



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Planejamento estrutural visando otimização da atividade tripanocida de
análogos sintéticos da piplartina**

CARLOS DA SILVA MAIA BEZERRA FILHO

**João Pessoa
UFPB – 2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



**Planejamento estrutural visando otimização da atividade tripanocida de
análogos sintéticos da piplartina**

CARLOS DA SILVA MAIA BEZERRA FILHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.
Área de Concentração: Farmacoquímica.

Orientador: Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa

João Pessoa
UFPB - 2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F481p Bezerra Filho, Carlos da Silva Maia.

Planejamento estrutural visando otimização da atividade tripanocida de análogos sintéticos da piplartina / Carlos da Silva Maia Bezerra Filho. - João Pessoa, 2020.

123 f.

Orientação: Damião Pergentino de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Piplartina. 2. Relação Estrutura-Atividade. 3. Atividade Tripanocida. I. Sousa, Damião Pergentino de. II. Título.

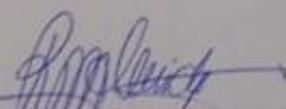
UFPB/BC

CARLOS DA SILVA MAIA BEZERRA FILHO

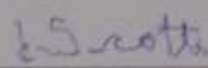
Planejamento estrutural visando otimização da atividade
tripanocida de análogos sintéticos da piplartina

Aprovada em 03/03/2020

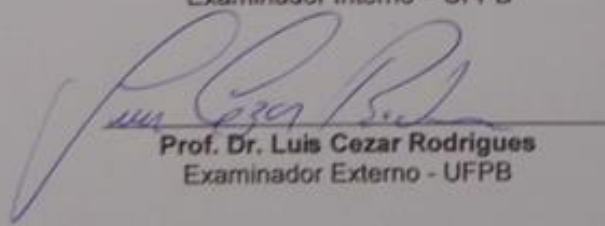
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Presidente da Banca – UFPB



Prof.ª Dra. Luciana Scotti
Examinador Interno – UFPB



Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Examinador Externo - UFPB

João Pessoa
UFPB - 2020

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus por seu amor, bondade e graça, bem como a todos meus familiares, especialmente aos meus pais, irmãos e avós por todos os ensinamentos, amor e incentivo, bem como à minha namorada Joice por estar comigo e me apoiar em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por seu imenso amor, graça, misericórdia e compaixão. Pelo dom da vida e por ter enviado Seu único filho, Jesus Cristo, para que hoje pudéssemos ser verdadeiramente livres, na esperança de passarmos toda a eternidade louvando e adorando o Nosso grandioso Deus.

Aos meus familiares, especialmente aos meus pais, Micheline e Carlos, meus irmãos Matheus e Carol, meus avós Vanda e Cassimiro (*in memoriam*), meus tios Ricardo e Bernadete e minha tia Maria (*in memoriam*) por todos os ensinamentos, amor e incentivo a estudar e seguir em frente com os meus sonhos, sem vocês eu não teria chegado até aqui e minhas vitórias são dedicadas a vocês.

À minha namorada Joice, por estar sempre ao meu lado, por todo apoio, paciência, compreensão e por me fazer tão feliz e amado. Espero passar o resto da minha vida ao seu lado para te amar, apoiar e respeitar sempre.

Aos meus amigos, Anderson, Caio, Catarina, Elias, Gabriel, Jean, Júnior, Humberto, Lucas, Mateus e a todos os alunos da minha turma de mestrado por todo companheirismo, ajuda, conversas, desabafos e estudos.

Ao meu orientador Dr. Damião Pergentino de Sousa pelas orientações, correções, disponibilidade e oportunidade. Espero que possamos trabalhar em outros projetos, obrigado pela confiança.

Aos amigos do Laboratório de Química Farmacêutica: Ana Júlia, Anna Emanuella, Alana Rodrigues, Allana Brunna, Lázaro, Marianna, Marina, Mayara, Rayanne, Severino e Susiany pelas conversas, companhia, contribuição e auxílio durante as atividades realizadas no laboratório.

Aos técnicos do LMCA, Marcelo e Evandro pela ajuda na análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . Bem como, a Rayanne do Laboratório Analítico Multiusuário (CCS-UFPB) pelas análises de IV.

À Professora Dra. Alice Martins e Ramon por terem realizado os testes biológicos destinados ao projeto.

A todos os professores que contribuíram para minha formação, especialmente ao professor Reinaldo que aceitou ser o presidente desta banca e aos professores Luis Cezar e Luciana Scotti por avaliarem este estudo.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro e a UFPB pelo apoio institucional e a todos aqueles que contribuíram para a realização deste grande sonho.

RESUMO

BEZERRA FILHO, Carlos da Silva Maia. **Planejamento estrutural visando otimização da atividade tripanocida de análogos sintéticos da piplartina.** 123 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2020.

A doença de Chagas é considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas e representa um grande problema de saúde pública devido aos altos índices de morbidade e mortalidade associados. Atualmente, os fármacos disponíveis para o tratamento da doença encontram-se desatualizados, possuem eficácia limitada e efeitos adversos e/ou colaterais severos que resultam em falta de adesão ao tratamento e redução da qualidade de vida dos pacientes. Assim, torna-se necessária a busca por novas alternativas terapêuticas que promovam maior seletividade ao parasito causador da doença, bem como por fármacos com novos mecanismos de ação e que apresentem boa eficácia. A piplartina, também conhecida como piperlongumina é um fenilpropanoide encontrado em plantas do gênero *Piper*. Dados da literatura relatam que a piplartina possui diversas atividades biológicas, incluindo atividade tripanocida. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi preparar uma coleção de treze ésteres análogos à piplartina (**01 – 13**), estruturalmente relacionados, e avaliar a atividade tripanocida dos compostos frente ao *Trypanosoma cruzi*, bem como, estabelecer a relação estrutura-atividade das substâncias avaliadas. Os ésteres foram preparados utilizando três diferentes metodologias: esterificação de Fischer, esterificações com haletos de alquila e arila e reação de Steglich. Na caracterização estrutural utilizaram-se as técnicas espectroscópicas de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C . Os produtos foram obtidos com rendimentos de 26,7–91,1%. Os testes tripanocidas foram realizados frente às formas evolutivas epimastigota e tripomastigota utilizando a técnica de microdiluição em placas de 96 poços para a determinação da concentração capaz de inibir o crescimento do parasito em 50% (CI_{50}), além disso, determinou-se a citotoxicidade dos compostos frente às células epiteliais renais de macaco *Rhesus* (LLC-MK2) para o cálculo do índice de seletividade (IS). O composto **10** apresentou boa atividade tripanocida frente à forma tripomastigota ($\text{CI}_{50} = 40,75 \pm 12,36 \mu\text{M}$). Enquanto **11** foi bioativo em ambas as formas evolutivas com $\text{CI}_{50} = 28,21 \pm 5,34 \mu\text{M}$ e $47,02 \pm 8,70 \mu\text{M}$ (forma epimastigota e tripomastigota, respectivamente), além de apresentar alto índice de seletividade ao parasito ($\text{IS} > 10$). Na investigação do mecanismo de ação tripanocida foi elucidado que ocorre através da indução de estresse oxidativo e lesão mitocondrial das células do parasito. Portanto, o presente estudo demonstra o potencial antiparasitário desta classe química para a pesquisa de novos fármacos com atividade tripanocida.

Palavras-chave: Piplartina, Relação Estrutura-Atividade, Atividade Tripanocida.

ABSTRACT

BEZERRA FILHO, Carlos da Silva Maia. **Structural design aiming to optimize the trypanocidal evaluation of piplartine synthetic analogs.** 123 p. Dissertation (Post-graduate Program in Natural Products and Synthetic Bioactives) – Health Sciences Center, Federal University of Paraíba. João Pessoa, 2020.

Chagas disease is considered one of the main neglected tropical diseases and represents a major public health problem due to the high rates of associated morbidity and mortality. Currently, the drugs available for the treatment of the disease are outdated, have limited efficacy and severe adverse and/or side effects that result in nonadherence to treatment and reduced quality of life for patients. Therefore, it is necessary to search for new therapeutic alternatives that promote greater selectivity to the parasite that causes the disease, as well as drugs with new mechanisms of action and that have good efficacy. Piplartine, also known as piperlongumin is a phenylpropanoid, found in plants of the genus *Piper*, data from the literature report that piplartine has several biological activities, including trypanocidal activity. Thus, the objective of the present work was to prepare a collection of thirteen piplartine analogs esters (**01** - **13**), structurally related, and evaluate the trypanocidal activity of the compounds against *Trypanosoma cruzi*, as well as to establish the structure-activity relationship of assessed substances. The esters were prepared using three different methodologies: Fischer esterification, esterifications with alkyl and aryl halides and Steglich reaction. In the structural characterization, the spectroscopic techniques of Infrared, Nuclear Magnetic Resonance of ^1H and ^{13}C were used. The products were obtained with yields of 26.7–91.1%. The trypanocidal tests were performed against the evolutionary forms epimastigote and trypomastigote using the microdilution technique in 96-well plates to determine the concentration capable of inhibiting the growth of the parasite by 50% (IC_{50}), in addition, the cytotoxicity of the compounds against *Rhesus* monkey renal epithelial cells (LLC-MK2) for the calculation of the selectivity index (SI). The compound **10** showed good trypanocidal activity against the trypomastigote form ($\text{IC}_{50} = 40.75 \pm 12.36 \mu\text{M}$). While **11** was bioactive in both evolutionary forms with $\text{IC}_{50} = 28.21 \pm 5.34 \mu\text{M}$ and $47.02 \pm 8.70 \mu\text{M}$ (epimastigote and trypomastigote, respectively), besides to presenting a high selectivity index to the parasite ($\text{SI} > 10$). In the investigation of the trypanocidal mechanism of action, it was elucidated that it occurs through the induction of oxidative stress and mitochondrial damage to the parasite cells. Therefore, the present study demonstrates the antiparasitic potential of this chemical class for the search for new drugs with trypanocidal activity.

Key-Words: Piplartine, Structure-Activity Relationship, Tripanocidal activity.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reações para preparação de ésteres.	33
Esquema 2: Mecanismo de reação da Esterificação de Fischer.	34
Esquema 3: Mecanismo de reação da Esterificação com Haletos de Alquila e Arila.	35
Esquema 4: Mecanismo da reação de Steglich.	37
Esquema 5: Planejamento experimental do estudo.	40
Esquema 6: Reação de esterificação de Fischer utilizando o ácido 3,4,5- trimetoxicinâmico e álcoois alifáticos.	42
Esquema 7: Reação de esterificação utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e haletos de alquila e arila.	43
Esquema 8: Reação de Steglich utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e os respectivos álcoois.	44
Esquema 9: Reações envolvendo o DCFH-DA.	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do benzonidazol e nifurtimox.	21
Figura 2: Estrutura química do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e piplartina.....	22
Figura 3: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Figura 4: Estrutura química da piplartina.....	30
Figura 5: Estrutura química dos ésteres preparados.....	41
Figura 6: Estrutura em comum dos ésteres análogos à piplartina.....	49
Figura 7: Histograma de intensidade de marcação com DCFH-DA.	61
Figura 8: Efeito de 11 sobre a produção de espécies reativas citoplasmáticas	61
Figura 9: Histograma de intensidade de marcação com Rho 123.....	62
Figura 10: Efeito de 11 sobre o potencial transmembrânico mitocondrial em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	63
Figura 11: Álcoois e haletos utilizados para o preparo de análogos sintéticos da piplartina.....	66
Figura 12: Estrutura química da rodamina 123.	71
Figura 13: Mecanismo de marcação mitocondrial utilizando a Rho123.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados físico-químicos e experimentais dos produtos obtidos.	45
Tabela 2: Espectroscopia de infravermelho – estiramentos (V) dos ésteres trimetoxicinâmicos em cm^{-1}	47
Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δH) para os ésteres 01- 04	51
Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δH) para os ésteres 05 - 07	52
Tabela 5: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δH) para os ésteres 08 – 10	53
Tabela 6: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δH) para os ésteres 11 – 13	54
Tabela 7: Assinalamentos de RMN de ^{13}C (δC) dos ésteres obtidos (1 – 13).	55
Tabela 8: Atividade tripanocida dos compostos 01 – 13 frentes à cepa Y de <i>T. cruzi</i>	59
Tabela 9: Citotoxicidade dos compostos 01 – 13 frentes à linhagem LLC-MK2.	60

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (01).	74
Espectro 2: Espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (01).	75
Espectro 3: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (01).	75
Espectro 4: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (01).	76
Espectro 5: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de etila (02).	77
Espectro 6: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de etila (02).	78
Espectro 7: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de etila (02).	78
Espectro 8: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de etila (02).	79
Espectro 9: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de propila (03).	80
Espectro 10: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de propila (03).	81
Espectro 11: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de propila (03).	81
Espectro 12: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de propila (03).	82
Espectro 13: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de isopropila (04).	83
Espectro 14: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de isopropila (04).	84
Espectro 15: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de isopropila (04).	84
Espectro 16: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de isopropila (04).	85

Espectro 17: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de pentila (05).	87
Espectro 18: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de pentila (05).	88
Espectro 19: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de pentila (05).	88
Espectro 20: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de pentila (05).	89
Espectro 21: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de decila (06).	90
Espectro 22: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de decila (06).	91
Espectro 23: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de decila (06).	91
Espectro 24: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de decila (06).	92
Espectro 25: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metoxibenzila (07).	93
Espectro 26: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metoxibenzila (07).	94
Espectro 27: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metoxibenzila (07).	94
Espectro 28: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metoxibenzila (07).	95
Espectro 29: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 3-metoxibenzila (08).	97
Espectro 30: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 3-metoxibenzila (08).	98
Espectro 31: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 3-metoxibenzila (08).	98
Espectro 32: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 3-metoxibenzila (08).	99
Espectro 33: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metilbenzila (09).	100

Espectro 34: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metilbenzila (09).....	101
Espectro 35: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metilbenzila (09).....	101
Espectro 36: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metilbenzila (09).....	102
Espectro 37: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de benzila (10).....	103
Espectro 38: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de benzila (10).....	104
Espectro 39: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de benzila (10).....	104
Espectro 40: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de benzila (10).....	105
Espectro 41: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de furfurila (11).....	106
Espectro 42: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de furfurila (11).....	107
Espectro 43: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de furfurila (11).....	107
Espectro 44: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de furfurila (11).....	108
Espectro 45: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de perila (12).....	109
Espectro 46: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de perila (12).....	110
Espectro 47: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de perila (12).....	110
Espectro 48: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de perila (12).....	111
Espectro 49: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de bornila (13).....	112
Espectro 50: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de bornila (13).....	113

Espectro 51: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de bornila (13).	113
Espectro 52: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de bornila (13).	114
Espectro 53: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de bornila (13).	114

LISTA DE ABREVIATURAS

APT – *Attached Proton Test*

CC – Cromatografia em Coluna

CC₅₀ - Concentração capaz de promover citotoxicidade em 50% das células hospedeiras LLC-MK2

CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CI₅₀ - Concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células do parasito

d – Dupleto

DCC – Dicicloexilcarbodiimida

DCFH-DA - Diacetato de 2',7' –diclorofluoresceína

DCU – Diciclohexiureia

dd – Duplo dupleto

ddd – Dupleto de dupleto de dupleto

DMAP - 4-(dimetilamino) piridina

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

ERO – Espécies reativas de oxigênio

Et₃N – Trietilamina

Hex: AcOEt – Mistura de hexano e acetato de etila

Hz – Hertz

IS – Índice de seletividade

IV – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

LIT - *Liver infusion tryptose*

LLC-MK2 – Células epiteliais renais de macaco *Rhesus*

m – Multipleto

MHz – Megahertz

mL – mililitro

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS - Solução salina tamponada de fosfato

ppm – Partes por milhão

q – quarteto

R_f – Fator de Retenção

Rho 123 – Rodamina 123

RMN de ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

RMN de ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – singleto

SFB - Soro fetal bovino

s/ – singleto largo

SN2 – Substituição nucleofílica bimolecular

SNAc - Substituição nucleofílica acílica

t – Tripleto

δ – Deslocamento químico em ppm

ΔΨ_m - Potencial transmembrânico mitocondrial

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO	21
2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1. Considerações gerais sobre a doença de Chagas	23
2.1.1 Histórico e incidência	23
2.1.2 Transmissão da doença.....	24
2.1.3 Ciclo do parasito	25
2.1.4 Aspectos clínicos	26
2.1.5 Tratamento	27
2.2. Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos	30
2.3. Considerações sobre os ésteres.....	32
2.3.1. Propriedades gerais e relevância econômica.....	32
2.3.2. Reações de obtenção	32
2.4. Relação entre estrutura química e atividade biológica.....	38
3.0. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo geral.....	39
3.2. Objetivos específicos	39
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Planejamento do estudo	40
4.2. Etapa Química	42
4.2.1 Preparação dos ésteres análogos à piplartina.....	42
4.3. Análise espectroscópica dos ésteres obtidos	46
4.3.1. Espectroscopia de Infravermelho	46

4.3.2. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C	49
4.4. Avaliação da atividade tripanocida dos análogos à piplartina (01 – 13).....	56
4.4.1. Avaliação tripanocida frente às formas epimastigota e tripomastigota do <i>T. cruzi</i>	56
4.4.2. Análise de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas	61
4.4.3. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	62
5.0. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	64
6.0. PARTE EXPERIMENTAL - QUÍMICA.....	65
6.1. Substâncias, materiais e métodos utilizados no preparo dos ésteres.....	65
6.2. Métodos cromatográficos.....	67
6.3. Métodos espectroscópicos	67
6.3.1. Ressonância Magnética Nuclear	67
6.3.2. Espectroscopia de Infravermelho.....	68
6.4. Ponto de Fusão.....	68
7.0. PARTE EXPERIMENTAL – BIOLÓGICA.....	68
7.1. Local de Trabalho	68
7.2. Linhagens Celulares	68
7.3. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> em células LLC-MK2.....	69
7.4. Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i> em cepas Y de <i>T. cruzi</i>	69
7.4.1. Ensaio em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	69
7.4.2. Ensaio em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	69
7.5. Análise de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas	70
7.6. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	71
8.0. PREPARAÇÃO DOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS DA PIPLARTINA	73
8.1. Preparação da primeira coleção de ésteres (01- 04)	73

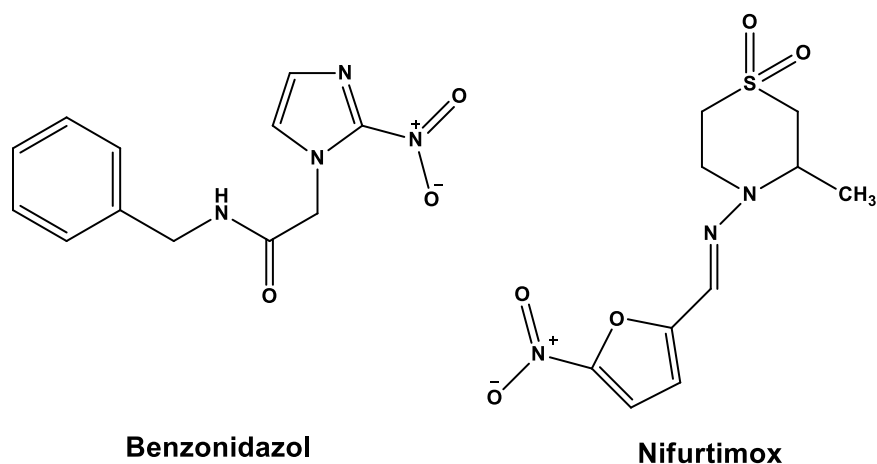
8.2. Dados espectroscópicos dos ésteres 01 – 04	74
8.2.1. 01: 3,4,5-trimetoxicinamato de metila	74
8.2.2. 02: 3,4,5-trimetoxicinamato de etila	77
8.2.3. 03: 3,4,5-trimetoxicinamato de propila	80
8.2.4. 04: 3,4,5-trimetoxicinamato de isopropila	83
8.3. Preparação da segunda coleção de ésteres (05- 07)	86
8.4. Dados espectroscópicos dos ésteres 05 – 07	87
8.4.1. 05: 3,4,5-trimetoxicinamato de pentila	87
8.4.2. 06: 3,4,5-trimetoxicinamato de decila.....	90
8.4.3. 07: 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metoxibenzila	93
8.5. Preparação da terceira coleção de ésteres (08 - 13)	96
8.6. Dados espectroscópicos dos ésteres 08 – 13.....	97
8.6.1. 08: 3,4,5-trimetoxicinamato de 3-metoxibenzila	97
8.6.2. 09: 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metilbenzila.....	100
8.6.3. 10: 3,4,5-trimetoxicinamato de benzila.....	103
8.6.4. 11: 3,4,5-trimetoxicinamato de furfurila	106
8.6.5. 12: 3,4,5-trimetoxicinamato de perila	109
8.6.6. 13: 3,4,5-trimetoxicinamato de (-)-bornila.....	112
9.0. REFERÊNCIAS	115

1.0. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas e representa um grande problema de saúde pública devido aos altos índices de morbidade e mortalidade causados às populações afetadas (MARINETO et al., 2010; LEE et al., 2013), visto que a doença promove complicações crônicas severas, como alterações digestivas e cardíacas que comprometem o estado geral de saúde dos pacientes, sendo os principais fatores responsáveis pela alta mortalidade e morbidade da doença (CHATELAIN, 2015; CAROD-ARTAL; GASCON, 2010; DA COSTA et al., 2019; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

Atualmente, o benzonidazol (Figura 1) é o único fármaco disponível para o tratamento da doença no Brasil, uma vez que o uso do nifurtimox foi descontinuado devido à alta toxicidade (CANÇADO, 2002; JACKSON et al., 2010). Entretanto, o benzonidazol foi desenvolvido à quase meio século e apesar de apresentar boa eficácia na fase aguda da doença, não apresenta resultados satisfatórios na fase crônica. Além disso, possui efeitos adversos e/ou colaterais graves que resultam em falta de adesão ao tratamento e redução da qualidade de vida dos pacientes, limitando sua utilização clínica (CLAYTON, 2010; SESTI-COSTA et al., 2014). Desse modo, torna-se necessária a busca por novas alternativas terapêuticas que promovam maior seletividade ao parasito sem promover complicações aos pacientes, bem como por fármacos com novos mecanismos de ação e que apresentem boa eficácia nas fases aguda e crônica da doença.

Figura 1: Estrutura química do benzonidazol e nifurtimox.



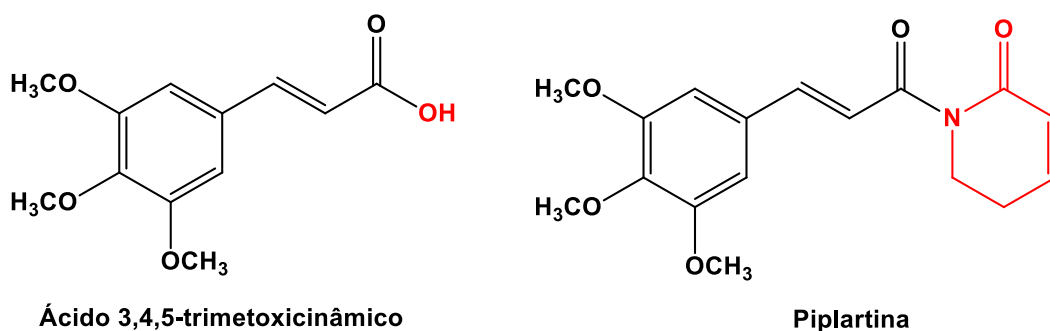
Fonte: Adaptado de MENEZES et al., 2015

Ao longo dos anos, os produtos naturais têm servido como importantes fontes de novos fármacos, de modo que mais da metade dos fármacos disponíveis na atualidade são provenientes de produtos naturais ou de análogos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Neste âmbito, estão inseridos os fenilpropanoides, especialmente os derivados cinâmicos, que são encontrados na natureza na forma de ácidos, ésteres e amidas. Atualmente, estudos têm sido realizados para averiguar as possíveis atividades biológicas destes compostos e seus análogos, incluindo atividade tripanocida (CARVALHO et al., 2012; ANDREU et al., 2009; GUMBO et al., 2018).

A piplartina, também conhecida como piperlongumina é um fenilpropanoide, encontrado em plantas do gênero *Piper* (BEZERRA et al., 2013; MENGARDA et al., 2020). Dados da literatura relatam que esta possui diversas atividades biológicas, incluindo ação citotóxica, antitumoral, antinociceptiva, antiagregante plaquetário, antibacteriano, antifúngico e antiparasitário (BEZERRA et al., 2013; MORAES et al., 2012; ARAÚJO-VILGES et al., 2017; NÓBREGA et al., 2019). Estudos de viabilidade celular revelaram que a piplartina apresentou atividade tripanocida frente à forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, promovendo aumento do estresse oxidativo das células do parasito (COTINGUIBA et al., 2009; VIEIRA et al., 2018). Além disso, apresentou baixa toxicidade sistêmica em camundongos (BEZERRA et al., 2008).

Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi preparar uma coleção de treze ésteres análogos à piplartina (**01 – 13**), estruturalmente relacionados, partindo do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (Figura 2) e avaliar a atividade tripanocida dos compostos frente ao *Trypanosoma cruzi*, bem como, estabelecer a relação estrutura-atividade das substâncias com o intuito de obter informações relevantes para o desenvolvimento de moléculas com melhor perfil biológico.

Figura 2: Estrutura química do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e piplartina



Fonte: Elaborado pelo autor

2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Considerações gerais sobre a doença de Chagas

2.1.1 Histórico e incidência

A doença de Chagas foi primeiramente descrita pelo médico e pesquisador Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, no ano de 1909, ao notar a presença abundante de insetos do gênero *Triatoma*, popularmente conhecido como “barbeiro”, em casas de pau-a-pique no município de Lassance, em Minas Gerais (CHAGAS, 1909). Ao estudar estes insetos, Carlos Chagas identificou a presença de um protozoário desconhecido, nominando-o *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao médico Oswaldo Cruz. Além disso, o pesquisador também determinou outros aspectos da doença como a epidemiologia, formas clínicas, meio de transmissão, patogenia, sintomatologia, dentre outros (AMATO NETO, 1950; MALAFAIA; RODRIGUES, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a doença de Chagas como uma das principais doenças tropicais negligenciadas que promove impactos socioeconômicos relevantes em diversos países, principalmente da América Latina como no Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Colômbia e Venezuela, onde a doença é endêmica. (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; HOTEZ et al., 2014; LEE et al., 2013).

Embora, inicialmente, os casos da doença de Chagas estivessem praticamente limitados à América Latina, a migração de pessoas provenientes das regiões endêmicas promoveu o surgimento da doença em territórios não endêmicos (AFONSO et al., 2012). Nos últimos anos, casos da doença têm sido relatados no Japão, Europa e na América do Norte, especialmente, nos Estados Unidos onde há o maior número de casos, principalmente, devido ao intenso número de imigrantes provindos da Bolívia, Brasil e México (GASCON; BERN; PINAZO, 2010; ORTÍ-LUCAS et al., 2014; SCHMUNIS; YADON, 2010).

A América Latina tem feito progressos significativos no controle da transmissão da doença de Chagas, estima-se que a prevalência da doença caiu de 18 milhões de pessoas, em 1991, para aproximadamente 7 milhões de pessoas, em 2019. Entretanto, a doença ainda provoca cerca de 12.000 mortes por ano (CUCUNUBÁ et al., 2016; OMS, 2019).

Dados da literatura relatam que o Brasil apresentou 1.156.821 casos de

doença de Chagas em 2015, sendo o segundo país com maior prevalência da doença, perdendo apenas para a Argentina, com 1.505.235 casos. Vale salientar, que a América Latina contou com 3.581.423 casos da doença, representando 62,4% dos casos mundiais (DIAS et al., 2016). Estes dados revelam que apesar dos avanços no controle da transmissão da doença ao longo dos anos, o número de infectados ainda é alto no contexto sanitário e socioeconômico dos países da América Latina, destacando a necessidade de atenção e prioridade no tratamento da doença nos países afetados, especialmente, Brasil e Argentina (DIAS et al., 2016).

2.1.2 Transmissão da doença

A doença de Chagas é uma antroponose transmitida pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozoário hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, que geralmente, se desenvolve em insetos hematófagos da família Reduviidae, principalmente em triatomíneos como o *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* que possuem grande relevância clínica no Brasil (CHAGAS, 1909; JURBERG et al., 2014).

Com relação à transmissão da doença, a principal forma de infecção ainda é a vetorial, ou seja, através do contato com as fezes do triatomíneo infectado com o parasito (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012). Entretanto, há outras formas de transmissão como a transfusão sanguínea e transplante de tecidos e órgãos, as manifestações clínicas destes tipos de transmissão tendem a ser mais graves, visto que os receptores estão imunocomprometidos, entretanto, a obrigatoriedade da triagem sorológica dos doadores promoveu uma drástica redução destes casos (COURA, 2015; MORAES-SOUZA; FERREIRA-SILVA, 2011).

Outra forma de transmissão é a congênita que pode ocorrer em qualquer período da gestação, mas é recorrente no último trimestre de gravidez ou até mesmo durante o parto através do contato das mucosas do recém-nascido com o sangue da mãe infectado com o parasito (OSTERMAYER et al., 2011). Por fim, há os casos de transmissão oral que estão associados ao consumo de bebidas e alimentos contaminados com o barbeiro ou seus excrementos (DIAS; AMATO NETO; LUNA, 2011). Este tipo de transmissão tem crescido nas últimas duas décadas, sendo a forma mais frequente no Brasil, principalmente em áreas urbanas onde não há a presença de vetores domiciliados, isto ocorre, principalmente, devido às mudanças

dos hábitos alimentares da população como o aumento do consumo de açaí e cupuaçu, frequentemente produzidos em áreas endêmicas (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017). Vale salientar que este tipo de transmissão, geralmente, é associado a altos níveis de concentração parasitária o que promove manifestações clínicas mais graves e maior índice de mortalidade (BRASIL, 2015; PEREIRA et al., 2009).

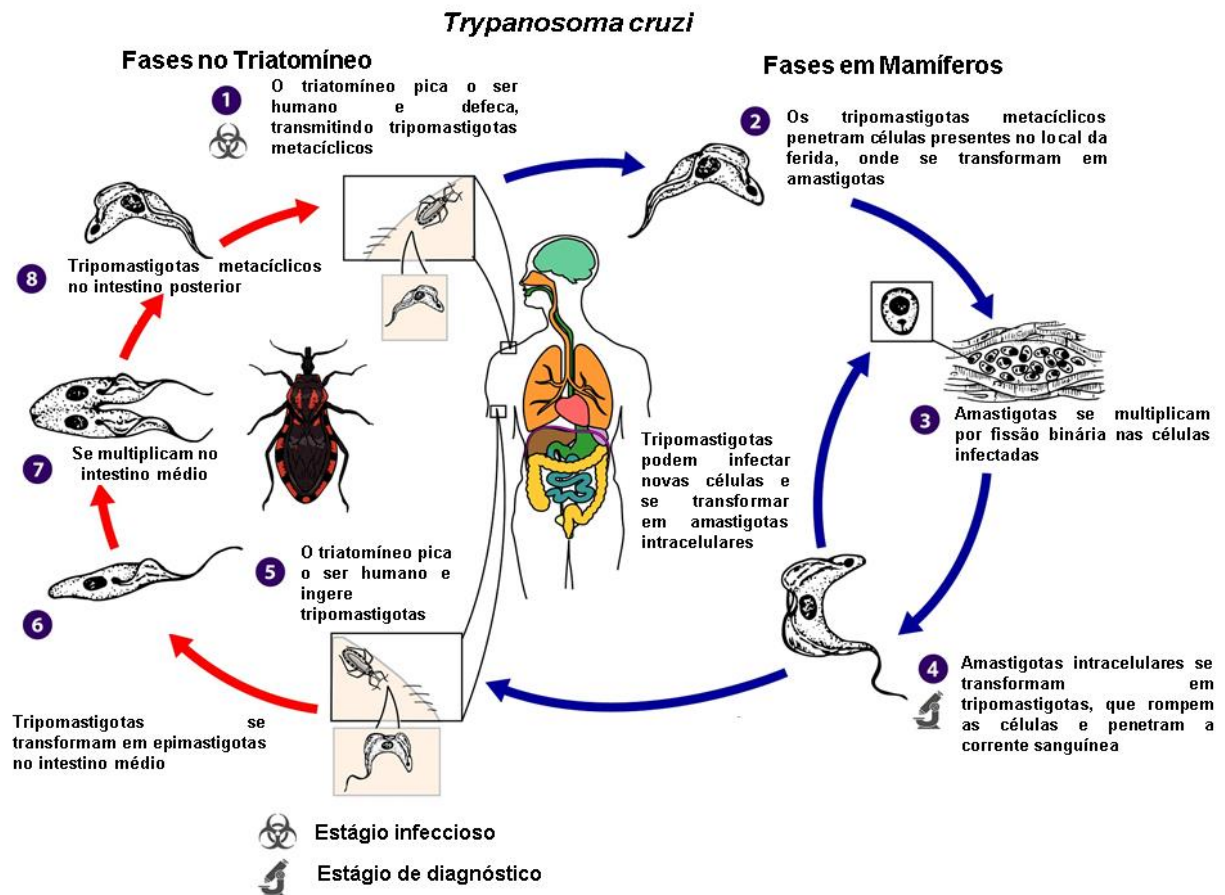
2.1.3 Ciclo do parasito

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo do tipo heteroxênico, ou seja, possui mais de um hospedeiro, que requer, obrigatoriamente, a passagem por um invertebrado onde o parasito passa pela fase de multiplicação extracelular e um hospedeiro vertebrado onde ocorre a multiplicação intracelular (COSTA et al., 2013). Ao decorrer do ciclo de desenvolvimento do *T. cruzi*, o parasito passa por três formas evolutivas distintas, tanto em características funcionais quanto morfológicas, são elas: epimastigota (forma não infectante, mas replicativa que está presente no intestino médio do triatomíneo); tripomastigota, (forma infectante e não replicativa que está presente no intestino posterior do triatomíneo); e amastigota (forma replicativa e não infectante presente no interior das células do hospedeiro vertebrado) (ROMERO; MORILLA, 2010).

O ciclo de vida do parasito está descrito na figura 3. Inicialmente, observa-se que em **1** o triatomíneo pica o ser humano e defeca ao mesmo tempo, com isso, o parasito na forma tripomastigota metacíclico, que está presente nas fezes do triatomíneo, entra no hospedeiro pela membrana da mucosa ou através da ferida causada pela picada. No interior do hospedeiro, os tripomastigotas metacíclicos invadem células, transformando-se em amastigotas no interior celular **2**. Desse modo, as amastigotas intracelulares se multiplicam por fissão binária **3**, em seguida, se diferenciam em tripomastigotas e rompem as células infectadas, sendo liberados na corrente sanguínea **4**. Com isso, tripomastigotas podem infectar novas células em outros tecidos, onde se transformam novamente em amastigotas intracelulares, geralmente, manifestações clínicas surgem devido a esse ciclo infeccioso. Quando o triatomíneo pica um ser humano infectado, tripomastigotas são ingeridas **5**. Dessa forma, os tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas no intestino médio do triatomíneo **6**, onde se multiplicam **7** e transformam-se em tripomastigotas

metacíclicos no intestino posterior do vetor, repetindo o ciclo 8 (CDC, 2012).

Figura 3: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Adaptado de CDC, 2012.

2.1.4 Aspectos clínicos

Em relação aos aspectos clínicos, a doença de Chagas apresenta duas fases definidas e distintas: fase aguda e crônica (CHAGAS, 1909).

Durante a fase aguda, os pacientes podem ser assintomáticos ou podem apresentar sintomas inespecíficos que aparecem cerca de uma a duas semanas após a infecção e duram até dois meses, os principais sintomas são: febre, mal-estar, cefaleia, linfadenomegalia e edema subcutâneo, e em casos mais graves podem ocorrer miocardite, hepatoesplenomegalia e meningoencefalite, com alta taxa de mortalidade, especialmente em idosos e crianças (BERN, 2015; PEREIRA; NAVARRO, 2013). Caso a forma de transmissão tenha sido a vetorial, há dois sinais característicos da reação inflamatória que ocorre devido à infecção, o sinal de

Romanã, no qual se observa um edema unilateral ou bipalpebral no hospedeiro e o Chagoma de inoculação, onde ocorre a formação de um nódulo furuncular com discreto edema central no local de penetração do parasito. Vale salientar que durante a fase aguda há a circulação do parasito no sangue dos indivíduos (PARKER; SETHI, 2011).

Na maioria dos casos não tratados, a fase aguda evolui para fase crônica indeterminada, em que 70-80% dos indivíduos são assintomáticos e não apresentam alterações no eletrocardiograma e em órgãos como esôfago e cólon. Além disso, a detecção do parasito no sangue é rara, mas é possível em órgãos e tecidos. Os pacientes podem permanecer neste estágio por anos ou até mesmo décadas. Todavia, 20-30% dos casos podem evoluir para a fase crônica determinada, no qual os pacientes desenvolvem alterações cardíacas, digestivas ou mistas, de forma geral, estas alterações surgem de 10 a 30 anos após o contato com o parasito (CUNHA-FILHO et al., 2013).

As alterações digestivas são menos frequentes e estão associadas à hipertrofia do tecido digestivo e redução da mobilidade do trato gastrointestinal, podendo evoluir para megacólon e megaesôfago devido à dilatação destes órgãos. Estas modificações são provocadas pela destruição dos neurônios responsáveis pelo controle da peristalse, presentes no sistema nervoso entérico (MARCHIORI, 2016). Os principais sintomas observados são regurgitação, disfagia, constipação intestinal com formação de fecaloma, dentre outros (REZENDE; MOREIRA, 2000).

As alterações cardíacas são as mais comuns nesta fase da doença, ocorrendo hipertrofia das fibras miocárdicas e fibrose progressiva devido à presença do parasito. Os principais sintomas são fadiga, arritmias, angina, palpitações e em casos mais graves pode ocorrer insuficiência cardíaca congestiva resultando na morte do paciente. As lesões cardíacas são consideradas os principais fatores responsáveis pela alta mortalidade e morbidade da doença nesta fase (CAROD-ARTAL; GASCON, 2010).

2.1.5 Tratamento

Do mesmo modo que ocorre em outras doenças negligenciadas, as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da doença de Chagas são reduzidas e não há medicamentos novos para o tratamento, visto que o tratamento para doença

de Chagas consiste no uso de medicamentos desenvolvidos há mais de 40 anos, são eles: benzonidazol, produzido em 1972 e nifurtimox, produzido em 1967 (CUNHA-FILHO, et al., 2013).

O nifurtimox é um composto nitrofurano, que age através da inibição da síntese do ácido pirúvico e promove distúrbios no metabolismo de carboidratos do parasito. Foi o primeiro medicamento a ser utilizado para o tratamento da doença, todavia, sua comercialização foi cancelada no Brasil e em outros países devido à sua alta toxicidade, inclusive, estudos relatam que 70% dos pacientes que faziam uso do medicamento apresentavam efeitos colaterais como náuseas, perda de peso, anorexia e em casos mais graves embora mais raros, efeitos neurotóxicos como polineuropatia e neurite periférica (BERN, 2015; CANÇADO, 2002; JACKSON et al., 2010).

O benzonidazol é um composto nitroimidazólico que não apresenta o mecanismo de ação totalmente elucidado, entretanto, estudos sugerem que o benzonidazol é um pró-fármaco que atua através da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que interagem com macromoléculas do parasito, promovendo estresse oxidativo e danos ao *T. cruzi* (MAYA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

Atualmente no Brasil, o benzonidazol é considerado o tratamento de primeira linha para a doença de Chagas, este medicamento é distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e produzido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) (OLIVEIRA et al., 2008). O tratamento tem sido eficaz logo após o contato com o parasito, durante a fase aguda, apresentando taxa média de cura de 80%, porém, durante a fase crônica esta taxa cai para valores abaixo de 20%, sem apresentar efetividade satisfatória (CLAYTON, 2010; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012).

Entretanto, assim como o nifurtimox, o benzonidazol apresenta efeitos colaterais severos, dentre os principais destacam-se: reações cutâneas como dermatite atópica e eritematose, além de febre, perda de peso e distúrbios gastrointestinais. Estes efeitos tendem a ocorrer durante as primeiras semanas de tratamento, enquanto o uso prologando do medicamento pode desencadear reações mais graves como leucopenia, trombocitopenia e danos ao sistema nervoso central como a degeneração neuronal, polineuropatia e desmielinização (ANTUNES et al., 2016; PINAZO et al., 2010).

Diante do exposto, há a necessidade do apoio às pesquisas que buscam

desenvolver novas farmacoterapias para o tratamento da doença de Chagas, tendo em vista que no Brasil há mais de 1.000.000 de portadores da doença e não há um tratamento efetivo para doença durante a fase crônica. Além disso, os medicamentos que estão no mercado apresentam alta toxicidade e foram desenvolvidos a mais de 40 anos (CLAYTON, 2010; DIAS et al., 2016; PINAZO et al., 2010). Deste modo, a busca por novos fármacos com baixa toxicidade e preferencialmente, com novos alvos farmacológicos torna-se relevante (URBINA, 2010).

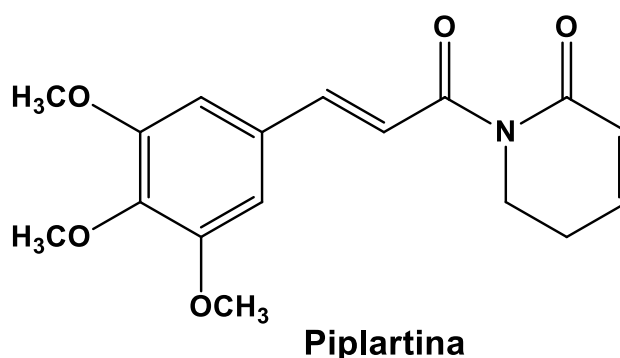
2.2. Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos

É neste âmbito que surgem os produtos naturais, tendo em vista que historicamente, são considerados ótimos fornecedores de princípios ativos com atividades biológicas. Além disso, atualmente, a maioria dos fármacos disponíveis no mercado são produtos naturais ou análogos de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Os fenilpropanoides são moléculas biossinteticamente derivadas do ácido chiquímico, presentes nas essências aromáticas da maioria das plantas e são constituídos por um anel aromático unido a três carbonos (C6-C3) formados a partir do aminoácido aromático fenilalanina, e seus derivados são produzidos a partir de reações de desaminação, hidroxilação, metilação, dentre outros (DEWICK, 2009; PICHERSKY, NOEL, DUDAREVA, 2006; VANHOLME, HOUARI, BOERJAN, 2019).

A piplartina, também chamada de piperlongumina (Figura 4), é um fenilpropanoide em forma de alcamida, tipicamente encontrada em plantas do gênero *Piper* como *Piper tuberculatum* Jacq., *Piper arborescens* Roxb., *Piper longum* L., popularmente conhecida como pimenta-longa, dentre outros (BEZERRA et al., 2013; DUH, WU, WANG, 1990; NAVICKIENE et al., 2003).

Figura 4: Estrutura química da piplartina



Fonte: Adaptado de BEZERRA et al., 2013

A piplartina possui diversas atividades biológicas, incluindo ação citotóxica, antitumoral, antinociceptiva, antiagregante plaquetário, antibacteriano, antifúngico, schistomicida e leishmanicida (BEZERRA et al., 2013; MORAES et al., 2012; ARAÚJO-VILGES et al., 2017; NÓBREGA et al., 2019). Estudos de viabilidade celular revelaram que a piplartina apresentou maior inibição do crescimento das

formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* ($CI_{50} = 21,0 \mu M$) do que o benzonidazol ($42,7 \mu M$) (COTINGUIBA et al., 2009), bem como estudos recentes indicaram que a piplartina reduz a expressão de enzimas antioxidantes envolvidos na defesa do parasito como a triparedoxina redutase e metionina sulfóxido redutase, sendo este o possível mecanismo de ação (VIEIRA et al., 2018).

Além disso, investigando os aspectos toxicológicos da piplartina em camundongos saudáveis, Bezerra e colaboradores (2008) demonstraram que a administração de 50 mg/kg de piplartina por sete dias não promoveu alterações da atividade das transaminases e não houve alterações hematológicas, demonstrando que o uso da piplartina é seguro, visto que apresentou baixa toxicidade sistêmica. Desta forma, um dos objetivos deste trabalho foi preparar uma coleção de ésteres análogos à piplartina para avaliação da atividade tripanocida.

2.3. Considerações sobre os ésteres

2.3.1. Propriedades gerais e relevância econômica

Ésteres são compostos orgânicos derivados de ácidos carboxílicos que possuem o grupo acilato ($R-COO-R'$), são abundantemente encontrados na natureza, geralmente, associados ao odor exalado por flores, frutos, e também são encontrados em animais e óleos vegetais na forma de triglicerídeos (OLIVEIRA et al., 2014).

Em relação às propriedades físico-químicas dos ésteres, os mesmos tendem a ter baixa polaridade, de modo que, são solúveis em diversos solventes orgânicos e pouco solúveis em água, exceto ésteres provindos de ácidos carboxílicos e álcoois de cadeia curta como o formiato de metila (HCO_2CH_3) e formiato de etila ($HCO_2CH_2CH_3$) (MARTINS, LOPES; ANDRADE, 2013). Além disto, ésteres de cadeia curta e baixo peso molecular, geralmente, são incolores, voláteis e possuem odor agradável a exemplo do formiato de etila, enquanto ésteres de alto peso molecular tendem a ser sólidos, com aspecto de pó ou cristais e são pouco voláteis (COSTA et al., 2004).

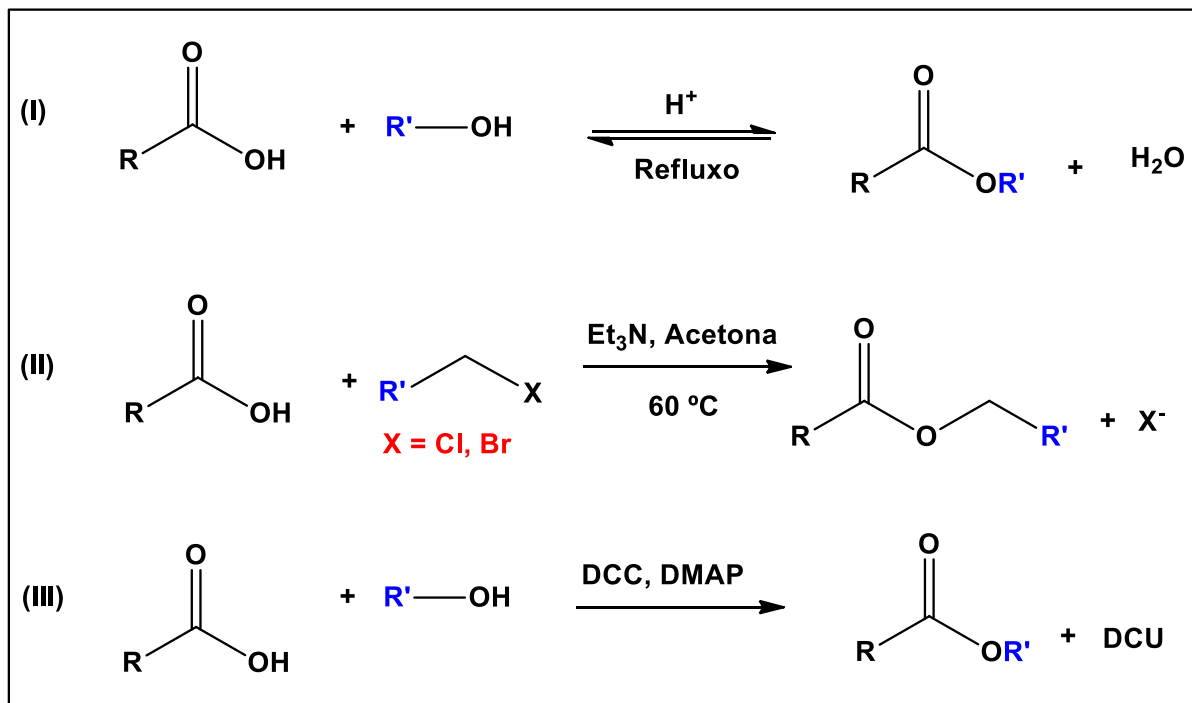
Vale salientar, que os ésteres possuem alta importância econômica, visto que são amplamente utilizados pelo setor industrial na fabricação de polímeros, cosméticos e pela indústria alimentícia na produção de flavorizantes (COSTA et al., 2004). No âmbito da indústria farmacêutica, os ésteres têm sido utilizados no revestimento de cápsulas e também como princípios ativos de medicamentos disponíveis no mercado, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico utilizado devido à suas ações anti-inflamatórias; a benzocaína que possui propriedades anestésicas e a eritromicina, um antibiótico macrolídeo utilizado, principalmente, no combate de infecções provocadas por bactérias gram-positivas (CALVALCANTE et al., 2015; NOVAK; KOVAC, 2015; VIEGAS, BOLZANI, BARREIRO, 2006).

2.3.2. Reações de obtenção

Tendo em vista a relevância dos ésteres em diversos setores industriais, o desenvolvimento de metodologias eficazes para a produção destes foram realizadas ao longo do tempo, de modo que, várias metodologias foram desenvolvidas. No esquema 1 estão apresentadas as reações de esterificação que foram empregadas

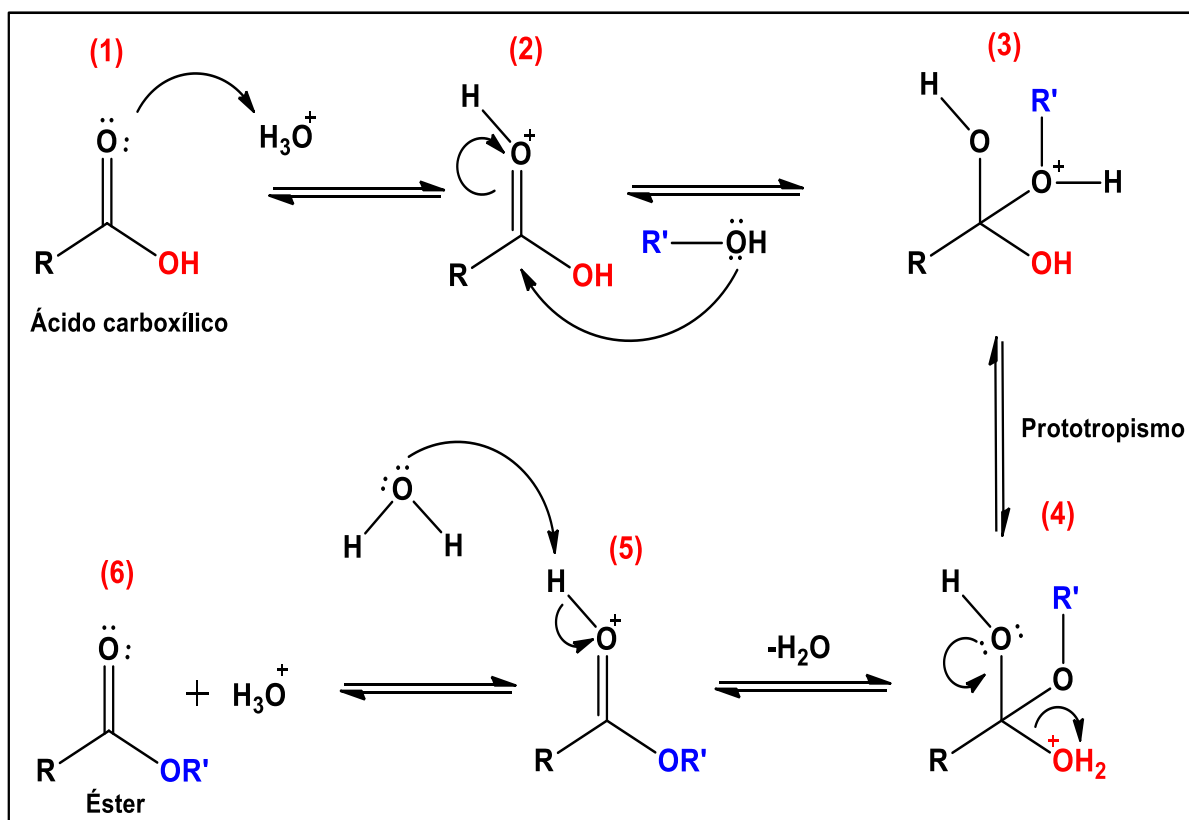
neste estudo.

Esquema 1: Reações para preparação de ésteres.



Legenda: (I) Esterificação de Fischer; (II) Esterificação com haletos; (III) Reação de Steglich. Fonte: Adaptado de NEISES; STEGLICH; CALVALCANTE et al., 2015; MUSKAWAR et al., 2014.

A primeira reação trata-se da esterificação de Fischer (I), também chamada de catálise ácida, que é um dos métodos mais conhecidos para formação de ésteres, o método foi desenvolvido por Fischer e Spear em 1895. A reação é conduzida sob refluxo e utiliza um ácido forte como catalisador. Por se tratar de uma reação reversível é necessário adicionar o álcool em excesso para que ocorra o deslocamento do equilíbrio químico para a formação do produto, geralmente, esta metodologia resulta em bons rendimentos reacionais (CALVALCANTE et al., 2015). O mecanismo de reação proposto está descrito no esquema 2.

Esquema 2: Mecanismo de reação da Esterificação de Fischer.

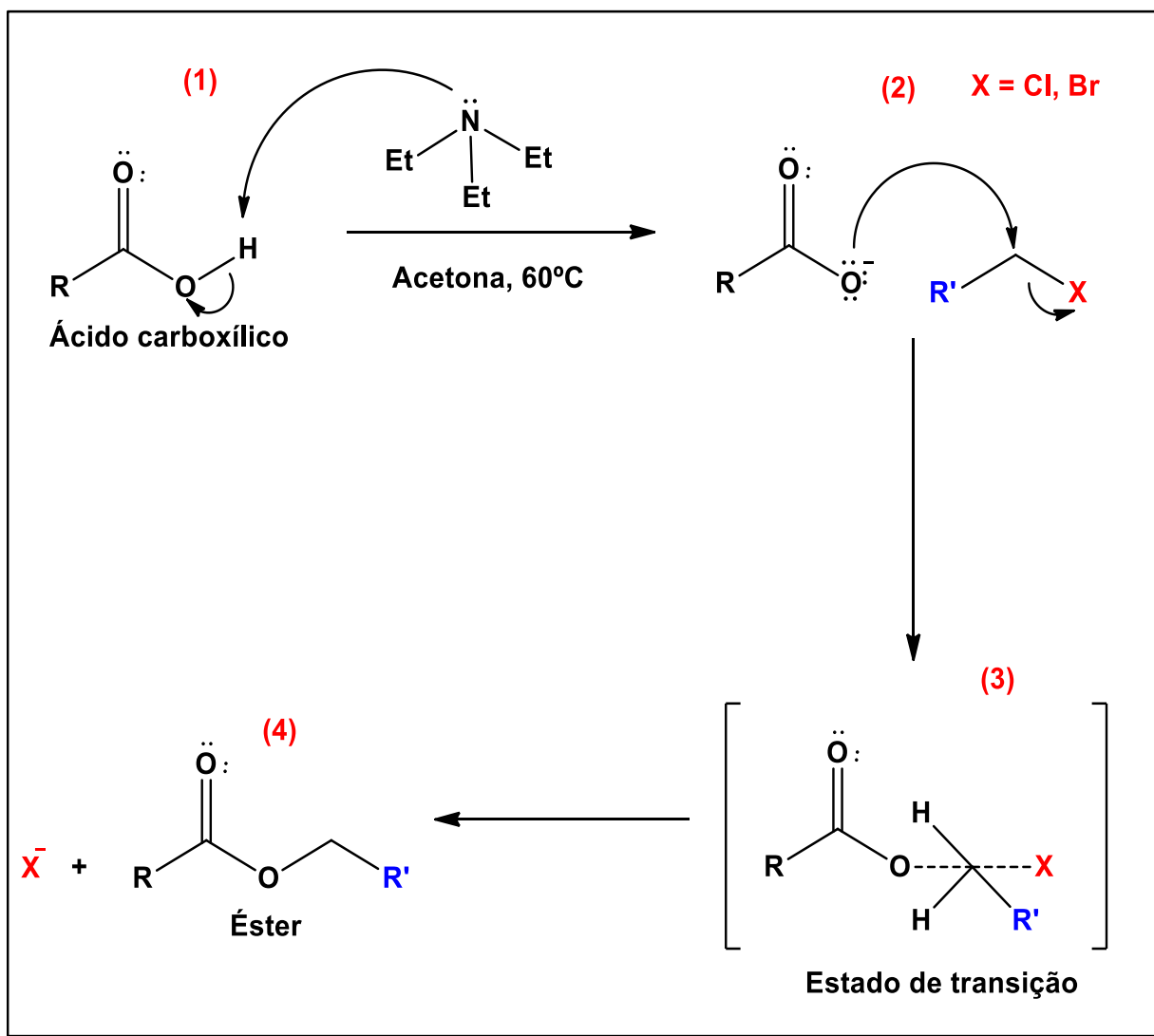
Fonte: Adaptado de CALVALCANTE et al., 2015

A esterificação de Fischer é uma reação de substituição nucleofílica acílica ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$). De acordo com o esquema 2, inicialmente, o catalisador ácido protona o oxigênio da carbonila **1**, tornando-a mais suscetível à ataques nucleofílicos. Deste modo, um par de elétrons presentes no oxigênio do álcool ataca a carbonila eletrofílica **2**, gerando uma molécula tetraédrica **3**. Com isso, ocorre a transferência intramolecular de um próton para uma hidroxila, prototropismo **4**, formando uma molécula de água (bom grupo abandonador), reestabelecendo a carbonila com a perda de uma molécula de água **5**. Após isso, a base conjugada do catalisador capta o próton presente no oxigênio da carbonila, formando o éster e restaurando o catalisador ácido **6** (CALVALCANTE et al., 2015).

A segunda reação trata-se da esterificação utilizando haletos de alquila e arila (**II**), que, geralmente, é uma reação de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$), ou seja, é uma reação de segunda ordem, logo a velocidade de reação depende da concentração do nucleófilo e substrato. Além disso, essa reação é favorecida quando ocorre em carbonos primários, devido ao menor impedimento estérico, e

quando o solvente utilizado é aprótico, evitando a solvatação do nucleófilo (BOECK et al., 2005; MUSKAWAR et al., 2014). A proposta de mecanismo de reação está descrito no esquema 3.

Esquema 3: Mecanismo de reação da Esterificação com Haletos de Alquila e Arila.

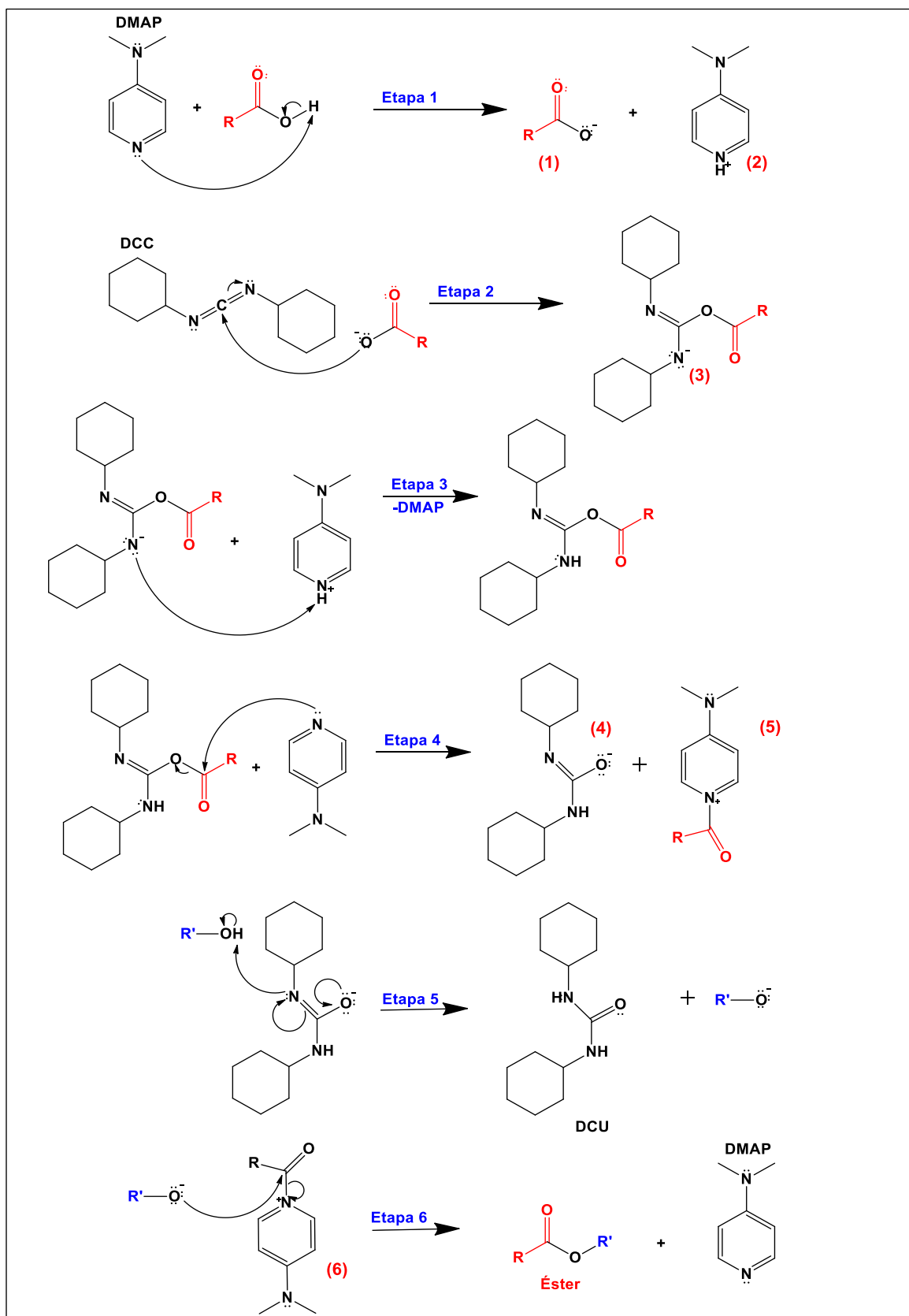


Fonte: Adaptado de BOECK et al., 2005; MUSKAWAR et al., 2014

Com base no esquema 3, primeiramente, o par de elétrons do nitrogênio da trietilamina ataca o hidrogênio do ácido carboxílico **1**, formando o sal do ácido, que é um nucleófilo mais forte. Dessa forma, um par de elétrons do oxigênio ataca o carbono do haleto **2** pelo lado oposto ao grupo abandonador X , ocorrendo a formação do estado de transição **3** que resulta na entrada do nucleófilo e saída do grupo abandonador, havendo a formação do éster **4** (BOECK et al., 2005; MUSKAWAR et al., 2014).

Por fim, a última reação de esterificação utilizada neste estudo foi a reação de Steglich (**III**), descrita por Neises e Steglich em 1978. Para isso, utiliza-se um catalisador nucleofílico, o 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) e o agente de acoplamento diciclohexilcarbodiimida (DCC), ao decorrer da reação há a formação de um subproduto indesejado a diciclohexiureia (DCU), que pode ser removida mediante a filtração, visto que o solvente usualmente utilizado nestas reações é o diclorometano e o DCU é pouco solúvel neste. Além disso, a reação é conduzida sob agitação e temperatura ambiente (LUTJEN et al., 2018; STEGLICH; NEISES, 1978). O mecanismo proposto para a reação está representado no esquema 4.

Com relação ao mecanismo da reação de esterificação de Steglich, de acordo com o esquema 4, inicialmente (**etapa 1**), o par de elétrons do nitrogênio do DMAP ataca o hidrogênio do ácido carboxílico, resultando em dois produtos ionizados **1** e **2**. Com isso (**Etapa 2**), um par de elétrons do oxigênio da base conjugada do ácido carboxílico **1** ataca o carbono central do DCC, quebrando uma ligação π entre carbono e nitrogênio **3**, logo, um par de elétrons do nitrogênio abstrai o próton do ácido conjugado do DMAP (**Etapa 3**). Deste modo, o par de elétrons do nitrogênio do DMAP ataca a carbonila do ácido carboxílico (**Etapa 4**), resultando na formação de **4** e **5**. Logo (**Etapa 5**), ocorre a restauração da carbonila com a abstração do hidrogênio do álcool, formando um alcóxido (bom nucleófilo) e DCU, que é o subproduto da reação. Por fim (**Etapa 6**), o oxigênio do alcóxido ataca a carbonila de **6**, resultando na formação do éster e restauração do catalisador (DMAP) (LUTJEN et al., 2018; STEGLICH; NEISES, 1978).

Esquema 4: Mecanismo da reação de Steglich.

Fonte: Adaptado de Lutjen et al., 2018; NEISES; STEGLICH, 1978.

2.4. Relação entre estrutura química e atividade biológica

Ao longo dos anos, diversas pesquisas realizadas em química medicinal buscaram correlacionar à estrutura química dos compostos com suas respectivas atividades biológicas, tendo em vista que estas interações ocorrem por meio de forças intermoleculares, ou seja, interações hidrofóbicas, eletroestáticas, covalentes, dentre outros (JIN-JUN et al., 2017; LI et al., 2012; LI et al., 2019; BI et al., 2019). Desse modo, notou-se que variações das características físico-químicas dos compostos como características eletrônicas, solubilidade, conformação espacial, parâmetros estéricos, mudanças de substituintes e extensão da cadeia carbônica afetavam diretamente a resposta celular (ARROIO, HONÓRIO; DA SILVA, 2010; BARREIRO; FRAGA, 2014).

Neste contexto, surgiu o estudo da “relação estrutura-atividade (REA)” que busca compreender os efeitos que uma estrutura química (ligante) pode desencadear ao interagir com receptores biológicos como moléculas proteicas, ex: enzimas, canais iônicos, receptores ou ácidos nucleicos e outras macromoléculas biológicas, de modo a compreender os principais fatores que governam esta interação para que ocorra a otimização da resposta biológica (ARROIO, HONÓRIO; DA SILVA, 2010; BARREIRO; FRAGA, 2014).

Para compreender a influência da estrutura química na atividade biológica, algumas metodologias são realizadas como a análise comparativa de uma coleção de moléculas, estruturalmente relacionadas, que partem de modificações na estrutura química de um composto modelo, com características físico-químicas e atividades biológicas conhecidas. Modificações no tamanho, conformação espacial, inserção de grupos substituintes e de centros estereogênicos são exemplos de alterações estruturais, que buscam aperfeiçoar a atividade biológica dos compostos, na tentativa de promover aumento da seletividade ao alvo ou até mesmo reduzir a toxicidade (BARREIRO; FRAGA, 2014, LIMA, 2007).

3.0. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Com base no exposto, este estudo buscou avaliar a atividade tripanocida de uma coleção de treze ésteres análogos à piplartina (**01 – 13**), estruturalmente relacionados, partindo do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e estabelecer uma relação estrutura-atividade das substâncias avaliadas.

3.2. Objetivos específicos

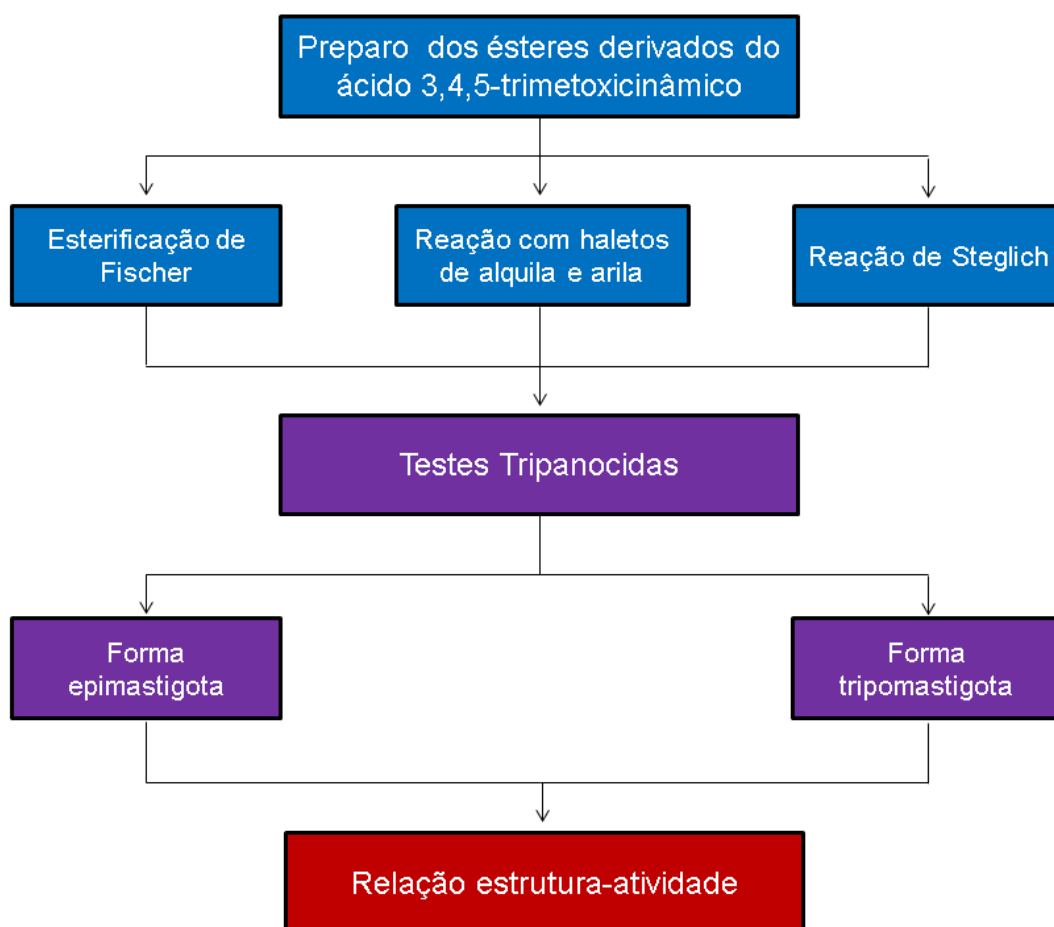
- Preparar os ésteres derivados do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico;
- Avaliar a atividade antiparasitária dos derivados frente ao *Trypanosoma cruzi*;
- Traçar uma relação estrutura-atividade das substâncias avaliadas;
- Estabelecer características químicas para o desenvolvimento de agentes tripanocidas com melhor perfil biológico

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

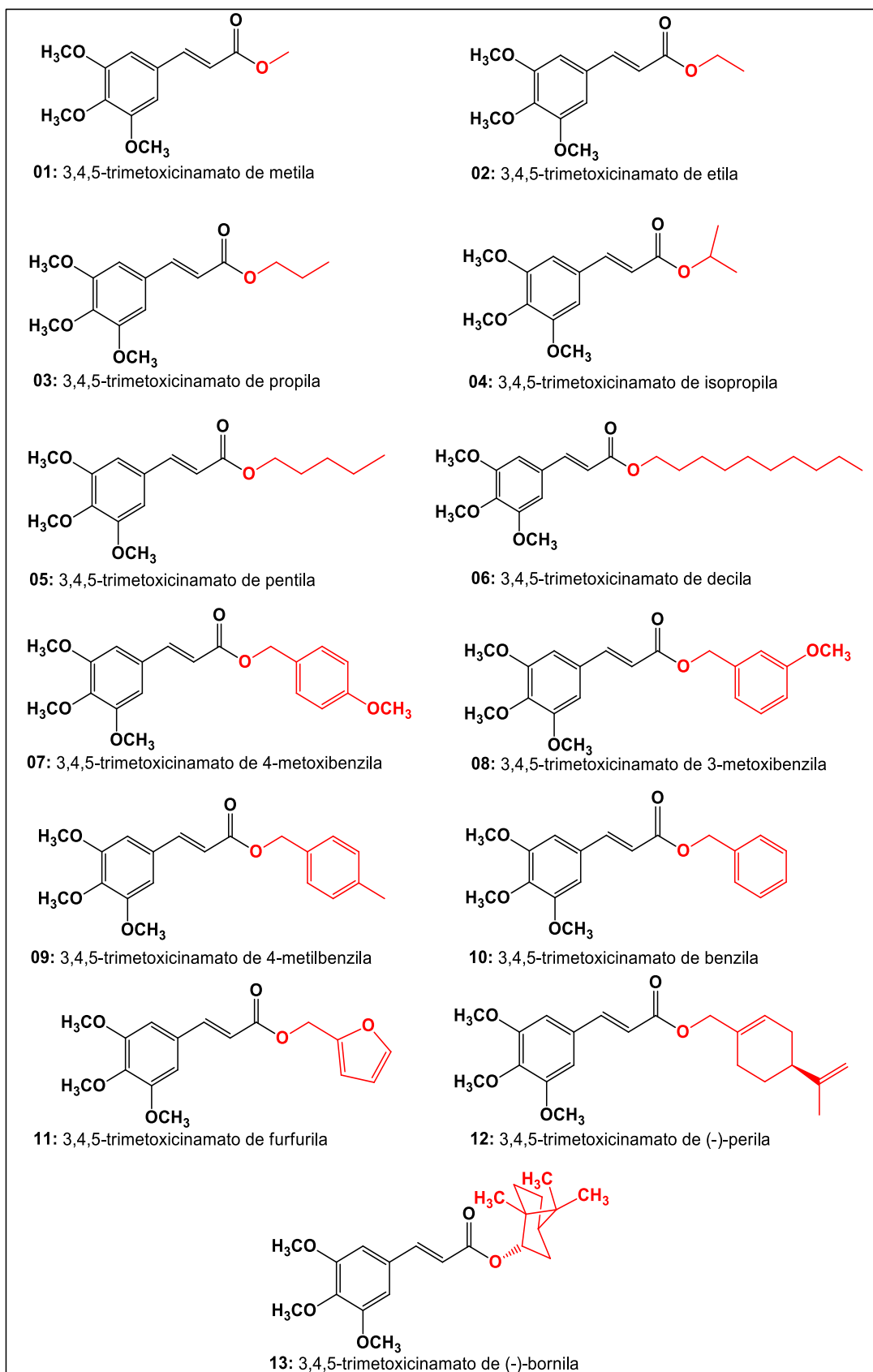
4.1. Planejamento do estudo

Neste estudo, foram preparados treze ésteres derivados do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (Figura 5) que foram caracterizados através das técnicas de Espectroscopia de Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e de Carbono Treze (RMN de ^{13}C). Após a caracterização, os compostos foram testados frente às formas tripomastigota e epimastigota do *T. cruzi*, bem como foi estabelecida a relação estrutura-atividade dos compostos avaliados. O planejamento e o desenvolvimento do estudo ocorreram conforme o esquema 5.

Esquema 5: Planejamento experimental do estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5: Estrutura química dos ésteres preparados.

Fonte: Elaborado pelo autor

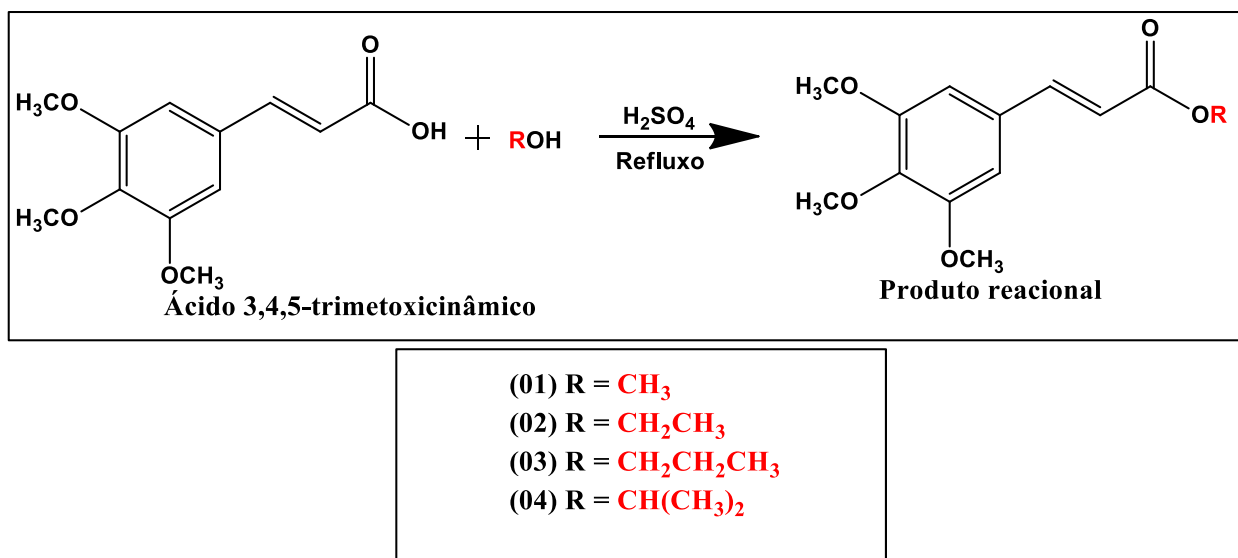
4.2. Etapa Química

4.2.1 Preparação dos ésteres análogos à piplartina

Os ésteres foram obtidos através de três diferentes metodologias: Esterificação de Fischer (DE FARIAS et al., 2016; SILVA et al., 2019); esterificação com haletos de alquila e arila (BOECK et al., 2005; LI et al., 2012) e reação de Steglich (LUTJEN et al., 2018; STEGLICH; NEISES, 1978).

Os quatro primeiros ésteres **(01- 04)** foram preparados por meio da esterificação de Fischer. Os álcoois utilizados nas reações foram: metanol, etanol, n-propanol e álcool isopropílico, o esquema reacional está descrito abaixo (Esquema 6).

Esquema 6: Reação de esterificação de Fischer utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e álcoois alifáticos.



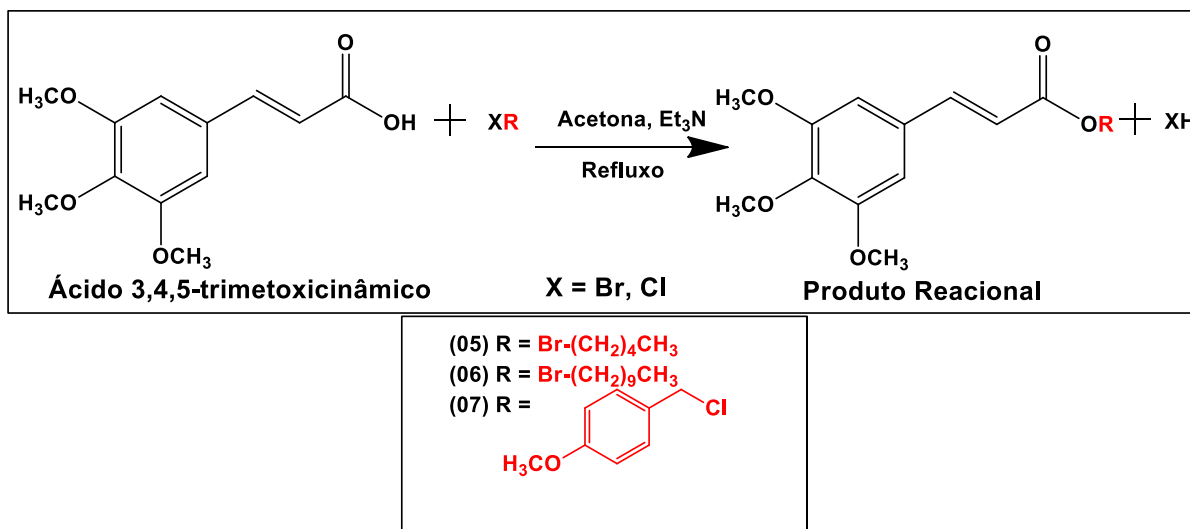
. Fonte: Elaborado pelo autor

Com isso, foram obtidos os seguintes ésteres: 3,4,5-trimetoxicinamato de metila **(01)**, 3,4,5-trimetoxicinamato de etila **(02)**, 3,4,5-trimetoxicinamato de propila **(03)** e 3,4,5-trimetoxicinamato de isopropila **(04)**. As reações duraram de 6-24 horas e apresentaram rendimentos que variaram entre 58,8 - 91,1%, tendo o éster **01** com maior rendimento.

Para a obtenção da segunda coleção de ésteres **(05 - 07)**, realizou-se a reação de esterificação do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico com haletos de alquila e arila. Os haletos empregados neste estudo foram: 1-bromopentano, 1-bromodecano

e cloreto de 4-metoxibenzila. O esquema reacional está descrito abaixo (Esquema 7).

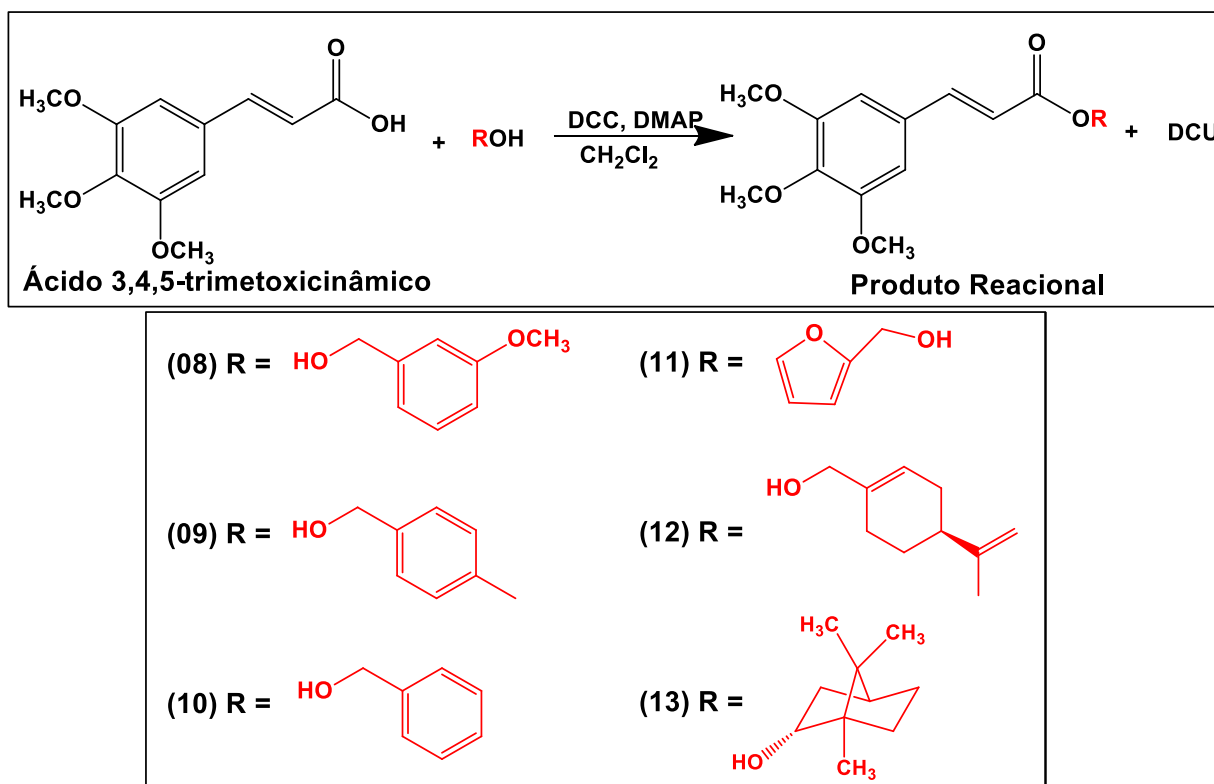
Esquema 7: Reação de esterificação utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e haletos de alquila e arila



Fonte: Elaborado pelo autor

Deste modo, foram preparados os ésteres: 3,4,5-trimetoxicinamato de pentila (**05**), 3,4,5-trimetoxicinamato de decila (**06**) e 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metoxibenzila (**07**). As reações duraram 48 horas e apresentaram rendimentos que variaram entre 38 - 47,5%, tendo o éster **07** com maior rendimento.

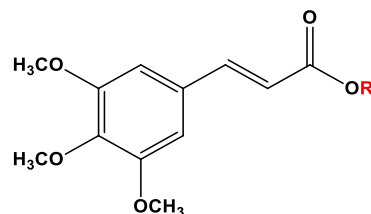
Por fim, o preparo da terceira coleção de ésteres (**08 - 13**) ocorreu através da reação de esterificação de Steglich utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e os seguintes reagentes: Álcool 3-metoxibenzílico, álcool 4-metilbenzílico, álcool benzílico, álcool furfurílico, álcool perílico e (-)-borneol (NEISES; STEGLICH, 1978; NÓBREGA et al., 2019). O esquema 8 ilustra a reação.

Esquema 8: Reação de Steglich utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e os respectivos álcoois.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Obtendo-se os ésteres: 3,4,5-trimetoxicinamato de 3-metoxibenzila (**08**), 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metilbenzila (**09**), 3,4,5-trimetoxicinamato de benzila (**10**), 3,4,5-trimetoxicinamato de furfurila (**11**), 3,4,5-trimetoxicinamato de (-)-perila (**12**) e 3,4,5-trimetoxicinamato de (-)-bornila (**13**). As reações duraram de 24 - 48 horas e apresentaram rendimentos que variaram entre 26,7 - 62,8%, tendo o éster **09** com maior rendimento.

A tabela 1 contém os principais dados físico-químicos e experimentais de todos os ésteres preparados, incluindo dados reacionais, de purificação, rendimento, ponto de fusão e fator de retenção (Rf) em uma mistura de hexano e acetato de etila (Hex: AcOEt). Dentre os análogos preparados **08**, **09** e **12** são inéditos.

Tabela 1: Dados físico-químicos e experimentais dos produtos obtidos.

Éster	Radical	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Tempo de Reação (h)	Purificação em Coluna (Hex:AcOEt)	Massa (mg)	Rendimento (%)	Aspecto	Rf (Hex: AcOEt)	Ponto de Fusão (°C)
01	Metila	C ₁₃ H ₁₆ O ₅	252,26	6	-	96,5	91,1	Sólido Branco	0,55 (7:3)	95-96
02	Etila	C ₁₄ H ₁₈ O ₅	266,29	6	-	92,2	82,5	Sólido Branco	0,56 (7:3)	65-66
03	Propila	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280,32	6	-	94,0	79,9	Sólido Bege	0,58 (7:3)	73-74
04	Isopropila	C ₁₅ H ₂₀ O ₅	280,32	24	8:2	69,2	58,8	Óleo marrom	0,60 (7:3)	-
05	Pentila	C ₁₇ H ₂₄ O ₅	308,37	48	8:2	54,1	41,9	Sólido Branco	0,65 (7:3)	103-104
06	Decila	C ₂₂ H ₃₄ O ₅	378,50	48	9:1	64,2	38,0	Sólido Branco	0,70 (7:3)	35-36
07	4-metoxibenzila	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	358,39	48	9:1	71,5	47,5	Sólido Branco	0,58 (7:3)	70-71
08	3-metoxibenzila	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	358,39	48	9:1	40,2	26,7	Óleo incolor	0,58 (7:3)	-
09	4-metilbenzila	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	342,39	24	9:1	90,3	62,8	Óleo incolor	0,62 (7:3)	-
10	Benzila	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	328,36	24	9:1	67,0	48,6	Sólido branco	0,55 (7:3)	82-83
11	Furfurila	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	318,32	48	8:2	55,0	41,2	Óleo marrom	0,60 (7:3)	-
12	(-)-Perila	C ₂₂ H ₂₈ O ₅	372,45	24	95:5	74,5	47,6	Óleo incolor	0,70 (7:3)	-
13	(-)-Bornila	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	374,47	24	95:5	72,6	46,2	Óleo incolor	0,72 (7:3)	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

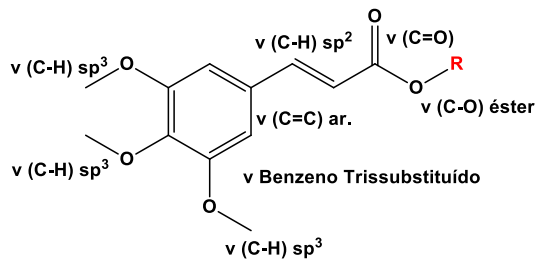
4.3. Análise espectroscópica dos ésteres obtidos

A caracterização estrutural dos análogos foi estabelecida por meio das técnicas de Espectroscopia de Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e Carbono Treze (RMN de ^{13}C).

4.3.1. Espectroscopia de Infravermelho

Através da técnica de IV é possível identificar a presença e/ou ausência de grupos funcionais importantes para a identificação dos compostos. A tabela 2 revela os principais dados obtidos pela espectroscopia de infravermelho para os ésteres preparados.

Ao analisar os espectros obtidos, foi observada a presença de sinais semelhantes entre os compostos, identificando sinais norteadores característicos, como por exemplo: bandas de absorção entre $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ tocante ao estiramento C-H sp^3 ; sinais entre $3000\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ referentes ao estiramento C-H dos carbonos sp^2 , um sinal forte em torno de 1710 cm^{-1} pertencente ao estiramento da carbonila de ésteres (C=O), vale ressaltar que a diminuição dessa frequência de absorção se dá devido à presença da ligação dupla (C=C) conjugada, resultando no aumento da característica de ligação simples da carbonila, algo observado em todos os compostos. Os sinais aos pares em torno de 1600 e 1475 cm^{-1} são referentes ao estiramento C=C de anéis aromáticos, absorções intensas em torno de 1250 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} são tocantes à presença da ligação C-O e, por fim, sinais por volta de 1580 , 1500 e 850 pertencentes ao estiramento de anéis aromáticos.

Tabela 2: Espectroscopia de infravermelho – estiramentos (ν) dos ésteres trimetoxicinâmicos em cm^{-1} .

R = Metila (01)	R = Decila (06)	R = Furfurila (11)
R = Etila (02)	R = 4-Metoxibenzila (07)	R = (-)-Perila (12)
R = Propila (03)	R = 3-Metoxibenzila (08)	R = (-)-Bornila (13)
R = Isopropila (04)	R = 4-Metilbenzila (09)	
R = Pentila (05)	R = Benzila (10)	

Éster	$\nu(\text{C-H}) \text{ sp}^2$ aro.	$\nu(\text{C-H}) \text{ sp}^3$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=C})\text{ar.}$	$\nu(\text{C-O})$ Éster	ν Benzeno Trissubstituído
01	3006	2946; 2838	1697	1634; 1469	1249; 1128	1583; 1505; 818
02	3004	2946; 2838	1702	1636; 1456	1280; 1123	1582; 1504; 827
03	3001	2939; 2840	1707	1640; 1472	1276; 1126	1581; 1505; 846

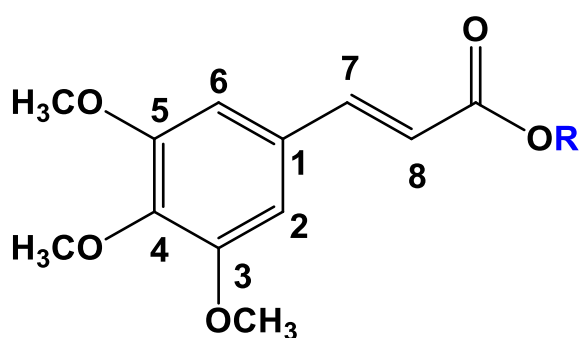
04	2982	2941; 2844	1706	1636; 1467	1276; 1128	1583; 1506; 828
05	3006	2933; 2857	1707	1636; 1461	1275; 1127	1583; 1508; 820
06	3001	2925; 2857	1714	1638; 1457	1276; 1126	1584; 1508; 824
07	3036	2942; 2838	1718	1640; 1467	1278; 1133	1582; 1515; 817
08	3002	2939; 2840	1716	1636; 1459	1278; 1136	1584; 1505; 846
09	3010	2932; 2837	1716	1640; 1465	1278; 1136	1582; 1509; 846
10	3021	2935; 2842	1704	1638; 1472	1276; 1127	1582; 1506; 827
11	3002	2945; 2842	1713	1638; 1459	1275; 1127	1583; 1505; 827
12	3006	2967; 2838	1709	1638; 1461	1274; 1128	1582; 1508; 826
13	-	2956; 2878	1709	1638; 1459	1276; 1129	1584; 1508; 828

4.3.2. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C

De acordo com os dados espectroscópicos de RMN de ^1H (Tabelas 3, 4, 5 e 6) e de ^{13}C obtidos (Tabela 7), pode-se confirmar que ocorreu a formação dos ésteres preparados. Os deslocamentos químicos demonstram que os produtos análogos à piplartina possuem treze hidrogênios em comum, sendo dois hidrogênios (**H-2**, **H-6**) pertencentes ao anel aromático; dois hidrogênios olefínicos (**H-7**, **H-8**) referentes à cadeia carbônica lateral ligada ao carbono 1 (um) e nove hidrogênios relacionados às três metoxilas presentes no anel aromático (**3,4,5-MeO**).

Com relação aos sinais comuns para todos análogos (Figura 6), o sinal de hidrogênio mais desblindado do espectro foi do hidrogênio olefínicos em forma de dubleto próximo à δ_{H} 7,59 ppm (**H-7**) acoplado ao hidrogênio vizinho que apresenta um sinal em forma de dubleto em torno de δ_{H} 6,33 ppm (**H-8**), a configuração da ligação π é *trans*, visto que o valor da constante de acoplamento (J) é próximo à 16 Hz. Além disso, há um sinal em forma de singlete com integral para dois hidrogênios referentes aos hidrogênios na posição *orto* do anel aromático (**H-2**, **H-6**) próximo à δ_{H} 6,75 ppm e, por fim, os hidrogênios das metoxilas (**3,4,5-MeO**) com integral para nove que fornecem um singlete em torno de δ_{H} 3,87 ppm.

Figura 6: Estrutura em comum dos ésteres análogos à piplartina

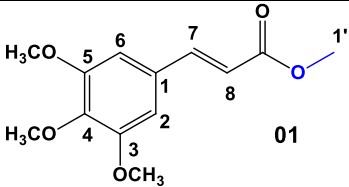
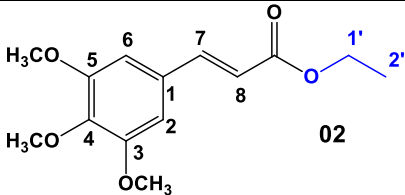
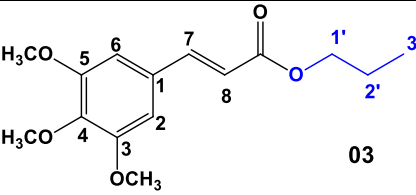
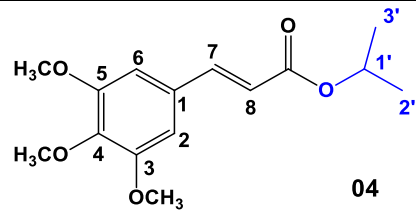


Fonte: Elaborado pelo autor

No tocante aos dados obtidos dos espectros de RMN de ^{13}C , os análogos possuem doze carbonos em comum. Um sinal próximo à δ_{C} 167,5 ppm atribuído à carbonila (**C=O**) dos ésteres formados; um, em torno de δ_{C} 153,5 ppm pertencente aos carbonos *meta* do anel aromático (**C-3**, **C-5**) ligados à metoxilas; um sinal em δ_{C} 140,1 ppm referente ao carbono *para* do anel aromático (**C-4**) também ligado à

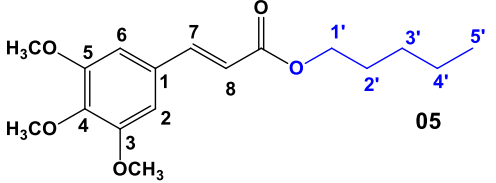
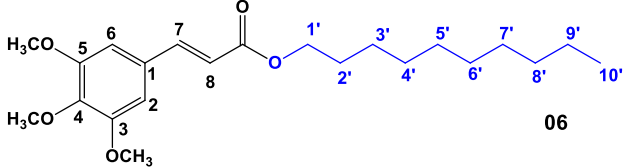
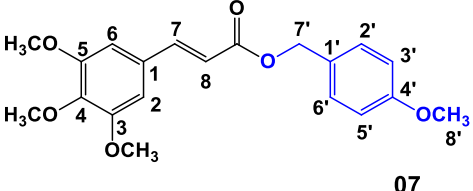
metoxila; outro sinal próximo à δ_c 130,0 ppm atribuído ao carbono aromático (**C-1**) adjacente ao grupo olefínico; um sinal em torno de δ_c 105,4 ppm pertencente aos dois carbonos *orto* do anel aromático (**C-2**, **C-6**). Além disso, há dois sinais próximos de δ_c 144,3 e 118,0 ppm atribuídos aos carbonos olefínicos (**C-7** e **C-8**, respectivamente) e, por fim, os sinais das metoxilas, um em torno de δ_c 61,1 ppm relacionado à metoxila da posição *para* (em **C-4**) e um em 56,2 ppm tocante às metoxilas da posição *meta* (ligadas a **C-3** e **C-5**) do anel aromático. Vale ressaltar que a caracterização dos análogos foi feita a partir de comparações com dados da literatura.

Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H}) para os ésteres **01- 04**.

Carbonos	   			
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-	-	-
2, 6	6,74 (s, 2H)	6,74 (s, 2H)	6,74 (s, 2H)	6,74 (s, 2H)
3, 5	-	-	-	-
4	-	-	-	-
7	7,60 (<i>d</i> , $J=15,92$ Hz, 1H)	7,59 (<i>d</i> , $J=15,91$ Hz, 1H)	7,58 (<i>d</i> , $J=15,90$ Hz, 1H)	7,57 (<i>d</i> , $J=15,89$ Hz, 1H)
8	6,33 (<i>d</i> , $J=15,92$ Hz, 1H)	6,34 (<i>d</i> , $J=15,91$ Hz, 1H)	6,34 (<i>d</i> , $J=15,90$ Hz, 1H)	6,32 (<i>d</i> , $J=15,89$ Hz, 1H)
3,4,5-MeO	3,87 (s, 9H)	3,87 (s, 9H)	3,87 (s, 9H)	3,87 (s, 9H)
1'	3,79 (s, 3H)	4,25 (<i>q</i> , $J=7,13$ Hz, 2H)	4,16 (<i>t</i> , $J=6,73$ Hz, 2H)	5,16 – 5,10 (<i>m</i> , 1H)
2'	-	1,34 (<i>t</i> , $J=7,13$ Hz, 3H)	1,74 - 1,67 (<i>m</i> , 2H)	1,31 (<i>d</i> , $J=6,26$ Hz, 3H)
3'	-	-	0,99 (<i>t</i> , $J=7,41$ Hz, 3H)	1,31 (<i>d</i> , $J=6,26$ Hz, 3H)

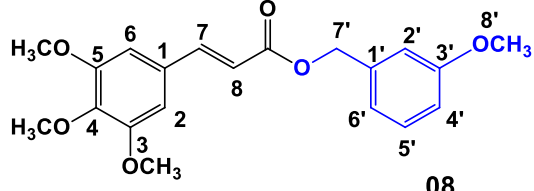
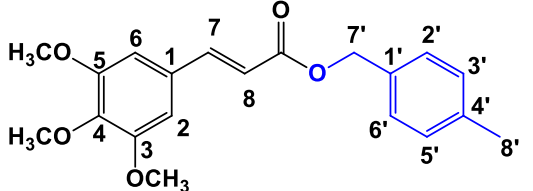
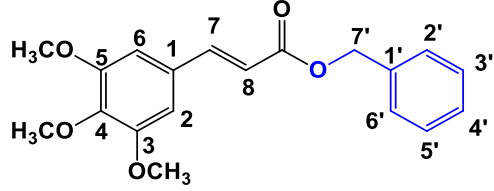
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H}) para os ésteres 05 - 07.

Carbonos			
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-	-
2, 6	6,74 (s, 2H)	6,74 (s, 2H)	6,73 (s, 2H)
3, 5	-	-	-
4	-	-	-
7	7,57 (d, $J=15,89$ Hz, 1H)	7,58 (d, $J=15,90$ Hz, 1H)	7,61 (d, $J=15,92$ Hz, 1H)
8	6,33 (d, $J=15,89$ Hz, 1H)	6,34 (d, $J=15,90$ Hz, 1H)	6,37 (d, $J=15,92$ Hz, 1H)
3,4,5-MeO	3,87 (s, 9H)	3,87 (s, 9H)	3,87 (s, 9H)
1'	4,18 (t, $J = 6,70$ Hz, 2H)	4,20 (t, $J = 6,74$ Hz, 2H)	-
2'	1,71 – 1,66 (m, 2H),	1,73 – 1,66 (m, 2H)	7,35 (d, $J= 8,67$ Hz, 1H)
3'	1,40 - 1,33 (m, 2H)	1,40 – 1,26 (m, 2H)	6,91 (d, $J=8,67$ Hz, 1H)
4'	1,40 - 1,33 (m, 2H)	1,40 – 1,26 (m, 2H)	-
5'	0,91 (t, $J=6,25$ Hz , 3H)	1,40 – 1,26 (m, 2H)	6,91 (d, $J=8,67$ Hz, 1H)
6'		1,40 – 1,26 (m, 2H)	7,35 (d, $J= 8,67$ Hz, 1H)
7'		1,40 – 1,26 (m, 2H)	5,18 (s, 2H)
8'		1,40 – 1,26 (m, 2H)	3,81 (s, 3H)
9'		1,40 – 1,26 (m, 2H)	
10'		0,87 (t, $J= 6,61$ Hz, 3H)	

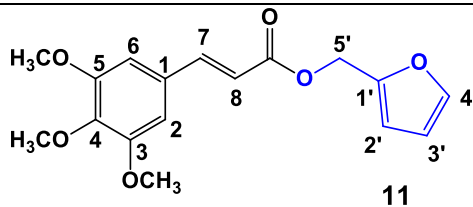
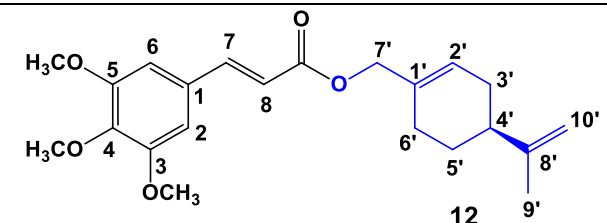
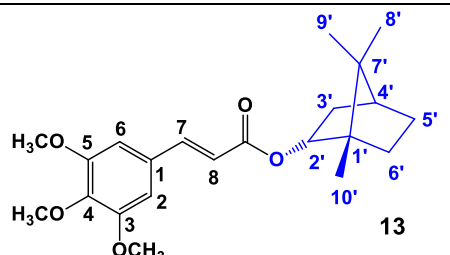
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 5: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δ_{H}) para os ésteres 08 - 10.

Carbonos	  		
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-	-
2, 6	6,75 (s, 2H)	6,74 (s, 2H)	6,75 (s, 2H)
3, 5	-	-	-
4	-	-	-
7	7,64 (<i>d</i> , $J=15,90$ Hz, 1H)	7,63 (<i>d</i> , $J=15,92$ Hz, 1H)	7,64 (<i>d</i> , $J=15,90$ Hz, 1H)
8	6,40 (<i>d</i> , $J=15,90$ Hz, 1H)	6,38 (<i>d</i> , $J=15,92$ Hz, 1H)	6,40 (<i>d</i> , $J=15,90$ Hz, 1H)
3,4,5-MeO	3,88 (s, 9H)	3,87 (s, 9H)	3,88 (s, 9H)
1'	-	-	-
2'	7,02 - 6,95 (<i>m</i> , 1H)	7,19 (<i>d</i> , $J= 7,82$ Hz, 1H)	7,43 – 7,37 (<i>m</i> , 1H)
3'	-	7,32 (<i>d</i> , $J= 7,98$ Hz, 1H)	7,43 – 7,37 (<i>m</i> , 1H)
4'	6,90 - 6,86 (<i>m</i> , 1H)	-	7,43 – 7,37 (<i>m</i> , 1H)
5'	7,31 (<i>t</i> , $J= 7,9$ Hz, 1H)	7,32 (<i>d</i> , $J= 7,98$ Hz, 1H)	7,43 – 7,37 (<i>m</i> , 1H)
6'	7,02-6,95 (<i>m</i> , 1H)	7,19 (<i>d</i> , $J= 7,82$ Hz, 1H)	7,43 – 7,37 (<i>m</i> , 1H)
7'	5,22 (s, 2H)	5,21 (s, 2H)	5,25 (s, 2H)
8'	3,83 (s, 3H)	2,36 (s, 3H)	

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 6: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (δH) para os ésteres **11** – **13**.

Carbonos			
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	-	-	-
2, 6	6,74 (s, 2H)	6,75 (s, 2H)	6,76 (s, 2H)
3, 5	-	-	-
4	-	-	-
7	7,62 (<i>d</i> , $J=15,91$ Hz, 1H)	7,60 (<i>d</i> , $J=15,90$ Hz, 1H)	7,59 (<i>d</i> , $J=15,90$ Hz, 1H)
8	6,38 – 6,35 (<i>m</i> , 1H)	6,36 (<i>d</i> , $J=15,90$ Hz, 1H)	6,36 (<i>d</i> , $J=15,90$ Hz, 1H)
3,4,5-MeO	3,86 (s, 9H)	3,88 (s, 9H)	3,88 (s, 9H)
1'	-	-	-
2'	6,38 – 6,35 (<i>m</i> , 1H)	5,80 (<i>sl</i> , 1H)	5,02 (<i>ddd</i> , $J=9,9$; 3,4; 2,1 Hz, 1H)
3'	6,46 – 6,45 (<i>m</i> , 1H)	2,15 (<i>m</i> , 2H)	2,48 – 2,37 (<i>m</i> , 1H)
4'	7,45 - 7,44 (<i>m</i> , 1H)	2,02 (<i>m</i> , 1H)	1,05 (<i>dd</i> , $J=16,1$; 6,5 Hz, 1H)
5'	5,19 (s, 2H)	1,86 (<i>m</i> , 1H)	1,71 (<i>t</i> , $J=4,5$ Hz, 1H)
6'		1,52 (<i>m</i> , 1H)	1,81 – 1,74 (<i>m</i> , 1H)
7'		2,15 (<i>m</i> , 2H)	1,30 – 1,25 (<i>m</i> , 1H)
8'		4,60 (s, 2H)	2,10 – 2,01 (<i>m</i> , 1H)
9'		-	1,40 – 1,32 (<i>m</i> , 1H)
10'		1,74 (s, 3H)	-
		4,72 (s, H-10', 2H)	0,88 (s, 3H)
			0,90 (s, 3H)
			0,95 (s, 3H)

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 7: Assinalamentos de RMN de ^{13}C (δC) dos ésteres obtidos (**1 – 13**).

Carbono	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	130,0	130,3	130,1	130,2	130,1	130,1	130,0	130,0	130,0	129,9	129,9	130,1	130,2
2, 6	105,4	105,7	105,3	105,3	105,3	105,4	105,4	105,4	105,4	105,3	105,5	105,4	105,4
3, 5	153,5	153,8	153,5	153,5	153,5	153,6	153,6	153,6	153,3	153,5	153,6	153,6	153,6
4	140,3	140,5	140,2	140,1	140,2	140,2	140,3	140,3	140,3	140,2	140,4	140,3	140,2
7	144,9	144,8	144,7	144,4	144,6	144,7	145,1	145,3	145,1	145,2	145,5	144,9	144,3
8	117,1	118,0	117,6	118,2	117,6	117,7	117,4	117,2	117,4	117,1	116,9	117,5	118,2
3,5-MeO	56,3	56,5	56,2	56,3	56,2	56,3	56,3	56,2	56,3	56,2	56,3	56,3	56,3
4-MeO	61,1	61,3	61,0	61,1	61,0	61,1	61,1	61,1	61,1	61,0	61,1	61,1	61,1
C=O	167,4	167,2	167,2	166,6	167,1	167,2	166,9	166,8	166,9	166,8	166,6	167,0	167,4
1'	51,8	60,9	66,3	67,9	64,8	64,9	128,3	137,7	133,1	136,1	149,7	132,8	49,1
2'	-	14,7	22,2	22,1	28,5	32,1	130,3	114,0	128,6	128,3	110,7	126,0	80,2
3'	-	-	10,6	22,1	28,2	29,7	114,1	159,9	129,4	128,6	110,8	30,6	37,0
4'	-	-	-	-	22,4	29,5	159,8	113,8	138,4	127,0	143,5	41,0	45,1
5'	-	-	-	-	14,0	29,5	114,1	129,8	129,4	128,6	58,3	27,5	27,4
6'	-	-	-	-	-	28,9	130,3	120,6	128,6	128,3	-	26,6	28,2
7'	-	-	-	-	-	28,9	66,4	66,4	66,5	66,4	-	68,7	48,0
8'	-	-	-	-	-	26,2	55,5	55,4	21,3	-	-	149,7	19,9
9'	-	-	-	-	-	22,8	-	-	-	-	-	20,8	19,0
10'	-	-	-	-	-	14,3	-	-	-	-	-	108,9	13,7

Fonte: Elaborado pelo autor

4.4. Avaliação da atividade tripanocida dos análogos à piplartina (01 – 13).

4.4.1. Avaliação tripanocida frente às formas epimastigota e tripomastigota do *T. cruzi*

Inicialmente, os ésteres preparados foram submetidos a testes *in vitro* utilizando a técnica de microdiluição em placas de 96 poços para a avaliação da atividade tripanocida frente à forma evolutiva epimastigota em diferentes concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 $\mu\text{g/mL}$). Em seguida, os compostos com melhor atividade foram testados frente à forma tripomastigota de *T. cruzi*. Em ambos os ensaios, foram calculados os valores de CI_{50} (concentração capaz de inibir o crescimento de 50% das células do parasito); considera-se que um composto tem atividade tripanocida quando $\text{CI}_{50} < 40 \mu\text{M}$ (JONES et al., 2013). Os resultados estão expressos na tabela 8.

Ao analisar a atividade biológica de compostos frente a patógenos que atingem o ser humano é importante que a citotoxicidade dos mesmos seja investigada frente a células de mamíferos para que seja calculada a seletividade dos compostos. Dessa forma, foram feitos ensaios de toxicidade *in vitro* em células epiteliais renais obtidas de macaco LLC-MK2 (*Rhesus monkey kidney*), utilizando diferentes concentrações dos compostos (25-200 $\mu\text{g/mL}$) e foi calculado o índice de seletividade (IS) através da razão entre a CC_{50} (concentração capaz de promover citotoxicidade em 50% das células hospedeiras LLC-MK2) e a CI_{50} , de modo que, os compostos foram considerados seletivos para o parasito quando $\text{IS} \geq 10$ (JONES et al., 2013). Os resultados estão expressos na tabela 9.

Com isso, foi feita uma análise das características químicas que podem influenciar a atividade biológica dos compostos, visto que a coleção de substâncias preparadas é estruturalmente relacionada, havendo variações no substituinte ligado ao oxigênio da função éster. Enquanto, a estrutura cinâmica trimetoxilada foi mantida. Dessa forma, os resultados aqui expressos podem servir de referência para o desenvolvimento de novos protótipos tripanocidas com melhor perfil biológico.

De acordo com os resultados observados na tabela 8, adotou-se, inicialmente, o composto **01** como esqueleto base de comparação para ésteres de cadeia alifática por apresentar uma estrutura mais simples, visto que, possui apenas um carbono na cadeia lateral. O **01** apresentou CI_{50} de $124,9 \pm 36,6 \mu\text{M}$ frente à forma epimastigota

do parasito e ao compará-lo com o análogo com radical etila (**02**) nota-se que houve diminuição da potência ($321,83 \pm 72,89 \mu\text{M}$) em contraste com os resultados obtidos por Lima e colaboradores (2016), em que o cafeato de etila apresentou CI_{50} de $18,27 \mu\text{M}$ frente à forma amastigota do parasito (LIMA et al., 2016). A presença de hidroxilas fenólicas neste derivado pode ter contribuído para o melhor perfil antiparasitário em comparação com **01**, além de eventuais diferenças na abordagem metodológica do teste biológico.

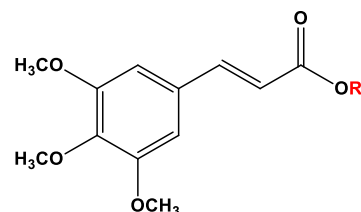
Além disso, os análogos que possuem três carbonos na cadeia lateral **03** (propila) e **04** (isopropila) apresentaram CI_{50} de $321,42 \pm 105,95 \mu\text{M}$ e $265,77 \pm 59,22 \mu\text{M}$, respectivamente, logo se percebe que o aumento da cadeia carbônica lateral em até três carbonos reduz drasticamente a atividade tripanocida de derivados trimetoxicinâmicos. Em adição, a inserção de dez carbonos ao oxigênio do éster (**06**) aboliu a atividade tripanocida, visto que não foi possível determinar a CI_{50} do composto na concentração máxima testada.

Todavia, o aumento da cadeia carbônica com a introdução do radical pentila (**05**) promoveu aumento da ação antiparasitária ($\text{CI}_{50} = 65,50 \pm 7,13 \mu\text{M}$) quando comparado ao **01**, esses resultados corroboram com o estudo desenvolvido por Lopes e colaboradores (2019), onde o *p*-cumarato de pentila apresentou CI_{50} de $5,16 \mu\text{M}$ frente à forma epimastigota do *T. cruzi*, em comparação com o *p*-cumarato de metila ($\text{CI}_{50} = 601 \mu\text{M}$). Deste modo, pode-se concluir que a substituição do anel aromático trimetoxilado por um anel aromático *para* hidroxilado potencializa a atividade tripanocida.

Ao analisar análogos que possuem anel aromático como substituinte, utilizou-se o composto **10** (3,4,5-trimetoxicinamato de benzila) como base de comparação para os demais ésteres, visto que não possui substituintes no anel. O **10** apresentou CI_{50} de $121,66 \pm 42,73 \mu\text{M}$ frente à forma epimastigota e ao compará-lo com os compostos substituídos **07** (4-metoxibenzila), **08** (3-metoxibenzila) e **09** (4-metilbenzila) ($\text{CI}_{50} = 157,37 \pm 38,50 \mu\text{M}$, $112,36 \pm 11,72 \mu\text{M}$ e $180,49 \pm 30,73 \mu\text{M}$, respectivamente) nota-se que não houve diferenças significativas da bioatividade frente à forma epimastigota do parasito. Entretanto, frente à forma tripomastigota, a ausência de substituintes no anel aromático resultou em boa atividade tripanocida, visto que o composto **10** exibiu CI_{50} de $40,75 \pm 12,36 \mu\text{M}$, além disso, apresentou seletividade ao parasito, com valor de $\text{IS} = 13,4$.

Com relação aos ésteres derivados de monoterpenos (**12** e **13**), o derivado perílico (**12**) foi o que apresentou melhor atividade com valores de $CI_{50} = 188,16 \pm 68,63 \mu M$ e $103,96 \pm 13,51 \mu M$ frente à forma epimastigota e tripomastigota, respectivamente. Entretanto, foram os compostos que apresentaram o maior índice de toxicidade com valores de $IS = 1,5$ e $0,5$, respectivamente, frente à forma epimastigota do parasito.

O derivado **11**, que possui o radical furfuril, foi o que apresentou melhor atividade biológica frente à forma epimastigota ($CI_{50} = 28,21 \pm 5,34 \mu M$) e com atividade tripanocida semelhante à pipartina ($21,0 \mu M$), vale salientar que ambas as substâncias apresentam um átomo eletronegativo como heteroátomo em um sistema cíclico, que pode contribuir na potencialização da bioatividade, neste mesmo estudo o medicamento de referência, benzonidazol, apresentou CI_{50} de $42,7 \mu M$ (COTINGUIBA et al., 2009), além disso, **11** apresentou alto índice de seletividade ($IS > 22,2$) e não foi possível determinar com precisão a CC_{50} , pois o composto não apresentou toxicidade na maior concentração testada. Frente às células tripomastigotas, a CI_{50} foi de $47,02 \pm 8,70$, não havendo diferença significativa em comparação com **10**, além de apresentar IS semelhante ($>13,4$). Deste modo, foram realizados mais testes com este composto para averiguar o possível mecanismo de ação tripanocida.

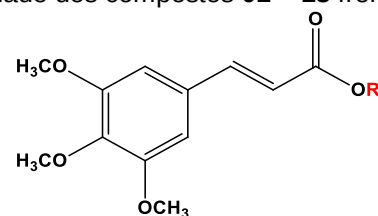
Tabela 8: Atividade tripanocida dos compostos **01 – 13** frentes à cepa Y de *T. cruzi*.

Derivado do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico

Éster	Radical	Epimastigota		Tripomastigota	
		Cl ₅₀ (µg/mL)	Cl ₅₀ (µM)	Cl ₅₀ (µg/mL)	Cl ₅₀ (µM)
01	Metila	31,5 ± 9,23	124,9 ± 36,6	-	-
02	Etila	85,68 ± 19,41	321,83 ± 72,89	-	-
03	Propila	90,1 ± 29,7	321,42 ± 105,95	-	-
04	Isopropila	74,5 ± 16,6	265,77 ± 59,22	-	-
05	Pentila	20,2 ± 2,2	65,50 ± 7,13	-	-
06	Decila	n*	n*	-	-
07	4-metoxibenzila	56,4 ± 13,8	157,37 ± 38,50	-	-
08	3-metoxibenzila	40,27 ± 4,2	112,36 ± 11,72	64,44 ± 19,01	179,80 ± 53,04
09	4-metilbenzila	61,80 ± 10,52	180,49 ± 30,73	39,92 ± 7,34	123,06 ± 21,44
10	Benzila	39,99 ± 14,03	121,66 ± 42,73	13,38 ± 4,06	40,75 ± 12,36
11	Furfurila	8,98 ± 1,70	28,21 ± 5,34	14,97 ± 2,77	47,02 ± 8,70
12	(-)-Perila	70,08 ± 25,56	188,16 ± 68,63	38,72 ± 5,03	103,96 ± 13,51
13	(-)-Bornila	155,1 ± 43,8	414,19 ± 116,97	-	-

Legenda: n* = Não foi possível determinar a Cl₅₀.

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 9: Citotoxicidade dos compostos **01 – 13** frentes à linhagem LLC-MK2.

Derivado do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico

LLCK-MK2				Índice de Seletividade	
Éster	Radical	CC ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µM)	Epimastigota	Tripomastigota
01	Metila	126,4 ± 25,4	501,1 ± 100,7	4,01	-
02	Etila	> 200,0	> 751,1	> 2,3	-
03	Propila	147,5 ± 15,6	526,2 ± 55,6	1,6	-
04	Isopropila	> 200,0	> 713,5	> 2,7	-
05	Pentila	> 200,0	> 648,6	> 9,9	-
06	Decila	> 200,0	> 528,4	n*	-
07	4-metoxibenzila	196,2 ± 26,6	547,4 ± 74,2	3,5	-
08	3-metoxibenzila	100,3 ± 21,7	279,9 ± 60,5	2,5	1,6
09	4-metilbenzila	182,8 ± 23,7	533,9 ± 69,2	3,0	4,6
10	Benzila	183,0 ± 47,8	557,3 ± 125,0	4,6	13,7
11	Furfurila	> 200,0	> 628,3	> 22,2	> 13,4
12	(-)-Perila	105,9 ± 13,8	284,3 ± 37,1	1,5	2,7
13	(-)-Bornila	71,2 ± 12,7	190,1 ± 33,9	0,5	-

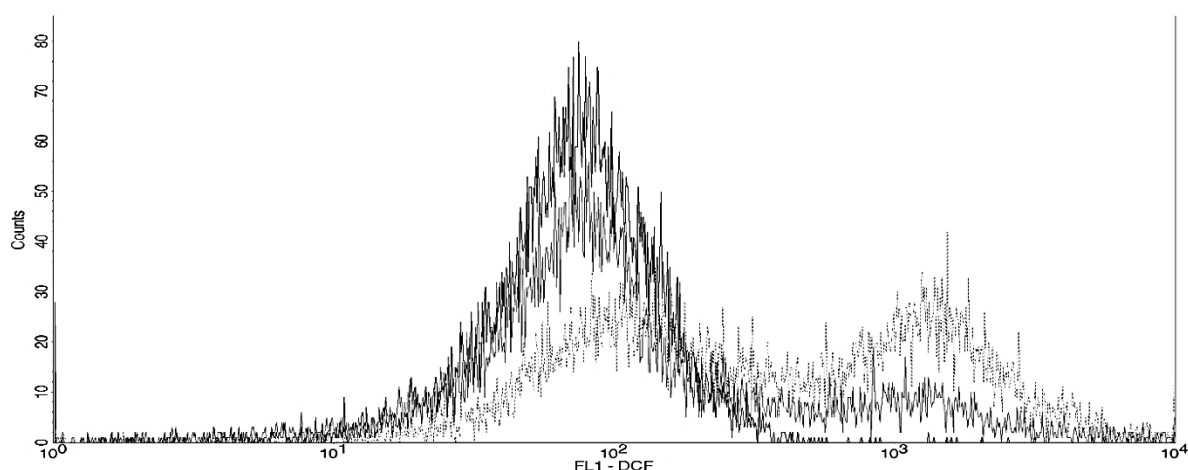
Legenda: n* = Não foi possível determinar a Cl₅₀.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.2. Análise de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas

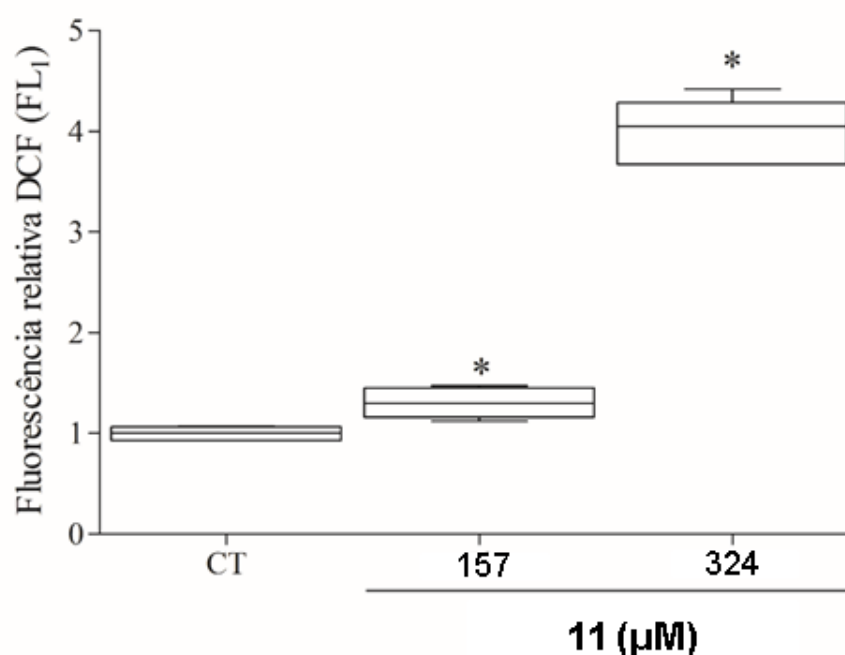
Para auxílio da determinação do mecanismo de ação de **11**, avaliou-se o aumento da concentração de EROs no interior das células epimastigotas de *T. cruzi*, através de técnicas fluorescentes utilizando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA)(CHEN et al., 2010). Os resultados estão ilustrados nas figuras 7 e 8.

Figura 7: Histograma de intensidade de marcação com DCFH-DA.



Legenda: DCFH-DA = Diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína. Grupos experimentais: controle – preto; **11** 157 μM – cinza escuro; **11** 324 μM – cinza claro.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8: Efeito de **11** sobre a produção de espécies reativas citoplasmáticas



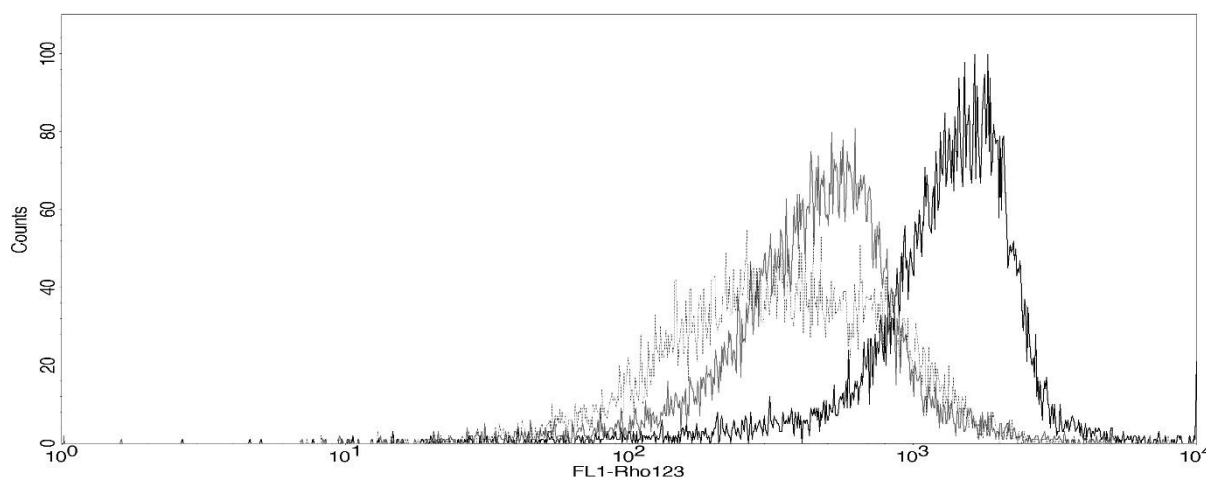
Fonte: Elaborado pelo autor.

Com base nas figuras 7 e 8, foi observado que houve aumento da fluorescência relativa em ambos os grupos tratados quando comparado com o controle (CT). O resultado indica que **11** induz stress oxidativo ao parasito, através do aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, semelhante à piplartina que possui efeito tripanocida através da indução do estresse oxidativo (VIEIRA et al., 2018).

4.4.3. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

Em adição, foi avaliada a capacidade de lesão mitocondrial exercida por **11** sobre o parasito, através do ensaio de potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizando o corante fluorescente rodamina 123 (Rho 123) (JOHNSON; WALSH, CHEN, 1980; POKORNÝ et al., 2014). Os resultados estão expostos nas figuras 9 e 10.

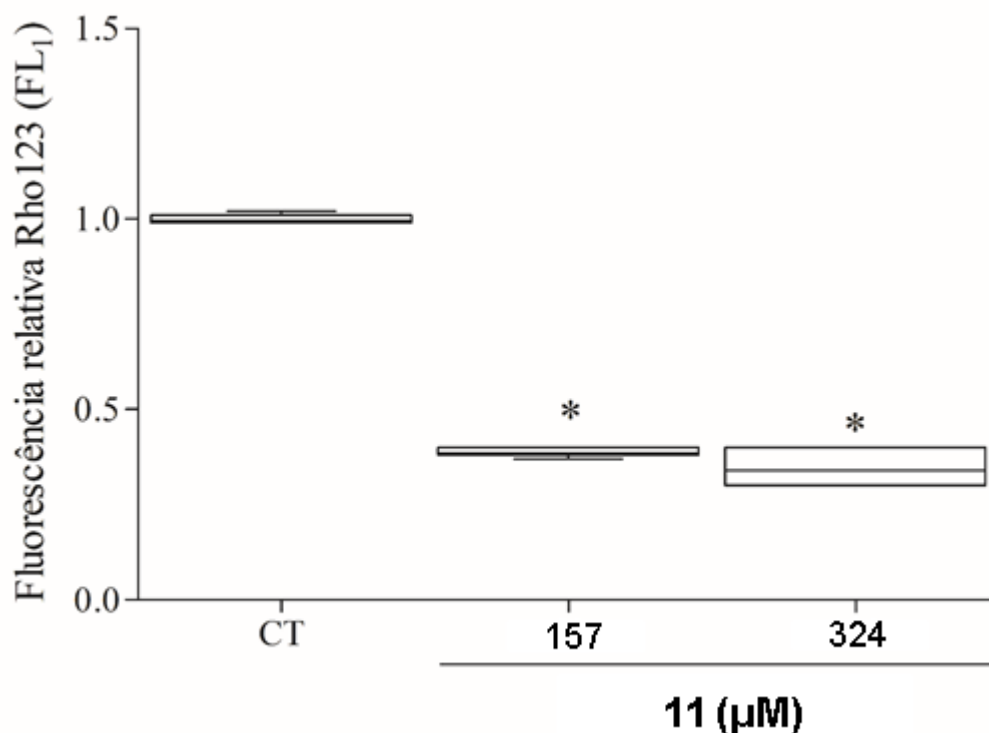
Figura 9: Histograma de intensidade de marcação com Rho 123



Legenda: Rho123 = Rodamina 123. Grupos experimentais: controle – preto; **11** 157 μM – cinza escuro; **11** 324 μM – cinza claro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10: Efeito de **11** sobre o potencial transmembrânico mitocondrial em epimastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com as figuras 9 e 10, conclui-se que **11** promoveu redução do acúmulo de rodamina no espaço intermembrânico da mitocôndria, indicando lesão mitocondrial, esses dados ajudam a explicar os possíveis mecanismos tripanocidas promovidos por **11**, resultados semelhantes foram obtidos através do tratamento das formas epimastigotas com o *p*-cumarato de pentila, ambos derivados cinâmicos (LOPES et al., 2019).

5.0. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente estudo foi possível preparar treze ésteres análogos à piplartina (**01 – 13**), estruturalmente relacionados; as reações ocorreram em uma única etapa através de três metodologias distintas. Os melhores rendimentos obtidos foram dos ésteres preparados a partir da esterificação de Fischer e todos os compostos foram caracterizados por meio das técnicas de espectroscopia de infravermelho e por RMN de ^1H e ^{13}C .

Na avaliação da atividade tripanocida dos treze compostos frente ao *T. cruzi*, o composto com radical furfurila (**11**), que possui um oxigênio como heteroátomo em um sistema cíclico, foi o derivado que apresentou atividade em ambas as formas do parasito com valores de $\text{Cl}_{50} = 28,21 \pm 5,34 \mu\text{M}$ e $47,02 \pm 8,70 \mu\text{M}$, frente às formas epimastigota e tripomastigota, respectivamente, além disso, apresentou alto índice de seletividade ao parasito ($\text{IS} > 10$). O mecanismo de ação tripanocida foi elucidado e ocorre através da indução de estresse oxidativo e lesão mitocondrial das células do parasito.

Em relação às características estruturais que influenciam a bioatividade dos ésteres, foi observado que o aumento da cadeia alquílica reduziu a atividade tripanocida, exceto para o derivado pentílico (**05**) que foi cerca de duas vezes mais potente que o derivado metílico (**01**). Além disso, a inserção de metoxilas e metilas nos derivados benzílicos (**07**, **08** e **09**) não promoveram alterações significativas da atividade tripanocida quando comparado com **10** (sem substituintes no anel aromático) frente à forma epimastigota. Entretanto, frente à forma tripomastigota **10** apresentou boa atividade tripanocida ($\text{Cl}_{50} = 40,75 \pm 12,36 \mu\text{M}$) e alto índice de seletividade ($\text{IS} = 13,7$), ao contrário dos derivados benzílicos substituídos.

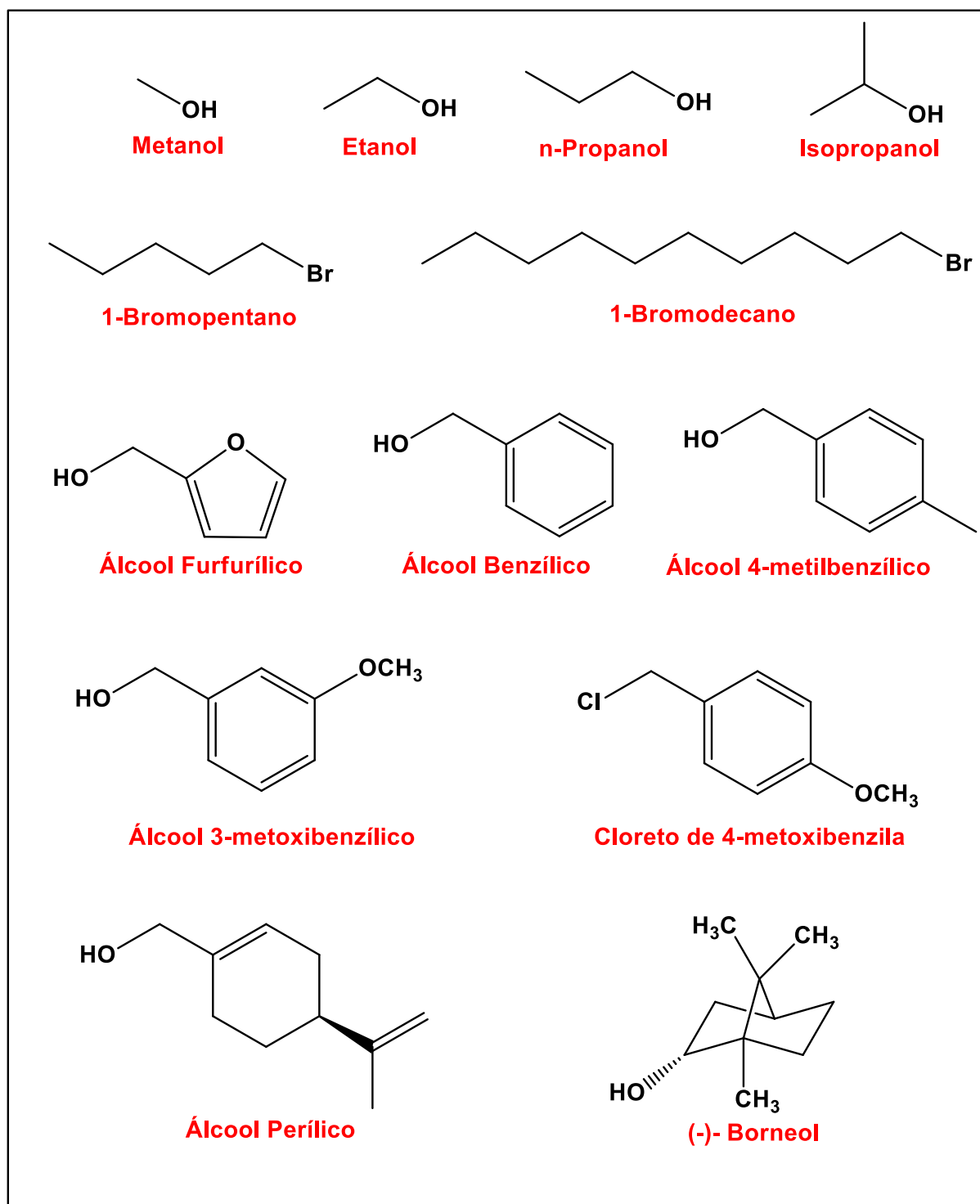
Com isso, conclui-se que foi possível estabelecer características químicas que podem servir de referência para o desenvolvimento de novos protótipos tripanocidas com melhor perfil biológico e outros estudos poderão ser realizados com os compostos **10** e **11** para pesquisa de novos fármacos com atividade tripanocida.

6.0. PARTE EXPERIMENTAL - QUÍMICA

6.1. Substâncias, materiais e métodos utilizados no preparo dos ésteres

Os experimentos químicos para o preparo dos derivados do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico foram conduzidos no Laboratório de Química Farmacêutica (LQF) da Universidade Federal da Paraíba (Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde).

Os reagentes utilizados no estudo apresentavam alto grau de pureza e foram obtidos de empresas como a Sigma Aldrich, Neon, Dinâmica, dentre outros. Para a preparação dos ésteres, foram utilizados 10 (dez) álcoois e 3 (três) haletos que foram submetidos a reações com o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico. Na figura 11 estão dispostos os álcoois e haletos de alquila e arila utilizados neste estudo.

Figura 11: Álcoois e haletos utilizados para o preparo de análogos sintéticos da piplartina

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2. Métodos cromatográficos

Para realizar a purificação das substâncias preparadas foi feita a técnica de cromatografia de adsorção em coluna (CC) utilizando sílica gel 60 ART 7734 da MERK (contendo partículas com dimensões que variam de 0,063 a 0,200 nm) como fase estacionária, havendo como suporte colunas de vidro cilíndricas. Enquanto a fase móvel foi preparada através de uma mistura entre hexano e acetato de etila (Hex:AcOEt) com gradiente crescente de polaridade.

Todas as etapas reacionais foram monitoradas através da técnica de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), em cromatofolhas de alumínio contendo sílica gel 60 F254 como fase estacionária e utilizando uma mistura entre hexano e acetato de etila em diferentes proporções como fase móvel. A visualização das placas cromatográficas ocorreu através da irradiação em câmara de luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm e utilizando revelador químico de H_2SO_4 a 5% em etanol, utilizando o aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58.

6.3. Métodos espectroscópicos

6.3.1. Ressonância Magnética Nuclear

Os compostos obtidos foram caracterizados através de espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Os equipamentos utilizados para as análises foram espectrômetros da Mercury-Varian operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C), e Varian-RMN- System operando a 500 MHz (^1H) e 125 MHz para (^{13}C); ambos os equipamentos estão localizados no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA/UFPB).

Os ésteres foram previamente solubilizados em CDCl_3 da MERK. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Adotou-se como referência de RMN de ^1H os sinais característicos dos hidrogênios presentes nas frações não deuteradas do clorofórmio ($\delta\text{H} = 7,26$ ppm), enquanto que para os espectros de RMN de ^{13}C , utilizou-se como referência os sinais do clorofórmio ($\delta\text{C} = 77,20$ ppm). Os desdobramentos provenientes do espectro de RMN de ^1H foram indicados de acordo com as convenções: *s* (Singleto), *d* (dubleto), *dd* (duplo

dubleto), *t* (triplete), *q* (quarteto), *quint* (quinteto), *sext* (sexteto), *sept* (septeto), *m* (multipleto).

Para a análise dos espectros de RMN de ^{13}C foi realizada a técnica de APT (*Attached Proton Test*) no qual os sinais dos carbonos quaternários e metilênicos se localizam na mesma face do espectro enquanto os sinais de carbonos metínicos e metílicos encontram-se na face oposta.

6.3.2. Espectroscopia de Infravermelho

Os compostos preparados também foram identificados através da técnica de IV, utilizando o espectrofotômetro por transformada de Fourier modelo Cary 630, da fabricante Agilent Technologies, localizado no Laboratório Analítico Multiusuário (CCS-UFPB). Para a realização da técnica, prepararam-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) contendo 1 mg de cada composto, as pastilhas foram formadas com o auxílio de uma prensa hidráulica e a frequência foi medida em cm^{-1} .

6.4. Ponto de Fusão

Para a análise do ponto de fusão dos derivados preparados, utilizou-se a placa de aquecimento de um aparelho da Microquímica Equipamentos LTDA, modelo MQAPF 302, localizada no Laboratório de Química Farmacêutica (CCS-UFPB). A faixa de temperatura do aparelho varia entre 10-350°C.

7.0. PARTE EXPERIMENTAL – BIOLÓGICA

7.1. Local de Trabalho

Os testes biológicos foram realizados no Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará, sob supervisão da professora Dra. Alice Maria Costa Martins

7.2. Linhagens Celulares

Neste estudo, foram utilizadas linhagens imortalizadas de células epiteliais

renais obtidas de macaco LLC-MK2 (*Rhesus monkey kidney*) e também as formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y.

7.3. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células LLC-MK2

Para a realização dos testes de citotoxicidade, utilizou-se o ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT). As células LLC-MK2 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), em seguida, foram expostas aos análogos em diferentes concentrações (25-200 µg/mL) e incubadas por 24 horas à 37°C. Com isso, adicionou-se MTT (Amresco, Solon, Ohio, USA; 5 mg/mL) e as células foram incubadas por 4 horas, quando foi adicionado 10% de dodecil sulfato de sódio (Vetec, São Paulo, Brasil) para solubilizar o formazan. As medidas da viabilidade celular foram realizadas em um leitor de microplacas (Biochrom® Asys Expert Plus) no comprimento de onda de 570 nm e a CC₅₀ foi definida. Para o cálculo da viabilidade celular relativa utilizou-se como controle negativo células tratadas apenas com solução salina tamponada de fosfato (PBS) estéril no meio. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas (MOSMANN, 1983).

7.4. Avaliação da atividade tripanocida *in vitro* em cepas Y de *T. cruzi*

7.4.1. Ensaio em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Inicialmente, os *Trypanosoma cruzi* foram cultivados na forma epimastigotas e distribuídos em placas de 96 poços a uma densidade de 10⁶ células/mL, em meio LIT (*Liver infusion tryptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico. Em seguida, as células foram tratadas com os análogos à piplartina, em diferentes concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 µg/mL) e incubadas a 28°C por 24 horas. Para quantificar a inibição de crescimento dos parasitos foi utilizada uma câmara de Neubauer (RODRIGUES et al., 2014) e a CI₅₀ foi definida. Para o cálculo da viabilidade celular relativa utilizou-se como controle negativo epimastigotas tratadas apenas com PBS estéril no meio (viabilidade de 100%). Os experimentos foram conduzidos em triplicatas.

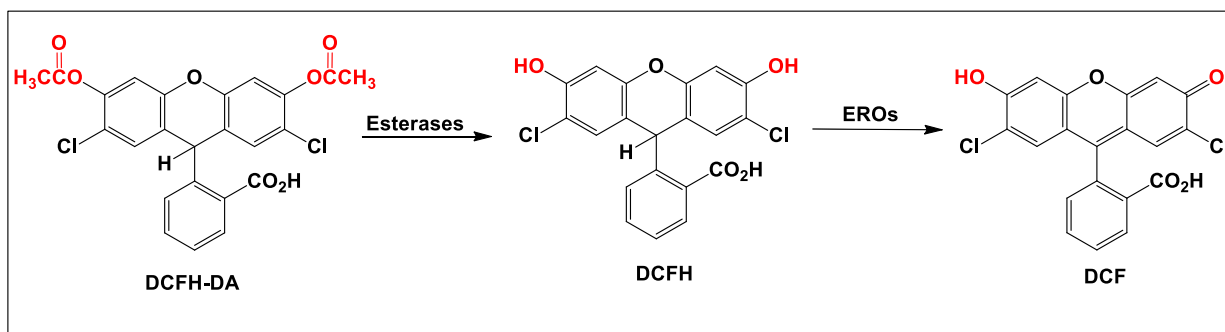
7.4.2. Ensaio em formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Primeiramente, obtiveram-se as formas tripomastigotas através da infecção de células LLC-MK2 com o parasito, deste modo, as células foram incubadas por 24 horas em frascos T-25/75cm² a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ em meio DMEM (Vitrocell, São Paulo, Brasil) suplementado com 2% de SFB e 1% de antibiótico. Posteriormente, as formas tripomastigotas foram distribuídas em placas de 96 poços e tratadas com os análogos à piplartina em diferentes concentrações (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 µg/mL) e incubadas a 37°C por 24 horas. A avaliação da viabilidade celular foi feita por contagem e a CI₅₀ foi definida (MEIRA et al. 2015). Para o cálculo da viabilidade celular relativa utilizou-se como controle negativo células tratadas apenas com PBS estéril no meio (viabilidade de 100%). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

7.5. Análise de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas

Avaliou-se o aumento da concentração de EROs no citoplasma de células epimastigotas tratadas com **11** utilizando DCFH-DA, molécula capaz de atravessar membranas em que, uma vez no meio intracelular, sofre clivagem por esterases citoplasmáticas formando o DCFH (forma reduzida de 2'-7'-diclorofluoresceína) que é incapaz de atravessar membranas. Deste modo, o DCFH interage com EROs citoplasmáticas formando o DCF (forma oxidada de 2'-7'-diclorofluoresceína) que emite fluorescência verde, de modo que, a intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à concentração citoplasmática de EROs (CHEN et al., 2010). O esquema 9 ilustra as reações envolvendo o DCFH-DA.

Esquema 9: Reações envolvendo o DCFH-DA.



Fonte: Adaptado de DIKALOV, GRIENDLING, HARRISON, 2007.

O procedimento experimental foi realizado da seguinte forma: Foram adicionadas 10⁶ células epimastigotas/mL em placas de 24 poços na presença de **11**

(157 μM e 324 μM). Após 3 horas, adicionou-se 10 μL de uma solução contendo DCFH-DA (2 mM em dimetilsufóxido), obtendo-se 20 μM de concentração final. Após 24 horas, as células foram centrifugadas (2800 RPM por 7 minutos), lavadas com PBS e ressuspensas em 500 μL de PBS para análise em citômetro de fluxo.

Com isso, o nível de marcação em cada grupo foi analisado pela média geométrica da intensidade de fluorescência (KESSLER et al., 2013) e os resultados foram expressos como intensidade relativa de fluorescência, segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Fluorescência relativa} = \frac{m\text{TESTE}}{m\text{CONTROLE}}$$

Onde:

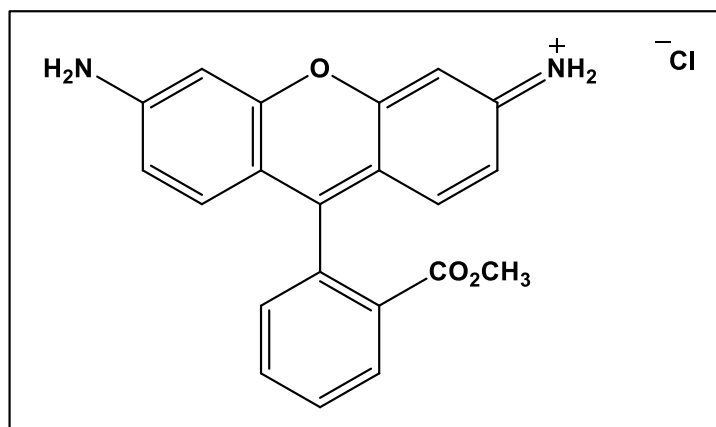
mTESTE = média geométrica do grupo analisado;

mCONTROLE = valor médio da média geométrica do grupo controle.

7.6. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

O potencial transmembrânico mitocondrial foi averiguado através da utilização do corante fluorescente rodamina 123 (Rho123) (figura 12) (JOHNSON; WALSH, CHEN, 1980; POKORNÝ et al., 2014)

Figura 12: Estrutura química da rodamina 123.

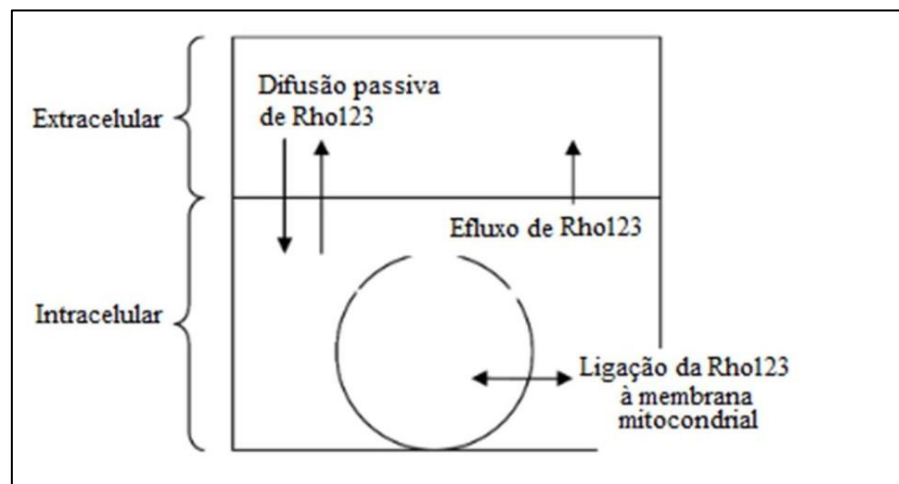


Fonte: JOHNSON et al., 1980.

A Rho123 é um corante lipofílico e catiônico que, normalmente, se acumula no espaço intermembrânico da mitocôndria devido à afinidade pelos íons H^+ , quando

há redução da concentração de íons H^+ no espaço intermembrânico, o acúmulo de Rho123 diminui. Deste modo, alterações no $\Delta\Psi_m$ podem ser medidas através da redução da fluorescência verde emitida pela Rho123 (ZHANG et al., 2011). O mecanismo de marcação mitocondrial está ilustrado na figura 13.

Figura 13: Mecanismo de marcação mitocondrial utilizando a Rho123.



Fonte: LOPES et al., 2019.

Inicialmente, adicionou-se **11** (157 e 324 μM) e formas epimastigotas (10^6 células/mL) em placas de 24 poços. Após 24 horas, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 100 μL de PBS e adicionou-se 5 μL de solução de Rho123 (200 $\mu g/mL$ em etanol absoluto), com concentração final de 10 $\mu g/mL$. Com isso, as amostras foram incubadas no escuro por 30 minutos, lavadas com PBS e ressuspensas em PBS (500 $\mu L/tubo$) para análise por citometria de fluxo (SAMPAIO et al., 2016). Os resultados foram avaliados pela intensidade relativa de fluorescência, calculado conforme descrito anteriormente.

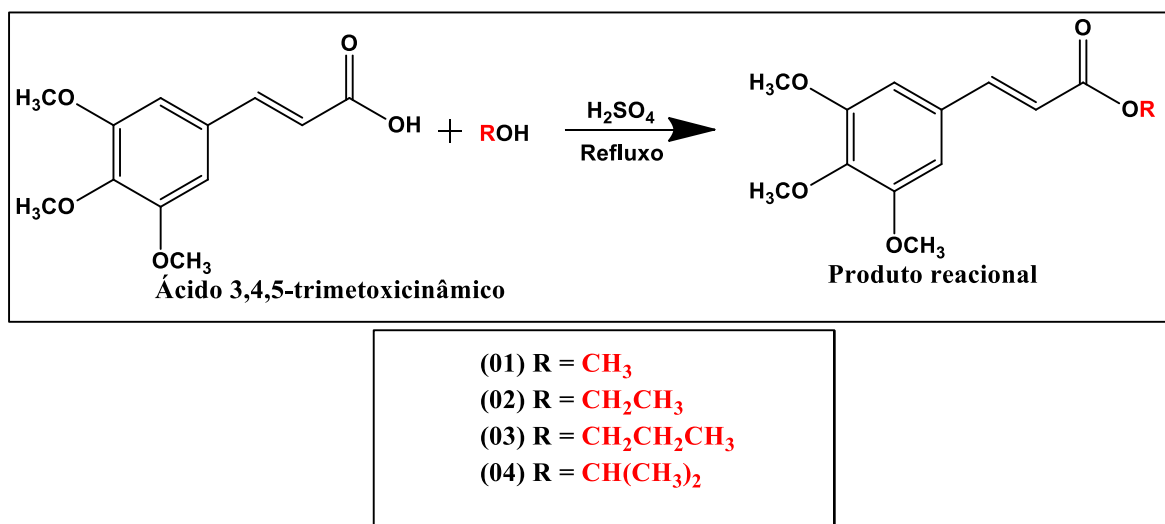
7.7. Análise Estatística

Para análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão médio (E.P.M) e os dados foram calculados usando a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Dunnett. A significância foi definida como * $p < 0,05$.

8.0. PREPARAÇÃO DOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS DA PIPLARTINA

8.1. Preparação da primeira coleção de ésteres (01- 04)

Esquema 6: Reação de esterificação de Fischer utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e álcoois alifáticos.

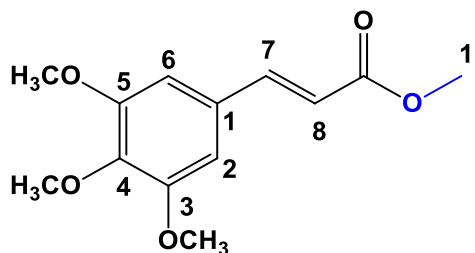


Fonte: Elaborado pelo autor.

Os ésteres foram preparados conforme o seguinte procedimento geral: Em um balão de fundo chato de 50 mL, adicionou-se 0,1g de ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (0,42 mmol) e 20 mL do respectivo álcool, em seguida, foi adicionado de forma lenta 0,2 mL de H₂SO₄ concentrado. Deste modo, a reação foi conduzida sob refluxo e agitação magnética por 6 à 24 horas. Todas as etapas de reação foram monitoradas por CCDA (DE FARIAS et al., 2016; SILVA et al., 2019). Após o término da reação, o álcool foi removido parcialmente sob pressão reduzida, em seguida, transferiu-se o produto para um funil de separação e realizou-se uma extração com 10 mL de água destilada e (3 x 10 mL) de acetato de etila, separando-se a fase orgânica da fase aquosa. A fase orgânica foi tratada com (3 x 10 mL) bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 5%, a fim de eliminar o resíduo do ácido orgânico, em seguida, lavou-se a fase orgânica com 10 mL de água destilada e por fim, secou-se com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e filtrou-se o produto reacional. Para a purificação do éster **04** foi necessário realizar uma cromatografia de adsorção em coluna em sílica gel 60, utilizando como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila com gradiente crescente de polaridade, procedimento acompanhado por CCDA (DE FARIAS et al., 2016; SILVA et al., 2019).

8.2. Dados espectroscópicos dos ésteres 01 – 04

8.2.1. 01: 3,4,5-trimetoxicinamato de metila



Aspecto: Sólido branco;

Rendimento: 91,1% (96,5 mg);

Ponto de Fusão: 95-96°C (lit. 95-98°C, KUMAR et al., 2005);

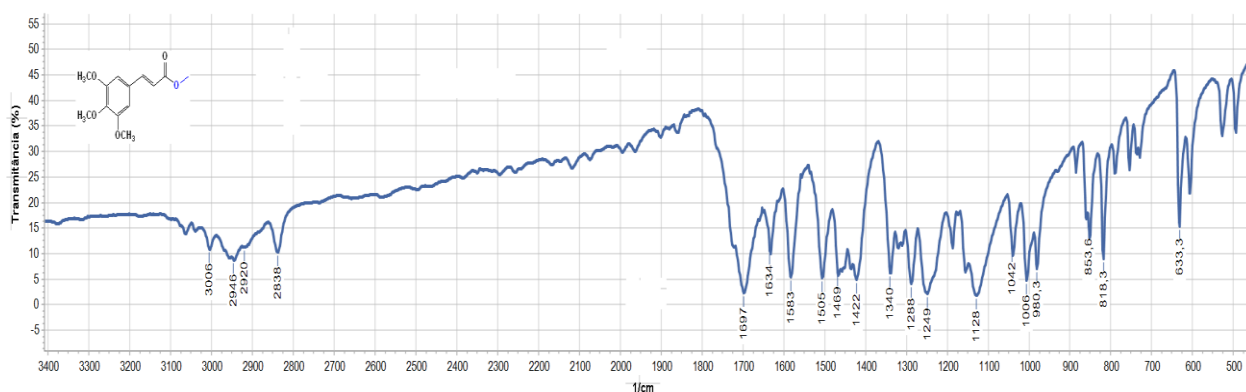
Tempo de Reação: 6 horas;

Fator de Retenção: 0,55 (7:3 Hex/AcOEt)

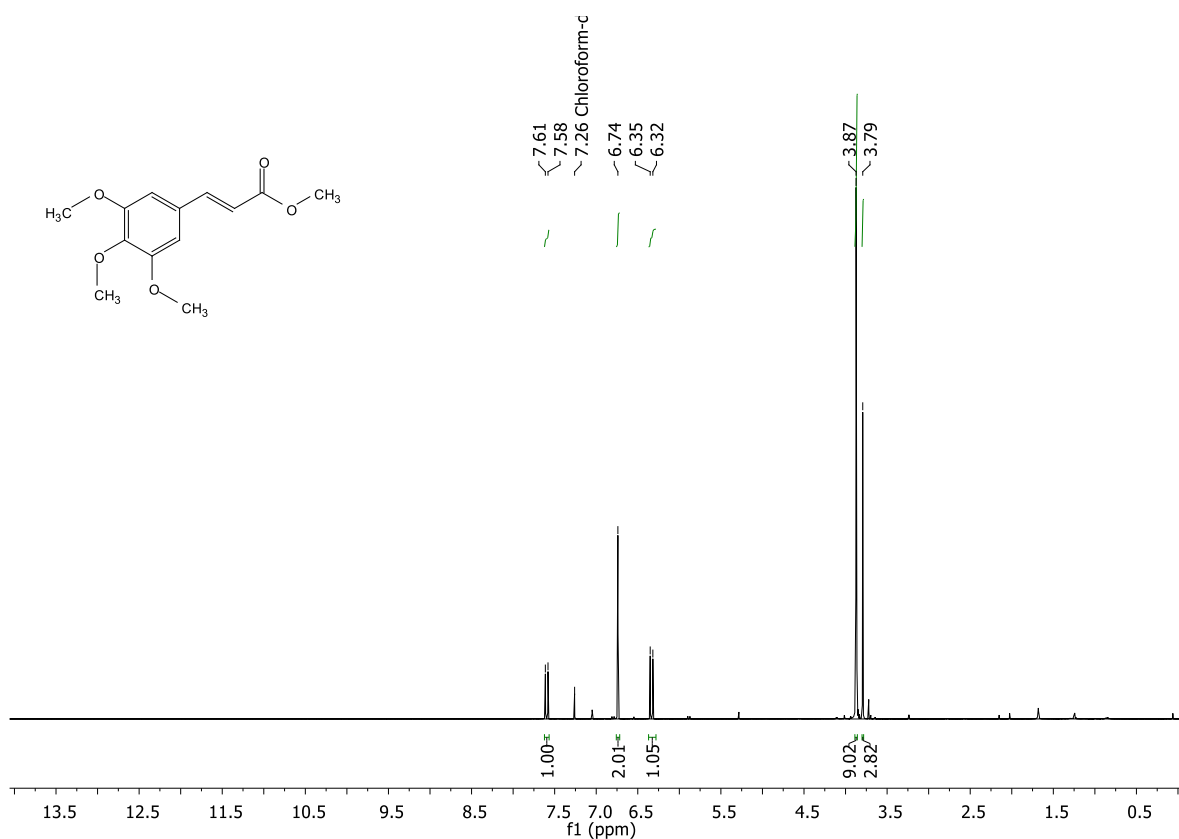
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7,60 (d, H-7, $J=15,92$ Hz, H=1), 6,74 (s, H-2; H-6, H=2), 6,33 (d, H-8, $J=15,92$ Hz, H=1), 3,87 (s, 3,4,5-MeO; H=9), 3,79 (s, H-1', H=3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 167,4 (C=O); 153,5 (C-3, C-5); 144,9 (C-7); 140,3 (C-4); 130,0 (C-1); 117,1 (C-8); 105,4 (C-2, C-6); 61,1 (C4-MeO); 56,3 (C3-MeO, C5-MeO); 51,8 (C-1')

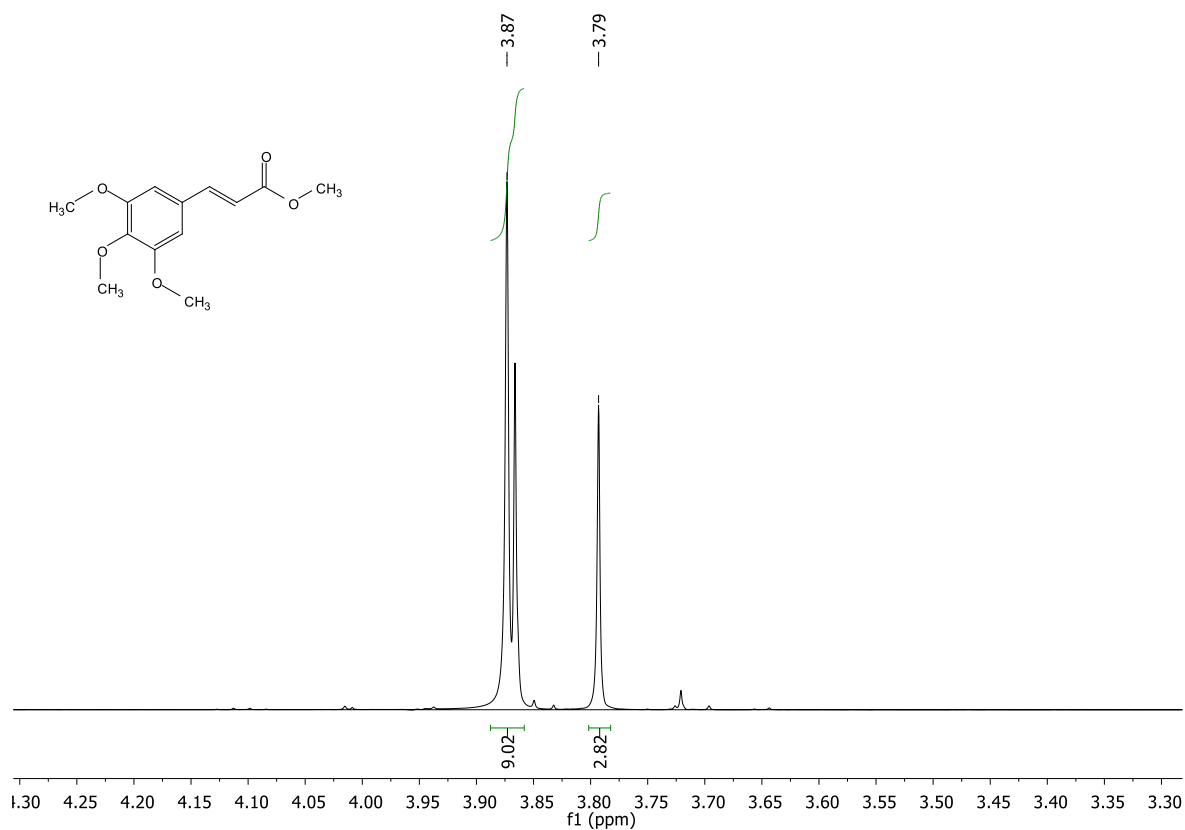
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3006 (C-H sp^2); 2946, 2838 (C-H sp^3); 1697 (C=O); 1634, 1469 (C=C); 1583, 1505, 818 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1249, 1128 (C-O éster) (KUMAR et al., 2005);



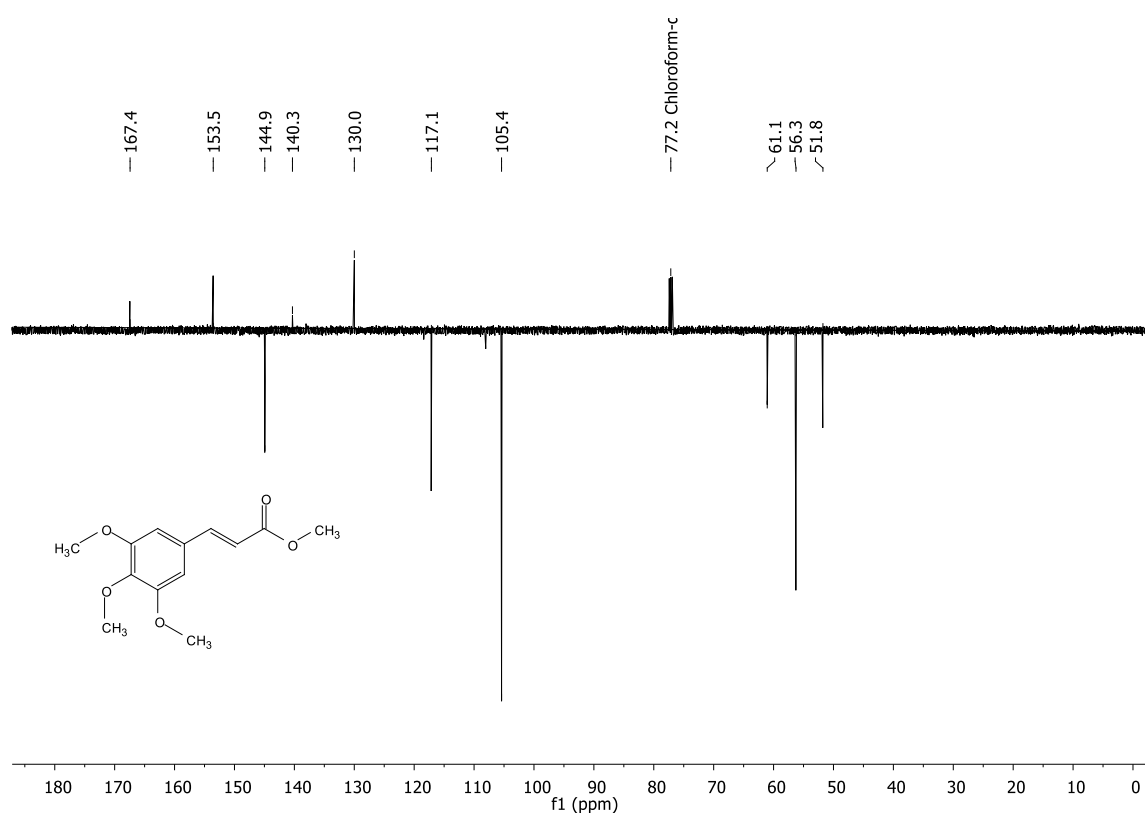
Espectro 1: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (01).



Espectro 2: Espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (01).

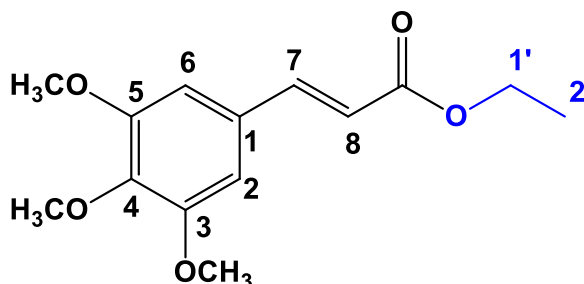


Espectro 3: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (01).



Espectro 4: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de metila (01).

8.2.2. 02: 3,4,5-trimetoxicinamato de etila



Aspecto: Sólido branco;

Rendimento: 82,5% (92,2 mg);

Ponto de Fusão: 65-66°C (lit. 68-69°C, JUNG et al., 2013)

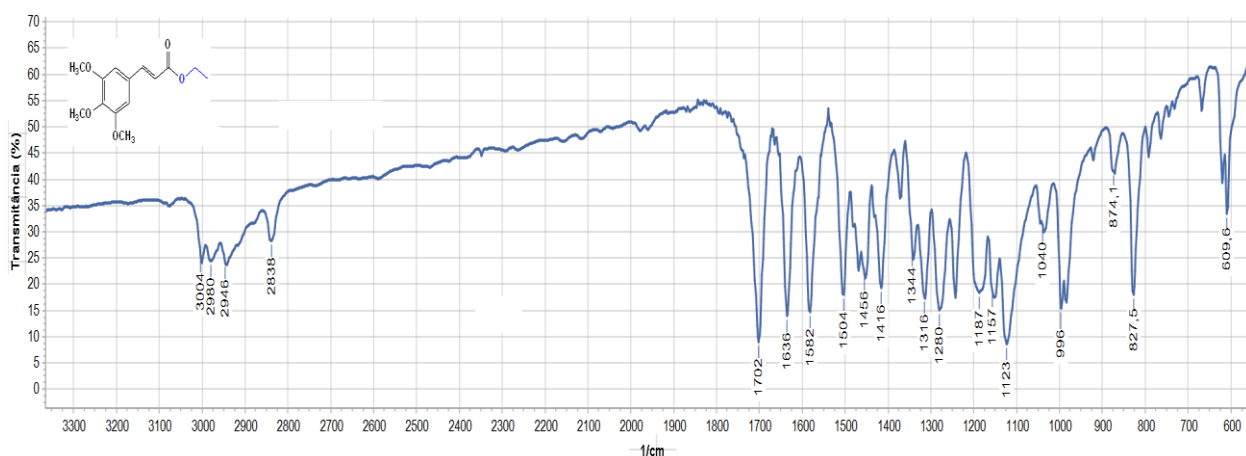
Tempo de Reação: 6 horas;

Fator de Retenção: 0,56 (7:3 Hex/AcOEt)

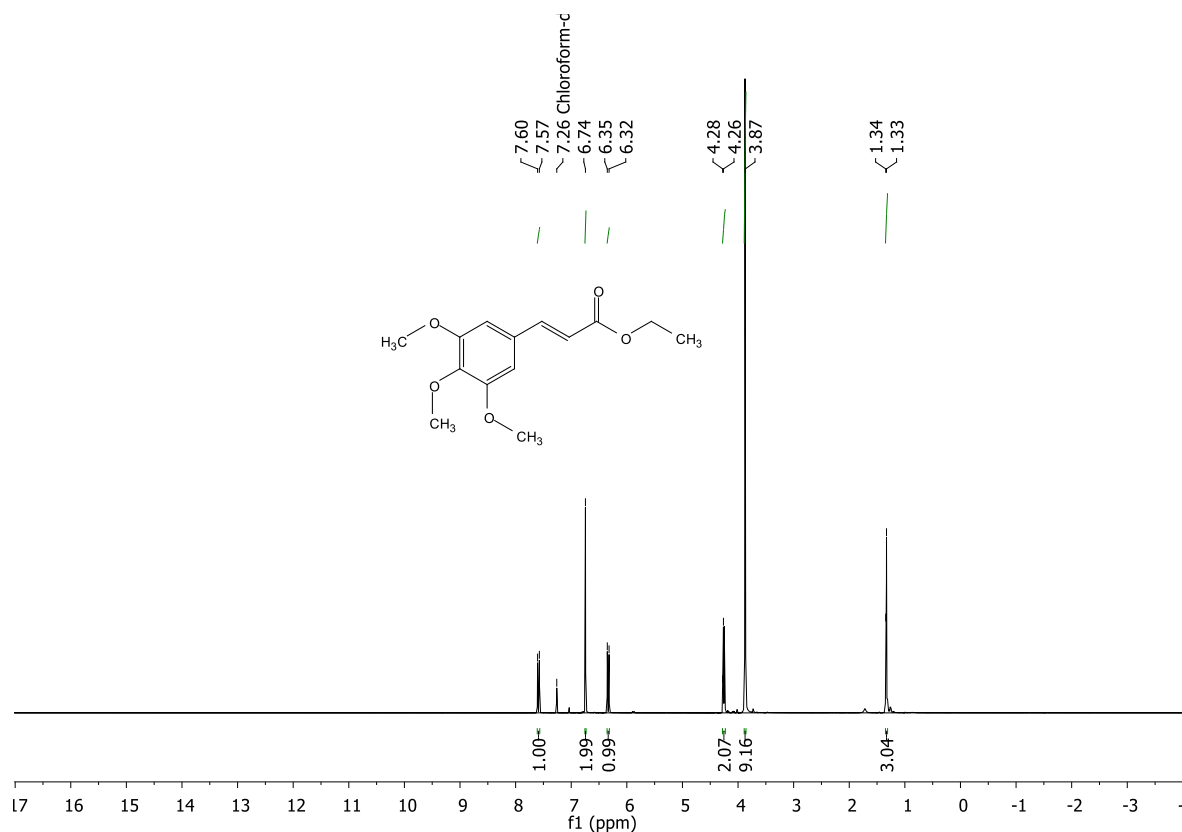
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7,59 (d, H-7, $J=15,91$ Hz, H=1), 6,74 (s, H-2; H-6, H=2), 6,34 (d, H-8, $J=15,91$ Hz, H=1), 4,25 (q, H-1', $J=7,13$ Hz, H=2); 3,87 (s, 3,4,5-MeO, H=9), 1,34 (t, H-2', $J=7,13$ Hz, H=3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 167,2 (C=O); 153,8 (C-3,C-5); 144,8 (C-7); 140,5 (C-4); 130,3 (C-1); 118,0 (C-8); 105,7 (C-2, C-6); 61,3 (C4-MeO) 60,9 (C-1'); 56,5 (C3-MeO, C5-MeO); 14,7 (C-2')

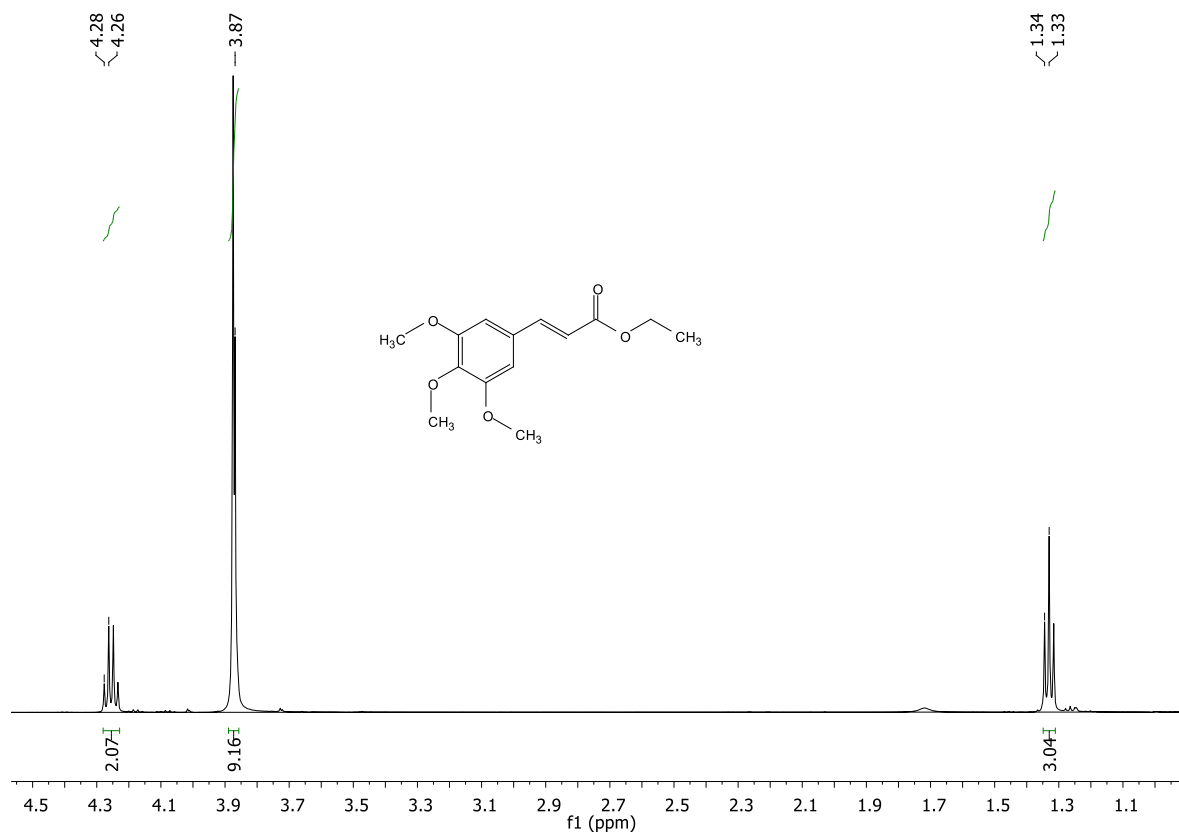
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3004 (C-H sp^2); 2946, 2838 (C-H sp^3); 1702 (C=O); 1636, 1456 (C=C); 1582, 1504, 827 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1280, 1123 (C-O éster) (JUNG et al., 2013).



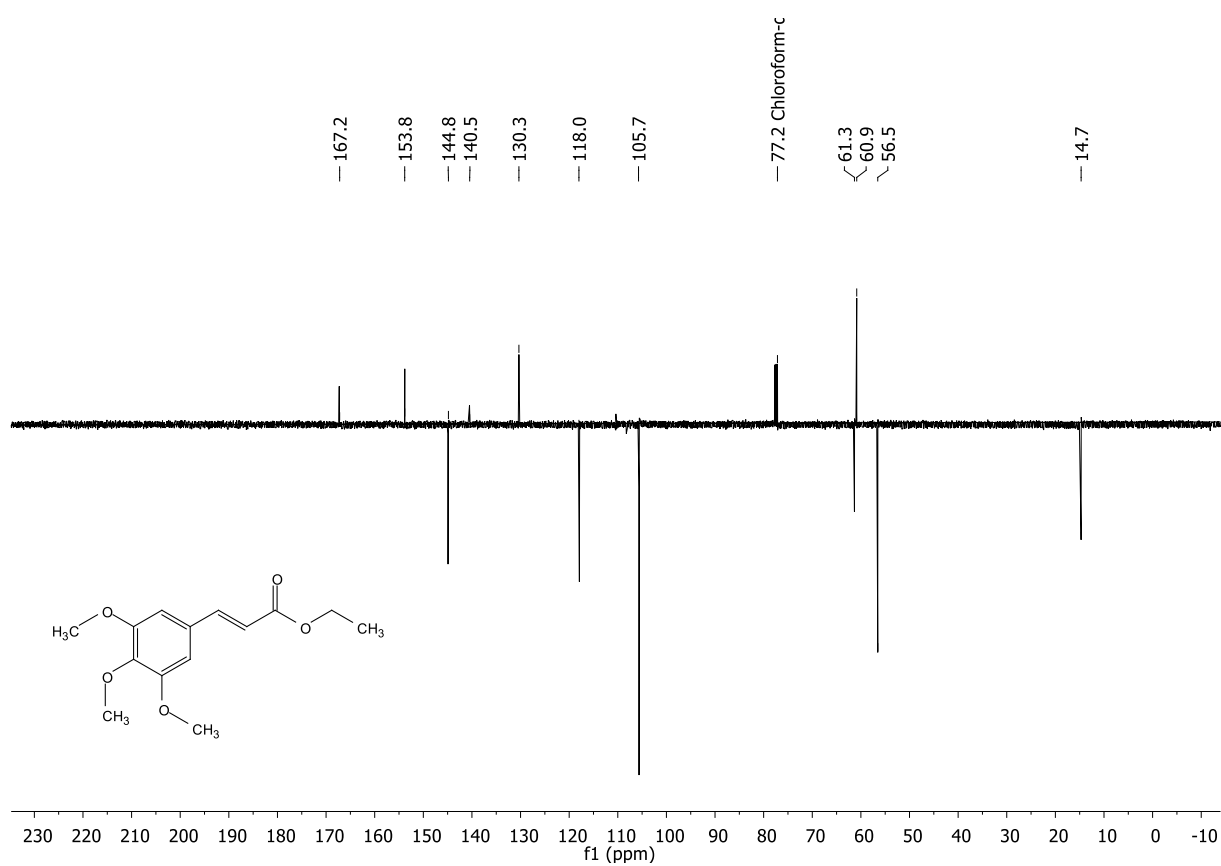
Espectro 5: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de etila (02).



Espectro 6: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de etila (**02**).

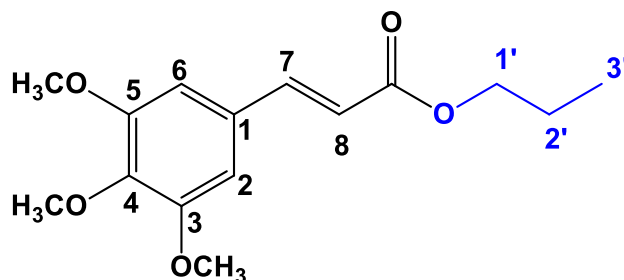


Espectro 7: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de etila (**02**).



Espectro 8: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de etila (**02**).

8.2.3. 03: 3,4,5-trimetoxicinamato de propila



Aspecto: Sólido bege;

Rendimento: 79,9% (94,0 mg);

Ponto de Fusão: 73-74 °C (lit. 58°C, KUMAR et al., 2005);

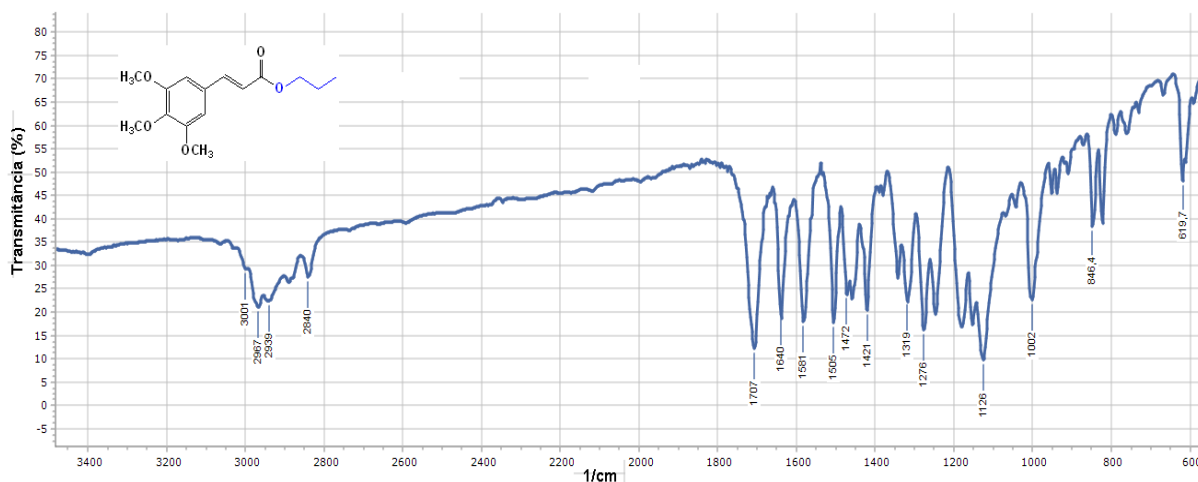
Tempo de Reação: 6 horas;

Fator de Retenção: 0,58 (7:3 Hex/AcOEt)

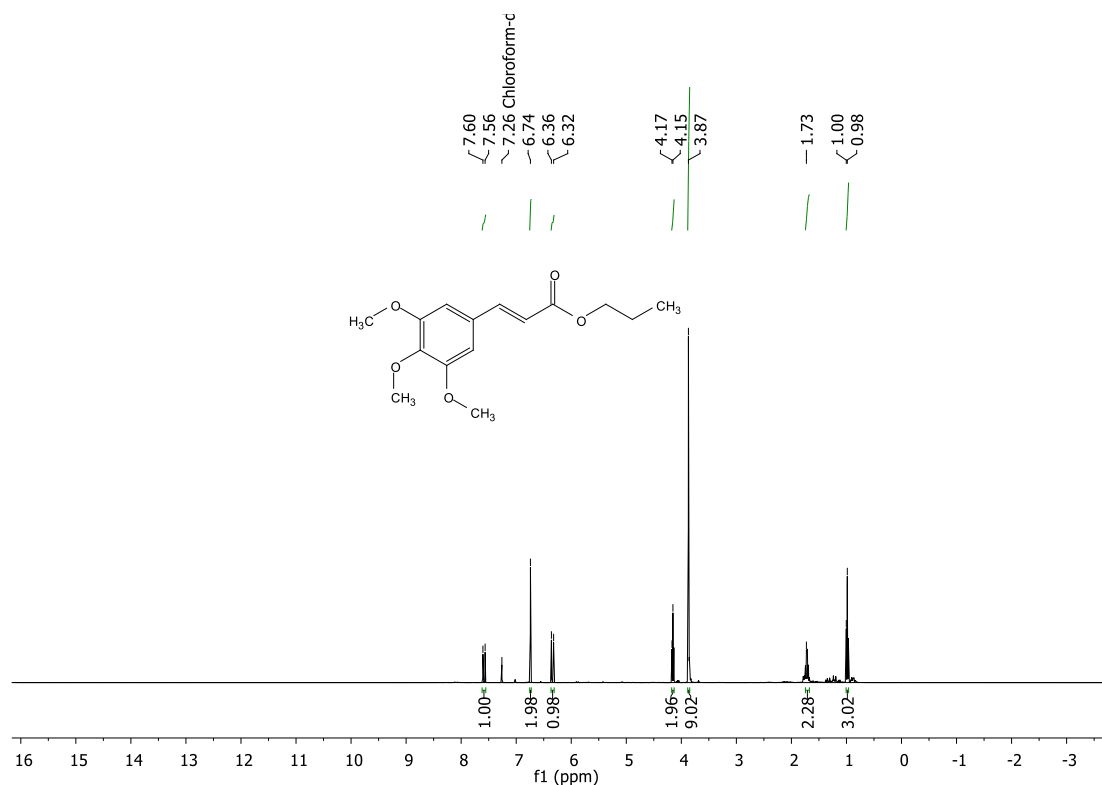
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7,58 (d, H-7, $J=15,90$ Hz, H=1), 6,74 (s, H-2; H-6, H=2), 6,34 (d, H-8, $J=15,90$ Hz, H=1), 4,16 (t, H-1', $J=6,73$ Hz, H=2); 3,87 (s, 3,4,5-MeO, H=9), 1,74-1,67 (m, H-2', H=2), 0,99 (t, H-3', $J = 7,41$ Hz, H =3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 167,2 (C=O); 153,5 (C-3, C-5); 144,7 (C-7); 140,2 (C-4); 130,1 (C-1); 117,6 (C-8); 105,3 (C-2, C-6); 66,3 (C-1'); 61,0 (C4-MeO); 56,2 (C3-MeO, C5-MeO); 22,2 (C-2'); 10,6 (C-3')

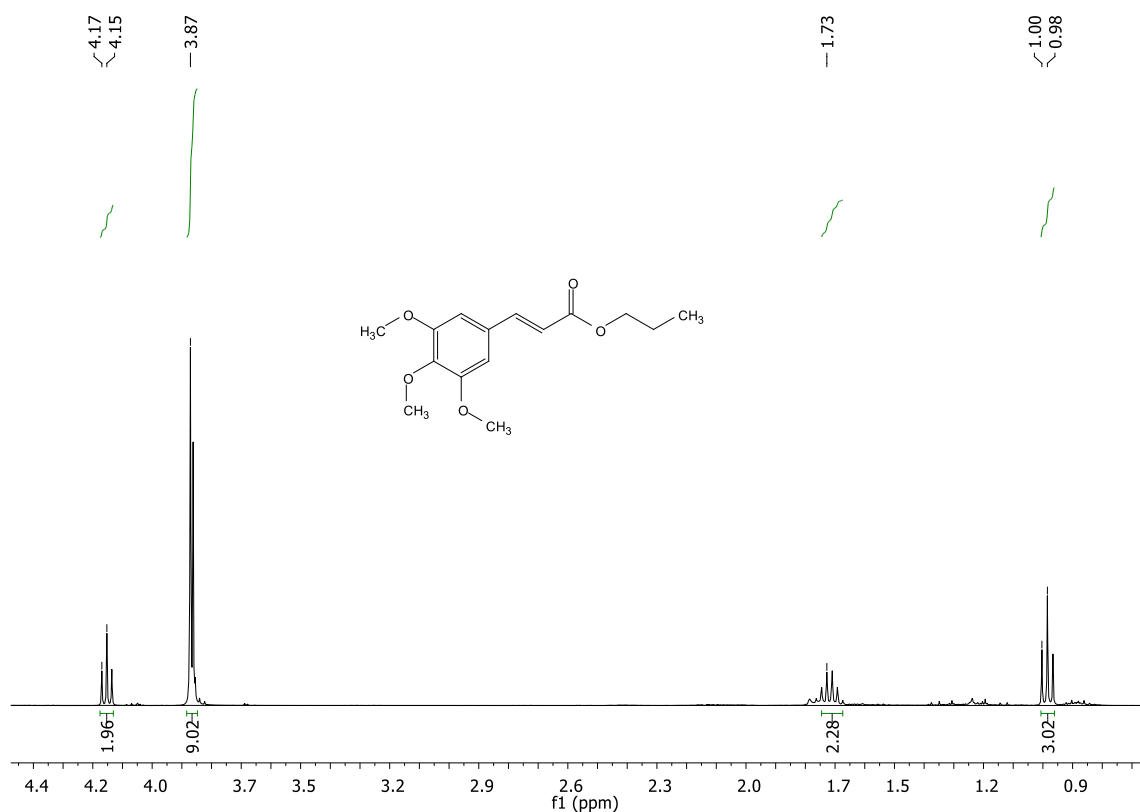
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3001 (C-H sp^2); 2939, 2840 (C-H sp^3); 1707 (C=O); 1640, 1472 (C=C); 1581, 1505, 846 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1276, 1126 (C-O éster) (KUMAR et al., 2005).



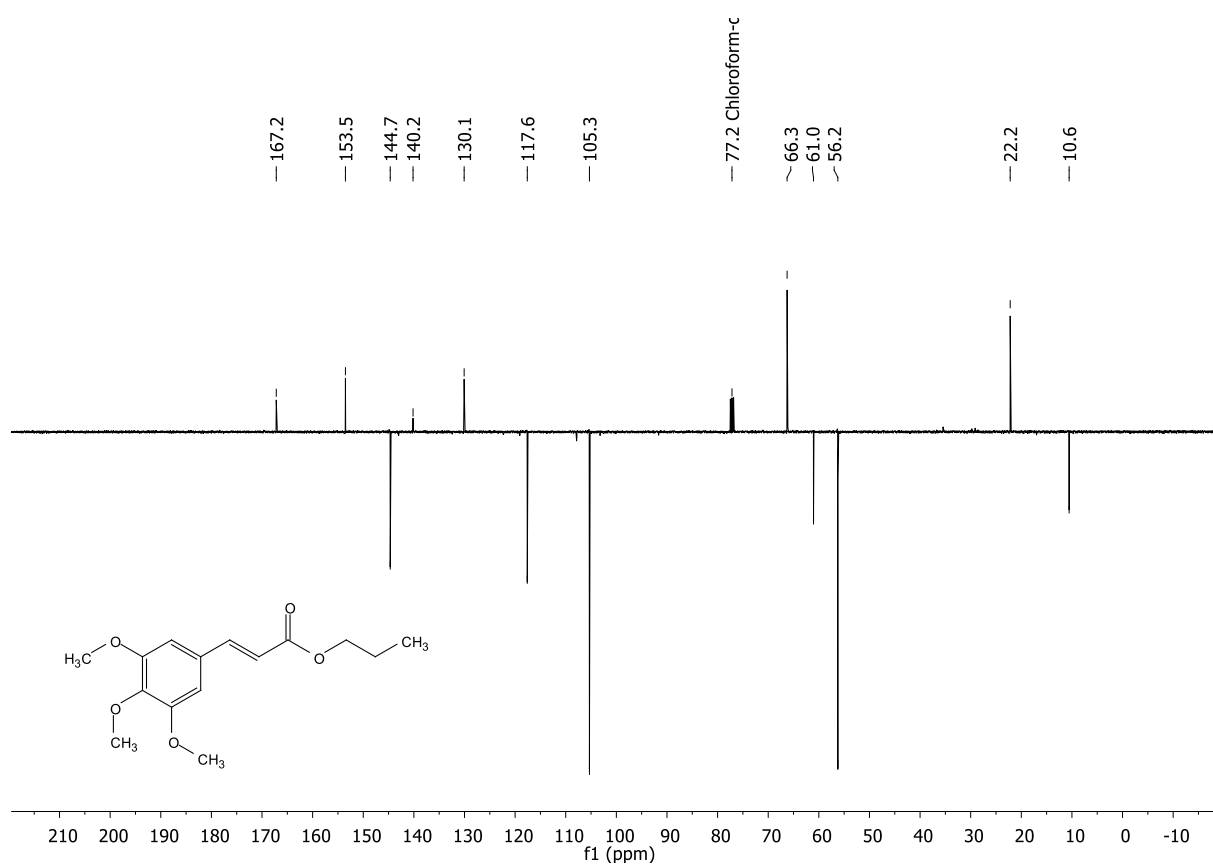
Espectro 9: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de propila (03).



Espectro 10: Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de propila (**03**).

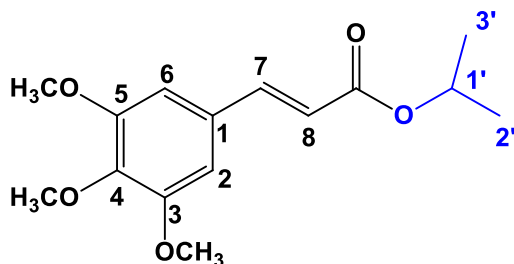


Espectro 11: Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de propila (**03**).



Espectro 12: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de propila (03).

8.2.4. 04: 3,4,5-trimetoxicinamato de isopropila



Aspecto: Óleo marrom;

Rendimento: 58,8% (69,2 mg);

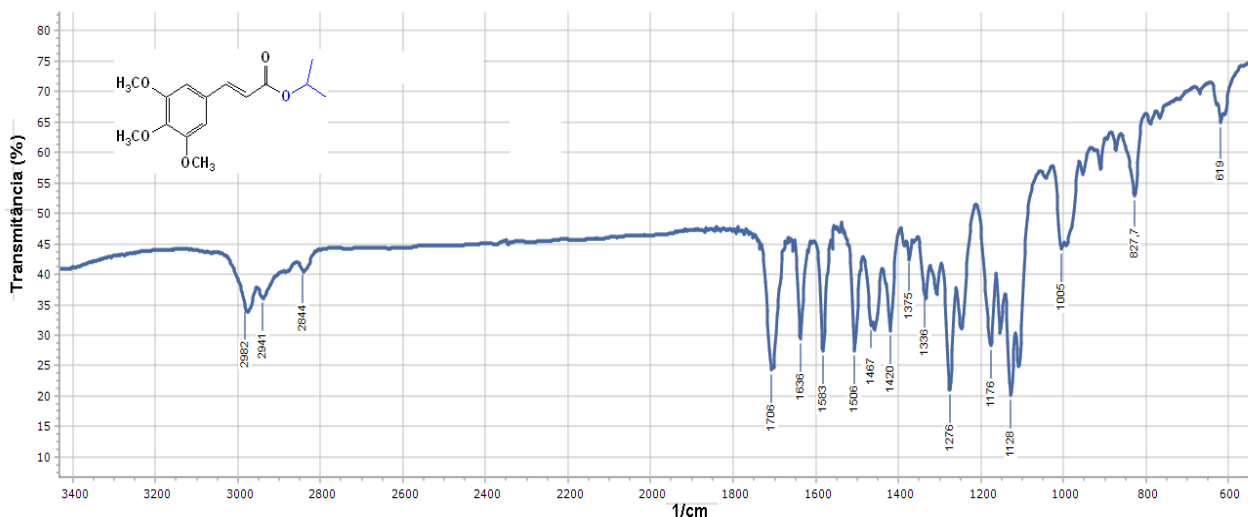
Tempo de Reação: 24 horas;

Fator de Retenção: 0,60 (7:3 Hex/AcOEt)

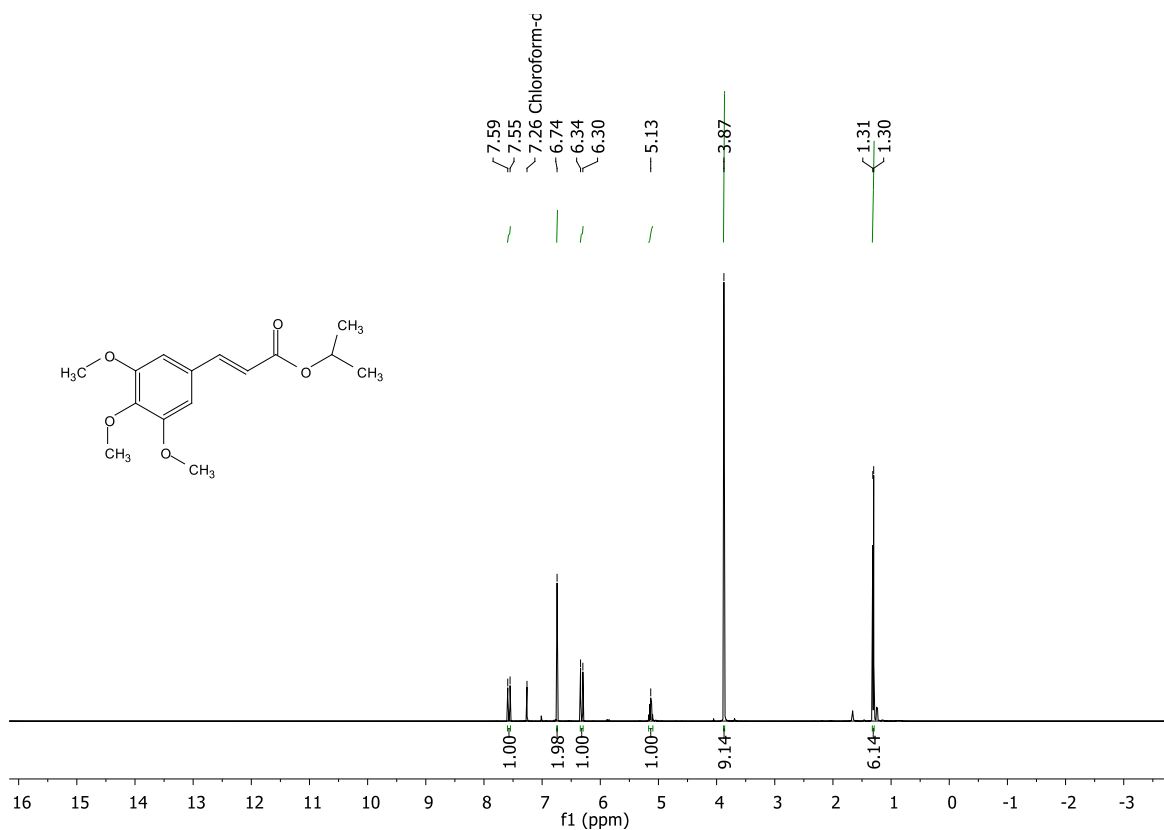
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7,57 (*d*, H-7, $J=15,89$ Hz, H=1), 6,74 (*s*, H-2; H-6, H=2), 6,32 (*d*, H-8, $J=15,89$ Hz, H=1), 5,16 – 5,10 (*m*, H-1', H=1); 3,87 (*s*, 3,4,5-MeO, H=9), 1,31 (*d*, H-2'; H-3', $J=6,26$ Hz, H=6)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 166,6 (C=O); 153,5 (C-3, C-5); 144,4 (C-7); 140,1 (C-4); 130,2 (C-1); 118,2 (C-8); 105,3 (C-2, C-6); 67,9 (C-1'); 61,1 (C4-MeO); 56,3 (C3-MeO, C5-MeO); 22,1 (C-2', C-3')

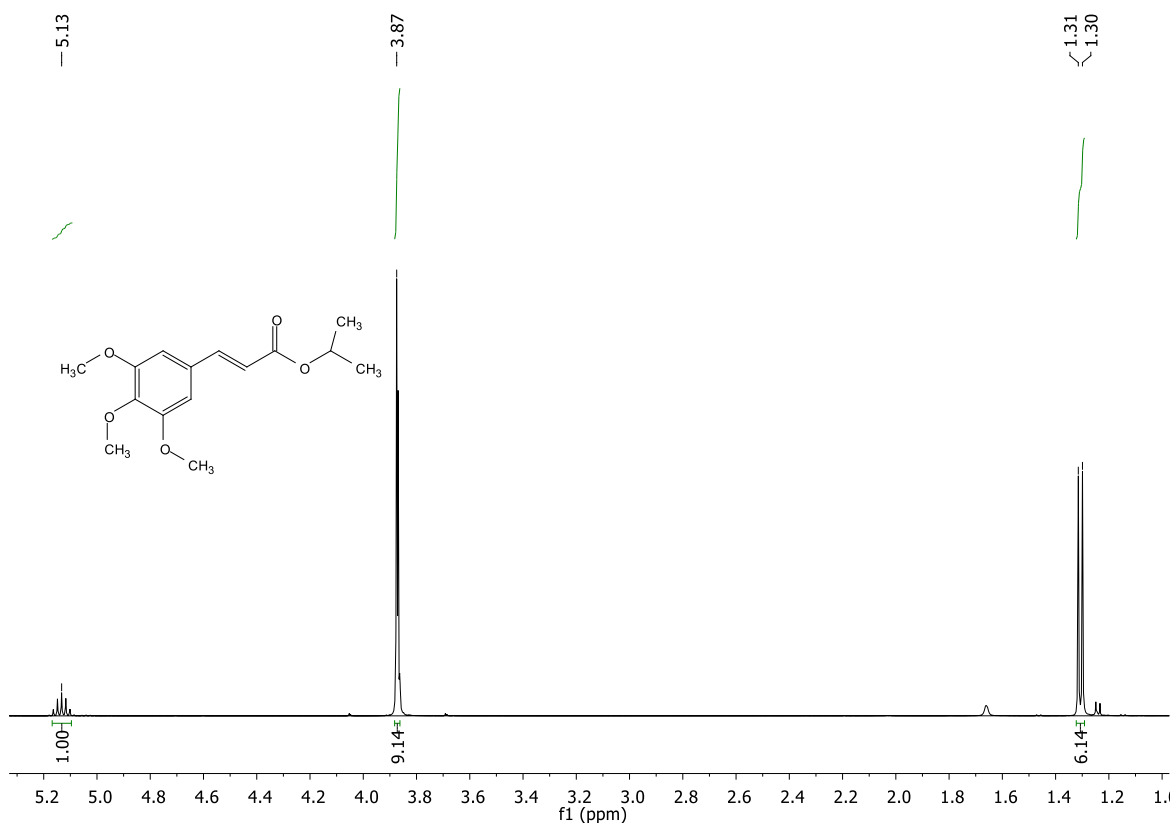
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 2982 (C-H sp^2); 2941, 2844 (C-H sp^3); 1706 (C=O); 1636, 1467 (C=C); 1583, 1506, 828 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1276, 1128 (C-O éster) (NÓBREGA et al., 2018).



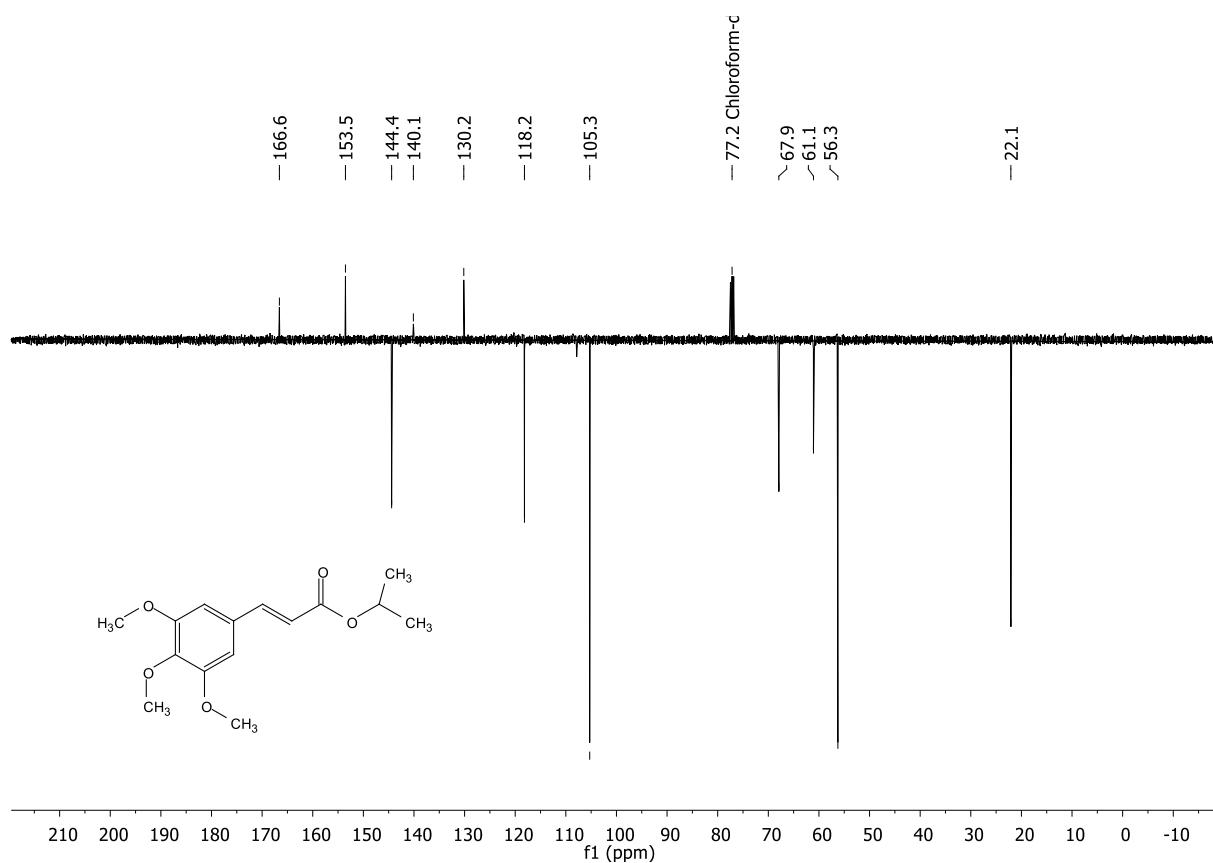
Espectro 13: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de isopropila (04).



Espectro 14: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de isopropila (04).



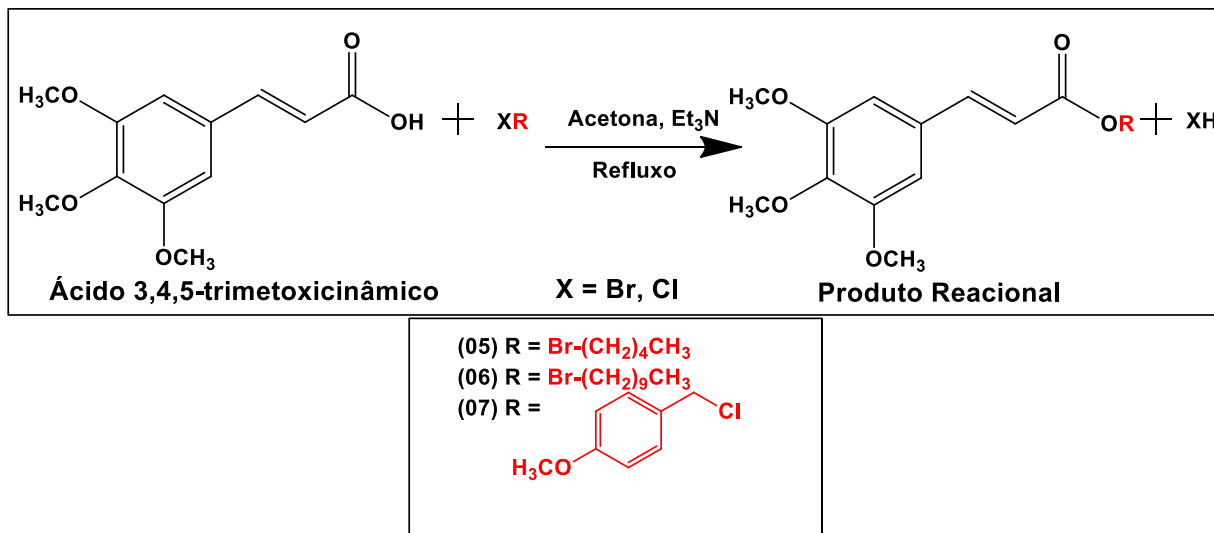
Espectro 15: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de isopropila (04).



Espectro 16: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de isopropila (04).

8.3. Preparação da segunda coleção de ésteres (05- 07)

Esquema 7: Reação de esterificação utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e haletos de alquila e arila.

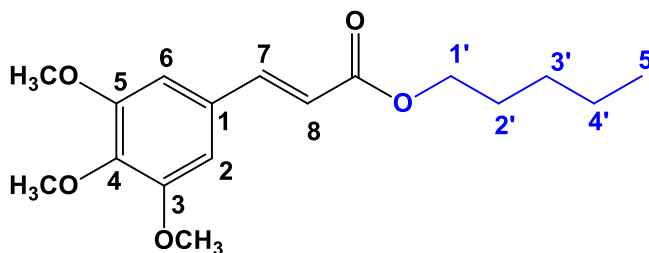


Fonte: Elaborado pelo autor

Em um balão de fundo chato de 50 mL, adicionou-se 0,1 g (0,42 mmol) do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e 0,43 mmol do haleto correspondente, dissolvendo-os em 5 mL de acetona anidra na presença de 1,68 mmol de trietilamina. A reação ocorreu durante 48 horas e foi conduzida sob refluxo e agitação magnética. As etapas de reação foram monitoradas por meio de CCDA (BOECK et al., 2005; LI et al., 2012). Após o término da reação, a acetona foi removida sob pressão reduzida, em seguida, o conteúdo foi vertido em um funil de separação, onde foi realizada a extração com 10 mL de água destilada e (3 x 10mL) diclorometano. Com isso, a fase orgânica foi tratada com (3 x 10 mL) NaHCO_3 a 5%, a fim de eliminar o ácido restante, em seguida lavou-se a fase orgânica com 10 mL de água destilada e por fim, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada. Após a extração, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia de adsorção em coluna em sílica gel 60, utilizando como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila com gradiente crescente de polaridade, procedimento acompanhado por CCDA (BOECK et al., 2005; LI et al., 2012).

8.4. Dados espectroscópicos dos ésteres 05 – 07

8.4.1. 05: 3,4,5-trimetoxicinamato de pentila



Aspecto: Sólido branco

Rendimento: 41,9% (54,1 mg)

Ponto de Fusão: 104-105 °C (lit. 105-106°C, NÓBREGA et al., 2018);

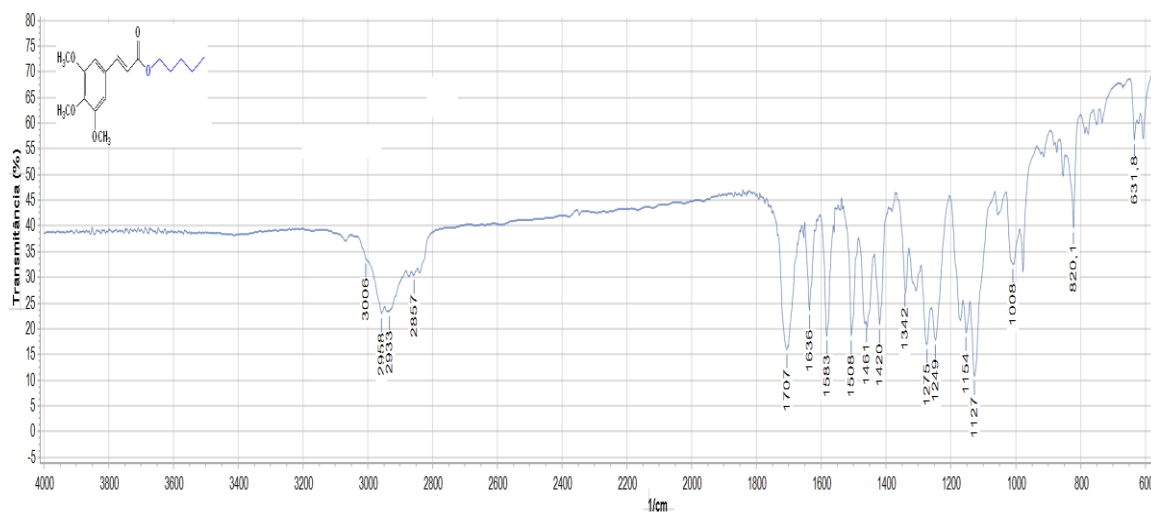
Tempo de Reação: 48 horas;

Fator de Retenção: 0,65 (7:3 Hex/AcOEt)

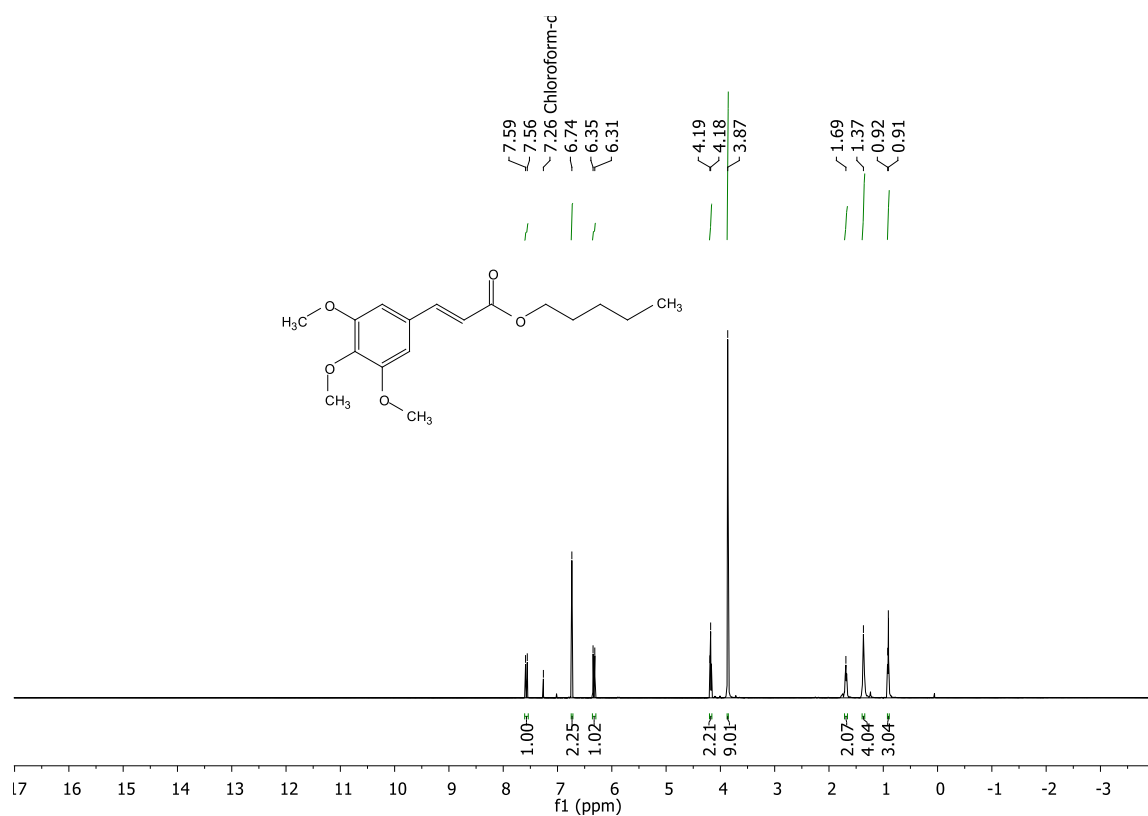
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7,57 (*d*, H-7, $J=15,89$ Hz, H=1), 6,74 (*s*, H-2; H-6, H=2), 6,33 (*d*, H-8, $J=15,89$ Hz, H=1), 4,18 (*t*, H-1', $J=6,70$ Hz, H=2); 3,87 (*s*, 3,4,5-MeO, H=9), 1,71 – 1,66 (*m*, H-2', H=2), 1,40 – 1,33 (*m*, H-3', H-4', H=4), 0,91 (*t*, H-5', $J=6,25$ Hz, H=3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 167,1 (C=O); 153,5 (C-3, C-5); 144,6 (C-7); 140,2 (C-4); 130,1 (C-1); 117,6 (C-8); 105,3 (C-2, C-6); 64,8 (C-1'); 61,0 (C4-MeO); 56,2 (C3-MeO, C5-MeO); 28,5 (C-2'); 28,2 (C-3'); 22,4 (C-4'); 14,0 (C-5')

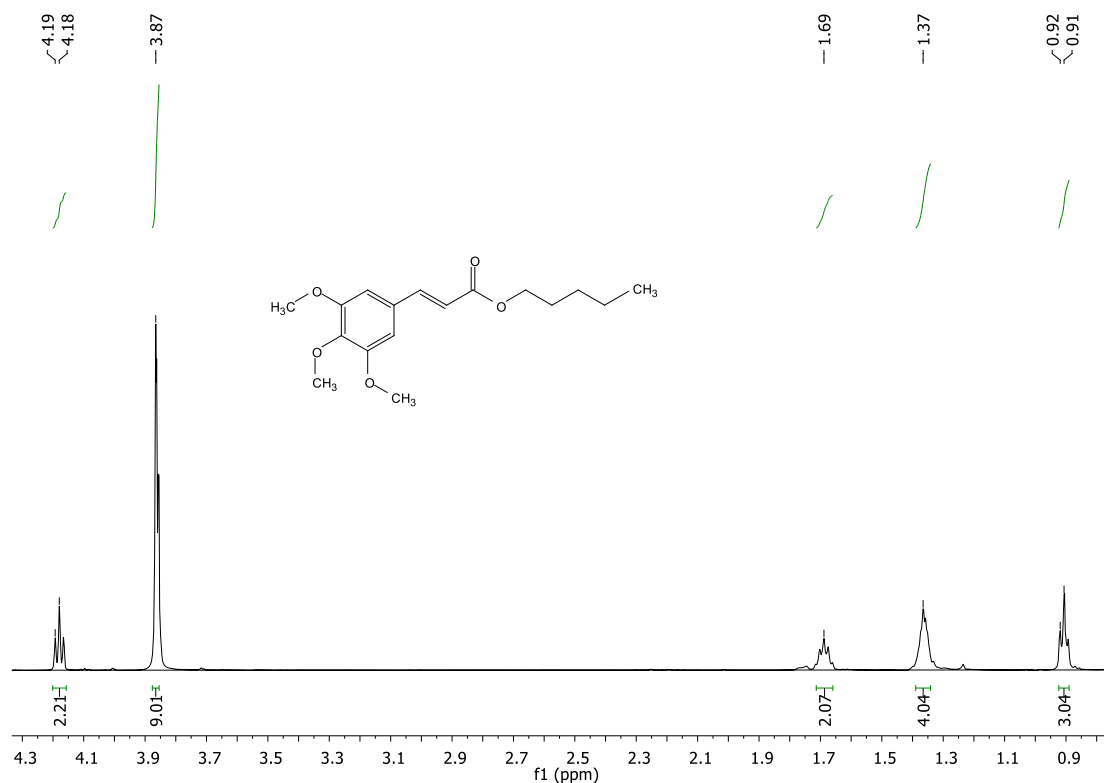
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3006 (C-H sp^2); 2933, 2857 (C-H sp^3); 1707 (C=O); 1636, 1461 (C=C); 1583, 1508, 820 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1275, 1127 (C-O éster) (NÓBREGA et al., 2018).



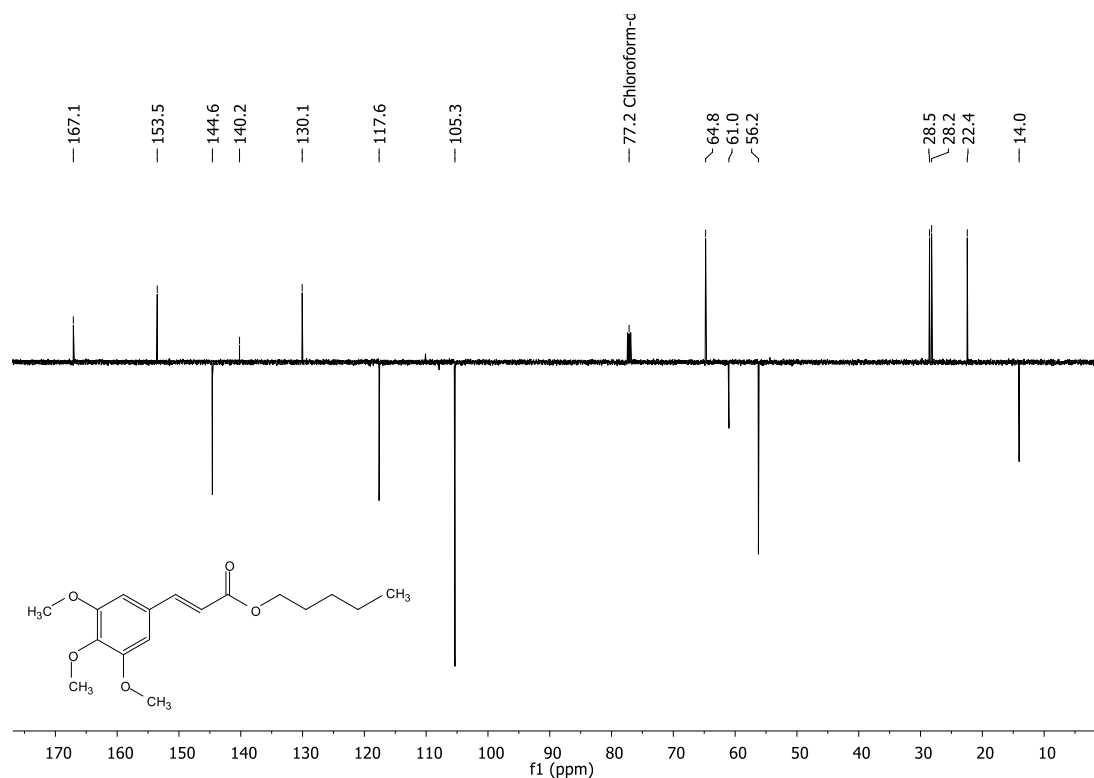
Espectro 17: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de pentila (05).



Espectro 18: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de pentila (05).

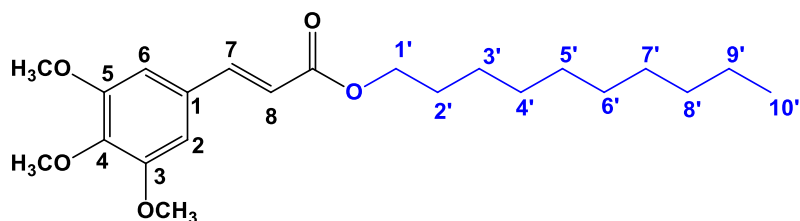


Espectro 19: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de pentila (05).



Espectro 20: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de pentila (05).

8.4.2. 06: 3,4,5-trimetoxicinamato de decila



Aspecto: Sólido branco

Rendimento: 38% (64,2 mg)

Ponto de Fusão: 35-36°C (lit. 37-38°C, NÓBREGA et al., 2018)

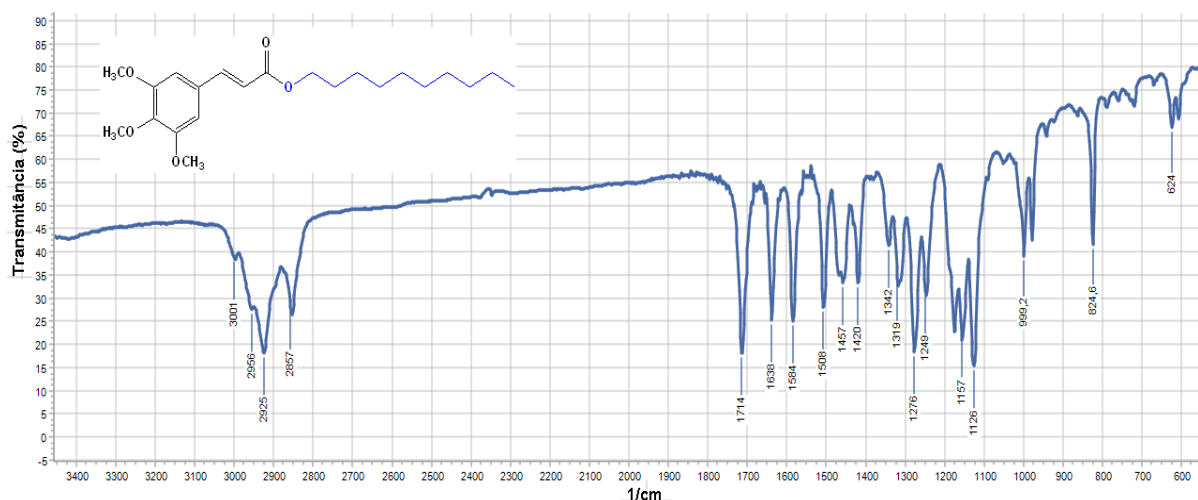
Tempo de Reação: 48 horas;

Fator de Retenção: 0,70 (7:3 Hex/AcOEt);

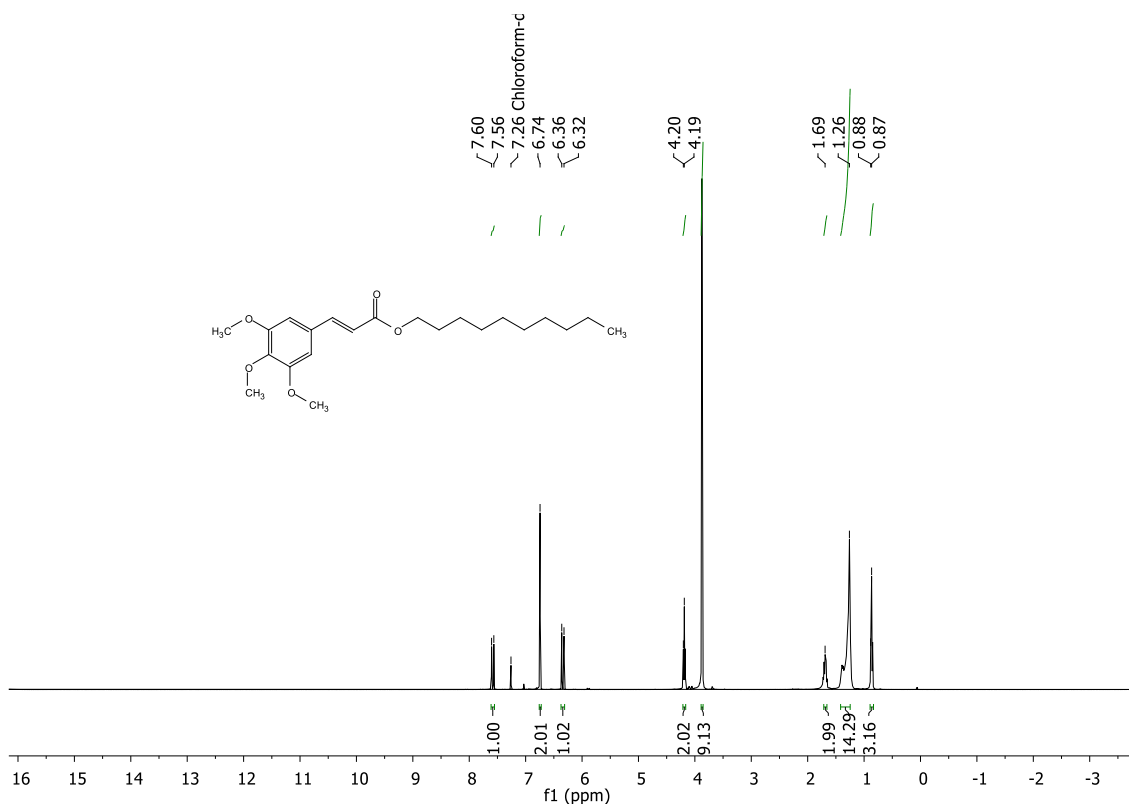
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7,58 (d, H-7, $J=15,90$ Hz, H=1), 6,74 (s, H-2; H-6, H=2), 6,34 (d, H-8, $J=15,90$ Hz, H=1), 4,20 (t, H-1', $J=6,74$ Hz, H=2); 3,87 (s, 3,4,5-MeO, H=9), 1,73 – 1,66 (m, H-2', H=2), 1,40 – 1,26 (m, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', H=14), 0,87 (t, H-10', $J=6,61$ Hz, H=3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 167,2 (C=O); 153,6 (C-3, C-5); 144,7 (C-7); 140,2 (C-4); 130,1 (C-1); 117,7 (C-8); 105,4 (C-2, C-6); 64,9 (C-1'); 61,1 (C4-MeO); 56,3 (C3-MeO, C5-MeO); 32,1 (C-2'); 29,7 (C-3'); 29,5 (C-4', C-5'); 28,9 (C-6', C-7'); 26,2 (C-8'); 22,8 (C-9'); 14,3 (C-10')

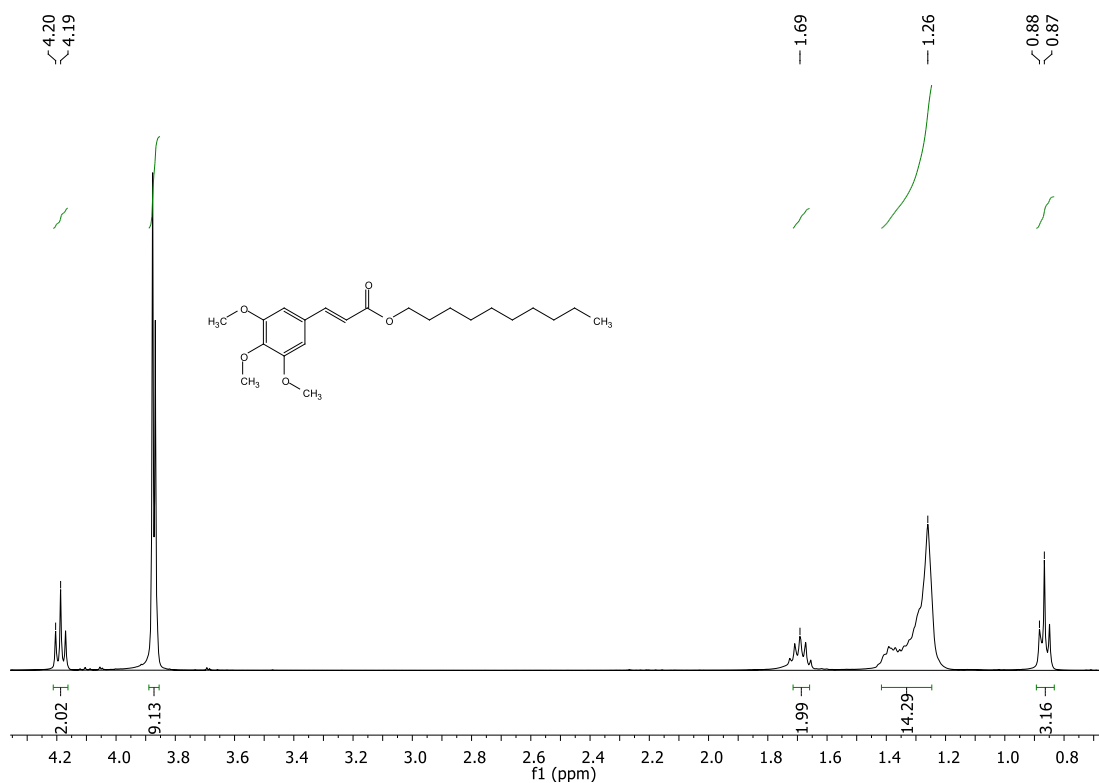
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3001 (C-H sp^2); 2925, 2857 (C-H sp^3); 1714 (C=O); 1638, 1457 (C=C); 1584, 1508, 824 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1276, 1126 (C-O éster) (NÓBREGA et al., 2018).



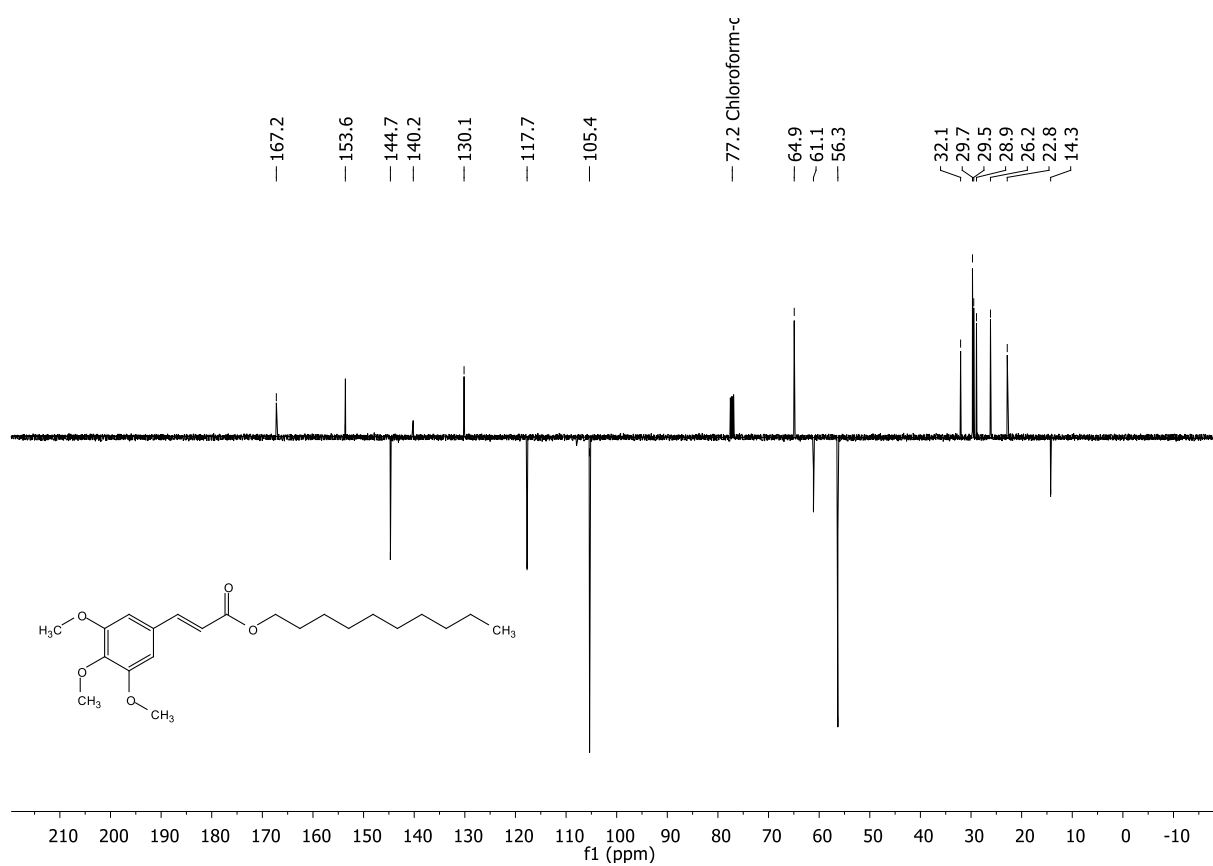
Espectro 21: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de decila (06).



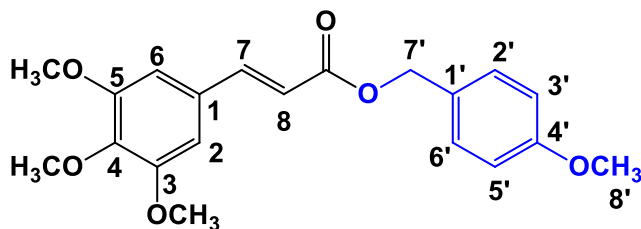
Espectro 22: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de decila (06).



Espectro 23: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de decila (06).



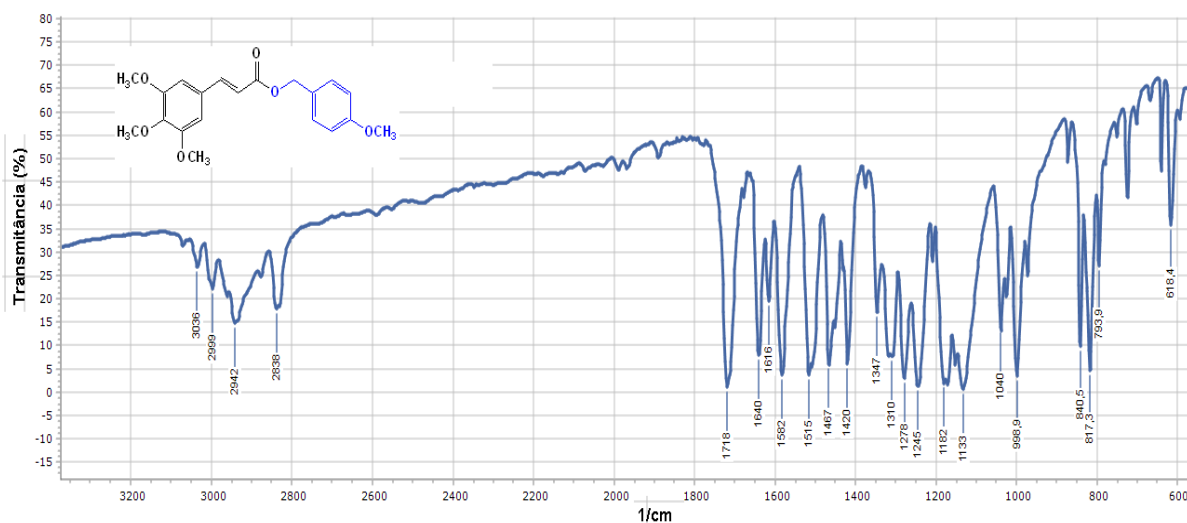
Espectro 24: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de decila (06).

8.4.3. 07: 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metoxibenzila**Aspecto:** Sólido branco**Rendimento:** 47,5% (71,5 mg)**Ponto de Fusão:** 70-71 °C (lit. 65-67°C, ZHAO et al., 2019)**Tempo de Reação:** 48 horas**Fator de Retenção:** 0,58 (7:3 Hex/AcOEt)

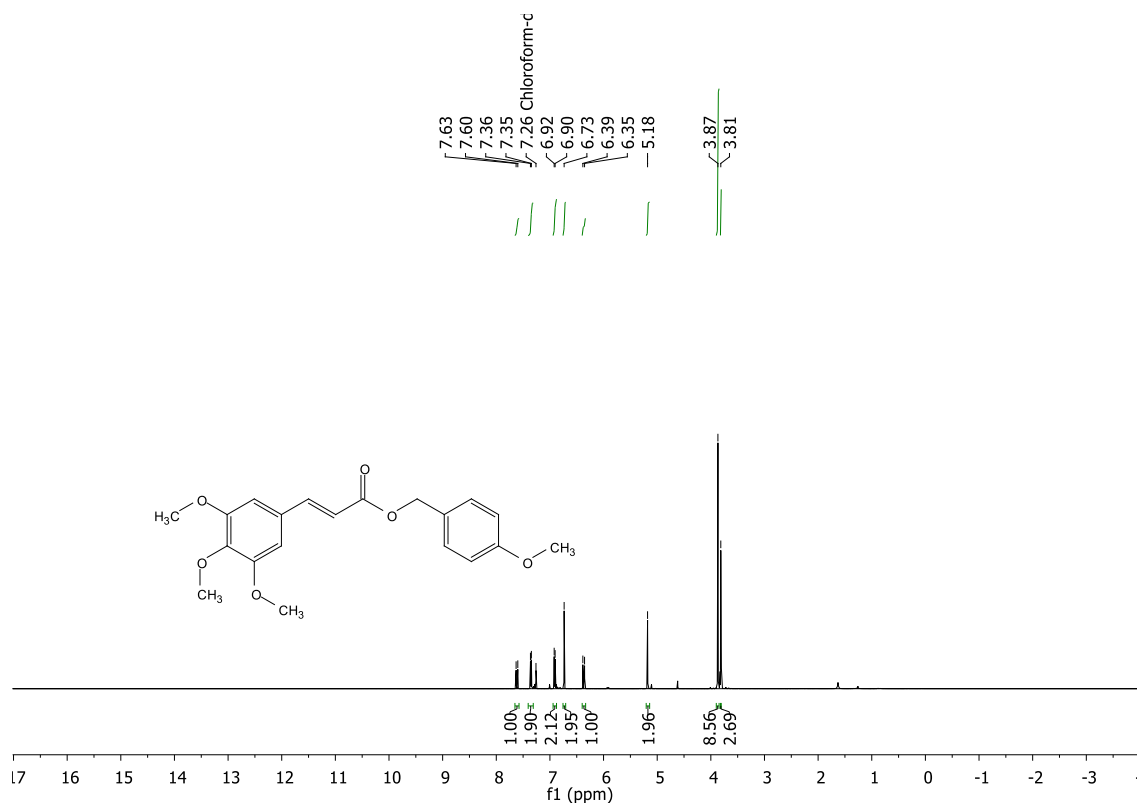
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7,61 (*d*, H-7, $J=15,92$ Hz, H=1), 7,35 (*d*, $J=8,67$, H-2', H-6', H=2), 6,91 (*d*, $J=8,67$, H-3', H-5', H=2), 6,73 (*s*, H-2; H-6, H=2), 6,37 (*d*, H-8, $J=15,92$ Hz, H=1), 5,18 (*s*, H-7', H=2), 3,87 (*s*, 3,4,5-MeO; H=9), 3,81 (*s*, H-8', H=3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 166,9 (C=O); 159,8 (C-4'); 153,6 (C-3, C-5); 145,1 (C-7); 140,3 (C-4); 130,3 (C-2', C-6'); 130,0 (C-1); 128,3 (C-1'); 117,4 (C-8); 114,1 (C-3', C-5'); 105,4 (C-2, C-6); 66,4 (C-7'); 61,1 (C4-MeO); 56,3 (C3-MeO, C5-MeO); 55,5 (C-8').

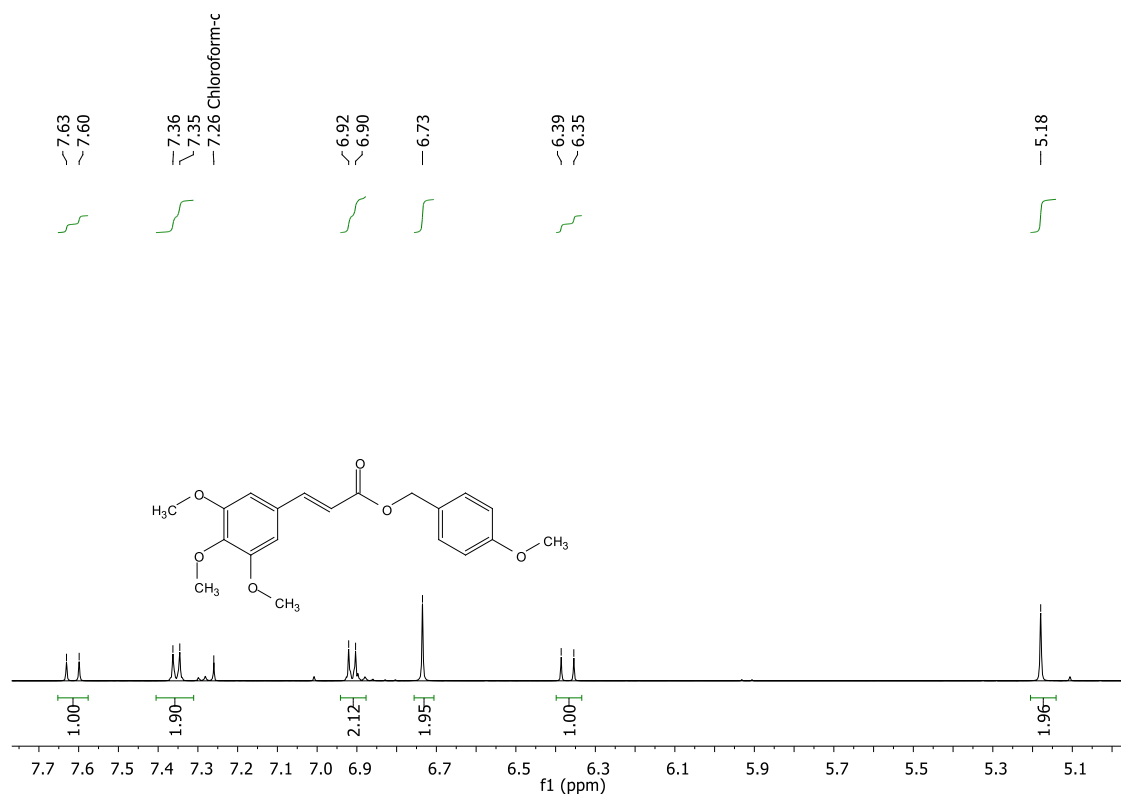
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3036 (C-H sp^2); 2942, 2838 (C-H sp^3); 1718 (C=O); 1640, 1467 (C=C); 1582, 1515, 817 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1278, 1133 (C-O éster) (ZHAO et al., 2019).



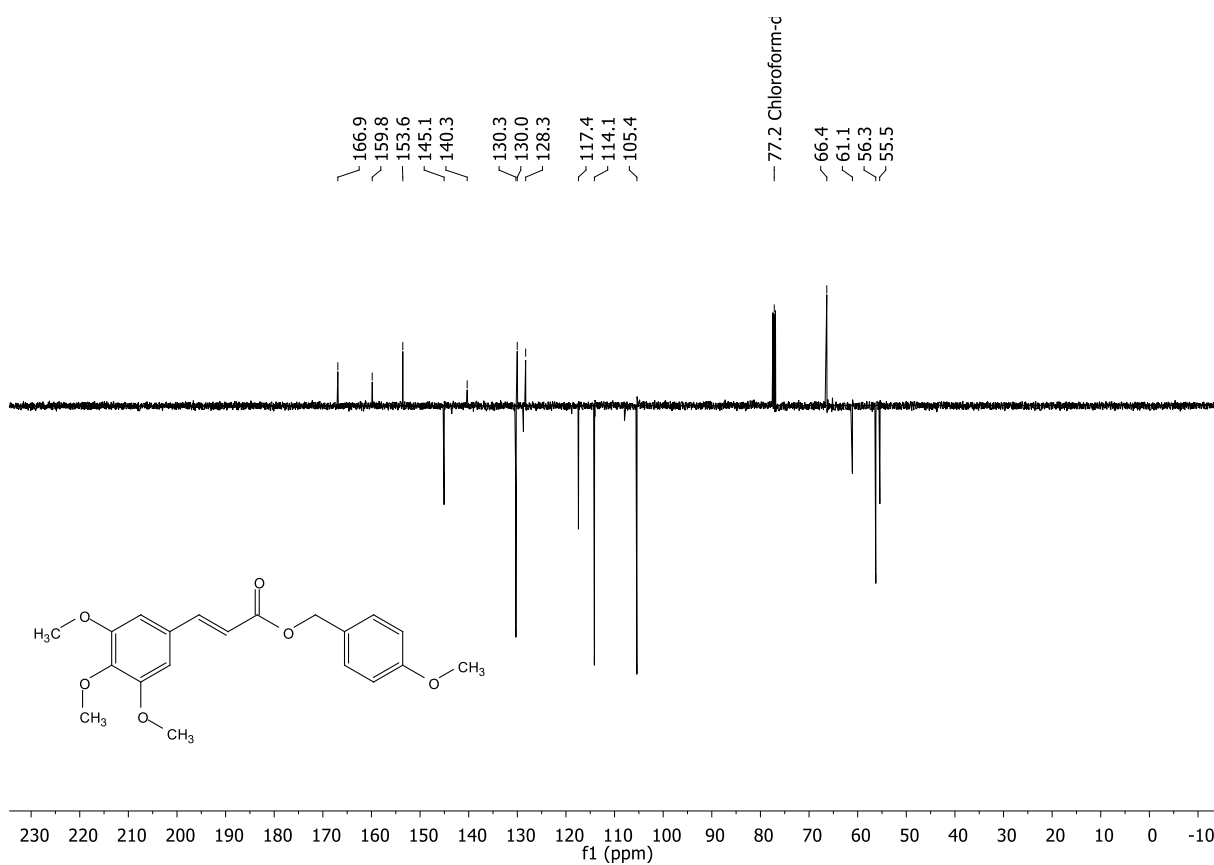
Espectro 25: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metoxibenzila (07).



Espectro 26: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metoxibenzila (**07**).



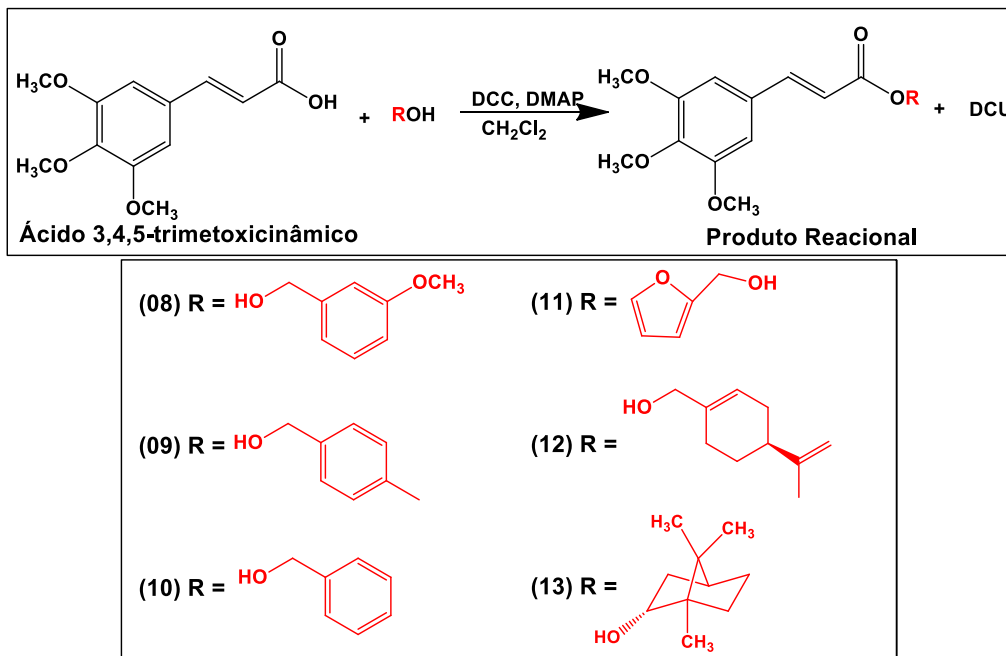
Espectro 27: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metoxibenzila (**07**).



Espectro 28: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metoxibenzila (07).

8.5. Preparação da terceira coleção de ésteres (08 - 13)

Esquema 8: Reação de Steglich utilizando o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico e os respectivos álcoois.



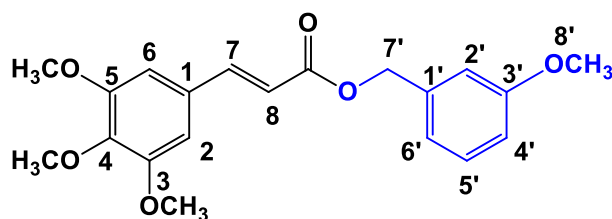
Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente, em um balão de fundo chato de 50 mL foram adicionados 0,1 g (0,42 mmol) do ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico, 0,54 mmol dos respectivos álcoois, 0,015 g de DMAP e 6,3 mL de diclorometano, após 5 minutos foi adicionado 0,11 g de DCC (0,54 mmol), a reação foi conduzida sob agitação magnética e temperatura ambiente por 24-48 horas (NEISES; STEGLICH, 1978; NÓBREGA et al., 2019).

Após este período, removeu-se parcialmente o solvente sob pressão reduzida, em seguida, o produto reacional foi filtrado, cerca de três vezes, para a remoção do DCU (pouco solúvel em diclorometano). Com isso, o conteúdo filtrado foi vertido em funil de separação para extração com 10 mL de água destilada e 10 mL de diclorometano (3x), havendo a separação da fase orgânica. Então, a fase orgânica foi tratada com 10 mL de bicarbonato de sódio 5%, em seguida, foi adicionado 10 mL de água destilada à fase orgânica. Por fim, secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e filtrou-se. Com isso, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto reacional foi purificado em coluna de sílica gel 60, para a fase móvel foi feito uma mistura de hexano e acetato de etila com gradiente crescente de polaridade. Monitorou-se a purificação e todas as etapas da reação por meio de CCDA (STEGLICH; NEISES, 1978; NÓBREGA et al., 2019).

8.6. Dados espectroscópicos dos ésteres 08 – 13

8.6.1. 08: 3,4,5-trimetoxicinamato de 3-metoxibenzila



Aspecto: Óleo incolor

Rendimento: 26,7% (40,2 mg)

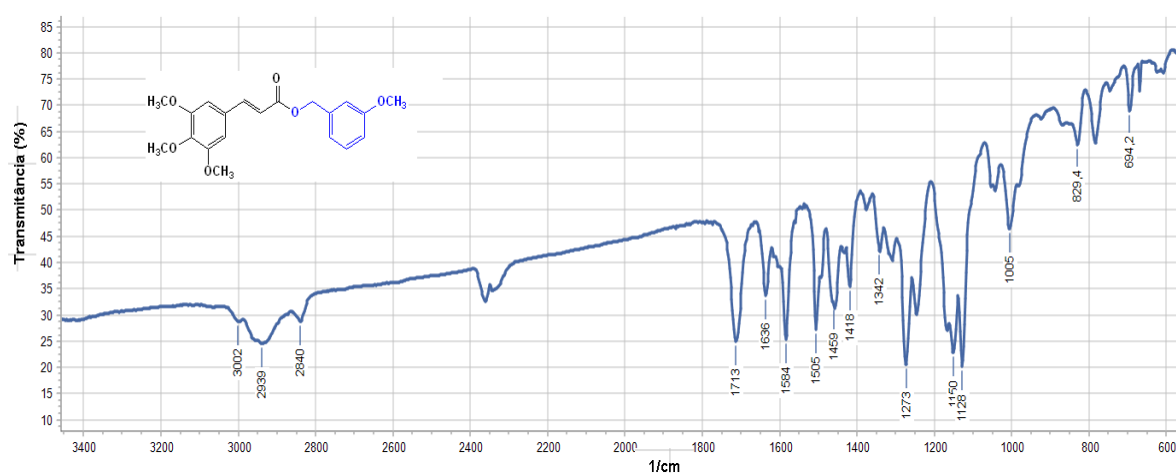
Tempo de Reação: 48 horas;

Fator de Retenção: 0,58 (7:3 Hex/AcOEt);

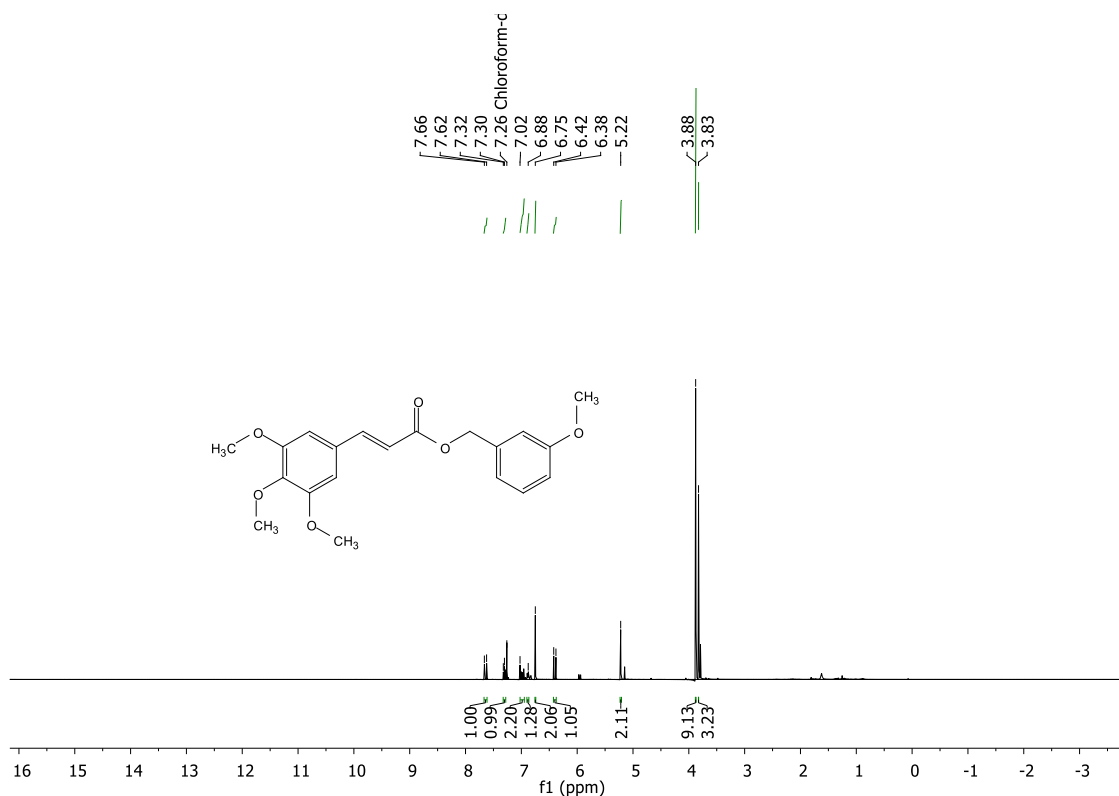
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δH 7,64 (*d*, H-7, $J=15,90$ Hz, H=1), 7,31 (*t*, $J=7,9$ Hz, H-5', H=1), 7,02 – 6,95 (*m*, H-2', H-6', H=2), 6,90 – 6,86 (*m*, H-4', H=1), 6,75 (*s*, H-2; H-6, H=2), 6,40 (*d*, H-8, $J=15,90$ Hz, H=1), 5,22 (*s*, H-7', H=2), 3,88 (*s*, 3,4,5-MeO; H=9), 3,83 (*s*, H-8', H=3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δC 166,8 (C=O); 159,9 (C-3'); 153,6 (C-3, C-5); 145,3 (C-7); 140,3 (C-4); 137,7 (C-1'); 130,0 (C-1); 129,8 (C-5'); 120,6 (C-6'); 117,2 (C-8); 114,0 (C-2'); 113,8 (C-4'); 105,4 (C-2, C-6); 66,4 (C-7'); 61,1 (C4-MeO); 56,2 (C3-MeO, C5-MeO); 55,4 (C-8')

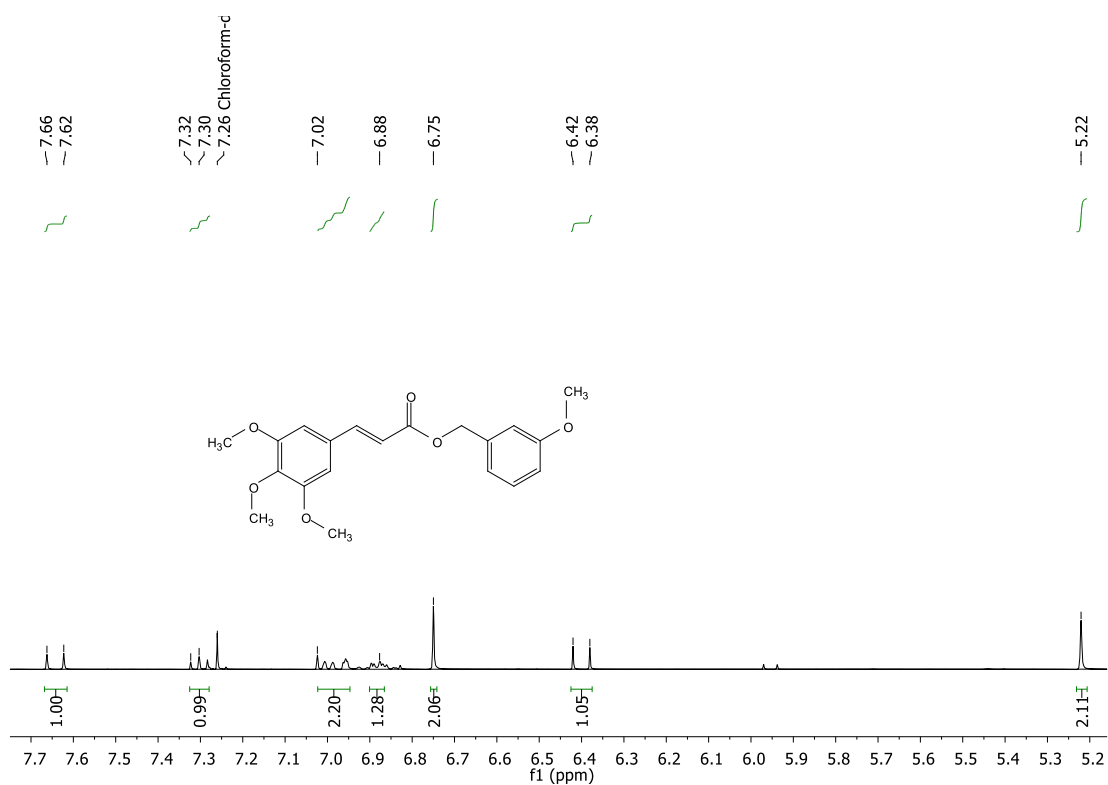
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3002 (C-H sp^2); 2939, 2840 (C-H sp^3); 1713 (C=O); 1636, 1459 (C=C); 1584, 1505, 846 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1278, 1136 (C-O éster)



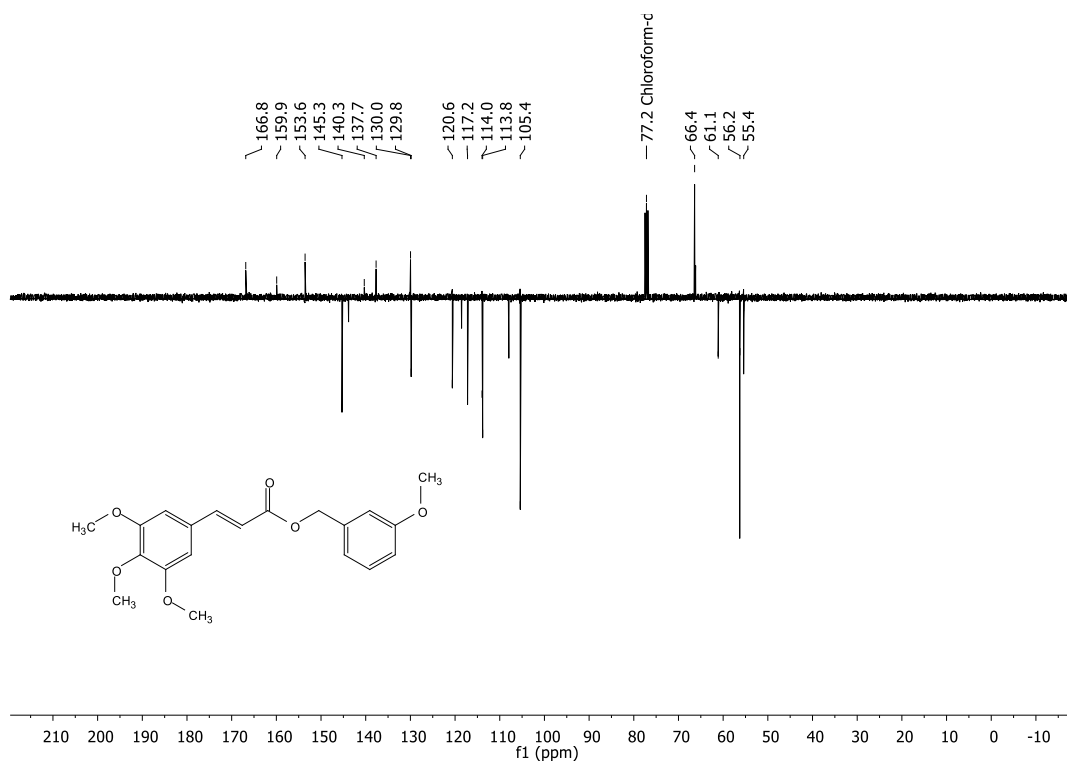
Espectro 29: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 3-metoxibenzila (08).



Espectro 30: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 3-metoxibenzila (08).

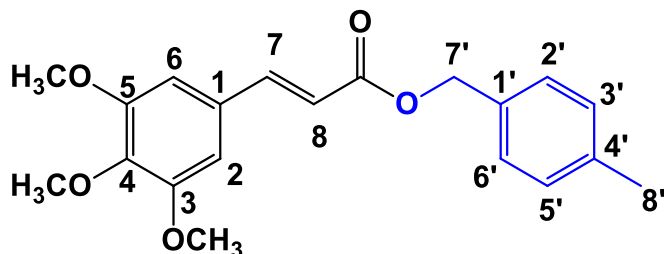


Espectro 31: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 3-metoxibenzila (08).



Espectro 32: Espectro de RMN de ¹³C-APT (100 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 3-metoxibenzila (**08**).

8.6.2. 09: 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metilbenzila



Aspecto: Óleo incolor

Rendimento: 62,8% (90,3 mg)

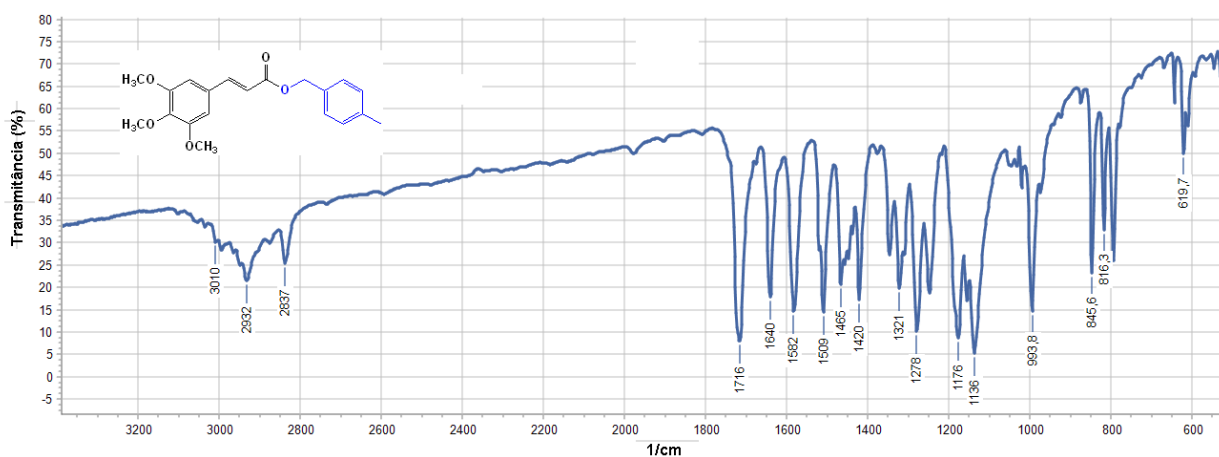
Tempo de Reação: 24 horas;

Fator de Retenção: 0,62 (7:3 Hex/AcOEt);

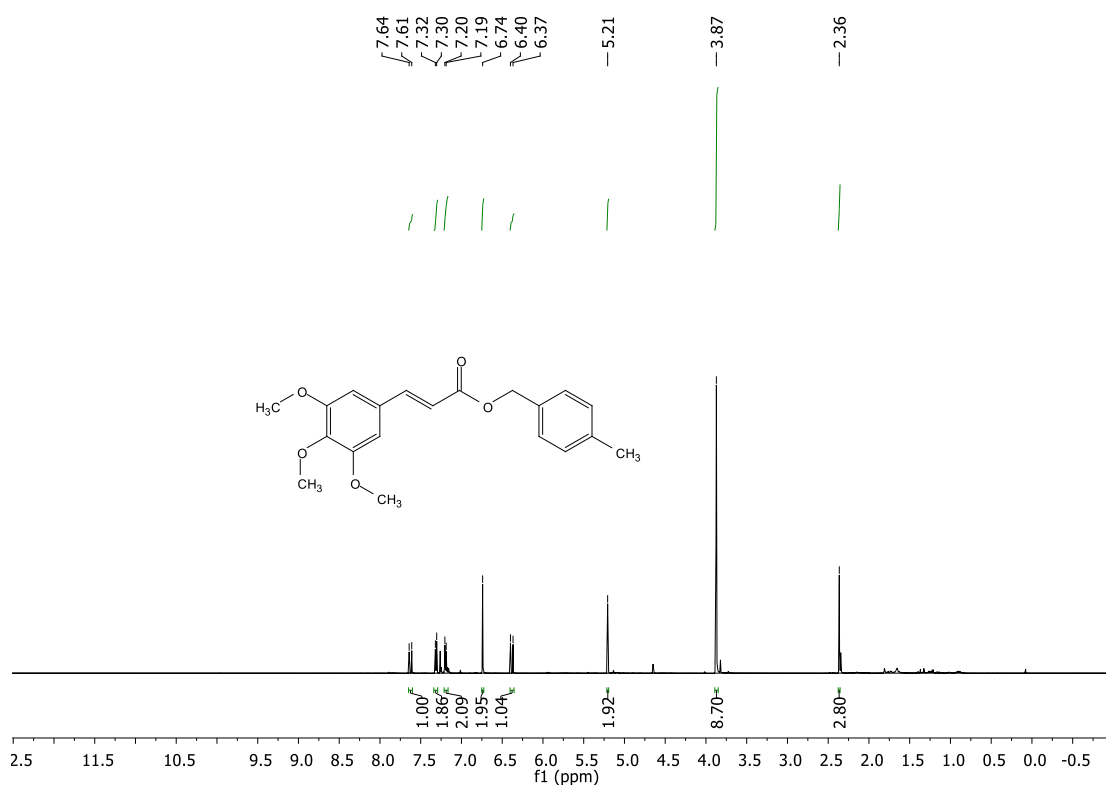
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δH 7,63 (*d*, H-7, $J=15,92$ Hz, $H=1$), 7,31 (*d*, H-3', H-5', $J=7,98$ Hz, $H=2$), 7,19 (*d*, $J=7,82$ Hz, H-2', H-6', $H=2$) 6,74 (*s*, H-2; H-6, $H=2$), 6,38 (*d*, H-8, $J=15,92$ Hz, $H=1$), 5,21 (*s*, H-7', $H=2$), 3,87 (*s*, 3,4,5-MeO; $H=9$), 2,36 (*s*, H-8', $H=3$)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δC 166,9 (C=O); 153,3 (C-3, C-5); 145,1 (C-7); 140,3 (C-4); 138,3 (C-4'); 133,1 (C-1'); 130,0 (C-1); 129,4 (C-3', C-5'); 128,6 (C-2', C-6'); 117,4 (C-8); 105,4 (C-2, C-6); 66,5 (C-7'); 61,1 (C4-MeO); 56,3 (C3-MeO, C5-MeO); 21,3 (C-8')

IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3010 (C-H sp^2); 2932, 2837 (C-H sp^3); 1716 (C=O); 1640, 1465 (C=C); 1582, 1509, 846 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1278, 1136 (C-O éster)



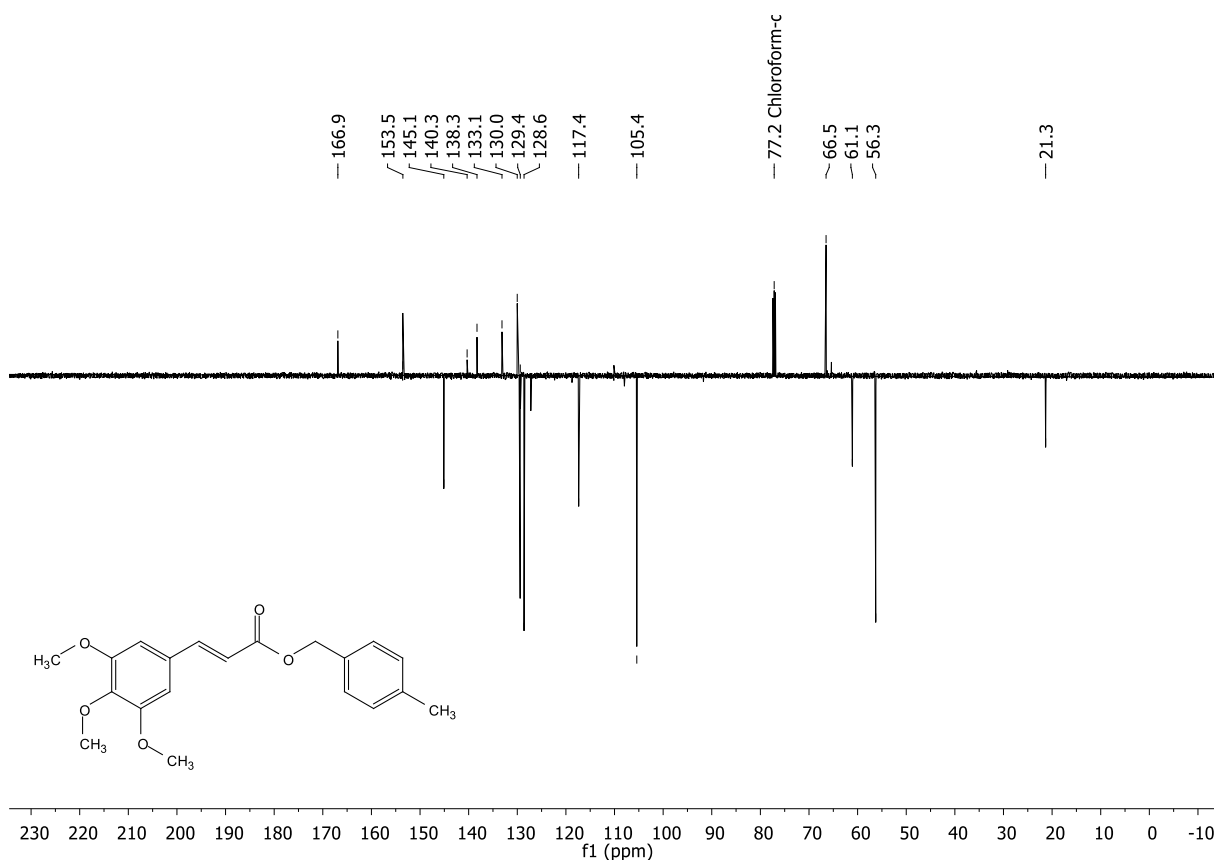
Espectro 33: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metilbenzila (09).



Espectro 34: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metilbenzila (09).

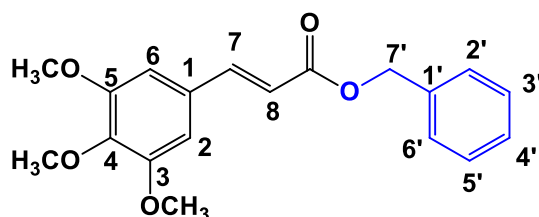


Espectro 35: Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metilbenzila (09).



Espectro 36: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de 4-metilbenzila (**09**).

8.6.3. 10: 3,4,5-trimetoxicinamato de benzila



Aspecto: Sólido branco

Rendimento: 48,6% (67,0 mg)

Ponto de Fusão: 82-83 °C (lit. 85-86°C, KATRITZKY et al., 2001)

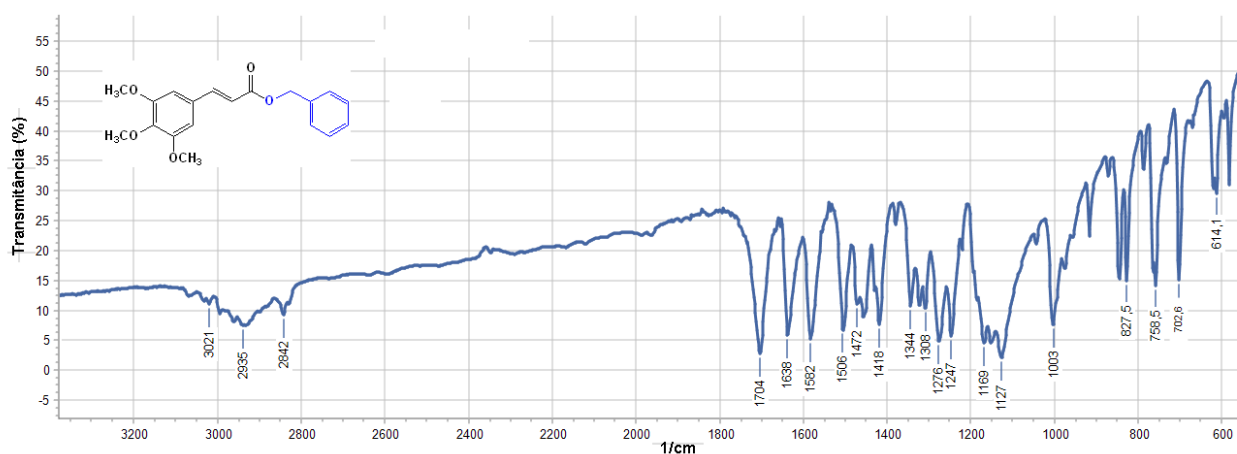
Tempo de Reação: 24 horas;

Fator de Retenção: 0,55 (7:3 Hex/AcOEt);

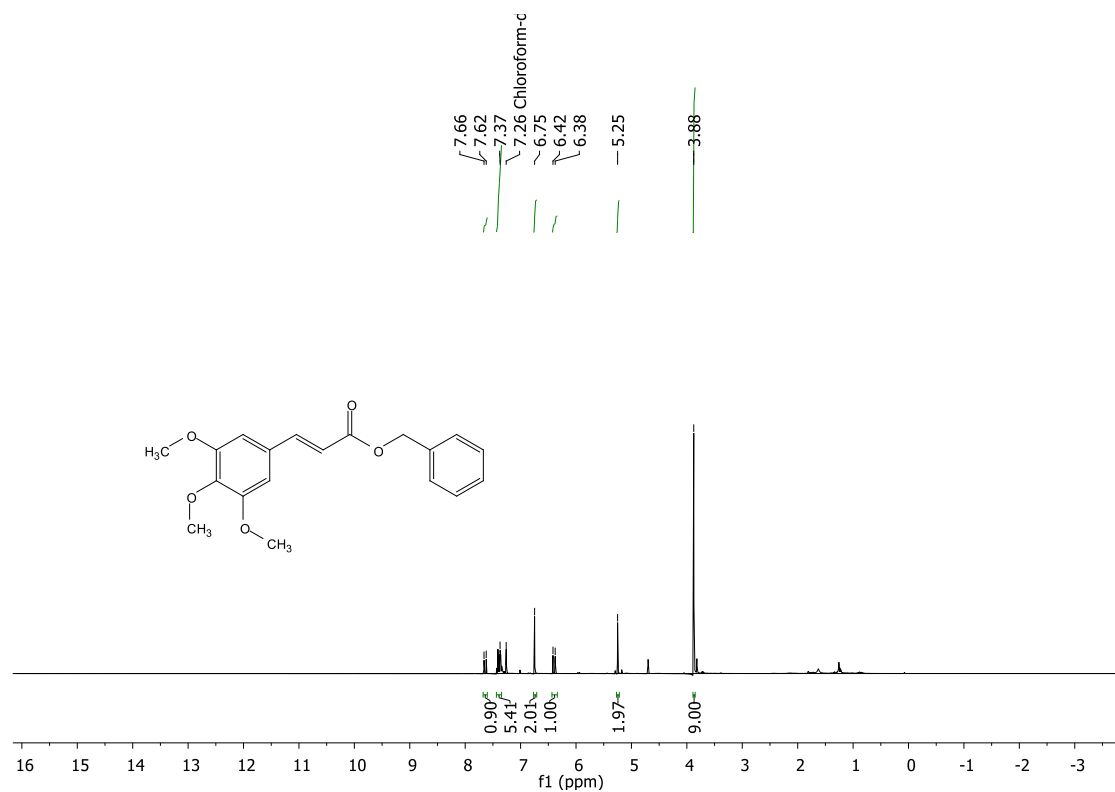
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δH 7,64 (*d*, H-7, $J=15,90$ Hz, H=1), 7,43 – 7,37 (*m*, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H=5), 6,75 (*s*, H-2; H-6, H=2), 6,40 (*d*, H-8, $J=15,90$ Hz, H=1), 5,25 (*s*, H-7', H=2), 3,88 (*s*, 3,4,5-MeO; H=9).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δC 166,8 (C=O); 153,5 (C-3, C-5); 145,2 (C-7); 140,2 (C-4); 136,1 (C-1'); 129,9 (C-1); 128,6 (C-3', C-5'); 128,3 (C-2', C-6'), 127,0 (C-4'), 117,1 (C-8); 105,3 (C-2, C-6); 66,4 (C-7'); 61,0 (C4-MeO); 56,2 (C3-MeO, C5-MeO).

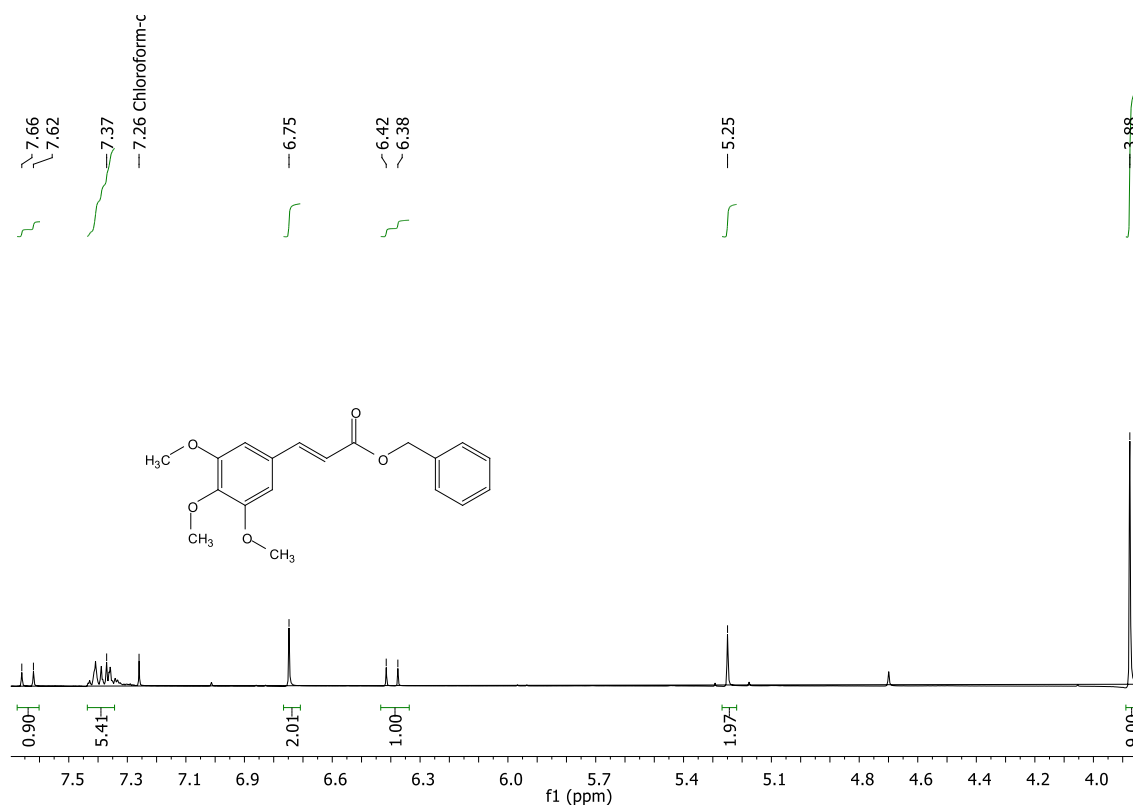
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3021 (C-H sp^2); 2935, 2842 (C-H sp^3); 1704 (C=O); 1638, 1472 (C=C); 1582, 1506, 827 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1276, 1127 (C-O éster) (KATRITZKY et al., 2001).



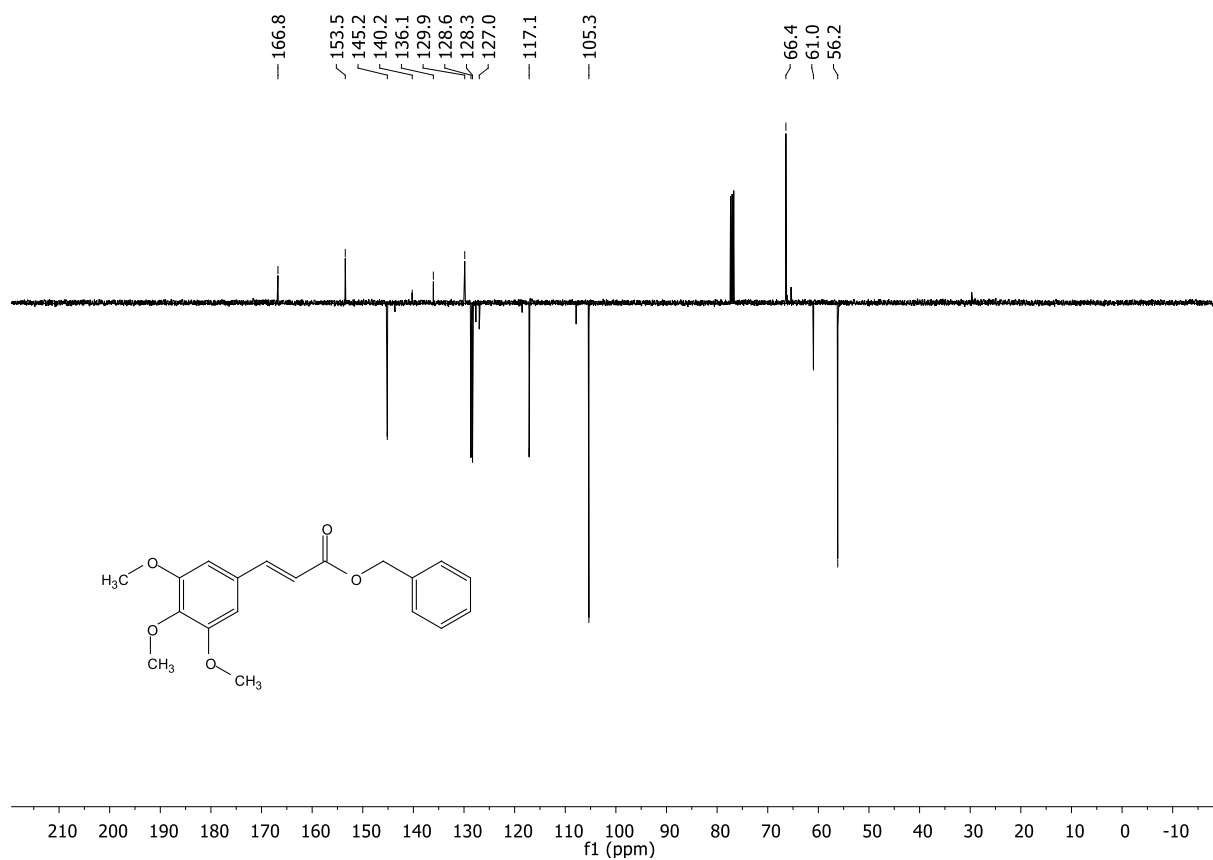
Espectro 37: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de benzila (10).



Espectro 38: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de benzila (10).

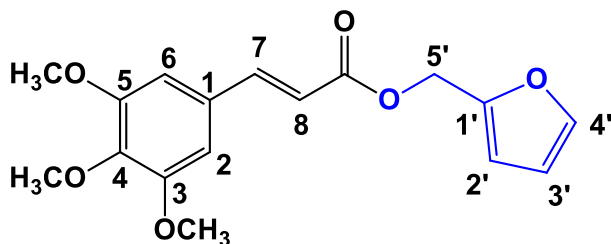


Espectro 39: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de benzila (10).



Espectro 40: Espectro de RMN de ¹³C-APT (100 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de benzila (10).

8.6.4. 11: 3,4,5-trimetoxicinamato de furfurila



Aspecto: Óleo marrom

Rendimento: 41,2% (55,0 mg)

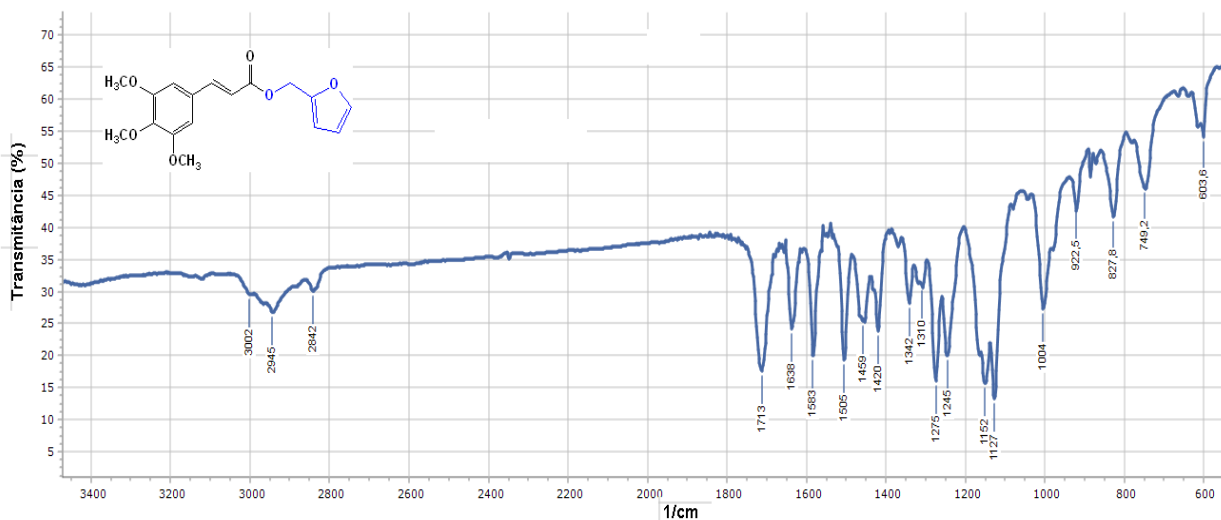
Tempo de Reação: 48 horas

Fator de Retenção: 0,6 (7:3 Hex/AcOEt);

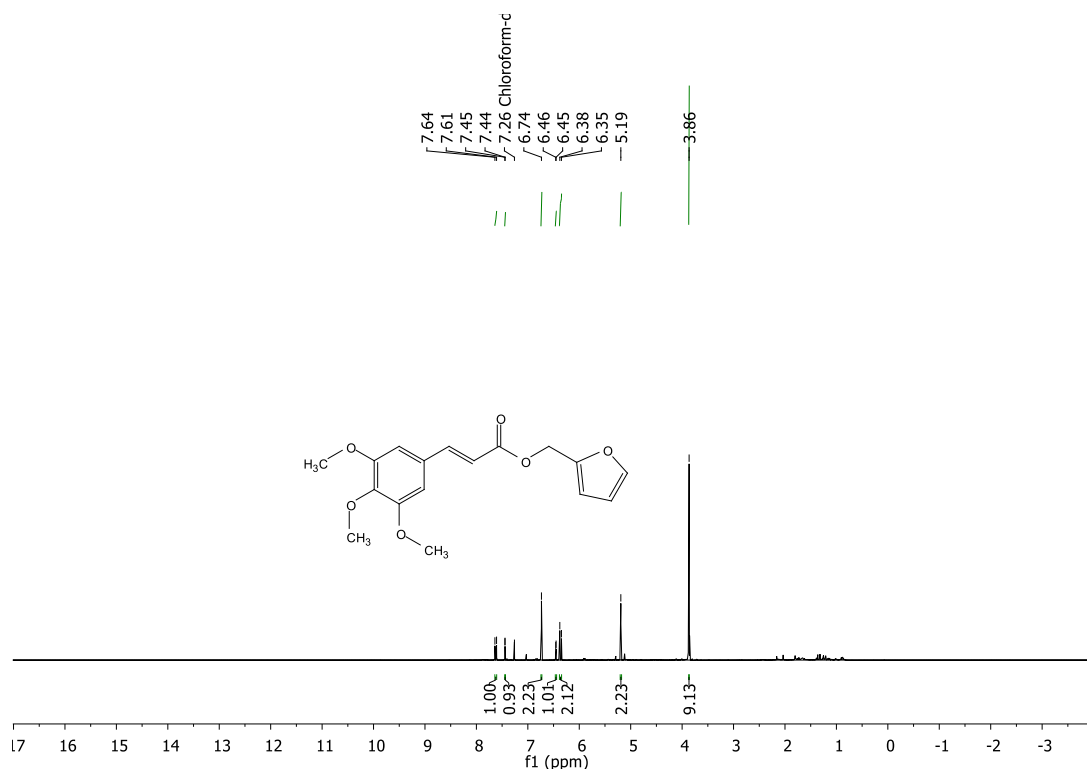
RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δH 7,62 (*d*, H-7, $J=15,91$ Hz, H=1), 7,45 – 7,44 (*m*, H-4', H=1) 6,74 (*s*, H-2; H-6, H=2), 6,46 – 6,45 (*m*, H-3', H=1), 6,38 – 6,35 (*m*, H-2', H-8, H=2), 5,19 (*s*, H-5', H=2), 3,86 (*s*, 3,4,5-MeO, H=9).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δC 166,6 (C=O); 153,6 (C-3, C-5); 149,7 (C-1'); 145,5 (C-7); 143,5 (C-4'); 140,4 (C-4); 129,9 (C-1); 116,9 (C-8); 110,8 (C-3'); 110,7 (C-2'); 105,5 (C-2, C-6); 61,1 (C4-MeO); 58,3 (C-5'); 56,3 (C3-MeO, C5-MeO).

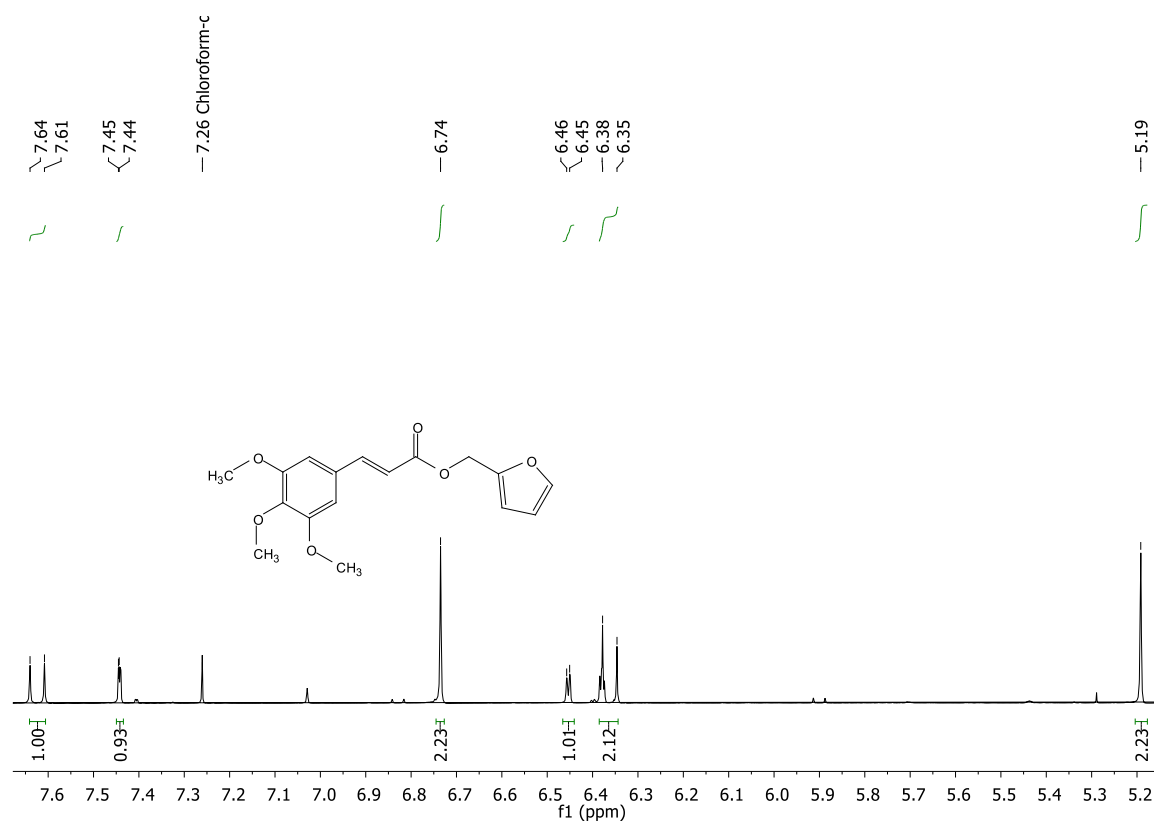
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3002 (C-H sp^2); 2945, 2842 (C-H sp^3); 1713 (C=O); 1638, 1459 (C=C); 1583, 1505, 827 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1275, 1127 (C-O éster) (NÓBREGA et al., 2019).



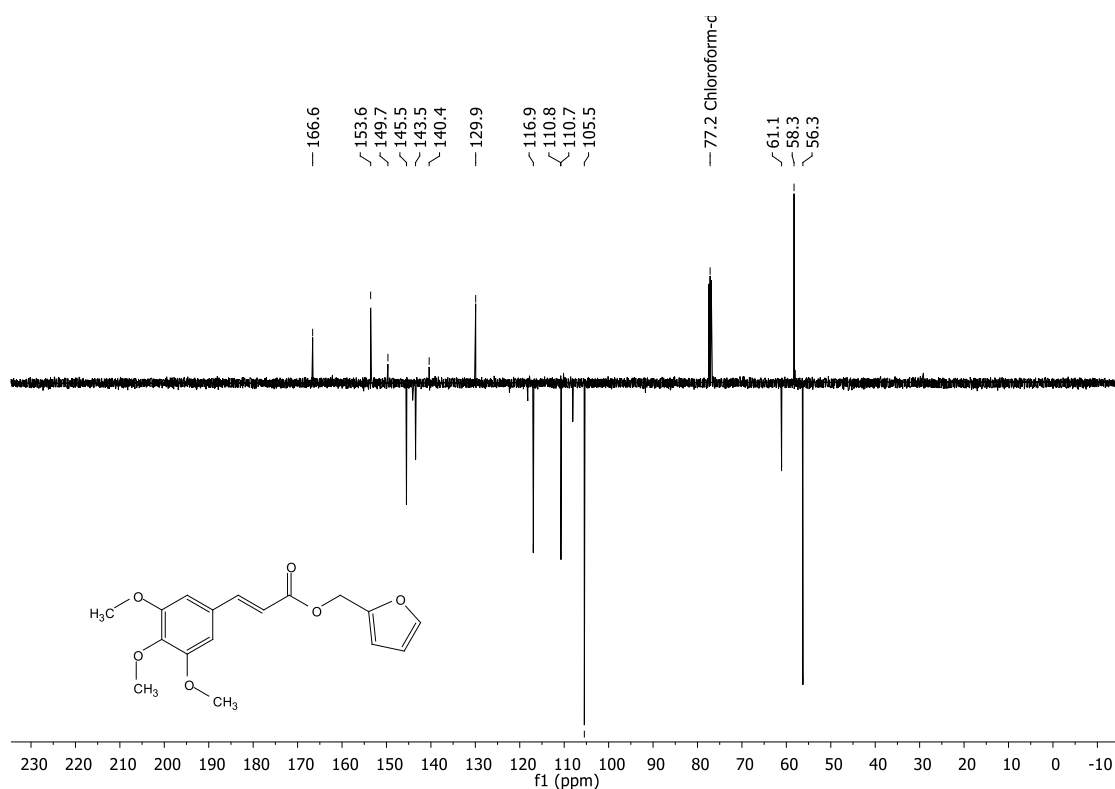
Espectro 41: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de furfurila (11).



Espectro 42: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de furfurila (**11**).

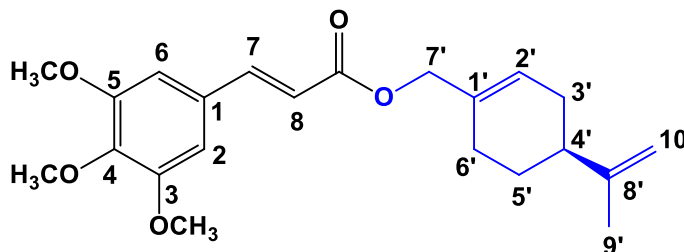


Espectro 43: Expansão do espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de furfurila (**11**).



Espectro 44: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinamato de furfurila (11).

8.6.5. 12: 3,4,5-trimetoxicinamato de (-)-perila



Aspecto: Óleo incolor

Rendimento: 47,6% (74,5 mg)

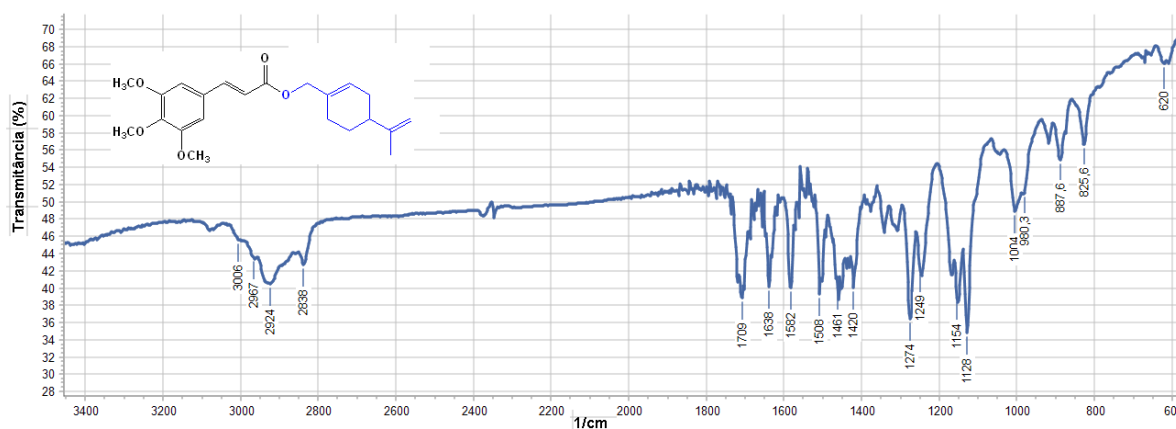
Tempo de Reação: 24 horas

Fator de Retenção: 0,7 (7:3 Hex/AcOEt);

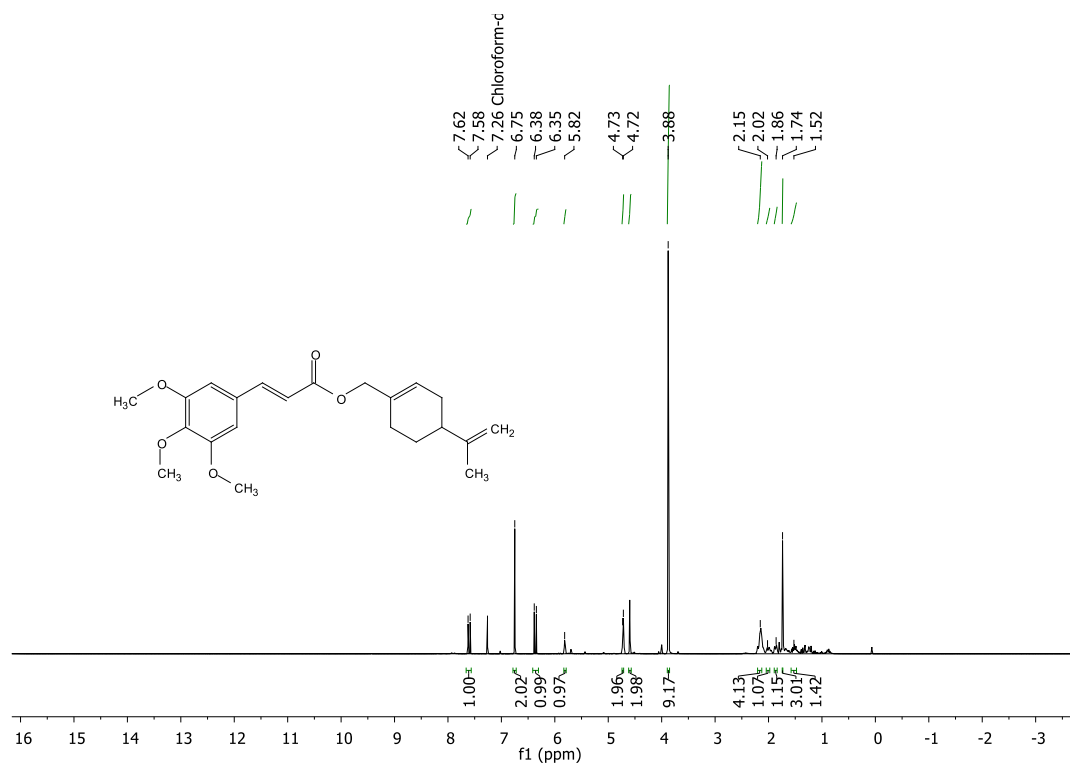
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ_{H} 7,60 (*d*, H-7, $J=15,90$ Hz, H=1), 6,75 (*s*, H-2; H-6, H=2), 6,36 (*d*, $J=15,90$ Hz, H-8, H=1), 5,80 (*sl*, H-2', H=1), 4,72 (*s*, H-10', H=2), 4,60 (*s*, H-7', H=2), 3,88 (*s*, 3,4,5-MeO, H=9), 2,15 (*m*, H-3a', H-3'b, H-6'a, H-6b, H=4), 2,02 (*m*, H-4', H=1), 1,86 (*m*, H-5'a, H=1), 1,74 (*s*, H-9', H=3), 1,52 (*m*, H-5'b, H=1).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ_{C} 167,0 (C=O); 153,6 (C-3, C-5); 149,7 (C-8'); 144,9 (C-7); 140,3 (C-4); 132,8 (C-1'); 130,1 (C-1); 126,0 (C-2'); 117,5 (C-8); 108,9 (C-10'); 105,4 (C-2, C-6); 68,7 (C-7'); 61,1 (C-4-MeO); 56,3 (C3-MeO, C5-MeO); 41,0 (C-4'); 30,6 (C-3'); 27,5 (C-5'); 26,6 (C-6'); 20,8 (C-9').

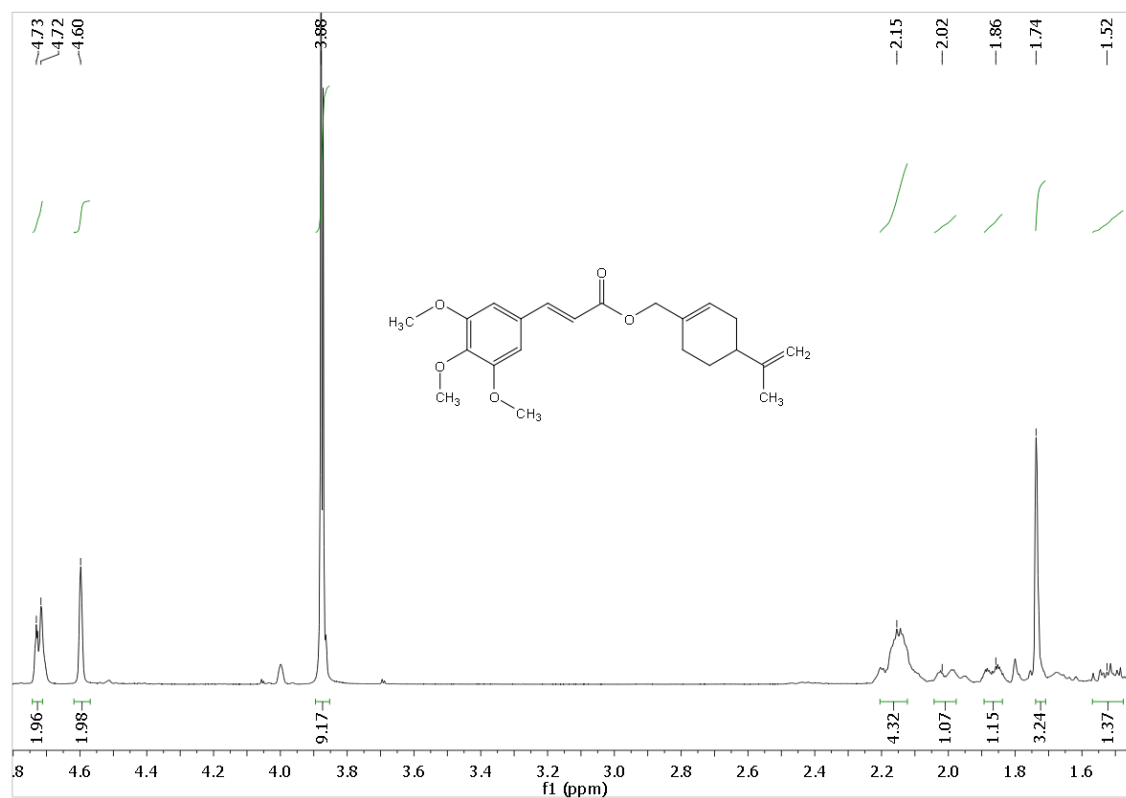
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 3006 (C-H sp^2); 2967, 2838 (C-H sp^3); 1709 (C=O); 1638, 1461 (C=C); 1582, 1508, 826 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1274, 1128 (C-O éster).



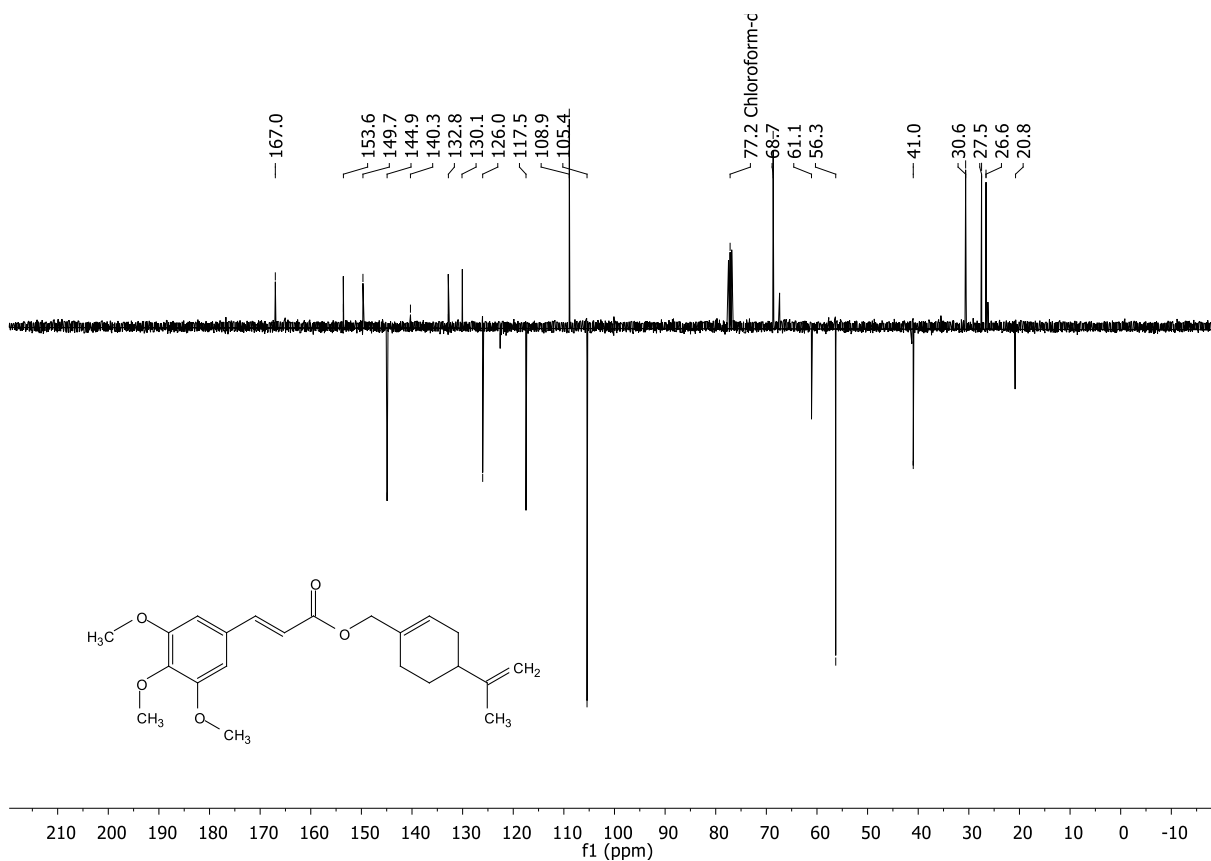
Espectro 45: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de perila (12).



Espectro 46: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de perila (**12**).

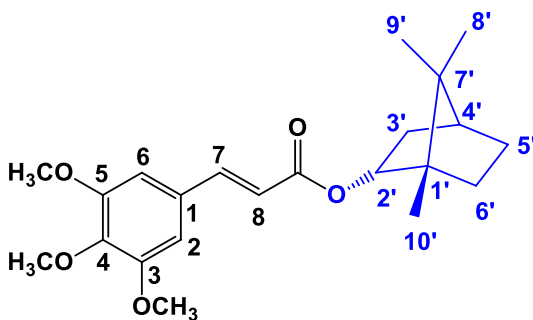


Espectro 47: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de perila (**12**).



Espectro 48: Espectro de RMN de ^{13}C -APT (100 MHz, CDCl_3) do 3,4,5-trimetoxicinato de perila (12).

8.6.6. 13: 3,4,5-trimetoxicinamato de (-)-bornila



Aspecto: Óleo incolor

Rendimento: 46,2% (72,6 mg)

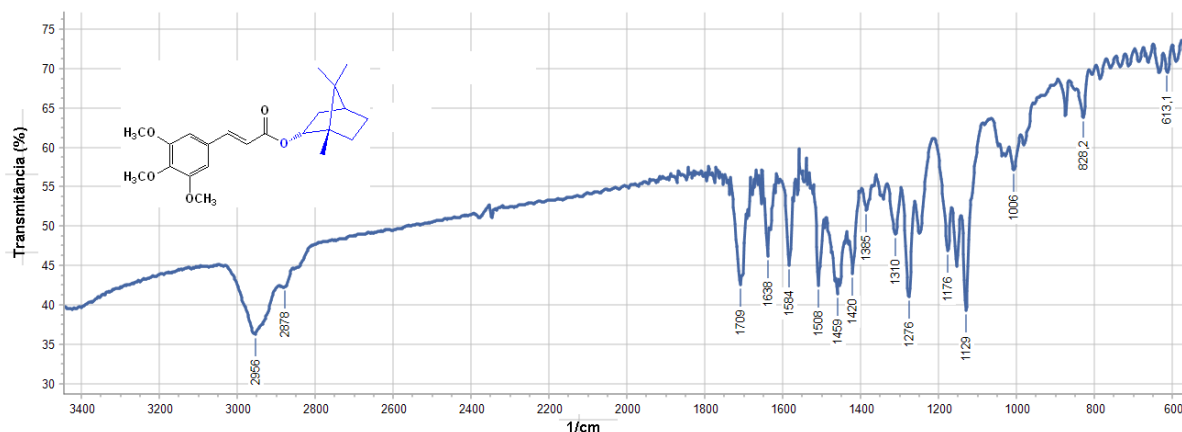
Tempo de Reação: 24 horas

Fator de Retenção: 0,7 (7:3 Hex/AcOEt);

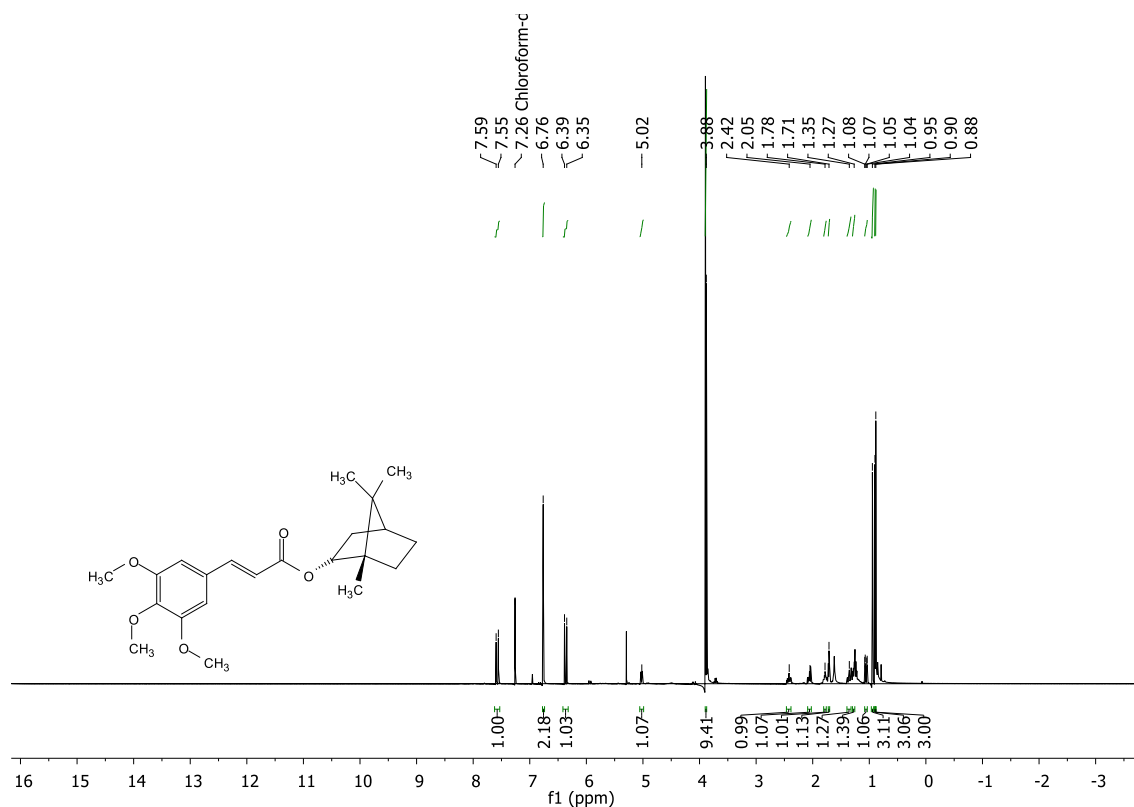
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δH 7,59 (*d*, H-7, $J=15,90$ Hz, H=1), 6,76 (*s*, H-2; H-6, H=2), 6,36 (*d*, $J=15,90$ Hz, H-8, H=1), 5,02 (*ddd*, $J=9,9; 3,4; 2,1$ Hz, H-2', H=1), 3,88 (*s*, 3,4,5-MeO, H=9), 2,48 – 2,37 (*m*, H-3a, H=1), 2,10 – 2,01 (*m*, H-6a, H=1), 1,81 – 1,74 (*m*, H-5a, H=1), 1,71 (*t*, $J=4,5$ Hz, H-4', H=1), 1,40 – 1,32 (*m*, H-6b, H=1), 1,30 – 1,25 (*m*, H-5b, H=1), 1,05 (*dd*, $J=16,1; 6,5$ Hz, H-3'b, H=1), 0,95 (*s*, H-10', H=3), 0,90 (*s*, H-9', H=3), 0,88 (*s*, H-8', H=3)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δC 167,4 (C=O); 153,6 (C-3, C-5); 144,3 (C-7); 140,2 (C-4); 130,2 (C-1); 118,2 (C-8); 105,4 (C-2, C-6); 80,2 (C-2'); 61,1 (C4-MeO); 56,3 (C3-MeO, C5-MeO); 49,1 (C-1'); 48,0 (C-7'); 45,1 (C-4'); 37,0 (C-3'); 28,2 (C-6'); 27,4 (C-5'); 19,9 (C-8'); 19,0 (C-9'); 13,7 (C-10').

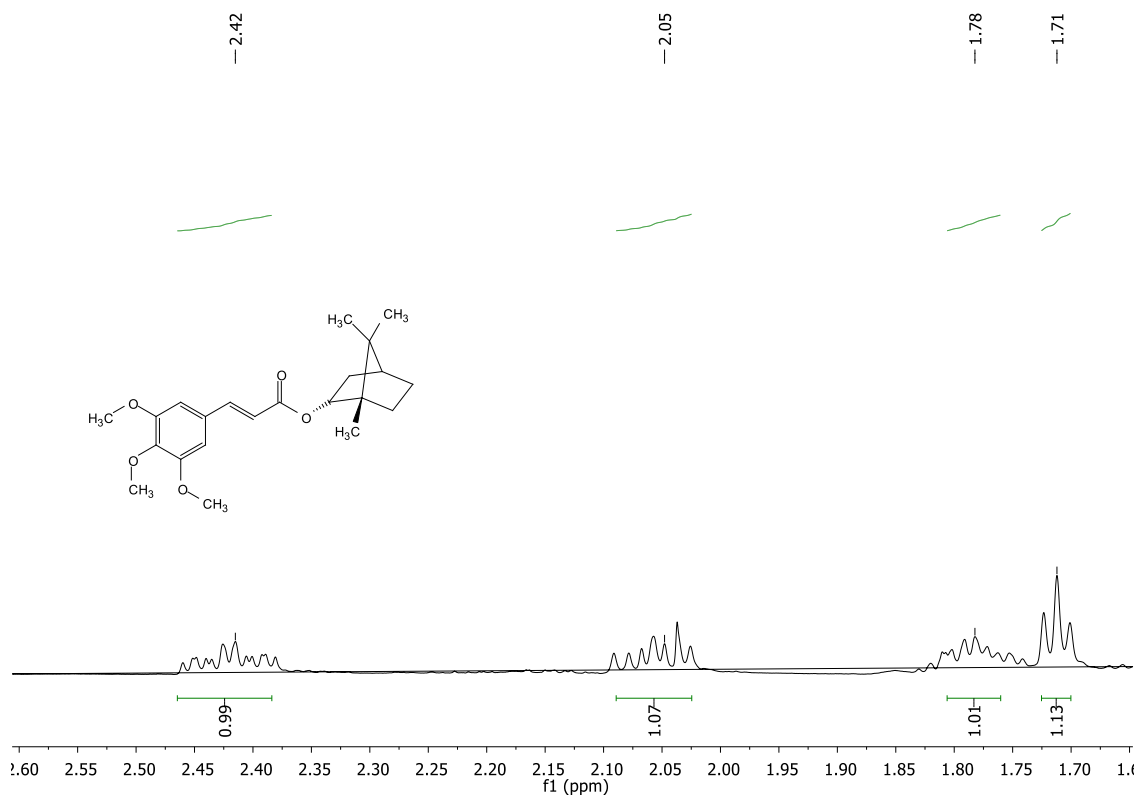
IV ν_{max} (KBr, cm^{-1}): 2956, 2878 (C-H sp^3); 1709 (C=O); 1638, 1459 (C=C); 1584, 1508, 828 (Benzeno assimetricamente trissubstituído); 1276, 1129 (C-O éster) (NÓBREGA et al., 2019).



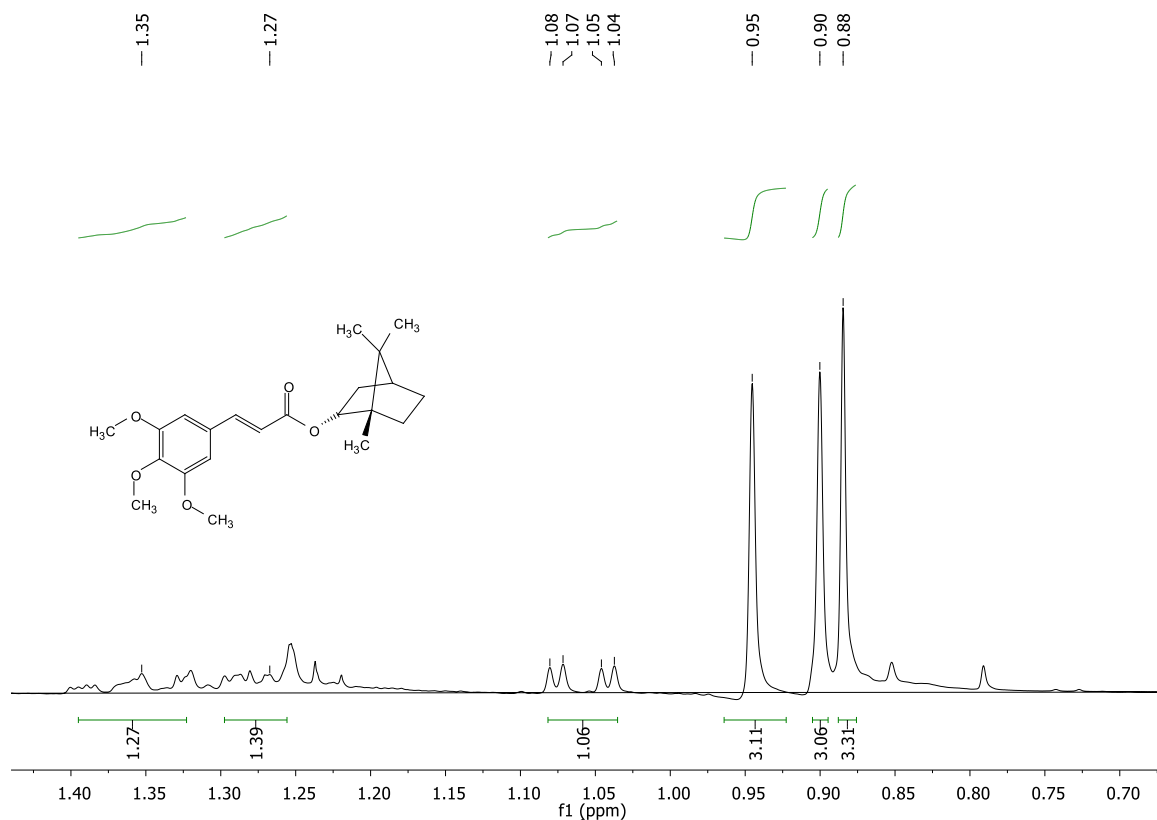
Espectro 49: Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) do 3,4,5-trimetoxicinamato de bornila (13).



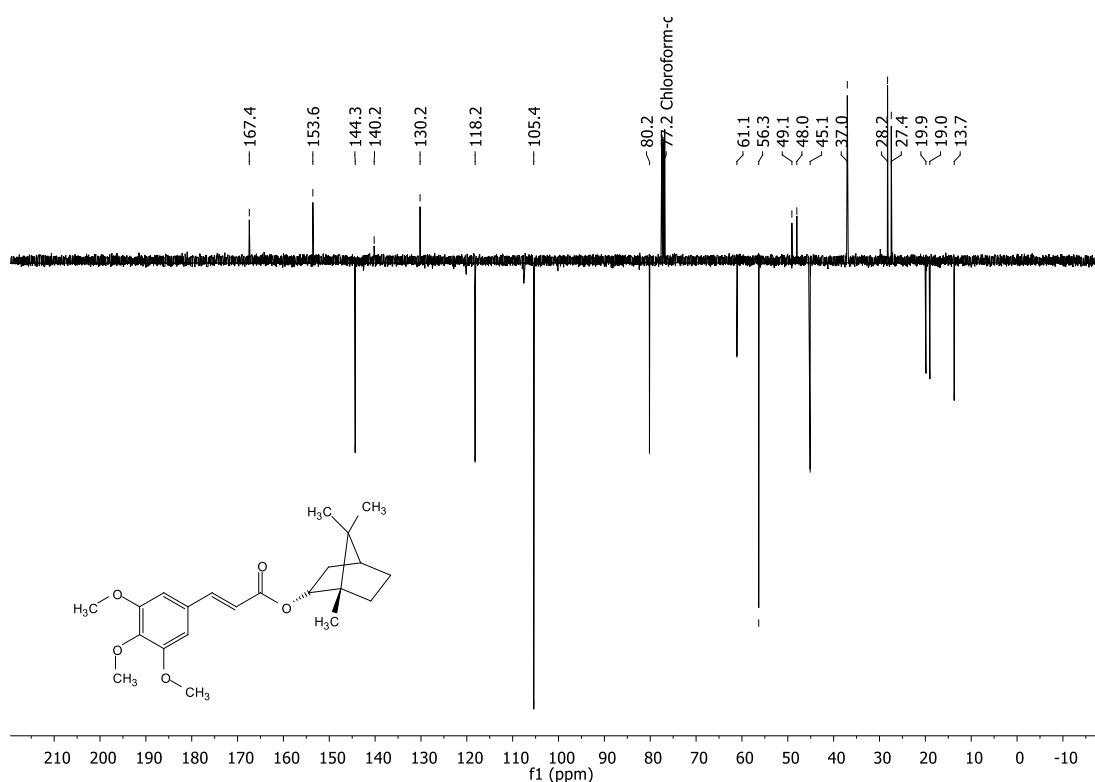
Espectro 50: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de bornila (**13**).



Espectro 51: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de bornila (**13**).



Espectro 52: Expansão do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de bornila (13).



Espectro 53: Espectro de RMN de ¹³C-APT (100 MHz, CDCl₃) do 3,4,5-trimetoxicinamato de bornila (13).

9.0. REFERÊNCIAS

AFONSO, A. M.; EBELL, M. H.; TARLETON, R. L. A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. 1-9, 2012.

AMATO NETO, V. A vida e obra de Carlos Chagas. **Imprensa Médica**, n.442, p.82-91, 1950.

ANDREU, G. L. P.; INADA, N. M.; PELLON, R. F.; DOCAMPO, M. L.; FASCIO, M. L.; D'ACCORSO, N. B.; VERCESI, A. E. *In vitro* effect of a new cinnamic acid derivative against the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Arzneimittelforschung**, v. 59, n. 4, p. 207-211, 2009.

ANTUNES, A. P.; RIBEIRO, A. L. P.; SABINO, E. C.; SILVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, C. D. L.; BOTELHO, A. C. D. C. Benznidazole therapy for Chagas disease in asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors: evaluation of the efficacy of different treatment regimens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 713-720, 2016.

ARAÚJO-VILGES, K. M. D.; OLIVEIRA, S. V. D.; COUTO, S. C. P.; FOKOUE, H. H.; ROMERO, G. A. S.; KATO, M. J.; KUCKELHAUS, S. A. S. Effect of piplartine and cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on peritoneal cells of Swiss mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, p.1601–1607, 2017.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal:- As bases moleculares da ação dos fármacos**, 3º ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.

BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O. D.; ALVES, A. P. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. D.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. W. *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology: An International Journal**, v. 28, n. 2, p. 156-163, 2008.

BEZERRA, D.P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; SAKER-NETO, N.; SILVEIRAER, COSTA-LOTUFO, L.V. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 48, p. 453–63, 2013.

BI, J.; WANG, W.; DU, J.; CHEN, K.; CHENG, K. Structure-activity relationship study and biological evaluation of SAC-Garlic acid conjugates as novel anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 179, p. 233-245, 2019.

BOECK, P.; SÁ, M. M.; DE SOUZA, B. S.; CERCENA, R.; ESCALANTE, A. M.;

ZACHINO, S. A.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. A simple synthesis of kaurenoic ester and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1360-1366, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 21, p. 1-9, 2015.

CALVALCANTE, P. M. M.; DA SILVA, R. L.; DE FREITAS, J. J. R.; DE FREITAS, J. C. R.; DE FREITAS FILHO, J. R. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, v. 26, n. 4, p. 319-329, 2015.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with Benznidazole. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 44, p. 29-37, 2002.

CAROD-ARTAL, F. J.; GASCON, J. Chagas disease and stroke. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 5, p. 533-542, 2010.

CARVALHO, S. A.; FEITOSA, L. O.; SOARES, M.; COSTA, T. E.; HENRIQUES, M. G.; SALOMÃO, K.; WARDELL, S. M. Design and synthesis of new (*E*)-cinnamic *N*-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 512-521, 2012.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Chagas Disease: What U.S. Clinicians Need to Know**, 2012 Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/cme/chagas/lesson_1/3.html>. Acesso em: 3 jan. 2020.

CHAGAS, C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Trypanosoma Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHATELAIN, Eric. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 22-35, 2015.

CHEN, X.; ZHONG, Z.; XU, Z.; CHEN, L.; WANG, Y. 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: forty years of application and controversy. **Free Radical Research**, v. 44, n. 6, p. 587-604, 2010.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S4-S5, 2010.

COSTA, M.; TAVARES, V.; AQUINO, M. V.; MOREIRA, D. Doença de Chagas: Uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 2, n. 1, 2013.

COSTA, T. S.; ORNELAS, D. L.; GUIMARÃES, P. I. C.; MERÇON, F. Confirmando a Esterificação de Fischer por Meio dos Aromas. **Química Nova na Escola**, v. 19, n.1, p. 36, 2004.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L.O.; BOLZANI, V.S.; DEBONSI, H.M.; PASSERINI, G.D.; CICARELLI, R.M.B.; KATO, M.J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703–711, 2009.

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

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286-296, 2012.

CUCUNUBÁ, Z. M.; OKUWOGA, O.; BASÁÑEZ, M. G.; NOUVELLET, P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 42, 2016.

CUNHA FILHO, M. S. S.; LEONARDI, D.; LAMAS, M. C.; SALOMON, C. J. Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas. **Brasilia Medica**, v. 49, n. 4, p.1-7, 2013.

DA COSTA, A. W. F.; DO CARMO NETO, J. R.; BRAGA, Y. L. L.; SILVA, B. A.; LAMOUNIER, A. B.; SILVA, B. O.; MACHADO, J. R. Cardiac Chagas Disease: MMPs, TIMPs, Galectins, and TGF- β as Tissue Remodelling Players. **Disease Markers**, v. 2019, 2019.

DE FARIAS, M. O.; LIMA, T. C.; PÉREZ, A. L. A. L.; SILVA, R. H. N.; OLIVEIRA, A. J. M. S.; LIMA, E. O.; DE SOUSA, D. P. Antifungal activity of ester derivatives from caffeic acid against *Candida species*. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 1, p. 151-159, 2016.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. 3rd ed. Reino Unido: John Wiley and Sons, 2009.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. D. A. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 375-379, 2011.

DIAS, J. C. P.; RAMOS J. A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; COURA, J. R.; SILVEIRA, A. C. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7-86, 2016.

DIKALOV, S.; GRIENDLING, K. K.; HARRISON, D. G. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. **Hypertension**, v. 49, p. 717–727, 2007.

DUH, C. Y.; WU, Y. C.; WANG, S. K. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of

Piper aborescens. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 6, p. 1575-1577, 1990.

FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Orally-transmitted Chagas disease. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 148, n. 3, p. 125-131, 2017.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 22-27, 2010.

GUMBO, M.; BETECK, R. M.; MANDIZVO, T.; SELDON, R.; WARNER, D. F.; HOPPE, H. C.; LIU, N. Cinnamoyl-oxaborole amides: Synthesis and their *in vitro* biological activity. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 2038, 2018.

HOTEZ, P. J.; M. ALVARADO; M.-G. BASÁÑEZ; I. BOLLIGER; R. BOURNE; M. BOUSSINESQ; S. J. BROOKER; A. S. BROWN; G. BUCKLE ; C. M. BUDKE. The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.7, p.e2865, 2014.

JACKSON, Y.; ALIROL, E.; GETAZ, L.; WOLFF, H.; COMBESURE, C.; CHAPPUIS, F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 10, p. e69-e75, 2010.

JIN-JUN, H.; YAO, S.; ZHOU, Y.; LIN, F.; LU-YING, C.; SHUAI, Y.; DE-AN, G. Anti-proliferation activity of terpenoids isolated from *Euphorbia kansui* in human cancer cells and their structure-activity relationship. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 10, p. 766-774, 2017.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 2, p. 990-994, 1980.

JONES, A. J.; GRKOVIC, T.; SYKES, M. L.; AVERY, V. M. Trypanocidal activity of marine natural products. **Marine Drugs**, v. 11, n. 10, p. 4058-4082, 2013.

JUNG, J. C.; MOON, S.; MIN, D.; PARK, W. K.; JUNG, M.; OH, S. Synthesis and Evaluation of a Series of 3,4,5-Trimethoxycinnamic Acid Derivatives as Potential Antinarcotic Agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, n. 3, p. 389-398, 2013.

JURBERG, J.; RODRIGUES, J. M.; MOREIRA, F. F.; DALE, C.; CORDEIRO, I. R.; VALDIR, J. D. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, FIOCRUZ. p. 1-58, 2014.

KATRITZKY, A. R.; ZHANG, S.; SOARES, A.; WANG, M. A facile synthesis of benzyl- α,β -unsaturated carboxylic esters. **ARKIVOC**, v. 10, p. 54-57, 2001.

KESSLER, R. L.; SOARES, M. J.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A. *Trypanosoma cruzi* Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

KUMAR, S.; ARYA, P.; MUKHERJEE, C.; SINGH, B. K.; SINGH, N.; PARMAR, V. S.; GHOSH, B. Novel aromatic ester from *Piper longum* and its analogues inhibit expression of cell adhesion molecules on endothelial cells. **Biochemistry**, v. 44, n. 48, p. 15944-15952, 2005.

LEE, B. Y.; BACON, K. M.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 342-348, 2013.

LI, W.; LI, N.; TANG, Y.; LI, B.; LIU, L.; ZHANG, X.; FU, H.; DUAN, J. Biological activity evaluation and structure-activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 6085 - 6088, 2012.

LI, Y. G.; WANG, J. X.; ZHANG, G. N.; ZHU, M.; YOU, X. F.; HU, X. X.; WANG, Y. C. Antibacterial Activity and Structure- Activity Relationship of a Series of Newly Synthesized Pleuromutilin Derivatives. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 2, p. e1800560, 2019.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LIMA, T. C.; SOUZA, R. J.; SANTOS, A. D.; MORAES, M. H.; BIONDO, N. E.; BARISON, A.; BIAVATTI, M. W. Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less. **Natural Product Research**, v. 30, n. 5, p. 551-557, 2016.

LOPES, S. P.; CASTILLO, Y. P.; MONTEIRO, M. L.; DE MENEZES, R.R.; ALMEIDA, R. N.; MARTINS, A.; SOUSA, D. P. D. Trypanocidal Mechanism of Action and *in silico* Studies of *p*-Coumaric Acid Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 5916, 2019.

LUTJEN, A. B.; QUIRK, M. A.; BARBERA, A. M.; KOLONKO, E. M. Synthesis of (*E*)-cinnamyl ester derivatives via a greener Steglich esterification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, n. 26, v. 19, p. 5291-5298, 2018.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A. S. D. L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 483–485, 2010.

MARCHIORI, E. Chagas disease: a tropical infection of interest to the radiologist. **Radiologia Brasileira**, v. 49, n. 6, p. 5-6, 2016.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI JR, A.; AVEZUM JR, A.; MATTOS, A. C.; RASSI, A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 319-324, 2009.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. D. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.

MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; DOS SANTOS, J. A. F.; MOREIRA, D. R. M.; NOGUEIRA, R. C.; TOMASSINI, T. C. B.; SOARES, M. B. P. *In vitro* and *in vivo* antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 22, n. 11, p. 969-974, 2015.

MENEZES, J. C. L.; VAZ, L. B. A.; DE ABREU VIEIRA, P. M.; DA SILVA FONSECA, K.; CARNEIRO, C. M.; TAYLOR, J. G. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of diaryldiazepines. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 43-51, 2015.

MENGARDA, A. C.; MENDONÇA, P. S.; MORAIS, C. S.; COGO, R. M.; MAZLOUM, S. F.; SALVADORI, M. C.; DE MORAES, J. Antiparasitic activity of pipartine (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis. **Acta Tropica**, p. 105350, 2020.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M.J.; NAKANO, E. *Schistosoma mansoni*: *in vitro* schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. **Experimental Parasitology**, v. 32, p. 222–227, 2012.

MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. O controle da transmissão transfusional. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 64-67, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUSKAWAR, P. N.; THENMOZHI, K.; GAJBHIYE, J. M.; BHAGAT, P. R.; Facile esterification of carboxylic acid using amide functionalized benzimidazolium dicationic ionic liquids. **Applied Catalysis A: General**, v. 482, p. 214–220, 2014.

NAVICKIENE, D. H. M.; BOLZANI, V. D. S.; KATO, M. J.; PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 14, n. 5, p. 281-284, 2003.

NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 17, p. 522–524, 1978.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NÓBREGA, F. R.; OZDEMIR, O.; NASCIMENTO, S. C. S.; BARBOZA, J. N.; TURKEZ, H.; DE SOUSA, D. P. Piplartine analogues and cytotoxic evaluation against glioblastoma. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1382, 2018.

NÓBREGA, F. R.; SILVA, L. V.; BEZERRA FILHO, C. D. S. M.; LIMA, T. C.; CASTILLO, Y. P.; BEZERRA, D. P.; SOUSA, D. P. D.. Design, Antileishmanial Activity, and QSAR Studies of a Series of Piplartine Analogues. **Journal of Chemistry**, v. 2019, 2019.

NOVAK, I.; KOVAČ, B. Electronic structure of antibiotic erythromycin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 138, p. 550-552, 2015.

OLIVEIRA, F. M.; NAGAO-DIAS, A. T.; DE PONTES, V. M. O.; DE SOUZA JÚNIOR, A. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 3, p. 209-228, 2008.

OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO, A. C. Síntese de ésteres de aromas de frutas: um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n.1, p. 152-167, 2014.

ORTÍ-LUCAS, R. M.; PARADA-BARBA, M. C.; RUBIA-ORTÍ, J. E.; CARRILLO-RUIZ, A.; BESO-DELGADO, M.; BOONE, A. L. Impact of Chagas disease in Bolivian immigrants living in Europe and the risk of stigmatization. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, 2014.

OSTERMAYER, A. L.; PASSOS, A. D. C.; SILVEIRA, A. C.; FERREIRA, A. W.; MACEDO, V.; PRATA, A. R. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 108-121, 2011.

PARKER, E. R.; SETHI, A. Chagas disease: coming to a place near you. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 1, p. 53-62, 2011.

PEREIRA, K. S.; SCHMIDT, F. L.; GUARALDO, A. M.; FRANCO, R. M.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. Chagas' disease as a foodborne illness. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 441-446, 2009.

PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. 34, 2013.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

PINAZO, M. J.; MUÑOZ, J.; POSADA, E.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; GÁLLEGO, M.; AYALA, E.; GASCON, J. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4896-4899, 2010.

POKORNÝ, J.; POKORNÝ, J.; KOBILKOVÁ, J.; JANDOVÁ, A.; VRBA, J.; VRBA JR. Targeting mitochondria for cancer treatment - two types of mitochondrial dysfunction. **Prague Medical Report**, v. 115, n. 3–4, p. 104–119, 2014.

REZENDE, J. M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 297–343, 2000.

RODRIGUES, J. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORREA, A. G.; SANGI, D. P.; NAKAMURA, C. V. A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benznidazole, against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Nanotechnological approaches against Chagas disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 4-5, p. 576-588, 2010.

SAMPAIO, T. L.; DA COSTA, M. F. B.; MENESES, G. C.; ARRIETA, M. C. V.; CHAVES FILHO, A. J. M.; DE MORAIS, G. B.; MARTINS, A. M. C. Nephroprotective effects of (-)- α -bisabolol against ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine**, v. 23, n. 14, p. 1843–1852, 2016.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; SILVA, M. C.; SANTOS, M.; SILVA, G. K.; MILANEZI, C.; SILVA, J. S. Ruthenium complex with benznidazole and nitric oxide as a new candidate for the treatment of chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

SILVA, R. H.; ANDRADE, A.; NÓBREGA, D. F.; CASTRO, R. D. D.; PESSÔA, H. L.; RANI, N.; DE SOUSA, D. P. Antimicrobial Activity of 4-Chlorocinnamic Acid Derivatives. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1-13, 2019.

URBINA, J.A. New insights in Chagas' disease treatment. **Drugs Future**, v.35, p. 409–419, 2010.

VANHOLME, B.; EL HOUARI, I.; BOERJAN, W. Bioactivity: phenylpropanoids' best kept secret. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 156-162, 2019.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, G. A. L.; SILVA, M. T. A. D.; REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; LAURE, H. J.; ROSA, J. C.; CICARELLI, R. M. B. *Trypanosoma cruzi*: analysis of two different

strains after piplartine treatment. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 22, n. 3, p. 208-218, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas Disease (American trypanosomiasis)**, 2019. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em 4 jan. 2020.

ZHANG, E.; ZHANG, C.; SU, Y.; CHENG, T.; SHI, C. Newly developed strategies for multifunctional mitochondria-targeted agents in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 3–4, p. 140–146, 2011.

ZHAO, Z.; BAI, Y.; XIE, J.; CHEN, X.; HE, X.; SUN, Y.; ZHENG, X. Excavating precursors from the traditional Chinese herb *Polygala tenuifolia* and *Gastrodia elata*: Synthesis, anticonvulsant activity evaluation of 3, 4, 5-trimethoxycinnamic acid (TMCA) ester derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102832, 2019.