

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

DISSERTAÇÃO

**TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS NO ALCALÓIDE
NATURAL PIPERINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
TÓXICA SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI***

TATIANA SANTANA RIBEIRO

2004

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

**TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS NO ALCALÓIDE
NATURAL PIPERINA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
TÓXICA SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI***

TATIANA SANTANA RIBEIRO

Sob a Orientação do Professor

Marco Edilson Freire de Lima

Dissertação submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências, Área de
Concentração em Química Orgânica.

Seropédica, RJ

Junho de 2004

547.2

R484t

T

Ribeiro, Tatiana Santana, 1979-

Transformações químicas no alcalóide natural piperina e avaliação da atividade tóxica sobre *Trypanosoma cruzi* / Tatiana Santana Ribeiro. - 2004.

139[4]f. : il., graf.

Orientador: Marco Edílson Freire de Lima.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas.

Bibliografia: f. 131-138.

1. Síntese orgânica - Teses. 2. Piperacea - Análise - Teses. 3. Plantas - Efeito dos alcalóides - Teses. 4. Chagas, Doença de - Tratamento - Teses. I. Lima, Marco Edílson Freire de. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Exatas. III. Título.

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

TATIANA SANTANA RIBEIRO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Orgânica, como requisito parcial para a obtenção do grau de *Mestre em Ciência*, Química Orgânica, com área de concentração em Síntese Orgânica.

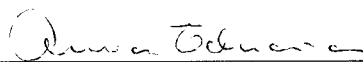
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29 DE JUNHO DE 2004.



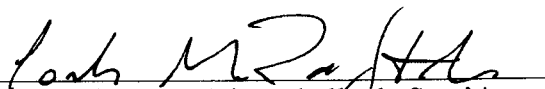
Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima
(DEQUIM-UFRRJ – Presidente/Orientador)



Prof. Dr. José Daniel Figueroa Villar
(IME-RJ)



Prof. Dra. Áurea Echevarria
(DEQUIM-UFRRJ)



Prof. Dr. Carlos Mauricio Rábello de Sant'Anna
(DEQUIM-UFRRJ – Suplente)

Aos meus queridos pais,
Antônio e Maria, pelo amor,
dedicação e apoio durante toda
a minha vida. Ao meu querido
irmão, Túlio, pelo carinho e
amizade. Dedico esta
dissertação a vocês.

Hoje levantei cedo pensando
no que tenho a fazer antes que
o relógio marque meia-noite.
É minha função escolher que
tipo de vida vou ter hoje.
Posso reclamar porque está
chovendo... ou agradecer às
águas por lavarem a poluição.
Posso ficar triste por não ter
dinheiro... ou me sentir
encorajado para administrar
minhas finanças, evitando o
desperdício.
Posso reclamar sobre minha
saúde... ou dar graças por estar
vivo.
Posso me queixar dos meus
pais por não terem me dado
tudo o que eu queria... ou
posso ser grato por ter
nascido.
Posso reclamar por ter que ir
trabalhar... ou agradecer por
ter trabalho.
Posso sentir tédio com as
tarefas de casa... ou agradecer
a Deus por ter um teto para
morar.
Posso lamentar as decepções
com os amigos... ou me
entusiasmar com a
possibilidade de fazer novas
amizades.
Se as coisas não saíram como
eu planejei, posso ficar feliz
por ter hoje para recomeçar.
O dia está na minha frente
esperando para ser o que eu
quiser.
E aqui estou eu, o escultor que
pode dar forma.
“Tudo depende só de mim”
(Charles Chaplin).

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Marco Edilson Freire de Lima, pela orientação, apoio, por todo amadurecimento científico que me passou e pela amizade.

Ao professor Dr. Norton Heise e ao aluno de mestrado Leonardo Freire de Lima (Laboratório de Glicobiologia, Departamento de Biofísica da UFRJ) pela realização dos ensaios biológicos e aos colegas que pertencem a mesma equipe pelo apoio dado durante este período de trabalho

Aos professores membros da banca examinadora pela leitura crítica e pela valiosa contribuição ao nosso trabalho

Ao professor Dr. José Carlos Neto, pela cessão do reagente DIBAL-H, que foi fundamental na preparação de alguns derivados, pela contribuição científica, pelo estímulo e principalmente pela amizade

A professora Dr.^a Rosane Nora pelo amadurecimento científico passado durante a fase experimental no laboratório, pela amizade e convívio

Aos professores Dr.^a Aurea Echevarria, Dr.^a Clarissa, Dr. João Neves, Dr. Maurício Sant'Anna, Dr. Aurélio B. Ferreira, Dr. Francisco, Dr. Mario, Dr. Anselmo, pela contribuição em minha formação e pela amizade

Aos amigos funcionários do Departamento de Química e do Instituto de Ciências Exatas, Fábio, Eli, Maurício, Osmar, Carlão, Sr. Oswaldo, André, Aldir, Conceição, Neli, Renato, Francis, Anselmo, Verinha, Aurea Tatagiba

Aos amigos Claudio, Rose e Julio pela força, união nos momentos difíceis, por todas as noites de estudo munidas de momentos de tensão e descontração que foram inesquecíveis e pelo convívio

Às amigas Grazielle e Regina pelo apoio, convivência, amizade, carinho, etc, etc, etc...

Aos amigos de laboratório Bruninho, Cléber, Breno, Rodrigo, Sarinha, Adriana e Sheila pelo convívio, enorme carinho, ajuda e incentivo.

Aos amigos da Pós-Graduação, Ildomar, Ari, Bauer, Luciano (“baiano”), Robson, Juliana, Marli, Cássia, Virgínia, Mário Sérgio, Pierre, Pilha, Silvana, Heloísa, Mirtes, Andressa, Viviane, Aline, Miguel, Cristian, Érika, Eliete, Kenia, Welisson, Rodney, Janaína, pelo convívio e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do alojamento feminino e masculino da Pós-Graduação pela maravilhosa convivência.

À amiga Patrícia Filteman (UFRJ) pelo grande apoio e contribuição nos momentos de sufoco, além da amizade.

Ao amigo Dario Júnior (IME) pela realização de alguns espectros de IV, imensa força e amizade.

A todos aqueles que participaram deste trabalho e na minha formação profissional direta e indiretamente e aos que não foram citados devido a minha fraca memória.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade.

A DEUS por tudo.

Muito obrigada.

SUMÁRIO

ÍNDICE.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ESQUEMAS.....	VII
LISTA DE ESPECTROS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS ESPÉCIES.....	2
1.2. OUTRAS AMIDAS NATURAIS RELACIONADAS À PIPERINA.....	5
1.3. PIPERINA – O ALCALÓIDE MAJORITÁRIO DE <i>PIPER NIGRUM</i> LINN.....	5
1.4. ESTUDO SOBRE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PIPERINA	6
1.4.1. APLICAÇÕES DA PIPERINA EM QUIMIOTERAPIA.....	8
1.5. BIOSÍNTESE DA PIPERINA.....	9
1.6. PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS COMO FONTES PARA PROTÓTIPOS DE FÁRMACOS.....	10
1.7. PRODUTOS NATURAIS COMO PRECURSORES EM SÍNTESE ORGÂNICA	15
1.8. TRABALHOS ENVOLVENDO MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NA PIPERINA	16
1.9. DOENÇA DE CHAGAS	20
1.9.1. TRATAMENTO	22
1.9.1.2. ALCALÓIDES ATIVOS EM <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	23
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
3.1. ESTRATÉGIAS EMPREGADAS NO TRABALHO DE MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E DE PREPARAÇÃO DE DERIVADOS	26
3.1.1. MODIFICAÇÃO NA CADEIA LATERAL	26
3.1.2. MODIFICAÇÕES NA FUNÇÃO AMÍDICA	27
3.1.2.1. FORMAÇÃO DAS AMIDAS 31, 42, 43, 44, 45 E DO ÉSTER 46	27
3.1.2.2. TRANSFORMAÇÃO DA PIPERINA EM AMINA ALÍLICA	28
3.2. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	29
3.2.1. ISOLAMENTO DA PIPERINA DOS FRUTOS DE <i>PIPER NIGRUM</i>	29
3.2.2. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS.....	32
3.2.2.1. REDUÇÃO CATALÍTICA DAS DUPLAS LIGAÇÕES PARA A OBTENÇÃO DA TETRAIDROPIPERINA	32
3.2.2.2. HIDRÓLISE ALCALINA DA PIPERINA	35
3.2.2.3. SÍNTESE DE DERIVADOS DA PIPERINA.....	37
3.2.2.4. REDUÇÃO DA CARBONILA DA PIPERINA PARA A FORMAÇÃO DA SUA RESPECTIVA AMINA ALÍLICA (47).....	42

3.2.2.5. SEQÜÊNCIA DE REAÇÕES ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DA PIPERETINA (3)	44
3.2.2.6. SEQÜÊNCIA DE REAÇÕES ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DOS DERIVADOS CINAMOIL PIPERIDIL (2) E CINAMOIL MORFOLIL (53).....	49
3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	51
5. MATERIAL E MÉTODOS	55
5.1. INSTRUMENTAL UTILIZADO NAS CARACTERIZAÇÕES ESPECTROMÉTRICAS:	55
5.2. NAS ANÁLISES, SÍNTESES E PURIFICAÇÕES	55
5.3. OUTROS EQUIPAMENTOS.....	56
5.4. ISOLAMENTO DA AMIDA PIPERIDIL DO ÁCIDO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2E-4E-PENTADIENÓICO (PIPERINA) (1).....	57
5.5. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS REALIZADAS NA PIPERINA.....	61
5.5.1. REDUÇÃO CATALÍTICA DA PIPERINA. PREPARAÇÃO DA TETRAIDROPIPERINA 40.....	61
5.5.2. HIDRÓLISE ALCALINA DA PIPERINA: PREPARAÇÃO DO ÁCIDO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2E, 4E-PENTADIENÓICO (ÁCIDO PIPERÍNICO 41).....	65
5.5.3. PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE AMIDAS E ÉSTERES A PARTIR DO ÁCIDO PIPERÍNICO	69
5.5.3.1. PREPARAÇÃO DA AMIDA MORFOLIL DO ÁCIDO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2E-4E-PENTADIENÓICO (42).....	70
5.5.3.2. PREPARAÇÃO DA AMIDA DIISOPROPIL DO ÁCIDO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2E-4E-PENTADIENÓICO (31).....	74
5.5.3.3. PREPARAÇÃO DA AMIDA VERATRIL DO ÁCIDO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2E-4E-PENTADIENÓICO (43).....	78
5.5.3.4. PREPARAÇÃO DA AMIDA BENZIL DO ÁCIDO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2E-4E-PENTADIENÓICO (44).....	82
5.5.3.5. PREPARAÇÃO AMIDA N-METIL-PIPERAZIL DO ÁCIDO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2E-4E-PENTADIENÓICO (45).....	86
5.5.3.6. PREPARAÇÃO DO ÉSTER CICLOEXIL DO ÁCIDO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2E-4E-PENTADIENÓICO (46).....	90
5.5.4. SÍNTESE DA 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-PENTA-2E,4E-DIENILPIPERIDINA (DIENAMINA) (47)	94
5.5.5. SEQÜÊNCIA PARA A SÍNTESE DA PIPERETINA (3).....	98
5.5.5.1. SÍNTESE DO 5-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2E-4E-PENTENOË (ÁLCOOL ALÍLICO 48) A PARTIR DO ÁCIDO PIPERÍNICO 41.....	98

5.5.5.2. SÍNTESE DO 5-(3,4-(METILENODIOXIFENIL)-2<i>E</i>-4<i>E</i>-PENTENAL (ALDEÍDO PIPERIDIL 49) A PARTIR DO ÁLCOOL ALÍLICO 48	102
5.5.5.2.1. PREPARAÇÃO DO MNO_2	102
5.5.5.2.2. PREPARAÇÃO DO ALDEÍDO (49)	103
5.5.5.3. REAÇÃO DE FORMAÇÃO DO ÉSTER ETÍLICO DO ÁCIDO 7-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2<i>E</i>,4<i>E</i>,6<i>E</i>- HEPTATRIENÓICO (PIPERETINOATO DE ETILA) (50)	107
5.5.5.4. HIDRÓLISE ALCALINA DO ÉSTER (50): SÍNTESE DO ÁCIDO 7-(3,4-METILENODIOXIFENIL)-2<i>E</i>,4<i>E</i>,6<i>E</i>-HEPTATRIENÓICO (ÁCIDO PIPERETÍNICO) (51)	111
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	131
ANEXOS	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Piperina, principal constituinte químico de <i>Piper nigrum</i> .	1
Figura 2: Área de cultivo da pimenta do reino.	2
Figura 3: Alguns alcalóides amídicos isolados de espécies de <i>Piper</i> .	4
Figura 4: Estrutura dos isômeros da piperina (14-16).	5
Figura 5: Algumas amidas presentes no extrato alcoólico de <i>P. nigrum</i> .	7
Figura 6: Estrutura química da quinina 19.	11
Figura 7: Estrutura química do taxol 20.	13
Figura 8: Estruturas químicas dos precursores do taxol.	14
Figura 9: Estrutura química do taxotere (docetaxel) 23.	14
Figura 10: Estruturas químicas de alguns salicilatos.	15
Figura 11: Estruturas químicas dos análogos sintetizados a partir da piperina que demonstraram maior efeito inibitório das oxidases estudadas.	17
Figura 12: Amidas <i>N,N</i> -dissubstituídas que demonstraram maior atividade inseticida sobre <i>A. monuste orseis</i> .	18
Figura 13: Exemplos de compostos modificados sinteticamente que apresentaram atividades biológicas mais relevantes.	19
Figura 14: Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	20
Figura 15: Localização da doença de Chagas.	21
Figura 16: vetor Barbeiro.	22
Figura 17: Fármacos de utilidade clínica reconhecida.	22
Figura 18: Alcalóides com atividade tripanocida.	24
Figura 19: Aparelhagem para extração da piperina de <i>Piper nigrum</i> .	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas atividades farmacológicas exibidas por espécies do gênero <i>Piper</i>	3
Tabela 2: Atividades biológicas de produtos de origem natural.....	16
Tabela 3: Deslocamentos químicos para os hidrogênios e carbonos da cadeia lateral da piperina (1) e da tetraidropiperina (40).....	33
Tabela 4: Dados de RMN 1H e de RMN 13C da piperetina 3, em comparação com a amida natural que pode ser isolada de <i>Piper nigrum</i> e <i>Piper aurantiacum</i>	48
Tabela 5: Valores de IC ₅₀ para a piperina, derivados e benzonidazol frente às formas epimastigotas e amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
Tabela 6: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a piperina.....	60
Tabela 7: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a tetraidropiperina.	64
Tabela 8: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o ácido piperínico.....	68
Tabela 9: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a amida morfóilil.....	73
Tabela 10: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a amida diisopropil.....	77
Tabela 11: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a amida veratril.....	81
Tabela 11: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a amida benzil.	85
Tabela 12: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a amida <i>N</i> -metil-piperazil	89
Tabela 14: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o éster cicloexil.	93
Tabela 15: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a dienamina.	97
Tabela 15: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o álcool alílico.....	101
Tabela 16: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o aldeído piperidil. ...	106
Tabela 17: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o piperetinoato de etila	110
Tabela 20: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o ácido piperetínico..	114
Tabela 19: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a piperetina.....	118
Tabela 20: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o ácido cinâmico.	122
Tabela 21: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o cinamoil piperidil. .	126
Tabela 22: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o cinamoil morfóilil...	130

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Proposta biossintética para a formação da piperina.	10
Esquema 2: Estratégicas de transformações na cadeia lateral.	27
Esquema 5: Reação de redução catalítica da piperina.	32
Esquema 6: Proposta de fragmentação para a tetraidropiperina 40.	34
Esquema 7: Hidrólise básica da piperina.	35
Esquema 8: Proposta de fragmentação para o ácido 41.	36
Esquema 9: Transformações realizadas através da formação do intermediário cloreto de ácido.	38
Esquema 10: Proposta de fragmentação para a amida morfolil 42.	39
Esquema 11: Proposta de fragmentação para a amida benzil 44.	40
Esquema 12: Proposta de fragmentação para o éster 46.	41
Esquema 13: Proposta de fragmentação para a amina alílica 47.	43
Esquema 14: Preparação da piperetina 3.	46
Esquema 15: Proposta de fragmentação da piperetina 3.	47
Esquema 16: Seqüência de preparação dos derivados cinâmicos.	49
Esquema 17: Proposta de fragmentação o derivado cinamoil piperidil 2.	50

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de IV da piperina.	58
Espectro 2: Espectro de massas da piperina.	58
Espectro 3: Espectro de RMN ¹ H da piperina.	59
Espectro 5: Espectro de IV da tetraidropiperina.	62
Espectro 6: Espectro de massas da tetraidropiperina.	62
Espectro 7: Espectro de RMN ¹ H da tetraidropiperina.	63
Espectro 8: Espectro de RMN ¹³ C da tetraidropiperina.	63
Espectro 9: Espectro de IV do ácido piperínico.	66
Espectro 10: Espectro de massas do ácido piperínico.	66
Espectro 11: Espectro de RMN ¹ H do ácido piperínico.	67
Espectro 13: Espectro de IV da amida morfolil.	71
Espectro 14: Espectro de massas da amida morfolil.	71
Espectro 15: Espectro de RMN ¹ H da amida morfolil.	72
Espectro 16: Espectro de RMN ¹³ C da amida morfolil.	72
Espectro 17: Espectro de IV da amida diisopropil.	75
Espectro 18: Espectro de massas da amida diisopropil.	75
Espectro 19: Espectro de RMN ¹ H da amida diisopropil.	76
Espectro 20: Espectro de RMN ¹³ C da amida diisopropil.	76
Espectro 21: Espectro de IV da amida veratril.	79
Espectro 22: Espectro de massas da amida veratril.	79
Espectro 23: Espectro de RMN ¹ H da amida veratril.	80
Espectro 24: Espectro de RMN ¹³ C da amida veratril.	80
Espectro 25: Espectro de IV da amida benzil.	83
Espectro 26: Espectro de massas da amida benzil.	83
Espectro 27: Espectro de RMN ¹ H da amida benzil.	84
Espectro 28: Espectro de RMN ¹³ C da amida benzil.	84
Espectro 29: Espectro de IV da amida <i>N</i> -metil-piperazil.	87
Espectro 30: Espectro de massas da amida <i>N</i> -metil-piperazil.	87
Espectro 31: Espectro de RMN ¹ H da amida <i>N</i> -metil-piperazil.	88
Espectro 33: Espectro de IV do éster cicloexil.	91
Espectro 34: Espectro de massas do éster cicloexil.	91
Espectro 35: Espectro de RMN ¹ H do éster cicloexil.	92
Espectro 36: Espectro de RMN ¹³ C do éster cicloexil.	92
Espectro 37: Espectro de IV da dienamina.	95
Espectro 38: Espectro de massas da dienamina.	95
Espectro 39: Espectro de RMN ¹ H da dienamina.	96
Espectro 40: Espectro de RMN ¹³ C da dienamina.	96
Espectro 41: Espectro de IV do álcool alílico.	99
Espectro 42: Espectro de massas do álcool alílico.	99
Espectro 43: Espectro de RMN ¹ H do álcool alílico.	100
Espectro 44: Espectro de RMN ¹³ C do álcool alílico.	100
Espectro 45: Espectro de IV do aldeído piperidil.	104
Espectro 46: Espectro de massas do aldeído piperidil.	104
Espectro 47: Espectro de RMN ¹ H do aldeído piperidil.	105
Espectro 48: Espectro de RMN ¹³ C do aldeído piperidil.	105

Espectro 49: Espectro de IV do piperetinoato de etila.....	108
Espectro 50: Espectro de massas do piperetinoato de etila.	108
Espectro 51: Espectro de RMN ¹ H do piperetinoato de etila.	109
Espectro 52: Espectro de RMN ¹³ C do piperetinoato de etila.	109
Espectro 53: Espectro de IV do ácido piperetínico.....	112
Espectro 54: Espectro de RMN ¹ H do ácido piperetínico.	113
Espectro 55: Espectro de RMN ¹³ C do ácido piperetínico.	113
Espectro 56: Espectro de IV da piperetina.....	116
Espectro 57: Espectro de massas da piperetina.	116
Espectro 58: Espectro de RMN ¹ H da piperetina.	117
Espectro 59: Espectro de RMN ¹³ C da piperetina.	117
Espectro 60: Espectro de IV para o ácido cinâmico.	120
Espectro 61: Espectro de massas para o ácido cinâmico.	120
Espectro 62: Espectro de RMN ¹ H para o ácido cinâmico.	121
Espectro 64: Espectro de IV do derivado cinamoil piperidil.....	124
Espectro 65: Espectro de massas do derivado cinamoil piperidil.....	124
Espectro 66: Espectro de RMN ¹ H do derivado cinamoil piperidil.....	125
Espectro 67: Espectro de RMN ¹³ C do derivado cinamoil piperidil.....	125
Espectro 68: Espectro de IV do derivado cinamoil morfolil.	128
Espectro 69: Espectro de massas do derivado cinamoil morfolil.	128
Espectro 70: Espectro de RMN ¹ H da amida cinamoil morfolil.....	129
Espectro 71: Espectro de RMN ¹³ C da amida cinamoil morfolil.	129

Abreviaturas e símbolos

Aromát.	Aromático
CCF	Cromatografia de Camada Fina
conj.	Conjugados(a)
d	dubleto
dd	duplo dubleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (Aumento da intensidade de Distorção por Transferência de Polarização)
di	dissubstituído
IV	Infra Vermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento em hertz
m	multiplete
pf	ponto de fusão
ppm	parte por milhão
q	q quarteto
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
s	singleto
t	tripleto
t.a.	temperatura ambiente
tri.	trissubstituído
UV	Ultra Violeta
IC ₅₀ :	Concentração Inibitória para 50%

RESUMO

Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa que tem como principal objetivo a utilização de produtos naturais abundantes na síntese de moléculas com potencial aplicação como drogas antiparasitárias. Aqui encontram-se descritos os resultados obtidos na avaliação da atividade tripanocida do alcalóide natural piperina, isolada dos frutos secos de *Piper nigrum*, e outros 12 derivados sintéticos sobre formas epimastigotas e amastigotas do protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da grave e incurável doença de Chagas (Tripanossomíase Americana). A piperina foi testada frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*, exibindo um efeito tóxico, dose-dependente, com valor de IC50 de 7,36 μ M. Este resultado nos estimulou a preparar uma série de derivados, visando determinar os fatores presentes na estrutura da piperina, responsáveis pela atividade tripanocida exibida. Os resultados obtidos demonstram que o produto natural e seus derivados podem ser considerados como promissores compostos-protótipo para o desenvolvimento de uma nova família de drogas, úteis na quimioterapia da doença de Chagas.

ABSTRACT

This work is part of a research program aiming at the use of abundant natural products in the synthesis of new molecules with potential application as antiparasitic drugs. We describe herein an evaluation of trypanocida effects of the natural alkaloid piperine (isolated from *Piper nigrum*) and twelve synthetic derivatives against epimastigote and amastigote forms of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of the incurable human disease, Chagas' disease. Piperine was tested against *T. cruzi* epimastigotes showing a dose-dependent toxicity, with IC₅₀ of 7.36 μ M. This preliminary result encouraged us to prepare a series of derivatives in order to determine the chemical features present in piperine responsible for the trypanocidal activity. The results obtained point to piperine and its derivatives as a suitable templates for the development of a new family of drugs with trypanocida activity.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O alcalóide amídico piperina **1** (*E,E*-1-*N*-piperoilpiperidina), é o principal constituinte químico de *Piper nigrum*, ocorrendo em maior proporção nos frutos da planta (Semler e Gross, 1988). *Piper nigrum* (popularmente conhecida como pimenta do reino) tem seu uso bastante difundido na medicina popular da Índia, país de onde é originária. No Brasil seu principal uso é como condimento na culinária. Apesar de ser considerada aqui uma planta exótica, o Brasil é um dos grandes produtores mundiais de pimenta do reino, destacando-se como principais produtores os estados do Pará e Espírito Santo (<http://www.brazilblackpepper.adm.br>).

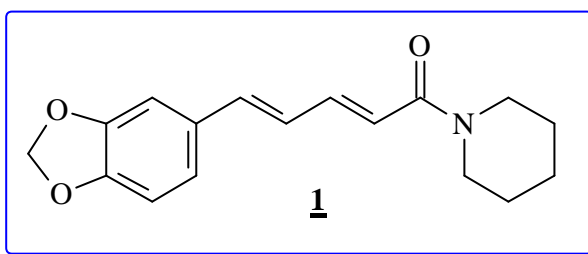


Figura 1: Piperina, principal constituinte químico de *Piper nigrum*.

Outro ponto relevante em relação a este produto natural é a sua abundância, sendo extraído com rendimentos de cerca de 3-7%, a partir dos frutos secos da planta (Ikan, 1991). Além disso, devido a maior abundância do alcalóide amídico nos frutos da planta, a pimenta do reino constitui-se como uma fonte renovável para esta substância, visto que com um manejo adequado pode-se realizar várias colheitas no ano, sem comprometer a planta (**Figura 2**, página 2).

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



Figura 2: Área de cultivo da pimenta do reino.

1.1. Atividades farmacológicas das espécies

Como mencionado, a utilização de espécies do gênero *Piper* com fins medicinais é prática comum nas culturas chinesa e indiana. Na China algumas prescrições recomendam o uso de *P. futokasura* no tratamento de arritmias cardíacas e da asma. Na Jamaica dores estomacais são tratadas com uma infusão de *P. aduncum* e *P. hispidum* (que também apresentam propriedades repelentes contra insetos). No México e Brasil usa-se *P. amalago* para aliviar dores estomacais e no combate a infecções. Na **Tabela 1** (página 3) estão sumarizadas algumas destas atividades farmacológicas exibidas por extratos alcoólicos de espécies do gênero *Piper* (Parmar *et al.*, 1997).

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

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

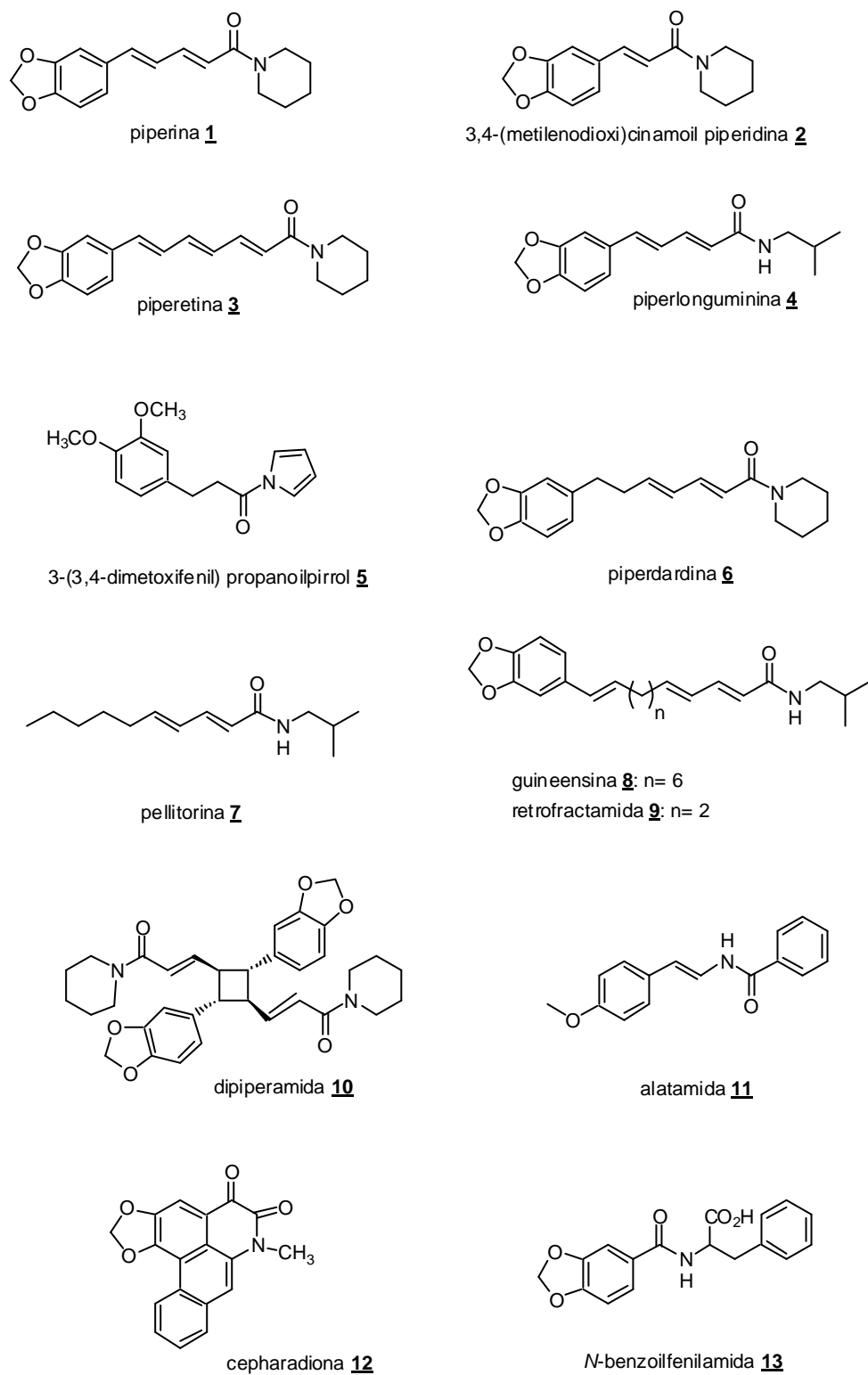


Figura 3: Alguns alcalóides amídicos isolados de espécies de *Piper* (Parmar et al., 1998 e 1997).

1.2. Outras amidas naturais relacionadas à piperina

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

1.3. Piperina – O alcalóide majoritário de *Piper nigrum* Linn

O alcalóide piperina é o isômero *trans-trans* de esqueleto 5-(3,4-metilendioxifenil)-2,4-dienoil-piperidina existindo ainda em menores proporções as formas *cis-trans* (isopiperina), *trans-cis* (isochavicina) e a *cis-cis* (chavicina) (**Figura 4**) (Semler e Gross, 1988). É responsável pelo sabor picante da pimenta do reino juntamente com a capsaicina (**Figura 5**, página 7). A piperina foi o primeiro alcalóide a ser isolado em espécies de *Piper* por Oerstedt em 1819, certamente devido à sua maior ocorrência, sendo que sua estrutura só foi determinada quase cem anos depois, por Landenburg e Scholtz (Epstein *et al.*, 1993).

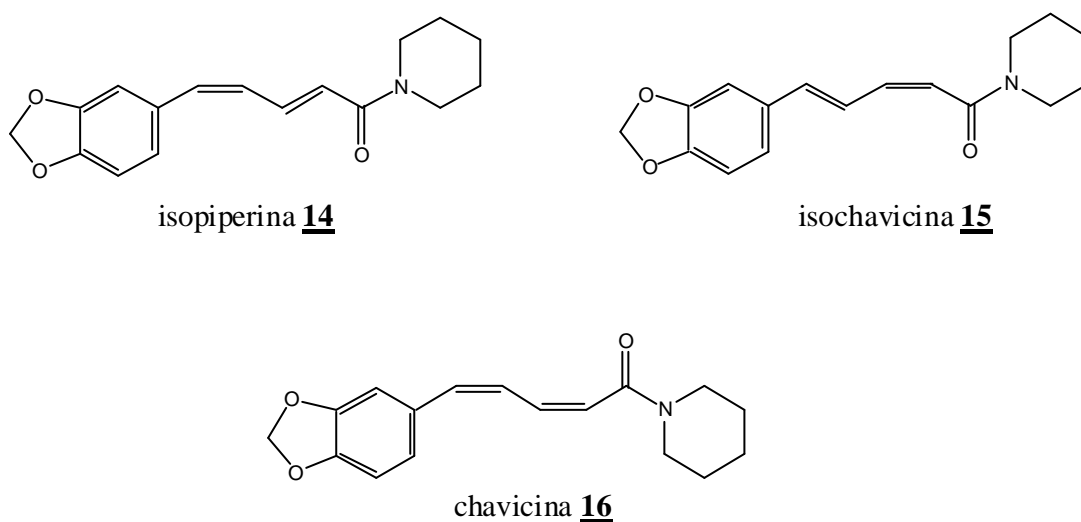


Figura 4: Estrutura dos isômeros da piperina (**14-16**).

A piperina é encontrada por toda a planta, sendo que em maior porcentagem nos frutos já secos. Seu isolamento foi descrito para todas espécies de *Piper*, além de *Piper nigrum* (Ahn *et al.*, 1992; Banerj e Nandi, 1988).

1.4. Estudo sobre atividades biológicas da piperina

A variedade de atividades biológicas exercidas pela piperina é bastante ampla. Tão antiga quanto a utilização de pimenta do reino como condimento é o conhecimento de suas propriedades inseticidas, que só foram cientificamente constatadas em 1924 por McIndoo e Sievers (Scott e Mckibben, 1978). Desde então, várias pesquisas seguiram-se com o intuito de identificar as substâncias responsáveis pela atividade inseticida. Os testes realizados com extratos alcoólicos de *P. nigrum*, mostraram haver um mecanismo sinérgico entre a piperina e outras amidas (Scott e Mckibben, 1978; Su, 1977). Tal observação foi mais tarde comprovada por Su e Horvat (Su e Horvat, 1981) que isolaram, identificaram e avaliaram o potencial inseticida de quatro amidas presentes no extrato alcoólico de *P. nigrum* contra gorgulhos. A guineensina foi a mais ativa das substâncias isoladas. No extrato bruto porém, possivelmente por uma interação com a piperina e a presença de outras amidas, a atividade inseticida foi maior. Recentemente foi avaliada a atividade inibidora de amidas isoladas de *Piper nigrum* contra larvas dos mosquitos *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* e *A. togoi*, que são vetores de diversas doenças infecciosas, com resultados extremamente interessantes (Park *et al.*, 2002).

Na China, o princípio pungente da pimenta do reino é indicado no tratamento da epilepsia desde tempos remotos (D'Hooger *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1984). Liu *et al.*, em estudo comparativo, mostraram que esta substância é capaz de induzir a síntese da serotonina prevenindo convulsões, porém menos eficientemente que seu análogo, a antiepilepsirina. D'Hoog *et al.*, verificaram que a piperina é capaz de proteger o sistema nervoso central (SNC) de apoplexias induzidas química ou eletricamente e que, além disso, atua como relaxante muscular. Outras ações da piperina sobre o SNC também foram observadas por outros pesquisadores. Takaki *et al.* mostraram que a piperina é capaz de influenciar na resposta contrátil ao estímulo do músculo mesentérico e na motilidade espontânea de íleo extraído de porcos da Guiné (Takaki *et al.*, 1990). Liu e Simon

analisaram as diferenças e similaridades das correntes elétricas produzidas nas células trigeminais de gânglios de ratos (Liu e Simon, 1996). Tais correntes foram induzidas por piperina, capsaicina e zingerona (**Figura 5**).

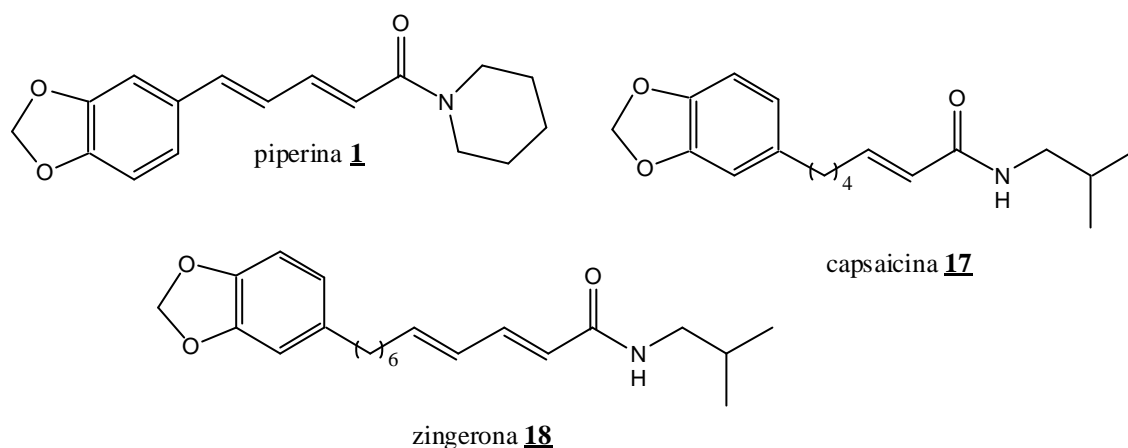


Figura 5: Algumas amidas presentes no extrato alcoólico de *P. nigrum*.

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 os medicamentos são co-administrados com a piperina, traduzindo-se numa maior concentração plasmática dos mesmos. Tal efeito foi constatado por Atal *et al.* em estudos com a vasicina e a esparteína (Atal *et al.*, 1981); por Bano *et al.*, com o propranolol, teofilina e a fenitoína (Bano *et al.*, 1991) e por Shoba *et al.* com a curcumina (Shoba *et al.*, 1998). Todos os trabalhos relatam um aumento de 100% (ou mais) na concentração de tais substâncias na corrente sanguínea. As razões levantadas para este efeito, segundo a maioria dos autores são:

? Alterações na permeabilidade das células epiteliais do trato gastro-intestinal, facilitando a absorção dos fármacos (Johri *et al.*, 1992);

? Influência na glicoronidação (etapa mais importante na biotransformação de compostos xenobióticos) (Renn *et al.*, 1993; Atal *et al.*, 1981);

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

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

1.4.1. Aplicações da piperina em quimioterapia

Na Índia, o uso de espécies de *Piper* no tratamento de doenças intestinais é bastante antigo. Isto estimulou a investigação da atividade antiparasitária de algumas destas espécies. Ghoshal comprovou a atividade antiamebíca de *P. longum*, relacionando esta atividade com a presença de piperina (Ghoshal *et al.*, 1996). Kapil relatou a atividade leishmanicida *in vitro* de piperina sobre cepas de *Leishmania donovani* (comparável à atividade exibida pela pentamidina, fármaco indicado para o tratamento da leishmaniose) (Kapil, 1993). Mais recentemente, Raay *et al.* (1999) descreveram os resultados obtidos com piperina em testes *in vivo* sobre animais infectados com *L. donovani*, observando a diminuição significativa da parasitemia com doses extremamente baixas.

Também foi observado que a piperina tem potencial antifúngico. Segundo Madhyastha e Bhat, a inibição do crescimento de *Aspergillus flavus* e da produção de aflatoxina em pimenta do reino deveu-se à ação combinada da piperina (1) e dos óleos essenciais de *P. nigrum* (Madhyastha e Bhat, 1984). Lee *et al.* descreveram a atividade antifúngica de amidas relacionadas à piperina sobre seis espécies de fungos fitopatogênicos (Lee *et al.*, 2001).

Piyachaturawat *et al.* verificaram que o uso prolongado de pimenta preta poderia resultar em concentrações tóxicas de piperina (Piyachaturawat *et al.*, 1983). Estes resultados incentivaram Dogra *et al.* a investigarem os efeitos imunotóxicos de piperina em camundongos. Foi observado que a piperina pode ser considerada como imunologicamente segura, não sendo observado nenhum efeito adverso nas doses testadas (Dogra *et al.*, 2003).

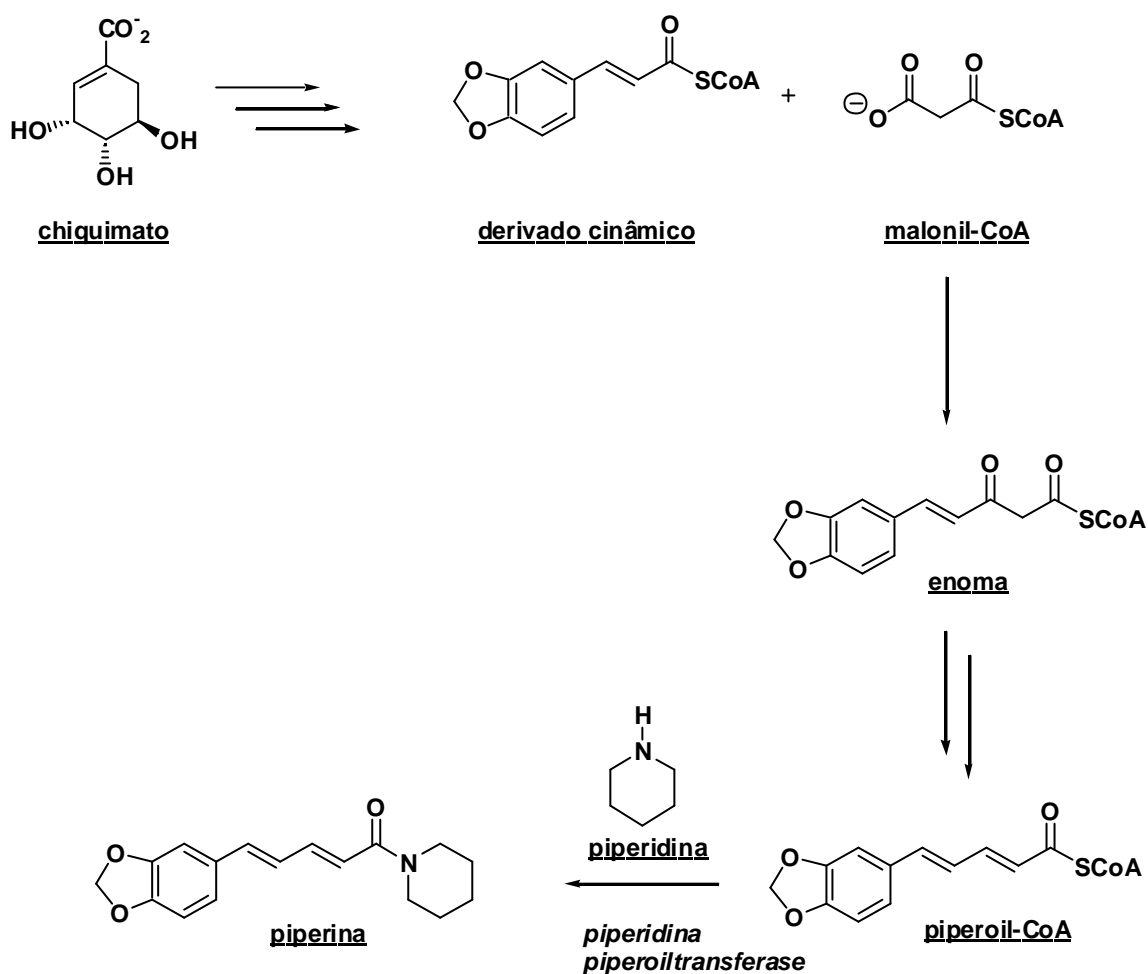
Recentemente Sunila *et al.* investigaram os efeitos da piperina como imunomodulador e a sua atividade antitumoral, e obtiveram resultados bastante interessantes. A piperina demonstrou potencial citotóxico *in vivo* em doses de 1,14 mg/Kg inibindo o crescimento de tumores sólidos (linfoma de Dalton) e levando ao aumento da sobrevida de camundongos

portadores de carcinoma de Elvilich em 58,8 %. Os imunomoduladores podem ser usados por um longo período e são aplicáveis na quimioterapia do câncer, associados a outros agentes quimioterápicos. A piperina parece combinar estes dois efeitos, tornando-se um protótipo para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer (Sunila e Kuttan, 2004).

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

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

Desde o início dos estudos biossintéticos da piperina foi proposto que sua formação dava-se por condensação da piperidina (esta é biossintetizada do aminoácido L-lisina), com o tioéster piperoil-CoA (**Esquema 1**). Geissman, na década de 70, propôs uma rota biossintética para a piperina que apenas a descoberta da enzima piperidina piperoiltransferase pôde confirmar (Geissman e Crout, 1969). Esta enzima mostrou-se específica para piperidina, alcançando 100% de atividade relativa (Geisler e Gross, 1990).



Esquema 1: Proposta biossintética para a formação da piperina.

1.6. Produtos naturais bioativos como fontes para protótipos de fármacos

Na pesquisa objetivando o desenvolvimento de fármacos, uma questão frequentemente vem à tona: como se origina ou se descobre um novo fármaco? A resposta, muitas vezes, diverge em dois extremos: “A pesquisa de fármacos é simplesmente um jogo de sorte” ou, “Novos fármacos podem ser agora racionalmente desenvolvidos com o emprego de técnicas computacionais” (Wiechert, 1992).

A descoberta de substâncias protótipo, ou seja, aquela que servirá como base para a síntese de análogos estruturais, constitui o primeiro passo para o desenvolvimento de um novo fármaco. Uma fonte explícita de substâncias protótipo é a natureza. Um dos primeiros fármacos que se originou de plantas foi a quinina **19** (**Figura 6**), extraída da árvore que depois foi classificada como *Cinchona officinalis*, e conhecida como quina. O pó do caule da quina-quina foi utilizado por cerca de 300 anos, quando em 1820, os professores Pierre Joseph Pelletier e Joseph Caventou, ambos da Escola de Farmácia de Paris, isolaram a quinina do pó do caule da quina-quina, passando-se a utilizá-la, ao invés do pó da planta (Agosta, 1997).

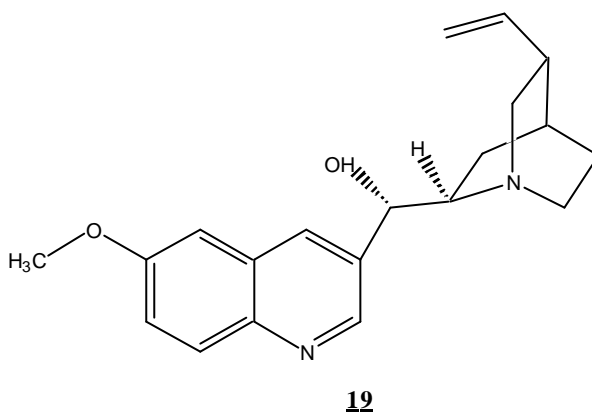


Figura 6: Estrutura química da quinina **19**.

Há muito tempo o homem aprendeu a utilizar as substâncias naturais, principalmente as de origem vegetal, para tratar suas doenças. Embora mais recentemente a procura por substâncias farmacologicamente ativas tenha aumentado consideravelmente, com a síntese de milhares de novos compostos, muitos deles promissores em termos farmacológicos, a busca por substâncias naturais bioativas ainda desperta grande interesse.

Plantas, organismos marinhos e microrganismos produzem o maior arsenal de diversidade estrutural em substâncias químicas, portanto possuem um grande potencial biológico (Petsko, 1996). Os produtos naturais continuam a ser procurados pelas indústrias agroquímicas e farmacêuticas como fontes de novas substâncias ativas, apesar de todo avanço no planejamento racional de fármacos, síntese química e química combinatória (Harvey, 2000).

Por outro lado, a biologia molecular, juntamente com o desenvolvimento da indústria química, fez com que o século XX fosse marcado por um impressionante arsenal de novas substâncias bioativas de origem sintética (Wiechert, 1992).

Os produtos naturais desempenham quatro papéis na medicina moderna (Demain, 1999):

- i) fornecem um grande número de fármacos úteis, para os quais a síntese comercial é difícil ou inviável (ex: morfina, taxol);
- ii) podem servir de compostos básicos que são modificados para aumentar a atividade ou diminuir a toxicidade (ex: hidromorfina a partir da morfina)
- iii) constituem protótipos ou modelos para fármacos sintéticos que possuem atividades fisiológicas similares às originais (ex: propoxifeno a partir da morfina);
- iv) alguns produtos naturais sem atividade podem ser modificados por métodos químicos ou biológicos para a produção de fármacos potentes, que não são obtidos facilmente por outros métodos (ex: obtenção do taxol a partir de bacatina III).

De fato, o início da síntese orgânica foi, talvez, estabelecido a partir da síntese da uréia, pelo químico alemão Wohler, 1807, onde foi derrubada a crença de que o homem não poderia sintetizar substâncias orgânicas (Schenkel *et al.*, 1999).

Dessa forma, as pesquisas avançam no sentido, também, de descobrir e/ou modificar um fármaco, no intuito de se obter melhor tolerância, utilização de menores doses, uso de dose diária com reduzidos efeitos colaterais.

Nos séculos antes da medicina moderna, da química sintética e da indústria farmacêutica, praticamente todos os medicamentos vinham das plantas. Hoje, mais de três bilhões de pacientes do terceiro mundo, sem acesso aos modernos fármacos sintéticos, dependem ainda de “medicamentos naturais”. A medicina tradicional, baseada no uso de plantas medicinais, ainda é cultivada na China e no Brasil, freqüentemente longe da tecnologia industrial. Por outro lado, a medicina ocidental explora espécies botânicas medicinais com considerável sucesso. Pesquisas nesse sentido são responsáveis, por exemplo, pela descoberta do taxol **20** (**Figura 7**, página 13), uma substância oriunda do caule de *Taxus brevifolia*, utilizada na quimioterapia do câncer (Schenkel *et al.*, 1999).

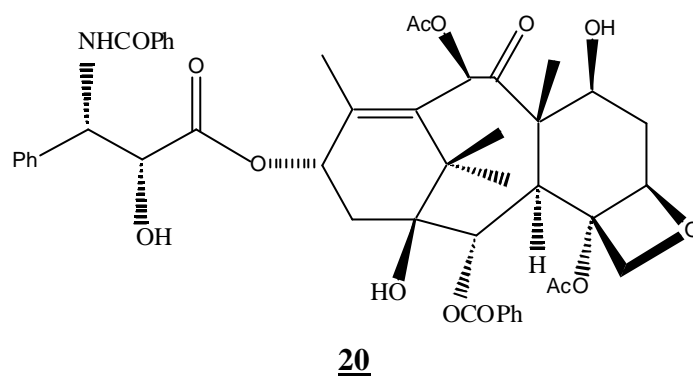


Figura 7: Estrutura química do taxol **20**.

O taxol é um exemplo marcante da utilização de produtos naturais como fármacos ou protótipos, e foi recentemente liberado para uso clínico contra câncer com o nome de Paclitaxel (Barreiro *et al.*, 1999).

Estima-se o consumo de *ca.* 230 kg/ano de taxol **20** para suprir as necessidades clínicas de pacientes com câncer (Corrêa, 1995). Uma vez que o taxol **20** é extraído das cascas de *Taxus brevifolia* (rendimento de 40 a 165 mg/kg de cascas secas), é necessário o corte da árvore para a extração do produto natural, tornando inviável sua obtenção por extração. Para a realização de estudos farmacológicos, por exemplo, 3000 árvores foram destruídas para a obtenção de 1kg de taxol **20** (Corrêa, 1995).

A síntese orgânica constitui uma alternativa viável para a obtenção do taxol **20**. O Paclitaxel foi obtido por semi-síntese pela primeira vez por Denis e colaboradores (1988), a partir da desacetilação da bacatina **21** (**Figura 8** página 14), precursor isolado de *Taxus baccata*, obtendo-se a desacetil-10-bacatina III **22** (**Figura 8**, página 14), precursor do taxol **20**. Por síntese total, o taxol **20** foi obtido no mesmo período por Holton *et al.* (1994a, 1994b) e Nicolaou *et al.* (1994) (Barreiro *et al.*, 1999; Kusama *et al.*, 2000).

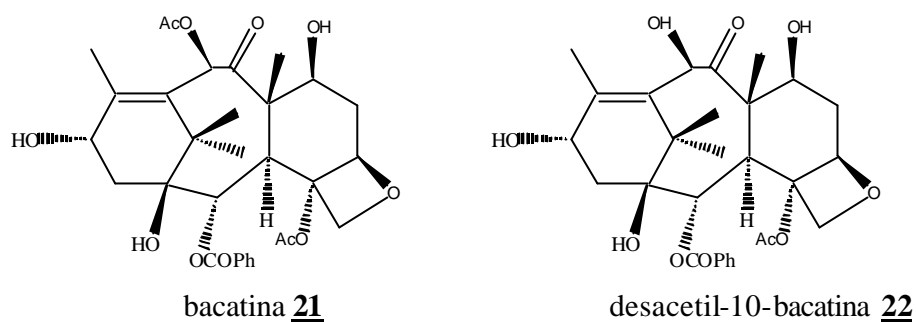


Figura 8: Estruturas químicas dos precursores do taxol.

Devido a estes estudos, chegou-se à síntese do taxotere (docetaxel, **23**, **Figura 9**), aprovado pelo *Food and Drug Administration* (EUA) para uso contra câncer de ovário, mama e pulmão, cérebro e garganta (Corrêa, 1995).

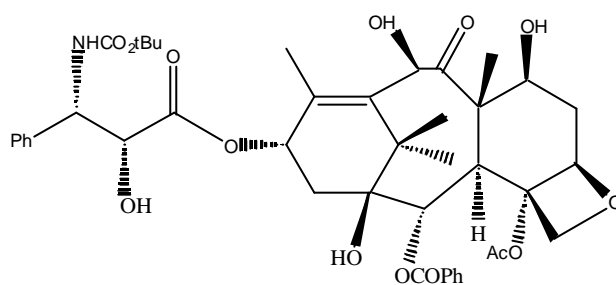


Figura 9: Estrutura química do taxotere (docetaxel) **23**.

Provavelmente, o medicamento mais conhecido e utilizado no mundo, que teve sua origem relacionada a um produto natural, seja a aspirina **24** (**Figura 10**, página 15). No século XVIII, o Reverendo Edward Stone percebeu que a planta *Salix alba* apresentava um sabor amargo. Suspeitando de um possível efeito como o da quina-quina, o Reverendo E. Stone utilizou *Salix alba* em pacientes febris, tendo de fato, obtido êxito. A substância responsável pelo efeito antitérmico era a salicina **25** (**Figura 10**, página 15), relacionada ao ácido salicílico **26** (**Figura 10**, página 15). Posteriormente, outras substâncias foram descobertas com a mesma atividade antitérmica, analgésica e capaz de aliviar os sintomas de doenças como a gota, febre reumática e artrite.

Essa classe de substâncias foi denominada salicilatos (Agosta, 1997).

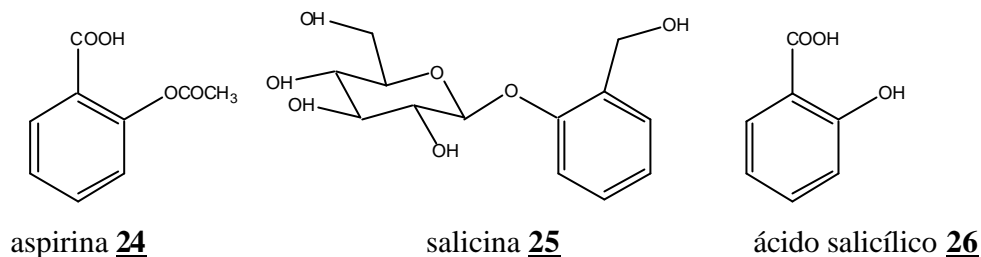


Figura 10: Estruturas químicas de alguns salicilatos.

A indústria farmacêutica Bayer, interessada nos salicilatos, chegou à síntese da aspirina, em 1897, realizada por Kolbe. A aspirina ainda é largamente utilizada no intuito de aliviar desde uma mera dor de cabeça até artrite reumatóide, ou como auxiliar na terapia anti-trombótica. Nos anos recentes, descobriu-se que baixas doses diárias de aspirina diminuem o incidente de infarto, provavelmente, por inibir a agregação plaquetária (Agosta, 1997).

1.7. Produtos naturais como precursores em síntese orgânica

A) A importância dos produtos naturais em síntese orgânica (Cragg *et al.*, 1997).

Em recente trabalho de Cragg *et al.* foi relatado que mais de 60% dos medicamentos mais usados são de origem natural. Segundo estes autores constituem drogas de origem natural:

- ? Produtos naturais em si (N);
- ? Derivados semi-sintéticos de produtos naturais (ND);
- ? Produtos sintéticos baseados em produtos naturais (S*);

Com o crescente desenvolvimento de novas tecnologias, como por exemplo a química combinatória, o interesse na descoberta de produtos naturais bioativos foi de certo modo comprometido. Em uma pesquisa feita pelo *US Food and Drugs Administration* (FDA), foi constatado que os produtos de origem natural são importantes no tratamento do câncer e de doenças infecciosas. Os resultados encontram-se, resumidamente, na **Tabela 2** (página 16).

Tabela 2: Atividades biológicas de produtos de origem natural.

Atividade	N(%)	ND (%)	S*(%)
Antibacteriana	1,5	68,7	-
Antitumoral	10,8	29,7	10,8
Antiinflamatória	30	67,5	-
Broncodilatador	-	33,3	66,6
Imunoestimulante	42,8	14,3	-

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

1.8. Trabalhos envolvendo modificações estruturais na piperina

Encontra-se na literatura diversas atividades biológicas associadas à piperina, entre estes trabalhos destacam-se três que, além de evidenciar o efeito da piperina mostram também o efeito de derivados e análogos, sintetizados a partir dela, visando traçar um perfil de relação estrutura-atividade para os modelos estudados.

Koul *et al.* demonstraram que a piperina e derivados inibem enzimas hepáticas (oxidases), dependentes de citocromo P450, envolvidas no metabolismo de drogas. Mostra-se o aumento da biodisponibilidade de drogas em pacientes voluntários, além da modulação de reações de glicuronidação. Neste mesmo estudo, foram sintetizados análogos a partir da piperina para serem testados como inibidores da atividade de oxidases hepáticas dependentes de citocromo P450.

Foram realizadas as seguintes modificações:

- i) no anel aromático;
- ii) na cadeia lateral;
- iii) na função amídica.

Estas modificações sintéticas resultaram em 38 análogos da piperina.

Foi observado que a saturação da cadeia lateral resultou num aumento significativo da inibição enzimática enquanto que, nas modificações no anel aromático e na função amídica foram poucos os análogos que demonstraram seletividade em inibir a atividade das oxidases estudadas (Koul *et al.*,2000).

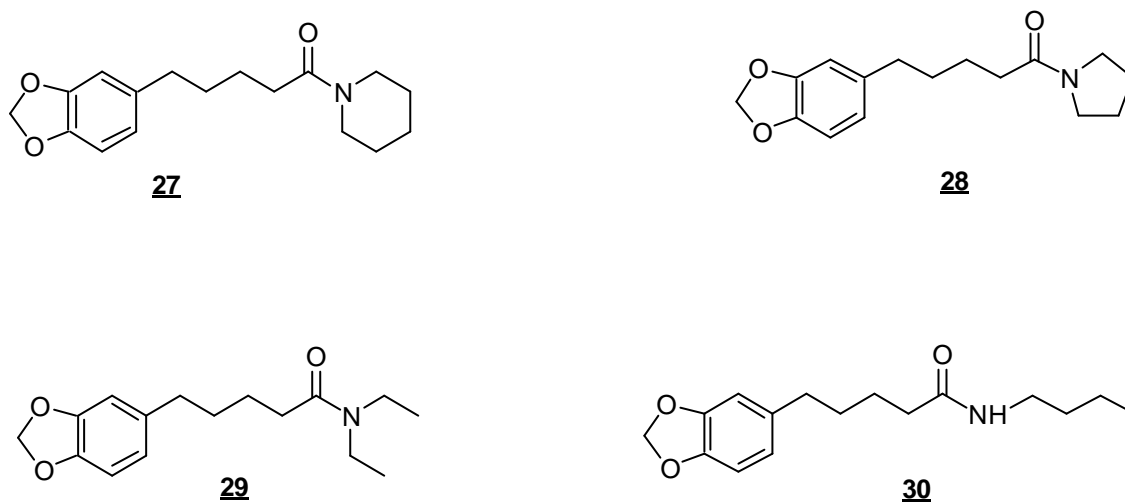


Figura 11: Estruturas químicas dos análogos sintetizados a partir da piperina que demonstraram maior efeito inibitório das oxidases estudadas.

De Paula *et al.* relataram a atividade inseticida de piperina e de amidas análogas sintetizadas a partir de piperina sobre diferentes espécies de insetos: *Ascia monuste orseis* Latr, *Acanthoscelides obtectus* Say, *Brevicoryne brassicae* L, *Protopolybia exígua* DeSaus e *Cornitermes cumulans* Kollar.

- ▶ Para a *A. monuste orseis* as amidas *N,N*-dissubstituídas mostraram maior atividade inseticida correspondendo a 95-97,5% de mortalidade.
- ▶ Para a *A. obtectus* todas as amidas apresentaram atividade inseticida entre 25-30% de mortalidade.

▶ Para a *B. brassicae* todas as amidas apresentaram atividade inseticida entre 52,5-92,5% de mortalidade, destacando que a piperina não apresentou atividade contra este inseto.

▶ Para a *P. exigua* todas as amidas apresentaram atividade inseticida entre 2-45% de mortalidade.

▶ Para a *C. cumulans* todas as amidas apresentaram atividade inseticida entre 5-42% de mortalidade.

Estes insetos são avaliados como de importância econômica no Brasil. Baseado nestes derivados, uma nova série de compostos está em fase de desenvolvimento na busca de novos inseticidas (De Paula *et al.*, 2000).

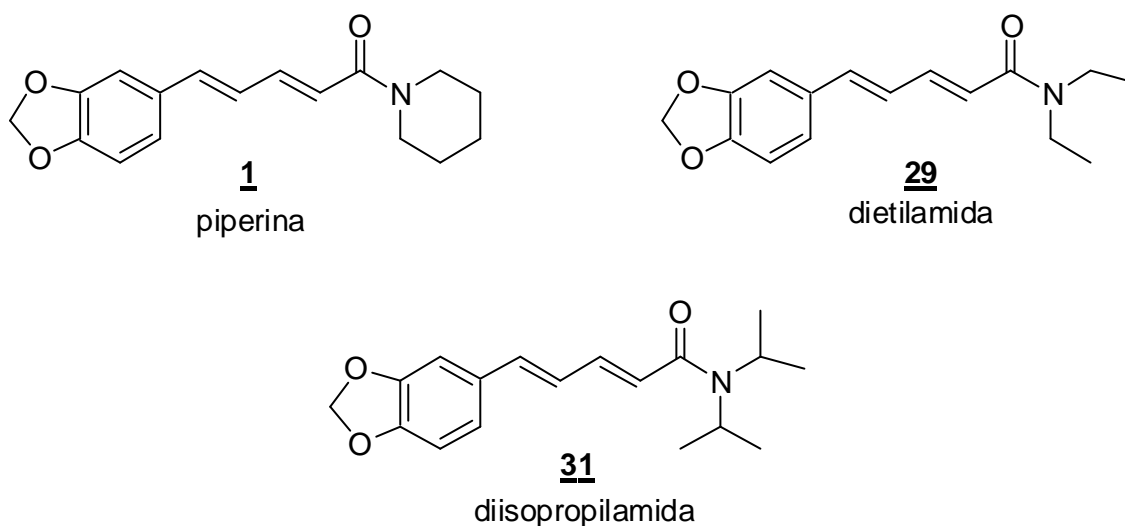


Figura 12: Amidas *N,N*-dissubstituídas que demonstraram maior atividade inseticida sobre *A. monuste orseis*.

Recentemente Venkatasamy *et al.* (2004), baseados em dados anteriormente descritos sobre a atividade da piperina na proliferação de melanócitos (Lin *et al.*, 1999), sintetizaram uma série de análogos e derivados do alcalóide natural, visando realizar um estudo de relação estrutura-atividade (SAR). Foram investigados os seus efeitos biológicos sobre a proliferação e diferenciação dos melanócitos. A perda progressiva dos melanócitos e despigmentação da pele ocasiona o vitiligo, doença que atinge 1% da população mundial, um incidente que varia de 0,1-9% em diferentes países.

A **Figura 13** abaixo mostra alguns exemplos de compostos modificados sinteticamente que apresentaram atividades biológicas mais relevantes (Venkatasamy *et al.*, 2004).

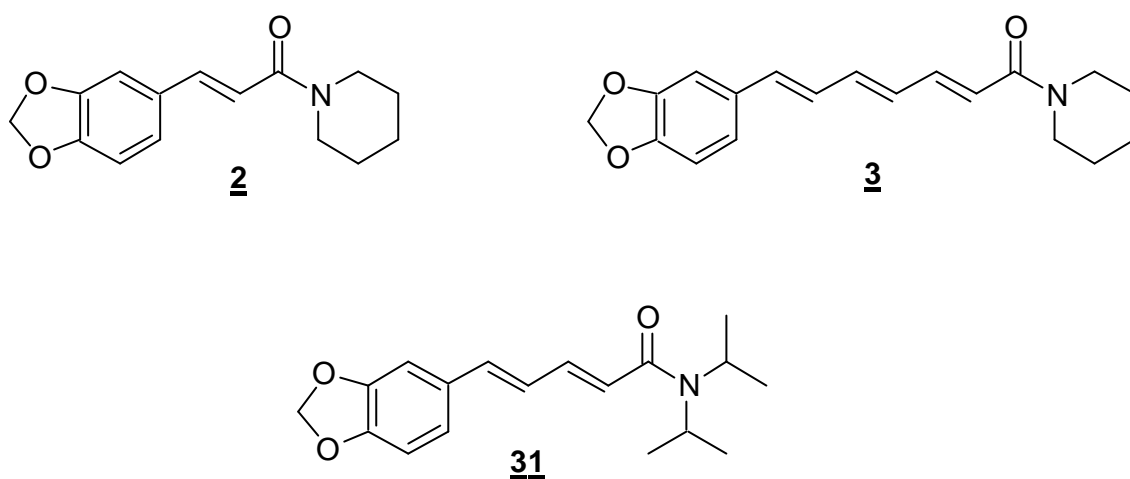


Figura 13: Exemplos de compostos modificados sinteticamente que apresentaram atividades biológicas mais relevantes (Venkatasamy *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos sobre piperina, seus análogos e derivados na proliferação de melanócitos foram muito satisfatórios e indicam a piperina como precursora de novos protótipos no tratamento do vitiligo (Venkatasamy *et al.*, 2004).

1.9. Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma enfermidade que apresenta manifestações clínicas complexas. O agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida). Este protozoário, que é capaz de infectar um grande número de vertebrados, possui um ciclo de vida complexo, com vários estágios, sendo que no hospedeiro vertebrado o parasita se encontra sob duas formas, a forma tripomastigota, flagelada e infectante; e a forma amastigota, que não possui flagelo livre e se replica no interior das células (Brenner e Andrade, 1979).

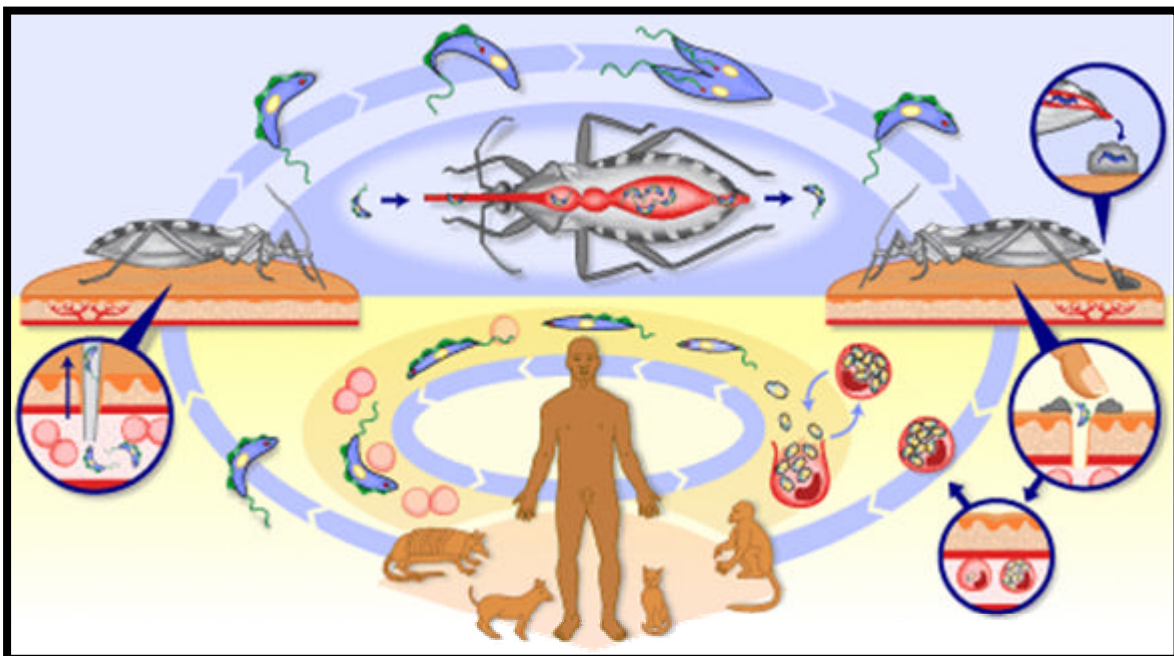


Figura 14: Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

O ciclo de vida do parasita (**Figura 14**) envolve obrigatoriamente a passagem por hospedeiros vertebrados (mamíferos, incluindo o homem) e muitos invertebrados (insetos da família Reduviidae), em uma série de estágios. A forma tripomastigota, presente no sangue do hospedeiro infectado, é ingerida pelo inseto e diferencia-se em epimastigota, forma não infectiva e replicativa, que no trato digestivo do inseto diferencia-se em

tripomastigotas metacíclicos. As formas metacíclicas são liberadas geralmente junto com as fezes e a urina do inseto durante seu repasto sanguíneo e ao penetrar no hospedeiro vertebrado diferencia-se na forma amastigota intracelular. Após vários ciclos de replicação os parasitas diferenciam-se na forma tripomastigota, havendo liberação dos mesmos na corrente sanguínea do hospedeiro, reiniciando o ciclo.

Esta parasitose é transmitida, principalmente, pelo contato da pele e mucosas com fezes ou urina de diferentes insetos hematófagos, da Família *Ruduviidae* e Subfamília *Triatominae* (o popular barbeiro, **Figura 16**, página 22), contaminados com o *T. cruzi*. Outras vias de transmissão são a transfusão com sangue contaminado (5-20%); por transmissão congênita (0,5-8%); ou ainda acidental, em laboratório (Dias, 2000; Brener e Andrade, 1979). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, cerca de 18 milhões de pessoas, entre o México e as Américas do Sul e Central, encontram-se infectadas pelo *T. cruzi*, o que aliado ao fato de não haver tratamento eficaz para erradicação do parasita intracelular, faz desta doença um dos maiores desafios na área de Saúde Pública nesta região do planeta (Coura e De Castro, 2002).



Figura 15: Localização da doença de Chagas.

Apesar das doenças infecciosas e parasitárias terem diminuído seus impactos na causa de óbitos ocorridos no Brasil (de um total de 45% em 1930, para cerca de 7% em 1999),

estas são ainda importantes, principalmente nas regiões do Brasil onde se concentram populações mais carentes (Barreto e Carmo).

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



Figura 16: vetor: Barbeiro

1.9.1. Tratamento

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

As drogas utilizadas no tratamento da doença de Chagas são (**Figura 17**):

- I) O derivado nitro-heterocíclico Benzonidazol (2-nitro-*N*-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida) (**32**);
- II) Nifurtimox (3-metil-*N*-[(5-nitro-2-furfuril)-metileno]-4-tiomorfolinoamina-1,1-dióxido) (**33**).

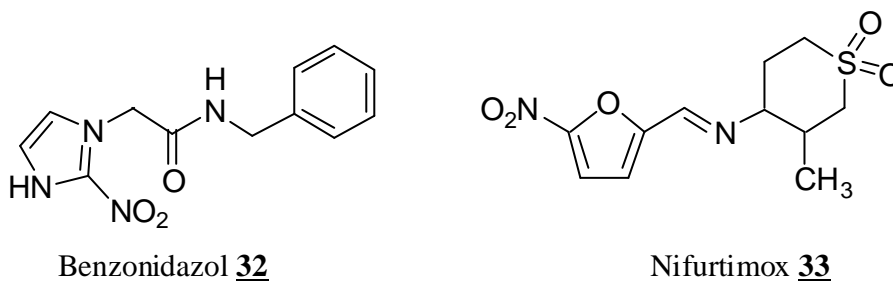


Figura 17: Fármacos de utilidade clínica reconhecida.

Atualmente, apenas o Benzonidazol **(32)** é usado para o tratamento da doença de Chagas. O Nifurtimox **(33)** após ser usado em vários países da América do Sul, inclusive no Brasil, deixou de ser comercializado devido ao seu alto grau de toxicidade (Coura e De Castro, 2002).

Desde a descoberta da doença de Chagas pelo Dr. Carlos Chagas em 1909, nenhuma droga eficaz ainda foi encontrada. Fica clara a dimensão do desafio colocado aos pesquisadores envolvidos no desenvolvimento de fármacos aplicáveis na quimioterapia da doença de Chagas, qual seja, a busca constante por novas substâncias com elevada atividade tripanocida, reduzidos efeitos colaterais, aliada à compreensão do mecanismo da ação antiparasitária destas substâncias, o que facilita o desenvolvimento racional de novos compostos protótipo.

Contudo, o elevado custo de investimento e a falta de um mercado potencial para aquisição das novas drogas desenvolvidas, visto que este tipo de enfermidade acontece em populações de baixo poder aquisitivo, não estimula as grandes corporações farmacêuticas a desenvolverem drogas para o tratamento de doenças tropicais. Entre as 1061 drogas novas desenvolvidas de 1975 a 1994, menos de 2,7% destinavam-se a doenças tropicais (Trouiller *et al.*, 2000).

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

Existem vários alcalóides que estão relacionados com o mecanismo de inibição da respiração celular do parasita, entre eles destaca-se a boldina **(34)**. A apomorfina **(35)** também demonstrou grande atividade tripanocida (**Figura 18**, página 24). (Morello *et al.*, 1994, Coura e De Castro, 2002).

Fournet *et al.* (1998) demonstraram que os alcalóides bisbenzillisoquinolínicos, dafinolina **(36)** e cefarantina **(37)** possuem atividade tripanocida sobre formas amastigotas de *T. cruzi* (**Figura 18**, página 24) (Coura e De Castro, 2002). Chataing *et al.* (1998) avaliaram o efeito tóxico de glicoalcalóides contra *T. cruzi*, evidenciando a atividade da α -solamargina **(38)** e a α -chaconina **(39)** sobre formas epimastigotas e tripomastigotas do

parasita, ambas, apresentam toxicidade mais alta que o ketoconazol, droga utilizada como controle (Coura e De Castro, 2002).

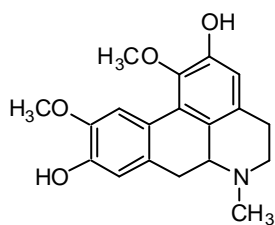
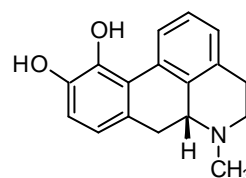
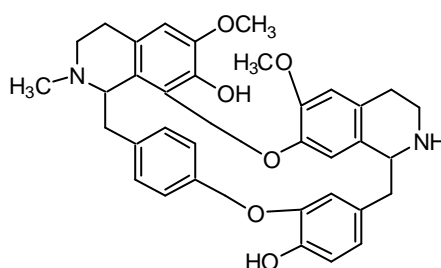
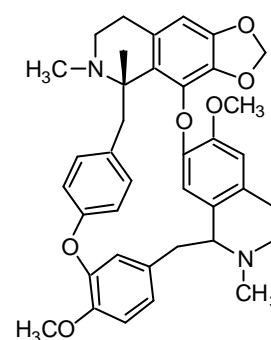
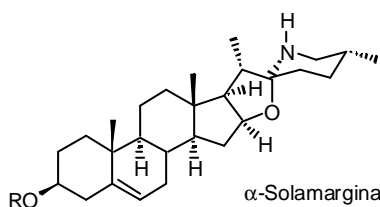
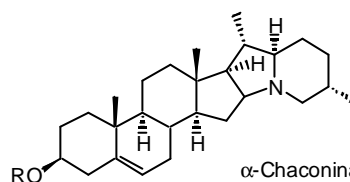
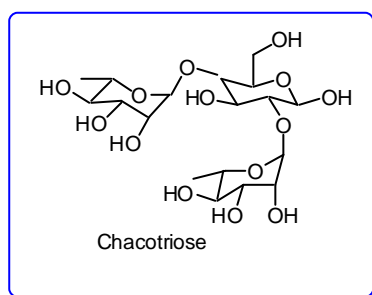
boldina **34**apomorfina **35**dafinolina **36**cefarantina **37** α -Solamargina, R= Chactriose **38** α -Chaconina, R= Chactriose **39**

Figura 18: Alcalóides com atividade tripanocida.

OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Os resultados anteriormente descritos por Kapil (1993) e posteriormente por Raay *et al.* (1999) sobre a atividade antiparasitária da piperina sobre *Leishmania donovani* (protozoário, da família dos Tripanossomatídeos, causador da leishmaniose visceral na Índia), nos estimularam a estudar a atividade tóxica deste alcalóide natural e de seus derivados sobre outro importante Tripanossomatídeo de interesse médico, o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, parasitose de grande impacto em diversos países, inclusive no Brasil. Outro fator relevante está na abundância do produto natural e na facilidade de sua extração do material vegetal, o que aliado ao seu perfil estrutural permite variadas abordagens, visando a obtenção de derivados. Desta forma, temos como principais objetivos neste trabalho:

- Isolar quantidades adequadas do produto natural, através da otimização do método de extração descrito, e utilizar metodologias de transformação química que permitam a preparação de derivados e análogos da piperina;

- Caracterizar os produtos obtidos, bem como os intermediários sintéticos, através dos métodos convencionais de análise (ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono, espectroscopia na região do infravermelho e espectrometria de massas);

- Avaliar a atividade tóxica dos derivados e análogos obtidos sobre o *Trypanosoma cruzi*, comparando os dados obtidos com a atividade exibida pelo produto natural, bem como com a droga de referência usada no tratamento da doença, o benzonidazol. Pretendemos assim, obter dados que permitam realizar um estudo comparativo entre a estrutura química e a atividade biológica para esta família de substâncias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estratégias empregadas no trabalho de modificação estrutural e de preparação de derivados

Como será visto na discussão do trabalho, a etapa de modificações estruturais foi desenvolvida sobre duas abordagens principais, que serão as modificações na cadeia lateral e as modificações na função amídica, com o objetivo de sintetizar análogos e derivados, e avaliá-los quanto sua toxicidade sobre formas epimastigotas e amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*.

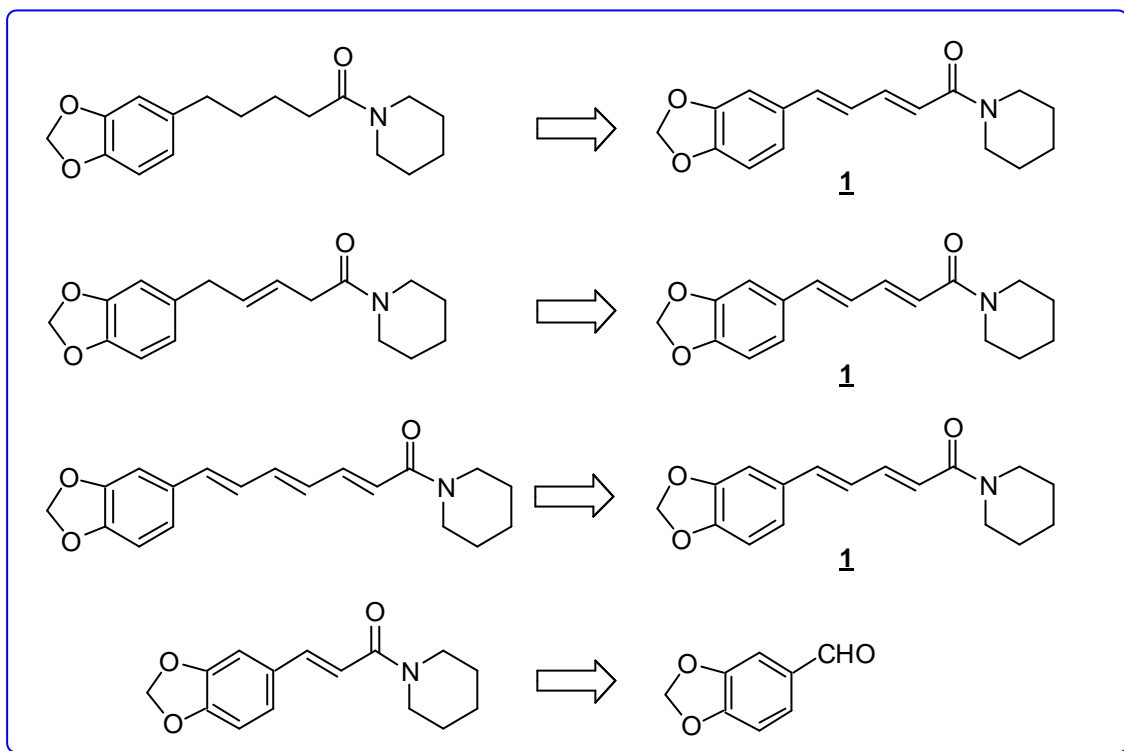
3.1.1. Modificação na cadeia lateral

Planejamos realizar uma série de modificações estruturais na cadeia lateral que envolveram reações como:

A) Redução catalítica das duas ligações duplas, responsáveis pela conjugação da carbonila amídica ao anel aromático (Da Conceição, 1999, Hudlický, 1986);

B) Redução parcial das ligações duplas, utilizando Zn/HOAc (Das B. e Madhusudham, 1998).

C) Variação do tamanho da cadeia lateral, com a formação de derivados cinâmicos (3C), utilizando reação de Knoevenagel com aldeído adequado (Da Silva *et al.*, 2002), e a preparação de derivados com sete átomos na cadeia lateral, utilizando a reação de Emmons-Horner como etapa chave (Maryanoff e Reitz, 1989).

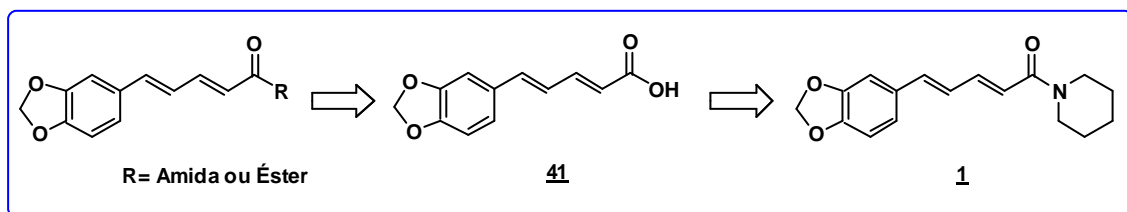


Esquema 2: Estratégias de transformações na cadeia lateral.

3.1.2. Modificações na função amídica

3.1.2.1. Formação das amidas **31**, **42**, **43**, **44**, **45** e do éster **46**

Outra transformação química que pretendemos realizar sobre a molécula da piperina é a hidrólise da função amida, gerando o ácido piperínico **41** (Da Conceição, 1999; Ikan, 1991) que servirá de precursor de uma série de derivados (formação de novas amidas e ésteres). Estas transformações envolvem a formação do intermediário cloreto de ácido a partir do ácido piperínico, utilizando cloreto de oxalila como reagente, com subsequente reação do cloreto de ácido com amina ou álcool adequados.

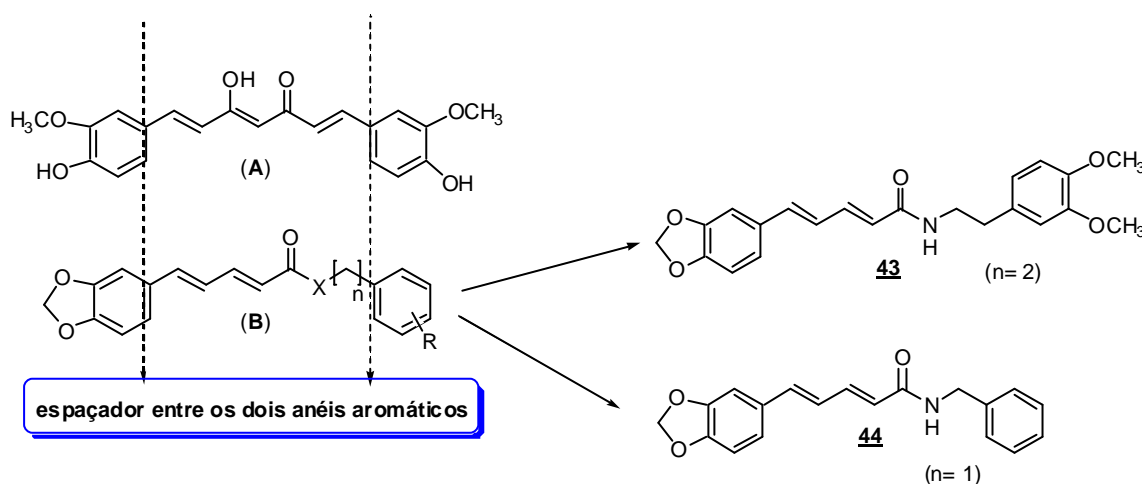


Esquema 3: Estratégias de transformações na função amídica da piperina.

Houve uma preocupação em selecionar as aminas como reagente, para a formação de amidas secundárias e terciárias para uma futura verificação dos efeitos tóxicos dessas amidas sobre *T. cruzi*.

Uma outra vertente foi realizar a síntese de amidas análogas aos curcuminóides. Os curcuminóides tem demonstrado um largo espectro de efeitos biológicos como: anti-inflamatórios, nematocidas, anti-oxidantes, anti-tumorais, anti-HIV e leishmanicidas. Mais recentemente, alguns derivados curcuminóides foram preparados por modificações estruturais da curcumina natural e testados contra a *Leishmania amazonensis*, o principal agente etiológico da leishmaniose cutânea no Brasil (Gomes, D.C.F. *et al.*, 2002).

Estes dados serviram de incentivo para sintetizarmos análogos dos curcuminóides a partir do ácido piperínico, como as amidas veratril (**43**) e benzil (**44**) substituídas, para que possam ser testadas numa outra doença parasitária de grande impacto no Brasil, a Doença de Chagas.



(A) Curcumina, um curcuminóide natural, ativo sobre *L. amazonensis*;

(B) Análogo sintético proveniente do ácido piperínico.

3.1.2.2. Transformação da piperina em amina alílica (Berardi *et al.*, 2003)

Planejamos também realizar a redução da carbonila amídica da piperina para a formação de sua respectiva amina alílica. Pretendemos fazer tentativas com o LiAlH_4 e com o DIBAL-H e verificar qual deles vai proporcionar melhores resultados.

3.2. Discussão dos resultados

3.2.1. Isolamento da piperina dos frutos de *Piper nigrum*

A primeira etapa deste trabalho consistiu no isolamento do produto natural (Ikan, 1991) para testá-lo contra formas epimastigotas de *T. cruzi*. Na avaliação realizada foi evidenciada uma toxicidade em resposta-dependente para a piperina com IC_{50} de 7,36 μ M. Este resultado preliminar nos incentivou a isolar quantidades adequadas de piperina, visto que esta será o precursora dos derivados modificados que pretendemos preparar para que, através de reações químicas, tenhamos a possibilidade de chegar a compostos mais ativos e/ou obter dados para traçar um perfil de SAR para esta família de substâncias.

Apesar da piperina ser disponível comercialmente (*Sigma-Aldrich Fine Chemicals, Inc.*), é necessária a sua importação e o preço final do produto é extremamente elevado (25 gramas, por cerca de R\$ 600,00).

Buscou-se na literatura alternativas para o isolamento deste alcalóide sendo encontrado a metodologia descrita por Epstein *et al.* (1993), que envolve a utilização de clorofórmio como solvente extrator. Contudo, experiências anteriores realizadas no laboratório, onde foi tentado o isolamento de piperina através desta metodologia, não forneceu resultados animadores. Este fato levou a repetir a metodologia descrita por Ikan (1991), onde realiza-se a extração utilizando-se uma aparelhagem de Soxhlet, tendo etanol como solvente (Santos, 1999). A **Figura 19** (página 30) mostra a aparelhagem utilizada para a extração do material vegetal.

Recentemente Raman e Gaikar (2002a e 2002b) descreveram alternativas para a extração da piperina utilizando microondas e solubilização hidrotópica, às quais não foram avaliadas em nosso trabalho.

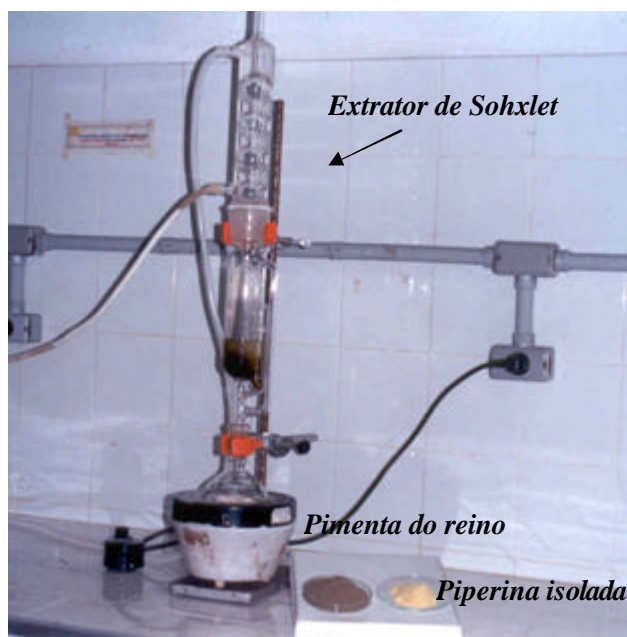


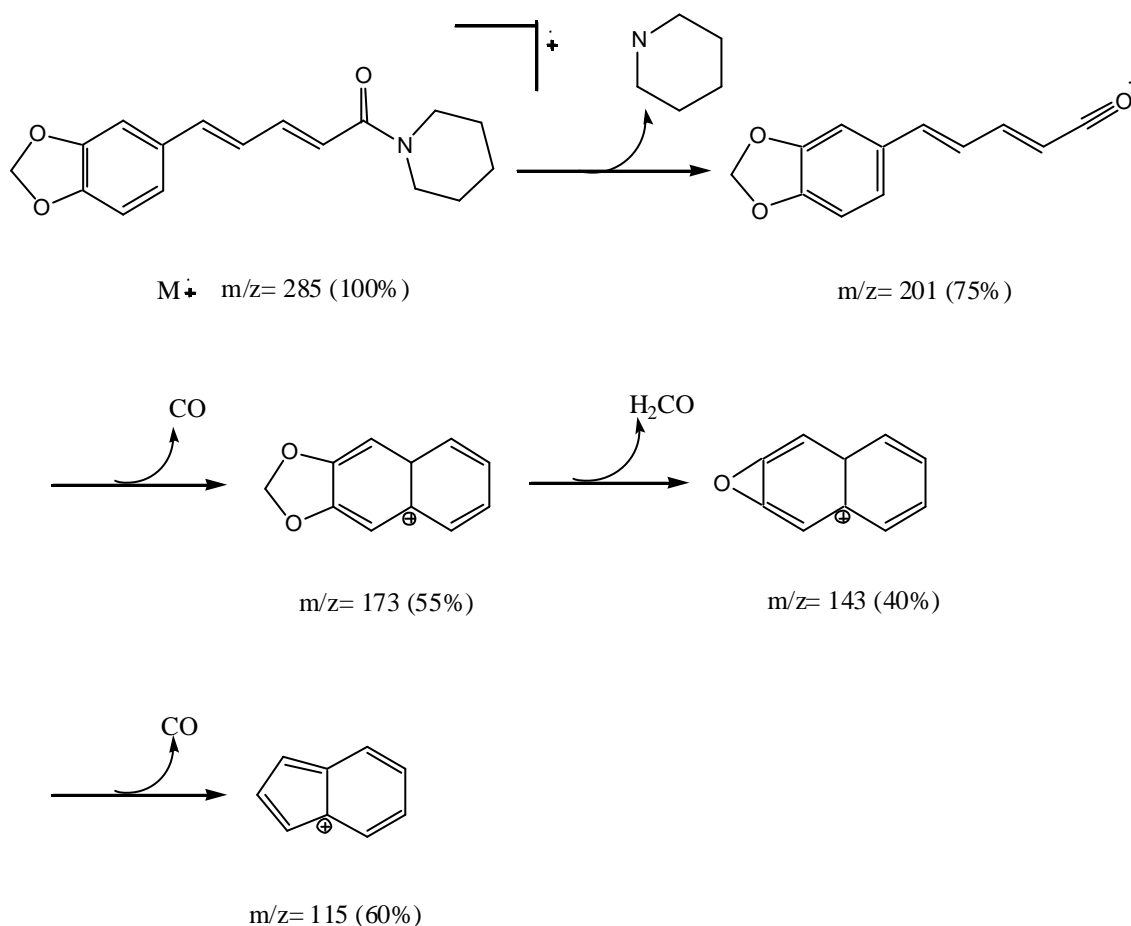
Figura 19: Aparelhagem para extração da piperina de *Piper nigrum*.

Após extração e tratamento adequado, e posterior cristalização, a piperina é obtida na forma de cristais amarelados. O material é obtido, normalmente, em grau de pureza adequado, o que é confirmado através de comparação do ponto de fusão determinado para a amostra, com aquele descrito na literatura (Ikan, 1991). O produto obtido também foi devidamente caracterizado através dos métodos convencionais de análise (RMN, IV, e EM), sendo que os dados obtidos foram totalmente compatíveis com a estrutura do alcalóide natural, e também por comparação com dados descritos na literatura (De Araújo-Júnior *et al.*, 1997).

Devido à facilidade de isolamento e à abundância do alcalóide no material vegetal decidiu-se isolar uma maior quantidade de piperina, estocando-a no laboratório para utilização neste e em outros trabalhos de nosso grupo. Após sucessivas extrações, trabalhando com cerca de 50 g de material vegetal em cada experimento, chegou-se a um estoque de 30g de piperina pura.

No espectro de IV de **1** observa-se uma forte absorção em 1643 cm^{-1} , indicando a presença da função carbonila amídica conjugada, além das absorções na região entre $2937\text{-}2858\text{ cm}^{-1}$, referentes as deformações axiais das ligações C-H (**Espectro 1**, página 58). No espectro de RMN¹H observa-se um sinal simples em $\delta\ 5,98\text{ ppm}$, referente aos 2

hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, além de um grupo de sinais entre δ 6,4 e δ 6,98 ppm referentes aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral, e os 3 hidrogênios aromáticos (**Espectro 3** página 59). No espectro de RMN ^{13}C observa-se um sinal a δ 165,3 ppm, referente à absorção do carbono da carbonila amídica (**Espectro 4** página 59). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular e pico base ($m/z= 285$ u.m.a., 100%) (**Espectro 2**, página 58), fragmentos característicos para a estrutura da amida natural. O **Esquema 4** mostra uma proposta de fragmentação para a piperina **1**.



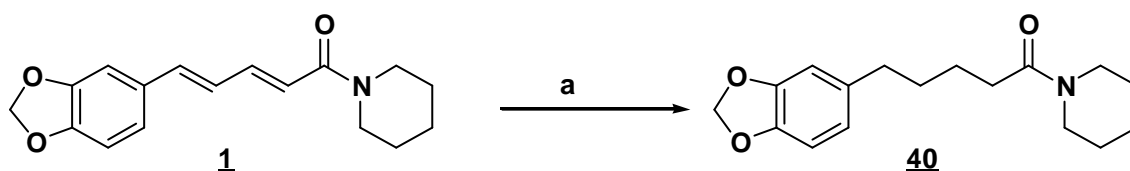
Esquema 4: Proposta de fragmentação para a piperina.

3.2.2. Modificações Estruturais

3.2.2.1. Redução catalítica das duplas ligações para a obtenção da tetraidropiperina

A preparação do primeiro derivado envolveu a reação de redução catalítica das ligações duplas, responsáveis pela conjugação da carbonila amídica ao anel aromático. As reações de redução de olefinas podem ser realizadas pela reação das mesmas com hidrogênio gasoso, sob alta pressão ou não, na presença de um catalisador metálico (Ni^0 , Pt^0 , Pd^0 , Rh^0 , etc) (Hudlický, 1986).

Em nosso caso, a reação de redução catalítica da piperina foi conduzida em acetato de etila como solvente, tendo Pd^0 como catalisador, em atmosfera de H_2 (a pressão normal) (Santos, 1999). O **Esquema 5** mostra a reação de redução catalítica.



Reagentes: a. H_2 , Pd/C (10 %); acetato de etila, pressão atmosférica, t.a., 2h (95%).

Esquema 5: Reação de redução catalítica da piperina.

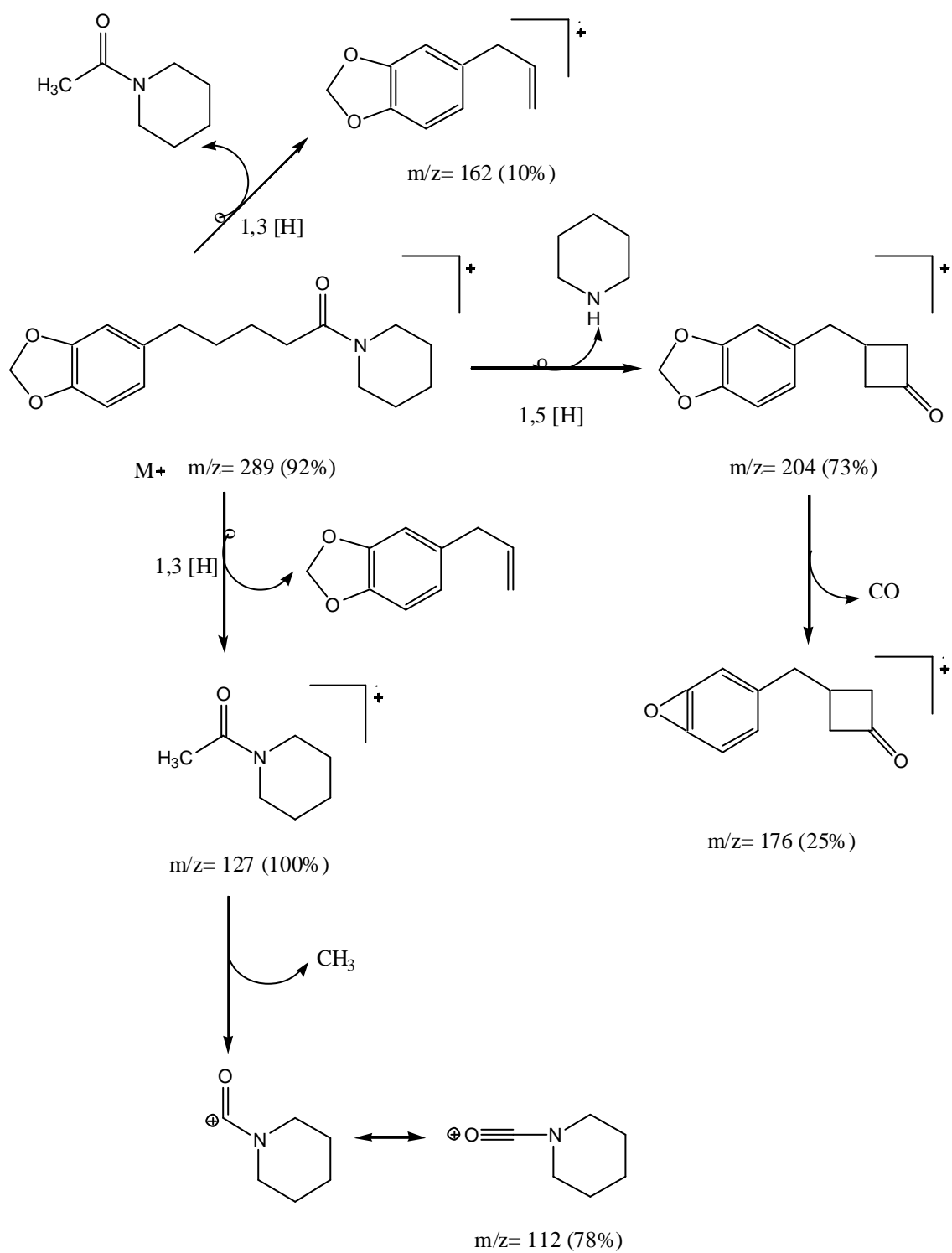
O produto obtido foi caracterizado pelos métodos convencionais de análise e apresentou dados espectrométricos compatíveis com a sua estrutura. No espectro de IV observa-se um conjunto de absorções entre $2929\text{-}2853\text{ cm}^{-1}$, referentes às deformações axiais das ligações C-H. A carbonila amídica absorve em 1637 cm^{-1} (**Espectro 5**, página 62). No espectro de RMN ^1H nota-se a simplificação dos sinais, antes presentes em campo mais baixo, acima de 5,0 ppm, e observa-se o aparecimento de um conjunto de sinais entre 2,49 e 1,50 ppm, devido aos hidrogênios ligados aos carbonos da cadeia lateral, agora saturada (**Espectro 7**, página 63). No espectro de RMN ^{13}C observa-se um sinal a $\delta 170,7$ ppm, correspondente à carbonila amídica e um sinal a $\delta 101,1$ ppm, correspondente ao

OCH₂O, além dos sinais referentes aos demais carbonos presentes na estrutura (**Espectro 8**, página 63). Na **Tabela 3** encontram-se alguns dos deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono de **1** e **40**.

Tabela 3: Deslocamentos químicos para os hidrogênios e carbonos da cadeia lateral da piperina (**1**) e da tetraidropiperina (**40**).

Posição	δ_H (ppm)		δ_C (ppm)	
	(1)	THP (40)	(1)	THP (40)
α	6,40	2,26	122,4	25,9
β	7,39	1,50	142,3	34,4
γ	6,72	1,50	125,2	32,6
δ	6,75	2,49	138,1	30,8
C=O	-----	-----	165,3	170,7

O espectro de massas apresentou o pico do íon molecular ($m/z= 289$ u.m.a., 60%), além de outros fragmentos característicos para a estrutura. No **Esquema 6** observa-se uma proposta de fragmentação para a amida saturada **40**. Cabe ressaltar a diferença no padrão de fragmentação neste caso, visto que devido à flexibilidade da cadeia lateral saturada é possível a ocorrência de rearranjos do tipo McLafferty (McLafferty e Turecek, 1993) levando à perda do fragmento $m/z= 127$ u.m.a. (100%) Através de migração de H (1,5) ocorre perda de piperidina com concomitante ciclização, ocorrendo à formação de uma ciclobutanona ($m/z= 204$ u.m.a., 73%) (**Esquema 6**) (**Espectro 6**, página 62).

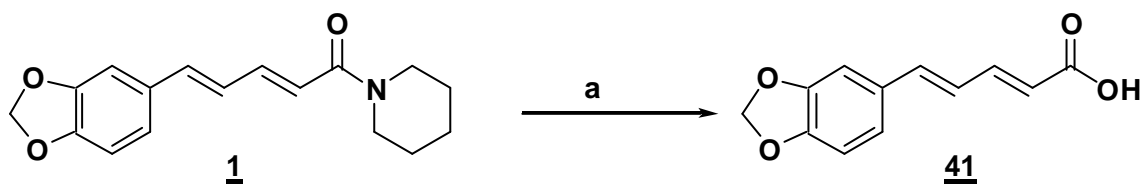


Esquema 6: Proposta de fragmentação para a tetraidropiperina **40**.

Tentamos também fazer a redução parcial do dieno presente em **1**, utilizando Zn/HOAc (Das B. e Madhusudham 1998) e ao mesmo tempo fizemos uma reação paralela substituindo zinco por estanho. Ambas as reações foram acompanhadas por Cromatografia de Camada Fina que indicou que não houve nenhuma formação de produto. Infelizmente, após repetidas tentativas não logramos êxito em reproduzir os resultados descritos por Das B. e Madhusudham.

3.2.2.2. Hidrólise alcalina da piperina

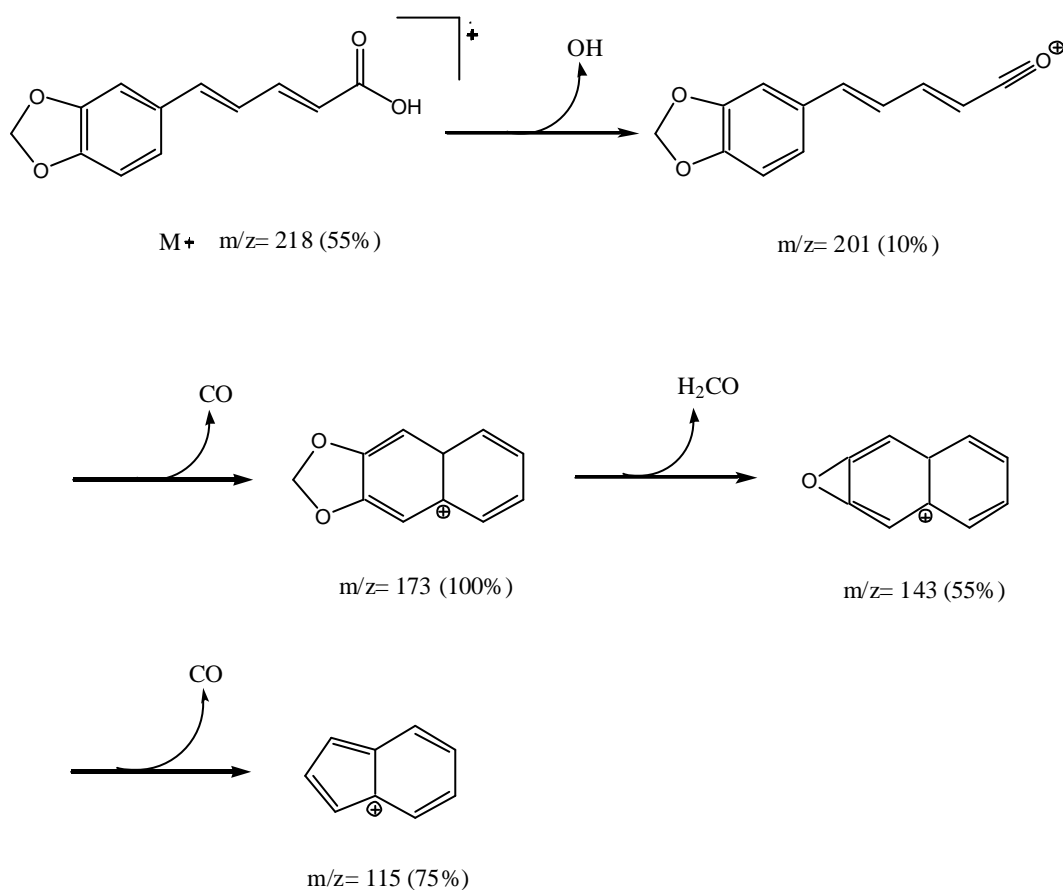
Outra transformação química realizada sobre a molécula da piperina foi a hidrólise da função amida, gerando o ácido piperínico **41** (**Esquema 7**). Esta reação encontra-se experimentalmente descrita no trabalho de Ikan (Ikan, 1991). Contudo, ao tentar reproduzir as condições descritas pelo autor não logrou-se êxito na obtenção do ácido desejado em quantidades adequadas. Nas condições de Ikan a reação não se completou. Devido a isso, realizou-se algumas modificações na metodologia proposta, elevando a quantidade de base utilizada (usamos solução alcoólica de KOH 20 %), além de aumentar o tempo de reação (Em seu trabalho o autor descreve a hidrólise total num tempo de ca. 2 h., em nosso caso foram necessárias 12 h., sob refluxo, para que a reação se completasse) (Da Conceição, 1999), gerando então o ácido piperínico **41**, após acidificação do meio, em altíssimo rendimento (90%) e elevada pureza (**Esquema 7**).



Reagentes: a. KOH/etanol, refluxo, 12 h; HCl 10%, até pH 3,0 (90%).

Esquema 7: Hidrólise básica da piperina.

O ácido **41** apresentou ponto de fusão idêntico ao descrito na literatura (pf.: 216-217°C) (Ikan, 1991). Além da análise comparativa do ponto de fusão, o produto foi devidamente caracterizado pelos métodos convencionais de análise. No espectro de infravermelho observa-se uma banda larga, em 3449 cm^{-1} , devido ao estiramento da ligação O-H. Observa-se ainda a absorção a 1678 cm^{-1} , característica da carbonila de ácido conjugado (**Espectro 9**, página 66). No espectro de RMN ^{13}C observa-se um sinal em δ 165,8 ppm, referente ao carbono da carbonila (**Espectro 12**, página 67). Os dados de RMN ^1H foram totalmente compatíveis com a estrutura de **41** (**Espectro 11**, página 67). No espectro de massas observa-se o pico do íon molecular ($m/z= 218$ u.m.a., 55%), além do pico-base atribuído ao carbocátion *bis*-alílico ($m/z= 173$ u.m.a., 100%) (**Espectro 10**, página 66). O **Esquema 8** mostra uma proposta de fragmentação para o ácido **41**.



Esquema 8: Proposta de fragmentação para o ácido **41**.

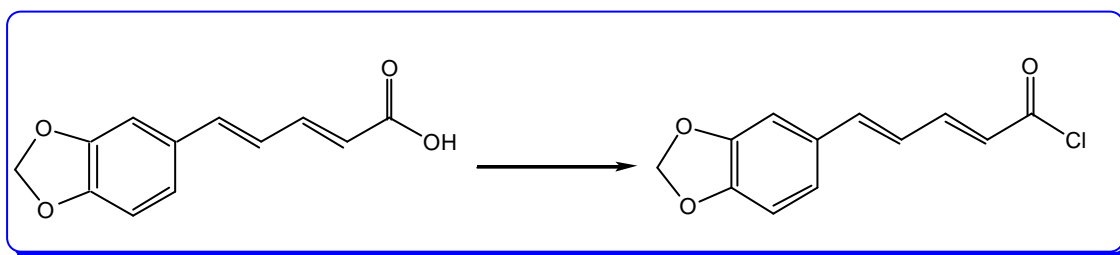
3.2.2.3. Síntese de derivados da piperina

Estes análogos foram sintetizados a partir da reação do cloreto do ácido piperínico e um álcool ou amina.

A seguir serão relatados os principais pontos que compreendem a síntese destes análogos a partir do ácido piperínico.

? Síntese do cloreto de ácido

Tanto para a síntese de amidas quanto para a dos ésteres a passagem pelo cloreto de ácido (cloreto de acila) foi comum.



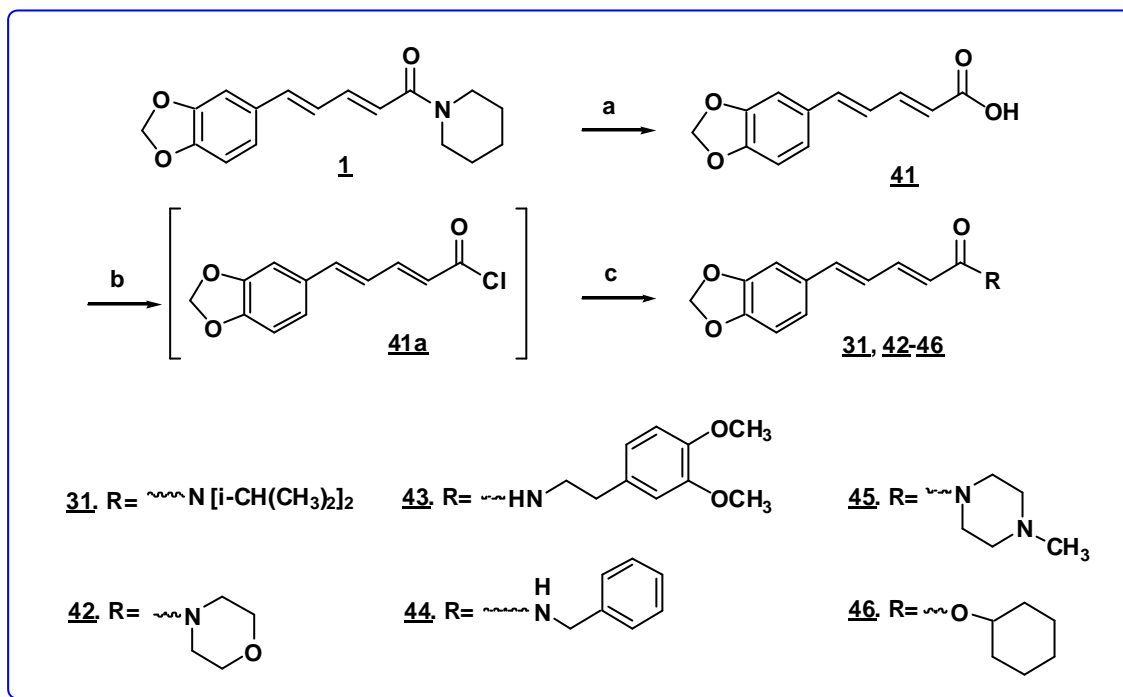
A formação do cloreto de ácido tem como objetivo sintetizar um intermediário mais reativo frente à substituição nucleofílica acílica que dará origem ao derivado de ácido (éster, amida, anidrido, etc.).

Os cloretos de tionila (SOCl_2) e oxalila (COCl_2) são usualmente os reagentes de escolha para a síntese de cloretos de acila. Apresentam a grande vantagem de formarem subprodutos gasosos (SO_2 , CO , CO_2) que não contaminam o produto (March, 1985).

Por haver disponibilidade de cloreto de oxalila, este foi utilizado na preparação do cloreto de ácido. Por ser mais reativo que o SOCl_2 , todas as reações foram realizadas à temperatura ambiente e houve conversão total ao cloreto de ácido.

As reações de síntese das amidas (**31**, **42**, **43**, **44**, **45**) e do éster (**46**) a partir do ácido piperínico processaram-se através da substituição acílica no cloreto de ácido, o qual é extremamente reativo. Adiciona-se a respectiva amina ou éster em excesso, esta adição ocorre em banho de gelo, pois o processo reacional é altamente exotérmico. Utiliza-se diclorometano como solvente, devido ao seu baixo ponto de ebulição, podendo ser

facilmente removido em evaporador rotatório. Os rendimentos destas reações foram extremamente satisfatórios, variando de 70-90 %.



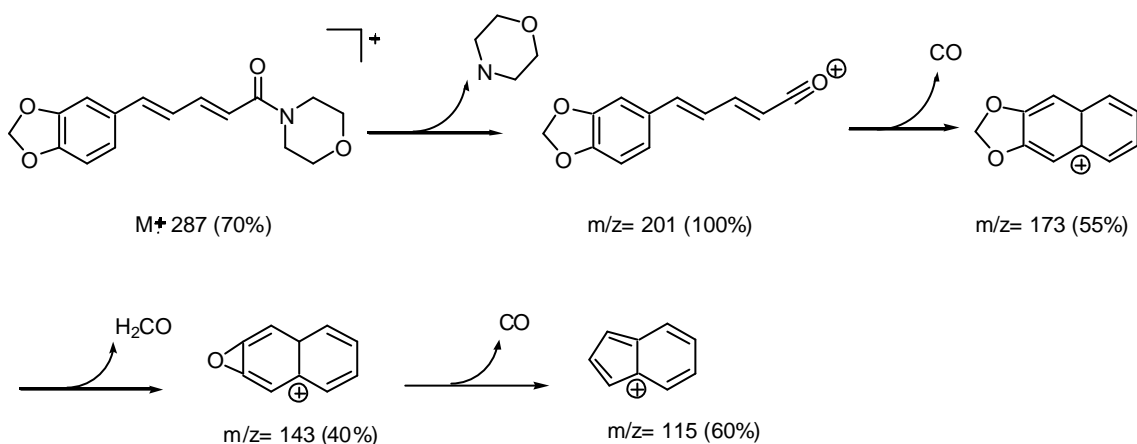
Condições: a. KOH, etanol, refluxo, 24h; depois HCl (aq.), 0°C (90%); b. (COCl)₂, 25°C, N₂, 30min. c. CH₂Cl₂, álcool ou amina, 0°C, N₂, 30-40min. (70-90%).

Esquema 9: Transformações realizadas através da formação do intermediário cloreto de ácido.

Para a discussão das atribuições dos dados espectrométricos obtidos para os diversos derivados sintetizados elegemos as amidas **42** e **44** e o éster **46** como exemplos.

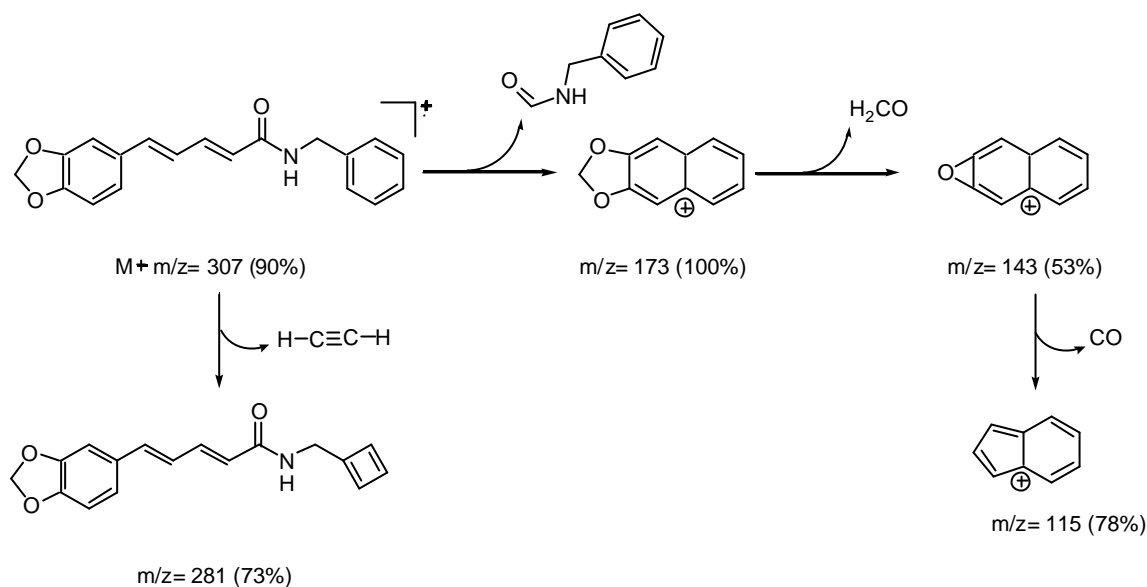
No espectro de IV de **42** observa-se uma forte absorção em 1675 cm⁻¹, indicando a presença da função carbonila amídica conjugada, além das absorções na região entre 2969-2860 cm⁻¹, referentes às deformações axiais das ligações C-H (**Espectro 13**, página 71). No espectro de RMN¹H observa-se um sinal simples em δ 5,95 ppm, referente aos 2 hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, além de um grupo de sinais entre δ 6,3 a δ 6,95 ppm, referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos *sp*² da cadeia lateral, e aos 3

hidrogênios aromáticos (**Espectro 15**, página 72). No espectro de RMN ^{13}C observa-se um sinal a δ 165,8 ppm, referente ao deslocamento químico da carbonila amídica (**Espectro 16**, página 72). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular ($m/z= 287$ u.m.a., 70%), o pico base $m/z= 201$ u.m.a. (100%) (**Espectro 14**, página 71). O **Esquema 10** mostra uma proposta de fragmentação para a morfolinilamida **42**.



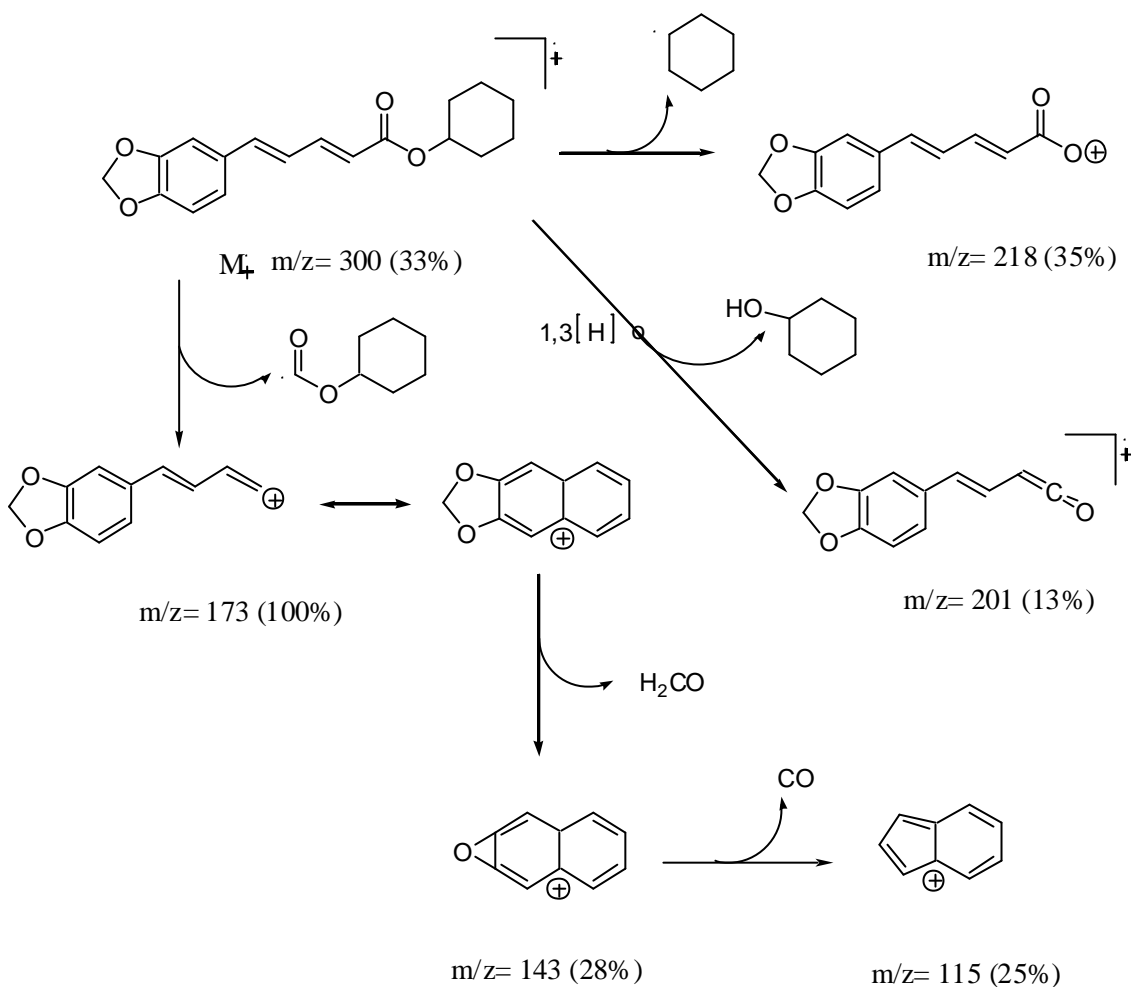
Esquema 10: Proposta de fragmentação para a morfolinilamida **42**.

No espectro de IV de **44** observa-se uma forte absorção em 3283 cm^{-1} , indicando a presença de amina secundária, além das absorções na região entre 2916 cm^{-1} referentes às deformações axiais das ligações C-H (**Espectro 25**, página 83). No espectro de RMN ^1H observa-se um sinal simples em δ 6,02 ppm, referente aos 2 hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, além de um grupo de um sinal intenso em δ 7,38 ppm, referentes aos cinco hidrogênios do anel aromático monossustituído, e outro sinal intenso em δ 3,47 ppm (singlete), referente ao hidrogênio da amida secundária (**Espectro 27**, página 84). No espectro de RMN ^{13}C observa-se um sinal a δ 165,23 ppm, referente ao deslocamento químico da carbonila amídica (**Espectro 28**, página 84). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular ($m/z= 307$, 90%), o pico base $m/z= 173$ (100%) (**Espectro 26**, página 83). O **Esquema 11** mostra uma proposta de fragmentação para a benzilamida **44**.



Esquema 11: Proposta de fragmentação para a benzilamida **44**.

No espectro de IV de **46** observa-se uma forte absorção em 1703 cm^{-1} , indicando a presença de carbonila de éster (**Espectro 33**, página 91). No espectro de RMN¹H observa-se um sinal simples em δ 5,9 ppm, referente aos 2 hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, além de um sinal intenso em δ 1,6 ppm, referentes aos hidrogênios 2' a 6' (**Espectro 35**, página 92). No espectro de RMN ¹³C observa-se um sinal a δ 166,4 ppm, referente ao deslocamento químico do carbono da carbonila (**Espectro 36**, página 92). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular ($m/z = 300$, 33%), o pico base na formação do carbocátion *bis*-alílico ($m/z = 173$ u. m. a.) (**Espectro 34**, página 91). O **Esquema 12** mostra uma proposta de fragmentação para o éster **46**.



Esquema 12. Proposta de fragmentação para o éster **46**.

As outras amidas apresentaram a maioria dos fragmentos de massas iguais ao das amidas morfolinil (**42**) e benzil (**44**) substituídas (**Esquemas 10 e 11**, respectivamente). Todos os dados espectrométricos (IV, RMN, EM), bem como suas respectivas atribuições para as amidas **31**, **42**, **43**, **44**, **45** e do éster **46**, incluindo seus respectivos espectros, encontram-se descritos na Parte Experimental.

3.2.2.4. Redução da carbonila da piperina para a formação da sua respectiva amina alílica (47)

Os principais reagentes usados como redutores e que são citados na literatura para conversão de amidas a amins são (March, 1985):

- ? Hidrogenação catalítica;
- ? Hidreto de lítio e alumínio (LiAlH_4);
- ? DIBAL;
- ? Boridreto de sódio (NaBH_4);
- ? Borano (BH_3).

A hidrogenação é recomendada para a redução de amidas primárias (ainda assim sob altas pressões e altas temperaturas) (March, 1985).

O boridreto de sódio não é capaz de reduzir amidas sozinho. São necessários outros reagentes coadjuvantes (CoCl_2 , ácido acético, por exemplo) para que a reação ocorra. Venkatasamy *et al.* fizeram a redução da piperina com NaBH_4/I_2 e obtiveram rendimentos baixíssimos (13%) (Venkatasamy *et al.*, 2004).

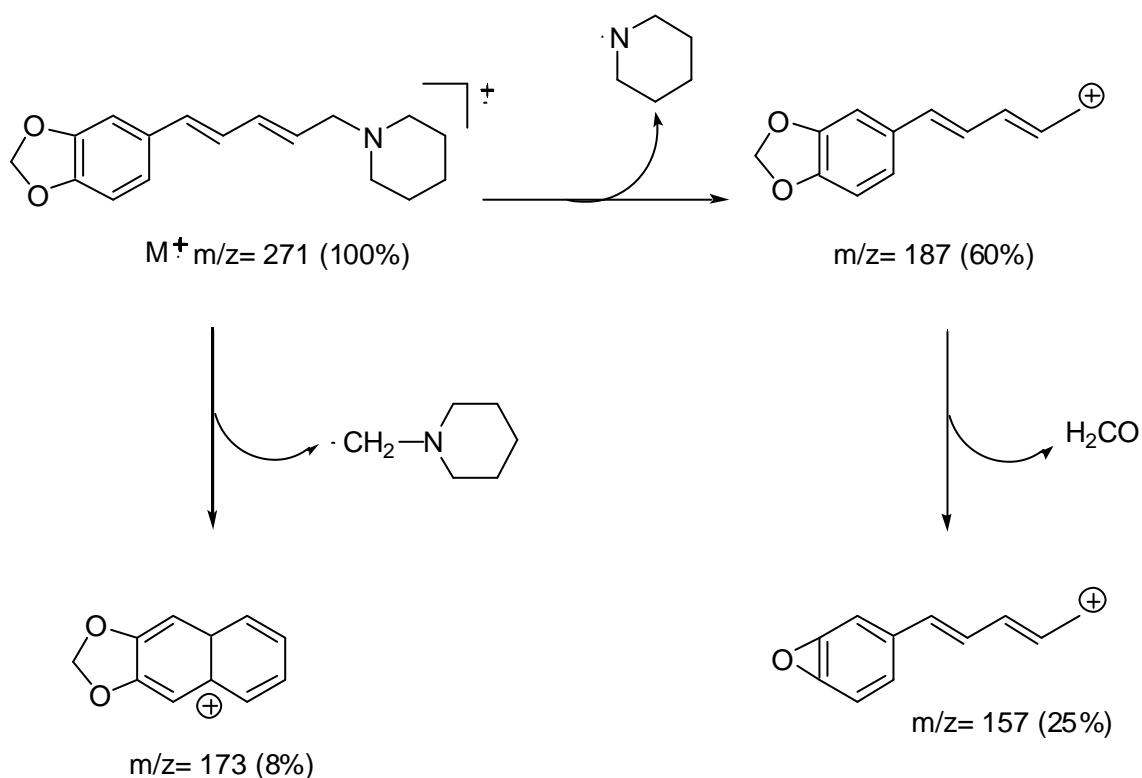
O borano é indicado para a redução de carbonilas de amidas saturadas preferencialmente, visto que também é capaz de promover redução de ligações duplas (March, 1985).

O uso de hidreto de lítio e alumínio é o mais recomendado para reduzir carbonilas de amidas. Porém, esta reação ocorre mais dificilmente do que com outros compostos carbonilados (ésteres e ácidos carboxílicos) (March, 1985). Quando a carbonila é conjugada a ligações duplas, é citado na literatura que reações paralelas podem ocorrer dificultando a obtenção da amina desejada, pois podem envolver redução das ligações duplas por adições conjugadas (Hudlicky, M., 1996).

Quando realizamos a redução da carbonila amídica da piperina com LiAlH_4 , ocorreu justamente a formação de vários produtos além da sua amina alílica, dificultando seu isolamento e com baixíssimos rendimentos (10%).

A reação de redução da amida piperina pode ser realizada de forma satisfatória utilizando-se hidreto de diisobutilalumínio (DIBAL-H) como reagente, gerando o produto desejado com rendimentos de 60%.

O produto obtido foi caracterizado pelos métodos convencionais de análise e apresentou dados espectrométricos compatíveis com a sua estrutura. No espectro de IV observa-se uma absorção de 2913 cm^{-1} , referentes às deformações axiais das ligações C-H. Neste mesmo espectro observa-se a ausência de sinal na área referente à deformação axial da carbonila que absorveu em 1643 cm^{-1} , confirmando a redução à amina alílica (**Espectro 37**, página 95). No espectro de RMN¹H observa-se um sinal simples em $\delta\ 5,91\text{ ppm}$, referente aos 2 hidrogênios do grupamento metilendioxílico, além de um grupo de sinais entre $\delta\ 5,79$ a $\delta\ 6,9\text{ ppm}$, referentes aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral, e os 3 hidrogênios aromáticos (**Espectro 39**, página 96). No espectro de RMN ¹³C observa-se um sinal a $\delta\ 61,4\text{ ppm}$, referente ao deslocamento químico do carbono que teve a carbonila reduzida (deslocamento de sinal para campo alto) (**Espectro 40**, página 96). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular ($m/z= 271\text{ u.m.a.}$), fragmentos para a estrutura da amina alílica (**Espectro 38**, página 95). O **Esquema 13** mostra uma proposta de fragmentação para a amina alílica **47**.



Esquema 13. Proposta de fragmentação para a amina alílica **47**.

3.2.2.5. Seqüência de reações envolvidas na síntese da piperetina (3)

A preparação da amida **3**, um análogo da piperina com sete carbonos na cadeia lateral, envolve uma rota sintética que é mostrada no **Esquema 14** (página 46).

Esta amida, chamada piperetina, pode ser isolada de *Piper nigrum* e *Piper aurantiacum* (De Araújo-Júnior, J. X. *et al.*,1997).

A primeira etapa da metodologia sintética que foi empregada na síntese de formação da piperetina consistiu na redução do ácido piperínico (**41**) a álcool (**48**), visto que já tínhamos sintetizado ácido piperínico em quantidades adequadas, por ser o precursor das outras amidas sintetizadas anteriormente. A primeira tentativa de redução foi realizada com LiAlH_4 em THF, que resultou em rendimentos baixíssimos (em torno de 10%), visto que houve também a formação de vários subprodutos, provavelmente devido à redução das ligações duplas da cadeia lateral, devido a adições conjugadas. A segunda tentativa foi realizada utilizando-se DIBAL, em THF(seco) sob atmosfera inerte (argônio), redutor de vários grupos funcionais orgânicos (March, 1985). De Araújo *et al.* (2001) utilizaram DIBAL em reações que envolviam conversão de éster α,β -insaturado a álcool alílico. Resolvemos então fazer uma tentativa com o ácido piperínico em condições semelhantes e obtivemos seu respectivo álcool alílico **48** com um rendimento de 60% e como único produto. Na sua caracterização por métodos espectrométricos de análise, observamos no espectro de IV a ausência do sinal de absorção de vibração da carbonila conjugada em 1678 cm^{-1} que antes estava presente para o ácido (**Espectro 41**, página 99). Dentre os deslocamentos químicos de RMN ^1H destaca-se a presença de um dubleto em δ 4,2 ppm ($J= 6,0\text{ Hz}$) (hidrogênios metilênicos ligados ao carbono carbinólico) (**Espectro 43**, página 100) e no espectro de massas o pico do íon molecular $m/z= 202\text{ u.m.a.}$ (38%), ambos indicam a formação do álcool **48** (**Espectro 42**, página 99).

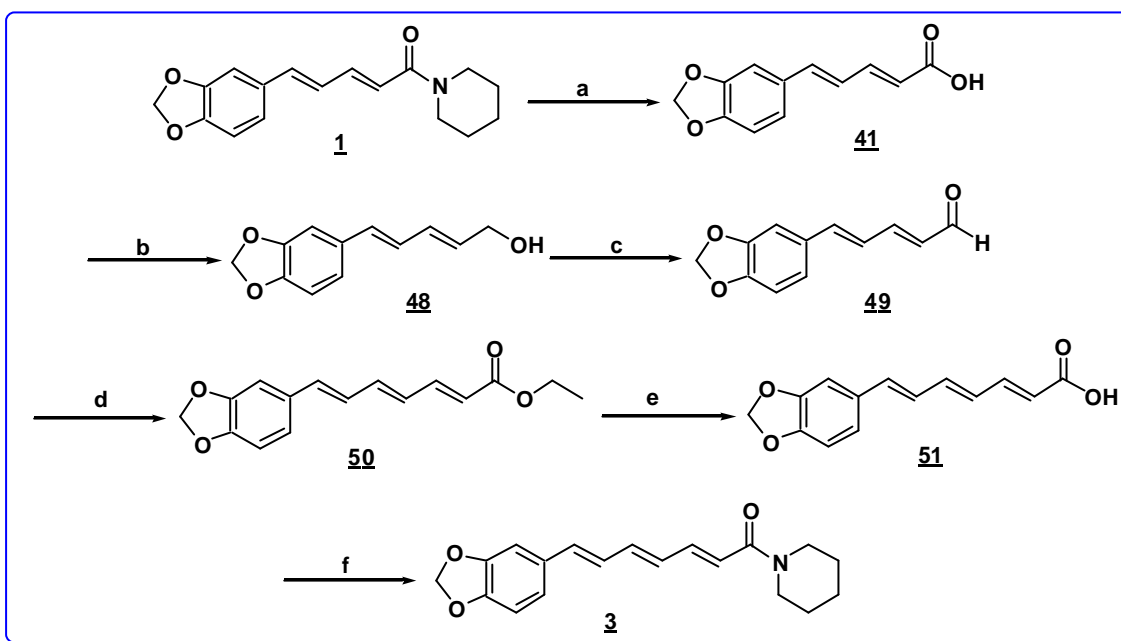
O álcool alílico **48** foi submetido à reação de oxidação, utilizando-se dióxido de manganês como agente oxidante, que é sabido oxidar álcoois alílicos aos respectivos aldeídos α,β -insaturados (Smith, 2001). Após um refluxo de 3 horas, o aldeído **49** foi obtido com um rendimento de 93%. Para sintetizar o aldeído **49** tivemos que preparar o dióxido de manganês e secá-lo na estufa por duas horas ($100\text{-}120^\circ\text{C}$) (Vogel, 1989). Inicialmente pretendíamos usar PDC (dicromato de piridínium) (em diclorometano como

solvente), já que tínhamos este reagente disponível em laboratório, porém, vimos na literatura que a oxidação de álcoois alifáticos por PDC pode isomerizar as duplas conjugadas e descartamos esta hipótese (Corey e Schmidt, 1979). O aldeído obtido foi caracterizado através dos métodos convencionais de análise, apresentando o sinal característico do hidrogênio aldeídico no espectro de RMN ^1H em $\delta 9,5$ ppm (d, $J = 7,96$ Hz; 1H) (**Espectro 47**, página 105) e no espectro de RMN ^{13}C o sinal característico de carbonila de aldeído em $\delta 193,5$ ppm (CHO) (**Espectro 48**, página 105).

O aldeído **49** foi submetido a uma reação de Wadsworth-Emmons-Horner (Maryanoff, 1989), visando a obtenção do éster $\alpha,\beta,\gamma,\delta,\epsilon,\zeta$ -insaturado **50**, utilizando condições reacionais semelhantes as de De Araújo-Júnior *et al.* (2001), que empregaram esta reação em uma das etapas de síntese da piperdardina mostrando-se bastante satisfatória. Os sinais de hidrogênio no espectro de RMN ^1H foram atribuídos para o éster **50**, de maneira que os sinais referentes aos seis hidrogênios olefínicos, em $\delta 5,8$ ppm (d, $J = 15,24$ Hz, 1H), $7,3$ ppm (dd, $J = 11,4; 15,24$ Hz, 1H), e $6,3$ - $6,6$ ppm (m, 4H), estão presentes no espectro, confirmando a obtenção do éster **50** (**Espectro 51**, página 109). O espectro de massas mostra que o pico do íon molecular é também o pico-base com $m/z = 272$ (100%) (**Espectro 50**, página 108).

O éster **50** foi submetido a uma reação de hidrólise, utilizando-se hidróxido de potássio como base e etanol como solvente à temperatura ambiente, seguido da neutralização do meio com solução aquosa de HCl, obtendo-se o ácido **51**. Este ácido foi caracterizado espectroscopicamente e o sinal de absorção de vibração em 3458 cm^{-1} caracterizou a hidroxila de ácido carboxílico (**Espectro 53**, página 112).

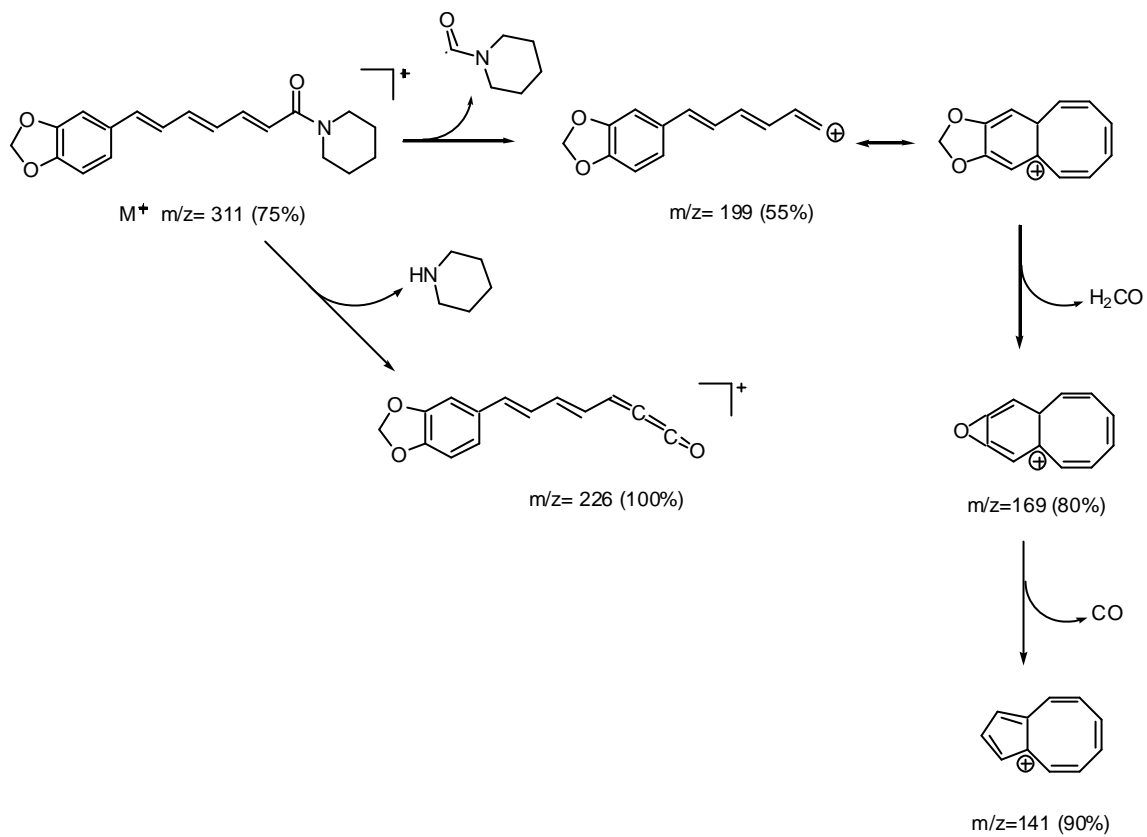
O ácido **51** foi o precursor na obtenção da piperetina **3**, utilizando-se a mesma metodologia de obtenção das outras amidas que sintetizamos. O ácido **51** gerou o cloreto de ácido correspondente, a partir de sua reação com cloreto de oxalila à temperatura ambiente por 30 minutos, seguido da adição de piperidina. A piperetina **3** foi obtida com 26 % de rendimento global a partir da piperina **1** (**Esquema 14**, página 46) e caracterizada espectroscopicamente por IV, RMN e massas. Os seus sinais de RMN ^1H e RMN ^{13}C (**Espectros 58 e 59**, respectivamente, página 117) foram comparados com os da piperetina isolada como produto natural, descritos na literatura (De Araújo Júnior *et al.*, 1997). Estes dados de comparação são demonstrados na **Tabela 5** (página 47).



Condições: **a.** KOH/etanol, refluxo, 12 h; HCl 10 % (pH 3.0) (90 %); **b.** DIBAL-H, THF, -10°C , 1h (60%); **c.** MnO_2 , THF, refluxo, 3 h (93%); **d.** trietilfosfonoacetato, THF, NaH, -15°C , 1h (90%); **e.** KOH/etanol, t.a., 25°C ; HCl (aq), 0°C (90%); **f.** $(\text{COCl})_2$, 25°C , 30min.; depois CH_2Cl_2 , piperidina, 0°C , 1h (90%).

Esquema 14: Preparação da piperetina **3**

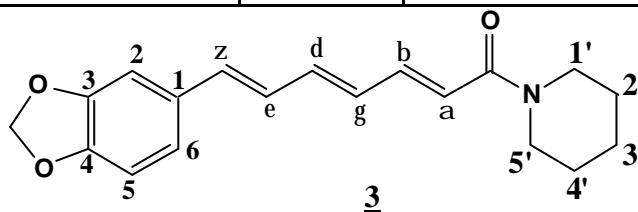
O Esquema 15 descreve uma proposta de fragmentação para a piperetina 3.



Esquema 15: Proposta de fragmentação da piperetina 3.

Tabela 4: Dados de RMN ^1H e de RMN ^{13}C da piperetina **3**, em comparação com a amida natural que pode ser isolada de *Piper nigrum* e *Piper aurantiacum* (Araújo-Júnior, J. X. et al., 1997).

Piperetina 3 (CDCl_3)			Piperetina natural (literatura)	
H	δH (ppm), J (Hz)	δC (ppm)	δH (ppm), J (Hz)	δC (ppm)
1'	3,46-3,55 (m, 2H)	43,1	3,48 (br s, 2H)	43,4
2'	1,52-1,57 (m, 2H)	26,2	1,48-1,60 (m, 2H)	25,7
3'	1,52-1,57 (m, 2H)	24,5	1,61-1,70 (m, 2H)	24,8
4'	1,52-1,57 (m, 2H)	29,6	1,48-1,60 (m, 2H)	26,8
5'	3,46-3,55 (m, 2H)	47,0	3,61 (br s, 2H)	47,0
C=O	-----	165,3	-----	165,5
α	6,3 (d, $J=14,0$; 1H)	119,9	6,3 (d, $J=14,6$; 1H)	120,2
β	7,3 (dd, $J=11,5$; 14,2; 1H)	142,3	7,33 (dd, $J=11,4$; 14,6; 1H)	142,4
γ	6,41(dd, $J=11,5$; 14,2; 1H)	130,3	6,39 (dd, $J=11,4$; 14,0; 1H)	130,5
δ	6,59 (m, 1H)	139,0	6,62 (dt, $J=14$; 10; 1H))	139,2
ϵ	6,61 (m, 1H)	126,5	6,64 (dd, $J=15$; 10; 1H)	126,8
ζ	6,57 (m, 1H)	135,2	6,57 (t, $J=15$, 1H)	135,4
1	-----	130,3	-----	131,6
2	6,91 (d, $J=1,5$; 1H)	105,4	6,94 (d, $J=1,6$; 1H)	105,6
3	-----	148,0*	-----	147,9
4	-----	147,6*	-----	147,9
5	6,72 (d, $J=8,12$; 1H)	108,3	6,74 (d, $J=8$; 1H)	108,6
6	6,83 (dd, $J=1,5$; 8,12; 1H)	122	6,84 (dd, $J=1,6$; 8; 1H)	122,1
OCH ₂ O	5,91 (s, 2H)	101,1	5,94 (s, 2H)	101,3



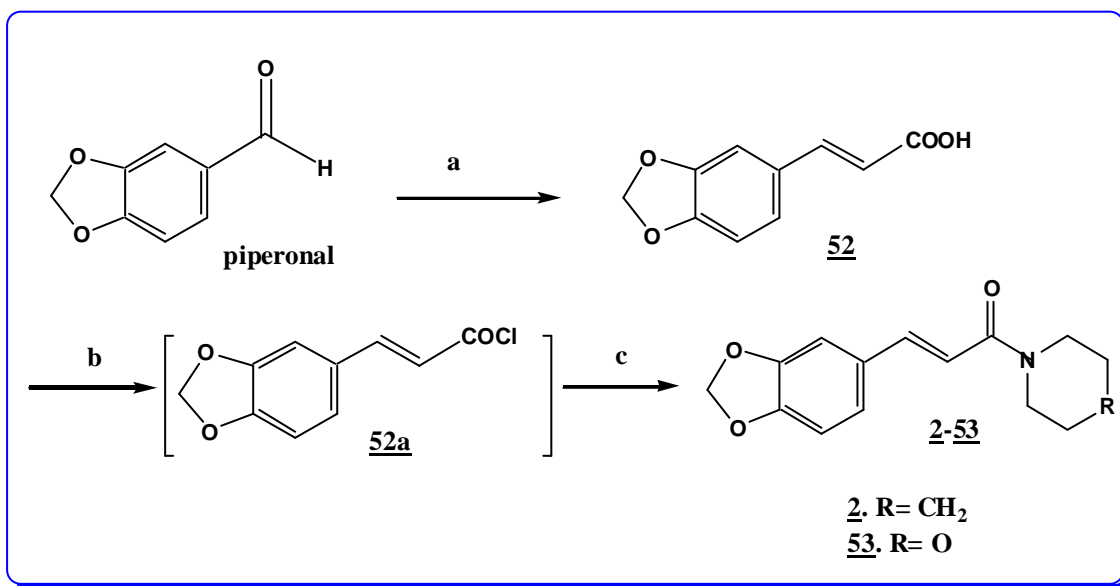
OBS: * Estes valores podem estar trocados.

3.2.2.6. Seqüência de reações envolvidas na síntese dos derivados cinâmicoila piperidil (2) e morfolinil (53) substituídos

A preparação do ácido cinâmico (52) (**Esquema 16**) foi realizada utilizando uma reação de Knoevenagel clássica, através da reação entre o piperonal e o ácido malônico, em presença de piperidina, tendo piridina como solvente (Da Silva *et al.*, 2002).

A reação se dá através da formação do enolato do ácido malônico, pela ação da piperidina como base. O ânion formado ataca o centro eletrofílico do piperonal (carbonila aldeídica), formando um intermediário susceptível de sofrer *in situ* uma eliminação descarboxilativa, gerando o alceno com configuração *E*. Após neutralização ácida do meio, o ácido cinâmico 52 é formado. Na preparação das amidas 2 e 53 a partir do ácido 52, foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente para as amidas obtidas a partir do ácido piperínico (**Esquema 9**, página 38). As amidas 2 e 53 foram obtidas em rendimentos satisfatórios (**Esquema 16**).

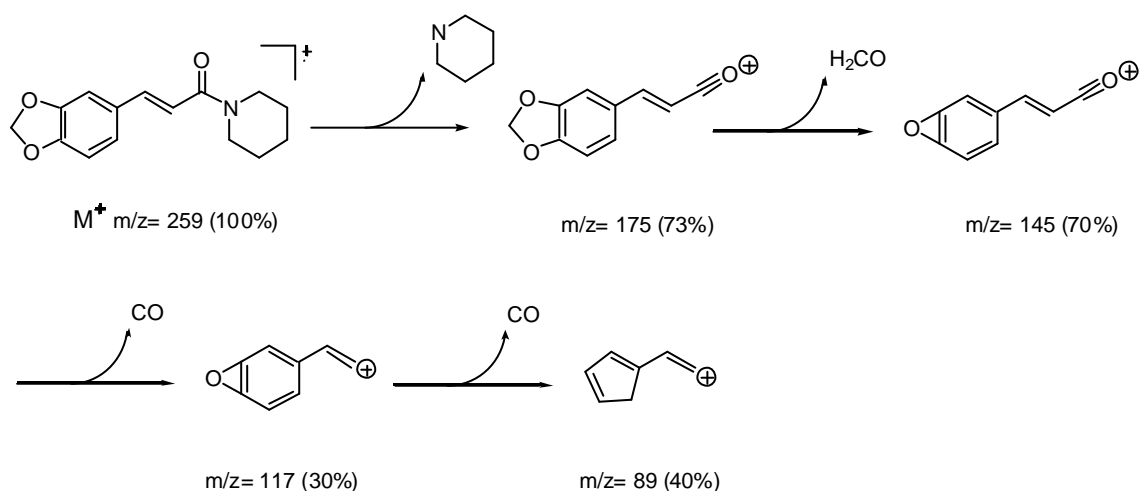
A piperamida 2 é um produto natural isolado por Loder *et al.* (1969) de *Piper novae hollandie*.



Condições: a. ácido malônico, piperidina, piridina, refluxo, 1,5h; resfriamento, HCl_(aq), (96%); b. (COCl)₂, 25°C, N₂, 30 min.; c. piperidina ou morfolina, 0°C, N₂, 30-40min., CH₂Cl₂; (75-80%).

Esquema 16: Seqüência de preparação dos derivados cinâmicos.

No espectro de IV de **2** observa-se uma forte absorção em 1644cm^{-1} , indicando a presença da função carbonila amídica conjugada, além das absorções na região entre $3058 - 2854\text{cm}^{-1}$, referentes as deformações axiais das ligações C-H (**Espectros 64**, página 124). No espectro de RMN¹H observam-se um sinal simples em δ 5,9 ppm, referente aos 2 hidrogênios do grupamento metilenodioxílico, além de um grupo de sinais entre δ 3,6 a δ 7,6 ppm, referentes aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral, e aos 3 hidrogênios aromáticos (**Espectros 66**, página 125). No espectro de RMN ¹³C observa-se um sinal a δ 165,39 ppm, referente ao deslocamento químico do carbono da carbonila amídica (**Espectros 67**, página 125). O espectro de massas mostrou, além do pico do íon molecular e pico base ($m/z=259$ u.m.a., 100%), fragmentos característicos para a estrutura do derivado cinamoila piperidil substituído **2** (**Espectro 65**, página 124). O **Esquema 17** mostra uma proposta de fragmentação o derivado cinamoila piperidil substituído **2**.



Esquema 17: Proposta de fragmentação para o derivado cinamoila piperidil substituído **2**.

3.3. Avaliação da atividade biológica

A avaliação da atividade tripanocida das moléculas obtidas neste trabalho foi realizada no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Gicobiologia, UFRJ, em colaboração com o aluno de mestrado Leonardo Freire de Lima e o professor Norton Heise.

Os ensaios biológicos foram realizados primeiramente sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*. (amostra Y-Fundação Oswaldo Cruz-RJ).

De cada droga foi feita uma solução estoque (10 mg/mL). Trabalhamos com um número de parasitas de $2,0 \times 10^5$ células/mL. Foram realizadas diluições seriadas das drogas testadas, de forma que chegaram-se a concentrações finais de 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56 e 0,78 $\mu\text{g/mL}$. A contagem de células foi realizada por sete dias em câmara de Neubauer, sendo que do primeiro ao sexto dia, fez-se a contagem somente dos poços onde havia maior concentração das drogas (25 $\mu\text{g/mL}$) e no sétimo dia fez-se a contagem de todos os poços. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Todos os compostos análogos e derivados da piperina foram testados sobre a forma epimastigota de *T. cruzi*, e os de maior toxicidade foram selecionados para serem testados contra a forma amastigota de *T. cruzi*.

Como pode ser visto na **Tabela 5**, a piperina **1** apresentou toxicidade comparável ao benzonidazol **32** ($\text{IC}_{50} = 7,36 \mu\text{M}$ para **1** e $2,20 \mu\text{M}$ para **32**)

Dos derivados preparados, a piperetina **3**, tetrahidropiperina **40**, as amidas morfolil **42** e diisopropil **31** e a amina alílica **47** foram as que demonstraram maior toxicidade sobre a forma epimastigota de *T. cruzi*, estes testes serviram para fazermos a seleção dos derivados que serão avaliados sobre a forma amastigota intracelular de *T. cruzi*.

Tabela 5: Valores de IC₅₀ para a piperina, derivados e benzonidazol frente às formas epimastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Compostos	Epimastigotas IC ₅₀ (µM)	Amastigotas IC ₅₀ (µM)
<u>1</u>	7,36	4,91
<u>2</u>	>96,52	NT ^a
<u>3</u>	10,67	7,40
<u>31</u>	14,85	7,77
<u>32^b</u>	2,20	2,58
<u>40</u>	19,41	11,52
<u>41</u>	>114,67	NT ^a
<u>42</u>	56,13	5,71
<u>43</u>	>65,61	NT ^a
<u>44</u>	>81,43	NT ^a
<u>45</u>	>83,33	NT ^a
<u>46</u>	>83,33	NT ^a
<u>47</u>	17,49	9,63
<u>53</u>	>95,78	NT ^a

^aNT: Não Testados

^b benzonidazol (droga de referência)

Foi avaliada a toxicidade das drogas mais ativas contra macrófagos peritoneais murinos não infectados, e a habilidade destes compostos em reduzir o número de amastigotas intracelulares de células infectadas *in vitro*. Os resultados são apresentados na **Tabela 5**. Foram obtidos valores de IC₅₀ dos compostos testados e comparados com a dose de Benzonidazol 32, a única droga utilizada no tratamento da doença de Chagas disponível comercialmente no Brasil.

Tanto o Benzonidazol 32, quanto a piperina 1 e seus derivados 3, 40, 31, 42, 47 não interferiram na viabilidade intracelular dos macrófagos não infectados até uma concentração de 20 µM, que foi demonstrado no teste de exclusão do Azul de Trypan com o objetivo de verificar a citotoxicidade dessas drogas em macrófagos murinos.

Como o esperado, o valor de IC₅₀ para o benzonidazol 32 foi similar ao previamente descrito na literatura para a forma epimastigota e a intracelular amastigota (Neal e Buerem,

1988; Martínez-Díaz *et al.*, 2001). A piperina demonstrou ser um potente inibidor de *T. cruzi*, sendo mais tóxica sobre amastigotas intracelulares do que sobre epimastigotas.

Dos derivados preparados, o ácido piperínico **41** e o éster **46** não apresentaram atividade na dose máxima em epimastigotas, o que mostra a importância da presença de uma função nitrogenada na cadeia para a atividade tripanocida. As amidas **2**, **43**, **44**, **45**, **53** mostraram-se inativas contra epimastigotas nas dosagens testadas. Logo, os derivados **2**, **41**, **43**, **44**, **45**, **46** e **53** não foram testados contra amastigotas. A menor toxicidade da amida **2** mostrou a importância da extensão da cadeia lateral na molécula original. Esta toxicidade foi mantida pela piperetina **3**, tanto contra epimastigotas quanto contra amastigotas (**Tabela 5**, página 52). A remoção das duplas ligações (formando a tetraidropiperina **40**) ocasionou uma diminuição na toxicidade, mas não demonstrou interferência significativa na atividade, isto sugere que a conjugação da cadeia lateral com o anel aromático não é essencial para a atividade tripanocida. A mudança do anel piperidínico do produto natural pelos grupos diisopropil (**31**) ou morfolinil (**42**) produziram compostos com menor atividade contra epimastigotas, mas, surpreendentemente, isso não interferiu significativamente em suas toxicidades contra amastigotas intracelulares. Outro dado relevante diz respeito à maior atividade observada para as amidas terciárias (**1**, **3**, **31**, **42**), comparadas às de natureza secundária (**43** e **44**) que se apresentaram inativas. Surpreendentemente a amida **45** (de natureza terciária) não demonstrou atividade tóxica sobre as formas epimastigotas. Finalmente, a redução da carbonila amídica da piperina, levando à formação de sua respectiva amina alílica **47**, conservou significativamente os efeitos tóxicos contra os parasitas, mostrando que a função amídica não é essencial a atividade tóxica sobre *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

5) MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Instrumental utilizado nas caracterizações espectrométricas:

- Os espectros de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) foram obtidos em espectrômetro de marca Bruker, modelo AC200 (PPGQO – UFRRJ). Foi utilizado como referência interna o tetrametilsilano (TMS) e os solventes clorofórmio (CDCl_3) e DMSO-*d*₆ na solubilização das amostras. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em unidade de parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz(Hz).

- Os espectros de IV foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer 1600 FT (PPGQO – UFRRJ), e Shimadzu IR-470 (IME), utilizado-se filme em NaCl para as amostras líquidas ou pastilhas de KBr para as amostras sólidas.

- Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons (70eV) utilizando cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrômetro de massa modelo VARIAN-SATURN 2000. Coluna capilar CP-SIL8CB (30 m X 0,25 X 0,25 μm). Temperatura do injetor = 250°C. Temperatura da fonte = 280°C. Condições de análise: Temperatura inicial = 150°C/1' -5°C/1' -270°C.

5.2. Nas análises, síntese e purificações

- Cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ (camada de 0,2 mm), da marca Merck para o acompanhamento por CCF (*Cromatografia de Camada Fina*) das reações.

- Sílica gel para coluna (70-230 mesh) , da marca Vetec.

- Solventes: acetato de etila, hexano, acetona, clorofórmio, diclorometano, etanol, éter etílico, metanol, THF, tolueno, fornecidos pela Vetec. Todos os solventes utilizados nas reações e nos métodos de purificação foram previamente destilados, quando necessário, e alguns deles foram tratados e secados de acordo com os métodos descritivos na literatura (Perrin *et al.*, 1966).

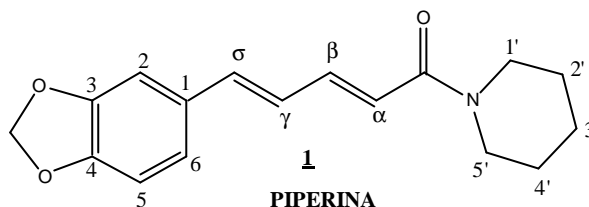
- Reagentes: hidróxido de potássio, hidrogênio, catalisador 10% Pd/C, ácido clorídrico concentrado, cloreto de oxalila, morfolina, diisopropilamina, veratrilamina, benzilamina, *N*-metil-piperazina, cicloexanol, piperonal, ácido malônico, piridina, piperidina, ácido acético glacial, piperidilamina, MgSO₄ anidro, NaOH, DIBAL, MnO₂, KMnO₄, sulfato de manganês, NaH, trietil 2-fosfoetanoato, K₂CO₃, NaCl, Na₂SO₄ anidro.

- Pimenta-do-reino comercial.

5.3. Outros equipamentos

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

5.4. Isolamento da E,E-1-N-piperoilpiperidina (piperina 1)



Em aparelhagem de Soxhlet foram colocados 50g de pimenta-do-reino e 500mL de etanol para a extração. A operação foi mantida por aproximadamente 3 horas (aparelhagem mostrada **na Figura 18**, página 30).

Após concentrar o extrato em evaporador rotatório, obteve-se um resíduo de aspecto viscoso e aroma adocicado, adicionou-se ao mesmo uma solução alcoólica de KOH a 10% para que ocorresse a precipitação dos taninos e demais materiais fenólicos, contaminantes do meio, na forma dos respectivos sais de potássio. Após filtração e remoção do material precipitado, foi adicionada ao sobrenadante uma pequena quantidade de água, suficiente para que o meio se tornasse turvo. Após um período de 48 horas em repouso, formou-se um precipitado amarelo que foi filtrado sob pressão reduzida. O sólido obtido foi lavado com pequena quantidade de água gelada, seguido de éter etílico gelado. Foram obtidos 3,5g (7%) de piperina na forma de cristais amarelo-claro.

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

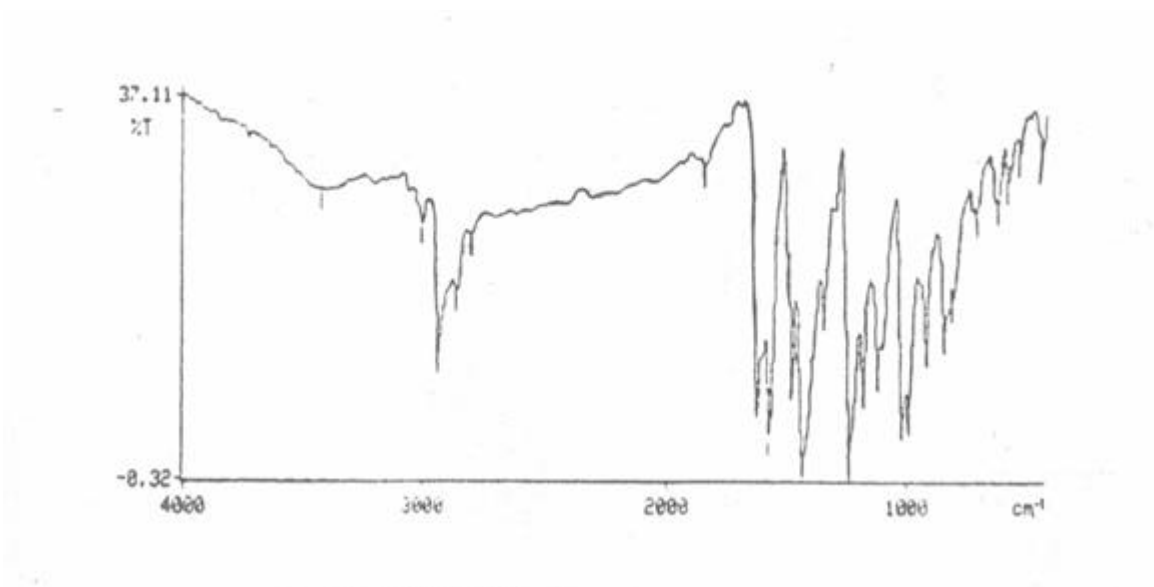
$\gamma_{\text{ass}}\text{CH}_2(\text{Csp}_3)$: 2937

$\gamma_{\text{s}}\text{CH}_2(\text{Csp}_3)$: 2858

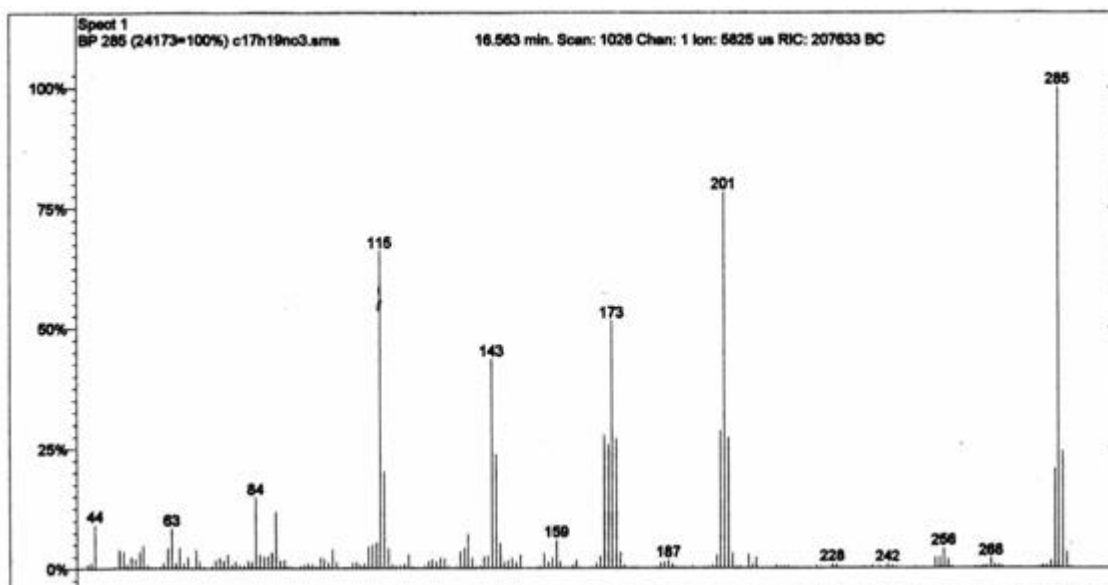
$\gamma\text{C}=\text{O}$: 1643

Aparecimento de banda adicional 1582(JC=C, vibrações do esqueleto do anel aromático) sugere a presença de elétrons conjugados com o anel.

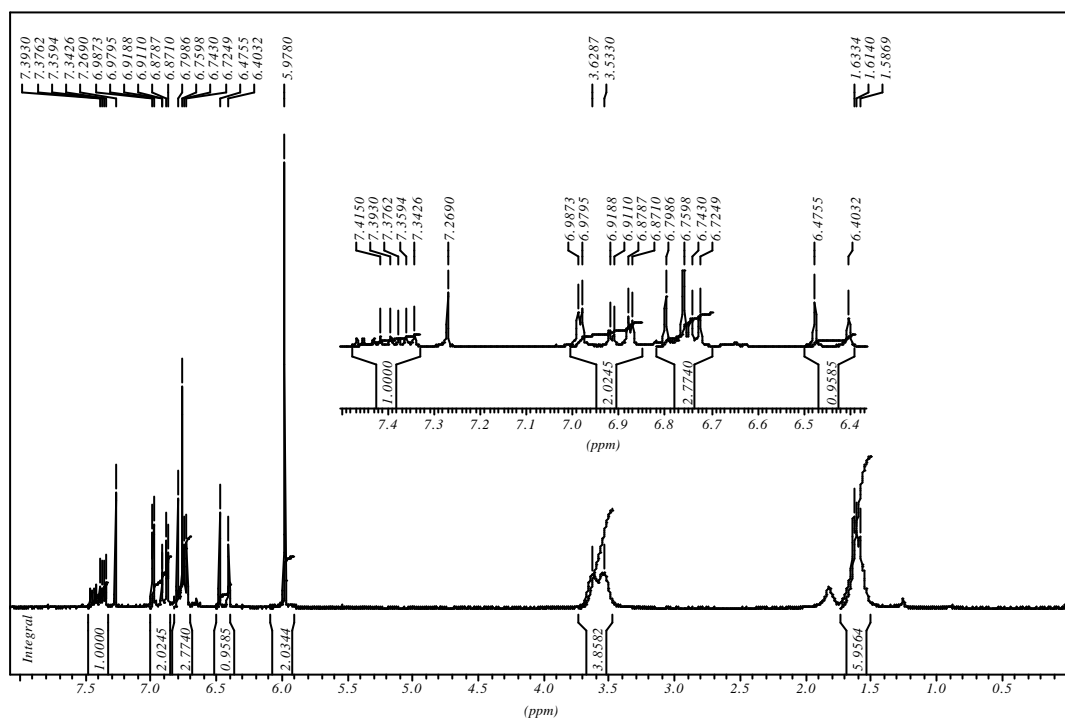
JO-CH₂-O: 1132



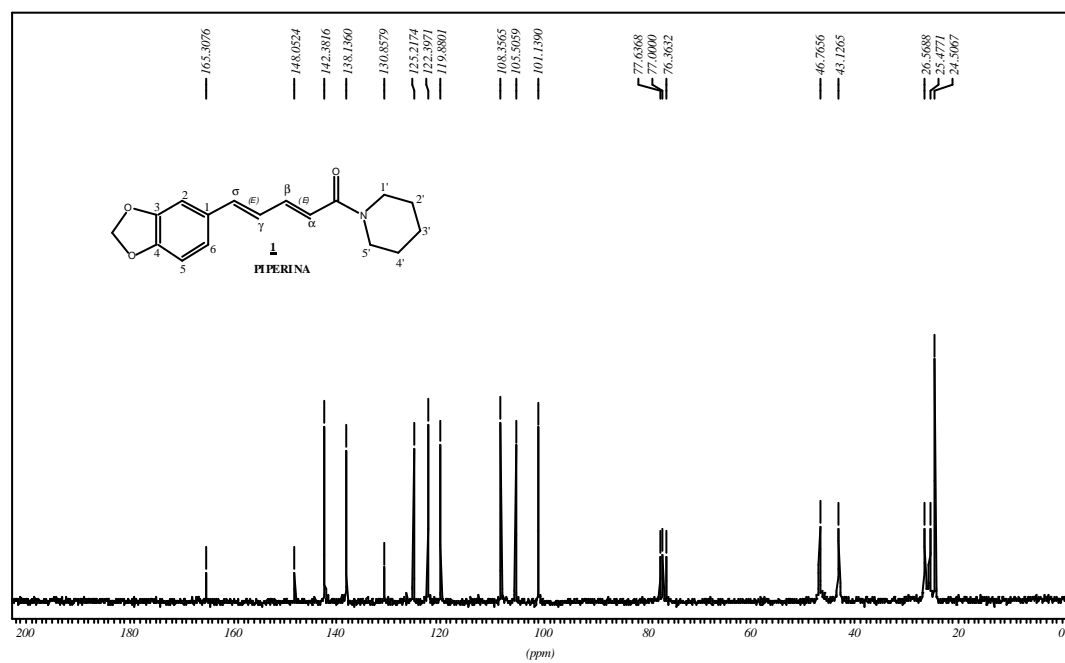
Espectro 1: Espectro de IV da piperina.



Espectro 2: Espectro de massas da piperina.



Espectro 3: Espectro de RMN¹H da piperina.

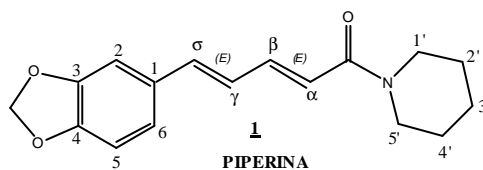


Espectro 4: Espectro de RMN¹³C da piperina.

Tabela 6: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a piperina :

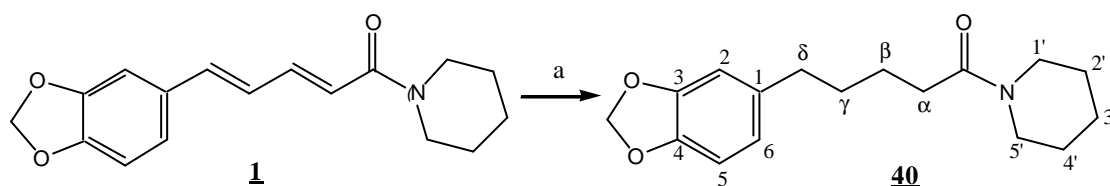
Posição	Piperina (CDCl ₃)	
	s _H (ppm), J(Hz):	s _C ^a (ppm):
1'	3,53-3,63 (m,2H)	43,1(CH ₂)
2'	1,58-1,61 (m,2H)	26,6 (CH ₂)
3'	1,58-1,63 (m,2H)	24,5 (CH ₂)
4'	1,58-1,63 (m,2H)	25,5 (CH ₂)
5'	3,53-3,63 (m,2H)	46,7 (CH ₂)
C=O	-----	165,3 (C)
a	6,40(d, J=14, 1H)	122,4 (CH)
β	7,39(dd, J=14,46, J=7, 1H)	142,3 (CH)
?	7,35(dd, J=14,46, J=7, 1H)	125,2(CH)
d	6,75(d, J=14, 1H)	138,1(CH)
1	-----	130,8 (C)
2	6, 89(d, J=2, 1H)	105,5 (CH)
3	-----	148 (C)
4	-----	148 (C)
5	6,7(d, J=8, 1H)	108,3 (CH)
6	6,91(dd, J=8, J=1,5; 1H)	119,9 (CH)
OCH ₂ O	5,98(s,2H)	101,1(CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT



5.5. Modificações Estruturais realizadas na piperina

5.5.1. Redução catalítica da piperina (Hudlicky, 1986). Preparação da tetraidropiperina (**40**)



Reagentes: a) H₂, Pd/C; acetato de etila, pressão atmosférica, t.a., 2h

Em um balão de 50mL de capacidade, foi feita uma solução de 0,2g (0,69 mmols) de piperina em 9 mL de acetato de etila, sobre a qual adicionou-se e 20 mg do catalisador Pd/C 10%. Esta suspensão foi mantida sob agitação à temperatura ambiente. Selou-se o balão com um septo retirando-se o ar presente no balão por um sistema de vácuo. Um balão contendo hidrogênio foi fixado ao septo. O meio reacional permaneceu sob pressão de hidrogênio e agitação por 2 horas, quando então a solução passou de amarela a incolor. Após o término da reação (acompanhada por CCF), o meio reacional foi filtrado numa coluna empacotada com sílica gel, a fim de retirar-se o catalisador. Após evaporação do solvente foram obtidos 0,19g (95%) na forma de um óleo amarelo claro.

IV(Filme):

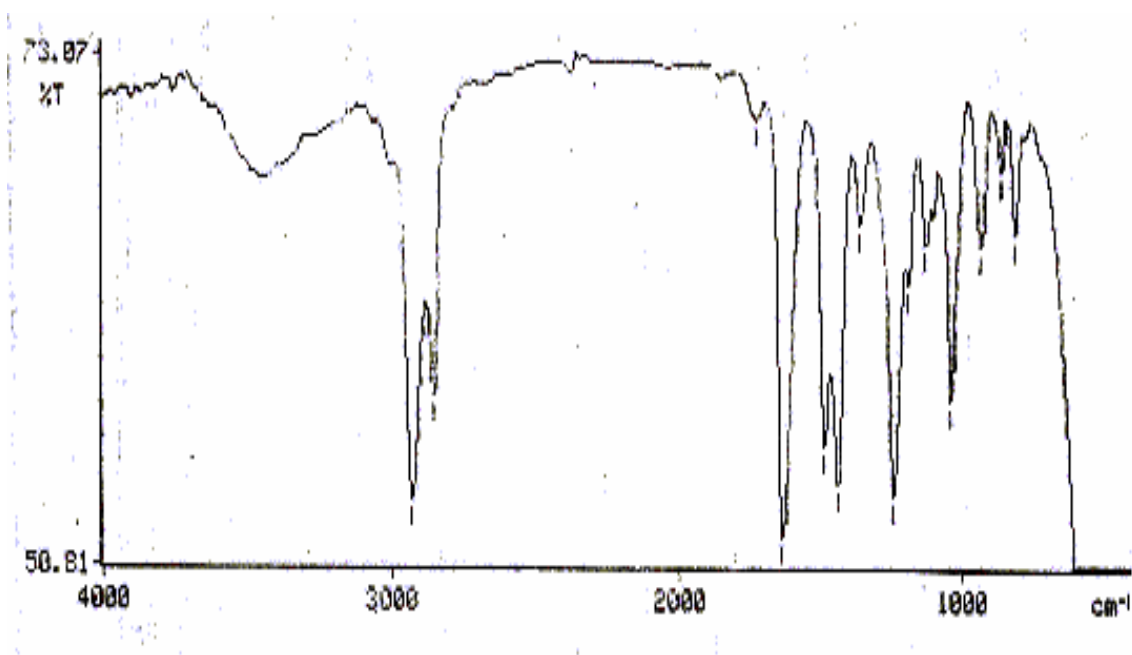
J_DCH₂(C_{sp}³):2929

J_SCH₂(C_{sp}³):2853

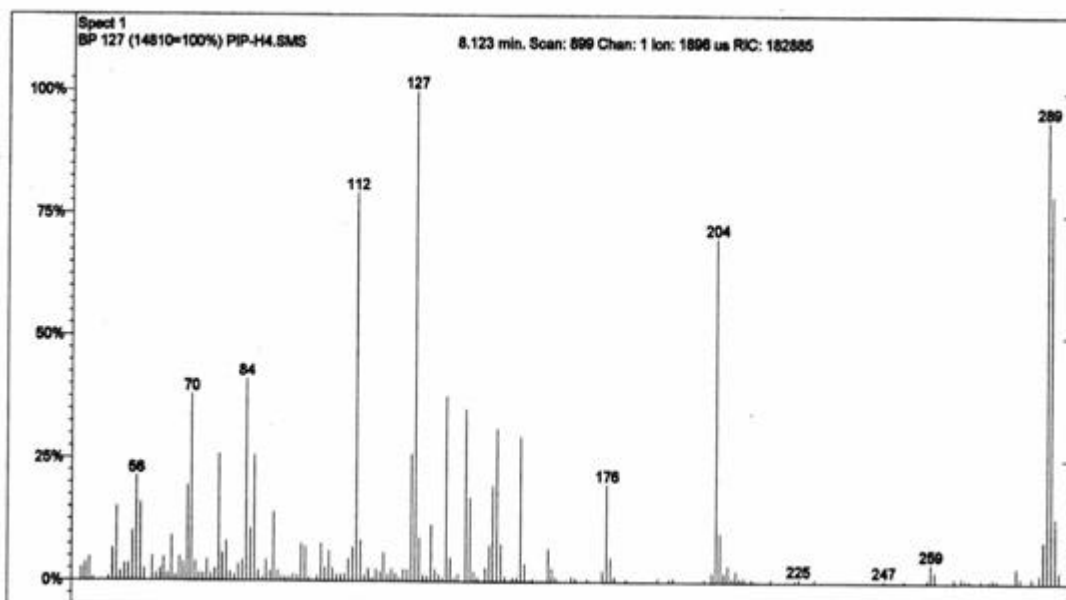
JC=O:1637

JC=C:1490(vibração do esqueleto de anel aromático)

JO-CH₂-O:1210



Espectro 5: Espectro de IV da tetrahidropiperina.

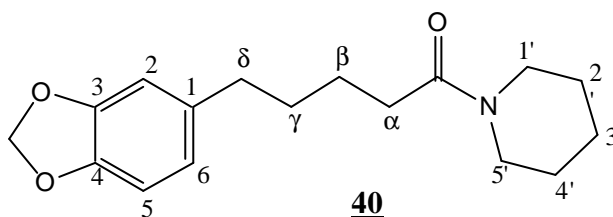


Espectro 6: Espectro de massas da tetrahidropiperina.

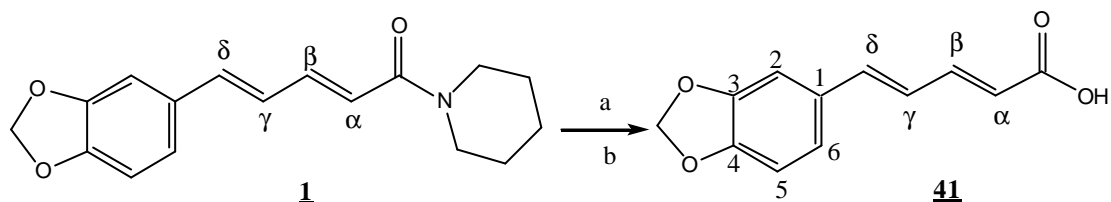
Tabela 7: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a tetraidropiperina :

Posição	piperina hidrogenada (CDCl ₃)	
	s _H (ppm), J(Hz):	s _C ^a (ppm):
1'	3,45-3,50 (m,2H)	42,0(CH ₂)
2'	1,45-1,58 (m,2H)	24,3(CH ₂)
3'	1,45-1,58 (m,2H)	23,9(CH ₂)
4'	1,45-1,58 (m,2H)	25,0(CH ₂)
5'	3,27-3,32 (m,2H)	46,1(CH ₂)
C=O	-----	170,7(C)
a	2,2 (t, J=7,02; 2H)	25,9(CH ₂)
β	1,45-1,55 (m,2H)	34,4(CH ₂)
γ	1,45-1,55 (m,2H)	32,6(CH ₂)
d	2,4 (t, J=7,02; 2H)	30,8(CH ₂)
1	-----	135,5 (C)
2	6,57-6,60 (m,1H)	107,4(CH)
3	-----	146,9(C)
4	-----	144,9(C)
5	6,57-6,60 (m,1H)	108,2(CH)
6	6,65 (m,1H)	120,5 (CH)
OCH ₂ O	5,84 (s,2H)	101,1(CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.



5.5.2. Hidrólise alcalina de piperina: Preparação do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2E,4E-pentadienóico 41) (Ikan, 1991)



Reagentes: a) KOH / Etanol, refluxo, 12h;
b) HCl 10%, até pH 3

Foram colocados em balão de 50 mL, 4g de piperina em 40 mL de solução alcoólica de KOH 20%. A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação por 12 horas, passando de amarela a marrom com formação de precipitado.

Retirou-se todo o etanol da mistura reacional em evaporador rotatório. Acrescentou-se água ao resíduo formado, deixando atingir a temperatura de ebulição, a fim de solubilizar todo o material precipitado, sendo a solução, em seguida, filtrada à quente. A esta solução aquosa do respectivo carboxilato, acrescentou-se solução de HCl concentrado até chegar a pH próximo de 3, ocorrendo a precipitação do ácido na forma de um sólido amarelo. Após filtração sob pressão reduzida, o material foi lavado com água gelada. O sólido obtido foi seco em dessecador e recristalizado em etanol, gerando 3,48g (87%) do ácido piperínico 41.

(p.f.: 216-7°C , Lit.: 216-7°C) (Ikan, 1991).

IV(KBr,cm⁻¹):

JO-H: 3449

JC-H(Csp₂): 2922

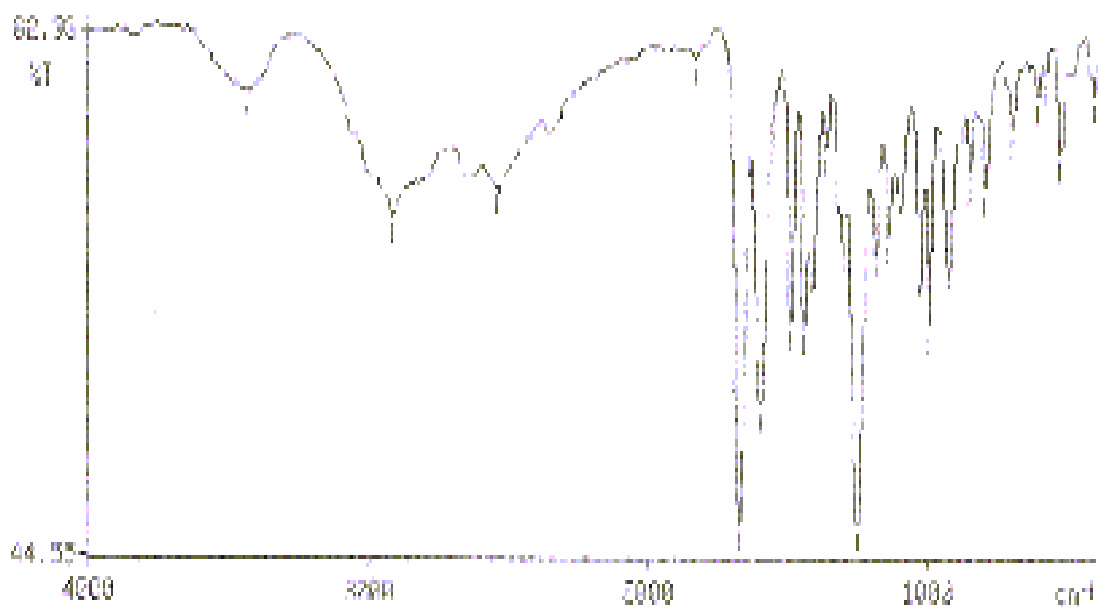
JC=O: 1678

JC=C: 1603-1449(vibração do esqueleto de anel aromático)

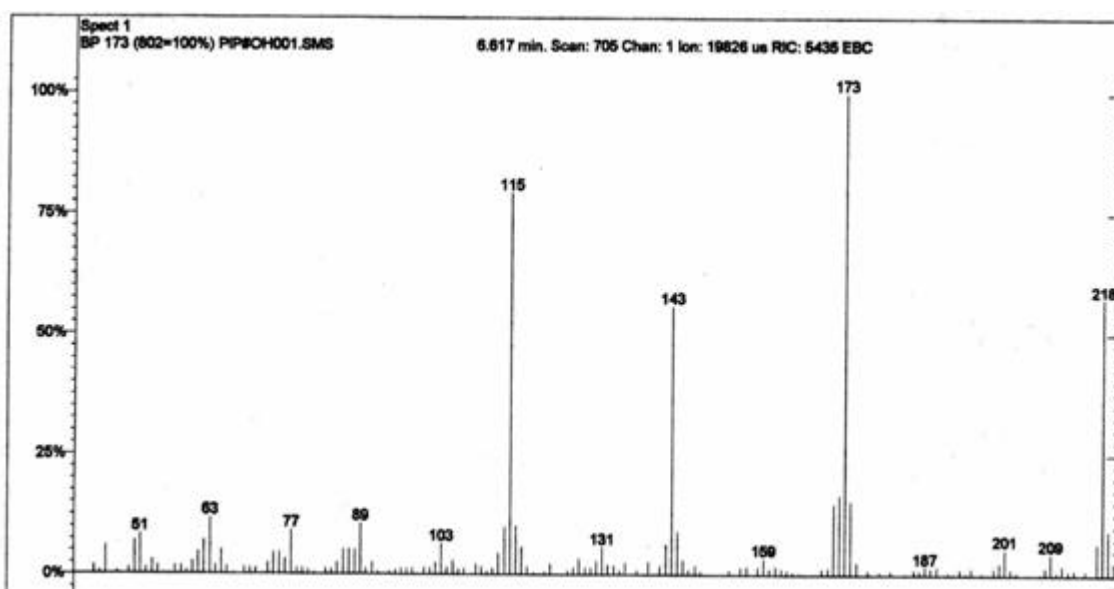
JC-O-C:1257

?C-H: 930(dobramento de H_{arom.} isolado)

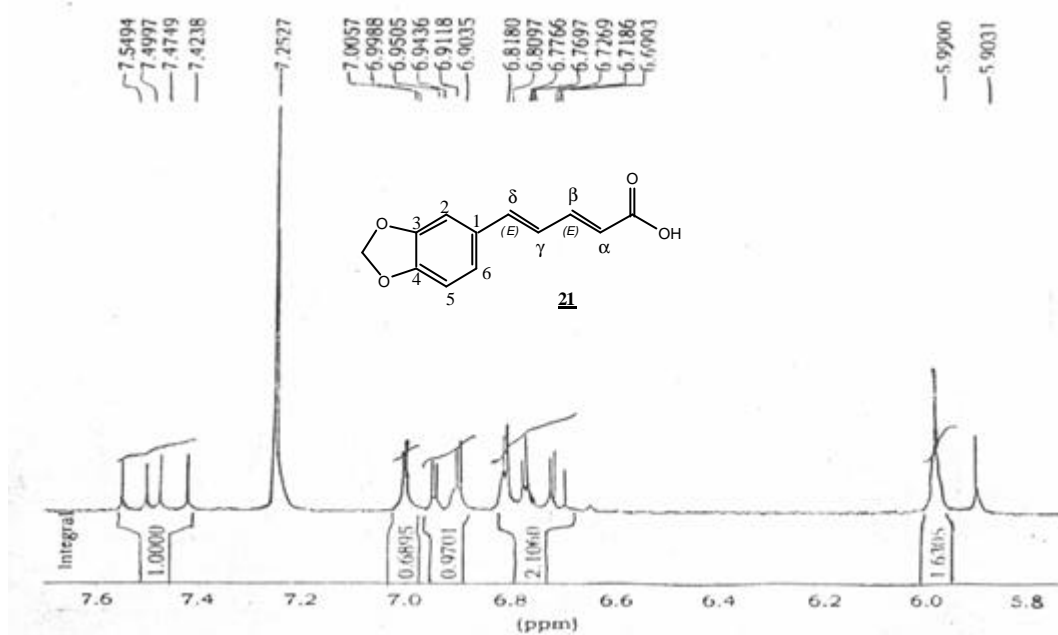
?C-H:852-799(dobramento de 2H_{arom.} vizinhos)



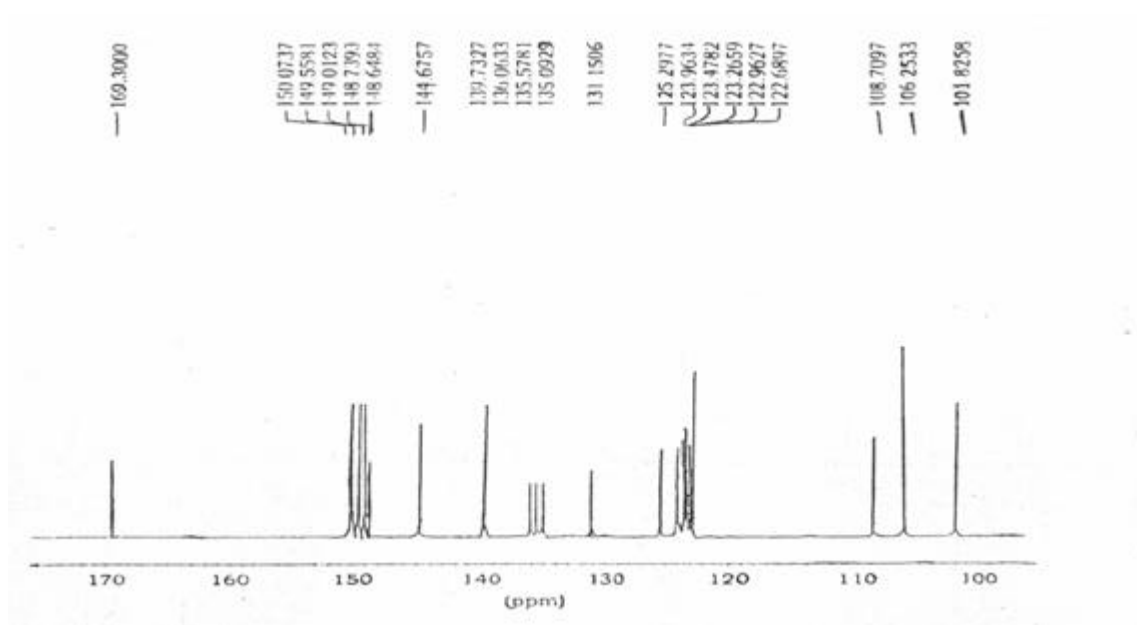
Espectro 9: Espectro de IV do ácido piperínico.



Espectro 10: Espectro de massas do ácido piperínico.



Espectro 11: Espectro de RMN ¹H do ácido piperínico.

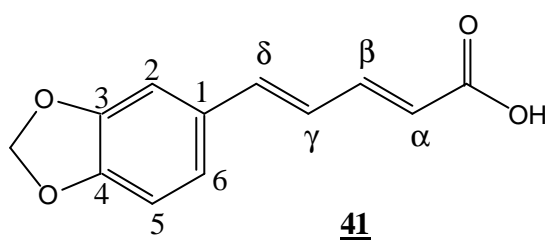


Espectro 12: Espectro de RMN ¹³C do ácido piperínico.

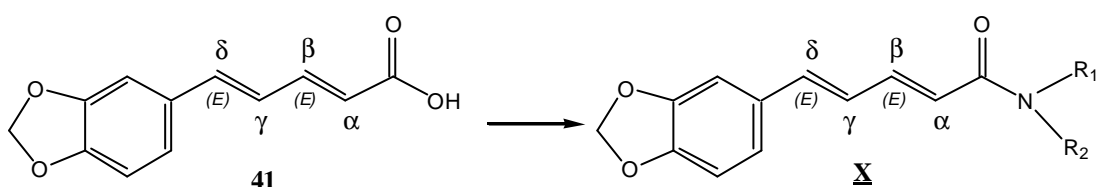
Tabela 8: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o ácido piperínico:

Posição	ácido piperínico (CDCl ₃)	
	s _H (ppm), <i>J</i> (Hz):	s _C ^a (ppm):
C=O	-----	169,3(C)
α	5,89(d, <i>J</i> =13, 1H)	123,3(CH)
β	7,5(dd, <i>J</i> =16, <i>J</i> =9,6, 1H)	139,7(CH)
γ	6,72(dd, <i>J</i> =16, <i>J</i> =9,6, 1H)	144,7(CH)
δ	6,77(d, <i>J</i> =16, 1H)	125,3(CH)
1	-----	131,2(C)
2	6,99(d, <i>J</i> =1,4, 1H)	108,7(CH)
3	-----	148,8(C)
4	-----	148,7(C)
5	6,8 (d, <i>J</i> =8, 1H)	106,4(CH)
6	6,94 (dd, <i>J</i> =8, <i>J</i> =1,4; 1H)	122,7(CH)
OCH ₂ O	5,99 (s, 2H)	101,8(CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.

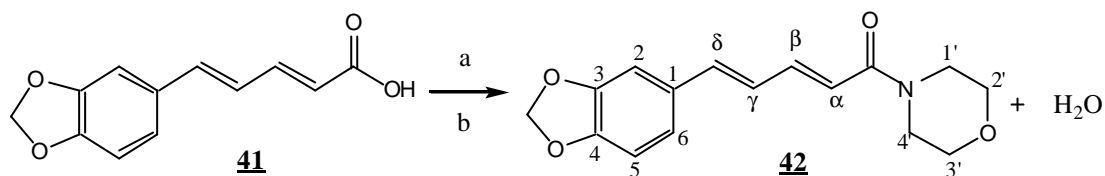


5.5.3. Procedimento geral para obtenção de amidas e ésteres a partir do ácido piperínico (Szmuszkovice, J., 1964)



Em um balão de 25mL de capacidade, mantido sob atmosfera de N₂, foi feita uma solução de 0,150g (0,688mmols) de ácido piperínico em 1mL de cloreto de oxalila. A mistura reacional ficou sob agitação, à temperatura ambiente, por cerca de 30 a 40 minutos, durante os quais foi observado desprendimento gasoso. A reação foi acompanhada por CCF até o consumo total do ácido de partida (pela adição de pequena quantidade do meio reacional em metanol, gerando o respectivo éster metílico). O excesso de cloreto de oxalila foi evaporado sob pressão reduzida, levando à formação de um resíduo amarelo que foi dissolvido em 2mL de CH₂Cl₂ (seco) e a solução resultante, mantida sob atmosfera de N₂, foi colocada num banho de gelo sendo adicionado sobre a mesma, gota-a-gota 0,722mmols do reagente adequado (amina ou álcool). Após cerca de 20 minutos de agitação à temperatura ambiente, a análise por CCF indicou o término da reação. O solvente foi recristalizado em etanol ou por cromatografia *flash* sobre sílica gel, usando como eluente hexano/acetato de etila 10 %) gerando os respectivos derivados de acila.

5.5.3.1. Preparação da morfolinilamida do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2E-4E-pentadienóico (41)



Reagentes: a) cloreto de oxalila
b) morfolina, CH₂Cl₂, t.a.

Seguindo o experimental descrito na página 69, foram utilizados 0,06mL (0,722 mmols; d= 0,999) de morfolina. Foram obtidos 0,197g de produto bruto, que após purificação por recristalização em etanol gerou 0,108g (55%) da amida 22 na forma de cristais amorfos de coloração bege.

Pf.:150°C.

IV (KBr,cm⁻¹):

JN-H: 3435 (amida terciária)

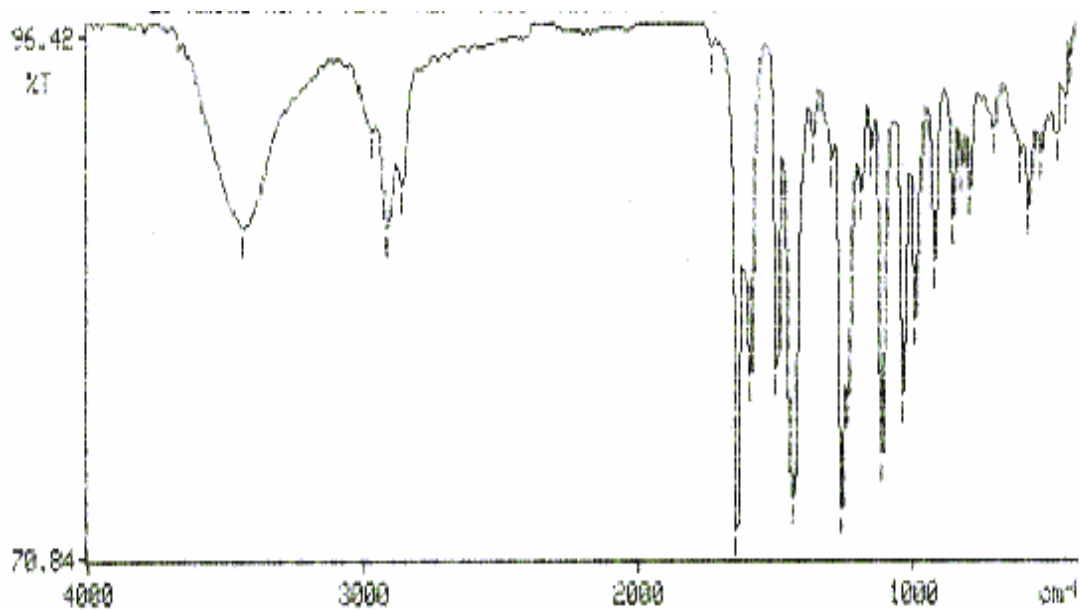
JC-H (Csp²): 2969-2860

JC=O: 1675

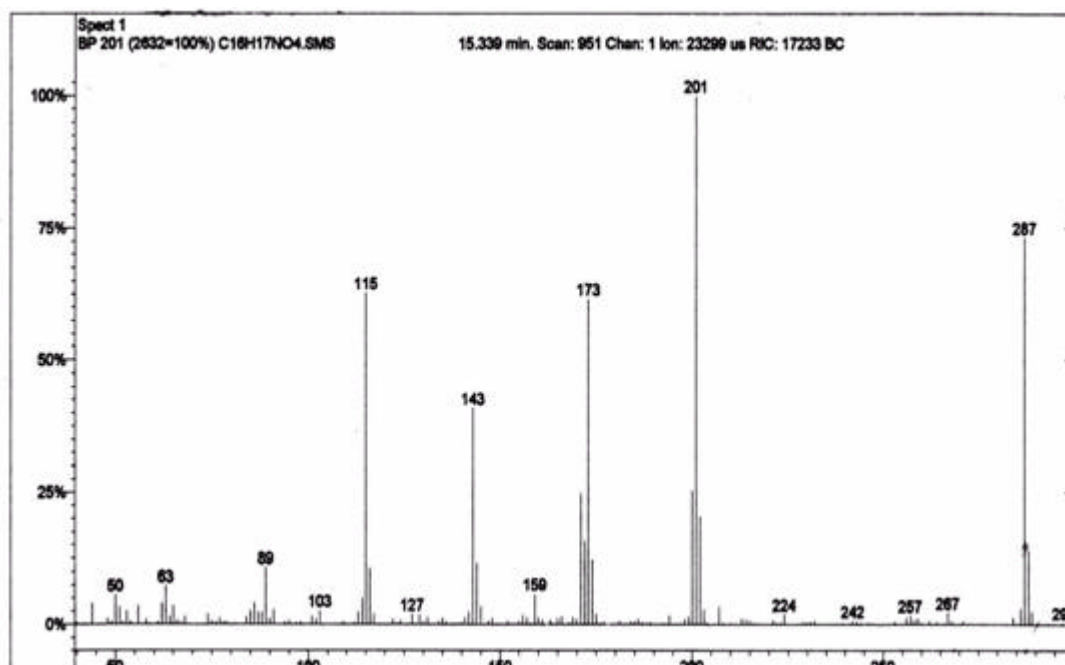
JC=C: 1594 (vibração do esqueleto de anel aromático)

JC-O-C:1262

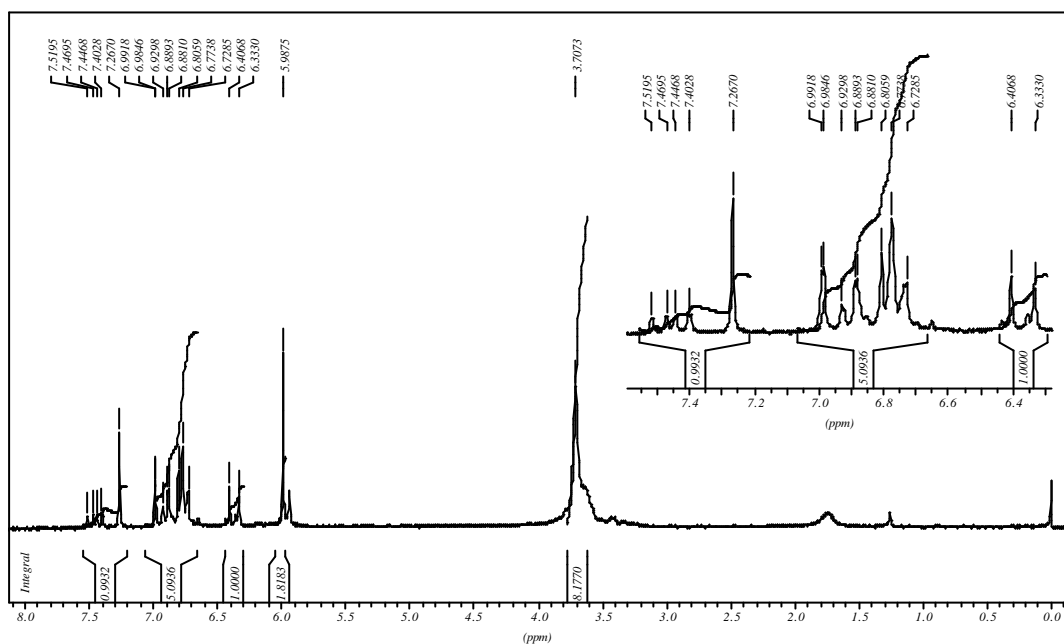
?C-H: 854-794 (aromático trissubstituído)



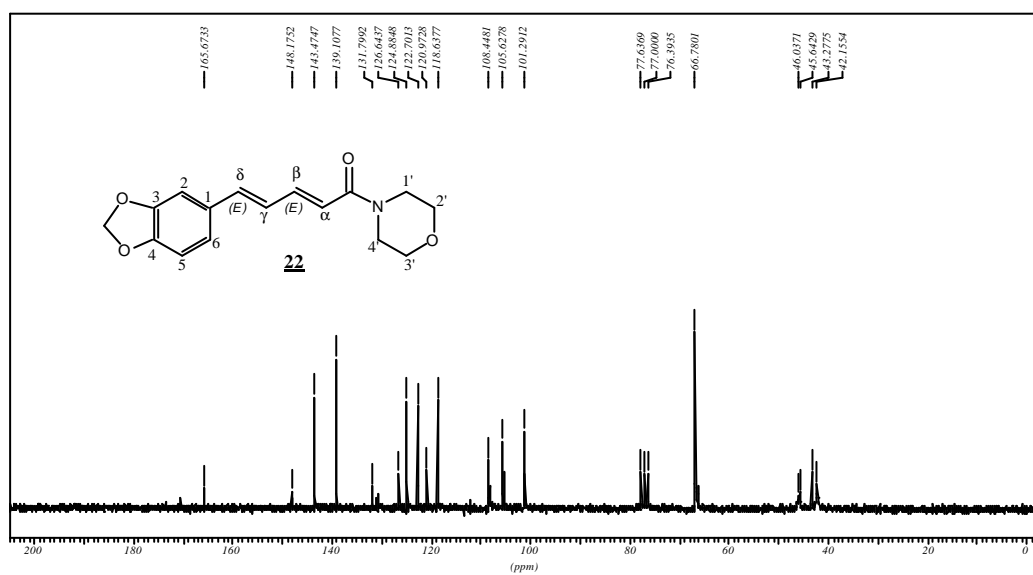
Espectro 13: Espectro de IV da amida morfolinilamida.



Espectro 14: Espectro de massas da amida morfolinilamida.



Espectro 15: Espectro de RMN ^1H da amida morfolinilamida.



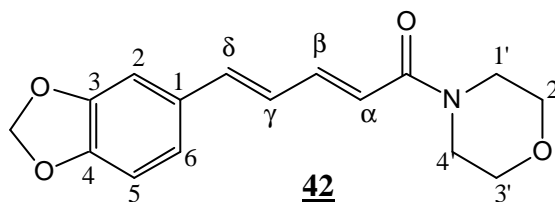
Espectro 16: Espectro de RMN ^{13}C da amida morfolinilamida.

Tabela 8: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a morfolinilamida :

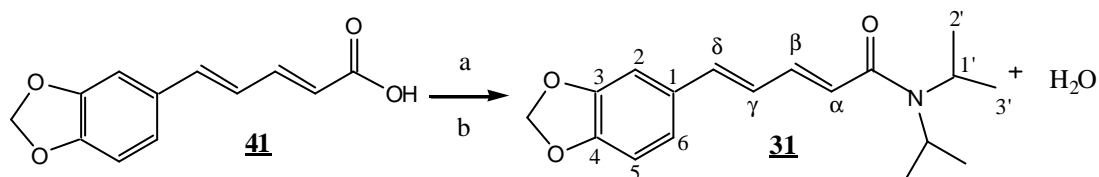
Posição	morfolinilamida (CDCl ₃)	
	s _H (ppm), J(Hz):	s _C (ppm), J(Hz):
1'	3,70(sl,2H)	46 (CH ₂)
2'	3,70(sl,2H)	66,75 (CH ₂)
3'	3,70(sl,2H)	66,75 (CH ₂)
4'	3,70(sl,2H)	43 (CH ₂)
C=O	-----	165,8 (C)
α	6,4 (d, J=14,7; 1H)	118,6 (CH)
β	7,5(dd, J=14,7; J= 10; 1H)	143,3 (CH)
γ	6,77 (s, 1H)	124,8 (CH)
δ	6,72 (d, J=9; 1H)	139 (CH)
1	-----	130,6 (CH)
2	6,95 (d, J=1,6; 1H)	108,4 (CH)
3	-----	148,2* (C)
4	-----	148,1* (C)
5	6,8 (s, 1H)	105,5 (CH)
6	6,84(dd, J=1,6; J= 8; 1H)	122,6 (CH)
OCH ₂ O	5,95 (s, 2H)	101,2 (CH ₂)

* as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.

* Estes valores podem estar trocados.



5.5.3.2. Preparação da diisopropilamida do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2E-4E-pentadienóico (**31**)



Reagentes: a) cloreto de oxalila
b) diisopropilamina, CH₂Cl₂, t.a.

Foram utilizados 0,1mL (0,722mmols; d=0,722) de diisopropilamina (recentemente destilada de CaH₂). Foram obtidos 0,200g de produto bruto, que após purificação por cromatografia flash sobre sílica gel (eluente: hexano/acetato de etila 10%) gerou 0,100g (50%) da amida **31** na forma de um óleo amarelo.

IV(KBr, cm⁻¹):

JN-H: 3441-3264(amida terciária)

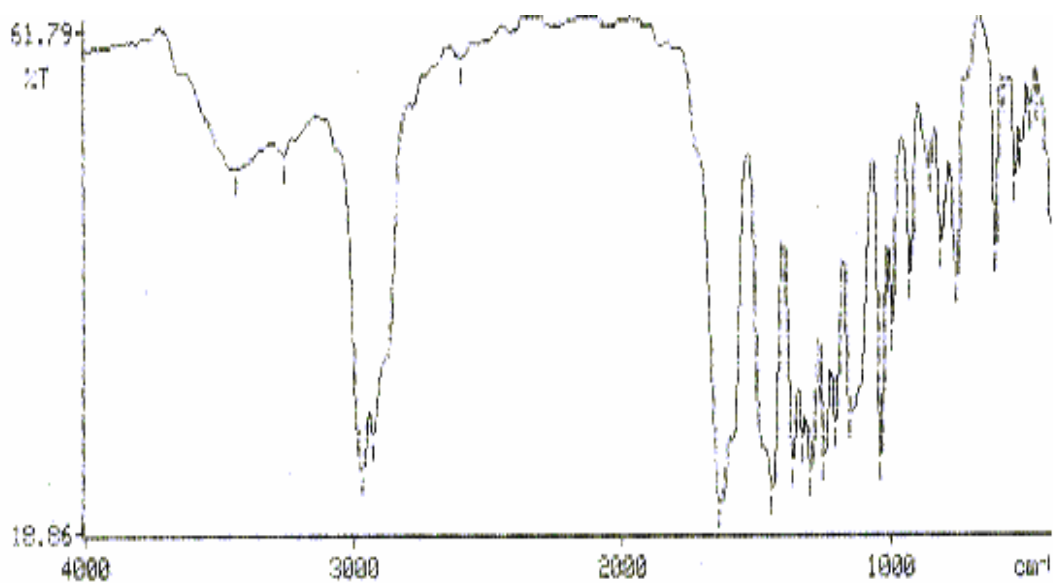
JC-H(Csp₂): 2972-2932

JC=O: 1635

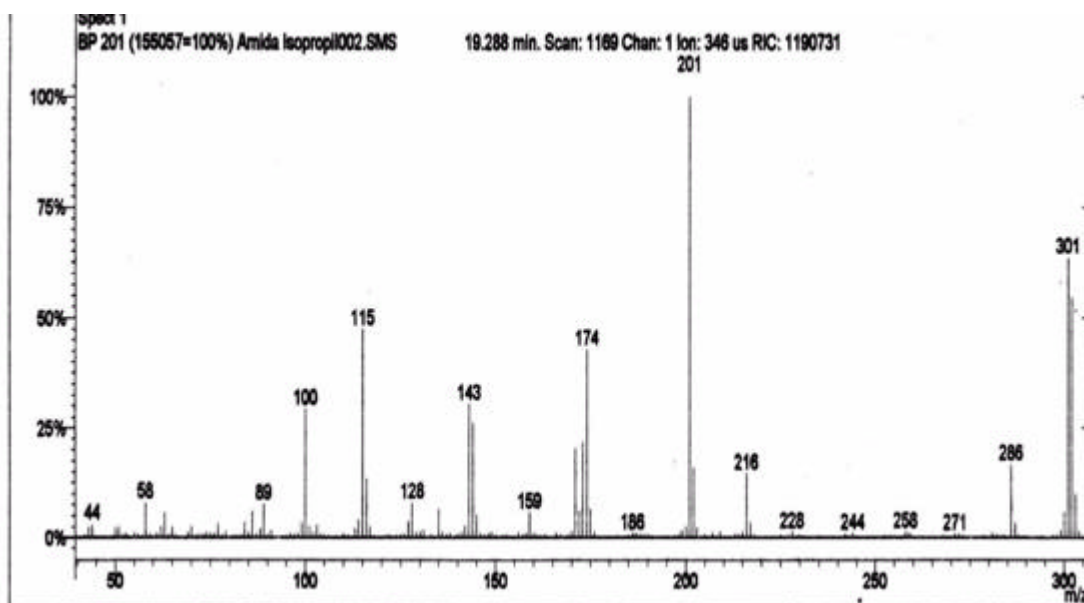
JC=C: 1443(vibração do esqueleto de anel aromático)

JC-O-C:1250

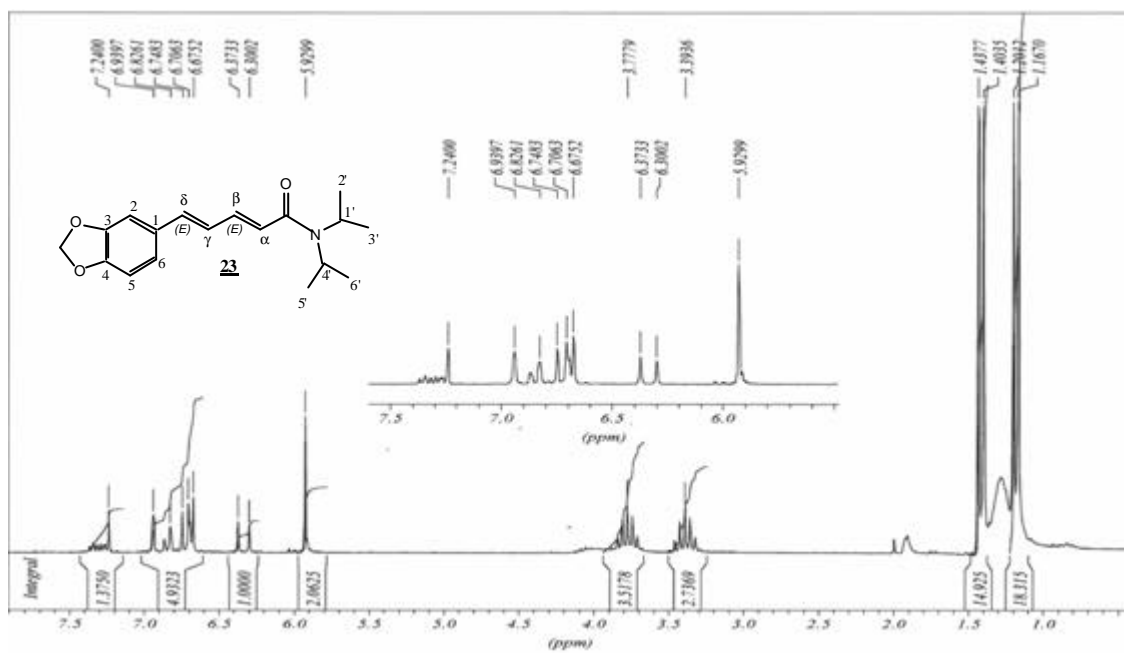
?C-H: 854-794 (aromático trissubstituído)



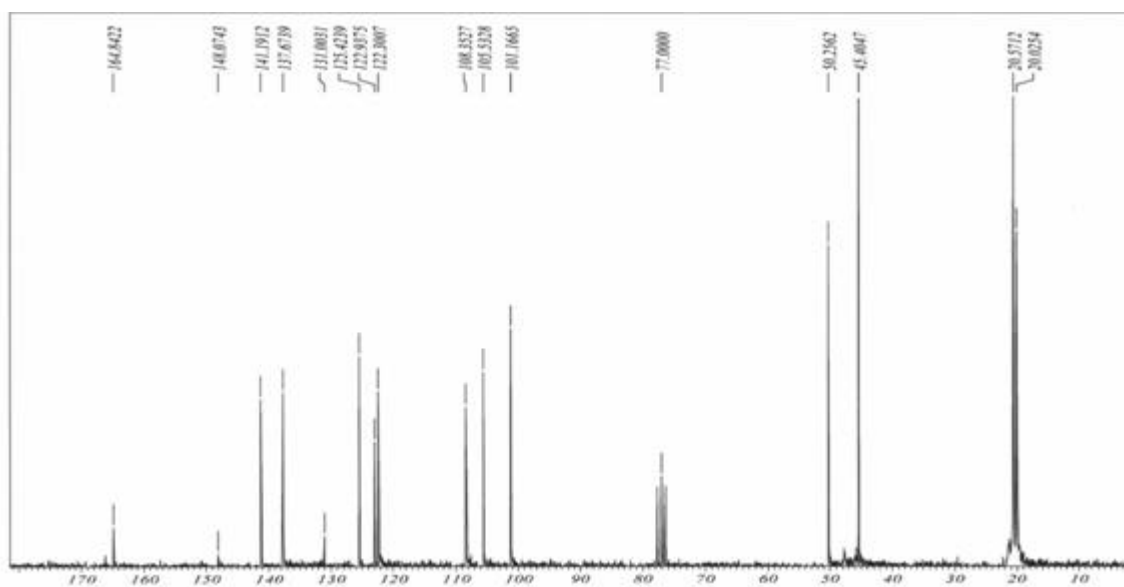
Espectro 17: Espectro de IV da amida diisopropil.



Espectro 18: Espectro de massas da amida diisopropil.



Espectro 19: Espectro de RMN¹H da amida diisopropil.

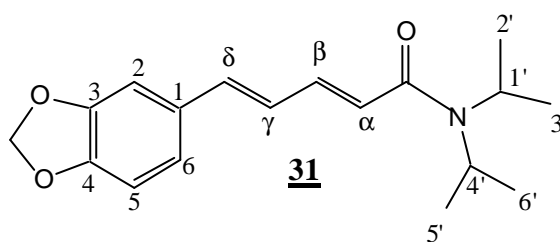


Espectro 20: Espectro de RMN¹³C da amida diisopropil.

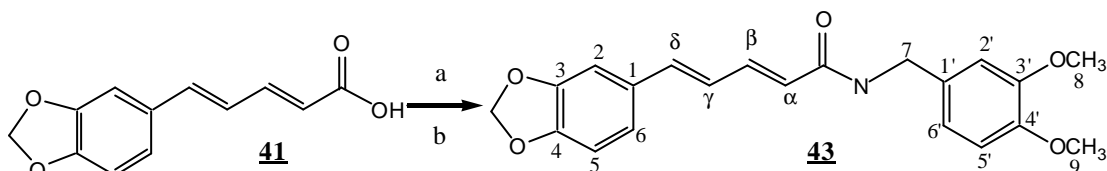
Tabela 10: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a diisopropilamida :

Posição	amida diisopropil (CDCl ₃)	
	$s_H(\text{ppm}), J(\text{Hz}):$	$s_C(\text{ppm}), J(\text{Hz}):$
1'	3,70-4,15 (m,1H)	47,8 (CH)
2'	1,43-1,25 (m,3H)	21 (CH ₃)
3'	1,43-1,25 (m,3H)	21 (CH ₃)
4'	3,70-4,15 (m,1H)	45,8 (CH)
5'	1,43-1,25 (m,3H)	21 (CH ₃)
6'	1,43-1,25 (m,3H)	21 (CH ₃)
C=O	-----	166,3 (C)
α	6,42 (d, $J=14,6$; 1H)	122,4 (CH)
β	7,32 (dd, $J=14,6, J=7$; 1H)	141,3 (CH)
γ	7,28 (dd, $J=14,6, J=7$; 1H)	123,1 (CH)
δ	6,75 (d, $J=14,6$; 1H)	137,8 (CH)
1	-----	131 (C)
2	6,9 (d, $J=1,64$; 1H)	105,5 (CH)
3	-----	148,2 (C)
4	-----	148,1 (C)
5	6,88 (d, $J=8$; 1H)	108,35 (CH)
6	6,92 (dd, $J=8, J=1,64$; 1H)	122,4 (CH)
OCH ₂ O	5,98 (s, 2H)	101,3 (CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.



5.5.3.3. Preparação da veratrilamida do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2E-4E-pentadienóico (**43**)



Reagentes: a) cloreto de oxalila
b) veratrilamina, CH₂Cl₂, t.a.

Foram utilizados 0,12mL (0,722mmols; d=1,074) de veratrilamina (recentemente destilada de CaH₂). Foram obtidos 0,262g de produto bruto, que após purificação por cromatografia flash sobre sílica gel (eluente: hexano/acetato de etila 10%) gerou 0,196g (75%) da amida **24** na forma de cristais amorfos alaranjados.

p.f.:167-168°C.

IV(KBr, cm⁻¹):

JNH: 3294

J_{ass}CH₂(Csp₂): 2940

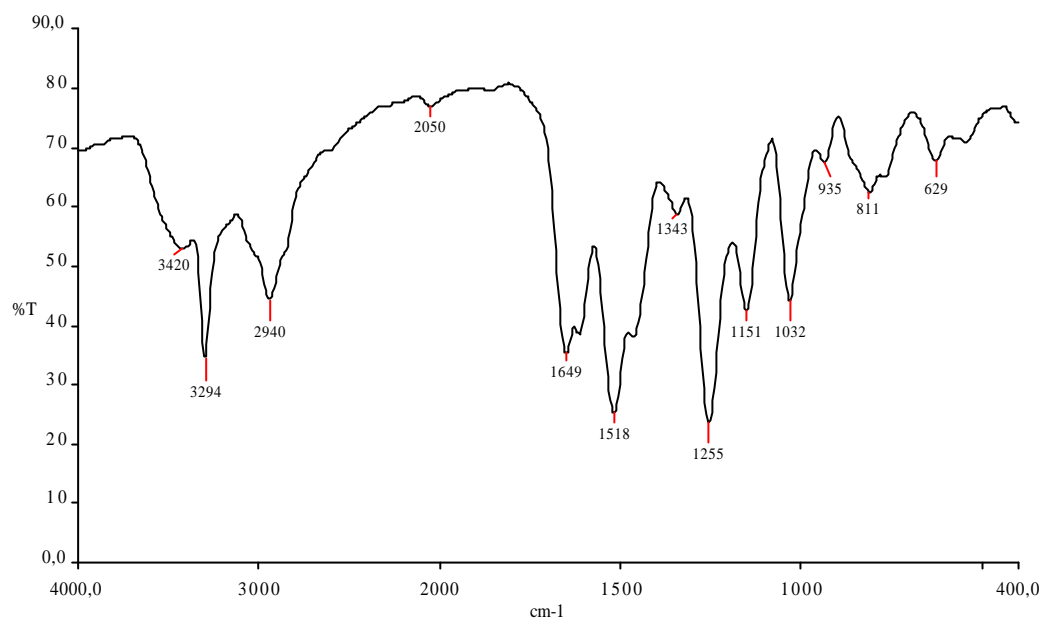
JC=O: 1649

Aparecimento de banda adicional 1518(JC=C, vibrações do esqueleto do anel aromático) sugere a presença de elétrons conjugados com o anel.

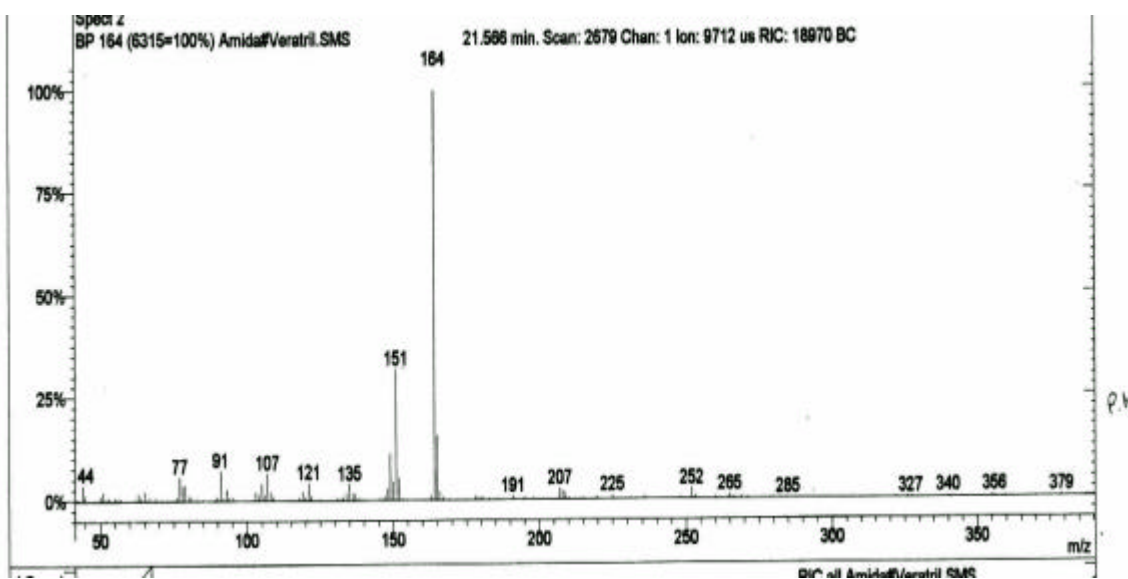
JO-CH₂-O: 1255

?C-H: 935(dobramento de H_{arom.} isolado)

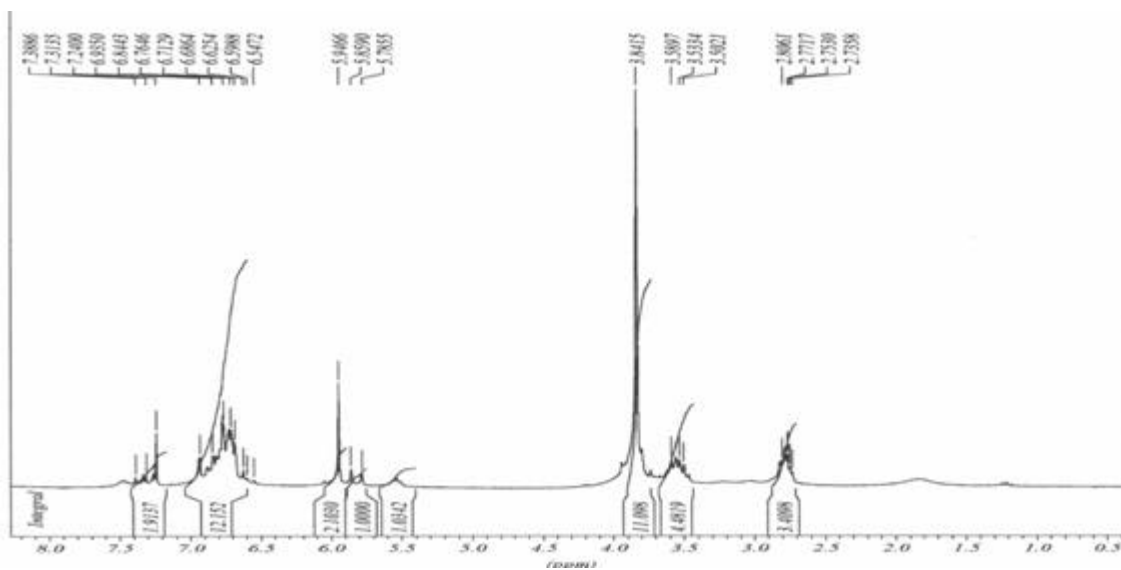
?C-H: 811(dobramento de 2 H_{arom.} vizinhos)



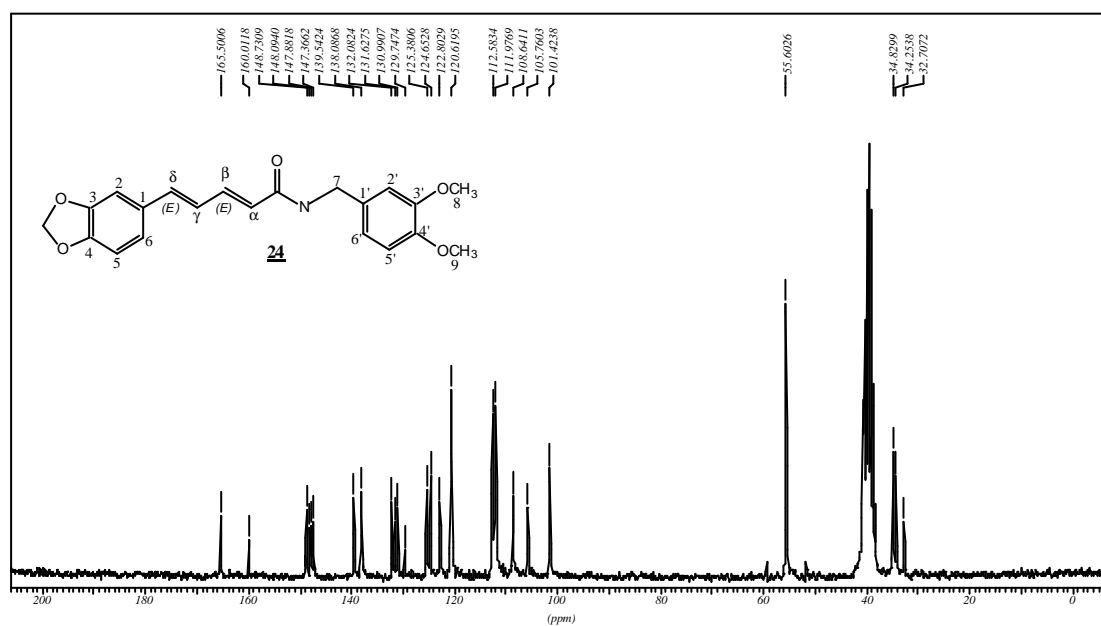
Espectro 21: Espectro de IV da veratrilamida.



Espectro 22: Espectro de massas da veratrilamida.



Espectro 23: Espectro de RMN¹H da veratrilamida.



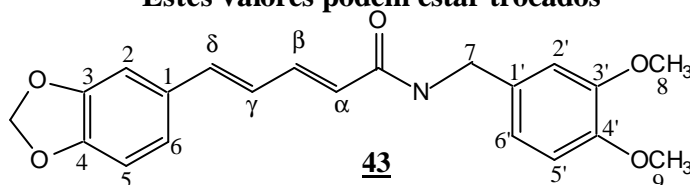
Espectro 24: Espectro de RMN¹³C da veratrilamida.

Tabela 11: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a veratrilamida:

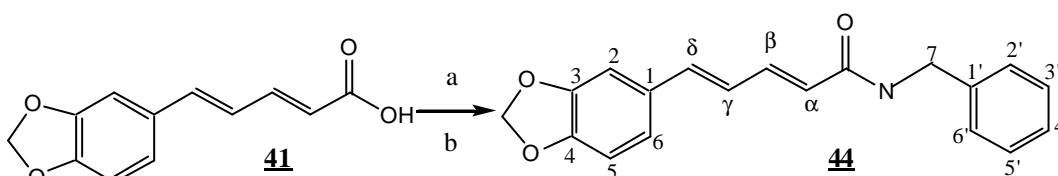
Posição	veratrilamida (DMSO- <i>d</i> 6)	
	$s_H(\text{ppm}), J(\text{Hz})$:	$s_C^a(\text{ppm})$:
1'	-----	147,3 (C)
2'	6,54-6,84 (m,1H)	125,3 (CH)
3'	6,54-6,84 (m,1H)	111,9 (CH)
4'	-----	147,8 (C)
5'	-----	147,8 (C)
6'	6,54-6,84 (m,1H)	112,5 (CH)
C=O	-----	165,5 (C)
a	5,8 (d, $J=14,7$; 1H)	120,6 (CH)
β	7,30 (d, $J=15,02$; 1H)	138 (CH)
γ	6,54-6,84 (m, 1H)	124,5 (CH)
d	6,54-6,84 (m, 1H)	139,5 (CH)
1	-----	130,9 (C)
2	6,54-6,84 (m, 1H)	108,6 (CH)
3	-----	148,7* (C)
4	-----	148* (C)
5	6,54-6,84 (m, 1H)	105,7 (CH)
6	6,54-6,84 (m, 1H)	122,8 (CH)
OCH ₂ O	5,9 (s,2H)	101,4 (CH ₂)
7	3,58-3,50 (m,2H)	34,8 (CH ₂)
8	3,58-3,50 (m,2H)	32,7 (CH ₂)
9	3,8 (s,3H)	55,6 (CH ₃)
10	3,8 (s,3H)	55,6 (CH ₃)
N-H	5,7 (m,1H)	-----

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.

* Estes valores podem estar trocados



5.5.3.4. Preparação da benzilamida do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2E-4E-pentadienóico (**41**)



Reagentes: a) cloreto de oxalila
b) benzilamina, CH₂Cl₂, t.a.

Foram utilizados 0,1mL (0,722 mmols; d=0,981) de benzilamina (recentemente destilada de CaH₂). Foram obtidos 0,210g de produto bruto, que após purificação por cromatografia flash sobre sílica gel (eluente: hexano/acetato de etila 10%) gerou 0,147g (70%) da amida **44** na forma de cristais amorfos de coloração marrom

Pf.:169°C.

IV(KBr, cm⁻¹):

JNH: 3283

J_{ass}CH₂(Csp₂): 2916

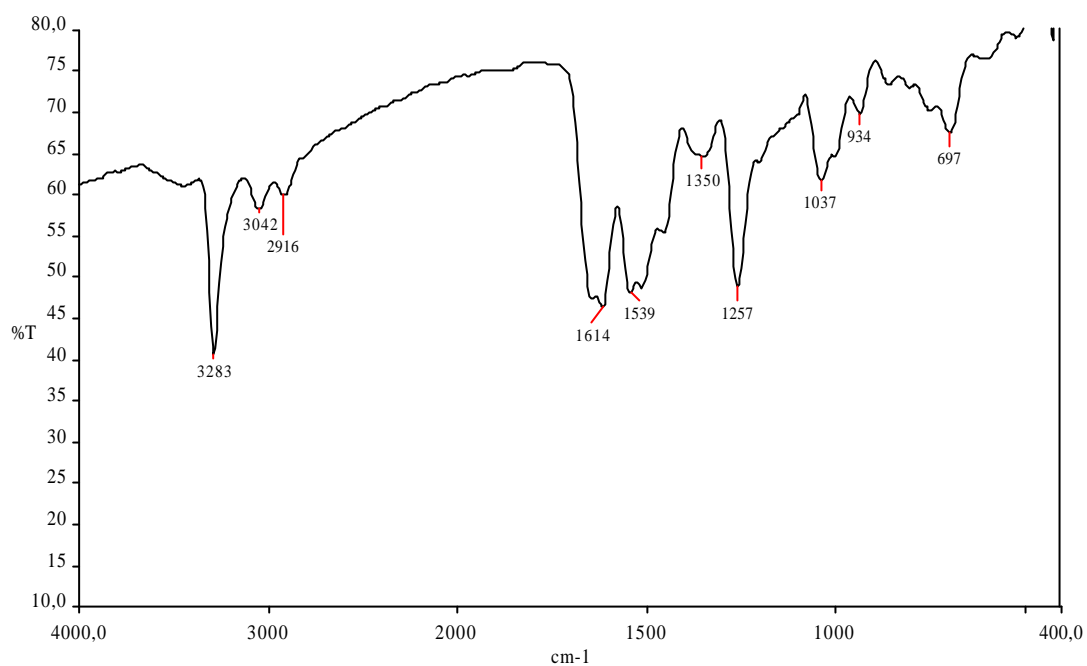
JC=O: 1614

Aparecimento de banda adicional 1539(JC=C, vibrações do esqueleto do anel aromático) sugere a presença de elétrons conjugados com o anel.

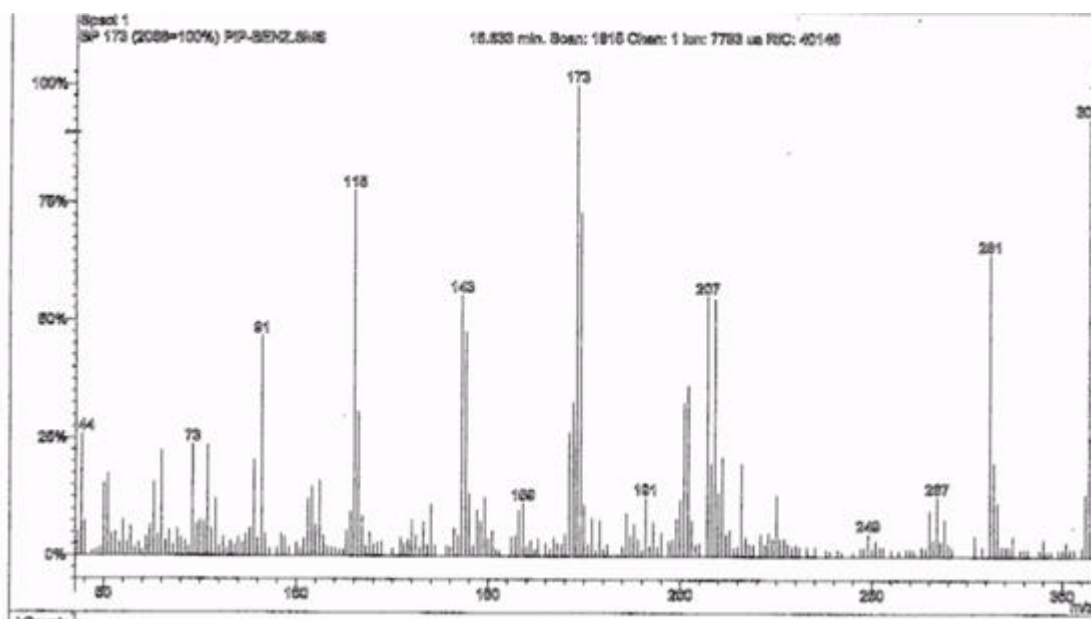
JC-H(Csp₂):3042(para aromático)

JO-CH₂-O: 1257

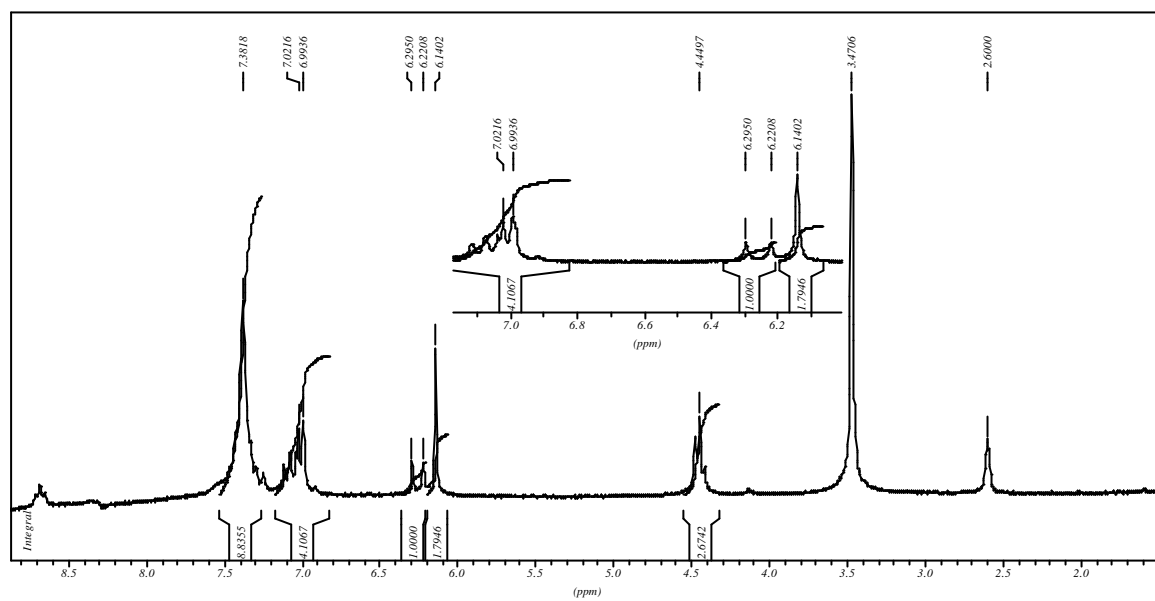
?C-H: 934(dobramento de H_{arom.} isolado)



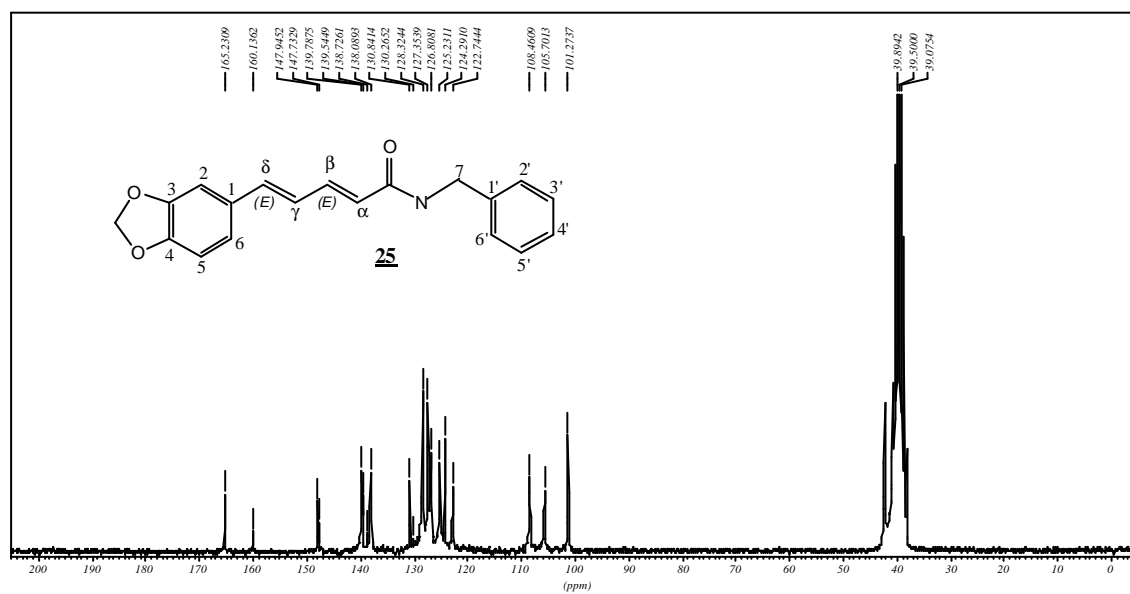
Espectro 25: Espectro de IV da benzilamida.



Espectro 26: Espectro de massas da benzilamida



Espectro 27: Espectro de RMN ^1H da benzilamida.



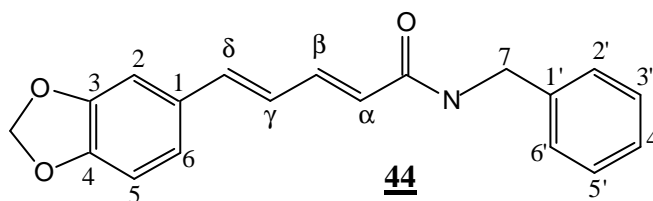
Espectro 28: Espectro de RMN ^{13}C da benzilamida

Tabela 11: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a benzilamida:

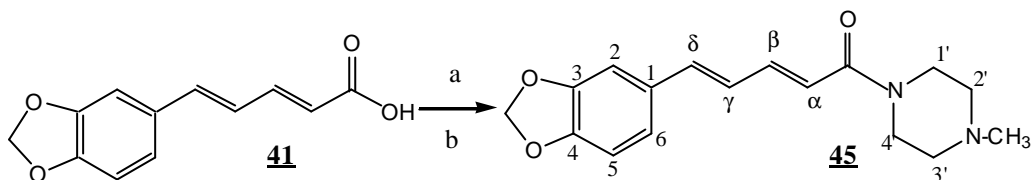
Posição	benzilamida (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	s _H (ppm), <i>J</i> (Hz):	s _C ^a (ppm):
1'	7,38 (sl. 1H)	130,2(CH)
2'	7,38 (sl. 1H)	128,3(CH)
3'	7,38 (sl. 1H)	127,3(CH)
4'	7,38 (sl. 1H)	125,2(CH)
5'	7,38 (sl. 1H)	127 (CH)
6'	7,38 (sl. 1H)	128,3(CH)
C=O	-----	165,2(C)
a	6,29 (d, <i>J</i> =14,8; 1H)	124,2 (CH)
β	6,99-7,02 (m, 1H)	139,7(CH)
γ	6,99-7,02 (m, 1H)	125,2 (CH)
d	6,99-7,02 (m, 1H)	139,5 (CH)
1	-----	130,8(C)
2	6,99-7,02 (m, 1H)	105,7 (CH)
3	-----	148*(C)
4	-----	147,7* (C)
5	6,99-7,02 (m, 1H)	108,4 (CH)
6	6,99-7,02 (m, 1H)	122,7 (CH)
7	6,99-7,02 (m, 1H)	122,7 (CH)
OCH ₂ O	4,44 (t,2H)	43,6(CH ₂)
N-H	6,1 (s,2H)	101,27(CH ₂)
	3,47 (s, 1H)	-----

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.

* Estes valores podem estar trocados



5.5.3.5. Preparação da *N*-metil-piperazilamida do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2*E*-4*E*-pentadienóico (**45**)



Reagentes: a) cloreto de oxalila
b) *N*-metil-piperazina, CH₂Cl₂, t.a.

Foram utilizados 0,07 mL (0,722 mmols; d=0,903) de *N*-metil-piperazina (recentemente destilada de CaH₂). Foram obtidos 0,206g de produto bruto, que após ser lavado com éter-etílico gelado, obteve-se 0,154g (75%) da amida **45** na forma de cristais amorfos marrons.

pf.:250°C.

IV(KBr, cm⁻¹):

JNH: 3294

J_{ass}CH₂(Csp₂): 2623

J_sCH₂(Csp₂): 2854

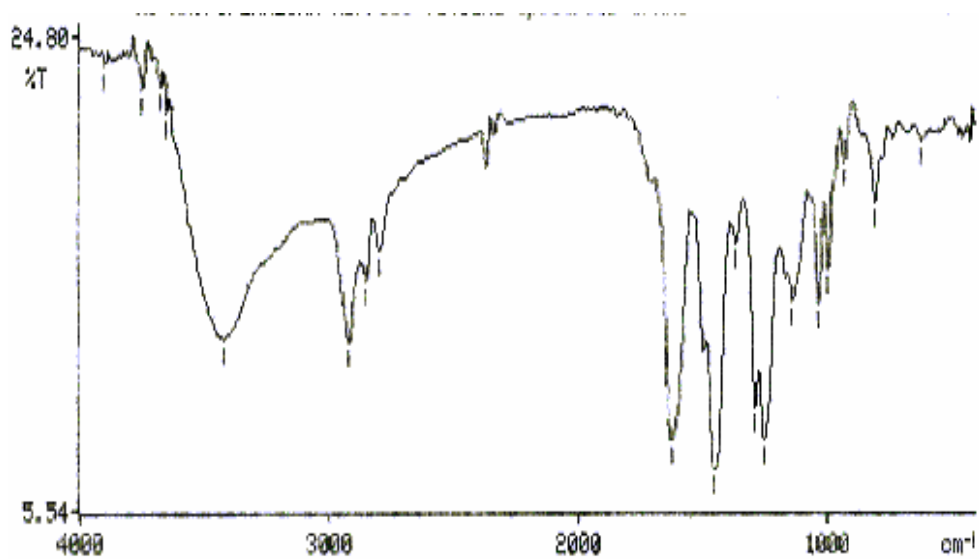
JC=O: 1626

JC=C: 1457 (vibração de esqueleto aromático)

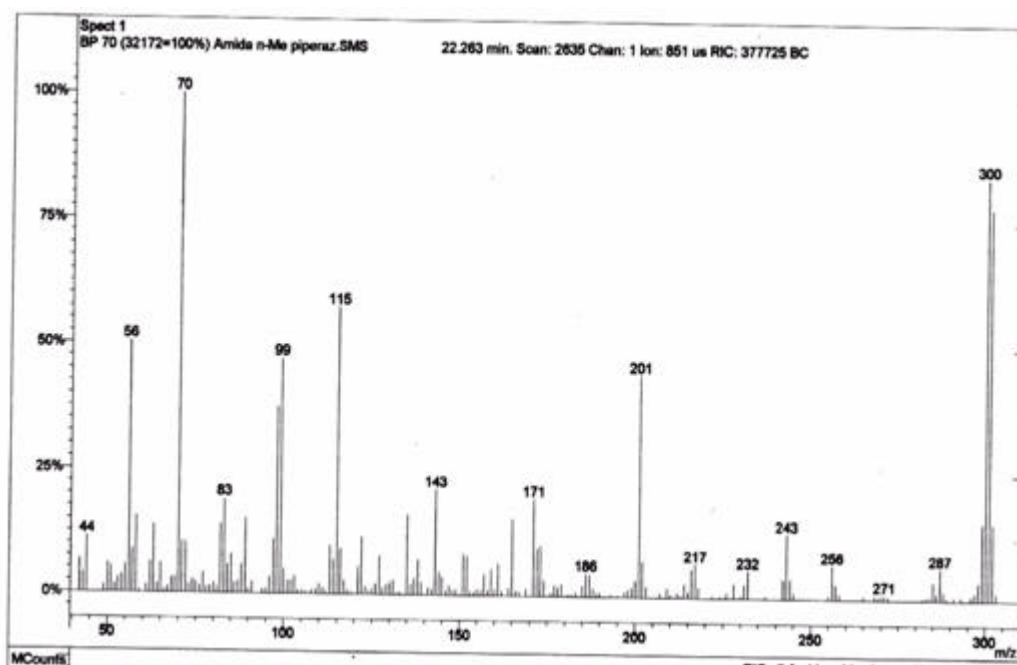
JO-CH₂-O: 1256

?C-H: 933(dobrimento de H_{arom.} isolado)

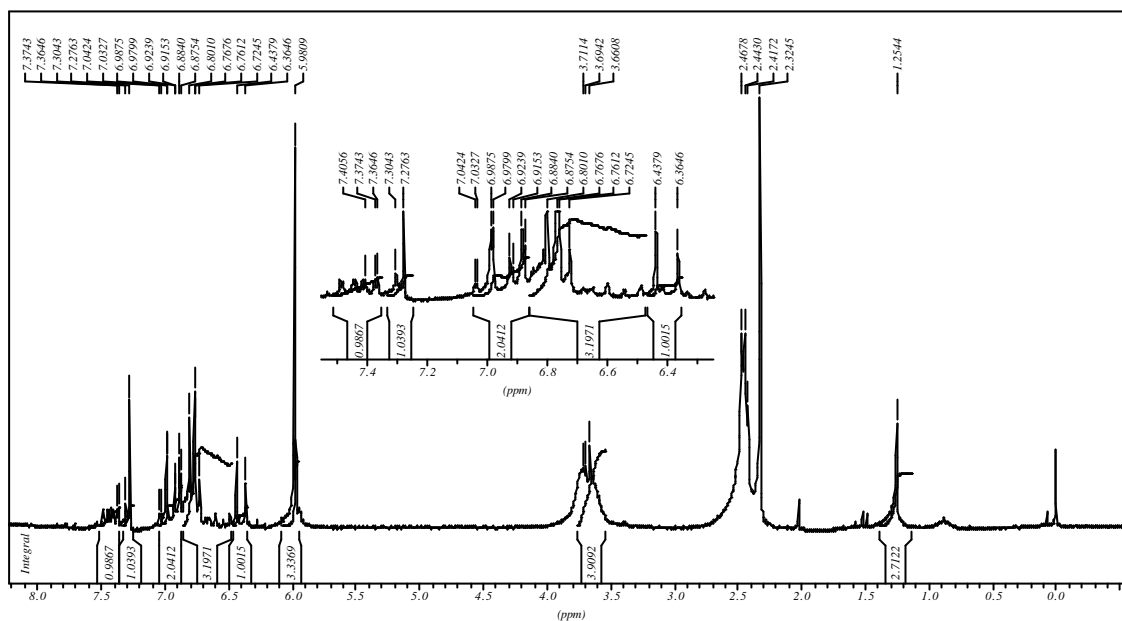
?C-H: 808(dobrimento de 2 H_{arom.} vizinhos)



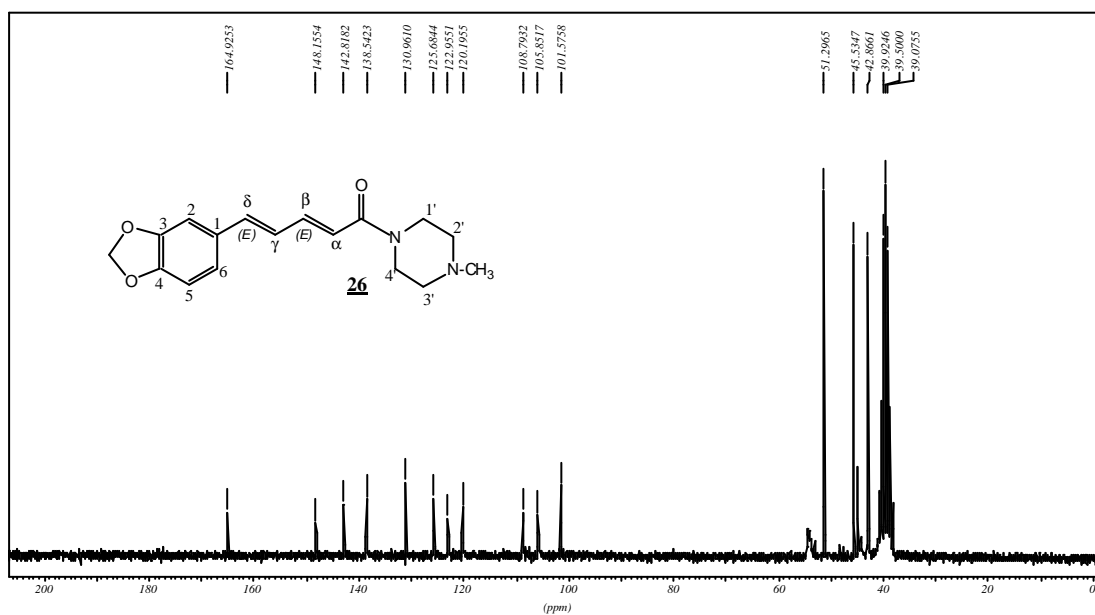
Espectro 29: Espectro de IV da *N*-metil-pipera zilamida.



Espectro 30: Espectro de massas da amida *N*-metil-piperazilamida.



Espectro 31: Espectro de RMN¹H da *N*-metil-piperazilamida.

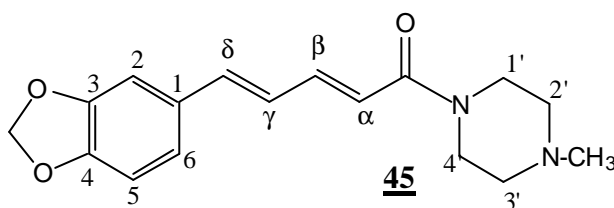


Espectro 32: Espectro de RMN¹³C da *N*-metil-piperazilamida.

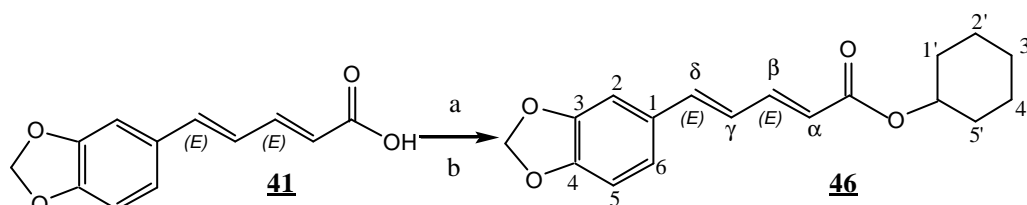
Tabela 12: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a *N*-metil-piperazilamida:

Posição	amida <i>N</i> -metil-piperazil (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	s _H (ppm), <i>J</i> (Hz):	s _C ^a (ppm):
1'	3,66-3,71 (m, 2H)	45,5 (CH)
2'	2,4-2,6 (m, 2H)	43 (CH)
3'	3,66-3,71 (m, 2H)	43 (CH)
4'	2,4-2,6 (m, 2H)	45,5 (CH)
C=O	-----	165 (C)
a	6,4 (d, <i>J</i> =14,66; 1H)	120,2 (CH)
β	7,37 (dd, <i>J</i> =14,66; <i>J</i> =10; 1H)	142,8 (C)
γ	6,8 (dd, <i>J</i> =14,66; <i>J</i> =7,34; 1H)	125,6 (CH)
d	7,27 (d, <i>J</i> =14,66; 1H)	138,5 (CH)
1	-----	131 (CH)
2	7,04(d, <i>J</i> =1,94, 1H)	105,8 (CH)
3	-----	148,1 (C)
4	-----	148,1 (C)
5	6,8(s, 1H)	108,7 (CH)
6	6,9 (d, <i>J</i> =1,72)	122,9 (CH)
7		
OCH ₂ O	2,4 (s, 3H)	51,2 (CH ₂)
N-CH ₃	5,98 (s, 1H)	101,5 (CH)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.



5.5.3.6. Preparação do éster cicloexil do ácido 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2E-4E-pentadienóico (**41**)



Reagentes: a) cloreto de oxalila
b) cicloexanol, CH_2Cl_2 , t.a.

Foram utilizados 0,07mL (0,722 mmols; $d=0,948$) de cicloexanol. Após isolamento do meio reacional com 50 mL de acetato de etila (lavado com solução saturada de NaCl e seco sobre Na_2SO_4) foram obtidos 0,206 g de produto bruto na forma de um óleo amarelado. Após purificação por cromatografia *flash* sobre sílica gel (eluente: hexano/acetato de etila 5 %) obteve-se 0,154g (75%) do éster **27** na forma de um óleo amarelo claro.

IV(NaCl, cm^{-1}):

$J_{\text{v}}\text{C-H}(\text{Csp}_3)$:2936

$J_{\text{s}}\text{C-H}(\text{Csp}_3)$:2859

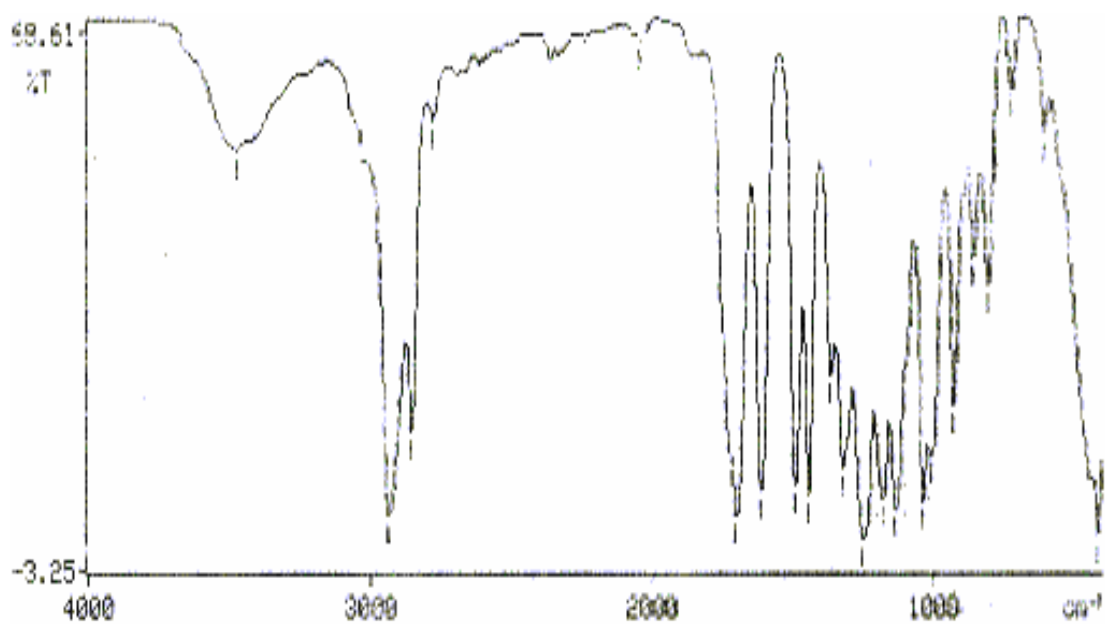
JC=O: 1703

JC=C: 1617-1494-1447(vibração do esqueleto do anel aromático)

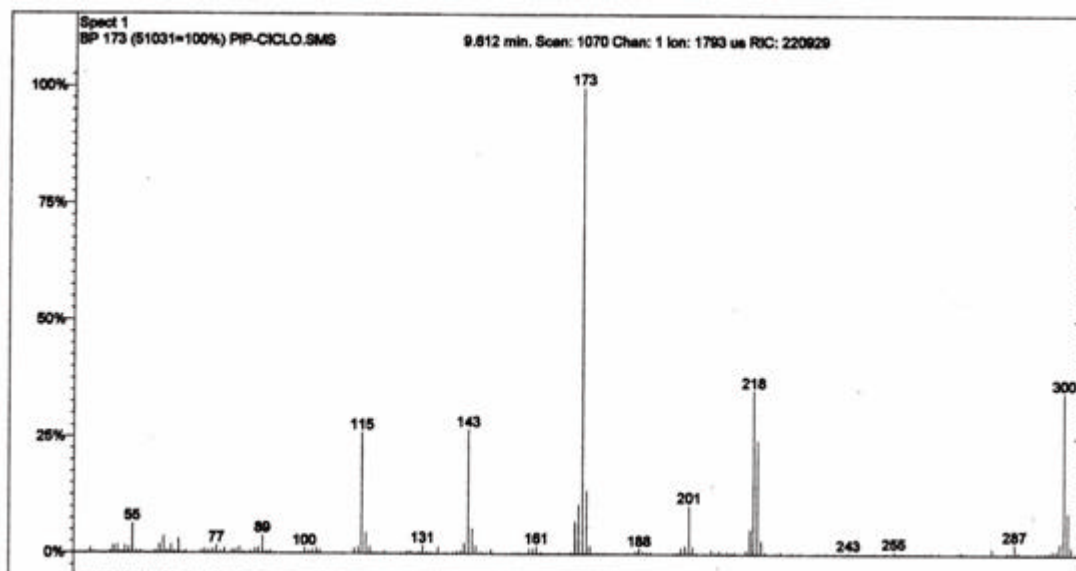
JC-O-C:1251

?C-H: 930(dobramento de $\text{H}_{\text{arom.}}$ isolado)

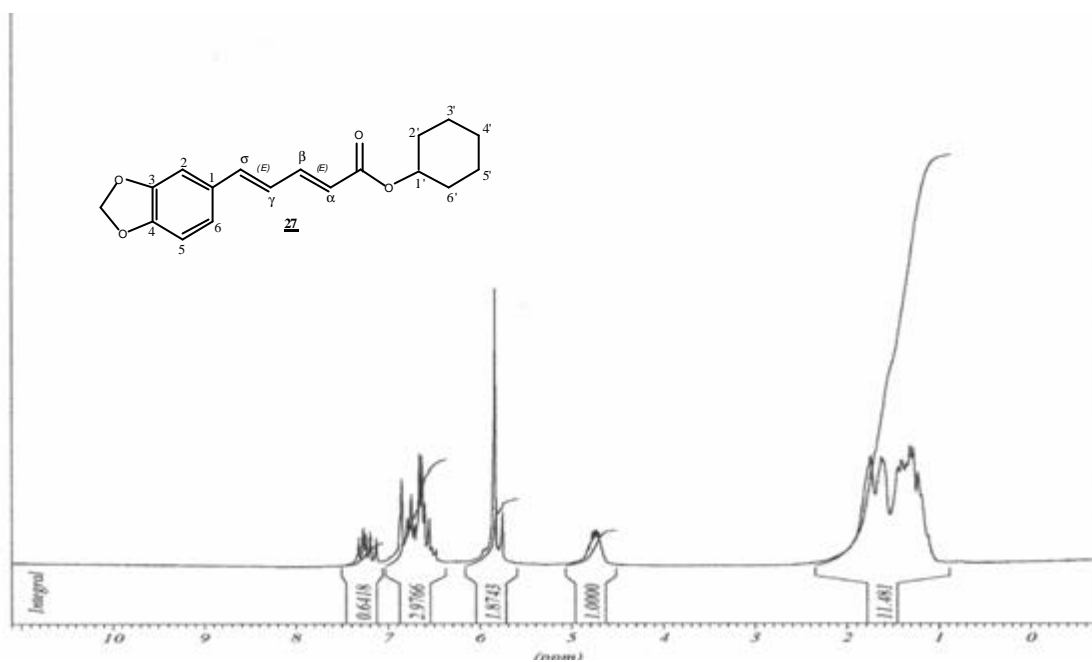
?C-H:859-808 (dobramento de $2\text{H}_{\text{arom.}}$ vizinhos)



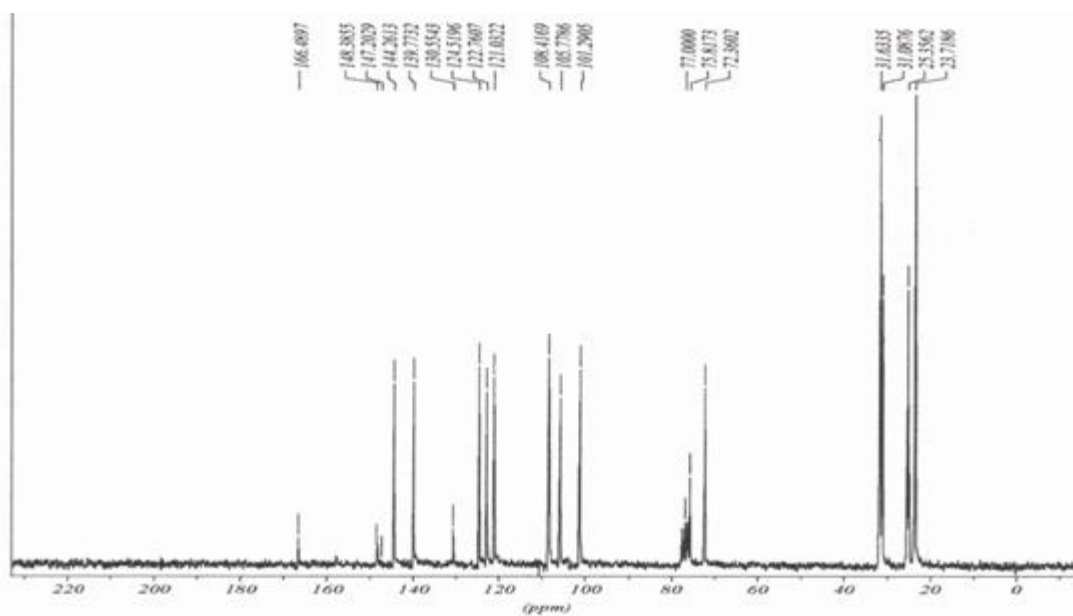
Espectro 33: Espectro de IV do éster cicloexil.



Espectro 34: Espectro de massas do éster cicloexil.



Espectro 35: Espectro de RMN ^1H do éster cicloexil.

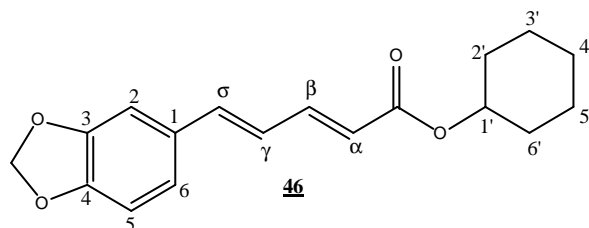


Espectro 36: Espectro de RMN ^{13}C do éster cicloexil.

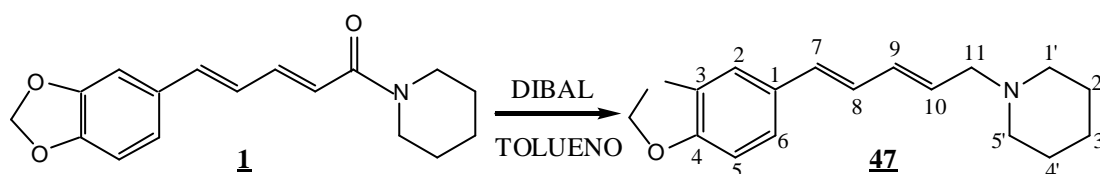
Tabela 13: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o éster cicloexil:

Posição	éster cicloexil (CDCl ₃)	
	s _H (ppm), J(Hz):	s _C ^a (ppm):
1'	4,8-4,9 (m,2H)	75,8 (CH)
2'	1,6-1,8 (m,2H)	31,6 (CH ₂)
3'	1,6-1,8 (m,2H)	25,3 (CH ₂)
4'	1,6-1,8 (m,2H)	23,7 (CH ₂)
5'	1,6-1,8 (m,2H)	25,3 (CH ₂)
6'	1,6-1,8 (m,2H)	31,08 (CH ₂)
C=O	1,6-1,8 (m,2H)	72,3 (CH ₂)
a	-----	166,4 (C)
β	6,69 (d, J=14, 1H)	121,3 (CH)
γ	7,4 (dd, J=14, J=7, 1H)	139,7 (CH)
d	7,3 (dd, J=14, J=7, 1H)	144,2 (CH)
1	6,75(d, J=14, 1H)	124,5 (CH)
2	-----	130,5 (C)
3	6,95 (d, J=2, 1H)	108,4 (CH)
4	-----	148,3 (C)
5	-----	147,2 (C)
6	6,7 (d, J=2, 1H)	105,7 (CH)
OCH ₂ O	6,8 (dd, J=8, J=2, 1H)	122,7 (CH)
	5,9 (s,2H)	101,2 (CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.



5.5.4. Síntese da 5-(3,4-metilenodioxifenil)-penta-2E, 4E-dienilpiperidina (dienamina **47)** (Berardi, F.*et al.*,2003).



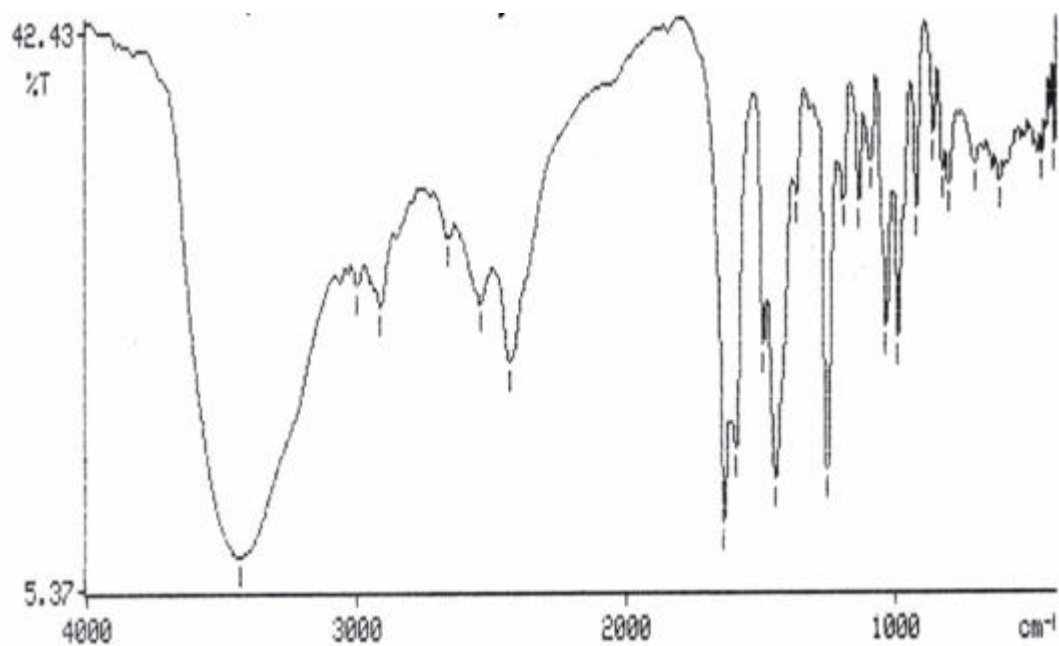
Fez-se uma solução de 0,200g (0,7mmols) de piperina em 10mL de tolueno(seco) num balão de 25mL sob atmosfera inerte (argônio) e mantida em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se aos poucos 2,8mL de DIBAL (4:1 em excesso). O meio reacional ficou sob agitação, por 2h e foi acompanhado por CCF. Ao fim da reação para “matar o balão num banho de gelo (sob agitação) e adicionou-se uma quantidade de acetato de etila ao meio reacional e deixando sob agitação por 20min em banho de gelo. A seguir fez-se uma extração em funil de separação com solução de NaOH 10% (3 x 10 mL), gotejou-se um pouco de solução de HCL 1M para separar melhor a emulsão formada. O produto bruto foi seco em Na₂SO₄ anidro e após a purificação por cromatografia flash sobre florisil (eluente: hexano/acetato de etila 10%) gerou 0,161g (85%) da dienamina **28** na forma de um óleo amarelo.

IV(Filme):

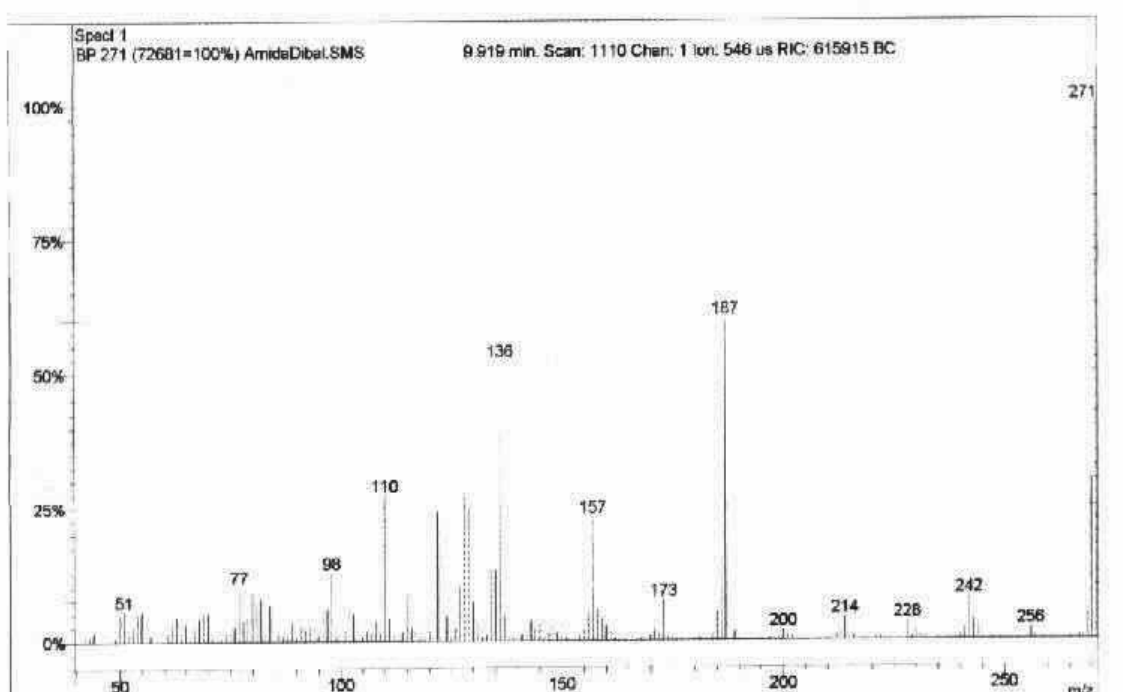
J_DCH₂(C_{sp3}):2913

JC=C:1594-1446(vibração do esqueleto de anel aromático)

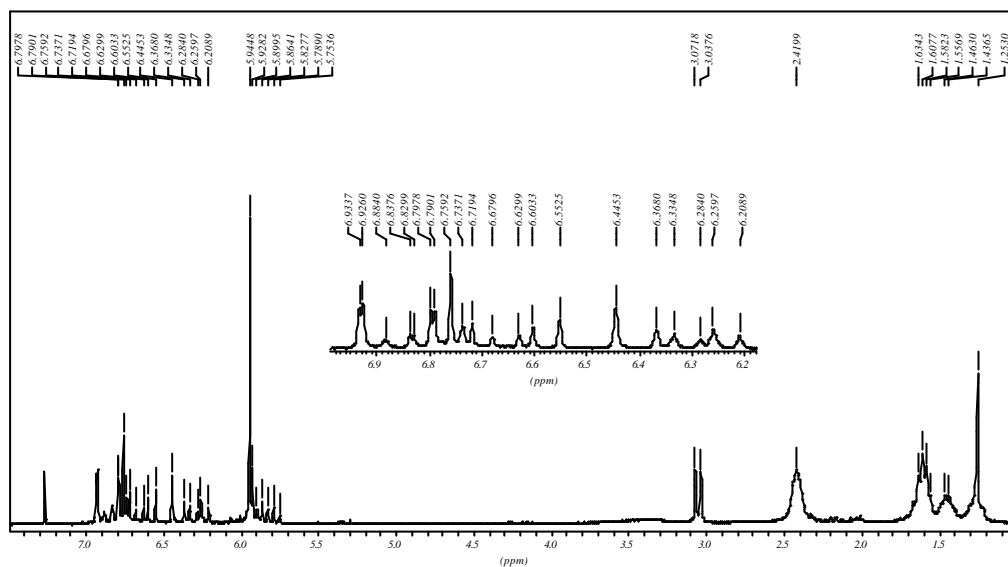
JO-CH₂-O:1257



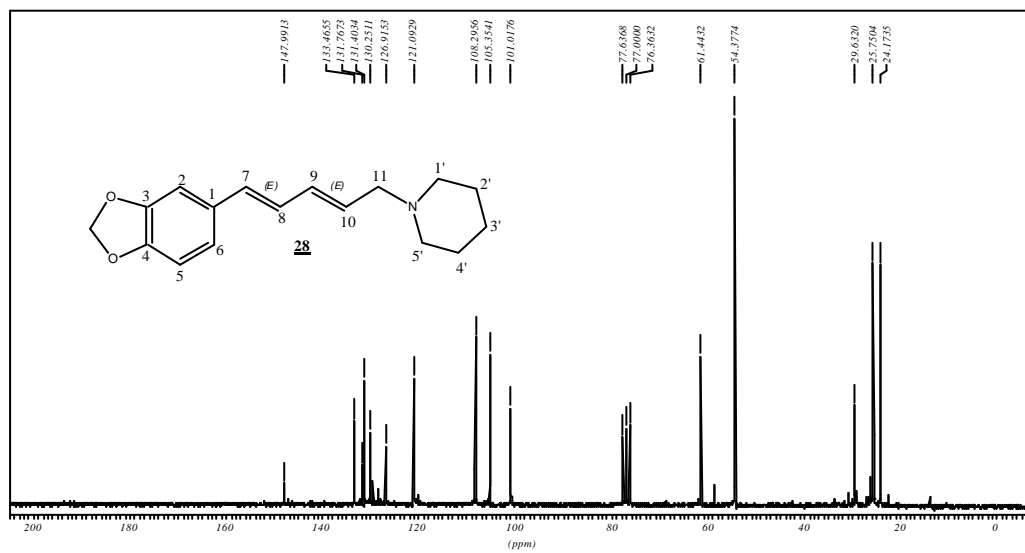
Espectro 37: Espectro de IV da dienamina.



Espectro 38: Espectro de massas da dienamina.



Espectro 39: Espectro de RMN¹H da dienamina.



Espectro 40: Espectro de RMN¹³C da dienamina.

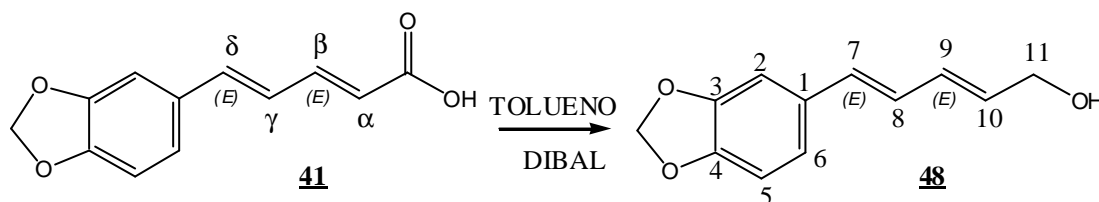
Tabela 14: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a dienamina:

Posição	dienamina (CDCl ₃)	
	δ_{H} (ppm), J (Hz):	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ (ppm):
1	-----	131,7 (C)
2	6,9 (d, $J=1,74$; 1H)	108,2 (CH ₂)
3	-----	148 (C)
	-----	148 (C)
5	6,75 (s, 1H)	105,3 (CH ₂)
6	6,8 (dd, $J=1,54$, $J=7,96$; 1H)	121 (CH ₂)
7	6,7 (d, $J=3,54$; 1H)	131,4 (CH)
8	6,6 (dd, $J=15,1$; $J=10,2$ 1H)	130,2 (CH)
9	6,6 (dd, $J=15,1$; 10,2 1H)	129,5 (CH)
10	5,79(dt, 1H)	128,5 (CH)
11	3,04 (d, $J=6,8$; m, 2H)	61,4 (CH ₂)
1'	2,41 (m, 2H)	54,4 (CH ₂)
2'	1,55-1,63 (m, 2H)	26,2 (CH ₂)
3'	1,43-1,46 (m, 2H)	24,1 (CH ₂)
4'	1,55-1,63 (m, 2H)	26,2 (CH ₂)
5'	2,41 (m, 2H)	54,4 (CH ₂)
6'		
OCH ₂ O	5,91 (s, 2H)	101 (CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.

5.5.5. Seqüência para a síntese da piperitina (3)

5.5.5.1. Síntese do 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2E-4E-pentenol (álcool alílico 48) a partir do ácido piperínico (41)



Fez-se uma solução de 0,100g (0,458mmols) de ácido piperínico a em 10mL de THF(seco) num balão de 25mL sob atmosfera inerte (argônio) que ficou sob agitação em banho de gelo. Adicionou-se gota-a-gota 1,8 mL (1,832 mmol) de uma solução 1M de DIBAL-H em THF. O meio reacional foi acompanhado por CCF e após 30-40 minutos houve todo o consumo do reagente de partida.

Acrescentou-se acetato de etila ao meio reacional e deixou-se sob agitação por 20 minutos em banho de gelo. A seguir o conteúdo do balão foi transportado para um funil de separação e fez-se uma extração com solução NaOH 10% (3 x 10 mL). O produto bruto foi seco em Na₂SO₄ anidro e após a purificação por cromatografia *flash* sobre sílica gel (eluente: hexano/acetato de etila 10%) gerou 0,055g (55%) do álcool alílico 48 a forma de cristais amorfos bege claro esbranquiçados.

p.f.:88-90°

IV (KBr, cm⁻¹):

JO-H: 3421

J_{ass}CH₂(Csp₂): 2932

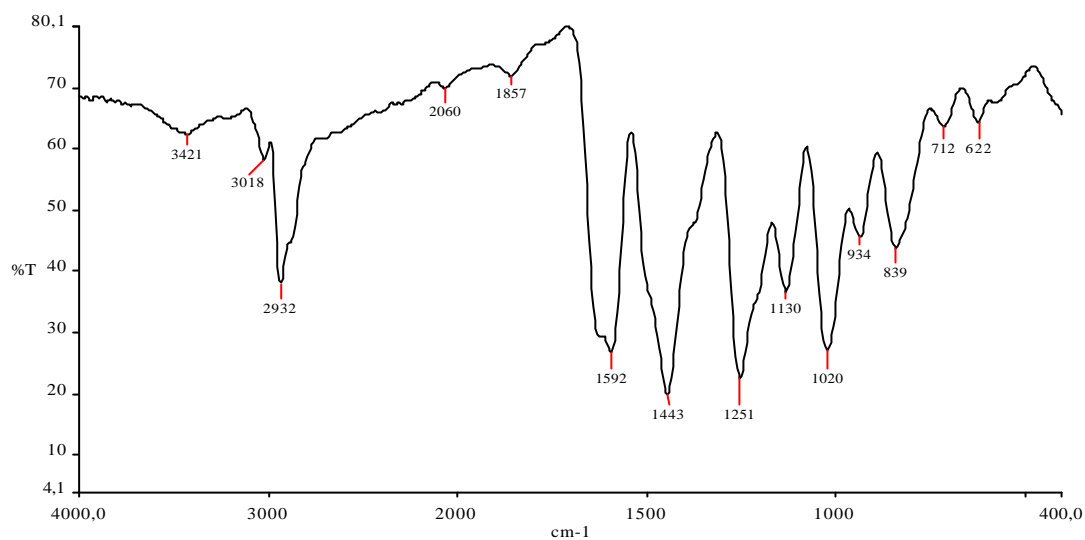
JC=C: 1592-1443 (vibrações do esqueleto do anel aromático)

JC-H(Csp₂):3018(para aromático)

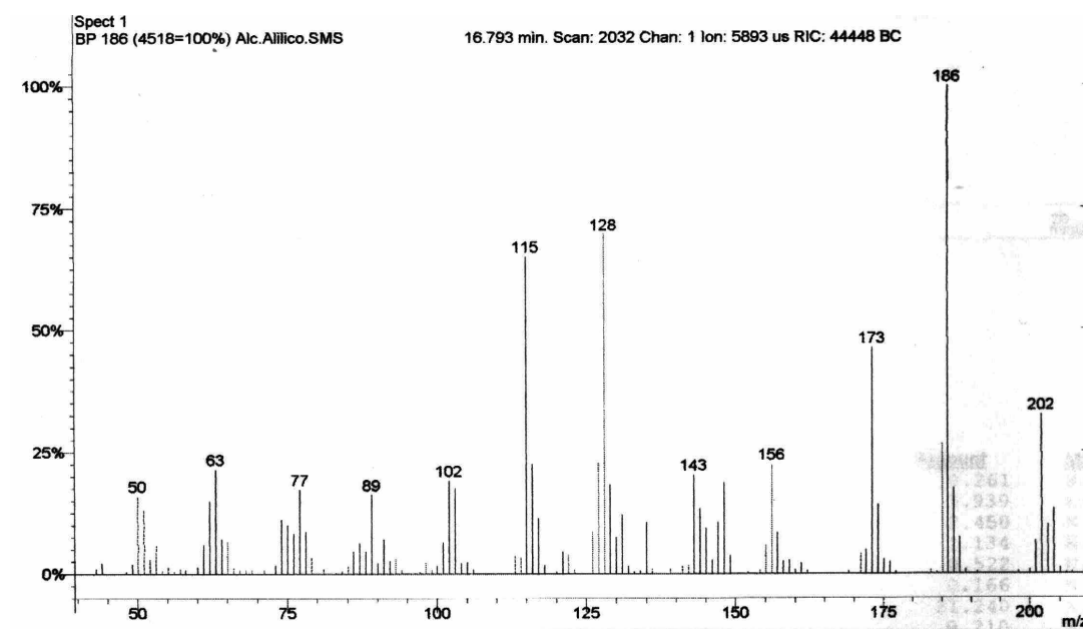
JO-CH₂-O: 1251

?C-H: 934(dobramento de H_{arom} . isolado)

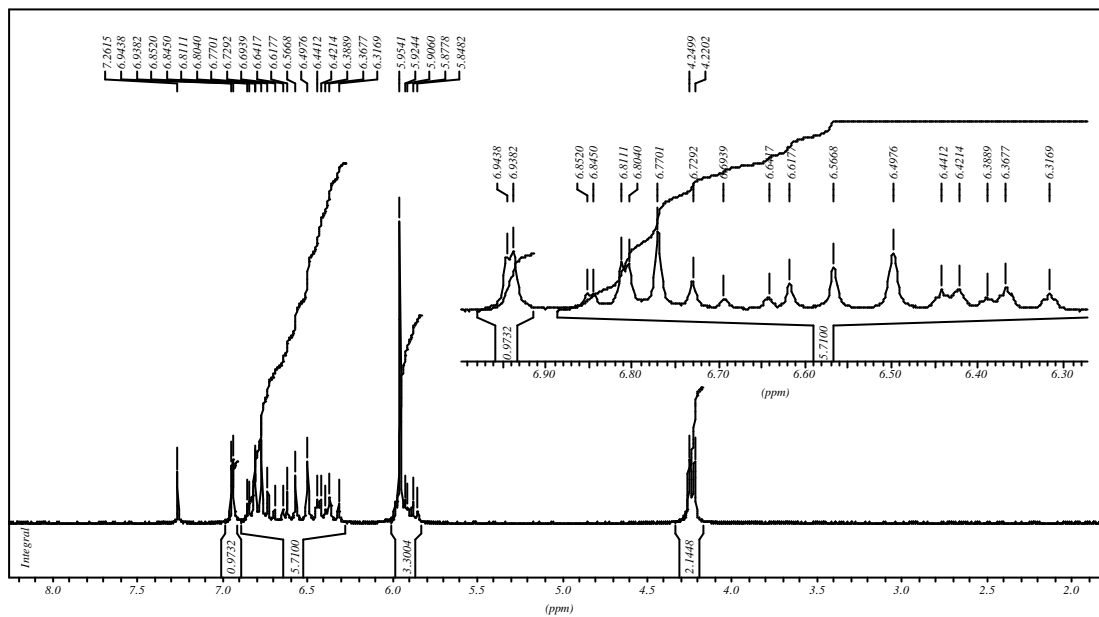
?C-H: 839(dobramento de $2H_{\text{arom}}$. vizinhos)



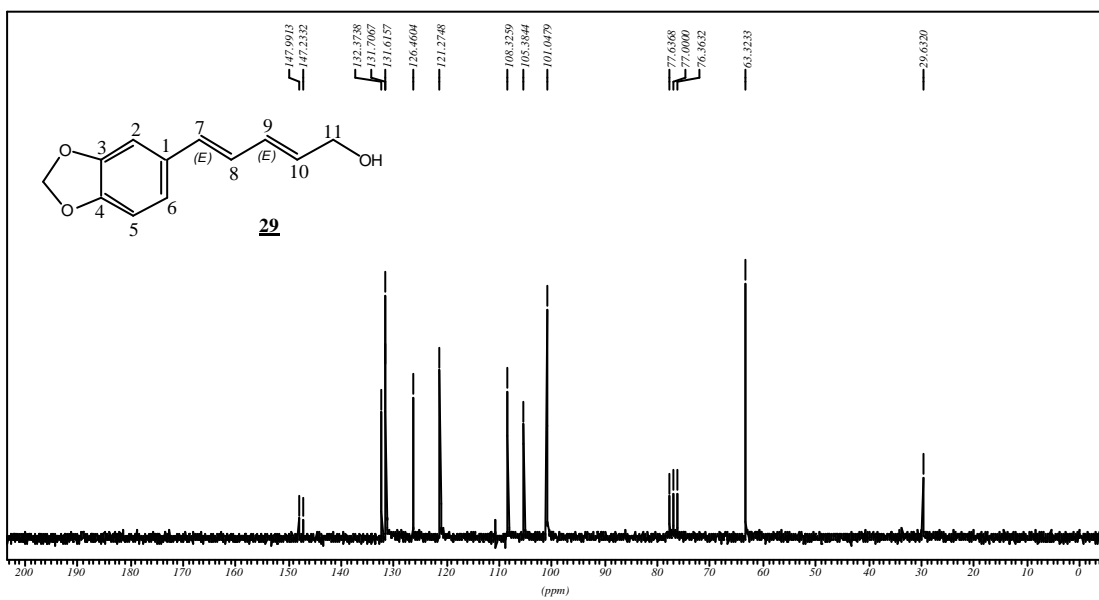
Espectro 41: Espectro de IV do álcool alílico.



Espectro 42: Espectro de massas do álcool alílico.



Espectro 43: Espectro de RMN¹H do álcool alílico.

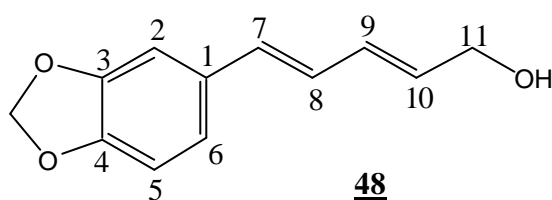


Espectro 44: Espectro de RMN¹³C do álcool alílico.

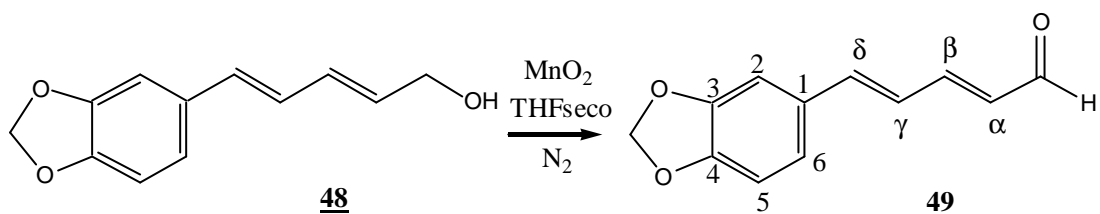
Tabela 15: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o álcool alílico:

Posição	álcool alílico (CDCl ₃)	
	s _H (ppm), <i>J</i> (Hz):	s _C ^a (ppm):
OH	1,24 (s,1H)	-----
1	-----	131,6 (C)
2	6,94 (d, <i>J</i> =1,4; 1H)	105,3 (CH)
3	-----	148 (C)
4	-----	147,2 (C)
5	6,7 (d, <i>J</i> = 8,1; 1H)	108,3 (CH)
6	6,8 (dd, <i>J</i> = 1,41; 8,1; 1H)	121,3 (CH)
7	6,5 (d, <i>J</i> = 13,84; 1H)	132,4 (CH)
8	6,7 (dd, <i>J</i> = 4,8; 13,84; 1H)	131,7 (CH)
9	6,4 (dd, <i>J</i> = 3,95; 4,8;1H)	126,4 (CH)
10	5,8 (d, <i>J</i> =6,0; 2H)	108 (CH ₂)
11	4,2 (d, <i>J</i> =6,0; 2H)	63,3 (CH ₂)
OCH ₂ O	5,9 (s,2H)	101,04 (CH ₂)

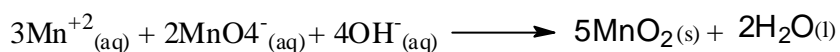
^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.



5.5.5.2. Síntese do 5-(3,4-metilenodioxifenil)-2E-4E-pentenol (aldeído piperidil 49) a partir do álcool alílico 48.



5.5.5.2.1. Preparação do MnO₂ (Vogel, 1989)



Adicionou-se simultaneamente durante uma hora uma solução de 4,5g de sulfato de manganês em 6 mL de H₂O e 4 g de NaOH em 10 mL de H₂O, solução 40 %, a uma solução aquecida de KMnO₄ (3,8g em 24mL de H₂O). Este meio reacional ficou sob agitação por mais uma hora. O precipitado fino foi isolado por filtração em funil de buckner, sendo lavado várias vezes com H₂O. O produto foi seco na estufa (100-120°C) por duas horas antes de ser filtrado.

5.5.5.2.2. Preparação do aldeído **49**

Em um balão de 50ml de capacidade, equipado com agitador magnético, e septo de borracha, foi feita uma solução de álcool 0,139g (0,6813mmols) em 5mL de THF (seco) agitado sob atmosfera inerte (N₂) e em seguida adicionou-se 0,292g (3,4065 mmols) de MnO₂ (excesso 5:1). Após 3 horas a análise por CCF indicou o término da reação. Fez-se uma filtração em funil de buckner para retirar o excesso de MnO₂, lavando-se com CH₂Cl₂. O solvente foi evaporado e em seguida fez-se uma filtração em coluna empacotada com florizil utilizando como emolvente uma solução de hexano-acetato de etila 10%. Após evaporação do solvente, obteve-se 130,7 g (95 %) do aldeído **49** na forma de cristais amarelo.

p.f.:97°C.

IV(KBr, cm⁻¹):

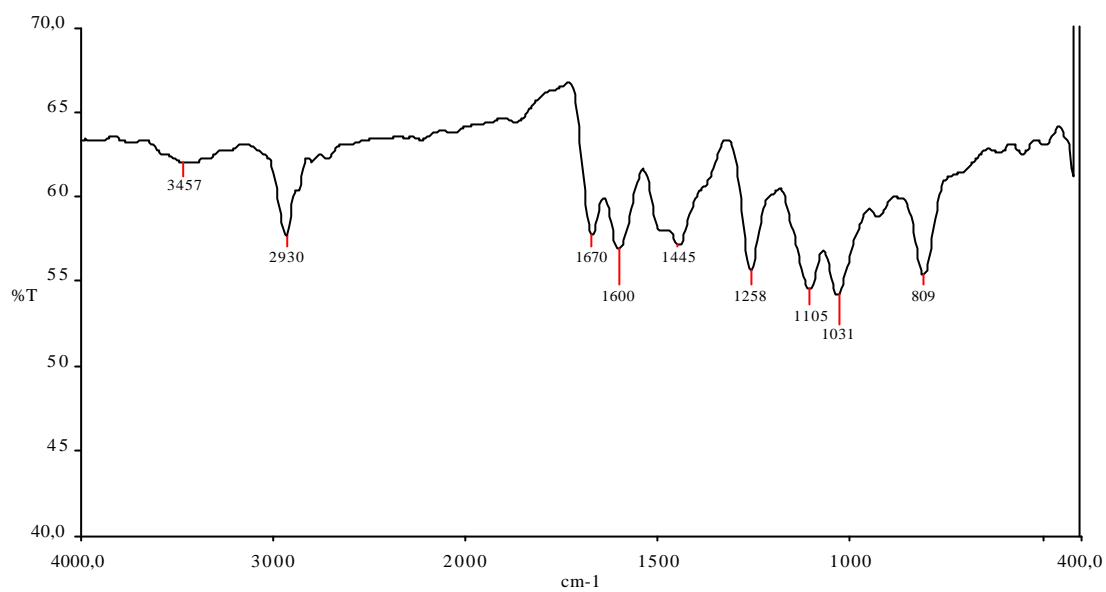
J_{ass}CH₂(Csp₂): 2930

JC=C: 1600-1445 (vibrações do esqueleto do anel aromático)

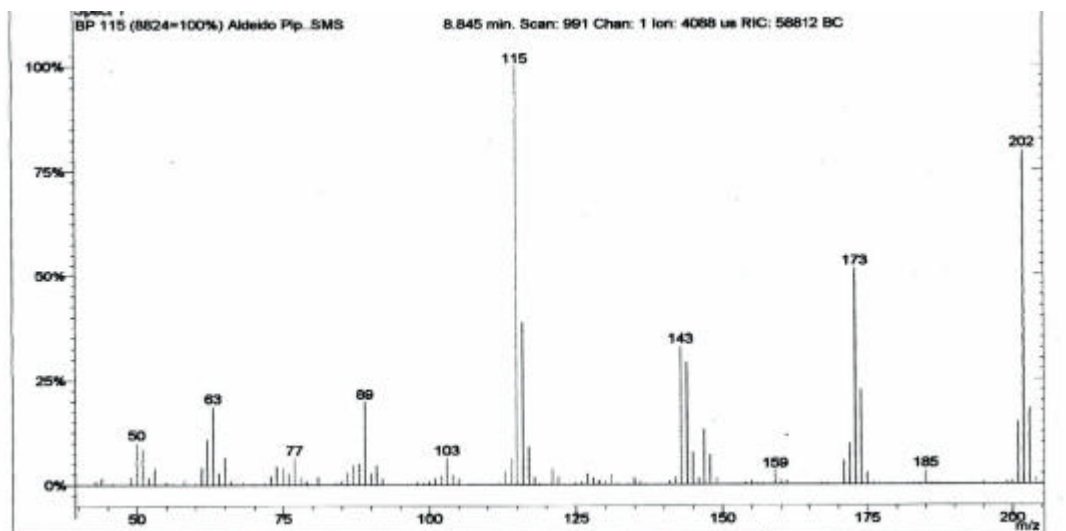
JC=O: 1670

JO-CH₂-O: 1258

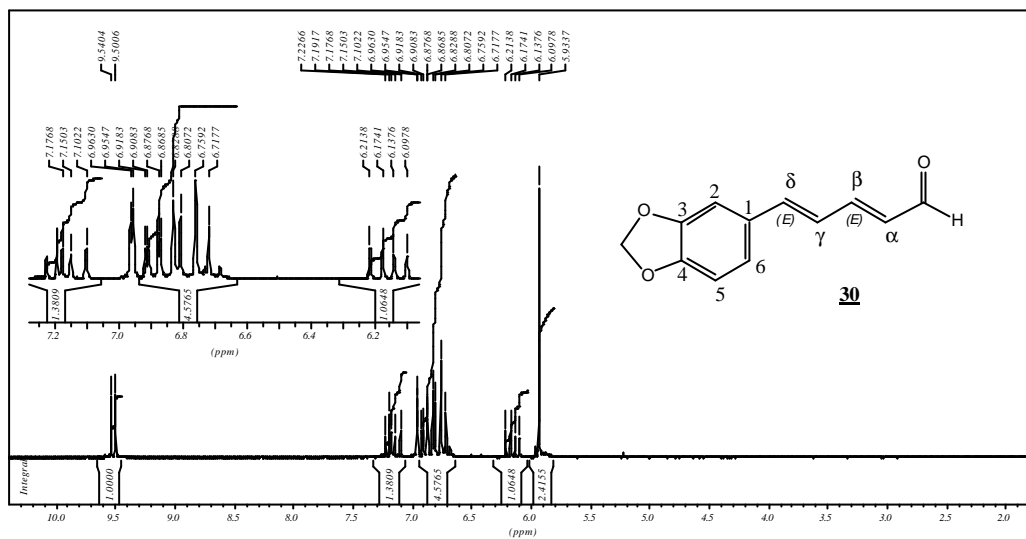
?C-H: 809(dobramento de 2H_{sarom.} vizinhos)



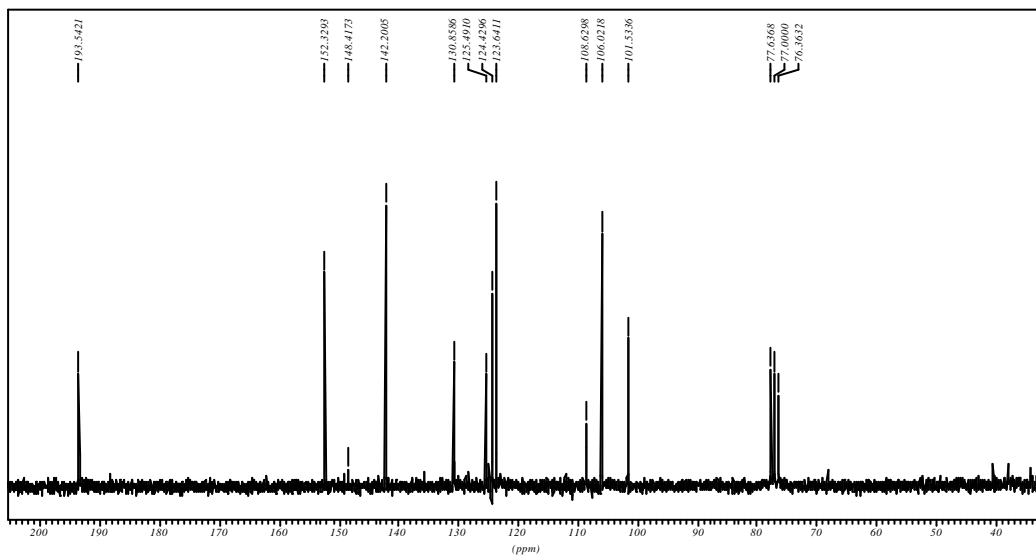
Espectro 45: Espectro de IV do aldeído piperidil.



Espectro 46: Espectro de massas do aldeído piperidil.



Espectro 47: Espectro de RMN¹H do aldeído piperidil.

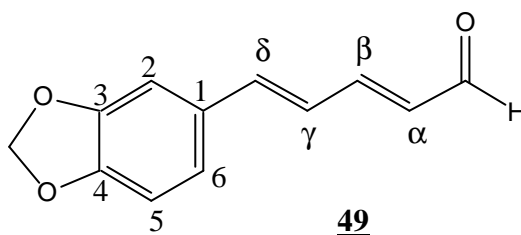


Espectro 48: Espectro de RMN¹³C do aldeído piperidil.

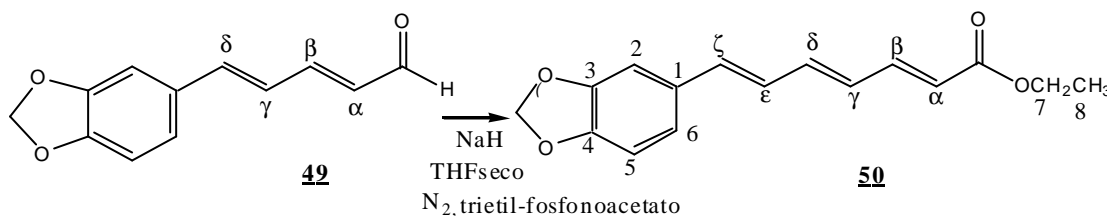
Tabela 16: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o aldeído piperidil:

Posição	aldeído piperidil (CDCl ₃)	
	s _H (ppm), J(Hz):	s _C ^a (ppm):
H-C=O	9,5 (d, J= 7,96;1H)	193,5 (CH)
α	6,2 (dd, J= 7,96; J=15,95;1H)	123,6 (CH)
β	7,1 (dd, J= 15,95; J=9,6;1H)	142,2 (CH)
γ	7,1 (J=9,6; 1H)	125,4 (CH)
δ	6,82 (d, J= 10;1H)	152,3 (CH)
1	-----	130,8 (C)
2	6,96 (d, J= 1,8;1H)	106 (CH)
3	-----	148,4 (C)
4	-----	148,4 (C)
5	6,7 (d, J= 8,3;1H)	108,6 (CH)
6	6,90 (dd, J= 2 ; J= 8,3;1H)	124,4 (CH)
OCH ₂ O	5,9 (s, 2H)	101,5 (CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.



5.5.5.3. Reação de formação do éter etílico do ácido 7-(3,4-melenodioxifenil)-2E,4E,6E-heptatrienóico (piperitinoato de etila) (50).



Em um balão de 50ml de capacidade, equipado com agitador magnético, e septo de borracha, foi feita uma suspensão 0,034g (0,7603mmols) de NaH em 5mL de THF seco agitado sob atmosfera inerte (N_2) à temperatura ambiente e em seguida, foi adicionado ao meio reacional, gota-a-gota, uma solução de 0,151mL (0,7603mmols) de trietil 2-fosfoetanoato, observando-se a evolução de hidrogênio. Após 10 minutos de reação, baixou-se a temperatura do sistema com banho de gelo e NH_4Cl e adicionou-se 0,128 g (0,6336mmols) de aldeído, gota-a-gota, com agitação, deixando então o meio reacional chegar a temperatura ambiente por 1 hora. Após o término da reação, acompanhada por CCF adicionou-se ao meio reacional 5mL de uma solução saturada de NH_4Cl , evaporou-se o THF à pressão reduzida e o resíduo foi particionado em 10mL de água e acetato de etila (3 X 25 mL). Em seguida, a fase orgânica foi lavada com 25 mL de uma solução saturada de K_2CO_3 e posteriormente com salmoura (2X25mL) sendo então seca sobre Na_2SO_4 anidro, filtrada e concentrada à pressão reduzida. O resíduo foi purificado em coluna filtrante de gel de sílica, eluída com uma mistura de hexano/acetato de etila 10%.

p.f.:98-100°C.

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

$J_{\text{ass}}\text{CH}_2(\text{Csp}^2)$: 2988

$J_{\text{s}}\text{CH}_2(\text{Csp}^2)$: 2915

JC=O: 1709

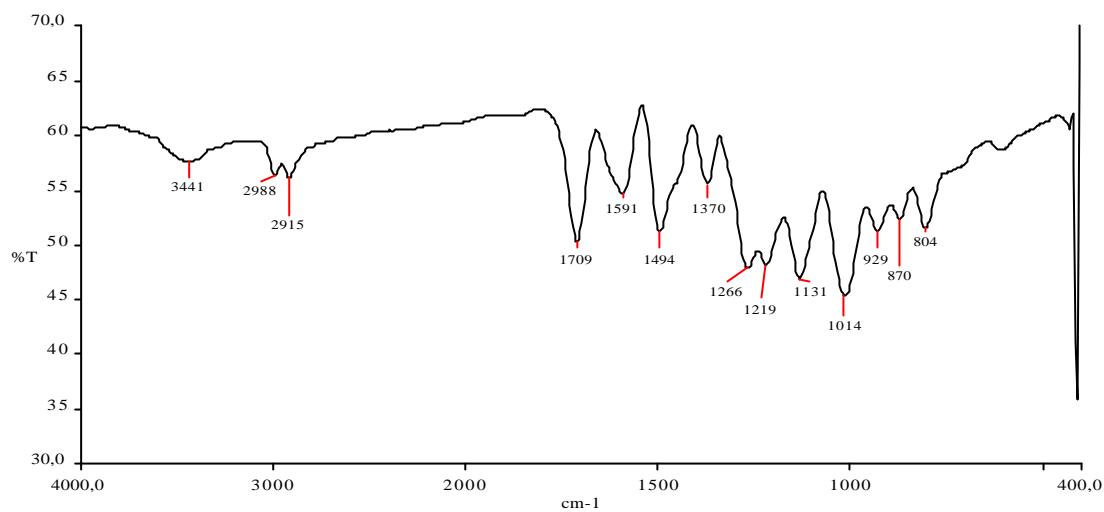
JC=C: 1591-1494 (vibração de esqueleto aromático)

JO- CH_2 -O: 1266 (para epóxido)

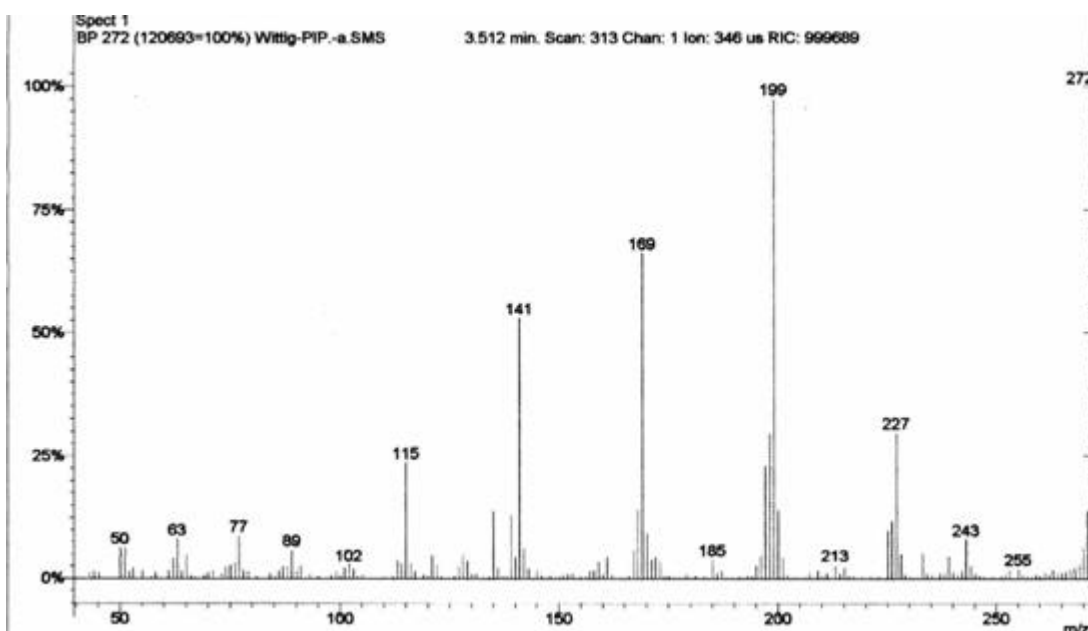
JO- CH_2 -O: 1219 (para éster)

?C-H: 929(dobramento de H_{arom} . isolado)

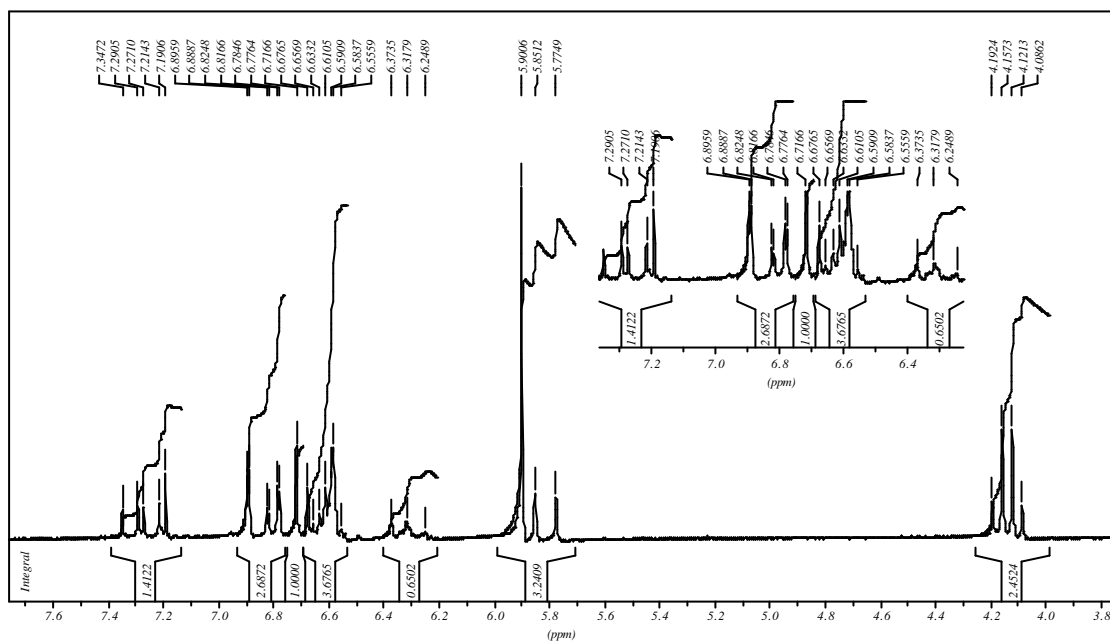
?C-H: 804(dobramento de 2 H_{arom.} vizinhos)



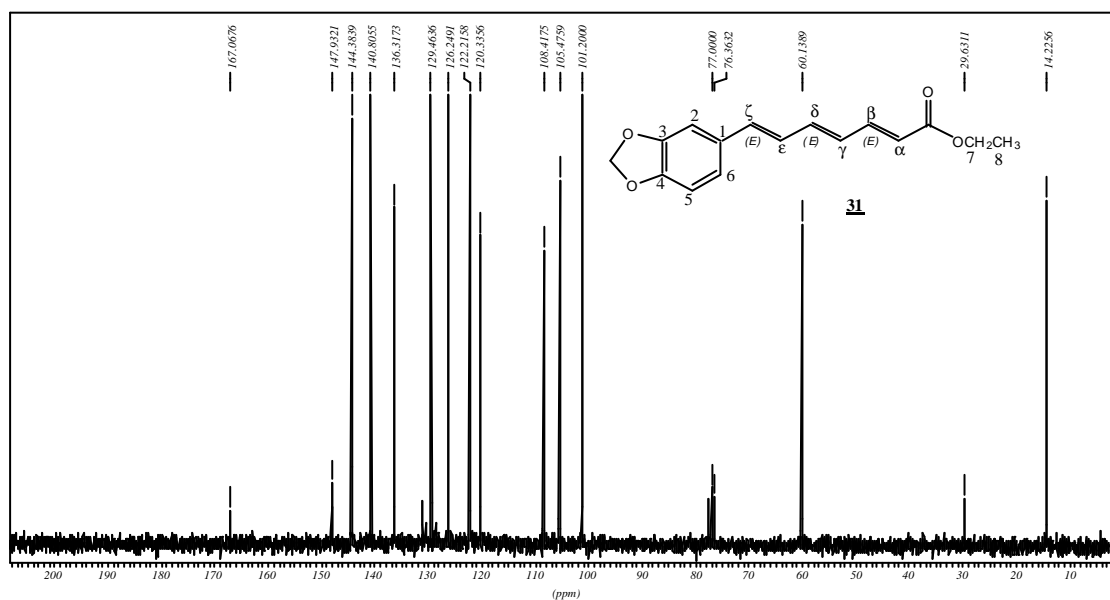
Espectro 49: Espectro de IV do piperitinoato de etila.



Espectro 50: Espectro de massas do piperitinoato de etila.



Espectro 51: Espectro de RMN¹H do piperitinoato de etila.

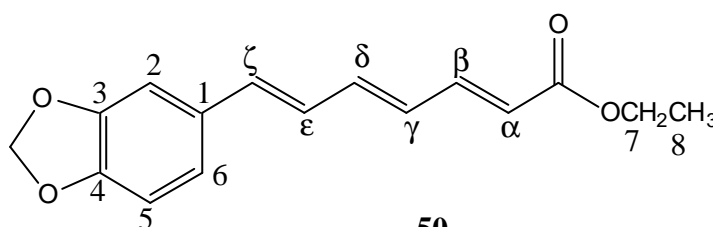


Espectro 52: Espectro de RMN¹³C do piperitinoato de etila.

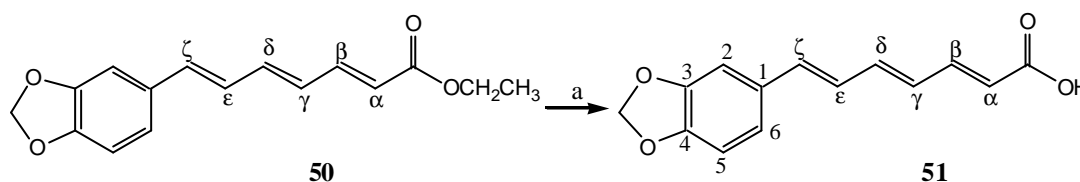
Tabela 17: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o piperitinoato de etila:

Posição	piperitinoato de etila (CDCl ₃)	
	s _H (ppm), <i>J</i> (Hz):	s _C (ppm), <i>J</i> (Hz):
C=O	-----	167 (C)
α	5,8 (d, <i>J</i> =15,24; 1H)	120,3 (CH)
β	7,3 (dd, <i>J</i> =11,4;15,24; 1H)	144,3 (CH)
γ	6,3 (d, <i>J</i> =11,4; 1H)	129,4 (CH)
δ	6,65-6,58 (m,1H)	140,8 (CH)
ε	6,65-6,58 (m,1H)	126,2 (CH)
ζ	6,65-6,58 (m,1H)	136,3 (CH)
1	-----	131 (C)
2	6,89 (d, <i>J</i> =1,8; 1H)	105,5 (CH)
3	-----	148 (C)
4	-----	148 (C)
5	6,71 (d, <i>J</i> =8; 1H)	108,4 (CH)
6	6,81 (dd, <i>J</i> =1,8; 8; 1H)	122,2 (CH)
7	4,1 (q, 2H)	60,1 (CH ₂)
8	1,2 (t, 3H)	14,2 (CH ₃)
OCH ₂ O	5,9 (s,2H)	101,2 (CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.



5.5.5.4. Hidrólise alcalina do éster (50): síntese do ácido 7-(3,4-melenodioxifenil)-2*E*,4*E*,6*E*-heptatrienóico (ácido piperitínico) (51) (Junior, 2003).



Reagentes: a) KOH 1M, EtOH

Em um balão de 50mL de capacidade, equipado com agitador magnético, foi feita uma solução de 105mg (0,386mmols) do éster em 10mL de etanol sobre a qual adicionou-se 5mL de KOH 1M. A evolução da reação foi acompanhada por CCF.

Após o término da reação o meio reacional foi concentrado no evaporador rotatório, sendo então acidulado com HCl 1M até pH próximo de 4 ocorrendo a precipitação de um sólido amarelo claro que foi então lavado com água gelada e filtrado a vácuo. O sólido foi pesado, gerando 93mg (rend:99%) do ácido.

P.f.: Se decompõe acima de 250°C.

IV(KBr, cm⁻¹):

JO-H: 3458

J_{DW}C-H(C_{sp}²): 2923

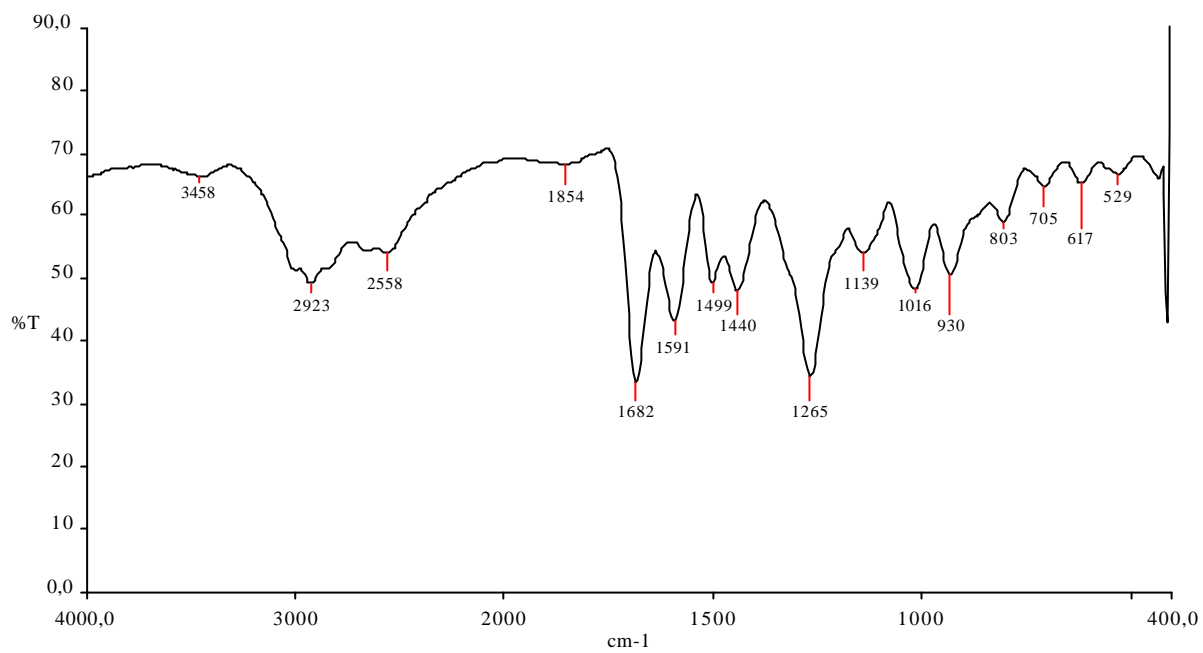
JC=O: 1682

JC=C: 1591-1440 (vibração do esqueleto de anel aromático)

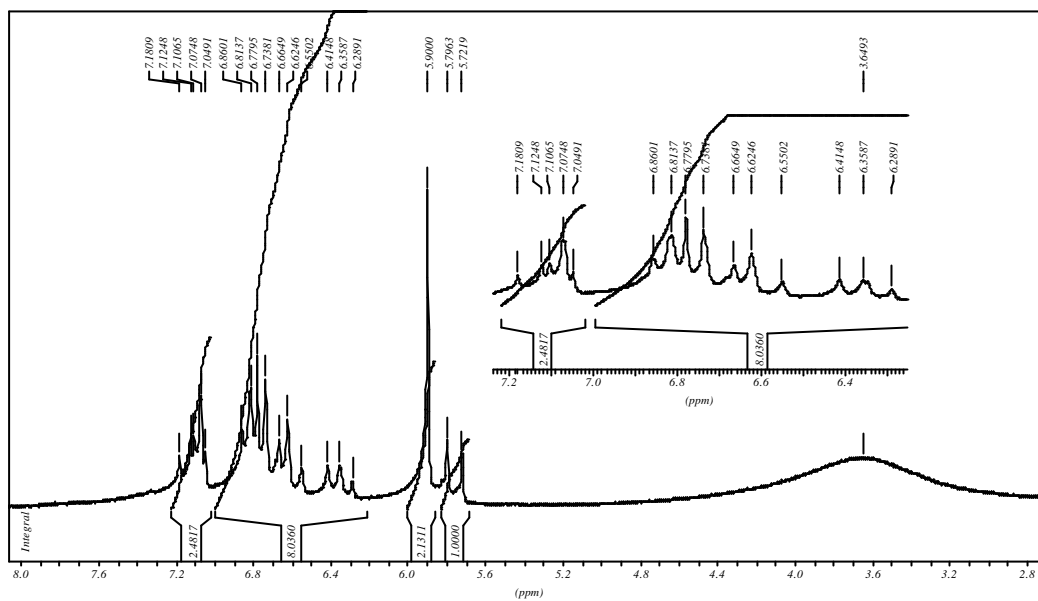
JC-O-C: 1265

?C-H: 930 (dobramento de H_{arom.} isolado)

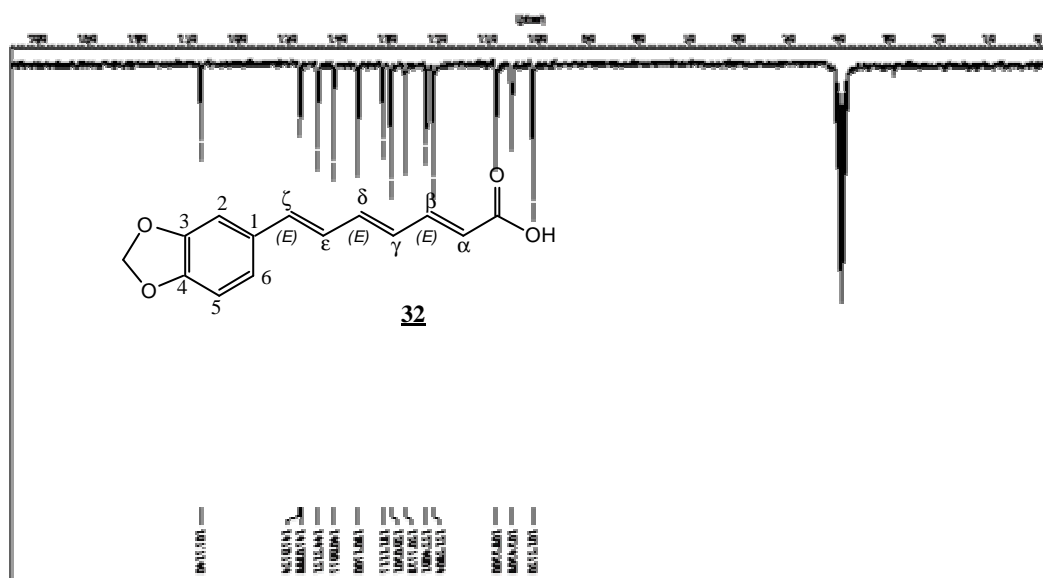
?C-H: 803 (dobramento de 2H_{arom.} vizinhos)



Espectro 53: Espectro de IV do ácido piperitínico.



Espectro 54: Espectro de RMN¹H do ácido piperítico.

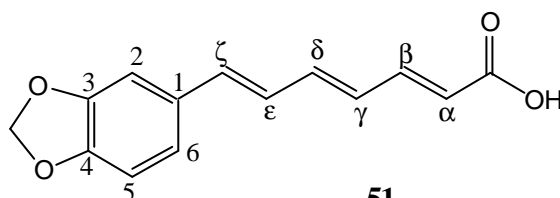


Espectro 55: Espectro de RMN¹³C do ácido piperítico.

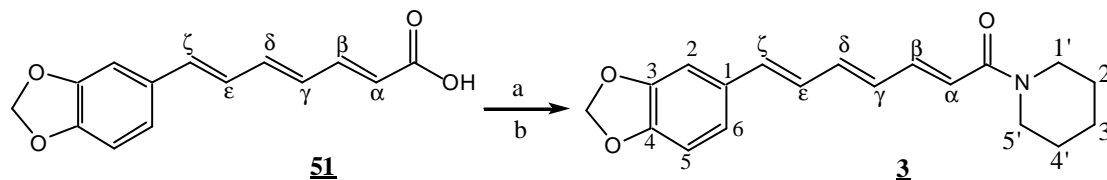
Tabela 20: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o ácido piperitínico:

Posição	ácido piperitínico (CDCl ₃)	
	s _H (ppm), J(Hz):	s _C (ppm), J(Hz):
C=O	-----	168 (C)
α	5,7 (d, J=14,6;1H)	121 (CH)
β	7,1 (m, 1H)	144,2 (CH)
γ	6,35 (m, 1H)	131,1 (CH)
δ	6,62 (m, 1H)	141 (CH)
ε	6,66 (m, 1H)	126,7 (CH)
ζ	6,55 (m, 1H)	136,1 (CH)
1	-----	129,6 (C)
2	6,8 (m, 1H)	105,4 (CH)
3	-----	148* (C)
4	-----	147,6* (C)
5	6,73 (m, 1H)	108,5 (CH)
6	6,81 (m, 1H)	122,4 (CH)
OCH ₂ O	5,9 (s, 2H)	101,3 (CH ₂)
OH	3,64 (s,1H)	-----

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.



5.5.5.5. Preparação da amida piperidil do ácido 7-(3,4-melenodioxifenil)-2E,4E,6E-heptatrienóico (piperitina) (**3**).



Reagentes: a) Cloreto de oxalila
b) CH₂Cl₂, piperidina

Em um balão de 25mL de capacidade, mantido sob atmosfera de N₂, foi feita uma solução de 0,100g (0,409mmols) de ácido de 7C (**32**) em 1mL de cloreto de oxalila. A mistura reacional ficou sob agitação, à temperatura ambiente, por cerca de 30 a 40 minutos, durante os quais foi observado desprendimento gasoso. A reação foi acompanhada por CCF até o consumo total do ácido de partida (pela adição de pequena quantidade do meio reacional em metanol, gerando o respectivo éster metílico). O excesso de cloreto de oxalila foi evaporado sob pressão reduzida, levando à formação de um resíduo amarelo que foi dissolvido em 2mL de CH₂Cl₂ (seco) e a solução resultante, mantida sob atmosfera de N₂, foi colocada num banho de gelo sendo adicionado sobre a mesma, gota-a-gota 0,045 mL (0,457 mmols) de piperidilamina. Após cerca de 20 minutos de agitação à temperatura ambiente, a análise por CCF indicou o término da reação. Adicionou-se ao meio reacional 50 mL de acetato de etila. Lavou-se a solução formada 3 vezes com 10 mL de HCl 1M (para consumir o excesso de piperidina), a fase orgânica foi separada em funil de separação e na etapa seguinte, lavou-se 3 vezes com 10mL de NaHCO₃. Usou-se CaSO₄ anidro para secagem da fase orgânica, que foi então evaporada sob pressão redusida. Foram obtidos 0,116 g de produto bruto, que após purificação por cromatografia *flash* sobre sílica gel (eluente: hexano/acetato de etila 10 % gerau 0,070g (60%) da amida **3** na forma de um amorfos amarelados.

P.f.:128-130°C.

IV(KBr,cm⁻¹):

J_{Dx}C-H(Csp²): 2930

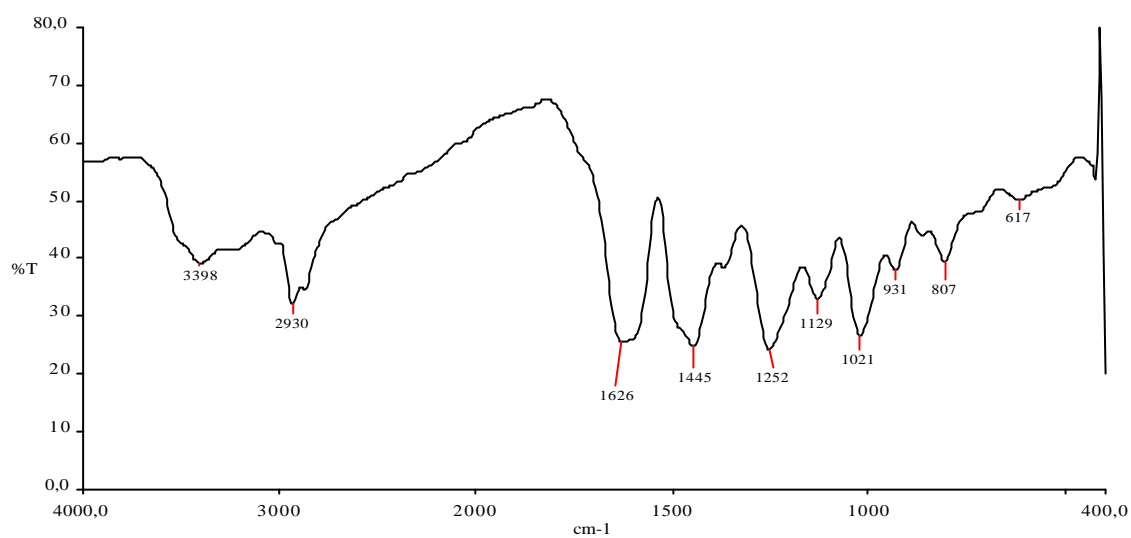
J_{C=O}: 1626

JC=C: 1445 (vibração do esqueleto de anel aromático)

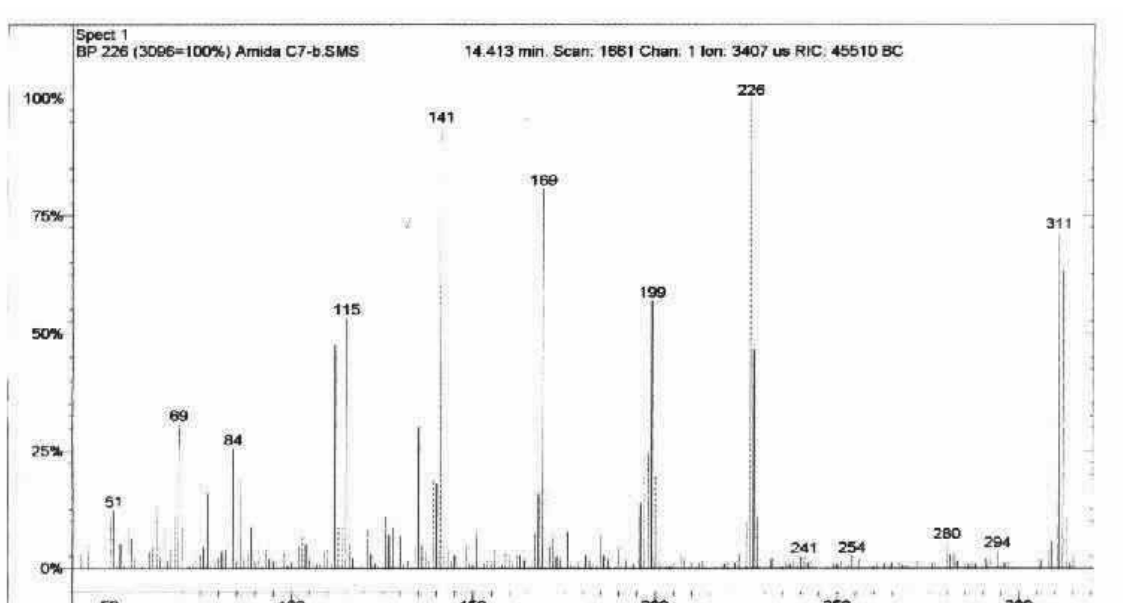
JC-O-C: 1252

?C-H: 931 (dobramento de $H_{\text{arom.}}$ isolado)

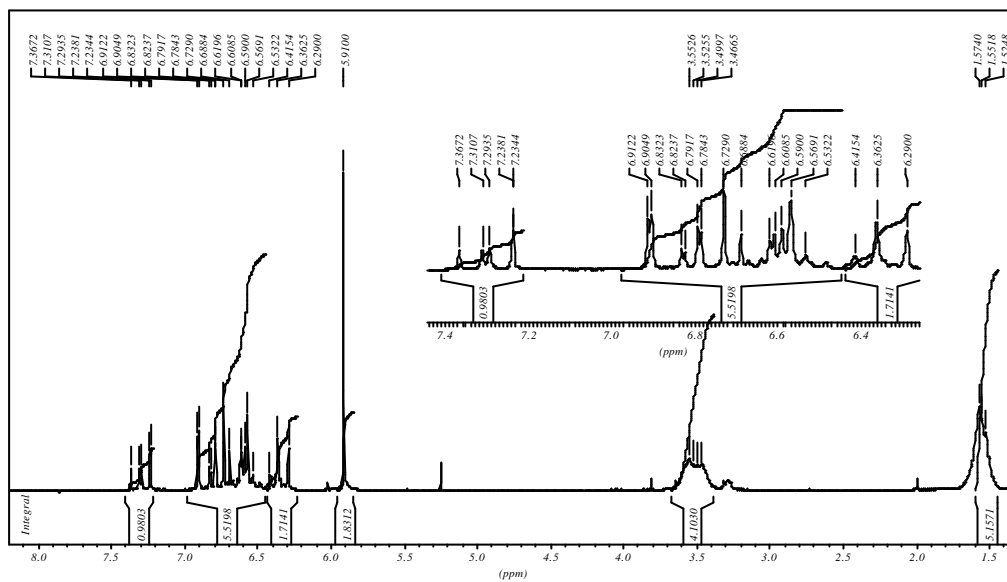
?C-H: 807 (dobramento de $2H_{\text{arom.}}$ vizinhos.



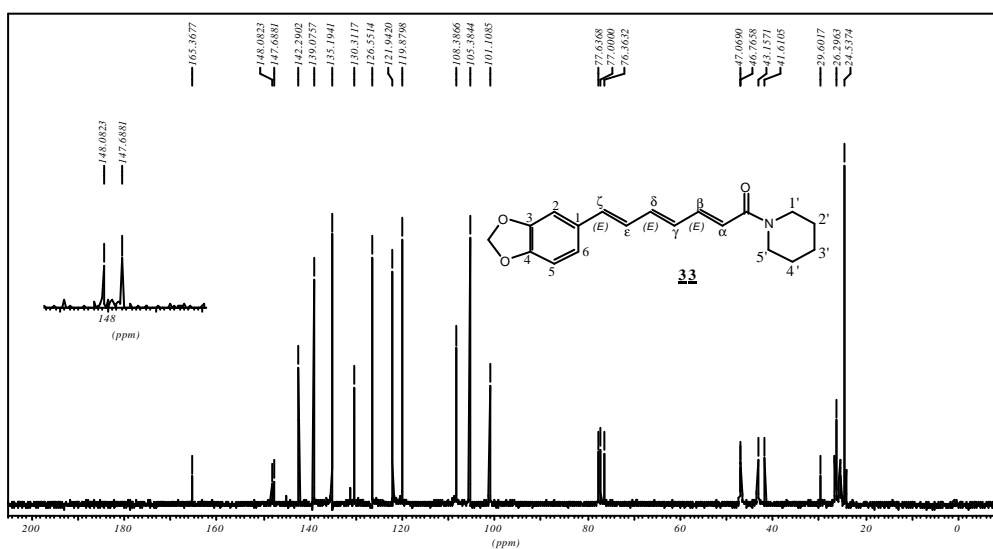
Espectro 56: Espectro de IV da piperitina.



Espectro 57: Espectro de massas da piperitina.



Espectro 58: Espectro de RMN¹H da piperitina.

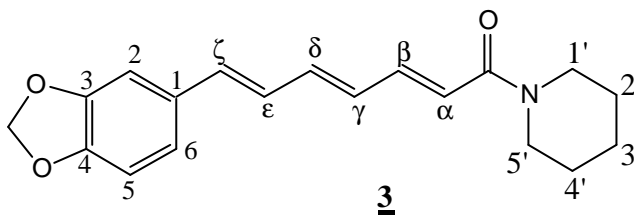


Espectro 59: Espectro de RMN¹³C da piperitina.

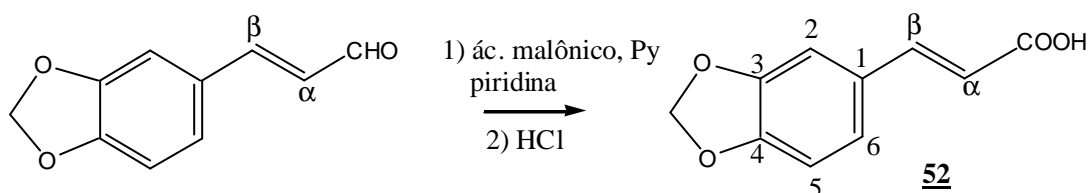
**Tabela 19: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para a piperitina
(De Araújo-Júnior, J.X. *et.al.*, 1997)**

Posição	piperitina (CDCl ₃)	
	s _H (ppm), J(Hz):	s _C (ppm), J(Hz):
1'	3,46-3,55 (m,2H)	43,4 (CH ₂)
2'	1,52-1,57 (m,2H)	25,1 (CH ₂)
3'	1,52-1,57 (m,2H)	24,2 (CH ₂)
4'	1,52-1,57 (m,2H)	24,5 (CH ₂)
5'	3,46-3,55 (m,2H)	47 (CH ₂)
C=O	-----	165,3 (C)
α	6,29 (d, J=14,2; 1H)	119,9 (CH)
β	7,30 (dd, J=11,5; 14,2; 1H)	142,3 (CH)
γ	6,36 (dd, J=11,5; 14,2; 1H)	131,3 (CH)
δ	6,57 (dd, J=10; 14,2; 1H)	139 (CH)
ε	6,61 (dd, J=10; 15; 1H)	126,5 (CH)
ζ	6,54 (d, J=15; 1H)	135,1 (CH)
1	-----	130,3 (C)
2	6,90 (d, J=2; 1H)	105,3 (CH)
3	-----	148 (C)
4	-----	147,3 (C)
5	6,70 (d, J=8; 1H)	108,3 (CH)
6	6,80 (dd, J=2; 8; 1H)	122 (CH)
OCH ₂ O	5,91 (s, 2H)	101,1 (CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.



5.5.6. Preparação do ácido-(3,4-metilenodioxifenil)-2*E*-propenoico (52) (ácido cinâmico) (Silva, E. F. *et al.*, 2002)



Em um bal\u00e3o de 50 mL de capacidade, equipado com condensador de refluxo, foram dissolvidos 5 g (33,3 mmol) de piperonal e 7,5 g (72 mmol) de \u00e1cido mal\u00f4nico numa mistura de 15 mL de piridina e 0,25mL (2,53 mmol) de piperidina. Em seguida, a mistura foi aquecida sob refluxo por cerca de 1,5 h em banho-maria . Ocorreu um r\u00e1pido desprendimento de CO₂. A rea\u00e7\u00e3o se completou ap\u00f3s ebuli\u00e7\u00e3o por 10 minutos adicionais, e em seguida, ap\u00f3s resfriar foi vertida em 5,7mL de solu\u00e7\u00e3o de HCl em excesso de \u00e1gua, o suficiente para neutralizar a piridina, ocorrendo a precipita\u00e7\u00e3o do produto. O \u00e1cido β -piperonilacr\u00edlico, foi filtrado, lavado com \u00e1gua, \u00e9ter e seco ao ar. Ap\u00f3s recristaliza\u00e7\u00e3o com \u00e1cido ac\u00e9tico glacial, o produto em sua forma pura, foi obtido na forma de um s\u00f3lido branco (6,1g) com 96% de rendimento.

p.f. :238⁰C.

IV(KBr,cm⁻¹):

JO-H: 3457

J_{DW}C-H(Csp₂): 2922

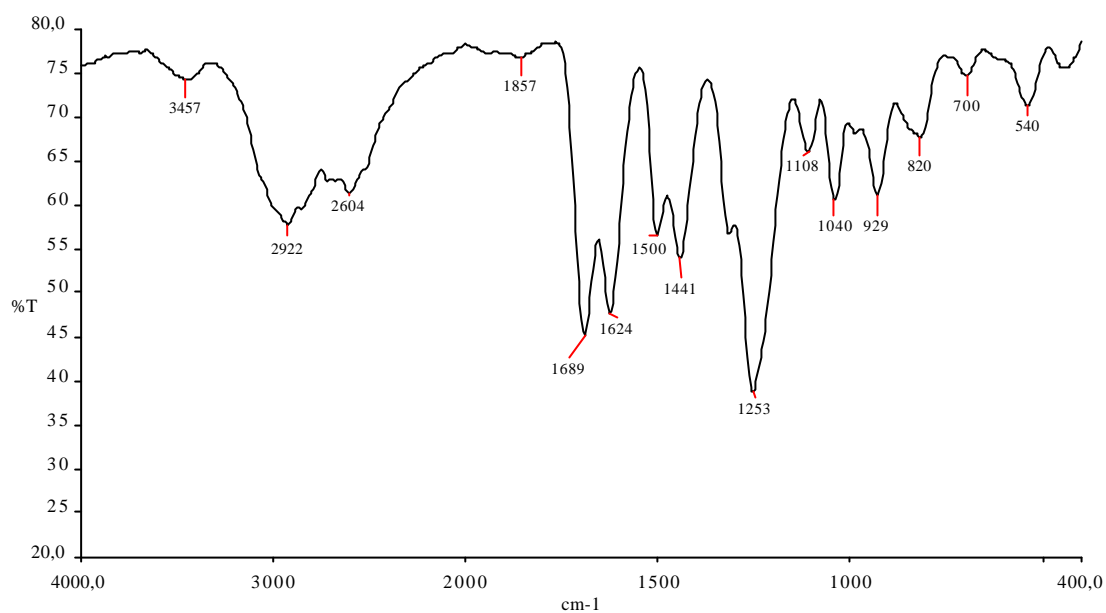
JC=O: 1689

JC=C: 1624-1441 (vibra\u00e7\u00e3o do esqueleto de anel arom\u00e1tico)

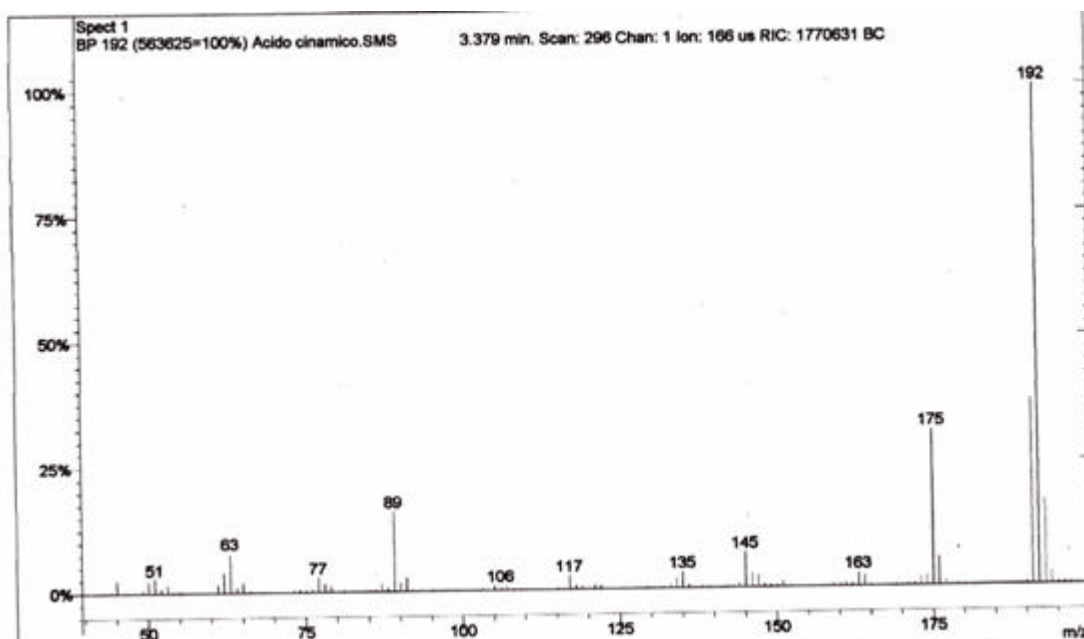
JC-O-C: 1253

?C-H: 929 (dobramento de H_{arom.} isolado)

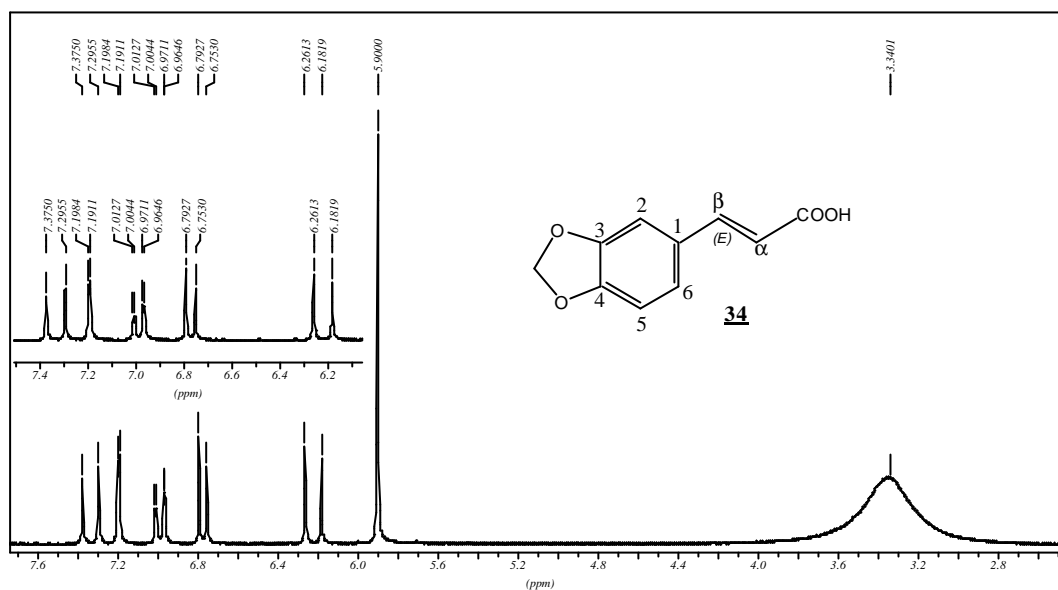
?C-H: 820 (dobramento de 2H_{arom.} vizinhos)



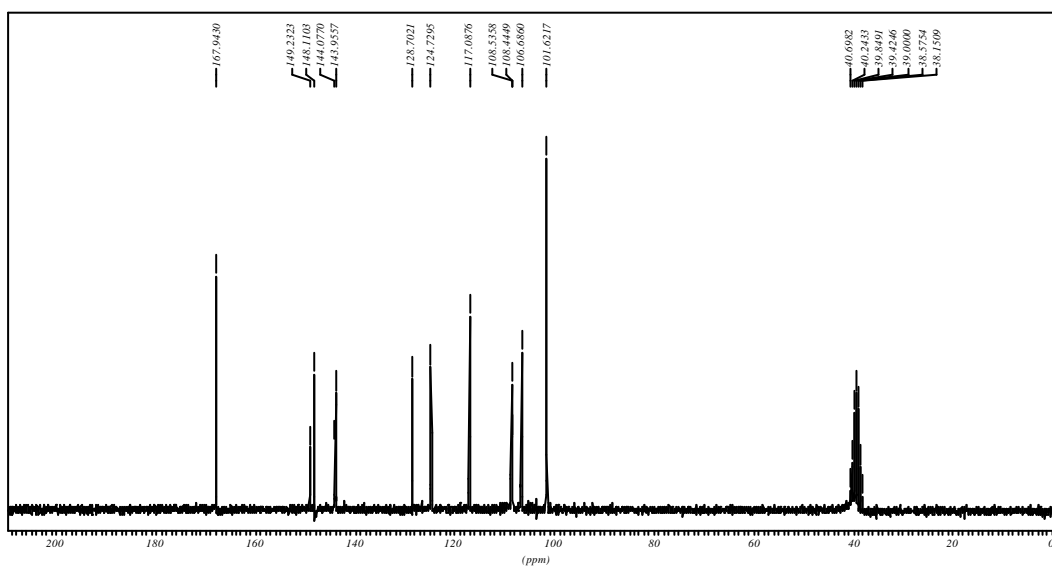
Espectro 60: Espectro de IV para o ácido cinâmico.



Espectro 61: Espectro de massas para o ácido cinâmico.



Espectro 62: Espectro de RMN¹H para o ácido cinâmico.

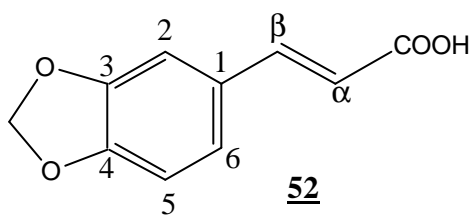


Espectro 63: Espectro de RMN¹³C para o ácido cinâmico.

Tabela 20: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o ácido cinâmico:

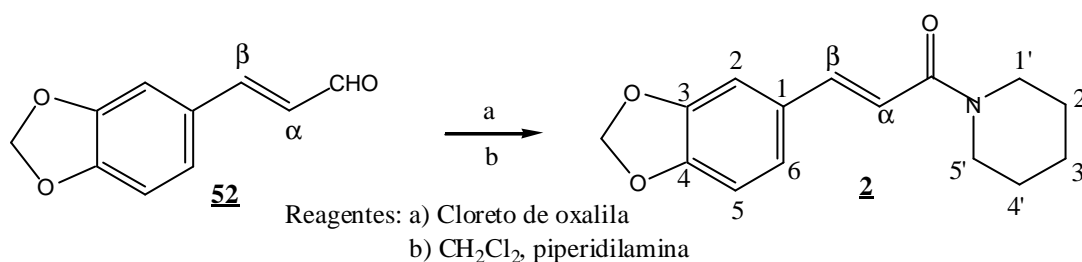
Posição	ácido cinâmico (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	s _H (ppm), <i>J</i> (Hz):	s _C ^a (ppm):
OH	3,59 (sl, 1H)	-----
C=O	-----	168 (C)
α	6,2 (d, <i>J</i> =14,2; 1H)	117,1 (CH)
β	7,3 (d, <i>J</i> =14,2; 1H)	144 (CH)
1	-----	128,7 (C)
2	7,1(d, <i>J</i> =2; 1H)	108,6 (CH)
3	-----	149,3 (C)
4	-----	148,1 (C)
5	7,05 (d, <i>J</i> =8; 1H)	106,76 (CH)
6	7,0 (dd, <i>J</i> =2; 8; 1H)	124,8 (CH)
OCH ₂ O	6,1 (s, 2H)	101,69 (CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.



5.5.7. Preparação dos derivados cinamoilas substituídos a partir do ácido-(3,4-metilenonodioxifenil)-2Epropenóico

5.5.7.1. Preparação da amida piperidil do ácido 3-(3,4-metilenonodioxifenil)-2Epropenóico (derivado cinamoila piperidil substituído)(2)



Em um balão de 25 mL de capacidade sob atmosfera de N₂, foram dissolvidos 0,300 g (1,56 mmols) de ácido-(3,4-metilenonodioxifenil)-2E-propenóico em 2 mL de cloreto de oxalila. Esta reação ficou sob agitação a temperatura ambiente por 30-40 minutos. A reação foi acompanhada por CCF até o consumo final do produto de partida.

O excesso de cloreto de oxalila foi evaporado à pressão reduzida levando a formação de um sólido que foi submetido à etapa seguinte sem purificação adicional.

Foram adicionados 2 mL de CH₂Cl₂ (seco) e 1,47 mL (1,56 mmols) de piperidina. Após 20 minutos a análise por CCF indicou o término da reação. O solvente foi evaporado em rotavapor e o resíduo formado foi purificado por cromatografia *flash* sobre sílica gel, utilizando como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila 10 %. Foram obtidos 0,323 g (80 %) na forma de cristais amorfos de coloração bege.

IV(KBr, cm⁻¹):

JN-H: 3423

JC-H(Csp₂): 3066-3003

J_vC-H(Csp₃): 2935

J_sC-H(Csp₃): 2854

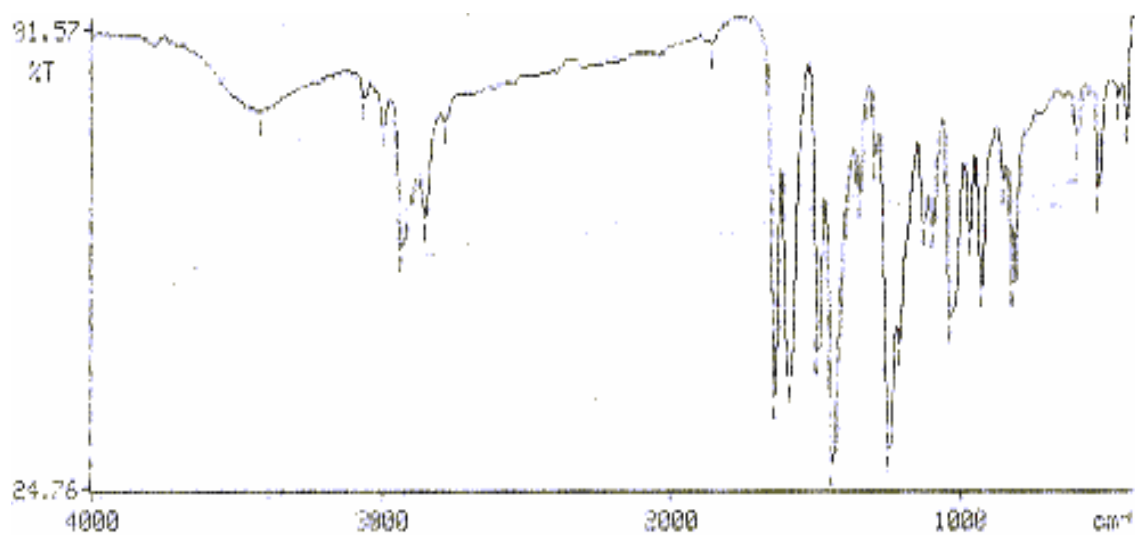
JC=O: 1644

JC=C: 1593-1496-1443(vibração do esqueleto de anel aromático)

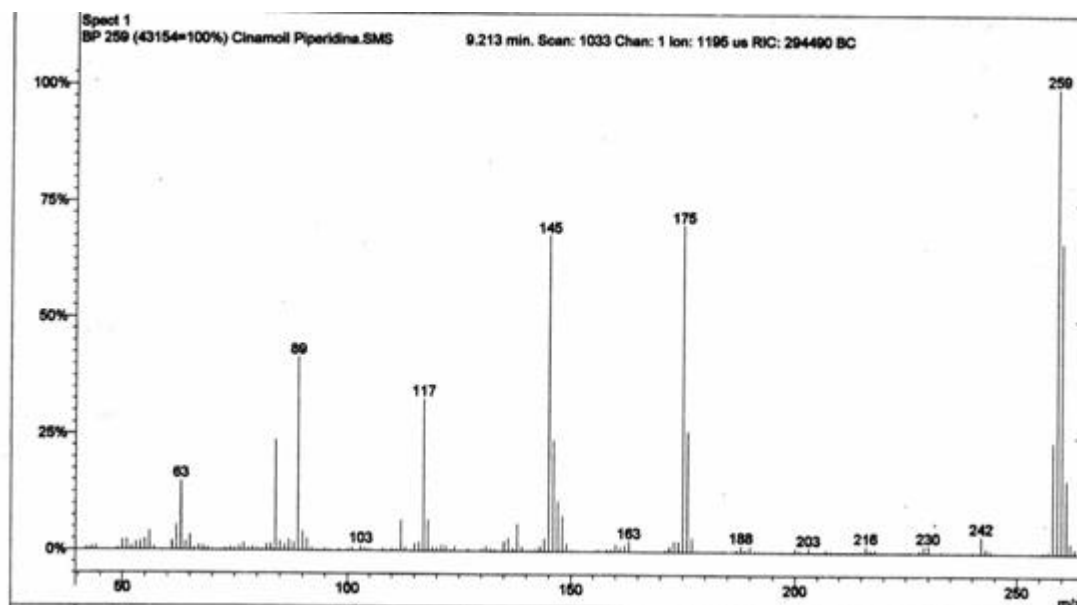
JC-O-C:1297-1250

?C-H: 971-931(dobramento de H_{arom.} isolado)

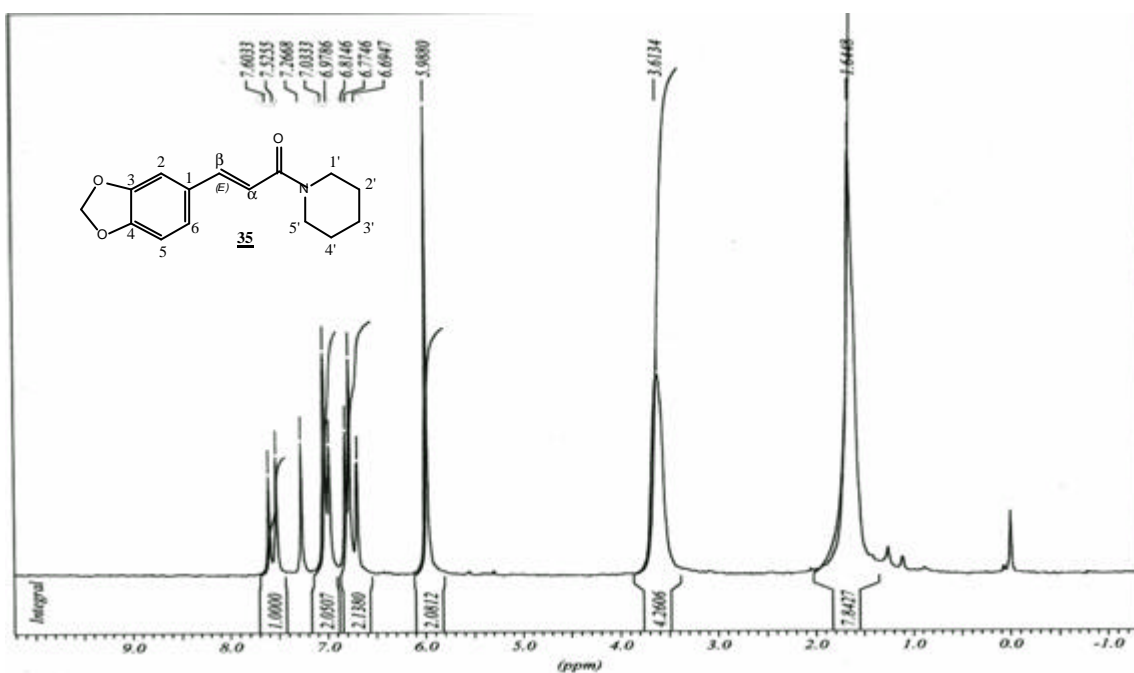
?C-H:855-819(dobramento de 2H_{arom.} vizinhos)



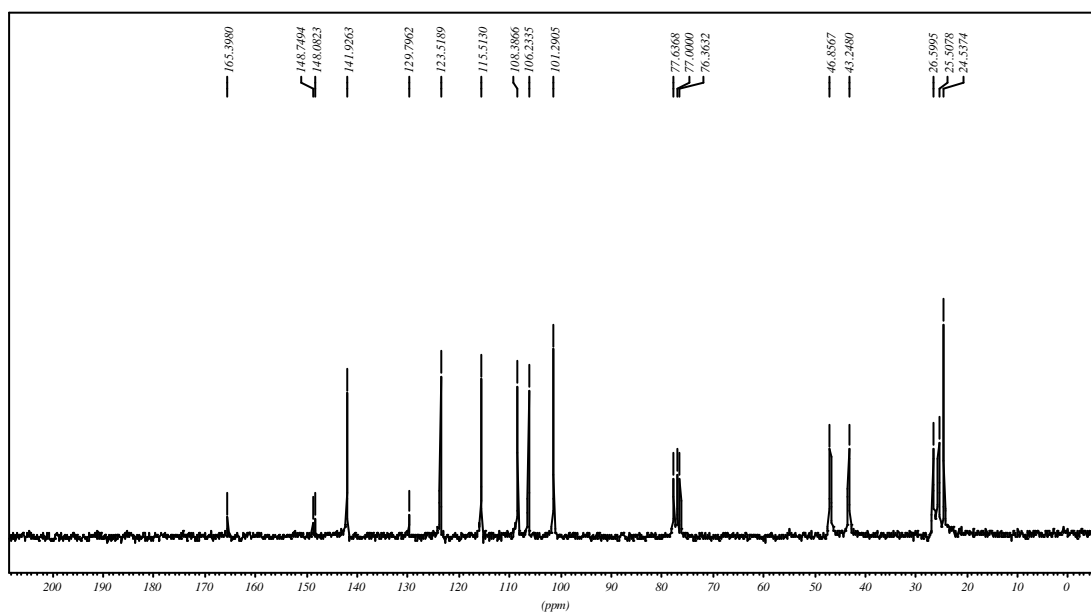
Espectro 64: Espectro de IV do derivado cinamoila piperidil substituído.



Espectro 65: Espectro de massas do derivado cinamoila piperidil substituído.



Espectro 66: Espectro de RMN¹H do derivado cinamoila piperidil substituído.

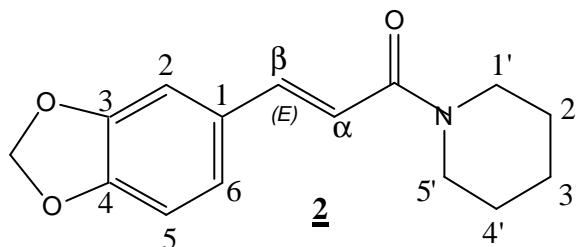


Espectro 67: Espectro de RMN¹³C do derivado cinamoila piperidil substituído.

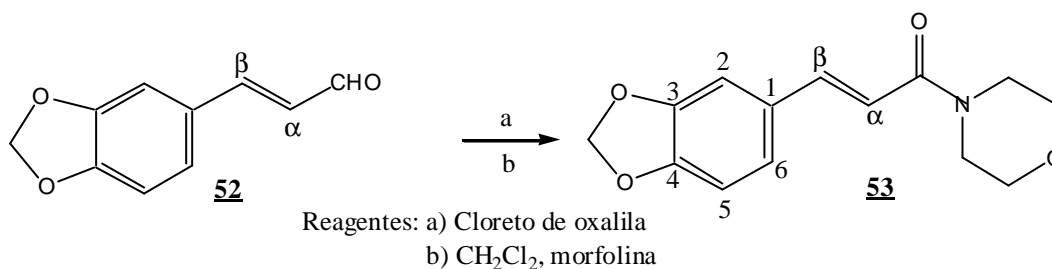
Tabela 21: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o cinamoil piperidil:

Posição	cinamoil piperidil(CDCl ₃)	
	s _H (ppm), <i>J</i> (Hz):	s _C ^a (ppm):
1	3,6 (sl,2H)	46,8 (CH ₂)
2	1,6 (sl,2H)	26,5 (CH ₂)
3	1,6 (sl,2H)	24,5 (CH ₂)
4	1,6 (sl,2H)	25,5 (CH ₂)
5	3,6 (sl,2H)	43,2 (CH ₂)
C=O	-----	165,39 (C)
a	6,7 (d, <i>J</i> =15,5; 1H)	115,5 (CH)
β	7,6 (d, <i>J</i> =15,5; 1H)	141,9 (CH)
1	-----	129,7 (C)
2	7,03 (s, 1H)	106,2 (CH)
3	-----	148,7 (C)
4	-----	148,0 (C)
5	6,8 (d, <i>J</i> =8, 1H)	108,3 (CH)
6	6,97 (s, 1H)	123,5 CH
OCH ₂ O	5,98 (s,2H)	101,29 (CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT.



5.5.7.2. Preparação da amida morfóil do ácido 3-(3,4-metilenonodioxifenil)-2E-propenóico (derivado cinamoila morfóil substituído) (53)



Em um balão de 25mL de capacidade sob atmosfera de N₂, foram dissolvidos 0,300g (1,56 mmols) de ácido-(3,4-metilenonodioxifenil)-2E-propenóico em 2 mL de cloreto de oxalila. Esta reação ficou sob agitação a temperatura ambiente por 30-40 minutos. A reação foi acompanhada por CCF até o consumo final do produto de partida. O excesso de cloreto de oxalila foi evaporado à pressão reduzida levando a formação de um sólido que foi submetido à etapa seguinte sem purificação adicional.

Foram adicionados 2mL de CH₂Cl₂ (seco) e 1,35mL(1,56 mmols) de morfolina. Após 20 minutos a análise por CCF indicou o término da reação. O solvente foi evaporado em rotavapor e o resíduo formado foi purificado por cromatografia *flash sobre sílica gel*, utilizando como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila 10%. Foram obtidos 0,325 g (80 %) da amida 53 na forma de cristais amorfos de coloração bege.

(rendimento de 80% e p.f.:152°C).

IV(KBr, cm⁻¹):

JN-H: 3423

JC-H(Csp₂): 3058

J_{sp}C-H(Csp₃): 2972-2915

J_sC-H(Csp₃): 2854

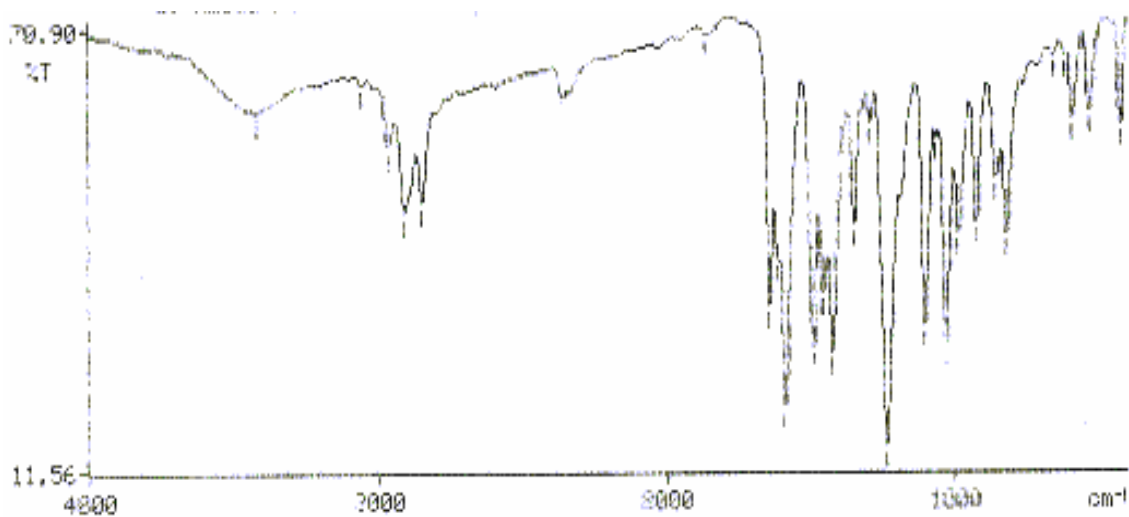
JC=O: 1645

JC=C: 1617-1494-1461(vibração do esqueleto de anel aromático)

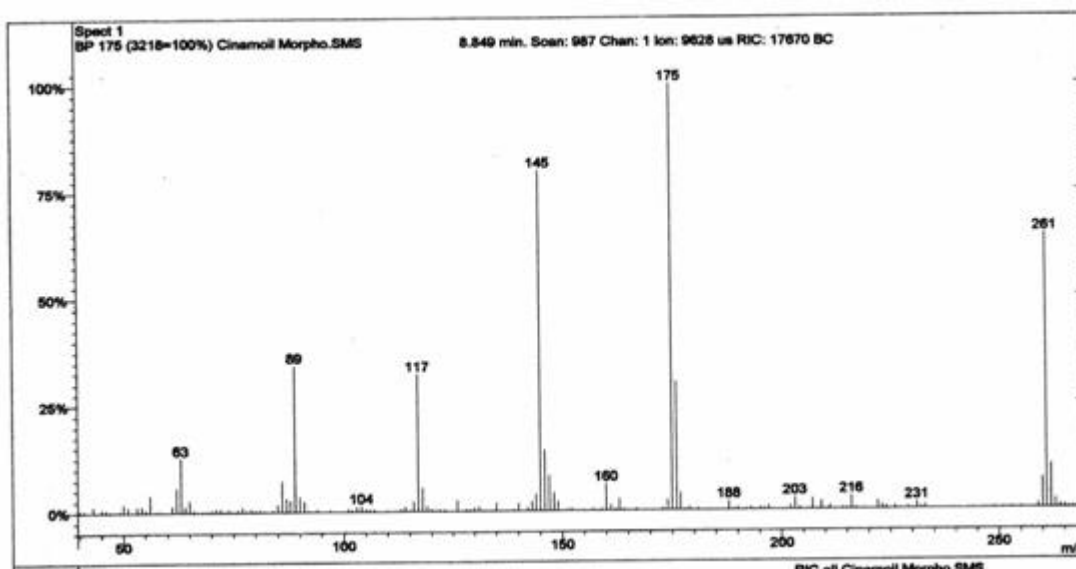
JC-O-C:1239

?C-H: 988-926(dobramento de $H_{\text{arom.}}$ isolado)

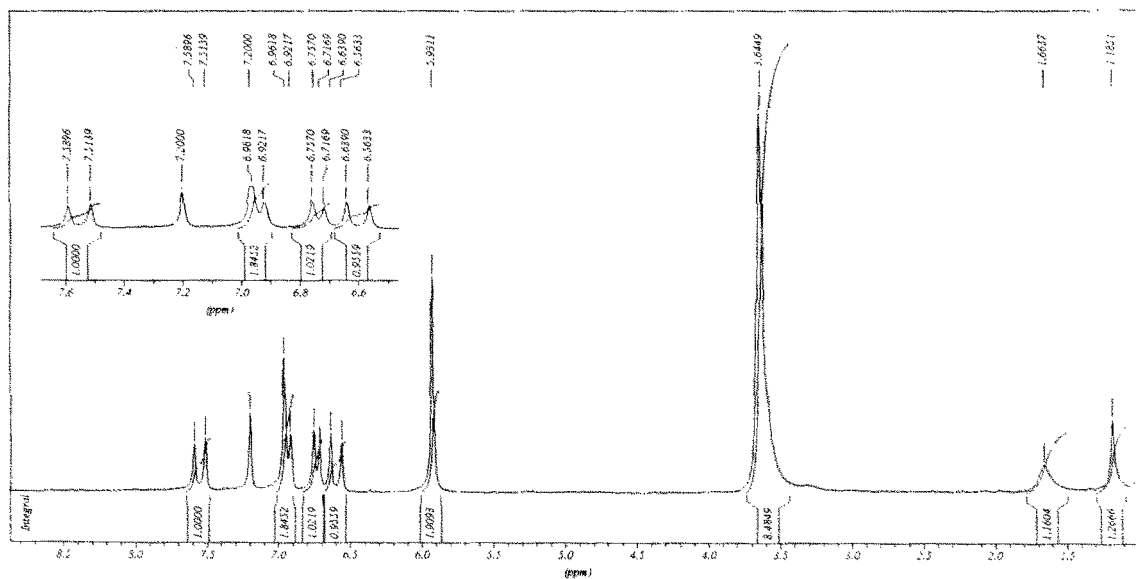
?C-H:859-821(dobramento de $2H_{\text{arom.}}$ vizinhos)



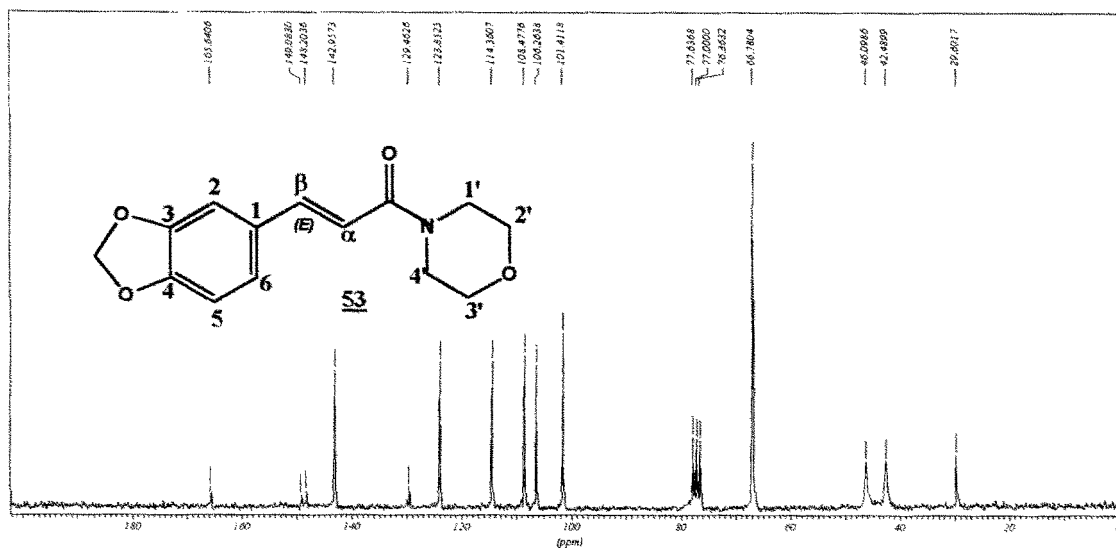
Espectro 68: Espectro de IV do derivado cinamoila morfóil substituído.



Espectro 69: Espectro de massas do derivado cinamoila morfóil substituído.



Espectro 70: Espectro de RMN¹H do derivado cinamoila morfóil substituído.

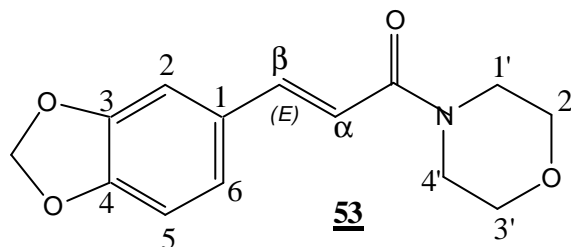


Espectro 71: Espectro de RMN¹³C do derivado cinamoila morfóil substituído.

Tabela 22: Deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono para o derivado cinamoil morfolid substituído :

Posição	cinamoil morfolid(CDCl ₃)	
	s _H (ppm), <i>J</i> (Hz):	s _C ^a (ppm):
1	3,64 (sl,2H)	42,4 (CH ₂)
2	3,64 (sl,2H)	66,8 (CH ₂)
3	3,64 (sl,2H)	66,8 (CH ₂)
4	3,64 (sl,2H)	46,1 (CH ₂)
C=O	-----	165,6 (C)
α	6,6 (d, <i>J</i> =15,1; 1H)	123,8 (CH)
β	7,6 (d, <i>J</i> =15,1; 1H)	142,9 (CH)
1	-----	129,7 (C)
2	6,96 (d,1H)	106,2 (CH)
3	-----	149 (C)
4	-----	148,2 (C)
5	6,7 (d, <i>J</i> =8; 1H)	108,3 (CH)
6	6,92 (d, <i>J</i> =8; 1H)	114,3 (CH)
OCH ₂ O	5,9 (s, 2H)	101,4 (CH ₂)

^a as multiplicidades dos carbonos foram determinadas por DEPT



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AGOSTA, W. C. Medicines and drugs from plants. *J. Chem. Ed.* 74: 857-860, **1997**.
- AHN, J. W., AHN M. J., ZEE, O. P., KIM, E. J., LEE, S. G., KIM, H. J., KUBO, I. Piperidine alkaloids from *Piper-retrofractum* fruits. *Phytochemistry* 31(10): 3609-12, **1992**.
- ATAL, C. K., DUBEY, R.K., SINGH, J. Biochemical basis of enhanced drug bioavailability by piperine-evidence that piperine is a potent inhibitor of drug-metabolism. *The J. Pharm. Exp. Therap.* 232(1): 258-62, **1985**.
- ATAL, C. K., ZUTSHI, U., RAO, P. G. Scientific evidence on the role of ayurvedic herbals on bioavailability of drugs. *J. Ethnopharm.* 4 (2): 229-232, **1981**.
- ATAL, C. K., DHAR, K. L., SINGH, J. Chemistry of Indian *Piper* species. *Loydia- the J. Nat. Prod.* 38(3): 256-264, **1975**.
- BANERJI, A & NANDI, G. Investigation of *Piper-argyrophyllum* miq-structure and synthesis of *N*-isobutyl-octadeca-2*E*, 4*E*-dienamide. *Indian J. Chem.* 27 (2): 163-165, **1988**.
- BANO, G., RAINA, R. K., ZUTSHI, U., BEDI, K. L., JOHRI, R. K., SHARMA, S. C. Effect of piperine on bioavailability and pharmacokinetics of propranolol and theophylline in healthy-volunteers. *Eur. J. Clin. Pharm.* 41 (6): 615-7, **1991**.
- BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M., ARAÚJO Jr., J. X. O uso de matérias-primas vegetais para a síntese de fármacos. In: Simões, C.M.O. (Ed.) *et al.*, *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Florianópolis: Ed. Universidade/ Ed. da UFSC, p.123-142, **1999**.
- BARRETO, L. M. & CARMO, E. H. Determinantes das condições de saúde e problemas prioritários no país. In: 11^a Conferência Nacional de Saúde. Disponível no endereço: <http://www.datasus.gov.br>.
- BARRETO JÚNIOR, C. B. Estudos da síntese de dienamidas análogas à piperina e avaliação da atividade antiparasitária sobre *Trypanosoma brucei*. Monografia, UFRuralRJ, **2003**.
- BHAT, B.G. & CHANDRASEKHARA, N. Interaction of piperina with rat-liver microsomes. *Toxicology* 44 (1): 91-8, **1987**.
- BHAT, B.G. & CHANDRASEKHARA, N. Effect of black pepper and piperine on bile secretion and composition in rats. *Toxicology* 31 (9): 913-16, **1987**.

- BRENER, Z., & ANDRADE, Z. A. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, **1979**.
- CHATAING, B., CONCEPCION, J. L., LOBATON, R., USUBILLAGA, A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in vitro by *Solanum* alkaloids: a comparison with Ketoconazole. *Planta Medica* 64: 31-36, **1998**.
- COUCEIRO, J. N. S. S., MARTINS-DA-SILVA, P., SANTOS, M. G. M., RIBEIRO, T. S., LIMA, M. E. F. Natural piperine as a new prototype of alternative antivirals against influenza. *Virus: Review & Research* (trabalho submetido, **2004**).
- COREY, E. J. & SCHMIDT, G. Useful procedures for the oxidation of alcohols involving pyridinium dichromate in aprotic media. *Tetrahedron Lett.* 5: 399-402, **1979**.
- CORRÊA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. *Química Nova*, 18: 460-67, **1995**.
- COURA, J. R. & DE CASTRO, S. L. A Critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97(1): 3-24, **2002**.
- CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* 60 (1): 52-60, **1997**.
- DAS, B. & MADHUSUDHAN Transformation of the conjugated dienamide system of some natural alkaloids to the β,γ -unsaturated amide function using Zn/HOAc. *Tetrahedron Lett.* 39: 9099-9100, **1998**.
- DA CONCEIÇÃO, A. P. S. Piperina: Modificações Estruturais, Síntese de Análogos e Avaliação Cítotóxica. Dissertação de Mestrado, UFRuralRJ, **1999**.
- DA SILVA, E. F., CANTO-CAVALHEIRO, M. M., BRAZ, V. R., CYSNE-FINKELSTEIN, L., LEON, L., ESCHEVARRIA, A. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *Eur. J. Med.Chem.* 37: 979-984, **2002**.
- DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X., DUARTE, C. M., CHAVES, M. C. O., PARENTE, J. P., FRAGA, C. A. M., BARREIRO, E. J. Synthesis of natural amide alkaloid piperdardine and a new bioactive analogue. *Synth. Commun.* 31 (1): 117-723, **2001**.
- DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X., BARREIRO, E. J., PARENTE, J. P., FRAGA, C. A. M. Synthesis of piperamidas and new analogues from natural safrole. *Synth. Commun.* 29 (2): 263-273, **1999**.

- DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X., DA CUNHA, E. V. L., CHAVES, M. C. O., GRAY, A. I. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 44 (3): 559-561, **1997**.
- DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microb. Biotechnol.* 52 (4): 455-463, **1999**.
- DENIS, J. N., GREENE, A. E., GUENARD, D., GUERITTEVOEGELEIN, F., MANGATAL, L., POTIER, P. A highly efficient, practical approach to natural Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 110 (17): 5917-5919, **1988**.
- DE PAULA, V. F., BARBOSA, L. C. A., DEMUNER, A. J., VELOSO, D. P., PICANÇO, M. C. Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. *Pest Manag. Sci.* 56 (2): 168-174, **2000**.
- D'HOOGE, R., PEI, Y. Q., RAES, A., LEBRUM, P., VANBOGAERT, P. P., DE DEYN P. P. Anticonvulsant activity of piperine on seizures induced by excitatory amino acid receptor agonists. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 46 (6): 557-60, **1996**.
- DIAS, J. C. P. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. *Epidemiologia*. In Z. Brener, Z. Andrade, M. Barra-Neto (eds), 2^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.48-74, **2000**.
- DOGRA, R. K. S., KHANNA, S., SHANKER, R., Immunotoxicological effects of piperine in mice. *Toxicology* 196: 229-236, **2003**.
- EPSTEIN, W., NETZ, D., SEIDEL, J. Isolation of piperine from black pepper. *J. Chem. Educ.* 70 (7): 598-99, **1993**.
- FOURNET, A., INCHAUST, A., YALUFF, G., ROJAS, A. A., GUINADEAU, H., BRUNETON, J., BREIDENBACH, M. A., KARPLUS, P. A., FAERMAN, C. H. Trypanocidal bisbenzylisoquinolone alkaloids are inhibitors of trypanothione reductase. *J. Enzym. Inhib.* 13: 1-9, **1998**.
- GEISLER, J.G. & GROSS, G.G. The biosynthesis of piperine in *Piper nigrum*. *Phytochemistry* 29 (2): 489-92, **1990**.
- GEISMAN, T. A. & CROUT, D. H. G. Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. *Freenar Cooper*, San Francisco, p.170, **1969**.
- GHOSHAL, S., PRASAD, B. N. K., LAKSIMI, V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* *in vitro* and *in vivo*. *J. Ethnopharm.* 50 (3):167-70, **1996**.

- GOMES, D. C. F., ALEGRIO, L. V., FREIRE DE LIMA, M. E., LEON, L. L., ARAÚJO, C. A. C. Synthetic derivatives of curcumin and their activity against *Leishmania amazonensis*. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 52 (2): 120-124, **2002a**.
- GOMES, D. C. F., ALEGRIO, L. V., LEON, L. L., FREIRE DE LIMA, M. E. Total Synthesis and Anti-leishmanial activity of some curcumin analogues. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 52 (9): 695-698, **2002b**.
- HARVEY, C. A. Colonization of agricultural windbreaks by forest trees: Effects of connectivity and remnant trees. *Ecolog. Applic.* 10 (6): 1762-1773, **2000**.
- HOLTON, R. A., KIM, H. B., SOMOZA, C., LIANG, F., BIEDIGER, R. J., BOATMAN, P. D., SHINDO, M., SMITH, C. C., KIM, S. C., NADIZADEH, H., SUZUKI, Y., TAO, C. L., VU, P., TANG, S. H., ZHANG, P. S., MURTHI, K. K., GENTILE, L. N., LIU, J. H. First total synthesis of Taxol .2. completion of the C-ring and D-ring. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (4): 1597-1598, **1994a**.
- HOLTON, R. A., KIM, H. B., SOMOZA, C., LIANG, F., BIEDIGER, R. J., BOATMAN, P. D., SHINDO, M., SMITH, C. C., KIM, S. C., NADIZADEH, H., SUZUKI, Y., TAO, C. L., VU, P., TANG, S. H., ZHANG, P. S., MURTHI, K. K., GENTILE, L. N., LIU, J. H. First total synthesis of Taxol .1. functionalization of the B-ring. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (4): 1599-1600, **1994b**.
- HUDLICKÝ, M. Reductions in Organic Chemistry. *John Wiley & Sons*, New York, pp. 1-3, **1986**.
- IKAN, R. In: Natural Products: A Laboratory Guide. *Academic Press*, 2nd Edition, pp. 233-238, **1991**.
- JOHRI, R. K., THUSU, N., KHAJURIA, A., ZUTSHI, U. Piperine-mediated changes in the permeability of rat intestinal epithelial-cells-the status of gamma-glutamyl transpeptidase activity, uptake of amino-acids and lipid-peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 43 (7): 1401-7, **1992**.
- KAPIL, A. Piperine: A potent inhibition of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. *Planta Medica* 59: 474, **1993**.
- KOUL, S., KOUL, J. L., TANEJA, S. C., DHAR, K. L., JAMWAL, D. S., SINGH, K., RENN, R. R., SINGH, J. Structure-Activity relationship of piperine and its synthetic analogues for their inhibitory potentials of rat hepatic microsomal constitutive and inducible cytochrome P450 activities. *J. Bioorg. Med. Chem.* 8(1): 251-268, **2000**.

- KUSAMA, H., HARA, R., KAWAHARA, S., NISHIMORI, T., KASHIMA, H., NAKAMURA, N., MORIHIRA, K., KUWAJIMA, I. Enantioselective total synthesis of (-)-taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 3811-3820, **2000**.
- LEE, S. E., PARK, B. S., KIM, M. K., CHOI, W.S., KIM, H. T., CHO, K. Y., LEE, S. G., LEE, H. S. Fungicidal activity of piperonaline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum* L., against phytopathogenic fungi. *Crop. Protec.* 20: 523-528, **2001**.
- LIN, Z. X., HOULT, J. R. S., BENNET, D. C., RAMAN, A. Stimulation of mouse melanocyte proliferation by *Piper nigrum* fruit extract and its main alkaloid, piperine. *Planta medica* 65: 600, **1999**.
- LIU, L & SIMON A. S. Similarities and differences in the currents activated by capsaicin, piperine, and zingerone in rat trigeminal ganglion cells. *J. Neuroph.* 76 (3): 1858-69, **1996**.
- LIU, G. Q., ALGERI, S., CECI, A., GARATTINI, S., GOBBI, M., MURAI, S. Stimulation of serotonin synthesis in rat-brain after antiepilepsirine, na antiepileptic piperine derivative. *Biochem. Pharmacol.* 33 (23): 3883-86, **1984**.
- MCLAFFERT, F. W. & TURECEK, F. Interpretation of Mass Spectra, 4thed., *University Science Books*, Mill Valley, CA, **1993**.
- MADHYASTHA, M. S. & BHAT, R. V. Aspergillus-parasiticus growth and aflatoxin production on black and white pepper and the inhibitory-action of their chemical-constituents. *Appl. Environm. Microbiol.* 48 (2): 376-9, **1984**.
- MANN, J. Chemical Aspects of Biosynthesis. *Oxford Science Publications*, Oxford, pp. 51-58, **1994**.
- MARCH, J. Advanced Organic Chemistry- Reactions, Mechanism and Structure. *John Willey & Sons*, 3rded., p.388, 1095,1099,1100,1101, **1985**.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A., ESCARIO, J. A., NOGAL-RUIZ, J. J., GÓMES-BARRIO, Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 53, **2001**.
- MARYANOFF, B. E. & REITZ, A. B. The wittig olefination reaction and modifications involving phosphoryl-stabilized carbanions. Stereochemistry, mechanism, and selected synthetic aspects. *Chem. Rev.* 89: 863, **1989**.
- MORELLO, A., LIPCHENCA, I., CASSELS, B. K., SPEISKY, H., ALDUNATE, J., REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several

strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 107: 367-371, **1994**.

NEAL, R. A. & BUEREN, J. Comparative studies of drug susceptibility of 5 strains of *Trypanosoma cruzi* *in vivo* and *in vitro*. *J. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 709, **1988**.

NICOLAOU, K. C., YANG, Z., LIU, J. J., UENO, H., NANTERMET, P. G., GUY, R. K., CLALBORNE, C. F., RENAUD, J., COULADOUROS, E. A., PAULVANNAN, K., SORENSEN, E. Total síntesis of Taxol. *Nature* 367: 630-34, **1994**.

Para maiores detalhes sobre a produção brasileira de pimenta-do-reino veja: [<http://www.brazilblackpepper.adm.br>]

PARK, I. K., LEE, S. G., SHIN, C. S., PARK, J. D., AHN, Y. J. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1866-1870, **2002**.

PARMAR, V. S., JAIN, S. C., BISHT, K. S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGI, O. D., PRASAD, A. K., WENGEL, J., OLSEN, C. E., BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46 (4): 597-673, **1997**.

PARMAR, V. S., JAIN, S. C., GUPTA, S., TALWAR, S., RAJWANSHI, V. K., KUMAR, R., AZIM, A., MALHOTRA, S., KUMAR, N., JAIN, R., SHARMA, N. K., TYAGI, O. D., LAWRIE, S. J., ERRINGTON, W., HOWART, O. W., OLSEN, C. E., SINGH, S. K., WENGEL, J. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry* 49(4): 1069-1078, **1998**.

PERRIN, D. D., ARMAREGO, W. L. F., PERRIN, D. R. Purification of laboratory chemicals. *Pergamon Press*, **1966**.

PETSKO, G. A. For medicinal purposes. *Nature* 384 (6604): 7-9, **1996**.

PIYACHATURAWAT, P., GINSUKON, T., TORKULKAS, C. Acute and sub acute toxicity of piperine in mice, rats and hamsters. *Toxicol. Lett.* 16: 351-359, **1983**.

RAAY, B., MEDDA, S., MUKHOPADHYAY, S., BASU, M. K. Targetin of piperine intercalated in mannose-coated liposomes in experimental leishmaniasis. *Indian J. Biochem. Bioph.* 36 (4): 248-251, **1999**.

RAMAN, G. & GAIKAR, V. G. Microwave-assisted extraction of piperine from *Piper nigrum*. *Ind. End. Chem. Res.* 41: 2521-2528, **2002a**.

- RAMAN, G. & GAIKAR, V. G. Extraction of piperine from *Piper nigrum* (black pepper) by hydrotropic solubilization. *Ind. End. Chem. Res.* 41: 2966-2976, **2002b**.
- RANU, B. C. & SAMANTA, S. Remarkably selective reduction of the $\alpha\beta$ -carbon-carbon double bond in highly activated $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -unsaturated alkenes by the InCl_3 - NaBH_4 reagent system. *J. Organic. Chem.* 68: 7130-7132, **2003**.
- REEN, R. K., WIEBEL, F. J., SINGH, J. Piperine inhibits aflatoxin B-1-induced cytotoxicity and genotoxicity in V79 Chinese hamster cells genetically engineered to express rat cytochrome P4502B1. *J. Ethnopharm.* 58 (3): 165-73, **1997**.
- REEN, R. K., JAMWAL, D. S., TANEJA, S. C., KOUL, J. L., DUBEY, R. K., WIEBEL, F. J., SINGH, J. Impairment of UDP-glucose dehydrogenase and glucuronidation activities in liver and small-intestine of rat and guinea-pig in vitro by piperine. *Biochem. Pharmacol.* 46 (2): 229-38, **1993**.
- SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. In: Simões, C.M.O. *et al.* (Ed.), Florianópolis: Ed. Universidade/Ed. Da UFSC, p.291, **1999**.
- SCHMUNIS, G. A. A tripanosomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. A., BARRAL-NETO, M. (eds). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2^a ed. Cap. 1, 2000*.
- SCOTT, W. P. & MCKIBBEN, G. H. Toxicity of black pepper extract to boll weevils. *J. Econ. Entomol.* 71(2): 343-44, **1978**.
- SEMLER, U. & GROSS, G. G. Distribution of piperine in vegetative parts of *Piper nigrum*. *Phytochemistry* 27 (5): 1566-1567, **1988**.
- SMITH, M. B. Organic Synthesis. *Mc Graw Hill*, second edition, pp. 287, **2001**.
- SHOBA, G., JOY, D., THANGAM, J. MAJEED, M., RAGENDRAN, R., SRINIVAS, P. S. S. R. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica* 64 (4): 353-6, **1998**.
- SU, H. C. F. & HORVAT, R. Isolation, identification, and insecticidal properties of *Piper nigrum* amides. *J. Agric. Food Chem.* 29 (1): 115-8, **1981**.
- SU, H. C. F. Insecticidal properties of black pepper to rice weevils and cowpea weevils. *J. Econom. Entomol.* 70 (1): 18-21, **1977**.
- SUNILA, E. S. & KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. *J. Ethnopharm.* 90: 339-346, **2004**.

- TAKAKI, M., JIN, J. G., LU, Y. F., NAKAYAMA, S. Effects of piperine on the motility of the isolated guinea-pig ileum-comparison with capsaicin. *Europ. J. Pharmacol.* 186: 71-7, **1990**.
- TROUILLER, P., REY, J. L., BOUSCHARAIN, P. Pharmaceutical development concerning diseases predominating in tropical regions: The concept of indigent drugs. *Ann. Pharm. Fr.* 58: 43-46, **2000**.
- VENKATASAMY, R., FAAS, L., YOUNG, A. R., RAMAN, A., HIDER, R. C. Effects of piperine analogues on stimulation of melanocyte proliferation and melanocyte differentiation. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 1-16, **2004**.
- VOGEL, A. I. TextBook of Proctical Organic Chemistry, fifth edition, editora Longman, p.445, **1989**.
- WIECHERT, R. Routes to new drugs. *L'actualité Chimique* Mai-Jun: 221-226, **1992**.

ANEXOS

ANEXOS

Durante a execução deste trabalho foi realizada a seguinte publicação:

RIBEIRO, T. S., FREIRE-DE-LIMA, L., PREVIATO, J. O., PREVIATO, L. M., HEISE, N., FREIRE-DE-LIMA, M. E. Toxic effects of natural piperine and derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 3555-3558, **2004**.

Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*

Tatiana Santana Ribeiro,^a Leonardo Freire-de-Lima,^b José Osvaldo Previato,^b Lucia Mendonça-Previato,^b Norton Heise^b and Marco Edilson Freire de Lima^{a,*}

^aUniversidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Km 7, BR 465 CEP: 23.890-000, Seropédica, RJ Brazil

^bUniversidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Ilha do Fundão, 21.944-970, Rio de Janeiro, RJ Brazil

Received 11 February 2004; revised 7 April 2004; accepted 10 April 2004

Abstract—We describe herein an evaluation of trypanocidal effects of the natural alkaloid piperine and twelve synthetic derivatives against epimastigote and amastigote forms of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of the incurable human disease, Chagas' disease. The results obtained point to piperine as a suitable template for the development of new drugs with trypanocidal activity.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The alkaloid piperine **1** (Fig. 1) is the main secondary metabolite in *Piper nigrum*, occurring mainly in the fruits.¹ *Piper nigrum* (popularly known as black pepper)

is widely used in folk medicine in India, where it originates.

Piperine **1** is very abundant in the plant, being extracted from the dry fruits with a yield of 3–7%.² Various

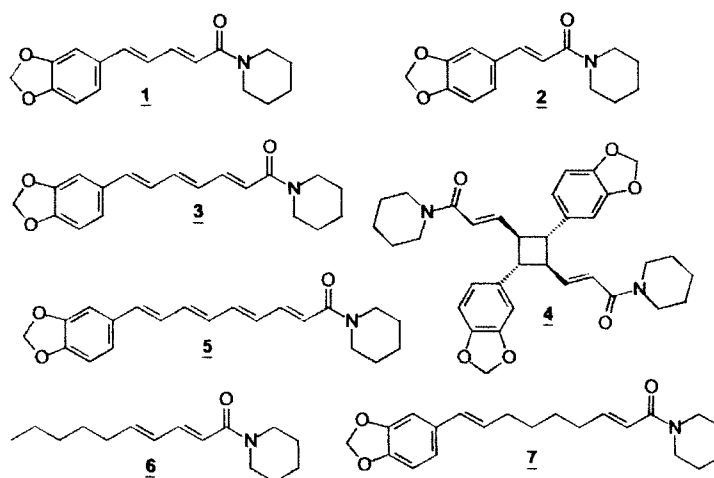


Figure 1. Chemical structures of some natural amides isolated from *Piper* sp.^{6,7}

Keywords: Piperine; Piperine analogues; *Piper nigrum*; Chagas' disease; *Trypanosoma cruzi*.

* Corresponding author. Tel./fax: +55-21-2682-2807; e-mail: marco@ufrrj.br

biological activities have been attributed to piperine including insecticidal³ and nematocidal activity,⁴ and inhibition of liver metabolism.⁵ Other natural amides have been isolated from *Piper* species. Some are shown in Figure 1.^{6,7}

The easy access to plant material (which may be required from different sources), the abundance of the natural product as well as the ease of extraction make piperine a useful starting material for the preparation of potentially bioactive compounds.

Kapil described the results of an investigation of piperine activity against promastigote forms of *Leishmania donovani*.⁸ More recently, Raay and co-workers described encouraging data obtained in vivo testing hamsters infected with *L. donovani* with piperine intercalated into mannose-coated liposomes.⁹ Based on these results, we investigated the activity of this alkaloid and of a series of derivatives on *Trypanosoma cruzi*, another important protozoan parasite and the cause of Chagas' disease (American trypanosomiasis) in humans, an incurable infectious disease responsible for 21,000 deaths and 200,000 new cases annually in 15 Southern Cone countries.¹⁰

The most common treatment for this disease involves two drugs, nifurtimox **8** and benznidazole **9** (Fig. 2), which are active only during the acute and short-term chronic phase. Benznidazole is now the only drug still available since the production of nifurtimox was stopped. Unfortunately, narrow therapeutic windows, strong side effects, and variable drug susceptibilities among *T. cruzi* strains result in low clinical efficacies for these nitro derivatives.¹¹ Thus, it is important to study and develop new compounds with antitrypanosomal activity, which may possess enhanced antiparasitic activity associated with low toxicity. Natural products have long been used as templates for the development of new molecules, which may be useful against parasitic diseases (e.g., quinine **10**, Fig. 2, the antimalarial isolated from *Cinchona officinalis*).^{12,13}

This work is part of a research program aiming at the use of abundant natural products in the synthesis of new molecules with potential application as antiparasitic drugs. We previously reported the evaluation of

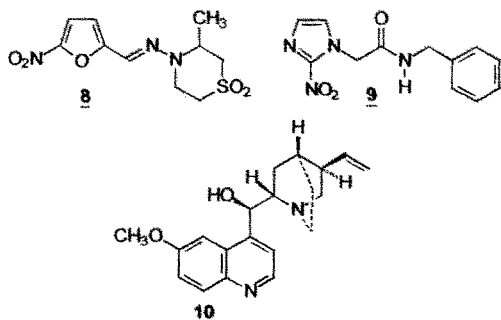


Figure 2. Structures of nifurtimox **8**, benznidazole **9** and quinine **10**.

antiparasitic activity of curcumin (isolated from *Curcuma longa*) and its derivatives on *Leishmania amazonensis*.¹⁴

We began our studies with the isolation of natural piperine **1** from the powdered dry fruits of *Piper nigrum* using the methodology described by Ikan,² and obtained the amide in a very pure form in 7% yield. The isolated product showed physical and spectrometric data identical to that reported in the literature.^{2,15}

Firstly, piperine was tested against *T. cruzi* epimastigotes. It showed a dose-dependent toxicity, with IC_{50} of 7.36 μ M. This preliminary result encouraged us to prepare a series of derivatives in order to determine the chemical features present in piperine responsible for the trypanocidal activity. We have carried out the saturation of the 2,4-diene moiety as well as some chemical transformations on the amide function and have also prepared amides with different length side chains.

Scheme 1 shows the chemical transformations carried out on **1**, affording derivatives **11–20**. The saturated derivative **11** was prepared from **1** by catalytic hydrogenation of the conjugated double bonds.¹⁶ The piperic acid **13** was obtained from **1** in excellent yield through basic hydrolysis.² Acid **13** was used as precursor of a series of derivatives, the ester **14** and the amides **15–19**, through the intermediacy of the acyl chloride (**13a**) prepared by treatment of **13** with oxalyl chloride,¹⁷ and addition of the relevant alcohol or amine. The allylic amine **12** was obtained as a single product by reduction of **1** with diisobutylaluminum hydride.¹⁸

The derivatives of the cinnamic series (Scheme 2) were obtained through classical Knoevenagel's methodology employing piperonal **20** as starting material.¹⁹ The cinnamic acid **21** prepared in this way was used to prepare amides **2** and **22**. Piperamide **2** is a natural product isolated by Loder et al. from *Piper novae hollandiae*.²⁰

Preparation of amide **3**, an analogue with a seven carbon extended side chain, involved the synthetic route shown in Scheme 3. This amide, named piperettine, is a natural product isolated from *Piper nigrum* and *Piper aurantiacum*.^{4,15} Amide **3** was prepared from **13** in five steps, employing an Emmons–Horner reaction of aldehyde **24** with triethylphosphonoacetate,²¹ which afforded the ester **25** stereoselectively, in good yield with *E*-configuration at $\Delta^{2,3}$. The reaction sequence from acid **26** to analogue **3** was similar to that employed for other amides (Schemes 1 and 2). This synthetic path afforded piperettine **3** in six steps from piperine **1**, in 26% overall yield.

The structures of all derivatives prepared in this work (Schemes 1–3) were confirmed by IR, MS, ¹H, and ¹³C NMR spectral data. The assignments are based on 2D NMR experiments and comparison with literature values^{2–5} and are consistent with the structures described.

Evaluation of the antiparasitic activity of the natural product and its derivatives was carried by screening

Table 1. Growth inhibition of *T. cruzi* (epimastigotes and amastigotes) for benzimidazole, piperine and its derivatives

Compound	Epimastigotes IC ₅₀ (μM)	Amastigotes IC ₅₀ (μM)
1	7.36	4.91
2	>96.52	NT ^a
3	10.67	7.40
9	2.20	2.58
11	19.41	11.52
12	17.49	9.63
13	>114.67	NT
14	>83.33	NT
15	>81.43	NT
16	>65.61	NT
17	14.85	7.77
18	56.13	5.71
19	>83.33	NT
22	>95.78	NT

^aNT: Not tested.

than epimastigotes. The apparently higher potency on amastigotes may be explained by its preferential uptake by tissue culture cells or by a greater capacity of intracellular amastigotes to fluid-phase pinocytosis.²⁸ Among the derivatives prepared, acid **13** and ester **14** did not show activity at the maximum dose on epimastigotes, evidence for the need for a nitrogen-containing function for activity. Amides **2**, **15**, **16**, **19**, and **22** were also shown to be inactive against epimastigotes at the dosage tested. Derivatives **2**, **13–16**, **19**, and **22** were not evaluated against amastigotes. The loss of toxicity observed for amide **2** clearly demonstrates the importance of the extended carbon side chain in the original molecule, corroborated by the maintenance of toxicity by piperettine **3** against epimastigotes and amastigotes (Table 1). Removal of the double bonds (derivative **11**) did not interfere significantly with activity, suggesting that conjugation is not essential for trypanocidal activity. Surprisingly, changing the piperidine moiety of the natural product for diisopropyl (**17**) or morpholyl groups (**18**) produces loss of activity on epimastigotes but does not interfere significantly with toxicity against intracellular amastigotes. Finally, reduction of the carbonylamide group of piperine gave the allylic amine **12**, which retained significant toxic effects against the parasites, showing that the carbonyl group is not important for the toxic effect. In conclusion, we have synthesized a series of piperine derivatives, which behave as potent inhibitors of the proliferation of *T. cruzi* parasites, and which may be considered suitable template compounds for the design of new and more potent drugs for the treatment of Chagas' disease.

Acknowledgements

Financial support from FAPERJ and fellowships from Capes to T. S. Ribeiro and from CNPq to L. Freire-de-Lima are gratefully acknowledged. We also thank Dr. Christopher Jones (Laboratory for Molecular Structure, NIBSC, Herts, UK) for critical reading of the manuscript.

References and notes

- Semler, U.; Gross, G. G. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1566.
- Ikan, R. In *Natural Products: A Laboratory Guide*, 2nd ed.; Academic Press: 1991; pp 233–238.
- de Paula, V. F.; Barbosa, L. C. D.; Demuner, A. J.; Pilo-Veloso, D.; Picanco, M. C. *Pest Manag. Sci.* **2000**, *56*, 168.
- Kiuchi, F.; Nakamura, N.; Tsuda, Y.; Kondo, K.; Yoshimura, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1452.
- Koul, S.; Koul, J. L.; Taneja, S. C.; Dhar, K. L.; Jamwal, D. S.; Singh, K.; Reen, R. K.; Sing, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 251.
- Parmar, V. S.; Jain, S. C.; Bisht, K. S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O. D.; Prasad, A. K.; Wengel, J.; Olsen, C. E.; Boll, P. M. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 597.
- Tsukamoto, S.; Cha, B.-C.; Ohta, T. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 1667.
- Kapil, A. *Planta Med.* **1993**, *59*, 474.
- Raay, B.; Medda, S.; Mukhopadhyay, S.; Basu, M. K. *Indian J. Biochem. Biophys.* **1999**, *36*, 248.
- Moncayo, A. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, *98*, 577.
- Coura, J. R.; DeCastro, S. L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 3.
- Cordell, G. A. *Phytochemistry* **2000**, 463.
- Mann, J. In *Murder, Magic, and Medicine*; Oxford University Press: England, 1992; pp 82–96.
- Gomes, D. C. F.; Alegrio, L. V.; Lima, M. E. F.; Leon, L. L.; Araújo, C. A. C. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **2002**, *52*, 120.
- Araujo-Junior, J. X.; Da-Cunha, E. V. L.; Chaves, M. C. O.; Gray, A. I. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 559.
- Hudlický, M. *Reductions in Organic Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1986; pp 1–3.
- Szmuszkovice, J. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 843.
- Berardi, F.; Loiodice, F.; Frachiolla, G.; Calabufio, N. A.; Perrone, R.; Tortorella, V. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2117.
- Silva, E. F.; Canto-Cavaleiro, M. M.; Braz, V. R.; Cysne-Finkelstein, L.; Leon, L. L.; Echevarria, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 979.
- Loder, J. W.; Moorhous, A.; Russell, G. B. *Austr. J. Chem.* **1969**, *22*, 1531.
- Marianoff, B. E.; Reitz, A. B. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863.
- Drug screening*. Biological assays on Y-strain epimastigotes (Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Brazil) were performed as previously described.²³ Benzimidazole **9** (Roche, Rio de Janeiro, Brazil), piperine **1** and its derivatives (Table 1) were stored as 10 mg mL⁻¹ stock solutions in dimethylsulfoxide (DMSO), and were serially diluted (1:2) in medium before use (the concentrations of 0.76, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, and 25 μg mL⁻¹ were used) in triplicate. Experiments on the intracellular form of the parasite were conducted on *T. cruzi*-infected (Y-strain) macrophages as described before.²³ The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were determined by linear regression analysis.²⁴ For cellular viability tests, peritoneal mouse macrophages were treated with the indicated concentrations of compounds for 72 h as described elsewhere.²⁵
- Saraiva, V. B.; Gibaldi, D.; Previato, J. O.; Mendonça-Previato, L.; Bozza, M. T.; Freire-de-Lima, C. G.; Heise, N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3472.
- Lux, H.; Heise, N.; Klenner, T.; Hart, D. T.; Oppendoes, F. R. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *111*, 1.
- Dolorenzi, J. C.; Freire-de-Lima, L.; Gattass, C. R.; Costa, D. A.; He, L.; Kuehne, M. E.; Saraiva, E. M. B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2111.
- Neal, R. A.; Bueren, J. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1988**, *82*, 709.
- Martínez-Díaz, R. A.; Escario, J. A.; Nogal-Ruiz, J. J.; Gómez-Barrio, A. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2001**, *96*, 53.
- Soares, M. J.; de Souza, W. *Parasitol. Res.* **1991**, *77*, 461.