

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**IGOR RODRIGUES LAPA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE DERIVADOS  
PIPERAZÍNICOS DO EUGENOL**

**Alfenas/MG**

**2023**

**IGOR RODRIGUES LAPA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE DERIVADOS  
PIPERAZÍNICOS DO EUGENOL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Lopardi Franco

**Alfenas/MG**

**2023**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Lapa, Igor Rodrigues.

Síntese e avaliação do potencial antimicrobiano de derivados piperazínicos do eugenol / Igor Rodrigues Lapa. - Alfenas, MG, 2023.  
166 f. : il. -

Orientador(a): Diogo Teixeira Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Eugenol. 2. Dihidroeugenol. 3. Piperazinas. 4. Bases de Mannich. 5. Antimicrobianos. I. Carvalho, Diogo Teixeira, orient. II. Título.

IGOR RODRIGUES LAPA

**"SÍNTESE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE DERIVADOS PIPERAZÍNICOS DO EUGENOL"**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 29 de junho de 2023.

Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Sônia Aparecida Figueiredo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Magali Benjamim Araújo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Diogo Teixeira Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 29/06/2023, às 18:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1024791** e o código CRC **5D6F27FD**.

Dedico este trabalho aos meus amigos Igor Gomes, Marco Túlio e Henrique Hendges por sempre acreditarem e me apoiarem durante todos esses anos, em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador e coorientador pelo apoio e por acreditarem em mim;

Aos professores, funcionários da Universidade Federal de Alfenas por me fornecerem o conhecimento e ferramentas necessárias para que este trabalho fosse realizado;

Aos colegas do LQFar, especialmente ao colega Lucas Garcia;

À FAPEMIG por todo apoio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.

Tem sempre uma saída para aqueles que são espertos o bastante para encontrá-la.

(RIORDAN, R., 2007, p. 224)

## RESUMO

A resistência apresentada por parte dos patógenos existentes no mundo todo, somada a falta de antimicrobianos inovadores são grandes problemas para a humanidade, principalmente em tempos pós-pandemia. Nesse sentido, a Química Medicinal se destaca como uma área muito importante tendo em vista seu papel no descobrimento e planejamento de novos candidatos a fármacos. Produtos naturais são, há muito tempo, empregados como substâncias de partida na elaboração de derivados potencialmente bioativos, muitas vezes por derivatização com grupos químicos reconhecidamente importantes como farmacóforo. Tendo isso em vista, e levando em conta as pesquisas deste grupo com eugenol e seus análogos, objetivou-se com deste trabalho sintetizar dezesseis derivados piperazínicos do eugenol/dihidroeugenol, caracterizá-los, avaliar sua citotoxicidade e suas atividades antibacteriana, antimicobacteriana e tripanossomicida *in vitro*. Para a síntese dos derivados, empregou-se essencialmente a reação de Mannich envolvendo eugenol ou dihidroeugenol, formaldeído e um conjunto de diferentes piperazinas. As substâncias planejadas, denominados IRLAE1-IRLAE10 e IRLAD1-IRLAD10 foram obtidas com rendimentos entre 10-84% e tiveram suas identidades comprovadas por métodos de análise estrutural. Das 16 substâncias sintetizadas, 13 são inéditas. Das avaliações biológicas, observou-se que todas elas apresentaram citotoxicidade somente acima de 500  $\mu\text{M}$  e que demonstraram apenas baixa atividade contra o parasita *Trypanosoma cruzi* (acima de 125  $\mu\text{M}$ ). Entretanto, os derivados IRLAE8, IRLAE9, IRLAE10, IRLAD4, IRLAD9 e IRLA10 mostraram atividade antibacteriana e antimicobacteriana expressivas (CIM entre 1,22 e 19,53  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) contra todas as espécies testadas (*Mycobacteroides abcessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*), inclusive contra isolados clínicos resistentes. Ainda, essas seis substâncias mostraram-se ativas contra a formação de biofilmes de espécie em valores de fração da concentração inibitória mínima. Esses achados apontam parte dos produtos como promissores e os destacam como bons protótipos para estudos mais aprofundados na busca de novos antimicrobianos.

Palavras-chave: eugenol; dihidroeugenol; piperazinas; bases de Mannich; antimicrobianos;

## ABSTRACT

The resistance presented by pathogens existing worldwide, added to the lack of innovative antimicrobials, are major problems for humanity, especially in post-pandemic times. In this sense, Medicinal Chemistry stands out as a very important area in view of its role in the discovery and planning of new drug candidates. Natural products have long been used as starting substances in the preparation of potentially bioactive derivatives, often by derivatization with chemical groups that are known to be important as a pharmacophore. Taking into account the research of this group with eugenol and its analogues, the objective of this work was to synthesize sixteen piperazine derivatives of eugenol/dihydroeugenol, characterize them, evaluate their cytotoxicity and their antibacterial, antimycobacterial and trypanocidal activities in vitro. For the synthesis of the derivatives, the Mannich reaction involving eugenol or dihydroeugenol, formaldehyde and a set of different piperazines was used. The chemical substances, called IRLAE1-IRLAE10 and IRLAD1-IRLAD10 were in yields between 10-84% and had their identities proven by structural analysis methods. Of the 16 synthesized substances, 13 are new. From the biological estimates, it was observed that all of them showed cytotoxicity only above 500  $\mu\text{M}$  and that only low activity against the *Trypanosoma cruzi* parasite (above 125  $\mu\text{M}$ ). However, the derivatives IRLAE8, IRLAE9, IRLAE10, IRLAD4, IRLAD9 and IRLA10 found significant antibacterial and antimycobacterial activity (MIC between 1.22 and 19.53  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) against all transient species (*Mycobacteroides abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*), including against resistant clinical isolates. Furthermore, these six substances proved to be active against the formation of biofilms of species at emission values of the minimum inhibitory concentration. These findings point to some of the products as promising and highlight them as good prototypes for further studies in the search for new antimicrobials.

Keywords: eugenol; dihydroeugenol; piperazines; Mannich bases; antimicrobials;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	20
Figura 2 - Evolução da Infecção pelo parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	21
Figura 3 - Estruturas dos dois fármacos disponíveis para o tratamento da Doença de Chagas. .....	22
Figura 4 - Formas do <i>Candida albicans</i> . .....	24
Figura 5 - Exemplos de antifúngicos utilizados no tratamento da Candidíase. ....	25
Figura 6 - Imagem microscópica do <i>Aspergillus fumigatus</i> . .....	26
Figura 7 - Resistência apresentada pelo <i>Aspergillus fumigatus</i> . .....	27
Figura 8 - Estruturas dos fármacos usados para tratamento das doenças causadas por MNT. ....	30
Figura 9 - Estruturas químicas das substâncias: eugenol, isoeugenol, dihidroeugenol. ....	31
Figura 10 - Comparação da atividade do eugenol e amoxicilina frente a <i>Helicobacter pylori</i> . .....	32
Figura 11 - Possíveis mecanismos de ação do eugenol contra patógenos. ....	33
Figura 12 - Derivado sintetizado por Rahim <i>et al.</i> (20217) e sua atividade antibacteriana. ....	34
Figura 13 - Derivados do eugenol sintetizados por Bilgiçli <i>et al.</i> (2019). .....	34
Figura 14 - Derivados sintetizados por De Almeida <i>et al.</i> (2019). ....	35
Figura 15 - Derivados triazólicos do eugenol sintetizados por Dos Santos <i>et al.</i> (2019). ....	36
Figura 16 - Compostos sintetizados por Olea <i>et al.</i> (2019). ....	36
Figura 17 - Comparação da atividade antifúngica de derivados do eugenol com o antifúngico BC-1000. ....	37
Figura 18 - Derivado glicosídico do eugenol sintetizado por De Souza <i>et al.</i> (2015). ....	38
Figura 19 - Derivados preparados por De Souza <i>et al.</i> (2020). ....	38
Figura 20 - Derivados do dihidroeugenol sintetizados por Resende <i>et al.</i> (2017). ....	39
Figura 21 - Síntese da piperazina ( <b>34</b> ) a partir da dietilenotriamina ( <b>33</b> ). ....	40
Figura 22 - Exemplos de fármacos antimicrobianos com o grupo piperazina . ....	40
Figura 23 - Compostos 41 e 42 e suas atividades biológicas. ....	41
Figura 24 - Compostos piperazínicos preparados por Reddy <i>et al.</i> (2022). ....	42
Figura 25 - Atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados por Reddy <i>et al.</i> . ....	43
Figura 26 - Derivados piperazínicos sintetizados por Keenan <i>et al.</i> (2013). ....	43
Figura 27 - Resultados do ensaio <i>in vivo</i> realizados por Keenan <i>et al.</i> (2013). ....	44
Figura 28 - Exemplos de fármacos e compostos bioativos do tipo base de Mannich. ....	46
Figura 29 - Reação de Mannich utilizada por Joshi <i>et al.</i> (2009). ....	47

Figura 30 - Derivados sintetizados por Filho <i>et al.</i> (2016).....	48
Figura 31 - Bases de Mannich preparadas por Paucar <i>et al.</i> .....	49
Figura 32 - Padrão estrutural construído com este trabalho. ....	50
Figura 33 - Derivados piperazínicos sintetizados.....	51
Figura 34 - Método de síntese das bases de Mannich piperazínicas. ....	53
Figura 35 - Mecanismo da Reação de Mannich utilizando eugenol e uma piperazina. ....	54
Figura 36 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE1.....	56
Figura 37 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE1 pelo método de pastilha de KBr. ....	57
Figura 38 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do derivado IRLAE3 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz). ....	59
Figura 39 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do derivado IRLAD3 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	61
Figura 40 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do derivado IRLAE3 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz). ....	63
Figura 41 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do derivado IRLAD3 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	64
Figura 42 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE3 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	66
Figura 43 - Mecanismo da reação de síntese das piperazinas <i>N</i> -sulfoniladas. ....	67
Figura 44 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE10.....	69
Figura 45 - Mecanismo de formilação da reação de Duff. ....	70
Figura 46 - Mecanismo da reação de animação reductiva. ....	71
Figura 47 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do derivado IRLAE8 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz). ....	73
Figura 48 - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do derivado IRLAE8 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz). ....	74
Figura 49 - Avaliação da viabilidade de células HepG2 pelo ensaio do corante resazurina tratas com os compostos piperazínicos sintetizados.....	76
Figura 50 - Avaliação da viabilidade de células H9c2 pelo ensaio do corante resazurina tras com os compostos piperazínicos sintetizados. ....	77
Figura 51 - Inibição da formação de biofilmes de <i>M. fortuitum</i> pelos derivados piperazínicos. .....	83
Figura 52 - Remoção/destruição de biofilmes pré-formados de <i>M. fortuitum</i> pelos derivados piperazínicos. ....	84
Figura 53 - Metodologia de síntese das sulfonamidas a partir piperazina.....	87
Figura 54 - Metodologia de Síntese dos derivados piperazínicos do eugenol.....	88
Figura 55 - Metodologia de Síntese do derivado aldeído do eugenol. ....	95
Figura 56 - Metodologia de síntese dos derivados IRLAE5 e IRLAD5. ....	96
Figura 57 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD1. ....	112
Figura 58 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE2.....	113

Figura 59 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD2. ....	114
Figura 60 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE3.....	115
Figura 61 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD3. ....	116
Figura 62 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE4.....	117
Figura 63 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD4. ....	118
Figura 64 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE5.....	119
Figura 65 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD5. ....	120
Figura 66 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE8.....	121
Figura 67 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD8. ....	122
Figura 68 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE9.....	123
Figura 69 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD9. ....	124
Figura 70 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD10. ....	125
Figura 71 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAE1 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz). ....	126
Figura 72 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAE1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	127
Figura 73 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	128
Figura 74 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAD1 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	129
Figura 75 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAD1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	130
Figura 76 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	131
Figura 77 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAE2 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz). ....	132
Figura 78 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAE2 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	133
Figura 79 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE2 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	134
Figura 80 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAD2 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	135
Figura 81 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAD2 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	136
Figura 82 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD2 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	137
Figura 83 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	138
Figura 84 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAE4 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz). ....	139
Figura 85 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAE4 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	140
Figura 86 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE4 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	141
Figura 87 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAD4 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	142
Figura 88 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAD4 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	143
Figura 89 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD4 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	144
Figura 90 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAE5 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz). ....	145
Figura 91 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAE5 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	146
Figura 92 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE5 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	147

Figura 93 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAD5 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	148
Figura 94 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAD5 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	149
Figura 95 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD5 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	150
Figura 96 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE8 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	151
Figura 97 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAD8 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	152
Figura 98 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAD8 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	153
Figura 99 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD8 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	154
Figura 100 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAE9 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz). ....	155
Figura 101 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAE9 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	156
Figura 102 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE9 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	157
Figura 103 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAD9 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	158
Figura 104 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAD9 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	159
Figura 105 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD9 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	160
Figura 106 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAE10 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz). ....	161
Figura 107 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAE10 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	162
Figura 108 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE10 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	163
Figura 109 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do derivado IRLAD10 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	164
Figura 110 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do derivado IRLAD10 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	165
Figura 111 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD10 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	166

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<sup>13</sup> C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
<sup>1</sup> H-RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
ATR	Reflectância Total Atenuada
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCS	Cromatografia em Coluna de Sílica
CC <sub>50</sub>	Concentração que reduz o número de células viáveis em 50%
CC <sub>90</sub>	Concentração que reduz o número de células viáveis em 90%
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória Média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
DC	Doença de Chagas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNFH	Dinitrofenilhidrazina
DO	Densidade Ótica
EC <sub>50</sub>	Metade da concentração efetiva máxima
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos
FF	Faixa de Fusão
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IS	Índice de Seletividade
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV	Infravermelho
LD <sub>50</sub>	Dose Letal Média
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDF	Resistentes à Diversos Fármacos
REA	Relação Estrutura Atividade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
THF	Tetrahidrofurano

TMS Tetrametilsilano

UFC Unidade Formadora de Colónias

UFMS Universidade Federal de Santa Maria

UHSM Hospital Universitário de Santa Maria

UNIFAL-MG Universidade Federal de Alfenas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1 GENERALIDADES E TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS .....	19
3.2 GENERALIDADES E TRATAMENTO DE DOENÇAS FÚNGICAS.....	23
3.3 GENERALIDADES E TRATAMENTO DE DOENÇAS BACTERIANAS.....	27
3.4 EUGENOL E DERIVADOS: ATIVIDADES BIOLÓGICAS E VERSATILIDADE SINTÉTICA .....	30
3.5 O NÚCLEO PIPERAZÍNICO COMO IMPORTANTE FARMACÓFORO PARA A QUÍMICA MEDICINAL.....	39
2.6 A QUÍMICA DAS BASES DE MANNICH E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	44
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>5 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>86</b>
5.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS PIPERAZÍNICOS .....	86
5.1.1 Síntese das piperazinas <i>N</i> -sulfoniladas .....	86
5.1.2 Síntese das bases de Mannich do eugenol e dihidroeugenol.....	88
5.1.3 Obtenção do 5-alil-2-hidroxi-3-metoxibenzaldeído .....	94
5.1.4 Síntese dos derivados piperazínicos não substituídos do eugenol e dihidroeugenol	95
5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	97
5.2.1 Toxicidade para células de mamíferos .....	97
5.2.2 Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	98
5.2.3 Cepas gram-negativas, gram-positivas e isolados clínicos multirresistentes .....	99
5.2.4 Cepas de micobactérias e isolados clínicos.....	100
5.2.5 Testes de suscetibilidade para micobactérias.....	100
5.2.6 Testes de suscetibilidade Gram-negativos e Gram-positivos.....	100
5.2.7 Ensaio de antibiofilme .....	101
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>103</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>104</b>
<b>ANEXO A - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO</b> .....	<b>112</b>
<b>ANEXO B - ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR</b> .....	<b>126</b>

## 1 INTRODUÇÃO

É de conhecimento geral que ao longo dos anos alguns patógenos vêm se tornando mais resistentes aos fármacos convencionais, chegando a mudar a maneira como estes são administrados de tempos em tempos em pacientes. Isso faz com que a falta de variedade desses fármacos se caracterize como um problema crescente atualmente. A situação é tão alarmante que, desde 2013, o Centro de Controle de Doenças e a Organização Mundial da Saúde (OMS) vêm monitorando esses patógenos, publicando relatórios e conscientizando a população (CDC, 2021).

Antes da pandemia em 2019, em seu último relatório de vigilância de resistência a antimicrobianos, o Centro de Controle de Doenças relatou a existência de ameaças urgentes como 8500 casos de *Acinetobacter* (causadora de pneumonia) resistente ao carbapenem, 323 casos de multirresistência da *Candida auris* e mais de 500 mil casos por anos de *Neisseria gonorrhoeae* resistente à diversos fármacos, entre outros patógenos (CDC, 2019).

Além do cenário seríssimo, a OMS (2022) reportou que grande parte do progresso no combate a resistência de antimicrobianos com esses relatórios, revezamento de medicamentos e assembleias de conscientização foi perdido devido à pandemia da covid-19. Isso foi devido ao grande número de internações hospitalares e falta de pessoal, fazendo com que o sistema de saúde fosse sobrecarregado, não tendo assim o rastreamento eficaz de infecções por patógenos resistentes a antimicrobianos adquiridas em hospitais. Assim, é de grande importância e urgência que novos antimicrobianos sejam sintetizados/descobertos para que essa demanda mundial possa ser suprida.

Dentre as diversas doenças que preocupam a humanidade, a Doença de Chagas (DC) é uma que tem ganhado destaque nos últimos anos. Causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, a DC é categorizada como uma Doença Tropical Negligenciada, pelo fato de afetar principalmente países tropicais subdesenvolvidos, fazendo com que não houvesse grande interesse por parte da indústria farmacêutica em desenvolver medicamentos para essa enfermidade. Contudo, esse cenário tem mudado nos últimos anos devido ao grande investimento de países latinos na pesquisa, planejamento e desenvolvimento de novos fármacos (TROUILLER, *et al*; 2009).

A transmissão da doença acontece principalmente através das fezes dos insetos do gênero *Triatoma* (um deles popularmente conhecido como “barbeiro”) que entram em contato com a ferida causada pela picada deste. Segundo Lidani *et al.*(2019), a Doença de Chagas acomete de 6 a 8 milhões de pessoas no mundo todo e causa aproximadamente 50 mil mortes

por ano. Em um dado mais recente trazido por Bern *et al.*(2020) as estatísticas mostravam 1,2 milhão de casos de cardiomiopatia, colocando essa doença como a primeira no fardo de doenças parasitárias. Ainda segundo os autores, essa situação tornou-se mais alarmante devido ao aparecimento de novas infecções em países não endêmicos, como Estados Unidos e países da Europa, devido a imigração de pessoas infectadas pelo parasita.

Essa problemática se torna mais preocupante pelo fato de que só há dois fármacos disponíveis aprovados pela Administração de Alimentos e Medicamentos estadunidense (em inglês FDA) para o tratamento da doença, sendo eles o nifurtimox e benznidazol. Assim, é urgente a procura de novos antimicrobianos, seja para a Doença de Chagas ou para outros patógenos que veem apresentando resistências aos fármacos já existentes, como os do gênero *Candida*.

Nesse âmbito o eugenol e seus derivados apresentam estruturas importantes para a Química Medicinal devido a suas diversas atividades biológicas. Sendo encontrado principalmente no Cravo-da Índia, o eugenol é conhecido por suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, porém ele e seus derivados têm grande destaque no âmbito antifúngico, tripanossomicida e antibacteriano. Além disso, é um composto com alta versatilidade sintética, podendo sofrer substituições em seu anel aromático, modificações em sua hidroxila fenólica e em seu grupo éter, trazendo grandes possibilidades em termos de novos antimicrobianos (PRAMOD; ANSARI; ALI; 2010).

Além do eugenol, outro composto que vêm chamando atenção nas pesquisas é a piperazina e seus análogos. Estes apresentam importantes atividades biológicas como a anticâncer, antiviral, antibacteriana, antifúngicas, dentre outras (SHAQUIQUZZAMAN, *et al.*2015). O núcleo piperazínico é constituído por um anel de quatro átomos de carbono e dois de nitrogênio em posição 1,4 em relação ao outro e está presente em alguns fármacos disponíveis no mercado como o imatinib, aripiprazol, ranolazina, entre outros (WU, 2012).

Por último, nas pesquisas de desenvolvimento de novos fármacos as bases de Mannich representam um grupo farmacofórico muito importante para a química medicinal. Um dos motivos para isso é que esses compostos possuem grande diversidade estrutural, devido aos tipos de substratos que podem ser submetidos a essa reação e da variedade de aminas que podem ser empregadas. Além disso, as bases de Mannich tendem a apresentar atividades biológicas interessantes como antibacteriana, antifúngica, antiviral, entre outras (ROMAN, 2015).

Em vista dos fatos apresentados, esses compostos têm um grande potencial que vem sendo explorado na pesquisa de desenvolvimento de novos fármacos, podendo trazer

resultados muito promissores nesse sentido. Assim, com esse trabalho objetivou-se, explorar a química do eugenol e do núcleo piperazínico através da reação da formação das bases de Mannich, em busca de compostos inéditos que tenham potencial para se tornarem novos candidatos a fármacos, suprimindo essa demanda tão urgente.

## 2 OBJETIVOS

- Objetivo geral: sintetizar derivados piperazínicos do eugenol e de seu análogo dihidroeugenol e avaliar o potencial antimicrobiano destes;
- Objetivos específicos:
  - Sintetizar derivados do eugenol e do dihidroeugenol por meio de incorporação de diferentes unidades piperazínicas;
  - Caracterizar estes derivados;
  - Avaliar a citotoxicidade *in vitro* destes derivados frente a células H9c2 (cardiomioblastos de ratos) e HepG2 (derivadas de carcinoma hepatocelular humano).
  - Avaliar o potencial antibacteriano e antimicobacteriano, contra bactérias patogênicas Gram negativas e positivas, micobactérias de crescimento rápido.
  - Avaliar o potencial antiparasitário, contra diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 GENERALIDADES E TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas (DC) é uma doença causada pelo parasita *T. cruzi*. A hipótese da origem desse parasita é que foi a partir do tripanosoma de morcego *T. marinkellei*, por ser geneticamente similar a este. Segundo Steverding (2014), existem evidências de infecção pelo *T. cruzi* até antes do período colonial, tendo até mesmo corpos mumificados em que o DNA desse parasita foi encontrado.

A descoberta e melhor estudo do *T. cruzi* e da doença foi realizado pelo médico Carlos Chagas que os estudou em uma zona rural do Brasil em 1907, dando o nome de seu mentor Oswaldo Cruz ao parasita recém-descoberto. Em seu estudo, Chagas isolou o parasita de um gato doméstico e de uma criança que apresentava sintomas da doença, levando-o a caracterização completa do ciclo da doença assim como as espécies de vetores (BERN *et al.*, 2020).

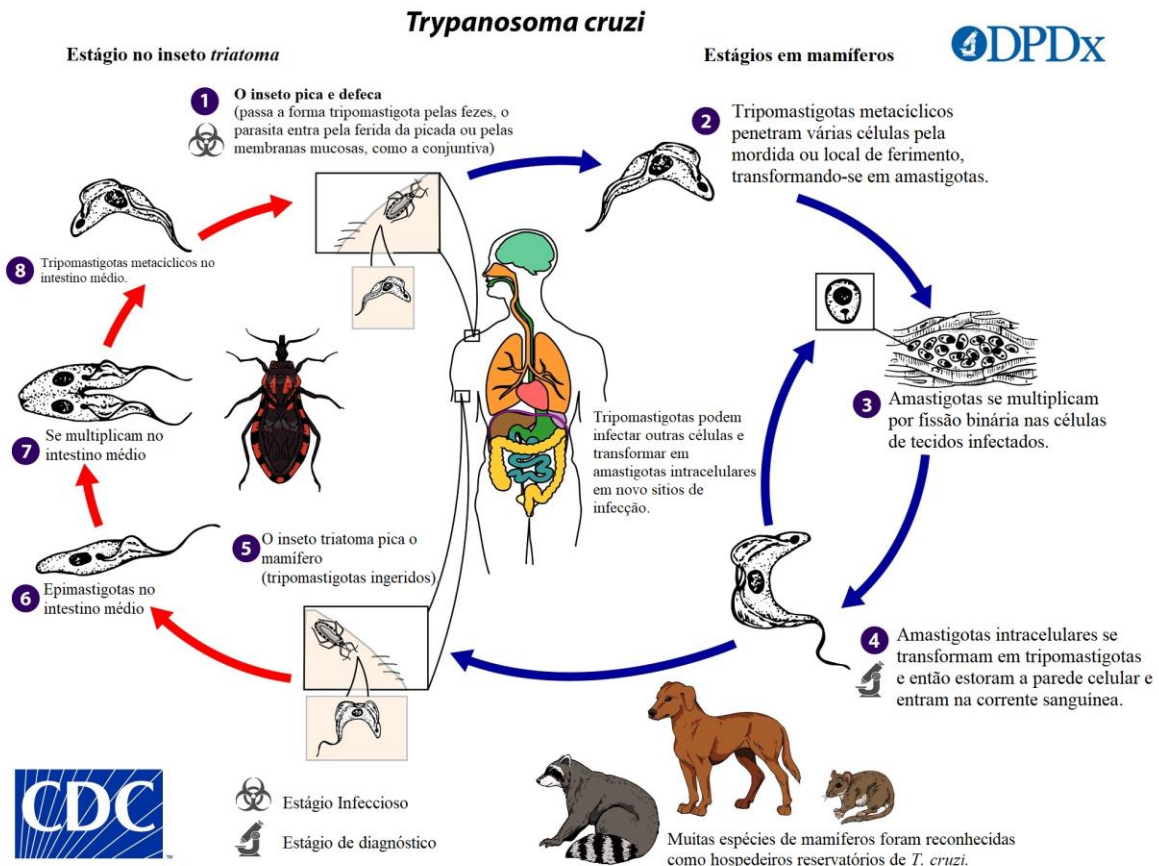
A DC é considerada uma doença tropical negligenciada, pelo fato de que apenas áreas rurais de países latinos são endêmicas dessa enfermidade. Isso faz com que grandes empresas farmacêuticas não possuam interesse no desenvolvimento de novos fármacos, por se tratar de países pobres em que a maior parte da população não terá condições financeiras para tal tratamento. Esse é um dos fatores que dificulta a luta contra essa doença (SANTOS *et al.*, 2020).

Atualmente, segundo a OMS (2022), são mais de 6 milhões de casos em todo mundo, tendo mais de 30 mil novos casos por ano e causando aproximadamente 10 mil mortes relacionadas à doença. Além desse alarmante paradigma, essa doença está aos poucos acometendo áreas urbanas dos países da América do Sul devido à imigração, além também de ter chegado a países de outros continentes. Assim, o órgão de saúde, estabeleceu como objetivos a informação e conscientização global sobre a enfermidade e dados da detecção do maior número de casos existente quanto possível, para que se tenha um controle melhor desse cenário.

O parasita *T. cruzi*, em seu ciclo de vida apresenta três formas. A primeira delas é chamada de epimastigota e é encontrada no sistema digestivo do inseto vetor, possuindo um formato alongado; a segunda forma é a tripomastigota na qual o parasita encontra-se no sangue e em ambiente extracelular; a terceira forma é a arredondada enquanto o parasita encontra-se dentro das células do hospedeiro (BERN, 2015).

Quando possui quantidade suficiente de parasitas em ambiente intracelular, mudam novamente para a forma tripomastigosta, rompendo a célula causando parasitemia para recomençar o ciclo através da picada do inseto vetor novamente, infectando este inseto. Abaixo é possível ver uma ilustração do ciclo de vida desse parasita (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Centro de Controle de Doenças (2021, adaptado).

Além da transmissão do parasita pelo inseto vetor (vetorial), existem também outros tipos de infecção, embora menos frequentes que esta última. Um exemplo é a infecção por via oral, que ocorre quando há a ingestão de alimentos contaminados pelo *T. cruzi*. Porém, os tipos de transmissão que vem preocupando países não endêmicos, como Estados Unidos, são a Vertical (que ocorre durante a gravidez em que o parasita passa para o feto pelo sangue) e pela transfusão de sangue ou doação de órgãos. Esses fatores se tornam muito mais sérios pelo fato de que a maioria das pessoas que apresentam parasitemia não sabem disso. Assim, isso faz com que a imigração dessas pessoas da América do Sul para outros países seja um problema (BERN *et al.*, 2020).

Assim como o parasita possui diferentes formas, a Doença de Chagas também se manifesta de duas maneiras diferentes, que são chamadas de fase aguda e fase crônica. A primeira fase da doença ocorre nas primeiras semanas de infecção, podendo durar até 3 meses. Esta fase é assintomática ou até mesmo oligossintomática, sendo que os sintomas podem incluir prurido no corpo, erupção cutânea, febre, perda de apetite, entre outros. Esta fase é a que tem mais probabilidade de sucesso no tratamento, porém devido ao fato de que o indivíduo melhora em pouco tempo, muitas pessoas não descobrem e não tratam a doença, permanecendo infectadas (CDC, 2022).

Já a fase crônica da doença ocorre após a primeira fase e pode levar anos para apresentar algum sintoma, ou até mesmo não apresentar durante a vida toda. Um exemplo disso pode ser encontrado na primeira paciente Berenice Soares de Moura, diagnosticada pelo próprio Carlos Chagas. Esta viveu sua vida toda sem apresentar sintomas, falecendo aos 72 anos por causas não relacionadas ao parasita (LIDANI *et al.*, 2019).

Nesta fase da doença, os sintomas se tornam mais agravados e a taxa de sucesso do tratamento diminui. Os sintomas podem incluir alargamento de alguns órgãos como coração (podendo causar insuficiência cardíaca, alteração do ritmo cardíaco e parada cardíaca), fígado, esôfago e cólon (podendo causar diversas complicações gastrointestinais como dificuldade para comer e/ou defecar) (CDC, 2012). Pode-se observar abaixo um diagrama das fases da doença (Figura 2).

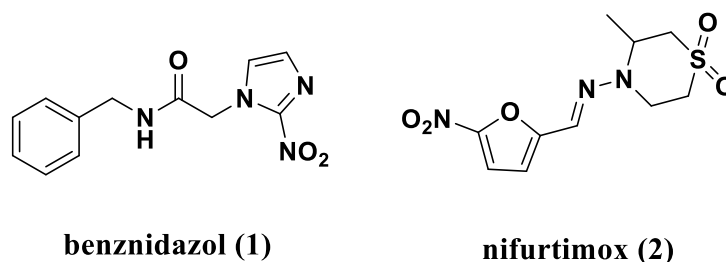
Figura 2 - Evolução da Infecção pelo parasita *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: CCD (2012, adaptado).

O tratamento da doença se dá pela administração de antiparasitário por algumas semanas. O primeiro e mais conhecido deles é o benznidazol (1, Figura 3), indicado para indivíduos de 2 a 12 anos de idade, sendo por via oral de 5-8 mg/kg/dia em 2 doses divididas por um período de 60 dias. O segundo é o nifurtimox (2, Figura 3) e é indicado para adultos, sendo também via oral se constituindo de 8 a 10 mg/kg/dia em duas doses por 60 dias (CDC, 2021).

Figura 3 - Estruturas dos dois fármacos disponíveis para o tratamento da Doença de Chagas.



Fonte: Do autor (2023).

Outra problemática do tratamento da Doença de Chagas encontra-se nos efeitos colaterais desses fármacos. Segundo Bermudez *et al.*(2016), para o benznidazol, sua baixa solubilidade afeta diretamente sua biodisponibilidade. Assim faz requerer maior dose, tendo-se conseqüentemente maior toxicidade, podendo causar sintomas como dermatite esfoliativa, supressão da medula óssea, neuropatia periférica, entre outros.

Ainda segundo os autores, o nifurtimox pode causar como efeitos colaterais doenças gastrointestinais, polineurite, confusão, convulsões focais ou generalizadas e até mesmo psicose. A taxa de sucesso dos dois tipos de tratamento é aproximadamente 99% quando realizado na fase aguda da doença. Porém essa taxa cai se realizado na fase crônica, que é onde a maioria das pessoas descobre a doença, por não apresentar sintomas até então (JACKSON; WYSSA; CHAPPUIS, 2020).

Além dos efeitos colaterais, ainda existe a problemática do custo do tratamento. Se levarmos os dados de doses diárias recomendadas pelo Centro de Controle de Doenças supracitados, para um adulto de 70 kg e o preço atual do nifurtimox (Lampit<sup>®</sup> aproximadamente, 1300,00 reais por 100 comprimidos de 30 mg) (DRUGS, 2022) o tratamento completo da doença pode chegar a mais de 18 mil reais. Isso é inviável para uma enfermidade que afeta predominantemente países pobres.

Com isso, muitos pacientes preferem interromper ou nem chegar a realizar o tratamento, seja pelo custo elevado ou pela quantidade de efeitos colaterais, preferindo viver com a doença, estando ciente que possa ter um tempo de vida curto devido a ela.

Em vista dos argumentos apresentados, é urgente o desenvolvimento de fármacos inéditos para a Doença de Chagas, fazendo com que a pesquisa de substâncias que tenham potencial antiparasitário seja essencial e tenha crescido exponencialmente nos últimos anos, explorando muitas vias partindo-se de produtos naturais e de caminho puramente sintéticos.

### 3.2 GENERALIDADES E TRATAMENTO DE DOENÇAS FÚNGICAS

Outro tipo de enfermidade que é um problema para a humanidade são as doenças advindas das infecções fúngicas, principalmente na realidade pós-covid-19 quando se fala de pessoas hospitalizadas. No cenário atual, esses tipos de doenças são responsáveis anualmente por pelo menos 13 milhões de infecções e 1,5 milhão de mortes no mundo todo, chegando a custar mais de 6 bilhões de dólares por ano (RAYENS; NORRIS, 2022).

Este tipo de infecção se torna um problema muito sério quando se trata de pessoas imunocomprometidas, como portadores do HIV, pacientes sob tratamento quimioterápico ou com imunossupressores. Isso faz com que uma infecção por um patógeno trivial para uma pessoa imunocompetente possa significar sequelas grave ou morte. Outro aspecto que torna essa situação mais alarmante são casos de coinfeção, em que o indivíduo adquire algum patógeno em instalações hospitalares ao ser tratado por outra condição, que segundo um estudo realizado por Rawson *et al.* (2020) ocorreu em 8% dos casos de infecção pelo novo coronavírus.

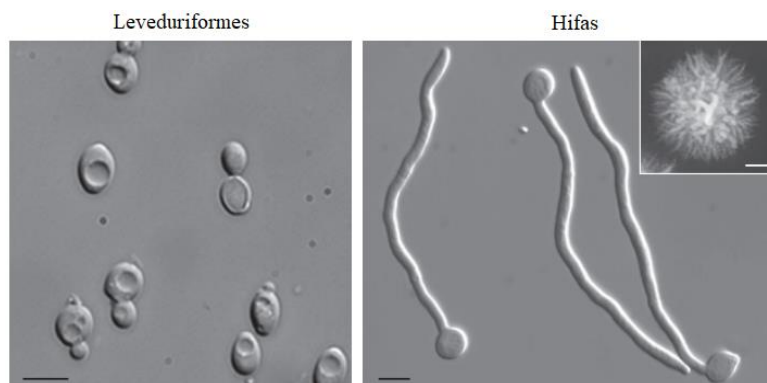
Com isso, a atenção dos pesquisadores da área de ciências farmacêuticas para com infecções fúngicas vêm crescendo, principalmente devido ao atual cenário de resistência de antimicrobianos. Segundo o CCD (2021), é estimado que ao redor do mundo 19% das infecções por *Aspergillus fumigatus* apresentam resistência ao azóis, que são fármacos mais comuns como antifúngicos. Um dos motivos para isso pode estar no uso desses compostos como fungicidas na agricultura. A consequência é que mais indivíduos possam ter contato com esses compostos, pois ainda segundo o órgão de saúde, esse uso quadruplicou.

Neste cenário, as infecções por fungos do gênero *Candida* também são um problema, pois, ainda segundo o órgão, 7% do fungo *Candida* advindas de amostras de sangue são resistentes ao fármaco de referência no mercado fluconazol. Além disso, esse patógeno começou a apresentar resistência à outra classe de fármacos, que são as equinocandinas, algo que não acontecia no passado. Com isso, percebe-se a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.

Existem mais de 17 espécies de *Candida* que são patogênicas para seres humanos, porém, a maioria das infecções é causada pelo *C. albicans*. Este é um fungo oportunista, dimórfico, podendo estar na forma de leveduriformes ou por filamentos que formam hifas (Figura 4). Este patógeno já existe normalmente na microbiota humana e não causa problemas quando sua população é controlada. Entretanto, quando há desestabilização imunológica do

hospedeiro, esse patógeno toma proveito para se multiplicar, assim causando a candidíase (PAPON *et al.*, 2013).

Figura 4 - Formas do *Candida albicans*.

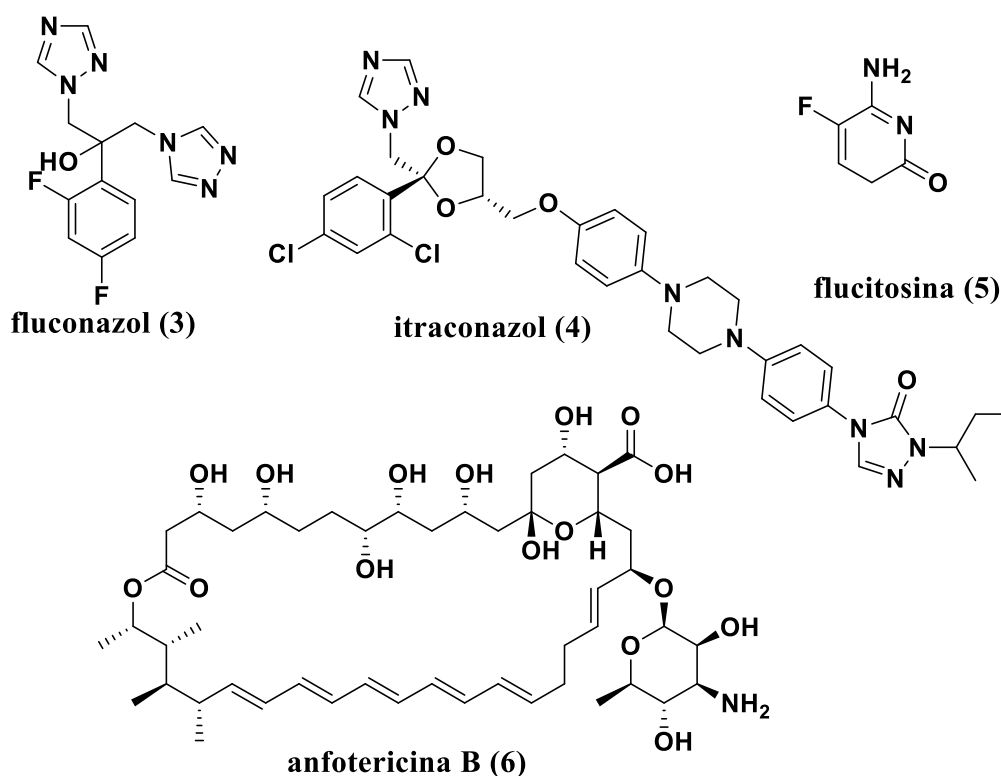


Fonte: SUDBERY (2011, adaptado).

Os tipos mais comuns de manifestação dessa doença, são por via oral ou no órgão sexual, provocando erupções, sensação de queimação, bolhas, mancha brancas, coceira e dor na área afetada. Porém, dependendo do estado imunológico da pessoa, pode se tornar um caso de infecção invasiva pelo patógeno, onde todo o corpo é afetado. Em casos mais extremos a infecção atinge o cérebro, atravessando a barreira hematoencefálica, causando sérios problemas neurológicos (SNARR; DRUMMOND; LIONAKIS, 2020).

Para o tratamento da infecção por *C. albicans*, os fármacos mais utilizados são os azóis. Estes são compostos heterocíclicos de cinco membros contendo um átomo de nitrogênio e pelo menos um outro heteroátomo no anel. Os mais conhecidos dentre os azóis existentes, são o fluconazol e o itraconazol (**3**, **4**, Figura 5). Além desta classe de fármacos, existem também a flucitosina, a anfotericina B (**5**, **6**, Figura 5) e as equinocandinas.

Figura 5 - Exemplos de antifúngicos utilizados no tratamento da Candidíase.



Fonte: Do autor (2023).

Esses fármacos podem ser administrados através de “sistemas de entrega”, o qual compreende cremes de 1 até 4%, supositórios vaginais de 100 até 1200 mg e comprimidos orais de 150 mg (fluconazol, dose única). Entretanto, para a candidíase invasiva o CCD recomenda a administração intravenosa de um antifúngico, que deve durar até duas semanas depois do cessar dos sintomas para casos de candidemia (CCD, 2020).

Após a cura da candidíase é comum o indivíduo ter sintomas como febre, calafrios, fraqueza, entre outros, um efeito colateral da rápida eliminação da população do fungo no corpo. Porém algo que é muito preocupante são os possíveis efeitos colaterais dos fármacos azóis, segundo Benitez e Carver (2019, p. 833, tradução nossa):

O uso prolongado de azólicos está associado à hepatotoxicidade e efeitos hormonais, incluindo ginecomastia, alopecia, diminuição da libido, oligospermia, azoospermia, impotência, hipocalcemia, hiponatremia e (raramente) insuficiência adrenal. voriconazol e posaconazol têm sido associados a neuropatias periféricas e itraconazol e voriconazol com pancreatite.

Além dos fungos do gênero *Candida*, outro que se pode dar destaque no cenário atual é o *Aspergillus* (Figura 6). Este também é oportunista, ou seja, é patogênico em situações anormais do sistema imunológicos, algo que determina a severidade dos sintomas

apresentados pelo hospedeiro. Este fungo afeta principalmente os pulmões, sendo o sintoma mais comum a hemoptise, porém o hospedeiro pode apresentar também febre, perda de peso, baqueteamento e mal-estar (RISCILI; WODD, 2009).

Figura 6 - Imagem microscópica do *Aspergillus fumigatus*.

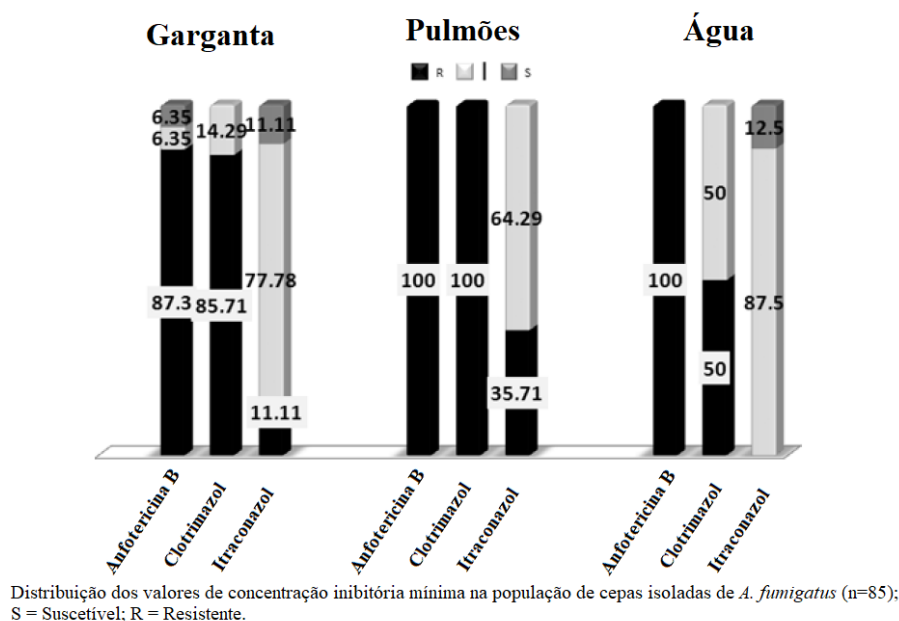


Fonte: CCD (2021)

A preocupação que gira em torno desse patógeno está em sua onipresença nos ambientes e no desenvolvimento de resistência à antifúngicos, podendo causar infecção invasiva. Segundo Dutkiewicz e Hage (2010), esses casos vêm aumentando devido ao aumento também de infecções pelo *Aspergillus*. Em pacientes imunocomprometidos a taxa de infecção invasiva aumentou de 0,33 para 5,8%.

Assim como a *Candida*, o principal tipo de tratamento para aspergilose também depende muito de fármacos triazólicos como itraconazol, voriconazol e o isavuconazol. Entretanto, a resistência a esse antimicrobianos por parte do patógeno vem aumentando com o passar dos anos. Um exemplo disso pode ser encontrado em um estudo realizado por Ziołkowska *et al.* (2014) mostrou que toda as cepas de *A. fumigatus* testadas foram resistentes ao miconazol e 70 a 90% delas apresentaram resistência à azóis e anfotericina B, como pode ser visto na figura a seguir (Figura 7).

Figura 7 - Resistencia apresentada pelo *Aspergillus fumigatus*.



Fonte: ZIÓŁKOWSKA; TOKARZEWSKI; NOWAKIEWICZ (2014, adaptado).

Neste sentido, a resistência relacionada ao gênero *Candida* também se mostra preocupante. Segundo o CCD (2019), a ameaça é considerada de nível sério e casos de resistências são apresentados principalmente por pacientes hospitalizados, representando 7% de todas as infecções. Segundo Ksiezopolska e Gabaldón (2018, p. 6, tradução nossa):

Em vez disso, estudos epidemiológicos estão mostrando um aumento constante na quantidade de isolados resistentes relatados, mesmo entre espécies naturalmente suscetíveis. Por exemplo, um aumento na resistência ao fluconazol em espécies naturalmente suscetíveis, como *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. sake* e *C. pelliculosa*, foi observado em um programa de vigilância populacional compreendendo mais de 250.000 cepas de *Candida* isoladas entre 1997 e 2007.

Em vista disso, não só antiparasitários inéditos são necessários, mas antifúngicos também. Fazendo com que órgãos como a OMS e o CCD continuem a vigilância constante, reportando cada caso o quanto possível dessas infecções em suas estatísticas, além de trazer conscientização e verbas para as pesquisas de novos antimicrobianos.

### 3.3 GENERALIDADES E TRATAMENTO DE DOENÇAS BACTERIANAS

Existem vários tipos de infecções bacterianas e muitas delas se tornaram um problema para a humanidade, principalmente por apresentarem resistência aos antimicrobianos existentes. Segundo Karaman *et al.* (2020), só na Europa a resistência por parte dos patógenos é responsável por 25 mil mortes e faz com que sejam gastos 1,5 bilhão de euro para custo

extra do sistema de saúde por ano. Ainda segundo os autores, a previsão é que, se nada for feito quanto a este cenário, passe a causar 10 milhões de mortes por ano até 2050 e um gasto de 100,2 trilhões de dólares até este ano. Isso faz com que doenças que estavam sob controle devido aos fármacos disponíveis sejam um problema novamente.

Parte dessa resistência é causada por bactérias que formam biofilme. Este se trata de uma grande quantidade de bactérias aderidas a algum tipo de superfície, protegidas por uma matriz extracelular (DAVIES, 2003). Essa proteção faz com que esses patógenos aumentem sua resistência exponencialmente aos fármacos existentes (KARAMAN *et al.*, 2020).

Dentre as ameaças mais urgentes, segundo o último relatório de ameaças por resistência a antimicrobianos do CCD (2019), estão bactérias do gênero *Acinetobacter*, a bactéria *Clostridioides difficile*, e bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Um resumo dos dados anuais de casos de pacientes em hospitais, mortes e custo extra nos Estados Unidos podem ser encontrados na tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais bactérias que apresentaram resistências no último anos.

<b>Ameaças Urgentes</b>	<b>Dados anuais para os Estados Unidos</b>
<i>Acinetobacter</i> resistente ao Carbapenem	8500 casos hospitalares, 700 mortes, \$ 281M
<i>Clostridioides difficile</i>	223900 casos hospitalares, 12800 mortes, \$ 1B
<i>Enterobacterales</i> resistente ao Carbapenem	13100 casos hospitalares, 1100 mortes, \$ 130 M
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistentes a Fármacos	550000 casos hospitalares, 1,14 M de novas infecções, \$
<b>Ameaças Sérias</b>	
<i>Campylobacter</i> resistente a fármacos	448400 casos
<i>Enterobacterceae</i> produzindo ESBL (enzimas	197400 casos hospitalares, 9100 mortes, \$ 1,2 B
<i>Enterococci</i> resistente à Vancomicina	54500 casos hospitalares, 5400 mortes, \$ 539 M
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a diversos	32600 casos hospitalares, 2700 mortes, \$ 767 M
<i>Nontyphoidal Salmonella</i> resistentes a fármacos	212500 infecções, 70 mortes
<i>Salmonella</i> sorotipo Typhi resistente a farmacos	4100 infecções, 700 mortes
<i>Shigella</i> resistente a fármacos	77000 infecções, 5 mortes
<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Meticilina	323700 casos hospitalares, 10600 mortes, \$ 1,7 B
<i>Streptococcus pneumoniae</i> resistente a fármacos	900 infecções, 3600 mortes
<i>Tuberculosis</i> resistente a fármacos	847 casos, 62 mortes, \$ 164000 por caso
<b>Ameaças Preocupantes</b>	
<i>Streptococcus</i> grupo A resistente à Eritromicina	5400 infecções, 450 mortes
<i>Streptococcus</i> grupo B resistente à Clindamicina	1300 infecções, 720 mortes
<b>Em Observação</b>	
<i>Aspergillus fumigatus</i> resistente a azóis	Sem Dados
<i>Mycoplasma genitalium</i> resistente a fármacos	Sem Dados
<i>Bordetella pertussis</i> resistente a fármacos	Sem Dados

Fonte: CCD (2019, adaptado).

Outra problemática pertencente a este cenário são as micobactérias. Estas são um tipo de bactérias aeróbicas, que não se movem e que possuem uma parede celular complexa, constituída principalmente de peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos. Esta parede celular faz com que apresentem resistência a álcoois e ácidos (GUZMAN *et al.*, 2012).

Dentre as mais conhecidas estão *Mycobacterium tuberculosis*, causadora da tuberculose e *M. leprae*, causadora da hanseníase. Além dessas, existem as chamadas micobactérias não tuberculosas (MNT) que geralmente são menos virulentas, mas que podem fazer seu hospedeiro apresentar sérios sintomas a depender de seu estado imunológico. Estas podem apresentar como bactérias relacionadas *M. avium* e *M. intracellulare* (complexo MAC), além de outras como *M. ulcerans*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. marinum* (GRIFFITH, 2007).

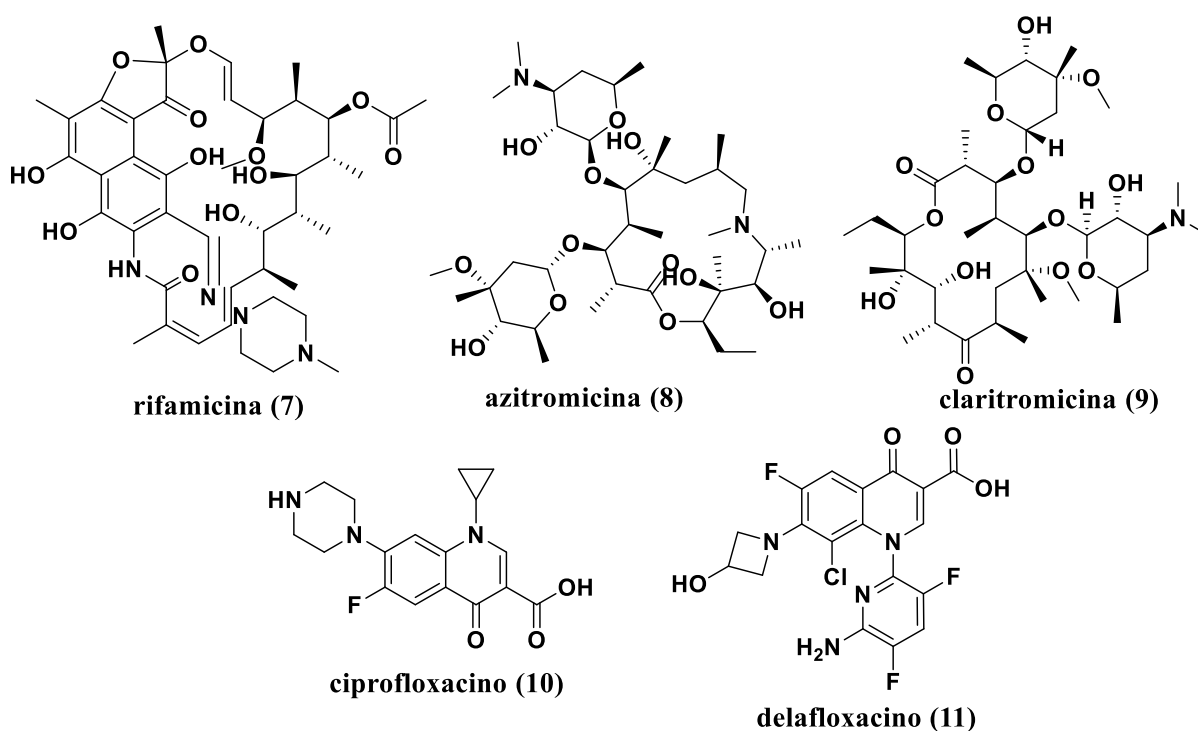
Mesmos que esses patógenos ainda não apresentem grande risco à saúde pública atualmente, o número de infecções vem aumentando, segundo Carneiro *et al.* (2018, p.106):

[...] com altas taxas de incidência e prevalência, incluindo todas as regiões dos EUA (a prevalência anual aumentou significativamente de 20 casos/100.000 habitantes em 1997 para 47 casos/100.000 habitantes em 2007, ou seja, 8,2% por ano), no sudoeste da Irlanda (incidência média de 0,4/100.000 habitantes), na Nova Zelândia (incidência de 1,92/100.000 habitantes), e no Canadá (incidência média de 6,7/100.000 habitantes).

As MNT afetam principalmente o pulmão e, segundo o Ministério da Saúde (2021), os sintomas mais recorrentes são (podendo variar a depender do estado do hospedeiro e do patógeno) hemoptise, febre, tosse, dispneia, fadiga, entre outros. Um fator agravante neste âmbito é que geralmente o diagnóstico é prejudicado pelo fato de os sintomas se assemelharem aqueles de uma doença pulmonar ou imunológica pré-existente, ou até mesmo com tuberculose pulmonar, fazendo com que a infecção por MNT seja mascarada.

O tratamento desse tipo de infecção pode se tornar complicado a depender do estado do hospedeiro. Segundo o CCD (2019) a maioria desses patógenos podem apresentar resistência aos antimicrobianos existentes. Assim, pode haver a necessidade de mais de um antimicrobiano por períodos extensos, podendo chegar até a um ano de tratamento. Nesse sentido, algum dos fármacos disponíveis são: rifamicina, macrolídeos como a azitromicina e claritromicina; e fluorquinolonas como o ciprofloxacino e delafloxacino (7-11, Figura 8) (PHILLEY *et al.*, 2016).

Figura 8 - Estruturas dos fármacos usados para tratamento das doenças causadas por MNT.



\*MNT: Micobactérias não tuberculosas.

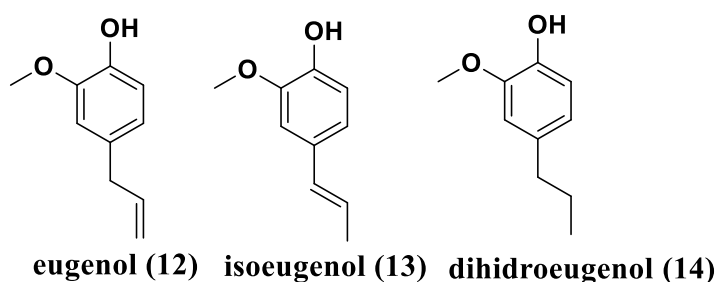
Fonte: Do autor (2023).

Em vista disso, devido a esse grande aumento na resistência apresentadas por bactérias e micobactérias, as pesquisas com o objetivo de desenvolvimento de novos antibacterianos são essenciais, podendo resultar em novas possibilidades a esse cenário.

### 3.4 EUGENOL E DERIVADOS: ATIVIDADES BIOLÓGICAS E VERSATILIDADE SINTÉTICA

O eugenol (**12**, Figura 9) é um composto constituinte de alguns óleos essenciais, presente em grande quantidade na planta *Syzygium aromaticum* (conhecida popularmente como cravo-da-índia); tem coloração amarelada e cheiro adocicado, sendo levemente solúvel em água e altamente solúvel em solventes orgânicos. Este se trata de um composto aromático que pertence à família dos fenóis, exemplos de seus análogos são o isoeugenol e o dihidroeugenol (**13** e **14**, Figura 11), também presentes nessa planta, porém em menor quantidade (PRAMOD; ANSARI; ALI; 2010).

Figura 9 - Estruturas químicas das substâncias: eugenol, isoeugenol, dihidroeuogenol.



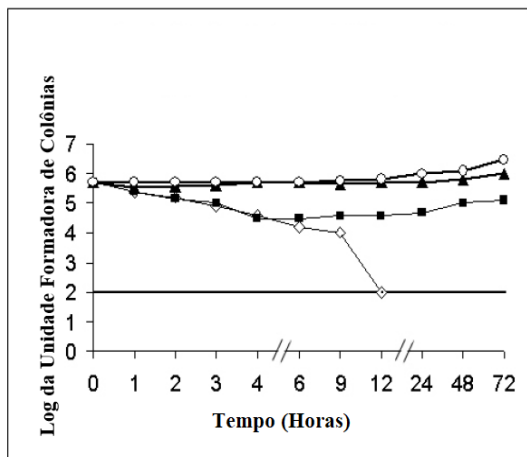
Fonte: Do autor (2023).

Os usos comerciais do eugenol são diversos, como flavorizante na indústria de cosméticos, conservante na alimentícia, constituinte de selantes em odontologia e como precursor de outros compostos químicos. Porém, seu destaque está na indústria farmacêutica, referindo-se ao emprego deste como protótipo na geração outros compostos químicos, visando à otimização de atividades biológicas que já possui. Dentre essas, estão a anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, antineoplásica e, como foco desse trabalho, antiparasitária, antifúngica e antibacteriana (KAUFMAN, 2015).

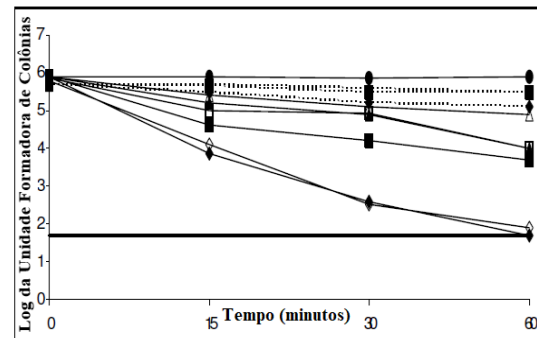
Assim, visando explorar as diversas atividades que o eugenol e seus derivados possuem, pode-se citar trabalhos de síntese que vêm ao longo dos anos tentando melhorá-las. No sentido antibacteriano, o próprio eugenol já demonstra atividades promissoras, um exemplo disso é uma pesquisa realizada por Ali *et al.* (2005), que visaram avaliar atividades desse composto e do cinamaldeído contra 30 cepas de *Helicobacter pylori*.

Os resultados apresentados pelos autores mostram que o eugenol conseguiu inibir o crescimento de todas as cepas em uma concentração de 2 µg/mL após apenas nove horas de incubação. Abaixo encontra-se uma figura que compara os resultados apresentados pelo eugenol com a amoxicilina, fármaco de referência disponível no mercado (Figura 10). O trabalho não apresenta testes de citotoxicidade do composto, porém segundo Ulanowska e Olas (2021), apenas concentrações altas são consideradas tóxicas, sendo uma dose segura até 2,5 mg/kg de massa corporal.

Figura 10 - Comparação da atividade do eugenol e amoxicilina frente a *Helicobacter pylori*.



Efeito da amoxicilina no crescimento do *H. pylori* (ATCC26695). O patógeno foi exposto a concentrações de (◇) 1 µg/ml, (■), 0,1 µg/ml, (▲), 0,01 µg/ml, (○) controle. Limite de detecção é mostrado como uma linha reta.

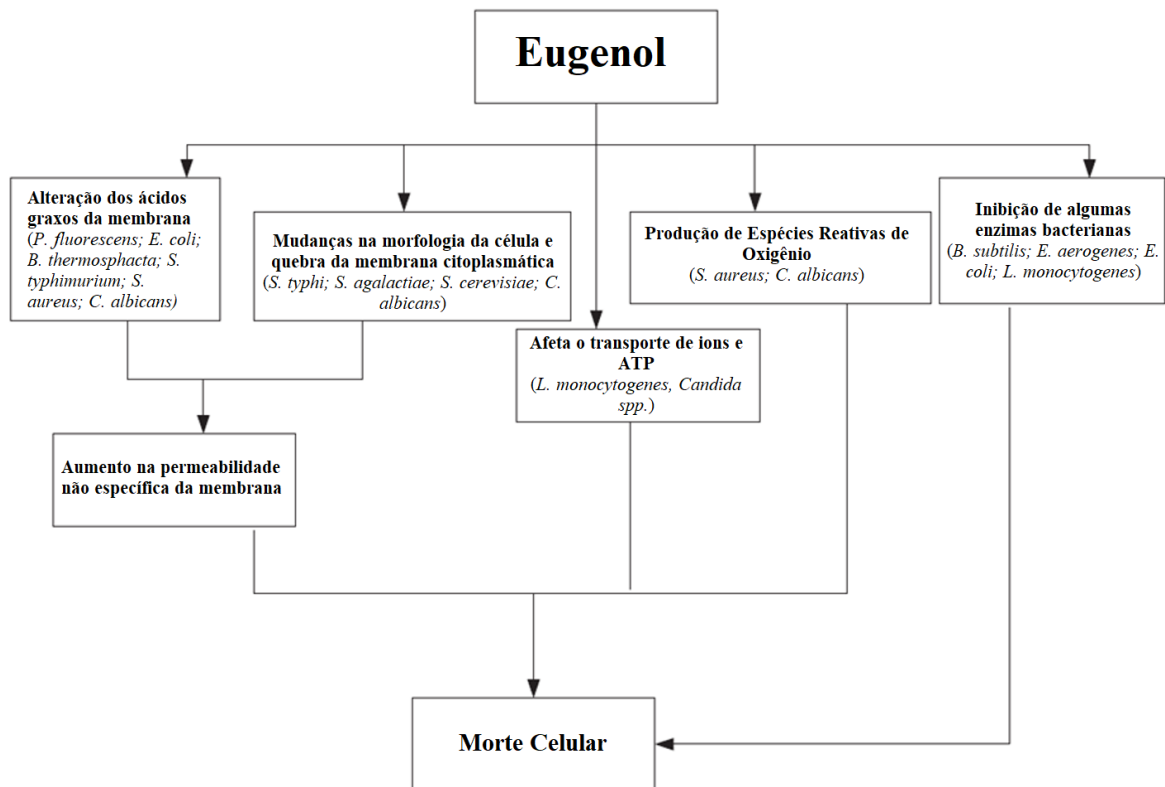


Efeito do eugenol no crescimento do *H. pylori* (ATCC26695). O patógeno foi exposto ao eugenol em pH 4 (linhas solidas) e pH 7 (linhas pontilhadas) a concentrações de (◆ ou ◇) 1 µg/ml, (■ ou □) 0,1 µg/ml, (▲ ou △) 0,01 µg/ml, (●) controle. Limite de detecção é mostrado como uma linha reta. O controle foi mantido com 0,1% DMSO.

Fonte: ALI *et al.* (2005, adaptado).

As pesquisas vão além de somente quantificar a atividade antimicrobiana do eugenol, como mostra uma revisão bibliográfica realizada por Marchese *et al.* (2017). Por ela, os autores avaliaram diversos trabalhos na literatura relatando os possíveis mecanismos de ação relacionados à atividade antimicrobiana. O eugenol apresentou atividade contra diferentes fungos e bactérias. Dentre os mecanismos possíveis, está principalmente o rompimento da membrana celular até inibição de enzimas essenciais, como mostrado na figura a seguir (Figura 11).

Figura 11 - Possíveis mecanismos de ação do eugenol contra patógenos.

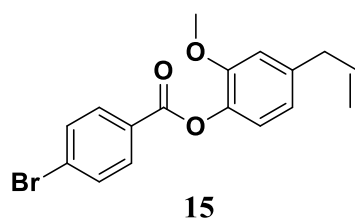


Fonte: Marchese *et al.* (2017, adaptado).

Neste sentido, visando melhora dessa atividade antibacteriana já existente há diversas pesquisas publicadas. Uma delas, publicadas por Rahim *et al.* (2017), visou sintetizar 13 compostos sendo éteres e ésteres derivados do eugenol e avaliar sua atividade antibacteriana contra três espécies de bactérias gram-positivas (*B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermis*) e duas de gram-negativas (*E. coli* e *S. typhimurium*).

Após os testes biológicos, os resultados foram apresentados na forma de zona de inibição em que se observou de 6 até 18 mm para os compostos sintetizados e o mais promissor destes é mostrado abaixo (15, Figura 12).

Figura 12 - Derivado sintetizado por Rahim *et al.*(20217) e sua atividade antibacteriana.



**Zonas de inibição:**

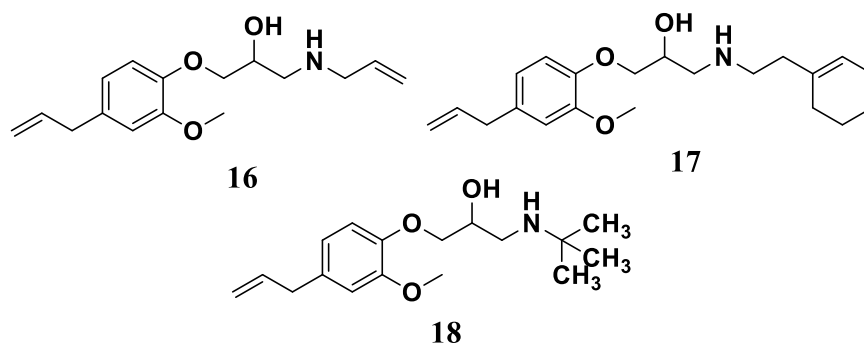
*B. subtilis*: 6 mm;  
*S. aureus*: 16 mm;  
*S. epidermis*: 10 mm;  
*E. coli*: 10 mm;  
*S. typhimurium*: 7 mm;

Fonte: RAHIM *et al.* (2017, adaptado).

Ainda nesse sentido, outro trabalho foi realizado por Bilgiçli *et al.*(2019). Neste os autores objetivaram sintetizar cinco derivados aminas oxipropanólicas do eugenol e avaliar *in vitro* suas atividade biológicas, bem como a antibacteriana. Assim, empregaram o método de difusão em poços utilizando cepas de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Essas bacterias, segundo os pesquisadores, têm histórico de resistência a mais de um antimicrobiano.

Os resultados foram apresentados por meio de zonas de inibição e três compostos (**16-18**, Figura 13) apresentaram os melhores resultados, que foram respectivamente: 21, 19 e 23 mm para *E. coli*; 15, 19 e 16 mm para *P. aeruginosa*; 22, 24 e 22 para *S. aureus* e por fim 21 mm para o *A. baumannii*.

Figura 13 - Derivados do eugenol sintetizados por Bilgiçli *et al.* (2019).

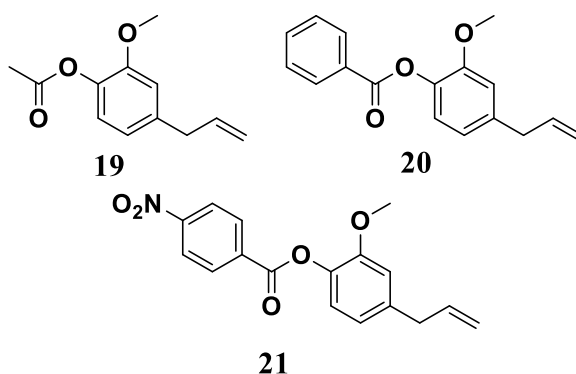


Fonte: BILGIÇLI *et al.* (2019, adaptado).

Os autores também fizeram a avaliação da atividade de inibição de fármacos de referência. Nesse sentido, observaram que, em geral, os compostos sintetizados apresentaram zona de inibição maior que estes, fazendo com que tenham grande potencial antimicrobiano.

Além de bactérias convencionais, existem pesquisas que mostram que os derivados do eugenol também apresentam grande potencial contra micobactérias. Dentre elas, está a desenvolvida por De Almeida *et al.* (2019), que visaram sintetizar três derivados (**19-21**, Figura 14) desse composto e avaliar suas atividades biológicas contra MT e MNT, além de avaliar o efeito combinatório do eugenol com fármacos *in vitro*.

Figura 14 - Derivados sintetizados por De Almeida *et al.* (2019).

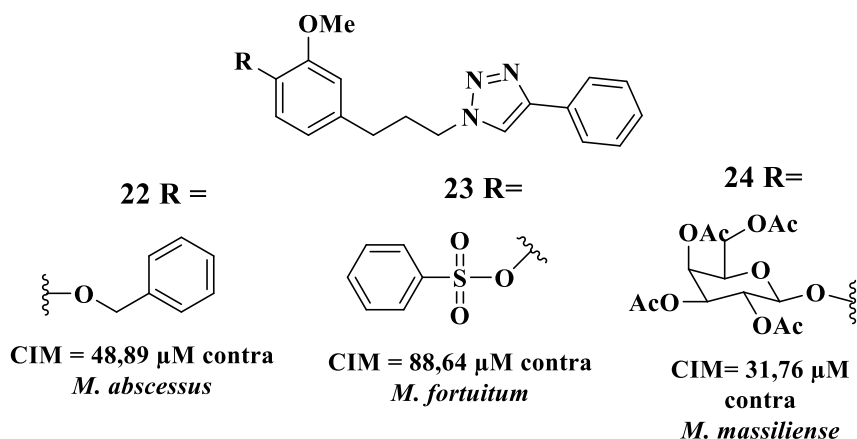


Fonte: DE ALMEIDA *et al.* (2019, adaptado).

Os resultados da pesquisa foram apresentados em termos de Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a concentração mais baixa do composto que impede o crescimento visível do patógeno. Dentre os principais resultados, o derivado **19** apresentou CIM de 62,5 µg/mL para *M. massiliense* e 31,25 µg/mL para *M. kansasii*; o composto **20** apresentou 3,9 e 7,8 µg/mL para *M. chelonae* e *M. massiliense* respectivamente e, por fim **21** apresentou <0,97 µg/mL para esses dois patógenos e 7,8 µg/mL para *M. fortuitum*, tendo grande potencial antimicrobiano.

Ainda nesse âmbito, com um trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS *et al.*, 2019) visou-se sintetizar derivados de **12** com o anel 1,2,3-triazol, avaliando-os contra as micobactérias de crescimento rápido *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. fortuitum*. Obtiveram derivados com atividade potencializada (**22-24**, Figura 15) se comparado aos seus precursores. Resultou também em produtos com citotoxicidade baixa, especialmente para **24**, obtendo um índice de seletividade de 7,16 contra *M. Massiliense*. Isso sugere, entre outros fatores, que a unidade glicosídica neste derivado é interessante de ser mantida para estudos futuros.

Figura 15 - Derivados triazólicos do eugenol sintetizados por Dos Santos *et al.* (2019).

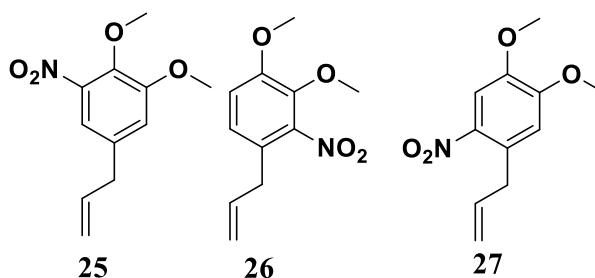


Fonte: DOS SANTOS *et al.* (2019, adaptado).

Além da atividade antibacteriana, os derivados do eugenol também são amplamente pesquisados devido ao seu potencial antifúngico, como mostra a pesquisa conduzida por Olea *et al.* (2019). Nela, os autores tinham por objetivo sintetizar derivados de **12** e avaliá-los contra cepas do fungo *Botrytis cinerea*, resistente a diversos fármacos.

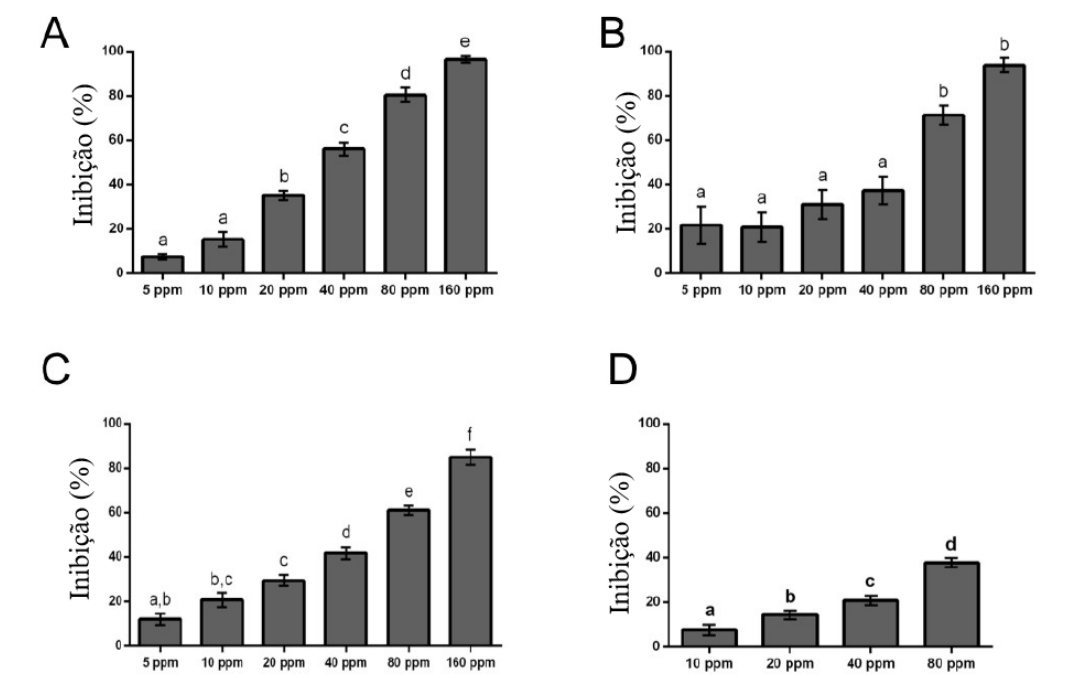
Os autores apresentaram os resultados em valores de Concentração Inibitória Média (CI<sub>50</sub>), ou seja, concentração do composto que apresenta leva a 50% de inibição da cultura. Três compostos **25**, **26** e **27** (Figura 16) obtiveram os melhores resultados que foram 45, 31 e 39 ppm, respectivamente. Esses ainda apresentaram gráficos comparando a atividade desses compostos com o fungicida de referência BC-1000 (Figura 17).

Figura 16 - Compostos sintetizados por Olea *et al.* (2019).



Fonte: OLEA *et al.* (2019, adaptado).

Figura 17 - Comparação da atividade antifúngica de derivados do eugenol com o antifúngico BC-1000.



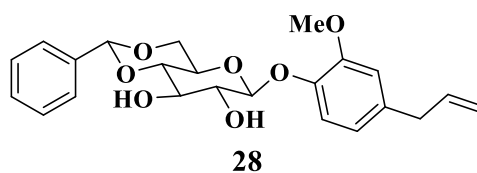
Efeito dos derivados do eugenol no crescimento micelial de *Botrytis cinerea* em meio sólido. Porcentagem de inibição do crescimento micelial determinado depois de 48 h de incubação em diferentes concentrações: (A) 26, (B) 27, (C) 25, (D) BC-1000, composto comercial usado como controle. Cada barra representa a média de pelo menos três experimentos independentes + desvio padrão. (a-f) indica diferenças significantes entre a concentração dos compostos, avaliado pelo teste de Turkey;  $p < 0,05$ .

Fonte: OLEA *et al.* (2019, adaptado).

Ao avaliar a Relação Estrutura-Atividade (REA), os autores chegaram à conclusão de que esses compostos possivelmente atuam no fungo por dois mecanismos diferentes. O primeiro deles é o acúmulo na membrana do fungo, devido ao caráter lipofílico dessas moléculas. O segundo por reações químicas com cadeias insaturadas, devido à presença de fortes grupos retiradores de elétrons no anel aromático, levando à ruptura das membranas do fungo e à produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO).

Ainda com relação à atividade antifúngica, outro exemplo, relata-se o trabalho de De Souza *et al.* (2015) do nosso grupo de pesquisa. Com este, objetivou-se sintetizar uma série de derivados glicosídicos do eugenol e os avaliar em relação a sua atividade antifúngica contra *Candida glabrata*. Dentre os resultados obtidos encontram-se valores de  $CI_{50}$  de 18,1  $\mu$ M para o derivado mais eficaz (28, Figura 18), sendo este três vezes mais potente que o fármaco de referência fluconazol.

Figura 18 - Derivado glicosídico do eugenol sintetizado por De Souza *et al.* (2015).

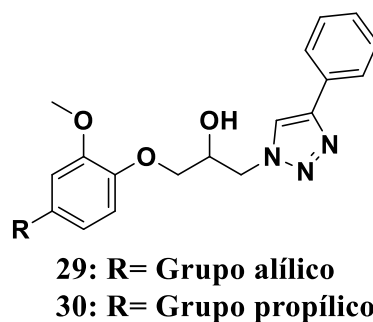


Fonte: DE SOUZA *et al.* (2015, adaptado).

Outro trabalho de De Souza (2020) sustenta que os derivados do eugenol também têm grande potencial antiparasitário. Neste, foram sintetizados doze derivados triazólicos e foi avaliada sua atividade *in vitro* contra formas epimastigota do *T. cruzi*, estudos de citotoxicidade contra células H9c2, além de estudos de *docking* molecular.

Como resultados do estudo *in vitro*, os compostos mais promissores foram **29** e **30** (Figura 19), com valores de  $CI_{50}$  de 88,4 e 42,8  $\mu$ M, respectivamente. Com isso, estes compostos foram testados em um ensaio *in vivo* em camundongos e comparados com o Benznidazol. O derivado **30** reduziu mais de 50% da parasitemia quando comparado com o controle e o composto **29** não mostrou capacidade significativa para reduzir a infecção. Os estudos de *docking* molecular mostrou que esses dois compostos interagem com o sítio ativo da enzima cruzaina.

Figura 19 - Derivados preparados por De Souza *et al.* (2020).



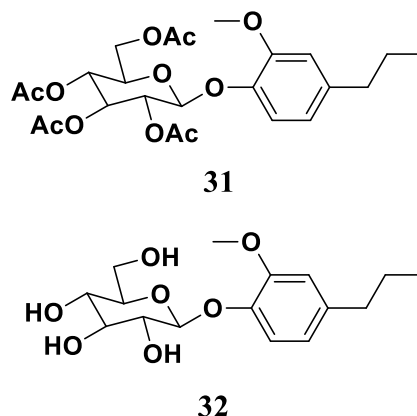
Fonte: DE SOUZA *et al.* (2020, adaptado).

Além das pesquisas envolvendo o eugenol, seu derivado dihidroeugenol também tem grande destaque, apresentando atividades biológicas semelhantes. Um exemplo disso pode ser encontrado no trabalho realizado por Resende *et al.* (2017) do nosso grupo de pesquisa, no qual os autores tiveram por objetivo sintetizar glicosídeos do eugenol, isoeugenol e dihidroeugenol e avaliar sua atividade contra bactérias presentes em alimentos.

Como resultado, embora todos os derivados sintetizados apresentaram atividade antibacteriana significativa, os dois compostos da série do dihidroeugenol (**31**, **32**, Figura 20),

foram os mais promissores, tendo valor de concentração bactericida mínima entre 0,18 e 0,37 (%v/v) para as bactérias testadas, sendo essas *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. enteritidis*.

Figura 20 - Derivados do dihidroeugenol sintetizados por Resende *et al.* (2017).



Fonte: Resende *et al.*(2017, adaptado).

Em vista desses fatores, todas essas pesquisas sustentam a ideia de que o eugenol e seus derivados possuem importante esqueleto estrutural para a farmacologia e química medicinal, apresentando um grande potencial antimicrobiano que vem sendo explorado pelos pesquisadores com o objetivo de propor fármacos inovadores que possam suprir a necessidade da humanidade.

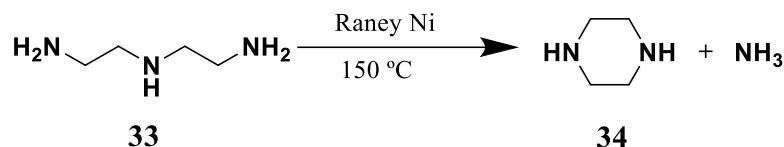
### 3.5 O NÚCLEO PIPERAZÍNICO COMO IMPORTANTE FARMACÓFORO PARA A QUÍMICA MEDICINAL

A piperazina (**35**, Figura 21) foi muito estudada desde sua descoberta no começo do século XX. Em primeiro lugar por sua atividade anti-helmíntica, atuando contra infecções causadas por *Ascaris lumbricoides* e *Enterobius vermicularis*, além de outras atividades biológicas que foram descobertas. Devido às suas propriedades versáteis quanto a interações químicas com diversos sítios biológicos, é considerada como uma estrutura privilegiada em Química Medicinal (AL-GHORBANI *et al.*, 2015).

Esse heterociclo e seus análogos *N*-substituídos são amplamente comercializados como reagentes devido à sua importância, porém sua síntese pode ser realizada de diversas maneiras, sendo que a maioria delas se baseiam em processos de ciclização. Um desses

métodos de síntese consiste no aquecimento do dietilenotriamina com níquel de Raney a aproximadamente 150 °C (Figura 20).

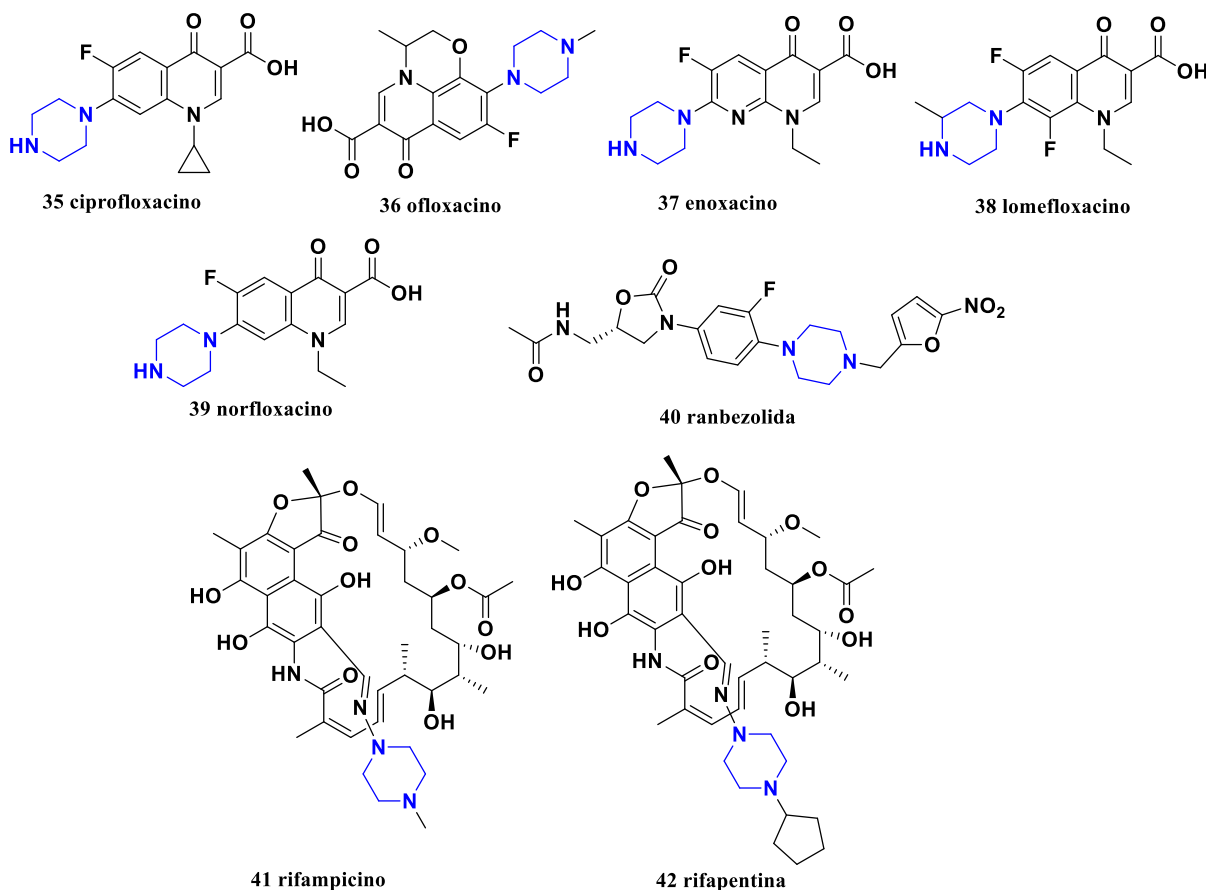
Figura 21 - Síntese da piperazina (**34**) a partir da dietilenotriamina (**33**).



Fonte: AL-GHORBANI *et al.* (2015, adaptado).

Compostos piperazínicos possuem diversas atividades biológicas. Dentre estas estão a antitumoral, antimalárica, inibidora de protease do HIV, como agentes antipsicóticos e antidepressivos, antibacteriana e antifúngica. Isso faz com que piperazinas constituam um importante arcabouço molecular para química farmacêutica. Além disso, está presente em fármacos disponíveis no mercado para tratamento de diversas doenças, como nos antimicrobianos **35-42**, mostrados na figura a seguir (Figura 22) (GIRASE *et al.*, 2020).

Figura 22 - Exemplos de fármacos antimicrobianos com o grupo piperazina .



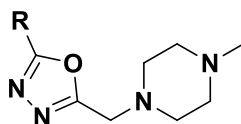
Fonte: GIRASE *et al.* (2020, adaptado).

Além dessa variedade de atividades, pesquisas mostram que o núcleo piperazínico pode ter influência positiva no perfil farmacocinético e farmacodinâmico em compostos. Um dos motivos para isso é a presença dos dois nitrogênios que podem servir de aceptores ou doadores de elétrons para interações do tipo ligação de hidrogênio. Esse fator faz com que haja maior interação com o meio biológico e maior solubilidade em água, aumentando, conseqüentemente, a biodisponibilidade do composto. Outro fator que pode potencializar essa atividade é a flexibilidade do anel piperazínico, podendo assumir diferentes conformações ao interagir com um sítio biológico (DURAND; SZOSTAK, 2021).

Em vista desses fatores, o núcleo piperazínico vem sendo amplamente pesquisado, tendo-se uma gama de trabalhos na área de síntese orgânica na procura de novos antimicrobianos que possuem esse núcleo. Exemplo disso, é o artigo publicado por Bhati *et al.* (2019), que visaram sintetizar cinco derivados 1, 3, 4-oxadiazóis piperazínicos, avaliar suas atividades biológicas *in vitro* e realizar estudo de *docking* destes. Dentre os patógenos testados estão cepas de *Salmonella*, *Pneumococos* e *Aspergillus*.

Os resultados com relação à atividade antimicrobiana foram promissores, pois todos os compostos apresentaram atividade superior aos seus antecessores. Assim, foram capazes de inibir a cepas de bactérias e o fungo testados possuindo CIM de 12,5 até 200 mg/L. Os compostos que mais se destacaram foram **43** e **44** (Figura 23), que obtiveram CIM de 12,5 até 25 mg/L, mostrando potencial comparável até fármacos de referência. Os resultados do estudo de *docking* molecular apresentados pelos autores refletiu os estudos *in vitro*, pois todos os compostos apresentaram energia de ligação melhores com a proteína estudada (ComA) se comparadas ao fármaco estreptomicina.

Figura 23 - Compostos 41 e 42 e suas atividades biológicas.



**43:** R= C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; MIC(mg/L) = *P. aeruginosa* e *S. mutans*: 25, *S. aureus* e *A. parasiticus*: 50.

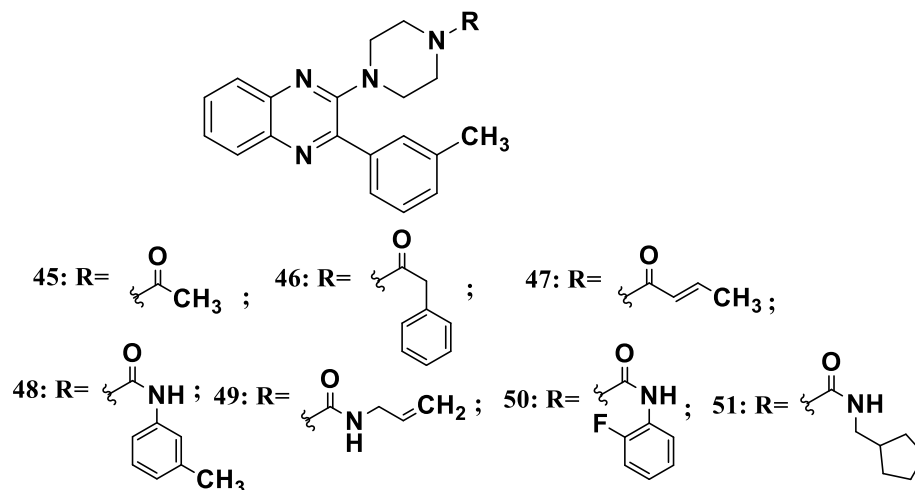
**44:** R= 4-ClC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; MIC(mg/L) = *P. aeruginosa*, *S. mutans* e *A. parasiticus*: 25, *S. aureus*: 50.

Fonte: BHATI *et al.* (2019, adaptado).

Outro trabalho que mostra o potencial antimicrobiano dos compostos que possuem o núcleo piperazínico é o realizado por Reddy *et al.* (2022). Nele os autores tiveram por objetivo sintetizar 7 derivados quinoxalínicos piperazínicos (**45-51**, Figura 24), caracterizá-los e

estudar sua atividade antimicrobiana contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e os fungos *A. niger* e *C. albicans*.

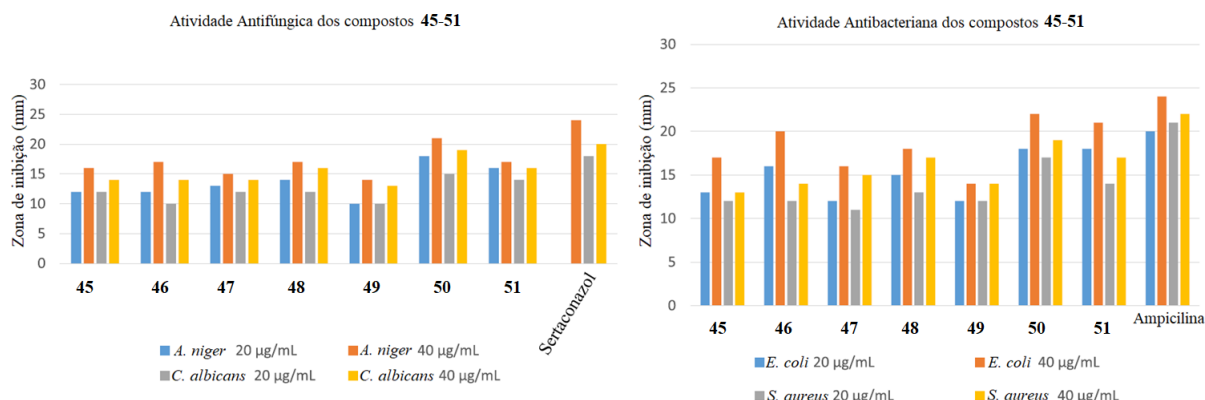
Figura 24 - Compostos piperazínicos preparados por Reddy *et al.* (2022).



Fonte: REDDY *et al.* (2022).

Os resultados foram apresentados por meio de zona de inibição e, dentre os compostos sintetizados, aqueles que apresentaram maior potencial na atividade antibacteriana foram **48**, **50** e **51**, com a zona de inibição de 17, 21 e 17 mm para *E. coli* e 17, 19 e 17 mm para *S. aureus*, respectivamente. Já com relação a atividade antifúngica, **50** apresentou zona de inibição de 21 mm para *A. niger* e 19 mm para *C. albicans*, respectivamente. Abaixo é possível conferir dois gráficos apresentados pelos autores resumindo a atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados, assim como a comparação com fármacos de referência (Figura 25).

Figura 25 - Atividade antimicrobiana dos compostos sintetizados por Reddy *et al.*

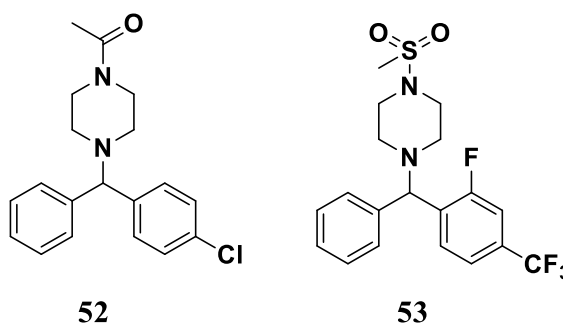


Fonte: REDDY *et al.* (2022, adaptado).

Além dessas atividades, os derivados que possuem o núcleo piperazínico também podem apresentar atividade tripanossomicida. Com o estudo realizado por Keenan *et al.* (2013), visou-se sintetizar análogos piperazínicos do antifúngico fenarimol e avaliar sua atividade contra o parasita *T. cruzi* em estudos *in vitro* e, posteriormente para os compostos com maior atividade, *in vivo*.

Os compostos **52** e **53** (Figura 26) demonstraram uma atividade com valores de  $CI_{50}$  de 0,240  $\mu$ M e 0,035  $\mu$ M, respectivamente, e apresentaram características interessantes para serem testados *in vivo* em cobaias.

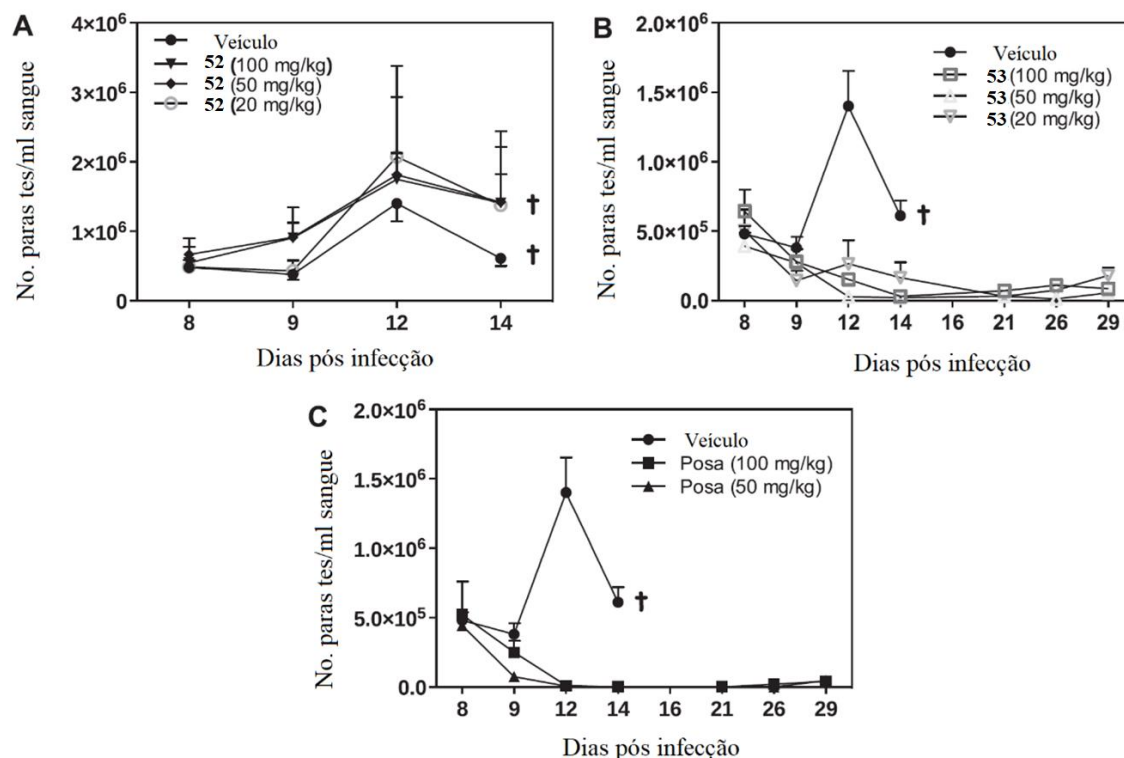
Figura 26 - Derivados piperazínicos sintetizados por Keenan *et al.* (2013).



Fonte: KENAN *et al.* (2013, adaptado).

Nesse ensaio, ambos os compostos exibiram rápida absorção, sem nenhuma reação adversa ou efeito colateral relacionados a estes, como observado na figura a seguir. O produto **52** foi incapaz de reduzir a parasitemia, apesar de ter melhorado a sobrevivência dos animais, enquanto os camundongos tratados com **56** tiveram a parasitemia diminuída em todas as concentrações testadas (Figura 27).

Figura 27 - Resultados do ensaio *in vivo* realizados por Keenan *et al.* (2013).



Eficácia dos compostos na parasitemia sanguínea *in vivo*. Animais eram administrado (A) 52, (B) 53 ou (C) posaconazol uma vez ao dia por 5 dias em diferentes concentrações. Parasitemia por ml de sangue foi avaliada em relação ao animal tratado com veículo. † indica a morte do animal devido à carga/morbidade do parasita. Barras de erro representam SEM.

Fonte: KEENAN *et al.* (2013, adaptado).

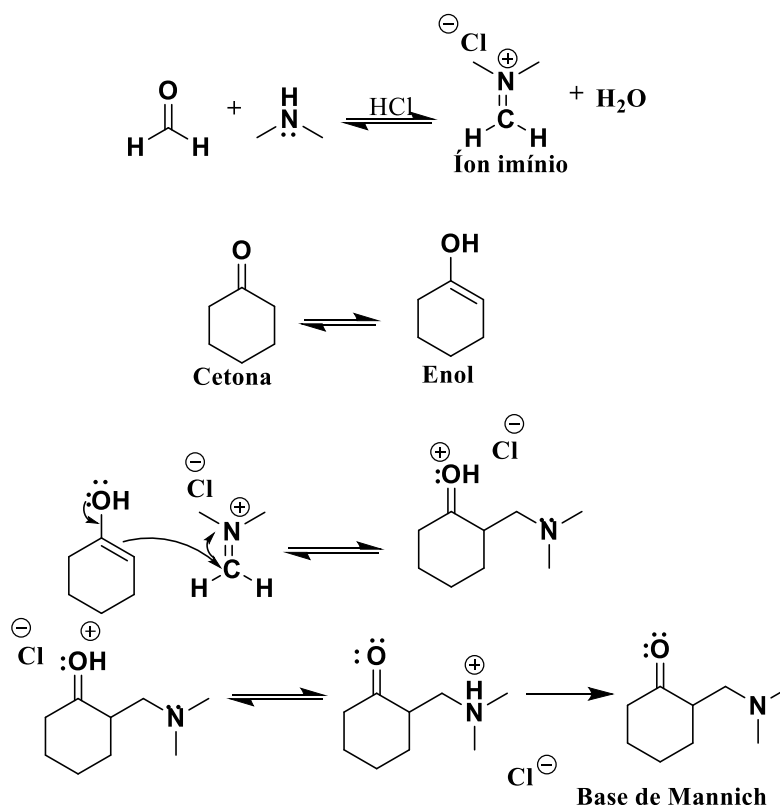
Assim, pelo fato de possuir essas diversas atividades biológicas, os derivados que possuem o núcleo piperazínico apresentam um grande potencial para se tornarem antimicrobianos inéditos.

## 2.6 A QUÍMICA DAS BASES DE MANNICH E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As bases de Mannich são produtos da reação de Mannich, nome em homenagem ao químico alemão Carl Ulrich Franz Mannich, que propôs o seu mecanismo de formação em 1912. Esta é um dos tipos de reações mais importantes para a formação de ligação carbono-carbono. Classificada como um tipo de condensação enólica, envolve classicamente a reação de um enol com íon imínio, este por sua vez sendo formado pela reação entre um aldeído ou cetona e uma amina (ou amônia) (ROMAN, 2015).

Em relação ao mecanismo da reação, em primeiro lugar há a formação do íon imínio pelo ataque da amina que age como um nucleófilo ao aldeído em questão (geralmente usa-se o formaldeído). Em seguida, há outro ataque nucleofílico por parte do composto enolizado e, por fim, ocorre a transferência de prótons para estabilizar o composto formado. Um exemplo genérico desse mecanismo pode ser conferido no esquema 1, a seguir (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Esquema 1 - Mecanismo da Reação de Mannich.



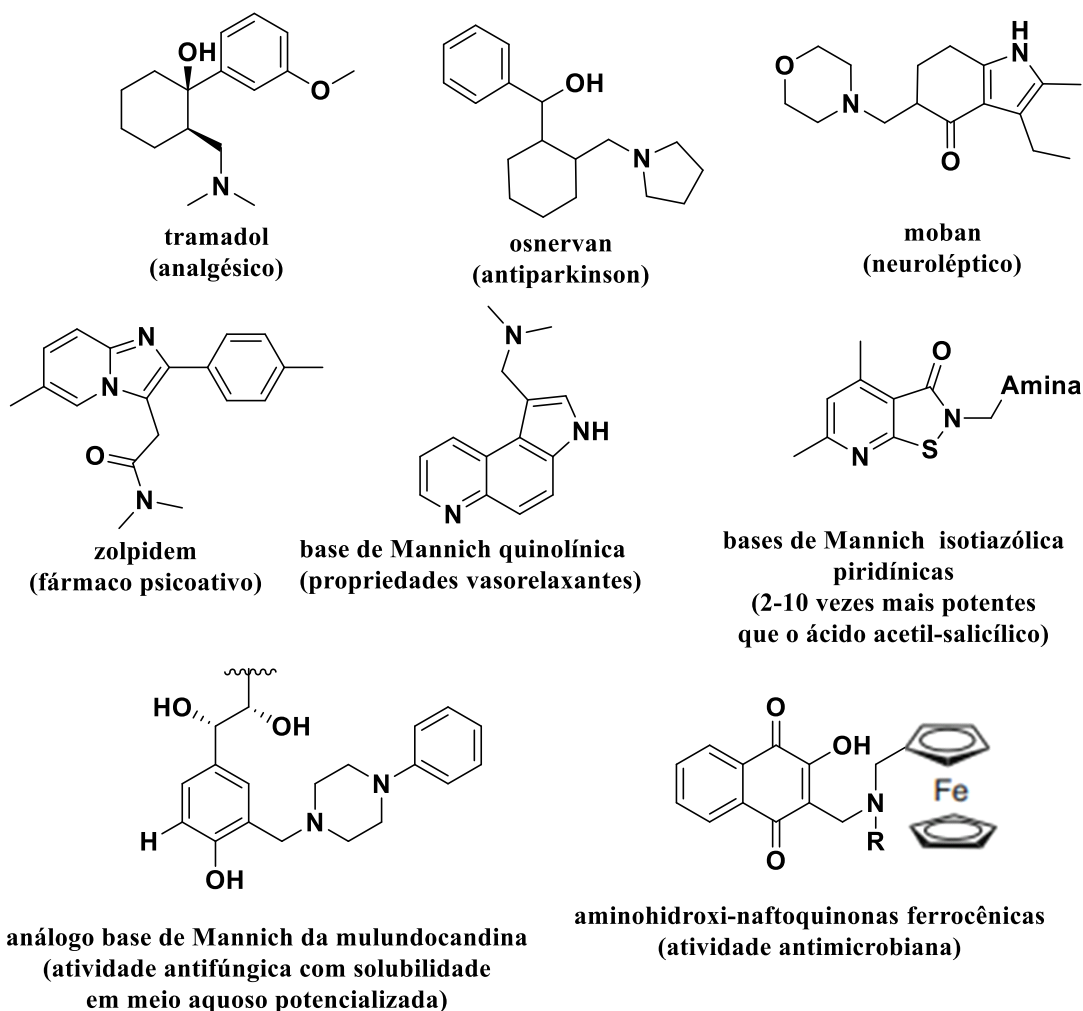
Fonte: CLAYDEN; GREEVES; WARREN (2012, adaptado).

Em relação às condições reacionais, podem variar desde temperatura ambiente, até mesmo aquecimento, a depender da reatividade da amina e enol envolvidos, sendo necessário meio ácido ou básico para a formação deste último.

Devido a importância sintética dessa reação, muito progresso foi feito em termos de pesquisa nessa área. Isso fez com que essa reação seja empregada na síntese orgânica de esqueletos químicos, para a síntese total ou parcial de fármacos ou de produtos naturais. Segundo Subramaniapillai (2013), as bases de Mannich tendem a melhorar a solubilidade de compostos em água, devido à protonação do nitrogênio básico presente nos compostos. Um

resumo do potencial dessa reação na geração de compostos bioativos é apresentado pelo autor e pode ser conferido na figura a seguir (Figura 28).

Figura 28 - Exemplos de fármacos e compostos bioativos do tipo base de Mannich.

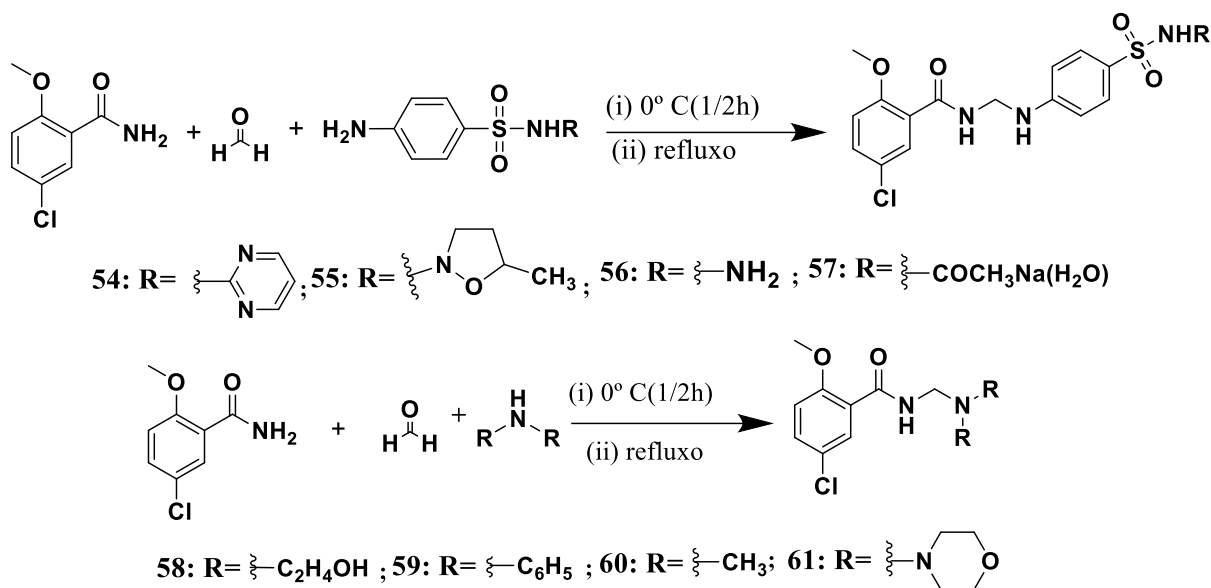


Fonte: SUBRAMANIAPILLAI (2013, adaptado).

Devido a essa grande versatilidade sintética, as bases de Mannich tem sido amplamente pesquisada na área das ciências farmacêuticas, a fim de potencializar as atividades biológicas de compostos que são enolizáveis. Dentre as atividades biológicas apresentadas por esses derivados está a antimicrobiana (ROMAN, 2015).

Essa atividade pode ser percebida em diversas pesquisas, como a realizada por Joshi *et al.* (2004). Nela os autores objetivaram sintetizar bases de Mannich derivadas da 5-cloro-2-metoxibenzamida e sulfonamidas/aminas e avaliar sua atividade antibacteriana contra patógenos Gram-positivos e negativos *in vitro* (Figura 29).

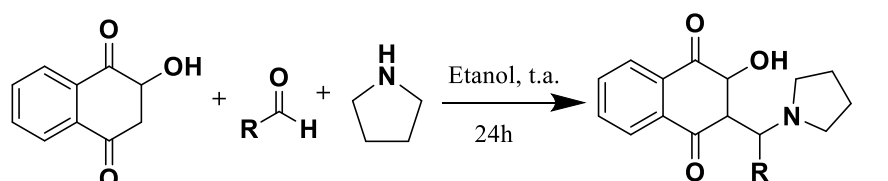
Figura 29 - Reação de Mannich utilizada por Joshi *et al.* (2009).



Fonte: JOSHI *et al.* (2009, adaptado).

Os resultados foram apresentados por meio de zona de inibição, em diferentes concentrações. Dentre os principais, para *E. coli*, o composto **57** apresentou melhor atividade (9,5 mm a 40 mg/mL); para *K. pneumoniae* foram os derivados **57** e **59** (10 e 10,5 mm, respectivamente a 40 mg/mL). Com isso, para esses patógeno as bases de Mannich apresentaram atividade superior às sulfonamidas de origem. O Derivado **57** também apresentou atividade superior que todas as outras Bases de Mannich ao inibir *S. aureus* (10,5 mm a 40 mg/mL).

Além da atividade antibacteriana, também pode ser atribuída às bases de Mannich a antifúngica. É o que mostra um trabalho desenvolvido por Filho *et al.* (2016), em que os autores visaram sintetizar Bases de Mannich derivadas da lausona e avaliar suas atividades biológicas (Figura 30).

Figura 30 - Derivados sintetizados por Filho *et al.* (2016).

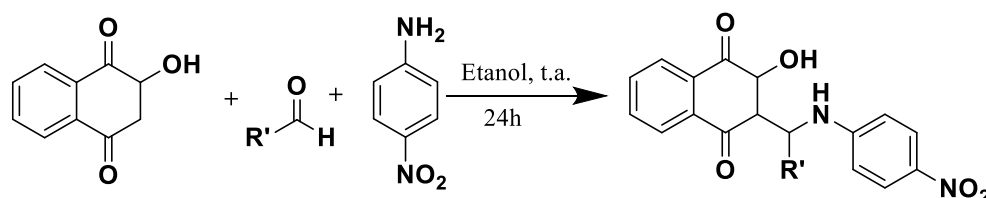
**62:** R = *o*-OH-Ph (77%);

**63:** R = Ph (32%);

**64:** R = Np (38%);

**65:** R = *p*-NO<sub>2</sub>-Ph (46%);

**66:** R = *p*-OCH<sub>3</sub>-Ph (44%);



**67:** R' = *p*-NO<sub>2</sub>-Ph (82%);

**68:** R' = Ph (69%);

**69:** R' = *o*-OH-Ph (93%);

**70:** R' = Np (90%);

**71:** R' = *p*-OCH<sub>3</sub>-Ph (63%);

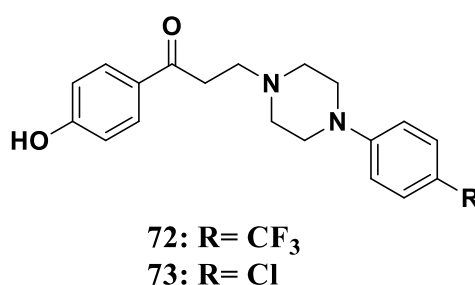
Fonte: FILHO *et al.* (2016, adaptado).

Os ensaios biológicos foram feitos contra cepas de *Candida*, sendo apresentados em termos de Concentração Inibitória Mínima. Os compostos **62**, **68** e **69** apresentaram melhor atividade antifúngica com CIM de 20, 330 e 85 µg/mL respectivamente. Estes compostos foram avaliados em um estudo de *docking* molecular em relação a cadeia 3OZW, um dos sítios alvo do fármaco cetoconazol, presente na flavohemoglobina, enzima que tem a função de realizar ligações lipídicas. Nesta análise, **62** apresentou interações de ligação cátion-pi por parte da pirrolidina e interações de van der Waals pelo grupo da lausona. Ainda nestes estudos, esses compostos apresentaram energia similar ao cetoconazol, indicando a possibilidade do mesmo mecanismo de ação e que são possíveis candidatos a novos antimicrobianos.

Em relação a atividade tripanossomicida das bases de Mannich, existem alguns trabalhos publicados que podem ser citados. Um desse exemplos é o artigo publicado por Paucar *et al.* (2019), que visaram sintetizar dez Bases de Mannich, avaliar suas atividades *in vitro* e, para os compostos mais promissores, *in vivo*.

Como resultados, os autores apresentaram índices de  $CI_{50}$  e, dentre os compostos sintetizados, os compostos **72** e **73** (Figura 31) demonstraram melhor atividade antiparasitária. Na forma epimastigota, apresentaram  $CI_{50}$  de 0,7 até 6,2  $\mu$ M, com índices de seletividade (IS)  $>50$ ; para a tripomastigota, esses compostos também apresentaram bons resultados de  $CI_{50}$  de 0,9 e 0,7  $\mu$ M, respectivamente, mantendo o IS  $>50$ .

Figura 31 - Bases de Mannich preparadas por Paucar *et al.*



Fonte: PAUCAR *et al.* (2019).

Por último, no ensaio *in vivo*, ambos compostos causaram uma diminuição substancial da parasitemia na fase crônica da doença ao ser comparado com o benznidazol, sendo que **71** apresentou atividade notável durante a fase aguda. Os autores também investigaram o possível mecanismo de ação desses compostos, que pode vir a ser pela inibição da enzima ferro-superóxido dismutase (Fe-SOD). Esta tem papel antioxidante, ao remover o excesso do ânion superóxido pela transformação para oxigênio e peróxido de hidrogênio.

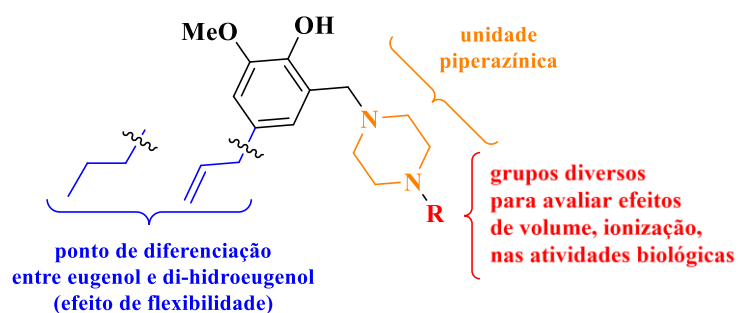
Em vista do que foi apresentado, percebe-se a importância das bases de Mannich para Química Medicinal, estas possuindo diversas atividades biológicas que podem ser exploradas e potencializadas. Além disso, há o fator da versatilidade sintética desses compostos, fazendo com que a reação de Mannich seja uma importante ferramenta para a síntese envolvendo ligações carbono-carbono, mostrando o grande potencial que estes compostos têm de se tornarem novos antimicrobianos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hipótese criada com este trabalho foi de que a união do eugenol ou dihidroeugenol a núcleos piperazínicos, formando novas entidades químicas, iria conduzir à descoberta de substâncias potencialmente ativas como agentes antimicrobianos, quer seja frente a bactérias, micobactérias, fungos e/ou protozoários.

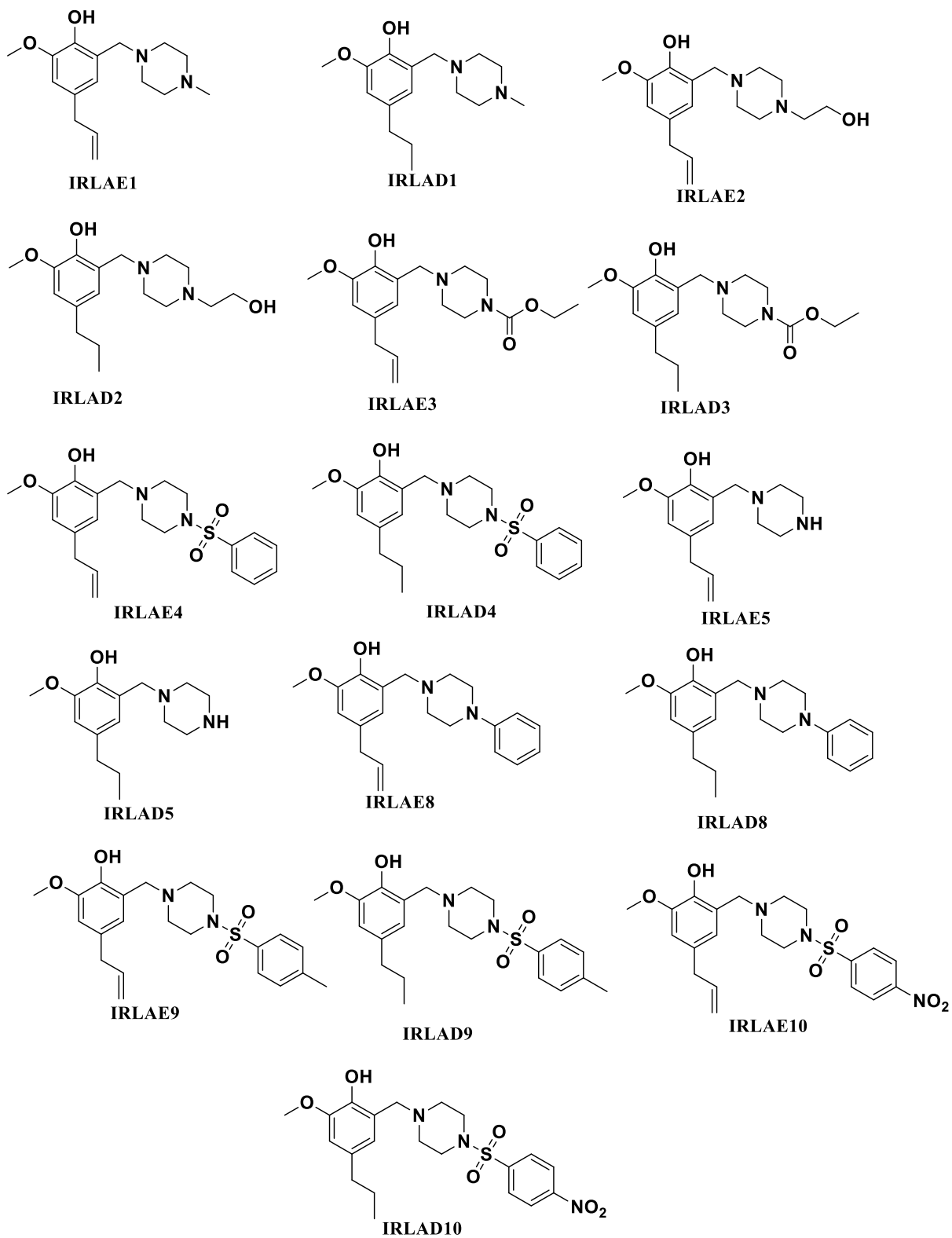
O padrão estrutural mostrado na Figura 32 ilustra o esqueleto geral dos produtos que foram sintetizados. Pretendeu-se efetuar variações que pudessem dar subsídios a discussão de Relação Estrutura-Atividade. Estas variações levaram em conta efeitos estéricos, de solubilidade, de ionização e de flexibilidade molecular. Na Figura 33 há especificamente cada derivado sintetizado.

Figura 32 - Padrão estrutural construído com este trabalho.



Fonte: Do autor, (2022).

Figura 33 - Derivados piperazínicos sintetizados.



Fonte: Do autor (2023).

Antes de serem sintetizados, os derivados da piperazina foram submetidos a uma análise preditiva de suas propriedades físico-químicas e seu perfil de semelhança com drogas usando o software online SwissADME. Como pode ser observado na Quadro 1, todos os compostos avaliados neste trabalho atendem à chamada Regra dos Cinco de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 2001), o que pode auxiliar na pré-seleção de substâncias que possuam características corretas de coeficiente de partição, solubilidade, peso molecular, e absorção oral. Embora não seja uma condição estrita para descartar a síntese de substâncias potencialmente bioativas, essa análise tem se mostrado de grande utilidade na primeira triagem.

Quadro 1 - Parâmetros físico-químicos *in silico* para os compostos IRLAE1-IRLAE10 e IRLAD1-IRLAD10

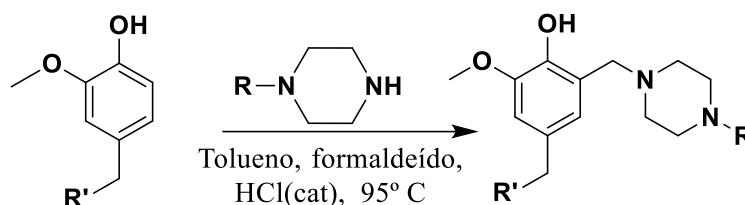
Derivado	MM	ALH	DLH	cLog P	Solubilidade em água	Absorção GI	Similaridade à fármacos (Violação da Rd5)
IRLAE1	276.37	4	1	2.15	Alta	Alta	Sim, 0
IRLAE2	306.40	5	2	1.70	Alta	Alta	Sim, 0
IRLAE3	334.41	5	1	2.34	Alta	Alta	Sim, 0
IRLAE4	402.51	6	1	2.76	Moderada	Alta	Sim, 0
IRLAE5	262.35	4	2	1.87	Alta	Alta	Sim, 0
IRLAE8	338.44	3	1	3.31	Moderada	Alta	Sim, 0
IRLAE9	416.53	6	1	3.15	Moderada	Alta	Sim, 0
IRLAE10	447.50	8	1	1.97	Moderada	Alta	Sim, 0
IRLAD1	278.39	4	1	2.30	Alta	Alta	Sim, 0
IRLAD2	308.42	5	2	1.83	Alta	Alta	Sim, 0
IRLAD3	336.43	5	1	2.49	Alta	Alta	Sim, 0
IRLAD4	404.52	6	1	2.80	Moderada	Alta	Sim, 0
IRLAD5	264.36	4	2	2.01	Moderada	Alta	Sim, 0
IRLAD8	340.46	3	1	3.44	Moderada	Alta	Sim, 0
IRLAD9	418.55	6	1	3.21	Pouco solúvel	Alta	Sim, 0
IRLAD10	449.52	8	1	2.22	Moderada	Alta	Sim, 0

Cálculos *in silico* realizados usando o software de previsão online SwissADME do Instituto Suíço de Bioinformática. MM: massa molecular; cLog P: logaritmo calculado do coeficiente de partição de um composto entre *n*-octanol e água; ALH: aceptores de ligação de H; DLH: doadores de ligação de H; Rd5: Regra dos cinco

Fonte: Do autor (2023).

Na síntese desses derivados há condensação de três substratos: um aldeído, uma amina e um composto com um hidrogênio ativo. Especificamente, utilizou-se o formaldeído, o eugenol/dihidroeugenol e a piperazina correspondente para cada caso. Em alguns casos a amina utilizada foi previamente sintetizada a partir da piperazina. O esquema geral de síntese é representado na Figura 34.

Figura 34 - Método de síntese das bases de Mannich piperazínicas.

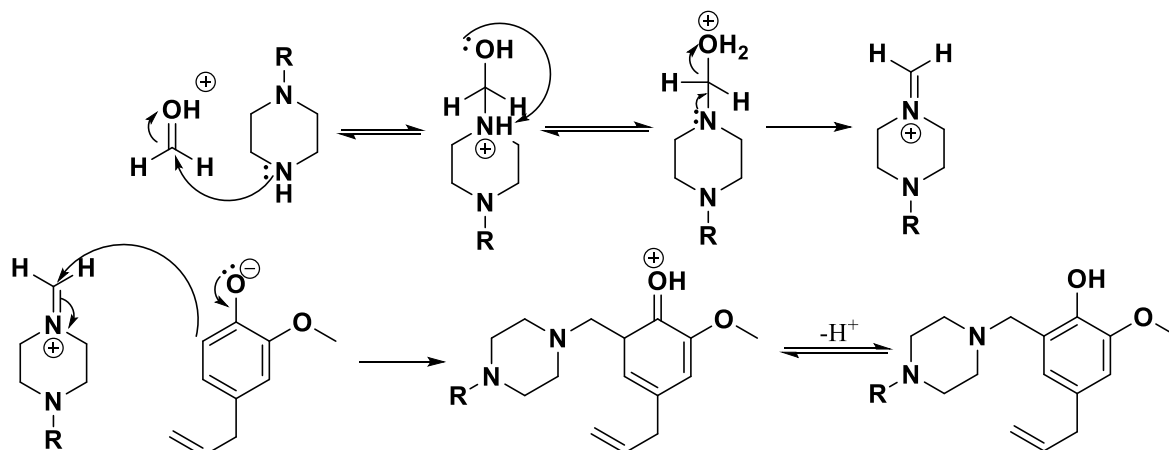


Fonte: Do autor (2023).

Devido ao fato dessa reação ser amplamente estudada, pode-se comparar as condições reacionais e rendimento com o que há na literatura. Assim, pôde-se perceber que essa reação pode ser realizada tanto utilizando etanol quanto tolueno como solvente, como é mostrado no trabalho de Filho *et al.* (2016). A escolha por esse último foi devido à indisponibilidade de etanol à época em nosso laboratório. Quanto à temperatura da reação, esta pode variar a depender da reatividade da amina utilizada, podendo em alguns casos ser 0° C ou 70-75 ° C como realizado pelo trabalho de Joshi *et al.* (2020). Os rendimentos desses dois trabalhos variam entre 32 a 93%, a depender da amina utilizada e sua reatividade.

O mecanismo proposto para esta reação pode ser observado na figura a seguir (Figura 35), onde em primeiro lugar há a formação do intermediário a partir da reação entre a piperazina e o formaldeído. Por fim, há a reação com o anel aromático por meio de um ataque nucleofílico (STĚPIEŇ *et al.*, 2021).

Figura 35 - Mecanismo da Reação de Mannich utilizando eugenol e uma piperazina.



Fonte: Do autor (2023).

Em termos de posição de substituição, pode-se criar a hipótese que essa se deu na posição *orto* à hidroxila, pelo fato de possuírem efeitos estéricos e eletrônicos que orientam dessa maneira. A posição *orto* ao grupo éter não é substituída por impedimento estérico desse próprio grupo e da cadeia alílica, já a posição *para* sofre efeitos estéricos do grupo alílico. Assim, a posição *orto* à hidroxila tem grande densidade eletrônica pela doação forte desse grupo e assim é substituída, como é observado em trabalhos em que há substituição no eugenol (DE CARVALHO *et al.*, 2017).

O derivado IRLAE1 foi preparado utilizando o eugenol e a 1-metilpiperazina. O tempo de reação foi de aproximadamente 6 horas, em que a mistura adquire um tom âmbar. Após este tempo, ao avaliar por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), nota-se ainda a presença do eugenol, o qual foi separado após a extração com solução aquosa de HCl 1 mol.L<sup>-1</sup>. Nesta etapa, devido ao sítio básico presente no produto final, este é protonado, algo que não ocorre com o eugenol, fazendo com que apenas o composto desejado tenha afinidade com a fase aquosa. Em seguida é feita a correção do pH para 6, devido ao fato do produto final ser anfótero, fazendo com que a maior parte deste esteja em sua forma neutra para subsequente extração com clorofórmio.

Após a evaporação a pressão reduzida e arrefecimento, o produto cristalizou naturalmente, dando um indício de sua pureza. Foi obtido 1,410 g de produto (84%) na forma de um sólido branco. Após análise por meio de CCD, nota-se a ausência de eugenol. O restante da piperazina de partida não pôde ser avaliado pelo fato desta ser pouco visível por CCD. Assim, formou-se a hipótese de que o íon imínio tenha sido transformado em outro composto e eliminado após a extração líquido-líquido.

O derivado IRLAD1, por sua vez, foi preparado utilizando essa mesma piperazina e dihidroeugenol. Os resultados foram similares ao anterior, com o mesmo tempo de reação e uma extração eficiente, em que o produto cristalizou naturalmente após a evaporação. Foi obtido 0,9848 g de produto (59%) na forma de um sólido branco.

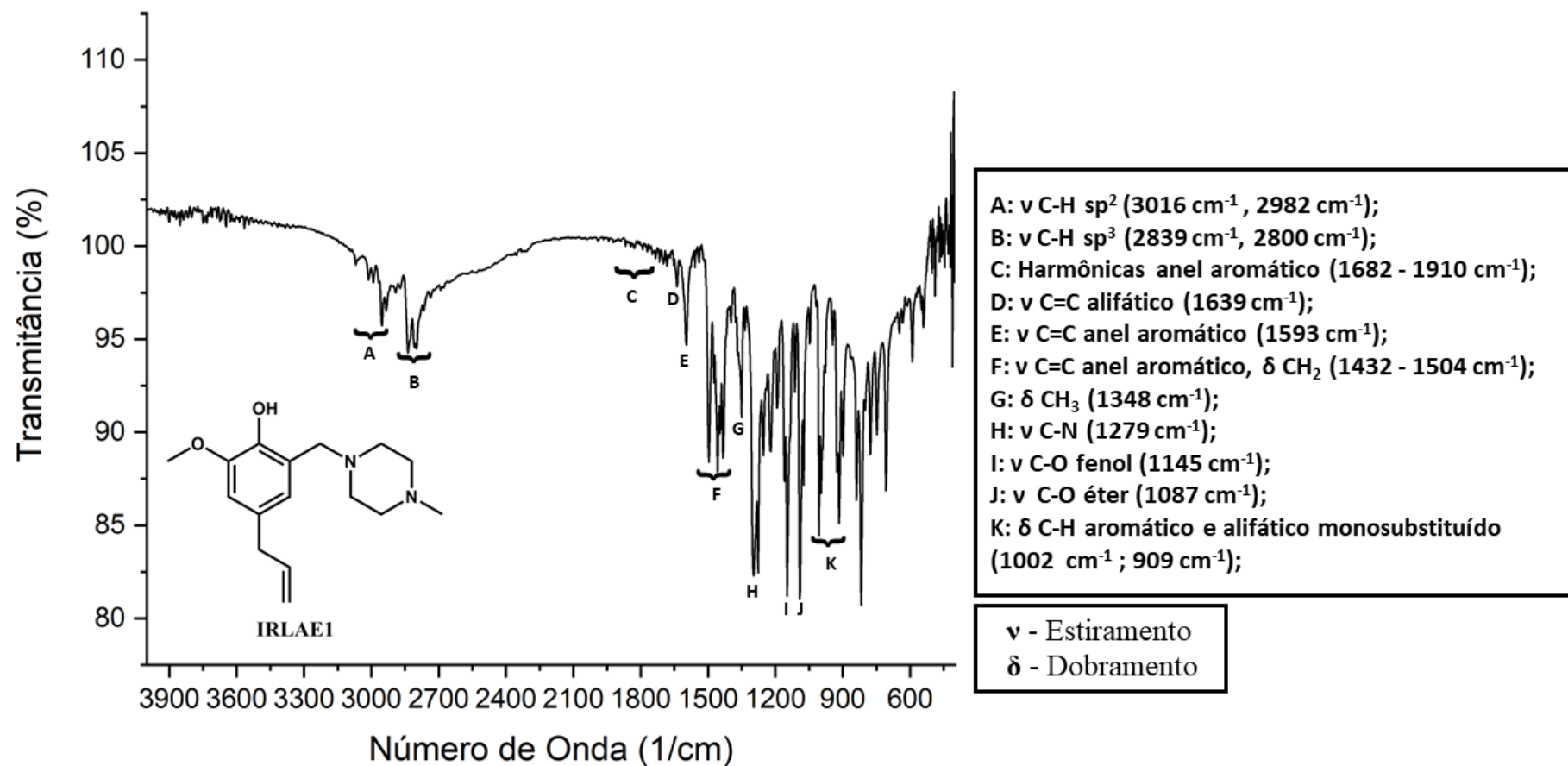
Para os produtos em geral, as faixas de fusão (FF) apresentaram resultado com intervalos de fusão de 1 a 1,5 °C.

Esses produtos finais, assim como todos os outros, foram caracterizados por meio de técnicas de espectroscopia. Com relação a Ressonância Magnética Nuclear, a numeração dos compostos não segue o padrão IUPAC e foi utilizada apenas para guiar e facilitar a leitura.

Nos espectros na região do Infravermelho, além das bandas referentes a estiramentos comuns do eugenol e da piperazina (Figura 36, **A-G**), pôde-se perceber bandas referentes aos estiramento C-N entre 1250 e 1100  $\text{cm}^{-1}$  referente a piperazina. Além disso, verificou-se dois estiramentos próximo a 1140 e 1050  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos grupos C-O fenólico e do éter (Figura 36, **H-J**).

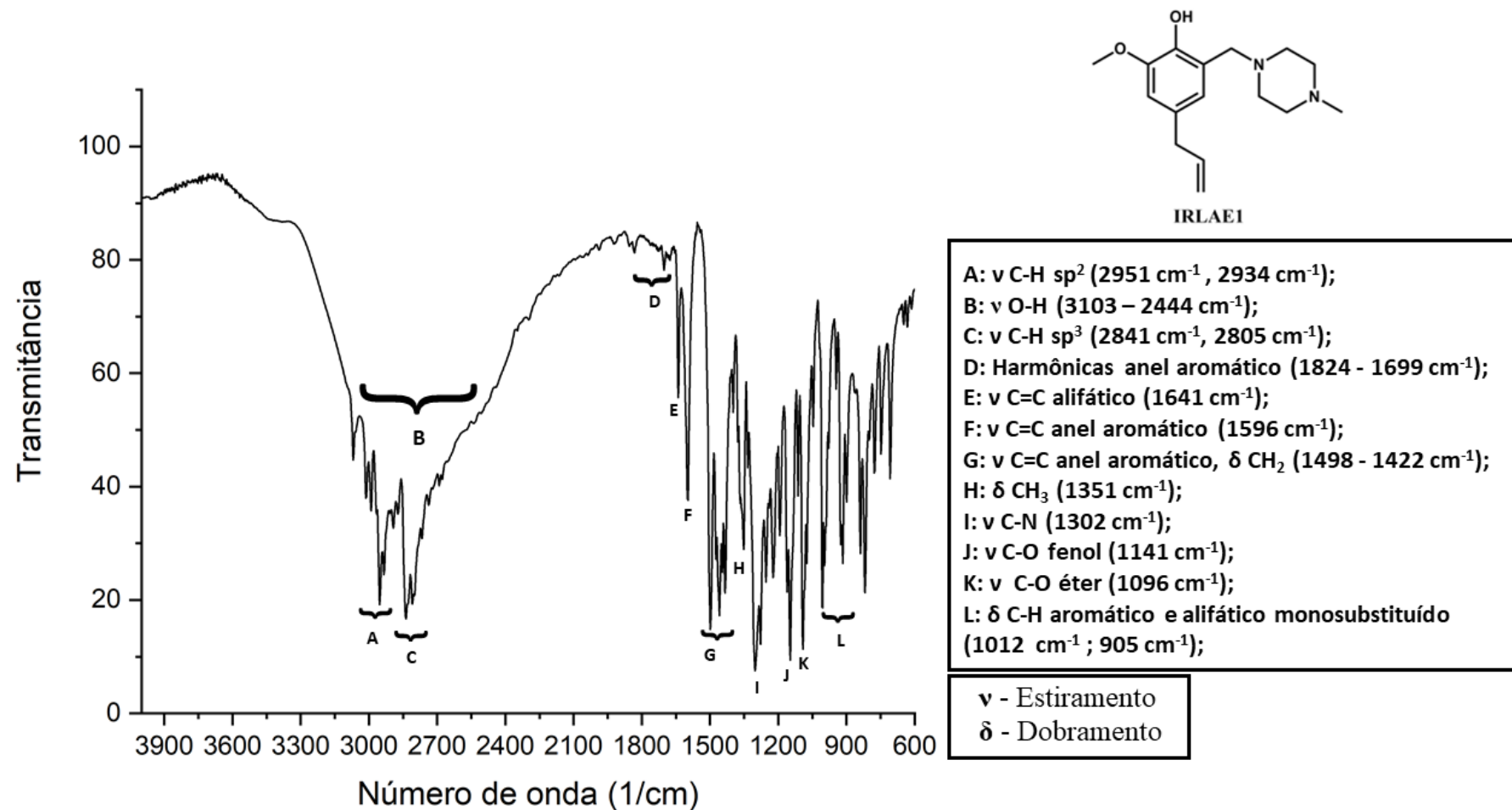
Para os derivados que possuem um grupo carbonila de carbamato ligado ao anel piperazínico, foi possível perceber uma terceira banda (além das duas referentes ao C-O fenólico e do grupo éter do eugenol) relacionada a essa ligação C-O próxima a 1070  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 60 e 61, Anexo A). Além disso, foram avaliadas a presença das bandas que são referentes aos diferentes grupos R do grupo piperazínico, como hidroxila, carbonila de carbamato, sulfonila, grupo nitro, entre outros. É importante salientar que a banda característica do grupo fenol que geralmente apresenta-se em 3500 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  não foi observada na maioria dos espectros, porém todos os compostos foram positivos no teste para fenol utilizando cloreto férrico. Assim, isso foi investigado mais a fundo que, segundo Silverstein, Webster e Kiemle (2005), bandas próximas a essa região não são muito nítidas ao utilizar o módulo ATR quando comparadas ao método utilizando pastilhas de KBr, sendo essa uma das desvantagens da primeira técnica. Dessa maneira, as amostras foram analisadas novamente por este segundo método e em todos os casos foi possível notar a banda referente ao fenol. Um exemplo disso pode ser encontrado na Figura 37, referente ao composto IRLAE1. O restante dos espectros no infravermelho e RMN referentes aos demais compostos é apresentado nos Anexo A e B (Figura 57-111).

Figura 36 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE1.



Fonte: Do autor (2023).

Figura 37 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE1 pelo método de pastilha de KBr.



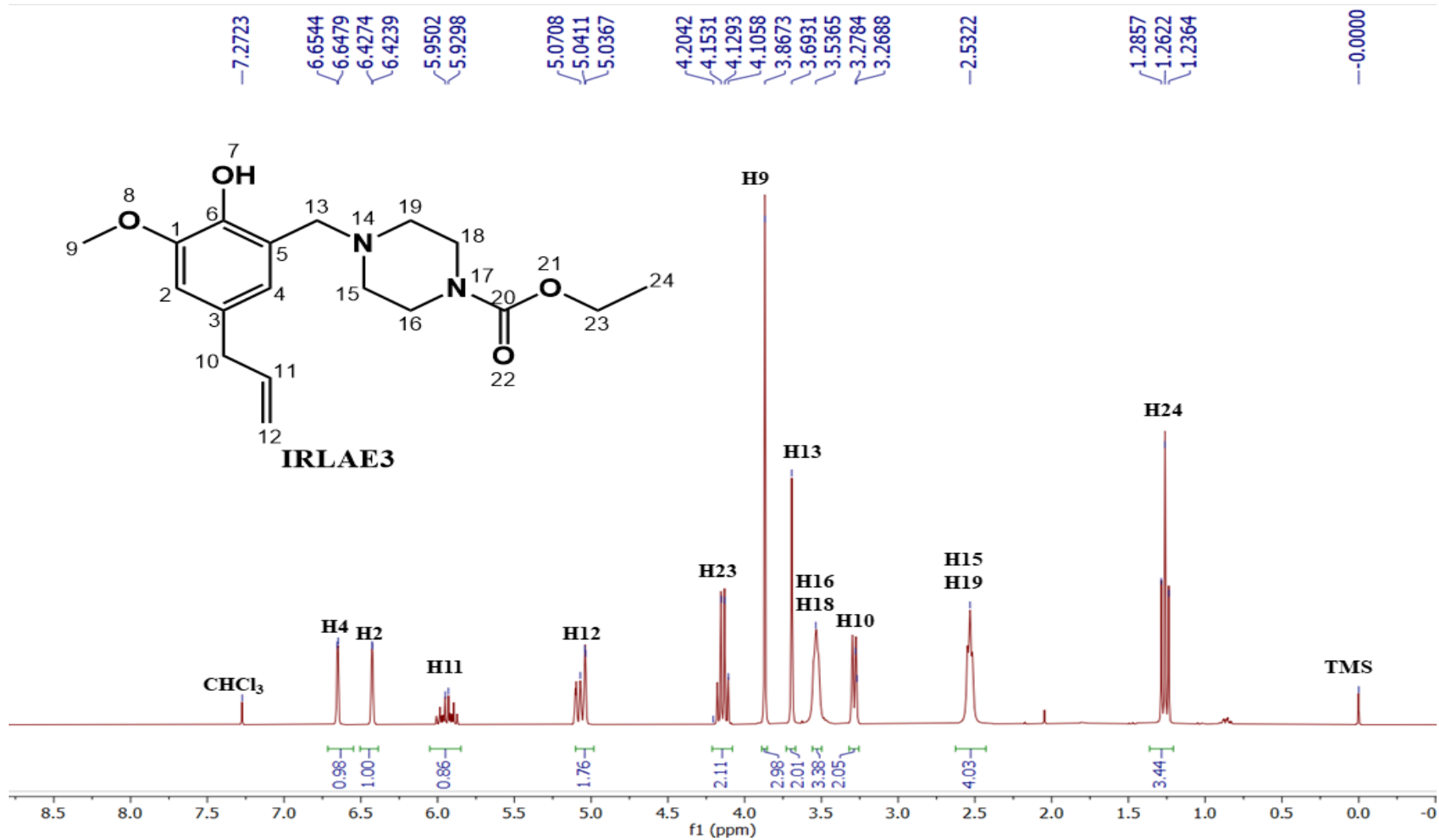
Fonte: Do autor (2023).

Já em relação aos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN dos compostos sintetizados, pôde-se perceber todos os sinais referentes aos hidrogênios do núcleo do eugenol/dihidroeugenol, e do núcleo piperazínico. Na Figura 38 tem-se o espectro  $^1\text{H}$ -RMN do composto IRLAE3, derivado da etil piperazina-1-carboxilato. Na região de 6,64-6,42 ppm encontram-se os sinais referentes aos únicos 2 hidrogênios aromáticos (H4 e H2) quase idênticos e nota-se que são dupletos, o que suporta a substituição do eugenol na posição 5.

Em  $\delta$  5,95 têm-se um multipletto relativo ao hidrogênio alílico H11, seguido do multipletto entre  $\delta$  5,07-5,03 referente ao H12. Estes hidrogênios estão ligados à carbonos  $\text{sp}^2$ , o que faz com que estejam mais desblindados e, por isso, resultam em sinais na região de aromáticos. Em seguida, em  $\delta$  4,20 ppm tem-se o multipletto referente aos dois hidrogênios H23 e em  $\delta$  3,86 ppm o simpleto referente aos três hidrogênios H9. Em todos os espectros pôde-se perceber próximo à  $\delta$  3,69 ppm um simpleto referente aos dois hidrogênios ligados ao carbono proveniente do formaldeído.

Em relação aos hidrogênios do núcleo piperazínico, em muitos casos, acoplaram em um mesmo sinal, como um simpleto entre  $\delta$  2,7 e 1,7 ppm (Figura 38). A exceção foi quando havia um heteroátomo muito eletronegativo como grupo R ligado ao anel, o que desblinda esses hidrogênios, apresentando-se como dois sinais de mesma intensidade. Pode-se perceber isso no derivado IRLAE3 em  $\delta$  3,53 e 2,53 ppm. Em  $\delta$  3,27 ppm, pode-se perceber o sinal referente ao H10 do núcleo do eugenol. Por último, em  $\delta$  1,28 ppm percebe-se o sinal dos três hidrogênios H24 que fazem parte da cadeia do éster (Figura 38).

Figura 38 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAE3 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



Fonte:

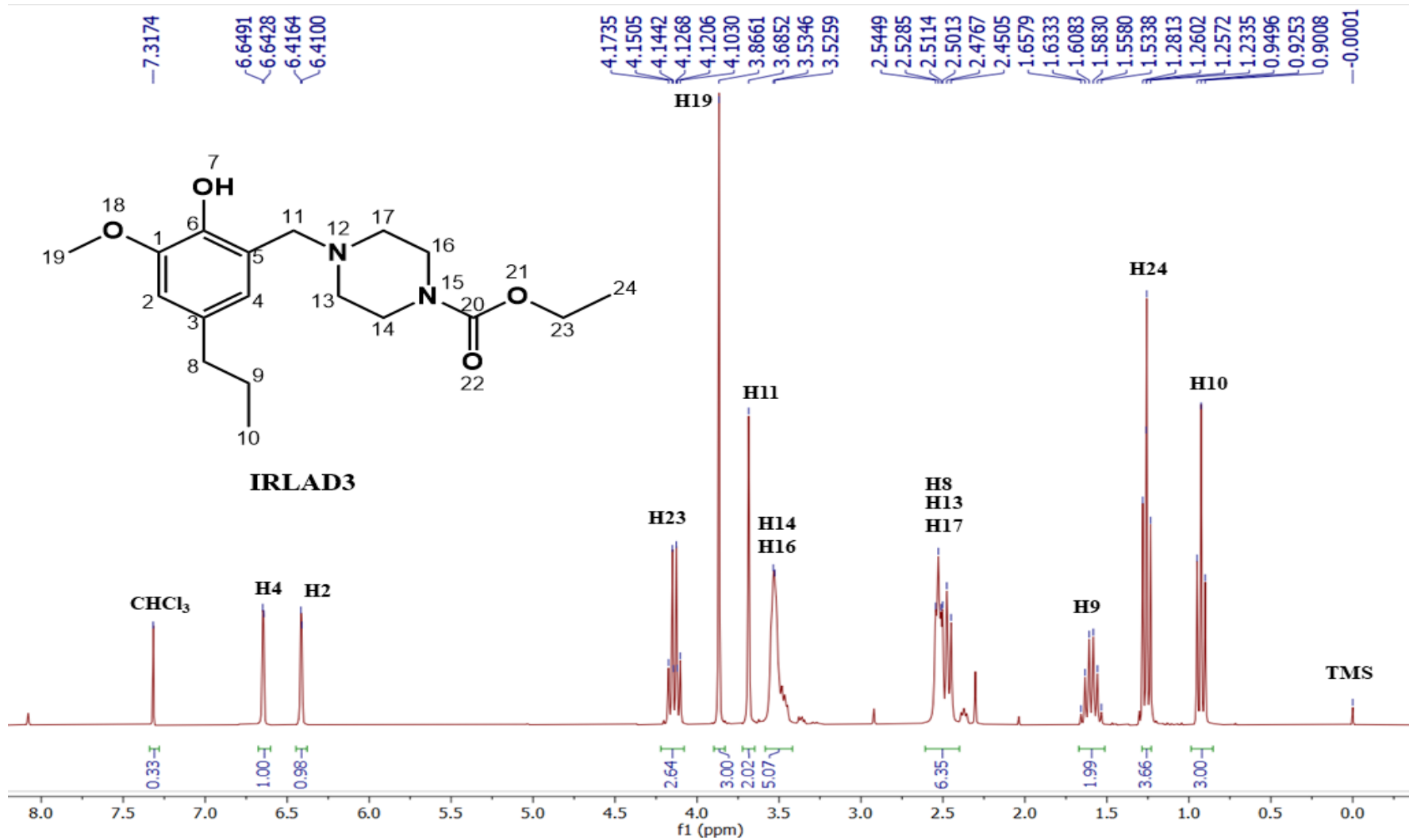
Do

autor

(2023).

Em relação aos compostos provenientes do dihidro Eugenol, nota-se que os sinais referente a cadeia carbônica ligada ao anel aromático são percebidos em uma região menos desblindada por estarem ligados agora a um carbono  $sp^3$ . Isso pode ser visto no espectro de  $^1H$ -RMN referente ao composto IRLAD3, em que H8, H9 e H10 estão em um multipletto em  $\delta$  2,54 ppm, em  $\delta$  1,67 ppm e um tripleto em  $\delta$  1,25 ppm, respectivamente (Figura 39).

Figura 39 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAD3 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



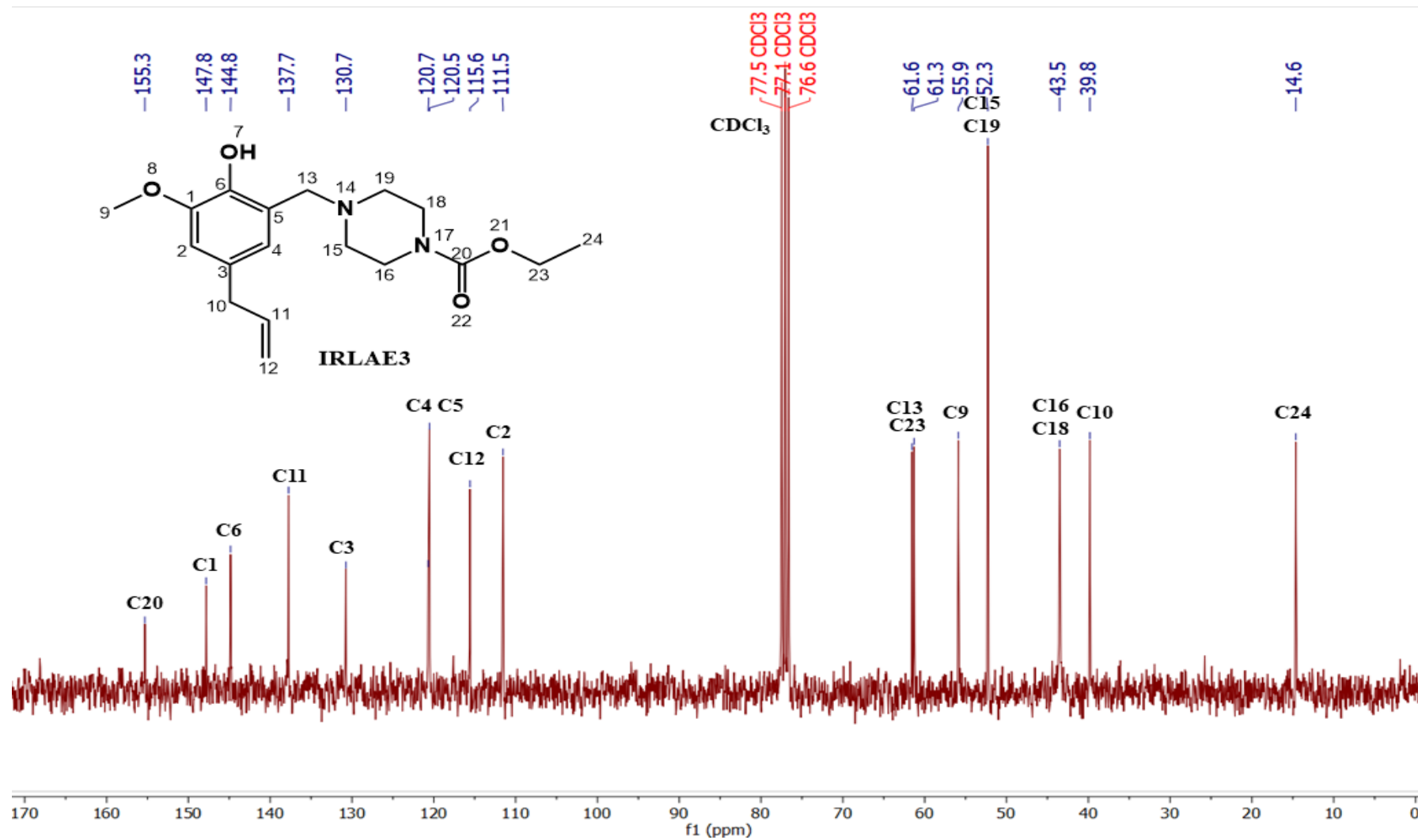
Fonte: Do autor (2023).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -RMN dos compostos em geral pôde-se perceber todos os carbonos referente aos dois núcleos. A seguir, tem-se o espectro de  $^{13}\text{C}$ - RMN do derivado IRLE3 (Figura 40), em que se verifica os sinais dos carbonos  $\text{sp}^2$  na região de maior desblindagem, representando os carbonos com ligação dupla e do anel aromático. Em primeiro lugar, pode-se perceber os sinais dos carbonos  $\text{sp}^2$  ligados a átomos eletronegativos, neste caso os oxigênios presentes no composto nesta ordem, carbonila ligada ao núcleo piperazínico a  $\delta$  155,3, o C1 em  $\delta$  147,8 e o C6 em  $\delta$  144,8.

Em seguida, encontram-se os sinais dos demais carbonos  $\text{sp}^2$ : a  $\delta$  137,7 o C11, a  $\delta$  130,7 o C3, a  $\delta$  120,7 o C4, a  $\delta$  120,5 o C5, a  $\delta$  115,6 o C12 e a  $\delta$  111,5 o C2. Em  $\delta$  61,6 e 61,3 tem-se o carbono C23 e C13 (carbono metilênico que une os dois ciclos) e em  $\delta$  55,9 está o C9. Já sinais referentes aos carbonos do núcleo piperazínico encontram em dois sinais em  $\delta$  52,3 e 43,5. Por último, têm-se os carbonos  $\text{sp}^3$  C10 a  $\delta$  39,8 e C24 a  $\delta$  14,6.

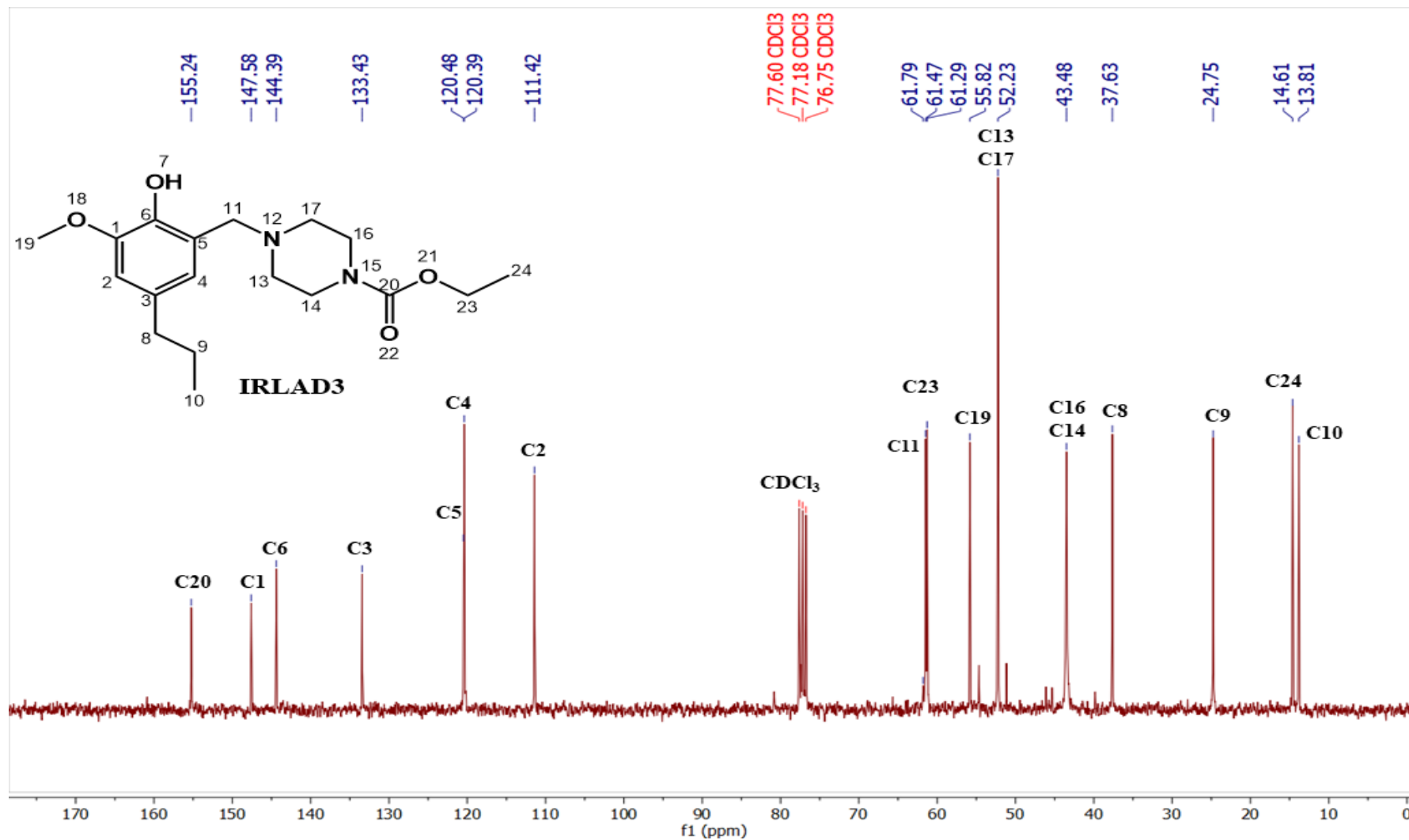
Para o derivado proveniente do dihidroeuogenol, novamente é possível perceber o deslocamento dos sinais referentes a cadeia carbônica ligada ao anel aromático, que neste caso são  $\text{sp}^3$ . Devido a isso esses sinais estão muito menos desblindados e aparecem em  $\delta$  24,75 e em  $\delta$  13,81 para o C9 e C10, respectivamente (Figura 41).

Figura 40 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAE3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



Fonte: Do autor (2023).

Figura 41 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAD3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



Fonte:

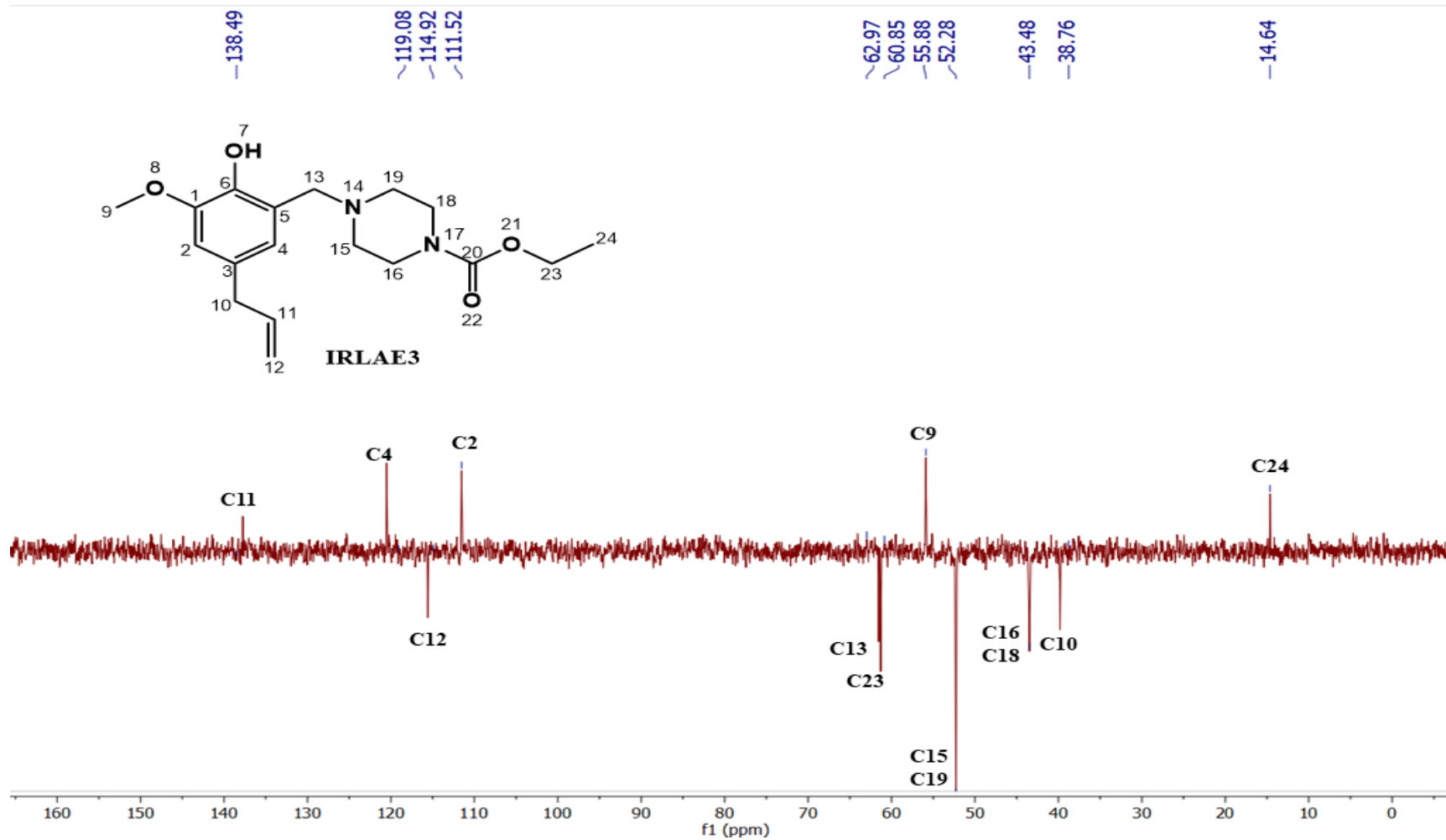
Do

autor

(2023).  
64

Pelo subespectro DEPT-135 (Figura 42), as atribuições feitas podem ser confirmadas. Ainda, pôde-se notar a ausência do sinal referente ao carbono 5, que foi substituído, sustentando o fato de que a síntese foi efetiva e que ocorreu nesta posição.

Figura 42 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE3 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



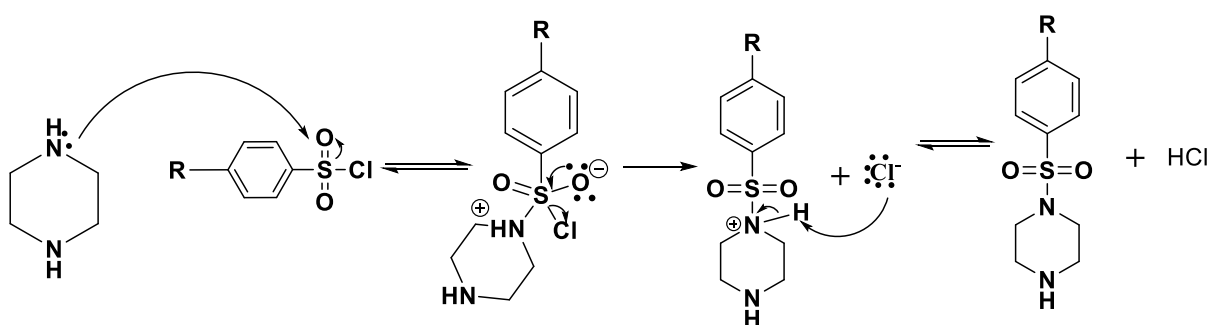
Fonte: Do autor (2023).

O derivado IRLAE2 foi preparado utilizando o eugenol e a 1-(2-hidroxietil) piperazina. Assim como os anteriores, a análise por meio de CCD mostrou a presença do material de partida, que não foi observada após a elaboração. Os resultados foram similares aos derivados anteriores, obtendo-se um sólido branco após cristalização por resfriamento. Foi obtido 0,732 g de produto (39%) na forma de um sólido branco. O mesmo aplica-se para o derivado IRLAD2, sintetizado utilizando o dihidroeuogenol, obtendo-se 0,499g de um sólido arroxeadado (27%).

Na síntese do derivado IRLAE3 foi obtido um óleo âmbar que, ao ser analisado por CCD apresentou uma mancha na base. Criou-se uma hipótese de que se tratava do ácido carboxílico após a hidrólise do grupo éster da piperazina a julgar pela polaridade e arraste na placa, característico desse grupo funcional. Com isso, o derivado foi purificado por recristalização, obtendo-se 1,741 g (84%) de um sólido branco amarelado. O derivado do dihidroeuogenol, por sua vez, obteve o mesmo padrão de CDD, sendo obtido um óleo puro após a tentativa de recristalização. Este óleo apresentou apenas uma mancha em CCD. Assim, para o IRLAD3, foi obtido 1,657 g de produto (81%) de um óleo âmbar.

Para a síntese das piperazinas precursoras de alguns dos próximos derivados, foi utilizada a metodologia descrita por Manasa *et al.* (2020), onde utiliza-se cloreto de benzenosulfonila, piperazina e trietilamina em acetona a 0 °C, se tratando de uma substituição nucleofílica (Figura 43).

Figura 43 - Mecanismo da reação de síntese das piperazinas *N*-sulfoniladas.



Fonte: Do autor (2023).

Em todas as três reações, ao adicionar o cloreto de sulfonila correspondente notou-se a formação de um sólido branco. A reação durou 30 minutos e, após a elaboração, foram obtidos sólidos com odor característico de compostos sulfonilados, obtendo rendimento entre 39 a 45%.

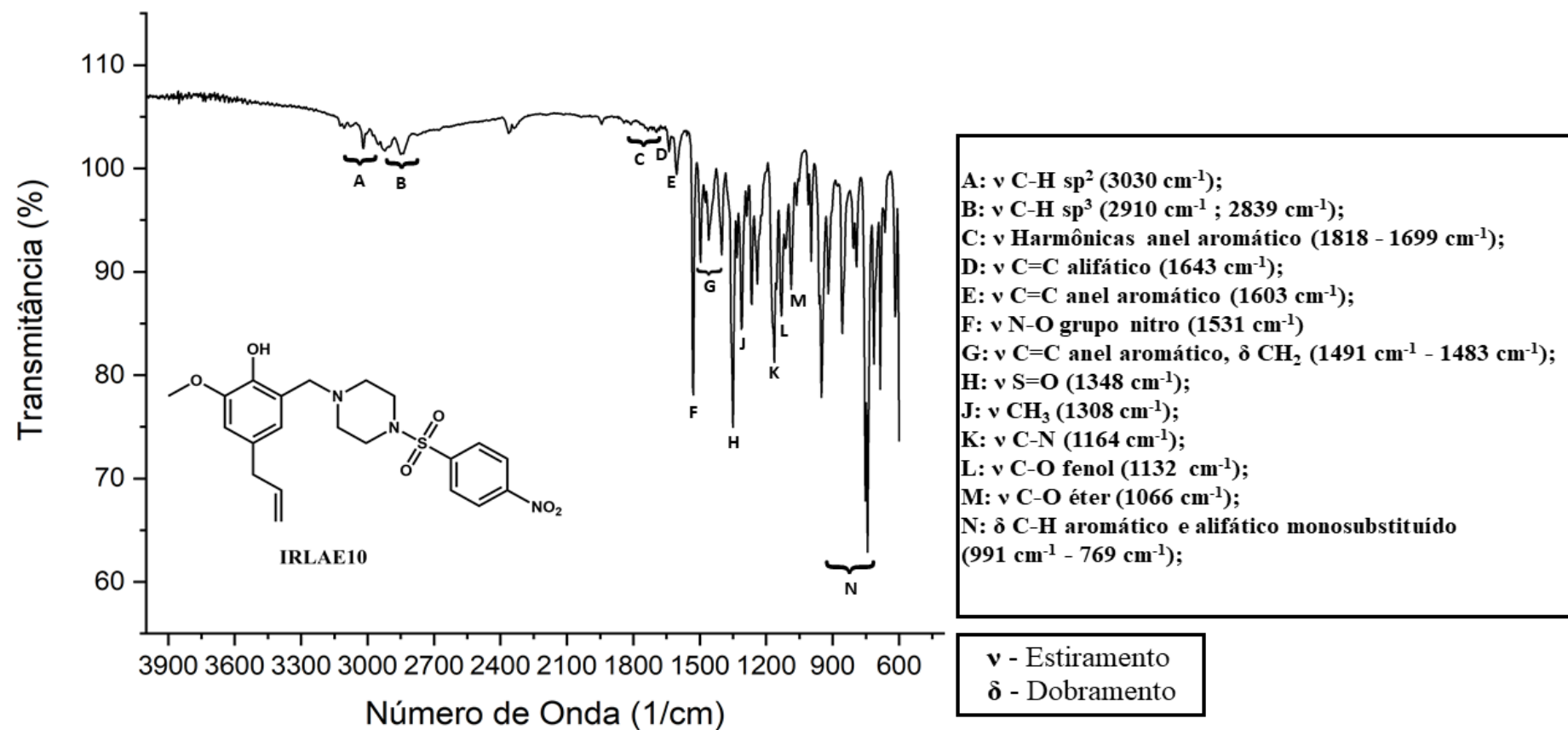
Devido aos fatos de que a síntese de sulfonamidas são reações rápidas e bem descritas na literatura (MONDAL, MALAKAR, 2020) e também por não se tratar de compostos inéditos, esses intermediários foram caracterizados por meio de CCD, com revelador de ninidrina, ao qual foram positivos. Assim, foi dada sequência a síntese, verificando a presença do grupo sulfonila nos derivados finais, o que comprovou que haviam sido devidamente obtidos.

Para a síntese do derivado IRLAE4, utilizou-se a benzenosulfonil-piperazina previamente sintetizada (IRLA4) em uma reação de Mannich com o eugenol. Como resultado, após a extração líquido-líquido, obteve-se um óleo âmbar impuro, apresentando três manchas em CCD, sendo duas mais polares, podendo ser o que sobrou da piperazina da reação anterior, ou até mesmo o derivado não substituído produzido em menor quantidade; e a terceira menos polar, ao qual criou-se a hipótese de ser o produto. Com isso, foi feita Cromatografia em Coluna de Sílica (CCS), obtendo-se, após a evaporação do solvente, 0,333 g de um sólido branco (13%).

Resultados similares foram obtidos para o derivado IRLAD4, proveniente do dihidroeugenol, resultando em 0,324 g de um sólido branco após a CSS (13%). Para os compostos partindo-se da 1-tosilpiperazina (IRLAE9: 202,27 mg e IRLAD9: 150,09 mg) e da 1-((4-nitrofenil)sulfonil)piperazina (IRLAE10: 190,61 mg e IRLAD10: 175,65 mg) os resultados foram similares, ou seja, sólidos resultantes de cristalização espontânea após a CCS.

Nos espectros na região do infravermelho dessa série de compostos, pôde-se observar além dos grupos já discutidos, as bandas referentes ao estiramento do grupo S=O e ao grupo NO<sub>2</sub> próximas a 1300 e 1500 cm<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 44, **F** e **H**), sugerindo que a síntese foi efetiva, o que foi confirmado pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, tendo em conta os sinais referente aos carbonos e hidrogênios aromáticos desse substituinte no anel piperazínico (Figura 106 e 107, anexo B).

Figura 44 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE10.

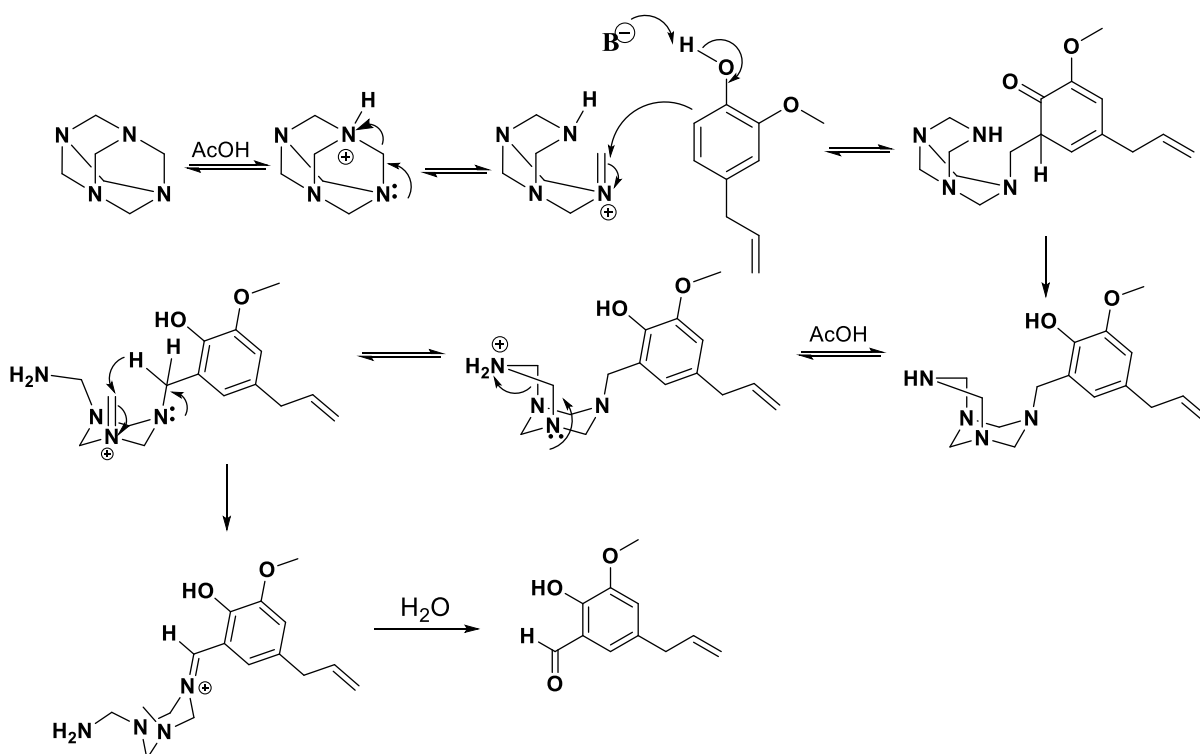


Fonte: Do autor (2023).

Para o preparo do derivado com o núcleo piperazínico não substituído do eugenol IRLAE5, foi constatado que a reação de Mannich não é efetiva neste caso. Mesmo após todo o processo de extração com ácido e bases, ao analisar por meio CCD, observou-se diversas manchas por toda a placa, além de resultar uma pequena massa após a elaboração, que não foi possível ser analisada.

Com isso, para a síntese desses compostos, utilizou-se uma reação do tipo *one-pot*, conhecida como aminação redutiva (AFANASYEV *et al.*, 2019), partindo-se do derivado aldeído do eugenol, da piperazina e um agente redutor. Entretanto, inicialmente foi realizada a formação dos intermediários formilados do eugenol e do dihidroeugenol pelo método conhecido como reação de Duff, que emprega o aquecimento do fenol de interesse com hexamina em ácido acético glacial. Este método é conhecido por seu baixo rendimento e consiste em uma aminometilação (gerada a partir desta amina) do eugenol, seguida pela desidrogenação da amina para a imina correspondente, a qual é hidrolisada *in situ* ao intermediário aldeídico correspondente (VINAYA *et al.*, 2014) (Figura 45).

Figura 45 - Mecanismo de formilação da reação de Duff.

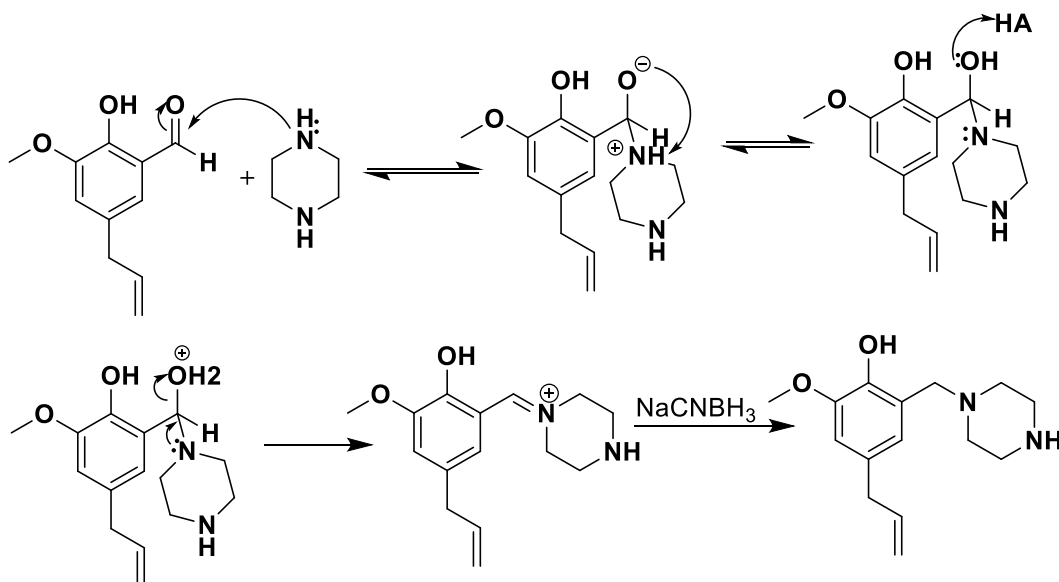


Fonte: Do autor (2023).

Devido ao fato de essa reação e esse intermediário serem bem conhecidos, para assegurar a formação e pureza relativa do produto, foi utilizado dinitrofenilhidrazina (DNFH) como revelador para a CCD, além da comparação com um padrão autêntico do produto. Para a elaboração da reação de formilação, após a neutralização de qualquer subproduto da hexamina com HCl, utiliza-se bicarbonato de sódio para corrigir o pH do meio.

Na aminação reductiva, o mecanismo segue pelo ataque nucleofílico da amina na carbonila do aldeído conduzindo à formação do íon imínio, que é reduzido pelo cianoborohidreto de sódio presente no mesmo frasco de reação (Figura 46).

Figura 46 - Mecanismo da reação de aminação reductiva.



Fonte: Do autor (2023).

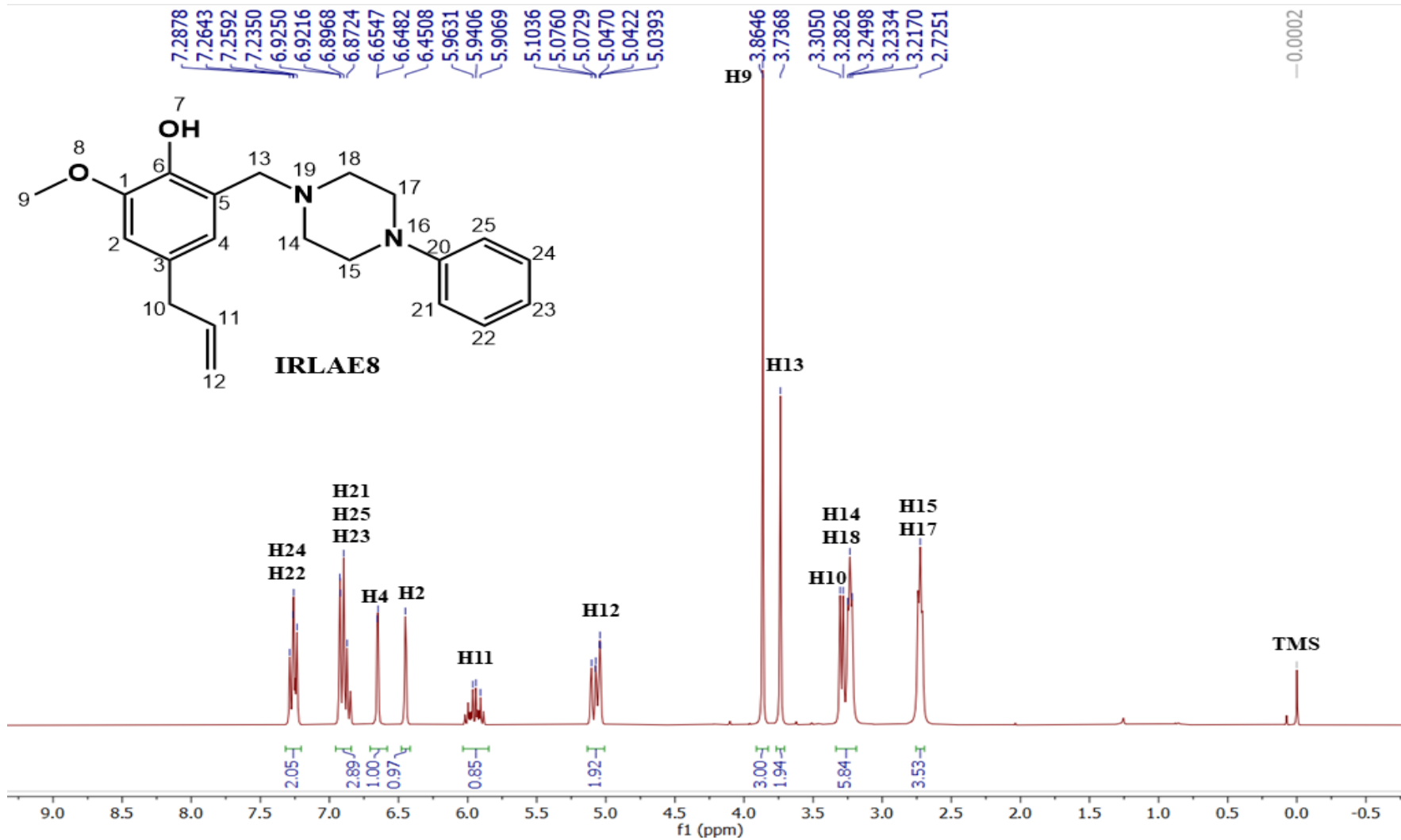
Referente ao derivado do eugenol, obteve-se, após a extração com acetato de etila, um óleo amarelado escurecido e impuro, com diversas manchas aparentes em CCD. Assim, devido a polaridade do composto ser muito alta e à basicidade do nitrogênio não substituído, não foi feita a purificação por CCS, optando-se pela tentativa de lavagem com hexano puro. Após a lavagem, observou o clareamento do óleo, além de uma única mancha arrastada em CCD. Resultados similares foram encontrados referente ao derivado partindo do dihidroeugenol. Porém, ao avaliar a identidade e pureza desse último composto, observou-se a presença do sinal referente ao carbono 5 na análise de DEPT-135. Isso pode indicar que haja algum tipo de impureza no composto, pelo fato deste ser um carbono totalmente substituído (Figura 95).

Na síntese do derivado fenilpiperazínico do eugenol IRLAE8, obteve-se após a

extração e evaporação um óleo de avermelhado, que em CCD apresentou impurezas. Após a purificação por CCS, obteve-se 0,513 g (24%) de um sólido branco cristalino (em agulhas finas). Para o derivado IRLAD8, foram obtidos resultados similares, tendo-se 0,542 g (26%) do produto após CCS, também na forma de um sólido cristalino.

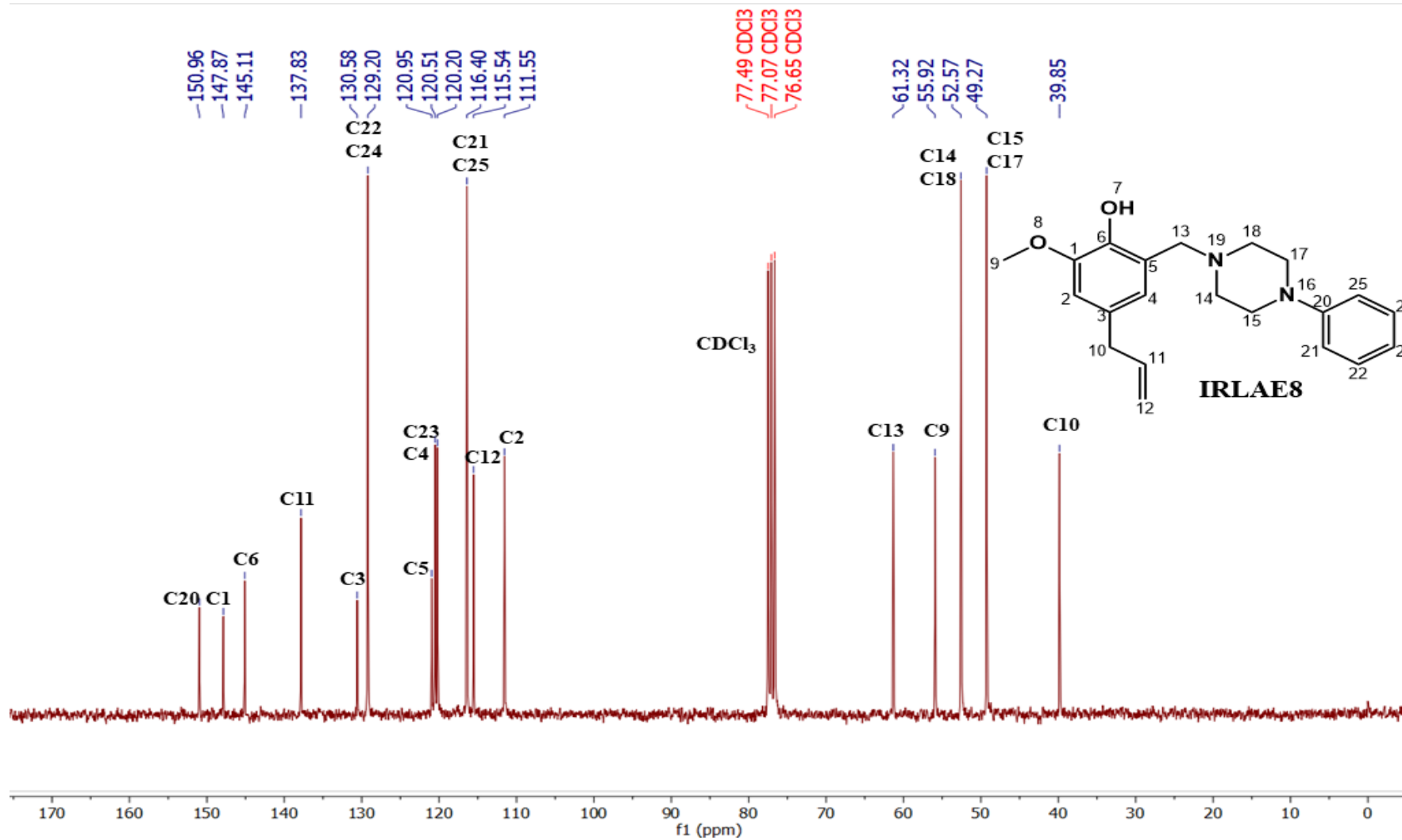
Nos espectros de RMN desses compostos, além dos sinais já discutidos, pôde-se verificar a presença dos sinais referentes aos hidrogênios e carbonos do anel ligado ao núcleo piperazínico que acoplaram como previsto na região de carbonos aromáticos próximo aos do núcleo do eugenol. Para o espectro de  $^1\text{H}$  tem-se H24 e H22 em 7,28 ppm e H21, H23 e H25 próximo a 6,92 ppm (Figura 47). Já em relação ao espectro de  $^{13}\text{C}$  tem-se C22 e C24 em  $\delta$  129,20, C23 em  $\delta$  120,20 e C21 e C25 em  $\delta$  116,40 (Figura 48).

Figura 47 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAE8 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



Fonte: Do autor (2023).

Figura 48 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAE8 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



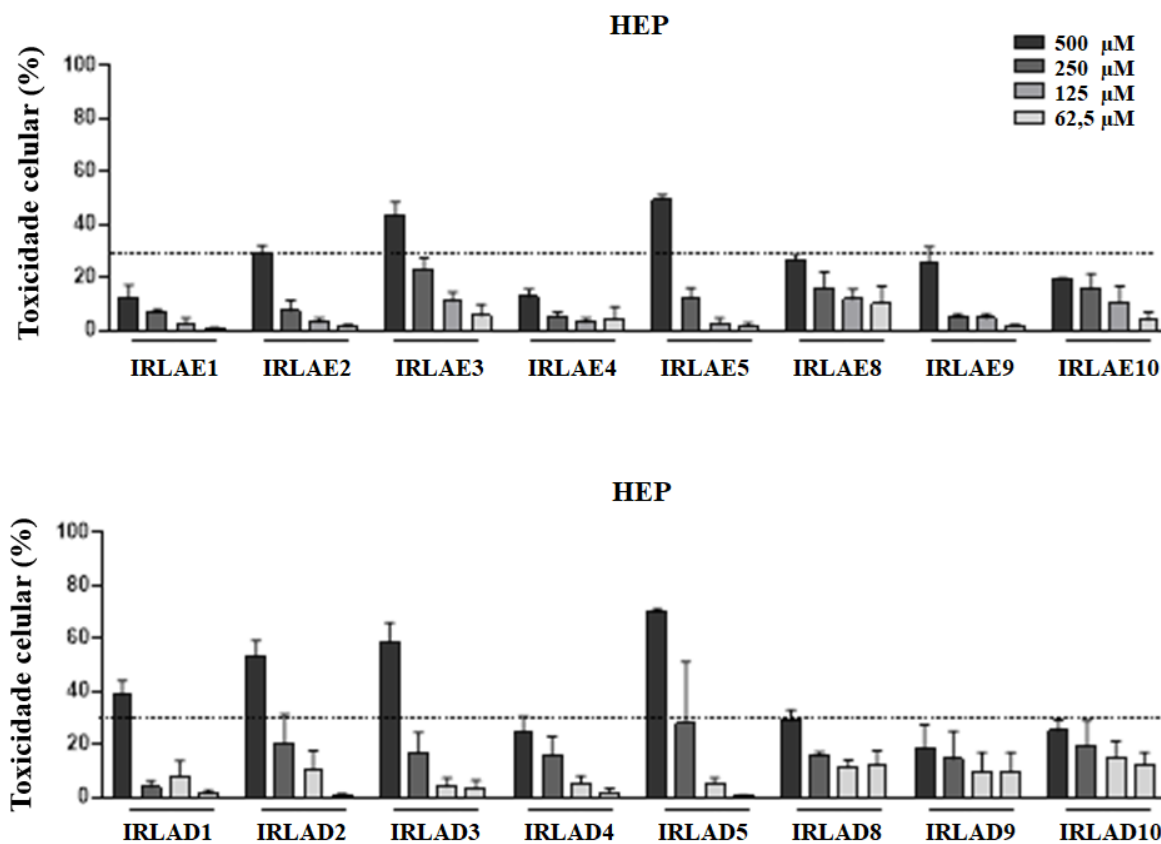
Fonte: Do autor (2023).

Das bases de Mannich sintetizadas, 13 são inéditas, sendo que IRLAE8 foi preparada no trabalho de Sharghi *et al.*(2012), em que os autores visaram propor uma nova metodologia de síntese, não avaliando nenhum tipo de atividade biológica. Ainda com relação a isso, outro trabalho de Buduma *et al.* (2021) trouxe a síntese de IRLE1 e IRLAE5, o qual avaliou sua atividade anticâncer, obtendo resultados de atividades brandas para esses dois compostos. Dessa forma, além das substâncias novas aqui apresentadas, têm-se o ineditismo no tipo de avaliação biológica realizada.

Para avaliar a segurança dos derivados piperazínicos, foi investigado seu potencial citotóxico frente às células H9c2 (cardiomioblastos de ratos) e HepG2 (derivadas de carcinoma hepatocelular humano). Considerou-se efeito citotóxico a redução igual ou superior a 30% na viabilidade das células, como preconizado pela ISO 10993-5.

As Figuras 49 e 50 mostram o percentual de inibição da proliferação das células H9c2 e HepG2, incubadas com diferentes concentrações das substâncias. De forma geral, o perfil de toxicidade foi mais acentuado nas células HepG2 (Figura 49); nesse tipo celular, as substâncias IRLAE3, IRLAE5, IRLAD2, IRLAD3, IRLAD5 e IRLAD10 induziram redução da viabilidade de mais de 30% das células quando a 500  $\mu$ M, mas o efeito foi concentração dependente, sendo irrelevante nas menores concentrações. As demais substâncias não induziram alteração significativa na viabilidade das células. O eugenol e dihidroeugenol não estão mostrados, porém não foram tóxicos e induziram níveis de proliferação celular até maiores que as células controle, para as células H9c2 e HepG2. É importante ressaltar que as concentrações de DMSO utilizadas na solubilização das substâncias não induziram redução na viabilidade das células (concentração final no poço <1%).

Figura 49 - Avaliação da viabilidade de células HepG2 pelo ensaio do corante resazurina tratadas com os compostos piperazínicos sintetizados.

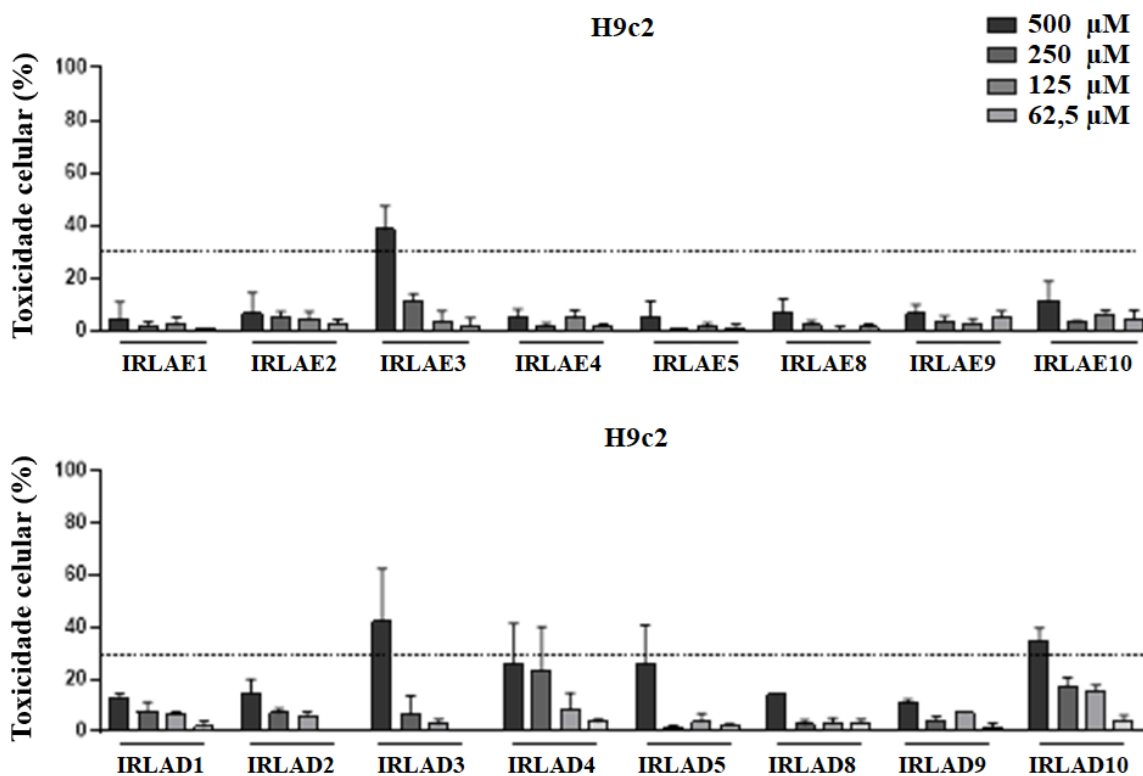


\*As células foram incubadas por 48 horas na presença ou ausência de concentrações decrescentes das substâncias. A viabilidade celular foi determinada por meio da resazurina. As absorbâncias foram medidas usando um leitor espectrofotométrico de microplacas em 570nm e 600nm, e a viabilidade celular foi calculada considerando a diferença na redução de resazurina entre células tratadas e não tratadas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados representam as médias de pelo menos dois experimentos independentes (n= 2).

Fonte: Do autor (2023).

Quando essas substâncias foram incubadas com células H9c2, foi observado efeito tóxico para a maior concentração de IRLAE3, IRLAD3, IRLAD4, IRLAD5 e IRLAD10 (Figura 50).

Figura 50 - Avaliação da viabilidade de células H9c2 pelo ensaio do corante resazurina tratadas com os compostos piperazínicos sintetizados.



As células foram incubadas por 48 horas na presença ou ausência de concentrações decrescentes das substâncias. A viabilidade celular foi determinada por meio da resazurina.

As absorbâncias foram medidas usando um leitor espectrofotométrico de microplacas em 570nm e 600nm, e a viabilidade celular foi calculada considerando a diferença na redução de resazurina entre células tratadas e não tratadas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados representam as médias de pelo menos dois experimentos independentes (n= 2).

Fonte: Do autor (2023).

Esses resultados obtidos são sustentados pela literatura acerca dos efeitos citotóxicos de bases de Mannich. Sendo este um estudo inovador, os artigos não possuem substâncias idênticas às aqui descritas, porém há relatos levando em conta outras bases de Mannich, o que possibilita fazer inferências quanto aos resultados desses ensaios. Um desses estudos é o realizado por Malinka *et al.* (2005), que sintetizou derivados isotiazolopiridínicos e avaliou suas atividades biológicas. Como resultado, além de possuírem significativa atividade analgésica, os compostos apresentaram pouca toxicidade, com valores de LD<sub>50</sub> acima de 255 mg/kg, chegando à conclusão de que todos os compostos foram menos tóxicos que seus antecessores.

Um outro estudo, realizado por Moreno-Viguri *et al.* (2016), também suporta os

resultados dessa pesquisa. A partir dele, os autores tiveram por objetivo sintetizar novos derivados do tipo base de Mannich arilamínicos e avaliar suas atividades antiparasitárias. Os autores realizaram um extenso estudo com relação a citotoxicidade dos compostos sintetizados. Como resultado, no ensaio frente a células Vero, os compostos apresentaram menor citotoxicidade que o fármaco de referência benznidazol, obtendo valores de IC<sub>50</sub> entre 30,1 e 2846,3 µM. Os autores também realizaram teste genotóxicos, pelo qual todas as substâncias foram não mutagênicas. Por último, realizaram o teste AMES, no qual os compostos foram não genotóxicos com ou sem ativação metabólica.

Todos esses fatores suportam a hipótese de que a citotoxicidade dos compostos depende de diversos fatores e não só do grupamento base de Mannich. Assim, para os compostos com atividades biológicas mais promissoras, se faz necessário um estudo mais elaborado sobre o mecanismo de ação e metabolismo para a confirmação dessa hipótese. Porém, os resultados aqui apresentados são muito promissores tendo em vista o fato de que mesmo aqueles que apresentaram maior toxicidade, o fizeram em maiores concentrações.

A seguir, foi determinada a atividade anti-*T. cruzi* sobre formas amastigotas intracelulares desse parasita, por meio da avaliação semiquantitativa em placas de 96 poços. Os dados obtidos mostraram discreta redução no parasitismo intracelular para as substâncias IRLAE3, IRLAE5, IRLAE8, IRLAD2, IRLAD3, IRLAD4, IRLAD5 e IRLAD10 após 48 horas de incubação. Já 48 horas após a lavagem das células, essas substâncias (exceto IRLAD2) mostraram ainda alguma interferência no parasitismo, especialmente nas maiores concentrações (500, 250 e 125 µM), para as quais era possível observar diferenças com relação aos controles. Desse modo, essas substâncias foram selecionadas para avaliação da atividade anti-tripomastigosta. Para esse ensaio foi utilizada a concentração de 25 µM, mas nenhuma substância foi efetiva em induzir mortalidade acima de 50% dos tripomastigostas. Dessa forma e tendo em vista a baixa potência como tripanossomicidas, os estudos visando esse alvo não foram aprofundados.

Em relação aos testes biológicos da atividade antibacteriana e antimicobacteriana, os resultados obtidos foram bastante promissores. Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima, foram utilizados os compostos sintetizados em onze concentrações diferentes a partir de diluições 1:2 (de 625 a 0,61 µg.mL<sup>-1</sup>). A atividade foi determinada frente a micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e micobactérias de crescimento rápido e os resultados podem ser conferidos no Quadro 2. Em geral, todos os derivados sintetizados apresentaram atividade superior (4,88 e 312,5 µg.mL<sup>-1</sup>) ao eugenol (IRLEU) e dihidroeugenol

(IRLDI), os quais mostraram valores de CIM acima de  $625 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Dentre os derivados, todos eles apresentaram inibição frente à todas as espécies testadas, não havendo variação significativa entre micobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas. Os derivados IRLAE1 e IRLAD1, sintetizados a partir da metilpiperazina, apresentaram menor atividade frente a todas as espécies (entre  $312,5$  e  $78,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Criou-se a hipótese de que isso se dá pelo fato de não possuírem algum grupo polar ligado a outra extremidade do núcleo piperazínico, como é o caso dos outros compostos, podendo afetar sua solubilidade em água e biodisponibilidade. Dentre os outros resultados gerais, observa-se valores de CIM entre  $78,125$  e  $19,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Por fim, os compostos que apresentaram maior atividade (CIM entre  $19,53$  e  $2,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) frente a todos os micro-organismos testados foram os que possuem grupo volumoso como substituinte no núcleo piperazínico (IRLAE8, IRLAE9, IRLAE10, IRLAD4, IRLAD9, IRLAD10), além de a maioria conter um grupo sulfonamida em sua estrutura. Para uma comparação direta entre os ensaios antibacterianos e o citotóxico, os quadros possuem colunas que mostram a equivalência de  $500 \mu\text{M}$  em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

No ensaio também foi utilizado fármacos de referência como padrões para cada tipo de microrganismo. Nesse sentido, a eritromicina foi utilizada como padrão para bactérias Gram-positivas, imipenem para Gram-Negativos e sulfametoxazol para micobactérias. Com isso, pode-se notar que os derivados piperazínicos que apresentaram maior atividade, o fizeram em valores iguais ou inferiores aos fármacos utilizados, mostrando seu grande potencial antimicrobiano.

Quadro 2 - Atividade antibacteriana dos derivados piperazínicos em termos de CIM, com destaque em azul para os derivados que apresentaram maior atividade.

Substância	<i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	500 µM em µg.mL <sup>-1</sup>
<b>IRLAE1</b>	312,5	312,5	156,25	156,25	156,25	156,25	138,09
<b>IRLAE2</b>	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	153,09
<b>IRLAE3</b>	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	167,09
<b>IRLAE4</b>	39,06	39,06	39,06	39,06	19,53	19,53	201,08
<b>IRLAE5</b>	78,125	78,125	78,125	78,125	39,06	39,06	131,08
<b>IRLAE8</b>	19,53	19,53	9,76	9,76	4,88	4,88	169,10
<b>IRLAE9</b>	9,76	9,76	9,76	9,76	4,88	4,88	208,08
<b>IRLAE10</b>	9,76	9,76	9,76	9,76	4,88	4,88	223,57
<b>IRLAD1</b>	156,25	156,25	156,25	156,25	78,125	78,125	139,10
<b>IRLAD2</b>	78,125	78,125	78,125	78,125	78,125	78,125	154,10
<b>IRLAD3</b>	78,125	78,125	78,125	78,125	78,125	78,125	168,10
<b>IRLAD4</b>	9,76	9,76	9,76	9,76	4,88	4,88	202,08
<b>IRLAD5</b>	78,125	78,125	78,125	78,125	78,125	78,125	132,09
<b>IRLAD8</b>	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	39,06	170,10
<b>IRLAD9</b>	9,76	9,76	9,76	9,76	9,76	9,76	209,09
<b>IRLAD10</b>	4,88	4,88	4,88	4,88	2,44	2,44	224,58
<b>IRLEU</b>	>625,00	>625,00	>625,00	>625,00	>625,00	>625,00	82,041
<b>IRLDI</b>	>625,00	>625,00	>625,00	>625,00	>625,00	>625,00	83,049
<b>Imipenem</b>	-	-	-	-	19,53	19,53	
<b>Eritromicina</b>	-	-	19,53	9,76	-	-	
<b>Sulfameto xazol</b>	64	128	-	-	-	-	

\*CIM: Concentração Inibitória Mínima. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), assim os resultados estão apresentados em termos de média + Desvio Padrão.

Fonte: Do autor (2023).

Assim, os resultados obtidos são sustentados pela literatura, em que se percebe que esses compostos apresentam grande potencial antibacteriano e antimicobacteriano. Roman (2015) fez um estudo sobre as diferentes bases de Mannich e suas atividades biológicas. Segundo o autor, os compostos fenólicos desse tipo apresentaram resultados promissores contra micobactérias. Ainda nesse sentido, compostos derivados da pirrolidina foram efetivas contra *M. tuberculosis* e uma série de espécies não tuberculosas. Além disso, ao analisar derivados da fenilpiperazina, foi constatado que possuir substituintes volumosos é benéfico para a atividade antimicobacteriana.

Outro estudo conduzido por Bishoy *et al.*(2021), que sintetizou bases de Mannich derivadas do timol, contendo grupos sulfanilamídicos, avaliou-as frente as bactérias *S. aureus*, *S. pyogenes* e *E. coli*, sua atividade antifúngica e um estudo de *docking* molecular. Como resultados, os autores obtiveram zonas de inibição entre 20-25 mm para a atividade antibacteriana e antifúngica. Por último, o estudo de *docking*, que foi feito visando uma proteína substrato responsável por produzir o ácido tetrahidrofólico na bactéria, mostrou que há interações entre o grupo sulfonila e o grupo fenólico com a proteína avaliada, reforçando os resultados da atividade dos compostos sintetizados nesse estudo.

Com isso, estes seis compostos mais promissores foram testados frente a isolados clínicos de micobactérias, de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que já apresentaram algum tipo de resistência. Foram utilizadas as mesmas concentrações do ensaio anterior. Como resultados, todos os compostos apresentaram alta atividade contra todos os microorganismos. Os valores de CIM variaram entre 1,22 e 9,76  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com destaque para IRLAD9 e IRLAD10, com valores entre 1,22 e 4,88  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Isso pode indicar que a presença de um substituinte no anel aromático possa favorecer a atividade do composto. Os resultados desse ensaio podem ser conferidos no quadro a seguir (Quadro 3) .

Quadro 3 - Atividade antibacteriana dos derivados piperazínicos frente a isolados clínicos em termos de CIM com destaque em azul para os derivados que apresentaram maior atividade.

Substância	Isolados Clínicos de micobactérias		Isolados Clínicos de Gram positivos		Isolados Clínicos de Gram negativos		500 $\mu$ M em $\mu$ g. mL <sup>-1</sup>
	IC 1	IC 2	IC 3	IC 4	IC 5	IC 6	
<b>IRLAE8</b>	9,76	9,76	4,88	4,88	2,44	4,88	169,10
<b>IRLAE9</b>	4,88	9,76	2,44	4,88	4,88	4,88	208,08
<b>IRLAE10</b>	9,76	4,88	4,88	4,88	9,76	4,88	223,57
<b>IRLAD4</b>	9,76	9,76	4,88	4,88	9,76	4,88	202,08
<b>IRLAD9</b>	4,88	4,88	4,88	4,88	2,44	2,44	209,09
<b>IRLAD10</b>	4,88	4,88	1,22	1,22	2,44	2,44	224,58

\*CIM: Concentração Inibitória Mínima. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), assim os resultados estão apresentados em termos de média + Desvio Padrão.

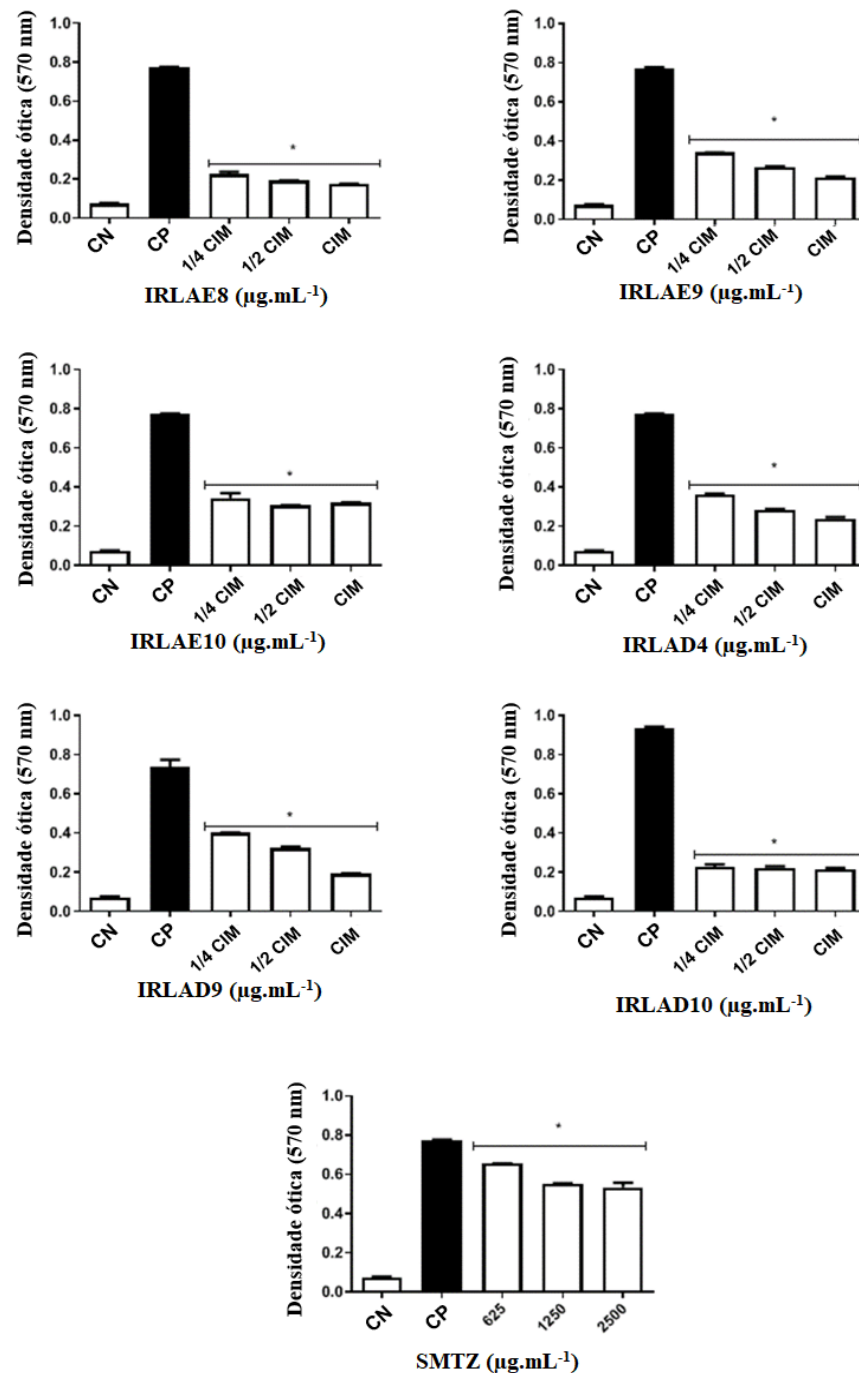
Fonte: Do autor (2023).

Outro estudo que sustenta os resultados aqui encontrados é o realizado por Idhayadhulla *et al.*(2010). Nele o autor teve por objetivo sintetizar derivados base de Mannich da morfolina possuindo anéis aromáticos substituídos ou não e avaliá-los frente a diferentes fungos e bactérias. Como resultado, obtiveram zonas de inibição entre 6 e 25 mm e observaram que dentre os compostos, os que possuem substituintes nos anéis aromáticos apresentam atividade superior quando comparado àqueles que não tinham. Embora sejam estruturas diferentes, esse fenômeno foi observado ao comparar IRLAE(ou D)4 com IRLAE(ou D)9 (ou 10) em ambos os ensaios (Quadros 2 e 3).

Ainda com relação aos compostos mais promissores, foi feita uma avaliação quanto à inibição da formação e remoção/destruição de biofilmes de *M. fortuitum* comparando-os com o fármaco de referência sulfametoxazol (SMTZ). No primeiro ensaio, observa-se que todos os compostos conseguiram inibir a formação de biofilme em 1/4 da MIC mais eficientemente que o SMTZ, o qual mesmo a 2500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> não mostrou resultado promissor (Figura 51). Já no segundo ensaio, é possível perceber que os derivados piperazínicos não apresentaram

atividade significativa, indicando que não são capazes de destruir ou remover o biofilme já formado (Figura 52).

Figura 51 - Inibição da formação de biofilmes de *M. fortuitum* pelos derivados piperazínicos.

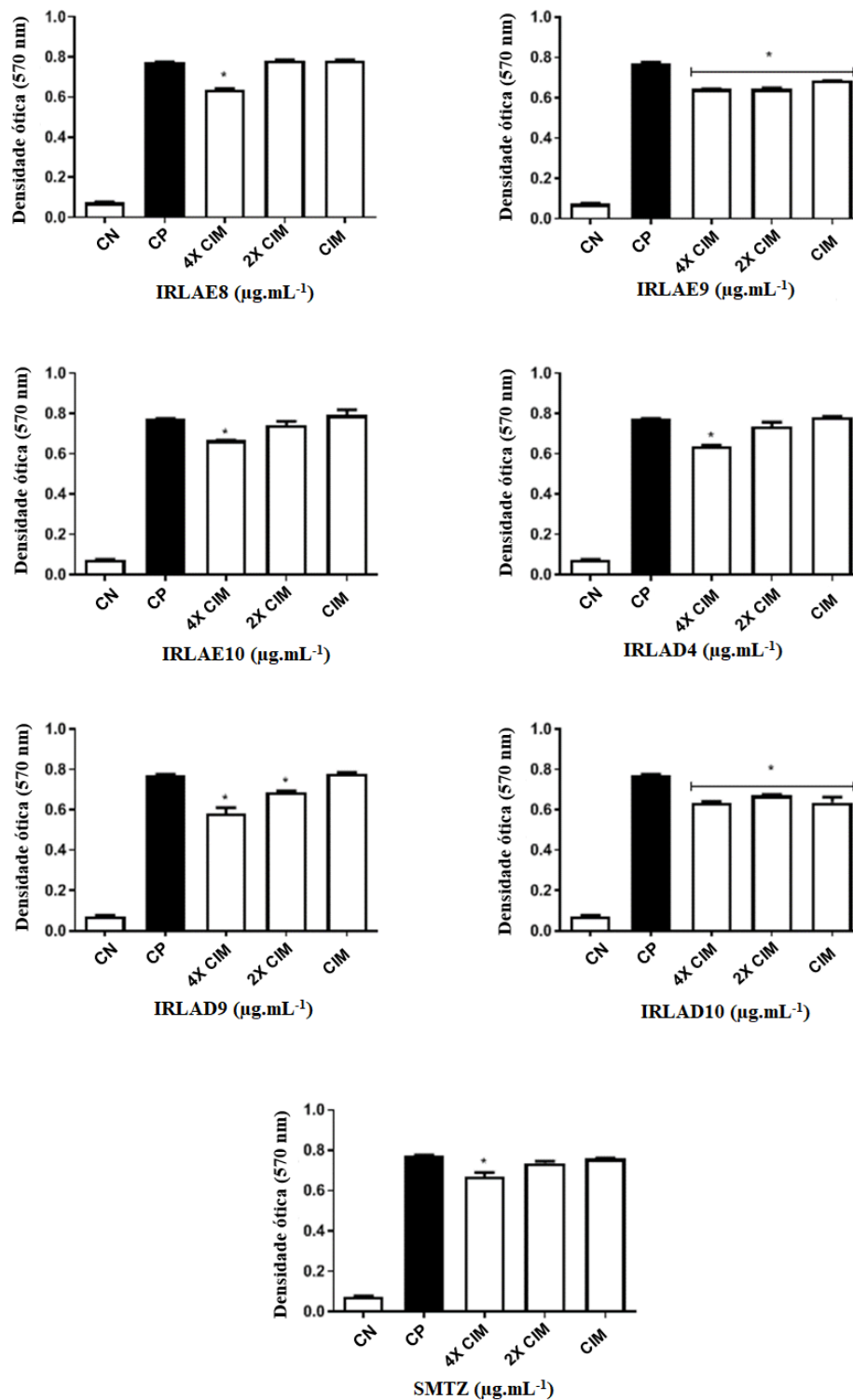


\*CN: controle negativo; CP: controle positivo; SMTZ: sulfametoxazol

A formação de biofilme foi determinada pela diferença significativa entre as médias de absorbância obtidas no CP e as médias obtidas no CN. O experimento foi realizado em triplicata (n= 3). As leituras de DO obtidas no ensaio de formação de biofilme foram registradas como média ± Desvio Padrão, e foram submetidas a um teste t (comparado com o CP). Um valor de  $P > 0,05$  foi considerado para indicar significância estatística.

Fonte: Do autor (2023).

Figura 52 - Remoção/destruição de biofilmes pré-formados de *M. fortuitum* pelos derivados piperazínicos.



\*CN: controle negativo; CP: controle positivo; SMTZ: sulfametoxazol

A formação de biofilme foi determinada pela diferença significativa entre as médias de absorbância obtidas no CP e as médias obtidas no CN. O experimento foi realizado em triplicata ( $n=3$ ). As leituras de DO obtidas no ensaio de formação de biofilme foram registradas como média  $\pm$  Desvio Padrão, e foram submetidas a um teste t (comparado com o CP). Um valor de  $P > 0,05$  foi considerado para indicar significância estatística.

Fonte: Do autor (2023).

Em vista dos fatos apresentados, pode-se afirmar que os compostos sintetizados possuem um grande potencial antibacteriano e antimicobacteriano, sendo mais efetivo que seus precedentes, principalmente os que possuem o grupo sulfonamida. Estes resultados ficam mais promissores quando se leva em conta o fato de apresentarem citotoxicidade apenas em altas concentrações (acima de 500  $\mu\text{M}$ ) e que a atividade antibacteriana e antimicobacteriana foi obtida em concentrações bastante inferiores. Quanto ao potencial antiparasitário dos compostos pode-se afirmar que os compostos não apresentaram resultados significantes. Os compostos piperazínicos sintetizados são ótimos candidatos a fármacos que possam ajudar a suprir a necessidade crescente de novos antimicrobianos. Ainda nesse sentido, podem ser realizados estudos mais aprofundados sobre seu mecanismo de ação e metabolismo.

## 5 PARTE EXPERIMENTAL

Em relação ao material de partida das reações, o eugenol e dihidroeugenol, foram obtidos comercialmente através da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> e utilizado como tal. Quanto aos derivados da piperazina, a maioria destas também foi obtida comercialmente, salvo para as sulfonaminas que foram sintetizadas a partir da piperazina não substituída.

Todas as etapas da síntese foram acompanhadas utilizando o método de CCD, com placas de sílica gel feitas em suporte de alumínio contendo detector de fluorescência (Macherey-Nagel, DC-Fertigfolien ALUGRAM<sup>®</sup> Xtra Sil G/UV254). Para as purificações realizadas em CCS foi utilizada sílica gel 60, 70-230 mesh (Sorblin), sendo os eluentes utilizados descritos em cada processo.

Para as determinações de faixa de fusão, utilizou-se um aparelho Bücher 535 (0-300 °C), calibrado com vanilina P.A. Merck<sup>®</sup>.

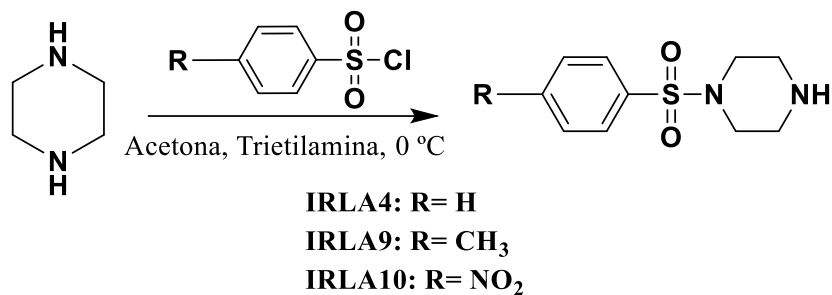
As análises de espectroscopia na região do infravermelho (IV) foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Controle de Qualidade da UNIFAL-MG, e obtidas em um espectrômetro Thermo Scientific Nicolet-iS50, com dispositivo ATR, e os valores foram descritos em número de onda ( $\bar{\nu}_{\text{máx}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ). As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UNIFAL-MG, obtidas em espectrômetro Bruker AC-300. Os resultados foram processados com o auxílio do software MestReNova, desenvolvido pela Mestrelab Research S.L.<sup>®</sup> (versão 14.1.1; 2019). O padrão empregado foi o tetrametilsilano (TMS) e como solvente o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Os valores de deslocamento químico são dados em partes por milhão ( $\delta$ , ppm).

### 5.1 SÍNTESE DOS DERIVADOS PIPERAZÍNICOS

#### 5.1.1 Síntese das piperazinas *N*-sulfoniladas

Em um balão de aquecimento foi solubilizado piperazina (2 equivalentes) em acetona a 0° C. Após isso, foi adicionado trietilamina (2,8 equivalentes) e a mistura foi deixada em agitação por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado o cloreto correspondente (1 equivalente) gota a gota, a solução sendo deixada em agitação por 30 minutos nessas condições (Figura 53).

Figura 53 - Metodologia de síntese das sulfonamidas a partir piperazina.



Fonte: Do autor (2023).

A reação foi terminada com água destilada, extraída com clorofórmio (4 x 20 mL), seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. No quadro a seguir são mostradas as quantidades de reagentes empregas em cada reação (Quadro 4).

Quadro 4 - Quantidades de reagentes para a síntese das piperazinas *N*-sulfoniladas.

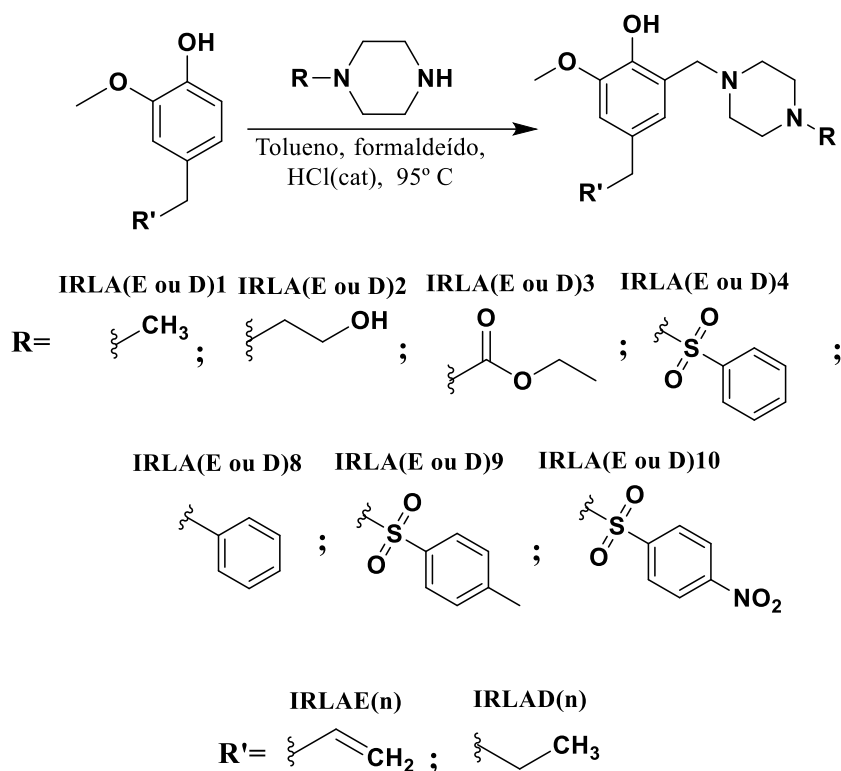
Produto	Quantidade dos Reagentes		
	Piperazina (g)	Trietilamina (mL)	Cloreto correspondente
<b>1-fenilsulfonilpiperazina</b>	5 g	11,33 mL	3,69 mL
<b>1-tosilpiperazina:</b>	5 g	11,33 mL	5,51 g
<b>1-((4-nitrofenil)sulfonil) piperazina:</b>	5 g	11,33 mL	6,41 g

Fonte: Do autor (2023).

### 5.1.2 Síntese das bases de Mannich do eugenol e dihidroeugenol

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foi adicionada a piperazina correspondente (2 equivalentes) em tolueno (5 mL) e, em seguida foram adicionados formaldeído (2 equivalentes) e HCl (37% p/v; 1 gota). Após isso, a mistura reagente foi aquecida até 95 °C com agitação. Atingida essa temperatura, foi adicionado eugenol/dihidroeugenol (1 equivalente), sendo mantida em agitação nessas condições por 6 horas e acompanhada por CCD (Figura 54). No quadro 4 são mostradas as quantidades de reagentes empregas em cada reação e o eluente usado para acompanhar por CCD.

Figura 54 - Metodologia de Síntese dos derivados piperazínicos do eugenol.



Fonte: Do autor (2023).

Após o término da reação, esta foi arrefecida e feita uma extração com solução aquosa de HCl ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) (5 x 30 mL). A fase aquosa resultante teve seu pH ajustado para 6 utilizando solução saturada de bicarbonato de sódio. Por fim, foi feita uma extração da fase aquosa com clorofórmio (5 x 20 mL). A fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado a pressão reduzida. Após isso, a depender da pureza do derivado, outros métodos de purificação foram utilizados, como CCS ou recristalização.

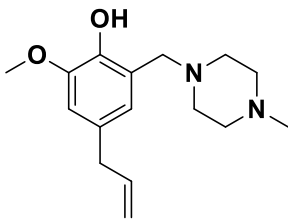
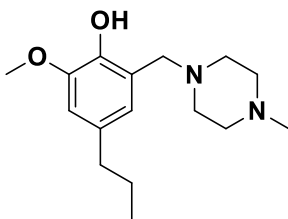
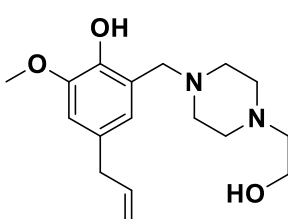
Quadro 4 - Quantidades de reagentes para a síntese dos produtos finais.

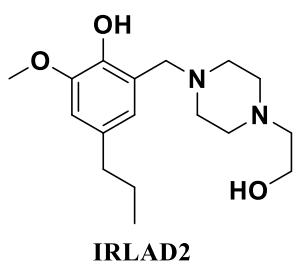
Produto	Quantidade dos Reagentes			
	Eugenol (E)/ Dihidroeugenol (D) (mL)	Piperazina Correspondente	Formaldeído (mL)	Proporção de Hexano/Acetato para CCD
<b>IRLAE1</b>	0,943	metilpiperazina: 1,35 mL	0,906	4:6
<b>IRLAD1</b>	0,963	metilpiperazina: 1,33 mL	0,895	4:6
<b>IRLAE2</b>	0,943	1(2-hidroetil)piperazina: 1,49 mL	0,906	4:6
<b>IRLAD2</b>	0,963	1(2-hidroetil)piperazina: 1,47 mL	0,895	4:6
<b>IRLAE3</b>	0,943	etil-1-carboxipiperazina: 1,78 mL	0,906	6:4
<b>IRLAD3</b>	0,963	etil-1-carboxipiperazina: 1,76 mL	0,895	6:4
<b>IRLAE4</b>	0,377	1-fenilsulfonilpiperazina: 1,10 g	0,3627	6:4
<b>IRLAD4</b>	0,385	1-fenilsulfonilpiperazina: 1,03 g	0,358	6:4
<b>IRLAE8</b>	0,943	1-fenilpiperazina: 1,917 mL	0,906	6:4
<b>IRLAD8</b>	0,963	1-fenilpiperazina: 1,893 mL	0,895	6:4
<b>IRLAE9</b>	0,471	1-tosilpiperazina: 1,46 g	0,453	4:6
<b>IRLAD9</b>	0,485	1-tosilpiperazina: 1,44 g	0,447	4:6
<b>IRLAE10</b>	0,471	1-((4-nitrofenil)sulfonil) piperazina: 1,65 g	0,453	4:6
<b>IRLAD10</b>	0,485	1-((4-nitrofenil)sulfonil) piperazina: 1,63 g	0,447	4:6

Fonte: Do autor (2023).

Adiante estão mostrados os dados de caracterização referentes à cada base de Mannich final obtido por esta metodologia (Quadro 5), onde tem-se o nome químico definido pela IUPAC, seu rendimento, aspecto, faixa de fusão, fórmula molecular, massa molar, fator de retenção e dados dos espectros no IV e de RMN.

Quadro 5 - Dados de caracterização dos derivados sintetizados pela reação de Mannich.

Estrutura do derivado	Caracterização
 <p data-bbox="316 703 416 734">IRLAE1</p>	<p data-bbox="564 376 1209 409"><b>4-álil-2-metoxi-6-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenol</b></p> <p data-bbox="564 412 1171 445"><b>Rendimento:</b> 84%; Sólido branco; <b>F.F.:</b> 82-87 °C;</p> <p data-bbox="564 448 1050 481"><b>F.M.:</b> C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <b>M.M.:</b> 276,38 g.mol<sup>-1</sup></p> <p data-bbox="564 483 1139 517"><b>Rf:</b> 0,41 (metanol e acetato de etila, 1,0:1,0 v/v)</p> <p data-bbox="564 519 1380 875"><b>IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):</b> 3016, 2982 (C-H sp<sup>2</sup>); 2839, 2800 (C-H sp<sup>3</sup>); 1639 (C=C alifático); 1593 (C=C ar); 1432 - 1504 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1348 (CH<sub>3</sub>); 1279 (C-N); 1145 (C-O fenólico); 1087 (C-O, éter); 1002, 909 (C-H ar, alifático). <b><sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 6,63 (d, 1H, J = 1,95 Hz, H4); 6,42 (d, 1H, J = 1,95 Hz, H2); 5,98-5,89 (m, 1H, H11); 5,10-5,03 (m, 2H, H12); 3,86 (s, 3H, H9); 3,69 (s, 2H, H13); 3,29-3,27 (m, 2H, H10); 3,29 (s, 8H, H15-H16, H18, H19); 2,31 (s, 3H, H20). <b><sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 147,7 (C1); 145,1 (C6); 137,8 (C11); 130,4 (C5); 120,9 (C4); 120,4 (C3); 115,5 (C12); 111,3 (C2); 61,1 (C13); 55,8 (C9); 54,8 (C16, C18); 52,3 (C15, C19); 45,7 (C20); 39,8 (C10).</p>
 <p data-bbox="316 1218 416 1249">IRLAD1</p>	<p data-bbox="564 887 1251 920"><b>2-metoxi-6-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-4-propilfenol</b></p> <p data-bbox="564 922 1171 956"><b>Rendimento:</b> 59%; Sólido branco; <b>F.F.:</b> 79-84 °C;</p> <p data-bbox="564 958 1050 992"><b>F.M.:</b> C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <b>M.M.:</b> 278,38 g.mol<sup>-1</sup></p> <p data-bbox="564 994 1139 1028"><b>Rf:</b> 0,41 (metanol e acetato de etila, 1,0:1,0 v/v)</p> <p data-bbox="564 1030 1380 1350"><b>IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):</b> 2942, 2910 (C-H sp<sup>2</sup>); 2847, 2791 (C-H sp<sup>3</sup>); 1595 (C=C ar); 1507 - 1459 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1356 (CH<sub>3</sub>); 1283 (C-N); 1140 (C-O fenólico); 1084 (C-O, éter); 820 (C-H ar). <b><sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 6,63 (d, 1H, J = 1,92 Hz, H4); 6,41 (d, 1H, J = 1,92 Hz, H2); 3,86 (s, 3H, H19); 3,68 (s, 2H, H11); 2,51-2,44 (m, 10H, H8, H13, H14, H16, H17); 2,29 (s, 3H, H20); 1,63-1,55 (m, 2H, H9); 0,92 (t, 3H, J = 7,32 Hz H10). <b><sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 147,5 (C1); 144,7 (C6); 133,1 (C3); 120,8 (C5); 120,2 (C4); 111,2 (C2); 61,2 (C11); 55,8 (C19); 54,9 (C13, C14); 52,4 (C16, C17); 45,8 (C20); 37,6 (C8); 24,7 (C9); 13,8 (C10).</p>
 <p data-bbox="316 1733 416 1765">IRLAE2</p>	<p data-bbox="564 1361 1326 1395"><b>4-álil-2-((4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metil)-6-metoxifenol</b></p> <p data-bbox="564 1397 1171 1431"><b>Rendimento:</b> 39%; Sólido branco; <b>F.F.:</b> 78-85 °C;</p> <p data-bbox="564 1433 1050 1467"><b>F.M.:</b> C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; <b>M.M.:</b> 306,41 g.mol<sup>-1</sup></p> <p data-bbox="564 1469 1139 1503"><b>Rf:</b> 0,46 (metanol e acetato de etila, 1,0:1,0 v/v)</p> <p data-bbox="564 1505 1380 1895"><b>IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):</b> 30197 - 3504 (O-H); 3009, 2995 (C-H sp<sup>2</sup>); 2820, 2869 (C-H sp<sup>3</sup>); 1642 (C=C alifático); 1586 (C=C ar); 1426 - 1496 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1356 (CH<sub>3</sub>); 1265 (C-N); 1077 (C-O fenólico); 1007 (C-O, éter); 931, 807 (C-H ar, alifático). <b><sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 6,63 (d, 1H, J = 1,95 Hz, H4); 6,42 (d, 1H, J = 1,95 Hz, H2); 5,98 - 5,89 (m, 1H, H11); 5,10-5,03 (m, 2H, H12); 3,86 (s, 3H, H9); 3,69 (s, 2H, H13); 3,62 (t, 2H, J = 5,25 Hz, H21); 3,29-3,27 (m, 2H, H10); 2,57-2,54 (m, 9H, H15, H16, H18, H19, H20). <b><sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 147,8 (C1); 145,1 (C6); 137,8 (C11); 130,5 (C3); 120,9 (C5); 120,4 (C4); 115,5 (C12); 111,4 (C2); 61,1 (C21); 59,0 (C13); 57,7 (C20); 55,8 (C9); 52,6 (C16, C18); 52,5 (C15, C19); 39,8 (C10).</p>



**2-((4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)metil)-6-metoxi-4-propilfenol**

**Rendimento:** 27%; Sólido arroxeadado; **F.F.:** 66-71 °C; **F.M.:**

$C_{17}H_{28}N_2O_3$ ; **M.M.:** 308,41 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,43 (metanol e acetato de etila, 1,0:1,0 v/v)

**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3509 - 3158 (O-H); 2966, 2919 (C-H sp<sup>2</sup>); 2831 (C-H sp<sup>3</sup>); 1587 (C=C ar); 1507 - 1567 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1359 (CH<sub>3</sub>); 1276 (C-N); 1156 (C-O fenólico); 1084 (C-O, éter); 1004 (C-H ar).

**<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6,63 (d, 1H, *J* = 1,89 Hz, H<sub>4</sub>); 6,42 (d, 1H, *J* = 1,92 Hz, H<sub>2</sub>); 3,86 (s, 3H, H<sub>19</sub>); 3,69 (s, 2H, H<sub>11</sub>); 3,64-3,60 (t, 2H, *J* = 5,40 Hz, H<sub>21</sub>); 2,57-2,45 (m, 10H, H<sub>8</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>20</sub>); 1,63-1,56 (m, 2H, H<sub>9</sub>); 0,92 (t, 3H, *J* = 7,29 Hz, H<sub>10</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 147,6 (C<sub>1</sub>); 144,6 (C<sub>6</sub>); 133,2 (C<sub>3</sub>); 120,7 (C<sub>5</sub>); 120,3 (C<sub>4</sub>); 111,3 (C<sub>2</sub>); 61,2 (C<sub>21</sub>); 59,1 (C<sub>20</sub>); 57,7 (C<sub>11</sub>); 55,8 (C<sub>19</sub>); 52,7 (C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>); 52,5 (C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>); 37,6 (C<sub>8</sub>); 24,8 (C<sub>9</sub>); 13,8 (C<sub>10</sub>).

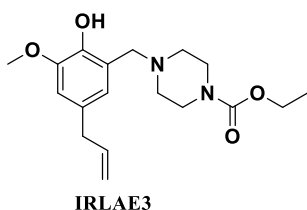
**etil 4-(5-alil-2-hidroxi-3-metoxibenzil)piperazina-1-carboxilato**

**Rendimento:** 84%; Sólido branco amarelado; **F.F.:** 52-58 °C;

**F.M.:**  $C_{18}H_{26}N_2O_4$ ; **M.M.:** 334,42 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,76 (hexano e acetato de etila, 4,0:6,0 v/v)

**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 2980 (C-H sp<sup>2</sup>); 2824, 2795 (C-H sp<sup>3</sup>); 1689 (C=O); 1589 (C=C ar); 1403 - 1489 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1347 (CH<sub>3</sub>); 1239 (C-N); 1144 (C-O, fenólico); 1111 (C-O éter); 1075 (C-O, éter); 997, 922 (C-H ar, alifático). **<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6,64 (d, 1H, *J* = 1,95 Hz, H<sub>4</sub>); 6,42 (d, 1H, *J* = 1,05 Hz, H<sub>2</sub>); 5,95 - 5,92 (m, 1H, H<sub>11</sub>); 5,07-5,03 (m, 2H, H<sub>12</sub>); 4,20-4,10 (m, 2H, H<sub>23</sub>); 3,86 (s, 3H, H<sub>9</sub>); 3,69 (s, 2H, H<sub>13</sub>); 3,53 (s, 4H, H<sub>16</sub>, H<sub>18</sub>); 3,27-3,26 (m, 2H, H<sub>10</sub>); 2,53 (s, 4H, H<sub>15</sub>, H<sub>19</sub>); 1,26 (t, 3H, *J* = 7,05 Hz, H<sub>24</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 155,3 (C<sub>20</sub>); 147,8 (C<sub>1</sub>); 144,8 (C<sub>6</sub>); 137,7 (C<sub>11</sub>); 130,7 (C<sub>3</sub>); 120,6 (C<sub>5</sub>); 120,5 (C<sub>4</sub>); 115,5 (C<sub>12</sub>); 111,5 (C<sub>2</sub>); 61,5 (C<sub>13</sub>); 61,2 (C<sub>23</sub>); 55,8 (C<sub>9</sub>); 52,2 (C<sub>15</sub>, C<sub>19</sub>); 43,4 (C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>); 39,8 (C<sub>10</sub>); 14,6 (C<sub>24</sub>).



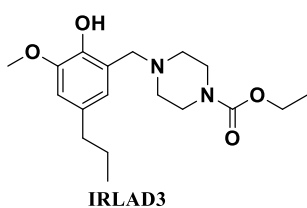
**etil 4-(2-hidroxi-3-metoxi-5-propilbenzil)piperazina-1-carboxilato**

**Rendimento:** 81%; Óleo âmbar; **F.F.:** Não se aplica;

**F.M.:**  $C_{18}H_{28}N_2O_4$ ; **M.M.:** 336,42 g.mol<sup>-1</sup>

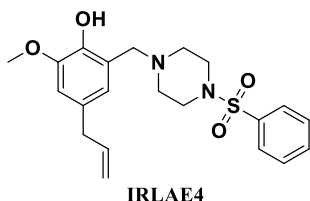
**Rf:** 0,81 (hexano e acetato de etila, 4,0:6,0 v/v)

**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3558-262 (O-H); 2969 (C-H sp<sup>2</sup>); 2854, 2815 (C-H sp<sup>3</sup>); 1706 (C=O); 1583 (C=C ar); 1491 - 1403 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1348 (CH<sub>3</sub>); 1228 (C-N); 1156 (C-O fenólico); 1124 (C-O, éter); 1077 (C-O, éter); 989 (C-H ar). **<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6,64 (d, 1H, *J* = 1,89 Hz, H<sub>4</sub>); 6,41 (d, 1H, *J* = 1,92 Hz, H<sub>2</sub>); 4,17-4,10 (m, 2H, H<sub>23</sub>); 3,86 (s, 3H, H<sub>19</sub>); 3,68 (s, 2H, H<sub>11</sub>); 3,53 (s, 4H, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>); 2,54-2,45 (m, 5H, H<sub>8</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>17</sub>); 1,65-1,53 (m, 2H, H<sub>9</sub>); 1,26 (t, 3H, *J* = 6,33 Hz, H<sub>24</sub>); 0,92 (t, 3H, *J* = 7,29 Hz, H<sub>10</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 155,2 (C<sub>20</sub>); 147,5 (C<sub>1</sub>); 144,3 (C<sub>6</sub>); 133,4 (C<sub>3</sub>); 120,4 (C<sub>5</sub>); 120,3 (C<sub>4</sub>); 111,4 (C<sub>2</sub>); 61,4 (C<sub>11</sub>); 61,2 (C<sub>23</sub>); 55,8 (C<sub>19</sub>); 52,2 (C<sub>13</sub>, C<sub>17</sub>); 43,4 (C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>); 37,6 (C<sub>8</sub>); 24,7 (C<sub>9</sub>); 14,6 (C<sub>24</sub>); 13,8 (C<sub>10</sub>).

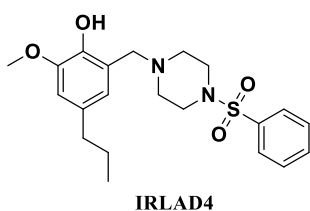


**4-alil-2-metoxi-6-((4-(fenilsulfonil)piperazin-1-il)metil)fenol****Rendimento:** 13%; Sólido branco amarelado; **F.F.:** 135-140 °C;**F.M.:** C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S; **M.M.:** 402,51 g.mol<sup>-1</sup>**Rf:** 0,81 (hexano e acetato de etila, 4,0:6,0 v/v)

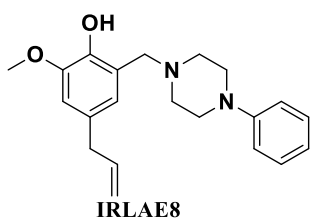
**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 2964 (C-H sp<sup>2</sup>); 2822 (C-H sp<sup>3</sup>); 1636 (C=C alifático); 1597 (C=C ar); 1509-1398 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1356 (S=O); 1311 (C-N); 1143 (C-O fenólico); 1082 (C-O, éter); 998, 922 (C-H ar, alifático). **<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,74-7,52 (m, 5H, H<sub>24</sub>, H<sub>25</sub>, H<sub>26</sub>, H<sub>27</sub>, H<sub>28</sub>); 6,61 (d, 1H, *J* = 1,89 Hz, H<sub>4</sub>); 6,41 (d, 1H, *J* = 1,95 Hz, H<sub>2</sub>); 5,96-5,87 (m, 1H, H<sub>9</sub>); 5,08-5,03 (m, 2H, H<sub>10</sub>); 3,81 (s, 3H, H<sub>19</sub>); 3,68 (s, 2H, H<sub>11</sub>); 3,26 (d, 2H, *J* = 6,60 Hz, H<sub>8</sub>); 3,07 (s, 4H, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>); 2,65 (s, 4H, H<sub>13</sub>, H<sub>17</sub>). **<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 147,5 (C<sub>1</sub>); 144,5 (C<sub>6</sub>); 137,6 (C<sub>9</sub>); 134,0 (C<sub>23</sub>); 133,2 (C<sub>26</sub>); 130,9 (C<sub>3</sub>); 129,2 (C<sub>24</sub>, C<sub>28</sub>); 127,7 (C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub>); 120,5 (C<sub>4</sub>); 120,5 (C<sub>5</sub>); 115,67(C<sub>10</sub>); 111,4 (C<sub>2</sub>); 60,6 (C<sub>11</sub>); 55,8 (C<sub>19</sub>); 51,5 (C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>); 46,0 (C<sub>13</sub>, C<sub>17</sub>); 39,7 (C<sub>8</sub>).

**2-metoxi-6-((4-(fenilsulfonil)piperazin-1-il)metil)-4-propilfenol****Rendimento:** 13%; Sólido branco; **F.F.:** 119-123 °C;**F.M.:** C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S; **M.M.:** 404,51 g.mol<sup>-1</sup>**Rf:** 0,86 (hexano e acetato de etila, 4,0:6,0 v/v)

**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 2983 (C-H sp<sup>2</sup>); 2825 (C-H sp<sup>3</sup>); 1599 (C=C ar); 1451-1395 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1399 (S=O); 1270 (CH<sub>3</sub>); 1169 (C-N); 1131 (C-O fenólico); 1092 (C-O, éter); 947(C-H ar). **<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,73-7,54 (m, 5H, H<sub>24</sub>, H<sub>25</sub>, H<sub>26</sub>, H<sub>27</sub>, H<sub>28</sub>); 6,61 (d, 1H, *J* = 1,86 Hz, H<sub>4</sub>); 6,39 (d, 1H, *J* = 1,92 Hz, H<sub>2</sub>); 3,81 (s, 3H, H<sub>19</sub>); 3,67 (s, 2H, H<sub>11</sub>); 3,06 (s, 4H, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>); 2,63 (s, 4H, H<sub>13</sub>, H<sub>17</sub>); 2,46 (t, 2H, *J* = 7,26 Hz, H<sub>8</sub>); 1,61-1,54 (m, 2H, H<sub>9</sub>); 0,91 (t, 3H, *J* = 7,32 Hz, H<sub>10</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 147,5 (C<sub>1</sub>); 144,1 (C<sub>6</sub>); 134,9 (C<sub>3</sub>); 133,6 (C<sub>22</sub>); 133,2 (C<sub>26</sub>); 129,2 (C<sub>24</sub>, C<sub>28</sub>); 127,7 (C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub>); 120,4 (C<sub>4</sub>); 120,1 (C<sub>5</sub>); 111,3 (C<sub>2</sub>); 60,7 (C<sub>11</sub>); 55,7 (C<sub>19</sub>); 51,5 (C<sub>13</sub>, C<sub>17</sub>); 46,0 (C<sub>16</sub>, C<sub>14</sub>); 37,6 (C<sub>8</sub>); 24,7 (C<sub>9</sub>); 13,8 (C<sub>10</sub>).

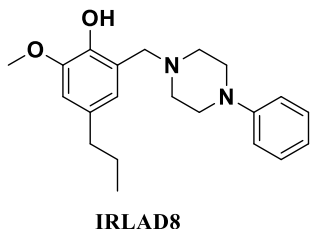
**4-alil-2-metoxi-6-((4-fenilpiperazin-1-il)metil)fenol****Rendimento:** 24%; Sólido branco; **F.F.:** 94-100 °C;**F.M.:** C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **M.M.:** 338,45 g.mol<sup>-1</sup>**Rf:** 0,91 (hexano e acetato de etila, 4,0:6,0 v/v)

**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 2960 (C-H sp<sup>2</sup>); 2827 (C-H sp<sup>3</sup>); 1642 (C=C alifático); 1586 (C=C ar); 1356 - 1489 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1307 (CH<sub>3</sub>); 1182 (C-N); 1140 (C-O fenólico); 1070 (C-O, éter); 993, 915 (C-H ar, alifático). **<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,28-7,23 (m, 2H, H<sub>22</sub>, H<sub>24</sub>); 6,92-6,87 (m, 3H, H<sub>21</sub>, H<sub>25</sub>, H<sub>23</sub>); 6,65 (d, 1H, *J* = 1,95 Hz, H<sub>4</sub>); 6,45 (d, 1H, *J* = 1,35 Hz, H<sub>2</sub>); 5,96 -5,90 (m, 1H, H<sub>11</sub>); 5,10-5,03 (m, 2H, H<sub>12</sub>); 3,86 (s, 3H, H<sub>9</sub>); 3,73 (s, 2H, H<sub>13</sub>); 3,30-3,21 (m, 6H, H<sub>10</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>18</sub>); 2,72 (s, 4H, H<sub>15</sub>, H<sub>17</sub>). **<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 150,9 (C<sub>20</sub>); 147,8 (C<sub>1</sub>); 145,1 (C<sub>6</sub>); 137,8 (C<sub>11</sub>); 130,5 (C<sub>3</sub>); 129,2 (C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>); 120,9 (C<sub>5</sub>); 120,5 (C<sub>4</sub>); 120,2 (C<sub>23</sub>); 116,4 (C<sub>21</sub>, C<sub>25</sub>); 115,5 (C<sub>12</sub>); 111,5 (C<sub>2</sub>); 61,3 (C<sub>13</sub>); 55,9 (C<sub>9</sub>); 52,5 (C<sub>14</sub>, C<sub>18</sub>); 49,2 (C<sub>15</sub>, C<sub>17</sub>); 39,8 (C<sub>10</sub>).

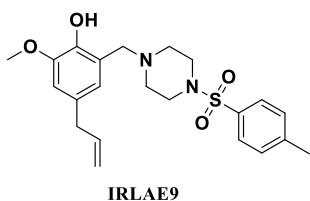


**2-metoxi-6-((4-(fenilsulfonil)piperazin-1-il)metil)-4-propilfenol****Rendimento:** 26%; Sólido Branco; **F.F.:** 101-106 °C;**F.M.:** C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **M.M.:** 340,45 g.mol<sup>-1</sup>**Rf:** 0,94 (hexano e acetato de etila, 6,0:4,0 v/v)

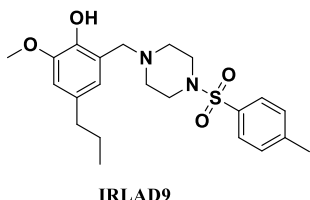
**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 2927 (C-H sp<sup>2</sup>); 1823 (C-H sp<sup>3</sup>); 1603 (C=C ar); 1499-1412 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1339 (CH<sub>3</sub>); 1236 (C-N); 1148 (C-O fenólico); 1092 (C-O, éter); 1004 (C-H ar). **<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,29-7,23 (m, 2H, H22, H24); 6,92-6,85 (m, 3H, H21, H23, H25); 6,64 (d, 1H, J = 1,95 Hz, H4); 6,44 (d, 1H, J = 1,89 Hz, H2); 3,86 (s, 3H, H19); 3,73 (s, 2H, H11); 3,23 (s, 4H, H14, H16); 2,72 (s, 4H, H13, H17); 2,48 (t, 2H, J = 7,35 Hz, H8); 1,64-1,57 (m, 2H, H9); 0,93 (t, 3H, J = 7,26 Hz, H10). **<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 150,9 (C20); 147,6 (C1); 144,6 (C6); 133,3 (C3); 129,2 (C24, C22); 120,7 (C5); 120,3 (C4); 120,1 (C23); 116,3 (C21, C25); 111,4 (C2); 61,3 (C11); 55,9 (C19); 52,5 (C13, C17); 49,2 (C14, C16); 37,7 (C8); 24,8 (C9); 13,9 (C10).

**4-allyl-2-metoxi-6-((4-tosilpiperazin-1-il)metil)fenol****Rendimento:** 16%; Sólido branco; **F.F.:** 95-99 °C;**F.M.:** C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S; **M.M.:** 416,17 g.mol<sup>-1</sup>**Rf:** 0,77 (hexano e acetato de etila, 4,0:6,0 v/v)

**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3015 (C-H sp<sup>2</sup>); 2839 (C-H sp<sup>3</sup>); 1643 (C=C alifático); 1595 (C=C ar); 1499- 1398 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1339 (S=O); 1180 (C-N); 1132 (C-O fenólico); 1077 (C-O, éter); 940, 743 (C-H ar, alifático). **<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,60 (d, 2H, J = 8,25 Hz, H24, H28); 7,33 (d, 2H, J = 8,01 Hz, H25, H27); 6,61-6,60 (d, 1H, J = 1,92 Hz, H4); 6,40-6,40 (d, 1H, J = 1,92 Hz, H2); 5,92 - 5,87 (m, 1H, H9); 5,08-5,02 (m, 2H, H10); 3,81 (s, 3H, H9); 3,67 (s, 2H, H11); 3,26 (d, 2H, J = 6,69 Hz, H8); 3,02 (s, 4H, H14, H16); 2,64 (s, 4H, H13, H17); 2,45 (s, 3H, H29). **<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 147,7 (C1); 144,5 (C6); 144,1 (C26); 137,6 (C9); 131,7 (C22); 130,8 (C3); 129,8 (C24, C28); 127,7 (C25, C27); 120,5 (C4); 120,3 (C5); 115,6 (C10); 111,4 (C2); 60,6 (C11); 55,7 (C19); 51,5 (C14, C16); 46,1 (C13, C17); 39,7 (C8); 21,5 (C29).

**2-metoxi-4-propil-6-((4-tosilpiperazin-1-il)metil)fenol****Rendimento:** 12%; Sólido branco; **F.F.:** 105-108 °C;**F.M.:** C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S; **M.M.:** 418,17 g.mol<sup>-1</sup>**Rf:** 0,80 (hexano e acetato de etila, 4,0:6,0 v/v)

**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3684-3094 (O-H); 3006 (C-H sp<sup>2</sup>); 2847 (C-H sp<sup>3</sup>); 1587 (C=C ar); 1491 - 1394 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1348 (S=O); 1172 (C-N); 1124 (C-O fenólico); 1084 (C-O, éter); 937 (C-H ar). **<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,60 (d, 2H, J = 8,25 Hz, H24, H28); 7,33 (d, 2H, J = 8,38 Hz, H25, H27); 6,60 (d, 1H, J = 1,89 Hz, H4); 6,39 (d, 1H, J = 1,89 Hz, H2); 3,81 (s, 3H, H19); 3,67 (s, 2H, H11); 3,03 (s, 4H, H14, H16); 2,64 (s, 4H, H13, H17); 2,48-2,43 (m, 5H, H8, H29); 1,61-1,54 (m, 2H, H9); 0,91 (t, 3H, J = 7,32 Hz, H10). **<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 147,5 (C1); 144,1 (C6); 133,6 (C22); 131,7 (C3); 129,8 (C24, C28); 127,7 (C25, C27); 120,3 (C4); 120,1 (C5); 111,3 (C2); 60,7 (C11); 55,7 (C19); 51,5 (C14, C16); 46,1 (C13, C17); 37,6 (C8); 24,7 (C9); 21,5 (C29); 13,8 (C10).



---

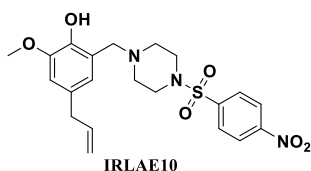
**4-allyl-2-metoxi-6-((4-((4-nitrofenil)sulfonil)piperazin-1-il)metil)fenol**

**Rendimento:** 14%; Sólido branco; **F.F.:** 101-106 °C;

**F.M.:** C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S; **M.M.:** 447,14 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,86 (hexano e acetato de etila, 4,0:6,0 v/v)

**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3030 (C-H sp<sup>2</sup>); 2910 (C-H sp<sup>3</sup>); 1643 (C=C alifático); 1603 (C=C ar); 1531 (N-O); 1491-1483 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1345 (S=O); 1308 (CH<sub>3</sub>); 1164 (C-N); 1132 (C-O fenólico); 1066 (C-O, éter); 991, 769 (C-H ar, alifático). **<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,40 (d, 2H, *J* = 7,59 Hz, H<sub>25</sub>, H<sub>27</sub>); 7,91 (d, 2H, *J* = 8,37 Hz, H<sub>24</sub>, H<sub>28</sub>); 6,61 (d, 1H, *J* = 1,92 Hz, H<sub>4</sub>); 6,41 (d, 1H, *J* = 1,92 Hz, H<sub>2</sub>); 5,96-5,87 (m, 1H, H<sub>9</sub>); 5,08-5,03 (m, 2H, H<sub>10</sub>); 3,81 (s, 3H, H<sub>19</sub>); 3,69 (s, 2H, H<sub>11</sub>); 3,26 (d, 2H, *J* = 6,72 Hz, H<sub>8</sub>); 3,13 (s, 4H, H<sub>13</sub>, H<sub>17</sub>); 2,67 (s, 4H, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 147,7 (C<sub>1</sub>); 144,4 (C<sub>6</sub>); 141,2 (C<sub>22</sub>); 137,5 (C<sub>9</sub>); 131,1 (C<sub>3</sub>); 128,9 (C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub>); 124,4 (C<sub>24</sub>, C<sub>28</sub>); 120,6 (C<sub>4</sub>); 120,1 (C<sub>5</sub>); 115,7 (C<sub>10</sub>); 111,6 (C<sub>2</sub>); 60,5 (C<sub>11</sub>); 55,8 (C<sub>19</sub>); 51,4 (C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>); 46,0 (C<sub>13</sub>, C<sub>17</sub>); 39,7 (C<sub>8</sub>).




---

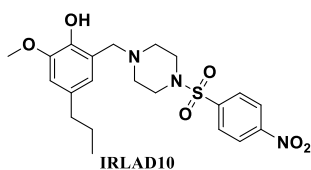
**2-metoxi-6-((4-((4-nitrofenil)sulfonil)piperazin-1-il)metil)-4-propilfenol**

**Rendimento:** 13%; Sólido branco; **F.F.:** 93-97 °C;

**F.M.:** C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S; **M.M.:** 449,14 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,83 (hexano e acetato de etila, 4,0:6,0 v/v)

**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 2942 (C-H sp<sup>2</sup>); 2871, 2815 (C-H sp<sup>3</sup>); 1595 (C=C ar); 1531 (N-O); 1492 - 1451 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1345 (S=O); 1300 (CH<sub>3</sub>); 1316 (C-N); 1124 (C-O fenólico); 1092 (C-O, éter); 963 (C-H ar). **<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 8,40 (d, 2H, *J* = 8,70 Hz, H<sub>23</sub>, H<sub>27</sub>); 7,92 (d, 2H, *J* = 8,70 Hz, H<sub>24</sub>, H<sub>26</sub>); 6,61 (d, 1H, *J* = 1,89 Hz, H<sub>4</sub>); 6,40 (d, 1H, *J* = 1,62 Hz, H<sub>2</sub>); 3,81 (s, 3H, H<sub>18</sub>); 3,68 (s, 2H, H<sub>10</sub>); 3,12 (s, 4H, H<sub>12</sub>, H<sub>16</sub>); 2,67 (s, 4H, H<sub>13</sub>, H<sub>15</sub>); 2,46 (t, 2H, *J* = 7,35 Hz, H<sub>8</sub>); 1,61-1,54 (m, 2H, H<sub>9</sub>) 0,91 (t, 3H, *J* = 7,29 Hz, H<sub>28</sub>). **<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 150,3 (C<sub>25</sub>); 147,5 (C<sub>1</sub>); 143,9 (C<sub>6</sub>); 141,2 (C<sub>21</sub>); 133,8 (C<sub>3</sub>); 128,9 (C<sub>23</sub>, C<sub>27</sub>); 124,4 (C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>); 120,5 (C<sub>4</sub>); 119,9 (C<sub>5</sub>); 111,5 (C<sub>2</sub>); 60,5 (C<sub>10</sub>); 55,8 (C<sub>18</sub>); 51,4 (C<sub>12</sub>, C<sub>16</sub>); 46,0 (C<sub>13</sub>, C<sub>15</sub>); 37,6 (C<sub>8</sub>); 24,7 (C<sub>9</sub>); 13,8 (C<sub>28</sub>).

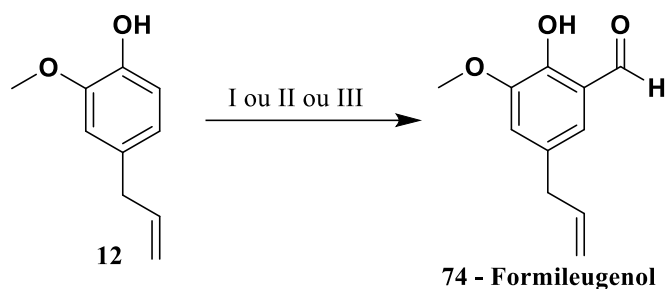


Fonte: Do autor (2023).

### 5.1.3 Obtenção do 5-allyl-2-hidroxi-3-metoxibenzaldeído

Para a formulação do eugenol, foi utilizado o método de síntese que são representados na Figura 55.

Figura 55 - Metodologia de Síntese do derivado aldeído do eugenol.



**I) Hexamina, AcOH glacial, 130 °C;**

**II) NaOH, Clorofórmio;**

**III) POCl<sub>3</sub>, DMF;**

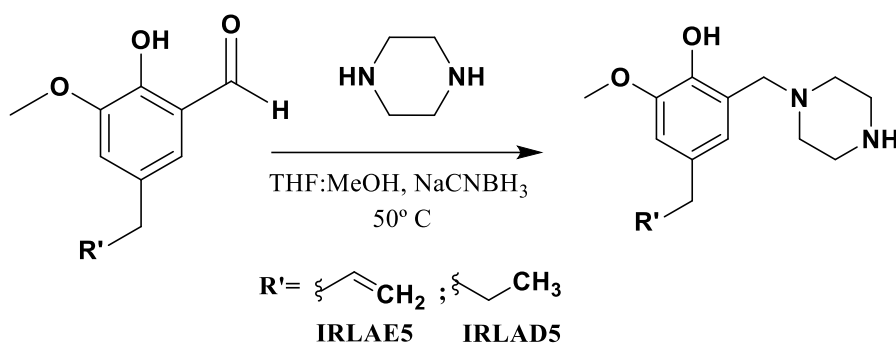
Fonte: Do autor (2023).

Em um balão de fundo redondo foi solubilizado hexamina (22,610 g) em ácido acético glacial (60 mL) a 80° C. Então, essa solução foi deixada em agitação por 10 minutos e, em seguida, foi adicionado eugenol (1,06 mL). Após isso, a temperatura foi elevada para 120° C e a solução foi mantida em agitação em refluxo de 6 a 24 horas (Figura 55). Terminada a reação, a mistura foi arrefecida a temperatura ambiente e foi adicionada solução aquosa de HCl (10 mL, 1 mol.L<sup>-1</sup>) e deixando agitar por 10 minutos. Em seguida, foi adicionada solução saturada de bicarbonato de sódio até atingir pH 7. Após isso, extraiu-se com éter etílico (4x30 mL), secou-se com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado a pressão reduzida. O produto foi então purificado por CCS, utilizando uma mistura de hexano e acetato (7:3).

#### 5.1.4 Síntese dos derivados piperazínicos não substituídos do eugenol e dihidroeugenol

Para a síntese dos derivados do eugenol contendo o núcleo piperazínico não substituído, utilizou-se a metodologia de aminação redutiva, utilizando como material de partida o derivado aldeído do eugenol previamente sintetizado (Figura 56).

Figura 56 - Metodologia de síntese dos derivados IRLAE5 e IRLAD5.



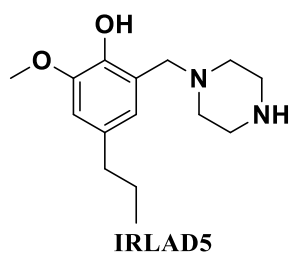
Fonte: Do autor (2023).

Adicionou-se em um balão de fundo chato o derivado aldeído do eugenol/dihidroeugenol (0,244 mL), piperazina (1,07 g), cianoborohidreto de sódio (0,319 g) em THF:Metanol (10 mL, 1:1). A reação foi aquecida a 50 °C, sendo mantida a essa temperatura e agitação por 4 horas. Após o término da reação, esta foi arrefecida e o produto extraído com acetato de etila. Por fim, o produto foi purificado por uma lavagem com hexano, seguido de recristalização.

Adiante estão mostrados os dados de caracterização referentes à cada base de Mannich final obtido por esta metodologia (Quadro 6), apresentando os mesmos parâmetros que o quadro anterior.

Quadro 6 - Dados de caracterização dos derivados sintetizados por aminação reductiva.

Estrutura do derivado	Caracterização
<p style="text-align: center;"><b>IRLAE5</b></p>	<p><b>4-alil-2-metoxi-6-((4-fenilpiperazin-1-il)metil)fenol</b>  <b>Rendimento:</b> 10%; Óleo amarelo; <b>F.F.:</b> Não se aplica;  <b>F.M.:</b> C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; <b>M.M.:</b> 262,16 g.mol<sup>-1</sup>  <b>Rf:</b> 0,33 (metanol e acetato de etila, 1,0:1,0 v/v)  <b>IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):</b> 3227-3577 (OH); 2988, 2929 (C-H sp<sup>2</sup>); 2822 (C-H sp<sup>3</sup>); 1660 (C=C ar); 1494 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1454 (CH<sub>3</sub>); 1422-1302 (N-H, C-N); 1080 (C-O fenólico); 1000 (C-O, éter); 922, 757 (C-H ar, alifático). <b><sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 6,64 (d, 1H, <i>J</i> = 1,92 Hz, H4); 6,46 (d, 1H, <i>J</i> = 1,92 Hz, H2); 5,97 -5,88 (m, 1H, H9); 5,09-5,03 (m, 2H, H10); 3,85 (s, 3H, H19); 3,73 (s, 2H, H11); 3,28 (d, 2H, <i>J</i> = 6,90 Hz, H8); 3,18 (s, 4H, H14, H16); 2,78 (s, 5H, H15, H13, H17). <b><sup>13</sup>C-RMN (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 147,6 (C1); 144,3 (C6); 137,5 (C9); 131,2 (C3); 121,0 (C4); 120,2 (C5); 115,7 (C10); 111,7 (C2); 60,4 (C11); 55,9 (C19); 52,2 (C13, C17); 50,8 (C14, C16); 50,0 (C8).</p>



**2-metoxi-6-((4-(fenilsulfonil)piperazin-1-il)metil)-4-propilfenol**

**Rendimento:** 12%; Óleo alaranjado; **F.F.:** Não se aplica;

**F.M.:** C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; **M.M.:** 264,16 g.mol<sup>-1</sup>

**Rf:** 0,30 (metanol e acetato de etila, 1,0:1,0 v/v)

**IV (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3567 (N-H); 3549-3238 (O-H); 2951-2910 (C-H sp<sup>2</sup>); 2815 (C-H sp<sup>3</sup>); 1595 (C=C ar); 1499-1403 (C=C ar, CH<sub>2</sub>); 1348 (CH<sub>3</sub>); 1277-1207 (N-H, C-N); 1148 (C-O fenólico); 1060 (C-O, éter); 750 (C-H ar). **<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6,64 (d, 1H, *J* = 1,92 Hz, H4); 6,43 (d, 1H, *J* = 1,92 Hz, H2); 3,87 (s, 3H, H8); 3,70 (d, 2H, *J* = 9,18 Hz, H13); 3,14 (s, 4H, H15, H16); 2,94 (s, 1H, H17); 2,77 (s, 4H, H18, H19); 2,49-2,44 (m, 2H, H10); 1,63-1,55 (m, 2H, H11) 0,92 (t, 3H, *J* = 6,15 Hz, H12). **<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 147,5 (C1); 144,0 (C6); 133,7 (C3); 120,7 (C4); 120,2 (C5); 111,5 (C2); 60,8 (C13); 55,8 (C8); 50,6 (C15, C16); 44,2 (C18, C19); 37,6 (C10); 24,8 (C11); 13,8 (C12).

Fonte: Do autor (2023).

## 5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 5.2.1 Toxicidade para células de mamíferos

Para o preparo e armazenamento das substâncias, 10 mg de IRLAE 1 a 5, 8-10 (nomeadas de 1 a 8), IRLAD 1 a 5, 8-10 (nomeadas de 9 a 16), IRLEU (nomeada 17) e IRLDI (nomeada 18) foram solubilizados em DMSO (Merck) puro e armazenadas como soluções-estoque na concentração de 100 mM a -20° C. Somente no momento do uso foram diluídas em meio de cultura fresco.

Os testes de toxicidade para células de mamíferos foram realizados em dois tipos celulares; células H9c2 (cardiomioblastos de ratos) e HepG2 (derivadas de carcinoma hepatocelular humano). Foram avaliadas 6 diluições seriadas 1:2 de cada substância, partindo de uma concentração inicial de 500µM. Duzentos microlitros de suspensão de células (concentração de 1,0 x10<sup>4</sup> células H9c2/mL ou 2,0 x10<sup>4</sup> HepG2/mL) foram pipetados em placas de 96 poços e incubados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, por 24 horas. O meio de cultura (DMEM/HAMF12, 10% soro fetal bovino, HAM F12 e 10% soro fetal bovino para H9c2 e HepG2, respectivamente) foi então removido e substituído por 200 µL de meio fresco contendo ou não as substâncias. Após 48 horas a 37°C, o sobrenadante foi removido e adicionados, em cada poço, 200 µL de meio de cultura fresco contendo 20 µL de resazurina 1mM, um indicador de proliferação celular. Decorridas duas horas de incubação, a 37°C, as placas foram lidas em leitor de microplacas (570 nm e 600 nm). O percentual de inibição da proliferação celular induzida pelas substâncias foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado} / A570 - (A600 \times R0) \text{ Controle+}] \times 100$$

Nesta fórmula, A570= Absorbância a 570nm, A600= Absorbância a 600 nm, Controle + é o poço contendo células, meio e resazurina, na ausência do fármaco. R0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo (C-), ou seja, apenas meio de cultura e resazurina na ausência de células [Ro = (A570 /A600)C-]. A absorbância do meio de cultura foi subtraída de todas as amostras (meio na ausência de resazurina). DMSO até 3% não inibe significativamente a proliferação celular e a 20%, induz 30% de redução na proliferação celular.

A partir da quantificação do percentual de inibição comparativamente aos controles, foram determinados os valores de CC-50 (concentração citotóxica para 50% das células) e CC-90 (concentração citotóxica para 90% das células).

As absorbâncias foram medidas usando um leitor espectrofotométrico de microplacas em 570nm e 600nm, e a viabilidade celular foi calculada considerando a diferença na redução de resazurina entre células tratadas e não tratadas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata (n=2) e os resultados representam as médias de pelo menos dois experimentos independentes.

### 5.2.2 Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

O efeito anti- *T. cruzi* foi avaliado utilizando formas amastigotas intracelulares da cepa Y e tripomastigotas da mesma cepa, derivadas de cultura de tecido.

Para o *screening* da atividade anti-amastigota,  $2 \times 10^3$  cardiomioblastos da linhagem H9c2, cultivados em meio DMEM 10% soro fetal bovino, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, foram plaqueados em placas de cultura de 96 poços juntamente com formas tripomastigotas da cepa Y na proporção de 10 parasitos:célula. Decorridas 24 horas, o meio de cultura foi removido e os poços lavados com meio fresco para remover os parasitos não internalizados. As células foram então incubadas com 200 µL de meio fresco contendo ou não as substâncias na faixa de concentração de 500 µM a 15,6µM (6 diluições 1:2) por 48 horas. Após esse período, o meio de cultura foi trocado por meio fresco e as placas foram analisadas diariamente, em microscópio óptico, para observação da atividade das substâncias sobre as formas intracelulares do parasito, comparativamente às células controle (infectadas). Essa análise foi realizada por mais 96 horas. As substâncias que apresentaram evidência de atividade, isto é,

redução no número de células infectadas e/ou redução do número de amastigotas por célula e/ou redução do número de tripomastigotas liberados, comparativamente ao controle, foram selecionadas para análise da atividade direta sobre formas tripomastigotas.

A avaliação sobre formas tripomastigotas foi realizada utilizando a concentração única de 25  $\mu\text{M}$ . As substâncias que induzissem percentual de mortalidade maior ou igual a 50% seriam avaliadas em curvas de concentração-efeito. Para determinação da atividade anti-tripomastigota, 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão na concentração  $3,0 \times 10^6$  parasitos/mL, foram pipetados em placa de cultura de 96 poços. Em seguida, os parasitos foram incubados com 100  $\mu\text{L}$  de cada substância a 25  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Os parasitos vivos foram então contados em câmara de Neubauer e o percentual de mortalidade calculado a partir do número de parasitos quantificados na ausência de substâncias.

Todos os controles (incubação apenas em meio, incubação com solvente e fármaco de referência) foram apropriadamente incluídos. Os experimentos foram feitos em duplicata ( $n=2$ ) e com no mínimo duas repetições. Os gráficos foram feitos no *software GraphPad Prism 8.0*. Os valores de  $\text{CC}_{50}$ ,  $\text{CC}_{90}$  e  $\text{EC}_{50}$  foram calculados no *software CompuSyn*.

### **5.2.3 Cepas gram-negativas, gram-positivas e isolados clínicos multirresistentes**

Neste estudo, as cepas padrão *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *K. pneumoniae* (BAA-2342), *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. epidermidis* (ATCC 14990) foram utilizadas nos ensaios. Além disso, foram utilizados isolados clínicos multirresistentes de cada espécie do Hospital Universitário de Santa Maria (UHSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Os isolados foram classificados como RDF de acordo com os resultados dos testes de suscetibilidade realizados no Laboratório de Análises Clínicas do UHSM e as definições estabelecidas por Magiorakos *et al.* (2012). Os microrganismos foram mantidos em caldo BHI suplementado com glicerol (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Índia) a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até o uso. Este trabalho foi realizado com autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, e aprovado por Laudo de Apresentação para Apreciação Ética n° 12114713.1.0000.5346.

#### 5.2.4 Cepas de micobactérias e isolados clínicos

As cepas padrão *M. abscessus* (ATCC 19977) e *M. fortuitum* (ATCC 6841) foram utilizadas neste trabalho. Além disso, para a realização deste estudo foram utilizados isolados clínicos de pacientes internados no HUSM obtidos do Laboratório de Análises Clínicas em 2020, caracterizados como bacilo ácido-álcool resistente (AARB positivo) e que cresceram em meio Lowenstein-Jensen (LJ) (HiMedia Laboratories Pvt Ltd, Mumbai, Índia). Os microrganismos foram mantidos a -80 °C e cultivados em ágar Löwenstein-Jensen (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Índia). Este trabalho foi conduzido com protocolo experimental aprovado pelo comitê de ética da UFSM para pesquisa com isolados clínicos, número CAAE: 71795417.6.0000.5346.

#### 5.2.5 Testes de suscetibilidade para micobactérias

Para micobactérias, os testes de sensibilidade foram realizados pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo padrão estabelecido pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI), documento M24-A2 (CLSI, 2015). A densidade do inóculo para este teste de suscetibilidade foi de  $5,0 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. Os compostos foram avaliados nas concentrações de 0,61 a 625 µg mL. O antimicrobiano sulfametoxazol (Sigma) foi avaliado como controle nas concentrações de 1,0 a 128 µg mL<sup>-1</sup>, de acordo com os pontos de corte do CLSI. Após 72 horas de incubação a 30°C, as placas de tratamento foram lidas e as CIM foram determinadas usando cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (Vetec VR, Rio de Janeiro, Brasil) como indicador de crescimento microbiano (SIQUEIRA *et al.* 2018). Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), assim os resultados estão apresentados em termos de média + Desvio Padrão.

#### 5.2.6 Testes de suscetibilidade Gram-negativos e Gram-positivos

Os testes de suscetibilidade foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, conforme o protocolo padrão CLSI M100eS23 (CLSI 2013), enquanto a padronização da densidade do inóculo foi realizada conforme a escala McFarland 0,5. Os antimicrobianos imipenem (Fluka) e eritromicina (Sigma) foram avaliados nas concentrações de 0,61 a 625 µg mL como controle. Os compostos foram avaliados nas concentrações de 0,61 a 625 µg mL<sup>-1</sup>

(Sigma). Para realizar esta avaliação, placas de 96 poços foram usadas com 100 µL de caldo Mueller-Hinton (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd, Índia), 100 µL de cada concentração específica de cada composto e 10 µL do inóculo por poço. As placas foram então incubadas durante 24 horas a 37°C. A CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano visível. Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (Vetec®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi utilizado como indicador de crescimento microbiano. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3), assim os resultados estão apresentados em termos de média + Desvio Padrão.

### 5.2.7 Ensaios de antibiofilme

Para o teste de inibição da formação de biofilme, os compostos foram testados individualmente quanto à sua capacidade de inibir a formação de biofilme de *Mycobacterium fortuitum*. As concentrações dos compostos utilizados foram inferiores às CIMs (1/2CIM e 1/4CIM). 1 mL de meio Middlebrook 7H9 (BD®, Le Pont de Claix, França) contendo  $1 \times 10^7$  UFC/mL do microrganismo a ser testado e 1 mL da diluição do composto a ser avaliado foram adicionados a tubos de ensaio de poliestireno com um capacidade de 5 ml. Os tubos foram cobertos com Parafilm® e incubados a 30 °C por 7 dias (SIQUEIRA *et al.*, 2018).

Para o teste de destruição do biofilme, meio Middlebrook 7H9 (1 mL) contendo  $1 \times 10^7$  UFC/mL do mesmo microrganismo foi adicionado a tubos de ensaio de poliestireno cobertos com Parafilm® e incubados a 30°C por 7 dias. Após a formação do biofilme, 1 mL do composto foi adicionado a cada tubo, em concentração superior à CIM (2X CIM e 4X CIM). O tubo foi coberto com Parafilm® e incubado a 30 °C por mais 24 h (SIQUEIRA, 2018).

Para a quantificação dos biofilmes, as células que estavam fracamente aderidas ao biofilme foram removidas por enxágue com solução salina, e o restante foi seco em temperatura ambiente por alguns minutos. Depois disso, 2 mL de uma suspensão de cristal violeta 0,1% foram adicionados e os tubos foram mantidos em repouso por 10 minutos antes de enxaguar novamente com solução salina para remover quaisquer células planctônicas remanescentes. Dois mililitros de etanol 95% foram adicionados a cada tubo de ensaio, mantidos por 15 min e transferidos para cubetas descartáveis para posterior leitura em densidade óptica (DO) de 570 nm.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro (U-1800, Hitachi) (SIQUEIRA, 2018). A formação de biofilme foi determinada pela diferença significativa entre as médias de

absorbância obtidas no controle positivo (meio de cultura e bactérias) e as médias obtidas no controle negativo (somente meio de cultura). O experimento foi realizado em triplicata. As leituras de DO obtidas no ensaio de formação de biofilme foram registradas como média  $\pm$  Desvio Padrão, e foram submetidas a um teste t (comparado com o controle positivo). Um valor de  $P > 0,05$  foi considerado para indicar significância estatística. Os gráficos foram preparados usando GraphPad Prism versão 8.01 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando todos os resultados desse estudo em consideração, conclui-se que a síntese dos 16 compostos base de Mannich foi efetiva, sendo treze desses inéditos. Com relação aos rendimentos obtidos, notou-se que estes eram mais altos ao utilizar derivados da piperazina comercial se comparado a reação utilizando as aminas preparadas. Com isso, a reação de Mannich se provou efetiva para sintetizar os compostos almejados, podendo necessitar de ajuste nas condições a depender da reatividade da piperazina em questão.

Quanto às técnicas de caracterização utilizadas, pôde-se concluir que elas foram o suficiente para a identificação dos produtos e que, na maioria dos compostos, todos os sinais de RMN e bandas dos espectros na região do infravermelho esperadas foram encontradas.

Em relação à atividade antimicrobiana dos derivados piperazínicos, todos eles apresentaram alguma atividade frente a todas as espécies de bactérias testadas, sendo essa superior a seus antecessores eugenol e dihidroeugenol, com valores de CIM entre 2,44 e 312,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Dos derivados sintetizados, IRLAE8, IRLAE9, IRLAE10, IRLAD4, IRLAD9 e IRLA10 apresentaram melhor atividade frente a todas as espécies de bactérias testadas e frente a isolados clínicos, o qual IRLAD9 e IRLAD10 obtiveram destaque, com valores de CIM entre 2,44 e 4,88  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Embora mais estudos sejam necessários, essa atividade dos seis derivados está provavelmente ligada aos seus substituintes volumosos e ao grupo sulfonila.

Quanto aos ensaios de citotoxicidade, os compostos somente apresentaram toxicidade acima de 500  $\mu\text{M}$ , algo promissor por ser dependente da concentração e sua atividade antimicrobiana se apresentar em concentrações muito inferiores. Com relação aos ensaios anti-*T. cruzi*, considerou-se que os derivados apresentaram atividade apenas discreta, não sendo, contudo, capazes de inibir a forma tripomastigota do parasita.

Com relação às etapas futuras deste trabalho, tem-se os ensaios antifúngicos e as análises de Espectroscopia de Massas dos compostos sintetizados. Estas duas análises já estão em andamento e seus dados serão incluídos no artigo a ser publicado.

Com isso, conclui-se que os compostos sintetizados neste trabalhos apresentaram pouca citotoxicidade e têm grande potencial antimicrobiano, especialmente IRLAE8, IRLAE9, IRLAE10, IRLAD4, IRLAD9 e IRLA10, fazendo com que seja interessante realizar estudos *in silico* ou *in vivo* para se ter mais dados quanto ao mecanismo de ação e metabolismo desses seis compostos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFANASYEV, O. I. *et al.* Reductive Amination in the Synthesis of Pharmaceuticals. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 23, p. 11857-11911, 2019.
- AL-GHORBANI, M. *et al.* Piperazine and Morpholine: Synthetic Preview and Pharmaceutical Applications. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 5, p. 281-301, 2015.
- ALI, S. M. *et al.* Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 4, n. 20, p. 1-7, 2005.
- AN, G. *et al.* Pd/C and NaBH<sub>4</sub> in Basic Aqueous Alcohol: An Efficient System for an Environmentally Benign Oxidation of Alcohols. **Synthesis**, v. 3, p. 477-485, 2010.
- BENITEZ, L. CARVER, P. L. Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents. **Drugs**, v. 79, p. 833-853, 2019.
- BERMUDEZ, J. *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. abril de 2016, n. 156, p. 1-16, 2015.
- BERN, C. Chagas' Disease. **The new england journal of medicine**, v. julho de 2015, n. 373, p. 456-466, 2015.
- BERN, C. *et al.* Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v.33, n. 1, p. 1-42, 2020.
- BHATI, S. *et al.* Synthesis, biological activities and docking studies of piperazine incorporated 1, 3, 4-oxadiazole derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1191, p. 197-205, 2019.
- BILGIÇLI, H. G. *et al.* Novel eugenol bearing oxypropanolamines: Synthesis, characterization, antibacterial, antidiabetic, and anticholinergic potentials. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 1-7, 2019.
- BISHOYI, A. K. *et al.* Design, molecular docking, and antimicrobial assessment of newly synthesized phytochemical thymol Mannich base derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1244, n. 130908, p. 1-13, 2021.
- BUDUMA, K. *et al.* Synthesis and bioactivity evaluation of eugenol hybrids obtained by Mannich and 1,3 dipolar cycloaddition reactions. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 58, n. 11, 2021.

CARNEIRO, M. S. *et al.* Nontuberculous mycobacterial lung disease in a high tuberculosis incidence setting in Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, p. 106-111, 2018.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **2019 AR Threats Report**. Publicado em: 23 de novembro de 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html#:~:text=More%20than%202.8%20million%20antimicrobial,people%20die%20as%20a%20result.>>. Acesso em: 15/11/2022.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **American Trypanosomiasis**. Publicado em: 16 de junho de 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>> Acesso em: 15/11/2022.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Antibiotic Resistance Threats In The United States 2019**. Publicado em: dezembro de 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>> Acesso em: 15/11/2022.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Antifungal Resistance in Candida**. Publicado em: maio de 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/antifungal-resistant.html#:~:text=About%207%25%20of%20all%20Candida,Candida%20glabrata%2C%20and%20Candida%20parapsilosis.>> Acesso em: 15/11/2022.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Antifungal-Resistant Aspergillus**. Publicado em: maio de 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/antifungal-resistant.html>> Acesso em: 15/11/2022.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Nontuberculous Mycobacteria (NTM)**. Publicado em: agosto de 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/organisms/ntm/clinicians.html>> Acesso em: 15/11/2022.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Parasites - American Trypanosomiasis** (also known as Chagas Disease). Publicado em: 11 de abril de 2021. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen\\_info/detailed.html#:~:text=Acute%20phase%3A%20During%20this%20phase,appetite%2C%20diarrhea%2C%20and%20vomiting.](https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html#:~:text=Acute%20phase%3A%20During%20this%20phase,appetite%2C%20diarrhea%2C%20and%20vomiting.)> Acesso em: 15/11/2022.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Phases and forms of Chagas disease**. Publicado em: agosto de 2012. Disponível em: <[cdc.gov/parasites/cme/chagas/lesson\\_2/1.html#:~:text=The%20acute%20phase%20lasts%20approximately,Spontaneous%20cure%20is%20extremely%20rare](https://www.cdc.gov/parasites/cme/chagas/lesson_2/1.html#:~:text=The%20acute%20phase%20lasts%20approximately,Spontaneous%20cure%20is%20extremely%20rare)> Acesso em: 15/11/2022.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Tracking Antimicrobial Resistance**. Publicado em: novembro de 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/tracking.html>> Acesso em: 06/06/2023.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Treatment for Invasive Candidiasis**. Publicado em: novembro de 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/invasive/treatment.html>> Acesso em: 15/11/2022.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. **Where Aspergillosis Comes From**. Publicado em: janeiro de 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/causes.html>> Acesso em: 15/11/2022. CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 2012.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, 22th informational supplement. M100 - S23**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2013.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardia spp. and Other Aerobic Actinomycetes**, 3rd Edition: M24-A2. 2011. Disponível em: <<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m24/>>. Acessado em: 02/10/2020.

DAVIES, D. Understanding Biofilm Resistance To Antibacterial Agents. **NATURE REVIEWS**, v. 2, p. 114-122, 2003.

DE ALMEIDA; A. L. *et al.* Eugenol and derivatives activity against Mycobacterium tuberculosis, nontuberculous mycobacteria and other bacteria. **Future Microbiology**, v. 14, p. 331-344, 2019.

DE CARVALHO, L. I. S. *et al.* Antifungal Activity of New Eugenol-Benzoxazole Hybrids against Candida spp. **Journal of Chemistry**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

DE SOUZA, T. B. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of 6-triazolo-6-deoxy eugenol glucosides. **Carbohydrate Research**, v. 410, p. 1-8, 2015.

DE SOUZA, T *et al.* Synthesis, activity, and molecular modeling studies of 1,2,3- triazole derivatives from natural phenylpropanoids as new trypanocidal agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 95, n. 1, p. 124-129, 2020.

DOS SANTOS, T. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of New Eugenol-Derived 1,2,3-Triazoles as Antimycobacterial Agents. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 7, p. 1425-1436, 2019.

DRUGS. **Lampit Prices, Coupons and Patient Assistance Programs**. Publicado em: 22 de outubro de 2022. Disponível em: <<https://www.drugs.com/price-guide/lampit#:~:text=The%20cost%20for%20Lampit%20oral,on%20the%20pharmacy%20you%20visit.>> Acesso em: 15/11/2022.

DURAND, C.; SZOSTAK, M. Recent Advances in the Synthesis of Piperazines: Focus on C-H Functionalization. **Organics**, v. 2, n. 4, p. 337-347, 2021.

DUTKIEWICZ, R.; HAGE, C. A. Aspergillus infections in the critically ill. **Proceedings Of The American Thoracic Society**, v. 7, p. 204-209, 2010.

ESPINOZA-HICKS, J. C. *et al.* A Convergent Total Synthesis of the Biologically Active Benzofurans Ailanthoidol, Egonol and Homoegonol from Biomass Derived Eugenol. **Synthesis**, v. 50, p. A-F, 2018.

FARMER, S. **Conversion of Carboxylic acids to amides using DCC as an activating agent**. Publicado em: setembro de 2020. Disponível em: <[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Organic\\_Chemistry\)/Carboxylic\\_Acids/Reactivity\\_of\\_Carboxylic\\_Acids/Conversion\\_of\\_Carboxylic\\_acids\\_to\\_amides\\_using\\_DCC\\_as\\_an\\_activating\\_agent](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Carboxylic_Acids/Reactivity_of_Carboxylic_Acids/Conversion_of_Carboxylic_acids_to_amides_using_DCC_as_an_activating_agent)> Acesso em: 15/11/2022.

FILHO, J. F. A. *et al.* Synthesis, *in vitro* Antifungal Activity and Molecular Modeling Studies of New Mannich Bases Derived from Lawsone. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 2127-2140, 2016.

GIRASE, P. S. *et al.* An appraisal of anti-mycobacterial activity with structure-activity relationship of piperazine and its analogues: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 210, 2021.

GRIFFITH, D. E. *et al.* An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, p. 367-416, 2007.

GU, J. *et al.* Copper-catalyzed one-pot oxidative amidation of alcohol to amide via C-H activation. **RSC Advances**, v. 6, p. 89413-89416, 2016.

GUZMAN, J. D. *et al.* Antimycobacterials from natural sources: ancient times, antibiotic era and novel scaffolds. **Frontiers in Bioscience**, v. 17, p. 1861-1881, 2012.

IDHAYADHULLA, A. *et al.* Synthesis of some Mannich base derivatives and their antimicrobial activity study. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 994-999, 2014.

**ISO 10993-5**: Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Switzerland. 2009. International Organization for Standardization.

JACKSON, Y.; WYSSA, B.; CHAPPUIS, F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, p. 690-696, 2020.

JOSHI S. *et al.* Synthesis and *in vitro* study of novel Mannich bases as antibacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 221-226, 2005.

KARAMAN, D. S. *et al.* Evolving Technologies and Strategies for Combating Antibacterial Resistance in the Advent of the Postantibiotic Era. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 15, p. 1-22, 2020.

KAUFMAN, T. S. The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-Organic Synthesis and a Convenient Precursor Toward Bio-Based Fine Chemicals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 6, p. 1055-1086, 2015.

KEENAN, M. *et al.* Design, structure-activity relationship and in vivo efficacy of piperazine analogues of fenarimol as inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 1756-1763, 2013.

KSIEZOPOLSKA, E. GABALDÓN, T. Evolutionary Emergence of Drug Resistance in *Candida* Opportunistic Pathogens. **Genes**, v. 9, p. 1-25, 2018.

LEGGIO, A. *et al.* One-pot synthesis of amides from carboxylic acids activated using thionyl chloride. **RSC Advances**, v. 6, p. 34468-34475, 2016.

LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Frontiers in public health**, v. 7, n. 166, p. 1-13, 2019.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definition for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n3, p. 168-181, 2012.

MALINKA, W *et al.* Synthesis, analgesic activity and computational study of new isothiazolopyridines of Mannich base type. **Il Farmaco**, v. 60, p. 961-968, 2015.

MANASA, K. L. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Imidazo[2,1-b]Thiazole based Sulfonyl Piperazines as Novel Carbonic Anhydrase II Inhibitors. **Metabolites**, v. 10, n 136, p. 1-12, 2020.

MARCHESE, A. *et al.* Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, p. 668-689, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Recomendações Para o Diagnóstico e Tratamento das Doenças Causadas por Micobactérias Não Tuberculosas no Brasil**. Publicado em: 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/tuberculose/recomendacoes-para-o-diagnostico-e-tratamento-das-doencas-causadas-por-micobacterias-nao-tuberculosas-no-brasil.pdf>> Acesso em: 15/11/2022.

MONDAL, S.; MALAKAR, S. Synthesis of sulfonamide and their synthetic and therapeutic applications: Recent advances. **Tetrahedron**, v. 76, n. 48, p. 1-77, 2020.

MORENO-VIGURI, E *et al.* In vitro and *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of new arylamine Mannich base-type derivatives. **Journal of medicinal chemistry**, v. 59, n. 24, p. 10929-10945, 2016.

OLEA, A. F. *et al.* Antifungal Activity of Eugenol Derivatives against *Botrytis Cinerea*. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1-14, 2019.

PAPON, N. *et al.* Emerging and Emerged Pathogenic Candida Species: Beyond the Candida albicans Paradigm. **PLOS Pathogens**, v. setembro de 2013, n. 9, p. 1-5, 2013.

PAUCAR, R. *et al.* Rational modification of Mannich base-type derivatives as novel antichagasic compounds: Synthesis, in vitro and in vivo evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 3902-3917, 2019.

PHILLEY, J. V. Treatment of Non-Tuberculous Mycobacterial Lung Disease. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 8, n. 4, p. 275-296, 2016.

PRAMOD, K.; ANSARI, S. H.; ALI, J. Eugenol: A Natural Compound with Versatile Pharmacological Actions. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 12, p. 1999-2006, 2010.

RAHIM, N. H. C. A. *et al.* Synthesis and Antibacterial Study of Eugenol Derivatives. **Asian Journal of Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 22-26, 2017.

RAWSON, T. M. *et al.* Bacterial and Fungal Coinfection in Individuals with Coronavirus: A Rapid Review to Support COVID-19 Antimicrobial Prescribing. **Clinical Infectious Diseases**, v. dezembro de 2020 p. 1459-1468, 2020.

RAYENS, E.; NORRIS, K. A. Prevalence and Healthcare Burden of Fungal Infections in the United States, 2018. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2022.

REDDY, Y. N. *et al.* One-pot synthesis of novel substituted quinoxaline piperazine derivatives and their antimicrobial activities. **Journal of Molecular Structure**, v. 1253, p. 1-8, 2022.

REIMER, K.; TIEMANN, F. Ueber die Einwirkung von Chloroform auf Phenole und besonders aromatische Oxysäuren in alkalischer Lösung. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 9 n. 2, p. 1268-1278, 1876.

RERKRACHANEEKORN, T. *et al.* NaI-mediated oxidative amidation of benzyl alcohols/aromatic aldehydes to benzamides via electrochemical reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 70, n. 27, p. 1-6 2021.

RIORDAN, R. **A Maldição do Titã**. 1. ed. Rio de Janeiro: INTRÍNSECA LTDA, 2009.

RISCILI, B. P.; WOOD, K. L. Noninvasive pulmonary Aspergillus infections. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, n. 2, p. 315-335, 2009.

ROMAN, G. Mannich bases in medicinal chemistry and drug design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, n. 7, p. 743-816, 2015.

SANTOS, S. S. *et al.* Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 4, p. 1-23, 2020.

SHAQUIQUZZAMAN, M. *et al.* Piperazine Scaffold: A Remarkable Tool in Generation of Diverse Pharmacological Agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. setembro de 2015, n. 102 p. 487-529, 2015.

SHARGHI, H; KHOSHNOOD, A.; DOROODMAND, M. M.; KHALIFEHC, R. Rapid, Eco-friendly, and One-pot Synthesis of New Lariat Ethers Based on Anthraquinone by Using ZnO Nanoparticles via “Mannich” Reaction under Solvent-free Condition. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 164-174, 2015.

SILVERSTAIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, Inc. 2005.

SIQUEIRA, F. S. *et al.* Sulfamethoxazole derivatives complexed with metals: a new alternative against biofilms of rapidly growing mycobacteria. **Biofouling**, v. 34, n. 8, p. 1-19, 2018.

SNARR, B. D.; DRUMMOND, R. A.; LIONAKIS, M. S. It's all in your head: antifungal immunity in the brain. **Elsevier Public Health Emergency Collection**, v. 58, p. 41-46, 2020.

STĘPIEŃ, Z. *et al.* Investigation into the Impact of the Composition of Ethanol Fuel Deposit Control Additives on Their Effectiveness. **Energies**, v. 14, p. 1-15, 2021.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Steverding Parasites & Vectors**, v. 7, n. 317, p.1-8, 2014.

SUBRAMANIAPILLAI, S. G. Mannich reaction: A versatile and convenient approach to bioactive skeletons. **Journal of Chemical Sciences**, v. 125, p. 467-482, 2013.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews**, v. 9, p. 737-748, 2011.

TROUILLER, P. *et al.* Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *In*: KIRTON, J. J. **Global Health**. Londres: Routledge, 2009. p. 2188-2194.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol - A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3671, 2021.

VILSMEIER, A.; HAACK, A. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 60, p. 119, 1927.

VINAYA, D. V. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of 2-Allyl-5-Hydroxy-4- Methoxy Benzaldehyde Derivatives for Anti-Hyperlipidemic Activity. **Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences**, v. 2, p. 36-43, 2014.

WAGNER, R. B.; ZOOK, H. D. **Synthetic Organic Chemistry**. John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, v. 1, p. 419, 1953.

WHO - World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Publicado em: 2022. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_1)>. Acesso em: 15/11/2022.

WHO - World Health Organization. **COVID-19 U.S. IMPACT ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE**. Publicado em: 2022. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/covid19-impact-report-508.pdf>>. Acesso em: 15/11/2022.

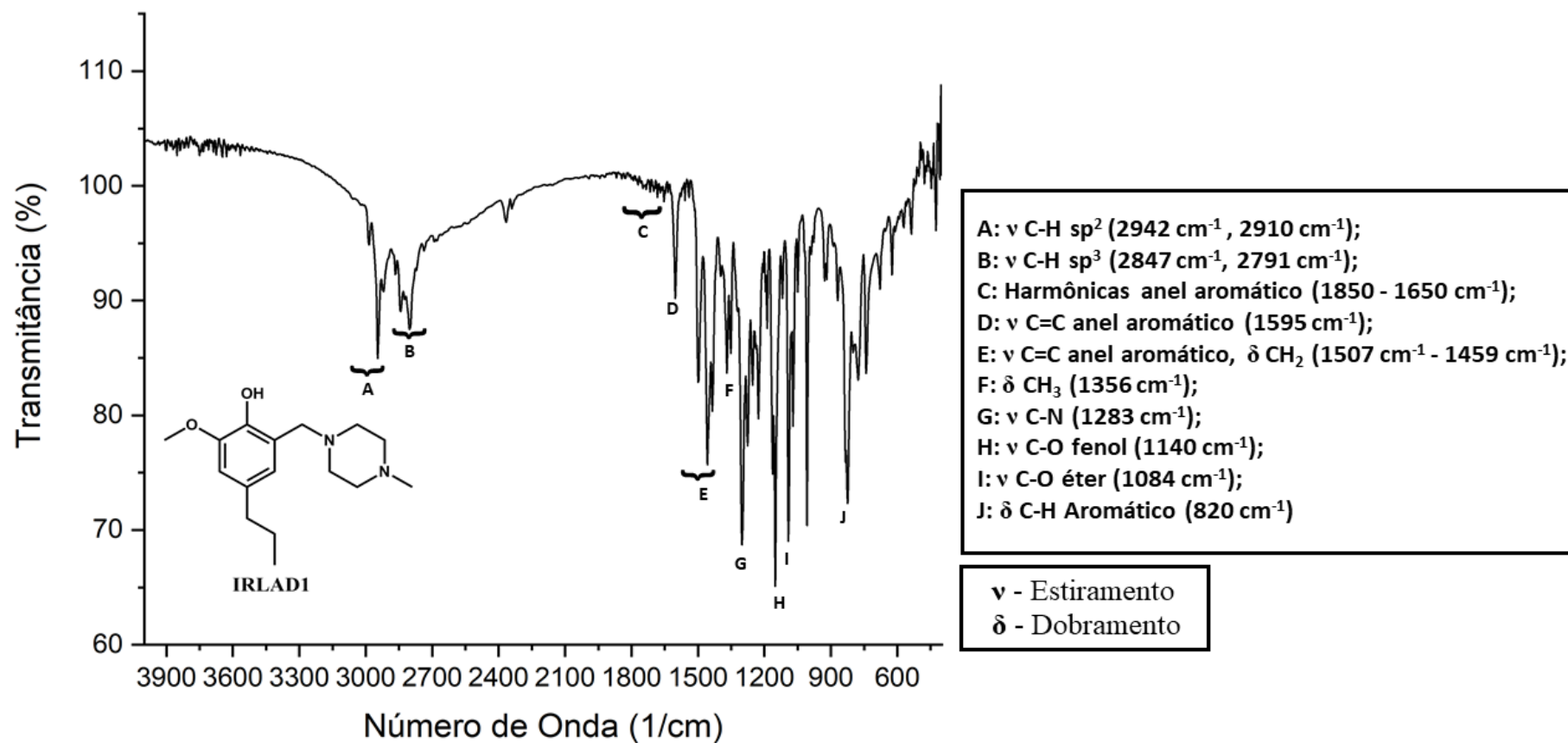
WU, Y. Heterocycles and Medicine: A Survey of the Heterocyclic Drugs Approved by the U.S. FDA from 2000 to Present. **Progress in Heterocyclic Chemistry**, v. 24, p.1-53, 2012.

ZHU, Z. *et al.* Multiple brain abscesses caused by infection with *Candida glabrata*: A case report. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, p. 2374-2380, 2018.

ZIÓŁKOWSKA, G.; TOKARZEWSKI, S.; NOWAKIEWICZ, A. Drug resistance of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from flocks of domestic geese in Poland. **Poultry Science**, v. 93, n. 5, p. 1106-1112, 2014.

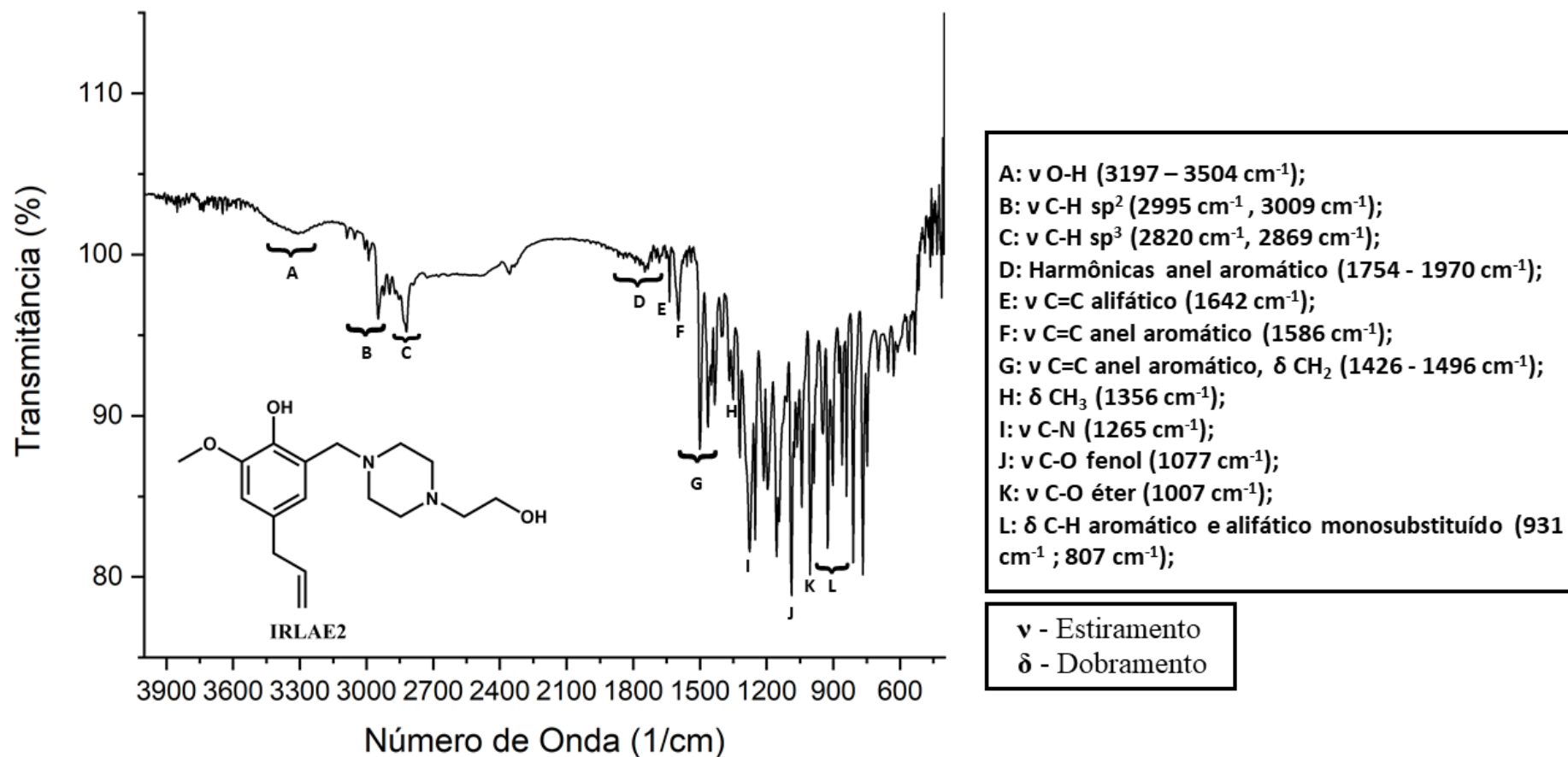
## ANEXO A - Espectros na região do Infravermelho

Figura 57 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD1.



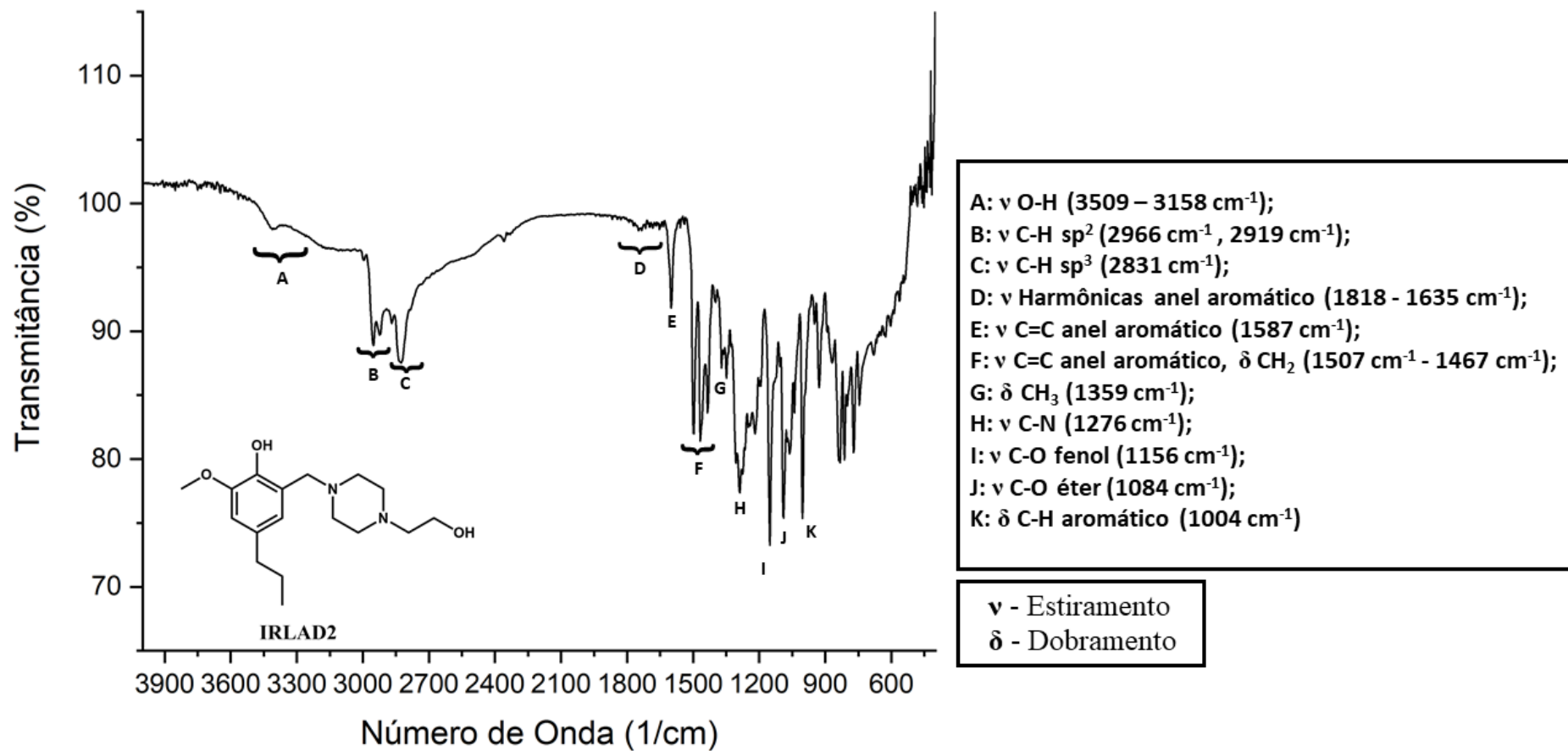
Fonte: Do autor (2023).

Figura 58 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE2.



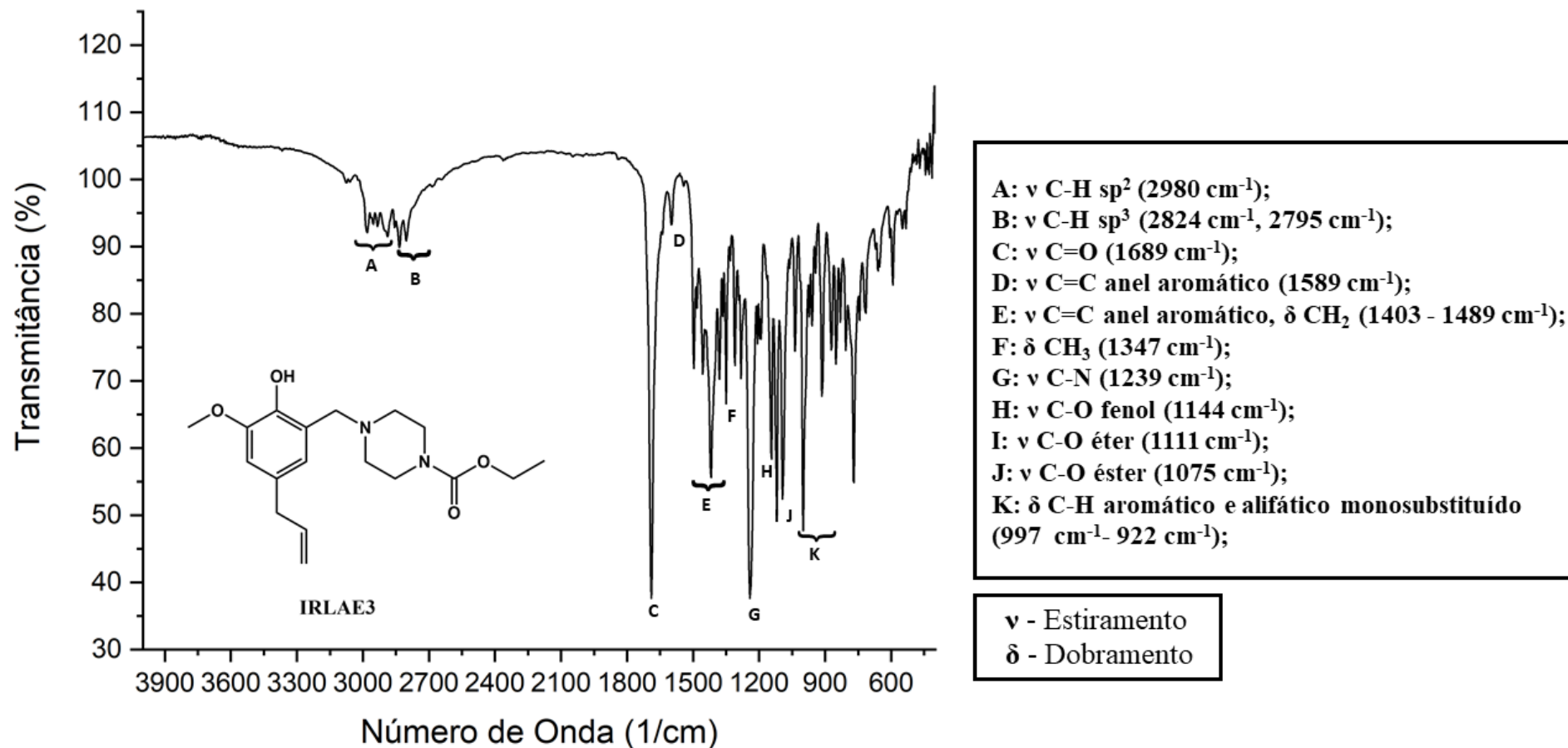
Fonte: Do autor (2023).

Figura 59 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD2.



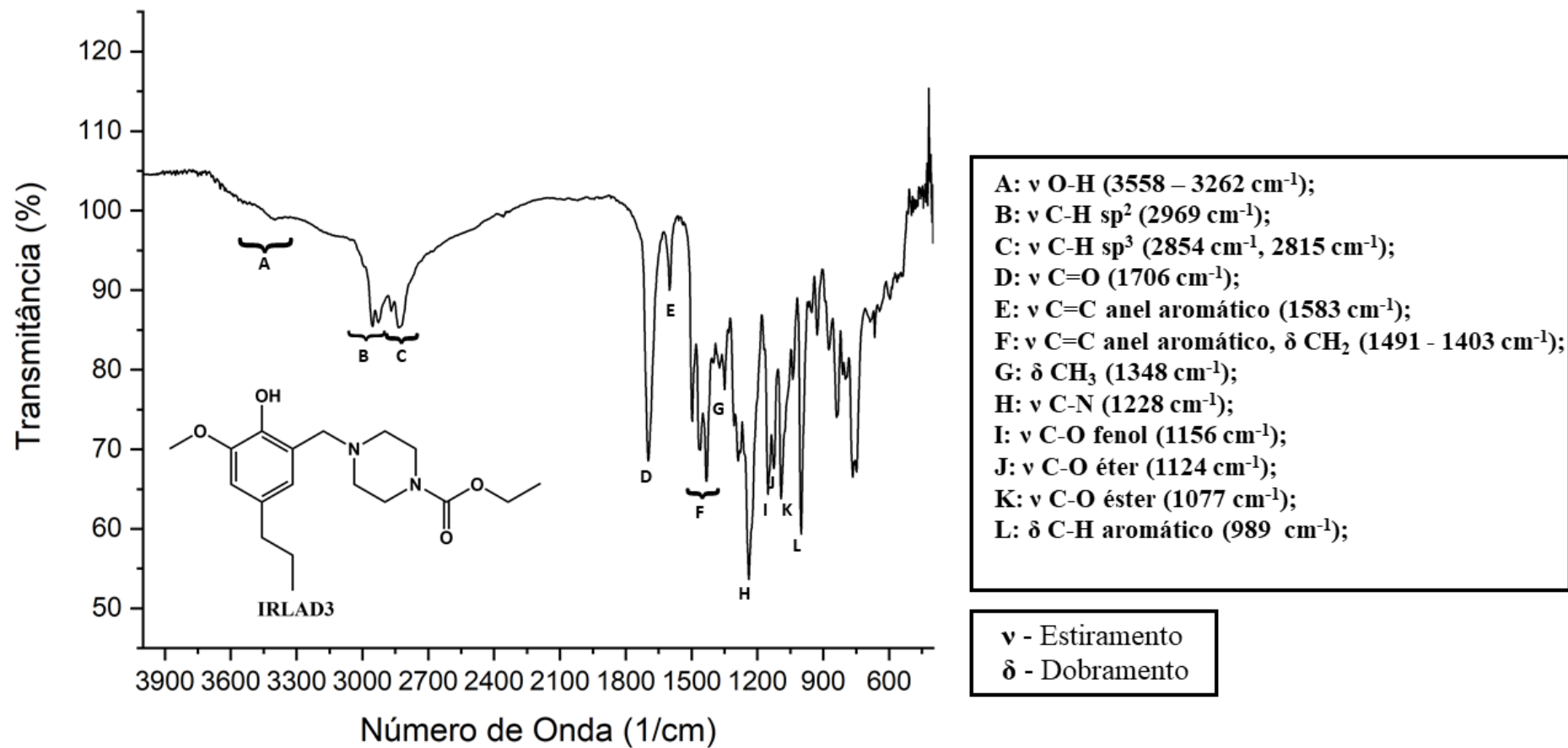
Fonte: Do autor (2023).

Figura 60 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE3.



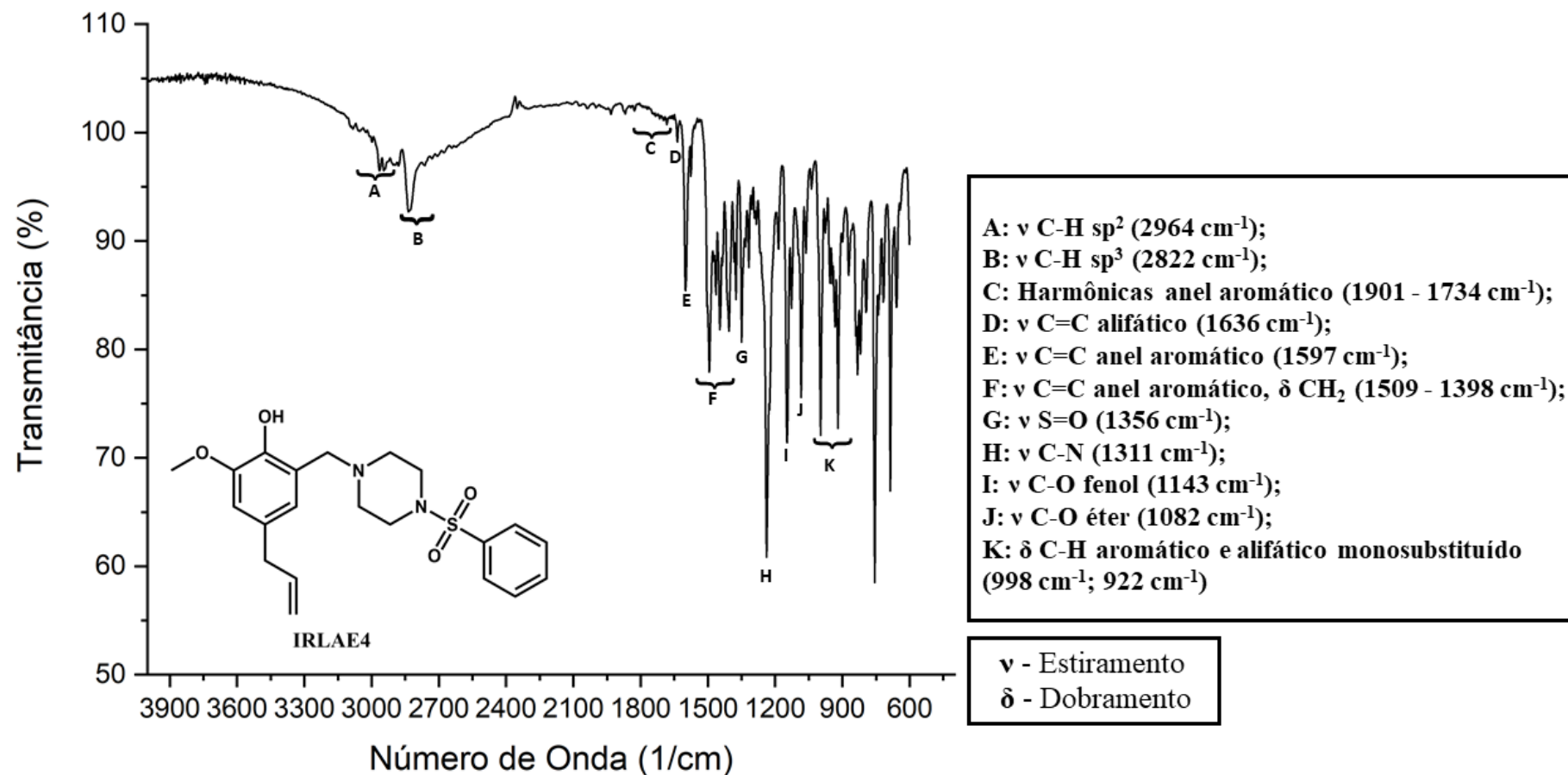
Fonte: Do autor (2023).

Figura 61 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD3.



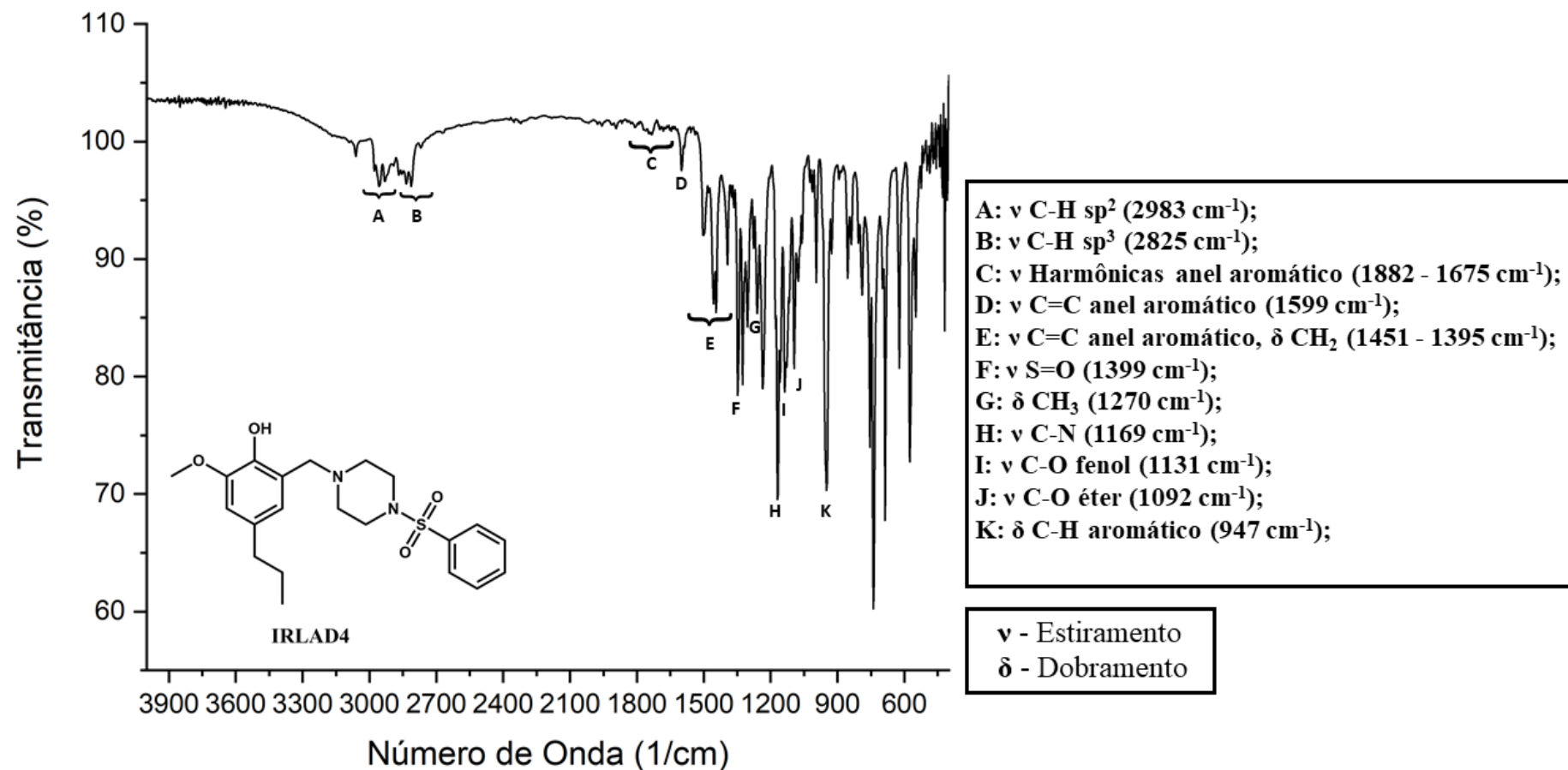
Fonte: Do autor (2023).

Figura 62 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE4.



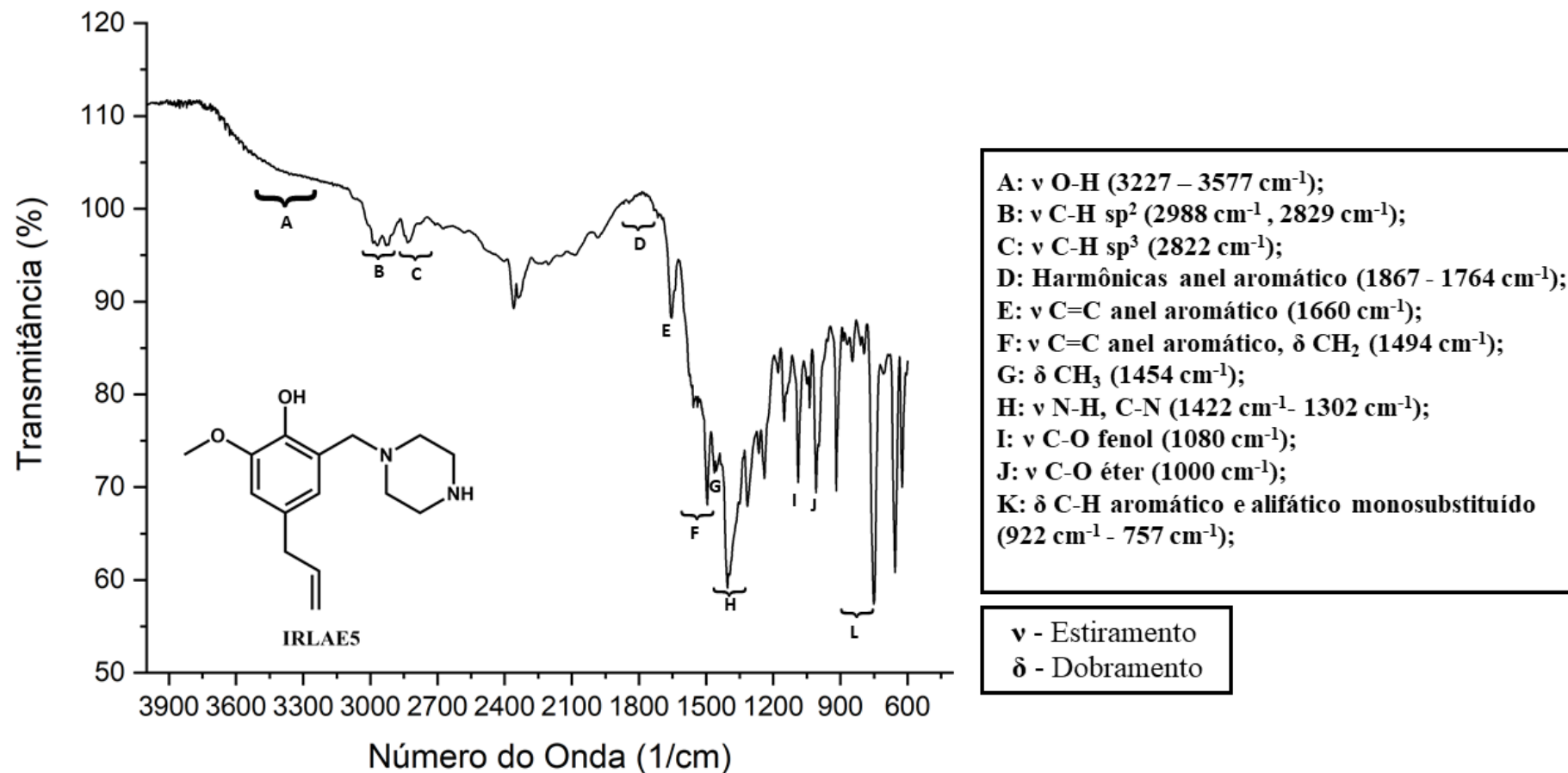
Fonte: Do autor (2023).

Figura 63 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD4.



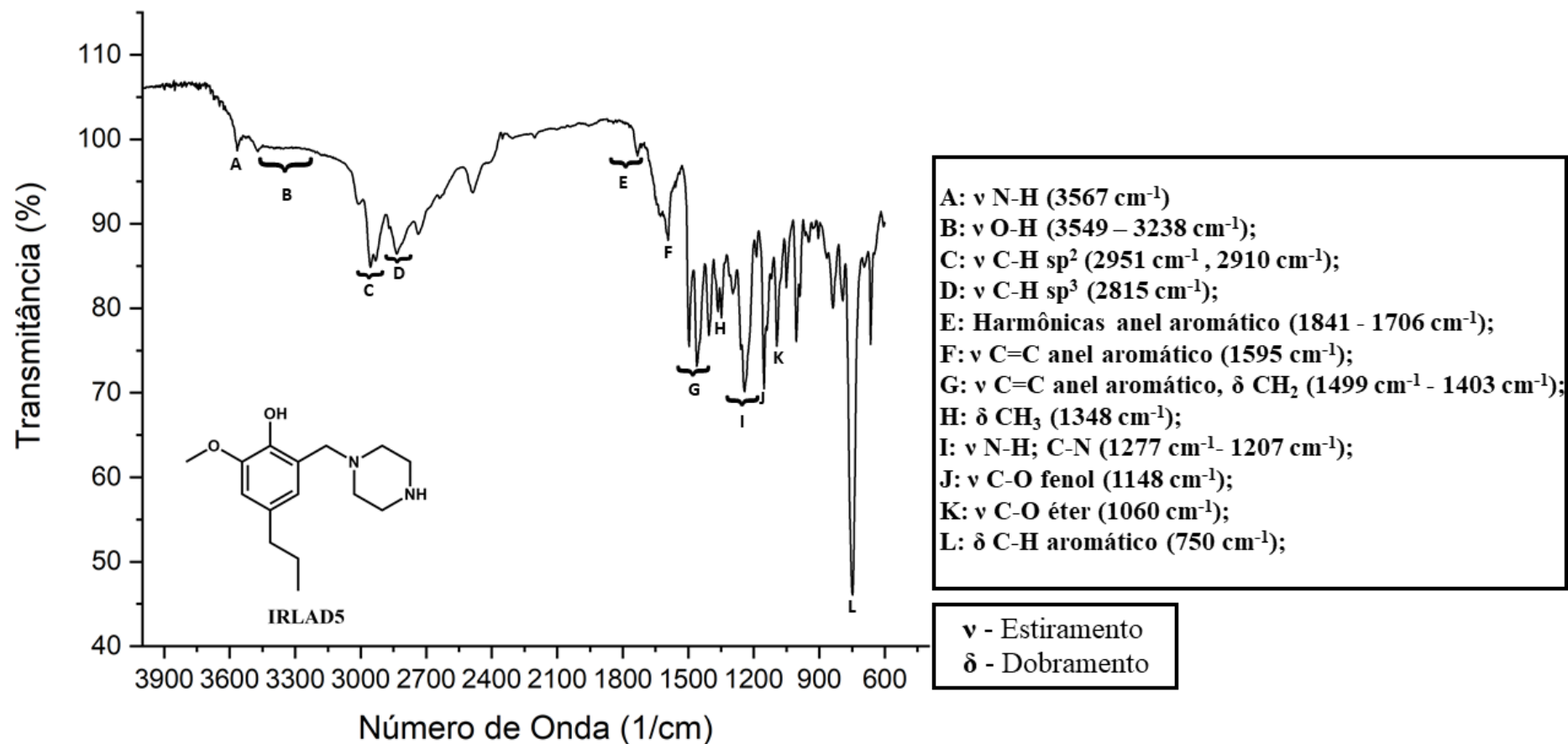
Fonte: Do autor (2023).

Figura 64 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE5.



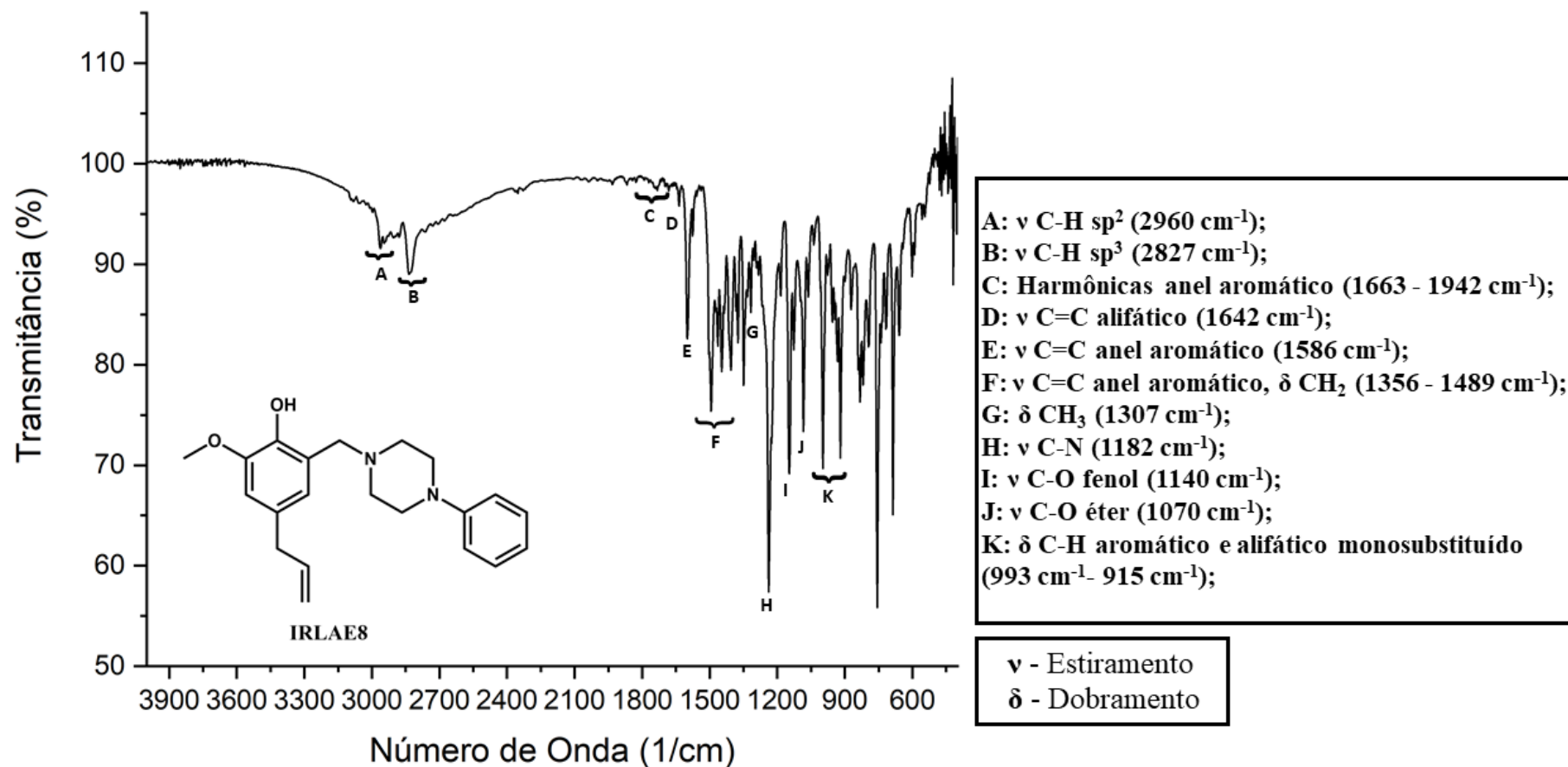
Fonte: Do autor (2023).

Figura 65 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD5.



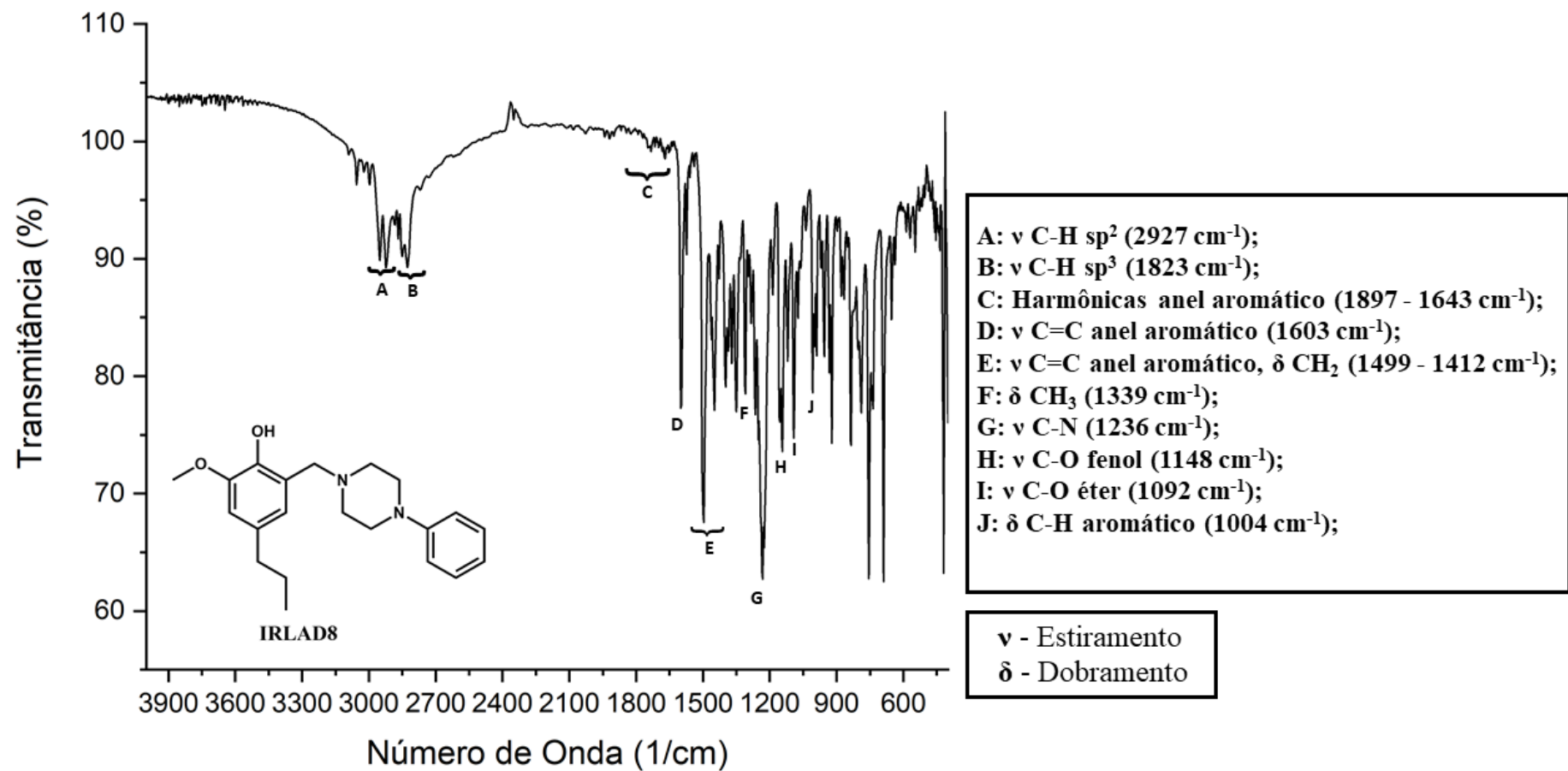
Fonte: Do autor (2023).

Figura 66 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE8.



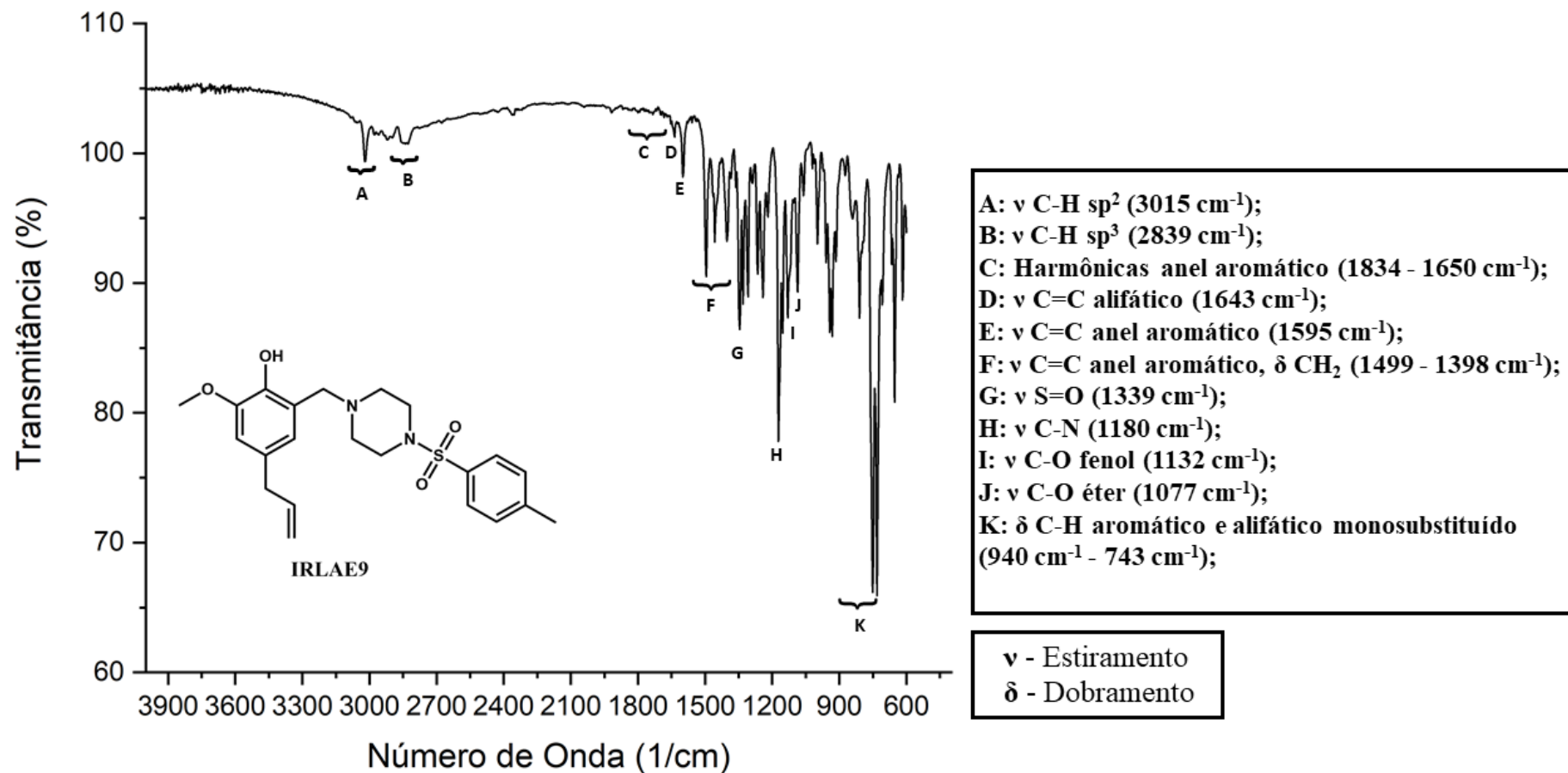
Fonte: Do autor (2023).

Figura 67 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD8.



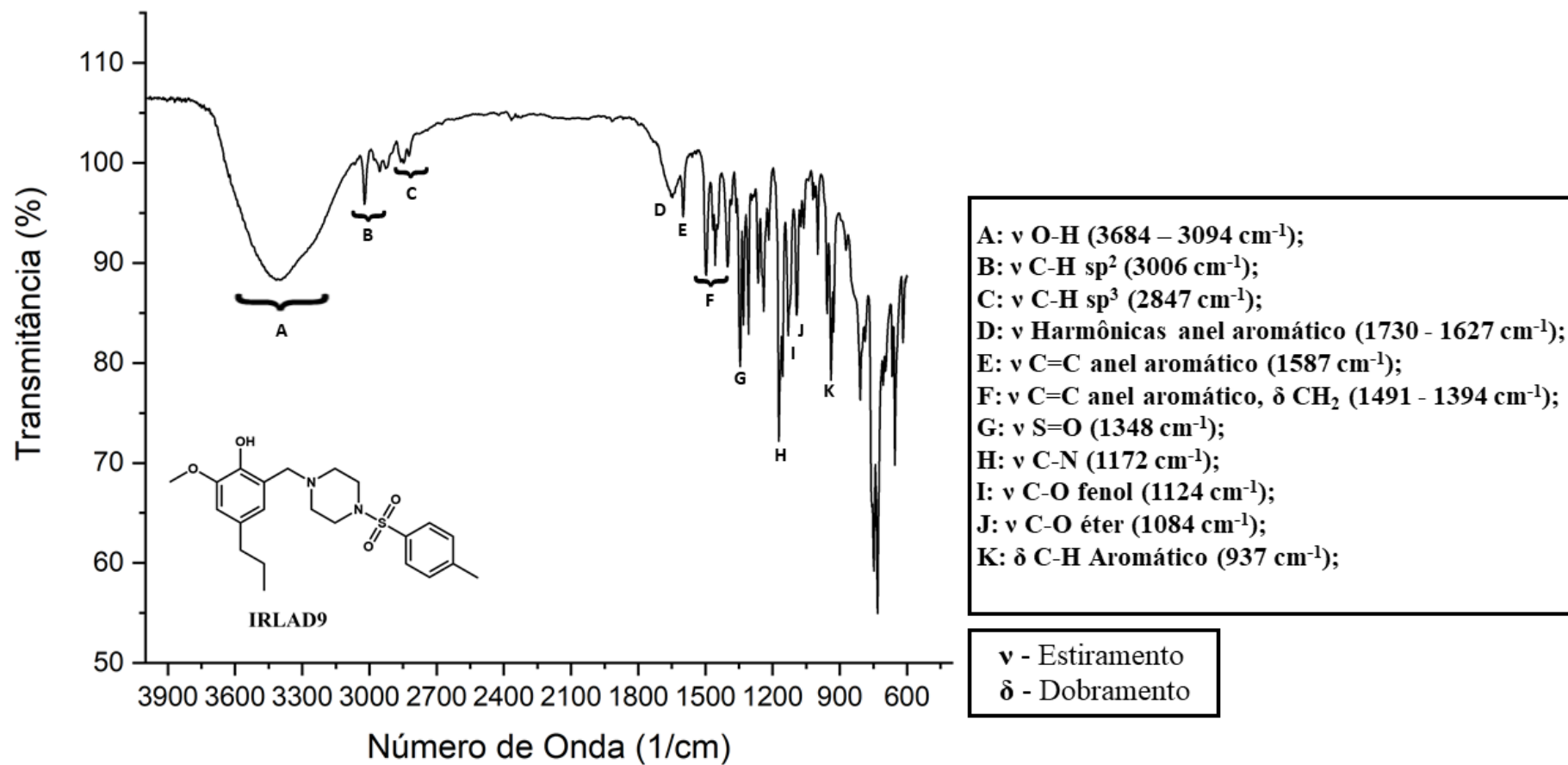
Fonte: Do autor (2023).

Figura 68 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAE9.



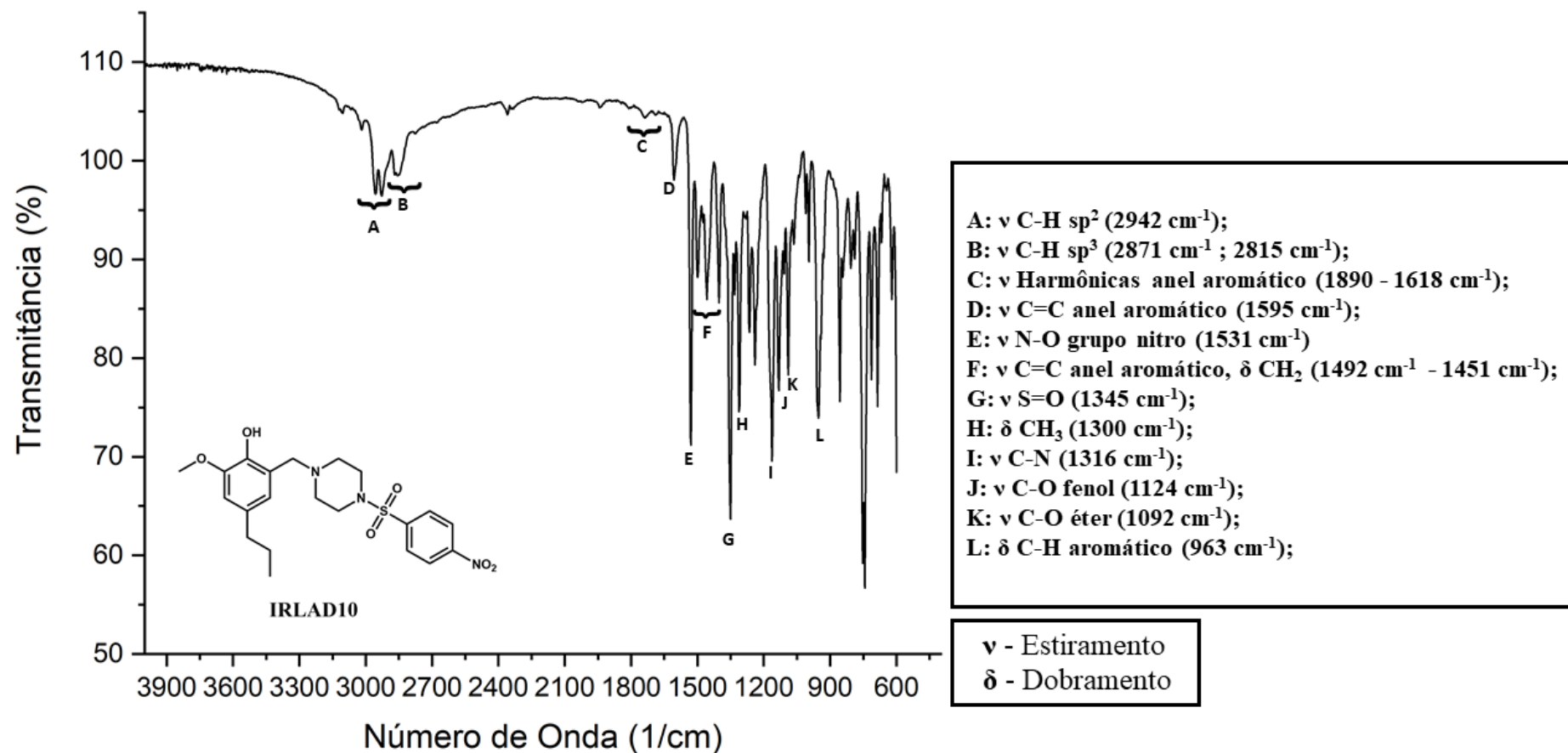
Fonte: Do autor (2023).

Figura 69 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD9.



Fonte: Do autor (2023).

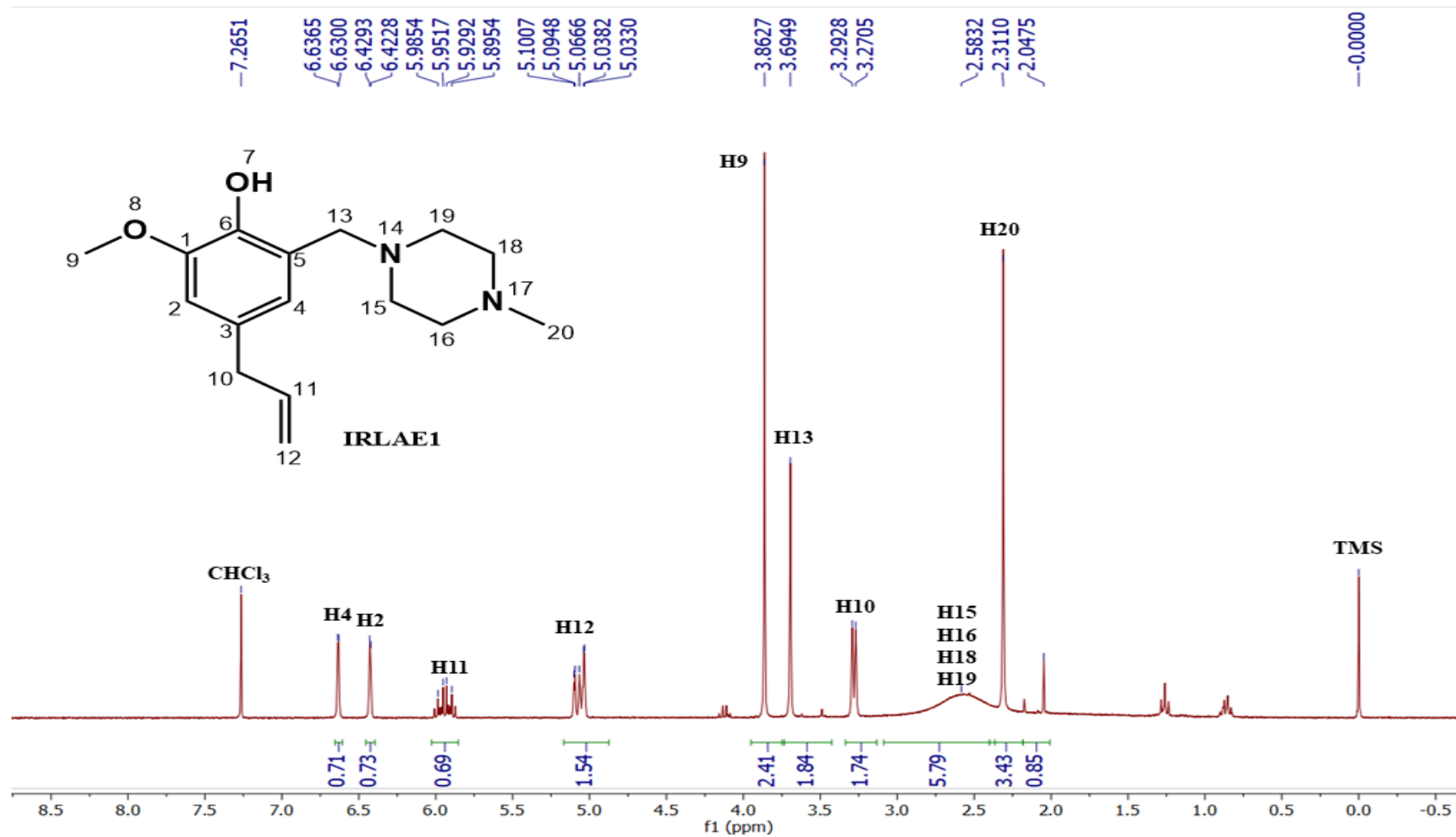
Figura 70 - Espectro de absorção na região do IV do derivado IRLAD10.



Fonte: Do autor (2023).

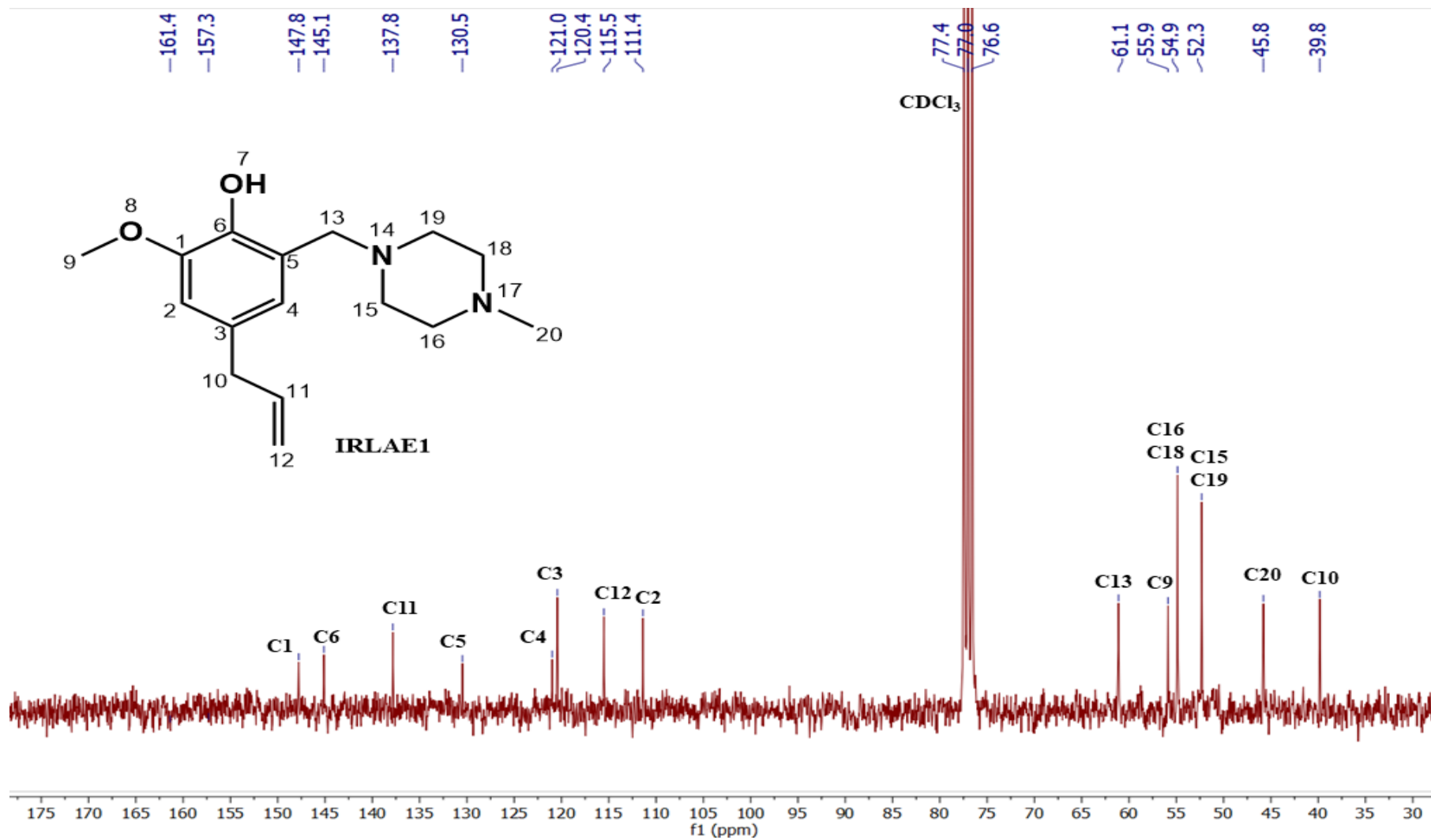
## ANEXO B - Espectros de Ressonância Magnética Nuclear

Figura 71 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAE1 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



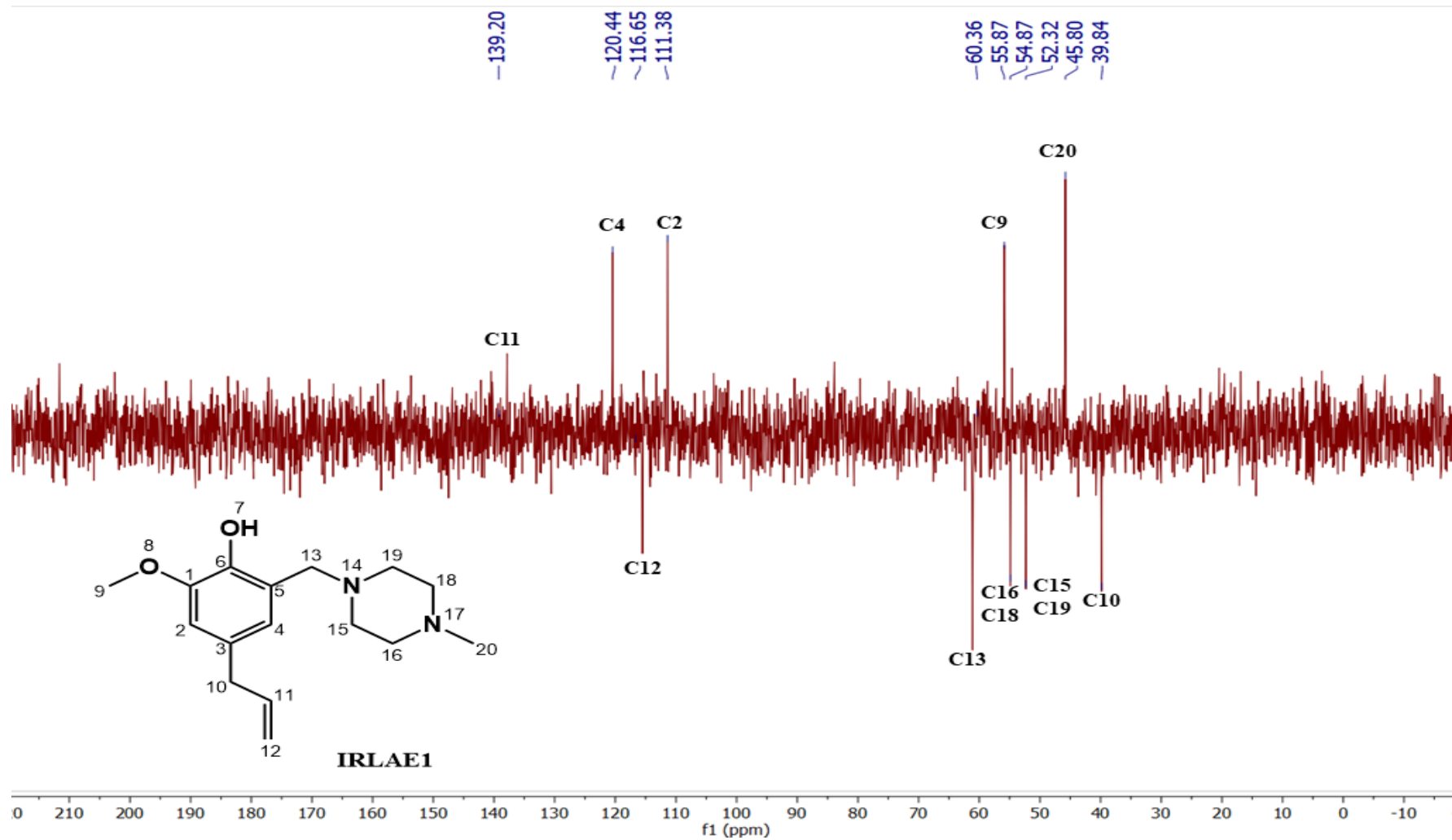
Fonte: Do autor (2023).

Figura 72 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAE1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



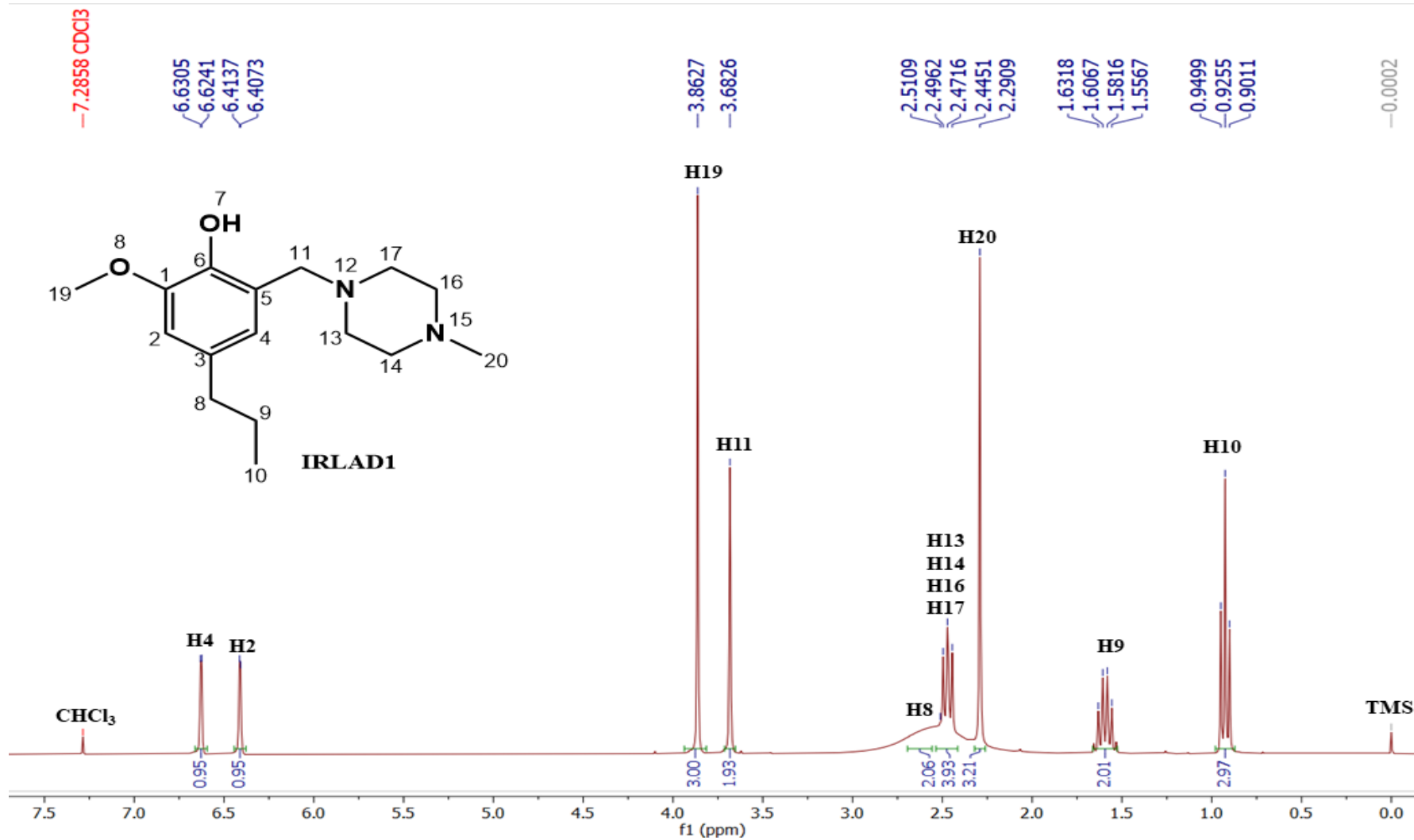
Fonte: Do autor (2023).

Figura 73 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE1 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



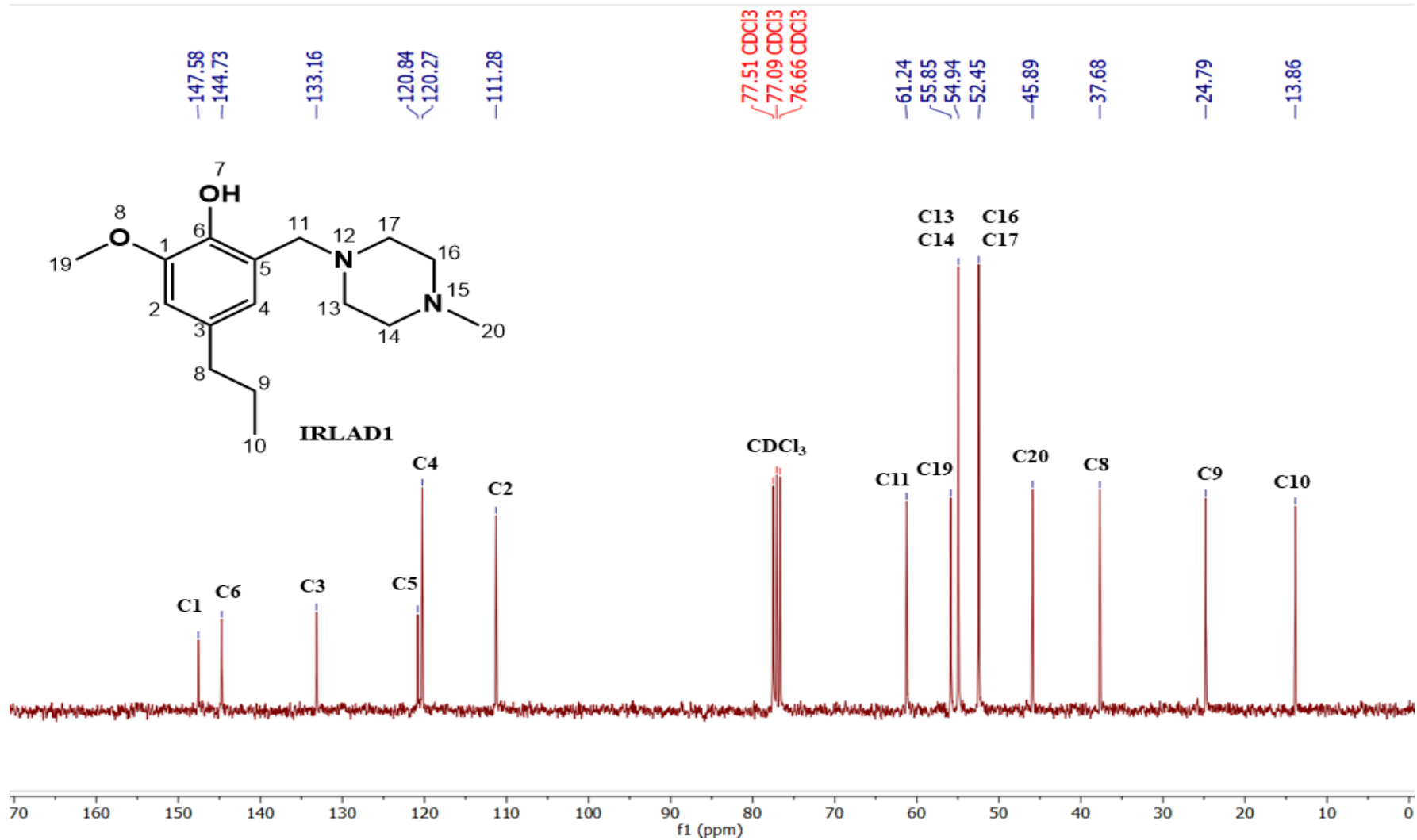
Fonte: Do autor (2023).

Figura 74 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAD1 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



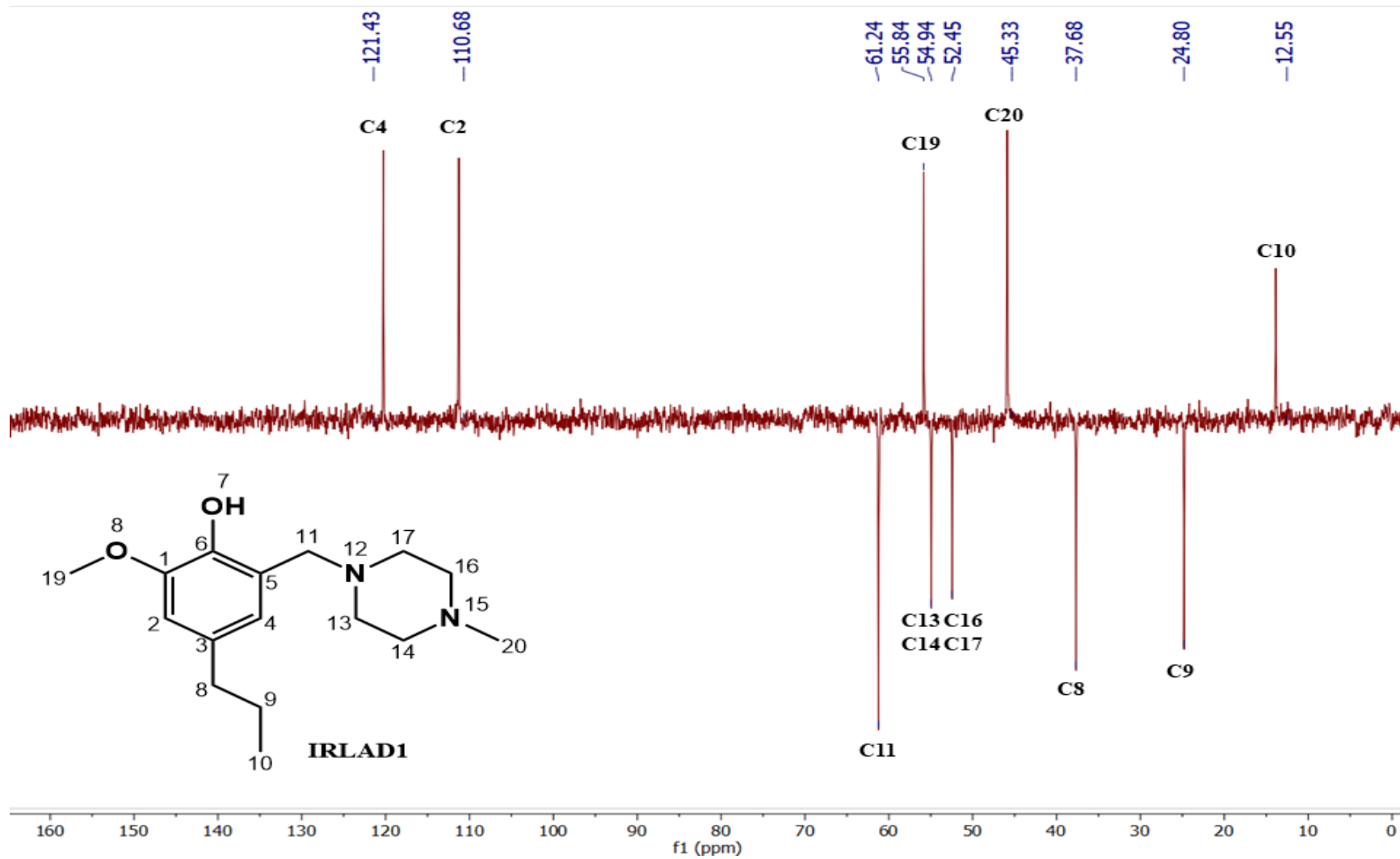
Fonte: Do autor (2023).

Figura 75 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAD1 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



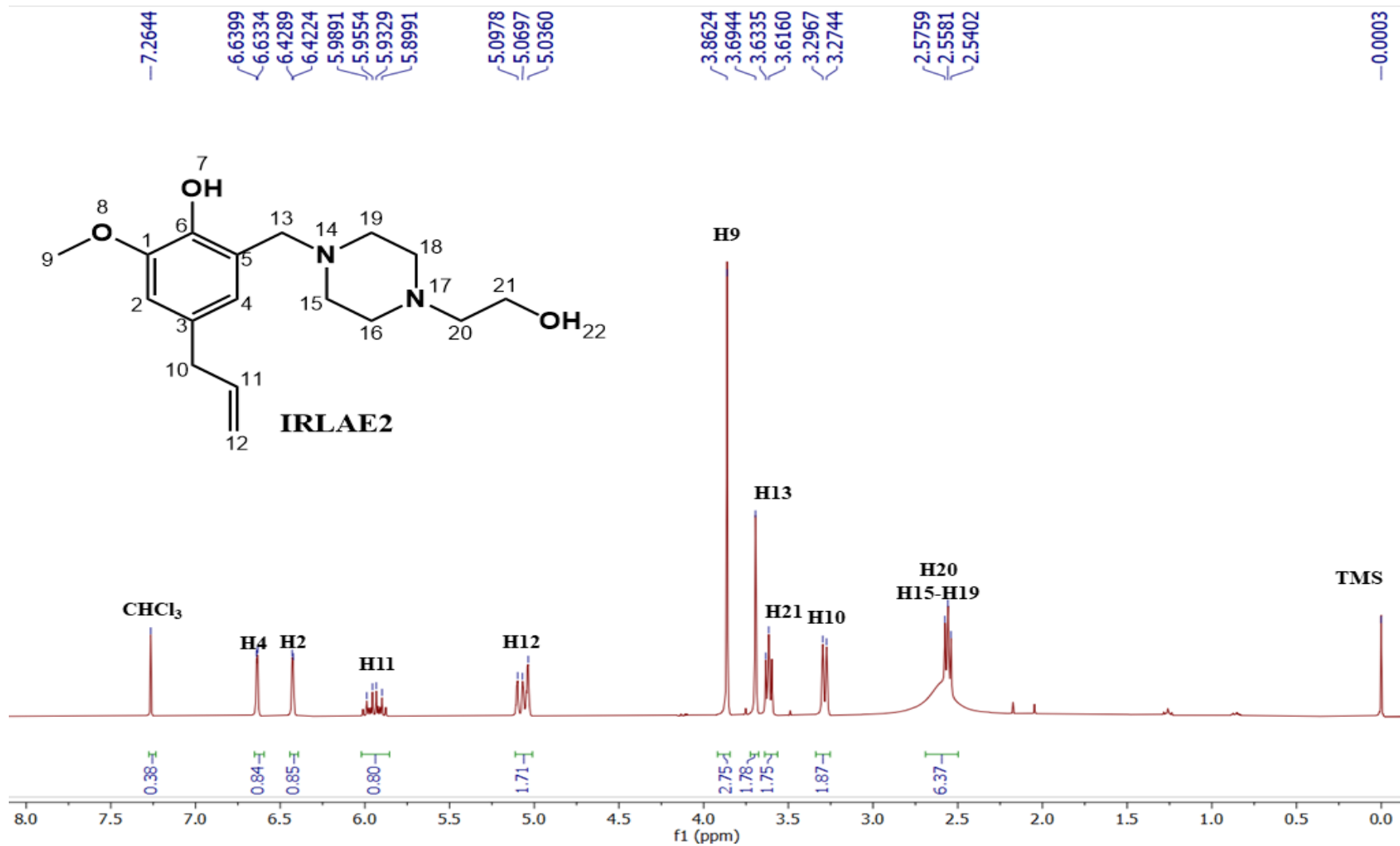
Fonte: Do autor (2023).

Figura 76 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD1 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



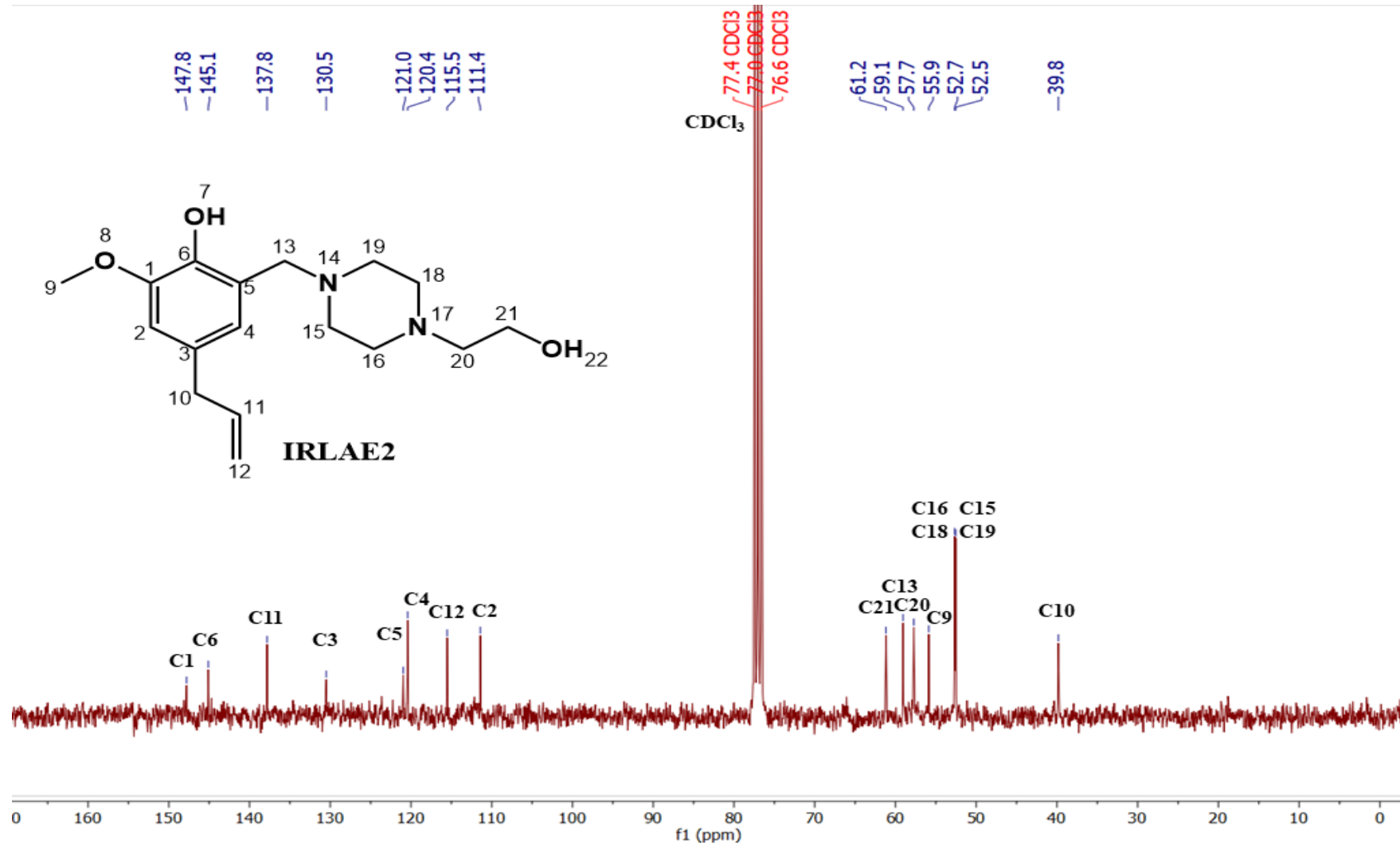
Fonte: Do autor (2023).

Figura 77 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAE2 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



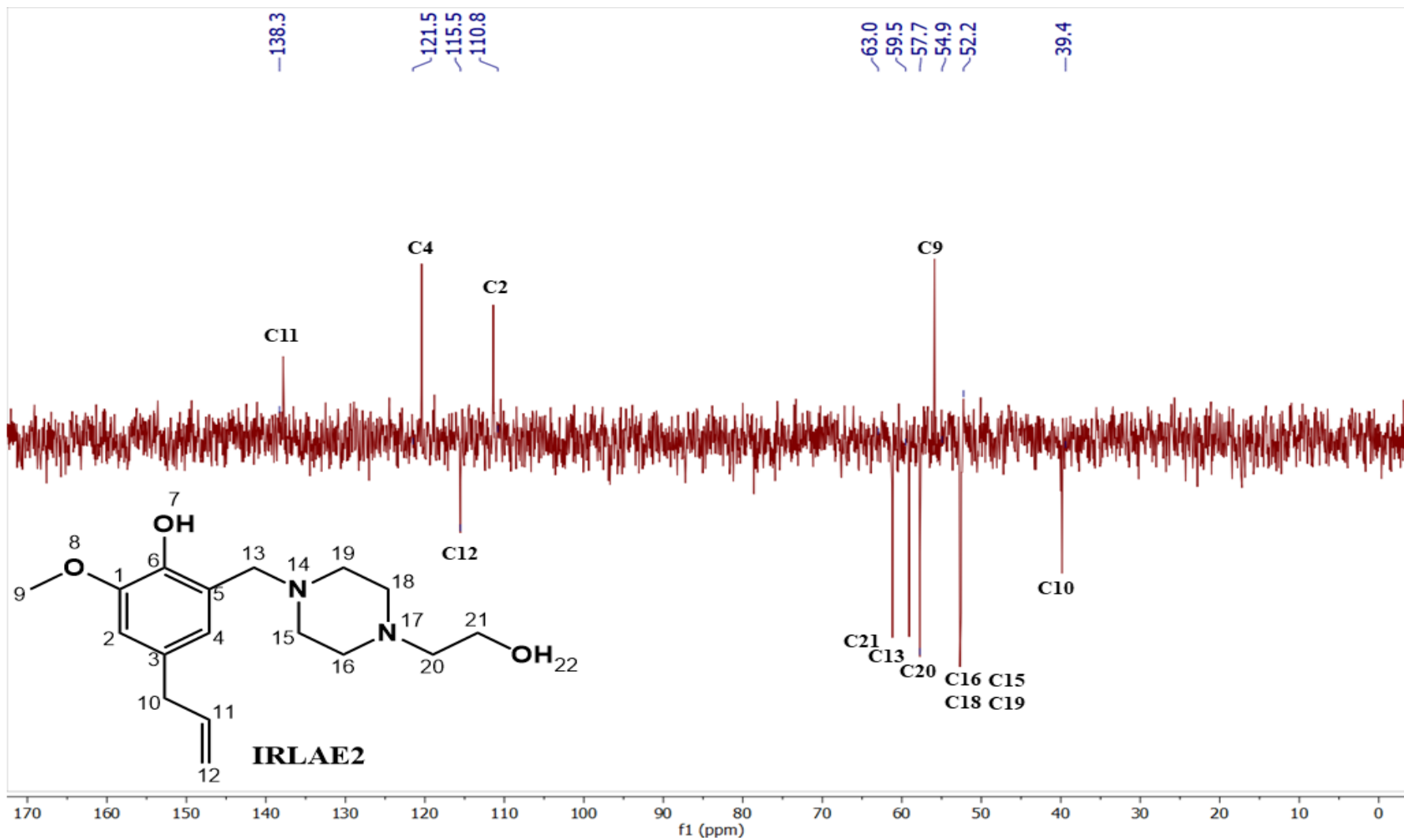
Fonte: Do autor (2023).

Figura 78 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAE2 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



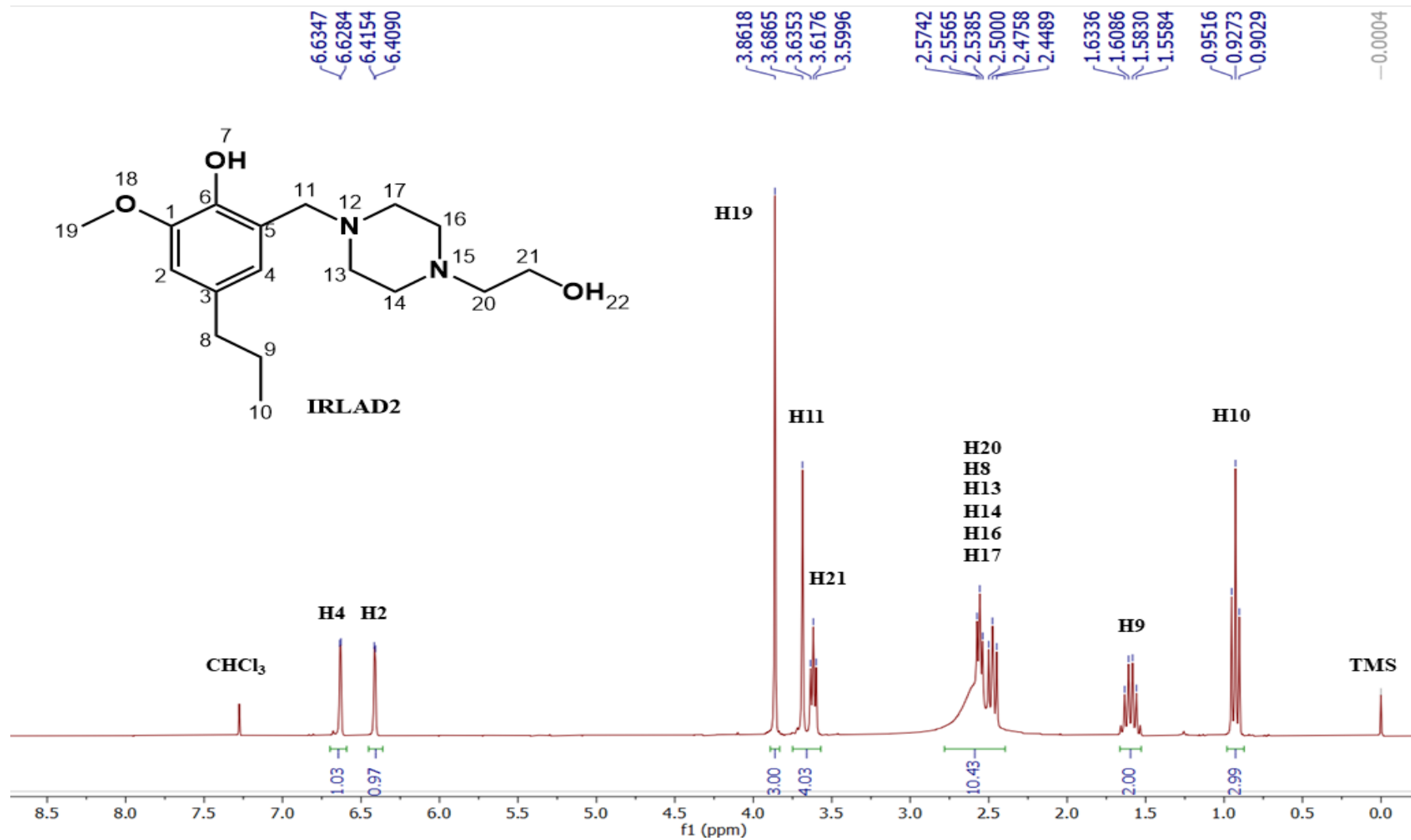
Fonte: Do autor (2023).

Figura 79 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE2 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



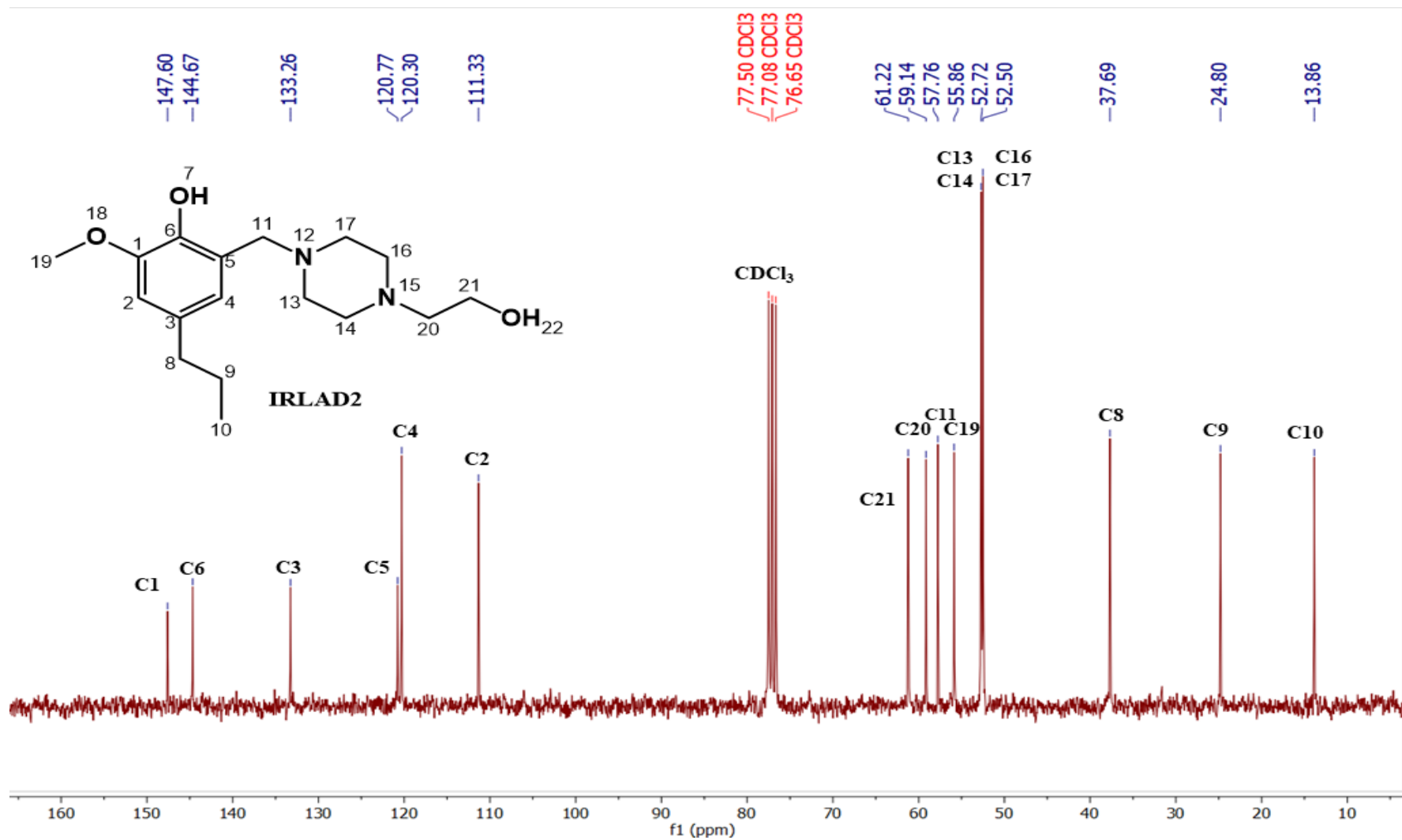
Fonte: Do autor (2023).

Figura 80 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAD2 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



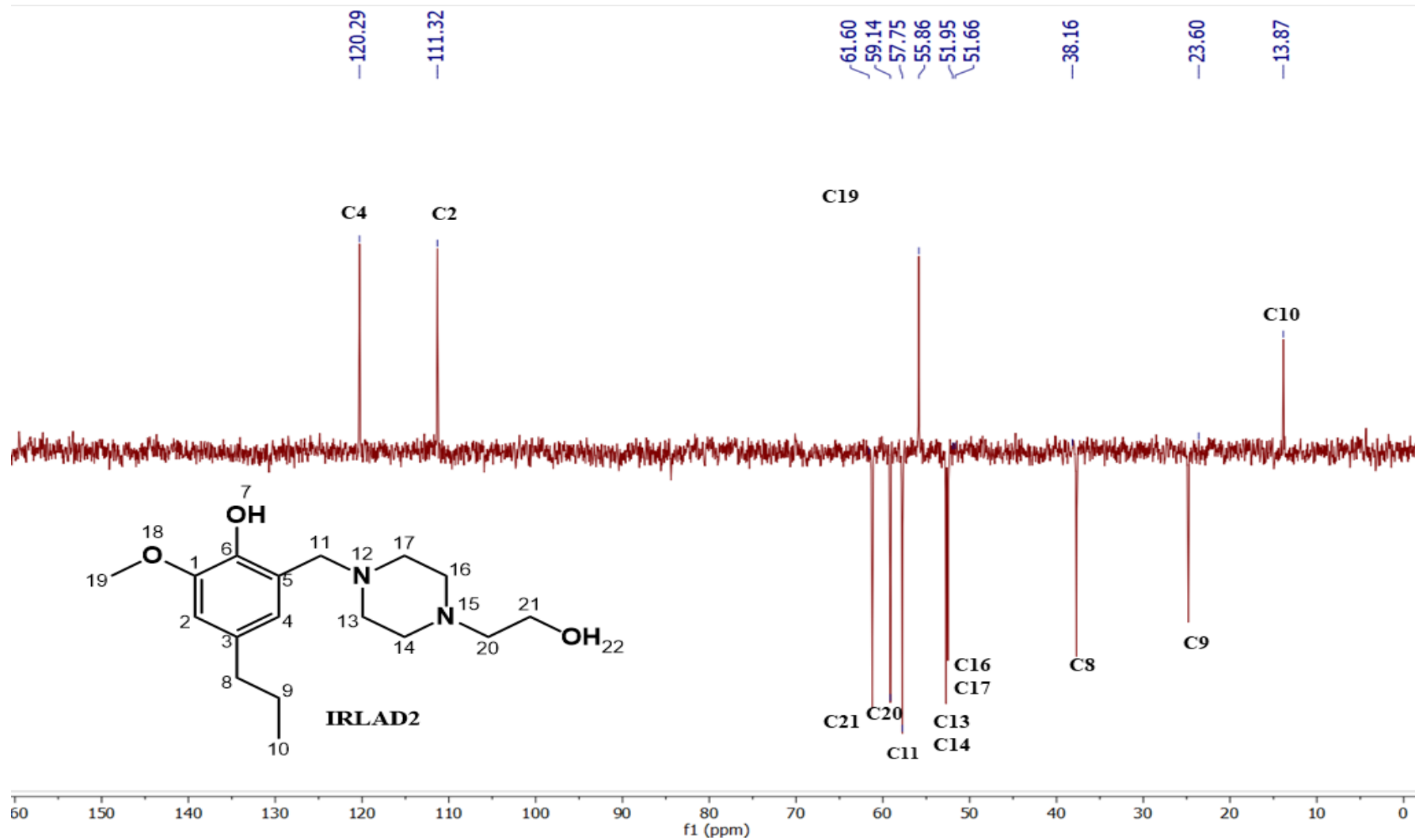
Fonte: Do autor (2023).

Figura 81 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAD2 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



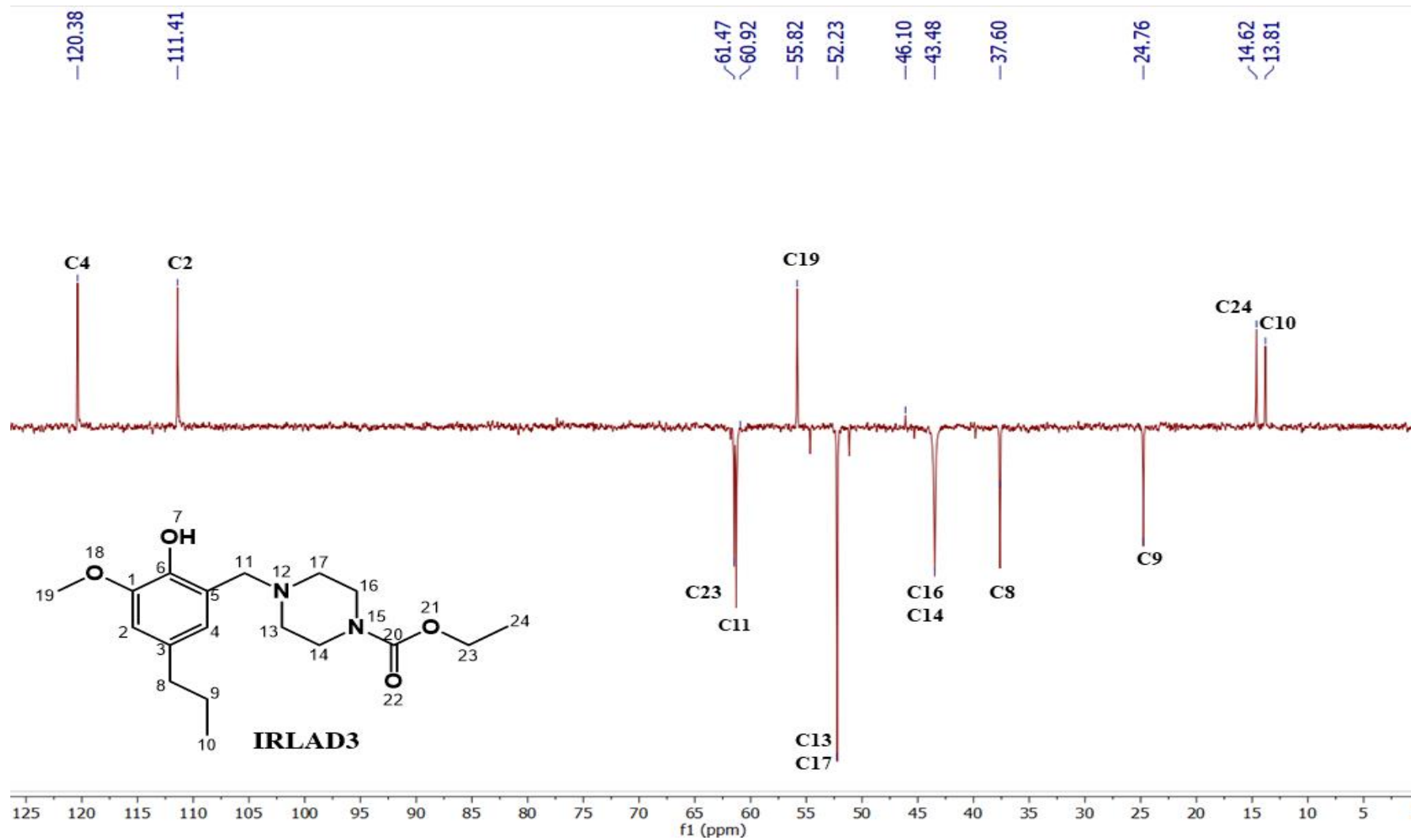
Fonte: Do autor (2023).

Figura 82 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD2 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



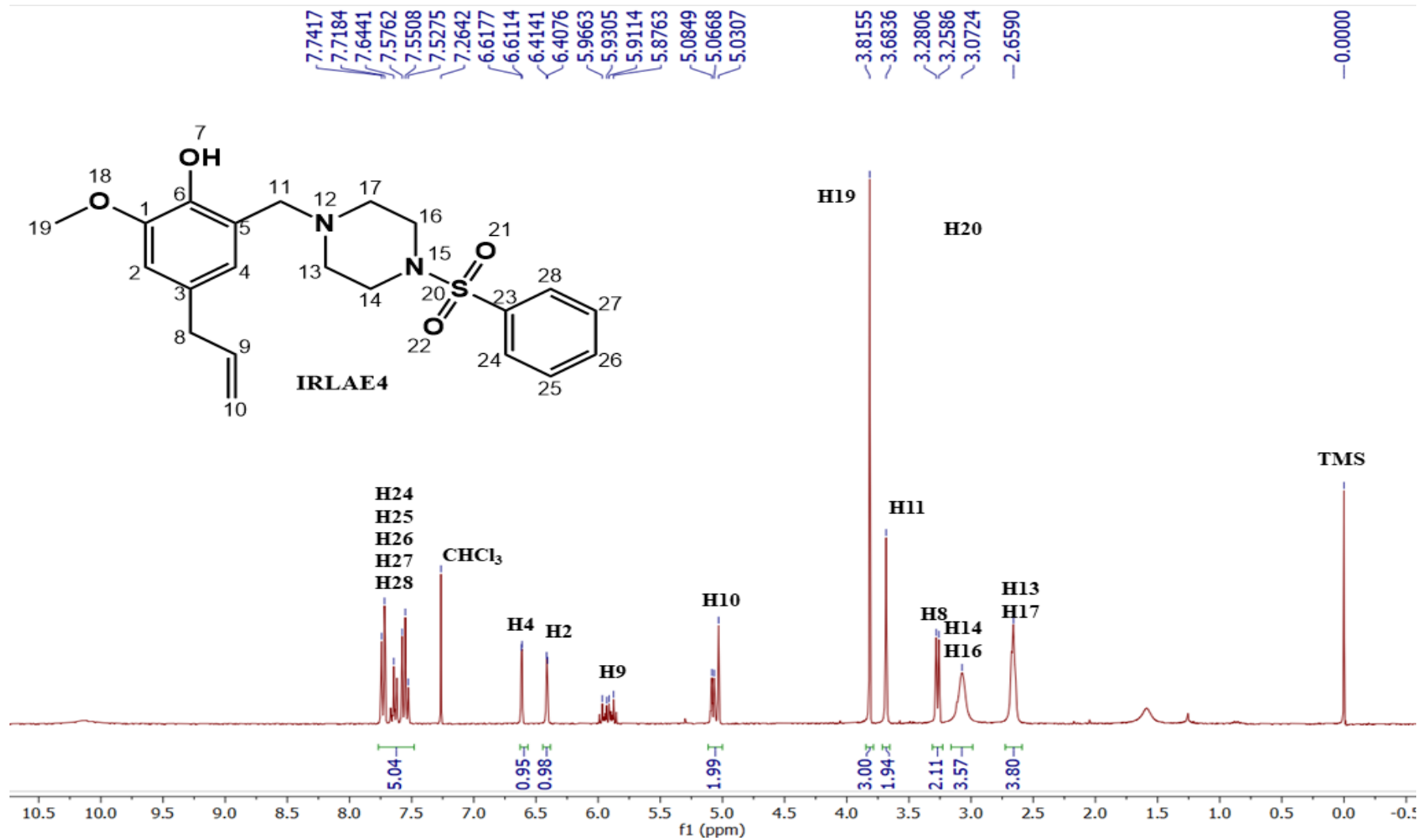
Fonte: Do autor (2023).

Figura 83 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD3 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



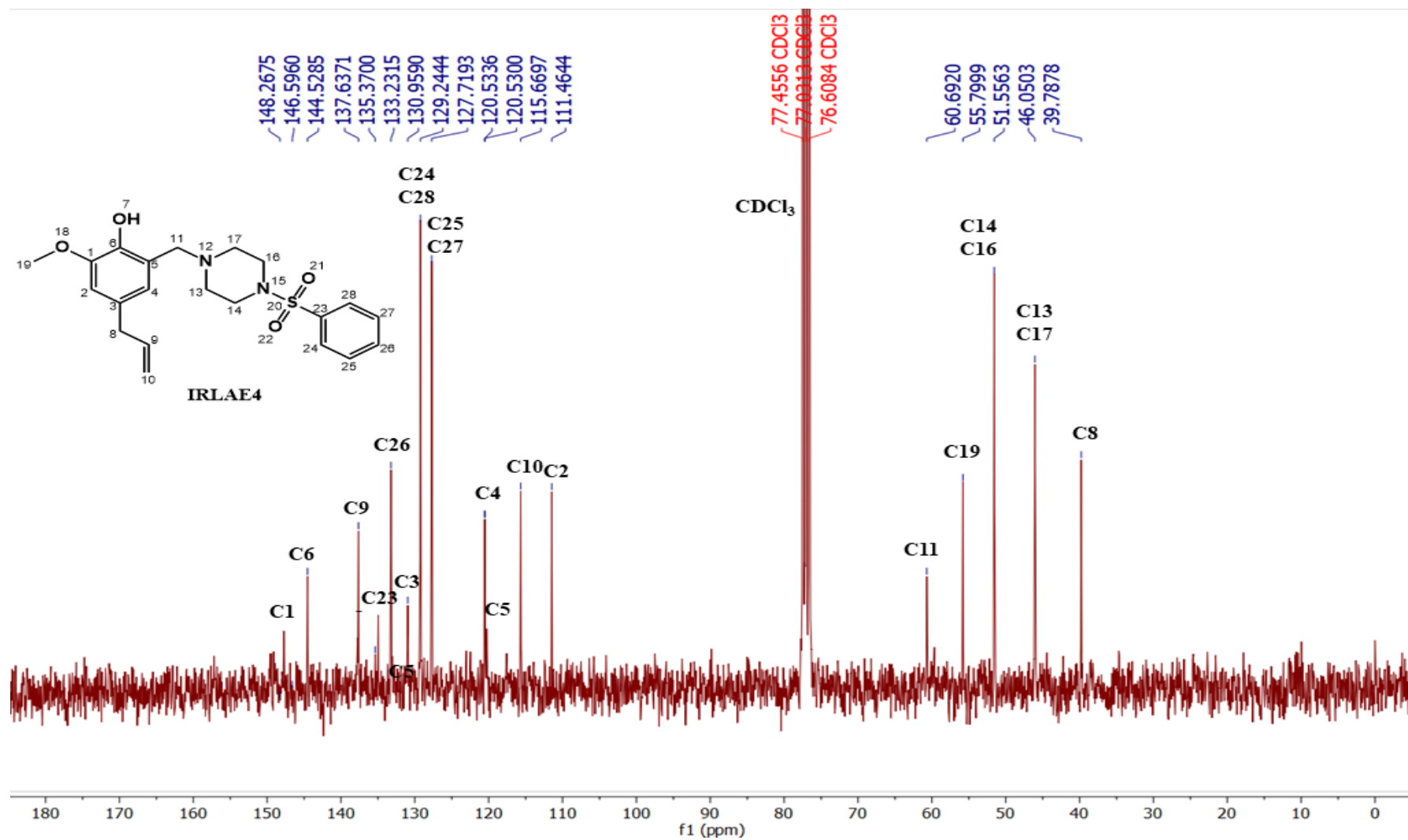
Fonte: Do autor (2023).

Figura 84 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAE4 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



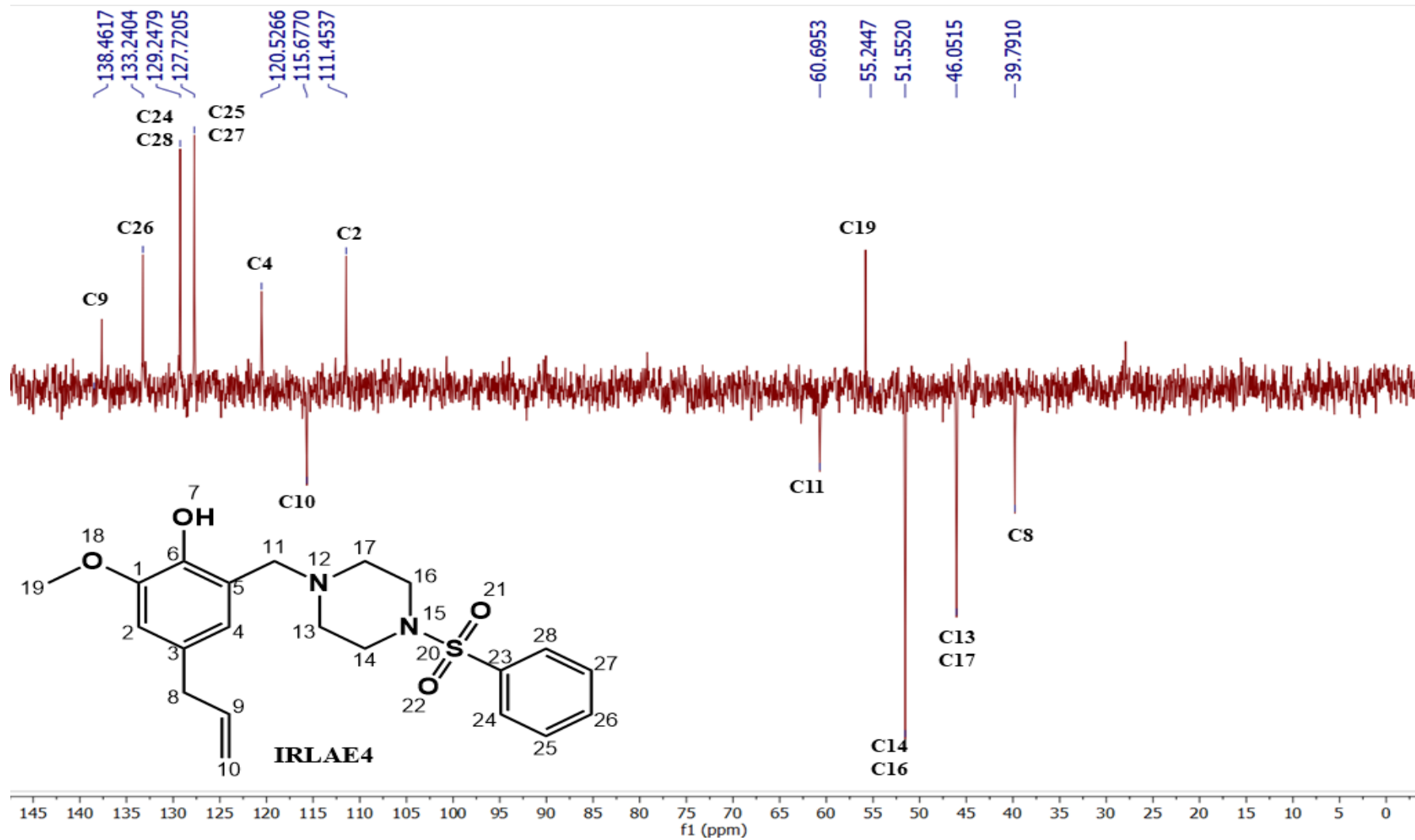
Fonte: Do autor (2023).

Figura 85 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAE4 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



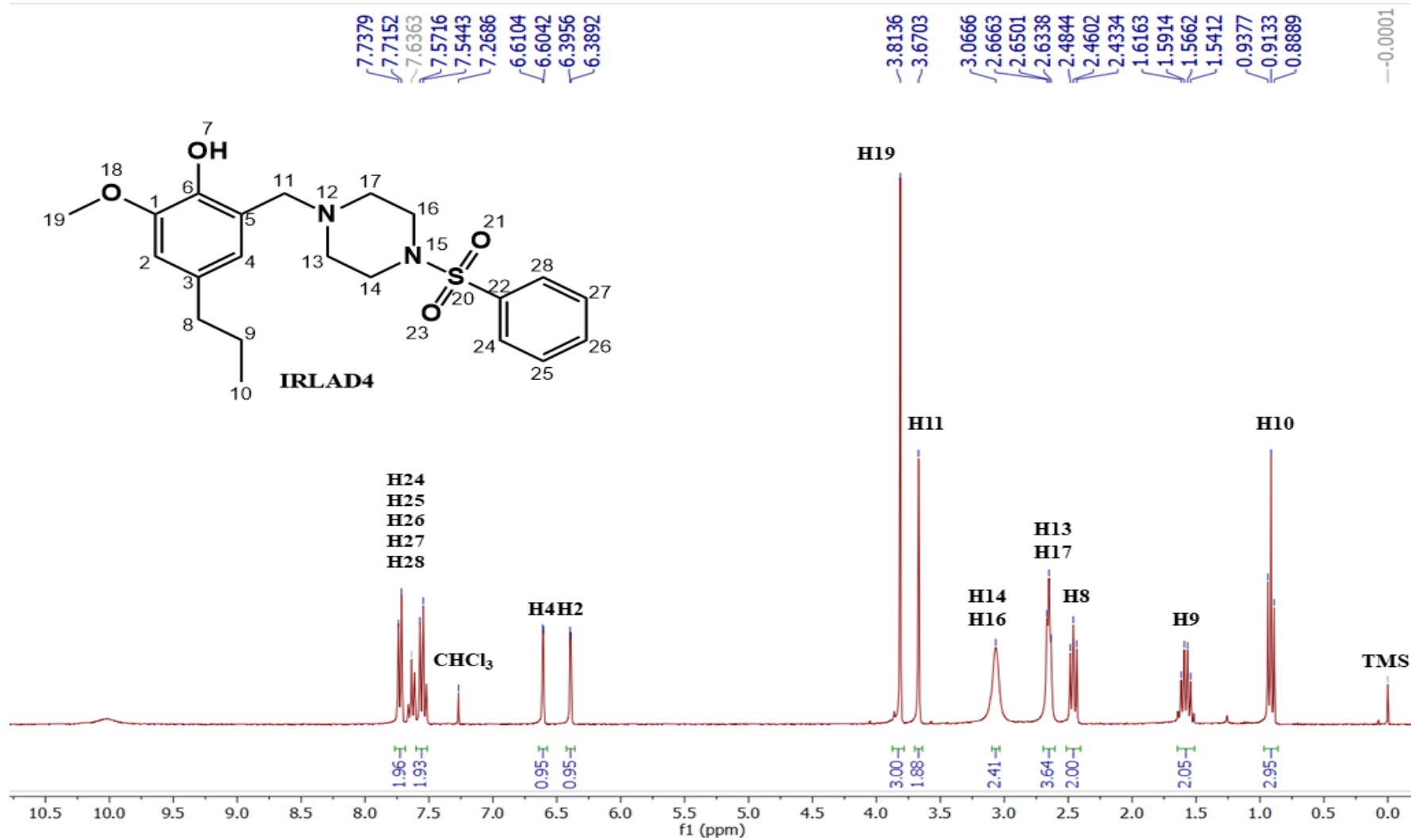
Fonte: Do autor (2023).

Figura 86 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE4 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



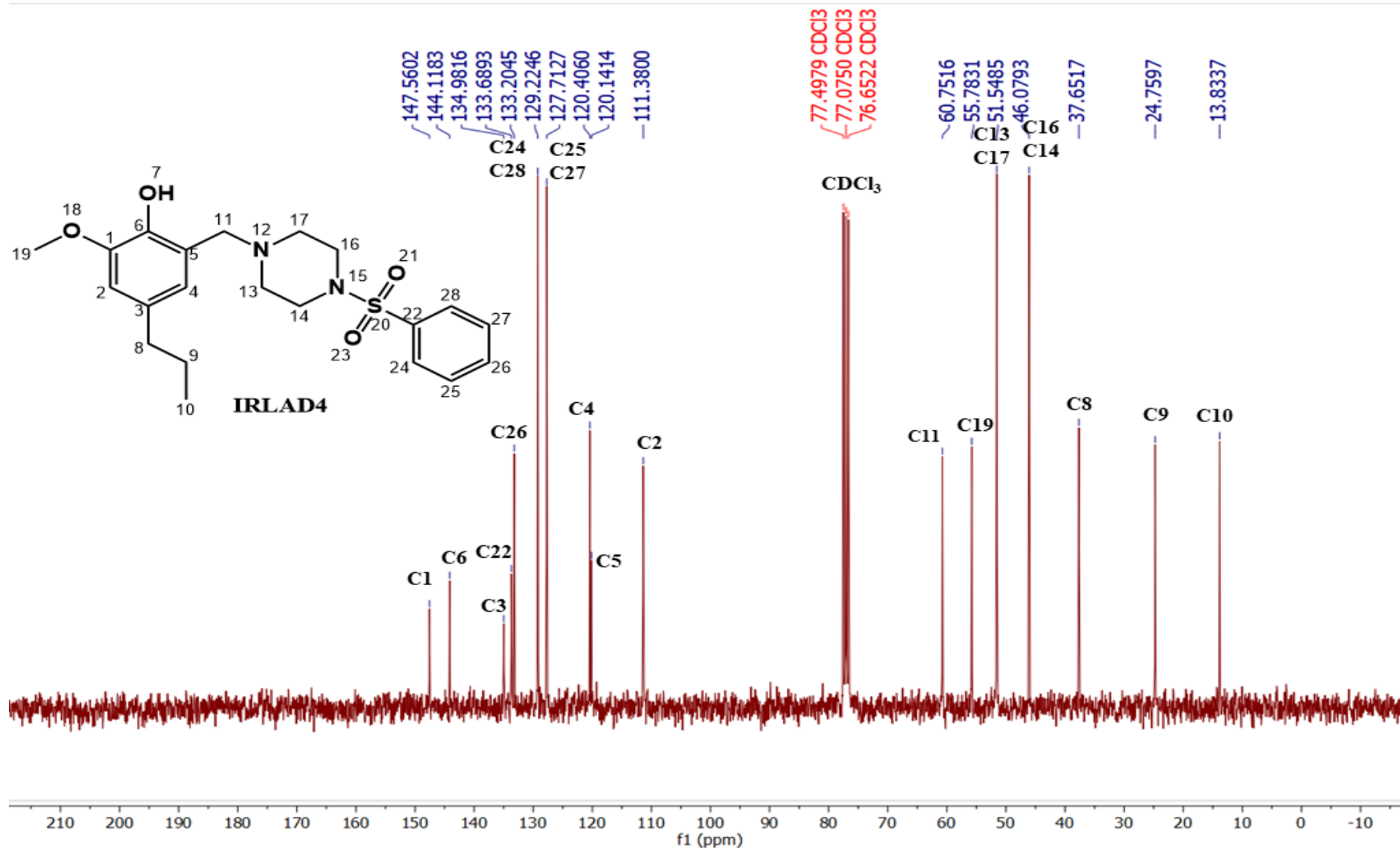
Fonte: Do autor (2023).

Figura 87 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAD4 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



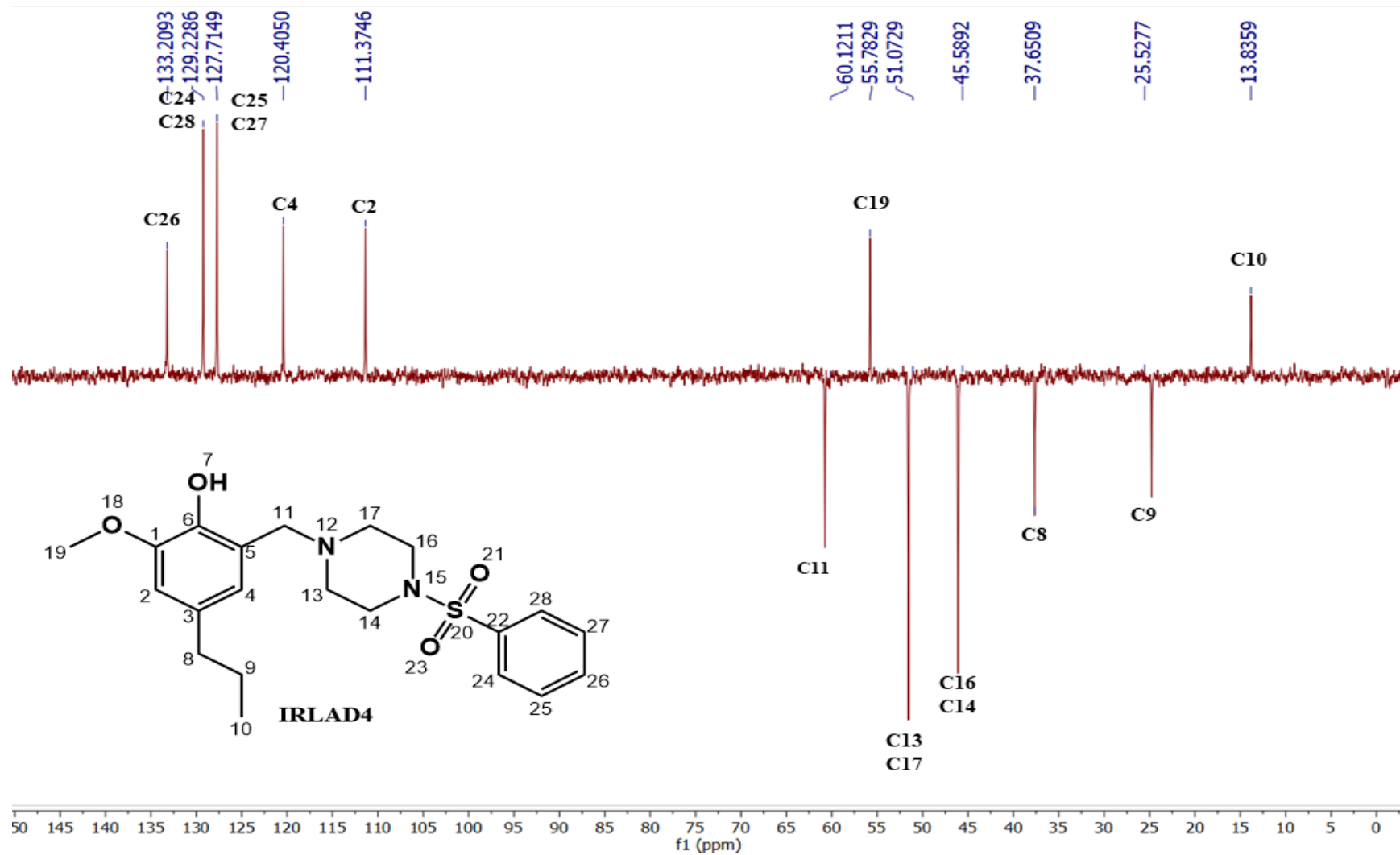
Fonte: Do autor (2023).

Figura 88 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAD4 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



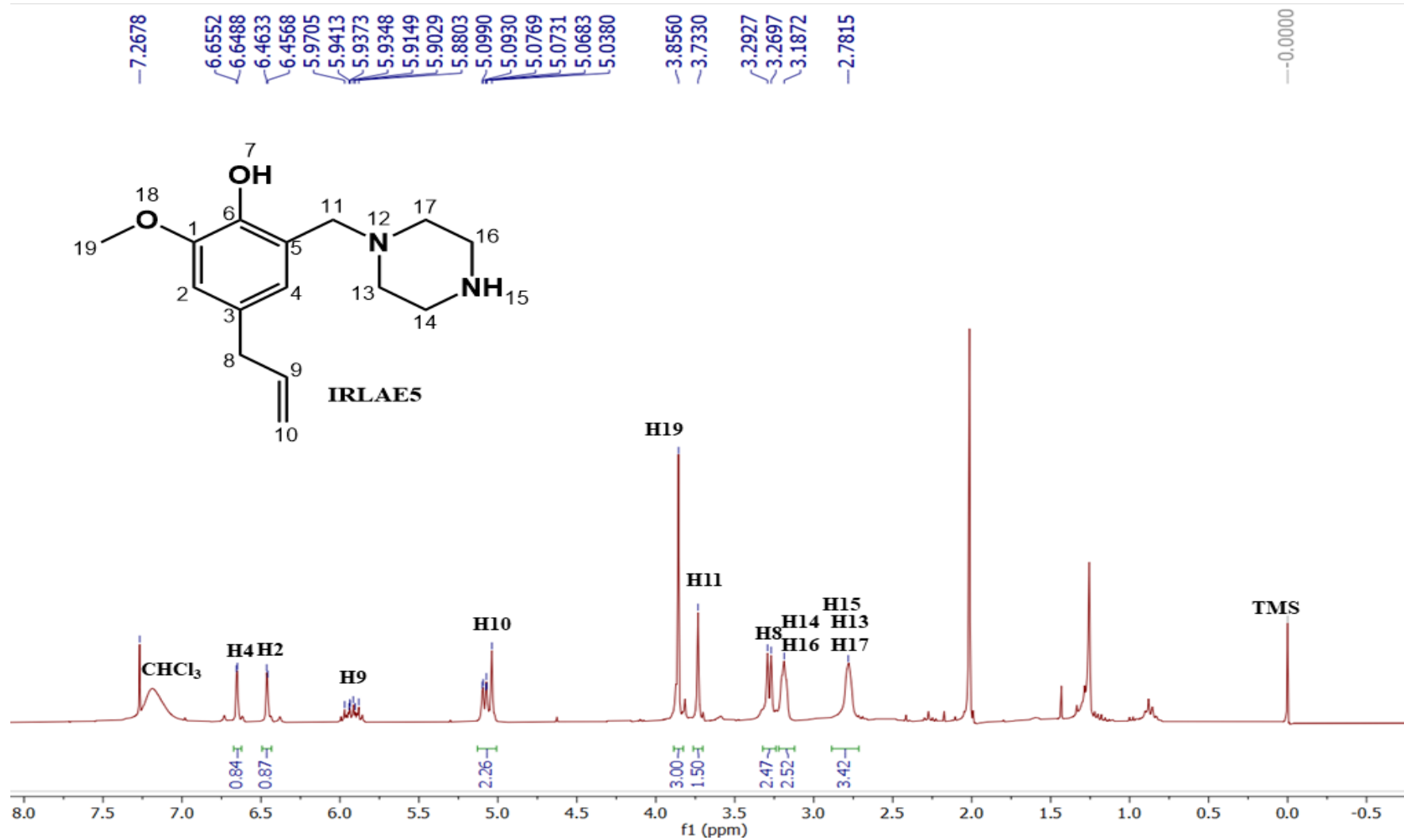
Fonte: Do autor (2023).

Figura 89 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD4 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



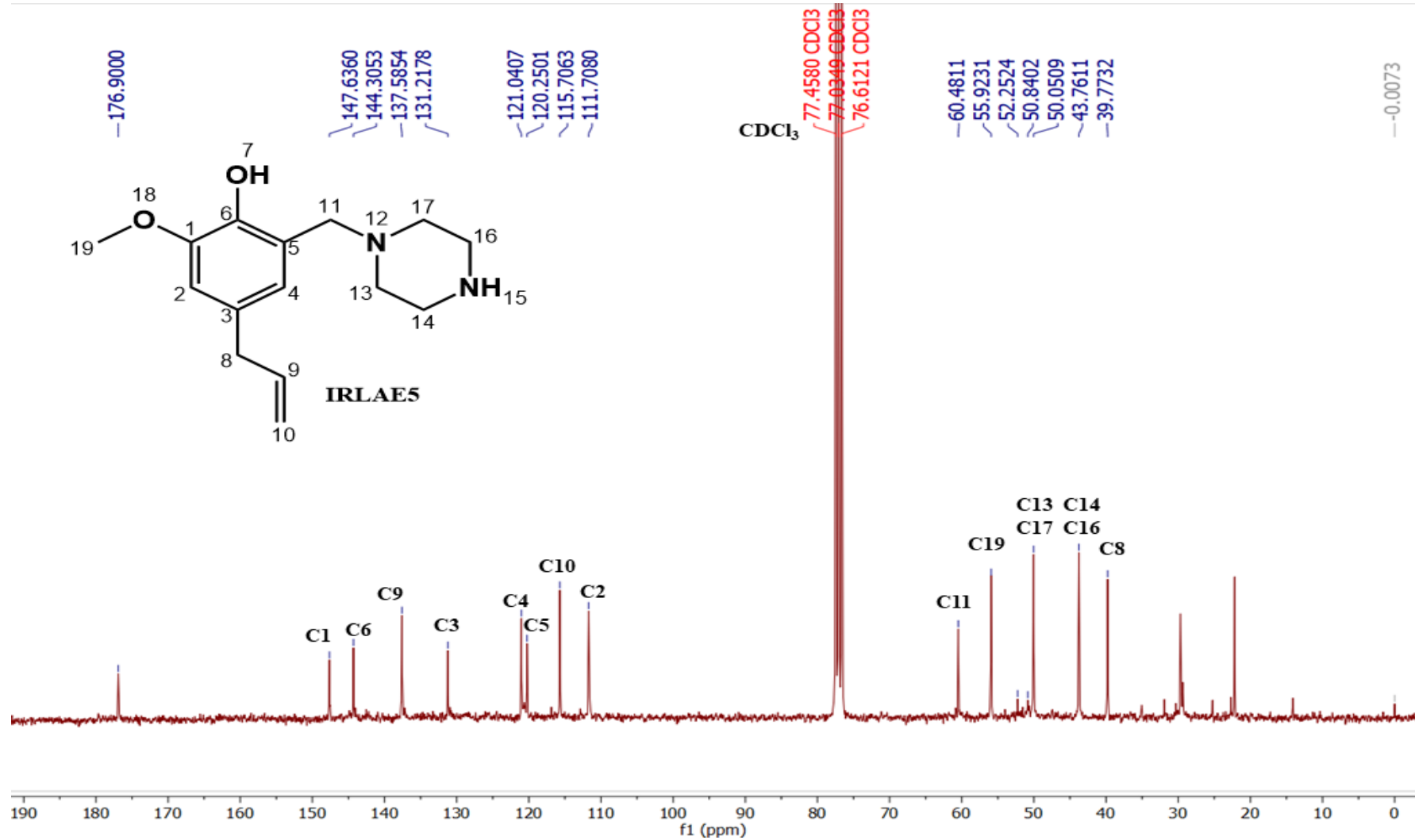
Fonte: Do autor (2023).

Figura 90 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAE5 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



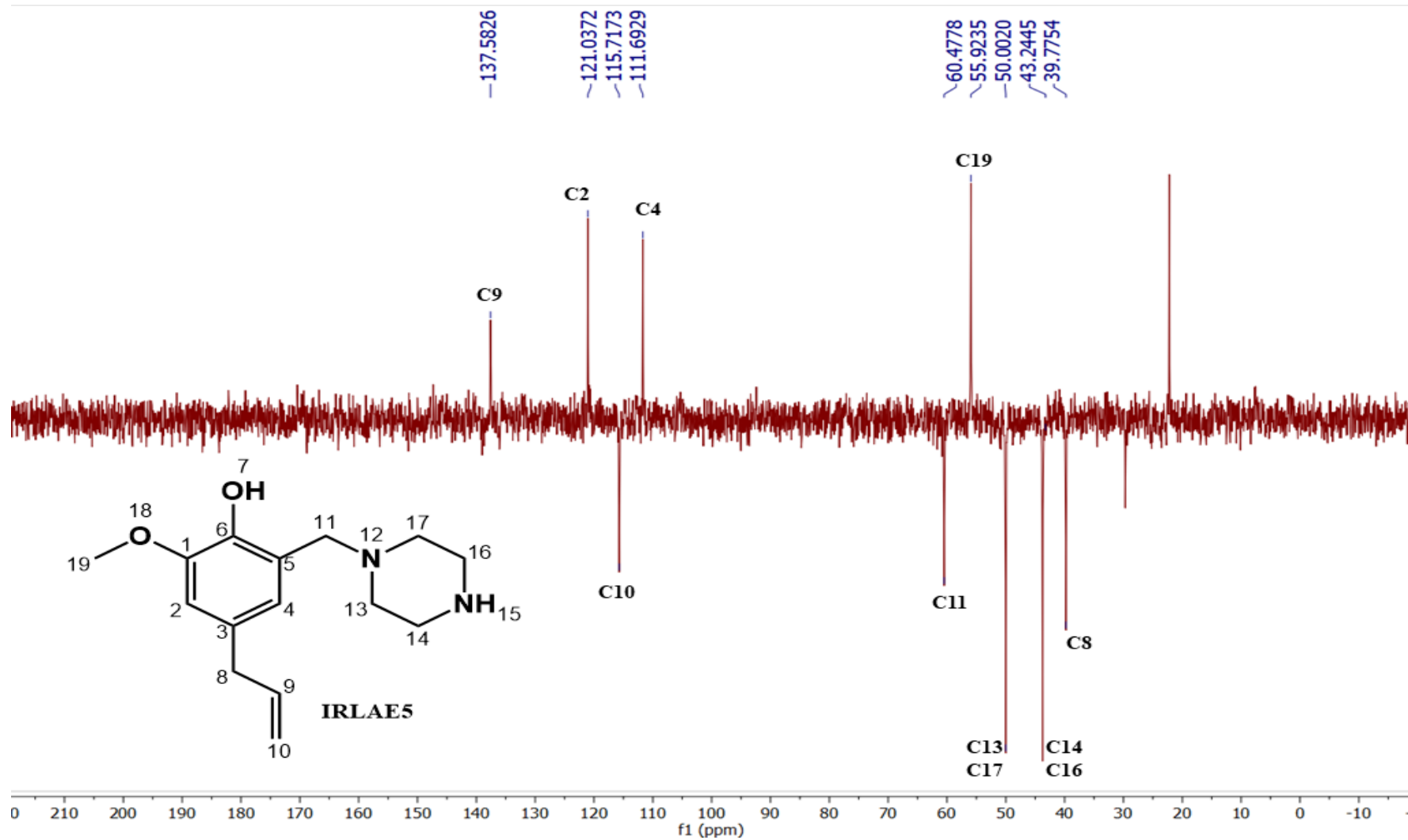
Fonte: Do autor (2023).

Figura 91 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAE5 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



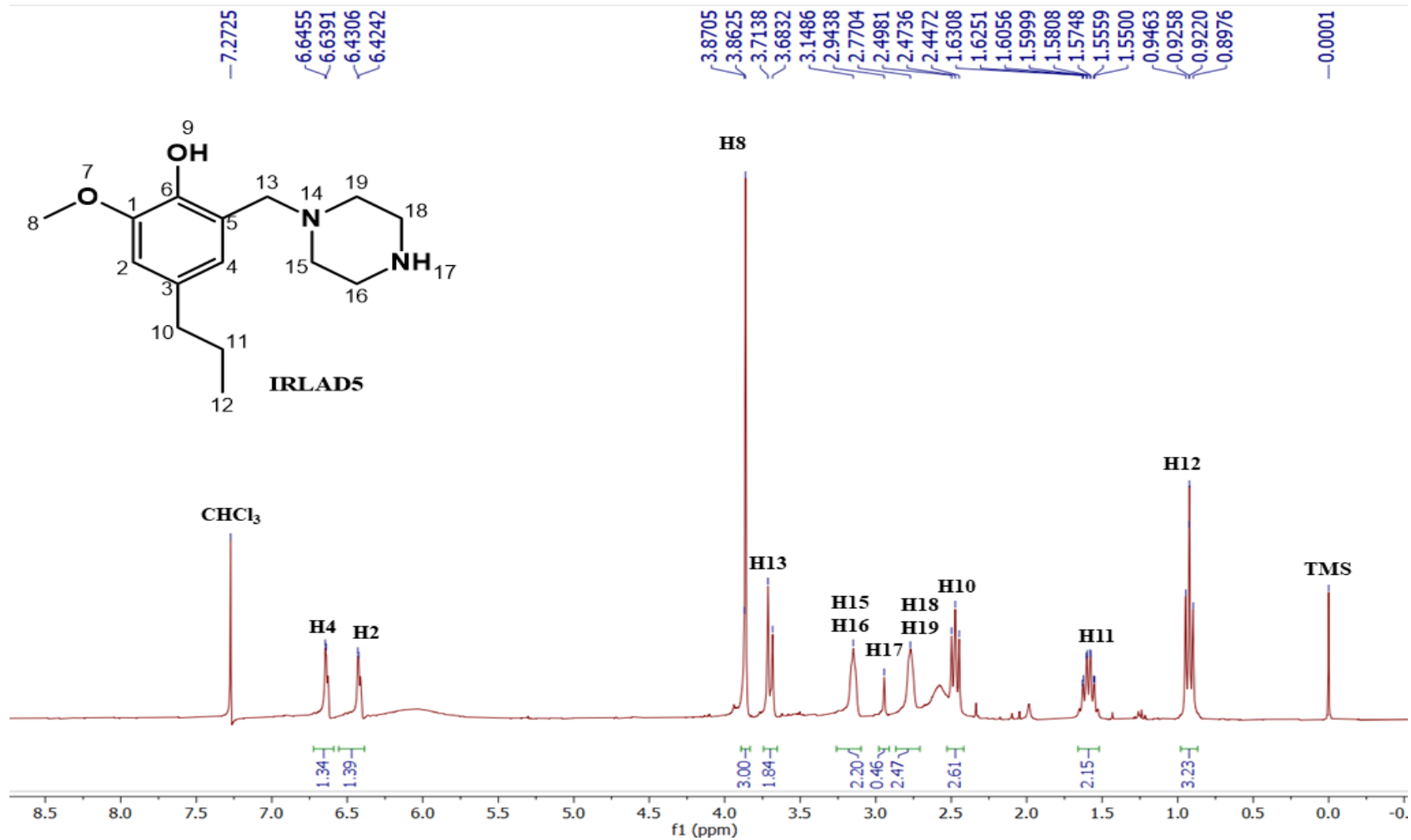
Fonte: Do autor (2023).

Figura 92 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE5 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



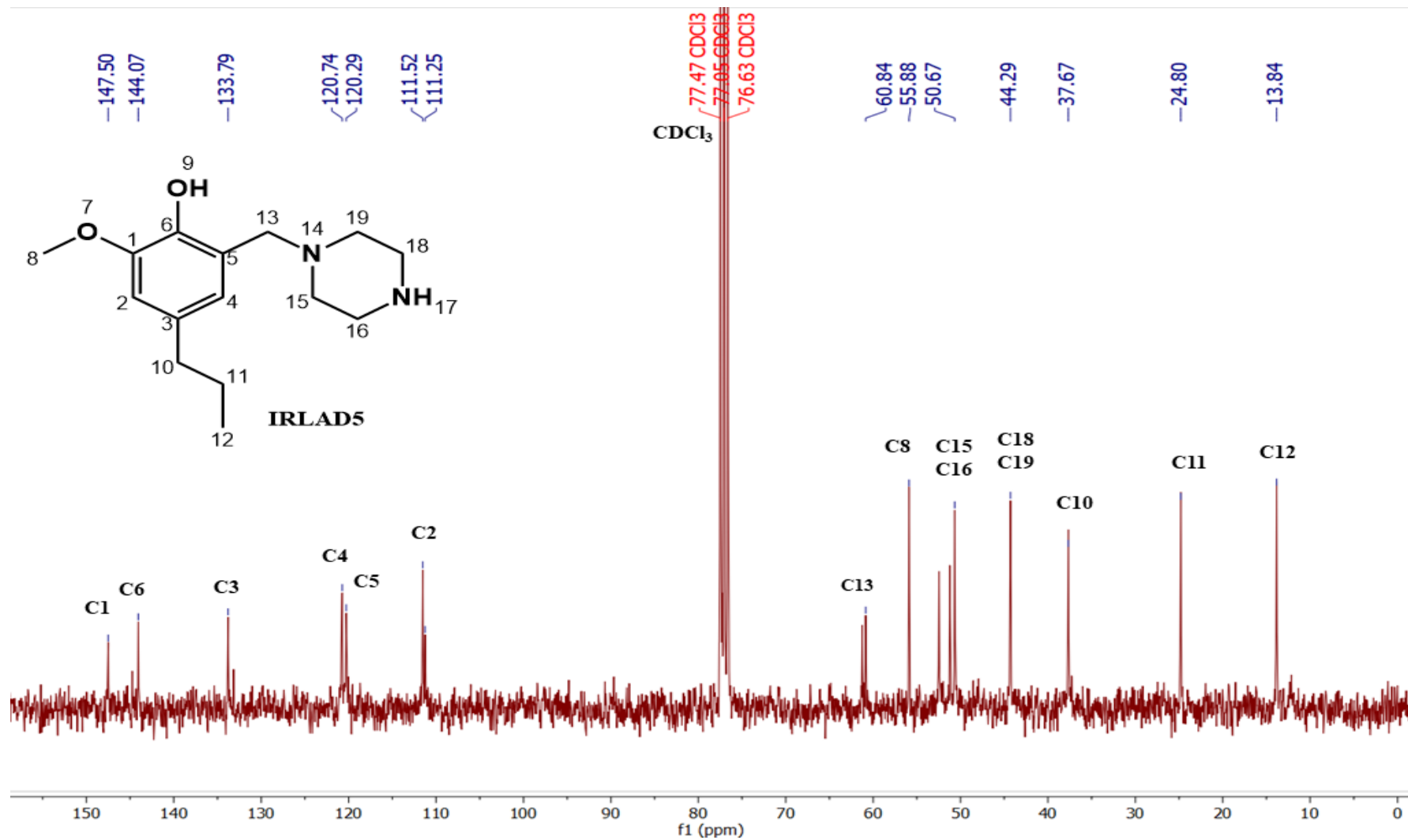
Fonte: Do autor (2023).

Figura 93 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAD5 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



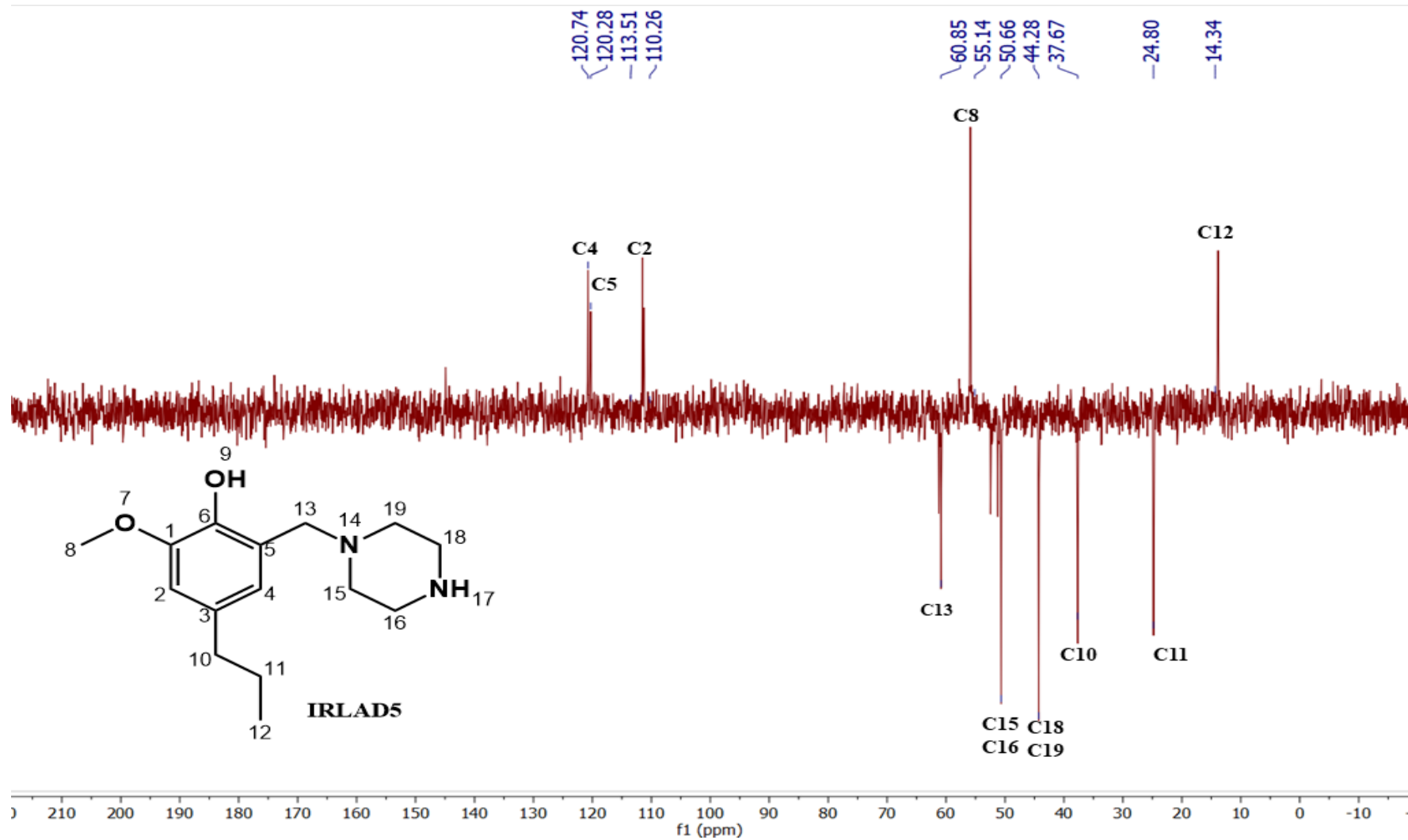
Fonte: Do autor (2023).

Figura 94 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAD5 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



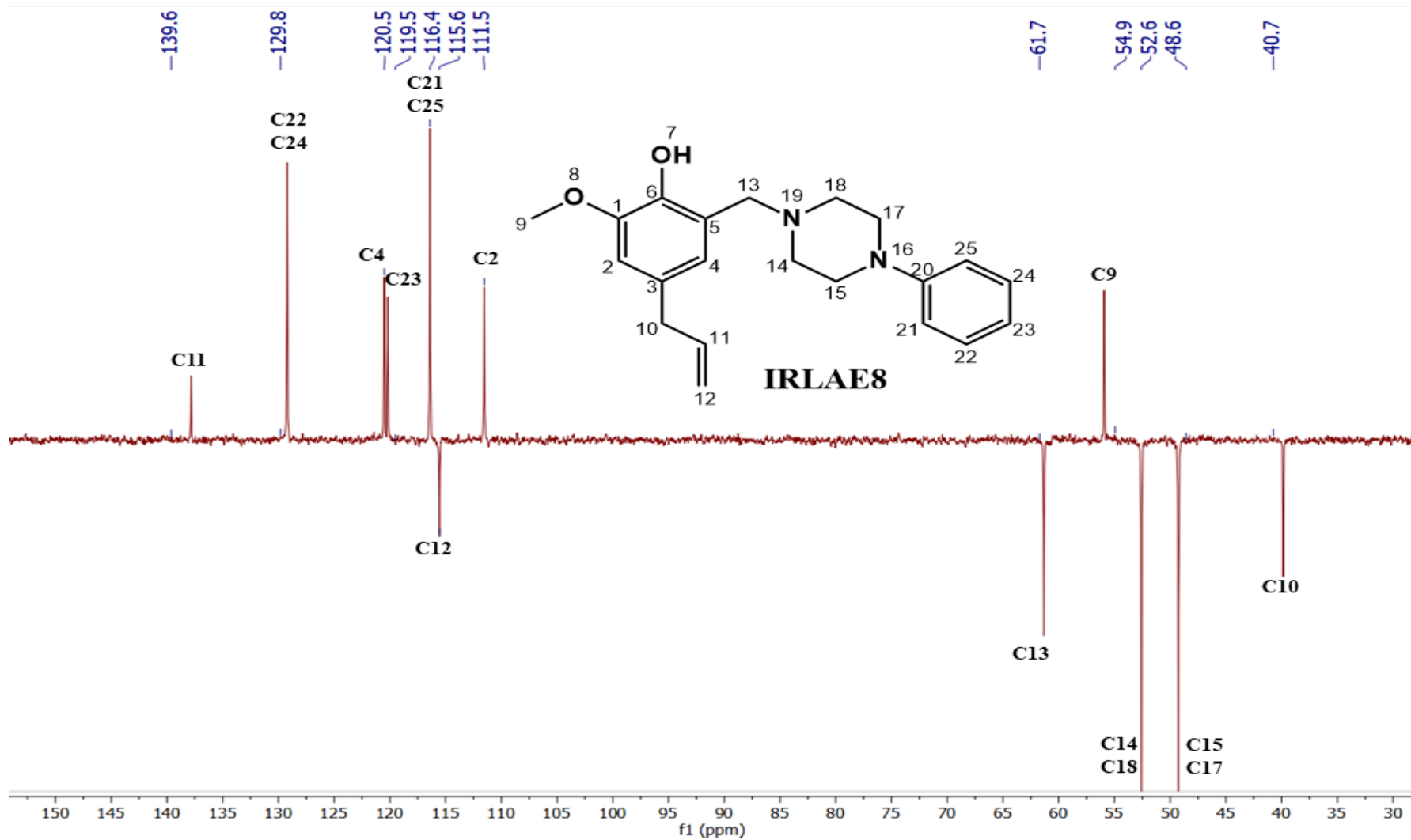
Fonte: Do autor (2023).

Figura 95 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD5 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



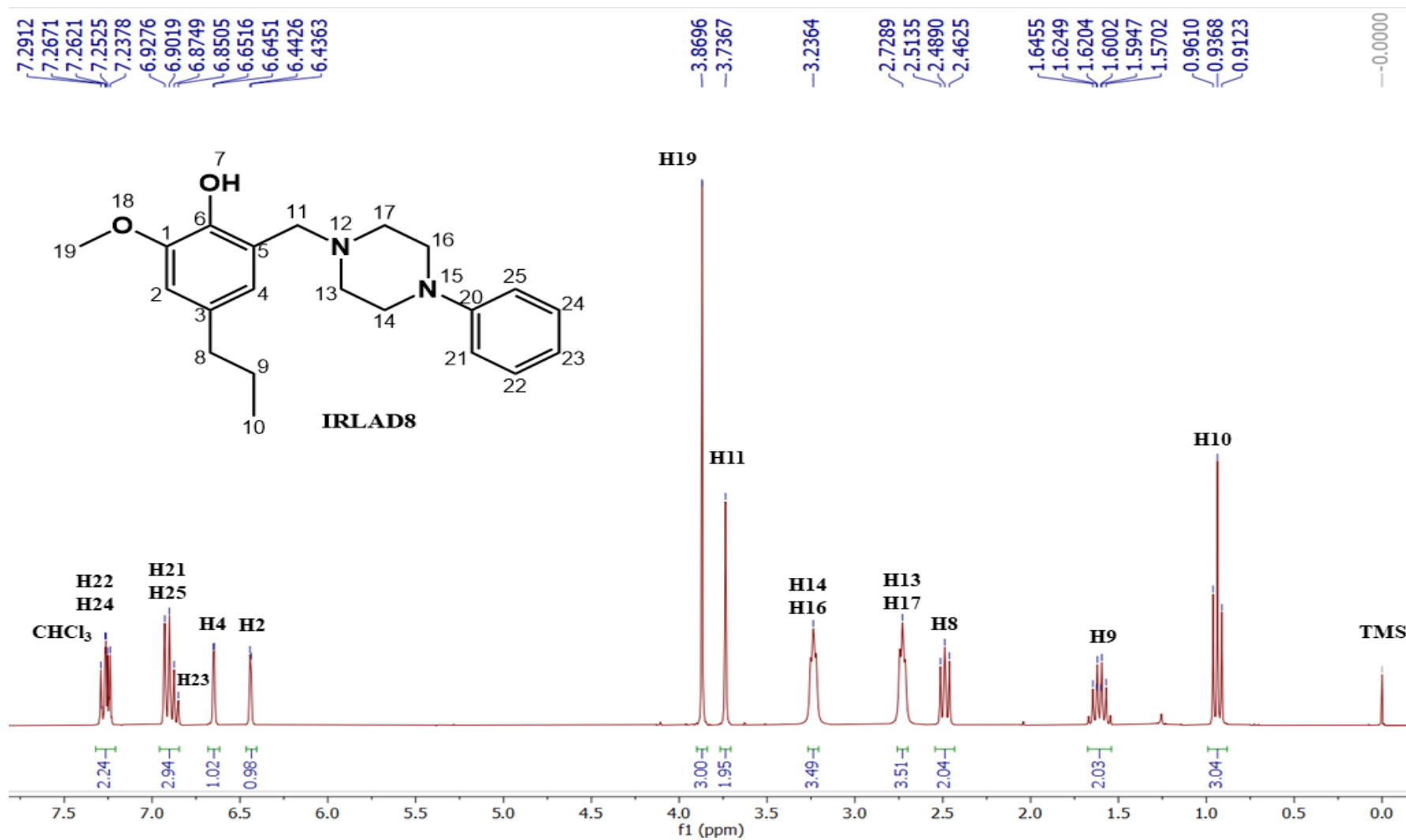
Fonte: Do autor (2023).

Figura 96 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE8 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



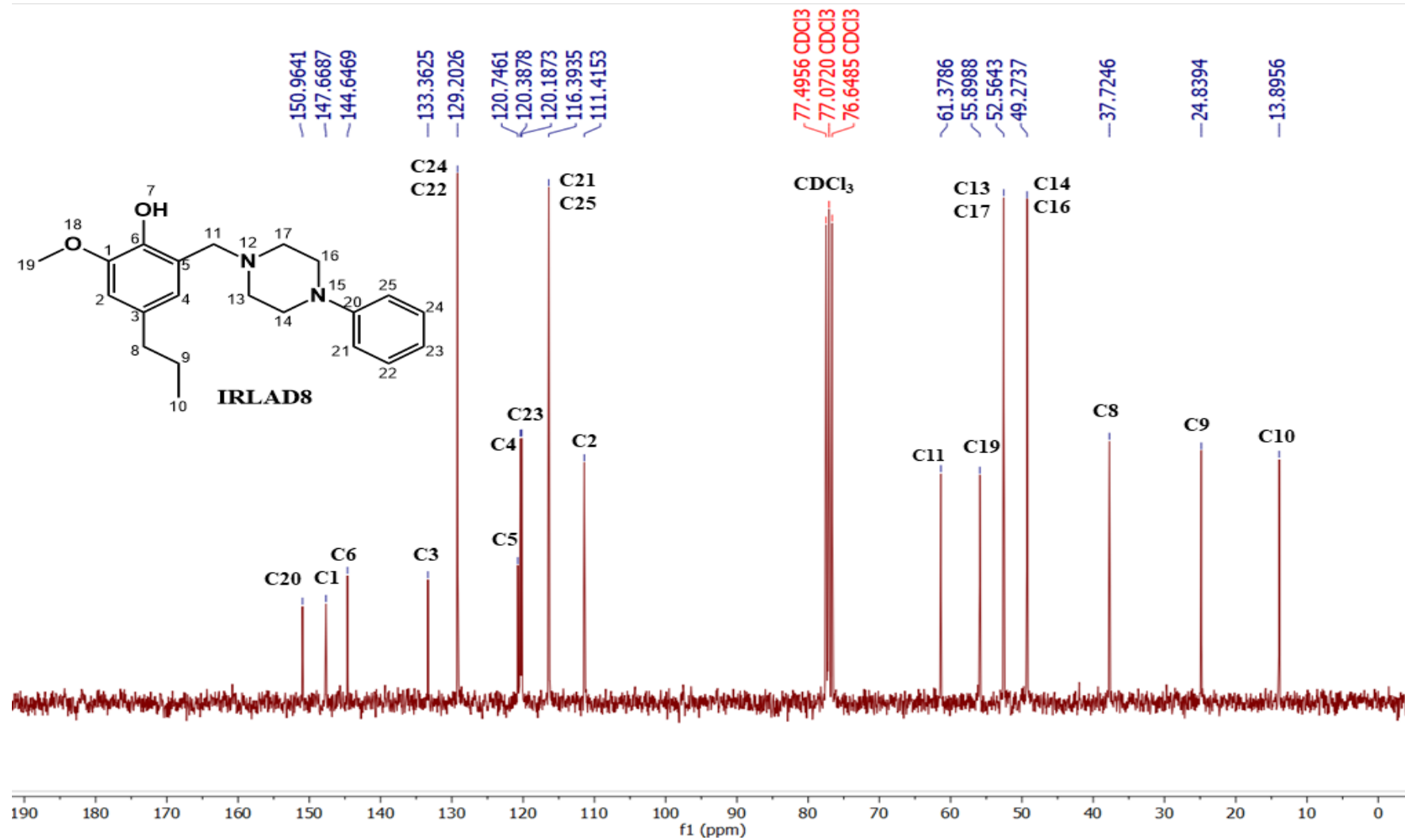
Fonte: Do autor (2023).

Figura 97 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAD8 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



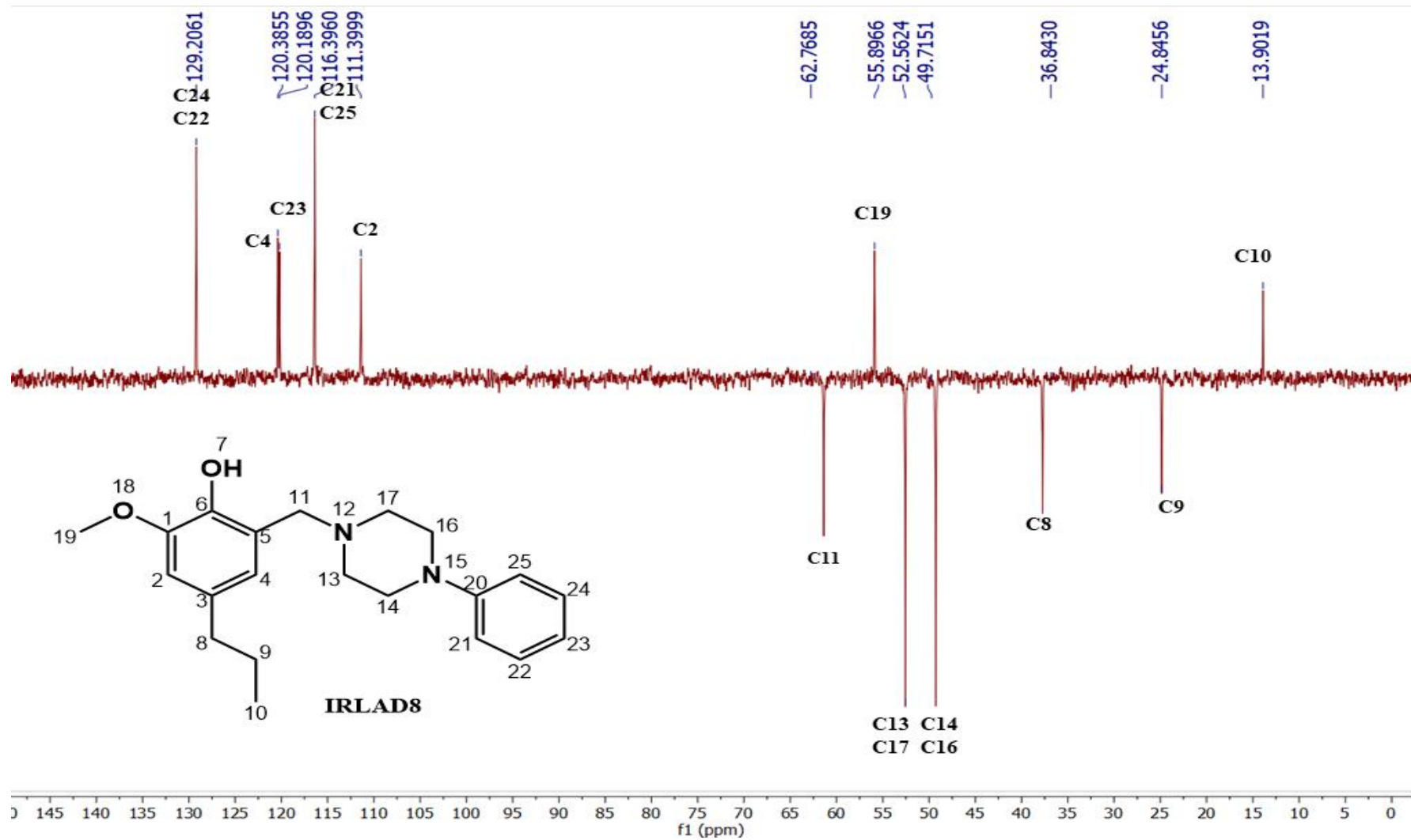
Fonte: Do autor (2023).

Figura 98 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAD8 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



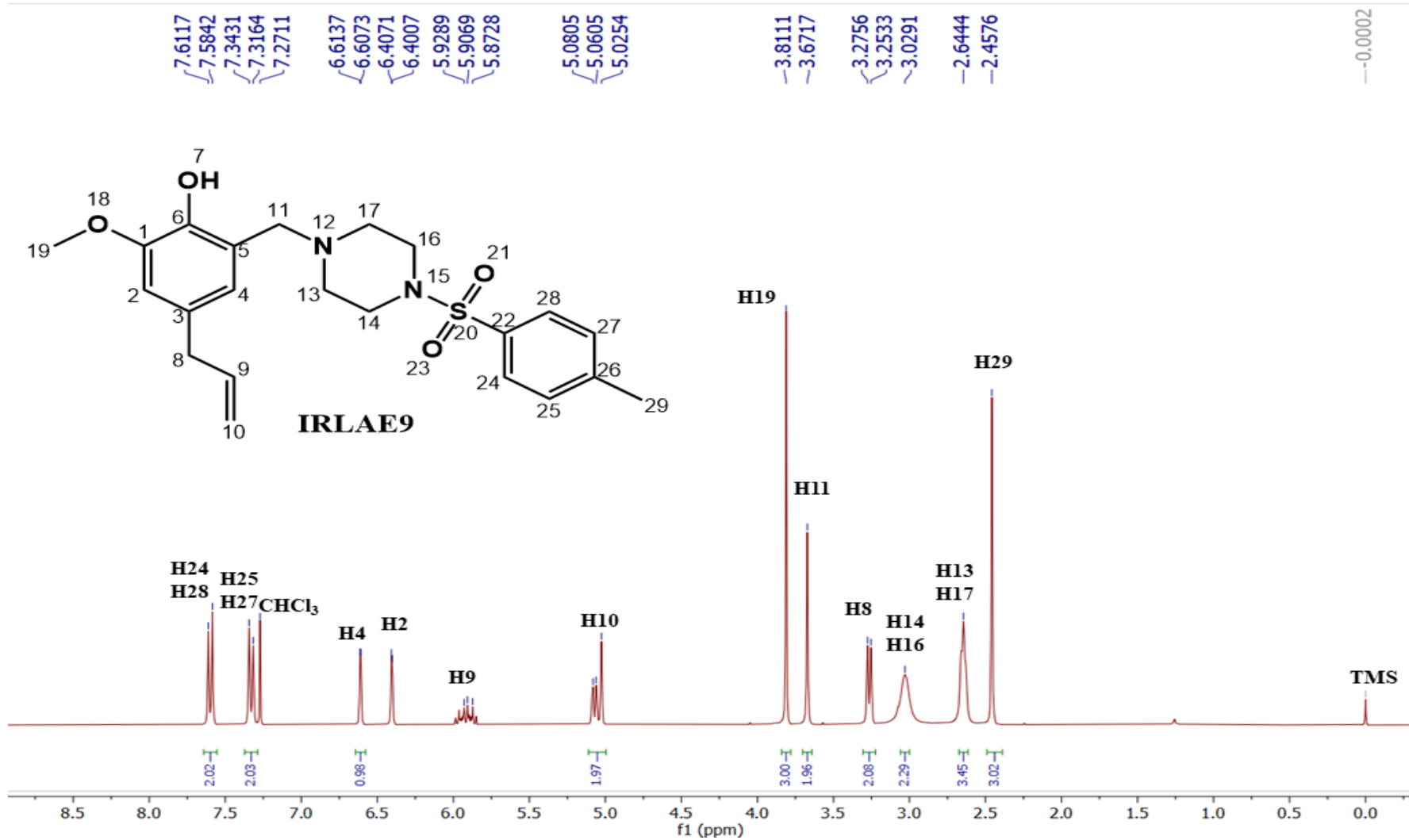
Fonte: Do autor (2023).

Figura 99 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD8 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



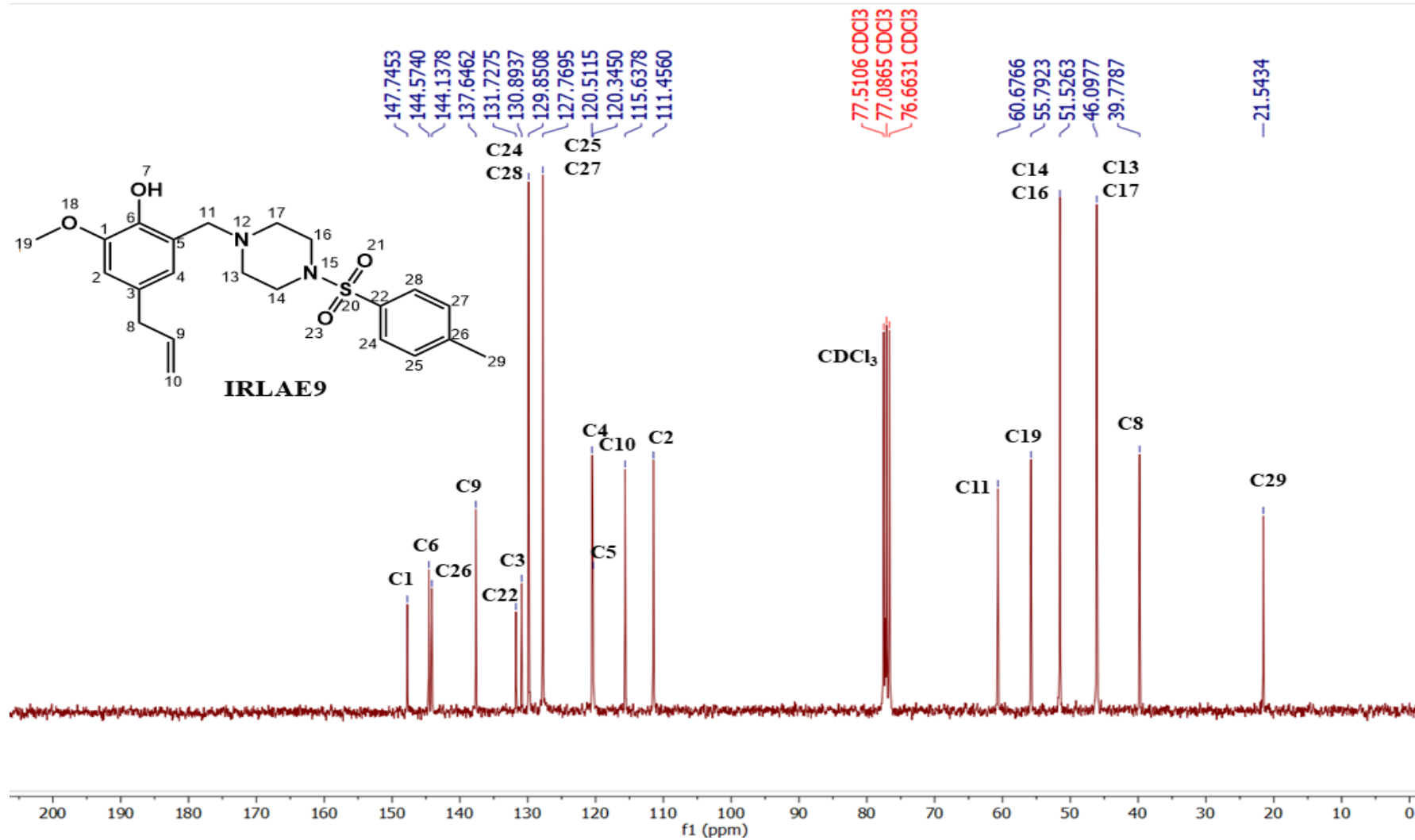
Fonte: Do autor (2023).

Figura 100 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAE9 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



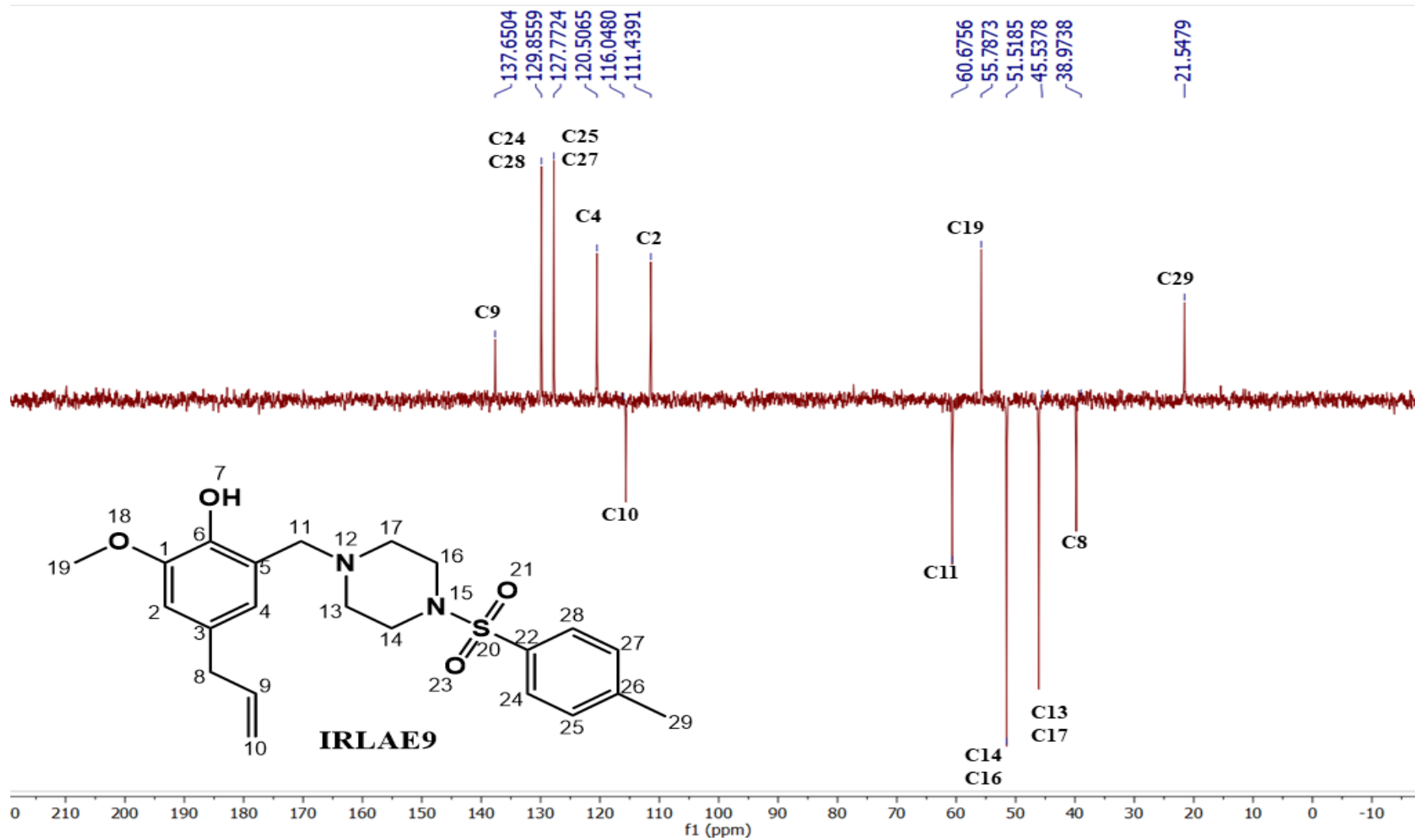
Fonte: Do autor (2023).

Figura 101 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAE9 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



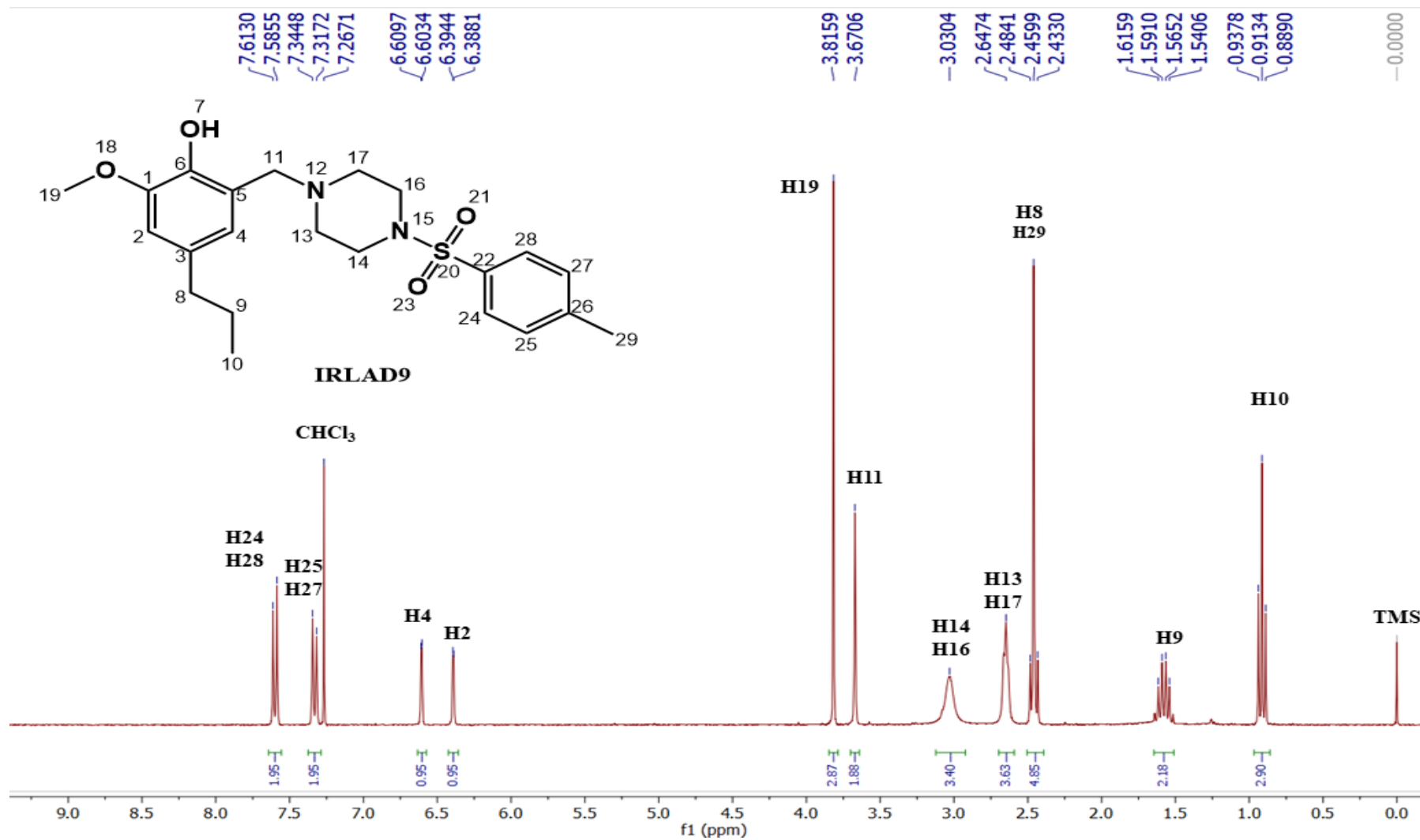
Fonte: Do autor (2023).

Figura 102 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE9 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



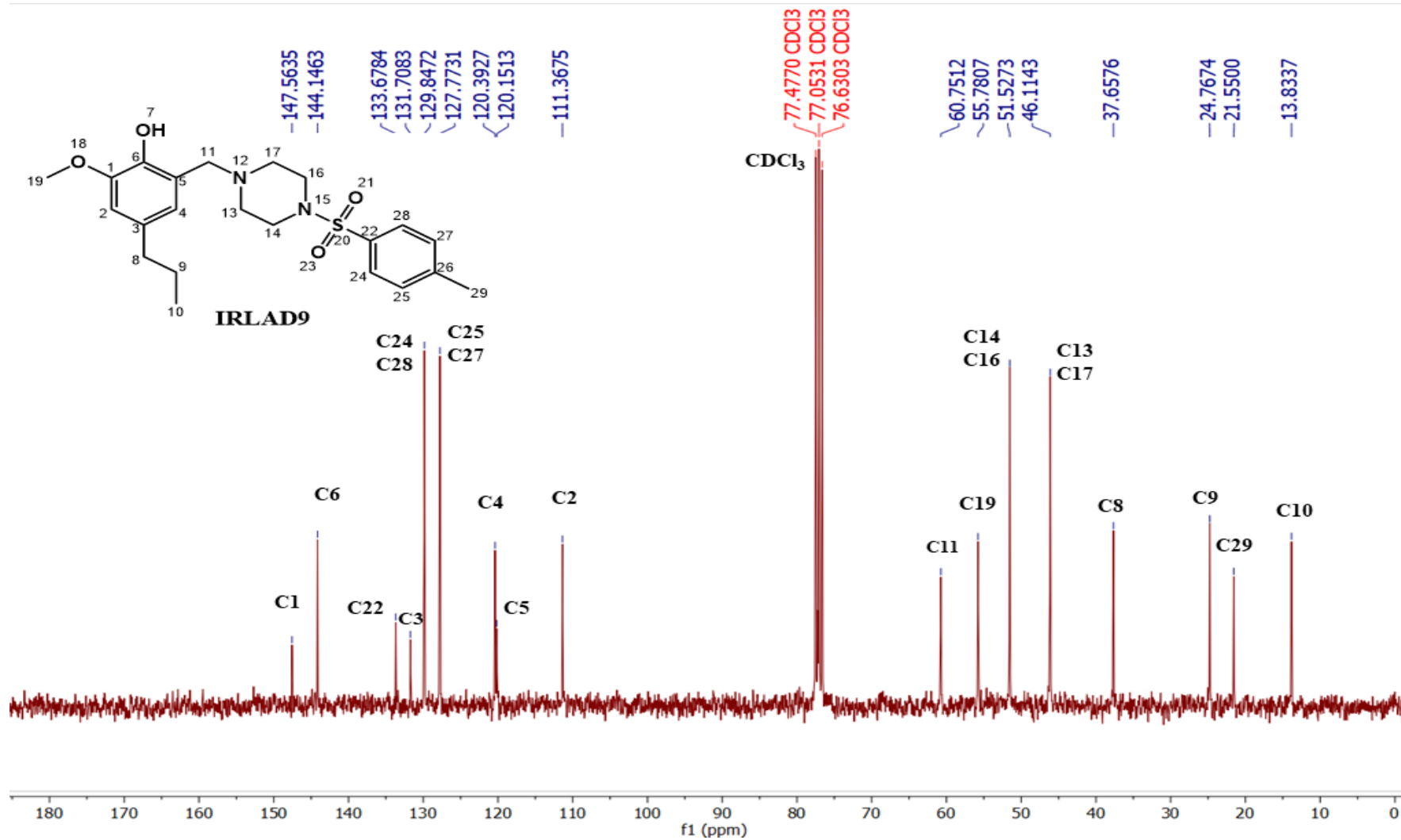
Fonte: Do autor (2023).

Figura 103 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAD9 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



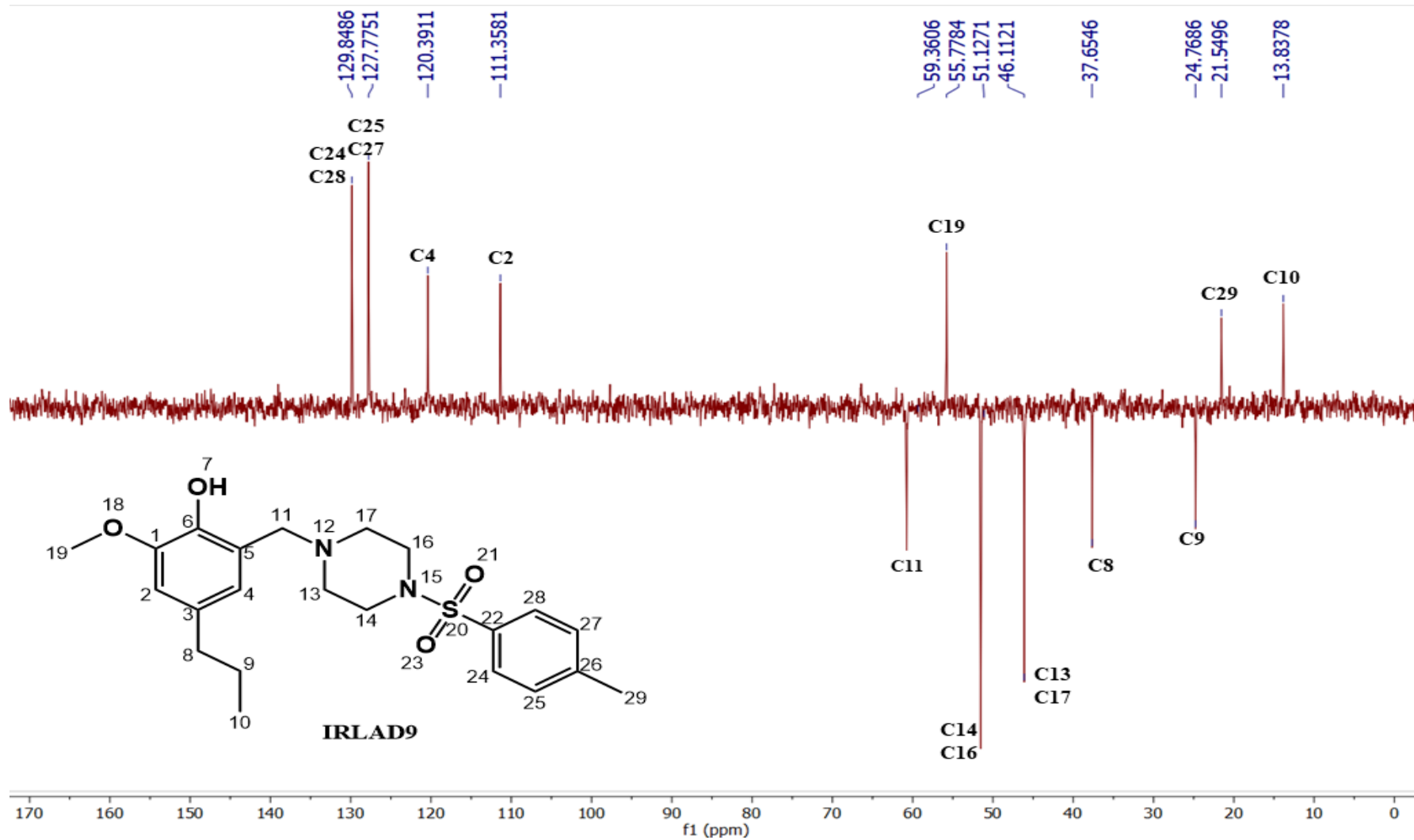
Fonte: Do autor (2023).

Figura 104 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAD9 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



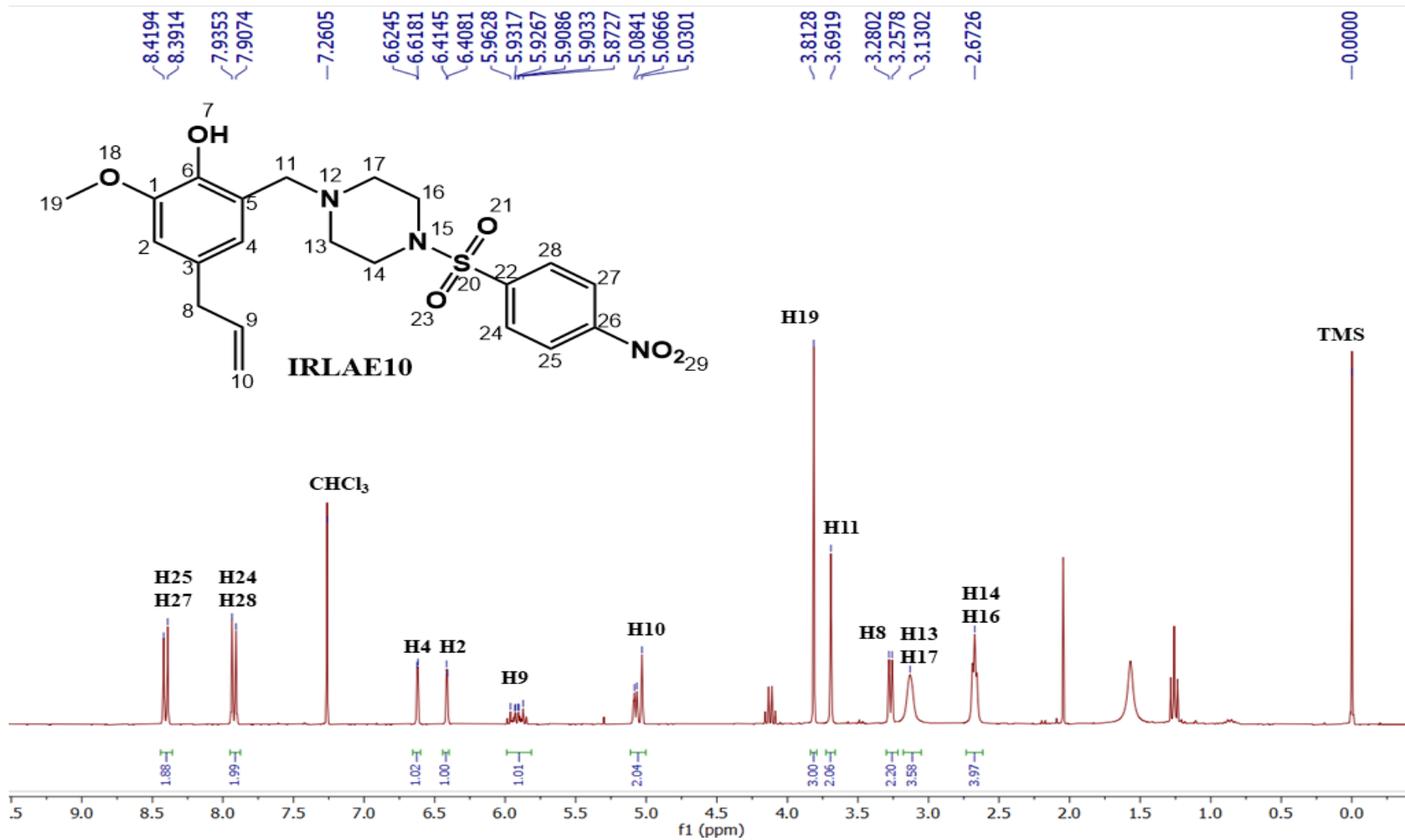
Fonte: Do autor (2023).

Figura 105 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD9 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



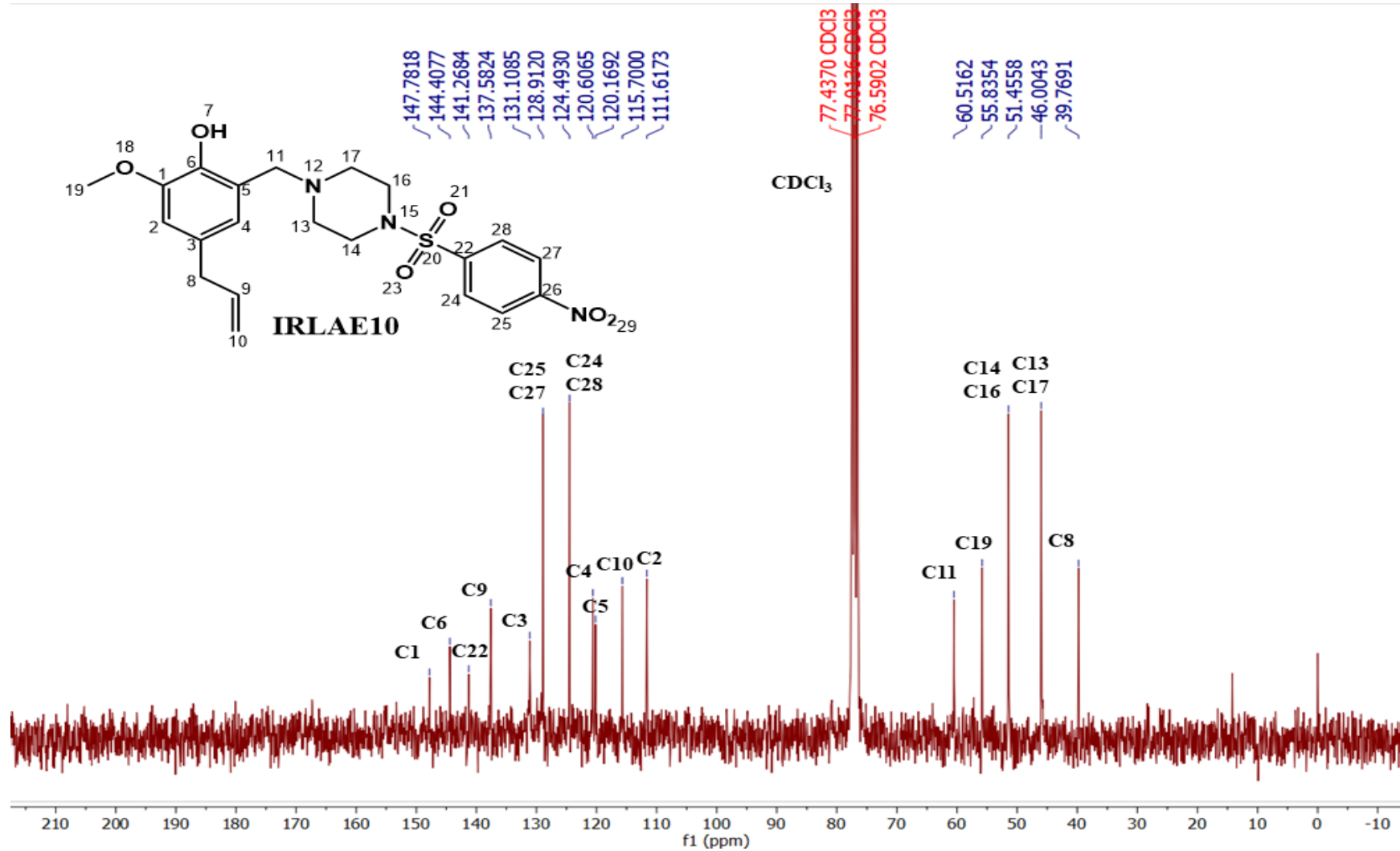
Fonte: Do autor (2023).

Figura 106 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAE10 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



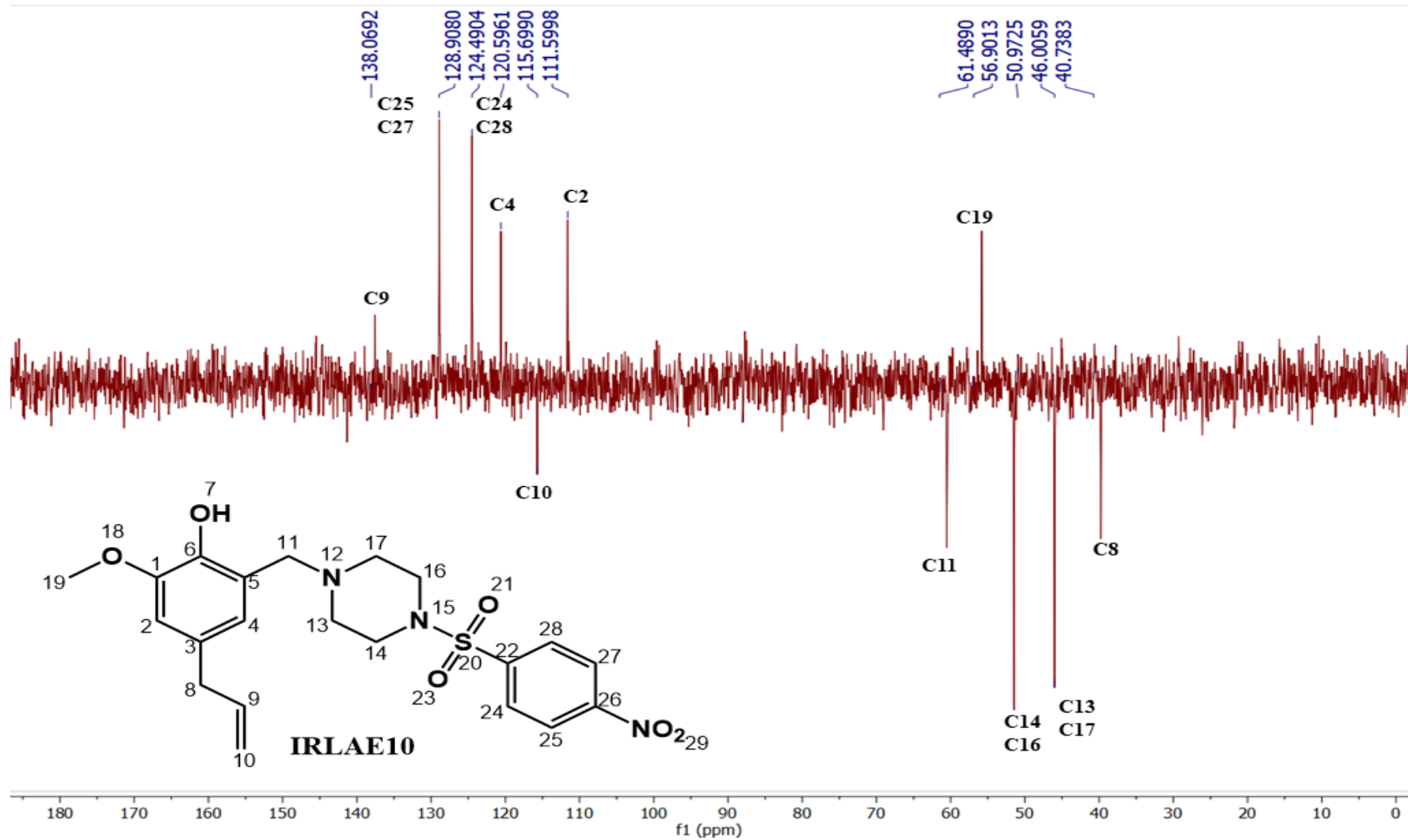
Fonte: Do autor (2023).

Figura 107 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAE10 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



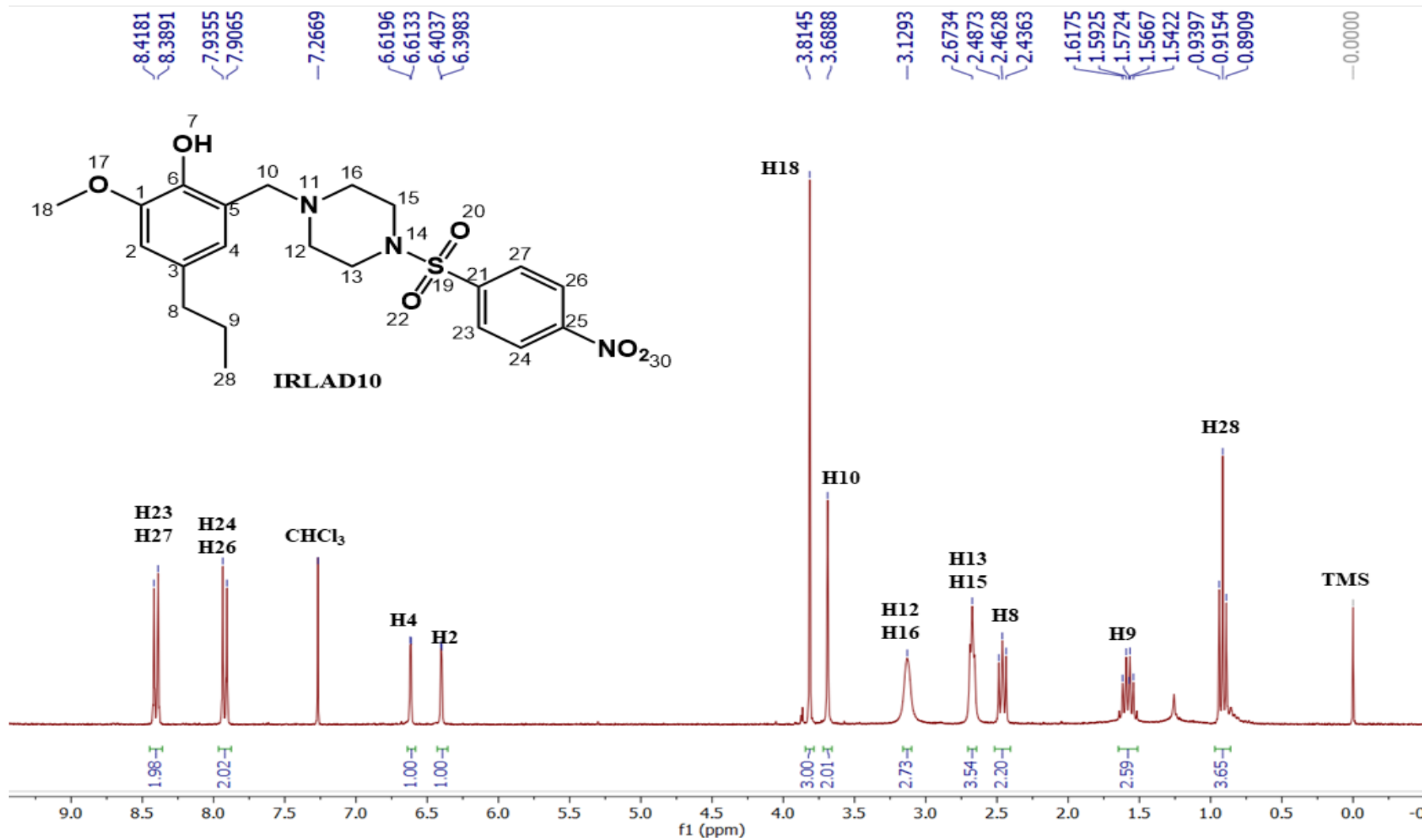
Fonte: Do autor (2023).

Figura 108 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAE10 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



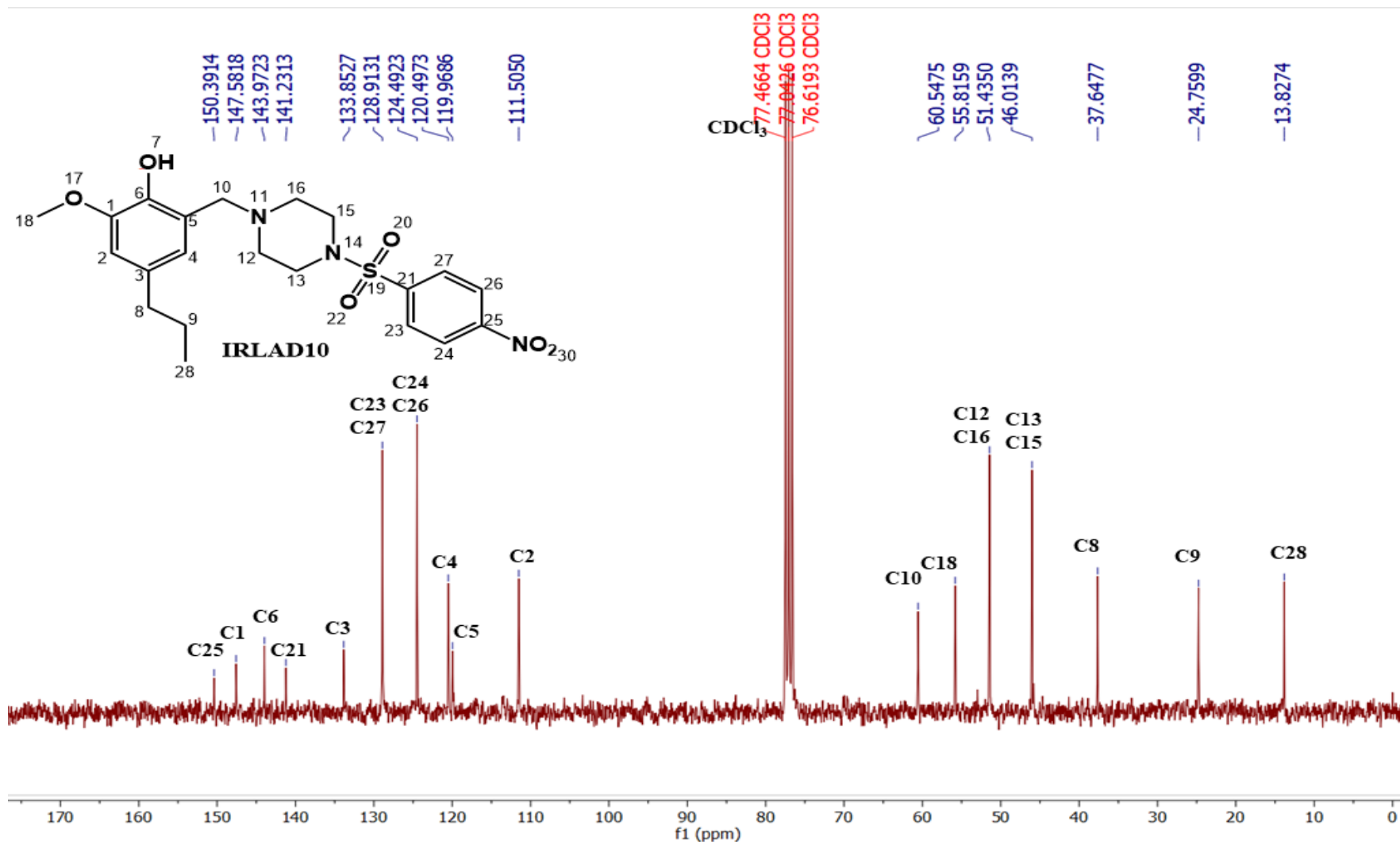
Fonte: Do autor (2023).

Figura 109 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado IRLAD10 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



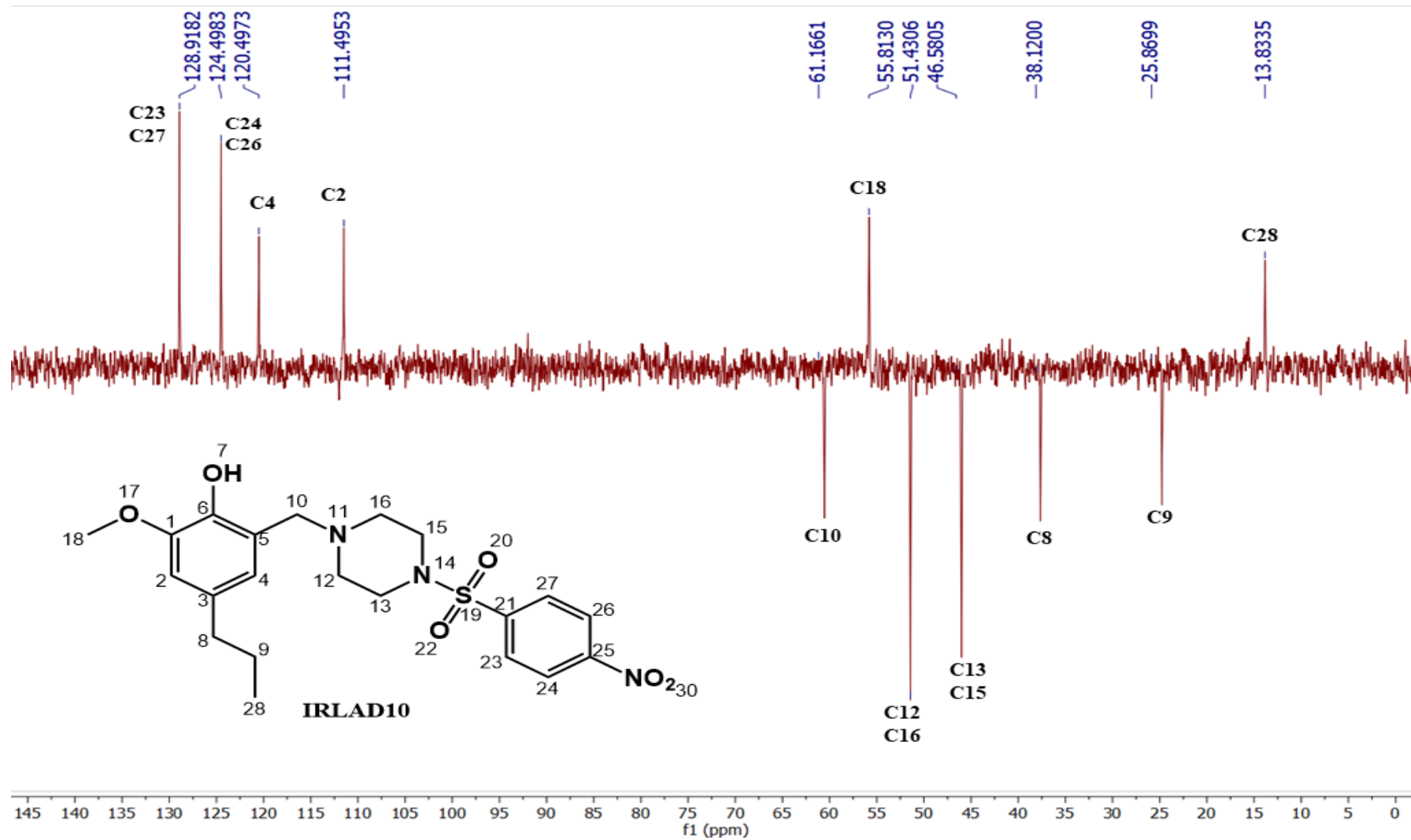
Fonte: Do autor (2023).

Figura 110 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do derivado IRLAD10 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).



Fonte: Do autor (2023).

Figura 111 - Subespectro DEPT-135 do derivado IRLAD10 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz).



Fonte: Do autor (2023).