



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

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE
NOVOS 1,2,4-TRIAZÓIS, DERIVADOS DA AMIDA NATURAL
PIPERINA, CONTRA FORMAS PROLIFERATIVAS DO *Trypanosoma
cruzi***

TATIANY NUNES FRANKLIM

Sob a Orientação do Professor
Dr. Marco Edilson Freire de Lima

e Co-orientação da Professora
Dr^a. Rosane Nora Castro

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação
em Química, Área de Concentração em
Química Orgânica

Seropédica, RJ
Junho de 2013

540

F831p Franklim, Tatiany Nunes, 1982-

T Planejamento, síntese e avaliação da atividade de novos 1,2,4-triazóis, derivados da amida natural piperina, contra formas proliferativas do *Trypanosoma cruzi* / Tatiany Nunes Franklim - 2013.

200 f. : il.

Orientador: Marco Edílson Freire de Lima.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 171-182.

1. Química - Teses. 2. Química - Síntese - Teses. 3. *Trypanosoma cruzi* - Controle - Teses. 4. Pimenta-do-reino - Teses. I. Lima, Marco Edílson Freire de, 1965-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

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

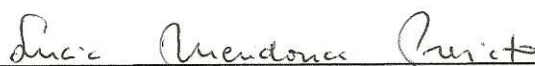
TATIANY NUNES FRANKLIM

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**,
no Curso de Pós-Graduação em Química, área de concentração de Química Orgânica.

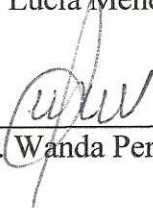
Tese aprovada em 21 de junho de 2013.




Prof^o Dr. Marco Edilson Freire de Lima (DEQUIM-ICE-UFRRJ)
(Orientador e Presidente)



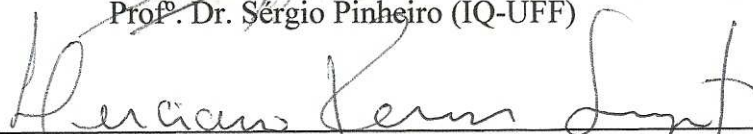
Prof^a. Dr^a. Lucia Mendonça Préviate (IBCCF-UFRRJ)



Prof^a. Dr^a. Wanda Pereira Almeida (IQ-UNICAMP)



Prof^o. Dr. Sérgio Pinheiro (IQ-UFF)



Prof^o. Dr. Luciano Ramos Suzart (DEQUIM-ICE-UFRRJ)

Dedico este trabalho a todos que amo. Primeiramente a Deus, aos meus pais Wilson e Vera, ao meu esposo Ricardo e aos meus irmãos Wilson Filho e Elen. Por fim, ao meu querido avô Pedro (*in memoriam*).

*“Adquire a sabedoria, adquiere o entendimento.
Não a abandones, e ela te guardará; ama-a, e ela te preservará.
A sabedoria é a coisa principal; adquiere, pois, a sabedoria; sim, com tudo o que possuis
adquiere o entendimento.
Estima-a, e ela te exaltará; se a abraçares, ela te honrará.
Ela dará à tua cabeça uma grinalda de graça; e uma coroa de glória te entregará.
E vindo a soberba, virá também a afronta; mas com os humildes encontramos a sabedoria.”*

Míshlê Shelomoh 950 a. C.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus amáveis pais, Wilson e Vera Franklim, pela referência que são, e por dedicarem suas vidas ao direcionamento do meu caminhar, sendo esta, mais uma fase por eles conduzida. Aos meus irmãos Wilson Filho e Elen, que juntamente com meus pais são fundamentais em meu viver e sempre me deram todo apoio. Amo vocês!

Ao meu querido esposo Ricardo, por ter participado em todas as etapas deste projeto, que foram muitas, e por não ter deixado faltar amor e motivação. Obrigada pelo incentivo e por sempre me passar segurança e encorajamento. Você é o meu grande presente de Deus, muito mais do que eu podia imaginar... Te amo muito!

Com admiração agradeço ao professor Marco Edilson, pela orientação, confiança, paciência e amizade. Muito obrigada pela credibilidade e pelo conhecimento compartilhado, além do bom exemplo de profissionalismo. Certamente sem seu direcionamento não seria possível dar mais este passo.

À professora Rosane Nora, pela co-orientação deste projeto, sempre enriquecendo e alegrando nossas discussões. Obrigada pelas correções dos relatórios nestes quatro anos e sugestões quanto a estes. Sei que foi de grande valia para mim.

Agradeço aos professores da pós-graduação Mário Geraldo de Carvalho e Cedric Gaebrin pelo conhecimento que adquiri ao lado de vocês ao longo do curso de pós-graduação.

As minhas amigas Osenir Silva e Carolina Collantes que sempre me deram forças assistindo meus seminários mesmo sem entender quase nada. Obrigada pela amizade sincera, e incentivo de vocês!

A minha amiga Natália Lopes, pelo companheirismo, pela amizade e grande auxílio no laboratório. Agradeço a oportunidade de aprender com você e de me divertir também. À amiga Juliana Torres, pelo bom humor e pelos diversos momentos de estudos.

Agradeço aos amigos do **LabQMed 48** e “agregados”, pela ajuda e momentos descontraídos. Ao amigo Welisson Ferreira, pela boa vontade e assessoria prestada com sua incrível capacidade de ajudar, e dando excelentes sugestões quanto as mais diversas reações.

Obrigada Dr. Leonardo Freire de Lima e a professora Lucia Mendonça-Previato do Laboratório de Glicobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ, pelas avaliações biológicas dos produtos sintetizados, e ao professor Marcos Eberlin e a professora Wanda Pereira do IQ-UNICAMP, por permitir a realização dos espectros de massa de alta resolução.

Agradeço a todos os técnicos e funcionários do PQ que contribuíram de alguma forma com este trabalho.

Agradeço a **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro** por nos oferecer ensino e pesquisa de qualidade.

Aos membros da banca por somarem conosco neste trabalho.

Agradeço a **CAPES** por conceder a bolsa.

E acima de tudo, agradeço ao meu Deus, Autor e consumidor da minha fé, pela Sua fidelidade sendo cumprida em mais esta etapa da minha vida.

RESUMO

FRANKLIM, Tatianny Nunes. **Planejamento, síntese e avaliação da atividade de novos 1,2,4-triazóis, derivados da amida natural piperina, contra formas proliferativas do *Trypanosoma cruzi***. 2013. 223p. Tese (Doutorado em Química, Química Orgânica). Instituto Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Os resultados descritos nesta tese envolvem o planejamento, a síntese e a avaliação da atividade tripanocida de treze novos derivados heterocíclicos da classe dos 1,2,4-triazolo-3-tionas, preparados a partir da amida natural piperina, principal constituinte químico dos frutos secos de *Piper nigrum* (pimenta do reino). Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa que tem como principal objetivo o uso de matérias-primas naturais, acessíveis e de fácil isolamento no planejamento e síntese de novas moléculas com potencial aplicação como fármacos antiparasitários. O planejamento dos novos derivados triazólicos diferentemente substituídos baseou-se nas estratégias do bioisosterismo e da hibridação molecular. Os treze derivados 1,2,4-triazóis foram preparados a partir da amida natural em quatro etapas, com o uso da irradiação de micro-ondas em três delas, e em rendimentos globais que variaram de 32 a 51%. O derivado substituído pelo radical cicloexila foi o que apresentou melhor perfil de atividade contra as formas proliferativas do *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), com valores de CI_{50} de 18,3 e 8,87 μM contra formas epimastigota e amastigota, respectivamente.

Palavras-chave: *Piper nigrum*. Micro-ondas. Bioisosterismo.

ABSTRACT

FRANKLIM, Tatiany Nunes. Design, synthesis and activity evaluation of new 1,2,4-triazoles, derived from natural piperine amide against proliferative forms of *Trypanosoma cruzi*. 2013. 223p. Thesis (Doctorate in Chemistry, Organic Chemistry). Instituto Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The work reported herein describes the design, synthesis and the assessment of the trypanocidal activity of thirteen new 1,2,4-triazole-3-thiones obtained from natural piperine, the main constituent of the dry fruits of *Piper nigrum* (black pepper). It is part of a research program aiming to use abundant and easily available natural products as starting materials for the design and synthesis of new molecules potentially useful as antiparasitic drugs. The design of the variously substituted triazole derivatives was based on the strategies of bioisosterism and molecular hybridization. The thirteen new 1,2,4-triazole were synthesized from the natural amide in four steps with the use of microwave irradiation on overall yields ranging from 32% to 51%. The cyclohexyl substituted derivative showed the best trypanocidal profile on proliferative forms of *Trypanosoma cruzi* (Y strain), with IC₅₀ values of 18.3 and 8.87 μM against epimastigotes and amastigotes, respectively.

Key words: *Piper nigrum*. Microwave. Bioisosterism.

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro no IV da piperina 1	29
Espectro 2: Espectro de massas da piperina 1	30
Espectro 3: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da piperina 1	30
Espectro 4: Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) da piperina 1	31
Espectro 5: Espectro de IV da acilidrazida 4	34
Espectro 6: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da acilidrazida 4	34
Espectro 7: Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da acilidrazida 4	35
Espectro 8: Espectro de IV da <i>N</i> -metilidrazinacarbotoamida 5a	37
Espectro 9: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -metilidrazinacarbotoamida 5a	38
Espectro 10: Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -metilidrazinacarbotoamida 5a	38
Espectro 11: Espectro de IV da <i>N</i> -etilidrazinacarbotoamida 5b	40
Espectro 12: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -etilidrazinacarbotoamida 5b	41
Espectro 13: Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -etilidrazinacarbotoamida 5b	41
Espectro 14: Espectro IV da <i>N</i> -isopropilidrazinacarbotoamida 5c	43
Espectro 15: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -isopropilidrazinacarbotoamida 5c	44
Espectro 16: Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -isopropilidrazinacarbotoamida 5c	44
Espectro 17: Espectro de IV da <i>N</i> -butilidrazinacarbotoamida 5d	46
Espectro 18: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -butilidrazinacarbotoamida 5d	47
Espectro 19: Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -butilidrazinacarbotoamida 5d	47
Espectro 20: Espectro de IV da <i>N</i> -hexilidrazinacarbotoamida 5e	49
Espectro 21: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -hexilidrazinacarbotoamida 5e	50
Espectro 22: Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -hexilidrazinacarbotoamida 5e	50
Espectro 23: Espectro de IV da <i>N</i> -cicloexilidrazinacarbotoamida 5f	52
Espectro 24: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -cicloexilidrazinacarbotoamida 5f	53
Espectro 25: Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -cicloexilidrazinacarbotoamida 5f	53

Espectro 26: Espectro de IV da <i>N</i> -fenilidrazinacarbotoamida 5g	55
Espectro 27: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -fenilidrazinacarbotoamida 5g	56
Espectro 28: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -fenilidrazinacarbotoamida 5g	53
Espectro 29: Espectro de IV da <i>N</i> -benzilidrazinacarbotoamida 5h	58
Espectro 30: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -benzilidrazinacarbotoamida 5h	59
Espectro 31: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -benzilidrazinacarbotoamida 5h	59
Espectro 32: Espectro de IV da <i>N</i> -trimetóxifenilidrazinacarbotoamida 5i	61
Espectro 33: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -trimetóxifenilidrazinacarbotoamida 5i	62
Espectro 34: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -trimetóxifenilidrazinacarbotoamida 5i	62
Espectro 35: Espectro de IV da <i>N</i> - <i>tert</i> -butilidrazinacarbotoamida 5j	64
Espectro 36: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> - <i>tert</i> -butilidrazinacarbotoamida 5j	65
Espectro 37: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> - <i>tert</i> -butilidrazinacarbotoamida 5j	65
Espectro 38: Espectro de IV da <i>N</i> -4-tiometilfenilidrazinacarbotoamida 5k	67
Espectro 39: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -4-tiometilfenilidrazinacarbotoamida 5k	68
Espectro 40: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -4-tiometilfenilidrazinacarbotoamida 5k	68
Espectro 41: Espectro de IV da <i>N</i> -3-metoxifenilidrazinacarbotoamida 5l	70
Espectro 42: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -3-metoxifenilidrazinacarbotoamida 5l	71
Espectro 43: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -3-metoxifenilidrazinacarbotoamida 5l	71
Espectro 44: Espectro de IV da <i>N</i> -4-trifluormetilfenilidrazinacarbotoamida 5m	73
Espectro 45: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -4-trifluormetilfenilidrazinacarbotoamida 5m	74
Espectro 46: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) da <i>N</i> -4-trifluormetilfenilidrazinacarbotoamida 5m	74
Espectro 47: Espectro de IV do metil-triazol 6a	77
Espectro 48: Espectro de massas do metil-triazol 6a	78
Espectro 49: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do metil-triazol 6a	78
Espectro 50: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do metil-triazol 6a	79

Espectro 51: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do metil-triazol <u>6a</u>	79
Espectro 52: Espectro de IV do etil-triazol <u>6b</u>	81
Espectro 53: Espectro de massas do etil-triazol <u>6b</u>	82
Espectro 54: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do etil-triazol <u>6b</u>	82
Espectro 55: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do etil-triazol <u>6b</u>	83
Espectro 56: Espectro de RMN ¹³ C (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do etil-triazol <u>6b</u>	83
Espectro 57: Espectro de IV do isopropil-triazol <u>6c</u>	85
Espectro 58: Espectro de massas do isopropil-triazol <u>6c</u>	86
Espectro 59: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do isopropil-triazol <u>6c</u>	86
Espectro 60: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do isopropil-triazol <u>6c</u>	87
Espectro 61: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do isopropil-triazol <u>6c</u>	87
Espectro 62: Espectro de IV do butil-triazol <u>6d</u>	89
Espectro 63: Espectro de massas do butil-triazol <u>6d</u>	90
Espectro 64: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do butil-triazol <u>6d</u>	90
Espectro 65: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do butil-triazol <u>6d</u>	91
Espectro 66: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do butil-triazol <u>6d</u>	91
Espectro 67: Espectro de IV do hexil-triazol <u>6e</u>	93
Espectro 68: Espectro de massas do hexil-triazol <u>6e</u>	94
Espectro 69: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do hexil-triazol <u>6e</u>	94
Espectro 70: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do hexil-triazol <u>6e</u>	95
Espectro 71: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do hexil-triazol <u>6e</u>	95
Espectro 72: Espectro de IV do cicloexil-triazol <u>6f</u>	97
Espectro 73: Espectro de massas do cicloexil-triazol <u>6f</u>	98
Espectro 74: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do cicloexil-triazol <u>6f</u>	98
Espectro 75: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do cicloexil-triazol <u>6f</u>	99
Espectro 76: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do cicloexil-triazol <u>6f</u>	99
Espectro 77: Espectro de IV do fenil-triazol <u>6g</u>	101
Espectro 78: Espectro de massas do fenil-triazol <u>6g</u>	102
Espectro 79: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do fenil-triazol <u>6g</u>	102
Espectro 80: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do fenil-triazol <u>6g</u>	103

Espectro 81: Espectro de RMN ¹³ C – DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do fenil-triazol <u>6g</u>	103
Espectro 82: Espectro de IV do benzil-triazol <u>6h</u>	105
Espectro 83: Espectro de massas do benzil-triazol <u>6h</u>	106
Espectro 84: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do benzil-triazol <u>6h</u>	106
Espectro 85: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do benzil-triazol <u>6h</u>	107
Espectro 86: Espectro de RMN ¹³ C – DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do benzil-triazol <u>6h</u>	107
Espectro 87: Espectro de IV do trimetoxifenil-triazol <u>6i</u>	109
Espectro 88: Espectro de massas do trimetoxifenil-triazol <u>6i</u>	110
Espectro 89: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do trimetoxifenil-triazol <u>6i</u>	110
Espectro 90: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do trimetoxifenil-triazol <u>6i</u>	111
Espectro 91: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do trimetoxifenil-triazol <u>6i</u>	111
Espectro 92: Espectro de IV do <i>tert</i> -butil-triazol <u>6j</u>	113
Espectro 93: Espectro de massas do <i>tert</i> -butil-triazol <u>6j</u>	114
Espectro 94: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do <i>tert</i> -butil-triazol <u>6j</u>	114
Espectro 95: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do <i>tert</i> -butil-triazol <u>6j</u>	115
Espectro 96: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do <i>tert</i> -butil-triazol <u>6j</u>	115
Espectro 97: Espectro de IV do 4-tiometilfenil-triazol <u>6k</u>	117
Espectro 98: Espectro de massas do 4-tiometilfenil-triazol <u>6k</u>	118
Espectro 99: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do 4-tiometilfenil-triazol <u>6k</u>	118
Espectro 100: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do 4-tiometilfenil-triazol <u>6k</u>	119
Espectro 101: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do 4-tiometilfenil-triazol <u>6k</u>	119
Espectro 102: Espectro de IV do 3-metoxifenil-triazol <u>6l</u>	121
Espectro 103: Espectro de massas do 3-metoxifenil-triazol <u>6l</u>	122
Espectro 104: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do 3-metoxifenil-triazol <u>6l</u>	122
Espectro 105: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do 3-metoxifenil-triazol <u>6l</u>	123
Espectro 106: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do 3-metoxifenil-triazol <u>6l</u>	123
Espectro 107: Espectro de IV do 4-trifluormetilfenil-triazol <u>6m</u>	125

Espectro 108: Espectro de massas do 4-trifluormetilfenil-triazol <u>6m</u>	126
Espectro 109: Espectro de massas de alta resolução (ES+) do 4-trifluormetilfenil-triazol <u>6m</u>	126
Espectro 110: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do 4-trifluormetilfenil-triazol <u>6m</u>	127
Espectro 111: Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do 4-trifluormetilfenil-triazol <u>6m</u>	127

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Proposta biossintética para a formação da piperina.....	5
Esquema 2: Metodologia utilizada para formação dos 1,2,4-triazóis.....	23
Esquema 3: Reação de formação dos derivados 1,2,4-triazóis.....	23
Esquema 4: Síntese de 4-amino-1,2,4-triazóis.....	24
Esquema 5: Reação de preparação do ácido piperínico.....	32
Esquema 6: Reação de preparação do cloreto do ácido 5-(3,4- metilenodioxifenil)-2 <i>E</i> , 4 <i>E</i> -pentadienóico.....	32
Esquema 7: Reação de preparação da (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienohidrazida.....	33
Esquema 8: Reação de preparação da <i>N</i> -metilidrazinacarbotoamida	37
Esquema 9: Reação de preparação da <i>N</i> -etilidrazinacarbotoamida.....	40
Esquema 10: Reação de preparação da <i>N</i> -isopropilidrazinacarbotoamida 5c	43
Esquema 11: Reação de preparação da <i>N</i> -butilidrazinacarbotoamida 5d	46
Esquema 12: Reação de preparação da <i>N</i> -hexilidrazinacarbotoamida 5e	49
Esquema 13: Reação de preparação da <i>N</i> -cicloexilidrazinacarbotoamida 5f	52
Esquema 14: Reação de preparação da <i>N</i> -fenilidrazinacarbotoamida 5g	55
Esquema 15: Reação de preparação da <i>N</i> -benzilidrazinacarbotoamida 5h	58
Esquema 16: Reação de preparação da <i>N</i> -trimetóxfenilidrazinacarbotoamida 5i	61
Esquema 17: Reação de preparação da <i>N</i> - <i>tert</i> -butilidrazinacarbotoamida 5j	64
Esquema 18: Reação de preparação da <i>N</i> - 4-tiometilfenilidrazinacarbotoamida 5k	67
Esquema 19: Reação de preparação da <i>N</i> -3-metoxifenilidrazinacarbotoamida 5l	70
Esquema 20: Reação de preparação da <i>N</i> -4-trifluormetilfenilidrazinacarbotoamida.....	73
Esquema 21: Reação de preparação do metil-triazol 6a	77
Esquema 22: Reação de preparação do etil-triazol 6b	81
Esquema 23: Reação de preparação do isopropil-triazol 6c	85
Esquema 24: Reação de preparação do butil-triazol 6d	89
Esquema 25: Reação de preparação do hexil-triazol 6e	93
Esquema 26: Reação de preparação do cicloexil-triazol 6f	97
Esquema 27: Reação de preparação do fenil-triazol 6g	101
Esquema 28: Reação de preparação do benzil-triazol 6h	105
Esquema 29: Reação de preparação do trimetoxifenil-triazol 6i	109
Esquema 30: Reação de preparação do <i>tert</i> -butil-triazol 6j	113
Esquema 31: Reação de preparação do 4-tiometilfenil-triazol 6k	117
Esquema 32: Reação de preparação do 3-metoxifenil-triazol 6l	121

Esquema 33: Reação de preparação do 4-trifluormetilfenil-triazol 6m	125
Esquema 34: Análise retrossintética para a preparação dos derivados triazólicos 6a-6m	140
Esquema 35: Proposta de fragmentação para a piperina 1	143
Esquema 36: Hidrólise básica da piperina. Obtenção do ácido piperínico (2).....	144
Esquema 37: Síntese do cloreto de acila (3) e da hidrazida (4).....	145
Esquema 38: Proposta mecanística para a formação de cloretos de acila em presença de cloreto de oxalila.....	146
Esquema 39: Síntese dos intermediários carbotioamidas (5).....	148
Esquema 40: Metodologia utilizada por Mavrova para a formação dos 1,2,4-triazóis.....	149
Esquema 41: Mecanismo proposto para obtenção dos intermediários carbotioamidas.....	150
Esquema 42: Mecanismo proposto para obtenção dos derivados triazólicos.....	156
Esquema 43: Proposta de fragmentação para o composto etil-triazol.....	158
Esquema 44: Proposta de fragmentação para o composto 4-tiometilfenil-triazol.....	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas das atividades biológicas da piperina.....	3
Tabela 2: Deslocamento químico de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a piperina 1	31
Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para 4	35
Tabela 4: Massa gerada, rendimento e ponto de fusão para os intermediários sintetizados.....	36
Tabela 5: Deslocamento químico de RMN ^1H e RMN ^{13}C para 5a	39
Tabela 6: Deslocamento químico de RMN ^1H e RMN ^{13}C para 5b	42
Tabela 7: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5c	45
Tabela 8: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5d	48
Tabela 9: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5e	51
Tabela 10: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5f	54
Tabela 11: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5g	57
Tabela 12: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5h	60
Tabela 13: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5i	63
Tabela 14: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5j	66
Tabela 15: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5k	69
Tabela 16: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5l	72
Tabela 17: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5m	75
Tabela 18: Massa gerada, rendimento e ponto de fusão para os triazóis sintetizados.....	76
Tabela 19: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6a	80
Tabela 20: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6b	84
Tabela 21: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6c	88
Tabela 22: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6d	92
Tabela 23: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6e	96
Tabela 24: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6f	100
Tabela 25: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6g	104
Tabela 26: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6h	108
Tabela 27: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6i	112
Tabela 28: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6j	116
Tabela 29: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6k	120
Tabela 30: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6l	124
Tabela 31: Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6m	128
Tabela 31: Algumas absorções na região do infravermelho (IV) dos intermediários carbotoamidas obtidos (5a-5m).....	153

Tabela 32: Deslocamentos químicos de RMN ^1H dos intermediários carbotoioamidas obtidos (5a-5m).....	154
Tabela 33: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C dos intermediários carbotoioamidas obtidos (5a-5m).....	155
Tabela 34: Algumas absorções na região do infravermelho (IV) dos compostos triazólicos obtidos (6a-6m).....	160
Tabela 35: Deslocamentos químicos de RMN ^1H dos compostos triazólicos obtidos (6a-6m).....	161
Tabela 36: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C dos compostos triazólicos obtidos (6a-6m).....	162
Tabela 37: Efeito tóxico dos novos triazóis (6a-6m) em formas proliferativas do <i>T. cruzi</i>	164
Tabela 38: Resultados da viabilidade celular. Citotoxicidade (μM) para macrófagos murinos tratados com os triazóis mais ativos em epimastigota.....	165

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Piperina <u>1</u> , principal constituinte químico do <i>Piper nigrum</i>	1
Figura 2: Área de cultivo do <i>P.nigrum</i>	2
Figura 3: Estrutura da amida natural piperina <u>1</u>	4
Figura 4: Derivados e análogos da piperina, avaliados contra <i>L. amazonensis</i>	6
Figura 5: Derivados e análogos da piperina sintetizado.....	6
Figura 6: Estrutura dos derivados mais ativos contra <i>L. amazonensis</i>	7
Figura 7: Análogos naturais da piperina, piperilina <u>33</u> e 4,5-diidropiperilina <u>34</u> , isoladas de <i>P. arboreum</i>	8
Figura 8: Cloridratos mesoiônicos, derivados e análogos da piperina.....	9
Figura 9: Imagem do <i>Trypanosoma cruzi</i> em microscopia eletrônica.....	10
Figura 10: Imagem do barbeiro, vetor da doença de Chagas.....	11
Figura 11: Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
Figura 12: Mapa dos casos registrados da DCA entre o período de 2000 a 2011.....	13
Figura 13: Fármacos com atividade tripanocida, Nifurtimox e Benzonidazol.....	14
Figura 14: Alcalóides com atividade anti - <i>T. cruzi</i> e do cetoconazol.....	16
Figura 15: Sistema de anel heterocíclico triazol.....	17
Figura 16: Primeiro composto 1,2,4-triazólico sintetizado por Blandin.....	17
Figura 17: Formas tautoméricas do composto 1,2,4-triazól-3-tiona.....	18
Figura 18: Produtos substituídos nas posições 4 e 5 contendo o 1,2,4-triazol.....	18
Figura 19: Estrutura química do Ribavirina.....	19
Figura 20: Composto 1,2,4-triazólico com atividade antimicrobiana.....	19
Figura 21: Protioconazol, antifúngico comercial, avaliado no tratamento de infecções com o fitopatógeno <i>Mycosphaerella graminicola</i>	20
Figura 22: Compostos azólicos, inibidores da biossíntese de ergosterol, testados no tratamento experimental da doença de Chagas.....	21
Figura 23: Derivados triazólicos preparados a partir da nor- β -lapachona e avaliados contra a forma tripomastigota do <i>T. cruzi</i>	22
Figura 24: Aparelhagem de Soxhlet.....	29
Figura 25: Estrutura cristalográfica da cruzaina do <i>T. cruzi</i> (PDB ID 1ME4) com inibidores de diferentes classes químicas.....	133
Figura 26: Representação esquemática da via da biossíntese de esteróis no <i>T. cruzi</i> e ação de azóis e outros inibidores representados pelas setas azuis.....	136
Figura 27: Inibidor azólico da farnesiltransferase, tipifarnib.....	137
Figura 28: Estrutura cristalográfica da CYP51 do <i>Trypanosoma cruzi</i> com o fluconazol ligado ao sítio catalítico da enzima.....	127

Figura 29: Estratégia no planejamento de novos híbridos piperina-triazol.....	138
Figura 30: Hipótese de como os triazóis age como bioisósteros não-clássicos de amida.	139
Figura 31: Frutos frescos (a) e moídos (b) de <i>P. nigrum</i> . Estrutura (c) e cristais (d) da amida natural piperina (1).....	141
Figura 32: Reator de micro-ondas utilizado para síntese orgânica em laboratório.....	144
Figura 33: Estrutura e espectro de RMN ¹³ C dos subprodutos gerados na reação de obtenção da hidrazida 4.....	147
Figura 34: Intermediários <u>5a-5m</u> obtidos a partir da hidrazida 4.....	151
Figura 35: Derivados triazólicos <u>6a-6m</u> sintetizados.....	157
Figura 37: Toxicidade das moléculas <u>6c-6f</u> e <u>6m</u> às formas amastigotas na concentração 5,0 µg.mL ⁻¹	166
Figura 38: Estudo da estabilidade da piperina por CLAE em pH 2,1; 7,0 e 8,0.....	169
Figura 39: Estudo da estabilidade do cicloexil-triazol por CLAE em pH 2,1; 7,0 e 8,0.....	170

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BHI = Infusão de cérebro e coração
CLAE-DAD = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
CCDA = Cromatografia de Camada Delgada Analítica
CG-EM = Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massas
CI₅₀ = Concentração Inibitória de 50%
d = duplete
dd = duplo duplete
DC = Doença de Chagas
DCA = Doença de Chagas Aguda
DCM = Diclorometano
DMSO = Dimetilsulfóxido
EM/IE = Espectrometria de Massas por Impacto de elétrons
EMAR/ES⁺ = Espectrometria de Massa de Alta Resolução com ionização por *Eletronspray* no modo positivo
Hz = Hertz
IBEs = Inibidores da Biossíntese do Ergosterol
IGF = Interconversão de Grupo Funcional
IV = InfraVermelho
J = constante de acoplamento
M⁺ = Íon Molecular
m = multiplete
m/z = razão massa-carga
PBS = Solução Tampão de Fosfato
Pf = Ponto de fusão
ppm = parte do milhão
q = quarteto
REA = Relação Estrutura-Atividade
RMN ¹H= Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C= Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
s = simpleto
sl = simpleto largo
SFB = Soro Fetal Bovino
SNAc = Substituição Nucleofílica Acílica
t = tripleto
t.a. = temperatura ambiente
TMS = Tetrametilsilano
δ = deslocamento químico
v = estiramento
μg = micrograma
μM = micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Piperina.....	1
1.2 Atividades biológicas da piperina.....	2
1.3 Biossíntese da piperina.....	4
1.4 Modificações estruturais na piperina.....	5
1.5 Doença de Chagas.....	9
1.5.1 Tratamento.....	14
1.5.2 Alcalóides ativos contra o <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.6 Triazóis.....	17
1.6.1 Atividades biológicas de compostos triazólicos.....	18
1.6.2 Atividade tripanocida de compostos triazólicos.....	20
1.6.3 Síntese de compostos possuindo o sistema 1,2,4-triazólico.....	23
2. JUSTIFICATIVAS	25
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Instrumentos utilizados nas caracterizações espectrométricas.....	27
4.2. Nas análises, sínteses e purificações.....	27
4.3. Outros equipamentos.....	28
4.4. Isolamento da 1-[(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]piperidine (piperina, <u>1</u>).....	28
4.5. Preparação do ácido (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienóico (ácido piperínico, <u>2</u>).....	32
4.6. Preparação do cloreto do ácido (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienóico (<u>3</u>).....	32
4.7. Preparação da (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dieno-hidrazida (<u>4</u>).....	33
4.8. Preparação dos derivados 2-[(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -alquil/aryl-hidrazinocarbotioamida (<u>5a-5m</u>).....	36
4.8.1. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -metil hidrazinocarbotioamida (<u>5a</u>).....	37
4.8.2. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -etil-hidrazinocarbotioamida (<u>5b</u>).....	38
4.8.3. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -isopropil-hidrazinocarbotioamida (<u>5c</u>).....	43

4.8.4. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -butilhidrazinacarbotioamida (5d).....	46
4.8.5. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -hexilhidrazinacarbotioamida (5e).....	49
4.8.6. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -cicloexilhidrazinacarbotioamida (5f).....	52
4.8.7. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -fenilhidrazinacarbotioamida (5g).....	54
4.8.8. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -benzilhidrazinacarbotioamida (5h).....	58
4.8.9. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -(3,4,5-trimetóxifenil)-hidrazinacarbotioamida (5i).....	61
4.8.10. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> - <i>tert</i> -butilhidrazinacarbotioamida (5j).....	64
4.8.11. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -(4-tiometilfenil)-hidrazinacarbotioamida (5k).....	67
4.8.12. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -(3-metóxifenil)-hidrazinacarbotioamida (5l).....	70
4.8.13. Preparação da [(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]- <i>N</i> -(4-triflúormetilfenil)-hidrazinacarbotioamida (5m).....	73
4.9. Preparação dos derivados triazólicos (2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona).....	76
4.9.1. Preparação do 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-metil-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (6a).....	77
4.9.2. Preparação do 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-etil-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (6b).....	81
4.9.3. Preparação do derivado 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-isopropil-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (6c).....	84
4.9.4. Preparação do derivado 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-butil-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (6d).....	89
4.9.5. Preparação do derivado 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-hexil-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (6e).....	93
4.9.6. Preparação do derivado 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-cicloexil-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (6f).....	97
4.9.7. Preparação do derivado 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-fenil-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (6g).....	101
4.9.8. Preparação do derivado 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-benzil-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (6h).....	104
4.9.9. Preparação do derivado 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (6i).....	109
4.9.10. Preparação do derivado 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4- <i>tert</i> -butil-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (6j).....	113

4.9.11.Preparação do 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-[4-(metiltiofenil)-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (<u>6K</u>).....	117
4.9.12.Preparação do 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-(3-metoxifenil)-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (<u>6l</u>).....	121
4.9.13.Preparação do 5-[(1 <i>E</i> ,3 <i>E</i>)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-[4-(trifluorometil)fenil]-2,4-diidro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-tiona (<u>6m</u>).....	125
4.10. Avaliação da atividade biológica.....	129
4.10.1 Parasitos.....	129
4.10.2 Atividade anti-epimastigotas.....	129
4.10.3 Citotoxicidade para macrófagos murinos.....	129
4.10.4 Atividade anti-amastigota.....	130
4.10.5 Análise estatística.....	130
4.10.6 Comitê de Ética.....	130
4.11. Avaliação da estabilidade dos triazóis em diferentes faixas de pH.....	131
4.11.1. Preparação dos tampões	131
4.11.1.1. Preparo da solução tampão de pH 2,1.....	131
4.11.1.2. Preparo da solução tampão de pH 7,00.....	131
4.11.1.3. Preparo da solução-tampão de pH 8,00.....	131
4.11.2 Preparo das soluções de pipedina <u>1</u> e do triazol <u>6f</u> para estudo de estabilidade.....	131
4.11.3 Análise por CLAE-DAD.....	131
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	133
5.1. Planejamento das moléculas triazólicas.....	133
5.2. Isolamento da piperina dos frutos secos de <i>Piper nigrum</i>	141
5.3. Preparação do ácido piperínico.....	143
5.4. Síntese da hidrazida.....	145
5.6. Síntese dos intermediários carbotioamidas e dos derivados triazólicos.....	148
5.7. Avaliações Biológicas: Atividade tripanocida.....	163
5.8. Avaliação da estabilidade da piperina <u>1</u> e do triazol <u>6f</u> em diferentes faixas de pH.....	167
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	170
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	171
ANEXOS.....	183

1. INTRODUÇÃO

1.1. Piperina

Ao se imaginar a utilização de produtos naturais como fármacos, ou mesmo como matéria prima para a preparação destes, esbarra-se no fato da maioria dos metabólitos especiais de origem vegetal serem biossintetizados em pequenas quantidades, serem de difícil isolamento, ou ainda, por não serem obtidos de fontes renováveis. Em relação a estas características, a amida natural piperina **1** é uma exceção dentre os metabólitos especiais de origem vegetal. Esta amida (**Figura 1**) está presente em diferentes espécies do gênero *Piper*, sendo mais abundante nos frutos de *Piper nigrum* (SEMLER & GROSS, 1988). Conhecida popularmente no Brasil como pimenta do reino, *P. nigrum* 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. A composição química da pimenta do reino vem motivando estudos científicos há quase duzentos anos, uma vez que o primeiro trabalho descrevendo o isolamento da piperina dos frutos de *P. nigrum* foi descrito em 1819 pelo químico e físico dinamarquês Hans Christian Oersted (ZACHARIAH, 2008). Posteriormente, foi realizada a determinação estrutural desta amida natural, como sendo a *N*-[5-(1,3-benzodioxola-4-il-1-oxo-penta-2E,4E-dienil)-piperidina] (**1**) (SEMLER & GROSS, 1988).

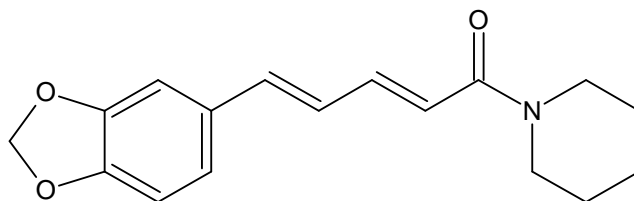


Figura 1. Piperina**1**, principal constituinte químico do *Piper nigrum*.

Acredita-se que a pimenta teve um papel importante na história mundial. O interesse dos exploradores por esta planta era devido à sua importância econômica, devido à sua aplicação como condimento, dando sabores exóticos aos seus pratos. Além disso, a pimenta e a piperina têm mais utilidades do que simplesmente dar sabor. A piperina possui diferentes possibilidades de aplicação, desde pesticidas a tratamentos médicos (SEMLER & GROSS, 1988).

A piperina apresenta caráter lipofílico e possui diversas atividades farmacológicas, como anti-inflamatória, antifertilidade e estimuladora da biossíntese de serotonina no sistema nervoso central, além de ser utilizada como inseticida. Outras amidas, em menores concentrações, foram posteriormente isoladas da pimenta do reino, mas atribui-se principalmente à piperina o sabor pungente deste condimento (SEMLER & GROSS, 1988; ZACHARIAH, 2008). Apesar de ser considerada uma planta exótica, o Brasil é um dos grandes produtores mundiais de pimenta do reino, com um total de 35.120 toneladas, colhidas em cerca de 20.000 hectares de área cultivada no ano de 2006. Destaca-se como principal produtor o estado do Pará (78%), seguido pelo Espírito Santo (16%). 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 à 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 colheitas sem comprometer a planta. A colheita é feita em três épocas: a primeira no mês de junho, a

segunda em torno do mês de agosto, e a terceira e última colheita ocorre em outubro (EMBRAPA, 2011). Dentre as espécies do gênero *Piper*, a pimenta do reino (*P. nigrum*) é a mais conhecida devido ao seu sabor e aroma incomparáveis, principais características responsáveis por sua importância econômica. A **Figura 2** apresenta uma área de cultivo da pimenta do reino para fins comerciais.



Figura 2. Área de cultivo do *P. nigrum*.

(<http://www.es.gov.br/Noticias/154762/pimentadoreino-supera-produtos-tradicionais-em-exportacoes.htm>)

Outro aspecto importante que podemos citar sobre a piperina é sua característica como estimulante natural e que intervêm na absorção de selênio, vitamina B e β -caroteno. Esta amida natural tem sido utilizada no tratamento de atletas e idosos cuja capacidade de absorver nutrientes é deficiente (SEMLER & GROSS, 1988).

1.2. Atividades biológicas da piperina

A piperina possui um variado perfil de atividades biológicas, como as descritas na **Tabela 1**. Somando a isso, a piperina possui algumas características essenciais para utilização como molécula protótipo e/ou precursora para o desenvolvimento de novos fármacos. Alguns desses requisitos são: ser abundante, por ser obtida de uma fonte renovável; possuir um isolamento simples; ter variadas atividades biológicas comprovadas; além de possuir funcionalidades possíveis de sofrerem diversas manipulações sintéticas. Como a piperina é a piperamida que ocorre em maior proporção na planta, esta se tornou o principal alvo de avaliações biológicas (PARMAR *et al.*, 1997; SRINIVASAN, 2007).

Tabela 1. Algumas das atividades biológicas da piperina

Atividades Biológicas	Referências
Amebicida	Ghosal, 1996; Marques <i>et al.</i> , 2010
Anticonvulsivante	Perdersenet <i>et al.</i> , 2009
Antidepressiva	Lee <i>et al.</i> , 2005; Mao <i>et al.</i> , 2011
Antifúngica	Marques <i>et al.</i> , 2010
Antiinflamatória	Bae <i>et al.</i> , 2010; Bang <i>et al.</i> , 2009
Antitumoral	Sunila, 2004; Rao <i>et al.</i> , 2010
Antimalárica*	Martinelli <i>et al.</i> , 2008
Hepatoprotetor	Matsuda <i>et al.</i> , 2009; Chandrasekhar <i>et al.</i> , 2008
Inseticida	Romão <i>et al.</i> , 2008; Barbieri-Junior <i>et al.</i> , 2007; De Paula <i>et al.</i> , 2000
Inibição da resistência bacteriana	Sangwan <i>et al.</i> , 2008
Leishmanicida	Kapil, 1993; Raay <i>et al.</i> , 1999; Veerareddy <i>et al.</i> , 2004; Singh <i>et al.</i> , 2010
Protetor do SNC**	Chonpathompikunlert <i>et al.</i> , 2010
Regulador do metabolismo lipídico	Kim <i>et al.</i> , 2011
Tripanocida	Ribeiro, 2004; Ribeiro <i>et al.</i> , 2004; Ferreira, 2006; Ferreira <i>et al.</i> , 2008; Freire-de-Lima <i>et al.</i> , 2008

*Em associação com outros fármacos **Sistema Nervoso Central

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).

Desde tempos remotos, a pimenta do reino já era empregada no tratamento de epilepsia na China (D'HOOGER *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 1984). Em pesquisa realizada por Liu e colaboradores, a piperina foi capaz de induzir a síntese da serotonina prevenindo assim 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 relata 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 gastrointestinal, facilitando a absorção dos fármacos (JOHRI *et al.*, 1992);
- Influência na glicuronidação (fase 2 do metabolismo e etapa mais importante na biotransformação de compostos xenobióticos) (REEN *et al.*, 1993; ATAL *et al.*, 1981);

- Atuação sobre enzimas hepáticas metabolizantes (ATAL *et al.*, 1985; ATAL *et al.*, 1981), monooxigenases hepáticas, dependentes de citocromo P450 (KOUL *et al.*, 2000; REEN, 1997; BHAT & CHANDRASEKHATA, 1987).

A maior vantagem relatada nos trabalhos sobre o aumento da biodisponibilidade de fármacos pela piperina é a possibilidade de utilização de uma rota alternativa de administração de medicamentos (via oral), evitando assim a via parenteral que é mais dolorosa e invasiva. Outro fato extremamente relevante, principalmente no caso de fármacos que possuem toxicidades elevadas, é que a sua co-administração com piperina pode viabilizar o uso de doses menores, minimizando os efeitos colaterais (BANO *et al.*, 1991, ATAL *et al.*, 1981, SHOBA *et al.*, 1998).

1.3. Biossíntese da piperina

A piperina (**1**) é composta por um grupo 1,3-benzodioxola (subunidade A), ao lado de uma cadeia de ácido pentadienóico (subunidade B) e o fragmento piperidina (subunidade C) (**Figura 3**).

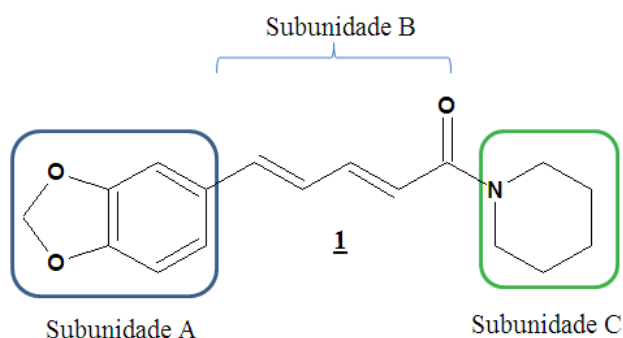
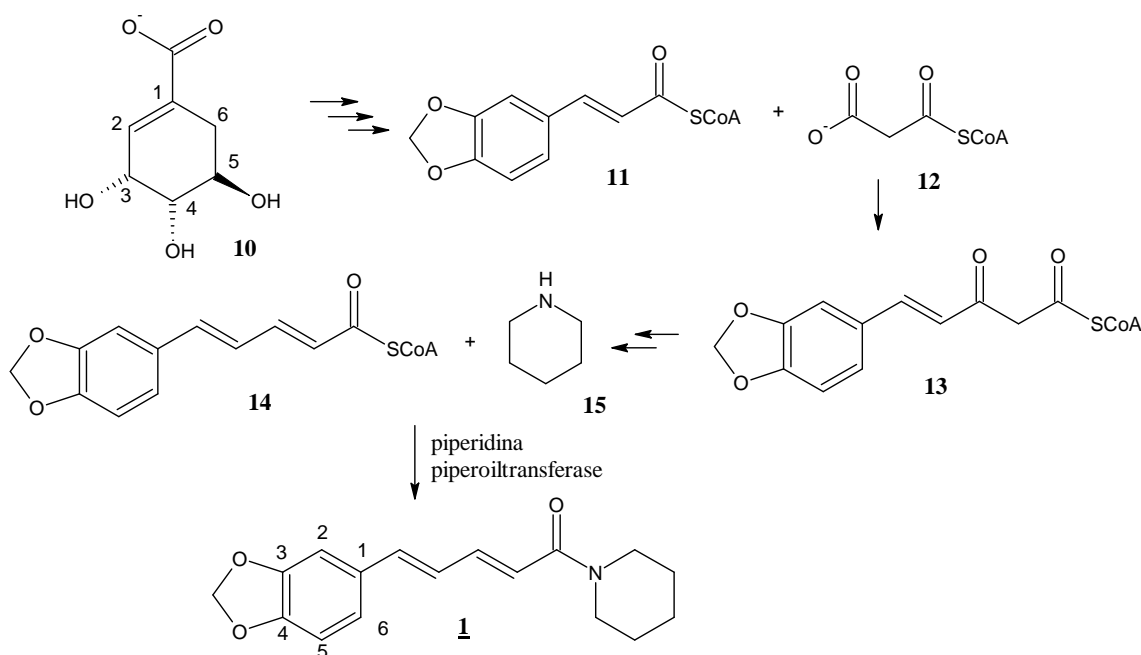


Figura 3. Estrutura da amida natural piperina **1**.

O ácido pipérico, porção acila da molécula da piperina (subunidades A e B, **Figura 3**), tem como precursor o respectivo derivado cinamoil-SCoA (**11**) (**Esquema 1**), o qual é biossintetizado a partir do ácido chiquímico (**10**), podendo apresentar diferentes padrões de oxigenação no anel aromático (nos carbonos 3, 4 e 5), sendo que o anel 3,4-metilenodioxí é bastante comum na classe dos fenilpropanoides (C₆-C₃). Após reação do derivado cinamoil-SCoA (**11**) com uma unidade de malonil-SCoA (**12**), seguida da redução da enona (**13**) e de uma β-eliminação, obtem-se o tioéster piperoil-SCoA (**14**), que reage com piperidina (**15**), formando a piperina (**1**) (DEWICK, 2001; GEISLER & GROSS, 1990). Desde o início dos estudos biossintéticos da piperina, foi proposto que sua formação dava-se por condensação da piperidina (**15**) com o tioéster piperoil-SCoA (**14**) (**Esquema 1**). Geissman e Crout, na década de 70, propuseram uma rota biossintética para a piperina, que somente pode ser confirmada após a descoberta da enzima piperidina piperoiltransferase (GEISSMAN & CROUT, 1969). Esta enzima mostrou-se específica para piperidina, alcançando 100% de atividade relativa (GEISLER & GROSS, 1990; FERREIRA *et al.*, 2012).



Esquema 1. Proposta biossintética para a formação da piperina (GEISLER & GROSS,1990; GEISSMAN & CROUT, 1969).

1.4. Modificações estruturais na piperina

Como já mostrado anteriormente, encontram-se na literatura vários trabalhos relacionados à piperina, referentes às diversas atividades biológicas desse produto natural. Além disso, alguns desses trabalhos também mostram o efeito de derivados e análogos da piperina, visando traçar um perfil de relação estrutura-atividade (REA) para os modelos estudados.

Em trabalho recente, realizado em nosso grupo de pesquisa, Ferreira e colaboradores avaliaram o efeito tóxico da piperina **1** e alguns de seus derivados e análogos (**Figura 4**) contra as formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis*. As avaliações destes derivados mostraram a importância da função piperamida (subunidade C, **Figura 3, página 4**) e da presença dos quatro carbonos olefínicos (subunidade B) do produto natural no efeito tóxico contra o parasito na forma amastigota. Além disso, observou-se que a presença do substituinte 3,4-metilenodioxí no núcleo aromático (subunidade A) foi irrelevante para o efeito antiparasitário observado. Do conjunto de moléculas avaliadas neste estudo (**1 e 2; 16 a 19**), a piperina (**1**) e o derivado fenilamida (**16**) apresentaram um melhor perfil de atividade. A piperina apresentou concentração inibitória para 50% (CI₅₀) de 14,2 µM contra promastigotas e CI₅₀ de 28 µM contra amastigotas de *L. amazonensis*. Já o derivado **16** apresentou valores de CI₅₀ de 28,9 µM e 24,5 µM contra promastigotas e amastigotas, respectivamente. Nestas avaliações foram usadas a anfotericina B e a miltefosina como controles positivos (FERREIRA *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2012).

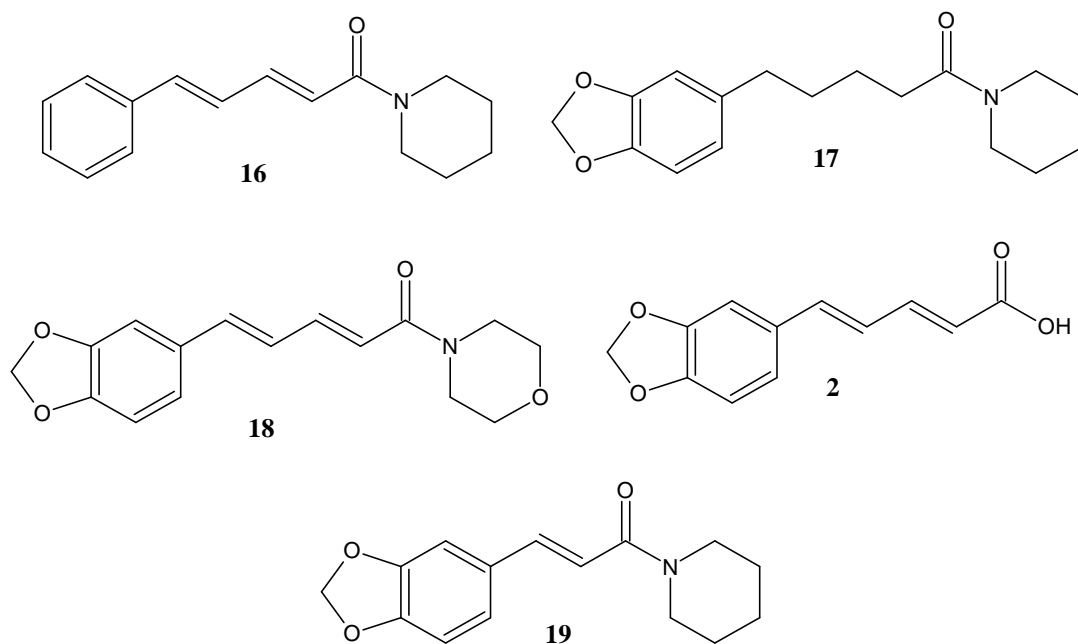


Figura 4. Derivados e análogos da piperina, avaliados contra *L. amazonensis* por Ferreira e colaboradores (FERREIRA *et al.*, 2011).

Tomando como ponto de partida os precedentes da literatura sobre a atividade leishmanicida da piperina, Ribeiro e colaboradores descreveram a atividade tripanocida da amida natural e com base nestes resultados propuseram a síntese de derivados e análogos (Figura 5), que foram testados frente às formas epimastigota e amastigota do *T. cruzi* (RIBEIRO, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2004). Este trabalho foi realizado em nosso grupo de pesquisa.

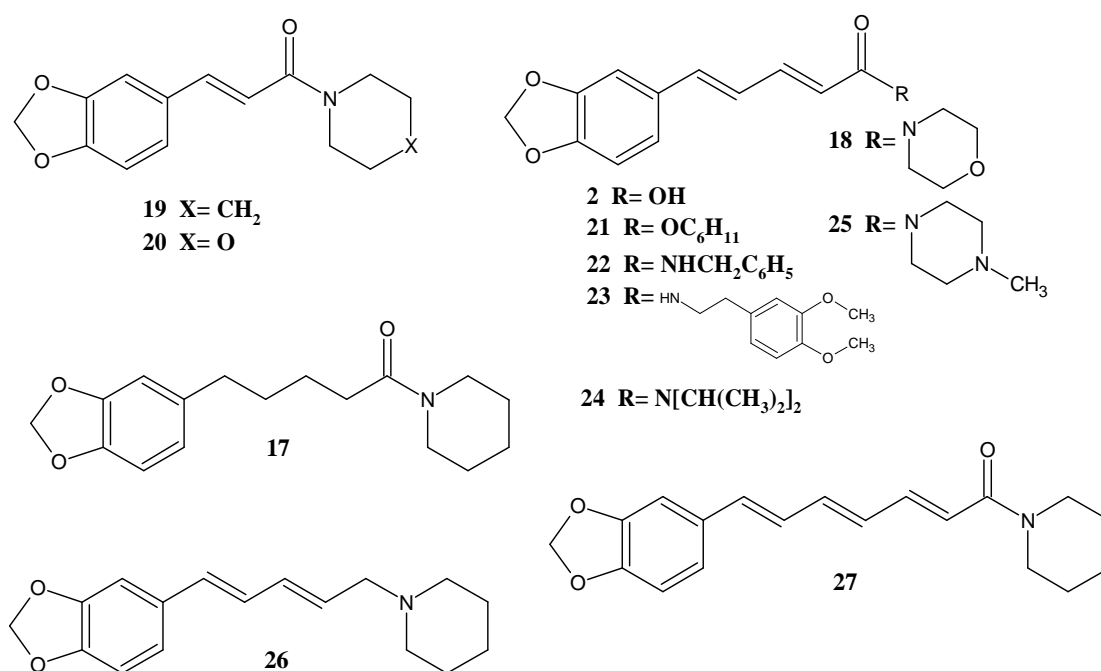


Figura 5. Derivados e análogos da piperina sintetizado por Ribeiro e colaboradores (RIBEIRO, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2004).

Na avaliação, realizada *in vitro*, a piperina **1** apresentou valores de CI_{50} de 7,36 μM e 4,91 μM frente às formas epimastigota e amastigota de *T. cruzi*, respectivamente. A síntese de derivados foi uma estratégia que teve como objetivo otimizar o efeito tripanocida da piperina, além de avaliar a importância de algumas subunidades estruturais presentes na amida natural para a atividade antiparasitária estudada. Neste estudo, apesar de não ter sido obtido nenhum derivado mais ativo do que a amida natural, várias informações de Relação Estrutura-Atividade (REA) foram evidenciadas como a presença da função nitrogenada que mostrou-se de significativa importância, uma vez que o ácido pipérico **2** ($CI_{50} > 114,67 \mu M$) e o éster **21** ($CI_{50} > 83,33 \mu M$) foram inativos, mesmo nas maiores concentrações avaliadas frente a epimastigotas do parasito (RIBEIRO, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2012).

Recentemente, Singh e colaboradores utilizaram a estratégia de hibridação molecular, preparando amidas da piperina com ésteres metílicos de aminoácidos naturais, visando avaliar suas atividades leishmanicidas (SINGH *et al.*, 2010). Esta estratégia se baseou na combinação das informações já descritas sobre as atividades leishmanicidas da amida natural **1** e de ésteres de aminoácidos e de dipeptídeos (RABINOVITCH, 1989). Os compostos desenhados por Singh foram sintetizados a partir da hidrólise da piperina e posterior reação do mesilato do ácido pipérico com ésteres metílicos de diferentes α -aminoácidos, gerando os derivados **28** a **32** apresentados na **Figura 6** (SINGH *et al.*, 2010).

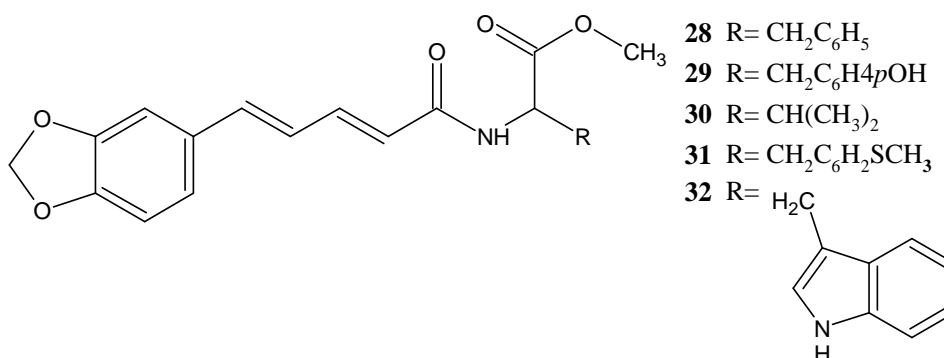


Figura 6. Estrutura dos derivados mais ativos contra *L. amazonensis*, preparados por Singh e colaboradores (SINGH *et al.*, 2010).

A atividade leishmanicida das amidas mostradas na **Figura 6** foi avaliada *in vitro* sobre promastigotas e amastigotas de *L. donovani*. Todas as amidas apresentaram maior atividade quando comparadas a piperina ($CI_{50} = 752 \mu M$ contra amastigotas) ou aos ésteres metílicos de aminoácidos, quando avaliados isoladamente. O composto com melhor perfil de atividade anti-amastigota, dentre os derivados testados, foi a amida **30**, conjugado do ácido pipérico com o éster metílico do aminoácido valina, que apresentou CI_{50} de 75 μM . A amida **30** foi posteriormente avaliada num modelo de infecção *in vivo* em hamsters. Os resultados foram comparados com a miltefosina, usada como controle positivo ($CI_{50} = 18 \mu M$ e 33 μM frente a amastigotas e promastigotas, respectivamente) (SINGH *et al.*, 2010).

Em trabalho realizado por outro grupo de pesquisa, foi descrita a avaliação da atividade da piperina e de outras piperamidas naturais, isoladas de *Piper tuberculatum* e *Piper arboreum*, contra a forma epimastigota de *T. cruzi* (COTINGUIBA *et al.*, 2009; REGASINI *et al.*, 2009). Do conjunto de resultados descritos nestes trabalhos, destacam-se as atividades anti-epimastigota dos análogos naturais da piperina, piperilina **33** e 4,5-diidropiperilina **34**, isoladas das folhas de *P. arboreum* ($CI_{50} = 6,57 \mu M$ e 210 μM , respectivamente)

demonstrados na **Figura 7**. Estes resultados demonstraram a importância da conjugação entre o núcleo benzodioxola e a carbonila amídica para a atividade tripanocida, uma vez que em **34** esta extensão de conjugação foi perdida. Contudo, outros fatores, como a maior liberdade conformacional presente em **34**, podem interferir na diferença de atividade entre estes derivados (REGASINI *et al.*, 2009).

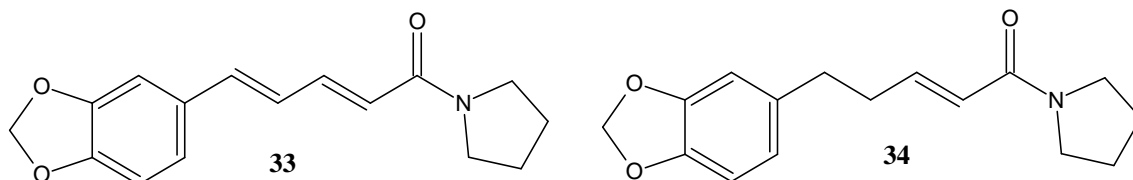


Figura 7. Análogos naturais da piperina, piperilina **33** e 4,5-dihdropiperilina **34**, isoladas de *P. arboreum* (REGASINI *et al.*, 2009).

Utilizando a estratégia de hibridação molecular, Ferreira e colaboradores sintetizaram em nosso grupo de pesquisa uma série de derivados e análogos da piperina com a incorporação de heterocíclis mesoiônicos, da classe dos cloridratos 1,3,4-tiadiazolio-2-fenilamina representados na **Figura 8** (FERREIRA, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008). Já havia na literatura informações sobre atividade tóxica contra *L. amazonensis* de moléculas contendo este núcleo heterocíclico. Desta forma, a estratégia de desenho molecular utilizada se baseou na junção das informações sobre a atividade antiparasitária da piperina e a atividade leishmanicida descrita para cloridratos 1,3,4-tiadiazolio-2-fenilamina (SILVA *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2012).

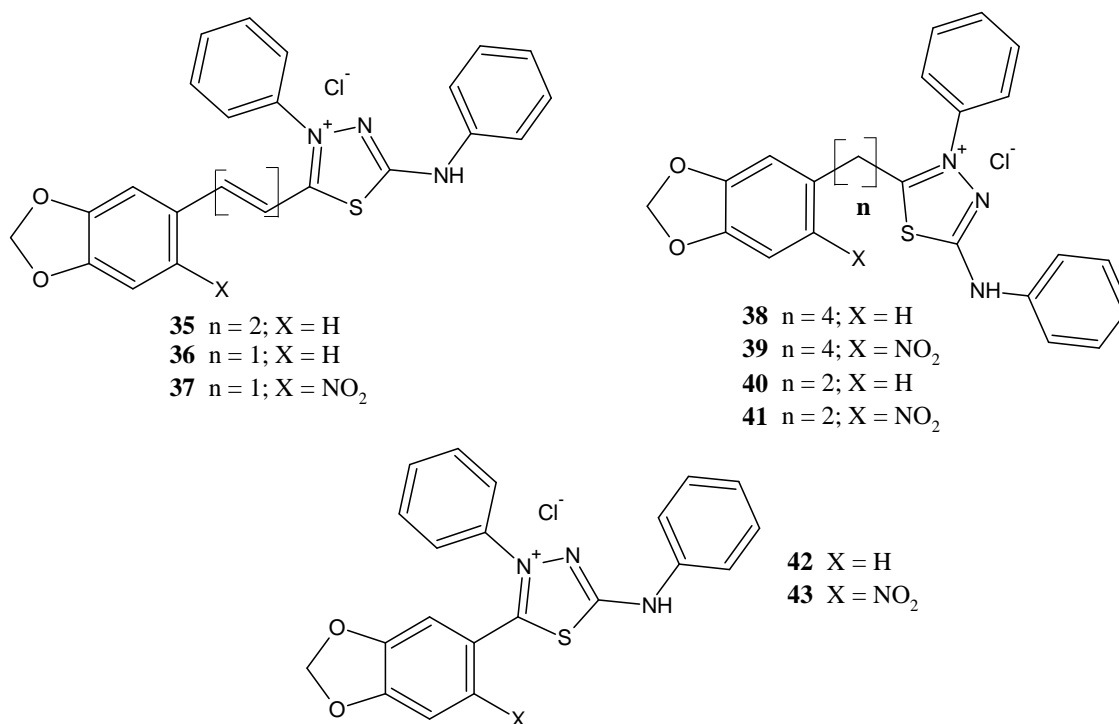


Figura 8. Cloridratos mesoiônicos, derivados e análogos da piperina (FERREIRA, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008).

A avaliação da atividade tripanocida dos derivados e análogos do produto natural, segundo Ferreira e colaboradores, demonstrou a importância da conjugação entre o anel benzodioxola e o heterociclo mesoiônico, implementada pelas cadeias espaçadoras insaturadas presentes nos derivados **35**, **36** e **37**, com respectivos valores de CI_{50} de 10,83 μM , 4,13 μM e 0,64 μM contra epimastigotas do *T. cruzi*. Dentre os derivados e análogos preparados por Ferreira, o mesoiônico **35** foi o que apresentou menor efeito citotóxico em macrófagos murinos ($CI_{50} = 38,56 \mu M$), demonstrando assim maior seletividade. Devido ao seu perfil de atividade, o derivado **35** foi avaliado contra tripomastigotas sanguíneos ($CI_{50} = 6,7 \mu M$) e amastigotas intracelulares ($CI_{50} = 1,35 \mu M$). Um resultado interessante observado neste trabalho foi a maior eficiência e a menor toxicidade do derivado **39**, quando comparado ao benzonidazol e ao seu precursor, a amida natural **1**. Além disso, o derivado **35** diminuiu a parasitemia de camundongos infectados a níveis indetectáveis, aumentando a sobrevivência dos animais tratados, quando comparados ao benzonidazol, que foi utilizado como fármaco de referência (FERREIRA, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008).

1.5. Doença de Chagas

A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase americana, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (**Figura 9**) é uma doença crônica que até o momento não conta com tratamento quimioterápico completamente eficaz e sem efeitos colaterais. O protozoário apresenta um ciclo de vida complexo e é capaz de infectar um grande número de vertebrados. O parasito se encontra sob duas formas nos hospedeiros vertebrados, a forma tripomastigota, flagelada e infectante; e a forma amastigota, que não possui flagelo livre e se replica no interior das células. É considerada uma das enfermidades humanas mais relacionadas com o subdesenvolvimento e a pobreza, o que torna crítica a situação de milhões de pacientes chagásicos (MOTA *et al.*, 2006).



Figura 9. Imagem do *Trypanosoma cruzi* em microscopia eletrônica (<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>).

Estima-se que aproximadamente 15 milhões de pessoas estejam infectadas na América Latina (WHO, 2002). Já no Brasil, existem hoje aproximadamente dois milhões de pacientes crônicos portadores da doença de Chagas. Destes, seiscentos mil desenvolvem complicações cardíacas ou digestivas que matam cerca de cinco mil pessoas a cada ano (RASSI-JUNIO *et al.*, 2010). Segundo dados do DNDi - América Latina (<http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>), cerca de 8 milhões de casos confirmados no

Continente Americano, com um total de 14.000 mortes e 667.000 DALYs (do inglês: Disability-Aadjusted Life Year, http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/). A doença de Chagas crônica causa deficiências significativas e tem alto impacto social e econômico, incluindo desemprego e diminuição da capacidade produtiva. Somente no Brasil, mais de US\$ 1,3 bilhões em salários e produtividade industrial foram perdidos devido a trabalhadores com doença de Chagas.

Essa parasitose é bastante frequente em regiões tropicais, abrangendo todo o continente americano, e está presente principalmente em áreas rurais com níveis de saneamento precário. Contudo, devido a fluxos migratórios ocorridos nas últimas décadas, há relatos da ocorrência da doença de Chagas nos Estados Unidos, Canadá e em vários países da Europa (LEE *et al.*, 2013). Sua transmissão endêmica ao homem e a outros animais ocorre pelo inseto hematófago, o *Triatoma infestans* (Triatominae), popularmente conhecido como barbeiro (**Figura 10**), quando suas fezes e urina contaminadas entram em contato com o orifício da picada realizada pelo inseto. Desde a descoberta de todo o ciclo do parasito, descrita em 1909 por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909; FOTI *et al.*, 2009), ainda nenhum fármaco eficaz foi disponibilizado no mercado para a fase crônica da doença (FERREIRA *et al.*, 2012).



Figura 10. Imagem do barbeiro, vetor da doença de Chagas (<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1478&sid=32>).

O ciclo de vida do parasito, representado pela **Figura 11**, envolve obrigatoriamente a passagem por hospedeiros vertebrados (mamíferos, incluindo o homem) e muitos invertebrados (insetos da família *Ruduviidae*), em uma série de estágios. No momento do repasto sanguíneo estes insetos eliminam fezes e urina, e a picada provoca um prurido que leva o homem a coçar o local onde ocorreu a picada. Caso estes insetos estejam infectados pelo *T. cruzi*, as formas infectantes do parasito (tripomastigotas metacíclicas) estão contidas em suas dejeções e penetram no homem pelo orifício da picada, através do ato de coçar. A forma tripomastigota passa para o sangue, invade células hospedeiras e vai parasitar em diferentes órgãos, diferenciando-se na forma amastigota intracelular. Os parasitos após vários ciclos de replicação diferenciam-se na forma tripomastigota, e com o rompimento das células, são liberadas na corrente sanguínea do hospedeiro. A forma tripomastigota, presente no sangue do hospedeiro infectado, é ingerida por outro barbeiro e diferencia-se em epimastigota, forma não infectiva e replicativa, que no trato digestivo do inseto diferencia-se em tripomastigotas metacíclicas, reiniciando o ciclo (BRENER *et al.*, 2000).

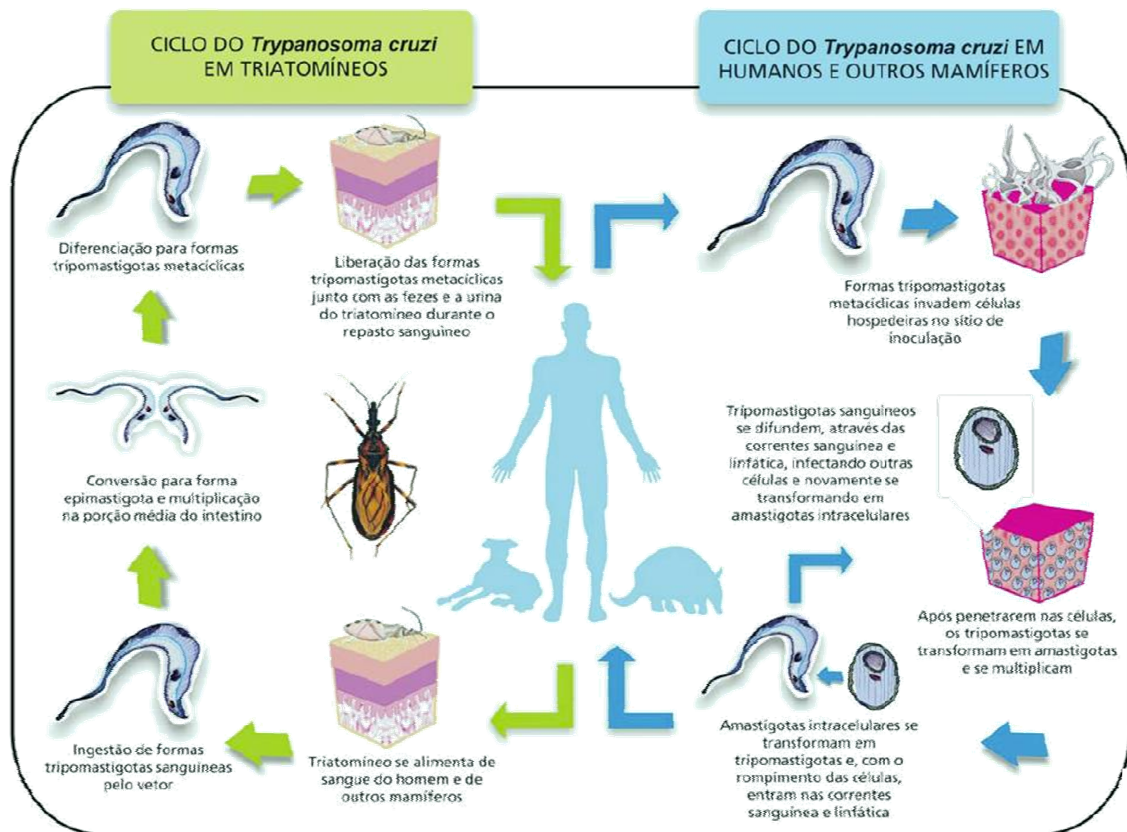


Figura 11. Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (http://jcascienciasdaterra.blogspot.com.br/2012_04_01_archive.html).

A doença de Chagas possui duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda, após o período de incubação, que geralmente é assintomático (de 1 semana a 1 mês), pode ocorrer febre, ínguas, inchaço do fígado e do baço, e vermelhidão pelo corpo (às vezes com sinal de Romaña ou chagoma de inoculação). A duração é curta para estes sintomas e nos casos mais graves pode levar à inflamação do coração, das camadas de proteção do cérebro (meningite) e do cérebro (encefalite). Os casos de óbitos nesta fase não são frequentes e quando ocorrem são decorrentes da inflamação do coração ou do cérebro. Mesmo que o hospedeiro não seja

submetido a um tratamento, a doença fica mais amena com o tempo e os sintomas desaparecem após algumas semanas ou meses, podendo não ser descoberta por anos ou até mesmo o resto da vida por muitos infectados. Nesta fase a detecção da doença de Chagas é bem mais difícil, pois a forma tripomastigota está bem menos presentes na circulação sanguínea. A forma de detecção se dá por testes laboratoriais, onde a presença de anticorpos contra o parasito ainda é elevada, confirmando assim a infecção (<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=94>).

A fase aguda pode evoluir para a fase crônica, que é a forma mais importante da doença de Chagas, pois leva a um comprometimento cardíaco grave, com o aparecimento de arritmias, diminuindo o bombeamento de sangue pelo coração, evoluindo para arritmias cardíacas fatais. Nesta fase, frequentemente, há o surgimento de uma miocardite crônica, fibrosante, com grande hipertrofia de miocardiócitos. O coração aumenta bastante o tamanho ao ponto de comprometer seu funcionamento, tornando-o assim inviável. Além dessas manifestações, pode ocorrer o aumento do esôfago e do intestino grosso, comprometendo a deglutição, contribuindo para o surgimento de engasgos e pneumonias por aspiração e constipação crônica e dor abdominal (<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=94>).

Existem outras formas habituais de transmissão da doença de Chagas para o homem além da vetorial: a transfusional, que é a segunda via mais importante de propagação da doença em centros urbanos, a transplacentária (congenita) e a transmissão pela via oral, que se dá pela ingestão de alimentos contaminados pelo *T. cruzi*. Outras vias de transmissão menos comuns são a adquirida através de acidente laboratorial, quando há manipulação inadequada de material contaminado e através do transplante de órgãos, quando o receptor recebe um órgão de doador infectado pelo *T. cruzi* (particularmente coração e rim) (BRENER *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, a ocorrência da doença de Chagas aguda (DCA) tem sido registrada em diferentes estados, em especial na região da Amazônia Legal (**Figura 12**) e estão relacionados à ingestão de alimentos contaminados, como caldo de cana, açaí e outros, e a transmissão por via vetorial. Entre o período de 2000 a 2011, foram registrados 1252 casos de doença de Chagas aguda no Brasil sendo que, 70% (877/ 1252) foram através da via oral, 7% (92/1252) por via vetorial e os demais não foram identificados a forma de transmissão (http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454).

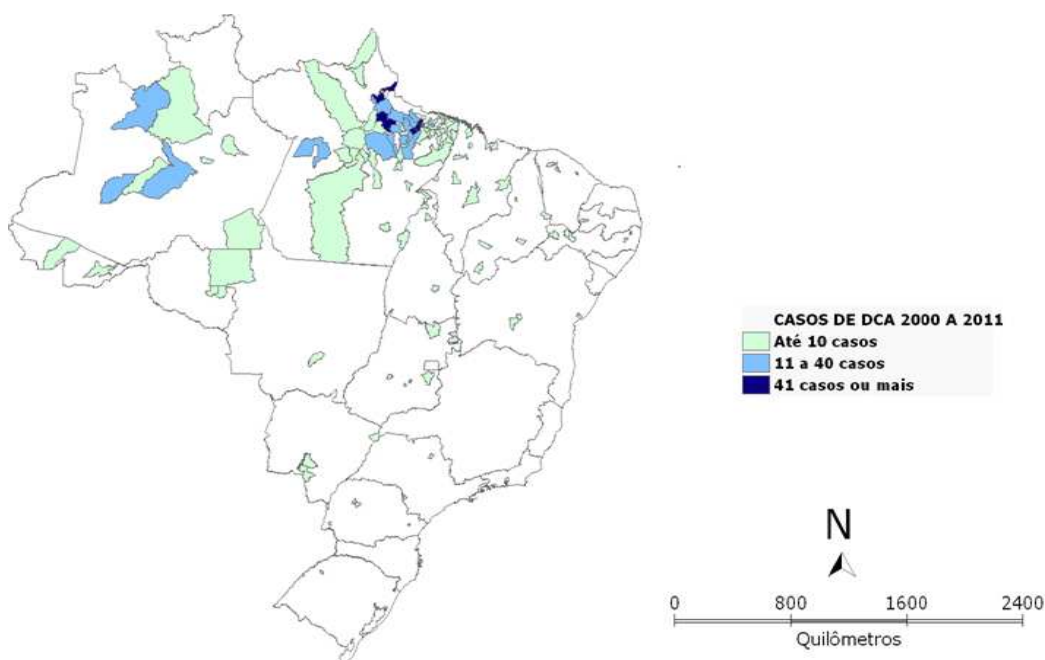


Figura 12. Mapa dos casos registrados da DCA entre o período de 2000 a 2011 (http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454).

1.5.1. Tratamento

A disponibilidade de fármacos aplicáveis ao tratamento da DC, na fase aguda, é extremamente restrita, havendo somente os nitro-heterocíclon benzonidazol e nifurtimox (**Figura 13**). Cabe ressaltar que estes fármacos já estão há quase meio século em uso, sem que outras alternativas tenham sido disponibilizadas.

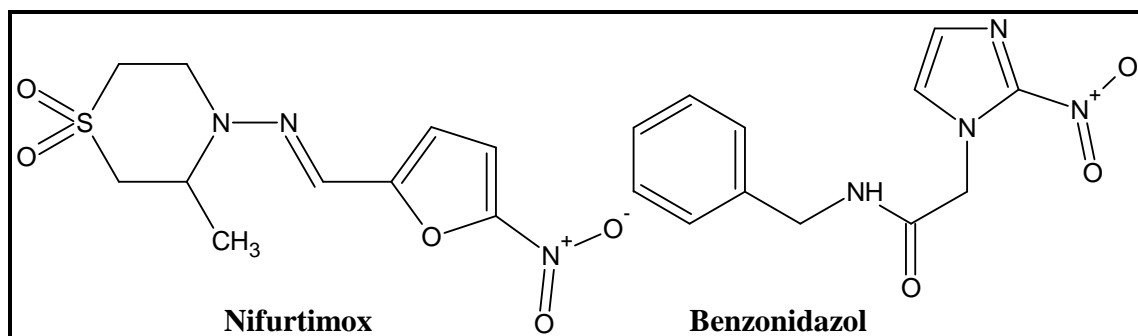


Figura 13. Fármacos com atividade tripanocida, Nifurtimox e Benzonidazol.

A partir de 1980, o nifurtimox teve a sua comercialização interrompida, primeiramente no Brasil e depois em outros países da América do Sul (Venezuela, Chile, Argentina), em razão de seus efeitos tóxicos (COURA & CASTRO, 2002). Atualmente, o benzonidazol é o único fármaco destinado ao tratamento desta doença no Brasil, mesmo não sendo eficiente em alguns estágios clínicos e apresentando sérios efeitos colaterais (GARCIA *et al.*, 2005).

As restrições para quanto ao uso desses fármacos no tratamento de pacientes chagásicos são as seguintes (<http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas/tratamentos-atuais.html>):

- Baixa eficácia na fase crônica da doença;
- Significativas variações regionais na eficácia, devido ao surgimento de resistência do *T. cruzi*;
- Alta taxa de abandono do tratamento devido aos efeitos colaterais causados pelos medicamentos;
- Longo período de tratamento (30 a 60 dias);
- Necessidade de monitoramento sob supervisão médica especial. Em países pobres, onde não é possível estabelecer programas de detecção em massa e o tratamento é muito caro, crianças com menos de 12 anos são normalmente as únicas a receberem tratamento. As crianças têm uma chance maior de se beneficiarem com o tratamento, por ser menos provável que desenvolvam lesões crônicas.

Observamos na literatura que diferentes alvos moleculares foram investigados visando o desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento da doença de Chagas (DIAS *et al.*, 2009). Nesta abordagem, a diversidade estrutural dos produtos naturais se coloca como uma alternativa na busca por novos antichagásicos. A revisão descrita por Uchiyama relaciona os trabalhos recentemente desenvolvidos na investigação de produtos naturais aplicáveis a quimioterapia da doença de Chagas, dentre os quais destacam-se os alcalóides (UCHIYAMA, 2009).

1.5.2. Alcalóides ativos contra o *Trypanosoma cruzi*

Diversos alcalóides com atividade anti-*T. cruzi* estão descritos na literatura (**Figura 14**) como a boldina, os quais apresentam seus mecanismos de ação relacionados com a inibição da respiração celular do parasito. Outro alcalóide que também apresentou alta atividade tripanocida foi a apomorfina (MORELLO *et al.*, 1994; COURA & DE CASTRO, 2002). Os alcalóides *bis*-benzilisquinolínicos, dafinolina e cefarantina foram estudados por Fournet e colaboradores, que evidenciaram suas atividades tripanocidas sobre a forma amastigota do *T. cruzi* (COURA & DE CASTRO, 2002; FOURNET *et al.*, 1998). Chataing e colaboradores avaliaram o efeito tóxico de glicoalcalóides contra *T. cruzi*, destacando a atividade da α -solamargina e a α -chaconina sobre formas epimastigota e tripomastigota do parasito (CHATAING *et al.*, 1998). Os resultados revelaram que ambos alcalóides apresentaram toxicidade mais alta que a droga utilizada como controle, o cetoconazol (COURA & DE CASTRO, 2002).

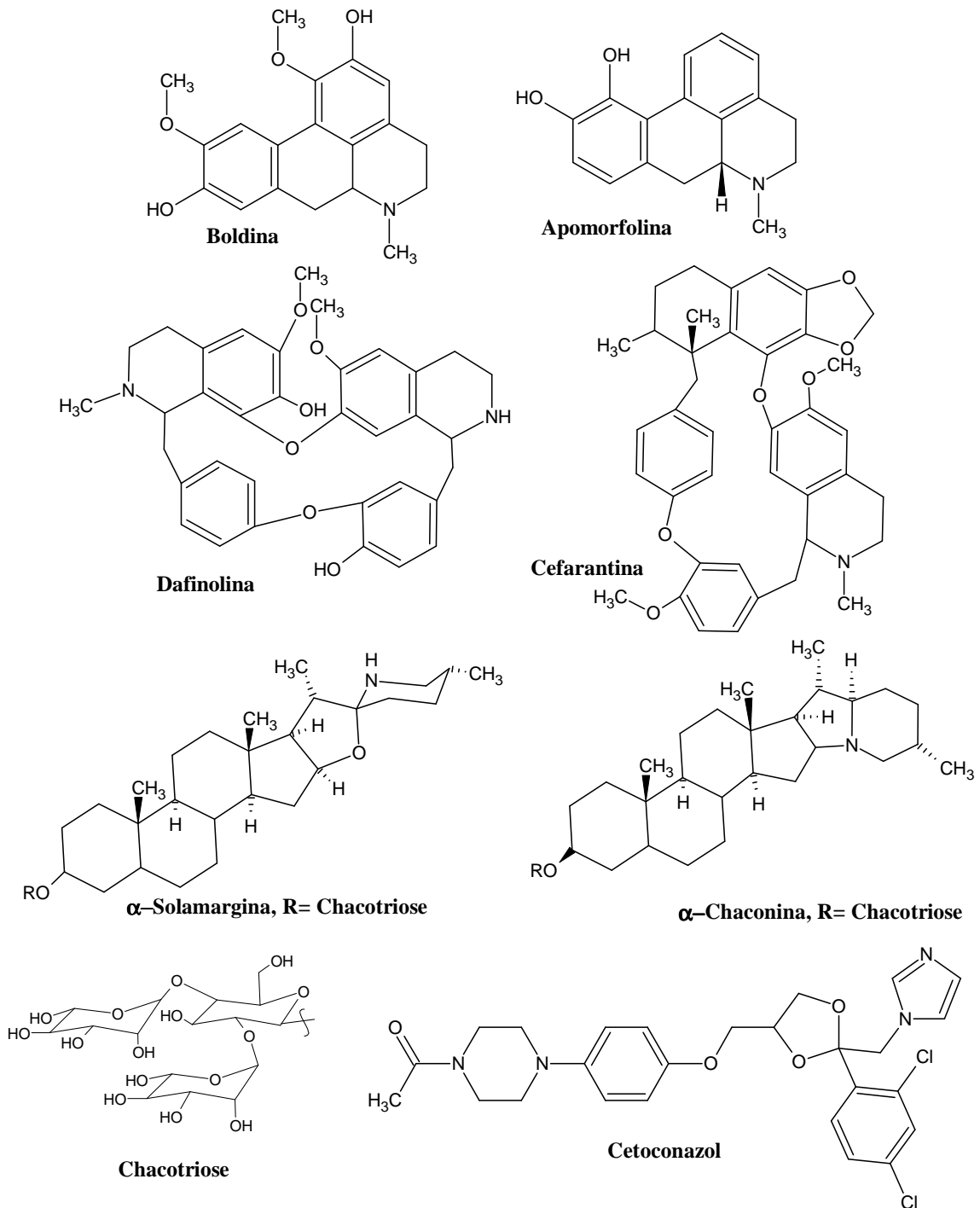


Figura 14. Alcalóides com atividade anti - *T. cruzi* e do cetoconazol (COURA & DE CASTRO, 2002).

1.6. Triazóis

Os fármacos usados na medicina humana possuem representantes das mais diferentes classes estruturais, mas na grande maioria deles (mais de 60%) encontramos núcleos heterocíclicos isolados ou mesmo fundidos (JOULE & MILLS, 2009). A presença de três heteroátomos de nitrogênio em sistemas de anéis de cinco membros define uma classe interessante de compostos heterocíclicos, os triazóis (**Figura 15**). Estes podem ser de dois tipos, 1,2,3-triazol ou ν -triazol (I) e 1,2,4-triazol ou δ -triazol (II). Os triazóis são pertencentes ao grupo dos azóis e são suficientemente apolares para se difundirem pelos tecidos infectados (POTTS, 1980).

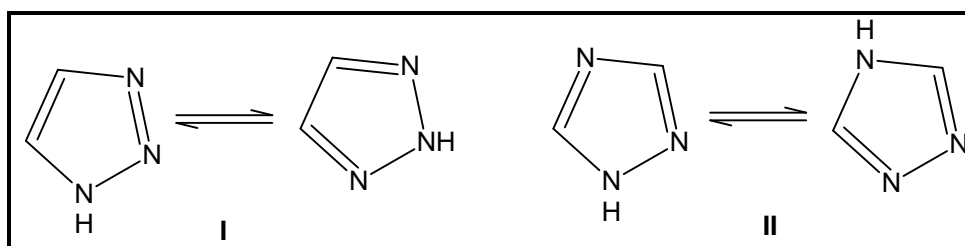


Figura 15. Sistema de anel heterocíclico triazol.

O nome triazol foi dado primeiramente por Blandin ao sistema de anel carbono-nitrogênio $C_2N_3H_3$. Após esta descoberta Blandin descreveu seus derivados em 1885. Este trabalho foi impulsionado pelo resultado de outro pesquisador, Fischer, que reagiu o cianogênio com a fenilidrazina originando o dicianofenilidrazina. A partir desta descoberta de Fischer, Blandin conseguiu sintetizar seu primeiro triazol (**Figura 16**) sendo então reconhecido por distinguir e estabelecer este sistema de anel (POTTS, 1980).

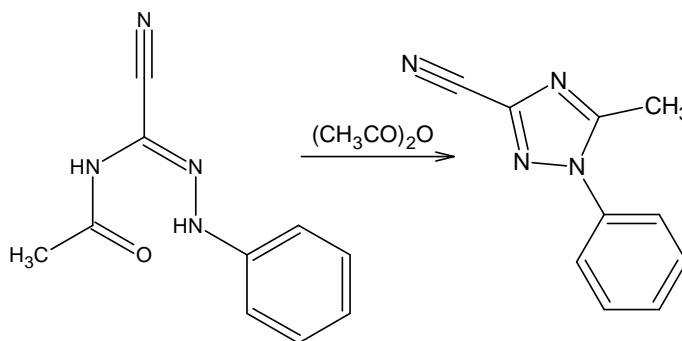


Figura 16. Primeiro composto 1,2,4-triazólico sintetizado por Blandin (POTTS, 1980).

A investigação da química dos 1,2,4-triazóis foi mais intensa após os trabalhos pioneiros dos investigadores, Andreocci e Bladin. A descoberta de que alguns triazóis foram capazes de inibir a formação de névoa em emulsões fotográficas e que outros foram eficazes como herbicidas e anti-convulsivantes, resultaram em uma crescente atenção para estes triazóis, particularmente pela indústria química, para sistemas de triazóis simples ou fundidos. Além disso, não há relatos sobre a descoberta destes sistemas triazólicos na natureza, sendo todos de origem sintética. Sendo assim, os primeiros métodos de preparação dos triazóis foram todos distinguidos por sua simplicidade e pelo seu baixo rendimento obtido (POTTS, 1980).

Dentro da classe dos heterocíclicos nitrogenados, o composto 1,2,4-triazól-3-tiona pode sofrer tautomerismo e existir nas estruturas tautoméricas tiona-tiol. Há três possibilidades, duas delas são as formas tiona (2-hidrotiona e 5-hidrotiona) e a terceira é a tiol como indicado na **Figura 17** (KHALIL, 2006).

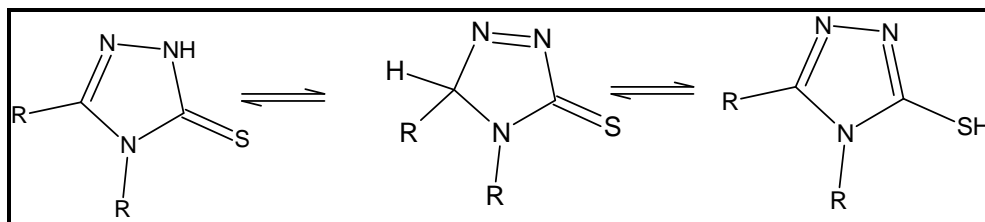


Figura 17. Formas tautoméricas do composto 1,2,4-triazól-3-tiona (KHALIL, 2006).

1.6.1. Atividades biológicas de compostos triazólicos

Os triazóis e seus derivados têm sido apresentados como agentes bactericidas, pesticidas e fungicidas eficientes. Os derivados 1,2,4-triazóis são conhecidos por exibirem atividade anti-inflamatória, anti-viral, anti-microbiana, analgésica, antidepressiva e anticonvulsivante (CANSIZ *et al.*, 2001; VAMVAKIDES, 1990). Produtos substituídos nas posições 4 e 5 contendo o 1,2,4-triazol (**Figura 18**) em sua molécula, mostram-se candidatos apropriados para posteriores modificações químicas e de interesse como compostos farmacologicamente ativos e ligantes úteis na química de coordenação (KAHN & MARTINEZ, 1998).

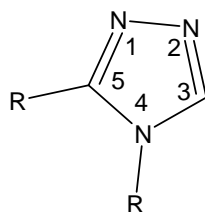


Figura 18. Produtos substituídos nas posições 4 e 5 contendo o 1,2,4-triazol (KAHN & MARTINEZ, 1998).

A síntese e a investigação da atividade biológica de glicosídeos 1,2,4-triazóis tem sido estimulada pela descoberta do Ribavirin (β -D-ribofuranosil-1,2,4-triazól-3-carboxamida) por sua atividade antiviral de amplo espectro, sendo útil contra vírus que possuem tanto *DNA* ou *RNA* como material genético. O Ribavirin foi desenvolvido, avaliado clinicamente e aprovado para o tratamento de viroses em humanos (**Figura 19**) (KHALIL, 2006).

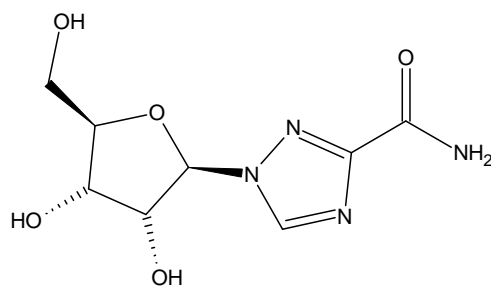


Figura 19. Estrutura química do Ribavirin.

Estimulado por estes resultados, Khalil sintetizou novos glicosídeos 1,2,4-triazóis para investigar sua atividade antibacteriana e antifúngica, e seus resultados mostraram-se promissores pois a maioria de seus derivados apresentaram atividade antimicrobiana sobre as formas *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium italicum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilise* e *Escherichia coli*. Na **Figura 20**, abaixo, encontra-se um dos compostos sintetizados que apresentou boa atividade antimicrobiana em testes com concentrações de 1; 2,5 e 5 mg/mL, com valores de inibição de 0,6-1cm através do método por difusão em Agar (KHALIL, 2006).

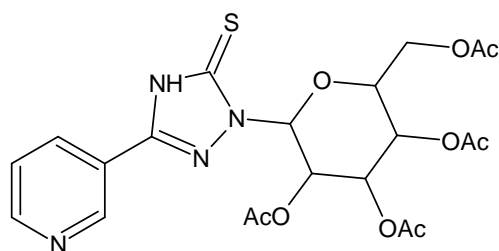


Figura 20. Composto 1,2,4-triazólico com atividade antimicrobiana (KHALIL, 2006).

O protioconazol, derivado da triazolinationa, é antifúngico comercialmente disponível e um dos mais importantes inibidores da 14α -desmetilase (CYP51) (**Figura 21**). Entretanto, informações mais concretas sobre o modo de ação deste triazol não se encontram disponíveis na literatura. Parker e colaboradores estudaram o efeito do protioconazol na composição de esteróis de *Mycosphaerella graminicola*, um fungo encontrado nas plantações de trigo, e realizaram o tratamento deste fungo com 5 μ g/mL de epoxiconazol, tebuconazol, triadimenol e protioconazol. Os resultados mostraram que todos os azóis inibiram a CYP51 da *Mycosphaerella graminicola* pois foi observado o acúmulo de lanosterol e eburicol e a diminuição de ergosterol nas células tratadas com estes azóis. Estes pesquisadores realizaram testes espectrofotométricos com estas substâncias em contato com o fungo e concluíram que o protioconazol age como um inibidor competitivo diferentemente dos outros azóis que são inibidores não competitivos. Sendo assim, esta pesquisa representou o primeiro estudo para validar o efeito do protioconazol na composição de esterol da *Mycosphaerella graminicola*. Os estudos de afinidade de ligação do protioconazol mostraram uma nova percepção para interação da CYP51 com inibidores de desmetilases, especialmente para esta nova triazolinationa (PARKER *et al.*, 2010).

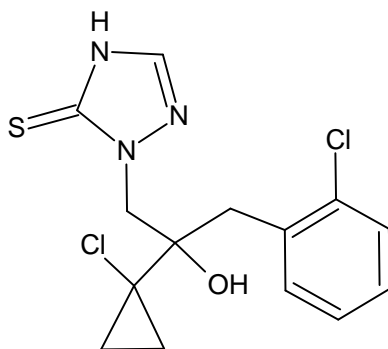


Figura 21. Protrioconazol, antifúngico comercial, avaliado no tratamento de infecções com o fitopatógeno *Mycosphaerella graminicola* (PARKER *et al.*, 2010).

1.6.2. Atividade tripanocida de compostos triazólicos

Alguns derivados azólicos foram estudados e testados para o tratamento experimental da DC e os resultados mostraram que estes compostos heterocíclicos sintéticos foram promissores contra as formas evolutivas do *T. cruzi*, e estão disponíveis comercialmente ou sendo testados contra outras infecções. Os triazóis primeiramente avaliados tanto experimental quanto clinicamente para o tratamento da doença de Chagas foram o Fluconazol, Itraconazol e Cetoconazol (**Figura 22**), contudo, nenhum deles apresentou resultados satisfatórios (BRENER *et al.*, 1993).

Com o desenvolvimento de novos derivados azólicos da classe dos triazóis, indicado na **Figura 22**, pode-se constatar a eficácia e a atividade tripanocida desses compostos triazólicos sobre alvos específicos do metabolismo do ergosterol. O ergosterol é uma substância de extrema importância para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do *T. cruzi*, como para a maioria dos fungos e leveduras. Estes compostos triazólicos agem principalmente sobre a enzima C14 α -desmetilase, uma enzima microssômica do citocromo P-450 (CYP51), impossibilitando assim a formação de zimosterol a partir do lanosterol e impedindo a formação do ergosterol (URBINA, 1997 & 2009). O resultado da inibição nas etapas finais da biossíntese do ergosterol é acúmulo de precursores do ergosterol na membrana celular do *T. cruzi*, comprometendo sua integridade. Devido a isso, a etapa de biossíntese do ergosterol é considerada um alvo bioquímico potencial para pesquisa de quimioterápicos, já que este esteróide é fundamental para a membrana celular dos tripanossomatídeos. Outra razão que contribui para o interesse sobre este alvo é que as células do hospedeiro vertebrado são dependentes do colesterol e não do ergosterol, contrariamente ao *T. cruzi* que é extremamente suscetível a inibidores da biossíntese de ergosterol (IBEs), *in vitro* e *in vivo* (URBINA, 2000; URBINA, 2001; URBINA, 2002). E somando a isso, o gene da enzima C14 α -desmetilase do parasito encontra-se ativado tanto na forma evolutiva presente no mamífero quanto no inseto vetor, o que destaca ainda mais a importância deste alvo metabólico (BUCKER *et al.*, 2003).

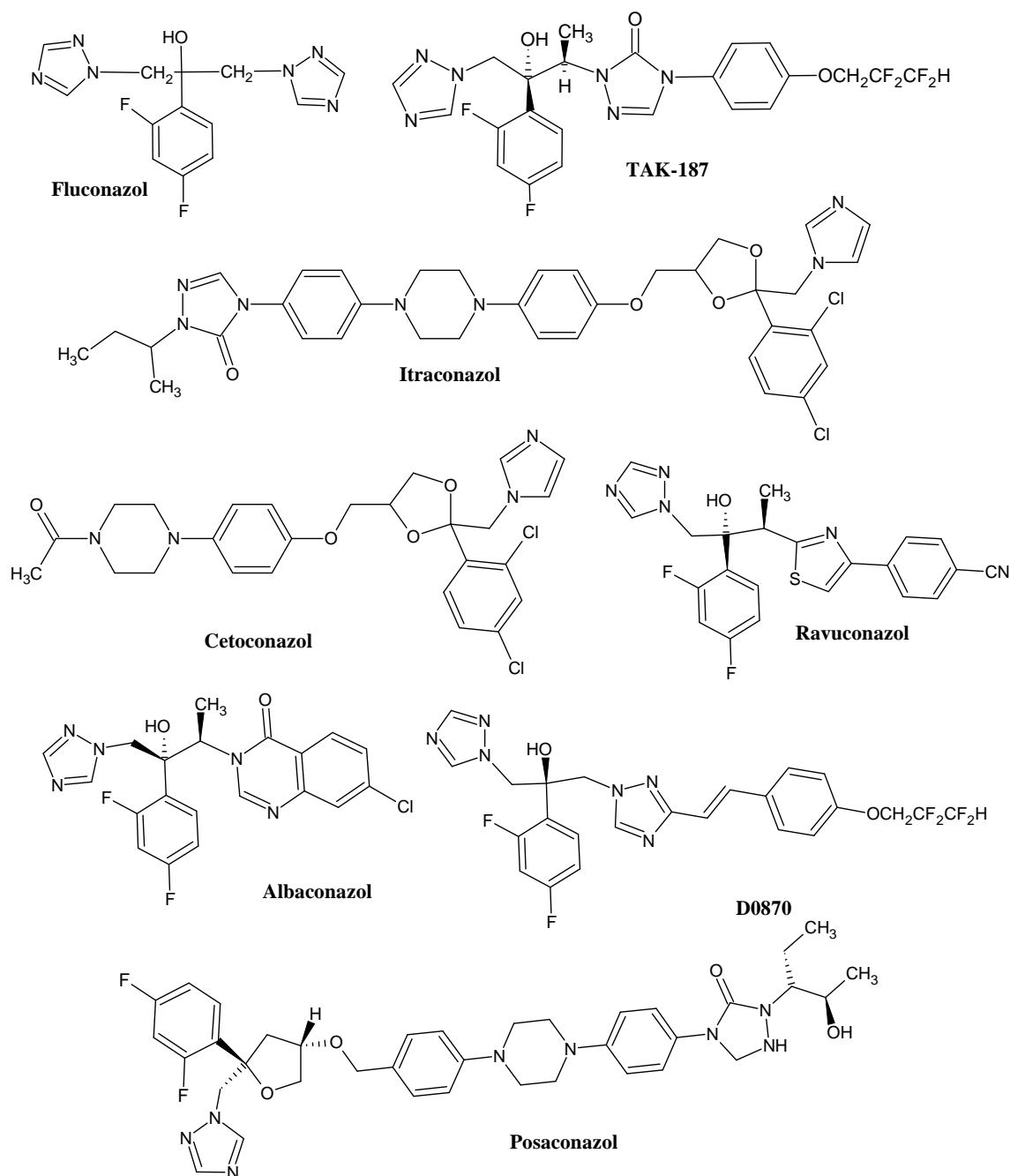


Figura 22. Compostos azólicos, inibidores da biossíntese de ergosterol, testados no tratamento experimental da doença de Chagas.

Entretanto, os IBEs comercialmente disponíveis, os quais são altamente eficazes no tratamento de doenças fúngicas, não são potentes o suficiente para a erradicação do *T. cruzi* em experimentos com animais infectados e em pacientes humanos (MOREIRA *et al.*, 1992; BRENER *et al.*, 1993). Urbina e colaboradores comprovaram que novos derivados triazólicos (inibidores do citocromo P450, dependente do esteroide C14 α -desmetilase, de fungos e protozoários) tais como o D0870 (Zeneca Pharmaceuticals) e o posaconazol (SCH 56592; Schering-Plough Research Institute), são capazes de induzir a cura parasitológica na fase crônica e aguda da doença de Chagas em testes com camundongos. Foi concluído que a atividade tripanocida destes compostos resulta de sua potente e seletiva atividade anti - *T.*

cruzi e de suas propriedades farmacocinéticas, particularmente a sua longa meia-vida e a uma ampla capacidade de distribuição através de diferentes tecidos (URBINA, 1996, URBINA, 1999; URBINA, 2000).

Com base nos dados a cima, Urbina e colaboradores investigaram a atividade do TAK-187, um triazol fungicida com longa meia-vida, contra o *T. cruzi* em diversos animais. Os estudos *in vitro* revelaram que a concentração inibitória mínima (CIM) contra a forma epimastigota foi de 0,3-1,0 μM , enquanto que na concentração correspondente contra a forma amastigota foi de 1 nM. Estes pesquisadores também avaliaram o efeito do TAK-187 por um longo período de tratamento e concluíram que este composto, quando administrado em dias alternados em doses de 10-20 mg/kg em camundongos na fase aguda e crônica da doença, induziu 80-100% de sobrevivência com 80-100% de cura parasitológica, em sobreviventes de ambos os casos (URBINA *et al.*, 2003). A pesquisa também mostrou que não foram observados efeitos secundários tóxicos em nenhum dos protocolos experimentais e os autores apontaram o TAK-187 como um potente composto anti - *T. cruzi* com atividade tripanocida *in vivo* e que deve ser considerado para estudos posteriores como um tratamento de potencial específico para a doença de Chagas em humanos (URBINA *et al.*, 2002).

Em outro estudo realizado, Silva e colaboradores sintetizaram derivados triazólicos a partir da nor- β -lapachona (**Figura 23**), da classe das quinonas, para serem avaliados contra a forma tripomastigota do *T. cruzi*. Os pesquisadores focaram no estudo tripanocida do híbrido formado entre as naftofuranoquinoidais e a porção triazólica. Assim, sintetizaram cinco derivados sendo todos mais ativos que a quinona original, com valores de CI_{50} que variaram de 17 a 359 μM , em 24h de tratamento. Isso indicou a melhora da atividade biológica com a introdução do núcleo triazólico ligado ao composto quinona. Dentre os derivados sintetizados, o mais ativo contra a forma tripomastigota foi aquele com a porção benzílica, apresentando CI_{50} de 17 μM , em 24h de tratamento. Neste sentido, os autores atribuíram esta melhora da atividade ao seu maior caráter lipofílico proporcionando uma melhor penetração através da membrana da célula do parasito (SILVA *et al.*, 2007). Assim, pode-se concluir que os triazóis são candidatos farmacóforos promissores ao desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento da doença de Chagas humana.

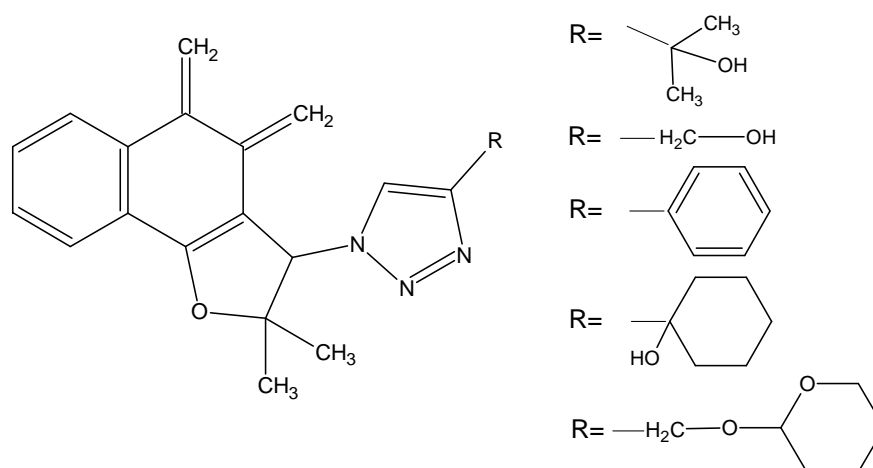
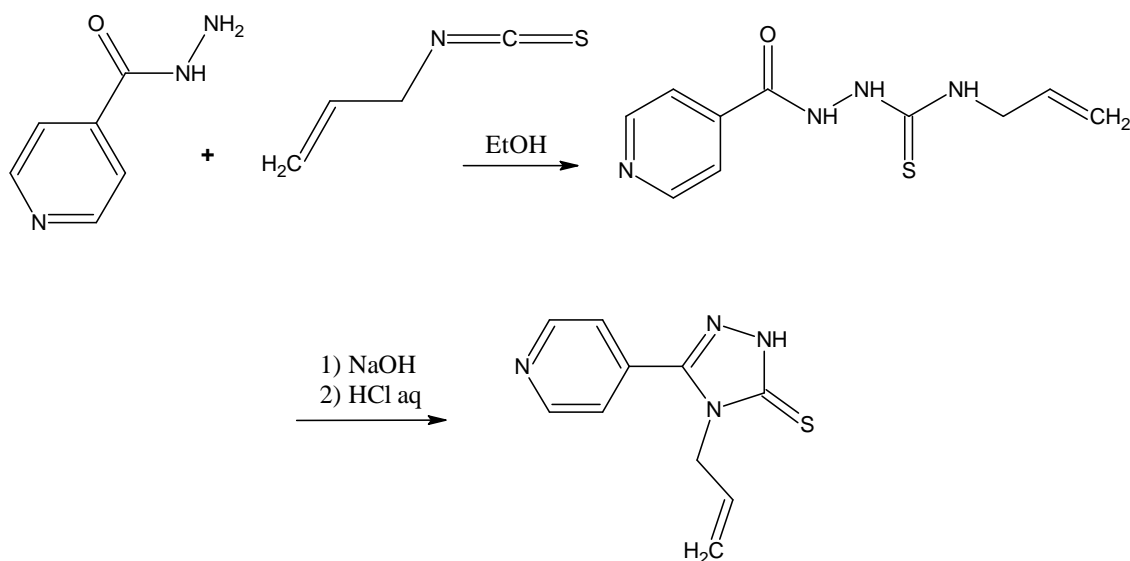


Figura 23. Derivados triazólicos preparados a partir da nor- β -lapachona e avaliados contra a forma tripomastigota do *T. cruzi* (SILVA *et al.*, 2007).

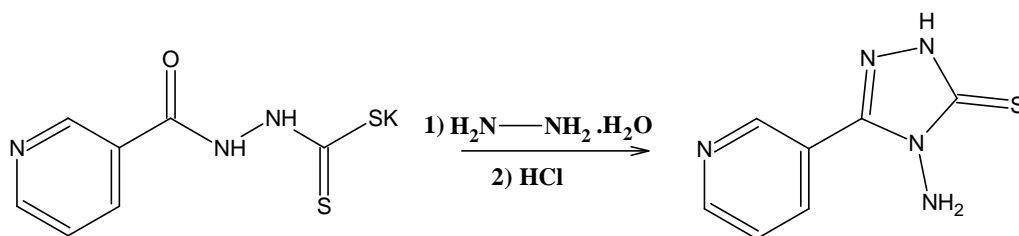
1.6.3. Síntese de compostos possuindo o sistema 1,2,4-triazólico

Um das metodologias mais utilizadas para formação de 1,2,4-triazóis é a partir das hidrazidas correspondentes. Cansiz e colaboradores sintetizaram derivados 1,2,4 triazolólicos 4,5-dissubstituídos (**Esquema 2**) a partir da reação da isonicotinidrazida com isotiocianato em meio de etanol sob condições de refluxo por 4 horas. A tiossemicarbazida gerada foi reagida com NaOH em solução aquosa por 8 horas em condições de refluxo e após posterior acidificação com HCl forneceu os derivados triazólicos planejados (CANSIZ *et al.*, 2012). Outro autor que utilizou uma metodologia similar para a síntese de 1,2,4-triazóis foi Mavrovra e colaboradores (MAVROVRA *et al.*, 2009).



Esquema 2. Metodologia utilizada para formação dos 1,2,4-triazóis (CANSIZ *et al.*, 2012).

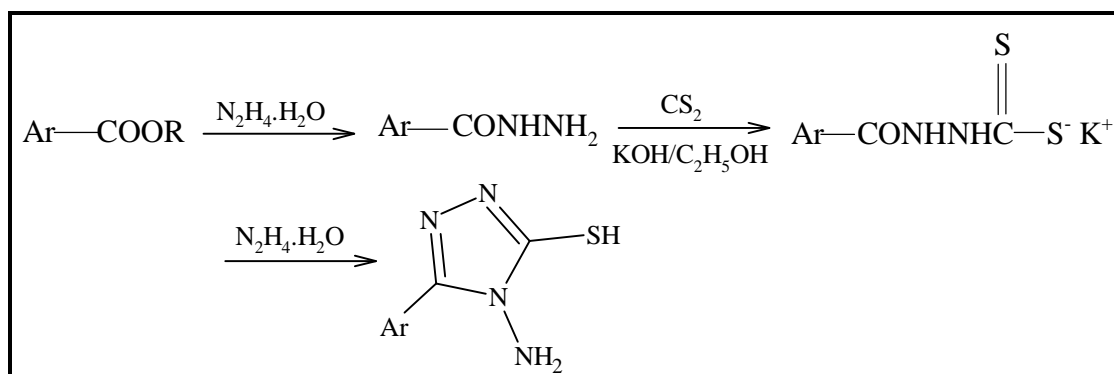
A metodologia empregada por Khalil para formação dos 1,2,4-triazóis foi a hidrazinólise do composto potássio-3-nicotinoiditiocarbazato, sob refluxo de 12h, com posterior acidificação com ácido clorídrico concentrado em meio aquoso para a obtenção do 4-amino-5-(piridina-3-il)-2,4-dihidro-[1,2,4]-triazól-3-tiona, representado pelo **Esquema 3** (KHALIL, 2006).



Esquema 3. Reação de formação dos derivados 1,2,4-triazóis (KHALIL, 2006).

Mathew e colaboradores sintetizaram uma série de derivados contendo os núcleos 1,2,4-triazol e 1,3,4-tiadiazol para serem testados quanto às suas atividades bactericida, antifúngica, anti-inflamatória e analgésica. A metodologia utilizada iniciou-se com a formação da

hidrazida aromática pela reação do éster aromático com hidrato de hidrazina. Logo em seguida, a hidrazida foi reagida com dissulfeto de carbono e hidróxido de potássio em meio alcoólico para a formação do ditiocarbazinato de potássio, o qual foi em seguida ciclizado pela reação com hidrato de hidrazina levando à formação do 1,2,4-triazol pretendido, como mostra o **Esquema 4** abaixo (MATHEW *et al.*, 2006).



Esquema 4. Síntese de 4-amino-1,2,4-triazóis (MATHEW *et al.*, 2006).

2. JUSTIFICATIVAS

Os trabalhos encontrados na literatura sobre o efeito da piperina e de seus derivados e análogos impulsionaram nosso grupo de pesquisa a estudar a atividade inibitória deste produto natural e de seus derivados sobre o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Como esta amida natural possui comprovada atividade leishmanicida (KAPIL, 1993; RAAY *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2002), nossa equipe testou a piperina e alguns de seus derivados e análogos sobre as formas evolutivas do *T. cruzi* (RIBEIRO, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2004; FERREIRA, 2006, FERREIRA *et al.*, 2008). Os resultados mostraram o potencial da piperina contra o *T. cruzi* e sua eficiência como precursor para o desenvolvimento de novas substâncias com perfil de atividade antiparasitária, estimulando-nos a continuar os estudos com o *T. cruzi* incorporando a unidade triazólica aos derivados da piperina.

A piperina, além de possuir um variado perfil de atividades biológicas, apresenta características importantes para sua utilização como molécula protótipo e/ou precursora para o desenvolvimento de novos fármacos, que envolvem sua abundância no material vegetal, sua facilidade de extração e por possuir funcionalidades possíveis de sofrerem diversas manipulações sintéticas.

Além das evidências da piperina como um modelo adequado para o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários, a escolha do núcleo triazólico foi baseada em sua fundamental importância na atividade tripanocida de compostos inibidores da biossíntese de ergosterol (esteróide de fundamental importância para a integridade da membrana celular dos tripanossomatídeos) (URBINA, 1996, URBINA 1999 & URBINA, 2000), que pode ser visualizado como um alvo bioquímico para a atividade de nossas moléculas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo isolar a amida natural, através da metodologia otimizada por nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO, 2004), em quantidades suficientes para produzir uma série de derivados da classe dos 1,2,4-triazóis que serão caracterizados através de técnicas espectrométricas e avaliados quanto a suas atividades tripanocidas.

3.2. Objetivos específicos

- Extrair a piperina **1** através de *Piper nigrum* em quantidades adequadas;
- Com base nas estratégias de modificação molecular do bioisosterismo e da hibridação molecular, sintetizar os derivados heterocíclicos da classe dos triazóis, que são preparados a partir de um precursor comum, o ácido piperínico **2**, gerando assim moléculas que viriam a fornecer maiores subsídios para ampliar os estudos de relação estrutura-atividade destes compostos;
- Investigar o uso de metodologias sintéticas clássicas e técnicas alternativas para síntese desses heterocíclicos, principalmente com irradiação de micro-ondas (Discover - CEM *Inc.*);

- Caracterizar devidamente os compostos obtidos, bem como seus intermediários, através das técnicas convencionais de análise (IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C , EM);
- Avaliar atividade antiparasitária dos novos derivados heterocíclicos frente ao *T. cruzi*, comparando com a atividade do produto natural piperina e do benzonidazol, fármaco de referência, usado no tratamento da doença (estudos realizados em colaboração com o Dr. Leonardo Freire de Lima e a Prof^a Lucia Mendonça-Previato - Laboratório de Glicobiologia - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ);

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Instrumentos utilizados nas caracterizações espectrométricas

- Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) foram obtidos em espectrômetros de marca Bruker, modelo Ultrashield Plus (PPGQ – UFRRJ). Foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS) e os solventes: clorofórmio (CDCl_3) e dimetilsulfóxido (DMSO- D_6) na solubilização das amostras. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz);
- Os espectros de Infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotometro da marca Bruker, modelo Vertex 70 (PPGQ-UFRRJ). As amostras sólidas foram pulverizadas e analisadas em pastilhas de KBr;
- Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos no cromatógrafo em fase gasosa acoplado ao espectrofotômetro de massas GCMS-QP2010 Plus da Shimadzu (PPGQ-UFRRJ). Condições de análise: Coluna: vf-5MS (30 m x 0,25 x 0,25 mm); Temperatura: 200°C/1' - 10°C - 290°C/40 min; Injetor: 270°C;
- Os espectros de massa de alta resolução (EMAR) foram obtidos no equipamento Micromass Q-TOF (Waters, UK) do Instituto de Química da UNICAMP;
- As análises por CLAE-DAD foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu constituído por duas bombas série LC-20AT, detector de arranjo de díodos série SPD-M20A e injetor Rheodyne 7125i com loop de 20 μL . O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito através do software LCSolution (Shimadzu). As análises foram realizadas em coluna analítica de fase reversa C-18 (150 x 4,6 mm, 5 μm de partícula, Allure Restek), mantida a 30°C. A fase móvel foi constituída por uma mistura de acetonitrila (98%, solvente B) e água (2%, solvente A). A separação foi feita no modo isocrático com fluxo constante de 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, e o volume de amostra injetada foi de 20 μL . O monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 200 e 500 nm.

4.2. Nas análises, sínteses e purificações

- Cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (camada de 0,2 mm), da marca Merck para o acompanhamento por CCDA (Cromatografia de Camada Delgada Analítica) das reações;
- Solventes: acetato de etila, acetona, clorofórmio, diclorometano, etanol, éter etílico e metanol, fornecidos pela Vetec e/ou Tédia Brazil. O diclorometano, utilizado como solvente nas reações que necessitavam de meio anidro, foi previamente seco através da destilação com hidreto de cálcio (VOGEL, 1978);
- Reagentes: Solução de ácido clorídrico concentrado (37%) e o hidróxido de sódio em pastilhas foram obtidos pela Vetec. Os demais reagentes: cloreto de oxalila, hidrato de hidrazina, isotiocianatos de alquila (metil, etil, isopropil, butil, *tert*-butil, hexil,

cicloexil), isotiocianato de fenila, isotiocianato de benzila, isotiocianato de 3,4,5-trimetoxifenila, isotiocianato de 3-metoxifenila, isotiocianato de 4-(trifluórmetil)fenila e isotiocianato de 4-metiltiofenila, foram adquiridos da Sigma-Aldrich;

- A pimenta do reino utilizada para isolamento da piperina foi obtida no comércio popular de várias regiões do país: Marataízes (ES), Porto Velho (RO) e Duque de Caxias (RJ).

4.3. Outros equipamentos

- Reator de micro-ondas - Modelo Discover - *CEM Inc*;
- Aparelho Aaker para medição dos pontos de fusão;
- Evaporador rotatório da Fisaton - Modelo 802;
- Câmara de revelação CCDA da marca Entela, modelo 58 Handheld, equipada com lâmpada UV com comprimento de onda de 254 e 365 nm;
- Placas de aquecimento e agitação da marca Corning e Fisatom;
- pHmetro da marca Analyser, modelo pH 300;
- Ponto de fusão da marca Aaker, modelo PFM-II.

4.4. Isolamento da 1-[(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]piperidine (piperina, 1)

Em uma aparelhagem de Soxhlet (**Figura 24**) foram colocados 250 g de pimenta do reino em um cartucho de papel de filtro e no balão de fundo redondo de 500 mL foram adicionados 350 mL de etanol a 95% e pedras de ebulição. O sistema foi mantido sob refluxo numa manta de aquecimento por aproximadamente 10 horas. Após término da extração, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório, e sob o resíduo de aspecto viscoso e aroma adocicado obtido, foram adicionados cerca de 100 mL de uma solução alcoólica de KOH a 10%, recentemente preparada. A adição da solução alcoólica básica foi feita para que ocorresse a precipitação dos taninos e demais materiais fenólicos, principais contaminantes do meio, na forma dos seus respectivos sais de potássio. Após filtração à vácuo 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 cerca de três dias em repouso, formou-se um precipitado amarelo que foi filtrado sob pressão reduzida. O sólido obtido foi lavado com uma pequena quantidade de água gelada, seguido de éter etílico gelado. Após a recristalização em etanol foram obtidos 7,5 g (3%) de piperina na forma de cristais amarelo-claro no formato de agulhas (IKAN, 1991).
Pf: 126-127°C (Lit.: 125-127°C – IKAN, 1991).



Figura 24. Aparelhagem de Soxhlet.

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, cm^{-1}):

$\nu\text{C-H (Csp}^2\text{)} = 3008$ (estiramento de C-H de sistema aromático);

$\nu\text{C-H (Csp}^3\text{)} = 2941 - 2850$ (estiramento de metilenos do anel piperidínico);

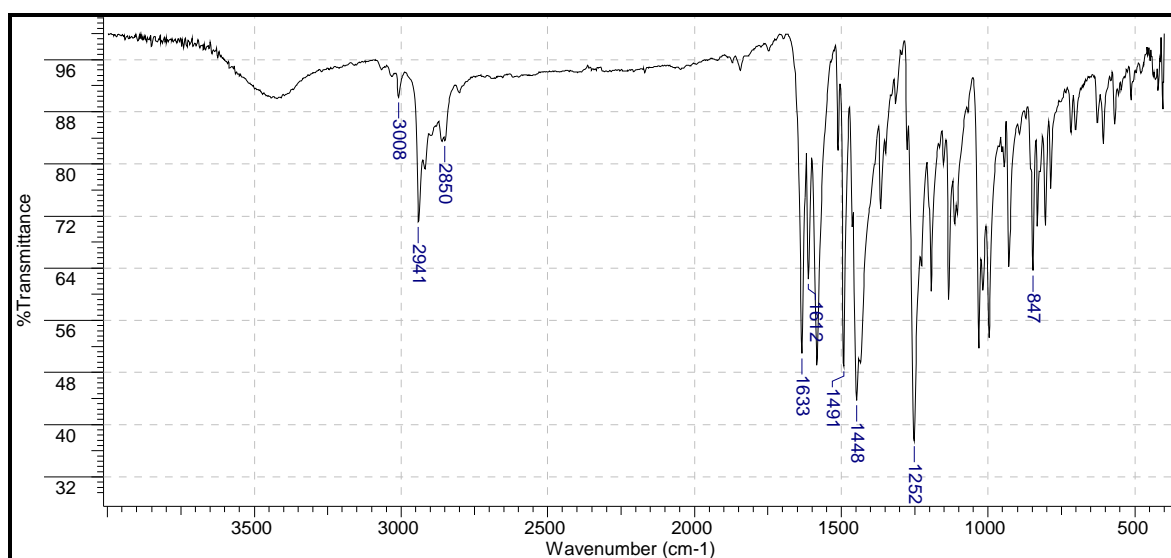
$\nu\text{C=O} = 1633$ (estiramento da carbonila de amida conjugada);

$\nu\text{C=C (Csp}^2\text{)} = 1612-1491$ (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\nu\text{C-O-C} = 1252$ (estiramento de éter);

$\delta\text{C-H (Csp}^2\text{)} = 929,5$ (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

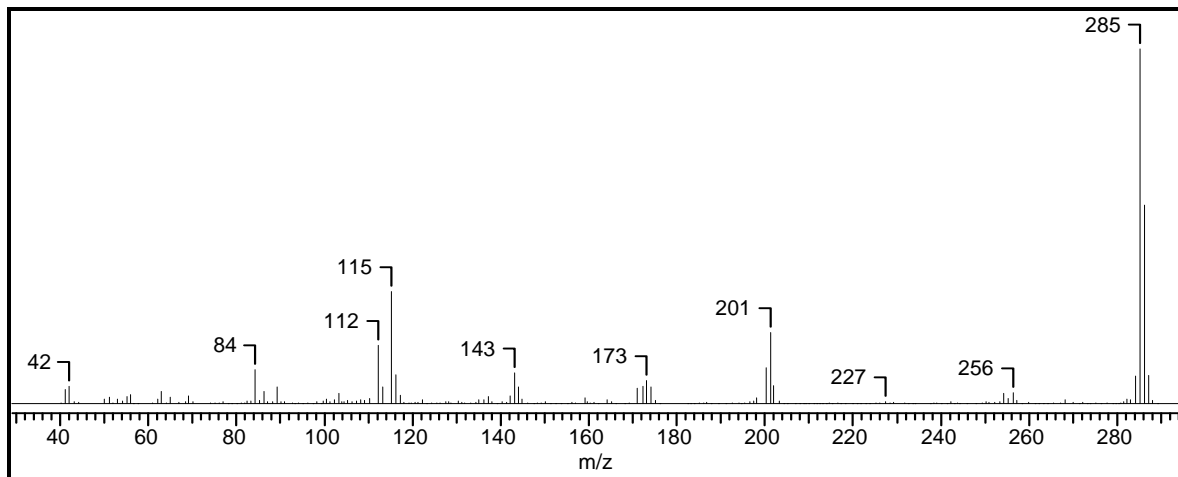
$\delta\text{C-H (Csp}^2\text{)} = 847$ (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



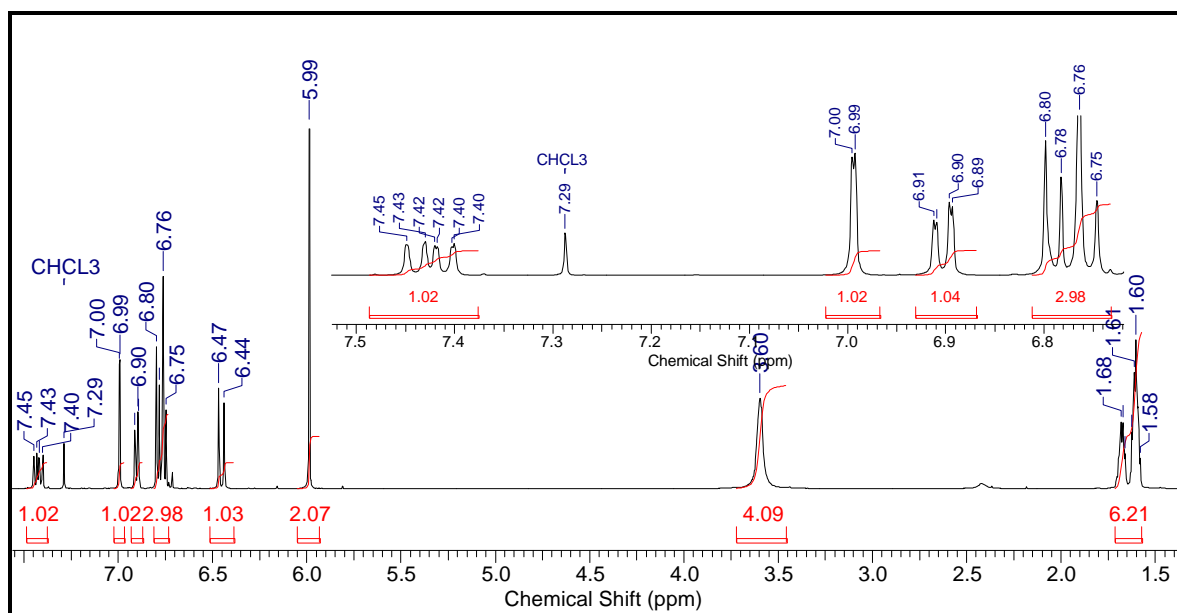
Espectro 1. Espectro no IV da piperina 1.

Dados do Espectro de Massas:

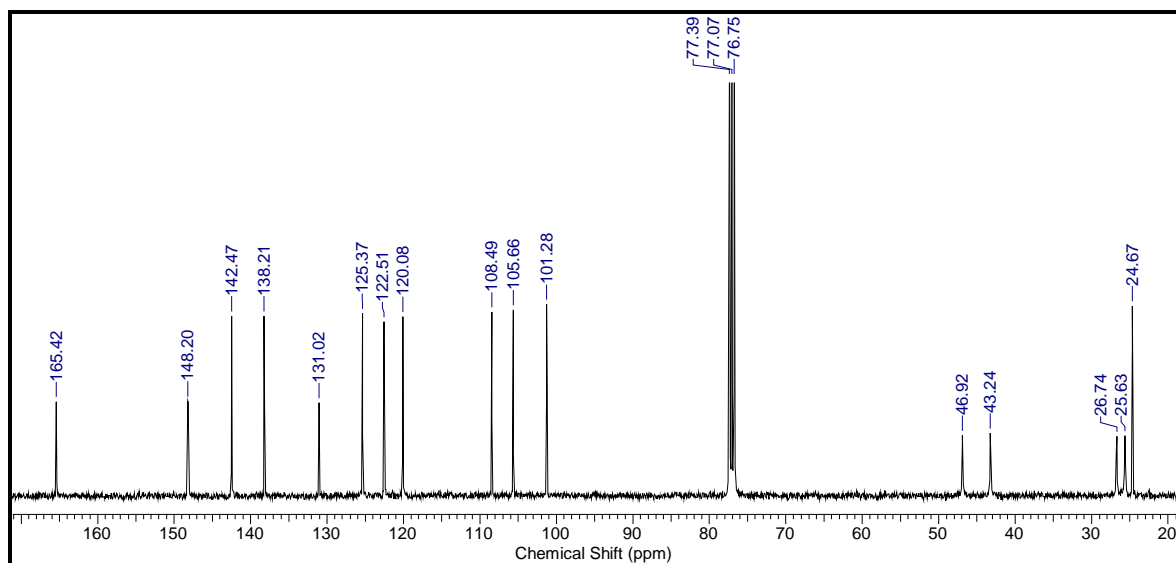
EM/IE: $m/z = 285$ (M^+ , 100%); 201(20%); 173(10%); 143(10%); 115(35%); 112(15%); 84(10%) e 42(5%).



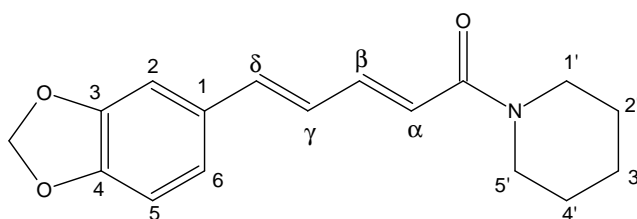
Espectro 2. Espectro de massas da piperina **1**.



Espectro 3. Espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) da piperina **1**.



Espectro 4. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) da piperina **1**.

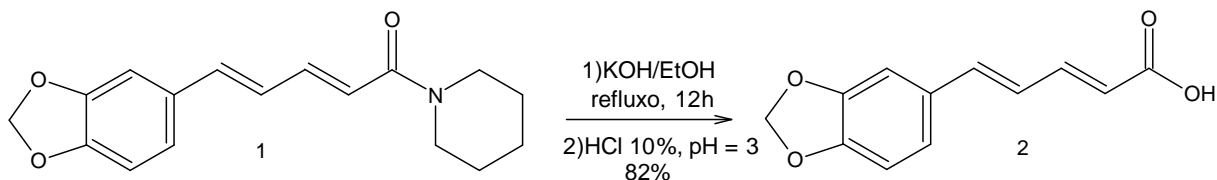


Piperina 1

Tabela 2. Deslocamento químico de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a piperina **1**.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; $J(\text{Hz})$	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'	3,60 (m, 2H)	43,24 (CH_2)
2'	1,58 - 1,68 (m, 2H)	24,67(CH_2)
3'	1,58 - 1,68 (m, 2H)	25,63(CH_2)
4'	1,58 - 1,68 (m, 2H)	26,74(CH_2)
5'	3,60 (m, 2H)	46,92(CH_2)
C=O	-----	165,42 (C)
α	6,45 (d; 14,5; 1H)	120,08 (CH)
β	7,43 (dd; 14,5 e 9,7; 1H)	142,47 (CH)
γ	6,75 - 6,80(m, 1H)	125,37 (CH)
δ	6,75 - 6,80 (m, 1H)	138,21 (CH)
1	-----	131,02 (C)
2	6,99 (d; 1,5; 1H)	105,66 (CH)
3 e 4	-----	148,20 (C)
5	6,75 - 6,80 (m, 1H)	108,49 (CH)
6	6,90 (dd; 8 e 1,5; 1H)	122,51 (CH)
OCH_2O	5,99 (s,2H)	101,28 (CH_2)

4.5. Preparação do ácido (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienóico (ácido piperínico, **2**)

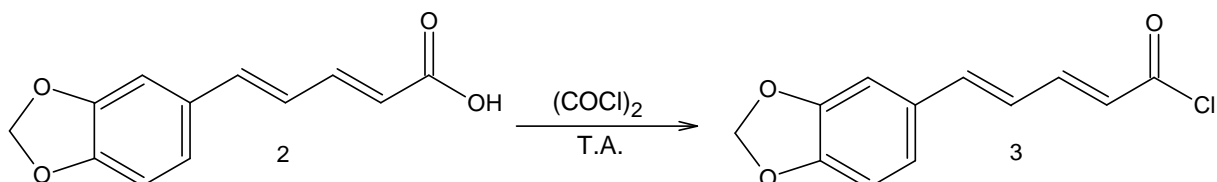


Esquema 5. Reação de preparação do ácido piperínico.

Em um balão de 50 mL de capacidade, equipado com barra de agitação magnética e condensador de refluxo, foram adicionados 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 1 hora no reator de micro-ondas (temperatura de 95°C e 35 W de potência). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), passando da cor amarela para marrom, com formação de precipitado. Após o término da reação, retirou-se todo o etanol da mistura reacional em evaporador rotatório, acrescentou-se água ao resíduo sólido formado, deixando-se atingir a temperatura de ebulição a fim de solubilizar todo o material precipitado, sendo a solução em seguida filtrada à quente. Esta solução aquosa foi extraída por duas vezes com éter etílico, com a finalidade de se retirar contaminantes diferentes do carboxilato. Em seguida, acrescentou-se, gota a gota, uma solução de HCl a 10%, até o meio atingir pH próximo de 3, ocorrendo então a precipitação do ácido na forma de um sólido amarelo. Após a filtração sob pressão reduzida, o material foi lavado com água gelada. O sólido obtido foi seco em dessecador e recristalizado em etanol, gerando 1,37 g (82%) do ácido piperínico **2**. O produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise e os dados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura (FERREIRA, 2006).

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

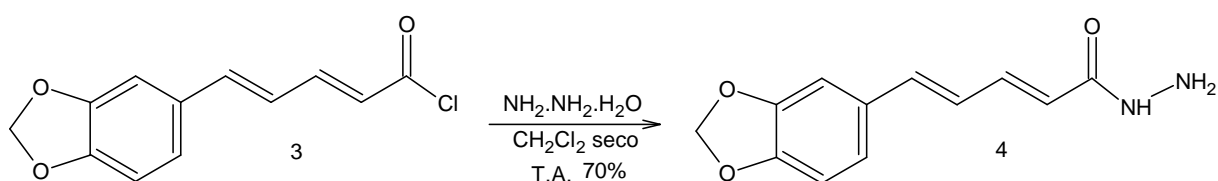
4.6. Preparação do cloreto do ácido (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienóico (**3**)



Esquema 6. Reação de preparação do cloreto do ácido 5-(3,4- metilendioxifenil)-2E, 4E-pentadienóico.

Em um balão de 25 mL de capacidade, equipado com barra de agitação magnética, septo de borracha, bolhomêtro e mantido sob atmosfera inerte, foram adicionadas 500 mg (2,29 mmol) do ácido **2**, seguido da adição de aproximadamente 1,5 mL (17,6160 mmol) de cloreto de oxalila. Esta solução foi submetida a agitação em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos. Após este tempo, constatou-se a finalização da reação por cromatografia em camada delgada (indiretamente, acompanhando a formação do éster metílico, através da reação de uma pequena alíquota com metanol). Concluída a reação, o excesso de (COCl)₂ foi removido em evaporador rotatório, restando apenas o cloreto de acila **3**, na forma de um resíduo sólido, de coloração laranja, que foi então utilizado na etapa posterior, sem tratamento prévio, devido à sua instabilidade em atmosfera úmida.

4.7. Preparação da (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dieno-hidrazida (**4**)



Esquema 7. Reação de preparação da (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dieno-hidrazida.

Essa reação da preparação da acilidrazida **4** foi realizada imediatamente após a reação de obtenção do cloreto de acila **3**, evitando assim a hidrólise deste intermediário. O sólido amarelo formado após a evaporação do excesso de cloreto de oxalila foi dissolvido em 5 mL de CH₂Cl₂ seco. Esta solução, mantida sob atmosfera inerte e em banho de gelo, foi adicionada, gota a gota, sobre uma solução contendo 1 mL de hidrato de hidrazina em 7 mL de diclorometano seco, mantida num balão de 25 mL, equipado com barra de agitação magnética, septo de borracha e regularizador de pressão, mantido sob atmosfera de nitrogênio seco. Após o término da adição, o meio reacional foi deixado por cerca de 10 minutos sob agitação à temperatura ambiente. Por análise por CCDA verificou-se o término da reação. O solvente foi removido no evaporador rotatório e após adição de água destilada o produto foi filtrado sob pressão reduzida. Foram obtidas 375 mg (70,57%) da hidrazida **4** na forma de um sólido amarelo. O produto foi devidamente caracterizado por ponto de fusão e através dos métodos convencionais de análise.

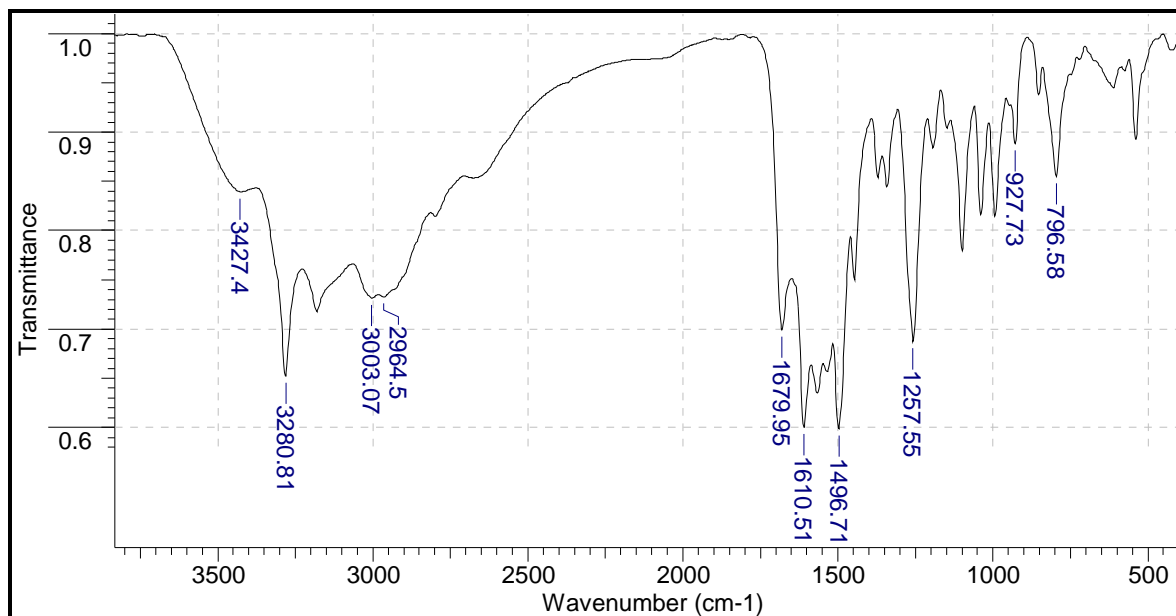
Pf: 240-242°C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, cm⁻¹):

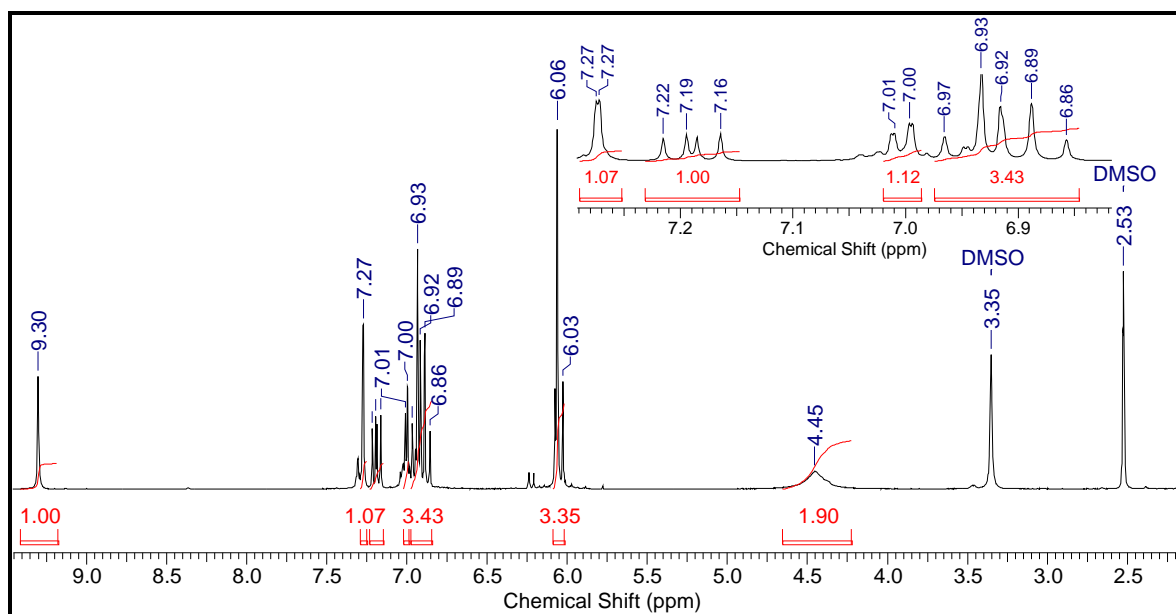
vN-H = 3280 (estiramento de hidrazida);
 vC-H (Csp²) = 3003 (estiramento de C-H de sistema aromático);
 vC-H (Csp³) = 2964 (estiramento de metilenos);
 vC=O = 1679 (estiramento da carbonila de hidrazida conjugada);
 vC=C (Csp²) = 1610-1496 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);
 vC-O-C = 1257 (estiramento de éter);

$\delta\text{C-H (Csp}^2) = 927$ (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

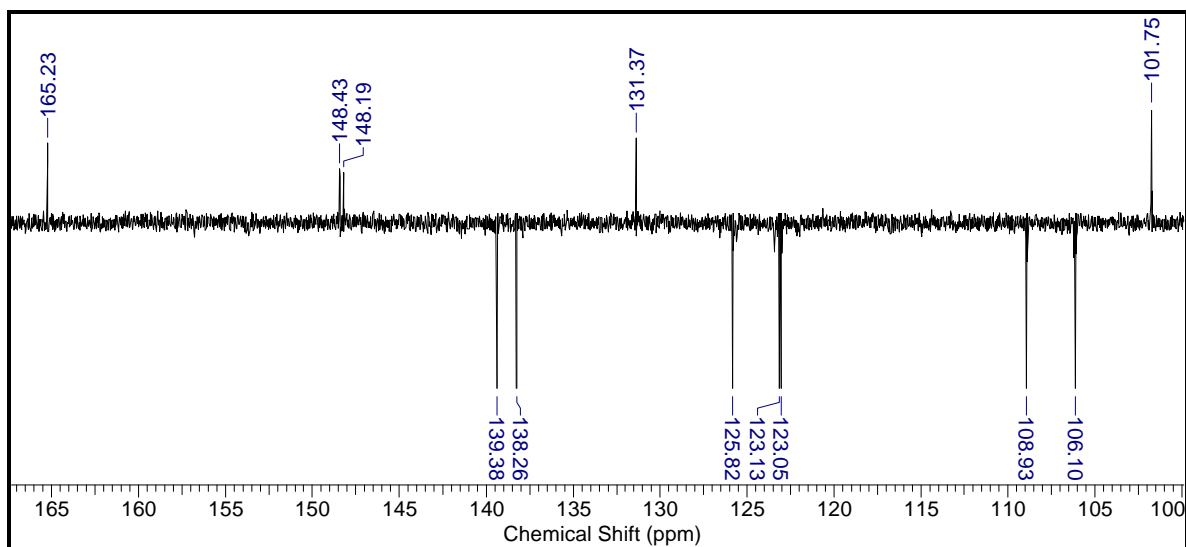
$\delta\text{C-H (Csp}^2) = 796$ (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



Espectro 5. Espectro de IV da acilidrazida **4**.



Espectro 6. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-D₆) da acilidrazida **4**.



Espectro 7. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT Q(500 MHz, DMSO- D_6) da acilidrazida **4**.

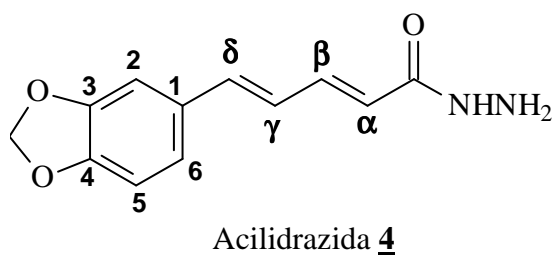


Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C para **4**.

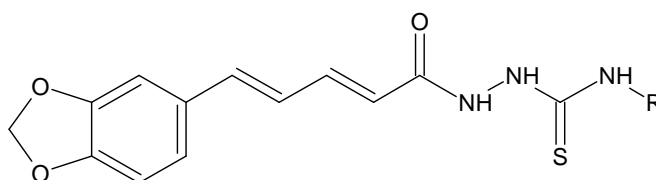
Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; $J(\text{Hz})$	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
NH ₂	4,45 (sl, 2H)	-----
NH	4,45 (s, 1H)	-----
C=O	-----	165,23 (C)
α	6,05 (d; 15,1; 1H)	123,05 (CH)
β	7,19 (dd; 15,1 e 10,4; 1H)	139,38 (CH)
γ	6,86 - 6,97 (m, 1H)	125,82 (CH)
δ	6,86 - 6,97 (m, 1H)	138,26 (CH)
1	-----	131,37 (C)
2	7,27 (d; 1,4; 1H)	106,10 (CH)
3	-----	148,19 (C)
4	-----	148,43 (C)
5	6,86 - 6,97 (m, 1H)	108,93 (CH)
6	7,00 (dd; 8 e 1,4; 1H)	123,13 (CH)
OCH ₂ O	6,06 (s, 2H)	101,75 (CH ₂)

4.8. Preparação dos derivados 2-[(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-N-alquil/aryl-hidrazinocarbotioamida (**5a-5m**)

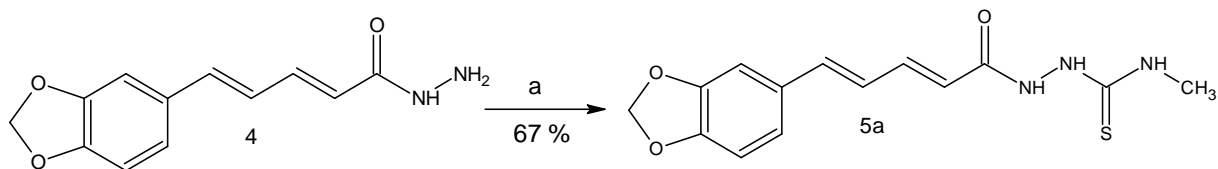
Em um balão de 10 mL, equipado com barra de agitação magnética e condensador de refluxo foram suspensas 100 mg (0,431 mmol) de hidrazida em 5 mL de etanol. Sobre esta suspensão adicionou-se 0,5172 mmol de diferentes isotiocianatos, sendo então a mistura submetida à irradiação de micro-ondas sob refluxo por 0,5h (100W, 78°C). A evolução da reação foi acompanhada por CCDA. Após o término da reação, a mistura foi colocada em evaporador rotatório para eliminação do etanol e logo em seguida o produto foi recolhido e recristalizado em etanol. Todos os intermediários tiveram seus pontos de fusão determinados, sendo caracterizados por RMN ¹H e ¹³C e IV. Na **Tabela 4**, a seguir, encontram-se descritos os intermediários N-alquil/aryl-hidrazinocarbotioamidas (**5a-5m**), sintetizados com suas respectivas massas geradas, rendimentos e respectivos pontos de fusão.

Tabela 4. Massa gerada, rendimento e ponto de fusão para os intermediários sintetizados.

N-alquildrazina-carbotioamida	R	Massa gerada (mg)	Rendimento	Ponto de Fusão
5a	metil	88,7	67%	195-196 °C
5b	etil	124	90%	192-193 °C
5c	isopropil	88,7	66%	193-194 °C
5d	butil	130,6	87%	173 -175 °C
5e	hexil	146	90%	165 -167 °C
5f	cicloexil	147	91%	192-194 °C
5g	fenil	119,3	87%	149-150 °C
5h	benzil	164	84%	196-197 °C
5i	3,4,5-trimetoxifenil	152,2	77%	189-191 °C
5j	<i>tert</i> -butil	120	80%	135-136 °C
5k	4-tiometilfenil	150	84%	175-177 °C
5l	3-metoxifenil	112	65%	174-175 °C
5m	4-trifluórmetilfenil	187	83%	177-178 °C



4.8.1. Preparação da [(2*E*,4*E*)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-*N*-metilhidrazinacarbotoamida (**5a**)



Reagentes: a) Isotiocianato de metila, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 8. Reação de preparação da *N*-metilhidrazinacarbotoamida.

Pf: 195 - 196 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm^{-1}):

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3321 (estiramento de carbotoamida);

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3170 (estiramento de hidrazida);

$\nu_{\text{C-H}}$ (Csp^3) = 2999 - 2922 (estiramento de metila e metilenos);

$\nu_{\text{C=O}}$ = 1664 (estiramento da carbonila de hidrazida conjugada);

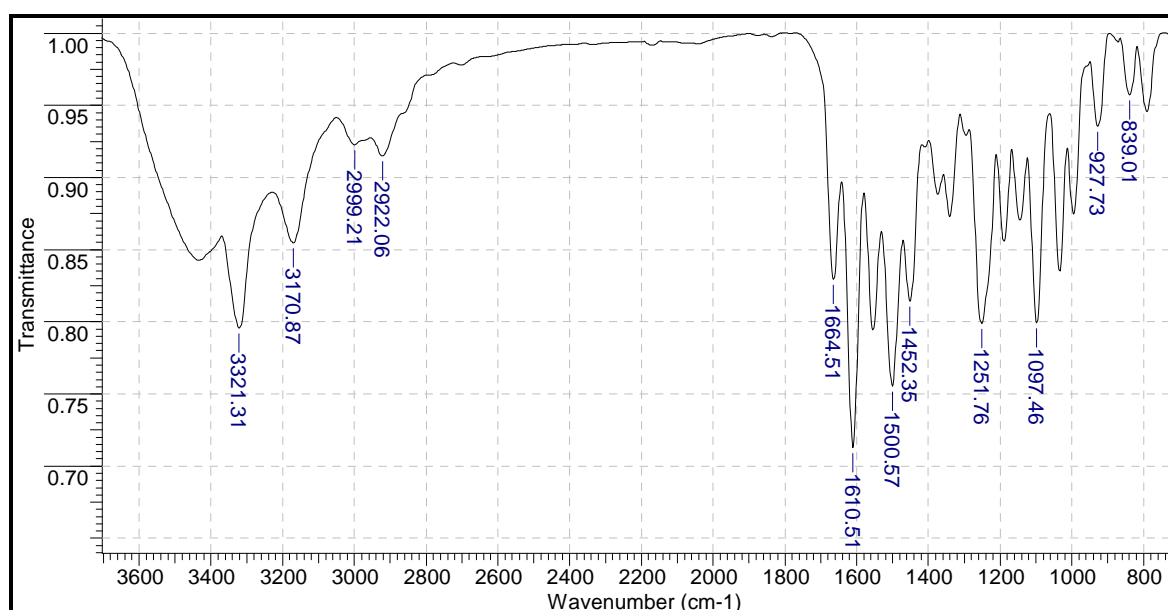
$\nu_{\text{C=C}}$ (Csp^2) = 1610 - 1500 - 1452 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1251 (estiramento de éter);

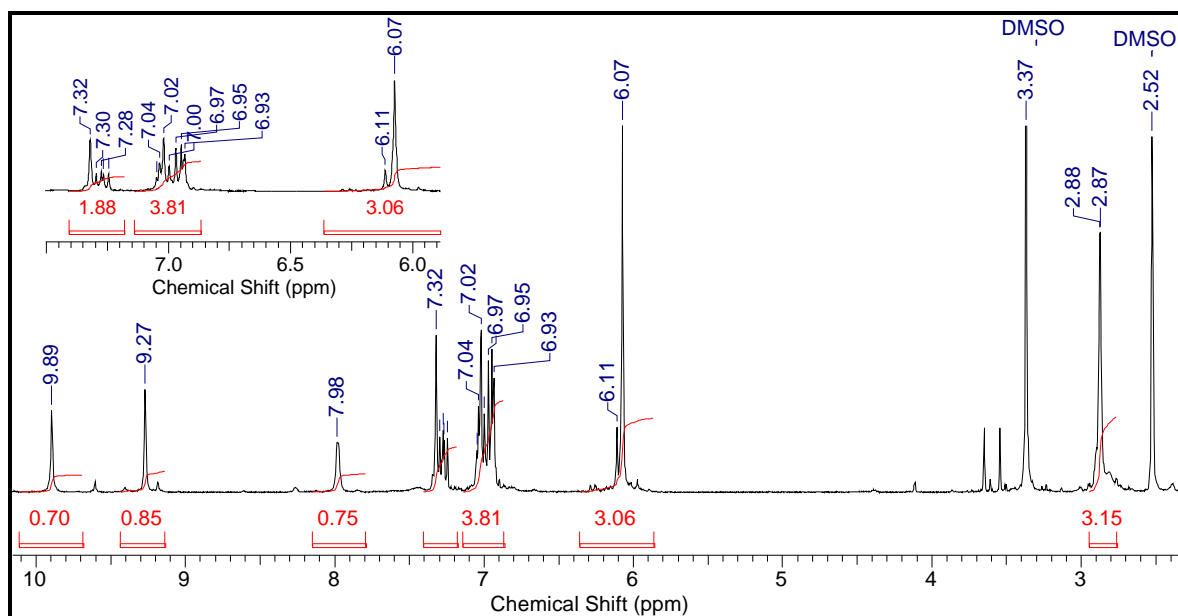
$\nu_{\text{C=S}}$ = 1097 (estiramento da tioamida);

$\delta_{\text{C-H}}$ (Csp^2) = 927 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

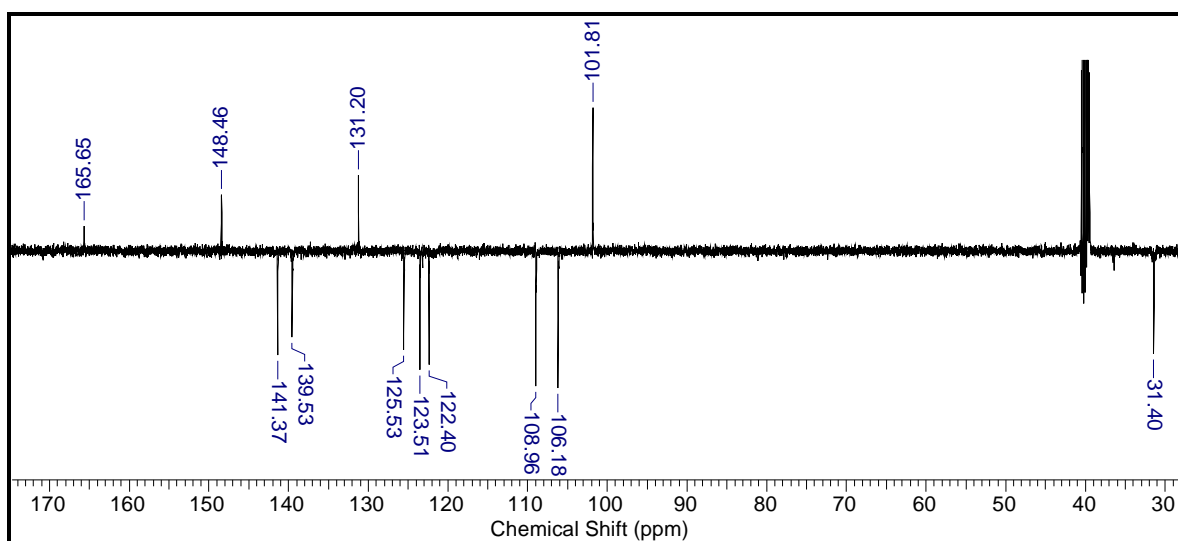
$\delta_{\text{C-H}}$ (Csp^2) = 839 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



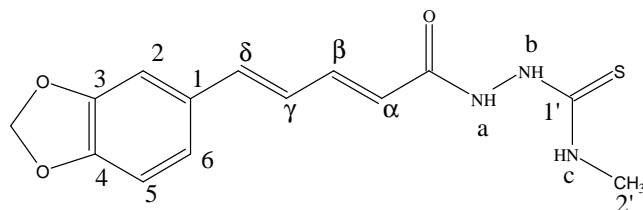
Espectro 8. Espectro de IV da *N*-metilhidrazinacarbotoamida **5a**.



Espectro 9. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) da *N*-metilidrazinacarbotoamida **5a**.



Espectro 10. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) da *N*-metilidrazinacarbotoamida **5a**.



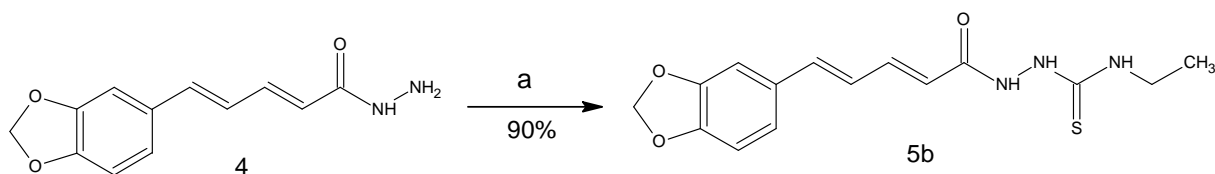
N-metilidrazinacarbotoamida **5a**

Tabela 5. Deslocamento químico de RMN ^1H e RMN ^{13}C para **5a**.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; <i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'	-----	*
2'	2,87 (d; 4,1; 3H)	31,40 (CH ₃)
C=O	-----	165,65 (C)
α	6,08 (d; 15; 1H)	122,40 (CH)
β	7,29 (dd; 15 e 10,5; 1H)	141,37 (CH)
γ	6,93-7,04 (m, 1H)	125,53 (CH)
δ	6,93-7,04 (m, 1H)	139,53 (CH)
1	-----	131,20 (C)
2	7,32 (s; 1H)	106,18 (CH)
3	-----	148,46 (C)
4	-----	148,46 (C)
5	6,93 - 7,04 (m, 1H)	108,96 (CH)
6	6,93 - 7,04(m, 1H)	123,51 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)	101,81 (CH ₂)
a	9,89 (s, 1H)	-----
b	9,27 (s, 1H)	-----
c	7,98 (s,1H)	-----

* Valor não observado no espectro de RMN ^{13}C .

4.8.2. Preparação da [(2*E*,4*E*)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-*N*-etilhidrazinacarbotioamida (**5b**)



Reagentes: a) Isotiocianato de etila, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 9. Reação de preparação da *N*-etilidrazinacarbotioamida.

Pf: 192-193 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm^{-1}):

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3315 (estiramento de carbotioamida);

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3190 (estiramento de hidrazida);

$\nu_{\text{C-H}}$ (Csp^3) = 2972 - 2929 (estiramento de metila e metilenos);

$\nu_{\text{C=O}}$ = 1666 (estiramento da carbonila de hidrazida conjugada);

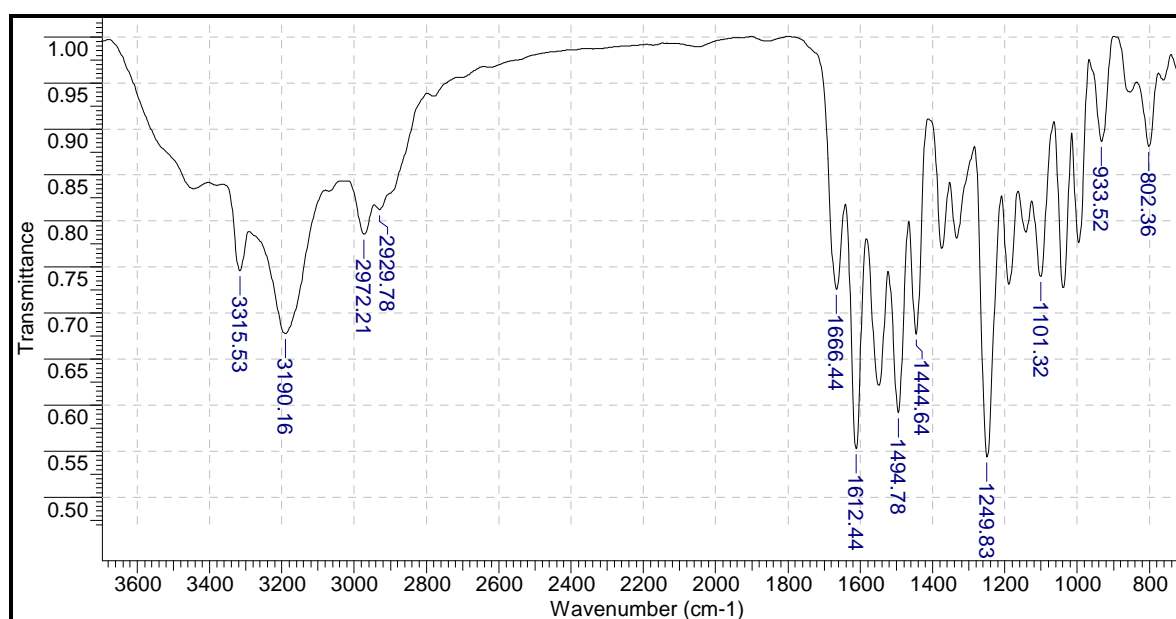
$\nu_{\text{C=C}}$ (Csp^2) = 1612 - 1498 - 1444 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1249 (estiramento de éter);

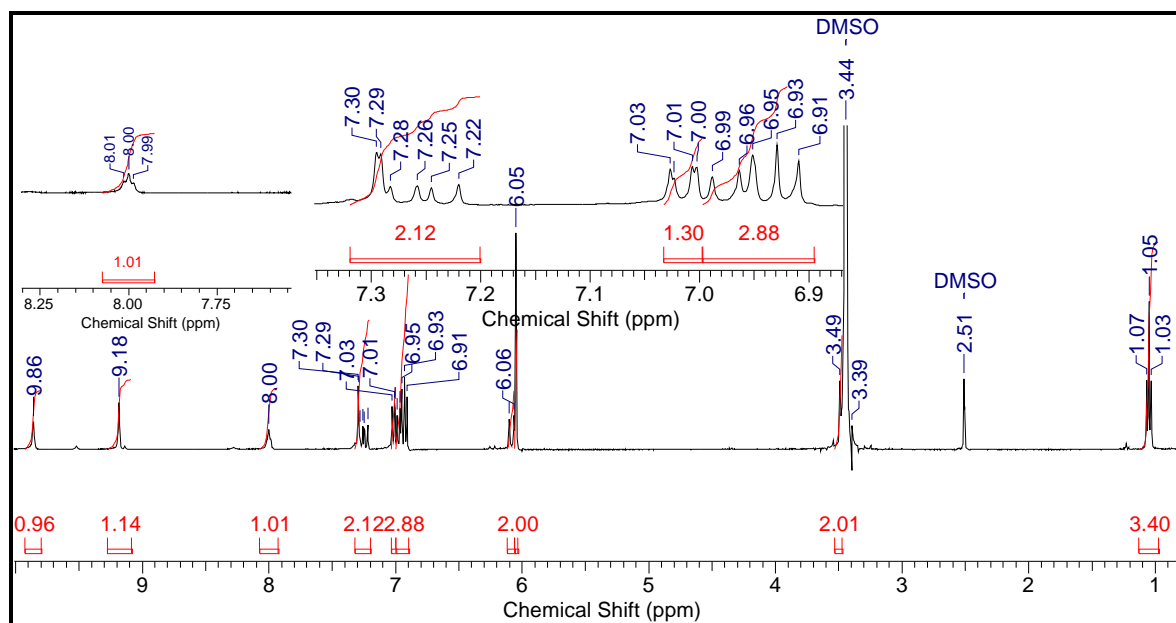
$\nu_{\text{C=S}}$ = 1101 (estiramento da tioamida);

$\delta_{\text{C-H}}$ (Csp^2) = 933 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

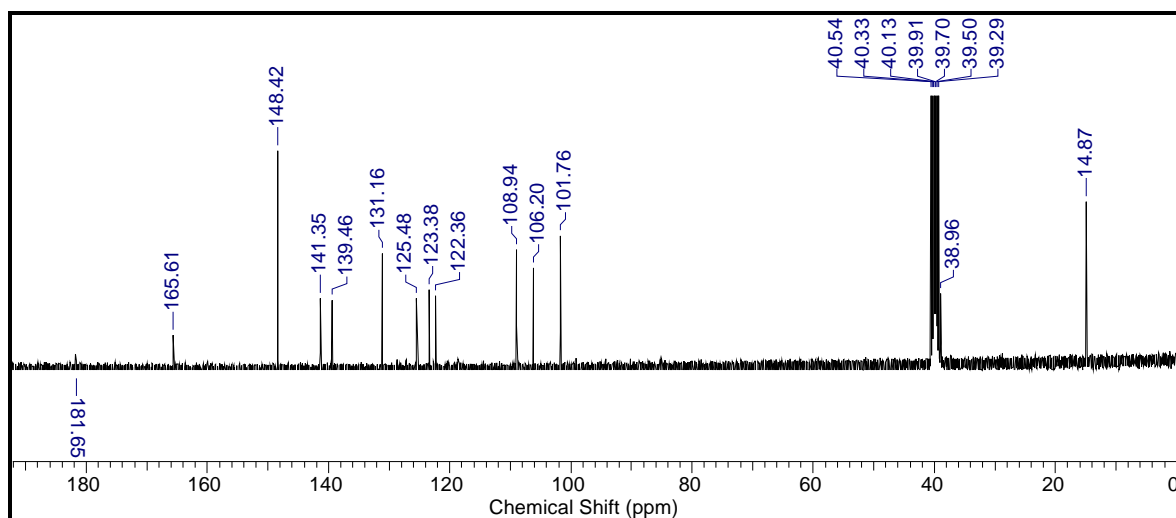
$\delta_{\text{C-H}}$ (Csp^2) = 802 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



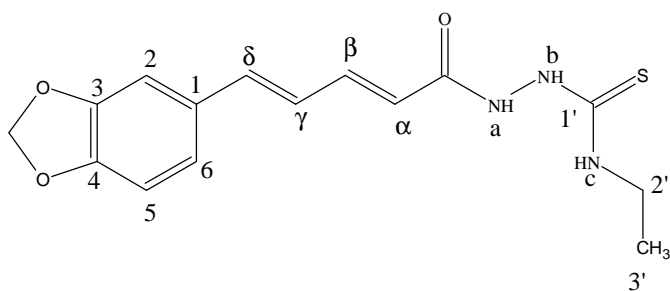
Espectro 11. Espectro de IV da *N*-etilidrazinacarbotioamida **5b**.



Espectro 12. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- D_6) da *N*-etilidrazinacarbotoamida **5b**.



Espectro 13. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO- D_6) da *N*-etilidrazinacarbotoamida **5b**.

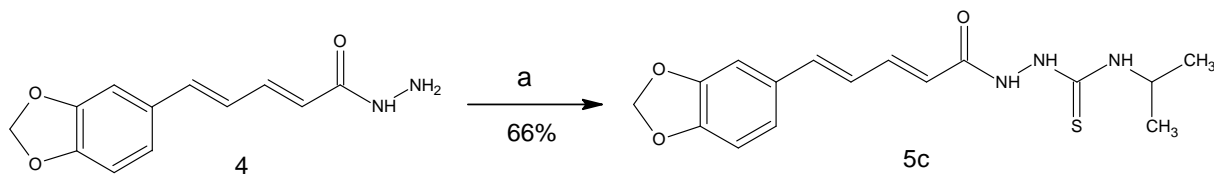


N*-etilidrazinacarbotoamida **5b*

Tabela 6. Deslocamento químico de RMN ^1H e RMN ^{13}C para **5b**.

Posição	δ ^1H (ppm) ; <i>J</i> (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	-----	181,65 (C)
2'	3,39 - 3,49 (m, 2H)	38,96 (CH ₂)
3'	1,05 (t; 7; 3H)	14,87 (CH ₃)
C=O	-----	165,61 (C)
α	6,08 (d; 15,3; 1H)	122,36 (CH)
β	7,25 (dd; 15,1 e 9,9; 1H)	141,35 (CH)
γ	6,91- 6,99 (m, 1H)	125,48 (CH)
δ	6,91- 6,99 (m, 1H)	139,46 (CH)
1	-----	131,16 (C)
2	7,29 (d; 1,5; 1H)	106,20 (CH)
3	-----	148,42 (C)
4	-----	148,42 (C)
5	6,91- 6,99 (m, 1H)	108,94 (CH)
6	7,01 (dd; 8,28 e 1,51; 1H)	123,38 (CH)
OCH ₂ O	6,05 (s, 2H)	101,76 (CH ₂)
a	9,86 (s, 1H)	-----
b	9,18 (s, 1H)	-----
c	8,00 (t; 5,2; 1H)	-----

4.8.3. Preparação da [(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-N-isopropilhidrazinacarbotoamida (**5c**)



Reagentes: a) Isotiocianato de isopropila, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 10. Reação de preparação da N-isopropilhidrazinacarbotoamida **5c**.

Pf: 193-194 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm^{-1}):

$\nu\text{N-H}$ = 3435 (estiramento de carbotoamida);

$\nu\text{N-H}$ = 3246 (estiramento de hidrazida);

$\nu\text{C-H}$ (Csp^3) = 2970 (estiramento de metila e metilenos);

$\nu\text{C=O}$ = 1666 (estiramento da carbonila de hidrazida conjugada);

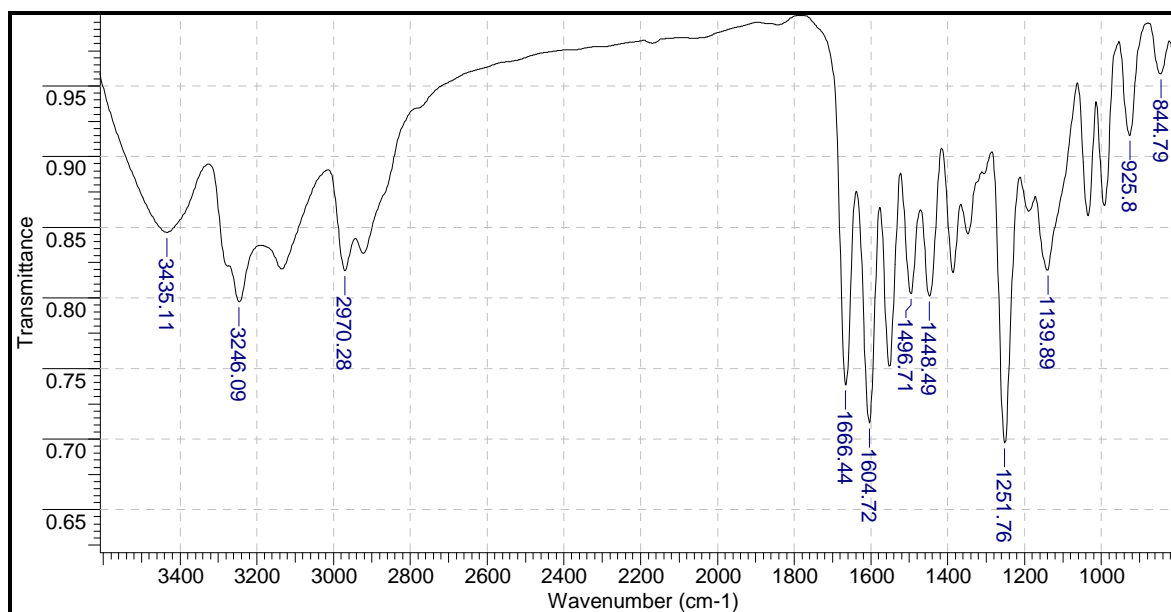
$\nu\text{C=C}$ (Csp^2) = 1604 - 1496 - 1448 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\nu\text{C-O-C}$ = 1251 (estiramento de éter);

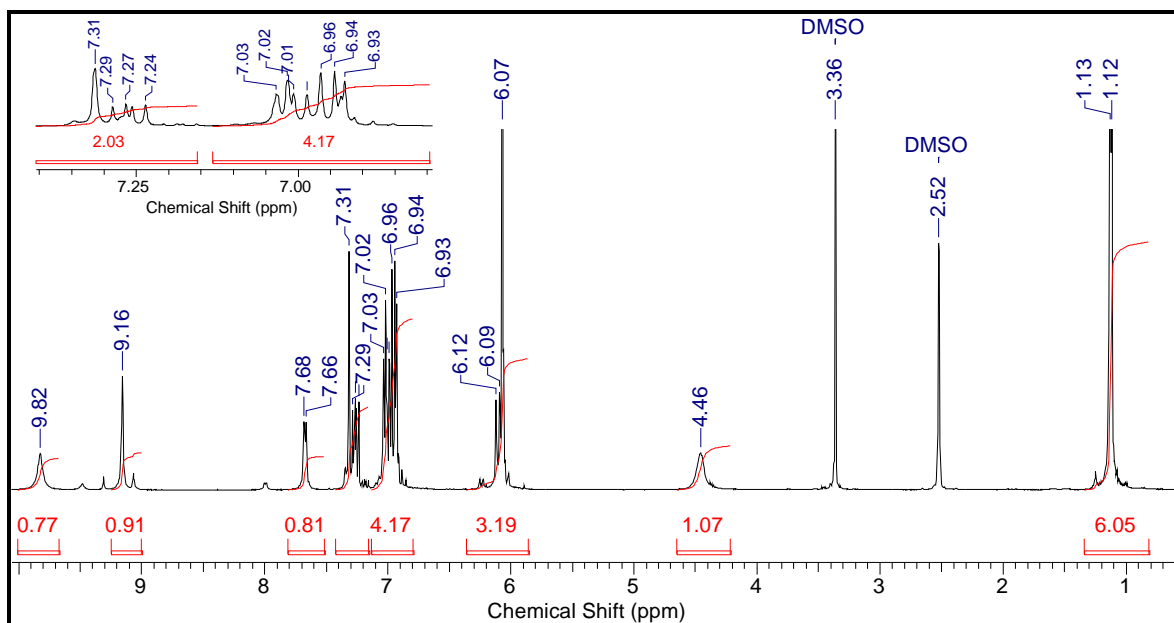
$\nu\text{C=S}$ = 1139 (estiramento da tioamida);

$\delta\text{C-H}$ (Csp^2) = 925 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

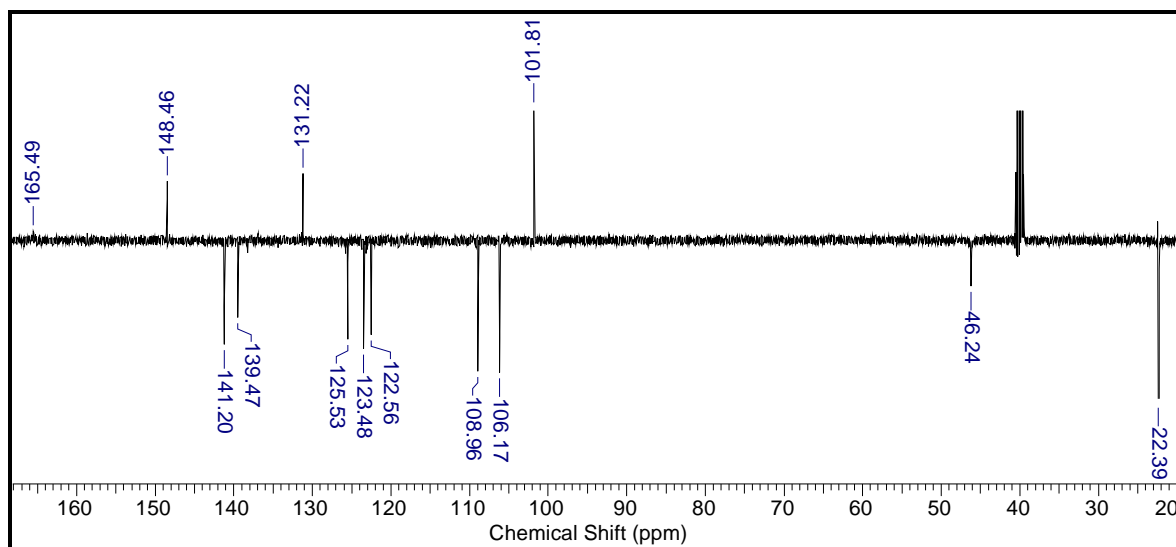
$\delta\text{C-H}$ (Csp^2) = 844 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



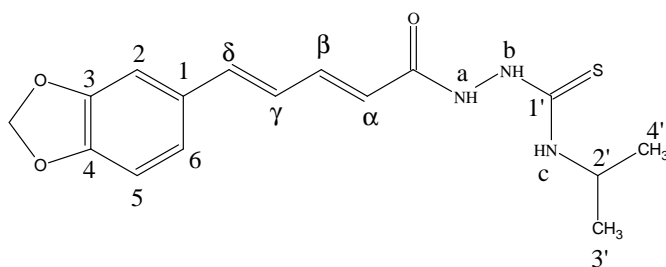
Espectro 14. Espectro IV da N-isopropilhidrazinacarbotoamida **5c**.



Espectro 15. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-isopropilidrazinacarbotoamida **5c**.



Espectro 16. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-isopropilidrazinacarbotoamida **5c**.



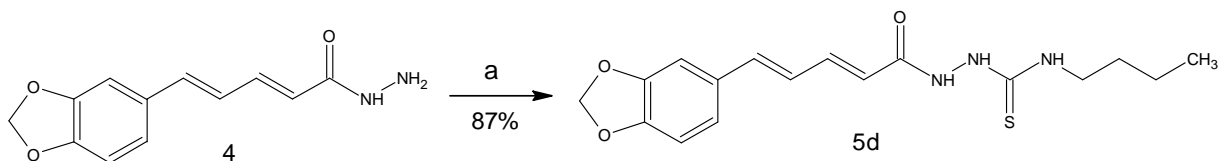
N-isopropilidrazinacarbotoamida 5c

Tabela 7. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5c.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	-----	*
2'	4,46 (s,1H)	46,24 (CH)
3'e 4'	1,12 (d; 6,6; 3H)	22,39 (CH ₃)
C=O	-----	165,49 (C)
α	6,10 (d; 15; 1H)	122,56 (CH)
β	7,26 (dd, 15 e 10,2; 1H)	141,20 (CH)
γ	6,93 - 7,03 (m, 1H)	125,53 (CH)
δ	6,93 - 7,03 (m, 1H)	139,47 (CH)
1	-----	131,22 (C)
2	7,31(s, 1H)	106,17 (CH)
3 e 4	-----	148,46 (C)
5	6,93 - 7,03 (m, 1H)	108,96 (CH)
6	6,93 - 7,03 (m; 1H)	123,48 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)	101,81 (CH ₂)
a	9,82 (s, 1H)	-----
b	9,16 (s, 1H)	-----
c	7,67 (d; 7,8; 1H)	-----

*Valor não observado no espectro de RMN ^{13}C .

4.8.4. Preparação da [(2*E*,4*E*)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-*N*-butilhidrazinacarbotoioamida (**5d**)



Reagentes: a) Isotiocianato de butila, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 11. Reação de preparação da *N*-butilidrazinacarbotoioamida **5d**.

Pf: 173-175°C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

ν N-H = 3435 (estiramento de carbotoioamida);

ν N-H = 3184 (estiramento de hidrazida);

ν C-H (Csp³) = 2945 - 2877 (estiramento de metila e metilenos);

ν C=O = 1660 (estiramento da carbonila de hidrazida conjugada);

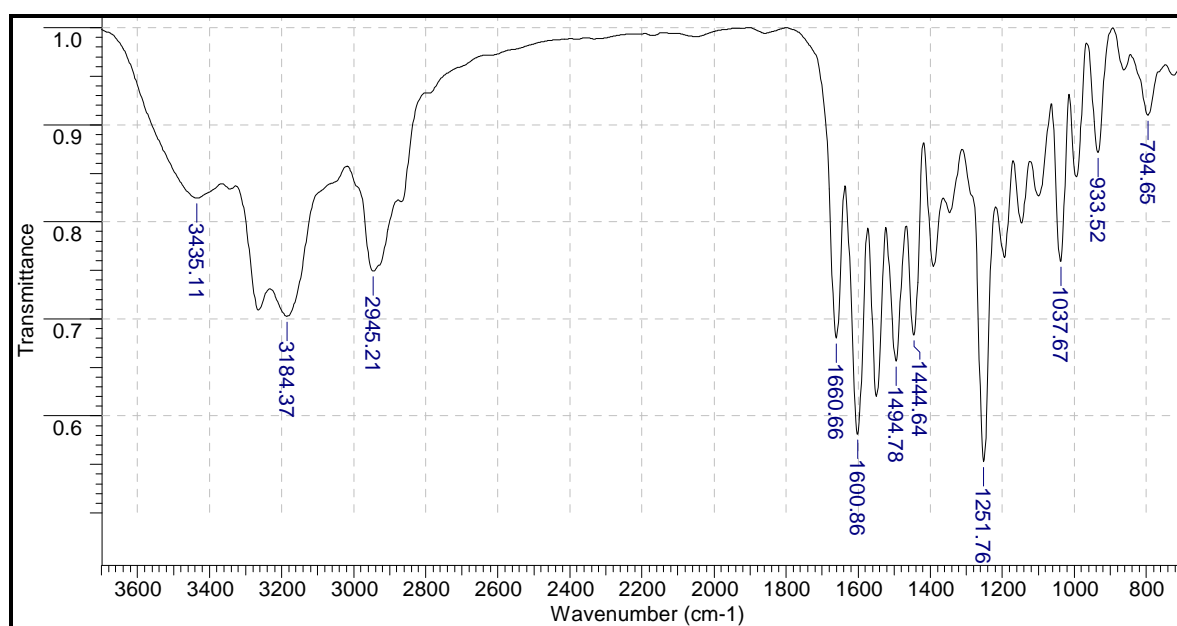
ν C=C (Csp²) = 1600 - 1494 - 1444 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

ν C-O-C = 1251 (estiramento de éter);

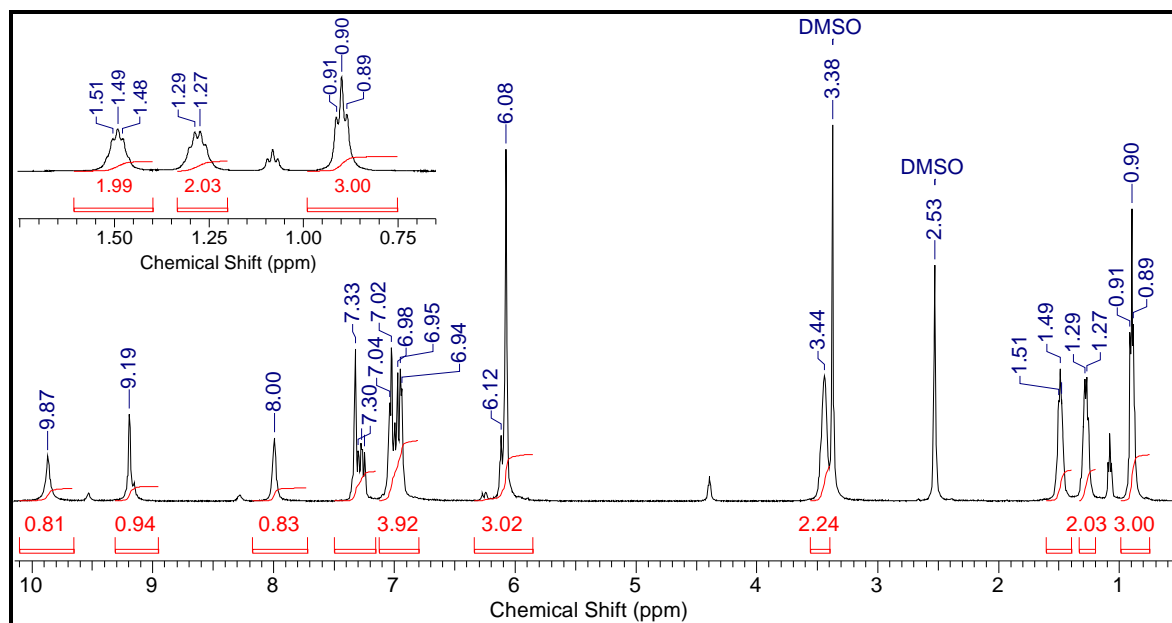
ν C=S = 1037 (estiramento da tioamida);

δ C-H (Csp²) = 933 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

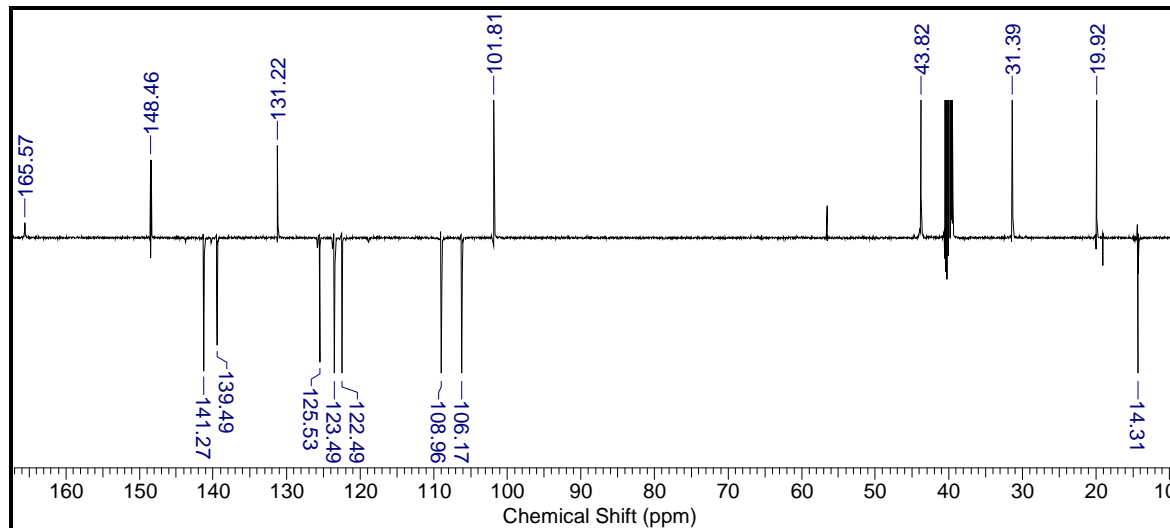
δ C-H (Csp²) = 794 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



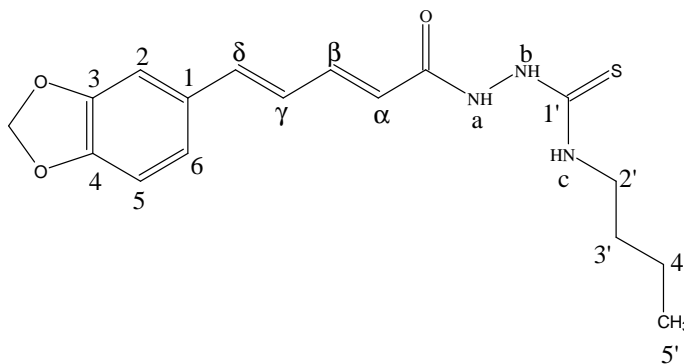
Espectro 17. Espectro de IV da *N*-butilidrazinacarbotoioamida **5d**.



Espectro 18. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-butilidrazinacarbotoamida **5d**.



Espectro 19. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-butilidrazinacarbotoamida **5d**.



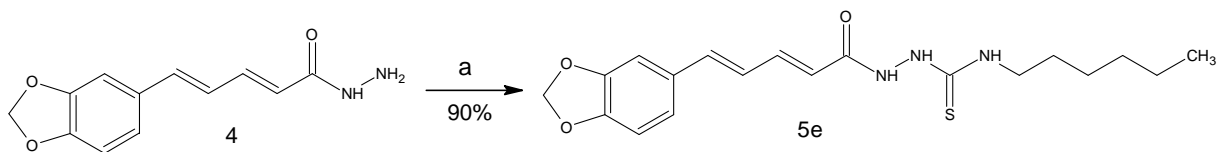
***N*-butilidrazinacarbotoamida 5d**

Tabela 8. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5d.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	-----	*
2'	3,44 (s,2H)	43,82(CH ₂)
3'	1,48-1,51 (m, 2H)	31,39 (CH ₂)
4'	1,27-1,29 (m, 2H)	19,92 (CH ₂)
5'	0,90 (t; 6,9; 3H)	14,31(CH ₃)
C=O	-----	165,57 (C)
α	6,12 (d; 1H)	122,49 (CH)
β	7,27 (dd, 14,82 e 10,72; 1H)	141,27 (CH)
γ	6,94 -7,04 (m, 1H)	125,53 (CH)
δ	6,94 -7,04 (m, 1H)	139,49 (CH)
1	-----	131,22 (C)
2	7,33 (s, 1H)	106,17 (CH)
3	-----	148,46 (C)
4	-----	148,40 (C)
5	6,94 -7,04 (m, 1H)	108,96 (CH)
6	6,94 -7,04 (m, 1H)	123,49 (CH)
OCH ₂ O	6,08 (s, 2H)	101,81 (CH ₂)
a	9,87 (s, 1H)	-----
b	9,19 (s, 1H)	-----
c	8,00 (s, 1H)	-----

*Valor não observado no espectro de RMN ^{13}C .

4.8.5. Preparação da [(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-N-hexilhidrazinacarbotoamida (5e)



Reagentes: a) Isotiocianato de hexila, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 12. Reação de preparação da N-hexilidrazinacarbotoamida 5e.

Pf: 165-167 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm^{-1}):

$\nu\text{N-H}$ = 3433 (estiramento de carbotoamida);

$\nu\text{N-H}$ = 3195 (estiramento de hidrazida);

$\nu\text{C-H}$ (Csp^3) = 2923 - 2860 (estiramento de metila e metilenos);

$\nu\text{C=O}$ = 1662 (estiramento da carbonila de hidrazida conjugada);

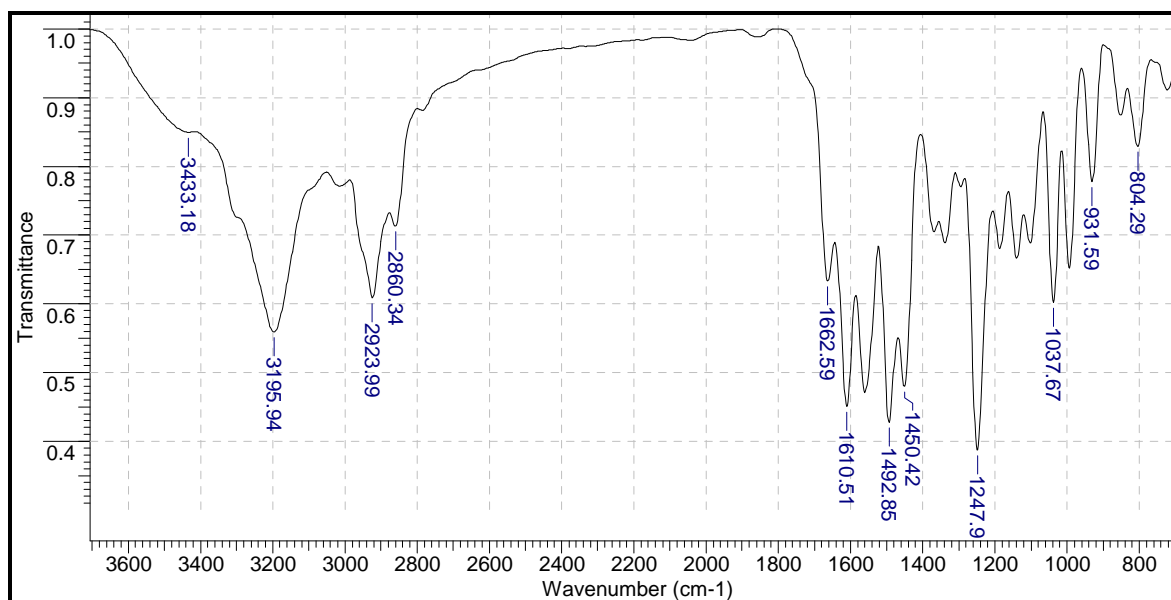
$\nu\text{C=C}$ (Csp^2) = 1610 - 1492 - 1450 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\nu\text{C-O-C}$ = 1247 (estiramento de éter);

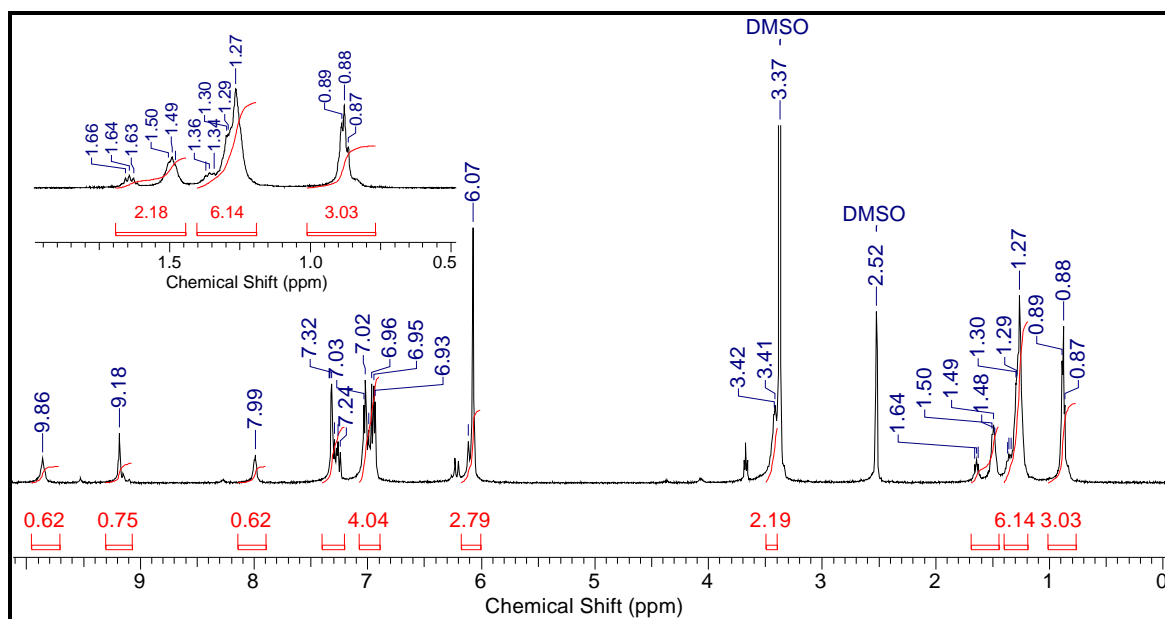
$\nu\text{C=S}$ = 1037 (estiramento da tioamida);

$\delta\text{C-H}$ (Csp^2) = 931 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

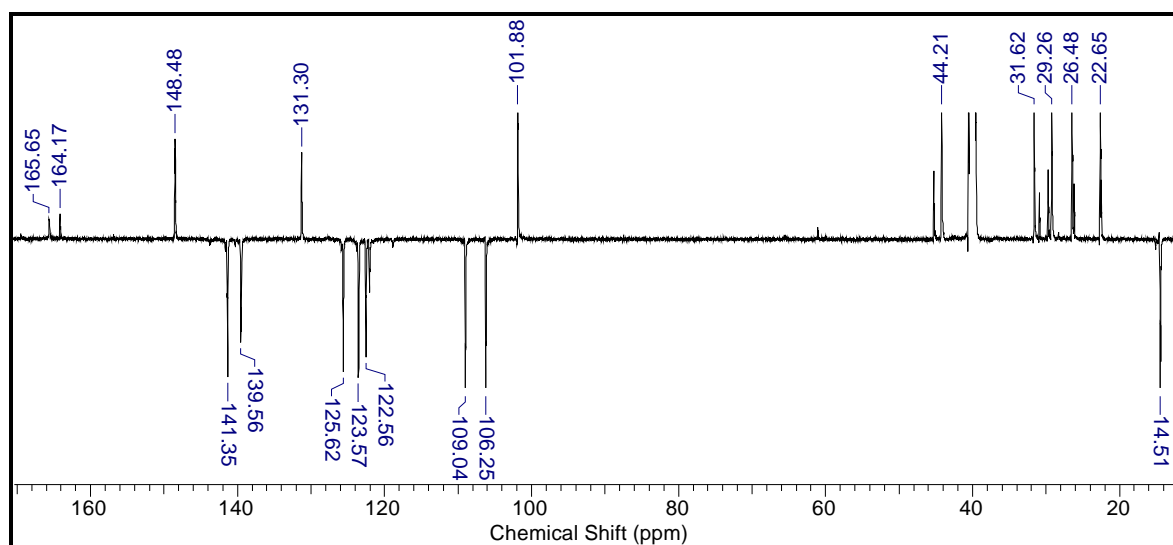
$\delta\text{C-H}$ (Csp^2) = 804 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



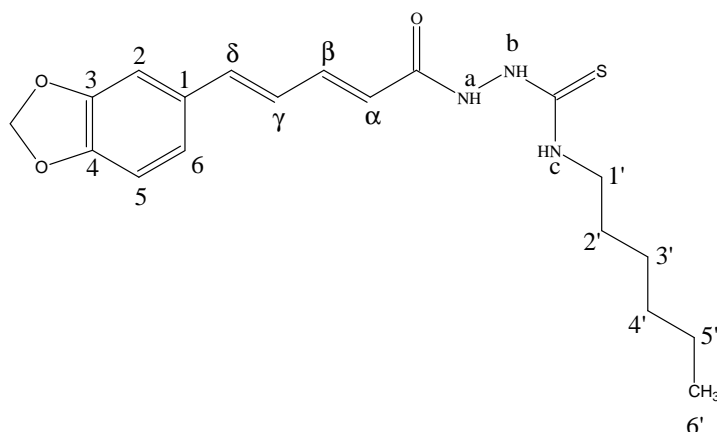
Espectro 20. Espectro de IV da N-hexilidrazinacarbotoamida 5e.



Espectro 21. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-hexilidrazinacarbotoamida 5e.



Espectro 22. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-hexilidrazinacarbotoamida 5e.

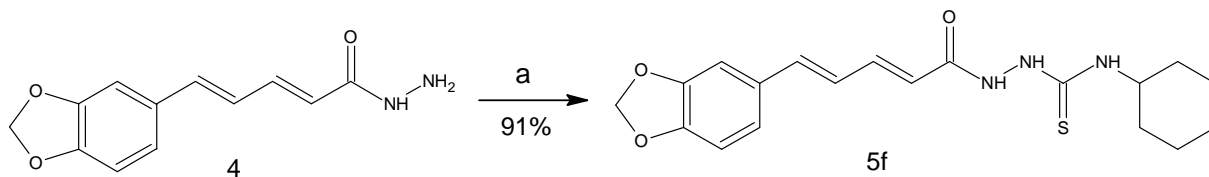


***N*-hexilidrazinacarbotoamida 5e**

Tabela 9. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5e.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	3,41 (s,2H)	44,21 (CH ₂)
2'	1,48 - 1,66 (m, 2H)	29,26 (CH ₂)
3'	1,27 - 1,37 (m, 2H)	26,48 (CH ₂)
4'	1,27 - 1,37 (m, 2H)	31,62 (CH ₂)
5'	1,27 - 1,37 (m, 2H)	22,65 (CH ₂)
6'	0,88 (t; 5; 3H)	14,51 (CH ₃)
C=O	-----	164,17 (C)
α	6,11 (d, 1H)	122,56 (CH)
β	7,26 (dd; 14,98 e 10,56; 1H)	141,35 (CH)
γ	6,93 - 7,03 (m, 1H)	125,62 (CH)
δ	6,93 - 7,03 (m, 1H)	139,56 (CH)
1	-----	131,30 (C)
2	7,32 (s, 1H)	106,25 (CH)
3 e 4	-----	148,48 (C)
5	6,93 - 7,03 (m, 1H)	109,04 (CH)
6	6,93 - 7,03 (m, 1H)	123,57 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)	101,88 (CH ₂)
a	9,86 (s, 1H)	-----
b	9,18 (s,1H)	-----
c	7,99 (s, 1H)	-----
C=S	-----	165,65 (C)

4.8.6. Preparação da [(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-N-cicloexilhidrazinacarbotioamida (**5f**)



Reagentes: a) Isotiocianato de cicloexila, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 13. Reação de preparação da N-cicloexilhidrazinacarbotioamida **5f**.

Pf: 192-194 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm^{-1}):

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3435 (estiramento de carbotioamida);

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3211 (estiramento de hidrazida);

$\nu_{\text{C-H}}$ (Csp^3) = 2929 - 2852 (estiramento de metilenos);

$\nu_{\text{C=O}}$ = 1637 (estiramento da carbonila de hidrazida conjugada);

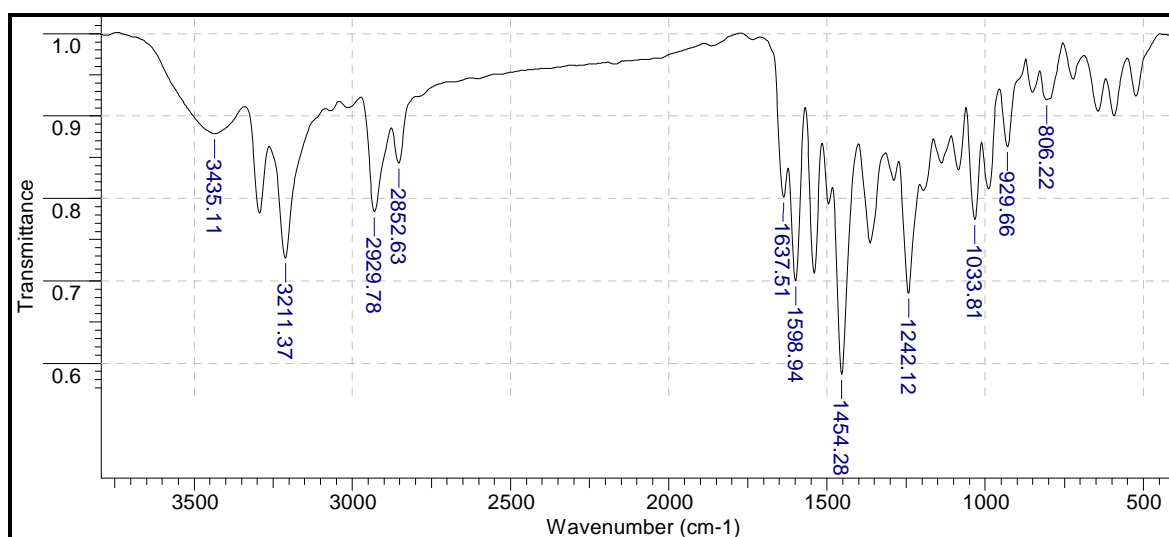
$\nu_{\text{C=C}}$ (Csp^2) = 1598 - 1454 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1242 (estiramento de éter);

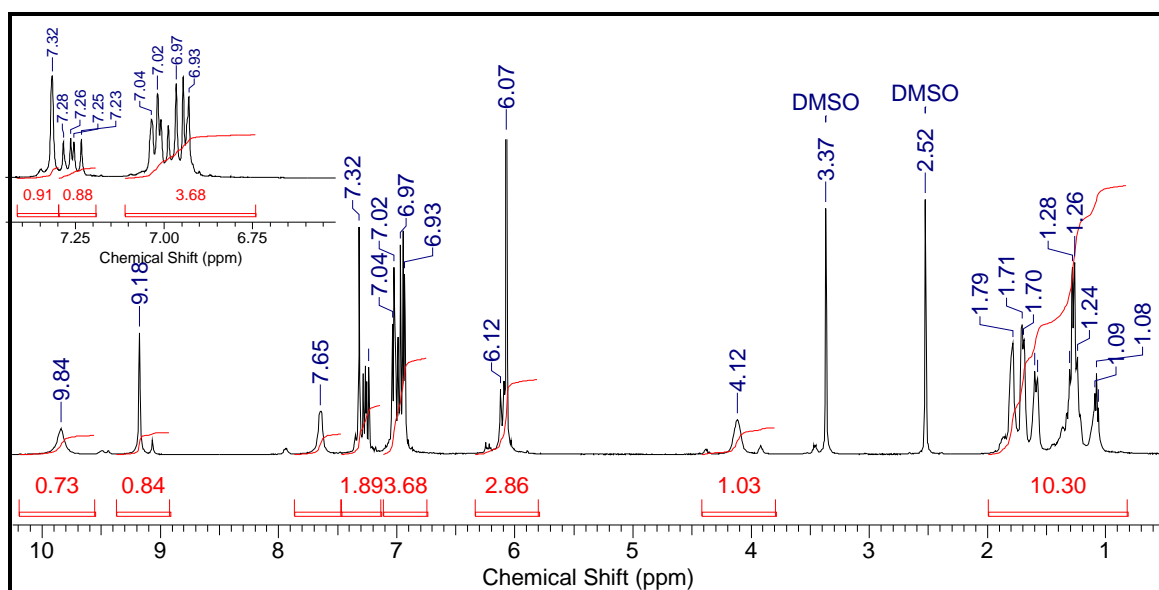
$\nu_{\text{C=S}}$ = 1033 (estiramento da tioamida);

$\delta_{\text{C-H}}$ (Csp^2) = 929 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

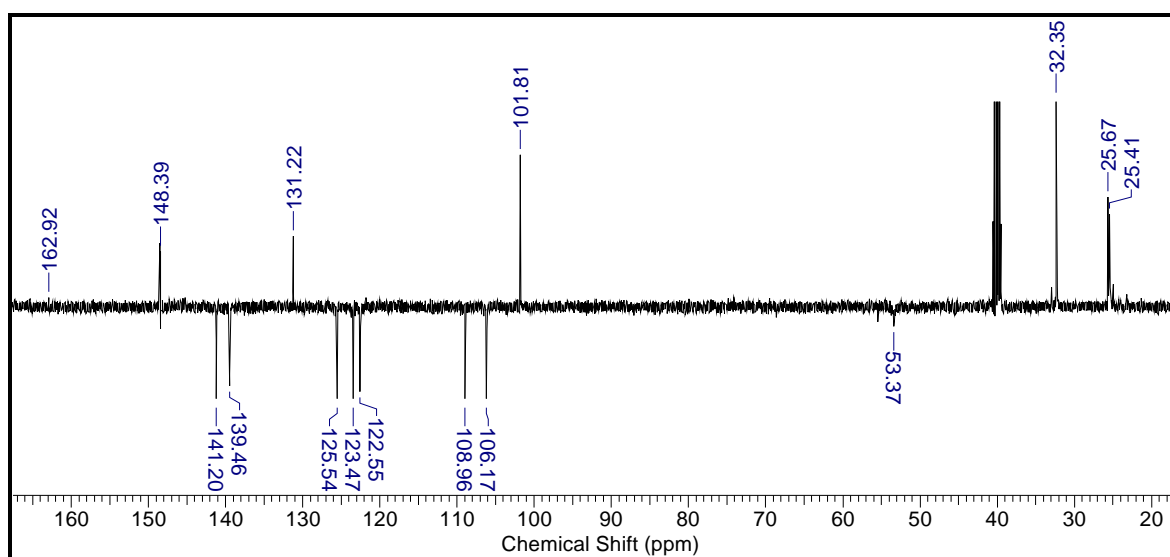
$\delta_{\text{C-H}}$ (Csp^2) = 806 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



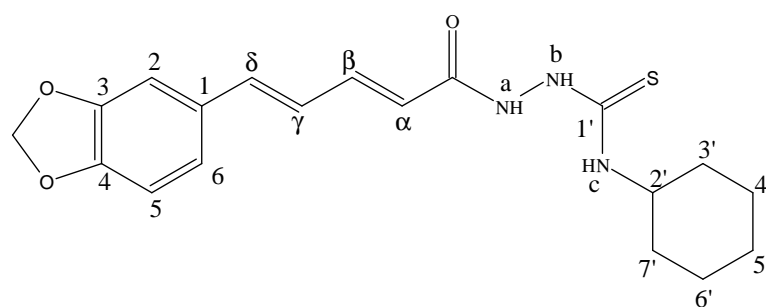
Espectro 23. Espectro de IV da N-cicloexilhidrazinacarbotioamida **5f**.



Espectro 24. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-cicloexilidrazinacarbotoamida **5f**.



Espectro 25. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-cicloexilidrazinacarbotoamida **5f**.



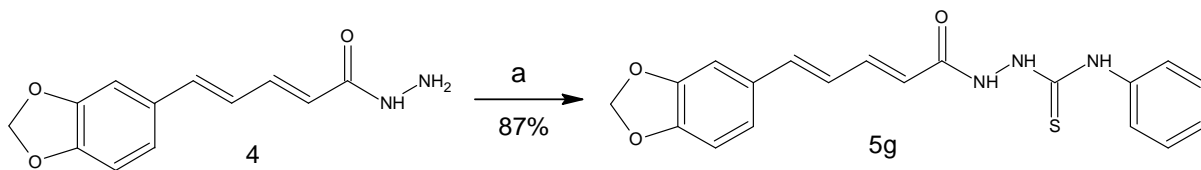
***N*-cicloexilidrazinacarbotoamida 5f**

Tabela 10. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5f.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'	-----	*
2'	4,07 - 4,19 (s,1H)	53,37 (CH ₂)
3'	1,06 - 1,89 (m, 2H)	32,35 (CH ₂)
4'	1,06 - 1,89 (m, 2H)	25,67 (CH ₂)
5'	1,06 - 1,89 (m, 2H)	25,41 (CH ₂)
6'	1,06 - 1,89 (m, 2H)	25,67 (CH ₂)
7'	1,06 - 1,89 (m, 2H)	32,35 (CH ₂)
C=O	-----	162,92(C)
α	6,10 (d; 15,13; 1H)	122,55 (CH)
β	7,25 (dd; 14,98 e 10,56; 1H)	141,20 (CH)
γ	6,93 - 7,04 (m, 1H)	125,54 (CH)
δ	6,93 - 7,04 (m, 1H)	139,46 (CH)
1	-----	131,22 (C)
2	7,32 (s,1H)	106,17 (CH)
3	-----	148,39 (C)
4	-----	148,39 (C)
5	6,93 - 7,04 (m, 1H)	108,96 (CH)
6	6,93 - 7,04 (m, 1H)	123,47 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)	101,81 (CH ₂)
a	9,84 (s, 1H)	-----
b	9,18 (s, 1H)	-----
c	7,65 (d; 2,52; 1H)	-----

*Valor não observado no espectro de RMN ^{13}C .

4.8.7. Preparação da [(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-N-fenilhidrazinacarbotioamida (**5g**)



Reagentes: a) Isotiocianato de fenila, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 14. Reação de preparação da N-fenilhidrazinacarbotioamida **5g**.

Pf: 149-150 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm^{-1}):

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3437 (estiramento de carbotioamida);

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3224 (estiramento de hidrazida);

$\nu_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 3045 (sistema aromático);

$\nu_{\text{C-H}}(\text{Csp}^3)$ = 2923 (estiramento de metileno do metilenodioxo);

$\nu_{\text{C=O}}$ = 1641 (estiramento da carbonila de hidrazida conjugada);

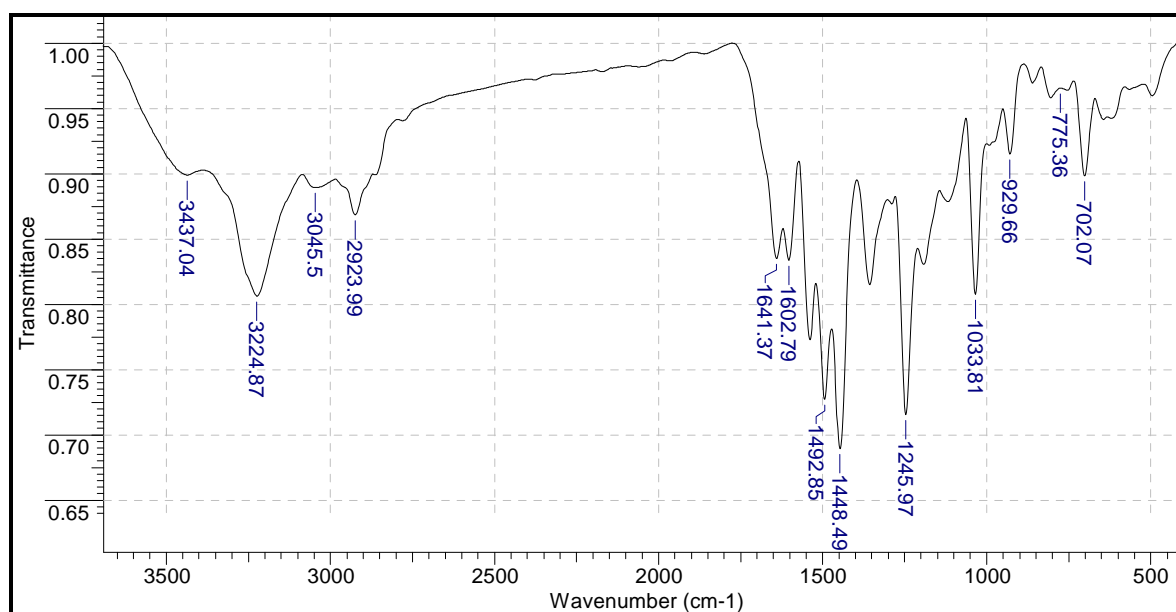
$\nu_{\text{C=C}}(\text{Csp}^2)$ = 1602 - 1492 - 1448 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1245 (estiramento de éter);

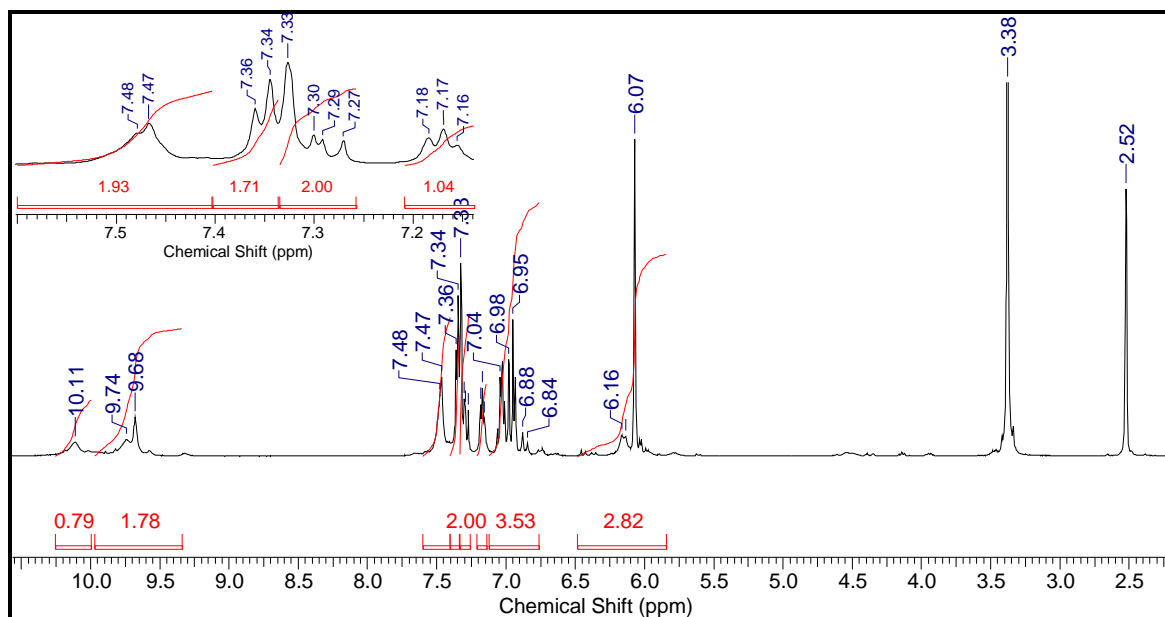
$\nu_{\text{C=S}}$ = 1033 (estiramento da tioamida);

$\delta_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 929 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

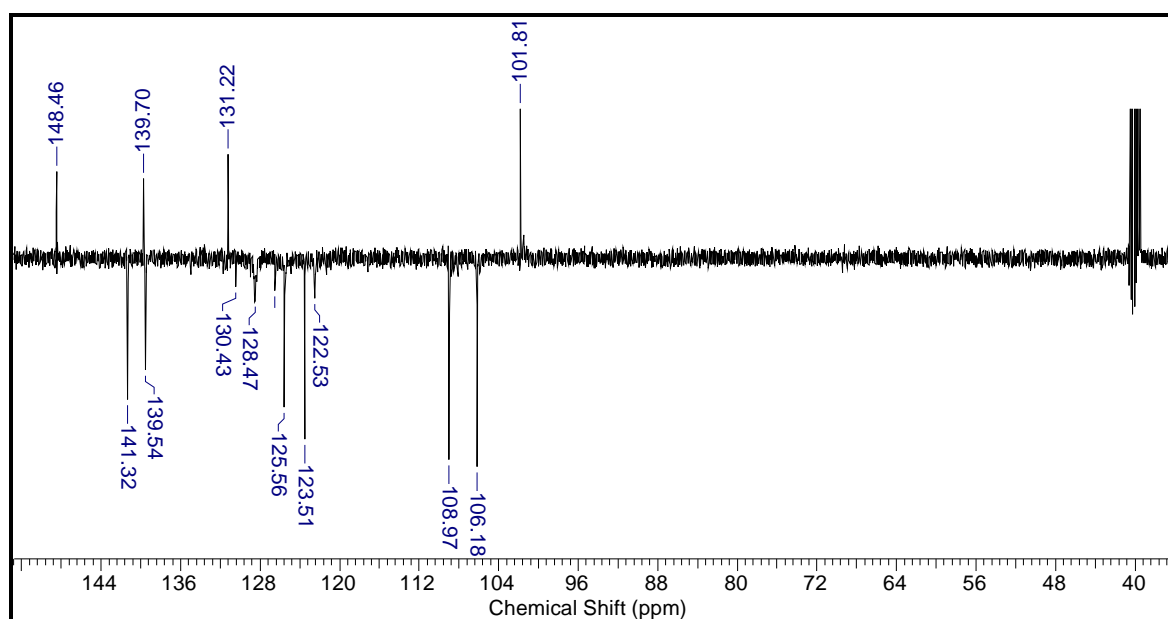
$\delta_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 775 e 702 (deformação angular fora do plano de C-H para 5H no sistema aromático).



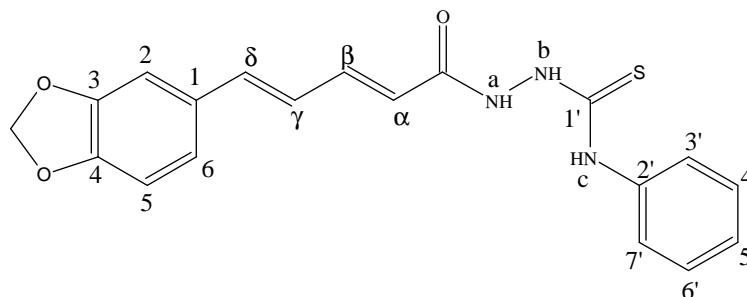
Espectro 26. Espectro de IV da N-fenilhidrazinacarbotioamida **5g**.



Espectro 27. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-fenilidrazinacarbotioamida **5g**.



Espectro 28. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-fenilidrazinacarbotioamida **5g**.



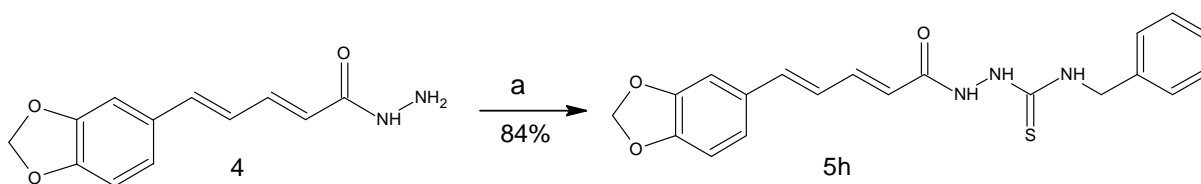
***N*-fenilidrazinacarbotoamida 5g**

Tabela 11. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5g.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	-----	*
2'	-----	139,70(C)
3'	7,47 - 7,48 (s,1H)	128,47(CH)
4'	7,34 - 7,36 (m, 1H)	130,43(CH)
5'	7,16 - 7,18 (m, 1H)	126,47(CH)
6'	7,34 - 7,36 (m, 1H)	130,43(CH)
7'	7,47 - 7,48 (s,1H)	128,47(CH)
C=O	-----	*
α	6,15 (d; 13,87; 1H)	122,53(CH)
β	7,27 - 7,33 (m; 1H)	141,32 (CH)
γ	6,84 - 7,04 (m, 1H)	125,56 (CH)
δ	6,84 - 7,04 (m, 1H)	139,54 (CH)
1	-----	131,22 (C)
2	7,33 (s, 1H)	106,18 (CH)
3 e 4	-----	148,46 (C)
5	6,84 - 7,04 (m, 1H)	108,97 (CH)
6	6,84 - 7,04 (m, 1H)	123,51 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)	101,81 (CH ₂)
a	10,11 (s, 1H)	-----
b	9,74 (s, 1H)	-----
c	9,68 (s, 1H)	-----

*Valor não observado no espectro de RMN ^{13}C .

4.8.8. Preparação da [(2*E*,4*E*)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-*N*-benzilhidrazinacarbotoamida (**5h**)



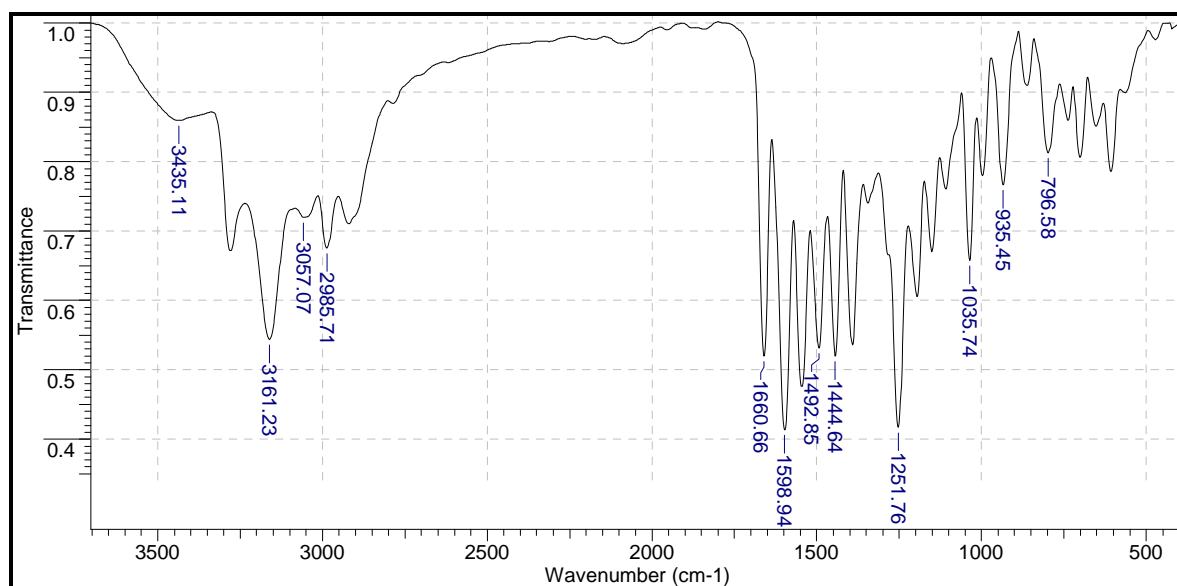
Reagentes: a) Isotiocianato de benzila, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 15. Reação de preparação da *N*-benzilhidrazinacarbotoamida **5h**.

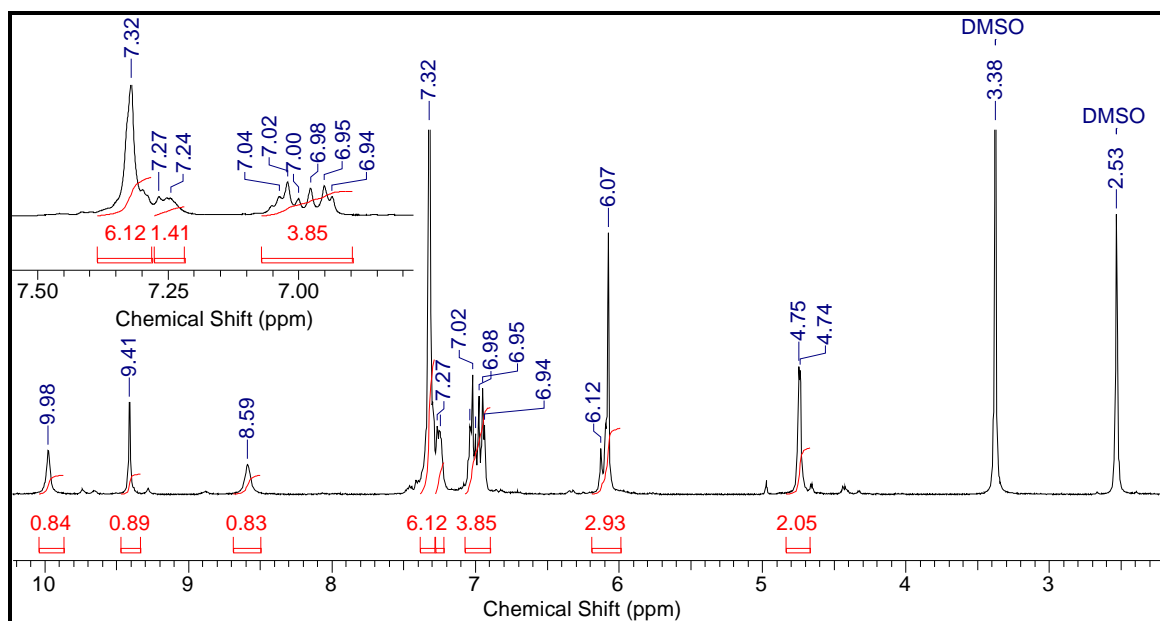
Pf: 196-197°C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm^{-1}):

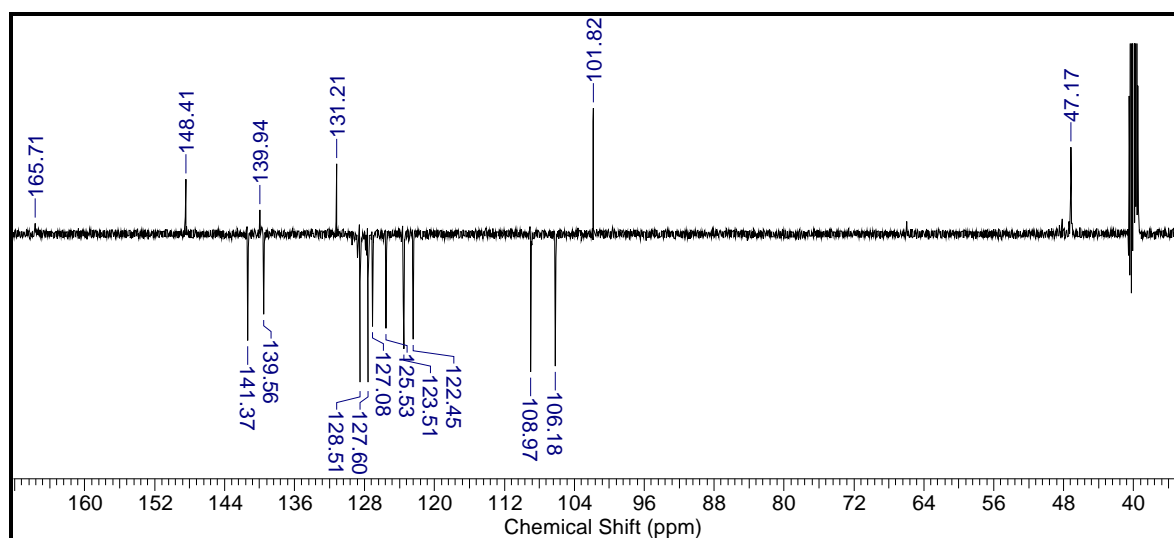
$\nu_{\text{N-H}}$ = 3435 (estiramento de carbotoamida);
 $\nu_{\text{N-H}}$ = 3161 (estiramento de hidrazida);
 $\nu_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 3057 (sistema aromático);
 $\nu_{\text{C-H}}(\text{Csp}^3)$ = 2985 (estiramento de metilenos);
 $\nu_{\text{C=O}}$ = 1660 (estiramento da carbonila de hidrazida conjugada);
 $\nu_{\text{C=C}}(\text{Csp}^2)$ = 1598- 1492- 1444 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);
 $\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1251 (estiramento de éter);
 $\nu_{\text{C=S}}$ = 1035 (estiramento da tioamida);
 $\delta_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 935 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);
 $\delta_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 796 e 702 (deformação angular fora do plano de C-H para 5H no sistema aromático).



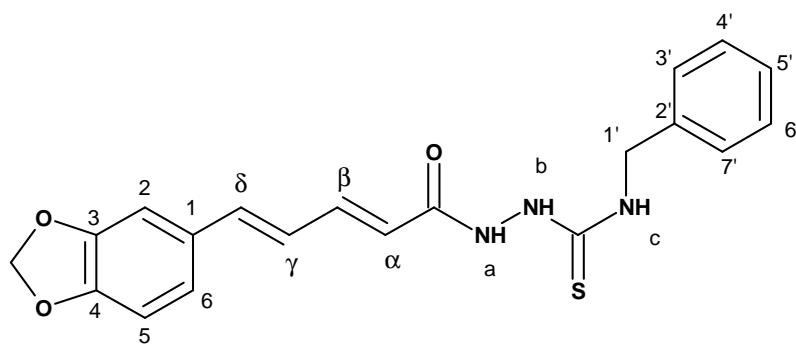
Espectro 29. Espectro de IV da *N*-benzilhidrazinacarbotoamida **5h**.



Espectro 30. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-benzilidrazinacarbotoamida 5h.



Espectro 31. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-benzilidrazinacarbotoamida 5h.



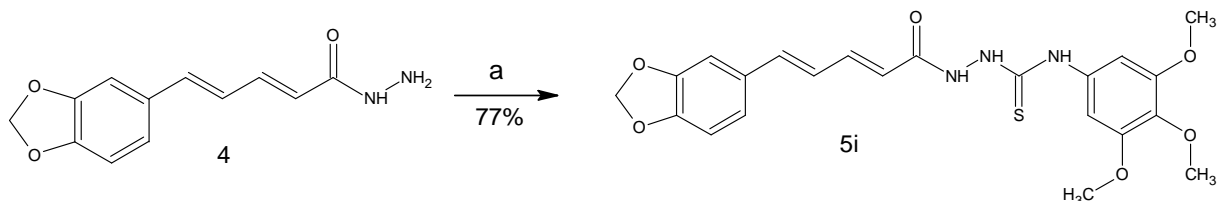
***N*-benzilidrazinacarbotioamida 5h**

Tabela 12. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5h.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
C=S	-----	*
1'	4,74 (d; 5,3; 2H)	41,17(CH ₂)
2'	-----	139,94 (C)
3' e 7'	7,29 - 7,32 (m, 1H)	128,51 (CH)
4' e 6'	7,29 - 7,32 (m, 1H)	127,60 (CH)
5'	7,29 - 7,32 (m, 1H)	127,08 (CH)
C=O	-----	165,71 (C)
α	6,11 (d; 15; 1H)	122,45 (CH)
β	7,24 - 7,27 (m, 1H)	141,37 (CH)
γ	6,94 - 7,04 (m, 1H)	125,53 (CH)
δ	6,94 - 7,04 (m, 1H)	139,56 (CH)
1	-----	131,21 (C)
2	7,32 (s; 1H)	106,18 (CH)
3 e 4	-----	148,41 (C)
5	6,94 - 7,04 (m, 1H)	108,97 (CH)
6	6,94 - 7,04 (m, 1H)	123,51 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)	101,82 (CH ₂)
a	9,98 (s, 1H)	-----
b	9,41 (s, 1H)	-----
c	8,59 (s, 1H)	-----

*Valor não observado no espectro de RMN ^{13}C .

4.8.9. Preparação da [(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-N-(3,4,5-trimetóxilfenil)-hidrazinacarbotoamida (**5i**)



Reagentes: a) Isotiocianato de trimetoxifenila, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 16. Reação de preparação da *N*-trimetóxilfenilidrazinacarbotoamida **5i**.

Pf: 189-191 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm^{-1}):

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3437 (estiramento de carbotoamida);

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3228 (estiramento de hidrazida);

$\nu_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 3064 (sistema aromático);

$\nu_{\text{C-H}}(\text{Csp}^3)$ = 2935 (estiramento de C-H da metila das metoxilas e metileno);

$\nu_{\text{C=O}}$ = 1660 (estiramento da carbonila de hidrazida conjugada);

$\nu_{\text{C=C}}(\text{Csp}^2)$ = 1606 - 1502 - 1452 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

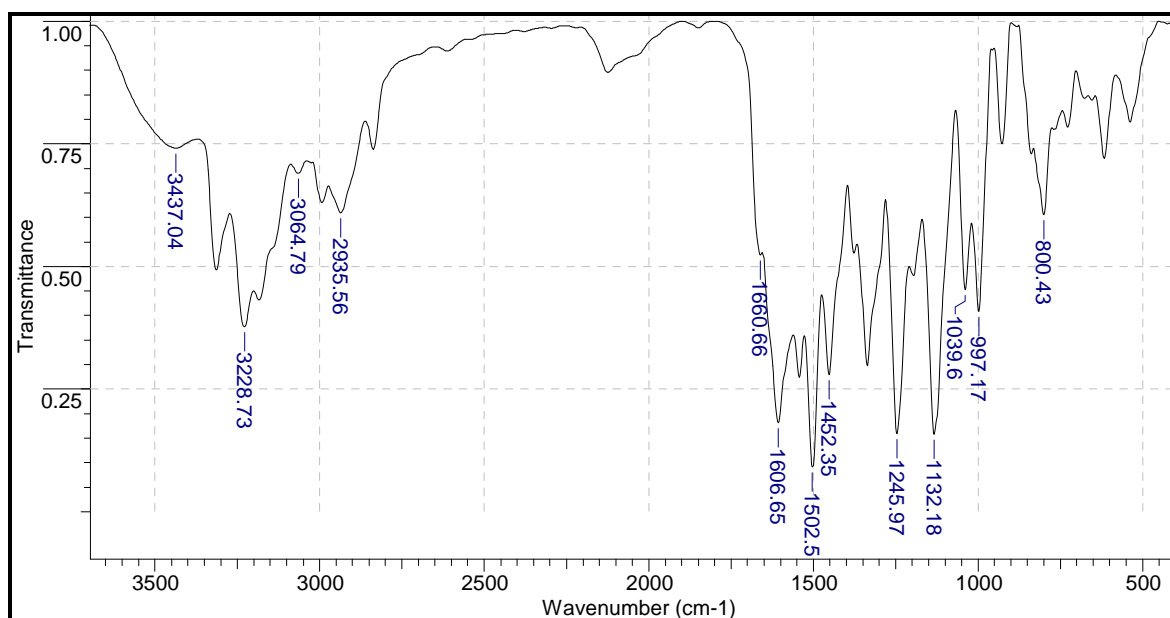
$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1245 (estiramento de éter);

$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1132 (metoxila);

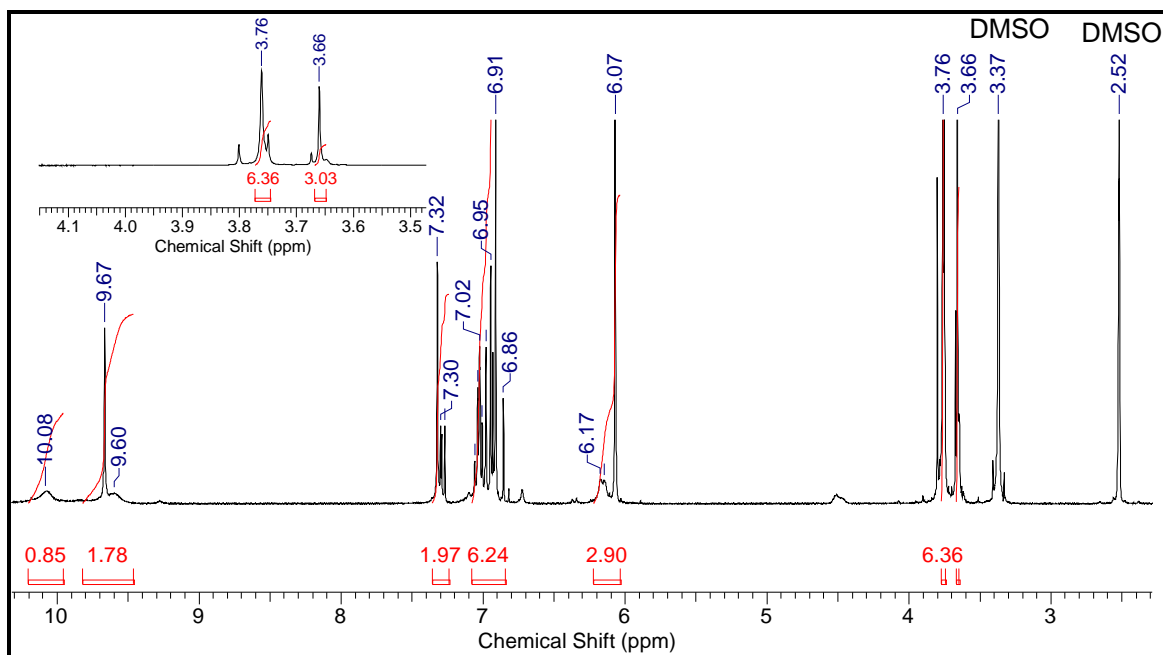
$\nu_{\text{C=S}}$ = 1039 (estiramento da tioamida);

$\delta_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 997 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

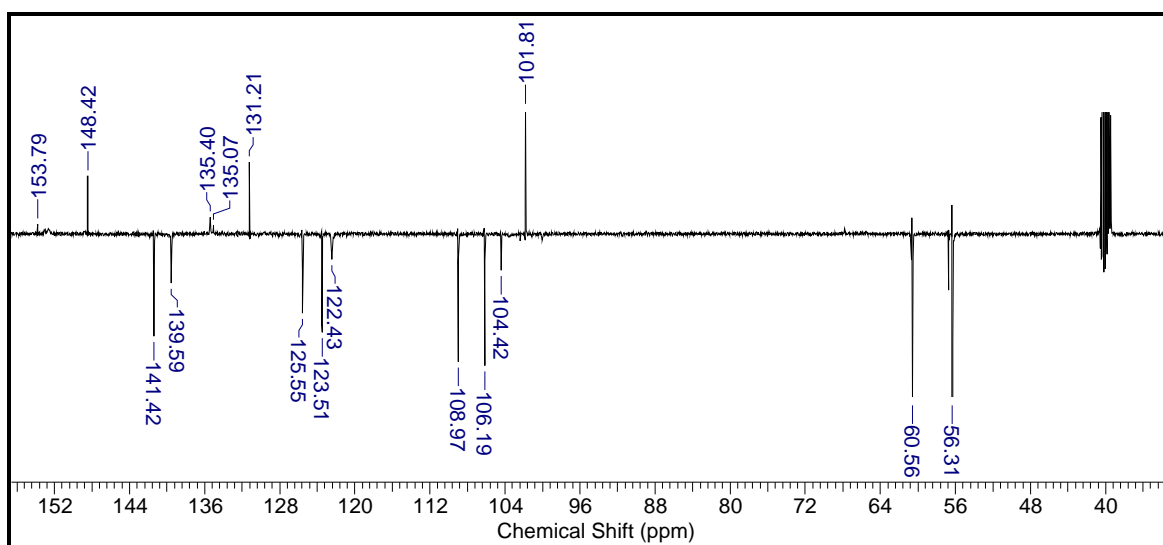
$\delta_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 800 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



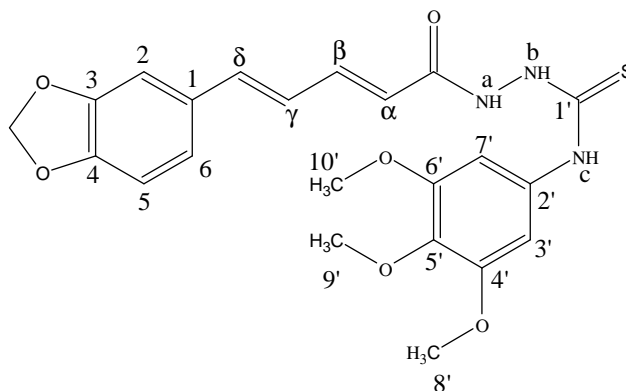
Espectro 32. Espectro de IV da *N*-trimetóxilfenilidrazinacarbotoamida **5i**.



Espectro 33. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-trimetóxiifenilidrazinacarbotoamida **5i**.



Espectro 34. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-trimetóxiifenilidrazinacarbotoamida **5i**.



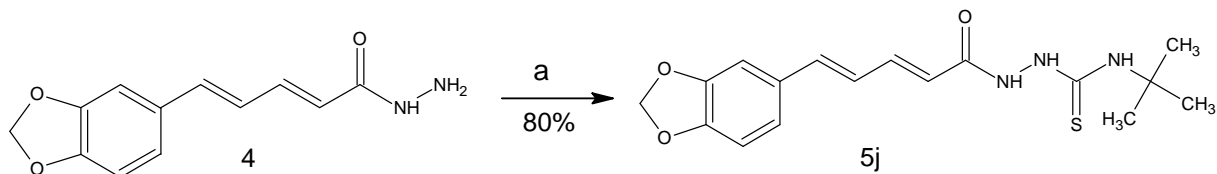
***N*-trimetóxiifenilidrazinacarbotoamida 5i**

Tabela 13. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5i.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	-----	*
2'	-----	135,07 (C)
3' e 7'	6,91(s,1H)	104,42 (CH)
4' e 6'	-----	153,79 (C)
5'	-----	135,40 (C)
8' e 10'	3,76 (s, 3H)	56,31 (CH ₃)
9'	3,66 (s, 3H)	60,56 (CH ₃)
C=O	-----	*
α	6,16 (d; 11,03; 1H)	122,43 (CH)
β	7,27 - 7,32 (m; 1H)	141,42 (CH)
γ	6,86 - 7,06 (m, 1H)	125,55 (CH)
δ	6,86 - 7,06 (m, 1H)	139,59 (CH)
1	-----	131,21 (C)
2	7,32 (s,1H)	106,19 (CH)
3	-----	148,42 (C)
4	-----	148,46 (C)
5	6,86 - 7,06 (m, 1H)	108,97 (CH)
6	7,03 (d; 7,88 e 1,26;1H)	123,51 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)	101,81 (CH ₂)
a	10,08 (s, 1H)	-----
b	9,67 (s, 1H)	-----
c	9,60 (s, 1H)	-----

*Valor não observado no espectro de RMN ^{13}C .

4.8.10. Preparação da [(2*E*,4*E*)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-*N*-*tert*-butilhidrazinacarbotoamida (5j)



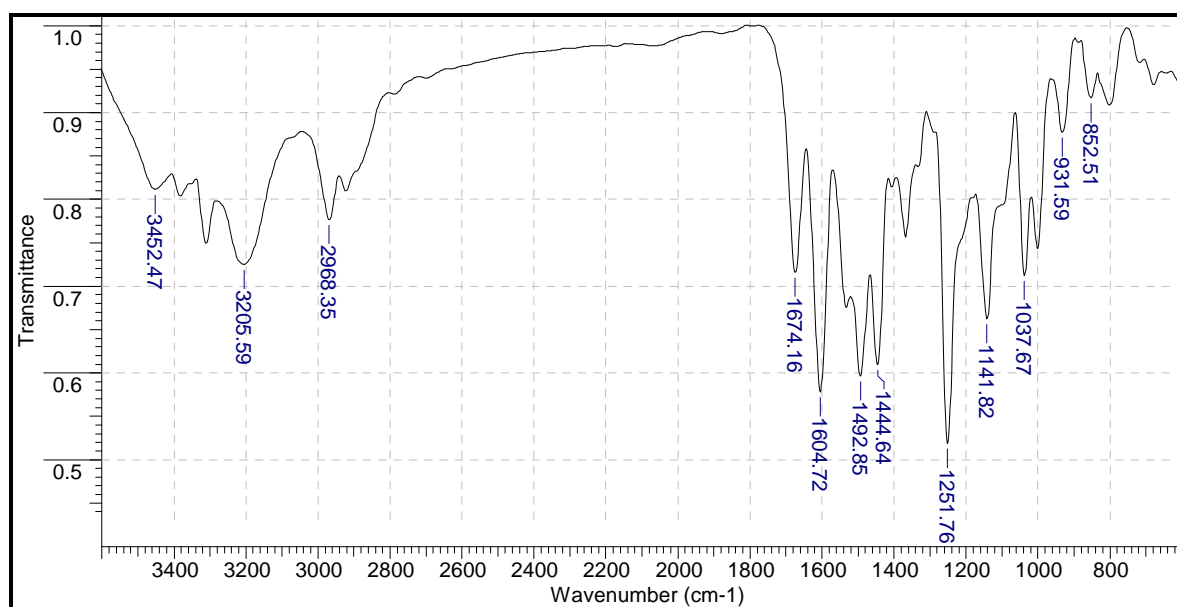
Reagentes: a) Isotiocianato de *tert*-butila, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 17. Reação de preparação da *N*-*tert*-butilidrazinacarbotoamida 5j.

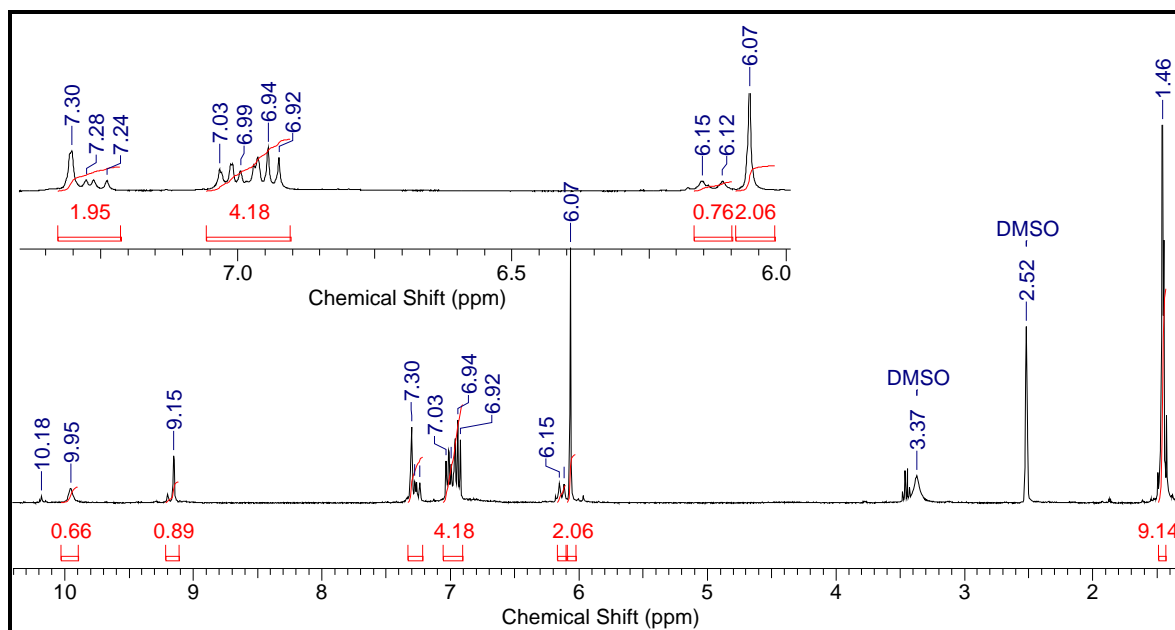
Pf: 135-136°C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

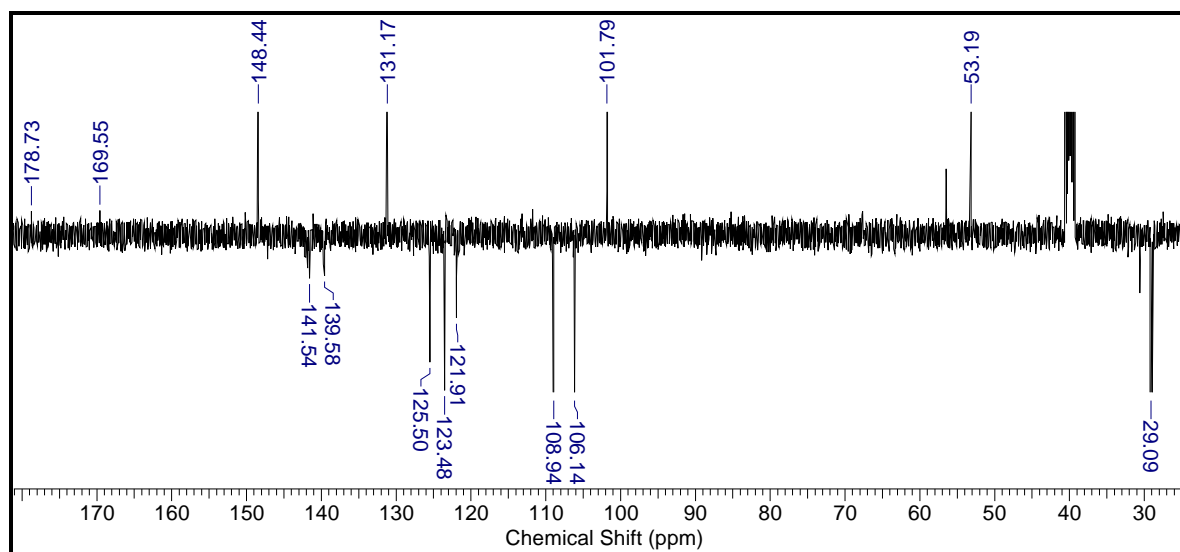
ν N-H = 3452 (estiramento de carbotoamida);
 ν C-H (Csp³) = 2968 (estiramento de metilenos);
 ν C=O = 1674 (estiramento da carbonila de hidrazida conjugada);
 ν C=C (Csp²) = 1604 - 1492 - 1444 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);
 ν C-O-C = 1251 (estiramento de éter);
 ν C-N = 1114 (estiramento C-N);
 ν C=S = 1037 (estiramento da tioamida);
 δ C-H (Csp²) = 931 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);
 δ C-H (Csp²) = 852 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



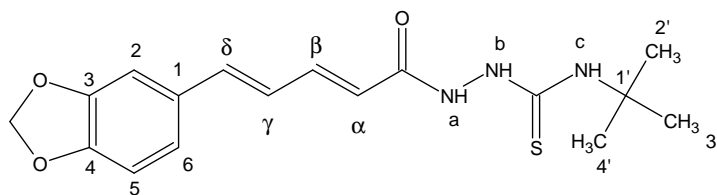
Espectro 35. Espectro de IV da *N*-*tert*-butilidrazinacarbotoamida 5j.



Espectro 36. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-*tert*-butilidrazinacarbotoamida **5j**.



Espectro 37. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-*tert*-butilidrazinacarbotoamida **5j**.

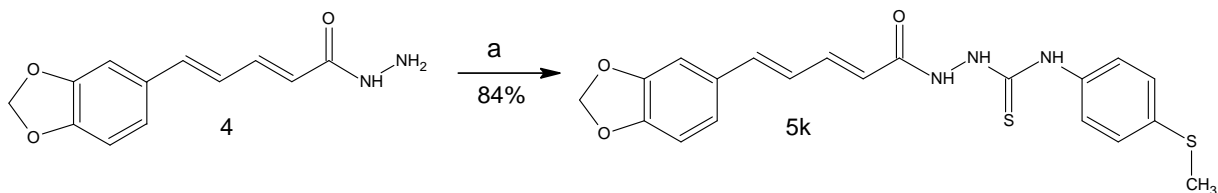


***N*-tert-butilidrazinacarbotoamida 5j**

Tabela 14. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5j.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; <i>J</i> (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'	-----	53,19 (C)
2', 3' e 4'	1,46 (s, 3H)	29,09 (CH ₃)
C=O	-----	169,55 (C)
α	6,14 (d; 14,81; 1H)	121,91 (CH)
β	7,24 - 7,30 (m; 1H)	141,54 (CH)
γ	6,92 - 7,03 (m, 1H)	125,50 (CH)
δ	6,92 - 7,03 (m, 1H)	139,58 (CH)
1	-----	131,17 (C)
2	7,30 (s, 1H)	106,14 (CH)
3	-----	148,44 (C)
4	-----	148,44 (C)
5	6,92 - 7,03 (m, 1H)	108,94 (CH)
6	7,02 (dd; 8,16 e 1,38; 1H)	123,48 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)	101,81 (CH ₂)
a	10,18 (s, 1H)	-----
b	9,95 (s, 1H)	-----
c	9,15 (s, 1H)	-----
C=S	-----	178,73 (C)

4.8.11. Preparação da [(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-N-(4-tiometilfenil)-hidrazinacarbotioamida (**5k**)



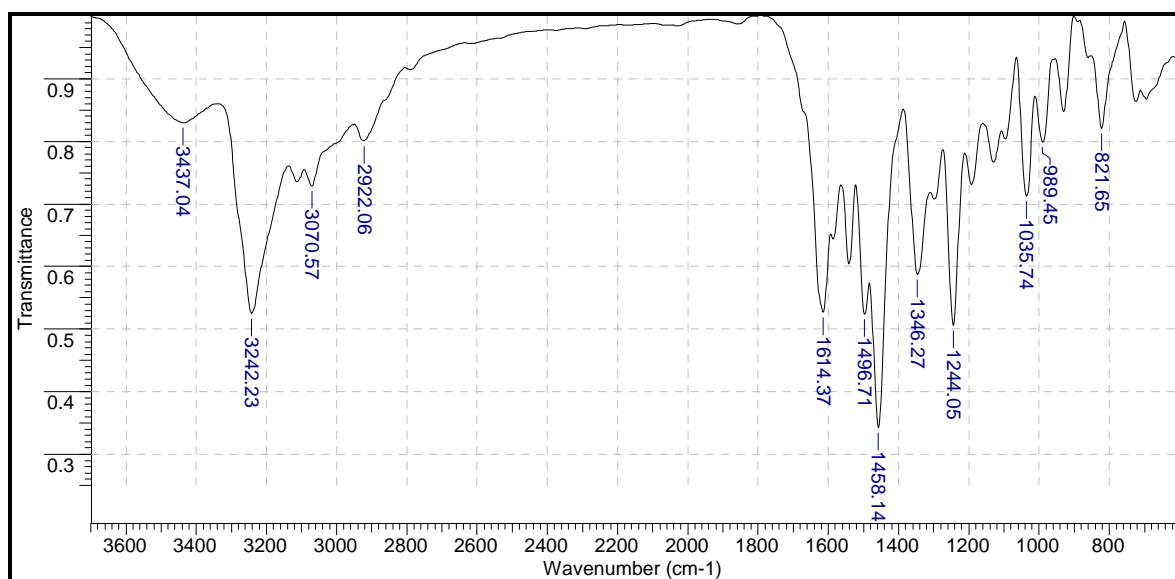
Reagentes: a) Isotiocianato de 4-tiometilfenila, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 18. Reação de preparação da N- 4-tiometilfenilidrazinacarbotioamida **5k**.

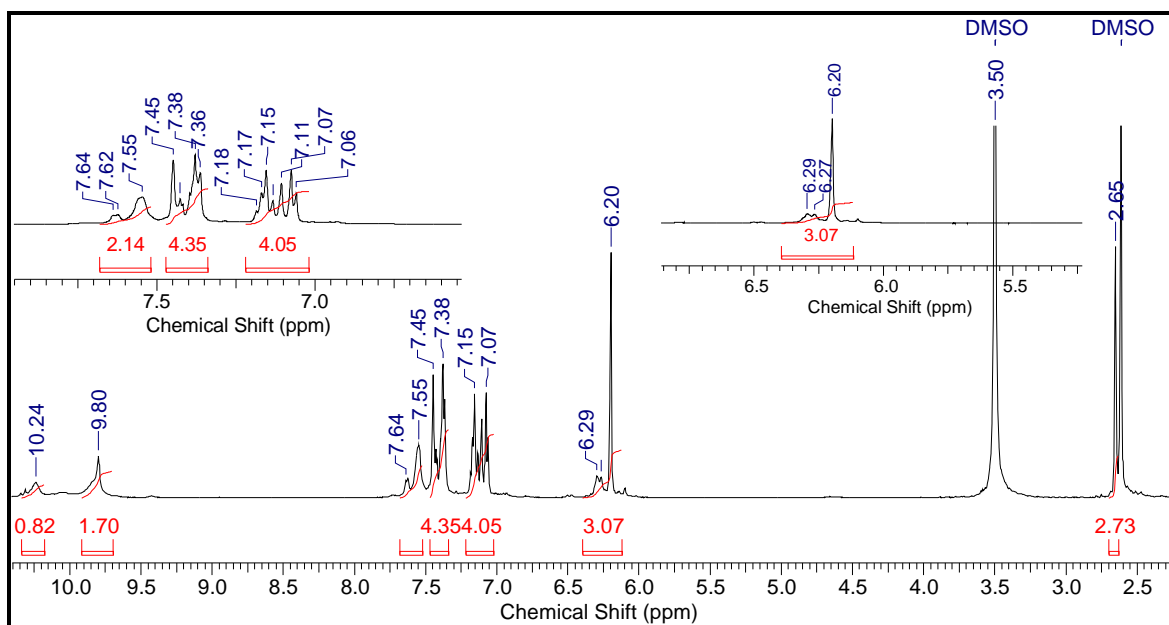
Pf: 175-177°C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm^{-1}):

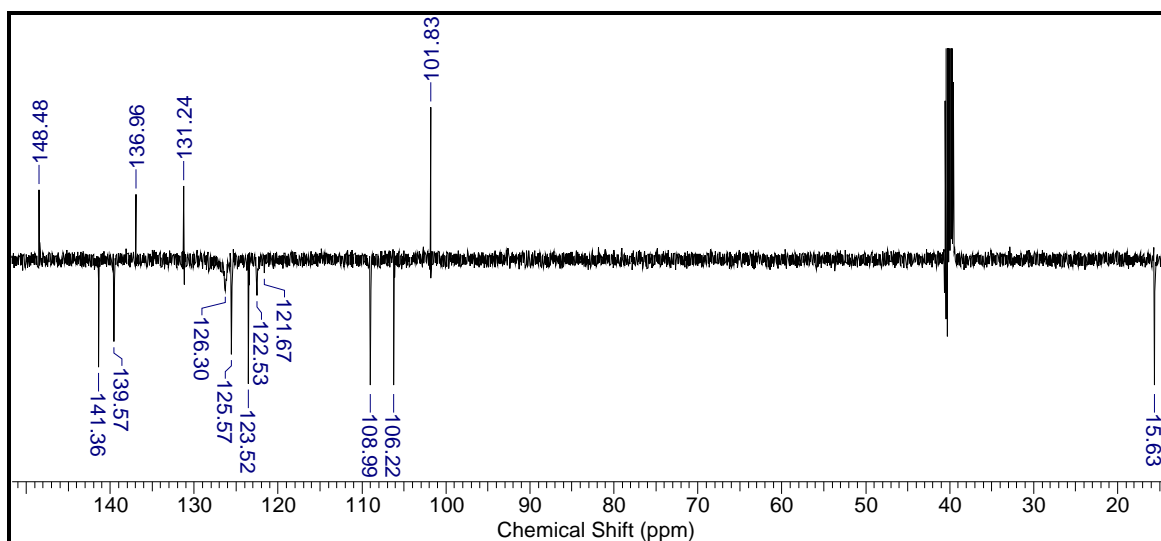
$\nu_{\text{N-H}}$ = 3437 (estiramento de carbotioamida);
 $\nu_{\text{N-H}}$ = 3242 (estiramento de hidrazida);
 $\nu_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 3070 (sistema aromático);
 $\nu_{\text{C-H}}(\text{Csp}^3)$ = 2922 (estiramento de metilenos);
 $\nu_{\text{C=C}}(\text{Csp}^2)$ = 1614 - 1496 - 1458 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);
 $\nu_{\text{C-N}}$ = 1346 (estiramento C-N);
 $\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1244 (estiramento de éter);
 $\nu_{\text{C=S}}$ = 1035 (estiramento da tioamida);
 $\delta_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 989 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);
 $\delta_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 821 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



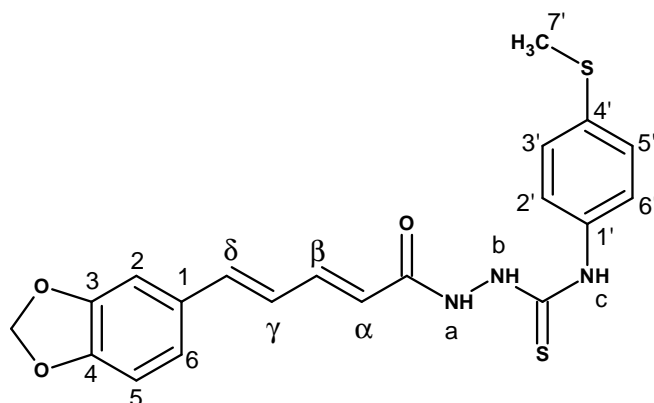
Espectro 38. Espectro de IV da N- 4-tiometilfenilidrazinacarbotioamida **5k**.



Espectro 39. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-4-tiometilfenilidrazinacarbotoamida **5k**.



Espectro 40. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-4-tiometilfenilidrazinacarbotoamida **5k**.



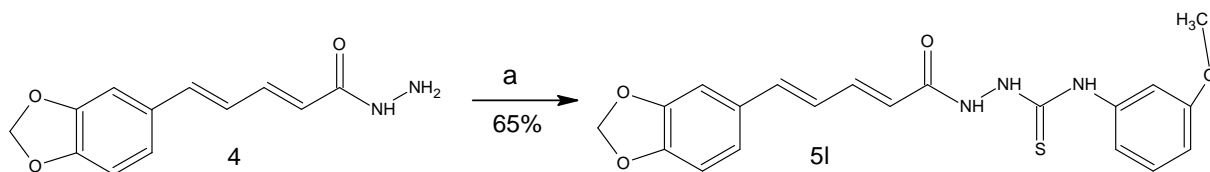
N*-4-tiometilfenilidrazinacarbotoamida **5k*

Tabela 15. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para **5k**.

Posição	δ ^1H (ppm) ; <i>J</i> (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
C=S	-----	*
1'	-----	136,96 (C)
2' e 6'	7,36 - 7,45 (m, 1H)	121,67 (CH)
3' e 5'	7,36 - 7,45 (m, 1H)	126,30 (CH)
4'	-----	*
7'	2,65 (s, 3H)	15,63 (CH)
C=O	-----	*
α	6,28 (d; 14,1; 1H)	122,53 (CH)
β	7,55 - 7,64 (m; 1H)	141,36 (CH)
γ	7,06 - 7,18 (m, 1H)	125,57 (CH)
δ	7,06 - 7,18 (m, 1H)	139,57 (CH)
1	-----	131,24 (C)
2	7,55 (s, 1H)	106,22 (CH)
3 e 4	-----	148,48 (C)
5	7,06 - 7,18 (m, 1H)	108,99 (CH)
6	7,06 - 7,18 (m; 1H)	123,52 (CH)
OCH ₂ O	6,20 (s, 2H)	101,83 (CH ₂)
a	10,24 (s, 1H)	-----
b	9,80 (s, 1H)	-----
c	9,80 (s, 1H)	-----

*Valor não observado no espectro de RMN ^{13}C

4.8.12. Preparação da [(2*E*,4*E*)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-*N*-(3-metóxfenil)-hidrazinacarbotoamida (**51**)



Reagentes: a) Isotiocianato de 3-metoxifenil, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 19. Reação de preparação da *N*-3-metoxifenilidrazinacarbotoamida **51**.

Pf: 174-175°C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3244 (estiramento de hidrazida);

$\nu_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 3070 (sistema aromático);

$\nu_{\text{C-H}}(\text{Csp}^3)$ = 2925 (estiramento de metila e metileno);

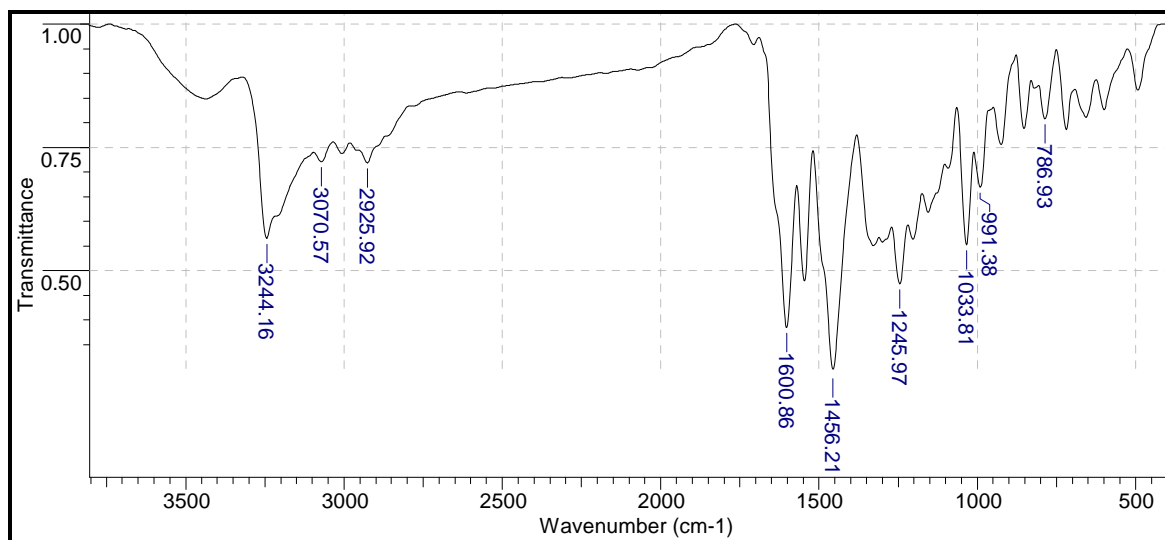
$\nu_{\text{C=C}}(\text{Csp}^2)$ = 1600 - 1456 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1245 (estiramento de éter);

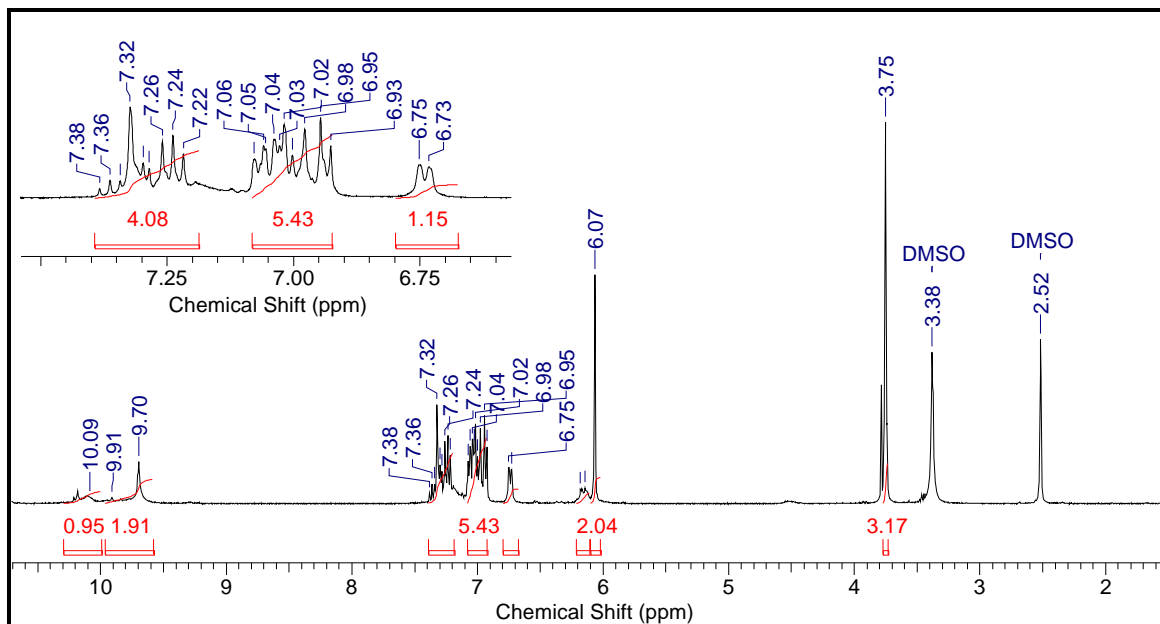
$\nu_{\text{C=S}}$ = 1033 (estiramento da tioamida);

$\delta_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 991 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

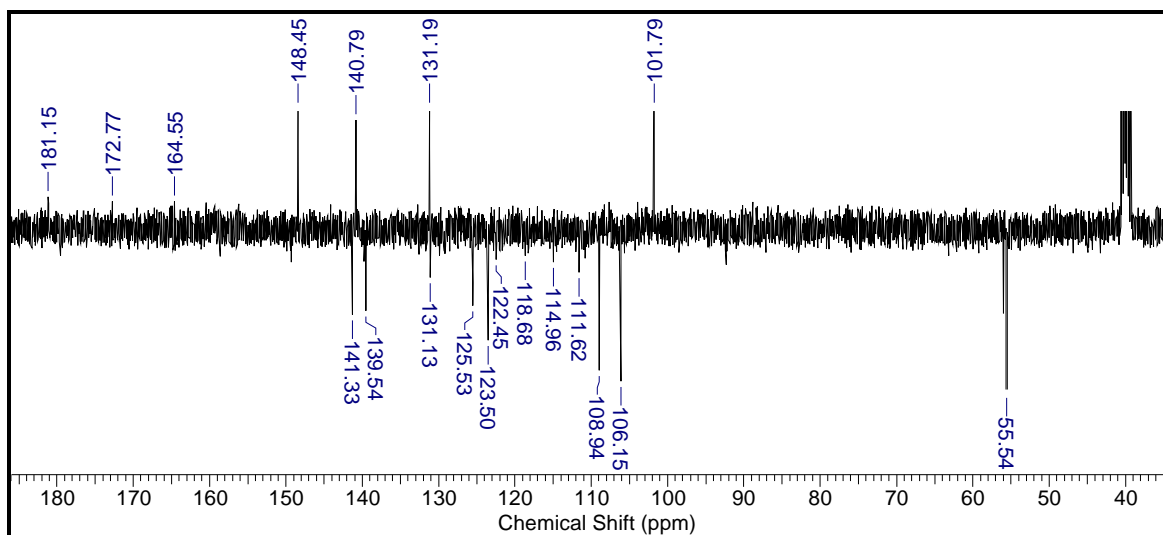
$\delta_{\text{C-H}}(\text{Csp}^2)$ = 786 (deformação angular fora do plano de C-H para 3H no sistema aromático).



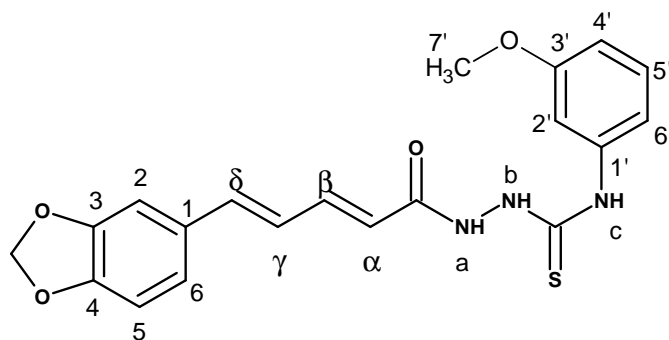
Espectro 41. Espectro de IV da *N*-3-metoxifenilidrazinacarbotoamida **51**.



Espectro 42. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-3-metoxifenilidrazinacarbotoamida **51**.



Espectro 43. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-3-metoxifenilidrazinacarbotoamida **51**.

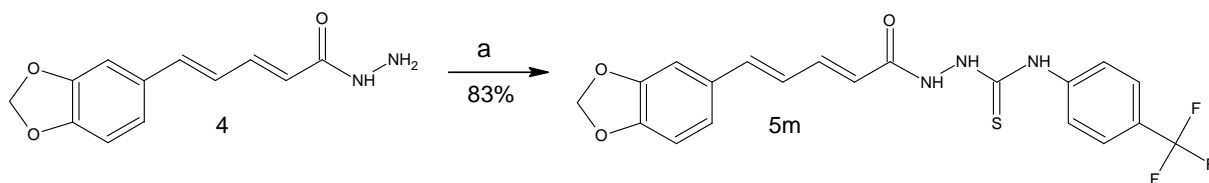


***N*-3-metoxifenilidrazinacarbotoamida 51**

Tabela 16. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 51.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
C=S	-----	181,15 (C)
1'	-----	140,79 (C)
2'	6,74 (d; 8,0; 1H)	111,62 (CH)
3'	-----	164,55 (C)
4'	6,93 - 7,08 (m, 1H)	114,96 (CH)
5'	7,22 - 7,38 (m, 1H)	131,13 (CH)
6'	7,22 - 7,38 (m, 1H)	118,68 (CH)
7'	3,75 (s, 3H)	55,54 (CH ₃)
C=O	-----	172,77 (C)
α	6,15 (d; 15,3; 1H)	122,45 (CH)
β	7,22 - 7,38 (m; 1H)	141,33 (CH)
γ	6,93 - 7,08 (m, 1H)	125,53 (CH)
δ	6,93 - 7,08 (m, 1H)	139,54 (CH)
1	-----	131,19 (C)
2	7,32 (s; 1H)	106,15 (CH)
3 e 4	-----	148,45 (C)
5	6,93 - 7,08 (m, 1H)	108,94 (CH)
6	6,93 - 7,08 (m; 1H)	123,50 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)	101,79 (CH ₂)
a	10,24 (s, 1H)	-----
b	9,80 (s, 1H)	-----
c	9,80 (s, 1H)	-----

4.8.13. Preparação da [(2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-il)penta-2,4-dienoil]-N-(4-trifluorometilfenil)-hidrazinacarbotioamida (5m)



Reagentes: a) Isotiocianato de 4-trifluorometilfenil, EtOH, refluxo, MW, 0,5h.

Esquema 20. Reação de preparação da *N*-4-trifluorometilfenilhidrazinacarbotioamida.

Pf: 177-178°C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3236 (estiramento de hidrazida);

$\nu_{\text{C-H}}$ (Csp^2) = 3076 (sistema aromático);

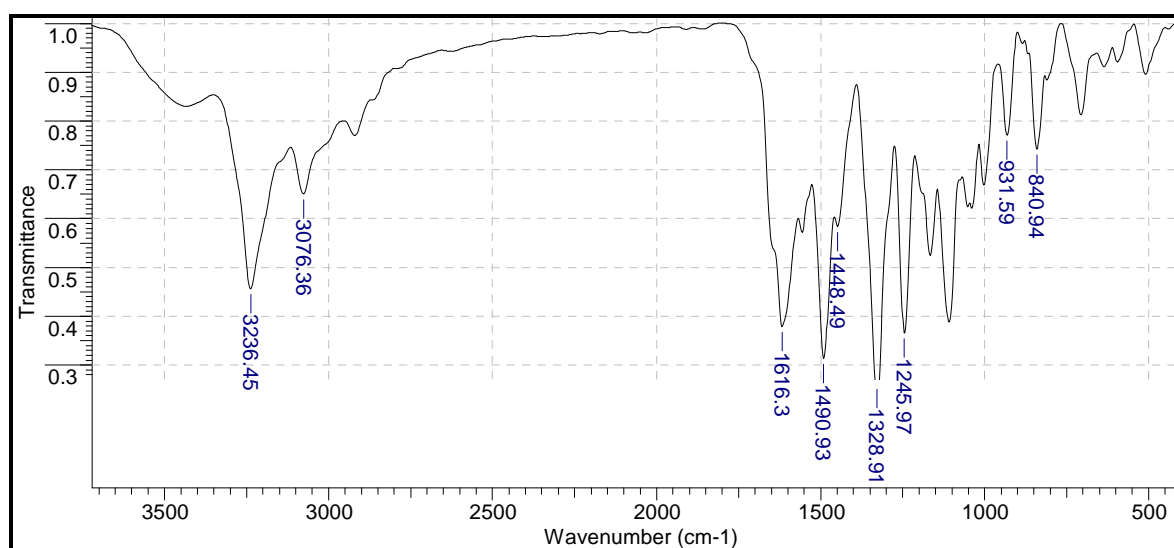
$\nu_{\text{C=C}}$ (Csp^2) = 1616 - 1490 - 1448 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\nu_{\text{C-F}}$ = 1328 (vibração da ligação C-F);

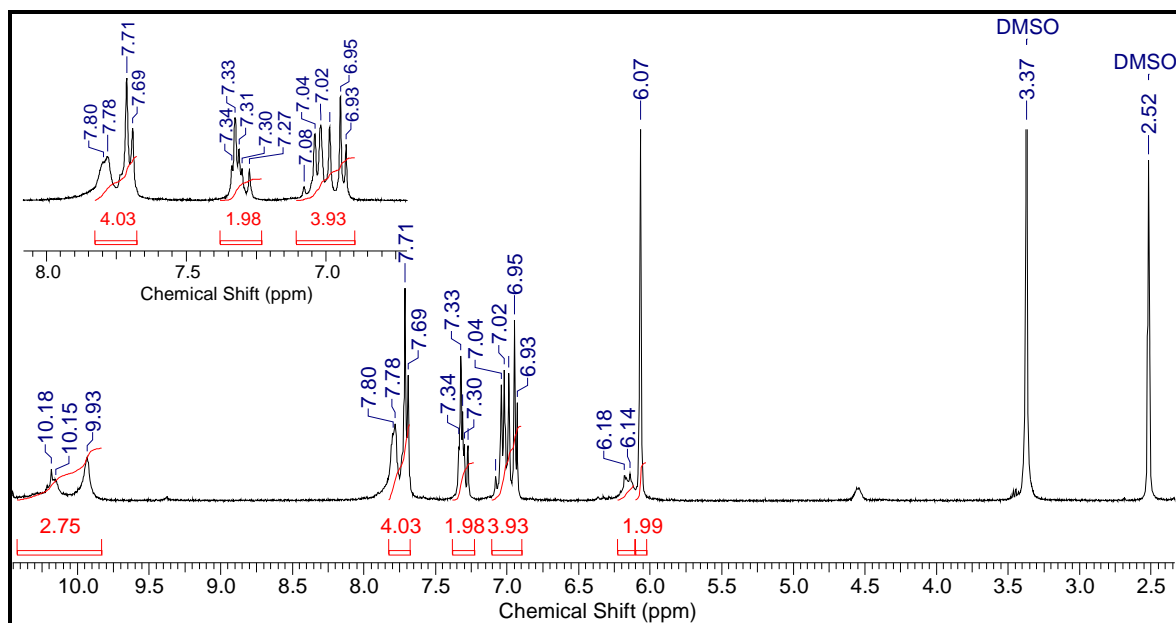
$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1245 (estiramento de éter);

$\delta_{\text{C-H}}$ (Csp^2) = 931 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

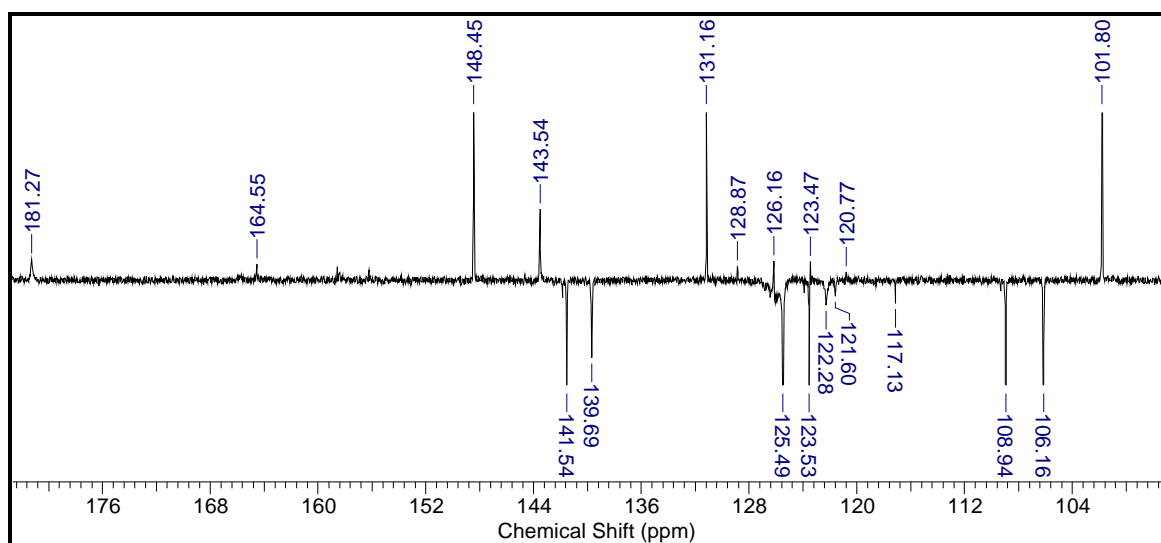
$\delta_{\text{C-H}}$ (Csp^2) = 840 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



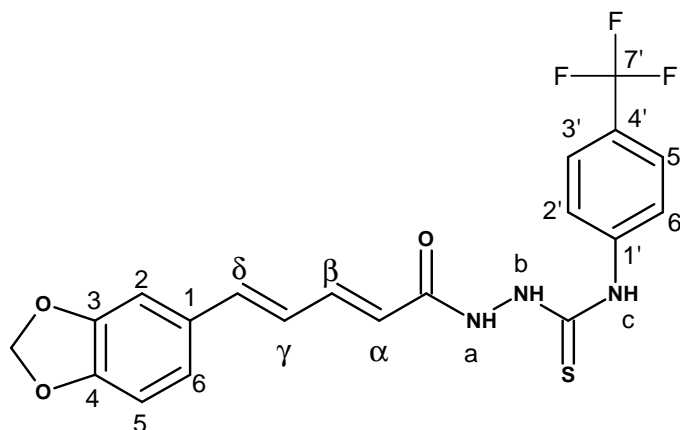
Espectro 44. Espectro de IV da *N*-4-trifluorometilfenilhidrazinacarbotioamida 5m.



Espectro 45. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-4-trifluorometilfenilidrazinacarboxamida **5m**.



Espectro 46. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) da *N*-4-trifluorometilfenilidrazinacarboxamida **5m**.



***N*-4-trifluorometilfenilidrazinacarbotoamida 5m**

Tabela 17. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 5m.

Posição	$\delta ^1\text{H}$ (ppm) ; <i>J</i> (Hz)	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)
C=S	-----	181,27 (C)
1'	-----	143,54 (C)
2'	7,69 - 7,80 (m, 1H)	121,60 (CH)
3'	7,69 - 7,80 (m, 1H)	117,13 (CH)
4'	-----	148,45(C)
5'	7,69 - 7,80 (m, 1H)	117,13 (CH)
6'	7,69 - 7,80 (m, 1H)	121,60 (CH)
7'	-----	120,77 - 128,83(q, CF ₃)
C=O	-----	164,55 (C)
α	6,16 (d; 14,8; 1H)	122,28 (CH)
β	7,27 - 7,34 (m; 1H)	141,54 (CH)
γ	6,93 - 7,08 (m, 1H)	125,49 (CH)
δ	6,93 - 7,08 (m, 1H)	139,69 (CH)
1	-----	131,16 (C)
2	7,33 (s,1H)	106,16 (CH)
3	-----	148,42 (C)
4	-----	148,42 (C)
5	6,93 - 7,08 (m, 1H)	108,94 (CH)
6	6,93 - 7,08 (m, 1H)	123,53 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s,2H)	101,80 (CH ₂)
a	10,18 (s,1H)	-----
b	10,15 (s,1H)	-----
c	9,93 (s,1H)	-----

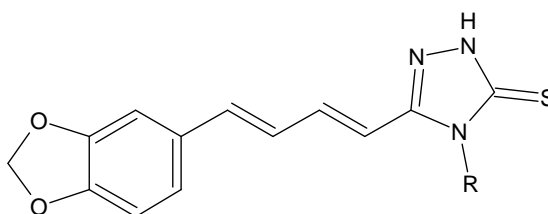
*Valor não observado no espectro de RMN ^{13}C

4.9. Preparação dos derivados triazólicos (2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona)

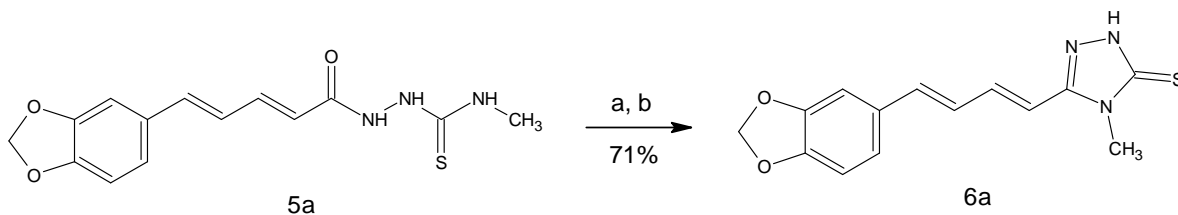
Em um balão de 10 mL contendo 90 mg do composto *N*-alquilidrazinacarbotoamida foi adicionado NaOH 10% (1 equivalente em relação ao substrato) em meio aquoso. A mistura foi submetida à irradiação de micro-ondas mantida sob refluxo por 0,5 h (100W e 101°C) e acompanhada por cromatografia em camada delgada. A solução após o resfriamento foi acidificada com ácido clorídrico em banho de gelo gerando a formação do precipitado. A mistura reacional foi filtrada e lavada com água gelada e após isso todos os derivados foram purificados pelo método de recristalização utilizando-se etanol. Todos os produtos foram caracterizados pelo ponto de fusão, RMN ¹H e ¹³C, IV e EM. Na **Tabela 18** a seguir, encontram-se descritos os triazóis sintetizados com suas respectivas massas geradas, rendimentos e pontos de fusão.

Tabela 18. Massa gerada, rendimento e ponto de fusão para os triazóis sintetizados.

Triazol	R	Massa gerada (mg)	Rendimento	Ponto de Fusão
6a	metil	60,6	71%	220-222 °C
6b	etil	52,6	62%	208-209 °C
6c	isopropil	77,3	90%	210-211 °C
6d	butil	78	71%	173 -174 °C
6e	hexil	67,7	79%	124 -125 °C
6f	cicloexil	55	64%	218-220 °C
6g	fenil	76,3	89%	244-245 °C
6h	benzil	65,6	76%	187-188 °C
6i	3,4,5-trimetoxifenil	70,1	81%	242-243 °C
6j	<i>tert</i> -butil	43	50%	183-184 °C
6k	4-tiometilfenil	64,5	75%	209-211 °C
6l	3-metoxifenil	68,7	80%	248-249 °C
6m	4-trifluormetilfenil	60,3	70%	232-233 °C



4.9.1. Preparação do 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-metil-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (**6a**)



Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h ; b) HCl.

Esquema 21. Reação de preparação do metil-triazol **6a**.

Pf: 220-222 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

ν N-H = 3431 (estiramento NH do triazol);

ν C-H (Csp³) = 2923 (estiramento de metila e metilenos);

ν C=C (Csp²) = 1616 - 1490 - 1446 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

ν N-H = 1543 (banda de confirmação da ligação N-H);

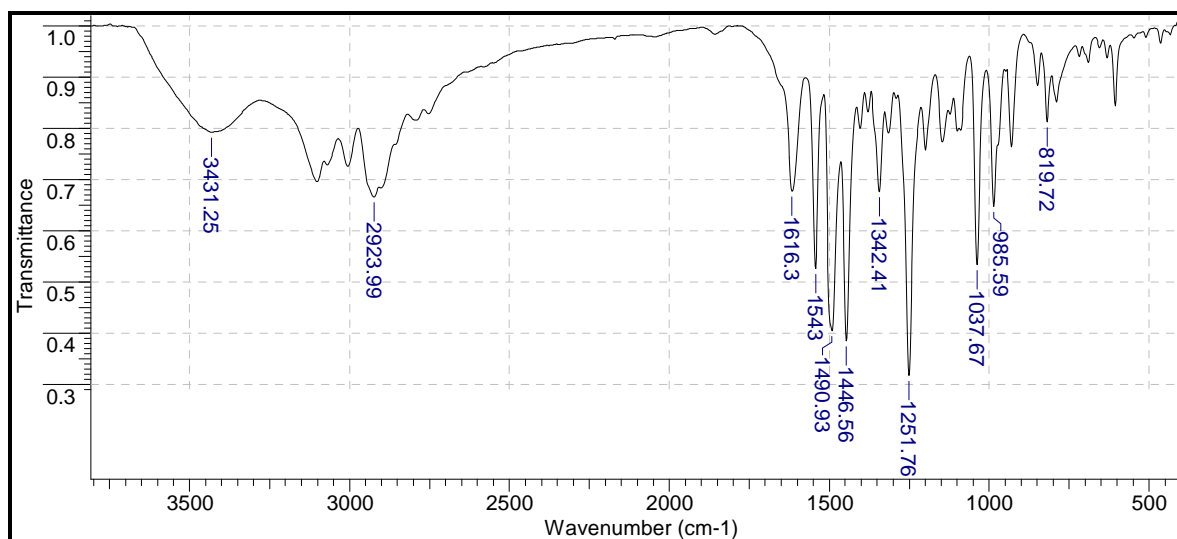
ν C-N = 1342 (vibração da ligação C-N do anel heterocíclico);

ν C-O-C = 1251 (estiramento de éter);

ν C=S = 1037 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);

δ C-H (Csp²) = 985 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

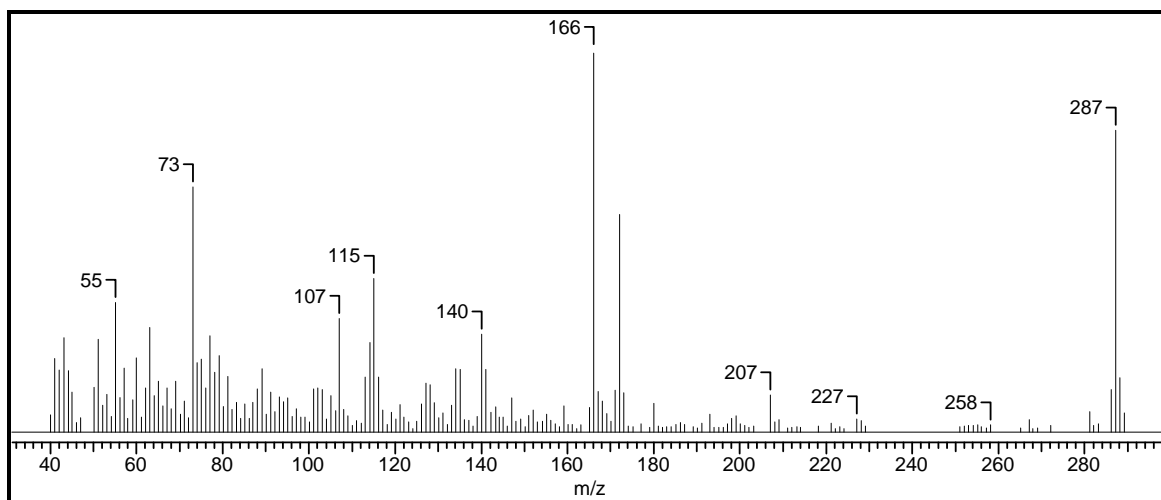
δ C-H (Csp²) = 819 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



Espectro 47. Espectro de IV do metil-triazol **6a**.

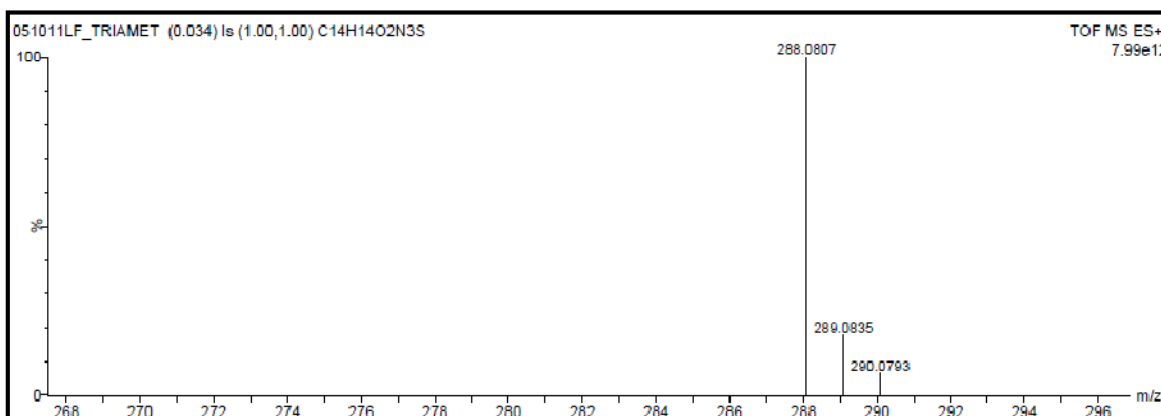
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: $m/z = 287$ (M^+ , 80%); 166 (100%); 140 (30%); 115 (40%); 107 (30%); 73 (70%) e 55 (40%).

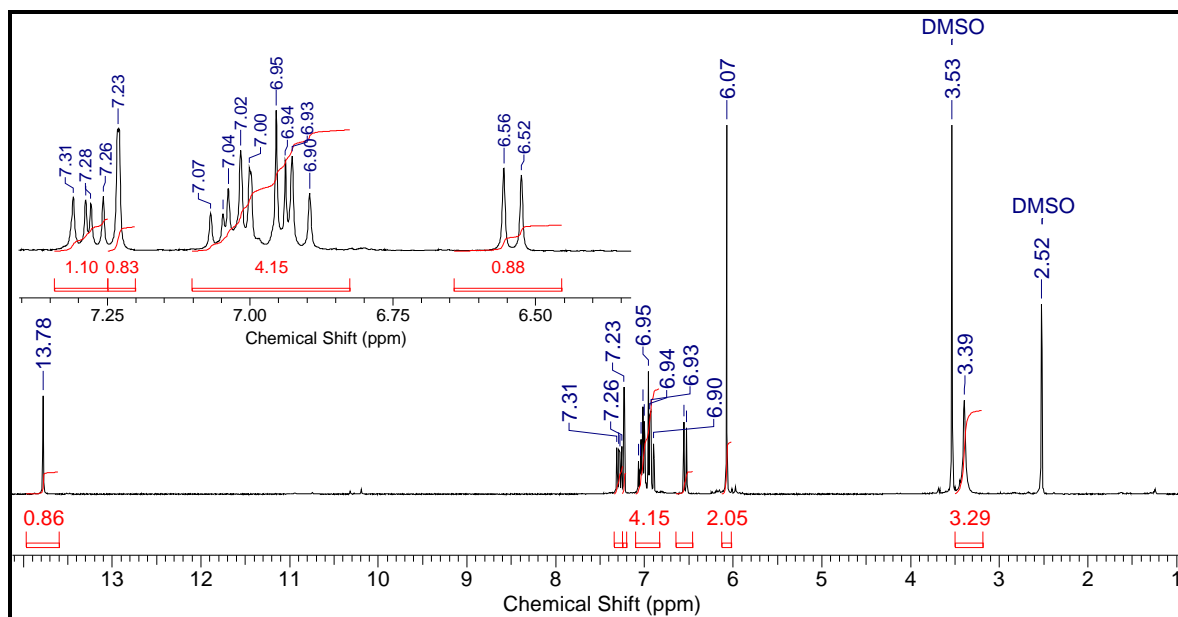


Espectro 48. Espectro de massas do metil-triazol **6a**.

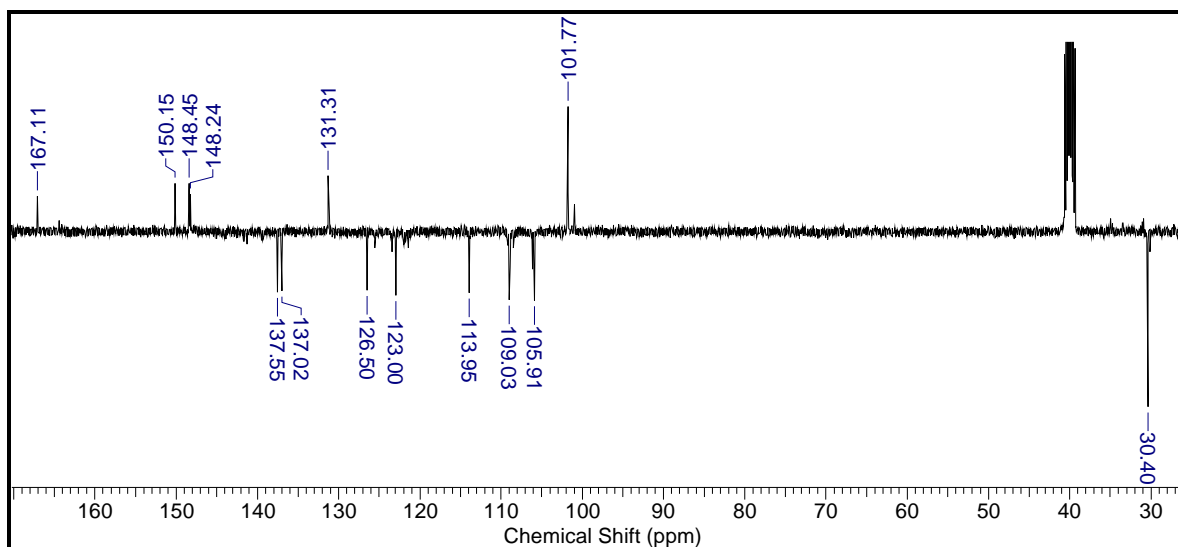
EMAR/ES+: massa calculada ($C_{14}H_{13}N_3O_2S + 1H$): 288,0806 (massa observada: 288,0807).



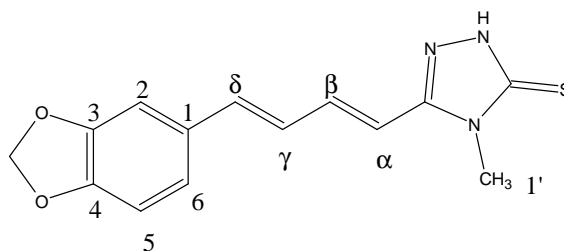
Espectro 49. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do metil-triazol **6a**.



Espectro 50. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) do metil-triazol **6a**.



Espectro 51. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) do metil-triazol **6a**.

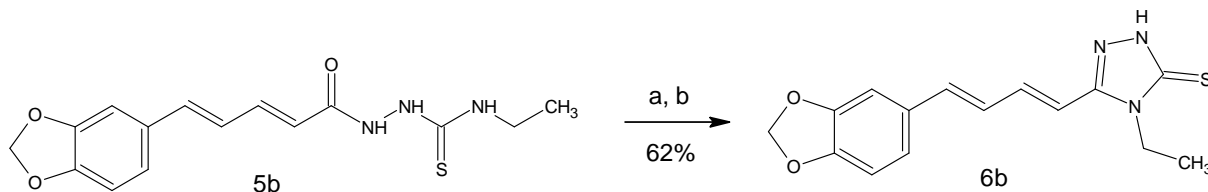


Metil-triazol **6a**

Tabela 19. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para **6a**.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	3,39 (s,3H)	30,40 (CH ₃)
C=S	-----	167,11 (C)
α	6,54 (d; 15,4; 1H)	113,95 (CH)
β	7,29 (dd; 14,98 e 10,56; 1H)	137,55(CH)
γ	6,90 - 7,07 (m, 1H)	126,50 (CH)
δ	6,90 - 7,07 (m, 1H)	137,02 (CH)
1	-----	131,31(C)
2	7,23 (s,1H)	105,91 (CH)
3	-----	148,24 (C)
4	-----	148,45 (C)
5	6,90 - 7,07 (m, 1H)	109,03 (CH)
6	6,90 - 7,07 (m, 1H)	123 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s; 2H)	101,77 (CH ₂)
NH	13,78 (s,1H)	-----
C=N	-----	150,15 (C)

4.9.2. Preparação do 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-etil-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (**6b**)



Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 22. Reação de preparação do etil-triazol **6b**.

Pf: 208 - 209 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

ν N-H = 3433 (estiramento NH do triazol);

ν C-H(Csp²) = 3064 (sistema aromático);

ν C-H (Csp³) = 2929 (estiramento de metila e metilenos);

ν C=C (Csp²) = 1614 - 1489 - 1442 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

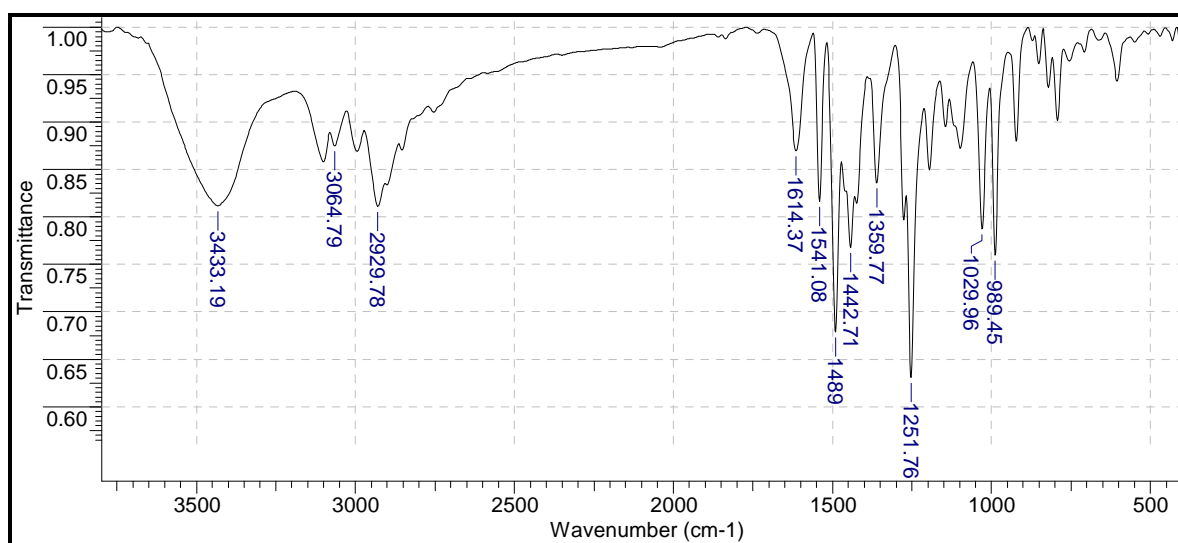
ν N-H = 1541 (banda de confirmação da ligação N-H);

ν C-N = 1359 (vibração da ligação C-N do anel heterocíclico);

ν C-O-C = 1251 (estiramento de éter);

ν C=S = 1029 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);

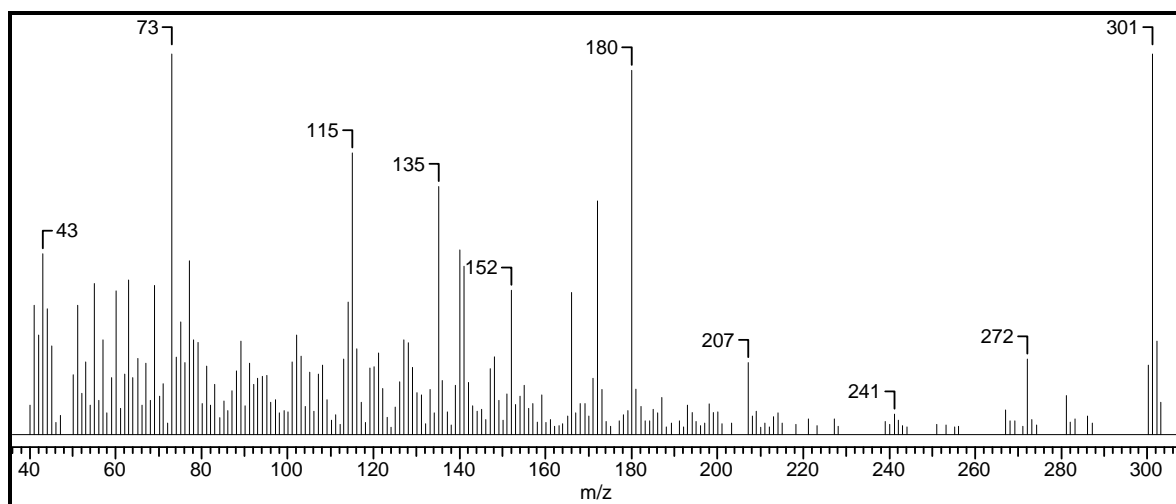
δ C-H (Csp²) = 989 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);



Espectro 52. Espectro de IV do etil-triazol **6b**.

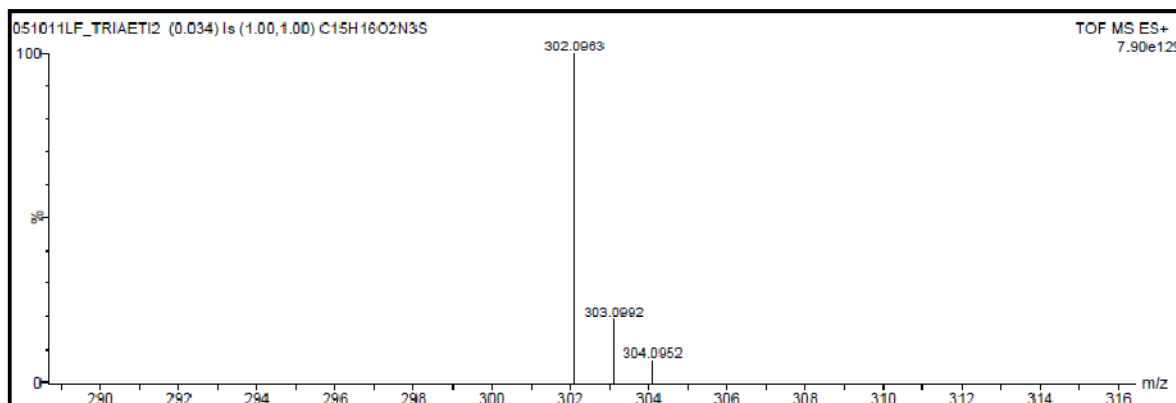
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: $m/z = 301$ (M^+ , 100%); 272 (20%); 207 (20%); 180 (80%); 135 (50%); 115 (60%); 73 (85%) e 43 (50%).

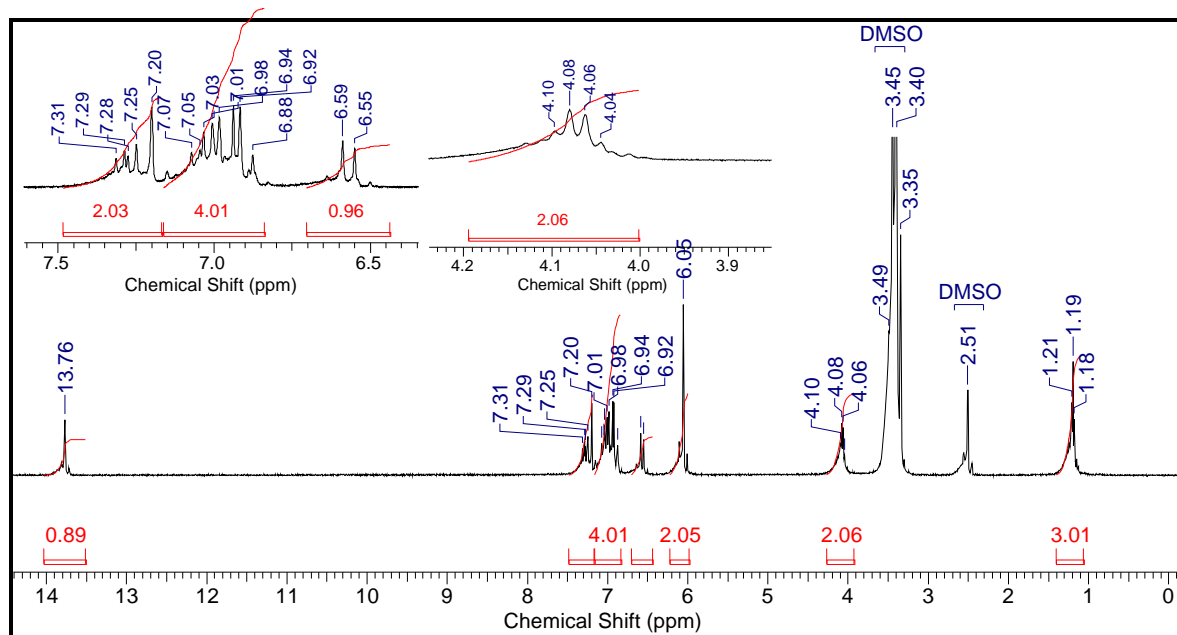


Espectro 53. Espectro de massas do etil-triazol **6b**.

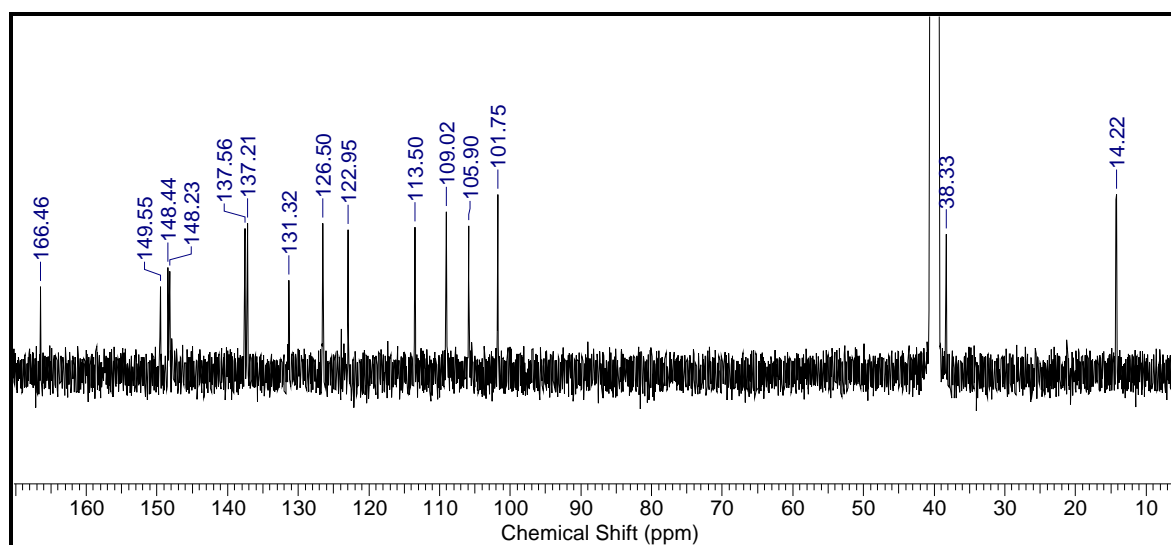
EMAR/ES+: massa calculada ($C_{15}H_{15}N_3O_2S + 1H$): 302.0963 (massa observada: 302.0963).



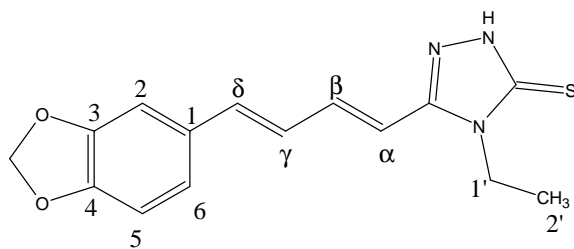
Espectro 54. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do etil-triazol **6b**.



Espectro 55. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) do etil-triazol **6b**.



Espectro 56. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, DMSO- D_6) do etil-triazol **6b**.

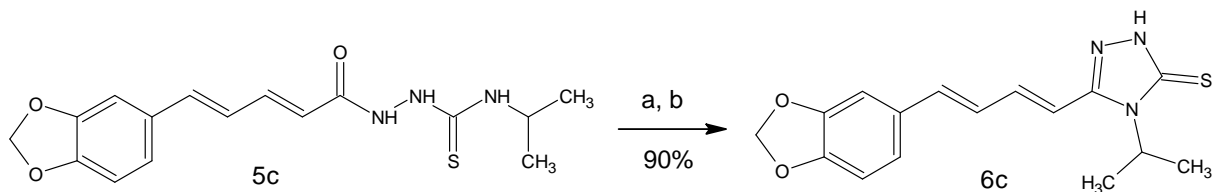


Etil-triazol 6b

Tabela 20. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6b.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	4,08 (q, 2H)	38,33 (CH ₂)
2'	1,19 (t, 7,03; 3H)	14,22 (CH ₃)
C=S	-----	166,46 (C)
α	6,57 (d; 15,3; 1H)	113,50 (CH)
β	7,28 (dd; 15,18 e 9,91; 1H)	137,56 (CH)
γ	6,88 - 7,07 (m, 1H)	126,50 (CH)
δ	6,88 - 7,07 (m, 1H)	137,21 (CH)
1	-----	131,32 (C)
2	7,20 (s,1H)	105,90 (CH)
3	-----	148,23 (C)
4	-----	148,44 (C)
5	6,88 - 7,07 (m, 1H)	109,02 (CH)
6	6,88 - 7,07 (m, 1H)	122,95 (CH)
OCH ₂ O	6,05 (s,2H)	101,75 (CH ₂)
NH	13,76 (s,1H)	-----
C=N	-----	149,55 (C)

4.9.3. Preparação do derivado 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-isopropil-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (**6c**)



Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 23. Reação de preparação do isopropil-triazol **6c**.

Pf: 210 - 211 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3429 (estiramento NH do triazol);

$\nu_{\text{C-H}}$ (Csp³) = 2935 (estiramento de metilas e metilenos);

$\nu_{\text{C=C}}$ (Csp²) = 1614 - 1492 - 1438 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\nu_{\text{N-H}}$ = 1539 (banda de confirmação da ligação N-H);

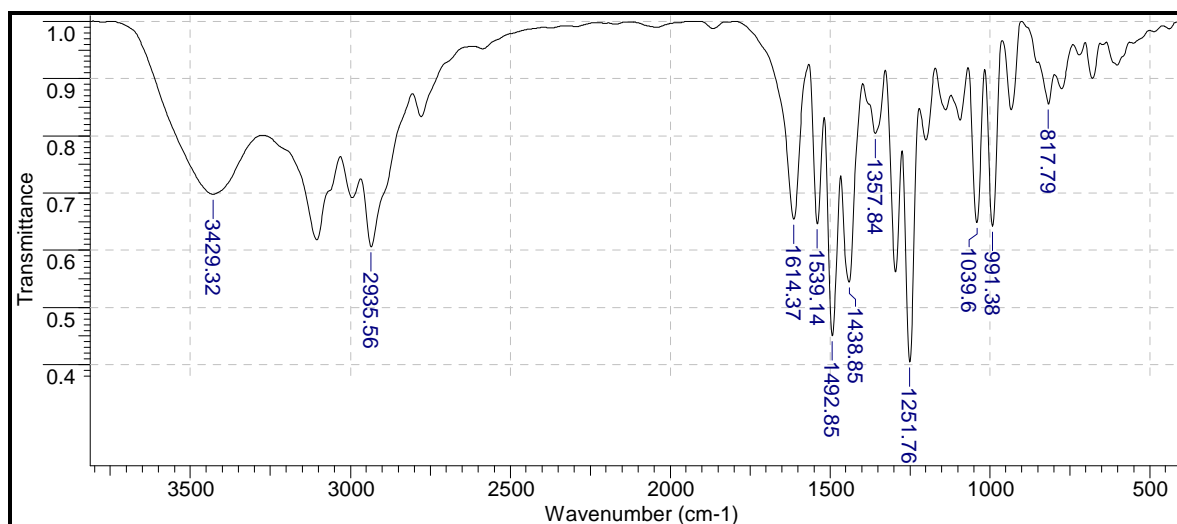
$\nu_{\text{C-N}}$ = 1357 (vibração da ligação C-N do anel heterocíclico);

$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1251 (estiramento de éter);

$\nu_{\text{C=S}}$ = 1039 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);

$\delta_{\text{C-H}}$ (Csp²) = 991 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

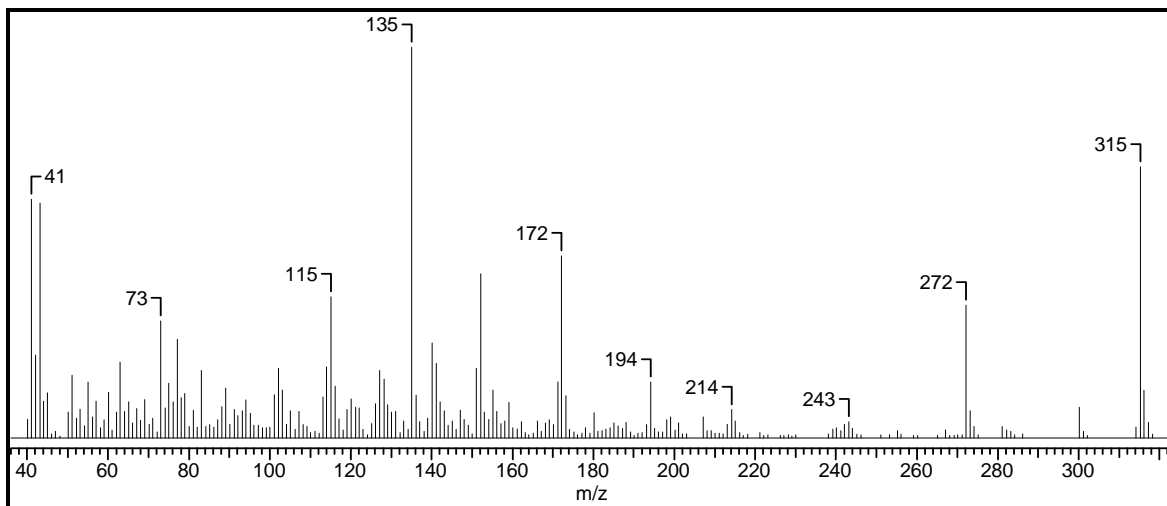
$\delta_{\text{C-H}}$ (Csp²) = 817 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



Espectro 57. Espectro de IV do isopropil-triazol **6c**.

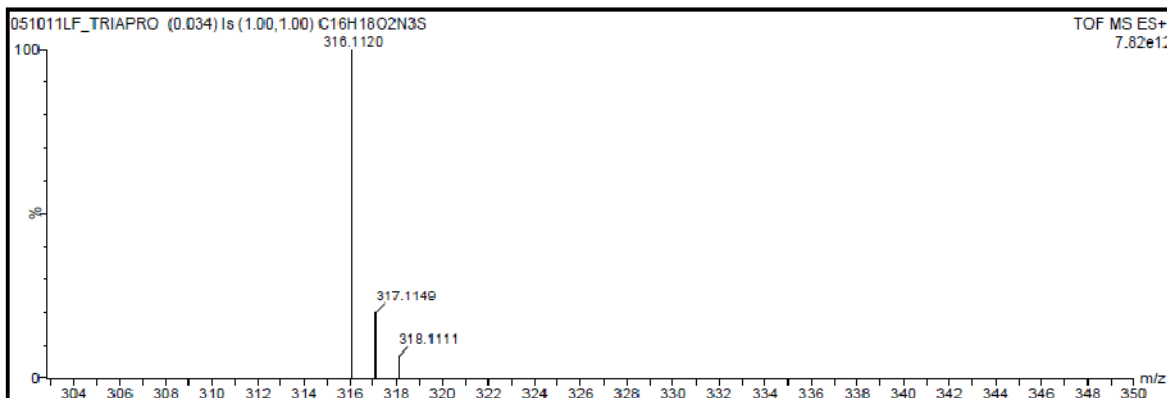
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: m/z = 315 (M⁺, 70%); 272 (35%); 194 (15%); 172 (45%); 135 (100%); 115 (40%); 73 (30%) e 41 (60%).

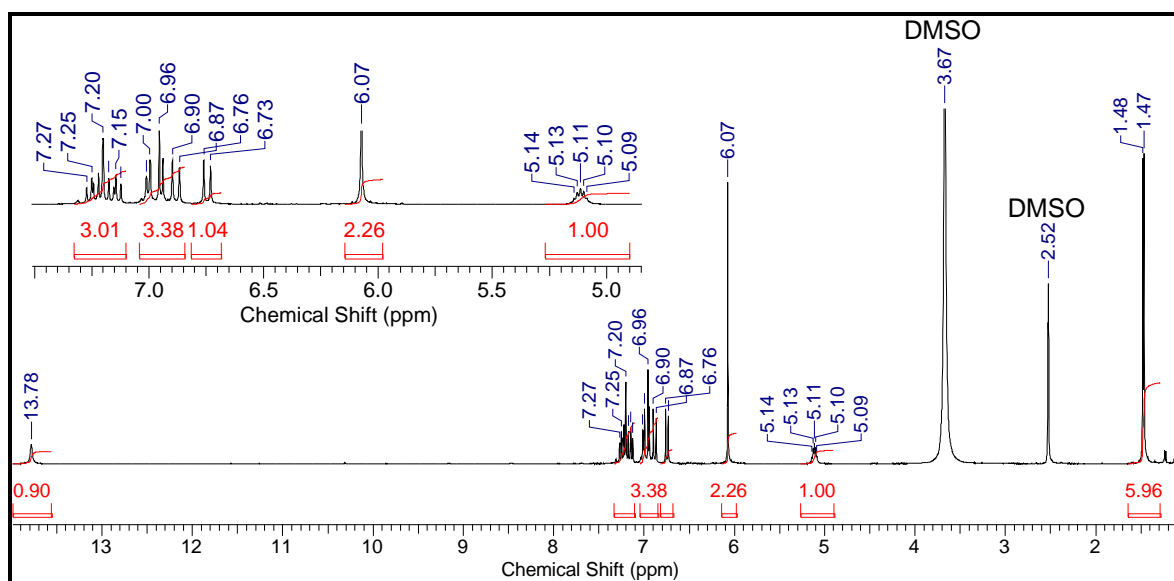


Espectro 58. Espectro de massas do isopropil-triazol **6c**.

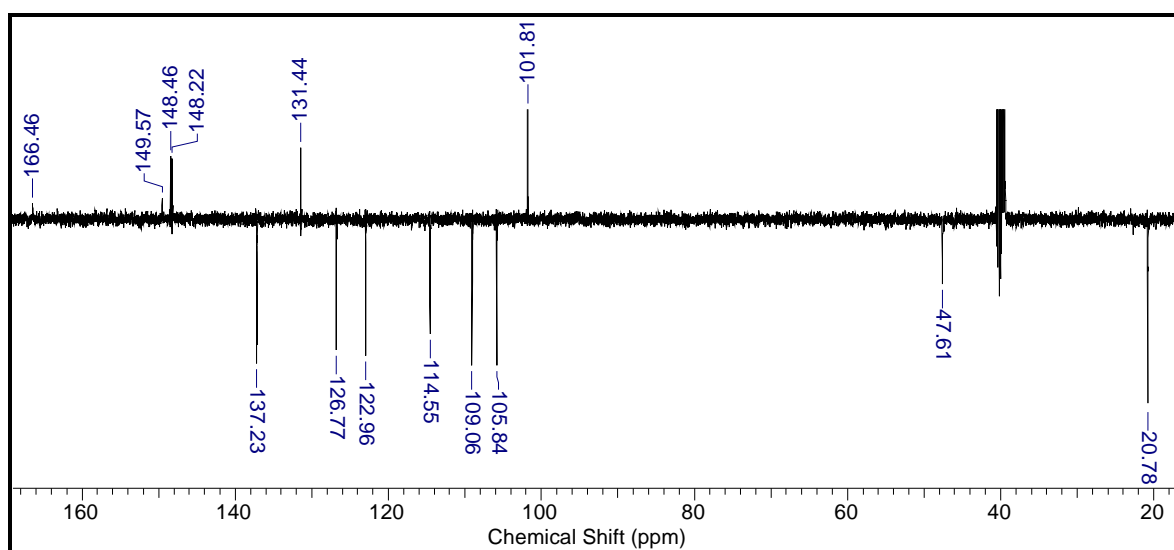
EMAR/ES+: massa calculada (C₁₆H₁₇N₃O₂S + 1H): 316.1119 (massa observada: 316.1120).



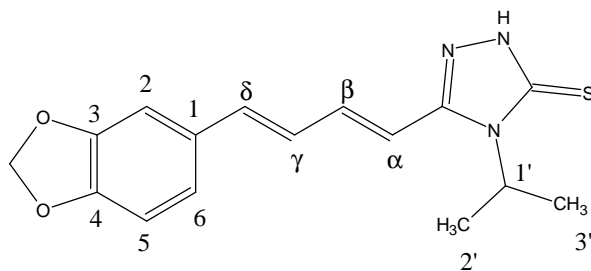
Espectro 59. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do isopropil-triazol **6c**.



Espectro 60. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) do isopropil-triazol **6c**.



Espectro 61. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) do isopropil-triazol **6c**.

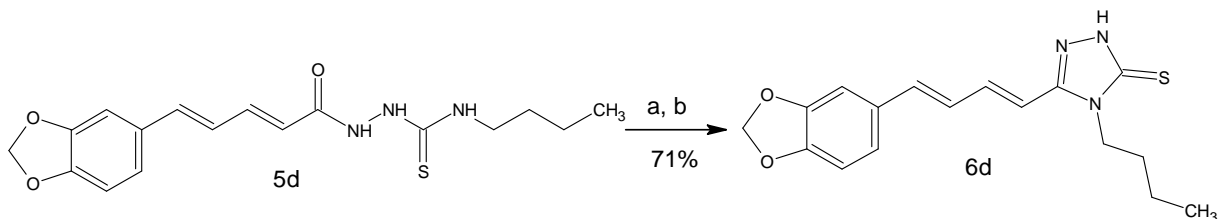


Isopropil-triazol 6c

Tabela 21. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6c.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	5,09 - 5,14 (m, H)	47,61 (CH)
2'	1,47 (d; 5; 3H)	20,78 (CH ₃)
3'	1,47 (d; 5; 3H)	20,78 (CH ₃)
C=S	-----	166,46 (C)
α	6,74 (d; 15; 1H)	114,55 (CH)
β	7,15 - 7,27 (m, 1H)	137,23 (CH)
γ	6,87 - 7,00 (m, 1H)	126,77 (CH)
δ	6,87 - 7,00 (m, 1H)	137,20 (CH)
1	-----	131,44 (C)
2	7,15 - 7,27 (m, 1H)	105,84 (CH)
3	-----	148,22 (C)
4	-----	148,46 (C)
5	6,87 - 7,00 (m, 1H)	109,06 (CH)
6	7,15 - 7,27 (m, 1H)	122,96 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s, 2H)	101,81 (CH ₂)
NH	13,78 (s, 1H)	-----
C=N	-----	149,57 (C)

4.9.4. Preparação do derivado 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-butil-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (**6d**)



Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 24. Reação de preparação do butil-triazol **6d**.

Pf: 173 - 174 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

vN-H = 3431 (estiramento NH do triazol);

vC-H(Csp²) = 3066 (sistema aromático);

vC-H (Csp³) = 2951 - 2929 (estiramento de metila e metilenos);

vC=C (Csp²) = 1614 - 1489 - 1444 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

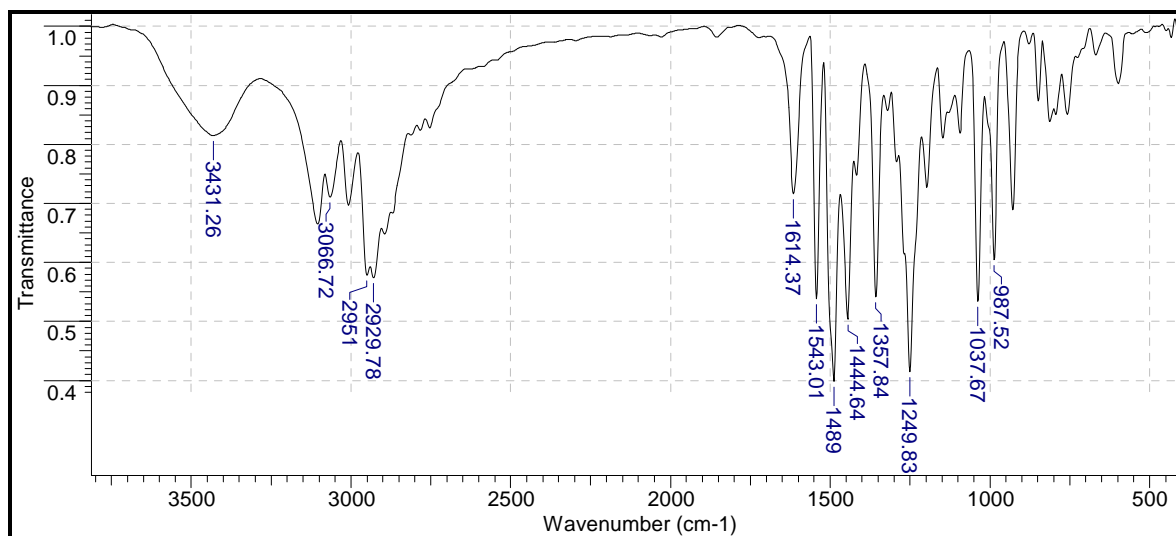
vN-H = 1543 (banda de confirmação da ligação N-H);

vC-N = 1357 (vibração da ligação C-N do anel heterocíclico);

vC-O-C = 1249 (estiramento de éter);

vC=S = 1037 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);

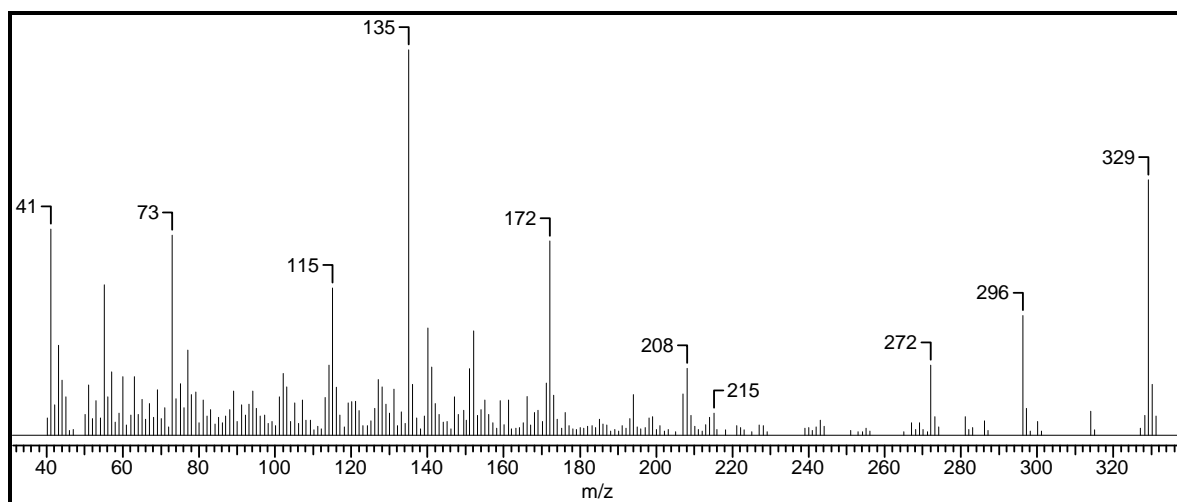
δC-H (Csp²) = 987 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);



Espectro 62. Espectro de IV do butil-triazol **6d**.

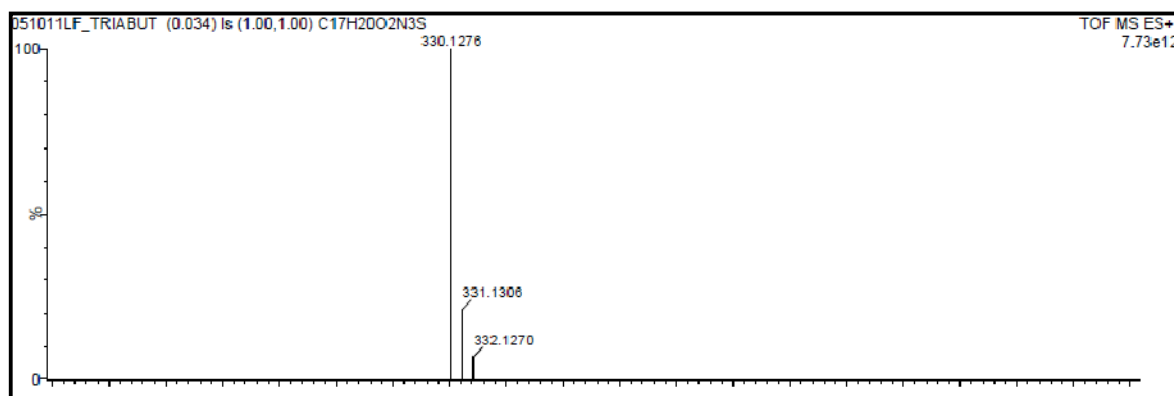
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: $m/z = 329$ (M^+ , 70%); 296 (30%); 272 (20%); 172 (50%); 135 (100%); 115 (40%); 73 (50%) e 41 (55%).

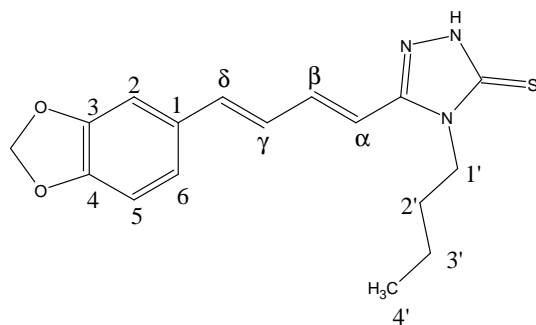


Espectro 63. Espectro de massas do butil-triazol **6d**.

EMAR/ES+: massa calculada ($C_{17}H_{19}N_3O_2S + 1H$): 330.1276 (massa observada: 330.1276).



Espectro 64. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do butil-triazol **6d**.

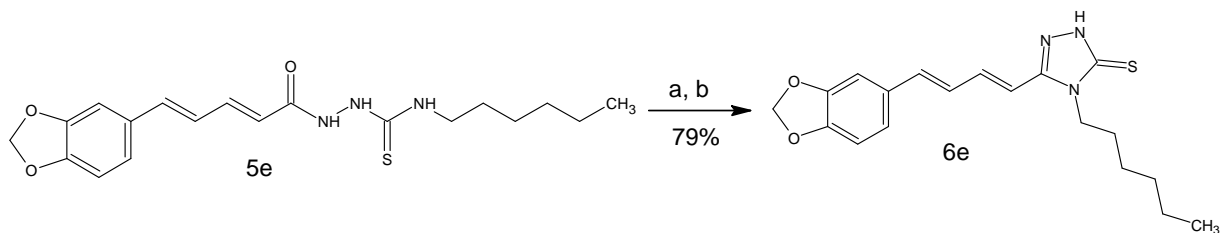


Butil-triazol 6d

Tabela 22. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6d.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'	4,02 - 4,05 (m; 2H)	42,92 (CH ₂)
2'	1,60 - 1,63 (m; 2H)	30,87(CH ₂)
3'	1,31 - 1,36 (m; 2H)	19,78 (CH ₂)
4'	0,94 (t; 7,2; 3H)	14,12(CH ₃)
C=S	-----	166,74 (C)
α	6,58 (d; 15,1; 1H)	113,56 (CH)
β	7,29 (dd; 15,1 e 11; 1H)	137,58 (CH)
γ	6,89 - 7,09 (m, 1H)	126,55 (CH)
δ	6,89 - 7,09 (m, 1H)	137,17 (CH)
1	-----	131,35 (C)
2	7,22 (s; 1H)	105,89 (CH)
3	-----	148,27 (C)
4	-----	148,48 (C)
5	6,89 - 7,09 (m, 1H)	109,06 (CH)
6	6,89 - 7,09 (m; 1H)	123,06 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s,2H)	101,81 (CH ₂)
NH	13,78 (s,1H)	-----
C=N	-----	149,79 (C)

4.9.5. Preparação do derivado 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-hexil-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (**6e**)



Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 25. Reação de preparação do hexil-triazol **6e**.

Pf: 124 - 125 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

ν N-H = 3433 (estiramento NH do triazol);

ν C-H(Csp²) = 3060 (sistema aromático);

ν C-H (Csp³) = 2923 (estiramento de metila e metilenos);

ν C=C (Csp²) = 1612 - 1492 - 1446 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

ν N-H = 1541 (banda de confirmação da ligação N-H);

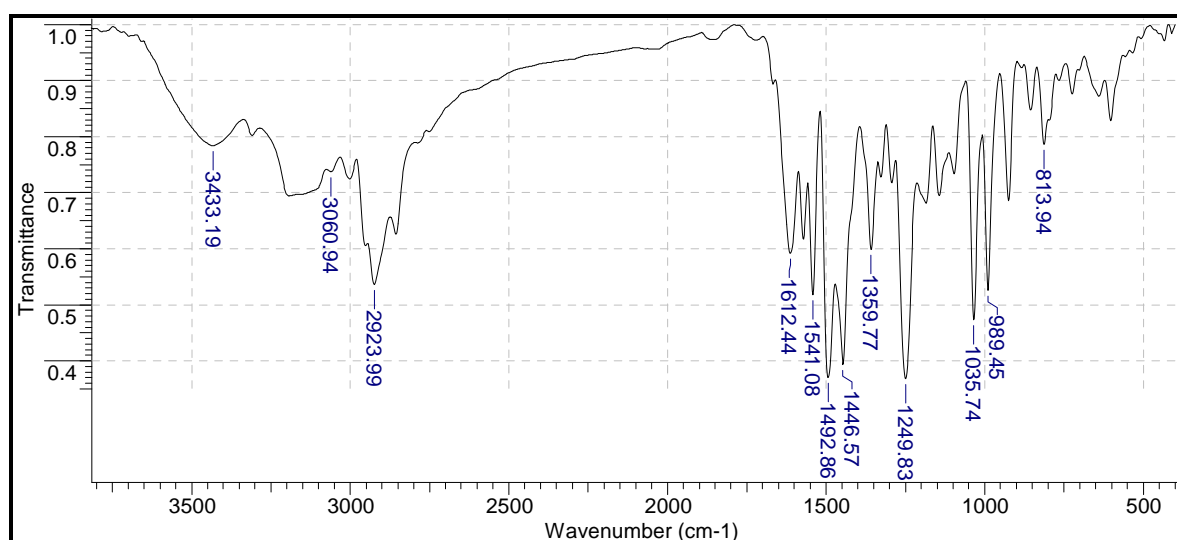
ν C-N = 1359 (vibração da ligação C-N do anel heterocíclico);

ν C-O-C = 1249 (estiramento de éter);

ν C=S = 1035 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);

δ C-H (Csp²) = 989 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

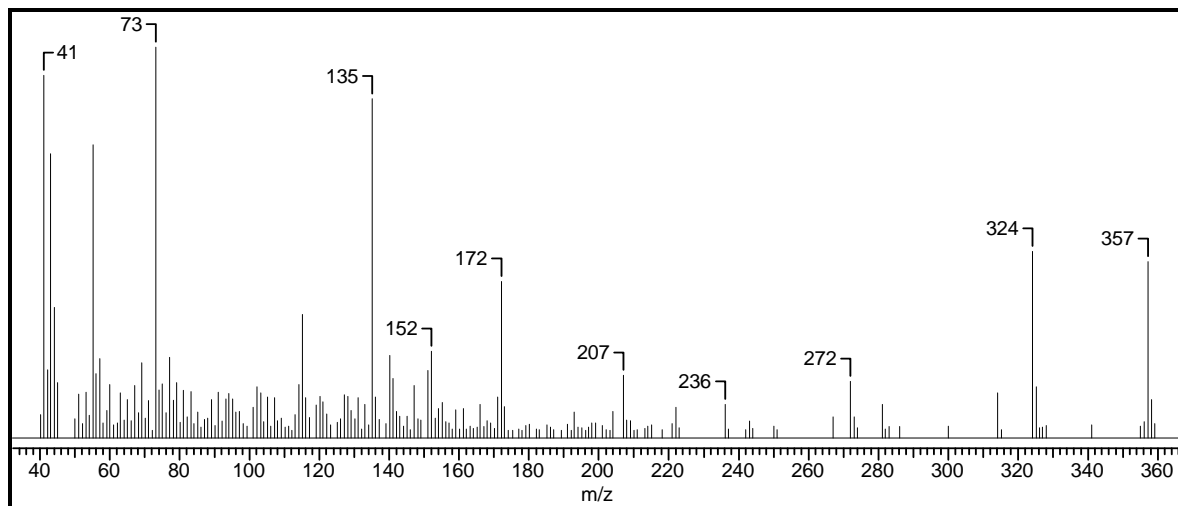
δ C-H (Csp²) = 813 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



Espectro 67. Espectro de IV do hexil-triazol **6e**.

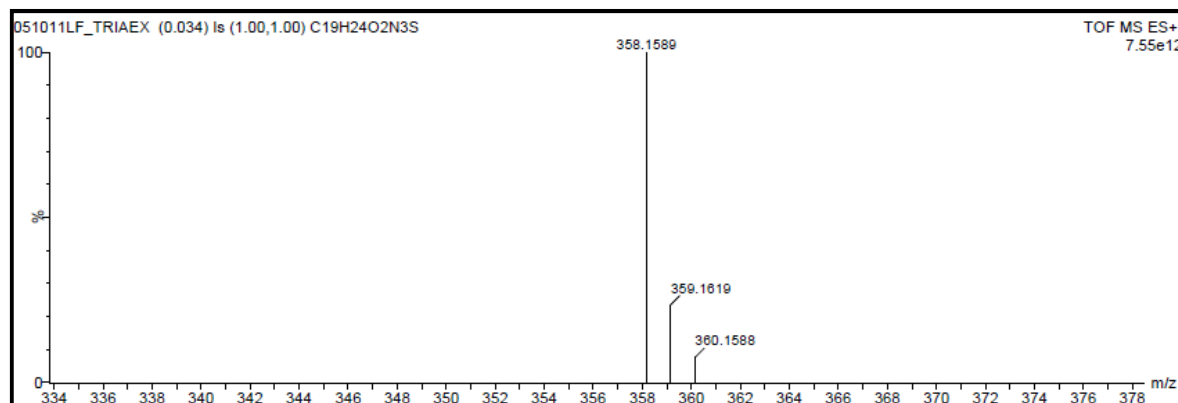
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: $m/z = 357$ (M^+ , 50%); 324 (55%); 272 (15%); 172 (40%); 152 (20%); 135 (85%); 73 (100%) e 41 (90%).

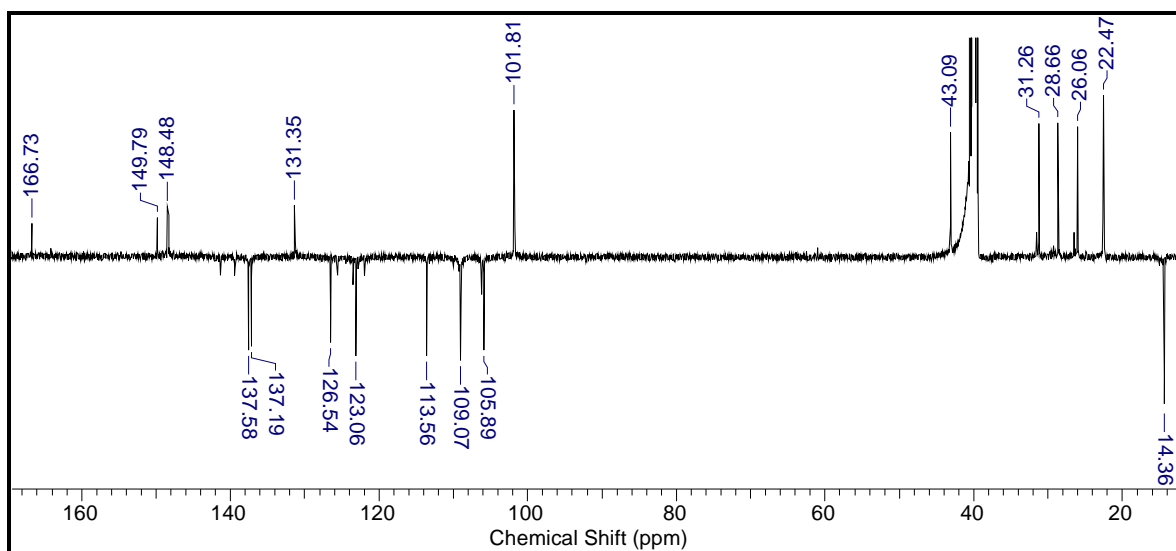
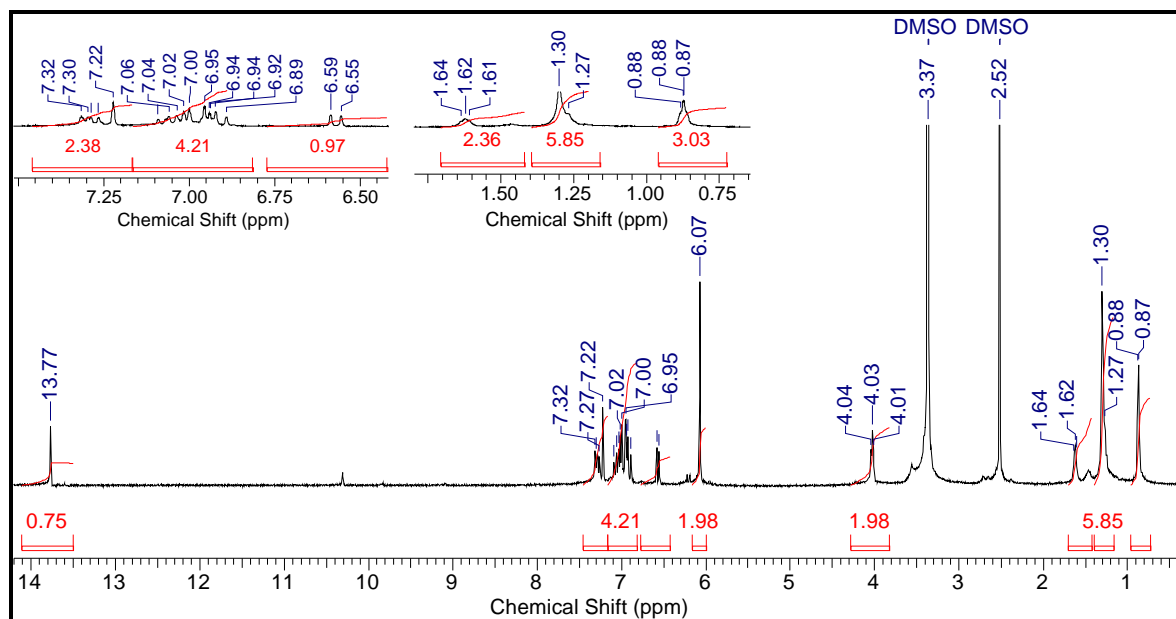


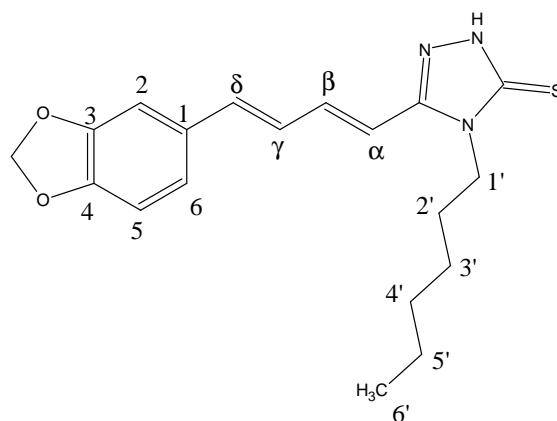
Espectro 68. Espectro de massas do hexil-triazol **6e**.

EMAR/ES+: massa calculada ($C_{19}H_{23}N_3O_2S + 1H$): 358.1589 (massa observada: 358.1589).



Espectro 69. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do hexil-triazol **6e**.



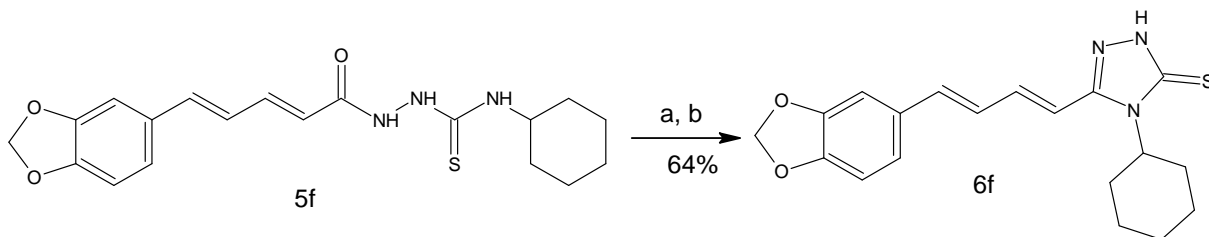


Hexil-triazol 6e

Tabela 23. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6e.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'	4,03 (t; 7,5; 2H)	43,09 (CH ₂)
2'	1,62 - 1,64 (m, 2H)	26,06 (CH ₂)
3'	1,27 - 1,30 (m, 2H)	28,66 (CH ₂)
4'	1,27 - 1,30 (m, 2H)	31,26 (CH ₂)
5'	1,27 - 1,30 (m, 2H)	22,47 (CH ₂)
6'	0,87 - 0,88 (m, 3H)	14,36 (CH ₃)
C=S	-----	166,73 (C)
α	6,57 (d; 15,45; 1H)	113,56 (CH)
β	7,29 (dd; 14,19 e 10,40; 1H)	137,58 (CH)
γ	6,89 - 7,09(m, 1H)	126,54 (CH)
δ	6,89 - 7,09 (m, 1H)	137,19 (CH)
1	-----	131,35(C)
2	7,32 (s,1H)	105,89 (CH)
3	-----	148,48 (C)
4	-----	148,48 (C)
5	6,89 - 7,09 (m, 1H)	109,07 (CH)
6	6,89 - 7,09 (m, 1H)	123,06 (CH)
OCH ₂ O	6,07 (s,2H)	101,81 (CH ₂)
NH	13,77 (s,1H)	-----
C=N	-----	149,79 (C)

4.9.6. Preparação do derivado 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-cicloexil-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (**6f**)



Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 26. Reação de preparação do cicloexil-triazol **6f**.

Pf: 218 - 220 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

ν N-H = 3425 (estiramento NH do triazol);

ν C-H (Csp³) = 2931 (estiramento de metilenos);

ν C=C (Csp²) = 1614 - 1492 - 1444 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

ν N-H = 1539 (banda de confirmação da ligação N-H);

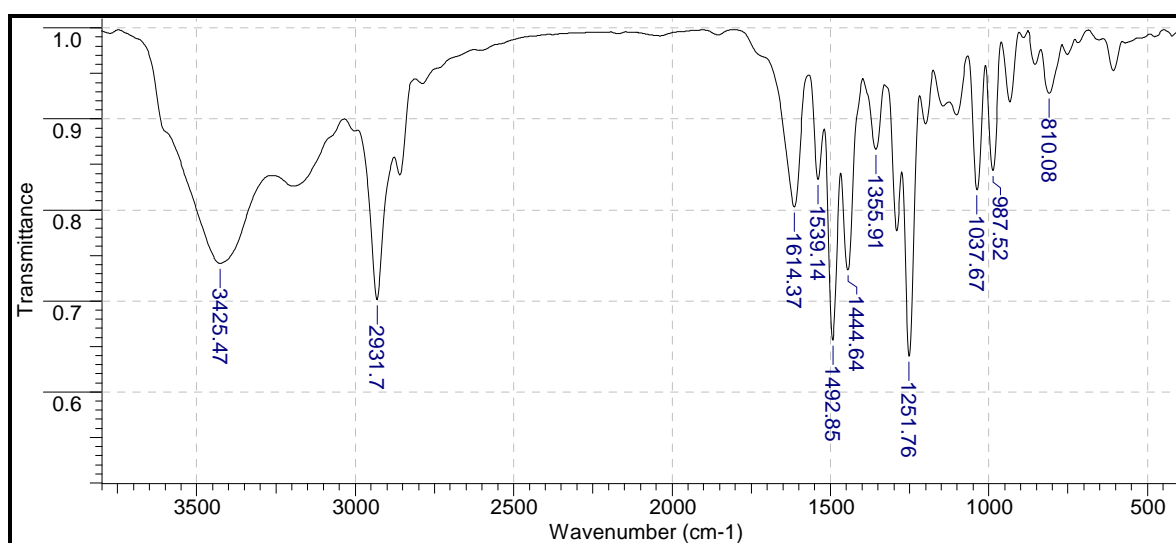
ν C-N = 1355 (vibração da ligação C-N do anel heterocíclico);

ν C-O-C = 1251 (estiramento de éter);

ν C=S = 1037 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);

δ C-H (Csp²) = 987 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

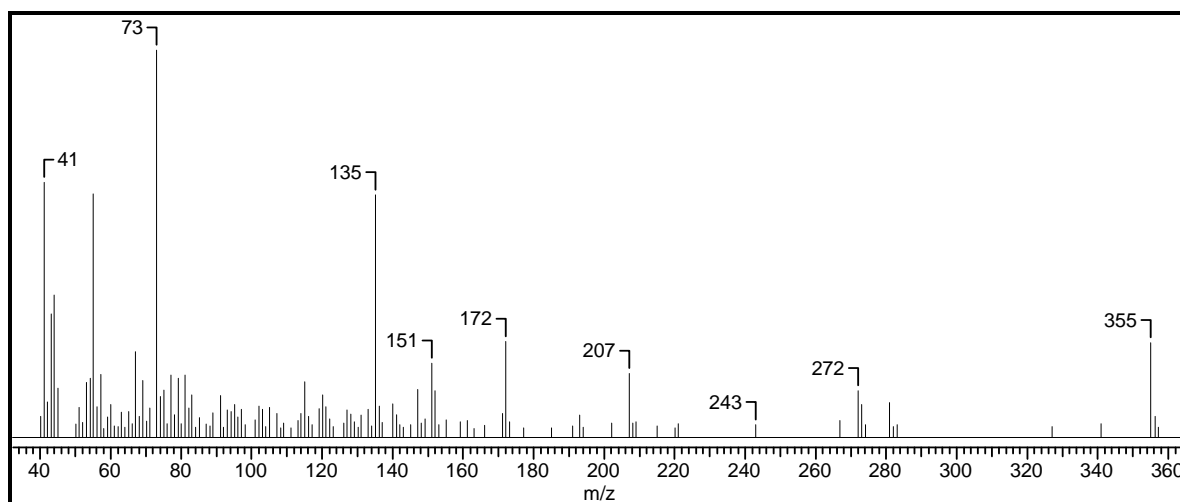
δ C-H (Csp²) = 810 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



Espectro 72. Espectro de IV do cicloexil-triazol **6f**.

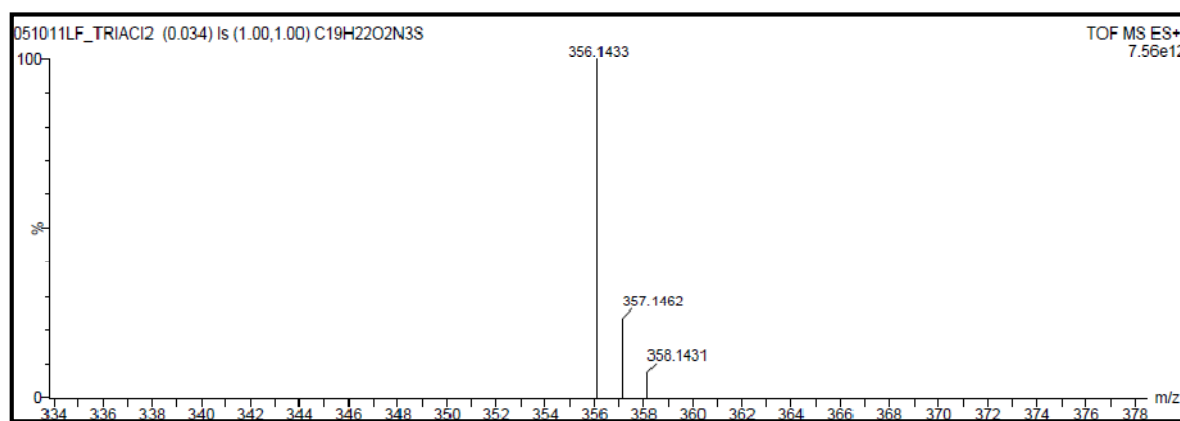
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: $m/z = 355$ (M^+ , 25%); 272 (15%); 207 (20%); 172 (25%); 151 (20%); 135 (65%); 73 (100%) e 41 (70%).

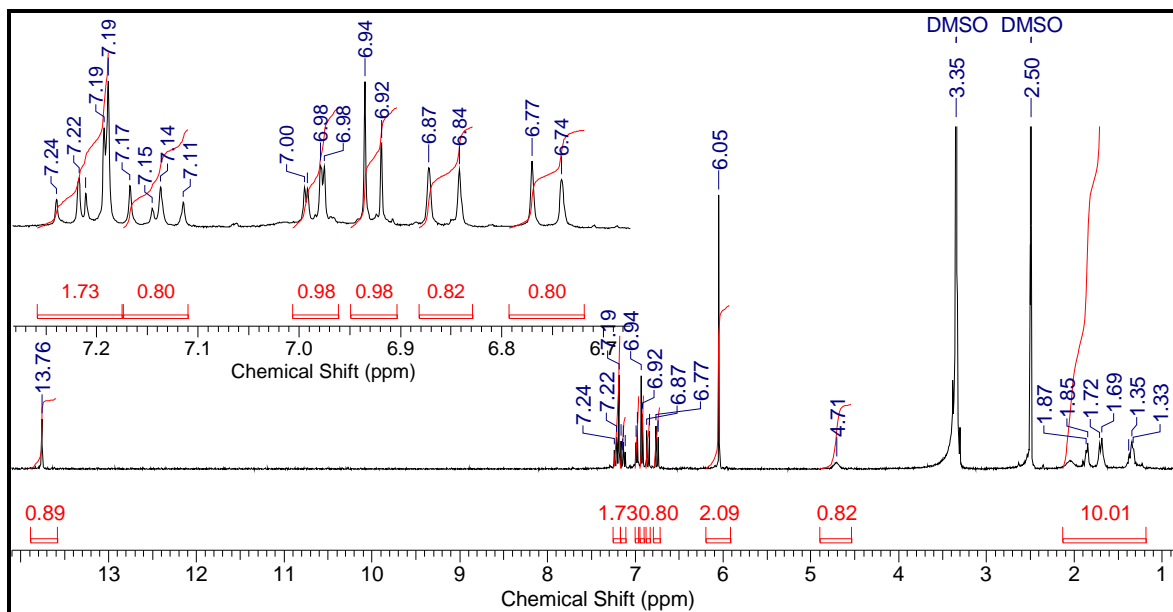


Espectro 73. Espectro de massas do cicloexil-triazol **6f**.

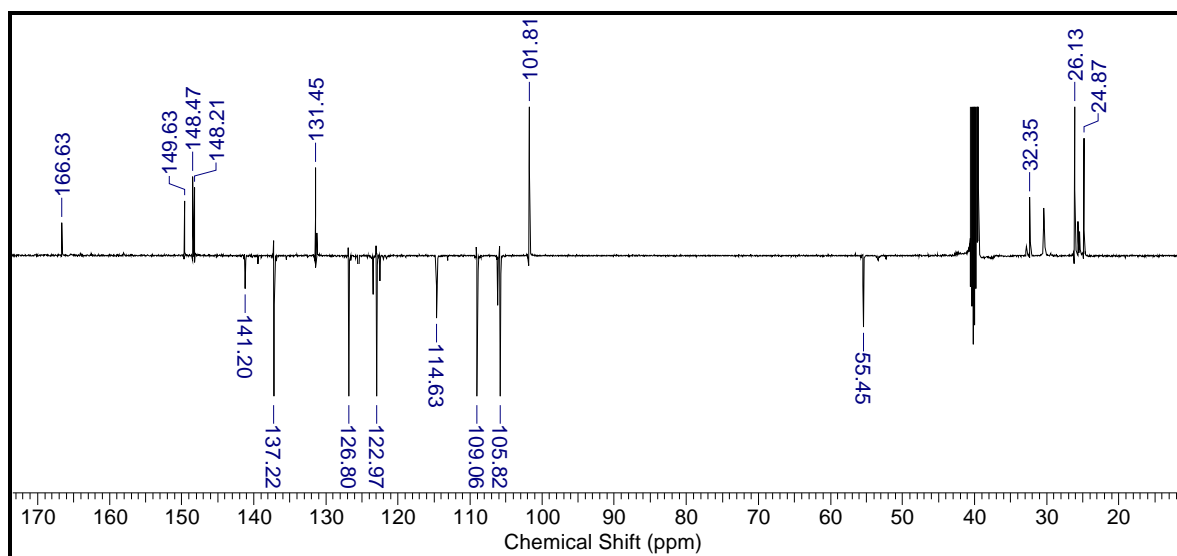
EMAR/ES+: massa calculada ($C_{19}H_{21}N_3O_2S + 1H$): 356.1432 (massa observada: 356.1433).



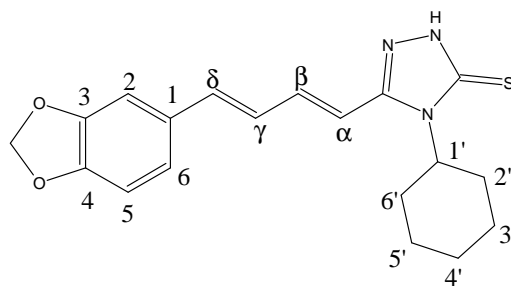
Espectro 74. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do cicloexil-triazol **6f**.



Espectro 75. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) do cicloexil-triazol **6f**.



Espectro 76. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) do cicloexil-triazol **6f**.

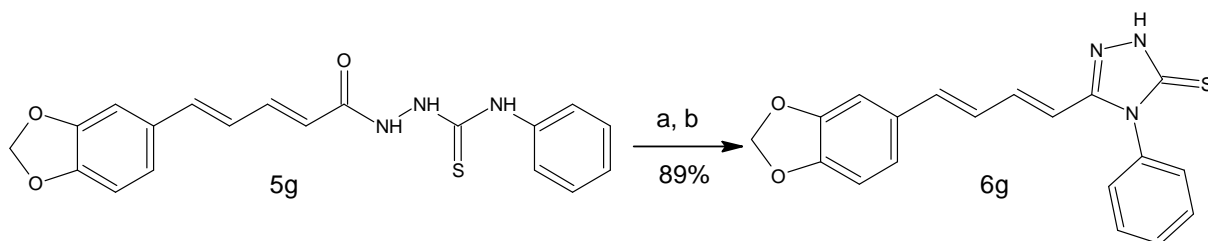


Cicloexil-triazol 6f

Tabela 24. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para o 6f.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'	4,71 (m, 1H)	55,45 (CH ₂)
2'	1,33 - 2,08 (m, 2H)	32,35 (CH ₂)
3'	1,33 - 2,08 (m, 2H)	26,13 (CH ₂)
4'	1,33 - 2,08 (m, 2H)	24,87 (CH ₂)
5'	1,33 - 2,08 (m, 2H)	26,13 (CH ₂)
6'	1,33 - 2,08 (m, 2H)	32,35 (CH ₃)
C=S	-----	166,63 (C)
α	6,75 (d; 14,5; 1H)	114,63 (CH)
β	7,19 - 7,24 (m, 1H)	141,20 (CH)
γ	7,11 - 7,17 (m, 1H)	126,80 (CH)
δ	6,85 (d; 15,13; 1H)	137,22 (CH)
1	-----	131,45 (C)
2	7,19 (d; 1,89; 1H)	105,82 (CH)
3	-----	148,21 (C)
4	-----	148,47 (C)
5	6,93 (d; 8,2; 1H)	109,06 (CH)
6	6,98 - 7,00 (m, 1H)	122,97 (CH)
OCH ₂ O	6,05 (s, 2H)	101,81 (CH ₂)
NH	13,76 (s, 1H)	-----
C=N	-----	149,53 (C)

4.9.7. Preparação do derivado 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-fenil-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (**6g**)



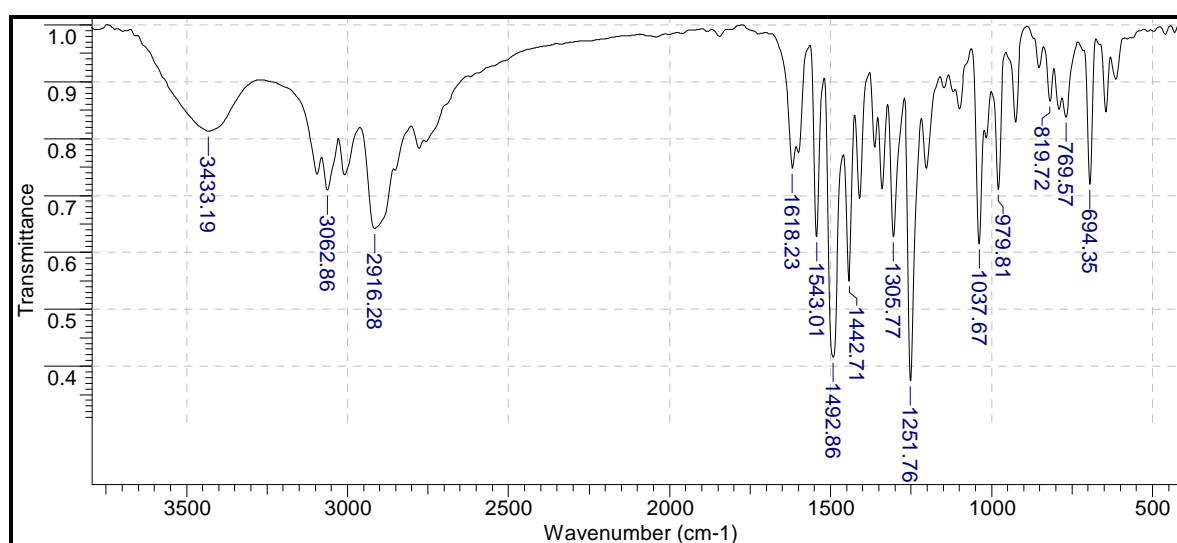
Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 27. Reação de preparação do fenil-triazol **6g**.

Pf: 244 - 245 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

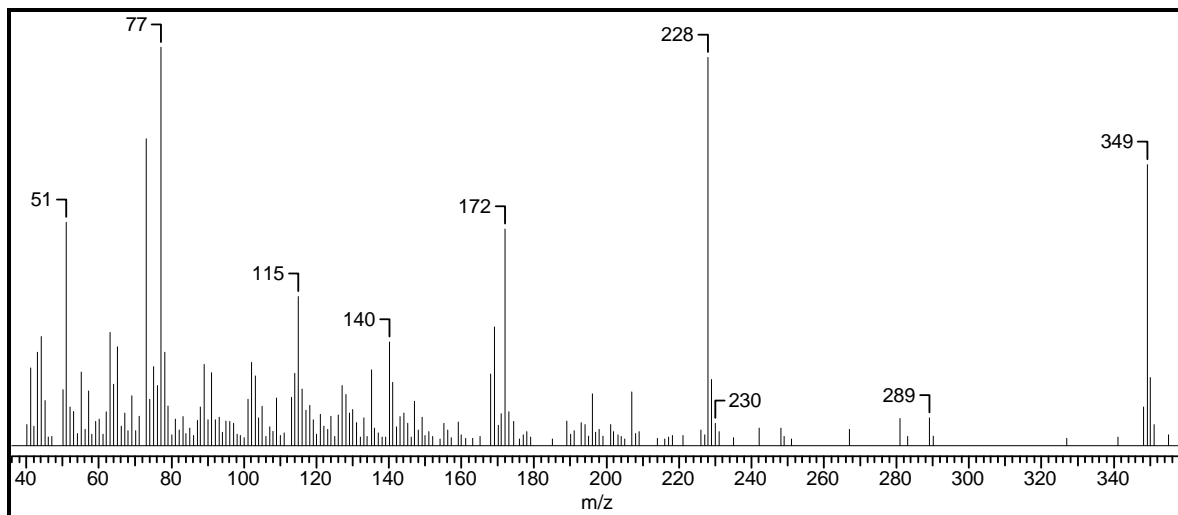
ν N-H = 3433 (estiramento NH do triazol);
 ν C-H(Csp²) = 3062 (sistema aromático);
 ν C-H (Csp³) = 2916 (estiramento de metileno);
 ν C=C (Csp²) = 1618 - 1492 - 1442 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);
 ν N-H = 1543 (banda de confirmação da ligação N-H);
 ν Ar-N = 1305 (estiramento da ligação C-N);
 ν C-O-C = 1251 (estiramento de éter);
 ν C=S = 1037 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);
 δ C-H (Csp²) = 979 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);
 δ C-H (Csp²) = 819 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático);
 δ C-H (Csp²) = 769 e 694 (deformação angular fora do plano de C-H para 5H no sistema aromático).



Espectro 77. Espectro de IV do fenil-triazol **6g**.

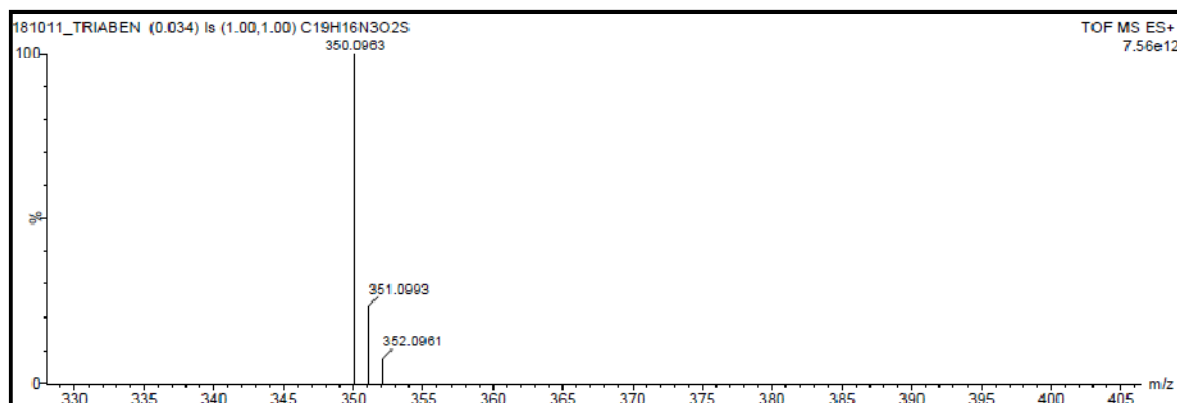
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: $m/z = 349$ (M^+ , 70%); 228 (100%); 172 (55%); 140 (25%); 115 (40%); 77 (100%) e 51 (60%).

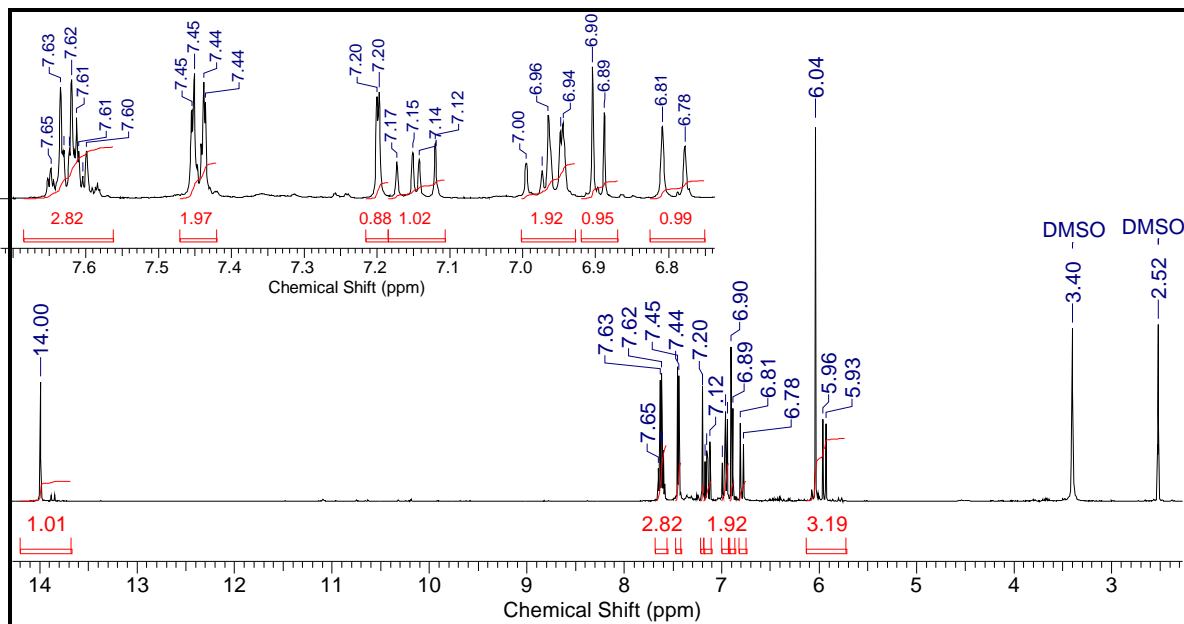


Espectro 78. Espectro de massas do fenil-triazol **6g**.

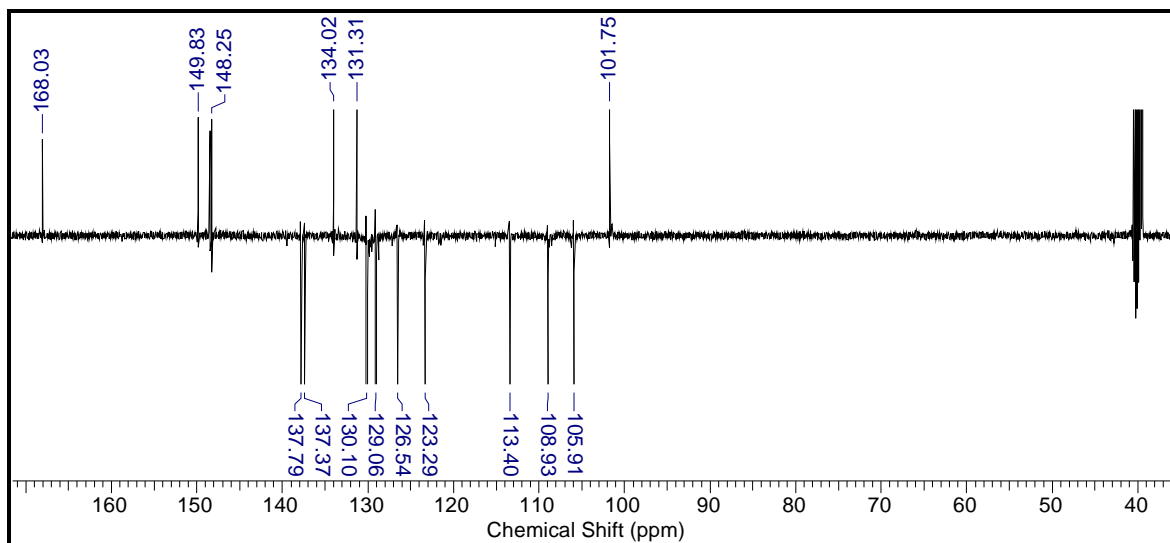
EMAR/ES+: massa calculada ($C_{19}H_{15}N_3O_2S + 1H$): 350.0963 (massa observada: 350.0963).



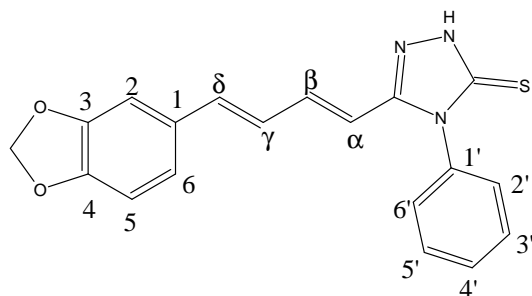
Espectro 79. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do fenil-triazol **6g**.



Espectro 80. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) do fenil-triazol **6g**.



Espectro 81. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ(500 MHz, DMSO- D_6) do fenil-triazol **6g**.

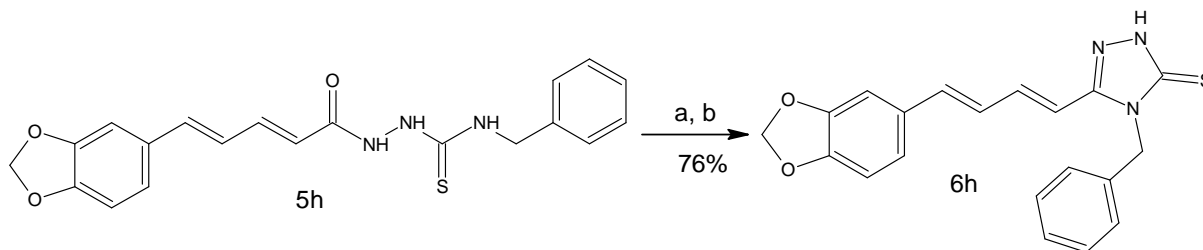


Fenil-triazol 6g

Tabela 25. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6g.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	-----	134,02 (C)
2'	7,44 (dd; 8,04 e 1,42; 1H)	129,06 (CH)
3'	7,58 - 7,65 (m, 1H)	130,10 (CH)
4'	7,58 - 7,65 (m, 1H)	130,12 (CH)
5'	7,58 - 7,65 (m, 1H)	130,10 (CH)
6'	7,44 (dd; 8,04 e 1,42; 1H)	129,06 (CH)
C=S	-----	168,03 (C)
α	5,95 (d; 15,45; 1H)	113,40 (CH)
β	7,15 (dd; 15 e 10; 1H)	137,79 (CH)
γ	6,79 (d; 15; 1H)	126,54 (CH)
δ	6,94 - 7,00 (m, 1H)	137,37 (CH)
1	-----	131,31 (C)
2	7,20 (d; 1,58; 1H)	105,91 (CH)
3	-----	148,25 (C)
4	-----	148,25 (C)
5	6,89 (d; 7,88; 1H)	108,93 (CH)
6	6,94 - 7,00 (m, 1H)	123,29 (CH)
OCH ₂ O	6,04 (s, 2H)	101,75 (CH ₂)
NH	14,00 (s, 1H)	-----
C=N	-----	149,83 (C)

4.9.8. Preparação do derivado 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-benzil-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (**6h**)



Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 28. Reação de preparação do benzil-triazol **6h**.

Pf: 187 - 188 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

ν N-H = 3433 (estiramento NH do triazol);

ν C-H(Csp²) = 3161 (sistema aromático);

ν C-H (Csp³) = 2989 - 2922 (estiramento de metilenos);

ν C=C (Csp²) = 1600 - 1492 - 1444 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

ν N-H = 1546 (banda de confirmação da ligação N-H);

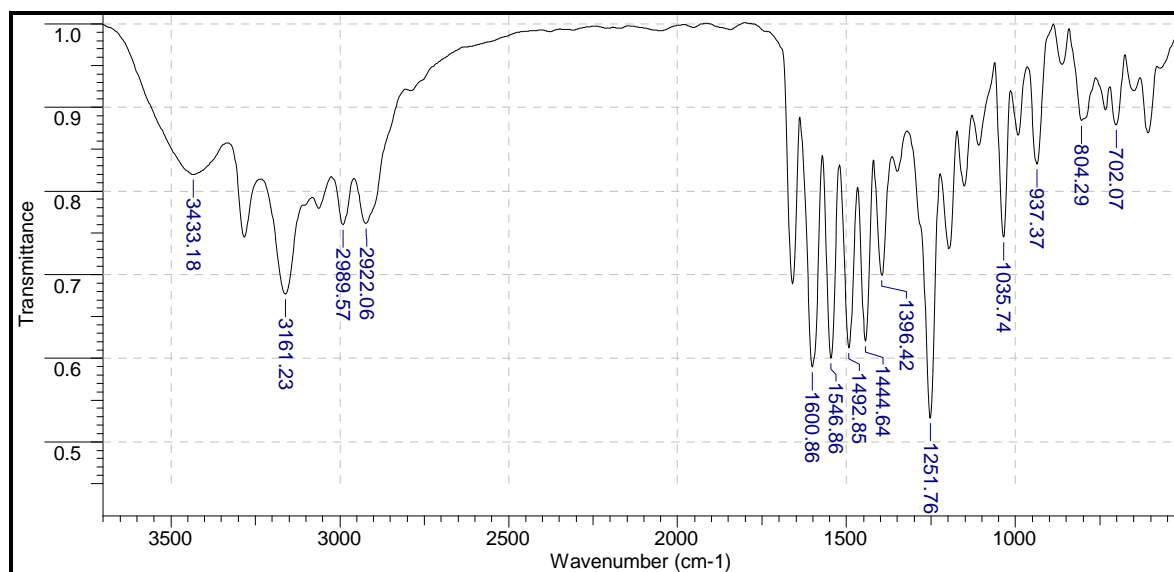
ν C-N = 1396 (vibração da ligação C-N do anel heterocíclico);

ν C-O-C = 1251 (estiramento de éter);

ν C=S = 1035 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);

δ C-H (Csp²) = 937 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

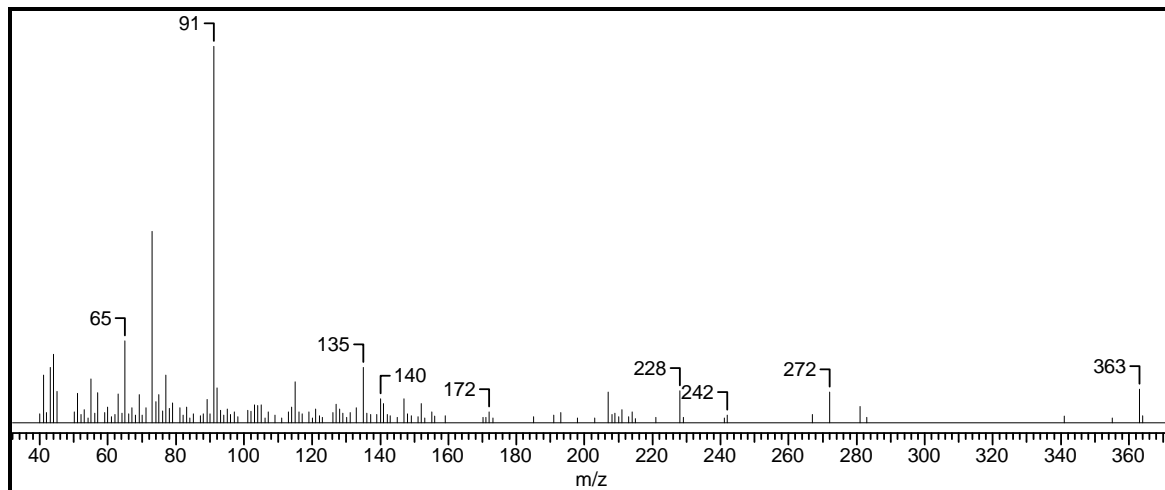
δ C-H (Csp²) = 804 e 702 (deformação angular fora do plano de C-H para 5H no sistema aromático).



Espectro 82. Espectro de IV do benzil-triazol **6h**.

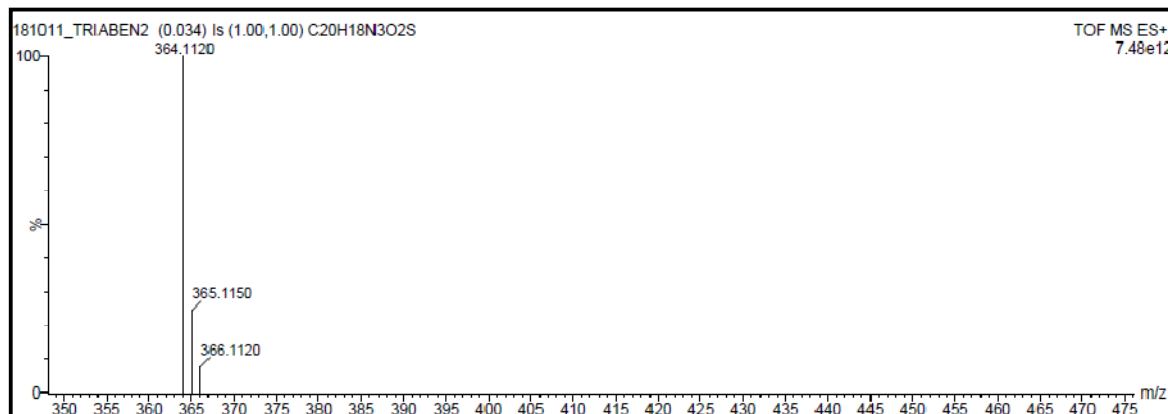
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: $m/z = 363$ (M^+ , 10%); 272 (10%); 228 (10%); 135 (15%); 91 (100%) e 65 (20%).

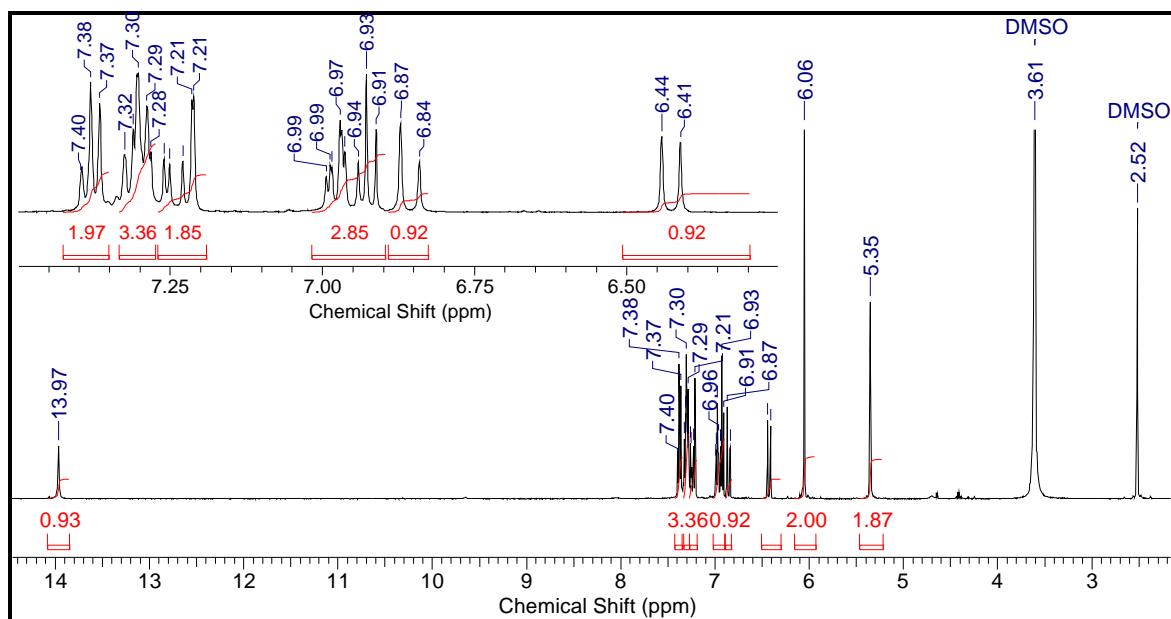


Espectro 83. Espectro de massas do benzil-triazol **6h**.

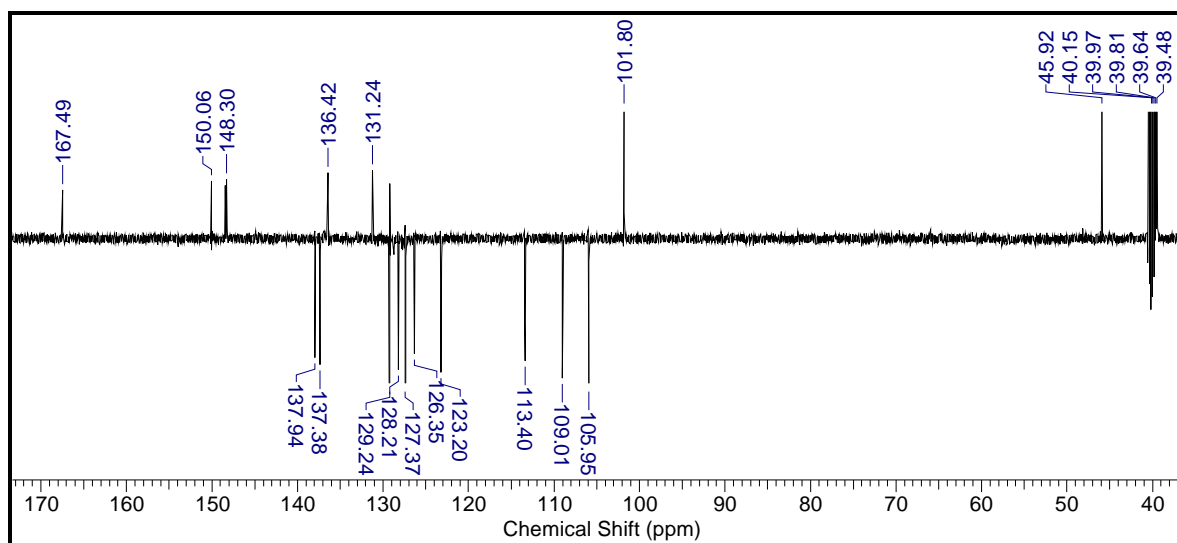
EMAR/ES+: massa calculada ($C_{20}H_{17}N_3O_2S + 1H$): 364.1119 (massa observada: 364.1120).



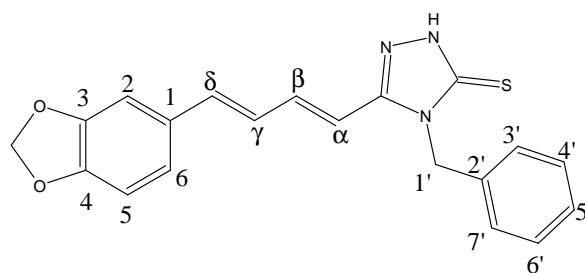
Espectro 84. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do benzil-triazol **6h**.



Espectro 85. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-*D*6) do benzil-triazol **6h**.



Espectro 86. Espectro de RMN ^{13}C – DEPTQ (500 MHz, DMSO-*D*6) do benzil-triazol **6h**.

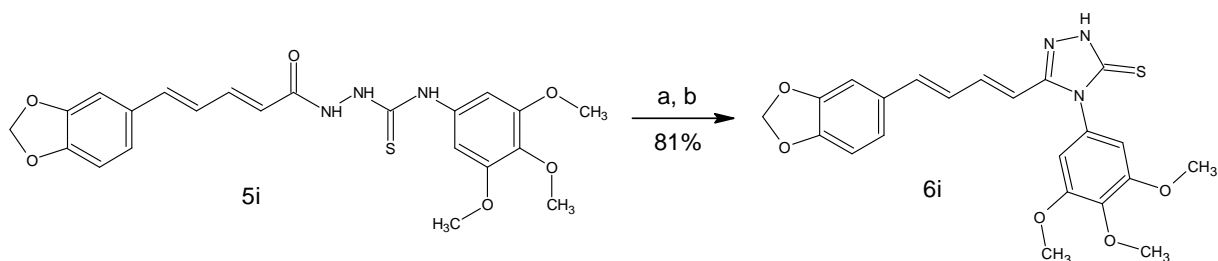


Benzil-triazol 6h

Tabela 26. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6h.

Posição	$\delta ^1\text{H}$ (ppm) ; J (Hz)	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)
1'	5,35 (s,2H)	45,92 (CH ₂)
2'	-----	136,42 (C)
3'	7,28 - 7,32 (m, 1H)	127,37(CH)
4'	7,37 - 7,40 (m, 1H)	129,24(CH)
5'	7,28 - 7,32 (m, 1H)	128,21(CH)
6'	7,37 - 7,40 (m, 1H)	129,24(CH)
7'	7,28 - 7,32 (m, 1H)	127,37(CH)
C=S	-----	167,49 (C)
α	6,42 (d; 15,45; 1H)	113,40 (CH)
β	7,21 - 7,26 (m; 1H)	137,94 (CH)
γ	6,85 (d; 15,45; 1H)	126,35 (CH)
δ	6,93 (d; 15,45 e 11; 1H)	137,38 (CH)
1	-----	131,24(C)
2	7,21 (d; 1,26;1H)	105,95 (CH)
3	-----	148,30 (C)
4	-----	148,30 (C)
5	6,91 - 6,99 (m, 1H)	109,01 (CH)
6	6,91 - 6,99 (m, 1H)	123,20 (CH)
OCH ₂ O	6,06 (s,2H)	101,80 (CH ₂)
NH	13,97 (s,1H)	-----
C=N	-----	150,06 (C)

4.9.9. Preparação do derivado 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-(3,4,5-trimetoxifenil)-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (**6i**)



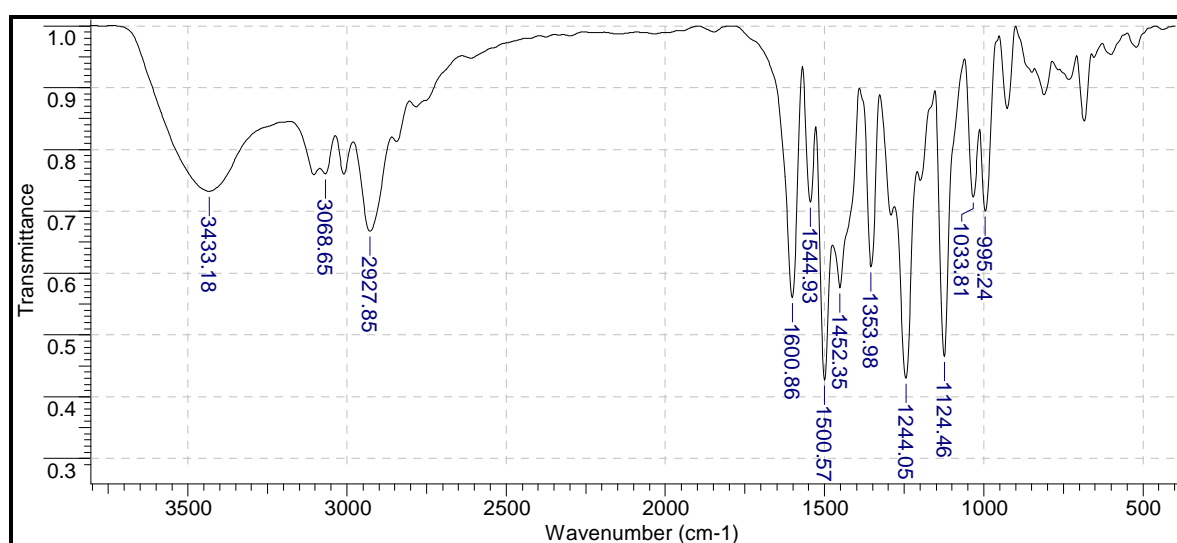
Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 29. Reação de preparação do trimetoxifenil-triazol **6i**.

Pf: 242 - 243 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

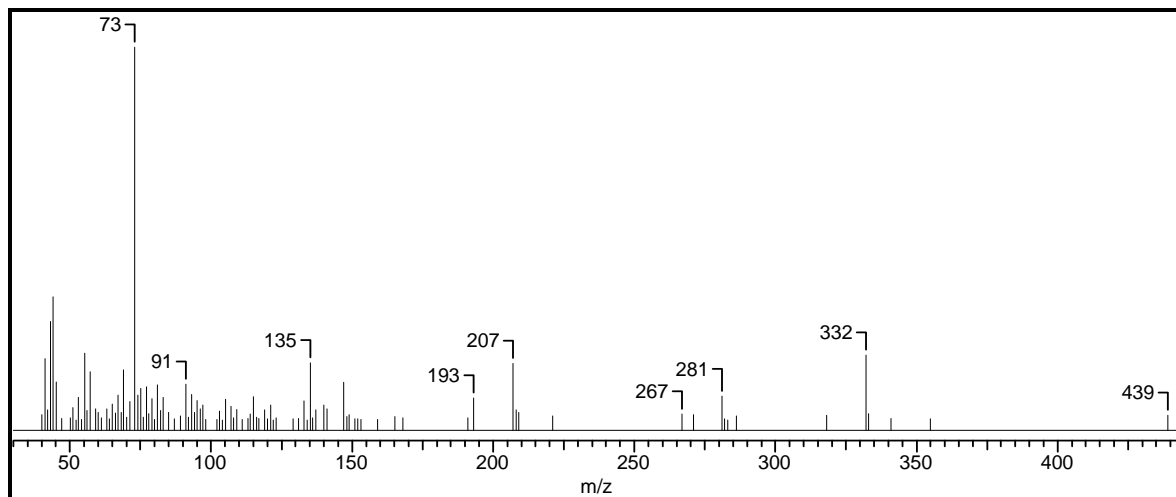
ν N-H = 3433 (estiramento NH do triazol);
 ν C-H(Csp²) = 3068 (sistema aromático);
 ν C-H (Csp³) = 2927 (estiramento de metilas e metileno);
 ν C=C (Csp²) = 1600 - 1500 - 1452 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);
 ν N-H = 1544 (banda de confirmação da ligação N-H);
 ν C-N = 1353 (vibração da ligação C-N do anel heterocíclico);
 ν C-O-C = 1244 (estiramento de éter);
 ν C-O-C = 1124 (metoxila);
 ν C=S = 1033 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);
 δ C-H (Csp²) = 955 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);



Espectro 87. Espectro de IV do trimetoxifenil-triazol **6i**.

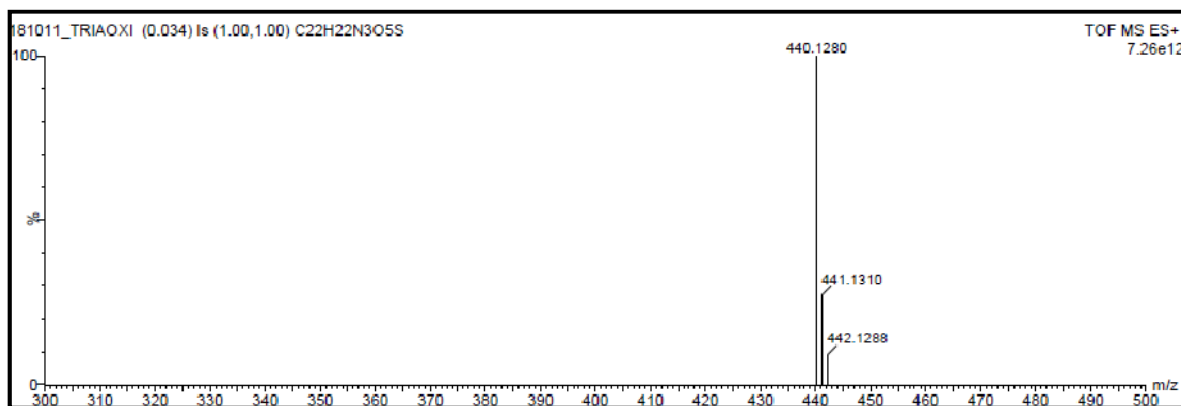
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: m/z = 439 (M⁺, 5%); 332 (20%); 281 (10%); 207 (20%); 193 (10%); 135 (20%); 91 (15%) e 73 (100%).

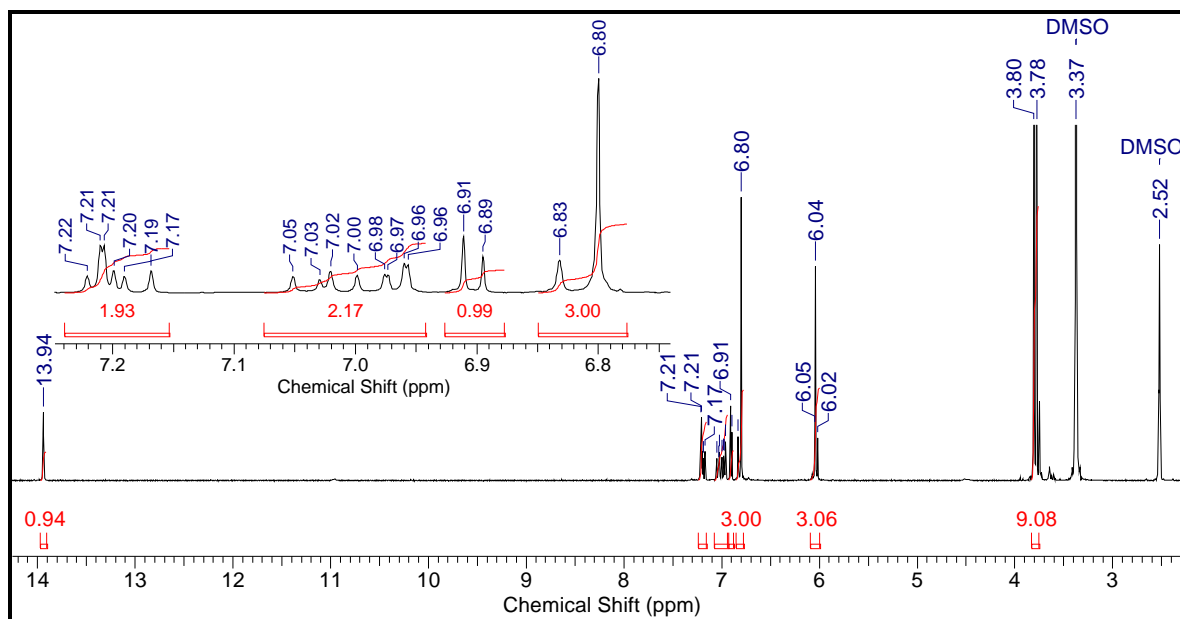


Espectro 88. Espectro de massas do trimetoxifenil-triazol **6i**.

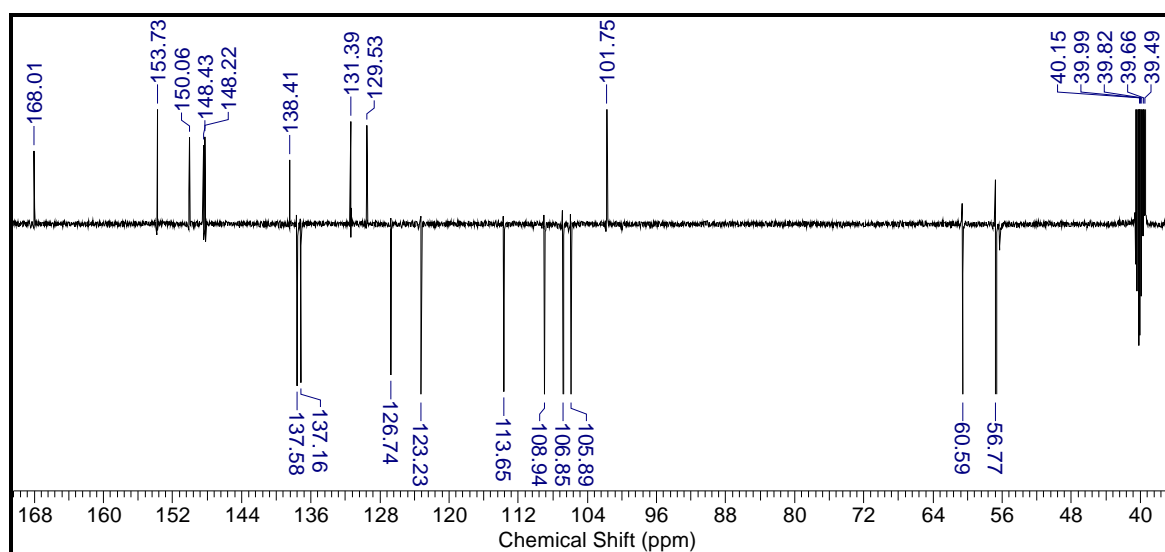
EMAR/ES+: massa calculada (C₂₂H₂₁N₃O₅S + 1H): 440.1280 (massa observada: 440.1280).



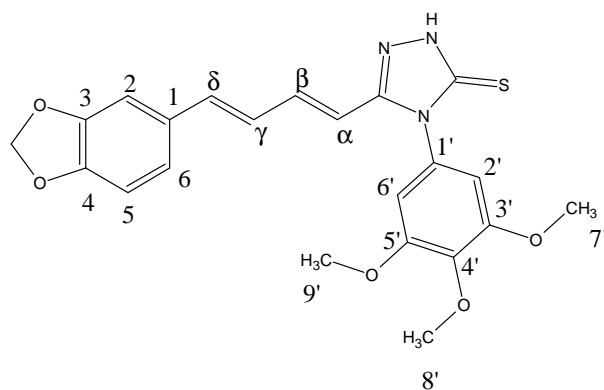
Espectro 89. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do trimetoxifenil-triazol **6i**.



Espectro 90. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) do trimetoxifenil-triazol **6i**.



Espectro 91. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) do trimetoxifenil-triazol **6i**.

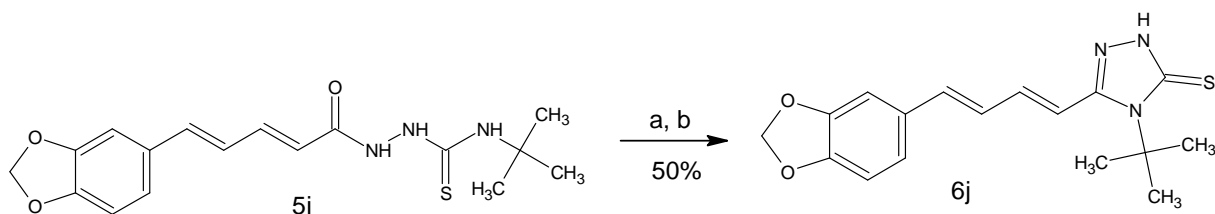


Trimetoxifenil-triazol **6i**

Tabela 27. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para **6i**.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	-----	129,53 (C)
2'	6,80 (s,1H)	106,85 (CH)
3'	-----	153,73 (C)
4'	-----	138,41 (C)
5'	-----	153,73 (C)
6'	6,80 (s,1H)	106,85 (CH)
7'	3,80 (s,3H)	56,77 (CH ₃)
8'	3,78 (s,3H)	60,59 (CH ₃)
9'	3,80 (s,3H)	56,77 (CH ₃)
C=S	-----	168,01 (C)
α	6,03 (d; 15; 1H)	113,65 (CH)
β	7,17 - 7,22 (m, 1H)	137,58 (CH)
γ	6,82 (d; 15,31; 1H)	126,74 (CH)
δ	7,03 (d; 15 e 10; 1H)	137,16 (CH)
1	-----	131,39 (C)
2	7,21(d; 1,58; 1H)	105,89 (CH)
3	-----	148,22 (C)
4	-----	148,43 (C)
5	6,90 (d; 7,88; 1H)	108,94 (CH)
6	6,96 (dd; 10 e 5; 1H)	123,23 (CH)
OCH ₂ O	6,04 (s,2H)	101,75 (CH ₂)
NH	13,94 (s,1H)	-----
C=N	-----	150,06 (C)

4.9.10. Preparação do derivado 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-tert-butil-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (6j)



Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 30. Reação de preparação do *tert*-butil-triazol **6j**.

Pf: 183-184°C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

$\nu_{\text{N-H}}$ = 3431 (estiramento NH do triazol);

$\nu_{\text{C-H}}$ (Csp³) = 2970 - 2918 (estiramento de metilas e metilenos);

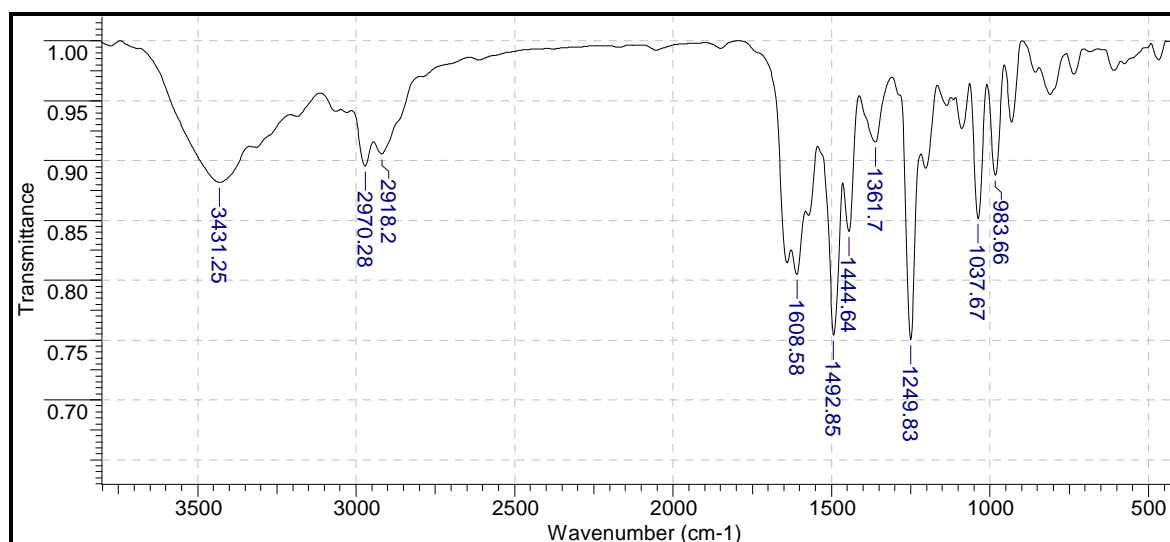
$\nu_{\text{C=C}}$ (Csp²) = 1608 - 1492 - 1444 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

$\nu_{\text{C-N}}$ = 1361 (vibração da ligação C-N do anel heterocíclico);

$\nu_{\text{C-O-C}}$ = 1249 (estiramento de éter);

$\nu_{\text{C=S}}$ = 1037 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);

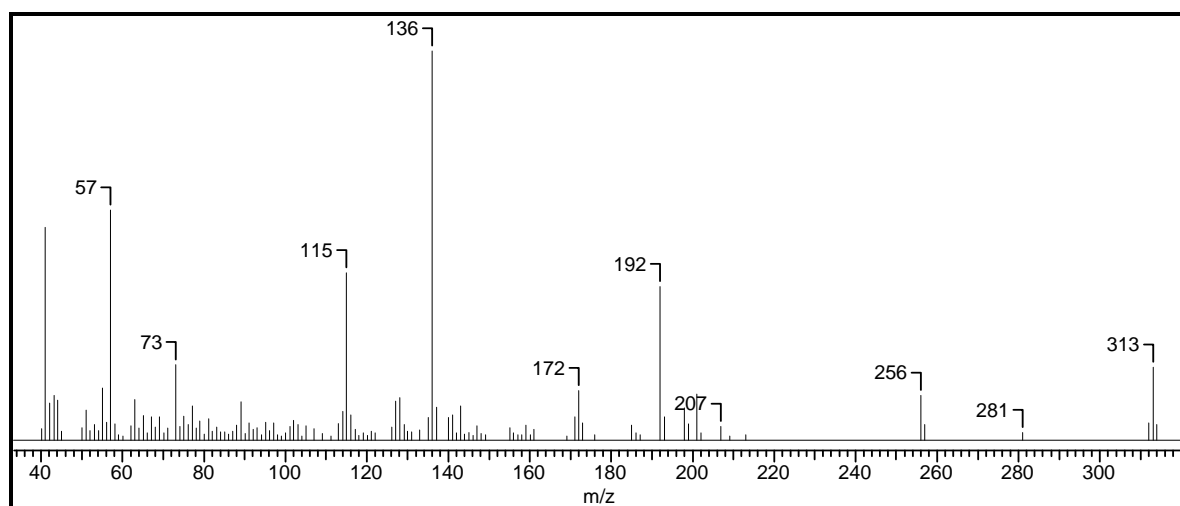
$\delta_{\text{C-H}}$ (Csp²) = 983 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);



Espectro 92. Espectro de IV do *tert*-butil-triazol **6j**.

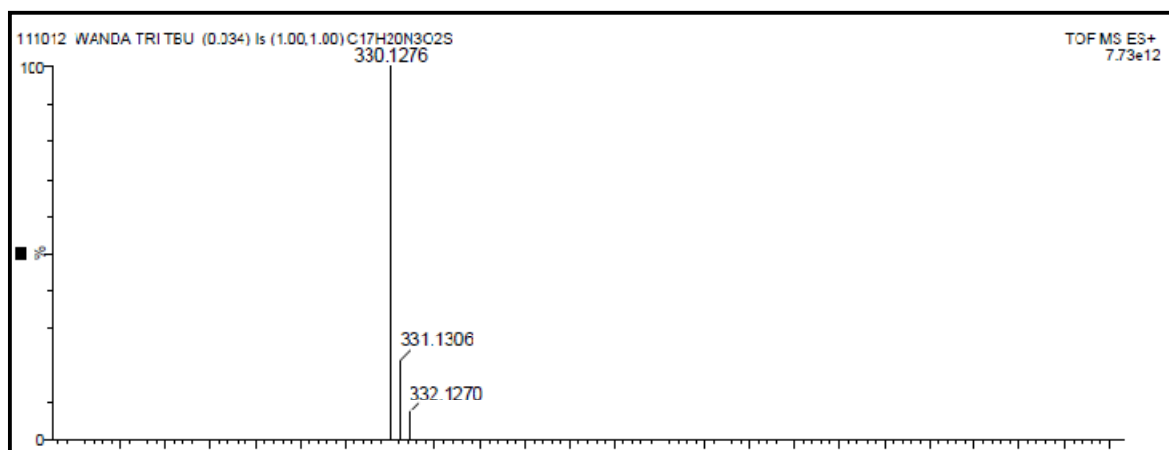
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: $m/z = 329 (M^+)$; 256 (15%); 192 (40%); 172 (10%); 136 (100%), 115 (40%), 73 (20%) e 57 (60%).

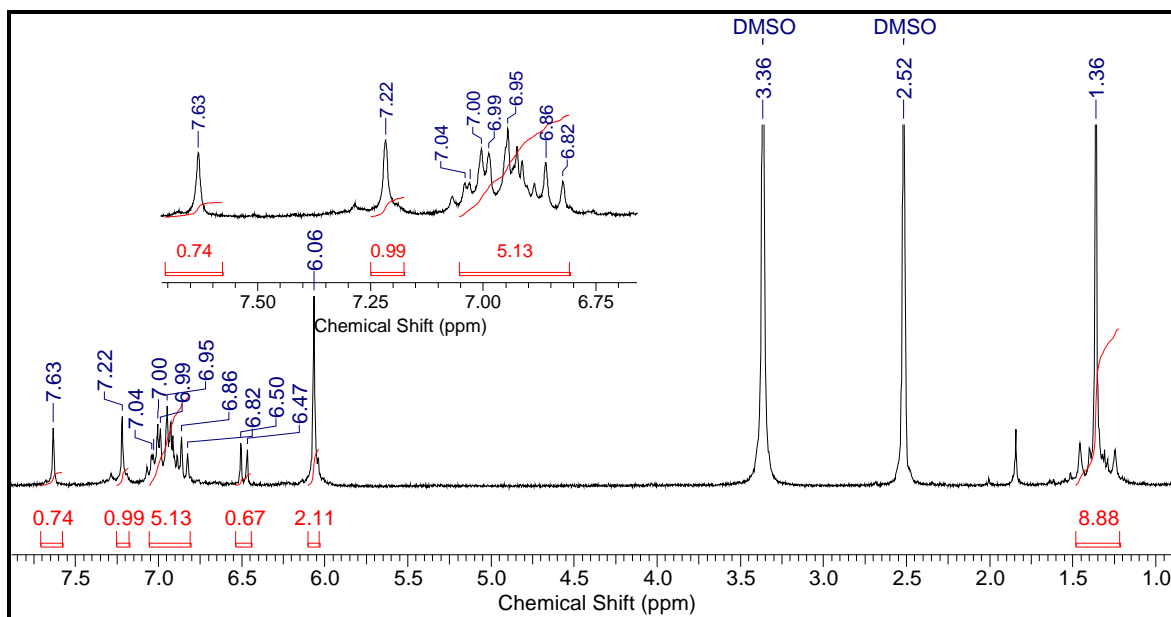


Espectro 93. Espectro de massas do *tert*-butil-triazol **6j**.

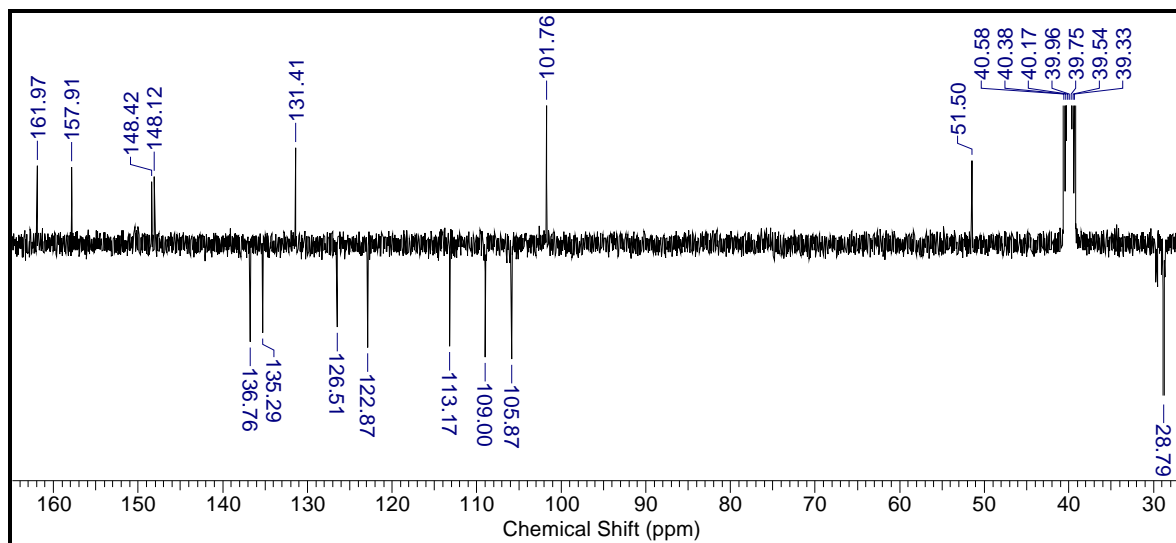
EMAR/ES+: massa calculada ($C_{17}H_{19}N_3O_2S + 1H$): 330.1276 (massa observada: 330.1276).



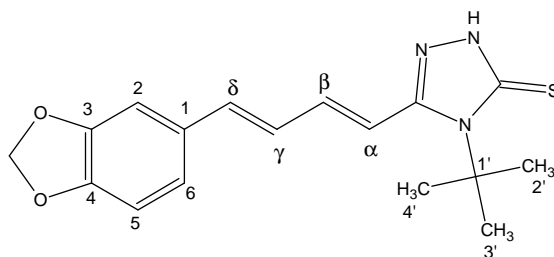
Espectro 94. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do *tert*-butil-triazol **6j**.



Espectro 95. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) do *tert*-butil-triazol **6j**.



Espectro 96. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) do *tert*-butil-triazol **6j**.

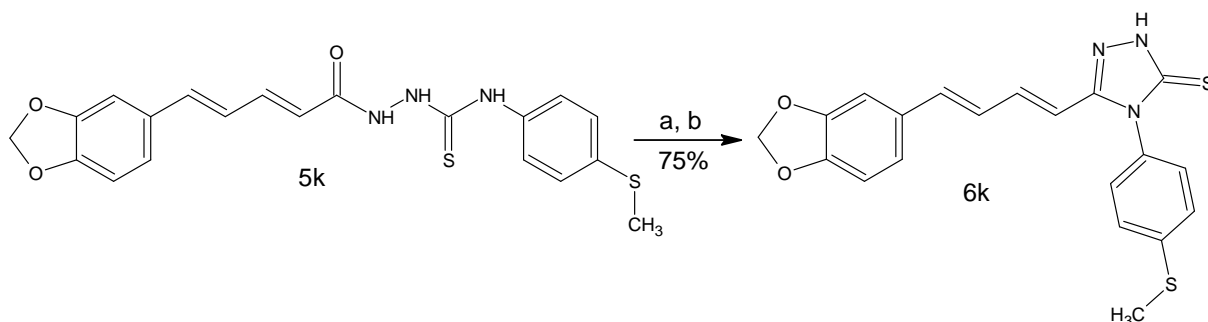


tert-butil-triazol **6j**

Tabela 28. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para **6j**.

Posição	δ ^1H (ppm) ; J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)
1'	-----	51,50 (C)
2',3'e 4'	1,36 (s, 9H)	28,79 (CH ₃)
C=S	-----	161,97 (C)
α	6,48 (d; 15,31; 1H)	113,17 (CH)
β	6,82 - 7,04 (m, 1H)	136,76 (CH)
γ	6,84 (d; 15,06; 1H)	126,51 (CH)
δ	6,82 - 7,04 (m, 1H)	135,29 (CH)
1	-----	131,41 (C)
2	7,22 (s, 1H)	105,87 (CH)
3	-----	148,12 (C)
4	-----	148,42 (C)
5	6,82 - 7,04 (m, 1H)	109,00 (CH)
6	6,82 - 7,04 (m, 1H)	122,87 (CH)
OCH ₂ O	6,06 (s, 2H)	101,76 (CH ₂)
NH	7,63 (s, 1H)	-----
C=N	-----	157,91 (C)

4.9.11. Preparação do 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-[4-(metiltiofenil)-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (6K)



Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 31. Reação de preparação do 4-tiometilfenil-triazol **6k**.

Pf: 209 - 211 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

ν N-H = 3429 (estiramento NH do triazol);

ν C-H(Csp²) = 3062 (sistema aromático);

ν C-H (Csp³) = 2920 (estiramento de metila e metileno);

ν C=C (Csp²) = 1616 - 1500 - 1442 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

ν N-H = 1543 (banda de confirmação da ligação N-H);

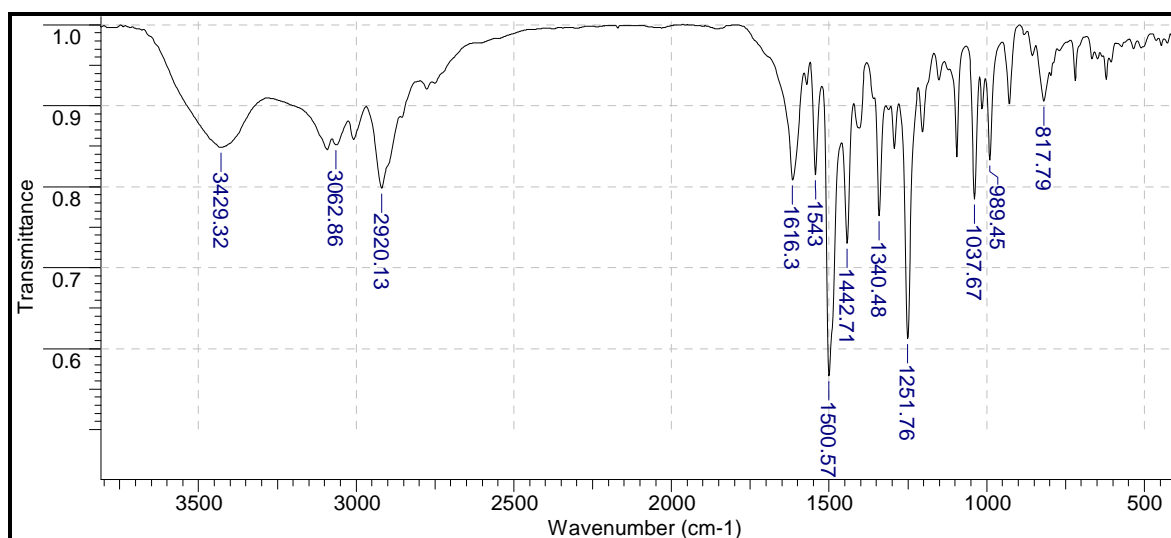
ν C-N = 1340 (vibração da ligação C-N do anel heterocíclico);

ν C-O-C = 1251 (estiramento de éter);

ν C=S = 1037 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);

δ C-H (Csp²) = 989 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

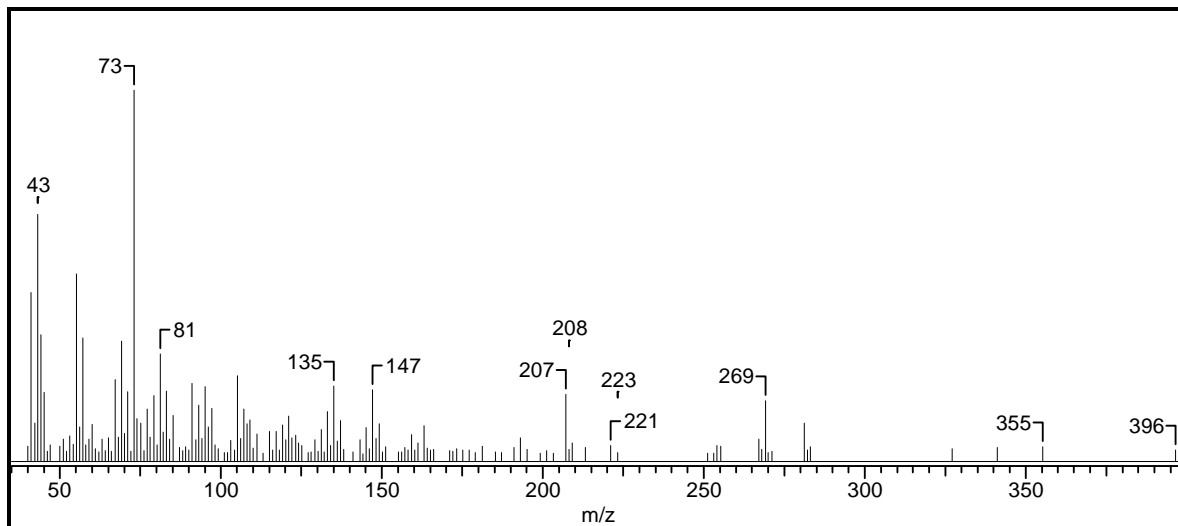
δ C-H (Csp²) = 817 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático);



Espectro 97. Espectro de IV do 4-tiometilfenil-triazol **6k**.

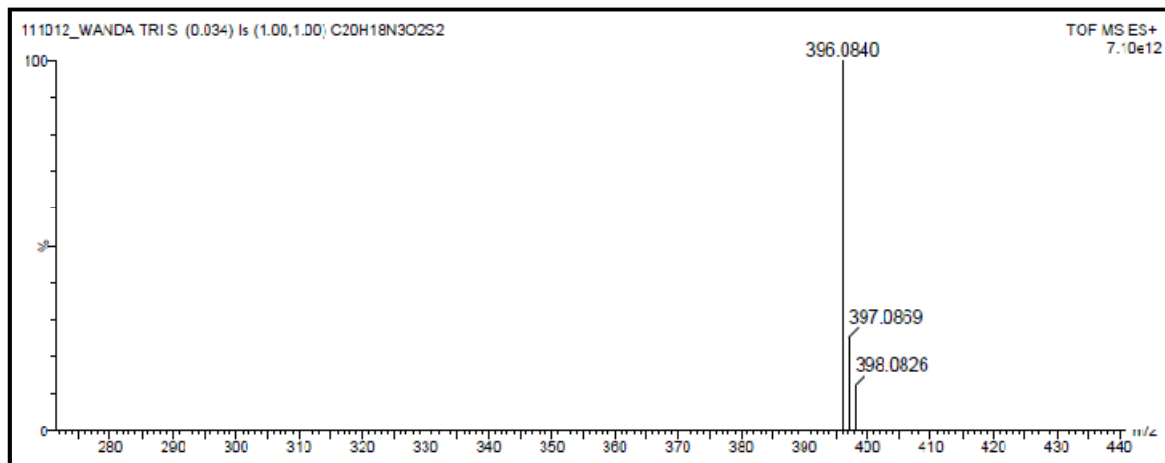
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: m/z = 396 (M+1, 5%); 355 (5%); 269 (20%); 223 (5%); 221 (5%); 208 (5%); 207 (20%); 147 (20%); 135 (20%); 81 (30%); 73 (100%); 43(65%).

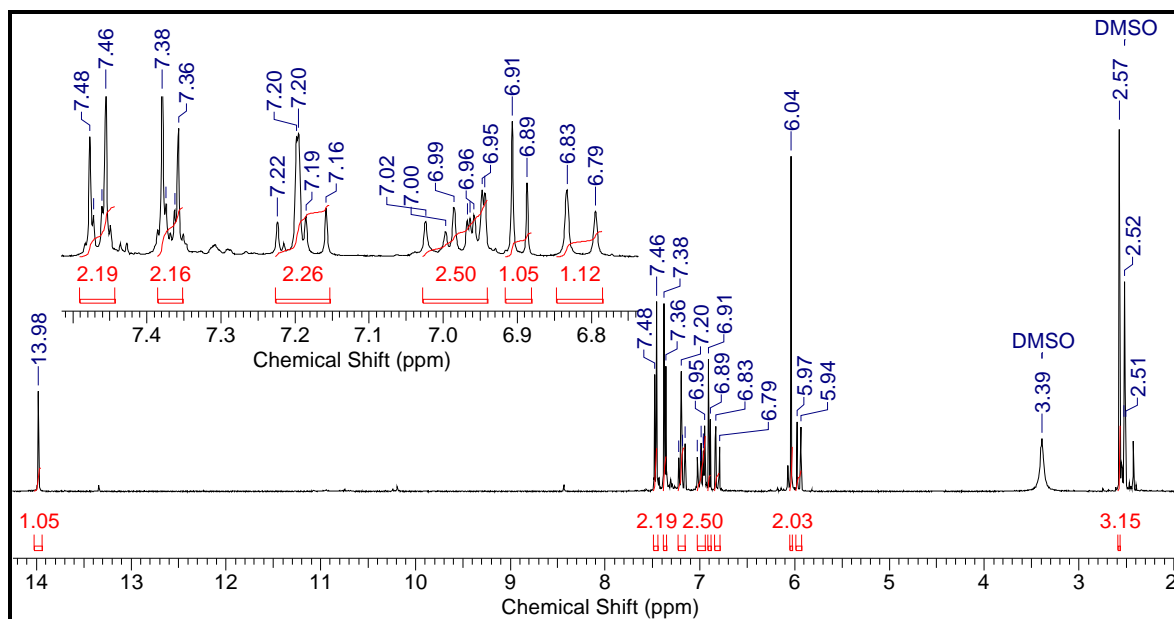


Espectro 98. Espectro de massas do 4-tiometilfenil-triazol **6k**.

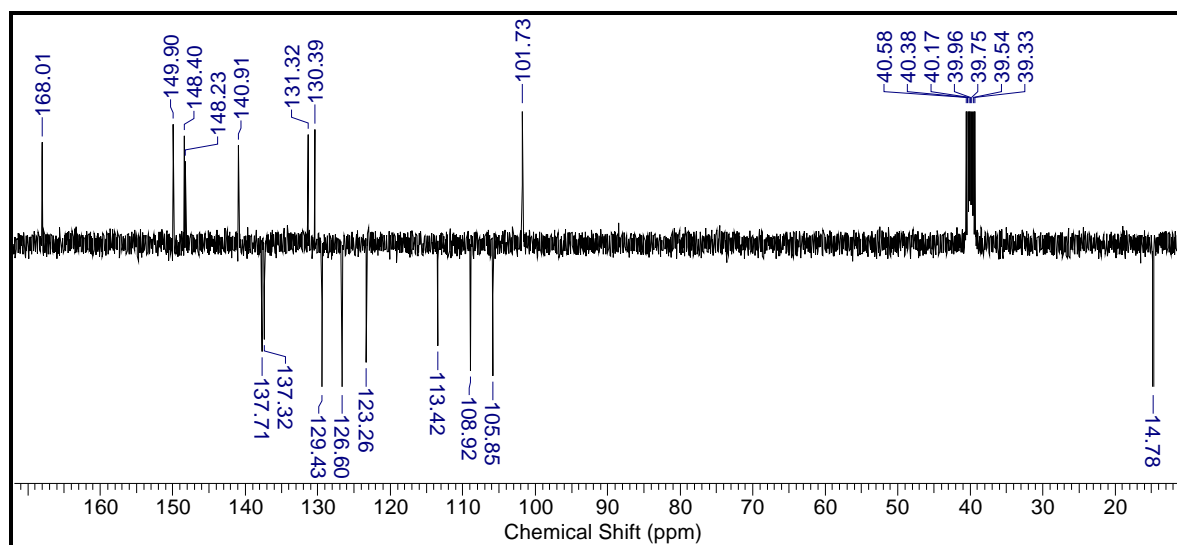
EMAR/ES+: massa calculada ($C_{20}H_{17}N_3O_2S_2 + 1H$): 396.0840 (massa observada: 396.0840).



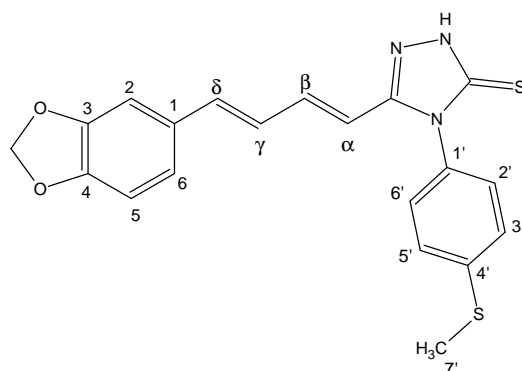
Espectro 99. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do 4-tiometilfenil-triazol **6k**.



Espectro 100. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) do 4-tiometilfenil-triazol **6k**.



Espectro 101. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) do 4-tiometilfenil-triazol **6k**.

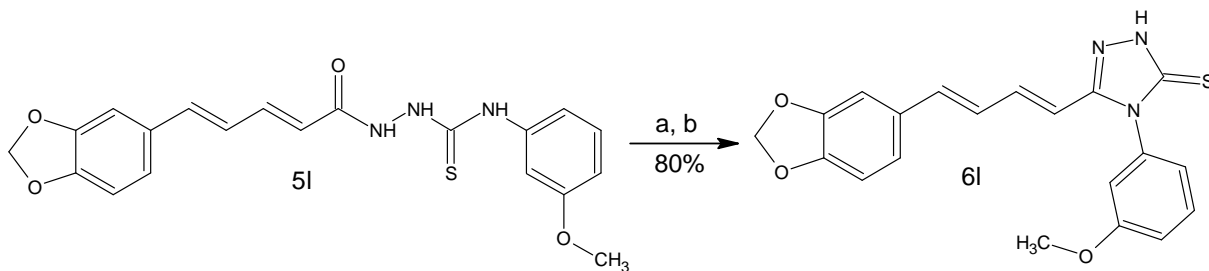


4-tiometilfenil-triazol 6k

Tabela 29. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6k.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'	-----	140,91 (C)
2'	7,37 (d; 10; 1H)	126,60 (CH)
3'	7,47 (d; 10; 1H)	129,43(CH)
4'	-----	130,39(C)
5'	7,47 (d; 10; 1H)	129,43(CH)
6'	7,37 (d; 10; 1H)	126,60(CH)
7'	2,52 (s, 3H)	14,78 (CH ₃)
C=S	-----	168,01 (C)
α	5,99 (d; 15,56; 1H)	113,42 (CH)
β	7,16 - 7,22 (m, 1H)	137,71 (CH)
γ	6,81 (d; 15,31; 1H)	126,57 (CH)
δ	7,00 (dd; 15 e 10; 1H)	137,32 (CH)
1	-----	131,32(C)
2	7,20 (d; 1,00; 1H)	105,85 (CH)
3	-----	148,23 (C)
4	-----	148,40 (C)
5	6,90 (d; 8,03; 1H)	108,92 (CH)
6	6,95 (dd; 10 e 5; 1H)	123,26 (CH)
OCH ₂ O	6,04 (s, 2H)	101,73 (CH ₂)
NH	13,98 (s, 1H)	-----
C=N	-----	149,90 (C)

4.9.12. Preparação do 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-(3-metoxifenil)-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (6I)



Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 32. Reação de preparação do 3-metoxifenil-triazol **6I**.

Pf: 248-249 °C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

vN-H = 3429 (estiramento NH do triazol);

vC-H(Csp²) = 3072 (sistema aromático);

vC-H (Csp³) = 2927 (estiramento de metila e metileno);

vC=C (Csp²) = 1604 - 1492 - 1448 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);

vN-H = 1543 (banda de confirmação da ligação N-H);

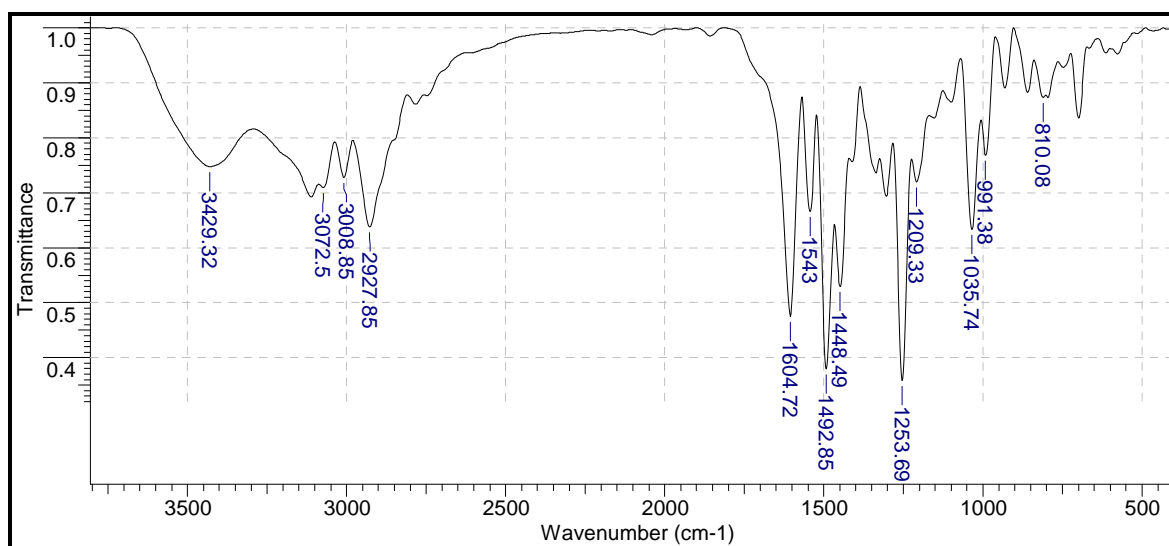
vC-O-C = 1253 (estiramento de éter);

vC-O-C = 1209 (metoxila);

vC=S = 1035 (estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico);

δC-H (Csp²) = 991 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);

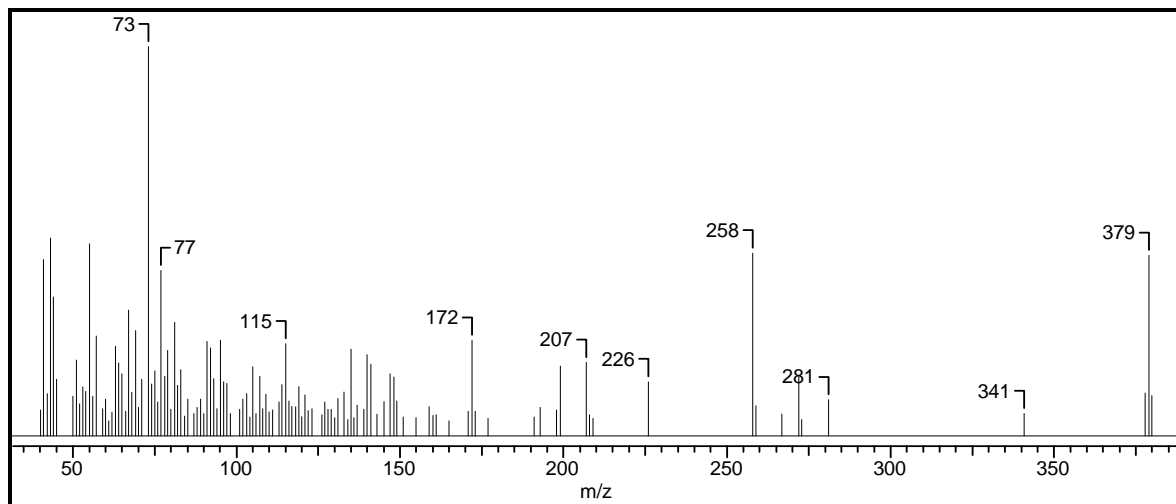
δC-H (Csp²) = 810 (deformação angular fora do plano de C-H para 3H isolado no sistema aromático).



Espectro 102. Espectro de IV do 3-metoxifenil-triazol **61**.

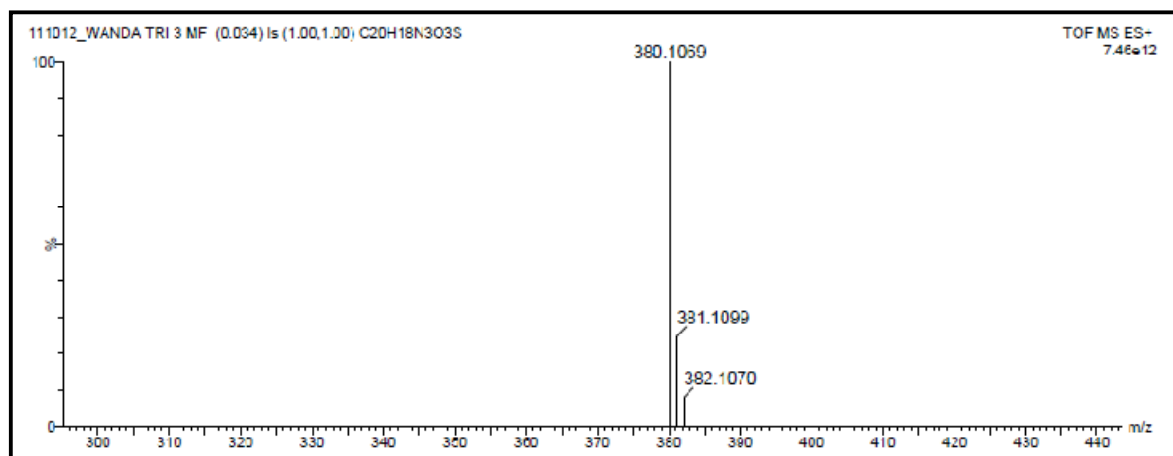
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: m/z = 379 (M⁺, 50%); 341 (5%); 281 (10%); 258 (50%); 207 (20%), 172 (25%); 115 (25%); 77 (45%) e 73 (100%).

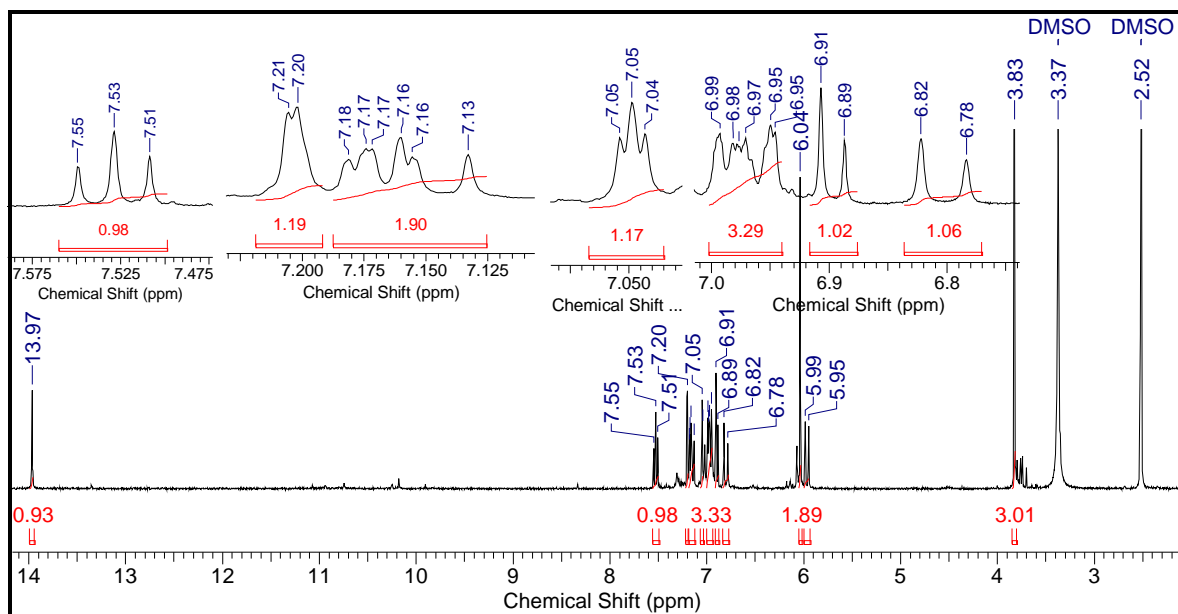


Espectro 103. Espectro de massas do 3-metoxifenil-triazol **61**.

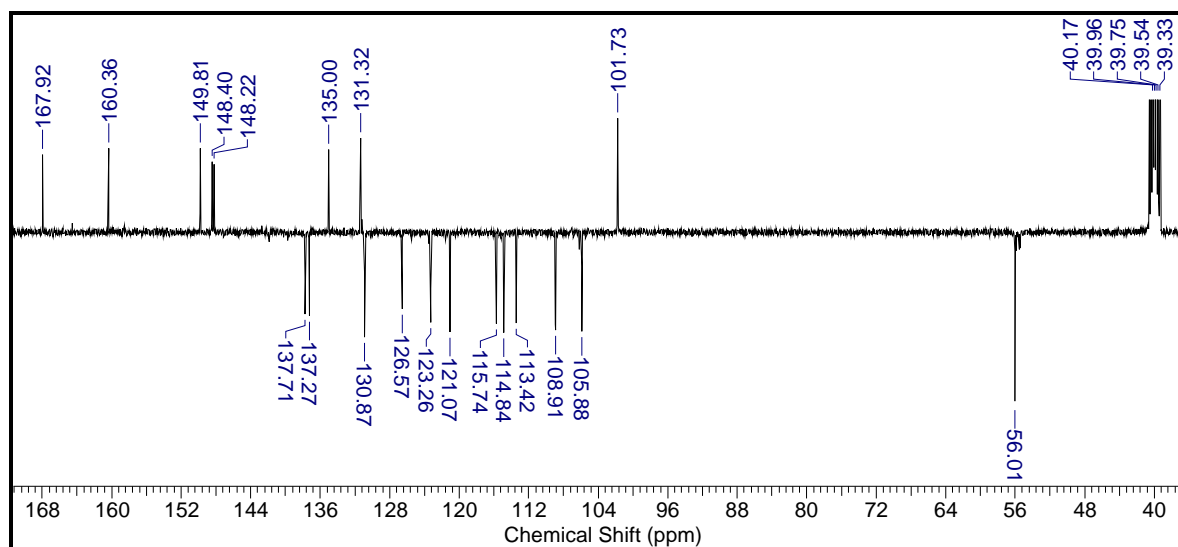
EMAR/ES⁺: massa calculada (C₂₀H₁₇N₃O₃S + 1H): 380.1068 (massa observada: 380.1069).



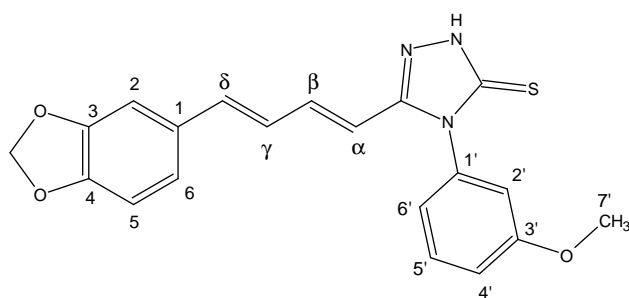
Espectro 104. Espectro de massas de alta resolução (ES⁺) do 3-metoxifenil-triazol **61**.



Espectro 105. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) do 3-metoxifenil-triazol **6l**.



Espectro 106. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) do 3-metoxifenil-triazol **6l**.

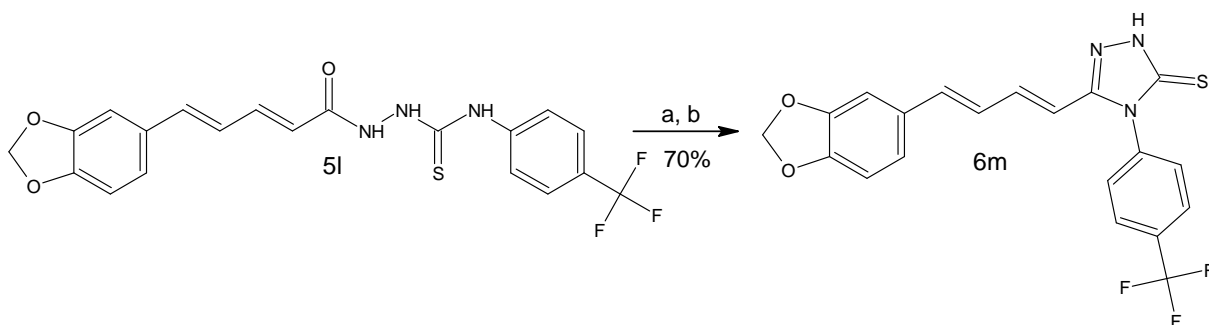


3-metoxifenil-triazol 6l

Tabela 30. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6l.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'	-----	135,00 (C)
2'	7,04 - 7,05 (m, 1H)	115,74 (CH)
3'	-----	160,36 (C)
4'	7,13 - 7,18 (m, 1H)	114,84 (CH)
5'	7,53 (t; 8,16; 1H)	130,87 (CH)
6'	6,95 - 6,99 (m, 1H)	121,07 (CH)
7'	3,83 (s, 3H)	56,01 (CH ₃)
C=S	-----	167,92 (C)
α	5,97 (d; 15,31; 1H)	113,42 (CH)
β	7,13 - 7,18 (m, 1H)	137,71 (CH)
γ	6,80 (d; 15,56; 1H)	126,57 (CH)
δ	6,95 - 6,99 (m, 1H)	137,27 (CH)
1	-----	131,32(C)
2	7,20 (d; 1,51; 1H)	105,88 (CH)
3	-----	148,22 (C)
4	-----	148,40 (C)
5	6,80 (d; 8,03; 1H)	108,91 (CH)
6	6,95 - 6,99 (m, 1H)	123,26 (CH)
OCH ₂ O	6,04 (s, 2H)	101,73 (CH ₂)
NH	13,97 (s, 1H)	-----
C=N	-----	149,81 (C)

4.9.13. Preparação do 5-[(1E,3E)-4-(1,3-benzodioxol-5-il)buta-1,3-dien-1-il]-4-[4-(trifluorometil)fenil]-2,4-diidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiona (6m)



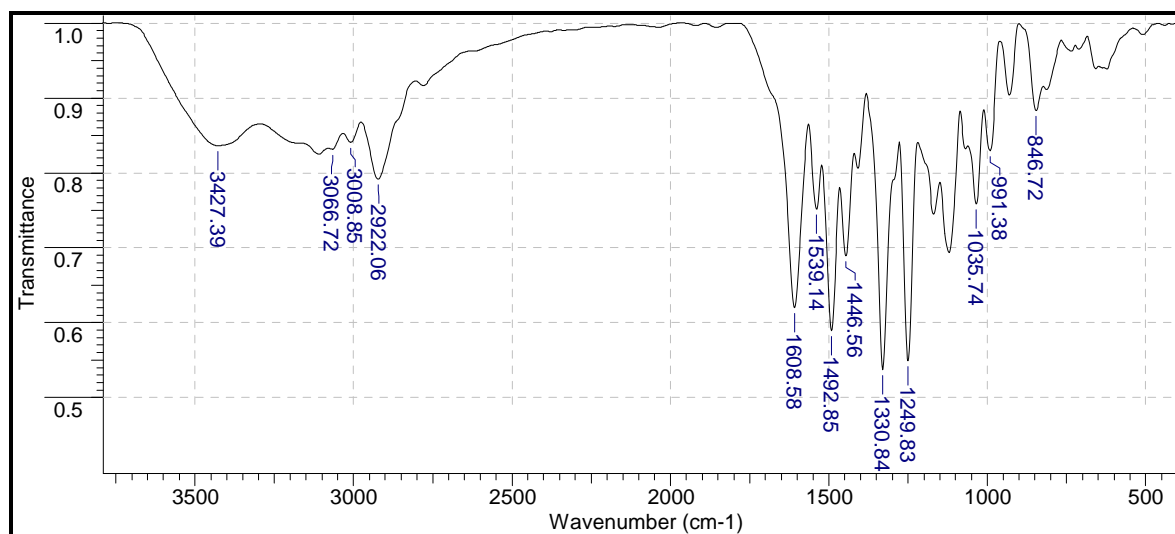
Reagentes: a) 10% NaOH, H₂O, refluxo, MW, 0,5h; b) HCl.

Esquema 33. Reação de preparação do 4-trifluorometilfenil-triazol 6m.

Pf: 232-233°C

Dados de Infravermelho (pastilha em KBr, em cm⁻¹):

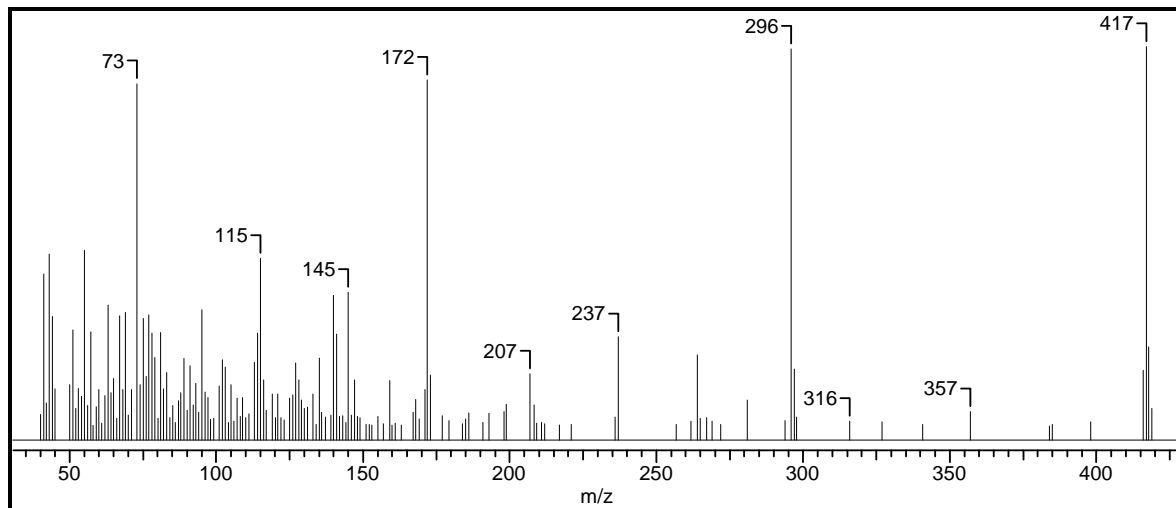
- vN-H = 3427 (estiramento NH do triazol);
- vC-H(Csp²) = 3066 (sistema aromático);
- vC-H(Csp²) = 3008 (cadeia olefínica);
- vC-H (Csp³) = 2922 (estiramento de metileno);
- vC=C (Csp²) = 1608 - 1492 - 1446 (vibração da ligação C=C do esqueleto aromático);
- vN-H = 1539 (banda de confirmação da ligação N-H);
- vC-F = 1330 (vibração da ligação C-F);
- vC-O-C = 1249 (estiramento de éter);
- δC-H (Csp²) = 991 (deformação angular fora do plano de C-H para H isolado no sistema aromático);
- δC-H (Csp²) = 846 (deformação angular fora do plano de C-H para 2H no sistema aromático).



Espectro 107. Espectro de IV do 4-trifluorometilfenil-triazol 6m.

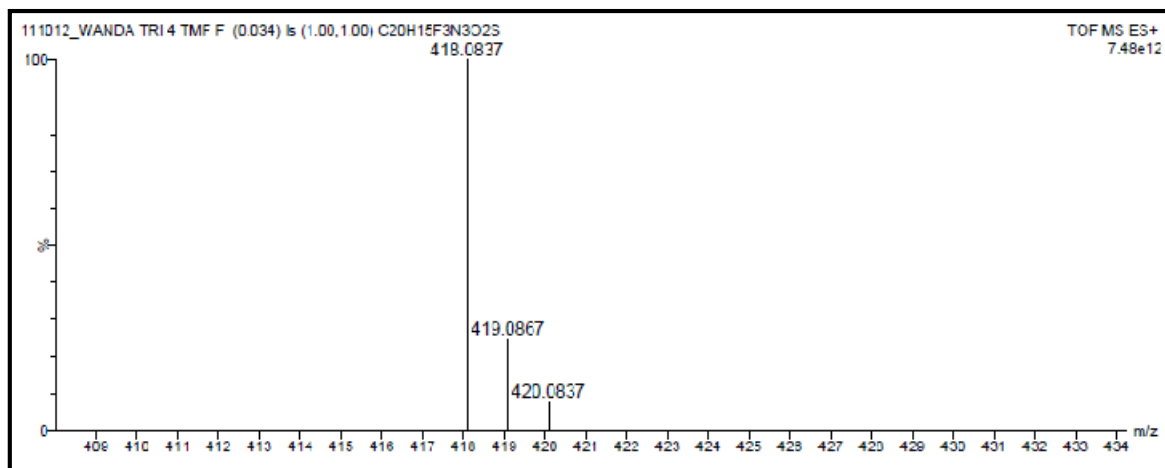
Dados do Espectro de Massas:

EM/IE: m/z = 417 (M⁺, 100%); 296 (100%); 237 (25%); 207 (20%); 172 (90%), 145 (40%); 115 (50%) e 73 (90%).

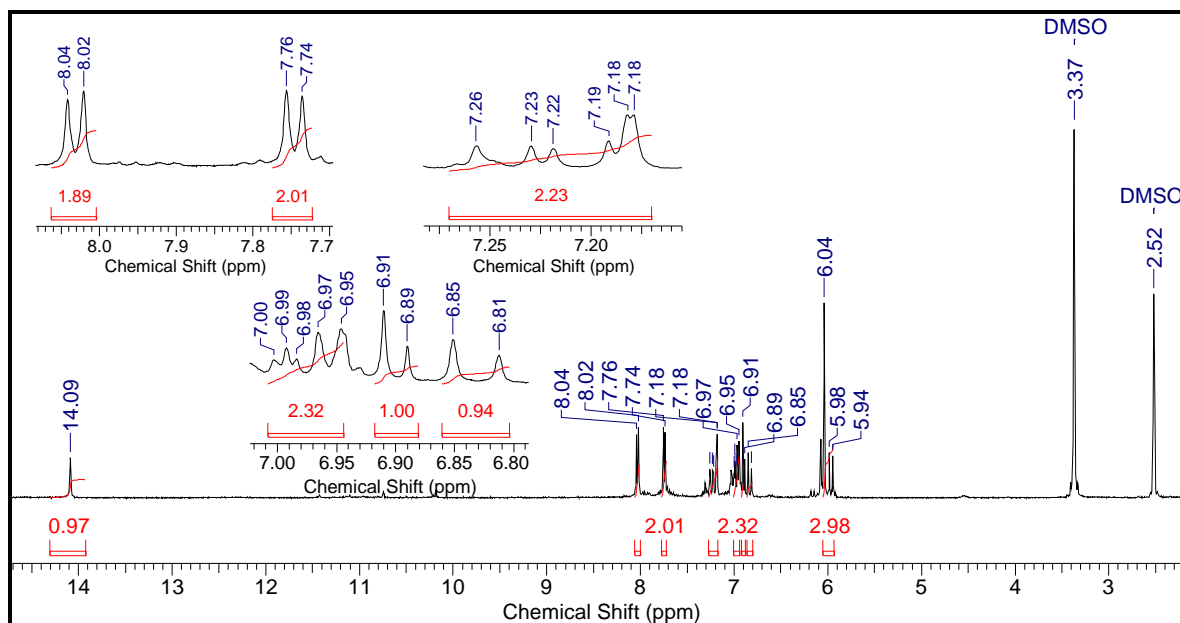


Espectro 108. Espectro de massas do 4-trifluorometilfenil-triazol **6m**.

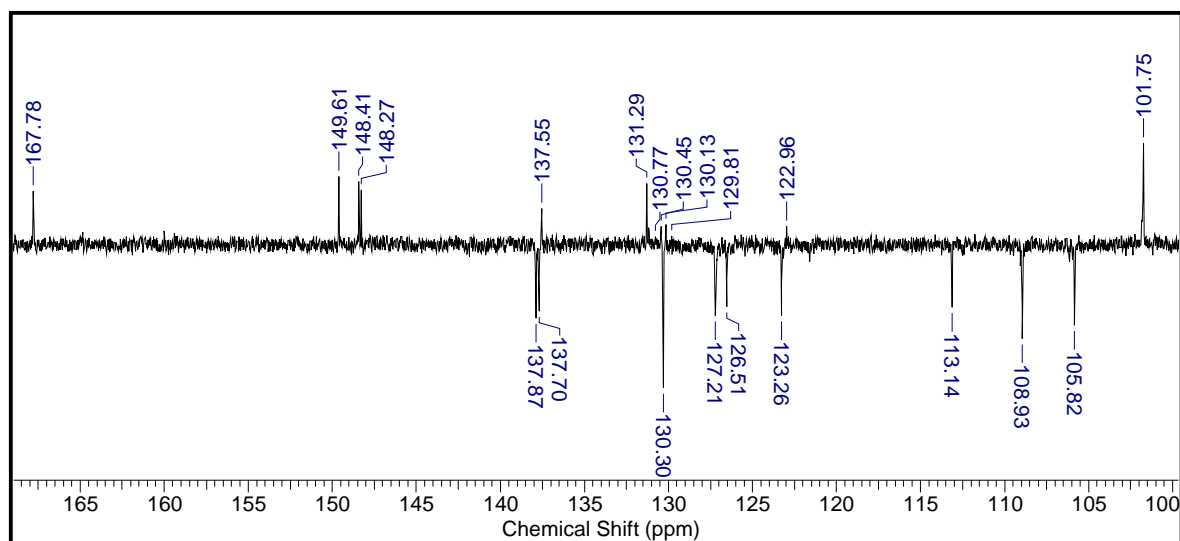
EMAR/ES+: massa calculada (C₂₀H₁₄F₃N₃O₂S + 1H): 418.0837 (massa observada: 418.0837).



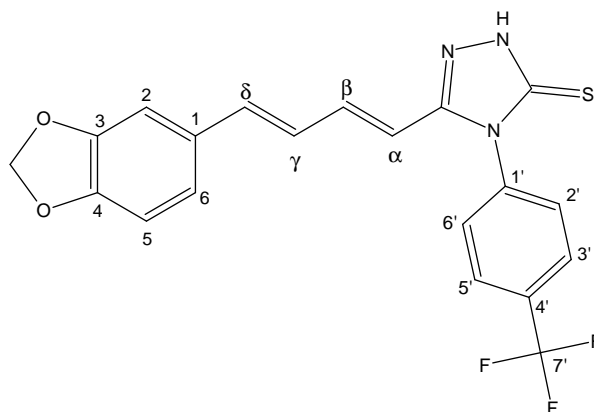
Espectro 109. Espectro de massas de alta resolução (ES+) do 4-trifluorometilfenil-triazol **6m**.



Espectro 110. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- D_6) do 4-trifluorometilfenil-triazol **6m**.



Espectro 111. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (500 MHz, DMSO- D_6) do 4-trifluorometilfenil-triazol **6m**.



4-trifluorometilfenil-triazol 6m

Tabela 31. Deslocamento químico de ^1H e ^{13}C para 6m.

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) ; J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1'	-----	137,55 (C)
2'	7,75 (d; 8,28; 1H)	127,21 (CH)
3'	8,03 (d; 8,53; 1H)	130,30 (CH)
4'	-----	122,96 (C)
5'	8,03 (d; 8,53; 1H)	130,30 (CH)
6'	7,75 (d; 8,28; 1H)	127,21 (CH)
7'	-----	129,81- 130,77 (q, CF_3)
C=S	-----	167,92 (C)
α	5,96 (d; 15,31; 1H)	113,14 (CH)
β	7,13 - 7,18 (m, 1H)	137,87 (CH)
γ	6,83 (d; 15,56; 1H)	126,51 (CH)
δ	6,95 - 7,00 (m, 1H)	137,70 (CH)
1	-----	131,29 (C)
2	7,20 (d; 1,51; 1H)	105,82 (CH)
3	-----	148,27 (C)
4	-----	148,41 (C)
5	6,90 (d; 8,03; 1H)	108,93 (CH)
6	6,95 - 7,00 (m, 1H)	123,26 (CH)
OCH_2O	6,04 (s, 2H)	101,75 (CH_2)
NH	14,09 (s, 1H)	-----
C=N	-----	149,61 (C)

4.10. Avaliação da atividade biológica

A avaliação da atividade tripanocida das moléculas obtidas neste trabalho foram realizadas pelo Dr. Leonardo Freire-de-Lima e pela Dra. Lucia Mendonça-Previato, no Laboratório de Glicobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF-UFRJ).

4.10.1. Parasitos

A forma epimastigota de *T. cruzi* (amostra Y) foi obtida da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz e foi mantidas a 28°C em meio composto por BHI (37 g/L), hemina (0,01 g/L; Sigma) e ácido fólico (0,02 g/L; Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF). A forma tripomastigota foi utilizada 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 (0,3 g/L), carbonato de sódio (2,0 g/L), piruvato de sódio (0,1 g/L), HEPES (2,4 g/L), gentamicina e suplementado com 10% SFB, sob atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C (ANDREWS *et al.*, 1985). Estes tecidos derivados de culturas tripomastigotas foram usados para infectar macrófagos peritoniais murinos (MØ) *in vitro* para avaliação quanto ao efeito tóxico das moléculas triazólicas sintetizadas por este trabalho.

4.10.2. Atividade anti-epimastigota

Para a avaliação dos efeitos anti-epimastigota dos compostos triazólicos, as substâncias (**6a-6m**) foram armazenadas em DMSO (Sigma) na concentração de 5 mg/L. O meio isento da substância contendo concentração final comparável de DMSO (0,05%) foi utilizado como controle. A forma epimastigota (1×10^5 células/mL) foi incubada em meio de BHI-SBF na ausência ou na presença de diferentes concentrações das substâncias **6a-6m** (0,5 a 25 µg.mL⁻¹), em um volume final de 1 mL em placas de 24 poços. Após 7 dias de tratamento, o efeito tóxico das substâncias foram quantificadas por contagem direta de epimastigotas vivas na Câmara de Neubauer.

4.10.3. Citotoxicidade para macrófagos murinos

A avaliação dos efeitos tóxicos para os compostos foram realizados como descrito anteriormente no **item 4.10.2**. Os macrófagos peritoneais murinos foram incubados (1×10^6 células/poço) em 24 poços com 1mL de meio de RPMI contendo 10% SBF. As células foram deixadas por 24h a 37°C para que pudessem aderir às lâminas e depois foram expostas por 72h aos cinco compostos (**6c**, **6d**, **6e**, **6f** e **6m**) que apresentaram maior atividade contra a forma epimastigota (concentração final máxima de DMSO de 0,05%). Os cinco fármacos foram testados em concentrações crescentes (0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 µg.mL⁻¹). Logo após, as células foram lavadas com PBS e o RPMI foi adicionado à cultura antes da adição do corante vital azul de Trypan na concentração final de 0,01%. O efeito tóxico dos compostos foi monitorado pela contagem de 200 células em Câmara de Neubauer onde o possível comprometimento da permeabilidade da membrana celular foi avaliada.

4.10.4 Atividade anti-amastigota

Macrófagos peritoneais murinos de BALB/c não infectados foram cultivados em placas de 24 poços como descrito no **item 4.10.3**, infectados com a forma tripomastigota de cultura de células VERO obtidas como descrito no **item 4.10.1**, em uma proporção de 10 parasitos por macrófago e incubados por 60 minutos a 37°C/ 5% CO₂. Após a incubação, as células não infectadas foram removidas pela lavagem com PBS, e as culturas com macrófagos infectados foram tratados com concentrações crescentes (0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 µg/mL) de compostos (**6c**, **6d**, **6e**, **6f** e **6m**) que apresentaram atividade anti-epimastigotas, mas sem efeito tóxico em macrófagos peritoneais murinos. Após o tratamento, as monocamadas foram lavadas com PBS a 37°C, fixadas em metanol e coradas com Giemsa (Sigma). A sobrevivência da forma amastigota foi determinada pela contagem de 200 células em triplicata, onde a porcentagem das células infectadas foram analisadas, como também, o número de amastigotas por macrófago.

4.10.5. Análise estatística

Os valores de concentração inibitória 50% (CI₅₀) mostrados na **Tabela 37 (página 164)** representam a média dos experimentos realizados em triplicata. O valor da CI₅₀ de todos os compostos foram determinados por análise de regressão linear utilizando o programa IGOR Pro 2,03 (Lake Oswego, Oregon - EUA).

4.10.6. Comitê de Ética

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde / UFRJ (licença # DAHEICB 055) e foram realizados sob as diretrizes da SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório) e seguidas rigorosamente a Legislação brasileira para Procedimentos para o Uso Científico de Animais (11.794/2008).

4.11. Avaliação da estabilidade dos triazóis em diferentes faixas de pH

O estudo de estabilidade da piperina e do triazol mais ativo frente a forma epimastigota do *T. cruzi* foi feito utilizando a comparação dos tempos retenções dessas substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD).

4.11.1. Preparação dos tampões

4.11.1.1 Preparo da solução tampão de pH 2,1

Para o preparo de uma solução-tampão em pH 2,10 foram pesados 2,76 g de fosfato monobásico e solubilizado a 1000 mL de água. O pH da solução tampão foi ajustado com H_3PO_4 e verificado com pHmetro (ASSUMPCÃO & MORITA, 1968).

4.11.1.2 Preparo da solução tampão de pH 7,00

Para o preparo de uma solução-tampão em pH 7,00 foram adicionados 39,00 mL de solução de 0,2 M de fosfato monobásico de sódio (27,80 g em 1000 mL) em 61,00 mL de solução de 0,2 M de fosfato dibásico de sódio (53,65 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ em 1000 mL). O pH da solução tampão foi verificado com pHmetro (ASSUMPCÃO & MORITA, 1968).

4.11.1.3 Preparo da solução-tampão de pH 8,00

Para o preparo da solução-tampão em pH 8 foram adicionados 5,30 mL de solução de 0,2 M de fosfato monobásico de sódio (27,8 g em 1000 mL) em 94,70 mL de solução de 0,2 M de fosfato dibásico de sódio (53,65 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ em 1000 mL). O pH da solução tampão foi verificado com pHmetro (ASSUMPCÃO & MORITA, 1968).

4.11.2 Preparo das soluções de piperina 1 e do triazol 6f para estudo de estabilidade

Devido à baixa solubilidade em água, a piperina 1 e o triazol 6f foram solubilizados em acetonitrila para preparar soluções 1 mM de cada substância teste. Cada solução estoque foi diluída com os tampões apropriados em frascos de vidro de 4,0 mL e mantidos sob agitação constante por tempo que variou de 0 - 1:20 - 3:00 - 5:00 - 12:00 e 24:00 horas. A concentração final do co-solvente acetonitrila variou de 5-10% (v/v) dependendo da solubilidade de cada substância. Um total de três soluções foram preparadas para cada substância (três faixas de pH e uma temperatura). Os frascos foram tampados e colocados em uma placa de agitação e aquecimento e mantidos a 37°C. Alíquotas de 20 μ L foram retiradas de cada frasco e monitorizadas por CLAE-DAD.

4.11.3 Análise por CLAE-DAD

Para as análises de estabilidade das substâncias em diferentes pH foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com duas bombas (LC-20AT), detector de arranjo de diodos (SPD-M20A, Shimadzu), forno para coluna (CTO -20A, Shimadzu) e injetor manual do tipo Rheodyne 7125i com loop de 20 μ L. O controle do equipamento e

aquisição dos dados foi feito através do software LCSolution (Shimadzu). As análises foram realizadas em coluna analítica de fase reversa C-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm de partícula, Allure - Restek), mantida a 30 °C. A fase móvel foi constituída por uma mistura de acetonitrila (98%, solvente B) e água (2%, solvente A). A separação foi feita no modo isocrático com fluxo constante de 1,2 mL.min⁻¹, e o volume de amostra injetada foi de 20 µL. O monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 200 e 500 nm, sendo o comprimento de onda selecionado a 340 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Planejamento das moléculas triazólicas

No planejamento de novos fármacos com aplicação como agentes quimioterápicos para doenças infecciosas é necessário conhecer os possíveis alvos bioquímicos como também as diferenças entre as células do parasito e do hospedeiro. Este conhecimento é fundamental, pois permite o planejamento de novas moléculas que ajam seletivamente sobre o parasito (BLOCK, 2010). Nas últimas décadas, a pesquisa para a síntese de novas moléculas para o tratamento da doença de Chagas vem sendo beneficiada pela descoberta de novos alvos no *T. cruzi* como o sequenciamento dos genomas, que contribuiu para identificação de diversos genes onde muitos deles estão presentes apenas nas células do parasita e não no homem. Desta forma, a identificação de vários alvos biológicos promissores neste parasito, sendo a maioria enzimas, foram favorecidos através da descoberta do sequenciamento dos genomas no *T. cruzi*.

Dentre os alvos macromoleculares mais explorados estão as proteases (cisteíno proteases, serino proteases, metaloproteínas e treonino proteases) que são de fundamental importância para o ciclo de vida no *T. cruzi*, pois possuem múltiplas funções que abrangem desde a invasão celular até o escape do parasito do sistema imune do hospedeiro (DIAS *et al.*, 2009). Um alvo bioquímico que tem sido amplamente estudado na quimioterapia da doença de Chagas é a cruzaina ou cruzipaina (EC 3.4.22), que constitui a mais abundante proteína da família das cisteíno-proteases que vem impulsionando a descoberta de vários inibidores potentes e seletivos contra o *T. cruzi*. Dentre as classes de inibidores desta enzima estão os derivados não peptídicos como os triazóis, pirimidinas, tiossemicarbazonas e chalconas, como demonstrado na **Figura 25** abaixo (DIAS *et al.*, 2009).

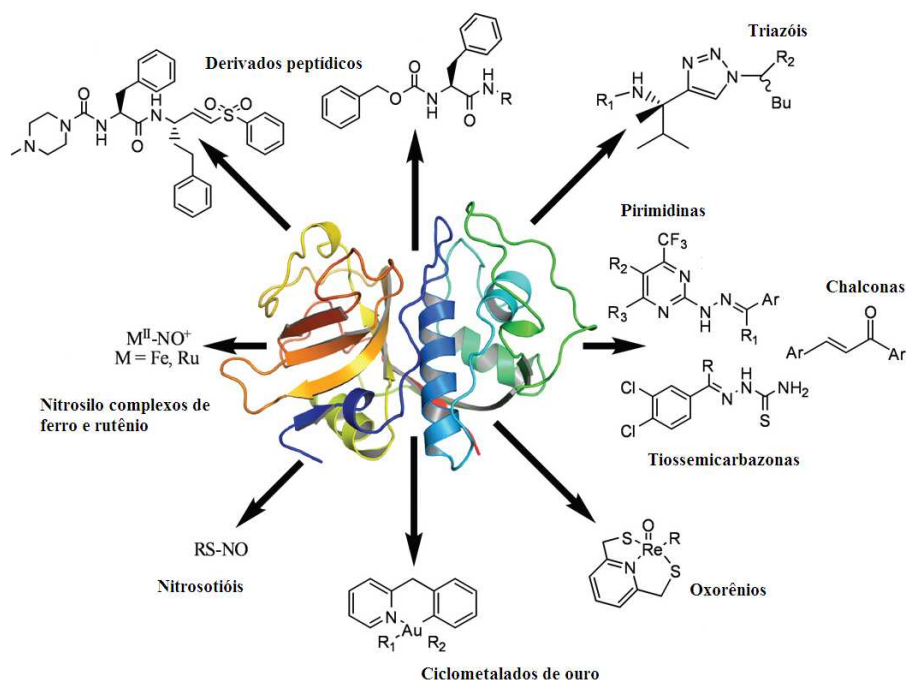


Figura 25. Estrutura cristalográfica da cruzaina do *T. cruzi* (PDB ID 1ME4) com inibidores de diferentes classes químicas (DIAS *et al.*, 2009).

Outro alvo bastante explorado e que vem implicando no desenvolvimento de novos fármacos é a biossíntese de esteróis. Esta via bioquímica possui grande importância visto que os inibidores da biossíntese de esteróis foram os únicos que conseguiram chegar a triagens clínicas avançadas como candidatos a fármacos anti-chagásicos, após os fármacos benzonidazol e nifurtimox (**Figura 26, página 136**). Os esteróis fazem parte das membranas celulares e desenvolvem um papel de grande importância, podendo ser produzidos tanto por plantas como por animais (LEPESHEVA *et al.*, 2011). No *T. cruzi*, os esteróis endógenos indicam possuir função direta na viabilidade celular e na regulação da atividade de enzimas de membrana (URBINA, 1997). O conhecimento sobre a síntese de esteróis em fungos possibilitou a interferência nesta via contribuindo no desenvolvimento de vários fármacos para o tratamento de micoses superficiais e sistêmicas. As células do *T. cruzi*, assim como fungos, são dependentes do ergosterol ao contrário das células dos hospedeiros vertebrados que dependem do colesterol. Assim, as etapas da biossíntese de esteróis neste parasito, que são divergentes em relação à síntese realizada por células de mamíferos, têm sido amplamente estudadas como alvo quimioterápico (<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>).

Dentre os esteróis, o principal responsável pelo crescimento do *Trypanosoma cruzi* é o ergosterol, que constitui-se como um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos. O ergosterol é o componente majoritário na membrana celular de fungos e de alguns tripanossomatídeos, como o *T. cruzi* e *Leishmania sp.*, possuindo função essencial na regulação da fluidez e integridade da membrana. Recentemente, as enzimas mais pesquisadas desta cascata metabólica são a esterol 14 α -desmetilase (EC 1.14.13.70), esqualeno epoxidase (EC 1.14.99.7), esqualeno sintase (EC 2.5.1.21), lanosterol sintase (EC 5.4.99.7), D-24(25) esterol metiltransferase (EC 2.1.1.43), farnesilpirofosfato sintase (EC 2.5.1.10) e a farnesiltransferase (EC 2.5.1.58) (DIAS *et al.*, 2009).

Dentre os compostos que mais se destacam como inibidores da biossíntese do ergosterol são os derivados azólicos. Os compostos da classe dos azóis são conhecidos por inibirem a enzima 14 α -desmetilase, também conhecida como CYP51, impedindo a desmetilação do carbono 14 do anel esteróide do lanosterol, como pode ser observado pela **Figura 26**. Esta enzima é um membro da família do citocromo P450, grupo de proteínas que possui a presença de um grupamento heme com espectro característico com absorvância máxima em 450 nm na forma reduzida e ligada a CO (monóxido de carbono) (DANIELSON, 2002). Estas proteínas geralmente catalisam reações de óxido-redução, com o átomo de ferro do grupamento heme estando diretamente relacionando nos casos de transferência de elétrons.

A CYP51 é encontrada em todos os reinos biológicos e é uma enzima essencial na biossíntese de esteróis e, tendo portanto grande importância na composição da estrutura da membrana. Esta enzima, na biossíntese do ergosterol, é responsável pela 14 α -desmetilação do lanosterol levando a zimosterol (**Figura 26**). O bloqueio desta etapa biossintética pelo anel heterocíclico dos azóis, ocorre pela interação direta com o átomo de ferro do citocromo P450, com o ligante lipofílico *N*-substituído do azol, ocupando o sítio ativo do substrato da enzima (lanosterol, no caso do *T. cruzi*), impedindo, assim, a ligação e a ativação de oxigênio molecular e a acomodação do substrato natural (LEPESHEVA *et al.*, 2007). O resultado desta inibição gera um acúmulo de lipídios pré-ergosterol na membrana parasitária comprometendo a integridade celular do parasito. No substrato livre, a cavidade do sítio ativo de esteróis 14 α -desmetilase contém molécula de água que é coordenada ao ferro heme. Evidentemente, esta molécula de água é fortemente ligada ao ferro e apenas deslocada parcialmente pelo substrato, mantendo-se nas proximidades do ferro e participando na liberação de próton catalítico. Compostos heterocíclicos, tais como triazol, imidazol, piridina e derivados de pirimidina, os

quais contêm um átomo básico, servem como ligantes mais fortes para o ferro heme. Estas substâncias facilmente coordenam o grupo heme substituindo a água da esfera de coordenação do ferro e afetando a ligação do substrato e, conseqüentemente, o seu metabolismo (LEPESHEVA & WATERMAN, 2011). O primeiro imidazol testado sobre o *T. cruzi* foi o cetoconazol induzindo um acúmulo de 14 α -metil esteróis em epimastigotas (<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>).

O tamanho e a configuração da região *N*-substituída das substâncias azólicas estão relacionados diretamente com o potencial de inibição destes compostos na CYP51 já que ocorre outras interações com a parte protéica desta enzima. Desta forma, compostos que são mais volumosos possuem poder de inibição maior na CYP51 de fungos, como o caso do cetoconazol, mas em humanos apresentam alta toxicidade devido a menor seletividade inibindo outros citocromos P450 além da CYP51 (LEPESHEVA *et al.*, 2007).

Apesar de estar presente em diferentes organismos vivos (plantas, fungos e animais), a 14 α -desmetilase (CYP51) apresenta baixa homologia entre organismos dos diferentes Reinos Biológicos. Por exemplo, a identidade da CYP51 varia de 22 a 24% entre fungos e humanos (LEPESHEVA *et al.*, 2007). Como há diferenças estruturais entre as CYP51 de fungos, mamíferos e protozoários, podemos visualizar a preparação de inibidores seletivos. No caso dos azóis anti-fúngicos, o CI₅₀ em células humanas é no mínimo 30 vezes maior, garantindo assim o uso seguro em humanos como antifúngico ou anti-*T. cruzi* (LAMB *et al.*, 1999; revisto por BUCKNER, 2008).

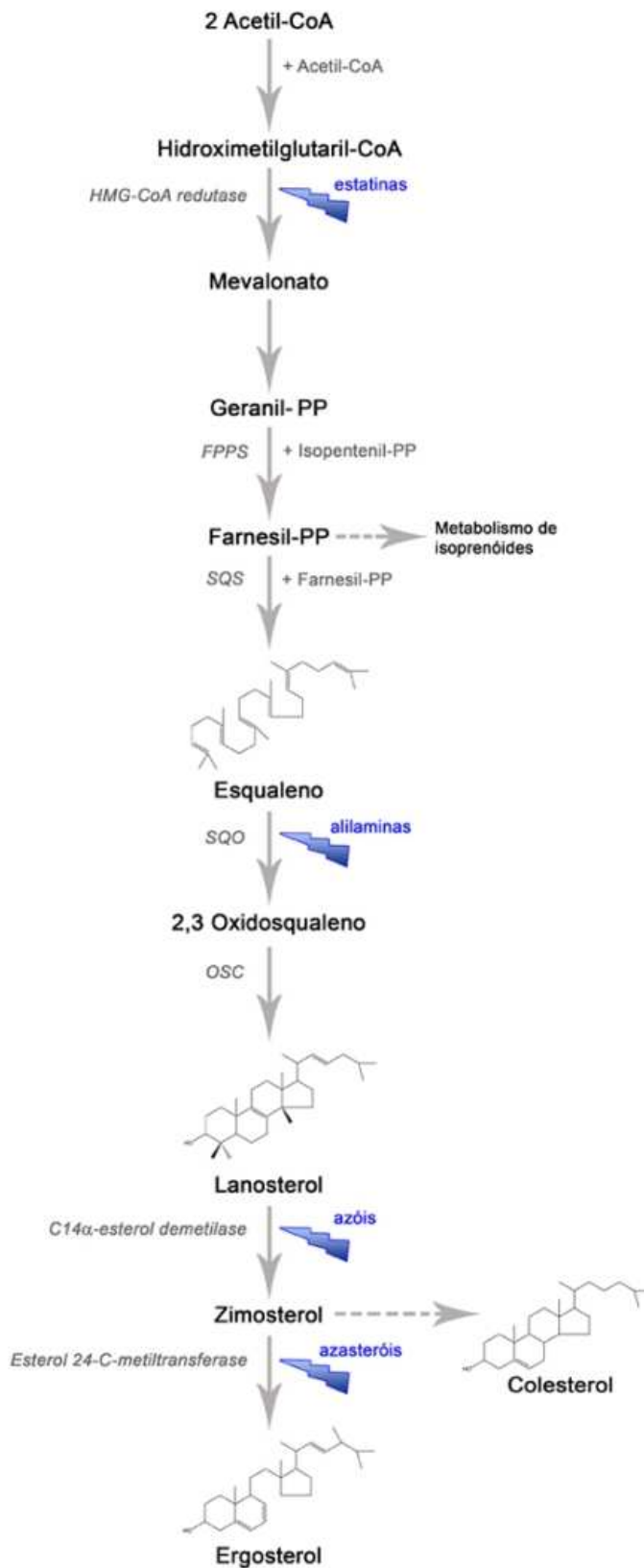


Figura 26. Representação esquemática da via da biossíntese de esteróis no *T. cruzi* e ação de azóis e outros inibidores representados pelas setas azuis (<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>).

Dentre os inibidores mais representativos da síntese de ergosterol estão os derivados azólicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol, que apresentam propriedades antifúngicas conhecidas (**Figura 22, página 21**), além do inibidor da farnesiltransferase, tipifarnib (**Figura 27**).

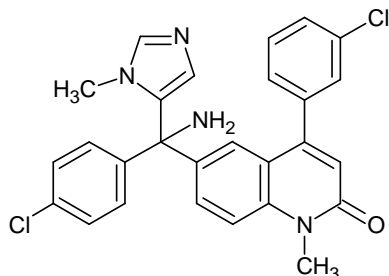


Figura 27. Inibidor azólico da farnesiltransferase, tipifarnib.

Outro exemplo da aplicação desta classe antifúngica como fármaco tripanocida inibidores da síntese de ergosterol, podemos citar o composto triazólico posaconazol (**Figura 22, página 21**), que encontra-se na fase II dos ensaios clínicos para o tratamento da doença de Chagas. Outro exemplo de composto antifúngico com a porção triazol é o protioconazol (**Figura 21, página 20**), do tipo 1,2,4-triazol-3-tiona, inibidor da 14 α -desmetilase, disponível comercialmente para o tratamento de infecções causadas por fitopatógenos (PARKER *et al.*, 2011). Abaixo encontra-se a estrutura cristalográfica da CYP51 do *Trypanosoma cruzi* com o fluconazol ligado ao sítio catalítico (**Figura 28**).

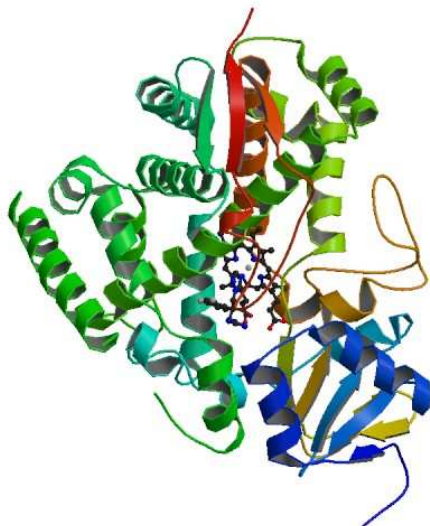


Figura 28. Estrutura cristalográfica da CYP51 do *Trypanosoma cruzi* com o fluconazol ligado ao sítio catalítico da enzima

(<http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000651>).

Outros alvos promissores na quimioterapia de Chagas, também identificados pelo sequenciamento do genoma no parasito, são a via glicolítica, o metabolismo dependente de grupos tióis, a transferência de ácido siálico e as DNA topoisomerases (LEPESHEVA *et al.*, 2011).

Tendo como alvo o esteroide 14 α -desmetilase (CYP51), planejamos a hibridação molecular da piperina e o núcleo triazólico, fornecendo uma série de novos compostos onde substituintes no anel triazólico foram adicionados de modo a permitir a investigação da REA (Relação Estrutura Atividade) nesta família de compostos, através da mudança em seus perfis eletrônicos e lipofílicos. Outra estratégia de modificação molecular empregada no planejamento dos novos derivados heterocíclicos nitrogenados foi o bioisosterismo, como demonstrado na **Figura 29**. Encontramos na literatura diferentes exemplos de substituição bioisotérica de amidas por anéis heterocíclicos nitrogenados contendo cinco membros como os triazóis, tiadiazóis e oxadiazóis (MEANWELL, 2011).

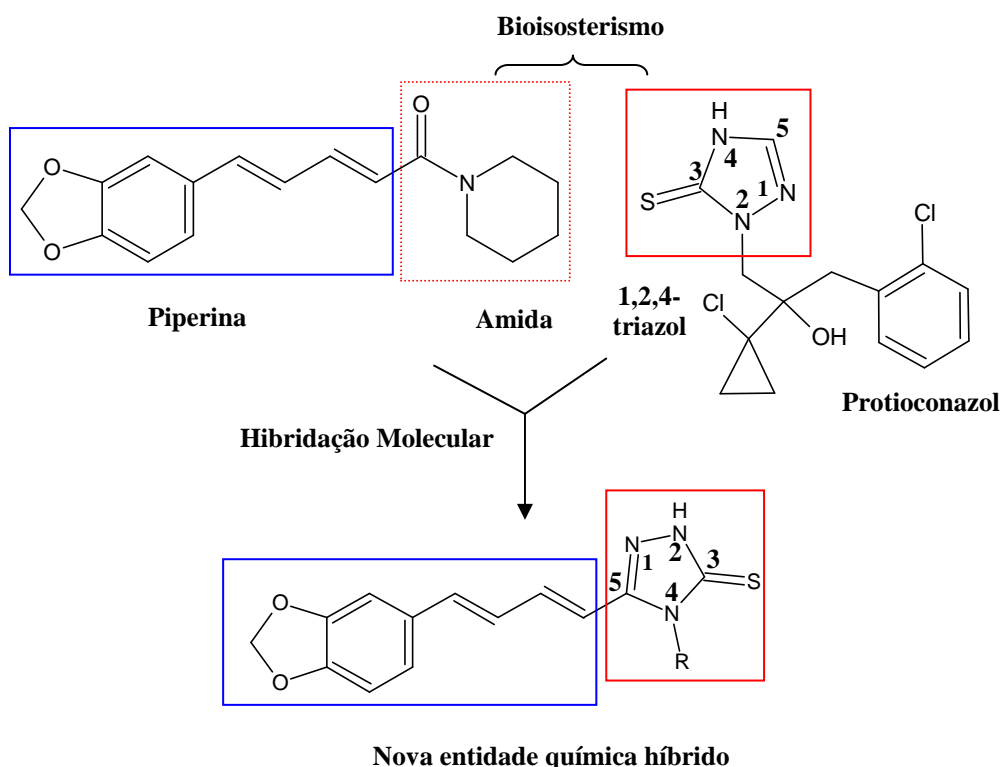


Figura 29. Estratégia no planejamento de novos híbridos piperina-triazol.

A inserção do anel triazólico em diversos compostos vem confirmando o potencial bioisostérico desta porção para a melhoria da atividade destas substâncias. Existem motivos importantes que sugerem que o grupo triazol apresente semelhança estrutural com a ligação amídica, mimetizando a ligação da amida Z ou E, dependendo do padrão de substituição em ambas (TRON *et al.*, 2007). Fazendo uma analogia do 1,2,3-triazol descrito por Tron e colaboradores sobre o 1,2,4-triazol, a porção triazólica 3,5-disubstituída possui similaridade com a porção amídica: o par de elétrons do nitrogênio 1 mimetiza do oxigênio carbonílico da ligação amídica, o carbono 5 com hibridação sp^2 ligado ao heteroátomo é eletronicamente semelhante ao carbono carbonílico, como pode ser visto pela **Figura 30**. Uma vez que o momento dipolar do sistema global do triazol é maior do que a da ligação amídica, o doador de ligação de hidrogênio e as propriedades receptoras são mais fortes no sistema triazólico. Além disso, a ligação entre os substituintes é idêntica em termos de átomos envolvidos e a relação entre o sítio aceptor de hidrogênio é também similar. Ainda, existem algumas diferenças na polarização do átomo, como o carbono carbonílico e o átomo de nitrogênio

polarizado negativamente no sistema triazólico. A avaliação do triazol nos compostos como um substituto da ligação amídica em estruturas peptidomiméticas tem sido sugeridas experimentalmente (TRON *et al.*, 2007).

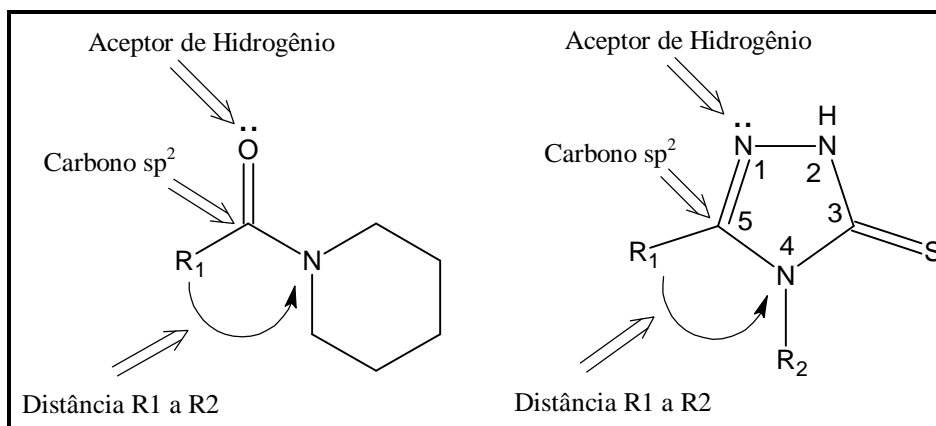
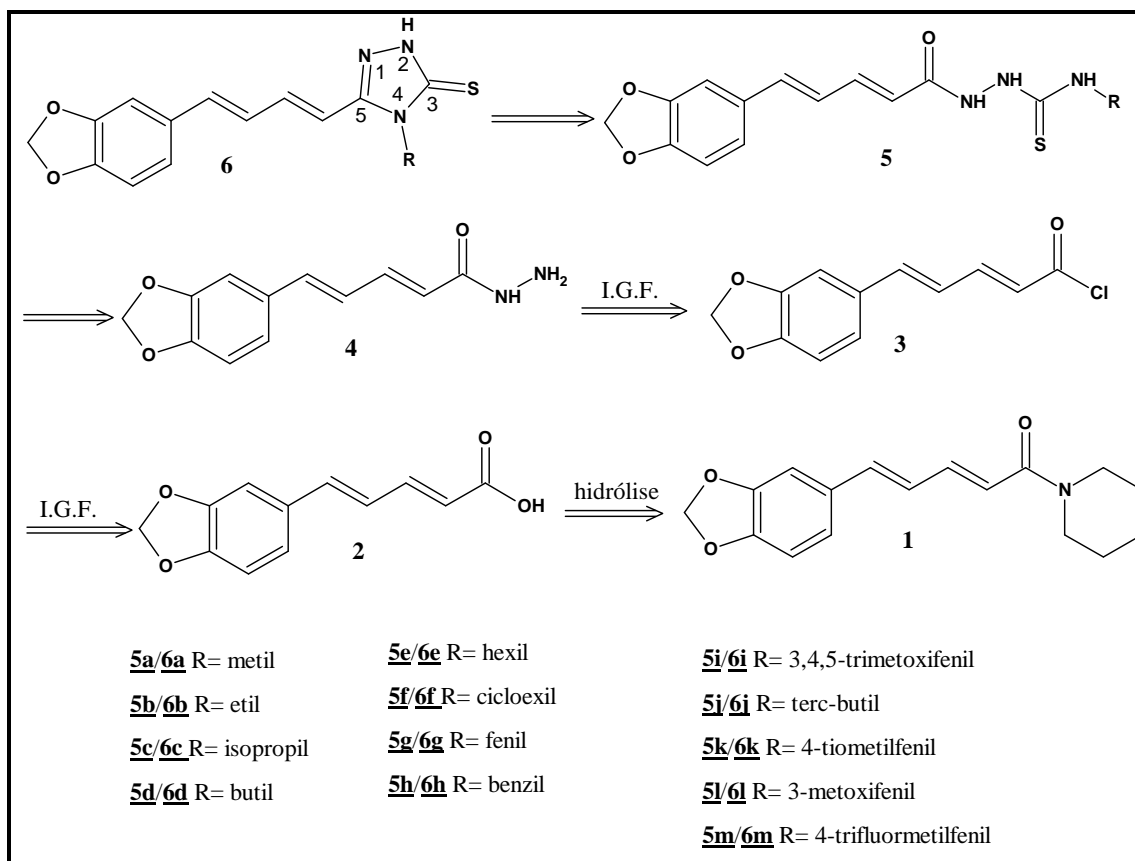


Figura 30. Hipótese de como os triazóis age como bioisómeros não-clássicos de amida.

A substituição entre a porção 1,2,3-triazol pelo seu bioisómero 1,2,4-triazol tem recebido atenção especial na química medicinal visto que representou um conceito eficiente para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos triazólicos, já que a porção triazólica apresenta atividades potentes ou aumenta as atividades biológicas (WANG *et al.*, 2010).

Para a formação dos novos derivados triazólicos, que foi fundamentada nas estratégias de hibridação molecular e do bioisosterismo (LIMA & BARREIRO, 2005), o produto natural de partida para a síntese dos novos heterocíclicos nitrogenados foi a piperina já que sua atividade antiparasitária está comprovada sobre as formas evolutivas do *T. cruzi*. Para a formação dos produtos triazólicos, como está descrito na análise retrossintética (**Esquema 34**), é necessária a passagem por um intermediário carbotioamida que sofre ciclização base-catalisada. Esta pode ser obtida a partir da reação da hidrazida com isotiocianatos diferentemente substituídos. Por sua vez, a hidrazida pode ser preparada por interconversão de grupos funcionais (IGF), através da reação de substituição nucleofílica acíclica (S_NAC) de um derivado onde a carbonila encontra-se ativada, como por exemplo num cloreto de acila. A escolha deste intermediário se deve à facilidade de sua preparação, uma vez que o mesmo pode ser sintetizado através da reação do ácido piperínico com diferentes reagentes normalmente disponíveis no laboratório de síntese orgânica (p.ex.: cloreto de oxalila ou cloreto de tionila). Outro ponto relevante em relação à obtenção do intermediário cloreto de ácido através destas metodologias é que as reações são limpas, já que a conversão é total e os subprodutos formados são gasosos (MARCH, 1985). Por sua vez, o ácido piperínico pode ser obtido pela hidrólise básica do produto natural **1**.



Esquema 34. Análise retróssintética para a preparação dos derivados triazólicos **6a-6m**.

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

A parte inicial deste trabalho consistiu no isolamento de produto natural (IKAN,1991), tendo em vista a necessidade de quantidades adequadas de piperina (**Figura 31**) para a síntese dos triazóis planejados, como pode ser visto na análise retrossintética mostrada no **Esquema 34**.

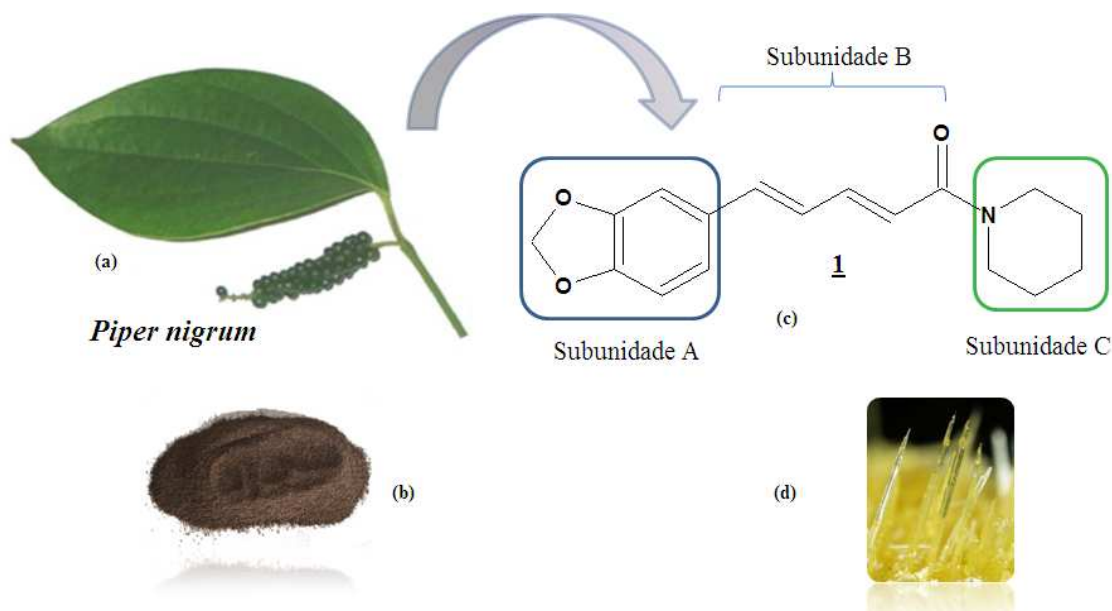


Figura 31. Frutos frescos (a) e moídos (b) de *P. nigrum*. Estrutura (c) e cristais (d) da amida natural piperina (**1**).

Na literatura podemos encontrar vários métodos para o isolamento da piperina, como o uso de CHCl_3 em condições de maceração (EPSTEIN *et al.*, 1993), o uso de HPCPC (*High Performance Centrifugal Partition Chromatography*) (CHEN *et al.*, 2009), o uso de solução aquosa de surfactante (PADALKAR & GAIKAR, 2008), o uso de ácido acético glacial, seguido de partição com clorofórmio (KANAKI *et al.*, 2008) e em condições supercríticas (KUMORO *et al.*, 2009). Além desses métodos, encontra-se descrita na literatura uma proposta alternativa relacionada à produção da amida natural em cultura líquida, induzida por fungos endofíticos (*Periconia sp.*), isolados de *Piper Longum* (VERMA *et al.*, 2011). Este procedimento é bastante promissor para a obtenção da piperina e outras substâncias bioativas em larga escala, principalmente pela possibilidade de conservar a estrutura física e a biodiversidade de plantas fitoterápicas.

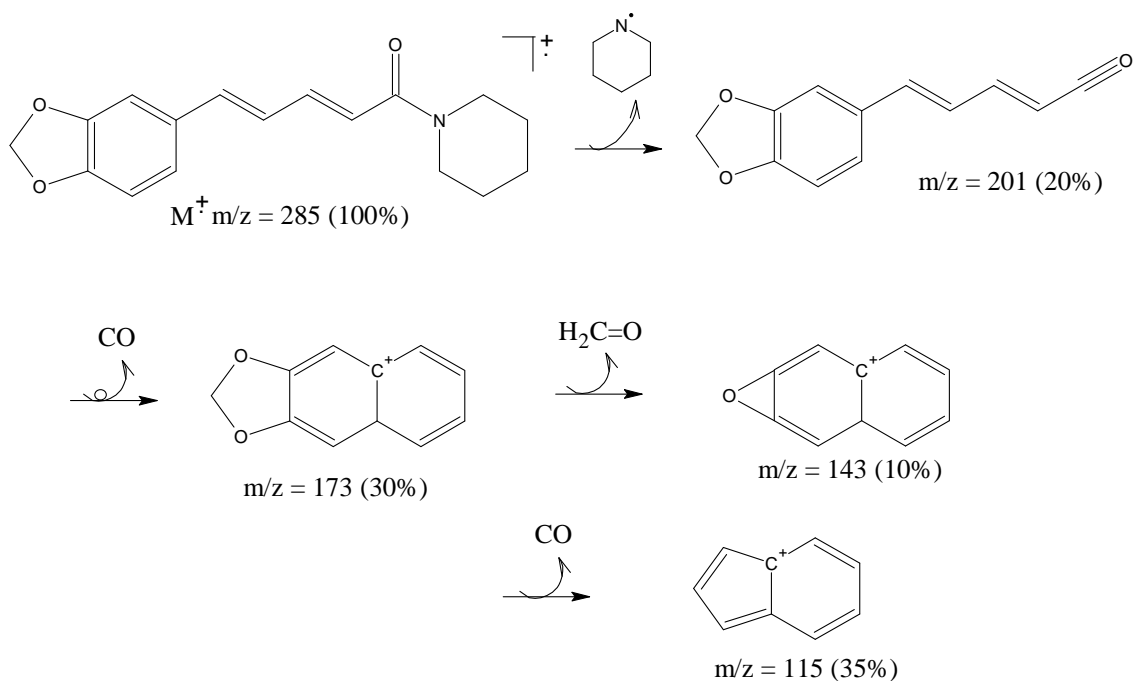
Em meio às várias metodologias encontradas, foi escolhida aquela que utiliza o extrator Soxhlet, pela facilidade de acesso ao equipamento, pela eficiência do método de extração, aliados à baixa toxicidade dos solventes utilizados durante o procedimento (etanol e água). O extrator Soxhlet é um dos equipamentos mais usados de extração contínua no isolamento de produtos naturais e seu funcionamento consiste na utilização de um solvente apropriado que é reciclado por destilação (IKAN, 1991). Subramaniam e colaboradores utilizaram um extrator Soxhlet modificado, do tipo DBSA (Double Bypasses Soxhlet Apparatus) para a extração contínua da piperina, e com isso obtiveram um aumento no

número de ciclos de refluxo com conseqüente diminuição no tempo de extração (SUBRAMANIAM *et al.*, 2011).

A metodologia aplicada neste trabalho para a extração do produto natural foi aquela originalmente descrita por Ikan e posteriormente adaptada em nosso laboratório por Santos (SANTOS, 1999), onde foi utilizada uma aparelhagem de Soxhlet, tendo etanol como solvente. Após a extração e tratamentos adequados, que envolveram a precipitação dos taninos (principais contaminantes do extrato) por tratamento com solução etanólica básica, a piperina foi obtida na forma de cristais amarelos. O produto, normalmente com grau de pureza adequado, foi confirmado através de comparação de seu ponto de fusão com o descrito na literatura e através dos métodos convencionais de análise (RMN, CG-EM e IV). Os dados obtidos foram totalmente compatíveis com a estrutura da amida natural (DE ARAÚJO JÚNIOR *et al.*, 1997).

Para a piperina isolada, foi determinado um ponto de fusão idêntico ao descrito na literatura [Pf: 126-127°C (IKAN, 1991)]. Através do espectro de infravermelho (**Espectro 1, página 29**) pode ser confirmada a presença da função carbonila amídica conjugada, por uma intensa absorção em 1633 cm⁻¹. As absorções na região entre 2941-2850 cm⁻¹ no espectro de IV são referentes às deformações axiais das ligações C-H e em 1252 cm⁻¹, referente ao estiramento do metileno do grupo metilendioxí. No espectro de massas (**Espectro 2, página 30**) encontram-se fragmentos como o íon molecular e pico base $m/z = 285$ (M⁺, 100%), além dos $m/z = 201$ (20%), 173 (10%), 143 (10%) e 115 (35%); compatíveis com descritos anteriormente na literatura (FERREIRA, 2006).

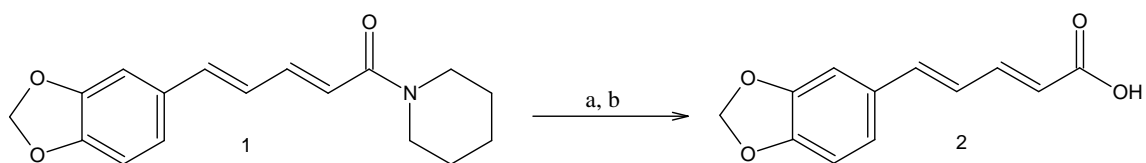
No espectro de RMN ¹H (**Espectro 3, página 30**), notou-se um simpleto largo em δ 5,98 ppm, indicando os 2 hidrogênios metilênicos do anel, além de um grupo de sinais entre δ 6,44 e δ 7,45 ppm com integração para 7 hidrogênios, referentes aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral e os 3 hidrogênios aromáticos. No espectro de RMN ¹³C (**Espectro 4, página 31**) observou-se um sinal em δ 165,4 ppm, indicando à absorção do carbono da carbonila amídica. O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular e pico base ($m/z = 285$ u.m.a., 100% de abundância relativa), fragmentos característicos para estrutura da amida natural. O **Esquema 35**, a seguir, descrevemos uma proposta de fragmentação para a piperina **1**.



Esquema 35. Proposta de fragmentação para a piperina **1**.

5.3. Preparação do ácido piperínico

Para a preparação dos derivados heterocíclicos nitrogenados pretendidos no planejamento estrutural realizado (**Esquema 34, página 140**) faz-se necessária a hidrólise da função amida presente na amida natural, originando o ácido piperínico **2**. Esta reação encontra-se experimentalmente descrita no trabalho de Ikan (IKAN, 1991). No entanto, a reação não se realizou conforme descrito por Ikan, sendo necessárias alterações no tempo de reação para 12 horas ao invés de 2 horas de refluxo. Além disso, também foi preciso aumentar a quantidade de base utilizada (RIBEIRO, 2004) para a formação do ácido piperínico **2**. Após acidificação do meio e recristalizado o produto, o ácido piperínico foi obtido em alto rendimento e grau de pureza adequado (RIBEIRO, 2004). Amidas são sabidamente pouco reativas frente às condições de hidrólise básica, devido ao reduzido caráter eletrofílico do carbono carbonílico nestes derivados. Este comportamento se deve à disponibilidade do par de elétrons do nitrogênio, ligado diretamente à carbonila, em doar elétrons por ressonância, suprindo assim a deficiência do carbono e, conseqüentemente, diminuindo a reatividade da carbonila frente a nucleófilos (MARCH, 1985). A literatura descreve reações de hidrólise de amidas em meio ácido, contudo estas metodologias não poderiam ser aplicadas à hidrólise da piperina, uma vez que a molécula possui funcionalidades sensíveis ao meio ácido, como o anel metilenodioxílico que em meio aquoso ácido pode sofrer abertura, gerando o catecol correspondente (COSTA, 2000). Além disso, temos na estrutura da piperina um dieno conjugado, que pode ser protonado, gerando outros produtos de decomposição. Este comportamento instável em meio ácido aquoso já foi observado em outras tentativas de hidrólise, realizadas anteriormente em nosso grupo, e assim optamos por manter as condições de hidrólise em meio alcoólico básico (**Esquema 36**).



Condições reacionais: (a) KOH, etanol, refluxo, 12 h ; (b) HCl 10%, pH = 3, 95%.

Esquema 36. Hidrólise básica da piperina. Obtenção do ácido piperínico (**2**).

Visando diminuir o tempo da reação de hidrólise básica da amida natural, uma vez que sob aquecimento convencional são necessárias 12 h de refluxo, a reação foi realizada com a utilização do reator de micro-ondas. Dispomos em nosso laboratório de um reator de micro-ondas (CEM, Inc.; Modelo Discover) (**FIGURA 32**).



Figura 32. Reator de micro-ondas utilizado para síntese orgânica em laboratório.

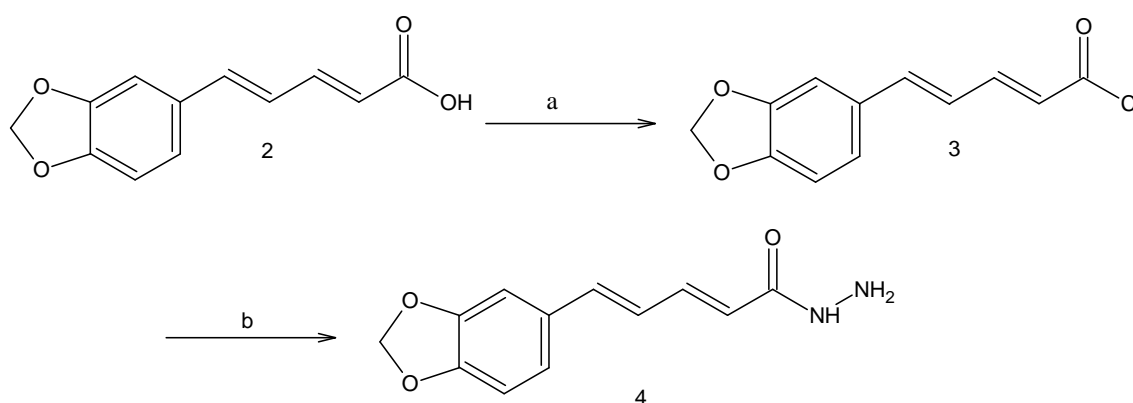
A irradiação de micro-ondas em síntese orgânica tem se mostrado extremamente útil, entre outras coisas, por fornecer os produtos desejados, normalmente, em maiores rendimentos; por propiciar o uso de menores quantidades de solventes, ou mesmo por permitir a execução de reações na ausência destes; além disso, com a irradiação de micro-ondas as transformações químicas ocorrem em tempos reacionais menores (KAPPE *et al.*, 2009). Isso pode ser explicado pelo fato de que as reações realizadas utilizando o micro-ondas diferem das reações que são termicamente aquecidas. O efeito do micro-ondas pode estar relacionado ao aumento nas vibrações moleculares na interface de reação. Alguns autores justificam que essa aceleração no término da reação esta relacionada com a energia de ativação que é alterada pela irradiação de micro-ondas, e que consequentemente contribui para diminuição

no tempo de reação. Experimentos em síntese orgânica utilizando o reator de micro-ondas podem, portanto, gerar resultados diferentes, quando comparados com as reações conduzidas sob aquecimento convencional, mesmo que a temperatura final seja a mesma (LINDSTROM *et al.*, 2001).

Foram realizados diferentes experimentos de irradiação por micro-ondas em sistema aberto, nos quais variou-se o tempo, a temperatura e a potência aplicada, objetivando-se chegar às condições reacionais ótimas. Uma vez estabelecida a melhor condição reacional, a amida natural foi mantida nas mesmas condições da hidrólise conduzida sob aquecimento convencional (quantidade de base e solvente), fornecendo o sal do ácido piperínico **2**, após 60 minutos de irradiação. Após o término da reação, a metodologia de isolamento seguiu como o utilizado no método de hidrólise convencional (**parte experimental, página 32**), fornecendo o ácido **2** em 82% de rendimento, comparável ao obtido através do método de aquecimento convencional.

O produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise (IV, CG-EM, ¹H RMN e ¹³C RMN). Os resultados foram compatíveis com os anteriormente descritos na literatura e em outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa (IKAN, 1991; FERREIRA, 2006, DE PAULA *et al.*, 2000).

5.4. Síntese da hidrazida



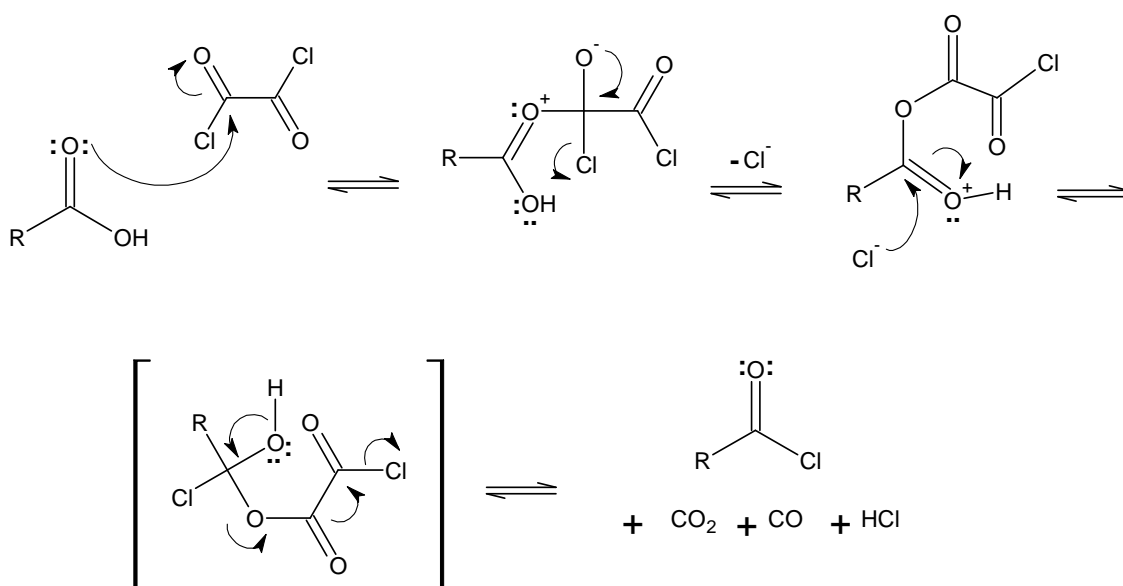
Condições reacionais: (a) (COCl)₂, 30 min; (b) NH₂.NH₂.H₂O, CH₂Cl₂ seco, t.a., 10 min., 70%.

Esquema 37. Síntese do cloreto de acila (**3**) e da hidrazida (**4**).

Como pode ser visto na análise retrossintética mostrada no **Esquema 34** (página 140), a próxima etapa da sequência sintética preconizada envolve a preparação da hidrazida **4**, derivada da piperina. Normalmente, vemos na literatura a preparação de hidrazidas através da reação de hidrazinólise dos respectivos ésteres metílicos ou etílicos em temperatura de refluxo (SILVA *et al.*, 2010 & LACERDA *et al.*, 2012). Contudo, como a hidrazinólise da amida não é viável e dispúnhamos do ácido **2**, e de quantidades adequadas de reagentes no almoxarifado, optamos por preparar o respectivo cloreto de ácido e reagí-lo diretamente com hidrazina monoidratada. Uma justificativa para a escolha da passagem pelo cloreto de ácido na preparação da hidrazida **4** está no fato de que a preparação do éster correspondente incluiria, de toda maneira, uma etapa a mais na sequência sintética. Além disso, a reação mais comum de transformação de um ácido num éster é a reação de Fischer, que ocorre normalmente em

presença de catálise ácida sob refluxo, o que poderia gerar produtos de degradação do substrato, visto que o anel metilenodioxílico é sensível a este tipo de condição reacional (COSTA, 2000). Outras metodologias de ativação da carboxila do ácido, como o uso de DCC (dicicloexilcarbodiimida) também envolvem o uso de meio anidro e possuem o inconveniente da formação de subprodutos, que são muitas vezes de difícil separação, contaminando o produto final. Desta forma, optamos pela preparação do cloreto de ácido (**3**) que é um intermediário mais reativo frente à reação de Substituição Nucleofílica Acílica (S_NAc) (**Esquema 37**). Os reagentes de escolha para a síntese de cloretos de ácido são geralmente os cloretos de tionila ($SOCl_2$) e oxalila $(COCl)_2$, por oferecerem a vantagem de formar subprodutos gasosos (SO_2 , CO , CO_2) que não contaminam o produto (MARCH, 1985). Dependendo do reagente utilizado, $SOCl_2$ ou $(COCl)_2$, as condições reacionais para a obtenção dos cloretos de ácido são distintas. Por exemplo, o refluxo faz-se necessário para utilização do cloreto de tionila, já para o cloreto de oxalila a reação pode ser realizada à temperatura ambiente (MARCH, 1985). Por haver disponibilidade do cloreto de oxalila em nosso laboratório, e também por este ser mais reativo que o cloreto de tionila, ele foi utilizado na preparação do cloreto de ácido desejado.

No **Esquema 38** apresentamos a proposta de March para o mecanismo de formação de cloretos de acila em presença de $(COCl)_2$ (MARCH, 1985).



Esquema 38. Proposta mecanística para a formação de cloretos de acila em presença de cloreto de oxalila (Adaptado de MARCH, 1985).

Uma vez obtido o cloreto de ácido, devido à sua alta reatividade, o mesmo não foi quantificado ou purificado, sendo utilizado imediatamente na etapa de S_NAc subsequente. Os cloretos de acila possuem elevada reatividade, portanto o produto de reação do cloreto de oxalila com o ácido piperínico foi imediatamente utilizado na reação com mono-hidrato de hidrazina. Através da reação de substituição nucleofílica acílica (S_NAc) foi gerada a hidrazida **4** com 70% de rendimento (**Esquema 37**).

Inicialmente, ao executarmos a reação para a obtenção da hidrazida como descrito na literatura (RIBEIRO *et al.*, 2004), ou seja: pela adição da hidrazina monoidratada sobre a

solução do cloreto de ácido, a hidrazida **4** foi obtida juntamente com uma mistura de produtos de difícil separação. Devido a este fato, o procedimento experimental foi alterado, fazendo-se então a adição inversa da solução do cloreto de acila à solução de hidrazina (ambos em diclorometano seco). Esta mudança foi suficiente para evitar o aparecimento dos subprodutos visualizados anteriormente, os quais, apesar de não estarem inequivocamente caracterizados, imaginamos que possivelmente sejam a diacilidrazina **50** e o oxadiazol correspondente **51** (FIGURA 33). Dados de RMN ^{13}C da mistura, principalmente aqueles referentes aos carbonos C=O e C=N, dão subsídio a esta proposta. Além disso, a literatura descreve a formação destes produtos em condições reacionais similares (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

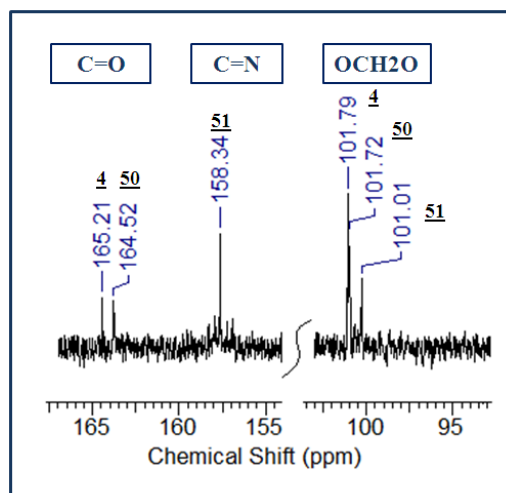
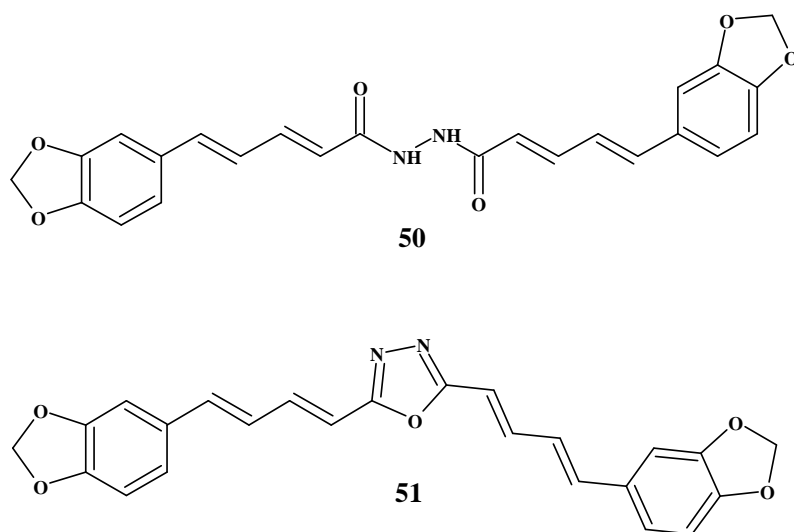
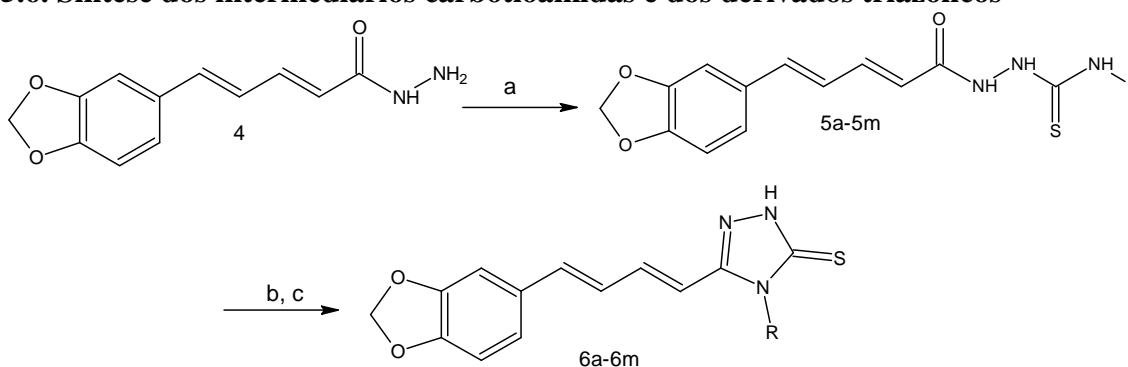


Figura 33. Estrutura e espectro de RMN ^{13}C dos subprodutos prováveis gerados na reação de obtenção da hidrazida **4**.

Uma vez obtida a hidrazida **4**, esta foi devidamente caracterizada através dos métodos convencionais de análise. Através do espectro de infravermelho (**Espectro 5, página 34**) pode ser confirmada a presença da função carbonila de hidrazida conjugada por uma intensa

absorção em 1679 cm^{-1} . As absorções na região em 3280 cm^{-1} é referente ao estiramento de hidrazida nas ligações N-H e em 1257 cm^{-1} , referente ao estiramento de éter. No espectro de RMN ^1H (**Espectro 4, página 34**) observou-se um simpleto em δ 6,06 ppm, referente aos dois hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, um dubleto δ 6,03 ppm referente ao hidrogênio α da cadeia olefínica com J de 15,10 HZ, além de um grupo de sinais entre δ 6,86 e δ 7,27 ppm, referentes aos hidrogênios aromáticos e olefínicos da cadeia lateral. Observou-se um simpleto em δ 4,45 ppm referente aos dois hidrogênios do grupamento NH_2 e um simpleto em δ 9,30 ppm referente ao grupamento NH. No espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 7, página 35**) notou-se um sinal em δ 165,23 ppm, referente à absorção do carbono da carbonila da hidrazida e em δ 101,75 ppm referente ao carbono do anel metilenodioxílico.

5.6. Síntese dos intermediários carbotoioamidas e dos derivados triazólicos

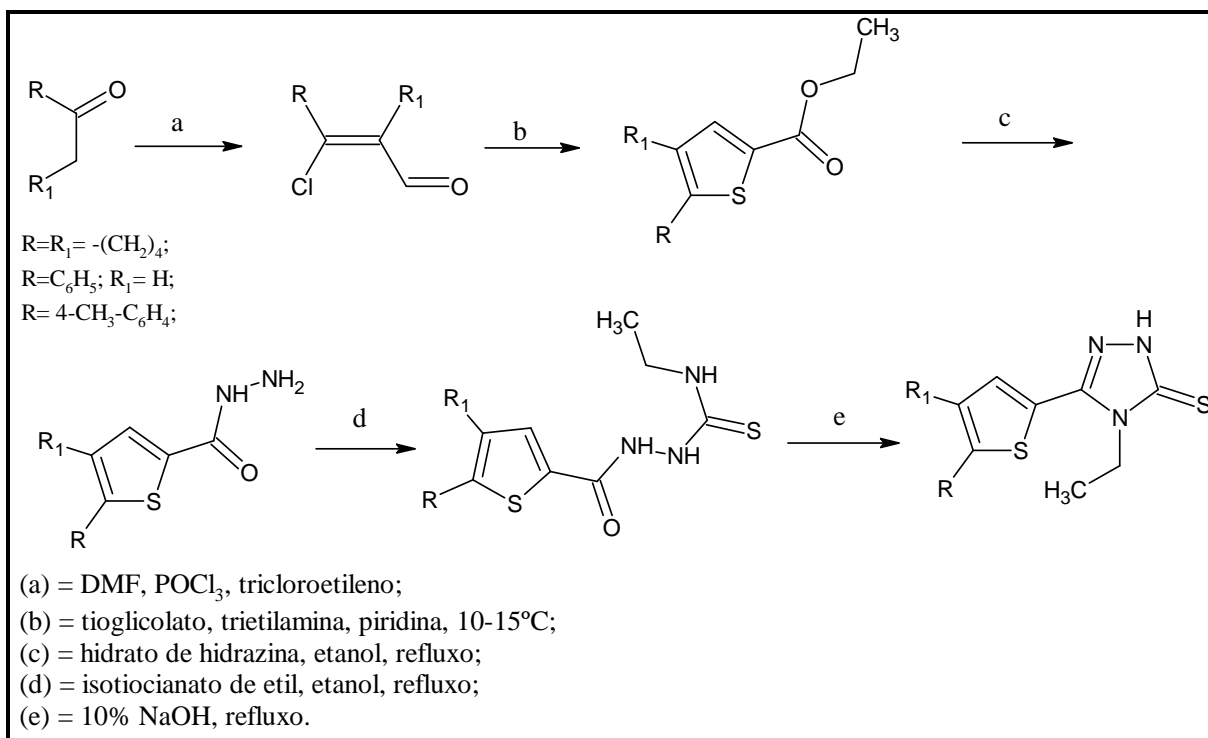


R= metil, etil, isopropil, butil,
hexil, ciclohexil, benzil, fenil, trimetoxifenil,
tert-butil, 3-metoxifenil, 4-tiometilfenil, 4-trifluormetilfenil.

Condições reacionais: (a) Isotiocianatos adequados, etanol, refluxo, 0,5 h, 65-91%; (b) 10% NaOH, H_2O , refluxo, MW, 0,5h; (c) HCl, 50-90%.

Esquema 39. Síntese dos intermediários carbotoioamidas (5).

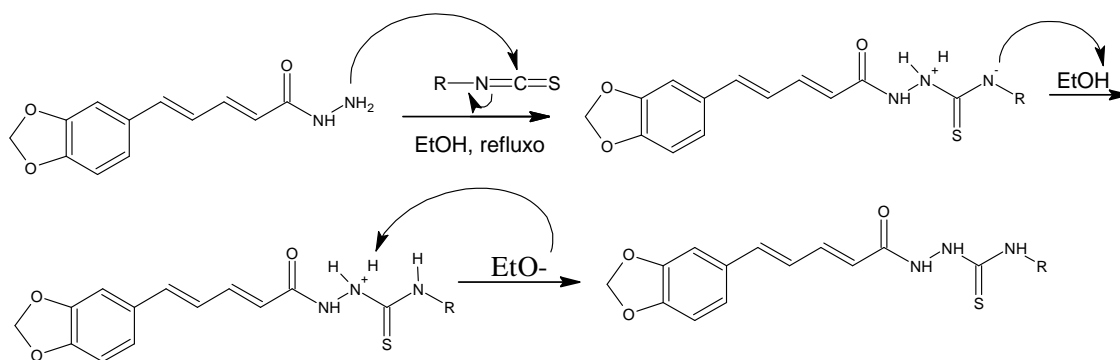
Como pode ser visto na análise retrossintética (**Esquema 34, página 140**), a hidrazida **4** é o intermediário comum à síntese dos triazóis planejados, uma vez que a passagem por este intermediário está presente nas principais metodologias para formação deste núcleo heterocíclico (CANSIZ *et al.*, 2012, MAVROVRA *et al.*, 2009 & KHAN *et al.*, 2010). Em seu trabalho, onde o objetivo era a síntese do 1,2,4-triazol 4,5-dissubstituídos (CANSIZ *et al.*, 2012), Cansiz e colaboradores transformou a hidrazida em carbotoioamida, através da reação das primeira com isotiocianato em meio de etanol, sob condições de refluxo por 4 horas. Para a obtenção do composto triazólico, Cansiz e colaboradores reagiu 1,4-dissubstituído tiossemicarbazida em solução aquosa de NaOH, sob condições de refluxo por 8h, promovendo assim a ciclização intramolecular (**Esquema 2, página 23**). Posteriormente, foi realizada a acidificação com HCl para obtenção triazol (CANSIZ *et al.*, 2012). Utilizando esta mesma metodologia, Mavrova e colaboradores sintetizaram os intermediários dos derivados 4,5-dissubstituídos-1,2,4-triazolotionas em condições de refluxo por 3 horas como demonstrado pelo **Esquema 40**. Neste trabalho, para os 1,2,4-triazóis, foi necessária a manutenção do refluxo por 5-12h para a finalização da reação (MAVROVRA *et al.*, 2009).



Esquema 40. Metodologia utilizada por Mavrova para a formação dos 1,2,4-triazóis (MAVROVRA *et al.*, 2009).

Em outro trabalho recente, KHAN e colaboradores realizaram a síntese de uma série de 1,2,4-triazóis a partir de ésteres do ácido correspondente. Os ésteres aromáticos substituídos foram obtidos pela reação do ácido correspondente com metanol na presença de ácido sulfúrico como catalisador. Estes ésteres foram convertidos para as correspondentes hidrazidas, através do refluxo com hidrato de hidrazina em metanol seco. Os derivados hidrazinocarbotioamidas foram sintetizados pela condensação das hidrazidas correspondentes com diferentes fenilisotiocianatos na presença de metanol seco em condições de refluxo por 10-12h. Os 1,2,4-triazóis-4,5-dissubstituídos foram sintetizados pela ciclização intramolecular das carbotioamidas, quando submetidas a refluxo de 12-14h em solução de hidróxido de sódio, seguida de neutralização com ácido clorídrico concentrado (KHAN *et al.*, 2010).

Ao estudarmos a aplicação destas metodologias na síntese dos derivados triazólicos planejados neste trabalho, realizamos a otimização das mesmas, substituindo o aquecimento convencional pelo uso da irradiação micro-ondas em sistema aberto e na temperatura de refluxo do solvente. O mecanismo proposto para esta reação está representado pelo **Esquema 41**.



Esquema 41. Mecanismo proposto para obtenção dos intermediários carbotoioamidas.

Seguindo a metodologia desenvolvida, as carbotoioamidas **5a-5m** (Figura 34) foram obtidas em cerca de 0,5 h de irradiação, tendo etanol como solvente. Os rendimentos para a obtenção destes intermediários variaram de 65 a 91% (como detalhado na parte experimental, Tabela 4, página 36).

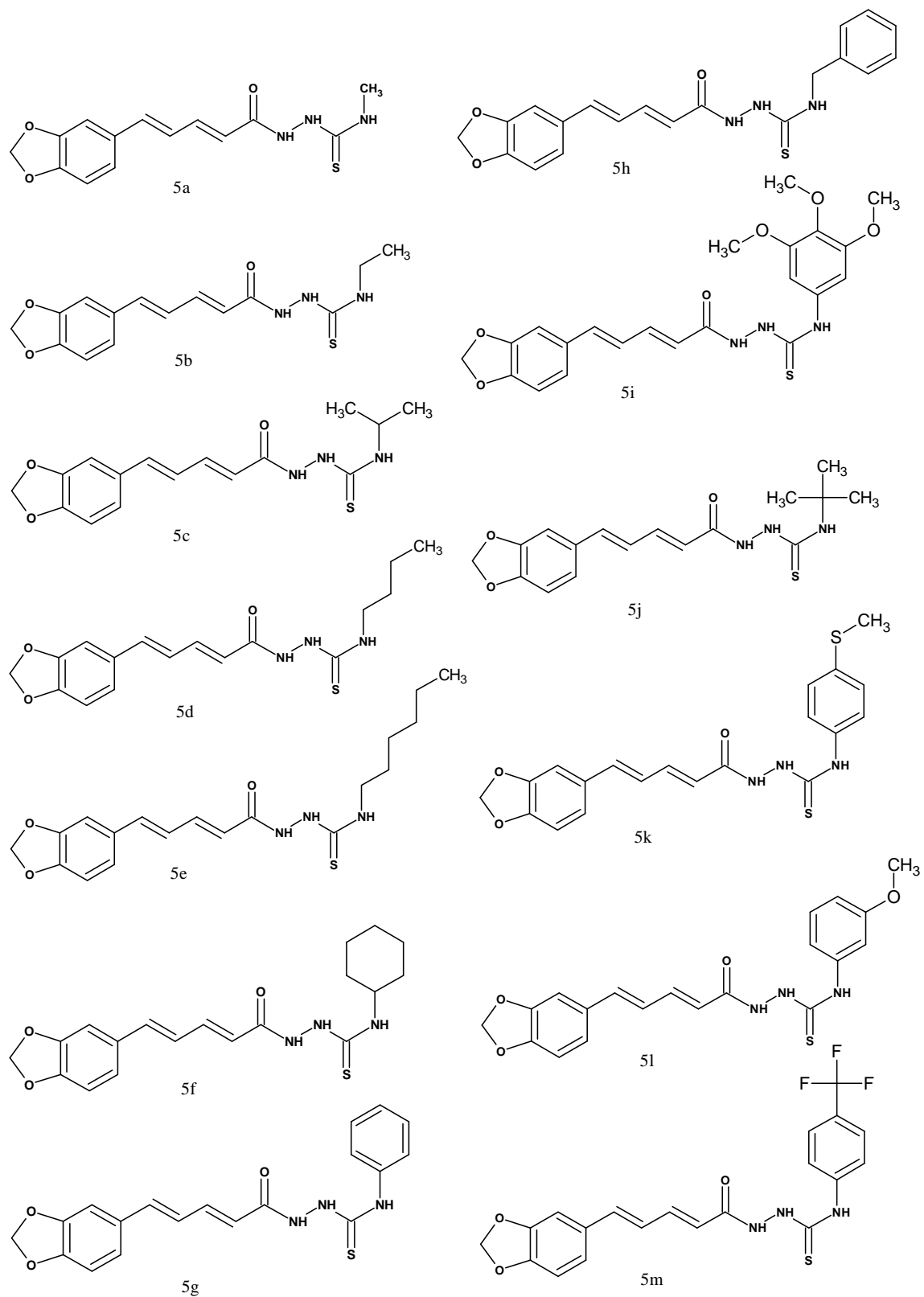


Figura 34. Intermediários **5a-5m** obtidos a partir da hidrazida **4**.

Para exemplificar a caracterização das treze carbotioamidas preparadas, através dos métodos físicos de análise (IV, RMN ^1H e ^{13}C), elegemos dois derivados com padrões de substituição diferenciado, a *N*-etilidrazinacarbotoamida (**5b**) e *N*-4-tiometilfenilidrazinacarbotoamida (**5k**).

A carbotioamida (**5b**) foi obtida na forma de um sólido marrom amorfo, apresentando ponto de fusão entre 192-193°C. Através da análise do espectro de infravermelho (**Espectro 11, página 40**) pode ser confirmado o estiramento de carbotioamida pela absorção em 3315 cm^{-1} , além do estiramento das ligações C-H de carbono sp^3 em 2972 - 2929 cm^{-1} . O anel metilenodioxi pode ser observado pelo sinal em 1249 cm^{-1} , referente ao estiramento assimétrico das ligações C-O-C. Outra absorção característica destes intermediários envolve o estiramento da tioamida que aparece no caso de (**5b**) em 1101 cm^{-1} . No espectro de RMN ^1H (**Espectro 12, página 41**), observa-se um tripleto em δ 1,05 ppm, com constante de acoplamento de 7 Hz, indicando os três hidrogênios do grupamento metila, e também um grupo de sinais entre δ 6,10 e δ 7,30 ppm referentes aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral e os três hidrogênios aromáticos. Além disso, observou-se um simpleto em δ 9,86 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio amídico e outro simpleto em δ 9,18 ppm, referente ao hidrogênio da sulfonil uréia vizinho ao grupamento amídico. Um tripleto também pode ser observado em δ 8,00 ppm, referente ao hidrogênio da sulfonil uréia, vizinho à cadeia alifática. No espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 13, página 41**) observa-se um sinal em δ 165,51 ppm, indicando a absorção do carbono da carbonila amídica e outro sinal em δ 181,65 ppm, indicando a absorção do carbono do grupamento sulfonil uréia.

O derivado *N*-4-tiometilfenilidrazinacarbotoamida (**5k**) foi obtido na forma de um sólido amarelo amorfo e apresentou ponto de fusão entre 175-177°C. Através do espectro de infravermelho (**Espectro 38, página 67**) pode ser confirmado o estiramento de carbotioamida pela absorção em 3437 cm^{-1} , além do estiramento das ligações C-H de carbono sp^3 em 2922 cm^{-1} . O grupo metilenodioxi pode ser observado pelo sinal em 1244 cm^{-1} , referente ao estiramento assimétrico das ligações C-O-C. No caso da carbotioamida (**5k**), o estiramento da tioamida ocorre em 1035 cm^{-1} . No espectro de RMN ^1H (**Espectro 39, página 68**) nota-se um simpleto em δ 2,65 ppm, indicando os três hidrogênios do grupamento metila e também um grupo de sinais entre δ 7,06 e δ 7,18 ppm, referentes aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral e aos os dois hidrogênios aromáticos ligados aos carbonos 5 e 6, vizinhos ao anel metilenodioxi. Observa-se também o simpleto em δ 7,55 ppm, referente ao hidrogênio aromático isolado, ligado ao carbono 2. Outro grupo de sinais foi observado na região entre δ 7,36 e δ 7,45 ppm, indicando os quatros hidrogênios aromáticos do radical tiometilfenil. Além disso, observou-se um simpleto em δ 10,24 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio amídico. O simpleto observado em δ 9,80 ppm, foi atribuído aos dois hidrogênios da sulfonil uréia, um deles vizinho ao grupamento amídico, e o outro vizinho à cadeia aromática. No espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 40, página 68**) observa-se um sinal em δ 148,48 ppm indicando a absorção dos dois carbonos quaternários aromáticos, ligados ao anel metilenodioxi. Os sinais observados em δ 121,67 ppm e δ 126,30 ppm foram atribuídos aos quatros carbonos aromáticos do radical tiometilfenil. A metila ligada ao átomo de enxofre apresenta um sinal em δ 15,63 ppm.

O conjunto de intermediários obtidos, apresentados na **Figura 34**, foi caracterizado pelos métodos convencionais de análises (RMN de ^1H e ^{13}C e IV). Todos os derivados carbotioamida (**5a-5m**) apresentaram dados espectroscópicos semelhantes, como pode ser observado pelas **Tabelas 31-33**.

Tabela 32. Algumas absorções na região do infravermelho (IV) dos intermediários carbotoioamidas obtidos (**5a-5m**).

	IV (cm ⁻¹)												
	5a	5b	5c	5d	5e	5f	5g	5h	5i	5j	5k	5l	5m
vN-H	3321	3315	3246	3263	3195	3292	3224	3278	3313	3311	3242	3244	3236
vC=O	1664	1666	1666	1660	1662	1637	1641	1660	1660	1674	*	*	*
	1610	1612	1604	1600	1610	1598	1602	1598	1606	1604	1614	1600	1616
vC=C (Csp²)	1500	1498	1496	1494	1492	*	1492	1492	1502	1492	1496	*	1490
	1452	1444	1448	1444	1450	1454	1448	1444	1452	1444	1458	1456	1448
vC-O-C	1251	1249	1251	1251	1247	1242	1245	1251	1245	1251	1244	1245	1245
vC=S	1097	1101	1139	1037	1037	1033	1033	1035	1039	1037	1035	1033	*
δC-H (Csp²)	927	933	925	933	931	929	929	935	997	931	989	991	931
δC-H (Csp²)	839	802	844	794	804	806	775	796	800	852	821	786	840

*Não observado

Tabela 33. Deslocamentos químicos de RMN ¹H dos intermediários carbotoioamidas obtidos (**5a-5m**).

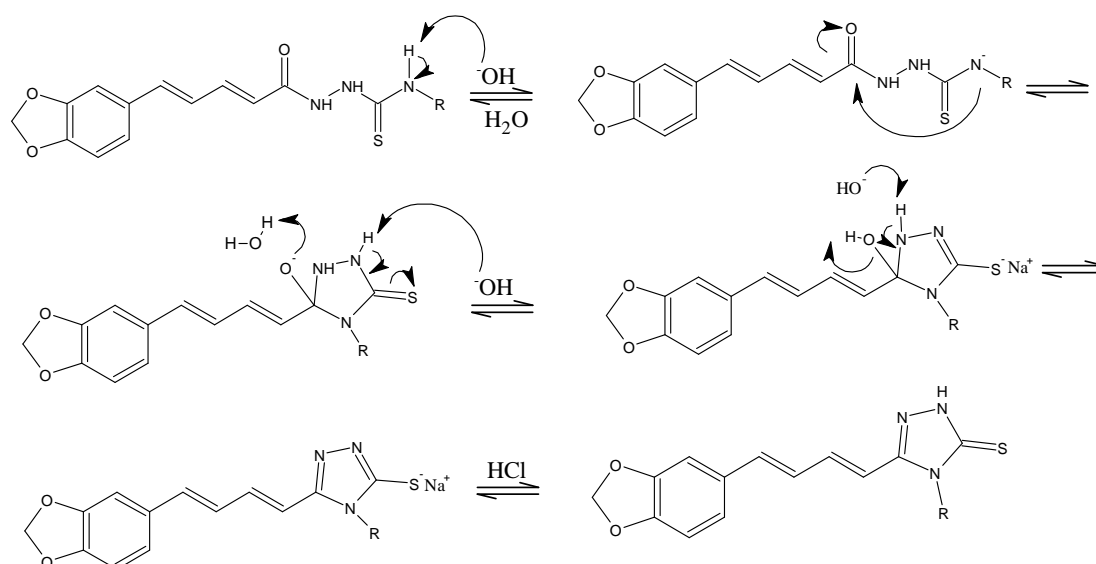
δH (ppm)													
H	5a	5b	5c	5d	5e	5f	5g	5h	5i	5j	5k	5l	5m
a	9,89	9,86	9,82	9,87	9,86	9,84	10,11	9,98	10,08	10,18	10,24	10,24	10,18
b	9,27	9,18	9,16	9,19	9,18	9,18	9,74	9,41	9,67	9,95	9,8	9,8	10,15
c	7,98	8	7,67	8	7,99	7,65	9,68	8,59	9,6	9,15	9,8	9,8	9,93
2	7,32	7,29	7,31	7,33	7,32	7,32	7,33	7,32	7,32	7,3	7,55	7,32	7,33
5	6,93-7,04	6,91-6,99	6,93-7,03	6,94-7,04	6,93-7,03	6,93-7,04	6,84-7,04	6,94-7,04	6,86-7,06	5,92-7,03	7,06-7,018	6,93-7,08	6,93-7,08
6	6,93-7,04	7,01	6,93-7,03	6,94-7,04	6,93-7,03	6,93-7,04	6,84-7,04	6,94-7,04	6,86-7,06	5,92-7,03	7,06-7,018	6,93-7,08	6,93-7,08
α	6,09	6,08	6,1	6,12	6,11	6,1	6,15	6,11	6,16	6,14	6,28	6,15	6,16
β	7,29	7,25	7,26	7,27	7,26	7,25	7,27 - 7,33	7,24 - 7,27	7,27 - 7,32	7,24 - 7,30	7,55 - 7,64	7,22 - 7,38	7,27 - 7,34
γ	6,93-7,04	6,91- 6,99	6,93 - 7,03	6,94 - 7,04	6,93 - 7,03	6,93 - 7,04	6,84 - 7,04	6,94 - 7,04	6,86 - 7,06	6,92 - 7,03	7,06 - 7,18	6,93 - 7,08	6,93 - 7,08
δ	6,93-7,04	6,91- 6,99	6,93 - 7,03	6,94 - 7,04	6,93 - 7,03	6,93 - 7,04	6,84 - 7,04	6,94 - 7,04	6,86 - 7,06	6,92 - 7,03	7,06 - 7,18	6,93 - 7,08	6,93 - 7,08
OCH₂O	6,07	6,05	6,07	6,08	6,07	6,07	6,07	6,07	6,07	6,07	6,2	6,07	6,07

Tabela 34. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C dos intermediários carbotoamidas obtidos (**5a-5m**).

δC (ppm)													
C	5a	5b	5c	5d	5e	5f	5g	5h	5i	5j	5k	5l	5m
C=S	*	181,65	*	*	*	*	*	*	*	178,73	*	181,15	181,27
C=O	165,65	165,61	165,49	165,57	164,17	162,92	*	165,71	*	169,55	*	172,77	164,55
α	122,4	122,36	122,56	122,49	122,56	122,55	122,53	122,45	122,43	121,91	122,53	122,45	122,28
β	141,37	141,35	141,2	141,27	141,35	141,2	141,32	141,37	141,42	141,54	141,36	141,33	141,54
γ	125,53	125,48	125,53	125,53	125,62	125,54	125,56	125,53	125,55	125,5	125,57	125,53	125,49
δ	139,53	139,46	139,47	139,49	139,56	139,46	139,54	139,56	139,59	139,58	139,57	139,54	139,69
1	131,2	131,16	131,22	131,22	131,3	131,22	131,22	131,21	131,21	131,17	131,24	131,19	131,16
2	106,18	106,2	106,17	106,17	106,25	106,17	106,18	106,18	106,19	106,14	106,22	106,15	106,16
3	148,46	148,42	148,46	148,46	148,48	148,39	148,46	148,41	148,42	148,44	148,48	148,45	148,42
4	148,46	148,42	148,46	148,4	148,48	148,39	148,46	148,41	148,46	148,44	148,48	148,45	148,42
5	108,96	108,94	108,96	108,96	109,04	108,96	108,97	108,97	108,97	108,94	108,99	108,94	108,94
6	123,51	123,38	123,48	123,49	123,57	123,47	123,51	123,51	123,51	123,48	123,52	123,5	123,53
OCH₂O	101,81	101,76	101,81	101,81	101,88	101,81	101,81	101,82	101,81	101,81	101,83	101,79	101,8

*Não observado

Tomando como base as metodologias anteriormente descritas para a síntese de derivados triazólicos (CANSIZ *et al.*, 2012, MAVROVRA *et al.*, 2009 & KHAN *et al.*, 2010), os intermediários carbotoioamidas **5a-5m** foram reagidos em solução aquosa de NaOH. A reação foi otimizada com o uso da irradiação micro-ondas em condições de refluxo (sistema aberto), em tempos reacionais que variaram de 0,5 a 1h. Para a obtenção dos derivados triazólicos, propomos o mecanismo que está representado pelo **Esquema 42**.



Esquema 42. Mecanismo proposto para obtenção dos derivados triazólicos.

O conjunto de triazóis **6a-6m** obtidos, apresentados na **Figura 35**, foram caracterizados pelos métodos convencionais de análises (RMN de ^1H e ^{13}C , IV, EM e EMAR) e os rendimentos para a obtenção destes produtos variaram de 62 a 90% (como detalhado na parte experimental, **Tabela 18**, página 76).

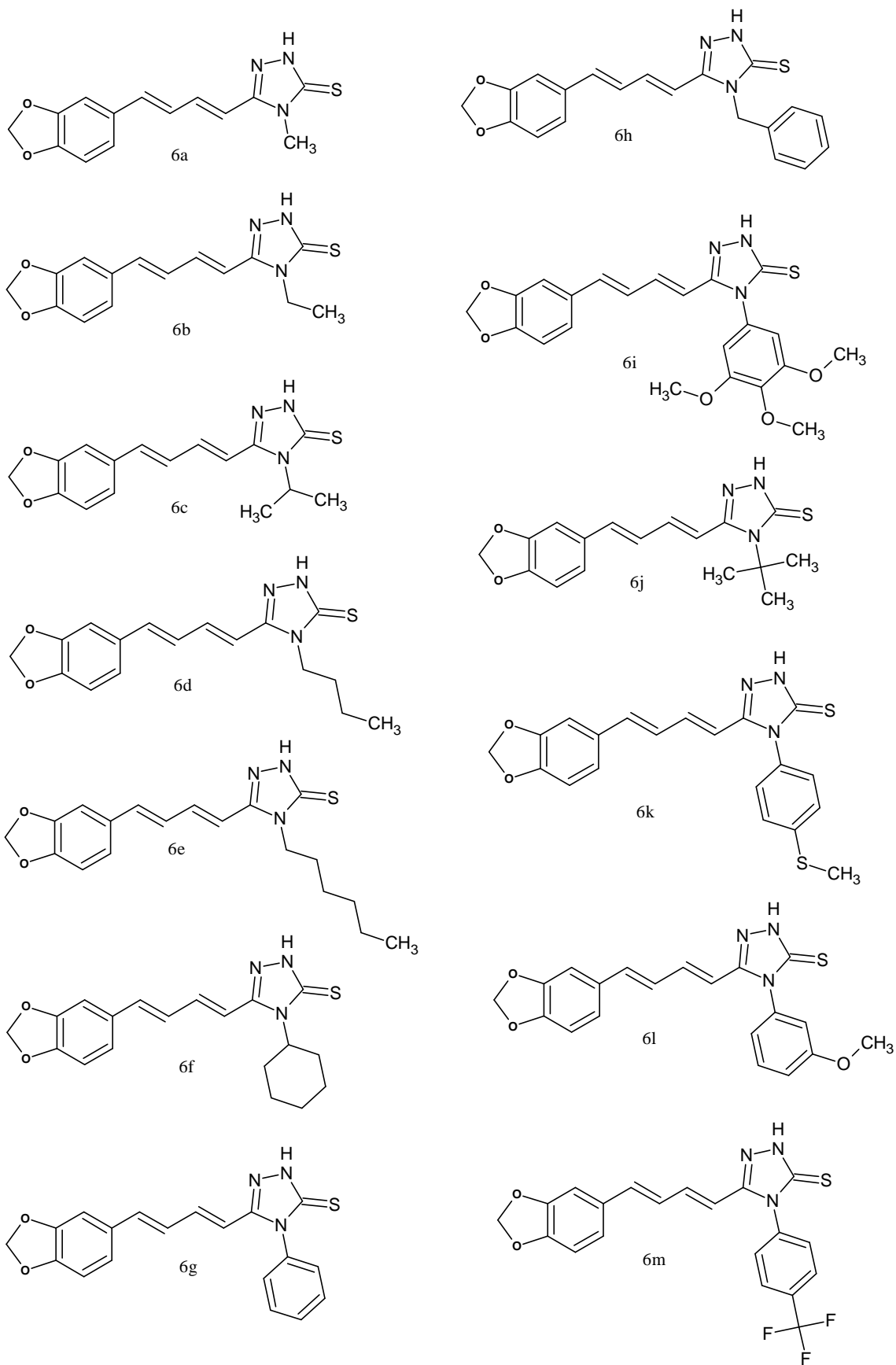
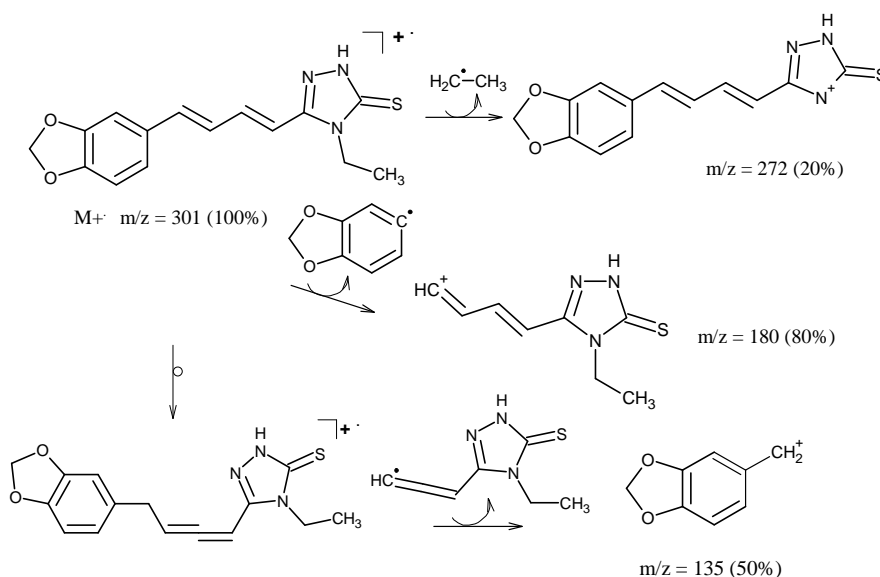


Figura 35. Derivados triazólicos **6a-6m** sintetizados.

Para exemplificar a caracterização dos treze triazóis sintetizados, através dos métodos físicos de análise (RMN de ^1H e ^{13}C , IV, EM e EMAR) elegemos dois derivados com padrões de substituição diferenciado, o etil-triazol (**6b**) e 4-tiometilfenil-triazol (**6k**).

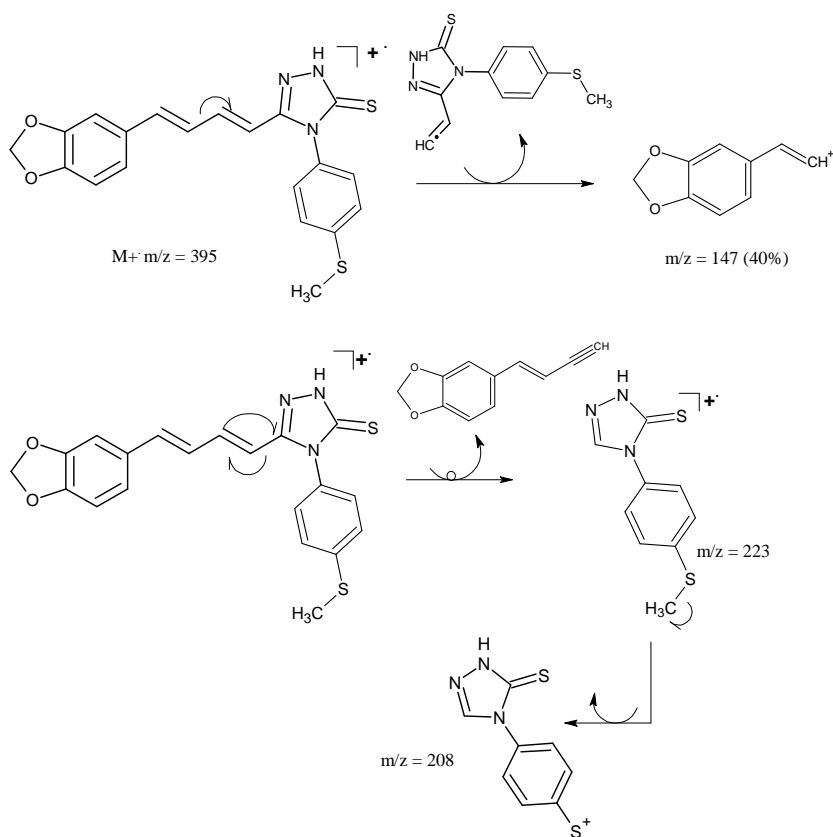
O triazol (**6b**) foi obtido na forma de um sólido marrom amorfo, apresentando ponto de fusão entre 208-209°C. Através do espectro de infravermelho (**Espectro 52, página 81**) pode ser confirmado o estiramento NH pela absorção em 3433 cm^{-1} , além do estiramento das ligações C-H de carbono sp^3 em 2929 cm^{-1} , e em 1359 cm^{-1} a vibração da ligação C-N do anel heterocíclico. A absorção em 1029 cm^{-1} é referente ao estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico e em 1251 cm^{-1} , o anel metilenodioxi. No espectro de RMN ^1H (**Espectro 55, página 83**), observa-se um simpleto em $\delta\ 13,76$ ppm indicando o hidrogênio do anel heterocíclico e um tripleto em $\delta\ 1,19$ ppm, com constante de acoplamento de 7,03 Hz, referente a metila. No espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 56, página 83**) observa-se um sinal em $\delta\ 166,46$ ppm indicando a absorção do carbono ligado ao enxofre e outro em $\delta\ 149,55$ ppm referente ao carbono ligado ao nitrogênio, ambos do anel heterocíclico. No espectro de massas do etil-triazol (**Espectro 53, página 82**) encontram-se fragmentos como o íon molecular e pico base $m/z = 301$ (M^+ , 100%), além dos $m/z = 272$ (20%), 207 (20%), 180 (80%), 135 (50%), 115 (60%), 73 (85%) e 43 (50%). No espectro de massas de alta resolução (**Espectro 54, página 82**), a massa observada foi de 302.0963, correspondendo ao mesmo valor da massa calculada. O **Esquema 43** apresenta a proposta de fragmentação para o etil triazol.



Esquema 43. Proposta de fragmentação para o composto etil-triazol.

O triazol (**6k**) foi obtido na forma de um sólido marrom amorfo apresentando ponto de fusão entre 209-211°C. Através do espectro de infravermelho (**Espectro 97, página 117**) pode ser confirmado o estiramento de NH pela absorção em 3429 cm^{-1} , além do estiramento das ligações C-H de carbono sp^3 em 2920 cm^{-1} e a vibração da ligação C-N do anel heterocíclico em 1340 cm^{-1} . A absorção em 1037 cm^{-1} é referente

ao estiramento da tiocarbonila do anel heterocíclico e em 1251 cm^{-1} do anel metilenodioxí. No espectro de RMN ^1H (**Espectro 100, página 119**), observa-se um simpleto em δ 13,98 ppm indicando o hidrogênio do anel heterocíclico e um simpleto em δ 2,52 ppm referente a metila. No espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 101, página 119**) nota-se um sinal em δ 166,01 ppm indicando a absorção do carbono ligado ao enxofre e outro em δ 149,90 ppm referente ao carbono ligado ao nitrogênio, ambos do anel heterocíclico. No espectro de massas do 4-tiometilfenil-triazol (**Espectro 98 página 118**) encontram-se fragmentos como o íon molecular protonado e pico base $m/z = 396$ ($M+1$, 10%) e 73 (100%), respectivamente, além dos $m/z = 355$ (5%), 269 (20%), 223 (5%), 221 (5%), 208 (5%), 207 (20%), 147 (20%), 135 (20%), 81 (30%) e 43(65%). No espectro de massas de alta resolução (**Espectro 99, página 118**), a massa observada foi de 396.0840, correspondendo ao mesmo valor da massa calculada. O **Esquema 43** apresenta a proposta de fragmentação para o 4-tiometilfenil-triazol.



Esquema 44. Proposta de fragmentação para o composto 4-tiometilfenil-triazol.

Nos espectros de ressonância de hidrogênio e carbono e de infravermelho, os compostos triazólicos apresentaram dados espectroscópicos semelhantes, como pode ser observado pelas **Tabelas 34-36**. Como característica principal observada na caracterização de todos os derivados triazólicos nos espectros de RMN ^1H , podemos citar o simpleto em torno de δ 14 ppm, atribuído ao hidrogênio do anel heterocíclico (N-H). Já no espectro de RMN ^{13}C , observa-se um sinal em torno de δ 166 ppm, característico do carbono ligado ao átomo de enxofre e outro em torno de δ 149 ppm, referente ao carbono quaternário do anel heterocíclico.

Tabela 35. Algumas absorções na região do infravermelho (IV) dos compostos triazólicos obtidos (**6a-6m**).

	IV (cm ⁻¹)												
	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g	6h	6i	6j	6k	6l	6m
vN-H	3101	3101	3105	3105	3192	3195	*	3282	3105	3315	*	3111	3109
	1616	1614	1614	1614	1612	1614	1618	1600	1600	1608	1616	1604	1608
vC=C (Csp²)	1490	1489	1492	1489	1492	1492	1492	1492	1500	1492	1500	1492	1492
	1446	1442	1438	1444	1446	1444	1442	1444	1452	1444	1442	1448	1446
vC-O-C	1251	1251	1251	1259	1249	1251	1251	1251	1244	1249	1251	1253	1249
vC=S	1037	1029	1039	1037	1035	1037	1037	1035	1033	1037	1037	1035	1035
δC-N	1342	1359	1357	1357	1359	1355	*	1396	1353	1361	1340	*	*
δC-H (Csp²)	985	989	991	987	989	987	979	937	955	983	989	991	991

*Não observado

Tabela 36. Deslocamentos químicos de RMN ¹H dos compostos triazólicos obtidos (**6a-6m**).

H	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g	6h	6i	6j	6k	6l	6m
NH	13,78	13,76	13,78	13,78	13,77	13,76	14	13,97	13,94	7,63	13,98	13,97	14,09
2	7,23	7,2	7,2	7,22	7,32	7,19	7,2	7,21	7,21	7,22	7,2	7,2	7,2
5	6,90-7,07	6,88-7,07	6,87-7,00	6,89-7,09	6,89-7,09	6,93	6,89	6,91-6,99	6,9	6,82-7,04	6,9	6,9	6,9
6	6,90-7,07	6,88-7,07	7,15-7,27	6,89-7,09	6,89-7,09	6,98-7,00	6,94-7,00	6,91-6,99	6,96	6,82-7,04	6,95	6,95-6,99	6,95-7,00
α	6,54	6,57	6,74	6,58	6,57	6,75	5,95	6,42	6,03	6,48	5,99	5,95	5,96
β	7,26-7,31	7,25-7,31	7,15-7,27	7,27-7,32	7,27-7,32	7,19-7,24	7,15	7,21-7,26	7,17-7,22	6,82-7,04	7,16-7,22	7,13-7,18	7,13-7,18
γ	6,90-7,07	6,88-7,07	6,87-7,00	6,89-7,09	6,89-7,09	7,11-7,17	6,79	6,85	6,82	6,84	6,81	6,8	6,81-6,85
δ	6,90-7,07	6,88-7,07	6,87-7,00	6,89-7,09	6,89-7,09	6,85	6,94-7,00	6,93	7,03	6,82-7,04	7	6,95-6,99	6,95-7,00
OCH₂O	6,07	6,05	6,07	6,07	6,07	6,05	6,04	6,06	6,04	6,06	6,04	6,04	6,04

Tabela 37. Deslocamentos químicos de RMN ¹³C dos compostos triazólicos obtidos (**6a-6m**).

δC (ppm)													
C	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g	6h	6i	6j	6k	6l	6m
C=S	167,11	166,46	166,46	166,74	166,73	166,63	168,03	167,49	168,01	161,97	168,01	167,92	167,92
C=N	150,15	149,55	149,57	149,79	149,79	149,53	149,83	150,06	150,06	157,91	149,9	149,81	149,61
α	113,95	113,5	114,55	113,56	113,56	114,63	113,4	113,4	113,65	113,17	113,42	113,42	113,14
β	137,55	137,56	137,23	137,58	137,58	141,2	137,79	137,94	137,58	136,76	137,71	137,71	137,87
γ	126,5	126,5	126,77	126,55	126,54	126,8	126,54	126,35	126,74	126,51	126,57	126,57	126,51
δ	137,02	137,21	137,2	137,17	137,19	137,22	137,37	137,38	137,16	135,29	137,32	137,27	137,7
1	131,31	131,32	131,44	131,15	131,35	131,45	131,31	131,24	131,29	131,41	131,32	131,32	131,29
2	105,91	105,9	105,84	105,89	105,89	105,82	105,91	105,95	105,89	105,87	105,85	105,88	105,82
3	148,24	148,23	148,22	148,27	148,48	148,21	148,25	148,3	148,22	148,12	148,23	148,22	148,27
4	148,45	148,44	148,46	148,48	148,48	148,47	148,25	148,3	148,43	148,42	148,4	148,4	148,41
5	109,03	109,02	109,06	109,06	109,07	109,06	108,93	109,01	108,94	109	108,92	108,91	108,93
6	123	122,95	122,96	123,06	123,06	122,97	123,29	123,2	123,23	122,87	123,26	123,26	123,26
OCH₂O	101,77	101,75	101,81	101,81	101,88	101,81	101,75	101,8	101,75	101,76	101,71	101,73	101,75

5.7. Avaliações Biológicas: Atividade tripanocida

Para a avaliação da atividade tripanocida dos derivados triazólicos obtidos (**6a-6m**, **Figura 35**) foi utilizada uma sequência de experimentos que está descrita no **item 5.0 (Material e Métodos, página 129)**, onde foram realizados testes *in vitro* contra as duas formas evolutivas replicativas do parasito (epimastigota e amastigota). Foi realizada também a avaliação da citotoxicidade dos novos heterocíclicos nitrogenados, aqueles que apresentaram valores de $CI_{50} < 30 \mu\text{M}$ contra epimastigotas, frente à célula hospedeira (macrófagos murinos, **item 5.3**).

Primeiramente, foi avaliada a atividade anti-epimastigota dos derivados obtidos (**6a-6m**) tendo o benzonidazol como fármaco controle. Como pode ser visto pelos valores de CI_{50} referentes à avaliação tripanocida, mostrados na **Tabela 37**, os triazóis **6c**, **6d**, **6e**, **6f** e **6m** apresentaram maior efeito tóxico à forma epimastigota. Estas moléculas, que apresentaram CI_{50} em epimastigotas abaixo de $30 \mu\text{M}$, foram então avaliadas quanto à suas citotoxicidades, utilizando o teste de exclusão do azul de Trypan (**item 5.3**) em macrófagos peritoneais ($M\phi$) de camundongos Balb/c. Os $M\phi$ foram tratados com os compostos descritos a cima em concentrações de 0,5; 1,0; 2,5 and $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O número de células viáveis foi determinado após 72 h de tratamento. Em todas as concentrações testadas para estes cinco derivados triazólicos, não houve toxicidade significativa nas células hospedeiras apresentando valores de viabilidade celular entre 85 a 95%.

Os *N*-alquil-triazóis **6a** e **6b** não apresentaram atividade significativa contra a forma epimastigota do *T. cruzi*, com valores de CI_{50} de 44,20 e $50,16 \mu\text{M}$, respectivamente. Com o crescimento da cadeia no anel triazólico, os *N*-alquilderivados (**6c-6f**) apresentaram elevação da atividade contra epimastigotas. Isto sugere que a lipofilicidade seja um parâmetro importante para a atividade tripanocida desta família de triazóis, interferindo, por exemplo, na sua capacidade de atravessar a membrana celular. Nas séries *N*-benzil e *N*-aril, os triazóis **6g-6l** não apresentaram atividade significativa. Somente o composto **6m**, o qual possui o substituinte *para*-trifluormetilfenil na posição 4 do anel heterocíclico, apresentou importante efeito tóxico contra a forma epimastigota.

Como todos os cinco derivados mais ativos frente à forma epimastigota ($CI_{50} < 30 \mu\text{M}$) apresentaram toxicidade seletiva, apresentados pelos dados de citotoxicidade para macrófagos murinos pela **Tabela 38**, estes foram testados contra a forma amastigota do parasito. Os compostos **6c**, **6f** e **6m**, apresentaram efeitos tripanocidas similares, com valores de CI_{50} de 11,11; 8,87 e $9,59 \mu\text{M}$, respectivamente. O triazol **6d** e **6e** apresentaram altos valores de CI_{50} em amastigotas. Entre os treze novos compostos preparados, o cicloexil-triazol (**6f**) teve melhor perfil tripanocida, apresentando CI_{50} de $18,30 \mu\text{M}$ e $8,87 \mu\text{M}$ contra formas epimastigota e amastigota das cepas Y de *Trypanosoma cruzi*, respectivamente, além de reduzidos efeitos tóxicos frente as células hospedeiras nas concentrações testadas. A **Figura 36** mostra imagens dos macrófagos infectados, tratados com os triazóis **6c**, **6d**, **6e**, **6f** e **6m** na concentração de $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 38. Efeito tóxico dos novos triazóis (**6a-6m**) em formas proliferativas do *T. cruzi*.

Triazóis	CI₅₀ (μM) epimastigotas	CI₅₀ (μM) amastigotas
<u>6a</u>	44.2 ± 7.30	<i>nt</i>
<u>6b</u>	50.16 ± 10.79	<i>nt</i>
<u>6c</u>	26.98 ± 6.98	11.11 ± 1.26
<u>6d</u>	13.22 ± 3.64	≥ 15.17**
<u>6e</u>	15.38 ± 4.47	≥ 13.98**
<u>6f</u>	18.30 ± 5.21	8.87 ± 2.39
<u>6g</u>	38.96 ± 8.88	<i>nt</i> ^{&}
<u>6h</u>	39.39 ± 6.88	<i>nt</i>
<u>6i</u>	35.30 ± 6.26	<i>nt</i>
<u>6j</u>	50.75 ± 10.63	<i>nt</i>
<u>6k</u>	40.75 ± 10.50	<i>nt</i>
<u>6l</u>	48.02 ± 6.06	<i>nt</i>
<u>6m</u>	18.46 ± 3.95	9.59 ± 2.87
Benzonidazol*	2.20 ± 0.16	2.50 ± 0.21

*Fármaco de referência; ** Máxima concentração permitida através do teste de exclusão do azul de Trypan; [&]Não testado.

Tabela 39. Resultados da viabilidade celular. Citotoxicidade (μM) para macrófagos murinos tratados com os triazóis mais ativos em epimastigota (**6c**, **6d**, **6e**, **6f** e **6m**).

Triazol	Concentração testada	% de viabilidade
6f	0,5 $\mu\text{g/mL}$ (1,40 μM)	93 +/- 3,0
	1,0 $\mu\text{g/mL}$ (2,81 μM)	97 +/- 2,0
	2,5 $\mu\text{g/mL}$ (7,04 μM)	91 +/- 5,0
	5,0 $\mu\text{g/mL}$ (14,08 μM)	89 +/- 3,0
6e	0,5 $\mu\text{g/mL}$ (1,40 μM)	93 +/- 4,0
	1,0 $\mu\text{g/mL}$ (2,80 μM)	92 +/- 2,0
	2,5 $\mu\text{g/mL}$ (7,00 μM)	89 +/- 5,0
	5,0 $\mu\text{g/mL}$ (14,00 μM)	94 +/- 3,0
6d	0,5 $\mu\text{g/mL}$ (1,52 μM)	93 +/- 4,0
	1,0 $\mu\text{g/mL}$ (3,04 μM)	91 +/- 6,0
	2,5 $\mu\text{g/mL}$ (7,06 μM)	95 +/- 4,0
	5,0 $\mu\text{g/mL}$ (15,20 μM)	89 +/- 7,0
6c	0,5 $\mu\text{g/mL}$ (1,58 μM)	93 +/- 4,0
	1,0 $\mu\text{g/mL}$ (3,17 μM)	94 +/- 5,0
	2,5 $\mu\text{g/mL}$ (7,93 μM)	89 +/- 3,0
	5,0 $\mu\text{g/mL}$ (15,87 μM)	91 +/- 6,0
6m	0,5 $\mu\text{g/mL}$ (1,20 μM)	94 +/- 4,0
	1,0 $\mu\text{g/mL}$ (2,39 μM)	92 +/- 7,0
	2,5 $\mu\text{g/mL}$ (5,99 μM)	96 +/- 3,0
	5,0 $\mu\text{g/mL}$ (11,99 μM)	92 +/- 5,0
Controle	não tratado	100%

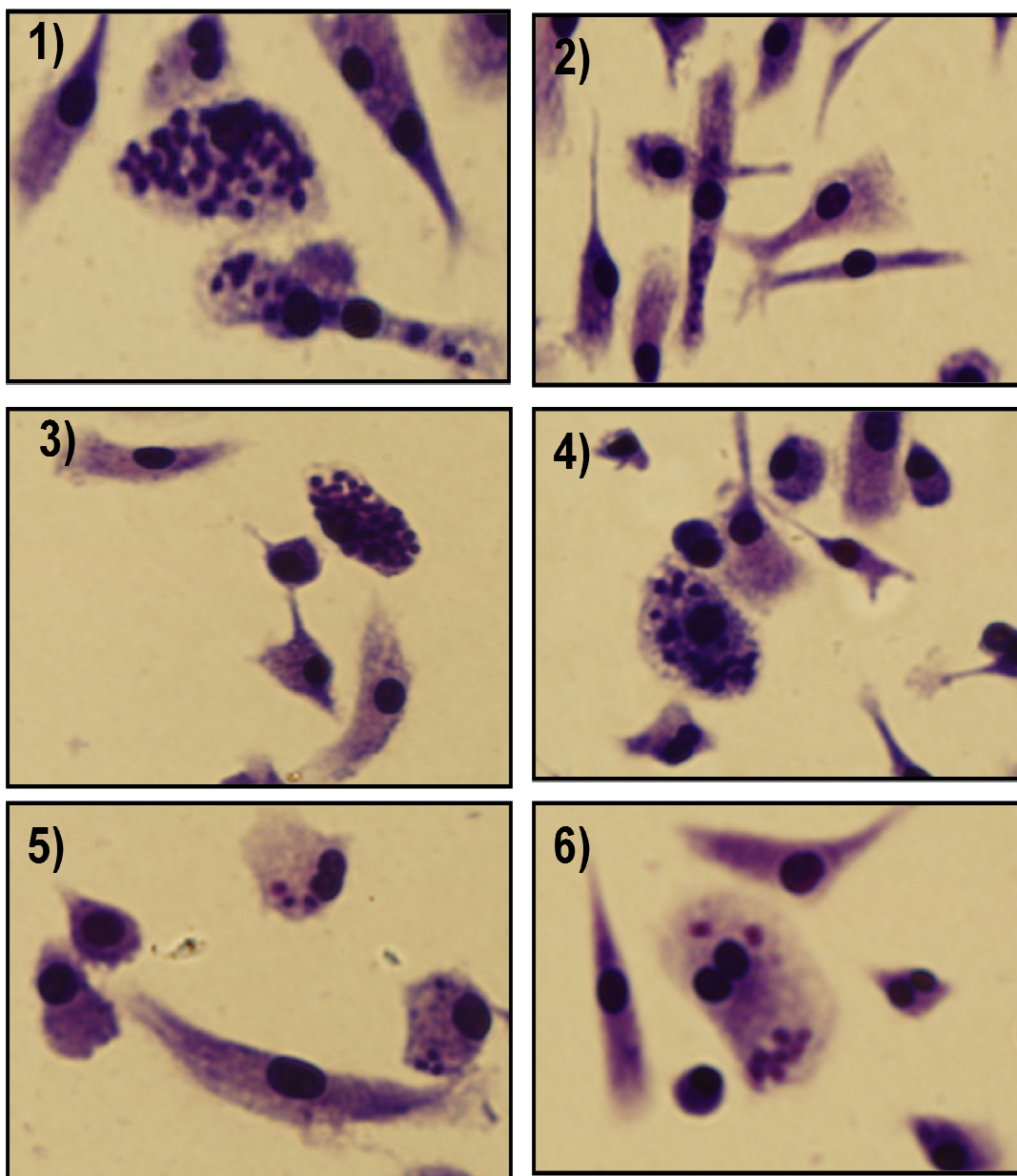


Figura 36. Toxicidade das moléculas **6c-6f** e **6m** à forma amastigota na concentração $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$: 1) DMSO 0,01% (veículo); 2) isopropil-triazol (**6c**); 3) butil-triazol (**6d**); 4) hexil-triazol (**6e**); 5) cicloexil-triazol (**6f**); 6) 4-trifluormetilfenil-triazol (**6m**).

As investigações sobre possíveis mecanismos de ação dos derivados triazólicos mais ativos sobre o *Trypanosoma cruzi* encontram-se em andamento. Os resultados permitirão o conhecimento da interferência ou não dos triazóis planejados neste trabalho na biossíntese de ergosterol na célula do parasito. Um método analítico com *T. cruzi* sem tratamento já foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa utilizando estudo por CLAE. Este método será baseado por outro desenvolvido e validado por Pinto e colaboradores, que utilizaram CLAE com detecção de UV para o estudo do efeito da atividade de xantonas na biossíntese de esteróis, identificando e quantificando os esteróis em diferentes fungos, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*

fumigatus e *Trichophyton mentagrophytes*. O método analítico utilizado por Pinto e colaboradores permitiu a análise e a quantificação de dois esteróis, o lanosterol (esterol intermediário na biossíntese do ergosteol) e o ergosterol (esterol final da via biossintética) (PINTO *et al.*, 2011).

5.8. Avaliação da estabilidade da piperina 1 e do triazol 6f em diferentes faixas de pH.

O planejamento de novas moléculas potencialmente úteis como fármacos para o tratamento do conjunto das chamadas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) deve considerar o acesso limitado dos pacientes a uma estrutura mínima de saúde (hospitais, postos de atendimento ambulatorial, profissionais de saúde adequadamente qualificados) (<http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas.html>). Isto se deve ao fato destas parasitoses causarem maiores danos às populações residentes nos bolsões de pobreza distribuídos nos países em desenvolvimento. Desta forma, o fármaco ideal para o tratamento de pacientes chagásicos crônicos, além de eliminarem o parasita de maneira seletiva nas duas fases da doença, deve também possuir características farmacocinéticas que permitam a sua administração por via oral, que é a via de administração mais simples, econômica e segura (BUXTOX & BENET, 2011), além de um regime de tratamento curto e com o menor número de doses possíveis.

Fármacos administrados por via oral transitam pelo trato digestório onde podem ser degradados pela flora bacteriana local, ou ainda, dependendo do compartimento em que se encontram, são submetidos a diferentes gradientes de pH, desde neutro na cavidade oral, a fortemente ácidos (pH 1,0-3,0 no estômago) ou alcalinos (pH 8,0-9,0 no intestino) (GUYTON & HALL, 2006).

Desta forma, entende-se que uma característica desejável a um fármaco desenvolvido para o tratamento da doença de Chagas deva possuir boas características de estabilidade em diferentes faixas de pH. O monitoramento da estabilidade dos medicamentos é um dos métodos mais eficazes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto durante a validade. A segurança e a eficácia também podem ser avaliadas, através do monitoramento da formação de produtos de degradação, que podem gerar perda de atividade terapêutica ou aumentar a sua toxicidade (SILVA *et al.*, 2009). Estudo da estabilidade de uma substância em solução aquosa, com potencial aplicação como fármaco, pode ser avaliado previamente através de testes simples e rápidos. Em geral esse estudo em solução aquosa se dá preliminarmente porque a formulação líquida é geralmente a forma mais estável e barata de um medicamento, e assim pode ser útil para determinar a sua viabilidade fisiológica e comercial. O monitoramento de preparações farmacêuticas em diferentes faixas de pH e temperatura é uma ferramenta de grande importância, usada pela indústria farmacêutica para avaliação, não só da estabilidade de princípios ativos, mas também de demais excipientes e aditivos presentes nas diferentes formulações (ALELYUNAS *et al.*, 2011).

Com a finalidade de garantir a integridade química dos triazóis planejados neste trabalho, realizou-se um estudo preliminar por CLAE do comportamento da piperina 1 e do derivado cicloexil-triazol (6f) frente a soluções tampão de pH 2,1; 7,0; e 8,0, mantidas por até 24h à temperatura do corpo humano (37°C). A escolha destas duas substâncias deve-se ao fato da primeira ser o precursor natural dos triazóis sintetizados, e também, em virtude do derivado *N*-cicloexil ter apresentado o melhor perfil de atividade biológica.

O uso da técnica de CLAE permitiu avaliar os perfis de estabilidade da piperina e do triazol em meio aquoso, em três soluções de pH e mostrou-se bastante útil visto que requer apenas 1 mg da substância de teste.

A solução de piperina **1** foi preparada com 5% de acetonitrila como co-solvente, enquanto que para o derivado *N*-cicloexil **6f**, devido a diferenças de solubilidade, o co-solvente foi aumentado para 10%. Entretanto, a força iônica da solução tampão foi ajustada para ser a mesma em intervalos de pH para minimizar o seu efeito sobre a cinética de estabilidade observada.

A avaliação da estabilidade dessas duas substâncias pode ser verificada durante os experimentos, através ausência de formação de precipitado ou mudança de coloração nas soluções avaliadas pela inspeção visual através do frasco e, principalmente, pelo não aparecimento de produtos de degradação detectáveis através das análises dos cromatogramas.

Os cromatogramas nas **Figuras 38 e 39**, não mostraram redução da área dos picos com variação do tempo e do pH à temperatura fisiológica humana. Esses dados podem sugerir uma estabilidade primária dessas substâncias que puderam ser observadas através da técnica de CLAE-DAD.

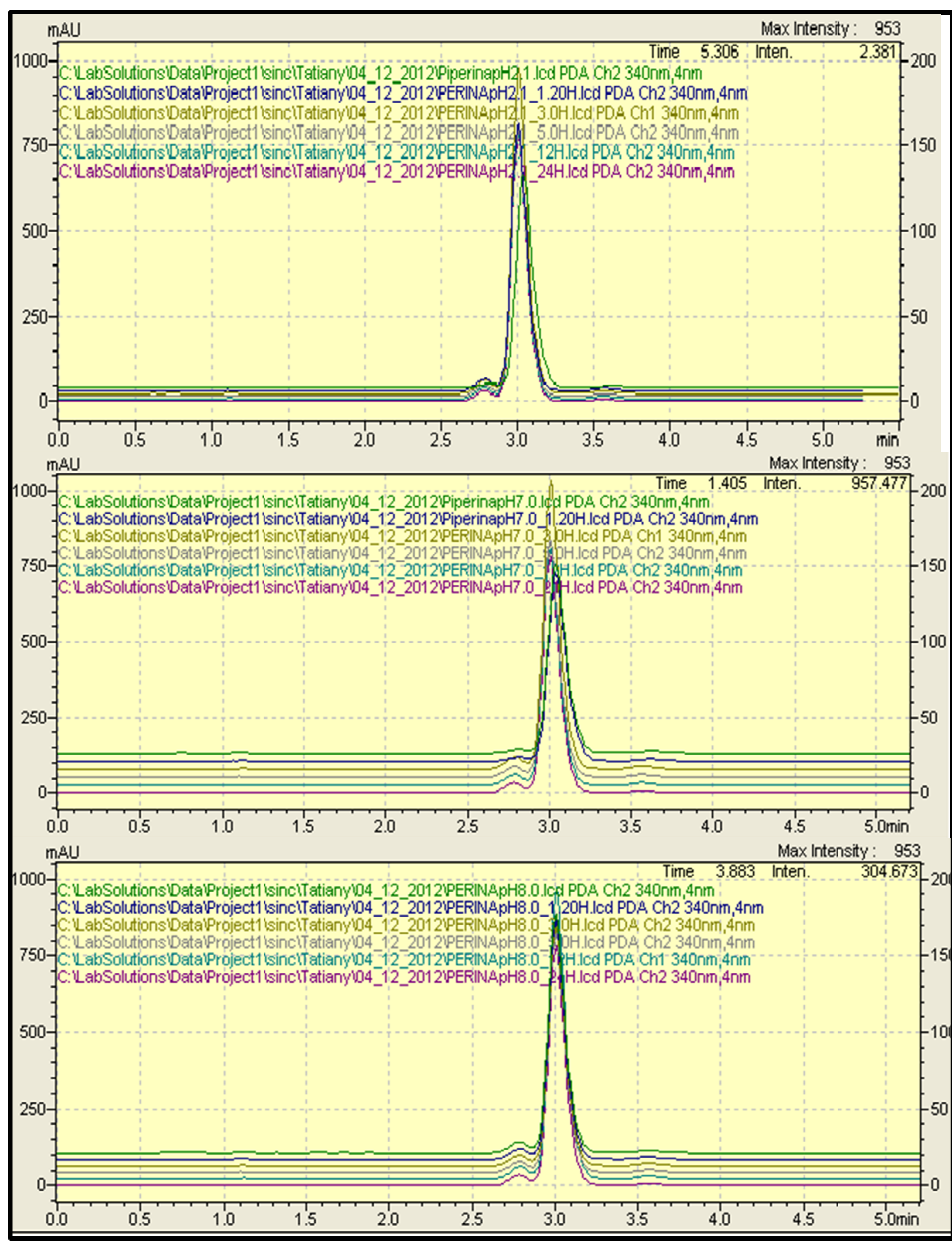


Figura 37. Estudo da estabilidade da piperina por CLAE em pH 2,1; 7,0 e 8,0.

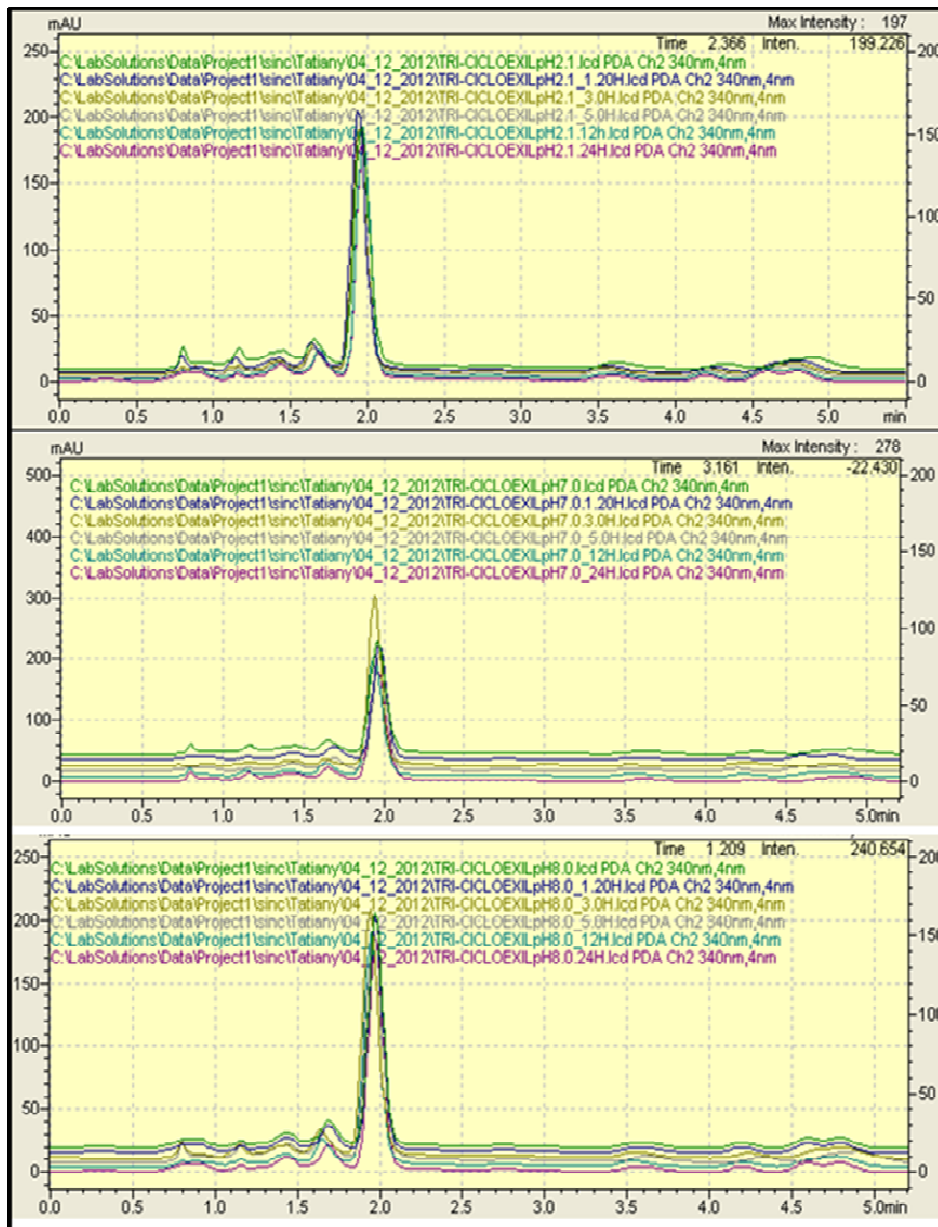


Figura 38. Estudo da estabilidade do cicloexil-triazol por CLAE em pH 2,1; 7,0 e 8,0.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Os resultados obtidos demonstram o potencial da piperina como matéria-prima, 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 a esta amida natural.
- A metodologia de preparação do ácido piperínico, através da hidrólise básica da amida natural, bem como a preparação dos intermediários (**5a-5m**) e dos compostos triazólicos (**6a-6m**) utilizando irradiação na região de micro-ondas, otimizou a rota sintética utilizada, diminuindo os tempos reacionais. Nossos resultados evidenciaram a potencialidade deste tipo de abordagem em síntese orgânica, notadamente na síntese de compostos heterocíclicos.
- A metodologia sintética preconizada se mostrou aplicável à preparação dos novos heterocíclicos nitrogenados (**6a-6m**), e os produtos finais obtidos, bem como seus precursores, foram devidamente caracterizados através dos métodos convencionais de análise.
- Os treze derivados triazólicos preparados neste trabalho foram planejados com o objetivo de realizarmos um estudo sobre a relação existente entre a estrutura química e a atividade biológica para esta classe de compostos. Observamos para o derivado **6f** um bom perfil estrutural quanto à atividade tripanocida frente à epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Os resultados obtidos foram recentemente publicados em periódico especializado na área (FRANKLIM *et al.*, 2013).
- O estudo preliminar por CLAE do comportamento da piperina **1** e do derivado cicloexil-triazol (**6f**) sugeriram uma estabilidade primária dessas substâncias em diferentes faixas de pH, o que viabiliza suas administrações por via oral em ensaios *in vivo*.
- As investigações sobre os possíveis mecanismos de ação exercidos pelos derivados triazólicos no *Trypanosoma cruzi* estão em andamento. Um método analítico para avaliação do perfil lipídico de células de *T. cruzi* sem tratamento já foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa. Esta proposta tem como base o trabalho desenvolvido e validado por Pinto e colaboradores (PINTO *et al.*, 2011), que utilizaram CLAE com detecção de UV para o estudo do efeito da atividade de xantonas na biossíntese de esteróis de membrana, identificando e quantificando lanosterol e ergosterol em diferentes fungos.
- Os trezes compostos intermediários *N*-alquilidrazinacarbotoamidas (**5a-5m**) serão avaliados frente às formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. Na literatura encontramos relatos indicando atividade tripanocida de tiosemicarbazonas, triazol na forma acíclica, como novos agentes anti-*T. cruzi* (CAPUTTO *et al.*, 2011).
- Compostos triazólicos tem sido apresentados como agentes fungicidas eficientes, devido a isso, as moléculas heterocíclicas nitrogenadas (**6a-6m**) sintetizadas neste trabalho foram encaminhadas para avaliação de suas atividades antifúngicas contra agentes causadores de infecções oportunistas graves, como *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALELYUNAS, Y. W.; PELOSI-KILBY, L.; SPREEN, R. C. Application of an automated multi-pH and multi-temperature platform for accelerated solution stability testing in supporting drug discovery. **Analytical Methods**, v. 3, p. 2392-2399, 2011.
- ASSUMPÇÃO, R. M. V.; MORITA, T. Manual de Soluções, Reagentes e Solventes. Editora da Universidade de São Paulo, 1968.
- ATAL, C. K.; ZUTSHI, U.; RAO, P. G. Scientific evidence on the role of ayurvedic herbals on bioavailability of drugs. **J. Ethnopharm.** v. 4, n. 2, p. 229-232, 1981.
- ATAL, C. K., DUBEY, R. K., SINGH, J. Biochemical basic of enhanced drug bioavailability by piperine-evidence that piperine is a potent inhibitor of drug-metabolism. **The J. Pharm. Exp. Therap.** v. 232, n. 1, p. 258-262, 1985.
- BAE, G. S.; KIM, M. S.; JUNG, W. S.; SEO, S. W.; YUN, S. W.; KIM, S. G.; PARK, R. K.; KIM, E. C.; SONG, H. J.; PARK, S. J. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. **Eur. J. Pharmacol.** v. 642, p. 154-162, 2010.
- BANG, J. S.; OH, D. H.; CHOI, H. M.; SUR, B. J. ; LIM, S. J. ; KIM, J. Y. ; YANG, H. I. ; YOO, M. C. ; HAHM, D. H.; KIM, K. S. Antiinflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1^β-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. **Arthrit. Res. Ther.** v. 11, n. 2, p. 1-9, 2009.
- 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.** v. 4, n. 6, p. 615-617, 1991.
- BARBIERI-JUNIOR, E.; BARRETO-JUNIOR, C. B.; RIBEIRO, R. C.; OLIVEIRA, V. H. S.; LIMA, M. E. F.; MOYA-BORJA, G. E. Efeito inseticida de amidas naturais de piper e do derivado sintético tetraidropiperina sobre *Lucilia cuprina* (diptera:calliphoridae) e *Musca domestica* (diptera: muscidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 16, n. 2, p. 87-91, 2007.
- BHAT, B. G. ; CHANDRASEKHARA, N. Interaction of piperine with rat-liver microsomes. **Toxicology**, v. 44, n. 1, p. 91-98, 1987.
- BLOCK, J. H. Selective toxicity. Em: Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development. *John Wiley & Sons, Inc.*, 2010.
- BRENER, Z.; CANÇADO, J. R.; GALVÃO, L. M.; DA LUZ, Z. M. P.; FILARDI, L. S.; PEREIRA, M. E. S.; SANTOS, L. M. T.; CANÇADO, C. B. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 88, p. 149-53, 1993.
- BRENER, Z.; ANDRADE, A. Z.; BARRAL NETO, M. (Orgs) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Dias JCP. Epidemiologia. Editora Guanabara Koogan, 2 ed, p. 48-74, 2000.

BUCKNER, F. S. Sterol 14 α -demethylase inhibitors for *Trypanosoma cruzi* infections. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 625, p. 61-80, 2008.

BUXTOX, I. L. O.; BENET, L. Z. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, metabolism, and elimination. **Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics**, 12^a ed, p. 20-22, 2011.

CANSIZ, A.; OREK, C.; KOPARIR, M.; KOPARIR, P.; CETIN, A. 4-Allyl-5-pyridin-4-yl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione: Synthesis, experimental and theoretical characterization. **Spectrochimica Acta, Part A.** v. 91, p. 136-145, 2012.

CAPUTTO, M. E.; CICCARELLI, A.; FRANK, F.; MOGLIONI, A. G.; MOLTRASIO, G. Y.; VEGA, D.; LOMBARDO, E.; FINKIELSZTEIN, L. M. Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolyldrazone derivatives as anti-tripanosoma cruzi agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 155-163, 2012.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 161-218, 1909.

CHANDRASEKHAR, R. B.; JITHAN, A.; NARSIMHA, R. Y.; MALLA, R. V. Fabrication and investigation on hepatoprotective activity of sustained release biodegradable piperine microspheres. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 1, n. 1, p. 87-96, 2008.

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**, v. 64, p. 31-36, 1998.

CHEN, Z.; WU, J. B.; ZHANG, J.; LI, X. J.; SHEN, M. H. One step purification of piperine directly from *Piper Nigurm L.* by High Performance Centrifugal Partition Chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 44, n. 8, p. 1884-1893, 2009.

CHONPATHOMPIKUNLERT, P.; WATTANATHORN, J.; MUCHIMAPURA, S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. **Food Chem. Toxicol.** v. 48, p. 798-802, 2010.

CIÊNCIAS DA TERRA -
http://jcasocienciasdaterra.blogspot.com.br/2012_04_01_archive.html, acessado em 15 de dezembro de 2012.

COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 357-369, 2000.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Med. Chem. Res.** v. 18, n. 703, 2009.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

DA SILVA, E. N. J.; MENNA-BARRETO, R. F.; PINTO, M. C.; SILVA, R. S.; TEIXEIRA, D. V.; DE SOUZA, M. C.; DE SIMONE, C. A.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; PINTO, A. V. Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Med. Chem.** v. 43, n. 8, p. 1774-1780, 2007.

DANIELSON, P. B. The Cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. **Current Drug Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 561-597, 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**, v. 44, n. 3, p. 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. Manage. Sci.** v. 56, n. 2, p. 168-174, 2000.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**, Jhon Wiley & Sons: New York, 2002.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DNDi, Drugs for Neglected Diseases *initiative* - <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas.html>, acessado em 17 de maio de 2013.

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.** v. 46, n. 6, p. 557-560, 1996.

EMBRAPA - Amazônia Oriental. Sistema de Produção da Pimenta do Reino - <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/colheita.htm>. Acessado em 20 de maio de 2013.

EPSTEIN, W. W.; NETZ, D. F.; SEIDEL, J. L. Isolation of piperine from black pepper. **Journal of Chemical Education**, v. 70, n. 7, p. 598-599, 1993.

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

FERREIRA, W. S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; SARAIVA, V. B.; ALISSON-SILVA, F.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; ECHEVARRIA, A.; FREIRE-DE-LIMA, M. E. Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: Chemical antibiologic studies. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2984-2991, 2008.

FERREIRA, C.; SOARES, D. C.; BARRETO-JUNIOR, C. B.; NASCIMENTO, M. T.; FREIRE-DE-LIMA, L.; DELORENZI, J. C.; LIMA, M. E. F.; ATELLA, G. C.; FOLLY, E.; CARVALHO, T. M. U.; SARAIVA, E. M.; PINTO-DA-SILVA, L. H. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 2155, 2011.

FERREIRA, W. S.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; DE LIMA, M. E. F. Piperina, seus análogos e derivados: potencial como antiparasitários. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 208-224, 2012.

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. Enzyme Inhib. Med. Chem.** v. 13, p. 1-9, 1998.

FOTI, L.; FONSECA, B. P. F.; NASCIMENTO, L. D.; MARQUES, C. F. S.; SILVA, E. D.; DUARTE, C. A. B. Viability study of a multiplex diagnostic platform for Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 136-141, 2009.

FRANKLIM, T. N.; FREIRE-DE-LIMA, L.; DINIZ, J. N. S.; PREVIATO, J. O.; CASTRO, R. N.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; LIMA, M. E. F. Design, synthesis and trypanocidal evaluation of novel 1,2,4-triazoles-3-thiones derived from natural piperine. **Molecules**, v. 18, p. 6366-6382, 2013.

FREIRE-DE-LIMA, L.; RIBEIRO, T. S.; ROCHA, G. M.; BRANDÃO, B. A.; ROMEIRO, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; FREIRE-DE-LIMA, M. E.; CARVALHO, T. M. U.; HEISE, N. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. **Parasitol Res.** v. 102, p. 1059-1067, 2008.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=125>, acessado em 15 de maio de 2013.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>, acessado em 21 de maio de 2013.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=94>, acessado em 03 de maio de 2013.

<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1478&sid=32>, acessado em 21 de janeiro de 2013.

GARCIA, S.; RAMOS, C. O.; SENRA, J. F. V.; VILASBOAS, F.; RODRIGUES, M. M.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.49, n. 4, p. 1521-1528, 2005.

GEISLER, J. G.; GROSS, G. G. The biosynthesis of piperine in *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 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 *Entamoebahistolytica* *in vitro* and *in vivo*. **J. Ethnopharm.** v. 50, n. 3, p. 167-170, 1996.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

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-glutamyltranpeptidase activity, uptake of amino-acid and lipid-peroxidation. **Biochem. Pharmacol.** v. 43, n. 7, p. 1401-1407, 1992.

JOULE, J. A.; MILLS, K. Heterocycles in Medicine. Em Heterocyclic Chemistry, John Wiley& Sons, 5^a ed, p. 645-664, 2009.

KANAKI, N.; DAVE, M.; PADH, H.; RAJANI, M. A rapid method for isolation of piperine from the fruits of *Piper nigrum* L. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, n.3, p. 281-283, 2008.

KAPIL, A. Piperine: a potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. **Planta Medica**, v. 59, n. 5, p. 474, 1993.

KAPPE, C. O.; DALLUYER, D.; MURPHREE, S. S. **Practical microwave synthesis for organic chemists: Strategies, instruments and protocols**. Wiley – VHC, 2009.

KHALIL, N. S. A. M. Efficient synthesis, structure, and antimicrobial activity of some novel N- and S-β-D-glucosides of 5-pyridin-3-yl-1,2,4-triazoles. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2187–2199, 2006.

KHAN, O.; MARTINEZ, J. Spin-transition polymers: from molecular materials toward memory devices. **Science**. v. 279, n. 5347, p. 44-48, 1998.

KHAN, I.; ALI, S.; HAMEED, S.; RAMA, N. H.; HUSSAIN, M. T.; WADOOD, A.; UDDIN, R.; UI-HAQ, Z.; KHAN, A.; ALI, S.; CHOUDHARY, W. I. Synthesis, antioxidant activities and urease inhibition of some new 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 5200-5207, 2010.

KIM, K. J.; LEE, M. S.; JO, K.; HWANG, J. K. Piperidine alkaloids from *Piper retrofractum* Vahl. protect against high-fat diet-induced obesity by regulating lipid metabolism and activating AMP-activated protein kinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 411, n.1, p. 219-225, 2011.

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.** v. 8, n. 1, p. 251-268, 2000.

KUNORO, A. C.; SINGH, H.; HASAN, M. Solubility of piperine in supercritical and near critical carbon dioxide. **Chinese Journal of Chemical Engineering** , v. 17, n. 6, p. 1014-1020, 2009.

LACERDA, R. B.; SILVA, L. L.; LIMA, C. K. F.; MIGUEZ, E.; MIRANDA, L. P.; LAUFER, S. A.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Discovery of novel orally active anti-inflammatory *N*-phenylpyrazolyl-*N*-glycinylohydrazones that inhibit TNF- α production. **PLOS ONE**, v. 7, e46925, 2012.

LAMB, D. C.; KELLY, D. E.; WATERMAN, M. R.; STROMSTEDT, M.; ROZMAN, D.; KELLY, S. L. Characteristics of the heterologously expressed human lanosterol 14 α -demethylase (other names: P45014DM, CYP51, P45051) and inhibition of the purified human and *Candida albicans* CYP51 with azole antifungal agents. **Yeast**, v. 15, n. 9, p. 755-63, 1999.

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.** v. 53, n. 7, p. 832-835, 2005.

LEE, B. Y.; BACON, K. M.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet Infect. Dis.** v. 13, n. 4, p. 342 - 348, 2013.

LEPESHEVA, G. I.; WATERMAN, M. R. Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2060-2071, 2011.

LEPESHEVA, G. I.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Targeting *Tripanossoma cruzi* sterol 14 α -demethylase (CYP51). **Advances in Parasitology**, v. 75, 2011.

- LEPESHEVA, G. I.; OTT, R. D.; HARGROVE, T. Y.; KLESHCHENKO, Y. Y.; SCHUSTER, I. Sterol 14 α -Demethylase as a Potential Target for Antitrypanosomal Therapy: Enzyme Inhibition and Parasite Cell Growth. **Chemistry & Biology**, v. 14, p. 283–1293, 2007.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p.23-49,2005.
- LINDSTROM, P.; TIERNEY, J.; WATHEY, B.; WESTMAN, J. Microwave assisted organic synthesis – a review. **Tetrahedron**, v. 57, p. 9225-9283, 2001.
- 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.** v. 33, n. 23, p. 3883-3886, 1984.
- MAO, Q. Q.; XIAN, Y. F.; IP, S. P.; CHE, C. T. Involvement of serotonergic system in the antidepressant-like effect of piperine. **Prog. Neuro-Psychoph.** v. 35, p.1144-1147, 2011.
- MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry-Reactions: Mecanism and Structure.** *John Wiley & Sons.* 3^{ed.}: 388, 437, 435, 1095, 1099, 110 e 1101, 1985.
- MARQUES, J. V.; OLIVEIRA, A.; RAGGI, L.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal Activity of Natural and Synthetic Amides from *Piper* species. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 21, n. 10, p. 1807-1813, 2010.
- MARTINELLI, A.; RODRIGUES, L. A.; CRAVO, P. Plasmodium chabaudi: Efficacy of artemisinin + curcumin combination treatment on a clone selected for artemisinin resistance in mice. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 304-307, 2008.
- MATHEW, V.; KESHAVAYYA, J.; VAIDYA, V. P. Heterocyclic system containing bridgehead nitrogen atom: synthesis and pharmacological activities of some substituted 1, 2,4-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 1048-1058, 2006.
- MATSUDA H.; NINOMIYA, K.; MORIKAWA, T.; YASUDA, D.; YAMAGUCHI, I.; YOSHIKAWA, M. Hepatoprotective amide constituents from the fruit of *Piper chaba*: Structural requirements, mode of action, and new amides. **Bioorg. Med. Chem.** v. 17, p. 7313-7323, 2009.
- MAVROVA, A. Ts.; WESSELINOVA, D.; TSENOV, Y. A. DENKOVA, P. Synthesis, cytotoxicity and effects of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives on immunocompetent cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n.1, p. 63-69, 2009.
- MEANWELL, N.A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **J. Med. Chem.** v. 54, p. 2529–2591, 2011.

MOREIRA, A. A.; DE SOUZA, H. B.; AMANTO NETO, V.; PINTO, P. L.; TOLEZANO, J. E.; NUNES, E. V.; OKUMURA, M. Evaluation of the therapeutic activity of itraconazole in chronic infections, experimental and human, by *Trypanosoma cruzi*. **Ver. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 34, n. 2, p. 177-80, 1992.

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.** v. 107, p. 367-371, 1994.

MOTA, D. C. G. D.; PEREIRA, A. M. T. B.; ARAÚJO, S. M.; GOMES, M. L. Estresse e resiliência em doença de Chagas. Disponível em: http://pepsic.bvs-psi.org.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141303942006000300006&lng=pt&nrm=iso**2006**.

OLIVEIRA, C. S.; LIRA, B. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LORENZO, J. G. F.; ATHAYDE-FILHO, P. F. Synthetic approaches and pharmacological activity of 1,3,4-oxadiazoles: a review of the literature from 2000–2012. **Molecules**, v. 17, p. 10192-10231, 2012.

PADALKAR, K. V.; GALKAR, V. G. Extraction of piperine from *piper nigrum* (black pepper) by aqueous solutions of surfactant and surfactant plus hydrotrope mixtures. **Separation Science and Technology**, v. 43, n. 11-12, p. 3097-3118, 2008.

PARK L. 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.** v. 50, n. 7, p. 1866-1870, 2002.

PARKER, J. E.; WARRILOW, A. G. S.; COLLS, H. J.; MARTEL, C. M.; NES, W. D.; FRAAIJE, B. A.; LUCAS, J. A.; KELLY, D. E.; KELLY, S. L. Mechanism of binding of prothioconazole to *Mycosphaerella graminicola* CYP51 differs from that of other azole antifungals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1460-1465, 2010.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PERDERSEN, M. E.; METZLER, B.; STAFFORD, G. I.; VAN-STANDEN, J. A. K.; RASMUSSEN, H. B. Amides from *Piper capense* with CNS Activity – A Preliminary SAR Analysis. **Molecules**, v. 14, n. 9, p. 3833-3843, 2009.

PINTO, E.; AFONSO, C.; DUARTE, S.; VALE-SILVA, L.; COSTA, E.; SOUSA, E.; PINTO, M. Antifungal activity of xanthenes: evaluation of their effect on ergosterol biosynthesis by high-performance liquid chromatography. **Chem. Biol. Drug Des.** v. 77, p. 212-222, 2011.

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES -
<http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000651>, acessado em 15 de maio de 2013.

PORTAL DA SAÚDE – Aspectos epidemiológicos -
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454, acessado em 03 de novembro de 2012.

PORTAL DO GOVERNO DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO -
<http://www.es.gov.br/Noticias/154762/pimentadoreino-supera-produtos-tradicionais-em-exportacoes.htm>, acessado em 20 de maio de 2013.

POTTS, K. T. **The chemistry of 1,2,4-triazoles**, Department of Organic Chemistry, University of Adelaide, Adelaide, Australia, p. 87-127, 1960.

RAAY, B.; MEDDA, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BASU, M. K. Targeting of piperine intercalated in mannose-coated liposomes in experimental leishmaniasis. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 36, n. 4, p. 248-251, 1999.

RABINOVITCH, M. Leishmanicidal activity of amino acid and peptide esters. **Parasitol Today**. v. 5, n. 9, p. 299-301, 1989.

RAO, V. R. S.; SURESH, G.; RAO, R. R.; BABU, K. S.; CHASHOO, G.; SAXENA, A. K.; RAO, J. M. Synthesis of piperine-amino acid ester conjugates and study of their cytotoxic activities against human cancer cell lines. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 38, 2010.

RASSI-JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

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.** v. 46, n. 2, p. 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.** v. 58, n. 3, p. 165-173, 1997.

REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; PASSERINI, G. D.; BOLZANI, V. S.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 19, p. 199-203, 2009.

RIBEIRO, T. S. **Transformações químicas no alcalóide natural piperina e a avaliação da atividade tóxica sobre *Trypanosoma cruzi***. 2004. Dissertação (Mestre em Ciências, Química Orgânica) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Seropédica, Rio de Janeiro.

RIBEIRO, T. S.; LIMA, L. F.; PREVIATO, J. O.; PREVIATO, L. M.; HEISE, N.; LIMA, M. E. F. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 3555–3558, 2004.

ROMÃO, J. A.; BOCCARDO, L.; DE PAULA, V. F.; CHAGAS, R. J.; MOREIRA, B. O. Toxicidade de extratos de *Piper nigrum*, piperina e piperamidas para o diplópodo *Orthoporus fuscipes* em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 1, p. 33-38, 2008.

SANGWAN, P. L.; KOUL, J. L.; SURRINDER, K.; REDDY, M. V.; THOTA, N.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; KALIA, N. P.; QAZI, G. N. Piperineanalogues as potentstaphylococcus aureus NorAeffluxpumpinhibitors. **Bioorg. Med. Chem.** v. 16, p. 9847-9857, 2008.

SANTOS, A. P. Piperina: Modificações estruturais, síntese de análogos e Avaliação citotóxica. 1999. Dissertação (Mestre em Ciências, Química Orgânica) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Seropédica, Rio de Janeiro.

SEMLER, U.; GROSS, G. G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1566-1567, 1988.

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.** v. 37, n. 12, p. 979-984, 2002.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R. E.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 30, n. 2, p.129-135, 2009.

SILVA, Y. K. C.; AUGUSTO, C. V.; BARBOSA, M. L. C.; MELO, G. M. A.; QUEIROZ, A. C.; DIAS, T. L. M. F.; JÚNIOR, W. B.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; MOREIRA, M. S. A. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. **Bioorg. Med. Chem.** v. 18, p. 5007–5015, 2010.

SHOBA, G.; JOY, D.; THANGAM, J.; MAJEED, M.; RAGENDRAM, R.; SRINIVAS, P. S. R. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta medica**, v. 64, n. 4, p. 353-356, 1998.

SINGH, I. P.; JAIN, S. K.; KAUR, A.; SINGH, S.; KUMAR, R.; GARG, P.; ARORA, S. K. Synthesis and antileishmanial activity oh piperoyl-amino acid conjugates. **Eur. J. Med. Chem.** v.45, p. 3439-3445, 2010.

SRINIVASAN, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Critic. Rev. Food Sci.** v. 47, p. 735-748, 2007.

SUBRAMANIAN, R.; SUBBRAMANIYAN, P.; NOORUL, J. A.; RAJ, V. Double bypasses soxhlet apparatus for extraction piperine from *piper nigrum*. **Arabian Journal of Chemistry**, 2011, No prelo.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **J. Ethnopharmacol.** v. 90, p. 339-346, 2004.

TRON, G. C.; PIRALI, T.; BILLINGTON, R. A.; CANONICO, P. L.; SORBA, G.; GENAZZANI, A. A. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 2, p. 278-308, 2008.

UCHIYAMA, N. J. Antichagasic activities of natural products against *Trypanosomacruzi*. **Health Sci.** v. 55, n. 1, p. 31-39, 2009.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LIENDO, A.; LAZARDI, K.; PIRAS, M. M.; PEREZ, N.; WINCKER, P.; RYLEY, J. F. Cure of short- and long-term experimental Chagas disease using D0870. **Science**, v. 273, n. 5277, p. 969-71, 1996.

URBINA, J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v. 114, p. S91-S99, 1997.

URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. **J. Mol. Med.** v. 77, n. 3, p. 332-338, 1999.

URBINA, J. A.; LIRA, R.; VISBAL, G.; BARTROLÍ, J. In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the Protozoan Parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2498-2502, 2000.

URBINA, J. A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 733-741, 2001.

URBINA, J. A.; CONCEPCION, J. L.; RANGEL, S.; VISBAL, B.; LIRA, R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 125, p. 35-45, 2002.

URBINA, J. A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; LIRA, R.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 1, p. 39-48, 2003.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 311-318, 2009.

VAMVARKIDES, A. Effect of some GABA, glycine, or glutamic acid derivatives on the forced swimming test in mice. **Ann Pharm Fr**, v. 48, n.3, p. 154-159, 1990.

VEERAREDDY, P. R.; VOBALABOINA, V.; NAHID, A. Formulation and evaluation of oil-in-water emulsions of piperine in visceral leishmaniasis. **Die Pharmazie**, v. 59, n. 3, p. 194-197, 2004.

VERMA, V. C.; LOBKOVCSKY, E.; GANGE, A. C.; SINGH, S. K.; PRAKASH, S. Piperine production by endophytic fungus *Periconiasp* isolated from *Piper longum* L. **J. Antibiot.** v. 64, n. 6, p. 427-431, 2011.

VOGEL, A. I. **Química Orgânica- Análise Orgânica Qualitativa**, Ao Livro Técnico AS, 3ª edição, 1978.

WANG, X. L.; WAN, K.; ZHOU, C. H. Synthesis of novel sulfanilamide-derived 1,2,3-triazoles and their evaluation for antibacterial and antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4631-4639, 2010.

WHO (World Health Organization). Control of Chagas Disease, **Technical Report Series**, 905, 109, **2002**.

ZACHARIAH, T. J.; PARTHASARATHY, V. A. Em Chemistry of Spices; PARTHASARATHY, V. A.; CHEMPAKAM, B.; ZACHARIAH, T.J., eds; CAB International: Oxfordshire, cap. 2, 2008.

ANEXOS

(Artigo publicado durante a execução deste trabalho)

Design, Synthesis and Trypanocidal Evaluation of Novel 1,2,4-Triazoles-3-thiones Derived from Natural Piperine

Article

Design, Synthesis and Trypanocidal Evaluation of Novel 1,2,4-Triazoles-3-thiones Derived from Natural Piperine

Tatiany Nunes Franklim¹, Leonardo Freire-de-Lima², Julliana de Nazareth Sá Diniz², José Osvaldo Previato², Rosane Nora Castro¹, Lucia Mendonça-Previato² and Marco Edilson Freire de Lima^{1,*}

¹ Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 07, CEP: 23.890-000, Seropédica, RJ, Brazil;

E-Mails: tnfranklim@gmail.com (T.N.F.); nora@ufrj.br (R.N.C.)

² Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP: 21.941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

E-Mails: leolima@biof.ufrj.br (L.F.-L.); jullianawinners@gmail.com (J.N.S.D.); previato@biof.ufrj.br (J.O.P.); luciamp@biof.ufrj.br (L.M.-P.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: marco@ufrj.br; Tel./Fax: +55-21-2682-1872.

Received: 29 March 2013; in revised form: 16 May 2013 / Accepted: 21 May 2013 /

Published: 29 May 2013

Abstract: The work reported herein describes the synthesis and the assessment of the trypanocidal activity of thirteen new 1,2,4-triazole-3-thiones obtained from natural piperine, the main constituent of the dry fruits of *Piper nigrum*. It is part of a research program aiming to use abundant and easily available natural products as starting materials for the design and synthesis of new molecules potentially useful as antiparasitic drugs. The variously substituted triazole derivatives were synthesized from the natural amide in four steps with the use of microwave irradiation on overall yields ranging from 32% to 51%. The cyclohexyl substituted derivative showed the best trypanocidal profile on proliferative forms of *Trypanosoma cruzi* (Y strain), with IC_{50} s = 18.3 and 8.87 μ M against epimastigotes and amastigotes, respectively.

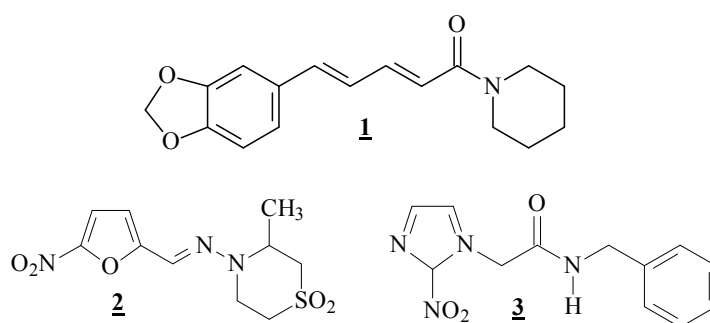
Keywords: *Trypanosoma cruzi*; *Piper nigrum*; antiparasitic drugs; bioisosterism; molecular hybridization

1. Introduction

Among the most important natural molecules that have had strong impact on human health during the last century we can mention quinine, extracted from *Cinchona officinales* (Rubiaceae) and penicillin, obtained from *Penicillium chrysogenum* (Trichocomaceae) through fermentation processes [1]. Another naturally occurring molecule of great importance is taxol, first isolated from *Taxus brevifolia* (Taxaceae). Taxol is an antitumor drug which has application in the treatment of various cancers such as ovarian, lung, melanoma and breast cancer [1]. Thus it may be seen that the natural products occupy a prominent position in drug development, mainly in the chemotherapy of infectious diseases and cancer [1–4].

When planning to use natural products as drugs or even as raw materials for drug synthesis, there is a limitation due to the fact that special metabolites of plant origin are biosynthesized in small quantities and, normally, isolated in a very laborious way [5]. Another significant limitation to the use of natural products in drug development is the fact that most of them are not obtained from sustainable sources [5]. Natural piperine (**1**, Figure 1) is an exception, due to its abundance and ease of isolation. Although found in different species of *Piper*, piperine is more abundant in the fruits of *Piper nigrum*, from where it can be extracted in yields of about 3%–7% [6,7]. *P. nigrum* sees widespread use in folk medicine in India and in Brazil, its main use being as a seasoning. Due to its great economic importance in different countries, including Brazil, nowadays large areas are cultivated with *Piper nigrum* [7,8]. The chemical composition of black pepper has motivated scientific studies for almost two hundred years since the first report describing the isolation of piperine from *P. nigrum* was published in 1819 by Hans Christian Oersted [8]. Various biological activities have been attributed to piperine, including insecticidal properties and inhibition of liver metabolism, stimulation of melanocyte proliferation, and antitumoral activity [7–10]. Piperine has been described as having toxic activity against different species of protozoa from the Trypanosomatidae family such as *Leishmania donovani* [11], *Leishmania amazonensis* [12], and *Trypanosoma cruzi* [13,14].

Figure 1. Chemical structures of piperine (**1**), nifurtimox (**2**) and benznidazole (**3**).



Despite the fact that neglected diseases, including tuberculosis, are responsible for 11.4% of the cause of all disabling clinical conditions in the World, only 21 (1.3%) of the 1,556 new drugs registered between 1,975 and 2,004 were developed specifically for the treatment of these infections [15]. These illnesses are known as neglected diseases due to the lack of investment from the pharmaceutical industry in the development of new drugs to treat the patients and also to the shortage of public policies aimed at their prevention [16]. The literature reports some studies concerning the development

of new molecules derived from natural products for the treatment of neglected diseases [17]. Our research group has been working during the last years on the discovery of new chemical entities that may be applicable to the treatment of leishmaniasis and Chagas' disease, using piperine as raw material [12–14,18].

Chagas' disease is an important parasitic infection, endemic in Latin America, which has the hemoflagelated protozoa *Trypanosoma cruzi* as its etiological agent [19,20]. This infection is normally transmitted by feces and urine of triatomine insects while blood feeding on a vertebrate host. The parasite has a complex life cycle with evolutive forms present in vertebrate and invertebrate hosts. The trypomastigote form when inside the insect differentiates into the epimastigote form and, after replication, reaches the posterior insect's intestinal tract, where it differentiates into the infective metacyclic trypomastigote form. When inside of vertebrate cells, the metacyclic trypomastigote form undergoes differentiation into amastigotes, which after several replicative cycles, cause the cell breakage, being released into the blood stream of the vertebrate where it differentiates into trypomastigotes, which are responsible for the dissemination of the infection [19]. According to the World Health Organization (WHO), some 10 million people are infected with the *T. cruzi*, mainly in Latin America, resulting in an estimated annual death toll of 10,000 [19,20]. Only two drugs are available for the treatment of Chagas disease: benznidazole (**2**) and nifurtimox (**3**) (Figure 1) [19,20]. These compounds are responsible for undesirable side effects, including anorexia, vomiting, peripheral polyneuropathy, and allergic dermatopathy. Another matter of great importance is that the efficacy of these drugs in the chronic phase of infection is still controversial [21]. Thus, considerable efforts have been directed to developing new chemotherapeutical agents for treating chagasic patients, especially using natural products as starting materials or even as a source of inspiration [10,22].

This work describes the synthesis and the evaluation of the trypanocidal activity of thirteen new 1,2,4-triazole-3-thiones **9a–9m** derived from natural piperine (**1**). The 1,2,4-triazole-3-thiones are five-membered heterocyclic rings present in the structure of numerous compounds with useful and wide-ranging biological activities, including antidepressant [23], antifungal [24], anti-inflammatory [25], antiviral [26] and antitumor effects [27].

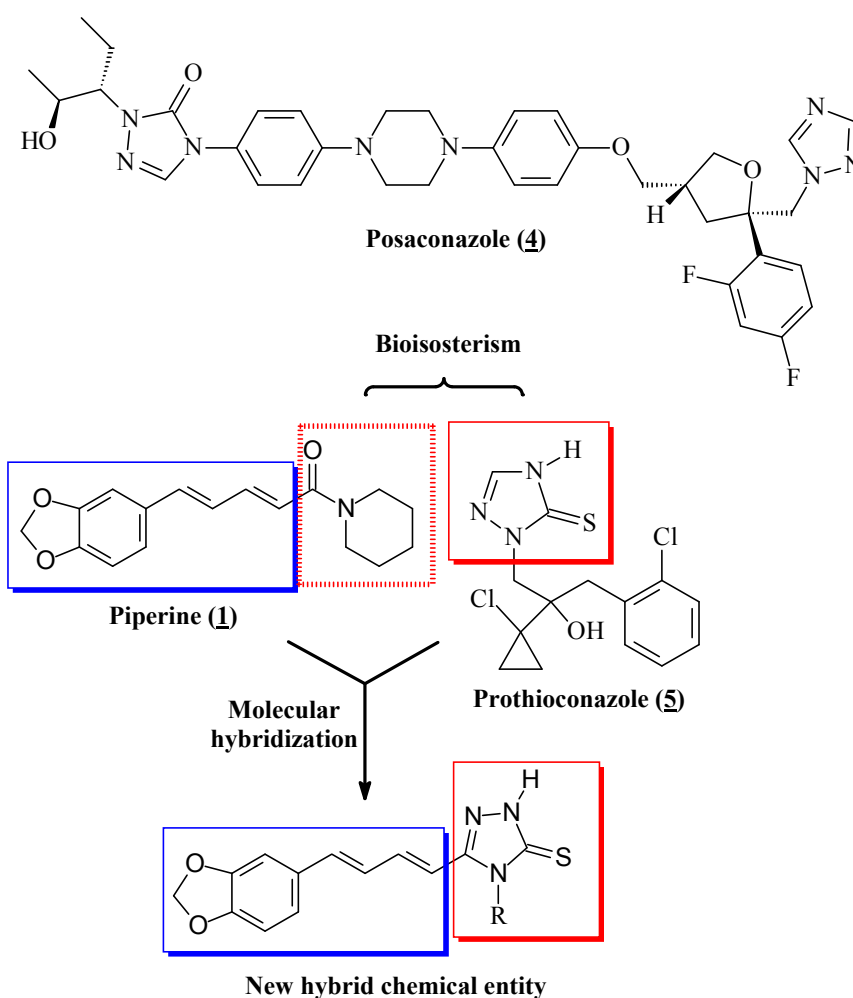
2. Results and Discussion

2.1. Chemistry

When planning new drugs as chemotherapeutic agents for infectious diseases it is necessary to have in mind the possible biochemical targets as well the differences between the parasite's and host's cells. Ergosterol is the major sterol component of fungi and also of the *T. cruzi* cell membranes. This lipid plays an important role in the regulation of membrane fluidity and integrity [28]. Azoles are a known class of inhibitors of the cytochrome P-450 dependent sterol 14 α -demethylase (CYP51) that promotes the 14 α -demethylation of lanosterol into ergosterol. The blockage of this biosynthetic pathway leads to the accumulation of toxic pre-ergosterol lipids in the parasite membrane compromising the cell viability [28]. Posaconazole (**4**, Figure 2) is an example of a broad spectrum anti-fungal azole that has been investigated with respect to its trypanocidal activity. The azole **4** is currently entering phase II clinical trials [29]. Another example of antifungal with the triazole moiety is the prothioconazole (**5**), a

1,2,4-triazole-3-thione and known inhibitor of 14α -demethylase, commercially available for the treatment of plant-pathogenic fungal infections [24]. The nitrogen-containing heterocyclics present in CYP51 inhibitors are important structural features for their coordination to the heme iron and stabilization of the complex enzyme-inhibitor [30]. Having this information in mind the molecular hybridization of piperine and the 1,2,4-triazole nucleus was planned [31], furnishing a series of new compounds where the N_4 -substituents the triazole ring were modified changing their electronic and lipophilic profiles in order to allow the investigation of the SAR (Figure 2). The molecular modification approach used on the designing the new derivatives was also based in the bioisosterism strategy [32], since there are different examples in the literature of the bioisosteric replacement of amides by five membered nitrogen-containing rings as triazole, thiadiazole and oxadiazole (Figure 2) [33].

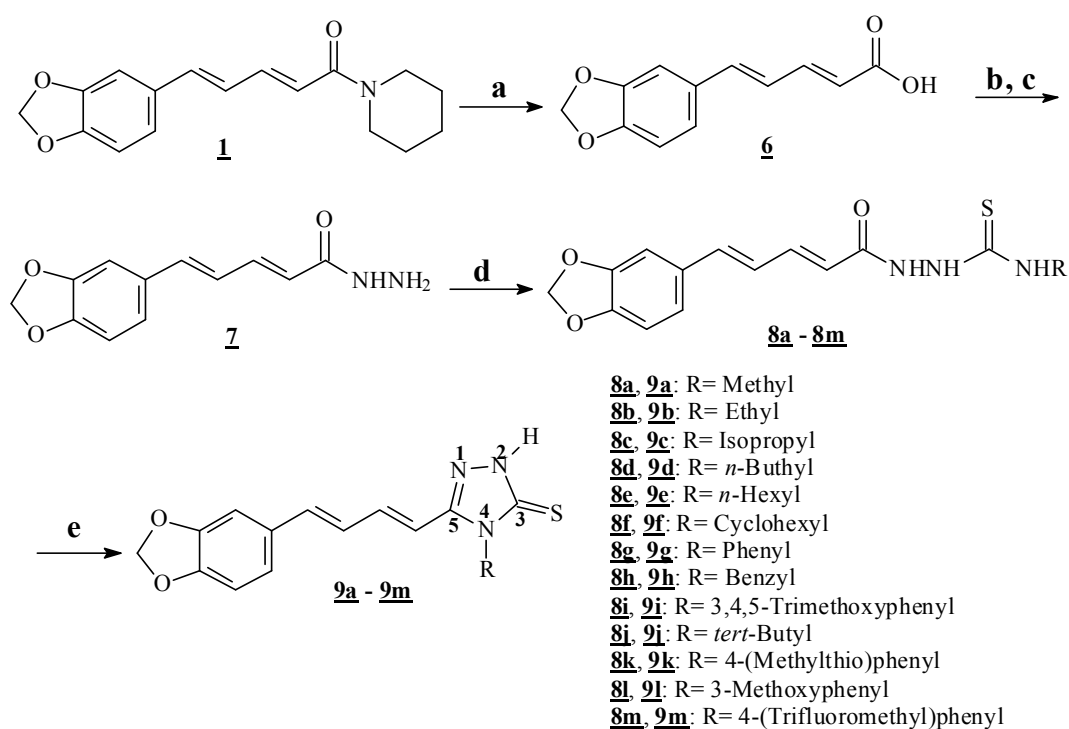
Figure 2. Strategies on the designing of new piperine-triazole hybrid.



Firstly, the isolation of suitable amounts of natural amide was carried out according to a previously described methodology [6]. As shown in Scheme 1, piperic acid (6) was obtained in excellent yield by basic hydrolysis of piperine (1). Originally this reaction was carried out in 24 h reflux [13], but after improvements on the experimental conditions it could be carried out in 1 h and with 80% yield in a microwave reactor in an open-vessel mode. Hydrazide 7 was prepared from the acid 6 after its reaction with oxalyl chloride [13,18], followed by the treatment of the acyl chloride intermediate with hydrazine monohydrate. The hydrazide 7 was the common intermediate for the preparation of allazole

derivatives by the reaction with different thioisocyanates, furnishing the carbothioamides **8a–8m** in good yields. These intermediates underwent basic promoted ring closure, generating the targeted triazoles (**9a–9m**) in moderate to good yields (Scheme 1). The literature describes that these reactions normally require conventional heating for several hours [34]. After some improvements in the experimental conditions, both reactions (preparation of carbothioamides and their ring closure to the corresponding triazoles) were conducted in a microwave reactor using water or ethanol as solvents, and resulting at reduced reaction times (30 min). Nowadays the principles of green chemistry are being observed in our laboratory, due to their growing importance, mostly for ecological and health reasons. Thus, chemical transformations have been conducted with the least expense of energy, decreased reaction times and, whenever possible, avoiding both the use of toxic solvents and harmful waste production [35].

Scheme 1. Preparation of new 1,2,4-triazole-2-thiones **9a–9m** from piperine (**1**).



Reaction conditions: (a) KOH, ethanol, mw, 1 h (80%); (b) (COCl)₂, 30 min, r.t.; (c) NH₂NH₂·H₂O, CH₂Cl₂, 0 °C to r.t. (71%); (d) suitable isothiocyanate, ethanol, mw, 30 min (65%–91%); (e) NaOH aq., mw, 30 min; then HCl aq. to pH 3.0 (62%–90%).

The physical and spectroscopical data for the compounds **7**, **8a–8m** and **9a–9m** are described herein (Experimental section), while the spectral characterization of the isolated natural amide **1** and piperic acid (**6**) has been described previously [36,37]. The ¹H-NMR analysis of the newly prepared triazoles **9a–9m** revealed characteristic absorptions assigned to the heterocyclic ring N-H protons at about δ 13 ppm that are quite different from absorptions assigned to the three different N-H protons present in the carbothioamides **8a–8m**, which showed signals between δ 7.65 to δ 10.24 ppm. The ¹³C-NMR spectra showed signals at about δ 168 ppm and δ 149 ppm, assigned to the two carbon atoms of heterocyclic ring (C₃ and C₄, respectively). The data observed in the high resolution mass spectra were consistent with the calculated values for the expected molecular formulas of the final products.

2.2. Biological Assays

All compounds were evaluated *in vitro* against the proliferative epimastigote form of Y strain *T. cruzi* having benznidazole (Bdz) as a control drug. The compounds **9c**, **9d**, **9e**, **9f** and **9m** which showed IC₅₀ values below 30 µM on epimastigotes were further selected for cell viability assays on peritoneal macrophages (Mø) from Balb/c mice. The Mø were treated with the selected compounds described above at the concentrations of 0.5, 1.0, 2.5 and 5 µg mL⁻¹. The number of viable cells was determined by a trypan blue dye exclusion assay after 72 h of treatment. In all the concentrations tested the five derivatives showed no significant toxicity on host cells, presenting cellular viability values ranging from 85% to 95%. The results obtained on the trypanocidal evaluation of the new triazoles are summarized in Table 1.

Table 1. Toxic effects of new triazoles (**9a–9m**) on proliferative forms of *T. cruzi*.

Triazoles	IC ₅₀ (µM)	
	Epimastigotes	Amastigotes
9a	44.2 ± 7.30	<i>nt</i>
9b	50.16 ± 10.79	<i>nt</i>
9c	26.98 ± 6.98	11.11 ± 1.26
9d	13.22 ± 3.64	≥15.17 **
9e	15.38 ± 4.47	≥13.98 **
9f	18.30 ± 5.21	8.87 ± 2.39
9g	38.96 ± 8.88	<i>nt</i>
9h	39.39 ± 6.88	<i>nt</i>
9i	35.30 ± 6.26	<i>nt</i>
9j	50.75 ± 10.63	<i>nt</i>
9k	40.75 ± 10.50	<i>nt</i>
9l	48.02 ± 6.06	<i>nt</i>
9m	18.46 ± 3.95	9.59 ± 2.87
Benznidazole *	2.20 ± 0.16	2.50 ± 0.21

Notes: * Reference drug; ** Maximum concentration allowed by trypan blue exclusion assay; *nt* = Not tested.

The *N*-alkyl-triazoles **9a** and **9b** had no important activity against the epimastigote form of *T. cruzi*, with IC₅₀ values of 44.2 and 50.16 µM, respectively. With increasing length of the alkyl chain, the *N*-alkyl derivatives (**9c–9f**) exhibited a higher activity activity on epimastigotes, suggesting that lipophilicity is an important parameter for the trypanocidal activity of this family of triazoles interfering, for example, with their ability to cross cell membranes. In the *N*-benzyl and *N*-aryl series, the triazoles **9g–9l** showed no significant activity. Only **9m**, which has a *para*-trifluoromethylaryl substituent at *N*-4 of the heterocyclic ring, showed an important toxic effect against epimastigotes. In the evaluation against amastigotes of *T. cruzi* the compounds **9c**, **9f** and **9m** showed similar trypanocidal effects, with IC₅₀ values of 11.11, 8.87 and 9.59 µM, respectively. The triazoles **9d** and **9e** showed higher IC₅₀ values on amastigotes. Among the thirteen new compounds prepared, the triazole **9f** (*N*-cyclohexyl derivative, Scheme 1) had the best trypanocidal profile, presenting IC₅₀ = 18.3 µM and 8.87 µM against epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Y strain), respectively.

3. Experimental

3.1. General

Melting points were determined on a Büchi B-510 apparatus and are uncorrected. The ^1H -NMR (500 MHz) and ^{13}C -NMR (125 MHz) spectra were recorded on a Bruker Ultrashield Plus Spectrometer (BrukerBioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) operating at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C . ^1H and ^{13}C -NMR shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) with respect to DMSO- d_6 (2.50 ppm for ^1H and 39.7 ppm for ^{13}C). Chemical shifts (δ) were reported in ppm and coupling constants (J) in Hertz [Hz]. Signal multiplicity was assigned as singlet (s), doublet (d), doublet of doublets (dd), triplet (t), quartet (q), multiplet (m) and broad signal (bs). The low-resolution mass spectra were carried out on a Shimadzu GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu Inc., Kyoto, Japan). Analytical conditions: Column: VF-5MS, 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm (Varian Inc., Santa Clara, CA, USA); Column temperature: 200 $^\circ\text{C}$ for one minute and then increasing to 290 $^\circ\text{C}$ at a rate of 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ and holding for 40 minutes; Injector temperature: 270 $^\circ\text{C}$. The high-resolution mass spectra were recorded with Q-TOF Micromass equipment (Waters, Milford, MA, USA). All the reactions involving microwave instrumentation used the Discover SP system (CEM Inc., Matthews, NC, USA) and were performed in open vessel mode. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on precoated silica gel plates (0.25 mm layer thickness) in an appropriate solvent and the spots were visualized under UV light (254 nm and 356 nm). The natural piperine (**1**) was extracted from powdered dry fruits of *P. nigrum* purchased from different sources on the market and presented physical and spectroscopic data consistent with that originally described [6,36,37]. The isolation method employed in this study was an adaptation of that previously reported [6].

3.1.1. Microwave-assisted Hydrolysis of Natural Piperine: Preparation of 1-[(2*E*,4*E*)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]piperidine (**6**)

A suspension of piperine (**1**, 2.20 g, 7.72 mmol) in an 20% (w/v) ethanolic solution of NaOH (22 mL) was placed in a 50 mL round bottom flask equipped with a magnetic stirring bar and a reflux apparatus. This suspension was then subjected to microwave irradiation (100 W) for 1 h in open vessel mode. The evolution of the reaction was monitored by TLC. At the end of the reaction the solvent was removed under reduced pressure and hot water was added to solubilize the carboxylate. The warm mixture was filtered and the resulting solution was acidified with concentrated HCl (37% w/v) until pH 3.0, whereupon the free acid precipitated as a yellow solid. After filtration the solid was washed twice with ice water. The acid **6** (1.37 g; 82%) was thus obtained as a yellow solid after recrystallization from ethanol and was characterized by its melting point, ^1H - and ^{13}C -NMR. All data were consistent with those previously reported in the literature [37].

3.1.2. Synthesis of (2*E*,4*E*)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienohydrazide (**7**)

Acid **6** (500 mg, 2.29 mmol) and oxalyl chloride (1.5 mL, 17.60 mmol) were added to a 10 mL round bottom flask equipped with a magnetic stirring bar, rubber septum and kept under a dry N_2 atmosphere. The resulting solution was subjected to stirring at room temperature for about 0.5 h. The

evolution of the reaction was accompanied by TLC (indirectly by the reaction of an aliquot with methanol leading to the spontaneous formation of the corresponding methyl ester). After the removal of excess oxalyl chloride the resulting residue was dissolved in dry dichloromethane (5 mL). The resulting solution was added dropwise to an ice-cooled mixture of hydrazine monohydrate (1.0 mL, 20.64 mmol) and dichloromethane (7 mL) placed in a 25 mL round bottom flask equipped with stirring bar, rubber septum and kept under a dry N₂ atmosphere. The reaction medium was allowed to reach room temperature (about thirty minutes) and then the solvent was removed under reduced pressure. The product precipitated with addition of ice water to the residue previously obtained and then was filtered, furnishing 375 mg (71% yield) of the hydrazide **7** as a yellow amorphous solid. m.p. = 237–239 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 9.30 (s, 1H, -NH-), 7.27 (d, 1H, *J* = 1.40 Hz), 7.19 (dd, 1H, *J* = 15.01 and 10.40 Hz), 7.00 (dd, 1H, *J* = 8.00 and 1.40 Hz), 6.86–6.97 (m, 3H), 6.05 (d, 1H, *J* = 15.10 Hz), 6.06 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 4.45 (s, 2H, -NH₂); ¹³C-NMR δ (ppm): 165.23, 148.43, 148.19, 139.38, 138.26, 131.27, 125.82, 123.13, 123.05, 108.93, 106.10, 101.75.

3.1.3. General Procedure for the Synthesis of Carbothioamides **8a** to **8m**

The suitable alkylisothiocyanates (0.517 mmol, 1.2 equiv.) were added to a suspension of hydrazide **7** (100 mg, 0.431 mmol) in ethanol (5 mL). The mixture was placed in a 10 mL round bottom flask equipped with a magnetic stirring bar and a reflux apparatus and then subjected to microwave irradiation (100 W) for 0.5 h in open vessel mode. The evolution of the reaction was monitored by TLC. After elimination of ethanol under reduced pressure and addition of water to the vessel the products were collected and recrystallized from ethanol. All compounds were characterized by ¹H- and ¹³C-NMR. The yields, melting points and spectral data observed for each carbothioamide **8a–8m** prepared are as follows:

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-methylhydrazinecarbothioamide (**8a**). Brown amorphous solid, yield 67%, m.p. = 195–196 °C (ethanol). ¹H-NMR δ (ppm): 9.89 (s, 1H, NH), 9.27 (s, 1H, NH), 7.98 (s, 1H, NH), 7.32 (s, 1H), 7.29 (dd, 1H, *J* = 14.98 and 10.56 Hz), 6.93–7.04 (m, 4H), 6.09 (d, 1H, *J* = 15.00 Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 2.87 (d, 3H, *J* = 15.00 Hz, -NH-CH₃); ¹³C-NMR δ (ppm): 165.65, 148.46, 141.37, 139.53, 131.20, 125.53, 123.51, 122.40, 108.96, 106.18, 101.81, 31.40.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-ethylhydrazinecarbothioamide (**8b**). Brown amorphous solid, yield 90%, m.p. = 192–193 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 9.86 (s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H, NH), 8.00 (t, 1H, *J* = 5.20 Hz, NH), 7.29 (d, 1H, *J* = 1.40 Hz), 7.25 (dd, 1H, *J* = 15.18 and 9.91 Hz), 7.00 (dd, 1H, *J* = 8.28 and 1.51 Hz), 6.91–6.99 (m, 3H), 6.08 (d, 1H, *J* = 15.30 Hz), 6.05 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 3.39–3.49 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₃), 1.05 (t, 3H, *J* = 7.00 Hz, -NH-CH₂-CH₃); ¹³C-NMR δ (ppm): 181.65, 165.61, 148.42, 141.35, 139.46, 131.16, 125.48, 123.38, 122.36, 108.94, 106.20, 101.76, 38.96, 14.87.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-isopropylhydrazinecarbothioamide (**8c**). Pale yellow amorphous solid, yield 66%, m.p. = 193–194 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 9.82 (s, 1H, NH), 9.16 (s, 1H, NH), 7.67 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz, NH), 7.31 (s, 1H), 7.26 (dd, 1H, *J* = 14.98 and 10.25 Hz),

6.93–7.03 (m, 4H), 6.10 (d, 1H, $J = 15.00$ Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 4.34–4.46 (m, 1H, -NH-CH-(CH₃)₂), 1.12 (d, 6H, $J = 6.60$ Hz, -NH-CH-(CH₃)₂); ¹³C-NMR δ (ppm): 165.49, 148.46, 141.20, 139.47, 131.22, 125.53, 123.48, 122.56, 108.96, 106.17, 101.81, 46.24, 22.39.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-butylhydrazinecarbothioamide (**8d**). Yellow amorphous solid, yield 87%, m.p. = 173–175 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 9.87 (s, 1H, NH), 9.19 (s, 1H, NH), 8.00 (s, 1H, NH), 7.33 (s, 1H), 7.27 (dd, 1H, $J = 14.82$ and 10.72 Hz), 6.94–6.98 (m, 2H), 7.02–7.30 (m, 2H), 6.10 (d, 1H, $J = 15.00$ Hz), 6.08 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 3.48–3.44 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.49 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.28 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 0.90 (t, 3H, $J = 6.90$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); ¹³C-NMR δ (ppm): 165.57, 148.46, 148.40, 141.27, 139.49, 131.22, 125.53, 123.49, 122.49, 108.96, 106.17, 101.81, 43.82, 31.39, 19.92, 14.31.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-hexylhydrazinecarbothioamide (**8e**). Yellow amorphous solid, yield 90%, m.p. = 165–167 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 9.86 (s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H, NH), 7.99 (s, 1H, NH), 7.32 (s, 1H), 7.26 (dd, 1H, $J = 14.98$ and 10.56 Hz), 6.93–7.02 (m, 2H), 7.03–7.24 (m, 2H), 6.11 (d, 1H, $J = 15.00$ Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 3.41–3.42 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.48–1.66 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.27–1.37 (m, 6H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 0.88 (t, 3H, $J = 5.00$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); ¹³C-NMR δ (ppm): 165.65, 164.17, 148.48, 141.35, 139.56, 131.30, 125.62, 123.57, 122.56, 109.04, 106.25, 101.88, 44.21, 31.62, 29.26, 26.48, 22.65, 14.50.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-cyclohexylhydrazinecarbothioamide (**8f**). Yellow amorphous solid, yield 91%, m.p. = 192–194 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 9.84 (s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H, NH), 7.65 (d, 1H, NH, $J = 2.52$ Hz), 7.32 (s, 1H), 7.25 (dd, 1H, $J = 14.98$ and 10.56 Hz), 7.03 (d, 1H, $J = 8.20$ Hz), 6.93–7.04 (m, 3H), 6.10 (d, 1H, $J = 15.13$ Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 4.07–4.19 (bs, 1H, -NH-CH-(CH₂-CH₂)₂-CH₂), 1.06–1.89 (m, 10H, -NH-CH-(CH₂-CH₂)₂-CH₂); ¹³C-NMR δ (ppm): 162.92, 148.39, 141.20, 139.46, 131.22, 125.54, 123.47, 122.55, 108.96, 106.17, 101.81, 53.37, 32.35, 25.67, 25.40.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-phenylhydrazinecarbothioamide (**8g**). Yellow amorphous solid, yield 87%, m.p. = 149–150 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 10.11 (s, 1H, NH), 9.74 (s, 1H, NH), 9.68 (s, 1H, NH), 7.44–7.48 (bs, 2H), 7.34–7.36 (m, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.27–7.33 (m, 1H), 7.16–7.18 (m, 1H), 6.84–7.04 (m, 4H), 6.15 (d, 1H, $J = 13.87$ Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-); ¹³C-NMR δ (ppm): 148.46, 141.32, 139.70, 139.54, 131.22, 130.43, 128.47, 126.47, 125.56, 123.51, 122.53, 108.97, 106.18, 101.81.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-benzylhydrazinecarbothioamide (**8h**). Yellow amorphous solid, yield 84%, m.p. = 196–197 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 9.98 (s, 1H, NH), 9.41 (s, 1H, NH), 8.59 (bs, 1H, NH), 7.32 (s, 1H), 7.29–7.32 (m, 5H), 7.24–7.27 (m, 1H), 6.94–7.04 (m, 4H), 6.11 (d, 1H, $J = 15.00$ Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 4.74 (d, 2H, $J = 5.30$ Hz); ¹³C-NMR δ (ppm): 165.71, 148.41, 141.37, 139.94, 139.56, 131.21, 128.51, 127.60, 127.08, 125.53, 123.51, 122.45, 108.97, 106.18, 101.82, 41.17.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-(3,4,5-trimethoxyphenyl) hydrazinecarbothioamide (**8i**). Pale yellow amorphous solid, yield 77%, m.p. = 189–191 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 10.08 (s, 1H, NH), 9.67 (s, 1H, NH), 9.60 (s, 1H, NH), 7.32 (s, 1H), 7.27–7.32 (m, 1H), 7.03 (dd, 1H, *J* = 7.88 and 1.26 Hz), 6.86–7.06 (m, 3H), 6.91 (s, 2H), 6.16 (d, 1H, *J* = 11.03 Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 3.76 (s, 6H), 3.66 (s, 3H); ¹³C-NMR δ (ppm): 153.79, 148.46, 148.42, 141.42, 139.59, 135.40, 135.07, 131.21, 125.55, 123.51, 122.43, 108.97, 106.19, 104.42, 101.81, 60.56, 56.31.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-*tert*-butylhydrazinecarbothioamide (**8j**). Yellow amorphous solid, yield 80%, m.p. = 135–136 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 10.18 (s, 1H, NH), 9.95 (s, 1H, NH), 9.15 (s, 1H, NH), 7.30 (s, 1H), 7.24–7.30 (m, 1H), 7.02 (dd, 1H, *J* = 8.16 and 1.38 Hz), 6.92–6.99 (m, 3H), 6.13 (d, 1H, *J* = 14.81 Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 1.46 (s, 9H, -C-(CH₃)₃); ¹³C-NMR δ (ppm): 178.73, 169.55, 148.44, 141.54, 139.58, 131.17, 125.50, 123.48, 121.91, 108.94, 106.14, 101.81, 53.19, 29.09.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-[4-(methylthio)phenyl] hydrazinecarbothioamide (**8k**). Yellow amorphous solid, yield 84%, m.p. = 175–177 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 10.24 (s, 1H, NH), 9.80 (s, 2H, NH), 7.55–7.64 (m, 1H), 7.55 (bs, 1H), 7.36–7.45 (m, 4H), 7.06–7.18 (m, 4H), 6.27 (d, 1H, *J* = 14.10 Hz), 6.20 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 2.65 (s, 3H, -S-CH₃); ¹³C-NMR δ (ppm): 148.48, 141.36, 139.57, 136.96, 131.24, 126.30, 125.57, 123.52, 122.53, 121.67, 108.99, 106.22, 101.83, 15.63.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-(3-methoxyphenyl) hydrazinecarbothioamide (**8l**). Dark green amorphous solid, yield 65%, m.p. = 174–175 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 10.09 (s, 1H, NH), 9.70 (s, 2H, NH), 7.32 (s, 1H), 7.22–7.38 (m, 3H), 6.93–7.08 (m, 5H), 6.74 (d, 1H, *J* = 8.03 Hz), 6.13 (d, 1H, *J* = 15.30 Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 3.75 (s, 3H); ¹³C-NMR δ (ppm): 181.15, 172.77, 164.55, 148.45, 141.33, 140.79, 139.54, 131.19, 131.13, 125.53, 123.50, 122.45, 118.68, 114.96, 111.62, 108.94, 106.15, 101.79, 55.54.

2-[(2E,4E)-5-(1,3-Benzodioxol-5-yl)penta-2,4-dienoyl]-N-[4-(trifluoromethyl)phenyl] hydrazinecarbothioamide (**8m**). Pale yellow amorphous solid, yield 83%, m.p. = 177–178 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 10.18 (s, 1H, NH), 10.15 (s, 1H, NH), 9.93 (s, 1H, NH), 7.69–7.80 (m, 4H), 7.33 (s, 1H), 7.27–7.34 (m, 1H), 6.93–7.08 (m, 4H), 6.16 (d, 1H, *J* = 14.80 Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-); ¹³C-NMR δ (ppm): 181.27, 164.55, 148.45, 143.54, 141.54, 139.69, 131.16, 130.10, 125.49, 124.81 (q, CF₃, *J*_{C-F} = 270 Hz), 123.53, 122.28, 121.60, 117.13, 108.94, 106.16, 101.80.

3.1.4. General Procedure to the Synthesis of Triazoles **9a** to **9m**

In a 10 mL bottom rounded flask equipped with a magnetic stirring bar and a reflux apparatus were placed the corresponding hydrazine carbothioamide **8a–8m** (1.37 mmol) and an aqueous solution of NaOH (2 mL, 1 equiv.). This mixture was then subjected to microwave irradiation (100 W) for 0.5 h in open vessel mode. The evolution of the reaction was monitored by TLC. Then the mixture was acidified with a 10% aqueous solution of HCl (w/v) until pH 3, filtered and the solids were washed twice with ice water (5 mL). After recrystallization from ethanol all the triazoles were characterized by NMR and low- and high-resolution mass spectra. All compounds were characterized by ¹H- and

^{13}C -NMR. The yields, melting points and spectral data observed for each carbothioamide **9a–9m** prepared are as follows:

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-methyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (9a). Brown amorphous solid, yield 71%, m.p. = 220–222 °C. ^1H -NMR δ (ppm): 13.78 (s, 1H, NH), 7.28 (dd, 1H, $J = 15.40$ and 11.00 Hz), 7.23 (s, 1H), 6.90–7.07 (m, 4H), 6.54 (d, 1H, $J = 15.40$ Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 3.39 (s, 3H, -N-CH₃); ^{13}C -NMR δ (ppm): 167.11, 150.15, 148.45, 148.24, 137.55, 137.02, 131.31, 126.50, 123.00, 113.95, 109.03, 105.91, 101.77, 30.40; MS (m/z): 287; HRMS (ES)- m/z : [M+H]⁺, found 288.0807. C₁₅H₁₅N₃O₂S requires 288.0806.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-ethyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (9b). Brown amorphous solid, yield 62%, m.p. = 208–209 °C. ^1H -NMR δ (ppm): 13.76 (s, 1H, NH), 7.28 (dd, 1H, $J = 15.30$ and 10.70 Hz), 7.20 (s, 1H), 6.88–7.07 (m, 4H), 6.57 (d, 1H, $J = 15.30$ Hz), 6.05 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 4.08 (q, 2H, $J = 7.03$ Hz, -N-CH₂-CH₃), 1.19 (t, 3H, $J = 7.03$ Hz, -NH-CH₂-CH₃); ^{13}C -NMR δ (ppm): 166.46, 149.55, 148.44, 148.23, 137.56, 137.21, 131.32, 126.50, 122.95, 113.50, 109.02, 105.90, 101.75, 38.33, 14.22; MS (m/z): 301; HRMS (ES)- m/z : [M+H]⁺, found 302.0963. C₁₅H₁₅N₃O₂S requires 302.0963.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-isopropyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (9c). Pale yellow amorphous solid, yield 90%, m.p. = 210–211 °C. ^1H -NMR δ (ppm): 13.78 (s, 1H, NH), 7.15–7.27 (m, 2H), 7.20 (s, 1H), 6.87–7.00 (m, 3H), 6.75 (d, 1H, $J = 15.00$ Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 5.09–5.14 (m, 1H, -NH-CH-(CH₃)₂), 1.47 (d, 6H, $J = 5.00$ Hz, -NH-CH-(CH₃)₂); ^{13}C -NMR δ (ppm): 166.46, 149.57, 148.46, 148.22, 137.23, 131.44, 126.77, 122.96, 114.55, 109.06, 105.84, 101.81, 46.61, 20.78; MS (m/z): 315; HRMS (ES)- m/z : [M+H]⁺, found 316.1120. C₁₆H₁₇N₃O₂S requires 316.1119.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-butyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (9d). Yellow amorphous solid, yield 71%, m.p. = 173–174 °C. ^1H -NMR δ (ppm): 13.78 (s, 1H, NH), 7.29 (dd, 1H, $J = 15.10$ and 11.00 Hz), 7.22 (s, 1H), 6.89–7.09 (m, 4H), 6.58 (d, 1H, $J = 15.10$ Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 4.04 (t, 2H, $J = 6.78$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.60–1.63 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.31–1.36 (m, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 0.93 (t, 3H, $J = 7.20$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); ^{13}C -NMR δ (ppm): 166.74, 149.79, 148.48, 148.27, 137.58, 137.17, 131.55, 125.53, 126.55, 123.06, 113.56, 109.06, 105.89, 101.81, 42.92, 30.87, 19.78, 14.12; MS (m/z): 329; HRMS (ES)- m/z : [M+H]⁺, found 330.1276. C₁₇H₁₉N₃O₂S requires 330.1276.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-hexyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (9e). Dark green amorphous solid, yield 79%, m.p. = 124–125 °C. ^1H -NMR δ (ppm): 13.77 (s, 1H, NH), 7.27–7.32 (m, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.89–7.06 (m, 4H), 6.57 (d, 1H, $J = 15.45$ Hz), 6.07 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 4.03 (t, 2H, $J = 7.57$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.62–1.64 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 1.27–1.30 (m, 6H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃), 0.84–0.90 (m, 3H, -NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); ^{13}C -NMR δ (ppm): 166.73, 149.79, 148.48, 137.58, 137.19, 131.35, 126.54, 123.06, 113.56, 109.07, 105.89, 101.81, 43.09, 31.26, 28.66, 26.06, 22.47, 14.36; MS (m/z): 357; HRMS (ES)- m/z : [M+H]⁺, found 358.1589. C₁₉H₂₃N₃O₂S requires 358.1589.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-cyclohexyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (**9f**). Yellow amorphous solid, yield 91%, m.p. = 192–194 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 13.76 (s, 1H, NH), 7.19 (d, 1H, *J* = 1.89 Hz), 7.19–7.24 (m, 1H), 7.11–7.17 (m, 1H), 6.99 (dd, 1H, *J* = 10.00 and 5.00 Hz), 6.93 (d, 1H, *J* = 8.20 Hz), 6.85 (d, 1H, *J* = 15.13 Hz), 6.75 (d, 1H, *J* = 14.50 Hz), 6.05 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 4.55–4.75 (bs, 1H, -NH-CH-(CH₂-CH₂)₂-CH₂), 1.33–2.08 (m, 10H, -NH-CH-(CH₂-CH₂)₂-CH₂); ¹³C-NMR δ (ppm): 166.63, 149.63, 148.47, 148.21, 141.20, 137.22, 131.45, 126.80, 122.97, 114.63, 109.06, 105.82, 101.81, 55.45, 32.35, 26.13, 24.87; MS (*m/z*): 355; HRMS (ES)-*m/z*: [M+H]⁺, found 356.1433. C₁₉H₂₁N₃O₂S requires 356.1432.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-phenyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (**9g**). Yellow amorphous solid, yield 89%, m.p. = 244–245 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 14.00 (s, 1H, NH), 7.58–7.65 (m, 3H), 7.44 (dd, 2H, *J* = 8.04 and 1.42 Hz), 7.20 (d, 1H, *J* = 1.58 Hz), 7.15 (dd, 1H, *J* = 15.00 and 10.00 Hz), 6.94–7.00 (m, 2H), 6.89 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz), 6.78 (d, 1H, *J* = 15.45 Hz), 6.04 (s, 2H, -O-CH₂-O-) 5.94 (d, 1H, *J* = 15.45 Hz); ¹³C-NMR δ (ppm): 168.03, 149.83, 148.25, 137.79, 137.37, 134.02, 131.31, 130.10, 129.06, 126.54, 123.29, 113.40, 108.93, 105.91, 101.75; MS (*m/z*): 349; HRMS (ES)-*m/z*: [M+H]⁺, found 350.0963. C₁₉H₁₅N₃O₂S requires 350.0963.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-benzyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (**9h**). Yellow amorphous solid, yield 76%, m.p. = 187–188 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 13.97 (s, 1H, NH), 7.37–7.40 (m, 2H), 7.28–7.32 (m, 3H), 7.21 (d, 1H, *J* = 1.26 Hz), 7.21–7.26 (m, 1H), 6.93 (d, 1H, *J* = 15.45 Hz), 6.93–6.99 (m, 2H), 6.85 (d, 1H, *J* = 15.45 Hz), 6.42 (d, 1H, *J* = 15.45 Hz), 6.06 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 5.35 (s, 2H); ¹³C-NMRδ (ppm): 167.49, 150.06, 148.30, 137.94, 137.38, 136.42, 131.24, 129.24, 128.21, 127.37, 126.35, 123.20, 113.40, 109.01, 105.95, 101.80, 45.92; MS (*m/z*): 363; HRMS (ES)-*m/z*: [M+H]⁺, found 364.1120. C₂₀H₁₇N₃O₂S requires 364.1119.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (**9i**). Pale yellow amorphous solid, yield 81%, m.p. = 242–243 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 13.94 (s, 1H, NH), 7.21 (d, 1H, *J* = 1.58 Hz), 7.17–7.22 (m, 1H), 7.03 (dd, 1H, *J* = 15.00 and 10.00 Hz), 6.96 (dd, 1H, *J* = 10.00 and 5.00 Hz), 6.90 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz), 6.81 (d, 1H, *J* = 15.00 Hz), 6.80 (s, 2H), 6.03 (d, 1H, *J* = 15.00 Hz), 6.04 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 3.80 (s, 6H), 3.78 (s, 3H); ¹³C-NMR δ (ppm): 168.01, 153.73, 150.06, 148.43, 148.22, 138.41, 137.58, 137.16, 131.39, 129.53, 126.74, 123.23, 113.65, 108.94, 106.85, 105.89, 101.75, 60.59, 56.77; MS (*m/z*): 439; HRMS (ES)-*m/z*: [M+H]⁺, found 440.1280. C₂₂H₂₁N₃O₅S requires 440.1280.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-tert-butyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (**9j**). Yellow amorphous solid, yield 50%, m.p. = 183–184 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 7.63 (s, 1H, NH), 7.22 (s, 1H), 6.84 (d, 1H, *J* = 15.06 Hz), 6.89–7.04 (m, 4H), 6.48 (d, 1H, *J* = 15.31 Hz), 6.06 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 1.36 (s, 9H, -C-(CH₃)₃); ¹³C-NMR δ (ppm): 161.97, 157.91, 148.42, 148.12, 136.76, 135.29, 131.41, 126.51, 122.87, 113.17, 109.00, 105.87, 101.76, 51.50, 28.79; MS (*m/z*): 329; HRMS (ES)-*m/z*: [M+H]⁺, found 330.1276. C₁₇H₂₀N₃O₂S requires 330.1276.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-[4-(methylthio)phenyl]-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (**9k**). Pale yellow amorphous solid, yield 75%, m.p. = 209–211 °C. ¹H-NMR δ

(ppm): 13.98 (s, 1H, NH), 7.47 (d, 2H, $J = 10.00$ Hz), 7.37 (d, 2H, $J = 10.00$ Hz), 7.20 (d, 1H, $J = 1.00$ Hz), 7.16–7.22 (m, 1H), 7.00 (dd, 1H, $J = 15.00$ and 10.00 Hz), 6.95 (dd, 1H, $J = 10.00$ and 5.00 Hz), 6.90 (d, 1H, $J = 8.03$ Hz), 6.81 (d, 1H, $J = 15.31$ Hz), 6.04 (s, 2H, -O-CH₂-O-), 5.95 (d, 1H, $J = 15.56$ Hz), 2.52 (s, 3H, -S-CH₃); ¹³C-NMR δ (ppm): 148.48, 141.36, 139.57, 136.96, 131.24, 126.30, 125.57, 123.52, 122.53, 121.67, 108.99, 106.22, 101.83, 15.63; MS (m/z): 396; HRMS (ES)- m/z : [M+H]⁺, found 396.0840. C₂₀H₁₈N₃O₂S₂ requires 396.0840.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-(3-methoxyphenyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (**9l**). Yellow amorphous solid, yield 80%, m.p. = 248–249 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 13.97 (s, 1H, NH), 7.53 (t, 1H, $J = 8.16$ Hz), 7.20 (d, 1H, $J = 1.51$ Hz), 7.13–7.18 (m, 2H), 7.04–7.05 (m, 1H), 6.95–6.99 (m, 3H), 6.90 (d, 1H, $J = 8.03$ Hz), 6.80 (d, 1H, $J = 15.56$ Hz), 5.97 (d, 1H, $J = 15.31$ Hz), 6.04 (s, 2H, -O-CH₂-O), 3.83 (s, 3H); ¹³C-NMR δ (ppm): 167.62, 160.36, 149.81, 148.40, 148.22, 137.71, 137.27, 135.00, 131.32, 130.87, 126.57, 123.23, 121.07, 115.74, 114.84, 113.42, 108.91, 105.88, 101.73, 56.01; MS(m/z): 379; HRMS (ES)- m/z : [M+H]⁺, found 380.1069. C₂₀H₁₈N₃O₃S requires 380.1068.

5-[(1E,3E)-4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)buta-1,3-dien-1-yl]-4-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione (**9m**). Brown amorphous solid, yield 70%, m.p. = 232–233 °C. ¹H-NMR δ (ppm): 14.09 (s, 1H, NH), 8.03 (d, 2H, $J = 8.53$ Hz), 7.75 (d, 2H, $J = 8.28$ Hz), 7.20 (d, 1H, $J = 1.51$ Hz), 7.13–7.18 (m, 1H), 6.95–7.00 (m, 2H), 6.90 (d, 1H, $J = 8.03$ Hz), 6.83 (m, 1H), 5.96 (d, 1H, $J = 15.31$ Hz), 6.04 (s, 2H, -O-CH₂-O-); ¹³C-NMR δ (ppm): 167.78, 149.61, 148.41, 148.27, 137.87, 137.70, 137.55, 131.29, 130.29, 130.30, 127.04 (q, $J_{C-F} = 270.00$ Hz) 127.19, 126.51, 123.26, 113.14, 108.93, 105.82, 101.75; MS(m/z): 417; HRMS (ES)- m/z : [M+H]⁺, found 418.0837. C₂₀H₁₅F₃N₃O₂S requires 418.0837.

3.2. Biological Assays

3.2.1. Parasites

Trypanosoma cruzi (Y strain) was obtained from the Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brazil) culture collection, and maintained in the Laboratory of Glycobiology (UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil) facilities. Epimastigote forms were maintained by weekly transfers at 28 °C in brain-heart-infusion (BHI) medium (Acumedia, Lansing, MI, USA), supplemented with 10 mg of hemin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 20 mg of folic acid L⁻¹ (Sigma) and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (BHI-FCS medium, Gibco, Grand Island, NY, USA). Tissue culture-derived trypomastigotes were obtained after infection of confluent monolayers of Vero cells (kidney epithelial cells extracted from African green monkeys) with blood trypomastigotes (Y strain) to establish the intracellular cycle and maintained in RPMI 1640 medium containing 10% FCS under an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. The tissue culture-derived trypomastigotes were used to infect *Mø* *in vitro* to evaluate the toxic effects of the drugs [14].

3.2.2. Anti-Epimastigote Effect

For evaluation of the anti-epimastigote effects, parasites (1×10^5 cells per mL) were subcultured in the absence or presence of different concentrations (0.5 to 25 µg.mL⁻¹) of the drugs **9a–9m**, from a

5 mg mL⁻¹ stock solution in DMSO (Sigma). The parasites were incubated in BHI-FCS medium with or without drugs in a final volume of 1.0 mL in 24-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland), and after 7 days, the toxic effects of the drugs were quantified by the direct count of the live epimastigotes in a Neubauer chamber [14]. Drug-free medium contained comparable final concentration of DMSO (0.05%) has been used as control.

3.2.3. Cytotoxicity to Macrophages

The evaluation of the toxic effects of the compounds was carried out as previously described [18]. Murine peritoneal M ϕ were seeded (1×10^6 cells per well) in 24-well plates with 1 mL of RPMI medium containing 10% FCS. The cells were allowed to attach for 24 h at 37 °C and then exposed for 72 h to the five compounds (**9c**, **9d**, **9e**, **9f** and **9m**) which showed highest activity against epimastigote forms (maximum final concentration of DMSO was 0.05%). The five drugs were assayed in increasing concentrations (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Afterwards, the cells were washed with PBS, and RPMI was added to the culture before the addition of vital dye trypan blue in a final concentration of 0.01%. The toxic effects of the drugs were monitored by the count of 200 cells in a Neubauer chamber where plasma membrane permeability was evaluated [13,18].

3.2.4. Anti-Amastigote Effect

Resident peritoneal M ϕ from non-infected BALB/c mice were harvested and cultured as described above. Adhered M ϕ were infected with *T. cruzi* trypomastigotes at a 10:1 parasite/macrophage ratio and incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 1 h. Subsequently, non-infective cells were removed by extensive washing with PBS, and the infected macrophage cultures were treated with increasing concentrations (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of the compounds **9c**, **9d**, **9e**, **9f** and **9m** which showed anti-epimastigote activity and non-toxic effects on M ϕ at the same concentrations assayed. After, monolayers were washed with PBS at 37 °C, fixed in methanol, and stained with Giemsa (Sigma). The amastigote survival was determined by the counting of 200 cells in triplicate, the percentage of infected cells was analyzed, as well as the number of amastigotes per macrophage and the endocytic index of the infected cells [13,18].

3.2.5. Statistical Analysis

The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) values shown in the Table 1 represent the mean of experiments carried out in triplicate. The IC₅₀ of all compounds were determined by linear regression analysis using the program IGOR Pro 2.03 (WaveMetrics, Inc, Lake Oswego, OR, USA).

3.2.6. Ethics Statement

All animal procedures were approved by the animal-care ethics committee of the Centro de Ciências da Saúde/UFRJ (License #DAHEICB 055) and were performed under the guidelines from SBCAL (Brazilian Society of Science in Laboratory Animals) and strictly followed the Brazilian law for Procedures for the Scientific Use of Animals (11.794/2008).

4. Conclusions

The results shown herein highlight the potential use of natural piperine as a precursor for new molecules suitable for the treatment of Chagas's disease. Through the use of bioisosterism and molecular hybridization as molecular modification strategies we were able to design and synthesize a new series of 1,2,4-triazole-2-thiones, derivatives of the natural amide piperine, which showed activity against proliferative forms of *T. cruzi*. The cyclohexyl triazole derivative **9f** showed the best activity profile, presenting $IC_{50} = 18.3$ and $8.87 \mu\text{M}$, against epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*, respectively, and low toxic effects on host cells (murine macrophages).

Acknowledgments

We thank CAPES for scholarship to T.N. Franklim. The authors are also grateful for financial supports from FAPERJ, CNPq, CAPES and PROCAD-NF. The authors wish to acknowledge Dr. Victor M. Rumjanek (UFRRJ) for reading the manuscripts.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Butler, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2141–2153.
2. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as Sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335.
3. Cragg, G.M.; Grothaus, P.G.; Newman, D.J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3012–3043.
4. Butler, M.S. Natural products to drugs: Natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 475–516.
5. Kolewe, M.E.; Gaurav, V.; Roberts, S.C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 243–256.
6. Ikan, R. *Natural Products: A Laboratory Guide*, 2nd ed.; Academic Press: London, UK, 1991.
7. Parmar, V.S.; Jain, S.C.; Bisht, K.S.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O.D.; Prasad, A.K.; Wengel, J.; Olsen, C.E.; Boll, P.M. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 597–673.
8. Zachariah, T.J.; Parthasarathy, V.A. Piper nigrum. In *Chemistry of Spices*, 1st ed.; Parthasarathy, V.A., Chempakam, B., Zachariah, T.J., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 2008; pp. 21–40.
9. Srinivasan, K. Black pepper and its pungent principle-piperine: A review of diverse physiological effects. *Critic. Rev. Food Sci.* **2007**, *47*, 735–748.
10. Ferreira, W.S.; Franklim, T.N.; Lopes, N.D.; Lima, M.E.F. Piperine, its analogues and derivatives: Potencial as antiparasitic drugs. *Rev. Virtual Quim.* **2012**, *4*, 208–224.
11. Kapil, A. Piperine: A potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. *Planta Med.* **1993**, *59*, 474.

12. Ferreira, C.; Soares, D.C.; Barreto-Junior, C.B.; Nascimento, M.T.; Freire-de-Lima, L.; Delorenzi, J.C.; Lima, M.E.F.; Atella, G.C.; Folly, E.; Carvalho, T.M.; *et al.* Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 2155–2164.
13. Ribeiro, T.S.; Freire-de-Lima, L.; Previato, J.O.; Mendonça-Previato, L.; Heise, N.; Lima, M.E.F. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3555–3558.
14. Freire-de-Lima, L.; Ribeiro, T.S.; Rocha, G.M.; Brandão, B.A.; Romeiro, A.; Mendonça-Previato, L.; Previato, J.O.; Lima, M.E.F.; Carvalho, T.M.; Heise, N.; The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. *Parasitol. Res.* **2008**, *102*, 1059–1067.
15. Chirac, P.; Torreele, E. Global framework on essential health R&D. *The Lancet* **2006**, *367*, 1560–1561.
16. Hunt, P. Neglected diseases: A human right analysis. World Health Organization (TDR). Available online: <http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/neglected-diseases-human-right-analysis/en/index.html> (accessed on 14 March 2013).
17. Ndjonka, D.; Rapado, L.N.; Silber, A.M.; Liebau, E.; Wrenger, C. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 3395–3439.
18. Ferreira, W.S.; Freire-de-Lima, L.; Saraiva, V.B.; Alisson-Silva, F.; Mendonça-Previato, L.; Previato, J.O.; Echevarria, A.; Lima, M.E.F. Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: chemical and biological studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2984–2991.
19. Clayton, J. Chagas disease 101. *Nature* **2010**, *465*, S4–S5.
20. World Health Organization, WHO, Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet N 340 (2012). Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> (accessed on 15 March 2013).
21. Castro, J.A.; Mecca, M.M.; Bartel, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum. Exp. Toxicol.* **2006**, *25*, 471–479.
22. Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B.P.; Veiga-Júnior, V.F.; Nakamura, C.V. Natural products and Chagas' disease: A review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 809–823.
23. Kane, J.M.; Dudley, M.W.; Sorensen, S.M.; Miller, F.P. 2,4-Dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thiones as potential antidepressant agents. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1253–1258.
24. Parker, J.E.; Warrilow, A.G.S.; Cools, H.J.; Martel, C.M.; Nes, W.D.; Fraaije, B.A.; Lucas, J.A.; Kelly, D.E.; Kelly, S.L. Mechanism of binding of prothioconazole to *Mycosphaerella graminicola* CYP51 differs from that of other azole antifungals. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 1460–1465.
25. Palaska, E.; Sahin, G.; Kelicen, P.; Durlu, N.T.; Altinok, G. Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. *Il Farmaco* **2002**, *57*, 101–107.
26. Küçükgülzel, I.; Tatar, E.; Küçükgülzel, S.G.; Rollas, S.; Clercq, E.D. Synthesis of some novel thiourea derivatives obtained from 5-[(4-aminophenoxy)methyl]-4-alkyl/aryl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thiones and evaluation as antiviral/anti-HIV and anti-tuberculosis agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 381–392.

27. Murty, M.S.R.; Ram, K.R.; Venkateswara, R.R.; Yadav, J.S.; Rao, J.V.; Velatooru, L.R. Synthesis of new S-alkylated-3-mercapto-1,2,4-triazole derivatives bearing cyclic amine moiety as potent anticancer agents. *Lett. Drug Design Discov.* **2012**, *9*, 276–281.
28. Lepesheva, G.I.; Villalta, F.; Waterman, M.R. Targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14 α -demethylase (CYP51). In *Advances in Parasitology*, Weiss, L.M., Tanowitz, H.B., Kirchhoff, L.V., Eds.; Elsevier Academic Press Inc.: San Diego, CA, USA, 2011; pp. 65–87.
29. Clayton, J. Chagas disease: Pushing through the pipeline. *Nature* **2010**, *465*, S12–S15.
30. Lepesheva, G.I.; Waterman, M.R. Sterol 14 α -demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2060–2071.
31. Viegas-Junior, C.; Danuello, A.; Bolzani, V.S.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A. Molecular hybridization: A useful tool in the design of new drug prototypes. *Chem. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1829–1852.
32. Lima, L.M.; Barreiro, E.J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23–49.
33. Meanwell, N.A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2529–2591.
34. Mavrova, A.T.; Wesselinova, D.; Tsenov, Y.A.; Denkova, P. Synthesis, cytotoxicity and effects of some 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives on immune competent cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 63–69.
35. Anastas, P. Twenty years of green chemistry. *Chem. Engene. News* **2011**, *89*, 62–65.
36. Araújo-Junior, J.X.; DaCunha, E.V.L.; Chaves, M.C.O.; Gray, A.J. Piperdardina, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 559–561.
37. Paula, V.F.; Barbosa, L.C.A.; Demuner, D.J.; Piló-Veloso, D.; Picanço, M.C. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. *Pest Manag. Sci.* **2000**, *56*, 168–174.

Sample Availability: Samples of the compounds **8a–8m** and **9a–9m** are available from the authors.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).