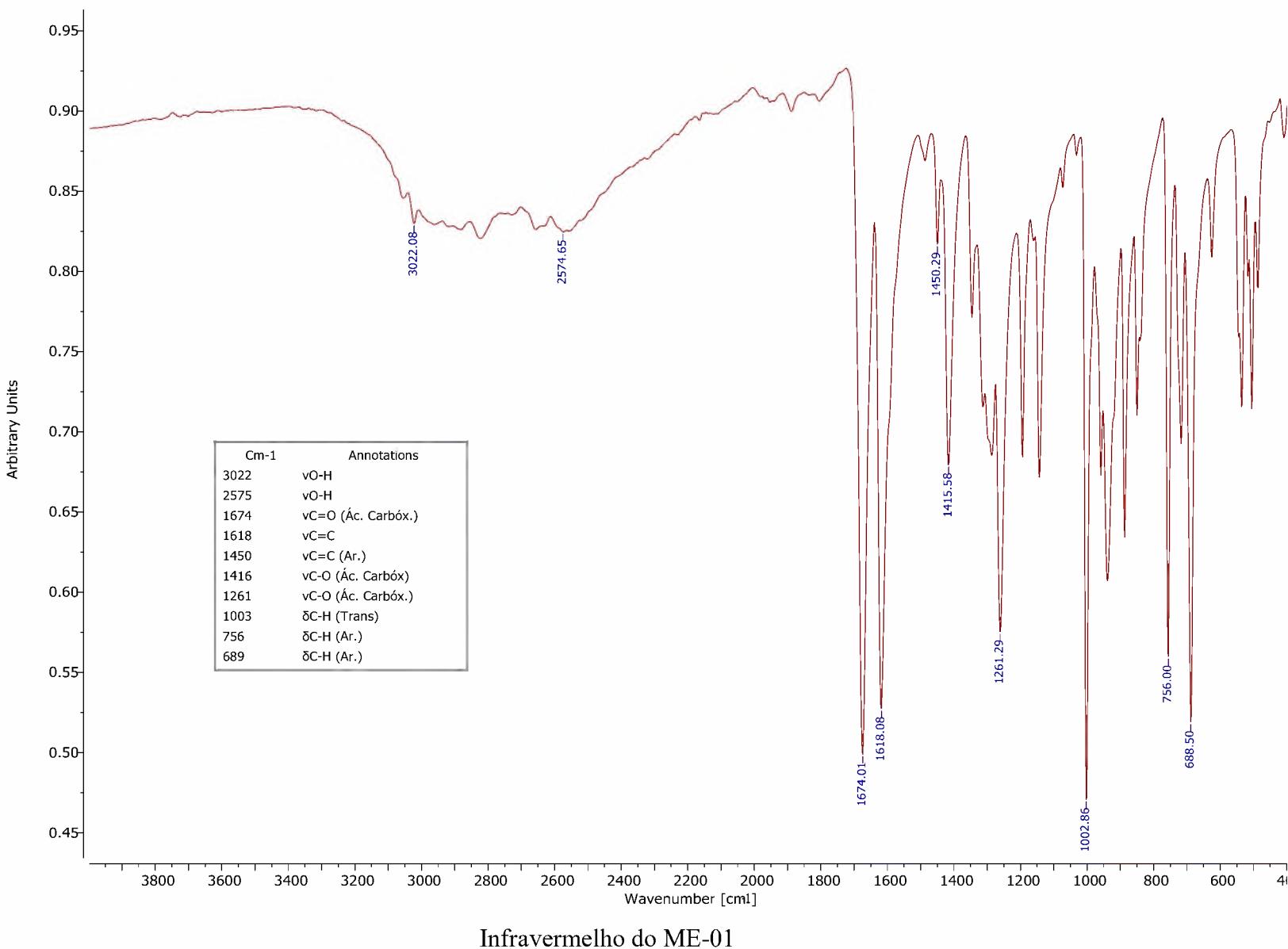


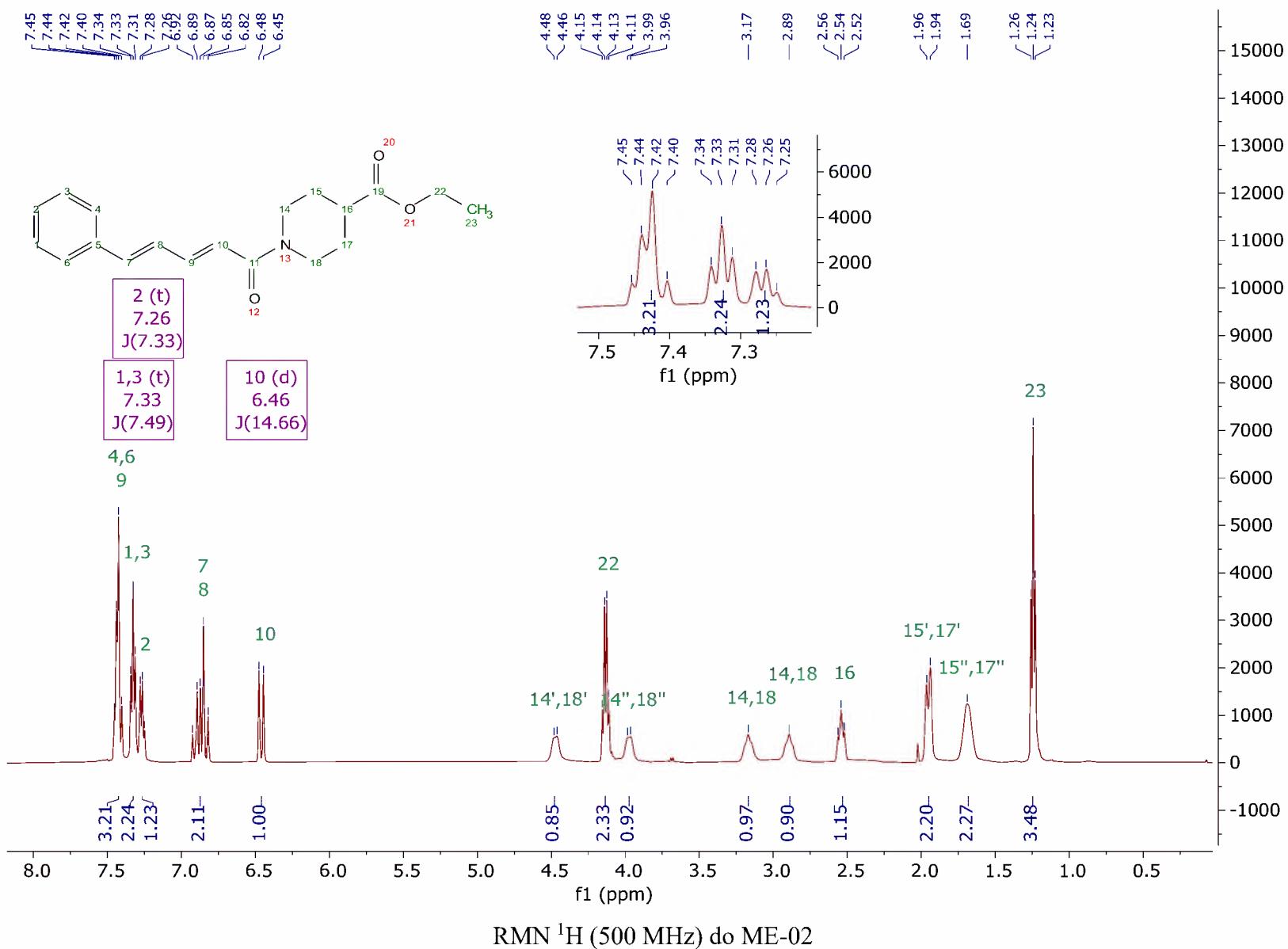


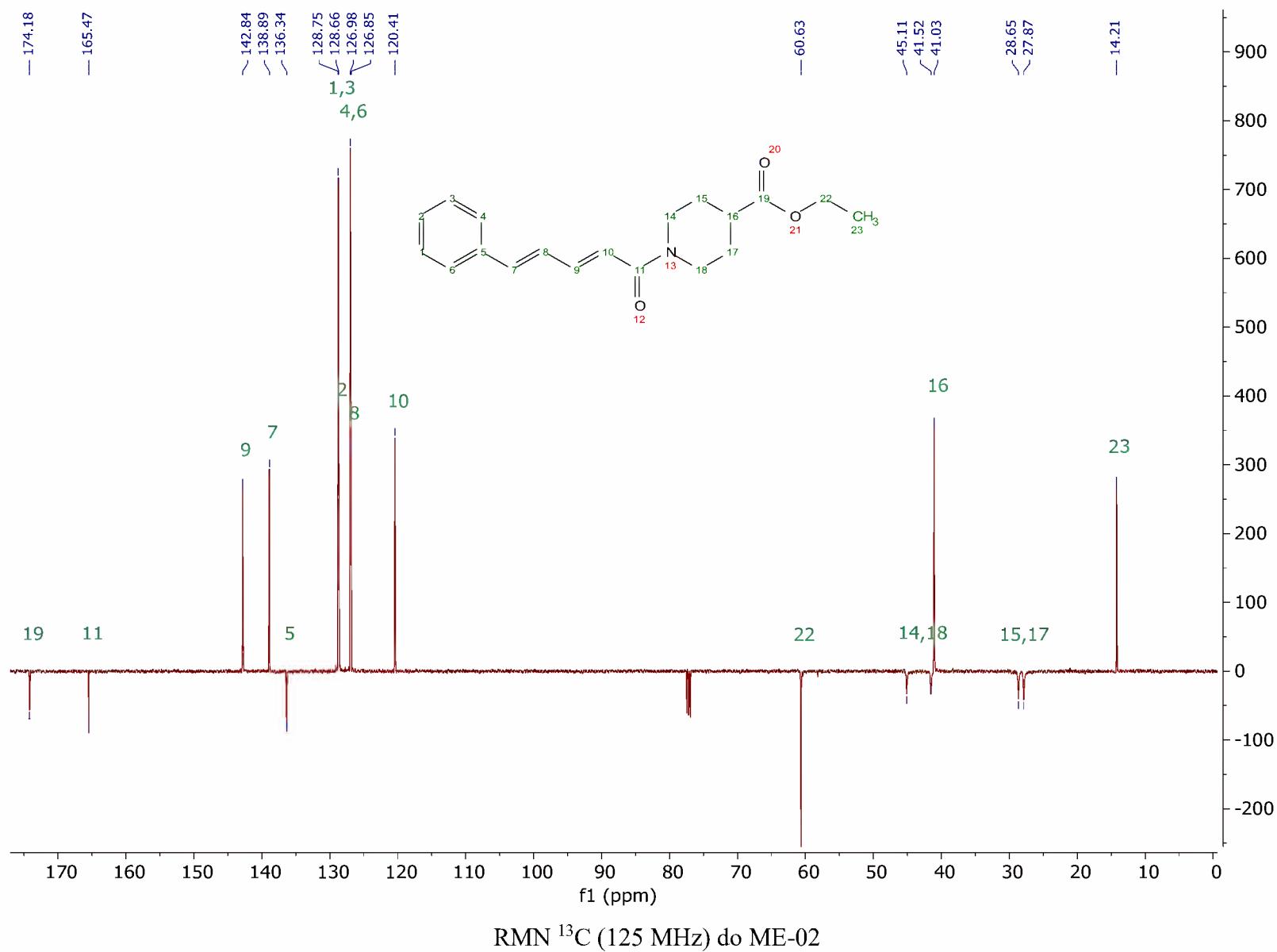


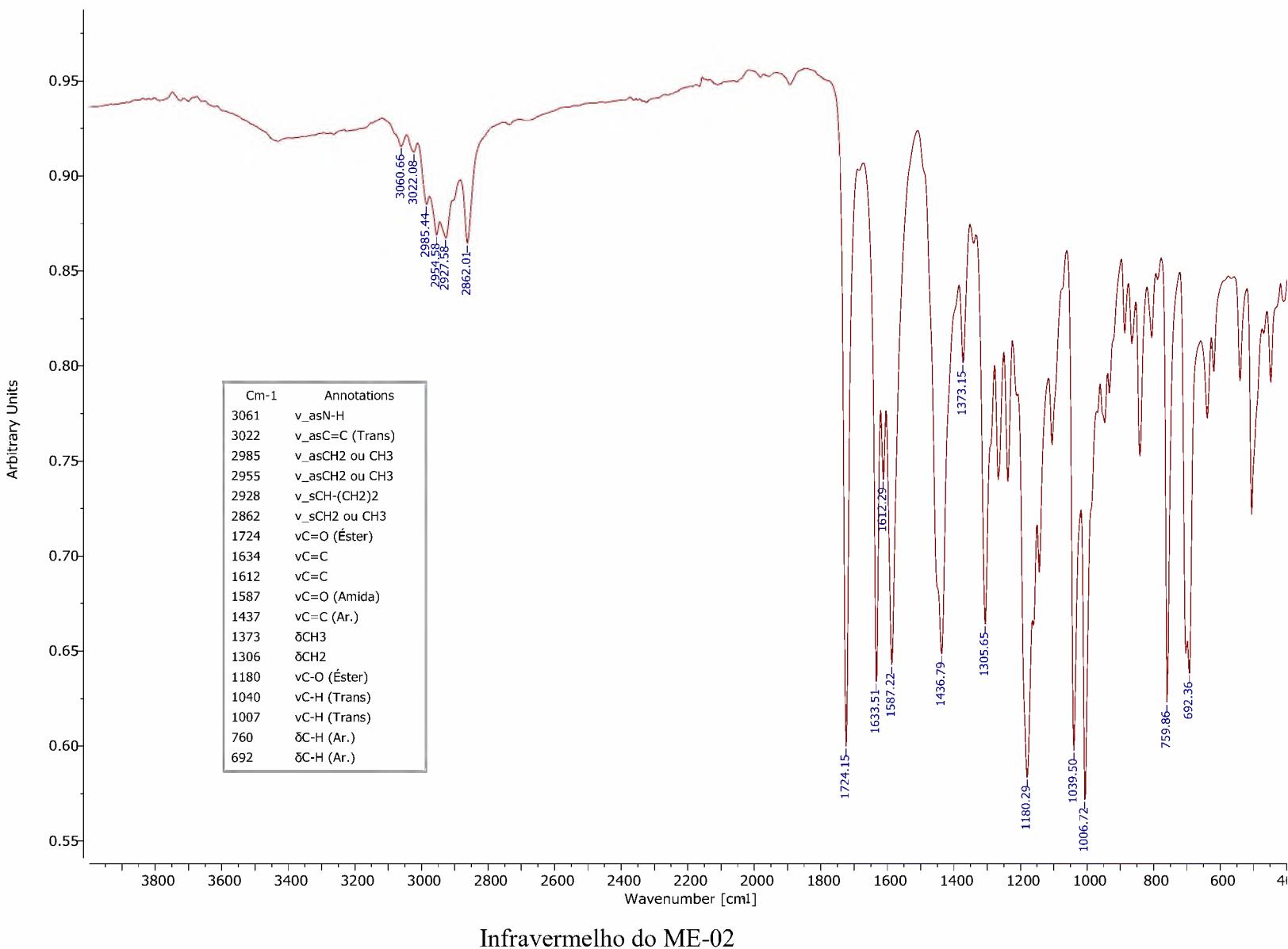




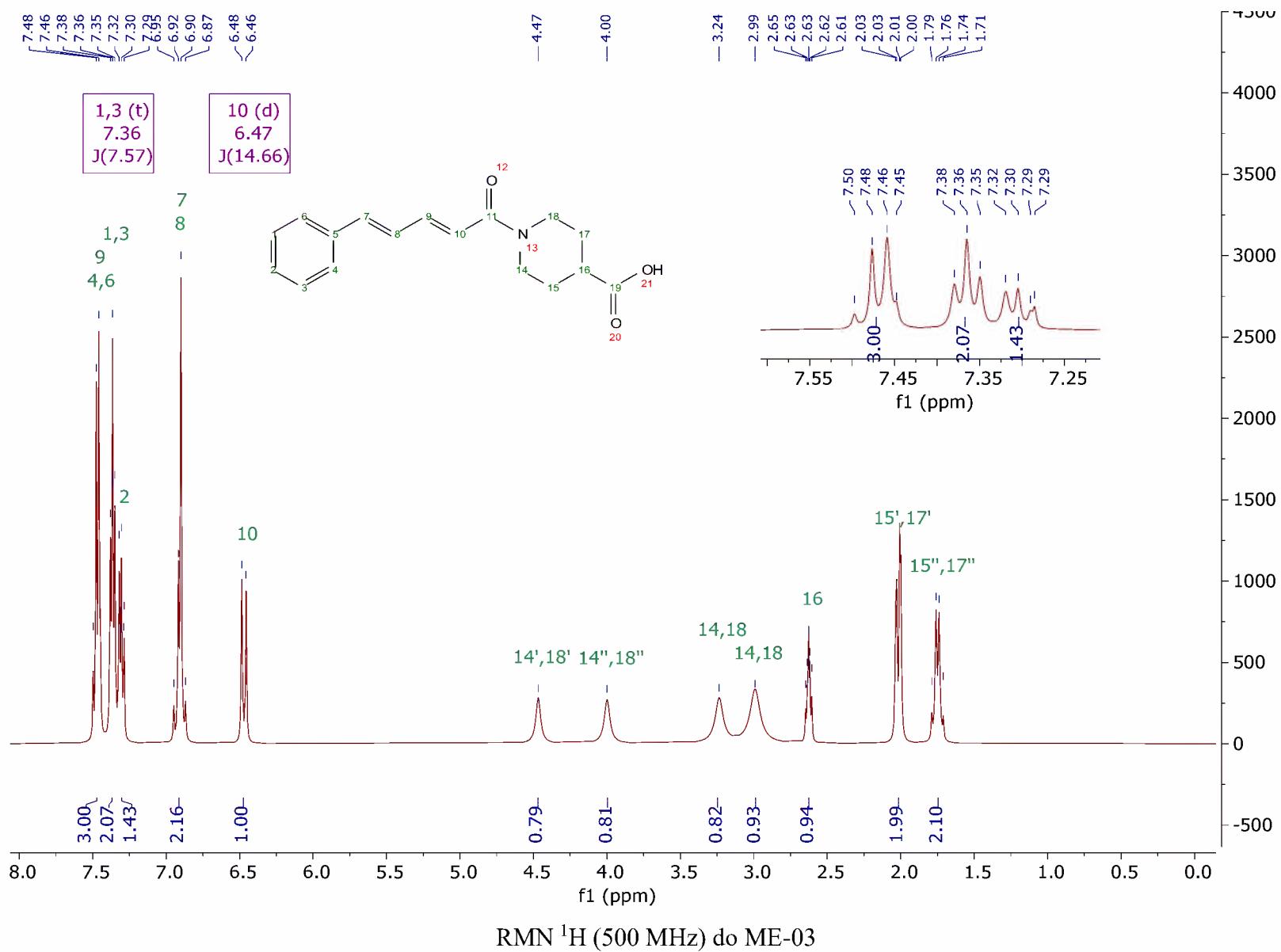


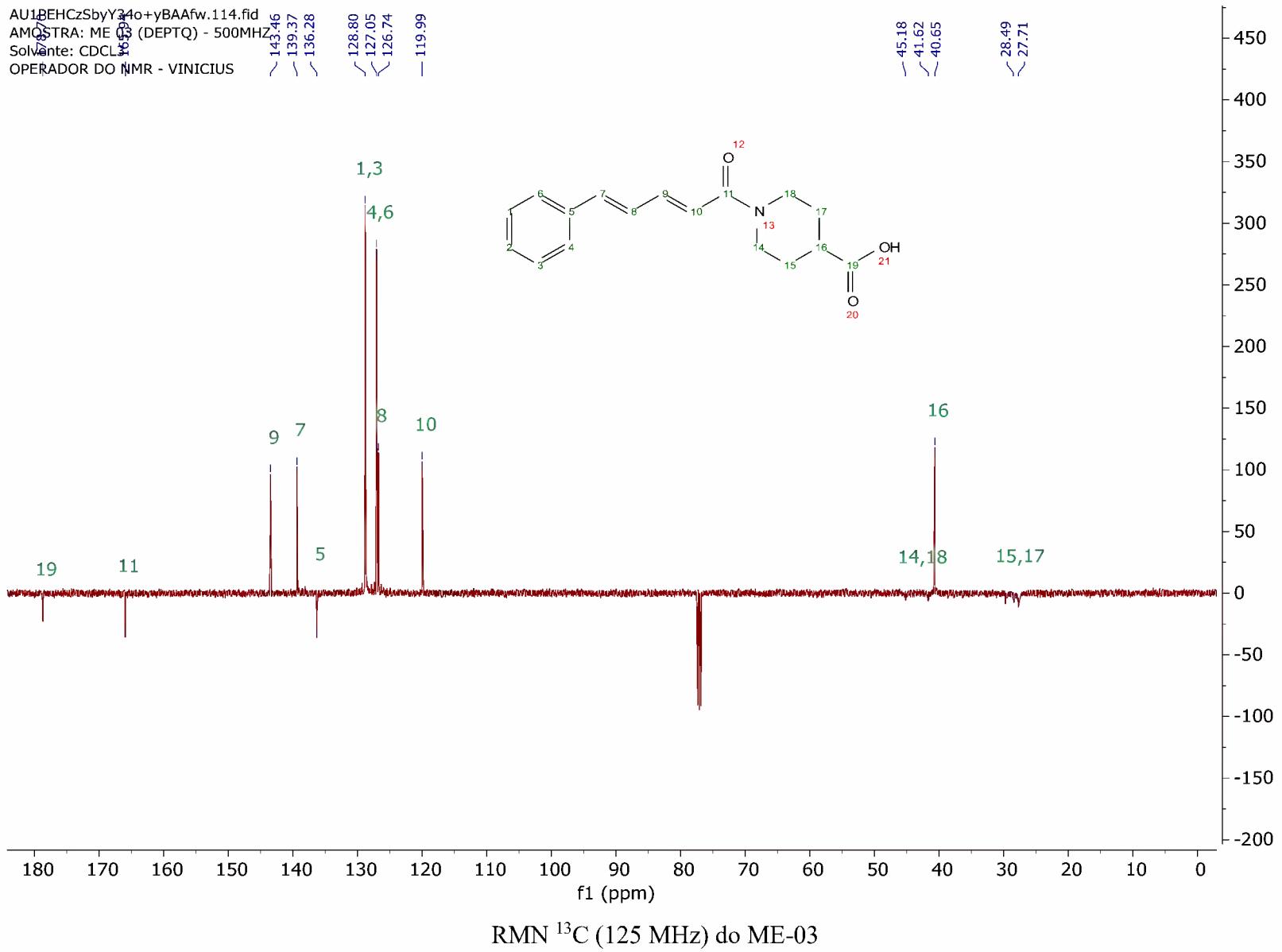


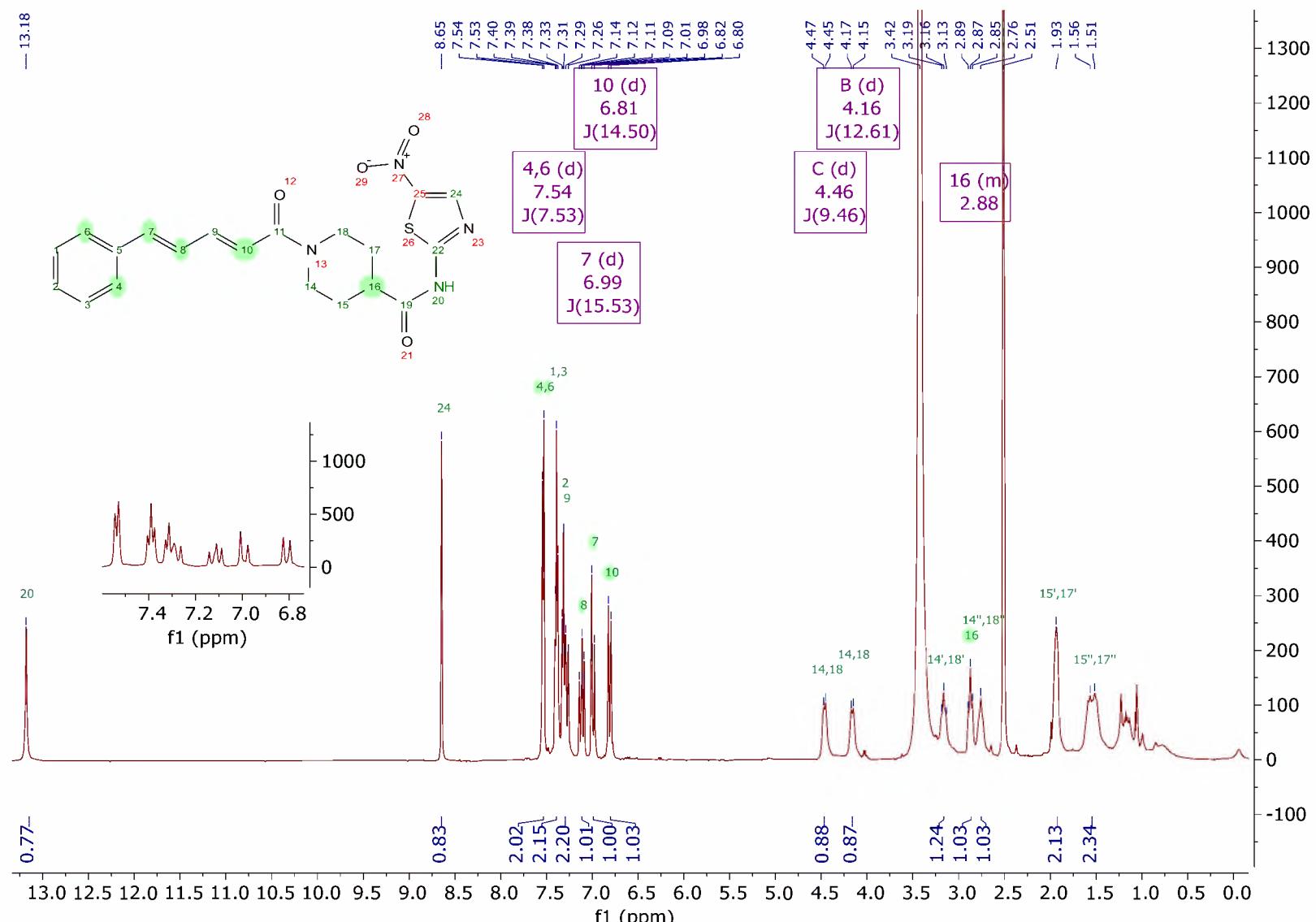




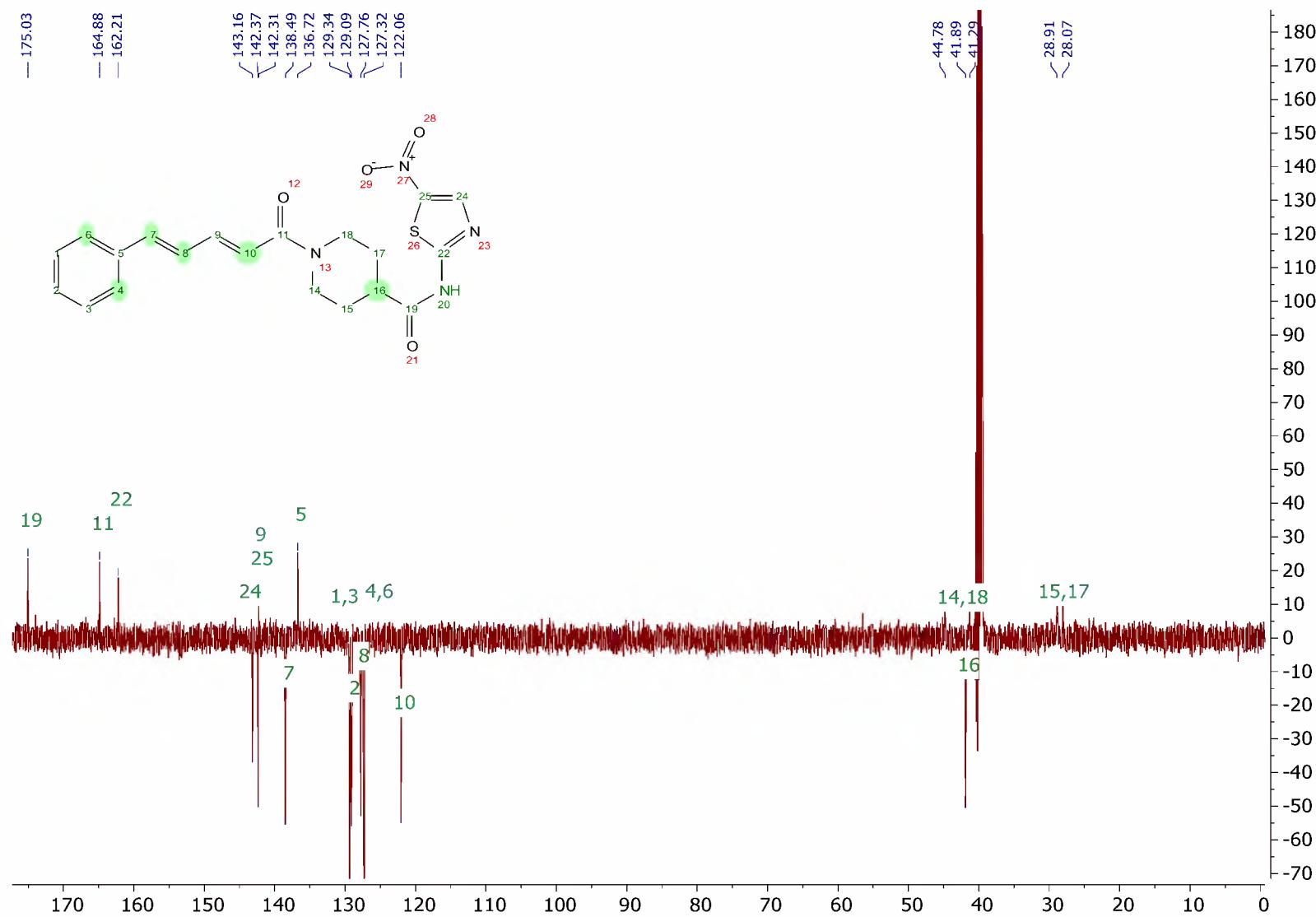
Infravermelho do ME-02

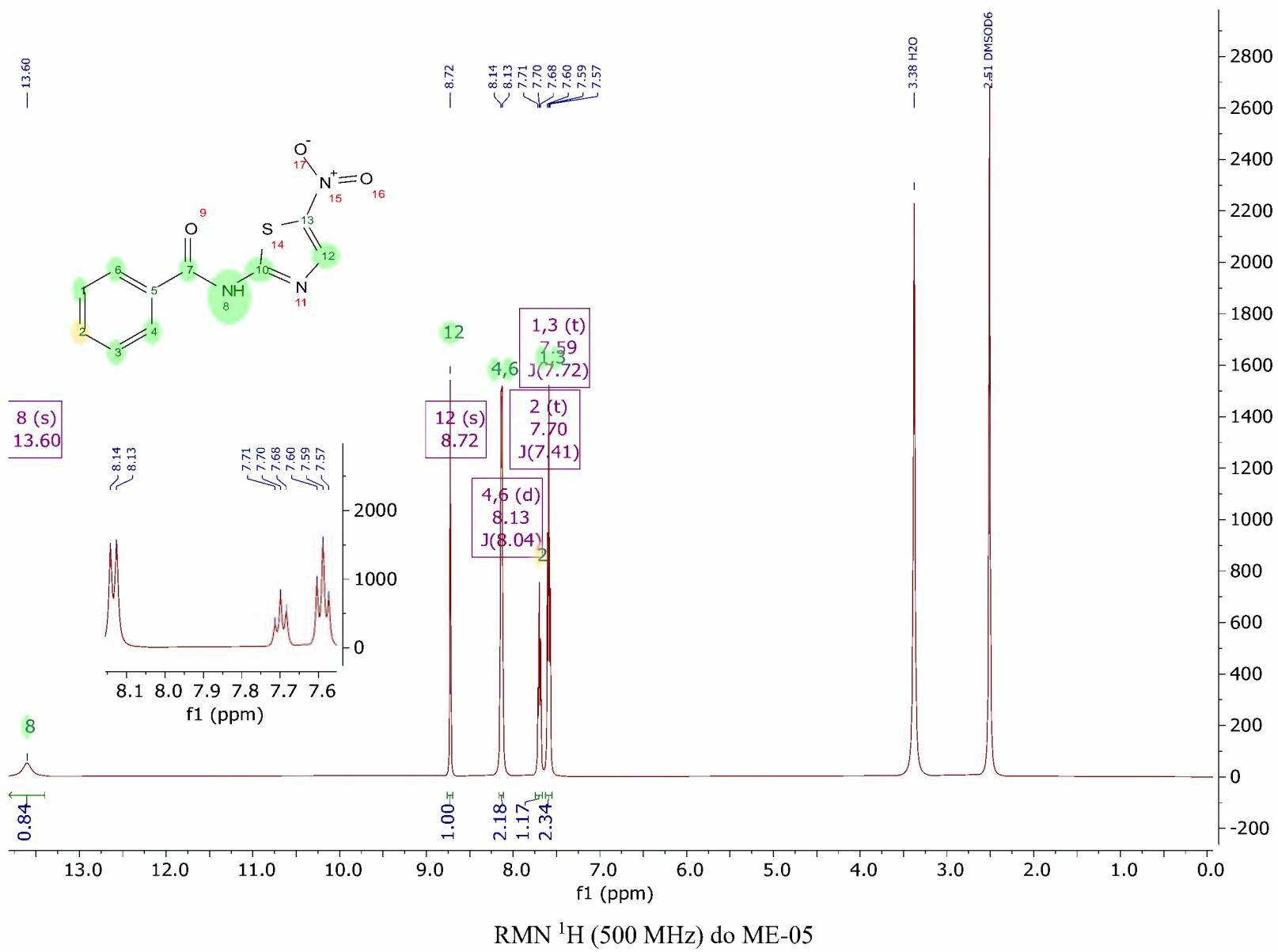


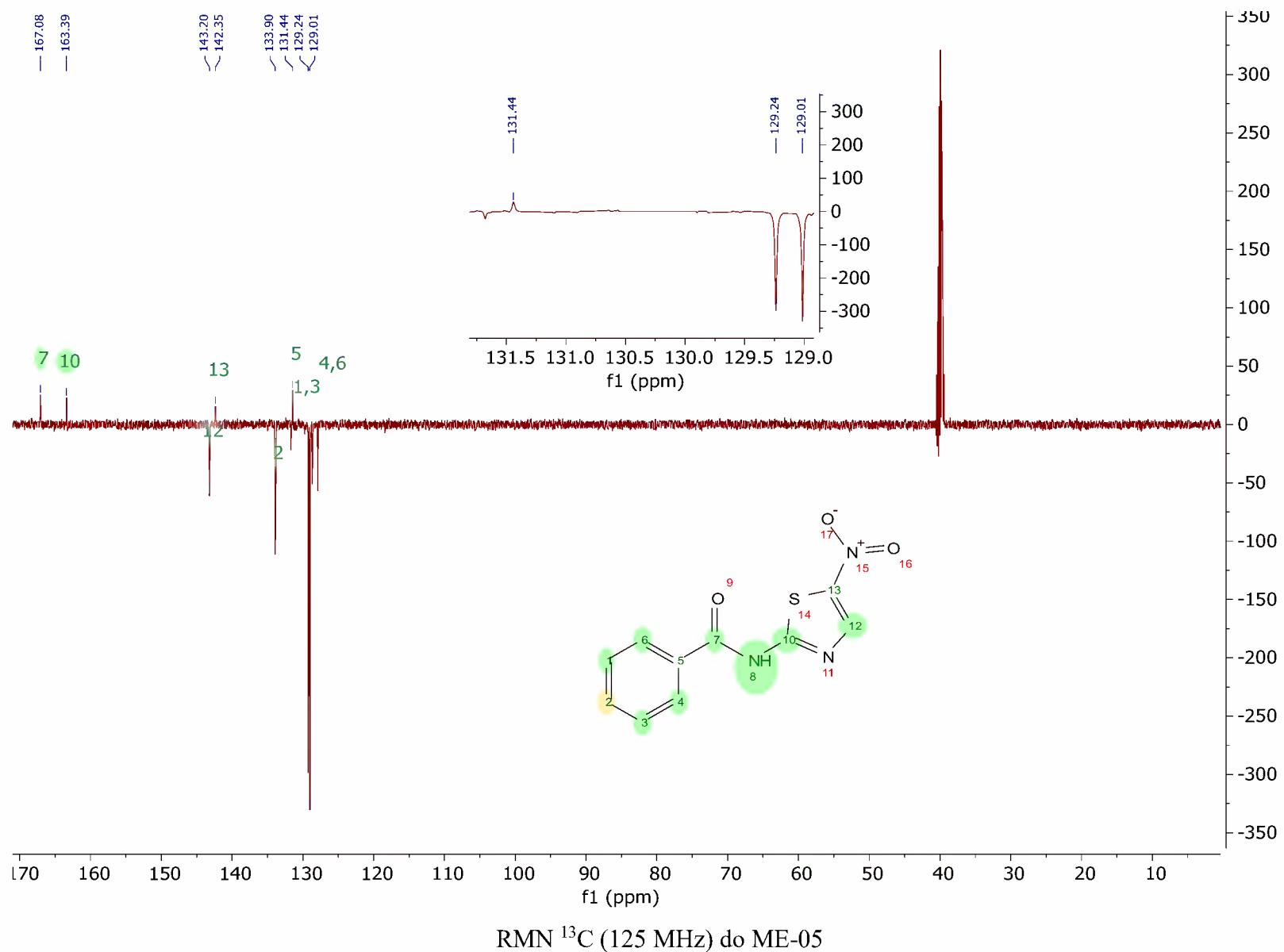


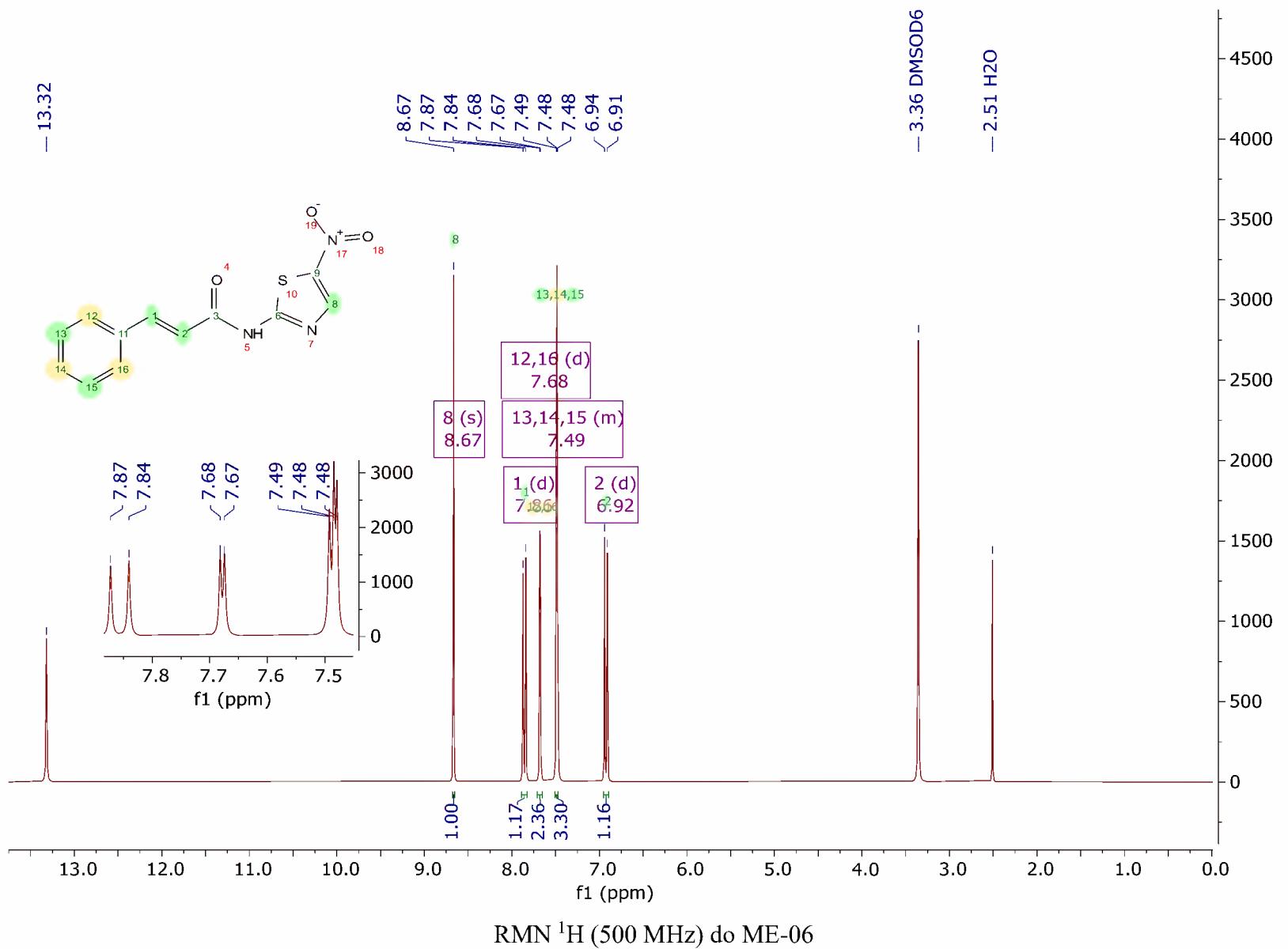


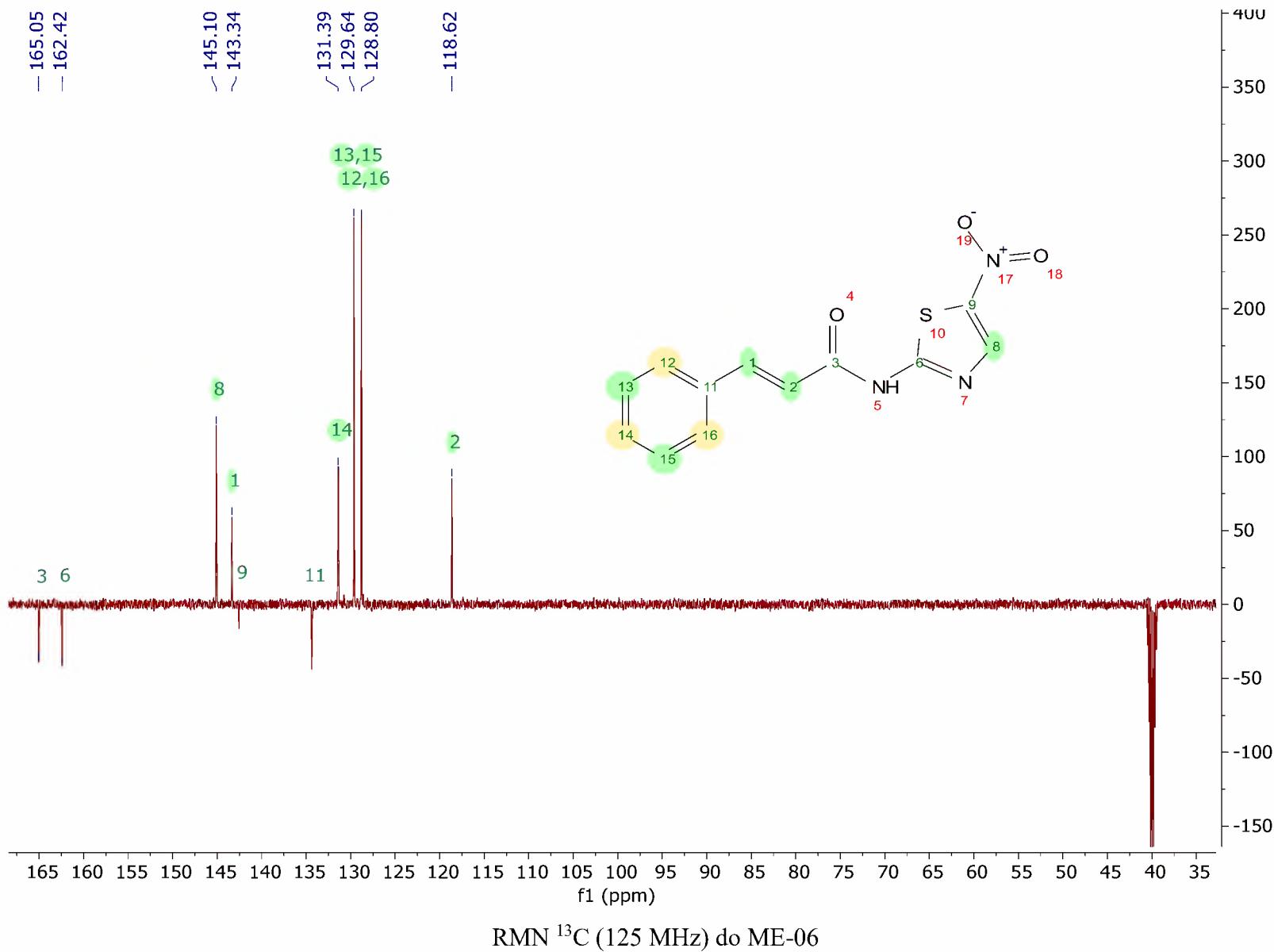
RMN ^1H (500 MHz) do ME-04

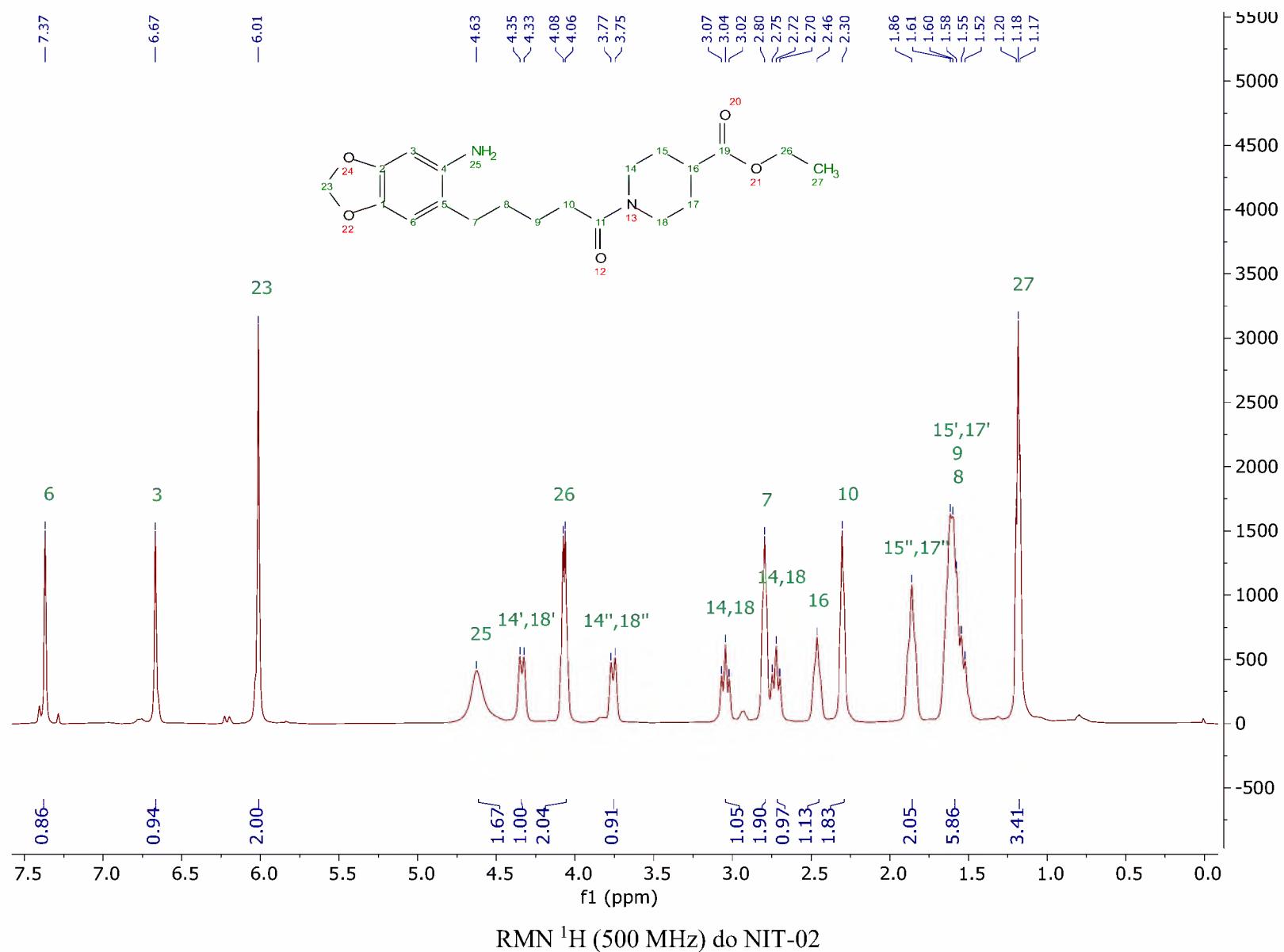


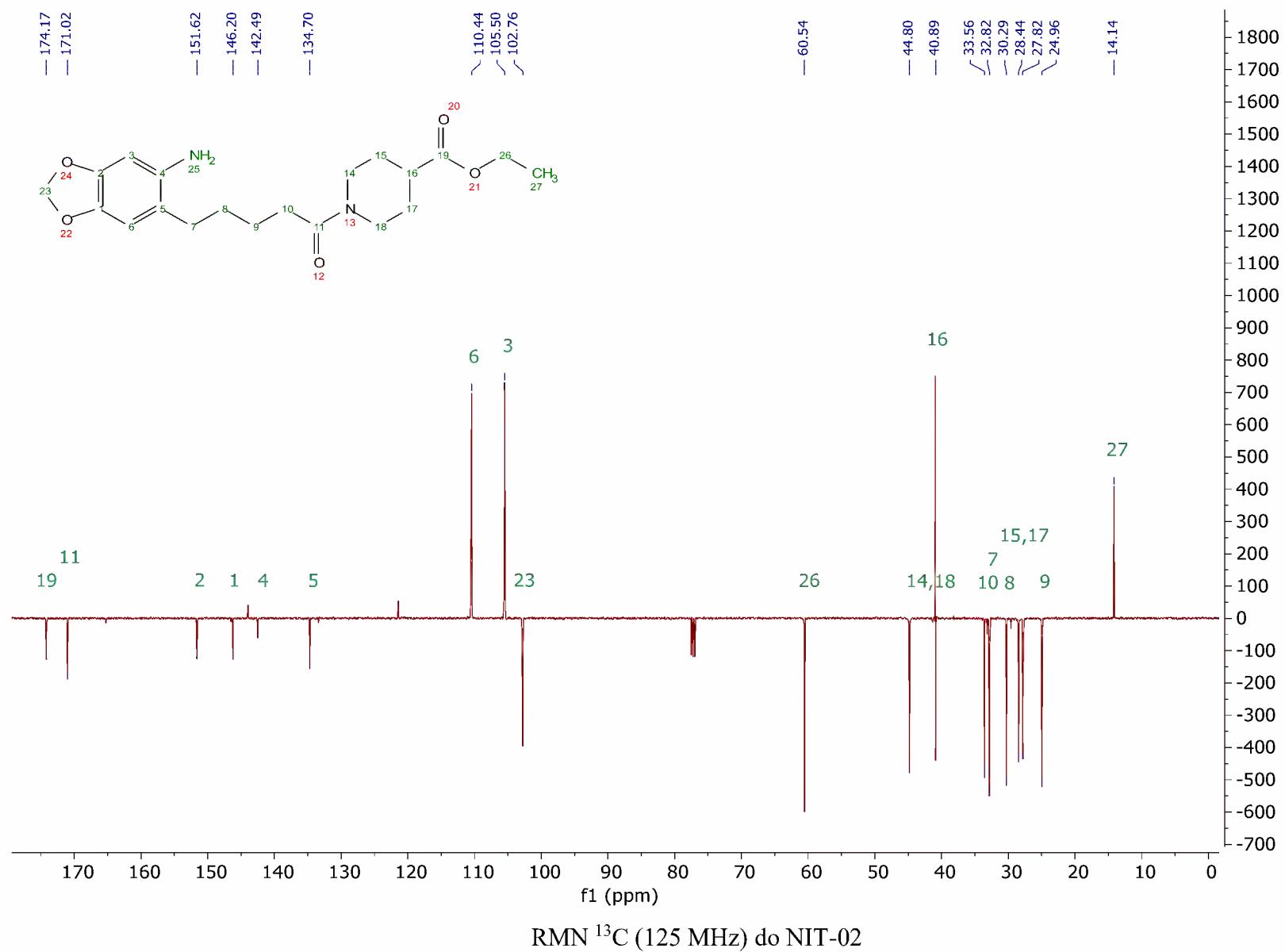


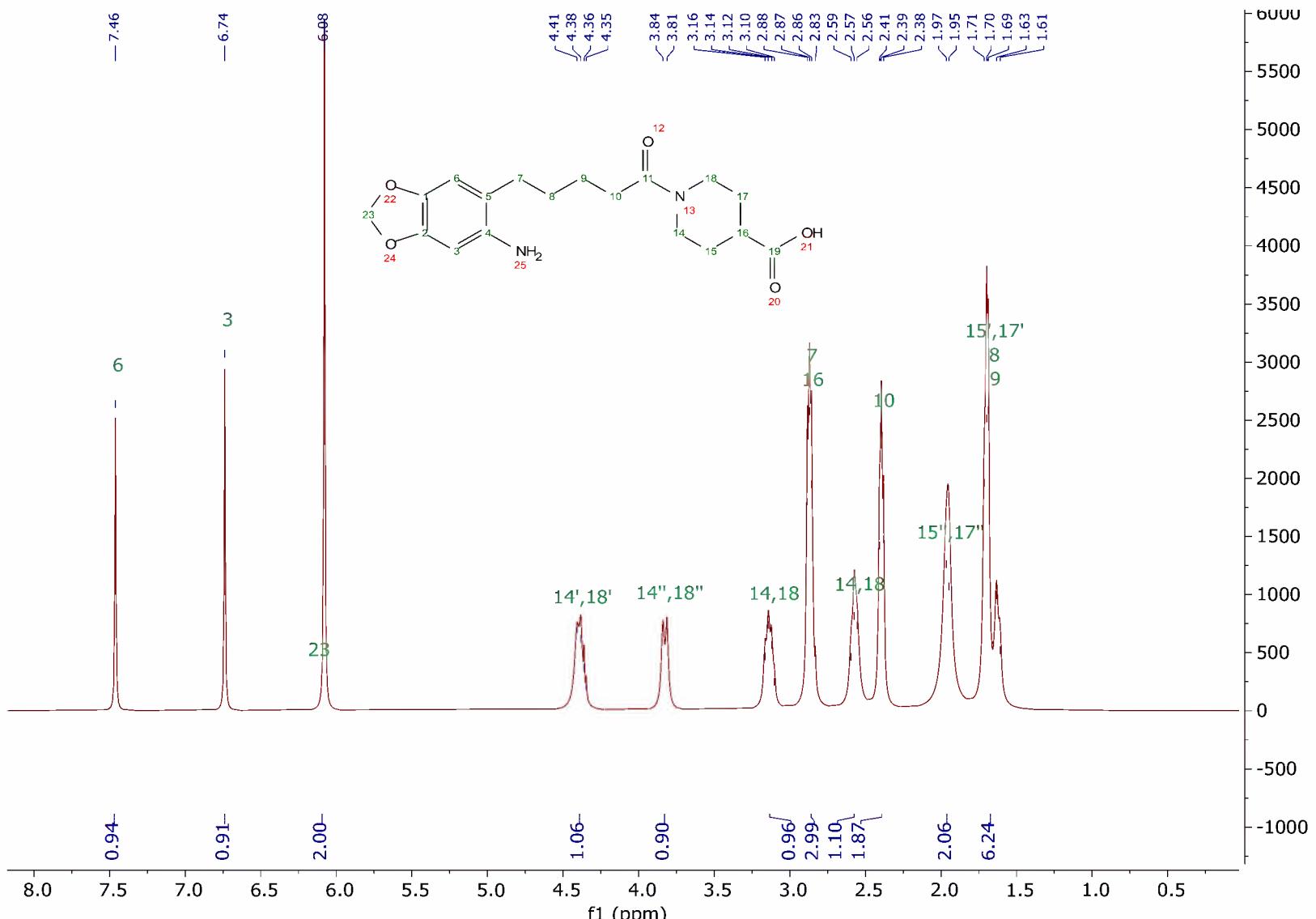


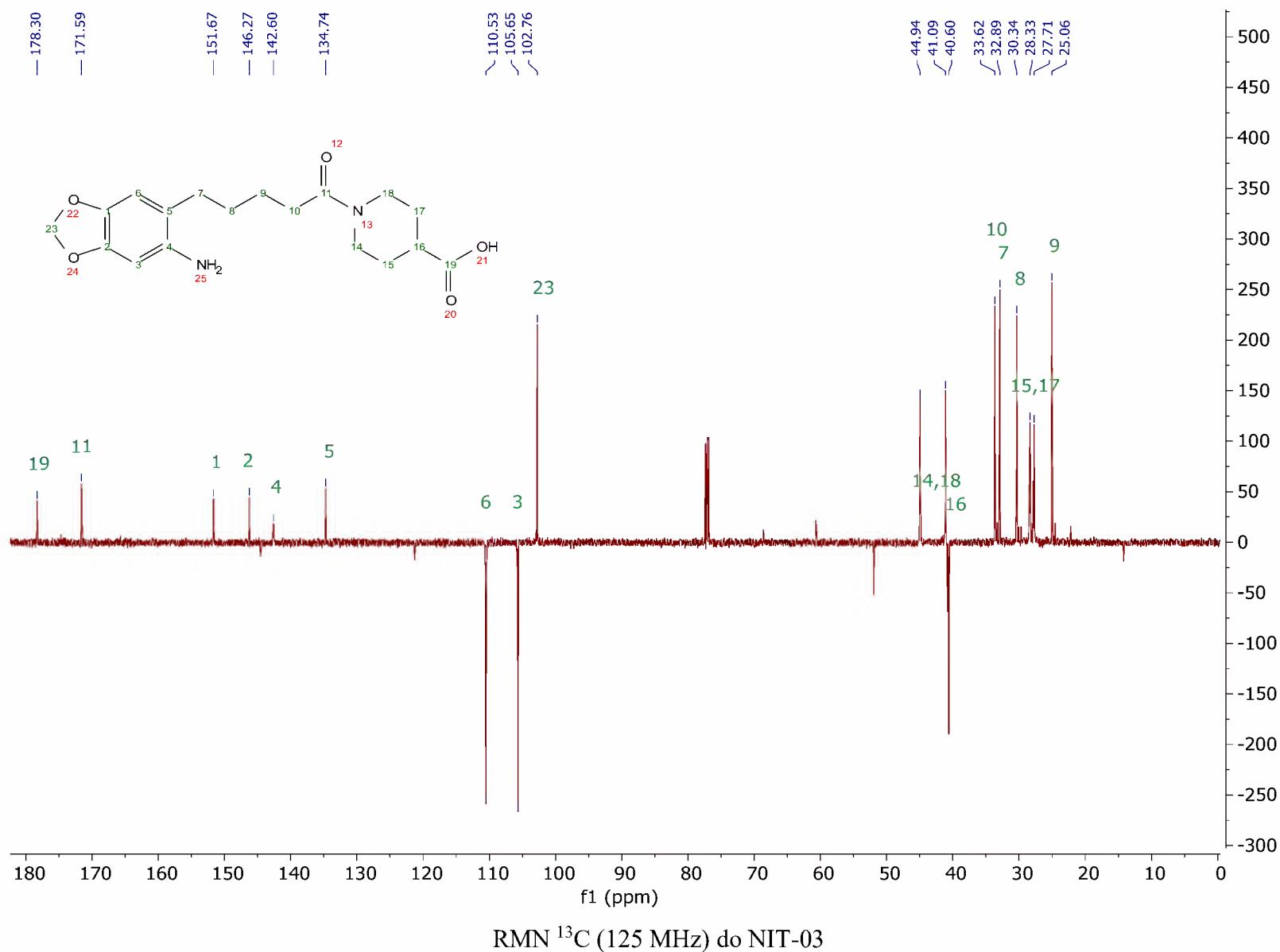


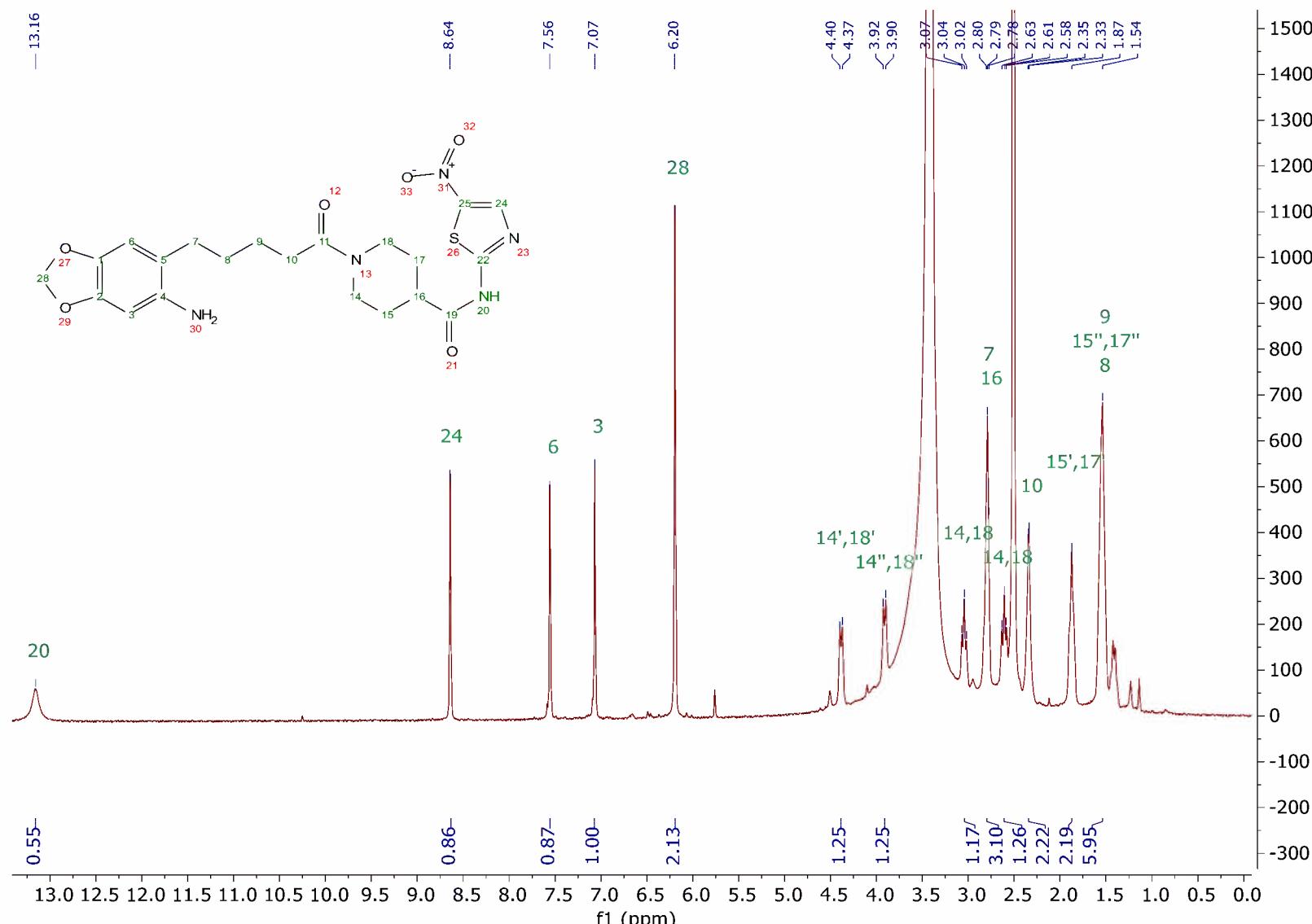




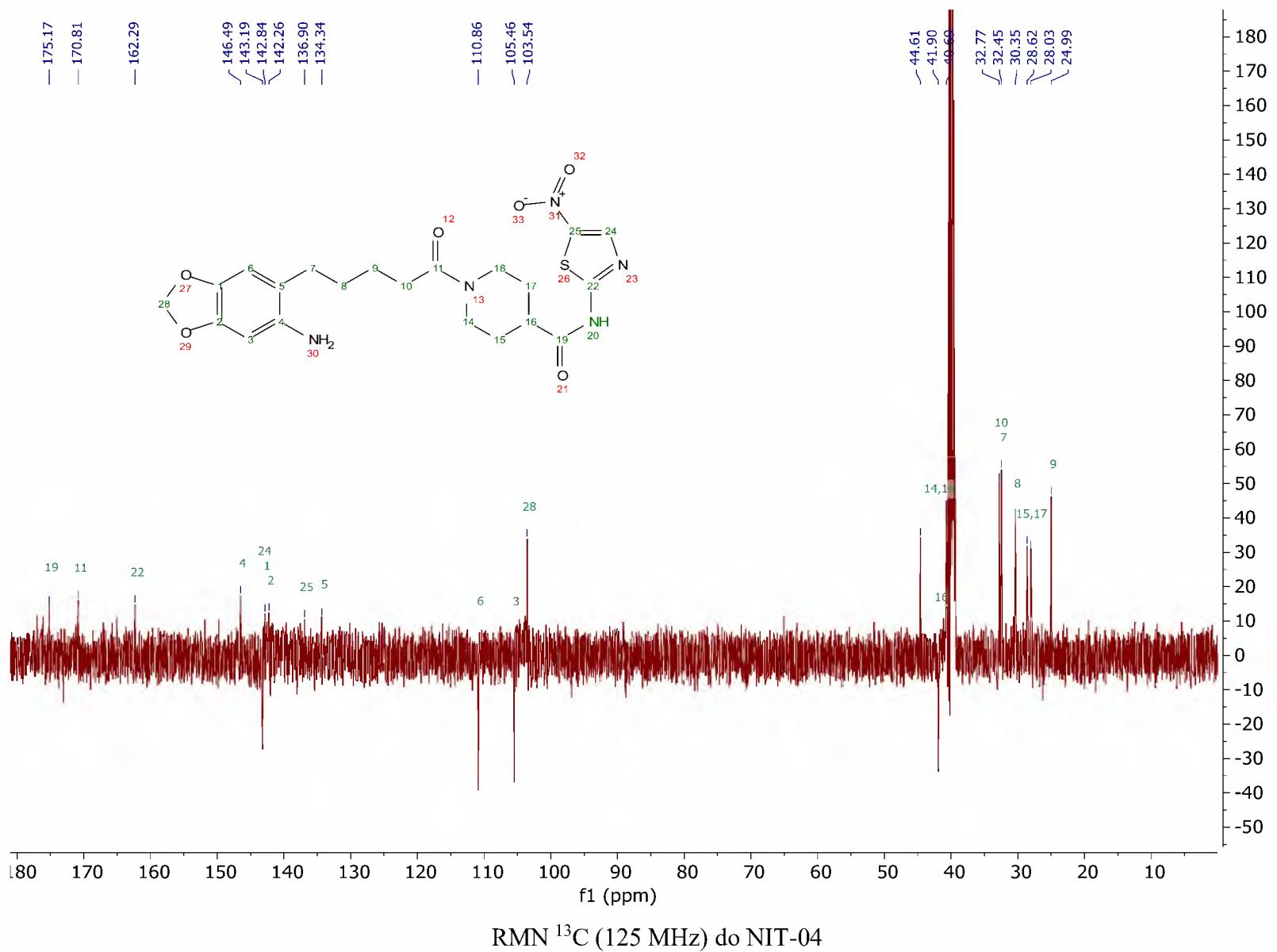


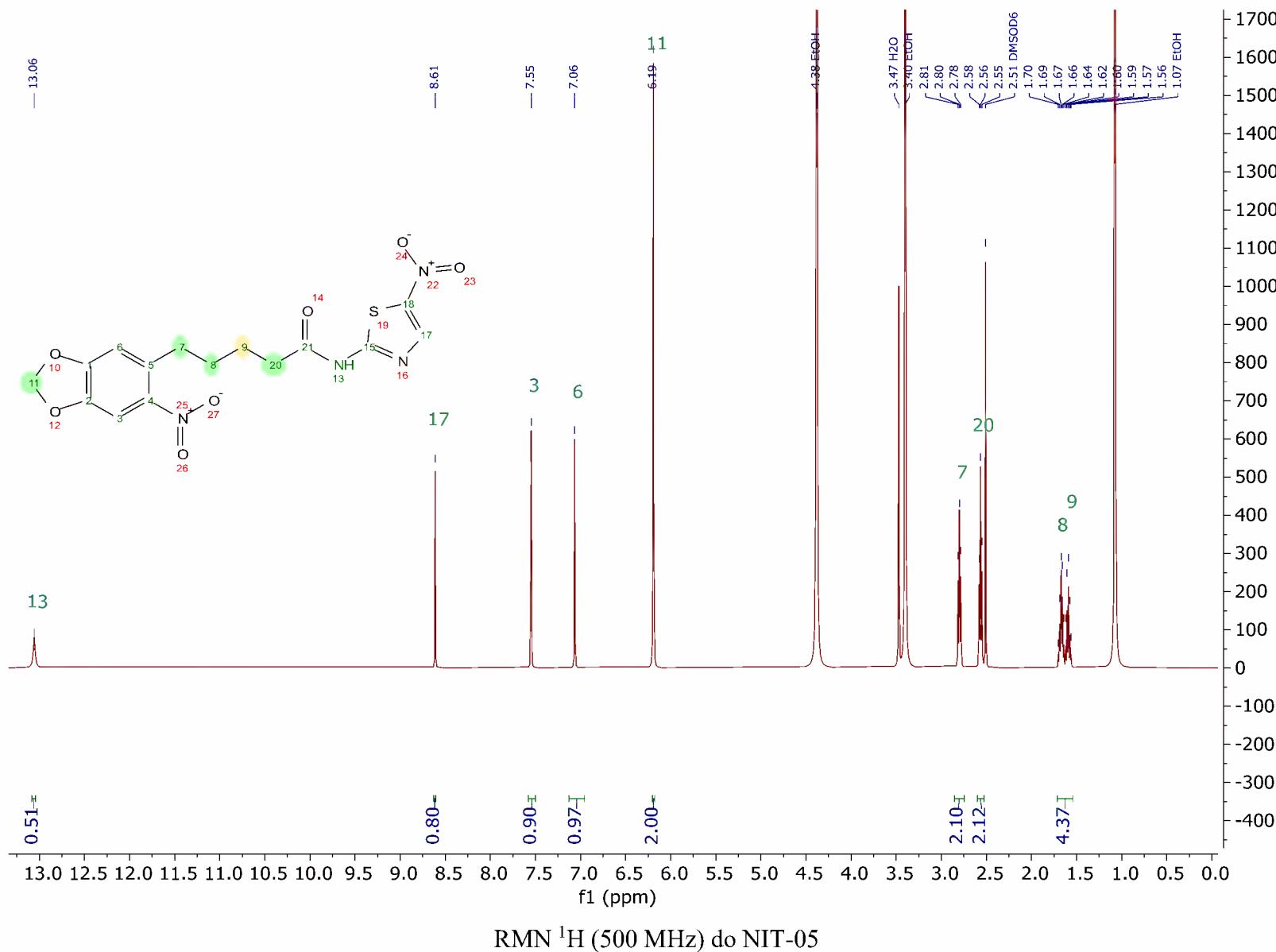


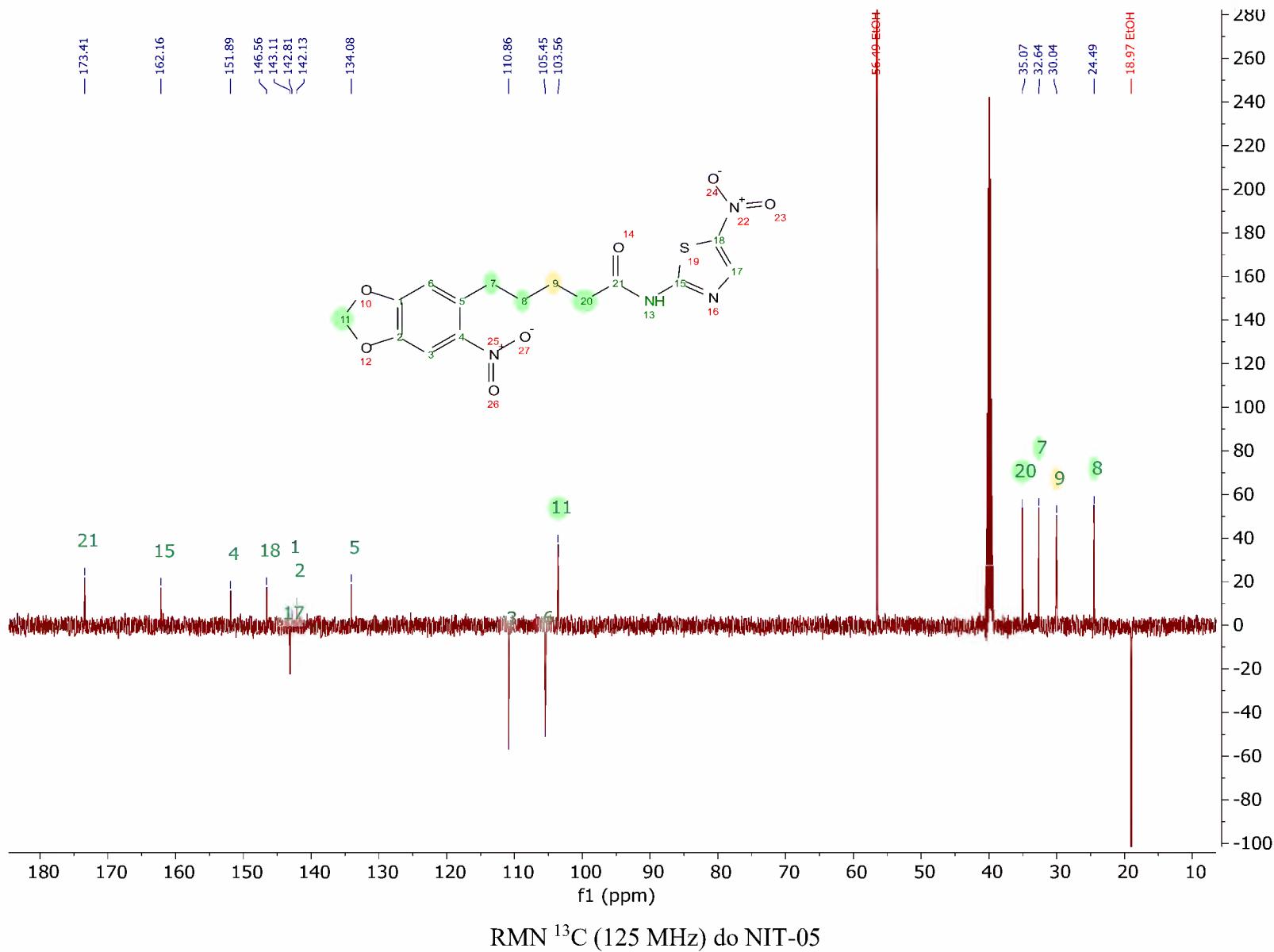




RMN ^1H (500 MHz) do NIT-04







7.2. ANEXO II – LC-MS E GRÁFICOS DE DOSE RESPOSTA



SHIMADZU
LabSolutions

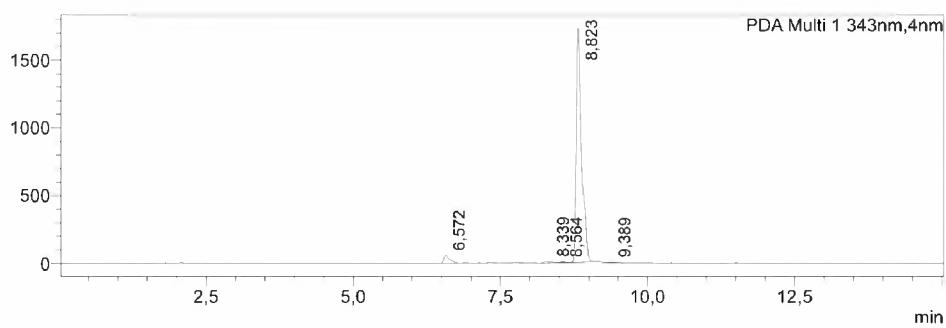
Analysis Report

<Sample Information>

A: H₂O (0,1% Ác.Fórmico) ; B: ACN (0,1% Ác.Fórmico)
 10,00 Pumps B.Conc 95
 13,00 Pumps B.Conc 95
 14,00 Pumps B.Conc 5
 15,00 Controller Stop

ESI (+)C:\LabSolutions\Data\Afonso Sample Name : LOP-4
 Sample ID : LOP-4
 Data Filename : LOP-4.lcd
 Method Filename : scan-5-95.lcm
 Batch Filename : Batch 1.lcb
 Vial # : 2 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 10 uL Acquired by : System Administrator
 Date Acquired : 05/01/2024 15:56:50 Processed by : System Administrator
 Date Processed : 05/01/2024 16:11:53

mAU

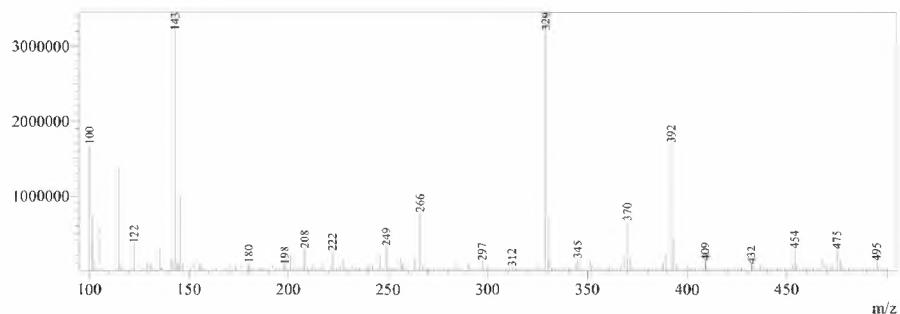


Peak Table

PDA Ch1 343nm						
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Area%	Height%
1	6,572	380651	58500	3,399	3,399	3,238
2	8,339	87381	9851	0,780	0,780	0,545
3	8,564	36894	7211	0,329	0,329	0,399
4	8,823	10684469	1728194	95,396	95,396	95,666
5	9,389	10730	2724	0,096	0,096	0,151
Total		11200125	1806480		100,000	100,000

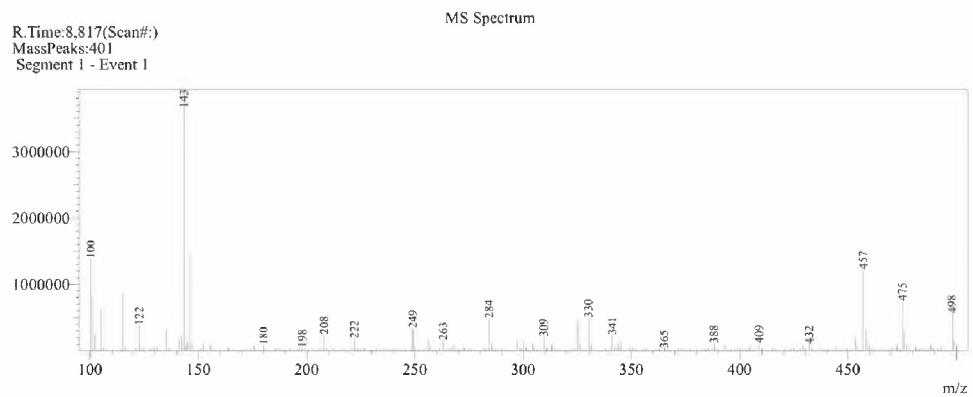
MS Spectrum

R.Time:6,567(Scan#:
 MassPeaks:398
 Segment 1 - Event 1



C:\LabSolutions\Data\Afonso\05-01-24\LOP-4.lcd

Análise LC-MS do LOP-04 (pg. 1)



C:\LabSolutions\Data\Afonso\05-01-24\LOP-4.lcd

Análise LC-MS do LOP-04 (pg. 2)



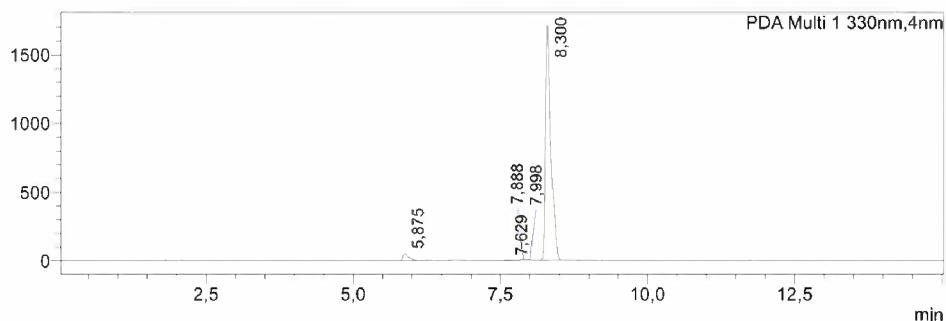
SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

<Sample Information>

A: H₂O (0,1% Ác.Fórmico) ; B: ACN (0,1% Ác.Fórmico)
 10,00 Pumps B.Conc 95
 13,00 Pumps B.Conc 95
 14,00 Pumps B.Conc 5
 15,00 Controller Stop

ESI (+)C:\LabSolutions\Data\Afonso Sample Name : LOC-4
 Sample ID : LOC-4
 Data Filename : LOC-4.lcd
 Method Filename : scan-5-95.lcm
 Batch Filename : Batch 1.lcb
 Vial # : 1 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 10 μ L
 Date Acquired : 05/01/2024 15:40:46 Acquired by : System Administrator
 Date Processed : 05/01/2024 15:55:49 Processed by : System Administrator

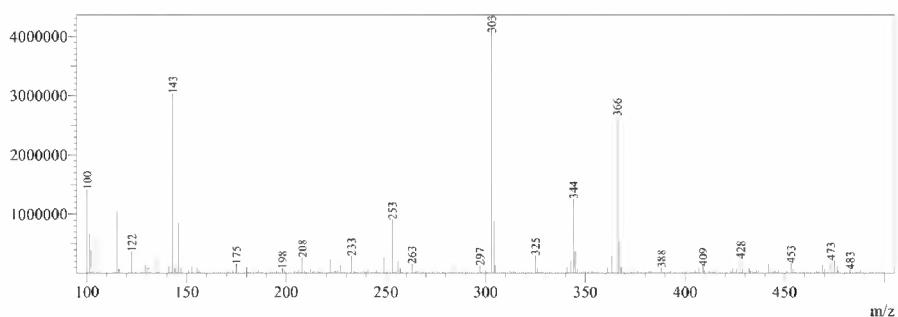
mAU



PDA Ch1 330nm							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Area%	Height%	
1	5,875	353839	52750	3,129	3,129	2,957	
2	7,629	26662	4323	0,236	0,236	0,242	
3	7,888	81293	13330	0,719	0,719	0,747	
4	7,998	11820	3438	0,105	0,105	0,193	
5	8,300	10833443	1710325	95,811	95,811	95,861	
Total		11307057	1784165		100,000	100,000	

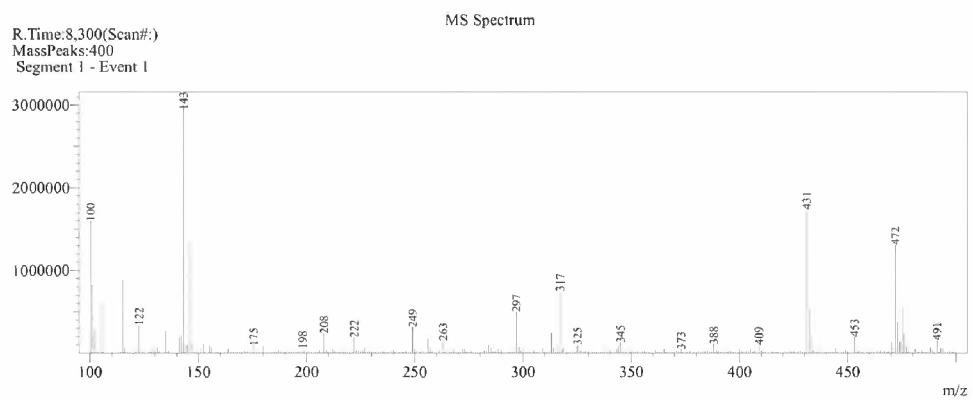
MS Spectrum

R.Time:5,867(Scan#:
 MassPeaks:401
 Segment 1 - Event 1



C:\LabSolutions\Data\Afonso\05-01-24\LOC-4.lcd

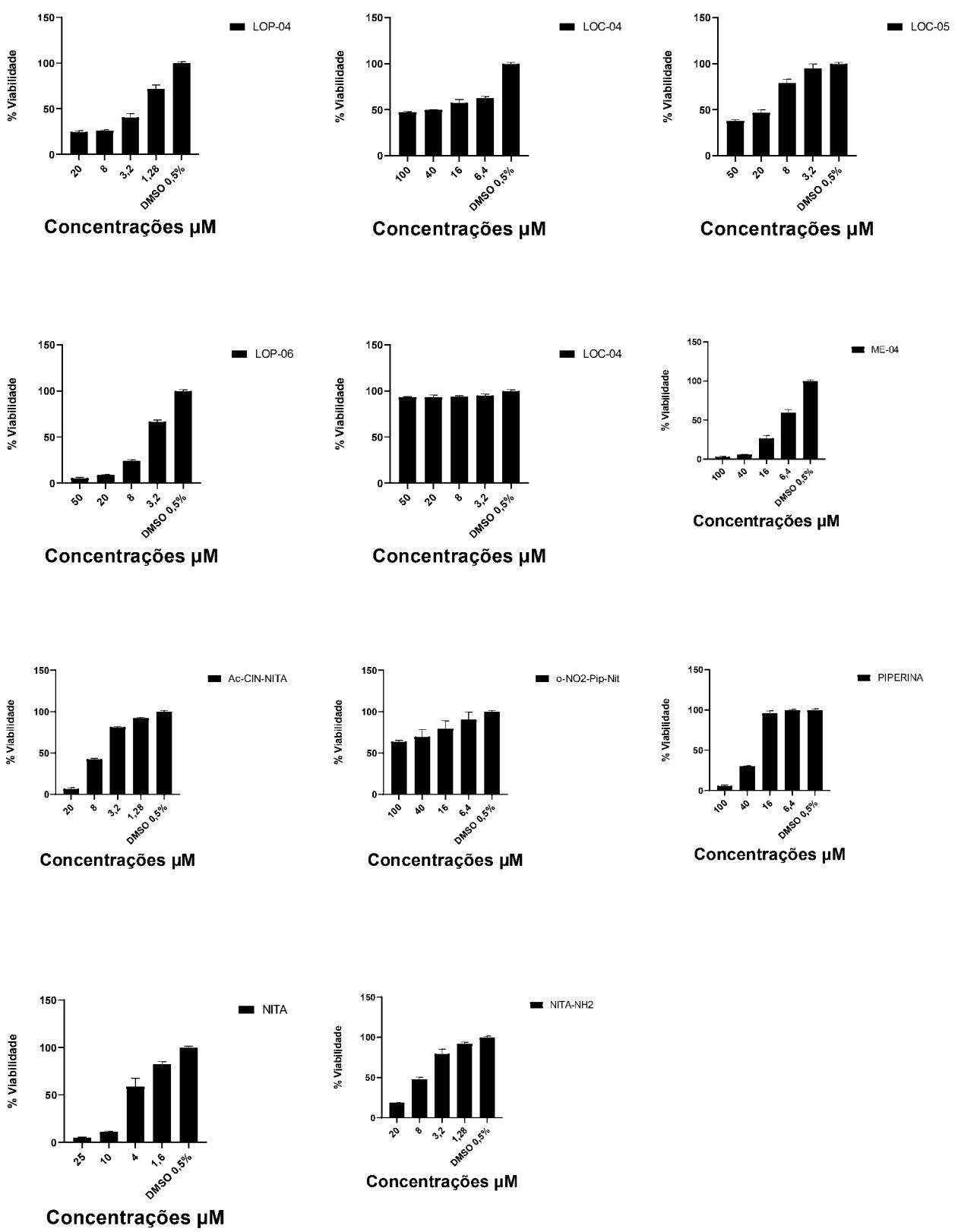
Análise LC-MS do LOC-04 (pg. 1)



C:\LabSolutions\Data\Afonso\05-01-24\LOC-4.lcd

Análise LC-MS do LOC-04 (pg. 2)

d



Gráficos de inibição dos compostos frente a amastigotas de *T. cruzi* 120h.

