





UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**UTILIZAÇÃO DA PIPERINA COMO PROTÓTIPO NA SÍNTESE DE
NOVOS ANTI-CHAGÁSICOS DA CLASSE DAS
1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINAS**

WELISSON DA SILVA FERREIRA

Sob a orientação dos Professores

Dr. Marco Edilson Freire de Lima (Orientador)

Dr^a. Aurea Echevarria (Co-Orientadora)

Dissertação submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em
Química Orgânica, na área de concentração de
Síntese Orgânica.

Seropédica, RJ

Julho de 2006

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

WELISSON DA SILVA FERREIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em Química Orgânica, na área de concentração de Síntese Orgânica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ___ / ___ / ___

**Prof. Marco Edílson Freire de Lima (Dep. de Química/ICE/UFRRJ)
(Orientador e Presidente)**

**Prof^a. Aurea Echevarria (Dep. De Química/ICE/UFRRJ)
(Co-Orientadora)**

Prof^a. Wanda Pereira Almeida (Fac. Ciências Médicas/ UNICAMP)

Prof. Marcos André Vannier dos Santos (CPQGM/FIOCRUZ-BA)

**Prof. Carlos Maurício Rabello de Sant'anna (Dep. Química/ICE/UFRRJ)
(Membro Suplente)**

Agradeço e dedico este trabalho a DEUS, aos meus queridos pais Rodmildo de Abreu Ferreira e Evanilda da Silva, à minha irmã Andreize da Silva Ferreira e meu sobrinho Andrews Ferreira Barroco.

... isso é coisa, isso é coisa, isso é coisa...

Seu assunto principal é falar mal

Onde você vai chegar assim? Aonde vai?

Seu assunto principal é falar mal da vida alheia, mas isso é coisa feia.

Isso é coisa feia.

Antes, antes, antes de julgar mal, porque não olha pra si mesmo.

Verá que está cometendo maior ou mesmo erro.

*Onde você vai chegar assim? Aonde vai? Pontando história sem fim, dele
e de mim.*

Seu assunto principal é falar mal da vida alheia, mas isso é coisa feia.

Isso é coisa feia.

*Julgando mal você gasta tempo e energia ao invés de levar a magia ao
irmão seu.*

Onde você vai chegar assim? Aonde vai?

Seu assunto principal é falar mal da vida alheia, mas isso é coisa feia.

Isso é coisa feia.

*Quando não souber o que falar não fale nada, então não venha me
ocupar apontando defeito dos outros, como se isso fosse normal,
julgando-se perfeito, isso em si é um defeito e você pode ver.*

*Todos nós temos uma infinidade, mas também temos qualidades que não
dá nem pra contar.*

Fala de fulano, fala de ciclano. Fala de fulano, fala de ciclano.

Fala de fulano, fala de beltrano.

"aonde vai chegar?"

(Donto de Equilíbrio)

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Marco Edilson Freire de Lima, que não deixou a desejar pela orientação, amizade e amadurecimento científico.

À Professora Aurea Echevarria pela Co-orientação deste trabalho, pelas sugestões e cessão do reagente 1,4-difeniltiossemicarbazida.

Aos amigos e irmãos do laboratório 48: Rodney, Breno, Nailton, Vitor, Planta, Roberto, Adriano, Ari, Luciano, Regina, Natália, Nazaret e Cleber, pela amizade e apoio científico.

À minha amiga e namorada Vanessa dos Santos Araújo, pelo incentivo, paciência e compreensão nas horas mais difíceis de conflito pessoal e profissional.

Aos Professores José Osvaldo e Lúcia Mendonça-Previato e alunos de Doutorado Victor Barbosa Saraiva e Leonardo Freire de Lima (IBCCF – UFRJ), pela colaboração na execução dos ensaios biológicos.

Aos Professores do PPGQO, João Batista, Carlos Mauricio, Mário Geraldo, Aurélio e Francisco pelo conhecimento adquirido durante todo meu curso de pós-graduação em química.

Às Professoras Luzineide Tinoco e Ana Paula Valente do Laboratório RMN – Instituto de Bioquímica Médica (UFRJ) pelos espectros de RMN (400/600 MHz).

Aos Professores Wanda Almeida Pereira (Dep. Farmacologia – UNICAMP) e Marcos Eberlin (IQ – UNICAMP) pelos espectros de massas, por inserção direta, dos cloridratos mesoiônicos obtidos neste trabalho.

Ao Professor Mário Geraldo de Carvalho (Dequim. – UFRuralRJ) por alguns espectros de RMN (200 MHz).

À Professora Rosane Nora Castro (Dequim. – UFRuralRJ) pelas discussões e sugestões dadas ao trabalho.

Aos amigos do alojamento M4-426: Deuci, Rodrigo, Maciel, Eduardo, André, Felipe, Carlos, Fabricio, Thiago e Flávio pela amizade e maravilhosa convivência.

Aos Professores, membros da banca examinadora, pela leitura crítica da dissertação e pelas sugestões dadas ao trabalho.

Ao CNPQ, pela bolsa concedida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade.

E principalmente a Deus e novamente a meus pais.

SUMÁRIO

ÍNDICE.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ESQUEMAS.....	x
LISTA DE ESPECTROS.....	xii
LISTA DE ABREVISTURAS E SÍMBOLOS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DO GENERO <i>PIPER</i>	2
1.2. OUTRAS AMIDAS NATURAIS RELACIONADAS À PIPERINA.....	3
1.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PIPERINA.....	5
1.4. BIOSÍNTESE DA PIPERINA.....	7
1.5. PRODUTOS NATURAIS (PN's) E A DESCOBERTA DOS FÁRMACOS.....	8
1.6. A IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS (PN's) EM SÍNTESE ORGÂNICA.....	13
1.7. TRABALHOS ENVOLVENDO MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NA PIPERINA.....	15
1.8. DOENÇA DE CHAGAS.....	19
1.8.1. TRATAMENTO.....	22
1.8.2. ALCALÓIDES ATIVOS EM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	24
1.9. MESOIÔNICOS.....	26
1.9.1. CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA.....	27
1.9.2. SÍNTESE DE COMPOSTOS DO SISTEMA 1,3,4-TIADIAZÓLIO-2- FENILAMINIDA E 1,3,4-TRIAZÓLIO-2-TIOLATO.....	29
1.9.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS MESOIÔNICOS.....	31
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....	34
3. ESTRATÉGIAS DE SÍNTESE.....	36
3.1. ESTRATÉGIAS PARA A SÍNTESE DOS NOVOS CLORETOS DE 1,3,4- TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINAS, DERIVADOS E ANÁLOGOS A AMIDA NATURAL (1).....	36
3.1.1. ESTRATÉGIA PARA A SÍNTESE DO CLORIDRATO MESOIÔNICO <u>62</u> , DERIVADO DA PIPERINA <u>1</u>	36
3.1.2. ESTRATÉGIAS PARA A SÍNTESE DE OUTROS CLORIDRATOS MESOIÔNICOS, DERIVADOS E ANÁLOGOS À PIPERINA <u>1</u>	37

3.2. ESTRATÉGIAS DE SÍNTESE DOS PRECURSORES ÁCIDOS, DERIVADOS E ANÁLOGOS À PIPERINA <u>1</u>, COM MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL.....	39
3.2.1. MODIFICAÇÃO DA CADEIA LATERAL.....	39
3.2.2. MODIFICAÇÃO DO ANEL AROMÁTICO.....	40
3.3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	41
3.3.1. ISOLAMENTO DA PIPERINA DOS FRUTOS SECOS DE <i>PIPER NIGRUM</i>	41
3.3.2. PREPARAÇÃO DOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS, INTERMEDIÁRIOS NA SÍNTESE DOS MESOIÔNICOS.....	43
3.3.2.1. HIDRÓLISE ALCALINA DA PIPERINA.....	43
3.3.2.2. SÍNTESE DO ÁCIDO CINÂMICO <u>71</u>	44
3.3.2.3. SÍNTESE DO ÁCIDO PIPERONÍLICO <u>70</u>	46
3.3.2.4. SÍNTESE DOS ÁCIDOS SATURADOS <u>63</u> E <u>73</u>	48
3.3.2.5. NITRAÇÃO DO ANEL AROMÁTICO PARA OS RESPECTIVOS ÁCIDOS CARBOXÍLICOS.....	50
3.3.3. SÍNTESE DOS CLORETO DE ÁCIDO.....	55
3.3.4. SÍNTESE DOS CLORIDRATOS MESOIÔNICOS MI À IX.....	56
3.4. TESTES BIOLÓGICOS : ATIVIDADE TRIPANOCIDA.....	65
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	68
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
5.1. INSTRUMENTAL UTILIZADO NAS CARACTERIZAÇÕES ESPECTROMÉTRICAS.....	69
5.2. NAS ANÁLISES, SÍNTESES E PURIFICAÇÕES.....	70
5.3. OUTROS EQUIPAMENTOS.....	70
5.4. ISOLAMENTO DA AMIDA PIPERIDINIL DO ÁCIDO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2(<i>E</i>)-4(<i>E</i>)-PENTADIENÓICO (PIPERINA) (<u>1</u>).....	71
5.5. PREPARAÇÃO DO ÁCIDO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2(<i>E</i>)-4(<i>E</i>)-PENTADIENÓICO (ÁCIDO PIPERÍNICO) (<u>60</u>).....	75
5.6. PREPARAÇÃO DO ÁCIDO 3-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2(<i>E</i>)-PROPENÓICO (ÁCIDO CINÂMICO) (<u>71</u>).....	79

5.7. PREPARAÇÃO DO ÁCIDO 3,4 METILENODIOXIBENZÓICO (ÁCIDO PIPERONÍLICO) (70)	83
5.8. PREPARAÇÃO DO ÁCIDO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL) PENTANÓICO (ÁCIDO TETRAIDROPIPERÍNICO) (63)	87
5.9. PREPARAÇÃO DO ÁCIDO 3-(3,4-METILENODIOXIFENIL) PROPANÓICO (ÁCIDO DIIDROGINÂMICO) (73)	91
5.10. PREPARAÇÃO DO 6-NITRO-3,4-METILENODIOXIBENZALDEIDO (6-NITROPIPERONAL) (85)	95
5.11. PREPARAÇÃO DO ÁCIDO 5-(6-NITRO-3,4-METILENODIOXIFENIL) PENTANÓICO (ÁCIDO 6-NITROTETRAIDROPIPERÍNICO) (64)	99
5.12. PREPARAÇÃO DO ÁCIDO 3-(6-NITRO-3,4-METILENODIOXIFENIL) PROPANÓICO (ÁCIDO 6-NITRODIIDROGINÂMICO) (74)	103
5.13. PREPARAÇÃO DO ÁCIDO 6-NITRO 3-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2(E)-PROPENÓICO (ÁCIDO 6-NITRO CINÂMICO) (72)	107
5.14. METODOLOGIAS APLICADAS PARA À SÍNTESE DOS CLORIDRATOS MESOIÔNICOS (M)	111
5.14.1. SÍNTESE DO CLORIDRATO MESOIÔNICO 62 - CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-1(E)-3(E)-BUTADIENIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MI)	112
5.14.2. SÍNTESE DO CLORIDRATO MESOIÔNICO 81 - CLORETO DE 4-FENIL-5-[2-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-(E)-ETENIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MII)	116
5.14.3. SÍNTESE DO CLORIDRATO MESOIÔNICO 80 - CLORETO DE 4-FENIL-5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MIII)	120
5.14.4. SÍNTESE DO CLORIDRATO MESOIÔNICO 67 - CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-BUTIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MIV)	124
5.14.5. SÍNTESE DO CLORIDRATO MESOIÔNICO 83 - CLORETO DE 4-FENIL-5-[2-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-ETIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MV)	129

5.14.6. SÍNTESE DO CLORIDRATO MESOIÔNICO <u>68</u> - CLORETO DE 4-FENIL-5-[4-(6-NITRO-3,4-METILENODIOXIFENIL)-BUTIL]-1, 3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MVII).....	132
5.14.7. SÍNTESE DO CLORIDRATO MESOIÔNICO <u>84</u> - CLORETO DE 4-FENIL-5-[2-(6-NITRO-3,4-METILENODIOXIFENIL)-ETIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MVIII).....	136
5.14.8. SÍNTESE DO CLORIDRATO MESOIÔNICO <u>82</u> - CLORETO DE 4-FENIL-5-[2-(6-NITRO-3,4-METILENODIOXIFENIL)-(E)-ETENIL]-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MIX).....	140
5.14.9. SÍNTESE DO CLORIDRATO MESOIÔNICO <u>80</u> - CLORETO DE 4-FENIL-5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MIII).....	144
5.14.10. SÍNTESE DO CLORIDRATO MESOIÔNICO <u>86</u> - CLORETO DE 4-FENIL-5-(6-NITRO-3,4-METILENODIOXIFENIL)-1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-FENILAMINA (MVI).....	145
5.15. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	149
5.15.1. PARASITAS.....	149
5.15.1.1. FORMAS EPIMASTIGOTAS.....	149
5.15.1.2. FORMAS TRIPOMASTIGOTAS.....	149
5.15.2. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	150
5.15.3. ATIVIDADE ANTI-EPIMASTIGOTA.....	150
5.15.4. CITOTOXICIDADE PARA MACROFAGOS MURINOS.....	151
5.15.4.1. TESTE DE EXCLUSÃO DO AZUL DE TRYPAN.....	151
5.15.5. ATIVIDADE ANTI-TRIPOMASTIGOTA.....	152
5.15.6. ATIVIDADE ANTI-AMASTIGOTA.....	153
5.15.7. ATIVIDADE TRIPANOCIDA <i>IN VIVO</i> : PARASITEMIA EM CAMUNDONGOS BALB/C.....	155
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Piperina, principal constituinte químico de <i>Piper nigrum</i>	1
Figura 2: Área de cultivo da pimenta do reino.....	2
Figura 3: Alguns alcalóides amídicos isolados de espécies de <i>Piper</i>	4
Figura 4: Os primeiros fármacos isolados de produtos naturais.....	9
Figura 5: Salicilatos que marcaram o desenvolvimento de fármacos no período de 1800-1900.....	10
Figura 6: Barbital, epinefrina, procaína, benzocaína e cocaína.....	11
Figura 7: Vimblastina, vincristina, etoposídeo, teniposídeo e taxol.....	12
Figura 8: Bacatina III, 10-desacetil-bacatina III e taxotere.....	13
Figura 9: Participação dos Produtos Naturais (PN's) no desenvolvimento de fármacos no período de 1981 a 2002.....	14
Figura 10: Estruturas químicas dos derivados que demonstraram maior efeito inibitório das oxidases estudadas.....	15
Figura 11: Amidas <i>N,N</i> -dissubstituídas que demonstraram maior atividade inseticida sobre <i>A. monuste orseis L.</i>	16
Figura 12: Exemplo de compostos modificados sinteticamente que apresentaram maiores atividades biológicas.....	16
Figura 13: Derivados e análogos que apresentaram maior atividade toxica ao <i>T. cruzi</i>	17
Figura 14: Derivados e análogos que apresentaram maior atividade tóxica contra o carcinoma de Ehrlich.....	18
Figura 15: Imagem do <i>Trypanosoma cruzi</i> em microscopia eletrônica.....	19
Figura 16: Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 17: Imagem de barbeiros, três gêneros diferentes.....	20
Figura 18. Distribuição geográfica da doença de Chagas.....	21
Figura 19: Fármacos de utilidade clínica reconhecida.....	22
Figura 20: Alcalóides com atividade tripanocida.....	25
Figura 21. Primeiro derivado mesoiônico, sintetizado por Fischer.....	26
Figura 22: Representações alternativas para os compostos mesoiônicos.....	27

Figura 23: Sequência de prioridade numérica para o heterociclo do tipo 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.....	28
Figura 24: Estruturas dos derivados da classe dos 1,3,4-tiadiazólios estudados.....	29
Figura 25: Rota sintética utilizada na preparação do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.....	29
Figura 26: Compostos mesoiônicos bioativos.....	32
Figura 27: Derivado 1,3,4-tiadiazólio com atividade antimelanoma.....	33
Figura 28: Extrator de Soxhlet acoplado à manta de aquecimento e condensador.....	41
Figura 29: Estrutura do cloridrato mesoiônico tomado como referência nas atribuições estruturais.....	59
Figura 30: Estruturas dos cloridratos mesoiônicos testados contra <i>T. cruzi</i>	66
Figura 31: Gráficos referentes à atividade anti-tripomastigota, em concentrações de viabilidade celular (macrófagos murinos).....	152
Figura 32: Efeito do MI sobre as formas amastigotas do <i>T. cruzi</i>	153
Figura 33: Toxicidade da molécula MI às formas amastigotas em diferentes concentrações.....	154
Figura 34: Parasitemia dos quatro grupos de animais tratados.....	155
Figura 35: Sobrevida dos quatro grupos de animais tratados.....	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas atividades farmacológicas exibidas por espécies do gênero <i>Piper</i>	3
Tabela 2: Valores de IC ₅₀ para a piperina e os derivados mais ativos contra a forma epimastigota e amastigota do <i>T. cruzi</i>	17
Tabela 3: Novas entidades químicas (NCEs) aprovadas entre 1975 e 1999 por classe de drogas.....	23
Tabela 4: Valores de IC ₅₀ (μM) dos cloridratos mesoiônicos sobre <i>L. amazonensis</i>	33
Tabela 6: Algumas absorções na região do infravermelho (IV) dos cloridratos mesoiônicos obtidos (MI – MIX) e o de referência MR	63
Tabela 7: Deslocamentos químicos de RMN ¹ H dos cloridratos mesoiônicos obtidos (MI – MIX) e o de referência MR	63
Tabela 8: Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C dos cloridratos mesoiônicos obtidos (MI – MIX) e o de referência MR	64
Tabela 9: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para a piperina <u>1</u>	74
Tabela 10: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para o ácido piperínico <u>60</u>	78
Tabela 11: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para o ácido cinâmico <u>71</u>	82
Tabela 12: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para o ácido piperonílico <u>70</u>	86
Tabela 13: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para o ácido tetraidropiperínico <u>63</u>	90
Tabela 14: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para o ácido diidrocinâmico <u>73</u>	94
Tabela 15: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para o 6-nitropiperonal <u>85</u>	98
Tabela 16: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para o ácido 6-nitrotetraidropiperínico <u>64</u>	102
Tabela 17: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para o ácido 6-nitrodiidrocinâmico <u>74</u>	106
Tabela 18: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para o ácido 6-nitrocinâmico <u>72</u>	110
Tabela 19: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para MI.....	115
Tabela 20: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para MII.....	109
Tabela 21: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para MIII.....	123
Tabela 22: Deslocamento químico de ¹ H e ¹³ C para MIV.....	127
Tabela 23: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para MV.....	131
Tabela 24: Deslocamentos químicos de ¹ H e ¹³ C para MVII.....	135

Tabela 25: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para MVIII.....	139
Tabela 26: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para MIX.....	143
Tabela 27: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para MVI.....	148
Tabela 28: Valores de IC_{50} para piperina, derivados e benzonidazol frente a diferentes formas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	151

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Proposta biossintética para a formação da piperina.....	7
Esquema 2: Diferentes rotas sintéticas para os sistemas 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina e 1,3,4-triazóli-2-tiolato.....	30
Esquema 3: Reação de anidroacilação com aldeído aromático	30
Esquema 4: Estratégia sintética para a preparação do novo derivado 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (62) a partir da amida natural 1	36
Esquema 5: Estratégia sintética para a preparação de outros derivado 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (67 e 68) a partir do ácido 60 , derivado da piperina 1	37
Esquema 6: Estratégia sintética para a preparação dos derivados 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina análogos à amida natural (1) a partir do piperonal 69	38
Esquema 7: Estratégia sintética para a preparação dos derivados 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina análogos a amida natural (1) a partir de aldeídos aromáticos (69 e 85).....	39
Esquema 8: Proposta de fragmentação para a piperina 1	42
Esquema 9: Hidrólise básica da piperina 1	43
Esquema 10: Proposta de fragmentação para o ácido piperínico 60	44
Esquema 11: Mecanismo da reação de Knoevenagel.....	45
Esquema 12: Proposta de fragmentação para o ácido cinâmico 71	46
Esquema 13: Oxidação do piperonal 69	46
Esquema 14: Proposta de fragmentação para o ácido piperonílico 70	47
Esquema 15: Reação de redução catalítica dos ácidos 63 e 73	48
Esquema 16: Proposta de fragmentação para o ácido tetraidropiperínico 63	49
Esquema 17: Proposta de fragmentação para o ácido diidrcinâmico 73	49
Esquema 18: Nitração do anel aromático.....	50
Esquema 19: Proposta de fragmentação para o 6-nitropiperonal 69	51
Esquema 20: Proposta de fragmentação para o ácido 6-nitrotetraidropiperínico 64	52
Esquema 21: Proposta de fragmentação para o ácido 6-nitrodiidrocinâmico 74	53
Esquema 22: Proposta de fragmentação para o ácido 6-nitrocinâmico 72	54
Esquema 23: Síntese dos cloretos de acila.....	55
Esquema 24: Mecanismo de formação dos cloretos de acila utilizando cloreto de oxalila....	56

Esquema 25: Reação de anidroacilação com cloretos de ácido.....	57
Esquema 26: Reação de anidroacilação com aldeídos aromáticos.....	57
Esquema 27. Preparação dos cloridratos mesoiônicos através da reação de anidroacilação.....	58
Esquema 28. Preparação dos derivados MVI e MIII , a partir dos respectivos aldeídos.....	58
Esquema 29: Proposta de fragmentação para o derivado MI	60
Esquema 30: Proposta de fragmentação para o derivado MII	61
Esquema 31: Proposta de fragmentação para o derivado MIII	62

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de IV da piperina 1	72
Espectro 2: Espectro de massas da piperina 1	72
Espectro 3: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da piperina 1	73
Espectro 4: Espectro de RMN ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) da piperina 1	73
Espectro 5: Espectro de IV do ácido piperínico 60	76
Espectro 6: Espectro de massas do ácido piperínico 60	76
Espectro 7: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃ e CD ₃ OD) do ácido piperínico 60	77
Espectro 8: Espectro de RMN ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃ e CD ₃ OD) do ácido piperínico 60	77
Espectro 9: Espectro de IV do ácido cinâmico 71	80
Espectro 10: Espectro de massas do ácido cinâmico 71	80
Espectro 11: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CD ₃ OD) do ácido cinâmico 71	81
Espectro 12: Espectro de RMN ¹³ C (200 MHz, CD ₃ OD) do ácido cinâmico 71	81
Espectro 13: Espectro de IV do ácido piperonílico 70	84
Espectro 14: Espectro de massas do ácido piperonílico 70	84
Espectro 15: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CD ₃ OD) do ácido piperonílico 70	85
Espectro 16: Espectro de RMN ¹³ C (200 MHz, CD ₃ OD) do ácido piperonílico 70	85
Espectro 17: Espectro de IV do ácido tetraidropiperínico 63	88
Espectro 18: Espectro de massas do ácido tetraidropiperínico 63	88
Espectro 19: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) do ácido tetraidropiperínico 63	89
Espectro 20: Espectro de RMN ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do ácido tetraidropiperínico 63	89
Espectro 21: Espectro de IV do ácido diidrocinâmico 73	92
Espectro 22: Espectro de massas do ácido diidrocinâmico 73	92
Espectro 23: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) do ácido diidrocinâmico 73	93
Espectro 24: Espectro de RMN ¹³ C (200 MHz, CDCl ₃) do ácido diidrocinâmico 73	93
Espectro 25: Espectro de IV do 6-nitropiperonal 85	96
Espectro 26: Espectro de massas do 6-nitropiperonal 85	96
Espectro 27: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do 6-nitropiperonal 85	97
Espectro 28: Espectro de RMN ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) do 6-nitropiperonal 85	97
Espectro 29: Espectro de IV do ácido 6-nitrotetraidropiperínico 64	100

Espectro 30: Espectro de massas do ácido 6-nitrotetraidropiperínico <u>64</u>	100
Espectro 31: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CD ₃ OD) do ácido 6-nitrotetraidropiperínico <u>64</u>	101
Espectro 32: Espectro de RMN ¹³ C (200 MHz, CD ₃ OD) do ácido 6-nitrotetraidropiperínico <u>64</u>	101
Espectro 33: Espectro de IV do ácido 6-nitrodiidrocinâmico <u>74</u>	104
Espectro 34: Espectro de massas do ácido 6-nitrodiidrocinâmico <u>74</u>	104
Espectro 35: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CD ₃ OD) do ácido 6-nitrodiidrocinâmico <u>74</u>	105
Espectro 36: Espectro de RMN ¹³ C (200 MHz, CD ₃ OD) do ácido 6-nitrodiidrocinâmico <u>74</u>	105
Espectro 37: Espectro de IV do ácido 6-nitrocinâmico <u>72</u>	108
Espectro 38: Espectro de massas do ácido 6-nitrocinâmico <u>72</u>	108
Espectro 39: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CD ₃ OD) do ácido 6-nitrocinâmico <u>72</u>	109
Espectro 40: Espectro de RMN ¹³ C (200 MHz, CD ₃ OD) do ácido 6-nitrocinâmico <u>72</u>	109
Espectro 41: Espectro de IV de MI	113
Espectro 42: Espectro de massas de MI	113
Espectro 43: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) de MI	114
Espectro 44: Espectro de RMN ¹³ C (400 MHz, DMSO-D ₆) de MI	114
Espectro 45: Espectro de IV de MII	117
Espectro 46: Espectro de massas de MII	117
Espectro 47: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO-D ₆) de MII	118
Espectro 48: Espectro de RMN ¹³ C (400 MHz, DMSO-D ₆) de MII	118
Espectro 49: Espectro de IV de MIII	121
Espectro 50: Espectro de massas de MIII	121
Espectro 51: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de MIII	122
Espectro 52: Espectro de RMN ¹³ C (400 MHz, CD ₃ OD) de MIII	122
Espectro 53: Espectro de IV de MIV	125
Espectro 54: Espectro de massas de MIV	125

Espectro 55: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de MIV	126
Espectro 56: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) de MIV	126
Espectro 57: Espectro de IV de MV	129
Espectro 58: Espectro de massas de MV	129
Espectro 59: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) de MV	130
Espectro 60: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD) de MV	130
Espectro 61: Espectro de IV de MVII	133
Espectro 62: Espectro de massas de MVII	133
Espectro 63: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) de MVII	134
Espectro 64: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, DMSO-D_6) de MVII	134
Espectro 65: Espectro de IV de MVIII	137
Espectro 66: Espectro de massas de MVIII	137
Espectro 67: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO-D_6) de MVIII	138
Espectro 68: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, DMSO-D_6) de MVIII	138
Espectro 69: Espectro de IV de MIX	141
Espectro 70: Espectro de massas de MIX	141
Espectro 71: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) de MIX	142
Espectro 72: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO-D_6) de MIX	142
Espectro 73: Espectro de IV de MVI	146
Espectro 74: Espectro de massas de MVI	146
Espectro 75: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-D_6) de MVI	147
Espectro 76: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, DMSO-D_6) de MVI	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

arom. = aromático

BHI = Infusão de cérebro e coração

CCF = Cromatografia de Camada Fina

d = **d**ubleto

dd = **d**uplo **d**ubleto

ddd = **d**uplo **d**uplo **d**ubleto

DP = **D**esvio **P**adrão

HEPES = ácido 2-**H**idróxi-**E**til-**P**iperazina-**E**tano-**S**ulfônico

IC₅₀ = **C**oncentração **I**nibitória de 50%

IV = **I**nfra**V**ermelho

J = constante de acoplamento

m = **m**ultipleto

m/z = razão massa-carga

PBS = Solução Tampão de Fosfato

Pf = **P**onto de **F**usão

Ph = fenil

ppm = **p**arte **p**or **m**ilhão

q = **q**uarteto

qui = **q**uinteto

RMN ¹H = **R**essonância **M**agnética **N**uclear de **H**idrogênio

RMN ¹³C = **R**essonância **M**agnética **N**uclear de **C**arbono 13

s = **s**inglete

sl = **s**inglete **l**argo

SFB = **S**oro **F**etal **B**ovino

t = **t**ripleto

t.a. = **t**emperatura **a**mbiente

UV = **U**ltra **V**ioleta

v = **v**estramento

σ = **d**obramento

RESUMO

Este trabalho se insere numa linha de pesquisa que visa a utilização de produtos naturais abundantes e acessíveis na síntese de novas moléculas com potencial atividade anti-chagásica. A piperina, amida majoritária de *Piper nigrum*, pode ser isolada dos frutos secos da planta em rendimentos de até 7%. Estudos recentes em nosso laboratório demonstraram a atividade antiparasitária da piperina e de uma série de derivados e análogos sobre o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. A literatura também relata resultados sobre a atividade tóxica de cloridratos mesoiônicos, da classe dos 1,3,4-tiadiazóis-2-fenilaminidas, contra *Leishmania amazonensis*, parasita da mesma família do *T. cruzi* (Trypanosomatidae). Descrevemos aqui a síntese e a caracterização de 9 novos derivados da classe dos 1,3,4-tiadiazóis, derivados e análogos da piperina, bem como a avaliação da atividade tóxica destes contra as várias formas evolutivas do *T. cruzi* e frente à célula hospedeira (macrófagos murinos). Os resultados obtidos na avaliação biológica evidenciaram o cloridrato do mesoiônico **MI** (Cloreto de 4-fenil-5-[4-(3,4-metilenodioxifenil)-1(*E*)-3(*E*)-butadienil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina) como aquele com melhor perfil de atividade. Nos ensaios *in vivo* **MI** apresentou atividade comparável ao fármaco benzonidazol.

Os resultados obtidos evidenciam **MI** como um novo protótipo para o desenvolvimento de um novo agente quimioterápico, de elevada eficácia, aplicável ao tratamento da doença de Chagas.

ABSTRACT

This work is part of a research project which investigates the utilization of abundant and accessible natural products in the synthesis of new molecules with potential activity against Chagas' disease. Recent studies carried out in our laboratory showed activity against *Trypanosoma cruzi* for piperine, a major component of *Piper nigrum* and for a series of its derivatives and analogues.

We herein describe the synthesis and characterization of nine new 1,3,4-tiadiazolium-2-phenylaminides derived from piperine. We also evaluated their toxic effects against the various evolutive forms of *T. cruzi*, and also against the host cell (murine macrophages). These results obtained show that the mesoionic hydrochloride **MI** possesses the best activity profile. Furthermore, **MI** showed *in vivo* activity comparable to benzonidazole.

The results suggest **MI** may be a new prototype for use in the development of a new chemotherapeutic agent with high efficiency, which may be employed in the treatment of Chagas's disease.

We found in the literature results about the toxic effects of mesoionic hydrochlorides 1,3,4-tiadiazolium-2-phenylamine against *Leishmania amazonensis* (Tripanosomatideo)



1. Introdução

A amida natural piperina **1** (amida piperidinil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2*E*-4*E*-pentadienóico - **Figura 1**) é o principal constituinte químico de *Piper nigrum* (Piperaceae), ocorrendo em maior proporção nos frutos da planta (Semler e Gross, 1988). *Piper nigrum* (popularmente conhecida como pimenta do reino) tem seu uso bastante difundido na medicina popular da Índia, país de onde é originária, sendo que no Brasil, seu principal uso é como condimento. Apesar de ser considerada aqui uma planta exótica, o Brasil é um dos grandes produtores mundiais de pimenta do reino, destacando-se como principais produtores os estados do Pará e Espírito Santo (<http://www.agecom.ba.gov.br>).

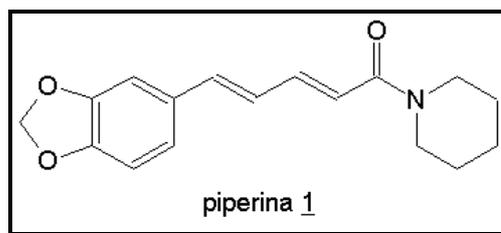


Figura 1. Piperina, principal constituinte químico de *Piper nigrum*.

Outro ponto relevante em relação a este produto natural é a sua abundância, sendo extraído com rendimentos de cerca de 3-7%, a partir dos frutos secos da planta (Ikan, 1991). Além disso, devido a maior ocorrência da amida nos frutos, a pimenta do reino constitui-se como uma fonte renovável para esta substância, visto que com manejo adequado pode-se realizar várias colheitas no ano sem comprometer a planta.

Por seu sabor e aroma incomparáveis, a pimenta do reino é a espécie mais conhecida do gênero *Piper*, vindo daí sua importância econômica. A **Figura 2** mostra uma área de cultivo da pimenta do reino para fins comerciais.



Figura 2: Área de cultivo da pimenta do reino (Detalhe: fruto da planta)

(http://www.governo.es.gov.br/scripts/porta1051_1.asp?noticia=99652783&secao=Not%C3%Adcias)

1.1. Atividades Farmacológicas do gênero *Piper* (Parmar *et al.*, 1997)

Como mencionamos, a utilização de espécies do gênero *Piper* com fins medicinais é prática comum nas culturas orientais. Na China, algumas prescrições recomendam o uso de *P. futokasura* no tratamento de asma e arritmias cardíacas. Na Jamaica, dores estomacais são tratadas com a infusão de *P. aduncum* e *P. hispidum* (também usada como repelente de insetos). No México e Brasil usa-se *P. amalago* para aliviar dores estomacais e no combate a infecções.

Na **Tabela 1** estão sumarizadas algumas destas atividades (Parmar *et al*, 1997).

Tabela 1: Algumas atividades farmacológicas exibidas por espécies do gênero *Piper*
(Parmar *et al*, 1997)

Atividade	Espécie do gênero <i>Piper</i>
Antitumoral	<i>P. hookeri</i> , <i>P. clarkii</i> , <i>P. hancei</i> , <i>P. rebesioides</i> , <i>P. wallichii</i>
Antileucêmica	<i>P. hookeri</i> , <i>P. futokadsura</i> , <i>P. attenuatum</i>
Antibiótica	<i>P. hookeri</i> , <i>P. wallichii</i>
Analgésica	<i>P. arboricola</i> , <i>P. nigrum</i>
Antibacteriana	<i>P. aducum</i> , <i>P. methysticum</i>
Anti-reumática	<i>P. guineense</i> , <i>P. nigrum</i>
Inseticida	<i>P. nigrum</i> , <i>P. hispidum</i> , <i>P. longum</i>
Anti-inflamatória	<i>P. amalago</i> , <i>P. nigrum</i>
Antipirética	<i>P. chaba</i> , <i>P. nigrum</i>
Anticâncer	<i>P. nigrum</i>

1.2. Outras amidas naturais relacionadas à piperina

As principais substâncias encontradas no gênero *Piper*, às quais são atribuídas as atividades anteriormente citadas, pertencem a várias classes. Dentre os principais constituintes do gênero pode-se citar os alcalóides, propenilfenóis, lignanas, neoligninas, terpenos, esteróides, chalconas, diidrochalconas, flavonas e flavononas (Parmar *et al.*, 1998 e 1997 ; Atal *et al.*, 1975). As amidas são, certamente, os principais constituintes do gênero *Piper*. A **Figura 3 (página 4)** mostra as estruturas de algumas amidas naturais, isoladas de espécies do gênero *Piper*.

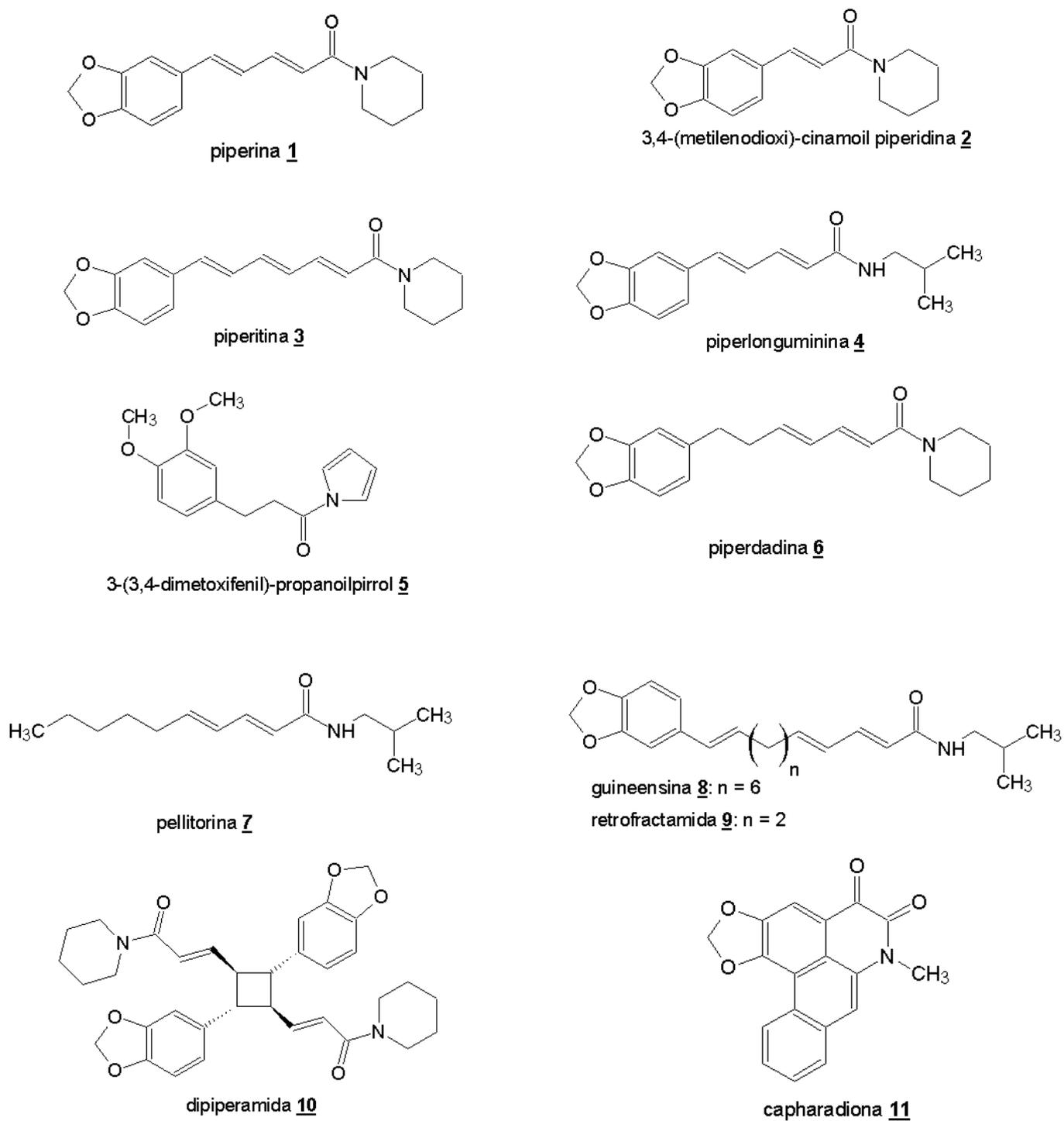


Figura 3: Alguns alcalóides amídicos isolados de espécies de *Piper* (Parmar *et al.*, 1998 e 1997).

1.3. Atividades biológicas da piperina

A variedade de atividades biológicas exibidas pela piperina é bastante ampla. Tão antiga quanto a utilização de pimenta do reino como condimento e o conhecimento de suas propriedades inseticidas, que só foram cientificamente constatadas em 1924 (Scott e Mckibben, 1978). Desde então, várias pesquisas seguiram-se com o intuito de identificar as substâncias responsáveis por esta atividade.

Recentemente, foi avaliada a atividade inibidora de amidas isoladas de *Piper nigrum* contra larvas dos mosquitos *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegyptis* e *Aedes togoi*, que são vetores de diversas doenças infecciosas, com resultados extremamente interessantes (Park *et al.*, 2002).

Na China, a pimenta do reino é utilizada no tratamento da epilepsia desde tempos remotos (D'Hooger *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1984). Liu e colaboradores, em estudo comparativo, mostraram que esta substância é capaz de induzir a síntese da serotonina prevenindo convulsões (Liu *et al.*, 1984).

Sem dúvida, o aumento da biodisponibilidade de outros medicamentos pela piperina é a mais intrigante das atividades farmacológicas desta substância. Este efeito é observado quando alguns medicamentos são co-administrados com a piperina, traduzindo-se numa maior concentração plasmática dos mesmos. Tal efeito foi constatado em estudos com a vasicina, a esparteína (Atal *et al.*, 1981), o propranolol, teofilina, a fenitoína (Bano *et al.*, 1991), e a curcumina (Shoba *et al.*, 1998). A maioria dos trabalhos relatam um aumento de 100% (ou mais) na concentração de tais substâncias na corrente sanguínea. As razões levantadas para este efeito, segundo a maioria dos autores são:

- Alterações na permeabilidade das células epiteliais do trato gastro-intestinal, facilitando a absorção dos fármacos (Johri *et al.*, 1992);
- Influência na glicoronidação (etapa mais importante na biotransformação de compostos xenobióticos) (Reen *et al.*, 1993; Atal *et al.*, 1981);

- Atuação sobre as enzimas hepáticas metabolizantes (Atal *et al.*, 1985; Atal *et al.*, 1981), monooxigenases hepáticas, dependentes de citocromo P450 (Koul *et al.*, 2000; Reen, 1997; Bhat e Chandrasekhara, 1987).

A grande vantagem ressaltada em todos os trabalhos para o aumento da biodisponibilidade de fármacos, está na possibilidade da utilização de uma rota alternativa de administração de medicamentos, evitando assim a via parenteral (mais dolorosa e invasiva), além de permitir o uso de doses menores dos fármacos co-administrados com piperina (Ribeiro, 2004).

Na Índia, o uso de espécies de *Piper* no tratamento de doenças intestinais é bastante antigo. Isto estimulou a investigação da atividade antiparasitária de algumas destas espécies. Ghoshal comprovou a atividade antiamebíca de *P. logum*, relacionando esta atividade com a presença de piperina (Ghoshal *et al.*, 1996). Kapil relatou a atividade leishmanicida, *in vitro*, da piperina sobre cepas de *Leishmania donovani* (comparável à atividade exibida pela pentamidina, fármaco indicado para o tratamento da leishmaniose) (Kapil, 1993). Após alguns anos, a piperina foi testada *in vivo* sobre animais infectados com *L. donovani*, podendo ser observado uma diminuição significativa da parasitemia com doses extremamente baixas (Raay *et al.*, 1999).

Lee e colaboradores descreveram a atividade antifúngica de amidas relacionadas à piperina sobre seis espécies de fungos fitopatogênicos (Lee *et al.*, 2001).

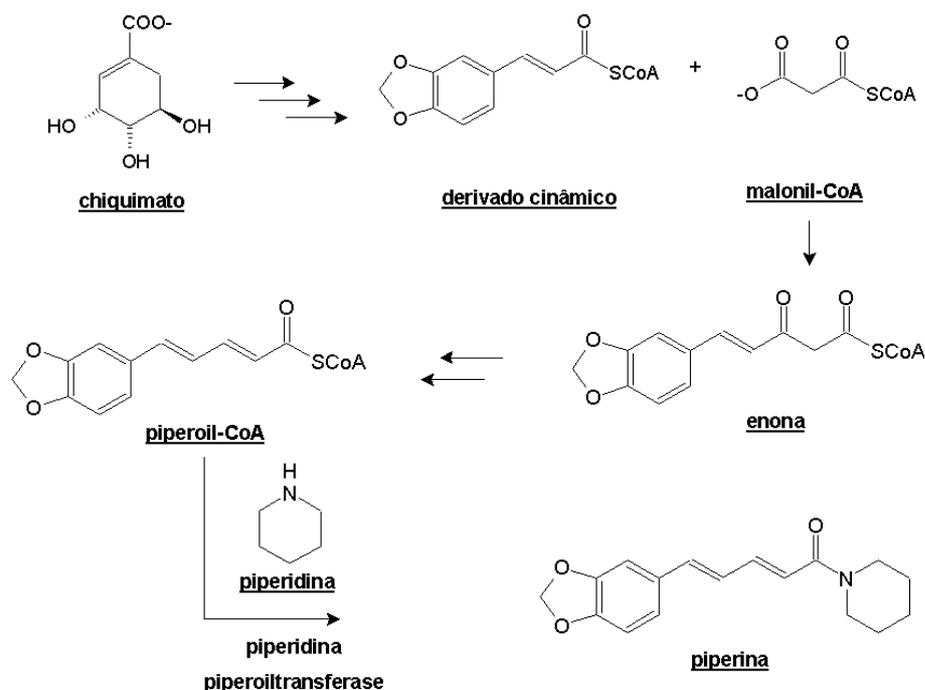
Encontramos na literatura relatos sobre a atividade antitumoral da piperina. Além do estudo *in vitro* frente às células cancerígenas, foi avaliada a atividade antitumoral da piperina *in vivo* (ratos), utilizando-se doses de 1,14 mg/Kg animal. Observou-se neste estudo a inibição do desenvolvimento do tumor induzido (linfoma de Dalton) em 37%, e o aumento da expectativa de vida dos animais portadores do carcinoma de Ehrlich em até 58% (Sunila e Kuttan, 2004).

Estudos recentes evidenciaram a ação da piperina na inibição da atividade, da enzima monoamina oxidase (MAO), em ratos. Esta enzima é responsável por catalizar a desaminação oxidativa de neurotransmissores como, por exemplo, serotonina e dopamina. As substâncias inibidoras da MAO são usadas no tratamento de distúrbios mentais, principalmente como antidepressivos e, na terapia das doenças de Parkinson e Alzheimer (Lee *et al.*, 2005).

1.4. Biossíntese da piperina (Mann, 1994; Geisler e Gross, 1990; Geisman e Crout, 1969)

A porção acil da molécula da piperina, tem sua biossíntese mostrada no **Esquema 1**. Observa-se o chiquimato como precursor do derivado cinâmico, que pode possuir diferentes padrões de oxigenação no anel aromático (nos carbonos 3, 4 e 5), sendo que o anel 3,4-metilenodioxi é bastante comum na classe dos fenil-propanóides (C₆-C₃) (Mann, 1994). Após condensação do tioéster do derivado cinâmico com uma unidade de malonil-SCoA, seguida da redução da enona gerada e β-eliminação, chegamos ao tioéster piperoil-CoA que reage com piperidina gerando a piperina (Geissman e Crout, 1969).

Desde o início dos estudos biossintéticos da piperina, foi proposto que sua formação dava-se por condensação da piperidina com o tioéster piperoil-CoA (**Esquema 1**). Geissman, na década de 60, propôs uma rota biossintética para a piperina que apenas a descoberta posterior da enzima piperidina piperoiltransferase pôde confirmar (Geissman e Crout, 1969). Esta enzima mostrou-se específica para piperidina, alcançando 100% de atividade relativa (Geisler e Gross, 1990).



Esquema 1: Proposta biossintética para a formação da piperina.

1.5. Produtos Naturais (PNs) e a descoberta dos Fármacos (Veigas *et al.*, 2006)

O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza pelos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado como fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa na área dos produtos naturais, do conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas e da inter-relação animal-inseto-planta. Neste sentido, a natureza forneceu muitos modelos moleculares que fundamentaram estudos de relação estrutura-atividade (*SAR*) e inspiraram o desenvolvimento da síntese orgânica clássica (Veigas *et al.*, 2006).

Os curares, por exemplo, eram drogas obtidas de diversas espécies de *Strychnos* e *Chondodendron* americanas e africanas, utilizadas pelos índios para produzir flexas envenenadas para caça e pesca (Pinto *et al.*, 1995; Dewick, 2002). A primeira planta de curare identificada foi coletada no Suriname e descrita, em 1783, por Schreber, como *Toxicaria americana*, tendo sido posteriormente classificada como *Strychnos guianensis* (Pinto *et al.*, 1995). Somente no século XIX Boehm isolou o principal constituinte ativo do curare americano (*Chondrodendro tomentosum*), a (+)-tubocurarina (**12**) (Figura 4, página 9).

O curare foi também responsável pelo início dos estudos sobre a relação entre estrutura química e atividade biológica (*SAR*), tendo sido, nesta área, o primeiro trabalho publicado sobre *SAR* em Química Farmacêutica, datado de 1869 (Veigas *et al.*, 2006; Barreiro *et al.*, 1999).

O ópio, preparado dos bulbos de *Papaver somniferum*, é conhecido há séculos por suas propriedades soporíferas e analgésicas. Em 1804, Armand Séquin isolou seu constituinte majoritário, a morfina (**13**), sendo a primeira substância natural utilizada clinicamente na forma pura (Veigas *et al.*, 2006).

Durante a colonização espanhola do Peru, em 1630, os jesuítas tomaram conhecimento da utilização pelos índios das cascas secas de espécies de *Cinchona* para o tratamento de alguns

tipos de febre (Veiga *et al.*, 2006). Em 1820, Pellertier e Caventou isolaram a quinina (**14**) da *Cinchona officianalis*, que durante quase trezentos anos foi o único princípio ativo eficaz contra a malária (Barreiro *et al.*, 1999).

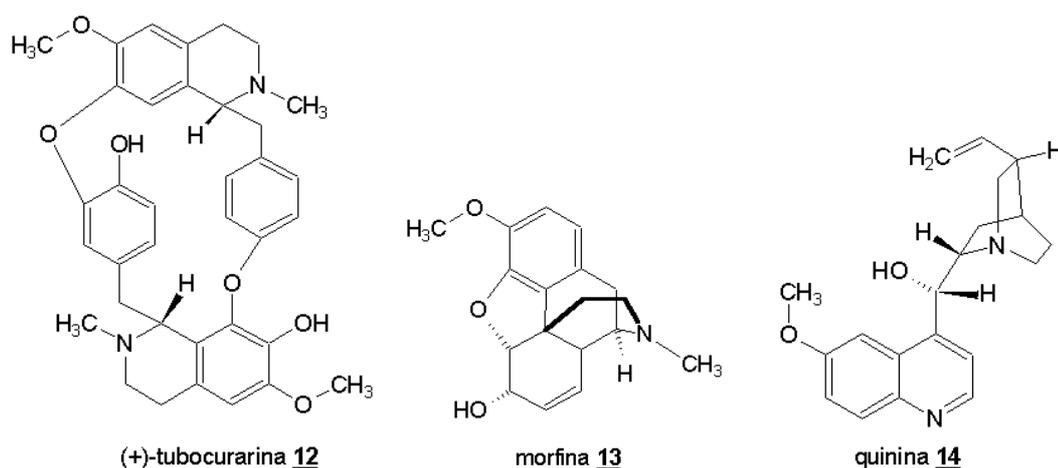


Figura 4: Os primeiros fármacos isolados de produtos naturais.

No início, os químicos estudavam plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporadas às farmacopéias da época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de substâncias ativas (Yunes *et al.*, 2001).

Talvez o marco mais importante para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais de plantas tenha sido o descobrimento dos salicilatos, com atividades analgésicas e antipiréticas, obtidos de *Salix alba*. Em 1828, Johann A. Buchner isolou uma pequena quantidade de salicina (**15**). Vários outros cientistas empenharam-se em melhorar os rendimentos e a qualidade da salicina obtida do extrato natural até que em 1860 Hermann Kolbe e seus alunos sintetizaram o ácido salicílico (**16**) e seu sal sódico a partir do fenol; Em 1898, Felix Hoffmann, descobriu o ácido acetil-salicílico (**17**, AAS, **Figura 5**, **página 10**), menos ácido que o ácido salicílico, mas mantendo a propriedade analgésica desejada (Veigas *et al.*, 2006; Weissmann, 1991)



Figura 5: Salicilatos que marcaram o desenvolvimento de fármacos no período de 1800-1900.

As propriedades terapêuticas do AAS levaram os laboratórios de pesquisa da Bayer a elegerem o AAS como um novo produto a ser lançado no mercado para competir com os salicilatos naturais, o que ocorreu a partir de 1897 sob o nome de Aspirina® (Veigas *et al.*, 2006). Após mais de 100 anos de sua descoberta, o AAS continua sendo alvo de inúmeras pesquisas sobre sua aplicação terapêutica como analgésico e antiinflamatório, atuando no controle da febre, na artrite reumática e na inibição da agregação plaquetária (Veigas *et al.*, 2006; Yunes *et al.*, 2001).

O descobrimento do AAS marcou de certa forma o final do primeiro período, onde a busca por substâncias naturais terapeuticamente úteis era feita ao acaso. Além disso, o AAS foi o pioneiro dos fármacos sintéticos. Um dos primeiros marcos deste segundo período foi o surgimento do barbital (18, ácido 5,5-dietilbarbitúrico) (**Figura 6, página 11**), em 1903, indicado como agente hipnótico; em 1904, foi sintetizada a epinefrina (19, broncodilatador e descongestionante nasal), seguida da procaína (20) e da benzocaína (21), dois anestésicos locais pertencentes à classe dos ésteres do ácido *p*-aminobenzoico, que tiveram como protótipo a estrutura da cocaína (22) (Viegas *et al.*, 2006).

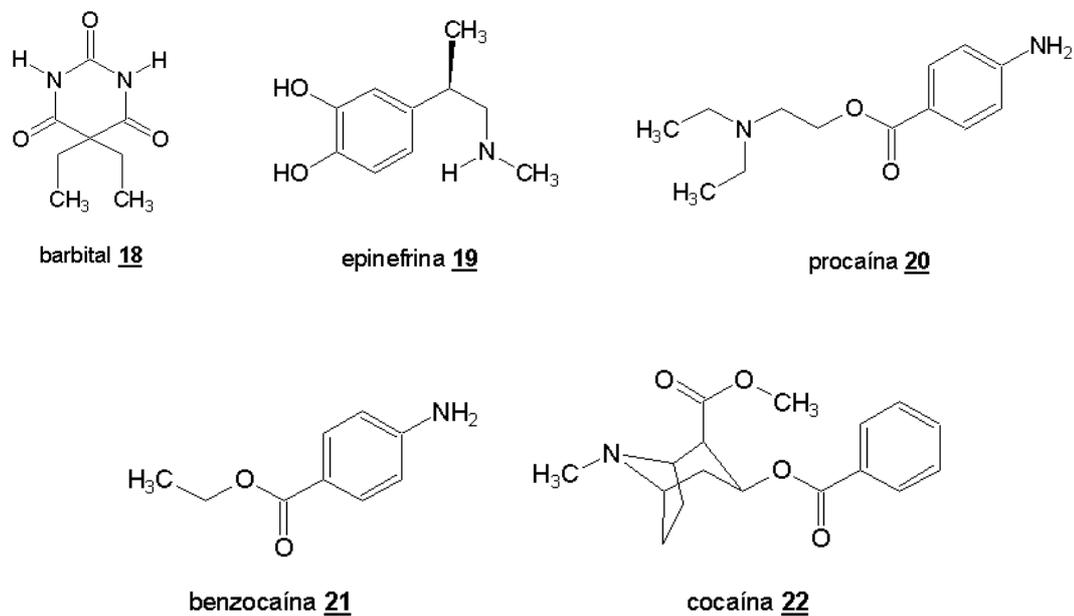


Figura 6: Barbital, epinefrina, procaína, benzocaína e cocaína.

Dentre os quimioterápicos para o câncer, a vimblastina (**23**) e a vincristina (**24**), extraídas de *Catharantus roseus*, o etoposídeo (**25**), o teniposídeo (**26**) e o taxol (**27**) são importantes fármacos introduzidos na terapêutica nos últimos anos (desde a segunda metade do século XX), que foram fundamentais para o renascimento do interesse nos produtos naturais por parte da indústria farmacêutica.

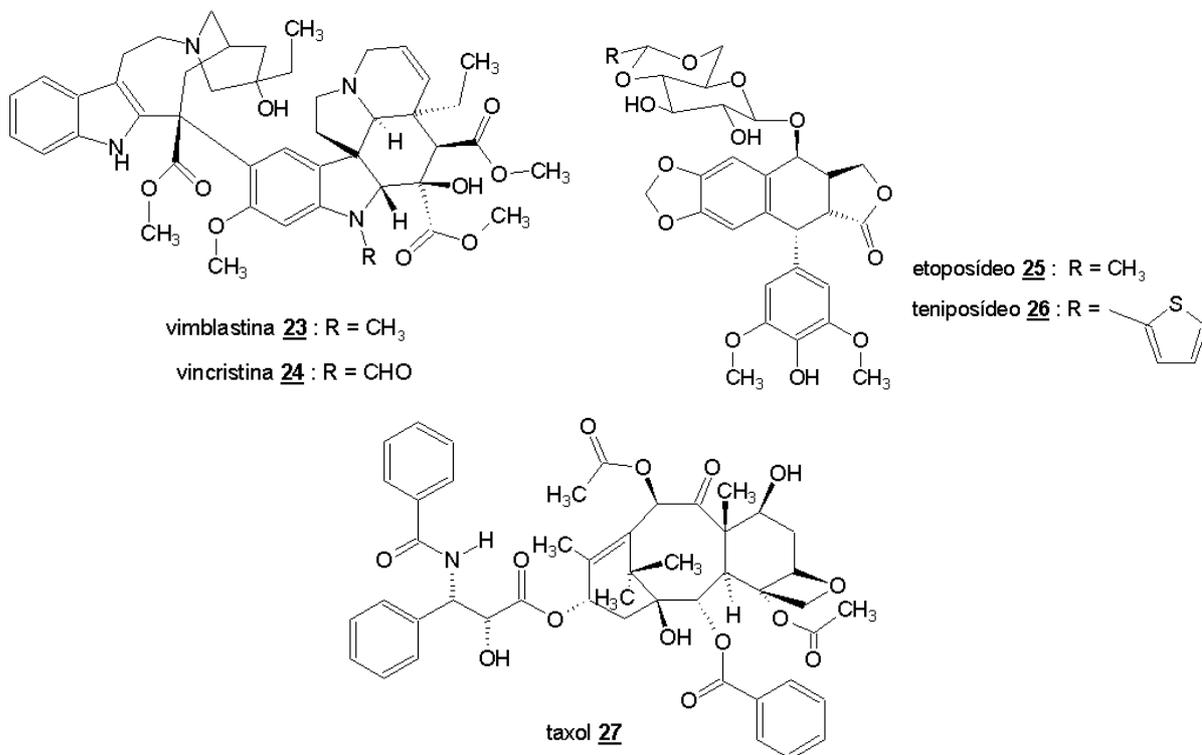


Figura 7: Vimblastina, vincristina, etoposídeo, teniposídeo e taxol.

Estima-se o consumo cerca de 230 Kg/ano de taxol (Paclitaxel®, nome comercial) para suprir as necessidades clínicas de pacientes com câncer (Correa, 1995). Uma vez que o taxol é extraído das cascas de *Taxus brevifolia*, e para extrair 1Kg de taxol, precisa-se de 10 toneladas de cascas, o que representa cerca de 3000 árvores (Correa, 1995), sua utilização clínica tornou-se inviável.

O interesse pelo taxol foi intenso a partir dos anos 80, quando vários grupos de pesquisa passaram a tentar viabilizar metodologias sintéticas para sua obtenção em maior escala. O taxol foi obtido por semi-síntese pela primeira vez por Denis e colaboradores (1988), a partir da desacetilação da bacatina (**28**, **Figura 8**, **página 13**), precursor isolado de *Taxus baccata*, obtendo-se a 10-desacetil-bacatina III (**29**), e o taxol em 4 etapas sintéticas consecutivas, em rendimentos de 52%, a partir do substrato natural de partida (Veigas *et al.*, 2006). Por síntese total, o taxol foi obtido no mesmo período por Holton (1994a, 1994b) e Nicolaou (1994), com rendimentos inviáveis (Barreiro *et al.*, 1999; Kusama *et al.*, 2000; Ribeiro, 2004). Também nesse período Greene e colaboradores (1994) obteve por semi-síntese o taxotere (**30**, docetaxel),

análogo duas vezes mais ativo que o próprio taxol, sendo utilizado contra câncer de ovário, mama, pulmão, cérebro e garganta (Correa, 1995).

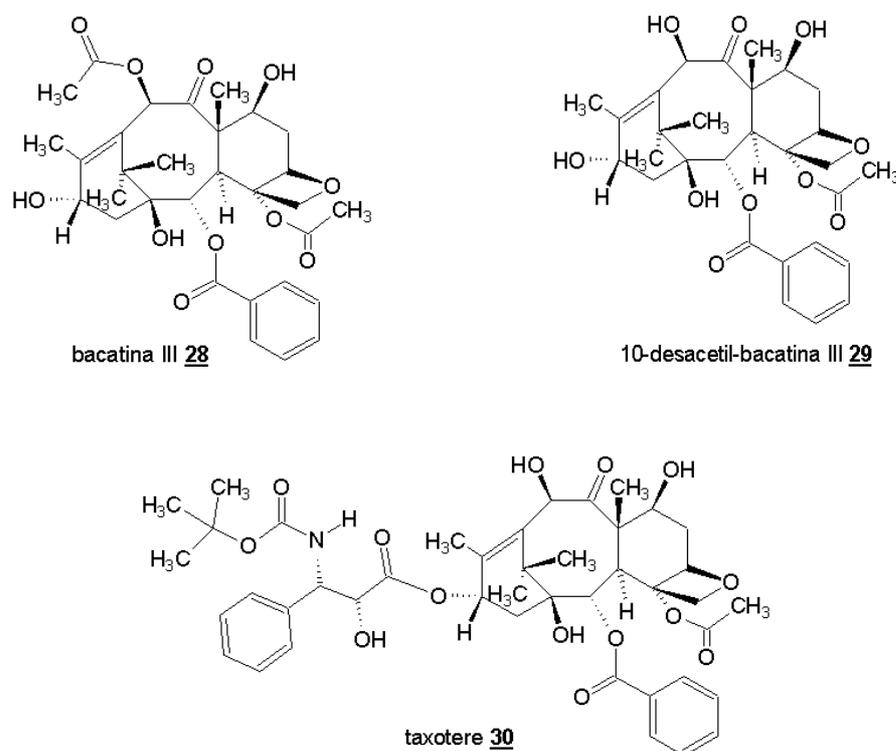


Figura 8: Bacatina III, 10-desacetil-bacatina III e taxotere.

1.6. A importância dos Produtos Naturais (PN's) em síntese orgânica (Newman *et al.*, 2003)

Recentemente Newman e colaboradores relataram a importância dos PN's, como fonte de novas estruturas, não necessariamente como drogas finais, mais sim como protótipos para novas drogas. Constatando a participação dos PN's num percentual cerca de 50% (**Figura 9, página 14**), direta ou indiretamente, no desenvolvimento de novos fármacos para o mercado (Newman *et al.*, 2003).

Classificação das drogas, segundo Newman e colaboradores, de acordo com sua origem:

- **B:** Biológica;
- **N:** Produto Natural;
- **ND:** Derivado do Produto Natural – semi-sintético;
- **S:** Sintética – sem referência farmacofórica de N;
- **S*:** Sintética – com referência farmacofórica de N;
- **V:** Vacina
- **NM:** Produto modelado com base em PN's.

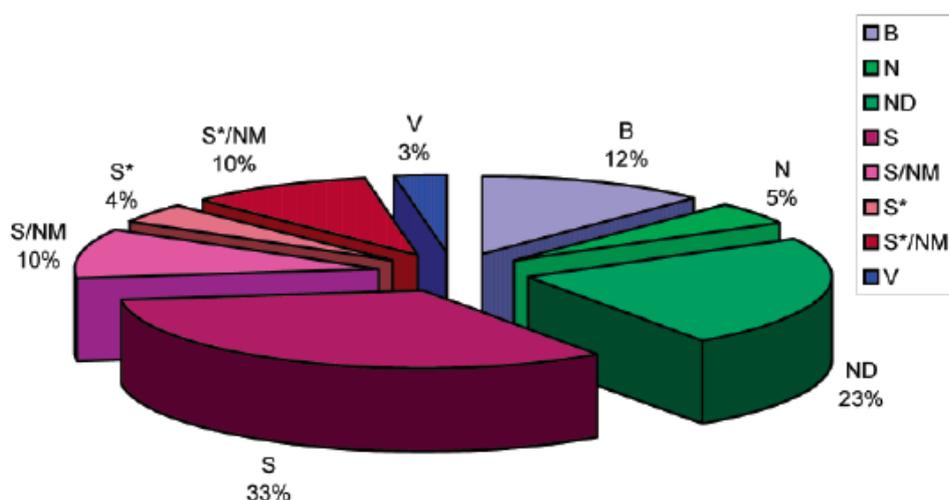


Figura 9: Participação dos Produtos Naturais (PN's) no desenvolvimento de fármacos no período de 1981 a 2002 (Newman *et al.*, 2003).

Dada a crescente ameaça à biodisponibilidade, através da destruição dos ecossistemas e a importância dos produtos naturais na descoberta de novos fármacos, torna-se necessário expandir a exploração dos mananciais naturais renováveis na busca de novos agentes bioativos. A piperina preenche os requisitos essenciais para utilização como molécula protótipo e/ou precursor para o desenvolvimento de novas drogas: abundância, presença em fonte renovável, fácil isolamento, variadas atividades biológicas constatadas, além de possuir funcionalidades possíveis de sofrerem variadas manipulações sintéticas (Ribeiro, 2004).

1.7. Trabalhos envolvendo modificações estruturais na piperina

Encontra-se na literatura diversas atividades biológicas associadas à piperina, entre estes trabalhos destacam-se alguns, que além de evidenciarem o efeito da piperina mostraram também o efeito de derivados e análogos, visando traçar um perfil de relação estrutura-atividade (*SAR*) para os modelos estudados.

Koul e colaboradores demonstraram que a piperina e derivados inibem enzimas hepáticas (oxidases), dependentes do citocromo P450. Foi observado que a saturação da cadeia lateral da piperina resultou em um aumento da inibição enzimática, enquanto que, nas modificações do anel aromático e na função amídica foram poucos os análogos que demonstraram seletividade em inibir a atividade das oxidases estudadas (Koul *et al.*, 2000).

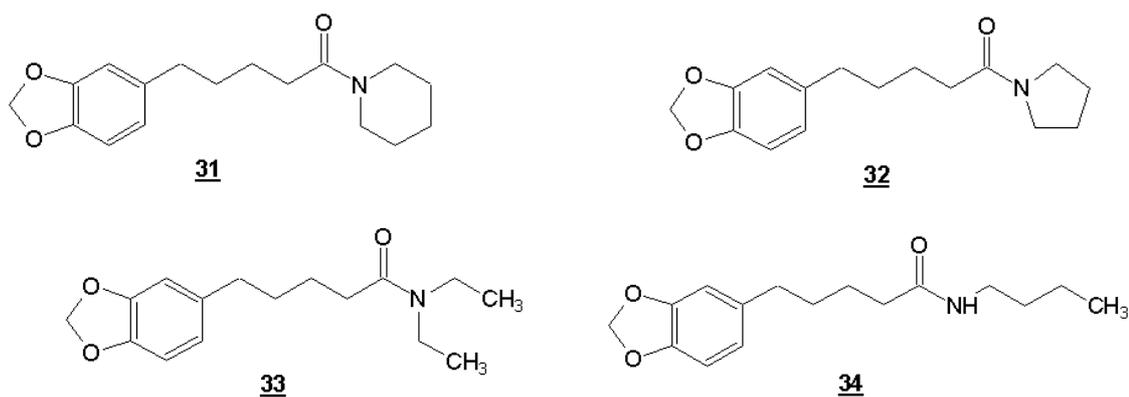


Figura 10: Estruturas químicas dos derivados que demonstraram maior efeito inibitório das oxidases estudadas.

De Paula e colaboradores relataram a atividade inseticida da piperina e de amidas análogas (sintetizadas a partir da mesma) sobre diferentes espécies de insetos: *Ascia monuste orseis* Latr, *Acanthoscelides obstectus* Say, *Brevicoryne brassicae* L, *Protopolybia exigua* Desaus e *Cornitermes cumulans* Kollar (De Paula *et al.*, 2000).

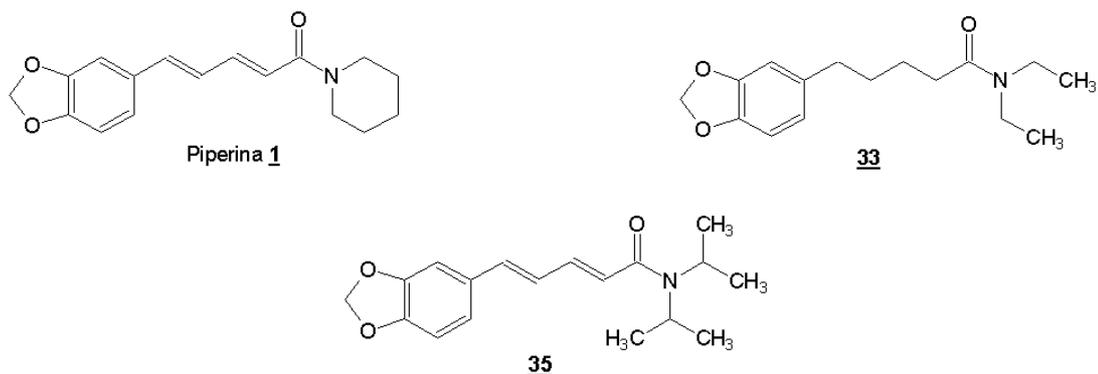


Figura 11: Amidas *N,N*-dissubstituídas que demonstraram maior atividade inseticida sobre *A. monuste orseis* L. (De Paula *et al.*, 2000).

Venkatasamy e colaboradores baseados em dados anteriores descritos sobre a atividade da piperina na proliferação de melanócitos (Lin *et al.*, 1999), sintetizaram uma série de análogos e derivados da amida natural, visando realizar um estudo de relação estrutura-atividade (*SAR*). Foram investigados os seus efeitos biológicos sobre a proliferação e diferenciação dos melanócitos. A perda progressiva dos melanócitos e despigmentação da pele ocasiona o vitiligo, doença que atinge cerca de 1% da população mundial, variando de 0,1-9% em diferentes países. A **Figura 12** mostra alguns exemplos de compostos modificados sinteticamente que apresentaram atividades biológicas mais relevantes, indicando a piperina como precursora de novos protótipos no tratamento do vitiligo (Venkatasamy *et al.*, 2004).

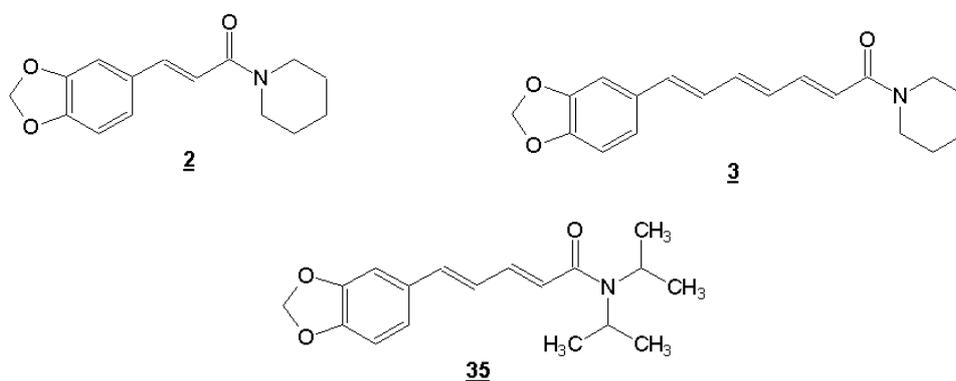


Figura 12: Exemplo de compostos modificados sinteticamente que apresentaram maiores atividades biológicas.

Ribeiro e colaboradores, em estudos realizados em nosso grupo de pesquisa, baseados em dados anteriores descritos sobre a atividade antiparasitária da piperina sobre *Leishmania donovani* (Trypanosomatídeo - causador da leishmaniose visceral) (Kapil, 1993; Raay *et al.*, 1999), sintetizaram uma série de análogos e derivados à amida natural, visando realizar um estudo sobre outro Trypanosomatídeo, o *Trypanosoma cruzi* – causador da doença de Chagas. A **Figura 13** mostra alguns exemplos de compostos modificados sinteticamente que apresentam atividades biológicas mais relevantes.

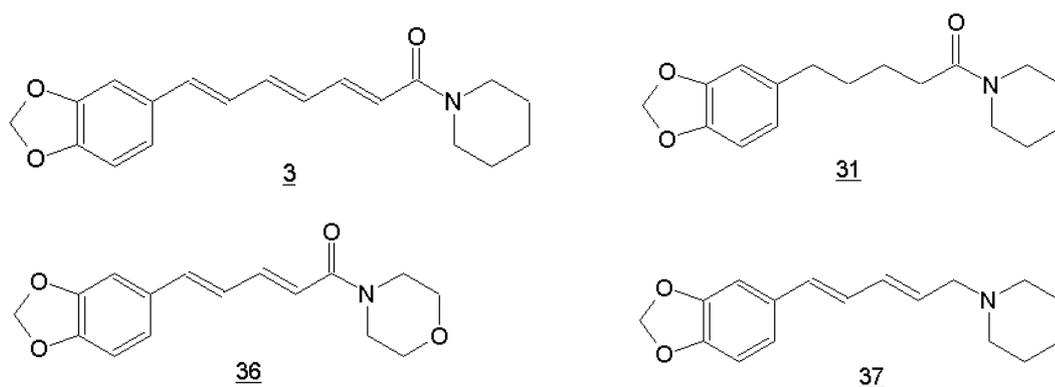


Figura 13: Derivados e análogos que apresentaram maior atividade toxica ao *T. cruzi*.

A **Tabela 2** mostra os valores de IC_{50} para a piperina **1** e os derivados mais ativos contra a forma epimastigota e amastigota do *Tripanosoma cruzi* (Ribeiro *et al.*, 2004).

Tabela 2: Valores de IC_{50} para a piperina e os derivados mais ativos contra a forma epimastigota e amastigota do *T. cruzi*.

Composto	IC_{50} (μ M)	
	Epimastigota	Amastigota
3	10,67	7,4
31	19,41	11,52
36	56,13	5,71
37	17,49	9,63
1	7,36	4,91

Recentemente, nosso grupo de pesquisa, motivado por dados descritos na literatura, sobre a atividade antitumoral da piperina frente às culturas *in vitro* de células L929, linfoma de Dalton (DLA) e do carcinoma ascítico de Ehrlich (EAL) (Sunila e Kuttan, 2004), sintetizaram uma série de análogos à amida natural, e investigaram suas atividades citotóxicas frente ao carcinoma de Ehrlich.

A **Figura 14** mostra as estruturas das amidas mais ativas nas avaliações realizadas (Barreto-Junior, 2005; Pissinate, 2006).

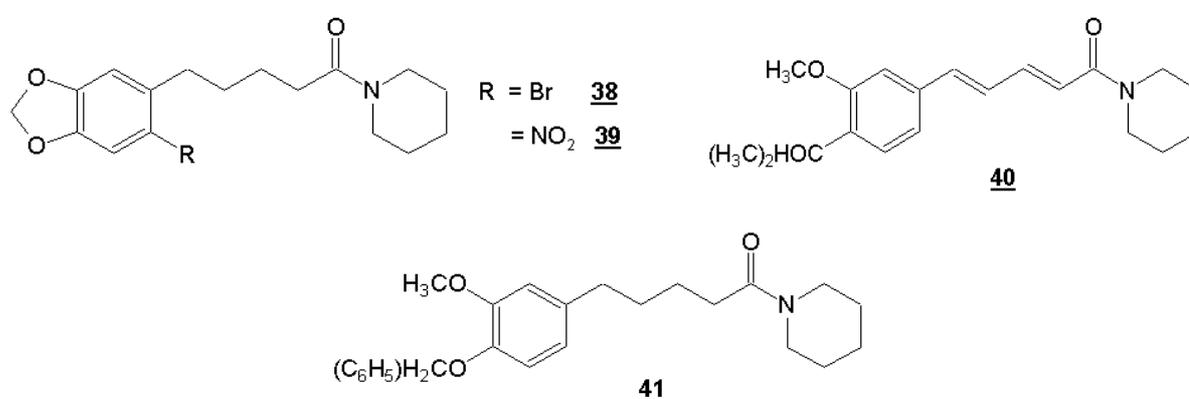


Figura 14: Derivados e análogos que apresentaram maior atividade tóxica contra o carcinoma de Ehrlich (Barreto-Junior, 2005; Pissinate, 2006).

1.8. Doença de Chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma parasitose com manifestações clínicas extremamente complexas. Esta enfermidade é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* - Kinetoplastida, Trypanosomatidae (**Figura 15**). Este microorganismo, que é capaz de infectar um grande número de vertebrados, possui um ciclo de vida complexo, com vários estágios, sendo que no hospedeiro vertebrado o parasita encontra-se sob duas formas, a forma tripomastigota, flagelada e infectante; e a forma amastigota, que não possui flagelo livre e se replica no interior das células (Brenner e Andrade, 1979).

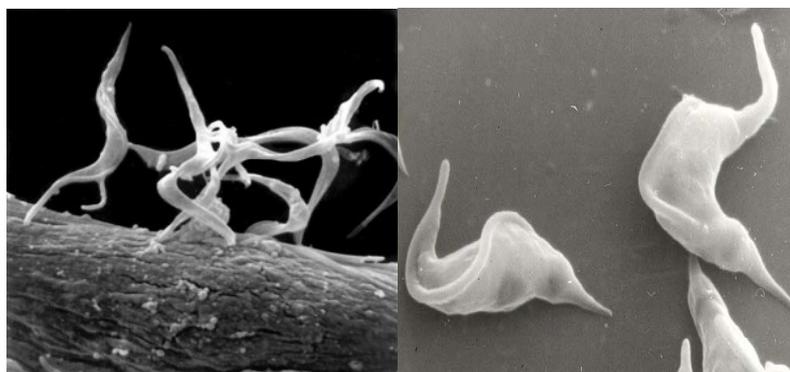


Figura 15: Imagem do *Trypanosoma cruzi* em microscopia eletrônica (<http://www.fiocruz.br/ccs/estetica/chagas.htm>)

O ciclo de vida do parasita (**Figura 16, página 20**) envolve obrigatoriamente a passagem por hospedeiros vertebrados (mamíferos, incluindo o homem) e muitos invertebrados (insetos da família *Ruduviidae*), em uma série de estágios. A forma tripomastigota, presente no sangue do hospedeiro infectado, é ingerida pelo inseto e diferencia-se em epimastigota, forma não infectiva e replicativa, que no trato digestivo do inseto diferencia-se em tripomastigotas metacíclicas. As formas metacíclicas são liberadas junto com as fezes e a urina do inseto durante seu repasto sanguíneo e ao penetrar no hospedeiro vertebrado diferenciam-se na forma amastigota intracelular. Após vários ciclos de replicação os parasitas diferenciam-se nas formas tripomastigotas, havendo liberação dos mesmos na corrente sanguínea do hospedeiro, reiniciando o ciclo.

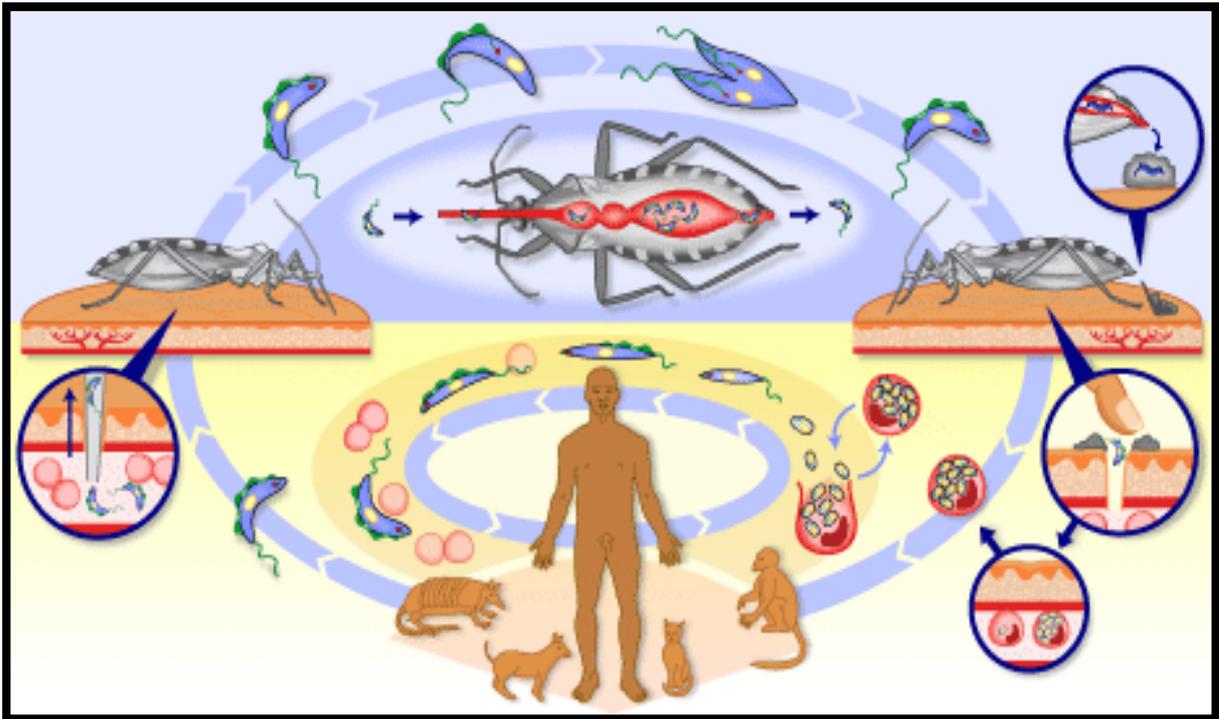


Figura 16: Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

(<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>)

Esta parasitose é transmitida, principalmente, pelo contato da pele e mucosas com fezes ou urina de diferentes insetos hematófagos, da Família *Ruduviidae*, tendo como exemplo os gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodinus* (o popular barbeiro, **Figura 17**), contaminados com o *T. cruzi*.

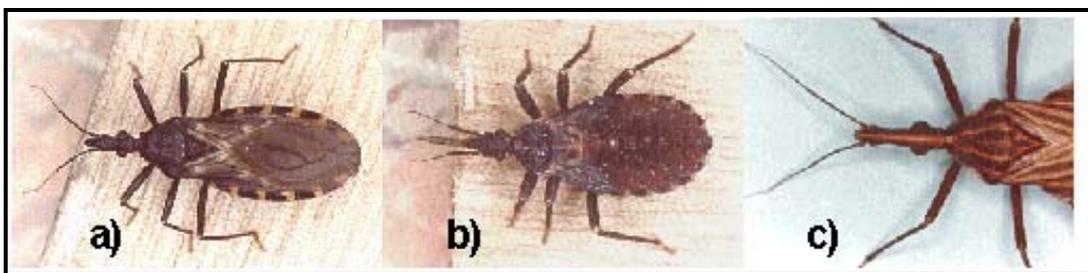


Figura 17: Imagem de barbeiros, três gêneros diferentes; a) *Triatoma*; b) *Panstrongylus* e c) *Rhodinus* (<http://ryoko.biosci.ohio-state.edu/~parasite/rhodnius.html>).

A transmissão da doença também pode ocorrer por transfusão de sangue, por transmissão congênita, por transplantes de órgãos, por via oral (raro) - como aconteceu em Santa Catarina, pela ingestão de caldo-de-cana contaminado com fezes, urina e o próprio inseto (Lewinsohn, 2005) - ou ainda, de forma acidental, em laboratório. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, cerca de 18 milhões de pessoas, entre o México e as Américas do Sul e Central, encontram-se infectadas pelo *T. cruzi*, o que, aliado ao fato de não haver tratamento eficaz para erradicação do parasita intracelular, faz desta doença um dos maiores desafios na área de Saúde Pública nesta região do planeta (**Figura 18**) (Coura e De Castro, 2002).

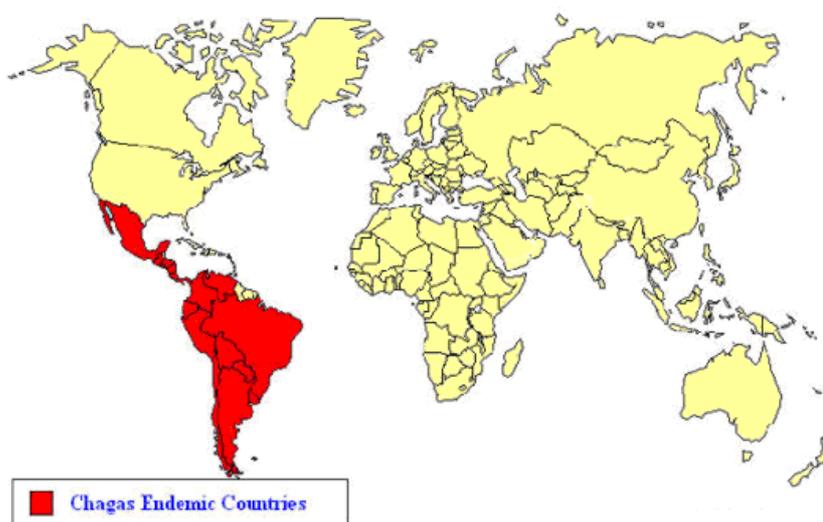


Figura 18. Distribuição geográfica da doença de Chagas.

(<http://www.who.int/ctd/chagas/geo.htm>)

Apesar das doenças infecciosas e parasitárias terem diminuído seus impactos na causa de óbitos ocorridos no Brasil (de um total de 45% em 1930, para cerca de 7% em 1999), estas são ainda importantes, principalmente nas regiões do Brasil onde se concentram as populações mais carentes (Barreto e Carmo).

Focalizando o Estado do Rio de Janeiro, segundo dados do Ministério da Saúde, no ano de 1999 ocorreram 5411 óbitos causados por infecções e parasitoses, sendo que 3244 destes ocorreram na capital. Neste mesmo ano ocorreram 39 óbitos causados por infecções por *T. cruzi*, sendo que a maior parte das mortes ocorreram no Município do Rio de Janeiro e em Niterói (26 e 6 óbitos por doença de Chagas, respectivamente) (Barreto e Carmo; Schmunis, 2000).

1.8.1. Tratamento

Em sua grande maioria, as drogas usadas no tratamento de pacientes portadores de infecções parasitárias provocam efeitos colaterais devido à sua toxidez (Coura e De Castro, 2002).

As drogas utilizadas no tratamento da doença de Chagas são (**Figura 19**):

- a) O derivado nitro-heterocíclico Benzonidazol (2-nitro-*N*-fenilmetil-1H-imidazol-1-acetamida) (**42**);
- b) Nifurtimox (3-metil-*N*-[(5-nitro-2-furfuril)-metileno]-4-tiomorfolinoamina-1,1-dióxido) (**43**).

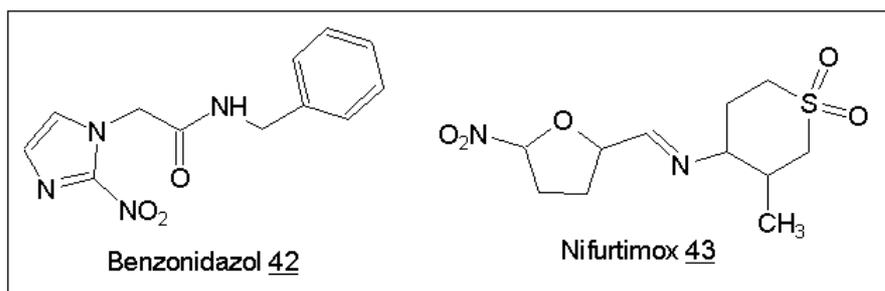


Figura 19: Fármacos de utilidade clínica reconhecida.

Atualmente, apenas o benzonidazol (**42**) é utilizado para o tratamento da doença de Chagas. O Nifurtimox (**43**), após ser usado em vários países da América do Sul, inclusive no Brasil, deixou de ser comercializado devido ao seu alto grau de toxicidade (Coura e De Castro, 2002).

Desde a descoberta da doença de Chagas pelo Dr. Carlos Chagas em 1909, nenhum fármaco eficaz ainda foi encontrado, ou seja, após quase um século da descrição de todo o ciclo desta grave enfermidade não fomos capazes de desenvolver uma terapia efetiva para o seu tratamento. Fica claro a dimensão do desafio colocado aos pesquisadores envolvidos no desenvolvimento de fármacos aplicáveis na quimioterapia da doença de Chagas, qual seja, a busca constante por novas substâncias com elevada atividade tripanocida, reduzidos efeitos colaterais, aliados à

compreensão do mecanismo da ação antiparasitário destas substâncias, o que facilita o desenvolvimento racional de novos compostos protótipo (Ribeiro, 2004).

Contudo, o elevado custo de investimento e a falta de um mercado potencial para aquisição de novas drogas desenvolvidas, visto que este tipo de enfermidade acomete em populações de baixo poder aquisitivo, não estimula as grandes corporações farmacêuticas a desenvolverem fármacos para o tratamento de doenças tropicais. Entre 1393 drogas novas produzidas no período de 1975 a 1999, apenas 13 (0,9%) destinam-se às doenças tropicais (**Tabela 3**), e destas nenhuma para doença de Chagas (Trouiller *et. al.*, 2002).

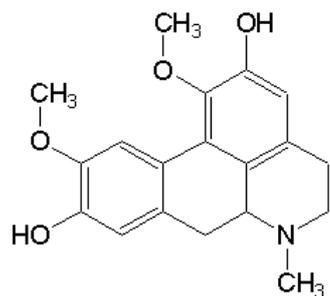
Tabela 3: Novas entidades químicas (NCEs) aprovadas entre 1975 e 1999 por classe de drogas (Trouiller *et al*, 2002).

Áreas terapêuticas	Novas entidades químicas aprovadas 1975-1999
Sistema nervoso central (SNC)	211 (15,1%)
Cardiovascular	179 (12,8%)
Citostático (neoplásmico)	111 (8,0%)
Respiratório (não-infectivo)	89 (6,4%)
Anti-infectivo e Antiparasitário	224 (16,1%)
HIV (Aids)	26 (1,9%)
Tuberculose	3 (0,2%)
Doenças tropicais	13 (0,9%)
Malária	4 (0,3%)
Outras categorias terapêuticas	579 (41,6%)
Total	1393 (100%)

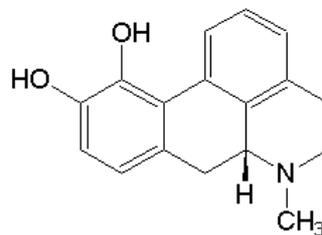
1.8.2. Alcalóides ativos em *Trypanosoma cruzi* (Coura e De Castro, 2002).

Existem vários alcalóides com ação tripanocida, cujos mecanismos de ação estão relacionados com a inibição da respiração celular do parasita, entre eles destaca-se a boldina (**44**). A apomorfina (**45**) também demonstrou grande atividade tripanocida (**Figura 20, página 25**). (Morello *et al.*, 1994, Coura e De Castro, 2002).

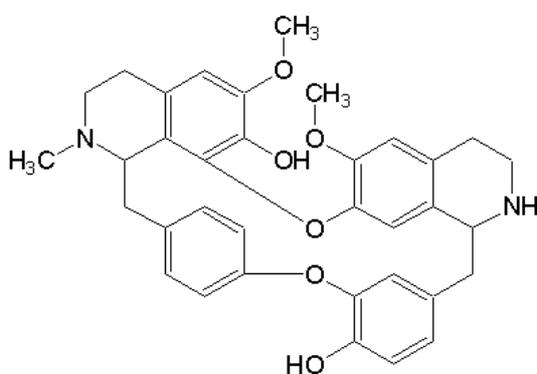
Fournet e colaboradores (1998) demonstram que os alcalóides bisbenzilisquinolínicos, dafinolina (**46**) e cefarantina (**47**) possuem atividade tripanocida sobre formas amastigotas de *T. cruzi* (**Figura 20, página 25**) (Coura e De Castro, 2002). Chataing e colaboradores (1998) avaliaram o efeito tóxico de glicoalcalóides contra *T. cruzi*, evidenciando a atividade da α -solamargina (**48**) e a α -chaconina (**49**) sobre formas epimastigotas e tripomastigotas do parasita, ambas, apresentaram toxicidade mais alta que o cetoconazol (**Figura 20, página 25**), droga utilizada como controle (Coura e De Castro, 2002).



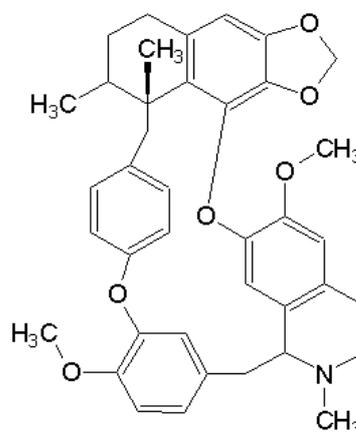
Boldina 44



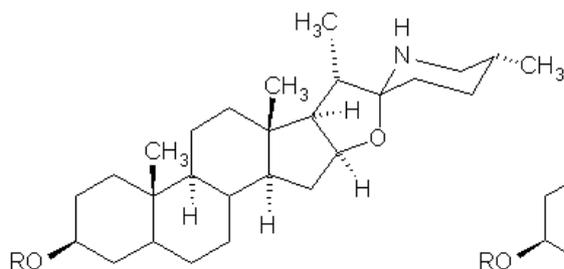
Apomorfina 45



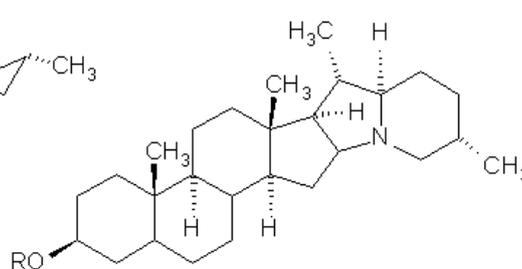
Dafinolina 46



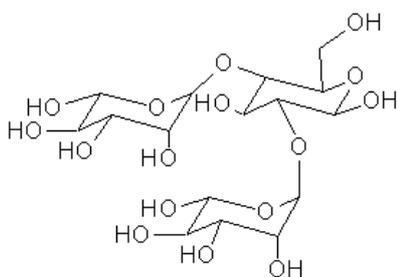
Cefarantina 47



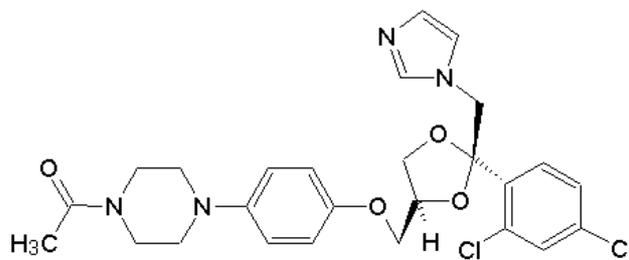
α -Solamargina, R = Chacotriose 48



α -Chaconina, R = Chacotriose 49



Chacotriose



Cetoconazol

Figura 20: Alcalóides com atividade tripanocida (Coura e De Castro, 2002).

1.9. Mesoionicos

Os compostos mesoiônicos têm sido objeto de estudos desde 1882 quando Emil Fisher e Emil Besthorn sintetizaram o primeiro composto (**50**, **Figura 21**) (Silva, 1997), apesar de só terem sido classificados como tal em 1957 por Baker e Ollis (Silva, 1997), com a seguinte definição:

- O composto deveria possuir um anel aromático heterocíclico de cinco ou seis membros que não fosse capaz de ser representado por uma estrutura covalente;
- Todos os átomos do anel proveriam elétrons p ou π , para formar um sexteto deslocalizado;
- O anel deveria apresentar uma carga positiva parcial, balanceada por uma negativa localizada em um grupo ou átomo exocíclico;
- O anel deveria ser planar, ou quase, possuindo considerável caráter aromático.

Devido às suas características estruturais especiais os mesoiônicos, nos últimos anos, têm sido alvo de inúmeros estudos nas mais diversas áreas, podendo-se destacar pesquisas na área de cristais líquidos (Sato, 1996), na confecção de materiais com propriedades óticas não-lineares (Moura *et al.*, 1994), na síntese de corantes (Edward e Sheffler, 1979) e sobre tudo nas pesquisas em função de suas atividades biológicas bastante diversificadas, que serão relatados posteriormente (**1.9.3., página 31**).

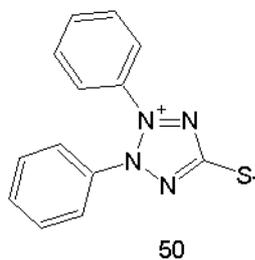


Figura 21. Primeiro derivado mesoiônico, sintetizado por Fischer.

1.9.1. Classificação e Nomenclatura

Atualmente, os mesoiônicos são descritos como sendo compostos pertencentes à classe das betaínas mesoméricas: betaínas mesoméricas são moléculas neutras, conjugadas, que podem ser representadas somente por estruturas dipolares nas quais as cargas positiva e negativa estão deslocalizadas dentro de um sistema π de elétrons. Dessa forma, compostos mesoiônicos têm sido descritos como betaínas heterocíclicas mesomérico-conjugadas (Ollis *et al.*, 1985).

Desde a proposição de Baker, diversas formas de representar um composto heterocíclico com estrutura mesoiônica são propostas. As mais comumente utilizadas são representadas na **Figura 22**, onde as estruturas **1** e **1.2** serão adotadas, pois são as mais usadas atualmente (Silva, 1997).

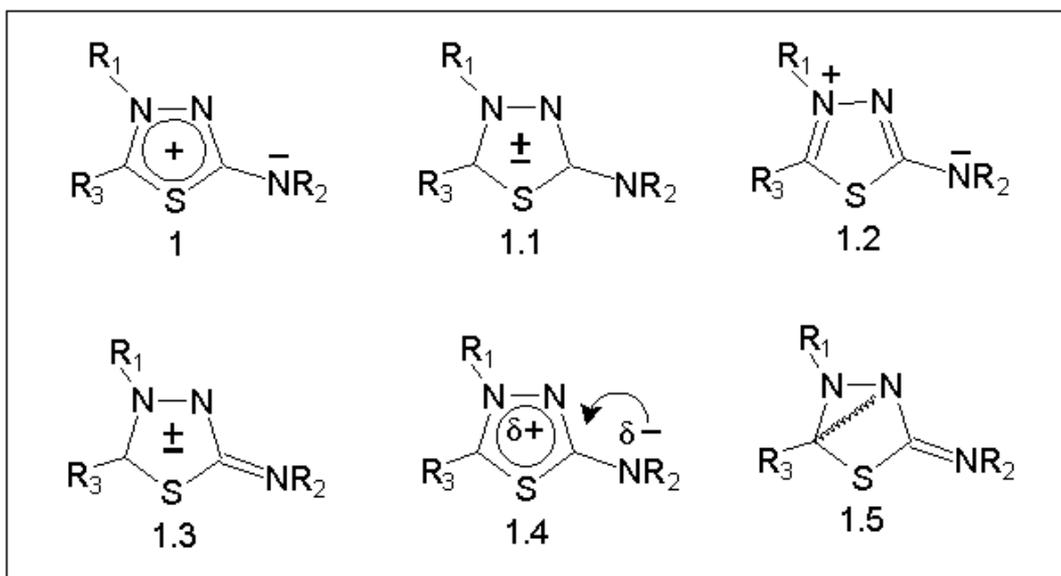


Figura 22: Representações alternativas para os compostos mesoiônicos (Silva, 1997).

A nomenclatura dos compostos heterocíclicos da classe das 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminas, não oferece qualquer dúvida, quanto à sua numeração, uma vez que a presença de um átomo de enxofre, que recebe o número 1, obedece a seqüência de prioridade utilizada em compostos heterocíclicos: oxigênio, enxofre e nitrogênio (Silva, 1997). A **Figura 23** mostra a numeração correta para esta classe de compostos.

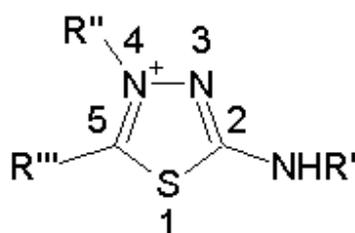


Figura 23: Sequência de prioridade numérica para o heterociclo do tipo 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina

Em busca de mais informações sobre a estrutura dos compostos mesoiônicos, Cheung e colaboradores, através de difração de raios-X e cálculos teóricos, estudaram o 4-fenil-5-(4-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (**51**) e seu cloridrato (**52**) (Cheung *et al.*, 1992). Através das evidências obtidas, sugeriram que em ambos os derivados a carga positiva está substancialmente associada com o átomo de *N*-4 (e seu grupo fenila), enquanto a negativa formalmente localizada no átomo de *N*-exocíclico. Estes estudos permitiram ainda obter as seguintes conclusões a respeito da estrutura dos compostos compostos **51** e **52** (**Figura 24, página 29**):

- (i) As ligações *N*-3/*N*-4 e *S*-1/*C*-2 possuem maior caráter de ligação simples enquanto que a ligação *S*-1/*C*-5 apresenta maior caráter de dupla;
- (ii) A ligação *C*-2/*N*-exocíclico têm um substancial caráter de ligação dupla, provavelmente maior na base livre (**51**), do que no cloridrato (**52**);
- (iii) As ligações *C*-5/*N*-4 e *C*-2/*N*-3 possuem caráter de dupla ligação;
- (iv) *N*-4 possui uma substancial carga positiva, enquanto *N*-3 tem uma negativa.

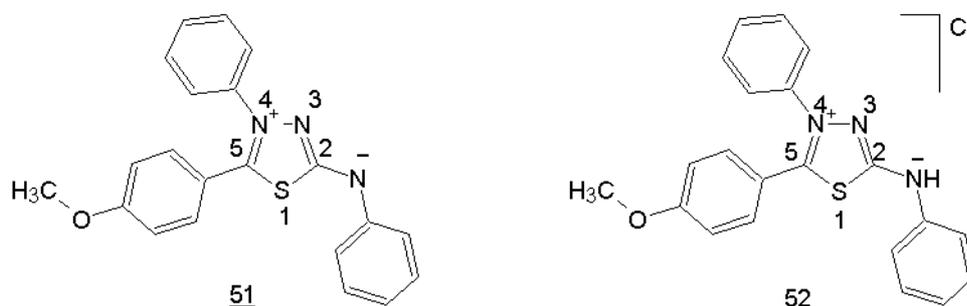


Figura 24. Estruturas dos derivados da classe dos 1,3,4-tiadiazólios estudados (Cheung *et al.*, 1992).

1.9.2. Síntese de compostos do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida e 1,3,4-triazólio-2-tiolato

Os primeiros derivados da classe dos 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminidas foram sintetizados em 1971, pela reação de *N*-tioacilhidrazinas e dicloretos de isocianetos de arila que produz o ácido conjugado intermediário, a partir do qual as bases livres são obtidas por tratamento das soluções em clorofórmio com amônia gasosa (Ollis e Ramsden, 1971). A **Figura 25** mostra a rota sintética utilizada na sua preparação.

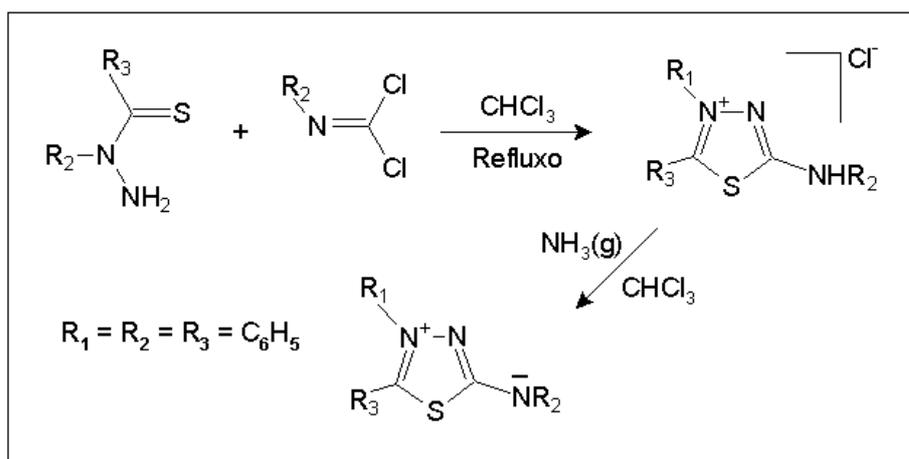
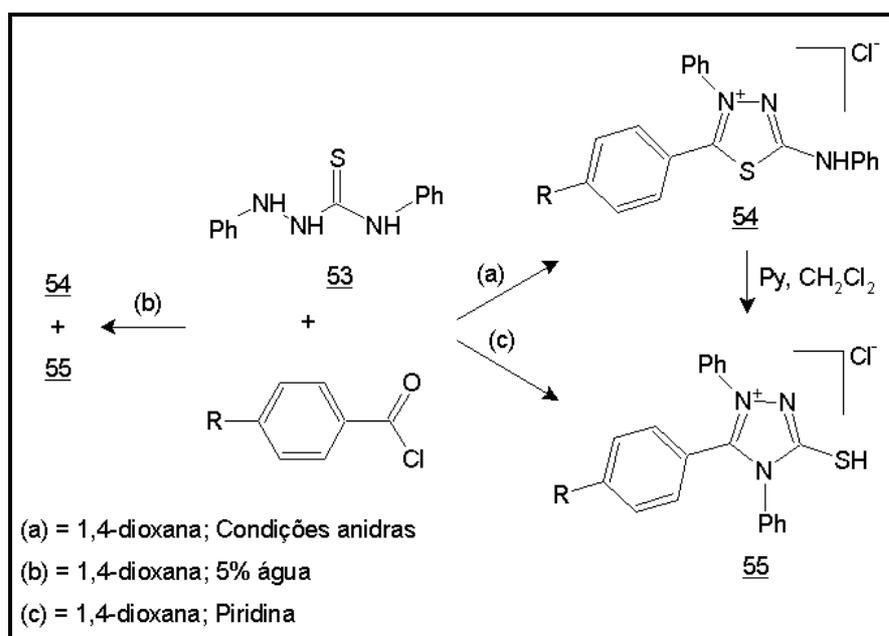


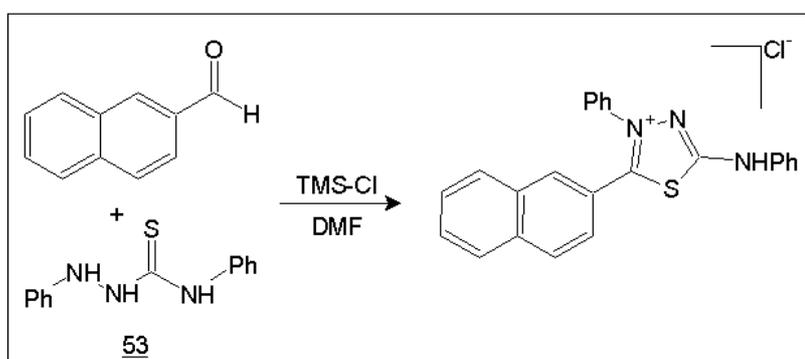
Figura 25: Rota sintética utilizada na preparação do sistema 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida (Ollis e Ramsden, 1971).

Outro método bastante utilizado consiste na reação de anidroacilação da 1,4-difeniltiossemicarbazida **53** com cloretos de aroila (Montanari *et al.*, 1994), que dependendo da natureza do meio reacional poderá haver ainda a formação do isômero 1,3,4-triazólio-2-tiol (**55**) (Echevarria *et al.*, 1995; Maciel *et al.*, 1998) (**Esquema 2**).



Esquema 2: Diferentes rotas sintéticas para os sistemas 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina e 1,3,4-triazóli-2-tiolato (Echevarria *et al.*, 1995; Montanari *et al.*, 1994; Maciel *et al.*, 1998).

Além de cloreto de aroila, também podem ser utilizados aldeídos aromáticos, tratados em cloreto de trimetilsilano (TMS-Cl) e dimetilformamida (DMF) (Kappel *et al.*, 2004), como mostra no **Esquema 3**.



Esquema 3: Reação de anidroacilação com aldeído aromático (Kappel *et al.*, 2004).

Os compostos do sistema 1,3,4-triazólio-2-tiolato podem ser também obtidos pela isomerização dos correspondentes 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminidas, através de diversas reações como por exemplo: solução etanólica saturada por amônia anidra em ebulição (Cawkill *et al.*, 1976); piridina em refluxo (Montanari *et al.*, 1994); solução de hidróxido de sódio 2M e solução de anilina em clorofórmio, estando estas duas últimas em benzeno tratado com excesso de isotiocianato de fenila (Ollis e Ramsden, 1974).

Ainda em relação à isomerização, podemos citar a que ocorre fotoquimicamente (Montanari *et al.*, 1993), em que o mesoiônico da série 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida é submetido à luz de mercúrio, propiciando a formação do seu isômero triazólio.

1.9.3. Atividades Biológicas dos Meso-iônicos

Os compostos mesoiônicos possuem características estruturais, que têm despertado um considerável interesse nos pesquisadores envolvidos na área da Química Medicinal. Este potencial como substâncias bioativas tem sido atribuído, até o momento, aos seguintes fatores: caráter aromático; anéis heterocíclicos de pequenos tamanhos; caráter final neutro, apesar da presença de cargas formais; variação de densidade eletrônica no anel; e às várias possibilidades da presença de heteroátomos diferentes, levando a diversos sistemas mesoiônicos (Silva, 1997).

Os mesoiônicos da série 4-fenil-1,3,4-tiadiazólio-2-tiolato 5-substituídos (**56**, **Figura 26**, **página 32**), foram testados por Kier e Stewart em *Staphylococcus aureus*, *Diplococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*, sendo que os compostos com os substituintes metil, etil, isopropil e propila, mostraram-se mais ativos (Stewart e Kier, 1965).

Echevarria e Schinzato estudaram as atividades antitumorais do cloreto de 1,3-difenil-2-[4-cloro-3-nitrofenil]-1,3,4-triazólio-5-tiol (**57**, **Figura 26**, **página 32**), que mostrou-se ativo contra os tumores de Ehrlich, Sarcoma 180 e B10MCII (Schinzato *et al.*, 1988).

Grynberg e colaboradores estudaram a atividade antitumoral *in vivo* dos cloridratos dos compostos mesoiônicos da série 4-fenil-5-(4-X-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (**58**, **Figura 26**, **página 32**), onde X = NO₂ e OH. Os compostos testados mostraram-se ativos contra Sarcoma 180 e o carcinoma de Ehrlich (Grynberg *et al.*, 1997).

Silva e colaboradores estudaram a atividade leishmanicida dos cloridratos dos compostos mesoiônicos da série 4-fenil-5-(3-Y e 4-X-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (**58**, Figura 26).

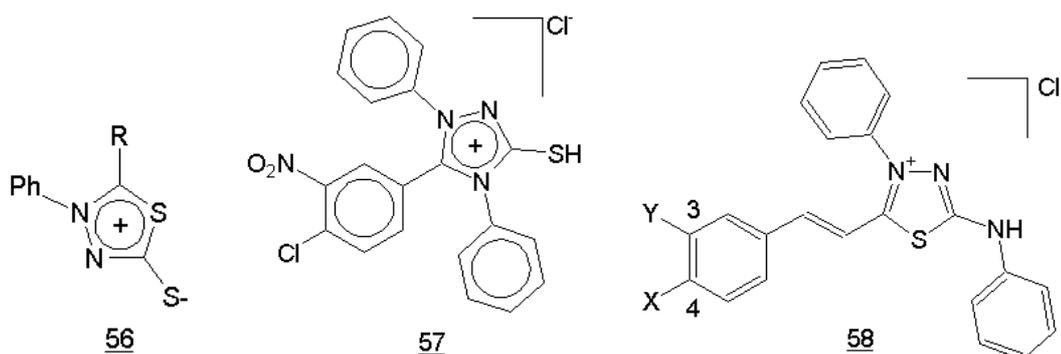


Figura 26. Compostos mesoiônicos bioativos.

Os compostos testados mostraram-se eficazes na inibição do crescimento destes microrganismos, tanto nas formas epimastigotas quanto amastigotas, como mostra a **Tabela 4**, onde os derivados com substituintes OCH₃ mostraram elevada atividade em relação ao padrão utilizado (pentamidina) (Silva *et al.*, 2002).

Tabela 4: Valores de IC₅₀(μM) dos cloridratos mesoiônicos sobre *L. amazonensis*
(Silva, *et al.*, 2002).

Compostos	X	Y	IC ₅₀ (μM)	
			Epimastigota	Amastigota
Xa	H	H	0,47±0,03	104,54±11,95
Xb	CH ₃	H	0,98±0,05	287,46±20,15
Xc	OCH₃	H	0,17±0,01	23,93±4,88
Xd	NO ₂	H	1,00±0,12	52,92±5,92
Xe	F	H	0,92±0,06	5,37±0,28
Xf	Cl	H	1,51±0,22	186,34±18,11
Xg	CN	H	27,80±8,48	79,85±6,28
Xh	Br	H	0,87±0,10	33,26±2,38
Xi	OCH ₂ CH ₃	H	1,49±0,20	76,68±4,64
Xj	OH	H	7,58±0,03	113,21±5,33
Xk	H	OCH₃	0,04±0,01	41,88±2,83
Xl	H	NO ₂	1,58±0,29	193,38±14,27
Xm	H	Cl	0,48±0,05	178,11±15,39
Xn	H	Br	0,52±0,05	5,48±0,04
Pentamidina*	-	-	0,46±0,08	118,00±7,31

*Padrão comercial

Senff-Ribeiro e colaboradores estudaram a atividade antimelanoma, de linhagem humana, e a relação estrutura-atividade dos cloridratos mesoiônicos da série 1,3,4-tiadiazólio, encontrando excelentes resultados para o derivado (MI-D) (**59**, **Figura 27**) (Senff-Ribeiro, 2004^{a,b} e 2003).

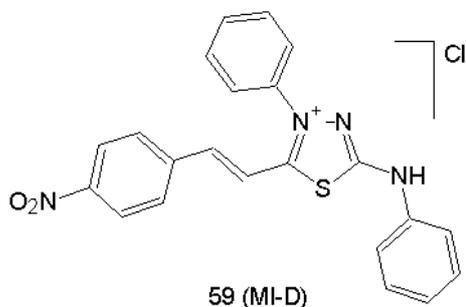


Figura 27. Derivado 1,3,4-tiadiazólio com atividade antimelanoma
(Senff-Ribeiro, 2004^{a,b} e 2003).



OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

2. Objetivos e Justificativas

Os resultados anteriormente descritos por Kapil (1993) e Raay (1999) sobre a atividade antiparasitária da piperina sobre *Leishmania donovani* (protozoário, da família dos Tripanossomatídeos, causador da leishmaniose visceral, na Índia), estimulou nosso grupo de pesquisa (Ribeiro, 2004) em avaliar a atividade tóxica desta amida natural e de seus derivados sobre outro importante Tripanossomatídeo de interesse médico, o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, parasitose de grande impacto na América do Sul, principalmente no Brasil.

Paralelamente, Silva e colaboradores (2002) descreveram a atividade antiparasitária de derivados mesoiônicos, da classe das 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminidas, sobre *Leishmania amazonensis* (protozoário, da família dos Tripanossomatídeos, leishmaniose cutânea no Brasil). Estes resultados, estimularam nosso grupo de pesquisa em continuar os estudos com o *Trypanosoma cruzi*, incorporando a unidade mesoiônica aos derivados e análogos da piperina.

Outro fator relevante sobre a utilização desta amida natural envolve a sua abundância no material vegetal, facilidade da sua extração, que aliado ao seu perfil estrutural, permite várias abordagens, visando a obtenção de derivados. Desta forma, temos como principais objetivos neste trabalho:

- Isolar quantidades adequadas da amida natural, através da metodologia otimizada pelo nosso grupo de pesquisa (Ribeiro, 2004), e realizar modificações na estrutura da piperina, que permitam a preparação de uma série de derivados mesoiônicos, incorporando ao produto natural a unidade 1,3,4-tiadiazólio.

- Realizar a síntese dos derivados mesoiônicos, com duas estratégias de modificação estrutural:
 - a) Modificações da cadeia lateral com a variação da quantidade de carbonos olefinicos e a saturação dos mesmos;
 - b) Nitração dos anéis aromáticos, mantendo o grupo metilendioxílico, contido na amida natural, piperina;

Com estes produtos pretendemos avaliar a importância das modificações realizadas na cadeia lateral (conjugação e a distância entre os anéis aromáticos homocíclicos e heterocíclicos), e dos anéis aromáticos (nitração – visto que o benzonidazol, droga de referência, possui um grupo nitro em sua estrutura – unidade farmacofórica) quanto à sua toxicidade sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*.

- Caracterizar os produtos obtidos, bem como os intermediários sintéticos, através dos métodos convencionais de análise: RMN ^1H e ^{13}C , espectroscopia na região do infravermelho e espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade tóxica dos novos derivados mesoiônicos obtidos sobre o *Trypanosoma cruzi*, comparando os dados observados com a atividade do produto natural e do benzonidazol, droga de referência, usada no tratamento da doença. Diante dos resultados que serão obtidos, pretendemos traçar um perfil da relação estrutura-atividade (*SAR*) dos derivados e análogos (mesoiônicos) com a piperina.

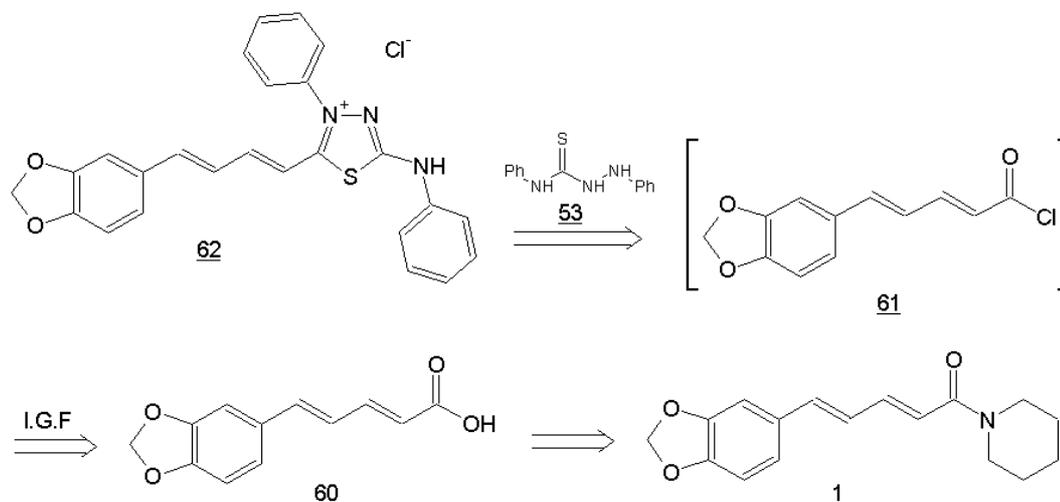


3. Estratégias de síntese

3.1. Estratégias para a síntese dos novos cloretos de 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminas, derivados e análogos a amida natural (**1**).

Como descrito na análise retrossintética (**Esquema 4**), para a síntese dos cloretos mesoiônicos, derivados e análogos à piperina **1**, é necessário a preparação de seus respectivos ácidos carboxílicos com duas abordagens de modificação estrutural: na cadeia lateral (variando a quantidade de carbonos olefinicos e a saturação dos mesmos) e anel aromático (nitração), para a formação dos intermediários cloretos de ácido com a consequente reação de anidrocilação com 1,4-difeniltiossemicarbazida **53** (Cheung *et al.*, 1992; Montanari *et al.*, 1994), salvo para aldeídos aromáticos (Kappel *et al.*, 2004).

3.1.1. Estratégia para a síntese do cloreto mesoiônico **62**, derivado da piperina **1**.



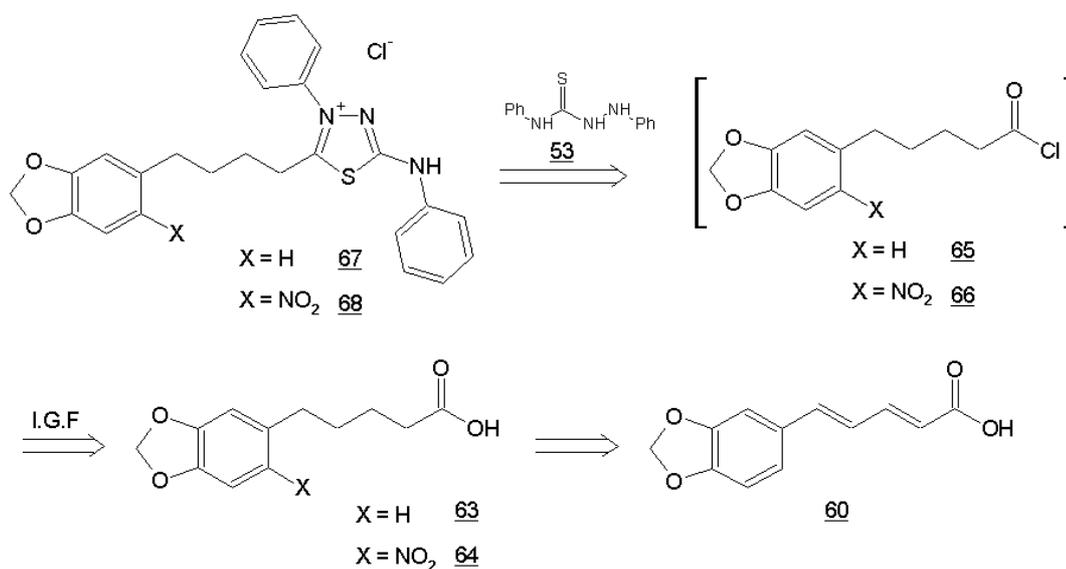
Esquema 4: Estratégia sintética para a preparação do novo derivado 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (**62**) a partir da amida natural **1**.

O cloreto mesoiônico **62** pode ser preparado através da reação de anidrocilação do cloreto de ácido **61** com 1,4-difeniltiossemicarbazida **53** (Montanari *et al.*, 1994). Por sua vez o cloreto de ácido **61** pode ser obtido por interconversão de grupo funcional (I.G.F) tendo o ácido **60** como seu precursor. Diversas metodologias podem ser empregadas para obtenção do

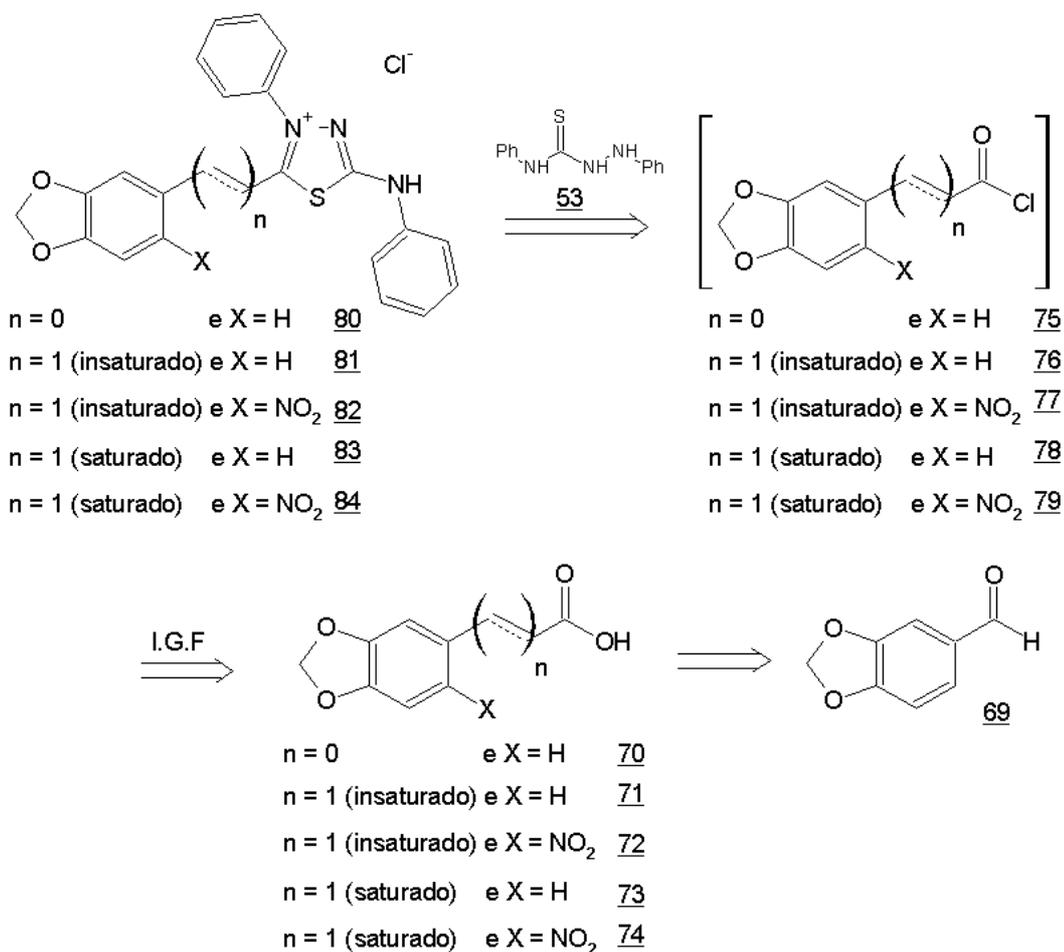
intermediário **61**, dentre elas destacamos o uso de cloreto de tionila (SOCl_2) e cloreto de oxalila ($\text{C}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$) (March, 1985). O ácido **60** pode ser facilmente preparado a partir da amida natural **1**, através de uma reação de hidrólise básica, como pode ser observado no **Esquema 4** (página 36).

3.1.2. Estratégia para a síntese de outros cloridratos mesoiônicos, derivados e análogos à piperina **1**.

Seguindo a mesma estratégia sintética descrita no **Esquema 4** (página 36), outros derivados e análogos podem também ser preparados variando a estrutura dos cloretos de ácido (preparados a partir dos respectivos ácidos) empregados na etapa de anidroacilação. No **Esquema 5**, pode ser observada a estratégia para outros derivados da piperina, com modificações estruturais e no **Esquema 6** (página 38) as estratégias para obter os cloridratos mesoiônicos análogos à piperina **1**, derivados do piperonal (**69**).

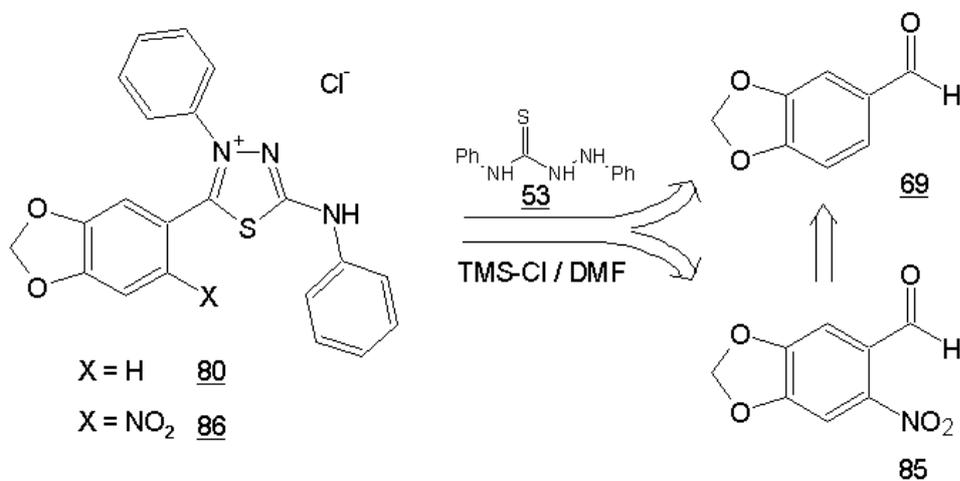


Esquema 5: Estratégia sintética para a preparação de outros derivado 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (**67** e **68**) a partir do ácido **60**, derivado da piperina **1**.



Esquema 6: Estratégia sintética para a preparação dos derivados 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina análogos à amida natural (**1**) a partir do piperonal **69**.

Para a síntese dos cloridratos mesoiônicos **80** e **86**, como apresentam intermediários aldeídos aromáticos (piperonal **69** e nitropiperonal **85**), pode ser utilizado a metodologia descrita por Kappel, utilizando também 1,4-difeniltiossemicarbazida **53** para a obtenção dos cloridratos mesoiônicos (Kappel *et al.*, 2004), sem a necessidade de preparar os intermediários cloretos de ácido (**Esquema 7**, página 39).



Esquema 7: Estratégia sintética para a preparação dos derivados cloretos de 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina análogos a amida natural (1) a partir de aldeídos aromáticos (69 e 85) (Kappel *et al.*, 2004).

3.2. Estratégias de síntese dos precursores ácidos, derivados e análogos à piperina 1, com modificação estrutural

3.2.1. Modificação da cadeia lateral

Para realizar a síntese dos ácidos carboxílicos foram necessária reações tais como:

- A síntese do derivado piperínico (60), com quatro carbonos (4C) insaturados entre a carbonila e o anel aromático (**Esquema 4, página 36**), utilizando a hidrólise básica da função amida da piperina 1 (Ikan, 1991);
- A síntese do derivado cinâmico (71), com 2C insaturados entre a carbonila e o anel aromático (**Esquema 6, página 38**), utilizando a reação de Knoevenagel com o piperonal (69) (Silva *et al.*, 2002);

- A síntese do derivado piperonílico (**70**), com ausência de carbono entre a carbonila e o anel aromático (**Esquema 6, página 38**), utilizando o reagente de Jones na reação de oxidação do piperonal (Rodig, 1990);
- A síntese dos ácidos saturados (**63** e **73**), utilizando a redução catalítica (Pd/C) das ligações duplas (**Esquema 5, página 37** e **Esquema 6, página 38** respectivamente), responsáveis pela conjugação da carboxila ao anel aromático (Venkatasamy *et al.*, 2004).

3.2.2. Modificação no anel aromático

Para a realizar a síntese dos derivados nitrados foram necessária reações tais como:

- A nitração dos ácidos saturados (**63** e **73**) (**Esquema 5, página 37** e **Esquema 6, página 38**, respectivamente), utilizando a reação de nitração catalisada por ácido (Rascado, 1997);
- A síntese do ácido 6-nitrocínâmico (**72**) foi obtida indiretamente pela nitração do piperonal (**69**) (**Esquema 6, página 38**) seguida da reação de Knoevenagel (Rascado, 1997; Silva *et al.*, 2002).

3.3. Discussão dos resultados

3.3.1. Isolamento da piperina dos frutos secos de *Piper nigrum*

A primeira etapa deste trabalho consistiu no isolamento do produto natural (Ikan,1991), visando a obtenção de quantidades adequadas de piperina para a síntese de seus derivados.

A metodologia aplicada para a extração do produto foi descrita por Ikan (1991), onde foi utilizada uma aparelhagem de Soxhlet, tendo etanol como solvente (Santos, 1999). A **Figura 28** mostra a aparelhagem utilizada para a extração do material vegetal.

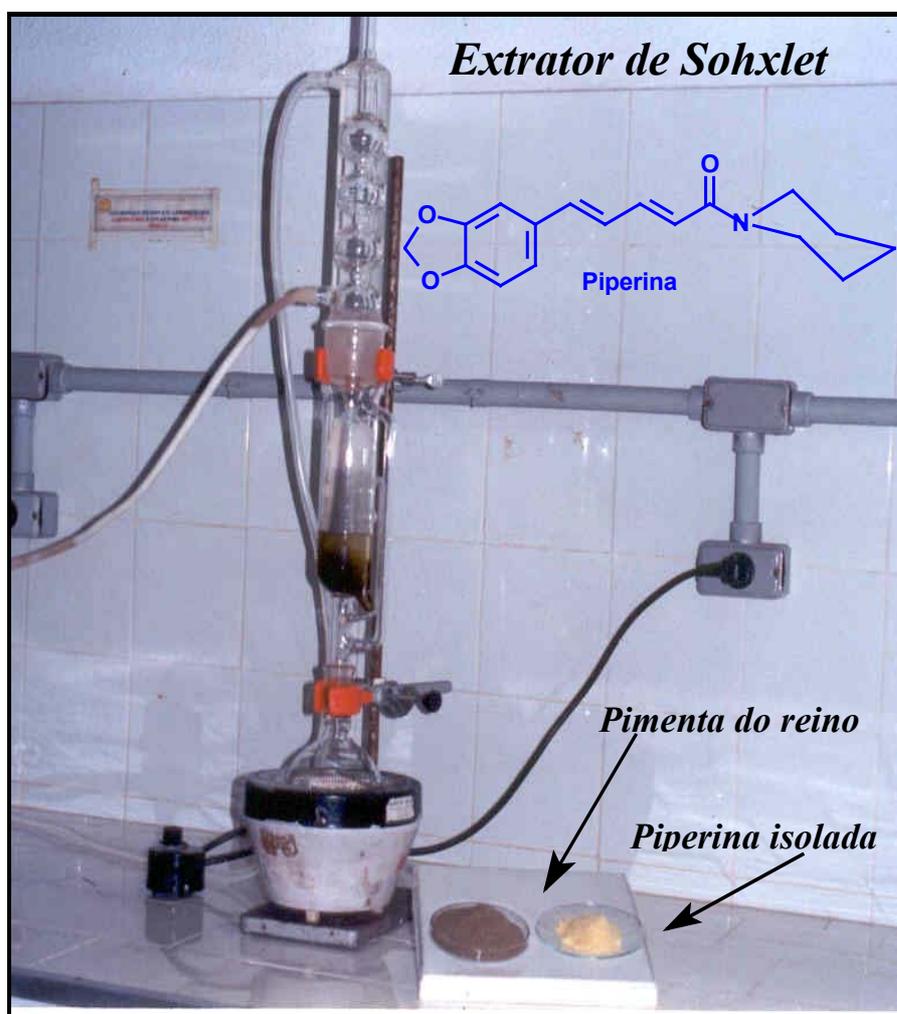
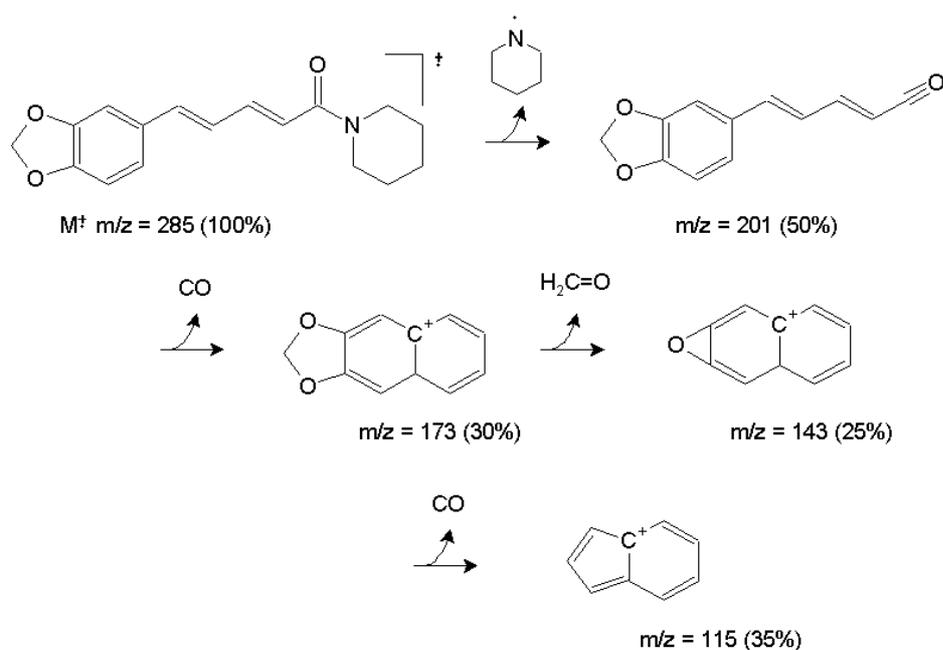


Figura 28: Extrator de Soxhlet acoplado à manta de aquecimento e condensador.

Após extração e tratamentos adequados, a piperina foi obtida na forma de cristais amarelos. O material foi obtido, normalmente, em grau de pureza adequado, o que foi confirmado através dos métodos convencionais de análise (RMN, IV e EM). Os dados obtidos foram totalmente compatíveis com a estrutura da amida natural, e também por comparação com dados descritos na literatura (De Araújo Júnior *et al.*, 1997).

No espectro de infravermelho pode ser observado uma forte absorção em 1634 cm^{-1} , indicando a presença da função carbonila amídica conjugada, além das absorções na região entre $2937\text{-}2858\text{ cm}^{-1}$, referentes às deformações axiais das ligações C-H (**Espectro 1, página 72**). No espectro de RMN ^1H , observou-se um sinal simples em $\delta\ 5,97\text{ ppm}$, referente aos 2 hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, além de um grupo de sinais entre $\delta\ 6,40$ e $\delta\ 7,43\text{ ppm}$, referentes aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral, e os 3 hidrogênios aromáticos (**Espectro 3, página 73**). No espectro de RMN ^{13}C observou-se um sinal em $\delta\ 165,3\text{ ppm}$, referente à absorção do carbono da carbonila amídica (**Espectro 4, página 73**). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular e pico base ($m/z = 285\text{ u.m.a.}$, 100% de abundância relativa) (**Espectro 2, página 72**), fragmentos característicos para a estrutura da amida natural. O **Esquema 8** mostra uma proposta de fragmentação para a piperina **1**.

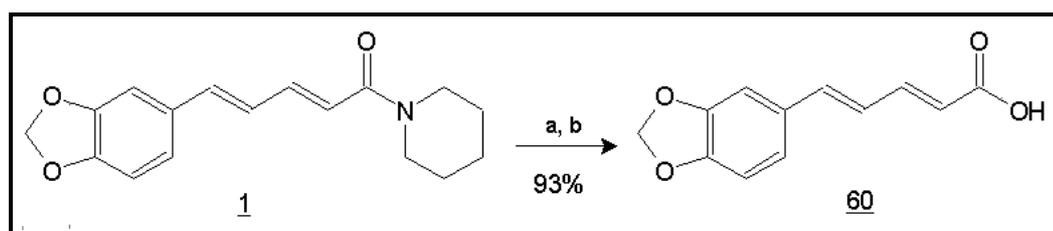


Esquema 8: Proposta de fragmentação para a piperina **1**.

3.3.2. Preparação dos ácidos carboxílicos, intermediários na síntese dos mesoiônicos

3.3.2.1. Hidrólise alcalina da piperina

A preparação do primeiro derivado envolveu a hidrólise da função amida presente na piperina (**1**), gerando o ácido piperínico **60** (**Esquema 9**). Esta reação encontra-se experimentalmente descrita no trabalho de Ikan (Ikan, 1991). Contudo a reação não se completou conforme descrito por Ikan (1991), sendo necessário então modificações no tempo de reação, de 2 horas para 12 horas de refluxo e elevar as quantidades de base utilizada (Ribeiro, 2004), gerando assim o ácido piperínico **60**, após acidificação do meio, em elevado rendimento (93%) e grau de pureza adequado (**Esquema 9**).

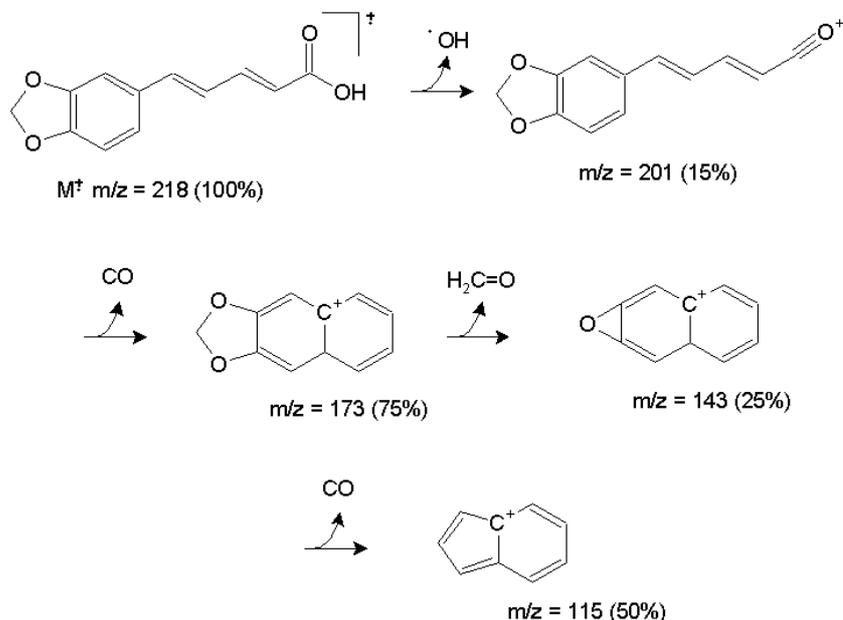


Reagentes: a) KOH/etanol, refluxo, 12h; b) HCl 10%, até pH 3,0 (95%)

Esquema 9: Hidrólise básica da piperina **1**.

O ácido **60** apresentou ponto de fusão idêntico ao descrito na literatura (Pf.: 216-217°C) (Ikan, 1991). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise. No espectro de infravermelho observou-se uma banda larga, em 3250 cm^{-1} , devido ao estiramento da ligação OH do ácido carboxílico. Observou-se ainda a absorção a 1678 cm^{-1} , característica da carbonila de ácido conjugado (**Espectro 5, página 76**). No espectro de RMN ^{13}C observou-se um sinal em $\delta\ 169,0\text{ ppm}$, referente ao carbono da carbonila (**Espectro 8, página 77**). No espectro de RMN ^1H observou-se um single em $\delta\ 12,2\text{ ppm}$ do hidrogênio ácido, e o restante dos sinais foram totalmente compatíveis com a estrutura de **60** (**Espectro 7, página 77**). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular e pico base ($m/z = 218\text{ u.m.a.}$, 100% de abundância relativa) (**Espectro 6, página 76**), fragmentos característicos para o ácido **60**.

O Esquema 10 mostra uma proposta de fragmentação para o ácido **60**.

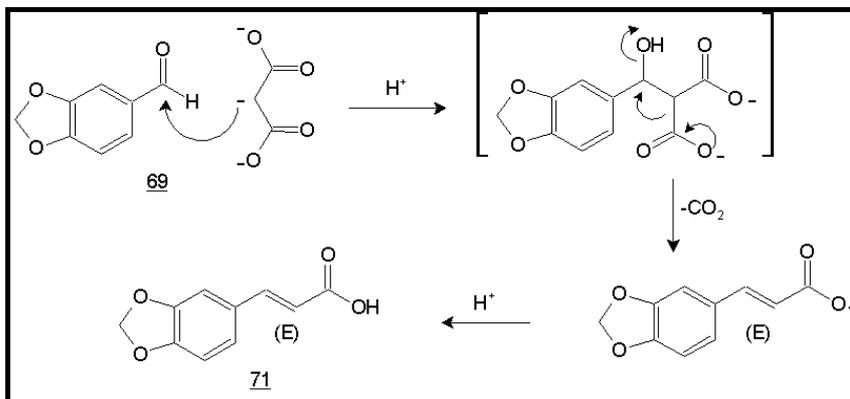


Esquema 10: Proposta de fragmentação para o ácido piperínico **60**.

3.3.2.2. Síntese do ácido cinâmico **71**

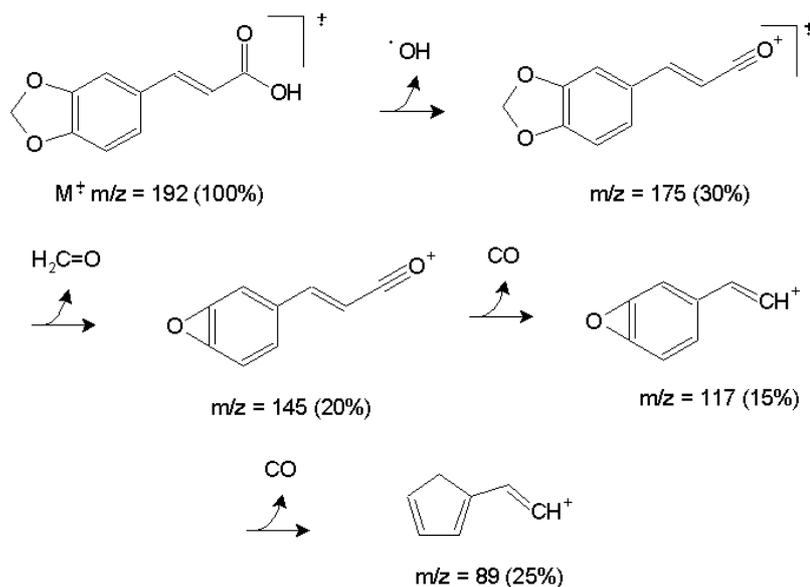
A preparação do ácido cinâmico (**71**) foi realizada através da reação de Knoevenagel entre o piperonal (**69**) e o ácido malônico (Esquema 11, página 45), em presença de piperidina, tendo piridina como solvente (Silva *et al.*, 2002).

A reação se dá através da formação do enolato do ácido malônico, pela ação da piperidina como base. O ânion formado ataca o centro eletrofílico do piperonal (carbonila aldeídica), formando um intermediário suscetível de sofrer, *in situ*, uma eliminação descarboxilativa, gerando o alceno com configuração *E*. Após neutralização ácida do meio, o ácido cinâmico **70** é formado, como mostra o mecanismo descrito no Esquema 11.



Esquema 11: Mecanismo da reação de Knoevenagel (Silva *et al.*, 2002).

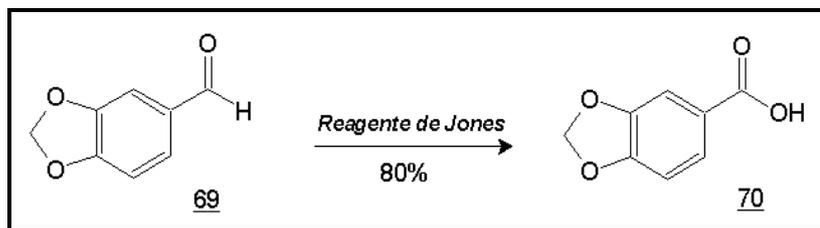
O ácido cinâmico **71** foi obtido, após recristalização, na forma de cristais brancos apresentando ponto de fusão idêntico ao descrito na literatura (Pf.: 238°C) (Silva *et al.*, 2002). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise. No espectro de infravermelho observou-se uma banda larga, em 3446cm^{-1} , devido ao estiramento da ligação OH do ácido carboxílico. Observou-se ainda a absorção em 1692cm^{-1} , característica da carbonila de ácido conjugado (**Espectro 9, página 80**). No espectro de RMN ^{13}C observou-se um sinal em δ 169 ppm, referente ao carbono da carbonila (**Espectro 12, página 81**). No espectro de RMN ^1H observou-se um singlete em δ 12,2 ppm, com um hidrogênio, referente ao ácido carboxílico, além de outros sinais compatíveis com a estrutura do ácido **71** (**Espectro 11, página 81**). O espectro de massa mostrou, além do pico do íon molecular e pico base ($m/z = 192$ u.m.a., 100% de abundância relativa) (**Espectro 10, página 80**), fragmentos característicos para o ácido **71**. O **Esquema 12 (página 46)** mostra uma proposta de fragmentação para o ácido cinâmico **71**.



Esquema 12: Proposta de fragmentação para o ácido cinâmico **71**.

3.3.2.3. Síntese do ácido piperonílico **70**

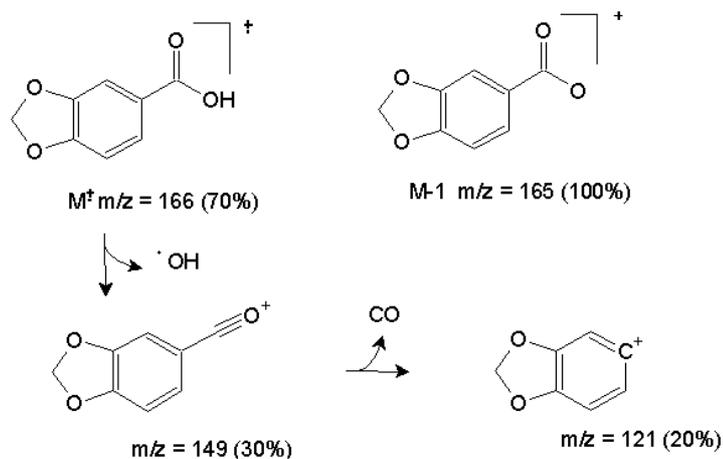
Para a preparação do derivado piperonílico **70** foi realizada uma reação de oxidação com o Reagente de Jones (2,68M CrO₃) (Rodig, 1994) sobre o piperonal (**Esquema 13**), tendo acetona como solvente.



Reagente de Jones: 2,68M CrO₃, acetona, 4h (80%)

Esquema 13: Oxidação do piperonal **69**.

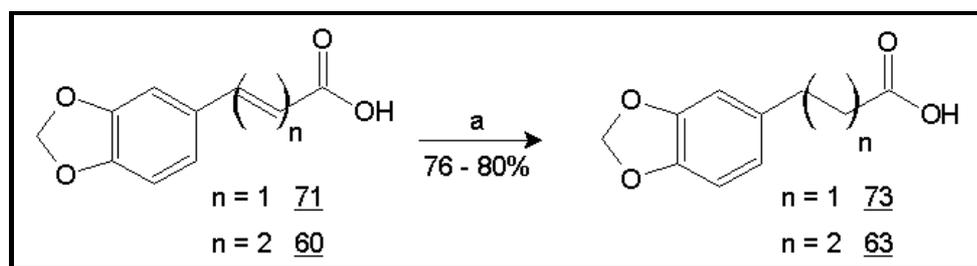
Após a recristalização, o ácido piperonílico (**70**) (**Esquema 13, página 46**) apresentou ponto de fusão semelhante ao descrito na literatura (Aldrich, 2004). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise. No espectro de infravermelho observa-se uma banda larga, de 3452 à 2500 cm^{-1} , devido ao estiramento da ligação OH do ácido carboxílico. Observou-se ainda a absorção em 1673 cm^{-1} , característica da carbonila de ácido conjugado (**Espectro 13, página 84**). No espectro de RMN ^{13}C observou-se um sinal em δ 167 ppm, referente ao carbono da carbonila (**Espectro 16, página 85**). No espectro de RMN ^1H observou-se um singlete em δ 12,6 ppm com um hidrogênio, referente ao ácido carboxílico, além de outros sinais compatíveis com a estrutura do ácido piperonílico **70** (**Espectro 15, página 85**). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular e pico base ($m/z = 165$ u.m.a., 100% de abundância relativa) (**Espectro 14, página 84**), fragmentos característicos para o ácido **70**. O **Esquema 14** mostra uma proposta de fragmentação para o ácido **70**.



Esquema 14: Proposta de fragmentação para o ácido piperonílico **70**.

3.3.2.4. Síntese dos ácidos saturados **63** e **73**

A preparação tanto do ácido tetraidropiperínico (**63**) quanto ao diidrocinâmico (**73**) foram realizadas através da redução catalítica clássica, tendo como catalisador Pd/C em atmosfera de H₂ (a pressão normal) e acetato de etila como solvente (Vankatasamy *et al.*, 2004). O Esquema 15 mostra as reações de redução catalítica.

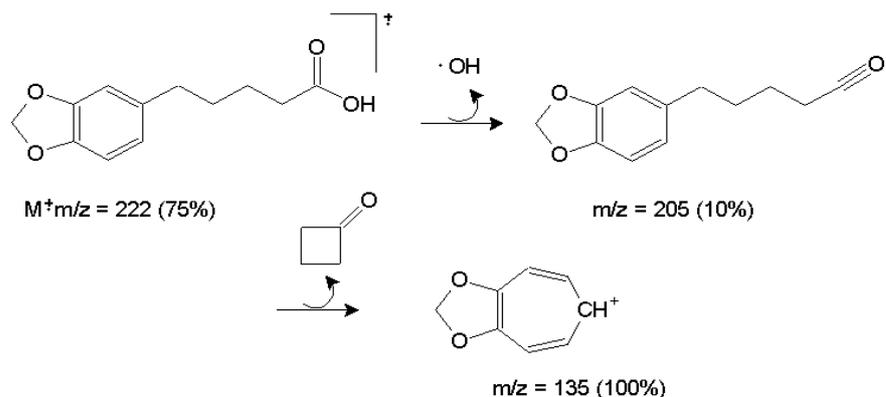


Reagentes: a) H₂, Pd/C; acetato de etila, pressão atmosférica, t.a, 3h

Esquema 15: Reação de redução catalítica dos ácidos **63** e **73**.

Os produtos obtidos foram caracterizados pelos métodos convencionais de análise e apresentaram dados espectroscópicos compatíveis com suas estruturas:

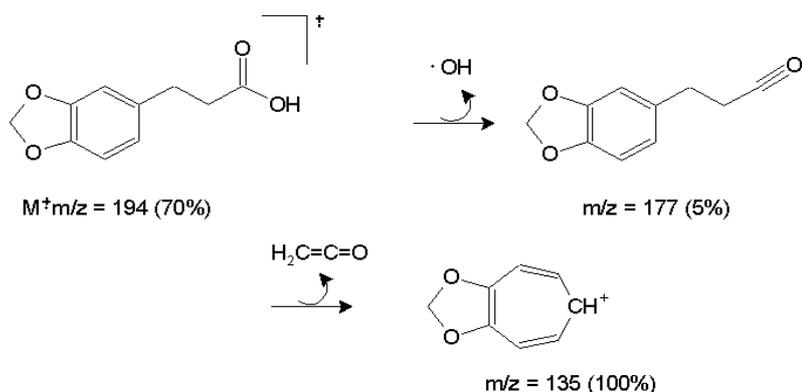
Para o ácido tetraidropiperínico (**63**) (**Esquema 15**), no espectro de infravermelho, foi observado uma banda larga, em 3441 cm⁻¹, devido ao estiramento da ligação OH, além da absorção em 1708 cm⁻¹, característica da carbonila de ácido não conjugada (**Espectro 17, página 88**). No espectro de RMN ¹³C foi observado um sinal em δ 180 ppm, referente ao carbono da carbonila não conjugada e sinais entre 24,2 e 35,3 ppm referentes aos carbonos saturados (**Espectro 20, página 89**). Nos espectro de RMN ¹H foram observados os sinais entre 1,6 a 2,5 ppm, referentes aos hidrogênios da cadeia saturada (**Espectro 19, página 89**). O espectro de massas, além do pico do íon molecular m/z = 222 u.m.a. e pico base 135 u.m.a., apresentou fragmentos característicos ao ácido **63** (**Espectro 18, página 88**). O **Esquema 16 (página 49)** mostra uma proposta de fragmentação para o ácido tetraidropiperínico **63**.



Esquema 16: Proposta de fragmentação para o ácido tetraidropiperínico **63**.

No espectro de infravermelho do ácido diidrocinâmico (**73**) (**Esquema 15, página 48**) foi observada uma banda larga, em 3284 cm^{-1} , devido ao estiramento da ligação OH, além da absorção em 1733 cm^{-1} , característica da carbonila de ácido não conjugada (**Espectro 21, página 92**). No espectro de RMN ^{13}C foi observado um sinal em $\delta 179\text{ ppm}$, referente ao carbono da carbonila não conjugada e os sinais 30,4 e 36,1 ppm referentes aos carbonos benzílico e α -carbonila, respectivamente (**Espectro 24, página 93**). Nos dados de RMN ^1H foram observados os dois tripletos em 2,63 e 2,87 ppm referentes aos dois metilenos α e β -carbonila (**Espectro 23, página 93**). O espectro de massas, além do pico do íon molecular $m/z = 194\text{ u.m.a.}$ e pico base 135 u.m.a., apresentou fragmentos característicos ao ácido **73** (**Espectro 22, página 92**).

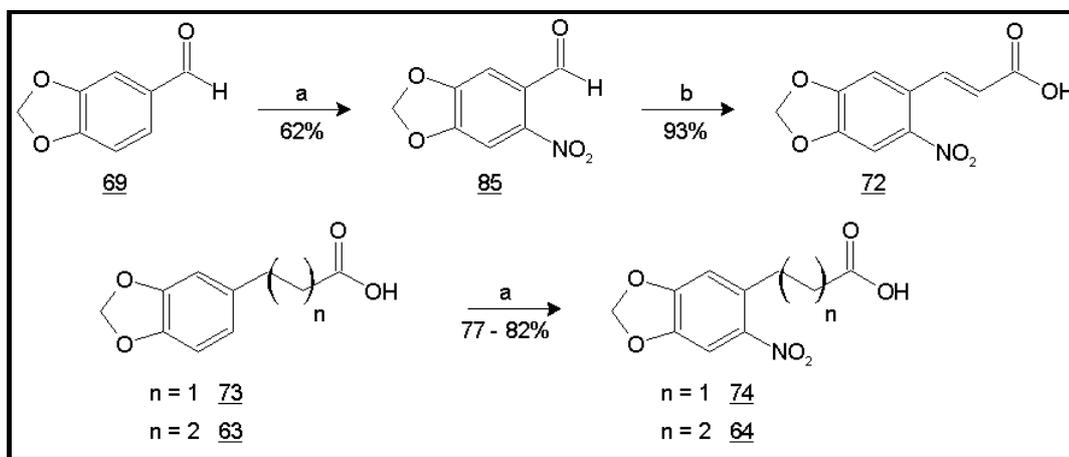
O **Esquema 17** mostra uma proposta de fragmentação para o ácido diidrocinâmico **73**.



Esquema 17: Proposta de fragmentação para o ácido diidrocinâmico **73**.

3.3.2.5. Nitração do anel aromático para os respectivos ácidos carboxílicos (Rascado, 1997)

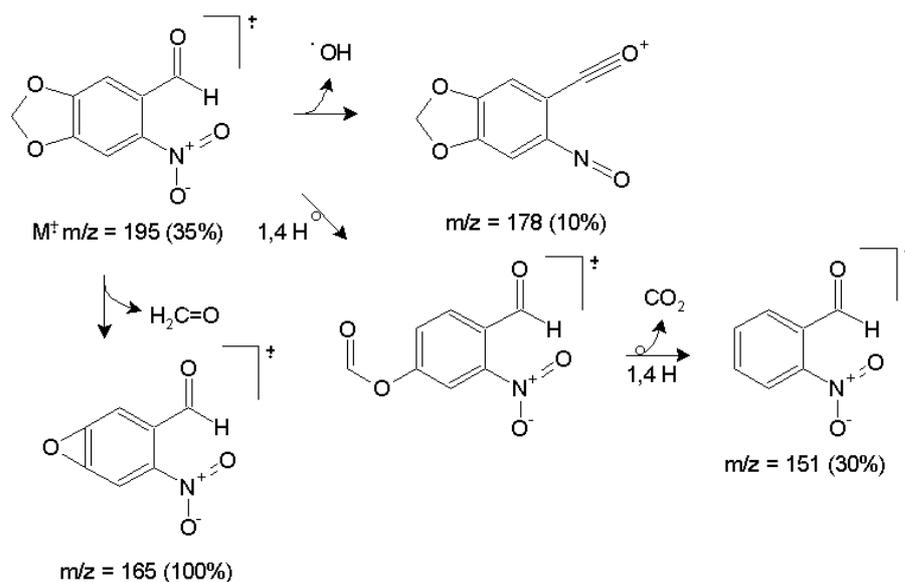
A nitração do anel aromático dos respectivos ácidos carboxílicos, obtidos na etapa anterior, foi realizada utilizando uma reação clássica de nitração em solvente orgânico gerando os respectivos nitro-aromáticos em rendimentos satisfatórios (62–82%) (Rascado, 1997) (**Esquema 18**). Para os ácidos conjugados **60** e **71**, não foi possível realizar a nitração do anel aromático devido a interferência das insaturações da cadeia lateral. Assim, a nitração do ácido cinâmico **71** foi realizada indiretamente, pela nitração do piperonal **69**, seguida da reação de Knoevenagel, para a obtenção do ácido nitrocinâmico **72**. Já a nitração do ácido piperínico **60**, apresentou problemas, com inúmeros subprodutos comprometendo seu rendimento, por isso foi descartada a utilização do seu derivado. Outro fator relevante a ser mencionado é a regioselectividade da nitração na posição 6 (seis) do anel aromático, como mostrado no **Esquema 18**.



Reagentes: a) HNO₃ (conc), Ácido acético Glacial, t.a, 5h; b) 1. ác. malônico, piridina e piperidina, 2. HCl

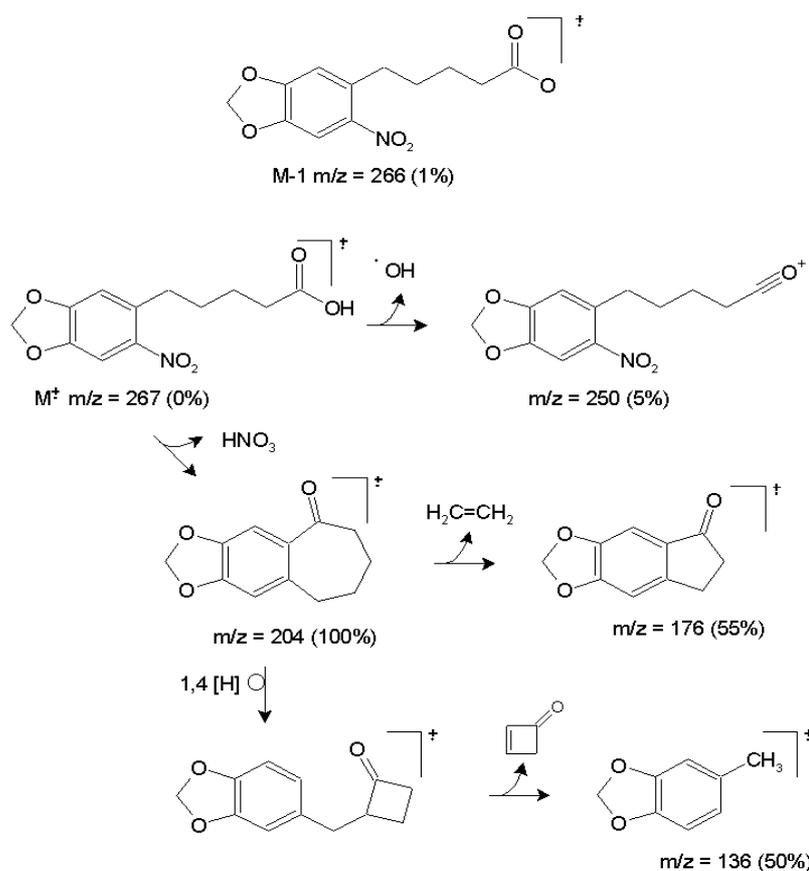
Esquema 18: Nitração do anel aromático.

O nitropiperonal (**85**) (**Esquema 18, página 50**) após recristalização, apresentou-se como um sólido amarelo na forma de agulhas e ponto de fusão idêntico a literatura (93°C - Aldrich, 2004). No espectro de infravermelho foi observada uma banda em 1680 cm⁻¹, devido ao estiramento da carbonila do aldeído e outra 1517 cm⁻¹, devido ao estiramento da ligação NO do grupo nitro ligado ao anel aromático (**Espectro 25, página 96**). No espectro de RMN ¹³C foi observado um sinal em δ 190 ppm, referente ao carbono da carbonila e outra a δ 153 ppm, atribuído ao carbono ligado ao grupo nitro (**Espectro 28, página 97**). Nos dados de RMN ¹H também foi observado o sinal do hidrogênio da carbonila aldeídica em δ 10,31 ppm e os sinais dos hidrogênios isolados no anel aromático em δ 7,54 e 7,35 ppm (**Espectro 27, página 97**). O espectro de massas, além de apresentar o íon molecular m/z = 195 e pico base 165, apresentou fragmentações características para o nitropiperonal **85** (**Espectro 26, página 96**). O **Esquema 19** mostra uma proposta de fragmentação para o nitropiperonal **85**.



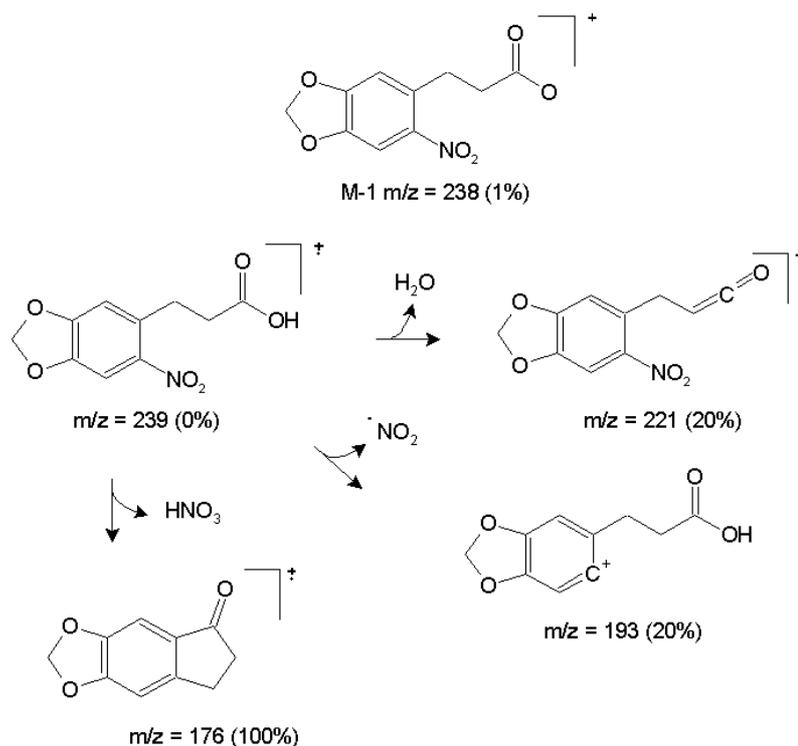
Esquema 19: Proposta de fragmentação para o 6-nitropiperonal **85**.

O ácido 6-nitrotetraidropiperínico **64** (Esquema 18, página 50), após recristalização, apresentou-se como um sólido amarelo amorfo e ponto de fusão 111-112°C. No espectro de infravermelho observou-se uma banda larga em 3423 cm⁻¹, devido ao estiramento da ligação OH do ácido carboxílico. Observou-se ainda a absorção em 1710 cm⁻¹, característica da carbonila de ácido não conjugado (Espectro 29, página 100). No espectro de RMN ¹³C observou-se um sinal em δ 177 ppm, referente ao carbono da carbonila não conjugada e outro sinal em δ 153 ppm referente ao carbono ligado ao grupo nitro (Espectro 32, página 101). O espectro de RMN ¹H, apesar de não ter apresentado o hidrogênio ácido, apresentou os singletes dos hidrogênios isolados do anel aromático em δ 9,08 e 8,50 ppm, o restante dos sinais foram totalmente compatíveis com a estrutura de **64** (Espectro 31, página 101). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular e pico base (m/z = 267 e 204 u.m.a. respectivamente), fragmentos característicos para o ácido **64** (Espectro 30, página 100). O Esquema 20 mostra uma proposta de fragmentação para o ácido 6-nitrotetraidropiperínico **64**.



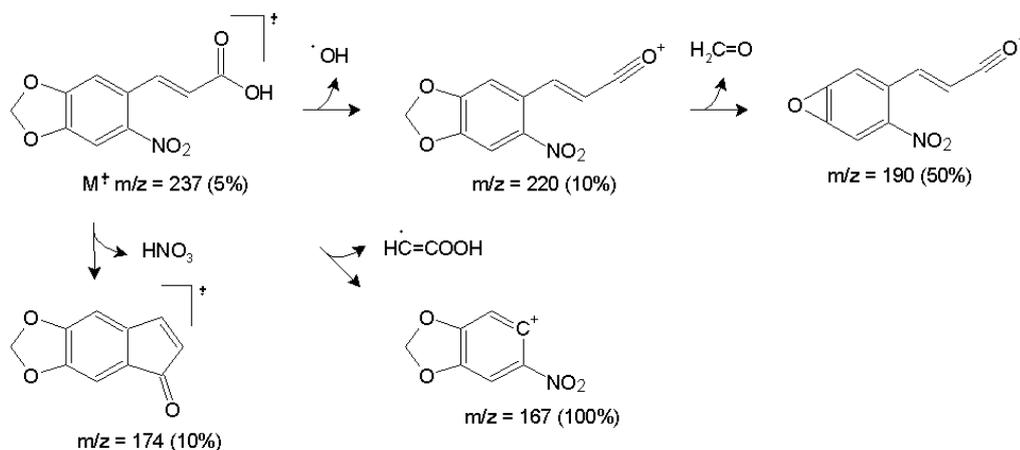
Esquema 20: Proposta de fragmentação para o ácido 6-nitrotetraidropiperínico **64**.

O ácido 6-nitrodiidrocinâmico **74** (**Esquema 18, página 50**), após recristalização, apresentou-se como um sólido amarelo amorfo e ponto de fusão 154-156°C. No espectro de infravermelho observou-se uma banda larga, em 3425 cm⁻¹, devido ao estiramento da ligação OH do ácido carboxílico. Observou-se ainda a absorção em 1711 cm⁻¹, característica da carbonila de ácido não conjugado (**Espectro 33, página 104**). No espectro de RMN ¹³C observou-se um sinal a δ 176 ppm, referente ao carbono da carbonila não conjugada e outro a δ 153 ppm, referente ao carbono ligado ao grupo nitro (**Espectro 36, página 105**). O espectro de RMN ¹H, apesar de não apresentar o hidrogênio ácido, apresentou os singletes dos hidrogênios isolados do anel aromático em δ 7,46 e 6,89 ppm. O restante dos sinais foram totalmente compatíveis com a estrutura de **74** (**Espectro 35, página 105**). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular e pico base (m/z = 239 e 176 u.m.a respectivamente), fragmentos característicos para o ácido **74** (**Espectro 34, página 104**). O **Esquema 21** mostra uma proposta de fragmentação para o ácido 6-nitrodiidrocinâmico **74**.



Esquema 21: Proposta de fragmentação para o ácido 6-nitrodiidrocinâmico **74**.

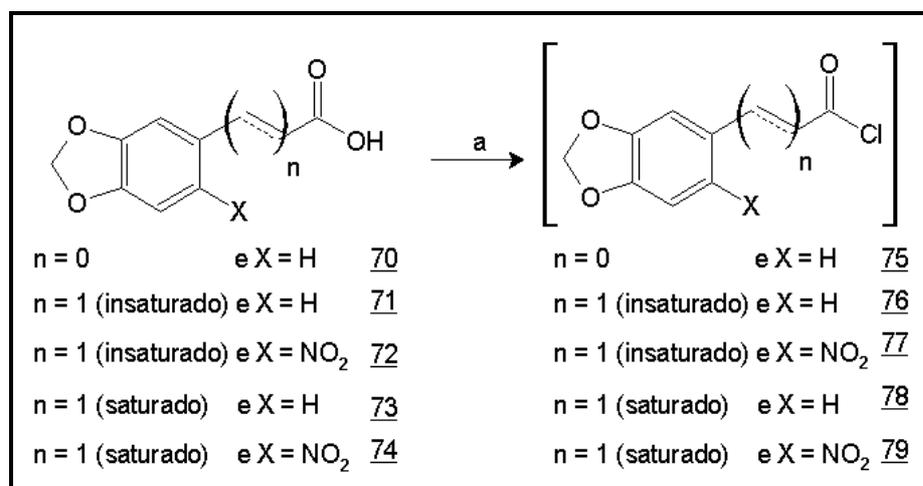
O ácido 6-nitrocinnâmico **72** (**Esquema 18, página 50**), apresentou-se como um sólido marrom amorfo e ponto de fusão 224-226°C. No espectro de infravermelho observou-se uma banda larga, em 3434 cm^{-1} , devido ao estiramento da ligação OH do ácido carboxílico. Observou-se ainda a absorção em 1696 cm^{-1} , característica da carbonila de ácido conjugado (**Espectro 37, página 108**). No espectro de RMN ^{13}C observou-se um sinal em δ 167 ppm, referente ao carbono da carbonila de ácido conjugado e outro a δ 151 ppm, referente ao carbono ligado ao grupo nitro (**Espectro 40, página 109**). O espectro de RMN ^1H , apesar de não ter apresentado o hidrogênio ácido, apresentou os dubletos δ 7,96 e 6,35 ppm, referentes aos hidrogênios olefínicos e os singletes dos hidrogênios isolados do anel aromático em δ 7,55 e 7,23 ppm (**Espectro 39, página 109**). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular e pico base ($m/z = 237$ e 167 u.m.a respectivamente), alguns fragmentos característicos para o ácido **72** (**Espectro 38, página 108**). O **Esquema 22** mostra uma proposta de fragmentação para o ácido 6-nitrocinnâmico **72**.



Esquema 22: Proposta de fragmentação para o ácido 6-nitrocinnâmico **72**.

3.3.3. Síntese dos cloretos de ácido

Para a maioria das sínteses dos cloridratos mesoiônicos (**MI**, **MII**, **MIII**, **MIV**, **MV**, **MVII**, **MVIII** e **MIX**) a passagem pelo cloreto de ácido (cloreto de acila) foi comum. A formação do cloreto de ácido teve como objetivo sintetizar um intermediário mais reativo frente à reação de anidroacilação que dará origem aos cloridratos mesoiônicos.



Reagente: a) $(COCl)_2$, t.a, 2-3h

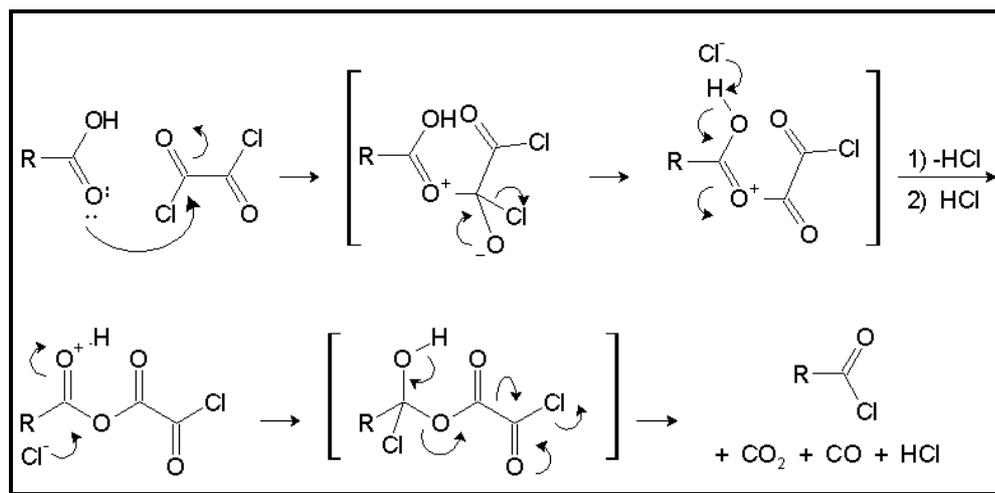
Esquema 23: Síntese dos cloretos de acila.

Os cloretos de tionila ($SOCl_2$) e oxalila ($COCl_2$) são usualmente os reagentes de escolha para a síntese de cloretos de acila. Apresentam a vantagem de formarem subprodutos gasosos (SO_2 , CO , CO_2) que não contaminam o produto (March, 1985). Apesar de apresentarem comportamento reacional semelhante, as condições reacionais são distintas: para utilizar o cloreto de tionila o refluxo é necessário, já o cloreto de oxalila faz-se em temperatura ambiente.

Por haver disponibilidade do cloreto de oxalila, este foi utilizado na preparação dos cloretos de ácidos. Por ser mais reativo que o $SOCl_2$, todas as reações foram realizadas em temperatura ambiente. Por apresentar alta reatividade os cloretos de ácido sintetizados não foram quantificados ou purificados por nenhuma técnica, foram todos considerados puros pelo acompanhamento por CCF (pela formação instantânea do éster metílico, pela reação com

metanol) e utilizados logo em seguida, após remoção do excesso de cloreto de oxalila em evaporador rotatório.

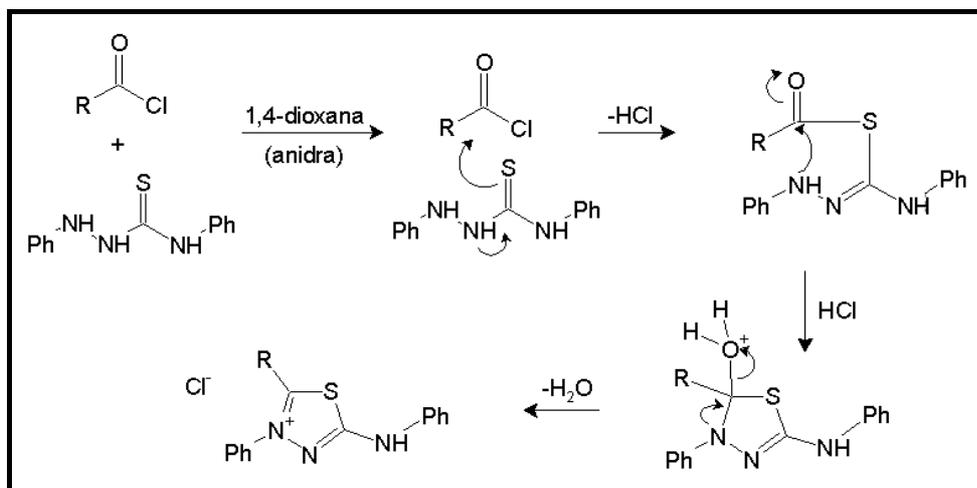
No **Esquema 24** descrevemos uma proposta para o mecanismo de formação dos cloretos de acila pela reação dos respectivos ácidos com cloreto de oxalila.



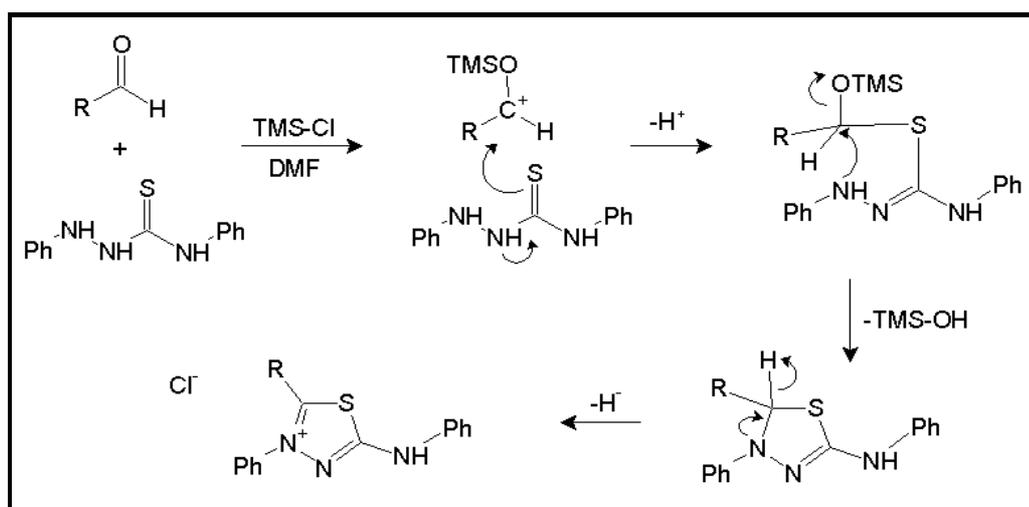
Esquema 24: Mecanismo de formação dos cloretos de acila utilizando cloreto de oxalila
(March, 1985)

3.3.4. Síntese dos cloridratos mesoiônicos MI à IX

A preparação dos sais dos compostos mesoiônicos da classe das 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminidas, foi realizada através da reação de anidroacilação entre 1,4-difeniltiossemicarbazida **53** e os intermediários cloretos de ácido (**61**, **65**, **66**, **75**, **76**, **77**, **78** e **79**) ou os aldeídos aromáticos (**69** e **85**). Estas reações encontram-se experimentalmente descritas nos trabalhos de Montanari e Kappel (Montanari *et al.*, 1994; Kappel *et al.*, 2004). Os **Esquemas 25 e 26** (página 57) mostram os mecanismos envolvidos em cada uma das metodologias utilizadas.

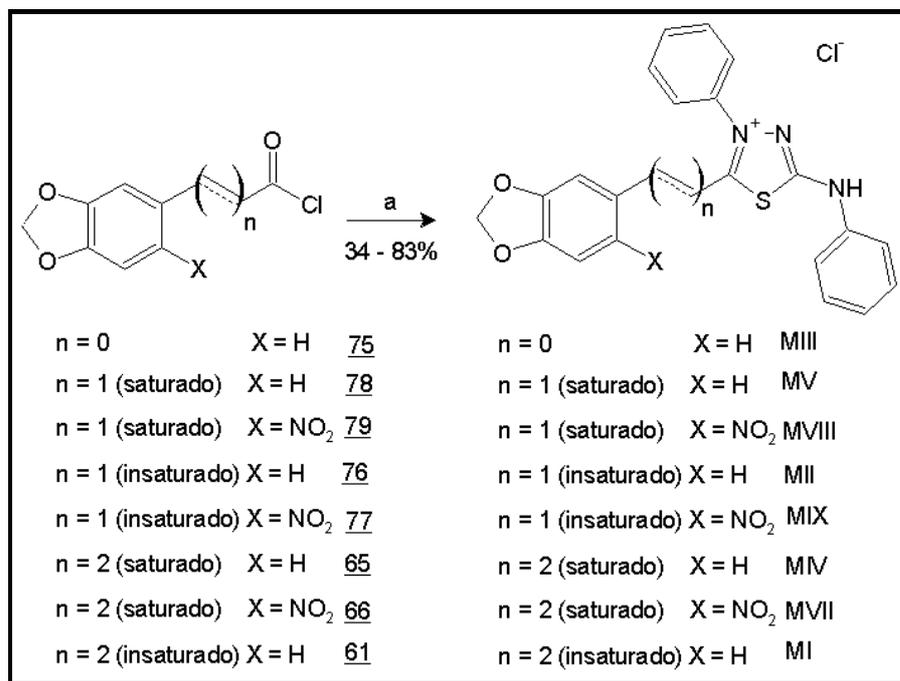


Esquema 25: Reação de anidroacilação com cloretos de ácido (Montanari *et al.*, 1994).



Esquema 26: Reação de anidroacilação com aldeídos aromáticos (Kappel *et al.*, 2004).

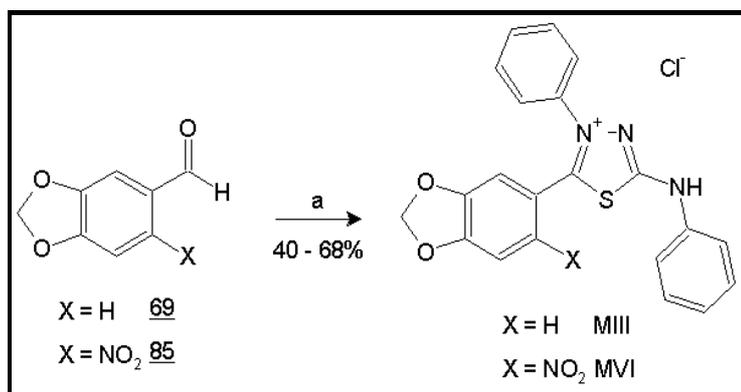
Como pode ser visto no **Esquema 27** (página 58), as reações de anidroacilação realizadas a partir dos cloretos de acila, apresentaram rendimentos variados (34-83%), gerando os respectivos cloridratos mesoiônicos.



Reagentes: a) 1,4-difeniltiossemicarbazida (53), 1,4-dioxana, t.a., 72 h.

Esquema 27. Preparação dos cloridratos mesoiônicos através da reação de anidroacilação.

Da mesma forma, nas reações de preparação dos cloridratos mesoiônicos a partir dos aldeídos 69 e 85, os rendimentos obtidos variaram, sendo de 40% para MVI e 68% para MIII (**Esquema 28**).



Reagentes: a) 1,4-difeniltiossemicarbazida 53, TMS-Cl, DMF, 24h.

Esquema 28. Preparação dos derivados MVI e MIII, a partir dos respectivos aldeídos.

Como o núcleo mesoiônico, 4-fenil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, está presente em todos os derivados (**MI** à **IX**), os espectros de IV, RMN ^1H e ^{13}C apresentaram-se bem semelhantes (**Tabela 6, 7 e 8, páginas 63 e 64**, respectivamente), salvo para as modificações da cadeia lateral e anel aromático na posição 5 destes derivados. Para exemplificar as atribuições dos dados espectrométricos, elegemos os derivados **MI**, **MII** e **MIII**. Na espectrometria de massas os cloridratos mesoiônicos (**MI** à **IX**) apresentaram além do íon molecular (**M-Cl** ou **M-HCl**) fragmentações características, como descrita na literatura (Montanari *et. al.*, 1994).

A atribuição dos dados espectrométricos (IV, RMN ^1H e ^{13}C) foi realizada por comparação com os dados da literatura, e o derivado **MR** (**Figura 29**) foi utilizado como padrão estrutural (Silva, 1997).

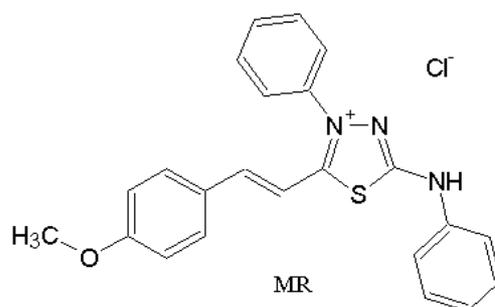
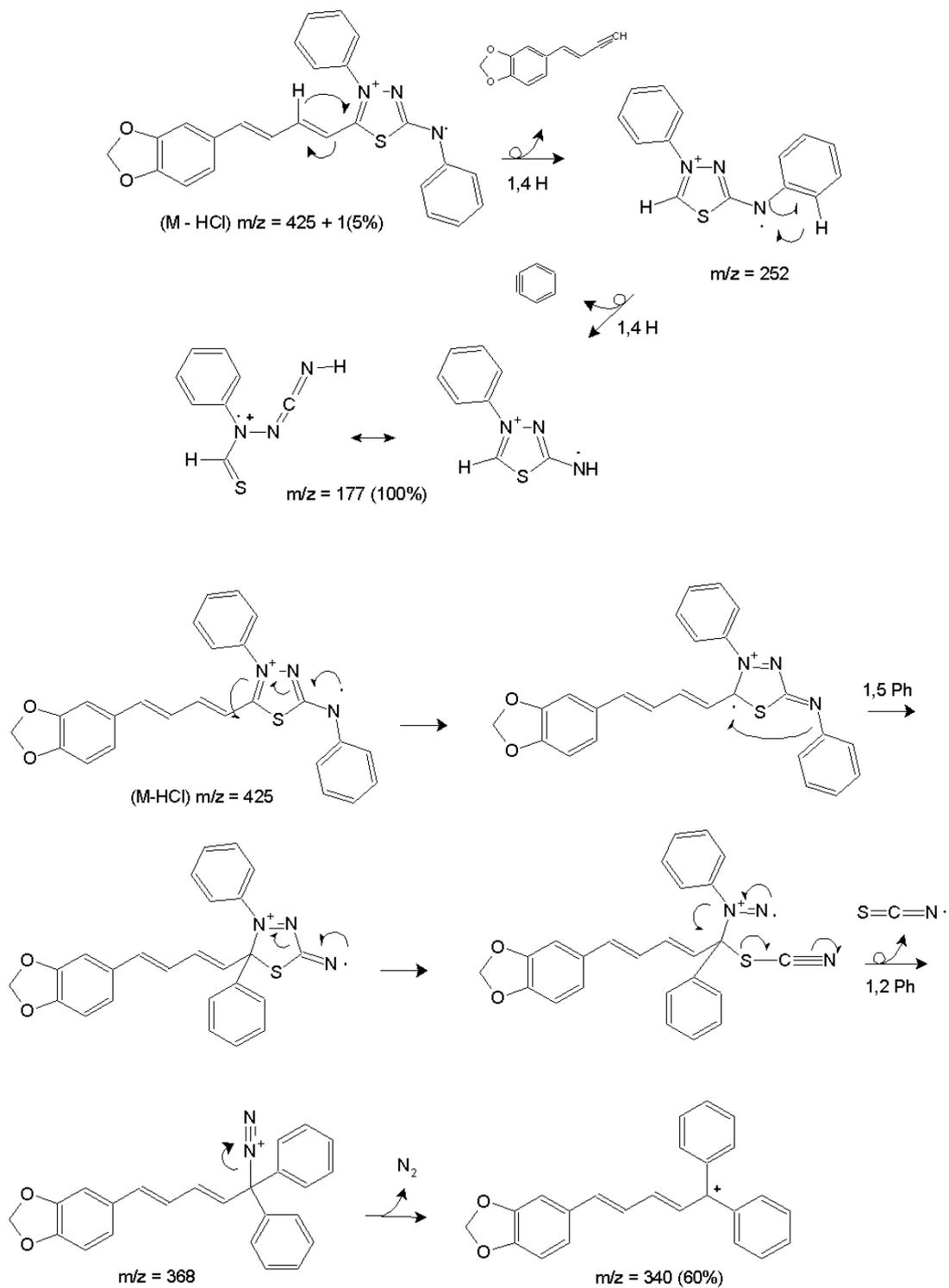


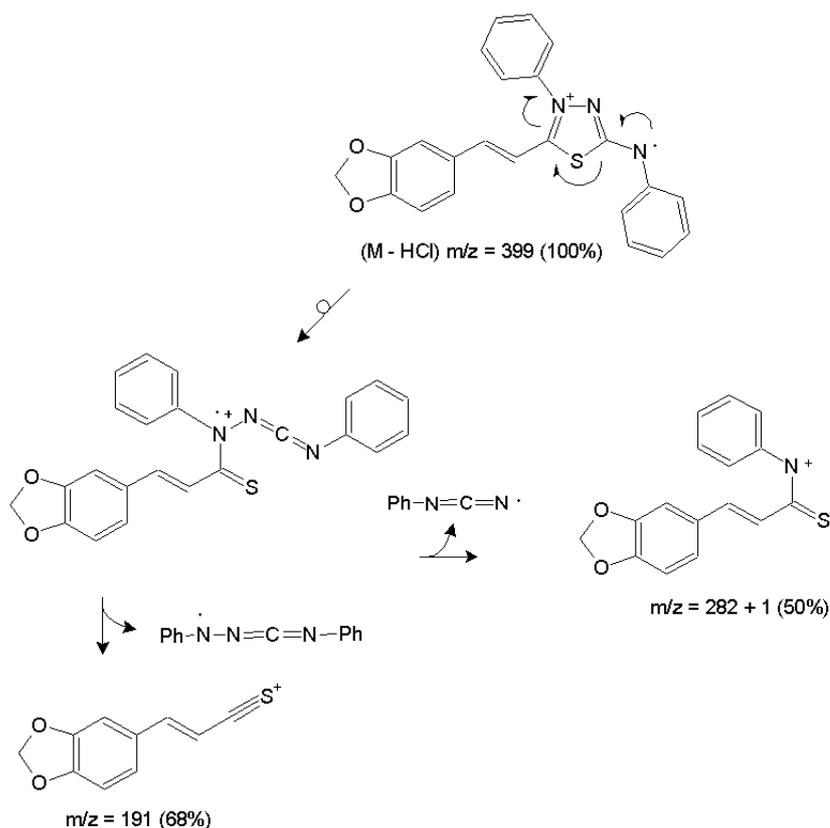
Figura 29: Estrutura do cloridrato mesoiônico tomado como referência nas atribuições estruturais.

O derivado **MI** (**Esquema 27, página 58**) foi obtido na forma de um sólido vermelho amorfo e apresentou ponto de fusão 155°C . No espectro de infravermelho observou-se uma banda larga em 3449 cm^{-1} , devido ao estiramento da fenilamina exocíclica. Observou-se ainda uma pequena absorção em 2780 cm^{-1} , possivelmente do grupamento imônio hexocíclico, e outra a 1565 cm^{-1} , devido à vibração do esqueleto heterocíclico (**Espectro 41, página 113**). No espectro de RMN ^{13}C observou-se um sinal a $\delta\ 159\text{ ppm}$, referente a absorção de um dos carbonos do núcleo heterociclo (**Espectro 44, página 114**). No espectro de RMN ^1H observou-se um singlete $\delta\ 12,37\text{ ppm}$, referente à fenilamina, além de outros sinais compatíveis com a estrutura de **MI** (**Espectro 43, página 114**). O espectro de massas apresentou, além do pico do íon molecular (**M-Cl**) e pico base ($m/z = 426$ e 177 u.m.a., respectivamente), fragmentos característicos para o **MI** (**Espectro 42, página 113**). O **Esquema 29** (**página 60**) mostra uma proposta de fragmentação para o derivado **MI**.



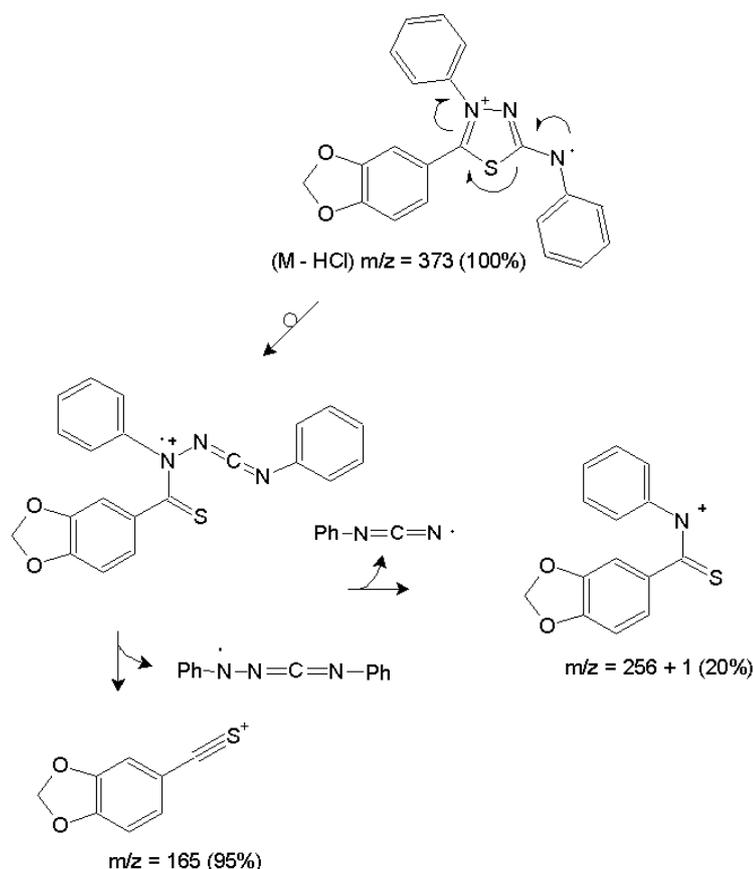
Esquema 29: Proposta de fragmentação para o derivado **MI**.

O derivado **MII** (**Esquema 27, página 58**) foi obtido na forma de um sólido amarelo amorfo e apresentou ponto de fusão entre 294-296°C. No espectro de infravermelho observou-se uma banda larga em 3425 cm^{-1} , devido ao estiramento da fenilamina exocíclica. Observou-se ainda a absorção em 2674 cm^{-1} do grupamento imônio exocíclico, 1567 cm^{-1} da vibração do esqueleto heterocíclico além de outros sinais (**Espectro 45, página 116**). No espectro de RMN ^{13}C observou-se dois sinais de δ 166 e 161 ppm, referentes aos carbonos do núcleo heterocíclico (**Espectro 48, página 117**). No espectro de RMN ^1H observou-se um singlete a δ 12,24 ppm, referente a fenilamina, além de outros sinais compatíveis com a estrutura de **MII** (**Espectro 47, página 117**). O espectro de massas apresentou, além do pico do íon molecular (**M-HCl**) e pico base ($m/z = 399$ u.m.a.), fragmentos clássicos, para esta classe de derivados, como m/z 283 e 191 u.m.a. (**Espectro 46, página 116**). O **Esquema 30** mostra uma proposta de fragmentação para o derivado **MII**.



Esquema 30: Proposta de fragmentação para o derivado **MII**.

O derivado **MIII** (**Esquema 27, página 58**) foi obtido na forma de um sólido amarelo-esverdeado amorfo e apresentou ponto de fusão 286-287°C. No espectro de infravermelho observou-se uma banda larga em 3455 cm^{-1} devido ao estiramento da fenilamina exocíclica. Observou-se ainda a absorção em 2645 cm^{-1} , referente ao grupamento imônio exocíclico, outra a 1565 cm^{-1} , devido à vibração do esqueleto heterocíclico, além de outros sinais (**Espectro 49, página 121**). No espectro de RMN ^{13}C observou-se dois sinais a δ 165 e 161 ppm, referentes aos carbonos do núcleo heterocíclico (**Espectro 52, página 122**). No espectro de RMN ^1H observou-se um singlete a δ 12,37 ppm, referente a fenilamina, além de outros sinais compatíveis com a estrutura de **MIII** (**Espectro 51, página 122**). O espectro de massas apresentou, além do pico do íon molecular (**M-HCl**) e pico base ($m/z = 373$ e 165 u.m.a.), fragmentos clássicos, para esta classe de derivados, como $m/z = 257$ e 165 u.m.a. (**Espectro 50, página 121**). O **Esquema 31** mostra uma proposta de fragmentação para o derivado **MIII**.



Esquema 31: Proposta de fragmentação para o derivado **MIII**.

Tabela 6: Algumas absorções na região do infravermelho (IV) dos cloridratos mesoiônicos obtidos (MI - MIX) e o de referência MR.

	IV (cm ⁻¹)									
	MR	MI	MII	MIII	MIV	MV	MVI	MVII	MVIII	MIX
vN-H	3410	3449	3425	3455	3443	3423	3437	3444	3426	3426
vC=N ⁺ HAr	2693	no*	2674	2645	2746	2769	2777	2774	2736	2736
vC=C	1600	1600	1600	1600	1600	1600	1610	1609	1615	1615
vC=C	1511	no	1499	1498	1497	1499	1500	1454	1505	1505
vC=C	1450	1440	1442	1451	1448	1448	1451	no	1451	1451
vC=N	1565	1565	1567	1565	1567	1570	1566	1567	1565	1565
vC-S	1310	1361	1362	1314	1320	1321	no	1330	no	1330

no* não observado

Tabela 7: Deslocamentos químicos de RMN ¹H dos cloridratos mesoiônicos obtidos (MI - MIX) e o de referência MR.

H	δH (ppm)									
	MR	MI	MII	MIII	MIV	MV	MVI	MVII	MVIII	MIX
NH	11,81	12,37	12,24	12,37	12,61	12,26	12,58	12,69	11,62	-
2'	6,98	7,46	7,56	7,59	7,52	7,56	7,55	7,59	7,55	7,59
3'	6,98	7,38	7,41	7,43	7,14	7,32	7,45	7,21	7,41	7,43
4'	6,98	7,09	7,14	7,15	6,96	7,09	7,18	7,01	7,15	7,18
2''	7,01	7,78	7,81	7,7	7,78	7,7	7,63	7,71	7,72	7,83
3''	7,01	7,73	7,74	7,62	7,64	7,7	7,57	7,66	7,72	7,74
4''	7,01	7,73	7,74	7,62	7,64	7,7	7,57	7,66	7,72	7,74
2'''	6,76	7,22	7,41	6,94	6,45	6,75	7,45	6,64	7,1	7,43
5'''	6,55	6,94	7,01	7,06	6,67	6,78	7,92	7,46	7,53	7,71
6'''	6,76	7,04	7,32	7,11	6,5	6,61	-	-	-	-
α	6,23	6,52	6,95	-	2,39	3,38	-	2,74	3,57	7,07
β	7,13	7,54	7,87	-	1,72	2,94	-	1,85	3,16	8,09
γ	-	7,17	-	-	1,56	-	-	1,64	-	-
δ	-	7,17	-	-	3,19	-	-	3,19	-	-
OCH ₂ O		6,06	6,1	6,13	5,9	5,98	6,36	6,09	6,23	6,27

Tabela 8: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C dos cloridratos mesoiônicos obtidos (MI - MIX) e o de referência MR.

C	δC (ppm)									
	MR	MI	MII	MIII	MIV	MV	MVI	MVII	MVIII	MIX
2	158,4	159	161,7	161,4	159,7	no	152,4	160,3	160,3	162,2
5	162,5	no	166	165,1	169,7	no	162,7	170,3	168,7	168,5
1'	137	no	no	139	136,9	138,4	137	137	136,8	137,7
2'	118	120,3	119,9	119,7	118,5	120,2	118,6	118,1	118,2	119,9
3'	129,4	131,2	131,3	131,1	129,8	131,3	130	130	129,4	131,1
4'	123,3	124,7	125,2	125,3	125,5	126	124,2	123,7	123,8	125,6
1''	138,6	138,3	no	139,6	138,3	139,7	138,4	138,6	138,5	138,7
2''	126,2	127,34	127,3	127,2	123,4	126,6	125,1	125,7	125,6	126,9
3''	130,1	130,6	130,6	130,7	128,6	130,5	129,5	129,3	129,8	130,4
4''	131,5	132,5	132,7	132,6	131,4	133,1	131,7	131,6	131,4	132,7
1'''	135,22	131,5	128,1	117,2	no	132,5	134,3	133,2	no	no
2'''	126,2	107	110	110,5	107,9	109,5	106	104,9	105	108,5
3'''	114,8	149,3	149,5	152,7	147,4	149,7	142,3	142,2	142,5	149,1
4'''	163,2	149,3	149,5	149	145,5	148,6	146,4	146,1	146,9	149,1
5'''	114,8	109,9	108,3	110,3	108,4	109,9	110,8	110,3	110,5	105,6
6'''	126,2	no	no	127,7	120,8	123	151,2	151,7	151,6	150,8
α	108,8	114,5	110,5	-	34,4	34,9	-	31,7	31,7	114,8
β	148,3	148,3	152,2	-	28,5	34,9	-	28,4	29,4	143,8
γ	-	125,6	-	-	24,8	-	-	28	-	-
δ	-	138,37	-	-	30,6	-	-	29,2	-	-
OCH₂O	-	102,82	103,3	103,9	100,6	102,5	105,1	103,1	103,44	105,1

3.4. Testes Biológicos : Atividade tripanocida

Para a avaliação da atividade tripanocida dos derivados mesoiônicos obtidos (**MI** à **MIX**, **Figura 30**) foi utilizada uma seqüência de experimentos que estão descritos nos **itens 5.15. (Material e Métodos)**, onde foram realizados testes *in vitro* contra as diferentes formas evolutivas do parasita (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas). Foi realizada também a avaliação da citotoxicidade das drogas frente à célula hospedeira (macrófagos murinos, item **5.15.4.**). Como o derivado **MI** foi a molécula que apresentou melhor perfil de atividade nas avaliações *in vitro*, ou seja: elevado efeito antiparasitário e reduzida citotoxicidade frente aos macrófagos, este derivado foi utilizado em testes *in vivo*, avaliando-se os níveis de parasitemia e a sobrevivência dos animais tratados (camundongos Balb/c), como descrito no item **5.15.7.**

Primeiramente foi avaliada a atividade anti-epimastigota dos derivados obtidos (**MI** à **MIX**). Como pode ser visto pelos valores de IC_{50} , mostrados na **Tabela 28 (página 151)**, os mesoiônicos **MI**, **MII**, **MIV** e **MIX** apresentaram maior efeito tóxico. Estas moléculas foram então avaliadas quanto à suas citotoxicidades, utilizando o teste de exclusão do azul de Trypan (item **5.15.4.1.**). O derivado **MI** mostrou-se o menos tóxico frente às células hospedeiras, apresentando uma margem de segurança três vezes maior que a aplicação necessária (**Tabela 28, página 151**). Também foi avaliada a atividade anti-tripomastigota destas drogas (**MI**, **MII**, **MIV** e **MIX**) e apenas o derivado **MI** mostrou IC_{50} abaixo da concentração tóxica de aplicação. Como **MI** apresentou toxicidade seletiva, este foi avaliado contra formas amastigotas. O resultado obtido foi extremamente animador, visto que o valor de IC_{50} observado para o tratamento com **MI** (1,35 μ M) foi menor do que aquele observado para a droga de referência, o benzonidazol (2,5 μ M), bem como para a piperina (4,9 μ M).

Em face aos dados obtidos nos ensaios *in vitro*, foram realizados tratamentos *in vivo* para o derivado **MI**. O tratamento dos 4 grupos de animais (**MI**-50 mg/Kg; benzonidazol-100 mg/Kg; H₂O; DMSO) foram realizados por via oral, durante 15 dias. Os grupos foram acompanhados durante 30 dias, apresentando um pico de parasitemia, para os controles tratados com H₂O e DMSO. No sétimo dia pós-infecção (dpi), o tratamento com o derivado **MI** mostrou-se semelhante ao benzonidazol, com níveis de parasitemia indetectáveis (**Figura 34, página 155**). Os animais dos grupos controle, tratados com H₂O e DMSO, não sobreviveram após o décimo dpi. Já os grupos tratados com benzonidazol e **MI** sobreviveram aos 30 dias de teste (**Figura 35, página 156**).

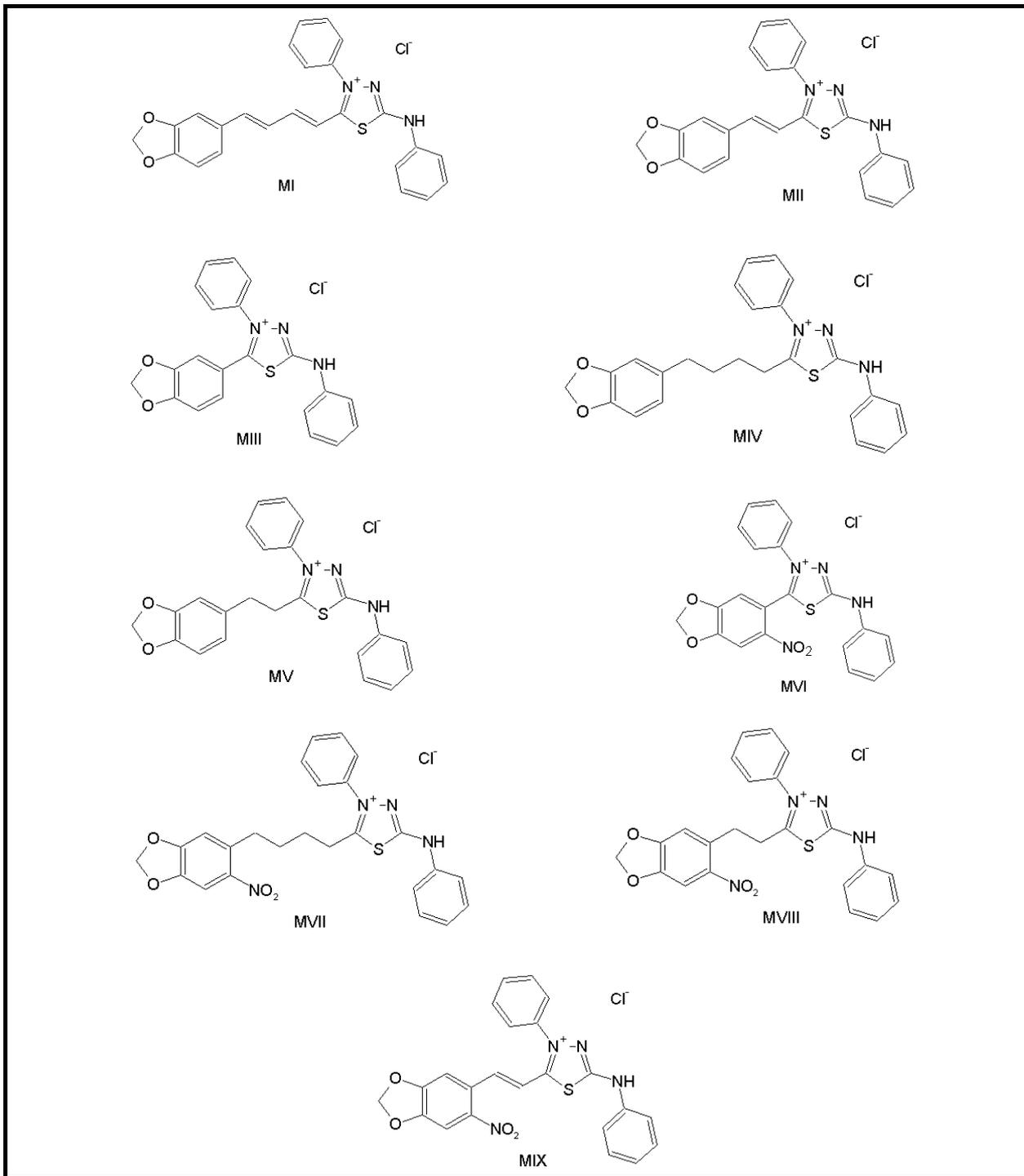


Figura 30: Estruturas dos cloridatos mesoiônicos testados contra *T. cruzi*.

Diante dos dados obtidos, nos testes de atividade tripanocida, foi avaliada a relação estrutura-atividade (*SAR*) dos cloridratos mesoiônicos sintetizados, derivados e análogos à amida natural **1**.

A estratégia de modificação estrutural teve como objetivo manter o grupo metilenodioxílico (presente na piperina **1**), variar a quantidade de carbonos olefínicos e a saturação dos mesmos, permitindo ou não a conjugação entre os dois anéis aromáticos (homocíclico e heterocíclico); nitração do anel 3,4-metilenodioxibenzílico, visto que o grupo nitro é uma unidade farmacofórica do benzonidazol, droga de referência; além da incorporação da 4-fenil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, unidade farmacofórica para a atividade leishmanicida descrita anteriormente por Silva (Silva, 1997).

A **Tabela 28 (página 151)** mostra os valores de atividade biológica para os cloridratos mesoiônicos avaliados.

Relacionando os derivados **MI**, **MII**, **MIII**, **MIV** e **MV** podemos observar a importância da presença dos carbonos olefínicos para a atividade anti-epimastigota, apontando **MI** e **MII** como os melhores derivados. Contudo o cloridrato mesoiônico **MI** mostrou-se o mais viável, por apresentar menor citotoxicidade no tratamento com o azul de Trypan (**Tabela 28, página 151**).

A nitração dos derivados saturados e insaturados visou otimizar a atividade tripanocida das drogas já testadas. Apesar de alcançar o objetivo na maioria dos derivados (**MVI**, **MVIII** e **MIX**), a presença do grupamento nitro também aumentou a toxicidade dos mesmos frente à célula hospedeira, inviabilizando a utilização destes derivados nas avaliações biológicas subsequentes.

Desta forma, o cloridrato mesoiônico **MI** apresenta um perfil estrutural ótimo no conjunto de derivados preparados, colocando-se como um verdadeiro protótipo para o desenvolvimento de um novo agente quimioterápico, de elevada eficácia, aplicável ao tratamento da doença de Chagas.



4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Os resultados obtidos demonstram o potencial da piperina como precursor, aplicável ao desenvolvimento de uma nova família de moléculas candidatas a fármacos, úteis no tratamento da doença de Chagas. A abundância do produto natural no material vegetal, bem como a facilidade da sua extração e manipulações sintéticas possíveis, são pontos relevantes em relação à esta amida natural.
- A metodologia sintética preconizada se mostrou aplicável à preparação dos novos cloridratos mesoiônicos (**MI-MIX**), e os produtos finais obtidos, bem como seus precursores, foram devidamente caracterizados através dos métodos convencionais de análise.
- Os nove derivados mesoiônicos preparados neste trabalho foram planejados com o objetivo de realizarmos um estudo sobre a relação existente entre a estrutura química e a atividade biológica (*SAR*) para esta classe de compostos. Observamos para o derivado **MI** um perfil estrutural ótimo quanto à atividade tripanocida.
- Esta nova molécula, da classe das 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminas, derivada da piperina (**MI**), apresentou, nas avaliações *in vivo*, diminuição da parasitemia a níveis não detectáveis, com perfil de atividade tripanocida comparável ao benzonidazol.
- Os resultados obtidos colocam o novo derivado mesoiônico **MI** como um candidato a fármaco, preparado a partir de um produto natural abundante, aplicável ao tratamento da doença de Chagas.
- As investigações sobre possíveis mecanismos de ação de **MI** sobre o *Trypanosoma cruzi* encontram-se em andamento, em colaboração ao Laboratório de Glicobiologia do IBCCF-UFRJ.
- Estudos *in vivo* sobre a toxicidade de **MI** encontram-se em andamento no laboratório.



5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Instrumentos utilizados nas caracterizações espectrométricas:

- Os espectros de RMN de ^1H (200, 400 e 600 MHz) e ^{13}C (50, 100 e 150 MHz) foram obtidos em espectrômetros de marca Bruker, modelos AC200 (PPGQO – UFRRJ); e AVANCE-400 e AVANCE-600 (Laboratório de BioNMR- Dep. de Bioquímica Médica-UFRRJ). Foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS) e os solventes: clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e dimetilsulfóxido (DMSO-D_6) na solubilização das amostras. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em unidade de parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).
- Os espectros de Infravermelho (IV) foram obtidos nos espectrômetros Pekin-Elmer 1600 FT (PPGQO – UFRRJ) e Shimadzu IR-470 (IME), utilizando-se pastilhas de KBr para as amostras sólidas.
- Os espectros de massas dos intermediários sintéticos foram obtidos por impacto de elétrons (70 eV) utilizando cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrômetro de massa VARIAN-SATURN 2000. Coluna capilar CP-SIL8CB (30m x 0,25 x 0,25 μm). Temperatura do injetor igual a 250°C. Temperatura de fonte igual a 280 C. Condições de análise: Temperatura inicial igual a 150°C/ 1' - 5° C/1' - 270°C.
Os espectros de massas dos cloridratos mesoiônicos foram obtidos em espectrometro Shimadzu-CG/MS QP 2000A, operando pelo modo de ionização por impacto de elétrons (70eV), equipado com probe para sólidos.

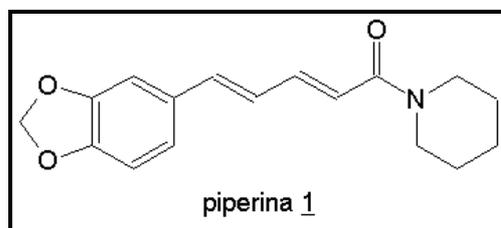
5.2. Nas análises, sínteses e purificações

- Cromatografia de sílica gel 60 F₂₅₄ (camada de 0,2 mm), da marca Merck para o acompanhamento por CCF (Cromatografia de Camada Fina) das reações.
- Sílica gel para coluna (70-230 mesh), da marca Vetec.
- Solventes: ácido acético glacial, acetato de etila, acetona, clorofórmio, diclorometano, 1,4 dioxana, etanol, éter etílico, hexano, metanol, THF, tolueno, fornecidos pela Vetec. Todos os solventes utilizados nas reações e nos métodos de purificação foram previamente destilados, quando necessário.
- Reagentes: ácido clorídrico concentrado, ácido malônico, ácido nítrico concentrado, álcool isopropílico, cloreto de oxalila, cloreto de trimetilsilano, dimetilformamida, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, piperidina, piperonal, piridina, Reagente de Jones (2,8M de CrO₃ em H₂SO₄) (Rodig, 1994).
- Pimenta-do-reino comercial.

5.3. Outros equipamentos

- Aparelho Melt-Temp II para medição dos pontos de fusão.
- Evaporador rotatório da Fisaton-Modelo 802.
- Câmara de revelação para CCF equipada com lâmpada UV com comprimento de onda de 254 e 365 nm.
- Placas de aquecimento e agitação magnética da Corning.
- Dessecador.

5.4. Isolamento da amida piperidinil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(E)-4(E)-pentadienóico (piperina) (1) (Ikan, 1991)



Numa aparelhagem de Soxhlet foram colocados 150 g de pimenta-do-reino e 1200 mL de etanol a 95%. O sistema foi mantido em refluxo por aproximadamente 12 horas (aparelhagem mostrada na **Figura 28, página 41**).

Após concentrar o extrato em evaporador rotatório, foi obtido um resíduo de aspecto viscoso e aroma adocicado, sendo então adicionado ao mesmo 150 mL de uma solução alcoólica de KOH 10%, para que ocorresse a precipitação dos taninos e demais materiais fenólicos, contaminantes do meio, na forma dos respectivos sais de potássio. Após filtração e remoção do material precipitado, foi adicionada ao sobrenadante uma pequena quantidade de água, suficiente para que o meio se tornasse turvo. Após um período de 72 horas em repouso, formou-se um precipitado amarelo que foi filtrado sob pressão reduzida. Esse procedimento foi repetido com mais algumas quantidades, somando 600 g de pimenta-do-reino. O sólido obtido foi lavado com uma pequena quantidade de água gelada, seguido de éter etílico gelado. Foram obtidos 18g (3%) de piperina na forma de cristais amarelo-claro.

Pf.: 127-129°C (Lit.: 125-127°C – Ikan, 1991)

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 3008$ (anel aromático)

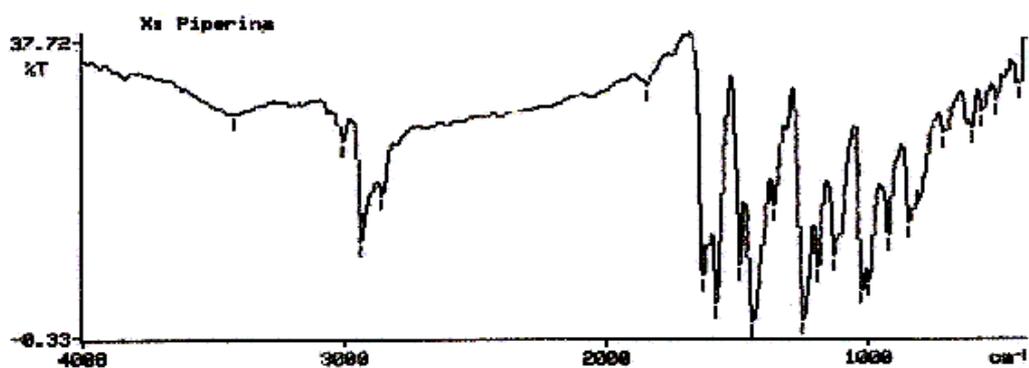
$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^3) = 2937\text{-}2858$ (anel piperidínico)

$\nu_{\text{C=O}} = 1634,5$ (vibração da amida conjugada)

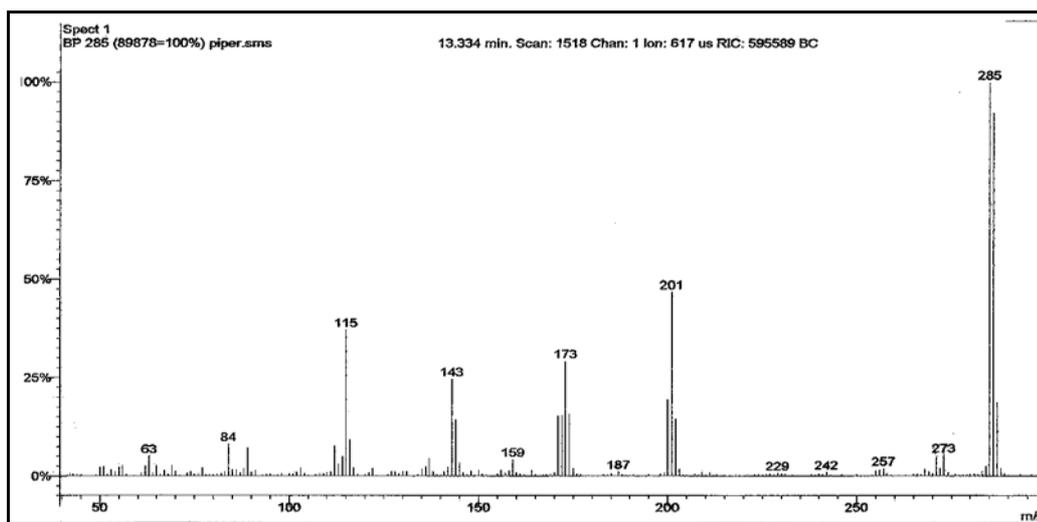
$\nu_{\text{C=C}} (\text{Csp}^2) = 1583\text{-}1490$ (vibração do esqueleto aromático)

$\sigma_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 930$ (dobramento de $1\text{H}_{\text{arom.}}$ isolado)

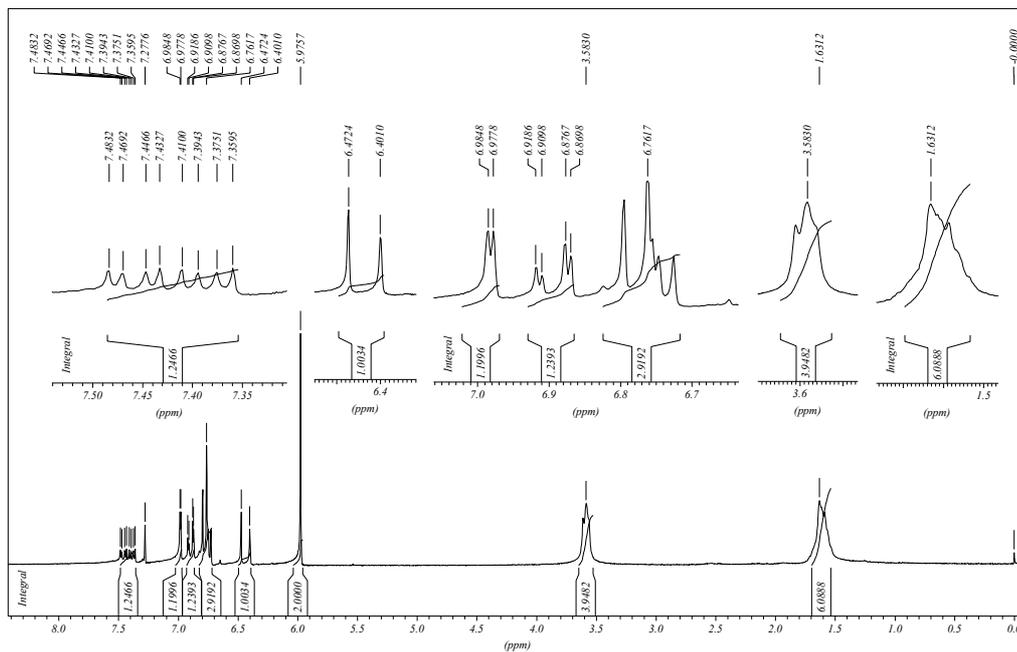
$\sigma_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 850$ (dobramento de $2\text{H}_{\text{arom.}}$ vizinhos)



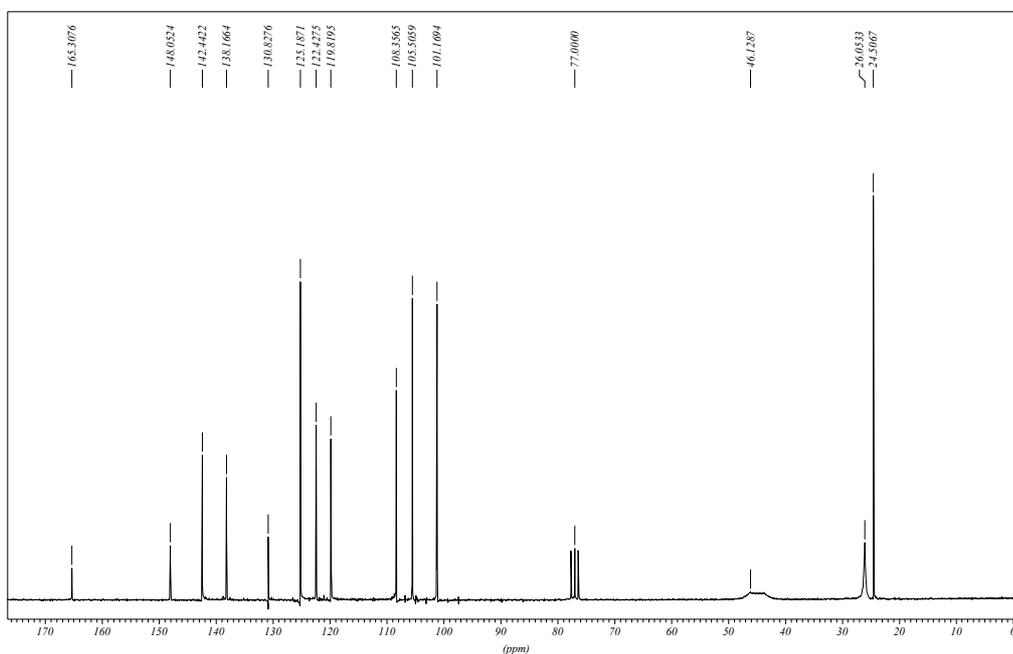
Espectro 1: Espectro de IV da piperina 1.



Espectro 2: Espectro de massas da piperina 1.



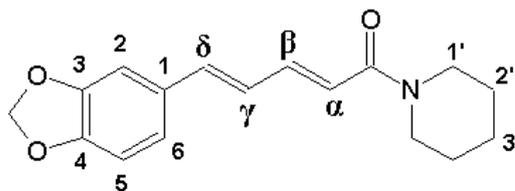
Espectro 3: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da piperina **1**.



Espectro 4: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) da piperina **1**.

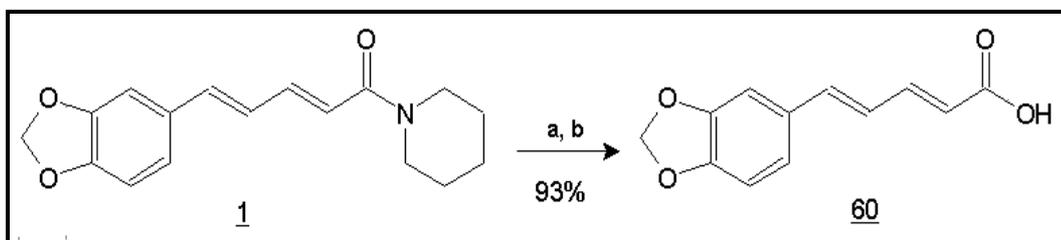
Tabela 9: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para a piperina 1.

Posição	Piperina (CDCl_3) 200MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
C=O	165,3 (C)
1	130,8 (C)
2	6,98 (d; 1,4; 1H)	105,5 (CH)
3	148,0 (C)
4	148,0 (C)
5	6,76 (m; 1H)	108,3 (CH)
6	6,89 (dd; 8,2 e 1,5; 1H)	122,4 (CH)
1'	3,58 (m; 4H)	46,1 (CH_2)
2'	1,63 (m; 4H)	26,0 (CH_2)
3'	1,63 (m; 6H)	24,5 (CH_2)
α	6,43 (d; 14,3; 1H)	119,8 (CH)
β	7,39 (ddd; 14,6, 7,1 e 2,9; 1H)	142,4 (CH)
γ	6,76 (m; 1H)	125,1 (CH)
δ	6,76 (m; 1H)	138,3 (CH)
OCH_2O	5,97 (sl; 2H)	101,1 (CH_2)



Piperina 1

5.5. Preparação do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2(*E*),4(*E*)-pentadienóico (ácido piperínico) (**60**) (Ikan, 1991)



Reagentes: a) KOH / Etanol, refluxo, 20h; b) HCl 10%, até pH 3

Num balão de 50 mL de capacidade foi feita uma suspensão de 2,20 g (7,72 mmol) de piperina em 22 mL de solução alcoólica de KOH 20%. A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação por 20 horas. A reação foi acompanhada por CCF, a solução passou de amarela para marrom-claro, com formação de precipitado.

Após o término da reação, o etanol foi retirado do meio reacional em evaporador rotatório. Acrescentou-se água ao resíduo formado, deixando o mesmo atingir a temperatura de ebulição até total solubilização, sendo a solução formada, em seguida, filtrada à quente. À esta solução aquosa do respectivo carboxilato, acrescentou-se solução de HCl 10% até chegar a pH próximo de 3, ocorrendo a precipitação do ácido na forma de um sólido amarelo. Após filtração sob pressão reduzida, o material foi lavado com água gelada. O sólido obtido foi seco em dessecador e recristalizado em etanol, gerando 1,65 g (93%) do ácido piperínico **60**.

Pf.: 218-219°C (Lit.: 216-217°C) (Ikan, 1991)

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

$\nu_{\text{O-H}} = 3250,0$ (ácido carboxílico)

$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^3) = 2919,5$ (metilenodioxí)

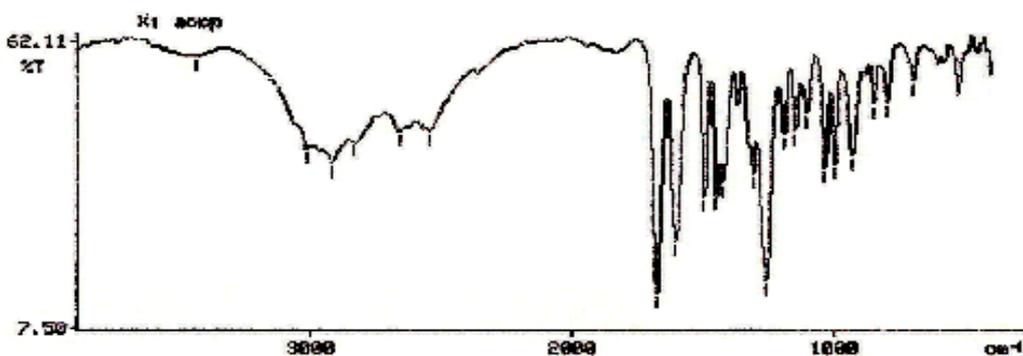
$\nu_{\text{C=O}} = 1678,8$ (vibração da carbonila do ácido carboxílico conjugado)

$\nu_{\text{C=C}} (\text{Csp}^2) = 1603-1495$ (vibração do esqueleto aromático)

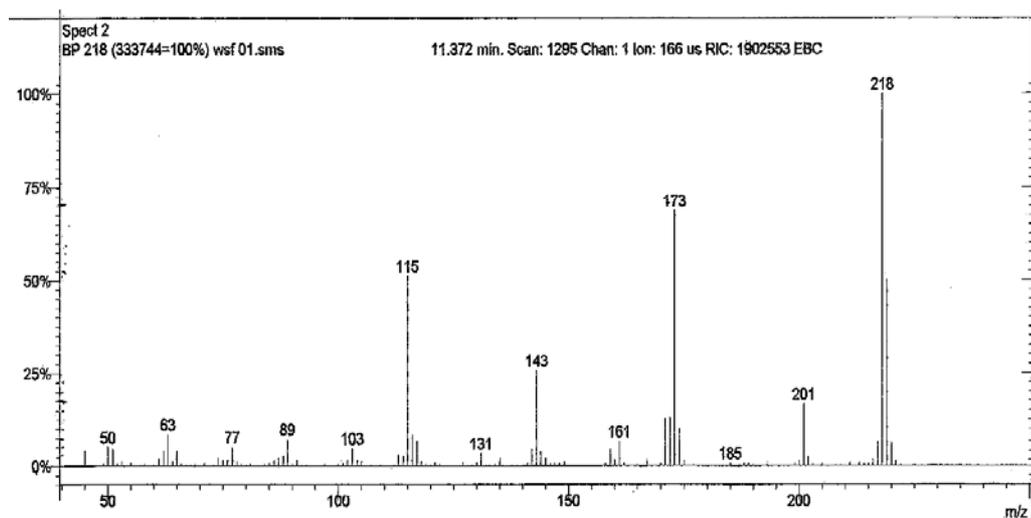
$\nu_{\text{C-O-C}} = 1257,5$ (metilenodioxí)

$\sigma_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 930$ (dobramento de $1\text{H}_{\text{arom.}}$ isolado)

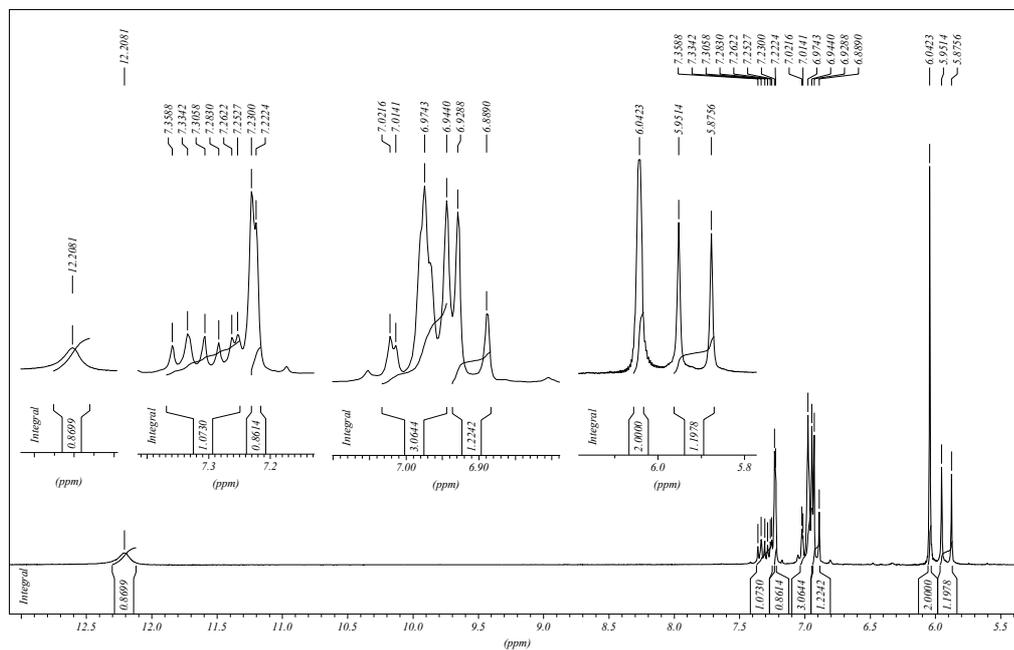
$\sigma_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 850$ (dobramento de $2\text{H}_{\text{arom.}}$ vizinhos)



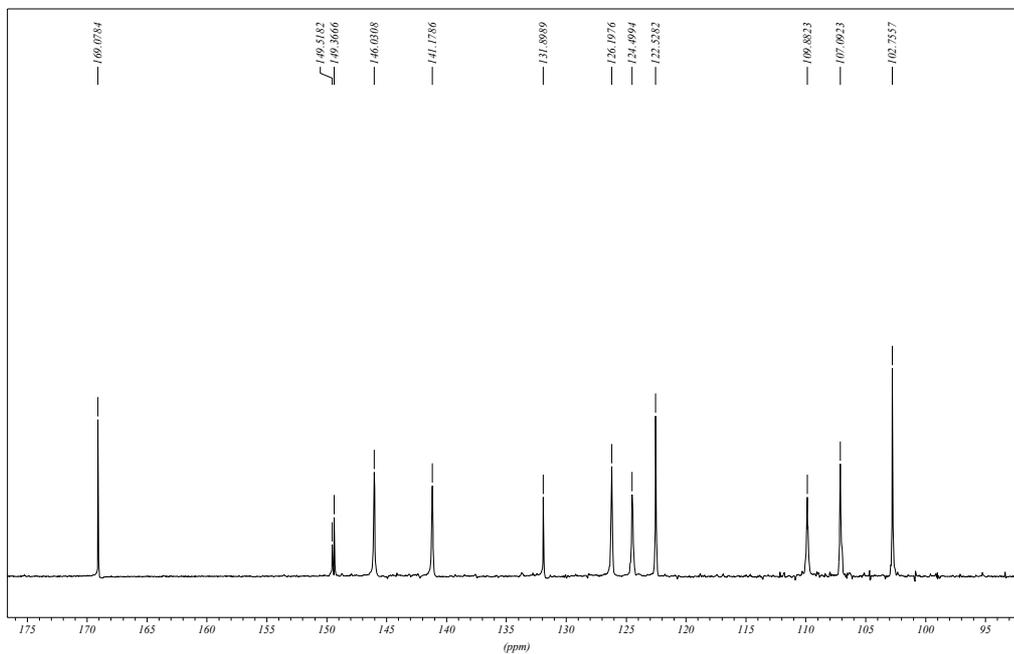
Espectro 5: Espectro de IV do ácido piperínico 60.



Espectro 6: Espectro de massas do ácido piperínico 60.



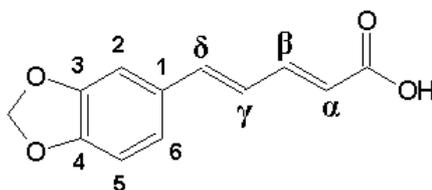
Espectro 7: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 e CD_3OD) do ácido piperínico **60**.



Espectro 8: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, CDCl_3 e CD_3OD) do ácido piperínico **60**.

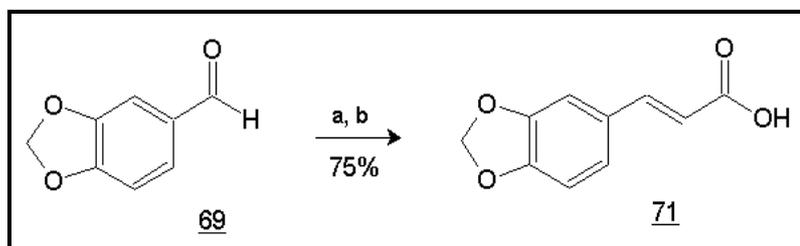
Tabela 10: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para o ácido piperínico 60.

Posição	Ácido piperínico (CDCl_3 e CD_3OD) 200MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
OH	12,20 (sl, 1H)
C=O	169,0 (C)
1	131,8 (C)
2	7,22 (sl; 1H)	109,8 (CH)
3	149,3 (C)
4	149,5 (C)
5	6,90 (d; 8,0; 1H)	107,0 (CH)
6	6,97 (m; 1H)	122,5 (CH)
α	5,96 (d; 15,1; 1H)	24,4 (CH)
β	7,30 (m; 1H)	141,1 (CH)
γ	6,97 (m; 1H)	126,1 (CH)
δ	6,97 (m; 1H)	141,1 (CH)
OCH_2O	6,04 (sl; 2H)	102,7 (CH_2)



Ácido piperínico 60

5.6. Preparação do ácido 3-(3,4-metilenodioxifenil)-2(*E*)-propenóico (ácido cinâmico) (71)
(Silva *et al.*, 2002)



Reagentes: a) ác. malônico, piridina e piperidina; b) HCl 10%

Em um balão de 50 mL de capacidade, equipado com condensador de refluxo, foram dissolvidos 5,0 g (33,3 mmol) de piperonal e 7,5 g (72 mmol) de ácido malônico numa mistura de 15 mL de piridina e 0,25 mL (2,53 mmol) de piperidina. Em seguida, a mistura foi aquecida sob refluxo por cerca de 8 horas em banho-maria, ocorrendo um vigoroso desprendimento de CO₂. A reação se completou após ebulição por mais 10 minutos adicionais e, em seguida, após resfriar, foi vertida em 10 mL de solução de HCl 10%, o suficiente para neutralizar a piridina, ocorrendo a precipitação do produto na forma de um sólido branco. O produto formado foi filtrado, lavado com água, éter etílico e seco ao ar. Após recristalização com ácido acético glacial, o produto em sua forma pura, foi obtido na forma de um sólido branco 4,8 g (75 %) (Lit.: 96%) (Silva *et al.*, 2002).

Pf.: 238°C (Lit.: 238°C)

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

$\nu\text{O-H}$ = 3446,0 (ácido carboxílico)

$\nu\text{C-H}$ (Csp^3) = 2919,8 (metilenodioxí)

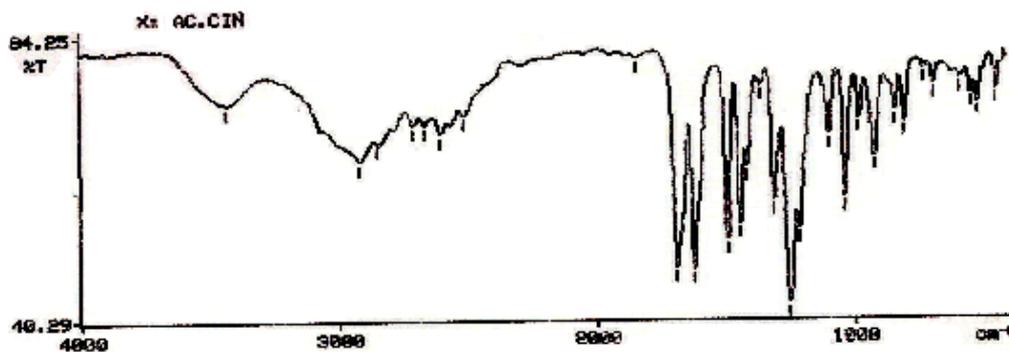
$\nu\text{C=O}$ = 1692,1 (vibração da carbonila do ácido carboxílico conjugado)

$\nu\text{C=C}$ (Csp^2) = 1493-1448 (vibração do esqueleto aromático)

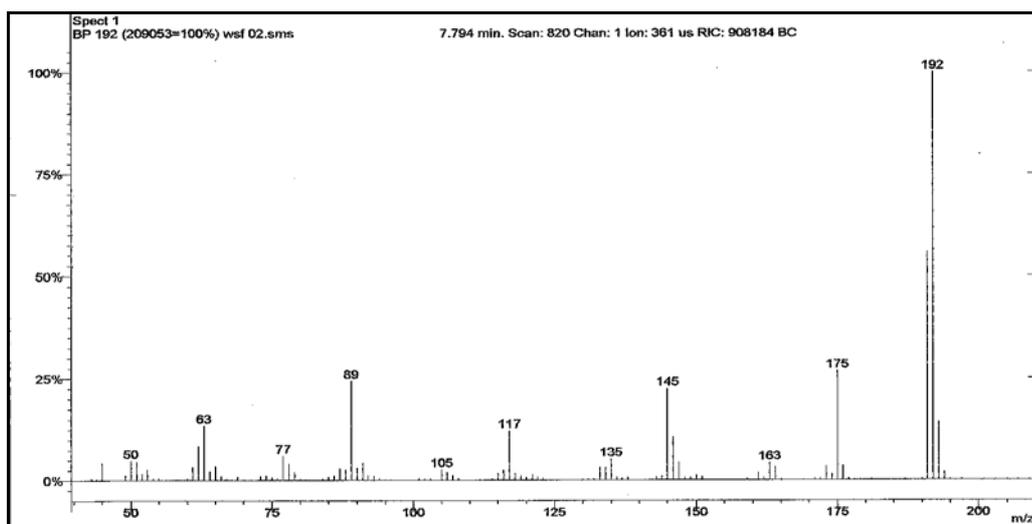
$\nu\text{C-O-C}$ = 1250,3 (metilenodioxí)

$\sigma\text{C-H}$ (Csp^2) = 930 (dobramento de $1\text{H}_{\text{arom.}}$ isolado)

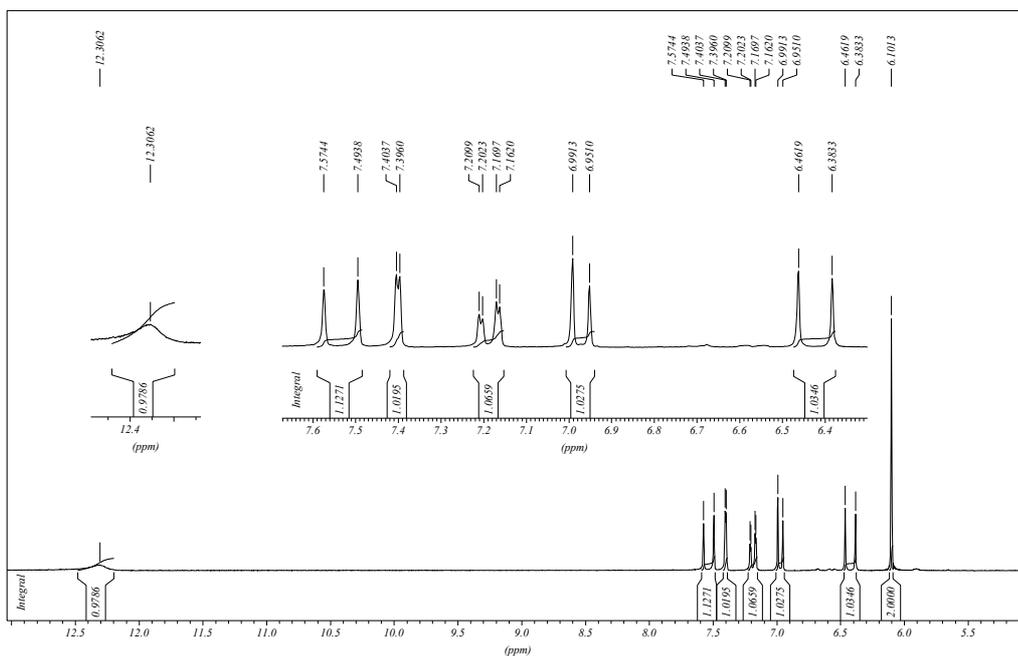
$\sigma\text{C-H}$ (Csp^2) = 850 (dobramento de $2\text{H}_{\text{arom.}}$ vizinhos)



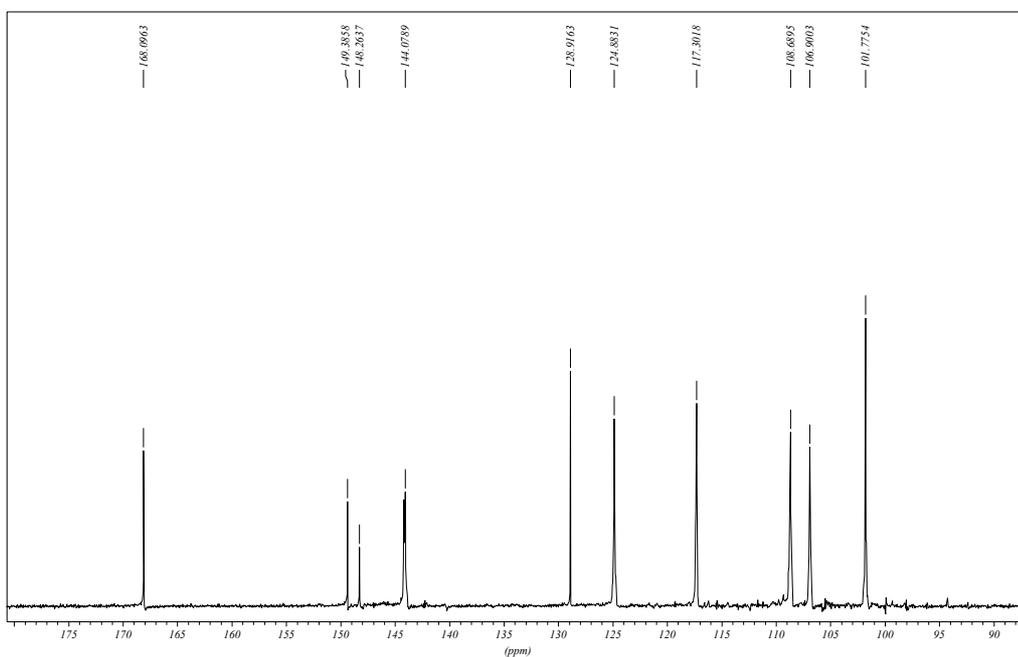
Espectro 9: Espectro de IV do ácido cinâmico 71.



Espectro 10: Espectro de massas do ácido cinâmico 71.



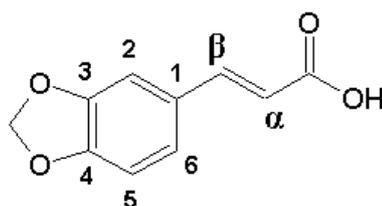
Espectro 11: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) do ácido cinâmico **71**.



Espectro 12: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, CD_3OD) do ácido cinâmico **71**.

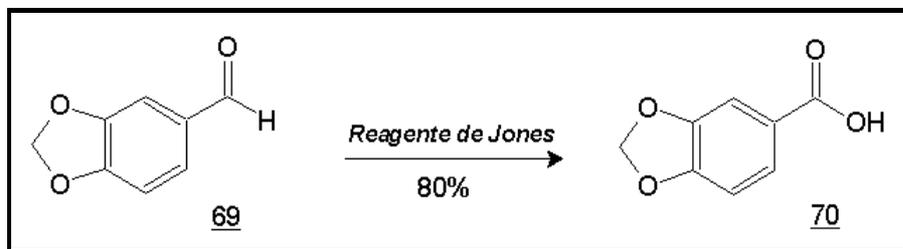
Tabela 11: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para o ácido cinâmico 71.

Posição	Ácido cinâmico (CD ₃ OD) 200MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
OH	12,20 (sl, 1H)
C=O	168,9 (C)
1	128,9 (C)
2	7,29 (d; 1,5; 1H)	108,6 (CH)
3	148,2 (C)
4	149,3 (C)
5	6,86 (d; 8,0; 1H)	106,9 (CH)
6	7,08 (dd; 8,0 e 1,5; 1H)	124,8 (CH)
α	6,32 (d; 15,7; 1H)	117,3 (CH)
β	7,43 (d; 16,1; 1H)	144,0 (CH)
OCH ₂ O	6,10 (sl; 2H)	101,7 (CH ₂)



Ácido cinâmico 71

5.7. Preparação do ácido 3,4 metilenodioxibenzóico (ácido piperonílico) (70) (Rodig, 1990)



Num balão de 25 mL de capacidade foram dissolvidos 2,0 g (13,3 mmol) de piperonal em 10 mL de acetona. Essa solução foi colocada em banho-de-gelo e mantida sob agitação, com adição gota-a-gota de 1,7 mL do Reagente de Jones (2,8M CrO₃ em H₂SO₄) (Rodig, 1990), durante 4 horas. A reação foi acompanhada pela mudança de cor da solução oxidante, de laranja (Cr⁺⁶) para verde (Cr⁺³), indicando a oxidação do aldeído. O excesso de reagente de Jones foi consumido pela adição de algumas gotas de álcool isopropílico. A solução resultante foi vertida em 50 mL de água gelada, havendo formação de um precipitado branco. Após um período de 12 horas o precipitado foi filtrado sob pressão reduzida, lavado com água gelada. O produto formado foi dissolvido em 50 mL de uma solução aquosa de KOH 20%. Esta solução foi extraída com acetato de etila (2 x 10 mL) e a fase aquosa foi neutralizada com HCl concentrado, até pH 3, sendo o precipitado formado filtrado e lavado com água gelada. Foram obtidos 1,7 g (78%) do ácido piperonílico 70 na forma de cristais amorfos de coloração bege (Lit.: 80%) (Rodig, 1990).

Pf.: 231-232°C (Lit.:229-231°C) (Catálogo Aldrich - 2005)

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

$\nu_{\text{O-H}} = 3452,2$ (ácido carboxílico)

$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^3) = 2921,5$ (metilenodioxí)

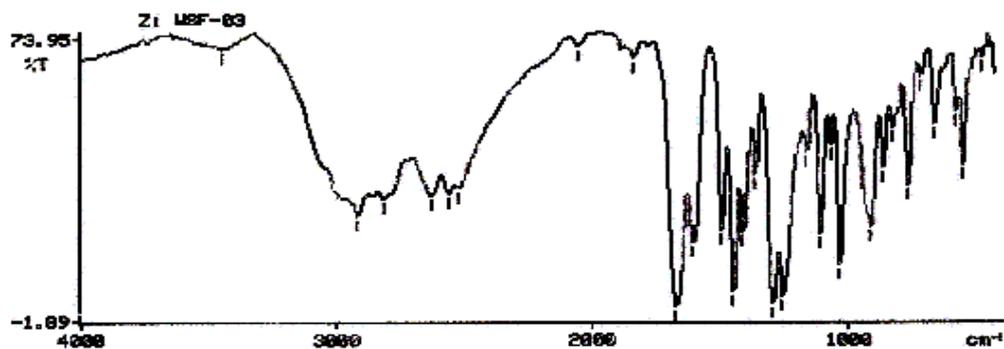
$\nu_{\text{C=O}} = 1673,8$ (vibração da carbonila do ácido carboxílico conjugado)

$\nu_{\text{C=C}} (\text{Csp}^2) = 1498-1450$ (vibração do esqueleto aromático)

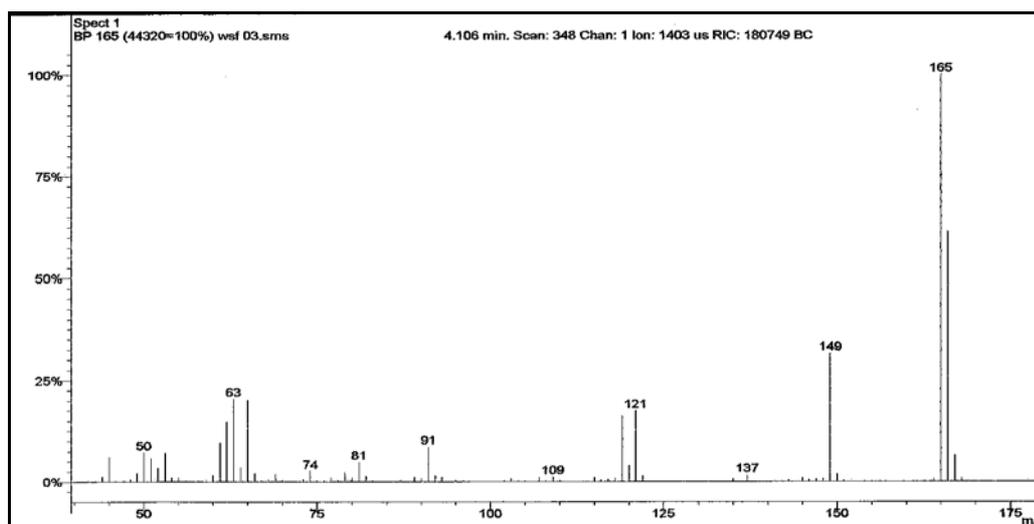
$\nu_{\text{C-O-C}} = 1258,5$ (metilenodioxí)

$\sigma_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 930$ (dobramento de $1\text{H}_{\text{arom.}}$ isolado)

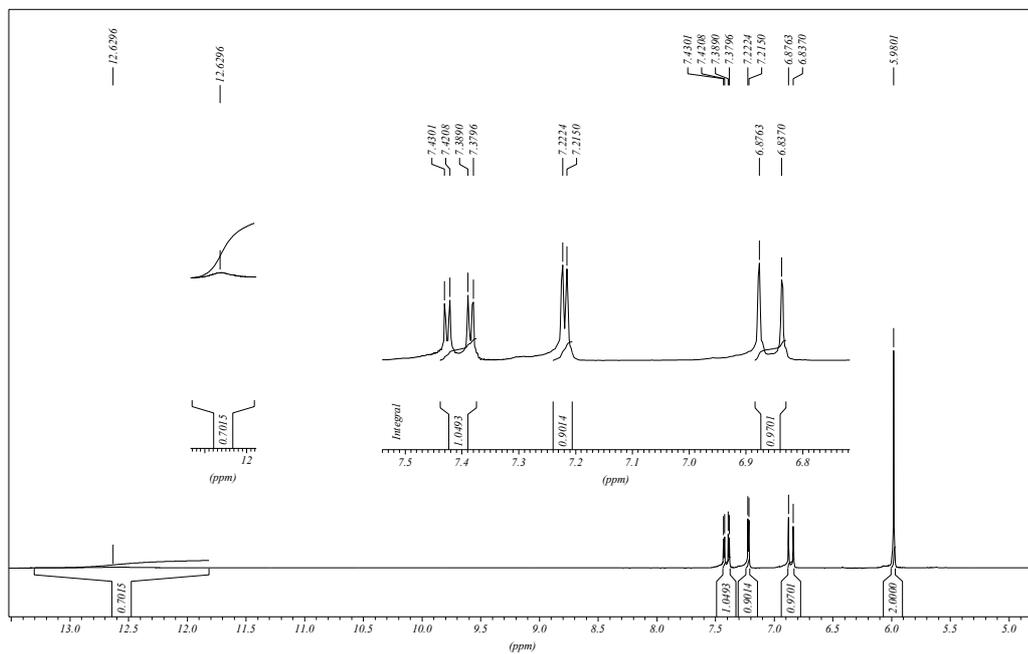
$\sigma_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 850$ (dobramento de $2\text{H}_{\text{arom.}}$ vizinhos)



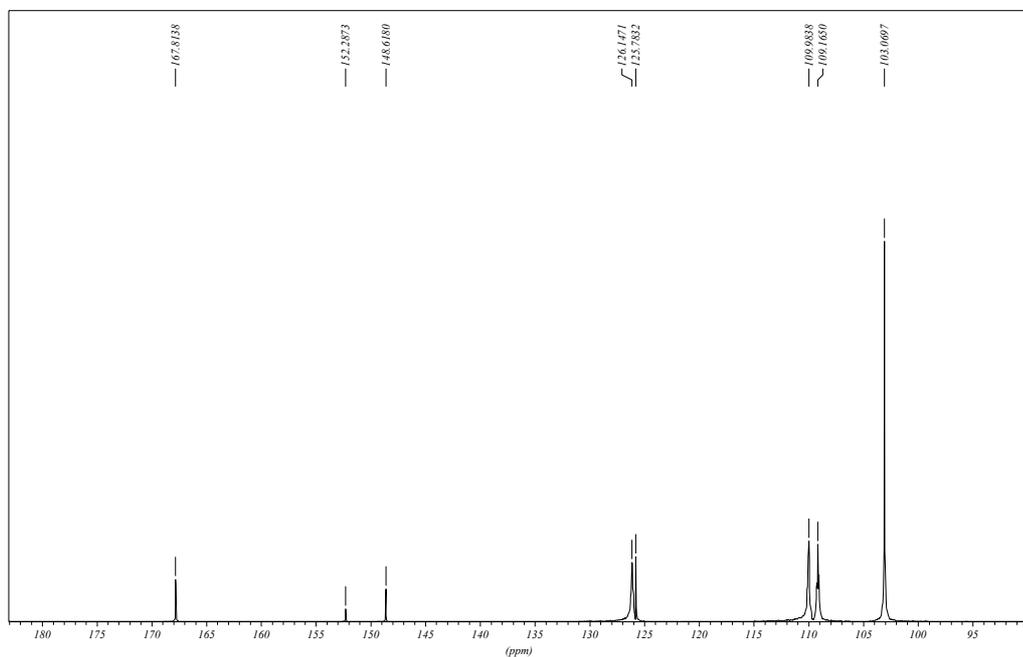
Espectro 13: Espectro de IV do ácido piperonílico 70.



Espectro 14: Espectro de massas do ácido piperonílico 70.



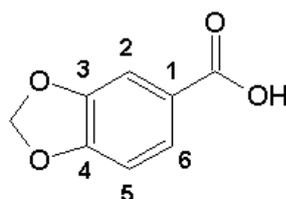
Espectro 15: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) do ácido piperônico **70**.



Espectro 16: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, CD_3OD) do ácido piperônico **70**.

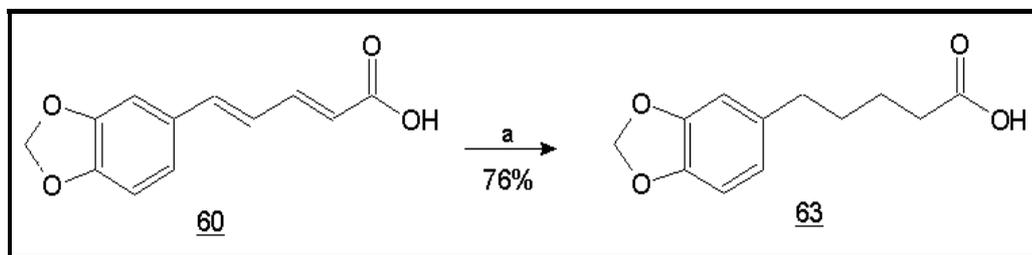
Tabela 12: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para o ácido piperonílico 70.

Posição	Ácido piperonílico (CD_3OD) 200MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
OH	12,65 (sl; 1H)
C=O	167,8 (C)
1	125,7 (C)
2	7,21 (d; 7,8; 1H)	109,9 (CH)
3	152,2 (C)
4	148,6 (C)
5	6,85 (d; 7,8; 1H)	109,1 (CH)
6	7,40 (dd; 8,0 e 1,8; 1H)	126,1 (CH)
OCH ₂ O	5,98 (sl; 1H)	103,0 (CH ₂)



Ácido piperonílico 70

5.8. Preparação do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil) pentanóico (ácido tetraidropiperínico) (63) (Venkatasamy *et al.*, 2004)



Reagentes: a) H₂(g), Pd/C; acetato de etila, t.a, 3h.

Num balão de 50 mL de capacidade, foi feita uma solução de 0,40 g (2,06 mmol) de ácido piperínico em 20 mL de acetato de etila, sobre a qual foi adicionado 0,05 g do catalisador Pd/C10%. Esta suspensão foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por alguns minutos. Selou-se o balão com um septo, retirando-se o ar presente no balão por um sistema de vácuo acoplado a um balão contendo hidrogênio fixado ao septo. O sistema então permaneceu por 3 horas sob atmosfera de hidrogênio e agitação magnética. Após o término da reação (acompanhada por CCF), o meio reacional foi filtrado numa seringa empacotada com sílica gel, para retirar o catalisador. Após evaporação do solvente, o sólido foi recristalizado em CHCl₃: Hexano (1:9) à 40°C, e o produto foi obtido na forma de um sólido bege amorfo 0,35 g (76%).

Pf.: 95-96°C (Lit.:95-96°C) (Sondengam, 1983).

Infravermelho (KBr, cm⁻¹)

ν O-H = 3441,0 (ácido carboxílico)

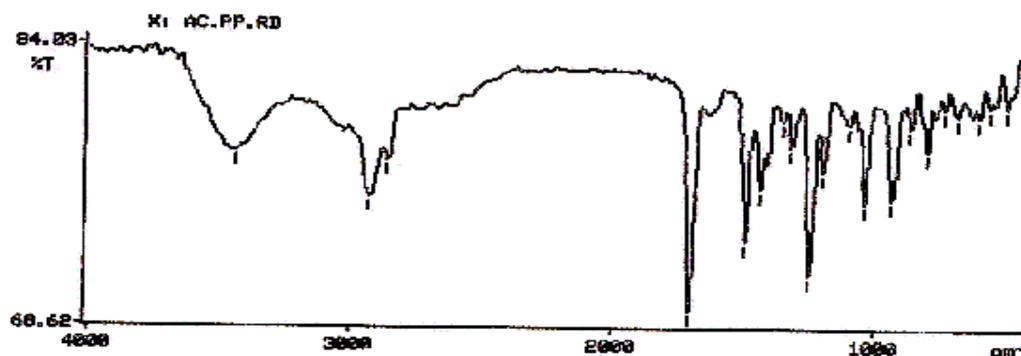
ν C-H (Csp³) = 2928- 2859 (saturados e metilenodioxí)

ν C=O = 1708,0 (vibração da carbonila do ácido carboxílico não conjugado)

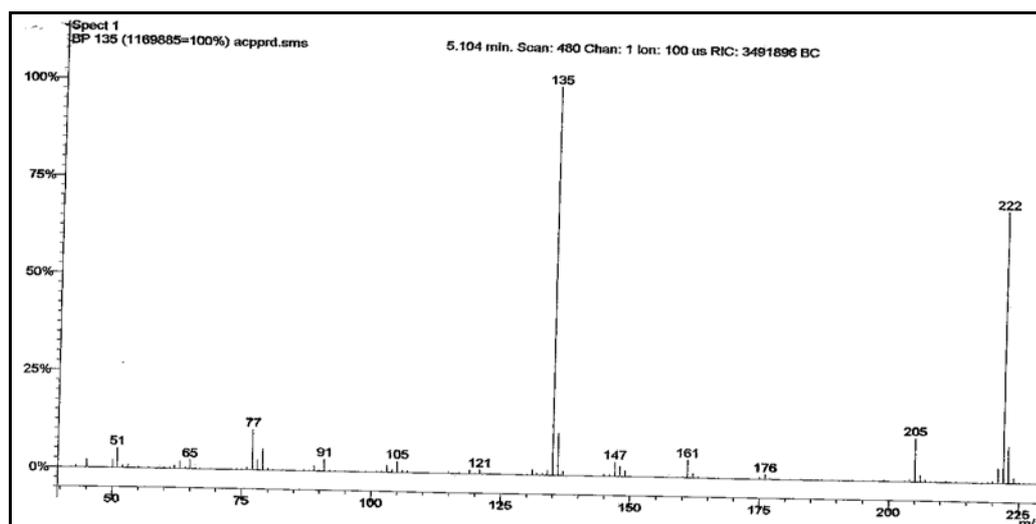
ν C=C (Csp²) = 1491-1440 (vibração do esqueleto aromático)

ν C-O-C = 1252,5 (metilenodioxí)

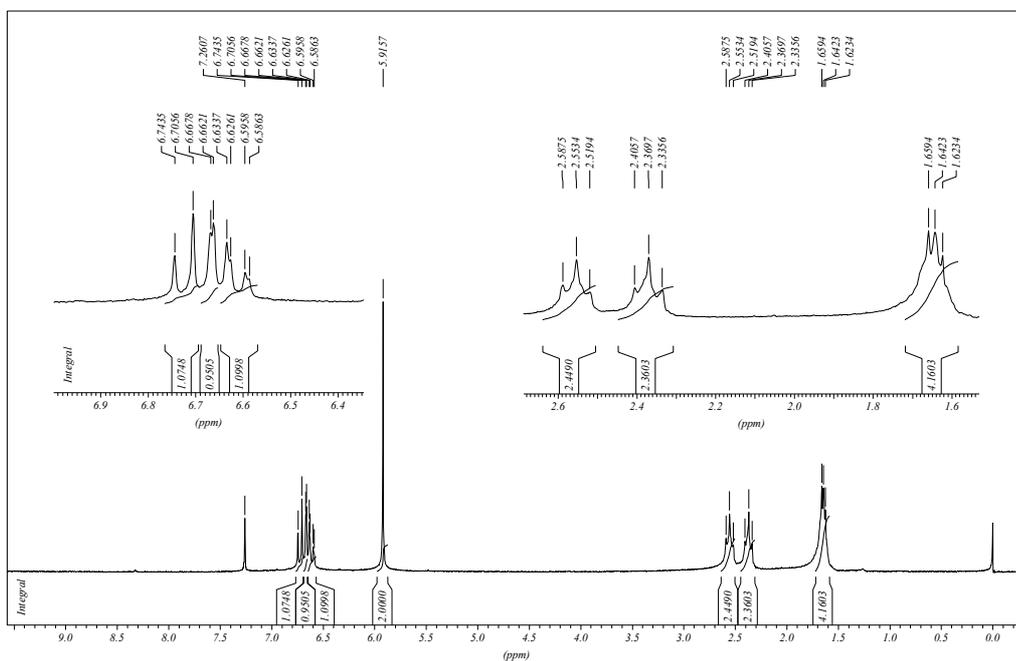
σ C-H (Csp²) = 936 (dobramento de 1H_{arom.} isolado)



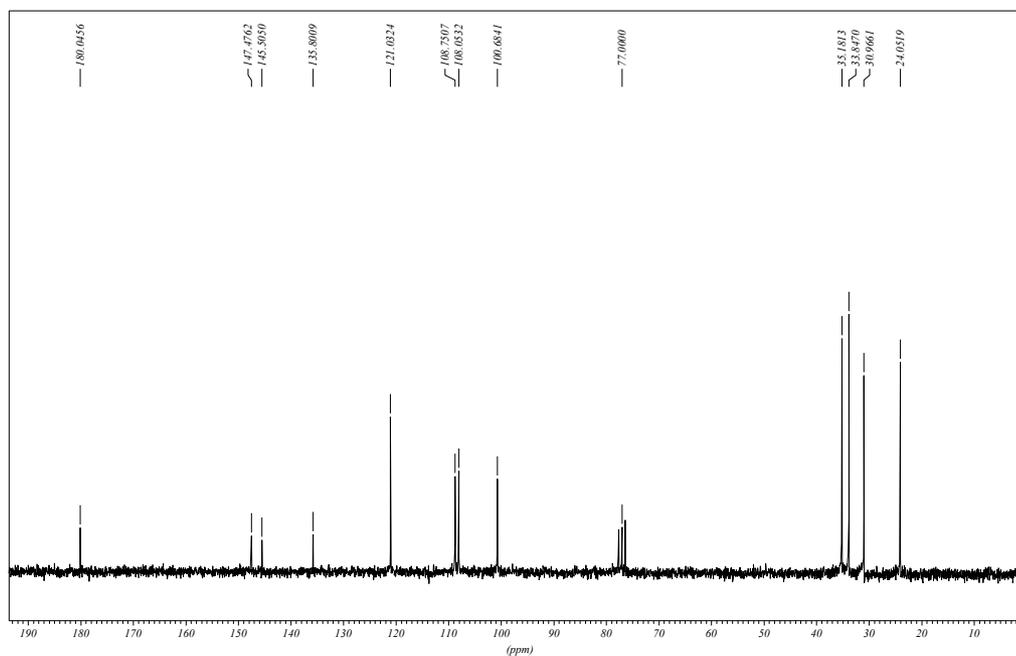
Espectro 17: Espectro de IV do ácido tetraidropiperínico **63**.



Espectro 18: Espectro de massas do ácido tetraidropiperínico **63**.



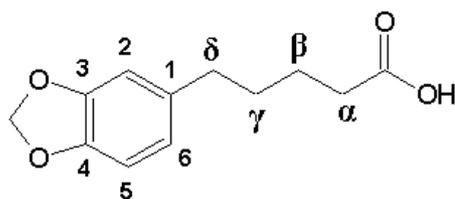
Espectro 19: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ácido tetraidropiperínico **63**.



Espectro 20: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) do ácido tetraidropiperínico **63**.

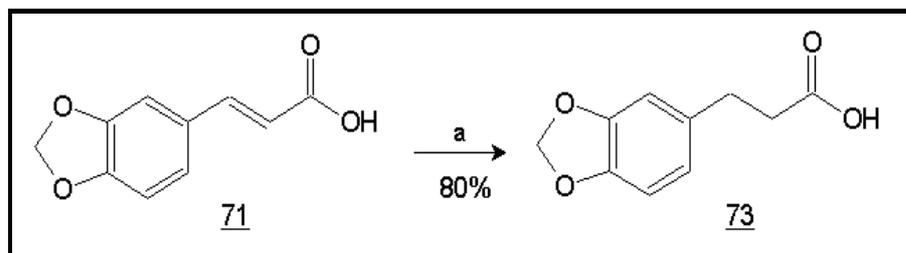
Tabela 13: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para o ácido tetraidropiperínico **63**.

Posição	Ácido tetraidropiperínico (CDCl_3) 200MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
OH
C=O	180,0 (C)
1	135,8 (C)
2	6,66 (d; 1,3; 1H)	108,7 (CH)
3	147,4 (C)
4	145,5 (C)
5	6,72 (d; 7,5; 1H)	108,7 (CH)
6	6,61 (dd, 7,5 e 1,5; 1H)	121,0 (CH)
α	2,55 (t; 7,0; 2H)	35,1 (CH_2)
β	1,64 (m; 2H)	24,0 (CH_2)
γ	1,64 (m; 2H)	30,9 (CH_2)
δ	2,36 (t; 6,8; 2H)	33,8 (CH_2)
OCH_2O	5,91 (sl; 2H)	100,6 (CH_2)



Ácido tetraidropiperínico **63**

5.9. Preparação do ácido 3-(3,4-metilenodioxifenil) propanóico (ácido diidrocinâmico) (73)
(Venkatasamy *et al.*, 2004)



Reagente: a) H₂(g), Pd/C; acetato de etila, t.a., 3h.

Num balão de 50 mL de capacidade, foi feita uma solução de 0,40 g (2,08 mmol) de ácido cinâmico em 20 mL de acetato de etila, sobre a qual foi adicionado 0,05 g do catalisador Pd/C10%. Esta suspensão foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por alguns minutos. Selou-se o balão com um septo, retirando-se o ar presente no balão por um sistema de vácuo acoplado a um balão contendo hidrogênio fixado ao septo. O sistema então permaneceu por 3 horas sob atmosfera de hidrogênio e agitação magnética. Após o término da reação (acompanhada por CCF), o meio reacional foi filtrado numa seringa empacotada com sílica gel, a fim de retirar o catalisador. Após evaporação do solvente, o sólido foi recristalizado em CHCl₃:hexano (2:8) à 40°C, e o produto foi obtido na forma de cristais brancos em forma de agulhas 0,32 g (80%) (Lit.: 80%) (Venkatasamy *et al.*, 2004).

Pf.: 84-85°C (Lit.:86-88°C) (Venkatasamy *et al.*, 2004).

Infravermelho (KBr, cm⁻¹)

$\nu_{\text{O-H}}$ = 3284,4 (ácido carboxílico)

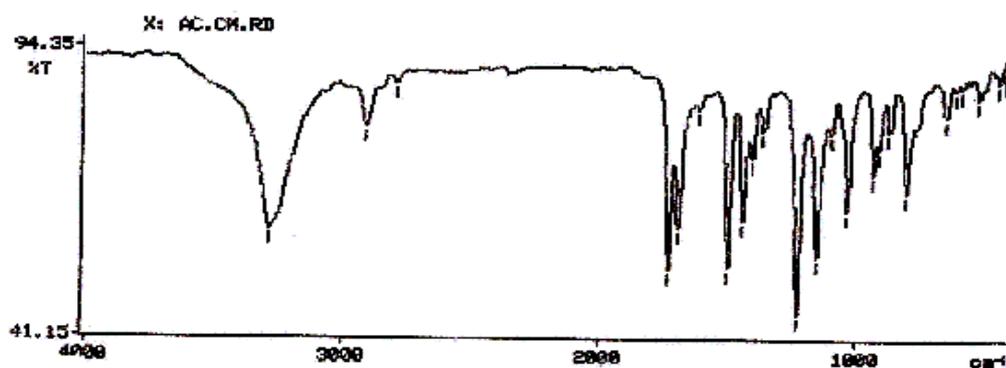
$\nu_{\text{C-H}}$ (Csp³) = 2916-2795 (saturados e metilenodioxí)

$\nu_{\text{C=O}}$ = 1733,3 (vibração da carbonila do ácido carboxílico não conjugado)

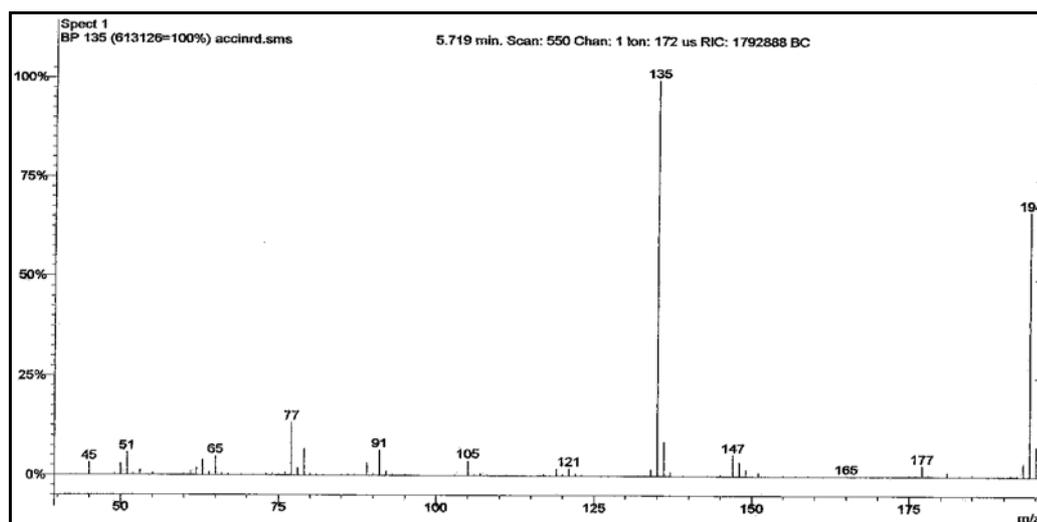
$\nu_{\text{C=C}}$ (Csp²) = 1612-1446 (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1232,6 (metilenodioxí)

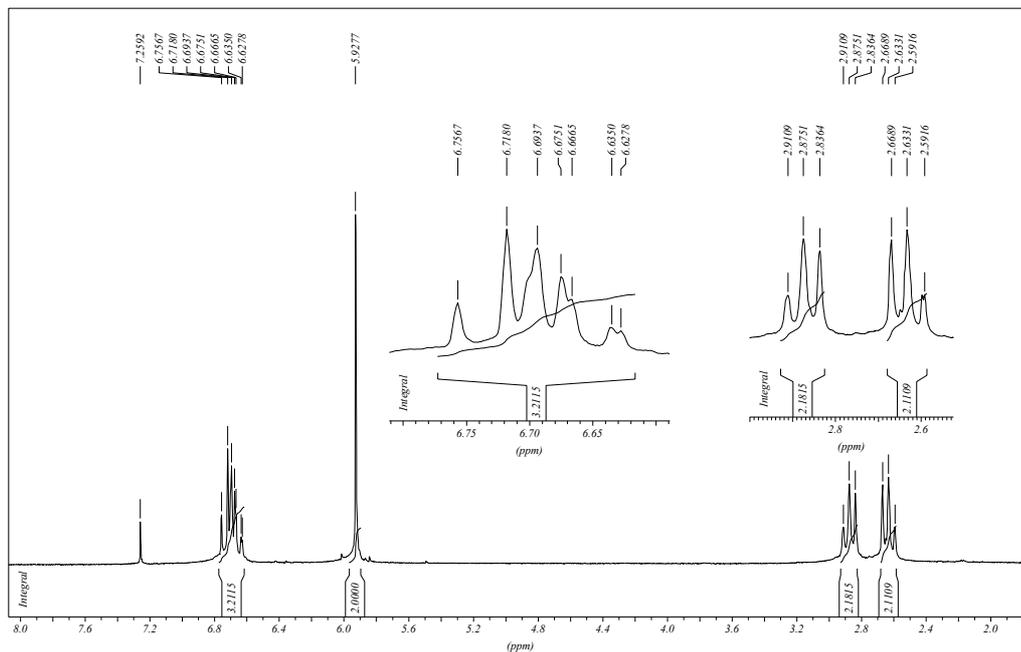
$\sigma_{\text{C-H}}$ (Csp²) = 938,5 (dobramento de 1H_{arom.} isolado)



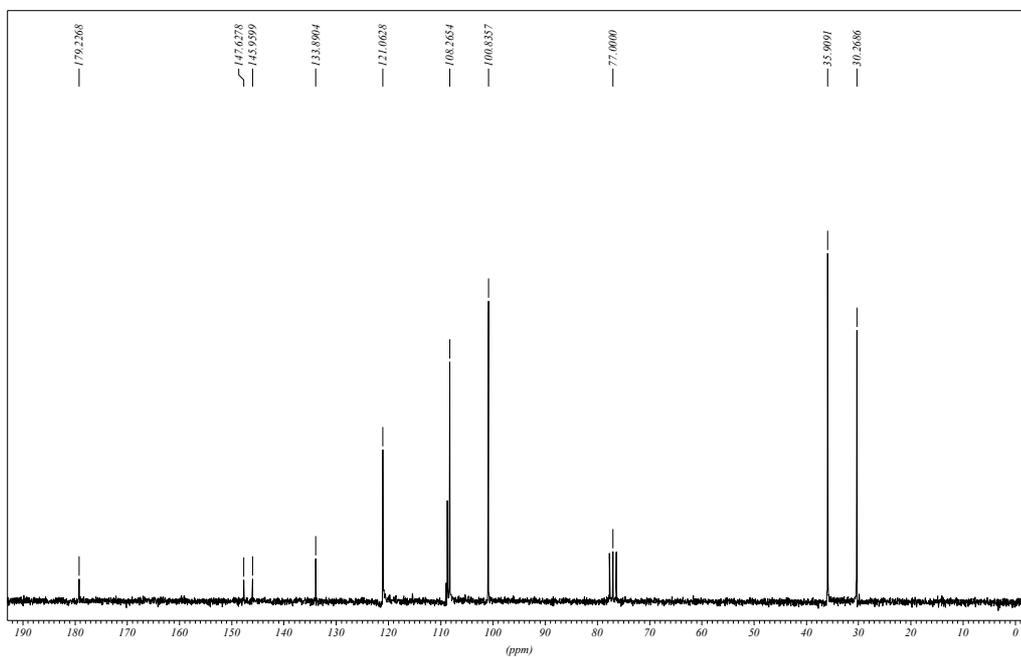
Espectro 21: Espectro de IV do ácido diidrocinâmico 73.



Espectro 22: Espectro de massas do ácido diidrocinâmico 73.



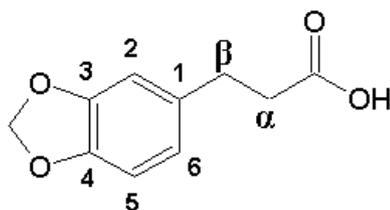
Espectro 23: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) do ácido diidrocinâmico 73.



Espectro 24: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) do ácido diidrocinâmico 73.

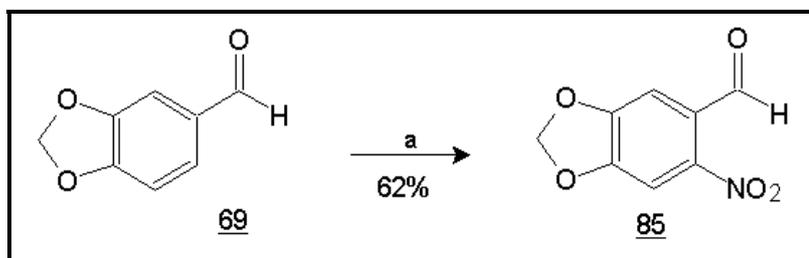
Tabela 14: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para o ácido diidrocinâmico 73.

Posição	Ácido diidrocinâmico (CDCl_3) 200MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
OH
C=O	179,2 (C)
1	133,8 (C)
2	6,69 (d; 1,1; 1H)	108,2 (CH)
3	147,6 (C)
4	145,9 (C)
5	6,73 (d; 7,7; 1H)	108,2 (CH)
6	6,64 (dd; 7,8 e 1,5; 1H)	121,0 (CH)
α	2,87 (t; 7,5; 2H)	35,9 (CH_2)
β	2,63 (t; 7,2; 2H)	30,9 (CH_2)
OCH_2O	5,92 (sl; 2H)	100,8 (CH_2)



Ácido diidrocinâmico 73

5.10. Preparação do 6-nitro-3,4-metilenodioxibenzaldeído (6-nitropiperonal) (85) (Rascado, 1997)



Reagentes: a) CH₃COOH(glacial) e HNO₃(conc), 6h

Num balão de 10 mL de capacidade foram dissolvidos 1,0 g (6,66 mmol) de piperonal 69 em 5,0 mL de ácido acético glacial, formando uma solução incolor. Sobre esta solução, mantida sob agitação magnética e à temperatura ambiente, foi adicionado 1,5 mL (33,3 mmol) de ácido nítrico concentrado, gota-a-gota. A reação foi acompanhada por CCF e após 6 horas a reação se completou apresentando-se como uma solução amarela, que foi transferida para um funil de decantação e particionada entre acetato de etila (10 mL) e água (4x10 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução saturada de NaHCO₃ (4x10 mL), e em seguida seca sobre Na₂SO₄ (anidro), filtrada e evaporada, fornecendo um sólido amarelo, o qual foi purificado por cromatografia em sílica gel (eluente: hexano/acetato de etila 5%) fornecendo 0,806 g (62%) do 6-nitropiperonal 85, na forma de cristais amarelos (Rascado, 1997).

Pf.: 88-90°C (Lit.: 93-94°C) (Catálogo Aldrich 2003-4)

Infravermelho (KBr, cm⁻¹)

$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 3059,8$ (aromático)

$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^3) = 2926,8$ (metilenodioxílico)

$\nu_{\text{C=O}} = 1680,8$ (vibração da carbonila do aldeído conjugado ao anel aromático)

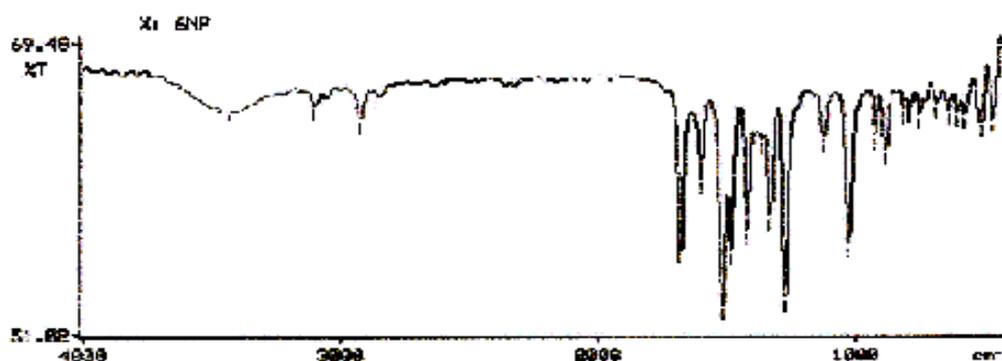
$\nu_{\text{C=C}} (\text{Csp}^2) = 1598-1423$ (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{\text{N=O}} = 1517,7$ (radical nitro)

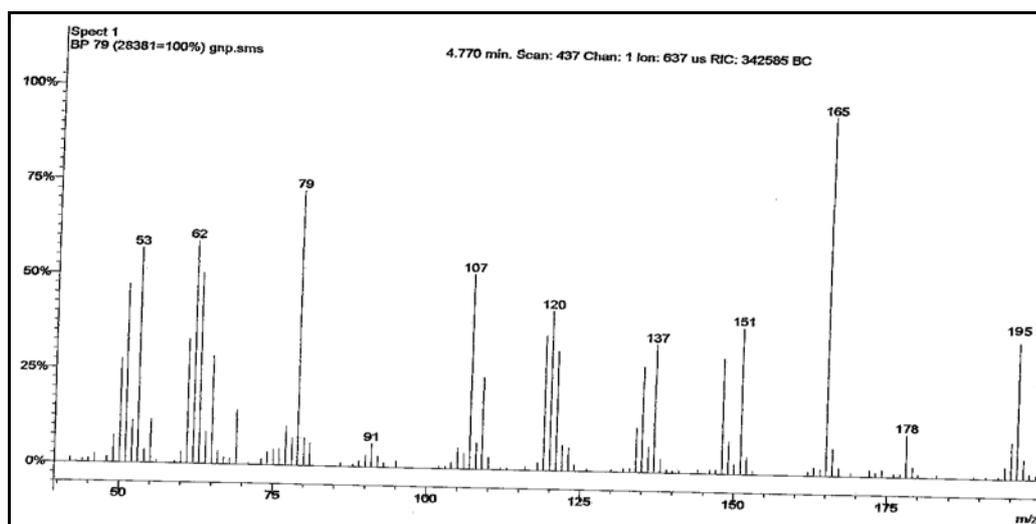
$\nu_{\text{C-N}} = 1369,4$ (radical nitro)

$\nu_{\text{C-O-C}} = 1277,5$ (metilenodioxi)

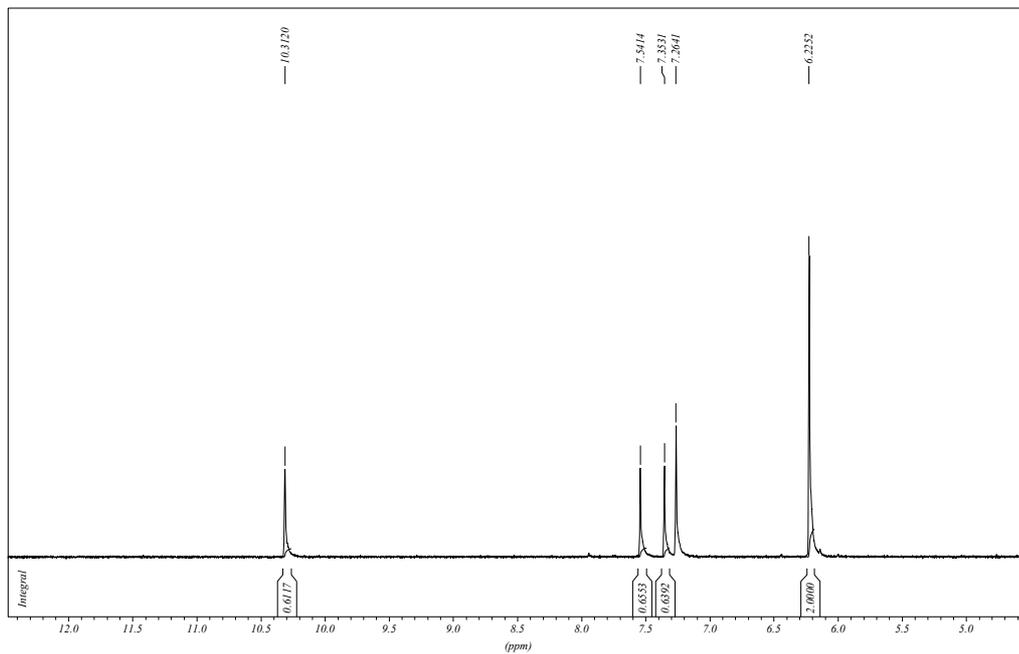
$\sigma_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 960,8$ (dobramento de $1\text{H}_{\text{arom.}} \text{ isolado}$)



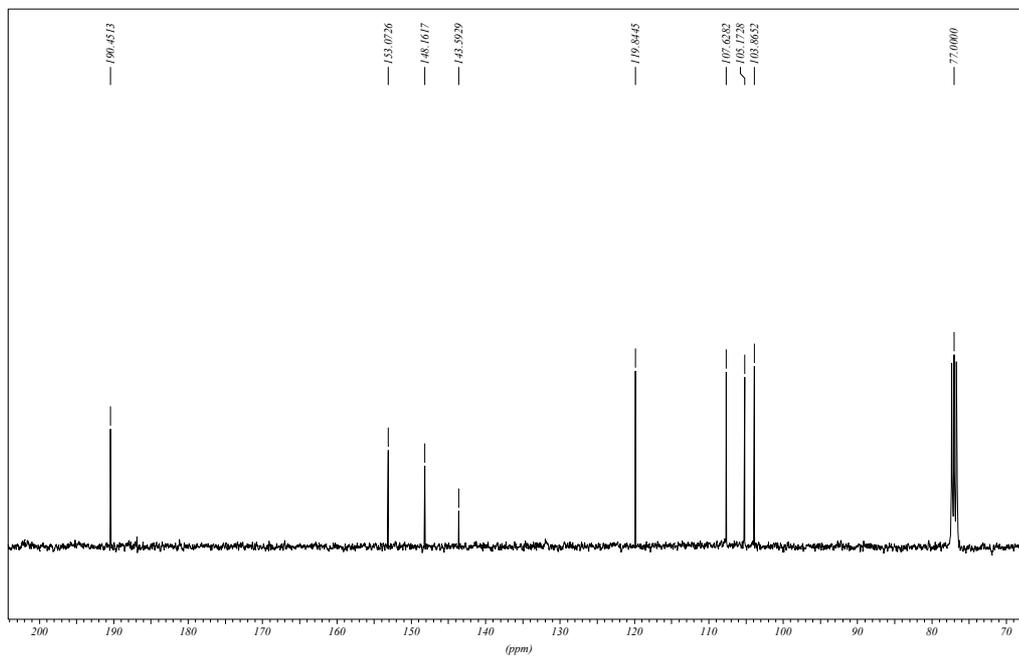
Espectro 25: Espectro de IV do 6-nitropiperonal 85.



Espectro 26: Espectro de massas do 6-nitropiperonal 85.



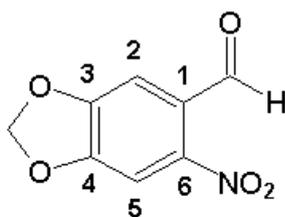
Espectro 27: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 6-nitropiperonal **85**.



Espectro 28: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do 6-nitropiperonal **85**.

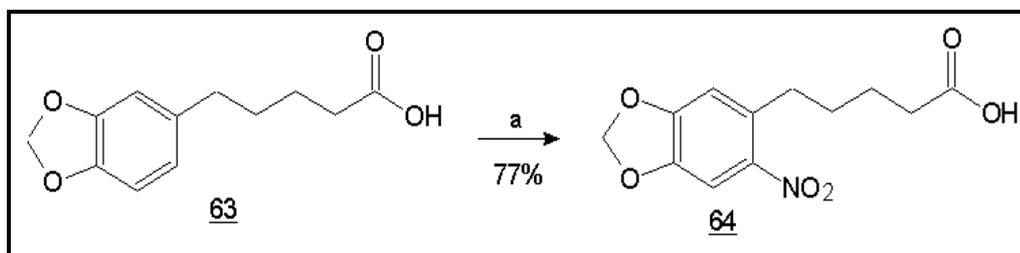
Tabela 15: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para o 6-nitropiperonal **85**.

Posição	6-nitropiperonal (CDCl_3) 400MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
CHO	10,31 (s; 1H)
C=O	190,4(C)
1	119,8 (C)
2	7,54 (s; 1H)	107,6 (CH)
3	153,0 (C)
4	148,1 C)
5	7,35 (s; 1H)	105,1 (CH)
6	143,5 (C)
OCH_2O	6,22 (sl; 1H)	103,8 (CH_2)



6-nitropiperonal **85**

5.11. Preparação do ácido 5-(6-nitro-3,4-metilenodioxifenil) pentanóico (ácido 6-nitrotetraidropiperínico) (64**) (Rascado, 1997).**



Reagentes: a) CH₃COOH(glacial) e HNO₃(conc), 3h

Em um balão de 10 mL de capacidade, foram dissolvidos 0,30 g (1,35 mmol) de ácido tetraidropiperínico **63** em 1,5 mL de ácido acético glacial, formando uma solução incolor. Sobre esta solução, mantida sob agitação magnética e à temperatura ambiente, foi adicionado 0,3 mL (4,44 mmol) de ácido nítrico concentrado, gota-a-gota. A reação foi acompanhada por CCF e após 3 horas a reação se completou, apresentando-se como uma solução amarela, que foi transferida para um funil de decantação e particionada entre acetato de etila (10 mL) e solução saturada de NaCl aquosa (4x10 mL). A fase orgânica foi lavada novamente com solução saturada de NaCl aquosa (3x10 mL) e água destilada (3x10 mL), e em seguida seca sobre Na₂SO₄ (anidro), filtrada e evaporada, fornecendo o ácido nitrado **64** na forma de um sólido amarelo amorfo 0,27 g (77%), em elevado grau de pureza.

Pf.: 111-112 °C.

Infravermelho (KBr, cm⁻¹)

$\nu_{\text{O-H}} = 3423,5$ (ácido carboxílico)

$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 3050,3$ (aromático)

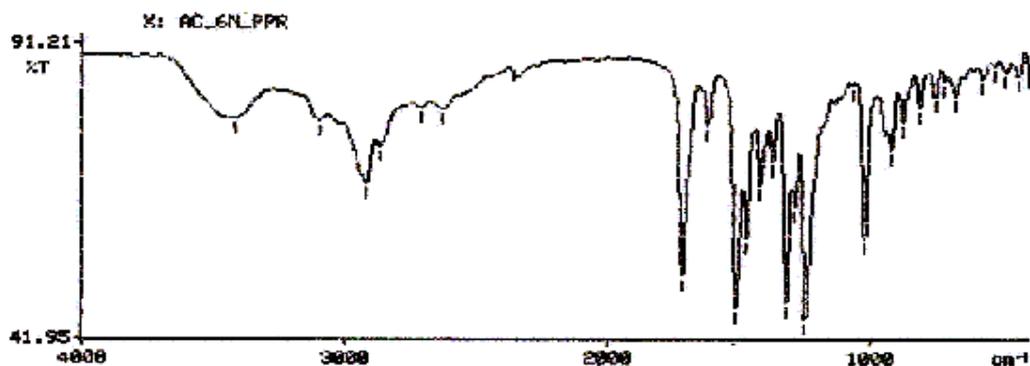
$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^3) = 2925- 2871$ (saturado e metilenodioxílico)

$\nu_{\text{C=O}} = 1718,0$ (vibração da carbonila do ácido carboxílico não conjugado)

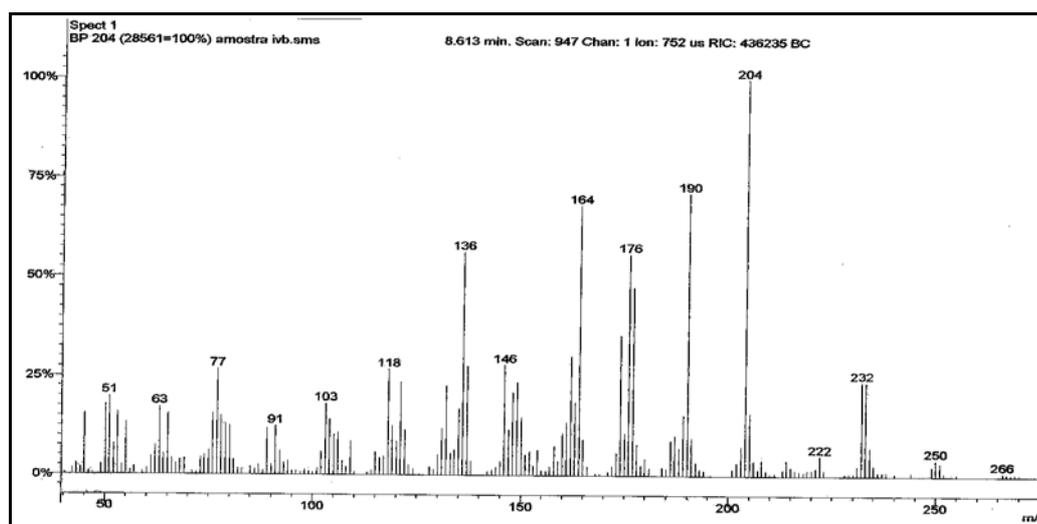
$\nu_{\text{C=C}} (\text{Csp}^2) = 1620- 1477$ (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{\text{N=O}} = 1518,7$ (radical nitro)

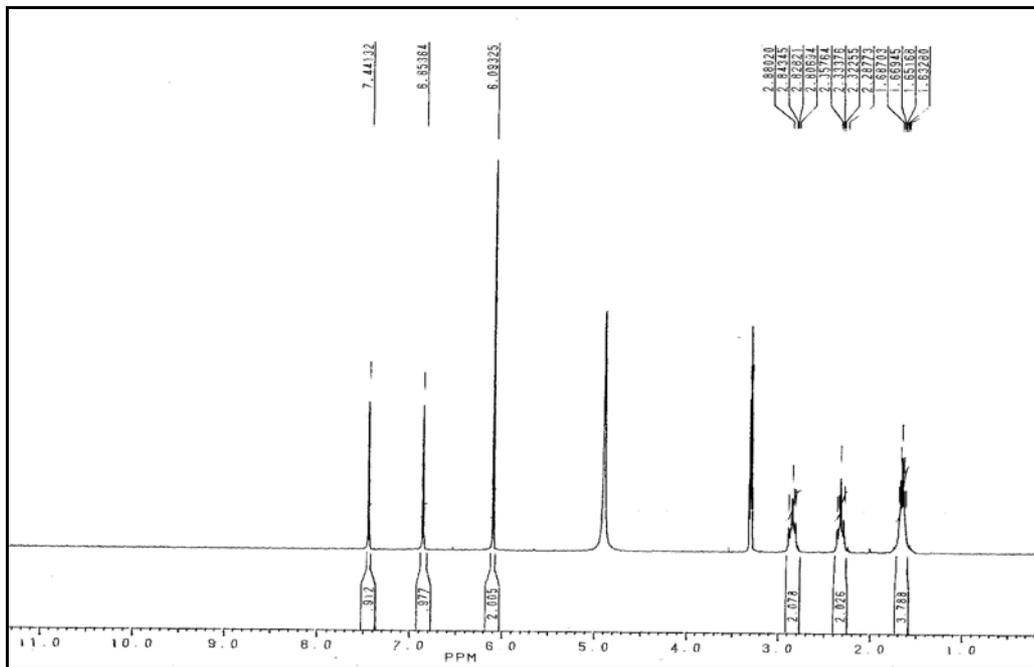
$\nu_{\text{C-O-C}} = 1250,7$ (metilenodioxílico)



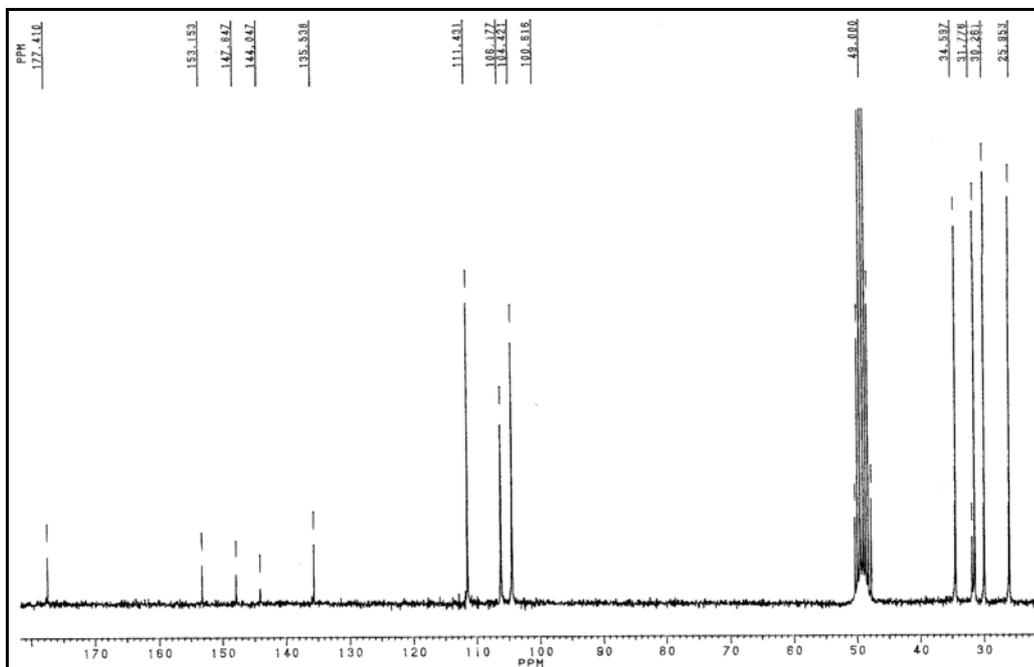
Espectro 29: Espectro de IV do ácido 6-nitrotetraidropiperínico 64.



Espectro 30: Espectro de massas do ácido 6-nitrotetraidropiperínico 64.



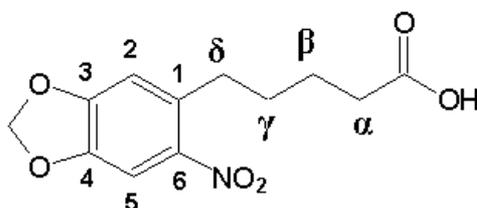
Espectro 31: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) do ácido 6-nitrotetrahidropiperínico **64**.



Espectro 32: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, CD_3OD) do ácido 6-nitrotetrahidropiperínico **64**.

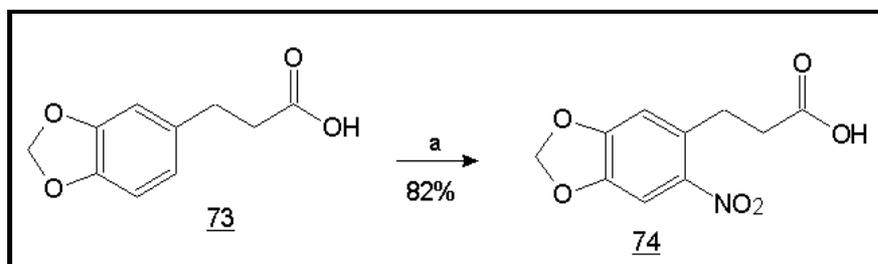
Tabela 16: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para o ácido 6-nitrotetraidropiperínico **64**.

Posição	Ácido 6-nitrotetraidropiperínico (CD_3OD) 200MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
OH
C=O	177,41 (C)
1	135,53 (C)
2	6,85 (s; 1H)	106,17 (CH)
3	147,64 (C)
4	144,04 (C)
5	7,44 (s; 1H)	111,43 (CH)
6	153,15(C)
α	2,82 (t; 7,0; 2H)	34,50 (CH_2)
β	1,65 (m; 2H)	25,95 (CH_2)
γ	1,65 (m; 2H)	30,26 (CH_2)
δ	2,32 (t; 6,8; 2H)	31,72 (CH_2)
OCH_2O	6,09 (sl; 2H)	100,61 (CH_2)



Ácido 6-nitrotetraidropiperínico **64**

5.12. Preparação do ácido 3-(6-nitro-3,4-metilenodioxifenil) propanóico (ácido 6-nitrodiidrocinâmico) (74) (Rascado, 1997).



Reagentes: a) CH₃COOH(glacial) e HNO₃(conc), 3h

Num balão de 10 mL de capacidade, equipado com condensador de refluxo, foram dissolvidos 0,30 g (1,54 mmol) de ácido diidrocinâmico 73 em 1,5 mL de ácido acético glacial, formando uma solução incolor. Sobre esta solução, mantida sob agitação magnética e à temperatura ambiente, foi adicionado 0,3 mL (6,66 mmol) de ácido nítrico concentrado, gota-a-gota. A reação foi acompanhada por CCF e após 3 horas a reação se completou apresentando-se como uma solução amarela, que foi transferida para um funil de decantação e particionada entre acetato de etila (10 mL) e solução saturada de NaCl aquosa (4x10 mL). A fase orgânica foi lavada novamente com solução saturada de NaCl aquosa (3x10 mL) e água destilada (3x10 mL), e em seguida seca sobre Na₂SO₄ (anidro), filtrada e evaporada, fornecendo o ácido nitrado 74 na forma de um sólido amarelo amorfo 0,30 g (82%) (Lit.: 80%) (Rascado, 1997), em elevado grau de pureza.

Pf.: 154-156°C (Lit.: 153°C) (Rascado, 1997).

Infravermelho (KBr, cm⁻¹)

$\nu_{\text{O-H}} = 3425,9$ (ácido carboxílico)

$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 3066,3$ (aromático)

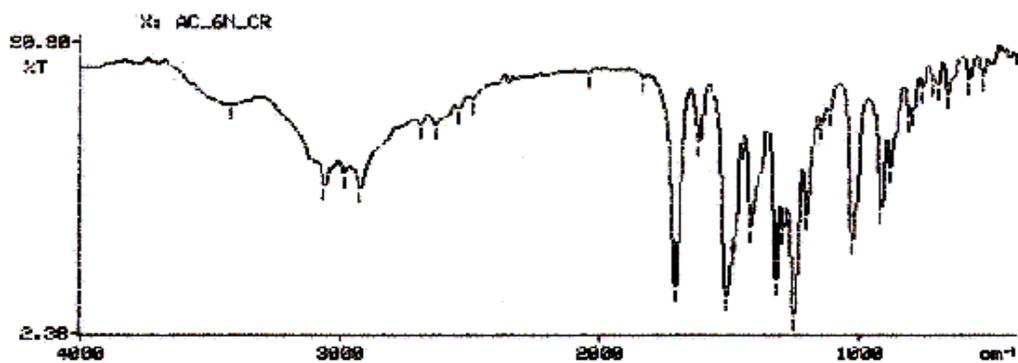
$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^3) = 2988-2927$ (saturado e metilenodioxílico)

$\nu_{\text{C=O}} = 1711,0$ (vibração da carbonila do ácido carboxílico não conjugado)

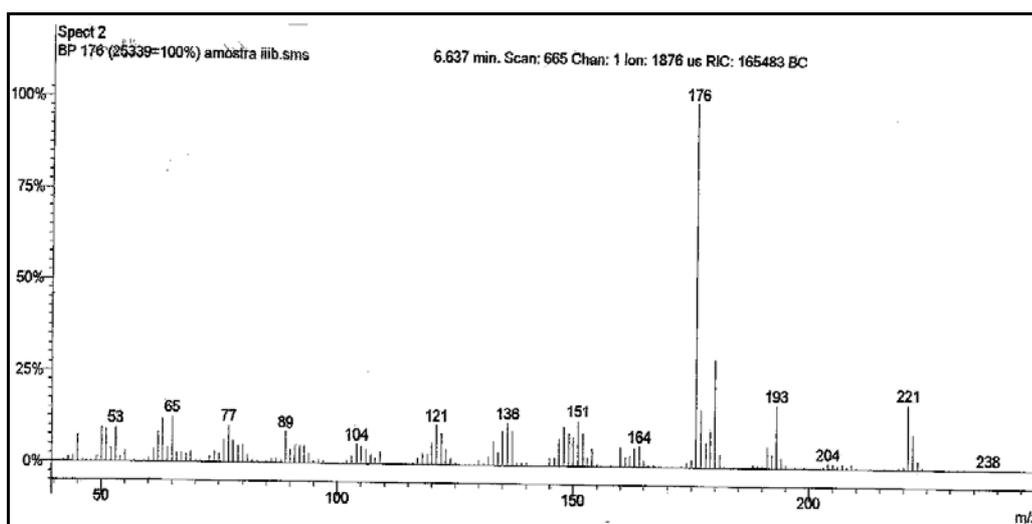
$\nu_{\text{C=C}} (\text{Csp}^2) = 1600-1456,5$ (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{\text{N=O}} = 1520,7$ (radical nitro)

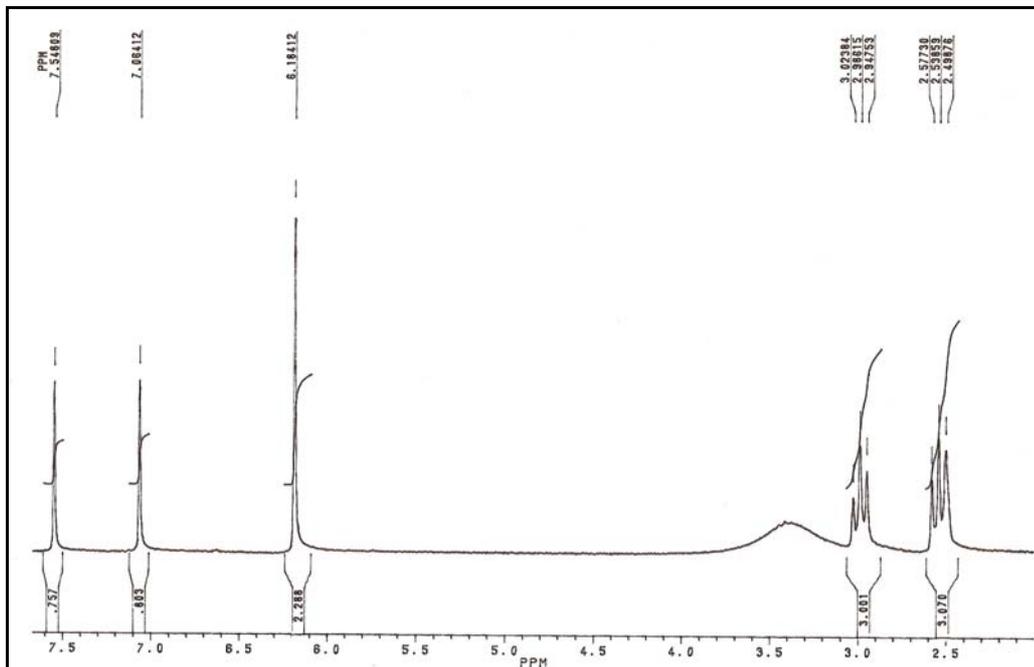
$\nu_{\text{C-O-C}} = 1256,7$ (metilenodioxílico)



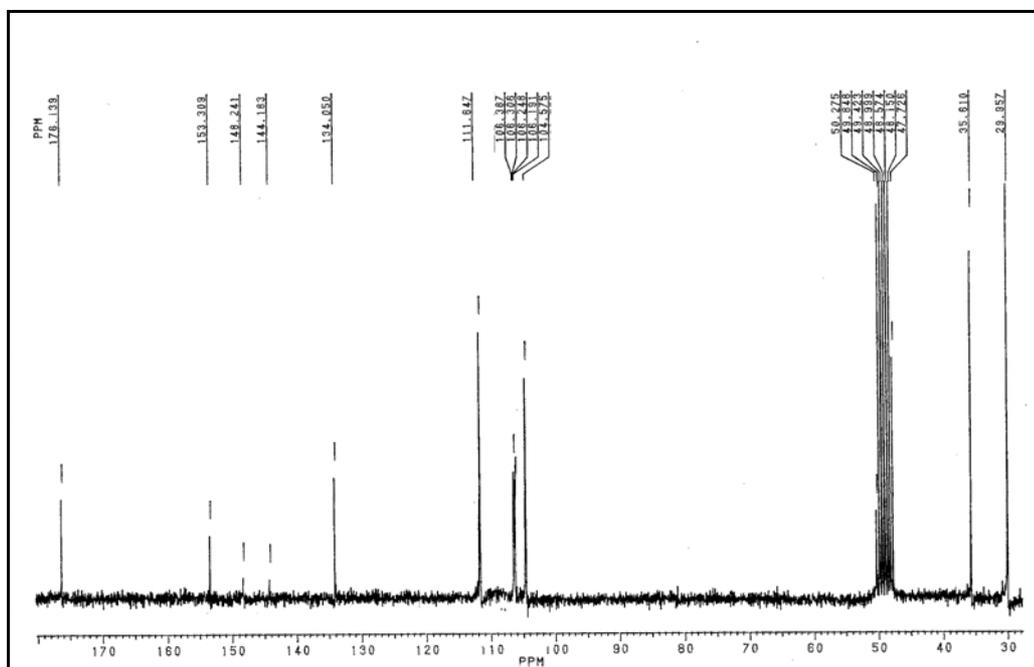
Espectro 33: Espectro de IV do ácido 6-nitrodiidrocinâmico 74.



Espectro 34: Espectro de massas do ácido 6-nitrodiidrocinâmico 74.



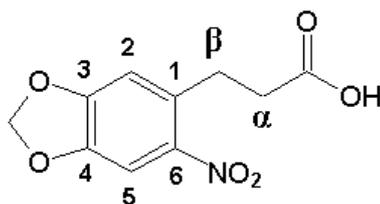
Espectro 35: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) do ácido 6-nitrodiidrocinâmico 74.



Espectro 36: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, CD_3OD) do ácido 6-nitrodiidrocinâmico 74.

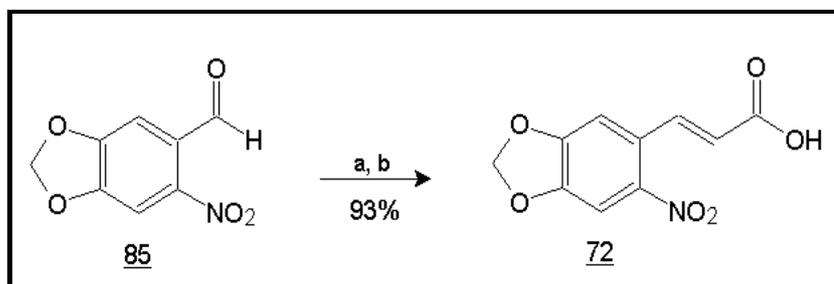
Tabela 17: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para o ácido 6-nitrodiidrocinâmico 74.

Posição	Ácido 6-nitrodiidrocinâmico (CD_3OD) 200MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
OH
C=O	176,13 (C)
1	134,05 (C)
2	7,06 (s; 1H)	106,24 (CH)
3	148,24 (C)
4	144,18 (C)
5	7,54 (s; 1H)	111,64 (CH)
6	153,30 (C)
α	2,98 (t; 7,5; 2H)	35,61 (CH_2)
β	2,53 (t; 7,3; 2H)	29,95 (CH_2)
OCH_2O	6,18 (sl; 2H)	104,57 (CH_2)



Ácido 6-nitrodiidrocinâmico 74

5.13. Preparação do ácido 6-nitro 3-(3,4-metilenodioxifenil)-2(*E*)-propenóico (ácido 6-nitro cinâmico) (72) (Silva *et al.*, 2002)



Reagentes: a) ác. malônico, piridina e piperidina, refluxo 5h; b) HCl 10%

Num balão de 10 mL de capacidade, equipado com condensador de refluxo, foram dissolvidos 0,50 g (2,56 mmol) de 6-nitropiperonal **85** e 0,61 g (5,92 mmol) de ácido malônico numa mistura de 1,2 mL de piridina e 0,02 mL (0,25 mmol) de piperidina. Em seguida, a mistura foi aquecida sob refluxo por cerca de 5 horas em banho-maria. Ocorreu um desprendimento de CO₂ pelo borbulhador conectado. A reação foi acompanhada por CCF, após se completar foi resfriada e vertida em 6 mL de solução de HCl 10%, o suficiente para neutralizar a piridina, ocorrendo a precipitação do produto. O ácido 6-nitrocinâmico **72**, foi filtrado, lavado com água, éter etílico e seco ao ar. Após recristalização em ácido acético glacial, obteve-se 0,56 g (93%) do ácido **72** na forma de um sólido marrom.

P.f. : 224-226°C

Infravermelho (KBr, cm^{-1})

$\nu\text{O-H}$ = 3434,6 (ácido carboxílico)

$\nu\text{C-H}$ (Csp^2) = 3069,3 (olefínico e aromático)

$\nu\text{C-H}$ (Csp^3) = 2925,9 (metilenodioxílico)

$\nu\text{C=O}$ = 1696,4 (vibração da carbonila do ácido carboxílico conjugado)

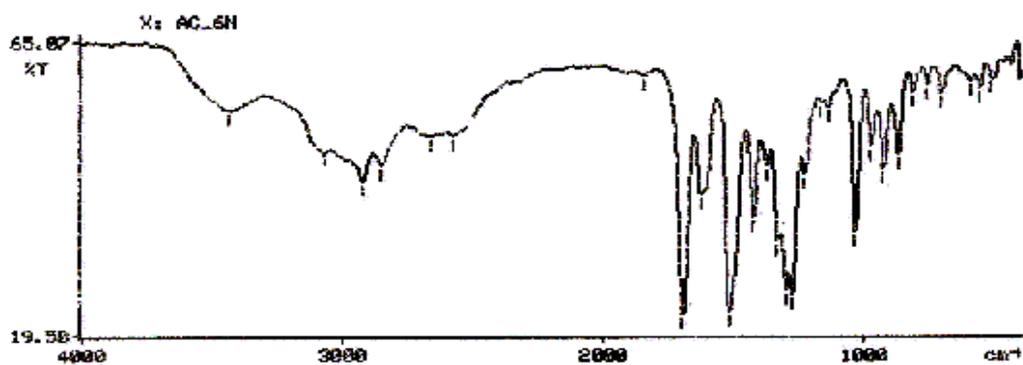
$\nu\text{C=C}$ (Csp^2) = 1626,8 (olefínicos)

$\nu\text{C=C}$ (Csp^2) = 1600-1428 (vibração do esqueleto aromático)

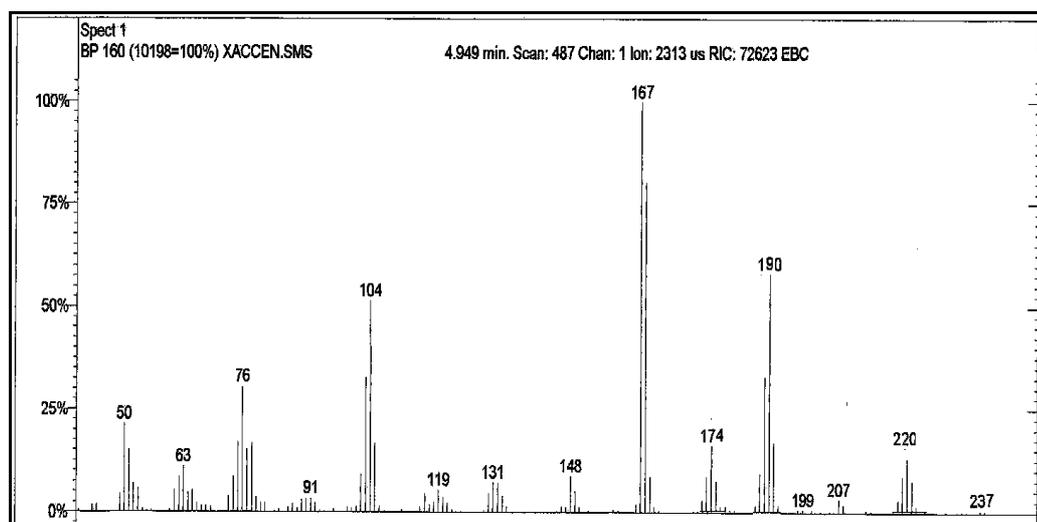
$\nu\text{N=O}$ = 1518,0 (radical nitro)

$\nu\text{C-O-C}$ = 1229,2 (metilenodioxi)

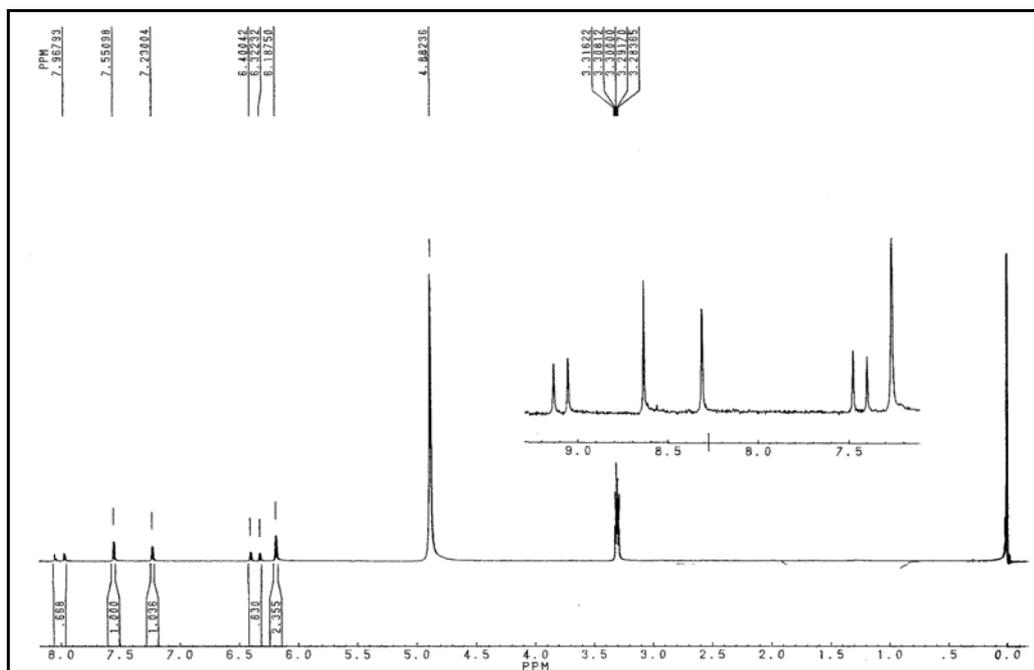
$\sigma\text{C-H}$ (Csp^2) = 975,8 (dobramento de $1\text{H}_{\text{arom.}}$ isolado)



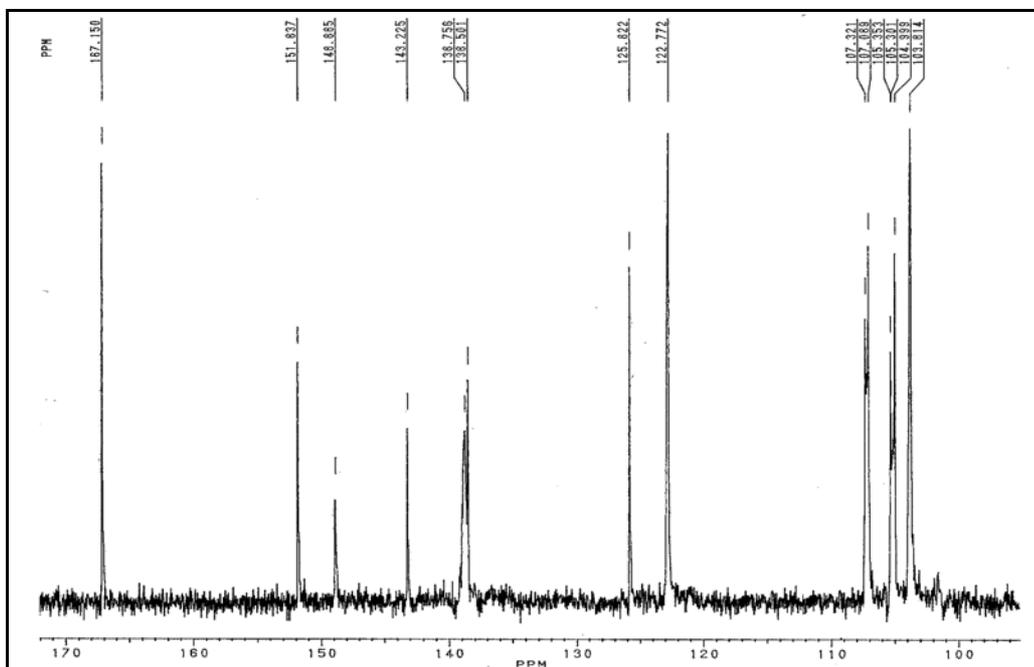
Espectro 37: Espectro de IV do ácido 6-nitrocinâmico 72.



Espectro 38: Espectro de massas do ácido 6-nitrocinâmico 72.



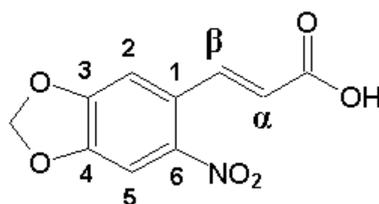
Espectro 39: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) do ácido 6-nitrocínâmico 72.



Espectro 40: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, CD_3OD) do ácido 6-nitrocínâmico 72.

Tabela 18: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para o ácido 6-nitrocínâmico 72.

Posição	Ácido 6-nitrocínâmico (CD_3OD) 200MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
OH
C=O	167,15 (C)
1	125,82 (C)
2	7,23 (s; 1H)	105,30 (CH)
3	148,88 (C)
4	148,88 (C)
5	7,55 (s; 1H)	107,01 (CH)
6	151,83 (CH)
α	6,36 (d; 15,8; 1H)	122,77 (CH)
β	7,96 (d; 16,1; 1H)	143,22 (CH)
OCH_2O	6,18 (sl; 2H)	103,81 (CH_2)



Ácido 6-nitrocínâmico 72

5.14. Metodologias aplicadas à síntese dos cloridratos mesoiônicos (M):

A) Metodologia Geral 1 (Montanari, 1994): Reação de anidroacilação para a síntese dos respectivos cloridratos mesoiônicos 62 (MI), 81 (MII), 80 (MIII), 67 (MIV), 83 (MV), 68 (MVII), 84 (MVIII) e 82 (MIX).

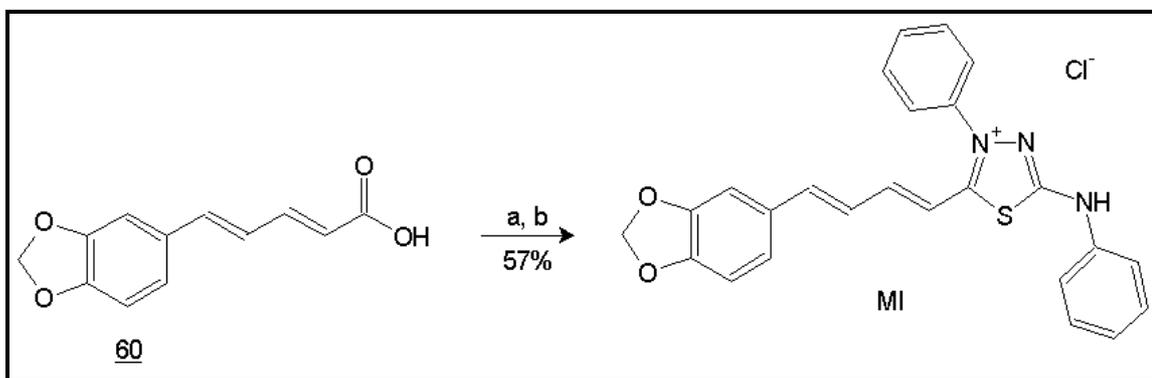
Em um balão de 10 mL de capacidade, acoplado a um borbulhador, foram adicionados 1,37 mmol do ácido carboxílico e 2,0 mL (excesso: 2,95g ; 22,81 mmol) de cloreto de oxalila (COCl)₂. A reação foi mantida à temperatura ambiente e agitação magnética, sendo acompanhada por CCF (do éster metílico correspondente, formado através da reação instantânea de uma alíquota do cloreto de acila com metanol) e pelo desprendimento de CO₂(g) durante 2-3 horas. O excesso de (COCl)₂ foi removido em evaporador rotatório, restando apenas o cloreto de acila que foi utilizado sem tratamento, devido à sua instabilidade em atmosfera úmida.

Paralelamente, em outro balão de 10 mL, foram adicionados 2 mL de 1,4-dioxana (anidra) e 0,333 g (1,37 mmol) de 1,4-difeniltiossemicarbazida 53, mantidos sobre agitação magnética, atmosfera inerte de nitrogênio e temperatura ambiente, onde foram adicionados, com o auxílio de uma seringa, a solução do cloreto de acila em 2 mL de 1,4-dioxana (anidra). Após 24 horas de agitação, a solução foi deixada em repouso por algumas horas para que ocorresse a precipitação do produto formado. O sólido obtido, após filtração à pressão reduzida, foi lavado com uma seqüência de solventes (1,4-dioxana, tolueno e éter etílico gelado, respectivamente).

B) Metodologia Geral 2 (Kappel, 2004): Reação de anidroacilação para a síntese dos respectivos cloridratos mesoiônicos 80 (MIII) e 86 (MVI).

Em um balão de 10 mL de capacidade foram adicionados 0,060 g (0,25 mmol) de 1,4-difeniltiossemicarbazida 53, 1 mL de DMF (anidro), 0,1mL (0,80 mmol) de TMS-Cl e 0,62 mmol do aldeído aromático, respectivamente. A reação foi mantida sob agitação magnética, atmosfera inerte de nitrogênio e temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCF. Após 12 horas a agitação foi interrompida e a solução foi mantida em repouso por 2 horas adicionais, filtrada a pressão reduzida e o sólido obtido foi lavado com uma seqüência de solventes (tolueno e éter gelado, respectivamente).

5.14.1. Síntese do Cloridrato mesoiônico 62 - Cloreto de 4-fenil-5-[4-(3,4-metilenodioxifenil)-1(*E*)-3(*E*)-butadienil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MI**).**



Reagentes: a) $C_2O_2Cl_2$, 3h; b) 1,4-difeniltiossemicarbazida 53, 1,4-dioxana, 72h.

Conforme a **Metodologia Geral 1**, 0,300 g (1,37 mmol) do ácido piperínico 60 reagiu para produzir o cloreto de acila 61 na forma de um sólido castanho, o qual reagiu com o 1,4-difeniltiossemicarbazida 53 e forneceu 0,362 g (57%) do respectivo cloridrato mesoiônico **MI** na forma de cristais vermelhos.

Pf.: 155°C (decompõe)

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

ν_{N-H} = 3449,0 (fenilamina hexocíclica)

ν_{C-H} (Csp^3) = 2926,8 (metilenodioxílico)

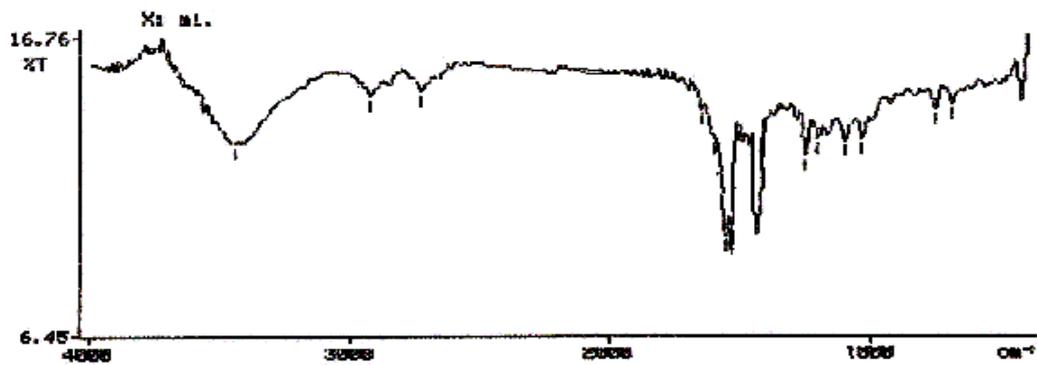
$\nu_{C=C}$ (Csp^2) = 1600-1440 (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{C=N}$ = 1565,0 (vibração do esqueleto heterocíclico)

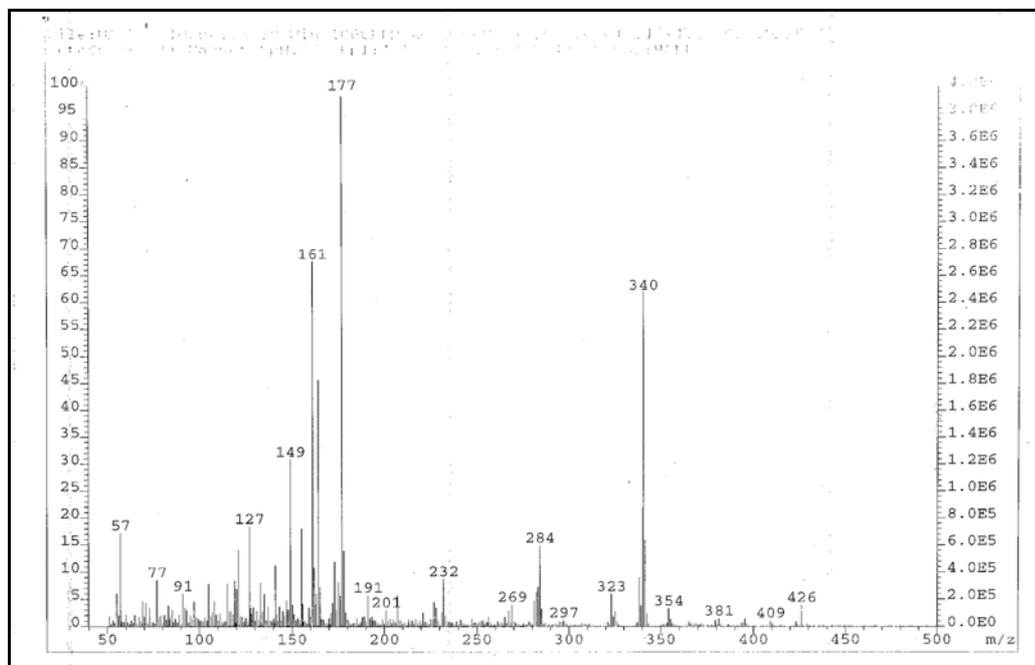
ν_{C-S} = 1361,1 (vibração do esqueleto heterocíclico)

ν_{C-O-C} = 1256,3 (metilenodioxílico)

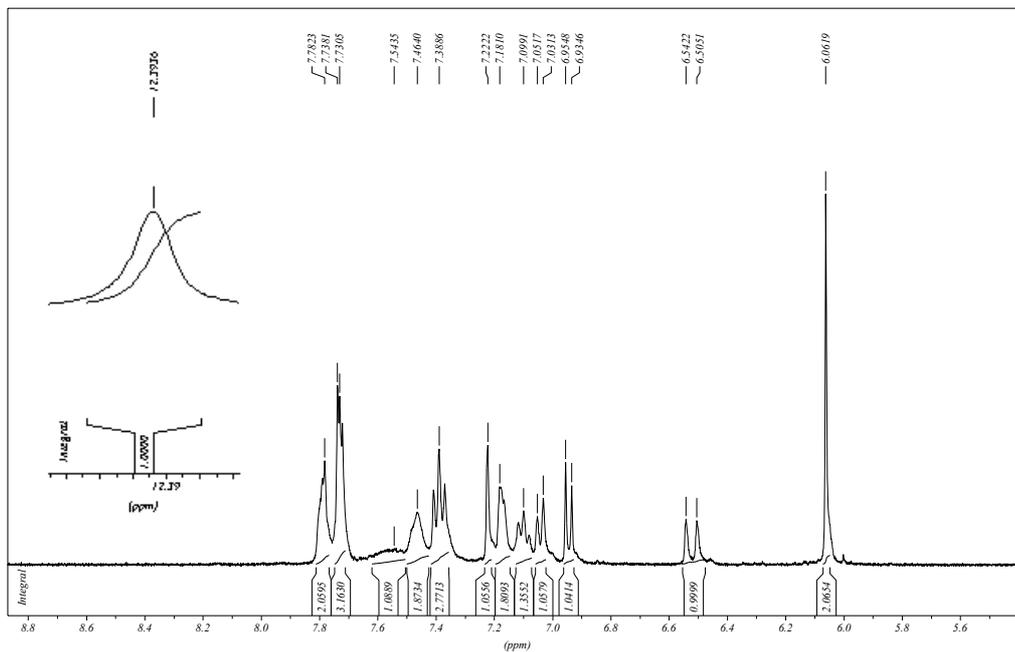
σ_{C-H} (Csp^2) = 758 e 692 (dobramento de $5H_{arom.}$ vizinhos)



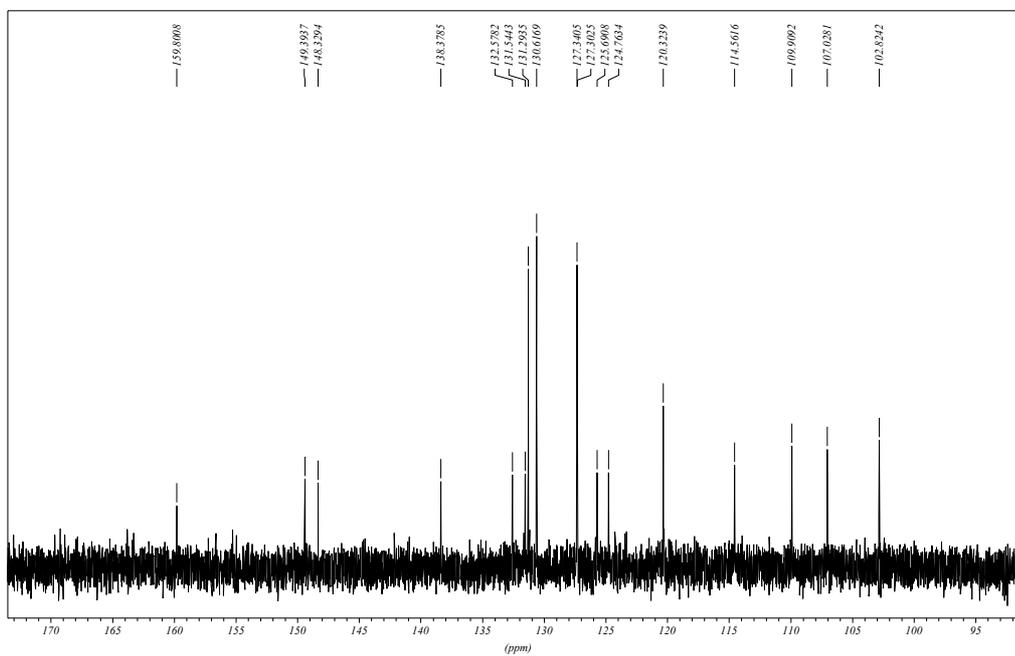
Espectro 41: Espectro de IV de MI.



Espectro 42: Espectro de massas de MI.

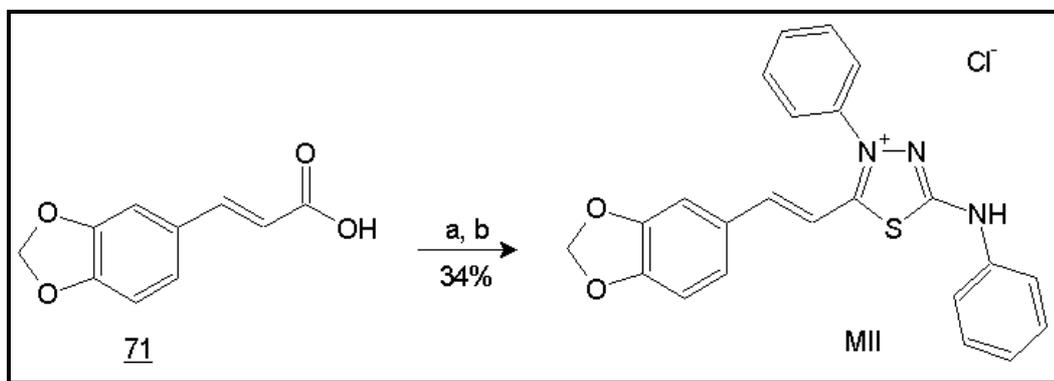


Espectro 43: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- D_6) de MI.



Espectro 44: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- D_6) de MI.

5.14.2. Síntese do Cloridrato mesoiônico 81 - Cloreto de 4-fenil-5-[2-(3,4-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MII**).**



Reagentes: a) $C_2O_2Cl_2$, 3h; b) 1,4-difeniltiossemicarbazida **53**, 1,4-dioxana, 72h.

Conforme a **Metodologia Geral 1**, 0,263 g (1,37 mmol) do ácido cinâmico **71** reagiu para produzir o cloreto de acila **76** na forma de um sólido amarelo, o qual reagiu com o 1,4-difeniltiossemicarbazida **53** e forneceu 0,203 g (34%) do respectivo cloridrato mesoiônico **MII** na forma de cristais amarelos.

Pf.: 294-296°C.

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

ν_{N-H} = 3425,0 (fenilamina hexocíclica)

ν_{C-H} (Csp^3) = 2900,3 (metilenodioxílico)

$\nu_{C=N^+HAr}$ = 2674,8 (grupo imônio hexocíclico)

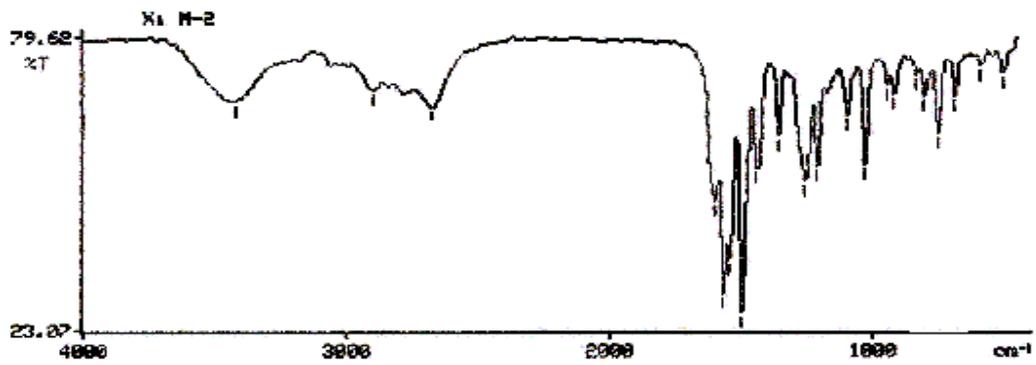
$\nu_{C=C}$ (Csp^2) = 1600; 1499 e 1442 (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{C=N}$ = 1567,9 (vibração do esqueleto heterocíclico)

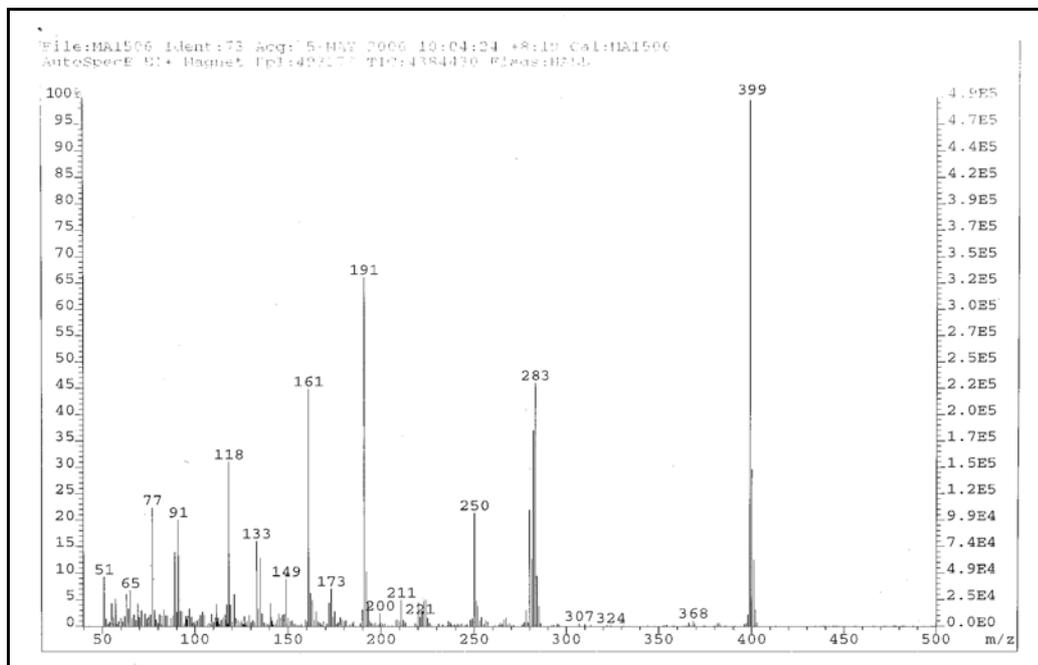
ν_{C-S} = 1362,1 (vibração do esqueleto heterocíclico)

ν_{C-O-C} = 1259,3 (metilenodioxílico)

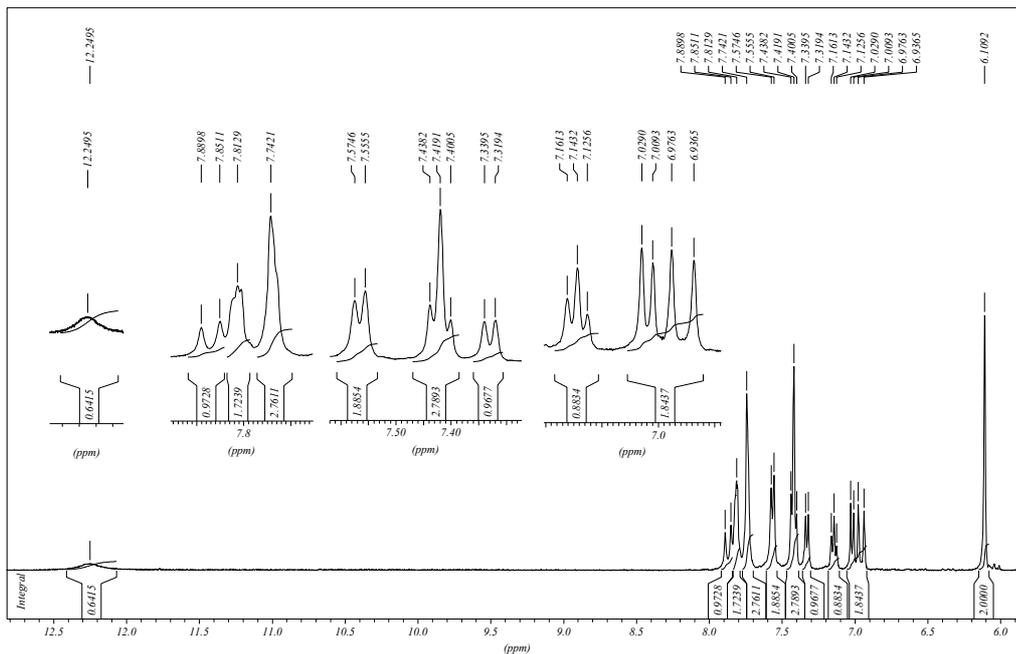
σ_{C-H} (Csp^2) = 754 e 690 (dobramento de $5H_{arom.}$ vizinhos)



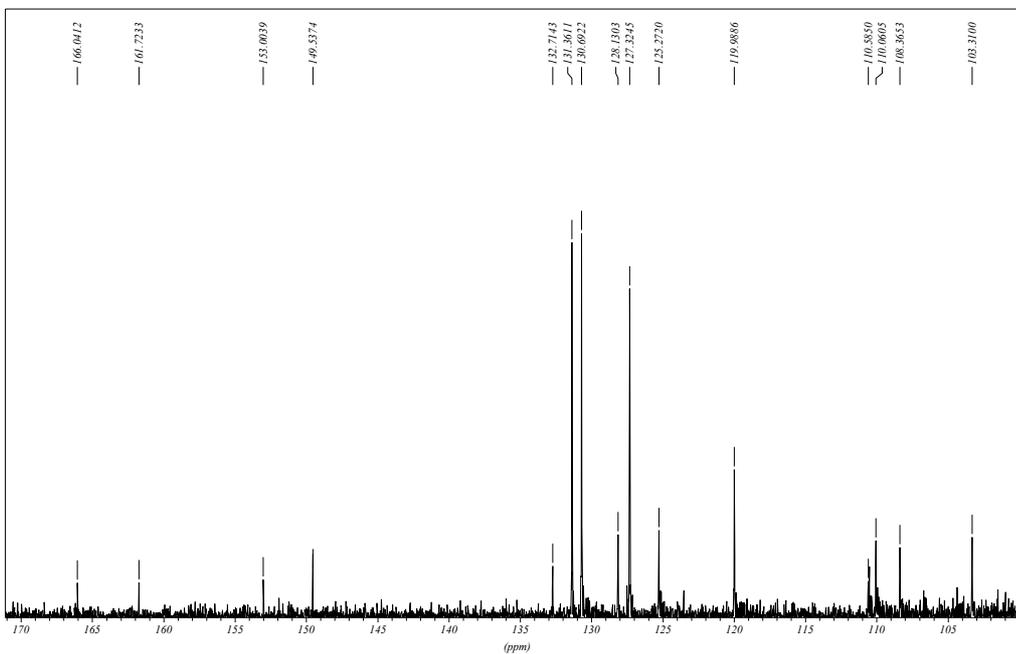
Espectro 45: Espectro de IV de MII.



Espectro 46: Espectro de massas de MII.



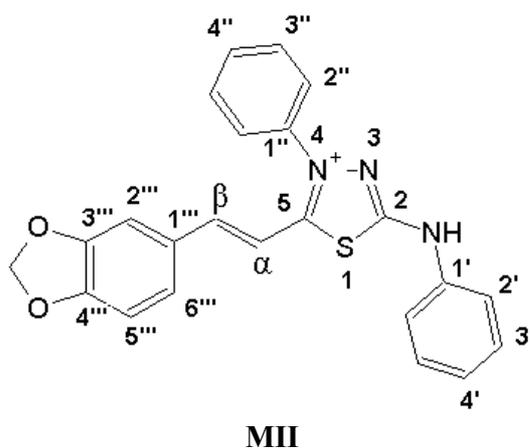
Espectro 47: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- D_6) de MII.



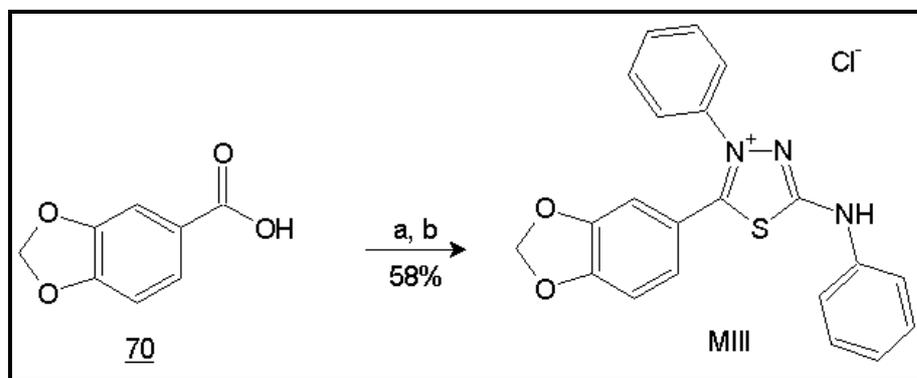
Espectro 48: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- D_6) de MII.

Tabela 20: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para MII.

Posição	MII (DMSO- D_6) 400MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
NH	12,24 (s; 1H)
CH (α)	6,95 (d; 15,9; 1H)	110,58 (CH)
CH (β)	7,87 (d; 15,5; 1H)	152,98 (CH)
2	161,71 (C)
5	166,03 (C)
1'	no (C)
2'	7,56 (d; 7,6; 2H)	119,98 (CH)
3'	7,41 (t; 7,5; 2H)	127,31 (CH)
4'	7,14 (t; 7,1; 1H)	125,28 (CH)
1''	no (C)
2''	7,81 (m; 2H)	131,35 (CH)
3''	7,74 (sl; 2H)	130,68 (CH)
4''	7,74 (sl; 1H)	132,71 (CH)
1'''	no (C)
2'''	7,41 (s; 1H)	110,06 (CH)
3'''	149,53 (C)
4'''	149,53 (C)
5'''	7,01 (d; 7,8; 1H)	128,13 (CH)
6'''	7,32 (d; 8,0; 1H)	no (C)
OCH_2O	6,1 (sl; 2H)	103,31 (CH_2)



5.14.3. Síntese do Cloridrato mesoiônico 80 - Cloreto de 4-fenil-5-(3,4-metilenodioxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MIII**).**



Reagentes: a) C₂O₂Cl₂, 3h; b) 1,4-difeniltiossemicarbazida 53, 1,4-dioxana, 72h.

Conforme a **Metodologia Geral 1**, 0,227 g (1,37 mmol) do ácido piperonílico 70 reagiu para produzir o cloreto de acila 75 na forma de um óleo verde-musgo, o qual reagiu com o 1,4-difeniltiossemicarbazida 53 e forneceu 0,326 g (58%) do respectivo cloridrato mesoiônico **MIII**, na forma de cristais amarelo-esverdeados.

Pf.: 286-287°C

Infravermelho (KBr, cm⁻¹):

vN-H = 3455,2 (fenilamina hexocíclica)

vC-H (Csp²) = 3054 (aromático)

vC-H (Csp³) = 2993,3 (metilenodioxílico)

vC=N⁺HAr = 2645,2 (grupo imônio hexocíclico)

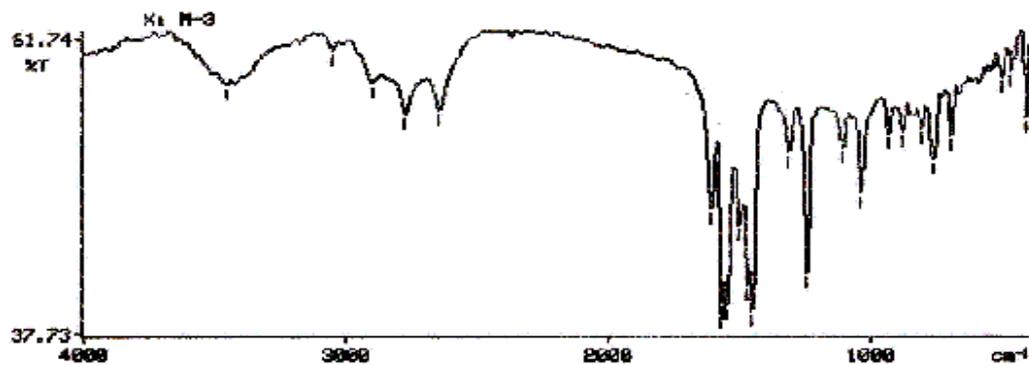
vC=C (Csp²) = 1600; 1498 e 1451 (vibração do esqueleto aromático)

vC=N = 1565,7 (vibração do esqueleto heterocíclico)

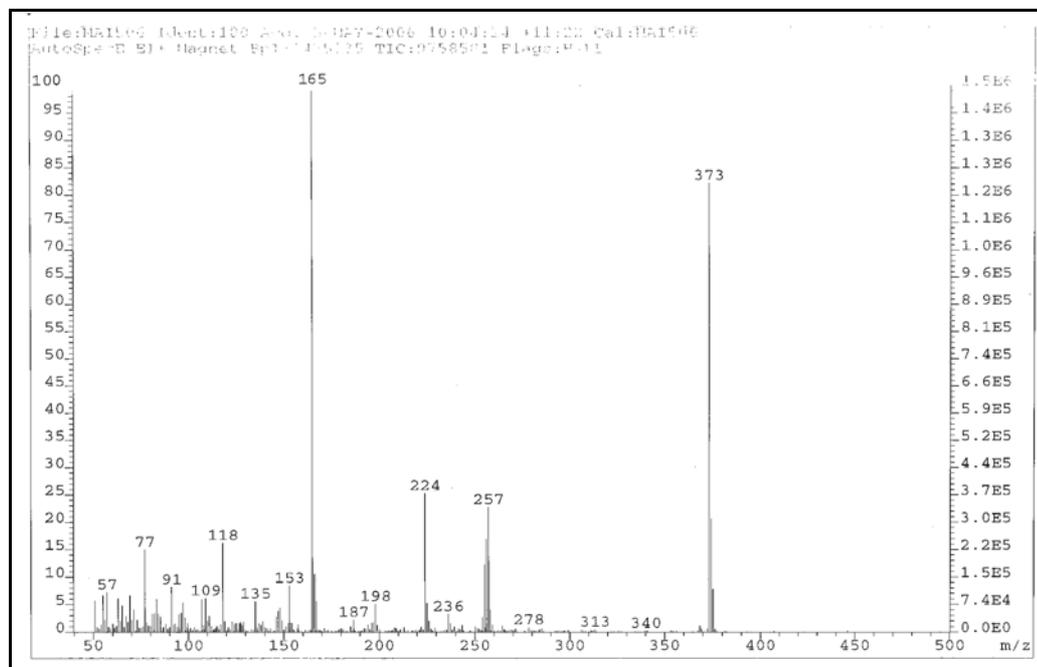
vC-S = 1314,0 (vibração do esqueleto heterocíclico)

vC-O-C = 1245,3 (metilenodioxílico)

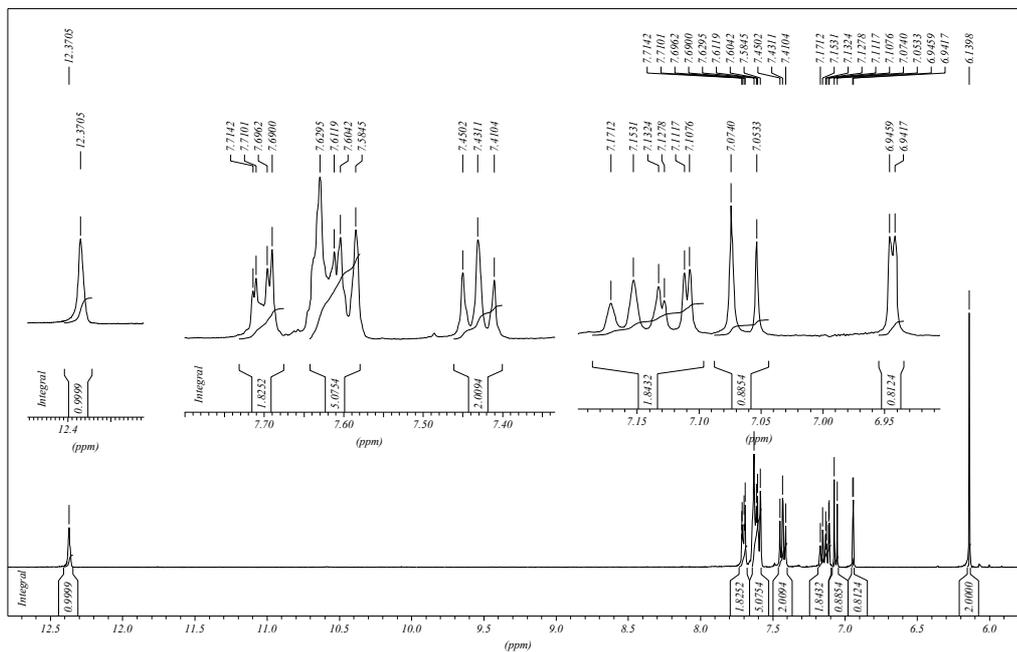
σC-H (Csp²) = 761 e 693 (dobramento de 5H_{arom.} vizinhos)



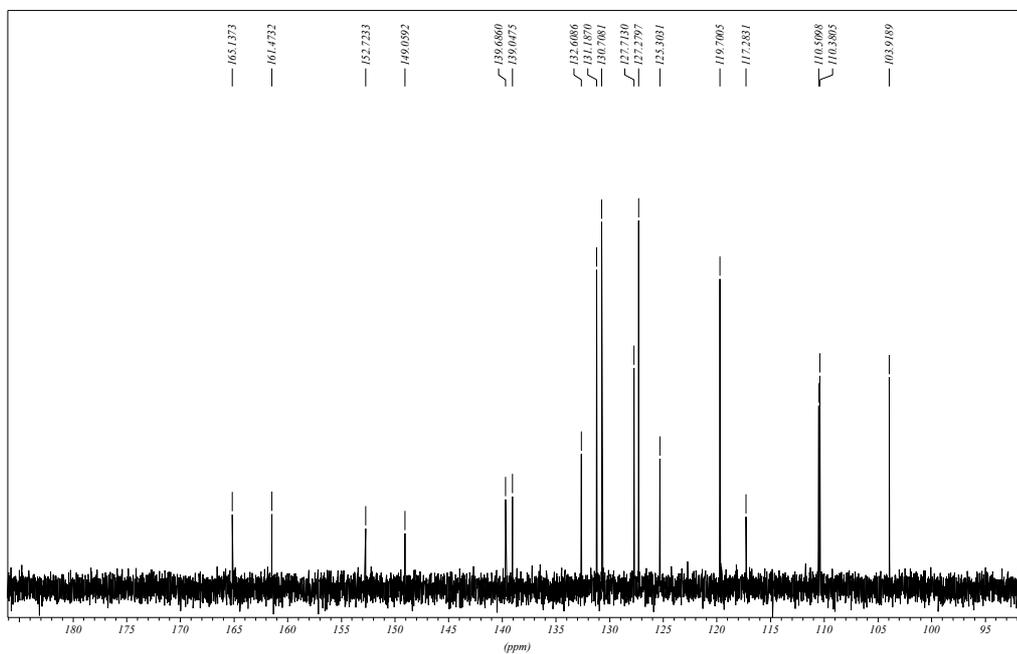
Espectro 49: Espectro de IV de MIII.



Espectro 50: Espectro de massas de MIII.



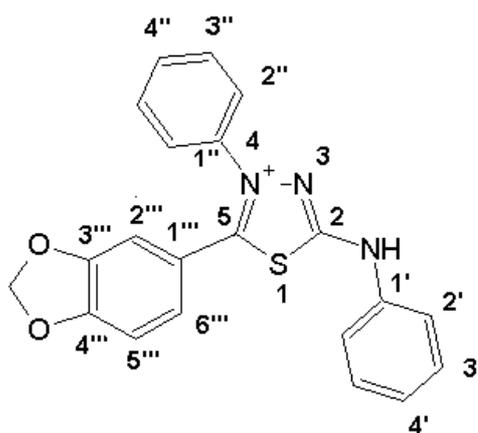
Espectro 51: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de **MIII**.



Espectro 52: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, CD_3OD) de **MIII**.

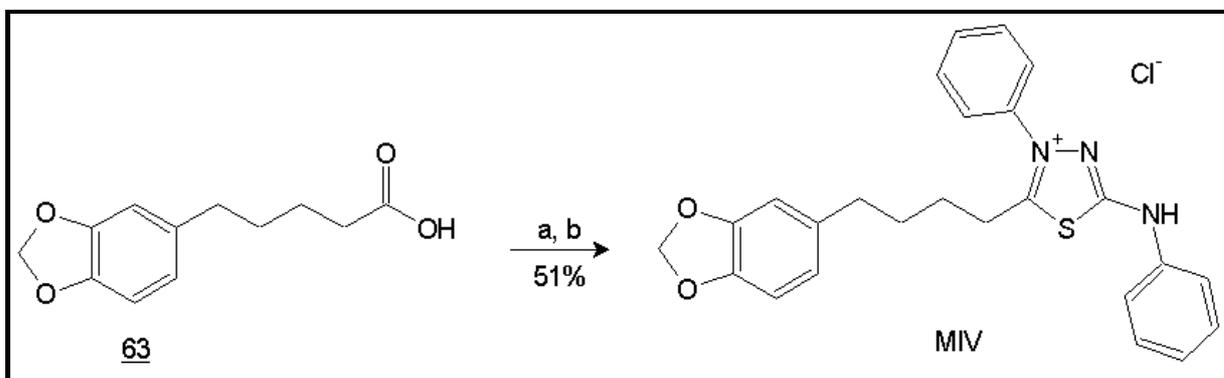
Tabela 21: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para MIII.

Posição	MIII (CD ₃ OD) 400MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
NH	12,37 (s; 1H)
2	161,47 (C)
5	165,13 (C)
1'	139,04 (C)
2'	7,59 (d; 7,8; 2H)	119,70 (CH)
3'	7,43 (t; 7,7; 2H)	131,18 (CH)
4'	7,15 (t; 7,6; 1H)	125,30 (CH)
1''	139,68 (C)
2''	7,70 (m; 2H)	127,27 (CH)
3''	7,62 (m; 2H)	130,70 (CH)
4''	7,62 (m; 1H)	132,60 (CH)
1'''	117,28(C)
2'''	6,94 (d; 1,6; 1H)	110,50 (CH)
3'''	152,72 (C)
4'''	149,05(C)
5'''	7,06 (d; 8,2; 1H)	110,38 (CH)
6'''	7,11 (dd; 8,1 e 1,7; 1H)	127,71 (CH)
OCH ₂ O	6,13 (sl; 2H)	103,91 (CH ₂)



MIII

5.14.4. Síntese do Cloridrato mesoiônico 67 - Cloreto de 4-fenil-5-[4-(3,4-metilenodioxifenil)-butil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MIV**).**



Reagentes: a) $C_2O_2Cl_2$, 3h; b) 1,4-difeniltiossemicarbazida **53**, 1,4-dioxana, 72h.

Conforme a **Metodologia Geral 1**, 0,304 g (1,37 mmol) do ácido tetraidropiperínico **63** reagiu para produzir o cloreto de acila **65** na forma de um sólido amarelo, o qual reagiu com o 1,4-difeniltiossemicarbazida **53** e forneceu 0,325 g (51%) do respectivo cloridrato mesoiônico **MIV** na forma de cristais brancos.

Pf.: 234-236°C

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

ν_{N-H} = 3443,6 (fenilamina hexocíclica)

ν_{C-H} (C_{sp^2}) = 3026,9 (aromático)

ν_{C-H} (C_{sp^3}) = 2924,3 e 2858 (alifáticos; metilenodioxílico)

$\nu_{C=N^+HAr}$ = 2746,2 (grupo imônio hexocíclico)

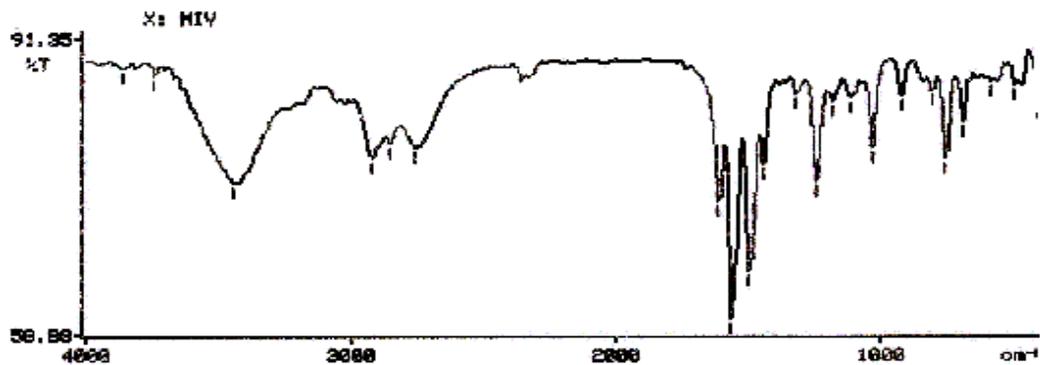
$\nu_{C=C}$ (C_{sp^2}) = 1600; 1497 e 1448 (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{C=N}$ = 1567,0 (vibração do esqueleto heterocíclico)

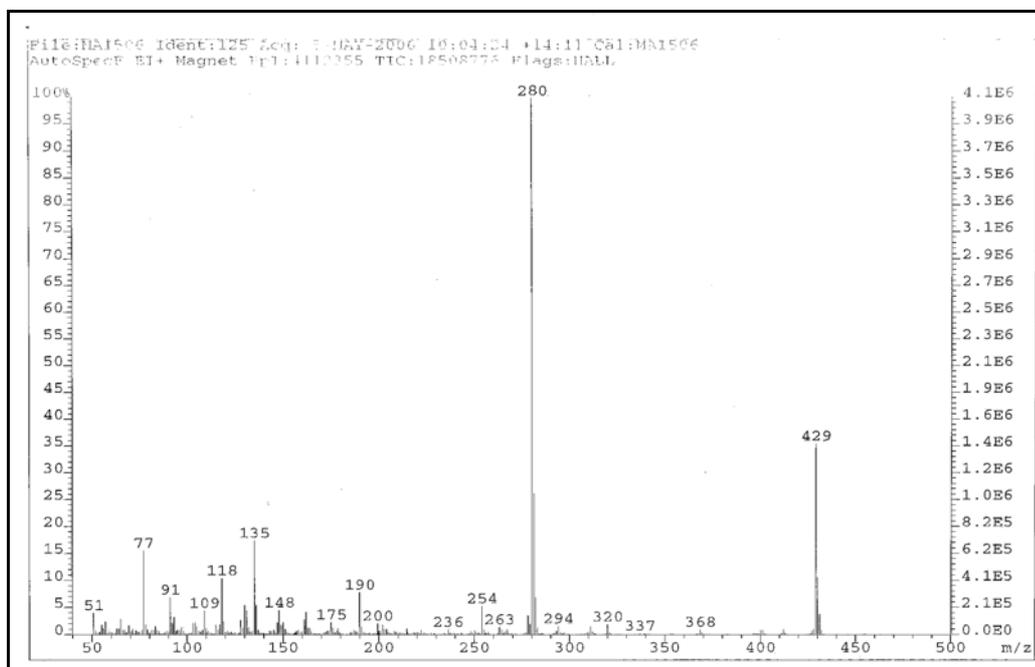
ν_{C-S} = 1320,0 (vibração do esqueleto heterocíclico)

ν_{C-O-C} = 1247,3 (metilenodioxílico)

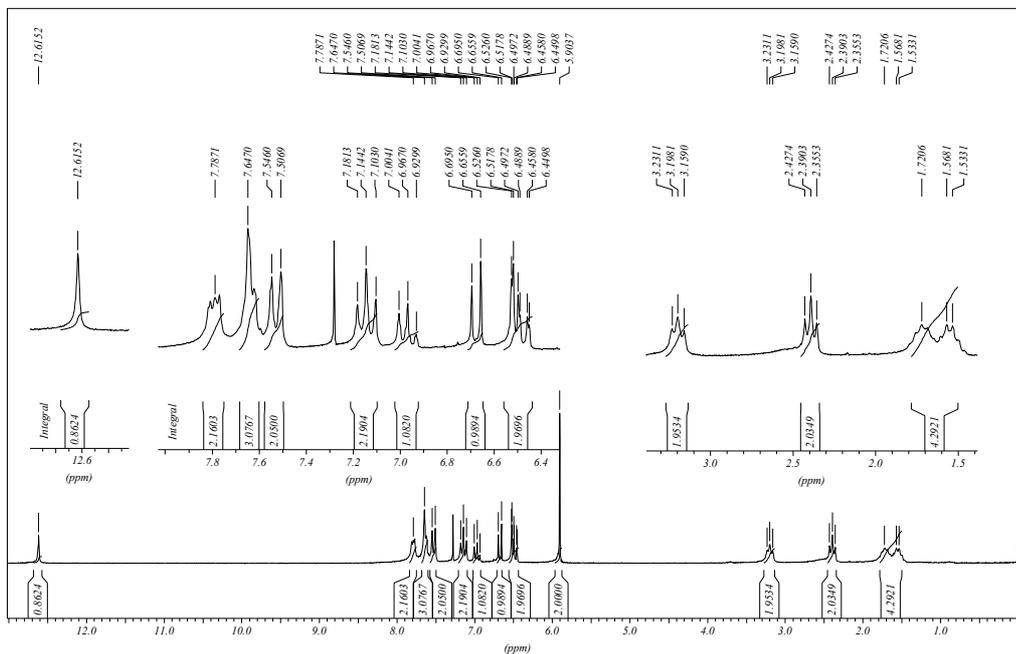
σ_{C-H} (C_{sp^2}) = 759 e 693 (dobramento de $5H_{arom.}$ vizinhos)



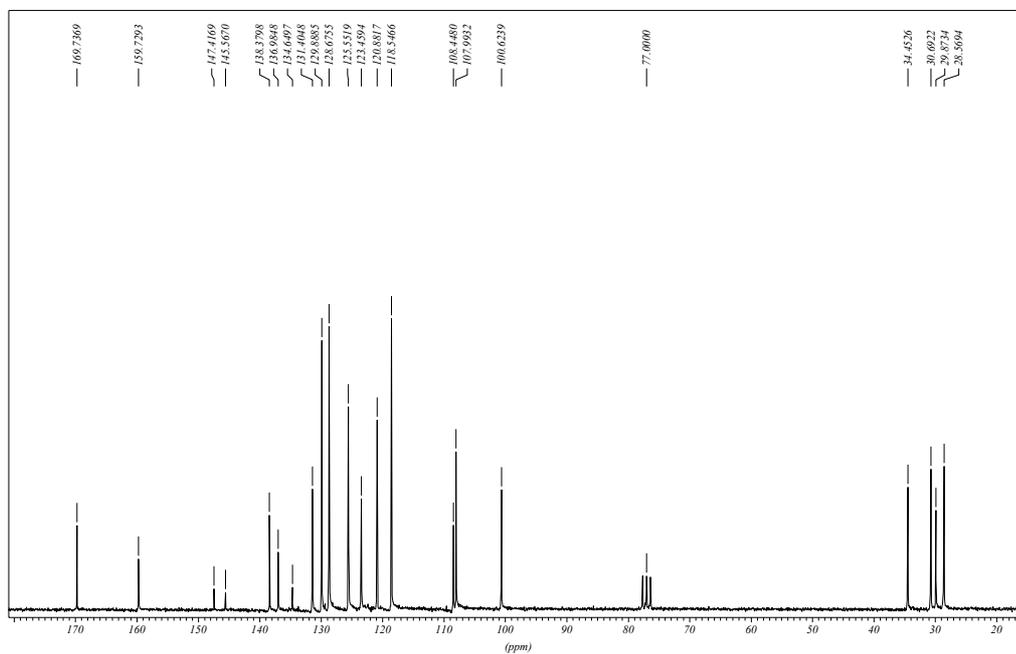
Espectro 53: Espectro de IV de MIV.



Espectro 54: Espectro de massas de MIV.



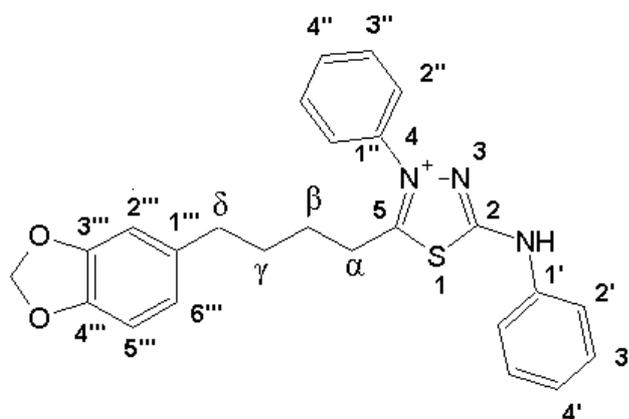
Espectro 55: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **MIV**.



Espectro 56: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, CDCl_3) de **MIV**.

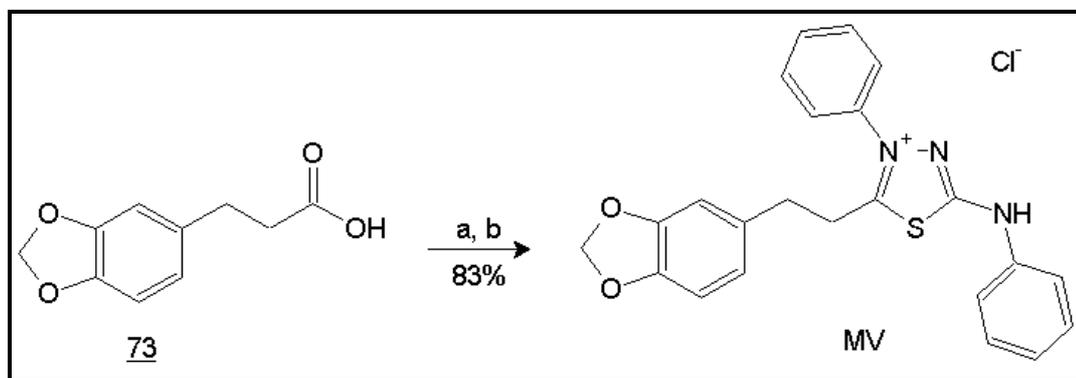
Tabela 22: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para MIV.

Posição	MIV (CDCl_3) 200MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
NH	12,61 (s; 1H)
CH_2 (α)	2,39 (t, 7,2; 2H)	34,4 (CH_2)
CH_2 (β)	1,72 (m; 2H)	28,5 (CH_2)
CH_2 (γ)	1,56 (m; 2H)	24,8 (CH_2)
CH_2 (δ)	3,19 (t, 7,2; 2H)	30,6 (CH_2)
2	159,7 (C)
5	169,7 (C)
1'	136,9 (C)
2'	7,52 (d, 7,8; 2H)	118,5 (CH)
3'	7,14 (t, 7,8; 2H)	129,8 (CH)
4'	6,96 (t, 7,4; 1H)	125,5 (CH)
1''	138,3 (C)
2''	7,78 (m, 2H)	123,4 (CH)
3''	7,64 (m, 2H)	128,6 (CH)
4''	7,64 (m, 1H)	131,4 (CH)
1'''	no
2'''	6,45 (d, 1,6; 1H)	107,9 (CH)
3'''	147,4 (C)
4'''	145,5 (C)
5'''	6,67 (d, 7,8; 1H)	108,4 (CH)
6'''	6,5 (dd, 6,0 e 1,6; 1H)	120,8 (CH)
OCH_2O	5,9 (sl; 2H)	100,6 (CH_2)



MIV

5.14.5. Síntese do Cloridrato mesoiônico 83 - Cloreto de 4-fenil-5-[2-(3,4-metilenodioxifenil)-etil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MV).



Reagentes: a) $C_2O_2Cl_2$, 3h; b) 1,4-difeniltiossemicarbazida **53**, 1,4-dioxana, 72h.

Conforme a **Metodologia Geral 1**, 0,266 g (1,37 mmol) do ácido diidrocinâmico **73** reagiu para produzir o cloreto de acila **78**, na forma de um sólido amarelo, o qual reagiu com o 1,4-difeniltiossemicarbazida **53** e forneceu 0,497 g (83%) do respectivo cloridrato mesoiônico **MV**, na forma de cristais brancos.

Pf.: 272-274°C

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

ν_{N-H} = 3423,0 (fenilamina hexocíclica)

ν_{C-H} (C_{sp^2}) = 3023,2 (aromático)

ν_{C-H} (C_{sp^3}) = 2897 e 2848 (alifáticos; metilenodioxílico)

$\nu_{C=N^+HAr}$ = 2769,2 (grupamento imônio hexocíclico)

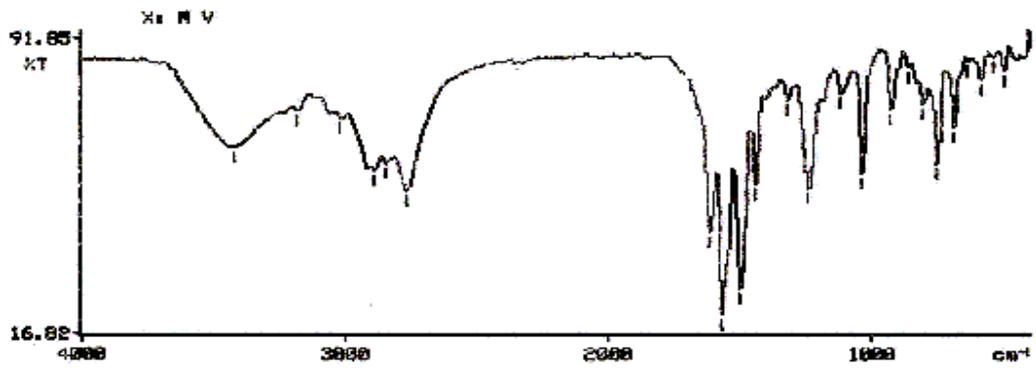
$\nu_{C=C}$ (C_{sp^2}) = 1600; 1499 e 1448 (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{C=N}$ = 1570,2 (vibração do esqueleto heterocíclico)

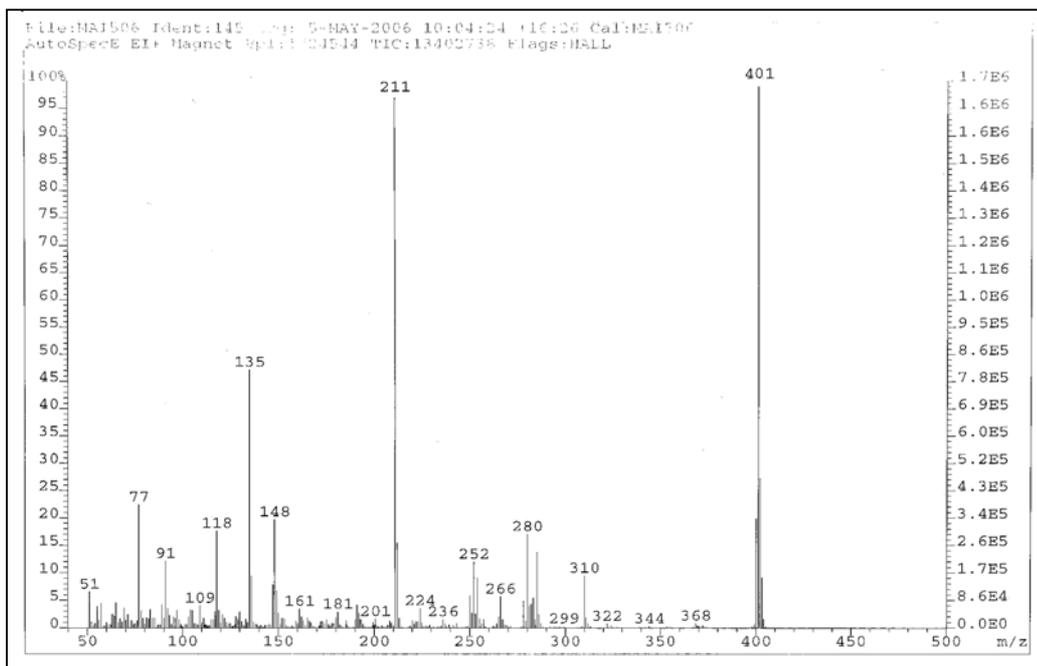
ν_{C-S} = 1321,8 (vibração do esqueleto heterocíclico)

ν_{C-O-C} = 1242,6 (metilenodioxílico)

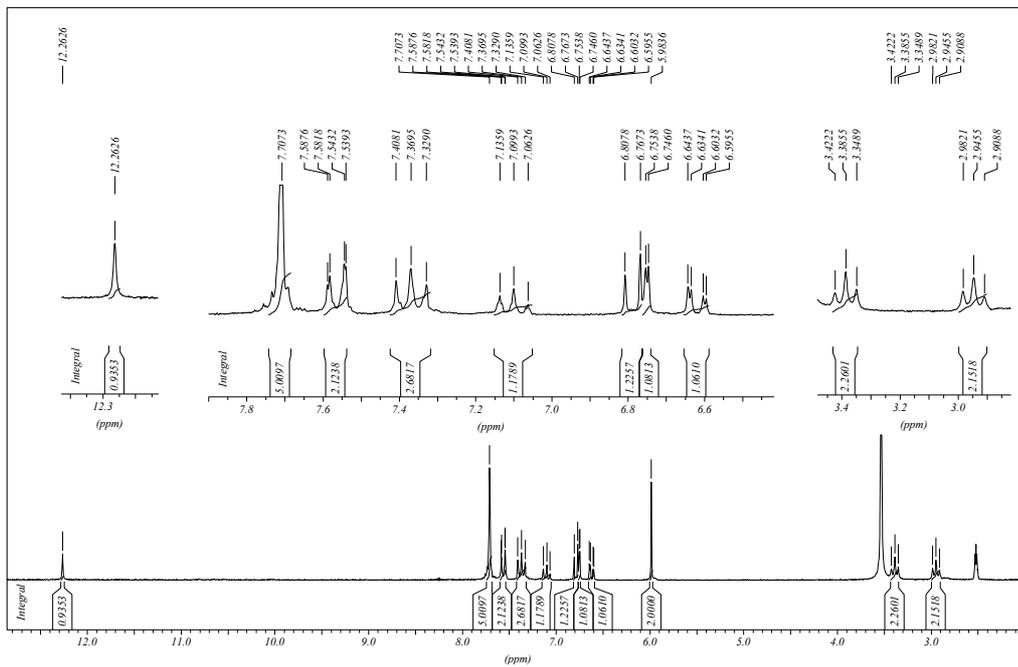
σ_{C-H} (C_{sp^2}) = 752 e 690 (dobramento de $5H_{arom.}$ vizinhos)



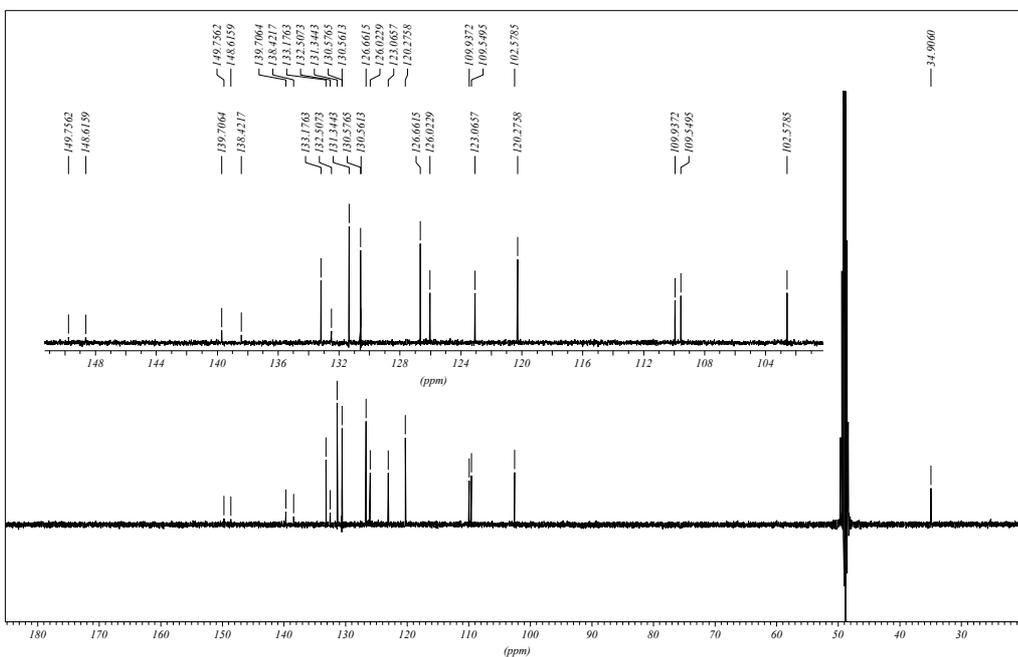
Espectro 57: Espectro de IV de MV.



Espectro 58: Espectro de massas de MV.



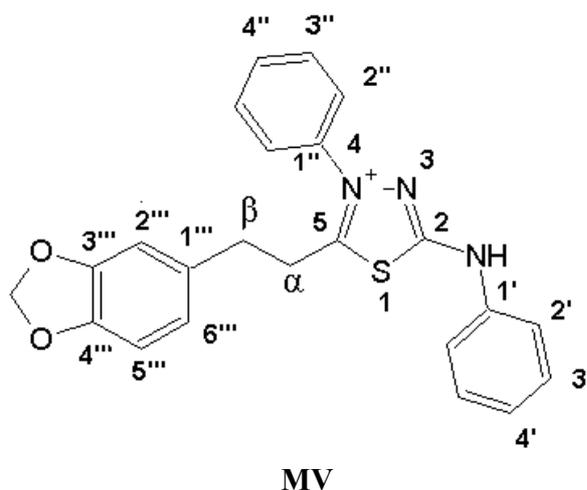
Espectro 59: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) de MV.



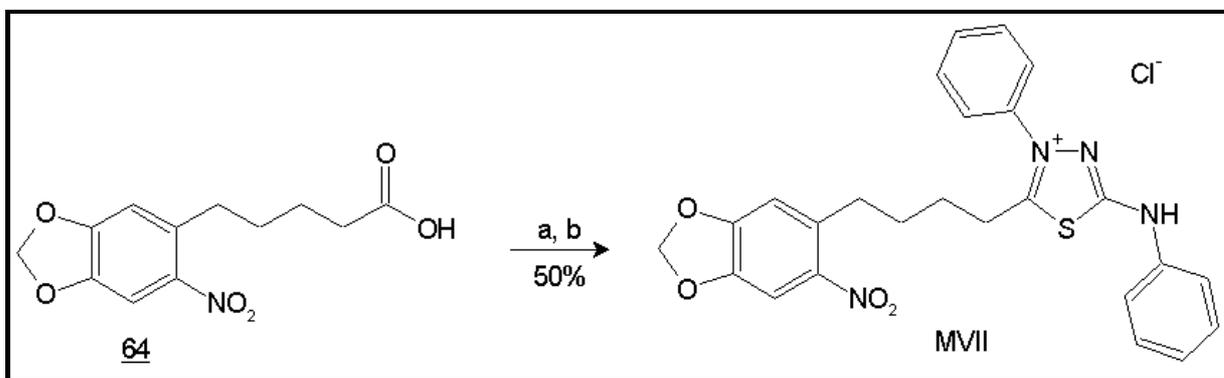
Espectro 60: Espectro de RMN ¹³C (400 MHz, CD₃OD) de MV.

Tabela 23: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para MV.

Posição	MV (CD_3OD e DMSO-D_6) 400MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
NH	12,26 (s; 1H)
CH_2 (α)	3,38 (t, 7,3; 2H)	34,9 (CH_2)
CH_2 (β)	2,94 (m; 2H)	34,9 (CH_2)
2	no
5	no
1'	138,4 (C)
2'	7,56 (d, 8,5; 2H)	120,2 (CH)
3'	7,36 (t, 7,9; 2H)	131,34 (CH)
4'	7,09 (t, 7,3; 1H)	126,0 (CH)
1''	139,7 (C)
2''	7,70 (m, 2H)	126,6 (CH)
3''	7,70 (m, 2H)	130,5 (CH)
4''	7,70 (m, 1H)	133,1 (CH)
1'''	132,5 (C)
2'''	6,75 (d, 1,5; 1H)	109,5 (CH)
3'''	149,7 (C)
4'''	148,6 (C)
5'''	6,78 (d, 8,0; 1H)	109,9 (CH)
6'''	6,5 (dd, 7,9 e 1,7; 1H)	123,0 (CH)
OCH_2O	5,98 (sl; 2H)	102,5 (CH_2)



5.14.6. Síntese do Cloridrato mesoiônico **68** - Cloreto de 4-fenil-5-[4-(6-nitro-3,4-metilenodioxifenil)-butil]-1, 3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (**MVII**).



Reagentes: a) $\text{C}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$, 3h; b) 1,4-difeniltiossemicarbazida **53**, 1,4-dioxana, 72h.

Conforme a **Metodologia Geral 1**, 0,366 g (1,37 mmol) do ácido 6-nitrotetraidropiperínico **63** reagiu para produzir o cloreto de acila **65** na forma de um sólido amarelo, o qual reagiu com o 1,4-difeniltiossemicarbazida **53** e forneceu 0,350 g (50%) do respectivo cloridrato mesoiônico **MVII** na forma de cristais brancos.

Pf.: 226-228°C

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3444,4 (fenilamina hexocíclica)

$\nu_{\text{C-H}}$ (Csp^2) = 3052,2 (aromático)

$\nu_{\text{C-H}}$ (Csp^3) = 2923 e 2848 (alifáticos; metilenodioxílico)

$\nu_{\text{C=N}^+\text{HAr}}$ = 2774,4 (grupamento imônio hexocíclico)

$\nu_{\text{C=C}}$ (Csp^2) = 1609 e 1454 (vibração do esqueleto aromático)

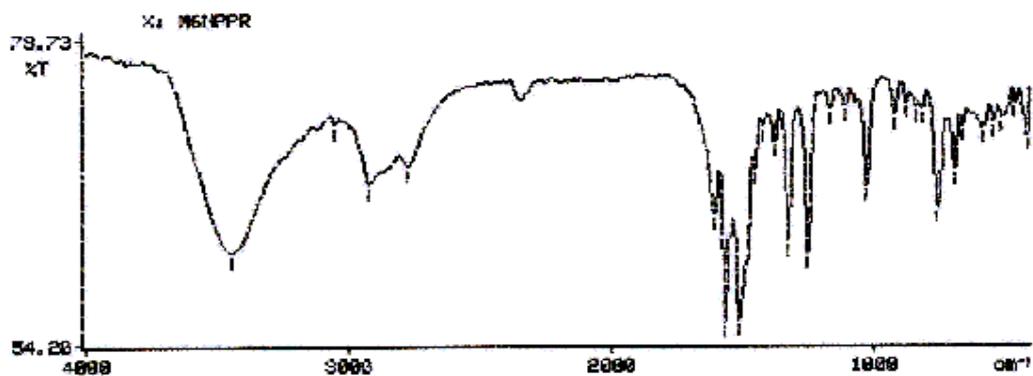
$\nu_{\text{C=N}}$ = 1567,4 (vibração do esqueleto heterocíclico)

$\nu_{\text{N=O}}$ = 1380,6 (vibração do grupo nitro)

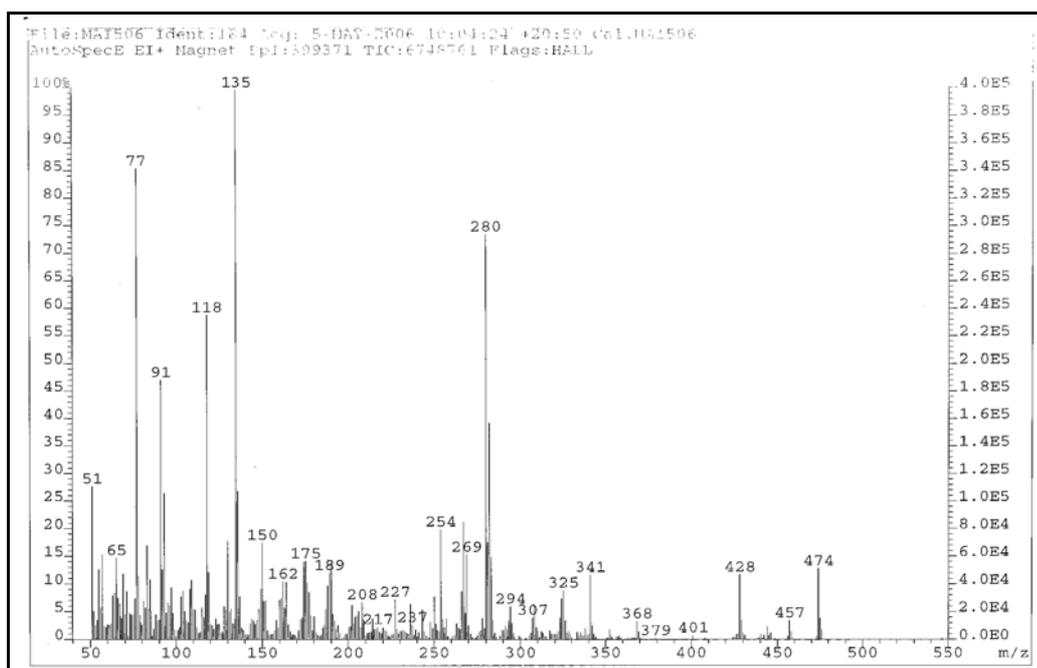
$\nu_{\text{C-S}}$ = 1330,1 (vibração do esqueleto heterocíclico)

$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1252,9 (metilenodioxílico)

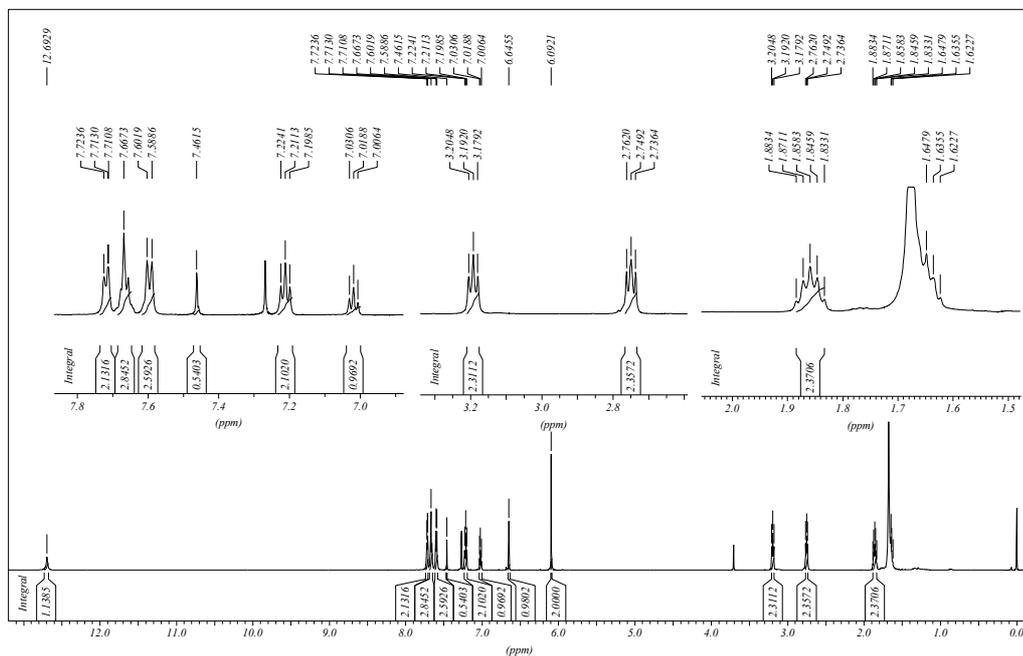
$\sigma_{\text{C-H}}$ (Csp^2) = 758 e 694 (dobramento de $5\text{H}_{\text{arom.}}$ vizinhos)



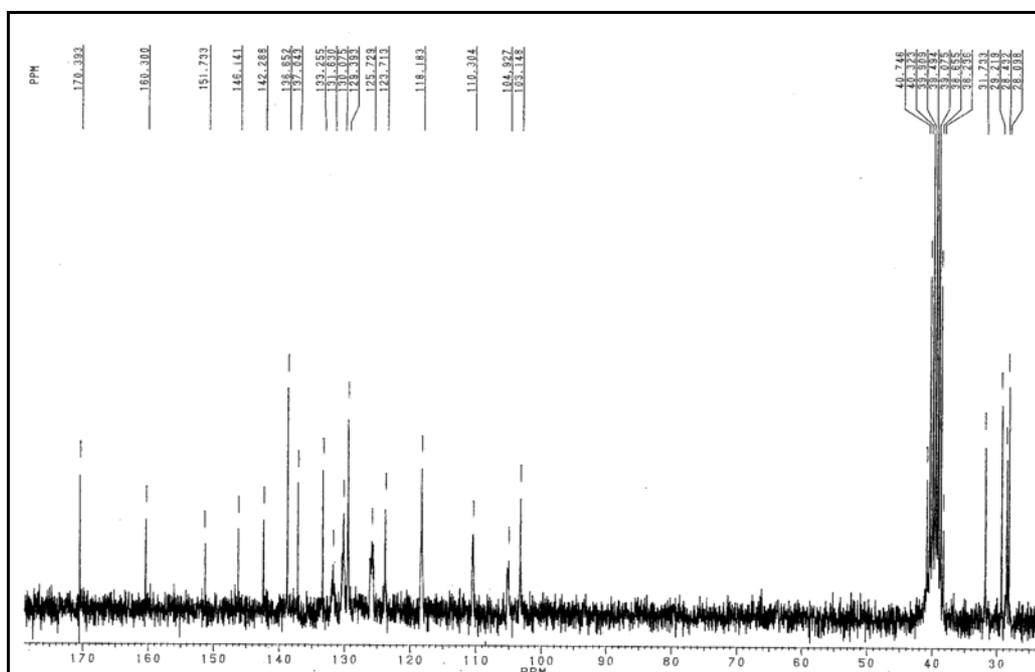
Espectro 61: Espectro de IV de MVII.



Espectro 62: Espectro de massas do MVII



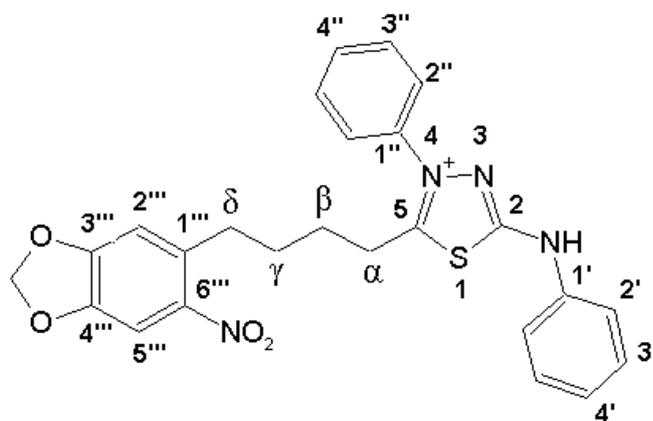
Espectro 63: Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) de MVII.



Espectro 64: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, DMSO-D_6) de MVII.

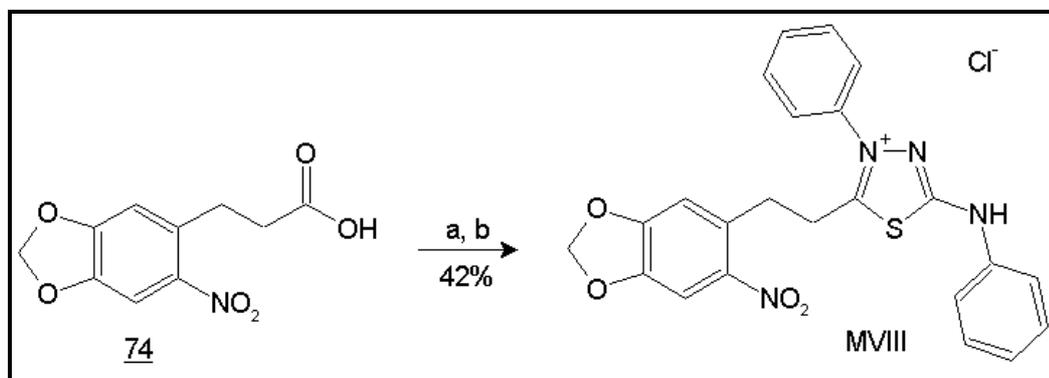
Tabela 24: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para MVII.

Posição	MVII (CDCl ₃ e DMSO-D ₆) 200/600MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
NH	12,69 (s; 1H)
CH ₂ (α)	2,74 (t; 7,6; 2H)	28 (CH ₂)
CH ₂ (β)	1,85 (qui; 7,6; 2H)	28,4 (CH ₂)
CH ₂ (γ)	1,64 (qui; 7,5; 2H)	29,2 (CH ₂)
CH ₂ (δ)	3,19 (t; 7,6; 2H)	31,7 (CH ₂)
2	160,3 (C)
5	170,3 (C)
1'	137 (C)
2'	7,59 (d; 7,9; 2H)	118,1 (CH)
3'	7,21 (t; 7,6; 2H)	130 (CH)
4'	7,01 (t; 7,2; 1H)	123,7 (CH)
1''	138,6 (C)
2''	7,71 (m; 2H)	125,7 (CH)
3''	7,66 (m; 2H)	129,3 (CH)
4''	7,66 (m; 1H)	131,6 (CH)
1'''	133,2 (C)
2'''	6,64 (s; 1H)	104,9 (CH)
3'''	142,2 (C)
4'''	146,1 (C)
5'''	7,46 (s; 1H)	110,3 (CH)
6'''	151,7 (C)
OCH ₂ O	5,90 (sl; 2H)	103,1 (CH ₂)



MVII

5.14.7. Síntese do Cloridrato mesoiônico 84 - Cloreto de 4-fenil-5-[2-(6-nitro-3,4-metilenodioxifenil)-etil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (**MVIII**).



Reagentes: a) $C_2O_2Cl_2$, 3h; b) 1,4-difeniltiossemicarbazida 53, 1,4-dioxana, 72h.

Conforme a **Metodologia Geral 1**, 0,327 g (1,37 mmol) do ácido 6-nitrodihidrocinâmico 74 reagiu para produzir o cloreto de acila 79, na forma de um sólido amarelo, o qual reagiu com o 1,4-difeniltiossemicarbazida 53 e forneceu 0,277 g (42%) do respectivo cloridrato mesoiônico **MVIII** na forma de cristais brancos.

Pf.: 248-250°C

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

ν_{N-H} = 3426,6 (fenilamina hexocíclica)

ν_{C-H} (Csp^2) = 3052,5 (aromático)

ν_{C-H} (Csp^3) = 2932 e 2842 (alifáticos; metilenodioxílico)

$\nu_{C=N^+HAr}$ = 2736,6 (grupamento imônio hexocíclico)

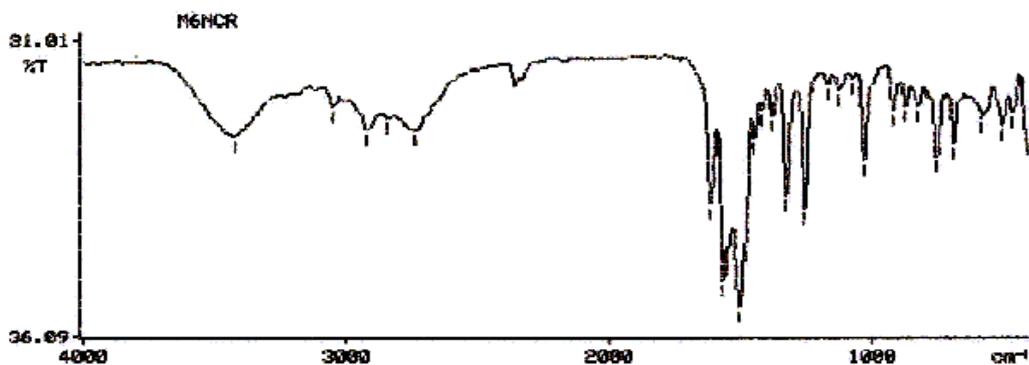
$\nu_{C=C}$ (Csp^2) = 1615, 1505 e 1451 (vibração do esqueleto aromático)

$\nu_{C=N}$ = 1565,9 (vibração do esqueleto heterocíclico)

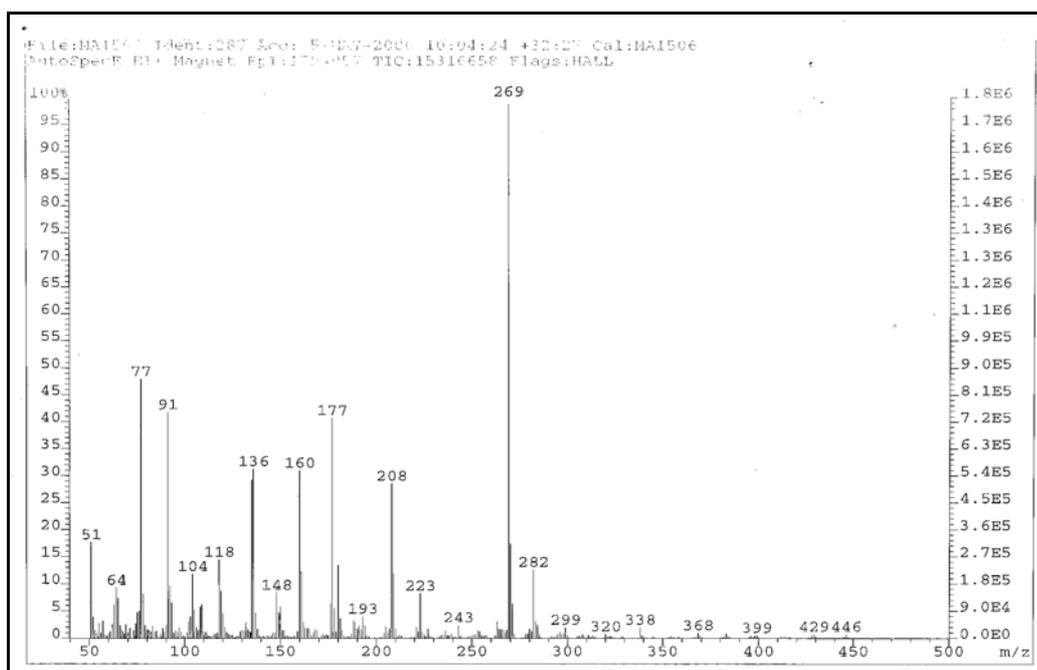
$\nu_{N=O}$ = 1385,8 (vibração do grupo nitro)

ν_{C-S} = 1330,1 (vibração do esqueleto heterocíclico)

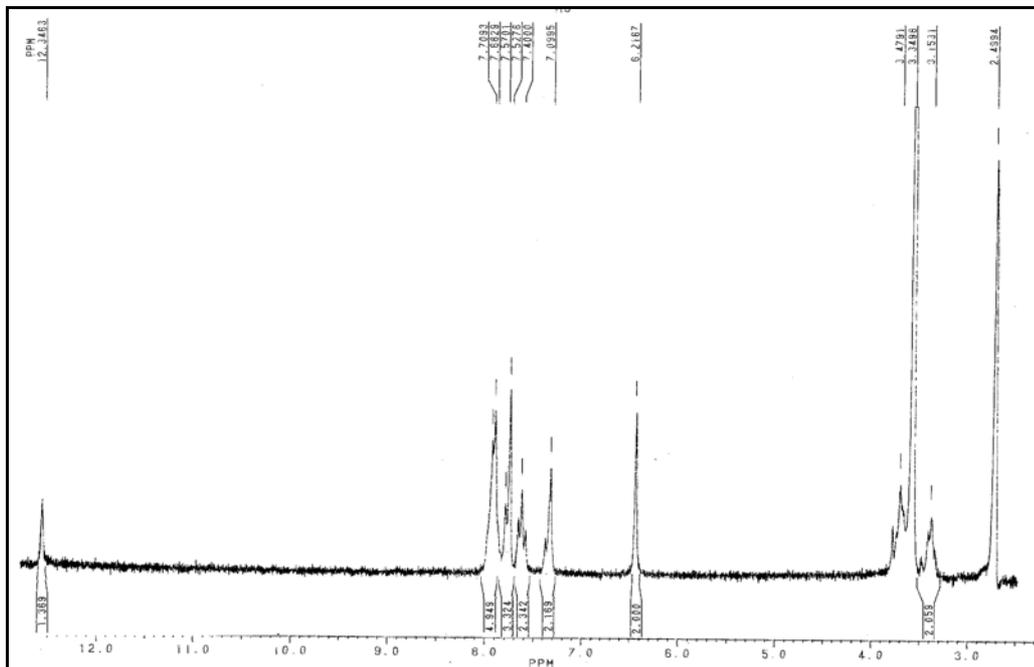
σ_{C-H} (Csp^2) = 757 e 692 (dobramento de $5H_{arom.}$ vizinhos)



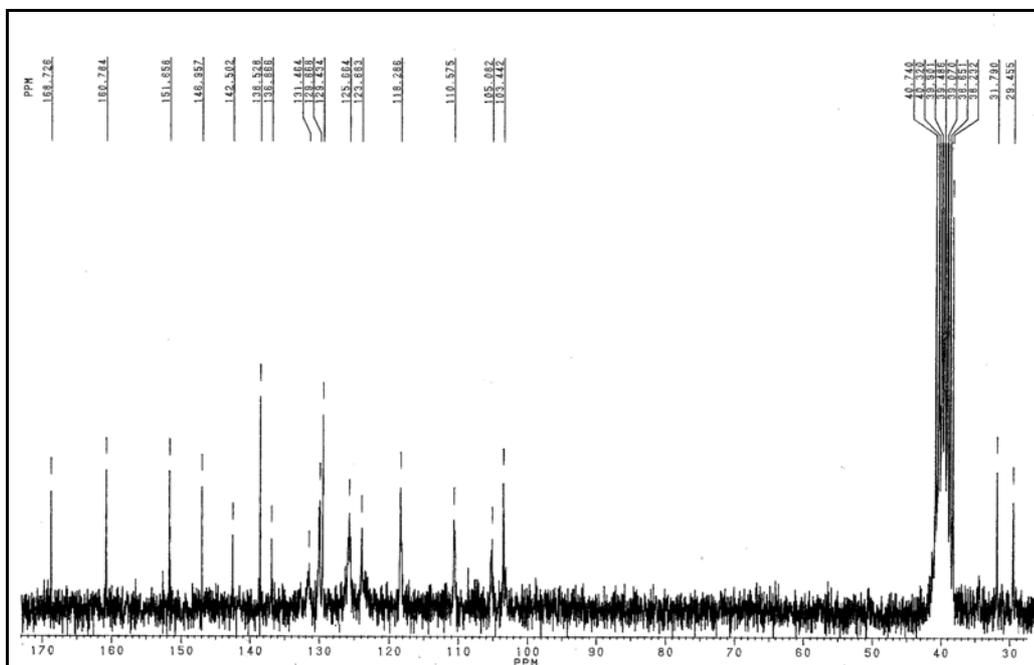
Espectro 65: Espectro de IV de MVIII.



Espectro 66: Espectro de massas de MVIII.



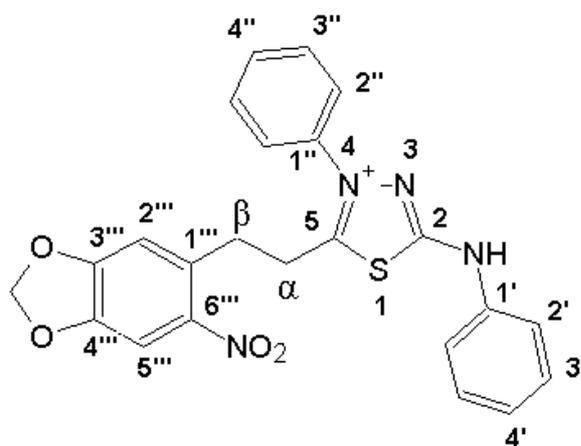
Espectro 67: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO- D_6) de **MVIII**.



Espectro 68: Espectro de RMN ^{13}C (200 MHz, DMSO- D_6) de **MVIII**.

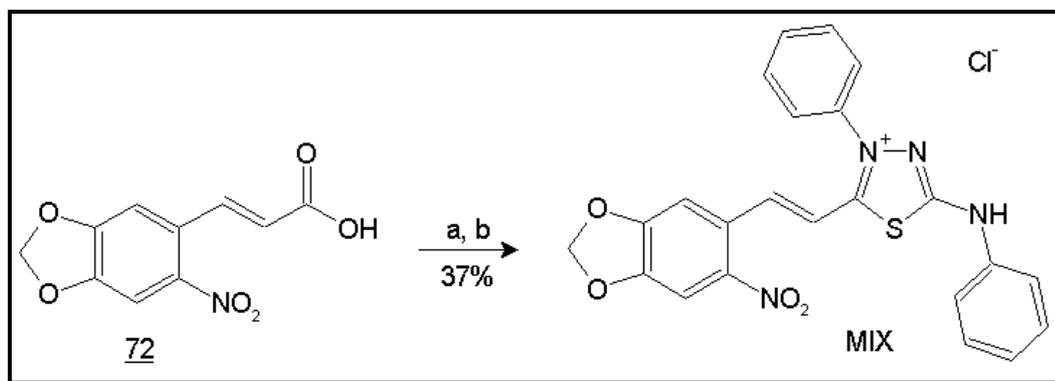
Tabela 25: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para MVIII.

Posição	MVIII (DMSO- D_6) 200MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
NH	12,34 (s; 1H)
CH_2 (α)	3,47 (m; 2H)	28 (CH_2)
CH_2 (β)	3,15 (m; 2H)	28,4 (CH_2)
2	160,3 (C)
5	170,3 (C)
1'	137 (C)
2'	7,57 (m; 2H)	118,1 (CH)
3'	7,40 (t; 7,8; 2H)	130 (CH)
4'	7,09 (m; 1H)	123,7 (CH)
1''	138,6 (C)
2''	7,70 (m; 2H)	125,7 (CH)
3''	7,70 (m; 2H)	129,3 (CH)
4''	7,70 (m; 1H)	131,6 (CH)
1'''	133,2 (C)
2'''	7,09 (s; 1H)	104,9 (CH)
3'''	142,2 (C)
4'''	146,1 (C)
5'''	7,52 (s; 1H)	110,3 (CH)
6'''	151,7 (C)
OCH_2O	6,21(sl; 2H)	103,1 (CH_2)



MVIII

5.14.8. Síntese do Cloridrato mesoiônico 82 - Cloreto de 4-fenil-5-[2-(6-nitro-3,4-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (**MIX**).



Reagentes: a) $C_2O_2Cl_2$, 3h; b) 1,4-difeniltiossemicarbazida 53, 1,4-dioxana, 72h.

Conforme a **Metodologia Geral 1**, 0,325 g (1,37 mmol) do ácido 6-nitrocinnâmico 72 reagiu para produzir o cloreto de acila 77, na forma de um sólido castanho, o qual reagiu com o 1,4-difeniltiossemicarbazida 53 e forneceu 0,243 g (37%) do respectivo cloridrato mesoiônico **MIX** na forma de cristais vermelhos.

Pf: 274-276°C

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

ν_{N-H} = 3426,6 (fenilamina hexocíclica)

ν_{C-H} (Csp^2) = 3052,5 (aromático)

ν_{C-H} (Csp^3) = 2922,8 (metilenodioxílico)

$\nu_{C=N^+HAr}$ = 2736,6 (grupamento imônio hexocíclico)

$\nu_{C=C}$ (Csp^2) = 1615; 1505 e 1451 (vibração do esqueleto aromático e olefínico)

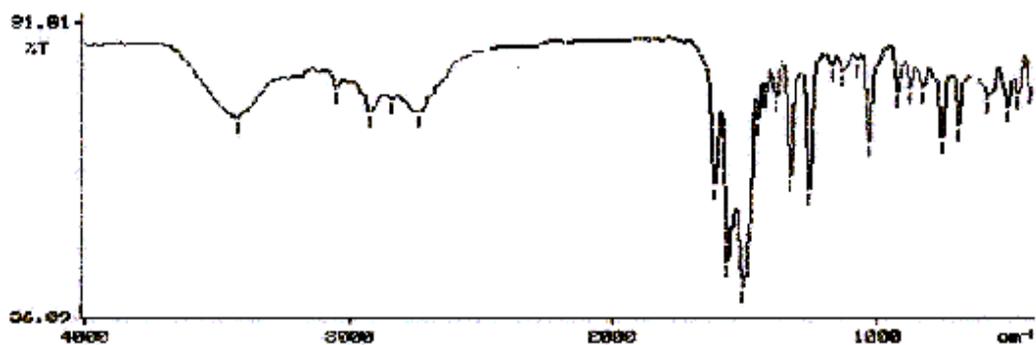
$\nu_{C=N}$ = 1565,9 (vibração do esqueleto heterocíclico)

$\nu_{N=O}$ = 1385,8 (vibração do grupo nitro)

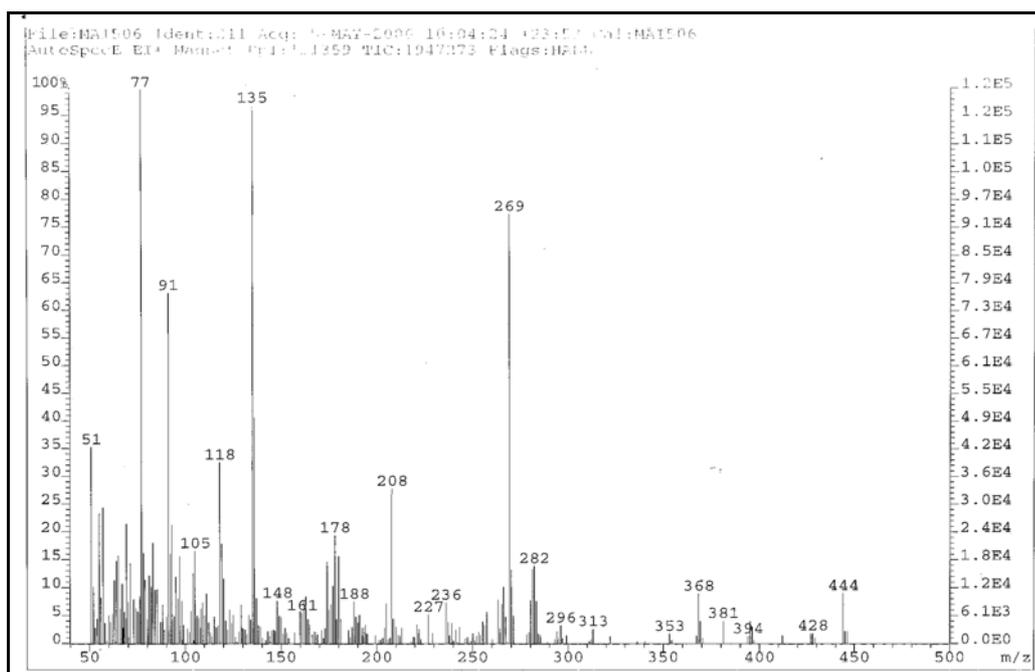
ν_{C-S} = 1330,4 (vibração do esqueleto heterocíclico)

ν_{C-O-C} = 1260,1 (metilenodioxílico)

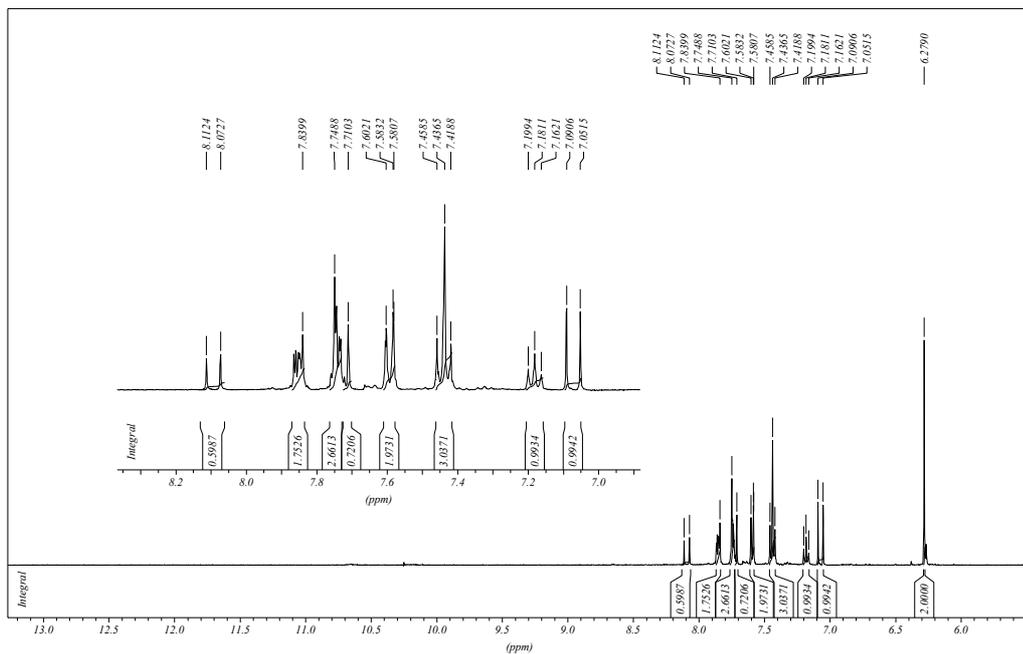
σ_{C-H} (Csp^2) = 757 e 692 (dobramento de $5H_{arom.}$ vizinhos)



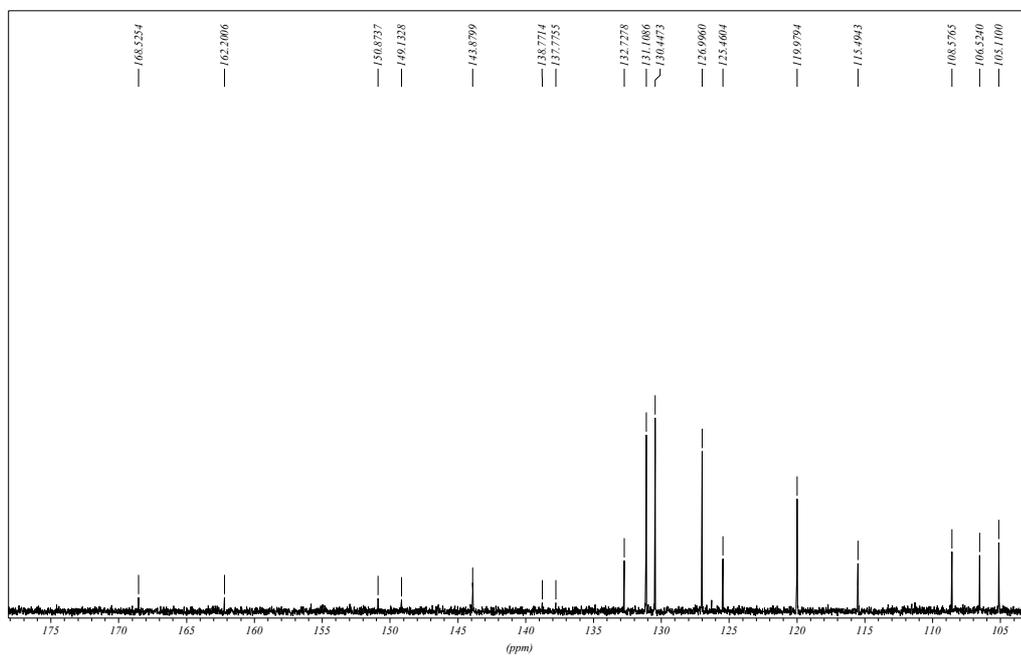
Espectro 69: Espectro de IV de MIX.



Espectro 70: Espectro de massas de MIX.



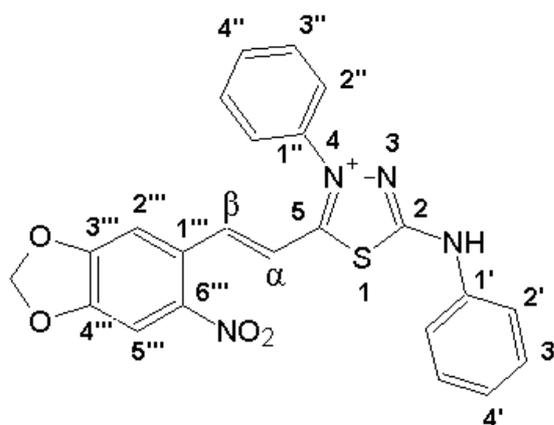
Espectro 71: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- D_6) de MIX.



Espectro 72: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- D_6) de MIX.

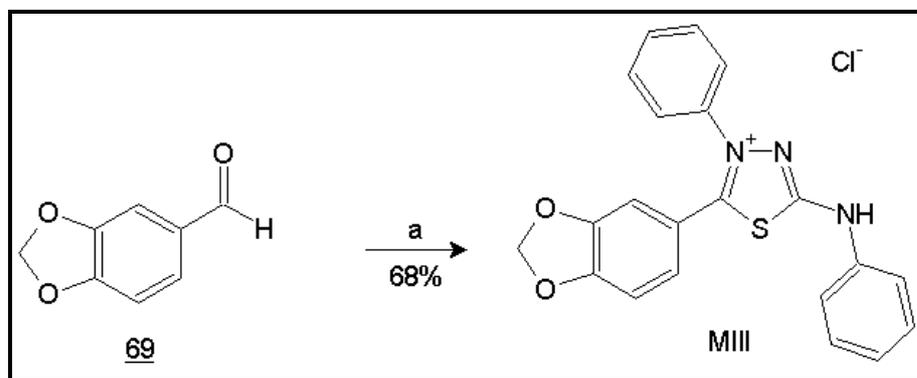
Tabela 26: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para MIX.

Posição	MIX (DMSO- D_6) 400MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
NH	12,69 (s; 1H)
CH_2 (α)	7,07 (d; 15,6; 1H)	115,49 (CH_2)
CH_2 (β)	8,09 (d; 15,8; 1H)	143,87 (CH_2)
2	162,20 (C)
5	168,52 (C)
1'	137,77 (C)
2'	7,59 (d; 7,5; 2H)	119,97 (CH)
3'	7,43 (t; 7,9; 2H)	131,1 (CH)
4'	7,18 (t; 7,4; 1H)	125,46 (CH)
1''	138,77 (C)
2''	7,83 (m; 2H)	126,99 (CH)
3''	7,74 (m; 2H)	130,44 (CH)
4''	7,74 (m; 1H)	132,72 (CH)
1'''	no (C)
2'''	7,43 (sl; 1H)	108,57 (CH)
3'''	149,13 (CH)
4'''	149,13 (CH)
5'''	7,71 (s; 1H)	106,52 (CH)
6'''	150,87 (C)
OCH_2O	6,27 (sl; 2H)	105,11 (CH_2)



MIX

5.14.9. Síntese do Cloridrato mesoiônico 80 - Cloreto de 4-fenil-5-(3,4-metilenodioxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (MIII).



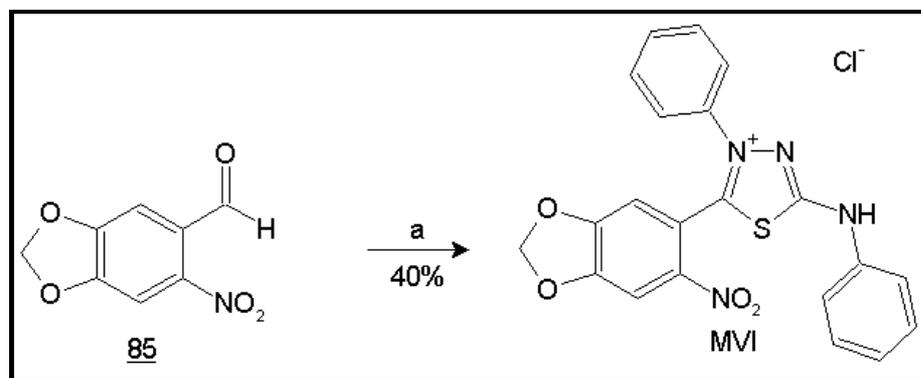
Reagentes: a) 1,4-difeniltiossemicarbazida **53**, TMS-Cl, DMF, 24h.

Conforme a **Metodologia Geral 2**, 0,293 g (0,62 mmol) do piperonal **69** reagiu, e forneceu 0,070 g do respectivo cloridrato mesoiônico **MIII**, na forma de cristais amarelo-esverdeado com 68% de rendimento.

Pf.: 286-7°C

Os espectros de IV, RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos para **MIII** foram idênticos aqueles obtidos, para o mesmo composto, sintetizado pela Metodologia Geral 1.

5.14.10. Síntese do Cloridrato mesoiônico 86 - Cloreto de 4-fenil-5-(6-nitro-3,4-metilenodioxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (**MVI**).



Reagentes: a) 1,4-difeniltiossemicarbazida **53**, TMS-Cl, DMF, 24h.

Conforme a **Metodologia Geral 2**, 0,121 g (0,62 mmol) do 6-nitropiperonal **85** reagiu, e forneceu 0,045 g (40%) do respectivo cloridrato mesoiônico **MVI**, na forma de cristais amarelos. Pf.: 264-266°C

Infravermelho (KBr, cm^{-1}):

$\nu_{\text{N-H}} = 3437,5$ (fenilamina hexocíclica)

$\nu_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 3010,2$ (aromático)

$\nu_{\text{C=N}^+\text{HAr}} = 2777,3$ (grupo imônio hexocíclico)

$\nu_{\text{C=C}} (\text{Csp}^2) = 1610; 1500$ e 1451 (vibração do esqueleto aromático)

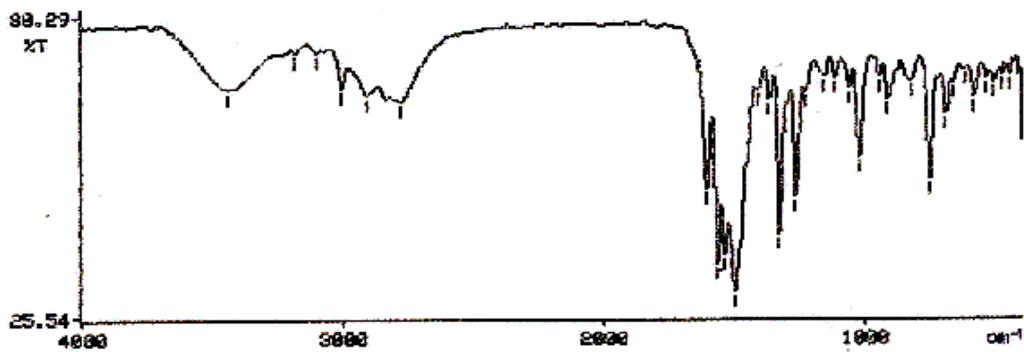
$\nu_{\text{C=N}} = 1566,8$ (vibração do esqueleto heterocíclico)

$\nu_{\text{N=O}} = 1366,5$ (vibração do grupo nitro)

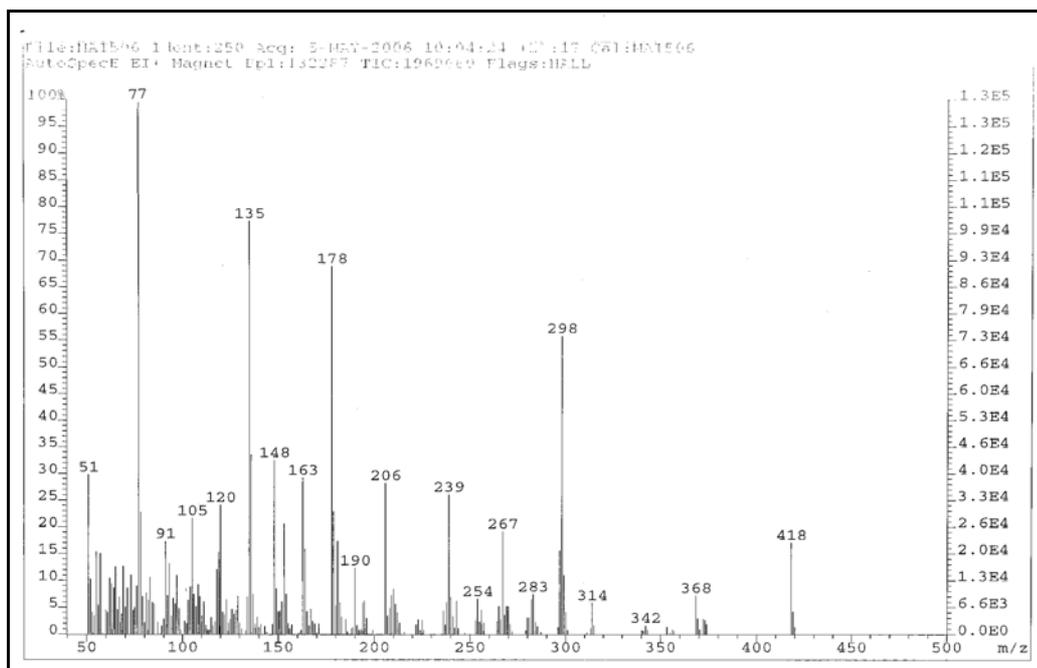
$\nu_{\text{C-S}} = 1329,2$ (vibração do esqueleto heterocíclico)

$\nu_{\text{C-O-C}} = 1267,0$ (metilenodioxílico)

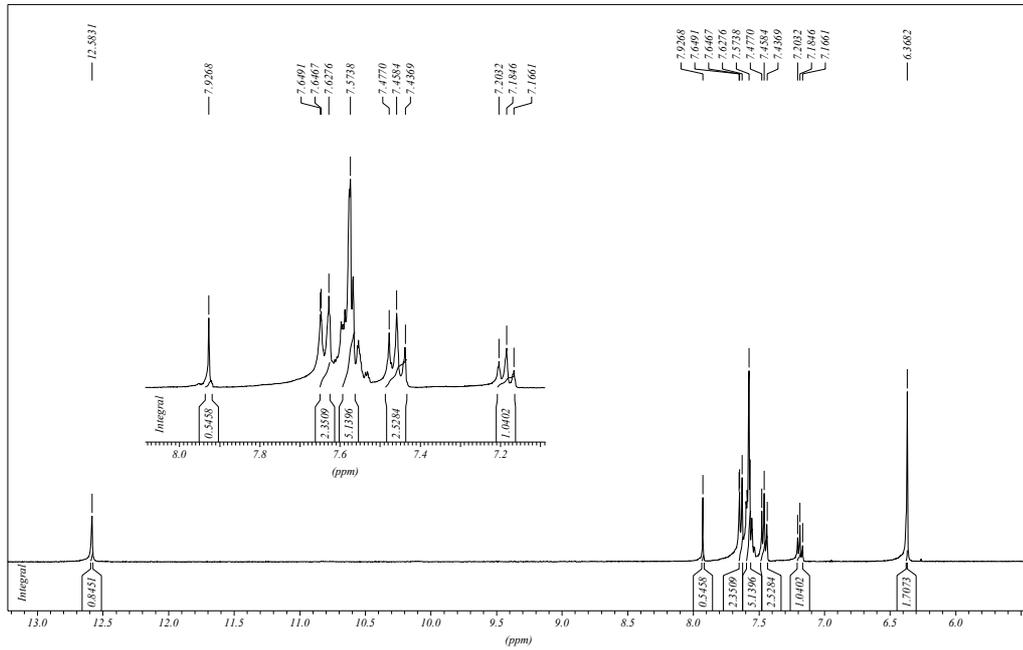
$\sigma_{\text{C-H}} (\text{Csp}^2) = 754$ e 690 (dobramento de $5\text{H}_{\text{arom.}}$ vizinhos)



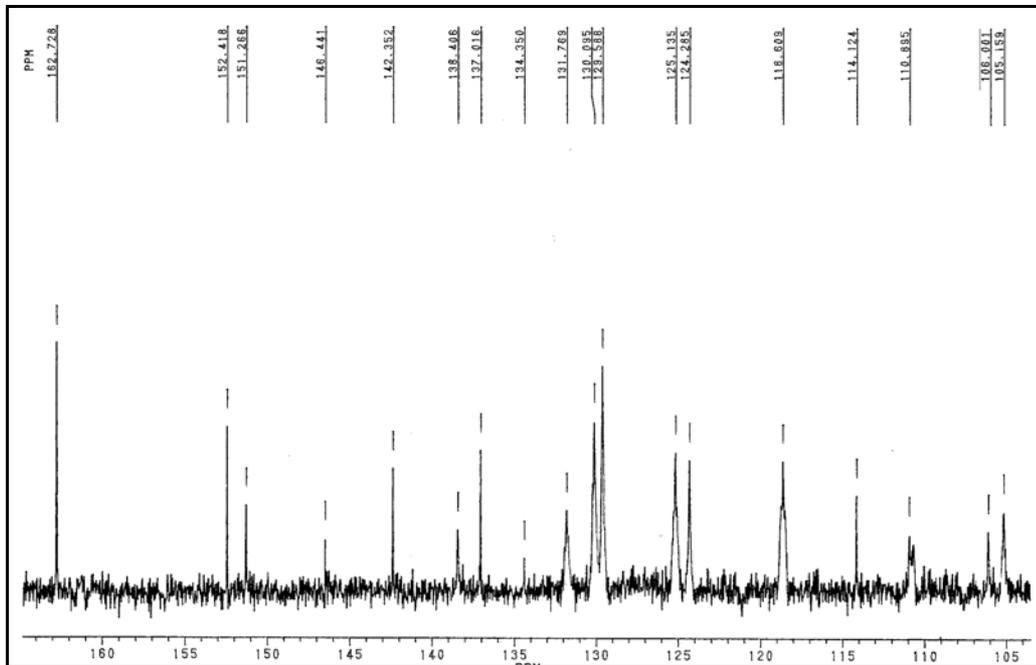
Espectro 73: Espectro de IV de MVI.



Espectro 74: Espectro de massas de MVI.



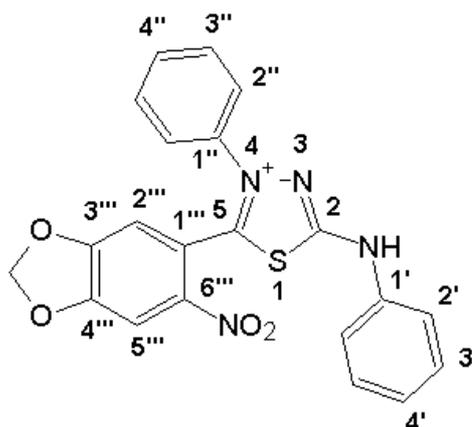
Espectro 75: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-D₆) de MVI.



Espectro 76: Espectro de RMN ¹³C (200 MHz, DMSO-D₆) de MVI.

Tabela 27: Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C para MVI.

Posição	MVI (DMSO- D_6) 200/400MHz	
	δH (ppm), J(Hz)	δC (ppm)
NH	12,58 (sl, 1H)
2	152,4 (C)
5	162,7 (C)
1'	137,0 (C)
2'	7,55 (m; 2H)	118,6 (CH)
3'	7,45 (t; 7,5; 2H)	130,0 (CH)
4'	7,18 (t; 7,4; 1H)	124,2 (CH)
1''	138,4 (C)
2''	7,63 (m; 2H)	125,1 (CH)
3''	7,57 (m; 2H)	129,5 (CH)
4''	7,57 (m; 1H)	131,7 (CH)
1'''	134,3 (C)
2'''	7,45 (sl; 1H)	106,0 (CH)
3'''	142,3 (C)
4'''	146,4 (C)
5'''	7,92 (s; 1H)	110,8 (CH)
6'''	151,2 (C)
OCH ₂ O	6,36 (sl; 2H)	105,1 (CH ₂)



MVI

5.15. Avaliação da atividade biológica

A avaliação da atividade tripanocida das moléculas obtidas neste trabalho foram realizadas no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Glicobiologia, UFRJ, em colaboração com os alunos de doutorado Leonardo Freire de Lima e Victor Barbosa Saraiva, sob a supervisão dos professores José Osvaldo e Lúcia Mendonça Previato.

5.15.1. Parasitas

5.15.1.1 - Formas epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, (amostra Y) foram mantidas a 28° C em meio composto por BHI (37g/L), hemina (0,01g/L) e ácido fólico (0,02g/L), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB). Os parasitas foram sub-cultivados no meio de cultura descrito acima a cada 5 dias com inóculos de 10 %.

5.15.1.2 - Formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas a partir da diferenciação *in vitro* de formas epimastigotas, incubadas em meio de urina artificial de triatomíneo (TAU) (Contreras *et al.*, 1985). Os tripomastigotas metacíclicos obtidos foram utilizados na infecção de camundongos Balb/c através de inóculo intraperitoneal (10^5 células/mL). As formas tripomastigotas sanguíneas foram mantidas semanalmente por passagens em camundongos Balb/c. Através de punção cardíaca, os tripomastigotas sanguíneos foram obtidos de camundongos infectados e separados através de centrifugação. O sobrenadante enriquecido com formas tripomastigotas foi utilizado para infecção de células VERO (células de rim de macaco verde africano). As monocamadas de células VERO infectadas foram mantidas em meio RPMI 1640 pH 7,2 composto por: L-glutamina (0,3g/L), carbonato de sódio (2,0g/L) (Sigma), piruvato de sódio (0,1g/L), HEPES (2,4g/L), gentamicina e suplementado com 10 % SFB, sob atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C (Andrews *et al.*, 1985). As formas tripomastigotas liberadas no sobrenadante após 5-7 dias de cultura foram separadas dos debris celulares por centrifugação. O sobrenadante obtido foi novamente centrifugado e o *pellet* enriquecido com formas tripomastigotas foi

ressuspendido em 10 mL de meio RPMI. Os parasitas obtidos foram utilizados para a manutenção das culturas de tripomastigotas ou na infecção de macrófagos.

5.15.2. - Obtenção de macrófagos

Macrófagos de camundongos Balb/c foram obtidos por lavagem peritonial com meio RPMI a 4 °C. Os macrófagos foram incubados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13 mm² e mantidas a 37 °C/ 5 % CO₂ por 90 minutos para que as células pudessem aderir nas lamínulas. Após a incubação, as culturas foram então lavadas com meio RPMI a 37 °C para a remoção de células que não aderiram e incubadas 18 h com meio RPMI, suplementado com 10 % de SFB, nas mesmas condições descritas acima.

5.15.3 - Atividade Anti-Epimastigota

A inibição do crescimento das formas epimastigotas foi avaliada com as moléculas (MI à IX) em concentrações crescentes (1,56 – 50µg/mL). Os parasitas (10⁵ células/mL) foram cultivados durante 7 dias em placas de 24 poços a 28 °C e o crescimento avaliado por contagem direta em Câmara de Neubauer no sétimo dia de cultivo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata utilizando DMSO 0,005%, concentração final, como controle negativo. A **Tabela 28** mostra os valores do IC₅₀ expressos em micromolar (µM) para as respectivas moléculas testadas.

Tabela 28: Valores de IC₅₀ (µM) para piperina, derivados e benzonidazol frente a diferentes formas do *Trypanosoma cruzi*.

Compostos	IC ₅₀ (µM)			
	Epimastigota	Citotoxicidade ¹	Tripomastigotas	Amastigotas
I	7,3	20	>[] _{max} ²	4,9
MI	10,83	38,56	6,7	1,35
MII	4,13	1,95	>[] _{max}	NT
MIII	113,06	NT ³	NT	NT
MIV	31,5	NT	NT	NT
MV	83,42	NT	NT	NT
MVI	13,42	6,62	>[] _{max}	NT
MVII	45,24	NT	NT	NT
MVIII	40,82	NT	NT	NT
MIX	0,64	1,08	>[] _{max}	NT
Benzonidazol⁴	2,2	2,5

¹Citotoxicidade para macrófagos murino; ²Maior que a concentração máxima permitida; ³Não testados; ⁴Droga de referência

5.15.4. Citotoxicidade para macrófagos murinos

5.15.4.1. Teste de exclusão do azul de Trypan

Todos os cloridratos mesoiônicos preparados foram testadas contra a forma epimastigota do *T. cruzi*, e as mais tóxicas tiveram seu efeito monitorado sobre monocamadas de macrófagos murinos, através do teste de exclusão do azul de Trypan. Os macrófagos peritoniais murinos obtidos por lavagem peritoneal como descrito no item **5.15.2. (página 150)** foram plaqueados em 24 poços, e incubados em concentrações crescentes (0.1 – 50 µg/mL) das moléculas que se mostraram mais ativas contra as formas epimastigotas (**MI, MII, MVI e MIX**). Após o tratamento, os macrófagos foram mantidos a 37°C/5% de CO₂ durante 72h, lavados com PBS pH 7,2 e incubados com o corante vital azul de Trypan (0,01%, concentração final) para se observar um possível comprometimento da permeabilidade da membrana celular. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados da viabilidade celular estão expressos na **Tabela 28**.

5.15.5. Atividade Anti-Tripomastigota

A atividade anti-tripomastigota dos cloridratos mesoiônicos mais ativos (MI, MII, MVI e MIX), foi monitorada sobre culturas de tripomastigotas metacíclicas, obtidas a partir de culturas de células VERO infectadas, como descrito no item 5.15.1.2. (página 149). Os parasitas foram tratados com concentrações viáveis das moléculas (0,025 – 10 µg/mL), selecionadas a partir do teste de exclusão do azul de Trypan. Após 24 horas, a lise dos parasitas foi quantificada por contagem direta em câmara de Neubauer. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados estão expressos em parasitas por mililitro ± DP e comparados aos controles tratados com DMSO 0,005%, concentração final (Figura 31).

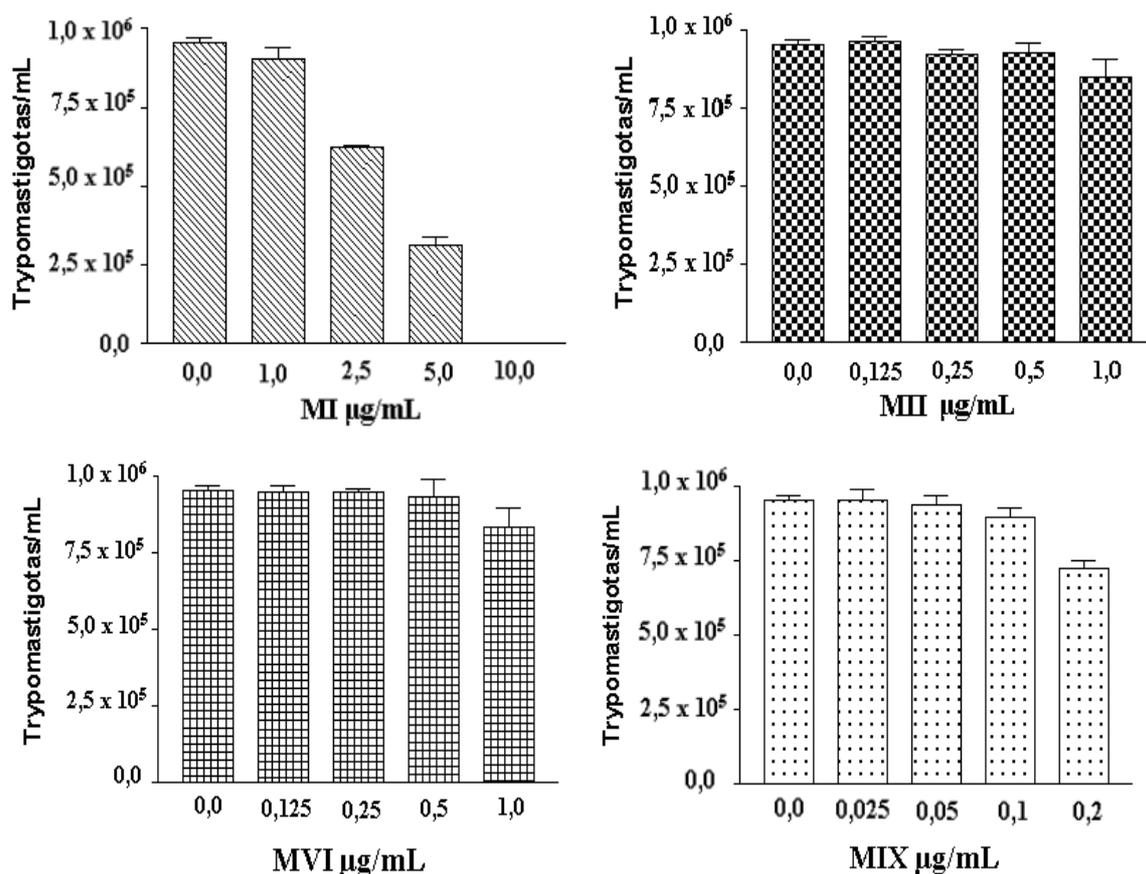


Figura 31: Gráficos referentes à atividade anti-tripomastigota, em concentrações de viabilidade celular (macrófagos murinos).

5.15.6. Atividade Anti-Amastigota

Macrófagos peritoneais murinos foram cultivados em placas de 24 poços como descrito no item 5.15.2. (página 150); infectados com formas tripomastigotas de cultura de células VERO obtidas como descrito no item 5.15.1.2. (página 149), em uma proporção de 5 parasitas por macrófagos e incubados por 90 minutos a 37°C/5 % CO₂. Após a incubação, as células foram lavadas com RPMI a 37°C para a remoção dos parasitas livres. As culturas foram então tratadas com concentrações crescentes (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10 µg/mL) do derivado (MI), que se mostrou mais viável diante da sequência de atividade aplicada ou com DMSO (0,01% concentração final) e mantidas a 37°C/5% CO₂ por 72 horas. Após o tratamento, as monocamadas foram lavadas com PBS pH 7,2 a 37 °C, fixadas com metanol, coradas com Giemsa, desidratadas em soluções de acetona-xilol e montadas em permount. As lâminas foram observadas em microscópio óptico de campo claro, sendo determinado o índice de infecção (*I*), obtido a partir da percentagem de macrófagos infectados (% Mφi), multiplicado pelo número médio de amastigotas por macrófago (A/Mφi) ($I = \% M\phi i \times A / M\phi i$). A percentagem de sobrevivência dos parasitas foi calculada em relação ao índice endocítico dos controles (% Sob = $I_{tratado} / I_{controle}$). A Figura 32, mostra a relação de amastigotas tratados com o derivado MI.

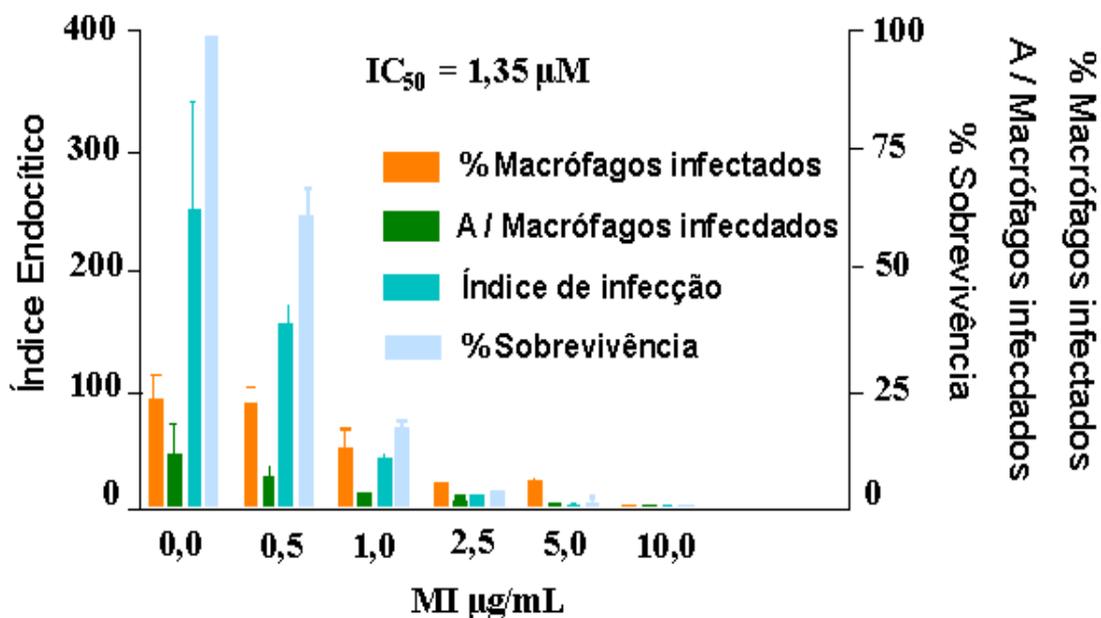


Figura 32: Efeito do MI sobre as formas amastigotas do *T. cruzi*.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e pelo menos 400 células por lamínula foram contadas. A **Figura 33** mostra a relação da toxicidade da molécula **MI** frente as formas amastigotas endocíticas do parasita.

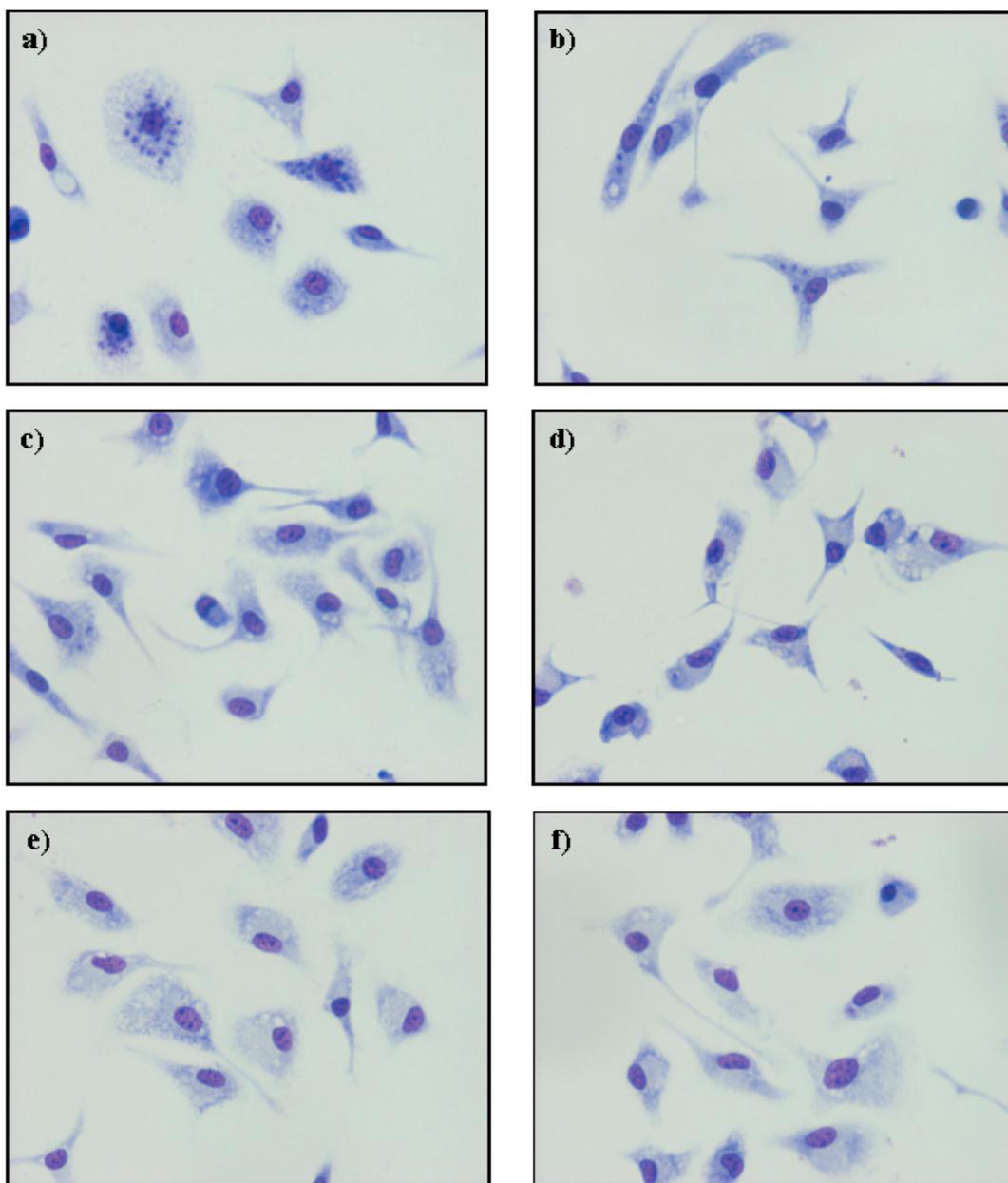


Figura 33: Toxicidade da molécula **MI** às formas amastigotas em diferentes concentrações: a) DMSO 0,01%; b) **MI** 0,5 µg/mL (1,0 µM); c) **MI** 1,0 µg/mL (2,2 µM); d) **MI** 2,5 µg/mL (5,4µM); e) **MI** 5,0 µg/mL (10,8 µM); f) **MI** 10µg/mL (21,6 µM).

5.15.7. Atividade tripanocida *in vivo*: Parasitemia em Camundongos Balb/c

A avaliação da atividade tripanocida da droga **MI** foi verificada em camundongos da linhagem Balb/c, infectados por via intraperitoneal com 10^5 tripomastigotas sanguíneos, mantidos por passagens sucessivas *in vivo*. Os ensaios foram realizados em 4 grupos: Controle H₂O, Controle DMSO 10 %, Benzonidazol 100 mg/Kg, **MI** 50 mg/Kg) (5 camundongos por grupo).

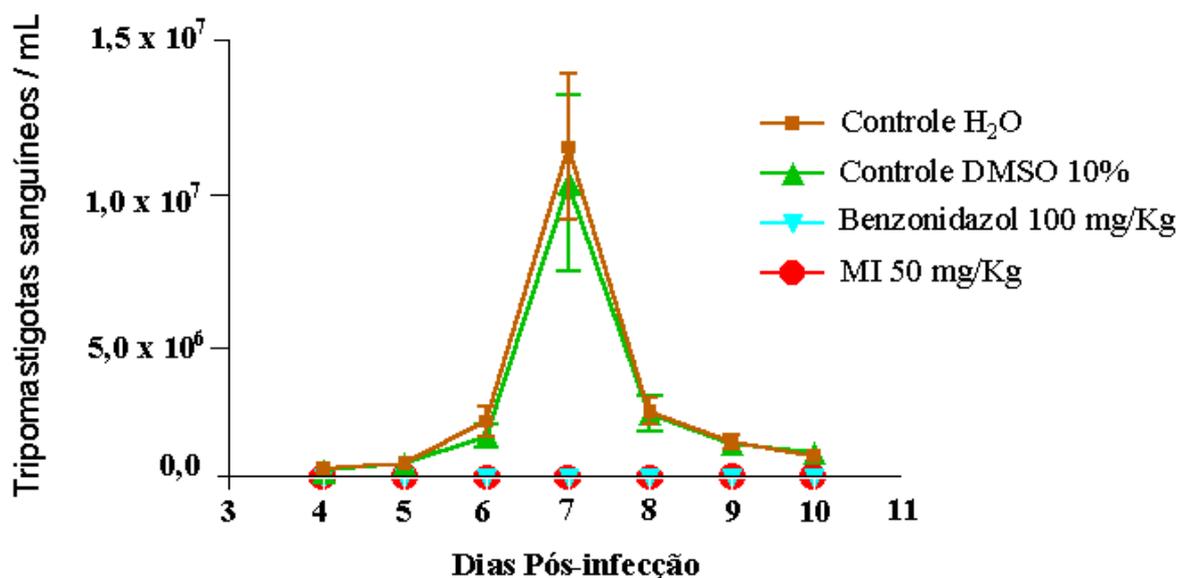


Figura 34: Parasitemia dos quatro grupos de animais tratados.

Todos os tratamentos foram realizados por via oral, logo após a infecção, se estendendo até o 15º dia pós-infecção (dpi). A parasitemia dos animais (**Figura 34**) foi quantificada do 4º ao 10º dpi, sendo observado e quantificado durante 30 dias, a mortalidade cumulativa (**Figura 35**) de todos os camundongos durante a infecção experimental (Saraiva *et al.*, 2002).

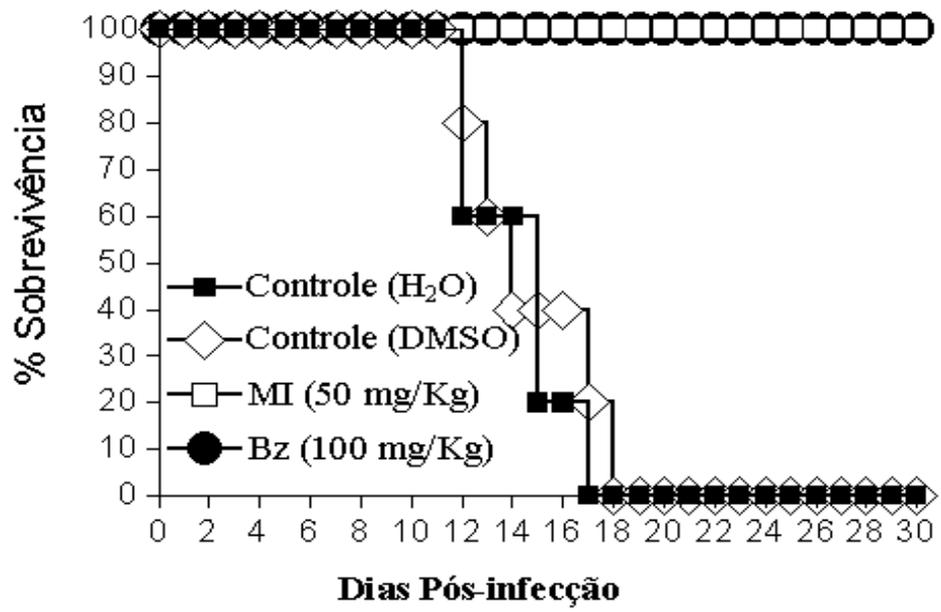


Figura 35: Sobrevida dos quatro grupos de animais tratados.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRICH. Catalog Handbook of fine chemicals Aldrich. **2003, 2004, 2005.**

ANDREWS, N. W., ALVES, M. J. M., SCHUMACHER, R. I., COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: protection in mice immunized with 8-methoxypsolarene-inactivated Trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 60: 255-262, **1985.**

ATAL, C. K., DHAR, K. L., SINGH, J. Chemistry of Indian *Piper* species. *Lloydia- J. Nat. Prod.* 38 (3): 256-264, **1975.**

ATAL, C. K., DUBEY, R. K., SINGH, J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine—evidence that piperine is a potent inhibitor of drug-metabolism. *The J. Pharm. Exp. Therap.* 232 (1): 258-262, **1985.**

ATAL, C. K., ZUTSHI, U., RAO, P. G. Scientific evidence on the role of ayurvedic herbals on bioavailability of drugs. *J. Ethnopharm.* 4 (2): 229-232, **1981.**

BANO, G., RAINA, R. K., ZUTSHI, U., BEDI, K. L., JOHRI, R. K., SHARMA, S. C. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy-volunteers. *Eur. J. Clin. Pharm.* 41 (6): 615-617, **1991.**

BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., ARAÚJO Jr., J. X. O uso de matérias-primas vegetais para a síntese de fármacos. In: *Simões, C.M.O. (Ed.) et al., Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Florianópolis: Ed. Universidade/Ed. Da UFSC: 123-142, **1999.**

BARRETO, L. M., CARMO, E. H. Determinantes das condições de saúde e problemas prioritários no país. In: 11^a Conferência Nacional de Saúde. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.datasus.gov.br>.

- BARRETO-JUNIOR, C. B. Abordagem para a síntese de amidas naturais bioativas e seus análogos. Dissertação de Mestrado, UFRuralRJ, **2005**.
- BHAT, B. G., CHANDRASEKHARA, N. Effect of black pepper end piperine on bile secretion and composition in rats. *Toxicology* 31 (9): 913-916, **1987**.
- BHAT, B. G., CHANDRASEKHARA, N. Interaction of piperine with rat-liver microsomes. *Toxicology* 44 (1): 91-98, **1987**.
- BRENER, Z., ANDRADE, Z. A. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **1979**.
- CHATAING, B., CONCEPCION, J. L., LOBATON, R., USUBILLAGA, A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in vitro by *Solanum* alkaloids: a comparison with ketoconazole. *Planta Medica* 64: 31-36, **1998**.
- CHEUNG, K. K., ECHEVARRIA, A., GALEMBECK, MACIEL, M. A. M., MILLER, J. Mesoionic compounds .3. Structure of the hydrochloride of 5-(4-methoxyphenyl)-4-phenyl-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine. *Acta. Cryst.* 48: 1471-1474, **1992**.
- CAWKILL, E., OLLIS, W. D., RAMSDENN, C. A., ROWSON, G. P. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 12: 439-440, **1976**.
- CONTRERAS, V. T., SALLES, J. M., THOMAS, N., MOREL, C. M., CHAN, J. H. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 315-327, **1985**.
- CORRÊA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. *Quim. Nova*, 18: 460-467, **1995**.
- COURA, J. R., DE CASTRO, S. L. A Critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97 (1): 3-24, **2002**.

- DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X., DA CUNHA, E. V. L., CHAVES, M. C. O., GRAY, A. I. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 44(3): 559-561, **1997**.
- DE PAULA, V. F., BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., VELOSO, D. P., PICANÇO, M. C. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. *Pest. Manag. Sci.* 56 (2): 168-174, **2000**.
- DENIS, J. N., GREENE, A. E., GUENARD, D., GUERITTEVOEGELEIN, F., MANGATAL, L., POTIER, P. A highly efficient, practical approach to natural taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 110 (17): 5917-5919, **1988**.
- DEWICK, P. M., Medicinal natural products: A biosynthetic approach, *John Wiley & Sons*: New York, **2002**.
- D'HOOGHE, R., PEI, Y. Q., RAES, A., LEBRUM, P., VANBOGAERT, P. P., DE DEYN, P. P. Anticonvulsant activity of piperine on seizures induced by excitatory amino acid receptor agonists. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 46 (6): 557-560, **1996**.
- ECHEVARRIA, A., GALEMBECH, S., MACIEL, M. A. M., MILLER, J. Reactions of aroylchlorides with 1,4-diphenylthiosemicarbazide: formation of both 1,3,4-thiadiazolium-2-aminides and 1,3,4-triazolium-2-thiolate. *Heterocyclic Comm.* 1 (2-3): 129-136, **1995**.
- EDWARD, J. T., SHEFFLER, R. H. Mesoionic dipyrido [1, 2, A, 1', 2', E] Imidazolium compounds from the Binz-Mark reaction. *J. Am. Chem. Soc.*: 168, **1979**.
- FOURNET, A., INCHAUST, A., YALUFF, G., ROJAS, A. A., GUINADEAU, H., BRUNETON, J., BREIDENBACH, M. A., KARPLUS, P. A., FAERMAN, C. H. Trypanocidal bisbenzylisoquinolone alkaloids are inhibitors of trypanothione reductase. *J. Enzym. Inhib.* 13: 1-9, **1998**.

- GEISLER, J. G., GROSS, G. G. The biosynthesis of piperine in *Piper nigrum*. *Phytochemistry* 29 (2): 489-492, **1990**.
- GEISMAN, T. A., CROUT, D. H. G. Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. *Freenar Cooper, San Francisco*: 170, **1969**.
- GHOSHAL, S., PRASAD, B. N. K., LAKSIMI, V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* *in vitro* and *in vivo*. *J. Ethnopharm.* 50 (3): 167-170, **1996**.
- GRYNBERG, N., SANTOS, A. C., ECHEVARRIA, A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminida class. *Anticancer Drugs* 8 (1): 88-91, **1997**.
- HOLTON, R. A., KIM, H. B., SOMOZA, C., LIANG, F., BIEDIGER, R. J., BOATMAN, P. D., SHINDO, M., SMITH, C. C., KIM, S. C., NADIZADEH, H., SUZUKI, Y., TAO, C. L., VU, P., TANG, S. H., ZHANG, P. S., MURTHI, K. K., GENTILE, L. N., LIU, J. H. First total synthesis of Taxol. 2. completion of the C-ring and D-ring. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (4): 1597-1598, **1994a**.
- HOLTON, R. A., KIM, H. B., SOMOZA, C., LIANG, F., BIEDIGER, R. J., BOATMAN, P. D., SHINDO, M., SMITH, C. C., KIM, S. C., NADIZADEH, H., SUZUKI, Y., TAO, C. L., VU, P., TANG, S. H., ZHANG, P. S., MURTHI, K. K., GENTILE, L. N., LIU, J. H. First total synthesis of Taxol. 1. functionalization of the B-ring. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (4): 1599-1600, **1994b**.
- IKAN, R. In: *Natural Products: A Laboratory Guide*, Academic Press, 2nd Edition: 233-238, **1991**.
- JOHRI, R. K., THUSU, N., KHAJURIA, A., ZUTSHI, U. Piperine-mediated changes in the permeability of rat intestinal epithelial-cells the status of gamma-glutamyl transpeptidase

- activity, uptake of amino-acid and lipid-peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 43 (7): 1401-1407, **1992**.
- KAPIL, A. Piperine: a potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*, *Planta Medica*, 59: 474, **1993**.
- KAPPEL, J. C., YOKUM, T. S., BARANY, G. Parallel solid-phase synthesis of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminides. *J. Comb. Chem.* 6: 746-752, **2004**.
- KOUL, S., KOUL, J. L., TANEJA, S. C., DHAR, K. L., JAMWAL, D. S., SINGH, K., REEN, R. R., SINGH, J. Structure-activity relationship of piperine and its synthetic analogues for their inhibitory potentials of rat hepatic microsomal constitutive and inducible cytochrome P450 activities. *J. Bioorg. Med. Chem.* 8 (1): 251-268, **2000**.
- KUSAMA, H., HARA, R., KAWAHARA, S., NISHIMORI, T., KASHIMA, H., NAKAMURA, N., MORIHIRA, K., KUWAJIMA, I. Enantioselective total synthesis of (-)-taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 3811-3820, **2000**.
- LEE, S. A., HONG, S. S., HAN, X. H., HWANG, J. S., OH, G. J. LEE, S. K. Piperine from the Fruits of *Piper longum* with Inhibitory Effect on Monoamine Oxidase and Antidepressant-Like Activity. *Chem. Pharm. Bull.* 53 (7): 832-835, **2005**.
- LEE, S. E., PARK, B. S., KIM, M. K., CHOI, W. S., KIM, H. T., CHO, K. Y., LEE, S. G., LEE, H. S. Fungicidal activity of piperonadine, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop. Protec.* 20: 523-528, **2001**.
- LEWINSOHN, R. Doença de Chagas: paradoxos e ilações. <http://www.comciencia.br/reportagens/2005/06/11.shtml>, **2005**.

- LIN, Z. X., HOULT, J. R. S., BENNET, D. C., RAMAN, A. Stimulation of mouse melanocyte proliferation by *Piper nigrum* fruit extract and its main alkaloid, piperine. *Planta Medica* 65: 600, **1999**.
- LIU, G. Q., ALGERI, S., CECI, A., GARATTINI, S., GOBBI, M., MURAI, S. Stimulation of serotonin synthesis in rat-brain after antiepilepsirine, antiepileptic piperine derivative. *Biochem. Pharmacol.* 33 (23): 3883-3886, **1984**.
- MACIEL, M. A. M., ECHEVARRIA, A., RUMJANEK, V. M. Isolamento e caracterização de acil-tiossemicarbazidas como intermediários na síntese de compostos mesoiônicos. *Quim. Nova* 21 (5): 569-572, **1998**.
- MANN, J. Chemical Aspects of Biosynthesis. *Oxford Science Publications, Oxford*: 51-58, **1994**.
- MARCH, J. Advanced Organic Chemistry-Reactions, Mecanism and Struture. *John Willey & Sons*, 3^oed.: 388, 437, 438, 1095, 1099, 1100 e 1101, **1985**.
- MONTANARI, C. A., SANDALL, J. P. B., MIYATA, Y., KYIAN, N. Z., MILLER, J. Some spectroscopic proprieties of cyclic products of dehydroacyllation of 1,4-diphenylthiosemicarbazide. *Quim. Nova* 16 (5): 404-408, **1993**.
- MONTANARI, C. A., SANDALL, J. P. B., MIYATA, Y., MILLER, J., Structural studies on some 1,3,4-thiadiazolium-2-amidines and their rearrangement isomers using N-15 and C-13 NMR-spectroscopy. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* (12): 2571-2575, **1994**.
- MORELLO, A., LIPCHENCA, I., CASSELS, B. K., SPEISKY, H., ALDUNATE, J., REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 107: 367-371, **1994**.

- MOURA, G. L. C., SIMAS, A., MILLER, J. Mesoionic Rings as efficient Bridges for the Design of Compounds with Large Optical Nonlinearities. 2nd Conference on Molecular Modeling, Rio de Janeiro (RJ), 26-28, **1994**.
- NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66: 1022-1037, **2003**.
- NICOLAOU, K. C., YANG, Z., LIU, J. J., UENO, H., NANTERMET, P. G., GUY, R. K., CLALBORNE, C. F., RENAUD, J., COULADOUROS, E. A., PAULVANNAN, K., SORENSEN, E. Total synthesis of Taxol. *Nature* 367: 630-634, **1994**.
- OLLIS, W. D., RAMSDEN, C. A. Synthesis of mesoionic anhydro-2-arylamino-1.3.4-oxadiazolium hydroxides. *J. Chem. Soc., D-Chem. Commun.* 19: 1222-1223, **1971**.
- OLLIS, W. D., RAMSDEN, C. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1, 633, **1974**
- OLLIS, W. D., STANFORTH, S. P., RAMSDEN, C. A., Heterocyclic mesomeric betaines. *Tetrahedron* 41(12): 2242, **1985**.
- PARK I.K., LEE S.G., SHIN S.C., PARK J.D., AHN Y.J. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (7), 1866-1870, **2002**.
- PARMAR, V. S., JAIN, S. C., BISHT, K. S., JAIN, TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O. D., PRASAD, A. K., WENGEL, J., OLSEN, C. E., BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46 (4): 597-673, **1997**.
- PARMAR, V. S., JAIN, S. C., GUPTA, S., TALWAR, S., RAJWANSSHI, V. K., KUMAR, R., AZIM, A., MALHOTRA, S., KUMAR, N., JAIN, R., SHARMA, NN. K., TYAGI, O. D., LAWRIE, S. J., ERRINGTON, W., HOWART, O. W., OLSEN, C. E., SINGH, S. K.,

- WENGEL, J. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry* 49 (4): 1069-1078, **1998**.
- PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira, *Quim. Nova* 18 (6): 608-615, **1995**.
- PISSINATE, K. Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos. Dissertação de mestrado, UFRuralRJ, **2006**.
- RAAY, B., MEDDA, S., MUKHOPADHYAY, S., BASU, M. K. Targetin of piperine intercalated in mannose-coated liposomes in experimental leishmaniasis. *Indian J. Biochem. Biopharmacol.* 36 (4): 248-251, **1999**.
- RASCADO, M. F. N. Utilização do saffrol na síntese de derivados do núcleo pirroloquinolina, potencialmente úteis como antineoplásicos. Dissertação de Mestrado, UFRuralRJ, **1997**.
- REEN, R. K., JAMWAL, D. S., TANEJA, S. C., KOUL, J. L., DUBEY, R. K., WIEBEL, F. J., SINGH, J. Impairment of UDP-glucose dehydrogenase and glucuronidation activities in liver and small-intestine of rat and guinea-pig *in vitro* by piperine. *Biochem. Pharmacol.* 46 (2): 229-238, **1993**.
- REEN, R. K., WIEBEL, F. J., SINGH, J. Piperine inhibits aflatoxin B-1-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1. *J. Ethnopharm.* 58 (3): 165-173, **1997**.
- RIBEIRO, T. S., Transformações químicas no alcalóide natural piperina e avaliação da atividade tóxica sobre *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado, UFRuralRJ, **2004**.
- RODIG, O. R., BELL-JR, D. E., CLARK, A. K., Organic Chemistry Laboratory, Standard & Microscale Experiments. *Saunders College Publishing*, 215, **1990**.

- SANTOS, A. P. Piperina: Modificações Estruturais, Síntese de análogos e Avaliação Citotóxica. Dissertação de Mestrado, UFRuralRJ, **1999**.
- SARAIVA, V. B., GIBALDI, D., PREVIATO, J. O., MENDONÇA-PREVIATO, L., BOZZA, M. T., FREIRE-DE-LIMA, C. G., HEISE, N. Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Anti-microb. Agent. Chemother.* 46: 3472-3477, **2002**.
- SATO, M., UJIIE, S. *Chemistry Citation Index*, jan-dec, **1996**.
- SCHMUNIS, G. A. A tripanossomíase americana e seus impactos na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. A., BARRAL-NETO, M. (eds). *Trypanosoma cruzi e Doença de chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2^a ed. Cap. 1, **2000**.
- SCHINZATO, T., GRYNBERG, N., GOMES, R., ECHEVARRIA, A., MILLER, J. Antitumor-activity of new mesoionic compound of the 1,3,4-triazolium-5-thiolato class. *Anticancer Reserch* 8 (5): 1098, **1988**.
- SCOTT, W. P., MCKIBBEN, G. H. Toxicity of black pepper extract to boll weevils. *J. Econ. Entomol.* 71 (2): 343-344, **1978**.
- SEMLER, U., GROSS, G. G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. *Phytochemistry* 27 (5): 1566-1567, **1988**.
- SENFF-RIBEIRO, A., ECHEVARRIA, A., SILVA, E. F. Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic: a estrutura-activity relationship study. *Anti-cancer Drugs* 15 (3): 269-275, **2004a**.

- SENN-RIBEIRO, A., ECHEVARRIA, A., SILVA, E. F. Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. *British J. Cancer* 91(2): 297-304, **2004b**.
- SENN-RIBEIRO, A., ECHEVARRIA, A., SILVA, E. F., SANCHES, V. S., OLIVEIRA, M. B. Effect of new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. *Melanoma Research* 13 (5): 465-471, **2003**.
- SHOBA, G., JOY, D., THANGAM, J., MAJEED, M., RAGENDRAN, R., SRINIVAS, P. S. R. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica* 64 (4): 353-356, **1998**.
- SILVA, E. F. Mesoiônicos, 1,3,4-tiadiazólio-2-amidinas: Síntese, Solvatocromismo & Citotoxicidade. Dissertação de Mestrado, UFRuralRJ. **1997**.
- SILVA, E. F., CANTO-CAVALHEIRO, M. M., BRAZ, V. R., CYSNE-FINKELSTEIN, L., LEON, L. L., ECHEVARRIA, A. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes.. *Eur. J. Med. Chem.* 37: 979-984, **2002**.
- SONDENGAM, B. L. Organic and Bio-Organic Chemistry. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions* 1 (6): 1219-1221, **1983**.
- STEWART, T. G., KIER, L. B. Synthesis of several mesoionic 1,3,4-thiadiazoles. *J. Pharm. Sci.* 54 (5): 731-734, **1965**.
- SUNILA, E. S., KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* L. and piperine. *J. Ethnopharm.* 90: 339-346, **2004**.

- TROUILLER, P., OLLIARO, P., TORREELE, E., ORBINSKI, J., LAING, R., FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *The Lancet*. 359, **2002**.
- VENKATASAMY, R., FAAS, L., YOUNG, A. R., RAMAN, A., HIDER, R. C. Effects of piperine analogues on stimulation of melanocyte proliferation and melanocyte differentiation. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 1905-1920, **2004**.
- VEIGAS, C. J., DA SILVA, V. B. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Quim. Nova* 29 (2): 326-337, **2006**.
- YUNES, R. A., PEDROSA, R. C., CECHINEL FILHO, V., Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim. Nova* 24 (1): 147-152, **2001**.
- WEISSMANN, G. Aspirin. *Sci. Am.* 264 (1): 84-90, **1991**
- WHO-World Health Organization, **1997**. Chagas disease: Thirteenth Programme Report, UNDP/TDR, Geneve.

