

POLIANA APARECIDA RODRIGUES GAZOLLA

**SÍNTESE DE DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-
TRIAZÓLICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES LEISHMANICIDA,
CITOTÓXICA, FUNGICIDA E INSETICIDA E OBTENÇÃO DE NOVOS
DERIVADOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS DO EUGENOL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Róbson Ricardo Teixeira

Coorientador: Adilson Vidal Costa

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G291s
2020
Gazolla, Poliana Aparecida Rodrigues, 1988-
Síntese e avaliação das atividades leishmanicida, citotóxica,
fungicida e inseticida de derivados da vanilina contendo o núcleo
1,2,3-triazólico e obtenção de novos derivados 1,2,3-triazólicos
do eugenol / Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla. – Viçosa,
MG, 2020.

491 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Robson Ricardo Teixeira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Triazóis. 2. Vanilina. 3. Eugenol. 4. Citotoxicidade.
5. Leishmaniose. 6. Fungicida. 7. Inseticida. 8. Síntese orgânica.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547

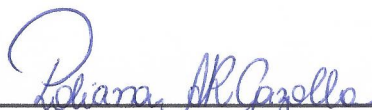
POLIANA APARECIDA RODRIGUES GAZOLLA

**SÍNTESE DE DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-
TRIAZÓLICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES LEISHMANICIDA,
CITOTÓXICA, FUNGICIDA E INSETICIDA E OBTENÇÃO DE NOVOS
DERIVADOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS DO EUGENOL**

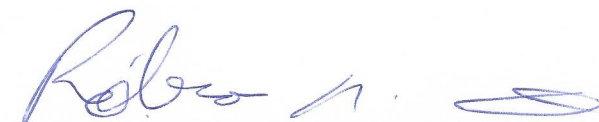
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de março de 2020.

Assentimento:



Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla
Autora



Róbson Ricardo Teixeira
Orientador

Dedico essa tese aos meus amados pais, Antônio e Filomena, por não medirem esforços para a realização de todos os meus sonhos.

Ao meu irmão Pedro pela alegria de tê-lo como irmão.

Ao meu marido Juarez, pela amizade, companheirismo, paciência, apoio e amor.

Aos amigos que sempre torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter me amparado nas maiores dificuldades e por se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

A Nossa Senhora por sempre me abençoar e proteger.

Aos meus amados pais Antonio Carlos e Filomena pelo exemplo, incentivo e apoio. O agradecimento é pequeno diante da grandeza de tudo que sempre fizeram para eu chegar até aqui. Obrigada por acreditarem que eu conseguiria ir tão longe e por sempre estarem presentes nos momentos mais difíceis, com incondicional amor e dedicação.

Ao meu irmão Pedro Antonio por ser exemplo de ser humano e por ter me presenteado com um dos maiores amores da minha vida, Benício.

Ao meu marido Juarez por todo o seu amor, carinho, companheirismo e paciência diante de todo o meu cansaço e desânimo.

Ao professor Róbson Ricardo Teixeira, por toda atenção, incentivo, apoio e confiança ao longo destes anos de trabalho e convivência. Por ter compartilhado sua experiência, profissionalismo, motivação e acima de tudo a humanidade, reconhecendo que somos pesquisadores e seres humanos com dificuldades ao longo dessa jornada.

À minha prima-irmã Luana por me acolher junto a sua família com tanto amor e cuidado.

À minha amiga-irmã Ana Paula pelo apoio, orações e por compartilhar alegrias, tristezas e confidências. Nosso encontro de alma foi um dos maiores presentes que a vida me deu.

Aos amigos Wagner, Juliana, Michelle e Francielle pela amizade e por sempre estarem à disposição nos momentos que eu precisei.

Às amigas, Ângela, Cecília, Crístielle, Dayana, Lívia e Bianca por todo carinho, torcida, risadas e encontros que pra sempre serão lembrados.

Aos familiares pelas orações, torcida e por terem contribuído, mesmo que de forma indireta, para a realização desse trabalho.

Às professoras Dra. Claudia Nascimento (UNIRIO) e Dra. Rossimiriam Pereira (UFMG) pela obtenção dos espectros de RMN e ao professor Dr. Boniek Gontijo Vaz (UFG) pela obtenção dos espectros de massas de alta resolução. Essas parcerias foram essenciais para a elucidação das estruturas dos compostos sintetizados.

Ao professor Dr. Wallace Pacienza Lima (UFRJ) pela realização dos ensaios leishmanicida.

Ao professor Dr. Gustavo Bressan (UFV), ao Dr. Raoni Siqueira e à Dra. Graziela Domingues pela realização dos ensaios de avaliação de citotoxicidade.

Ao Dr. Daniel de Assis Santos (UFMG) pela realização dos ensaios de avaliação da atividade fungicida.

À Dra. Graziela Domingues (UFV) pela realização dos ensaios de avaliação da atividade inseticida.

Aos amigos (as) e colegas do grupo de pesquisa GSPCB – Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos - pela colaboração, amizade e por deixarem o ambiente de trabalho muito mais agradável e prazeroso.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos professores da banca examinadora que prontamente aceitaram participar da finalização desta pesquisa.

Meu eterno agradecimento.

BIOGRAFIA

Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla, filha de Antonio Carlos Gazolla e Filomena Auxiliadora Rodrigues Gazolla, nasceu em 29 de outubro de 1988, em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Em 2008, ingressou no curso de Licenciatura e Bacharelado em Química na Universidade Federal de Viçosa, onde diplomou-se em 2013.

Em 2013, ingressou no Curso de Mestrado em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação em julho de 2015.

RESUMO

GAZOLLA, Poliana Aparecida Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2020. **Síntese e avaliação das atividades leishmanicida, citotóxica, fungicida e inseticida de derivados da vanilina contendo o núcleo 1,2,3-triazólico e obtenção de novos derivados 1,2,3-triazólicos do eugenol.** Orientador: Róbson Ricardo Teixeira. Coorientador: Adilson Vidal Costa.

Vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) e eugenol (4-alil-2-metoxifenol) são duas substâncias fenólicas naturais, que possuem atrativas atividades biológicas e que podem ser utilizadas como material de partida para a obtenção de novos derivados potencialmente bioativos. Os compostos triazólicos constituem uma classe de substâncias que apresentam um amplo espectro de bioatividades e que vêm atraindo a atenção de vários grupos de pesquisa. O presente trabalho teve por objetivo sintetizar uma série de derivados da vanilina e do eugenol contendo o núcleo 1,2,3-triazólico e avaliar bioatividades dos primeiros. Para a síntese de vinte e dois derivados da vanilina, foram empregadas reações S_N2 e a reação de cicloadição catalisada por Cu(I) (reação “click”) entre diferentes azidas benzílicas e os alquinos terminais 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**) e 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**). A reação “click” correspondeu à etapa chave envolvida na preparação dos derivados da vanilina e nesta etapa os compostos foram obtidos com rendimentos variando de 60% a 91%. Os compostos sintetizados foram caracterizados via espectroscopia de IV, RMN de 1H e de ^{13}C e por espectrometria de massas de alta resolução. Uma vez sintetizados, estes derivados foram submetidos a testes de avaliação de suas atividades leishmanicida, citotóxica, fungicida e inseticida. A avaliação da atividade leishmanicida dos derivados triazólicos da vanilina contra *Leishmania amazonensis* mostrou que o composto 3-metoxi-4-(3-(1-(4-nitrobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)benzaldeído (**7b**) foi o mais ativo, apresentando valores de IC_{50} iguais a 1,1 e 4,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contra as formas promastigotas e amastigotas, respectivamente. Considerando exemplos descritos na literatura sobre efeitos citotóxicos da vanilina contra diferentes linhagens de células cancerígenas, realizou-se também uma avaliação da atividade citotóxica desses compostos contra as linhagens celulares B16F10 (melanoma metastático murino), Jurkat (leucemia linfoblástica aguda) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama). De modo geral, os resultados obtidos mostraram que os derivados triazólicos da vanilina avaliados apresentaram pouca eficácia em inibir a viabilidade da linhagem

celular MDA-MB-231. No entanto, os compostos 4-((1-(4-isopropilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6a**), 4-((1-(4-iodobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6e**), 4-((1-(4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6f**) e 3-metoxi-4-((1-(4-(trifluorometoxi)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldeído (**6j**) foram ativos em termos de redução da viabilidade celular da linhagem B16F10, apresentando valores moderados de citotoxicidade. Dentre os derivados mencionados, o mais promissor foi o 4-((1-(4-iodobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6e**) que reduziu a viabilidade celular da linhagem B16F10 em aproximadamente 70% na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Considerando a linhagem celular Jurkat, os compostos 3-metoxi-4-((1-(4-(trifluorometoxi)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldeído (**6j**), 4-(3-(1-(4-iodobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (**7e**) e 3-metoxi-4-(3-(1-(4-(trifluorometoxi)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)benzaldeído (**7j**) apresentaram inibição da viabilidade celular entre 40%-65%. Com relação à atividade fungicida, os compostos avaliados contra diferentes espécies de fungos apresentaram atividade inferior aos fármacos comerciais (itraconazol e anfotericina B) usados como controle positivo nos ensaios de avaliação da atividade fungicida. Porém foi possível observar que alguns derivados triazólicos apresentaram melhor eficácia do que a vanilina. Os derivados da vanilina também foram avaliados contra a espécie de inseto *Drosophila suzukii*. No entanto, os compostos apresentaram baixa eficácia contra esta espécie (os compostos mais ativos apresentaram porcentagem de mortalidade em torno de 5%). Na presente investigação, também foi desenvolvida uma nova rota sintética para a preparação de novos derivados triazólicos do eugenol. Neste caso, reações de epoxidação, de abertura de anel de epóxido e a reação “click” foram usadas para a obtenção de dezesseis novos derivados do eugenol. Mais uma vez, a etapa chave envolvida na síntese dos derivados do eugenol foi a reação “click” entre a azida (\pm) 4-(3-azido-2-hidroxiopropil)-2-metoxifenol (**9**) e diferentes alquinos terminais, sendo as substâncias obtidas nesta etapa com rendimentos variando de 68% a 89%. Esta rota sintética poderá ser utilizada para a obtenção de um número maior de derivados do eugenol e avaliação de suas bioatividades. Assim, na presente investigação demonstrou-se a viabilidade de utilização da vanilina e do eugenol para a obtenção de novas substâncias triazólicas e que no caso da vanilina foram exploradas com respeito a quatro bioatividades.

Palavras-chave: Vanilina. Eugenol. 1,2,3-triazol. Leishmanicida. Citotoxicidade. Fungicida. Inseticida.

ABSTRACT

GAZOLLA, Poliana Aparecida Rodrigues, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2020. **Synthesis and evaluation of the leishmanicide, cytotoxic, fungicide, and insecticide activity of vanillin derivatives with 1,2,3-triazolic fragments and preparation of new 1,2,3-triazolic eugenol derivatives.** Adviser: Róbson Ricardo Teixeira. Co-adviser: Adilson Vidal Costa.

Vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) and eugenol (4-allyl-2-methoxyphenol) are phenolic natural compounds that present attractive biological activities and can be used as starting materials for the preparation of potentially bioactive compounds. The triazoles are another class of compounds that presents several biological activities and that has attracted the attention of several research groups. The present investigation aimed to prepare a series of vanillin and eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazolic portions. The vanillin derivatives had their bioactivities evaluated. The synthesis of twenty-two vanillin derivatives was achieved using S_N2 and copper(I) catalyzed dipolar cycloaddition (click reaction) reactions. The click reaction between different benzylic azides and the alkynes 3-methoxy-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde (**2**) and 3-methoxy-4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde (**3**) was the crucial step involved in the preparation of vanillin derivatives. Considering the cycloaddition step, the derivatives were obtained within the 60% -91% range. The compounds were fully characterized by IR and NMR (1H and ^{13}C) spectroscopies as well as high-resolution mass spectrometry. The leishmanicidal evaluation of vanillin triazolic derivatives against *Leishmania amazonensis* revealed that the most active compound corresponded to 3-methoxy-4-((1-(4-nitrobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)benzaldehyde (**7b**), which presented IC_{50} equal to $1.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $4.2 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, on promastigote and amastigote forms. Considering the previous reports on the cytotoxic activity of vanillin against different cell lines, the cytotoxicity of the vanillin derivatives was assessed on B16F10 (murine melanoma), Jurkat (human T-cell leukemia), and MDA-MB-231 (metastatic breast cancer) cell lines. As a general trend, the vanillin triazolic derivatives presented low efficacy in reducing MDA-MB-231 cell viability. On the contrary, the compounds 4-((1-(4-isopropylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3-methoxybenzaldehyde (**6a**), 4-((1-(4-iodobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3-methoxybenzaldehyde (**6e**), 4-((1-(4-bromobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3-methoxybenzaldehyde (**6f**), and 4-((1-(4-trifluoromethoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3-methoxybenzaldehyde

(6j) presented moderate activity on B16F10 cell line, being 6e the most active reducing 70% of cell viability at 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Regarding Jurkat cell line, the substances 4-((1-(4-trifluoromethoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3-methoxybenzaldehyde (6j), 4-((1-(4-iodobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)propoxy)benzaldehyde (7e) e 4-((1-(4-trifluoromethoxybenzyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)propoxy)benzaldehyde (7j) were the most efficient ones reducing cell viability within the 40%-65% range at 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The fungicide activity evaluation of vanillin derivatives against different fungus species showed that they are less effective than the commercial fungicides itraconazole and amphotericin B. However, some of the derivatives present superior activity than vanillin. When evaluated against the insect species *Drosophilla suzukii*, it was found that the derivatives presented very low efficiency against it (the most active compounds displayed mortality around 5% in the biological assays). In the present investigation, a synthetic route to prepare new 1,2,3-triazolic compounds from eugenol was also developed. In this case, epoxidation, epoxide ring-opening, and click reaction were the transformations utilized for the synthesis of sixteen new eugenol derivatives. Once again, the click reaction between the azide (\pm)-4-(3-azido-2-hydroxypropyl)-2-methoxyphenol (9) and different alkynes was the fundamental step in the synthetic route. For this step, the compounds were obtained with yields ranging from 68% to 89%. This synthetic pathway can be used for the preparation of a higher number of eugenol derivatives and these, in turn, can be subsequently evaluated for their bioactivities. Thus, the present work demonstrated the viability of using vanillin and eugenol for the synthesis of new compounds. In the case of vanillin, the compounds were explored concerning their biological activities.

Keywords: Vanillin. Eugenol. 1,2,3-triazole. Leishmanicide. Cytotoxicity. Fungicide. Insecticide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estruturas de substâncias naturais empregadas como fármacos.....	22
Figura 1.2. Estrutura do fármaco sintético derivado da salicina.....	23
Figura 1.3. <i>Vanilla planifolia</i> e estrutura química da vanilina (1).....	24
Figura 1.4. Estruturas químicas da papaverina (a), L-dopa (b) e L-metildopa (c)	25
Figura 1.5. Estruturas químicas do eugenol e da vanilina.....	26
Figura 1.6. Estrutura geral dos compostos alvos de estudo deste trabalho.....	26
Figura 2.1. Exemplos de heterociclos farmacologicamente ativos.....	31
Figura 2.2. Estrutura do núcleo 1,2,3-triazólico.....	32
Figura 2.3. Estruturas dos alcinos 2 e 3 sintetizados a partir da vanilina e dos derivados triazólicos sintetizados neste trabalho.	36
Figura 2.4. Estruturas dos ésteres metanossulfonatos e os rendimentos obtidos em suas preparações.....	41
Figura 2.5. Estruturas e rendimentos das azidas sintetizadas.....	42
Figura 2.6. Espectro no infravermelho (ATR) do composto 2	73
Figura 2.7. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto 2	74
Figura 2.8. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) do composto 2	75
Figura 2.9. Espectro de massas de alta resolução do composto 2	76
Figura 2.10. Espectro no infravermelho (ATR) do composto 3	81
Figura 2.11. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto 3	82
Figura 2.12. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) do composto 3	83
Figura 2.13. Espectro de massas de alta resolução do composto 3	84
Figura 2.14. Valores descritos de deslocamento químico para os átomos de benzeno monossustituído (PRETSCH <i>et al.</i> , 1989).....	88
Figura 2.15. Espectro no infravermelho (ATR) do composto 6f	89
Figura 2.16. Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto 6f	90
Figura 2.17. Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) do composto 6f	91
Figura 2.18. Espectro de massas de alta resolução do composto 6f	92
Figura 2.19. Valores descritos de deslocamento químico para os átomos de carbono do anisol (PRETSCH <i>et al.</i> , 1989).....	94
Figura 2.20. Espectro no infravermelho (ATR) do composto 7i	95
Figura 2.21. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto 7i	96
Figura 2.22. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto 7i	97

Figura 2.23. Espectro de massas de alta resolução do composto 7i	98
Figura 3.1. Ciclo biológico dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	108
Figura 3.2. Manifestações clínicas da leishmaniose em humanos.....	109
Figura 3.3. Estruturas de fármacos usados no tratamento da leishmaniose.....	110
Figura 3.4. Estrutura dos 1,2,3-triazóis derivados do esterol avaliados contra a forma promastigota de <i>Leishmania donovani</i>	111
Figura 3.5. Conversão da Resazurina em Resorufina..	126
Figura 3.6. Atividade anti-promastigota dos compostos a) 1, 2, 6a-6k e b) 3, 7a-7k . <i>L. amazonensis</i> (5×10^5 promastigotas/mL) foram cultivadas na presença de diferentes concentrações (0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) dos compostos 1, 2, 6a-6k e 7a-7k por 72 h a 26 °C em meio M199 suplementado com 5% de soro fetal bovino. A quantidade de parasitos foi medida indiretamente através do método Alamar Blue e representado através da porcentagem de crescimento.	128
Figura 3.7. Citotoxicidade contra macrófagos dos compostos 1, 3, 6a-6k e 7a-7k . Macrófagos diferenciados de medula óssea-BMDM (1×10^5 /poço) foram plaqueados em placa de 96 poços e incubados na presença de diferentes com concentrações (0,1; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) dos compostos por 48 h a 37 °C em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar Blue e representado por porcentagem.....	130
Figura 3.8. Estruturas dos derivados que apresentaram melhores atividades contra as formas promastigota de <i>L. amazonensis</i>	134
Figura 3.9. Estruturas dos derivados que apresentaram melhores atividades contra a forma amastigota de <i>L. amazonensis</i>	135
Figura 3.10. Estruturas de nitrocompostos utilizados no tratamento de algumas patologias.....	135
Figura 4.1. Tipos de câncer mais incidentes projetados para 2020-2022 na população brasileira	140
Figura 4.2. Estruturas de quimioterápicos empregados no tratamento do câncer ..	141
Figura 4.3. Derivado da vanilina com atividade antiproliferativa (GU <i>et al.</i> , 2018)..	142
Figura 4.4. Conversão do sal MTT no produto formazan.....	154
Figura 4.5. Viabilidade celular das linhagens B16F10, Jurkat e MDA-MB-231 após 48 e 72 horas de tratamento com os compostos 1, 2, 3, 6a-6k e 7a-7k na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	159
Figura 4.6. Compostos triazólicos mais ativos contra a linhagem B16F10 na concentração 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 48 e 72 horas de tratamento	160

Figura 4.7. Compostos triazólicos mais ativos contra a linhagem Jurkat na concentração 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 48 e 72 horas de tratamento.	160
Figura 4.8. Composto triazólico mais ativo contra a linhagem MDA-MB-231 na concentração 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 72 horas de tratamento	161
Figura 5.1. Estrutura da anfotericina B.....	164
Figura 5.2. Estruturas dos principais fármacos azólicos	165
Figura 5.3. Derivados da vanilina que apresentaram elevada atividade antifúngica contra <i>C. neoformans</i>	166
Figura 6.1. Espécie de inseto <i>Drosophila suzukii</i>	177
Figura 6.2. Mortalidades de adultos de <i>Drosophila suzukii</i> em bioensaio de ingestão/contato por 24h de exposição. Insetos considerados mortos quando não conseguiam se locomover duas vezes a distância do próprio corpo após estímulo. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. C- = controle negativo (solução aquosa 20% m v^{-1} de açúcar e 5% v v^{-1} de DMSO). C+ = controle positivo (imidacloprida). *Difere do controle negativo pelo teste t-student $P < 0,05$	181
Figura 6.3. Estruturas dos derivados da vanilina que apresentaram melhores atividades inseticidas contra <i>D. suzukii</i>	181
Figura 6.4. Mortalidades de adultos de <i>Drosophila suzukii</i> em bioensaio de ingestão/contato por 24h de exposição. Insetos considerados mortos quando não conseguiam se locomover duas vezes a distância do próprio corpo após estímulo. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. C- = controle negativo (solução aquosa 20% m v^{-1} de açúcar e 5% v v^{-1} de DMSO). C+ = controle positivo (imidacloprida). *Difere do controle negativo pelo teste t-student $P < 0,05$	182
Figura 7.1. Estruturas das substâncias 8 , 9 e 10a-10h	188
Figura 7.2. Espectro no infravermelho (ATR) do composto 8.	205
Figura 7.3. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 8.	206
Figura 7.4. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 8.....	207
Figura 7.5. Espectro no infravermelho (ATR) do composto 9....	210
Figura 7.6. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 9.....	211
Figura 7.7. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 9.....	212
Figura 7.8. Espectro no infravermelho (ATR) do composto 10g.	216
Figura 7.9. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 10g.....	217
Figura 7.10. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 10g.....	218

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 2.1. Regioisômeros obtidos via cicloadição térmica clássica de Huisgen.	32
Esquema 2.2. Reação “click” ou CuAAC	33
Esquema 2.3. Análise retrossintética para a preparação dos derivados da vanilina.	35
Esquema 2.4. Reações envolvidas na preparação dos compostos triazólicos derivados da vanilina	70
Esquema 2.5. Proposta mecanística para a obtenção do composto 2	71
Esquema 2.6. Proposta de mecanismo para CTF sugerido por Makosza e colaboradores (1969).....	78
Esquema 2.7. Etapas envolvidas na obtenção dos ésteres metanossulfonatos e azidas aromáticas benzílicas	85
Esquema 2.8. Reação CuAAC utilizada para a obtenção dos compostos triazólicos 6a-6k e 7a-7k	86
Esquema 2.9. Proposta de ciclo catalítico para a reação “click” (CuAAC).....	100
Esquema 7.1. Análise retrossintética para a preparação dos novos derivados triazólicos do eugenol.. ..	187
Esquema 7.2. Reações envolvidas na preparação dos compostos triazólicos 10a-10h	202
Esquema 7.3. Mecanismo para a reação de epoxidação do eugenol.....	203
Esquema 7.4. Mecanismo para a abertura do epóxido 8 derivado do eugenol....	208
Esquema 7.5. Reação CuAAC utilizada para a obtenção dos compostos triazólicos 10a-10h	213

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Valores de IC ₅₀ da atividade leishmanicida e citotoxicidade contra macrófagos dos compostos 1 , 2 e 6a-6k	132
Tabela 3.2 - Valores de IC ₅₀ da atividade leishmanicida e citotoxicidade contra macrófagos dos compostos 3 e 7a-7k	133
Tabela 4.1 - Viabilidade celular (%) da linhagem B16F10 quando exposta aos compostos 1 , 2 , 3 , 6a-6k e 7a-7k após 48 e 72 horas de tratamento (média±desvio padrão).....	156
Tabela 4.2 - Viabilidade celular (%) da linhagem Jurkat quando exposta aos compostos 1 , 2 , 3 , 6a-6k e 7a-7k após 48 e 72 horas de tratamento (média±desvio padrão).....	157
Tabela 4.3 - Viabilidade celular (%) da linhagem MDA-MB-231 quando exposta aos compostos 1 , 2 e 6a-6k após 48 e 72 horas de tratamento (média±desvio padrão).....	158
Tabela 5.1 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos 1 , 2 , 3 , 6a-6k e 7a-7k frente às linhagens fúngicas avaliadas após o tempo de incubação	170
Tabela 5.2 - Concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos 1 , 2 , 3 , 6a-6k e 7a-7k frente às linhagens fúngicas avaliadas	171
Tabela 5.3 - Razão entre a concentração fungicida mínima (CFM) e concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos 1 , 2 , 3 , 6a-6k e 7a-7k frente às linhagens fúngicas avaliadas.....	172
Tabela 6.1 - Mortalidade (%) de adultos de <i>Drosophila suzukii</i> em bioensaio de ingestão/contato quando expostos aos compostos 1 , 2 , 3 , 6a-6k e 7a-7k por 24h.....	180

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angström
ATR	Reflectância Total Atenuada
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
dd _{ap}	Dupleto duplo aparente
ddt _{ap}	Dupleto de dupleto de tripleto aparente
DMSO	Dimetilsulfóxido
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
m	Multiplete
MHz	Megahertz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
P.A.	Para análise
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
quint	Quinteto
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
sept	Septeto
t	Tripleto
td	Tripleto duplo
T _f	Temperatura de fusão
v v ⁻¹	Volume/volume
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: APRESENTAÇÃO	21
1.1. PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS.....	21
1.2. VANILINA E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	22
1.3. MOTIVAÇÃO DO TRABALHO	25
1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 2: SÍNTESE DE DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO	31
2.1. INTRODUÇÃO	31
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.2.1. Generalidades Metodológicas	36
2.3. PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS	38
2.3.1. SÍNTESE DOS ALCINOS TERMINAIS DERIVADOS DA VANILINA.....	38
2.3.2. SÍNTESE DOS ÉSTERES METANOSSULFONATOS.....	40
2.3.3. SÍNTESE DAS AZIDAS ORGÂNICAS	41
2.3.4. SÍNTESE DOS COMPOSTOS TRIAZÓLICOS DERIVADOS DA VANILINA .	43
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO	107
3.1. INTRODUÇÃO	107
3.2. MATERIAS E MÉTODOS.....	125
3.2.1. Generalidades.....	125
3.2.2. Avaliação da atividade anti-promastigota.....	125
3.2.3. Avaliação da citotoxicidade.....	126
3.2.4. Avaliação da atividade anti-amastigota	126
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
3.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO	139
4.1. INTRODUÇÃO	139
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	153

4.2.1. Generalidades	153
4.2.2. Linhagens celulares e cultivo celular	153
4.2.3. Avaliação da atividade citotóxica pelo método MTT	153
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	155
4.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
CAPÍTULO 5: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA DOS DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO	163
5.1. INTRODUÇÃO	163
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	166
5.2.1. Generalidade.....	166
5.2.2. Avaliação da atividade antifúngica dos compostos	167
5.2.3. Diluição dos compostos	167
5.2.4. PREPARO DO INÓCULO	167
5.2.5. Leitura e interpretação da concentração inibitória mínima (CIM)	168
5.2.6. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	169
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	169
5.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	174
CAPÍTULO 6: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DOS DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO	176
6.1. INTRODUÇÃO	176
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	178
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	179
6.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	183
CAPÍTULO 7: SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS DO EUGENOL CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO.....	186
7.1. INTRODUÇÃO	186
7.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	188
7.2.1. Generalidades Metodológicas	188
7.3. PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS	189
7.3.1. SÍNTESE DO EPÓXIDO DERIVADO DO EUGENOL.....	189
7.3.2. SÍNTESE DA AZIDA ORGÂNICA DERIVADA DO EUGENOL	190
7.3.3. SÍNTESE DOS COMPOSTOS TRIAZÓLICOS 10a-10h	191
7.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	202
7.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	219

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	220
ANEXO I: ESPECTROS	222
ANEXO II: PUBLICAÇÕES	324

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO

1.1. PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

A utilização de plantas como fonte de substâncias biologicamente ativas ocorre desde os primórdios da história da humanidade. Estas substâncias apresentam grande importância no tratamento e cura de diversas doenças e são responsáveis pelo desenvolvimento da subárea mais antiga da Química Orgânica, a Química de Produtos Naturais (VEIGA JR, 2008, PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Os estudos científicos sobre plantas medicinais ocorreram a partir do século XIX, quando foram descritos os primeiros relatos a respeito do isolamento de diversos metabólitos secundários (MONTANARI e BOLZANI, 2001; LIMA, 2016). Desde então, a descoberta de novos produtos naturais bioativos, com características físico-químicas e grupos farmacofóricos para o desenvolvimento de novos fármacos, têm despertado grande interesse dos pesquisadores (SUKURU *et al.*, 2009; NEWMAN e CRAGG, 2016).

Diversas substâncias naturais já fundamentaram estudos de relação estrutura-atividade, inspiraram o desenvolvimento da síntese orgânica e a criação da indústria farmacêutica (VIEGAS JR *et al.*, 2006). No entanto, ainda estima-se que cerca de 80% dos quase 160.000 compostos catalogados no *Dictionary of Natural Products* têm características promissoras para se tornarem potenciais modelos de novos fármacos (BERLINCK *et al.*, 2017).

A importância dos produtos naturais na sociedade moderna é indiscutível e pode ser atestada, por exemplo, diante da variedade de fármacos disponíveis no mercado obtido a partir de produtos naturais. Entre os vários exemplos de substâncias oriundas de plantas e que apresentam importância farmacológica pode-se destacar a quinina, morfina, atropina, o taxol e a salicina (Figura 1.1, p. 22).

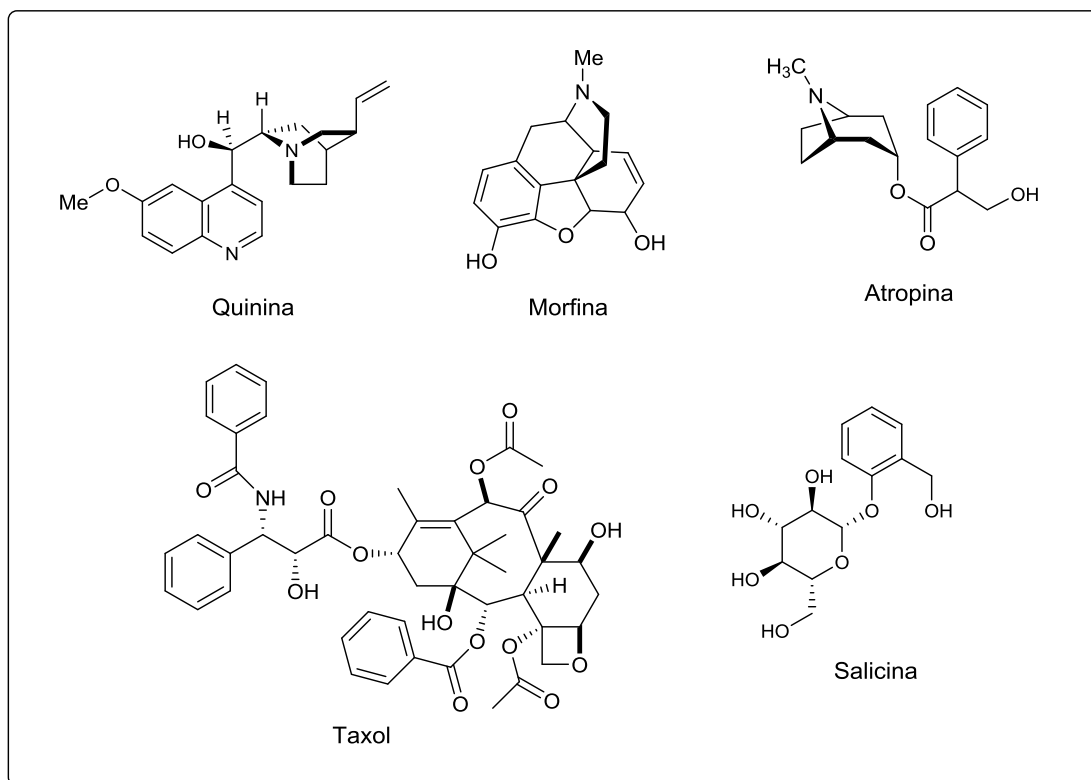


Figura 1.1. Estruturas de substâncias naturais empregadas como fármacos.

Encontrada em 1820 em espécies vegetais do gênero *Cinchona*, a quinina foi utilizada por quase trezentos anos como o único princípio ativo contra a malária. Essa substância também é conhecida por apresentar atividade antitérmica e analgésica e por inspirar a origem de outros antimaláricos sintéticos (DOS SANTOS e PINTO, 2012).

Isolada no século XIX, a morfina é uma substância natural extraída do ópio (*Papaver somniferum*) e é conhecida por apresentar propriedades analgésica, hipnótica e antitussígena (FILHO e YUNES, 1998). Atualmente, ela continua sendo utilizada como analgésico no tratamento da dor crônica ou aguda e dores causadas por doenças degenerativas.

A atropina é um antagonista colinérgico que age sobre o sistema nervoso parassimpático inibindo a atividade do neurotransmissor acetilcolina. É um alcalóide encontrado na planta *Atropa belladonna* e muito utilizado na medicina para combater arritmias e para o tratamento de Mal de Parkinson (ANDRADE *et al.*, 2002).

O diterpeno taxol é uma droga antineoplásica isolada da casca do Teixo do pacífico (*Taxus brevifolia*) e que possui atividade contra vários tipos de câncer

incluindo melanoma, câncer de ovário, leucemia e câncer de mama (PELTIER *et al.*, 2006; WEAVER, 2014).

Como último exemplo menciona-se a salicina (Figura 1.1, pg. 22), substância isolada de cascas da espécie de salgueiro *Salix alba*. Esta substância é responsável por inspirar a síntese do ácido acetilsalicílico (Figura 1.2), primeiro fármaco derivado de um produto natural produzido em escala industrial. O ácido acetilsalicílico é o componente do medicamento mais vendido no mundo, a Aspirina[®], sendo utilizado como analgésico, anti-inflamatório, antitérmico e no tratamento da artrite reumatóide (RISHTON, 2008, BÓ *et al.*, 2019).

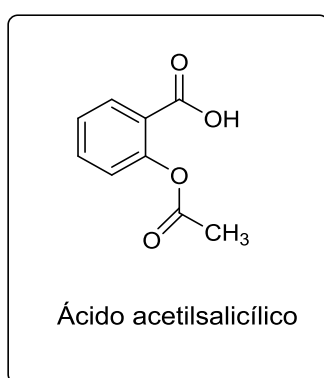


Figura 1.2. Estrutura do fármaco sintético derivado da salicina.

1.2. VANILINA E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Uma classe de metabólitos secundários de ampla ocorrência nas plantas são os compostos fenólicos (LIMA NETO *et al.*, 2015). Esses compostos constituem um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina, sendo essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuírem na pigmentação (ANGELO e JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade de estruturas que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (VIZZOTO *et al.*, 2010).

De acordo com a literatura, os compostos fenólicos são reconhecidos como importantes agentes antioxidantes naturais e por apresentarem ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas, incluindo anti-inflamatória, anticâncer,

antimicrobiana, antialérgica, antiviral, antitrombótica, hepatoprotetora, entre outras (LI *et al.*, 2014; KUMAR e GOEL, 2019).

Dentre os compostos fenólicos bioativos mais conhecidos no mundo encontram-se a vanilina, quimicamente designada como 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (Figura 1.3).

Obtida tradicionalmente das sementes da vagem de uma orquídea tropical, a *Vanilla planifolia* (Figura 1.3), a vanilina corresponde a um composto aromático, apresentando aroma característico de baunilha, muito apreciada e de grande interesse comercial, uma vez que é utilizada como flavorizante em alimentos, bebidas e em diversos produtos farmacêuticos (KUMAR *et al.*, 2012, ZHANG *et al.*, 2017).

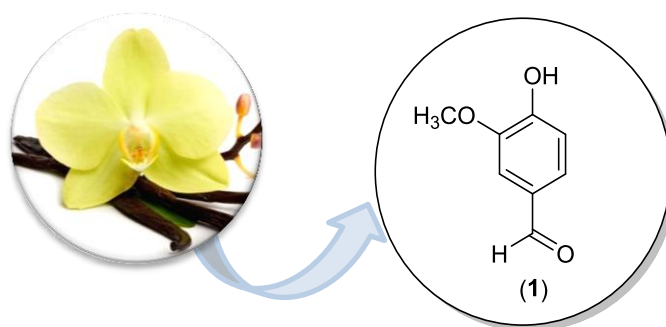


Figura 1.3. *Vanilla planifolia* e estrutura química da vanilina (1).

Embora possa ter uma origem natural, a produção sintética de vanilina em escala industrial é a maior fonte comercial deste importante composto (LEITE FILHO *et al.*, 2016).

A vanilina pode ser sintetizada a partir do eugenol encontrado no óleo de cravo, da lignina contida no licor negro e através do uso de precursores derivados de petróleo tais como o guaiacol e o *p*-cresol (DAUGSCH e PASTORE, 2005; PACHECO e DAMASIO, 2010).

Outras utilidades da vanilina incluem desodorizantes de ambientes, ceras para pisos e assoalhos, além de atuar como intermediário em sínteses de herbicidas, agentes antiespumantes ou drogas como papaverina (antiespasmódica), *L*-dopa (antiparkinsoniano), *L*-metildopa (anti-hipertensivo), Figura 1.4 (pg. 25) (PACHECO e DAMASIO, 2010).

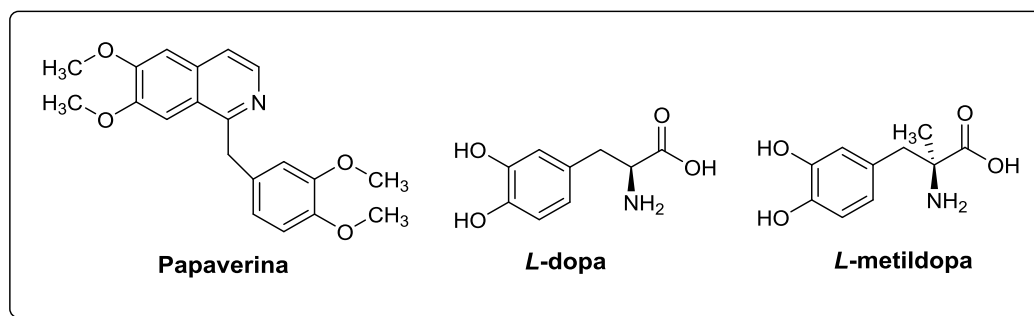


Figura 1.4. Estruturas químicas da papaverina, L-dopa e L-metildopa.

Por fim, além do potencial antimutagênico (ANGELO e JORGE, 2007), as atividades antioxidante, antimicrobiana (DAUGSCH e PASTORE, 2005), anticarcinogênica, antimetastática, antiangiogênica, citotóxica (BEZERRA *et al.*, 2016); anti-inflamatória e antifúngica (ZHANG *et al.*, 2017), fazem desta substância, estruturalmente simples, um valioso e promissor objeto de estudo e pesquisa para o desenvolvimento de compostos derivados bioativos.

1.3. MOTIVAÇÃO DO TRABALHO

Diversos estudos já validaram o efeito de produtos naturais e seus derivados como potenciais fontes de novos e seletivos agentes para o tratamento de várias doenças. Dentre os trabalhos mais recentes publicados na literatura, menciona-se as investigações envolvendo a síntese e avaliação das atividades citotóxica (GAZOLLA *et al.*, 2018), leishmanicida (TEIXEIRA *et al.*, 2018) e antiviral (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019) de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos.

O eugenol é um fenilpropanoide metoxilado encontrado em várias plantas aromáticas, sendo um dos principais constituintes do óleo essencial do cravo da Índia.

As principais atividades biológicas descritas na literatura para esta substância natural são: antimicrobiana (ESCOBAR, 2002); anti-inflamatória (KIM *et al.*, 2003); inseticida (MACIEL *et al.*, 2010); espasmolítica; antisséptica; antipirética (FENG e LIPTON, 1987); antioxidante (NAGABABU e LAKSHMAIAH, 1994; ABRAHAM, 2001); neuroprotetora (KABUTO *et al.*, 2007); analgésica e anestésica (ESCOBAR, 2002).

Considerando a similaridade estrutural entre eugenol e vanilina (Figura 1.5), bem como as importantes atividades biológicas relatadas para o eugenol e seus derivados 1,2,3-triazólicos, o presente trabalho objetivou a síntese de moléculas derivadas da vanilina que sejam promissoras e potencialmente bioativas.

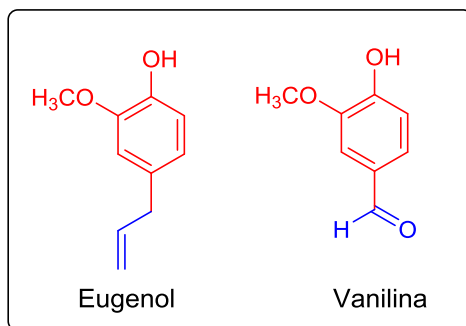


Figura 1.5. Estruturas químicas do eugenol e da vanilina.

Assim, descreve-se nesse trabalho a síntese, caracterização e a avaliação das atividades leishmanicida, citotóxica, fungicida e inseticida de derivados da vanilina contendo o núcleo 1,2,3-triazólico. Os compostos sintetizados possuem como estrutura geral a estrutura apresentada na Figura 1.6.

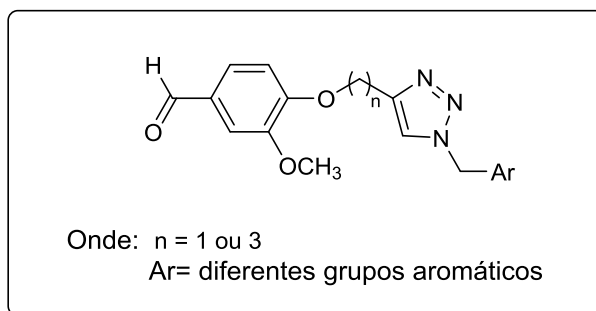


Figura 1.6. Estrutura geral dos compostos alvos de estudo deste trabalho.

As estruturas dos compostos sintetizados e biologicamente avaliados serão apresentadas no Capítulo 2 enquanto os resultados das atividades leishmanicida, citotóxica, fungicida e inseticida serão abordados nos capítulos 3, 4, 5 e 6, respectivamente. De forma a contextualizar as bioatividades avaliadas, são descritas de forma breve e introdutória aspectos relacionados às doenças, bem

como os problemas relacionados aos fármacos disponíveis para tratamento e a necessidade de pesquisas para a descoberta de novos princípios ativos.

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S.K. Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 39, p. 493-498, 2001.
- ANDRADE, S.F., FANTONI, D.T., CORTOPASSI, S.R.G., NETO, J.P.A. *Terapêutica do Sistema Nervoso*. In: ANDRADE, S.F. *Manual de terapêutica veterinária*, 2ª ed., São Paulo: Roca, 2002.
- ANGELO, P.M. e JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolf Lutz*, v. 66, p. 232-240, 2007.
- BERLINCK, R.G.S.; BORGES, W.S.; SCOTTI, M.T.; VIEIRA, P.C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. *Química Nova*, v. 40, p. 706-710, 2017.
- BEZERRA, D. P.; SOARES, A. K.N.; DE SOUSA, D.P. Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1-9, 2016.
- BÓ, L. G.; ALMEIDA, R. M.; CARDOSO, C.M.M.; ZAVARIZE, D. G.; BRUM, S.S.; MENDONÇA, A. R. V. Acetylsalicylic acid biosorption onto fungal-bacterial biofilm supported on activated carbons: an investigation via batch and fixed-bed experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, p. 28962–28976, 2019.
- DAUGSCH, A. e PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. *Química Nova*, v. 28, p. 642-645, 2005.
- DE OLIVEIRA, ANDRÉ S.; GAZOLLA, POLIANA A. R.; OLIVEIRA, ANA FLÁVIA C. DA S.; PEREIRA, WAGNER L.; DE S. VIOL, LÍVIA C.; MAIA, ANGÉLICA F. DA S.; SANTOS, EDJON G.; DA SILVA, ÍTALO E. P.; MENDES, TIAGO A. DE OLIVEIRA; DA SILVA, ADALBERTO M.; DIAS, ROBERTO S.; DA SILVA, CYNTHIA C.; POLÊTO, MARCELO D.; TEIXEIRA, RÓBSON R.; DE PAULA, SERGIO O. Discovery of novel West Nile Virus protease inhibitor based on isobenzonafuranone and triazolic derivatives of eugenol and indan-1,3-dione scaffolds. *PLoS One*, v. 14, p. e0223017, 2019.
- DOS SANTOS, N. P.; PINTO, A. C. A Mata é sua Farmácia – A Pesquisa de plantas brasileiras para o combate de doenças tropicais no século XIX. *Revista Virtual de Química*, v. 4, p. 162-172, 2012.
- ESCOBAR, R. G. Eugenol: Propriedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista Cubana de Estomatología*, v. 39, 2002.

- FENG, J; LIPTON, J. M. Eugenol: antipyretic activity in rabbits. *Neuropharmacology*, v. 26, p.1775-1778, 1987.
- FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, p. 99-105, 1998.
- GAZOLLA, P. A. R.; TEIXEIRA, R. R.; DA SILVA, A. M.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; SIQUEIRA, R. P.; GONÇALVES, V. H. S.; PEREIRA, H. S.; BRESSAN, G. C. Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. *Química Nova*, v. 41, p. 497-506, 2018.
- KABUTO, H., TADA, M., KOHNO, M. Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, p. 423-427, 2007.
- KIM, S.S; OH, O.J; MIN, H.Y; PARK, E.J; KIM, Y; PARK, H.J; NAMHAN, Y; LEE, S.K. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharidestimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Science*, v. 73, p. 337-48, 2003.
- KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*. v. 24, p. e00370, 2019.
- KUMAR, R.; SHARMA, P. K.; MISHRA, P. S. Review on the Vanillin derivatives showing various Biological activities. *International Journal of Pharm Tech Research*, v. 4, p. 266-279, 2012.
- LEITE FILHO, C. A.; REIS, S. A. G. B.; ROLIM, L. A.; ARAÚJO C. R. M.; GONSALVES, A. A. Síntese de derivados da Vanilina e Avaliação como Agentes Fotoprotetores frente à Radiação UVB. *Revista Virtual de Química*, v. 8, p. 2057-2071, 2016.
- LI, A.; LI, S.; ZHANG, Y.; XU, X.; CHEN, Y.; LI, H. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, v. 6, p. 6020-6047, 2014.
- LIMA, R. A. Estudo químico das cascas de *Maytenus guianensis* Klotzsch ex Reissek e o seu potencial antimicrobiano. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas, 2016.
- LIMA NETO, G. A.; KAFFASHI, S.; LUIZ, W. T.; FERREIRA, W. R.; DIAS DA SILVA, Y. S. A.; PAZIN, G. V.; VIOLANT, I. M. P. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Planta Medicinal*, v. 17, p. 1069-1077, 2015.
- MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; SILVA, R.A.; BARROS, R.S.; SOUSA, R.N.; SOUSA, L.C.; BRITO, E.S.; SOUZA-NETO, M.A.

- Chemical composition of Eucalyptus spp. Essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary Parasitology*, v. 167, p. 1-7, 2010.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v. 24, p. 105-111, 2001.
- NAGABABU, E; LAKSHMAIAH, N. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. *Free Radical Research*, v. 20, p. 253-66, 1994.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, p. 629-661, 2016.
- PACHECO, S. M. V.; DAMASIO, F. Vanilina: Origem, Propriedades e Produção. *Química Nova na Escola*, v. 32, p. 215-219, 2010.
- PELTIER, S.; OGER, J. M.; LAGARCE, F. R.; COUET, W.; ENHANCED, J. P. B. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharmaceutical Research*, v. 23, p. 1243-1250, 2006.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 3, p. 146-152, 2012.
- RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. *The American Journal of Cardiology*, v. 101, p. 43D-49D, 2008.
- SUKURU, S. C. K.; JENKINS, J. L.; BECKWITH, R. E. J.; SCHEIBER, J.; BENDER, A.; MIKHAILOV, D.; DAVIES, J. W.; GLICK, M. Plate-Based Diversity Selection Based on Empirical HTS Data to Enhance the Number of Hits and Their Chemical Diversity. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 14, p. 690-699, 2009.
- TEIXEIRA, R. R.; GAZOLLA, P. A. R.; DA SILVA, A. M.; BORSODI, M. P. G.; BERGMANN, B. R.; FERREIRA, R. S.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; LIMA, W. P. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 146, p. 274-286, 2018.
- VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 308, 2008.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, p. 326-337, 2006.
- VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. *Embrapa Clima Temperado*, v. 316, p. 1-16, 2010.

WEAVER, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 25, p. 2677-2681, 2014.

ZHANG, J; ZHAO, L.; ZHU, C.; WU, Z.; ZHANG,G.; GAN, X.; LIU, D.; PAN, J.; HU, D. Y.; SONG, B. A. Facile Synthesis of Novel Vanillin Derivatives Incorporating a Bis(2-hydroxyethyl)dithioacetal Moiety as Antiviral Agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 65, p. 1-35, 2017.

CAPÍTULO 2

SÍNTESE DE DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO

2.1. INTRODUÇÃO

Compostos heterocíclicos são abundantes na natureza e desempenham papel importante em diversas áreas da química devido à ampla variedade de atividades biológicas que apresentam. Além de fazerem parte da estrutura de diversos fármacos, eles também são utilizados como modelos na busca de novos compostos bioativos (VENEPALLY e REDDY JALA, 2017). Na Figura 2.1 estão apresentados alguns exemplos de compostos heterocíclicos e suas respectivas atividades biológicas.

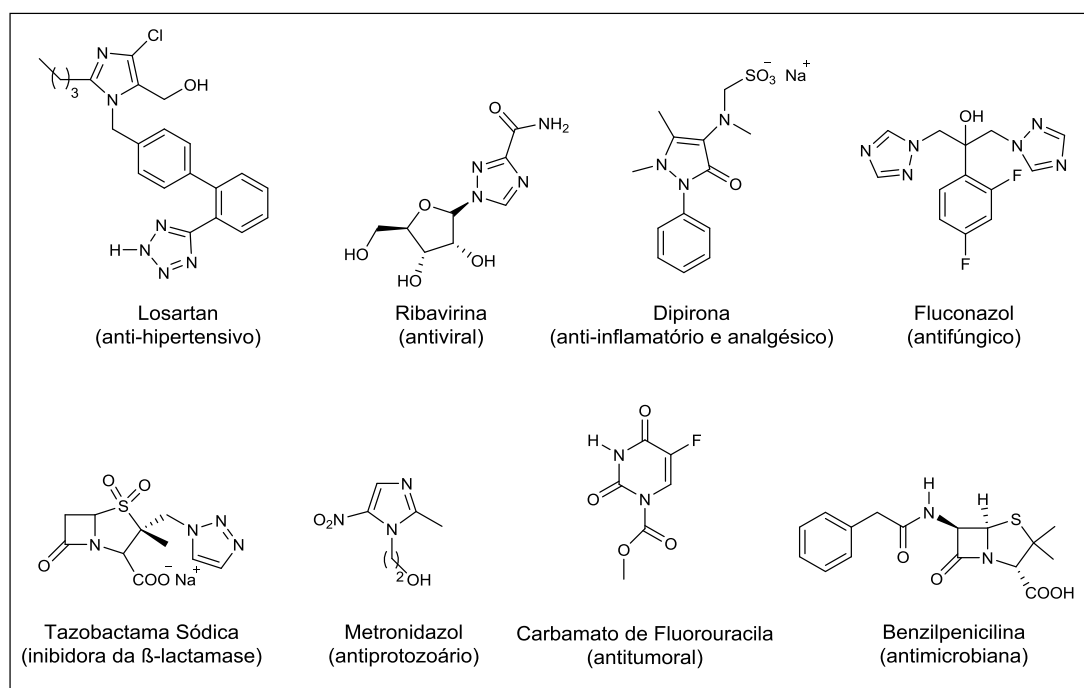


Figura 2.1. Exemplos de heterociclos farmacologicamente ativos.

Dentre os diversos grupos de heterocíclicos conhecidos e estudados encontram-se aqueles contendo núcleos 1,2,3-triazólicos, cujas estruturas correspondem a anéis de cinco membros contendo três átomos de nitrogênio vicinais (CANDUZINI, 2012; PRAVEENA *et al.*, 2015).

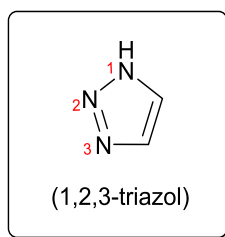
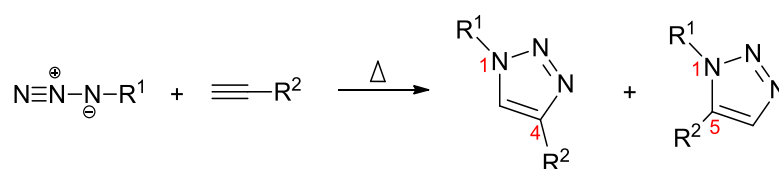


Figura 2.2. Estrutura do núcleo 1,2,3-triazólico.

Obtidos de forma exclusivamente sintética, os compostos heterocíclicos contendo núcleos 1,2,3-triazólicos tem despertado grande interesse por possuírem uma ampla gama de aplicações, tais como explosivos, agroquímicos e principalmente fármacos (HEIN e FOKIN, 2010; BORGATI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; MAO *et al.*, 2015).

Um dos métodos clássicos para a obtenção de 1,2,3-triazóis é a cicloadição 1,3-dipolar envolvendo azidas orgânicas e alcinos terminais (Esquema 2.1), observada em 1893 por Arthur Michael e desenvolvida por Huisgen. Esta reação concertada requer o emprego de elevada temperatura, longos tempos de reação e, geralmente, forma uma mistura de aproximadamente 1:1 dos regioisômeros 1,4 e 1,5-dissubstituídos, quando alcinos assimétricos estão envolvidos (DEOBALD, 2010; FREITAS *et al.*, 2011; CANDUZINI, 2012).



Esquema 2.1. Regioisômeros obtidos via cicloadição térmica clássica de Huisgen.

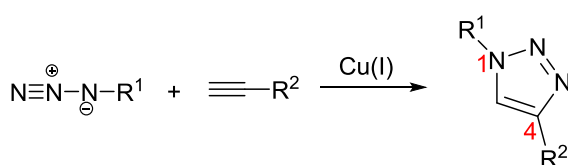
A fim de controlar a regioseletividade e otimizar as condições de reação para a formação de 1,2,3-triazóis empregando-se alcinos e azidas, diversas metodologias foram desenvolvidas (DHEER *et al.*, 2017). Em 2001, estudos realizados pelos pesquisadores Sharpless e Meldal revelaram que a presença de Cu(I) como catalisador acelerava a reação das azidas com alcinos terminais sem a necessidade de aquecimento. Além disso, a grande vantagem desta metodologia em relação à reação de Huisgen refere-se à regioseletividade, produzindo exclusivamente de forma rápida e eficiente o regioisômero 1,4-dissubstituído-1,2,3-triazólico, utilizando condições reacionais brandas e

fornecendo os triazóis com excelentes rendimentos (KOLB *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2011; BORGATI, 2012).

Desde a descoberta de Sharpless e Meldal, essa metodologia passou a ser amplamente utilizada para a preparação de 1,2,3-triazóis e é denominada como reação “click”, também conhecida como cicloadição (C) entre um Alcino (A) e uma azida (A), catalisada por cobre (Cu(I)) (reação CuAAC) (PEREIRA *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2016; DHEER *et al.*, 2017; MEGHANI *et al.*, 2017; OUYANG *et al.*, 2018).

O conceito de química “click”, introduzido por Sharpless, está associado às reações termodinamicamente favoráveis, de fácil execução e que forneçam os produtos com elevados rendimentos. Assim, uma reação “click” é caracterizada por ser uma reação rápida, estereoespecífica (mas não necessariamente enantiosseletiva), utilizar reagentes simples e solventes que não causem impacto negativo ao meio ambiente (como a água), obter produtos que devem ser de fácil isolamento, produzir produtos secundários inofensivos e que possam ser removidos preferencialmente sem uso de cromatografia, e não ser necessário o uso de cuidados especiais (como o emprego de atmosfera inerte) na condução das reações (KOLB *et al.*, 2001; FREITAS, 2011; HOU *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2016).

Dentre as reações compreendidas na categoria de reações “click”, a reação CuAAC (Esquema 2.2) é considerada o exemplo perfeito.



Esquema 2.2. Reação “click” ou CuAAC.

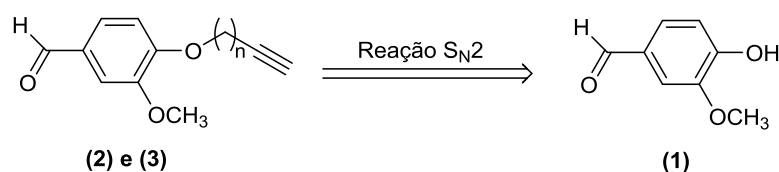
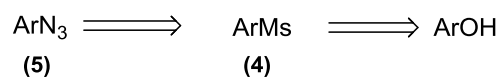
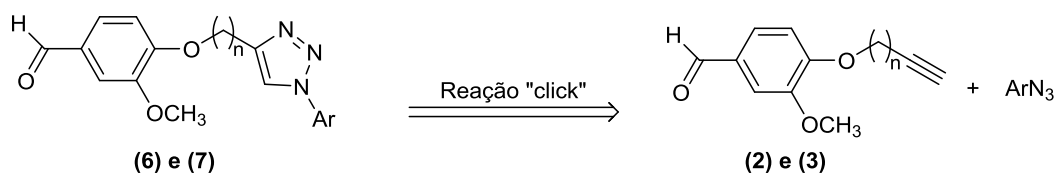
Além de atuarem como grupo farmacofórico de substâncias bioativas, um fato importante relacionado ao núcleo 1,2,3-triazólico é a sua utilização em estratégias de acoplamento de duas ou mais substâncias a fim de promover a potencialização de suas atividades farmacológicas (MANETSCH *et al.*, 2004; WHITING *et al.*, 2006; DHEER *et al.*, 2017).

Dentre as várias atividades biológicas relatadas na literatura para os derivados 1,2,3-triazólicos, podem ser mencionadas: anti-HIV (DA SILVA *et al.*,

2009); antimicrobiana (THOMAS *et al.*, 2010); antibacteriana (BOECHAT *et al.*, 2011), antitumoral (CAFICI *et al.*, 2008; KAMAL *et al.*, 2008, DA CRUZ *et al.*, 2014), antiproliferativa (DEMCHUK *et al.*, 2014), antiprotozoária (BAKUNOV *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2010), antifúngica (PORE *et al.*, 2006; AHER *et al.*, 2009), antimalárica (GUANTAI *et al.*, 2010), tripanocida (SILVA JR. *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2010), anti-inflamatória (DHEER *et al.*, 2017), citotóxica (ANJOS *et al.*, 2009; GAZOLLA *et al.*, 2018), leishmanicida (FERREIRA *et al.*, 2007; PORTA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019); antiviral (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019), dentre outras.

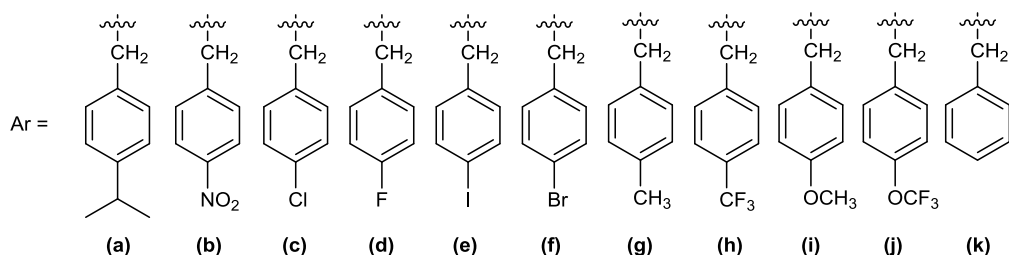
Conforme descrito no Capítulo 1 deste trabalho, a vanilina (**1**) é uma substância com importantes bioatividades e que é estruturalmente similar ao eugenol. Trabalhos desenvolvidos pelo Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos (GSPCB) da UFV mostraram que a associação entre o eugenol e porções 1,2,3-triazólicas resultou em compostos que possuem atividades citotóxica (GAZOLLA *et al.*, 2018), leishmanicida (TEIXEIRA *et al.*, 2018) e antiviral (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Considerando estes fatos, vislumbrou-se que a associação entre a vanilina (**1**) e diferentes grupos triazólicos também poderia resultar em compostos com interessantes bioatividades. Assim, descreve-se neste capítulo a síntese e a caracterização estrutural de 22 derivados da vanilina contendo o núcleo 1,2,3-triazólico.

A análise retróssintética para a preparação dos compostos triazólicos derivados da vanilina é apresentada no Esquema 2.3, pg. 35.



Onde: $n = 1$, para a obtenção de **2** e **6**

$n = 3$, para a obtenção de **3** e **7**



Esquema 2.3. Análise retrossintética para a preparação dos derivados da vanilina.

De acordo com a análise retrossintética, a etapa chave envolvida na preparação dos compostos triazólicos **6** e **7** corresponde a reação "click" (CuAAC) entre a vanilina alquilada (**2** e **3**) e diferentes azidas aromáticas (**5**). As azidas aromáticas **5** seriam preparadas a partir da obtenção dos ésteres metanossulfonados **4** que, por sua vez, poderiam ser preparados a partir de diferentes álcoois benzílicos comerciais. A preparação dos alcinos **2** e **3** ocorreria *via* reação de substituição nucleofílica bimolecular ($S_{\text{N}}2$) entre a vanilina (**1**) e os agente alquilantes brometo de propargila e pent-4-in-1-ilmetanosulfonato.

Na Figura 2.3 (pg. 36) encontram-se representada às estruturas dos compostos triazólicos sintetizados a partir da implementação do plano sintético apresentado no Esquema 2.3. Também são apresentadas as estruturas dos alcinos, **2** e **3**, preparados a partir da vanilina.

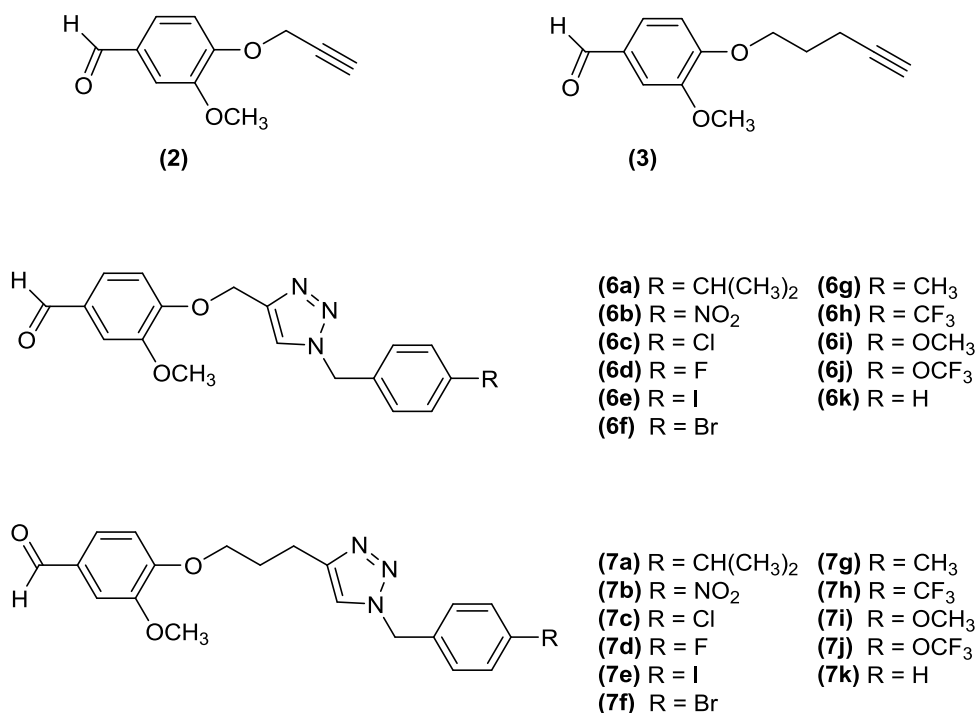


Figura 2.3. Estruturas dos alcinos **2** e **3** sintetizados a partir da vanilina e dos derivados triazólicos sintetizados neste trabalho.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Generalidades Metodológicas

Foram utilizados reagentes de grau P.A. para a síntese dos compostos.

As substâncias vanilina, álcool benzílico, álcool 4-fluorobenzílico, álcool 4-clorobenzílico, álcool 4-bromobenzílico, álcool 4-iodobenzílico, álcool 4-nitrobenzílico, álcool 4-metoxibenzílico, álcool 4-trifluorometoxibenzílico, álcool 4-trifluorobenzílico, álcool 4-isopropilbenzílico, álcool pent-4-in-1-ol, brometo de 4-metilbenzila, sulfato de cobre penta-hidratado, ascorbato de sódio, brometo de propargila (3-bromoprop-1-ino), brometo de tetrabutilamônio ((Bu)₄NBr), cloreto de mesila e azida de sódio foram adquiridas comercialmente da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e utilizados sem prévia purificação. Acetona, éter etílico, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, hidróxido de sódio, carbonato de sódio, trietilamina, ácido clorídrico e dimetilsulfóxido foram adquiridos da FMaia (Belo Horizonte, Brasil). Os solventes clorofórmio, diclorometano, tolueno, acetato

de etila e hexano foram adquiridos da Êxodo Científica (Sumaré, São Paulo, Brasil) e utilizados após destilação realizada no rotaevaporador.

A secagem do diclorometano e trietilamina foram feitas adicionando-se peneira molecular 4 Å aos solventes. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente e sob atmosfera de nitrogênio. Após este período, o solvente foi filtrado e armazenado sob atmosfera de nitrogênio em um frasco âmbar contendo peneira molecular 4 Å.

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se placas cromatográficas de sílica-gel impregnadas sobre alumínio. Após a eluição, as placas de CCD foram observadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) e reveladas com solução de permanganato de potássio (3 g de KMnO_4 , 20 g de K_2CO_3 , 5 mL de NaOH 5% m v^{-1} , 300 mL de água).

As separações em coluna cromatográfica foram realizadas utilizando-se sílica-gel (70-230 mesh), como fase estacionária. Os solventes utilizados como eluentes foram usados sem prévia purificação.

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF-302 e não foram corrigidas.

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos empregando-se a técnica reflectância total atenuada (ATR) em equipamento Varian 660-IR com acessório GladiATR na região de 4000 a 500 cm^{-1} .

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 300 MHz e 500 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 75 MHz e 125 MHz) foram obtidos em dois espectrômetros, VARIAN MERCURY 300 e BRUKER AVANCE-III HD Nanobay. Foram utilizados como solventes clorofórmio (CDCl_3) e dimetilsulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$) deuterados. As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

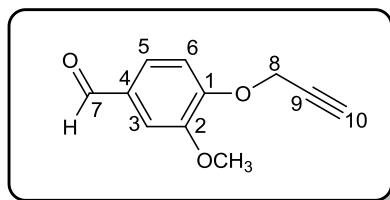
Os espectros de massas foram obtidos em aparelho Q-Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Germany).

A numeração utilizada nas estruturas dos compostos e nas descrições dos dados referentes aos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C não está necessariamente relacionada àquela recomendada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

2.3. PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS

2.3.1. SÍNTESE DOS ALCINOS TERMINAIS DERIVADOS DA VANILINA

Síntese do 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**)



A um balão de fundo redondo (100 mL) contendo uma solução de vanilina (0,800 g; 5,26 mmol) em acetona (40 mL) foram adicionados carbonato de potássio (1,45 g; 10,5 mmol) e 3-bromoprop-1-ino (1,25 g; 10,5 mmol). A mistura resultante foi então mantida sob refluxo por 24 horas. Após o resfriamento da mistura à temperatura ambiente, adicionou-se água gelada (50 mL) e, posteriormente, realizou-se a extração da fase aquosa com acetato de etila (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi lavada com solução aquosa saturada de cloreto de sódio (25,0 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto **2** foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v v⁻¹) e obtido como um sólido branco com 72% (0,716 g; 3,77 mmol) de rendimento.

Característica: sólido branco.

CCD: R_f = 0,50 (hexano-acetato de etila 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 81,4-82,6 °C.

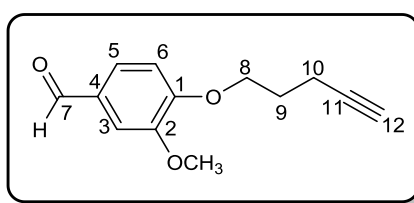
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3258, 3078, 3006, 2938, 2833, 2728, 2120, 1677, 1586, 1505, 1455, 1422, 1395, 1337, 1260, 1223, 1132, 1008, 926, 865, 806, 781, 730, 649, 548. O espectro é apresentado na Figura 2.6 (pg. 73).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,55 (s_{ap}, 1H, H-10); 3,91 (s, 3H, OCH₃); 4,83 (s_{ap}, 2H, H-8); 7,12 (d, 1H, J = 8,1 Hz, H-6); 7,40-7,45 (m, 2H, H-3/H-5); 9,84 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura 2.7 (pg. 74).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 56,0 (OCH_3); 56,7 (C-8); 76,7 (C-10); 77,4 (C-9); 109,3 (C-3); 112,4 (C-6); 126,2 (C-5); 130,8 (C-4); 149,9 (C-2); 152,0 (C-1); 190,9 (CHO). O espectro é apresentado na Figura 2.8 (pg. 75).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_3$: 191,07082, encontrado: 191,07039. O espectro é apresentado na Figura 2.9 (pg. 76).

Síntese do 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**)



A um balão de fundo redondo de 50 mL, contendo uma barra de agitação magnética, adicionaram-se vanilina (2,00 g; 13,2 mmol), brometo de tetrabutilamônio (0,424 g; 1,32 mmol), 15,0 mL de solução aquosa de NaOH 35% m v^{-1} e 15,0 mL de tolueno. A mistura resultante foi resfriada em banho de gelo e mantida sob agitação magnética por 1 hora. Em seguida, adicionou-se a essa mistura o pent-4-in-1-il-metanosulfonato (2,56 g; 15,8 mmol), previamente preparado a partir do pent-4-in-1-ol conforme descrito na literatura (TEIXEIRA *et al.*, 2018). Logo após, a reação foi mantida sob agitação e aquecimento (50 °C) por mais 2 horas. Decorrido este período, o volume da reação foi reduzido em evaporador rotativo. Posteriormente, adicionou-se solução saturada de cloreto de sódio (20,0 mL) à mistura que, então, foi transferida para um funil de separação e a fase aquosa extraída com éter etílico (3 x 20,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando-se como eluente hexano-acetato de etila-clorofórmio (4:1:1 v v^{-1}) e obtido como um sólido branco com 68% de rendimento (1,95 g; 8,95 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,68$ (hexano-acetato de etila 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 85,9–86,6 °C.

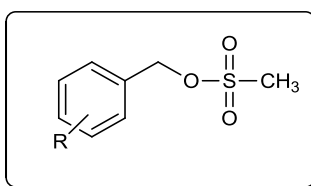
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3214, 2956, 2825, 2763, 2730, 2165, 1982, 1857, 1673, 1582, 1506, 1460, 1424, 1396, 1351, 1263, 1237, 1159, 1133, 1042, 1027, 963, 931, 868, 811, 714, 655, 592, 575, 535, 458. O espectro é apresentado na Figura 2.10 (pg. 81).

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1,92 (quint, 2H, $J = 6,6$ Hz, H-9); 2,33 (td, 2H, $J_1 = 7,0$ Hz e $J_2 = 2,6$ Hz, H-10); 2,82 (t, 2H, $J = 2,6$ Hz, H-12); 3,83 (s, 3H, OCH₃); 4,14 (t, 2H, $J = 6,0$ Hz, H-8); 7,18 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, H-6); 7,39 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-3); 7,53 (dd, 1H, $J_1 = 8,3$ Hz e $J_2 = 1,6$ Hz, H-5); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura 2.11 (pg. 82).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl₃) δ : 15,1 (C-10); 27,7 (C-9); 56,0 (OCH₃); 67,2 (C-12); 69,1 (C-8); 83,0 (C-11); 109,2 (C-3); 111,5 (C-6); 126,7 (C-5); 130,0 (C-4); 149,8 (C-2); 153,9 (C-1); 190,9 (CHO). O espectro é apresentado na Figura 2.12 (pg. 83).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M+H]⁺: Calculado para C₁₃H₁₅O₃: 219,10212, encontrado: 219,10162. O espectro é apresentado na Figura 2.13 (pg. 84).

2.3.2. SÍNTESE DOS ÉSTERES METANOSSULFONATOS



A um balão de fundo redondo (100 mL) foram adicionados 20,0 mL de diclorometano e o álcool benzílico comercial de interesse (1,00 equiv.). A mistura resultante, sob atmosfera de nitrogênio, foi resfriada a -50 °C. Em seguida, adicionou-se trietilamina (2,00 equiv.). Posteriormente, adicionou-se lentamente à mistura de reação o cloreto de mesila (1,50 equiv.) dissolvido em 1,00 mL de diclorometano. Após o término da reação, evidenciado por meio de análise por

CCD, adicionaram-se 10,0 mL de água destilada. A fase orgânica foi separada, lavada com solução aquosa ($0,100 \text{ mol L}^{-1}$) de HCl (3 x 15,0 mL), seguida de solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio (3 x 5,00 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sobre pressão reduzida para a obtenção do éster metanossulfonato de interesse. Os ésteres não foram submetidos a nenhum processo subsequente de purificação.

As estruturas dos ésteres metanossulfonatos foram confirmadas utilizando técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C e estão em total acordo com os dados descritos na literatura. Como estas substâncias sintetizadas não são inéditas e possuem caracterização bem documentada na literatura (BORGATI *et al.*, 2013; GAZOLLA, 2015; LIMA, 2018), optou-se por não descrever detalhadamente suas caracterizações. Na Figura 2.4, encontram-se representadas as estruturas dos ésteres metanossulfonatos e os rendimentos obtidos nas suas preparações.

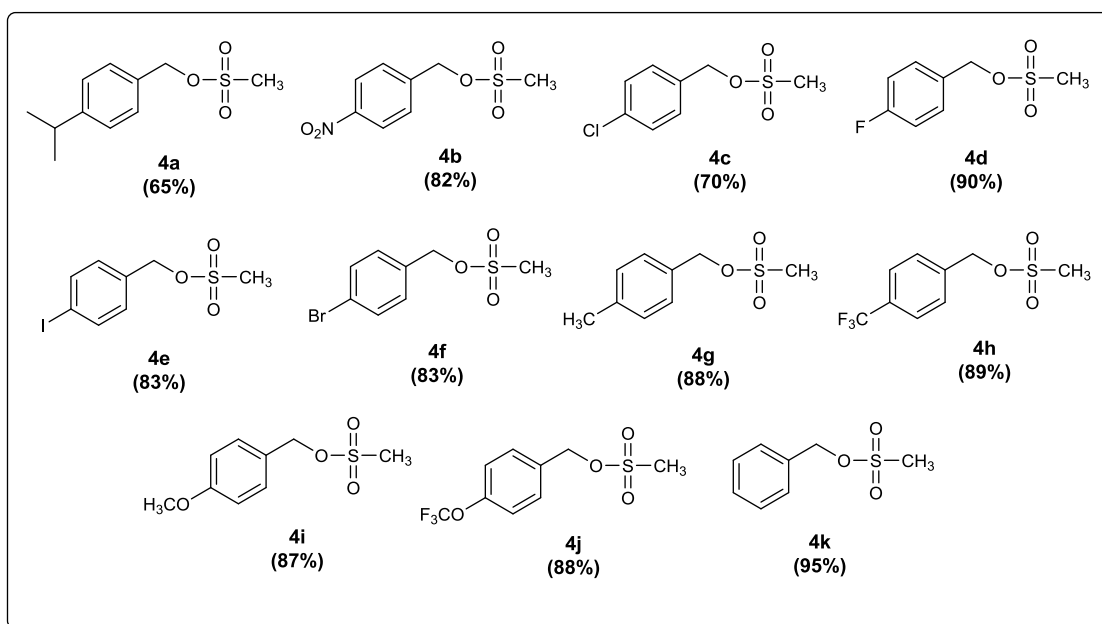
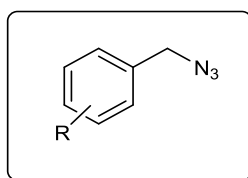


Figura 2.4. Estruturas dos ésteres metanossulfonatos e os rendimentos obtidos em suas preparações.

2.3.3. SÍNTESE DAS AZIDAS ORGÂNICAS



A um balão de fundo redondo (100 mL) contendo 10,0 mL de dimetilsulfóxido e azida de sódio (4,00 equiv.), foi adicionado o éster metanossulfonato de interesse (1,00 equiv.) sintetizado conforme descrito no item 2.3.2. A mistura de reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente e monitorada por CCD. Terminada a reação, adicionaram-se 10,0 mL de água gelada e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 20,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi lavada com solução saturada de NaCl, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sobre pressão reduzida para a obtenção da azida de interesse.

As estruturas das azidas benzílicas foram confirmadas utilizando técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C e estão em total acordo com os dados descritos na literatura. Assim como os ésteres metanossulfonatos, as azidas sintetizadas não são inéditas e possuem caracterização bem documentada na literatura (BORGATI *et al.*, 2013; GAZOLLA, 2015; LIMA, 2018), portanto, optou-se por não descrever detalhadamente suas caracterizações. Na Figura 2.5., encontra-se representadas as estruturas das azidas e os rendimentos obtidos em suas reações de preparação.

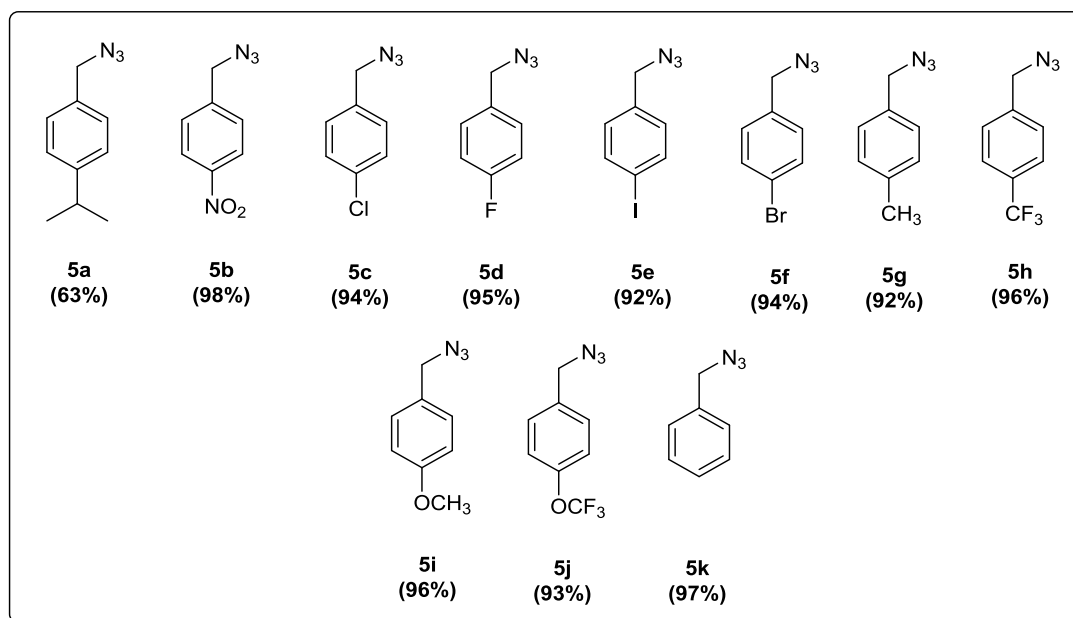
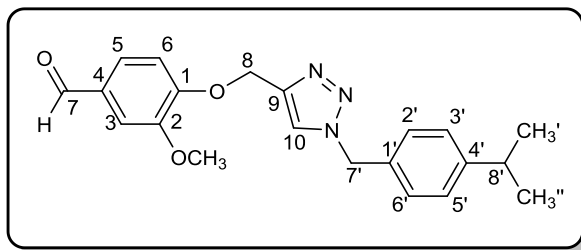


Figura 2.5. Estruturas e rendimentos das azidas sintetizadas.

2.3.4. SÍNTESE DOS COMPOSTOS TRIAZÓLICOS DERIVADOS DA VANILINA

Síntese do 4-((1-(4-isopropilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6a**)



A um balão de fundo redondo (10 mL) foram adicionados 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**) (0,156 g; 0,820 mmol), 4-isopropilbenzilazida (**5a**) (0,144 g; 0,820 mmol), ascorbato de sódio (0,0650 g; 0,328 mmol), 1,00 mL de diclorometano e 1,00 mL de água. Em seguida, adicionou-se $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0410 g; 0,164 mmol). A mistura de reação foi mantida sob agitação vigorosa à temperatura ambiente. Após o término da reação, evidenciado por análise por CCD, a mistura foi transferida para um funil de separação e a fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 10,0 mL) lavada com solução saturada de carbonato de sódio, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sobre pressão reduzida. O composto **6a** foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel eluída com acetato de etila-hexano (2:1 v v⁻¹), sendo obtido com 82% de rendimento (0,246 g; 0,674 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,69$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 103,8–104,9 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3138, 2959, 2870, 2726, 1980, 1679, 1585, 1506, 1462, 1423, 1395, 1338, 1261, 1134, 1050, 1029, 994, 811, 782, 730, 639, 562. O espectro é apresentado na Figura A1 (pg. 223) no anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,22 (d, 6H, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_3'/\text{CH}_3''$); 2,89 (sept, 1H, $J = 7,2$ Hz, H-8'); 3,87 (s, 3H, OCH_3); 5,32 (s, 2H, H-8); 5,46 (s, 2H, H-7'); 7,16-7,22 (m, 5H, H-2'/H-3'/H-5'/H-6'/H-6); 7,38-7,42 (m, 2H, H-3/H-5); 7,57 (s, 1H,

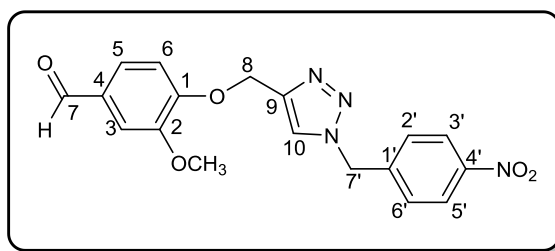
H-10); 9,83 (s, 1H, $\underline{\text{CHO}}$). O espectro é apresentado na Figura A2 (pg. 224) no anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 23,8 ($\underline{\text{CH}_3'}/\underline{\text{CH}_3''}$); 33,8 (C-8'); 53,9 (C-7'); 56,0 ($\underline{\text{OCH}_3}$); 62,9 (C-8); 109,1 (C-3); 112,5 (C-6); 123,1 (C-10); 126,7 (C-5); 127,1 (C-3'/C-5'); 128,3 (C-2'/C-6'); 130,5 (C-1'); 131,5 (C-4); 143,4 (C-9); 149,7 (C-4'); 149,8 (C-2); 153,0 (C-1); 190,9 ($\underline{\text{CHO}}$). O espectro é apresentado na Figura A3 (pg. 225) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3$: 366,18177, encontrado: 366,18170; **$[\text{M}+\text{Na}]^+$:** Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{NaO}_3$: 388,16371, encontrado: 388,16291. **$[2\text{M}+\text{Na}]^+$:** Calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{NaO}_6$: 753,33765, encontrado: 753,33576. O espectro é apresentado na Figura A4 (pg. 226) no anexo.

Os compostos **6b-6k** e **7a-7k** foram sintetizados empregando-se a mesma metodologia descrita para a preparação do composto **6a**. Porém, para a preparação dos compostos **7a-7k** foi utilizado o alquino 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**). A seguir, estão descritas as informações relativas às reações e os dados obtidos para a identificação de cada substância.

Síntese do 3-metoxi-4-((1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldeído (**6b**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,179 g; 0,486 mmol) com 60% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**) (0,155 g; 0,820 mmol), 4-nitrobenzilazida (**5b**) (0,146 g; 0,820 mmol), ascorbato de sódio (0,0650 g; 0,328 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0410 g; 0,164 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,25$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 118,7–119,3 °C.

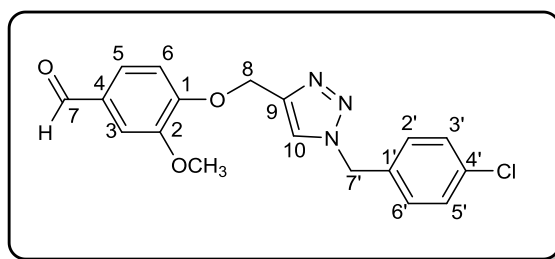
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3129, 3078, 2936, 2852, 2769, 2001, 1658, 1595, 1584, 1507, 1465, 1426, 1399, 1338, 1266, 1234, 1142, 1047, 1026, 1001, 845, 817, 789, 728, 643, 565. O espectro é apresentado na Figura A5 (pg. 227) no anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,87 (s, 3H, OCH_3); 5,35 (s, 2H, H-8); 5,63 (s, 2H, H-7'); 7,19 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,38-7,43 (m, 4H, H-2'/H-6'/H-3/H-5); 7,70 (s, 1H, H-10); 8,20 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3'/H-5'); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A6 (pg. 228) no anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 53,1 (C-7'); 55,9 (OCH_3); 62,7 (C-8); 109,2 (C-3); 112,3 (C-6); 123,0 (C-10); 124,3 (C-3'/C-5'); 126,6 (C-5); 128,6 (C-2'/C-6'); 130,6 (C-4); 141,3 (C-1'); 144,1 (C-9); 148,1 (C-4'); 149,8 (C-2); 152,7 (C-1); 190,8 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A7 (pg. 229) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_5$: 369,11989, encontrado: 369,11927; **$[\text{M}+\text{Na}]^+$:** Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{NaO}_5$: 391,10184, encontrado: 391,10133. O espectro é apresentado na Figura A8 (pg. 230) no anexo.

Síntese do 4-((1-(4-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6c**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,261 g; 0,731 mmol) com 87% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**) (0,160 g; 0,840 mmol), 4-clorobenzilazida (**5c**) (0,141 g; 0,840 mmol),

ascorbato de sódio (0,0670 g; 0,336 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0420 g; 0,168 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,53$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 103,6–104,5 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3127, 3097, 2963, 2932, 2831, 2769, 1999, 1664, 1584, 1507, 1464, 1427, 1401, 1347, 1265, 1223, 1142, 1049, 1028, 999, 862, 818, 785, 730, 642, 565, 489, 445. O espectro é apresentado na Figura A9 (pg. 231) no anexo.

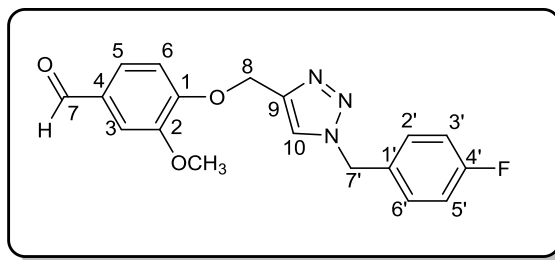
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,87 (s, 3H, OCH_3); 5,32 (s, 2H, H-8); 5,47 (s, 2H, H-7'); 7,19 (d_{ap}^* , 3H, $J = 8,3$ Hz, H-2'/H-6'/H-6); 7,32 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3'/H-5'); 7,38-7,42 (m, 2H, H-3/H-5); 7,59 (s, 1H, H-10); 9,82 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A10 (pg. 232) no anexo.

*Apesar da sobreposição dos sinais referentes aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-6, observou-se a presença de um duplete aparente sendo possível calcular a constante de acoplamento $J = 8,1$ Hz, característica de acoplamento de hidrogênios em posições *orto* de acordo com a literatura (PAVIA *et al.*, 2015).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 53,1 (C-7'); 55,9 (OCH_3); 62,7 (C-8); 109,1 (C-3); 112,4 (C-6); 123,0 (C-10); 126,5 (C-5); 129,3 (C-3'/C-5'); 129,4 (C-2'/C-6'); 130,5 (C-4); 132,5 (C-1'); 134,7 (C-4'); 143,4 (C-9); 149,6 (C-2); 152,6 (C-1); 190,9 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A11 (pg. 233) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{ClN}_3\text{O}_3$: 358,09584, encontrado: 358,09540; **$[\text{M}+\text{Na}]^+$:** Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{NaO}_3$: 380,07779, encontrado: 380,07735. O espectro é apresentado na Figura A12 (pg. 234) no anexo.

Síntese do 4-((1-(4-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6d**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,197 g; 0,578 mmol) com 66% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**) (0,167 g; 0,880 mmol), 4-fluorobenzilazida (**5d**) (0,133 g; 0,880 mmol), ascorbato de sódio (0,0700 g; 0,352 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0440 g; 0,176 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,59$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 81,6–82,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3140, 3073, 3001, 2938, 2834, 2806, 1988, 1681, 1584, 1507, 1465, 1422, 1391, 1335, 1262, 1219, 1158, 1134, 1119, 1054, 1028, 993, 853, 814, 778, 724, 633, 566, 542, 487. O espectro é apresentado na Figura A13 (pg. 235) no anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,87 (s, 3H, OCH_3); 5,33 (s, 2H, H-8); 5,47 (s, 2H, H-7'); 7,03 (t_{ap}, 2H, $J = 8,6$ Hz, H-3'/H-5'); 7,19 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,22-7,28 (m, 2H, H-2'/H-6'); 7,38-7,42 (m, 2H, H-3'/H-5'); 7,58 (s, 1H, H-10); 9,82 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A14 (pg. 236) no anexo.

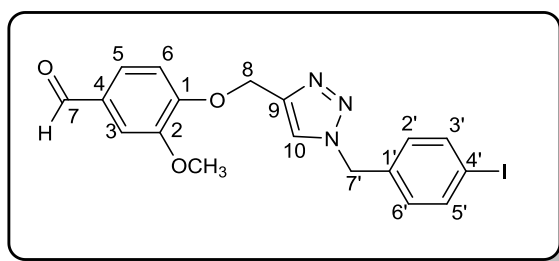
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 53,2 (C-7'); 55,9 (OCH_3); 62,6 (C-8); 109,1 (C-3); 112,4 (C-6); 116,1 (d, $J = 21,8$ Hz, C-3'/C-5'); 122,8 (C-10); 126,5 (C-5); 130,0-130,1 (m*, C-2'/C-6'/C-1'); 130,5 (C-4); 143,7 (C-9); 149,7 (C-2); 152,7 (C-1); 162,8 (d, $J = 252,0$ Hz, C-4'); 190,9 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A15 (pg. 237) no anexo.

*Apesar da sobreposição dos dupletos referentes aos carbonos C-2'/C-6' e C-1', foi possível calcular as constantes de acoplamento $J = 8,3$ Hz e $J = 3,0$ Hz, características de acoplamento C-F em *meta* e *para* de acordo com valores descritos na literatura (PRETSCH *et al.*, 1989).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$:

Calculado para $C_{18}H_{17}FN_3O_3$: 342,12539, encontrado: 342,12498; $[M+Na]^+$: Calculado para $C_{18}H_{16}FN_3NaO_3$: 364,10734, encontrado: 364,10696. O espectro é apresentado na Figura A16 (pg. 238) no anexo.

Síntese do 4-((1-(4-iodobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6e**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,214 g; 0,477 mmol) com 71% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**) (0,127 g; 0,670 mmol), 4-iodobenzilazida (**5e**) (0,174 g; 0,670 mmol), ascorbato de sódio (0,0530 g; 0,268 mmol) e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,0340 g; 0,134 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,51$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 107,8–108,6 °C.

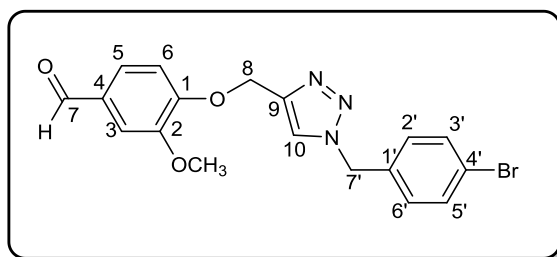
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3134, 3079, 3003, 2930, 2808, 2704, 1976, 1694, 1586, 1504, 1452, 1384, 1333, 1258, 1217, 1158, 1114, 1051, 1028, 983, 849, 815, 779, 726, 631, 588, 564, 467. O espectro é apresentado na Figura A17 (pg. 239) no anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,88 (s, 3H, OCH_3); 5,33 (s, 2H, H-8); 5,44 (s, 2H, H-7'); 6,99 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2'/H-6'); 7,19 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,38-7,40 (m, 1H, H-5); 7,42 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-3); 7,58 (s, 1H, H-10); 7,68 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3'/H-5'); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A18 (pg. 240) no anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 53,5 (C-7'); 55,9 (OCH_3); 62,7 (C-8); 94,7 (C-4'); 109,2 (C-3); 112,4 (C-6); 123,0 (C-10); 126,5 (C-5); 129,8 (C-2'/C-6'); 130,6 (C-4); 133,8 (C-1'); 138,2 (C-3'/C-5'); 143,7 (C-9); 149,9 (C-2); 152,9 (C-1); 190,8 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A19 (pg. 241) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$: 450,03146, encontrado: 450,03118; $[\text{M}+\text{Na}]^+$: Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{NaO}_3$: 472,01340, encontrado: 472,01299. O espectro é apresentado na Figura A20 (pg. 242) no anexo.

Síntese do 4-((1-(4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6f**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,250 g; 0,622 mmol) com 83% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**) (0,142 g; 0,750 mmol), 4-bromobenzilazida (**5f**) (0,159 g; 0,750 mmol), ascorbato de sódio (0,0590 g; 0,300 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0370 g; 0,150 mmol).

Característica: sólido amarelo palha.

CCD: $R_f = 0,57$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v $^{-1}$).

Faixa de fusão: 101,8–102,9 °C.

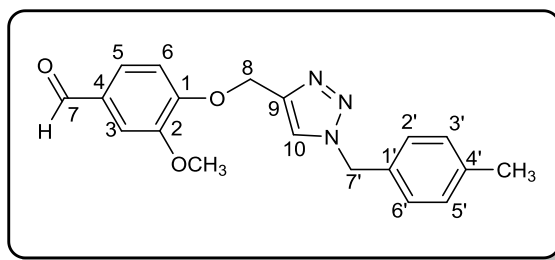
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3128, 3099, 2962, 2931, 2829, 2770, 1996, 1665, 1584, 1507, 1487, 1464, 1426, 1401, 1346, 1266, 1224, 1163, 1142, 1069, 1049, 1020, 999, 861, 820, 783, 730, 642, 565, 480. O espectro é apresentado na Figura 2.15 (pg. 90).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,87 (s, 3H, OCH_3); 5,33 (s, 2H, H-8); 5,45 (s, 2H, H-7'); 7,13 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, H-2'/H-6'); 7,18 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,39-7,42 (m, 2H, H-3'/H-5'); 7,48 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, H-3'/H-5'); 7,58 (s, 1H, H-10); 9,82 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura 2.16 (pg. 91).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 53,4 (C-7'); 55,8 (OCH_3); 62,8 (C-8); 109,1 (C-3); 112,6 (C-6); 122,9 (C-4'); 123,0 (C-10); 126,4 (C-5); 129,4 (C-2'/C-6'); 130,4 (C-1'); 132,0 (C-3'/C-5'); 133,1 (C-4); 143,6 (C-9); 149,8 (C-2); 152,8 (C-1); 190,8 (CHO). O espectro é apresentado na Figura 2.17 (pg. 92).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{BrN}_3\text{O}_3$: 402,04533, encontrado: 402,04543; **$[\text{M}+\text{Na}]^+$:** Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{NaO}_3$: 424,02727, encontrado: 424,02710. O espectro é apresentado na Figura 2.18 (pg. 93).

Síntese do 4-((1-(4-metilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6g**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,196 g; 0,582 mmol) com 66% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**) (0,169 g; 0,890 mmol), 4-metilbenzilazida (**5g**) (0,131 g; 0,890 mmol), ascorbato de sódio (0,0700 g; 0,356 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0450 g; 0,178 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,51$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 97,9–98,4 °C.

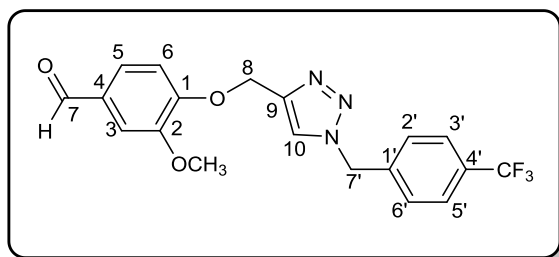
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3129, 3004, 2961, 2935, 2834, 2766, 1979, 1669, 1584, 1506, 1464, 1428, 1399, 1347, 1264, 1233, 1162, 1140, 1049, 1030, 996, 863, 821, 784, 728, 633, 566, 478. O espectro é apresentado na Figura A21 (pg. 243) no anexo.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,32 (s, 3H, CH₃); 3,86 (s, 3H, OCH₃); 5,31 (s, 2H, H-8); 5,44 (s, 2H, H-7'); 7,14 (s_{ap}, 4H, H-2'/H-3'/H-5'/H-6'); 7,19 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,37-7,41 (m, 2H, H-3/H-5); 7,54 (s, 1H, H-10); 9,81 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A22 (pg. 244) no anexo.

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 21,1 (CH₃); 54,0 (C-7'); 55,9 (OCH₃); 62,9 (C-8); 109,2 (C-3); 112,7 (C-6); 123,0 (C-10); 126,6 (C-5); 128,1 (C-3'/C-5'); 129,8 (C-2'/C-6'); 130,5 (C-1'); 131,2 (C-4); 138,4 (C-4'); 143,4 (C-9); 149,7 (C-2); 152,9 (C-1); 190,6 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A23 (pg. 245) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M+H]⁺: Calculado para C₁₉H₂₀N₃O₃: 338,15047, encontrado: 338,14999; **[M+Na]⁺:** Calculado para C₁₉H₁₉N₃NaO₃: 360,13241, encontrado: 360,13171. **[2M+Na]⁺:** Calculado para C₃₈H₃₈N₆NaO₆: 697,27505, encontrado: 697,27339. O espectro é apresentado na Figura A24 (pg. 246) no anexo.

Síntese do 4-((1-(4-(trifluorometil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6h**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,201 g; 0,514 mmol) com 67% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-ilo)benzaldeído (**2**) (0,146 g; 0,770 mmol), 4-trifluorobenzilazida (**5h**) (0,155 g; 0,770 mmol),

ascorbato de sódio (0,0610 g; 0,308 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0390 g; 0,154 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,47$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 110,9–111,7 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3141, 3075, 3000, 2944, 2857, 1984, 1678, 1620, 1587, 1505, 1468, 1421, 1400, 1325, 1262, 1221, 1158, 1117, 1066, 1018, 1001, 818, 784, 732, 618, 591. O espectro é apresentado na Figura A25 (pg. 247) no anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,87 (s, 3H, OCH_3); 5,34 (s, 2H, H-8); 5,57 (s, 2H, H-7'); 7,19 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-6); 7,36 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, H-2'/H-6'); 7,41 (dd_{ap}^* , 2H, $J_1 = 9,5$ Hz e $J_2 = 1,4$ Hz, H-3'/H-5); 7,61 ($\text{d}_{\text{ap}}^{**}$, 3H, $J = 7,8$ Hz, H-3'/H-5'/H-10); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A26 (pg. 248) no anexo.

*Apesar da sobreposição dos sinais referentes aos hidrogênios H-3 e H-5 observou-se a presença de um duplete duplo aparente sendo possível calcular as constantes de acoplamento $J_1 = 9,5$ Hz e $J_2 = 1,4$ Hz, características de acoplamentos de hidrogênios em posições *orto* e *meta*, respectivamente.

**Os sinais referentes aos hidrogênios H-3'/H-5' e H-10 também se apresentaram sobrepostos, porém foi possível observar a presença de um duplete aparente com constante de acoplamento $J = 7,8$ Hz.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 53,5 (C-7'); 55,8 (OCH_3); 62,8 (C-8); 109,3 (C-3); 112,6 (C-6); 123,1 (C-10); 126,0 (q, $J = 3,8$ Hz, C-3'/C-5'); 126,4 (C-5); 127,3 (q*, $J = 270,4$ Hz, CF_3); 128,2 (C-2'/C-6'); 130,7 (C-4); 131,0 (q, $J = 32,8$ Hz, C-4'); 138,1 (C-1'); 144,0 (C-9); 149,8 (C-2); 152,5 (C-1); 190,4 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A27 (pg. 249) no anexo.

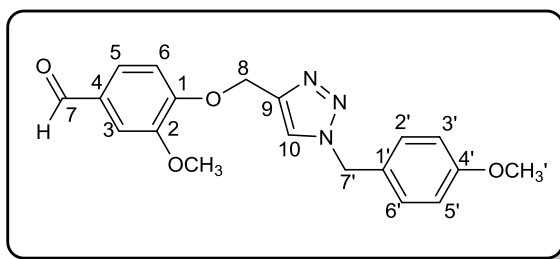
*Não foi possível observar todos os sinais do quarteto referente ao acoplamento do carbono do grupo CF_3 . A ausência de um dos sinais pode ser justificada por se encontrar, provavelmente, na região do ruído do equipamento. Entretanto, apesar

de serem visualizados apenas três sinais, foi possível calcular a constante de acoplamento cujo valor está de acordo com aquele descrito na literatura (PRETSCH *et al.*, 1989).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$:

Calculado para $C_{19}H_{17}F_3N_3O_3$: 392,12220, encontrado: 392,12199; $[M+Na]^+$: Calculado para $C_{19}H_{16}F_3N_3NaO_3$: 414,10415, encontrado: 414,10361. O espectro é apresentado na Figura A28 (pg. 250) no anexo.

Síntese do 4-((1-(4-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6i**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,155 g; 0,439 mmol) com 78% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**) (0,108 g; 0,570 mmol), 4-metoxibenzilazida (**5i**) (0,092 g; 0,570 mmol), ascorbato de sódio (0,0450 g; 0,228 mmol) e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,0280 g; 0,114 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,44$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 66,7–67,8 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3141, 3010, 2953, 2833, 1979, 1671, 1584, 1507, 1463, 1427, 1397, 1348, 1266, 1248, 1234, 1178, 1138, 1047, 1029, 991, 848, 811, 779, 728, 636, 552, 516, 460. O espectro é apresentado na Figura A29 (pg. 251) no anexo.

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 3,78 (s, 3H, OCH_3'); 3,87 (s, 3H, OCH_3); 5,31 (s, 2H, H-8); 5,43 (s, 2H, H-7'); 6,87 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-3'/H-5'); 7,18-7,22 (m, 3H,

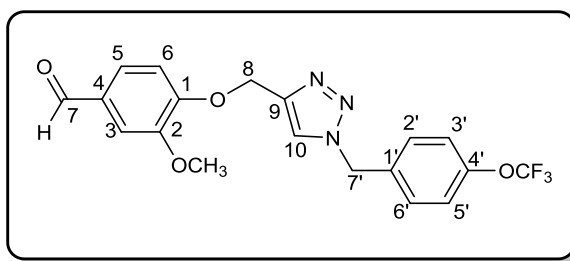
H-2'/H-6'/H-6); 7,37-7,40 (m, 1H, H-5); 7,42 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, /H-3); 7,54 (s, 1H, H-10); 9,82 (s, 1H, $\underline{\text{C}}\text{HO}$). O espectro é apresentado na Figura A30 (pg. 252) no anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 53,8 (C-7'); 55,3 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3'$); 55,9 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 62,9 (C-8); 109,2 (C-3); 112,5 (C-6); 114,3 (C-3'/C-5'); 122,8 (C-10); 126,1 (C-1'); 126,7 (C-5); 129,6 (C-2'/C-6'); 130,3 (C-4); 143,1 (C-9); 149,9 (C-2); 152,9 (C-1); 159,9 (C-4'); 190,9 ($\underline{\text{C}}\text{HO}$). O espectro é apresentado na Figura A31 (pg. 253) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4$: 354,14538, encontrado: 354,14528. O espectro é apresentado na Figura A32 (pg. 254) no anexo.

Síntese do 3-metoxi-4-((1-(4-(trifluorometoxi)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldeído (**6j**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,266 g; 0,654 mmol) com 89% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**) (0,140 g; 0,740 mmol), 4-trifluorometoxibenzilazida (**5j**) (0,161 g; 0,740 mmol), ascorbato de sódio (0,0590 g; 0,296 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0370 g; 0,148 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,68$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v $^{-1}$).

Faixa de fusão: 108,6–109,5 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3146, 3080, 3000, 2963, 2824, 2750, 1976, 1682, 1585, 1506, 1463, 1424, 1396, 1261, 1214, 1150, 1120, 1053, 1029, 985, 853, 818, 793, 727, 635, 588. O espectro é apresentado na Figura A33 (pg. 255) no anexo.

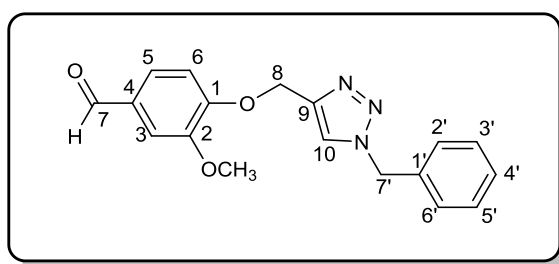
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,88 (s, 3H, OCH_3); 5,34 (s, 2H, H-8); 5,51 (s, 2H, H-7'); 7,18-7,22 (m, 3H, H-3'/H-5'/H-6'); 7,30 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-2'/H-6'); 7,39-7,43 (m, 2H, H-3/H-5); 7,61 (s, 1H, H-10); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A34 (pg. 256) no anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 53,2 (C-7'); 55,7 (OCH_3); 62,9 (C-8); 109,4 (C-3); 112,8 (C-6); 120,3 (q^* , $J = 256,1$ Hz, OCF_3); 121,5 (C-10); 123,1 (C-5); 126,5 (C-3'/C-5'); 129,9 (C-2'/C-6'); 130,9 (C-4); 132,7 (C-1'); 144,0 (C-9); 149,4 (q, $J = 2,3$ Hz, C-4'); 150,0 (C-2); 152,7 (C-1); 190,8 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A35 (pg. 257) no anexo.

*Não foi possível observar todos os sinais do quarteto referente ao acoplamento do carbono do grupo OCF_3 . A ausência de um dos sinais pode ser justificada por se encontrar, provavelmente, na região do ruído do equipamento. Entretanto, apesar de serem visualizados apenas três sinais, foi possível calcular a constante de acoplamento cujo valor está de acordo com aquele descrito na literatura (PRETSCH *et al.*, 1989).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4$: 408,11712, encontrado: 408,11677. O espectro é apresentado na Figura A36 (pg. 258) no anexo.

Síntese do 4-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**6k**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,215 g; 0,666 mmol) com 72% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (**2**) (0,177 g; 0,930 mmol), benzilazida (**5k**) (0,124 g; 0,930 mmol), ascorbato de sódio (0,0740 g; 0,372 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0470 g; 0,186 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,61$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 99,3–100,7 °C.

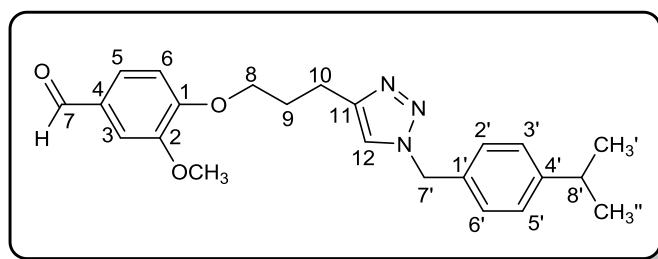
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3142, 3066, 3027, 3003, 2941, 2847, 2775, 1977, 1668, 1584, 1506, 1465, 1429, 1396, 1347, 1265, 1233, 1214, 1162, 1137, 1050, 1030, 991, 858, 807, 755, 716, 697, 635, 563, 470. O espectro é apresentado na Figura A37 (pg. 259) no anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,86 (s, 3H, OCH_3); 5,32 (s, 2H, H-8); 5,49 (s, 2H, H-7'); 7,19 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,23-7,26 (m, 2H, H-3/H-5); 7,33-7,41 (m, 5H, H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'); 7,57 (s, 1H, H-10); 9,82 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A38 (pg. 260) no anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 54,2 (C-7'); 55,9 (OCH_3); 62,8 (C-8); 109,4 (C-3); 112,6 (C-6); 122,9 (C-10); 126,5 (C-5); 127,9 (C-2'/C-6'); 128,8 (C-4'); 129,1 (C-3'/C-5'); 130,5 (C-4); 134,2 (C-1'); 143,4 (C-9); 149,6 (C-2); 152,9 (C-1); 190,6 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A39 (pg. 261) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3$: 324,13482, encontrado: 324,13429; **$[\text{M}+\text{Na}]^+$:** Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{NaO}_3$: 346,11676, encontrado: 346,11621. O espectro é apresentado na Figura A40 (pg. 262) no anexo.

Síntese do 4-(3-(1-(4-isopropilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (**7a**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,217 g; 0,552 mmol) com 87% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**) (0,139 g; 0,640 mmol), 4-isopropilbenzilazida (**5a**) (0,112 g; 0,640 mmol),

ascorbato de sódio (0,0506 g; 0,256 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0319 g; 0,128 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,61$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 112,3–112,7 °C.

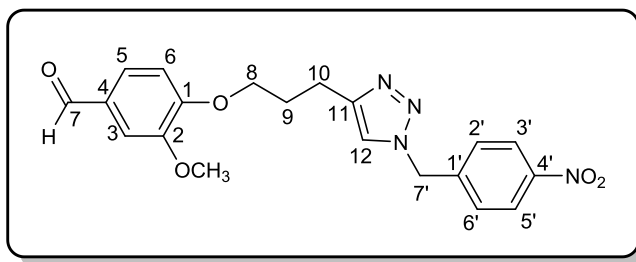
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3125, 3001, 2962, 2913, 2871, 2837, 2017, 1671, 1583, 1508, 1459, 1422, 1399, 1327, 1264, 1235, 1160, 1131, 1028, 1009, 964, 859, 814, 788, 731, 708, 651, 571, 538, 482. O espectro é apresentado na Figura A41 (pg. 263) no anexo.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 1,16 (d, 2H, $J = 6,9$ Hz, $\text{CH}_3'/\text{CH}_3''$); 2,07 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-9); 2,77 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz, H-10); 2,85 (sept, 1H, $J = 6,9$ Hz, H-8'); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 4,11 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, H-8); 5,48 (s, 2H, H-7'); 7,14 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-6); 7,19-7,23 (m, 4H, H-2'/H-3'/H-5'/H-6'); 7,39 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, H-3); 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz e $J_2 = 1,7$ Hz, H-5); 7,94 (s, 1H, H-12); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A42 (pg. 264) no anexo.

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 21,5 (C-10); 23,7 ($\text{CH}_3'/\text{CH}_3''$); 28,2 (C-9); 33,0 (C-8'); 52,4 (C-7'); 55,5 (OCH_3); 67,6 (C-8); 109,7 (C-3); 112,0 (C-6); 122,1 (C-12); 126,0 (C-5); 126,5 (C-3'/C-5'); 127,8 (C-2'/C-6'); 129,6 (C-1'); 133,7 (C-4); 146,3 (C-11); 148,2 (C-4'); 149,2 (C-2); 153,5 (C-1); 191,3 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A43 (pg. 265) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3$: 394,21307, encontrado: 394,21284; **$[\text{M}+\text{Na}]^+$:** Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_3$: 416,19501, encontrado: 416,19435. O espectro é apresentado na Figura A44 (pg. 266) no anexo.

Síntese do 3-metoxi-4-(3-(1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (**7b**)



Este composto foi obtido como um sólido amarelo (0,242 g; 0,610 mmol) com 69% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**) (0,194 g; 0,890 mmol), 4-nitrobenzilazida (**5b**) (0,158 g; 0,890 mmol), ascorbato de sódio (0,0703 g; 0,356 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0444 g; 0,178 mmol).

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,28$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 133,8–134,2 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3150, 3080, 2956, 2912, 2834, 1976, 1671, 1584, 1508, 1469, 1406, 1345, 1279, 1260, 1237, 1131, 1026, 1003, 860, 807, 728, 654, 590, 571, 432. O espectro é apresentado na Figura A45 (pg. 267) no anexo.

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2,09 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-9); 2,80 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, H-10); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 4,12 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-8); 5,73 (s, 2H, H-7'); 7,15 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,39 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-3); 7,48 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-2'/H-6'); 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz e $J_2 = 1,6$ Hz, H-5); 8,03 (s, 1H, H-12); 8,21 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-3'/H-5'); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A46 (pg. 268) no anexo.

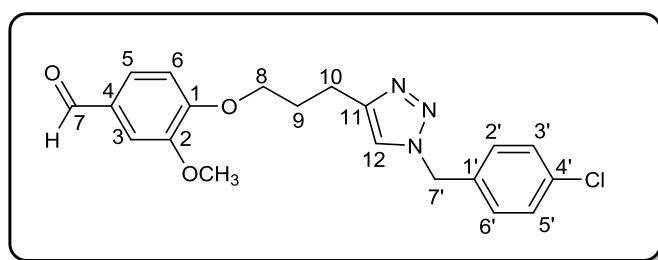
RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 21,5 (C-10); 28,1 (C-9); 51,6 (C-7'); 55,4 (OCH_3); 67,5 (C-8); 109,5 (C-3); 112,0 (C-6); 122,6 (C-12); 123,8 (C-2'/C-6'); 126,0 (C-5); 128,8 (C-3'/C-5'); 129,5 (C-1'); 143,6 (C-4); 146,5 (C-11); 147,0 (C-

4'); 149,0 (C-2); 153,4 (C-1); 191,3 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A47 (pg. 269) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$:

Calculado para $C_{20}H_{21}N_4O_5$: 397,15119, encontrado: 397,15097. O espectro é apresentado na Figura A48 (pg. 270) no anexo.

Síntese do 4-(3-(1-(4-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (**7c**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,221 g; 0,573 mmol) com 89% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**) (0,141 g; 0,650 mmol), 4-clorobenzilazida (**5c**) (0,109 g; 0,650 mmol), ascorbato de sódio (0,0513 g; 0,260 mmol) e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,0324 g; 0,130 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,54$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 67,9–68,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/cm^{-1}$: 3151, 3088, 2949, 2907, 2835, 2016, 1672, 1585, 1508, 1492, 1470, 1449, 1406, 1327, 1279, 1259, 1236, 1130, 1083, 1028, 1007, 851, 825, 794, 775, 729, 654, 571, 508, 440. O espectro é apresentado na Figura A49 (pg. 271) no anexo.

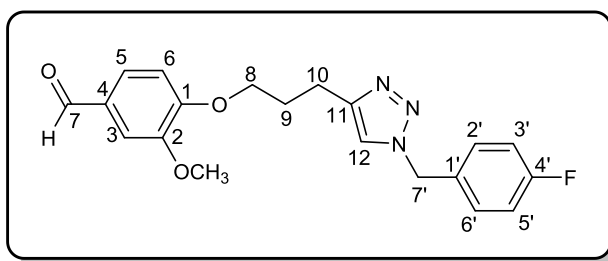
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2,08 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-9); 2,78 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz, H-10); 3,83 (s, 3H, OCH₃); 4,11 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-8); 5,55 (s, 2H, H-7'); 7,14 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-6); 7,30 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-2'/H-6'); 7,39 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, H-3); 7,42 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-3'/H-5'); 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz e $J_2 =$

1,7 Hz, H-5); 7,96 (s, 1H, H-12); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A50 (pg. 272) no anexo.

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 21,5 (C-10); 28,2 (C-9); 51,9 (C-7'); 55,5 (OCH₃); 67,6 (C-8); 109,6 (C-3); 111,9 (C-6); 122,2 (C-12); 126,0 (C-5); 128,7 (C-2'/C-6'); 129,5 (C-1'); 129,7 (C-3'/C-5'); 132,7 (C-4); 135,2 (C-4'); 146,3 (C-11); 149,2 (C-2); 153,5 (C-1); 191,3 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A51 (pg. 273) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M+H]⁺: Calculado para C₂₀H₂₁ClN₃O₃: 386,12714, encontrado: 386,12664. O espectro é apresentado na Figura A52 (pg. 274) no anexo.

Síntese do 4-(3-(1-(4-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (**7d**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,222 g; 0,601 mmol) com 89% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**) (0,148 g; 0,680 mmol), 4-fluorobenzilazida (**5d**) (0,103 g; 0,680 mmol), ascorbato de sódio (0,0537 g; 0,272 mmol) e CuSO₄·5H₂O (0,0339 g; 0,136 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: R_f = 0,55 (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 71,9–72,3 °C.

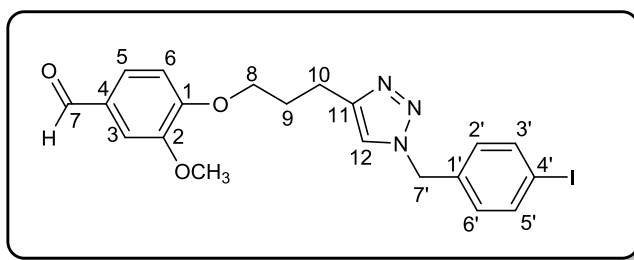
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3136, 3074, 2932, 2858, 2028, 1678, 1584, 1508, 1463, 1423, 1397, 1340, 1264, 1221, 1159, 1133, 1027, 940, 808, 780, 730, 654, 590, 533, 491. O espectro é apresentado na Figura A53 (pg. 275) no anexo.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,07 (quint, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-9); 2,78 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, H-10); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 4,11 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, H-8); 5,53 (s, 2H, H-7'); 7,14 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-6); 7,18 (t_{ap} , 2H, $J = 8,7$ Hz, H-3'/H-5'); 7,33-7,37 (m, 2H, H-2'/H-6'); 7,39 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-3); 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,0$ Hz e $J_2 = 1,5$ Hz, H-5); 7,96 (s, 1H, H-12); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A54 (pg. 276) no anexo.

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 21,5 (C-10); 28,2 (C-9); 51,8 (C-7'); 55,4 (OCH_3); 67,5 (C-8); 109,5 (C-3); 111,9 (C-6); 115,5 (d, $J = 21,2$ Hz, C-3'/C-5'); 122,1 (C-12); 126,0 (C-5); 129,5 (C-1'); 130,0 (d, $J = 7,5$ Hz, C-2'/C-6'); 132,3 (C-4); 146,3 (C-11); 149,2 (C-2); 153,5 (C-1); 161,7 (d, $J = 230,0$ Hz, C-4'); 191,3 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A55 (pg. 277) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_3$: 370,15669, encontrado: 370,15635. O espectro é apresentado na Figura A56 (pg. 278) no anexo.

Síntese do 4-(3-(1-(4-iodobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (**7e**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,212 g; 0,444 mmol) com 81% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**) (0,120 g; 0,550 mmol), 4-iodobenzilazida (**5e**) (0,142 g; 0,550 mmol), ascorbato de sódio (0,0434 g; 0,220 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0275 g; 0,110 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,52$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v $^{-1}$).

Faixa de fusão: 60,5–61,8 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3130, 3073, 2960, 2940, 2825, 2763, 1990, 1668, 1583, 1508, 1461, 1422, 1400, 1351, 1278, 1261, 1239, 1135, 1027, 1006, 929, 857, 822, 805, 776, 730, 652, 592, 473. O espectro é apresentado na Figura A57 (pg. 279) no anexo.

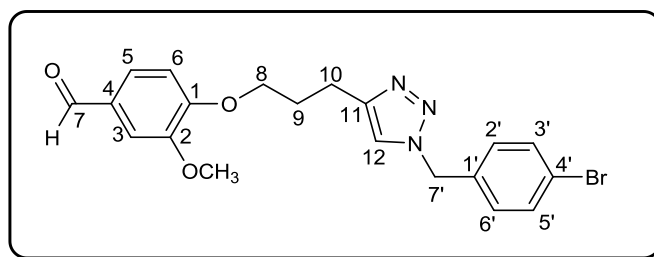
RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,07 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-9); 2,78 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, H-10); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 4,11 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-8); 5,50 (s, 2H, H-7'); 7,07 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-2'/H-6'); 7,14 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, H-6); 7,39 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-3); 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,3$ Hz e $J_2 = 1,6$ Hz, H-5); 7,72 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-3'/H-5'); 7,95 (s, 1H, H-12); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A58 (pg. 280) no anexo.

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 21,5 (C-10); 28,2 (C-9); 52,1 (C-7'); 55,4 (OCH_3); 67,7 (C-8); 94,1 (C-4'); 109,5 (C-3); 111,9 (C-6); 122,2 (C-12); 126,0 (C-5); 129,5 (C-1'); 130,0 (C-2'/C-6'); 135,8 (C-4); 137,4 (C-3'/C-5'); 146,3 (C-11); 149,0 (C-2); 153,5 (C-1); 191,2 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A59 (pg. 281) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$:

Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$: 478,06276, encontrado: 478,06281. O espectro é apresentado na Figura A60 (pg. 282) no anexo.

Síntese do 4-(3-(1-(4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (**7f**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,201 g; 0,467 mmol) com 80% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído

(**3**) (0,126 g; 0,580 mmol), 4-bromobenzilazida (**5f**) (0,123 g; 0,580 mmol), ascorbato de sódio (0,0458 g; 0,232 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0289 g; 0,116 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,41$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 74,2–74,8 °C.

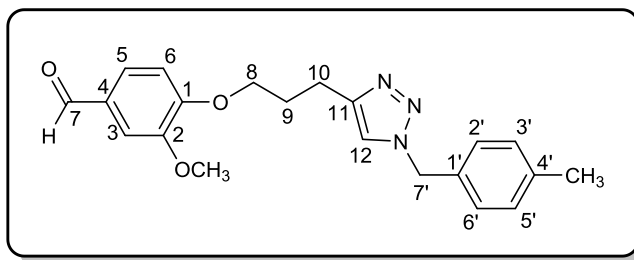
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3131, 3078, 2944, 2831, 2759, 2021, 1672, 1581, 1551, 1505, 1461, 1423, 1400, 1346, 1261, 1237, 1213, 1134, 1026, 1010, 940, 853, 801, 773, 729, 652, 571, 476. O espectro é apresentado na Figura A61 (pg. 283) no anexo.

RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2,08 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-9); 2,78 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, H-10); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 4,11 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-8); 5,55 (s, 2H, H-7'); 7,14 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, H-6); 7,23 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-2'/H-6'); 7,39 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-3); 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,3$ Hz e $J_2 = 1,8$ Hz, H-5); 7,55 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-3'/H-5'); 7,96 (s, 1H, H-12); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A62 (pg. 284) no anexo.

RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 21,4 (C-10); 28,2 (C-9); 51,9 (C-7'); 55,5 (OCH_3); 67,6 (C-8); 109,6 (C-3); 112,0 (C-6); 121,2 (C-4'); 122,2 (C-12); 126,0 (C-5); 129,5 (C-1'); 130,0 (C-2'/C-6'); 131,6 (C-3'/C-5'); 135,6 (C-4); 146,5 (C-11); 149,2 (C-2); 153,4 (C-1); 191,3 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A63 (pg. 285) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_3$: 430,07663, encontrado: 430,07679; **$[\text{M}+\text{Na}]^+$:** Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{NaO}_3$: 452,05857, encontrado: 452,05813. O espectro é apresentado na Figura A64 (pg. 286) no anexo.

Síntese do 4-(3-(1-(4-metilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (**7g**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,220 g; 0,603 mmol) com 88% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**) (0,148 g; 0,680 mmol), 4-metilbenzilazida (**5g**) (0,100 g; 0,680 mmol), ascorbato de sódio (0,0537 g; 0,272 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0339 g; 0,136 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,46$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 81,5–82,3 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3123, 3078, 2997, 2935, 2917, 2873, 2831, 2157, 1669, 1582, 1507, 1460, 1423, 1399, 1333, 1260, 1234, 1161, 1133, 1028, 1006, 862, 822, 785, 756, 729, 653, 592, 480. O espectro é apresentado na Figura A65 (pg. 287) no anexo.

RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 2,07 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-9); 2,26 (s, 3H, CH_3); 2,77 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, H-10); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 4,11 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-8); 5,47 (s, 2H, H-7'); 7,13-7,19 (m, 5H, H-6/H-2'/H-3'/H-5'/H-6'); 7,39 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-3); 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz e $J_2 = 1,6$ Hz, H-5); 7,92 (s, 1H, H-12); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A66 (pg. 288) no anexo.

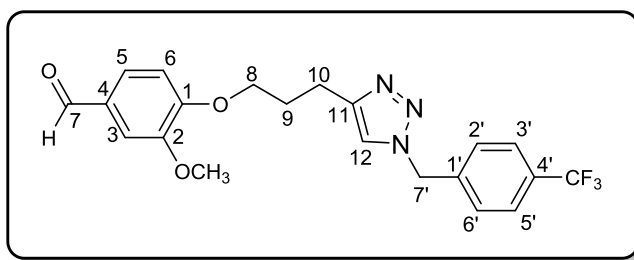
RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 20,5 (CH_3); 21,4 (C-10); 28,2 (C-9); 52,3 (C-7'); 55,4 (OCH_3); 67,6 (C-8); 109,6 (C-3); 111,8 (C-6); 122,0 (C-12); 126,0 (C-5); 127,8 (C-3'/C-5'); 129,2 (C-2'/C-6'); 129,5 (C-1'); 133,1 (C-4); 137,1 (C-4'); 146,3

(C-11); 149,2 (C-2); 153,4 (C-1); 191,3 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A67 (pg. 289) no anexo.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$:

Calculado para $C_{21}H_{24}N_3O_3$: 366,18177, encontrado: 366,18128. O espectro é apresentado na Figura A68 (pg. 290) no anexo.

Síntese do 4-(3-(1-(4-(trifluorometil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (**7h**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,169 g; 0,403 mmol) com 88% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**) (0,111 g; 0,510 mmol), 4-trifluorometilbenzilazida (**5h**) (0,103 g; 0,510 mmol), ascorbato de sódio (0,0403 g; 0,204 mmol) e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,0255 g; 0,102 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,58$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 94,9–95,8 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3169, 3086, 2954, 2906, 2831, 2011, 1672, 1584, 1508, 1470, 1420, 1404, 1323, 1279, 1258, 1153, 1131, 1109, 1065, 1021, 1006, 859, 797, 784, 727, 655, 591, 570, 422. O espectro é apresentado na Figura A69 (pg. 291) no anexo.

RMN de 1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,09 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-9); 2,80 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, H-10); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 4,12 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, H-8); 5,67 (s, 2H, H-7'); 7,15 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-6); 7,39 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, H-3); 7,45 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-2'/H-6'); 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz e $J_2 = 1,7$ Hz, H-5); 7,73 (d, 2H, $J = 8,2$

Hz, H-3'/H-5'); 8,01 (s, 1H, H-12); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A70 (pg. 292) no anexo.

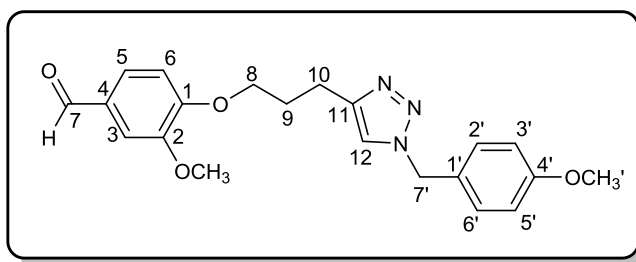
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 21,4 (C-10); 28,0 (C-9); 52,0 (C-7'); 55,4 (OCH₃); 67,4 (C-8); 109,6 (C-3); 111,9 (C-6); 122,2 (C-12); 124,1 (q, $J = 270,8$ Hz, CF₃); 125,6 (q, $J = 3,7$ Hz, C-3'/C-5'); 126,0 (C-5); 128,4 (C-2'/C-6'); 128,5 (q, $J = 31,6$ Hz, C-4'); 129,6 (C-4); 140,9 (C-1'); 146,6 (C-11); 149,2 (C-2); 153,5 (C-1); 191,3 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A71 (pg. 293) no anexo.

*Não foi possível observar todos os sinais do quarteto referente ao acoplamento do carbono do grupo CF₃. A ausência de um dos sinais pode ser justificada por se encontrar, provavelmente, na região do ruído do equipamento. Entretanto, apesar de serem visualizados apenas três sinais, foi possível calcular a constante de acoplamento cujo valor está de acordo com aquele descrito na literatura (PRETSCH *et al.*, 1989).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z [M+H]⁺:

Calculado para C₂₁H₂₁F₃N₃O₃: 420,15350, encontrado: 420,15310. O espectro é apresentado na Figura A72 (pg. 294) no anexo.

Síntese do 4-(3-(1-(4-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (**7i**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,227 g; 0,596 mmol) com 91% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**) (0,144 g; 0,660 mmol), 4-metoxibenzilazida (**5i**) (0,108 g; 0,660 mmol), ascorbato de sódio (0,0521 g; 0,264 mmol) e CuSO₄·5H₂O (0,0329 g; 0,132 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,49$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 71,7–72,3 °C.

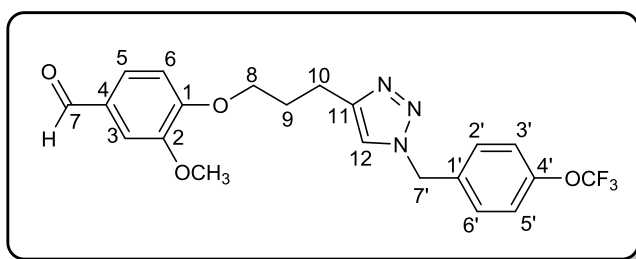
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3134, 3078, 2993, 2939, 2834, 2757, 2009, 1669, 1596, 1582, 1508, 1459, 1422, 1398, 1364, 1331, 1248, 1175, 1133, 1026, 1004, 859, 810, 790, 728, 653, 592, 555, 512, 485. O espectro é apresentado na Figura 2.20 (pg. 96).

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,06 (quint, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-9); 2,76 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, H-10); 3,72 (s, 3H, OCH_3); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 4,11 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz, H-8); 5,45 (s, 2H, H-7'); 6,90 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-3'/H-5'); 7,14 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,25 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H-2'/H-6'); 7,39 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-3); 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz e $J_2 = 1,6$ Hz, H-5); 7,90 (s, 1H, H-12); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura 2.21 (pg. 97).

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 21,4 (C-10); 28,2 (C-9); 52,2 (C-7'); 55,0 (OCH_3); 55,5 (OCH_3); 67,6 (C-8); 109,3 (C-3); 111,7 (C-6); 114,1 (C-3'/C-5'); 121,8 (C-12); 125,7 (C-5); 128,1 (C-1'); 129,4 (C-2'/C-6'); 129,5 (C-4); 146,3 (C-11); 149,2 (C-2); 153,4 (C-1); 159,0 (C-4'); 191,3 (CHO). O espectro é apresentado na Figura 2.22 (pg. 98).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4$: 382,17668, encontrado: 382,17643. O espectro é apresentado na Figura 2.23 (pg. 99).

Síntese do 4-(3-(1-(4-(trifluorometoxi)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (**7j**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,190 g; 0,437 mmol) com 87% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**) (0,111 g; 0,510 mmol), 4-trifluorometoxibenzilazida (**5j**) (0,111 g; 0,510 mmol), ascorbato de sódio (0,0403 g; 0,204 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0255 g; 0,102 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,60$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 52,3–53,8 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3132, 3078, 2961, 2834, 2769, 1976, 1671, 1586, 1509, 1466, 1424, 1401, 1352, 1276, 1259, 1134, 1048, 1027, 928, 857, 814, 771, 731, 652, 590, 573, 516, 488. O espectro é apresentado na Figura A73 (pg. 295) no anexo.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,08 (quint, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-9); 2,79 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz, H-10); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 4,12 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-8); 5,59 (s, 2H, H-7'); 7,15 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,35-7,41 (m, 5H, H-3/H-2'/H-3'/H-5'/H-6'); 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz e $J_2 = 1,7$ Hz, H-5); 7,99 (s, 1H, H-12); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A74 (pg. 296) no anexo.

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 21,5 (C-10); 28,2 (C-9); 51,6 (C-7'); 55,4 (OCH_3); 67,6 (C-8); 109,6 (C-3); 112,0 (C-6); 120,0 (q, $J = 254,5$ Hz, OCF_3); 121,3 (C-2'/C-6'); 122,2 (C-12); 126,0 (C-5); 129,7 (C-3'/C-5'); 129,5 (C-1'); 135,7 (C-4); 146,5 (C-11); 147,9 (C-4'); 149,2 (C-2); 153,5 (C-1); 191,3 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A75 (pg. 297) no anexo.

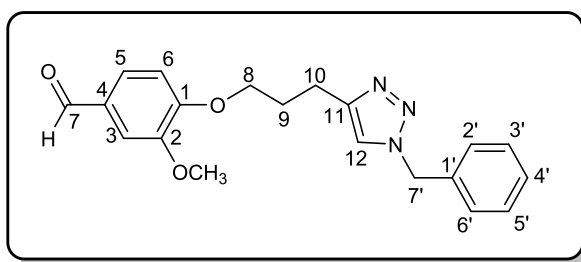
*Não foi possível observar todos os sinais do quarteto referente ao acoplamento do carbono do grupo OCF_3 . A ausência de um dos sinais pode ser justificada por se encontrar, provavelmente, na região do ruído do equipamento. Entretanto, apesar de serem visualizados apenas três sinais, foi possível calcular a constante de acoplamento cujo valor está de acordo com aquele descrito na literatura (PRETSCH *et al.*, 1989).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$:

Calculado para $C_{21}H_{21}F_3N_3O_4$: 436,14842, encontrado: 436,14798; $[M+Na]^+$:

Calculado para $C_{21}H_{20}F_3N_3NaO_4$: 458,13036, encontrado: 458,12986. O espectro

é apresentado na Figura A76 (pg. 298) no anexo.

Síntese do 4-(3-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (7k**)**

Este composto foi obtido como um sólido branco (0,208 g; 0,593 mmol) com 83% de rendimento empregando-se 3-metoxi-4-(pent-4-in-1-iloxi)benzaldeído (**3**) (0,155 g; 0,710 mmol), benzilazida (**5k**) (0,094 g; 0,710 mmol), ascorbato de sódio (0,0561 g; 0,284 mmol) e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,0355 g; 0,142 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,63$ (acetato de etila-hexano 2:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 73,8–74,9 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}/cm^{-1}$: 3121, 3081, 2938, 2838, 2015, 1670, 1581, 1506, 1458, 1423, 1399, 1332, 1259, 1231, 1130, 1027, 1005, 859, 818, 728, 706, 653, 592, 567, 483, 460. O espectro é apresentado na Figura A77 (pg. 299) no anexo.

RMN de 1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 2,08 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz, H-9); 2,78 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz, H-10); 3,83 (s, 3H, OCH_3); 4,11 (t, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-8); 5,54 (s, 2H, H-7'); 7,14 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, H-6); 7,26-7,38 (m, 5H, H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'); 7,39 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-3); 7,52 (dd, 1H, $J_1 = 8,3$ Hz e $J_2 = 1,8$ Hz, H-5); 7,96 (s, 1H, H-12); 9,83 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura A78 (pg. 300) no anexo.

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 21,5 (C-10); 28,2 (C-9); 52,6 (C-7'); 55,4 (OCH_3); 67,6 (C-8); 109,6 (C-3); 111,9 (C-6); 122,2 (C-12); 126,0 (C-5); 127,7 (C-2'/C-6'); 128,0 (C-4'); 128,7 (C-3'/C-5'); 129,5 (C-1'); 136,2 (C-4); 146,3 (C-11);

149,2 (C-2); 153,5 (C-1); 191,3 (CHO). O espectro é apresentado na Figura A79 (pg. 301) no anexo.

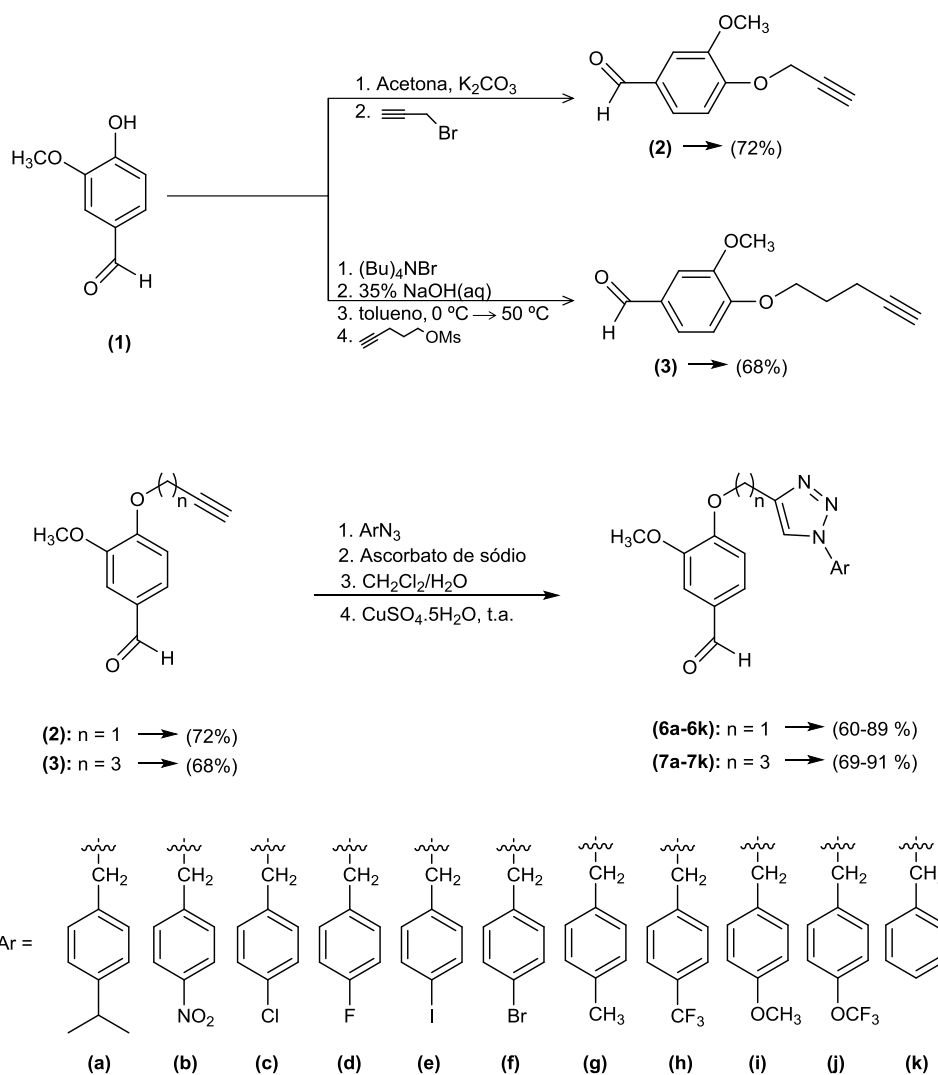
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO m/z $[M+H]^+$:

Calculado para $C_{20}H_{22}N_3O_3$: 352,16612, encontrado: 352,16568; $[M+Na]^+$:

Calculado para $C_{20}H_{21}N_3NaO_3$: 374,14806, encontrado: 374,14738. O espectro é apresentado na Figura A80 (pg. 302) no anexo.

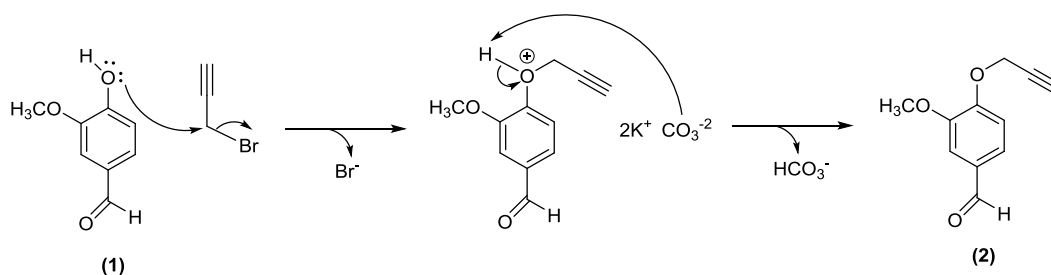
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos triazólicos derivados da vanilina foram sintetizados de acordo com a rota sintética apresentada no Esquema 2.4.



Esquema 2.4. Reações envolvidas na preparação dos compostos triazólicos derivados da vanilina.

A etapa inicial deste trabalho consistiu na preparação do composto **2** a partir da reação de propargilação entre a vanilina (**1**), obtida comercialmente, e o brometo de propargila. Empregando-se condições clássicas conforme descrito na literatura (PINGAEW *et al.*, 2014), o composto **1** reagiu com o brometo de propargila via reação de substituição nucleofílica bimolecular, culminando na obtenção do composto **2** em 72 % de rendimento. No Esquema 2.5 está apresentada uma proposta mecanística para a obtenção deste alcino.



Esquema 2.5. Proposta mecanística para a obtenção do composto **2**.

Uma vez sintetizado, a identidade do composto **2** foi confirmada de maneira inequívoca pela espectrometria de massas de alta resolução e espectroscopias no IV e de RMN de ^1H e ^{13}C .

Analisando o espectro no IV do composto **2** (Figura 2.6, pg. 73) a presença da banda em 3258 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\text{C}_{sp}\text{-H}$ de alcinos, juntamente com a banda em 2120 cm^{-1} , atribuída ao estiramento carbono-carbono de ligações triplas, confirma a presença do fragmento de alcino terminal na estrutura do composto **2**. A banda atribuída ao estiramento da ligação C-H de carbono com hibridização sp^3 , foi observada em 2938 cm^{-1} . As bandas em 1586, 1505 e 1455 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos da ligação C=C de anel aromático. Já as bandas em 3078 e 3006 cm^{-1} foram relacionadas aos estiramentos da ligação =CH de anel aromático. Por fim, destacam-se as bandas em 2833 e 2728 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento da ligação C-H de aldeído, a banda em 1677 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C=O de aldeídos aromáticos, e as bandas em 1260 e 1008 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação C-O de éter aromático (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **2** (Figura 2.7, pg. 74) observou-se que o sinal mais blindado corresponde ao hidrogênio do alcino terminal, sendo este observado como um simpleto em $\delta_{\text{H}} 2,55$ e integrado para um hidrogênio. O

simpleto observado em δ_{H} 3,91 foi atribuído aos átomos de hidrogênio do grupo metoxila ($-\text{OCH}_3$). Em δ_{H} 4,83, o simpleto integrado para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído aos hidrogênios metilênicos H-8. Na região de deslocamento químico característica de hidrogênios aromáticos o duplete observado em δ_{H} 7,12 e integrado para dois átomos de hidrogênio apresentou constante de acoplamento $J = 8,1$ Hz e foi atribuído ao hidrogênio H-6. Este valor de constante de acoplamento é típico para acoplamento de hidrogênios em posição *orto* e está de acordo com a literatura (PAVIA *et al.*, 2015). Observou-se também nesta região a presença de um multiplete em δ_{H} 7,40-7,46 atribuído aos hidrogênios H-3 e H-5. Por fim, o simpleto desblindado observado em δ_{H} 9,84 e integrado para um átomo de hidrogênio foi atribuído ao hidrogênio do grupo aldeído ($-\text{CHO}$).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.8, pg. 75) observa-se que o número de sinais presentes no espectro é compatível com a estrutura desta substância. Assim, o sinal observado em δ_{C} 56,0 foi associado ao carbono do grupo metoxila (OCH_3). O sinal observado em δ_{C} 56,7 foi atribuído ao carbono metilênico (C-8). Os sinais em δ_{C} 76,7 e δ_{C} 77,4 correspondem aos carbonos *sp* C-10 e C-9, respectivamente. O sinal do carbono do grupo aldeído (CHO) foi observado em δ_{C} 190,9. Os demais sinais correspondem aos carbonos do anel aromático e aparecem em δ_{C} 109,3 (C-3); 112,4 (C-6); 126,2 (C-5); 130,8 (C-4); 149,9 (C-2); 152,0 (C-1).

O espectro de massas de alta resolução forneceu a massa exata $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 191,07039 compatível com a fórmula molecular esperada para o composto **2** ($\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_3$) (Figura 2.9, pg. 76).

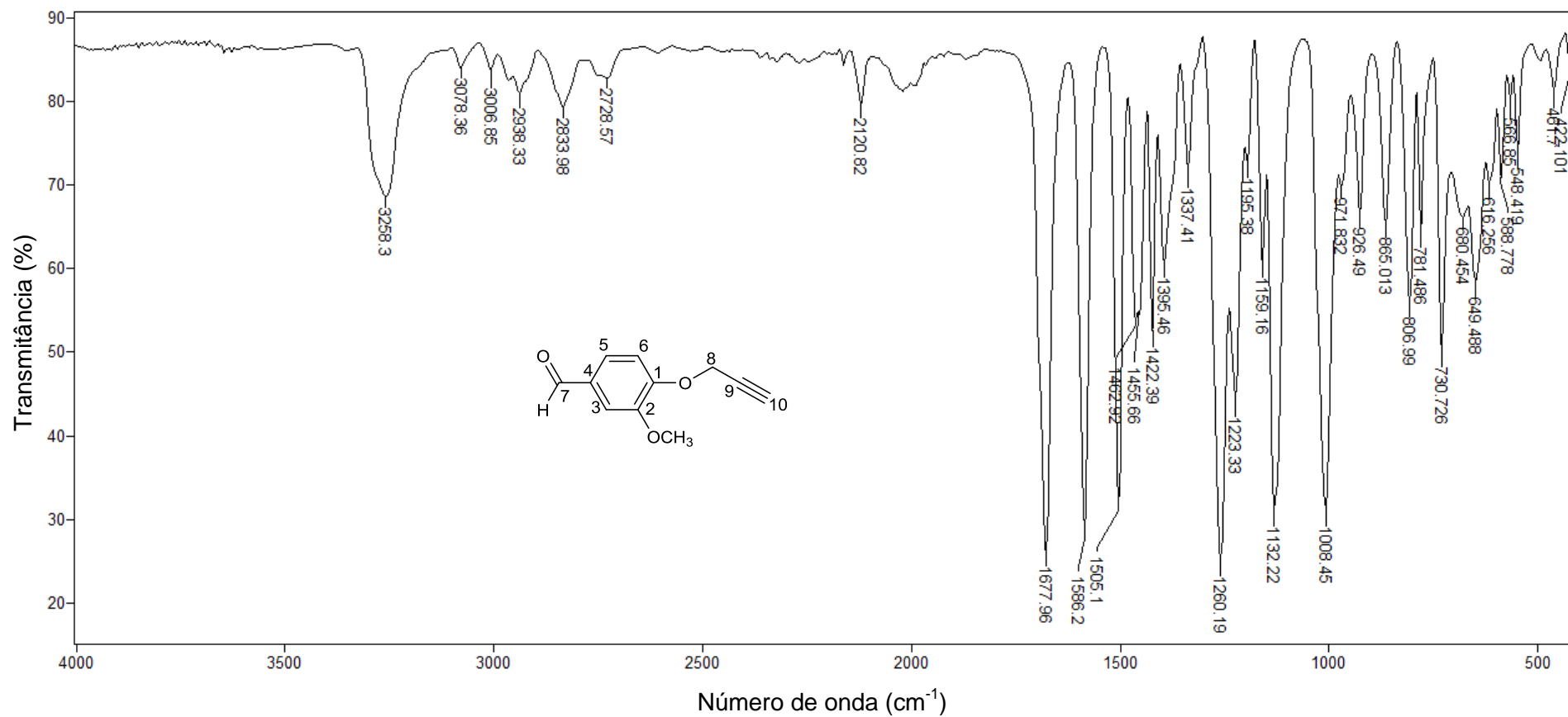


Figura 2.6. Espectro no infravermelho (ATR) do composto 2.

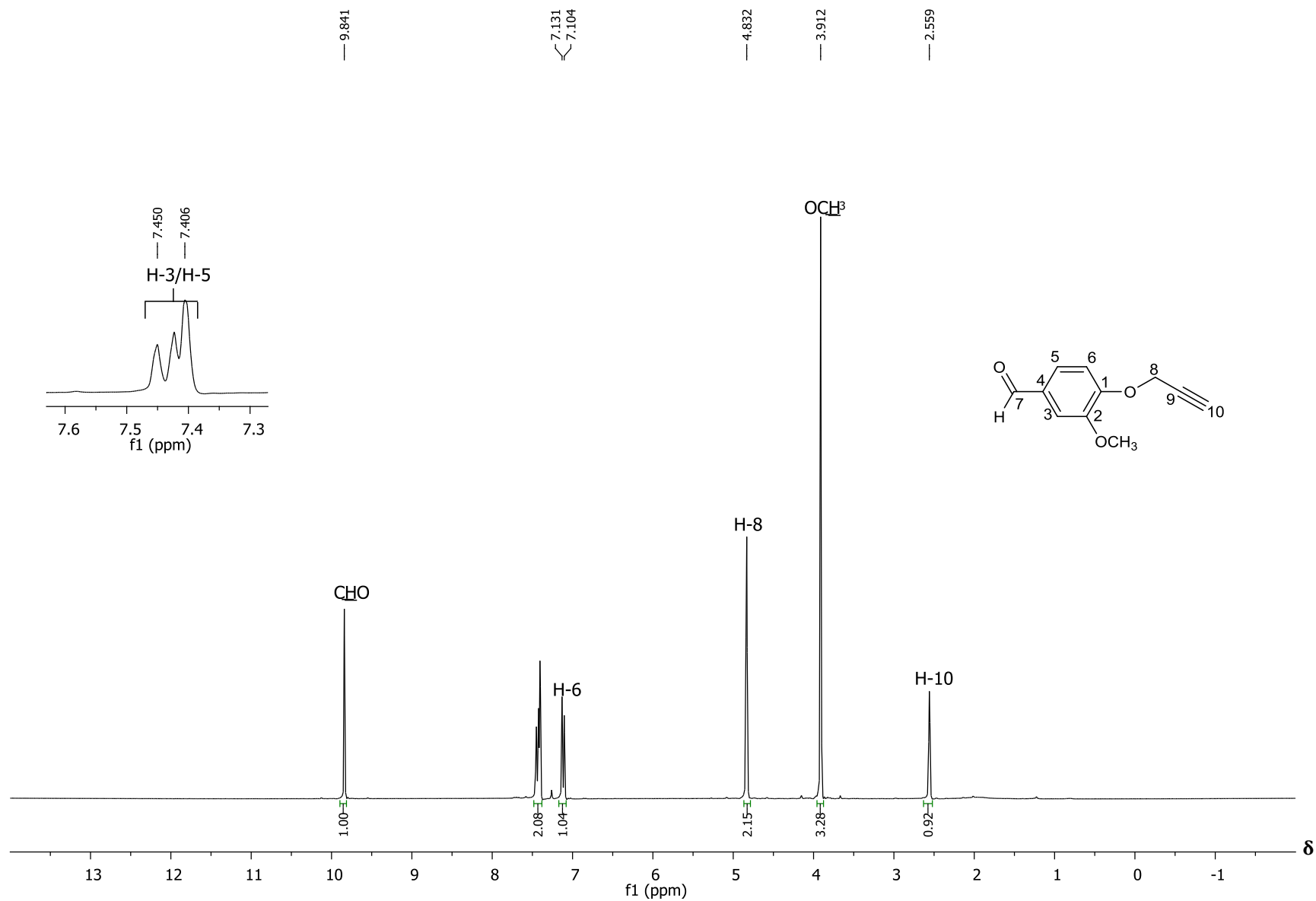


Figura 2.7. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **2**.

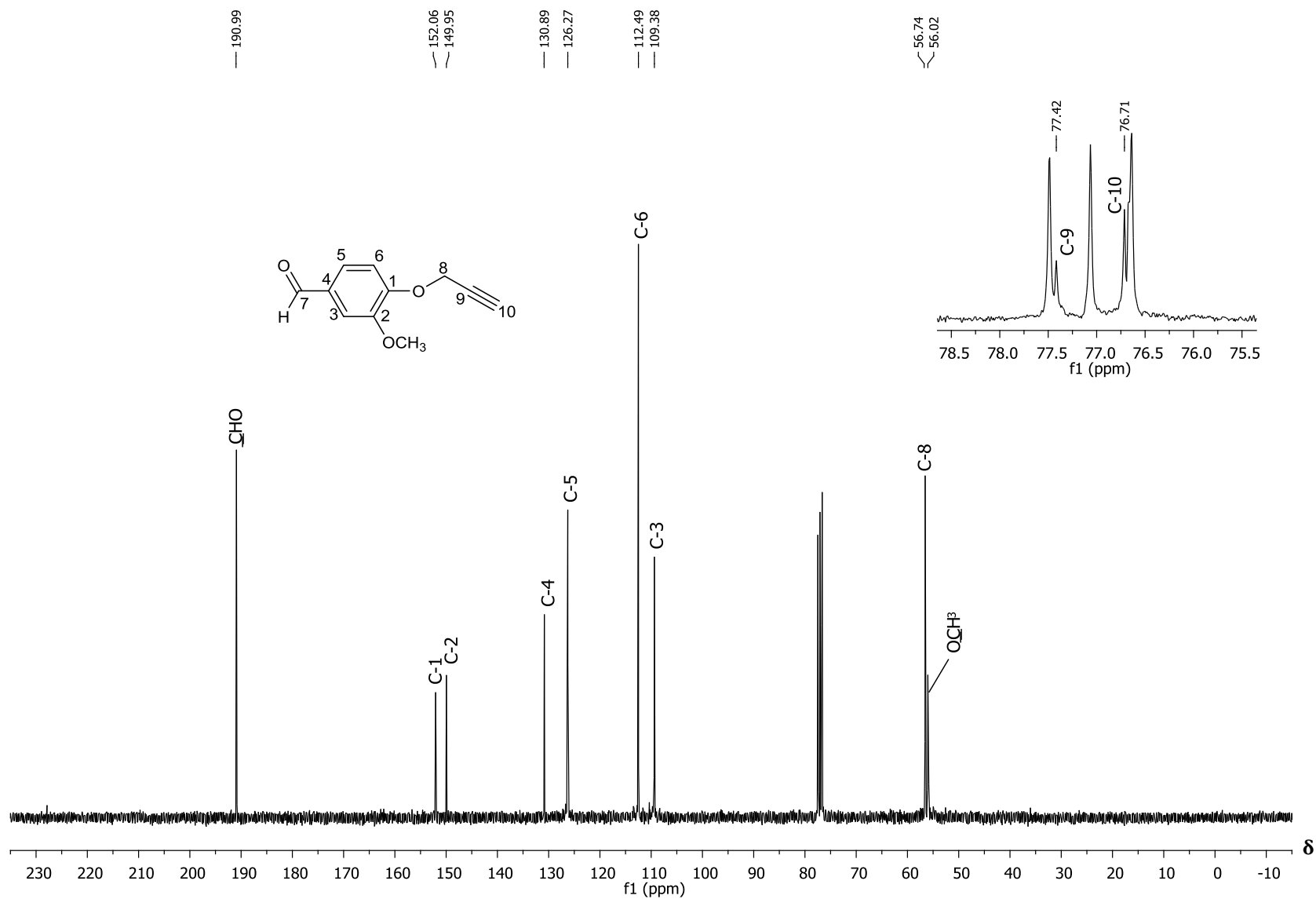


Figura 2.8. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **2**.

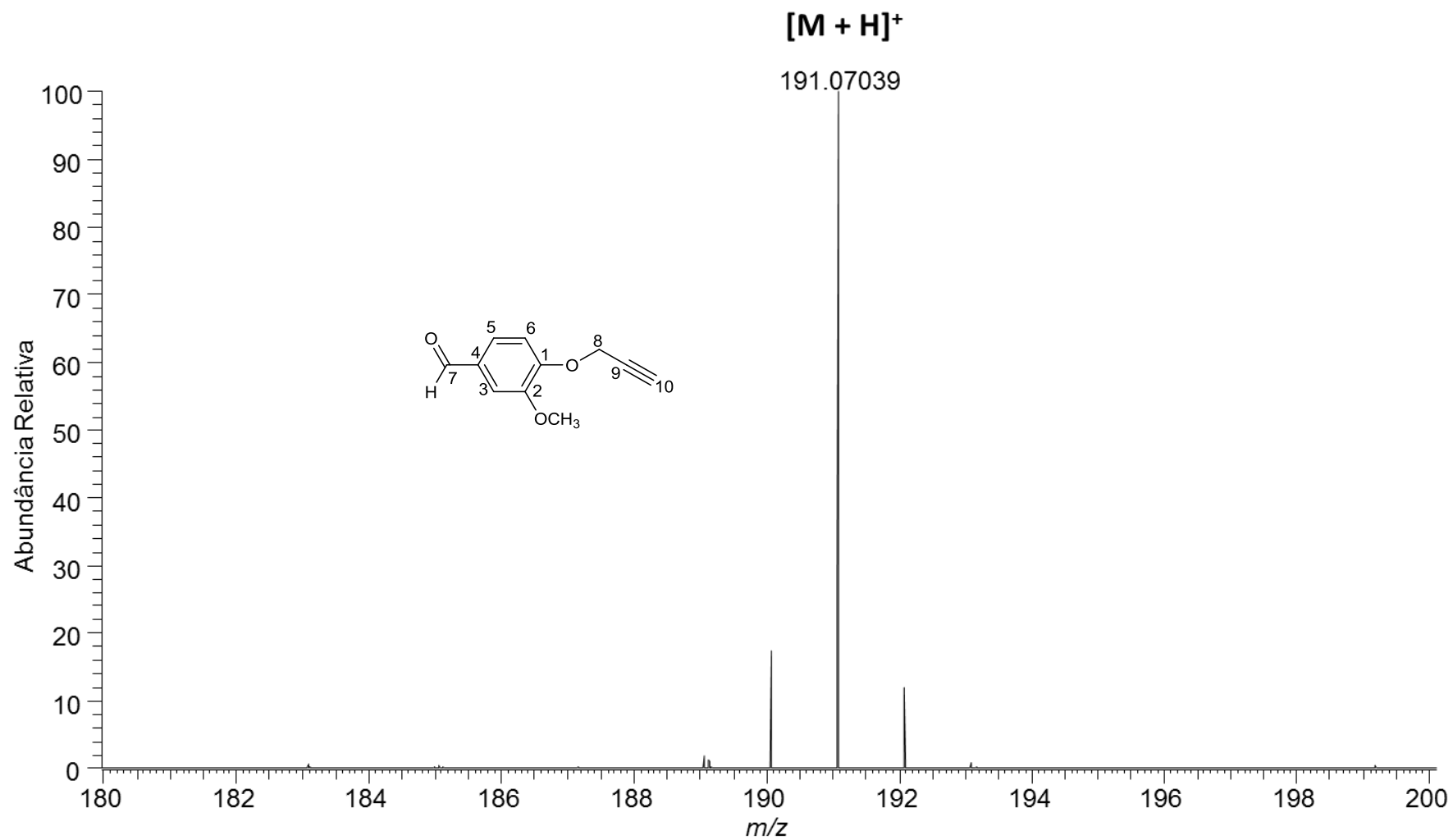


Figura 2.9. Espectro de massas de alta resolução do composto 2.

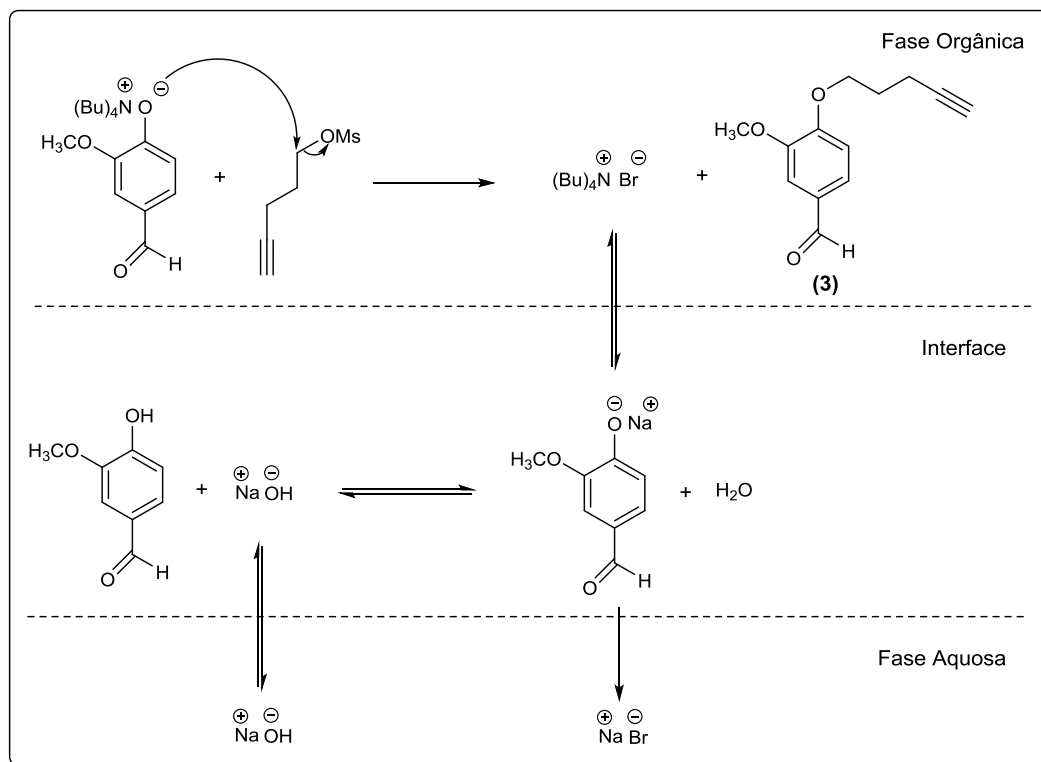
Posteriormente, tendo como objetivo avaliar a influência do aumento da cadeia carbônica na atividade biológica dos derivados triazólicos da vanilina (**1**), foi realizada a síntese do alcino **3**. Para isto, a vanilina (**1**) foi tratada com pent-4-in-1-il-metanosulfonato e solução aquosa de NaOH 35% ($m\ v^{-1}$) na presença do catalisador de transferência de fase (brometo de tetrabutilamônio, $((Bu)_4NBr)$ em tolueno, resultando na formação do produto via reação S_N2 e rendimento igual a 68% (Esquema 2.4, pg. 70). Vale ressaltar que a metodologia utilizada para a preparação de **2** foi inicialmente testada para a síntese do composto **3**. No entanto, devido ao baixo rendimento obtido (inferior a 30%) buscou-se por uma nova metodologia eficiente e que fornecesse valor de rendimento sinteticamente útil.

A catálise de transferência de fase (CTF), introduzida no final dos anos 1960, se tornou um método popular e é amplamente utilizada em síntese orgânica. Desde então, esta metodologia tem sido bastante aplicada, uma vez que promove reações em sistemas imiscíveis de duas fases, não requer o uso de solventes anidros, fornece produtos com altos rendimentos e com elevado grau de pureza, não requer altas temperaturas, apresenta baixo custo e pode ser utilizada para os mais diversos tipos de reações, inclusive na síntese orgânica assimétrica (SCHETTIN *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2018).

Diversos tipos de compostos catalisam estas reações, como por exemplo, sais de amônio quaternários, sais de fosfônio quaternários, poliéteres macrocíclicos (éteres de coroa e criptandos), polímeros, dentre outros (LUCCHESI & MARZORATI, 2000). No entanto, os sais de amônio quaternários são os catalisadores mais utilizados e convenientes, visto que possuem eficiência elevada, apresentam baixo custo e são relativamente estáveis (SCHETTIN *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2018). Logo, para a síntese do alcino **3** o catalisador de escolha foi o brometo de tetrabutilamônio, $(Bu)_4NBr$.

Do ponto de vista mecanístico, é apresentada no Esquema 2.6 (pg. 78) a proposta sugerida por Makosza e colaboradores (1969). Segundo esta proposta, ocorre inicialmente a desprotonação da vanilina (**1**) pela base (NaOH) na interface, resultando na formação do alcóxido de sódio. Em seguida, ocorre uma troca iônica entre o alcóxido e o catalisador de transferência de fase $((Bu)_4NBr)$, gerando o alcóxido de amônio quaternário. Este por sua vez, é então transferido para a fase orgânica onde reage com o composto alquilante (pent-4-in-1-

ilmetanosulfonato) via S_N2 para formar o alcino terminal **3** com concomitante regeneração do catalisador.



Esquema 2.6. Proposta de mecanismo para CTF sugerido por Makosza e colaboradores (1969).

Uma vez sintetizado, a identidade do composto **3** foi confirmada pela espectrometria de massa de alta resolução e espectroscopias no IV e de RMN de 1H e ^{13}C .

Analisando o espectro no IV do composto **3** (Figura 2.10, pg. 81) a presença da banda em 3214 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $C_{sp}-H$ de alcinos, juntamente com a banda em 2165 cm^{-1} , atribuída ao estiramento carbono-carbono de ligações triplas, confirmam a presença do fragmento de alcino terminal na estrutura do composto **3**. A banda atribuída ao estiramento da ligação $C-H$ de carbono com hibridização sp^3 , foi observada em 2956 cm^{-1} . As bandas em 1582 , 1506 e 1460 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos da ligação $C=C$ de anel aromático. Por fim, destacam-se as bandas em 2825 e 2730 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento da ligação $C-H$ de aldeído, a banda em 1673 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação $C=O$ de aldeídos aromáticos, e as bandas em 1263 e 1027

cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação C-O de éter aromático (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **3** (Figura 2.11, pg. 82) observou-se em δ_{H} 1,92 um quinteto integrado para dois átomos de hidrogênio referente aos hidrogênios metilênicos H-9, confirmando assim o acoplamento destes dois hidrogênios com os átomos vizinhos H-10 e H-8. O sinal em δ_{H} 2,33 e atribuído aos hidrogênios H-10 apresentou-se como um tripleto de dupletos com constantes de acoplamentos iguais a $J_1 = 7,0$ Hz e $J_2 = 2,6$ Hz, referentes ao acoplamento de H-10 com os hidrogênios H-9 e H-12, respectivamente. Já o tripleto, presente em δ_{H} 2,82 e integrado para um átomo de hidrogênio foi atribuído ao hidrogênio acetilênico H-12. Este sinal possui constante de acoplamento $J = 2,6$ Hz, que corresponde ao valor de acoplamento típico de alcinos terminais a longa distância e confirma o acoplamento deste hidrogênio com os hidrogênios vizinhos H-10. O simpleto observado em δ_{H} 3,83 foi atribuído aos átomos de hidrogênio do grupo metoxila ($-\text{OCH}_3$). O tripleto observado em δ_{H} 4,14 e integrado para dois átomos de hidrogênio apresentou constante de acoplamento $J = 6,0$ Hz e foi atribuído ao hidrogênio H-8. Na região de deslocamento químico característica de hidrogênios aromáticos, o duplete observado em δ_{H} 7,18 e integrado para um átomo de hidrogênio apresentou constante de acoplamento $J = 8,3$ Hz e foi atribuído ao hidrogênio H-6. Este valor de constante de acoplamento é típico para acoplamento de hidrogênios em posição *orto* e está de acordo com a literatura (PAVIA *et al.*, 2015). Observou-se também nesta região a presença do duplete em δ_{H} 7,39 atribuído ao hidrogênio H-3 ($J = 1,6$ Hz) e do duplete de dupletos em δ_{H} 7,53 ($J_1 = 8,3$ Hz e $J_2 = 1,6$ Hz) atribuído aos hidrogênios H-5. Por fim, o simpleto desblindado observado em δ_{H} 9,83 e integrado para um átomo de hidrogênio foi atribuído ao hidrogênio do grupo aldeído ($-\text{CHO}$).

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **3** (Figura 2.12, pg. 83) observa-se que o número de sinais presentes no espectro é compatível com a estrutura desta substância. Os sinais observados em δ_{C} 15,1 e δ_{C} 27,7 foram atribuídos aos carbonos metilênicos C-10 e C-9. O sinal observado em δ_{C} 56,0 foi associado ao carbono do grupo metoxila (OCH_3). Os sinais em δ_{C} 67,2 e δ_{C} 83,0 correspondem aos carbonos *sp* C-12 e C-11, respectivamente. O menor deslocamento químico observado para o C-12 ocorre em razão da blindagem anisotrópica provocada pelas ligações π . O sinal observado em δ_{C} 69,1 foi atribuído ao carbono metilênico

(C-8). Já o sinal do carbono do grupo aldeído (CHO) foi observado em δ_C 190,9. Os demais sinais correspondem aos carbonos do anel aromático e aparecem em δ_C 109,3 (C-3); 111,5 (C-6); 126,7 (C-5); 130,0 (C-4); 149,8 (C-2); 153,9 (C-1).

O espectro de massas de alta resolução forneceu a massa exata $[M+H]^+$ de 219,10212 compatível com a fórmula molecular esperada para o composto **3** ($C_{13}H_{15}O_3$) (Figura 2.13, pg. 84).

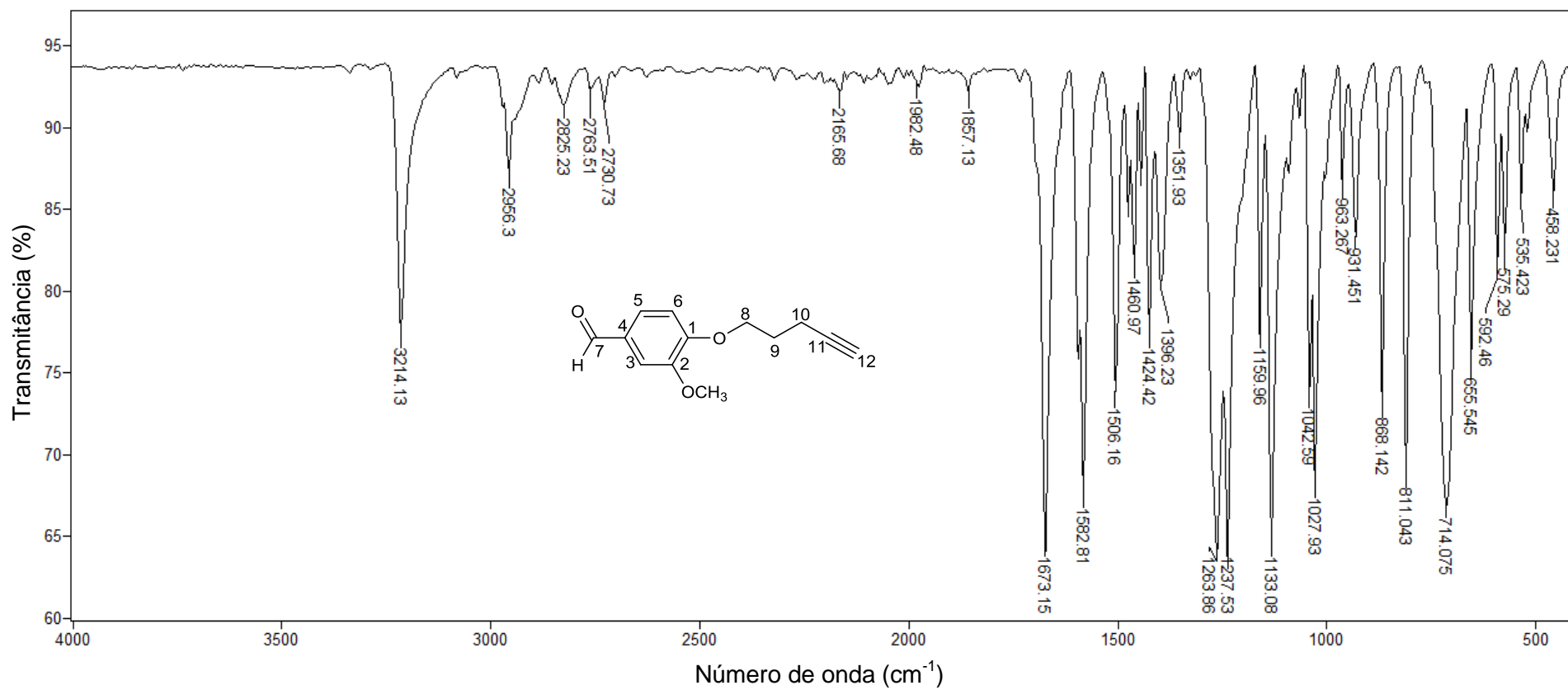


Figura 2.10. Espectro no infravermelho (ATR) do composto 3.

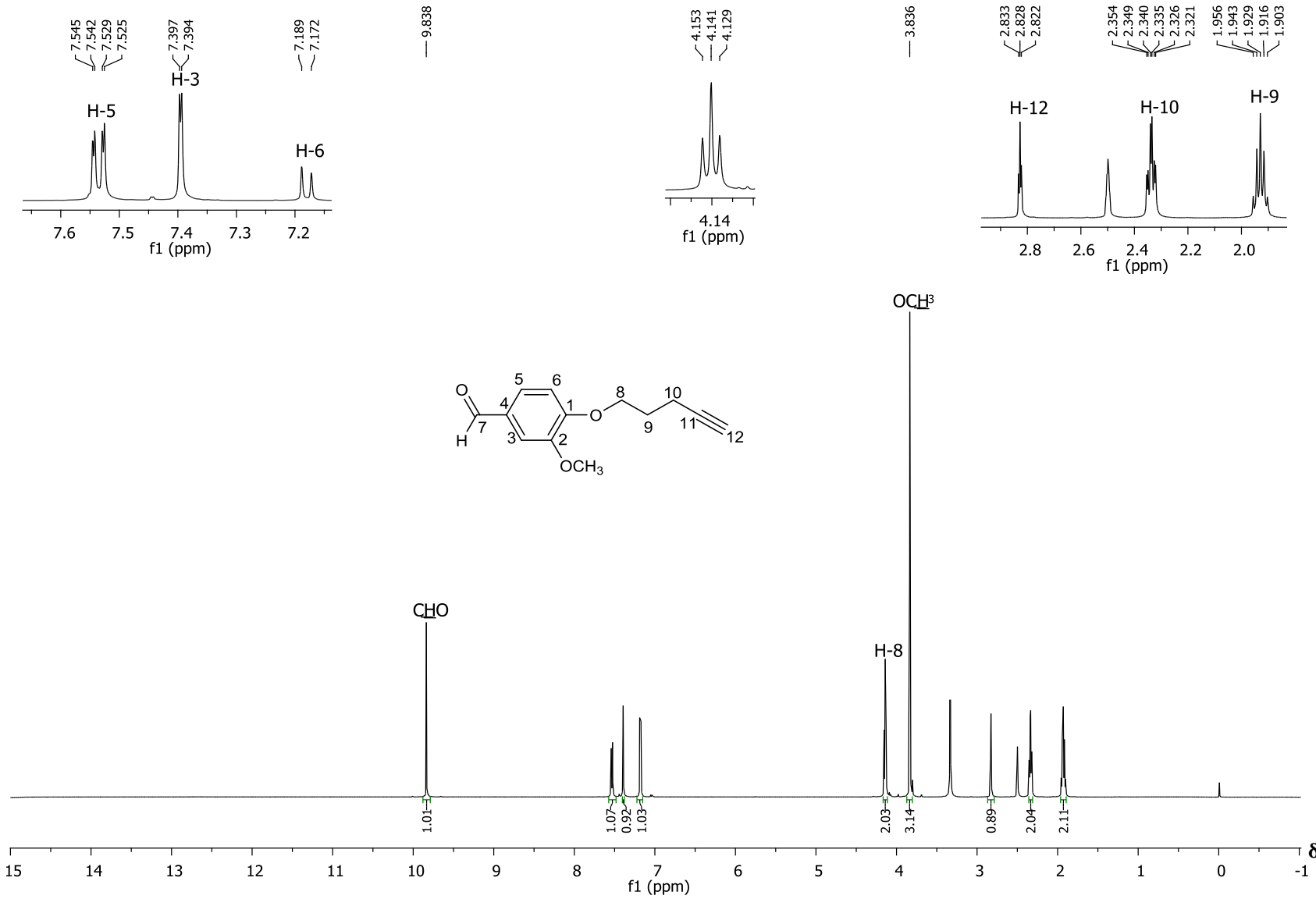


Figura 2.11. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) do composto 3.

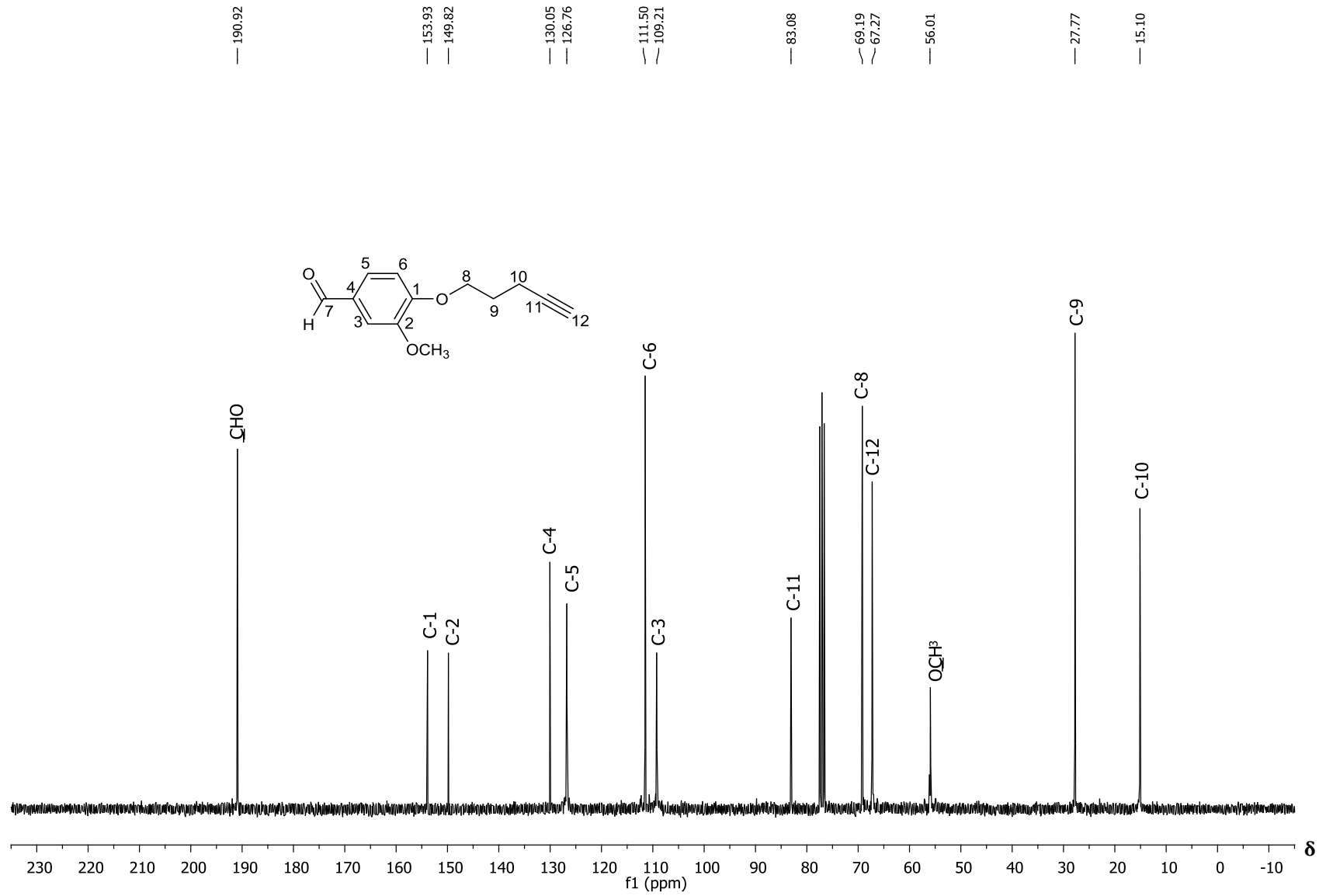


Figura 2.12. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 3.

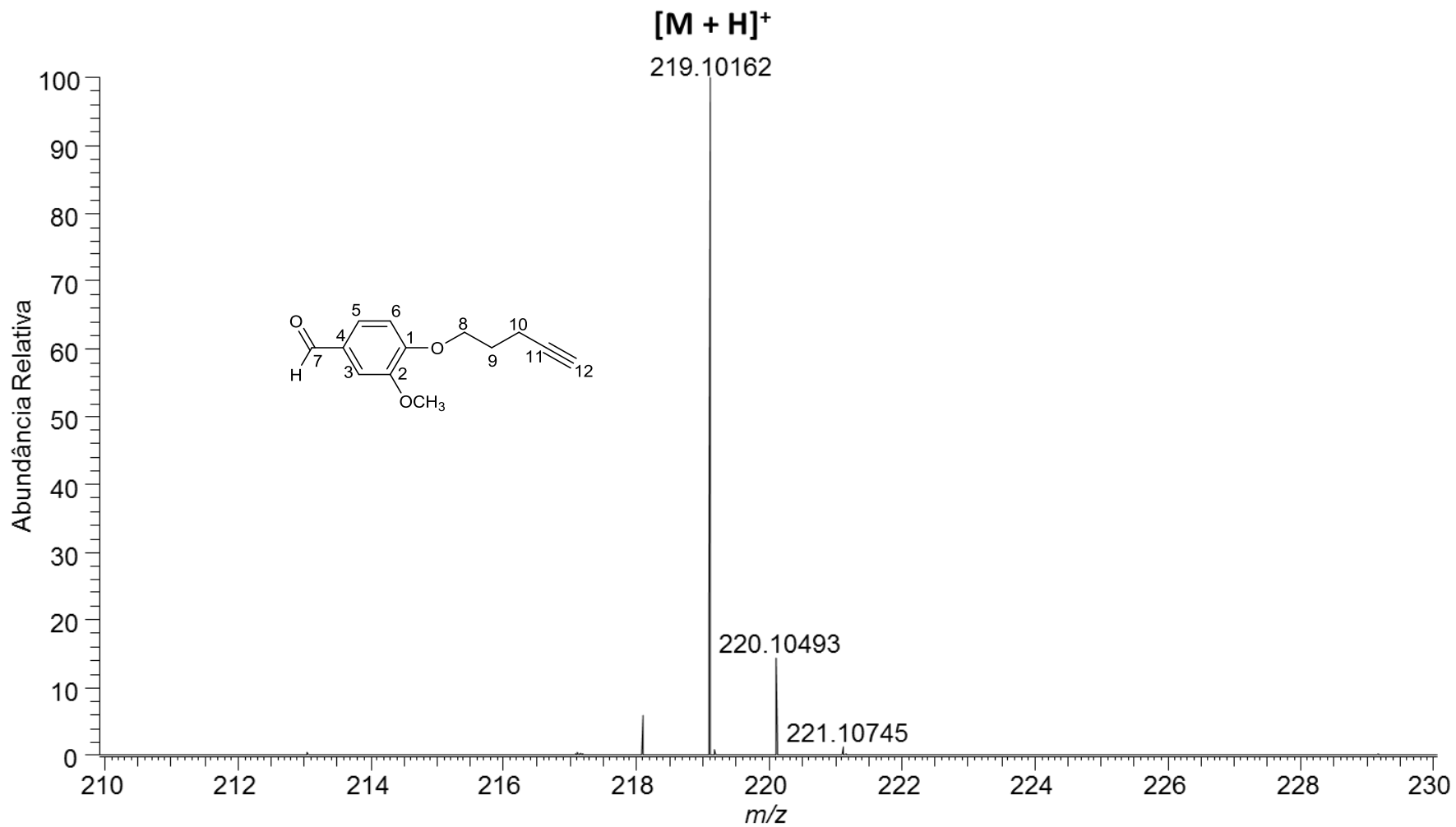
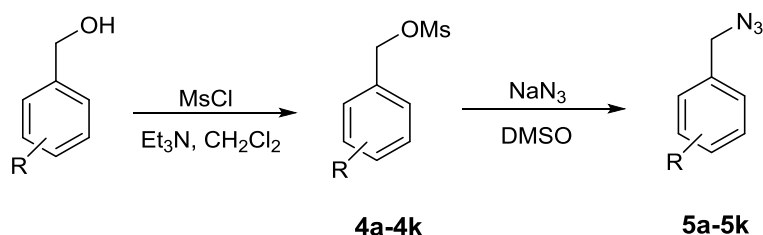


Figura 2.13. Espectro de massas de alta resolução do composto 3.

Conforme apresentado no Esquema 2.4 (pg. 70), os derivados **6a-6k** e **7a-7k** foram preparados via reação “click” entre os alquinos **2** e **3** e diferentes azidas aromáticas. As azidas benzílicas foram sintetizadas conforme a metodologia descrita por BORGATI (2013) e confirmadas por técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C , apresentando total concordância com os dados descritos na literatura. No Esquema 2.7 estão apresentadas as etapas envolvidas na preparação das azidas benzílicas utilizadas neste trabalho.



Onde: Ms = SO_2CH_3

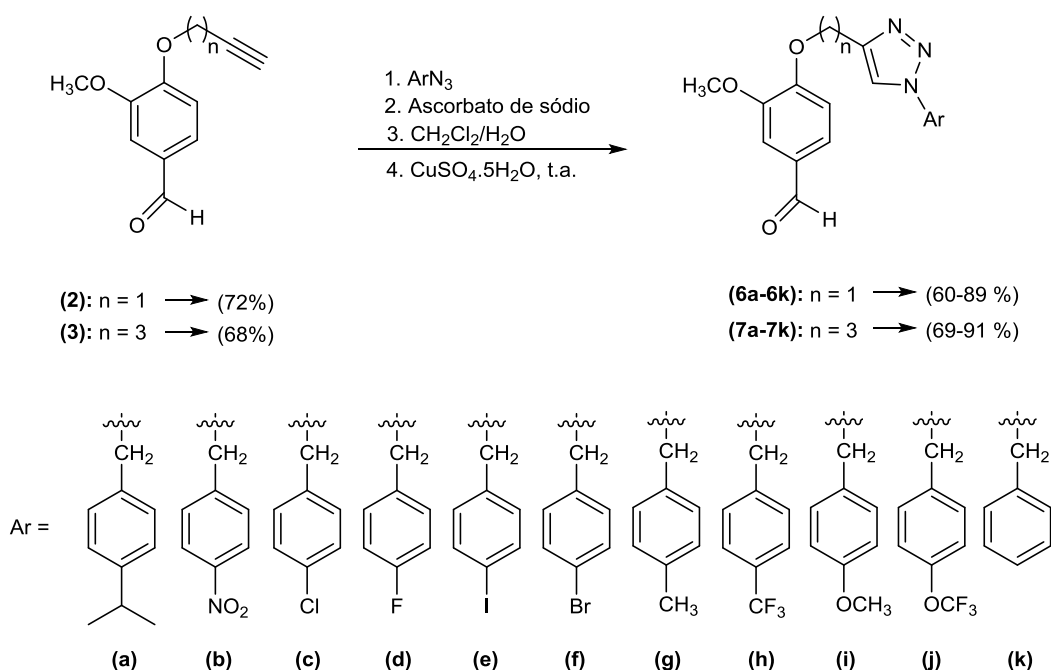
- | | |
|--|--|
| <p>(a) R = $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
 (b) R = NO_2
 (c) R = Cl
 (d) R = F
 (e) R = I
 (f) R = Br</p> | <p>(g) R = CH_3
 (h) R = CF_3
 (i) R = OCH_3
 (j) R = OCF_3
 (k) R = H</p> |
|--|--|

Esquema 2.7. Etapas envolvidas na obtenção dos ésteres metanossulfonatos e azidas aromáticas benzílicas.

O Esquema 2.7 mostra que inicialmente os álcoois benzílicos disponíveis comercialmente foram convertidos nos correspondentes ésteres metanossulfonatos. Esta reação corresponde a uma das estratégias mais utilizadas para transformar um álcool em um melhor reagente para uma reação do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$, uma vez que o éster metanossulfonato formado possui um melhor grupo abandonador, neste caso o grupo mesila (CLAYDEN *et al.*, 2001). Sendo assim, a etapa subsequente consistiu na obtenção das azidas aromáticas **5a-5k** devido à substituição do grupo mesila dos compostos **4a-4k** pelo nucleófilo N_3^- , em uma reação de substituição nucleofílica bimolecular.

Uma vez obtidos os alquinos **2** e **3** e as azidas aromáticas **5a-5k**, procedeu-se à preparação dos compostos triazólicos derivados da vanilina (**1**). Para a realização dessas reações, empregou-se a metodologia desenvolvida inicialmente por Sharpless e colaboradores em 2001, na qual o sulfato de cobre

penta-hidratado foi utilizado como fonte de cobre(II) e o ascorbato de sódio como agente redutor gerando *in situ* a espécie catalítica cobre(I) (DÍEZ-GONZALES, 2011). Estas reações ocorreram normalmente em temperatura ambiente e foram conduzidas utilizando-se um sistema bifásico constituído por água e diclorometano (BORGATI *et al.*, 2013). No Esquema 2.8, encontra-se representada a reação CuAAC utilizada para a síntese dos compostos **6a-6k** e **7a-7k**.



Esquema 2.8. Reação CuAAC utilizada para a obtenção dos compostos triazólicos **6a-6k** e **7a-7k**.

A utilização da reação “click” permitiu a síntese dos derivados triazólicos da vanilina (**1**), **6a-6k** e **7a-7k**, em condições brandas, com bons rendimentos, tempos de reação muito curtos (menos de um minuto), sendo os produtos de fácil isolamento. Estes compostos sintetizados foram obtidos com rendimentos que variaram de 60% a 91% após purificação em coluna de sílica gel. A seguir será discutida a caracterização de dois dos compostos 1,2,3-triazólico sintetizados. Os demais triazóis possuem caracterização semelhante e seus espectros estão apresentados no Anexo I.

Analisando o espectro no IV do composto **6f** (Figura 2.15, pg. 89) nota-se a presença de bandas de estiramentos da ligação =C-H de compostos aromáticos

em 3128 e 3099 cm^{-1} . As bandas em 2962 e 2931 cm^{-1} são referentes ao estiramento da ligação C-H de carbono com hibridização sp^3 . As bandas em 2829 e 2770 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento da ligação C-H de aldeído e a banda em 1665 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C=O de aldeídos aromáticos. Já as bandas em 1584, 1507 e 1487 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos da ligação C=C de anel aromático. Por fim, destacam-se as bandas em 1266 e 1142 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação C-O de éter aromático e a banda em 1346 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-N de aromático (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **6f** (Figura 2.16, pg. 90), o simpleto observado em δ_{H} 3,87 e integrado para três átomos de hidrogênio foi atribuído aos hidrogênios do grupo metoxila ($-\text{OCH}_3$). Os simpletos em δ_{H} 5,33 e δ_{H} 5,45 correspondem aos sinais referentes aos hidrogênios metilênicos H-8 e H-7', respectivamente. O maior deslocamento químico observado para os átomos H-7', pode ser explicado pelos efeitos de anisotropia dos anéis benzênico e triazólico e pela eletronegatividade do átomo de nitrogênio que retira elétrons por efeito indutivo. Além disso, uma análise que pode levar a essa conclusão é a inexistência deste simpleto no espectro de RMN de ^1H do composto **2** (Figura 2.7, pg. 74), que corresponde à molécula precursora da substância **6f**. Na região de deslocamento químico característica de hidrogênios aromáticos, observa-se: o duplete em δ_{H} 7,13 possuindo $J = 7,9$ Hz e atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6'; o duplete em δ_{H} 7,18 e integrado para um átomo de hidrogênio atribuído ao H-6; o duplete em δ_{H} 7,48 com $J = 7,9$ Hz atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5'. A maior desblindagem observada para o sinal atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5' pode ser justificada pela proximidade destes hidrogênios ao substituinte bromo, o qual promove a diminuição da densidade eletrônica nas posições *orto* devido ao efeito indutivo retirador de elétrons. Já os valores idênticos de constantes de acoplamento $J = 7,9$ Hz, confirmam o acoplamento em *orto* do hidrogênio H-2' com H-3' e do hidrogênio H-5' com H-6' (PAVIA *et al.*, 2015). Nesta mesma região característica de hidrogênios aromáticos, observa-se também a presença de um multiplete em δ_{H} 7,37-7,43 atribuído aos hidrogênios H-3 e H-5. O simpleto observado em δ_{H} 7,59 e atribuído ao hidrogênio H-10, corresponde ao sinal do hidrogênio do anel triazólico, o qual é desblindado devido ao efeito retirador de elétrons por efeito indutivo do átomo de nitrogênio e ao efeito de anisotropia do

anel triazólico. O sinal mais desblindado observado em δ_{H} 9,84 foi atribuído ao próton do grupo aldeído ($-\text{C}\underline{\text{H}}\text{O}$) e é justificado pela anisotropia do grupo $\text{C}=\text{O}$.

No espectro de RMN de ^{13}C da substância **6f** (Figura 2.17, pg. 91) o sinal observado em δ_{C} 53,4 foi atribuído ao carbono metilênico C-7'. Os sinais em: δ_{C} 55,8 foi atribuído ao carbono do grupo metoxila ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3'$); δ_{C} 122,9 foi atribuído ao carbono C-4'; δ_{C} 129,4 foi atribuído aos carbonos C-2'/C-6' e δ_{C} 132,0 foi atribuído aos carbonos C-3'/C-5'. Estes valores de deslocamento químico estão em acordo com valores descritos na literatura e apresentados na Figura 2.14 (PRETSCH *et al.*, 1989).

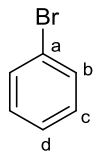
	δ
	(a) 122,7
	(b) 131,7
	(c) 130,1
	(d) 126,9

Figura 2.14. Valores descritos de deslocamento químico para os átomos de benzeno monossustituído (PRETSCH *et al.*, 1989).

Os carbonos do anel triazólico foram observados em δ_{C} 123,0 e δ_{C} 143,6 e atribuídos aos carbonos C-10 e C-9 respectivamente. O sinal do carbono do grupo aldeído ($\underline{\text{C}}\text{HO}$) foi observado em δ_{C} 190,8. Os demais sinais correspondem aos carbonos dos anéis aromáticos e foram atribuídos conforme os sinais apresentados no espectro da molécula precursora **2** (Figura 2.8, pg. 75).

O espectro de massas de alta resolução forneceu a massa exata $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 402,04543 e $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de 424,02727 compatível com as fórmulas moleculares esperadas para o composto **6f** ($\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{BrN}_3\text{O}_3/\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_3\text{NaO}_3$) (Figura 2.18, pg. 92).

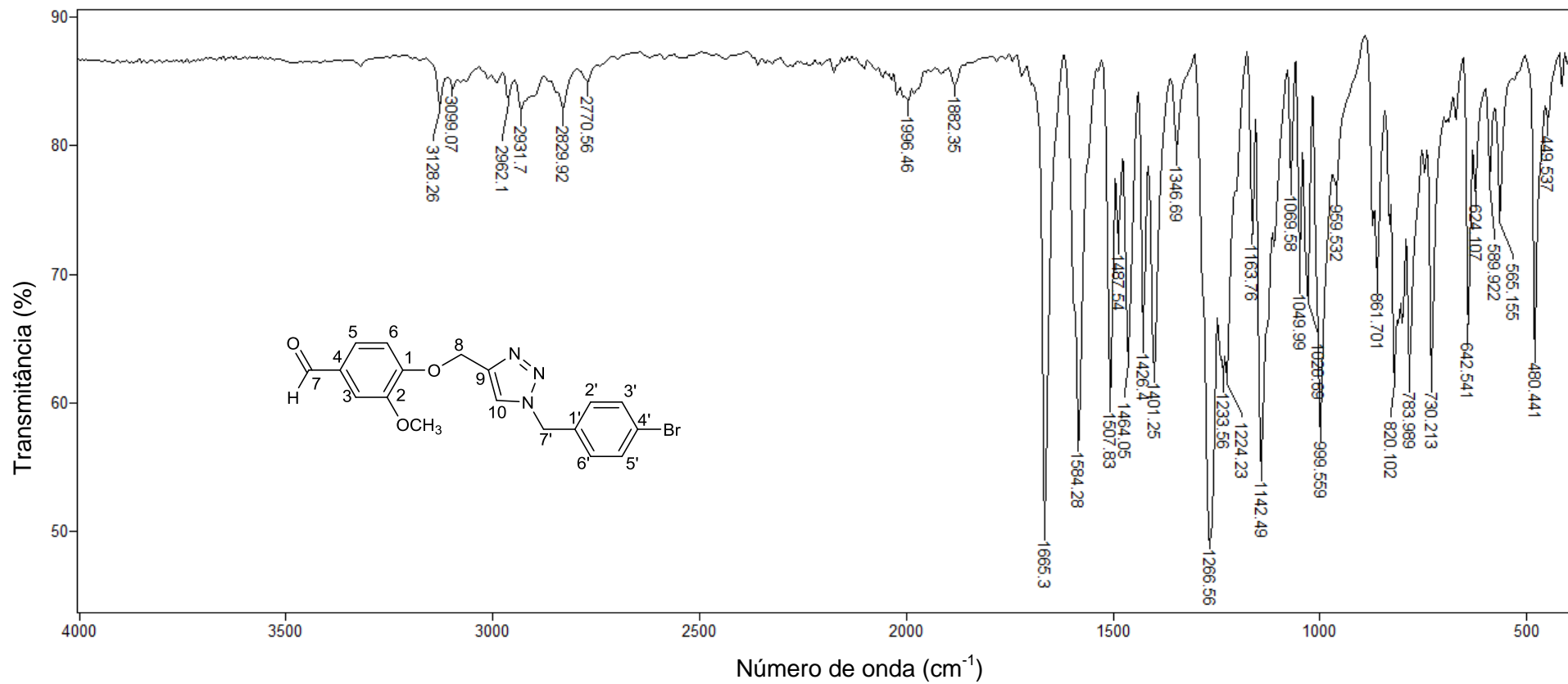


Figura 2.15. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6f**.

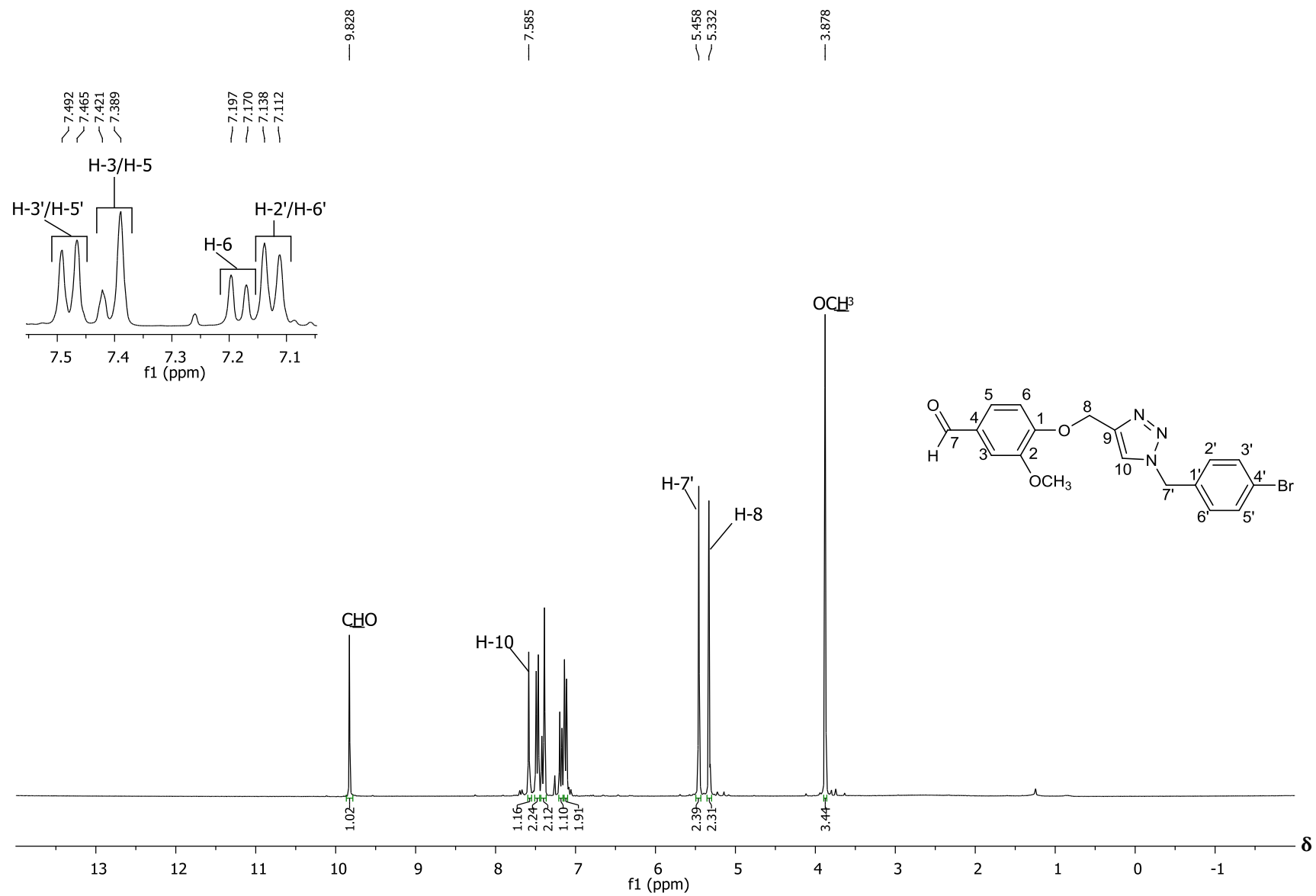


Figura 2.16. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **6f**.

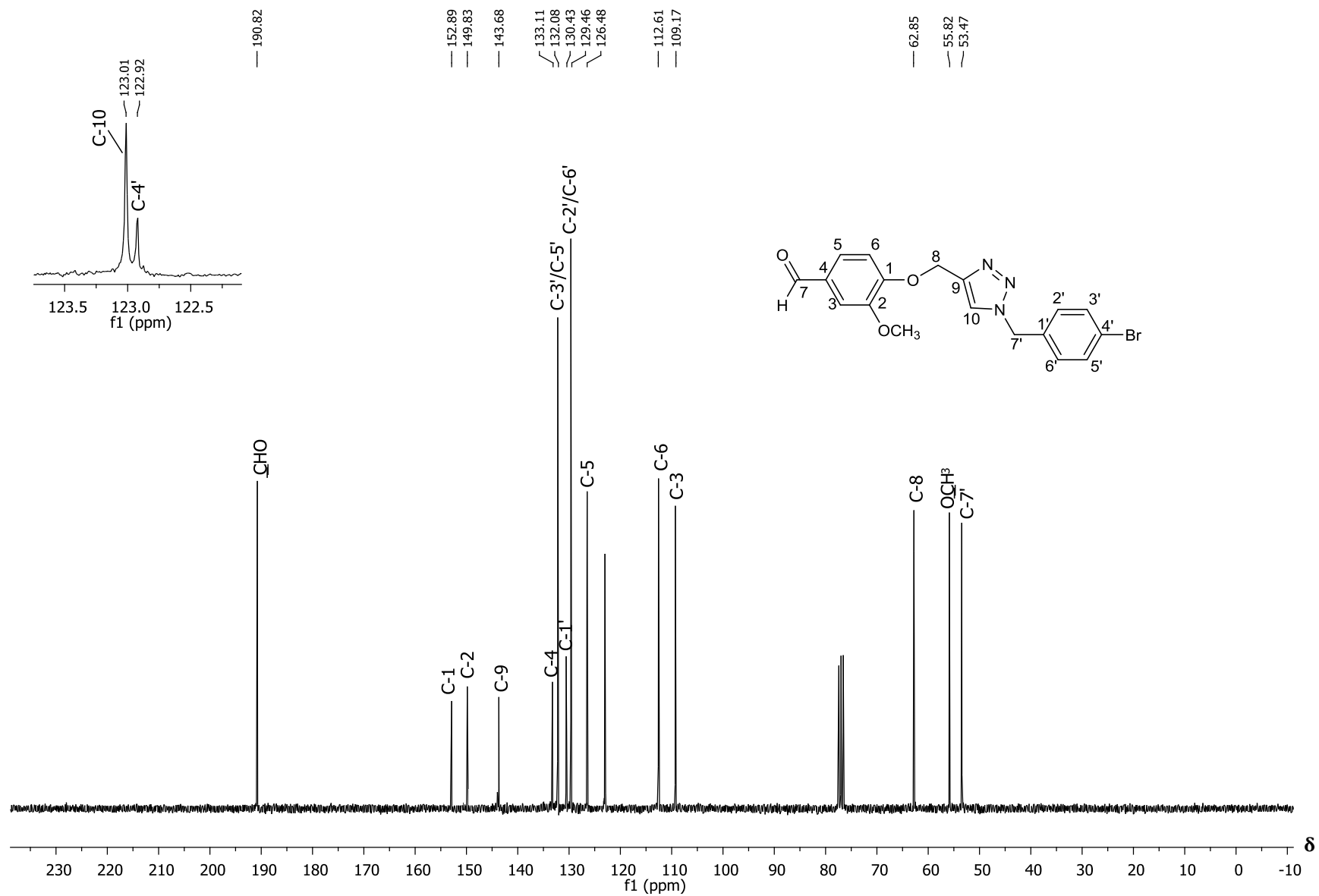


Figura 2.17. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **6f**.

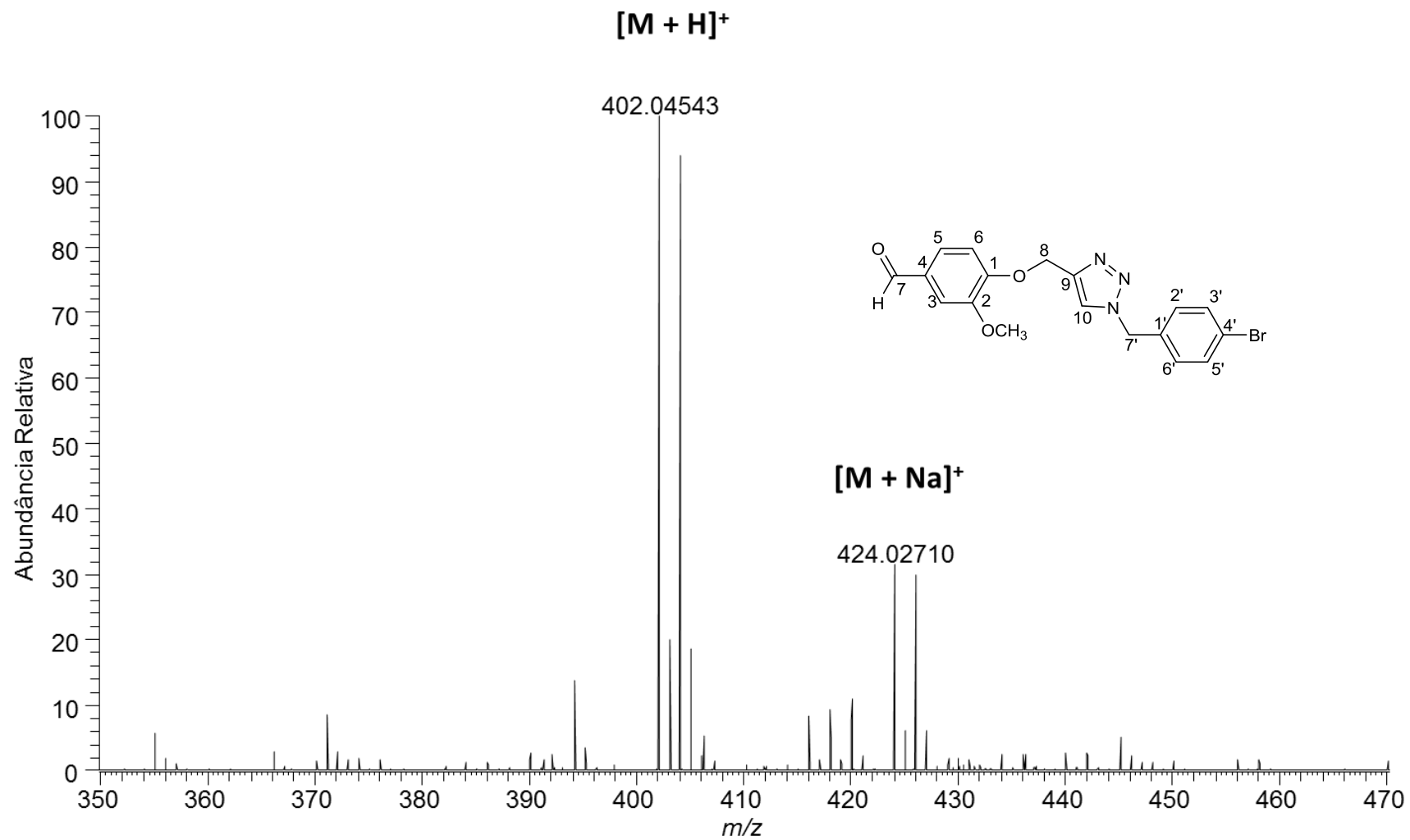


Figura 2.18. Espectro de massas de alta resolução do composto **6f**.

Analisando o espectro no IV do composto **7i** (Figura 2.20, pg. 95) observa-se a presença de bandas de estiramentos da ligação =C-H de compostos aromáticos em 3134 e 3078 cm^{-1} . As bandas em 2993 e 2939 cm^{-1} são referentes ao estiramento da ligação C-H de carbono com hibridização sp^3 . As bandas em 2834 e 2757 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento da ligação C-H de aldeído e a banda em 1669 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C=O de aldeídos aromáticos. Já as bandas em 1582, 1508 e 1459 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos da ligação C=C de anel aromático. E por último, destacam-se as bandas em 1248 e 1026 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-O de éter aromático e a banda em 1331 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-N de aromático (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **7i** (Figura 2.21, pg. 96) os simpletos em δ_{H} 3,72 e δ_{H} 3,83 foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos metoxila, sendo o simpleto em δ_{H} 3,72 atribuído ao grupo (-OCH₃') e o simpleto mais desblindado em δ_{H} 3,83 atribuído ao grupo (-OCH₃). O simpleto em δ_{H} 5,45 corresponde ao sinal referente aos hidrogênios metilênicos H-7'. Na região de deslocamento químico característica de hidrogênios aromáticos, observa-se o duplete em δ_{H} 6,90 possuindo $J = 8,5$ Hz e atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5' e o duplete em δ_{H} 7,25 com $J = 8,5$ Hz atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6'. A maior blindagem observada para o sinal atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5' pode ser justificada pela proximidade destes átomos ao grupo metoxila, o qual promove o aumento da densidade eletrônica nas posições *orto* devido à deslocalização de elétrons. Já os valores idênticos de constantes de acoplamento $J = 8,5$ Hz, confirmam o acoplamento em *orto* do hidrogênio H-2' com H-3' e do hidrogênio H-5' com H-6' (PAVIA *et al.*, 2015). Por fim, o simpleto em δ_{H} 7,90 corresponde ao sinal referente ao hidrogênio do anel triazólico H-12. A inexistência deste simpleto no espectro de RMN de ^1H do composto **3** (Figura 2.11, pg. 82), que corresponde à molécula precursora da substância **7i**, confirma incontestavelmente a formação da molécula. Os outros sinais foram atribuídos de acordo com os sinais apresentados no espectro do composto **3** (Figura 2.11, pg. 82).

No espectro de RMN de ^{13}C da substância **7i** (Figura 2.22, pg. 97) os sinais observados em δ_{C} 21,4; δ_{C} 28,2 e δ_{C} 52,2 foram atribuídos aos carbonos

metilênicos C-10, C-9 e C-7', respectivamente. Os sinais em: δ_C 55,0 foi atribuído ao carbono do grupo metoxila (OCH_3); δ_C 55,5 foi atribuído ao carbono do grupo metoxila (OCH_3); δ_C 159,0 foi atribuído ao carbono C-4'; δ_C 129,4 foi atribuído aos carbonos C-2'/C-6' e δ_C 114,1 foi atribuído aos carbonos C-3'/C-5'. Estes valores de deslocamento químico estão em acordo com valores descritos na literatura e apresentados na Figura 2.19 (PRETSCH *et al.*, 1989).

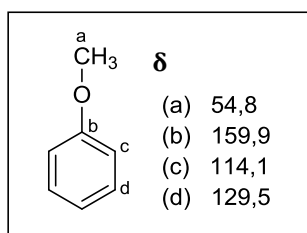


Figura 2.19. Valores descritos de deslocamento químico para os átomos de carbono do anisol (PRETSCH *et al.*, 1989).

Os carbonos do anel triazólico foram observados em δ_C 121,8 e δ_C 146,3 e atribuídos aos carbonos C-12 e C-11, respectivamente. O sinal do carbono do grupo aldeído (CHO) foi observado em δ_C 191,3. Os demais sinais correspondem aos carbonos dos anéis aromáticos e foram atribuídos conforme os sinais apresentados no espectro da molécula precursora **3** (Figura 2.12, pg. 83).

O espectro de massas de alta resolução forneceu a massa exata $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 382,17643 compatível com a fórmula molecular esperada para o composto **7i** ($\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4$) (Figura 2.23, pg. 98).

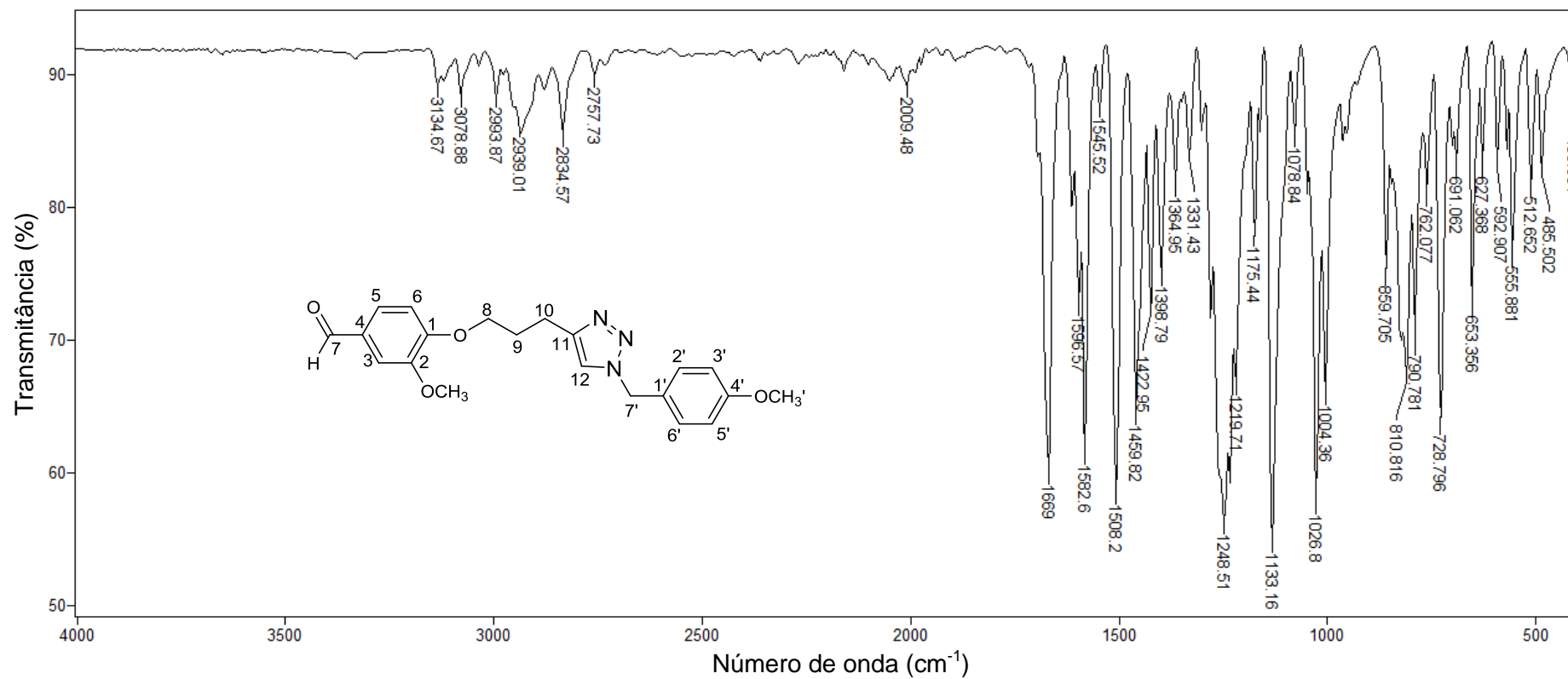


Figura 2.20. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7i**.

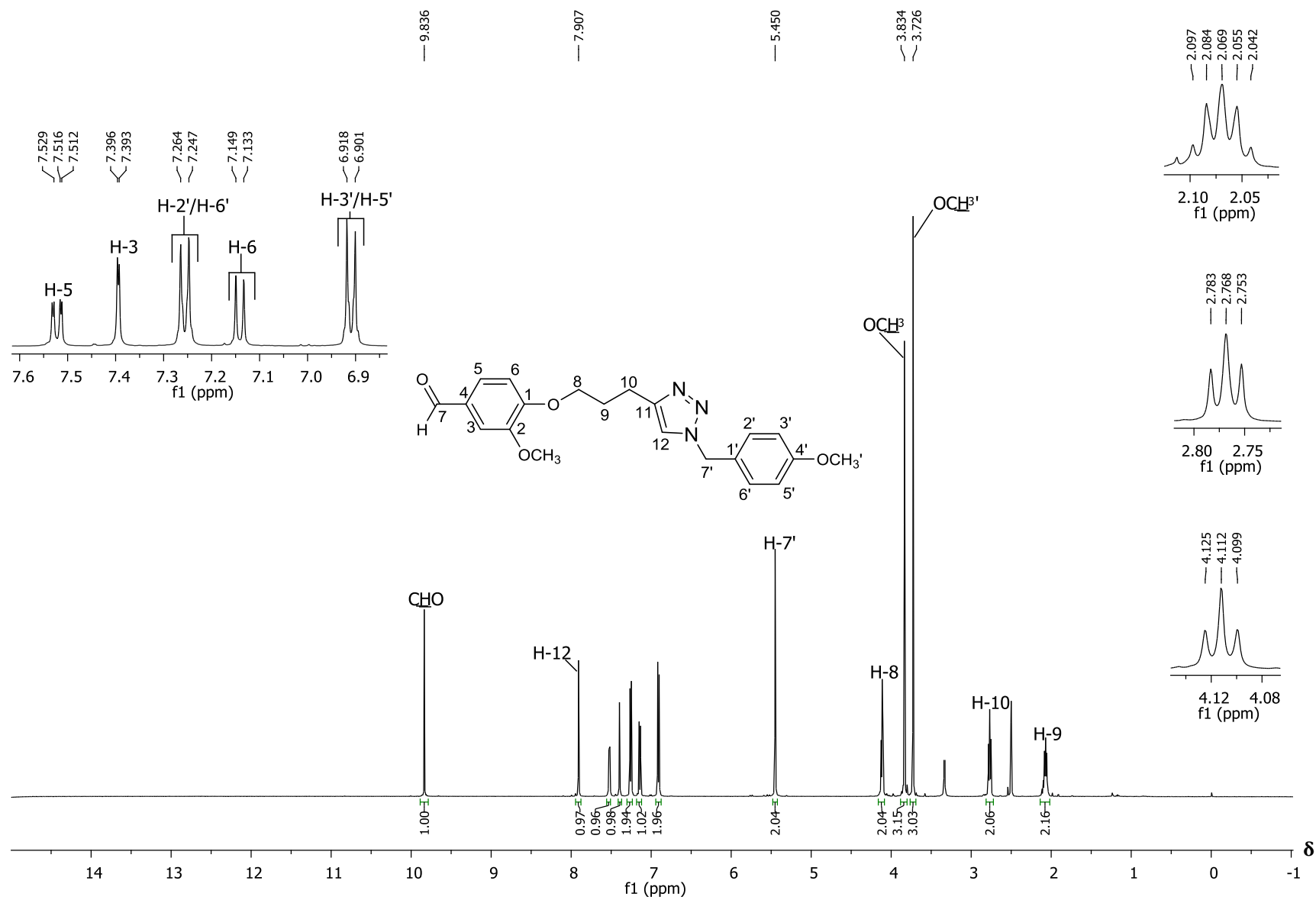


Figura 2.21. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) do composto **7i**.

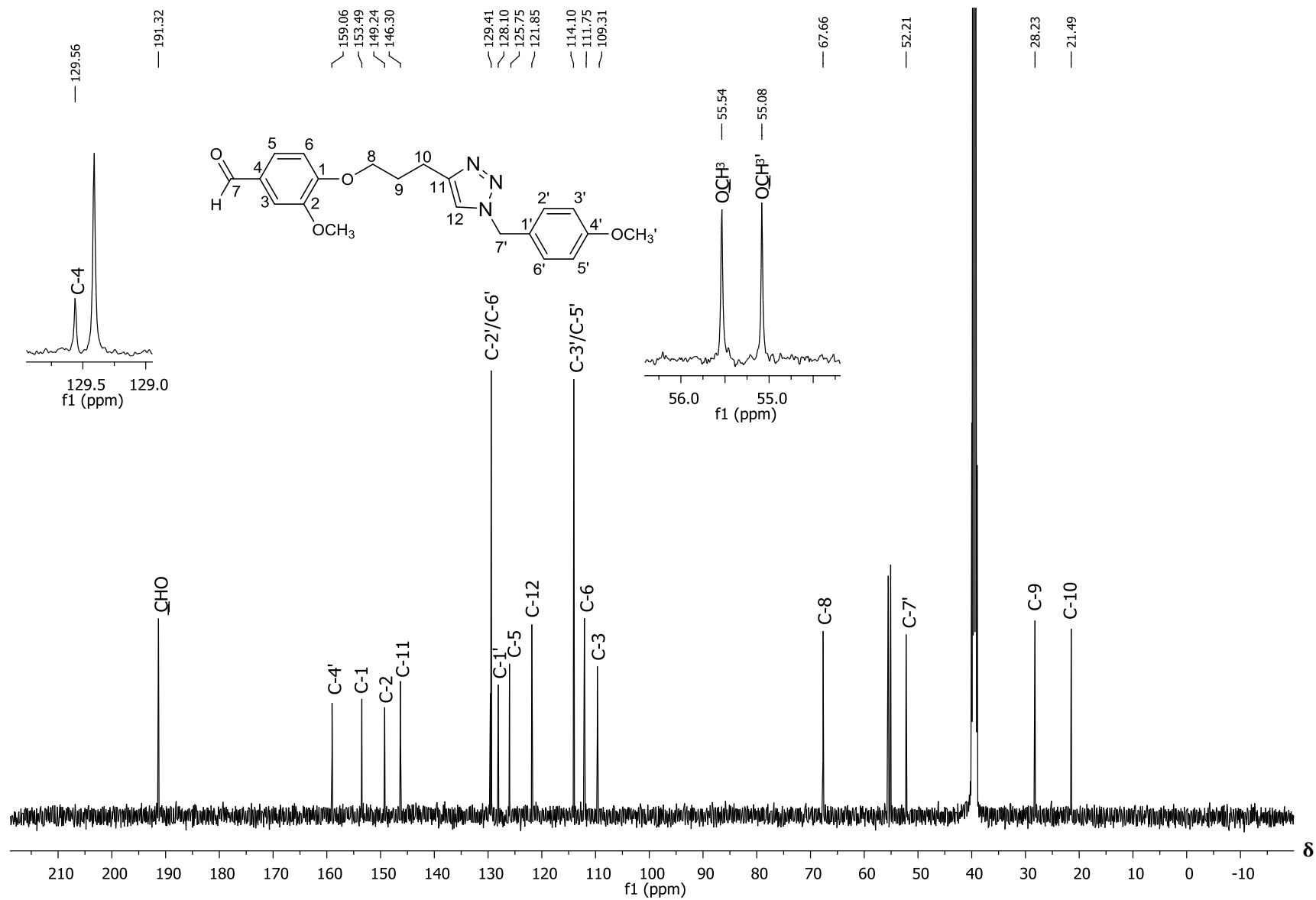


Figura 2.22. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **7i**.

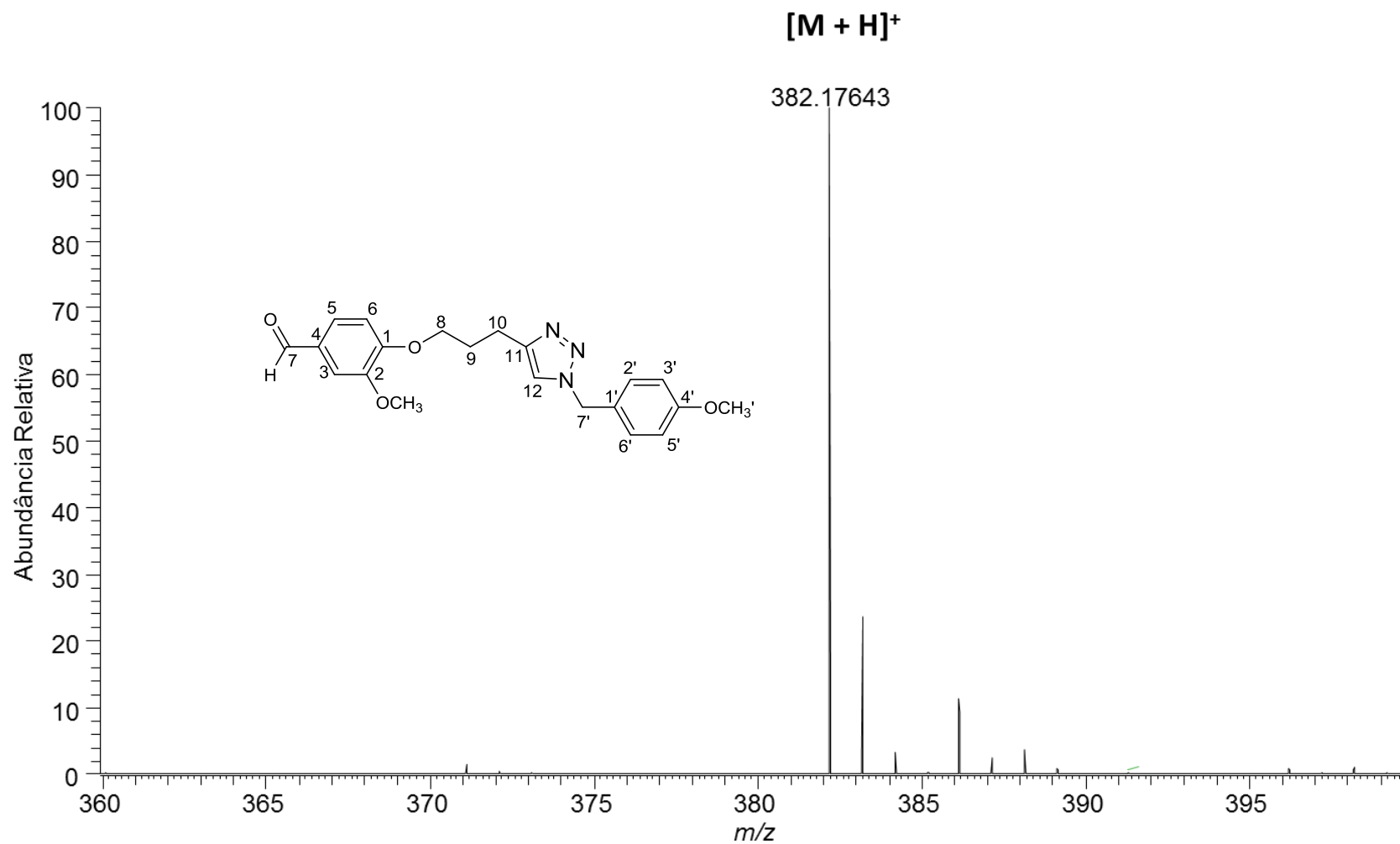
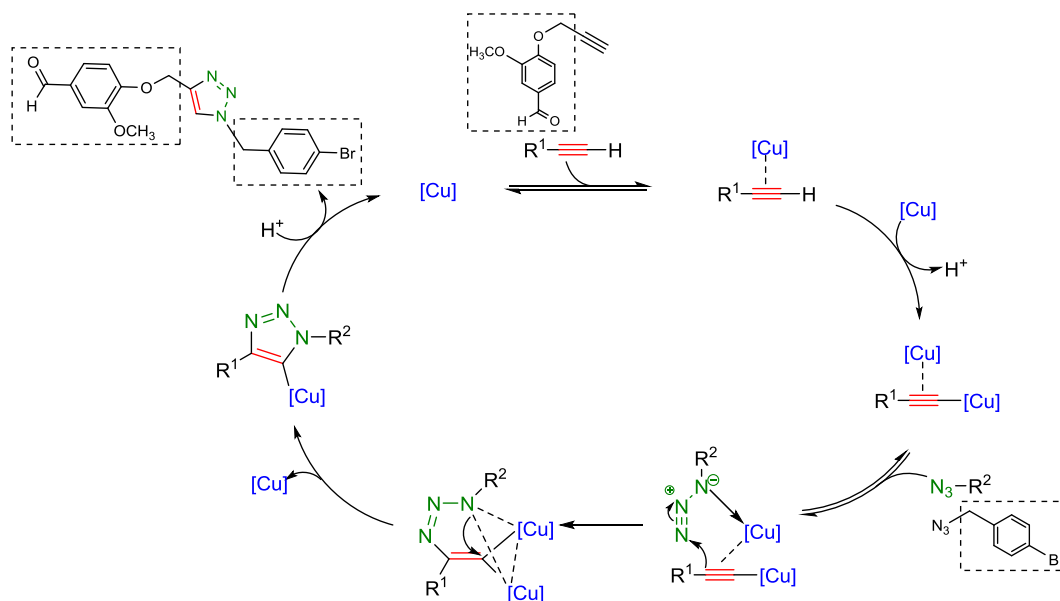


Figura 2.23. Espectro de massas de alta resolução do composto **7i**.

Conforme já mencionado, a principal contribuição para o aprimoramento da cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen foi à descoberta de que o metal cobre atua como catalisador deste processo. Desde então, além da elevada regioseletividade, formando exclusivamente o isômero 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído, várias vantagens podem ser destacadas para a reação CuAAC. Uma das vantagens que esta reação apresenta é a robustez em relação aos grupos funcionais presentes nos reagentes, já que a reação “click” não é influenciada pelos efeitos eletrônicos ou estéricos dos substituintes presentes nesses compostos. Outro ponto a ser considerado é o acentuado aumento da velocidade de reação, por um fator de 10^7 , em relação à reação não catalisada (WU e FOKIN, 2007). Apesar do Cu(I) ser a espécie envolvida no processo catalisado, as fontes de cobre podem variar entre Cu(I) e Cu(II). Uma alternativa que se tornou muito prática e comum para a reação “click” é a utilização de sais estáveis de Cu(II), como o sulfato penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), na presença de um agente redutor fraco como o ascorbato de sódio. A presença do ascorbato de sódio se faz essencial, pois garante que qualquer cobre oxidado seja convertido em espécies de cobre cataliticamente ativas, ou seja, espécies de cobre que apresentem estado de oxidação +1. A utilização da água como solvente também se torna fundamental para esta reação, pois além de ser um solvente benigno, universal, que dissolve os sais inorgânicos de Cu(II) e o ascorbato de sódio, é capaz de preservar o acetileno de cobre em seu estado reativo quando o mesmo é formado *in situ* (HEIN e FOKIN, 2010).

Diversas propostas mecanísticas já foram relatadas para essa reação, mas em nenhuma delas há um mecanismo totalmente elucidado. No entanto, o mecanismo atualmente aceito para a reação CuAAC foi proposto por Worrell e colaboradores (2013) e foi corroborado por estudos teóricos anteriormente estabelecidos. A partir de experimentos simples e dedutivos, os pesquisadores propuseram um mecanismo que necessita de dois átomos de cobre equivalentes dentro do complexo ativo da cicloadição, que atuam em conjunto para a formação regioseletiva de 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituído. Tomando-se a formação do composto **6f** como exemplo, no Esquema 2.9 (pg. 100), temos a representação do ciclo catalítico da proposta mecanística atualmente aceita.



Esquema 2.9. Proposta de ciclo catalítico para a reação "click" (CuAAC).

Conforme pode ser observado, a primeira etapa do ciclo catalítico consiste na complexação entre a espécie de Cu(I) e o alcino terminal. Com a formação deste complexo, o pKa do alcino terminal reduz de 25 para 9,8 o que possibilita a desprotonação do complexo alcino/Cu em meio aquoso e a sua complexação com a segunda espécie de Cu(I), resultando na formação do complexo acetileno de cobre. Posteriormente, o acetileno de cobre se coordena com a azida orgânica gerando o complexo azida-acetileno. Neste intermediário, o cobre tem um efeito sinérgico, pois torna o nitrogênio terminal da azida mais eletrofílico e o carbono β -vinilidênico do alcino mais nucleofílico, o que favorece a formação da primeira ligação C-N do intermediário cíclico denominado metalociclo. Esta etapa é endotérmica e define a regioseletividade da reação, pois possui energia de ativação de 15 kcal mol^{-1} que é menor que a energia de ativação para a reação não catalisada, 26 kcal mol^{-1} . Esta diferença entre as energias de ativação também explica o grande aumento de velocidade desta reação em relação à reação não catalisada (MELDAL e TORNØE, 2008). Na etapa seguinte, ocorre a contração do anel e a liberação de um átomo de Cu(I) resultando em uma ligação efetiva entre C-N e a obtenção da triazóila de cobre. Na última etapa do ciclo-catalítico ocorre a protonação do intermediário triazolídico levando assim à formação do produto 1,2,3-triazol-1,4-disubstituído e a regeneração do catalisador.

Tendo assegurado a obtenção de 22 compostos triazólicos inéditos derivados da vanilina (1) procedeu-se à avaliação de suas atividades leishmanicida, citotóxica, fungicida e inseticida (Capítulos 3, 4, 5 e 6).

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHER, N. G.; PORE, V. S.; MISHRA, N. N.; KUMAR, A.; SHUKLA, P. K.; SHARMA, A.; BHAT, M. K. Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 19, p. 759-763, 2009.
- ANJOS, J. V.; FILHO, R. A. W. N.; NASCIMENTO, S. C.; SRIVASTAVA, R. M.; MELO, S.J.; SINOUE, D. Synthesis and cytotoxic profile of glycosyl-triazole linked to 1,2,4-oxadiazole moiety at C5 through a straight-chain carbon and oxygen atoms. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 3571-3576, 2009.
- BAKUNOV, S. A.; BAKUNOVA, S. M.; WENZLER, T.; GHEBRU, M.; WERBOVETZ, K. A.; BRUN, R.; TIDWELL, R. R. Synthesis and antiprotozoal activity of cationic 1,4-diphenyl-1H-1,2,3-triazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, p. 254-272, 2010.
- BARBOSA, L. C. A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Editora UFV, 2008.
- BOECHAT, N.; FERREIRA, V. F.; FERREIRA, S. B.; FERREIRA, M. L. G.; SILVA, F. C.; BASTOS, M. M.; COSTA, M. S.; LOURENÇO, M. C. S.; PINTO, A. C.; KRETTLI, A. U.; AGUIAR, A. C.; TEIXEIRA, B. M.; SILVA, N. V.; MARTINS, P. R. C.; BEZERRA, F. A. F. M.; CAMILO, A. L. S.; SILVA, G. P.; COSTA, C. C. P. Novel 1,2,3-triazole derivatives for use against Mycobacterium tuberculosis H37Rv (ATCC 27294) strain. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, p. 5988-5999, 2011
- BORGATI, T. F. Síntese e avaliação da atividade herbicida de triazóis. Tese (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química do Instituto Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
- BORGATI, T. F.; ALVES, R. B.; TEIXEIRA, R. R.; DE FREITAS, R. P.; PERGIGÃO, T. G.; DA SILVA, S. F.; DOS SANTOS, A. A.; BASTIDAS, A. J. O. Synthesis and phytotoxic activity of 1,2,3-triazole derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, p. 953-961, 2013.
- CANDUZINI, H. A. Síntese e funcionalização de 1,2,3-triazóis via reação de cicloadição [3+2] de azidas e acetilenos terminais. Dissertação (Mestrado – Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, 2012.
- CAFICI, L.; PIRALI, T.; CONDORELLI, F.; GROSSO, E. D.; MASSAROTTI, A.; SORBA, G.; CANONICO, P. L.; TRON, G. C.; GENAZZANI, A. A. Solution-

phase parallel synthesis and biological evaluation of combretatriazoles. *Journal of Combinatorial Chemistry*, v. 10, p. 732-740, 2008.

- CARVALHO, I.; ANDRADE, P.; CAMPO, V. L.; GUEDES, P. M. M.; SESTI-COSTA, R.; SILVA, J. S.; SCHENKMAN, S.; DEDOLA, S.; HILL, L.; REJZEK, M.; NEPOGODIEV, S. A.; FIELD, R. A. 'Click chemistry' synthesis of a library of 1,2,3-triazolesubstitutedgalactose derivatives and their evaluation against *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 2412-2427, 2010.
- CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Organic Chemistry. Oxford University Press: United Kingdom, 2001b.
- DA CRUZ, E. H. G.; HUSSENE, C. M. B.; DIAS, G. G.; DIOGO, E. B. T.; DE MELO, I. M. M.; RODRIGUES, B. L.; DA SILVA, M. G.; VALENÇA, W. O.; CAMARA, C. A.; DE OLIVEIRA, R. N.; DE PAIVA, Y. G.; GOULART, M. O. F.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; JÚNIOR, E. N. S. 1,2,3-triazole-aryl-amino and thio-substituted 1,4-naphthoquinones: Potent antitumor activity, electrochemical aspects, and bioisosteric replacement of C-ring-modified lapachones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 1608-1619, 2014.
- DA SILVA, F. C.; DE SOUZA, M. C. B. V.; FRUGULHETI, I. I. P.; CASTRO, H. C.; SOUZA, S. L. O.; DE SOUZA, T. M. L.; RODRIGUES, D. Q.; SOUZA, A. M.T.; ABREU, F. P.; RODRIGUES, C. R.; FERREIRA, V. F. Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1H-1,2,3 triazole derivatives of carbohydrates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 373-383, 2009.
- DE OLIVEIRA, ANDRÉ S.; GAZOLLA, POLIANA A. R.; OLIVEIRA, ANA FLÁVIA C. DA S.; PEREIRA, WAGNER L.; DE S. VIOL, LÍVIA C.; MAIA, ANGÉLICA F. DA S.; SANTOS, EDJON G.; DA SILVA, ÍTALO E. P.; MENDES, TIAGO A. DE OLIVEIRA; DA SILVA, ADALBERTO M.; DIAS, ROBERTO S.; DA SILVA, CYNTHIA C.; POLÊTO, MARCELO D.; TEIXEIRA, RÓBSON R.; DE PAULA, SERGIO O. Discovery of novel West Nile Virus protease inhibitor based on isobenzonafuranone and triazolic derivatives of eugenol and indan-1,3-dione scaffolds. *PLoS One*, v. 14, p. e0223017, 2019.
- DEOBALD, A. M. Síntese de arilazidas e 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos contendo calcogênios. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, 2010.
- DEMCHUK, D. V.; SAMET, A. V.; CHERNYSHEVA, N. B.; USHKAROV, V. I.; STASHINA, G. A.; KONYUSHKIN, L. D.; RAIHSTAT, M. M.; FIRGANG, S. I.; PHILCHENKOV, A. A.; ZAVELEVICH, M. P.; KUIAVA, L. M.; CHEKHUN, V. F.; BLOKHIN, D. Y.; KISELYOV, A. S.; SEMENOVA, M. N.; SEMENOV, V. V. Synthesis and antiproliferative activity of conformationally restricted 1,2,3-triazole analogues of combretastatins in the sea urchin embryo model and against human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 738-755, 2014.

- DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorganic Chemistry*, v. 71, p. 30-54, 2017.
- DÍEZ-GONZÁLES, S. Well-defined copper(I) complexes for click azide-alkyne cycloaddition reactions: one click beyond. *Catalysis Science & Technology*, v. 1, p. 166-178, 2011.
- FERREIRA, S. B.; COSTA, M. S.; BOECHAT, N.; BEZERRA, R. J. S.; GENESTRA, M. S.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; KOVER, W. B.; FERREIRA, V. F. Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, p. 1388-1395, 2007.
- FREITAS, R. P.; FREITAS, L. B. O; RUELA, F.A.; PEREIRA, G. R.; ALVES, R. B. A reação "click" na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. *Química Nova*, v. 34, p. 1791-1804, 2011.
- GAZOLLA, P. A. R. Síntese e avaliação das atividades citotóxica e leishmanicida de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 2015.
- GAZOLLA, P. A. R.; TEIXEIRA, R. R.; DA SILVA, A. M.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; SIQUEIRA, R. P.; GONÇALVES, V. H. S.; PEREIRA, H. S.; BRESSAN, G. C. Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. *Química Nova*, v. 41, p. 497-506, 2018.
- GUANTAI, E. M.; NCOKAZI, K.; EGAN, T. J.; Gut, J.; ROSENTHAL, P. J.; SMITH, P. J.; CHIBALE, K. Design, synthesis and in vitro antimalarial evaluation of triazolelinked chalcone and dienone hybrid compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 8243-8256, 2010.
- HEIN, J. E.; FOKIN, V.V. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chemistry Society Review*, v. 39, p. 1302-1315, 2010.
- HOU, J.; LIU, X.; SHEN, J.; ZHAO, G.; WANG, P. G. The impact of click chemistry in medicinal chemistry. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 7, p. 489-501, 2012.
- KAMAL, A.; SHANKARAIHAH, N.; DEVAIAH, V.; REDDY, K.L.; JUVEKAR, A.; SEN, S.; KURIAN, N.; ZINGDE, S. Synthesis of 1,2,3 triazole-linked pyrrolobenzodiazepineconjugates employing 'click' chemistry: DNA-binding affinity and anticancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 18, p. 1468-1473, 2008.
- KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B.; FINN, M. G. Click Chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 40, p. 2004-2021, 2001.

- LIMA, A. M. A. Síntese de derivados da benzofenona contendo o núcleo 1,2,3-triazólico e avaliação de suas atividades citotóxica, leishmanicida e fotoprotetora. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 2018.
- LUCCHESI, A. M.; MARZORATI, L. Catálise de transferência de fase. *Química Nova*, v. 23, p. 641-652, 2000.
- MAKOSZA, M.; WAWRZYNIOWICZ, M. Reactions of organic anions. Catalytic method preparation of dichlorocyclopropane derivatives in aqueous medium. *Tetrahedron Letters*, v. 53, p. 4659-4662, 1969.
- MANETSCH, R.; KRASINSKI, A.; RADIC, Z.; RAUSHEL, J.; Taylor, P.; SHARPLESS, K. B.; KOLB, H. C. In Situ Click Chemistry: Enzyme Inhibitors Made to Their Own Specifications. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, p. 12809-12818, 2004.
- MAO, M.; LI, Y.; LIU, Q.; XIONG, L.; ZHANG, X.; LI, Z. Synthesis and biological evaluation of novel N-pyridylpyrazole derivatives containing 1,2,3-triazole moieties. *Journal of Pesticide Science*, v. 40, p. 138-142, 2015.
- MELDAL, M.; TORNØE, C. W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chemical Review*, v. 108, p. 2952–3015, 2008.
- MEGHANI, N. M.; AMIN, H. H.; JINLEE, B. Mechanistic applications of click chemistry for pharmaceutical drug discovery and drug delivery. *Drug Discovery Today*, v. 22, p. 1604–1619, 2017.
- OUYANG, T.; LIU, X.; OUYANG, H.; REN, L. Recent trends in click chemistry as a promising technology for virus-related research. *Virus Research*, v. 256, p. 21–28, 2018.
- PATEL, N.; SOOD, R.; BHARATAM, P. V. NL_2^+ systems as new-generation phase-transfer catalysts. *Chemical Reviews*, v. 118, p. 8770-8785, 2018.
- PAVIA, D. L. LAMPMAN, G. M. KRIZ, G. S. VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. Cengage Learning, 2015.
- PEREIRA, G. R.; SANTOS, L. J.; LUDUVICO, I.; ALVES, R. B. DE FREITAS, R. P. “Click” chemistry as a tool for the facile synthesis of fullerene glycoconjugate derivatives. *Tetrahedron Letters*, v. 51, p. 1022-1025, 2010.
- PINGAEW, R.; MANDI, P.; NANTASENAMAT, C.; PRACHAYASITTIKUL, S.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Design, synthesis and molecular docking studies of novel N-benzenesulfonyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-based triazoles with potential anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 81, p. 192-203, 2014.
- PORE, V.S.; AHER, N.G.; KUMAR, M.; SHUKLA, P.K. Design and synthesis of fluconazole/bile acid conjugate using click reaction. *Tetrahedron*, v. 62, p. 11178-11186, 2006.

- PORTA, E. O. J.; CARVALHO, P. B.; AVERY, M. A.; TEKWANI, B, L.; LABADIE, G. R. Click chemistry decoration of amino sterols as promising strategy to developed new leishmanicidal drugs. *Steroids*, v. 79, p. 28-36, 2014.
- PRAVEENA, K. S. S.; MURTHY, N. Y. S.; PAL, S. Synthesis and biological activities of 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v. 7, p. 506-522, 2015.
- PRETSCH, E.; CLERC, T.; SEIBL, J.; SIMON, W. Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds - ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, IR, MS, UV/VIS. 2^a ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1989.
- RODRIGUES, MICHELLE PEIXOTO; TOMAZ, DEBORAH CAMPOS; ÂNGELO DE SOUZA, LUCIANA; ONOFRE, THIAGO SOUZA; AQUILES DE MENEZES, WEMERSON; ALMEIDA-SILVA, JULIANA; SUAREZ-FONTES, ANA MÁRCIA; ROGÉRIA DE ALMEIDA, MÁRCIA; MANOEL DA SILVA, ADALBERTO; BRESSAN, GUSTAVO COSTA; VANNIER-SANTOS, MARCOS ANDRÉ; RANGEL FIETTO, JULIANA LOPES; TEXEIRA, RÓBSON RICARDO. Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 183, p. 111688, 2019.
- SCHETTIN, R.; SICIGNANO, M.; RICCARDIS, F.; IZZO, I.; SALA, G. D. Macrocyclic hosts in asymmetric phase-transfer catalyzed reactions. *Synthesis*, v. 50, p. 4777–4795, 2018.
- SILVA JR., E. N.; BARRETO, R.F.S.M.; PINTO, M.C.F.R.; SILVA, R.S.F.; TEIXEIRA, D.V.; SOUZA, M.C.B.V.; SIMONE, C.A.; CASTRO, S. L.; FERREIRA, V.F.; PINTO, A.V. Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, p. 1774-1780, 2008.
- TEIXEIRA, R. R.; GAZOLLA, P. A. R.; DA SILVA, A. M.; BORSODI, M. P. G.; BERGMANN, B. R.; FERREIRA, R. S.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; LIMA, W. P. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 146, p. 274-286, 2018.
- THOMAS, K. D.; ADHIKARI, A. V.; SHETTY, N. S. Design, synthesis and antimicrobial activities of some new quinoline derivatives carrying 1,2,3-triazole moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 3803-3810, 2010.
- VENEPALLY, V.; REDDY JALA, R. C. An insight into the biological activities of heterocyclic-fatty acid hybrid molecules. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 141, p. 113–137, 2017.

- WANG, C.; IKHLEF, D.; KAHLAL, S.; SAILLARD, J. Y.; ASTRUC, D. Metal-catalyzed azide-alkyne "click" reactions: Mechanistic overview and recent trends. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 316, p. 1–20, 2016.
- WHITING, M.; TRIPP, J. C.; LIN, Y. C.; LINDSTROM, W.; OLSON, A. J.; ELDER, J. H.; SHARPLESS, K. N.; FOKIN, V. V. Click SAR Profiling of New Inhibitors of HIV 1 Protease Enabled by the Cu(I)-Catalyzed Synthesis of 1,2,3-Triazole. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, p. 7697-7710, 2006.
- WORRELL, B.T.; MALIK, J.A.; FOKIN, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloadditions. *Science*, v. 340, p. 457-460, 2013.
- WU, P.; FOKIN, V. V. Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications. *Aldrichimica Acta*, v. 40, p. 7-17, 2007.
- ZHANG, W.; LI, Z.; ZHOU, M.; WU, F.; HOU, X.; LUO, H.; LIU, H.; HAN, X.; YAN, G.; DIN, Z.; LI, R. Synthesis and biological evaluation of 4-(1,2,3-triazol-1-yl)coumarin derivatives as potential antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, p.799-807, 2014.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DOS DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO

3.1. INTRODUÇÃO

As denominadas Doenças Negligenciadas consistem em um grupo de doenças causadas por agentes infecciosos ou parasitas, podendo ser endêmicas em países em desenvolvimento e grave ameaça para os países industrializados (BASTOS *et al.*, 2012). Dentre as doenças parasitárias negligenciadas que afetam anualmente milhões de pessoas encontra-se a Leishmaniose (SILVA-JARDIM *et al.*, 2014).

A Leishmaniose pode ser definida como um grupo de doenças causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Esses protozoários são parasitas unicelulares heteroxênicos que apresentam duas formas morfológicas no seu ciclo de vida, a promastigota e a amastigota (Figura 3.1, pg. 108). As formas promastigotas caracterizam-se por serem fusiformes e com longo flagelo, são extracelulares e vivem no trato digestivo do inseto vetor. As formas amastigotas, por sua vez, são arredondadas e com curto flagelo que não se exterioriza, são intracelulares e parasitam principalmente macrófagos do hospedeiro vertebrado (CHAN-BACAB e PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2008; BLANCO *et al.*, 2017).

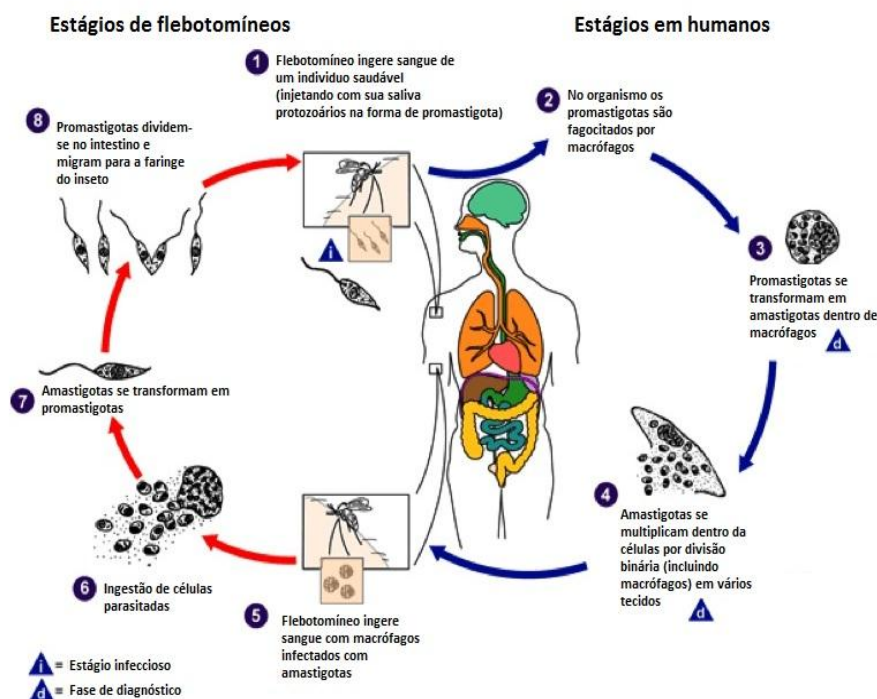


Figura 3.1. Ciclo de transmissão da *Leishmania*.

Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso 11 de maio de 2020.

O modo de transmissão desta doença ocorre pela picada do vetor fêmea flebotomíneo que adquire o parasito ao picar reservatórios (roedores, gambás, endentados, equinos, caninos e primatas), transmitindo-o ao homem (DUARTE *et al.*, 2010).

De acordo com a *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi, 2020), a leishmaniose está entre as doenças de maior importância mundial, atingindo 98 países com mais de 1 bilhão de indivíduos sob risco de desenvolver a infecção. Os países mais afetados são: Brasil, Índia, Etiópia, Quênia, Sudão do Sul, Somália e Sudão, e representam mais de 90% dos novos casos.

No Brasil, a leishmaniose atinge 19 estados sendo que mais de 90% dos casos humanos da doença concentram-se nas regiões Norte e Nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; BASTOS *et al.*, 2016).

A manifestação clínica da doença depende da complexidade da interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o tipo de protozoário, podendo

agredir a pele, as mucosas e as vísceras (Figura 3.2). Portanto, pode se apresentar de quatro formas distintas, sendo elas:

- a) leishmaniose cutânea, caracterizada por úlceras crônicas na pele desenvolvidas no local da picada do inseto vetor;
- b) leishmaniose cutânea disseminada, caracterizada por úlceras crônicas e disseminadas na pele, com aspecto hanseniforme e muito difíceis de curar;
- c) leishmaniose mucosa cutânea, caracterizada por úlceras crônicas similares à forma cutânea, porém tende a reaparecer associada a infecções secundárias e levando à destruição de grandes extensões de tecido podendo ser mutilantes;
- d) leishmaniose visceral, considerada a mais grave, que pode atingir fígado, baço e medula óssea, levando o paciente à morte (BASTOS *et al.*, 2012; BLANCO, 2017).

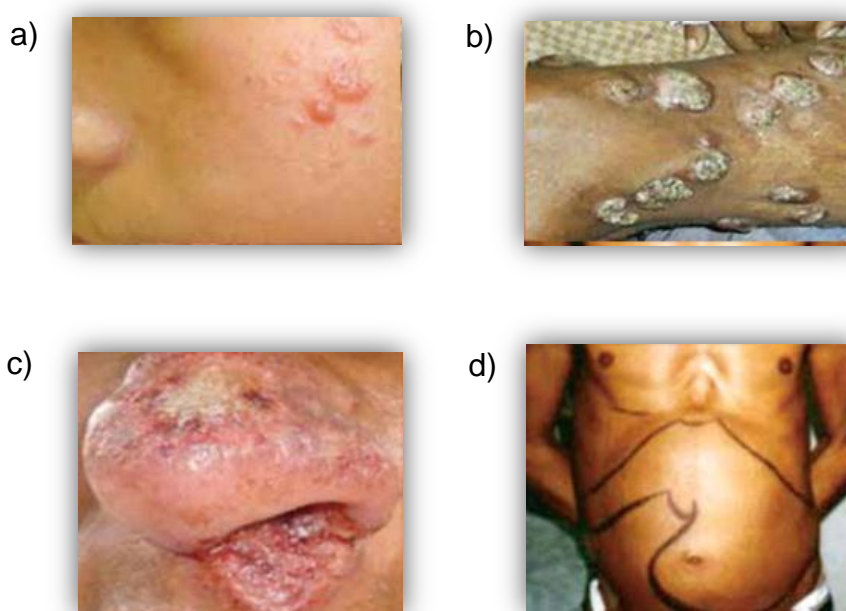


Figura 3.2. Manifestações clínicas da leishmaniose em humanos.

Fonte: ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUDE, 2013.

Os medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose no Brasil são os antimoniais pentavalentes (Pentostan[®] e Glucantime[®]), a anfotericina B e a

pentamidina, introduzidos como quimioterápicos desde a década de 1940 (Figura 3.3) (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016).

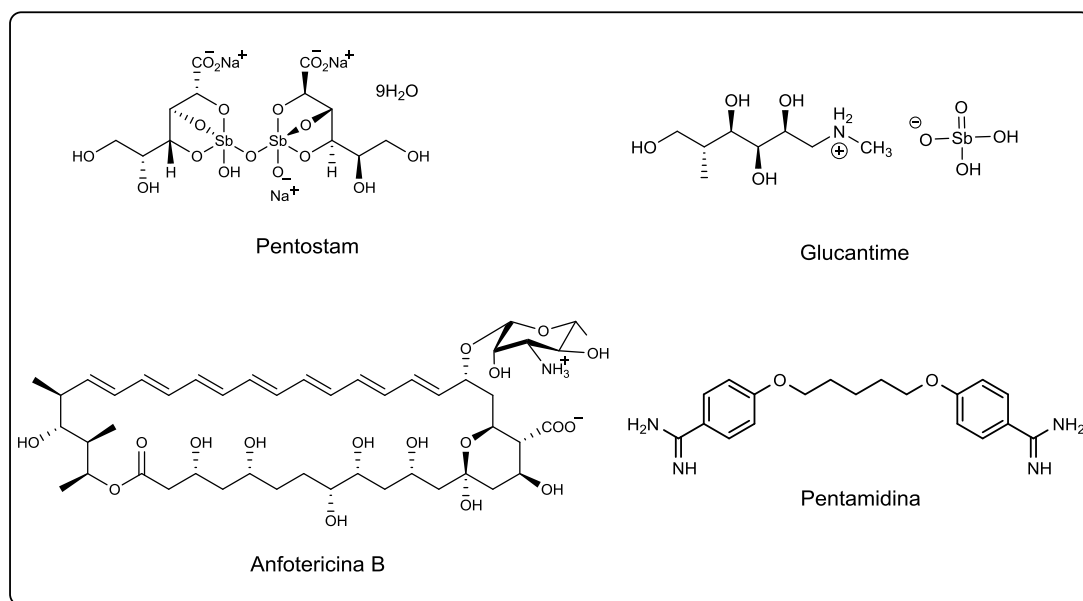


Figura 3.3. Estruturas de fármacos usados no tratamento da leishmaniose.

Apesar de serem utilizados no tratamento da leishmaniose, estes fármacos (Figura 3.3), apresentam importantes problemas relacionados ao seu uso como, por exemplo, elevada toxicidade, dificuldades de administração, graves efeitos colaterais que incluem mialgia, artralgia, aumento sérico das enzimas hepáticas, pancreatite, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancitopenia, insuficiência renal reversível e cardiotoxicidade (SILVA-LÓPEZ, 2010). Além disso, todos os fármacos disponíveis possuem custos elevados e são de administração parenteral, o que exige colaboração dos pacientes e favorece o aparecimento de cepas resistentes devido a tratamentos descontínuos (TELES *et al.*, 2011).

Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas efetivas contra a leishmaniose, a busca por novos medicamentos mais eficientes, de baixo custo e apresentando menores efeitos colaterais, para substituir ou reforçar aqueles que já estão sendo utilizados, é necessária e também de grande relevância.

Com respeito à busca por novos quimioterápicos para o tratamento da leishmaniose, moléculas funcionalizadas com o núcleo 1,2,3-triazólico têm sido descritas na literatura apresentando atividade leishmanicida. Como exemplo,

pode-se citar o trabalho desenvolvido por Porta e colaboradores (2014) no qual foram sintetizados derivados do esteroide contendo o núcleo 1,2,3-triazólico. Todos os 10 derivados preparados (Figura 3.4) foram avaliados *in vitro* contra *Leishmania donovani* e todos os compostos apresentaram significativos valores de IC_{50} . O composto que apresentou melhor resultado é cerca de cinco vezes mais ativo ($IC_{50} = 1,14 \mu\text{mol L}^{-1}$) do que o fármaco pentamidina ($IC_{50} = 6,17 \mu\text{mol L}^{-1}$) usado como controle positivo.

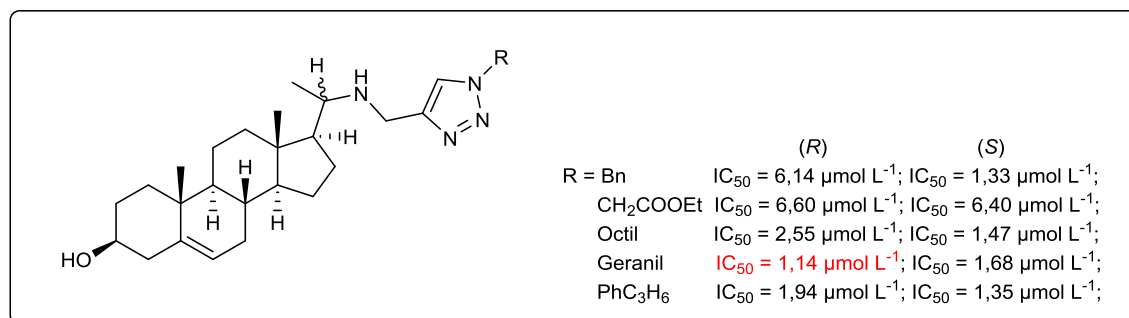


Figura 3.4. Estrutura dos 1,2,3-triazóis derivados do esteroide avaliados contra a forma promastigota de *Leishmania donovani*.

Recentemente, Teixeira e colaboradores (2018) também relataram a síntese de moléculas funcionalizadas contendo núcleo 1,2,3-triazol. O trabalho descreveu a síntese de vinte e seis derivados do eugenol. Os compostos preparados tiveram a atividade leishmanicida avaliada contra *Leishmania amazonensis*. O derivado mais ativo apresentou contra a forma promastigota $IC_{50} = 7,4 \mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, este composto foi avaliado contra a forma intracelular amastigota e apresentou $IC_{50} = 1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, ou seja, atividade leishmanicida superior ao quimioterápico comercial Glucantime ($IC_{50} = 45,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). A citotoxicidade deste composto contra macrófagos também foi avaliada e o derivado apresentou $IC_{50} = 211,9 \mu\text{mol L}^{-1}$. Assim, a substância mais ativa apresentou índice de seletividade igual a 132,5. Os resultados vinculados ao desenvolvimento desta investigação são descritos no artigo apresentado a seguir que foi publicado no ano de 2018 na revista científica European Journal of Medicinal Chemistry.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities



Róbson Ricardo Teixeira^{a,*}, Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla^a, Adalberto Manoel da Silva^b, Maria Paula Gonçalves Borsodi^c, Bartira Rossi Bergmann^c, Rafaela Salgado Ferreira^d, Boniek Gontijo Vaz^e, Géssica Adriana Vasconcelos^e, Wallace Pacienza Lima^c

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, S/N, Viçosa, MG, 36570-900, Brazil

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense, Campus Araquari Rodovia BR 280, Km 27, Cx. Postal 21, Araquari, SC, 89245-000, Brazil

^c Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Imunofarmacologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Bloco I2-038, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, 21941-902, RJ, Brazil

^d Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, 31270-901, MG, Brazil

^e Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Av. Esperança, S/N, Campus Samambaia, Goiânia, 74690-970, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2017

Received in revised form

11 January 2018

Accepted 15 January 2018

Keywords:

Eugenol

Leishmaniasis

Antileishmanial

Leishmanicidal

Triazole

ABSTRACT

In this paper, it is described the synthesis and the evaluation of the leishmanicidal activity of twenty-six eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. The evaluation of the compounds on promastigotes of *Leishmania amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) showed that eugenol derivatives present leishmanicidal activities with varying degrees of effectiveness. The most active compound, namely 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7k**) (IC₅₀ = 7.4 ± 0.8 μmol L⁻¹), also targeted *Leishmania* parasites inside peritoneal macrophages (IC₅₀ = 1.6 μmol L⁻¹) without interfering with cell viability. The cytotoxicity of **7k** against macrophage cells presented IC₅₀ of 211.9 μmol L⁻¹ and the selective index was equal to 132.5. Under similar conditions, compound **7k** was more effective than glucantime and pentamidine, two drugs currently in the clinic. In addition, theoretical calculations showed that this compound also presents most physicochemical and pharmacokinetic properties within the ranges expected for orally available drugs. It is believed that eugenol bearing 1,2,3-triazole functionalities may represent a scaffold to be explored toward the development of new agents to treat leishmaniasis.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Parasitic diseases affect millions of hundreds of people annually and constitute an important global health problem. These diseases affect mainly the poorest population around the world and represent a significant issue in terms of human health and well-being. Malaria, River blindness (Onchocerciasis), Lymphatic Filiasis, Schistosomiasis, Trypanosomiasis, and Leishmaniasis are some examples of parasitic diseases.

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by the protozoan *Leishmania* and classified as one of the most important neglected tropical diseases (NTDs) that affect 350 million people in 98

countries, with a global incidence of 0.9–1.6 million cases per year [1]. *Leishmania* parasites are transmitted via the bites of infected female phlebotomine sandflies. Three main clinical manifestations of leishmaniasis, depending on the parasite species and the host-parasite relationship, are known: visceral (often known as Kala-azar and the most serious form of the disease), cutaneous (the most common), and mucocutaneous [2]. Visceral leishmaniasis is responsible for 20,000–40,000 deaths annually [1].

Currently, several investigations have been conducted to find alternative treatments for leishmaniasis [3] due to the small number of available drugs and the development of resistance or decreased the sensitivity of parasite strains to existing treatments that have been utilized for human therapy [3]. These studies have sought new methods and targets for diagnosis, new vaccine candidates and new rationally designed drugs that can be applied not

* Corresponding author.

E-mail address: robsonr.teixeira@ufv.br (R.R. Teixeira).

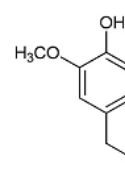
only in humans but also in dogs because canines are considered the major reservoirs of several species of *Leishmania* [4,5].

Historically, chemotherapy for leishmaniasis has relied on the use of pentavalent antimonial drugs, such as *N*-methylglucamine antimoniate (Fig. 1), which is one of the most widely used drugs [6]. However, this drug has limited clinical potential due to the occurrence of serious side effects and high incidence of disease recurrence [7]. Pentamidine (Fig. 1) is another antileishmanial agent, but it is inadequate as a first-line treatment because of its high toxicity [8]. Amphotericin B has been used as a second-choice drug in the treatment of leishmaniasis since the 1960s, but the rate of resistance against this drug is high [8]. Two other examples of antileishmanial compounds are miltefosine and paromomycin (Fig. 1). The major limitation of miltefosine is teratogenicity, excluding its use in women of child-bearing age [9,10]. The most common side effect associated with the paromomycin is the ototoxicity, as well as problems in liver function. In patients treated with the ointment formulation, skin rashes, local pruritus and burs have been encountered [11]. Additionally, the drugs used in therapy have some limitations in common: (i) they are toxic and their long-time administration causes various undesirable side effects; (ii) they are costly; (iii) they show low efficacy in endemic areas due to the observed resistance of various parasite species [12]. The aforementioned problems illustrate the need to develop new antileishmanial drugs.

In the search for new drugs for the treatment of diseases, the exploitation of natural products is a viable approach [13–18]. In this

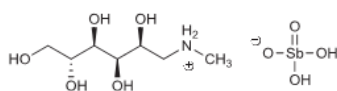
regard, compounds obtained from nature can be used directly as a pharmaceutical or can be chemically modified to afford derivatives with improved pharmacological activity.

Eugenol (1) (Fig. 2) is a natural compound which has been identified in several aromatic plants such as *Myristica fragrans* Houtt. (nutmeg), *Cinnamomum verum* J.Presl (true cinnamon), *C. loureirii* Nees. (Saigon cinnamon), *Ocimum gratissimum* Forsk. (basil) and *Ocimum basilicum* L. (sweet basil). However, *Eugenia caryophyllata* (= *Syzygium aromaticum*) can be considered the principal natural source of this compound as it represents between 45% and 90% of the composition of the essential oil derived from this species. Several biological activities have been reported for eugenol (1) including antibacterial, antifungal, antiparasitoid, and antiproliferative activities.

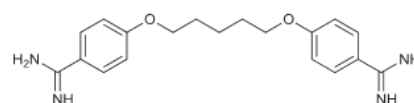


Eugenol (1)

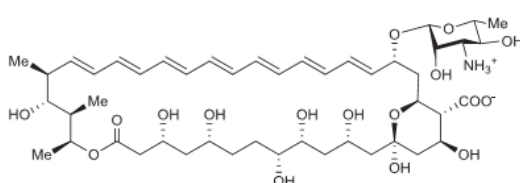
Fig. 2. The structure of eugenol (1).



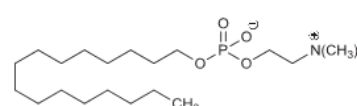
***N*-methylglucamine antimoniate**



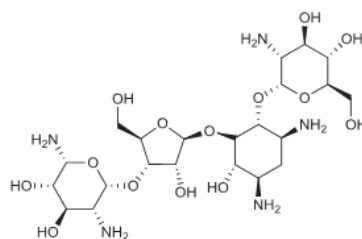
pentamidine



amphotericin B



miltefosine



paromomycin

Fig. 1. Structures of drugs used for the treatment of leishmaniasis.

antiviral, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, anticancer and anti-diabetes [19,20].

An investigation conducted with *Ocimum gratissimum* revealed that its eugenol-rich essential oil presents leishmanicidal activity. The IC_{50} values of the oil against promastigotes and amastigotes were, respectively, $135 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Eugenol (**1**) alone was also evaluated and the activity against promastigote forms was even more pronounced (IC_{50} value of $80 \mu\text{g mL}^{-1}$) [21]. Considering the leishmanicidal effect of eugenol (**1**) [21] and its derivatives [22] as well as reports on the antileishmanial activity of 1,2,3-triazole containing compounds [23–25], it is described in this paper the synthesis and leishmanicidal activity evaluation of a series of compounds derived from eugenol and containing 1,2,3-triazolic portions.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of eugenol derivatives

The first step towards the preparation of eugenol 1,2,3-triazolic compounds corresponded to the extraction of eugenol (**1**). This compound was obtained via hydrodistillation from cloves purchased in the local market in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. After the extraction procedure, the compound was purified by silica gel column chromatography. Next, eugenol (**1**) was submitted to alkylation reactions affording the derivatives **2** and **4** as outlined in Scheme 1 [26].

For the synthesis of eugenol derivatives containing triazole rings, it was required the preparation of several benzyl azides (compounds of general structure **5** in Scheme 2) which were obtained in two steps from the corresponding benzyl alcohols utilizing methodology previously described in the literature [27].

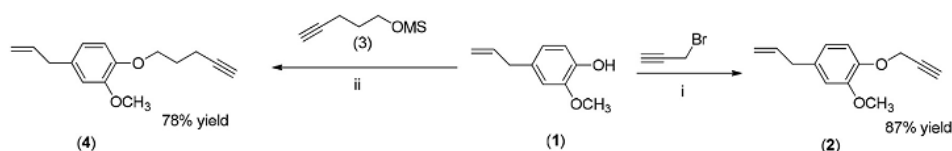
The key step involved in the synthesis of eugenol derivatives **6a–6n** and **7a–7m** (Scheme 3) corresponded to the Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC), also known as click reaction [28–33], between the alkyne compounds **2** and **4** and the benzyl azides **5**. Compounds were obtained with synthetically useful yields between 77% and 91% (Scheme 3). In general, reactions took less than 1 min for their completion. The synthesis of the compounds was planned so that the influence on the leishmanicidal activity of different benzylic groups attached to triazole ring as well as the length of the chain connecting the triazole ring to the eugenol portion could be assessed. All the triazolic compounds were fully characterized by NMR (^{13}C and ^1H), IR and high-resolution mass spectrometry. In the ^1H NMR spectra, the signal for the hydrogen present in the triazolic ring was observed within the 7.20–7.67 ppm range. The allylic protons were observed as doublets, while the hydrogen atoms of methylene groups attached to nitrogen or oxygen were noticed as singlets in the ^1H

NMR spectra. The carbon chemical shifts are compatible with the structures of the compounds. In the IR spectra, expected bands for functional groups were noticed. The molecular formulas of the eugenol triazolic derivatives were confirmed by high-resolution mass spectrometry analyses.

2.2. Evaluation of leishmanicidal activity of eugenol derivatives

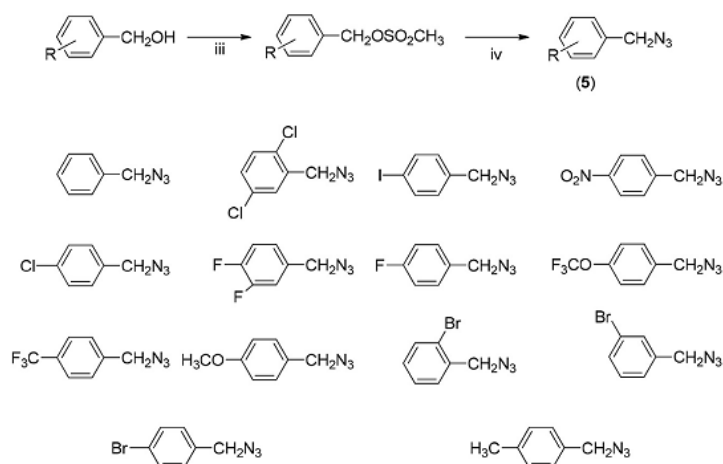
Taking into consideration previous reports concerning the leishmanicidal activity of eugenol (**1**) and triazole containing compounds, we turned our attention to evaluate the leishmanicidal activities of eugenol derivatives **6a–6n** and **7a–7m**. The treatment of the parasites with the compounds resulted in a dose-dependent growth inhibition of *L. amazonensis* promastigotes. The 50% growth inhibitory activity values (IC_{50}), after 72 h of treatment of each compound, were determined by the Alamar Blue assay [34], and are shown in Table 1. Eugenol derivatives **6a**, **6b**, **6k**, **7a**, **7b**, and **7k** were the most active ones, presenting IC_{50} values of 30.2, 59.4, 49.2, 37.9, 32.2 and $7.4 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Pentamidine and amphotericin B were used as positive controls in the assays and presented IC_{50} of 4.2 and $0.4 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. It is worth to mention that the IC_{50} values of compounds **6a**, **6b**, **6k**, **7a**, **7b**, and **7k** are superior to the IC_{50} of eugenol (**1**) ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$; $487 \mu\text{mol L}^{-1}$) evaluated against promastigote forms of *L. amazonensis* [21].

After demonstrating leishmanicidal activity against extracellular promastigotes, the next step was to investigate the effect against intracellular amastigotes, the parasite form responsible for the mammalian infection. We determined that compound **7k**, the most active against promastigote form, was able to target the *Leishmania* parasites inside of mouse peritoneal macrophages ($IC_{50} = 1.6 \mu\text{mol L}^{-1}$), without interfering with host cell viability (Table 2). At similar conditions, pentamidine and glucantime exhibited IC_{50} values of $1.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $45.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($124.3 \mu\text{mol L}^{-1}$) respectively. Compound **7k** was assayed against uninfected murine intraperitoneal macrophages to evaluate its cytotoxicity; it was found LD_{50} of $211.9 \mu\text{mol L}^{-1}$. At similar conditions, pentamidine and glucantime exhibited LD_{50} values of $8.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $75.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($206.3 \mu\text{mol L}^{-1}$), respectively. Thus, the selectivity index ($SI = LD_{50}/IC_{50}$ intracellular amastigotes) value for compound **7k** was 132.5, whereas $SI = 4.7$ for pentamidine and $SI = 1.6$ for glucantime. Therefore, the derivative **7k** presents lower toxicity when compared to drugs currently used in the treatment of leishmaniasis. In order to determine whether anti-amastigote activity resulted from activation of the macrophage antileishmanial mechanism, compound **7k** was also evaluated with respect to the nitric oxide production. It was observed that **7k** did not significantly stimulate the production of nitric oxide, suggesting a direct and selective action of this derivative on the intracellular amastigote (data not shown).



Reagents and conditions: (i) NaOH, CH_3OH , 40°C ; then acetonitrile, r.t.; (ii) NaOH, CH_3OH , 40°C ; then acetonitrile, 70°C .

Scheme 1. Alkylation procedures of eugenol (**1**).



Reagents and conditions: (iii) Et₃N, CH₃SO₂Cl, CH₂Cl₂, -50 °C; (iv) NaN₃, DMSO, r.t.

Scheme 2. Synthesis and structures of benzyl azides.

Infected amastigote macrophages treated with **7k**, glucantime and without treatment (negative control) were observed by microphotography and revealed that the parasites were killed but that the host cells remained unaffected (Fig. 3).

2.3. Analysis of estimated physicochemical and pharmacokinetic properties

During drug development, it is important to consider several relevant properties, in addition to leishmanicidal activity. Therefore, to evaluate if the most potent compounds against *L. amazonensis* (**6a**, **6b**, **6k**, **7a**, **7b**, **7k**) are suitable for further steps of lead optimization, a set of 44 properties were estimated employing the software QikProp [35]. Among those, we highlight the analysis of those referring to Lipinski's [36] and Veber's rules [37], which are considered as reference parameters for orally available drugs. The six highlighted compounds obey Veber's rules and most of the Lipinski's rules, except for clogP (Table 3). These results indicate that the compounds herein investigated obey most physicochemical drug-like properties.

Other key properties for drug development, such as the estimated affinity to HERG K⁺ channels (QPlogHERG), permeability through Caco-2 (QPpCaco) and MDCK cells (QPpMDCK) and skin (QPlogK_p) and the number of predicted metabolic sites (#metab), were also calculated (Table 4). This analysis reveals properties which would probably have to be improved when optimizing these compounds. For example, a key concern would be to reduce the affinity for HERG, a K⁺ channel commonly associated with cardiac toxicity [38]. Skin permeability should also be improved in case a topical application is desired, as indicated by the QPlogK_p values. On the other hand, high predicted permeability through Caco-2 cells, a model for the gut-blood barrier, and MDCK cells, which model the blood brain barrier, indicate good overall permeability in biological membranes, which is a desirable property for orally available drugs. The predicted number of metabolites is also within the desired range, observed for most drugs. Altogether, most of the calculated properties seem favorable for drug development.

3. Conclusion

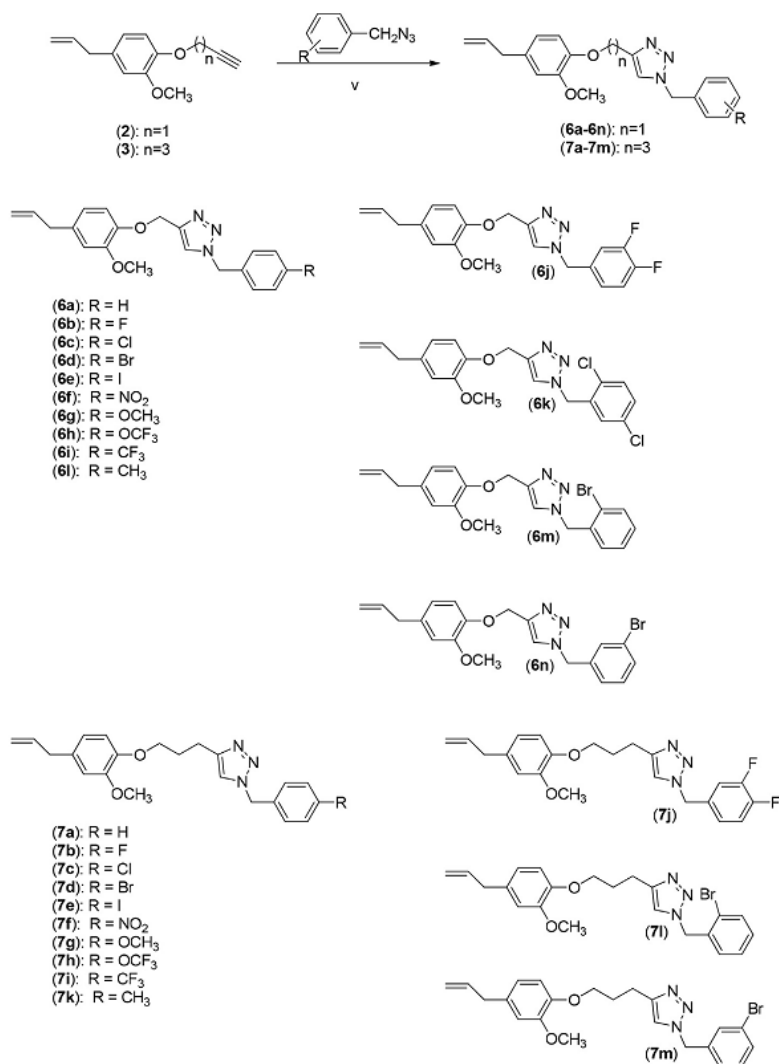
In conclusion, a series of compounds derived from eugenol and containing 1,2,3-triazolic portions were prepared in good yields and described for the first time. Among all the evaluated derivatives against *L. amazonensis*, compound 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7k**) showed significant antileishmanial activity and selectivity index superior to those of pentamidine and glucantime, while also having most physicochemical and pharmacokinetic properties within the ranges expected for orally available drugs. The results suggest that these compounds can be used as promising novel prototypes for drug development against leishmaniasis.

4. Material and methods

4.1. Extraction and purification of eugenol and synthesis of 1,2,3-triazole derivatives

4.1.1. Generalities

Solvents were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Benzyl alcohols, pent-4-yn-1-ol, methanesulfonyl chloride, sodium azide, triethylamine, propargyl bromide, geneticin and dimethyl sulfoxide hybri-max (DMSO) were purchased from Sigma Aldrich and used as received. M199 medium powder, fetal calf serum (HIFCS), penicillin, and streptomycin were procured from Cultilab. Eugenol (**1**) was extracted via hydrodistillation from cloves purchased in the local market in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil, and subsequently purified by column chromatography (*vide infra*). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 300 instrument at 300 MHz and 75 MHz, respectively, using CDCl₃ or C₆D₆ as solvents. NMR data are presented as follows: chemical shift (δ) in ppm, multiplicity, the number of protons, *J* values in Hertz (Hz), and proton assignment. Multiplicities are shown as the following abbreviations: s (singlet), brs (broad singlet), d (doublet), dd (double of a doublet), t (triplet), quartet, brd (broad doublet), ddt_{ap} (apparent doublet of doublets of triplets), q (quartet), quint (quintet), m (multiplet). IR spectra were obtained using Varian 660-IR equipped with GladiATR scanning from 4000 to 500 cm⁻¹. High-



Reagents and conditions: (v) Sodium ascorbate (40 mol%), CuSO₄·5H₂O (20 mol%), EtOH/H₂O (1:1 v/v)

Scheme 3. Click reactions involved in the preparation of eugenol triazolic derivatives.

resolution mass spectra were recorded on a Q-Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Germany). The spectra were acquired using the following conditions. Ionization source: Electron spray (+) and (–); Spray voltage: 3.5 kV; Capillary temperature: 275 °C; Sheath gas: 5 (arbitrary units); Auxiliary gas: 0 (arbitrary units). For the mass spectrometry analyses, the samples were prepared as follows: a mass of 1 mg of the compound to be analyzed was dissolved in 1 mL of acetonitrile. Then, the solution was diluted with 1 mL of methanol so that the final concentration corresponded to 1 ppm. The resulting solution was directly injected in the Q-Exactive equipment at 5 μL min^{–1}. The spectra were recorded in full MS mode. Low-resolution mass spectra were recorded on Shimadzu GCMS-

QP5050A instrument under electron impact (70 eV) conditions of positive ion mode. Analytical thin layer chromatography analyses were conducted on aluminum backed precoated silica gel plates using different solvent systems. TLC plates were visualized using potassium permanganate solution, phosphomolybdic acid solution and/or UV light. Flash column chromatography was performed using silica gel 60 (60–230 mesh). Solvents were dried using standard procedures described in the literature [39].

4.1.2. Extraction and purification of eugenol (1)

Eugenol was extracted via hydrodistillation from dried flower buds of *Eugenia caryophyllata*, known as cloves, purchased in the

Table 1
Effect of eugenol derivatives **6a–6n** and **7a–7m** on promastigote form of *L. amazonensis*.

Compound	Promastigote IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)
6a	30.2 ± 1.5
6b	59.4 ± 1.7
6c	1780 ± 3
6d	993 ± 3
6e	2013 ± 3
6f	130.2 ± 2.1
6g	424.9 ± 2.6
6h	322.1 ± 2.5
6i	2013 ± 3
6j	969 ± 3
6k	49.2 ± 1.7
6l	106.2 ± 2.1
6m	159.6 ± 2.2
6n	155.8 ± 2.1
7a	37.9 ± 1.5
7b	32.2 ± 1.5
7c	817 ± 3
7d	286.7 ± 2.5
7e	278.9 ± 2.4
7f	173.3 ± 2.3
7g	119.5 ± 2.0
7h	145.9 ± 2.1
7i	295.2 ± 2.5
7j	177.5 ± 2.3
7k	7.4 ± 0.8
7l	913.3 ± 2.9
7m	980.2 ± 2.9
pentamidine	4.2 ± 0.3
amphotericin B	0.4 ± 0.1

local market in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. Thus, 60.0 g of cloves were mixed with 500 mL of distilled water in a round bottom flask which was connected to the hydrodistillation apparatus. The mixture was heated for three hours. The obtained hydrolate was transferred to a separatory funnel and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 × 30 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated, and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was submitted to column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (6:1 v/v). The described procedure afforded 7.12 g of eugenol (**1**) which corresponded to approximately 12% yield in relation to the initial mass of cloves used in the extraction process. The structure of eugenol (**1**) is in agreement with the following data.

Yellow oil, TLC: R_f = 0.44 (hexane-ethyl acetate 6:1 v/v). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.33 (d, 2H, J = 6.7 Hz), 3.88 (s, 3H), 5.02–5.13 (m, 2H), 5.54 (s, 1H, OH), 5.97 (ddt_{ap}, 1H, J₁ = 16.8 Hz, J₂ = 10.2 Hz and J₃ = 6.7 Hz), 6.67–6.72 (m, 2H), 6.86 (d, 1H, J = 8.5 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 39.8, 55.8, 111.1, 114.2, 115.5, 121.1, 131.9, 137.8, 143.8, 146. MS, m/z (%) 164 ([M]⁺; C₁₀H₁₂O₂, 100); 149 (35); 131 (29); 103 (32); 91 (28); 77 (34); 65 (13); 55 (24); 41 (7).

Table 2
In vitro antileishmanial activity of **7k** against promastigotes, intracellular amastigotes of *L. amazonensis* after 72 h of treatment, and its cytotoxicity against macrophages.

Compound	Promastigotes IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Amastigotes ^a IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Macrophages ^b LD ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Selectivity index (SI) ^c
7k	7.4 ± 0.8	1.6 ± 0.2	211.9 ± 2.3	132.5
glucantime^e	nd ^d	45.5 ± 1.6	75.5 ± 2.6	1.6
pentamidine	4.2 ± 0.4	1.8 ± 0.2	8.5 ± 0.6	4.7

Arithmetic means ± SD (n = 3).

^a Intracellular amastigotes.

^b Murine peritoneal macrophages.

^c SI = LD₅₀/IC₅₀ intracellular amastigotes.

^d nd: not determined.

^e Glucantime [μg/ml].

4.1.3. Synthesis of 4-allyl-2-methoxy-1-(prop-2-yn-1-yloxy) benzene (**2**)

A 50 mL round bottom flask was charged with eugenol (**1**) (1.20 g, 7.32 mmol), sodium hydroxide (0.313 g, 7.83 mmol) and 25 mL of methanol. The resulting mixture was heated at 40 °C and magnetically stirred for 30 min. After this time, methanol was removed under reduced pressure and 10.0 mL of anhydrous ethanol was added to the removal of the residual water. The ethanol was removed under reduced pressure. Then, the round bottom flask, under a nitrogen atmosphere, was charged with anhydrous acetonitrile (25.0 mL) and propargyl bromide (800 μL, 8.79 mmol) was added slowly. The mixture was magnetically stirred at room temperature for 18 h. TLC analysis revealed the completion of the reaction after this time. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was partitioned between 25.0 mL of sodium hydroxide solution (0.1 mol L⁻¹) and 25 mL of diethyl ether. The layers were separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (2 × 25.0 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic layer was washed with brine (25.0 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (6:1 v/v). The described procedure afforded 1.29 g (6.37 mmol, 87% yield) of compound **2**. The structure of **2** is supported by the following data.

Yellow oil, TLC: R_f = 0.45 (hexane-ethyl acetate 6:1 v/v). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.49 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 3.35 (d, 2H, J = 6.7 Hz), 3.86 (s, 3H), 4.73 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 5.03–5.14 (m, 2H), 5.96 (ddt_{ap}, 1H, J₁ = 16.8 Hz, J₂ = 10.2 Hz, J₃ = 6.7 Hz), 6.70–6.76 (m, 2H), 6.97 (d, 1H, J = 8.6 Hz). ¹H NMR (300 MHz, C₆D₆) δ: 1.99 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 3.14 (d, 2H, J = 6.6 Hz), 3.31 (s, 3H), 4.36 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 4.93–5.02 (m, 2H), 5.85 (ddt_{ap}, 1H, J₁ = 17.0 Hz, J₂ = 10.4 Hz and J₃ = 6.6 Hz), 6.52 (d, 1H, J = 1.7 Hz), 6.57 (dd, 1H, J₁ = 8.1 Hz and J₂ = 1.7 Hz), 6.83 (d, 1H, J = 8.1 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 39.8, 55.8, 56.9, 75.5, 78.7, 112.3, 114.6, 115.7, 120.3, 134.2, 137.4, 145.0, 149.6. MS, m/z (%) 202 ([M]⁺; C₁₃H₁₄O₂, 40), 163 (100), 135 (9), 103 (42), 91 (33), 77 (19), 65 (13), 55 (9), 41 (23).

4.1.4. Synthesis of pent-4-yn-1-yl methanesulfonate (**3**)

Pent-4-yn-1-ol (1.68 g, 20.0 mmol) and dichloromethane (20 mL) were added to a 100 mL round-bottom flask under nitrogen atmosphere. The mixture was cooled to -50 °C and triethylamine (5.60 mL, 40.0 mmol) was added. After that, methanesulfonyl chloride was added slowly (2.32 mL, 30.0 mmol) to the reaction mixture under continuous stirring. The progress of the reaction was monitored by TLC. After completion of it, 10 mL of distilled water were added. The organic phase was washed with 1% HCl solution (3 × 15 mL) followed by saturated aqueous NaHCO₃ (3 × 5 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3

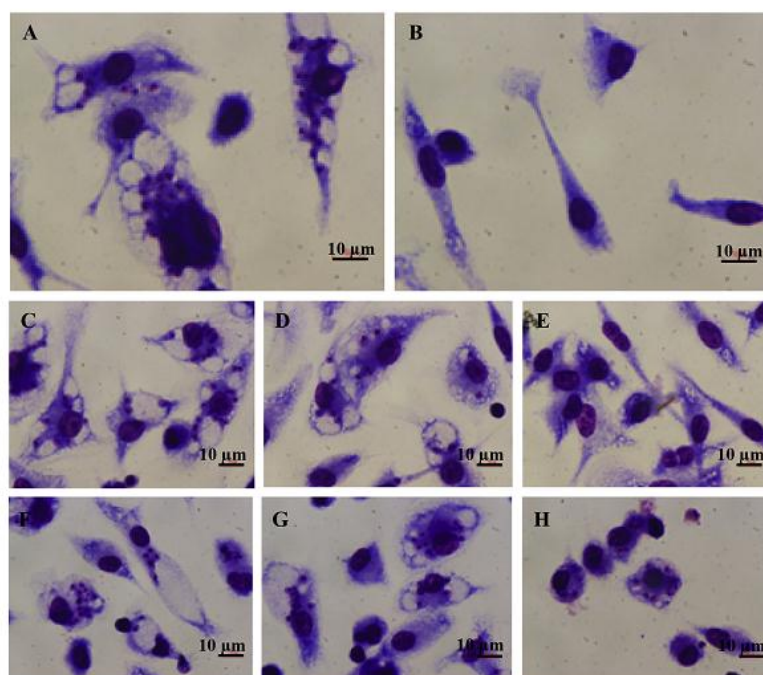


Fig. 3. Microphotographs of the *L. amazonensis*-infected macrophages treated with compound **7k**, glucantime and those without treatment. After 48 h of treatment, the slides were stained and parasites quantified by optical microscopy. (A) Negative control; (B) uninfected macrophages; (C) $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, (D) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ and (E) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ of **7k**; (F) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2.73 \mu\text{mol L}^{-1}$), (G) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($27.3 \mu\text{mol L}^{-1}$) and (H) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($273 \mu\text{mol L}^{-1}$) of glucantime.

Table 3

Calculated molecular properties for compounds most active against *Leishmania*. Estimated properties are considered relevant for drug-likeness according to the Lipinski's and Veber's rules.

Compound	Molecular weight (g/mol)	clogP	# H-bond donors	# H-bond acceptors	# Lipinski's rule violations	# of rotatable bonds	PSA (\AA^3)
Ideal values	≤ 500	≤ 5	≤ 5	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 75
6a	335.4	5.15	0	4	1	8	45.6
6b	353.4	5.39	0	4	1	8	45.6
6k	404.3	6.05	0	4	1	8	45.2
7a	363.5	5.95	0	4	1	10	46.0
7b	381.4	6.19	0	4	1	10	45.9
7k	377.5	6.28	0	4	1	10	46.1

Table 4

Additional predicted pharmacokinetic properties for compounds most active against *Leishmania*.

Compound	QPlogHERG ^a	QPPCaco (nm/s) ^b	QPPMDCK (nm/s) ^c	QPlogK _p ^d	#metab ^e
Range ^f or reference values	> -5	> 500	> 500	-8.0 to -1.0	1 to 8
6a	-6.8	3136	1701	-0.42	5
6b	-6.7	3147	3091	-0.55	5
6k	-6.6	3176	8274	-0.69	5
7a	-7.1	3474	1901	-0.16	5
7b	-7.0	3497	3464	-0.29	5
7k	-7.0	3490	1910	-0.35	6

^a Predicted $\log\text{IC}_{50}$ for HERG K^+ blockage.

^b Predicted apparent Caco-2 cell permeability for non-active transport.

^c Predicted apparent MDCK cell permeability for non-active transport.

^d Predicted skin permeability, $\log K_p$.

^e Number of likely metabolic sites.

^f Range observed for 95% of known drugs.

v/v) to give compound **3** in 92% yield (3.00 g, 18.0 mmol).

Yellow oil, TLC: $R_f = 0.76$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.93 (quint, 2H, $J = 6.5$ Hz), 1.99 (t, 1H, $J = 2.7$ Hz), 2.33 (td, 2H, $J_1 = 6.8$ Hz and $J_2 = 2.7$ Hz), 3.00 (s, 3H, CH_3), 4.32 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz), ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.5, 27.6, 37.1 (CH_3), 68.2, 69.7, 82.0.

4.1.5. Data for 4-allyl-2-methoxy-1-(pent-4-yn-1-yloxy)benzene (**4**)

This compound was prepared using a similar procedure to that described for the preparation of compound **2**. In this case, the alkylating agent corresponded to compound **3**. Substance **4** was obtained in 78% yield (1.64 g, 7.13 mmol) after purification by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (6:1 v/v). The structure of **4** is supported by the following data.

Yellow oil, TLC: $R_f = 0.55$ (hexane-ethyl acetate 6:1 v/v). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.97 (t, 1H, $J = 2.6$ Hz), 2.04 (quint, 2H, $J = 6.6$ Hz), 2.42 (td, 2H, $J_1 = 7.0$ Hz and $J_2 = 2.6$ Hz), 3.34 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.85 (s, 3H), 4.10 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.03–5.13 (m, 2H), 5.97 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.68–6.75 (m, 2H), 6.85 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 15.2, 28.2, 39.8, 55.9, 67.5, 68.8, 83.6, 112.4, 113.6, 115.6, 120.5, 133.0, 137.6, 146.7, 149.5. MS, m/z (%) 230 ($[\text{M}]^+$, $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$, 100), 164 (68), 149 (44), 131 (29), 121 (16), 103 (34), 91 (31), 77 (23), 65 (16), 55 (15), 41 (34).

4.1.6. General procedure for the preparation of compounds **6a–6n** and **7a–7m** exemplified by the synthesis of compound 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-benzyl-1H-1,2,3-triazole (**6a**)

A 10 mL round bottom flask was charged with 4-allyl-2-methoxy-1-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**2**) (0.150 g, 0.740 mmol), benzyl azide (0.0990 g; 0.740 mmol), sodium ascorbate (0.0590 g, 0.300 mmol), 1.00 mL of ethanol and 1.00 mL of distilled water. Then, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0370 g, 0.150 mmol) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature. After completion of the reaction as noticed by TLC analysis, the mixture was extracted with dichloromethane (3×10.0 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic layer was washed with aqueous sodium carbonate saturated solution, dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v). Compound **6a** was obtained in 91% yield (0.228 g, 0.680 mmol). The structure of **6a** is supported by the following data.

White solid, m.p. 90.5–91.3 °C, TLC: $R_f = 0.49$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3086, 3034, 2999, 2929, 2912, 1589, 1511, 1446, 1259, 1229, 1143, 1016, 921, 831, 713, 696. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.50 (s, 2H), 5.94 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.71 (m, 2H), 6.94 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.21–7.40 (m, 5H), 7.54 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 54.1, 55.7, 63.5, 112.2, 114.6, 115.7, 120.4, 122.7, 128.1, 128.7, 129.0, 133.8, 134.4, 137.4, 144.8, 145.8, 149.5. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2$, 336.17120; found: 336.17020. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{NaO}_2$, 358.15315; found: 358.15164.

Compounds **6b–6n** and **7a–7m** were prepared using a procedure similar to that described for the synthesis of **6a**. The structures of these compounds were confirmed by NMR (^1H and ^{13}C), IR, and HRMS analyses. Information regarding the reactions involved in the preparation of the aforementioned compounds and data that support their structures are described below.

4.1.6.1. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6b**). White solid, obtained in 87% yield (0.218 g, 0.620 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.143 g, 0.710 mmol), 4-fluorobenzyl azide (0.107 g, 0.710 mmol), sodium ascorbate (0.0560 g, 0.280 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0350 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 92.1–92.7 °C, TLC: $R_f = 0.39$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3069, 3005, 2935, 2914, 1588, 1511, 1259, 1223, 1143, 1017, 905, 771. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.94 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.5$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.67–6.70 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.04 (t_{ap}, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.20–7.30 (m, 2H), 7.54 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.4, 55.7, 63.4, 112.2, 114.5, 115.7, 116.1 (d, $J = 21.8$ Hz), 120.4, 122.6, 129.9 (d, $J = 8.3$ Hz), 130.3 (d, $J = 3.0$ Hz), 133.8, 137.4, 145.0, 145.8, 149.5, 162.8 (d, $J = 246.0$ Hz). HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_2$, 354.16178; found: 354.16077. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{NaO}_2$, 376.14372; found: 376.14240.

4.1.6.2. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6c**). White solid, obtained in 84% yield (0.210 g, 0.570 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.137 g, 0.680 mmol), 4-chlorobenzyl azide (0.1114 g, 0.680 mmol), sodium ascorbate (0.0540 g, 0.270 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0340 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 112.3–112.6 °C, TLC: $R_f = 0.37$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3001, 2936, 2915, 1588, 1513, 1943, 1258, 1228, 1143, 1016, 907, 803, 722, 693, 592. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.94 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.18 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.33 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.54 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 53.4, 55.7, 63.4, 112.2, 114.6, 115.7, 120.4, 122.7, 129.2, 129.3, 132.9, 133.9, 134.7, 137.4, 145.0, 145.8, 149.5. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClN}_3\text{O}_2$, 370.13223; found: 370.13132. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{NaO}_2$, 392.11417; found: 392.11285.

4.1.6.3. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6d**). White solid, obtained in 80% yield (0.216 g, 0.520 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.132 g, 0.650 mmol), 4-bromobenzyl azide (0.138 g, 0.650 mmol), sodium ascorbate (0.0510 g, 0.260 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0330 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 119.1–120.2 °C, TLC: $R_f = 0.59$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3001, 2935, 2915, 1588, 1513, 1385, 1258, 1229, 1144, 1015, 803, 738, 592, 488. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.94 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 17.1$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.92 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.11 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.48 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.54 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 53.4, 55.7, 63.4, 112.2, 114.6, 115.7, 120.4, 122.7, 122.8, 129.6, 132.2, 133.4, 133.9, 137.4, 145.1, 145.7, 149.5. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 414.08171; found: 414.08072. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 436.06366; found: 436.06058.

4.1.6.4. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6e**). White solid, obtained in 87% yield (0.200 g, 0.430 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.101 g, 0.500 mmol), 4-iodobenzyl azide (0.130 g, 0.500 mmol), sodium ascorbate (0.0400 g, 0.200 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0250 g, 0.100 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl

acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 129.2–131.1 °C, (3:1:3 v/v), TLC: $R_f = 0.37$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3124, 3063, 2932, 1587, 1512, 1486, 1385, 1258, 1228, 1143, 1017, 1008, 911, 801, 769, 592, 485. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.82 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.5$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.92 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.98 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.54 (s, 1H), 7.69 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 53.5, 55.7, 63.4, 94.5, 112.2, 114.6, 115.7, 120.4, 122.7, 129.8, 133.9, 134.1, 137.4, 138.2, 145.1, 145.8, 149.5. HRMS (M + H⁺): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{IN}_3\text{O}_2$, 462.06784; found: 462.06711. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{IN}_3\text{NaO}_2$, 484.04979; found: 484.04898.

4.1.6.5. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6f**). White solid, obtained in 89% yield (0.223 g, 0.590 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.133 g, 0.660 mmol), 4-nitrobenzyl azide (0.118 g, 0.660 mmol), sodium ascorbate (0.0520 g, 0.260 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0330 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 120.9–121.9 °C, TLC: $R_f = 0.14$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3063, 3005, 2950, 2917, 1591, 1516, 1350, 1258, 1230, 1140, 1019, 835, 720. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.01–5.12 (m, 2H), 5.25 (s, 2H), 5.62 (s, 2H), 5.93 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.92 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.37 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.63 (s, 1H), 8.20 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.0, 55.7, 63.3, 112.3, 114.5, 115.7, 120.4, 123.0, 124.2, 128.5, 134.0, 137.4, 141.5, 145.4, 145.7, 148.0, 149.5. HRMS (M + H⁺): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4$, 381.15628; found: 381.15533. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{NaO}_4$, 403.13822; found: 403.13715.

4.1.6.6. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6g**). White solid, obtained in 80% yield (0.200 g, 0.550 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.138 g, 0.680 mmol), 4-methoxybenzyl azide (0.110 g, 0.680 mmol), sodium ascorbate (0.0540 g, 0.270 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0340 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 92.4–93.1 °C, TLC: $R_f = 0.36$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3068, 3005, 2936, 2832, 1613, 1587, 1512, 1463, 1251, 1227, 1142, 1016, 903, 805, 774, 702, 548. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.31 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.80 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 5.01–5.12 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.88 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 6.94 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.21 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.51 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 53.7, 55.3, 55.7, 63.5, 112.2, 114.4, 114.5, 115.6, 120.4, 122.5, 126.4, 129.7, 133.7, 137.4, 144.7, 145.9, 149.5, 159.9. HRMS (M + H⁺): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3$, 366.18177; found: 366.18069. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{NaO}_3$, 388.16371; found: 388.16229.

4.1.6.7. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-(trifluoromethoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6h**). White solid, obtained in 85% yield (0.213 g, 0.510 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.121 g, 0.600 mmol), 4-(trifluoromethoxy)benzyl azide (0.130 g, 0.600 mmol), sodium ascorbate (0.0480 g, 0.240 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0300 g, 0.120 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 126.4–127.3 °C, TLC: $R_f = 0.49$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3004, 2978, 2941, 1589, 1510, 1467, 1387, 1256, 1218, 1142, 1017, 915, 804. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.51 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H,

$J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.20 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.28 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.57 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.2, 55.8, 63.4, 112.2, 114.5, 115.8, 120.3 (q, $J = 256.3$ Hz, OCF_3), 120.4, 121.5, 122.7, 129.5, 133.2, 133.9, 137.4, 145.1, 145.8, 149.3–149.2 (m), 149.5. HRMS (M + H⁺): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$, 420.15350; found: 420.15250. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_3$, 442.13545; found: 442.13422.

4.1.6.8. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6i**). White solid, obtained in 84% yield (0.210 g, 0.520 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.125 g, 0.620 mmol), 4-(trifluoromethyl)benzyl azide (0.125 g, 0.620 mmol), sodium ascorbate (0.0490 g, 0.250 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0310 g, 0.120 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 142.7–143.0 °C, TLC: $R_f = 0.43$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3060, 3003, 2977, 2944, 1589, 1515, 1422, 1328, 1229, 1142, 1117, 1017, 913, 799, 624. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.25 (s, 2H), 5.57 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.34 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.58 (brs, 1H), 7.61 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.4, 55.8, 63.4, 112.2, 114.6, 115.7, 120.4, 122.8, 123.7 (q, $J = 270.8$ Hz, CF_3), 126.0 (q, $J = 3.8$ Hz), 128.1, 131.0 (q, $J = 32.5$ Hz), 133.9, 137.4, 138.4, 145.2, 145.7, 149.5. Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$, 404.15859; found: 404.15771. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_2$, 426.14053; found: 426.13928.

4.1.6.9. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(3,4-difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6j**). White solid, obtained in 78% yield (0.195 g, 0.530 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.136 g, 0.670 mmol), 3,4-difluorobenzyl azide (0.113 g, 0.670 mmol), sodium ascorbate (0.0530 g, 0.270 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0340 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 104.9–105.2 °C, TLC: $R_f = 0.30$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3003, 2939, 2915, 1589, 1516, 1447, 1287, 1259, 1213, 1142, 1018, 835, 756, 575. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 5.01–5.12 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.92 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.97–7.19 (m, 3H), 7.57 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.0 (brd, $J = 1.0$ Hz), 55.7, 63.4, 112.2, 114.6, 115.7, 117.2 (d, $J = 18.0$ Hz), 117.9 (d, $J = 18.0$ Hz), 120.4, 122.7, 124.2 (dd, $J_1 = 6.8$ Hz and $J_2 = 3.8$ Hz), 131.4–131.5 (m), 133.9, 137.4, 145.2, 145.6, 149.5, 148.7–148.9 (m), 152.0–152.2 (m). Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$, 372.15236; found: 372.15137. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_3\text{NaO}_2$, 394.13430; found: 394.13312.

4.1.6.10. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(2,5-dichlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6k**). White solid, obtained in 81% yield (0.203 g, 0.500 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.125 g, 0.620 mmol), 2,5-dichlorobenzyl azide (0.125 g, 0.620 mmol), sodium ascorbate (0.0490 g, 0.250 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0310 g, 0.120 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 87.9–88.4 °C, TLC: $R_f = 0.59$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3143, 3008, 2962, 2871, 1587, 1508, 1460, 1391, 1256, 1213, 1137, 1030, 1003, 905, 821, 797, 645, 560. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.83 (s, 3H), 5.01–5.12 (m, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.60 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 9.9$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.68–6.71 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.12 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 7.27 (dd, 1H,

$J_1 = 8.6$ Hz and $J_2 = 2.3$ Hz), 7.35 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.67 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 50.9, 55.8, 63.5, 112.3, 114.7, 115.7, 120.5, 123.1, 130.0, 130.2, 130.9, 131.5, 133.5, 133.97, 133.99, 137.4, 145.1, 145.7, 149.5. Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$, 404.09326; found: 404.09232. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{NaO}_2$, 426.07520; found: 426.07388.

4.1.6.11. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazole (6f). White solid, obtained in 82% yield (0.205 g, 0.590 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.145 g, 0.720 mmol), 4-methylbenzyl azide (0.106 g, 0.720 mmol), sodium ascorbate (0.0570 g, 0.290 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0360 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 81.4–82.3 °C, TLC: $R_f = 0.66$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3064, 3003, 2917, 1588, 1513, 1446, 1257, 1229, 1142, 1017, 907, 803, 756. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.34 (s, 3H, CH_3), 3.32 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.01–5.12 (m, 2H), 5.22 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.94 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.15 (s, 4H), 7.52 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 21.1 (CH_3), 39.8, 53.9, 55.7, 63.5, 112.2, 114.6, 115.6, 120.4, 122.6, 128.1, 129.7, 131.4, 133.8, 137.5, 138.6, 144.7, 145.9, 149.5. Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$, 350.18685; found: 350.18582. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{NaO}_2$, 372.16880; found: 372.16776.

4.1.6.12. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (6m). White solid, obtained in 77% yield (0.208 g, 0.500 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.132 g, 0.650 mmol), 2-bromobenzyl azide (0.138 g, 0.650 mmol), sodium ascorbate (0.0510 g, 0.260 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0330 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 67.5–68.6 °C, TLC: $R_f = 0.70$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3141, 3079, 3003, 2944, 2873, 1587, 1509, 1421, 1389, 1254, 1213, 1134, 1050, 1026, 1000, 920, 759, 649, 596. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.82 (s, 3H), 5.00–5.11 (m, 2H), 5.25 (s, 2H), 5.64 (s, 2H), 5.94 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.95 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.12 (dd, 1H, $J_1 = 7.4$ Hz and $J_2 = 1.7$ Hz), 7.17–7.33 (m, 2H), 7.60 (dd, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz and $J_2 = 1.2$ Hz), 7.66 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.7, 55.7, 63.5, 112.2, 114.7, 115.6, 120.4, 123.1, 123.4, 128.1, 130.30, 130.33, 133.1, 133.8, 134.0, 137.4, 144.7, 145.7, 149.5. Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 414.08171; found: 414.08096. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 436.06366; found: 436.06290.

4.1.6.13. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(3-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (6n). White solid, obtained in 79% yield (0.213 g, 0.520 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.132 g, 0.650 mmol), 3-bromobenzyl azide (0.138 g, 0.650 mmol), sodium ascorbate (0.0510 g, 0.260 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0330 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 97.5–97.9 °C, TLC: $R_f = 0.70$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3011, 2936, 1588, 1512, 1463, 1387, 1226, 1142, 1017, 835, 735, 692, 665. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.82 (s, 3H), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.94 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.8$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), [7.13–7.26 (m), 7.40 (brs), 7.48 (d_{ap}, $J = 7.7$ Hz), 4H], 7.57 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 53.3, 55.7, 63.4, 112.2, 114.6, 115.7, 120.5, 122.7, 123.0, 126.6, 130.6, 131.0, 131.9, 133.9, 136.6, 137.4, 145.1, 145.8, 149.5. Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 414.08171; found: 414.08069. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 436.06366; found: 436.06265.

4.1.6.14. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-benzyl-1H-1,2,3-triazole (7a). White solid, obtained in 79% yield (0.198 g, 0.540 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.158 g, 0.690 mmol), benzyl azide (0.0920 g, 0.690 mmol), sodium ascorbate (0.0550 g, 0.280 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0350 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 71.4–72.6 °C, TLC: $R_f = 0.16$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3059, 3007, 2958, 2830, 2876, 1588, 1513, 1461, 1332, 1260, 1230, 1140, 1026, 915, 799, 709, 663. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.17 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.90 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.01–5.11 (m, 2H), 5.48 (s, 2H), 5.95 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.22–7.37 (m, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.9, 55.8, 68.1, 112.3, 113.4, 115.5, 120.4, 120.9, 127.9, 128.5, 129.0, 132.9, 134.8, 137.6, 146.6, 147.7, 149.3. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$, 364.20250; found: 364.20148. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{NaO}_2$, 386.18445; found: 386.18341.

4.1.6.15. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (7b). White solid, obtained in 86% yield (0.215 g, 0.560 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.151 g, 0.660 mmol), 4-fluorobenzyl azide (0.100 g, 0.660 mmol), sodium ascorbate (0.0520 g, 0.260 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0330 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 96.4–96.8 °C, TLC: $R_f = 0.21$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3061, 3008, 2951, 1587, 1511, 1455, 1260, 1222, 1140, 1015, 905, 798, 772, 654. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.17 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.90 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.95 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.8$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.03 (t, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.16–7.30 (m, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.2, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 116.0 (d, $J = 21.8$ Hz), 120.4, 120.8, 129.7 (d, $J = 8.3$ Hz), 130.7 (d, $J = 3.0$ Hz), 132.9, 137.6, 146.6, 147.8, 149.3, 162.7 (d, $J = 246.8$ Hz). Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{FN}_3\text{O}_2$, 382.19308; found: 382.19211. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{NaO}_2$, 404.17502; found: 404.17404.

4.1.6.16. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (7c). White solid, obtained in 87% yield (0.218 g, 0.550 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.145 g, 0.630 mmol), 4-chlorobenzyl azide (0.106 g, 0.630 mmol), sodium ascorbate (0.0480 g, 0.250 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0320 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 81.8–82.2 °C, TLC: $R_f = 0.46$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3063, 3000, 2937, 2856, 1589, 1514, 1446, 1259, 1227, 1140, 1015, 909, 799, 776, 739, 641. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.17 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.90 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.00–5.11 (m, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.95 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.16 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.24 (s, 1H), 7.32 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.2, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 120.4, 120.9, 129.2, 132.9, 133.3, 134.6, 137.6, 146.6, 147.9, 149.3. Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{ClN}_3\text{O}_2$, 398.16353; found: 398.16272. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{NaO}_2$, 420.14547; found: 420.14474.

4.1.6.17. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (7d). White solid, obtained in 84%

yield (0.210 g, 0.480 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.130 g, 0.570 mmol), 4-bromobenzyl azide (0.120 g, 0.570 mmol), sodium ascorbate (0.0450 g, 0.230 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0290 g, 0.110 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 89.4–90.3 °C, TLC: $R_f = 0.46$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3063, 2999, 2950, 1588, 1514, 1459, 1420, 1260, 1227, 1141, 1013, 908, 797, 733, 489. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.17 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.90 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.03–5.13 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.10 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.24 (s, 1H), 7.47 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.2, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 120.4, 120.9, 122.7, 129.5, 132.2, 133.0, 133.9, 137.6, 146.6, 147.9, 149.4. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 442.11301; found: 442.11227. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 464.09496; found: 464.09402.

4.1.6.18. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7e**). White solid, obtained in 91% yield (0.246 g, 0.500 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.127 g, 0.550 mmol), 4-iodobenzyl azide (0.143 g, 0.550 mmol), sodium ascorbate (0.0440 g, 0.202 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0280 g, 0.110 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 98.3–99.2 °C, TLC: $R_f = 0.45$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3062, 2999, 2951, 1588, 1513, 1461, 1419, 1260, 1227, 1140, 1009, 910, 797, 731, 655, 484. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.17 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.90 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.33 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.00–5.12 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.96 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.24 (s, 1H), 7.68 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.3, 55.8, 68.0, 94.3, 112.3, 113.4, 115.6, 120.4, 120.9, 129.6, 132.9, 134.5, 137.6, 138.1, 146.6, 147.9, 149.3. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{IIN}_3\text{O}_2$, 490.09915; found: 490.09836. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{IN}_3\text{NaO}_2$, 512.08109; found: 512.08038.

4.1.6.19. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7f**). White solid, obtained in 82% yield (0.205 g, 0.500 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.141 g, 0.610 mmol), 4-nitrobenzyl azide (0.109 g, 0.610 mmol), sodium ascorbate (0.0480 g, 0.240 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0310 g, 0.120 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 79.7–80.4 °C, TLC: $R_f = 0.29$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3062, 2949, 2911, 1590, 1518, 1465, 1348, 1227, 1139, 1014, 907, 849, 798, 713, 592. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.19 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.94 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.31 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.00–5.12 (m, 2H), 5.59 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.31–7.38 (m, 3H), 8.19 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.6, 39.7, 52.9, 55.8, 68.0, 112.4, 113.4, 115.6, 120.4, 121.3, 124.2, 128.4, 133.0, 137.5, 141.9, 146.6, 147.9, 148.3, 149.3. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4$, 409.18758; found: 409.18677. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{NaO}_4$, 431.16952; found: 431.16867.

4.1.6.20. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7g**). White solid, obtained in 83% yield (0.224 g, 0.570 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.158 g, 0.690 mmol), 4-methoxybenzyl azide (0.113 g, 0.690 mmol), sodium ascorbate (0.0550 g, 0.280 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0350 g,

0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 88.9–90.4 °C, TLC: $R_f = 0.22$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3114, 3062, 3005, 2951, 2868, 1587, 1512, 1455, 1295, 1251, 1227, 1131, 1032, 1015, 917, 801, 749, 652. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.16 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.88 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.80 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.00–5.11 (m, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 9.9$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.87 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.15–7.23 (m, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.5, 55.3, 55.8, 68.1, 112.3, 113.4, 114.4, 115.5, 120.4, 120.6, 126.8, 129.5, 132.9, 137.6, 146.6, 147.6, 149.3, 159.8. Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3$, 394.21307; found: 394.21225. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_3$, 416.19501; found: 416.19415.

4.1.6.21. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-(trifluoromethoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7h**). White solid, obtained in 84% yield (0.210 g, 0.470 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.129 g, 0.560 mmol), trifluoromethoxybenzyl azide (0.129 g, 0.560 mmol), sodium ascorbate (0.0440 g, 0.220 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0280 g, 0.110 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 93.4–94.9 °C, TLC: $R_f = 0.49$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3118, 3063, 2949, 2878, 1590, 1511, 1454, 1259, 1225, 1138, 1034, 1014, 911, 800, 743, 652. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.18 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.91 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.01–5.13 (m, 2H), 5.48 (s, 2H), 5.95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.19 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.23–7.31 (m, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.0, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 120.3 (q, $J = 257.0$ Hz, OCF_3), 120.4, 121.0, 121.4, 129.3, 133.0, 133.6, 137.6, 146.6, 148.0, 149.2–149.3 (m), 149.4. Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$, 448.18480; found: 448.18399. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_3$, 470.16675; found: 470.16602.

4.1.6.22. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7i**). White solid, obtained in 92% yield (0.230 g, 0.530 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.133 g, 0.580 mmol), trifluoromethylbenzyl azide (0.117 g, 0.580 mmol), sodium ascorbate (0.0460 g, 0.230 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0290 g, 0.120 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 111.3–112.5 °C, TLC: $R_f = 0.50$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3062, 2947, 2910, 1589, 1516, 1466, 1421, 1328, 1263, 1224, 1142, 1116, 1014, 908, 798, 740, 669. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.19 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.92 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.02 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.54 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.28 (s, 1H), 7.32 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.61 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.8, 39.7, 53.2, 55.9, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 120.4, 121.1, 123.8 (q, $J = 270.8$ Hz, CF_3), 126.0 (q, $J = 3.8$ Hz), 128.0, 130.9 (q, $J = 32.5$ Hz), 133.0, 137.6, 138.8, 146.7, 148.1, 149.4. Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$, 432.18989; found: 443.18903. HRMS ($M + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_2$, 454.17183; found: 454.17093.

4.1.6.23. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(3,4-difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7j**). White solid, obtained in 90% yield (0.225 g, 0.560 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.144 g, 0.630 mmol), 3,4-difluorobenzyl azide (0.107 g, 0.630 mmol), sodium ascorbate (0.0500 g, 0.250 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0320 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with

hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 97.1–97.8 °C, TLC: $R_f = 0.41$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3061, 2949, 1588, 1515, 1454, 1261, 1288, 1228, 1141, 1017, 915, 754. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.18 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.92 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.00–5.12 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.71 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.92–7.20 (m, 3H), 7.27 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 52.5, 55.9 (brd, $J = 8.3$ Hz), 68.0, 112.5, 113.4, 115.6, 117.0 (d, $J = 17.3$ Hz), 117.9 (d, $J = 17.3$ Hz), 120.4, 120.9, 124.0 (dd, $J_1 = 6.8$ Hz and $J_2 = 3.8$ Hz), 131.8–131.9 (m), 133.0, 137.5, 146.5, 148.1, 149.3, [148.6–148.9 (m), 151.9–152.2 (m)]. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$, 400.18366; found: 400.18274. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{F}_2\text{N}_3\text{NaO}_2$, 422.16560; found: 422.16473.

4.1.6.24. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7k**). White solid, obtained in 80% yield (0.216 g, 0.570 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.165 g, 0.720 mmol), 4-methylbenzyl azide (0.106 g, 0.720 mmol), sodium ascorbate (0.0570 g, 0.290 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0360 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 59.6–60.9 °C, TLC: $R_f = 0.42$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3061, 2953, 2916, 2880, 1588, 1514, 1449, 1420, 1260, 1228, 1140, 1014, 904, 845, 799, 75, 720, 650. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.16 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.34 (s, 3H, CH_3), 2.88 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.10–7.18 (m, 4H), 7.21 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 21.0 (CH_3), 22.1, 28.7, 39.7, 53.7, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.5, 120.4, 120.7, 127.9, 129.6, 131.7, 132.8, 137.5, 138.4, 146.6, 147.6, 149.3. Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$, 378.21815; found: 378.21719. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_2$, 400.20010; found: 400.19922.

4.1.6.25. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7l**). White solid, obtained in 79% yield (0.198 g, 0.450 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.130 g, 0.570 mmol), 2-bromobenzyl azide (0.120 g, 0.570 mmol), sodium ascorbate (0.0450 g, 0.230 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0290 g, 0.110 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 47.8–49.1 °C, TLC: $R_f = 0.61$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3104, 3054, 2931, 1587, 1511, 1467, 1419, 1230, 1135, 1027, 948, 804, 744, 653. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.19 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.92 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.02 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.61 (s, 2H), 5.95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.78 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.08 (dd, 1H, $J_1 = 7.5$ Hz and $J_2 = 1.6$ Hz), 7.15–7.31 (m, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.59 (dd, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz and $J_2 = 1.1$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.6, 55.8, 68.1, 112.3, 113.4, 115.5, 120.3, 121.3, 123.2, 128.1, 130.1, 130.2, 132.9, 133.1, 134.4, 137.6, 146.6, 147.7, 149.3. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 442.11301; found: 442.11197. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 464.09496; found: 464.09390.

4.1.6.26. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(3-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7m**). White solid, obtained in 81% yield (0.203 g, 0.460 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.130 g, 0.570 mmol), 3-bromobenzyl azide (0.120 g, 0.570 mmol), sodium ascorbate (0.0450 g, 0.230 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0290 g, 0.110 mmol). Purified by column chromatography eluted with

hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 65.9–67.1 °C, TLC: $R_f = 0.32$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3062, 2949, 2881, 1589, 1514, 1462, 1260, 1227, 1140, 1013, 798, 726, 689, 586. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.18 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.91 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.02 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.78 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), [7.10–7.30 (m), 7.38 (brs), 7.46 (d_{ap}), $J = 7.8$ Hz, 5H]. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.1, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 120.4, 121.0, 123.0, 126.4, 130.6, 130.8, 131.7, 132.9, 137.1, 137.6, 146.6, 148.0, 149.3. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 442.11301; found: 442.11218. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 464.09496; found: 464.09412.

4.2. Leishmanicidal assays

4.2.1. Parasites

Promastigotes of *L. amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) transfected with the gene of green fluorescent protein (GFP) were cultured in M199 medium, supplemented with 50 UI/mL of penicillin, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of streptomycin and 10% (v/v) of heat-inactivated fetal calf serum and 2% of human urine at 26 °C. Promastigotes were periodically cultured in 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of geneticin (G418) for bright green fluorescence selection [40].

4.2.2. Antipromastigote assay

For evaluation of anti promastigote activity, fluorescent promastigotes were plated in triplicate at 5×10^5 parasites/well with varying concentrations of the tested compounds (0, 0.1, 1, 10, and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in a final volume of 200 μL of medium M199 containing 5% HIFCS. It is important to mention that the compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the final concentration of DMSO was $\leq 1\%$ in all treated variables. After 72 h at 27 °C, the fluorescence intensity of the cultures was measured using a plate-reader fluorometer (Fluoroskan) set at 435 nm excitation/538 nm emissions. All treatments were performed in triplicate, and the results were expressed as percent inhibition in relation to control treatment in medium alone.

4.2.3. Antiamastigote assay

For antiamastigote activity, mouse peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavities of BALB/c mice in ice-cold DMEM medium (Sigma). The cells were plated at $2 \times 10^6/\text{mL}$ in Lab-Tek 8-chamber slides (Nunc, Naperville, Ill.) and incubated at 37 °C and 4% CO_2 for 1 h. No adherent cells were removed by washing with pre warmed phosphate-buffered saline (PBS). Adherent macrophages were infected with *L. amazonensis* promastigotes (stationary growth phase) at a 5:1 parasite/macrophage ratio and incubated for 1 h at 35 °C and 5% CO_2 . After 4 h, the chambers were washed three times with pre warmed PBS to remove free parasites. The monolayers were incubated with compound **7k** up to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for 72 h at 37 °C and 5% CO_2 . The reference drugs pentamidine (Sigma-Aldrich) and glucantime (Sanofi-aventis) were used at concentrations varying from 0.1 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 0.1 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The anti amastigote activity was evaluated microscopically after staining the chambers with the Instant Prov hematological dye system (Newprov, Curitiba, Brazil); at least 200 macrophages were counted per sample. The results are expressed as the infection index (IF) using the following equation: $\text{IF} = \% \text{ infected cells} \times \text{number of amastigotes/total macrophages}$. The calculation of the IC_{50} was performed by logarithmic regression, and the statistical analysis was performed using Student's *t*-test in GraphPad Prism 5.0 software.

4.2.4. Cytotoxicity evaluation against macrophages

The release of the cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) into the culture medium was measured using an assay kit (Doles Reagents, Brazil) and a plate-reader spectrometer (SpectraMax M5) at 340 nm. Maximum and minimum release values were obtained with cells cultured with 2% Triton X-100 or medium, respectively. LDH release was expressed as percent of the positive control. The IC₅₀ values were calculated by linear regression analysis. Data were analyzed using Student's t-test when comparing two groups or one-way ANOVA for more than two groups followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test, using the GraphPad Program; p-values less than 0.05 were considered statistically significant.

4.3. Calculation of physicochemical and pharmacokinetic properties

2D representations of eugenol derivatives were drawn in the Maestro interface [41]. Ligands were then prepared with the Lig-Prep software, and relevant protonation states at pH 7.0 were calculated with Epik. Forty-four physicochemical and pharmacokinetic properties were calculated by the normal mode of QikProp [35].

Acknowledgements

This work was supported by the National Program for Academic Cooperation (PROCAD) of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-CAPES/Brazil, and by the agencies CNPq and FAPEMIG (Grant APQ-02957-17).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.046>.

References

- [1] J. Alvar, I.D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer, Leishmaniasis worldwide and global estimates, *PLoS One* 7 (2012) e35671.
- [2] WHO, Leishmaniasis, Fact Sheet No. 375, WHO, Geneva, Switzerland, 2015. Available online, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. (Accessed 15 February 2016).
- [3] S. Sundar, J. Chakravarty, Investigational drugs for visceral leishmaniasis, *Expert Opin. Invest. Drugs* 24 (2015) 43–59.
- [4] R.F. de Souza, Y.L. dos Santos, R.V. de Souza, L. Borges-Pereira, I.S. Caldas, M.R. de Almeida, M.T. Bahia, J.L. Fietto, Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis, *Acta Trop.* 125 (2013) 60–66.
- [5] M. Gramiccia, L. Gradoni, The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control, *Int. J. Parasitol.* 35 (2005) 1169–1180.
- [6] F. Frézard, C. Demicheli, R.R. Ribeiro, Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs, *Molecules* 14 (2009) 2317–2336.
- [7] M.F. García Bustos, A. Barrio, G.G. Prieto, E.M. de Raspi, R.O. Cimino, R.M. Cardozo, L.A. Parada, M. Yeo, J. Soto, D.A. Uncos, C. Parodi, M.A. Basombrio, In vivo antileishmanial efficacy of miltefosine against *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*, *J. Parasitol.* 100 (2014) 840–847.
- [8] S.L. Croft, S. Sundar, A.H. Fairlamb, Drug resistance in leishmaniasis, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 111–126.
- [9] S.L. Croft, G.H. Coombs, Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs, *Trends Parasitol.* 19 (2003) 502–508.
- [10] M. Ouellette, J. Drummler-Smith, B. Papadopolou, Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments, *Drug Resist. Updates* 7 (2004) 257–266.
- [11] L. Monzote, Current treatment of leishmaniasis: a review, *Open Antimicrob. Agents J.* 1 (2009) 9–19.
- [12] B.S. McGwire, A.R. Satoskar, Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment, *QJM* 107 (2014) 7–14.
- [13] B. Schmidt, D.M. Ribnicky, A. Poulev, S. Logendra, W.T. Cefalu, I. Raskin, A natural history of botanical therapeutics, *Metabolism* 57 (2008) S3–S9.
- [14] A.L. Harvey, Natural products in drug discovery, *Drug Discov. Today* 13 (2008) 894–901.
- [15] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2014, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 629–661.
- [16] V.P. Gullo, J. McAlpine, K.S. Lam, D. Baker, F. Petersen, Drug discovery from natural products, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33 (2006) 523–531.
- [17] D.A. Dias, S. Urban, U. Roessner, A historical overview of natural products in drug discovery, *Metabolites* 2 (2012) 303–336.
- [18] P.M. Cheuka, G. Mayoka, P. Mutai, K. Chibale, The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases, *Molecules* 22 (2016) pii: E58.
- [19] G.P. Kamatou, I. Vermaak, A.M. Vijojo, Eugenol – from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule, *Molecules* 17 (2012) 6953–6981.
- [20] P. Singh, R.H. Jayaramaiah, S.B. Agawane, G. Vannuruswamy, A.M. Korwar, A. Anand, V.S. Dhaygude, M.L. Shaikh, R.S. Joshi, R. Boppana, M.J. Kulkarni, H.V. Thulasiram, A.P. Giri, Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes: proteomic and mechanistic insights, *Sci. Rep.* 6 (2016) 18798.
- [21] T. Ueda-Nakamura, R.R. Mendonça-Filho, J.A. Morgado-Díaz, P.M. Korehisa, B.P.D. Filho, D.A.G. Cortez, D.S. Alviano, S.M. Rosa, A.H. Lopes, C.S. Alviano, C.V. Nakamura, Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*, *Parasitol. Int.* 55 (2006) 99–105.
- [22] S.M. de Morais, N.S. Vila-Nova, C.M.L. Bevilacqua, F.C. Rondon, C.H. Lobo, A.A.A.N. Moura, C.C. Campello, M.E. Wilson, H.F. de Andrade Jr., Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6250–6255.
- [23] M.V. Papadopoulou, W.D. Bloomer, H.S. Rosenzweig, E. Chatelain, M. Kaiser, S.R. Wilkinson, C. McKenzie, J.R. Ioset, Novel 3-nitro-1*H*-1,2,4-triazole-based amides and sulfonamides as potential antitrypanosomal agents, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 5554–5565.
- [24] S.B. Ferreira, M.S. Costa, N. Boechat, R.J.S. Bezerra, M.S. Genestira, M.M. Canto-Cavalheiro, W.B. Kover, V.F. Ferreira, Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles as antileishmanial agents, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 1388–1395.
- [25] D. Rodríguez-Hernández, L.C. Barbosa, A.J. Demuner, R.M. de Almeida, R.T. Fujiwara, S.R. Ferreira, Highly potent anti-leishmanial derivatives of hederagenin, a triterpenoid from *Saindus saponaria* L, *Eur. J. Med. Chem.* 29 (2016) 153–159.
- [26] K.C. Tiew, D. Dou, T. Teramoto, H. Lai, K.R. Alliston, G.H. Lushington, R. Padmanabhan, W.C. Groutas, Inhibition of Dengue virus and West Nile virus proteases by click chemistry-derived benz[d]isothiazol-3(2*H*)-one derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 1213–1221.
- [27] T.F. Borgati, R.B. Alves, R.R. Teixeira, R.P. de Freitas, T.G. Perdigão, S.F. da Silva, A.A. dos Santos, A.J.O. Bastidas, Synthesis and phytotoxic activity of 1,2,3-triazole derivatives, *J. Braz. Chem. Soc.* 24 (2013) 953–961.
- [28] M. Meldal, C.W. Tornøe, Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2952–3015.
- [29] J.E. Hein, V.V. Fokin, Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1302–1315.
- [30] J.E. Moses, A.D. Moorhouse, The growing applications of click chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 36 (2007) 1249–1262.
- [31] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 2004–2021.
- [32] B.T. Worrell, J.A.V.V. Fokin, Direct Evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions, *Science* 340 (2013) 457–460.
- [33] P. Wu, V.V. Fokin, Catalytic azide-alkyne cycloaddition: reactivity and applications, *Aldrichim Acta* 40 (2007) 7–17.
- [34] R. Mukhopadhyay, V. Ramesh, S. Sundar, L. Maes, et al., Validation of a simple resazurin-based promastigote assay for the routine monitoring of miltefosine susceptibility in clinical isolates of *Leishmania donovani*, *Parasitol. Res.* 112 (2013) 825–828 pmid:23239091.
- [35] QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015 version 4.6.
- [36] C.A. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 44 (2000).
- [37] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2615–2623.
- [38] M.C. Sanguinetti, M. Tristani-Firouzi, hERG potassium channels and cardiac arrhythmia, *Nature* 440 (2006) 463–469.
- [39] D.D. Perrin, W.L.F. Armarego, Purification of Laboratory Chemicals, third ed., Pergamon, Oxford, 1988.
- [40] B. Rossi-Bergmann, C.R. Lenglet, D. Bezerra-Santos, Y.M. Costa-Pinto, A. Traub-Czeko, Use of fluorescent leishmania for faster quantitation of parasite growth in vitro and in vivo, in: XXVI Annual Meeting on Basic Res in Chagas Disease, Caxambu, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 (Suppl. II) (1999) 74.
- [41] LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015 version 3.6.

Considerando a atividade leishmanicida apresentada pelos derivados 1,2,3-triazólicos, bem como a similaridade estrutural entre o eugenol e a vanilina (Capítulo 1), o presente trabalho objetivou a obtenção de novas moléculas que possam ser utilizadas como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos, que sejam mais eficientes e menos tóxicos aos pacientes infectados com parasitos do gênero *Leishmania*. Neste capítulo são descritos os resultados da avaliação da atividade leishmanicida dos derivados triazólicos da vanilina **6a-6k** e **7a-7k** contra *Leishmania amazonensis*.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Generalidades

O ensaio de avaliação da atividade leishmanicida dos compostos triazólicos derivados da vanilina **6a-6k** e **7a-7k** foram realizados em colaboração com o professor Dr. Wallace Pacienza Lima no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), na Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

3.2.2. Avaliação da atividade anti-promastigota

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (5×10^5 /mL) em fase metacíclica foram plaqueadas em placa de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações dos compostos **1**, **2**, **3**, **6a-6k** e **7a-7k** (0,1; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) durante 72 h a 26 °C em meio M199 suplementado com 5% de soro fetal bovino. Após este tempo, a viabilidade dos parasitos foi avaliada por fluorimetria (555/585 nm) pelo método de Alamar Blue e representada por meio da porcentagem de crescimento.

O método Alame Blue representa um método simples e quantitativo de medida da proliferação celular, viabilidade e citotoxicidade. Este método consiste na utilização do corante indicador denominado resazurina, que é uma substância azul, não tóxica, solúvel em água e que muda de cor devido à atividade celular. As enzimas produzidas por células que crescem ativamente convertem a resazurina à sua forma rosa fluorescente, resorufina (Figura 3.5, pg. 126). A produção de resorufina é proporcional à atividade metabólica da célula. Embora esta mudança de cor seja visível, geralmente é monitorada por instrumentos que

medem com precisão mudanças na absorção ou fluorescência (RÓLON *et al.*, 2006; OSAKA e HEFTY, 2013).

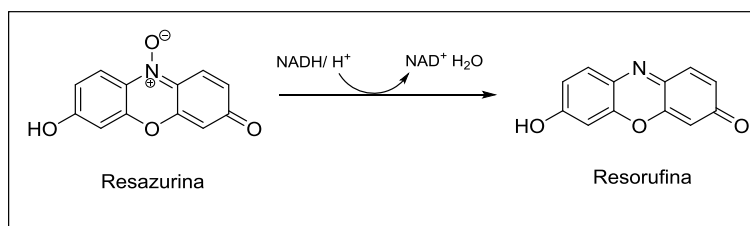


Figura 3.5. Conversão da Resazurina em Resorufina.

Os valores de IC₅₀ foram calculados a partir da curva de regressão não linear dos valores obtidos em cada concentração.

3.2.3. Avaliação da citotoxicidade

Macrófagos diferenciados de medula óssea - BMDM (1x10⁵/poço) foram plaqueados em placa de 96 poços e incubados com diferentes concentrações dos compostos **1**, **2**, **3**, **6a-6k** e **7a-7k** (0,1; 1; 10; 100 e 1000 μmol L⁻¹) durante 48 h a 37 °C em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino. Após este período, a viabilidade celular foi avaliada por fluorimetria (555/585 nm) pelo método de Alamar Blue e representada como porcentagem. Os valores de CC₅₀ foram calculados a partir da curva de regressão não linear dos valores obtidos em cada concentração.

3.2.4. Avaliação da atividade anti-amastigota

Macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c foram distribuídas em placas de 24 poços com lamínulas de vidro na concentração de 2x10⁶ células/poço, em meio DMEM+5% HIFCS, em um volume de 0,3 mL/poço. As placas foram mantidas em estufa de 37°C e 5% CO₂ por 2 h para garantir a aderência dos macrófagos. Em seguida os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis*-GFP, em uma razão de 10 promastigotas por macrófago, por 4 h a 34 °C. Após o tempo de infecção, a cultura foi lavada 3 vezes com PBS morno e incubada com 10; 100 ou 1000 μmol L⁻¹ dos compostos por 48 h à 37°C e 5% CO₂. A carga parasitária na cultura foi avaliada por

coloração panótica, seguido de contagem direta de parasitos/macrófagos de pelo menos 100 amastigotas/cultura. O cálculo do IC₅₀ foi feito por análise de regressão logarítmica realizada no GraphPad Prism 5.0.

Produção de óxido nítrico

Macrófagos infectados e tratados como descrito anteriormente, receberam IFN γ (1 μ g/mL) e os sobrenadantes foram coletados para a dosagem da produção de óxido nítrico pelo método modificado de Griess (BREDT e SNYDER, 1994). A densidade óptica foi avaliada usando espectrofotômetro (Bio-Tek Powerwave XS) no comprimento de onda de 570 nm. Por fim, a quantidade de nitrito acumulada foi calculada por meio de uma curva padrão com várias concentrações de nitrito de sódio (NaNO₂) 0-50 mol L⁻¹.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos triazólicos derivados da vanilina **6a-6k** e **7a-7k** foram avaliados contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*, espécie que causa a leishmaniose cutânea (LC) a qual é caracterizada pela presença de pequenos nódulos cutâneos ou até mesmo a destruição dos tecidos (DOS SANTOS *et al.*, 2011).

A ação dos compostos **1**, **2**, **3**, **6a-6k** e **7a-7k** foi avaliada pela inibição do crescimento da forma promastigota na presença de diferentes concentrações (0,1; 1; 10; 100 e 1000 μ mol L⁻¹) e após 72 h de tratamento. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar Blue e representada em porcentagem conforme apresentado na Figura 3.6 (pg. 128).

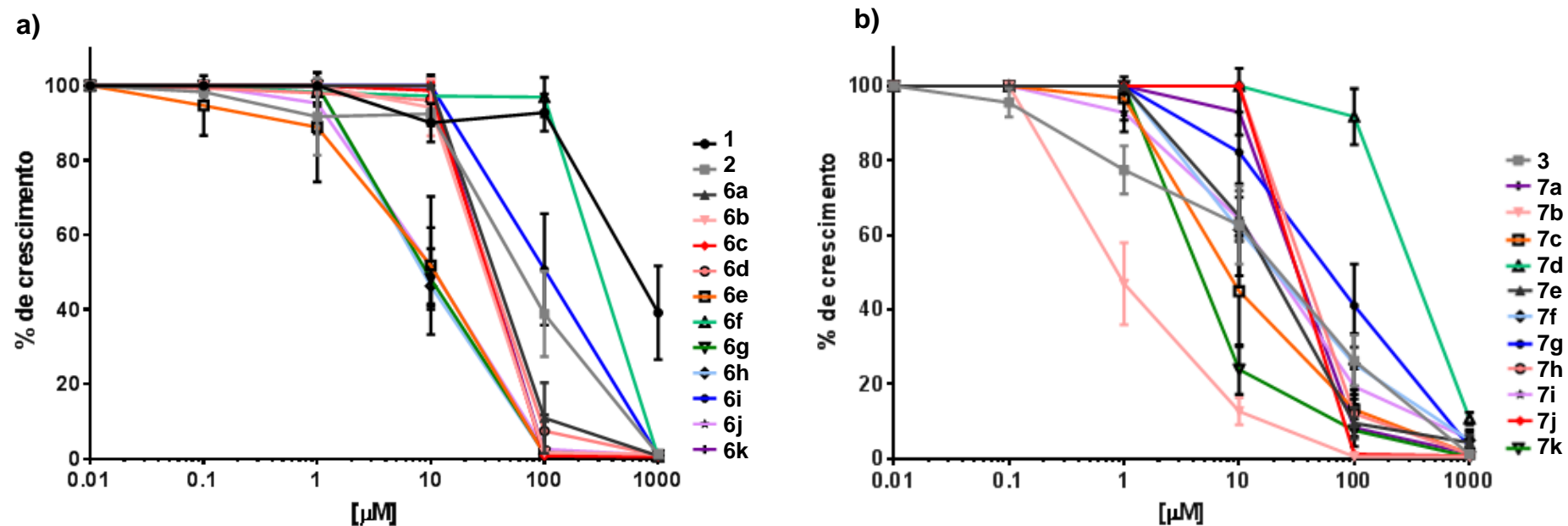


Figura 3.6. Atividade anti-promastigota dos compostos a) 1, 2, 6a-6k e b) 3, 7a-7k. *L. amazonensis* (5×10^5 promastigotas/mL) foram cultivadas na presença de diferentes concentrações (0,1; 1; 10; 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) dos compostos 1, 2, 6a-6k e 7a-7k por 72 h a 26 °C em meio M199 suplementado com 5% de soro fetal bovino. A quantidade de parasitos foi medida indiretamente através do método Alamar Blue e representado através da porcentagem de crescimento.

Com base nos resultados, verificou-se que para a série de compostos triazólicos **6a-6k** os valores de IC_{50} variaram, de modo geral, entre 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo os compostos **6b**, **6e**, **6h** e **6k** aqueles que apresentaram as melhores atividades leishmanicida. Os compostos **6e** e **6k** apresentaram valores de IC_{50} inferiores a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contra a forma promastigota (Figura 3.6, pg. 128). Para a série dos compostos triazólicos **7a-7k**, os valores de IC_{50} variaram de 1,0 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, indicando uma possível influência do aumento da cadeia carbônica com respeito à atividade leishmanicida dos derivados analisados (Figura 3.6, pg. 128). Os compostos mais ativos desta série foram os compostos **7b**, **7c** e **7k**, sendo o composto **7b** o mais eficiente com valor de IC_{50} aproximado de 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cabe salientar que a vanilina (**1**) apresentou atividade leishmanicida inferior comparada aos compostos sintetizados mostrando que a sua conversão em derivados triazólicos resultou em compostos com maior eficiência de inibir a viabilidade celular das formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Os compostos **1**, **3**, **6a-6k** e **7a-7k** também foram submetidos a ensaios *in vitro* para avaliação da citotoxicidade dos compostos frente aos macrófagos. Neste sentido, empregaram-se diferentes concentrações (0,1; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) durante 48 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar Blue e representada em porcentagem conforme apresentado na Figura 3.7 (pg. 130).

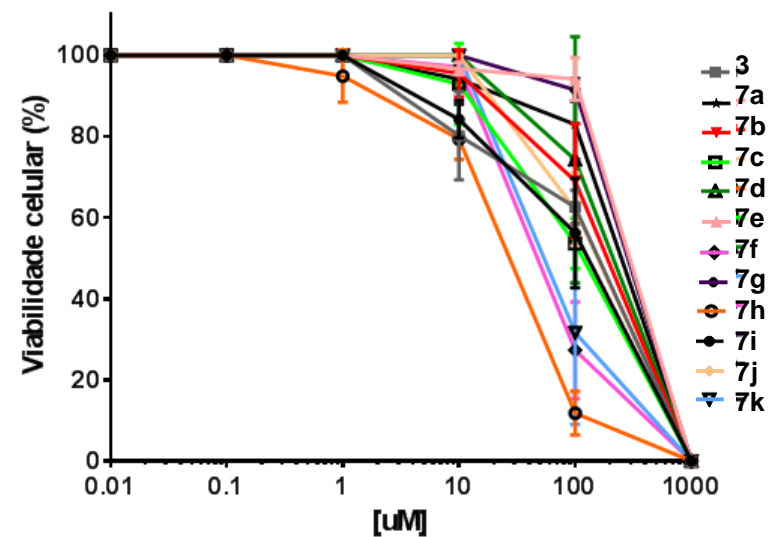
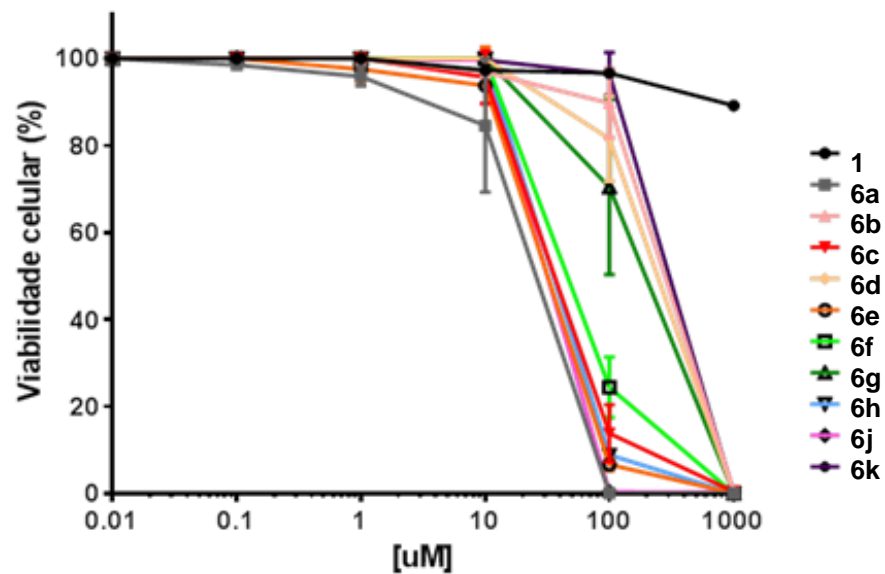


Figura 3.7. Citotoxicidade contra macrófagos dos compostos **1**, **3**, **6a-6k** e **7a-7k**. Macrófagos diferenciados de medula óssea-BMDM (1×10^5 /poço) foram plaqueados em placa de 96 poços e incubados na presença de diferentes concentrações (0,1; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) dos compostos por 48 h a 37 °C em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar Blue e representado por porcentagem.

De acordo com os resultados (Figura 3.7, pg. 130) foi observado que os derivados triazólicos de maior toxicidade frente aos macrófagos foram os compostos **6a**, **6e**, **6h**, **6j**, **7f**, **7h** e **7k**.

As amastigotas são as formas parasitárias persistentes no hospedeiro, e responsáveis por causar os sintomas da doença. Sendo assim, este deve ser o principal alvo quimioterápico de novos agentes leishmanicidas (DE MORAIS *et al.*, 2014). Após os testes realizados contra as formas promastigotas, as *substâncias mais ativas* foram selecionadas para a avaliação da atividade contra as formas amastigotas intracelulares e os resultados desta avaliação são apresentados nas Tabelas 3.1 e 3.2 (pgs. 132 e 133). O Glucantime foi utilizado como controle positivo nos testes anti-amastigotas e para efeito de comparação foram incluídos os dados referentes às atividades apresentadas pelo composto mais ativo 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-metilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol¹ conforme descrito no trabalho de Teixeira e colaboradores (2018).

¹ No artigo “Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities” publicado na revista European Journal and Medicinal Chemistry 2018, 146, 274-286 e que foi incluído neste capítulo.

Tabela 3.1. Valores de IC₅₀ da atividade leishmanicida e citotoxicidade contra macrófagos dos compostos 1, 2 e 6a-6k.

Amostra	IC ₅₀ (µmol L ⁻¹)			IS	Nitrito (µg/ml)
	Promastigotas	Amastigotas	Macrófagos		
Anfotericina B	0,2 ± 0,1	nd	Nd	nd	Nd
*Composto Ativo	7,4 ± 0,8	1,6 ± 0,2	211,9 ± 2,3	132,5	1,3 ± 0,3
1	696,8 ± 2,8	nd	8092,2 ± 3,9	11,6	Nd
2	66,2 ± 1,8	nd	Nd	nd	Nd
6a	38,3 ± 1,6	nd	23,6 ± 1,4	0,6	Nd
6b	29,6 ± 1,5	38,6 ± 2,3	305,1 ± 2,5	10,3	1,1 ± 0,3
6c	51,4 ± 1,5	nd	Nd	nd	Nd
6d	33,6 ± 1,3	nd	226,2 ± 2,4	6,7	Nd
6e	9,5 ± 0,9	29,8 ± 3,7	31,6 ± 1,5	3,2	1,6 ± 0,4
6f	303,5 ± 2,5	nd	Nd	nd	Nd
6g	32,3 ± 0,5	nd	174,4 ± 2,3	5,3	Nd
6h	9,1 ± 0,9	23,2	36,8 ± 1,6	4,0	0,9 ± 0,1
6i	103,3 ± 2,0	nd	Nd	nd	Nd
6j	10,3 ± 1,0	nd	31,6 ± 1,5	3,0	Nd
6k	32,6 ± 1,5	43,7 ± 2,5	300,8 ± 2,4	9,2	1,0±0,3
**Glucantime	nd	45,5 ± 1,6	75,5 ± 2,6	1,6	1,9 ± 0,5
***IFN-γ	nd	nd	Nd	nd	12,3 ± 0,8

Média ± SD (n = 3).

Os dados marcados em azul foram obtidos em experimentos anteriores. Estão sendo mostrados somente para comparação.

IS= Índice seletividade (IS= IC₅₀ da citotoxicidade frente a macrófagos/IC₅₀ da atividade de leishmanicida)

*Composto mais ativo conforme descrito no trabalho de Teixeira e colaboradores (2018).

**Glucantime (µg mL⁻¹)

***IFN-γ = Interferon-gama (1 µg mL⁻¹)

nd = não determinado.

Tabela 3.2. Valores de IC₅₀ da atividade leishmanicida e citotoxicidade contra macrófagos dos compostos 3 e 7a-7k.

Amostra	IC ₅₀ (µmol L ⁻¹)			IS	Nitrito (µg/ml)
	Promastigotas	Amastigotas	Macrófagos		
Anfotericina B	0,2 ± 0,1	nd	Nd	nd	nd
*Composto Ativo	7,4 ± 0,8	1,6 ± 0,2	211,9 ± 2,3	132,5	1,3 ± 0,3
3	18,6 ± 1,3	nd	121,8 ± 2,0	nd	nd
7a	32,5 ± 1,5	nd	227,5 ± 2,4	nd	nd
7b	1,1 ± 0,2	4,2 ± 1,0	163,8 ± 2,2	148,9	1,9 ± 0,6
7c	9,5 ± 1,0	25,1 ± 3,7	103,9 ± 2,0	10,9	2,6 ± 0,6
7d	335,0 ± 2,5	nd	191,4 ± 2,3	nd	nd
7e	17,5 ± 1,2	nd	286,2 ± 2,5	nd	nd
7f	21,1 ± 1,3	nd	52,3 ± 1,7	nd	nd
7g	62,8 ± 1,8	nd	275,6 ± 2,4	nd	nd
7h	39,3 ± 1,6	nd	25,6 ± 1,4	nd	nd
7i	19,5 ± 1,3	nd	103,5 ± 2,0	nd	nd
7j	32,3 ± 1,5	nd	140,8 ± 2,1	nd	nd
7k	5,3 ± 0,7	8,5 ± 2,5	60,8 ± 1,8	11,5	1,5 ± 0,7
**Glucantime	Nd	45,5 ± 1,6	75,5 ± 2,6	1,6	1,9 ± 0,5
***IFN-γ	Nd	nd	Nd	nd	12,3 ± 0,8

Média ± SD (n = 3).

Os dados marcados em azul foram obtidos em experimentos anteriores. Estão sendo mostrados somente para comparação.

IS= Índice seletividade (IS= IC₅₀ da citotoxicidade frente a macrófagos/IC₅₀ da atividade de leishmanicida)

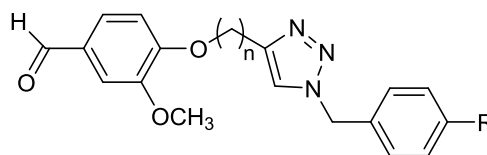
*Composto mais ativo conforme descrito no de Teixeira e colaboradores (2018).

**Glucantime (µg mL⁻¹)

***IFN-γ = Interferon-gama (1 µg mL⁻¹).

nd = não determinado.

A partir da análise dos resultados apresentados na Tabela 3.1 (pg. 132) verificou-se que os compostos **6a-6k** apresentaram, de modo geral, baixa eficiência sobre as formas promastigota de *Leishmania amazonensis* quando comparados com a Anfotericina B (quimioterápico comercial) e com o composto mais ativo descrito por Teixeira e coautores (2018). No entanto, os compostos **6b**, **6e**, **6h** e **6k** demonstraram atividades promissoras dentre todas as substâncias avaliadas, com IC_{50} de 29,6; 9,5; 9,1 e 32,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (Figura 3.8). Para a série dos compostos **7a-7k**, conforme observado na Tabela 3.2 (pg. 133), as substâncias que se destacaram devido a maior atividade frente às formas promastigota de *L. amazonensis* foram **7b**, **7c** e **7k** com valores de IC_{50} respectivamente iguais a 1,1; 9,5 e 5,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 3.8).



n=1: (6b) R = NO ₂ IC_{50} = 29,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	n=3: (7b) R = NO ₂ IC_{50} = 1,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$
(6e) R = I IC_{50} = 9,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(7c) R = Cl IC_{50} = 9,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$
(6h) R = CF ₃ IC_{50} = 9,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(7k) R = H IC_{50} = 5,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$
(6k) R = H IC_{50} = 32,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$	

Figura 3.8. Estruturas dos derivados que apresentaram melhores atividades contra as formas promastigota de *L. amazonensis*.

Devido a maior atividade destes compostos contra as formas promastigota de *L. amazonensis*, os mesmos foram selecionados para a avaliação da atividade leishmanicida contra as formas amastigota intracelular. O Glucantime (quimioterápico comercial) foi utilizado como controle positivo e os dados de atividade leishmanicida do composto mais ativo descrito no trabalho de Teixeira e colaboradores (2018) foram incluídos para efeito de comparação (Tabelas 3.1 e 3.2). As estruturas dos compostos e os valores de IC_{50} da atividade leishmanicida contra as formas amastigota estão apresentados na Figura 3.9 (pg. 135).

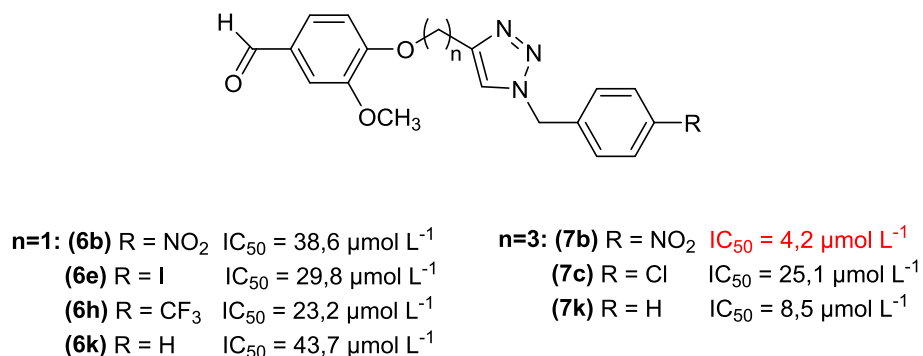


Figura 3.9. Estruturas dos derivados que apresentaram melhores atividades contra a forma amastigota de *L. amazonensis*.

Comparando-se os valores de IC₅₀ obtidos para **6b**, **6e**, **6h**, **6k**, **7b**, **7c**, **7c** e **7k** é possível observar que todos estes compostos apresentaram atividade leishmanicida superior ao quimioterápico comercial Glucantime (IC₅₀ = 45,5 ± 1,6 μmol L⁻¹). Destaca-se ainda a influência do aumento da cadeia carbônica sobre a atividade leishmanicida dos derivados analisados, que pode ser atestada pelos valores de IC₅₀ obtidos para os compostos **7b** e **7k**, que possuem os mesmos benzila das substâncias **6b** e **6k**. Dentre todos os compostos avaliados, o nitrocomposto **7b** foi o composto mais ativo, apresentando valor de IC₅₀ igual 4,2 μmol L⁻¹.

Os nitrocompostos já foram empregados em muitas classes terapêuticas e atualmente são utilizados no tratamento de algumas doenças devido às diversas aplicações que eles apresentam, tais como: antianginosos, anti-hipertensivos, anticoagulantes, anti-inflamatórios, antibacterianos, antineoplásicos e antiparasitários (PAULA *et al.*, 2009; NEPALI *et al.*, 2019). Alguns exemplos de nitrocompostos utilizados como fármacos são apresentados na Figura 3.10.

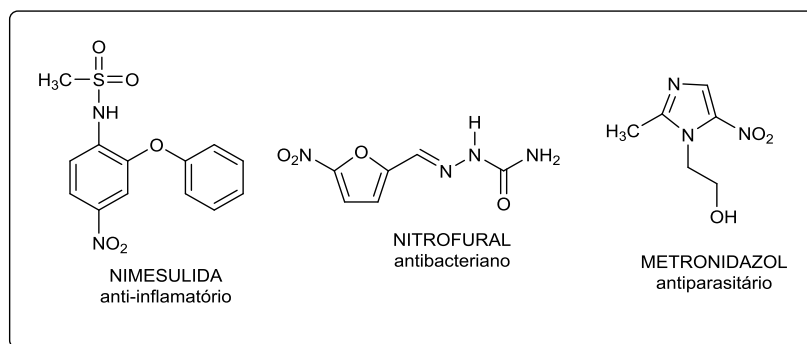


Figura 3.10. Estruturas de nitrocompostos utilizados no tratamento de algumas patologias.

A maioria dos nitrocompostos com ação antineoplásica antiparasitária e antibacteriana apresenta o processo de biorredução enzimática do grupo nitro como provável mecanismo de ação ($\text{Ar-NO}_2 \rightarrow \text{Ar-NH}_2$), sendo este essencial para a atividade biológica (PAULA *et al.*, 2009). Diante disso, a maior atividade apresentada para o composto **7b** contra a forma amastigota de *L. amazonensis*, pode estar relacionada à presença do grupo nitro na molécula.

De acordo com Orme e colaboradores (2001), um composto pode ser considerado promissor para o desenvolvimento de novos fármacos direcionados ao tratamento de doenças negligenciadas se seu índice de seletividade for igual ou superior a 10. Embora **7b** tenha apresentado índice de seletividade igual a 148,9 ($\text{IS} > 10$) (Tabela 3.2, pg. 133), compostos contendo grupos nitro ($-\text{NO}_2$) podem induzir graves efeitos de toxicidade, e este é indubitavelmente o motivo, em muitos casos, de serem evitados. Porém, a toxicidade dos compostos nitroaromáticos pode ser seletiva e serem a base quimioterápica contra bactérias, parasitas ou células tumorais sem prejudicar o organismo hospedeiro ou células normais. No geral, as questões relacionadas a esses agentes são realmente contraditórias, pois o grupo nitro é considerado um farmacóforo ou parte integrante do farmacóforo e um toxicóforo ou um alerta estrutural (NEPALI *et al.*, 2019).

Para confirmar a perspectiva de que o composto **7b** seja explorado como um modelo para o desenvolvimento de um novo agente quimioterápico para o tratamento da leishmaniose outros testes de citotoxicidade deverão ser realizados.

Por fim, vale ressaltar que todos os compostos foram testados apenas contra a espécie *Leishmania amazonensis*. Logo, a grande variação entre as espécies do parasita nos impossibilita descartar a atividade destes compostos contra outras espécies do parasita.

3.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; GOMES, A. T. P. C.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. *Revista Virtual de Química*, v. 4, p. 257-267, 2012.

- BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia antileishmania: uma revisão da literatura. *Revista Virtual de Química*, v. 8, p. 2072-2104, 2016.
- BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. *Revista Virtual de Química*, v. 9, p. 861-876, 2017.
- CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Products Report*, v. 18, p. 674-688, 2001.
- DE MORAIS, S. M.; VILA-NOVA, N. S.; BEVILAQUA, C. M. L.; RONDON, F. C.; LOBO, C. H.; MOURA, A. A. A. N.; SALES, A. D.; RODRIGUES, A. P. R.; DE FIGUEREIDO, J. R.; CAMPELLO, C. C.; WILSON, M. E.; JR. ANDRADE, H. F. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 6250-6255, 2014.
- DOS SANTOS, A. O.; COSTA, M. A.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, M. M. S.; NAKAMURA, C. V. Leishmania amazonensis: effects of oral treatment with copaíba oil in mice. *Experimental Parasitology*, v. 129, p. 145-151, 2011.
- DUARTE, I. R. M.; ARRUDA, C. C. P.; ANDRADE, A. R. O.; NUNES, V. L. B.; SOUZA, A. I.; DOURADO, D. M.; COSTA, S. C. G. Comportamento biológico de Leishmania (L) amazonensis isolada de um gato doméstico (Feliscatus) de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 39, p. 33-40, 2010.
- DNDi. Drugs for Neglected Diseases initiative. Disponível em <<https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>>. Acesso em: 06 jan. 2020.
- GIL, E. S.; PAULA, J. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; BEZERRA, J. C. B. Produtos naturais com potencial leishmanicida. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 29, p. 223-230, 2008.
- LIMA JUNIOR, J. A. C.; COSTA, G. C.; REIS, A. S.; BEZERRA, J. L.; PATRÍCIO, F. J. B.; SILVA, L. A.; AMARAL, F. M. M.; NASCIMENTO, F. R. F. Inibição da infecção in vitro de macrófagos por *Leishmania amazonensis* por extração e frações de *Chenopodium ambrosioides* L. *Revista Ciência e Saúde*, v. 16, p. 46-53, 2014.
- MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges/ Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, p. 2941-2947, 2008.
- NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper Regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallecens* (C. DC.) Yunck. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 61-66, 2006.

- NEPALI, K.; HSUEH-YUN, L.; JING-PING, L. Nitro-Group-Containing Drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, p. 2851-2893, 2019.
- OSAKA, I.; HEFTY, P. S. Simple resazurin-based microplate assay for measuring chlamydia infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, p. 2838-2840, 2013.
- ORME, I.; SECRIST, J.; ANATHAN, S.; KWONG, C.; MADDY, J.; REYNOLDS, R.; POFFENBERGER, A.; MICHAEL, M.; MILLER, L.; KRAHENBUH, J.; ADAMS, L.; BISWAS, A.; FRANZBLAU, S.; ROUSE, D.; WINFIELD, D.; BROOKS, J. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 1943–1946, 2001.
- PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividades e toxicidade de nitrocompostos. *Química Nova*, v. 32, p. 1013 - 1020, 2009.
- PORTA, E. O. J.; CARVALHO, P. B.; AVERY, M. A.; TEKWANI, B. L.; LABADIE, G. R. Click chemistry decoration of amino sterols as promising strategy to developed new leishmanicidal drugs. *Steroids*, v. 79, p. 28-36, 2014.
- RÓLON, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, v. 99, p. 103-107, 2006.
- SILVA, S. C. S. P.; BERL, F. P.; TAVARES, L. C.; SOARES, S. R. C.; LINDOSO, J. A. L. Effects of nitro-heterocyclic derivatives against *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes and intracellular amastigotes. *Experimental Parasitology*, v. 163, p. 68-75, 2016.
- SILVA-JARDIM, I.; THIEMANN, O. T.; ANIBAL, F. F. Leishmanicida and Chagas disease chemotherapy: a critical review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, p. 1810-1823, 2014.
- SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Química Nova*, v. 33, p. 1541-1548, 2010.
- TEIXEIRA, R. R.; GAZOLLA, P. A. R.; DA SILVA, A. M.; BORSODI, M. P. G.; BERGMANN, B. R.; FERREIRA, R. S.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; LIMA, W. P. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 146, p. 274-286, 2018.
- TELES, C. B. G.; MOREIRA, L. S.; SILVA, A. A. E.; FACUNDO, V. A.; ZULIANI, J. P.; STÁBELI, R. G.; SILVA- JARDIM, I. Activity of the Lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 936-942, 2011.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO

4.1. INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer José de Alencar (INCA), a definição de câncer está associada a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Devido à rápida divisão celular, estas células podem se tornar muito agressivas e incontroláveis, determinando assim a formação de tumores ou neoplasias malignas.

A origem desta doença está relacionada a condições multifatoriais externas ou internas ao organismo, como por exemplo, fatores ambientais, culturais, socioeconômicos, estilo de vida, hábitos alimentares, fatores genéticos e envelhecimento (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

O número de casos de câncer tem aumentado consideravelmente em todo o mundo, configurando-se na atualidade como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial e uma das principais causas de mortalidade nos seres humanos (GHORAB e AL-SAID, 2012; INCA, 2019).

Os tipos de câncer de maior incidência que acometem os seres humanos, em escala mundial, são o de pulmão (2,1 milhões) seguido pelo de mama (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão). Nos homens os mais frequentes são o de pulmão (14,5%), próstata (13,5%), cólon e reto (10,9%), estômago (7,2%) e fígado (6,3%). No caso das mulheres, os casos mais recorrentes são os de mama (24,2%), cólon e reto (9,5%), pulmão (8,4%) e colo do útero (6,6%) (BRAY *et al.*, 2018).

A estimativa para o Brasil, triênio 2020-2022, aponta para a ocorrência de cerca de 625 mil novos casos de câncer, para cada ano. Nos homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata (29,2%), cólon e reto (9,1%), pulmão (7,9%), estômago (5,9%) e cavidade oral (5,0%); e, nas mulheres, os de mama (29,7%), cólon e reto (9,2%), colo do útero (7,4%), pulmão (5,6%) e tireoide (5,4%) ficarão entre os principais (Figura 4.1, pg. 140) (INCA, 2019).


Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

Figura 4.1. Tipos de câncer mais incidentes projetados para 2020-2022 na população brasileira.

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2019). Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil.

Os principais tipos de tratamento empregados para o câncer baseiam-se, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores, radioterapia e a quimioterapia (ROSAS *et al.*, 2013). No que tange a quimioterapia, medicamentos denominados quimioterápicos são administrados em intervalos regulares, que variam de acordo com os esquemas terapêuticos e que possuem como objetivo primário a destruição das células cancerígenas e a preservação das células saudáveis (DE ARAUJO, 2012; GAZOLLA *et al.*, 2018).

Embora importantes progressos tenham sido alcançados no desenvolvimento de novos quimioterápicos, a maioria dos fármacos atualmente disponíveis, como o paclitaxel (Taxol[®]), cisplatina (Platinil[®] ou Platinol[®]), vimblastina (Velban[®]), vincristina (Oncovin[®]), etoposídeo (Etopophos[®]), dentre outros (Figura 4.2, pg. 141), ainda causam vários efeitos colaterais como diarreia, vômito, fraqueza, queda de cabelo, maior susceptibilidade a infecções, tonteados e a resistência intrínseca ou adquirida de diversos tipos de câncer a estes medicamentos (BYRNE *et al.*, 2018). Devido a estes fatores, a busca pelo desenvolvimento de novos quimioterápicos, mais específicos e eficientes continua sendo prioridade de investigação de diversos pesquisadores.

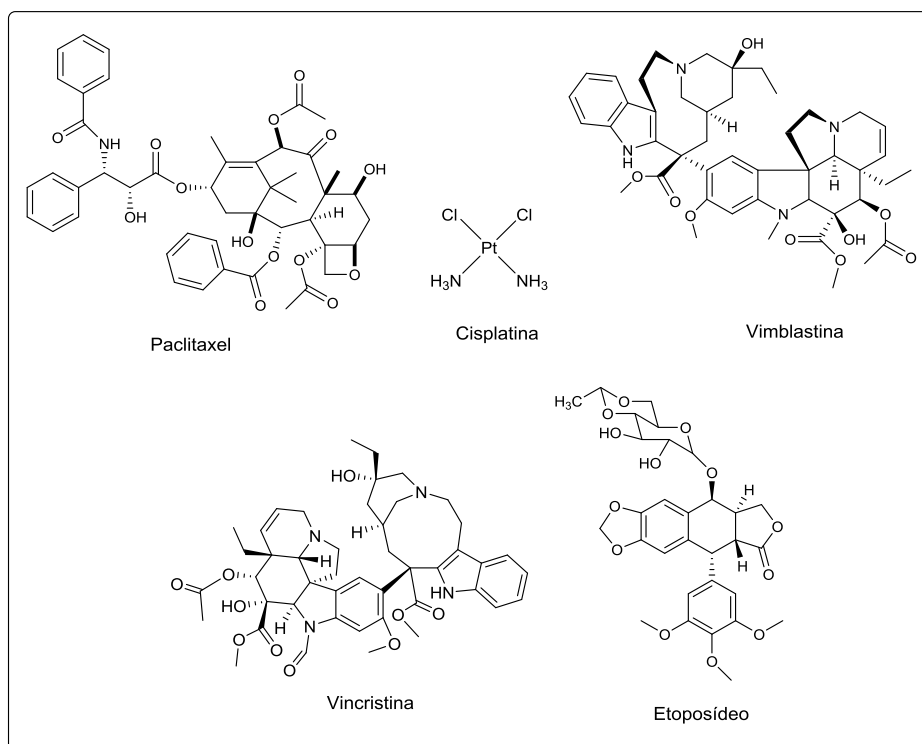


Figura 4.2. Estruturas de quimioterápicos empregados no tratamento do câncer.

Os produtos naturais vêm sendo considerados uma fonte importante de substâncias potencialmente úteis na busca por novos fármacos que sejam eficientes no tratamento do câncer.

De acordo com a literatura, 70% das substâncias anticancerígenas são provenientes de fontes naturais ou correspondem a derivados de produtos naturais (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010; DE CARVALHO, 2013). Dentre as substâncias naturais que vêm sendo pesquisadas para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos encontram-se a vanilina e seus derivados.

Bezerra e coautores (2016) descreveram sobre a potencial contribuição da vanilina para a prevenção e tratamento do câncer destacando as atividades anticarcinogênica, antimetastática, antiangiogênica e citotóxica. No que se refere à atividade citotóxica, a vanilina foi avaliada em células HepG2 (*hepatocarcinoma humano*) e os resultados obtidos indicaram a inibição da proteína AP-1, que está relacionada com a regulação de uma variedade de processos celulares, tais como proliferação, crescimento, diferenciação, apoptose e migração celular (CHENG *et al.*, 2007). Menciona-se ainda a investigação do efeito da vanilina contra células HT-29 (adenocarcinoma colorretal), a qual confirmou a capacidade desta

substância de induzir o efeito citostático em células HT-29, além de promover a morte celular através de vias de apoptose (HO *et al.*, 2009).

Recentemente, um derivado da vanilina (Figura 4.3) foi relatado por apresentar atividade antiproliferativa contra as células do carcinoma espinocelular de esôfago ESCC (TE-1 e ECA-109). O composto foi capaz de induzir a parada mitótica e o desalinhamento cromossômico nas células do ESCC. Além disso, o derivado da vanilina foi capaz de aumentar a sensibilidade dessas células no tratamento com a radioterapia (GU *et al.*, 2018).

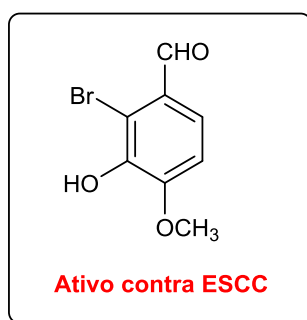


Figura 4.3. Derivado da vanilina com atividade antiproliferativa (GU *et al.*, 2018).

Outra classe de compostos que tem sido amplamente estudada com relação a sua atividade citotóxica são os 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos.

Gazolla e colaboradores (2018) sintetizaram vinte e seis derivados do eugenol contendo porções 1,2,3-triazólicas e avaliaram suas atividades contra as linhagens de células cancerígenas HL60 (leucemia mieloide aguda) Nalm6 (leucemia linfóide aguda) e B16F10 (melanoma metastático murino). A avaliação da citotoxicidade destes compostos resultou na identificação de cinco derivados, que significativamente reduziram a viabilidade da linhagem leucêmica mieloide HL60 apresentando valores de IC_{50} iguais a 70,74; 77,96; 75,83; 74,61; 74,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A subsequente avaliação destes derivados mostrou que três deles, apresentaram atividade contra a linhagem leucêmica linfóide Nalm6 apresentando valores de IC_{50} iguais 66,30; 76,67 e 85,59 $\mu\text{mol L}^{-1}$. No entanto, apenas um derivado, apresentou citotoxicidade contra a linhagem de melanoma metastático murino B16F10 com IC_{50} igual 179,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados vinculados ao desenvolvimento desta pesquisa são descritos no artigo apresentado a seguir e que foi publicado no ano de 2018 na revista científica Química Nova.

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE DERIVADOS DO EUGENOL CONTENDO NÚCLEOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS

Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla^a, Róbson Ricardo Teixeira^{a*}, Adalberto Manoel da Silva^b, Boniek Gontijo Vaz^c, Géssica Adriana Vasconcelos^c, Raoni Pais Siqueira^d, Victor Hugo Sousa Gonçalves^d, Higor Sette Pereira^a e Gustavo Costa Bressan^d

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa – MG, Brasil

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense, 89245-000 Araquari – SC, Brasil

^cInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Av. Esperança, S/N, Campus Samambaia, 74690-970, Goiânia – GO, Brasil

^dDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa – MG, Brasil

Recebido em 21/09/2017; aceito em 29/01/2018; publicado na web em 22/02/2018

SYNTHESIS AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF 1,2,3-TRIAZOLE DERIVATIVES OF EUGENOL. Eugenol is an aromatic compound found in several plant species. It presents important biological activities including cytotoxicity. In this paper, it is described the synthesis and the evaluation of the cytotoxic activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. Eugenol, extracted via hydrodistillation from dried flower buds of *Eugenia caryophyllata* (= *Syzygium aromaticum*), was submitted to alkylation reactions to afford two terminal alkynes in good yields. The key reaction involved in the preparation of eugenol derivatives corresponded to the Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC), between alkynylated eugenol derivatives and different benzyl azides. The evaluation of the cytotoxicity of twenty seven synthesized derivatives against HL60 leukemia cell line revealed that at 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, five of them, namely 4-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl-1-(3-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6n**), 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-benzyl-1H-1,2,3-triazole (**7a**), 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7c**), 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7e**) and 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(3-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7m**), were capable of significantly decreasing cell viability. These most active triazole derivatives were also evaluated against B16F10 melanoma and Nalm6 leukemia cell lines. While only compound **7a** was active against the former, compounds **6n**, **7a**, and **7m** displayed activity against the latter. Derivative **7a** was active against all cell lines. It is believed that eugenol derivatives bearing triazole functionalities may represent a scaffold to be explored toward the development of new agents against cancer.

Keywords: eugenol; triazole; cytotoxic activity; click chemistry; CuAAC reaction.

INTRODUÇÃO

O câncer correspondeu a uma das principais causas de mortes no século XX e vem difundindo-se de forma contínua e aumentando sua incidência no século XXI.¹ Sua denominação está associada a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células anormais que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Devido à rápida divisão celular, estas células podem se tornar muito agressivas e incontroláveis, determinando assim a formação de tumores ou neoplasias malignas.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. A estimativa para o ano de 2025 aponta para a ocorrência de aproximadamente 20 milhões de novos casos.²

Investigações científicas multidisciplinares têm sido conduzidas buscando encontrar alternativas para combater esta doença, no entanto, a cura ainda não foi alcançada. Os principais tipos de tratamento empregados para o câncer baseiam-se, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores ao tratamento radioterápico e a quimioterapia.

No que tange à quimioterapia, são utilizados compostos químicos que possuem como objetivo primário a destruição das células neoplásicas e a preservação das células saudáveis.³

Dentre os diversos medicamentos quimioterápicos para o

tratamento do câncer introduzidos nas últimas décadas, a maioria (60%) tem sua origem nos produtos naturais. Como exemplo, mencionam-se os quimioterápicos vimblastina (Velban[®]), vincristina (Oncovin[®]), paclitaxel (Taxol[®]), podofilotoxina, etoposídeo (Etopophos[®]) e camptotecina (Figura 1).⁴

Apesar da introdução de diversos fármacos no arsenal terapêutico contra o câncer, a quimioterapia apresenta diversos problemas dentre os quais se destacam os efeitos colaterais (como diarreia, vômito, fraqueza, queda de cabelo e tonturas) e a resistência intrínseca ou adquirida de diversos tipos de câncer aos agentes quimioterápicos.^{5,6} Devido a estes fatores, a exploração de produtos naturais pela busca do desenvolvimento de novos quimioterápicos, mais específicos e eficientes, continua sendo prioridade de investigação de diversos pesquisadores.⁷⁻¹⁰

O eugenol (**1**) (Figura 2) é um composto natural encontrado em várias plantas aromáticas como noz moscada, canela, folha de louro, saffrã, mirra e manjeriço.¹¹ No entanto, o cravo da Índia *Eugenia caryophyllata* (= *Syzygium aromaticum*) pode ser considerado a principal fonte natural do eugenol (**1**), pois representa entre 45% e 90% da composição do óleo essencial derivado desta espécie.

Várias atividades biológicas foram relatadas para o eugenol (**1**), dentre elas destacam-se as atividades antibacteriana, antifúngica, antiplasmodial, antiviral, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, antidiabetes e citotóxica contra diferentes linhagens celulares de câncer.^{12,13} Uma investigação realizada sobre o efeito da atividade antiproliferativa do eugenol (**1**) contra as linhagens de células leucêmicas U-937, HL-60, HepG2, 3LL Lewis e SNU-C5, resultaram em valores de IC₅₀ iguais a 39,4, 23,7, 118,6, 89,6 e 129,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$,

*e-mail: robsonr.teixeira@ufv.br

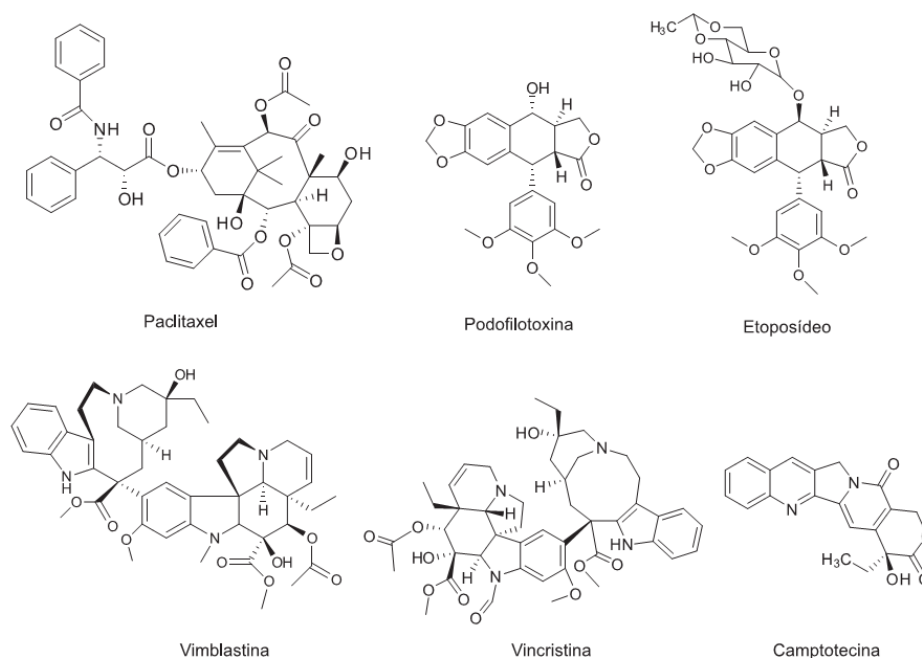


Figura 1. Estruturas de alguns quimioterápicos originários de plantas e empregados no tratamento do câncer

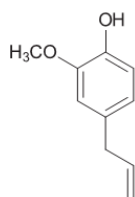


Figura 2. Estrutura do eugenol (1)

respectivamente.¹⁴

Considerando o efeito citotóxico descrito para o eugenol (1) bem como diversos trabalhos descritos na literatura a respeito da atividade citotóxica de compostos 1,2,3- triazólicos, é descrito neste artigo a síntese e a avaliação da atividade citotóxica de uma série de compostos derivados do eugenol (1) contendo núcleos 1,2,3-triazólicos.

PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades

Os reagentes pent-4-in-1-ol, cloreto de mesila, azida de sódio, trietilamina, brometo de propargila, sulfato de cobre pentaidratado e os álcoois benzílicos foram adquiridos comercialmente da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, United States) e utilizados sem prévia purificação. Os solventes foram adquiridos comercialmente da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A secagem dos solventes foi realizada utilizando procedimentos padrão descritos na literatura.¹⁵ O eugenol (1) foi extraído por meio da hidrodestilação de cravos da índia adquiridos no mercado local (Viçosa, Minas Gerais, Brasil) e purificado por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh-ASTM, Merck). Os espectros de RMN ¹H (300 MHz) e ¹³C (75 MHz) foram obtidos em um instrumento Varian Mercury 300 utilizando CDCl₃ e C₆D₆ como solventes. Os dados de RMN são apresentados da seguinte

forma: deslocamento químico (δ) em ppm, multiplicidade, número de hidrogênios, valores de J em Hertz (Hz). As multiplicidades são apresentadas como as seguintes abreviações: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), ddt_{ap} (duplo duplo triplete aparente), t (triplete), dt (duplo triplete), q (quarteto), quint (quinteto), m (multiplete). Os espectros no IV foram obtidos em equipamento Varian 660-IV equipado com GladiATR na região de 4000 a 500 cm⁻¹. As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica gel pré-revestidas com suporte de alumínio, usando diferentes sistemas de solventes e foram visualizadas usando solução de permanganato de potássio e/ou luz UV. Os pontos de fusão foram determinados em aparelho MQAPF-302 e não foram corrigidos. Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos em equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A sob condições de impacto de elétrons (70 eV). Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em equipamento Q-Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). Foram empregadas as seguintes condições: Fonte de ionização: eletrospray (+) e (-); spray voltage: 3.5 kV; temperatura do capilar: 275 °C; sheath gas: 5 (unidades arbitrárias); auxiliary gas: 0 (unidades arbitrárias). Para obtenção dos espectros de massas de alta resolução as amostras para análise foram preparadas da seguinte maneira: uma massa de 1 mg das amostras foi solubilizada em 1 mL de acetonitrila e diluídas em metanol até a concentração final de 1 ppm. A solução resultante foi diretamente injetada no equipamento Q-Exactive a um fluxo de 5 μ L min⁻¹. Os espectros foram adquiridos no modo full-MS.

Extração e purificação do eugenol (1)

O Eugenol (1) foi extraído *via* hidrodestilação de brotos secos de *Eugenia caryophyllata* (\approx *Syzygium aromaticum*), conhecidos como cravo-da-índia. Assim, 60,0 g de cravo e 500 mL de água destilada foram misturados em um balão de fundo redondo que foi conectado ao sistema de hidrodestilação. A mistura foi aquecida

durante três horas. O hidrolato obtido foi transferido para um funil de separação e a fase aquosa extraída com diclorometano (3 x 30 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O óleo resultante foi submetido à purificação por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (6:1 v/v). O procedimento descrito proporcionou a obtenção de 7,12 g de eugenol (**1**) que correspondeu a aproximadamente 12% de rendimento em relação à massa inicial de cravo da Índia utilizado no processo de extração. A estrutura do eugenol (**1**) está de acordo com os seguintes dados.

Óleo amarelo, $R_f = 0,44$ (hexano-acetato de etila 6:1 v/v). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,33 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,88 (s, 3H); 5,02-5,13 (m, 2H); 5,54 (s, 1H, OH); 5,97 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,67-6,72 (m, 2H); 6,86 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 55,8; 111,1; 114,2; 115,5; 121,1; 131,9; 137,8; 143,8; 146. EM, m/z (%): 164 ([M]⁺, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$, 100), 149 (35), 131 (29), 103 (32), 91 (28), 77 (34), 65 (13), 55 (24), 41 (7).

Procedimentos sintéticos

Síntese do 4-alil-2-metoxi-1-(prop-2-in-1-iloxi)benzeno (**2**)

A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados hidróxido de sódio (0,313 g; 7,38 mmol), eugenol (**1**) (1,20 g; 7,32 mmol) e 25,0 mL de metanol. A mistura resultante foi aquecida a 40 °C e mantida sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida, o metanol foi removido sob pressão reduzida e 10,0 mL de etanol anidro foram adicionados para a eliminação de água residual. O etanol foi removido e ao balão, sob atmosfera de nitrogênio, adicionaram-se acetonitrila (25 mL) e brometo de propargila (800 μL ; 8,79 mmol) lentamente. O sistema foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 18 horas. Após esse período, foi evidenciado através da análise por CCD o término da reação. A mistura de reação foi concentrada e particionada com 25,0 mL de solução aquosa (0,1 mol L⁻¹) de hidróxido de sódio e éter etílico (3 x 25,0 mL). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com solução aquosa saturada de cloreto de sódio (25,0 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (6:1 v/v) e obtido com 87% (1,29 g; 6,37 mmol) de rendimento. A estrutura do composto **2** está de acordo com os seguintes dados.

Óleo amarelo, $R_f = 0,45$ (hexano-acetato de etila 6:1 v/v). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,49 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz); 3,35 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,86 (s, 3H); 4,73 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz); 5,03-5,14 (m, 2H); 5,96 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz, $J_3 = 6,7$ Hz); 6,70-6,76 (m, 2H); 6,97 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 1,99 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz); 3,14 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,31 (s, 3H); 4,36 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz); 4,93-5,02 (m, 2H); 5,85 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,4$ Hz e $J_3 = 6,6$ Hz); 6,52 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz); 6,57 (dd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz e $J_2 = 1,7$ Hz); 6,83 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 55,8; 56,9; 75,5; 78,7; 112,3; 114,6; 115,7; 120,3; 134,2; 137,4; 145,0; 149,6. EM, m/z (%): 202 ([M]⁺, $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_2$, 40), 163 (100), 135 (9), 103 (42), 91 (33), 77 (19), 65 (13), 55 (9), 41 (23).

Síntese do pent-4-in-1-iltetanosulfonato (**3**)

A um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados pent-4-in-1-ol (1,68 g, 20,0 mmol) e diclorometano (20 mL). A mistura de reação, sob atmosfera de nitrogênio, foi resfriada a -50 °C e trietilamina (5,60 mL, 40,0 mmol) foi adicionada. Em seguida, adicionou-se lentamente ao meio reacional cloreto de mesila (2,3 mL, 30,0 mmol). Após o término da reação, evidenciado por análise de CCD, adicionaram-se 10,0 mL de água destilada. A fase orgânica

foi extraída, lavada com solução aquosa de HCl 1% (3 x 15,0 mL) seguida de solução aquosa saturada de NaHCO_3 (3 x 5,0 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sobre pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v) e obtido com 92% (3,00 g, 18,0 mmol) de rendimento. A estrutura do composto **3** está de acordo com os seguintes dados.

Óleo amarelo, $R_f = 0,76$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,93 (quint, 2H, $J = 6,5$ Hz); 1,99 (t, 1H, $J = 2,7$ Hz); 2,33 (dt, 2H, $J_1 = 6,8$ Hz e $J_2 = 2,7$ Hz); 3,00 (s, 3H, CH_3); 4,32 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 14,5; 27,6; 37,1; 68,2; 69,7; 82,0.

Síntese do 4-alil-2-metoxi-1-(pent-4-in-1-iloxi)benzeno (**4**)

Este composto foi preparado utilizando um procedimento semelhante ao descrito para a preparação do composto **2**. Neste caso, o agente de alquilação correspondeu ao composto **3**. A substância **4** foi obtida com 78% de rendimento (1,64 g, 7,13 mmol) após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (6:1 v/v). A estrutura de **4** é suportada pelos seguintes dados.

Óleo amarelo, $R_f = 0,55$ (hexano-acetato de etila 6:1 v/v). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,97 (t, 1H, $J = 2,6$ Hz); 2,04 (quint, 2H, $J = 6,6$ Hz); 2,42 (dt, 2H, $J_1 = 7,0$ Hz e $J_2 = 2,6$ Hz); 3,34 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,85 (s, 3H); 4,10 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz); 5,03-5,13 (m, 2H); 5,97 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,68-6,75 (m, 2H); 6,85 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 15,2; 28,2; 39,8; 55,9; 67,5; 68,8; 83,6; 112,4; 113,6; 115,6; 120,5; 133,0; 137,6; 146,7; 149,5. EM, m/z (%): 230 ([M]⁺, $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$, 100), 164 (68), 149 (44), 131 (29), 121 (16), 103 (34), 91 (31), 77 (23), 65 (16), 55 (15), 41 (34).

Síntese dos compostos **6a-6n** e **7a-7m** exemplificados pela síntese do composto **4** - ((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-benzil-1H-1,2,3-triazole (**6a**)

A um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 4-alil-2-metoxi-1-(prop-2-in-1-iloxi)benzeno (**2**) (0,150 g; 0,740 mmol), benzilazida (0,0990 g; 0,740 mmol), ascorbato de sódio (0,0590 g; 0,300 mmol), 1,00 mL de etanol e 1,00 mL de água. Em seguida, adicionou-se $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0370 g; 0,150 mmol). A mistura de reação foi agitada vigorosamente à temperatura ambiente. Após o término da reação evidenciado pela análise por CCD, a mistura de reação foi extraída com diclorometano (3 x 10,0 mL). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com solução saturada de carbonato de sódio, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sobre pressão reduzida. O composto **6a** foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v). O procedimento descrito resultou na obtenção de **6a** com 91% de rendimento (0,228 g; 0,680 mmol). A estrutura do composto **6a** está de acordo com os seguintes dados.

Sólido branco, P.f. = 90,5-91,3 °C, $R_f = 0,49$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3086, 3034, 2999, 2929, 2912, 1589, 1511, 1446, 1259, 1229, 1143, 1016, 921, 831, 713, 696. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,23 (s, 2H); 5,50 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,71 (m, 2H); 6,94 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz); 7,21-7,40 (m, 5H); 7,54 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 54,1; 55,7; 63,5; 112,2; 114,6; 115,7; 120,4; 122,7; 128,1; 128,7; 129,0; 133,8; 134,4; 137,4; 144,8; 145,8; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2$: 336,17120; encontrado: 336,17020. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{NaO}_2$: 358,15315; encontrado: 358,15164.

Os compostos **6b-6n** e **7a-7m** foram preparados utilizando um procedimento semelhante ao descrito para a síntese de **6a**. As

estruturas destes compostos foram são suportadas pelos seguintes dados.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6b**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 92,1-92,7 °C, $R_f = 0,39$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3069, 3005, 2935, 2914, 1588, 1511, 1259, 1223, 1143, 1017, 905, 771. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,23 (s, 2H); 5,47 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,5$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,67-6,70 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,04 (t_{ap}, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,20-7,30 (m, 2H); 7,54 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,7; 53,4; 55,7; 63,4; 112,2; 114,5; 115,7; 116,1 (d, $J = 21,8$ Hz); 120,4; 122,6; 129,9 (d, $J = 8,3$ Hz); 130,3 (d, $J = 3,0$ Hz); 133,8; 137,4; 145,0; 145,8; 149,5; 162,8 (d, $J = 246,0$ Hz). HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_2$; 354,16178; encontrado: 354,16077. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{NaO}_2$; 376,14372; encontrado: 376,14240.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6c**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 112,3-112,6 °C, $R_f = 0,37$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3001, 2936, 2915, 1588, 1513, 1943, 1258, 1228, 1143, 1016, 907, 803, 722, 693, 592. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,23 (s, 2H); 5,47 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,18 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,33 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,54 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 53,4; 55,7; 63,4; 112,2; 114,6; 115,7; 120,4; 122,7; 129,2; 129,3; 132,9; 133,9; 134,7; 137,4; 145,0; 145,8; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClN}_3\text{O}_2$; 370,13223; encontrado: 370,13132. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{NaO}_2$; 392,11417; encontrado: 392,11285.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6d**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 119,1-120,2 °C, $R_f = 0,59$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3001, 2935, 2915, 1588, 1513, 1385, 1258, 1229, 1144, 1015, 803, 738, 592, 488. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,82 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,23 (s, 2H); 5,45 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17,1$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,92 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,11 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz); 7,48 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz); 7,54 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 53,4; 55,7; 63,4; 112,2; 114,6; 115,7; 120,4; 122,7; 122,8; 129,6; 132,2; 133,4; 133,9; 137,4; 145,1; 145,7; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_2$; 414,08171; encontrado: 414,08072. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$; 436,06366; encontrado: 436,06058.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-iodobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6e**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 129,2-131,1 °C, $R_f = 0,37$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3124, 3063, 2932, 1587, 1512, 1486, 1385, 1258, 1228, 1143, 1017, 1008, 911, 801, 769, 592, 485. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,82 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,20 (s, 2H); 5,44 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,5$ Hz e $J_3 = 6,6$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,92 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 6,98 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz); 7,54 (s, 1H); 7,69 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 53,5; 55,7; 63,4; 94,5; 112,2; 114,6; 115,7; 120,4; 122,7; 129,8; 133,9; 134,1; 137,4; 138,2; 145,1; 145,8; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{IN}_3\text{O}_2$; 462,06784; encontrado: 462,06711. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{IN}_3\text{NaO}_2$; 484,04979; encontrado: 484,04898.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6f**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 120,9-121,9 °C, $R_f = 0,14$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3063, 3005, 2950, 2917, 1591, 1516, 1350, 1258, 1230, 1140, 1019, 835, 720. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,01-5,12 (m, 2H); 5,25 (s, 2H); 5,62 (s, 2H); 5,93 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,3$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,92 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,37 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,63 (s, 1H); 8,20 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,7; 53,0; 55,7; 63,3; 112,3; 114,5; 115,7; 120,4; 123,0; 124,2; 128,5; 134,0; 137,4; 141,5; 145,4; 145,7; 148,0; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4$; 381,15628; encontrado: 381,15533. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{NaO}_4$; 403,13822; encontrado: 403,13715.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6g**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 92,4-93,1 °C, $R_f = 0,36$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3068, 3005, 2936, 2832, 1613, 1587, 1512, 1463, 1251, 1227, 1142, 1016, 903, 805, 774, 702, 548. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,31 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,80 (s, 3H); 3,81 (s, 3H); 5,01-5,12 (m, 2H); 5,21 (s, 2H); 5,43 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,88 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz); 6,94 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 7,21 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,51 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 53,7; 55,3; 55,7; 63,5; 112,2; 114,4; 114,5; 115,6; 120,4; 122,5; 126,4; 129,7; 133,7; 137,4; 144,7; 145,9; 149,5; 159,9. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3$; 366,18177; encontrado: 366,18069. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{NaO}_3$; 388,16371; encontrado: 388,16229.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-(trifluorometoxi)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6h**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 126,4-127,3 °C, $R_f = 0,49$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3004, 2978, 2941, 1589, 1510, 1467, 1387, 1256, 1218, 1142, 1017, 915, 804. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,24 (s, 2H); 5,51 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,20 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,28 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,57 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,7; 53,2; 55,8; 63,4; 112,2; 114,5; 115,8; 120,3 (q, $J = 256,3$ Hz); 120,4; 121,5; 122,7; 129,5; 133,2; 133,9; 137,4; 145,1; 145,8; 149,3-149,2 (m); 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$; 420,15350; encontrado: 420,15250. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_3$; 442,13545; encontrado: 442,13422.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-(trifluorometil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6i**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 142,7-143,0 °C, $R_f = 0,43$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3060, 3003, 2977, 2944, 1589, 1515, 1422, 1328, 1229, 1142, 1117, 1017, 913, 799, 624. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,25 (s, 2H); 5,57 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 7,34 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz); 7,58 (sl, 1H); 7,61 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,7; 53,4; 55,8; 63,4; 112,2; 114,6; 115,7; 120,4; 122,8; 123,7 (q, $J = 270,8$ Hz); 126,0 (q, $J = 3,8$ Hz); 128,1; 131,0 (q, $J = 32,5$ Hz); 133,9; 137,4; 138,4; 145,2; 145,7; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$; 404,15859; encontrado: 404,15771. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_2$; 426,14053; encontrado: 426,13928.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(2,5-diclorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6j**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 87,9-88,4 °C, $R_f = 0,59$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3143, 3008, 2962, 2871, 1587, 1508, 1460, 1391, 1256, 1213, 1137, 1030, 1003, 905, 821, 797, 645, 560. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,83 (s, 3H); 5,01-5,12 (m, 2H); 5,23 (s, 2H); 5,60 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 9,9$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,68-6,71 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 7,12 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz); 7,27 (dd, 1H, $J_1 = 8,6$ Hz e $J_2 = 2,3$ Hz); 7,35 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 7,67 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 50,9; 55,8; 63,5; 112,3; 114,7; 115,7; 120,5; 123,1; 130,0; 130,2; 130,9; 131,5; 133,5; 133,97; 133,99; 137,4; 145,1; 145,7; 149,5. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$: 404,09326; encontrado: 404,09232. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{NaO}_2$: 426,07520; encontrado: 426,07388.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(3,4-difluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6k**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 104,9-105,2 °C, $R_f = 0,30$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3003, 2939, 2915, 1589, 1516, 1447, 1287, 1259, 1213, 1142, 1018, 835, 756, 575. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,82 (s, 3H); 5,01-5,12 (m, 2H); 5,24 (s, 2H); 5,45 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,3$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,92 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 6,97-7,19 (m, 3H); 7,57 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,7; 53,0 (brd, $J = 1,0$ Hz); 55,7; 63,4; 112,2; 114,6; 115,7; 117,2 (d, $J = 18,0$ Hz); 117,9 (d, $J = 18,0$ Hz); 120,4; 122,7; 124,2 (dd, $J_1 = 6,8$ Hz e $J_2 = 3,8$ Hz); 131,4-131,5 (m); 133,9; 137,4; 145,2; 145,6; 149,5; 148,7-148,9 (m); 152,0-152,2 (m). HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$: 372,15236; encontrado: 372,15137. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_3\text{NaO}_2$: 394,13430; encontrado: 394,13312.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-metilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6l**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 81,4-82,3 °C, $R_f = 0,66$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3064, 3003, 2917, 1588, 1513, 1446, 1257, 1229, 1142, 1017, 907, 803, 756. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,34 (s, 3H); 3,32 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,01-5,12 (m, 2H); 5,22 (s, 2H); 5,45 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,6$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,15 (s, 4H); 7,52 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 21,1; 39,8; 53,9; 55,7; 63,5; 112,2; 114,6; 115,6; 120,4; 122,6; 128,1; 129,7; 131,4; 133,8; 137,5; 138,6; 144,7; 145,9; 149,5. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$: 350,18685; encontrado: 350,18582. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{NaO}_2$: 372,16880; encontrado: 372,16776.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(2-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6m**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 67,5-68,6 °C, $R_f = 0,70$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3141, 3079, 3003, 2944, 2873, 1587, 1509, 1421, 1389, 1254, 1213, 1134, 1050, 1026, 1000, 920, 759, 649, 596. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,82 (s, 3H); 5,00-5,11 (m, 2H); 5,25 (s, 2H); 5,64 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,6$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,95 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 7,12 (dd, 1H, $J_1 = 7,4$ Hz e $J_2 = 1,7$ Hz); 7,17-7,33 (m, 2H); 7,60 (dd, 1H, $J_1 = 7,8$ Hz e $J_2 = 1,2$ Hz); 7,66 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,7; 53,7; 55,7; 63,5; 112,2; 114,7; 115,6; 120,4; 123,1; 123,4; 128,1; 130,30; 130,33; 133,1; 133,8; 134,0; 137,4; 144,7; 145,7; 149,5. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_2$: 414,08171; encontrado: 414,08096. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$: 436,06366; encontrado: 436,06290.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(3-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6n**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 97,5-97,9 °C, $R_f = 0,70$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3011, 2936, 1588, 1512, 1463, 1387, 1226, 1142, 1017, 835, 735, 692, 665. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,82 (s, 3H); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,24 (s, 2H); 5,47 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 10,8$ Hz e $J_3 = 6,6$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); [7,13-7,26 (m), 7,40 (sl), 7,48 (d_{ap}, $J = 7,7$ Hz), 4H]; 7,57 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 53,3; 55,7; 63,4; 112,2; 114,6; 115,7; 120,5; 122,7; 123,0; 126,6; 130,6; 131,0; 131,9; 133,9; 136,6; 137,4; 145,1; 145,8; 149,5. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_2$: 414,08171; encontrado: 414,08069. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$: 436,06366; encontrado: 436,06265.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol (**7a**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 71,4-72,6 °C, $R_f = 0,16$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3059, 3007, 2958, 2830, 2876, 1588, 1513, 1461, 1332, 1260, 1230, 1140, 1026, 915, 799, 709, 663. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,17 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz); 2,90 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz); 5,01-5,11 (m, 2H); 5,48 (s, 2H); 5,95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,22-7,37 (m, 6H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,9; 55,8; 68,1; 112,3; 113,4; 115,5; 120,4; 120,9; 127,9; 128,5; 129,0; 132,9; 134,8; 137,6; 146,6; 147,7; 149,3. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$: 364,20250; encontrado: 364,20148. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{NaO}_2$: 386,18445; encontrado: 386,18341.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7b**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 96,4-96,8 °C, $R_f = 0,21$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3061, 3008, 2951, 1587, 1511, 1455, 1260, 1222, 1140, 1015, 905, 798, 772, 654. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,17 (quint, 2H, $J = 6,9$ Hz); 2,90 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,44 (s, 2H); 5,95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,8$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,03 (t, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,16-7,30 (m, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,2; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 116,0 (d, $J = 21,8$ Hz); 120,4; 120,8; 129,7 (d, $J = 8,3$ Hz); 130,7 (d, $J = 3,0$ Hz); 132,9; 137,6; 146,6; 147,8; 149,3; 162,7 (d, $J = 246,8$ Hz). HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{FN}_3\text{O}_2$: 382,19308; encontrado: 382,19211. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{NaO}_2$: 404,17502; encontrado: 404,17404.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7c**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 81,8-82,2 °C, $R_f = 0,46$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3063, 3000, 2937, 2856, 1589, 1514, 1446, 1259, 1227, 1140, 1015, 909, 799, 776, 739, 641. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,17 (quint, 2H, $J = 6,9$ Hz); 2,90 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,82 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz); 5,00-5,11 (m, 2H); 5,44 (s, 2H); 5,95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,16 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,24 (s, 1H); 7,32 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,2; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 120,4; 120,9; 129,2; 132,9; 133,3; 134,6; 137,6; 146,6; 147,9; 149,3. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): calculado para

$C_{21}H_{25}ClN_3O_2$; 398,16353; encontrado: 398,16272. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{22}H_{25}ClN_3NaO_2$; 420,14547; encontrado: 420,14474.

*Para este composto, houve a sobreposição de sinais de átomos de carbono.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7d**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 89,4-90,3 °C, R_f = 0,46 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3110, 3063, 2999, 2950, 1588, 1514, 1459, 1420, 1260, 1227, 1141, 1013, 908, 797, 733, 489. δ : 2,17 (quint, 2H, J = 6,9 Hz); 2,90 (t, 2H, J = 7,5 Hz); 3,32 (d, 2H, J = 6,7 Hz); 3,82 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, J = 6,3 Hz); 5,03-5,13 (m, 2H); 5,43 (s, 2H); 5,95 (ddt_{up}, 1H, J_1 = 16,8 Hz, J_2 = 10,2 Hz e J_3 = 6,7 Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, J = 7,9 Hz); 7,10 (d, 2H, J = 8,4 Hz); 7,24 (s, 1H); 7,47 (d, 2H, J = 8,4 Hz). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,2; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 120,4; 120,9; 122,7; 129,5; 132,2; 133,0; 133,9; 137,6; 146,6; 147,9; 149,4. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{22}H_{25}BrN_3O_2$; 442,11301; encontrado: 442,11227. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{23}H_{24}BrN_3NaO_2$; 464,09496; encontrado: 464,09402.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-iodobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7e**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 98,3-99,2 °C, R_f = 0,45 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3110, 3062, 2999, 2951, 1588, 1513, 1461, 1419, 1260, 1227, 1140, 1009, 910, 797, 731, 655, 484. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,17 (quint, 2H, J = 6,9 Hz); 2,90 (t, 2H, J = 7,5 Hz); 3,33 (d, 2H, J = 6,6 Hz); 3,82 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, J = 6,3 Hz); 5,00-5,12 (m, 2H); 5,41 (s, 2H); 5,95 (ddt_{up}, 1H, J_1 = 16,8 Hz, J_2 = 10,2 Hz e J_3 = 6,6 Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, J = 7,9 Hz); 6,96 (d, 2H, J = 8,3 Hz); 7,24 (s, 1H); 7,68 (d, 2H, J = 8,3 Hz). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,3; 55,8; 68,0; 94,3; 112,3; 113,4; 115,6; 120,4; 120,9; 129,6; 132,9; 134,5; 137,6; 138,1; 146,6; 147,9; 149,3. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{22}H_{25}IO_2$; 490,09915; encontrado: 490,09836. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{22}H_{24}IN_3NaO_2$; 512,08109; encontrado: 512,08038.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7f**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 79,7-80,4 °C, R_f = 0,29 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3111, 3062, 2949, 2911, 1590, 1518, 1465, 1348, 1227, 1139, 1014, 907, 849, 798, 713, 592. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,19 (quint, 2H, J = 6,9 Hz); 2,94 (t, 2H, J = 7,5 Hz); 3,31 (d, 2H, J = 6,7 Hz); 3,81 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, J = 6,3 Hz); 5,00-5,12 (m, 2H); 5,59 (s, 2H); 5,94 (ddt_{up}, 1H, J_1 = 16,8 Hz, J_2 = 10,2 Hz e J_3 = 6,7 Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, J = 7,8 Hz); 7,31-7,38 (m, 3H); 8,19 (d, 2H, J = 8,7 Hz). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,6; 39,7; 52,9; 55,8; 68,0; 112,4; 113,4; 115,6; 120,4; 121,3; 124,2; 128,4; 133,0; 137,5; 141,9; 146,6; 147,9; 148,3; 149,3. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{22}H_{25}N_4O_4$; 409,18758; encontrado: 409,18677. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{22}H_{24}N_4NaO_4$; 431,16952; encontrado: 431,16867.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7g**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 88,9-90,4 °C, R_f = 0,22 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3114, 3062, 3005, 2951, 2868, 1587, 1512, 1455, 1295, 1251, 1227, 1131, 1032, 1015, 917, 801, 749, 652. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,16 (quint, 2H, J = 7,0 Hz); 2,88 (t, 2H, J = 7,5 Hz); 3,32 (d, 2H, J = 6,6 Hz); 3,80 (s, 3H); 3,82 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, J = 6,4 Hz); 5,00-5,11 (m, 2H); 5,40 (s, 2H); 5,95 (ddt_{up}, 1H, J_1 = 16,8 Hz, J_2 = 9,9 Hz e J_3 = 6,6 Hz); 6,65-6,73 (m,

2H), 6,77 (d, 1H, J = 7,9 Hz); 6,87 (d, 2H, J = 8,6 Hz); 7,15-7,23 (m, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1, 28,7, 39,7, 53,5, 55,3, 55,8, 68,1, 112,3, 113,4, 114,4, 115,5, 120,4, 120,6, 126,8, 129,5, 132,9, 137,6, 146,6, 147,6, 149,3, 159,8. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{23}H_{28}N_3O_3$; 394,21307; encontrado: 394,21225. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{23}H_{27}N_3NaO_3$; 416,19501; encontrado: 416,19415.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-(trifluorometoxi)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7h**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 93,4-94,9 °C, R_f = 0,49 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3118, 3063, 2949, 2878, 1590, 1511, 1454, 1259, 1225, 1138, 1034, 1014, 911, 800, 743, 652. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,18 (quint, 2H, J = 6,9 Hz); 2,91 (t, 2H, J = 7,5 Hz); 3,32 (d, 2H, J = 6,7 Hz); 3,81 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, J = 6,3 Hz); 5,01-5,13 (m, 2H); 5,48 (s, 2H); 5,95 (ddt_{up}, 1H, J_1 = 16,8 Hz, J_2 = 10,2 Hz e J_3 = 6,7 Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, J = 7,9 Hz); 7,19 (d, 2H, J = 8,6 Hz); 7,23-7,31 (m, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,0; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 120,3 (q, J = 257,0 Hz); 120,4; 121,0; 121,4; 129,3; 133,0; 133,6; 137,6; 146,6; 148,0; 149,2-149,3 (m); 149,4HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{23}H_{25}F_3N_3O_3$; 448,18480; encontrado: 448,18399. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{23}H_{24}F_3N_3NaO_3$; 470,16675; encontrado: 470,16602.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-(trifluorometil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7i**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 111,3-112,5 °C, R_f = 0,50 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3110, 3062, 2947, 2910, 1589, 1516, 1466, 1421, 1328, 1263, 1224, 1142, 1116, 1014, 908, 798, 740, 669. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,19 (quint, 2H, J = 6,9 Hz); 2,92 (t, 2H, J = 7,5 Hz); 3,32 (d, 2H, J = 6,7 Hz); 3,81 (s, 3H); 4,02 (t, 2H, J = 6,3 Hz); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,54 (s, 2H); 5,94 (ddt_{up}, 1H, J_1 = 16,8 Hz, J_2 = 10,2 Hz e J_3 = 6,74 Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, J = 7,9 Hz); 7,28 (s, 1H); 7,32 (d, 2H, J = 8,1 Hz); 7,61 (d, 2H, J = 8,1 Hz). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,8; 39,7; 53,2; 55,9; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 120,4; 121,1; 123,8 (q, J = 270,8 Hz); 126,0 (q, J = 3,8 Hz); 128,0; 130,9 (q, J = 32,5 Hz); 133,0; 137,6; 138,8; 146,7; 148,1; 149,4. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{23}H_{25}F_3N_3O_2$; 432,18989; encontrado: 432,18903. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{23}H_{24}F_3N_3NaO_2$; 454,17183; encontrado: 454,17093.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(3,4-difluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7j**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 97,1-97,8 °C, R_f = 0,41 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3111, 3061, 2949, 1588, 1515, 1454, 1261, 1288, 1228, 1141, 1017, 915, 754. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,18 (quint, 2H, J = 6,9 Hz); 2,92 (t, 2H, J = 7,5 Hz); 3,32 (d, 2H, J = 6,7 Hz); 3,82 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, J = 6,3 Hz); 5,00-5,12 (m, 2H); 5,43 (s, 2H); 5,95 (ddt_{up}, 1H, J_1 = 16,8 Hz, J_2 = 10,2 Hz e J_3 = 6,7 Hz); 6,65-6,71 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, J = 7,9 Hz); 6,92-7,20 (m, 3H); 7,27 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 52,5; 55,9 (dl, J = 8,3 Hz); 68,0; 112,5; 113,4; 115,6; 117,0 (d, J = 17,3 Hz); 117,9 (d, J = 17,3 Hz); 120,4; 120,9; 124,0 (dd, J_1 = 6,8 Hz e J_2 = 3,8 Hz); 131,8-131,9 (m); 133,0; 137,5; 146,5; 148,1; 149,3; [148,6-148,9 (m), 151,9-152,2 (m)]. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{22}H_{23}F_2N_3O_2$; 400,18366; encontrado: 400,18274. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{22}H_{22}F_2N_3NaO_2$; 422,16560; encontrado: 422,16473.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-metilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7k**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 59,6-60,9 °C, R_f = 0,42 (hexano-acetato de

etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3061, 2953, 2916, 2880, 1588, 1514, 1449, 1420, 1260, 1228, 1140, 1014, 904, 845, 799, 75, 720, 650. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,16 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz); 2,34 (s, 3H); 2,88 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,43 (s, 2H); 5,95 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,10-7,18 (m, 4H); 7,21 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 21,0; 22,1; 28,7; 39,7; 53,7; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,5; 120,4; 120,7; 127,9; 129,6; 131,7; 132,8; 137,5; 138,4; 146,6; 147,6; 149,3. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$: 378,21815; encontrado: 378,21719. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_2$: 400,20010; encontrado: 400,19922.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(2-bromoben-zil)-1H-1,2,3-triazol (7i): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 47,8-49,1 °C, $R_f = 0,61$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3104, 3054, 2931, 1587, 1511, 1467, 1419, 1230, 1135, 1027, 948, 804, 744, 653. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,19 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz); 2,92 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,82 (s, 3H); 4,02 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,61 (s, 2H); 5,95 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,78 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 7,08 (dd, 1H, $J_1 = 7,5$ Hz e $J_2 = 1,6$ Hz); 7,15-7,31 (m, 2H); 7,35 (s, 1H); 7,59 (dd, 1H, $J_1 = 7,8$ Hz e $J_2 = 1,1$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,6; 55,8; 68,1; 112,3; 113,4; 115,5; 120,3; 121,3; 123,2; 128,1; 130,1; 130,2; 132,9; 133,1; 134,4; 137,6; 146,6; 147,7; 149,3. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_3\text{O}_2$: 442,11301; encontrado: 442,11197. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$: 464,09496; encontrado: 464,09390.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(3-bromoben-zil)-1H-1,2,3-triazol (7m): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 65,9-67,1 °C, $R_f = 0,32$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3062, 2949, 2881, 1589, 1514, 1462, 1260, 1227, 1140, 1013, 798, 726, 689, 586. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,18 (quint, 2H, $J = 6,9$ Hz); 2,91 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,82 (s, 3H); 4,02 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,44 (s, 2H); 5,94 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,78 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); [7,10-7,30 (m), 7,38 (sl), 7,46 (d_{ap}, $J = 7,8$ Hz, 5H)]. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,1; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 120,4; 121,0; 123,0; 126,4; 130,6; 130,8; 131,7; 132,9; 137,1; 137,6; 146,6; 148,0; 149,3. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_3\text{O}_2$: 442,11301; encontrado: 442,11218. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$: 464,09496; encontrado: 464,09412.

Ensaios biológicos

Cultivo de linhagens celulares

As linhagens celulares HL60 (leucemia mieloide aguda), Nalm6 (leucemia linfóide aguda) e B16F10 (melanoma metastático murino) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) pH 7,4 suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina. As células cresceram em garrafas de cultivo celular sob atmosfera umidificada com 5% de CO_2 .

Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

Células HL60 e Nalm6 ($7,0 \times 10^4$ células/poço) e B16F10 ($1,0 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços, cada um contendo 100 μL de meio RPMI completo e 100 μL de solução de cada composto em diferentes concentrações. Os compostos foram diluídos em meio RPMI contendo 10% v/v de soro fetal bovino e 0,4% v/v de DMSO (Sigma). Células tratadas com 0,4% v/v de DMSO (veículo) foram utilizadas como controle. Após 48 horas de incubação, 10 μL de MTT (5 mg/mL, Sigma) foram adicionados em cada poço. Após 3 horas a 37 °C, a solução contendo MTT foi removida dos poços e então foram adicionados 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de DMSO para solubilização do formazan. Finalmente, a absorbância foi avaliada em leitora de microplacas (Spectra Max M5, Molecular Devices).

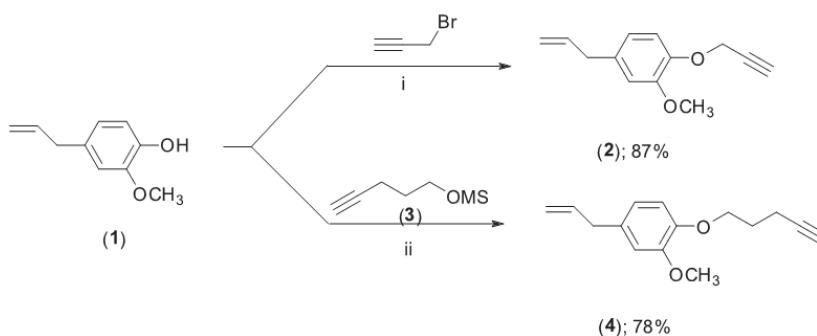
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Síntese dos compostos triazólicos derivados do eugenol

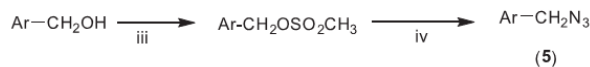
A primeira etapa envolvida na preparação dos compostos derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos correspondeu à extração do eugenol (1). Este composto foi obtido por hidrodestilação do cravo da Índia e purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Em seguida, o eugenol (1) foi submetido a reações de alquilação resultando na obtenção dos derivados (2) e (4) conforme apresentado no Esquema 1.¹⁶

Para a síntese dos compostos triazólicos derivados do eugenol foi necessária a preparação de várias azidas benzílicas (estrutura geral (5) no Esquema 2) que foram obtidas em duas etapas a partir dos álcoois benzílicos correspondentes, de acordo com a metodologia descrita na literatura.¹⁷

A etapa chave envolvida na síntese dos compostos triazólicos derivados do eugenol correspondeu à reação de cicloadição entre um alcino e uma azida catalisada por cobre (I) (CuAAC), também conhecida como reação "click".¹⁸⁻²³ Assim, os compostos 6a-6n e 7a-7m foram preparados a partir dos compostos alquilados (2 e 4) e as azidas benzílicas (5), e obtidos com rendimentos sinteticamente úteis (77%-91%) (Esquema 3).

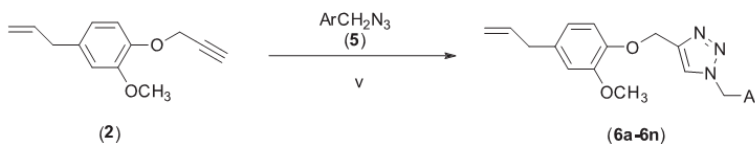


Esquema 1. i) NaOH, CH_3OH , 40 °C; acetonitrila, t.a; ii) NaOH, CH_3OH , 40 °C; acetonitrila, 70 °C

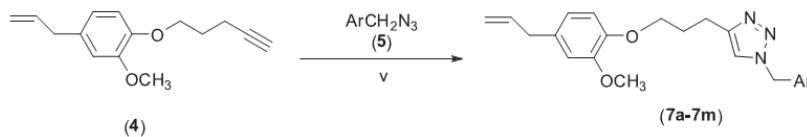


Ar = fenila; 4-fluorofenila; 4-clorofenila; 4-bromofenila; 4-iodofenila; 4-nitrofenila; 4-metoxifenila; 4-trifluorometoxifenila; 4-trifluorometilfenila; 3,4-difluorofenila; 2,5-diclorofenila; 4-metilfenila; 2-bromofenila; 3-bromofenila.

Esquema 2. iii) Et_3N , $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, CH_2Cl_2 , $-50\text{ }^\circ\text{C}$; iv) NaN_3 , DMSO , *t.a.*



- 6a:** Ar = fenila (91%)
6b: Ar = 4-fluorofenila (87%)
6c: Ar = 4-clorofenila (87%)
6d: Ar = 4-bromofenila (80%)
6e: Ar = 4-iodofenila (87%)
6f: Ar = 4-nitrofenila (89%)
6g: Ar = 4-metoxifenila (80%)
6h: Ar = 4-trifluorometoxifenila (85%)
6i: Ar = 4-trifluorometilfenila (84%)
6j: Ar = 2,5-diclorofenila (81%)
6k: Ar = 3,4-difluorofenila (78%)
6l: Ar = 4-metilfenila (82%)
6m: Ar = 2-bromofenila (77%)
6n: Ar = 3-bromofenila (79%)



- 7a:** Ar = fenila (79%)
7b: Ar = 4-fluorofenila (86%)
7c: Ar = 4-clorofenila (87%)
7d: Ar = 4-bromofenila (84%)
7e: Ar = 4-iodofenila (91%)
7f: Ar = 4-nitrofenila (82%)
7g: Ar = 4-metoxifenila (83%)
7h: Ar = 4-trifluorometoxifenila (84%)
7i: Ar = 4-trifluorometilfenila (92%)
7j: Ar = 3,4-difluorofenila (90%)
7k: Ar = 4-metilfenila (80%)
7l: Ar = 2-bromofenila (79%)
7m: Ar = 3-bromofenila (81%)

Esquema 3. v) ascorbato de sódio (40 mol%), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 mol%), $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v)

Os compostos triazólicos foram obtidos empregando-se condições de reação similares àquelas previamente descritas na literatura.¹⁷ As reações, de modo geral, duraram menos do que um minuto e não foram observadas variações de velocidade das transformações utilizando-se azidas benzílicas contendo grupos doadores ou retiradores de elétrons ligados ao anel aromático. O alquino terminal utilizado (**2** ou **4**) também não influenciou a velocidade dos processos “click”.

Todos os compostos triazólicos foram completamente caracterizados pelas espectroscopias de RMN (^1H e ^{13}C) e no infravermelho

(IV) bem como pela espectrometria de massas. Nos espectros de RMN de ^1H , o sinal atribuído ao hidrogênio presente no anel triazólico foi observado como um simpleto dentro da faixa de 7,20-7,67 ppm. Os sinais referentes aos átomos de hidrogênios metilênicos ligados ao oxigênio e ao nitrogênio também foram observados como simpletos nos espectros de RMN de ^1H . No espectro de RMN de ^{13}C foi observado que o número de sinais presentes e os deslocamentos químicos são compatíveis com as estruturas das substâncias. Nos espectros no IV, as bandas esperadas para os grupos funcionais foram

observadas. As fórmulas moleculares dos derivados triazólicos do eugenol **6a-6n** e **7a-7m** foram confirmadas pela espectrometria de massas de alta resolução. Cabe destacar que a síntese dos compostos foi planejada de modo a avaliar o efeito dos diferentes grupos benzila ligados à porção triazólica (Esquema 3) bem como do tamanho da cadeia alifática (ligando a porção eugenol à porção triazólica) sobre a atividade citotóxica dos compostos.

Avaliação da atividade citotóxica dos compostos triazólicos derivados do eugenol

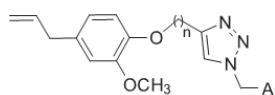
Os compostos triazólicos **6a-6n** e **7a-7m** foram inicialmente avaliados com respeito aos seus efeitos citotóxicos contra a linhagem leucêmica HL60 (leucemia mieloide aguda). Esta linhagem foi tratada com diferentes concentrações dos compostos (100, 50 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos para a viabilidade celular estão apresentados na Tabela 1.

Não foi possível estabelecer uma correlação entre estruturas químicas e atividade biológica. Os resultados apresentados mostram que os compostos **6n**, **7a**, **7c**, **7e** e **7m** foram os mais ativos e apresentaram uma redução igual ou superior a 80% de células viáveis nos tratamentos a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Devido ao efeito citotóxico mais pronunciado para estas substâncias, elas foram consideradas promissoras e tiveram suas atividades citotóxicas avaliadas contra as linhagens celulares HL60, Nalm6 e B16F10 para determinação de valores de IC_{50} . Neste caso, as linhagens foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos (200, 150, 125, 100, 75, 50 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$), por 48 horas. Esses testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Comparando-se os valores de IC_{50} apresentados na Tabela 2, observa-se, como tendência geral, que a linhagem mieloide (HL60) apresentou maior sensibilidade ao efeito citotóxico dos compostos em relação à linhagem linfóide (Nalm6) e murina (B16F10). Além disso, observa-se que dos cinco compostos mais ativos, quatro (**7a**, **7c**, **7e**,

Tabela 1. Efeito dos compostos triazólicos derivados do eugenol sobre a viabilidade (%) da linhagem celular HL60, após 48 horas de exposição aos compostos (média \pm desvio padrão)



Composto*	Ar	Viabilidade (%)**		
		25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
6a	Fenila	75,92 \pm 16,21	77,73 \pm 12,22	69,65 \pm 9,62
6b	4-fluorofenila	67,98 \pm 13,09	64,12 \pm 3,08	54,89 \pm 11,22
6c	4-clorofenila	75,25 \pm 3,53	76,87 \pm 11,19	83,68 \pm 6,07
6d	4-bromofenila	75,72 \pm 1,83	81,12 \pm 2,81	82,68 \pm 9,84
6e	4-iodofenila	78,23 \pm 6,39	81,57 \pm 12,93	86,54 \pm 18,31
6f	4-nitrofenila	74,31 \pm 3,11	72,03 \pm 1,53	78,63 \pm 0,40
6g	4-metoxifenila	71,78 \pm 9,36	74,76 \pm 12,12	78,80 \pm 3,64
6h	4-trifluorometoxifenila	86,84 \pm 16,65	76,06 \pm 6,68	73,70 \pm 16,80
6i	4-triflorometila	79,77 \pm 1,55	80,68 \pm 7,02	77,10 \pm 6,15
6j	2,5-diclorofenila	69,16 \pm 2,10	90,31 \pm 13,28	106,54 \pm 6,84
6k	3,4-difluorofenila	68,30 \pm 3,52	76,56 \pm 7,11	85,27 \pm 6,59
6l	4-metilfenila	75,44 \pm 0,93	69,01 \pm 1,47	71,34 \pm 3,63
6m	2-bromofenila	85,08 \pm 6,67	78,78 \pm 7,39	77,13 \pm 4,65
6n	3-bromofenila	82,38 \pm 0,52	79,88 \pm 0,07	18,93 \pm 5,30
7a	Fenila	79,44 \pm 9,18	80,66 \pm 3,27	20,85 \pm 7,92
7b	4-fluorofenila	84,64 \pm 11,17	81,15 \pm 7,69	38,24 \pm 4,95
7c	4-clorofenila	75,67 \pm 1,30	76,62 \pm 2,09	12,39 \pm 3,79
7d	4-bromofenila	79,77 \pm 21,94	79,58 \pm 12,48	82,13 \pm 8,98
7e	4-iodofenila	88,20 \pm 16,48	87,13 \pm 15,32	13,04 \pm 3,80
7f	4-nitrofenila	74,66 \pm 5,60	81,99 \pm 3,95	39,62 \pm 5,36
7g	4-metoxifenila	87,93 \pm 19,11	87,50 \pm 16,95	89,80 \pm 12,08
7h	4-trifluorometoxifenila	72,33 \pm 2,03	75,77 \pm 6,90	64,97 \pm 2,09
7i	4-trifluorometila	85,09 \pm 20,36	79,39 \pm 9,67	84,12 \pm 15,99
7j	3,4-difluorofenila	76,27 \pm 7,42	70,58 \pm 5,84	77,09 \pm 3,30
7k	4-metilfenila	80,39 \pm 10,62	64,95 \pm 9,08	27,88 \pm 6,49
7l	2-bromofenila	93,92 \pm 10,74	90,74 \pm 5,61	88,74 \pm 2,32
7m	3-bromofenila	93,03 \pm 8,93	88,54 \pm 8,41	19,88 \pm 5,19

* Para os compostos **6a-6n**, n=1 e para os compostos **7a-7m**, n=3; **Considerou-se 100% de viabilidade celular no tratamento controle com o veículo DMSO.

Tabela 2. Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) obtidos para as linhagens celulares HL60, Nalm6 e B16F10 tratadas com os compostos **6n**, **7a**, **7c**, **7e**, **7m**

Composto	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)		
	HL60	Nalm6	B16F10
6n	70,74±0,269	66,30±3,451	NA
7a	75,83±4,752	85,59±2,913	179,7±3,090
7c	74,61±2,171	NA	NA
7e	74,54±6,554	NA	NA
7m	77,96±4,815	76,67±0,368	NA

IC₅₀:concentração dos compostos requerida para inibir 50% da viabilidade celular, determinada após 48 horas de tratamento. (NA) Compostos não ativos nas condições experimentais utilizadas.

7m) possuem como característica estrutural comum o tamanho da cadeia carbônica lateral do anel triazólico, que é comparativamente maior que a do composto **6n**.

Para a linhagem HL60, verifica-se que todos os compostos foram capazes de inviabilizar o crescimento celular, apresentando valores de IC₅₀ abaixo de 100 μmol L⁻¹. No entanto, dentre os cinco compostos investigados, o composto **6n** foi o de maior atividade, apresentando valor de IC₅₀ igual a 70,74 μmol L⁻¹. Para a linhagem Nalm6, observa-se que os compostos mais ativos, **6n** e **7m**, possuem como característica estrutural comum a presença do grupo 3-bromofenila. O composto **6n**, que possui menor comprimento da cadeia alifática conectando a porção eugenol à porção triazólica, apresentou maior efeito citotóxico contra esta linhagem celular (IC₅₀ igual a 66,30 μmol L⁻¹). Por último, em relação à linhagem celular B16F10, a qual é refratária ao tratamento quimioterápico em geral,²⁴ observa-se que apenas o composto **7a** foi capaz de diminuir a viabilidade celular, caracterizando-se como derivado triazólico do eugenol que apresentou atividade citotóxica contra as três linhagens celulares investigadas.

CONCLUSÃO

A conversão do eugenol em derivados contendo porções 1,2,3-triazólicas e avaliação da citotoxicidade destes resultou na identificação de cinco derivados que significativamente reduziram a viabilidade da linhagem leucêmica mieloide HL60. A subsequente avaliação destes derivados mais ativos mostrou que três deles apresentaram atividade contra a linhagem leucêmica linfóide Nalm6 enquanto que apenas um derivado apresentou citotoxicidade contra a linhagem de melanoma metastático murino B16F10. Embora as atividades descritas sejam moderadas, acredita-se que derivados triazólicos do eugenol possam representar uma classe de compostos a serem explorados visando à obtenção de novos agentes quimioterápicos contra o câncer. Estudos neste sentido estão em andamento em nossos laboratórios.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Espetros de RMN, no IV e de massas utilizados na caracterização dos compostos estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio por intermédio do Programa de Apoio a Grupos Emergentes (PRONEM) e CEX-APQ-02957-17. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio por meio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) e pela concessão de uma bolsa de estudos (PARG).

REFERÊNCIAS

- Balanchandran, P.; Govindarajan, R.; *Pharmacol. Res.* **2005**, *51*, 19.
- <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>, acessada em Fevereiro de 2018.
- De Araujo, M. E. M. B.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Francisco, Brasil, 2012.
- Costa-Lotufo, L. V.; Montenegro, R. C.; Alves, A. P. N. N.; Madeira, S. V. F.; Pessoa, C.; Moraes, M. E. A.; Moraes, M. O.; *Rev. Virtual Quim.* **2010**, *2*, 47.
- Huang, Z.; Tong, Y.; Wang, J.; Hang, Y.; *Cancer Cell Int.* **2003**, *3*, 5.
- Ghorab, M. M.; Al-Said, M.; *Arch. Pharm. Res.* **2012**, *35*, 987.
- Harvey, A. L.; *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 894.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629.
- Dias, D. A.; Urban, S.; Roessner, U.; *Metabolites* **2012**, *2*, 303.
- Cheuka, P. M.; Mayoka, G.; Mutai, P.; Chibale, K.; *Molecules* **2017**, *22*, 58.
- Jaganathan, S. K.; Supriyanto, E.; *Molecules* **2012**, *17*, 6290.
- Kamatou, G. P.; Vermaak, I.; Viljoen, A. M.; *Molecules* **2012**, *17*, 6953.
- Singh, P.; Jayaramaiah, R. H.; Agawane, S. B.; Vannuruswamy, G.; Korwar, A. M.; Anand, A.; Dhaygude, V. S.; Shaikh, M. L.; Joshi, R. S.; Boppana, R.; Kulkarni, M. J.; Thulasiram, H. V.; Giri, A. P.; *Sci. Reports* **2016**, *6*, 18798.
- Yoo, C. B.; Han, K. T.; Cho, K. S.; Ha, J.; Park, H. J.; Nam, J. H.; Kil, U. H.; Lee, K. T.; *Cancer Lett.* **2005**, *225*, 41.
- Perrin, D. D.; Armarego, W. L.; *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed., Butterworth-Heinemann Ltd.: Londres, 1988, p. 340.
- Tiew, K.-C.; Dou, D.; Teramoto, T.; Lai, H.; Alliston, K. R.; Lushington, G. H.; Padmanabhan, R.; Groutas, W. C.; *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1213.
- Borgati, T. F.; Alves, R. B.; Teixeira, R. R.; Freitas, R. P.; Perdigão, T. G.; Silva, S. F.; Santos, A. A.; Bastidas, A. J. O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 953.
- Meldal, M.; Tornøe, C. W.; *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952.
- Hein, J. E.; Fokin, V. V.; *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302.
- Moses, J. E.; Moorhouse, A. D.; *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249.
- Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V.; *Science* **2013**, *340*, 457.
- Wu, P.; Fokin, V. V.; *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7.
- Tatman, D.; Mo, H.; *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 129.



Considerando as atividades citotóxicas da vanilina e dos compostos 1,2,3-triazólicos, bem como a similaridade estrutural entre o eugenol e a vanilina já mencionados, descreve-se neste capítulo a avaliação da citotoxicidade dos compostos **6a-6k** e **7a-7k** (Esquema 2.4, pg. 70), contra as linhagens B16F10 (melanoma metastático murino), Jurkat ((leucemia linfoblástica aguda T–LLA-T) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama).

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Generalidades

O ensaio de avaliação da citotoxicidade dos compostos triazólicos derivados da vanilina **6a-6k** e **7a-7k** foram realizados em colaboração com o Dr. Raoni Pais Siqueira, Dra. Graziela Domingues de Almeida Lima e o professor Dr. Gustavo Costa Bressan do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

4.2.2. Linhagens celulares e cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho foram: B16F10 (melanoma metastático murino), Jurkat ((leucemia linfoblástica aguda T – LLA-T) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama). A linhagem B16F10 e Jurkat foram gentilmente cedida pela Dra. Anésia Aparecida dos Santos (Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais) e a linhagem MDA-MB-231 foi gentilmente cedida por Dra. Sandra Martha Gomes Dias (Laboratório Nacional de Biotecnologia, Campinas, São Paulo, Brasil). Para o cultivo utilizou-se meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium*, Sigma) pH 7,2 suplementado com 100 U mL⁻¹ de penicilina (Sigma), 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina (Sigma) e 10% v v⁻¹ de soro fetal bovino (SFB, LGC Bio). As células foram crescidas em suspensão utilizando garrafas de 75, 150 e 300 cm², mantidas sob atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO₂.

4.2.3. Avaliação da atividade citotóxica pelo método MTT

Os compostos derivados da vanilina, assim como a vanilina comercial, foram submetidos a ensaios biológicos para avaliar suas atividades citotóxicas contra as linhagens B16F10 (melanoma metastático murino), Jurkat ((leucemia linfoblástica aguda T – LLA-T) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama). As

atividades citotóxicas dos compostos foram avaliadas empregando o método MTT, que consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal amarelo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) no produto de coloração azul formazan (Figura 4.4) pela atividade da enzima succinildesidrogenase presente na mitocôndria e no citoplasma da célula viável, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983; BERNAS E DOBRUCKI, 2002).

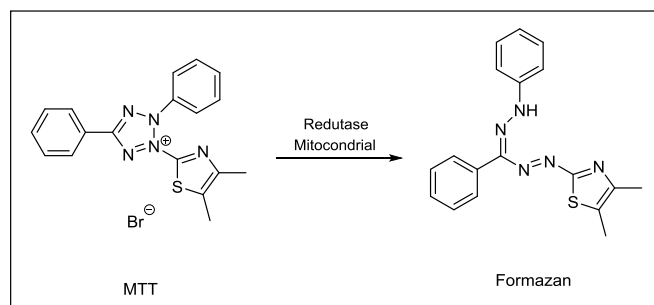


Figura 4.4. Conversão do sal MTT no produto formazan.

Para avaliação da atividade citotóxica dos compostos, as células foram contadas em câmaras de *neubauer*, ressuspensas em meio RPMI 1640 (10% v v⁻¹ SFB, 100 U mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina) e incubadas em placa de 96 poços de fundo chato, na densidade de 10.000 células/poço (B16F10) e 25.000 célula/poço (MDA-MB-231), mantidas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂ para adaptação das células. Os compostos foram avaliados na concentração de 100 µmol L⁻¹ por 48 e 72 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂. Como veículo foi utilizado o solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração 0,4% v v⁻¹. Para verificação do efeito citotóxico, foi adicionado a cada poço 10 µL do reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, MTT (Sigma Aldrich) na concentração de 5 mg mL⁻¹ e incubou-se novamente a 37 °C por 4 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi removido, o formazan foi ressuspendido em 100 µL de DMSO e a leitura de absorvância no comprimento de onda de 540 nm foi realizada em leitora automática de microplacas (Biotek Sinergy HT). Para os cálculos da viabilidade e preparo dos gráficos utilizaram-se os programas Microsoft Excel e *Prism5*.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos **1**, **2**, **3**, **6a-6k**, **7a-7k** foram submetidos a ensaios biológicos para a avaliação de suas atividades citotóxicas em linhagens celulares B16F10 (melanoma metastático murino) e Jurkat (leucemia linfoblástica aguda T – LLA-T). A atividade citotóxica sobre a linhagem MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) foi avaliada apenas para os compostos **1**, **2**, **6a-6k** devido à dificuldade de crescimento das células cancerígenas no laboratório. Os compostos foram avaliados na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 48 e 72 h e os resultados obtidos para a viabilidade celular das linhagens avaliadas estão apresentados nas Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 (pgs. 156-158) e na Figura 4.5 (pg. 159).

Tabela 4.1. Viabilidade celular (%) da linhagem B16F10 quando exposta aos compostos **1**, **2**, **3**, **6a-6k** e **7a-7k** após 48 e 72 horas de tratamento (média±desvio padrão).

Compostos	Concentração 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	
	48 h	72 h
1	105,22 ± 22,56	79,35 ± 5,96
2	77,46 ± 1,76	74,47 ± 1,44
3	117,86 ± 14,97	88,43 ± 2,92
6a	69,25 ± 4,88	53,87 ± 0,52
6b	86,30 ± 16,53	82,07 ± 8,78
6c	77,47 ± 7,16	63,19 ± 4,75
6d	70,50 ± 14,38	68,66 ± 0,48
6e	52,47 ± 7,20	32,90 ± 1,85
6f	59,73 ± 3,45	50,40 ± 3,61
6g	95,75 ± 13,36	71,87 ± 2,50
6h	70,87 ± 17,54	65,87 ± 1,31
6i	80,23 ± 9,25	67,77 ± 0,56
6j	62,07 ± 3,39	46,83 ± 6,20
6k	95,83 ± 24,24	68,04 ± 4,82
7a	76,32 ± 6,07	117,12 ± 21,11
7b	102,45 ± 0,76	91,25 ± 2,07
7c	87,50 ± 18,82	86,73 ± 2,92
7d	96,85 ± 8,31	88,66 ± 0,75
7e	88,39 ± 0,85	126,90 ± 40,01
7f	93,92 ± 7,09	92,66 ± 4,11
7g	81,82 ± 19,35	91,70 ± 7,14
7h	93,35 ± 0,10	88,87 ± 2,72
7i	76,15 ± 2,29	106,47 ± 14,63
7j	91,54 ± 3,13	93,64 ± 8,93
7k	93,31 ± 1,88	89,29 ± 4,37

Tabela 4.2. Viabilidade celular (%) da linhagem Jurkat quando exposta aos compostos **1**, **2**, **3**, **6a-6k** e **7a-7k** após 48 e 72 horas de tratamento (média±desvio padrão).

Compostos	Concentração 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	
	48 h	72 h
1	93,41 \pm 3,63	90,92 \pm 9,63
2	49,85 \pm 3,22	94,53 \pm 3,57
3	60,46 \pm 8,71	84,70 \pm 13,70
6a	60,21 \pm 9,66	85,90 \pm 4,54
6b	63,97 \pm 15,66	72,12 \pm 6,76
6c	64,24 \pm 20,99	84,09 \pm 10,35
6d	74,80 \pm 9,76	90,26 \pm 10,39
6e	95,65 \pm 6,26	77,38 \pm 1,08
6f	75,62 \pm 3,41	128,75 \pm 29,80
6g	77,66 \pm 12,59	84,07 \pm 12,31
6h	55,91 \pm 9,91	56,53 \pm 6,01
6i	82,57 \pm 3,77	78,84 \pm 4,28
6j	36,43 \pm 11,69	49,74 \pm 6,50
6k	98,19 \pm 12,84	62,31 \pm 0,50
7a	79,22 \pm 6,39	68,17 \pm 2,12
7b	54,88 \pm 9,92	89,60 \pm 3,26
7c	56,83 \pm 9,70	74,71 \pm 13,16
7d	70,42 \pm 11,16	92,60 \pm 8,95
7e	36,79 \pm 9,30	24,48 \pm 6,47
7f	58,27 \pm 8,37	48,32 \pm 3,69
7g	73,37 \pm 4,85	69,73 \pm 5,59
7h	49,49 \pm 6,86	72,61 \pm 10,12
7i	78,58 \pm 7,69	73,82 \pm 10,99
7j	58,76 \pm 5,52	81,26 \pm 4,44
7k	85,27 \pm 4,34	98,54 \pm 4,48

Tabela 4.3. Viabilidade celular (%) da linhagem MDA-MB-231 quando exposta aos compostos **1**, **2** e **6a-6k** após 48 e 72 horas de tratamento (média \pm desvio padrão).

Compostos	Concentração 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	
	48 h	72 h
1	82,66 \pm 2,19	91,06 \pm 3,80
2	97,53 \pm 13,43	90,83 \pm 2,53
6a	75,01 \pm 8,03	90,10 \pm 6,21
6b	99,83 \pm 7,45	105,22 \pm 16,53
6c	92,25 \pm 5,01	114,49 \pm 8,72
6d	91,89 \pm 2,61	109,45 \pm 6,07
6e	81,85 \pm 2,69	84,50 \pm 7,35
6f	94,41 \pm 9,76	96,50 \pm 0,98
6g	69,76 \pm 10,62	104,59 \pm 7,11
6h	69,18 \pm 6,07	85,92 \pm 8,33
6i	91,78 \pm 6,98	96,43 \pm 3,26
6j	77,41 \pm 2,07	63,56 \pm 4,92
6k	79,52 \pm 10,02	100,81 \pm 7,96

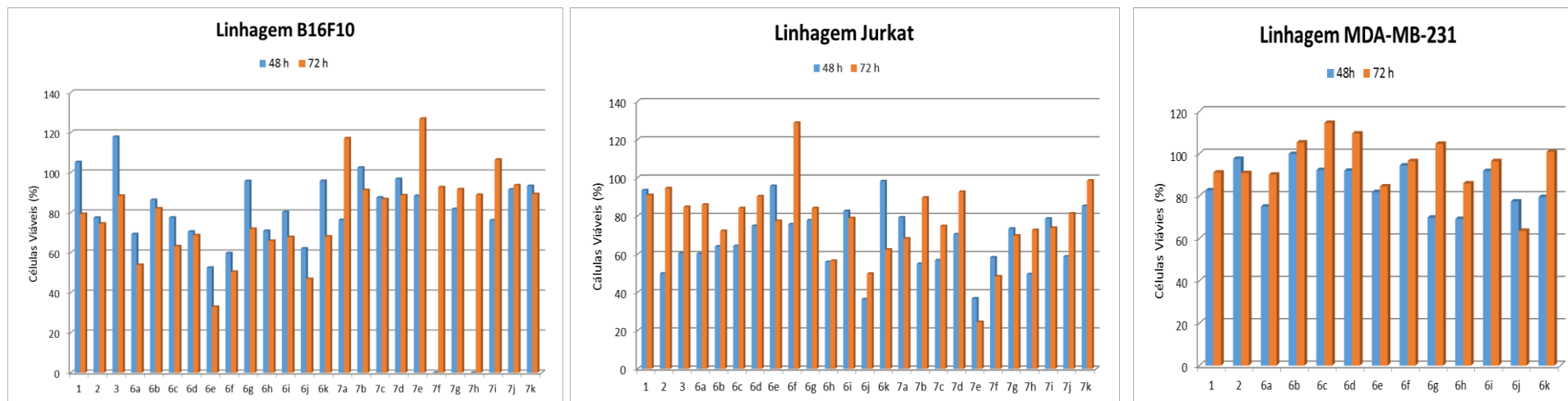


Figura 4.5. Viabilidade celular das linhagens B16F10, Jurkat e MDA-MB-231 após 48 e 72 horas de tratamento com os compostos **1, 2, 3, 6a-6k e 7a-7k** na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Os resultados obtidos mostram que os compostos **6a**, **6e**, **6f** e **6j** (Tabela 4.1, pg. 156; Figura 4.5, pg. 159), apresentaram atividades citotóxicas mais efetivas contra a linhagem B16F10. Após 48 h de tratamento, os compostos supracitados, foram capazes de inibir a viabilidade celular entre aproximadamente 30%-50%. Além disso, para o período de 72 h de tratamento, as mesmas substâncias tiveram os efeitos citotóxicos ainda mais pronunciados, inibindo a viabilidade celular em cerca de 50%-70%. Dentre estes compostos mais ativos destaca-se o composto **6e**, o qual reduziu a viabilidade celular da linhagem B16F10 em aproximadamente 70%.

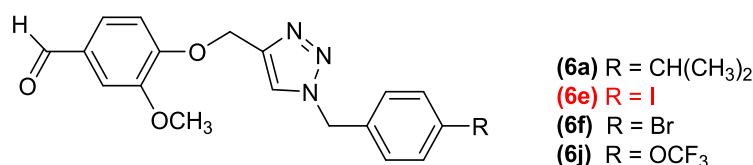


Figura 4.6. Compostos triazólicos mais ativos contra a linhagem B16F10 na concentração 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 48 e 72 horas de tratamento.

Analisando os resultados obtidos para a linhagem Jurkat (Tabela 4.2, pg. 157; Figura 4.5, pg. 159) verificou-se que os compostos **6j**, **7e** e **7j** apresentaram as melhores atividades citotóxicas quando comparado aos demais, inibindo a viabilidade celular entre 40%-65% após 48 h de tratamento e 50%-75% após 72 h. No entanto, o composto **7e** foi a substância mais promissora sendo capaz de inibir em aproximadamente 65% das células cancerígenas após 48 h de tratamento e 75% após 72 h.

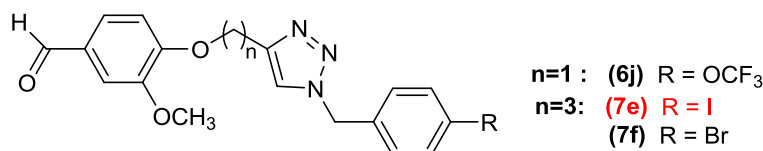


Figura 4.7. Compostos triazólicos mais ativos contra a linhagem Jurkat na concentração 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 48 e 72 horas de tratamento.

Por fim, os resultados obtidos mostram que os compostos **6a-6k**, de modo geral, não apresentaram eficácia em inibir a viabilidade da linhagem celular MDA-MB-231 (Tabela 4.3, pg. 158; Figura 4.5, pg. 159). Exceção a esta generalização é a substância **6j** (Figura 4.8, pg. 161) que reduziu a viabilidade celular em cerca

de 40% após 72 h de tratamento. Cabe salientar que este composto também reduziu significativamente a viabilidade celular das células B16F10 após 72 h (cerca de 60% de inibição de viabilidade celular) e das células Jurkat (aproximadamente 65% de inibição após 48h e 50% após 72 h).

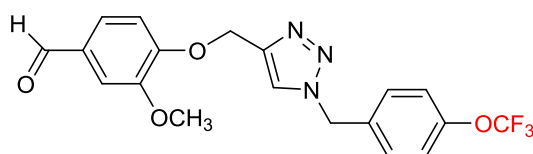


Figura 4.8. Composto triazólico mais ativo contra a linhagem MDA-MB-231 na concentração $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ após 72 horas de tratamento.

Cumprе ressaltar que os dados contra as linhagens testadas confirmam que a modificação da vanilina (1) em derivados 1,2,3-triazólicos resultou em compostos, **6a**, **6e**, **6f**, **6j**, **7e** e **7f**, que apresentaram maior eficácia com respeito à inibição da viabilidade celular. Outro fato a ser mencionado é a característica comum dos substituintes trifluorometoxi e dos átomos de iodo e bromo, sugerindo que a presença destes é um fator importante para potencializar a atividade citotóxica dos compostos avaliados.

4.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNAS, T.; DOBRUCKI, J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC -1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, v. 47, p. 236-242, 2002.
- BEZERRA, D. P.; SOARES, A. K.N.; DE SOUSA, D.P. Overview of the Role of Vanillin on Redox Status and Cancer Development. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 1-9, 2016.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68,, p. 394-424, 2018.
- BYRNE, J. D.; YEH, J. J.; DESIMONE, J. M. Use of iontophoresis for the treatment of cancer. *Journal of Controlled Release*, v. 284, p. 144-151, 2018.
- CHENG, W. Y.; HSIANG, C. Y.; BAU, D. T.; CHEN, J. C.; SHEN, W. S.; LI, C. C.; LO, H. Y.; WU, S. L.; CHIANG, S. Y.; HO, T. Y. Microarray analysis of vanillin-regulated gene expression profile in human hepatocarcinoma cells. *Pharmacological Research*, v. 56, p. 474–482, 2007.

- COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da universidade federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, v. 2, p. 47-58, 2010.
- DE ARAUJO, M. E. M. B. Avaliação das atividades antioxidante e antiproliferativa da rutina e seus produtos obtidos por hidrólise enzimática. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de São Francisco, Bragança Paulista, 2012.
- DE CARVALHO, N. C. Avaliação da atividade antineoplásica do extrato etanólico da própolis G6 Baiana. Dissertação (Mestrado-Biotecnologia) – Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.
- GAZOLLA, P. A. R.; TEIXEIRA, R. R.; DA SILVA, A. M.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; SIQUEIRA, R. P.; GONÇALVES, V. H. S.; PEREIRA, H. S.; BRESSAN, G. C. Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. *Química Nova*, v. 41, p. 497-506, 2018.
- GHORAB, M. M.; AL-SAID, M. Anticancer activity of novel indenopyridine derivatives. *Archives of Pharmacal Research*, v. 35, p. 987-994, 2012.
- GU, M. M.; LI, M.; GAO, D.; LIU, L. H.; LANG, Y.; YANG, S. M.; OU, H.; HUANG, B.; ZHOU, P. K.; SHANG, Z. F. The vanillin derivative 6 bromine-5-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde induces aberrant mitotic progression and enhances radio-sensitivity accompanying uppression the expression of PLK1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 348, p. 76-84, 2018.
- HO, K. L.; YAZAN, L. S.; ISMAIL, N.; ISMAIL, M. Apoptosis and cell cycle arrest of human colorectal cancer cell line HT-29 induced by vanillin. *Cancer Epidemiology*, v. 33, p. 155–160, 2009.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Ministério da saúde. *Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2019.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, p. 55-63, 1983.
- OLIVEIRA, M. M.; MALTA, D. C.; GUAUCHE, H.; MOURA, L.; AZEVEDO E SILVA, G. Estimated number of people diagnosed with cancer in Brazil: data from the National Health Survey, 2013. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 18, p. 146-157, 2015.
- ROSAS, M. S. L.; SILVA, B. N. M.; PINTO, R. G. M. P.; SILVA, B. V.; SILVA, R. A.; GUERRA, L. R.; SOARES, G. C. M. T.; CASTRO, H. C.; LIONE, V. O. F. Incidência do câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental. *Revista Virtual de Química*, v. 5, p. 243-265, 2013.

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA DOS DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO

5.1. INTRODUÇÃO

Os fungos são micro-organismos pertencentes ao reino Fungi, onipresentes na natureza, vivendo em quase todos os ambientes terrestres e apresentando uma grande variação de formas e tamanhos (OLIVEIRA, 2014).

Estima-se a existência de dois milhões de espécies de fungos, os quais são utilizados na conservação e preparação de alimentos, obtenção de metabólitos ativos como a Penicilina, e em diversas áreas biotecnológicas. No entanto, apesar dos benefícios de algumas espécies, cerca de 600 delas são patogênicas, causando danos à saúde do homem, das plantas ou de animais (BENNETT, 1998; GHORAI *et al.*, 2009; LIFE, 2020).

As principais causas da incidência e prevalência das infecções fúngicas no mundo estão associadas às características socioeconômicas, geo-ecológicas e o crescente número de pessoas susceptíveis ao contágio das infecções. Logo, a mortalidade relacionada às doenças fúngicas, acima de 1,5 milhão, é semelhante à da tuberculose e três vezes superior à da malária (BONGOMIN *et al.*, 2017).

As infecções fúngicas são subdivididas em cinco grupos, sendo as infecções mais graves oriundas de outros problemas de saúde, como asma, AIDS, câncer, transplante e terapias com corticosteróides (LIFE, 2020). As infecções são agrupadas da seguinte forma:

- Infecções fúngicas invasivas (frequentemente fatais): especialmente meningite criptocócica, aspergilose invasiva, infecção da corrente sanguínea por *Candida*, pneumonia por *Pneumocystis*;
- Infecção pulmonar crônica ou tecido profundo: especialmente aspergilose pulmonar crônica;
- Doença fúngica alérgica: especialmente aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), asma grave com sensibilização por fungos (SAFS);
- Infecção da mucosa: especialmente candidíase oral e esofágica, vaginite por *Candida*;

- Infecção da pele, cabelos e unhas: especialmente micose, tinea capitis, pé de atleta, onicomicose.

Existem quatro classes de fármacos utilizados para o tratamento de doenças fúngicas: azóis, polienos, equinocandinas, e análogos de pirimidina. Dentre todas as classes, os azóis e o fármaco de referência da classe dos polienos, a anfotericina B, são os antifúngicos mais empregados devido ao grande espectro de ação e fácil administração (CAMPOY e ADRIO, 2017).

A anfotericina B (Figura 5.1) é obtida de fontes naturais e embora apresente o maior espectro de ação antifúngica é extremamente tóxica, sendo relacionada com frequência à disfunção renal. Alguns efeitos colaterais, como náusea e tremores, ocorrem devido à infusão; porém, outros efeitos adversos estão associados à sua capacidade de ligação com o colesterol e outros constituintes da membrana de células humanas. Devido à sua estrutura anfifílica, atua formando um complexo com o ergosterol, produzindo poros que alteram a permeabilidade da membrana celular, o que permite o vazamento do conteúdo citoplasmático e causando a lise celular do fungo (FILIPPIN e SOUZA, 2006; SHENG e ZHANG, 2011; CAMPOY e ADRIO, 2017).

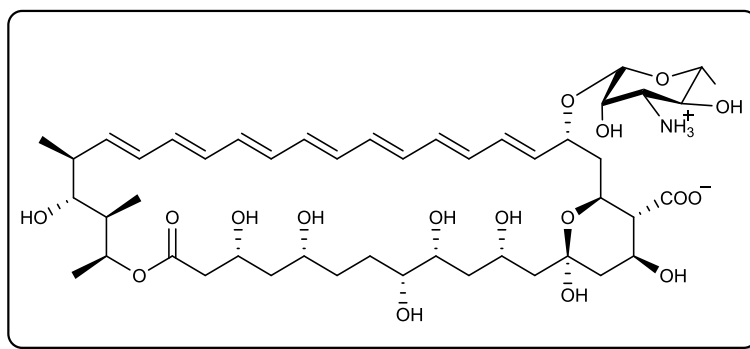


Figura 5.1. Estrutura da anfotericina B.

O principal mecanismo de ação dos fármacos azólicos (Figura 5.2, pg. 165) é a inibição da biossíntese do ergosterol, que é fundamental para a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos fungos. Os azóis são menos tóxicos e possuem boa disponibilidade oral, porém seu uso prolongado favorece o surgimento de espécies fúngicas resistentes a estes compostos (NOBRE *et al.*, 2002; KATHIRAVAN *et al.*, 2012).

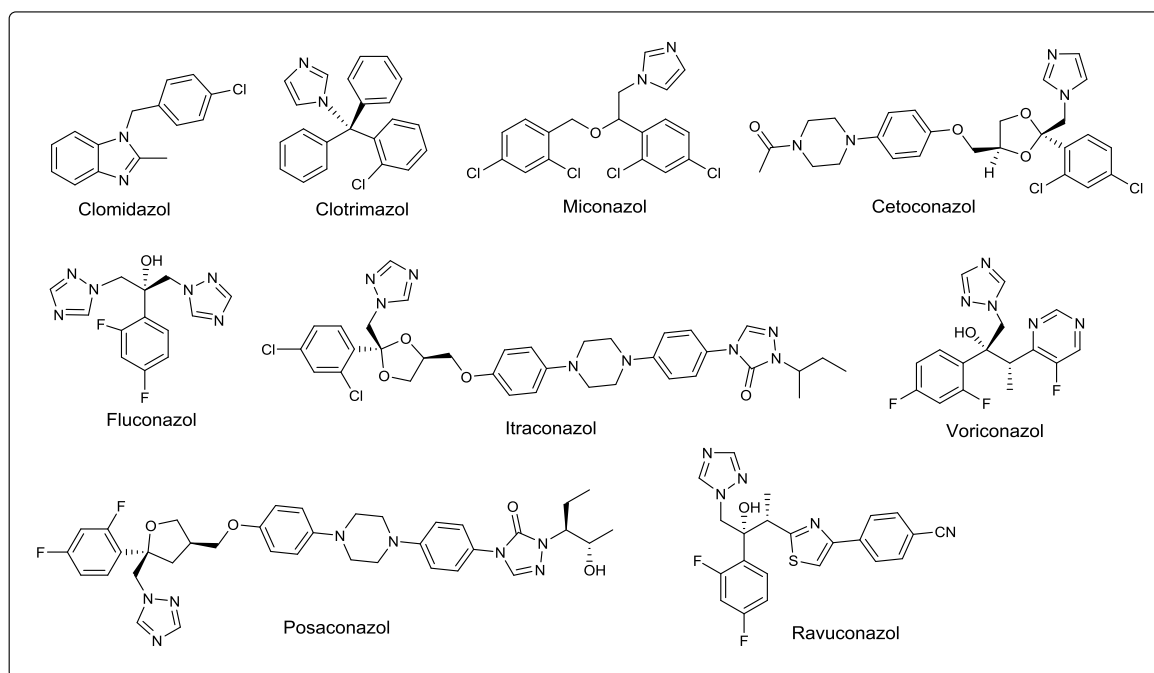


Figura 5.2. Estruturas dos principais fármacos azólicos.

As infecções fúngicas têm se mostrado um grande desafio para o diagnóstico e tratamento devido à pouca disponibilidade de fármacos eficazes e que não sejam nocivos aos pacientes. Estudos para o desenvolvimento de novos compostos bioativos são fundamentais, principalmente, diante dos riscos inerentes ao surgimento de novas espécies patogênicas e da crescente resistência dos fungos aos fármacos de primeira escolha. Neste contexto, destaca-se a utilização dos produtos naturais, tal como a vanilina objeto de investigação deste trabalho, como fonte de substâncias para o desenvolvimento de novos princípios ativos para o tratamento de infecções provocadas por fungos (PERLIN *et al.*, 2017).

Kim e colaboradores (2014) investigaram as atividades antifúngicas da vanilina e de 33 derivados desta contra o patógeno *Cryptococcus neoformans*. Embora a vanilina tenha apresentado valor de concentração inibitória mínima (CIM) relativamente elevada (CIM >128,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sugerindo atividade antifúngica mínima, dentre os derivados avaliados o 2-hidroxi-3-metoxibenzaldeído e o 3-etoxi-2-hidrobenzaldeído (Figura 5.3, pg. 166) apresentaram elevada atividade antifúngica contra *C. neoformans* com CIM igual 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, inferior ao do fármaco comercial fluconazol (CIM = 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

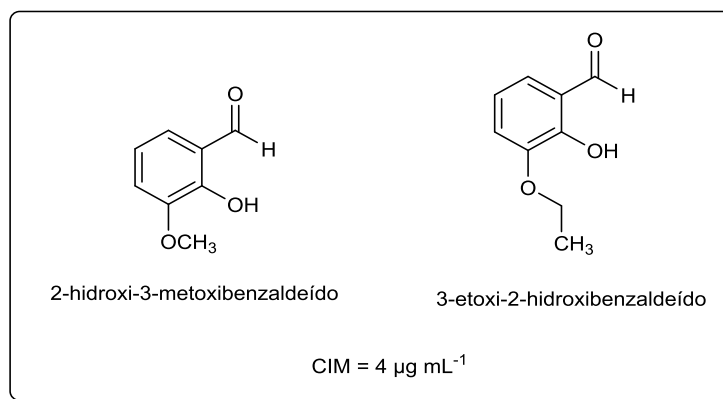


Figura 5.3. Derivados da vanilina que apresentaram elevada atividade antifúngica contra *C. neoformans*.

Considerando as atividades antifúngicas dos fármacos azólicos já existentes bem como da vanilina, e levando-se em conta ainda a necessidade de obtenção de novas moléculas que possam ser utilizadas como modelos para o desenvolvimento de novos antifúngicos, mais eficientes e menos tóxicos aos pacientes infectados, descreve-se neste capítulo os resultados da avaliação da atividade fungicida dos derivados triazólicos da vanilina **6a-6k** e **7a-7k** contra as linhagens fúngicas *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale*.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Generalidades

O ensaio de avaliação da atividade fungicida dos compostos **1**, **2**, **3**, **6a-6k** e **7a-7k** foram realizados pelo Dr. Daniel de Assis Santos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os micro-organismos utilizados são linhagens de referência de leveduras e fungos filamentosos pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG. As leveduras utilizadas foram *Candida albicans* SC5314, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida parapsilosis* ATCC 20019, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* H99 e *Cryptococcus gattii* R265. As linhagens de fungos filamentosos utilizadas foram *Trichophyton rubrum* ATCC 28189 e *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533.

Os micro-organismos foram crescidos previamente a cada ensaio. As leveduras foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD, Acumedia, São Paulo, Brasil) e incubadas a 37 °C por 48 horas. Os fungos filamentosos, por sua vez, foram cultivados em placas em Petri contendo Ágar Batata Dextrose (ABD, Acumedia) que foram incubadas a 28 °C por 7 dias.

5.2.2. Avaliação da atividade antifúngica dos compostos

A avaliação da sensibilidade dos micro-organismos frente aos compostos **6a-6k** e **7a-7k** foi realizada por meio do método de microdiluição em caldo proposto pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Os ensaios foram realizados com base nos documentos M38-A2 e M27-A3 para fungos filamentosos e leveduras, respectivamente (CLSI, 2008b; CLSI, 2008a).

5.2.3. Diluição dos compostos

Inicialmente, foram preparadas soluções-estoque na concentração de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada um dos compostos em DMSO. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em meio sintético RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) tamponado para pH 7,0 com ácido morfolino-propano-sulfônico (MOPS, Sigma-Aldrich) 0,165 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de forma que, ao final, fossem obtidas concentrações dos compostos que variassem de 512,0 a 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No ensaio com fungos filamentosos, o meio RPMI 1640 foi suplementado com 2% m v^{-1} de glicose (CLSI, 2008b).

Na sequência, alíquotas de 100 μL de cada diluição seriada foram distribuídas nos orifícios de placas de microdiluição de 96 poços de fundo chato. O experimento foi realizado em duplicata.

5.2.4. PREPARO DO INÓCULO

Leveduras

O inóculo fúngico de leveduras foi preparado a partir de culturas de *C. albicans* SC5314, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. parapsilosis* ATCC 20019, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* H99 e *C. gattii* R265 previamente incubadas a 37 °C, por 48 horas em placas de Petri contendo ASD. Para cada micro-

organismo, a massa de células foi recolhida assepticamente e suspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina estéril (0,85% m v⁻¹). Após homogeneização em vórtex, a transmitância foi medida em espectrofotômetro a 530 nm, sendo ajustada para 75% a 77%, o que corresponde a uma suspensão de 1 x 10⁶ a 5 x 10⁶ células mL⁻¹.

A suspensão obtida foi homogeneizada em vórtex durante 15 segundos e diluída em meio RPMI 1640 nas proporções 1:50 e em seguida 1:20. Alíquotas de 100 µL do inóculo foram dispensadas em placas contendo os compostos, resultando em uma concentração de 5 x 10² a 2,5 x 10³ células mL⁻¹ (CLSI, 2008a). As placas foram incubadas à 37 °C por 72 horas.

Fungos filamentosos

O inóculo fúngico de fungos filamentosos foi preparado a partir de culturas de *T. rubrum* ATCC 28189 e *T. interdigitale* ATCC 9533 incubadas a 28 °C, por 7 dias em tubos contendo ABD inclinado para a produção de conídios. As colônias de fungos foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril (0,85% m v⁻¹) acrescida de 1% de Tween 80 para obtenção de uma suspensão. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e a mistura de fragmentos de conídios e hifas filtrada em filtro (tamanho dos poros: 14 µm), que reteve os fragmentos de hifas e permitiu apenas a passagem de conídios. As densidades das suspensões foram ajustadas em espectrofotômetro a 520 nm e uma transmitância de 70 a 72%, a qual corresponde à concentração de 2 X 10⁶ a 4 X 10⁶ conídios mL⁻¹ (SANTOS e HAMDAN, 2005).

A suspensão-padrão fúngica foi homogeneizada durante 15 segundos em vórtex, diluída na proporção 1:50 com o meio RPMI 1640, para se obter o inóculo 2X concentrado (4 x 10⁴ a 8 x 10⁴ UFC mL⁻¹). O inóculo (2X) foi diluído a 1:1 quando inoculados, chegando-se à concentração final desejada (2 x 10⁴ a 4 x 10⁴ UFC mL⁻¹). Alíquotas de 100 µL do inóculo foram dispensadas em placas contendo os compostos. As placas foram incubadas à 28 °C por 7 dias.

5.2.5. Leitura e interpretação da concentração inibitória mínima (CIM)

A leitura foi realizada pela observação visual da inibição de crescimento em cada poço e comparada com o crescimento observado no poço do controle positivo (inóculo fúngico na ausência do antifúngico ou dos compostos testados)

(CLSI, 2008a). Além disso, um controle de esterilidade do meio RPMI 1640 foi incluído em cada placa.

Para os compostos, a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração que inibiu 100% do crescimento microbiano após o tempo de incubação. Como controle positivo de inibição de crescimento foi utilizado o antifúngico itraconazol (Sigma-Aldrich) para os fungos filamentosos e a anfotericina B (Sigma-Aldrich) para as leveduras. Os antifúngicos foram diluídos em concentrações seriadas que variaram entre 2 e 0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para o itraconazol, a CIM foi considerada como sendo a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico. Já para a anfotericina B, a CIM foi considerada como a menor concentração capaz de inibir 100% desse crescimento (CLSI, 2008a).

5.2.6. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Após a determinação da CIM dos compostos frente as linhagens fúngicas testadas, foi determinada a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico. Para tanto, alíquotas de 50 μL foram removidas dos poços onde não houve crescimento visível e subcultivadas em ABD para fungos filamentosos ou ASD para leveduras. A incubação das placas contendo leveduras se deu a 37 °C por 48 horas, enquanto a placas contendo fungos filamentosos foram incubadas a 28 °C por 7 dias. (OBANDO *et al.*, 2009). As amostras foram semeadas em placas de Petri em duplicata.

A concentração fungicida mínima (CFM) foi definida como a menor concentração do composto em que nenhuma colônia foi observada após o período de incubação (OBANDO *et al.*, 2009).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade fungicida dos compostos **1**, **2**, **3**, **6a-6k** e **7a-7k** estão apresentados na Tabela 5.1 (Concentração inibitória mínima (CIM), pg. 170), Tabela 5.2 (Concentração fungicida mínima (CFM), pg. 171) e Tabela 5.3 (Razão entre a concentração fungicida mínima (CFM) e concentração inibitória mínima (CIM), pg. 172).

Tabela 5.1. Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos 1, 2, 3, 6a-6k e 7a-7k frente às linhagens fúngicas avaliadas após o tempo de incubação.

	CIM (µg/mL)							
	<i>Cryptococcus gattii</i> R265	<i>Cryptococcus neoformans</i> H99	<i>Candida albicans</i> SC5314	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i> 20019	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i> 9533	<i>Trichophyton rubrum</i> 28189
1	128	64	256	256	256	256	128	128
2	64	64	256	256	256	256	64	64
3	64	64	256	256	256	256	64	64
6a	128	64	> 512	256	> 512	128	64	64
6b	32	64	128	> 512	> 512	> 512	128	128
6c	128	128	> 512	> 512	> 512	> 512	128	128
6d	64	64	256	256	256	256	128	128
6e	128	64	> 512	> 512	> 512	> 512	128	128
6f	64	64	> 512	> 512	> 512	> 512	128	128
6g	128	128	> 512	> 512	> 512	> 512	128	128
6h	64	128	> 512	> 512	> 512	> 512	128	128
6i	128	128	256	256	256	256	128	128
6j	128	64	> 512	> 512	> 512	> 512	128	128
6k	128	128	256	256	256	128	128	128
7a	128	128	> 512	> 512	> 512	> 512	128	> 512
7b	128	128	256	> 512	512	256	128	128
7c	64	64	256	256	256	256	64	64
7d	64	64	256	256	256	256	64	64
7e	64	128	256	256	256	256	64	64
7f	32	64	256	256	256	256	64	64
7g	32	64	256	256	256	256	128	128
7h	64	64	256	256	256	256	64	128
7i	128	64	256	256	256	256	128	64
7j	128	64	128	> 512	> 512	128	128	128
7k	64	64	256	256	256	128	64	64
AMB*	0,25	0,50	1,00	1,00	0,50	1,00	-	-
ITZ**	-	-	-	-	-	-	0,25	0,25

*Anfotericina B utilizado como controle positivo para as leveduras.

** Itraconazol utilizado como controle positivo para os fungos filamentosos.

Tabela 5.2. Concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos 1, 2, 3, 6a-6k e 7a-7k frente às linhagens fúngicas avaliadas.

	CFM (µg/mL)							
	<i>Cryptococcus gattii</i> R265	<i>Cryptococcus neoformans</i> H99	<i>Candida albicans</i> SC5314	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i> 20019	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i> 9533	<i>Trichophyton rubrum</i> 28189
1	128	256	512	256	> 512	256	> 512	> 512
2	64	128	256	256	> 512	256	> 256	> 256
3	256	256	256	256	> 512	256	> 256	128
6a	256	256	-	256	-	256	> 256	> 256
6b	> 128	128	256	-	-	-	> 512	> 512
6c	128	256	-	-	-	-	> 512	> 512
6d	64	256	512	256	512	256	> 512	512
6e	256	256	-	-	-	-	> 512	> 512
6f	256	256	-	-	-	-	> 512	> 512
6g	256	256	-	-	-	-	512	> 512
6h	64	256	-	-	-	-	> 512	> 512
6i	256	256	256	256	> 512	256	> 512	> 512
6j	128	128	-	-	-	-	> 512	> 512
6k	256	256	256	256	> 512	256	> 512	> 512
7a	128	256	-	-	-	-	> 512	-
7b	128	128	256	-	> 512	256	> 512	> 512
7c	64	256	256	256	> 512	256	> 256	> 256
7d	64	128	256	256	512	256	> 256	> 256
7e	256	128	256	512	256	256	256	256
7f	> 128	256	256	256	> 512	256	256	> 256
7g	128	128	512	256	> 512	512	> 512	512
7h	64	256	256	256	512	256	> 256	512
7i	256	256	256	256	> 512	256	> 512	256
7j	256	128	512	-	-	128	> 512	> 512
7k	256	256	256	256	512	256	> 256	> 256
AMB*	0,25	0,50	1,00	1,00	0,50	1,00	-	-
ITZ**	-	-	-	-	-	-	0,25	0,25

*Anfotericina B utilizado como controle positivo para as leveduras.

** Itraconazol utilizado como controle positivo para os fungos filamentosos.

Tabela 5.3. Razão entre a concentração fungicida mínima (CFM) e concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos 1, 2, 3, 6a-6k e 7a-7k frente às linhagens fúngicas avaliadas.

	CFM/CIM							
	<i>Cryptococcus gattii</i> R265	<i>Cryptococcus neoformans</i> H99	<i>Candida albicans</i> SC5314	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida parapsilosis</i> 20019	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i> 9533	<i>Trichophyton rubrum</i> 28189
1	1	4	2	1	> 2	1	> 4	> 4
2	1	2	1	1	> 2	1	> 4	> 4
3	4	4	1	2	> 2	1	> 4	2
6a	2	4	-	1	-	2	> 4	> 4
6b	> 4	2	2	-	-	-	> 4	> 4
6c	1	2	-	-	-	-	> 4	> 4
6d	1	4	2	1	2	1	> 4	4
6e	2	4	-	-	-	-	> 4	> 4
6f	4	4	-	-	-	-	> 4	> 4
6g	2	2	-	-	-	-	4	> 4
6h	1	2	-	-	-	-	> 4	> 4
6i	2	2	1	1	> 2	1	> 4	> 4
6j	1	2	-	-	-	-	> 4	> 4
6k	2	2	1	1	> 2	2	> 4	> 4
7a	1	2	-	-	-	-	> 4	-
7b	1	1	1	-	> 1	1	> 4	> 4
7c	1	4	1	1	> 2	1	> 4	> 4
7d	1	2	1	1	2	1	> 4	> 4
7e	4	1	1	2	1	1	4	4
7f	> 2	4	1	1	> 2	1	4	> 4
7g	4	2	2	1	> 2	2	> 4	4
7h	1	4	1	1	2	1	> 4	4
7i	2	4	1	1	> 2	1	> 4	4
7j	2	2	4	-	-	1	> 4	> 4
7k	4	4	1	1	2	2	> 4	> 4

Atividade Fungicida (CFM/CIM \leq 4)

Atividade Fungistática (CFM/CIM > 4)

Os compostos **1, 2, 3, 6a-6k** e **7a-7k** apresentaram, de forma geral, atividade antifúngica em concentrações inferiores a 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para as linhagens de *Candida sp.*, a CIM variou entre 256 e superior a 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para

Cryptococcus spp., a CIM dos compostos foram inferiores, com concentrações variando de 32 a 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para os fungos filamentosos, os compostos apresentaram atividade antifúngica com CIM variando entre 64 e 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nenhum dos compostos avaliados apresentou maior eficácia que os fármacos itraconazol e anfotericina B, empregados como controles positivos nos ensaios de avaliação de atividade antifúngica.

Uma substância antifúngica pode exercer um efeito fungicida ou fungistático de acordo com a sua concentração e o tempo de exposição ao microrganismo. Segundo Siddiqui e colaboradores (2013), uma forma de analisar se a substância é fungicida ou fungistática é através do cálculo da razão entre a CFM e a CIM. Para $\text{CFM/CIM} > 4$ é determinada atividade fungistática já para $\text{CFM/CIM} \leq 4$ é determinada atividade fungicida. Essa informação é importante para a análise da viabilidade terapêutica da substância, visto que indivíduos imunocompetentes podem se beneficiar de uma substância fungistática para conseguir tratar a infecção, porém, em indivíduos imunodebilitados, uma substância fungicida é a orientação terapêutica mais eficaz.

A avaliação da atividade fungicida ou fungistática indicou que a maior parte dos compostos apresentou ação fungicida para as leveduras testadas, com CFM variando de 64 a maior que 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em contrapartida, a ação desses compostos foi fungistática para os fungos filamentosos, com uma CFM que variou de 128 e maior que 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em um contexto de avaliação da ação entre as diferentes espécies de fungo, os resultados mais promissores foram para as linhagens de *Cryptococcus* e *Trichophyton*. Para *Cryptococcus spp.*, esses resultados foram ainda melhores devido ao fato dos compostos apresentarem ação fungicida.

Um outro aspecto que merece ser destacado é que a junção da vanilina a porções 1,2,3-triazólicas resultou, em alguns casos, na obtenção de derivados triazólicos que apresentaram melhor eficácia do que o produto natural. Por exemplo, na Tabela 5.2 (pg. 171) nota-se que os compostos **6d**, **6h**, **7c**, **7d** e **7h** apresentam o dobro da eficácia, comparado à vanilina, contra a espécie *Cryptococcus gattii* R265.

Embora os compostos triazólicos avaliados não tenham manifestado elevadas atividades fungicidas os resultados obtidos impulsionam a continuação de pesquisas por derivados com maior potencial antifúngico.

5.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNETT, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, v. 66, p. 101-107, 1998.
- BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.; DENNING, D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi*, v. 3, p. 1-29, 2017.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J.L. Antifungals. *Biochemical Pharmacology*, v. 133, p. 86-96, 2017.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard M27–A3 3rd edn. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, (PA). 2008a.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38–A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b.
- FILIPPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p.167-194, 2006.
- GHORAI, S; SAMUDRA, P. B.; DEEPAK, V.; SUDESHNA, C.; SOUMYA, M.; SUMAN, K. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, v. 42, p. 577-587, 2009.
- KATHIRAVAN, M. K.; SALAKE, A. B.; CHOTHE, A. S.; DUDHE, P. B.; WATODE, R. P.; MUKTA, M. S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 5678-5698, 2012.
- KIM, J. H.; LEE, H.-O.; CHO, Y.-J.; KIM, J.; CHUN, J.; CHOI, J.; LEE, Y.; JUNG, W. H. A vanillin derivative causes mitochondrial dysfunction and triggers oxidative stress in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE*, v. 9, p. e89122, 2014.
- LIFE – Leading International Fungal Education. Fungal Infections. Disponível em <<http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases>.> Acesso em 04 de janeiro de 2020.
- NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciência Rural*, v. 32, p.175-184, 2002.
- OBANDO, D.; PANTARAT, N.; HANDKE, R.; KODA, Y.; WIDMER, F.; DJORDJEVIC, J. T.; ELLIS, D.; SORRELL, T. C.; JOLLIFFE, K. A. Synthesis, antifungal, haemolytic and cytotoxic activities of a series of bis (alkylpyridinium) alkanes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 6329-6339, 2009.

- OLIVEIRA, J. C. Tópicos em Micologia Médica. Rio de Janeiro, p. 1-230 2014.
- SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 1917-1920, 2005.
- SHENG, C.; ZHANG, W. New Lead in antifungal drug discovery. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 733-766, 2011.
- SIDDIQUI, Z. N.; FAROOQ, F.; MUSTHAFA, T. N. M.; AHMAD, A.; KHAN, U. A. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 17, p.237-243, 2013.
- PERLIN, S. D.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Fungal Infection*, v. 17, p. e383-e392, 2017.

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DOS DERIVADOS DA VANILINA CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO

6.1. INTRODUÇÃO

A população mundial irá crescer nos próximos 30 anos passando dos atuais 7,7 bilhões de seres humanos para 9,7 bilhões em 2050 (ONU, 2020). Dentre os vários aspectos relacionados ao crescimento populacional, haverá o aumento da demanda por alimentos e, necessariamente, a produtividade agrícola terá que ser elevada.

O aumento da produtividade agrícola não se deve apenas à adoção de técnicas aprimoradas de cultivo e manejo, mas também ao ascendente uso de espécies geneticamente modificadas e de defensivos agrícolas. Os defensivos agrícolas, também conhecidos como agroquímicos, são vitais no controle de pragas e doenças, estando eles classificados em diferentes classes sendo os herbicidas, fungicidas, nematicidas e inseticidas os mais consumidos no mundo (BARBOSA, 2004).

A utilização de agroquímicos reduz as perdas causadas por insetos, plantas daninhas e fungos patogênicos, os quais são os responsáveis pela redução de até 30% do rendimento das culturas agrícolas (SHANG *et al.*, 2019). No entanto, há problemas relacionados ao uso destes agentes de controle de pragas como, por exemplo, o aparecimento de resistência dos organismos alvos aos agroquímicos. (VELASCO e CAPANEMA, 2006; BELCHIOR *et al.*, 2014).

Pesquisas no campo da agroquímica vêm sendo desenvolvidas para a obtenção de novos princípios ativos que sejam mais efetivos contra as espécies-alvo, que causem nenhum ou reduzido impacto ambiental, que apresentem diferentes mecanismos de ação, e que sejam empregados em doses cada vez menores (BARBOSA, 2004; DUKE, 2010). Dentro deste contexto, uma estratégia que vem sendo utilizada para a obtenção de novos agroquímicos é a utilização de produtos naturais, sejam estes empregados diretamente como inseticidas ou sendo utilizados para o preparado de derivados sintéticos (KARUNAMOORTHY, 2012; KORTBEEK *et al.*, 2019).

Uma busca na literatura revelou que não há relatos com respeito ao efeito inseticida da substância natural vanilina. No entanto, modificações químicas em sua estrutura produziram derivados com grupos isotiazol que apresentaram efeito sinérgico da atividade inseticida quando misturados a inseticidas comerciais (POTKIN *et al.*, 2009; KLETSKOV *et al.*, 2017). Além disso, a investigação conduzida por Kim e colaboradores (2012) mostrou efeito sinérgico de repelência quando a vanilina foi adicionada a diferentes óleos essenciais. Estes resultados motivaram a avaliação dos efeitos inseticidas dos derivados triazólicos da vanilina sintetizados neste trabalho contra a espécie de inseto *Drosophila suzukii*.

Drosophila suzukii (Figura 6.1) é uma praga originária do Japão que se encontra, atualmente, em expansão mundial e uma das poucas espécies de drosofilídeos capazes de perfurar frutos sadios em desenvolvimento. Popularmente conhecida como drosófila de asa manchada, esta praga apresenta tamanho médio, comprimento de corpo de 2 a 3 mm, olhos vermelhos e cor corporal variando entre marrom e amarelo. Os machos são reconhecidos pela presença de manchas escuras nas asas; já as fêmeas são identificadas pelo ovopositor grande e serrilhado (SANTOS, 2014; MELO *et al.*, 2018).



Figura 6.1. Espécie de inseto *Drosophila suzukii*.

Nos últimos anos, a praga tem se espalhado por países da Europa e América do Norte, provocando danos econômicos relevantes em diversas frutíferas, especialmente em morango, cereja, uva, ameixa, caqui, amora, framboesa, mirtilo (*blueberry*) e o figo (GOODHUE *et al.* 2011; ANDREAZZA *et al.*, 2016; ANDREAZZA *et al.*, 2017; JAPOSHVILI *et al.*, 2018).

No Brasil, o primeiro registro de *D. suzukii* ocorreu em 2013 no município de Vacaria no Rio Grande do Sul, quando frutos de morangueiro foram

danificados causando prejuízo de até 30% na produção. Além do Sul do país, a mosca *D. suzukii* foi encontrada em São Paulo nas frutas de mirtilo, comercializadas em um centro atacadista. Em Minas Gerais e no Rio de Janeiro foi observada em campos de morango e em um trecho de Mata Atlântica nativa, respectivamente. Na região Central, especificamente Brasília, a espécie foi localizada em uma reserva natural de cerrado (BENITO *et al.*, 2016; ANDREAZZA *et al.*, 2017).

Os danos causados pela *D. suzukii* são classificados em primário e secundário. No primário, as fêmeas perfuram a superfície das frutas de casca fina, depositando os ovos sob a cicatriz da oviposição. Em seguida, ocorre o desenvolvimento larval, as quais se alimentam da polpa do fruto, levando ao colapso do tecido da fruta. Os danos secundários podem ocorrer posteriormente ao dano primário, uma vez que após a formação de orifícios de oviposição as frutas ficam expostas a outros patógenos, como bactérias, leveduras, fungos, além de outras espécies de drosófilas e nitidulídeos. Assim, os frutos infestados apresentam danos como orifícios e podridões, que impedem a sua comercialização e causam prejuízos econômicos (SANTOS, 2014; ASPLEN *et al.*, 2015).

Um dos grandes desafios relacionados à busca por inseticidas eficientes para o combate desta espécie consiste na resistência das larvas aos agroquímicos, uma vez que estão bem protegidas sob a casca do fruto (CARRAU *et al.*, 2018). Porém, pesquisas têm sido direcionadas em busca de substâncias bioativas que possam apresentar eficiente atividade inseticida para combater *D. suzukii*.

No presente capítulo, são descritos os resultados alcançados com respeito à avaliação da atividade inseticida dos derivados triazólicos da vanilina contra a mosca *D. suzukii*.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação da atividade inseticida dos compostos **1**, **2**, **3**, **6a-6k** e **7a-7k** contra *D. suzuki*, realizou-se o bioensaio de ingestão/contato. Inicialmente, os compostos foram diluídos em água destilada (20% m v⁻¹ de açúcar) e dimetilsulfóxido (5% v v⁻¹) na concentração de 1000 ppm. Como controle positivo foi utilizado o inseticida comercial imidacloprida na mesma concentração; como controle negativo foi utilizada solução aquosa 20% m v⁻¹ de açúcar e 5% v v⁻¹ de

DMSO. Em seguida, um rolete de algodão foi colocado em cada frasco de vidro de 200 mL ($n = 4$) e embebido com 1,8 mL de cada composto diluído. Cada frasco foi vedado com uma espuma e recebeu 25 moscas cada. O bioensaio foi conduzido em condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), fotoperíodo (12:12 h claro/escuro) e umidade ($55 \pm 10\%$). Após 24 h, a mortalidade dos insetos foi avaliada (insetos que não conseguiam se locomover duas vezes a distância do próprio corpo após estímulo foram considerados mortos).

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio de avaliação da atividade inseticida dos compostos **1, 2, 3, 6a-6k e 7a-7k** contra *D. sukii* foi realizado em quadruplicata e os dados da porcentagem de mortalidade estão expressos em média. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6.1 (pg. 180) e Figura 6.2 (pg. 181).

Tabela 6.1. Mortalidade (%) de adultos de *Drosophila suzukii* em bioensaio de ingestão/contato quando expostos aos compostos **1, 2, 3, 6a-6k** e **7a-7k** por 24h

Composto	Mortalidade (%)
	Média±EP
1	6,00 ± 4,76
2	3,08 ± 2,14
3	1,79 ± 1,79
6a	3,65 ± 2,11
6b	0,93 ± 0,93
6c	1,09 ± 1,09
6d	4,00 ± 1,63
6e	4,77 ± 3,64
6f	2,68 ± 2,68
6g	1,00 ± 1,00
6h	3,09 ± 1,93
6i	0,00 ± 0,00
6j	1,04 ± 1,04
6k	0,96 ± 0,96
7a	1,73 ± 1,00
7b	3,69 ± 2,72
7c	4,67 ± 0,78
7d	2,63 ± 1,81
7e	3,76 ± 2,24
7f	4,84 ± 0,80
7g	3,33 ± 1,92
7h	1,46 ± 0,85
7i	0,86 ± 0,86
7j	5,20 ± 2,12
7k	5,97 ± 0,69

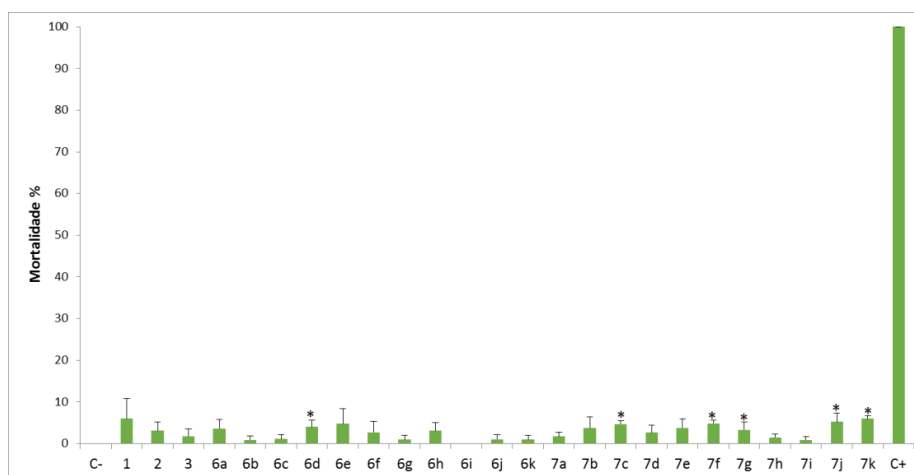


Figura 6.2. Mortalidades de adultos de *Drosophila suzukii* em bioensaio de ingestão/contato por 24h de exposição. Insetos considerados mortos quando não conseguiam se locomover duas vezes a distância do próprio corpo após estímulo. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. C- = controle negativo (solução aquosa 20% m v⁻¹ de açúcar e 5% v v⁻¹ de DMSO). C+ = controle positivo (imidacloprida). *Difere do controle negativo pelo teste t-student $P < 0,05$.

Observa-se que os compostos **1**, **2**, **3**, **6a-6k** e **7a-7k** apresentaram menor toxicidade para as moscas de *D. suzukii* em relação ao produto comercial utilizado como controle positivo, imidacloprida. Dos compostos triazólicos avaliados, **6d**, **7c**, **7f**, **7g**, **7j** e **7k** (Figura 6.3) foram os que exibiram maior potencial inseticida com valores de porcentagem de mortalidade média iguais a $(4,00 \pm 1,63)$, $(4,67 \pm 0,78)$, $(4,84 \pm 0,80)$, $(3,33 \pm 1,92)$, $(5,20 \pm 2,12)$ e $(5,96 \pm 0,69)$, respectivamente. De acordo com os dados, é possível estabelecer que o aumento do tamanho do espaçador entre o núcleo 1,2,3-triazólico e a porção vanilina parece favorecer a atividade biológica uma vez que a maioria dos compostos mais ativos apresentam em sua estrutura o maior espaçador ($n = 3$ na Figura 6.3).

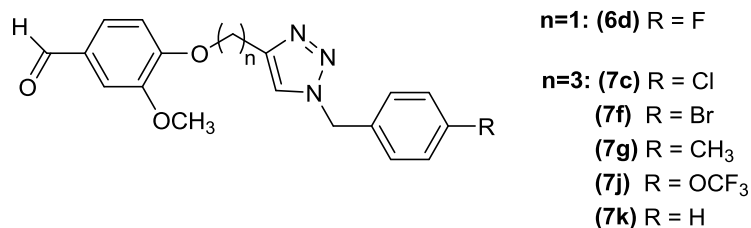


Figura 6.3. Estruturas dos derivados da vanilina que apresentaram melhores atividades inseticidas contra *D. suzukii*.

A fim de comparar os resultados da atividade inseticida dos derivados triazólicos da vanilina, é apresentado na Figura 6.4. Os dados obtidos para os 23 compostos triazólicos derivados do eugenol previamente sintetizados (GAZOLLA, 2015). Para o ensaio de avaliação da atividade inseticida dessas substâncias derivadas do eugenol foram utilizadas a mesma metodologia e espécie descritas anteriormente.

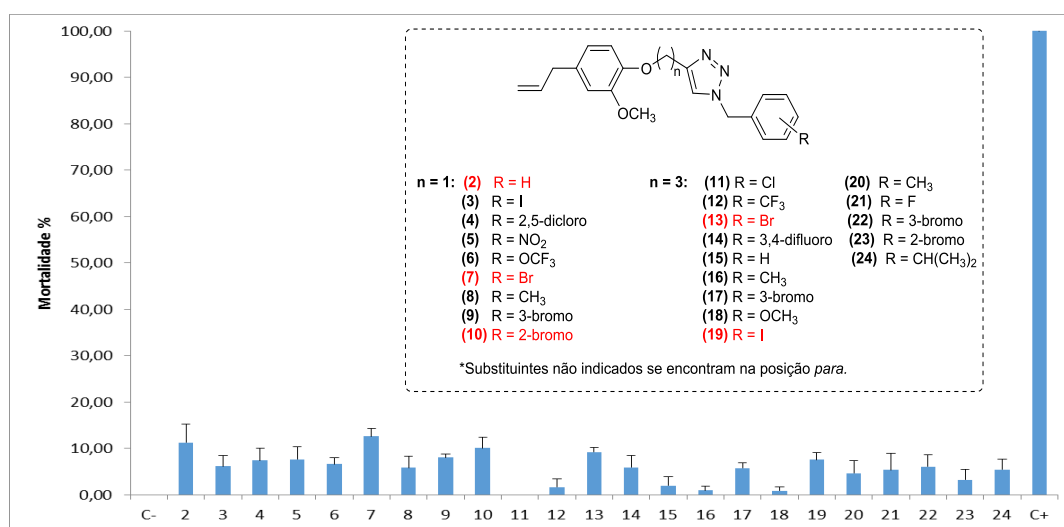


Figura 6.4. Mortalidades de adultos de *Drosophila suzukii* em bioensaio de ingestão/contato por 24h de exposição. Insetos considerados mortos quando não conseguiam se locomover duas vezes a distância do próprio corpo após estímulo. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. C- = controle negativo (solução aquosa 20% m v⁻¹ de açúcar e 5% v v⁻¹ de DMSO). C+ = controle positivo (imidacloprida). *Difere do controle negativo pelo teste t-student $P < 0,05$.

Os resultados de maior percentual de mortalidade observados foram para os compostos **2** (11,28±3,92); **7** (12,58±1,77); **10** (10,08±2,37); **13** (9,2±0,98); **19** (7,56±1,52). Dos cinco compostos mais ativos, três (**7**, **10** e **13**) são compostos bromados. Menciona-se que o derivado da vanilina **7f** também possui como substituinte o elemento bromo. Logo, a presença do bromo na porção benzílica do anel triazólico parece potencializar a atividade inseticida. Cumpre ressaltar que o eugenol é um composto para o qual há relatos na literatura descrevendo sua ação inseticida (HUANG *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2020). Assim, buscou-se avaliar a atividade inseticida de derivados triazólicos do eugenol previamente sintetizados. Apesar dos resultados não terem sido expressivos para ambas as

séries de derivados triazólicos, de modo geral, as atividades inseticidas obtidas para os derivados do eugenol foram superiores às aquelas apresentadas pelos derivados da vanilina. É importante ressaltar que não existem registros na literatura sobre a avaliação inseticida de derivados triazólicos destas substâncias naturais. A partir desses resultados, novas modificações estruturais podem ser racionalizadas com a finalidade de obtenção de moléculas mais ativas.

6.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREAZZA, F.; BERNARDI, D.; BOTTON, M.; NAVA, D. E. *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in Peaches: is it a problem? *Scientia Agricola*, v. 74, p. 489-491, 2016.
- ANDREAZZA, F.; BERNARDI, D.; DOS SANTOS, R. S. S.; GARCIA, F. R. M.; OLIVEIRA, E. E.; BOTTON, M.; NAVA, D. E. *Drosophila suzukii* in Southern Neotropical Region: Current Status and Future Perspectives. *Neotropical Entomology*, v. 46, p. 591-605, 2017.
- ASPLEN et al. Invasion biology of spotted wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. *Journal of Pest Science*, v. 88, p. 469-494, 2015.
- BARBOSA, L. C. A. Os Pesticidas, o homem e o meio ambiente. Editora UFV, 2004.
- BELCHIOR, D. C. V.; SARAIVA, A. S.; LÓPEZ, A. M. C.; SCHEIDT, G. N. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, v. 34, p. 135-151, 2014.
- BENITO, N. P.; DA SILVA, M. L.; DOS SANTOS, R. S. S. Potential spread and economic impact of invasive *Drosophila suzukii* in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, p. 571-578, 2016.
- CARRAU, T.; HIEBERT, N.; VILCINSKAS, A.; LEE, K-Z. Identification and characterization of natural viruses associated with the invasive insect pest *Drosophila suzukii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 154, p. 74-78, 2018.
- DA SILVA, B. C.; MELO, D. R.; FRANCO, C. T.; MATURANO, R.; FABRI, R. L.; DAEMON, E. Evaluation of eugenol and (*E*)-cinnamaldehyde insecticidal activity against larvae and pupae of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 57, p. 181-186, 2020.
- DUKE, S. O. Herbicide and pharmaceutical relationships. *Weed Science*, v. 58, p. 334-339, 2010.

- GAZOLLA, P. A. R. Síntese e Avaliação Citotóxica e Leishmanicida de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, 2015.
- GOODHUE, R. E.; BOLDA, M.; FARNSWORTH, D.; WILLIAMS, J. C.; ZALOM, F. G. Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs. *Pest Management Science*, v. 67, p. 1396-1402, 2011.
- HUANG, Y.; HO, S.H.; LEE, H.C.; YAP, Y.L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, v. 38, p. 403–412, 2002.
- KARUNAMOORTHY, K. Medicinal and aromatic plants: a major source of green pesticides/riskreduced pesticides. *Medicinal & Aromatic Plants*, v. 01, p. 1–8, 2012.
- KIM, S. I.; YOON, J. S.; BAECK, S. J.; LEE, S. H.; AHN, Y. J.; KWON, D. W. Toxicity and synergic repellency of plant essential oil mixtures with vanillin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 49, p. 876-885, 2012.
- KLETSKOV, A. V.; POTKIN, V. I.; DIKUSAR, E. A.; ZOLOTAR, R. M. New data on vanillin-based isothiazolic insecticide synergists. *Natural Product Communications*, v. 12, p. 105-106, 2017.
- KORTBEEK, R. W. J.; GRAGT, M. V D.; BLEEKER, P. M. Endogenous plant metabolites against insects. *European Journal of Plant Pathology*, v. 154, p. 67–90, 2019.
- MELO, M.; CARVALHO, C.; PIMENTEL, R.; LOPES, D. J. H. Detection of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in Terceira Island, Azores. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 41, p. 152-155, 2018.
- ONU Brasil – Nações Unidas Brasil. Disponível em <<https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-chegar-a-97-bilhoes-e-pessoas-em-2050-diz-relatorio-da-onu/>> Acesso em 30 de janeiro de 2020.
- POTKIN, V.; ZUBENKO, Y.; BYKHOVETZ, A.; ZOLOTAR, R.; GONCHARUK, V. Synthesis of novel vanillin derivatives containing isothiazole moieties and its synergistic effect in mixtures with insecticides. *Natural Product Communications*, v. 4, p. 1205-1208, 2009.
- SANTOS, R. S. S. Ocorrência de *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera, Drosophilidae) atacando frutos de morango no Brasil. Comunicado Técnico – Embrapa, 2014.

SHANG, X-F.; ZHAO, Z-M.; LI, J-C.; YANG, G. Z.; LIU, Y-Q.; DAI, L-X.; ZHANG, Z-J.; YANG, Z-G.; MIAO, X-L.; YANG, C-J.; ZHANG, J-Y. Insecticidal and antifungal activities of *Rheum palmatum* L. anthraquinones and structurally related compounds. *Industrial Crops and Products*, v. 137, p. 508-520, 2019.

VELASCO, L. O. M.; CAPANEMA, L. X. L.; O setor de agroquímicos, *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, p. 69-96, 2006.

CAPÍTULO 7

SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS DO EUGENOL CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO

7.1. INTRODUÇÃO

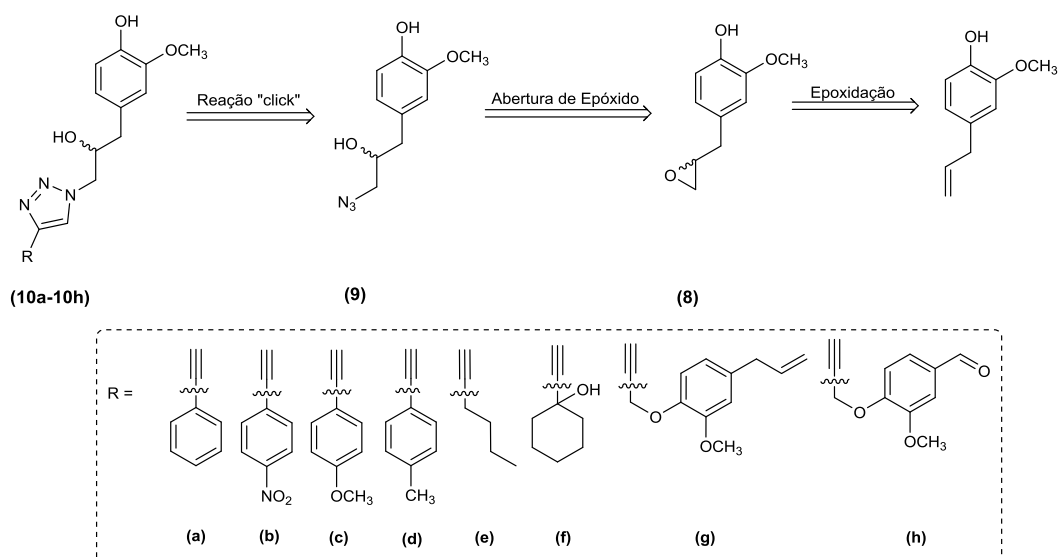
Uma abordagem utilizada no desenvolvimento de novos fármacos e agroquímicos é a associação de dois ou mais fragmentos bioativos. Neste caso cria-se uma nova substância de estrutura molecular química híbrida que pode apresentar potencialização da atividade biológica em relação aos fragmentos isolados (VIEGAS-JUNIOR, C. *et al.*, 2007).

Conforme já exposto nos capítulos anteriores, o eugenol e os compostos contendo o núcleo 1,2,3-triazol (Capítulos 1 e 2), despertam grande interesse devido as diversas atividades biológicas que eles apresentam. A união do eugenol com grupos 1,2,3-triazólicos têm levado à obtenção de compostos com significativas atividades citotóxica (GAZOLLA *et al.*, 2018), leishmanicida (TEIXEIRA *et al.*, 2018) e antiviral (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Sendo assim, a associação entre estes fragmentos bioativos têm resultado em novas moléculas híbridas com importantes bioatividades.

Além dos bons resultados encontrados da associação eugenol e 1,2,3-triazol, a inexistência de relatos na literatura sobre a modificação da porção alílica do eugenol para a obtenção de derivados contendo grupos 1,2,3-triazólicos motivam a síntese de novos compostos visando à potencialização das atividades biológicas.

Neste sentido, o presente trabalho também objetivou a síntese de uma azida orgânica derivada do eugenol e que foi utilizada para a preparação de 16 derivados 1,2,3-triazólicos inéditos via reação “click”. Assim, descreve-se neste capítulo a síntese e a caracterização estrutural desses novos derivados triazólicos do eugenol.

A análise retrossintética para a preparação dos compostos triazólicos é apresentada no Esquema 7.1 (pg. 187).



Esquema 7.1. Análise retrossintética para a preparação dos novos derivados triazólicos do eugenol.

De acordo com a análise retrossintética, a etapa chave envolvida na preparação dos compostos **10a-10h** corresponderia à reação click entre a azida orgânica **9** e diferentes alquinos disponíveis comercialmente. A azida seria preparada a partir da reação de abertura do anel de epóxido, enquanto o epóxido **8** seria obtido via reação de epoxidação do eugenol na presença do ácido *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA).

Na Figura 7.1. (pg. 188), encontram-se representadas as estruturas dos compostos sintetizados a partir do eugenol.

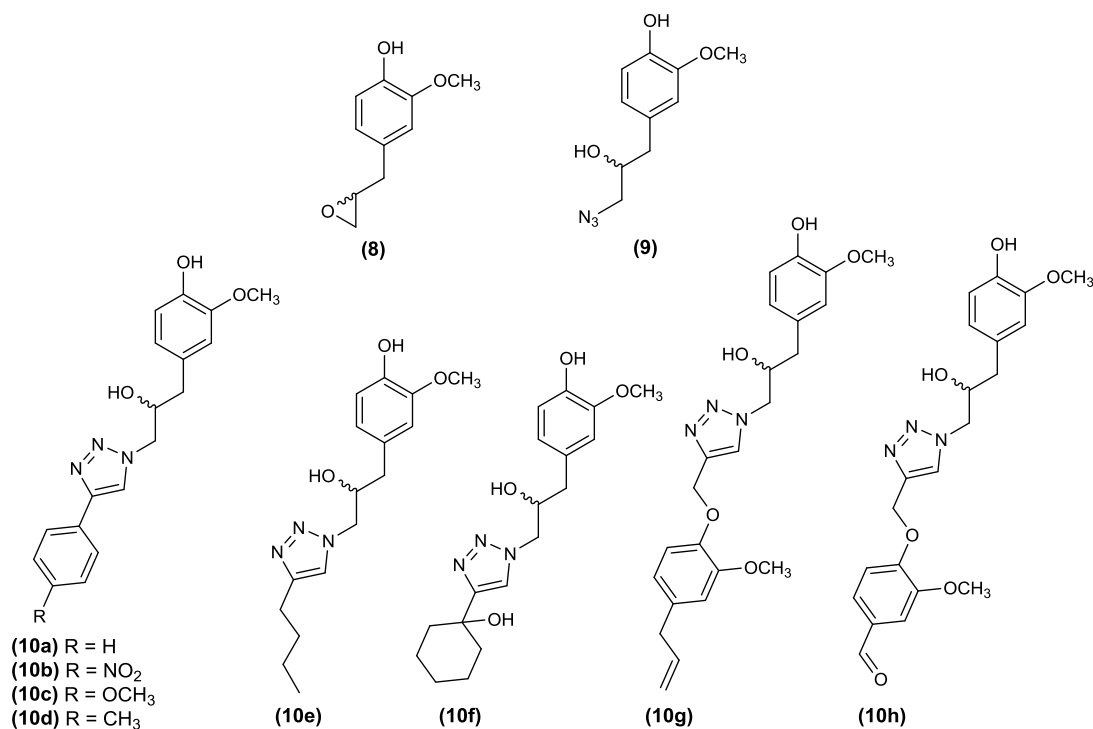


Figura 7.1. Estruturas das substâncias 8, 9 e 10a-10h.

7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1. Generalidades Metodológicas

Foram utilizados reagentes de grau P.A. para a síntese dos compostos.

As substâncias fenilacetileno, 1-etinil-4-nitrobenzeno, 1-etinil-4-metoxibenzeno, 1-etinil-4-metilbenzeno, hex-1-ino, 1-etinilcicloexan-1-ol, eugenol, vanilina, sulfato de cobre pentaidratado, ascorbato de sódio, azida de sódio e ácido *m*-cloroperbenzóico foram adquiridas comercialmente da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e utilizados sem prévia purificação. Cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, cloreto de amônio e sulfito de sódio foram adquiridos da FMaia (Belo Horizonte, Brasil). Os solventes metanol, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e hexano foram adquiridos da Êxodo Científica (Sumaré, São Paulo, Brasil) e utilizados após destilação realizada através do rotaevaporador.

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se placas cromatográficas de sílica-gel impregnadas sobre alumínio. Após a eluição, as placas de CCD foram observadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) e reveladas com solução de permanganato de potássio (3 g de KMnO₄, 20 g de K₂CO₃, 5 mL de NaOH 5% m v⁻¹, 300 mL de água).

As separações em coluna cromatográfica foram realizadas utilizando-se sílica-gel (70-230 mesh), como fase estacionária. Os solventes utilizados como eluentes foram usados sem prévia purificação.

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF-302 e não foram corrigidas.

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos empregando-se a técnica reflectância total atenuada (ATR) em equipamento Varian 660-IR com acessório GladiATR na região de 4000 a 500 cm^{-1} .

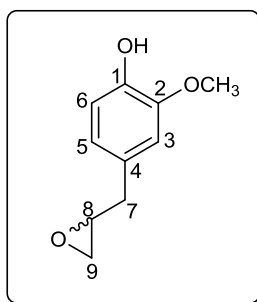
Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 200 MHz, 400 MHz e 600 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 50 MHz, 100 MHz e 150 MHz) foram obtidos em espectrômetros BRUKER AVANCE. Foram utilizados como solventes clorofórmio (CDCl_3) e metanol (CD_3OD) deuterados. As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

A numeração utilizada nas estruturas dos compostos e nas descrições dos dados referentes aos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C não estão necessariamente relacionadas com aquelas recomendadas pela nomenclatura *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

7.3. PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS

7.3.1. SÍNTESE DO EPÓXIDO DERIVADO DO EUGENOL

Síntese do (\pm) 2-metoxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol (**8**)



A um balão de fundo redondo (50 mL) foram adicionados eugenol (2,00 g; 12,2 mmol) e ácido *m*-cloroperbenzóico (5,47 g; 24,4 mmol) dissolvidos em clorofórmio (20,0 mL). A mistura de reação foi mantida sob agitação e aquecimento (50 °C) por 24 h. Decorrido este período, adicionaram-se 20,0 mL de solução de Na_2SO_3 (20% m v^{-1}) e a fase aquosa foi extraída com clorofórmio (3 x

20,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi lavada com solução de NaHCO_3 (10% m v⁻¹) (2 x 20,0 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto **8** foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v v⁻¹) e obtido com 55% (1,21 g; 6,70 mmol) de rendimento.

Característica: óleo amarelo.

CCD: $R_f = 0,49$ (hexano-acetato de etila 2:1 v v⁻¹).

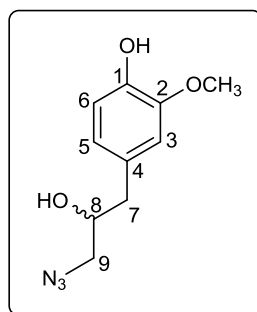
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3399, 3057, 2998, 2933, 2842, 2057, 1733, 1603, 1513, 1462, 1431, 1402, 1367, 1269, 1235, 1200, 1150, 1121, 1030, 927, 822, 791, 732, 627, 561, 432. O espectro é apresentado na Figura 7.2 (pg. 205).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,56 (dd, 1H, $J_1 = 5,0$ Hz e $J_2 = 2,6$ Hz, H-9_a); 2,80-2,83 (m, 3H, H-7a, H-7b/H-9b); 3,12-3,17 (m, 1H, H-8); 3,90 (s, 3H, OCH_3); 6,75 (dd, 1H, $J_1 = 8,0$ Hz e $J_2 = 1,8$ Hz, H-5); 6,78 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-3); 6,87 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-6). O espectro é apresentado na Figura 7.3 (pg. 206).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 38,3 (C-7); 46,7 (C-9); 52,7 (C-8); 55,9 (OCH_3); 111,6 (C-3); 114,3 (C-6); 121,6 (C-5); 129,1 (C-4); 144,4 (C-1); 146,5 (C-2). O espectro é apresentado na Figura 7.4 (pg. 207).

7.3.2. SÍNTESE DA AZIDA ORGÂNICA DERIVADA DO EUGENOL

Síntese do (\pm) 4-(3-azido-2-hidroxipropil)-2-metoxifenol (**9**)



A um balão de fundo redondo (25 mL) foram adicionados (\pm) 2-metoxi-4-(oxiran-2-ilmetil)fenol (**8**) (0,700 g; 3,89 mmol), azida de sódio (1,26 g; 19,4 mmol), cloreto de amônio (0,520 g; 9,73 mmol) e 8,00 mL de metanol : água (4:1 v v⁻¹). A

mistura reacional foi mantida sob agitação por 18 horas à temperatura de 60 °C e monitorada por CCD. Terminada a reação, adicionaram-se 10,0 mL de água destilada. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (3 x 30,0 mL), lavada com solução saturada de NaCl, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sobre pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (2:1 v v⁻¹). O composto (\pm) 4-(3-azido-2-hidroxipropil)-2-metoxifenol (**9**) foi obtido com 94% de rendimento (0,815 g; 3,66 mmol).

Característica: óleo amarelo.

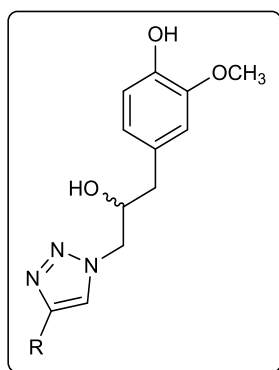
CCD: R_f = 0,33 (hexano-acetato de etila 2:1 v v⁻¹).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3386, 2957, 2926, 2858, 2097, 1604, 1514, 1462, 1432, 1367, 1269, 1233, 1206, 1152, 1122, 1069, 1032, 927, 858, 814, 795, 741, 633, 557, 451. O espectro é apresentado na Figura 7.5 (pg. 210).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 2,70 (dd, 1H, $J_1 = 13,8$ Hz e $J_2 = 7,8$ Hz, H-7a); 2,75 (dd, 1H, $J_1 = 13,8$ Hz e $J_2 = 5,8$ Hz, H-7b); 3,28 (dd, 1H, $J_1 = 12,6$ Hz e $J_2 = 6,6$ Hz, H-9a); 3,37 (dd, 1H, $J_1 = 12,6$ Hz e $J_2 = 3,8$ Hz, H-9b); 3,87 (s, 3H, OCH₃); 3,92-3,99 (m, 1H, H-8); 6,69 (dd, 1H, $J_1 = 7,8$ Hz e $J_2 = 1,8$ Hz, H-5); 6,71 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-3); 6,85 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-6). O espectro é apresentado na Figura 7.6 (pg. 211).

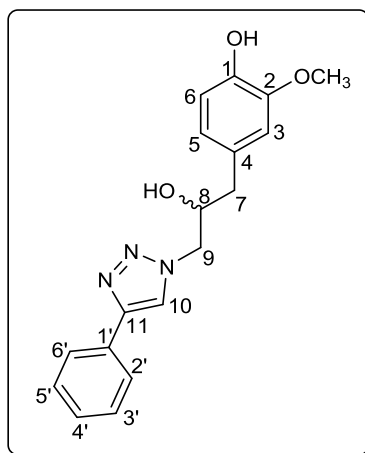
RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 40,4 (C-7); 55,90 (OCH₃); 55,94 (C-9); 71,7 (C-8); 111,8 (C-3); 114,6 (C-6); 121,8 (C-5); 128,7 (C-4); 144,5 (C-1); 146,6 (C-2). O espectro é apresentado na Figura 7.7 (pg. 212).

7.3.3. SÍNTESE DOS COMPOSTOS TRIAZÓLICOS 10a-10h



A um balão de fundo redondo (25 mL) foram adicionados a azida (\pm) 4-(3-azido-2-hidroxipropil)-2-metoxifenol (**9**) (1,00 equivalente), o alquino de interesse (1,00 equivalente), ascorbato de sódio (0,400 equivalente), 2,00 mL de água destilada e 2,00 mL de diclorometano. Em seguida, adicionou-se o $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,200 equivalente). A mistura de reação permaneceu sob agitação vigorosa por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o término da reação, determinado via análise por CCD, a mistura resultante foi lavada com solução saturada de Na_2CO_3 e a fase aquosa extraída com diclorometano (3 x 20,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando-se como eluente uma mistura de hexano-acetato de etila (1:1 v v⁻¹). Os derivados triazólicos, **10a–10h**, foram obtidos com rendimentos variando de 68%–89%. A seguir estão descritas as informações relativas às reações envolvidas na preparação dos compostos e os dados que suportam as estruturas destas substâncias.

Síntese do (\pm) 4-(2-hidroxi-3-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)propil)-2-metoxifenol (**10a**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,106 g; 0,326 mmol) com 89% de rendimento empregando-se fenilacetileno (0,0380 g; 0,370 mmol), (\pm) 4-(3-azido-2-hidroxipropil)-2-metoxifenol (**9**) (0,0820 g; 0,370 mmol), ascorbato de sódio (0,0300 g; 0,152 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0190 g; 0,0740 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,32$ (hexano-acetato de etila 1:1 $v v^{-1}$).

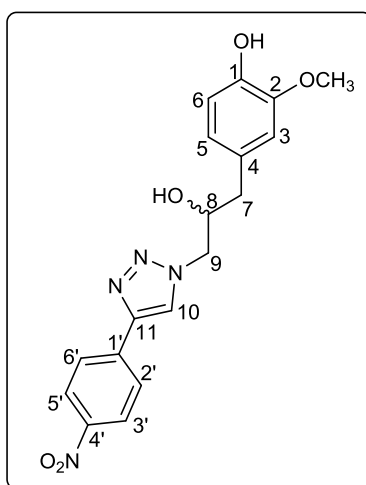
Faixa de fusão: 132,9–133,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3351, 3159, 3066, 2938, 2840, 2163, 1730, 1605, 1516, 1464, 1445, 1428, 1366, 1273, 1231, 1209, 1154, 1123, 1076, 1034, 976, 897, 862, 817, 767, 693, 632, 560, 510, 469, 433. O espectro é apresentado na Figura A81 (pg. 303) no anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ : 2,69 (d, 2H, $J = 6,4$ Hz, H-7); 3,78 (s, 3H, OCH_3); 4,13-4,20 (m, 1H, H-8); 4,28 (dd, 1H, $J_1 = 14,0$ Hz e $J_2 = 8,0$ Hz, H-9_a); 4,44 (dd, 1H, $J_1 = 14,0$ Hz e $J_2 = 3,4$ Hz, H-9_b); 6,66 (dd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz e $J_2 = 1,3$ Hz, H-5); 6,69 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 6,81 (d, 1H, $J = 1,3$ Hz, H-3); 7,27 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz, H-4'); 7,36 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz, H-3'/H-5'); 7,74 (d, 2H, $J = 7,4$ Hz, H-2'/H-6'); 8,19 (s, 1H, H-10). O espectro é apresentado na Figura A82 (pg. 304) no anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ : 40,1 (C-7); 55,0 (C-9); 55,1 (OCH_3); 71,2 (C-8); 112,6 (C-3); 114,8 (C-6); 121,6 (C-5); 122,0 (C-10); 125,2 (C-2'/C-6'); 127,9 (C-4'); 128,5 (C-3'/C-5'); 128,9 (C-1'); 130,3 (C-4); 144,8 (C-1); 147,1 (C-2); 147,4 (C-11). O espectro é apresentado na Figura A83 (pg. 305) no anexo.

Síntese do (\pm) 4-(2-hidroxi-3-(4-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)propil)-2-metoxifenol (**10b**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,0820 g; 0,221 mmol) com 68% de rendimento empregando-se 1-etinil-4-nitrobenzeno (0,0470 g; 0,320 mmol), (\pm) 4-(3-azido-2-hidroxiopropil)-2-metoxifenol (**9**) (0,0720 g; 0,320 mmol), ascorbato de sódio (0,0250 g; 0,129 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0160 g; 0,0650 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,13$ (hexano-acetato de etila 1:1 v v⁻¹).

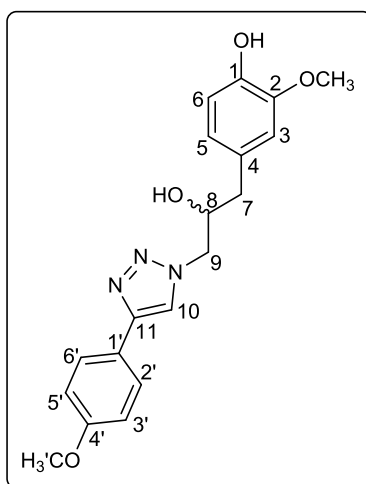
Faixa de fusão: 86,8–87,6 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3326, 3132, 2932, 2846, 2163, 2042, 1742, 1604, 1514, 1454, 1430, 1343, 1268, 1235, 1151, 1108, 1053, 1029, 977, 934, 854, 800, 755, 711, 689, 655, 637, 500, 460. O espectro é apresentado na Figura A84 (pg. 306) no anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ : 2,70 (d, 2H, $J = 6,4$ Hz, H-7); 3,78 (s, 3H, OCH_3); 4,13-4,19 (m, 1H, H-8); 4,30 (dd, 1H, $J_1 = 13,8$ Hz e $J_2 = 7,8$ Hz, H-9a); 4,48 (dd, 1H, $J_1 = 13,8$ Hz e $J_2 = 3,4$ Hz, H-9b); 6,65 (dd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz e $J_2 = 1,3$ Hz, H-5); 6,68 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-6); 6,81 (d, 1H, $J = 1,3$ Hz, H-3); 7,98 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-2'/H-6'); 8,22 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-3'/H-5'); 8,39 (s, 1H, H-10). O espectro é apresentado na Figura A85 (pg. 307) no anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) δ : 40,4 (C-7); 55,0 (C-9); 55,2 (OCH_3); 71,2 (C-8); 112,6 (C-3); 114,8 (C-6); 121,6 (C-5); 123,8 (C-3'/C-5'); 123,7 (C-10); 125,8 (C-2'/C-6'); 128,7 (C-4); 136,9 (C-1'); 144,9 (C-1); 145,0 (C-2); 147,2 (C-4'); 147,5 (C-11). O espectro é apresentado na Figura A86 (pg. 308) no anexo.

Síntese do (±) 4-(2-hidroxi-3-(4-(4-metoxifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)propil)-2-metoxifenol (**10c**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,0870 g; 0,245 mmol) com 72% de rendimento empregando-se 1-etinil-4-metoxibenzeno (0,0450 g; 0,340 mmol), (±) 4-(3-azido-2-hidroxipropil)-2-metoxifenol (**9**) (0,0760 g; 0,340 mmol), ascorbato de sódio (0,0270 g; 0,136 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0170 g; 0,0680 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,22$ (hexano-acetato de etila 1:1 v v⁻¹).

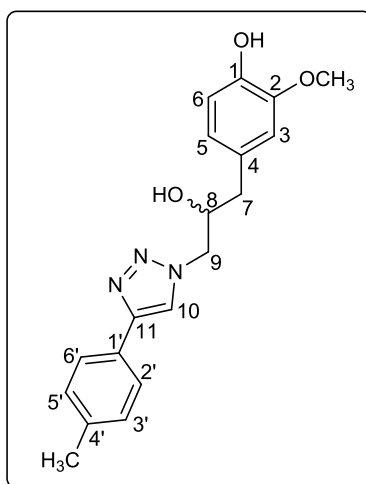
Faixa de fusão: 136,1–136,8 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3463, 3230, 3020, 2978, 2920, 2842, 2036, 1613, 1560, 1515, 1498, 1439, 1352, 1275, 1240, 1174, 1150, 1123, 1094, 1023, 980, 830, 794, 665, 608, 559, 534, 455. O espectro é apresentado na Figura A87 (pg. 309) no anexo.

RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) δ : 2,73 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz, H-7); 3,81 (s, 3H, OCH_3'); 3,84 (s, 3H, OCH_3); 4,18-4,23 (m, 1H, H-8); 4,31 (dd, 1H, $J_1 = 13,8$ Hz e $J_2 = 7,8$ Hz, H-9_a); 4,48 (dd, 1H, $J_1 = 14,1$ Hz e $J_2 = 3,3$ Hz, H-9_b); 6,71 (dd, 1H, $J_1 = 7,9$ Hz e $J_2 = 1,6$ Hz, H-5); 6,74 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H-6); 6,86 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-3); 6,97 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-3'/H-5'); 7,70 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-2'/H-6'); 8,14 (s, 1H, H-10). O espectro é apresentado na Figura A88 (pg. 310) no anexo.

RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) δ : 44,3 (C-7); 58,3 (C-9); 58,9 (OCH_3'); 59,0 (OCH_3); 75,0 (C-8); 116,7 (C-3); 117,9 (C-3'/C-5'); 118,7 (C-6); 125,1 (C-5); 125,5 (C-1'); 126,8 (C-10); 130,7 (C-2'/C-6'); 132,9 (C-4); 148,5 (C-1); 150,9 (C-2); 151,5 (C-11); 163,8 (C-4'). O espectro é apresentado na Figura A89 (pg. 311) no anexo.

Síntese do (\pm) 4-(2-hidroxi-3-(4-(*p*-tolil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)propil)-2-metoxifenol (**10d**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,0970 g; 0,286 mmol) com 81% de rendimento empregando-se 1-etinil-4-metilbenzeno (0,0410 g; 0,35 mmol), (\pm) 4-(3-azido-2-hidroxi-1-propil)-2-metoxifenol (**9**) (0,0780 g; 0,350 mmol), ascorbato de sódio (0,0280 g; 0,140 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0170 g; 0,0700 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,29$ (hexano-acetato de etila 1:1 v v⁻¹).

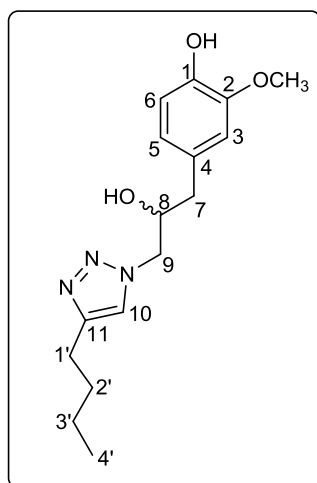
Faixa de fusão: 122,5–123,3 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3534, 3238, 2921, 1607, 1513, 1433, 1371, 1267, 1242, 1210, 1140, 1124, 1096, 1078, 1057, 1036, 980, 927, 887, 851, 826, 798, 766, 728, 666, 640, 557, 516, 425. O espectro é apresentado na Figura A90 (pg. 312) no anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,38 (s, 3H, CH_3); 2,73 (dd, 1H, $J_1 = 13,8$ Hz e $J_2 = 7,0$ Hz, H-7a); 2,83 (dd, 1H, $J_1 = 13,8$ Hz e $J_2 = 4,6$ Hz, H-7b); 3,87 (s, 3H, OCH_3); 4,27-4,34 (m, 2H, H-9a/H-8); 4,52 (dd, 1H, $J_1 = 17,2$ Hz e $J_2 = 6,0$ Hz, H-9b); 6,72 (dd, 1H, $J_1 = 8,0$ Hz e $J_2 = 1,4$ Hz, H-5); 6,76 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, H-3); 6,87 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-6); 7,21 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-3'/H-5'); 7,66 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-2'/H-6'); 7,84 (s, 1H, H-10). O espectro é apresentado na Figura A91 (pg. 313) no anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 21,2 (CH_3); 40,5 (C-7); 55,2 (C-9); 55,9 (OCH_3); 71,3 (C-8); 111,8 (C-3); 114,6 (C-6); 120,9 (C-5); 122,0 (C-10); 125,6 (C-2'/C-6'); 127,3 (C-1'); 128,4 (C-4); 129,5 (C-3'/C-5'); 138,1 (C-4'); 144,6 (C-1); 146,6 (C-2); 147,3 (C-11). O espectro é apresentado na Figura A92 (pg. 314) no anexo.

Síntese do (\pm) 4-(3-(4-butil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2-hidroxiopropil)-2-metoxifenol (**10e**)



Este composto foi obtido como um óleo incolor (0,098 g; 0,321 mmol) com 82% de rendimento empregando-se hex-1-ino (0,032 g; 0,39 mmol), (\pm) 4-(3-azido-2-hidroxiopropil)-2-metoxifenol (**9**) (0,087 g; 0,39 mmol), ascorbato de sódio (0,0310 g; 0,156 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0200 g; 0,0780 mmol).

Característica: óleo incolor.

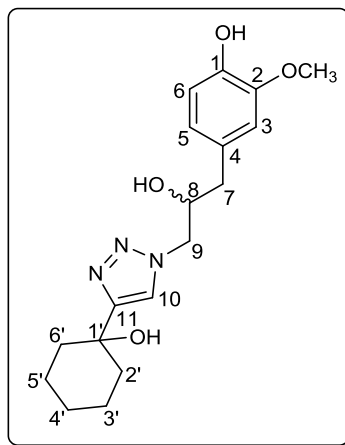
CCD: $R_f = 0,17$ (hexano-acetato de etila 1:1 v v $^{-1}$).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3399, 3140, 2954, 2930, 2859, 1704, 1600, 1553, 1514, 1453, 1430, 1365, 1270, 1217, 1153, 1123, 1033, 933, 860, 801, 741, 633, 565, 458. O espectro é apresentado na Figura A93 (pg. 315) no anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,94 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, H-4'); 1,39 (sext, 2H, $J = 7,4$ Hz, H-3'); 1,66 (quint, 2H, $J = 7,6$ Hz, H-2'); 2,69-2,74 (m, 2H, H-7a/H-1'); 2,80 (dd, 1H, $J_1 = 13,8$ Hz e $J_2 = 4,6$ Hz, H-7b); 3,89 (s, 3H, OCH_3); 4,22-4,30 (m, 2H, H-9a/H-8); 4,47 (dd, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz e $J_2 = 6,0$ Hz, H-9b); 6,71 (dd, 1H, $J_1 = 8,0$ Hz e $J_2 = 1,6$ Hz, H-5); 6,76 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-3); 6,87 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-6); 7,43 (s, 1H, H-10). O espectro é apresentado na Figura A94 (pg. 316) no anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 13,7 (C-4'); 22,2 (C-3'); 25,1 (C-1'); 31,4 (C-2'); 40,5 (C-7); 55,0 (C-9); 55,9 (OCH_3); 71,3 (C-8); 111,8 (C-3); 114,4 (C-6); 121,8 (C-5); 122,3 (C-10); 128,3 (C-4); 144,6 (C-1); 146,6 (C-2); 148,0 (C-11). O espectro é apresentado na Figura A95 (pg. 317) no anexo.

Síntese do (\pm) 4-(2-hidroxi-3-(4-(1-hidroxicicloexil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)propil)-2-metoxifenol (**10f**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,0920 g; 0,265 mmol) com 77% de rendimento empregando-se 1-etinil-1-cicloexan-1-ol (0,0430 g; 0,350 mmol), (\pm) 4-(3-azido-2-hidroxi-propil)-2-metoxifenol (**9**) (0,0780 g; 0,350 mmol), ascorbato de sódio (0,0280 g; 0,140 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0180 g; 0,0700 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,22$ (hexano-acetato de etila 1:1 v v⁻¹).

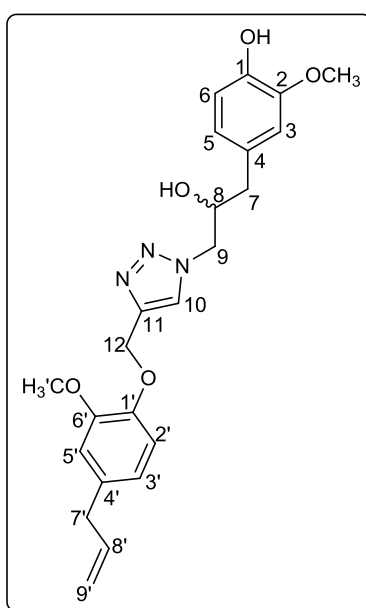
Faixa de fusão: 133,2–133,9 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3273, 3158, 3024, 2933, 2852, 1713, 1596, 1527, 1449, 1362, 1283, 1253, 1218, 1153, 1127, 1047, 1034, 963, 914, 846, 811, 798, 756, 689, 623, 555, 509, 478, 455. O espectro é apresentado na Figura A96 (pg. 318) no anexo.

RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) δ : 1,31-1,86 (m, 10H, H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/ H-6'); 2,69 (dd, 2H, $J_1 = 14,1$ Hz e $J_2 = 6,3$ Hz, H-7a, H-7b); 3,86 (s, 3H, OCH_3); 4,15-4,20 (m, 1H, H-8); 4,29 (dd, 1H, $J_1 = 13,8$ Hz e $J_2 = 7,8$ Hz, H-9a); 4,45 (dd, 1H, $J_1 = 13,8$ Hz e $J_2 = 3,3$ Hz, H-9b); 6,71 (dd, 1H, $J_1 = 7,8$ Hz e $J_2 = 1,5$ Hz, H-5); 6,75 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H-6); 6,86 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-3); 7,84 (s, 1H, H-10). O espectro é apresentado na Figura A97 (pg. 319) no anexo.

RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) δ : 21,4 (C-3'/C-5'); 24,9 (C-4'); 37,4 (C-2'/C-6'); 40,3 (C-7); 54,8 (C-9); 54,9 (OCH_3); 68,7 (C-8); 71,1 (C-1'); 112,8 (C-3); 114,9 (C-6); 121,4 (C-5); 122,1 (C-10); 128,9 (C-4); 144,8 (C-1/ C-2); 147,5 (C-11). O espectro é apresentado na Figura A98 (pg. 320) no anexo.

Síntese do (\pm) 4-(3-(4-((4-*alil*-2-metoxifenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2-hidroxiopropil)-2-metoxifenol (**10g**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,0960 g; 0,226 mmol) com 80% de rendimento empregando-se eugenol (0,0570 g; 0,280 mmol), (\pm) 4-(3-azido-2-hidroxipropil)-2-metoxifenol (**9**) (0,0620 g; 0,280 mmol), ascorbato de sódio (0,0220 g; 0,112 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0140 g; 0,0560 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,13$ (hexano-acetato de etila 1:1 v v⁻¹).

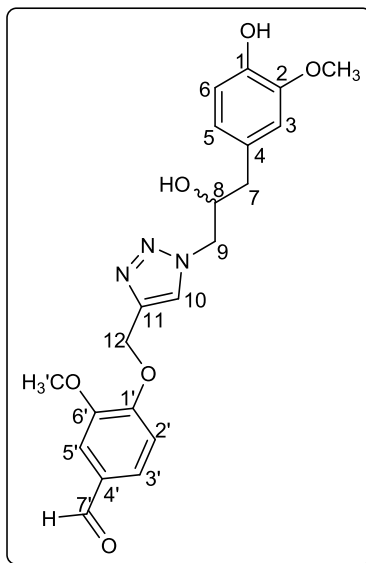
Faixa de fusão: 54,8–55,6 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3351, 3138, 2933, 2912, 2840, 1638, 1592, 1511, 1463, 1427, 1364, 1258, 1221, 1136, 1057, 1028, 1007, 905, 851, 800, 740, 645, 566, 480, 455. O espectro é apresentado na Figura 7.8 (pg. 216).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,69 (dd, 1H, $J_1 = 14,0$ Hz e $J_2 = 7,6$ Hz, H-7a); 2,78 (dd, 1H, $J_1 = 14,0$ Hz e $J_2 = 5,2$ Hz, H-7b); 3,33 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-7'); 3,85 (s, 3H, OCH_3'); 3,88 (s, 3H, OCH_3); 4,21-4,26 (m, 1H, H-8); 4,30 (dd, 1H, $J_1 = 12,8$ Hz e $J_2 = 5,2$ Hz, H-9a); 4,49 (dd, 1H, $J_1 = 12,8$ Hz e $J_2 = 1,6$ Hz, H-9b); 5,05-5,12 (m, 2H, H-9'); 5,25 (s, 2H, H-12); 5,95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,0$ Hz e $J_3 = 6,8$ Hz, H-8'); 6,68-6,74 (m, 4H, H-3/H-3'/H-5/H-5'); 6,86 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-6); 6,96 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-2'); 7,76 (s, 1H, H-10). O espectro é apresentado na Figura 7.9 (pg. 217).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 39,8 (C-7'); 40,4 (C-7); 55,0 (C-9); 55,8 (OCH_3'); 55,9 (OCH_3); 63,2 (C-12); 71,4 (C-8); 111,8 (C-5'); 112,4 (C-3); 114,5 (C-6); 114,6 (C-9'); 115,6 (C-2'); 120,5 (C-3'); 122,0 (C-5); 124,5 (C-10); 128,1 (C-4); 133,9 (C-4'); 137,5 (C-8'); 144,2 (C-11); 144,6 (C-1); 145,9 (C-2); 146,7 (C-1'); 149,5 (C-6'). O espectro é apresentado na Figura 7.10 (pg. 218).

Síntese do (\pm) 4-((1-(2-hidroxi-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (**10h**)



Este composto foi obtido como um sólido branco (0,0860 g; 0,208 mmol) com 72% de rendimento empregando-se vanilina (0,0550 g; 0,290 mmol), (\pm) 4-(3-azido-2-hidroxi-2-propil)-2-metoxifenol (**9**) (0,0650 g; 0,290 mmol), ascorbato de sódio (0,0230 g; 0,116 mmol) e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0150 g; 0,0580 mmol).

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,30$ (hexano-acetato de etila 1:1 v v⁻¹).

Faixa de fusão: 144,4–145,6 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3292, 2933, 2840, 2009, 1674, 1582, 1506, 1464, 1424, 1396, 1266, 1234, 1156, 1133, 1093, 1027, 1001, 929, 866, 853, 814, 781, 729, 642, 563, 530, 455. O espectro é apresentado na Figura A99 (pg. 321) no anexo.

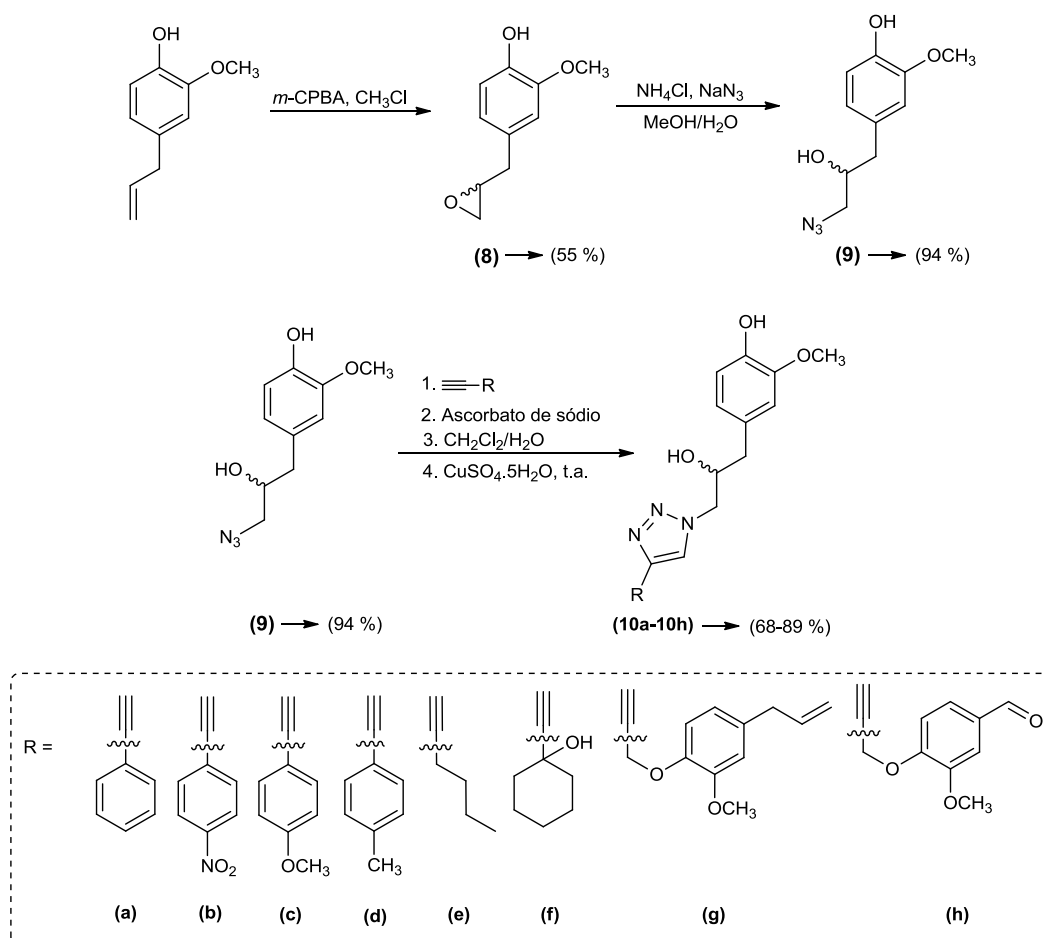
RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) δ : 1,26 (dd, 2H, $J_1 = 11,3$ Hz e $J_2 = 6,3$ Hz, H-7a, H-7b); 3,13 (s, 3H, OCH_3'); 3,19 (s, 3H, OCH_3); 3,69-3,78 (m, 1H, H-8); 3,95 (dd, 1H, $J_1 = 11,8$ Hz e $J_2 = 6,4$ Hz, H-9a); 4,24 (dd, 1H, $J_1 = 11,7$ Hz e $J_2 = 2,9$ Hz, H-9b); 5,44 (s, 2H, H-12); 8,00 (dd, 1H, $J_1 = 6,8$ Hz e $J_2 = 1,2$ Hz, H-5); 8,08 (s, 1H, H-10); 8,09 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz, H-6); 8,26 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz, H-3); 8,45 (dd, 1H, $J_1 = 7,0$ Hz e $J_2 = 1,2$ Hz, H-3'); 8,58 (d, 1H, $J = 1,2$ Hz, H-5'); 8,62 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz, H-2'); 10,24 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura 100 (pg. 322) no anexo.

RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) δ : 44,2 (C-7); 58,9 (OCH_3'); 58,9 (OCH_3); 66,2 (C-9); 74,9 (C-12); 106,8 (C-8); 114,3 (C-5'); 116,7 (C-3); 118,1 (C-2'); 118,7 (C-6); 122,9 (C-5); 125,5 (C-10); 129,1 (C-3'); 132,8 (C-4); 136,1 (C-4'); 147,2 (C-11); 148,8 (C-1); 151,4 (C-2); 151,7 (C-6'); 153,5 (C-1')^{*}. O espectro é apresentado na Figura 101 (pg. 323) no anexo.

^{*}O sinal para o grupo carbonila não foi observado no espectro de RMN de ^{13}C . Porém, a presença deste grupo funcional pode ser confirmada pela banda intensa em 1674 cm^{-1} observada no espectro no infravermelho, bem como pelo simpleto observado em $\delta_{\text{H}} 10,24$ no espectro de RMN de ^1H .

7.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

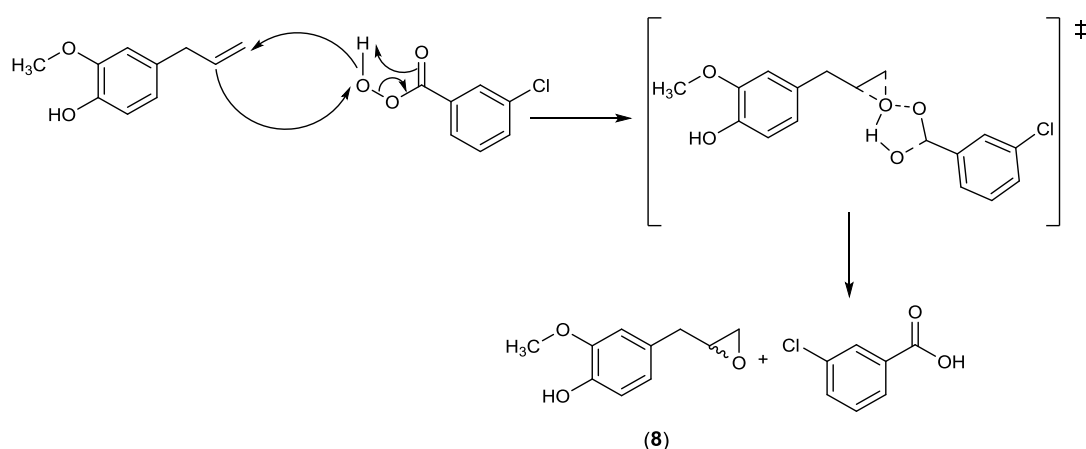
Os compostos triazólicos derivados do eugenol **10a-10h** foram sintetizados de acordo com a rota sintética apresentada no Esquema 7.2.



Esquema 7.2. Reações envolvidas na preparação dos compostos triazólicos **10a-10h**.

Os epóxidos podem ser preparados a partir de diferentes classes de compostos, mas comumente são derivados de alcenos. Um dos métodos convencionais para se preparar epóxidos é a partir da reação de alcenos com perácidos, sendo o ácido *meta*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA) um perácido relativamente estável, adquirido comercialmente e amplamente utilizado nas epoxidações (CLAYDEN *et al.*, 2001).

A etapa inicial da síntese dos compostos **10a-10h** consistiu na modificação estrutural do eugenol via reação de epoxidação levando à formação do composto **8**. O mecanismo proposto para a reação está representado no Esquema 7.3.



Esquema 7.3. Mecanismo para a reação de epoxidação do eugenol.

O derivado **8** foi obtido com 55% de rendimento após purificação em coluna cromatográfica de sílica gel e sua estrutura foi confirmada por espectroscopia no IV e de RMN de ^1H e ^{13}C .

Analisando o espectro no IV do composto **8** (Figura 7.2., pg. 205) a banda larga em 3399 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação O–H característica de fenol. A presença das bandas em 3057 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C–H, e em 1235 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C–O–C confirmam a presença do anel epóxido. As bandas atribuídas ao estiramento da ligação C–H com hibridização sp^3 foram observadas em 2933 e 2842 cm^{-1} . As bandas em 1603 , 1513 e 1462 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos da ligação C=C de anel aromático. Já a banda em 2998 cm^{-1} foi relacionada ao estiramento da ligação =CH de anel aromático. Por fim, destacam-se as bandas em 1269 e 1030 cm^{-1} referentes aos estiramentos da ligação C–O de éter aromático (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **8** (Figura 7.3., pg. 206), o duplete de dupletos observado em δ_{H} 2,56, integrado para um átomo de hidrogênio e com valores de constantes de acoplamento iguais a $J_1 = 5,0$ Hz e $J_2 = 2,6$ Hz foi atribuído a um dos átomos de hidrogênio (H-9a) ligados a C-9. O valor de deslocamento químico e de constantes de acoplamento $J_{(cis)}$ e $J_{(trans)}$ estão de acordo com os dados típicos descritos na literatura para compostos contendo anéis de três membros (PAVIA *et al.*, 2015). O sinal do outro hidrogênio H-9 (H-9b) foi observado sobreposto ao sinal dos átomos H-7a, H-7b, dando origem ao multiplete observado em δ_{H} 2,80-2,83. O sinal para H-8 também foi observado como um multiplete em δ_{H} 3,12-3,17. O simpleto observado em δ_{H} 3,90 e integrado para três átomos de hidrogênio foi atribuído aos átomos de hidrogênio do grupo metoxila (OCH_3). Na região de deslocamento químico característica de hidrogênios aromáticos foi observada a presença do duplete de dupletos em δ_{H} 6,75 atribuído ao hidrogênio H-5, o qual apresentou constante de acoplamento $J_1 = 8,0$ Hz e $J_2 = 1,8$ Hz. Observou-se também nesta região a presença do duplete em δ_{H} 6,78 atribuído ao hidrogênio H-3 e o duplete em δ_{H} 6,87 com constante de acoplamento $J = 8,0$ Hz, atribuído ao hidrogênio H-6. Os valores idênticos de constantes de acoplamento ($J = 8,0$ Hz), encontrados para H-5 e H-6 são típicos para acoplamentos de hidrogênios em posição *orto* e estão em total acordo com a literatura (PAVIA *et al.*, 2015).

Com respeito ao espectro de RMN de ^{13}C (Figura 7.4., pg. 207) observa-se que o número de sinais presentes no espectro é compatível com a estrutura desta substância. Os sinais correspondentes aos átomos de carbono do anel epóxido foram observados em δ_{C} 46,7 (C-9) e em δ_{C} 52,7 (C-8). O sinal observado em δ_{C} 38,3 foi atribuído ao carbono metilênico (C-7). O sinal observado em δ_{C} 55,9 foi associado ao carbono do grupo metoxila (OCH_3). Os demais sinais correspondem aos carbonos do anel aromático.

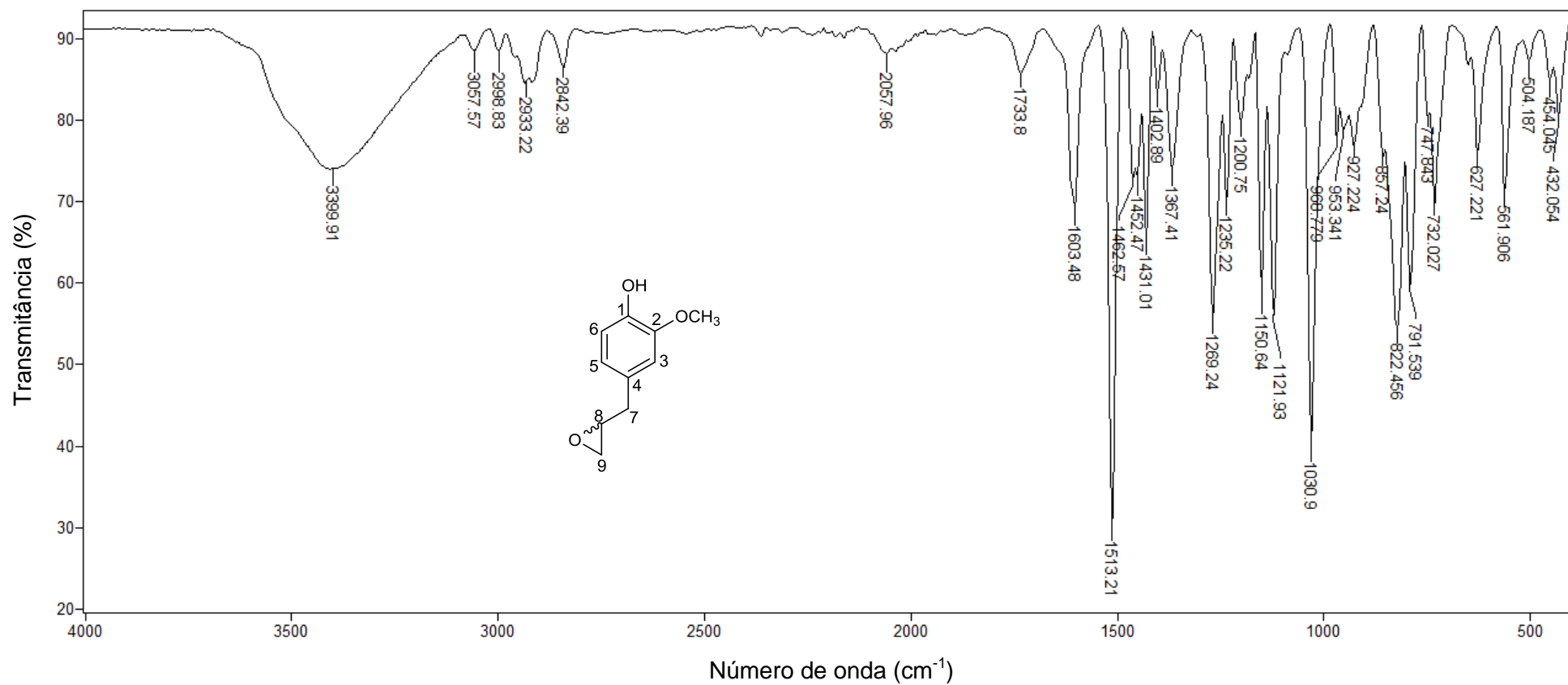


Figura 7.2. Espectro no infravermelho (ATR) do composto 8.

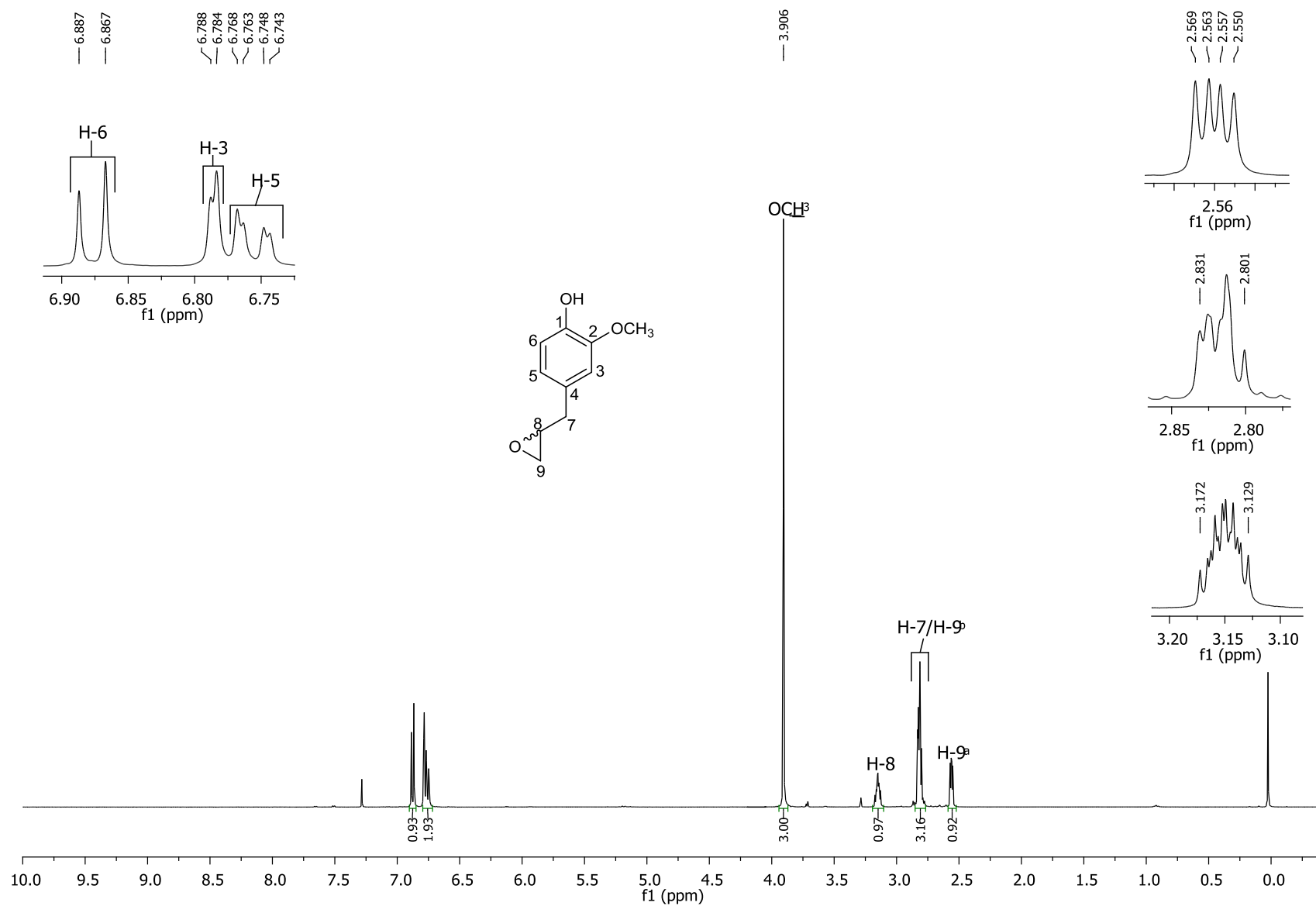


Figura 7.3. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **8**.

δ

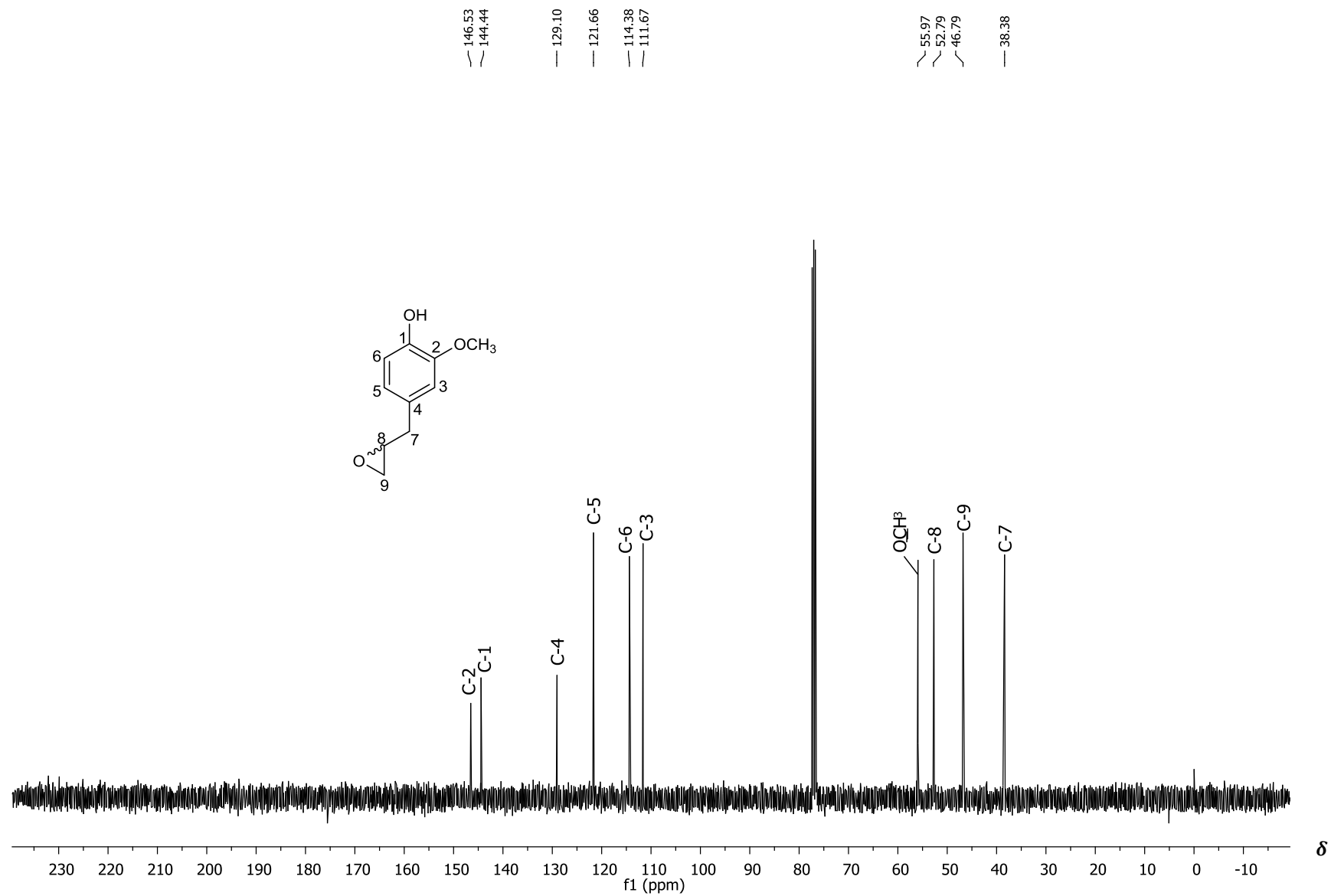
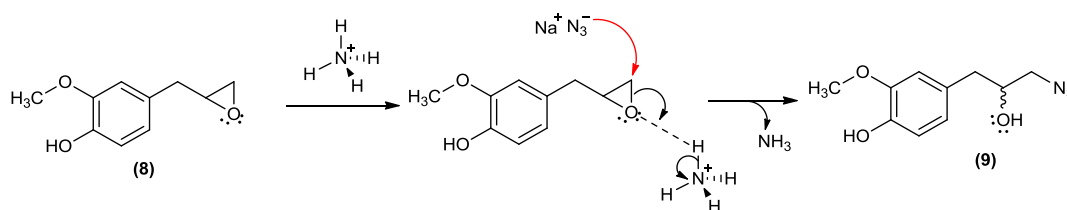


Figura 7.4. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **8**.

Uma vez obtido o composto epoxidado realizou-se a síntese da azida orgânica **9** via reação de abertura do anel de epóxido.

Para a abertura do anel de epóxido do composto **8** foi utilizado o método clássico de obtenção de 1,2-azido-álcoois. A reação foi então conduzida na presença de cloreto de amônio e azida de sódio em metanol e água a 60 °C. Sob essas condições, o cloreto de amônio se coordena ao anel oxirano e o ataque do nucleófilo ocorre principalmente no carbono menos substituído (FRINGUELLI *et al.*, 1999; AMANTINI *et al.*, 2002). O mecanismo proposto para a reação está representado no Esquema 7.4.



Esquema 7.4. Mecanismo para a abertura do epóxido **8** derivado do eugenol.

O composto **9** foi obtido com 94% de rendimento e sua identidade foi confirmada por espectroscopia no IV e de RMN de ^1H e ^{13}C .

Analisando o espectro no infravermelho do composto **9** (Figura 7.5, pg. 210), a banda intensa em 2097 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação tripla entre átomos de nitrogênio confirmando a formação da azida.

No espectro de RMN de ^1H do composto **9** (Figura 7.6., pg. 211) os dupletos de dupletos observados em δ_{H} 2,70 e δ_{H} 2,75 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio metilênicos diastereotópicos H-7a e H-7b. O hidrogênio H-7a apresentou valores de constantes de acoplamentos iguais a $J_1 = 13,8\text{ Hz}$ e $J_2 = 7,8\text{ Hz}$, enquanto H-7b apresentou valores de constantes iguais a $J_1 = 13,8\text{ Hz}$ e $J_2 = 5,8\text{ Hz}$. Os dupletos de dupletos observados em δ_{H} 3,28 e δ_{H} 3,37 foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-9a e H-9b. Estes sinais são mais desblindados devido ao efeito retirador de elétrons por efeito indutivo dos átomos de nitrogênios do grupo azida. Por fim, o sinal do hidrogênio H-8 foi observado como multipletos em δ_{H} 3,92-3,99, estando mais desblindado em relação aos dupletos de dupletos, uma vez que se encontra ligado diretamente à hidroxila. Os outros sinais foram atribuídos comparando-se os sinais observados

no espectro de RMN de ^1H do composto **8** com aqueles observados no espectro de **9**. (PAVIA *et al.*, 2015).

Com respeito ao espectro de RMN de ^{13}C (Figura 7.7., pg. 212) observa-se que o número de sinais presentes no espectro é compatível com a estrutura desta substância. O sinal observado em δ_{C} 55,9 foi atribuído ao carbono C-9 ligado ao grupo funcional azida. Já o sinal em δ_{C} 71,7 foi relacionado ao carbono C-8 ligado à hidroxila. Os demais sinais foram atribuídos comparando-se os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C do composto **8** com aqueles observados no espectro de **9**.

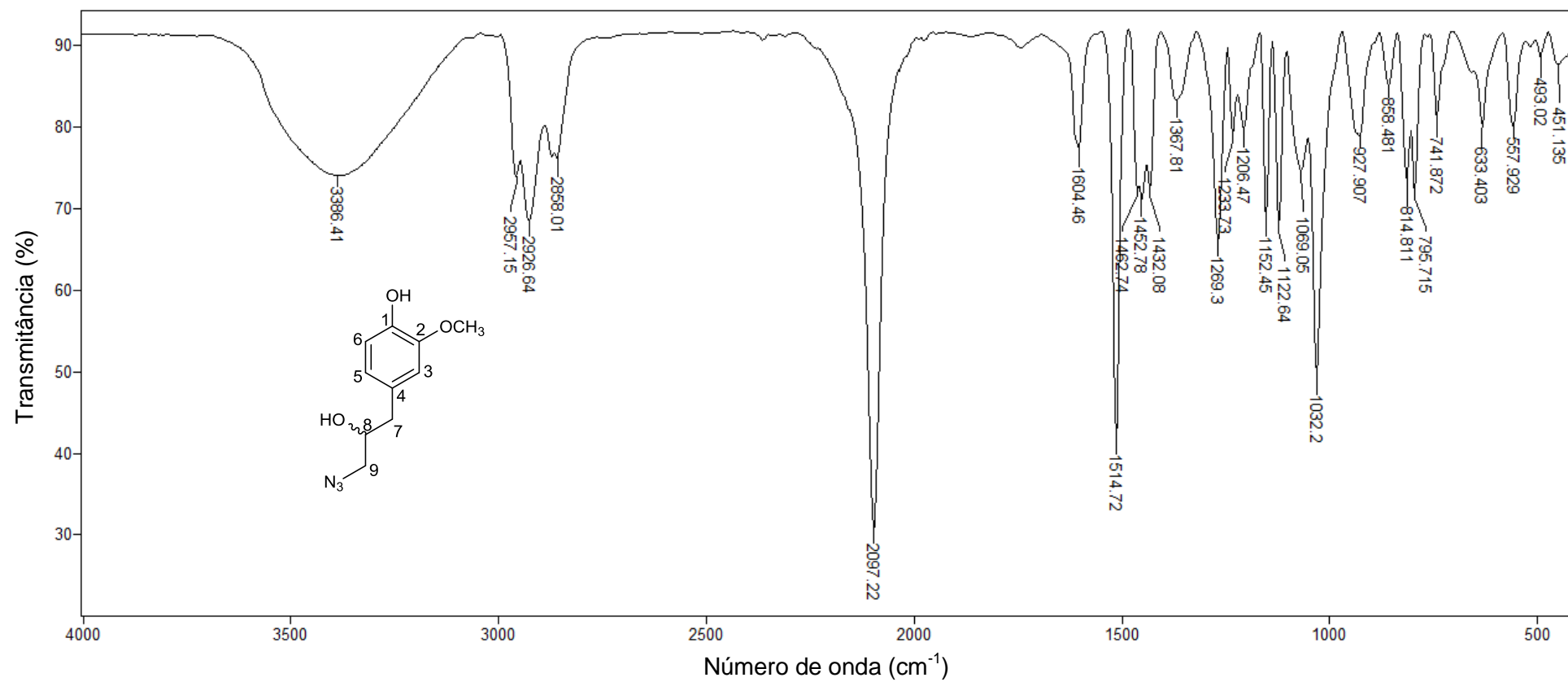


Figura 7.5. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9**.

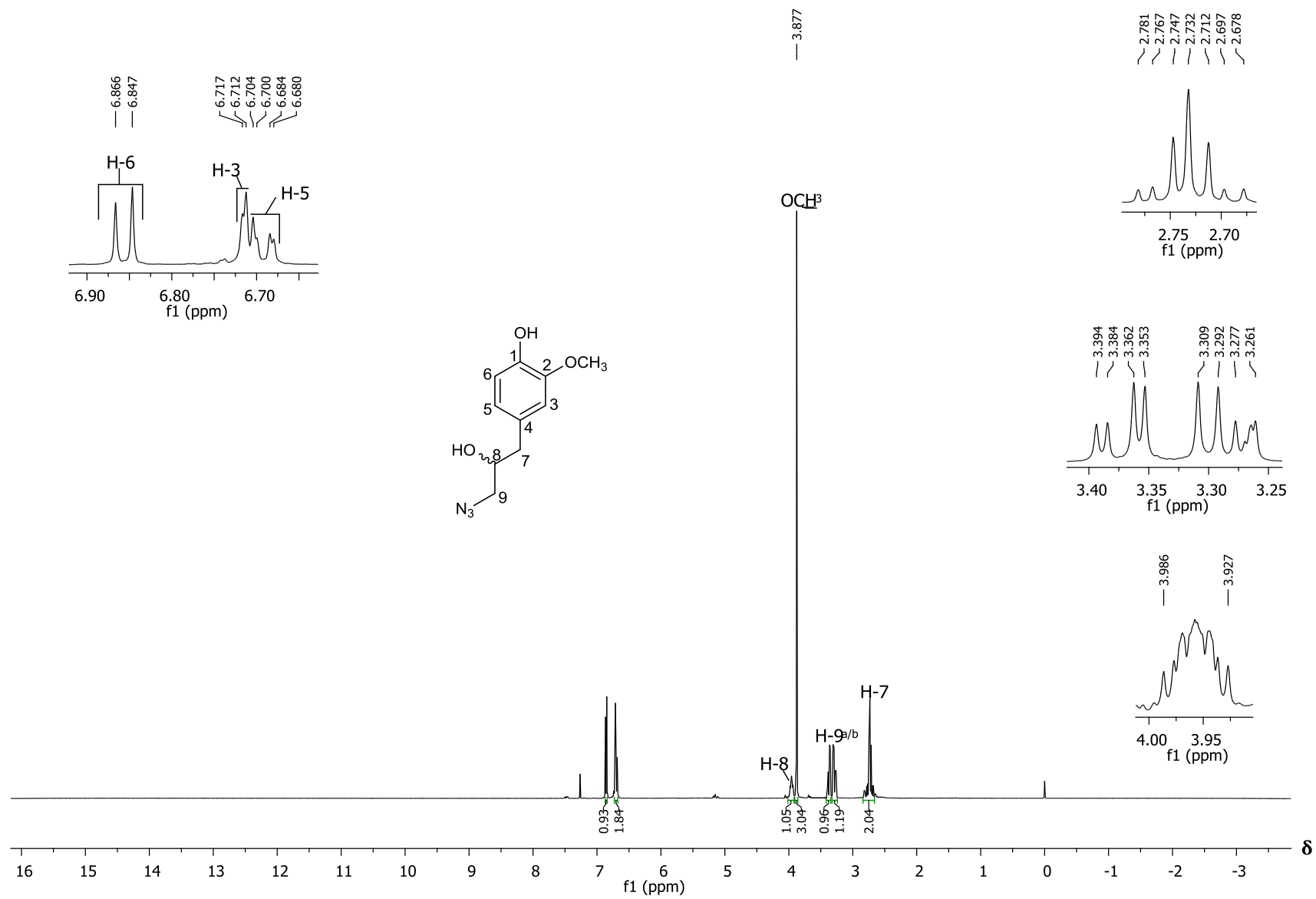


Figura 7.6. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **9**.

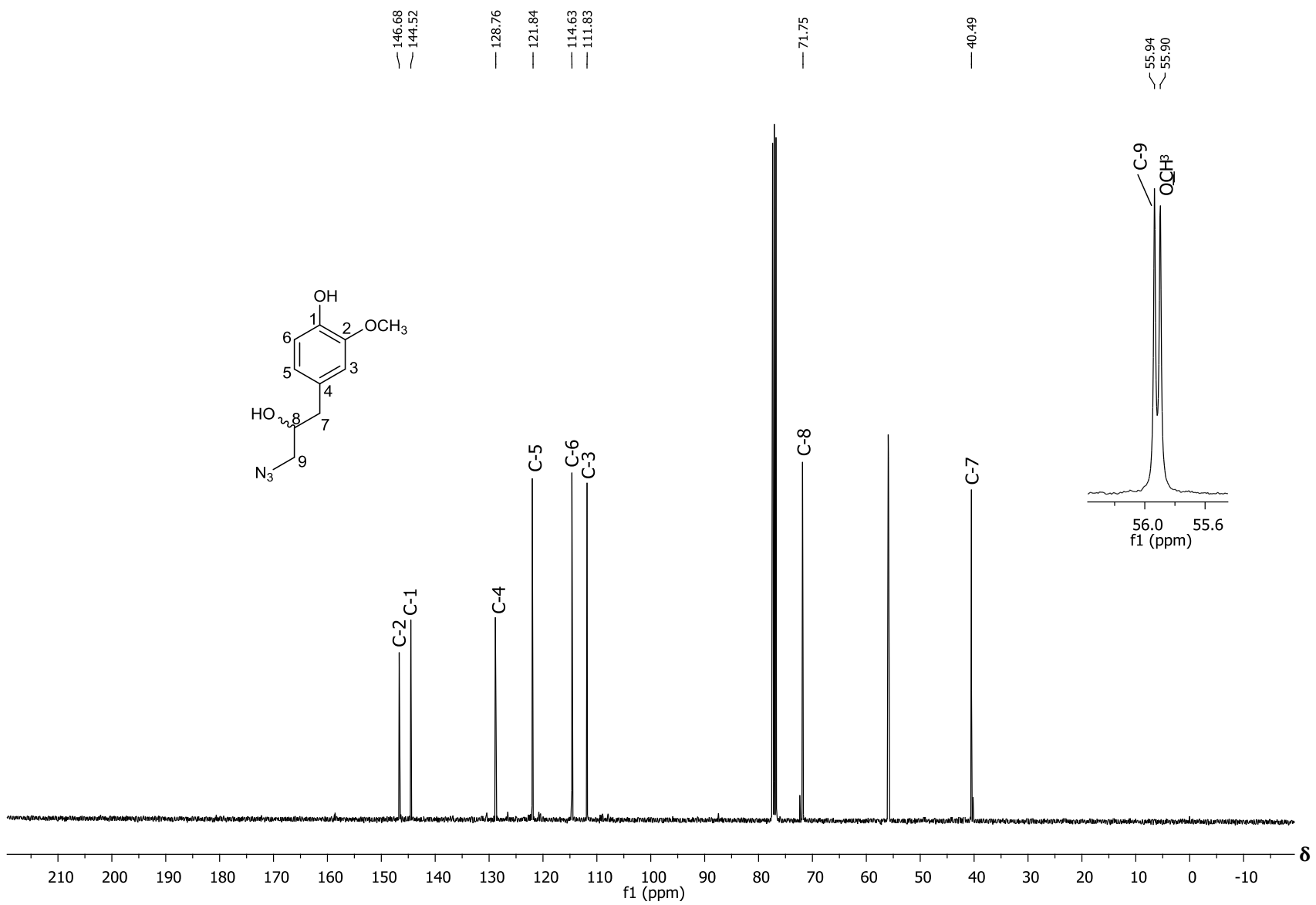
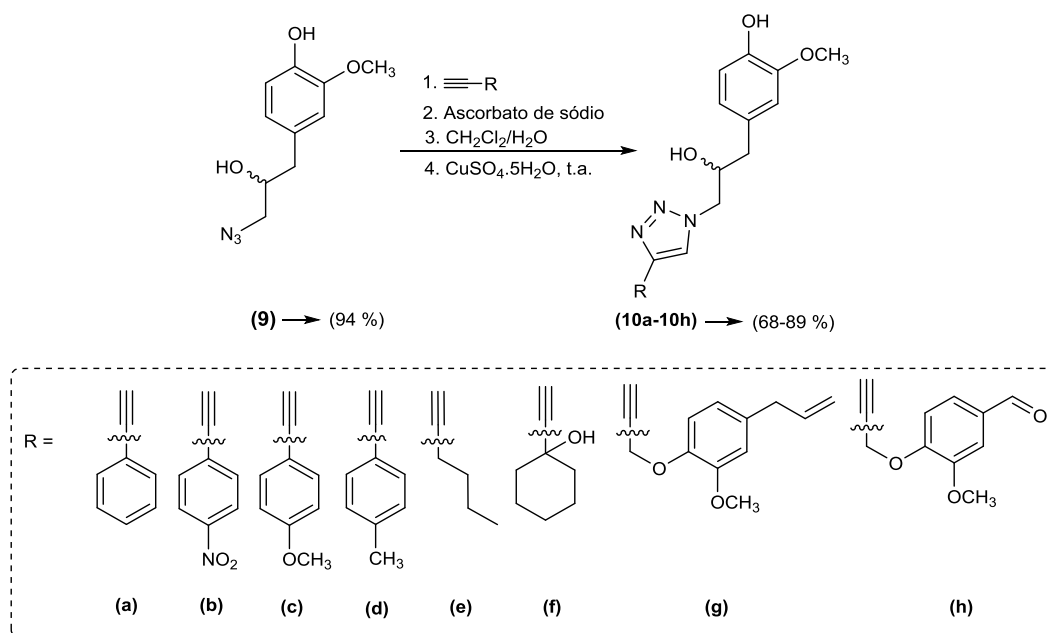


Figura 7.7. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **9**.

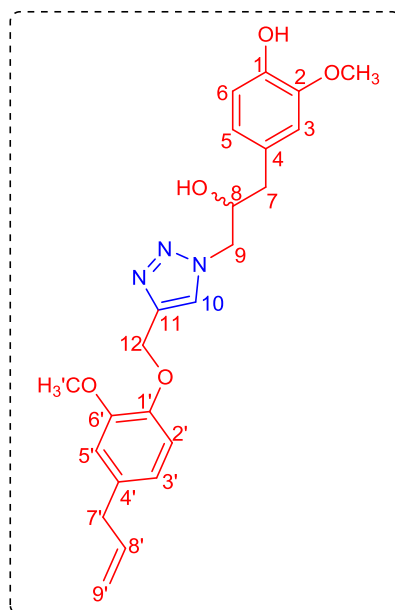
Após a obtenção da azida orgânica procedeu-se a preparação dos compostos triazólicos derivados do eugenol. Os compostos **10a-10h** foram sintetizados via reação “click” a partir da azida **9** e de alquinos comerciais. A discussão detalhada sobre a reação “click” e a proposta atual do ciclo catalítico foram apresentadas no Capítulo 2. No Esquema 7.5 encontra-se representada a reação CuAAC utilizada para a síntese deste derivados.



Esquema 7.5. Reação CuAAC utilizada para a obtenção dos compostos triazólicos **10a-10h**.

A seguir será discutida a caracterização estrutural de um dos compostos 1,2,3-triazólico sintetizados. Os dados espectroscópicos dos demais derivados podem ser verificados na seção 7.3.3 (pgs. 191) e os respectivos espectros estão apresentados no Anexo.

A identidade do híbrido **10g** contendo os fragmentos: **eugenol**, **1,2,3-triazol** e **eugenol**, foi confirmada pela espectroscopia no IV e de RMN de ^1H e ^{13}C .



Analisando o espectro no IV do composto **10h** (Figura 7.8, pg. 216) a banda larga em 3351 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação O-H. Já a banda em 3138 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C-H com hibridização sp^2 , enquanto a banda em 2933 cm^{-1} foi banda atribuída ao estiramento da ligação C-H com hibridização sp^3 . O estiramento da ligação de C=C do alqueno foi observado em 1638 cm^{-1} . As bandas em 1592, 1511 e 1463 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos da ligação C=C de anel aromático. Por fim, as bandas em 1258 e 1028 cm^{-1} são referentes aos estiramentos da ligação C-O de éter aromático (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **10h** (Figura 7.9, pg. 217), os dupletos de dupletos observados em δ_H 2,69 e δ_H 2,78 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio metilênicos diastereotópicos (H-7a e H-7b). O hidrogênio H-7a apresentou valores de constantes de acoplamento $J_1 = 14,0\text{ Hz}$ e $J_2 = 7,6\text{ Hz}$, já H-7b apresentou valores de constantes $J_1 = 14,0\text{ Hz}$ e $J_2 = 5,2\text{ Hz}$. O dupletos em δ_H 3,33 e integrado para dois átomos de hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios metilênicos H-7'. Os simpletos observados em δ_H 3,85 e δ_H 3,88 correspondem aos sinais dos hidrogênios dos grupos metoxila ($\text{OCH}_3'/\text{OCH}_3$). O sinal para H-8 foi observado como um multipletos em δ_H 4,21-4,26. Já os átomos de hidrogênios metilênicos diastereotópicos (H-9a/H-9b) foram observados como dupletos de dupletos em δ_H 4,30 e δ_H 4,49. Outro multipletos foi observado nesta região, em δ_H 5,05-5,12, e atribuído ao hidrogênio H-9'. O simpleto observado em δ_H 5,25 e integrado para dois átomos de hidrogênios corresponde ao sinal dos

hidrogênios metilênicos H-12. A multiplicidade esperada para H-8' seria um duplete de duplete de tripleto, o qual deveria apresentar seis picos em cada metade do multiplete simétrico. No entanto, devido à sobreposição de sinais o que se observa é um sinal que se assemelha a quintetos sobrepostos (PAVIA *et al.*, 2015). Apesar da sobreposição destes sinais foi possível calcular as constantes de acoplamento alílico $J_{trans} = 16,8$ Hz, $J_{cis} = 10,0$ Hz, além da constante de acoplamento $J = 6,8$ Hz referente ao acoplamento de H-8' com os hidrogênios vizinhos H-7'. Na região de deslocamento químico característica de hidrogênios aromáticos foi observada a presença de um multiplete em δ_H 6,68-6,74 atribuído aos hidrogênios H-3/H-3'/H-5/H-5'. Observou-se também nesta região a presença do duplete em δ_H 6,86 atribuído ao hidrogênio H-6 e o duplete em δ_H 6,96 atribuído ao hidrogênio H-2', ambos apresentando constantes de acoplamento iguais $J = 8,0$ Hz. Por fim, o simpleto observado em δ_H 7,76 e integrado para um átomo de hidrogênio foi atribuído ao H-10 e corresponde ao sinal mais desblindado devido ao efeito de anisotropia do anel triazólico e ao efeito retirador de elétrons por efeito indutivo do átomo de nitrogênio.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 7.10., pg. 218) o número de sinais no espectro é compatível com estrutura desta substância. Os sinais dos carbonos metilênicos foram observados em δ_C 39,8 (C-7'), δ_C 40,4 (C-7), δ_C 55,0 (C-9), δ_C 63,2 (C-12). O sinal do carbono C-8, ligado a hidroxila, foi observado em δ_C 71,4. Já, os sinais dos carbonos sp^2 foram observados em δ_C 114,6 (C-9') e δ_C 137,5 (C-8'). Observam-se ainda os sinais em δ_C 55,8 e δ_C 55,9 atribuídos aos carbonos dos grupos metoxila (OCH_3'/OCH_3). Os carbonos do anel triazólico foram observados em δ_C 124,5 e δ_C 144,2, e atribuídos aos carbonos C-10 e C-11, respectivamente. Os demais sinais correspondem aos carbonos do anel aromático.

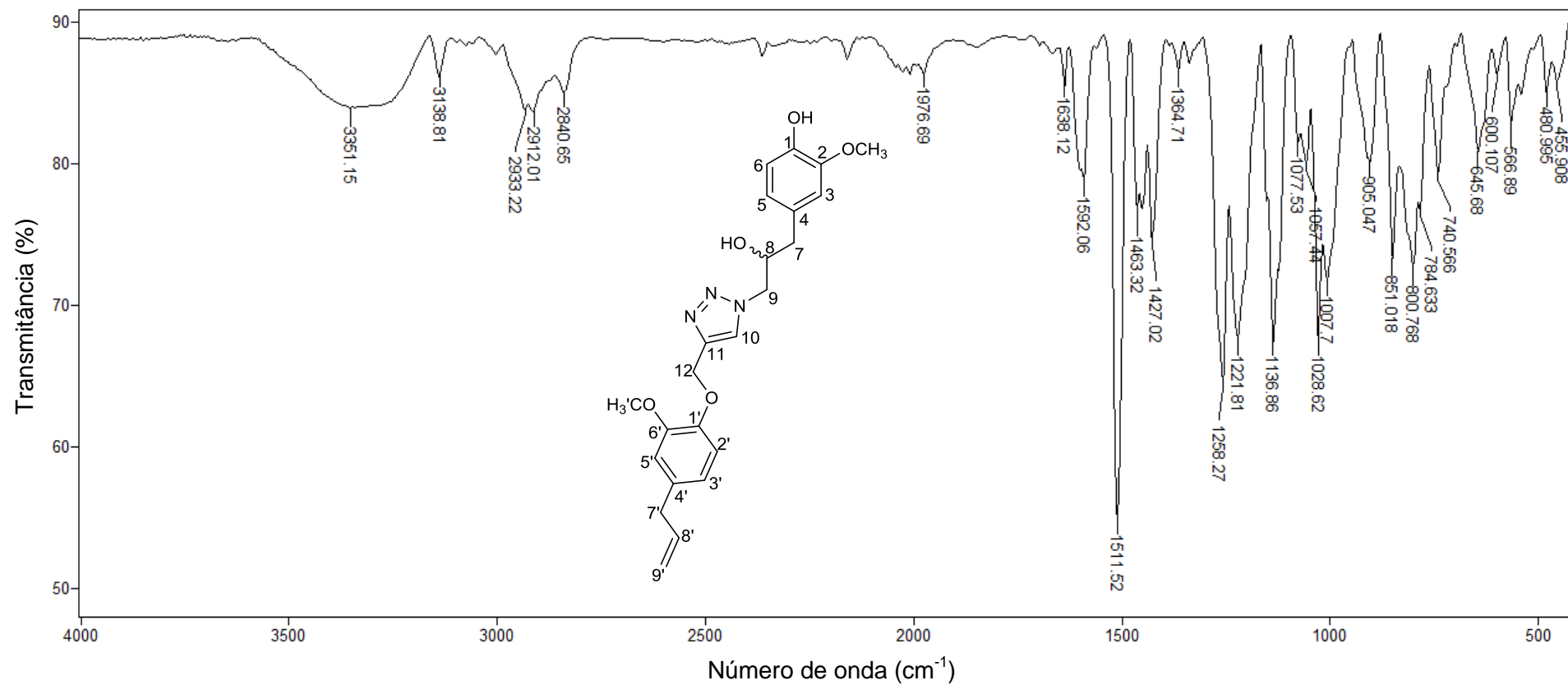


Figura 7.8. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10g**.

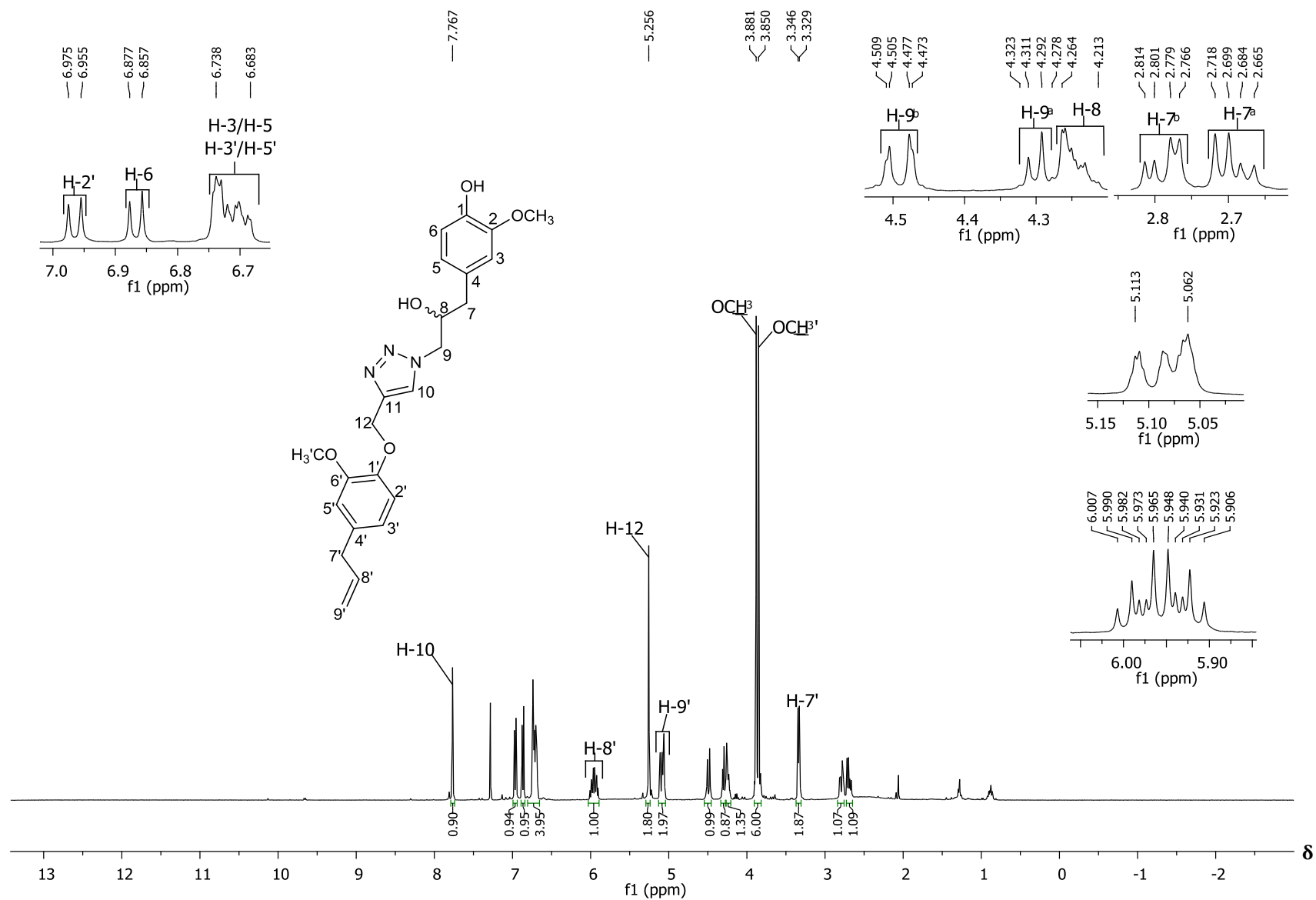


Figura 7.9. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **10g**.

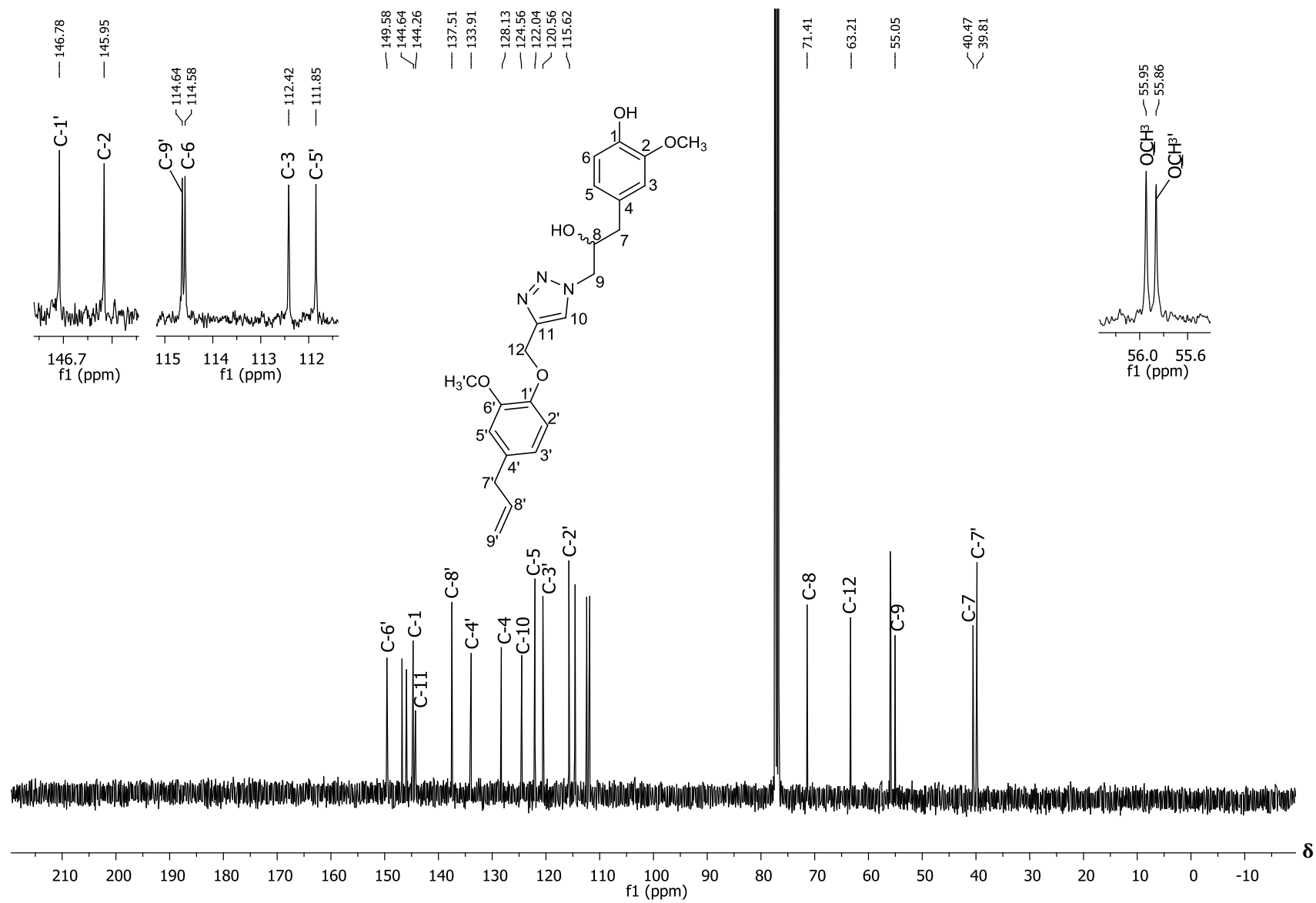


Figura 7.10. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **10g**.

7.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANTINI, D.; FRINGUELLI, F.; PIERMATTI, O.; TORTOIOLI, S.; VACCARO, L. Nucleophilic ring opening of 1,2-epoxides in aqueous médium. *Archive for Organic Chemistry*, v. xi, p. 293-311, 2002.
- BARBOSA, L. C. A. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Editora UFV, 2008.
- CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. *Organic Chemistry*. Ed. Oxford University Press, Oxford, 2001.
- DE OLIVEIRA, ANDRÉ S.; GAZOLLA, POLIANA A. R.; OLIVEIRA, ANA FLÁVIA C. DA S.; PEREIRA, WAGNER L.; DE S. VIOL, LÍVIA C.; MAIA, ANGÉLICA F. DA S.; SANTOS, EDJON G.; DA SILVA, ÍTALO E. P.; MENDES, TIAGO A. DE OLIVEIRA; DA SILVA, ADALBERTO M.; DIAS, ROBERTO S.; DA SILVA, CYNTHIA C.; POLÊTO, MARCELO D.; TEIXEIRA, RÓBSON R.; DE PAULA, SERGIO O. Discovery of novel West Nile Virus protease inhibitor based on isobenzonafuranone and triazolic derivatives of eugenol and indan-1,3-dione scaffolds. *PLoS One*, v. 14, p. e0223017-e0223017, 2019.
- FRINGUELLI, F.; PIERMATTI, O.; PIZZO, F.; VACCARO, L. Ring Opening of Epoxides with Sodium Azide in Water. A Regioselective pH Controlled Reaction. *Journal of Organic Chemistry*, v. 64, p. 6094-6096, 1999.
- GAZOLLA, P. A. R.; TEIXEIRA, R. R.; DA SILVA, A. M.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; SIQUEIRA, R. P.; GONÇALVES, V. H. S.; PEREIRA, H. S.; BRESSAN, G. C. Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. *Química Nova*, v. 41, p. 497-506, 2018.
- PAVIA, D. L. LAMPMAN, G. M. KRIZ, G. S. VYVYAN, J. R. *Introdução à espectroscopia*. Cengage Learning, 2015.
- TEIXEIRA, R. R.; GAZOLLA, P. A. R.; DA SILVA, A. M.; BORSODI, M. P. G.; BERGMANN, B. R.; FERREIRA, R. S.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; LIMA, W. P. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 146, p. 274-286, 2018.
- VIEGAS-JUNIOR, C. *et al.* Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

No presente trabalho foram sintetizados no total sessenta e quatro compostos, sendo onze ésteres metanossulfonatos, doze azidas, dois alquinos terminais, um epóxido, vinte e dois derivados da vanilina contendo o núcleo 1,2,3-triazólico (**6a-6k e 7a-7k**) e dezesseis derivados do eugenol também contendo o núcleo 1,2,3-triazólico (**10a-10h**). Dentre os trinta e oito compostos triazólicos obtidos, trinta e sete ainda não foram descritos na literatura e tiveram suas estruturas confirmadas por meio das espectroscopias de RMN de ^1H e no IV. Os derivados triazólicos da vanilina também tiveram suas estruturas confirmadas por meio da espectrometria de massas de alta resolução. Os derivados triazólicos foram preparados empregando-se como etapa chave a reação “click” e, de modo geral, foram obtidos com rendimentos sinteticamente úteis. Os testes para a avaliação da atividade leishmanicida dos compostos **6a-6k e 7a-7k** mostraram que a conversão da vanilina em derivados triazólicos resultou em compostos capazes de inibir a viabilidade celular das formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. O composto **7b** apresentou valores de IC_{50} promissores iguais a $1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ (formas promastigotas) e $4,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (formas amastigotas). Vale ressaltar que a grande variação entre as espécies do parasito não descarta a possibilidade destes compostos apresentarem atividade contra outras espécies, uma vez que os mesmos foram testados apenas contra a espécie *Leishmania amazonensis*. No que tange aos testes de avaliação de citotoxicidade dos compostos **6a-6k e 7a-7k** contra diferentes linhagens de células de câncer, eles apresentaram, de modo geral, maior eficácia com respeito à inibição das viabilidades celulares quando comparados à vanilina. Dentre os compostos avaliados, a substância **6e** foi a que apresentou melhor resultado frente à linhagem B16F10, reduzindo a viabilidade celular em aproximadamente 70%. Contra a linhagem Jurkat, os compostos **6j, 7e e 7j** apresentaram inibição da viabilidade celular moderada variando entre 40%-65%. De maneira geral, os compostos triazólicos não apresentaram eficácia em inibir a viabilidade da linhagem celular MDA-MB-231. Os testes para a avaliação da atividade fungicida e inseticida dos compostos triazólicos derivados da vanilina não mostraram resultados tão expressivos quando comparados àqueles obtidos nos ensaios de

avaliação de atividade leishmanicida e citotóxica. Porém, estes resultados de baixa eficácia das atividades são relevantes, pois apontam para o caminho a não ser seguido em termos de modificações estruturais da estrutura da vanilina para obtenção de novos fungicidas e inseticidas. Por outro lado, novas alterações estruturais podem ser consideradas, como por exemplo, a introdução de novos grupos funcionais e variação da posição dos grupos funcionais no anel aromático da porção benzílica, de modo que compostos mais promissores possam ser gerados. Os resultados alcançados neste trabalho apontam para o fato de que os derivados da vanilina contendo o núcleo 1,2,3-triazólico podem ser considerados compostos promissores para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos para o tratamento da leishmaniose e do câncer. Novamente, de posse dos dados de atividade biológica *versus* estrutura química obtidos com o desenvolvimento deste trabalho pode-se pensar em subsequentes alterações nas estruturas dos derivados da vanilina para a preparação de compostos ainda mais potentes no que tange à atividade leishmanicida e anticâncer. A rota desenvolvida para a preparação dos novos derivados triazólicos do eugenol é curta (três etapas) e forneceu os derivados em bons rendimentos. Assim, será buscada a preparação de um grupo maior de novos derivados e avaliação de suas bioatividades. Conforme já mostrado ao longo deste trabalho, estudos envolvendo derivados triazólicos do eugenol já resultaram na descoberta de substâncias com importantes atividades leishmanicida, citotóxica e inibidora de protease viral. Uma vez preparados os novos derivados triazólicos do eugenol, o caminho estará pavimentado para a avaliação da atividade biológica destes e possibilidade de resultados ainda mais encorajadores com respeito à bioatividade dos novos derivados do eugenol.

ANEXO I
ESPECTROS

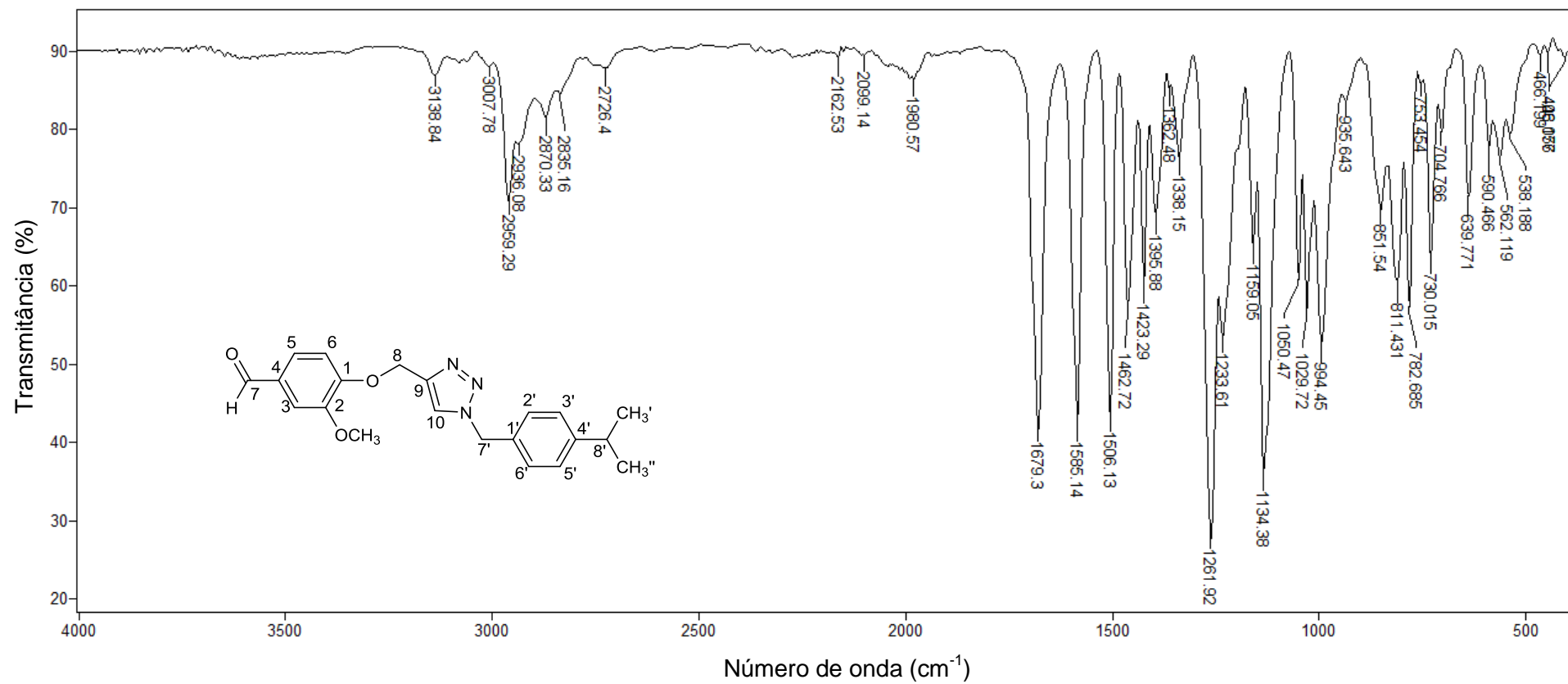


Figura A1. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6a**.

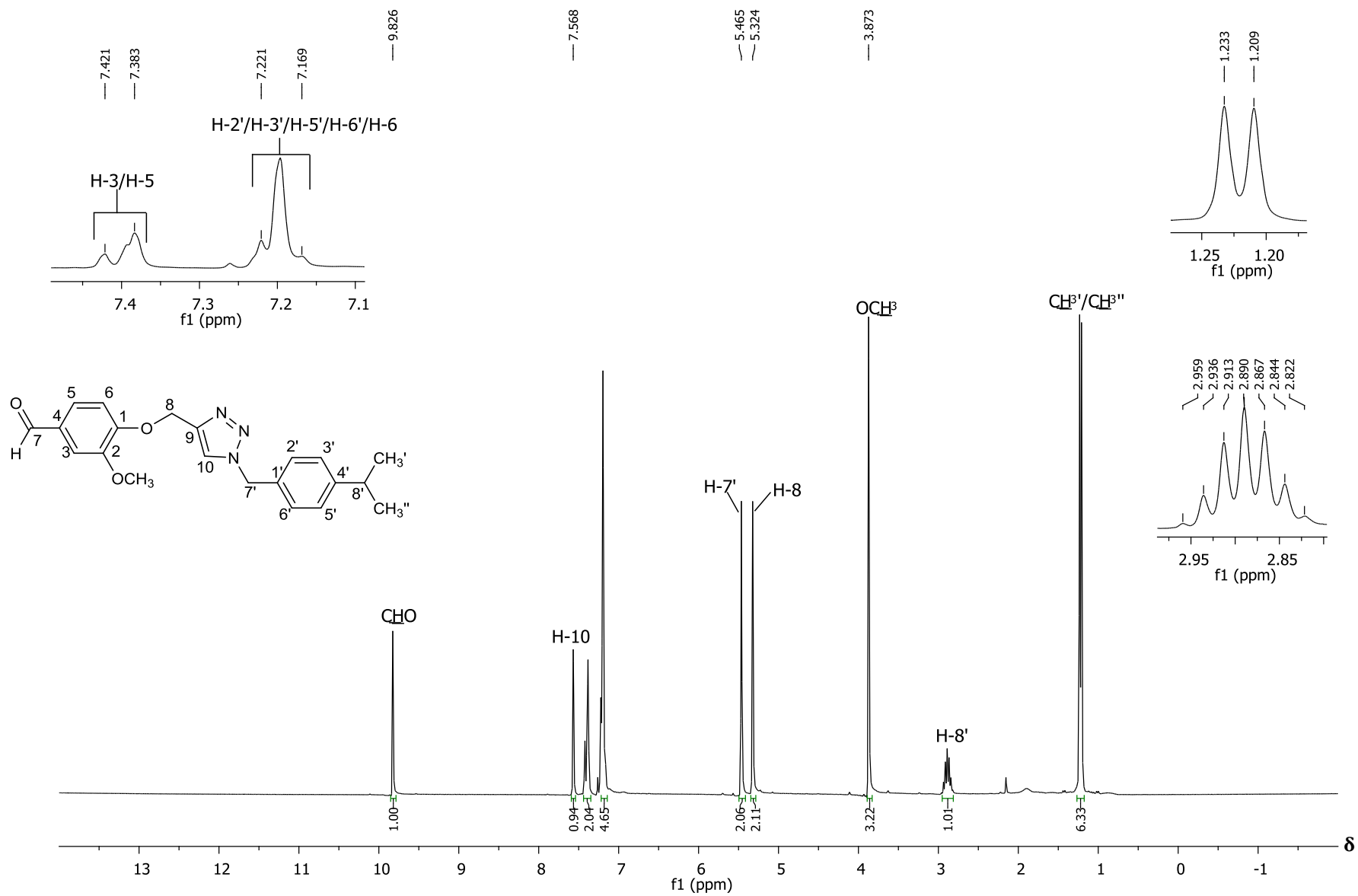


Figura A2. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **6a**.

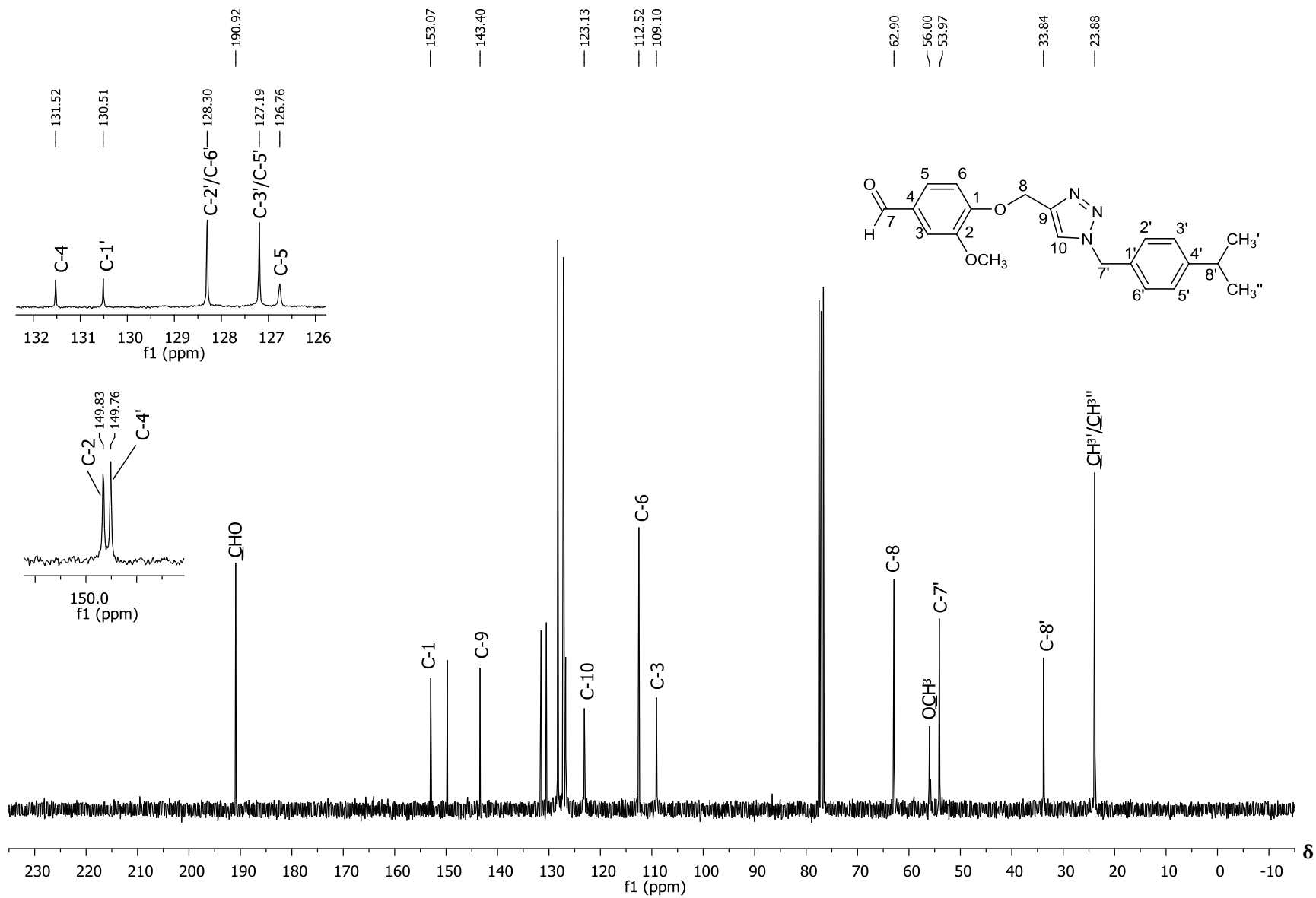


Figura A3. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **6a**.

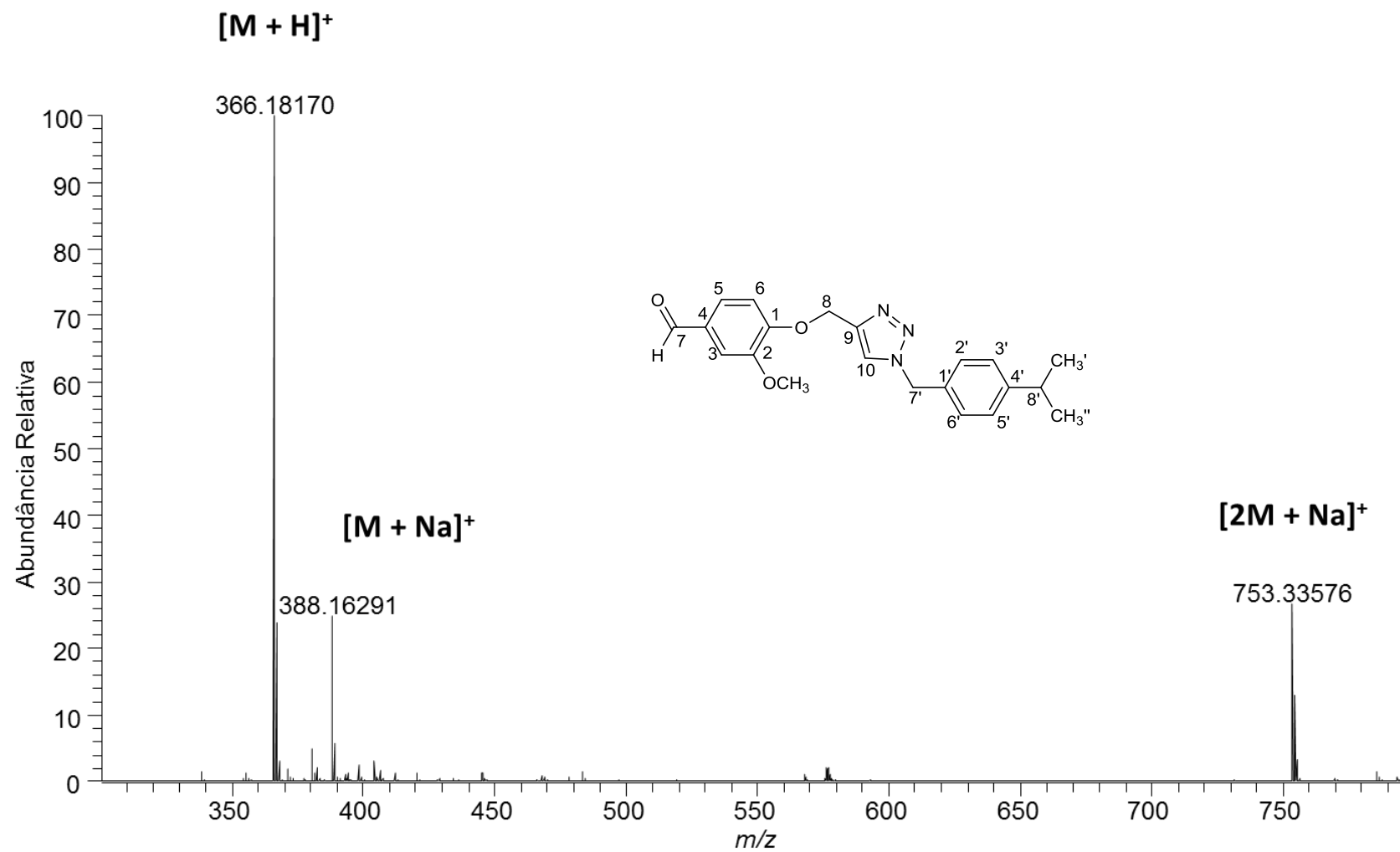


Figura A4. Espectro de massas de alta resolução do composto **6a**.

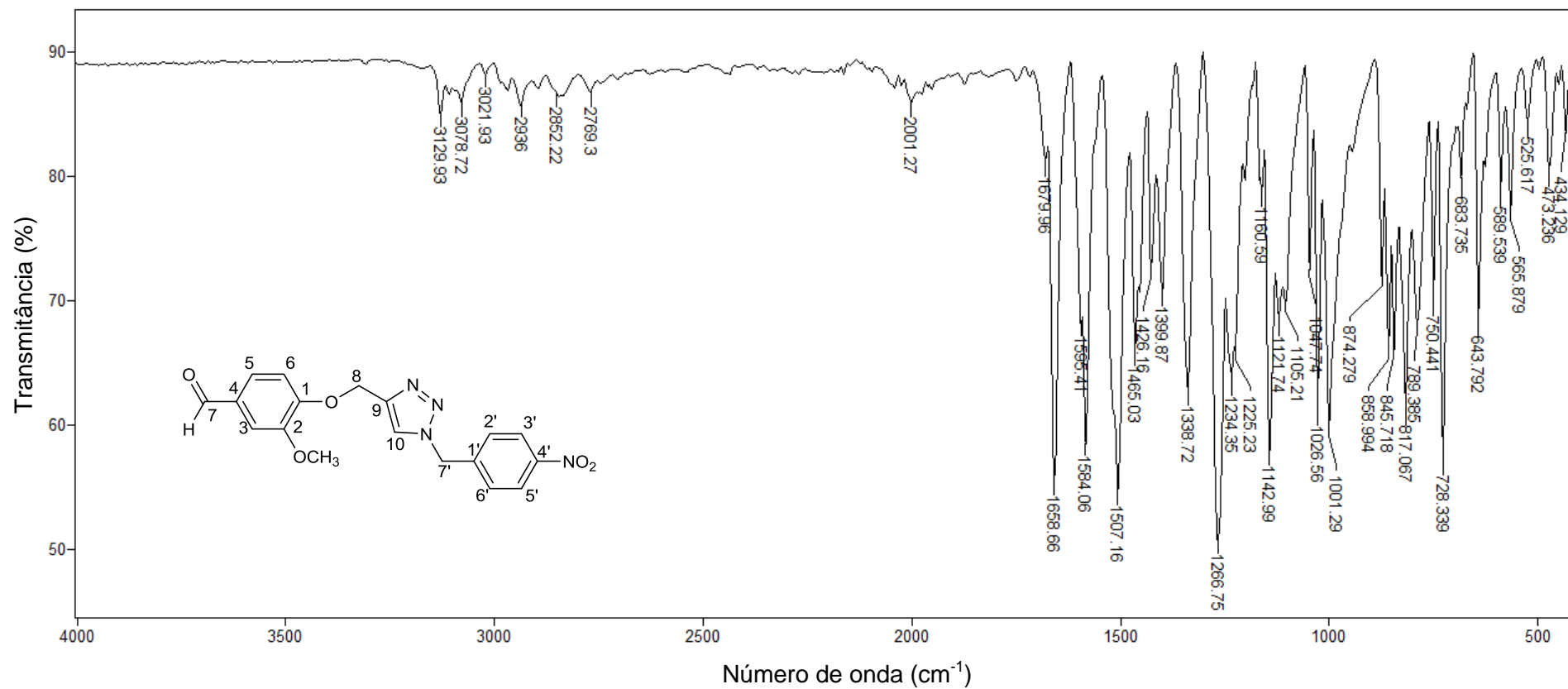


Figura A5. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6b**.

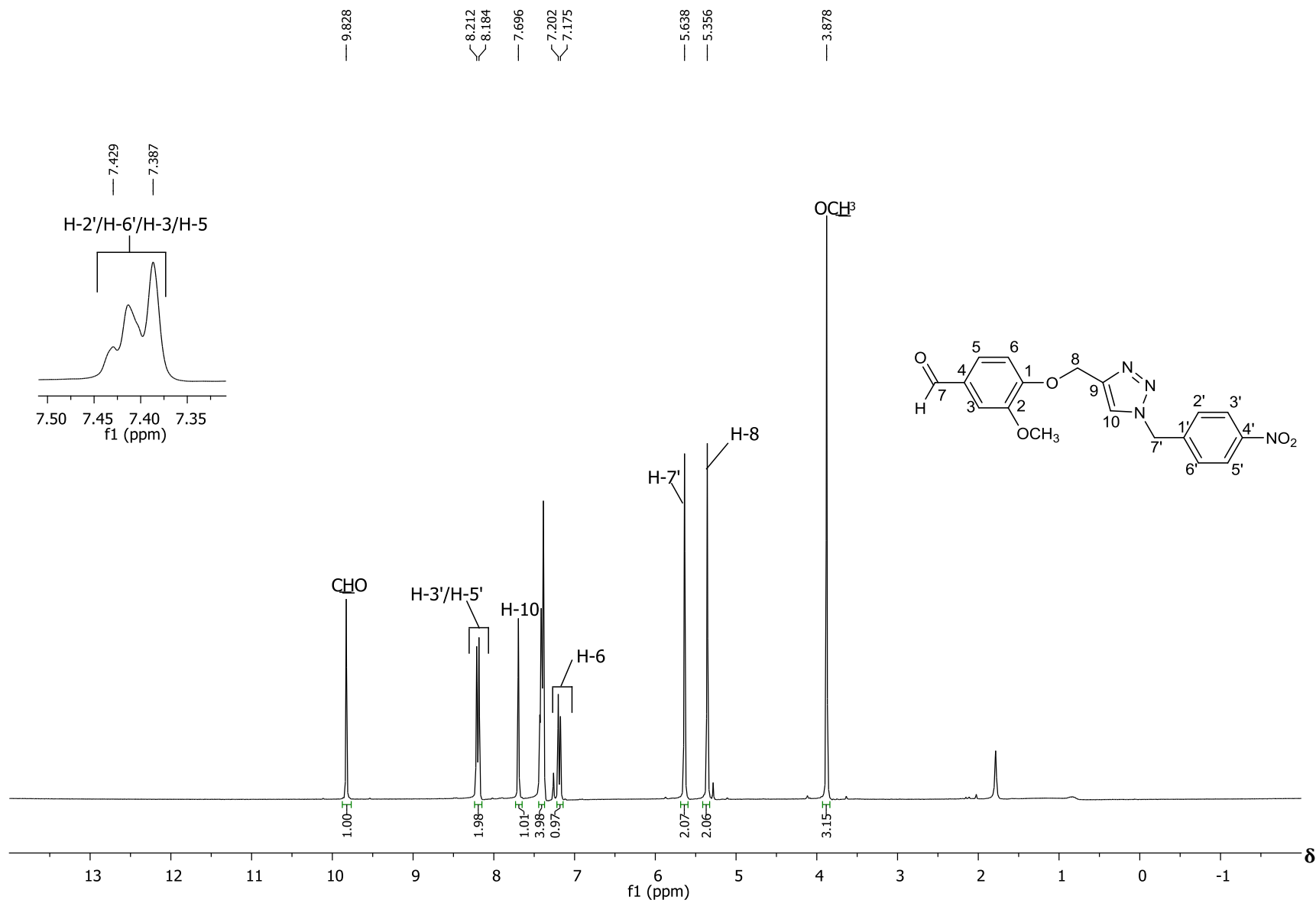


Figura A6. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **6b**.

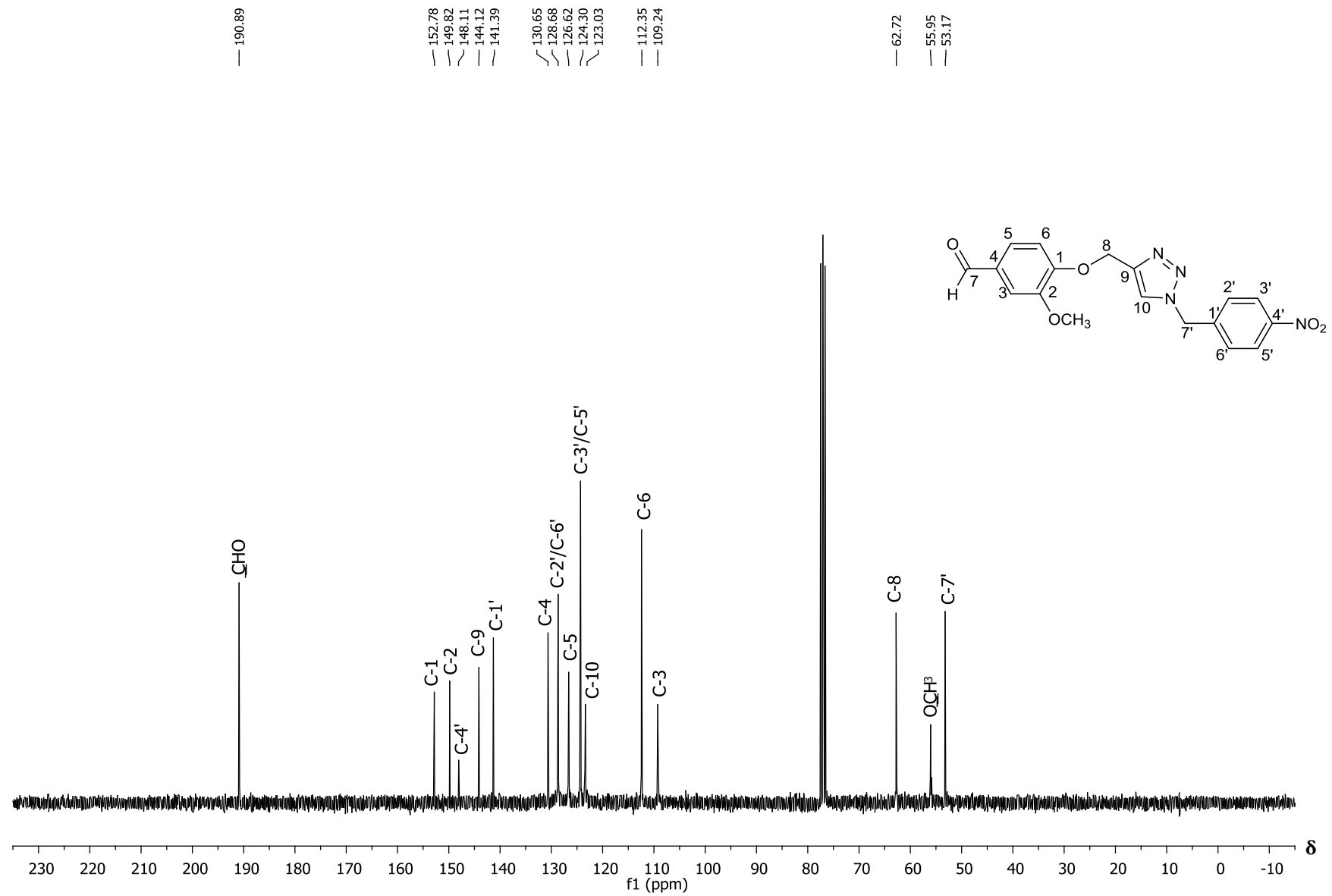


Figura A7. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **6b**.

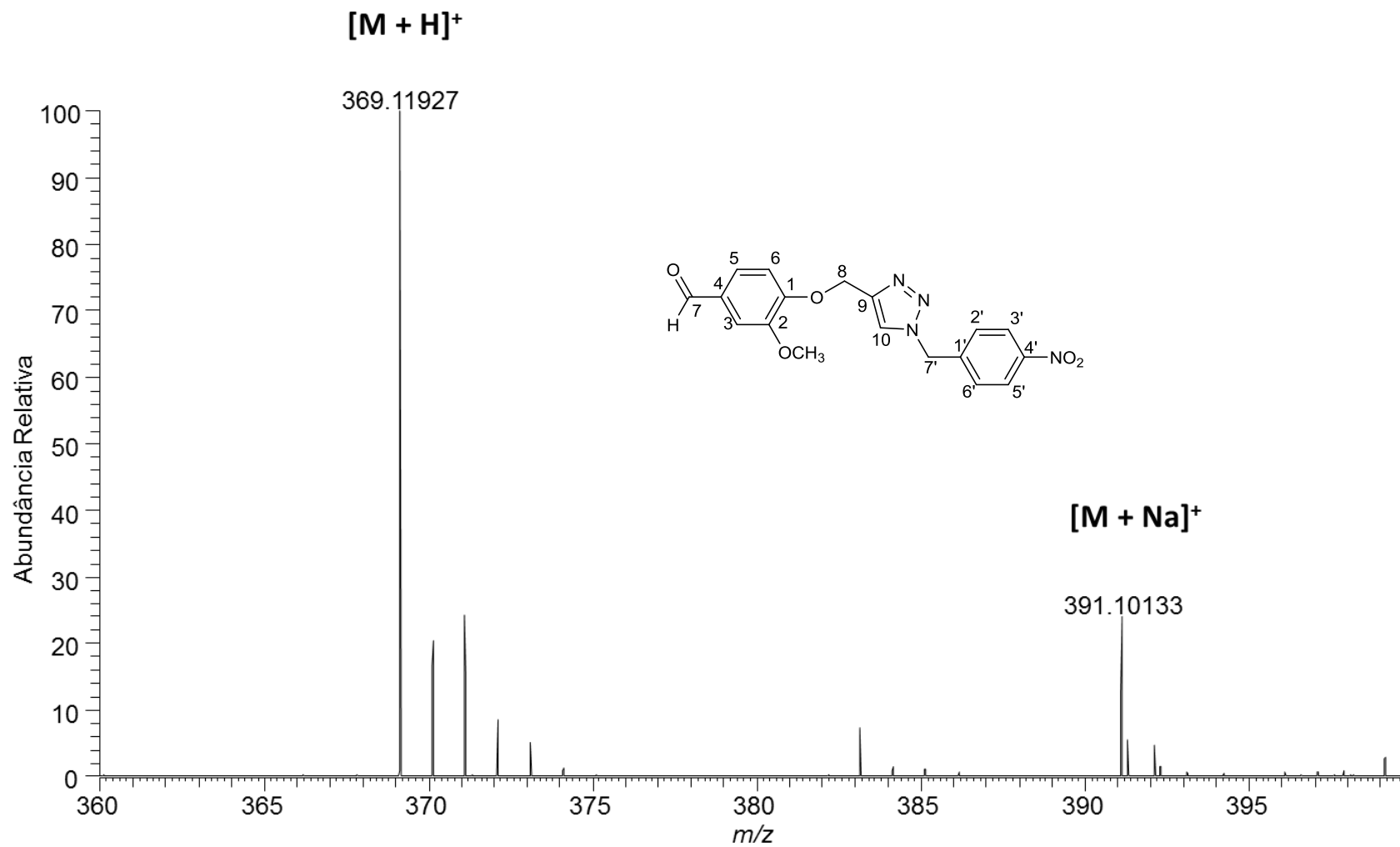


Figura A8. Espectro de massas de alta resolução do composto **6b**.

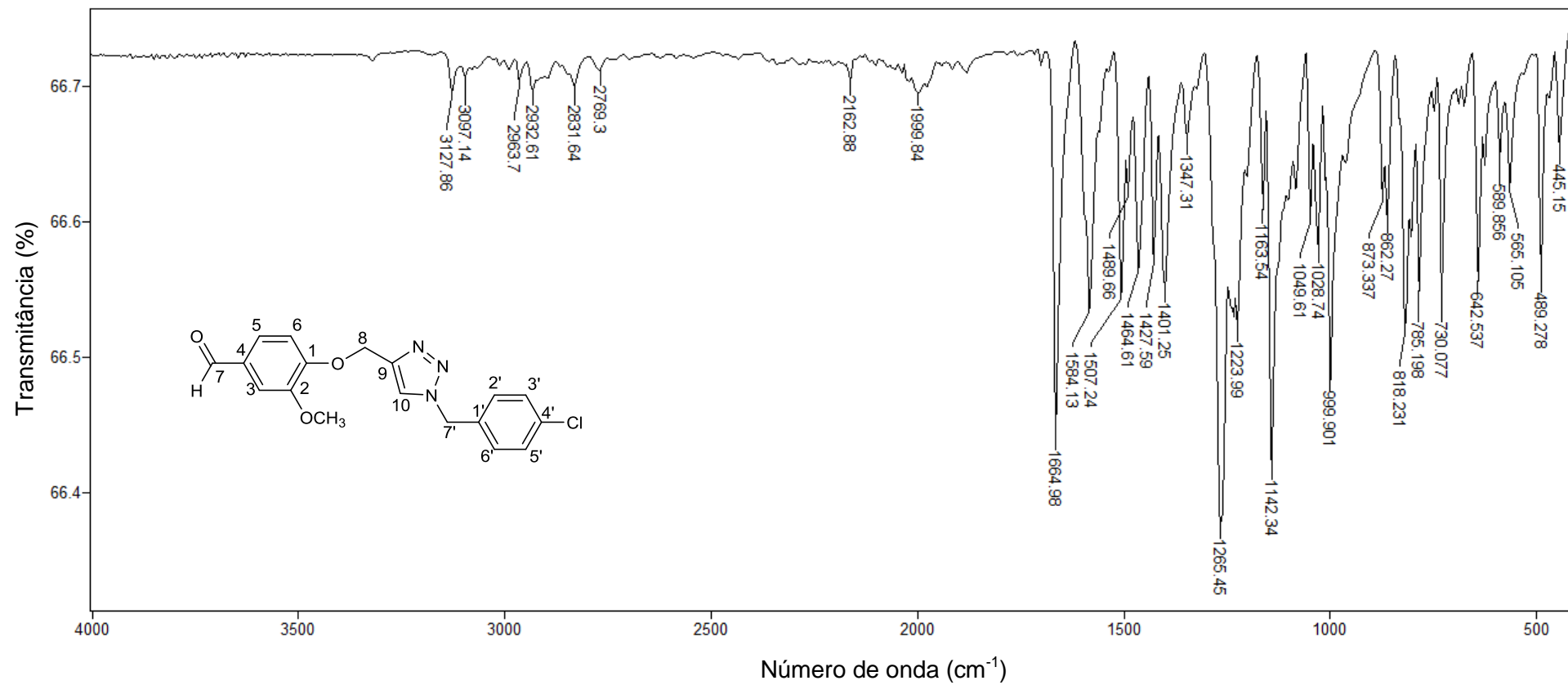


Figura A9. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6c**.

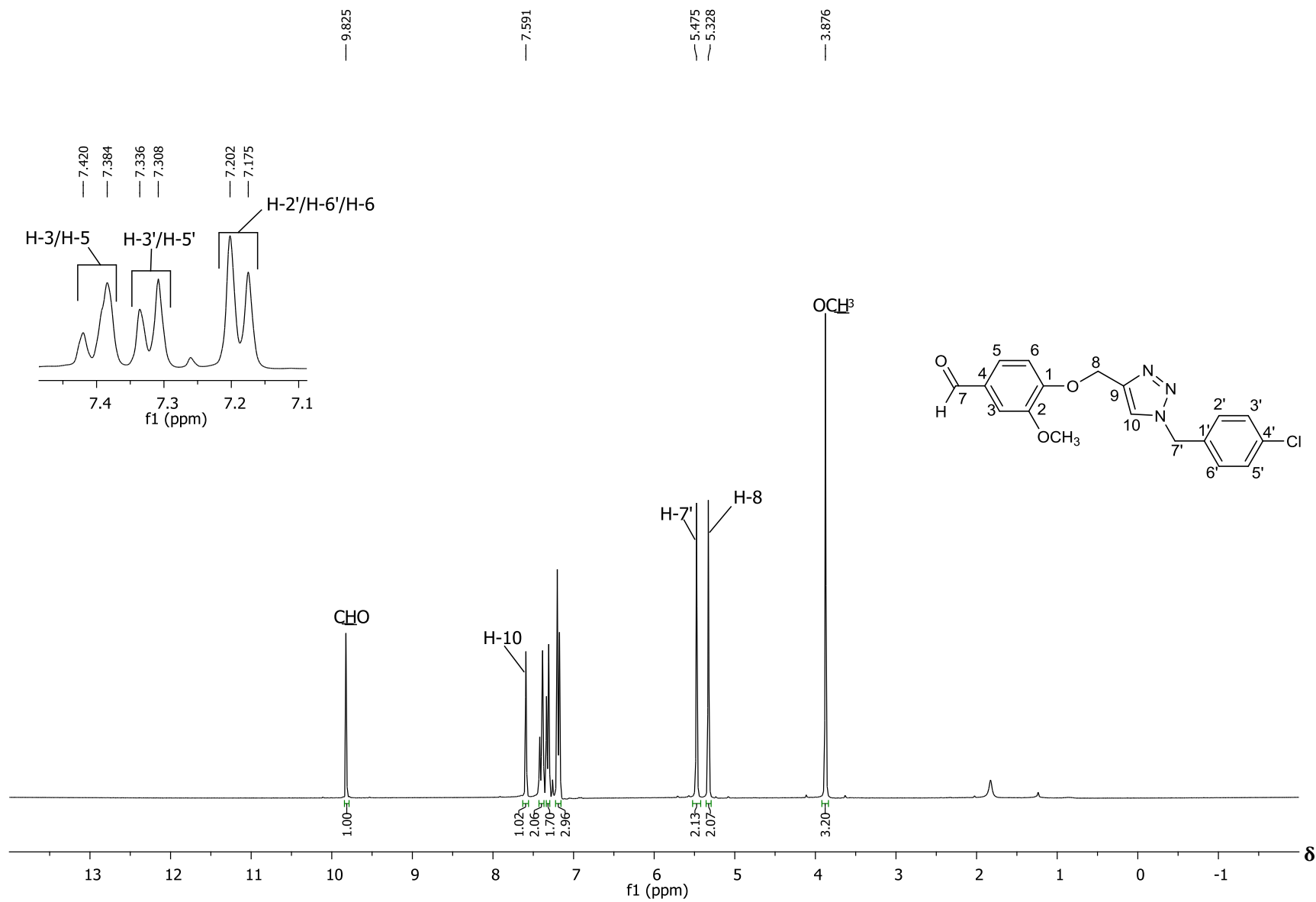


Figura A10. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **6c**.

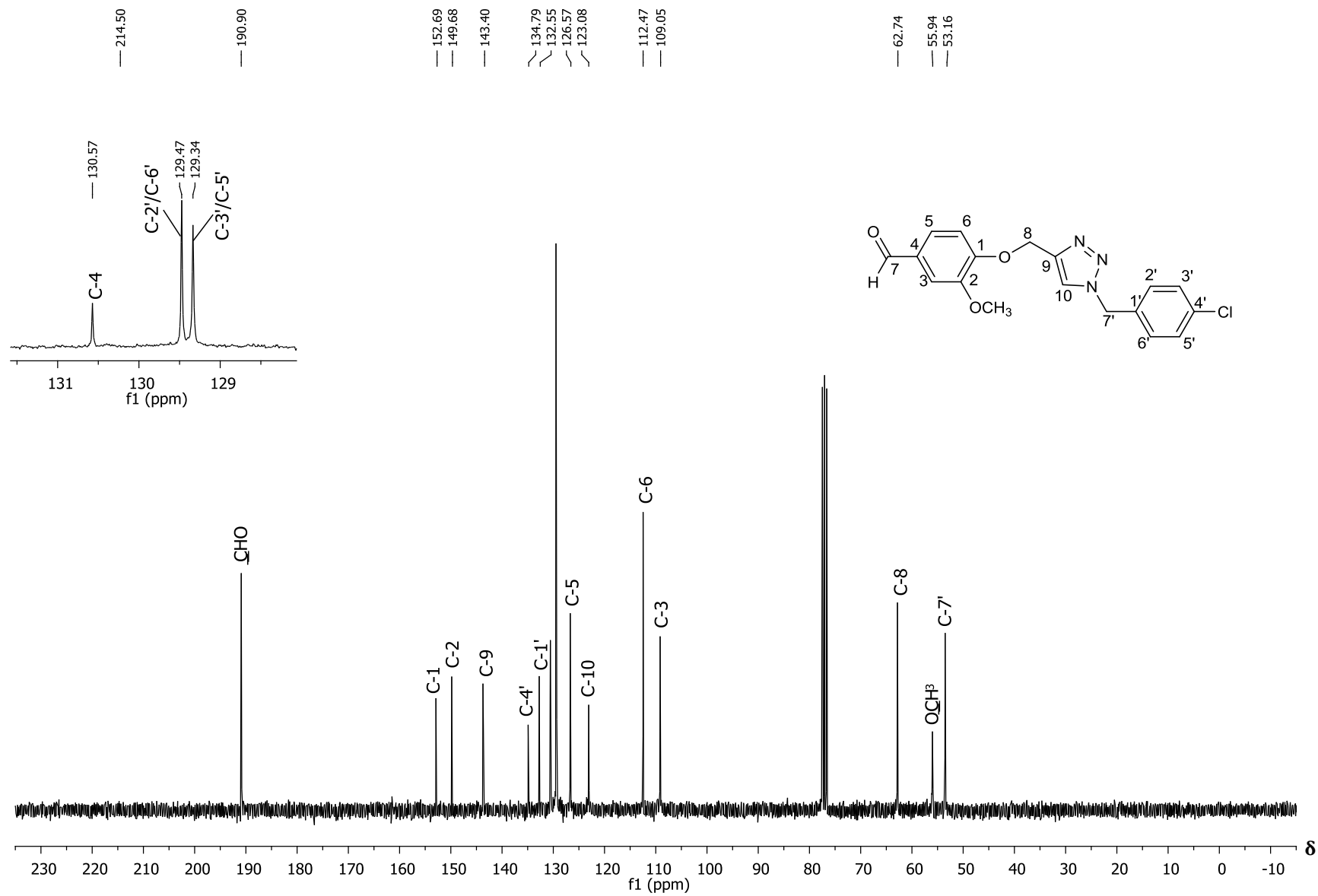


Figura A11. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **6c**.

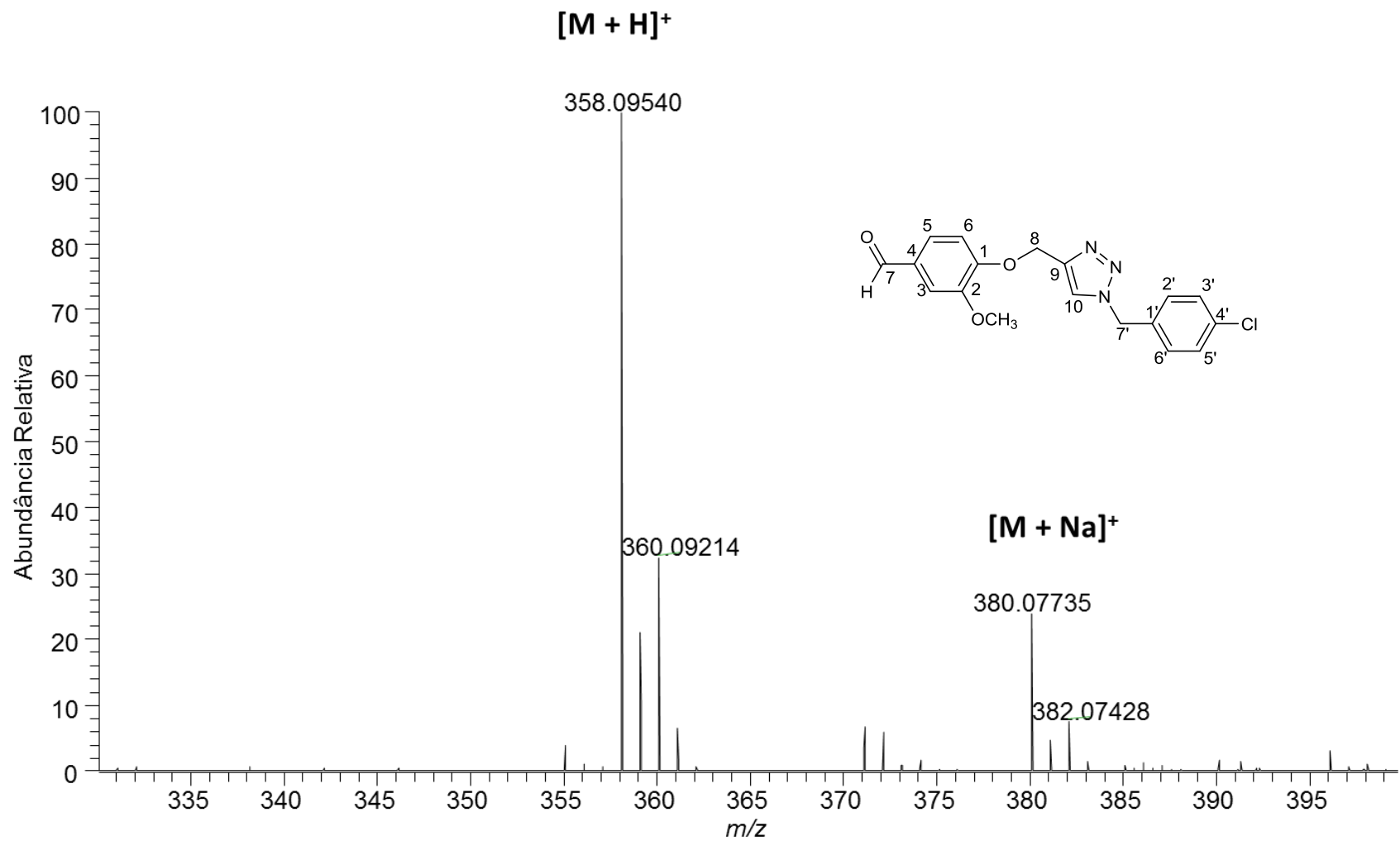


Figura A12. Espectro de massas de alta resolução composto **6c**.

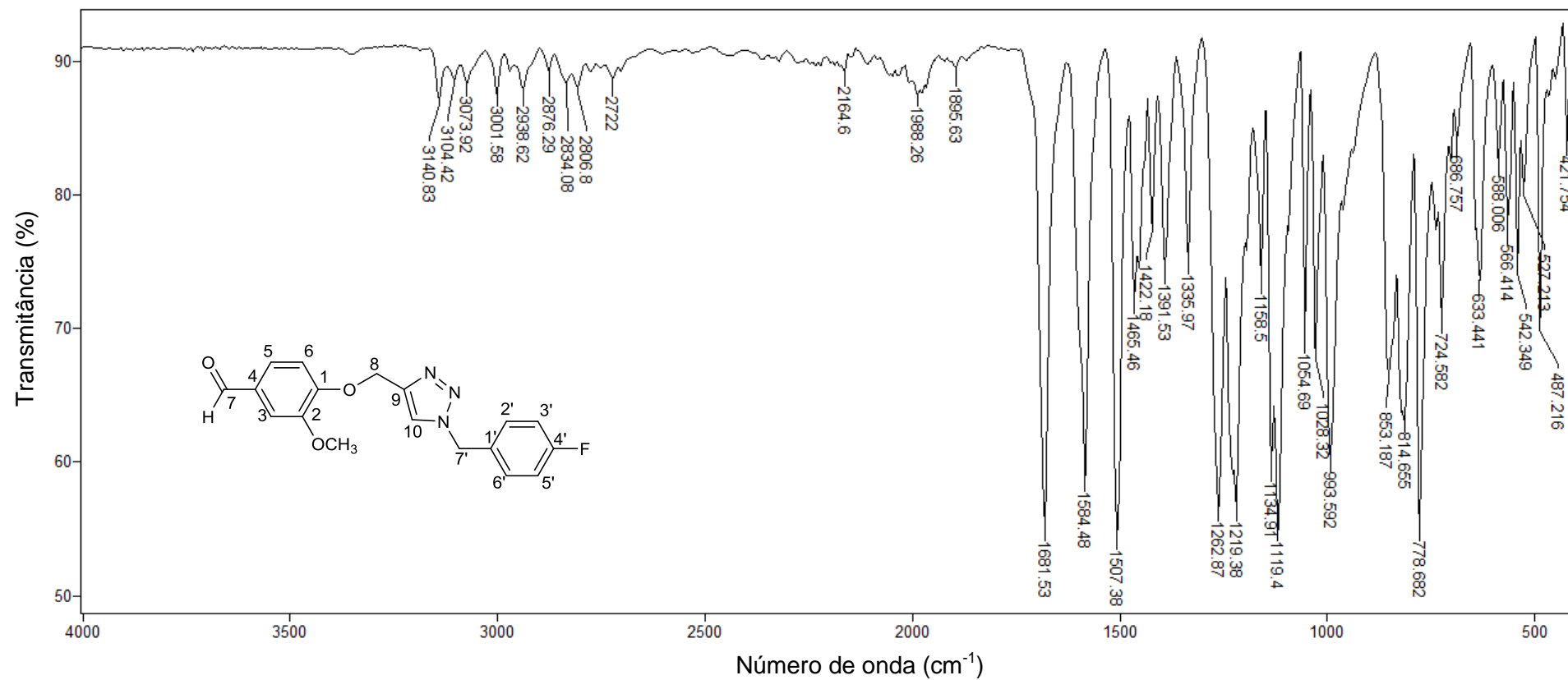


Figura A13. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6d**.

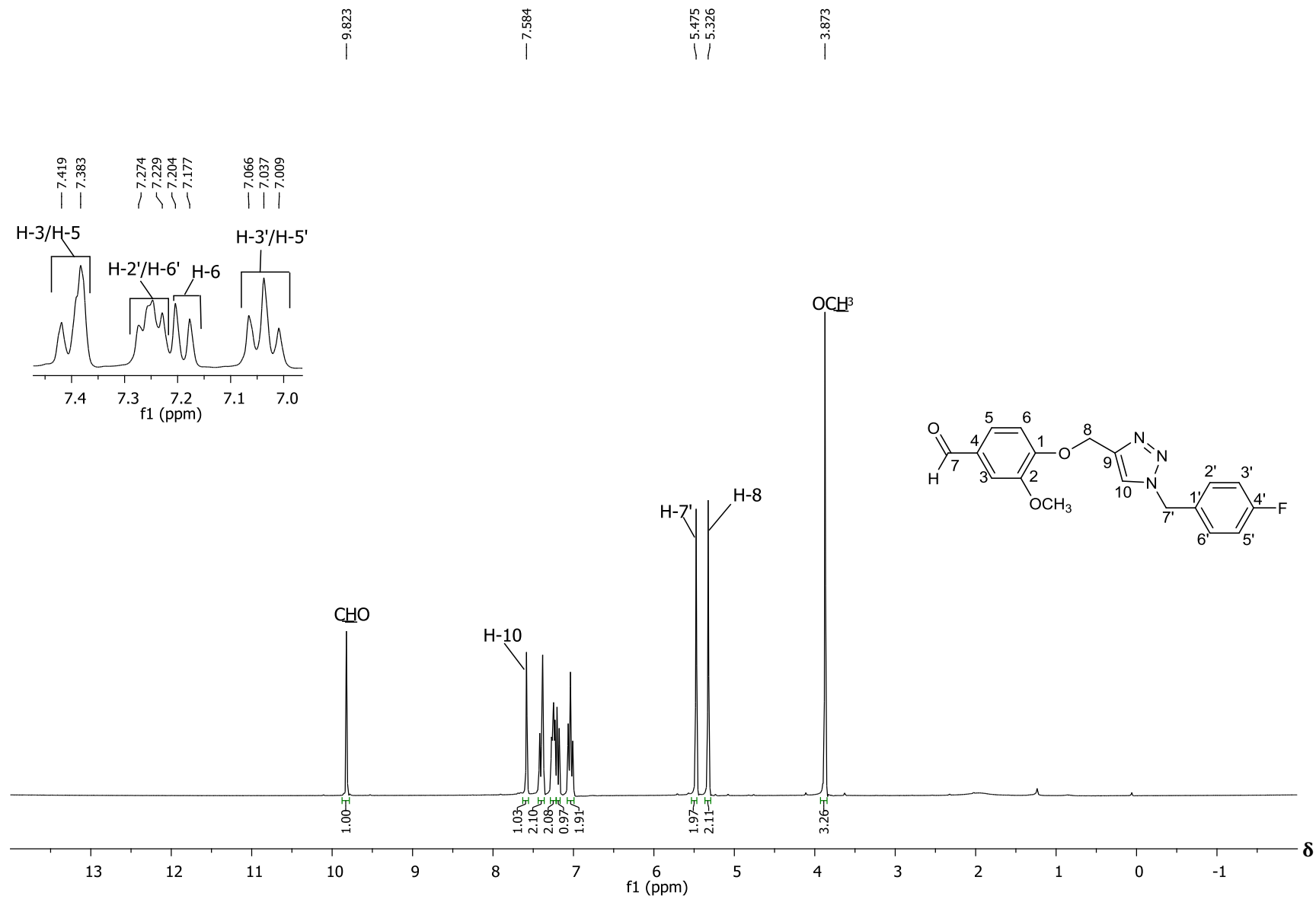


Figura A14. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **6d**.

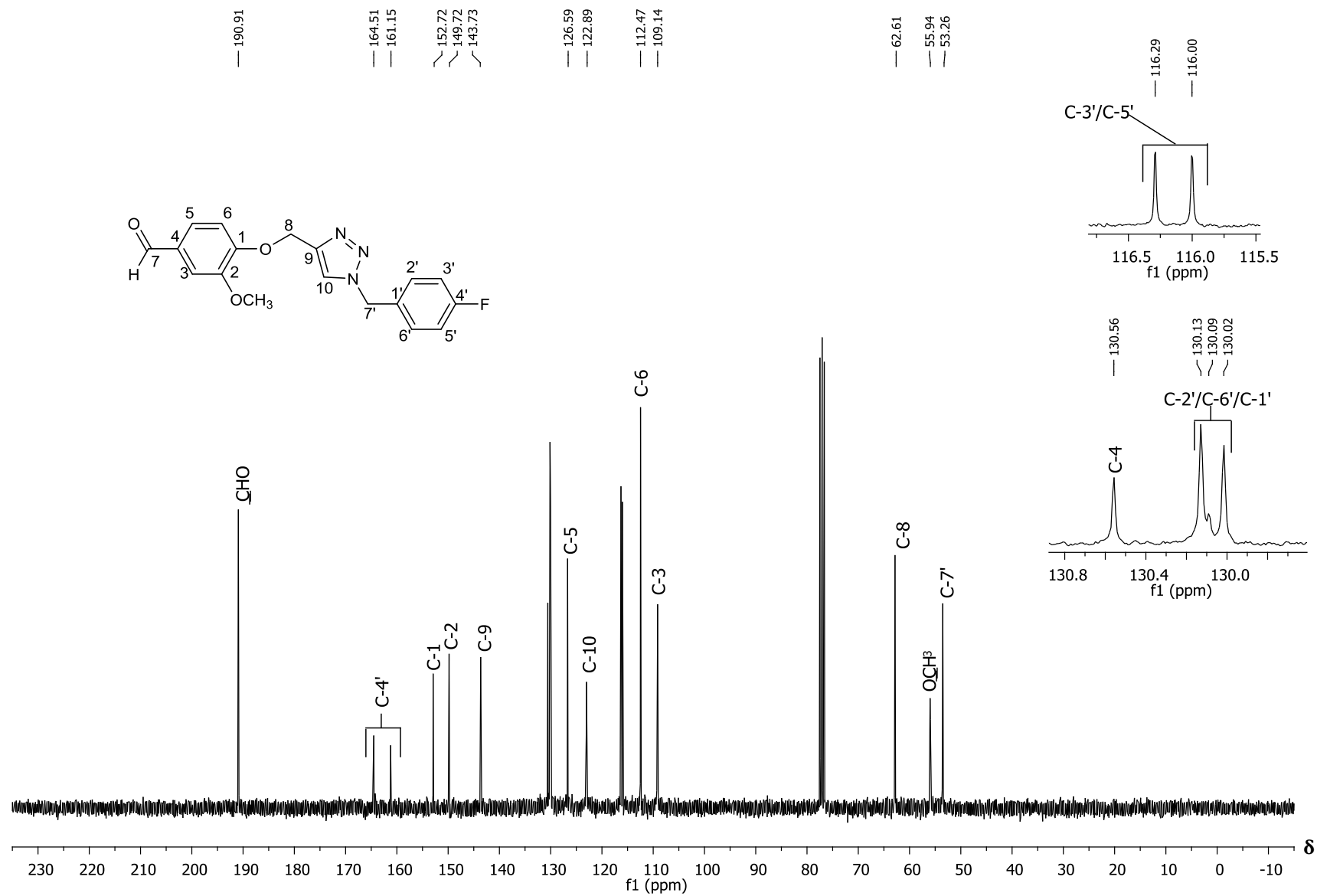


Figura A15. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **6d**.

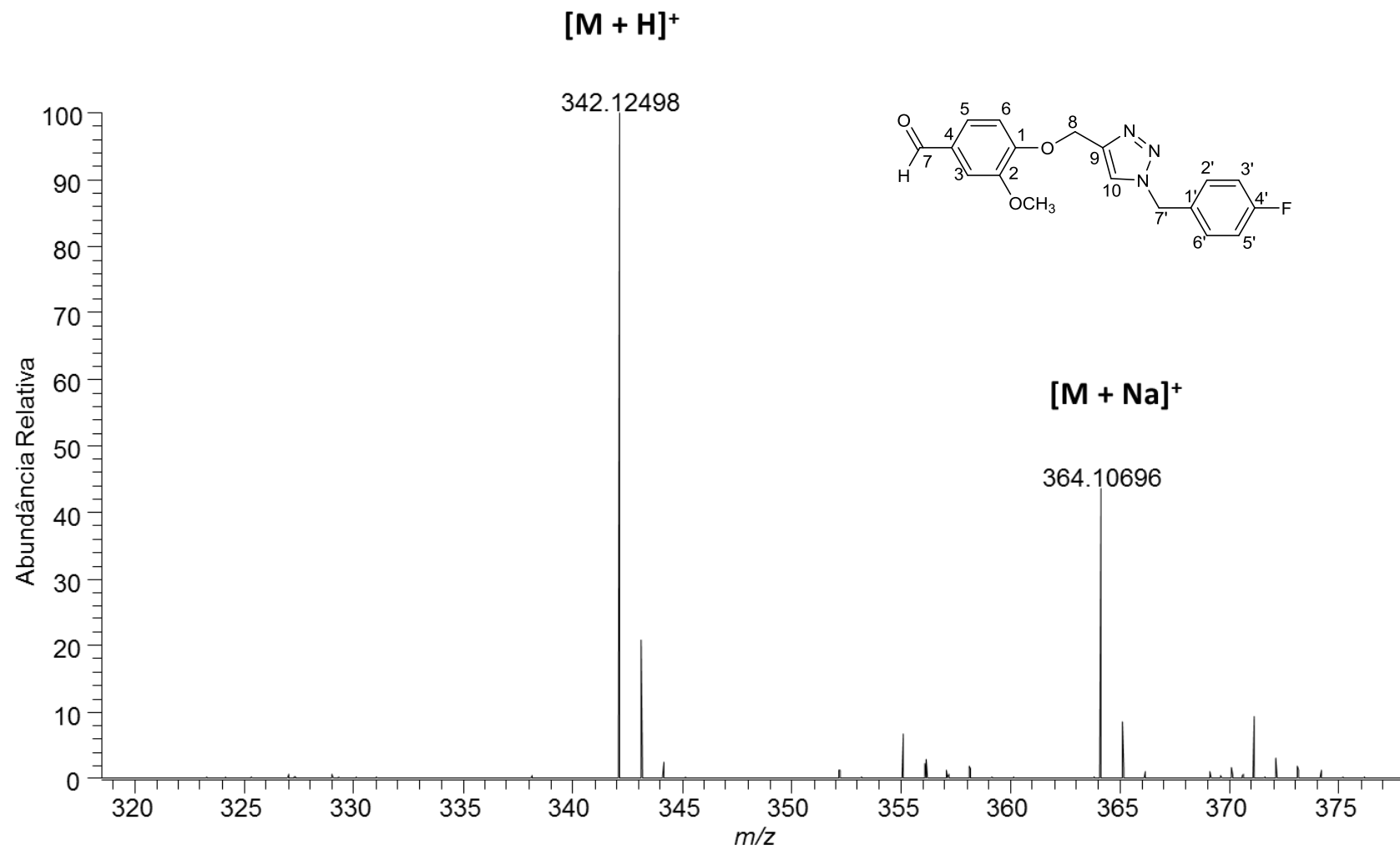


Figura A16. Espectro de massas de alta resolução do composto **6d**.

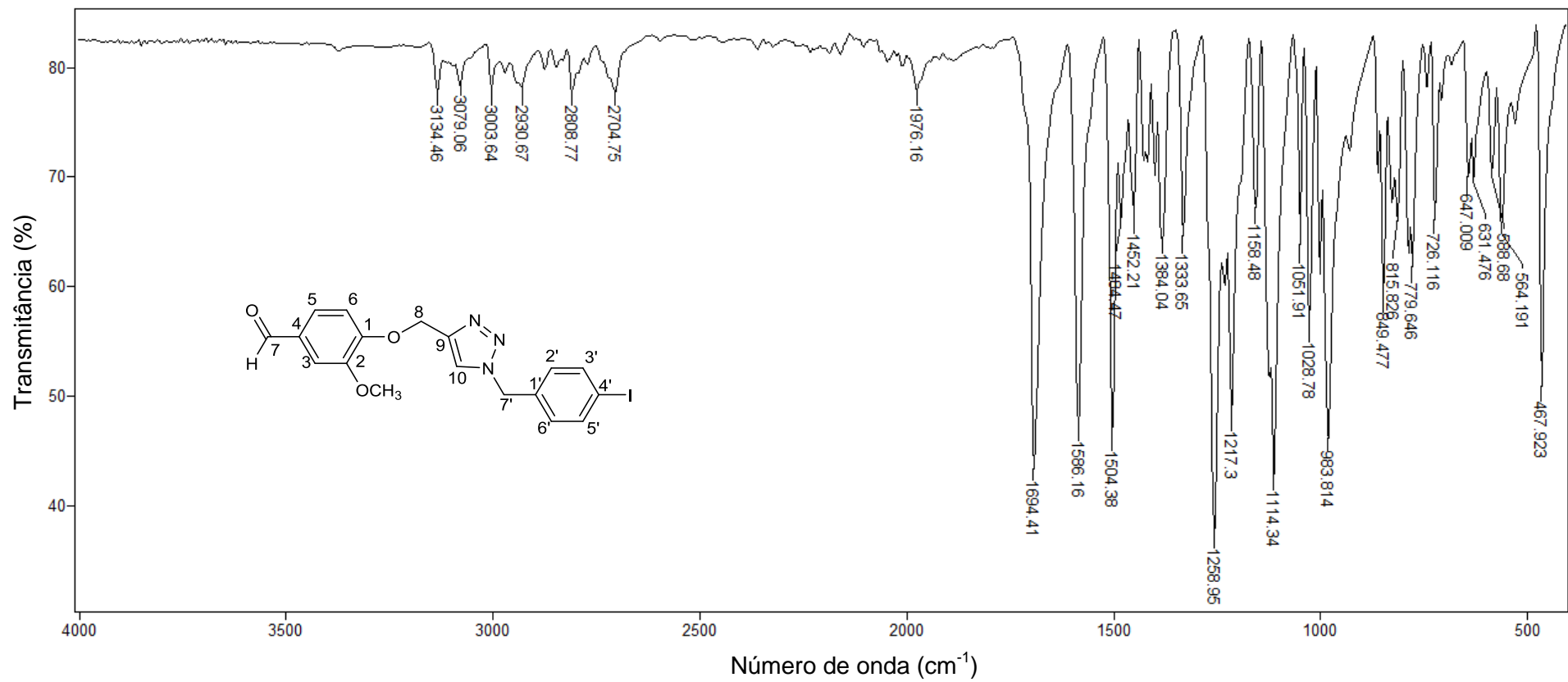


Figura A17. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6e**.

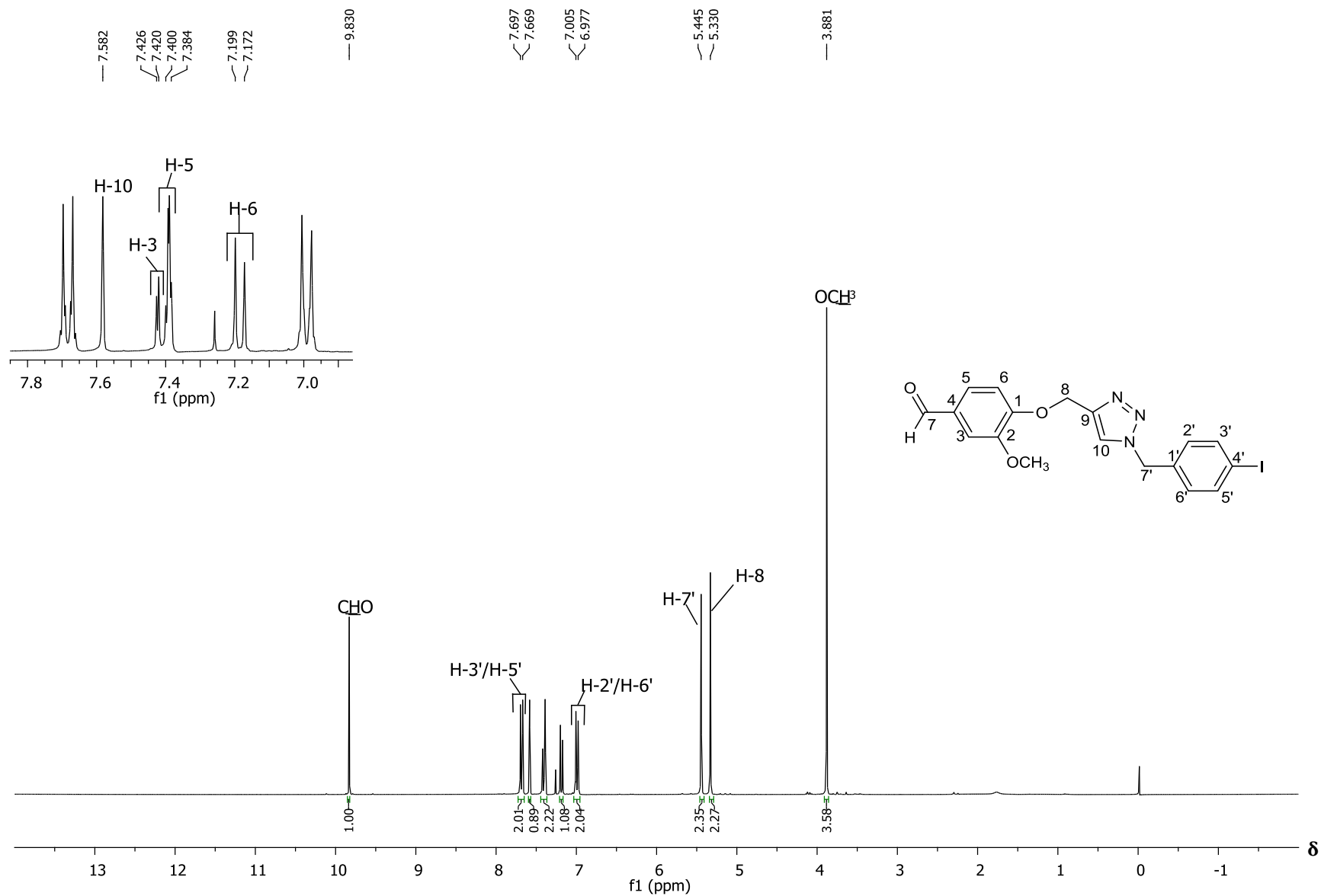


Figura A18. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **6e**.

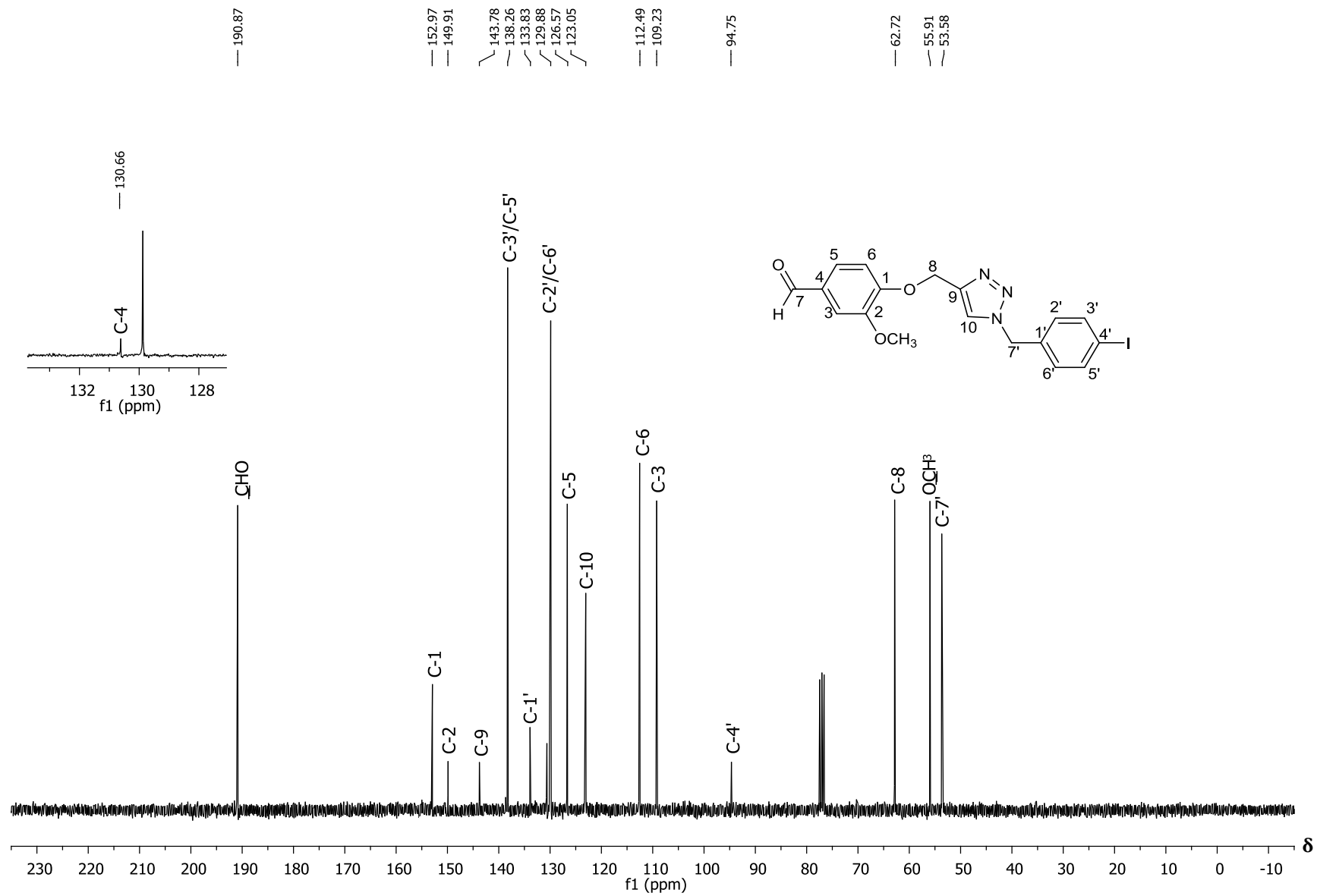


Figura A19. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **6e**.

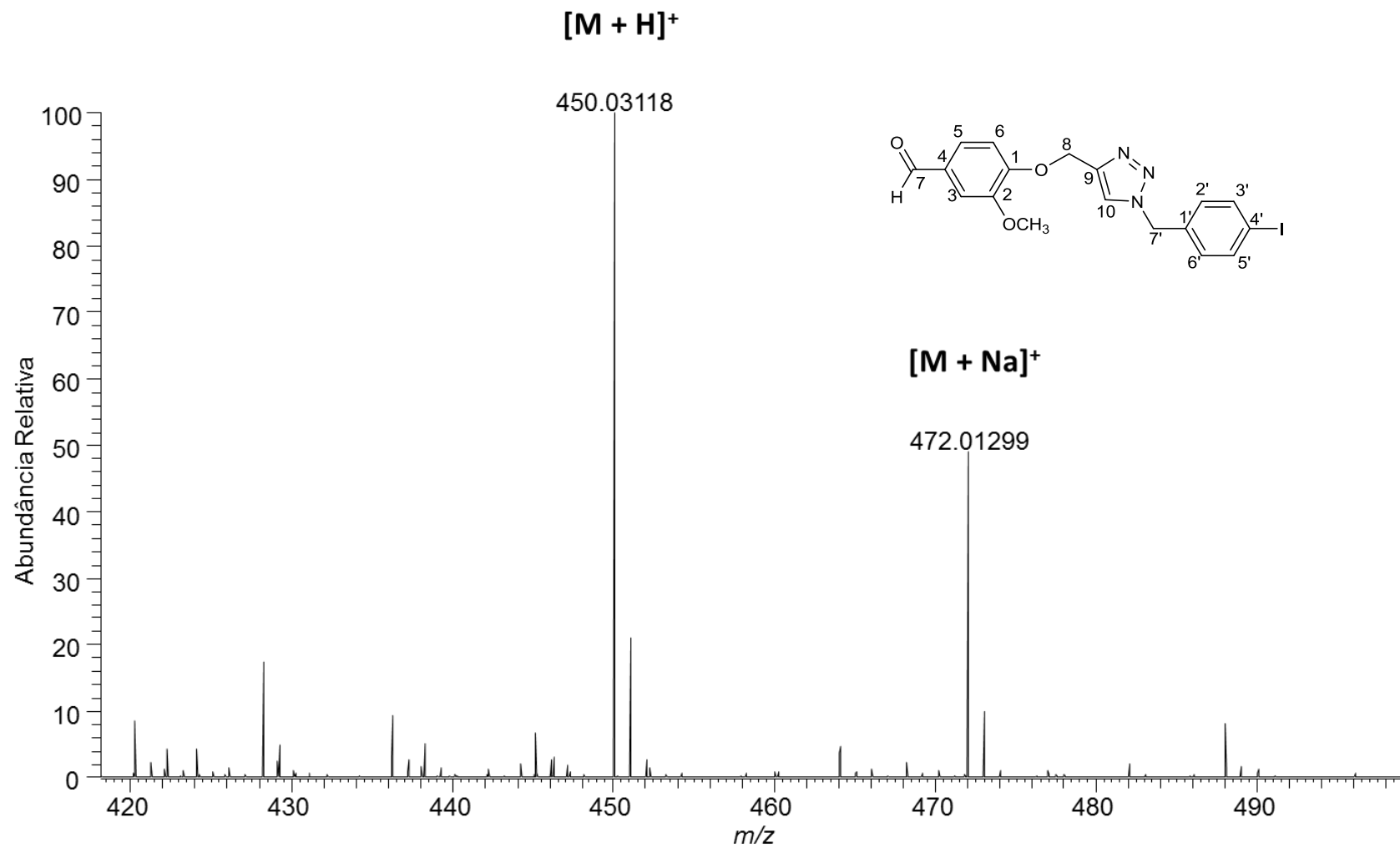


Figura A20. Espectro de massas de alta resolução do composto **6e**.

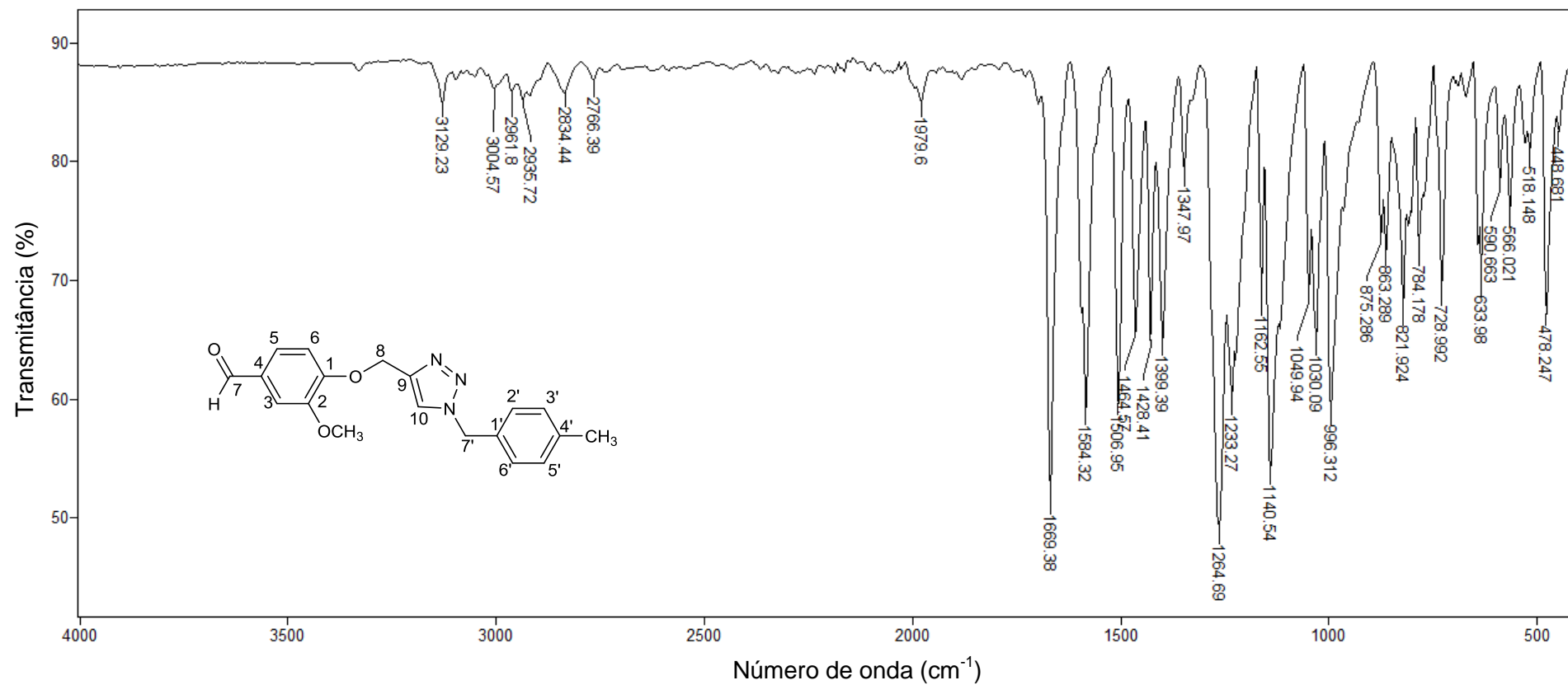


Figura A21. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6g**.

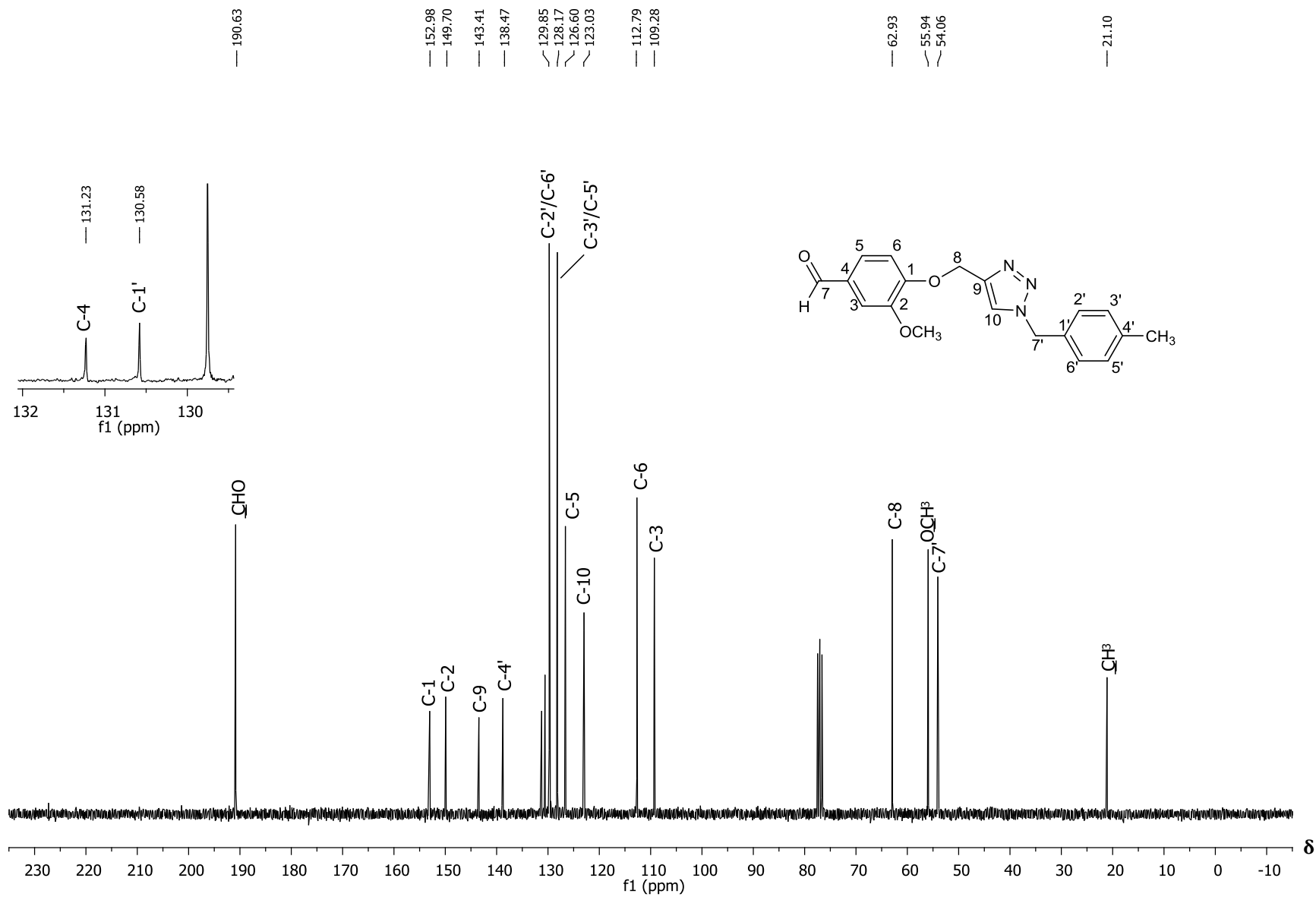


Figura A23. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **6g**.

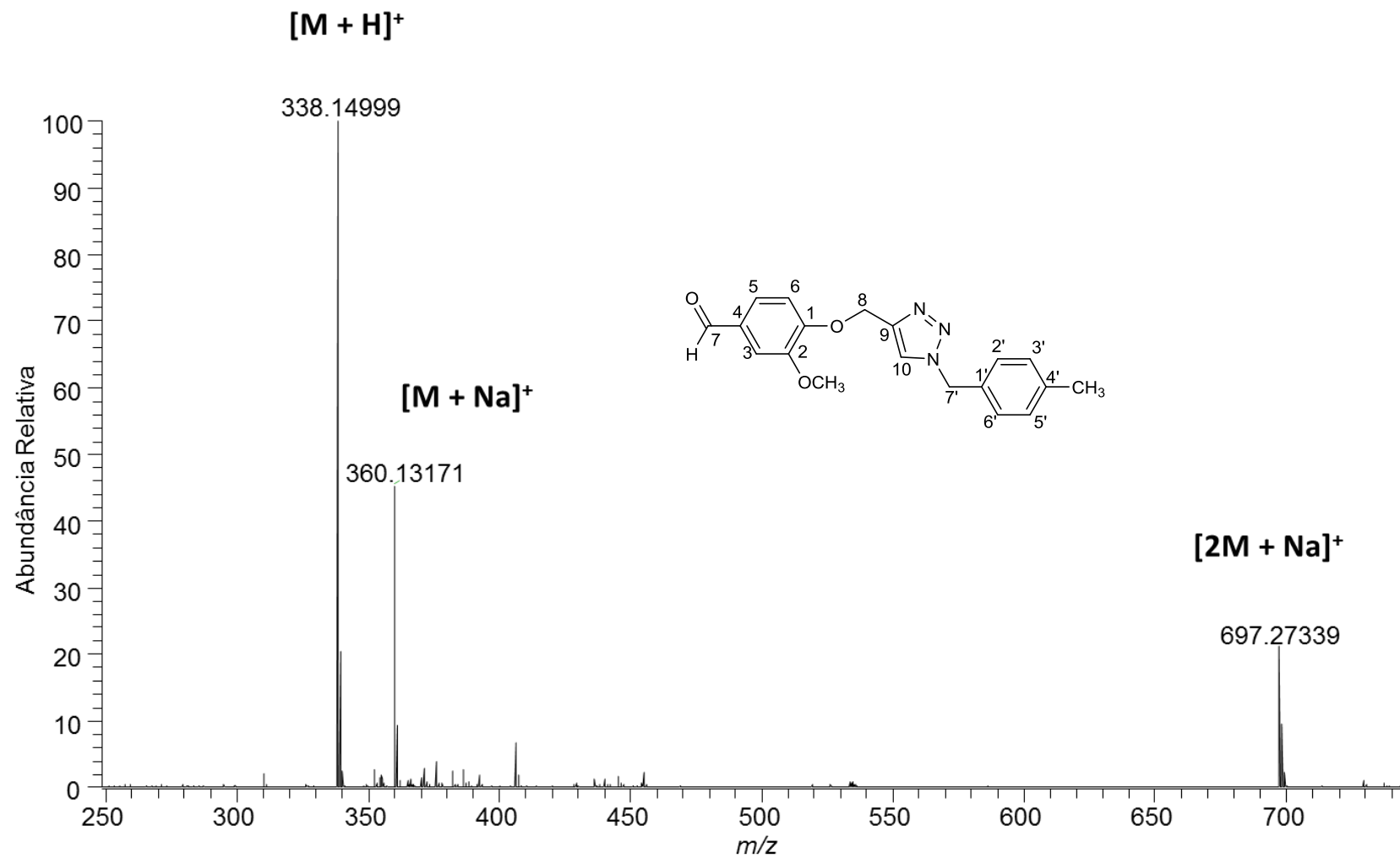


Figura A24. Espectro de massas de alta resolução do composto **6g**.

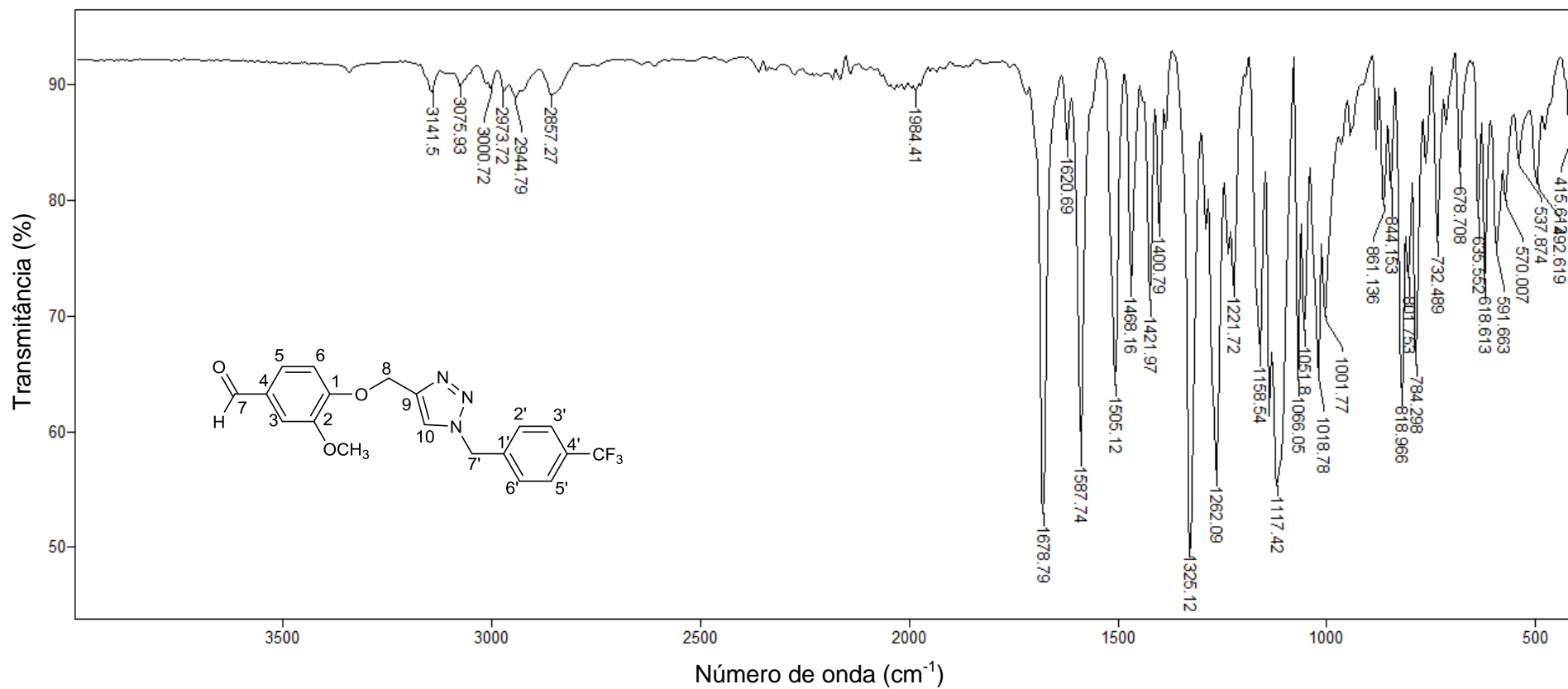


Figura A25. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6h**.

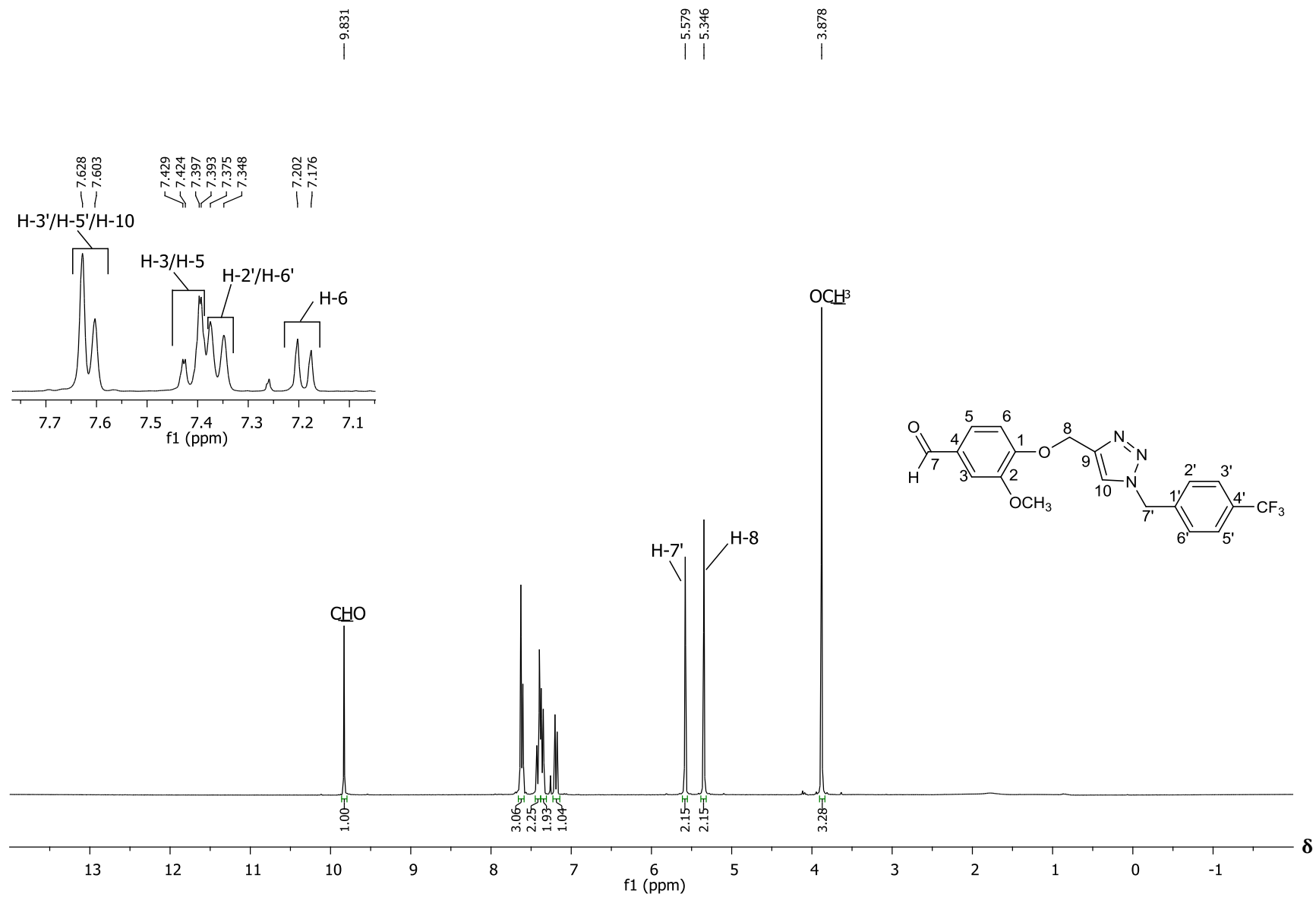


Figura A26. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **6h**.

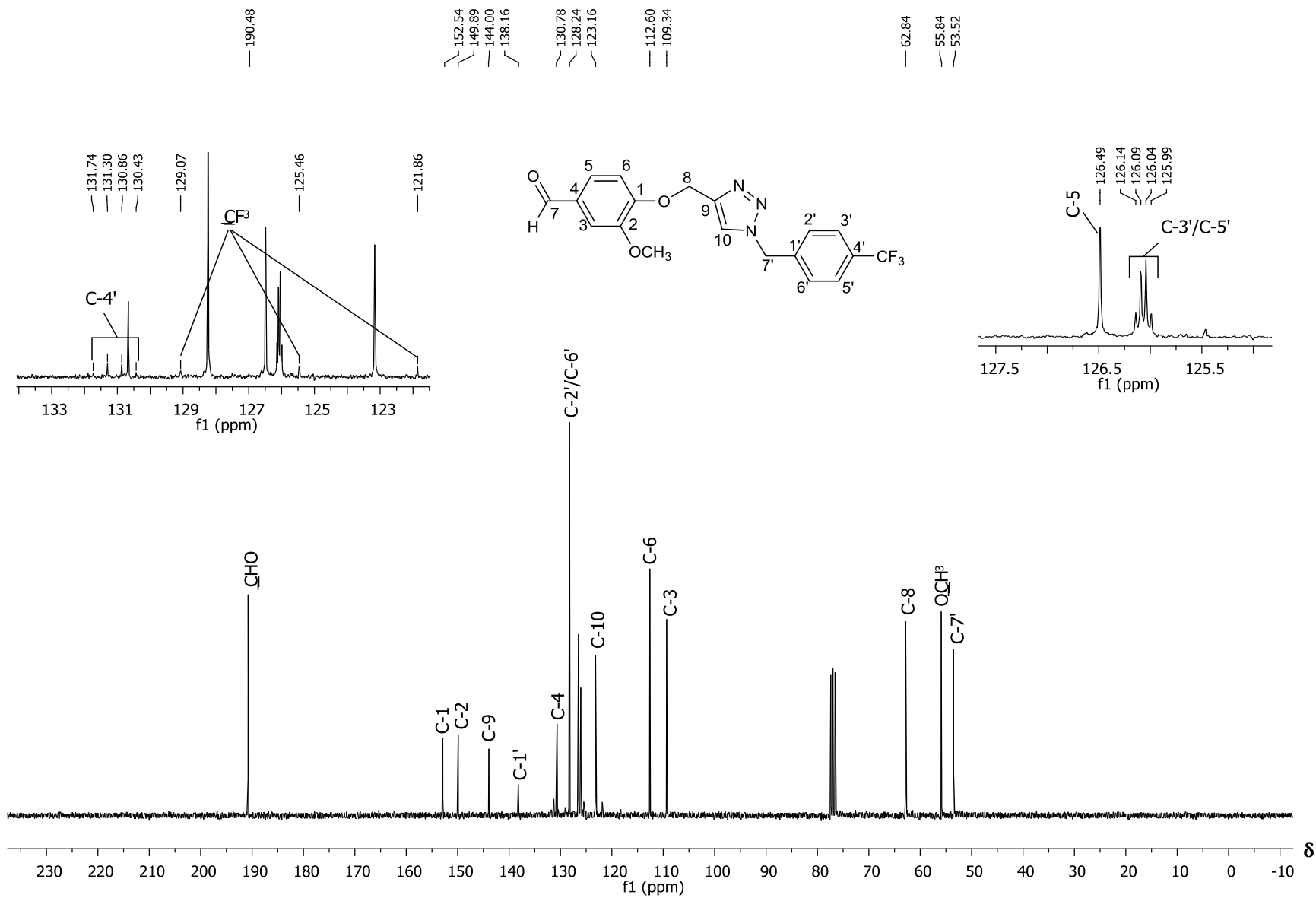


Figura A27. Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **6h**.

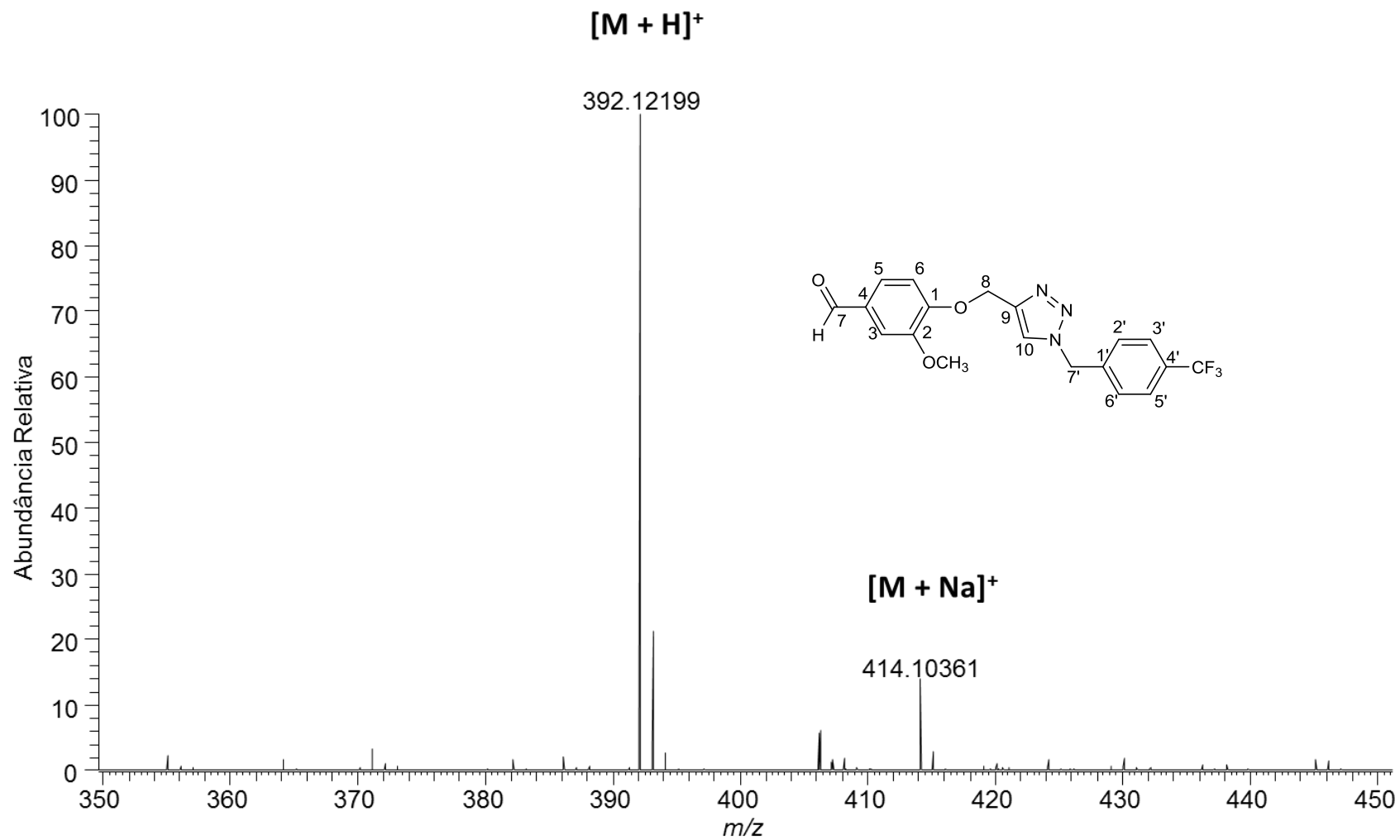


Figura A28. Espectro de massas de alta resolução do composto **6h**.

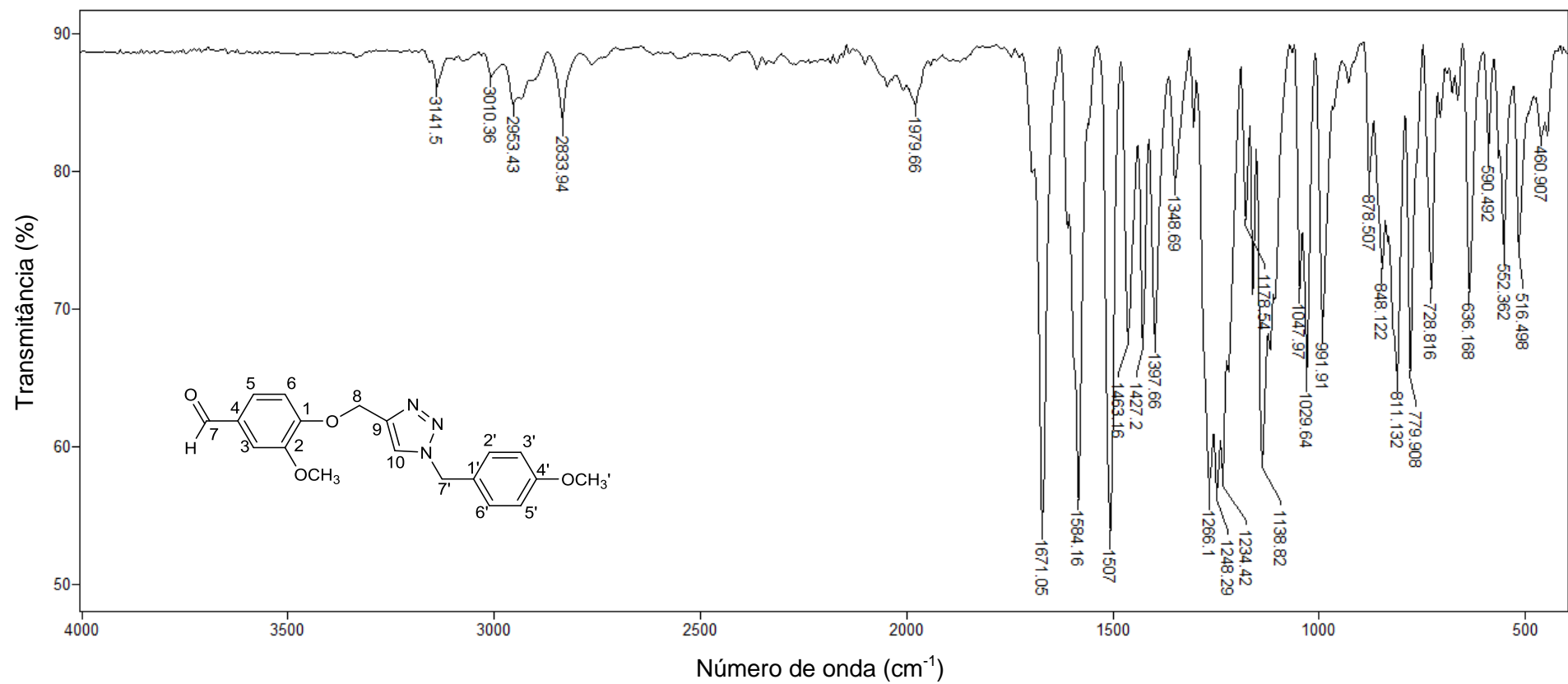


Figura A29. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6i**.

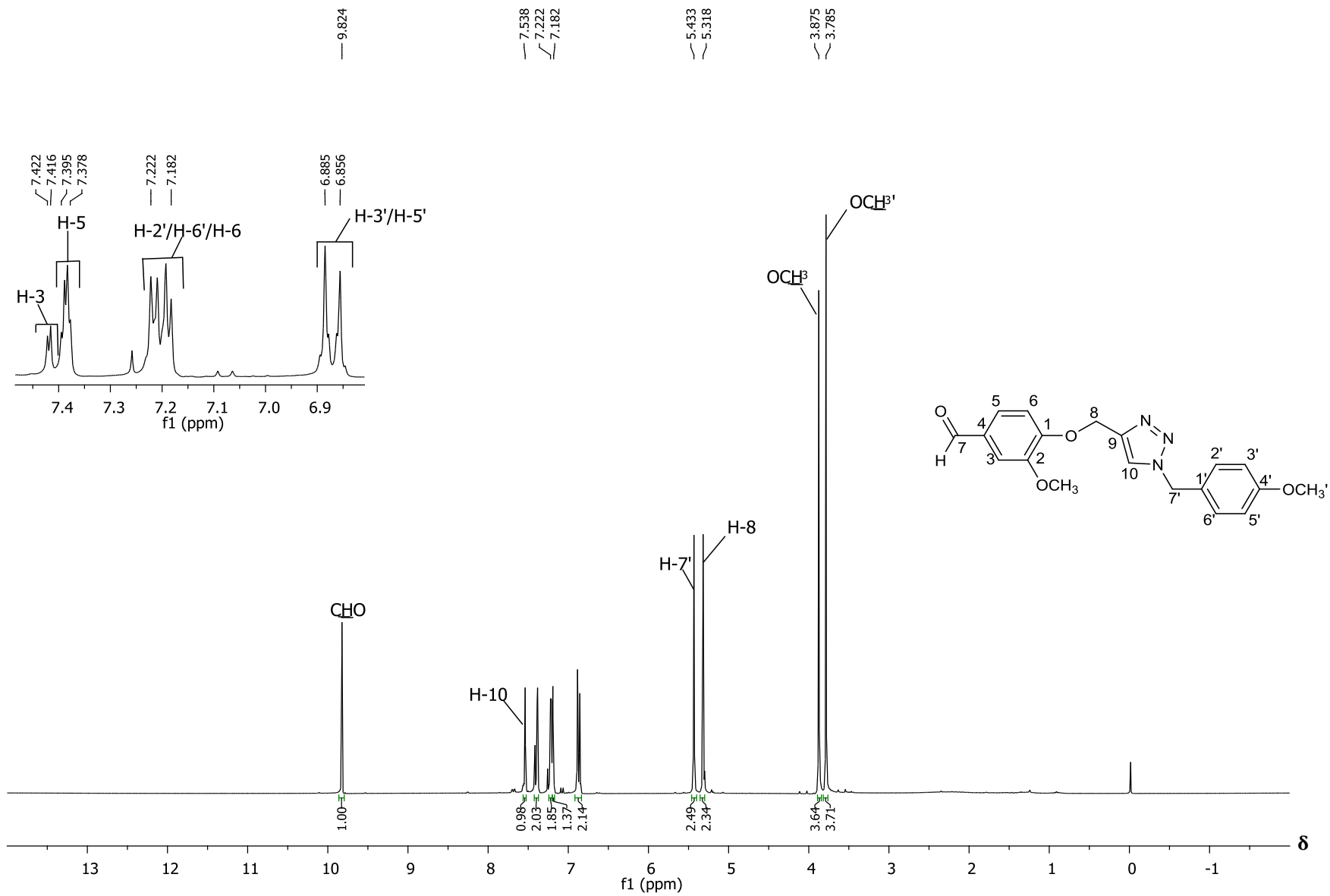


Figura A30. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **6i**.

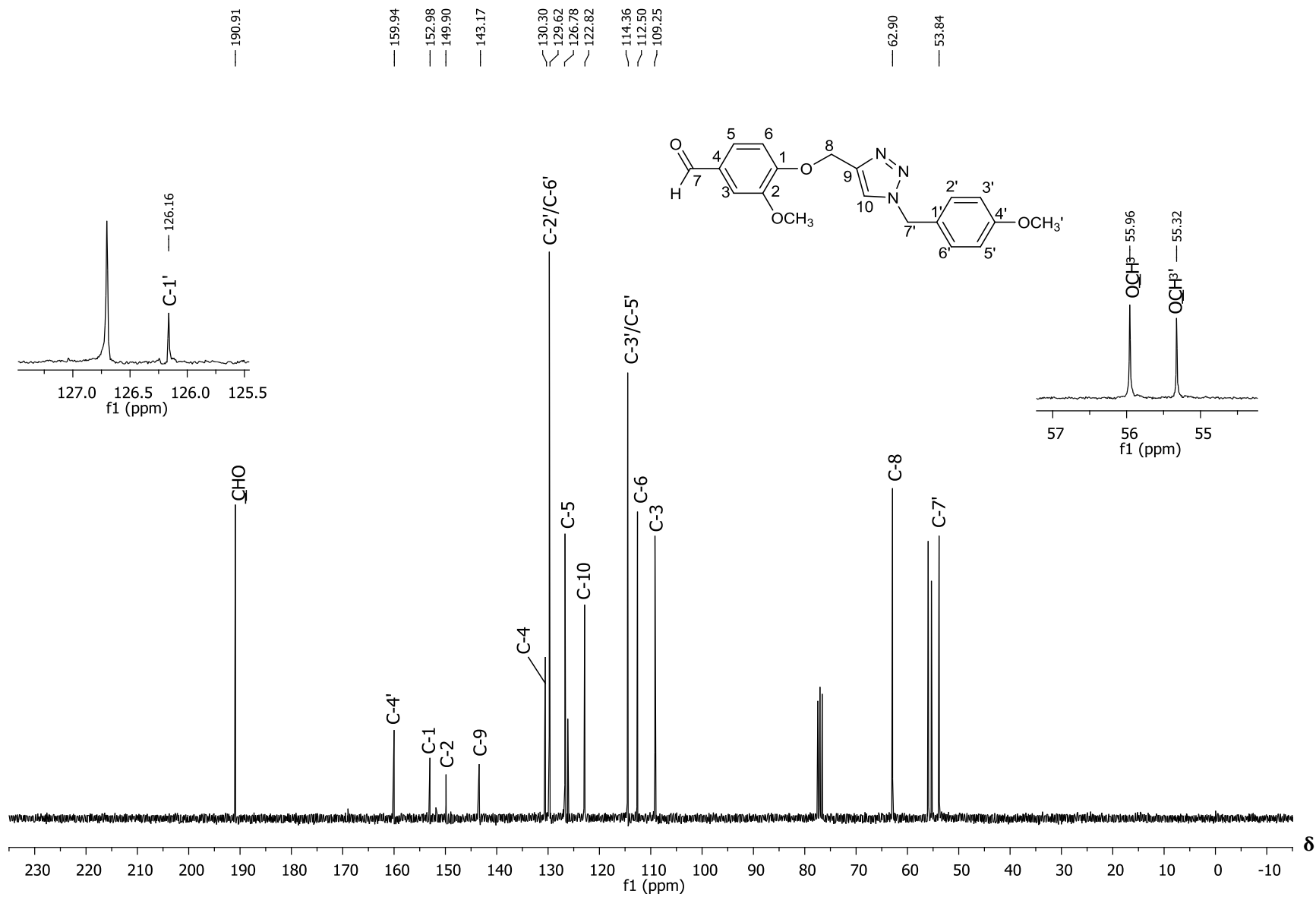


Figura A31. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **6i**.

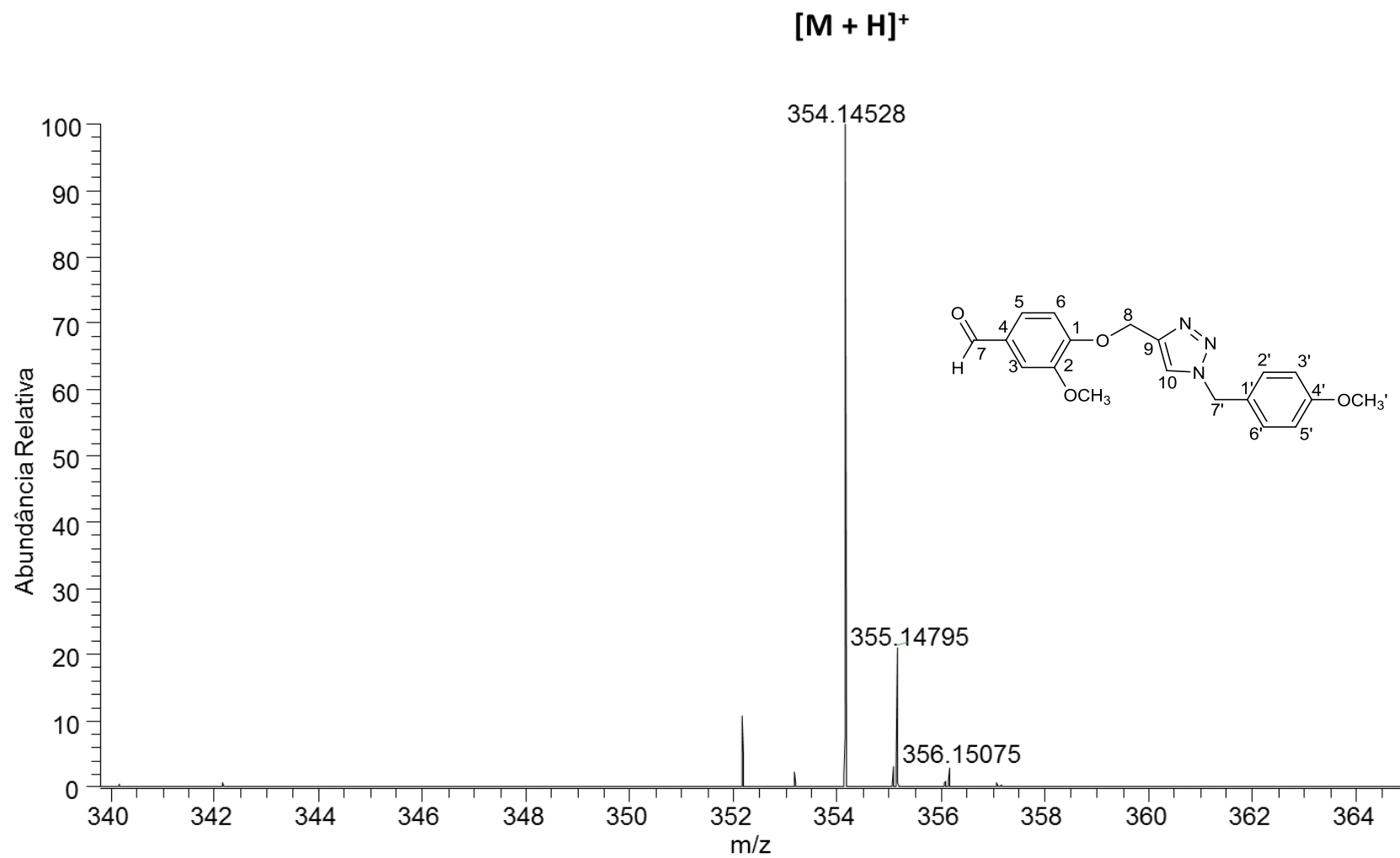


Figura A32. Espectro de massas de alta resolução do composto **6i**.

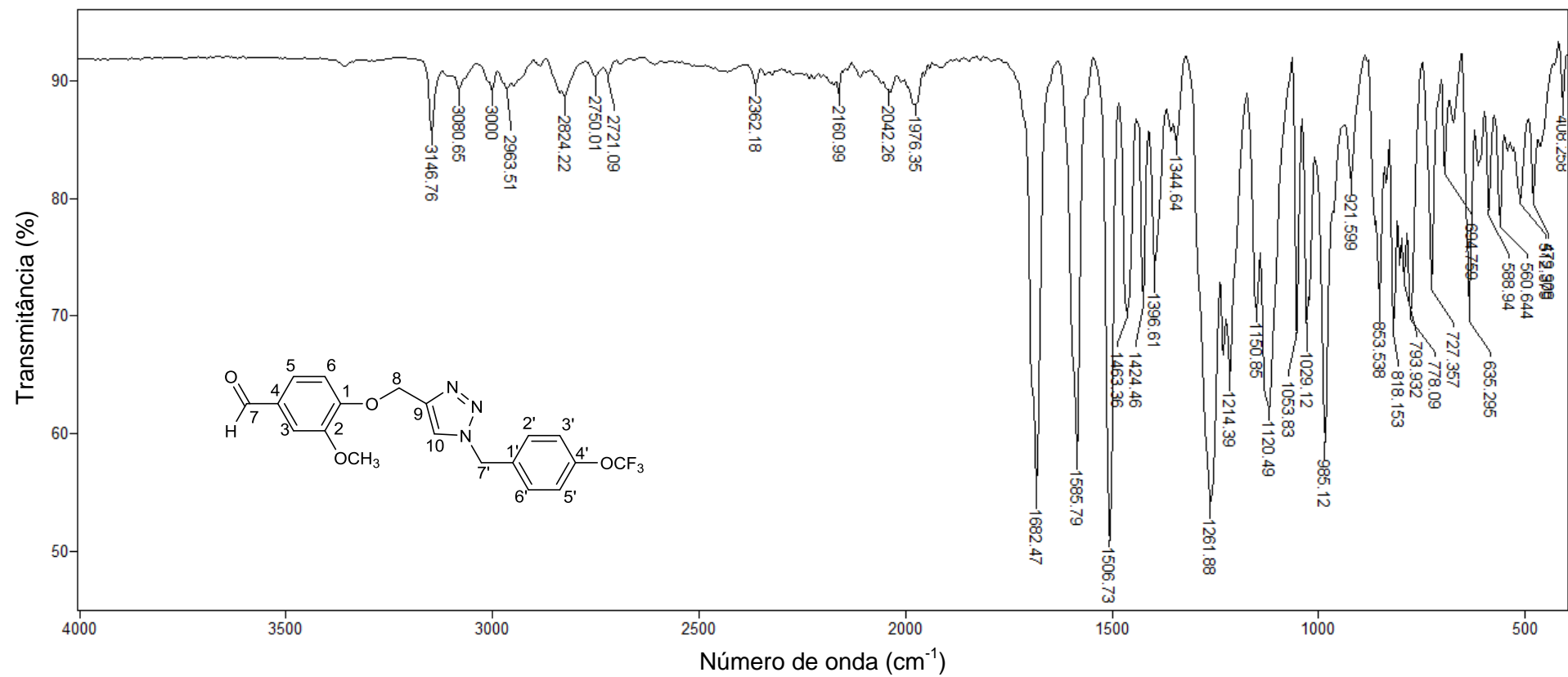


Figura A33. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6j**.

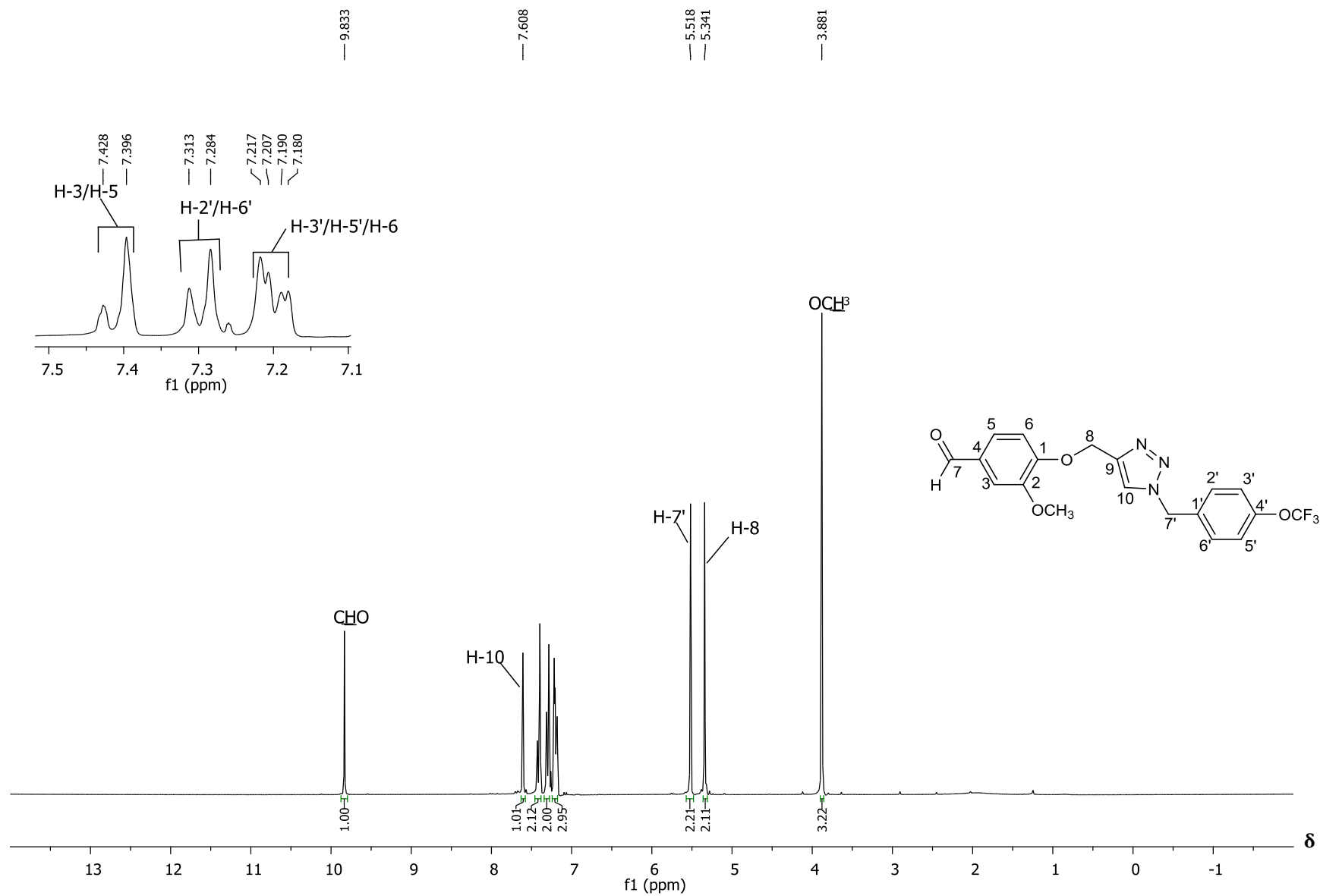


Figura A34. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **6j**.

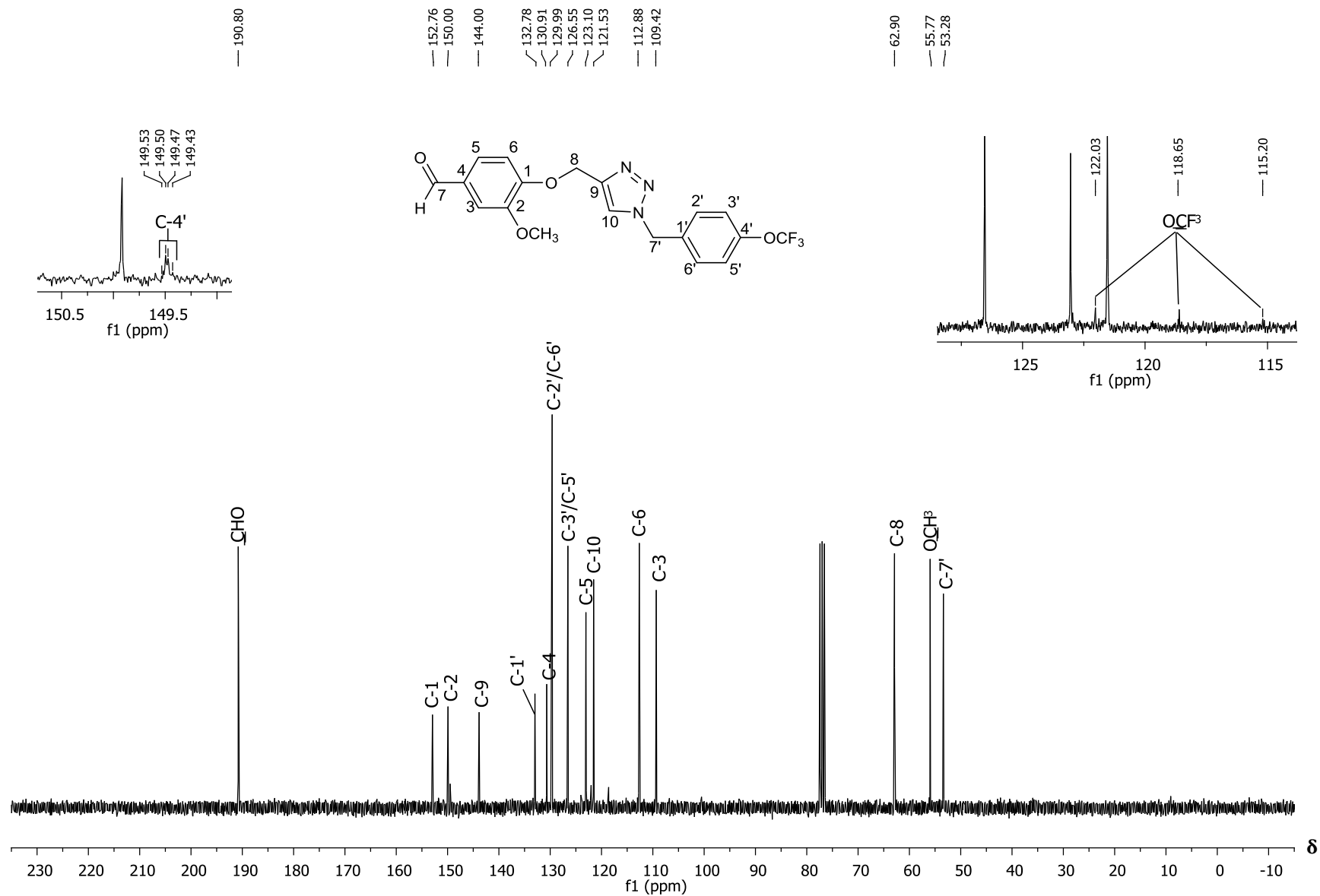


Figura A35. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **6j**.

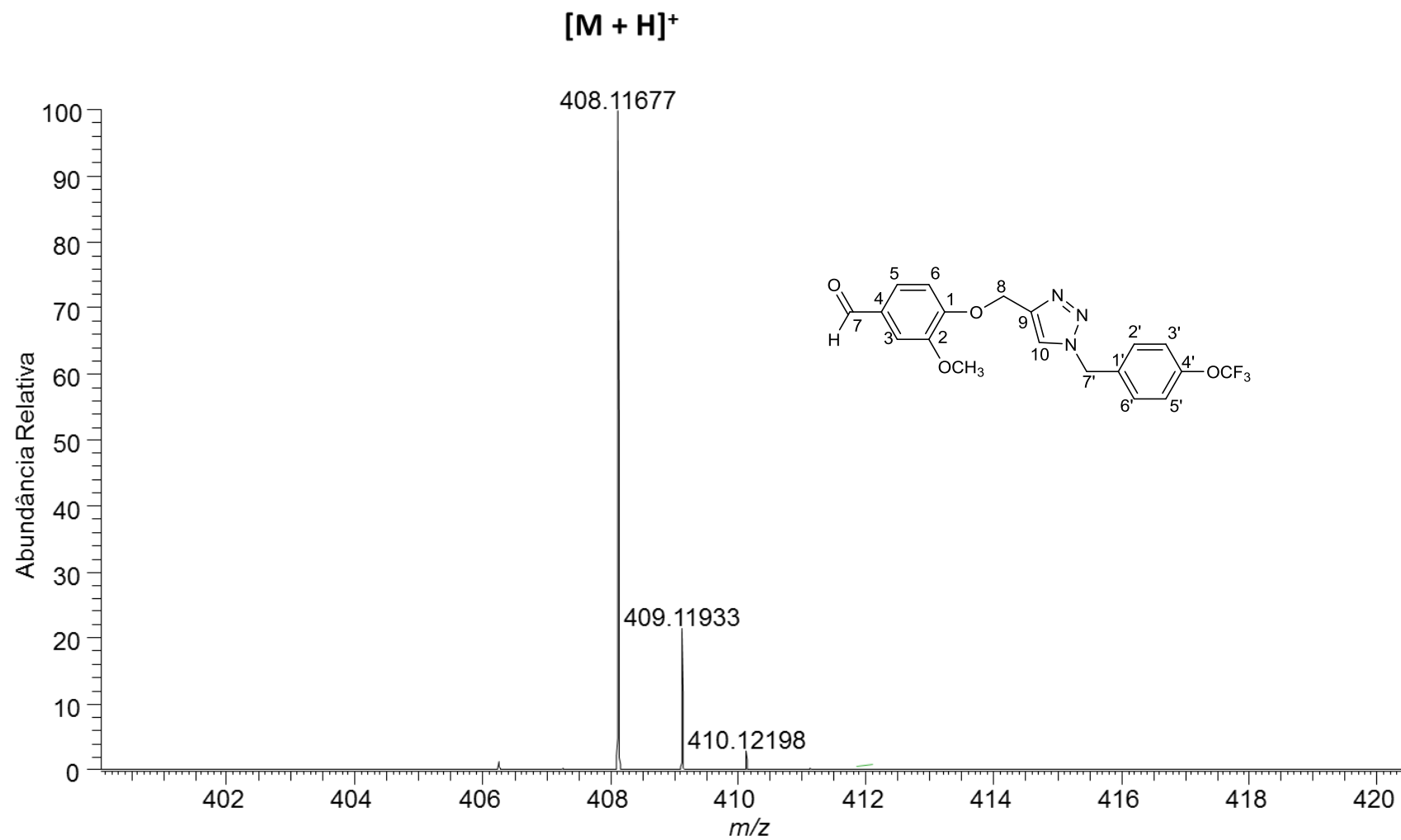


Figura A36. Espectro de massas de alta resolução do composto **6j**.

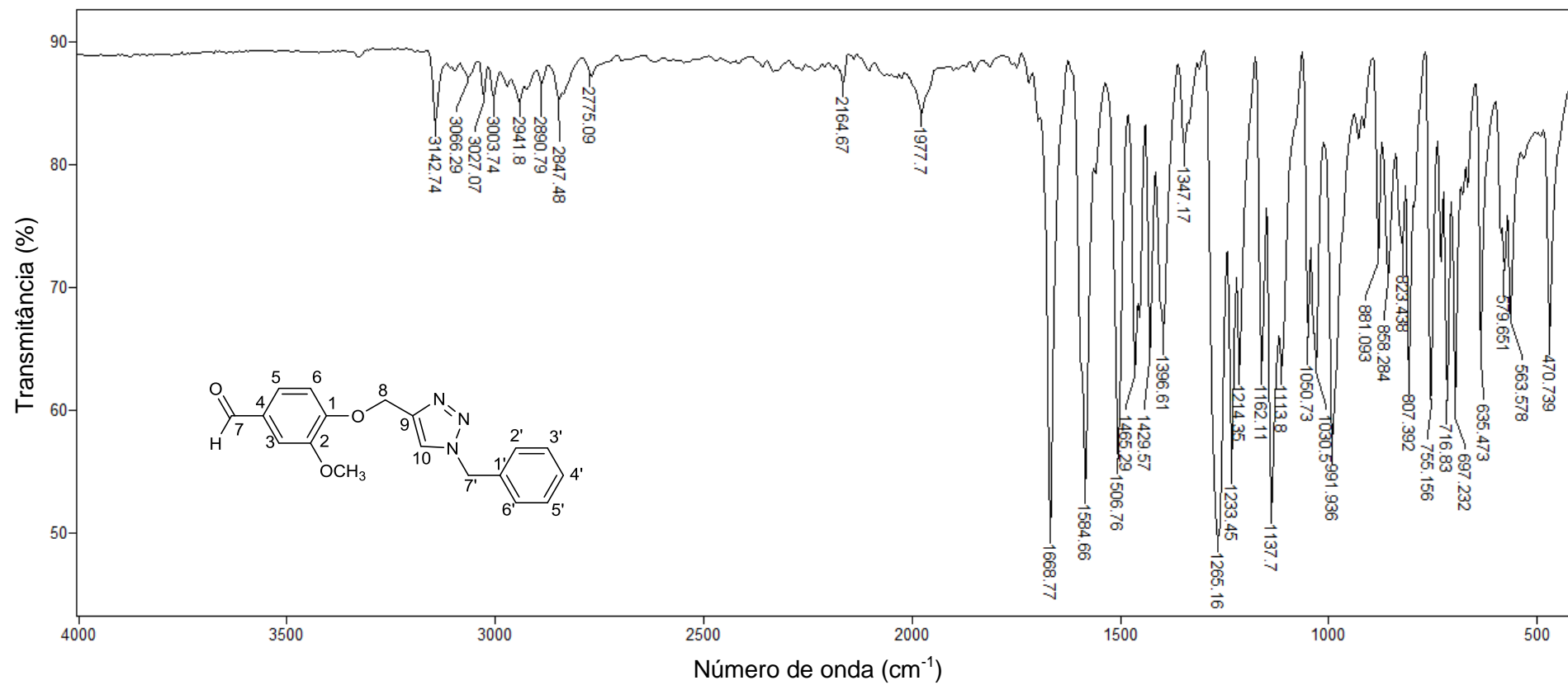


Figura A37. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6k**.

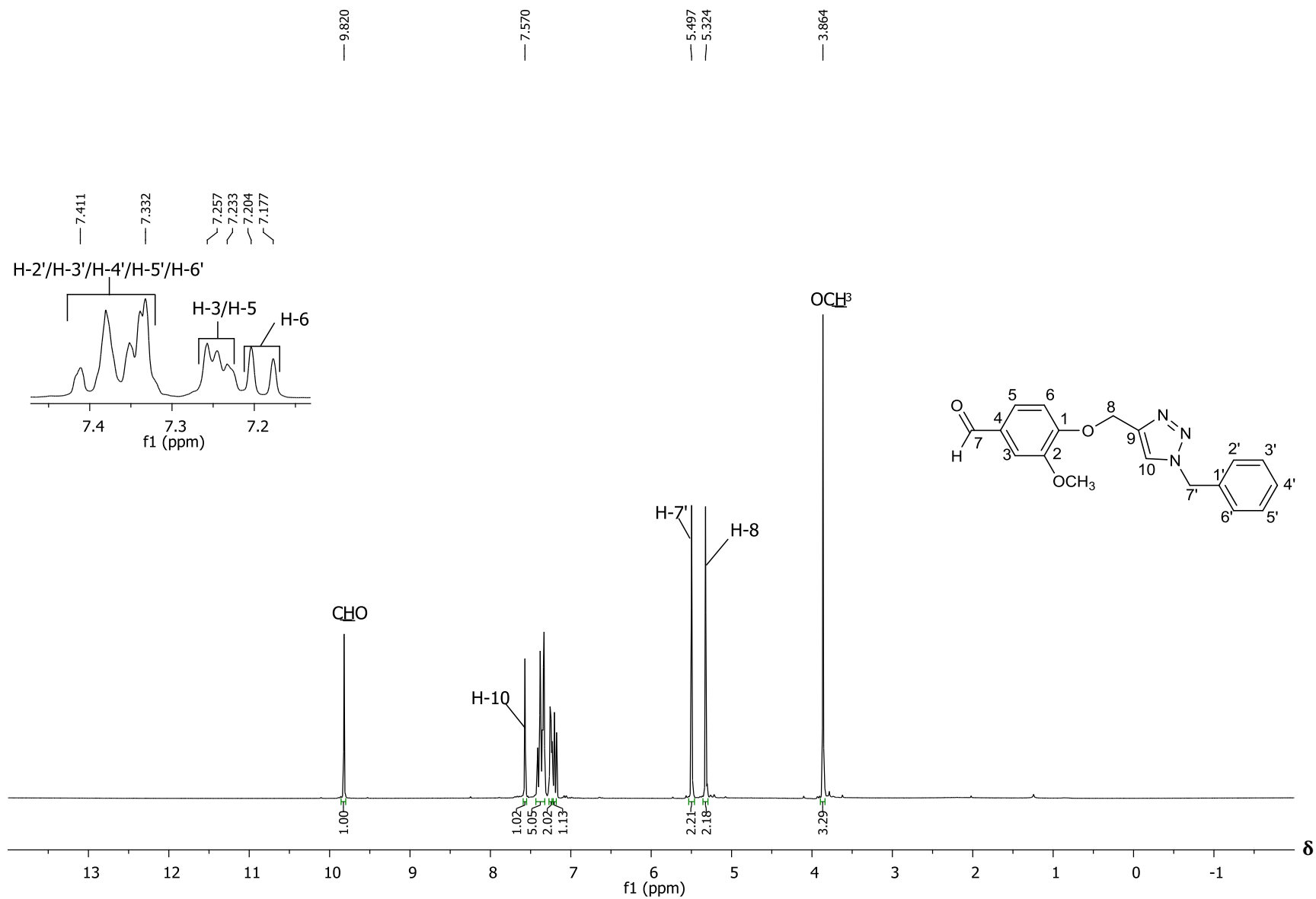


Figura A38. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **6k**.

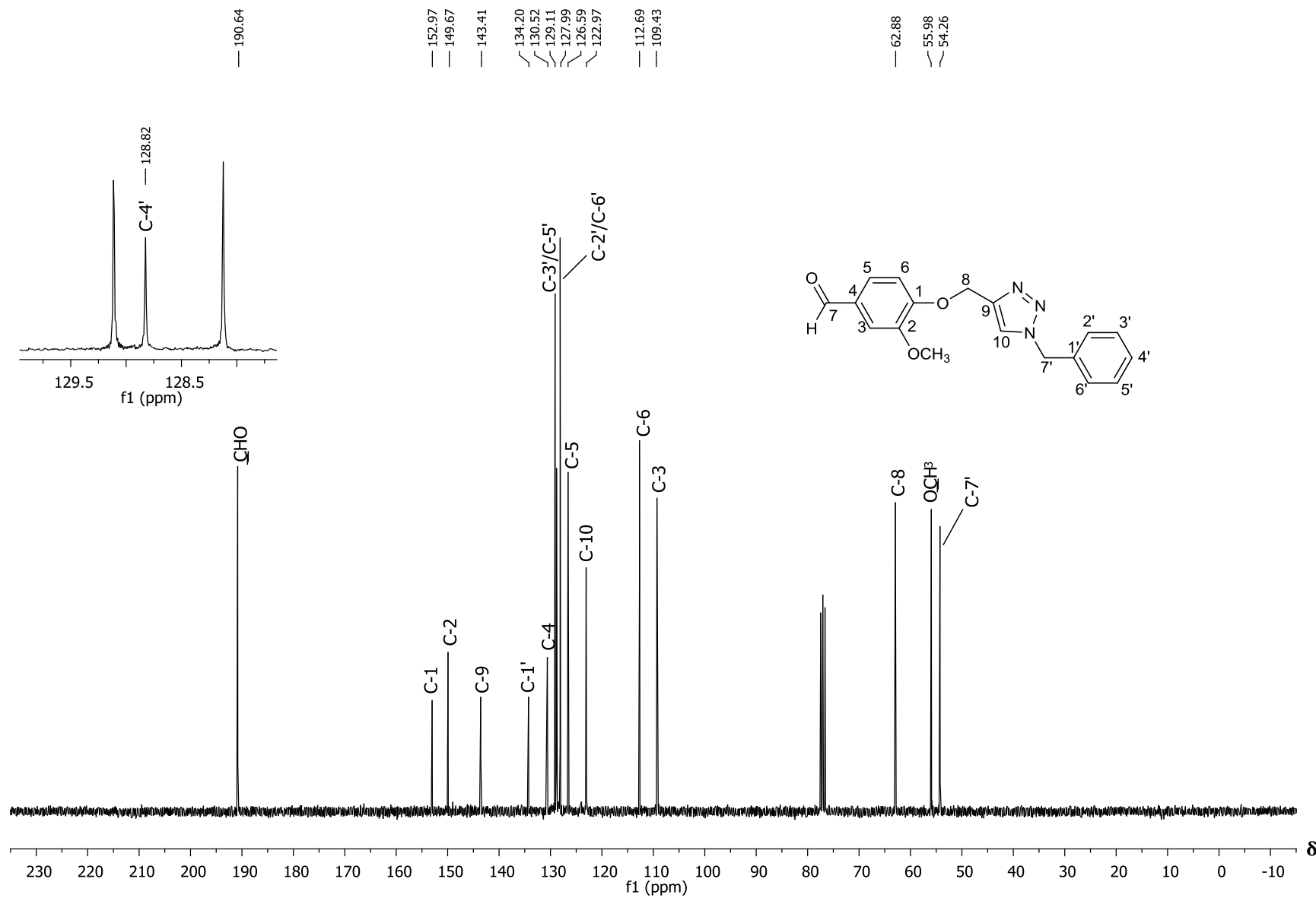


Figura A39. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **6k**.

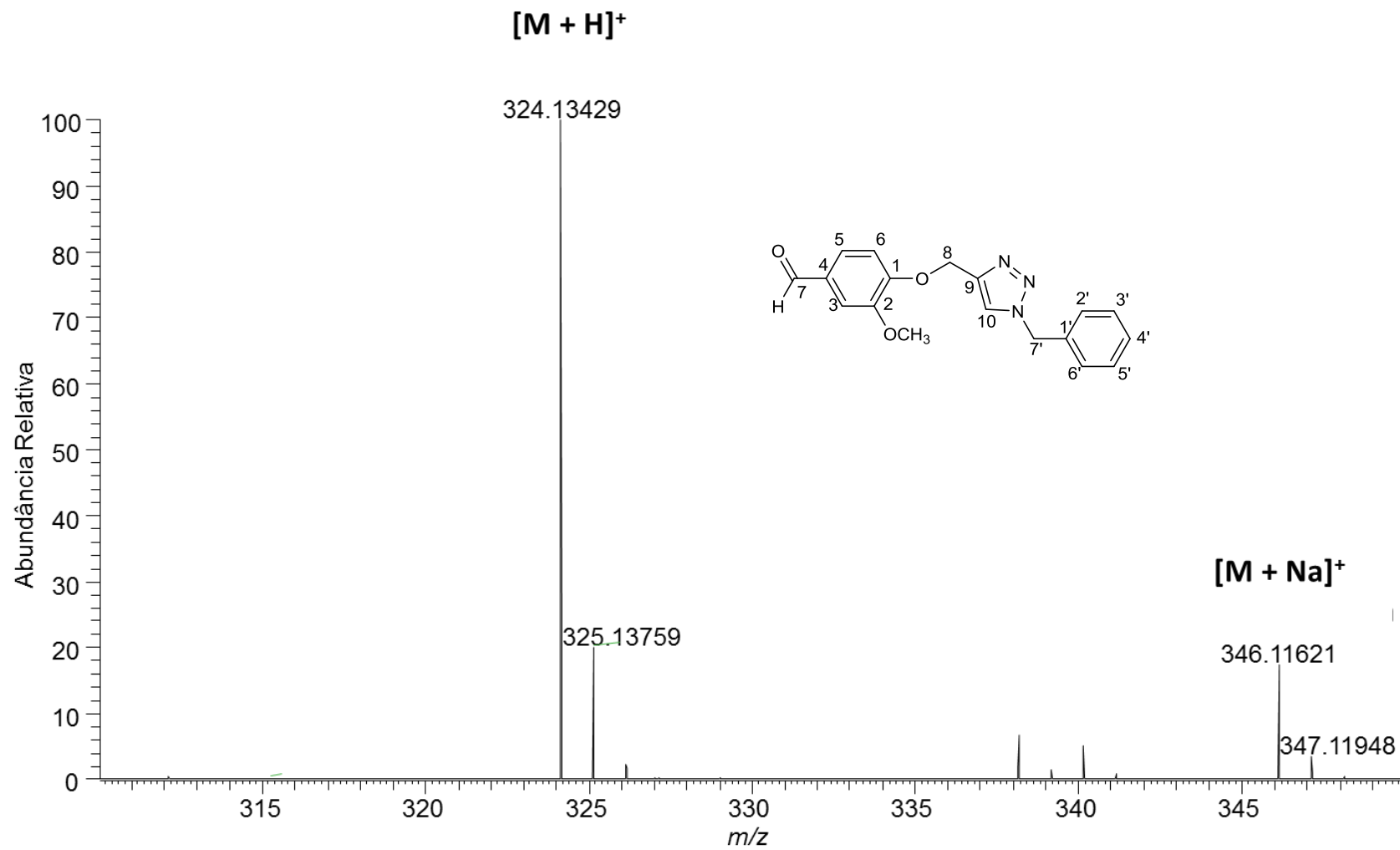


Figura A40. Espectro de massas de alta resolução do composto **6k**.

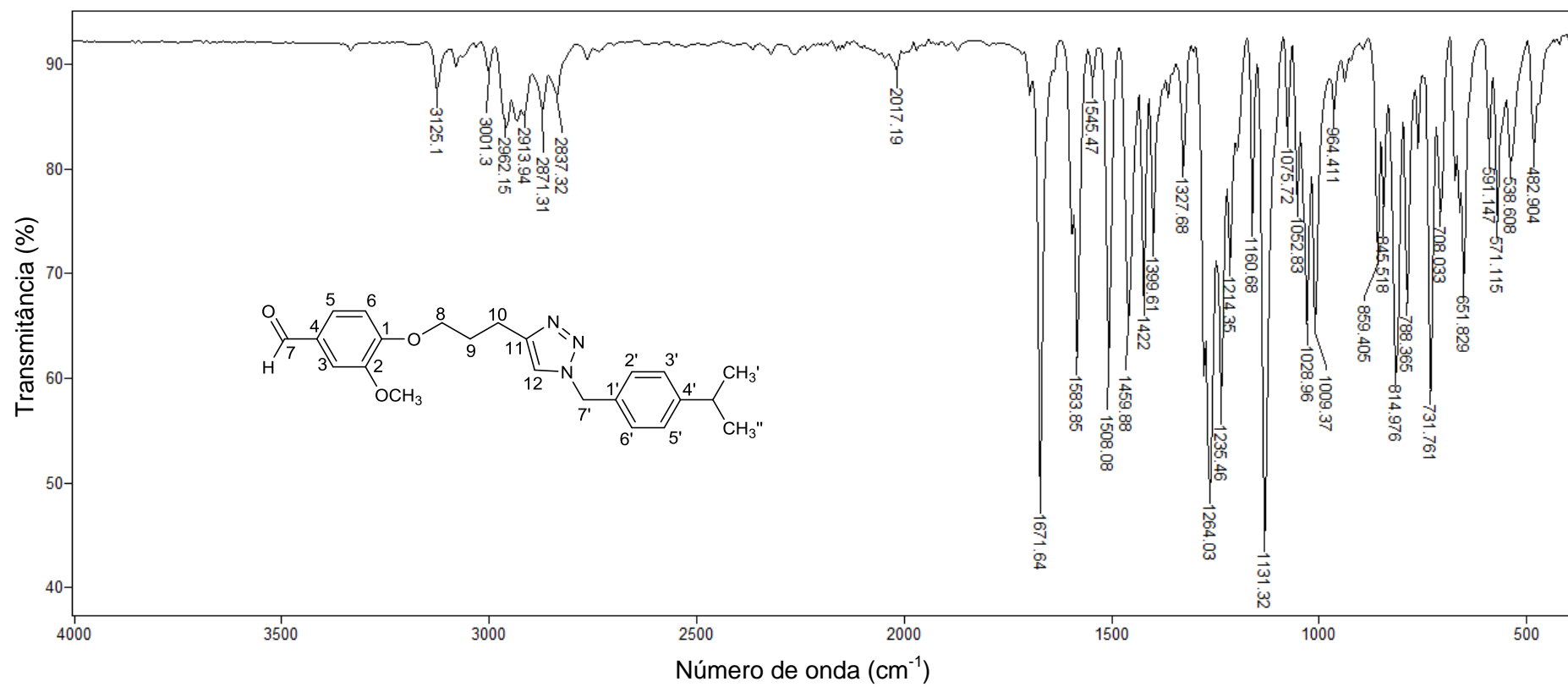


Figura A41. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7a**.

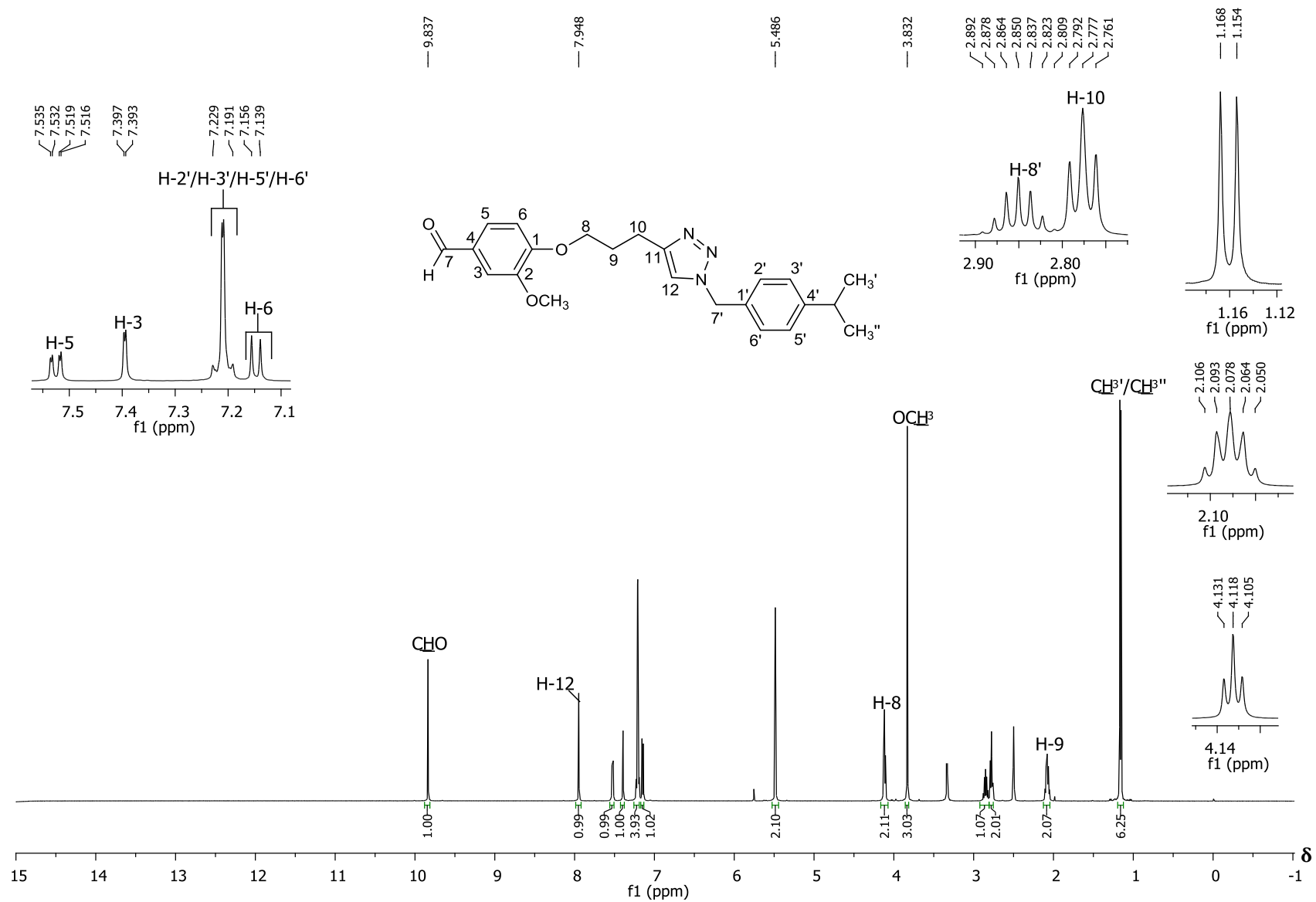


Figura A42. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **7a**.

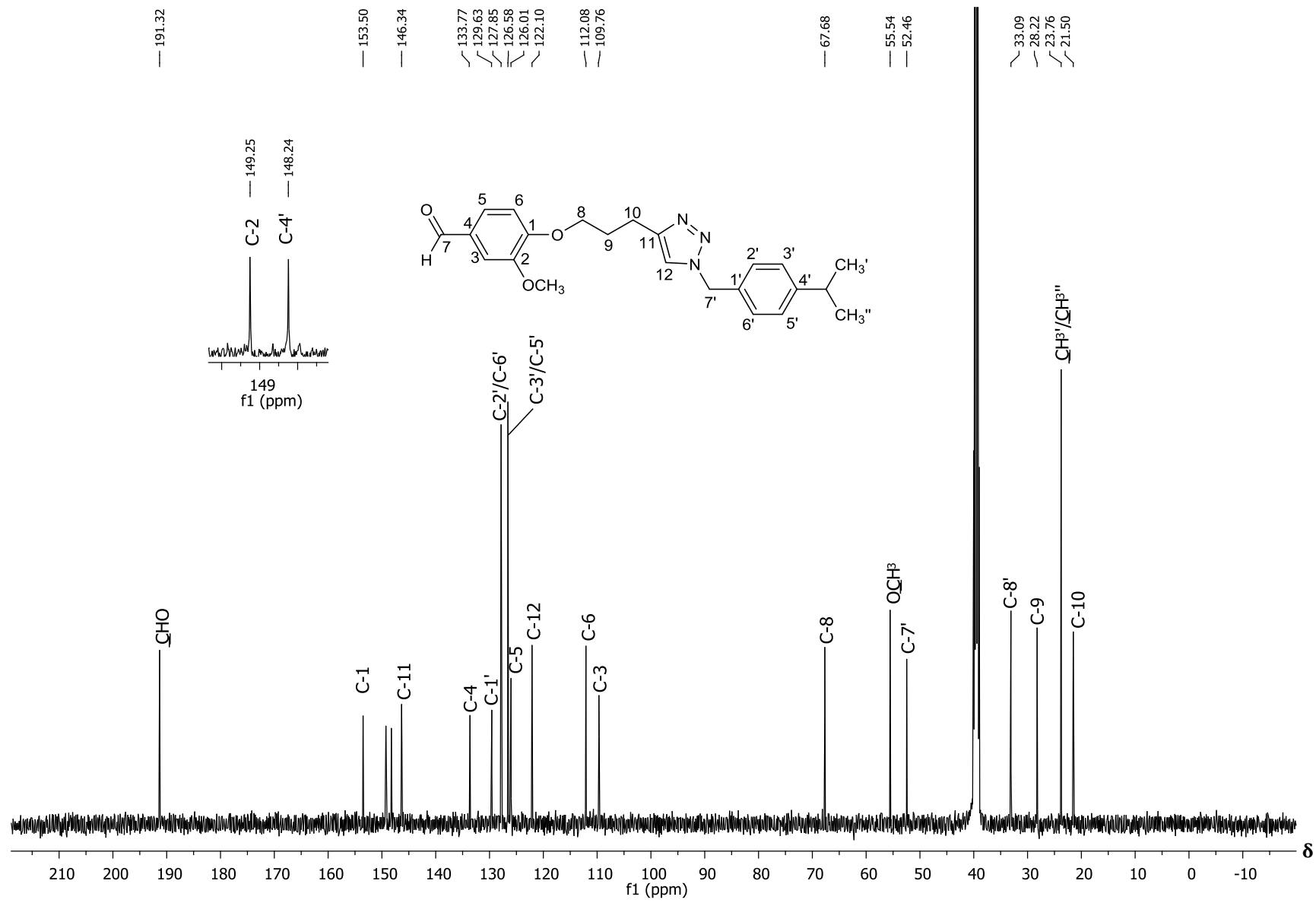


Figura A43. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) do composto **7a**.

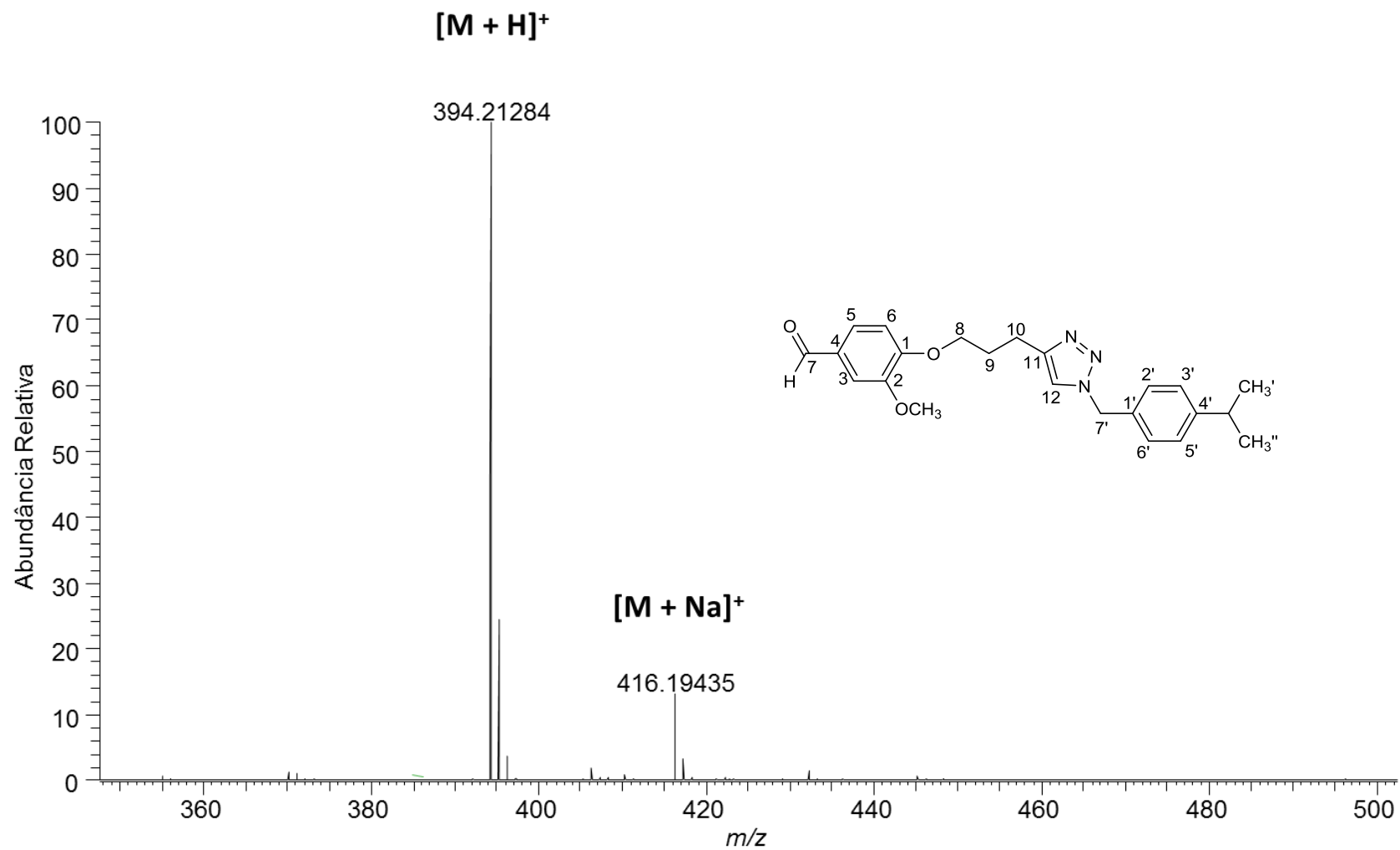


Figura A44. Espectro de massas de alta resolução do composto **7a**.

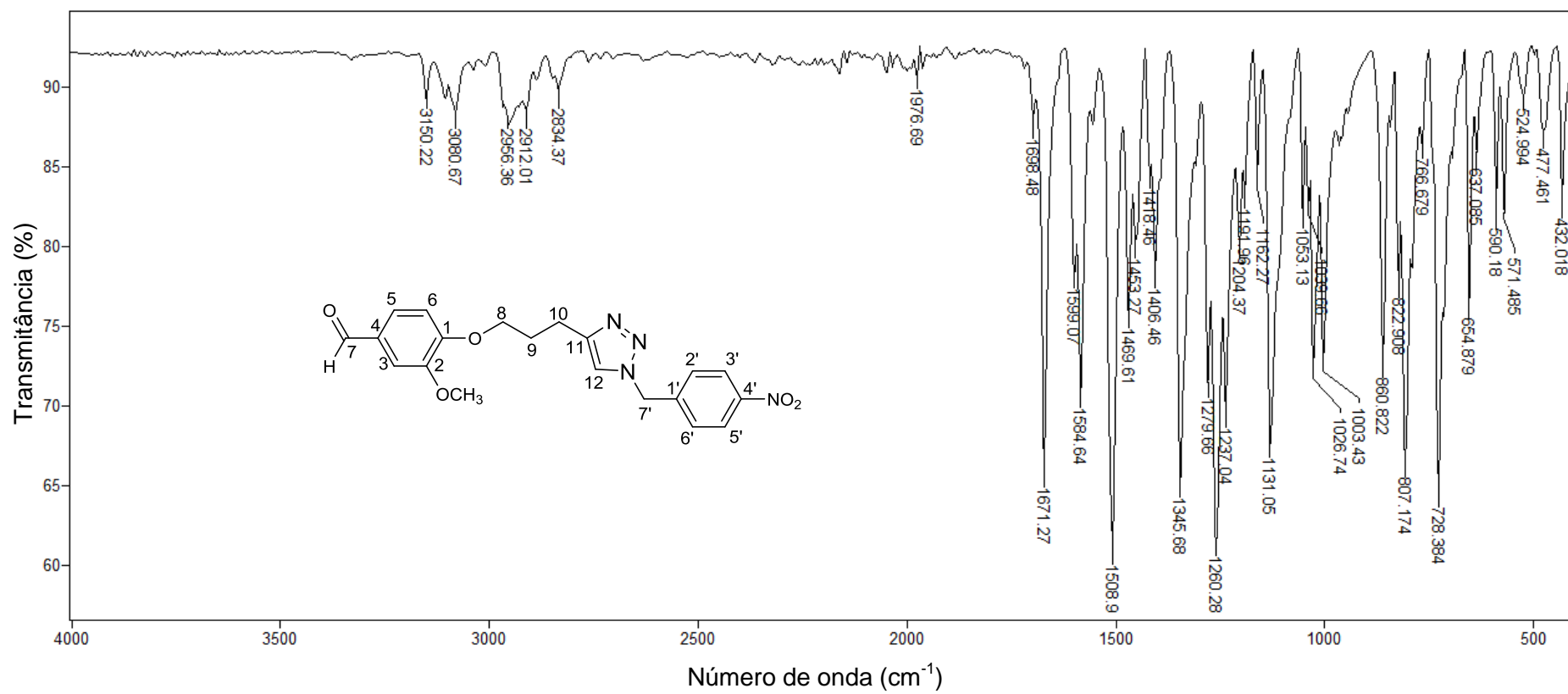


Figura A45. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7b**.

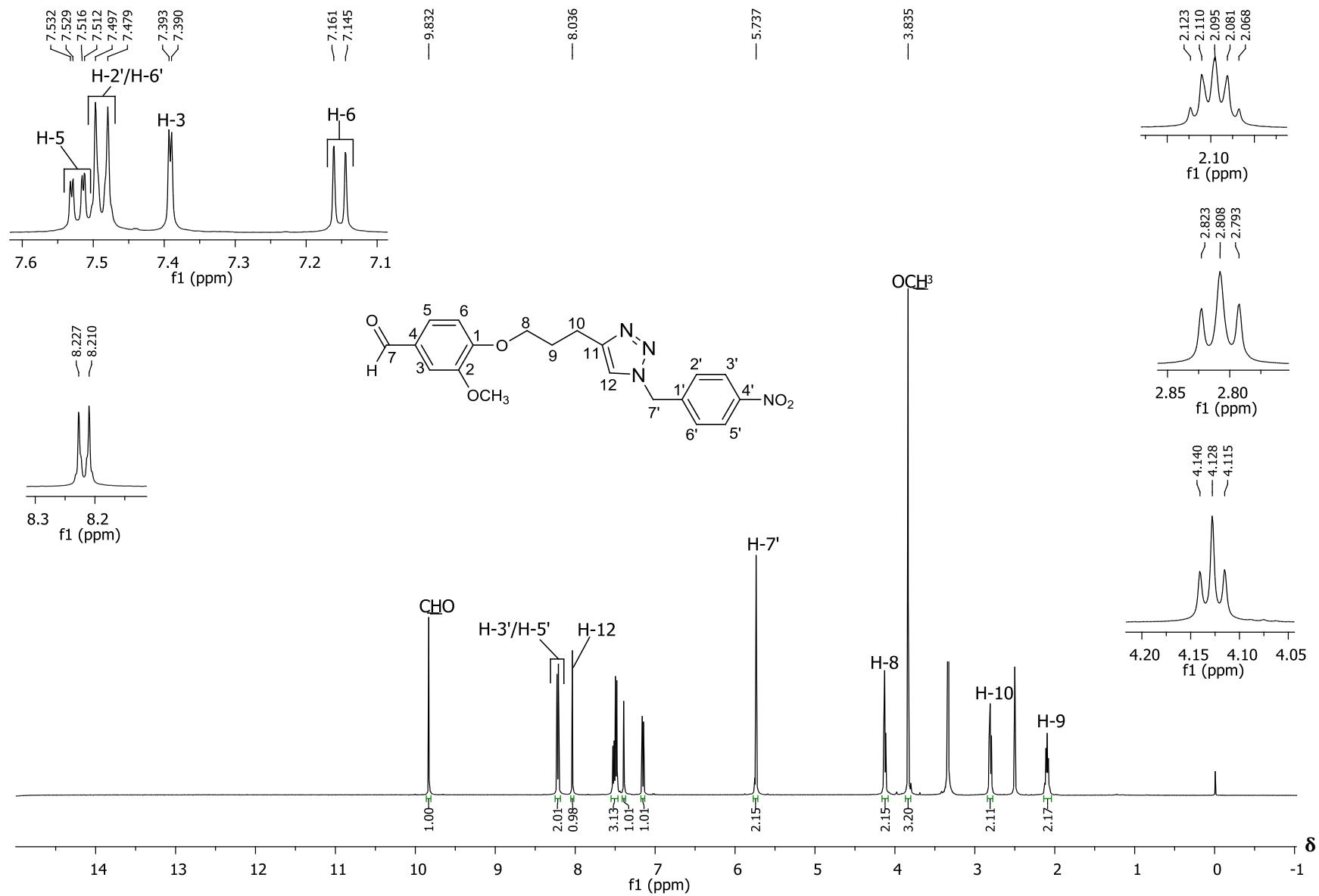


Figura A46. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **7b**.

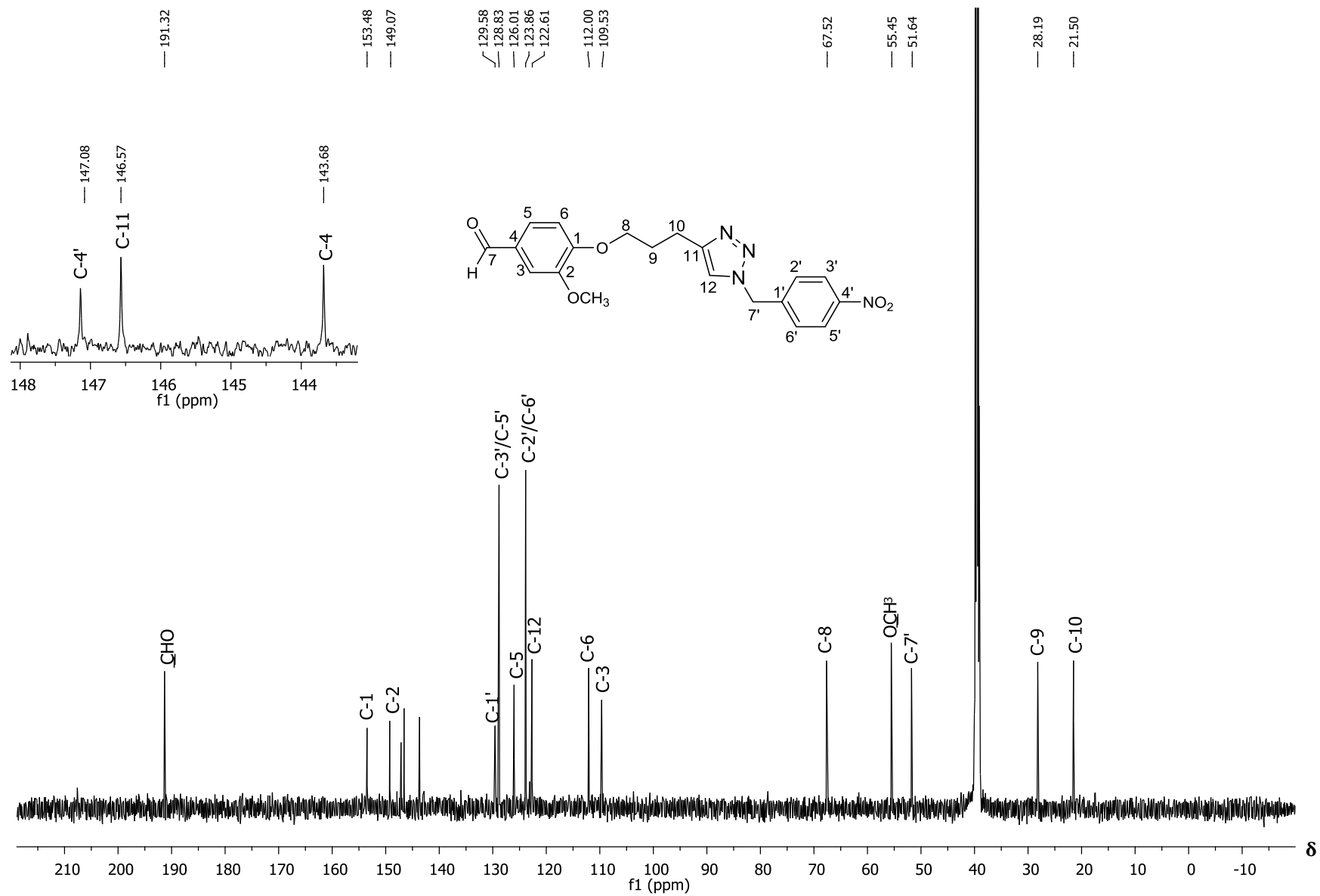


Figura A47. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **7b**.

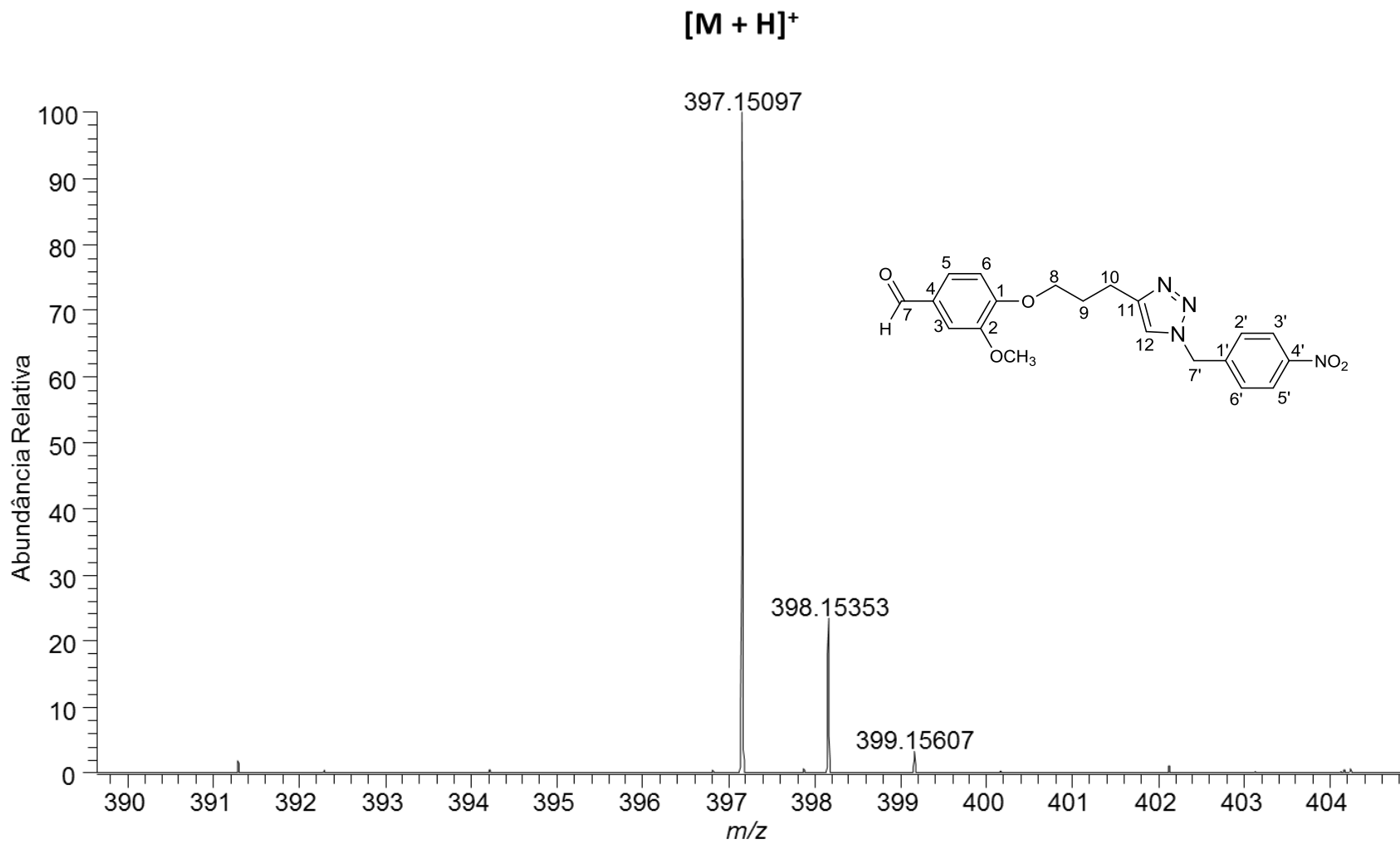


Figura A48. Espectro de massas de alta resolução do composto **7b**.

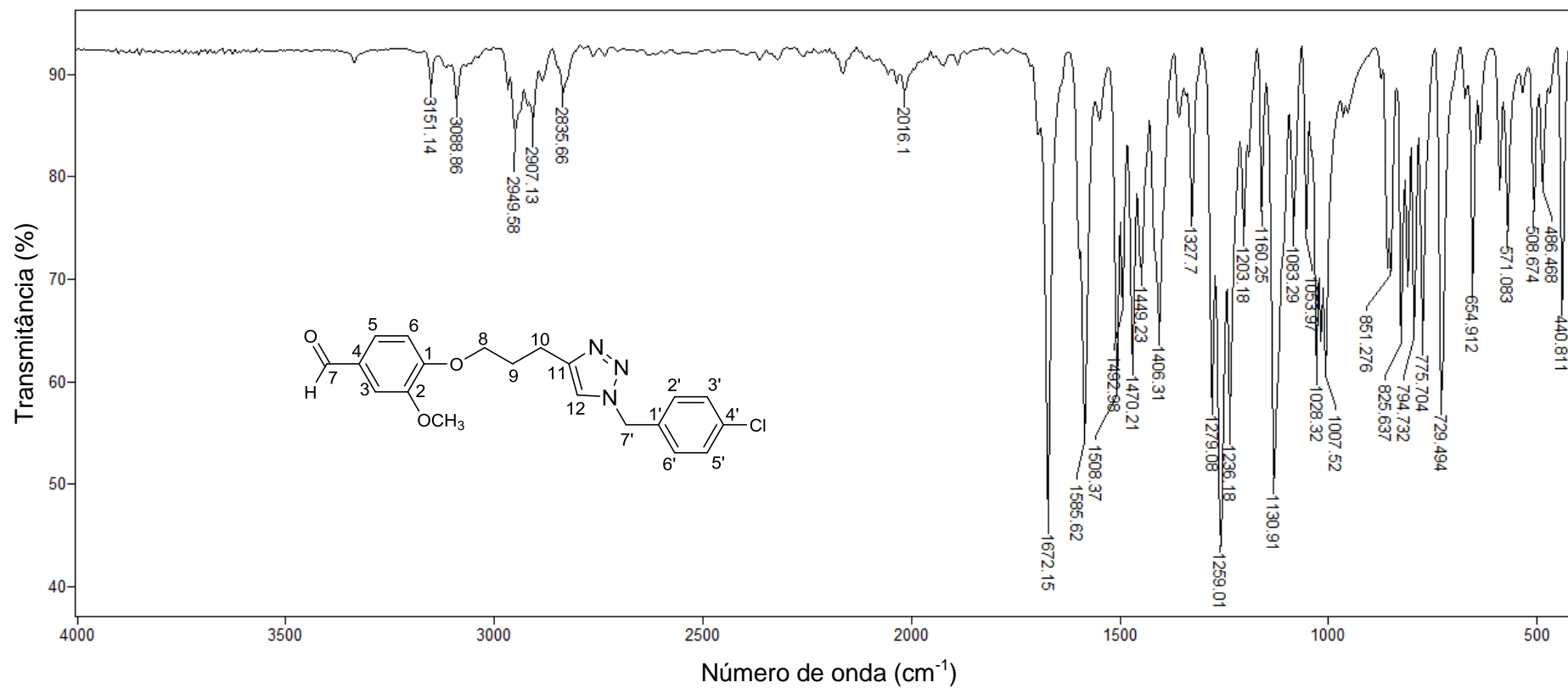


Figura A49. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7c**.

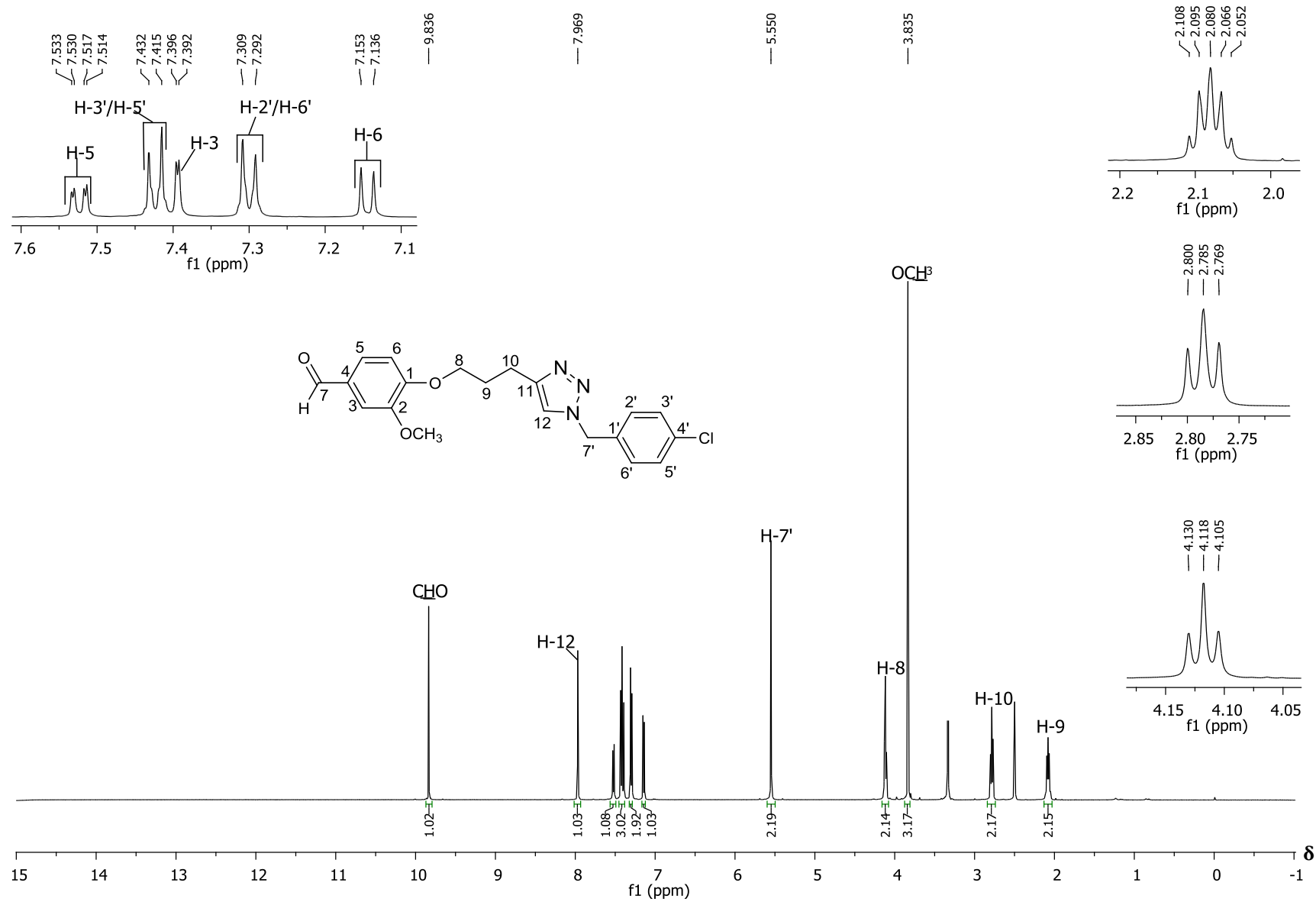


Figura A50. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **7c**.

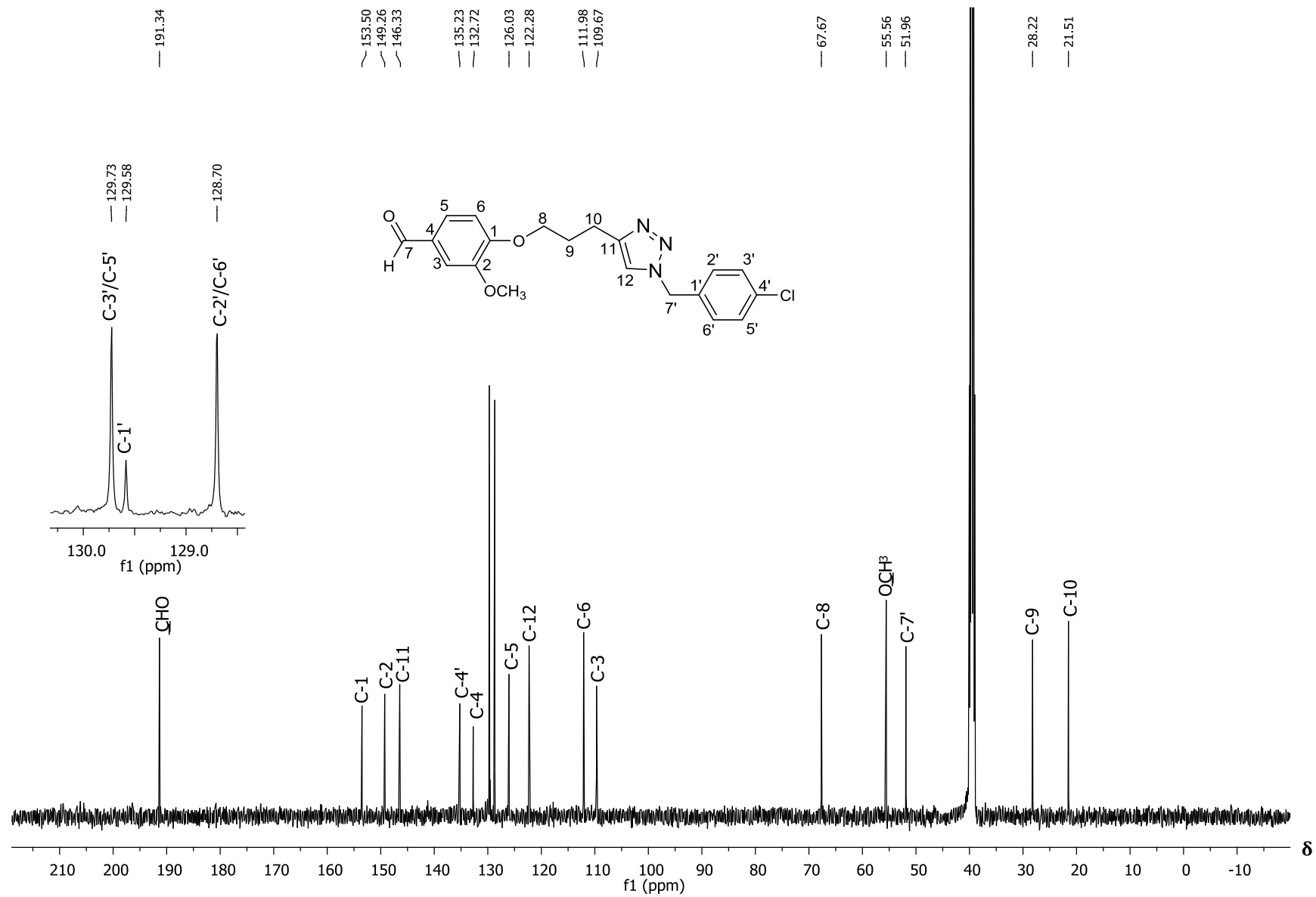


Figura A51. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **7c**.

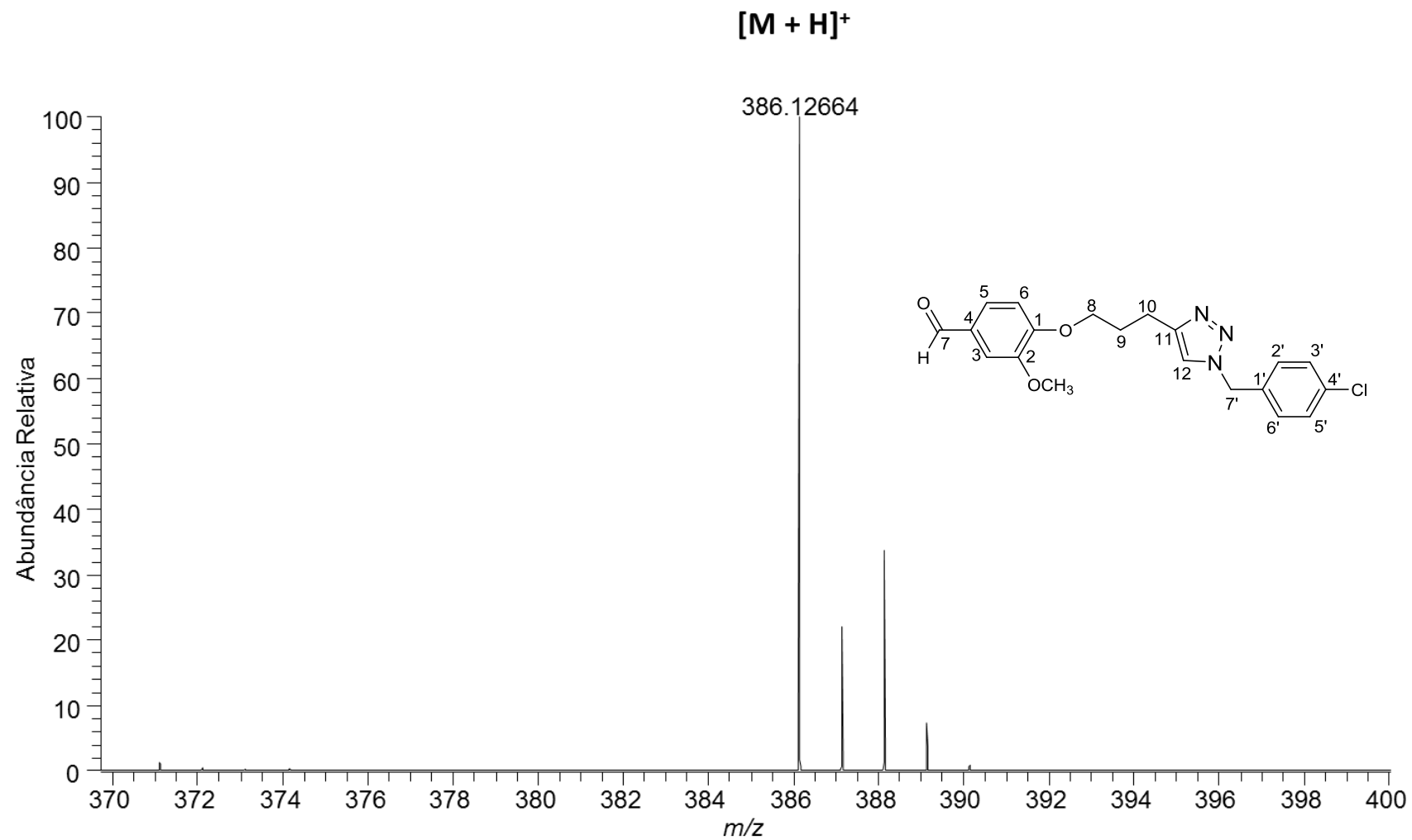


Figura A52. Espectro de massas de alta resolução do composto **7c**.

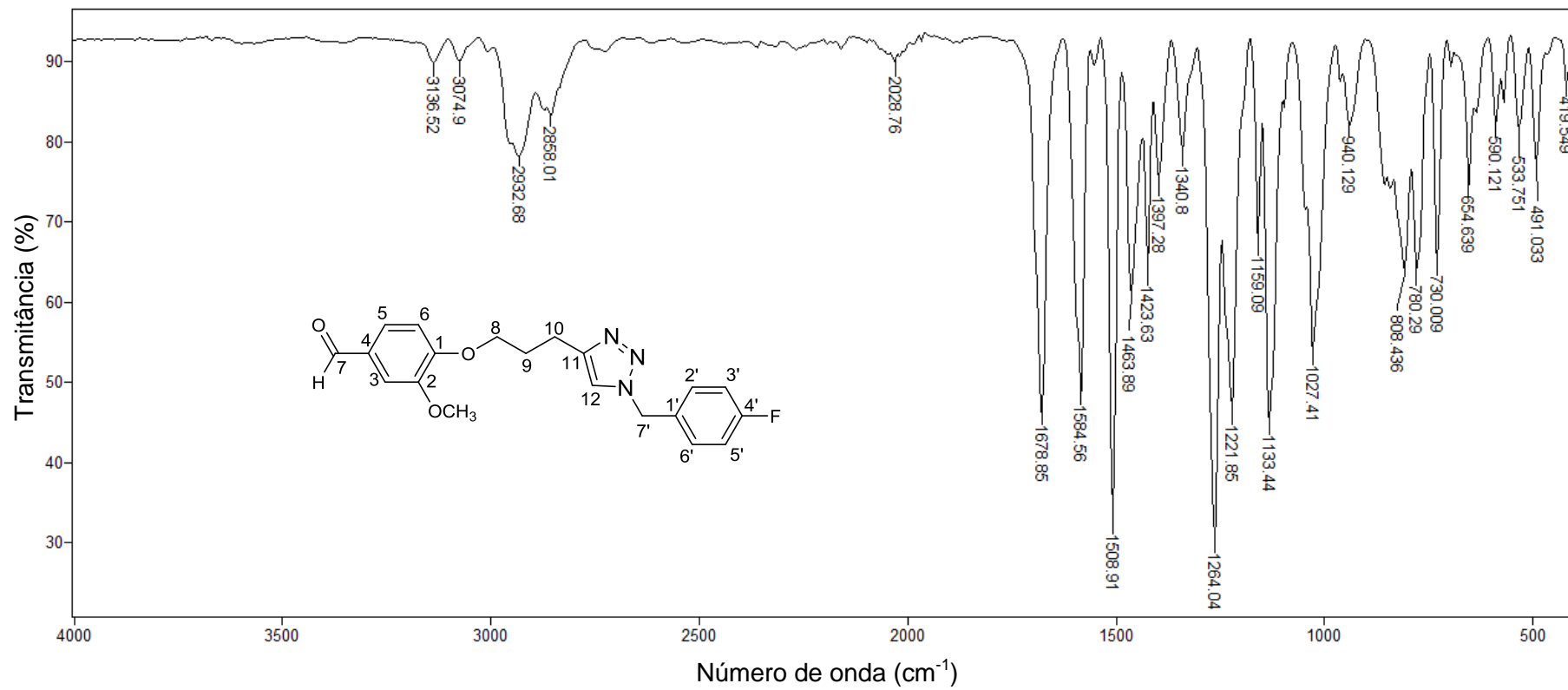


Figura A53. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7d**.

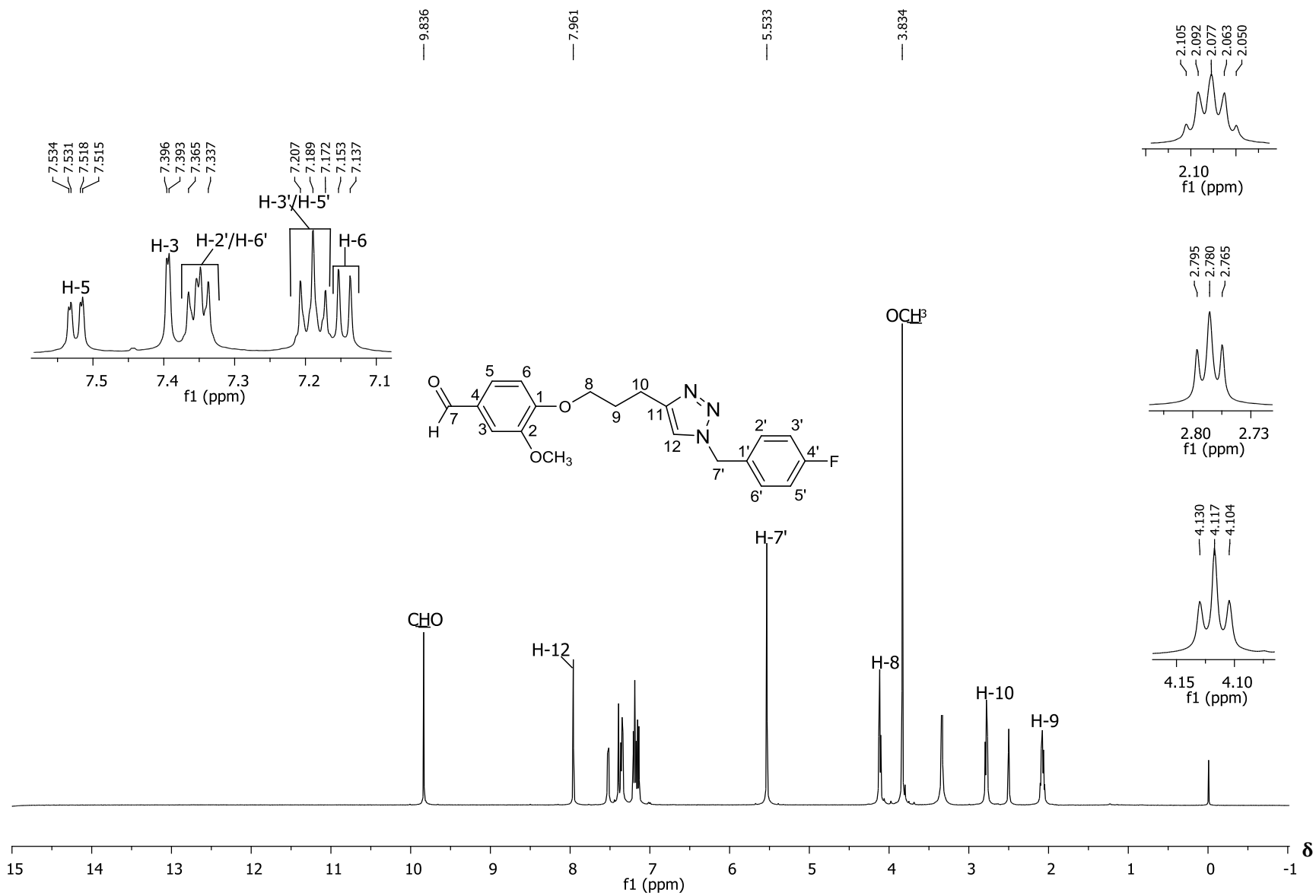


Figura A54. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **7d**.

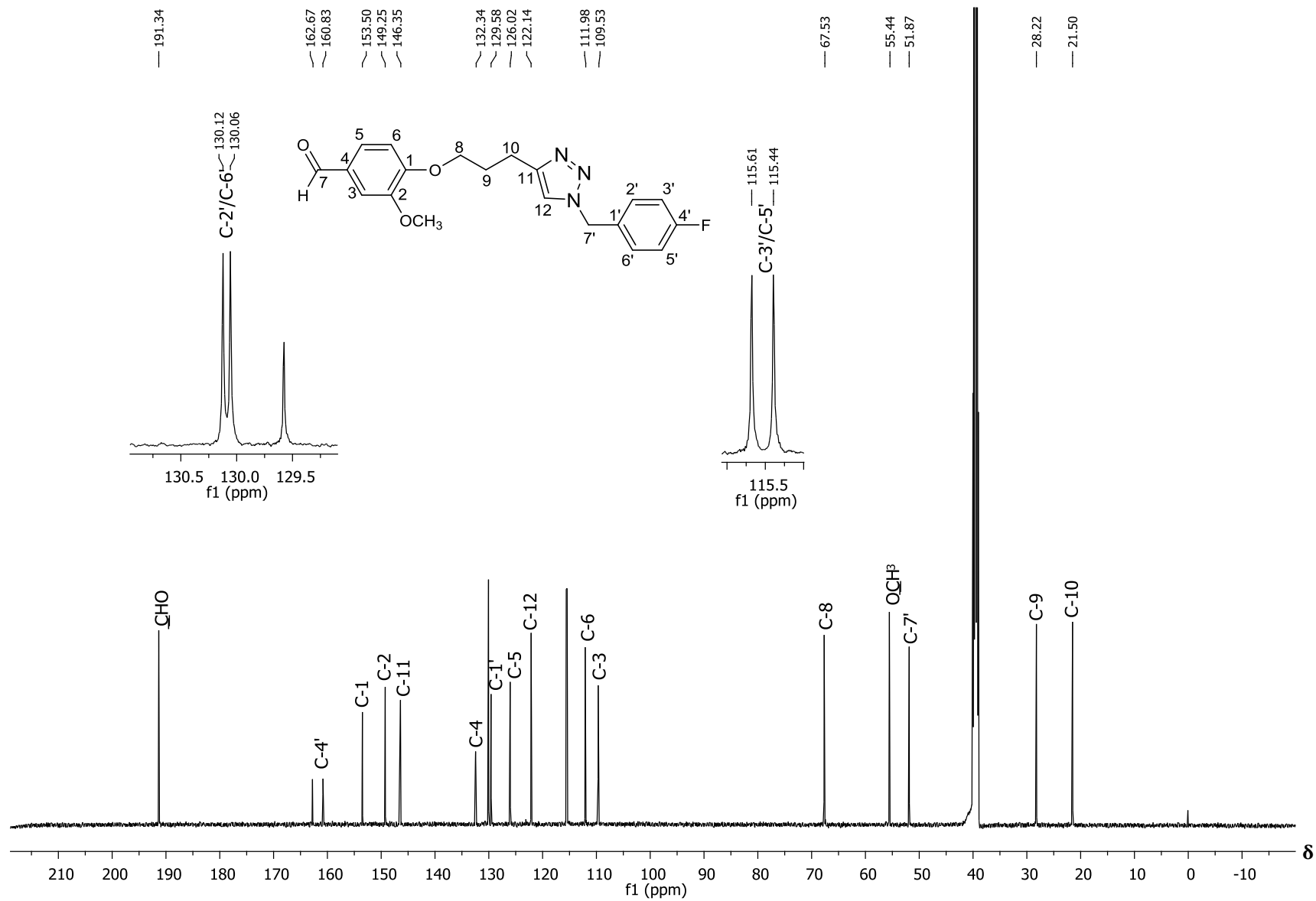


Figura A55. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **7d**.

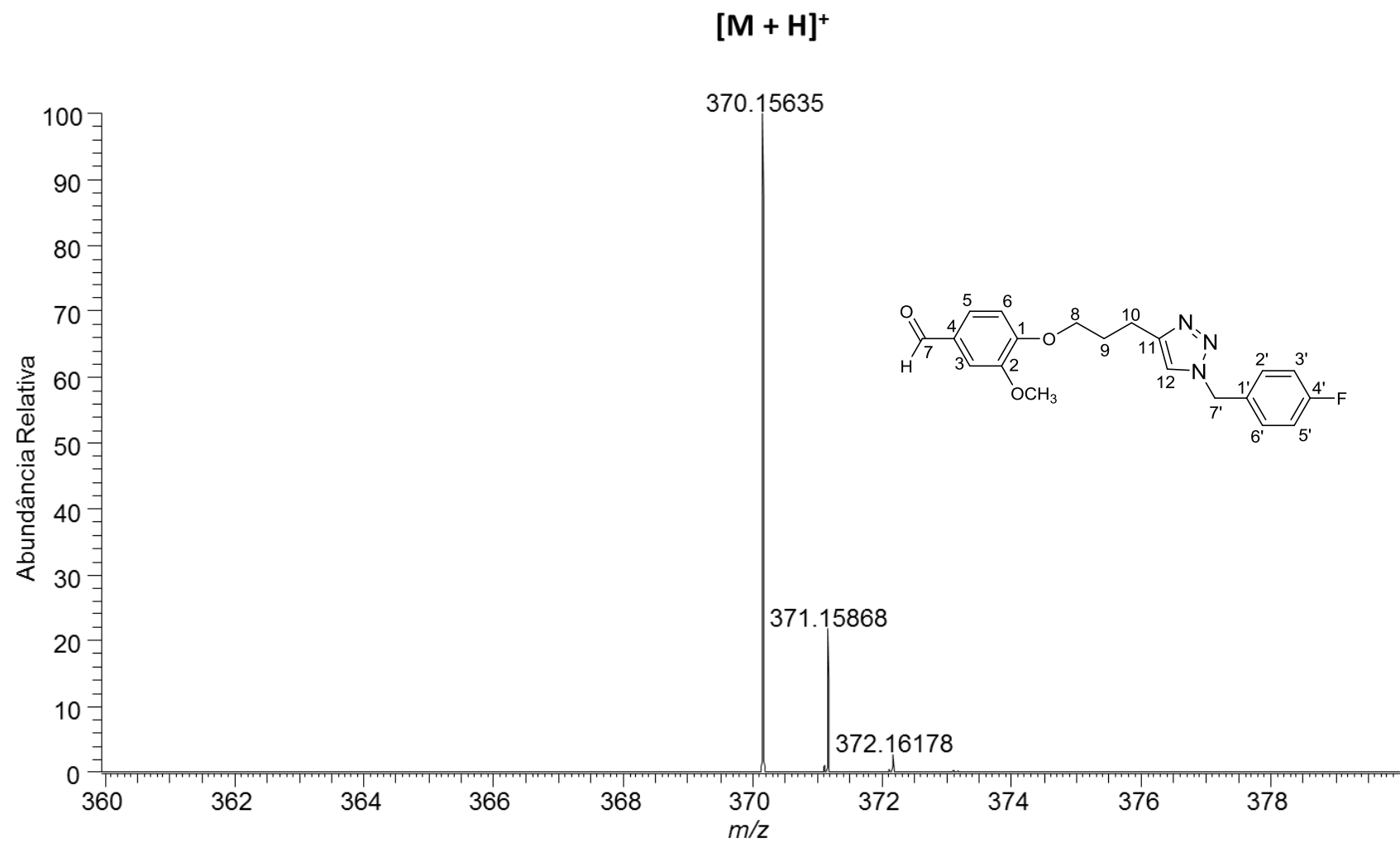


Figura A56. Espectro de massas de alta resolução do composto **7d**.

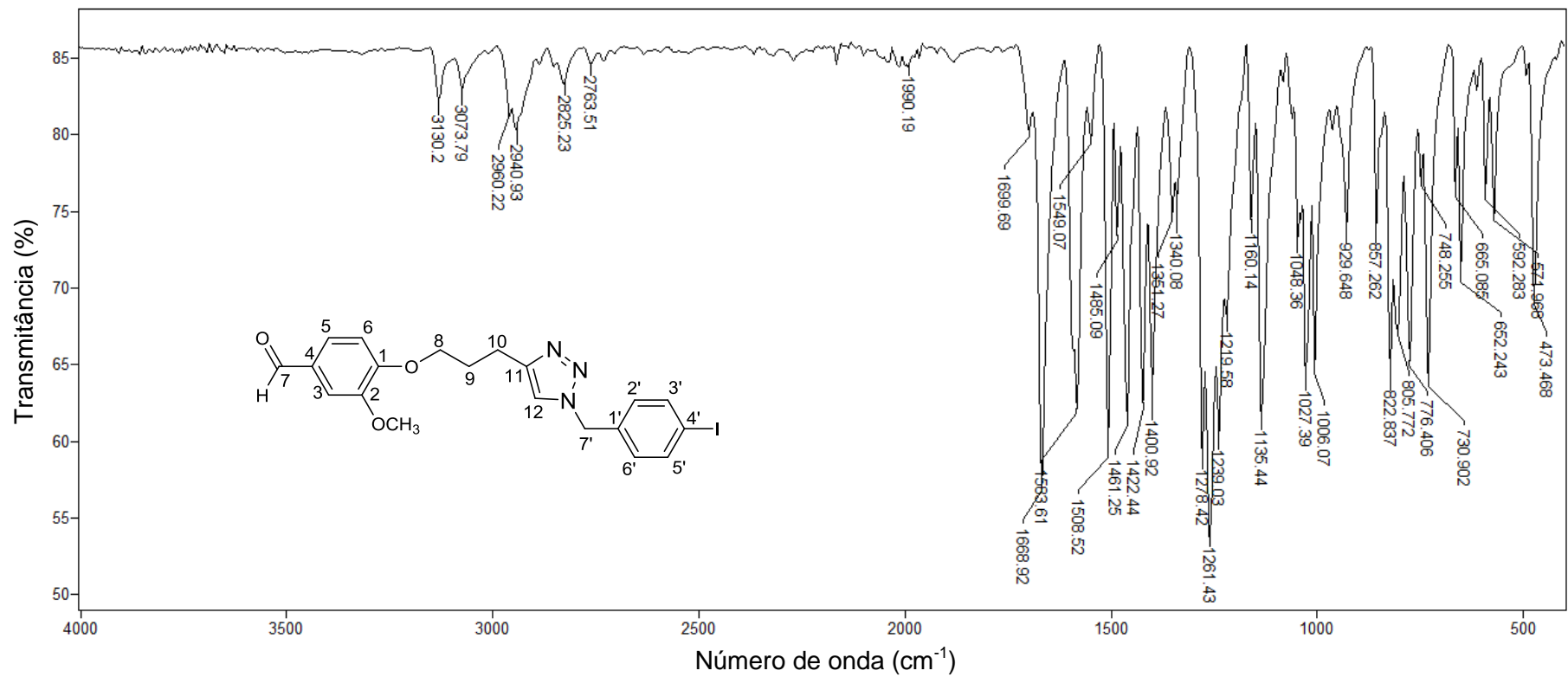


Figura A57. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7e**.

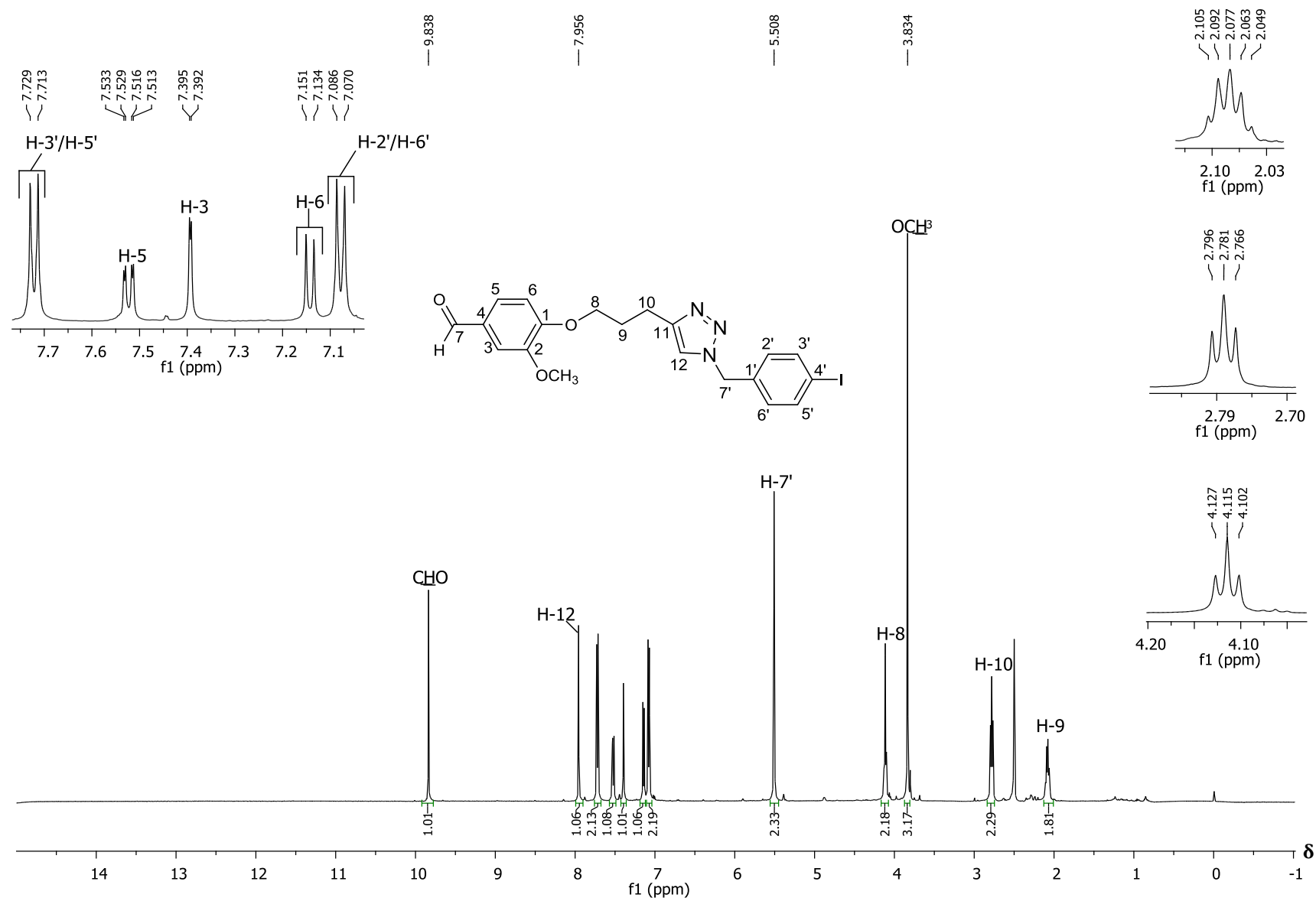


Figura A58. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **7e**.

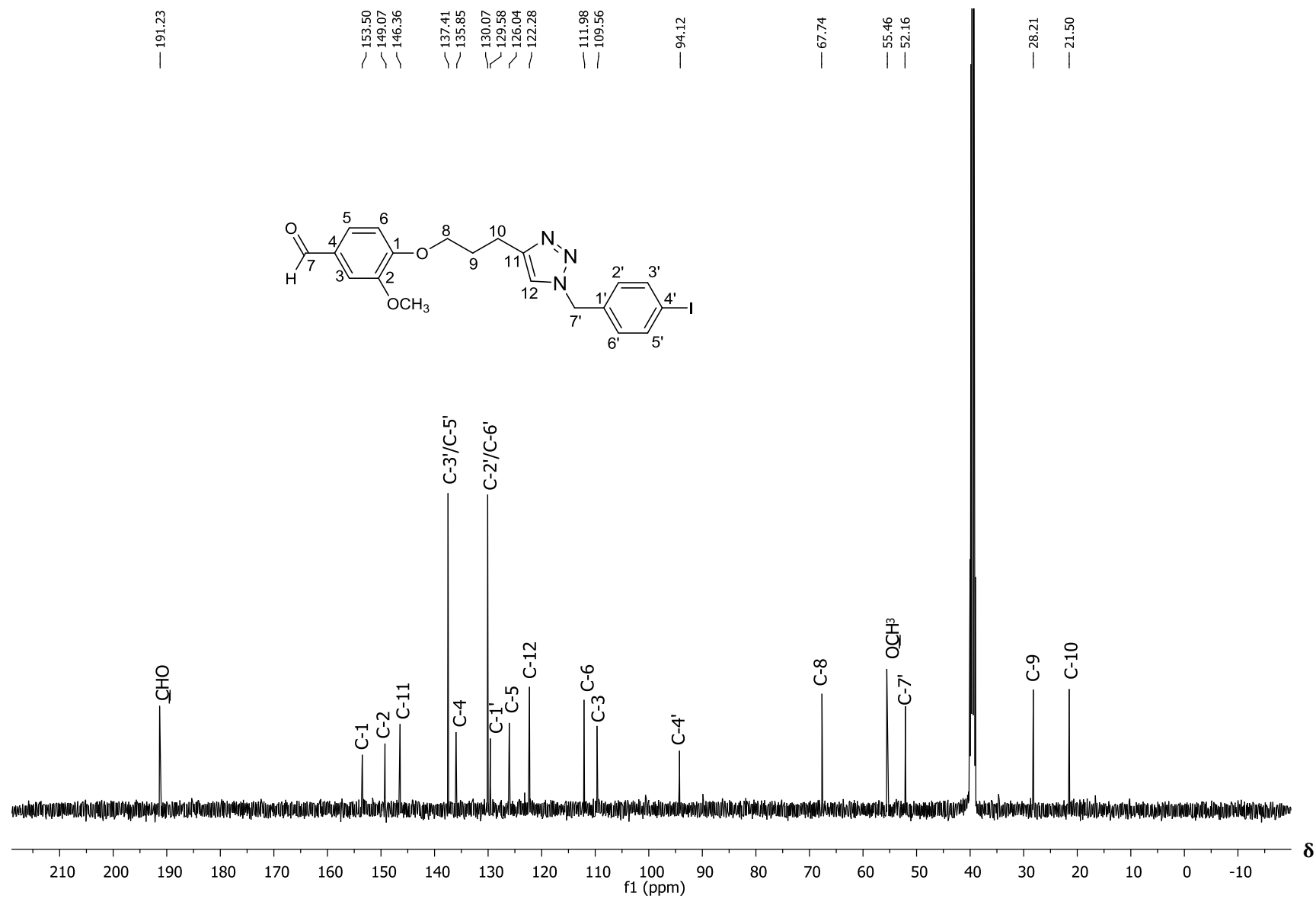


Figura A59. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **7e**.

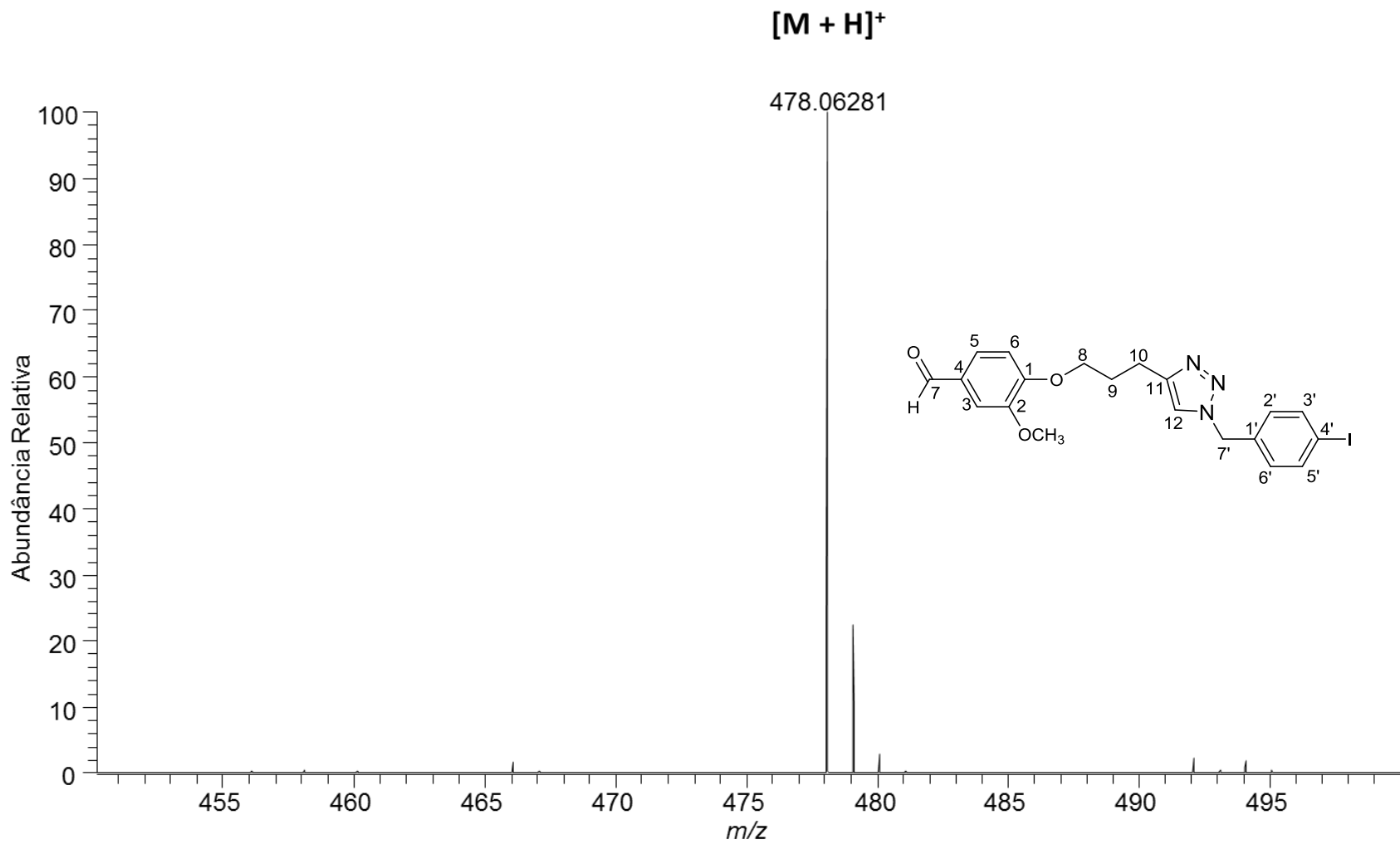


Figura A60. Espectro de massas de alta resolução do composto **7e**.

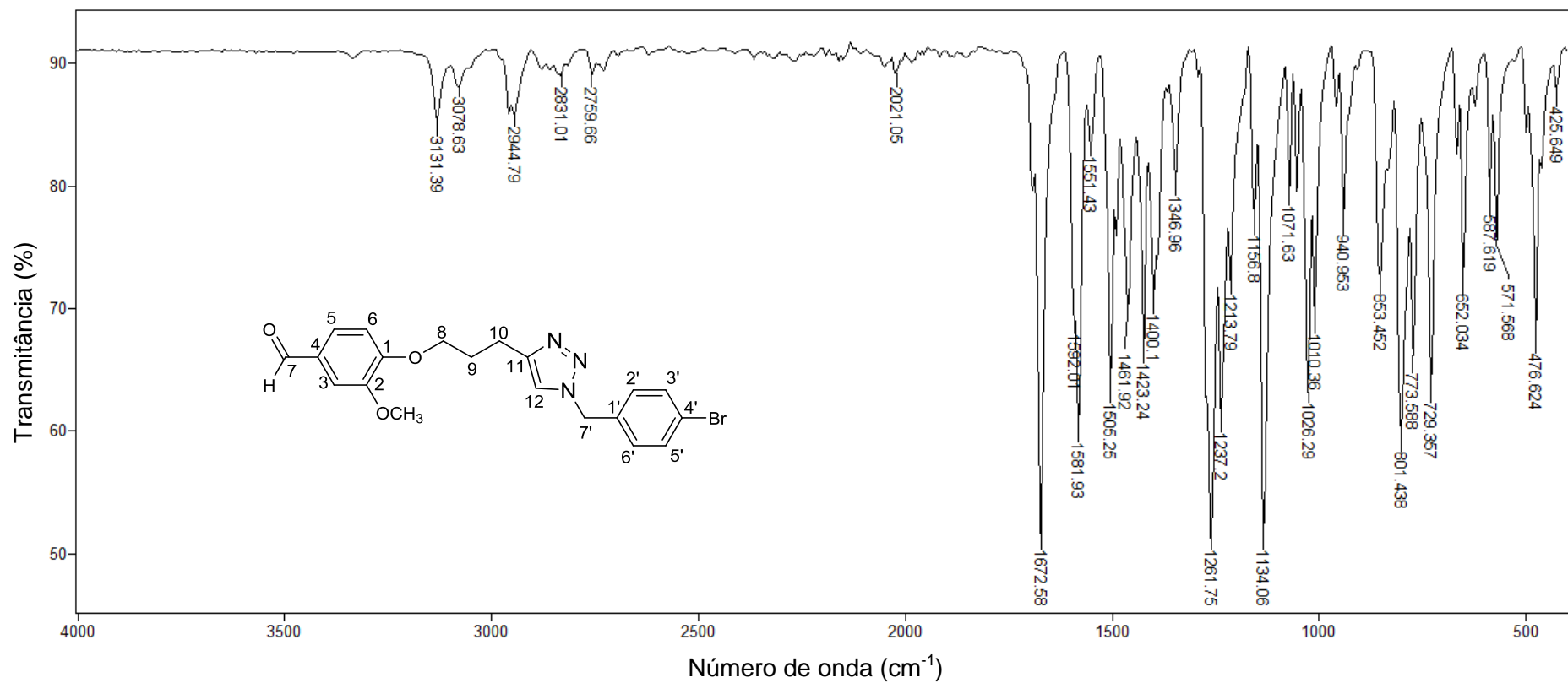


Figura A61. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7f**.

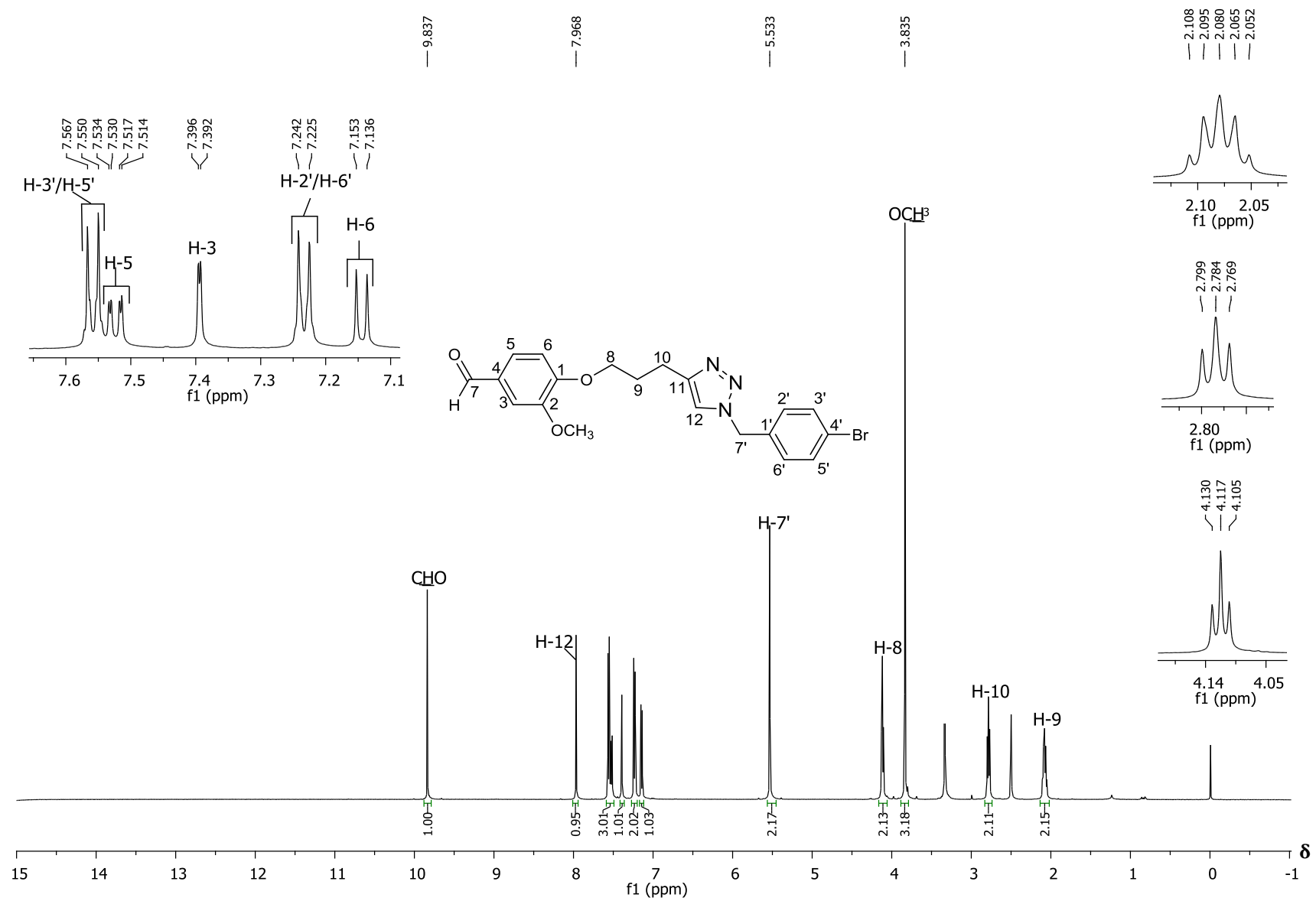


Figura A62. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **7f**.

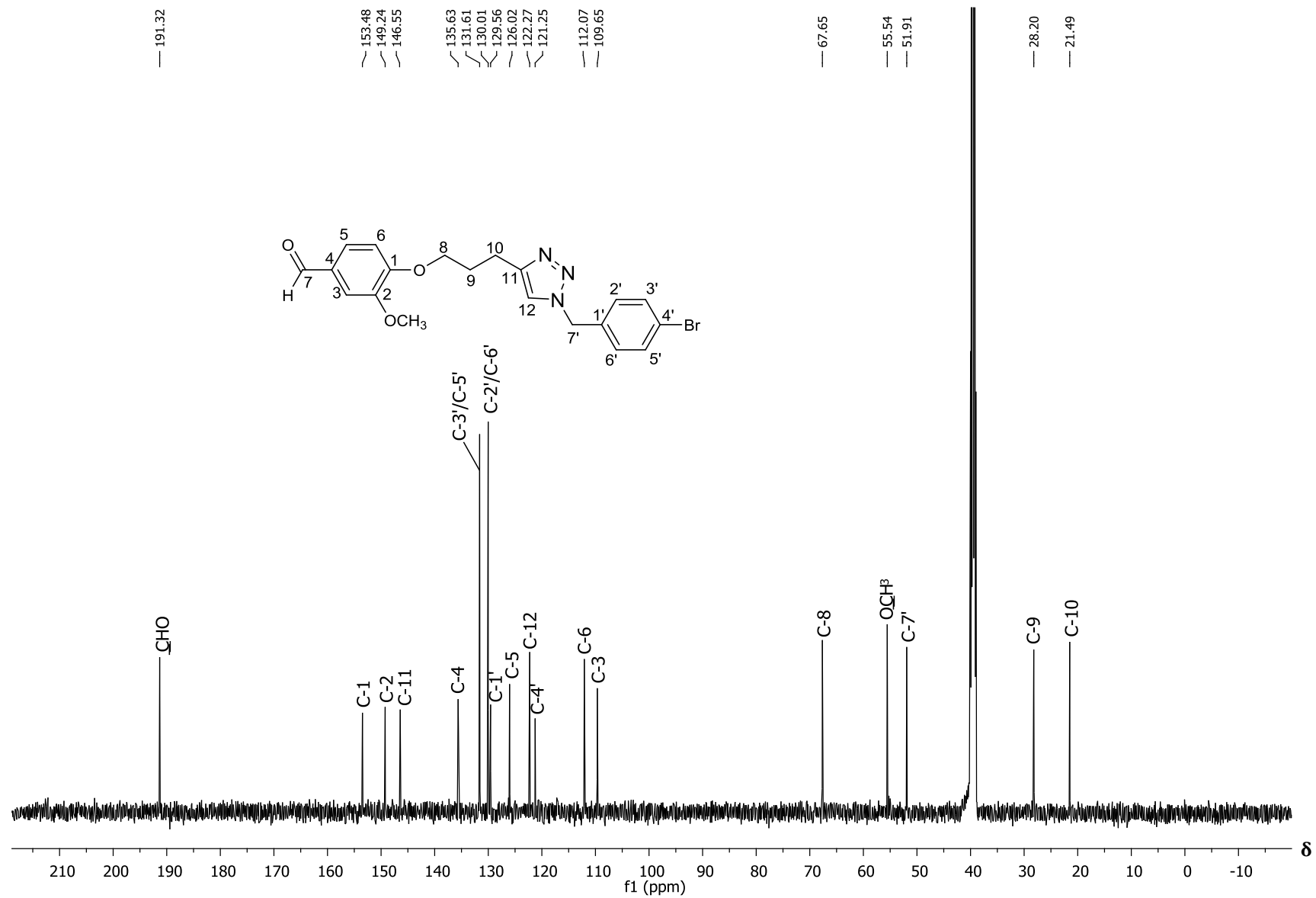


Figura A63. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **7f**.

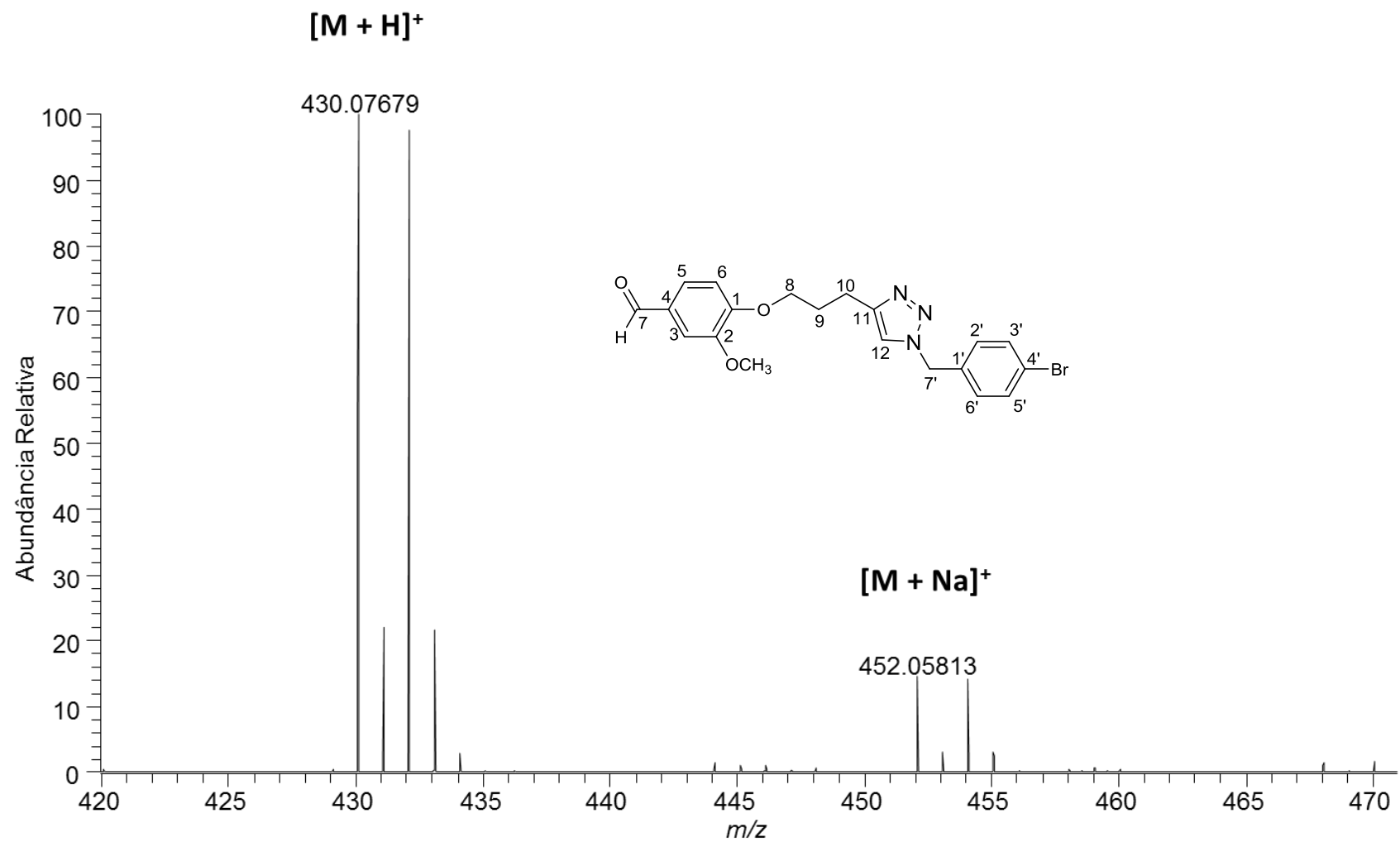


Figura A64. Espectro de massas de alta resolução do composto **7f**.

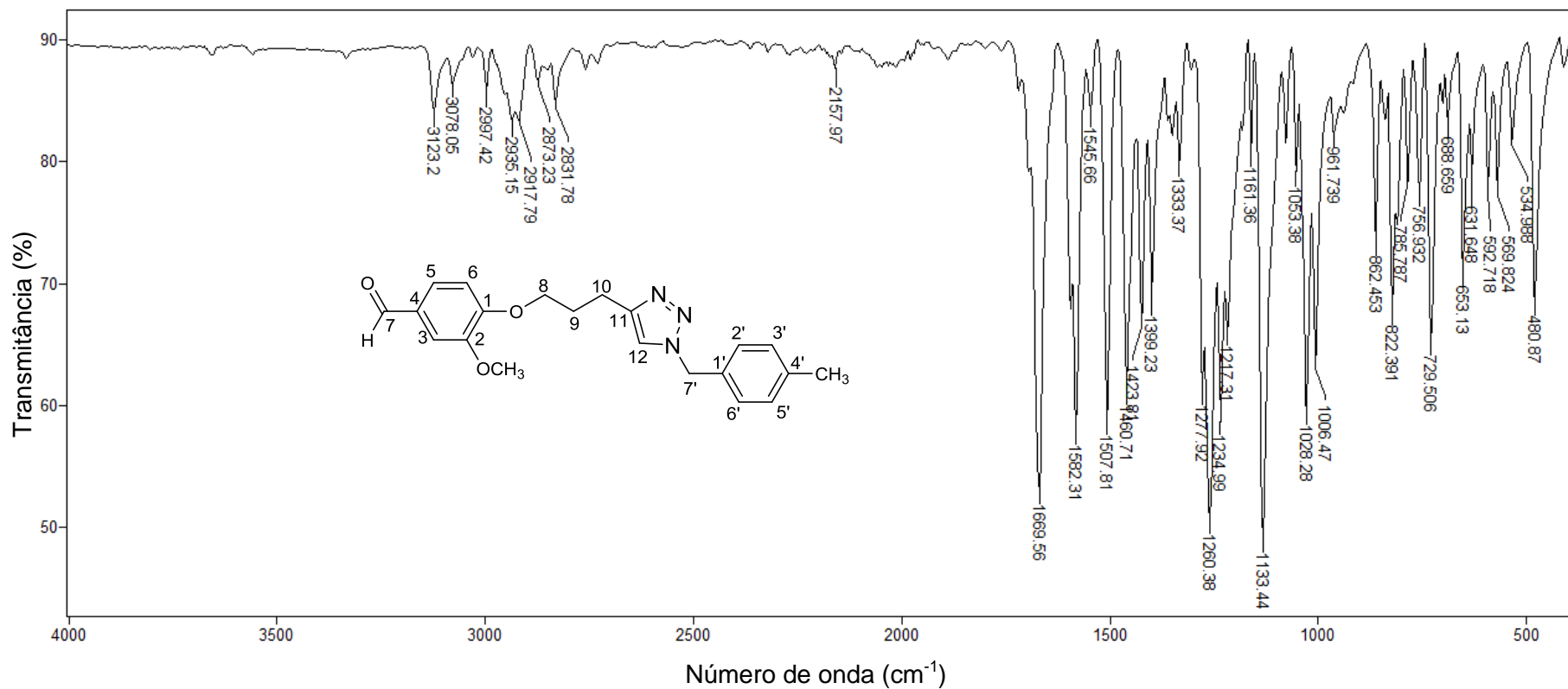


Figura A65. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7g**.

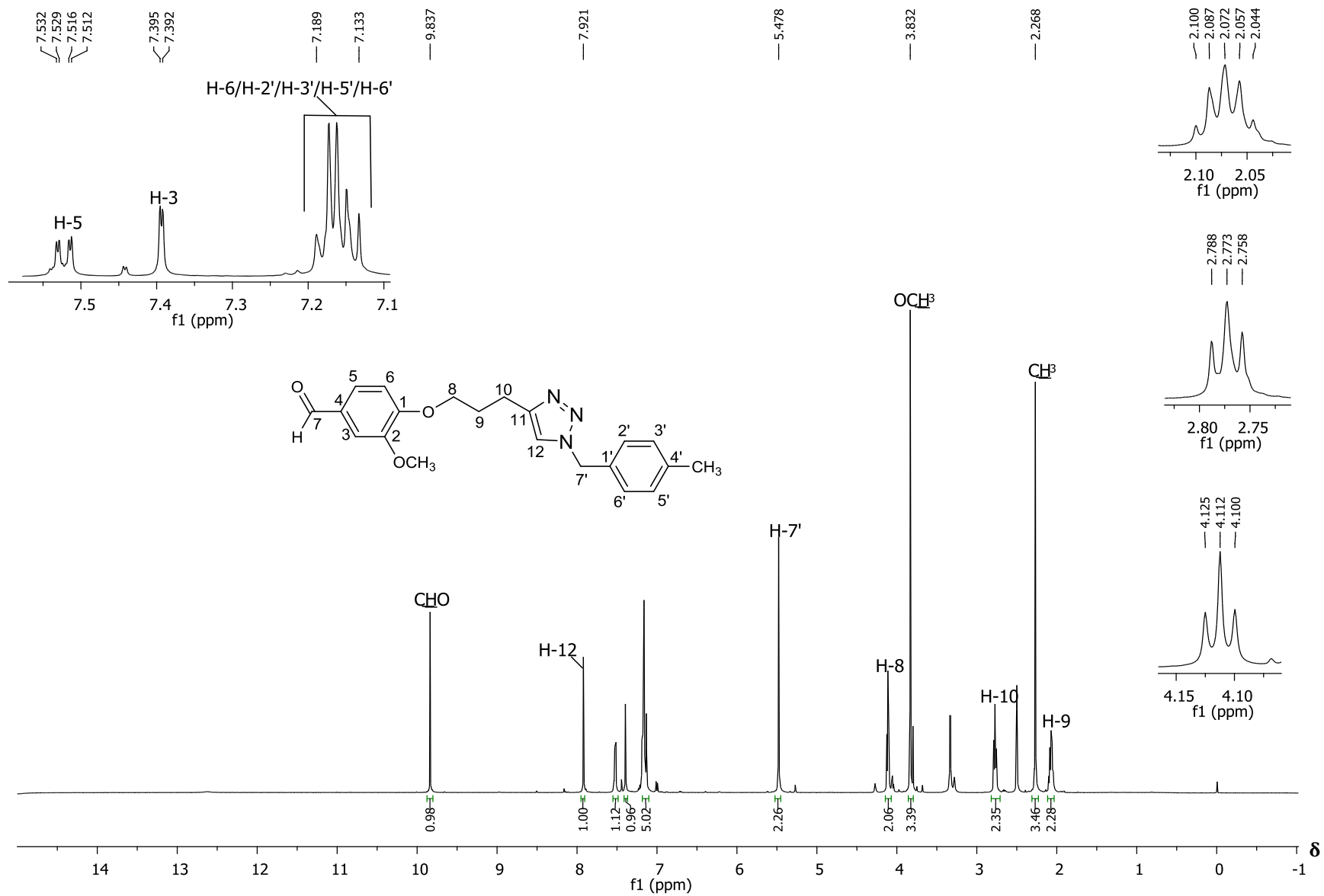


Figura A66. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **7g**.

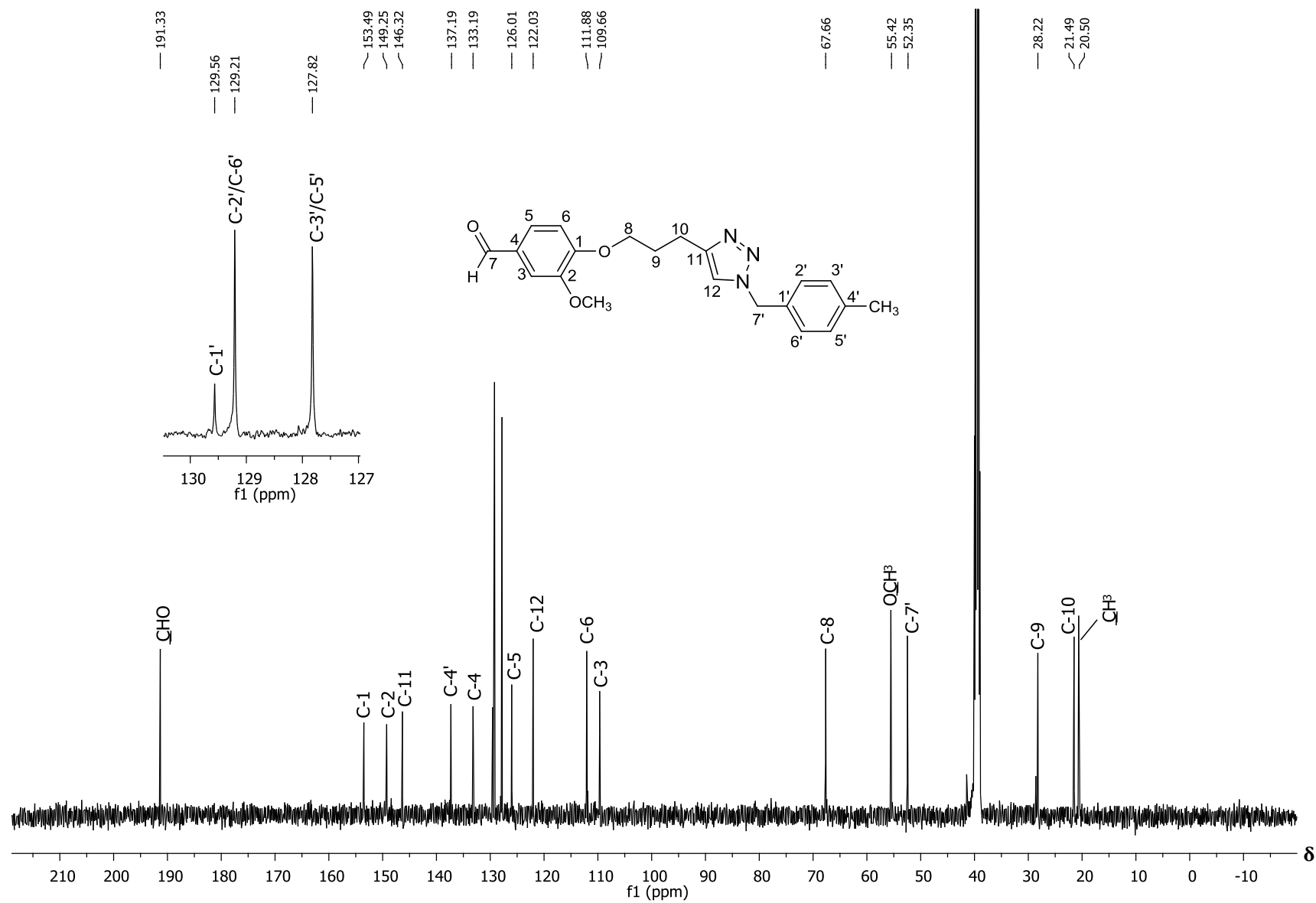


Figura A67. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **7g**.

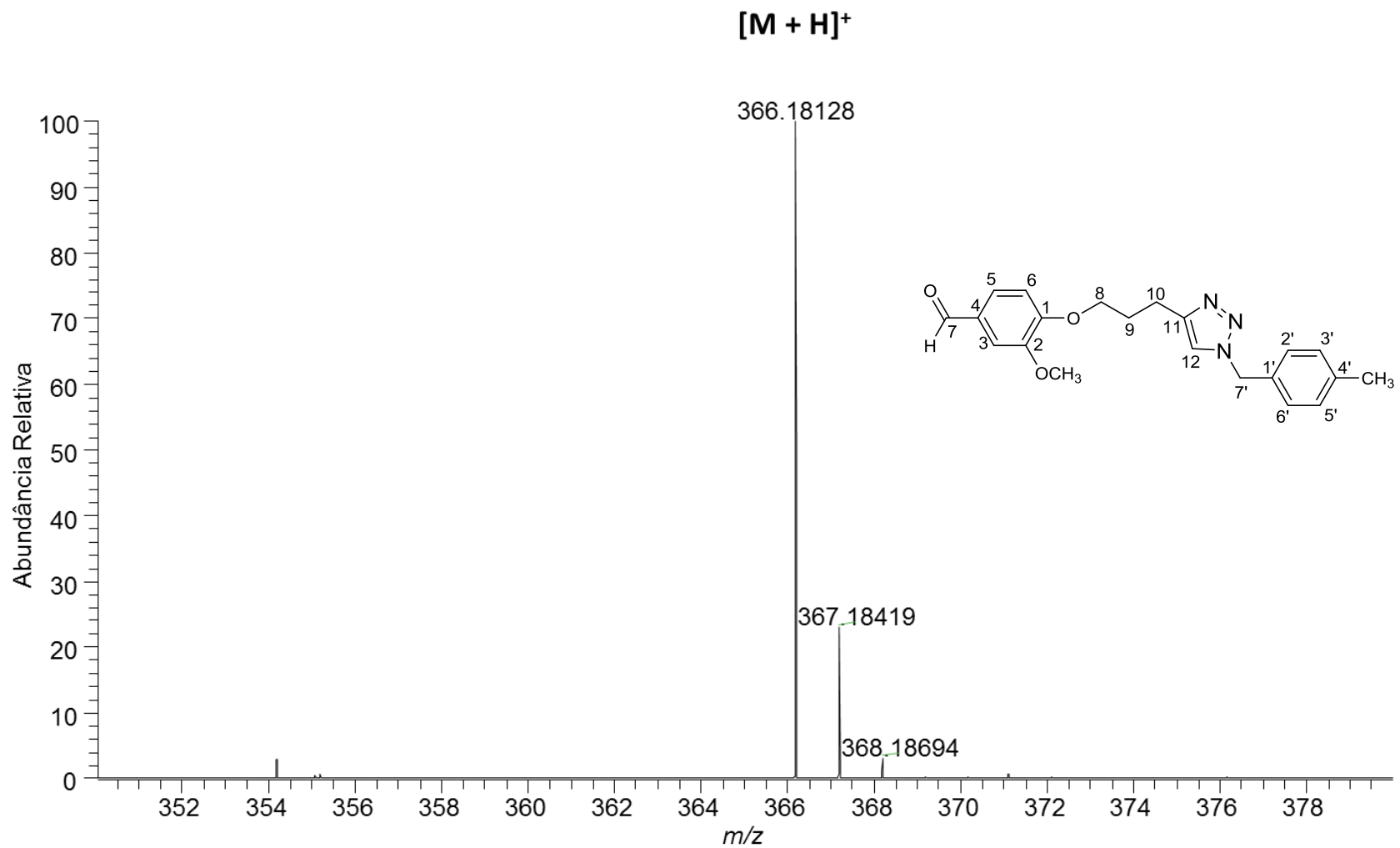


Figura A68. Espectro de massas de alta resolução do composto **7g**.

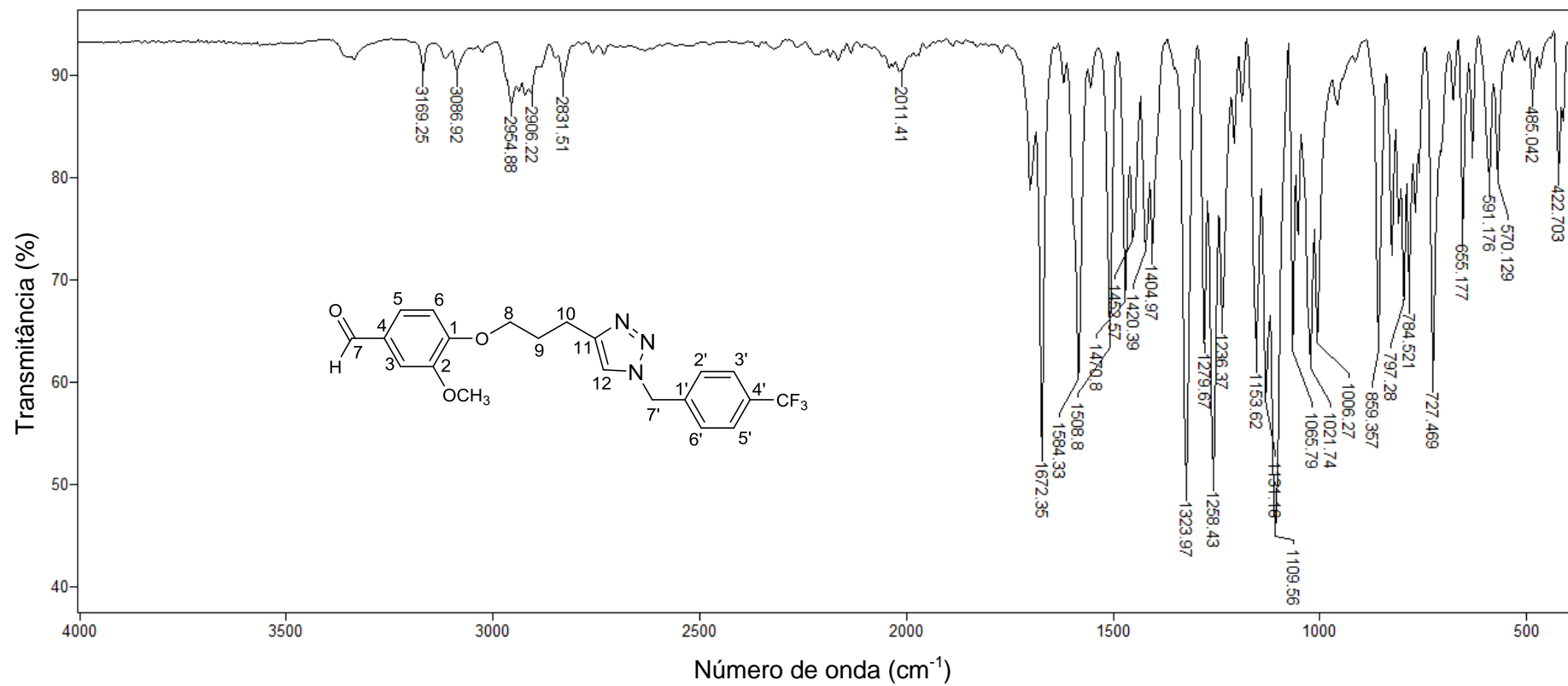


Figura A69. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7h**.

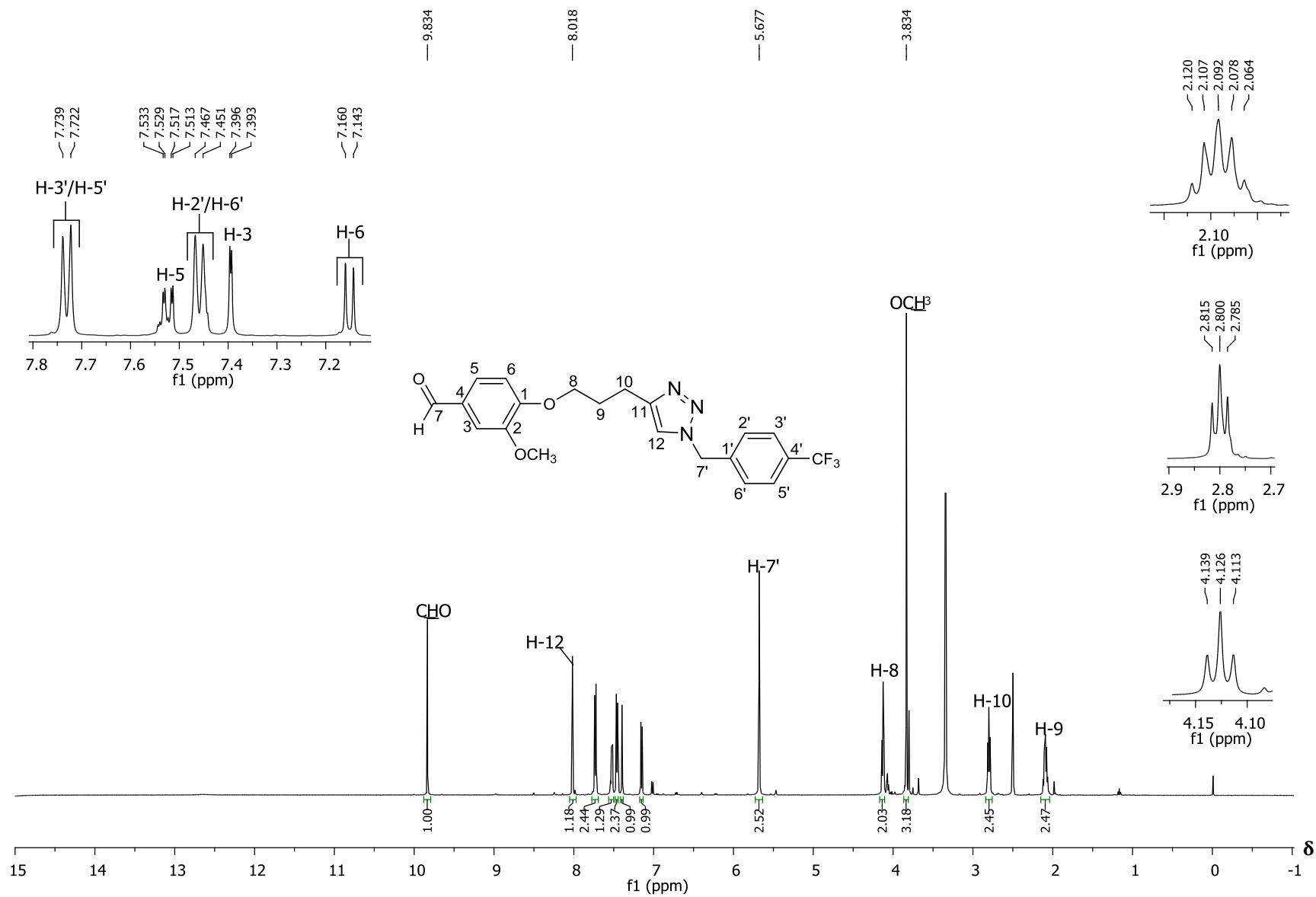


Figura A70. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **7h**.

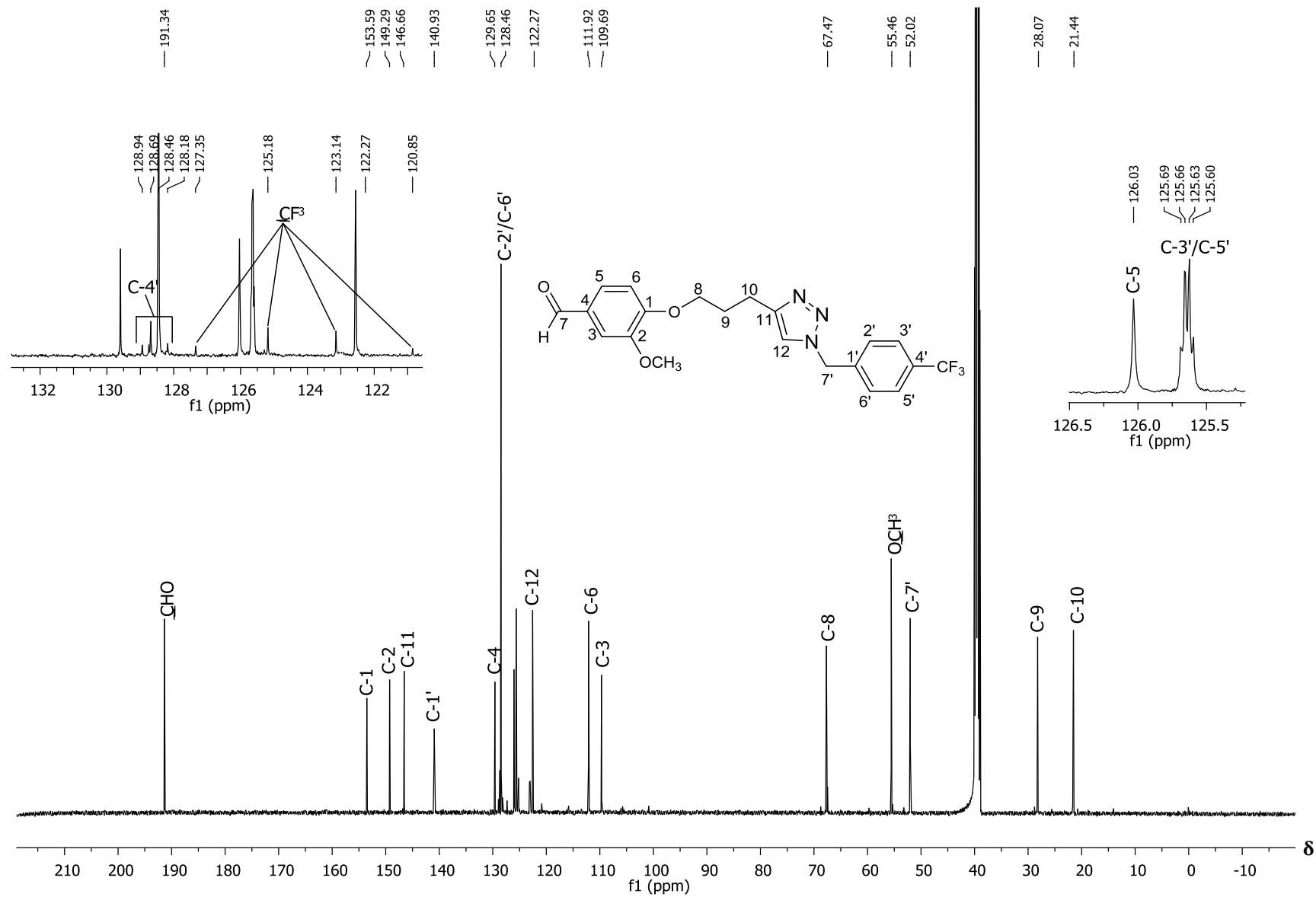


Figura A71. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) do composto **7h**.

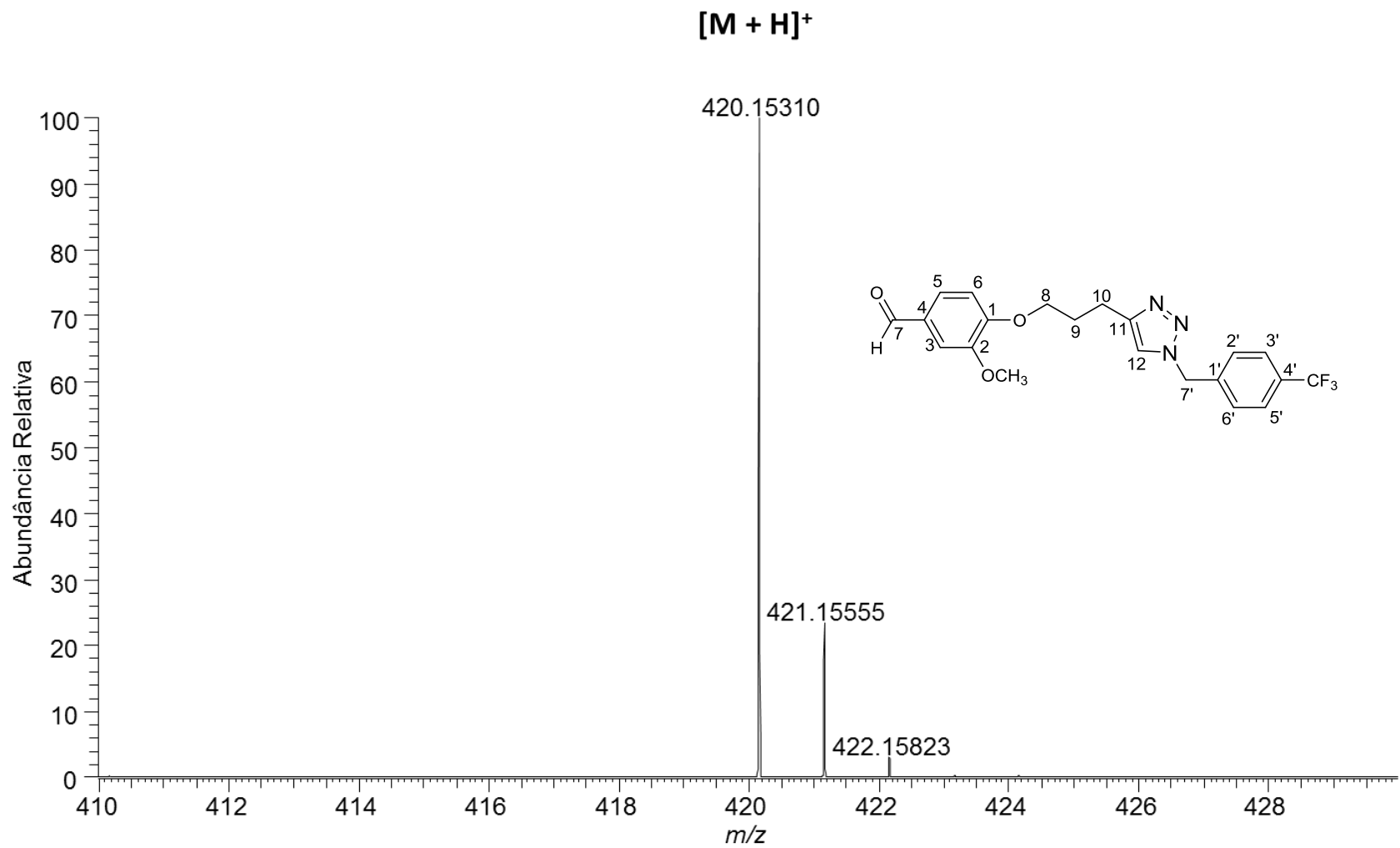


Figura A72. Espectro de massas de alta resolução do composto **7h**.

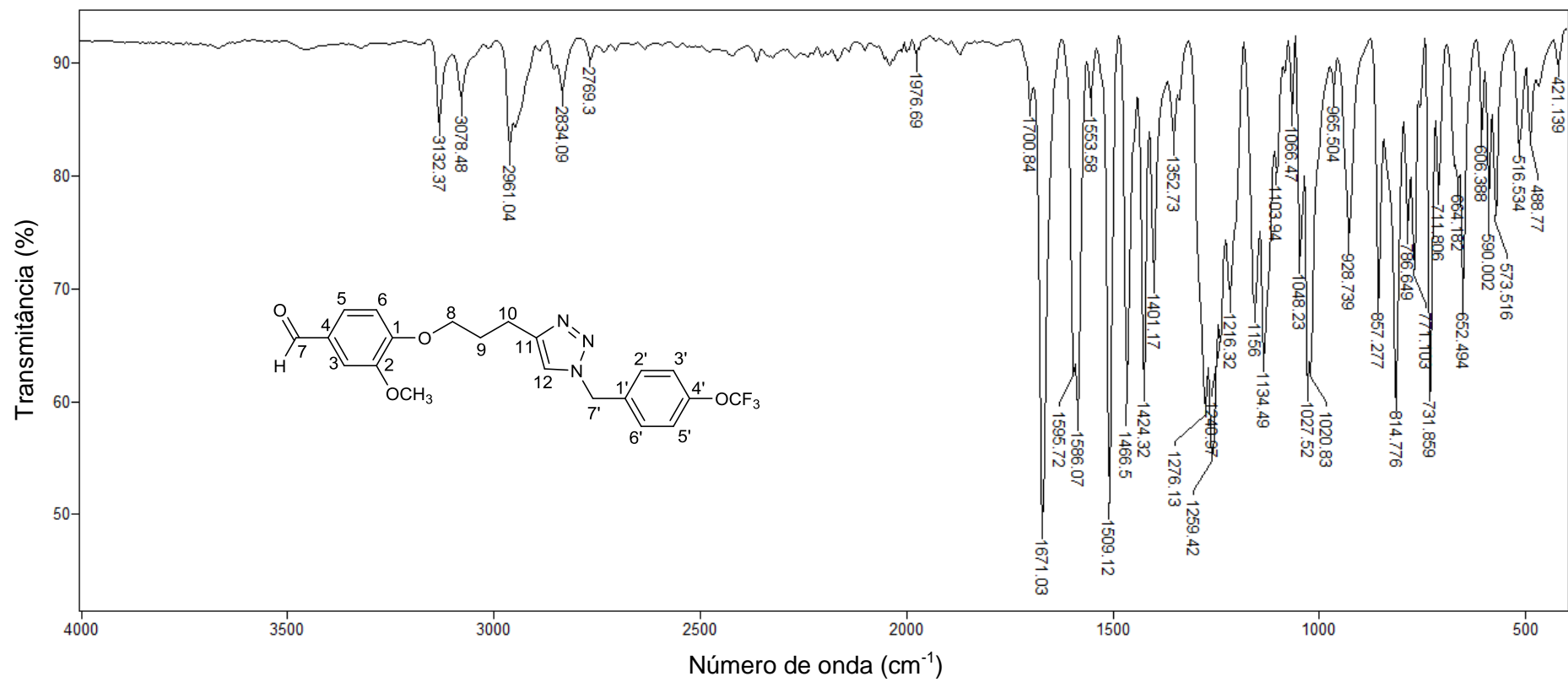


Figura A73. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7j**.

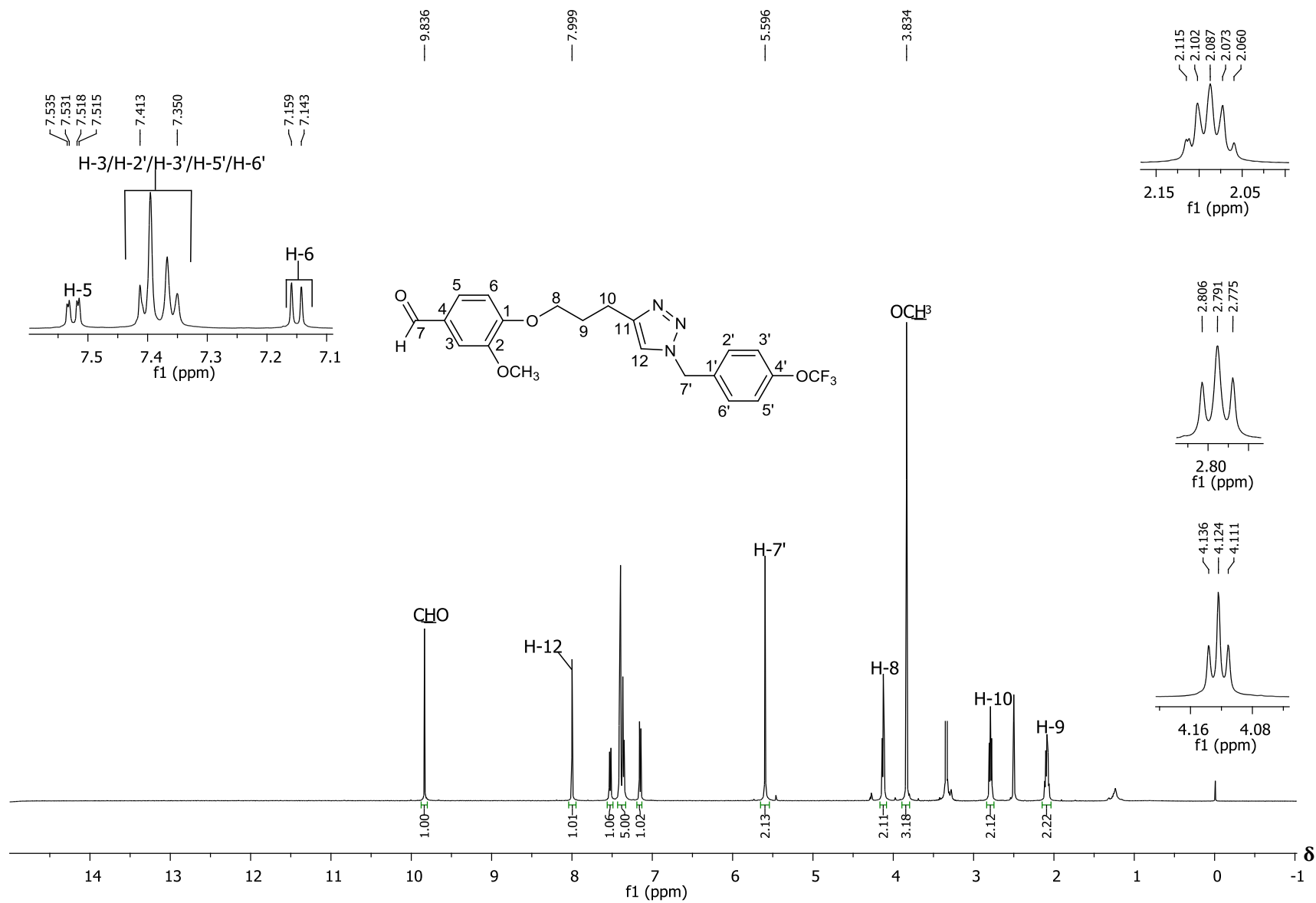


Figura A74. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **7j**.

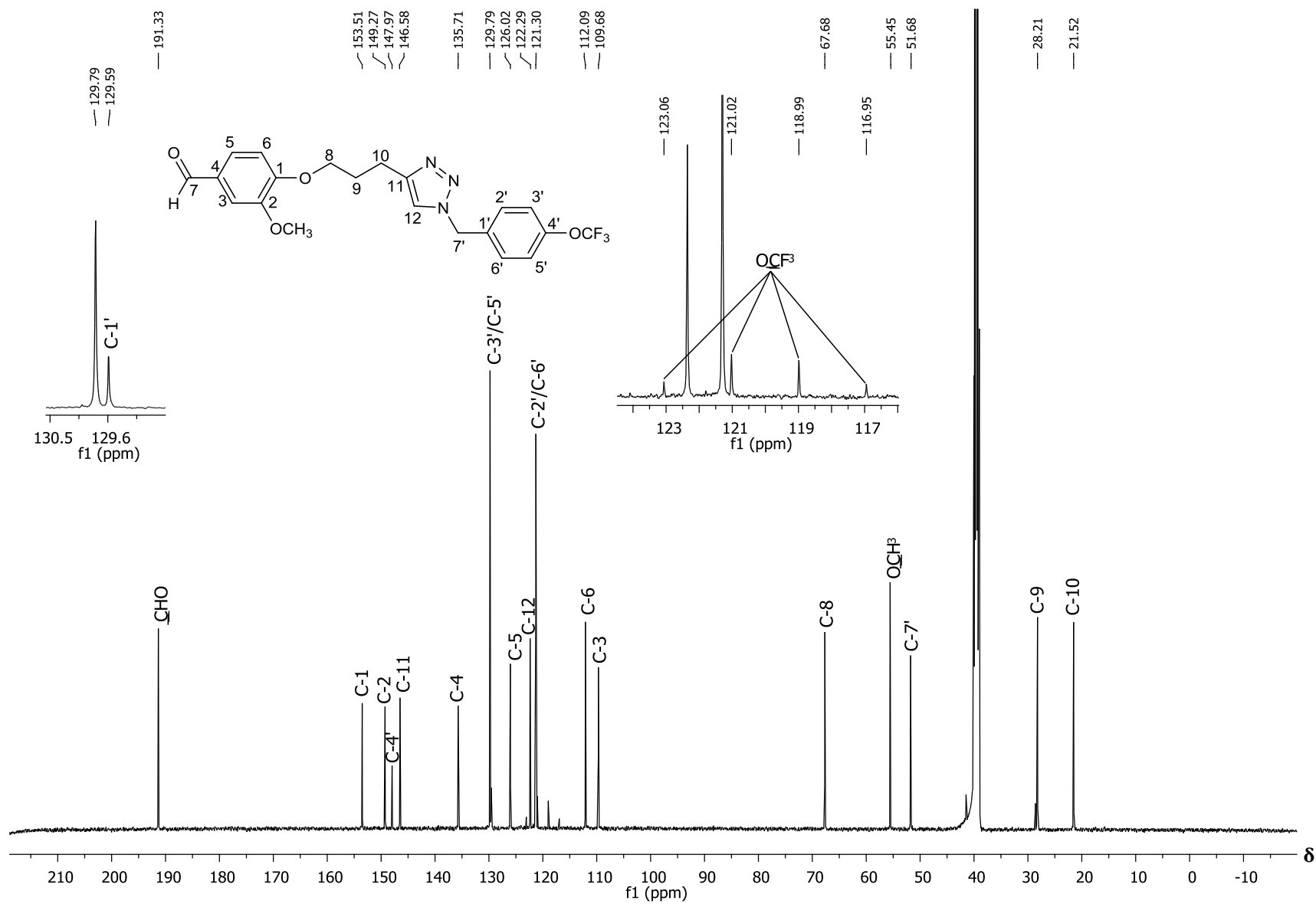


Figura A75. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **7j**.

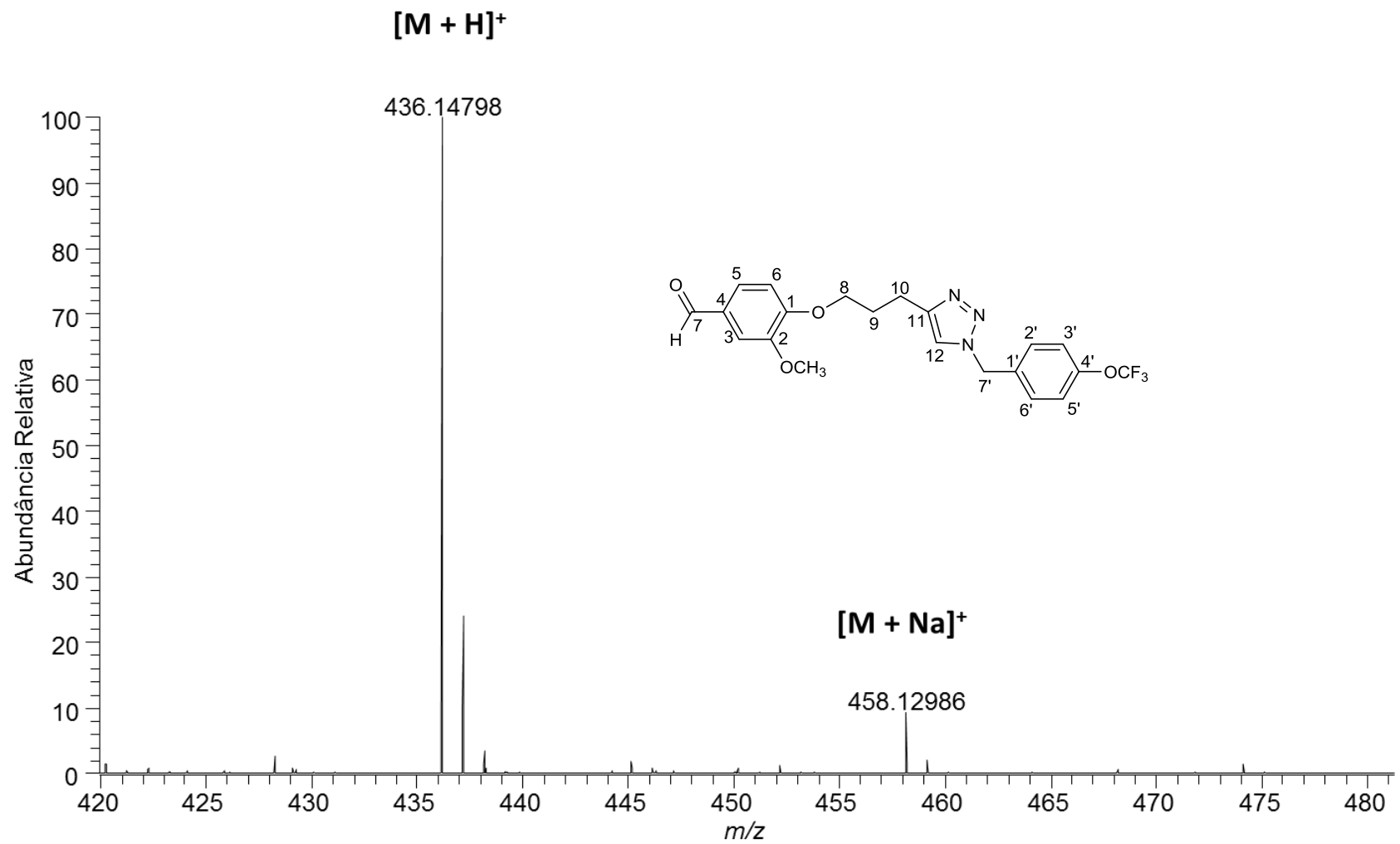


Figura A76. Espectro de massas de alta resolução do composto **7j**.

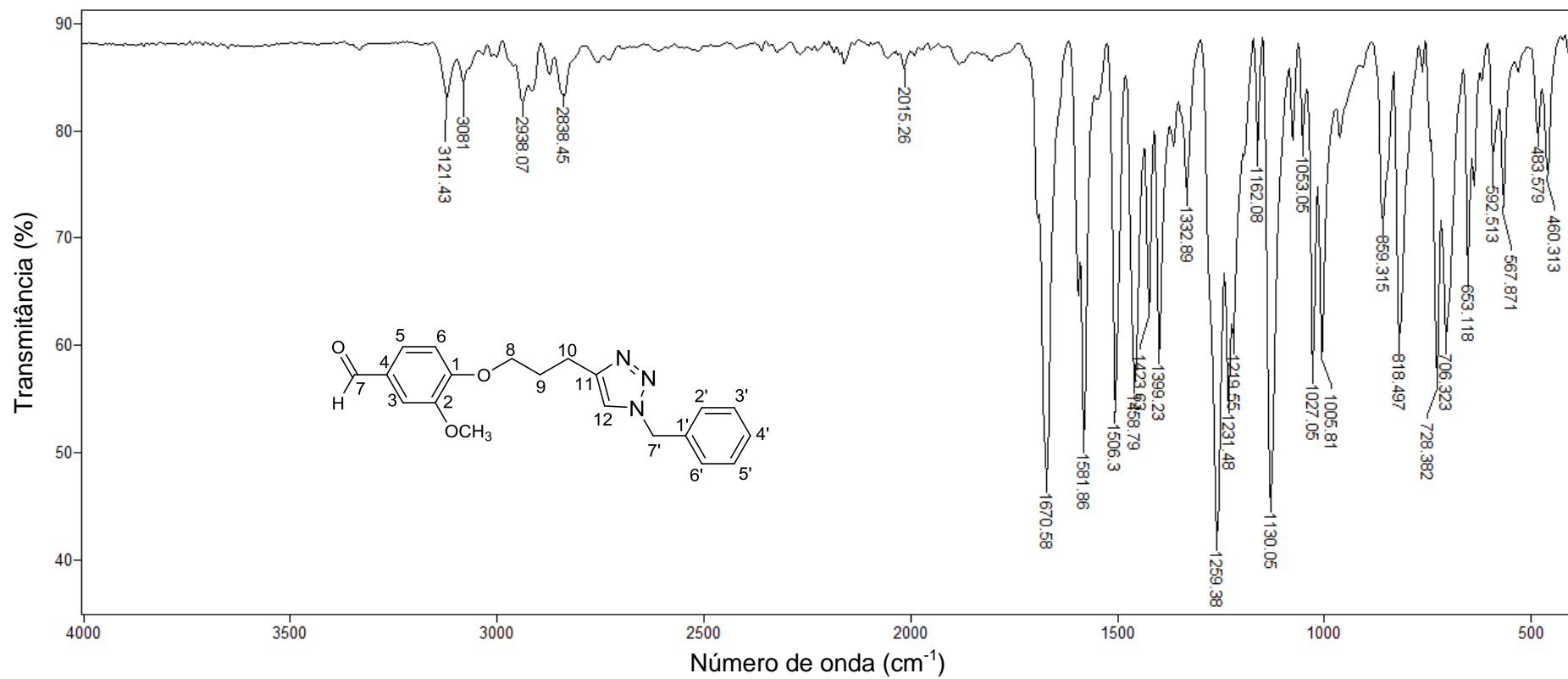


Figura A77. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **7k**.

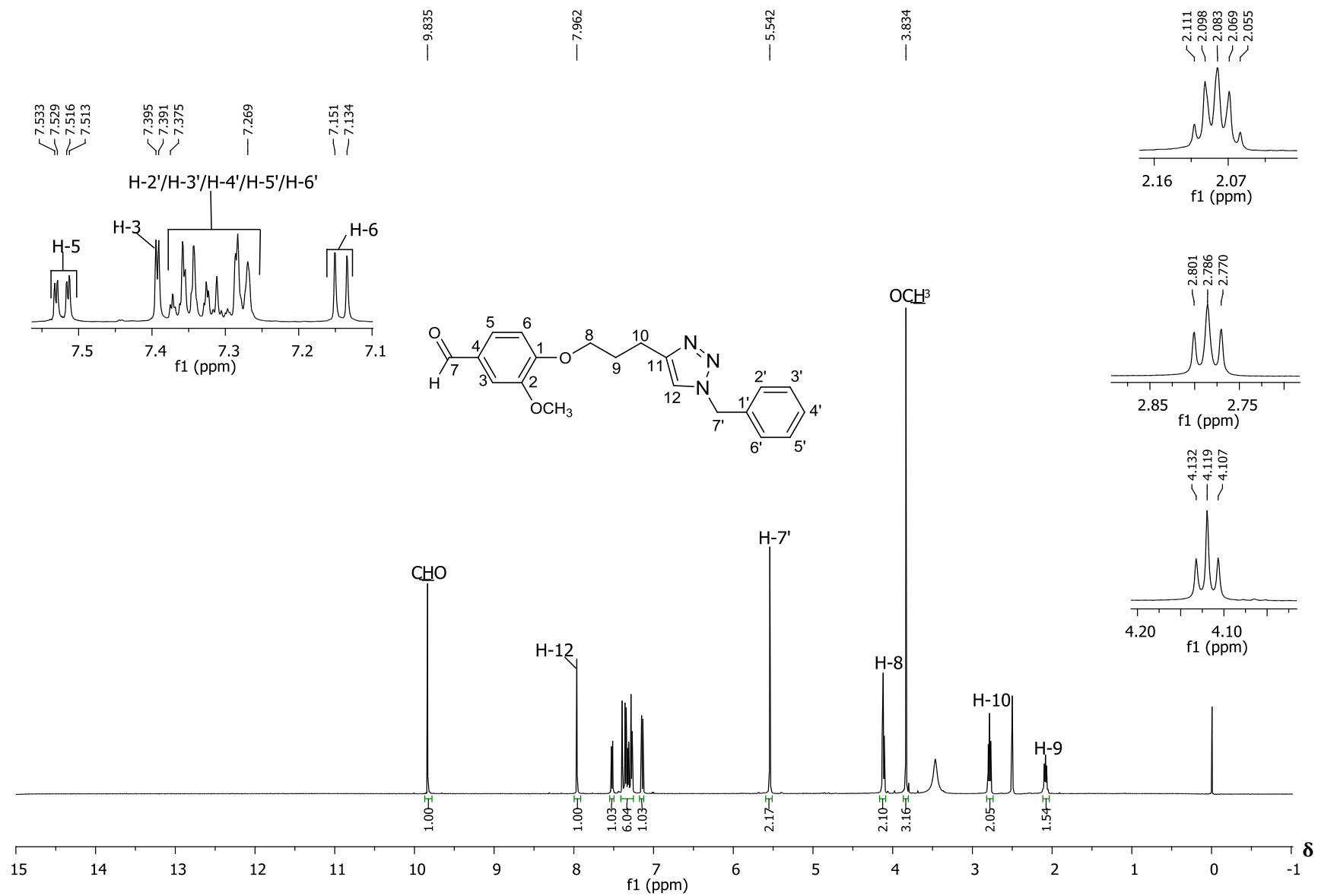


Figura A78. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **7k**.

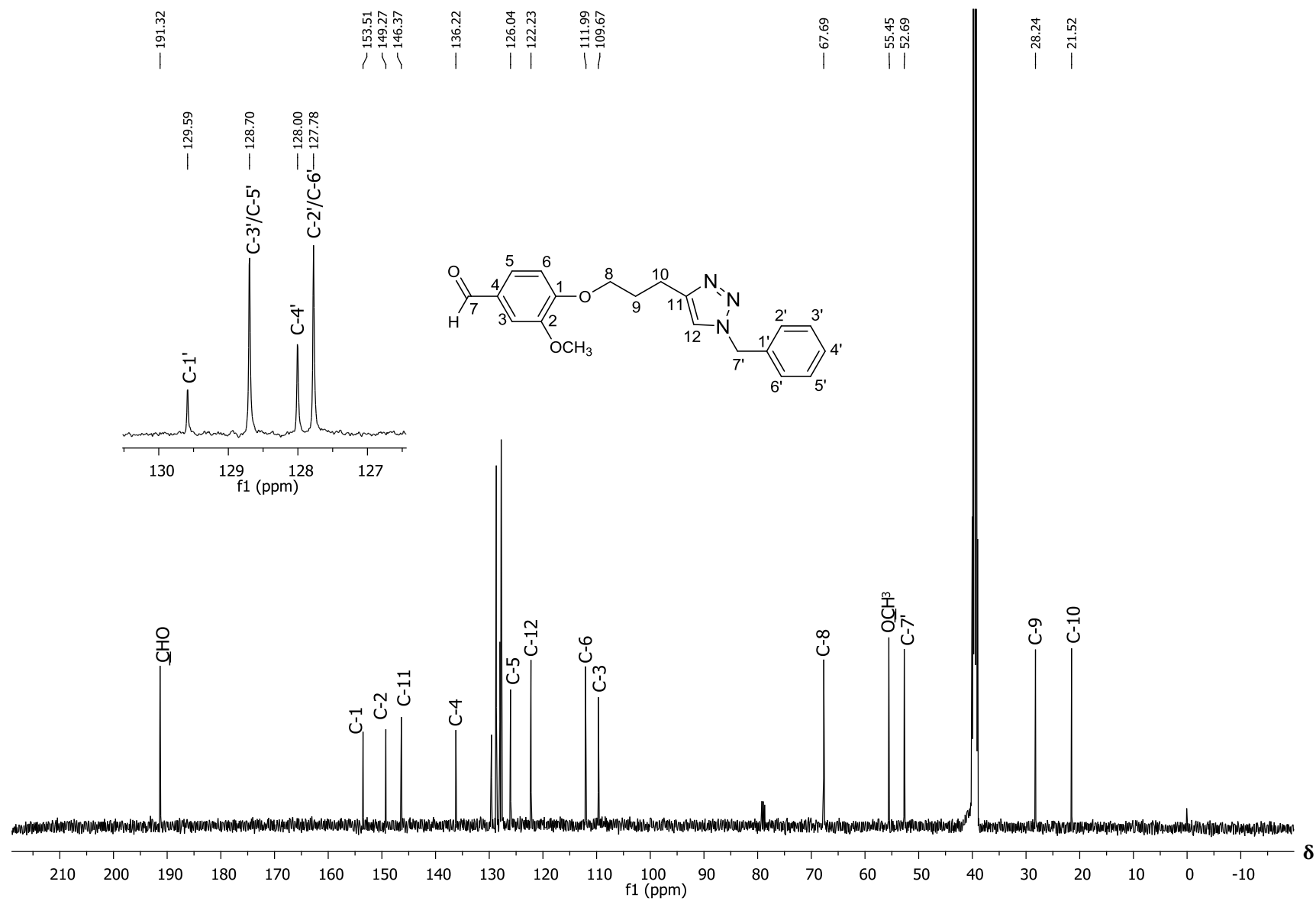


Figura A79. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **7k**.

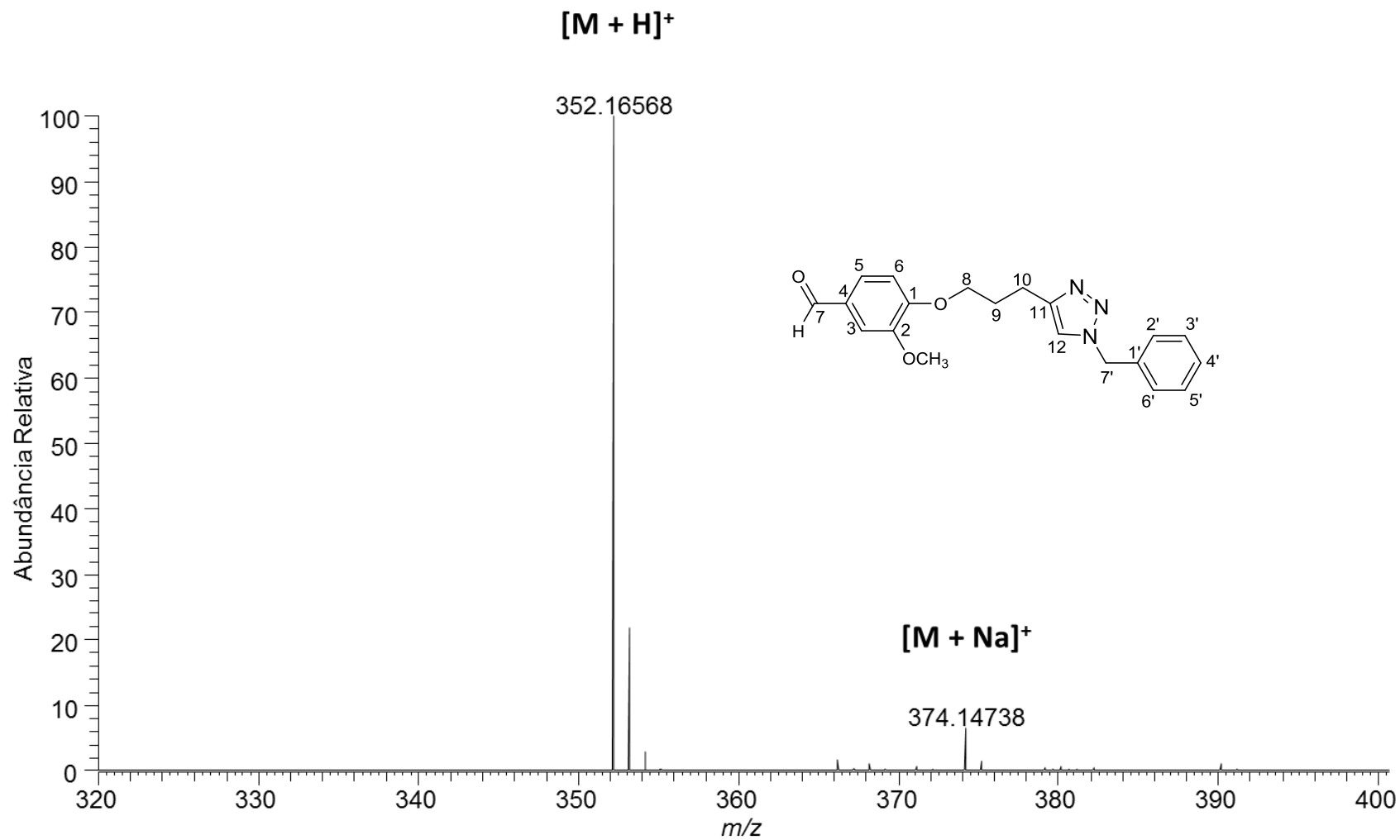


Figura A80. Espectro de massas de alta resolução do composto **7k**.

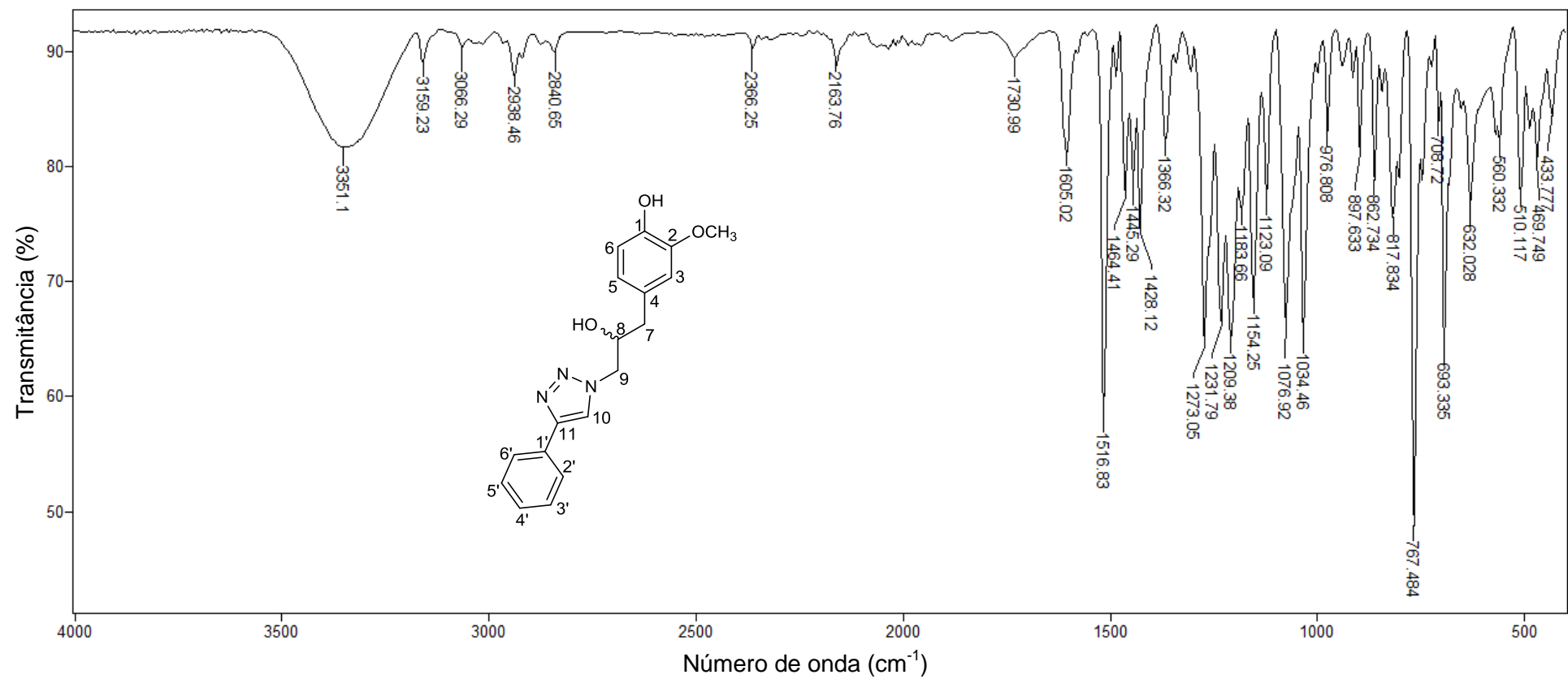


Figura A81. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10a**.

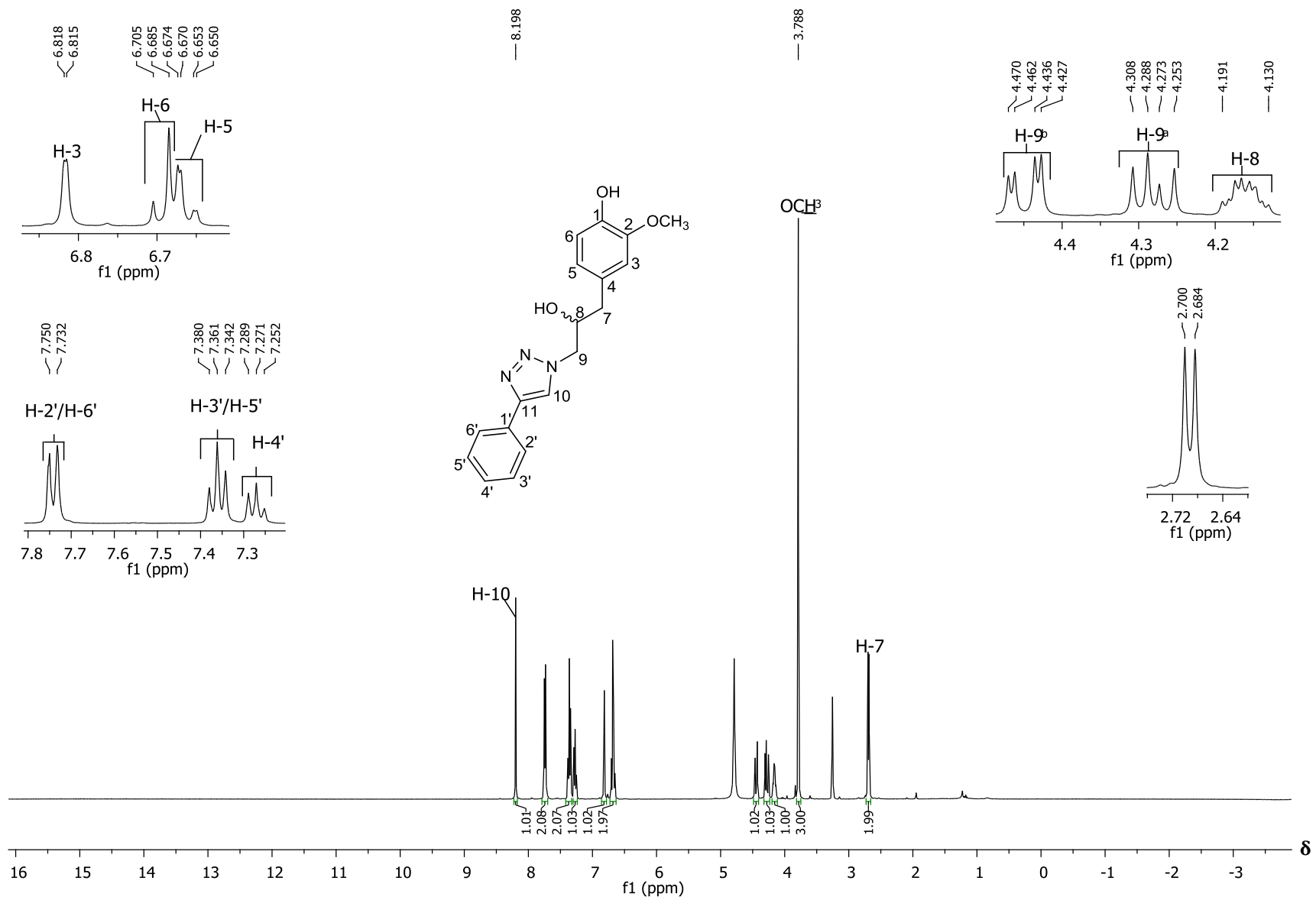


Figura A82. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) do composto **10a**.

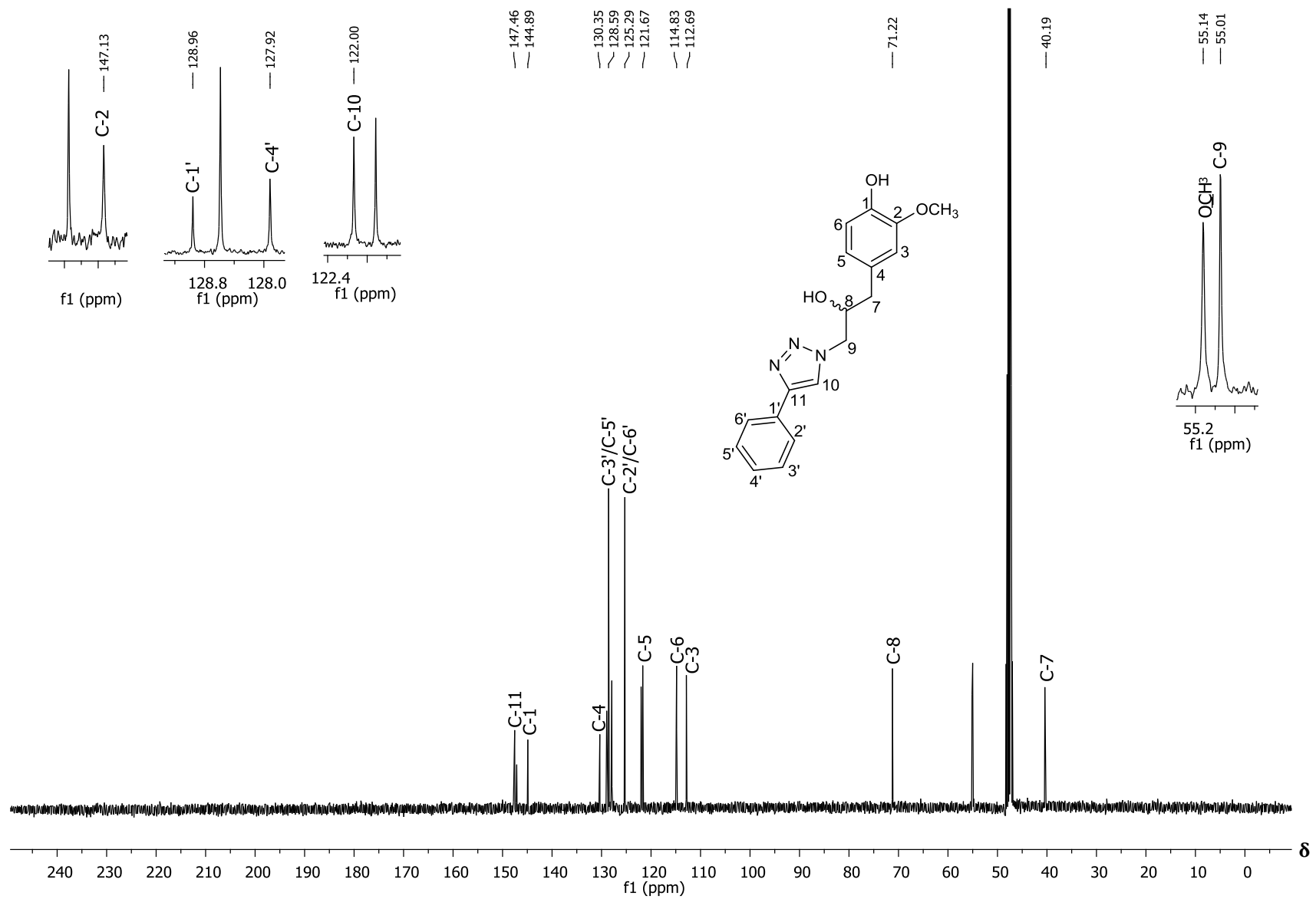


Figura A83. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) do composto **10a**.

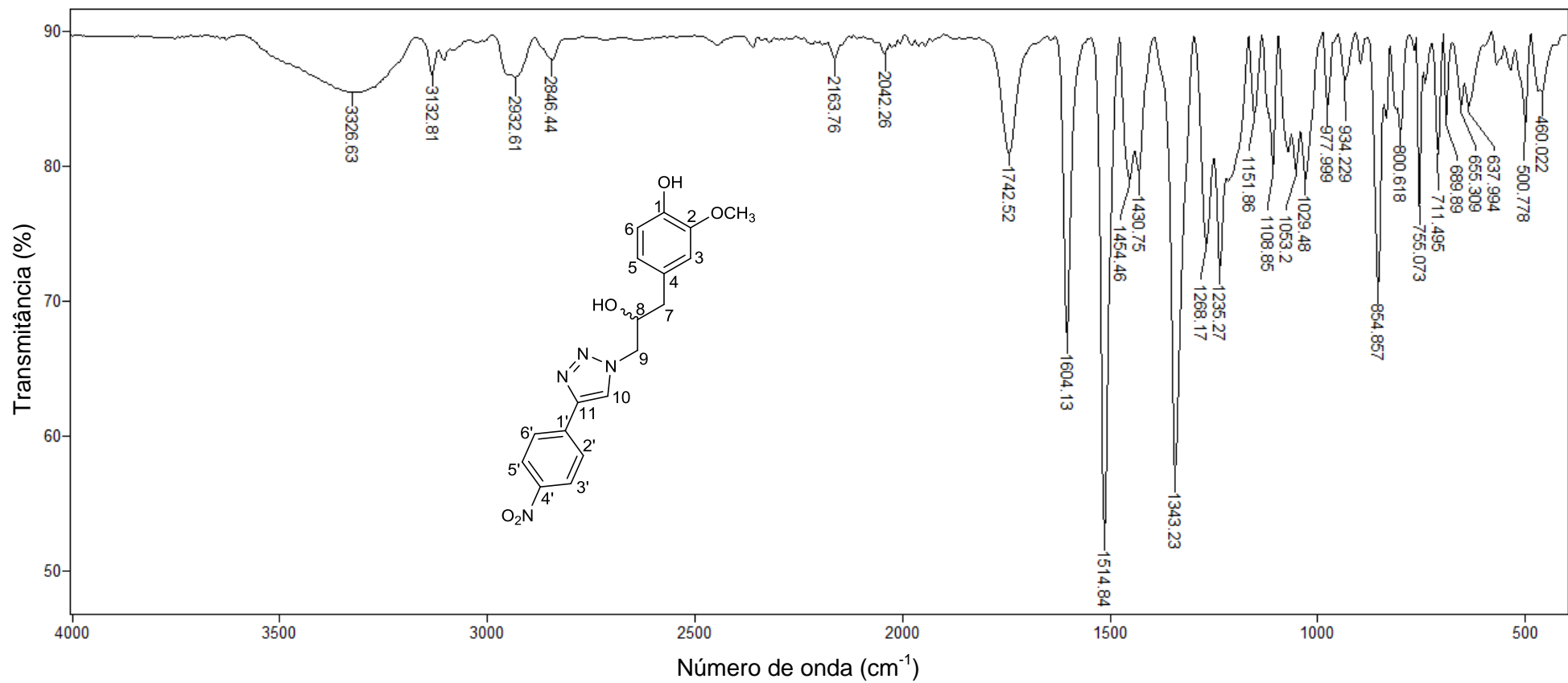


Figura A84. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10b**.

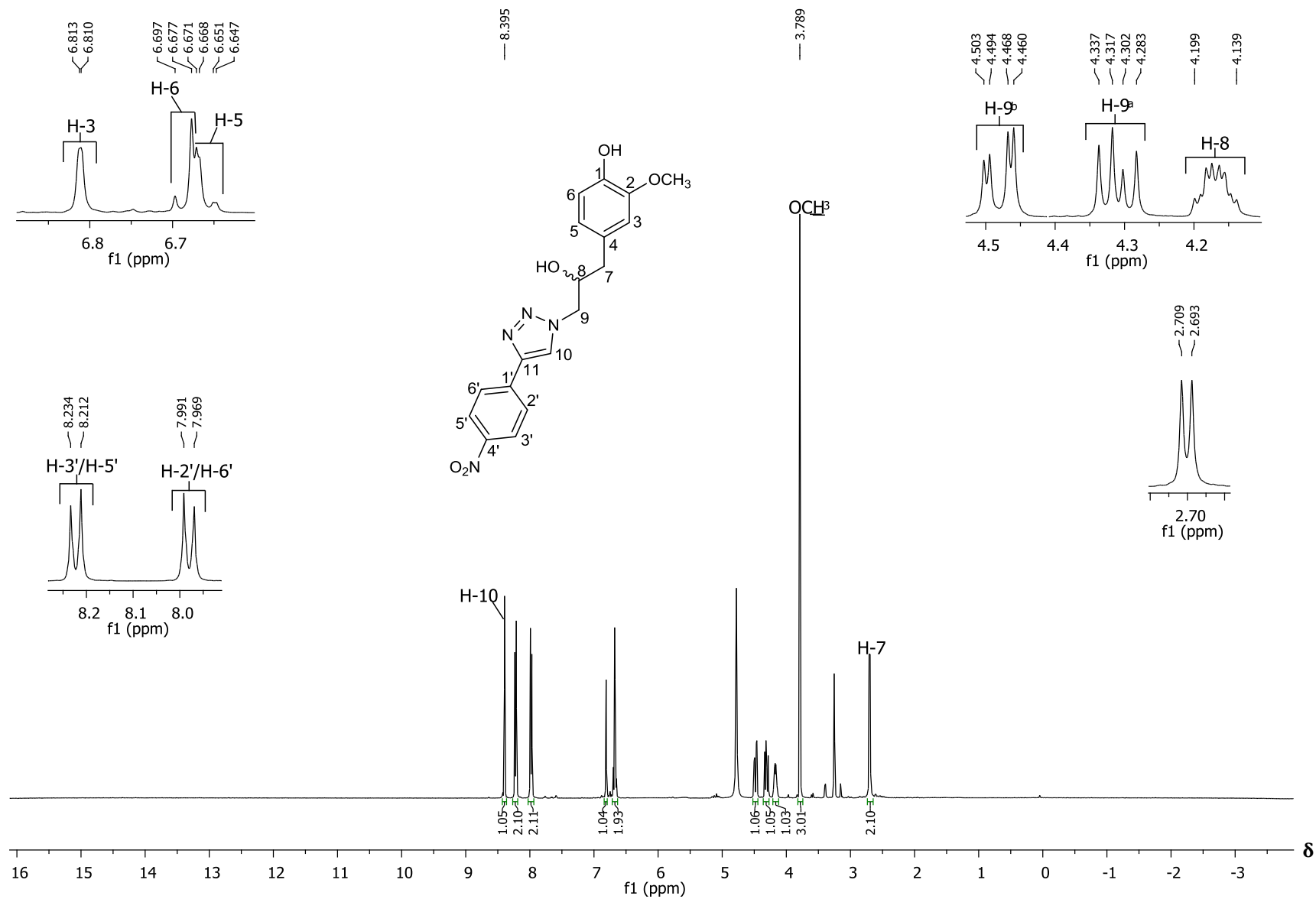


Figura A85. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) do composto **10b**.

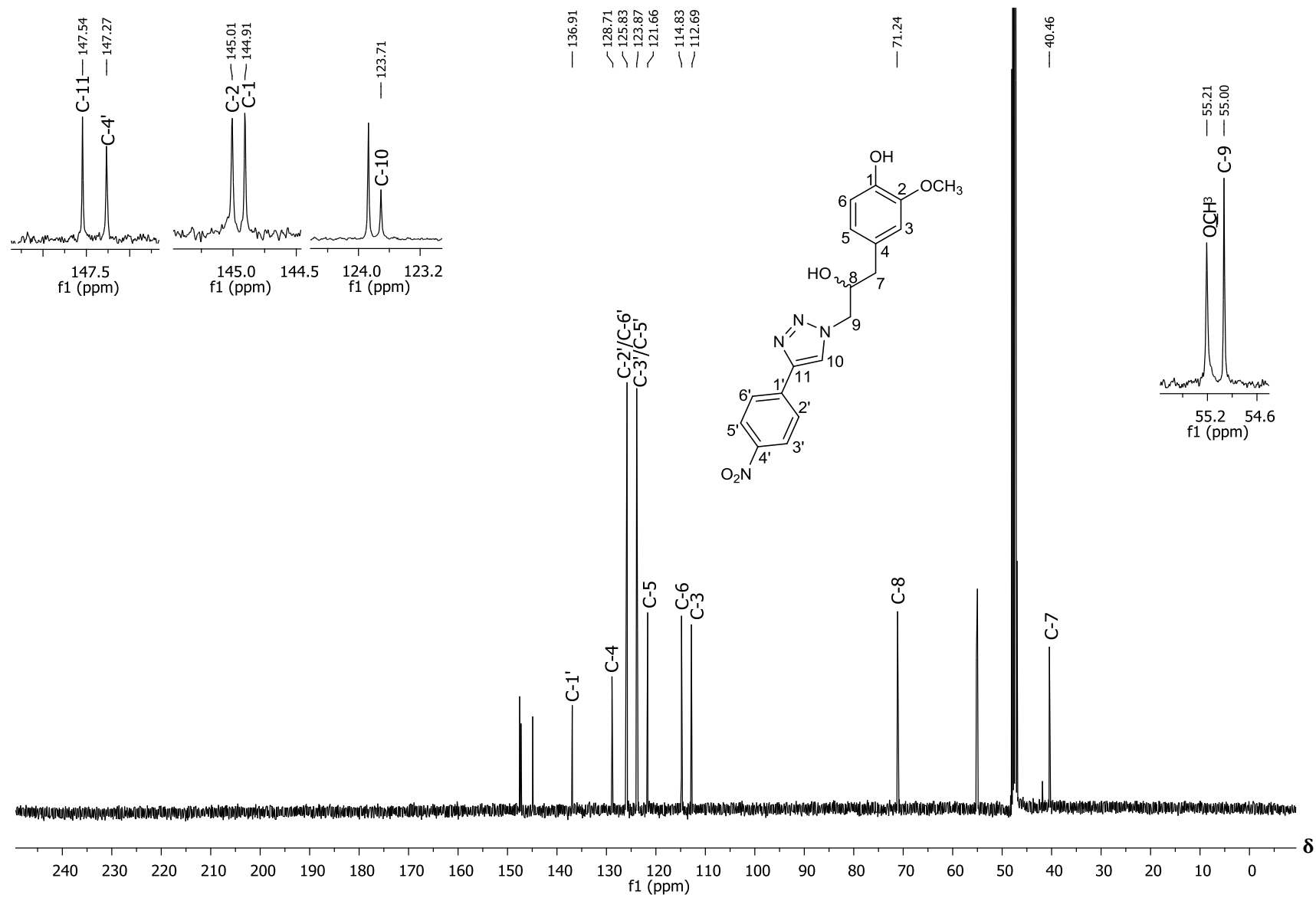


Figura A86. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) do composto **10b**.

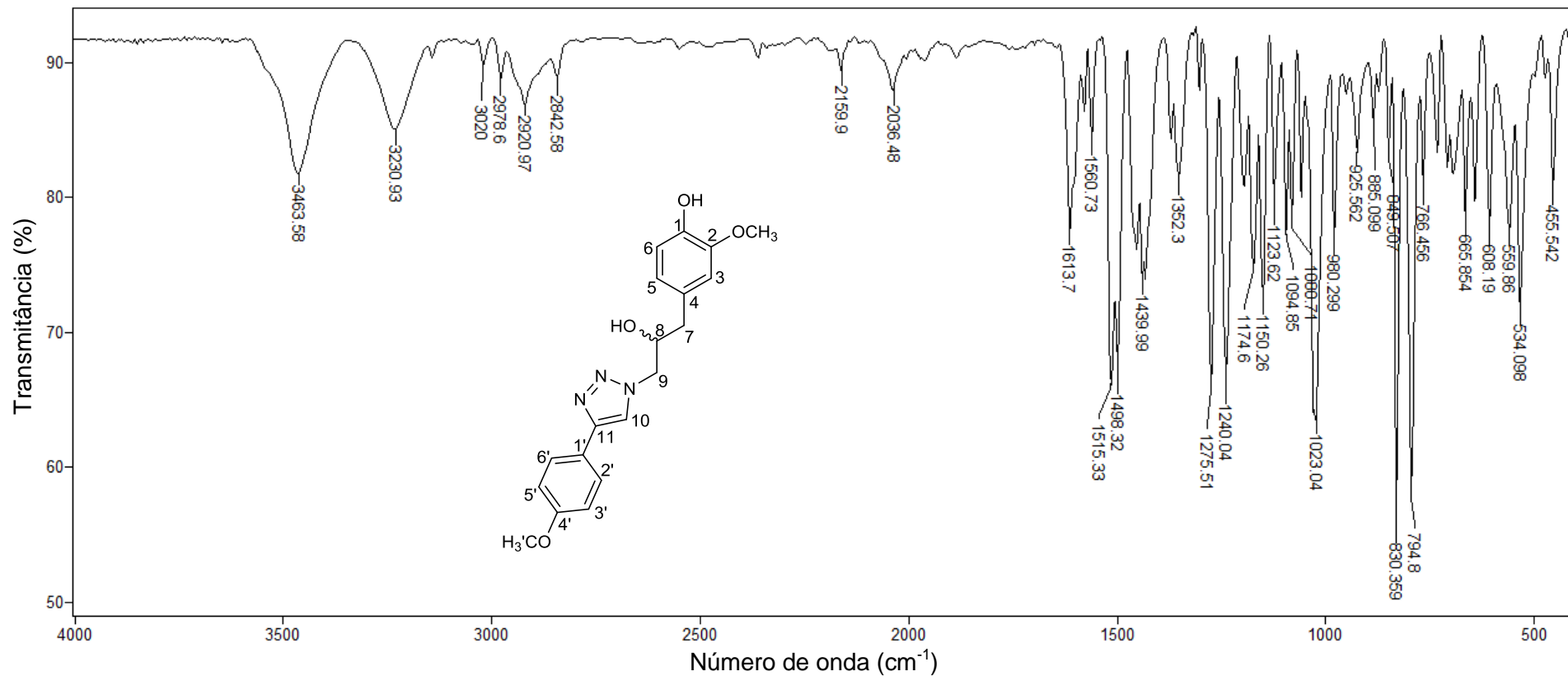


Figura A87. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10c**.

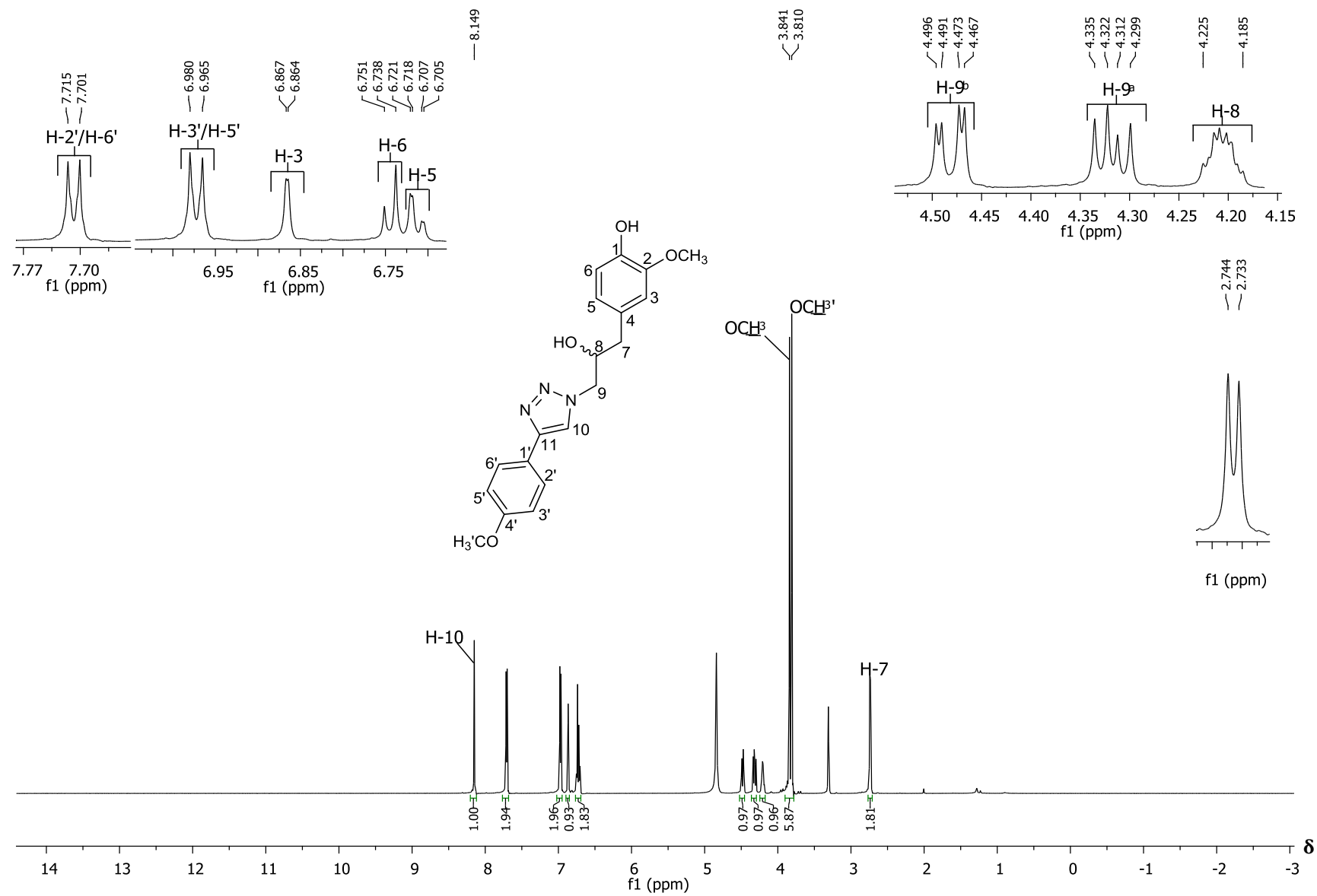


Figura A88. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD) do composto **10c**.

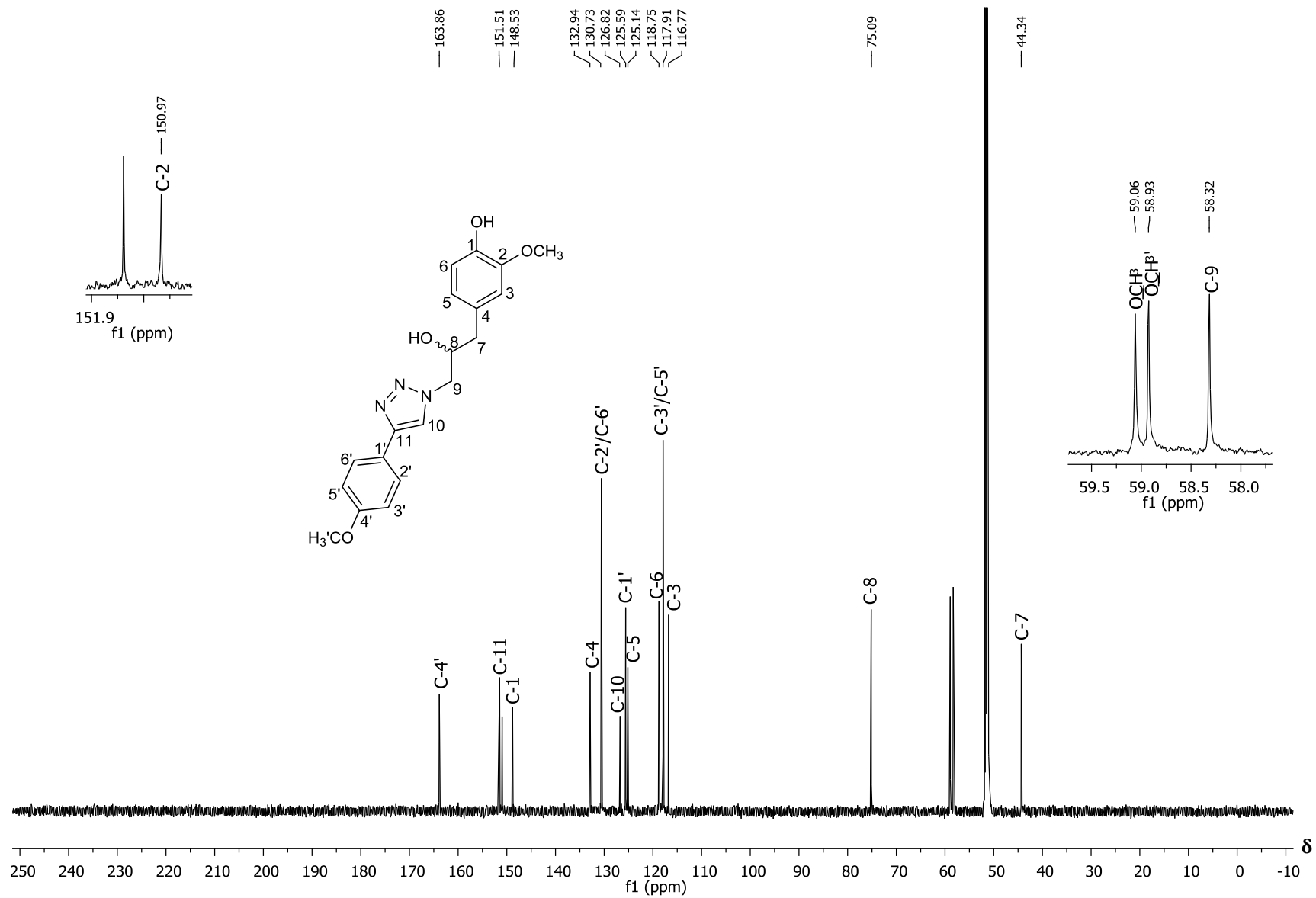


Figura A89. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) do composto **10c**.

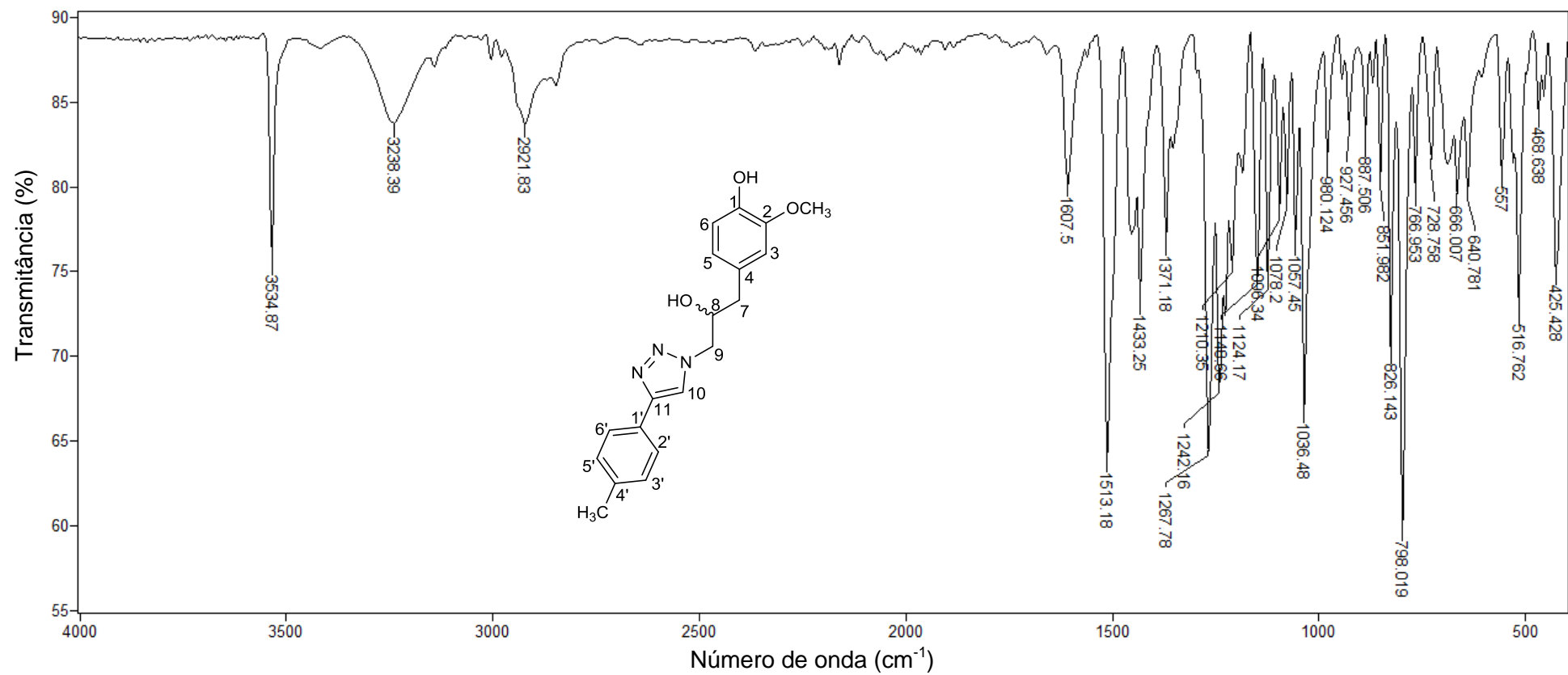


Figura A90. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10d**.

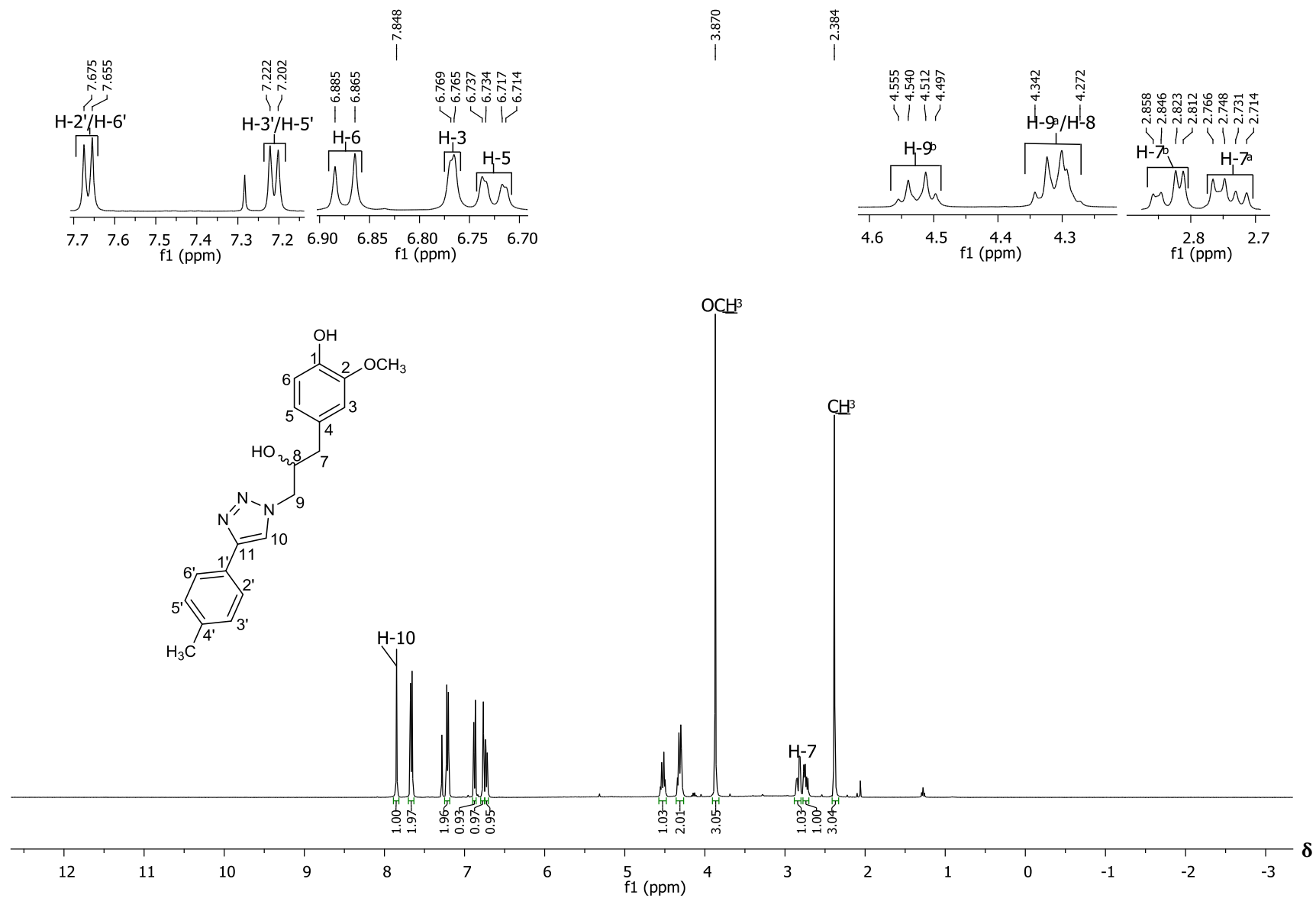


Figura A91. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **10d**.

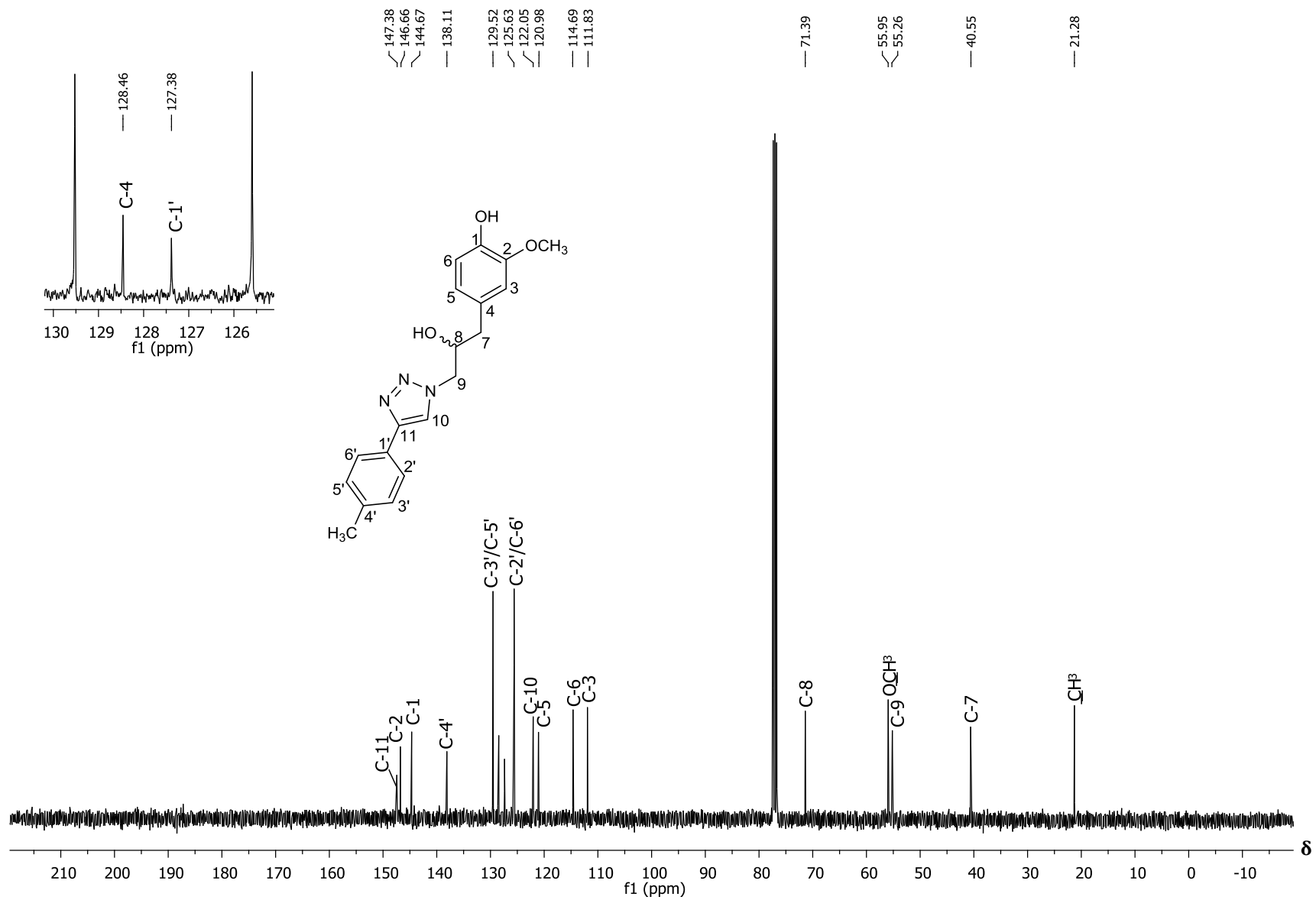


Figura A92. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **10d**.

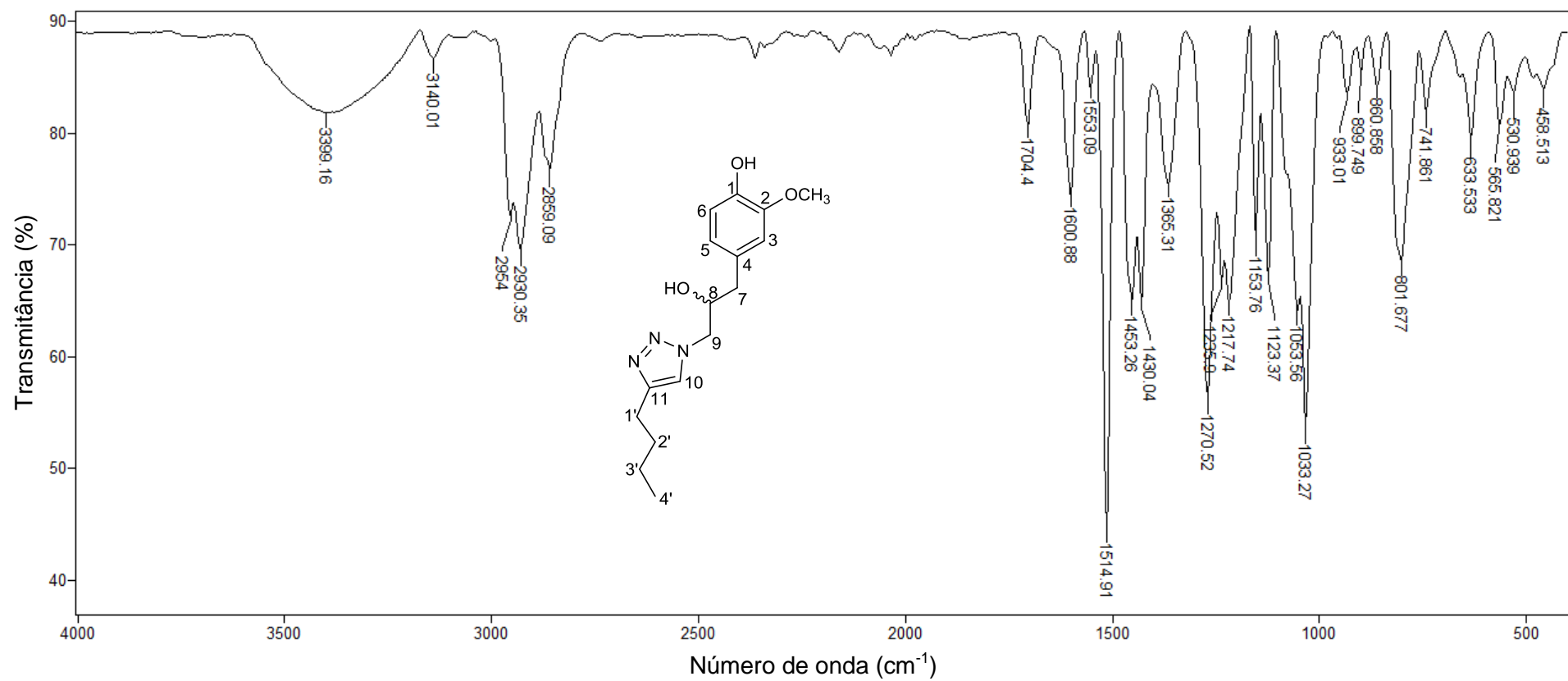


Figura A93. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10e**.

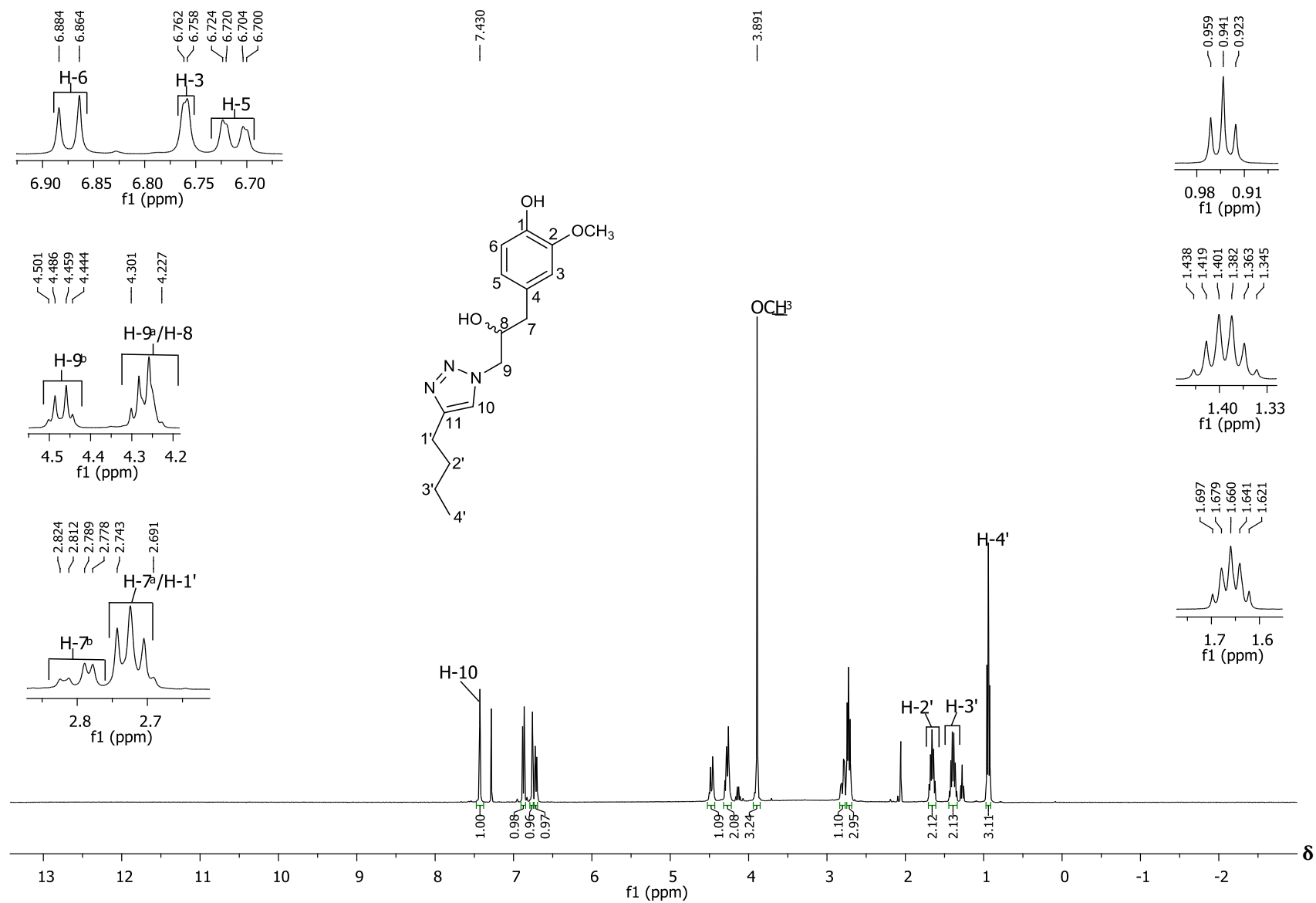


Figura A94. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **10e**.

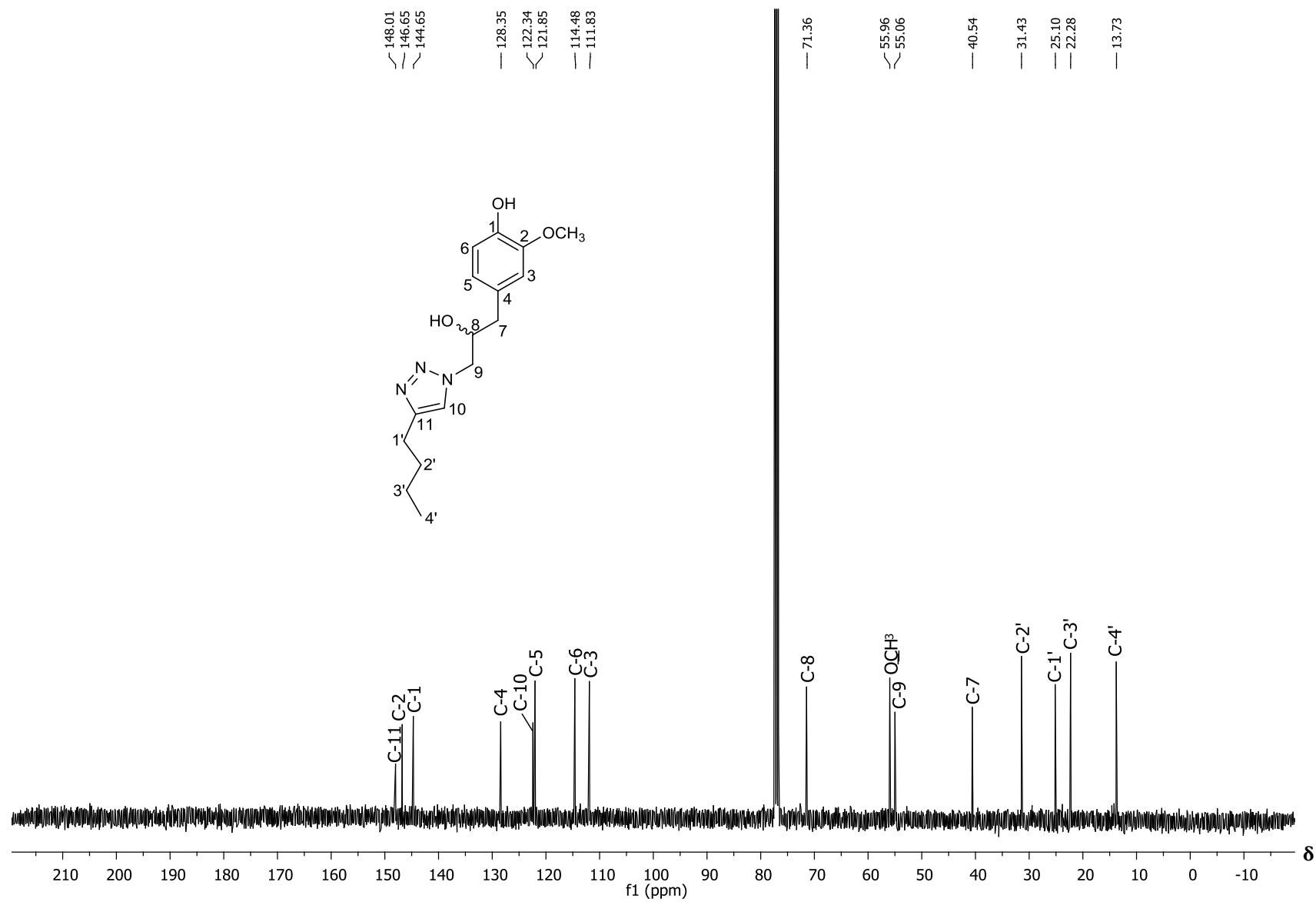


Figura A95. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **10e**.

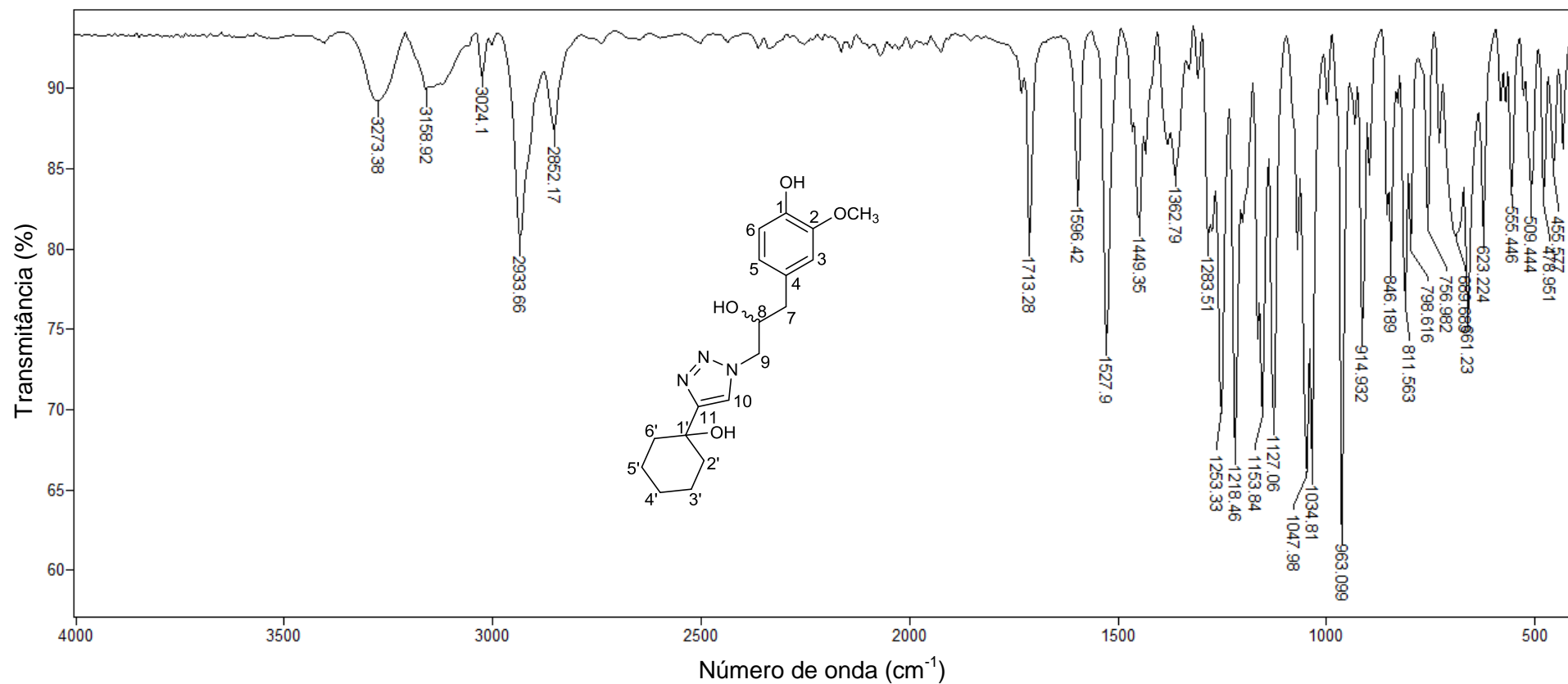


Figura A96. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10f**.

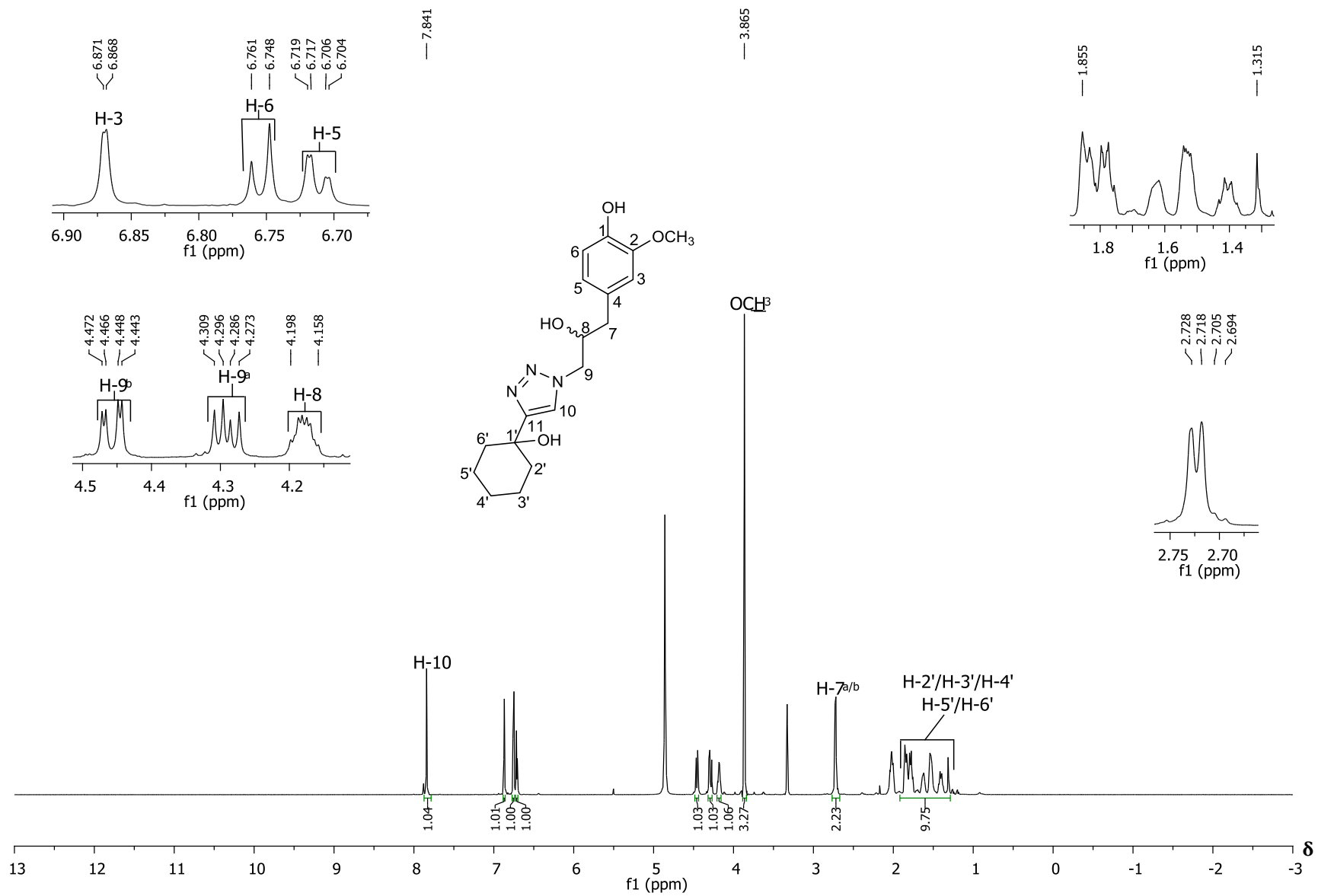


Figura A97. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto **10f**.

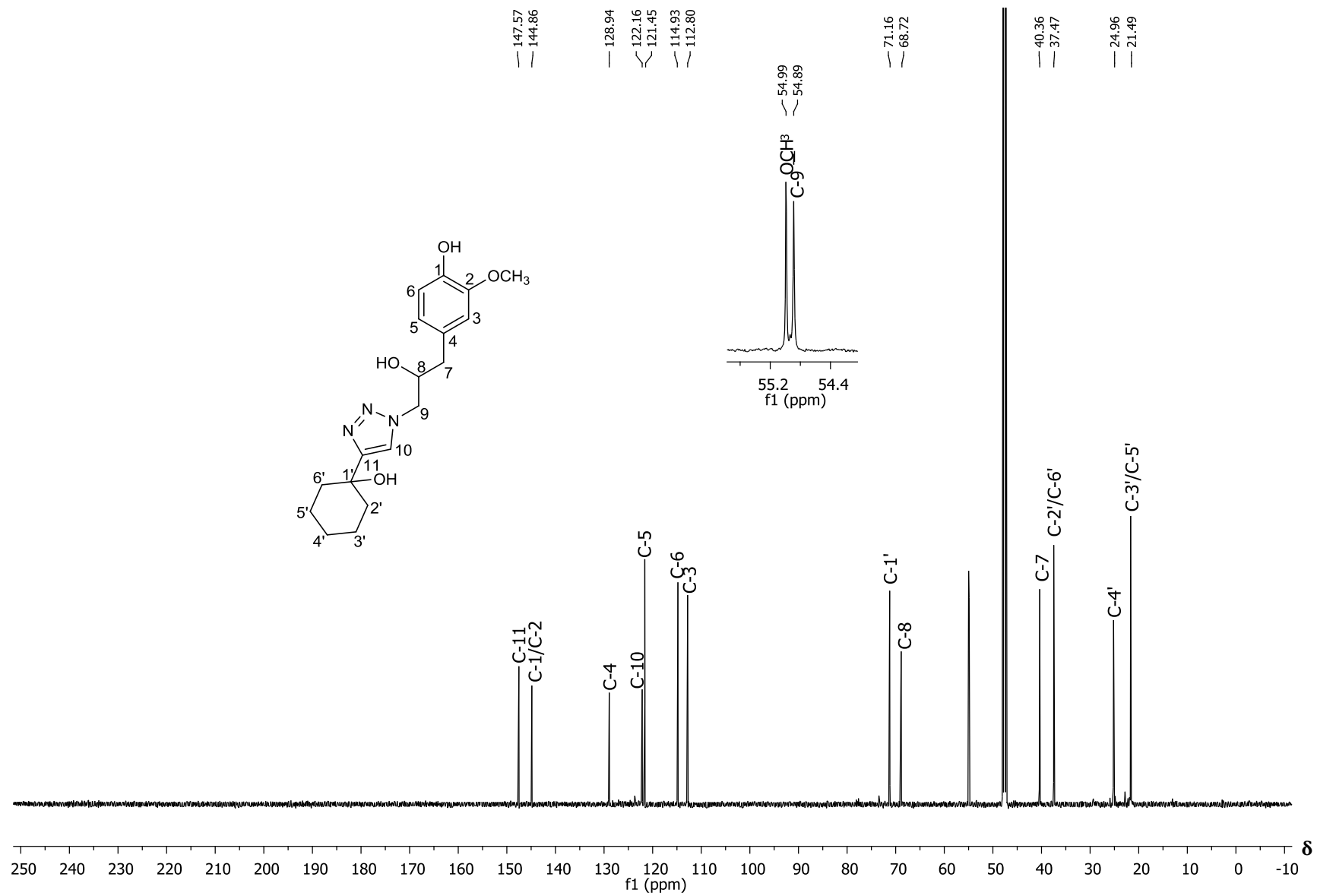


Figura A98. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) do composto **10f**.

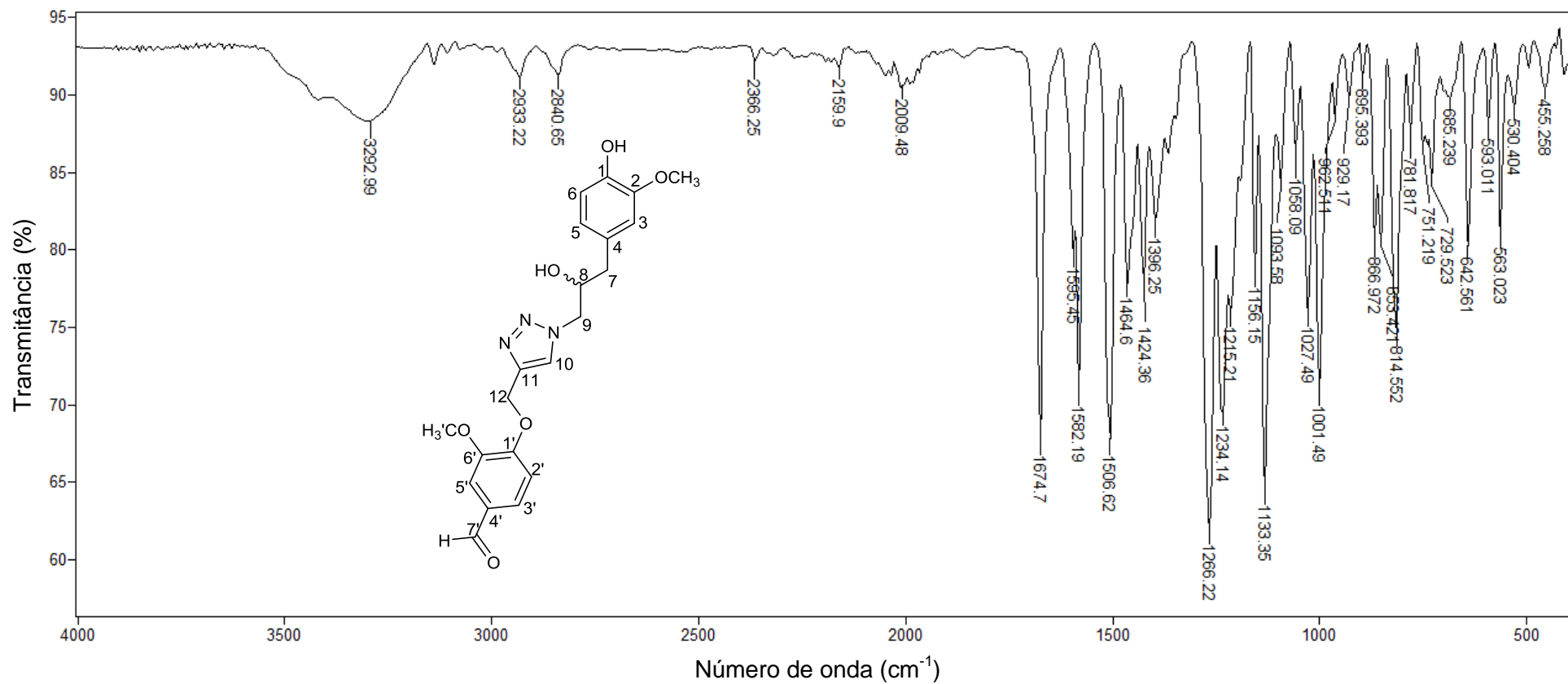


Figura A99. Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10h**.

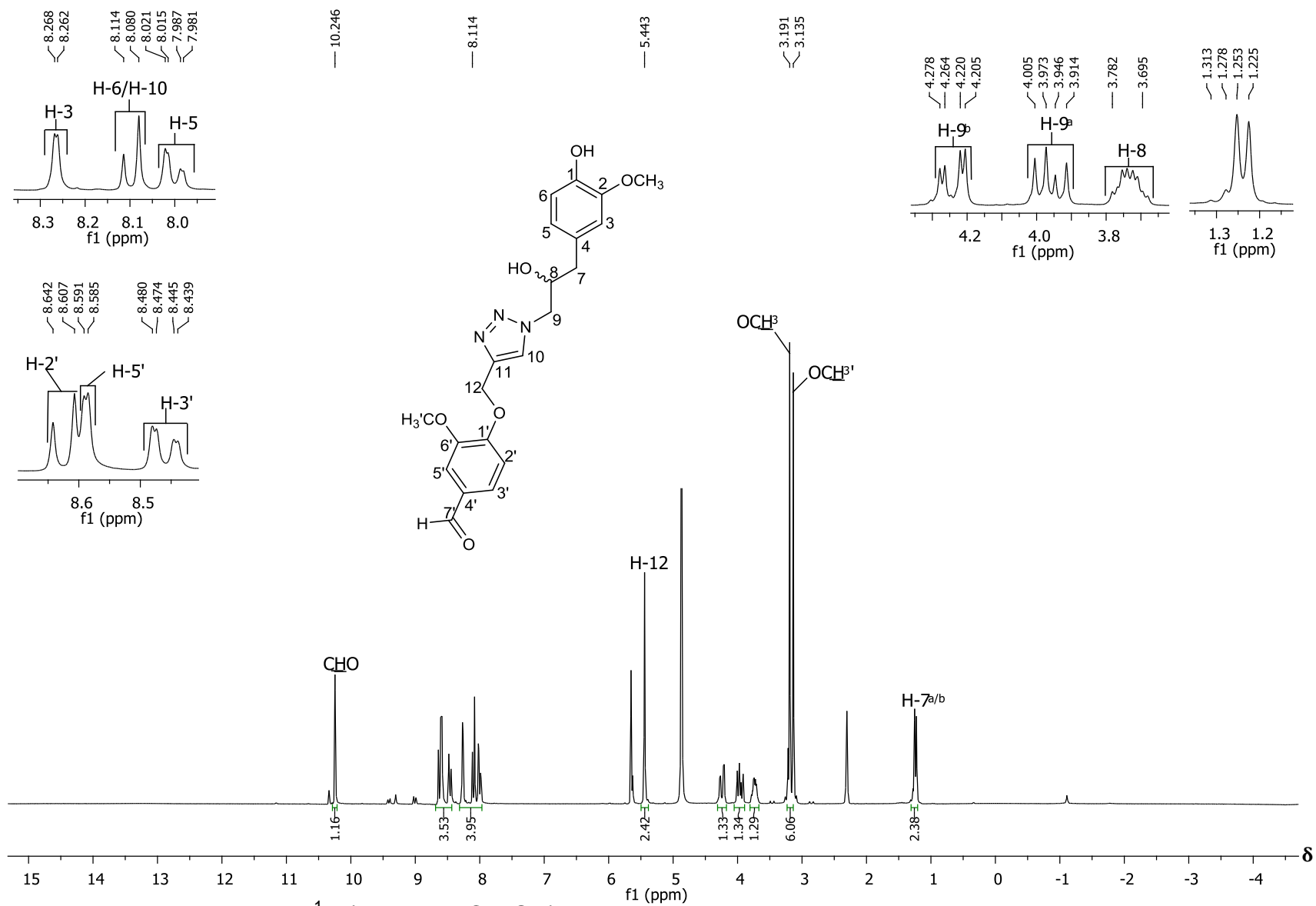


Figura A100. Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CD₃OD) do composto **10h**.

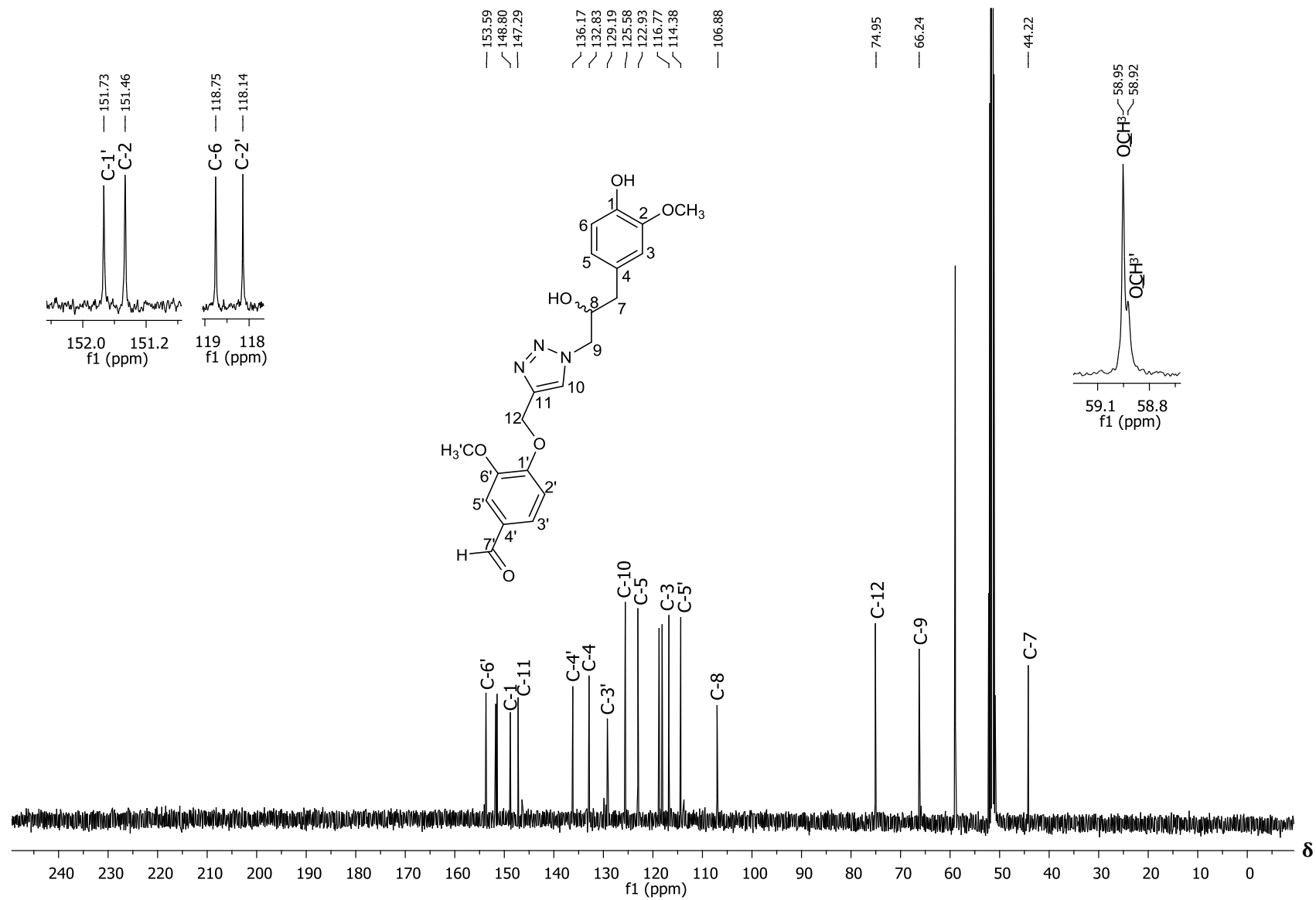


Figura A101. Espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CD₃OD) do composto **10h**.

ANEXO II
PUBLICAÇÕES

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE DERIVADOS DO EUGENOL CONTENDO NÚCLEOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS

Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla^a, Róbson Ricardo Teixeira^{a*}, Adalberto Manoel da Silva^b, Boniek Gontijo Vaz^c, Géssica Adriana Vasconcelos^c, Raoni Pais Siqueira^d, Victor Hugo Sousa Gonçalves^d, Higor Sette Pereira^d e Gustavo Costa Bressan^d

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa – MG, Brasil

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense, 89245-000 Araquari – SC, Brasil

^cInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Av. Esperança, S/N, Campus Samambaia, 74690-970, Goiânia – GO, Brasil

^dDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa – MG, Brasil

Recebido em 21/09/2017; aceito em 29/01/2018; publicado na web em 22/02/2018

SYNTHESIS AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF 1,2,3-TRIAZOLE DERIVATIVES OF EUGENOL. Eugenol is an aromatic compound found in several plant species. It presents important biological activities including cytotoxicity. In this paper, it is described the synthesis and the evaluation of the cytotoxic activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. Eugenol, extracted via hydrodistillation from dried flower buds of *Eugenia caryophyllata* (= *Syzygium aromaticum*), was submitted to alkylation reactions to afford two terminal alkynes in good yields. The key reaction involved in the preparation of eugenol derivatives corresponded to the Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC), between alkynylated eugenol derivatives and different benzyl azides. The evaluation of the cytotoxicity of twenty seven synthesized derivatives against HL60 leukemia cell line revealed that at 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, five of them, namely 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(3-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6n**), 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-benzyl-1H-1,2,3-triazole (**7a**), 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7c**), 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7e**) and 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(3-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7m**), were capable of significantly decreasing cell viability. These most active triazolic derivatives were also evaluated against B16F10 melanoma and Nalm6 leukemia cell lines. While only compound **7a** was active against the former, compounds **6n**, **7a**, and **7m** displayed activity against the latter. Derivative **7a** was active against all cell lines. It is believed that eugenol derivatives bearing triazole functionalities may represent a scaffold to be explored toward the development of new agents against cancer.

Keywords: eugenol; triazole; cytotoxic activity; click chemistry; CuAAC reaction.

INTRODUÇÃO

O câncer correspondeu a uma das principais causas de mortes no século XX e vem difundindo-se de forma contínua e aumentando sua incidência no século XXI.¹ Sua denominação está associada a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células anormais que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Devido à rápida divisão celular, estas células podem se tornar muito agressivas e incontroláveis, determinando assim a formação de tumores ou neoplasias malignas.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. A estimativa para o ano de 2025 aponta para a ocorrência de aproximadamente 20 milhões de novos casos.²

Investigações científicas multidisciplinares têm sido conduzidas buscando encontrar alternativas para combater esta doença, no entanto, a cura ainda não foi alcançada. Os principais tipos de tratamento empregados para o câncer baseiam-se, de forma geral, na associação da ressecção cirúrgica dos tumores ao tratamento radioterápico e a quimioterapia.

No que tange à quimioterapia, são utilizados compostos químicos que possuem como objetivo primário a destruição das células neoplásicas e a preservação das células saudáveis.³

Dentre os diversos medicamentos quimioterápicos para o

tratamento do câncer introduzidos nas últimas décadas, a maioria (60%) tem sua origem nos produtos naturais. Como exemplo, mencionam-se os quimioterápicos vimblastina (Velban[®]), vincristina (Oncovin[®]), paclitaxel (Taxol[®]), podofilotoxina, etoposídeo (Etopophos[®]) e camptotecina (Figura 1).⁴

Apesar da introdução de diversos fármacos no arsenal terapêutico contra o câncer, a quimioterapia apresenta diversos problemas dentre os quais se destacam os efeitos colaterais (como diarreia, vômito, fraqueza, queda de cabelo e tonturas) e a resistência intrínseca ou adquirida de diversos tipos de câncer aos agentes quimioterápicos.^{5,6} Devido a estes fatores, a exploração de produtos naturais pela busca do desenvolvimento de novos quimioterápicos, mais específicos e eficientes, continua sendo prioridade de investigação de diversos pesquisadores.⁷⁻¹⁰

O eugenol (**1**) (Figura 2) é um composto natural encontrado em várias plantas aromáticas como noz moscada, canela, folha de louro, sassafrás, mirra e manjeriço.¹¹ No entanto, o cravo da Índia *Eugenia caryophyllata* (= *Syzygium aromaticum*) pode ser considerado a principal fonte natural do eugenol (**1**), pois representa entre 45% e 90% da composição do óleo essencial derivado desta espécie.

Várias atividades biológicas foram relatadas para o eugenol (**1**), dentre elas destacam-se as atividades antibacteriana, antifúngica, antiplasmodial, antiviral, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, antidiabetes e citotóxica contra diferentes linhagens celulares de câncer.^{12,13} Uma investigação realizada sobre o efeito da atividade antiproliferativa do eugenol (**1**) contra as linhagens de células leucêmicas U-937, HL-60, HepG2, 3LL Lewis e SNU-C5, resultaram em valores de IC₅₀ iguais a 39,4, 23,7, 118,6, 89,6 e 129,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$,

*e-mail: robson.teixeira@ufv.br

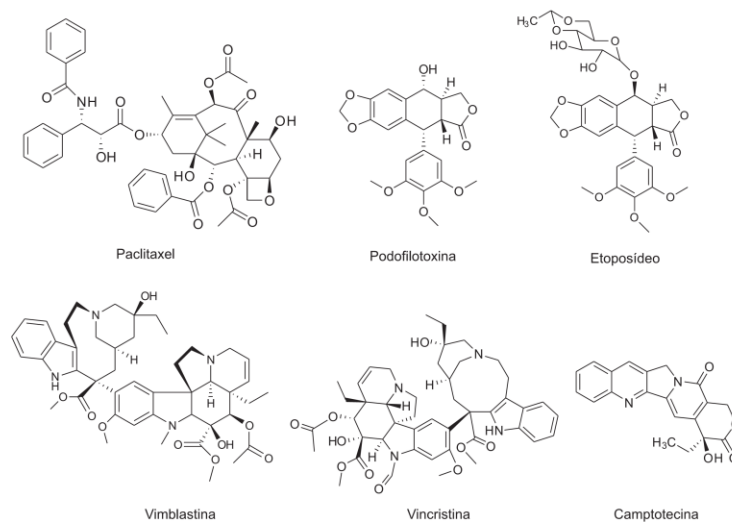


Figura 1. Estruturas de alguns quimioterápicos originários de plantas e empregados no tratamento do câncer

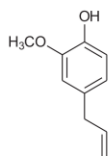


Figura 2. Estrutura do eugenol (1)

respectivamente.¹⁴

Considerando o efeito citotóxico descrito para o eugenol (1) bem como diversos trabalhos descritos na literatura a respeito da atividade citotóxica de compostos 1,2,3- triazolícos, é descrito neste artigo a síntese e a avaliação da atividade citotóxica de uma série de compostos derivados do eugenol (1) contendo núcleos 1,2,3-triazolícos.

PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades

Os reagentes pent-4-in-1-ol, cloreto de mesila, azida de sódio, trietilamina, brometo de propargila, sulfato de cobre pentaidratado e os álcoois benzílicos foram adquiridos comercialmente da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, United States) e utilizados sem prévia purificação. Os solventes foram adquiridos comercialmente da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A secagem dos solventes foi realizada utilizando procedimentos padrão descritos na literatura.¹⁵ O eugenol (1) foi extraído por meio da hidrodestilação de cravos da Índia adquiridos no mercado local (Viçosa, Minas Gerais, Brasil) e purificado por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh-ASTM, Merck). Os espectros de RMN ¹H (300 MHz) e ¹³C (75 MHz) foram obtidos em um instrumento Varian Mercury 300 utilizando CDCl₃ e C₆D₆ como solventes. Os dados de RMN são apresentados da seguinte

forma: deslocamento químico (δ) em ppm, multiplicidade, número de hidrogênios, valores de J em Hertz (Hz). As multiplicidades são apresentadas como as seguintes abreviações: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), ddt_m (duplo duplo triplete aparente), t (triplete), dt (duplo triplete), q (quarteto), quint (quinteto), m (multiplete). Os espectros no IV foram obtidos em equipamento Varian 660-IV equipado com GladiATR na região de 4000 a 500 cm⁻¹. As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica gel pré-revestidas com suporte de alumínio, usando diferentes sistemas de solventes e foram visualizadas usando solução de permanganato de potássio e/ou luz UV. Os pontos de fusão foram determinados em aparelho MQAPF-302 e não foram corrigidos. Os espectros de massa de baixa resolução foram obtidos em equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A sob condições de impacto de elétrons (70 eV). Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em equipamento Q-Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). Foram empregadas as seguintes condições: Fonte de ionização: eletrospray (+) e (-); spray voltage: 3.5 kV; temperatura do capilar: 275 °C; sheath gas: 5 (unidades arbitrárias); auxiliary gas: 0 (unidades arbitrárias). Para obtenção dos espectros de massas de alta resolução as amostras para análise foram preparadas da seguinte maneira: uma massa de 1 mg das amostras foi solubilizada em 1 mL de acetonitrila e diluídas em metanol até a concentração final de 1 ppm. A solução resultante foi diretamente injetada no equipamento Q-Exactive a um fluxo de 5 μ L min⁻¹. Os espectros foram adquiridos no modo full-MS.

Extração e purificação do eugenol (1)

O Eugenol (1) foi extraído *via* hidrodestilação de brotos secos de *Eugenia caryophyllata* (= *Syzygium aromaticum*), conhecidos como cravo-da-índia. Assim, 60,0 g de cravo e 500 mL de água destilada foram misturados em um balão de fundo redondo que foi conectado ao sistema de hidrodestilação. A mistura foi aquecida

durante três horas. O hidrolato obtido foi transferido para um funil de separação e a fase aquosa extraída com diclorometano (3 x 30 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O óleo resultante foi submetido à purificação por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (6:1 v/v). O procedimento descrito proporcionou a obtenção de 7,12 g de eugenol (**1**) que correspondeu a aproximadamente 12% de rendimento em relação à massa inicial de cravo da Índia utilizado no processo de extração. A estrutura do eugenol (**1**) está de acordo com os seguintes dados.

Óleo amarelo, $R_f = 0,44$ (hexano-acetato de etila 6:1 v/v). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,33 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,88 (s, 3H); 5,02-5,13 (m, 2H); 5,54 (s, 1H, OH); 5,97 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,67-6,72 (m, 2H); 6,86 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 55,8; 111,1; 114,2; 115,5; 121,1; 131,9; 137,8; 143,8; 146. EM, m/z (%): 164 (M⁺, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$, 100), 149 (35), 131 (29), 103 (32), 91 (28), 77 (34), 65 (13), 55 (24), 41 (7).

Procedimentos sintéticos

Síntese do 4-alil-2-metoxi-1-(prop-2-in-1-ilo)benzeno (**2**)

A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados hidróxido de sódio (0,313 g; 7,38 mmol), eugenol (**1**) (1,20 g; 7,32 mmol) e 25,0 mL de metanol. A mistura resultante foi aquecida a 40 °C e mantida sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida, o metanol foi removido sob pressão reduzida e 10,0 mL de etanol anidro foram adicionados para a eliminação de água residual. O etanol foi removido e ao balão, sob atmosfera de nitrogênio, adicionaram-se acetonitrila (25 mL) e brometo de propargila (800 μL ; 8,79 mmol) lentamente. O sistema foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 18 horas. Após esse período, foi evidenciado através da análise por CCD o término da reação. A mistura de reação foi concentrada e particionada com 25,0 mL de solução aquosa (0,1 mol L⁻¹) de hidróxido de sódio e éter etílico (3 x 25,0 mL). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com solução aquosa saturada de cloreto de sódio (25,0 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (6:1 v/v) e obtido com 87% (1,29 g; 6,37 mmol) de rendimento. A estrutura do composto **2** está de acordo com os seguintes dados.

Óleo amarelo, $R_f = 0,45$ (hexano-acetato de etila 6:1 v/v). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,49 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz); 3,35 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,86 (s, 3H); 4,73 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz); 5,03-5,14 (m, 2H); 5,96 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz, $J_3 = 6,7$ Hz); 6,70-6,76 (m, 2H); 6,97 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz). RMN ^1H (300 MHz, C_6D_6) δ : 1,99 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz); 3,14 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,31 (s, 3H); 4,36 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz); 4,93-5,02 (m, 2H); 5,85 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,4$ Hz e $J_3 = 6,6$ Hz); 6,52 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz); 6,57 (dd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz e $J_2 = 1,7$ Hz); 6,83 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 55,8; 56,9; 75,5; 78,7; 112,3; 114,6; 115,7; 120,3; 134,2; 137,4; 145,0; 149,6. EM, m/z (%): 202 (M⁺, $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$, 40), 163 (100), 135 (9), 103 (42), 91 (33), 77 (19), 65 (13), 55 (9), 41 (23).

Síntese do pent-4-in-1-ilmetanosulfonato (**3**)

A um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados pent-4-in-1-ol (1,68 g, 20,0 mmol) e diclorometano (20 mL). A mistura de reação, sob atmosfera de nitrogênio, foi resfriada a -50 °C e trietilamina (5,60 mL, 40,0 mmol) foi adicionada. Em seguida, adicionou-se lentamente ao meio reacional cloreto de mesila (2,3 mL, 30,0 mmol). Após o término da reação, evidenciado por análise de CCD, adicionaram-se 10,0 mL de água destilada. A fase orgânica

foi extraída, lavada com solução aquosa de HCl 1% (3 x 15,0 mL) seguida de solução aquosa saturada de NaHCO_3 (3 x 5,0 mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sobre pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v) e obtido com 92% (3,00 g, 18,0 mmol) de rendimento. A estrutura do composto **3** está de acordo com os seguintes dados.

Óleo amarelo, $R_f = 0,76$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,93 (quint, 2H, $J = 6,5$ Hz); 1,99 (t, 1H, $J = 2,7$ Hz); 2,33 (dt, 2H, $J_1 = 6,8$ Hz e $J_2 = 2,7$ Hz); 3,00 (s, 3H, CH_3); 4,32 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 14,5; 27,6; 37,1; 68,2; 69,7; 82,0.

Síntese do 4-alil-2-metoxi-1-(pent-4-in-1-ilo)benzeno (**4**)

Este composto foi preparado utilizando um procedimento semelhante ao descrito para a preparação do composto **2**. Neste caso, o agente de alquilação correspondeu ao composto **3**. A substância **4** foi obtida com 78% de rendimento (1,64 g, 7,13 mmol) após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (6:1 v/v). A estrutura de **4** é suportada pelos seguintes dados.

Óleo amarelo, $R_f = 0,55$ (hexano-acetato de etila 6:1 v/v). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 1,97 (t, 1H, $J = 2,6$ Hz); 2,04 (quint, 2H, $J = 6,6$ Hz); 2,42 (dt, 2H, $J_1 = 7,0$ Hz e $J_2 = 2,6$ Hz); 3,34 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,85 (s, 3H); 4,10 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz); 5,03-5,13 (m, 2H); 5,97 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,68-6,75 (m, 2H); 6,85 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 15,2; 28,2; 39,8; 55,9; 67,5; 68,8; 83,6; 112,4; 113,6; 115,6; 120,5; 133,0; 137,6; 146,7; 149,5. EM, m/z (%): 230 (M⁺, $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$, 100), 164 (68), 149 (44), 131 (29), 121 (16), 103 (34), 91 (31), 77 (23), 65 (16), 55 (15), 41 (34).

Síntese dos compostos 6a-6n e 7a-7m exemplificados pela síntese do composto 4 - ((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-benzil-1H-1,2,3-triazole (6a)

A um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 4-alil-2-metoxi-1-(prop-2-in-1-ilo)benzeno (**2**) (0,150 g; 0,740 mmol), benzilazida (0,0990 g; 0,740 mmol), ascorbato de sódio (0,0590 g; 0,300 mmol), 1,00 mL de etanol e 1,00 mL de água. Em seguida, adicionou-se $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,0370 g; 0,150 mmol). A mistura de reação foi agitada vigorosamente à temperatura ambiente. Após o término da reação evidenciado pela análise por CCD, a mistura de reação foi extraída com diclorometano (3 x 10,0 mL). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com solução saturada de carbonato de sódio, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sobre pressão reduzida. O composto **6a** foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v). O procedimento descrito resultou na obtenção de **6a** com 91% de rendimento (0,228 g; 0,680 mmol). A estrutura do composto **6a** está de acordo com os seguintes dados.

Sólido branco, P.f. = 90,5-91,3 °C, $R_f = 0,49$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max} /cm⁻¹: 3086, 3034, 2999, 2929, 2912, 1589, 1511, 1446, 1259, 1229, 1143, 1016, 921, 831, 713, 696. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,23 (s, 2H); 5,50 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,71 (m, 2H); 6,94 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz); 7,21-7,40 (m, 5H); 7,54 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 54,1; 55,7; 63,5; 112,2; 114,6; 115,7; 120,4; 122,7; 128,1; 128,7; 129,0; 133,8; 134,4; 137,4; 144,8; 145,8; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$: 336,17120; encontrado: 336,17020. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{NaO}_2$: 358,15315; encontrado: 358,15164.

Os compostos **6b-6n** e **7a-7m** foram preparados utilizando um procedimento semelhante ao descrito para a síntese de **6a**. As

estruturas destes compostos foram são suportadas pelos seguintes dados.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6b**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 92,1-92,7 °C, $R_f = 0,39$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3069, 3005, 2935, 2914, 1588, 1511, 1259, 1223, 1143, 1017, 905, 771. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,23 (s, 2H); 5,47 (s, 2H); 5,94 (ddt_{up}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,5$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,67-6,70 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,04 (t_{up}, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,20-7,30 (m, 2H); 7,54 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,7; 53,4; 55,7; 63,4; 112,2; 114,5; 115,7; 116,1 (d, $J = 21,8$ Hz); 120,4; 122,6; 129,9 (d, $J = 8,3$ Hz); 130,3 (d, $J = 3,0$ Hz); 133,8; 137,4; 145,0; 145,8; 149,5; 162,8 (d, $J = 246,0$ Hz). HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{FN}_3\text{O}_2$: 354,16178; encontrado: 354,16077. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{FN}_3\text{NaO}_2$: 376,14372; encontrado: 376,14240.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6c**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 112,3-112,6 °C, $R_f = 0,37$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3001, 2936, 2915, 1588, 1513, 1493, 1258, 1228, 1143, 1016, 907, 803, 722, 693, 592. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,23 (s, 2H); 5,47 (s, 2H); 5,94 (ddt_{up}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,18 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,33 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,54 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 53,4; 55,7; 63,4; 112,2; 114,6; 115,7; 120,4; 122,7; 129,2; 129,3; 132,9; 133,9; 134,7; 137,4; 145,0; 145,8; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClN}_3\text{O}_2$: 370,13223; encontrado: 370,13132. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClN}_3\text{NaO}_2$: 392,11417; encontrado: 392,11285.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6d**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 119,1-120,2 °C, $R_f = 0,59$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3001, 2935, 2915, 1588, 1513, 1385, 1258, 1229, 1144, 1015, 803, 738, 592, 488. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,82 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,23 (s, 2H); 5,45 (s, 2H); 5,94 (ddt_{up}, 1H, $J_1 = 17,1$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,92 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,11 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz); 7,48 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz); 7,54 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 53,4; 55,7; 63,4; 112,2; 114,6; 115,7; 120,4; 122,7; 122,8; 129,6; 132,2; 133,4; 133,9; 137,4; 145,1; 145,7; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{BrN}_3\text{O}_2$: 414,08171; encontrado: 414,08072. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$: 436,06366; encontrado: 436,06058.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-iodobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6e**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 129,2-131,1 °C, $R_f = 0,37$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3124, 3063, 2932, 1587, 1512, 1486, 1385, 1258, 1228, 1143, 1017, 1008, 911, 801, 769, 592, 485. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,82 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,20 (s, 2H); 5,44 (s, 2H); 5,94 (ddt_{up}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,5$ Hz e $J_3 = 6,6$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,92 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 6,98 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz); 7,54 (s, 1H); 7,69 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 53,5; 55,7; 63,4; 94,5; 112,2; 114,6; 115,7; 120,4; 122,7; 129,8; 133,9; 134,1; 137,4; 138,2; 145,1; 145,8; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{IN}_3\text{O}_2$: 462,06784; encontrado: 462,06711. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{IN}_3\text{NaO}_2$: 484,04979; encontrado: 484,04898.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6f**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 120,9-121,9 °C, $R_f = 0,14$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3063, 3005, 2950, 2917, 1591, 1516, 1350, 1258, 1230, 1140, 1019, 835, 720. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,01-5,12 (m, 2H); 5,25 (s, 2H); 5,62 (s, 2H); 5,93 (ddt_{up}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,3$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,92 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,37 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,63 (s, 1H); 8,20 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,7; 53,0; 55,7; 63,3; 112,3; 114,5; 115,7; 120,4; 123,0; 124,2; 128,5; 134,0; 137,4; 141,5; 145,4; 145,7; 148,0; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_4$: 381,15628; encontrado: 381,15533. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{NaO}_4$: 403,13822; encontrado: 403,13715.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6g**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 92,4-93,1 °C, $R_f = 0,36$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3068, 3005, 2936, 2832, 1613, 1587, 1512, 1463, 1251, 1227, 1142, 1016, 903, 805, 774, 702, 548. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,31 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,80 (s, 3H); 3,81 (s, 3H); 5,01-5,12 (m, 2H); 5,21 (s, 2H); 5,43 (s, 2H); 5,94 (ddt_{up}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,88 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz); 6,94 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 7,21 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,51 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8; 53,7; 55,3; 55,7; 63,5; 112,2; 114,4; 114,5; 115,6; 120,4; 122,5; 126,4; 129,7; 133,7; 137,4; 144,7; 145,9; 149,5; 159,9. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$: 366,18177; encontrado: 366,18069. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{NaO}_2$: 388,16371; encontrado: 388,16229.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-(trifluorometil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6h**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 126,4-127,3 °C, $R_f = 0,49$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3004, 2978, 2941, 1589, 1510, 1467, 1387, 1256, 1218, 1142, 1017, 915, 804. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,24 (s, 2H); 5,51 (s, 2H); 5,94 (ddt_{up}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,20 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,28 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,57 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,7; 53,2; 55,8; 63,4; 112,2; 114,5; 115,8; 120,3 (q, $J = 256,3$ Hz); 120,4; 121,5; 122,7; 129,5; 133,2; 133,9; 137,4; 145,1; 145,8; 149,3-149,2 (m); 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$: 420,15350; encontrado: 420,15250. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_2$: 442,13545; encontrado: 442,13422.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-(trifluorometil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6i**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 142,7-143,0 °C, $R_f = 0,43$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3060, 3003, 2977, 2944, 1589, 1515, 1422, 1328, 1229, 1142, 1117, 1017, 913, 799, 624. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,02-5,12 (m, 2H); 5,25 (s, 2H); 5,57 (s, 2H); 5,94 (ddt_{up}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 7,34 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz); 7,58 (sl, 1H); 7,61 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,7; 53,4; 55,8; 63,4; 112,2; 114,6; 115,7; 120,4; 122,8; 123,7 (q, $J = 270,8$ Hz); 126,0 (q, $J = 3,8$ Hz); 128,1; 131,0 (q, $J = 32,5$ Hz); 133,9; 137,4; 138,4; 145,2; 145,7; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$: 404,15859; encontrado: 404,15771. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_2$: 426,14053; encontrado: 426,13928.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(2,5-diclorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6j**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 87,9-88,4 °C, $R_f = 0,59$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3143, 3008, 2962, 2871, 1587, 1508, 1460, 1391, 1256, 1213, 1137, 1030, 1003, 905, 821, 797, 645, 560. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,83 (s, 3H); 5,01-5,12 (m, 2H); 5,23 (s, 2H); 5,60 (s, 2H); 5,94 (dd_{up}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 9,9$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,68-6,71 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 7,12 (d, 1H, $J = 2,3$ Hz); 7,27 (dd, 1H, $J_1 = 8,6$ Hz e $J_2 = 2,3$ Hz); 7,35 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz); 7,67 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 39,8; 50,9; 55,8; 63,5; 112,3; 114,7; 115,7; 120,5; 123,1; 130,0; 130,2; 130,9; 131,5; 133,5; 133,97; 133,99; 137,4; 145,1; 145,7; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para C₂₀H₂₀Cl₂N₃O₂: 404,09326; encontrado: 404,09232. HRMS (M+Na⁺): calculado para C₂₀H₁₉Cl₂N₃NaO₂: 426,07520; encontrado: 426,07388.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(3,4-difluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6k**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 104,9-105,2 °C, $R_f = 0,30$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3065, 3003, 2939, 2915, 1589, 1516, 1447, 1287, 1259, 1213, 1142, 1018, 835, 756, 575. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,82 (s, 3H); 5,01-5,12 (m, 2H); 5,24 (s, 2H); 5,45 (s, 2H); 5,94 (dd_{up}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,3$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,92 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 6,97-7,19 (m, 3H); 7,57 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 39,7; 53,0 (brd, $J = 1,0$ Hz); 55,7; 63,4; 112,2; 114,6; 115,7; 117,2 (d, $J = 18,0$ Hz); 117,9 (d, $J = 18,0$ Hz); 120,4; 122,7; 124,2 (dd, $J_1 = 6,8$ Hz e $J_2 = 3,8$ Hz); 131,4-131,5 (m); 133,9; 137,4; 145,2; 145,6; 149,5; 148,7-148,9 (m); 152,0-152,2 (m). HRMS (M+H⁺): calculado para C₂₀H₂₀F₂N₃O₂: 372,15236; encontrado: 372,15137. HRMS (M+Na⁺): calculado para C₂₀H₁₉F₂N₃NaO₂: 394,13430; encontrado: 394,13312.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(4-metilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6l**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 81,4-82,3 °C, $R_f = 0,66$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3064, 3003, 2917, 1588, 1513, 1446, 1257, 1229, 1142, 1017, 907, 803, 756. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,34 (s, 3H); 3,32 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,81 (s, 3H); 5,01-5,12 (m, 2H); 5,22 (s, 2H); 5,45 (s, 2H); 5,94 (dd_{up}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,6$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,15 (s, 4H); 7,52 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 21,1; 39,8; 53,9; 55,7; 63,5; 112,2; 114,6; 115,6; 120,4; 122,6; 128,1; 129,7; 131,4; 133,8; 137,5; 138,6; 144,7; 145,9; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para C₂₁H₂₃N₃O₂: 350,18685; encontrado: 350,18582. HRMS (M+Na⁺): calculado para C₂₁H₂₂N₃NaO₂: 372,16880; encontrado: 372,16776.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(2-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6m**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 67,5-68,6 °C, $R_f = 0,70$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3141, 3079, 3003, 2944, 2873, 1587, 1509, 1421, 1389, 1254, 1213, 1134, 1050, 1026, 1000, 920, 759, 649, 596. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,82 (s, 3H); 5,00-5,11 (m, 2H); 5,25 (s, 2H); 5,64 (s, 2H); 5,94 (dd_{up}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,6$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,95 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 7,12 (dd, 1H, $J_1 = 7,4$ Hz e $J_2 = 1,7$ Hz); 7,17-7,33 (m, 2H); 7,60 (dd, 1H, $J_1 = 7,8$ Hz e $J_2 = 1,2$ Hz); 7,66 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 39,7; 53,7; 55,7; 63,5; 112,2; 114,7; 115,6; 120,4; 123,1; 123,4; 128,1; 130,30; 130,33; 133,1; 133,8; 134,0; 137,4; 144,7; 145,7; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para C₂₀H₂₀BrN₃O₂: 414,08171; encontrado: 414,08096. HRMS (M+Na⁺): calculado para C₂₀H₂₀BrN₃NaO₂: 436,06366; encontrado: 436,06290.

Dados para 4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(3-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**6n**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 97,5-97,9 °C, $R_f = 0,70$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3065, 3011, 2936, 1588, 1512, 1463, 1387, 1226, 1142, 1017, 835, 735, 692, 665. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 3,32 (d, 2H, $J = 6,6$ Hz); 3,82 (s, 3H); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,24 (s, 2H); 5,47 (s, 2H); 5,94 (dd_{up}, 1H, $J_1 = 16,9$ Hz, $J_2 = 10,8$ Hz e $J_3 = 6,6$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); [7,13-7,26 (m), 7,40 (sl), 7,48 (d_{up}, $J = 7,7$ Hz), 4H]; 7,57 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 39,8; 53,3; 55,7; 63,4; 112,2; 114,6; 115,7; 120,5; 122,7; 123,0; 126,6; 130,6; 131,0; 131,9; 133,9; 136,6; 137,4; 145,1; 145,8; 149,5. HRMS (M+H⁺): calculado para C₂₀H₂₁BrN₃O₂: 414,08171; encontrado: 414,08069. HRMS (M+Na⁺): calculado para C₂₀H₂₀BrN₃NaO₂: 436,06366; encontrado: 436,06265.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol (**7a**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 71,4-72,6 °C, $R_f = 0,16$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3059, 3007, 2958, 2830, 2876, 1588, 1513, 1461, 1332, 1260, 1230, 1140, 1026, 915, 799, 709, 663. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,17 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz); 2,90 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz); 5,01-5,11 (m, 2H); 5,48 (s, 2H); 5,95 (dd_{up}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,22-7,37 (m, 6H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,9; 55,8; 68,1; 112,3; 113,4; 115,5; 120,4; 120,9; 127,9; 128,5; 129,0; 132,9; 134,8; 137,6; 146,6; 147,7; 149,3. HRMS (M+H⁺): calculado para C₂₂H₂₅N₃O₂: 364,20250; encontrado: 364,20148. HRMS (M+Na⁺): calculado para C₂₂H₂₄N₃NaO₂: 386,18445; encontrado: 386,18341.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7b**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 96,4-96,8 °C, $R_f = 0,21$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3111, 3061, 3008, 2951, 1587, 1511, 1455, 1260, 1222, 1140, 1015, 905, 798, 772, 654. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,17 (quint, 2H, $J = 6,9$ Hz); 2,90 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,44 (s, 2H); 5,95 (dd_{up}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,8$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,03 (t, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,16-7,30 (m, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,2; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 116,0 (d, $J = 21,8$ Hz); 120,4; 120,8; 129,7 (d, $J = 8,3$ Hz); 130,7 (d, $J = 3,0$ Hz); 132,9; 137,6; 146,6; 147,8; 149,3; 162,7 (d, $J = 246,8$ Hz). HRMS (M+H⁺): calculado para C₂₂H₂₃FN₃O₂: 382,19308; encontrado: 382,19211. HRMS (M+Na⁺): calculado para C₂₂H₂₂FN₃NaO₂: 404,17502; encontrado: 404,17404.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-clorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7c**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 81,8-82,2 °C, $R_f = 0,46$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3111, 3063, 3000, 2937, 2856, 1589, 1514, 1446, 1259, 1227, 1140, 1015, 909, 799, 776, 739, 641. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,17 (quint, 2H, $J = 6,9$ Hz); 2,90 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,82 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz); 5,00-5,11 (m, 2H); 5,44 (s, 2H); 5,95 (dd_{up}, 1H, $J_1 = 17,0$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,16 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,24 (s, 1H); 7,32 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,2; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 120,4; 120,9; 129,2; 132,9; 133,3; 134,6; 137,6; 146,6; 147,9; 149,3. HRMS (M+H⁺): calculado para

$C_{21}H_{25}ClN_3O_2$: 398,16353; encontrado: 398,16272. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{21}H_{25}ClN_3NaO_2$: 420,14547; encontrado: 420,14474.

*Para este composto, houve a sobreposição de sinais de átomos de carbono.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-bromobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7d**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 89,4-90,3 °C, R_f = 0,46 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3110, 3063, 2999, 2950, 1588, 1514, 1459, 1420, 1260, 1227, 1141, 1013, 908, 797, 733, 489. δ : 2,17 (quint, 2H, *J* = 6,9 Hz); 2,90 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 3,32 (d, 2H, *J* = 6,7 Hz); 3,82 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz); 5,03-5,13 (m, 2H); 5,43 (s, 2H); 5,95 (ddt_{ap}, 1H, *J*₁ = 16,8 Hz, *J*₂ = 10,2 Hz e *J*₃ = 6,7 Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz); 7,10 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz); 7,24 (s, 1H); 7,47 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,2; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 120,4; 120,9; 122,7; 129,5; 132,2; 133,0; 133,9; 137,6; 146,6; 147,9; 149,4. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{22}H_{23}BrN_3O_2$: 442,11301; encontrado: 442,11227. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{22}H_{23}BrN_3NaO_2$: 464,09496; encontrado: 464,09402.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-iodobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7e**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 98,3-99,2 °C, R_f = 0,45 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3110, 3062, 2999, 2951, 1588, 1513, 1461, 1419, 1260, 1227, 1140, 1009, 910, 797, 731, 655, 484. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,17 (quint, 2H, *J* = 6,9 Hz); 2,90 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 3,33 (d, 2H, *J* = 6,6 Hz); 3,82 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz); 5,00-5,12 (m, 2H); 5,41 (s, 2H); 5,95 (ddt_{ap}, 1H, *J*₁ = 16,8 Hz, *J*₂ = 10,2 Hz e *J*₃ = 6,6 Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz); 6,96 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz); 7,24 (s, 1H); 7,68 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,3; 55,8; 68,0; 94,3; 112,3; 113,4; 115,6; 120,4; 120,9; 129,6; 132,9; 134,5; 137,6; 138,1; 146,6; 147,9; 149,3. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{22}H_{25}IO_2$: 490,09915; encontrado: 490,09836. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{22}H_{25}IN_3NaO_2$: 512,08109; encontrado: 512,08038.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7f**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 79,7-80,4 °C, R_f = 0,29 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3111, 3062, 2949, 2911, 1590, 1518, 1465, 1348, 1227, 1139, 1014, 907, 849, 798, 713, 592. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,19 (quint, 2H, *J* = 6,9 Hz); 2,94 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 3,31 (d, 2H, *J* = 6,7 Hz); 3,81 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz); 5,00-5,12 (m, 2H); 5,59 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, *J*₁ = 16,8 Hz, *J*₂ = 10,2 Hz e *J*₃ = 6,7 Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz); 7,31-7,38 (m, 3H); 8,19 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,6; 39,7; 52,9; 55,8; 68,0; 112,4; 113,4; 115,6; 120,4; 121,3; 124,2; 128,4; 133,0; 137,5; 141,9; 146,6; 147,9; 148,3; 149,3. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{22}H_{23}N_4O_2$: 409,18758; encontrado: 409,18677. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{22}H_{23}N_4NaO_2$: 431,16952; encontrado: 431,16867.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7g**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 88,9-90,4 °C, R_f = 0,22 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3114, 3062, 3005, 2951, 2868, 1587, 1512, 1455, 1295, 1251, 1227, 1131, 1032, 1015, 917, 801, 749, 652. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,16 (quint, 2H, *J* = 7,0 Hz); 2,88 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 3,32 (d, 2H, *J* = 6,6 Hz); 3,80 (s, 3H); 3,82 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, *J* = 6,4 Hz); 5,00-5,11 (m, 2H); 5,40 (s, 2H); 5,95 (ddt_{ap}, 1H, *J*₁ = 16,8 Hz, *J*₂ = 9,9 Hz e *J*₃ = 6,6 Hz); 6,65-6,73 (m,

2H); 6,77 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz); 6,87 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz); 7,15-7,23 (m, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,5; 55,3; 55,8; 68,1; 112,3; 113,4; 114,4; 115,5; 120,4; 120,6; 126,8; 129,5; 132,9; 137,6; 146,6; 147,6; 149,3; 159,8. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{23}H_{28}N_3O_2$: 394,21307; encontrado: 394,21225. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{23}H_{27}N_3NaO_2$: 416,19501; encontrado: 416,19415.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-(trifluorometoxi)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7h**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 93,4-94,9 °C, R_f = 0,49 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3118, 3063, 2949, 2878, 1590, 1511, 1454, 1259, 1225, 1138, 1034, 1014, 911, 800, 743, 652. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,18 (quint, 2H, *J* = 6,9 Hz); 2,91 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 3,32 (d, 2H, *J* = 6,7 Hz); 3,81 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz); 5,01-5,13 (m, 2H); 5,48 (s, 2H); 5,95 (ddt_{ap}, 1H, *J*₁ = 16,8 Hz, *J*₂ = 10,2 Hz e *J*₃ = 6,7 Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz); 7,19 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz); 7,23-7,31 (m, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,0; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 120,3 (q, *J* = 257,0 Hz); 120,4; 121,0; 121,4; 129,3; 133,0; 133,6; 137,6; 146,6; 148,0; 149,2-149,3 (m); 149,4HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{23}H_{25}F_3N_3O_2$: 448,18480; encontrado: 448,18399. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{23}H_{24}F_3N_3NaO_2$: 470,16675; encontrado: 470,16602.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-(trifluorometil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7i**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 111,3-112,5 °C, R_f = 0,50 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3110, 3062, 2947, 2910, 1589, 1516, 1466, 1421, 1328, 1263, 1224, 1142, 1116, 1014, 908, 798, 740, 669. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,19 (quint, 2H, *J* = 6,9 Hz); 2,92 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 3,32 (d, 2H, *J* = 6,7 Hz); 3,81 (s, 3H); 4,02 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,54 (s, 2H); 5,94 (ddt_{ap}, 1H, *J*₁ = 16,8 Hz, *J*₂ = 10,2 Hz e *J*₃ = 6,74 Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz); 7,28 (s, 1H); 7,32 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz); 7,61 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,8; 39,7; 53,2; 55,9; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 120,4; 121,1; 123,8 (q, *J* = 270,8 Hz); 126,0 (q, *J* = 3,8 Hz); 128,0; 130,9 (q, *J* = 32,5 Hz); 133,0; 137,6; 138,8; 146,7; 148,1; 149,4. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{23}H_{25}F_3N_3O_2$: 432,18989; encontrado: 432,18903. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{23}H_{24}F_3N_3NaO_2$: 454,17183; encontrado: 454,17093.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(3,4-difluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7j**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 97,1-97,8 °C, R_f = 0,41 (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) ν_{max}/cm^{-1} : 3111, 3061, 2949, 1588, 1515, 1454, 1261, 1288, 1228, 1141, 1017, 915, 754. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 2,18 (quint, 2H, *J* = 6,9 Hz); 2,92 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz); 3,32 (d, 2H, *J* = 6,7 Hz); 3,82 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, *J* = 6,3 Hz); 5,00-5,12 (m, 2H); 5,43 (s, 2H); 5,95 (ddt_{ap}, 1H, *J*₁ = 16,8 Hz, *J*₂ = 10,2 Hz e *J*₃ = 6,7 Hz); 6,65-6,71 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, *J* = 7,9 Hz); 6,92-7,20 (m, 3H); 7,27 (s, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 52,5; 55,9 (dl, *J* = 8,3 Hz); 68,0; 112,5; 113,4; 115,6; 117,0 (d, *J* = 17,3 Hz); 117,9 (d, *J* = 17,3 Hz); 120,4; 120,9; 124,0 (dd, *J*₁ = 6,8 Hz e *J*₂ = 3,8 Hz); 131,8-131,9 (m); 133,0; 137,5; 146,5; 148,1; 149,3; [148,6-148,9 (m), 151,9-152,2 (m)]. HRMS (M+H⁺): calculado para $C_{23}H_{25}F_2N_3O_2$: 400,18366; encontrado: 400,18274. HRMS (M+Na⁺): calculado para $C_{23}H_{24}F_2N_3NaO_2$: 422,16560; encontrado: 422,16473.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(4-metilbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol (**7k**): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v), P.f. = 59,6-60,9 °C, R_f = 0,42 (hexano-acetato de

etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3061, 2953, 2916, 2880, 1588, 1514, 1449, 1420, 1260, 1228, 1140, 1014, 904, 845, 799, 75, 720, 650. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,16 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz); 2,34 (s, 3H); 2,88 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,81 (s, 3H); 4,01 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,43 (s, 2H); 5,95 (dd_{up}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,77 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); 7,10-7,18 (m, 4H); 7,21 (s, 1H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 21,0; 22,1; 28,7; 39,7; 53,7; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,5; 120,4; 120,7; 127,9; 129,6; 131,7; 132,8; 137,5; 138,4; 146,6; 147,6; 149,3. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$: 378,21815; encontrado: 378,21719. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_2$: 400,20010; encontrado: 400,19922.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(2-bromoben-zil)-1H-1,2,3-triazol (7): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v). P.f. = 47,8-49,1 °C, $R_f = 0,61$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3104, 3054, 2931, 1587, 1511, 1467, 1419, 1230, 1135, 1027, 948, 804, 744, 653. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,19 (quint, 2H, $J = 7,0$ Hz); 2,92 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,82 (s, 3H); 4,02 (t, 2H, $J = 6,4$ Hz); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,61 (s, 2H); 5,95 (dd_{up}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,78 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz); 7,08 (dd, 1H, $J_1 = 7,5$ Hz e $J_2 = 1,6$ Hz); 7,15-7,31 (m, 2H); 7,35 (s, 1H); 7,59 (dd, 1H, $J_1 = 7,8$ Hz e $J_2 = 1,1$ Hz). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,6; 55,8; 68,1; 112,3; 113,4; 115,5; 120,3; 121,3; 123,2; 128,1; 130,1; 130,2; 132,9; 133,1; 134,4; 137,6; 146,6; 147,7; 149,3. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_3\text{O}_2$: 442,11301; encontrado: 442,11197. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$: 464,09496; encontrado: 464,09390.

Dados para 4-(3-(4-alil-2-metoxifenoxi)propil)-1-(3-bromoben-zil)-1H-1,2,3-triazol (7m): Sólido branco, purificado por cromatografia em coluna eluída com hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v). P.f. = 65,9-67,1 °C, $R_f = 0,32$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v). IV (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3062, 2949, 2881, 1589, 1514, 1462, 1260, 1227, 1140, 1013, 798, 726, 689, 586. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,18 (quint, 2H, $J = 6,9$ Hz); 2,91 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz); 3,32 (d, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,82 (s, 3H); 4,02 (t, 2H, $J = 6,3$ Hz); 5,00-5,13 (m, 2H); 5,44 (s, 2H); 5,94 (dd_{up}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz e $J_3 = 6,7$ Hz); 6,65-6,73 (m, 2H); 6,78 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz); [7,10-7,30 (m), 7,38 (sl), 7,46 (d_{up}, $J = 7,8$ Hz, 5H)]. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 22,1; 28,7; 39,7; 53,1; 55,8; 68,0; 112,3; 113,4; 115,6; 120,4; 121,0; 123,0; 126,4; 130,6; 130,8; 131,7; 132,9; 137,1; 137,6; 146,6; 148,0; 149,3. HRMS (M+H⁺): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_3\text{O}_2$: 442,11301; encontrado: 442,11218. HRMS (M+Na⁺): calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$: 464,09496; encontrado: 464,09412.

Ensaios biológicos

Cultivo de linhagens celulares

As linhagens celulares HL60 (leucemia mielóide aguda), Nalm6 (leucemia linfóide aguda) e B16F10 (melanoma metastático murino) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) pH 7,4 suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células cresceram em garrafas de cultivo celular sob atmosfera umidificada com 5% de CO_2 .

Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

Células HL60 e Nalm6 ($7,0 \times 10^4$ células/poço) e B16F10 ($1,0 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços, cada um contendo 100 µL de meio RPMI completo e 100 µL de solução de cada composto em diferentes concentrações. Os compostos foram diluídos em meio RPMI contendo 10% v/v de soro fetal bovino e 0,4% v/v de DMSO (Sigma). Células tratadas com 0,4% v/v de DMSO (veículo) foram utilizadas como controle. Após 48 horas de incubação, 10 µL de MTT (5 mg/mL, Sigma) foram adicionados em cada poço. Após 3 horas a 37 °C, a solução contendo MTT foi removida dos poços e então foram adicionados 100 µL/poço de DMSO para solubilização do formazan. Finalmente, a absorbância foi avaliada em leitora de micropalacas (Spectra Max M5, Molecular Devices).

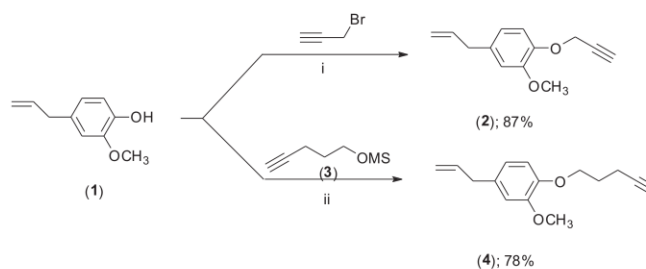
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Síntese dos compostos triazólicos derivados do eugenol

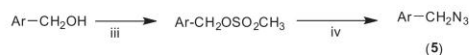
A primeira etapa envolvida na preparação dos compostos derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos correspondeu à extração do eugenol (1). Este composto foi obtido por hidrodestilação do cravo da Índia e purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Em seguida, o eugenol (1) foi submetido a reações de alquilação resultando na obtenção dos derivados (2) e (4) conforme apresentado no Esquema 1.¹⁶

Para a síntese dos compostos triazólicos derivados do eugenol foi necessária a preparação de várias azidas benzílicas (estrutura geral (5) no Esquema 2) que foram obtidas em duas etapas a partir dos álcoois benzílicos correspondentes, de acordo com a metodologia descrita na literatura.¹⁷

A etapa chave envolvida na síntese dos compostos triazólicos derivados do eugenol correspondeu à reação de cicloadição entre um alcino e uma azida catalisada por cobre (I) (CuAAC), também conhecida como reação "click".¹⁸⁻²³ Assim, os compostos 6a-6n e 7a-7m foram preparados a partir dos compostos alquilados (2 e 4) e as azidas benzílicas (5), e obtidos com rendimentos sinteticamente úteis (77%-91%) (Esquema 3).

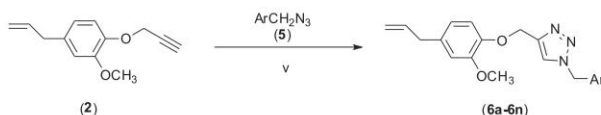


Esquema 1. i) NaOH, CH_3OH , 40 °C; acetoneitrila, t.a.; ii) NaOH, CH_3OH , 40 °C; acetoneitrila, 70 °C

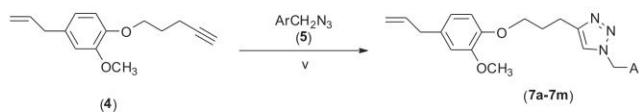


Ar = fenila; 4-fluorofenila; 4-clorofenila; 4-bromofenila; 4-iodofenila; 4-nitrofenila; 4-metoxifenila; 4-trifluorometoxifenila; 4-trifluorometilfenila; 3,4-difluorofenila; 2,5-diclorofenila; 4-metilfenila; 2-bromofenila; 3-bromofenila.

Esquema 2. iii) Et_3N , $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, CH_2Cl_2 , -50°C ; iv) NaN_3 , DMSO , l.a.



- 6a: Ar = fenila (91%)
 6b: Ar = 4-fluorofenila (87%)
 6c: Ar = 4-clorofenila (87%)
 6d: Ar = 4-bromofenila (80%)
 6e: Ar = 4-iodofenila (87%)
 6f: Ar = 4-nitrofenila (89%)
 6g: Ar = 4-metoxifenila (80%)
 6h: Ar = 4-trifluorometoxifenila (85%)
 6i: Ar = 4-trifluorometilfenila (84%)
 6j: Ar = 2,5-diclorofenila (81%)
 6k: Ar = 3,4-difluorofenila (78%)
 6l: Ar = 4-metilfenila (82%)
 6m: Ar = 2-bromofenila (77%)
 6n: Ar = 3-bromofenila (79%)



- 7a: Ar = fenila (79%)
 7b: Ar = 4-fluorofenila (86%)
 7c: Ar = 4-clorofenila (87%)
 7d: Ar = 4-bromofenila (84%)
 7e: Ar = 4-iodofenila (91%)
 7f: Ar = 4-nitrofenila (82%)
 7g: Ar = 4-metoxifenila (83%)
 7h: Ar = 4-trifluorometoxifenila (84%)
 7i: Ar = 4-trifluorometilfenila (92%)
 7j: Ar = 3,4-difluorofenila (90%)
 7k: Ar = 4-metilfenila (80%)
 7l: Ar = 2-bromofenila (79%)
 7m: Ar = 3-bromofenila (81%)

Esquema 3. v) ascorbato de sódio (40 mol%), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 mol%), $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v)

Os compostos triazólicos foram obtidos empregando-se condições de reação similares àquelas previamente descritas na literatura.¹⁷ As reações, de modo geral, duraram menos do que um minuto e não foram observadas variações de velocidade das transformações utilizando-se azidas benzílicas contendo grupos doadores ou retiradores de elétrons ligados ao anel aromático. O alquino terminal utilizado (2 ou 4) também não influenciou a velocidade dos processos "click".

Todos os compostos triazólicos foram completamente caracterizados pelas espectroscopias de RMN (^1H e ^{13}C) e no infravermelho

(IV) bem como pela espectrometria de massas. Nos espectros de RMN de ^1H , o sinal atribuído ao hidrogênio presente no anel triazólico foi observado como um simpleto dentro da faixa de 7,20-7,67 ppm. Os sinais referentes aos átomos de hidrogênios metilênicos ligados ao oxigênio e ao nitrogênio também foram observados como simpletos nos espectros de RMN de ^1H . No espectro de RMN de ^{13}C foi observado que o número de sinais presentes e os deslocamentos químicos são compatíveis com as estruturas das substâncias. Nos espectros no IV, as bandas esperadas para os grupos funcionais foram

observadas. As fórmulas moleculares dos derivados triazólicos do eugenol **6a-6n** e **7a-7m** foram confirmadas pela espectrometria de massas de alta resolução. Cabe destacar que a síntese dos compostos foi planejada de modo a avaliar o efeito dos diferentes grupos benzila ligados à porção triazólica (Esquema 3) bem como do tamanho da cadeia alquílica (ligando a porção eugenol à porção triazólica) sobre a atividade citotóxica dos compostos.

Avaliação da atividade citotóxica dos compostos triazólicos derivados do eugenol

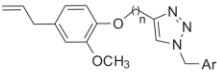
Os compostos triazólicos **6a-6n** e **7a-7m** foram inicialmente avaliados com respeito aos seus efeitos citotóxicos contra a linhagem leucêmica HL60 (leucemia mieloide aguda). Esta linhagem foi tratada com diferentes concentrações dos compostos (100, 50 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) por 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos para a viabilidade celular estão apresentados na Tabela 1.

Não foi possível estabelecer uma correlação entre estruturas químicas e atividade biológica. Os resultados apresentados mostram que os compostos **6n**, **7a**, **7c**, **7e** e **7m** foram os mais ativos e apresentaram uma redução igual ou superior a 80% de células viáveis nos tratamentos a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Devido ao efeito citotóxico mais pronunciado para estas substâncias, elas foram consideradas promissoras e tiveram suas atividades citotóxicas avaliadas contra as linhagens celulares HL60, Nalm6 e B16F10 para determinação de valores de IC_{50} . Neste caso, as linhagens foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos (200, 150, 125, 100, 75, 50 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$), por 48 horas. Esses testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Comparando-se os valores de IC_{50} apresentados na Tabela 2, observa-se, como tendência geral, que a linhagem mieloide (HL60) apresentou maior sensibilidade ao efeito citotóxico dos compostos em relação à linhagem linfóide (Nalm6) e murina (B16F10). Além disso, observa-se que dos cinco compostos mais ativos, quatro (**7a**, **7c**, **7e**,

Tabela 1. Efeito dos compostos triazólicos derivados do eugenol sobre a viabilidade (%) da linhagem celular HL60, após 48 horas de exposição aos compostos (média±desvio padrão)



Composto*	Ar	Viabilidade (%)**		
		25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol L}^{-1}$
6a	Fenila	75,92±16,21	77,73±12,22	69,65±9,62
6b	4-fluorofenila	67,98±13,09	64,12±3,08	54,89±11,22
6c	4-clorofenila	75,25±3,53	76,87±11,19	83,68±6,07
6d	4-bromofenila	75,72±1,83	81,12±2,81	82,68±9,84
6e	4-iodofenila	78,23±6,39	81,57±12,93	86,54±18,31
6f	4-nitrofenila	74,31±3,11	72,03±1,53	78,63±0,40
6g	4-metoxifenila	71,78±9,36	74,76±12,12	78,80±3,64
6h	4-trifluorometoxifenila	86,84±16,65	76,06±6,68	73,70±16,80
6i	4-triflorometila	79,77±1,55	80,68±7,02	77,10±6,15
6j	2,5-diclorofenila	69,16±2,10	90,31±13,28	106,54±6,84
6k	3,4-difluorofenila	68,30±3,52	76,56±7,11	85,27±6,59
6l	4-metilfenila	75,44±0,93	69,01±1,47	71,34±3,63
6m	2-bromofenila	85,08±6,67	78,78±7,39	77,13±4,65
6n	3-bromofenila	82,38±0,52	79,88±0,07	18,93±5,30
7a	Fenila	79,44±9,18	80,66±3,27	20,85±7,92
7b	4-fluorofenila	84,64±11,17	81,15±7,69	38,24±4,95
7c	4-clorofenila	75,67±1,30	76,62±2,09	12,39±3,79
7d	4-bromofenila	79,77±21,94	79,58±12,48	82,13±8,98
7e	4-iodofenila	88,20±16,48	87,13±15,32	13,04±3,80
7f	4-nitrofenila	74,66±5,60	81,99±3,95	39,62±5,36
7g	4-metoxifenila	87,93±19,11	87,50±16,95	89,80±12,08
7h	4-trifluorometoxifenila	72,33±2,03	75,77±6,90	64,97±2,09
7i	4-triflorometila	85,09±20,36	79,39±9,67	84,12±15,99
7j	3,4-difluorofenila	76,27±7,42	70,58±5,84	77,09±3,30
7k	4-metilfenila	80,39±10,62	64,95±9,08	27,88±6,49
7l	2-bromofenila	93,92±10,74	90,74±5,61	88,74±2,32
7m	3-bromofenila	93,03±8,93	88,54±8,41	19,88±5,19

* Para os compostos **6a-6n**, n=1 e para os compostos **7a-7m**, n=3; **Considerou-se 100% de viabilidade celular no tratamento controle com o veículo DMSO.

Tabela 2. Valores de IC₅₀ (μmol L⁻¹) obtidos para as linhagens celulares HL60, Nalm6 e B16F10 tratadas com os compostos **6n**, **7a**, **7c**, **7e**, **7m**

Composto	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)		
	HL60	Nalm6	B16F10
6n	70,74±0,269	66,30±3,451	NA
7a	75,83±4,752	85,59±2,913	179,7±3,090
7c	74,61±2,171	NA	NA
7e	74,54±6,554	NA	NA
7m	77,96±4,815	76,67±0,368	NA

IC₅₀: concentração dos compostos requerida para inibir 50% da viabilidade celular, determinada após 48 horas de tratamento. (NA) Compostos não ativos nas condições experimentais utilizadas.

7m) possuem como característica estrutural comum o tamanho da cadeia carbônica lateral do anel triazólico, que é comparativamente maior que a do composto **6n**.

Para a linhagem HL60, verifica-se que todos os compostos foram capazes de inviabilizar o crescimento celular, apresentando valores de IC₅₀ abaixo de 100 μmol L⁻¹. No entanto, dentre os cinco compostos investigados, o composto **6n** foi o de maior atividade, apresentando valor de IC₅₀ igual a 70,74 μmol L⁻¹. Para a linhagem Nalm6, observa-se que os compostos mais ativos, **6n** e **7m**, possuem como característica estrutural comum a presença do grupo 3-bromo-fenila. O composto **6n**, que possui menor comprimento da cadeia alifática conectando a porção eugenol à porção triazólica, apresentou maior efeito citotóxico contra esta linhagem celular (IC₅₀ igual a 66,30 μmol L⁻¹). Por último, em relação à linhagem celular B16F10, a qual é refratária ao tratamento quimioterápico em geral,²⁴ observa-se que apenas o composto **7a** foi capaz de diminuir a viabilidade celular, caracterizando-se como derivado triazólico do eugenol que apresentou atividade citotóxica contra as três linhagens celulares investigadas.

CONCLUSÃO

A conversão do eugenol em derivados contendo porções 1,2,3-triazólicas e avaliação da citotoxicidade destes resultou na identificação de cinco derivados que significativamente reduziram a viabilidade da linhagem leucêmica mielóide HL60. A subsequente avaliação destes derivados mais ativos mostrou que três deles apresentaram atividade contra a linhagem leucêmica linfóide Nalm6 enquanto que apenas um derivado apresentou citotoxicidade contra a linhagem de melanoma metastático murino B16F10. Embora as atividades descritas sejam moderadas, acredita-se que derivados triazólicos do eugenol possam representar uma classe de compostos a serem explorados visando à obtenção de novos agentes quimioterápicos contra o câncer. Estudos neste sentido estão em andamento em nossos laboratórios.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Espectros de RMN, no IV e de massas utilizados na caracterização dos compostos estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio por intermédio do Programa de Apoio a Grupos Emergentes (PRONEM) e CEX-APQ-02957-17. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio por meio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) e pela concessão de uma bolsa de estudos (PARG).

REFERÊNCIAS

- Balanchandran, P.; Govindarajan, R.; *Pharmacol. Res.* **2005**, *51*, 19.
- <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>, acessada em Fevereiro de 2018.
- De Araujo, M. E. M. B.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Francisco, Brasil, 2012.
- Costa-Lotufu, L. V.; Montenegro, R. C.; Alves, A. P. N. N.; Madeira, S. V. F.; Pessoa, C.; Moraes, M. E. A.; Moraes, M. O.; *Rev. Virtual Quim.* **2010**, *2*, 47.
- Huang, Z.; Tong, Y.; Wang, J.; Hang, Y.; *Cancer Cell Int.* **2003**, *3*, 5.
- Ghorab, M. M.; Al-Said, M.; *Arch. Pharm. Res.* **2012**, *35*, 987.
- Harvey, A. L.; *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 894.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629.
- Dias, D. A.; Urban, S.; Roessner, U.; *Metabolites* **2012**, *2*, 303.
- Cheuka, P. M.; Mayoka, G.; Mutai, P.; Chibale, K.; *Molecules* **2017**, *22*, 58.
- Jaganathan, S. K.; Supriyanto, E.; *Molecules* **2012**, *17*, 6290.
- Kamatou, G. P.; Vermaak, I.; Viljoen, A. M.; *Molecules* **2012**, *17*, 6953.
- Singh, P.; Jayaramaiah, R. H.; Agawane, S. B.; Vannuruswamy, G.; Korwar, A. M.; Anand, A.; Dhaygude, V. S.; Shaikh, M. L.; Joshi, R. S.; Boppana, R.; Kulkarni, M. J.; Thulasiram, H. V.; Giri, A. P.; *Sci. Reports* **2016**, *6*, 18798.
- Yoo, C. B.; Han, K. T.; Cho, K. S.; Ha, J.; Park, H. J.; Nam, J. H.; Kil, U. H.; Lee, K. T.; *Cancer Lett.* **2005**, *225*, 41.
- Perrin, D. D.; Armarego, W. L.; *Purification of Laboratory Chemicals*, 3^o ed., Butterworth-Heinemann Ltd.: Londres, 1988, p. 340.
- Tiew, K.-C.; Dou, D.; Teramoto, T.; Lai, H.; Alliston, K. R.; Lushington, G. H.; Padmanabhan, R.; Groutas, W. C.; *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1213.
- Borgati, T. F.; Alves, R. B.; Teixeira, R. R.; Freitas, R. P.; Perdigão, T. G.; Silva, S. F.; Santos, A. A.; Bastidas, A. J. O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 953.
- Meldal, M.; Tornøe, C. W.; *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952.
- Hein, J. E.; Fokin, V. V.; *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302.
- Moses, J. E.; Moorhouse, A. D.; *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249.
- Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V.; *Science* **2013**, *340*, 457.
- Wu, P.; Fokin, V. V.; *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7.
- Tatman, D.; Mo, H.; *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 129.





Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities



Róbson Ricardo Teixeira ^{a,*}, Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla ^a,
Adalberto Manoel da Silva ^b, Maria Paula Gonçalves Borsodi ^c, Bartira Rossi Bergmann ^c,
Rafaela Salgado Ferreira ^d, Boniek Gontijo Vaz ^e, Géssica Adriana Vasconcelos ^e,
Wallace Pacienza Lima ^c

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, S/N, Viçosa, MG, 36570-900, Brazil

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense, Campus Araquari Rodovia BR 280, Km 27, Cx. Postal 21, Araquari, SC, 89245-000, Brazil

^c Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Imunofarmacologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Bloco I2-038, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, 21941-902, RJ, Brazil

^d Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, 31270-901, MG, Brazil

^e Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Av. Esperança, S/N, Campus Samambaia, Goiânia, 74690-970, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2017
Received in revised form
11 January 2018
Accepted 15 January 2018

Keywords:

Eugenol
Leishmaniasis
Antileishmanial
Leishmanicidal
Triazole

ABSTRACT

In this paper, it is described the synthesis and the evaluation of the leishmanicidal activity of twenty-six eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. The evaluation of the compounds on promastigotes of *Leishmania amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) showed that eugenol derivatives present leishmanicidal activities with varying degrees of effectiveness. The most active compound, namely 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7k**) ($IC_{50} = 7.4 \pm 0.8 \mu\text{mol L}^{-1}$), also targeted *Leishmania* parasites inside peritoneal macrophages ($IC_{50} = 1.6 \mu\text{mol L}^{-1}$) without interfering with cell viability. The cytotoxicity of **7k** against macrophage cells presented IC_{50} of $211.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ and the selective index was equal to 132.5. Under similar conditions, compound **7k** was more effective than glucantime and pentamidine, two drugs currently in the clinic. In addition, theoretical calculations showed that this compound also presents most physicochemical and pharmacokinetic properties within the ranges expected for orally available drugs. It is believed that eugenol bearing 1,2,3-triazole functionalities may represent a scaffold to be explored toward the development of new agents to treat leishmaniasis.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Parasitic diseases affect millions of hundreds of people annually and constitute an important global health problem. These diseases affect mainly the poorest population around the world and represent a significant issue in terms of human health and well-being. Malaria, River blindness (Onchocerciasis), Lymphatic Filiasis, Schistosomiasis, Trypanosomiasis, and Leishmaniasis are some examples of parasitic diseases.

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by the protozoan *Leishmania* and classified as one of the most important neglected tropical diseases (NTDs) that affect 350 million people in 98

countries, with a global incidence of 0.9–1.6 million cases per year [1]. *Leishmania* parasites are transmitted via the bites of infected female phlebotomine sandflies. Three main clinical manifestations of leishmaniasis, depending on the parasite species and the host-parasite relationship, are known: visceral (often known as Kalazar and the most serious form of the disease), cutaneous (the most common), and mucocutaneous [2]. Visceral leishmaniasis is responsible for 20,000–40,000 deaths annually [1].

Currently, several investigations have been conducted to find alternative treatments for leishmaniasis [3] due to the small number of available drugs and the development of resistance or decreased the sensitivity of parasite strains to existing treatments that have been utilized for human therapy [3]. These studies have sought new methods and targets for diagnosis, new vaccine candidates and new rationally designed drugs that can be applied not

* Corresponding author.

E-mail address: robsonr.teixeira@ufv.br (R.R. Teixeira).

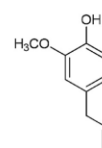
only in humans but also in dogs because canines are considered the major reservoirs of several species of *Leishmania* [4,5].

Historically, chemotherapy for leishmaniasis has relied on the use of pentavalent antimonial drugs, such as *N*-methylglucamine antimoniate (Fig. 1), which is one of the most widely used drugs [6]. However, this drug has limited clinical potential due to the occurrence of serious side effects and high incidence of disease recurrence [7]. Pentamidine (Fig. 1) is another antileishmanial agent, but it is inadequate as a first-line treatment because of its high toxicity [8]. Amphotericin B has been used as a second-choice drug in the treatment of leishmaniasis since the 1960s, but the rate of resistance against this drug is high [8]. Two other examples of antileishmanial compounds are miltefosine and paromomycin (Fig. 1). The major limitation of miltefosine is teratogenicity, excluding its use in women of child-bearing age [9,10]. The most common side effect associated with the paromomycin is the ototoxicity, as well as problems in liver function. In patients treated with the ointment formulation, skin rashes, local pruritus and blurs have been encountered [11]. Additionally, the drugs used in therapy have some limitations in common: (i) they are toxic and their long-time administration causes various undesirable side effects; (ii) they are costly; (iii) they show low efficacy in endemic areas due to the observed resistance of various parasite species [12]. The aforementioned problems illustrate the need to develop new antileishmanial drugs.

In the search for new drugs for the treatment of diseases, the exploitation of natural products is a viable approach [13–18]. In this

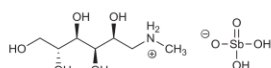
regard, compounds obtained from nature can be used directly as a pharmaceutical or can be chemically modified to afford derivatives with improved pharmacological activity.

Eugenol (1) (Fig. 2) is a natural compound which has been identified in several aromatic plants such as *Myristica fragrans* Houtt. (nutmeg), *Cinnamomum verum* J.Presl (true cinnamon), *C. loureirii* Nees. (Saigon cinnamon), *Ocimum gratissimum* Forssk. (basil) and *Ocimum basilicum* L. (sweet basil). However, *Eugenia caryophyllata* (= *Syzygium aromaticum*) can be considered the principal natural source of this compound as it represents between 45% and 90% of the composition of the essential oil derived from this species. Several biological activities have been reported for eugenol (1) including antibacterial, antifungal, antiplasmodial,

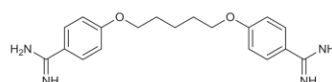


Eugenol (1)

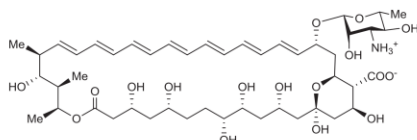
Fig. 2. The structure of eugenol (1).



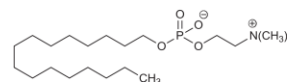
***N*-methylglucamine antimoniate**



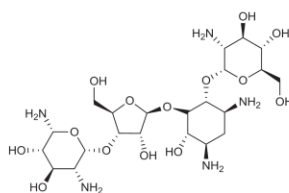
pentamidine



amphotericin B



miltefosine



paromomycin

Fig. 1. Structures of drugs used for the treatment of leishmaniasis.

antiviral, anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, anticancer and anti-diabetes [19,20].

An investigation conducted with *Ocimum gratissimum* revealed that its eugenol-rich essential oil presents leishmanicidal activity. The IC_{50} values of the oil against promastigotes and amastigotes were, respectively, $135 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Eugenol (**1**) alone was also evaluated and the activity against promastigote forms was even more pronounced (IC_{50} value of $80 \mu\text{g mL}^{-1}$) [21]. Considering the leishmanicidal effect of eugenol (**1**) [21] and its derivatives [22] as well as reports on the antileishmanial activity of 1,2,3-triazole containing compounds [23–25], it is described in this paper the synthesis and leishmanicidal activity evaluation of a series of compounds derived from eugenol and containing 1,2,3-triazolic portions.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of eugenol derivatives

The first step towards the preparation of eugenol 1,2,3-triazolic compounds corresponded to the extraction of eugenol (**1**). This compound was obtained via hydrodistillation from cloves purchased in the local market in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. After the extraction procedure, the compound was purified by silica gel column chromatography. Next, eugenol (**1**) was submitted to alkylation reactions affording the derivatives **2** and **4** as outlined in Scheme 1 [26].

For the synthesis of eugenol derivatives containing triazole rings, it was required the preparation of several benzyl azides (compounds of general structure **5** in Scheme 2) which were obtained in two steps from the corresponding benzyl alcohols utilizing methodology previously described in the literature [27].

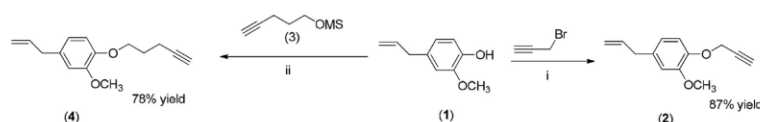
The key step involved in the synthesis of eugenol derivatives **6a–6n** and **7a–7m** (Scheme 3) corresponded to the Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC), also known as click reaction [28–33], between the alkynylated compounds **2** and **4** and the benzyl azides **5**. Compounds were obtained with synthetically useful yields between 77% and 91% (Scheme 3). In general, reactions took less than 1 min for their completion. The synthesis of the compounds was planned so that the influence on the leishmanicidal activity of different benzylic groups attached to triazole ring as well as the length of the chain connecting the triazole ring to the eugenol portion could be assessed. All the triazolic compounds were fully characterized by NMR (^{13}C and ^1H), IR and high-resolution mass spectrometry. In the ^1H NMR spectra, the signal for the hydrogen present in the triazolic ring was observed within the 7.20–7.67 ppm range. The allylic protons were observed as doublets, while the hydrogen atoms of methylene groups attached to nitrogen or oxygen were noticed as singlets in the ^1H

NMR spectra. The carbon chemical shifts are compatible with the structures of the compounds. In the IR spectra, expected bands for functional groups were noticed. The molecular formulas of the eugenol triazolic derivatives were confirmed by high-resolution mass spectrometry analyses.

2.2. Evaluation of leishmanicidal activity of eugenol derivatives

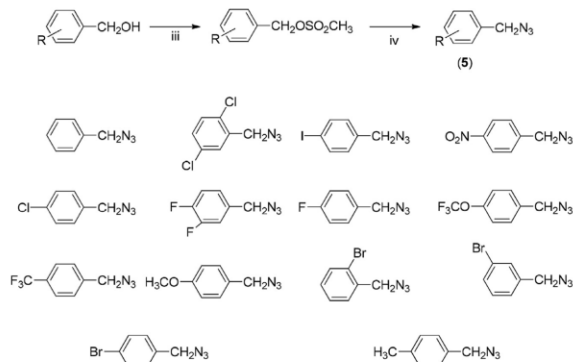
Taking into consideration previous reports concerning the leishmanicidal activity of eugenol (**1**) and triazole containing compounds, we turned our attention to evaluate the leishmanicidal activities of eugenol derivatives **6a–6n** and **7a–7m**. The treatment of the parasites with the compounds resulted in a dose-dependent growth inhibition of *L. amazonensis* promastigotes. The 50% growth inhibitory activity values (IC_{50}), after 72 h of treatment of each compound, were determined by the Alamar Blue assay [34], and are shown in Table 1. Eugenol derivatives **6a**, **6b**, **6k**, **7a**, **7b**, and **7k** were the most active ones, presenting IC_{50} values of 30.2, 59.4, 49.2, 37.9, 32.2 and $7.4 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Pentamidine and amphotericin B were used as positive controls in the assays and presented IC_{50} of 4.2 and $0.4 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. It is worth to mention that the IC_{50} values of compounds **6a**, **6b**, **6k**, **7a**, **7b**, and **7k** are superior to the IC_{50} of eugenol (**1**) ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$; $487 \mu\text{mol L}^{-1}$) evaluated against promastigote forms of *L. amazonensis* [21].

After demonstrating leishmanicidal activity against extracellular promastigotes, the next step was to investigate the effect against intracellular amastigotes, the parasite form responsible for the mammalian infection. We determined that compound **7k**, the most active against promastigote form, was able to target the *Leishmania* parasites inside of mouse peritoneal macrophages ($IC_{50} = 1.6 \mu\text{mol L}^{-1}$), without interfering with host cell viability (Table 2). At similar conditions, pentamidine and glucantime exhibited IC_{50} values of $1.8 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $45.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($124.3 \mu\text{mol L}^{-1}$) respectively. Compound **7k** was assayed against uninfected murine intraperitoneal macrophages to evaluate its cytotoxicity; it was found LD_{50} of $211.9 \mu\text{mol L}^{-1}$. At similar conditions, pentamidine and glucantime exhibited LD_{50} values of $8.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $75.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($206.3 \mu\text{mol L}^{-1}$), respectively. Thus, the selectivity index ($SI = LD_{50}/IC_{50}$ intracellular amastigotes) value for compound **7k** was 132.5, whereas $SI = 4.7$ for pentamidine and $SI = 1.6$ for glucantime. Therefore, the derivative **7k** presents lower toxicity when compared to drugs currently used in the treatment of leishmaniasis. In order to determine whether anti-amastigote activity resulted from activation of the macrophage antileishmanial mechanism, compound **7k** was also evaluated with respect to the nitric oxide production. It was observed that **7k** did not significantly stimulate the production of nitric oxide, suggesting a direct and selective action of this derivative on the intracellular amastigote (data not shown).



Reagents and conditions: (i) NaOH, CH_3OH , 40°C ; then acetonitrile, r.t.; (ii) NaOH, CH_3OH , 40°C ; then acetonitrile, 70°C .

Scheme 1. Alkylation procedures of eugenol (**1**).



Reagents and conditions: (iii) Et₃N, CH₃SO₂Cl, CH₂Cl₂, -50 °C; (iv) NaN₃, DMSO, r.t.

Scheme 2. Synthesis and structures of benzyl azides.

Infected amastigote macrophages treated with **7k**, glucantime and without treatment (negative control) were observed by microphotography and revealed that the parasites were killed but that the host cells remained unaffected (Fig. 3).

2.3. Analysis of estimated physicochemical and pharmacokinetic properties

During drug development, it is important to consider several relevant properties, in addition to leishmanicidal activity. Therefore, to evaluate if the most potent compounds against *L. amazonensis* (**6a**, **6b**, **6k**, **7a**, **7b**, **7k**) are suitable for further steps of lead optimization, a set of 44 properties were estimated employing the software QikProp [35]. Among those, we highlight the analysis of those referring to Lipinski's [36] and Veber's rules [37], which are considered as reference parameters for orally available drugs. The six highlighted compounds obey Veber's rules and most of the Lipinski's rules, except for clogP (Table 3). These results indicate that the compounds herein investigated obey most physicochemical drug-like properties.

Other key properties for drug development, such as the estimated affinity to HERG K⁺ channels (QPlogHERG), permeability through Caco-2 (QPpCaco) and MDCK cells (QPpMDCK) and skin (QPlogK_p) and the number of predicted metabolic sites (#metab), were also calculated (Table 4). This analysis reveals properties which would probably have to be improved when optimizing these compounds. For example, a key concern would be to reduce the affinity for HERG, a K⁺ channel commonly associated with cardiac toxicity [38]. Skin permeability should also be improved in case a topical application is desired, as indicated by the QPlogK_p values. On the other hand, high predicted permeability through Caco-2 cells, a model for the gut-blood barrier, and MDCK cells, which model the blood brain barrier, indicate good overall permeability in biological membranes, which is a desirable property for orally available drugs. The predicted number of metabolites is also within the desired range, observed for most drugs. Altogether, most of the calculated properties seem favorable for drug development.

3. Conclusion

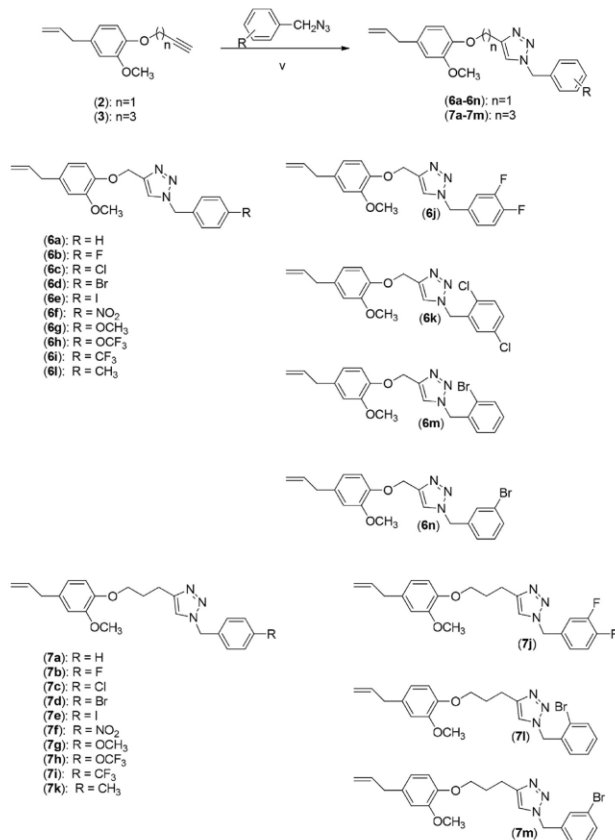
In conclusion, a series of compounds derived from eugenol and containing 1,2,3-triazolic portions were prepared in good yields and described for the first time. Among all the evaluated derivatives against *L. amazonensis*, compound 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7k**) showed significant antileishmanial activity and selectivity index superior to those of pentamidine and glucantime, while also having most physicochemical and pharmacokinetic properties within the ranges expected for orally available drugs. The results suggest that these compounds can be used as promising novel prototypes for drug development against leishmaniasis.

4. Material and methods

4.1. Extraction and purification of eugenol and synthesis of 1,2,3-triazole derivatives

4.1.1. Generalities

Solvents were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Benzyl alcohols, pent-4-yn-1-ol, methanesulfonyl chloride, sodium azide, triethylamine, propargyl bromide, geneticin and dimethyl sulfoxide hybri-max (DMSO) were purchased from Sigma Aldrich and used as received. M199 medium powder, fetal calf serum (HIFCS), penicillin, and streptomycin were procured from Cultilab. Eugenol (**1**) was extracted via hydrodistillation from cloves purchased in the local market in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil, and subsequently purified by column chromatography (*vide infra*). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 300 instrument at 300 MHz and 75 MHz, respectively, using CDCl₃ or C₆D₆ as solvents. NMR data are presented as follows: chemical shift (δ) in ppm, multiplicity, the number of protons, *J* values in Hertz (Hz), and proton assignment. Multiplicities are shown as the following abbreviations: s (singlet), brs (broad singlet), d (doublet), dd (double of a doublet), t (triplet), quartet, brd (broad doublet), ddt_{ap} (apparent doublet of doublets of triplets), q (quartet), quint (quintet), m (multiplet). IR spectra were obtained using Varian 660-IR equipped with GladiATR scanning from 4000 to 500 cm⁻¹. High-



Reagents and conditions: (v) Sodium ascorbate (40 mol%), CuSO₄·5H₂O (20 mol%), EtOH/H₂O (1:1 v/v)

Scheme 3. Click reactions involved in the preparation of eugenol triazolic derivatives.

resolution mass spectra were recorded on a Q-Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Germany). The spectra were acquired using the following conditions. Ionization source: Electron spray (+) and (-); Spray voltage: 3.5 kV; Capillary temperature: 275 °C; Sheath gas: 5 (arbitrary units); Auxiliary gas: 0 (arbitrary units). For the mass spectrometry analyses, the samples were prepared as follows: a mass of 1 mg of the compound to be analyzed was dissolved in 1 mL of acetonitrile. Then, the solution was diluted with 1 mL of methanol so that the final concentration corresponded to 1 ppm. The resulting solution was directly injected in the Q-Exactive equipment at 5 $\mu\text{mL min}^{-1}$. The spectra were recorded in full MS mode. Low-resolution mass spectra were recorded on Shimadzu GCMS-

QP5050A instrument under electron impact (70 eV) conditions of positive ion mode. Analytical thin layer chromatography analyses were conducted on aluminum backed precoated silica gel plates using different solvent systems. TLC plates were visualized using potassium permanganate solution, phosphomolybdic acid solution and/or UV light. Flash column chromatography was performed using silica gel 60 (60–230 mesh). Solvents were dried using standard procedures described in the literature [39].

4.1.2. Extraction and purification of eugenol (1)

Eugenol was extracted via hydrodistillation from dried flower buds of *Eugenia caryophyllata*, known as cloves, purchased in the

Table 1
Effect of eugenol derivatives **6a–6n** and **7a–7m** on promastigote form of *L. amazonensis*.

Compound	Promastigote IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)
6a	30.2 ± 1.5
6b	59.4 ± 1.7
6c	1780 ± 3
6d	993 ± 3
6e	2013 ± 3
6f	130.2 ± 2.1
6g	424.9 ± 2.6
6h	322.1 ± 2.5
6i	2013 ± 3
6j	969 ± 3
6k	49.2 ± 1.7
6l	106.2 ± 2.1
6m	159.6 ± 2.2
6n	155.8 ± 2.1
7a	37.9 ± 1.5
7b	32.2 ± 1.5
7c	817 ± 3
7d	286.7 ± 2.5
7e	278.9 ± 2.4
7f	173.3 ± 2.3
7g	119.5 ± 2.0
7h	145.9 ± 2.1
7i	295.2 ± 2.5
7j	177.5 ± 2.3
7k	7.4 ± 0.8
7l	913.3 ± 2.9
7m	980.2 ± 2.9
pentamidine	4.2 ± 0.3
amphotericin B	0.4 ± 0.1

local market in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. Thus, 60.0 g of cloves were mixed with 500 mL of distilled water in a round bottom flask which was connected to the hydrodistillation apparatus. The mixture was heated for three hours. The obtained hydrolate was transferred to a separatory funnel and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 × 30 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated, and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was submitted to column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (6:1 v/v). The described procedure afforded 7.12 g of eugenol (**1**) which corresponded to approximately 12% yield in relation to the initial mass of cloves used in the extraction process. The structure of eugenol (**1**) is in agreement with the following data.

Yellow oil, TLC: R_f = 0.44 (hexane-ethyl acetate 6:1 v/v). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.33 (d, 2H, J = 6.7 Hz), 3.88 (s, 3H), 5.02–5.13 (m, 2H), 5.54 (s, 1H, OH), 5.97 (dd_{ap}, 1H, J₁ = 16.8 Hz, J₂ = 10.2 Hz and J₃ = 6.7 Hz), 6.67–6.72 (m, 2H), 6.86 (d, 1H, J = 8.5 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 39.8, 55.8, 111.1, 114.2, 115.5, 121.1, 131.9, 137.8, 143.8, 146. MS, m/z (%) 164 ([M]⁺, C₁₀H₁₂O₂, 100); 149 (35); 131 (29); 103 (32); 91 (28); 77 (34); 65 (13); 55 (24); 41 (7).

Table 2
In vitro antileishmanial activity of **7k** against promastigotes, intracellular amastigotes of *L. amazonensis* after 72 h of treatment, and its cytotoxicity against macrophages.

Compound	Promastigotes IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Amastigotes ^a IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Macrophages ^b LD ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Selectivity index (SI) ^c
7k	7.4 ± 0.8	1.6 ± 0.2	211.9 ± 2.3	132.5
glucantime^e	nd ^d	45.5 ± 1.6	75.5 ± 2.6	1.6
pentamidine	4.2 ± 0.4	1.8 ± 0.2	8.5 ± 0.6	4.7

Arithmetic means ± SD (n = 3).

^a Intracellular amastigotes.

^b Murine peritoneal macrophages.

^c SI = LD₅₀/IC₅₀ intracellular amastigotes.

^d nd: not determined.

^e Glucantime [μg/ml].

4.1.3. Synthesis of 4-allyl-2-methoxy-1-(prop-2-yn-1-yloxy) benzene (**2**)

A 50 mL round bottom flask was charged with eugenol (**1**) (1.20 g, 7.32 mmol), sodium hydroxide (0.313 g, 7.83 mmol) and 25 mL of methanol. The resulting mixture was heated at 40 °C and magnetically stirred for 30 min. After this time, methanol was removed under reduced pressure and 10.0 mL of anhydrous ethanol was added to the removal of the residual water. The ethanol was removed under reduced pressure. Then, the round bottom flask, under a nitrogen atmosphere, was charged with anhydrous acetonitrile (25.0 mL) and propargyl bromide (800 μL, 8.79 mmol) was added slowly. The mixture was magnetically stirred at room temperature for 18 h. TLC analysis revealed the completion of the reaction after this time. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was partitioned between 25.0 mL of sodium hydroxide solution (0.1 mol L⁻¹) and 25 mL of diethyl ether. The layers were separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (2 × 25.0 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic layer was washed with brine (25.0 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (6:1 v/v). The described procedure afforded 1.29 g (6.37 mmol, 87% yield) of compound **2**. The structure of **2** is supported by the following data.

Yellow oil, TLC: R_f = 0.45 (hexane-ethyl acetate 6:1 v/v). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 2.49 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 3.35 (d, 2H, J = 6.7 Hz), 3.86 (s, 3H), 4.73 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 5.03–5.14 (m, 2H), 5.96 (dd_{ap}, 1H, J₁ = 16.8 Hz, J₂ = 10.2 Hz, J₃ = 6.7 Hz), 6.70–6.76 (m, 2H), 6.97 (d, 1H, J = 8.6 Hz). ¹H NMR (300 MHz, C₆D₆) δ: 1.99 (t, 1H, J = 2.4 Hz), 3.14 (d, 2H, J = 6.6 Hz), 3.31 (s, 3H), 4.36 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 4.93–5.02 (m, 2H), 5.85 (dd_{ap}, 1H, J₁ = 17.0 Hz, J₂ = 10.4 Hz and J₃ = 6.6 Hz), 6.52 (d, 1H, J = 1.7 Hz), 6.57 (dd, 1H, J₁ = 8.1 Hz and J₂ = 1.7 Hz), 6.83 (d, 1H, J = 8.1 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 39.8, 55.8, 56.9, 75.5, 78.7, 112.3, 114.6, 115.7, 120.3, 134.2, 137.4, 145.0, 149.6. MS, m/z (%) 202 ([M]⁺, C₁₃H₁₄O₂, 40), 163 (100), 135 (9), 103 (42), 91 (33), 77 (19), 65 (13), 55 (9), 41 (23).

4.1.4. Synthesis of pent-4-yn-1-yl methanesulfonate (**3**)

Pent-4-yn-1-ol (1.68 g, 20.0 mmol) and dichloromethane (20 mL) were added to a 100 mL round-bottom flask under nitrogen atmosphere. The mixture was cooled to -50 °C and triethylamine (5.60 mL, 40.0 mmol) was added. After that, methanesulfonyl chloride was added slowly (2.32 mL, 30.0 mmol) to the reaction mixture under continuous stirring. The progress of the reaction was monitored by TLC. After completion of it, 10 mL of distilled water were added. The organic phase was washed with 1% HCl solution (3 × 15 mL) followed by saturated aqueous NaHCO₃ (3 × 5 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3

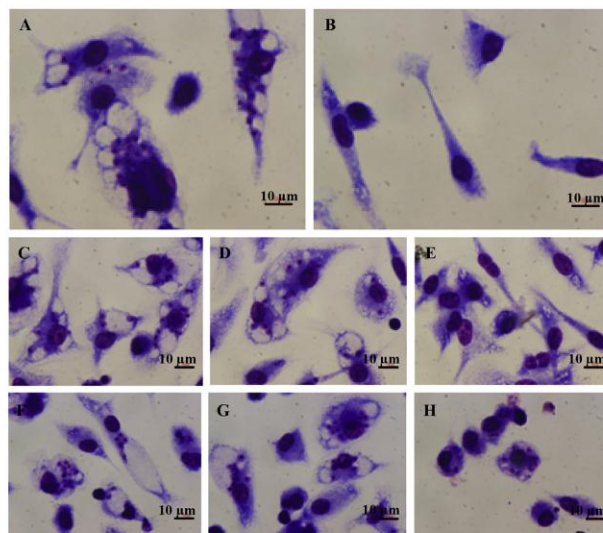


Fig. 3. Microphotographs of the *L. amazonensis*-infected macrophages treated with compound **7k**, glucantime and those without treatment. After 48 h of treatment, the slides were stained and parasites quantified by optical microscopy. (A) Negative control; (B) uninfected macrophages; (C) $1 \mu\text{mol L}^{-1}$, (D) $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ and (E) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ of **7k**; (F) $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2.73 \mu\text{mol L}^{-1}$), (G) $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($27.3 \mu\text{mol L}^{-1}$) and (H) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($273 \mu\text{mol L}^{-1}$) of glucantime.

Table 3

Calculated molecular properties for compounds most active against *Leishmania*. Estimated properties are considered relevant for drug-likeness according to the Lipinski's and Veber's rules.

Compound	Molecular weight (g/mol)	clogP	# H-bond donors	# H-bond acceptors	# Lipinski's rule violations	# of rotatable bonds	PSA (\AA^2)
Ideal values	≤ 500	≤ 5	≤ 5	≤ 10	≤ 1	≤ 10	≤ 75
6a	335.4	5.15	0	4	1	8	45.6
6b	353.4	5.39	0	4	1	8	45.6
6k	404.3	6.05	0	4	1	8	45.2
7a	363.5	5.95	0	4	1	10	46.0
7b	381.4	6.19	0	4	1	10	45.9
7k	377.5	6.28	0	4	1	10	46.1

Table 4

Additional predicted pharmacokinetic properties for compounds most active against *Leishmania*.

Compound	QPlogHERG ^a	QPPCaco (nm/s) ^b	QPPMDCK (nm/s) ^c	QPlogK _p ^d	#metab ^e
Range ^f or reference values	> -5	> 500	> 500	-8.0 to -1.0	1 to 8
6a	-6.8	3136	1701	-0.42	5
6b	-6.7	3147	3091	-0.55	5
6k	-6.6	3176	8274	-0.69	5
7a	-7.1	3474	1901	-0.16	5
7b	-7.0	3497	3464	-0.29	5
7k	-7.0	3490	1910	-0.35	6

^a Predicted logIC₅₀ for HERG K⁺ blockage.

^b Predicted apparent Caco-2 cell permeability for non-active transport.

^c Predicted apparent MDCK cell permeability for non-active transport.

^d Predicted skin permeability, log K_p.

^e Number of likely metabolic sites.

^f Range observed for 95% of known drugs.

v/v) to give compound **3** in 92% yield (3.00 g, 18.0 mmol).

Yellow oil, TLC: $R_f = 0.76$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v), $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.93 (quint, 2H, $J = 6.5$ Hz), 1.99 (t, 1H, $J = 2.7$ Hz), 2.33 (td, 2H, $J_1 = 6.8$ Hz and $J_2 = 2.7$ Hz), 3.00 (s, 3H, CH_3), 4.32 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz), $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.5, 27.6, 37.1 (CH_3), 68.2, 69.7, 82.0.

4.1.5. Data for 4-allyl-2-methoxy-1-(pent-4-yn-1-yloxy)benzene (**4**)

This compound was prepared using a similar procedure to that described for the preparation of compound **2**. In this case, the alkylating agent corresponded to compound **3**. Substance **4** was obtained in 78% yield (1.64 g, 7.13 mmol) after purification by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (6:1 v/v). The structure of **4** is supported by the following data.

Yellow oil, TLC: $R_f = 0.55$ (hexane-ethyl acetate 6:1 v/v), $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.97 (t, 1H, $J = 2.6$ Hz), 2.04 (quint, 2H, $J = 6.6$ Hz), 2.42 (td, 2H, $J_1 = 7.0$ Hz and $J_2 = 2.6$ Hz), 3.34 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.85 (s, 3H), 4.10 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.03–5.13 (m, 2H), 5.97 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.68–6.75 (m, 2H), 6.85 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 15.2, 28.2, 39.8, 55.9, 67.5, 68.8, 83.6, 112.4, 113.6, 115.6, 120.5, 133.0, 137.6, 146.7, 149.5. MS, m/z (%) 230 ($[\text{M}]^+$, $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$, 100), 164 (68), 149 (44), 131 (29), 121 (16), 103 (34), 91 (31), 77 (23), 65 (16), 55 (15), 41 (34).

4.1.6. General procedure for the preparation of compounds **6a–6n** and **7a–7m** exemplified by the synthesis of compound 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-benzyl-1H-1,2,3-triazole (**6a**)

A 10 mL round bottom flask was charged with 4-allyl-2-methoxy-1-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (**2**) (0.150 g, 0.740 mmol), benzyl azide (0.0990 g; 0.740 mmol), sodium ascorbate (0.0590 g, 0.300 mmol), 1.00 mL of ethanol and 1.00 mL of distilled water. Then, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0370 g, 0.150 mmol) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature. After completion of the reaction as noticed by TLC analysis, the mixture was extracted with dichloromethane (3 \times 10.0 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic layer was washed with aqueous sodium carbonate saturated solution, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v). Compound **6a** was obtained in 91% yield (0.228 g, 0.680 mmol). The structure of **6a** is supported by the following data.

White solid, m.p. 90.5–91.3 °C, TLC: $R_f = 0.49$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3086, 3034, 2999, 2929, 2912, 1589, 1511, 1446, 1259, 1229, 1143, 1016, 921, 831, 713, 696. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.50 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.71 (m, 2H), 6.94 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.21–7.40 (m, 5H), 7.54 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 54.1, 55.7, 63.5, 112.2, 114.6, 115.7, 120.4, 122.7, 128.1, 128.7, 129.0, 133.8, 134.4, 137.4, 144.8, 145.8, 149.5. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2$, 336.17120; found: 336.17020. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{NaO}_2$, 358.15315; found: 358.15164.

Compounds **6b–6n** and **7a–7m** were prepared using a procedure similar to that described for the synthesis of **6a**. The structures of these compounds were confirmed by NMR (^1H and ^{13}C), IR, and HRMS analyses. Information regarding the reactions involved in the preparation of the aforementioned compounds and data that support their structures are described below.

4.1.6.1. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6b**). White solid, obtained in 87% yield (0.218 g, 0.620 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.143 g, 0.710 mmol), 4-fluorobenzyl azide (0.107 g, 0.710 mmol), sodium ascorbate (0.0560 g, 0.280 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0350 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 92.1–92.7 °C, TLC: $R_f = 0.39$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3069, 3005, 2935, 2914, 1588, 1511, 1259, 1223, 1143, 1017, 905, 771. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.5$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.67–6.70 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.04 (t_{ap}, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.20–7.30 (m, 2H), 7.54 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.4, 55.7, 63.4, 112.2, 114.5, 115.7, 116.1 (d, $J = 21.8$ Hz), 120.4, 122.6, 129.9 (d, $J = 8.3$ Hz), 130.3 (d, $J = 3.0$ Hz), 133.8, 137.4, 145.0, 145.8, 149.5, 162.8 (d, $J = 246.0$ Hz). HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{FN}_3\text{O}_2$, 354.16178; found: 354.16077. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{NaO}_2$, 376.14372; found: 376.14240.

4.1.6.2. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6c**). White solid, obtained in 84% yield (0.210 g, 0.570 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.137 g, 0.680 mmol), 4-chlorobenzyl azide (0.1114 g, 0.680 mmol), sodium ascorbate (0.0540 g, 0.270 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0340 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 112.3–112.6 °C, TLC: $R_f = 0.37$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3001, 2936, 2915, 1588, 1513, 1943, 1258, 1228, 1143, 1016, 907, 803, 722, 693, 592. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.18 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.33 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.54 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 53.4, 55.7, 63.4, 112.2, 114.6, 115.7, 120.4, 122.7, 129.2, 129.3, 132.9, 133.9, 134.7, 137.4, 145.0, 145.8, 149.5. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{ClN}_3\text{O}_2$, 370.13223; found: 370.13132. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{NaO}_2$, 392.11417; found: 392.11285.

4.1.6.3. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6d**). White solid, obtained in 80% yield (0.216 g, 0.520 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.132 g, 0.650 mmol), 4-bromobenzyl azide (0.138 g, 0.650 mmol), sodium ascorbate (0.0510 g, 0.260 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0330 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 119.1–120.2 °C, TLC: $R_f = 0.59$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3001, 2935, 2915, 1588, 1513, 1385, 1258, 1229, 1144, 1015, 803, 738, 592, 488. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.1$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.92 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.11 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.48 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.54 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 53.4, 55.7, 63.4, 112.2, 114.6, 115.7, 120.4, 122.7, 122.8, 129.6, 132.2, 133.4, 133.9, 137.4, 145.1, 145.7, 149.5. HRMS ($\text{M} + \text{H}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 414.08171; found: 414.08072. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 436.06366; found: 436.06058.

4.1.6.4. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6e**). White solid, obtained in 87% yield (0.200 g, 0.430 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.101 g, 0.500 mmol), 4-iodobenzyl azide (0.130 g, 0.500 mmol), sodium ascorbate (0.0400 g, 0.200 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0250 g, 0.100 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl

acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 129.2–131.1 °C, (3:1:3 v/v), TLC: $R_f = 0.37$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v), IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3124, 3063, 2932, 1587, 1512, 1486, 1385, 1258, 1228, 1143, 1017, 1008, 911, 801, 769, 592, 485. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.82 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.5$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.92 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.98 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.54 (s, 1H), 7.69 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 53.5, 55.7, 63.4, 94.5, 112.2, 114.6, 115.7, 120.4, 122.7, 129.8, 133.9, 134.1, 137.4, 138.2, 145.1, 145.8, 149.5. HRMS (M + H⁺): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$, 462.06784; found: 462.06711. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{NaO}_2$, 484.04979; found: 484.04898.

4.1.6.5. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (6f). White solid, obtained in 89% yield (0.223 g, 0.590 mmol) from the reaction of alkyne 2 (0.133 g, 0.660 mmol), 4-nitrobenzyl azide (0.118 g, 0.660 mmol), sodium ascorbate (0.0520 g, 0.260 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0330 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 120.9–121.9 °C, TLC: $R_f = 0.14$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v), IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3063, 3005, 2950, 2917, 1591, 1516, 1350, 1258, 1230, 1140, 1019, 835, 720. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.01–5.12 (m, 2H), 5.25 (s, 2H), 5.62 (s, 2H), 5.93 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.92 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.37 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.63 (s, 1H), 8.20 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.0, 55.7, 63.3, 112.3, 114.5, 115.7, 120.4, 123.0, 124.2, 128.5, 134.0, 137.4, 141.5, 145.4, 145.7, 148.0, 149.5. HRMS (M + H⁺): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_4$, 381.15628; found: 381.15533. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{NaO}_4$, 403.13822; found: 403.13715.

4.1.6.6. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole (6g). White solid, obtained in 80% yield (0.200 g, 0.550 mmol) from the reaction of alkyne 2 (0.138 g, 0.680 mmol), 4-methoxybenzyl azide (0.110 g, 0.680 mmol), sodium ascorbate (0.0540 g, 0.270 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0340 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 92.4–93.1 °C, TLC: $R_f = 0.36$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v), IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3068, 3005, 2936, 2832, 1613, 1587, 1512, 1463, 1251, 1227, 1142, 1016, 903, 805, 774, 702, 548. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.31 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.80 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 5.01–5.12 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.88 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 6.94 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.21 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.51 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 53.7, 55.3, 55.7, 63.5, 112.2, 114.4, 114.5, 115.6, 120.4, 122.5, 126.4, 129.7, 133.7, 137.4, 144.7, 145.9, 149.5, 159.9. HRMS (M + H⁺): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3$, 366.18177; found: 366.18069. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{NaO}_3$, 388.16371; found: 388.16229.

4.1.6.7. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-(trifluoromethoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole (6h). White solid, obtained in 85% yield (0.213 g, 0.510 mmol) from the reaction of alkyne 2 (0.121 g, 0.600 mmol), 4-trifluoromethoxybenzyl azide (0.130 g, 0.600 mmol), sodium ascorbate (0.0480 g, 0.240 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0300 g, 0.120 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 126.4–127.3 °C, TLC: $R_f = 0.49$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v), IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3004, 2978, 2941, 1589, 1510, 1467, 1387, 1256, 1218, 1142, 1017, 915, 804. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.51 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H,

$J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.20 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.28 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.57 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.2, 55.8, 63.4, 112.2, 114.5, 115.8, 120.3 (q, $J = 256.3$ Hz, OCF_3), 120.4, 121.5, 122.7, 129.5, 133.2, 133.9, 137.4, 145.1, 145.8, 149.3–149.2 (m), 149.5. HRMS (M + H⁺): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$, 420.15350; found: 420.15250. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_3$, 442.13545; found: 442.13422.

4.1.6.8. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazole (6i). White solid, obtained in 84% yield (0.210 g, 0.520 mmol) from the reaction of alkyne 2 (0.125 g, 0.620 mmol), 4-trifluoromethylbenzyl azide (0.125 g, 0.620 mmol), sodium ascorbate (0.0490 g, 0.250 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0310 g, 0.120 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 142.7–143.0 °C, TLC: $R_f = 0.43$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v), IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3060, 3003, 2977, 2944, 1589, 1515, 1422, 1328, 1229, 1142, 1117, 1017, 913, 799, 624. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.02–5.12 (m, 2H), 5.25 (s, 2H), 5.57 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.34 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.58 (brs, 1H), 7.61 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.4, 55.8, 63.4, 112.2, 114.6, 115.7, 120.4, 122.8, 123.7 (q, $J = 270.8$ Hz, CF_3), 126.0 (q, $J = 3.8$ Hz), 128.1, 131.0 (q, $J = 32.5$ Hz), 133.9, 137.4, 138.4, 145.2, 145.7, 149.5. Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$, 404.15859; found: 404.15771. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_2$, 426.14053; found: 426.13928.

4.1.6.9. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(3,4-difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (6j). White solid, obtained in 78% yield (0.195 g, 0.530 mmol) from the reaction of alkyne 2 (0.136 g, 0.670 mmol), 3,4-difluorobenzyl azide (0.113 g, 0.670 mmol), sodium ascorbate (0.0530 g, 0.270 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0340 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 104.9–105.2 °C, TLC: $R_f = 0.30$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v), IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3003, 2939, 2915, 1589, 1516, 1447, 1287, 1259, 1213, 1142, 1018, 835, 756, 575. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 5.01–5.12 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.3$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.92 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.97–7.19 (m, 3H), 7.57 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.0 (brd, $J = 1.0$ Hz), 55.7, 63.4, 112.2, 114.6, 115.7, 117.2 (d, $J = 18.0$ Hz), 117.9 (d, $J = 18.0$ Hz), 120.4, 122.7, 124.2 (dd, $J_1 = 6.8$ Hz and $J_2 = 3.8$ Hz), 131.4–131.5 (m), 133.9, 137.4, 145.2, 145.6, 149.5, 148.7–148.9 (m), 152.0–152.2 (m). Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$, 372.15236; found: 372.15137. HRMS (M + Na⁺): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{F}_2\text{N}_3\text{NaO}_2$, 394.13430; found: 394.13312.

4.1.6.10. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(2,5-dichlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (6k). White solid, obtained in 81% yield (0.203 g, 0.500 mmol) from the reaction of alkyne 2 (0.125 g, 0.620 mmol), 2,5-dichlorobenzyl azide (0.125 g, 0.620 mmol), sodium ascorbate (0.0490 g, 0.250 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0310 g, 0.120 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 87.9–88.4 °C, TLC: $R_f = 0.59$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v), IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3143, 3008, 2962, 2871, 1587, 1508, 1460, 1391, 1256, 1213, 1137, 1030, 1003, 905, 821, 797, 645, 560. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.83 (s, 3H), 5.01–5.12 (m, 2H), 5.23 (s, 2H), 5.60 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 9.9$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.68–6.71 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.12 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz), 7.27 (dd, 1H,

$J_1 = 8.6$ Hz and $J_2 = 2.3$ Hz), 7.35 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.67 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 50.9, 55.8, 63.5, 112.3, 114.7, 115.7, 120.5, 123.1, 130.0, 130.2, 130.9, 131.5, 133.5, 133.97, 133.99, 137.4, 145.1, 145.7, 149.5. Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$, 404.09326; found: 404.09232. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{NaO}_2$, 426.07520; found: 426.07388.

4.1.6.11. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6l**). White solid, obtained in 82% yield (0.205 g, 0.590 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.145 g, 0.720 mmol), 4-methylbenzyl azide (0.106 g, 0.720 mmol), sodium ascorbate (0.0570 g, 0.290 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0360 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 81.4–82.3 °C. TLC: $R_f = 0.66$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3064, 3003, 2917, 1588, 1513, 1446, 1257, 1229, 1142, 1017, 907, 803, 756. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.34 (s, 3H, CH_3), 3.32 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.81 (s, 3H), 5.01–5.12 (m, 2H), 5.22 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.15 (s, 4H), 7.52 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 21.1 (CH_3), 39.8, 53.9, 55.7, 63.5, 112.2, 114.6, 115.6, 120.4, 122.6, 128.1, 129.7, 131.4, 133.8, 137.5, 138.6, 144.7, 145.9, 149.5. Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$, 350.18685; found: 350.18582. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{NaO}_2$, 372.16880; found: 372.16776.

4.1.6.12. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6m**). White solid, obtained in 77% yield (0.208 g, 0.500 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.132 g, 0.650 mmol), 2-bromobenzyl azide (0.138 g, 0.650 mmol), sodium ascorbate (0.0510 g, 0.260 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0330 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 67.5–68.6 °C. TLC: $R_f = 0.70$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3141, 3079, 3003, 2944, 2873, 1587, 1509, 1421, 1389, 1254, 1213, 1134, 1050, 1026, 1000, 920, 759, 649, 596. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.82 (s, 3H), 5.00–5.11 (m, 2H), 5.25 (s, 2H), 5.64 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.95 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.12 (dd, 1H, $J_1 = 7.4$ Hz and $J_2 = 1.7$ Hz), 7.17–7.33 (m, 2H), 7.60 (dd, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz and $J_2 = 1.2$ Hz), 7.66 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.7, 53.7, 55.7, 63.5, 112.2, 114.7, 115.6, 120.4, 123.1, 123.4, 128.1, 130.30, 130.33, 133.1, 133.8, 134.0, 137.4, 144.7, 145.7, 149.5. Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 414.08171; found: 414.08096. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 436.06366; found: 436.06290.

4.1.6.13. 4-((4-Allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(3-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**6n**). White solid, obtained in 79% yield (0.213 g, 0.520 mmol) from the reaction of alkyne **2** (0.132 g, 0.650 mmol), 3-bromobenzyl azide (0.138 g, 0.650 mmol), sodium ascorbate (0.0510 g, 0.260 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0330 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 97.5–97.9 °C. TLC: $R_f = 0.70$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3065, 3011, 2936, 1588, 1512, 1463, 1387, 1226, 1142, 1017, 835, 735, 692, 665. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.32 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.82 (s, 3H), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 5.94 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.9$ Hz, $J_2 = 10.8$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.93 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), [7.13–7.26 (m), 7.40 (brs), 7.48 (d_{ap}, $J = 7.7$ Hz), 4H], 7.57 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 39.8, 53.3, 55.7, 63.4, 112.2, 114.6, 115.7, 120.5, 122.7, 123.0, 126.6, 130.6, 131.0, 131.9, 133.9, 136.6, 137.4, 145.1, 145.8, 149.5. Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 414.08171; found: 414.08069. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 436.06366; found: 436.06265.

4.1.6.14. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-benzyl-1H-1,2,3-triazole (**7a**). White solid, obtained in 79% yield (0.198 g, 0.540 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.158 g, 0.690 mmol), benzyl azide (0.0920 g, 0.690 mmol), sodium ascorbate (0.0550 g, 0.280 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0350 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 71.4–72.6 °C. TLC: $R_f = 0.16$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3059, 3007, 2958, 2830, 2876, 1588, 1513, 1461, 1332, 1260, 1230, 1140, 1026, 915, 799, 709, 663. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.17 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.90 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.01–5.11 (m, 2H), 5.48 (s, 2H), 5.95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.22–7.37 (m, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.9, 55.8, 68.1, 112.3, 113.4, 115.5, 120.4, 120.9, 127.9, 128.5, 129.0, 132.9, 134.8, 137.6, 146.6, 147.7, 149.3. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$, 364.20250; found: 364.20148. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{NaO}_2$, 386.18445; found: 386.18341.

4.1.6.15. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7b**). White solid, obtained in 86% yield (0.215 g, 0.560 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.151 g, 0.660 mmol), 4-fluorobenzyl azide (0.100 g, 0.660 mmol), sodium ascorbate (0.0520 g, 0.260 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0330 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 96.4–96.8 °C. TLC: $R_f = 0.21$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3061, 3008, 2951, 1587, 1511, 1455, 1260, 1222, 1140, 1015, 905, 798, 772, 654. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.17 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.90 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.8$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.03 (t, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.16–7.30 (m, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.2, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 116.0 (d, $J = 21.8$ Hz), 120.4, 120.8, 129.7 (d, $J = 8.3$ Hz), 130.7 (d, $J = 3.0$ Hz), 132.9, 137.6, 146.6, 147.8, 149.3, 162.7 (d, $J = 246.8$ Hz). Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{FN}_3\text{O}_2$, 382.19308; found: 382.19211. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{NaO}_2$, 404.17502; found: 404.17404.

4.1.6.16. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7c**). White solid, obtained in 87% yield (0.218 g, 0.550 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.145 g, 0.630 mmol), 4-chlorobenzyl azide (0.106 g, 0.630 mmol), sodium ascorbate (0.0480 g, 0.250 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0320 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 81.8–82.2 °C. TLC: $R_f = 0.46$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3063, 3000, 2937, 2856, 1589, 1514, 1446, 1259, 1227, 1140, 1015, 909, 799, 776, 739, 641. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.17 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.90 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.00–5.11 (m, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.95 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.16 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 7.24 (s, 1H), 7.32 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.2, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 120.4, 120.9, 129.2, 132.9, 133.3, 134.6, 137.6, 146.6, 147.9, 149.3. Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{ClN}_3\text{O}_2$, 398.16353; found: 398.16272. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{NaO}_2$, 420.14547; found: 420.14474.

4.1.6.17. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7d**). White solid, obtained in 84%

yield (0.210 g, 0.480 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.130 g, 0.570 mmol), 4-bromobenzyl azide (0.120 g, 0.570 mmol), sodium ascorbate (0.0450 g, 0.230 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0290 g, 0.110 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 89.4–90.3 °C, TLC: $R_f = 0.46$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3063, 2999, 2950, 1588, 1514, 1459, 1420, 1260, 1227, 1141, 1013, 908, 797, 733, 489. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.17 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.90 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.03–5.13 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.95 (dd_{tap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.10 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.24 (s, 1H), 7.47 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.2, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 120.4, 120.9, 122.7, 129.5, 132.2, 133.0, 133.9, 137.6, 146.6, 147.9, 149.4. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 442.11301; found: 442.11227 HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 464.09496; found: 464.09402.

4.1.6.18. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7e**). White solid, obtained in 91% yield (0.246 g, 0.500 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.127 g, 0.550 mmol), 4-iodobenzyl azide (0.143 g, 0.550 mmol), sodium ascorbate (0.0440 g, 0.202 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0280 g, 0.110 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 98.3–99.2 °C, TLC: $R_f = 0.45$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3062, 2999, 2951, 1588, 1513, 1461, 1419, 1260, 1227, 1140, 1009, 910, 797, 731, 655, 484. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.17 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.90 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.33 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.00–5.12 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.95 (dd_{tap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.96 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 7.24 (s, 1H), 7.68 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.3, 55.8, 68.0, 94.3, 112.3, 113.4, 115.6, 120.4, 120.9, 129.6, 132.9, 134.5, 137.6, 138.1, 146.6, 147.9, 149.3. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{IIN}_3\text{O}_2$, 490.09915; found: 490.09836 HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{IN}_3\text{NaO}_2$, 512.08109; found: 512.08038.

4.1.6.19. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7f**). White solid, obtained in 82% yield (0.205 g, 0.500 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.141 g, 0.610 mmol), 4-nitrobenzyl azide (0.109 g, 0.610 mmol), sodium ascorbate (0.0480 g, 0.240 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0310 g, 0.120 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 79.7–80.4 °C, TLC: $R_f = 0.29$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3062, 2949, 2911, 1590, 1518, 1465, 1348, 1227, 1139, 1014, 907, 849, 798, 713, 592. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.19 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.94 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.31 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.00–5.12 (m, 2H), 5.59 (s, 2H), 5.94 (dd_{tap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.31–7.38 (m, 3H), 8.19 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.6, 39.7, 52.9, 55.8, 68.0, 112.4, 113.4, 115.6, 120.4, 121.3, 124.2, 128.4, 133.0, 137.5, 141.9, 146.6, 147.9, 148.3, 149.3. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4$, 409.18758; found: 409.18677. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{NaO}_4$, 431.16952; found: 431.16867.

4.1.6.20. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7g**). White solid, obtained in 83% yield (0.224 g, 0.570 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.158 g, 0.690 mmol), 4-methoxybenzyl azide (0.113 g, 0.690 mmol), sodium ascorbate (0.0550 g, 0.280 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0350 g,

0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 88.9–90.4 °C, TLC: $R_f = 0.22$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3114, 3062, 3005, 2951, 2868, 1587, 1512, 1455, 1295, 1251, 1227, 1131, 1032, 1015, 917, 801, 749, 652. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.16 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.88 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.80 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.00–5.11 (m, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.95 (dd_{tap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 9.9$ Hz and $J_3 = 6.6$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.87 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.15–7.23 (m, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.5, 55.3, 55.8, 68.1, 112.3, 113.4, 114.4, 115.5, 120.4, 120.6, 126.8, 129.5, 132.9, 137.6, 146.6, 147.6, 149.3, 159.8. Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_3$, 394.21307; found: 394.21225. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_3$, 416.19501; found: 416.19415.

4.1.6.21. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7h**). White solid, obtained in 84% yield (0.210 g, 0.470 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.129 g, 0.560 mmol), trifluoromethylbenzyl azide (0.129 g, 0.560 mmol), sodium ascorbate (0.0440 g, 0.220 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0280 g, 0.110 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 93.4–94.9 °C, TLC: $R_f = 0.49$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3118, 3063, 2949, 2878, 1590, 1511, 1454, 1259, 1225, 1138, 1034, 1014, 911, 800, 743, 652. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.18 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.91 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.01–5.13 (m, 2H), 5.48 (s, 2H), 5.95 (dd_{tap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.19 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz), 7.23–7.31 (m, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.0, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 120.3 (q, $J = 257.0$ Hz, OCF_3), 120.4, 121.0, 121.4, 129.3, 133.0, 133.6, 137.6, 146.6, 148.0, 149.2–149.3 (m), 149.4. Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$, 448.18480; found: 448.18399 HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_3$, 470.16675; found: 470.16602.

4.1.6.22. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7i**). White solid, obtained in 92% yield (0.230 g, 0.530 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.133 g, 0.580 mmol), trifluoromethylbenzyl azide (0.117 g, 0.580 mmol), sodium ascorbate (0.0460 g, 0.230 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0290 g, 0.120 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 111.3–112.5 °C, TLC: $R_f = 0.50$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3062, 2947, 2910, 1589, 1516, 1466, 1421, 1328, 1263, 1224, 1142, 1116, 1014, 908, 798, 740, 669. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.19 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.92 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.02 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.54 (s, 2H), 5.94 (dd_{tap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.74$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.28 (s, 1H), 7.32 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 7.61 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.8, 39.7, 53.2, 55.9, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 120.4, 121.1, 123.8 (q, $J = 270.8$ Hz, CF_3), 126.0 (q, $J = 3.8$ Hz), 128.0, 130.9 (q, $J = 32.5$ Hz), 133.0, 137.6, 138.8, 146.7, 148.1, 149.4. Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$, 432.18989; found: 443.18903. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_2$, 454.17183; found: 454.17093.

4.1.6.23. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(3,4-difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (**7j**). White solid, obtained in 90% yield (0.225 g, 0.560 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.144 g, 0.630 mmol), 3,4-difluorobenzyl azide (0.107 g, 0.630 mmol), sodium ascorbate (0.0500 g, 0.250 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0320 g, 0.130 mmol). Purified by column chromatography eluted with

hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 97.1–97.8 °C, TLC: $R_f = 0.41$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3061, 2949, 1588, 1515, 1454, 1261, 1288, 1228, 1141, 1017, 915, 754. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.18 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.92 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.00–5.12 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.95 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.71 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 6.92–7.20 (m, 3H), 7.27 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 52.5, 55.9 (brd, $J = 8.3$ Hz), 68.0, 112.5, 113.4, 115.6, 117.0 (d, $J = 17.3$ Hz), 117.9 (d, $J = 17.3$ Hz), 120.4, 120.9, 124.0 (dd, $J_1 = 6.8$ Hz and $J_2 = 3.8$ Hz), 131.8–131.9 (m), 133.0, 137.5, 146.5, 148.1, 149.3, [148.6–148.9 (m), 151.9–152.2 (m)]. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2$, 400.18366; found: 400.18274. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{F}_2\text{N}_3\text{NaO}_2$, 422.16560; found: 422.16473.

4.1.6.24. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazole (7k). White solid, obtained in 80% yield (0.216 g, 0.570 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.165 g, 0.720 mmol), 4-methylbenzyl azide (0.106 g, 0.720 mmol), sodium ascorbate (0.0570 g, 0.290 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0360 g, 0.140 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 59.6–60.9 °C, TLC: $R_f = 0.42$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 3061, 2953, 2916, 2880, 1588, 1514, 1449, 1420, 1260, 1228, 1140, 1014, 904, 845, 799, 75, 720, 650. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.16 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.34 (s, 3H, CH_3), 2.88 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.81 (s, 3H), 4.01 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.95 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.77 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 7.10–7.18 (m, 4H), 7.21 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 21.0 (CH_3), 22.1, 28.7, 39.7, 53.7, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.5, 120.4, 120.7, 127.9, 129.6, 131.7, 132.8, 137.5, 138.4, 146.6, 147.6, 149.3. Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$, 378.21815; found: 378.21719. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_2$, 400.20010; found: 400.19922.

4.1.6.25. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (7l). White solid, obtained in 79% yield (0.198 g, 0.450 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.130 g, 0.570 mmol), 2-bromobenzyl azide (0.120 g, 0.570 mmol), sodium ascorbate (0.0450 g, 0.230 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0290 g, 0.110 mmol). Purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 47.8–49.1 °C, TLC: $R_f = 0.61$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3104, 3054, 2931, 1587, 1511, 1467, 1419, 1230, 1135, 1027, 948, 804, 744, 653. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.19 (quint, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.92 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.02 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.61 (s, 2H), 5.95 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.78 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.08 (dd, 1H, $J_1 = 7.5$ Hz and $J_2 = 1.6$ Hz), 7.15–7.31 (m, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.59 (dd, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz and $J_2 = 1.1$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.6, 55.8, 68.1, 112.3, 113.4, 115.5, 120.3, 121.3, 123.2, 128.1, 130.1, 130.2, 132.9, 133.1, 134.4, 137.6, 146.6, 147.7, 149.3. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 442.11301; found: 442.11197. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 464.09496; found: 464.09390.

4.1.6.26. 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(3-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (7m). White solid, obtained in 81% yield (0.203 g, 0.460 mmol) from the reaction of alkyne **3** (0.130 g, 0.570 mmol), 3-bromobenzyl azide (0.120 g, 0.570 mmol), sodium ascorbate (0.0450 g, 0.230 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0290 g, 0.110 mmol). Purified by column chromatography eluted with

hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), m.p. 65.9–67.1 °C, TLC: $R_f = 0.32$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3110, 3062, 2949, 2881, 1589, 1514, 1462, 1260, 1227, 1140, 1013, 798, 726, 689, 586. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.18 (quint, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.91 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.02 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 5.00–5.13 (m, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.94 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 10.2$ Hz and $J_3 = 6.7$ Hz), 6.65–6.73 (m, 2H), 6.78 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), [7.10–7.30 (m), 7.38 (brs), 7.46 (d_{ap}), $J = 7.8$ Hz, 5H]. $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 22.1, 28.7, 39.7, 53.1, 55.8, 68.0, 112.3, 113.4, 115.6, 120.4, 121.0, 123.0, 126.4, 130.6, 130.8, 131.7, 132.9, 137.1, 137.6, 146.6, 148.0, 149.3. Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{BrN}_3\text{O}_2$, 442.11301; found: 442.11218. HRMS ($\text{M} + \text{Na}^+$): Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{NaO}_2$, 464.09496; found: 464.09412.

4.2. Leishmanicidal assays

4.2.1. Parasites

Promastigotes of *L. amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) transfected with the gene of green fluorescent protein (GFP) were cultured in M199 medium, supplemented with 50 IU/ml of penicillin, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of streptomycin and 10% (v/v) of heat-inactivated fetal calf serum and 2% of human urine at 26 °C. Promastigotes were periodically cultured in 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of geneticin (G418) for bright green fluorescence selection [40].

4.2.2. Antipromastigote assay

For evaluation of anti promastigote activity, fluorescent promastigotes were plated in triplicate at 5×10^5 parasites/well with varying concentrations of the tested compounds (0, 0.1, 1, 10, and 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in a final volume of 200 μL of medium M199 containing 5% HIFCS. It is important to mention that the compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the final concentration of DMSO was $\leq 1\%$ in all treated variables. After 72 h at 27 °C, the fluorescence intensity of the cultures was measured using a plate-reader fluorometer (Fluoroskan) set at 435 nm excitation/538 nm emissions. All treatments were performed in triplicate, and the results were expressed as percent inhibition in relation to control treatment in medium alone.

4.2.3. Antiamastigote assay

For antiamastigote activity, mouse peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavities of BALB/c mice in ice-cold DMEM medium (Sigma). The cells were plated at $2 \times 10^6/\text{mL}$ in Lab-Tek 8-chamber slides (Nunc, Naperville, Ill.) and incubated at 37 °C and 4% CO_2 for 1 h. No adherent cells were removed by washing with pre warmed phosphate-buffered saline (PBS). Adherent macrophages were infected with *L. amazonensis* promastigotes (stationary growth phase) at a 5:1 parasite/macrophage ratio and incubated for 1 h at 35 °C and 5% CO_2 . After 4 h, the chambers were washed three times with pre warmed PBS to remove free parasites. The monolayers were incubated with compound **7k** up to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for 72 h at 37 °C and 5% CO_2 . The reference drugs pentamidine (Sigma-Aldrich) and glucantime (Sanofi-aventis) were used at concentrations varying from 0.1 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 0.1 to 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The anti amastigote activity was evaluated microscopically after staining the chambers with the Instant ProV hematological dye system (Newprov, Curitiba, Brazil); at least 200 macrophages were counted per sample. The results are expressed as the infection index (IF) using the following equation: $\text{IF} = \% \text{ infected cells} \times \text{number of amastigotes/total macrophages}$. The calculation of the IC_{50} was performed by logarithmic regression, and the statistical analysis was performed using Student's *t*-test in GraphPad Prism 5.0 software.

4.2.4. Cytotoxicity evaluation against macrophages

The release of the cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) into the culture medium was measured using an assay kit (Doles Reagents, Brazil) and a plate-reader spectrometer (SpectraMax M5) at 340 nm. Maximum and minimum release values were obtained with cells cultured with 2% Triton X-100 or medium, respectively. LDH release was expressed as percent of the positive control. The IC_{50} values were calculated by linear regression analysis. Data were analyzed using Student's t-test when comparing two groups or one-way ANOVA for more than two groups followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test, using the GraphPad Program; p-values less than 0.05 were considered statistically significant.

4.3. Calculation of physicochemical and pharmacokinetic properties

2D representations of eugenol derivatives were drawn in the Maestro interface [41]. Ligands were then prepared with the Lig-Prep software, and relevant protonation states at pH 7.0 were calculated with Epik. Forty-four physicochemical and pharmacokinetic properties were calculated by the normal mode of QikProp [35].

Acknowledgements

This work was supported by the National Program for Academic Cooperation (PROCAD) of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-CAPES/Brazil, and by the agencies CNPq and FAPEMIG (Grant APQ-02957-17).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.046>.

References

- [1] J. Alvar, I.D. Vélez, C. Berni, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer, Leishmaniasis worldwide and global estimates, *PLoS One* 7 (2012), e35671.
- [2] WHO, Leishmaniasis, Fact Sheet No. 375, WHO, Geneva, Switzerland, 2015. Available online, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. (Accessed 15 February 2016).
- [3] S. Sundar, J. Chakravarty, Investigational drugs for visceral leishmaniasis, *Expert Opin. Invest. Drugs* 24 (2015) 43–59.
- [4] R.F. de Souza, Y.L. dos Santos, R.V. de Souza, L. Borges-Pereira, I.S. Caldas, M.R. de Almeida, M.T. Bahia, J.L. Fietto, Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis, *Acta Trop.* 125 (2013) 60–66.
- [5] M. Gramiccia, L. Gradoni, The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control, *Int. J. Parasitol.* 35 (2005) 1169–1180.
- [6] F. Frézard, C. Demicheli, R.R. Ribeiro, Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs, *Molecules* 14 (2009) 2317–2336.
- [7] M.F. García Bustos, A. Barrio, G.G. Prieto, E.M. de Raspi, R.O. Cimino, R.M. Cardozo, L.A. Parada, M. Yeo, J. Soto, D.A. Uncos, C. Parodi, M.A. Basombrio, In vivo antileishmanial efficacy of miltefosine against *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*, *J. Parasitol.* 100 (2014) 840–847.
- [8] S.L. Croft, S. Sundar, A.H. Fairlamb, Drug resistance in leishmaniasis, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 111–126.
- [9] S.L. Croft, G.H. Coombs, Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs, *Trends Parasitol.* 19 (2003) 502–508.
- [10] M. Ouellette, J. Drummelsmith, B. Papadopolou, Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments, *Drug Resist. Updates* 7 (2004) 257–266.
- [11] L. Monzote, Current treatment of leishmaniasis: a review, *Open Antimicrob. Agents J.* 1 (2009) 9–19.
- [12] B.S. McWire, A.R. Satskar, Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment, *QJM* 107 (2014) 7–14.
- [13] B. Schmidt, D.M. Ribnick, A. Poulev, S. Logendra, W.T. Cefalu, I. Raskin, A natural history of botanical therapeutics, *Metabolism* 57 (2008) 53–59.
- [14] A.L. Harvey, Natural products in drug discovery, *Drug Discov. Today* 13 (2008) 894–901.
- [15] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2014, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 629–661.
- [16] V.P. Gullo, J. McAlpine, K.S. Lam, D. Baker, F. Petersen, Drug discovery from natural products, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33 (2006) 523–531.
- [17] D.A. Dias, S. Urban, U. Roessner, A historical overview of natural products in drug discovery, *Metabolites* 2 (2012) 303–336.
- [18] P.M. Cheuka, G. Mayoka, P. Mutai, K. Chibale, The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases, *Molecules* 22 (2016) pii: E58.
- [19] G.P. Kamatou, I. Vermaak, A.M. Vijoer, Eugenol – from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule, *Molecules* 17 (2012) 6953–6981.
- [20] P. Singh, R.H. Jayaramaiah, S.B. Agawane, G. Vannuruswamy, A.M. Korwar, A. Anand, V.S. Dhayge, M.L. Shaikh, R.S. Joshi, R. Boppana, M.J. Kulkarni, H.V. Thulasiram, A.P. Giri, Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes: proteomic and mechanistic insights, *Sci. Rep.* 6 (2016) 18798.
- [21] T. Ueda-Nakamura, R.R. Mendonça-Filho, J.A. Morgado-Díaz, P.M. Korehisa, B.P.D. Filho, D.A.G. Cortez, D.S. Alviano, S.M. Rosa, A.H. Lopes, C.S. Alviano, C.V. Nakamura, Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*, *Parasitol. Int.* 55 (2006) 99–105.
- [22] S.M. de Moraes, N.S. Vila-Nova, C.M.L. Bevilacqua, F.C. Rondon, C.H. Lobo, A.A.A.N. Moura, C.C. Campello, M.E. Wilson, H.F. de Andrade Jr., Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6250–6255.
- [23] M.V. Papadopoulou, W.D. Bloomer, H.S. Rosenzweig, E. Chatelain, M. Kaiser, S.R. Wilkinson, C. Mckenzie, J.R. Joset, Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based amides and sulfonamides as potential antitrypanosomal agents, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 5554–5565.
- [24] S.B. Ferreira, M.S. Costa, N. Boechat, R.J.S. Bezerra, M.S. Genestra, M.M. Canto-Cavalheiro, W.B. Kover, V.F. Ferreira, Synthesis and evaluation of new difluoromethyl azoles as antileishmanial agents, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 1388–1395.
- [25] D. Rodríguez-Hernández, L.C. Barbosa, A.J. Demuner, R.M. de Almeida, R.T. Fujiwara, S.R. Ferreira, Highly potent anti-leishmanial derivatives of hederagenin, a triterpenoid from *Saindois saponaria* L, *Eur. J. Med. Chem.* 29 (2016) 153–159.
- [26] K.C. Tiew, D. Dou, T. Teramoto, H. Lai, K.R. Alliston, G.H. Lushington, R. Padmanabhan, W.C. Groutas, Inhibition of Dengue virus and West Nile virus proteases by click chemistry-derived benz[d]isothiazol-3(2H)-one derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 1213–1221.
- [27] T.F. Borgati, R.B. Alves, R.R. Teixeira, R.P. de Freitas, T.G. Perdigão, S.F. da Silva, A.A. dos Santos, A.J.O. Bastidas, Synthesis and phytotoxic activity of 1,2,3-triazole derivatives, *J. Braz. Chem. Soc.* 24 (2013) 953–961.
- [28] M. Meddad, C.W. Tornøe, Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2952–3015.
- [29] J.E. Hein, V.V. Fokin, Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1302–1315.
- [30] J.E. Moses, A.D. Moorhouse, The growing applications of click chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 36 (2007) 1249–1262.
- [31] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 2004–2021.
- [32] B.T. Worrell, J.A.V.V. Fokin, Direct Evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions, *Science* 340 (2013) 457–460.
- [33] P. Wu, V.V. Fokin, Catalytic azide-alkyne cycloaddition: reactivity and applications, *Aldrichim Acta* 40 (2007) 7–17.
- [34] R. Mukhopadhyay, V. Ramesh, S. Sundar, L. Maes, et al., Validation of a simple resazurin-based promastigote assay for the routine monitoring of miltefosine susceptibility in clinical isolates of *Leishmania donovani*, *Parasitol. Res.* 112 (2013) 825–828 pmid:23239091.
- [35] QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015 version 4.6.
- [36] C.A. Lipinski, Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 44 (2000).
- [37] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2615–2623.
- [38] M.C. Sanguinetti, M. Tristani-Firouzi, hERG potassium channels and cardiac arrhythmia, *Nature* 440 (2006) 463–469.
- [39] D.D. Perrin, W.L.F. Armarego, Purification of Laboratory Chemicals, third ed., Pergamon, Oxford, 1988.
- [40] B. Rossi-Bergmann, C.R. Lenglet, D. Bezerra-Santos, Y.M. Costa-Pinto, A. Traub-Czeko, Use of fluorescent leishmania for faster quantitation of parasite growth in vitro and in vivo, in: XXVI Annual Meeting on Basic Res in Chagas Disease, Caxambu, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 (Suppl. II) (1999) 74.
- [41] LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015 version 3.6.

RESEARCH ARTICLE

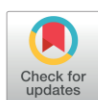
Discovery of novel West Nile Virus protease inhibitor based on isobenzonafuranone and triazolic derivatives of eugenol and indan-1,3-dione scaffolds

André S. de Oliveira^{1,2}✉, Poliana A. R. Gazolla²✉, Ana Flávia C. da S. Oliveira^{1,2}✉, Wagner L. Pereira², Lívia C. de S. Viol², Angélica F. da S. Maia², Edjon G. Santos¹, Ítalo E. P. da Silva¹, Tiago A. de Oliveira Mendes², Adalberto M. da Silva^{4,5}, Roberto S. Dias¹, Cynthia C. da Silva¹, Marcelo D. Polêto¹, Róbson R. Teixeira^{4*}, Sergio O. de Paula^{1*}

1 Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil, **2** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais, Fazenda Biribiri, MG, Brazil, **3** Departamento de Bioquímica Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil, **4** Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil, **5** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense, Araquari, SC, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

* depaula@ufv.br (SOP); robsonr.teixeira@ufv.br (RRT)



OPEN ACCESS

Citation: de Oliveira AS, Gazolla PAR, Oliveira AFCdS, Pereira WL, de S. Viol LC, Maia AFdS, et al. (2019) Discovery of novel West Nile Virus protease inhibitor based on isobenzonafuranone and triazolic derivatives of eugenol and indan-1,3-dione scaffolds. PLoS ONE 14(9): e0223017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017>

Editor: Graciela Andrei, Katholieke Universiteit Leuven Rega Institute for Medical Research, BELGIUM

Received: April 12, 2019

Accepted: September 11, 2019

Published: September 26, 2019

Copyright: © 2019 de Oliveira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The following authors of this paper received scholarships during this research: ASO and AFCdS from the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais (IFNMG – www.ifnmg.edu.br); EGS, IEPS and AMS from the Fundação de Amparo à Pesquisa do

Abstract

The West Nile Virus (WNV) NS2B-NS3 protease is an attractive target for the development of therapeutics against this arboviral pathogen. In the present investigation, the screening of a small library of fifty-eight synthetic compounds against the NS2-NB3 protease of WNV is described. The following groups of compounds were evaluated: 3-(2-aryl-2-oxoethyl)isobenzofuran-1-(3*H*)-ones; eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazolic functionalities; and indan-1,3-diones with 1,2,3-triazolic functionalities. The most promising of these was a eugenol derivative, namely 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)-propyl)-1-(2-bromobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole (**35**), which inhibited the protease with IC₅₀ of 6.86 μmol L⁻¹. Enzyme kinetic assays showed that this derivative of eugenol presents competitive inhibition behaviour. Molecular docking calculations predicted a recognition pattern involving the residues His⁵¹ and Ser¹³⁵, which are members of the catalytic triad of the WNV NS2B-NS3 protease.

Introduction

The West Nile Virus (WNV) is a member of the same family as the Dengue virus (DENV), Zika virus (ZIKV) and Yellow Fever virus (YFV), the *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus. They are arboviruses that present RNA as a genome [1]. Diseases caused by *Flavivirus* are the major causes of fatality in poverty-stricken regions across Africa, Asia and some parts of the Americas. The combined potential health risk associated with arthropod-borne viruses like DENV, WNV, and ZIKV is enormous. These arboviruses are either emerging or re-emerging in many regions [2].

Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – www.fapemig.br); RSD, TAOM and SOP from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ – www.memoria.cnpq.br); PARG, WLP, LCSV and AFSM from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – www.capes.gov.br). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Three WNV strains are known to be capable of causing unforeseen and large epidemics, leading to serious public health problems. Since 2004, lineages 1 and 3 have been circulating in Europe and, since 2010, beginning in a major epidemic in Greece, lineage 2 has been circulating in several European countries. [3, 4]. The WNV crossed the Atlantic and reached the Western Hemisphere in 1999, when a group of patients with encephalitis was reported in the New York City metropolitan area. Within three years, the virus spread to Canada and Mexico, followed by animal cases in Central and South America [5, 6]. Recently, the first human case of WNV was reported in Brazil, with the development of encephalitis. It is possible that sporadic cases or small groups of the WNV disease had already occurred in different regions of the country without being properly diagnosed [7].

WNV is a genetically and geographically diverse virus. Four or five distinct WNV genetic lines have been proposed, based on phylogenetic analyses of published isolates. Their genomes differ from each other by about 20–25%, and are well correlated with the geographic point of isolation [8–10]. They are enveloped viruses whose genome consists of single-stranded, positive-polarity RNA approximately 11 kb. This RNA contains a single open reading frame encoding a precursor polyprotein, which is processed by viral and host proteases, giving rise to three structural proteins: capsid protein (C), envelope glycoprotein (E) and pre-membrane/membrane protein (prM/M); and seven non-structural proteins, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5, which are involved in the replicative cycle of the virus [11]. Viral protease performs the cleavage of some sites: NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A and NS4B-NS5. It also cleaves the signal sequences at the C-prM position and the NS4A-NS4B, within NS2A, and within the NS3 itself [12, 13].

Despite the tremendous efforts invested in *Flavivirus* research, no clinically approved antiviral chemotherapeutics are available for humans, and disease treatment is limited to supportive care [13]. Inhibition of viral enzymes has proved to be one important approach toward the development of antiviral therapies [2, 13–15]. Non-structural proteins encoded by these RNA viruses are essential for their replication and maturation, and thus may offer ideal targets for developing antiviral drugs [2]. *Flavivirus* genomes are translated into a single polyprotein that needs to be cleaved by viral and host proteases. Because it processes most of the polyprotein cleavages, viral protease is necessary and essential for virus replication [16, 17].

Considering the premises, the screening of a small library of fifty-eight synthetic compounds against the NS2-NB3 protease of WNV is described in the present investigation. The following groups of compounds were evaluated: (I) 3-(2-aryl-2-oxoethyl)isobenzofuran-1(3H)-ones; (II) eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazolic functionalities; and (III) indan-1,3-diones with 1,2,3-triazolic functionalities. Fig 1 displays the general structures of the evaluated compounds.

The isobenzofuran-1-(3H)-ones, 1,2,3-triazolic derivatives, eugenol, and indan-1,3-diones are substances that have been described in the literature as being endowed with antiviral activities [8, 18–28]. Isobenzofuran-1-(3H)-one derivatives have several biological activities [18, 29–35], highlighting antiviral action for HIV [18]. Indan-1,3-diones derivatives have been specifically associated with antiviral activity. Studies have indicated efficient action of indan-1,3-diones against the enzyme integrase of the HIV-1 virus [36]; against the structure of human papillomavirus (HPV) [37–39]; and also against the Hepatitis C virus (HCV) protease [40], and recently for WNV protease [41]. Eugenol has been tested against the Herpes virus (HSV), HSV-1 (five viral isolates) and HSV-2 (five viral isolates), providing complete protection against one isolate of each type, HSV-1 and 2, and protection between 16.5% and 87.7% for the remaining isolates [21–23]. The triazole ring was associated with the molecules due to the antimicrobial activity already described for 1,2,3-triazole compounds, especially studies that demonstrated antiviral action against the Dengue virus [19, 20]. This fact prompted the

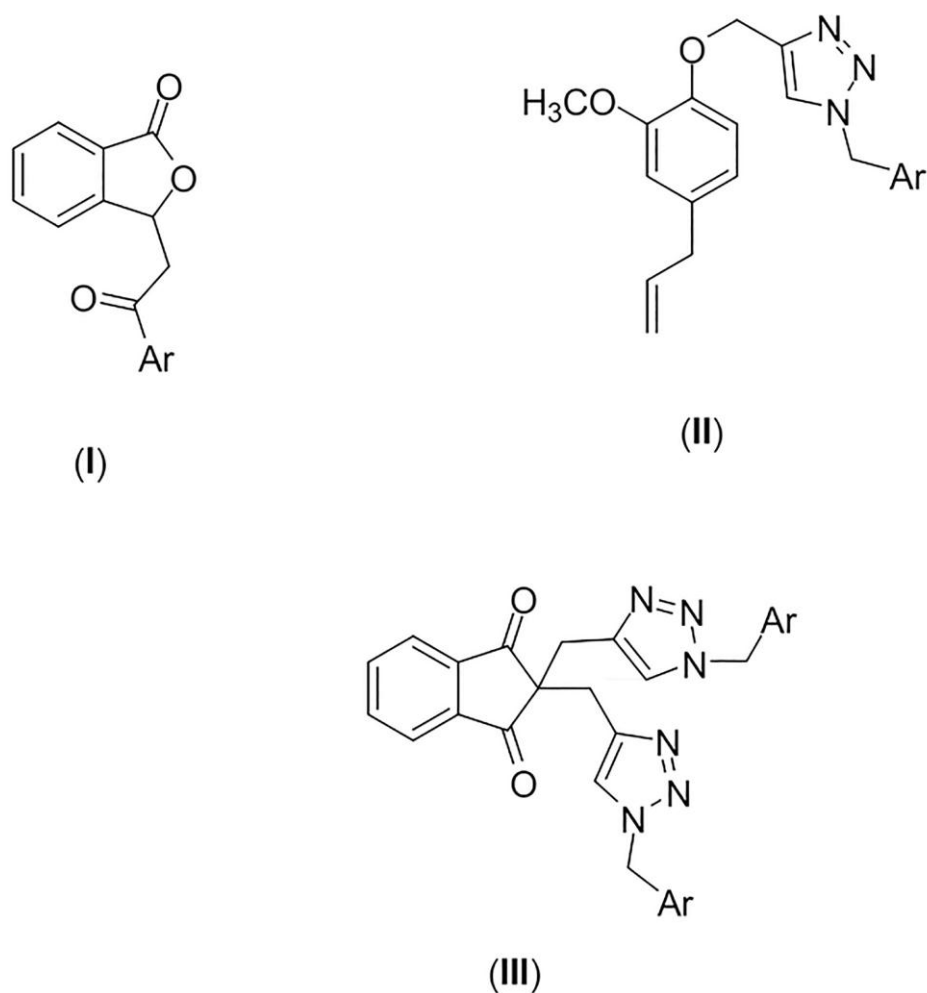


Fig 1. General structures of compounds evaluated as inhibitors of WNV NS2-NB3 protease. 3-(2-aryl-2-oxoethyl)isobenzofuran-1(3H)-ones (I); eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazolic functionalities (II); indan-1,3-diones with 1,2,3-triazolic functionalities (III).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017.g001>

authors to evaluate the effect of the compounds presenting general structures (I), (II) and (III) on the NS2-NB3 WNV protease.

Materials and methods

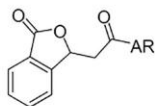
Synthesis

Solvents were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Benzyl alcohols, pent-4-yn-1-ol, methanesulfonyl chloride, sodium azide, triethylamine, propargyl bromide, acetophenones, and indan-1,3-dione were procured from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, United States) and used as received. Eugenol was extracted via hydrodistillation from cloves purchased in the local market in Viçosa, Minas Gerais state, Brazil, and subsequently purified by column chromatography (*vide infra*). ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded on a Varian Mercury 300 MNR Spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, United States) at 300 MHz and 75 MHz, respectively, using CDCl_3 , C_6D_6 or $\text{DMSO}-d_6$ as solvents. NMR data are presented as follows: chemical shift (δ) in ppm, multiplicity, the number of protons, and J values in Hertz (Hz). Multiplicities are shown as the following abbreviations: s (singlet), brs (broad singlet), d (doublet), d_{ap} (apparent doublet), dd (doublet of a doublets), t (triplet), brd (broad doublet), $dd_{\text{t,ap}}$ (apparent doublet of doublets of triplets), q (quartet), quint (quintet), and m (multiplet). Some signals in the ^{13}C NMR spectra were described as multiplets due to the ^{19}F - ^{13}C coupling. IR spectra were obtained using a Varian 660-IR equipped with GladiATR (Varian, Palo Alto, CA, USA) scanning from 4000 to 500 cm^{-1} . Analytical thin-layer chromatography analysis was conducted on aluminum-backed, pre-coated silica gel plates using different solvent systems. TLC plates were visualized using potassium permanganate solution, phosphomolybdic acid solution and/or UV light. Flash column chromatography was performed using silica gel 60 (60–230 mesh). Melting points were determined using a MQAPF-302 melting point apparatus (Microquímica, Santa Catarina, Brazil) and are uncorrected. Solvents were dried using standard procedures described in the literature [42].

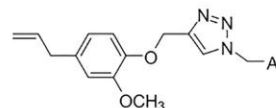
Synthesis of 3-(2-oxo-aryl)-isobenzofuran-1-(3H)-ones 1–18. The preparation of compounds 1–18 (Fig 2) was carried out via $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ catalyzed condensation reactions between phthalaldehyde and different acetophenones as previously reported [43].

Extraction and purification of eugenol (19). Eugenol (19) was extracted via hydrodistillation from dried flower buds of *Eugenia caryophyllata*, commonly known as cloves, purchased in the local market in Viçosa, Minas Gerais state, Brazil. Thus, 60.0 g of cloves were mixed with 500 mL of distilled water in a round-bottom flask which was connected to the hydrodistillation apparatus. The mixture was heated for three hours. The obtained hydrolyte was transferred to a separatory funnel and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 x 30 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was submitted to column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (6:1 v/v). The described procedure afforded 7.12 g of eugenol (19), which corresponded to approximately a 12% yield in relation to the initial mass of cloves used in the extraction process.

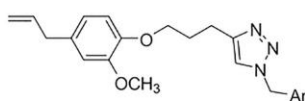
Synthesis of 4-allyl-2-methoxy-1-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (20). A 50 mL round-bottom flask was charged with eugenol (19) (1.20 g, 7.32 mmol), sodium hydroxide (0.313 g, 7.83 mmol) and 25 mL of methanol. The resulting mixture was heated to 40 °C and magnetically stirred for 30 minutes. After this time, methanol was removed under reduced pressure and 10.0 mL of anhydrous ethanol was added for the removal of the residual water. The ethanol was removed under reduced pressure. Then, the round-bottom flask, under a nitrogen atmosphere, was charged with anhydrous acetonitrile (25.0 mL) and propargyl bromide (800 μL , 8.79 mmol) was added slowly. The mixture was magnetically stirred at room temperature



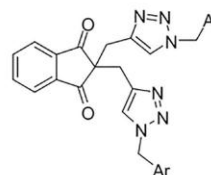
- 1: Ar = phenyl
- 2: Ar = 2-hydroxyphenyl
- 3: Ar = 3-hydroxyphenyl
- 4: Ar = 4-methylphenyl
- 5: Ar = 4-nitrophenyl
- 6: Ar = 3-nitrophenyl
- 7: Ar = 2-nitrophenyl
- 8: Ar = 2-bromophenyl
- 9: Ar = 3-bromophenyl
- 10: Ar = 4-bromophenyl
- 11: Ar = 3-fluorophenyl
- 12: Ar = 2-fluorophenyl
- 13: Ar = 4-fluorophenyl
- 14: Ar = 2-methoxyphenyl
- 15: Ar = 3-methoxyphenyl
- 16: Ar = 4-methoxyphenyl
- 17: Ar = 2-methylphenyl
- 18: Ar = 3-methylphenyl



- 23: Ar = phenyl
- 24: Ar = 4-fluorophenyl
- 25: Ar = 4-chlorophenyl
- 26: Ar = 4-bromophenyl
- 27: Ar = 4-iodophenyl
- 28: Ar = 4-nitrophenyl
- 29: Ar = 4-methoxyphenyl
- 30: Ar = 4-trifluoromethoxyphenyl
- 31: Ar = 4-trifluoromethylphenyl
- 32: Ar = 3,4-difluorophenyl
- 33: Ar = 2,5-dichlorophenyl
- 34: Ar = 4-methylphenyl
- 35: Ar = 2-bromophenyl
- 36: Ar = 3-bromophenyl



- 37: Ar = phenyl
- 38: Ar = 4-fluorophenyl
- 39: Ar = 4-chlorophenyl
- 40: Ar = 4-bromophenyl
- 41: Ar = 4-iodophenyl
- 42: Ar = 4-nitrophenyl
- 43: Ar = 4-methoxyphenyl
- 44: Ar = 4-trifluoromethoxyphenyl
- 45: Ar = 4-trifluoromethylphenyl
- 46: Ar = 3,4-difluorophenyl
- 47: Ar = 4-methylphenyl
- 48: Ar = 2-bromophenyl
- 49: Ar = 3-bromophenyl



- 51: Ar = 4-bromophenyl
- 52: Ar = 3-bromophenyl
- 53: Ar = 2-bromophenyl
- 54: Ar = 4-chlorophenyl
- 55: Ar = 4-fluorophenyl
- 56: Ar = 4-methoxyphenyl
- 57: Ar = 4-trifluoromethoxyphenyl
- 58: Ar = 4-nitrophenyl
- 59: Ar = 2,4-difluorophenyl
- 60: Ar = 4-iodophenyl
- 61: Ar = phenyl
- 62: Ar = 4-trifluoromethylphenyl
- 63: Ar = 4-methylphenyl

Fig 2. Structures of compounds 1–18, 23–49, and 51–63.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017.g002>

for 18 hours. TLC analysis revealed the completion of the reaction after this time. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was partitioned between 25.0 mL of sodium hydroxide solution (0.1 mol L^{-1}) and 25 mL of diethyl ether. The layers were separated and the aqueous phase was extracted with diethyl ether (2 x 25.0 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic layer was washed with brine (25.0 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (6:1 v/v). The described procedure afforded 1.29 g (6.37 mmol, 87% yield) of compound 20.

Synthesis of pent-4-yn-1-yl methanesulfonate (21). Pent-4-yn-1-ol (1.68 g, 20.0 mmol) and dichloromethane (20 mL) were added to a 100 mL round-bottom flask under nitrogen atmosphere. The mixture was cooled to -50°C and triethylamine (5.60 mL, 40.0 mmol) was added. After that, methanesulfonyl chloride was added slowly (2.32 mL, 30.0 mmol) to the reaction mixture under continuous stirring. The progress of the reaction was monitored by TLC. After completion of it, 10 mL of distilled water were added. The organic phase was washed with 1% HCl solution (3 x 15 mL) followed by saturated aqueous NaHCO_3 (3 x 5 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v) to give compound 21 in 92% yield (3.00 g, 18.0 mmol).

Synthesis 4-allyl-2-methoxy-1-(pent-4-yn-1-yloxy)benzene (22). This compound was prepared using a similar procedure to that described for the preparation of compound 20. In this case, the alkylating agent corresponded to compound 21. Substance 22 was obtained in 78% yield (1.64 g, 7.13 mmol) after purification by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate (6:1 v/v).

Synthesis of compounds 23–51 exemplified by the synthesis of compound 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-benzyl-1H-1,2,3-triazole (23). A 10 mL round bottom flask was charged with 4-allyl-2-methoxy-1-(prop-2-yn-1-yloxy)benzene (20) (0.150 g, 0.740 mmol), benzyl azide (0.0990g; 0.740 mmol), sodium ascorbate (0.0590 g, 0.300 mmol), 1.00 mL of ethanol and 1.00 mL of distilled water. Then, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0370 g, 0.150 mmol) was added. The reaction mixture was vigorously stirred at room temperature. After completion of the reaction, as noticed was by TLC analysis, the mixture was extracted with dichloromethane (3 x 10.0 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic layer was washed with aqueous sodium carbonate saturated solution, dried over anhydrous sodium sulphate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v). Compound 23 was obtained in 91% yield (0.228g, 0.680 mmol). Selected IR and NMR spectra is show at A-C Figs in S1 File.

Compounds 24–51 were prepared using a procedure similar to that described for the synthesis of 23. The structures of these compounds were confirmed by NMR (^1H and ^{13}C), and IR analyses and are supported by the following data.

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (24)

White solid, m.p. $92.1\text{--}92.7^\circ\text{C}$, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: $R_f = 0.39$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at D-F Figs in S1 File.

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (25)

White solid, m.p. 112.3–112.6°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.37 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at G-I Figs in [S1 File](#).

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (26)

White solid, m.p. 119.1–120.2°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.59 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at J-L Figs in [S1 File](#).

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (27)

White solid, m.p. 129.2–131.1°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.37 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at M-O Figs in [S1 File](#).

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (28)

White solid, m.p. 120.9–121.9°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v) TLC: R_f = 0.14 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at P-R Figs in [S1 File](#).

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole (29)

White solid, m.p. 92.4–93.1°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.36 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at S-U Figs in [S1 File](#).

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-(trifluoromethoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazole (30)

White solid, m.p. 126.4–127.3°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.49 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at V-W Figs in [S1 File](#).

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazole (31)

White solid, m.p. 142.7–143.0°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.43 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at Y-AA Figs in [S1 File](#).

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(3,4-difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (32)

White solid, m.p. 104.9–105.2°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.30 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at AB-AD Figs in [S1 File](#).

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(2,5-dichlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (33)

White solid, m.p. 87.9–88.4°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.59 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at AE-AG Figs in [S1 File](#).

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazole (34)

White solid, m.p. 81.4–82.3°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.66 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at AH-AJ Figs in [S1 File](#).

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (35)

White solid, m.p. 67.5–68.6°C, TLC: R_f = 0.70 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at AK-AM Figs in [S1 File](#).

Data for 4-((4-allyl-2-methoxyphenoxy)methyl)-1-(3-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (36)

White solid, m.p. 97.5–97.9°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.70 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at AN-AP Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-benzyl-1H-1,2,3-triazole (37)

White solid, m.p. 71.4–72.6°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.16 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at AQ-AS Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (38)

White solid, m.p. 96.4–96.8°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.21 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at AT-AV Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (39)

White solid, m.p. 81.8–82.2°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.46 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at AX-AY Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (40)

White solid, m.p. 89.4–90.3°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.46 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at AZ-BB Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (41)

White solid, m.p. 98.3–99.2°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.45 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at BC-BE Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (42)

White solid, m.p. 79.7–80.4°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f 0.29 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at BF-BH Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazole (43)

White solid, m.p. 88.9–90.4°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.22 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at BI-BK Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-(trifluoromethoxy)benzyl)-1H-1,2,3-triazole (44)

White solid, m.p. 93.4–94.9°C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: R_f = 0.49 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at BL-BN Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1H-1,2,3-triazole (45)

White solid, m.p. 111.3–112.5 °C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: $R_f = 0.50$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at BO-BQ Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(3,4-difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (46)

White solid, m.p. 97.1–97.8 °C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: $R_f = 0.41$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at BR-BT Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazole (47)

White solid, m.p. 59.6–60.9 °C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: $R_f = 0.42$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at BU-BX Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (48)

White solid, m.p. 47.8–49.1 °C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: $R_f = 0.61$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at BW-BZ Figs in [S1 File](#).

Data for 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(3-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazole (49)

White solid, m.p. 65.9–67.1 °C, purified by column chromatography eluted with hexane-ethyl acetate-dichloromethane (3:1:3 v/v), TLC: $R_f = 0.32$ (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at CA-CC Figs in [S1 File](#).

2,2-di(prop-2-yn-1-yl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (50). To a mixture of indan-1,3-dione (0.146 g, 1.00 mmol) and distilled water (40 mL), it was added potassium hydroxide (0.140 g, 0.250 mmol) and propargyl bromide (0.364 mL, 4.00 mmol). The resulting mixture was magnetically stirred at 40 °C for 24h. After this time, the reaction mixture was cooled down to room temperature and it was neutralized with aqueous solution of HCl 0.100 mol L⁻¹. The aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic phase was washed with brine (15 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure. Compound **50** was not submitted to any purification process and it was obtained in 93% yield (0.207 g, 0.930 mmol).

Synthesis of compounds 51–63 exemplified by the synthesis of 2,2-bis((1-(4-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (51). To a 10 mL round bottom-flask, containing 1.5 mL of dichloromethane and 1.5 mL of distilled water, it was added 4-bromobenzylazide (168.8 mg, 0.800 mmol), alkyne **50** (88.8 mg, 0.400 mmol), and sodium ascorbate (60.0 mg, 0.300 mmol). Then, it was added CuSO₄·5H₂O (38.0 mg, 0.150 mmol) and the resulting mixture was vigorously stirred at room temperature for 2 hours. After that, it was added to the reaction mixture sodium carbonate saturated aqueous solution (20 mL) and the resulting aqueous phase was extracted with dichloromethane (3 x 15 mL) followed by ethyl acetate (3 x 15 mL). The organic extracts were combined and the resulting organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica-gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane 3:1:3 v/v. Compound **51** was obtained in 51% yield (143.1 mg, 0.220 mmol). Selected IR and NMR spectra is show at CD-CF Figs in [S1 File](#).

Compounds **52–63** were synthesized employing a procedure similar to that described for the preparation of **51**. The structures of substances **52–63** are supported by the following data.

Data for 2,2-bis((1-(3-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (52)

White solid, m.p. 185.6–187.2 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.08 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at CG-CI Figs in [S1 File](#).

Data for 2,2-bis((1-(2-bromobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (53)

Pale yellow solid, m.p. 178.4–179.7 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.11 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at CJ-CL Figs in [S1 File](#).

Data for 2,2-bis((1-(4-chlorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (54)

White solid, m.p. 222.3–223.9 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.02 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at CM-CO Figs in [S1 File](#).

Data for 2,2-bis((1-(4-fluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (55)

White solid, m.p. 223.0–224.5 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.01 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at CP-CR Figs in [S1 File](#).

Data for 2,2-bis((1-(4-methoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (56)

White solid, m.p. 118.5–119.8 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.01 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at CS-CU Figs in [S1 File](#).

Data for 2,2-bis((1-(4-trifluoromethoxybenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (57)

White solid, m.p. 253.7–254.5 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.02 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at CV-CW Figs in [S1 File](#).

Data for 2,2-bis((1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (58)

White solid, m.p. 271.2–272.4 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.01 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at CY-DA Figs in [S1 File](#).

Data for 2,2-bis((1-(2,4-difluorobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (59)

White solid, m.p. 178.3–179.5 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.06 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at DB-DD Figs in [S1 File](#).

Data for 2,2-bis((1-(4-iodobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (60)

White solid, m.p. 211.3–212.2 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.06 (hexane-ethyl acetate 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at DE-DG Figs in [S1 File](#).

Data for 2,2-bis((1-(2-benzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (61)

White solid, m.p. 161.5–162.8 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.05 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at DH-DJ Figs in [S1 File](#).

Data for 2,2-bis((1-(4-trifluoromethylbenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (62)

White solid, m.p. 243.7–244.6 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.24 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at DK-DM Figs in [S1 File](#).

Data for 2,2-bis((1-(4-methylbenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1H-indene-1,3(2H)-dione (63)

White solid, m.p. 170.8–171.4 °C, purified by silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl-acetate-dichloromethane (3:1:1 v/v), TLC: R_f = 0.08 (hexane-ethyl acetate-dichloromethane 3:1:1 v/v). Selected IR and NMR spectra is show at DN-DP Figs in [S1 File](#).

Evaluation of the inhibitory activity of compounds 1–18, 23–49, and 51–63 on WNV NS2B-NS3 protease

In order to assess the activity of the synthesized compounds on WNV NS2B-NS3pro, recombinant WNV NS2B-NS3 protease (catalog number SE-2907, already purified and activated) and fluorescent substrate pERTKR-AMC (catalog number ES013) were purchased from R & D Systems (Minneapolis, MN, United States). Compounds 1–18, 23–49, and 51–63 were dissolved in pure dimethyl sulfoxide (DMSO); solutions were then diluted in a buffer to obtain working solutions with a final concentration of 1% v/v DMSO. A volume of 50 μ L of purified NS2B-NS3pro (final concentration of 1 ng μ L⁻¹) diluted in a buffer (50 mmol L⁻¹ Tris, 30% (v/v) glycerol, pH 9.5) was incubated with 50 μ L of each compound (final concentration of 16 μ mol L⁻¹) in a 96-well black plate for 30 min at 21–22°C. After this time, the assay was initiated by addition of 50 μ L of the substrate (40 mmol L⁻¹ –initial concentration). A solution containing a buffer and DMSO was used as negative control on the same plate. The blank contained 50 μ L of the buffer and 100 μ L of the substrate. The fluorescence intensity was continuously recorded at a 360 nm excitation wavelength and at an emission wavelength of 460 nm using a SpectraMax[®] M5 microplate reader (Molecular Devices, San José, CA, United States). Compounds which effectively inhibited the enzyme were selected for further biological assays. Analyses were performed using Microsoft Excel (Microsoft Office Software) and GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.). The assays were conducted in triplicate during three isolated experiments, and the statistical analyses were conducted by utilizing the multiple comparisons of one-way ANOVA.

Determination of IC₅₀

The inhibitory enzymatic activity of compound 35, the one most active against the WNV NS2-NB3 protease, was evaluated at eight different concentrations (66 μ mol L⁻¹–0.5 μ mol L⁻¹) using the protease assay as described above. Fluorescence was measured in triplicate wells at intervals of 30 s for 5 min in three independent experiments. IC₅₀ values were calculated using GraphPad Prism software 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, United States), using four-parameter nonlinear regression analysis (Hill slope method).

Determination of K_i

Three different concentrations (2, 4 and 8 μ mol L⁻¹) of inhibitor 35 and five different concentrations of substrate pERTKR-AMC (20, 40, 60, 80, 100 mmol L⁻¹) were tested *in vitro* against the WNV protease (37.04 nmol L⁻¹ protein, 1 ng μ L⁻¹). Fluorescence was measured in triplicate

wells at an interval of 30 s. The velocity values (RFU/minute) were then calculated for each substrate/inhibitor pair. K_i values were calculated with GraphPad Prism software 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, United States) with non-linear regression in the competitive inhibition mode of enzyme-kinetics.

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of compound **35** was assessed using an MTT assay [44]. VERO cells (5×10^4 cells) were seeded in 96-well plates. Each well contained 100 μ L of each compound solution at different concentrations (1000, 250, 125, 63, 32, 17, 8 and 4 μ mol L⁻¹). The compound was diluted in MEM medium with 2% FBS and 1% DMSO. After 24 h of incubation at 37 °C, 100 μ L of the MTT solution (5%) was added to the wells. After 4 h at 37 °C, the MTT solution was removed and 100 μ L/well of DMSO was added to solubilize the formazan. Absorbance was measured at 550 nm in a microplate reader (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer—ThermoFisher®, Waltham, MA, United States). The data were analyzed and CC_{50} was determined using GraphPad Prism 6.

Virucidal assay

The virucidal assay was performed as described by Oliveira et al. [41].

Molecular modeling studies

Ligands were prepared in the Ligprep program (Schrödinger, New York, NY, United States) [45] employing the OPLS_2005 force field, with protonation states predicted using Epik at pH 9.5 ± 2.0 . The West Nile Virus protease NS2B-NS3 PDB code 2IJO [46], chosen as the receptor, was prepared with the Protein Preparation Wizard (Schrödinger, New York, NY, United States), with removal of all waters and addition of hydrogens based on PROPKA calculations at pH 9.5. Docking calculations were performed with the Glide software (Schrödinger, New York, NY, United States) [47, 48], employing the Induced Fit docking methodology [49] and Glide SP. All the software packages used are part of the Schrödinger Release 2016–2 package (Schrödinger, New York, NY, United States) [50]. A spherical grid with 12 Å radius was centered in the Isoleucine 123 residue so that the active site was fully included within the grid. All residues within 5 Å from the center were considered flexible. Docking results were ranked based on their docking score and the top ranking poses for each compound were analyzed with the Maestro 10.6 software (Schrödinger, New York, NY, United States) [51].

Results and discussion

Synthesis of compounds **1–18**, **23–49**, and **51–63**

The structures of the synthesized compounds are depicted in Fig 2.

As previously mentioned, the synthesis of isobenzofuran-(3*H*)-ones **1–18** has been previously reported [43].

For the preparation of compounds **23–49**, we initially isolated eugenol (**19**) from dried flower buds of *Eugenia caryophyllata* via hydrodistillation. Subsequently, eugenol (**19**) was submitted to alkylation procedures, affording terminal alkynes **21** and **22** in yields of, respectively, 87% and 78% (Fig 3).

Then, the CuAAC reactions (click reactions) between benzyl azides (ArCH₂N₃) and terminal alkynes **21** and **22** led to the formation of triazolic derivatives **23–49** (Fig 4). The click reactions, in general, took less than one minute for their completion.

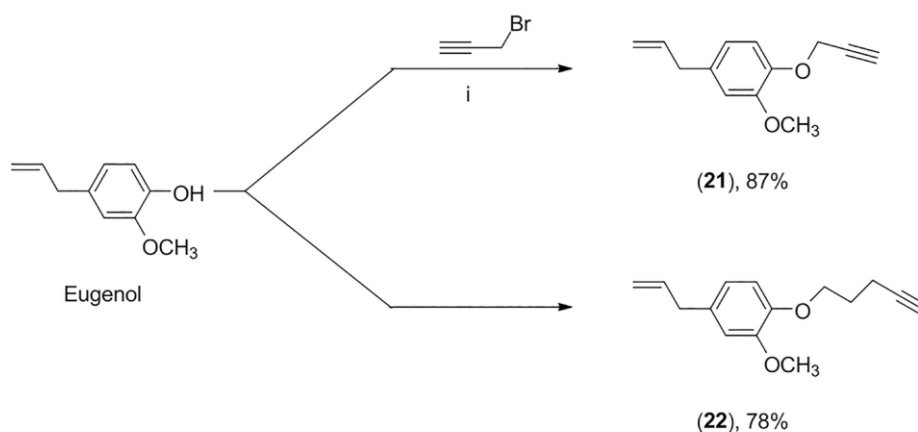


Fig 3. Preparation of alkylated derivatives of eugenol. i) NaOH, CH₃OH, 40 °C; acetonitrile, r.t.; ii) NaOH, CH₃OH, 40 °C; acetonitrile, 70 °C.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017.g003>

A similar sequence, namely alkylation of indan-1,3-dione followed by click reaction between compound **50** and benzyl azides, was utilized to prepared triazolic compounds **51–63** (Fig 5).

It should be mentioned that the azides, used in the preparation of compounds **23–49** and **51–63**, were obtained via the methodology previously described in the literature [52]. Once prepared, the synthesized compounds were submitted to biological assays to evaluate their inhibitory effects against the NS2-NS3 protease of WNV.

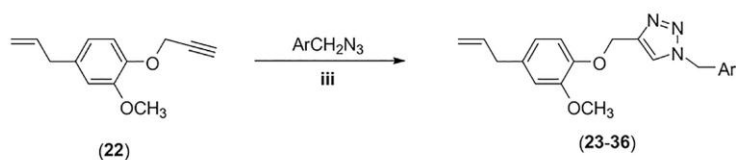
Identification of WNV protease inhibitors

The *Flavivirus* protease is essential for the processing of the polyprotein which generates the viral proteins required for viral replication and maturation of infectious virions. Therefore, the protease is an ideal target for the discovery of antivirals against *Flavivirus* [53]. In the present investigation, we evaluated the inhibitory activity of fifty-eight compounds against the WNV NS2B-NS3 protease (eighteen 3-(2-oxo-2-aryl)-isobenzofuran-1(3*H*)-ones, compounds **1–18**; twenty-seven derivatives of eugenol with triazole rings, compounds **23–49**; thirteen derivatives of indan-1,3-diones presenting triazole rings, compounds **51–63**, Fig 2). In this regard, a purified preparation of WNV NS2B3NS3pro and the fluorogenic peptide substrate pERTKR-AMC was utilized.

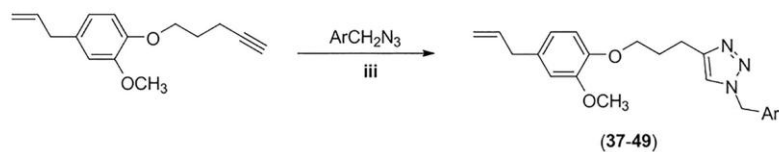
Our primary screen resulted in the identification of eighteen compounds (~31% of the evaluated compounds) that exhibited inhibitory effects on protease activity (Fig 6).

Subsequently, we took these eighteen compounds and conducted a secondary screening with further validation based on their relative strengths of inhibition (at least 50%). This resulted in the selection of compound **35**, a eugenol derivative which was utilized in further experiments.

A derivative of the natural product eugenol capable of significantly inhibiting the activity of the WNV NS2B-NS3 protease was identified. Taking the eugenol derivatives into



23: Ar = phenyl (91%)
 24: Ar = 4-fluorophenyl (87%)
 25: Ar = 4-chlorophenyl (87%)
 26: Ar = 4-bromophenyl (80%)
 27: Ar = 4-iodophenyl (87%)
 28: Ar = 4-nitrophenyl (89%)
 29: Ar = 4-methoxyphenyl (80%)
 30: Ar = 4-trifluoromethoxyphenyl (85%)
 31: Ar = 4-trifluoromethylphenyl (84%)
 32: Ar = 3,4-difluorophenyl (78%)
 33: Ar = 2,5-dichlorophenyl (81%)
 34: Ar = 4-methylphenyl (82%)
 35: Ar = 2-bromophenyl (77%)
 36: Ar = 3-bromophenyl (79%)



37: Ar = phenyl (79%)
 38: Ar = 4-fluorophenyl (86%)
 39: Ar = 4-chlorophenyl (87%)
 40: Ar = 4-bromophenyl (84%)
 41: Ar = 4-iodophenyl (91%)
 42: Ar = 4-nitrophenyl (82%)
 43: Ar = 4-methoxyphenyl
 44: Ar = 4-trifluoromethoxyphenyl (84%)
 45: Ar = 4-trifluoromethylphenyl (92%)
 46: Ar = 3,4-difluorophenyl (90%)
 47: Ar = 4-methylphenyl (80%)
 48: Ar = 2-bromophenyl (79%)
 49: Ar = 3-bromophenyl (81%)

Fig 4. Preparation of eugenol derivatives 23–49. iii) sodium ascorbate (40 mol%), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 mol%), $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v).

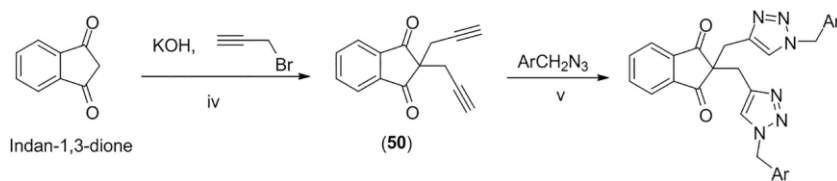
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017.g004>

consideration, we made variations in the size of the carbon chain that links eugenol moiety and the triazole ring. Also, the substitution pattern of the aromatic ring attached to the triazole portion was varied. These modifications afforded a group of eugenol triazolic derivatives from which was identified the very active compound **35**. It is important to mention that further chemical modifications can be planned regarding the eugenol and triazole fragments so that new derivatives with improved activity may be obtained. Considering that there is no *Flavivirus* protease inhibitor approved for pre-clinical trial [54], the exploitation of the new scaffold herein identified, namely triazolic derivatives of eugenol, would be of considerable importance.

Determination of IC_{50} and K_i values of the enzymatic inhibitory activity of compound **35**

The enzymatic inhibition was evaluated in the presence of varying concentrations ($0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ to $66 \mu\text{mol L}^{-1}$) of compound **35**. A dose-response inhibition was noticed with IC_{50} value of $6.86 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig 7).

The enzyme kinetic assay was conducted under five different substrate concentrations and three varying concentrations of compound **35**. We used the Michaelis-Menten equation to find the values of V_{MAX} and K_M , and with these, the Lineweaver-Burk graph was built.



- 51: Ar = 4-bromophenyl (55%)
- 52: Ar = 3-bromophenyl (55%)
- 53: Ar = 2-bromophenyl (70%)
- 54: Ar = 4-chlorophenyl (43%)
- 55: Ar = 4-fluorophenyl (48%)
- 56: Ar = 4-methoxyphenyl (73%)
- 57: Ar = 4-trifluoromethoxyphenyl (73%)
- 58: Ar = 4-nitrophenyl (80%)
- 59: Ar = 2,4-difluorophenyl (60%)
- 60: Ar = 4-iodophenyl (70%)
- 61: Ar = phenyl (70%)
- 62: Ar = 4-trifluoromethylphenyl (53%)
- 63: Ar = 4-methylphenyl (63%)

Fig 5. Synthesis of compounds 51–63. iv) aqueous KOH, then propargyl bromide, 40°C , 24h; v) sodium ascorbate (40 mol%), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 mol%), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ (1:1 v/v), 2h.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017.g005>

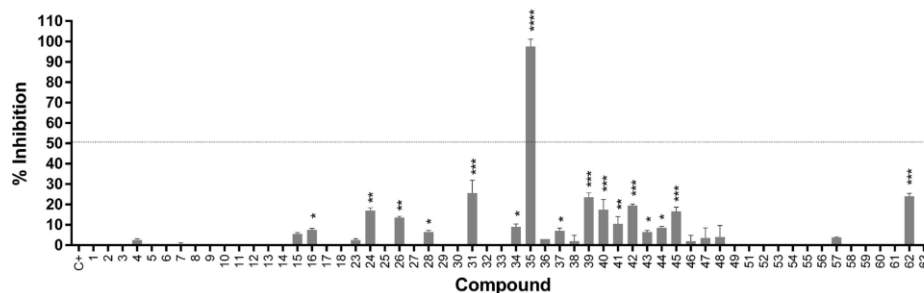


Fig 6. Inhibitory activity screening for WNV protease. Fifty-eight compounds were evaluated at the concentration of $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ against the WNV NS2-NB3 protease. The assays were conducted in triplicate during three isolated experiments (p value < 0.0001).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017.g006>

Compound 35 showed a decrease of enzymatic V_{MAX} and an increase in K_{M} , presenting the behaviour of a competitive inhibitor (Fig 8A and 8B). The K_{i} value was $3.06 (\pm 0.38) \mu\text{mol L}^{-1}$.

For compound 35, the enzyme kinetic data showed an increase in the K_{M} value, a typical behaviour of competitive inhibitors. In addition, this compound displayed a low K_{i} value. In a recent investigation, Balasubramanian and collaborators [53] found eight promising flavivirus protease inhibitors presenting K_{i} values within the 0.22 to $6.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ range. However, the K_{i} value may not be analyzed individually. In the study by Balasubramanian and collaborators, a compound presenting low K_{i} value ($0.22 \mu\text{mol L}^{-1}$) but displaying a CC_{50} of $29.16 \mu\text{mol L}^{-1}$ was identified [53].

For the development of new drugs, the World Health Organization (WHO) strongly recommends the use of compounds with pharmacological effects already described and substances already approved for clinical use, so that several steps can be abbreviated in the long validation process [55]. Eugenol (19) has been safely used in *in vivo* experiments, and it has

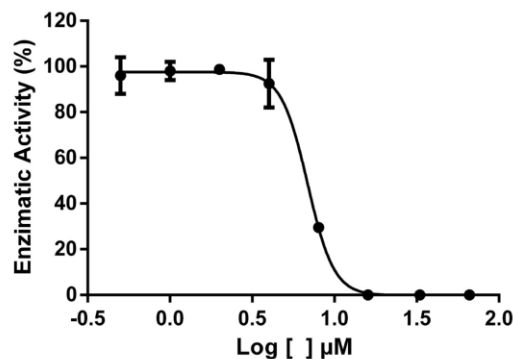


Fig 7. Enzymatic inhibitory profile of compound 35.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017.g007>

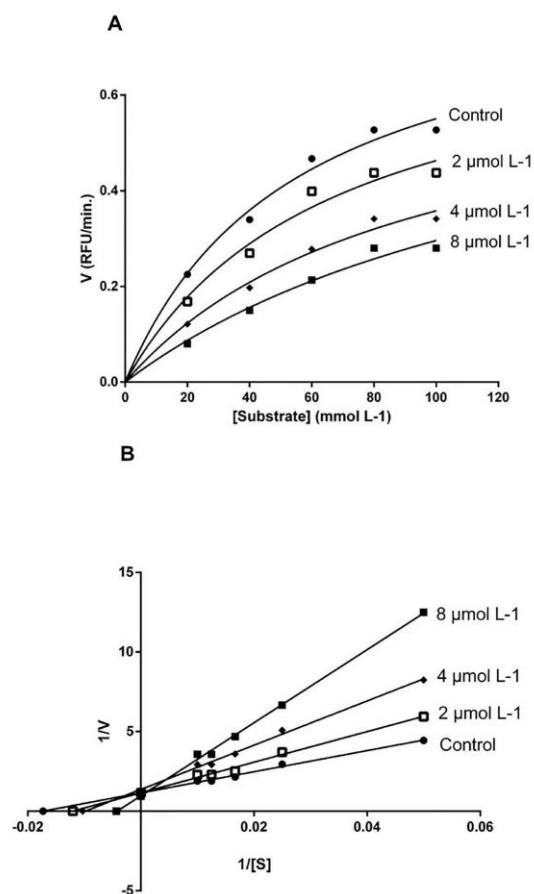


Fig 8. Enzymatic kinetics of WNV NS2-NB3 protease in the presence of compound 35. In A, the Michaelis-Menten plot is shown. In B, the Lineweaver-Burk plot is presented.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017.g008>

been recognized as a safe, effective and inexpensive anesthetic for fish, amphibians and rats [56, 57]. Also, the analgesic effect of eugenol (19) in different models of pain has been well documented [58–62]. A recent work with BALB/c mice used a derivative of eugenol (19) to treat visceral Leishmaniasis. This derivative presented low cytotoxicity for macrophages as well as for naive mice with immune-stimulatory activity. Moreover, no biochemical alterations in

hepatic and renal enzymes were noticed [63]. Eugenol (**19**) is generally non-allergenic for humans, although in sensitized individuals it may cause a range of tissue reactions from low-grade local to systemic. Low concentrations of eugenol (**19**) are well known to exert local anti-inflammatory, antiseptic, and anesthetic effects on dental pulp. Also, eugenol (**19**) may have antibacterial effects that are beneficial for dental hygiene, being included in materials such as toothpastes and mouthwashes [64–66]. All these features make eugenol (**19**), as well as its derivatives, very interesting compounds to be explored in drug development.

Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of compound **35** on Vero cells was investigated via the colorimetric MTT assay and the determined CC_{50} value was $327.20 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig 9). Luo and collaborators [54] reported the best parameters for the most promising compounds against the protease of *Flavivirus*. They highlighted a compound with low cytotoxicity presenting CC_{50} superior to $300 \mu\text{mol L}^{-1}$. Eugenol derivative **35** presented a similar CC_{50} , and it can be considered a compound with low cytotoxicity. Therefore, although a very potent inhibitor, this compound presented considerable cytotoxicity.

Molecular modeling

Multiple targets and inhibitory mechanisms have been proposed for *Flavivirus* proteases so far [53, 54, 67, 68], which have provided insightful structural information regarding the NS2B-NS3 catalytic site, helping computational-aided drug design efforts even further. For instance, by solving NS2B-NS3's tridimensional structure bound to a peptide-like inhibitor, Erbel and coworkers [69] provided fundamental information regarding the protease fold, catalytic site structure and inhibition mechanisms. As found by others [46, 70–72], inhibitors often bind to His⁵¹ or to nearby residues such as Asp⁷⁵, Asp¹²⁹, Gly¹⁵³ and Tyr¹⁶¹ (S1 Fig), hampering the bond of the substrate to the catalytic site.

In order to perform our own molecular docking calculations, the crystallographic structure of the NS2B-NS3 protease was obtained from PDB 2IJO, in which NS2B-NS3 is co-crystallized with the WNV protease inhibitor aprotinin. All molecules derived from eugenol were analyzed for their probable three-dimensional binding conformation, binding energy, chemical groups involved, profile of binding and identity of the involved amino acids, as observed in table A in S1 File. The predicted recognition mechanism for compound **35** relies on interactions with His⁵¹, Thr¹³⁴, Ser¹³⁵ and Tyr¹⁶¹, as represented in Fig 10A, and the ligand occupies pocket S1 of the catalytic site. The NH⁺ of the His⁵¹ ring interacts with the triazole ring of **35** in cation- π and π - π type interactions, and the Tyr¹⁶¹ ring interacts with the phenyl ring of **35** via π - π type interaction, while a halogen bond can be formed between the Br atom and the OH from Ser¹³⁵ or the NH from Thr¹³⁴. It is important to highlight that both His⁵¹ and Ser¹³⁵ are members of the catalytic triad of the NS2B-NS3 protease, which might explain the observed competitive inhibitory activity of **35**.

In addition, compound **36** showed no inhibitory activity, despite the fact that the only difference from compound **35** is the position of a bromo substituent (*orto* in **35** and *meta* in **36**). Our calculations suggest that the formation of a halogen bond for **36** with bromo in *meta* might induce a more stable conformation for the ligand in which the triazole ring interacts with Gly¹⁵³ instead of His⁵¹ and, consequently, leaves the S1 pocket free (Fig 10B). These results suggest that the bromo substituent in *orto* is pivotal for a proper recognition of compound **35**, along with the cation- π interaction between His⁵¹ and the triazole ring, while the methoxyphenyl ring region might be a suitable target for further improvements.

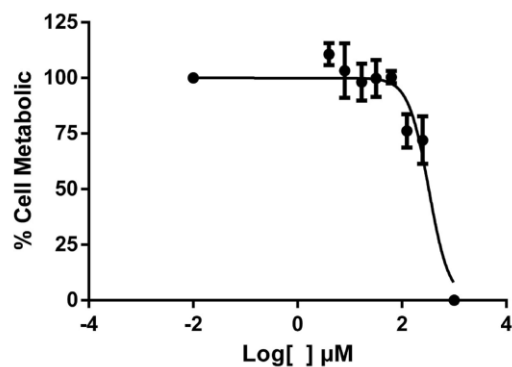


Fig 9. Dose-response profile of compound 35 on Vero cells.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017.g009>

Virucidal assay

To determine whether compound 35 would have antiviral activity for *Flaviviruses*, a virucidal assay was performed with four serotypes of DENV, due to its close evolutionary proximity to WNV and due to the highly conserved NS2B-NS3 fold and sequence. This assay was performed by prior incubation of the compound with each viral strain, followed by its addition to the cell layer for virus adsorption and internalization. Subsequently, the compound-virus solution was removed and antiviral action was observed through the formation of lysis plates. The concentration of test compounds that inhibited 50% of the viral infection (EC_{50}) was obtained by nonlinear regression, leading to the calculation of the Selectivity Index (SI). The observed results are presented in Table 1.

The compound had good SI values for DENV-1-3 and a higher value for DENV-4. All together, the results indicate that compound 35 has significant antiviral efficacy and is a promising antiviral candidate for *Flavivirus*.

Conclusion

In this work, a small library of fifty-eight synthetic compounds (isobenzofuran-1(3*H*)-ones and triazolic derivatives of eugenol and indandione) were screened against the WNV NS2B-NS3 protease. By modifying the structure of the natural product eugenol to produce 1,2,3-triazolic derivatives, a compound presenting low cytotoxicity and considerable inhibitory protease activity was identified. Compound 35 corresponds to 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(2-bromobenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole. In addition, molecular docking calculations suggested that the inhibition mechanism relies on interactions between His⁵¹, Thr¹³⁴, Ser¹³⁵ and Tyr¹⁶¹. The virucidal assay with DENV-1-4 strains indicates that compound 35 is a promising lead compound for antiviral activity against *Flavivirus*. Taken together, our results provide insightful information for further development of *Flavivirus* protease inhibitors via rational drug design. Efforts towards this end are under way in our laboratories.

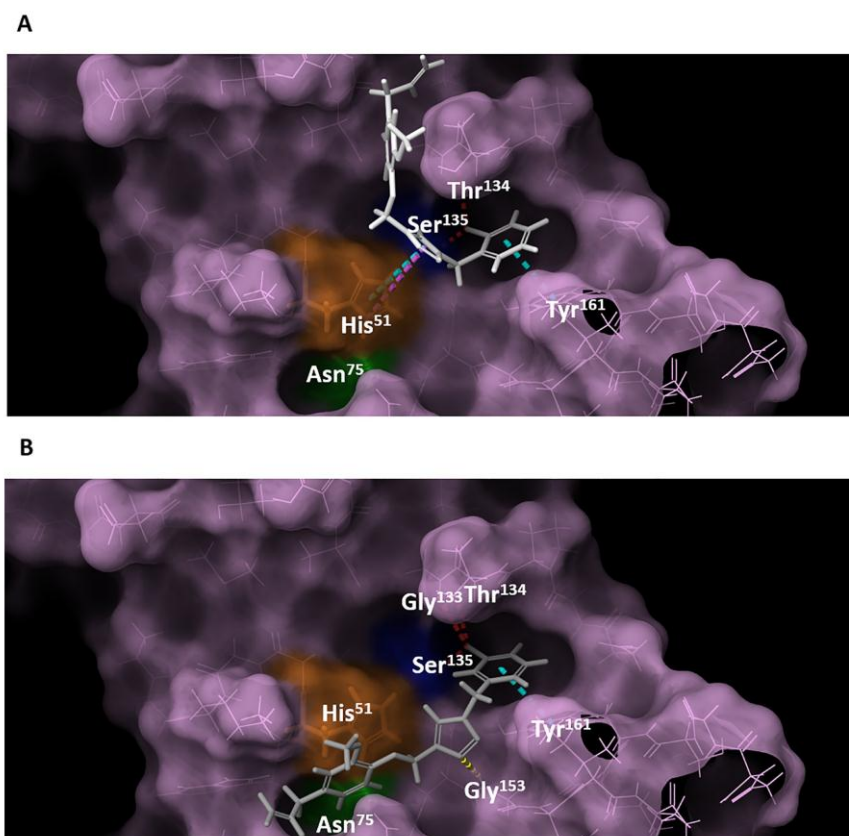


Fig 10. WNV protease docking with compound 35 and 36. The entire protease is shown in lilac, highlighting residues Ser¹³⁵ (dark blue), His⁵¹ (orange), and Asp⁷⁵ (green). A. In white is compound 35. B. In gray is compound 36. Hydrogen bonds are shown in yellow, halogen bonds are shown in red, T-shape π - π interactions are shown in cyan and cation- π interactions are shown in pink.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017.g010>

Table 1. CC₅₀, EC₅₀ and SI values of the compound 35 in the presence of DENV-1-4.

Compound	CC ₅₀ $\mu\text{mol L}^{-1}$	DENV-1		DENV-2		DENV-3		DENV-4	
		EC ₅₀ $\mu\text{mol L}^{-1}$	SI	EC ₅₀ $\mu\text{mol L}^{-1}$	SI	EC ₅₀ $\mu\text{mol L}^{-1}$	SI	EC ₅₀ $\mu\text{mol L}^{-1}$	SI
35	327.20	46.57	7	49.20	7	70.10	5	14.17	23

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223017.t001>

Supporting information

S1 File. Table A. Docking of the compounds 23 to 49 with WNV protease. The entire protease is shown in lilac, highlighting residues Ser135 (dark blue), His51 (orange), and Asp75 (green). The compound is shown in red. FigsA-DP Figs. Selected IR and NMR spectra. (PDF)

S1 Fig. Inhibition mechanisms observed between WNV NS2B-NS3 protease cocrystallized peptide-like molecules obtained from Protein Data Bank. A. 2YOL; B. 3E90; C. 5IDK; and D. 2FP7. (TIFF)

Author Contributions

Conceptualization: André S. de Oliveira.

Formal analysis: André S. de Oliveira, Poliana A. R. Gazolla, Ana Flávia C. da S. Oliveira.

Investigation: André S. de Oliveira, Poliana A. R. Gazolla, Ana Flávia C. da S. Oliveira, Wagner L. Pereira, Lívia C. de S. Viol, Angélica F. da S. Maia, Edjon G. Santos, Ítalo E. P. da Silva, Tiago A. de Oliveira Mendes, Adalberto M. da Silva, Roberto S. Dias, Cynthia C. da Silva.

Methodology: André S. de Oliveira, Poliana A. R. Gazolla, Ana Flávia C. da S. Oliveira, Wagner L. Pereira, Lívia C. de S. Viol, Angélica F. da S. Maia, Edjon G. Santos, Ítalo E. P. da Silva, Tiago A. de Oliveira Mendes, Adalberto M. da Silva, Roberto S. Dias, Cynthia C. da Silva.

Project administration: Róbson R. Teixeira, Sergio O. de Paula.

Resources: Róbson R. Teixeira, Sergio O. de Paula.

Software: Tiago A. de Oliveira Mendes, Marcelo D. Polêto.

Supervision: Róbson R. Teixeira, Sergio O. de Paula.

Validation: André S. de Oliveira, Poliana A. R. Gazolla, Ana Flávia C. da S. Oliveira.

Visualization: Róbson R. Teixeira, Sergio O. de Paula.

Writing – original draft: André S. de Oliveira, Poliana A. R. Gazolla, Ana Flávia C. da S. Oliveira, Róbson R. Teixeira, Sergio O. de Paula.

Writing – review & editing: André S. de Oliveira, Poliana A. R. Gazolla, Ana Flávia C. da S. Oliveira, Marcelo D. Polêto, Róbson R. Teixeira, Sergio O. de Paula.

References

1. Martin-Acebes MA, Vazquez-Calvo A, Saiz JC. Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses. *Prog Lipid Res.* 2016; 64:123–37. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.09.005> PMID: 27702593.
2. Bhakat S, Karubiu W, Jayaprakash V, Soliman ME. A perspective on targeting non-structural proteins to combat neglected tropical diseases: Dengue, West Nile and Chikungunya viruses. *Eur J Med Chem.* 2014; 87:677–702. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.010> PMID: 25305334.
3. Chaskopoulou A, Dovas CI, Chaintoutis SC, Kashefi J, Koehler P, Papanastassopoulou M. Detection and early warning of West Nile Virus circulation in Central Macedonia, Greece, using sentinel chickens and mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013; 13(10):723–32. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1176> PMID: 23919609.

4. Chaskopoulou A, L'Ambert G, Petric D, Bellini R, Zgomba M, Groen TA, et al. Ecology of West Nile virus across four European countries: review of weather profiles, vector population dynamics and vector control response. *Parasit Vectors*. 2016; 9(1):482. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1736-6> PMID: 27590848; PubMed Central PMCID: PMC5009705.
5. Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, Trono K, et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(10):1559–61. <https://doi.org/10.3201/eid1210.060852> PMID: 17176571; PubMed Central PMCID: PMC3290965.
6. Kleinschmidt-DeMasters BK, Beckham JD. West Nile Virus Encephalitis 16 Years Later. *Brain Pathol*. 2015; 25(5):625–33. <https://doi.org/10.1111/bpa.12280> PMID: 26276026.
7. Ometto T, Durigon EL, de Araujo J, Aprelon R, de Aguiar DM, Cavalcante GT, et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008–2010. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013; 107(11):723–30. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt081> PMID: 24008895.
8. Flatau E, Kohn D, Daher O, Varsano N. West Nile fever encephalitis. *Isr J Med Sci*. 1981; 17(11):1057–9. PMID: 6274825.
9. Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I, Nowotny N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(2):225–31. <https://doi.org/10.3201/eid1102.041028> PMID: 15752439; PubMed Central PMCID: PMC3320449.
10. Berthet FX, Zeller HG, Drouet MT, Rauzier J, Digoutte JP, Deubel V. Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J Gen Virol*. 1997; 78(Pt 9):2293–7. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-9-2293> PMID: 9292017.
11. Costa SM, Azevedo AS, Paes MV, Sarges FS, Freire MS, Alves AM. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology*. 2007; 358(2):413–23. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.052> PMID: 17020777.
12. Teo KF, Wright PJ. Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. *J Gen Virol*. 1997; 78(Pt 2):337–41. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-2-337> PMID: 9018055.
13. Oliveira AS, Silva ML, Oliveira AFCS, Silva CC, Teixeira RR, Paula SOD. NS3 and NS5 proteins: important targets for anti-dengue drug design. *J Braz Chem Soc*. 2014; 25(10):1759–69.
14. Noble CG, Chen YL, Dong H, Gu F, Lim SP, Schul W, et al. Strategies for development of Dengue virus inhibitors. *Antiviral Res*. 2010; 85(3):450–62. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.12.011> PMID: 20060421.
15. Lim SP, Wang QY, Noble CG, Chen YL, Dong H, Zou B, et al. Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral Res*. 2013; 100(2):500–19. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.013> PMID: 24076358.
16. Xu T, Sampath A, Chao A, Wen D, Nanao M, Chene P, et al. Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å. *J Virol*. 2005; 79(16):10278–88. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10278-10288.2005> PMID: 16051821; PubMed Central PMCID: PMC1182654.
17. Lescar J, Luo D, Xu T, Sampath A, Lim SP, Canard B, et al. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Res*. 2008; 80(2):94–101. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.07.001> PMID: 18674567.
18. Yoganathan K, Rossant C, Ng S, Huang Y, Butler MS, Buss AD. 10-Methoxydihydrofusicin, fusicarinin, and fusicin, novel antagonists of the human CCR5 receptor from *Oidiodendron griseum*. *J Nat Prod*. 2003; 66(8):1116–7. <https://doi.org/10.1021/np030146m> PMID: 12932138.
19. Aravapalli S, Lai H, Teramoto T, Alliston KR, Lushington GH, Ferguson EL, et al. Inhibitors of Dengue virus and West Nile virus proteases based on the aminobenzamide scaffold. *Bioorg Med Chem*. 2012; 20(13):4140–8. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.055> PMID: 22632792; PubMed Central PMCID: PMC3563422.
20. Tiew KC, Dou D, Teramoto T, Lai H, Alliston KR, Lushington GH, et al. Inhibition of Dengue virus and West Nile virus proteases by click chemistry-derived benz[d]isothiazol-3(2H)-one derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2012; 20(3):1213–21. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.12.047> PMID: 22249124; PubMed Central PMCID: PMC3279297.
21. Tragoolpua Y, Jatisatienr A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bull-ock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. *Phytother Res*. 2007; 21(12):1153–8. <https://doi.org/10.1002/ptr.2226> PMID: 17628885.
22. Benencia F, Courreges MC. In vitro and in vivo activity of eugenol on human herpesvirus. *Phytother Res*. 2000; 14(7):495–500. PMID: 11054837.

23. Serkedjeva J, Ivancheva S. Antitherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *J Ethnopharmacol*. 1999; 64(1):59–68. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00095-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00095-6) PMID: 10075123.
24. Dai JP, Zhao XF, Zeng J, Wan QY, Yang JC, Li WZ, et al. Drug screening for autophagy inhibitors based on the dissociation of Beclin1-Bcl2 complex using BIFC technique and mechanism of eugenol on anti-influenza A virus activity. *PLoS One*. 2013; 8(4):e61026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061026> PMID: 23613775; PubMed Central PMCID: PMC3628889.
25. Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA. West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol*. 2007; 88(Pt 3):875–84. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82403-0> PMID: 17325360.
26. Behnam MA, Nitsche C, Boldescu V, Klein CD. The Medicinal Chemistry of Dengue Virus. *J Med Chem*. 2016; 59(12):5622–49. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01653> PMID: 26771861.
27. Weigel LF, Nitsche C, Graf D, Bartenschlager R, Klein CD. Phenylalanine and Phenylglycine Analogues as Arginine Mimetics in Dengue Protease Inhibitors. *J Med Chem*. 2015; 58(19):7719–33. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00612> PMID: 26367391.
28. Timiri AK, Sinha BN, Jayaprakash V. Progress and prospects on DENV protease inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2016; 117:125–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.04.008> PMID: 27092412.
29. Huang XZ, Zhu Y, Guan XL, Tian K, Guo JM, Wang HB, et al. A novel antioxidant isobenzofuranone derivative from fungus *Cephalosporium* sp. AL031. *Molecules*. 2012; 17(4):4219–24. <https://doi.org/10.3390/molecules17044219> PMID: 22481542.
30. Strobel G, Ford E, Worapong J, Harper JK, Arif AM, Grant DM, et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry*. 2002; 60(2):179–83. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00062-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00062-6) PMID: 12009322.
31. Peng Y, Zeng X, Feng Y, Wang X. Antiplatelet and antithrombotic activity of L-3-n-butylphthalide in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 43(6):876–81. <https://doi.org/10.1097/00005344-200406000-00018> PMID: 15167282.
32. Yang H, Hu GY, Chen J, Wang Y, Wang ZH. Synthesis, resolution, and antiplatelet activity of 3-substituted 1(3H)-isobenzofuranone. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007; 17(18):5210–3. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.06.082> PMID: 17632002.
33. Ma F, Gao Y, Qiao H, Hu X, Chang J. Antiplatelet activity of 3-butyl-6-bromo-1(3H)-isobenzofuranone on rat platelet aggregation. *J Thromb Thrombolysis*. 2012; 33(1):64–73. <https://doi.org/10.1007/s11239-011-0647-9> PMID: 22057435.
34. Cardozo JAB-F, Raimudo, Javier Rincón-Velanda; Guerrero-Pabón, Mario F. 3-Butyl-isobenzofuranone: a compound isolated from *Apium graveolens* with anticonvulsant activity. *Rev Colomb Ciencias Quim Farm*. 2005; 34(1):69–76.
35. Teixeira RR, Bressan GC, Pereira WL, Ferreira JG, de Oliveira FM, Thomaz DC. Synthesis and antiproliferative activity of C-3 functionalized isobenzofuran-1(3H)-ones. *Molecules*. 2013; 18(2):1881–96. <https://doi.org/10.3390/molecules18021881> PMID: 23377131.
36. Artico M, Di Santo R, Costi R, Novellino E, Greco G, Massa S, et al. Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl compounds as inhibitors of HIV-1 integrase: synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *J Med Chem*. 1998; 41(21):3948–60. <https://doi.org/10.1021/jm9707232> PMID: 9767632.
37. Goudreau N, Cameron DR, Deziel R, Hache B, Jakalian A, Malenfant E, et al. Optimization and determination of the absolute configuration of a series of potent inhibitors of human papillomavirus type-11 E1-E2 protein-protein interaction: a combined medicinal chemistry, NMR and computational chemistry approach. *Bioorg Med Chem*. 2007; 15(7):2690–700. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.036> PMID: 17306550.
38. Davidson W, McGibbon GA, White PW, Yoakim C, Hopkins JL, Guse I, et al. Characterization of the binding site for inhibitors of the HPV11 E1-E2 protein interaction on the E2 transactivation domain by photoaffinity labeling and mass spectrometry. *Anal Chem*. 2004; 76(7):2095–102. <https://doi.org/10.1021/ac0353335o> PMID: 15053675.
39. Yoakim C, Ogilvie WW, Goudreau N, Naud J, Hache B, O'Meara JA, et al. Discovery of the first series of inhibitors of human papillomavirus type 11: inhibition of the assembly of the E1-E2-Origin DNA complex. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003; 13(15):2539–41. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(03\)00510-9](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(03)00510-9) PMID: 12852961.
40. Liu Y, Saldívar A, Bess J, Solomon L, Chen CM, Tripathi R, et al. Investigating the origin of the slow-binding inhibition of HCV NS3 serine protease by a novel substrate based inhibitor. *Biochemistry*. 2003; 42(29):8862–9. <https://doi.org/10.1021/bi034661v> PMID: 12873147.
41. Oliveira A, de Souza APM, de Oliveira AS, da Silva ML, de Oliveira FM, Santos EG, et al. Zirconium catalyzed synthesis of 2-arylidene Indan-1,3-diones and evaluation of their inhibitory activity against

- NS2B-NS3 WNV protease. *Eur J Med Chem.* 2018; 149:98–109. Epub 2018/03/03. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.037> PMID: 29499491.
42. Perrin DD, Armarego WLF. *Purification of Laboratory Chemicals*. 3rd edn ed. Oxford: Pergamon; 1988.
 43. da Silva Maia AF, Siqueira RP, de Oliveira FM, Ferreira JG, da Silva SF, Caiuby CAD, et al. Synthesis, molecular properties prediction and cytotoxic screening of 3-(2-aryl-2-oxoethyl)isobenzofuran-1(3H)-ones. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016; 26(12):2810–6. Epub 2016/05/09. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.065> PMID: 27155902.
 44. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1–2):55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4) PMID: 6606682.
 45. LigPrep SR. 3.4.014 ed. New York: Schrödinger, LLC; 2016.
 46. Aleshin AE, Shiryayev SA, Strongin AY, Liddington RC. Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the Flaviviridae fold. *Protein Sci.* 2007; 16(5):795–806. <https://doi.org/10.1110/ps.072753207> PMID: 17400917; PubMed Central PMCID: PMC2206648.
 47. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem.* 2004; 47(7):1739–49. <https://doi.org/10.1021/jm0306430> PMID: 15027865.
 48. Schrödinger. Glide. New York: Schrödinger, LLC; 2016.
 49. Sherman W, Day T, Jacobson MP, Friesner RA, Farid R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *J Med Chem.* 2006; 49(2):534–53. <https://doi.org/10.1021/jm050540c> PMID: 16420040.
 50. Schrödinger. Schrödinger Release. New York: Schrödinger, LLC; 2016.
 51. Schrödinger. Maestro. 10.6 ed. New York: Schrödinger, LLC; 2016.
 52. Borgati TF, Alves RB, Teixeira RR, Freitas RPD, Perdigão TG, Silva SFD, et al. Synthesis and phyto-toxic activity of 1,2,3-triazole derivatives. *J Braz Chem Soc.* 2013; 24:953–61.
 53. Balasubramanian A, Manzano M, Teramoto T, Pilankatta R, Padmanabhan R. High-throughput screening for the identification of small-molecule inhibitors of the flaviviral protease. *Antiviral Res.* 2016; 134:6–16. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.08.014> PMID: 27539384; PubMed Central PMCID: PMC5065773.
 54. Luo D, Vasudevan SG, Lescar J. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Res.* 2015; 118:148–58. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.014> PMID: 25842996.
 55. Xu M, Lee EM, Wen Z, Cheng Y, Huang WK, Qian X, et al. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nat Med.* 2016; 22(10):1101–7. <https://doi.org/10.1038/nm.4184> PMID: 27571349.
 56. Khalilzadeh E, Hazrati R, Saiah GV. Effects of topical and systemic administration of Eugenia caryophyllata buds essential oil on corneal anesthesia and analgesia. *Res Pharm Sci.* 2016; 11(4):293–302. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.189297> PMID: 27651809; PubMed Central PMCID: PMC5022377.
 57. Kildea MA, GL GLA, Kearney RE. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*) Aquaculture. 2004; 232:265–77.
 58. Daniel AN, Sartoretto SM, Schmidt G, Caparroz-Assef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models. *Rev Bras Farmacogn.* 2009; 19:212–7.
 59. Kurian R, Arulmozhi DK, Veeranjanyulu A, Bodhankar SL. Effect of eugenol on animal models of nociception. *Indian J of Pharmacol.* 2006; 38:341–5.
 60. Lionnet L, Beaudry F, Vachon P. Intrathecal eugenol administration alleviates neuropathic pain in male Sprague-Dawley rats. *Phytother Res.* 2010; 24(11):1645–53. <https://doi.org/10.1002/ptr.3174> PMID: 21031622.
 61. Ohkubo T, Shibata M. The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiaicol. *J Dent Res.* 1997; 76(4):848–51. <https://doi.org/10.1177/00220345970760040501> PMID: 9126180.
 62. Park SH, Sim YB, Lee JK, Kim SM, Kang YJ, Jung JS, et al. The analgesic effects and mechanisms of orally administered eugenol. *Arch Pharm Res.* 2011; 34(3):501–7. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0320-z> PMID: 21547684.
 63. Islamuddin M, Chouhan G, Want MY, Ozbak HA, Hemeg HA, Afrin F. Immunotherapeutic Potential of Eugenol Emulsion in Experimental Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(10):

- e0005011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005011> PMID: 27776125; PubMed Central PMCID: PMC5077126.
64. Fujisawa S, Murakami Y. Eugenol and Its Role in Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 929:45–66. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41342-6_3 PMID: 27771920.
 65. Mahadlek J, Charoenteeraboon J, Phaechamud T. Zinc Oxide Gels for periodontitis treatment. *J Metal Mater Mineral.* 2010; 20:159–63.
 66. Tanaka S, Royds C, Buckley D, Basketter DA, Goossens A, Bruze M, et al. Contact allergy to isoeugenol and its derivatives: problems with allergen substitution. *Contact Dermatitis.* 2004; 51(5–6):288–91. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2004.00446.x> PMID: 15606655.
 67. Lei J, Hansen G, Nitsche C, Klein CD, Zhang L, Hilgenfeld R. Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. *Science.* 2016; 353(6298):503–5. <https://doi.org/10.1126/science.aag2419> PMID: 27386922.
 68. Noble CG, Seh CC, Chao AT, Shi PY. Ligand-bound structures of the dengue virus protease reveal the active conformation. *J Virol.* 2012; 86(1):438–46. <https://doi.org/10.1128/JVI.06225-11> PMID: 22031935; PubMed Central PMCID: PMC3255909.
 69. Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, et al. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol.* 2006; 13(4):372–3. <https://doi.org/10.1038/nsmb1073> PMID: 16532006.
 70. Robin G, Chappell K, Stoermer MJ, Hu SH, Young PR, Fairlie DP, et al. Structure of West Nile virus NS3 protease: ligand stabilization of the catalytic conformation. *J Mol Biol.* 2009; 385(5):1568–77. *Epub* 2008/12/09. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.026> PMID: 19059417.
 71. Hammamy MZ, Haase C, Hammami M, Hilgenfeld R, Steinmetzer T. Development and characterization of new peptidomimetic inhibitors of the West Nile virus NS2B-NS3 protease. *ChemMedChem.* 2013; 8(2):231–41. <https://doi.org/10.1002/cmcc.201200497> PMID: 23307694.
 72. Nitsche C, Zhang L, Weigel LF, Schilz J, Graf D, Bartenschlager R, et al. Peptide-Boronic Acid Inhibitors of Flaviviral Proteases: Medicinal Chemistry and Structural Biology. *J Med Chem.* 2017; 60(1):511–6. *Epub* 2016/12/15. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01021> PMID: 27966962.

Eugenol

Biosynthesis, Toxicity
and Uses

Megan Shelton
Editor



Chemistry Research
and Applications

NOVA

Complimentary Contributor Copy

CHEMISTRY RESEARCH AND APPLICATIONS

EUGENOL
BIOSYNTHESIS, TOXICITY AND USES

MEGAN SHELTON
EDITOR



Complimentary Contributor Copy

CONTENTS

Preface		vii
Chapter 1	Eugenol as an Active Component in Food Packaging Materials <i>Florencia Muratore, María L. Goñi, Miriam C. Strumia, Silvia E. Barbosa, Nicolás A. Gañan and Raquel E. Martini</i>	1
Chapter 2	Antiprotozoal Activity of Eugenol and Derivatives <i>Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva, Alex Ramos Aguiar and Adilson V. Costa</i>	49
Chapter 3	Thermosetting Materials from Eugenol Derivatives <i>Dailyn Guzmán, Angels Serra and Xavier Ramis</i>	79
Index		119
Related Nova Publications		125

Complimentary Contributor Copy

In: Eugenol: Biosynthesis, Toxicity and Uses ISBN: 978-1-53615-429-0
Editor: Megan Shelton © 2019 Nova Science Publishers, Inc.

Chapter 2

**ANTIPROTOZOAL ACTIVITY OF EUGENOL
AND DERIVATIVES**

***Róbson R. Teixeira^{1,*}, Poliana A. R. Gazolla¹,
Silma F. da Silva¹, Alex Ramos Aguiar¹
and Adilson V. Costa²***

¹Chemistry Department, Universidade Federal de Viçosa,
Viçosa, Minas Gerais State, Brazil

²Physics and Chemistry Department,
Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre,
Espírito Santo State, Brazil

ABSTRACT

Parasitic diseases, such as leishmaniasis, malaria, and trypanosomiasis, affect millions of people annually and are thus a major health concern. Currently, there are several investigations focused on finding alternative drugs for the treatment of parasitic diseases, and the exploitation of natural products is a viable approach. In this regard, compounds obtained from nature can be used directly as a pharmaceutical

* Corresponding Author's E-mail: robsonr.teixeira@ufv.br.

Complimentary Contributor Copy

50 *Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.*

or can be chemically modified to afford derivatives with improved pharmacological activity. Eugenol is a natural compound which has been identified in several aromatic plants and that presents a number of biological activities, including antiprotozoal. In this book chapter, it will be covered the advances concerning the antiprotozoal activity of eugenol as well as natural and synthetic derivatives of it. It is going to be demonstrated that chemical modifications of eugenol can afford promising antiprotozoal compounds.

Keywords: antimalarial, eugenol, parasitic diseases, antiprotozoal activity, leishmanicidal, trypanocidal

INTRODUCTION

Parasitic diseases affect millions of hundreds of people annually and constitute an important global health problem. They are a serious threat mainly to the poorest population around the world and represent a significant issue in terms of human health and well-being [1]. Malaria, trypanosomiasis, and leishmaniasis are some examples of parasitic diseases.

The term parasitic disease is related to the infections caused by protozoa and helminth worm species. Humans can harbor around 300 helminth worms and nearly 100 protozoa. Not all of them are pathogenic to human beings; however, some of them are responsible for approximately 20 human diseases or disease complexes which are among the most relevant diseases around the world, mainly in the tropics [2].

From the historical standpoint, until the end of the nineteenth century, parasitologists were concerned with the discovery of parasites, their host and their life cycles. However, this focus changed with the perception of the involvement of parasites with human diseases. As a result, the approach to the subject significantly altered from zoologist point of view to medicinal [2].

Currently, there are several investigations focused on finding drugs for the treatments of parasitic diseases. In the search for new drugs for the treatment of diseases, the exploitation of natural products is a viable

Complimentary Contributor Copy

approach. In this regard, compounds obtained from nature can be used directly as a pharmaceutical or can be chemically modified to afford derivatives with improved pharmacological activity [3-12].

Eugenol is a natural phenylpropanoid compound, which has been identified in several aromatic plants such as *Myristica fragrans* Houtt. (nutmeg), *Cinnamomum verum* J. Presl (true cinnamon), *C. loureirii* Nees. (Saigon cinnamon), *Ocimum gratissimum* Forssk. (basil) and *Ocimum basilicum* L. (sweet basil). However, *Eugenia caryophyllata* (= *Syzygium aromaticum*) can be considered the principal natural source of this compound as it represents between 45% and 90% of the composition of the essential oil derived from this species. Eugenol is a versatile starting material and building block for organic and bio-organic synthesis [13]. In addition, several biological activities have been reported for eugenol, including antiprotozoal [14].

In this book chapter, it will be covered the advances concerning the antiprotozoal activity of eugenol [14] as well as natural and synthetic derivatives of it. It will not be covered studies related to the antiprotozoal activity of formulations containing eugenol or derivatives of it.

LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF EUGENOL AND ITS DERIVATIVES

Among the parasitic diseases, Leishmaniasis is one of the most important. It corresponds to a complex of diseases caused by the protozoan *Leishmania*. It affects 350 million people in 98 countries, with a global incidence of 0.9 – 1.6 million cases per year [15]. *Leishmania* parasites are transmitted *via* the bites of infected female phlebotomine sandflies. Three main clinical manifestations of leishmaniasis, depending on the parasite species and the host-parasite relationship, are known: visceral (often known as Kalazar and the most serious form of the disease), cutaneous (the most common), and mucocutaneous [16]. Visceral leishmaniasis is responsible for 20,000 - 40,000 deaths annually [15].

Complimentary Contributor Copy

52 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

Traditionally, chemotherapy for leishmaniasis has relied on the use of pentavalent antimonial drugs, such as *N*-methylglucamine antimoniate (Figure 1), which is one of the most widely used drugs [17]. However, this drug has limited clinical potential due to the occurrence of serious side effects and a high incidence of disease recurrence [18]. Pentamidine [19], amphotericin B [19], paromomycin [20], and miltefosine [21, 22] are other drugs that have been used for the treatment of leishmaniasis (Figure 1). The drugs used in the therapy, however, have limitations in common: (i) they are toxic and their long-time administration causes various undesirable side effects; (ii) they are costly; (iii) they show low efficacy in endemic areas due to the observed resistance of various parasite species [23]. The aforementioned problems illustrate the need to develop new antileishmanial drugs. As a consequence, several investigations have been conducted to find alternative treatments for leishmaniasis [24].

Ocimum gratissimum L. is an aromatic subshrub species that belongs to the Lamiaceae family and is considered an important producer of essential oil, widely used in folk medicine [24]. An investigation conducted with this species revealed that its eugenol-rich essential oil presents leishmanicidal activity. The IC₅₀ values of the essential oil against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis* were, respectively, 135 µg mL⁻¹ and 100 µg mL⁻¹. Eugenol alone was also evaluated and the activity against promastigote form was even more pronounced (IC₅₀ value of 80 µg mL⁻¹) [25]. Other reports on the leishmanicidal effect of eugenol-rich essential oils are also described in the literature [26-27] and they are possibly associated with the high content of eugenol in these essential oils.

Considering the antileishmanial activity of eugenol, researchers have chemically modified its structure directed to find novel, less toxic, and more effective antileishmanial drugs. Thus, Teixeira's research group converted eugenol (**1**) into a series of triazole derivatives [28]. The preparation of the derivatives started with the extraction of eugenol (**1**) from cloves. Subsequently, this compound was converted, via alkylation procedures, into alkynes (**2**) and (**4**) (Figure 2). Compound (**3**) was prepared by treating pent-4-yn-1-ol with methanesulfonyl chloride [28].

Complimentary Contributor Copy

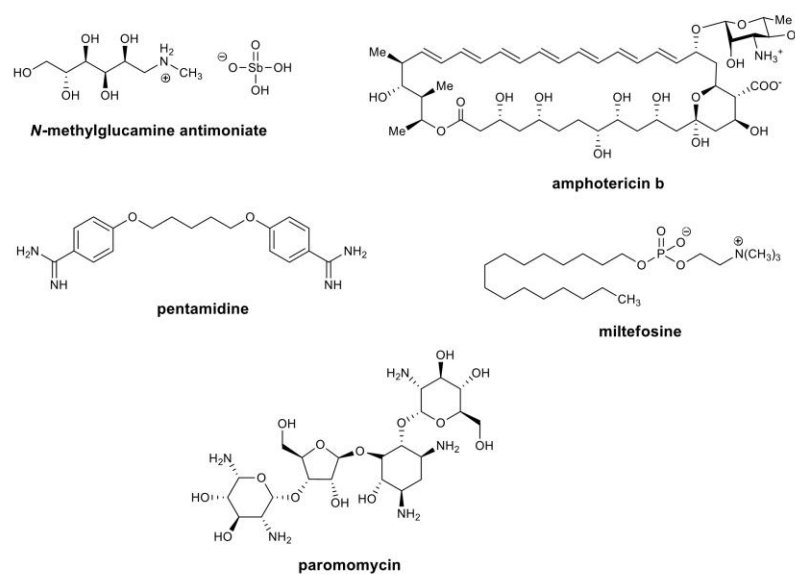


Figure 1. Structures of compounds used in the chemotherapy of leishmaniasis.

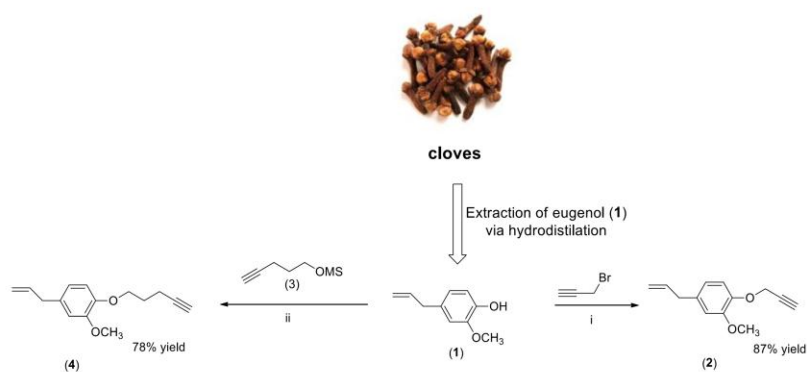


Figure 2. Preparation of alkylated derivatives (2) and (4) from eugenol (1). The reactions conditions were as followed: (i) NaOH, CH₃OH, 40°C; then acetonitrile, r.t.; (ii) NaOH, CH₃OH, 40°C; then acetonitrile, 70°C [28].

Then, compounds (2) and (4) were submitted to the Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC), also known as click reaction [29-34], with a series of benzyl azides (Figure 3).

54 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

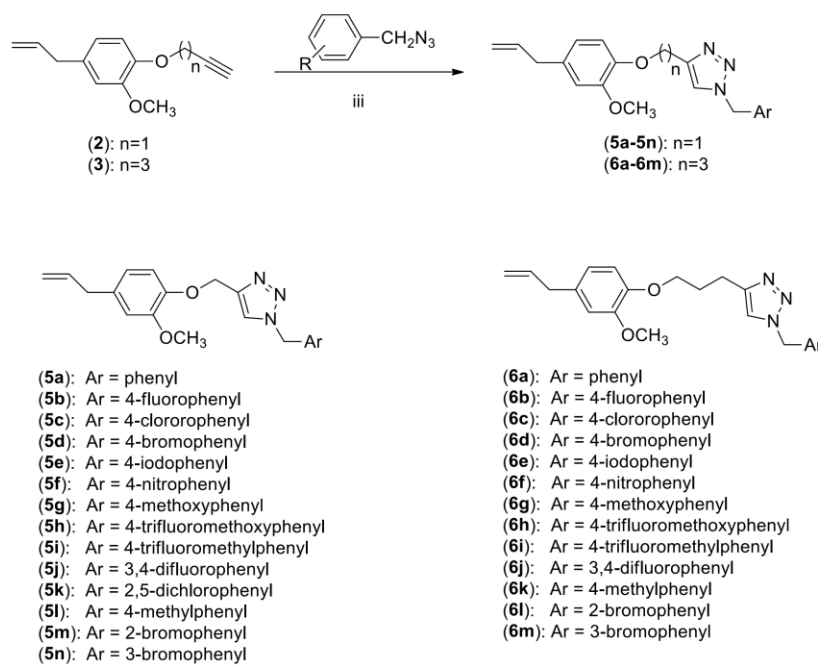


Figure 3. Preparation of a series of eugenol derivatives bearing triazole portions. Reagents and conditions: (iii) *Sodium ascorbate* (40 mol%), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 mol%), EtOH/H₂O (1:1 v/v) [28].

The evaluation of the leishmanicidal activity of the compounds (**5a-5n**) and (**6a-6m**) against the promastigote form of *Leishmania amazonensis*, which causes cutaneous leishmaniasis, showed that the compounds present activity with different degrees of potency (Table 1). The triazole derivatives of eugenol (**1**) were less potent than the pentamidine and amphotericin B used as positive controls in the bioassays. The most active derivative (**6k**) was used in subsequent assays [28].

The intracellular amastigote form of *L. amazonensis* is responsible for the infection in mammals. The most potent eugenol triazole derivative (**6k**) was also evaluated against macrophages infected with amastigote form. Macrophages are the main host cells used in the evaluation of *in vitro* infection assays with *L. amazonensis*.

Table 1. Effect of eugenol derivatives 5a-5n and 6a-6m on promastigote form of *L. amazonensis*

Compound	Promastigote IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)
5a	30.2 ± 1.5
5b	59.4 ± 1.7
5c	1780 ± 3.0
5d	993 ± 3.0
5e	2013 ± 3.0
5f	130.2 ± 2.1
5g	424.9 ± 2.6
5h	322.1 ± 2.5
5i	2013 ± 3.0
5j	969 ± 3.0
5k	49.2 ± 1.7
5l	106.2 ± 2.1
5m	159.6 ± 2.2
5n	155.8 ± 2.1
6a	37.9 ± 1.5
6b	32.2 ± 1.5
6c	817 ± 3.0
6d	286.7 ± 2.5
6e	278.9 ± 2.4
6f	173.3 ± 2.3
6g	119.5 ± 2.0
6h	145.9 ± 2.1
6i	295.2 ± 2.5
6j	177.5 ± 2.3
6k	7.4 ± 0.80
6l	913.3 ± 2.9
6m	980.2 ± 2.9
pentamidine	4.2 ± 0.3
amphotericin B	0.4 ± 0.1

It was found that compound (**6k**) was able to target the *Leishmania* parasites inside of mouse peritoneal macrophages (IC₅₀ = 1.6 μmol L⁻¹), without interfering with host cell viability (Table 2). At similar conditions, pentamidine and glucantime exhibited IC₅₀ values of 1.8 μmol L⁻¹ and 45.5 μg mL⁻¹ (124.3 μmol L⁻¹) respectively.

56 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

Table 2. *In vitro* antileishmanial activity of (6k) against promastigote, intracellular amastigote of *L. amazonensis* after 72 h of treatment, and its cytotoxicity against macrophages

Compound	Promastigote IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Amastigote ^a IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Macrophages ^b CC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Selectivity Index ^c (SI)
6k	7.4 ± 0.8	1.6 ± 0.2	211.9 ± 2.3	132.5
glucantime ^e	Nd ^d	45.5 ± 1.6	75.5 ± 2.6	1.6
pentamidine	4.2 ± 0.4	1.8 ± 0.2	8.5 ± 0.6	4.7

Arithmetic means ± Standard deviation (n = 3).

^a Intracellular amastigotes.

^b Murine peritoneal macrophages.

^c SI = CC₅₀/IC₅₀ intracellular amastigotes.

^d Nd: not determined.

^e glucantime [μg mL⁻¹].

Compound (6k) was assayed against uninfected murine intraperitoneal macrophages to evaluate its cytotoxicity; it was found CC₅₀ of 211.9 μmol L⁻¹. Thus, the selectivity index (SI = CC₅₀/IC₅₀ intracellular amastigotes) value for compound (6k) was 132.5, whereas SI = 4.7 for pentamidine and SI = 1.6 for glucantime. Therefore, the derivative (6k) presents lower toxicity when compared to drugs currently used in the treatment of leishmaniasis [28]. Compound (6k) was also evaluated with respect to the nitric oxide (NO) production. This experiment was conducted in order to determine whether anti-amastigote activity resulted from activation of the macrophage antileishmanial mechanism. It was noticed that (6k) did not significantly stimulate the production of nitric oxide, suggesting a direct and selective action of this derivative on the intracellular amastigote (data not shown) [28].

The DNDi (Drugs for Neglected Disease *initiative*) has reported limited requirements to be reached in order to proceed with the next stage of development towards a drug for visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* [35]. According to the criteria, IC₅₀ of the activity against *L. donovani* amastigotes in macrophages should be ≤ 10 μmol L⁻¹ and the selective index should be ≥ 10 fold more active against the parasite versus the mammalian cell line. Even though compound (6k) was not evaluated against *L. donovani*, it is possible to state that, base on the

Complimentary Contributor Copy

selection criteria of DNDi, the triazole derivative (**6k**) is a promising compound for the treatment of leishmaniasis.

Straightforward acylation procedures were used to synthesize the eugenol derivatives (**7**) and (**8**) (Figure 4). The authors did not report yields of these reactions.

The obtained esters had their leishmanicidal activity evaluated against *Leishmania infantum chagasi*, which is also a causative agent of visceral leishmaniasis (Table 3). It was found that the derivatives (**7**) and (**8**) were more efficient than eugenol (**1**) against both forms of *L. infantum chagasi* and they had similar effects on amastigote form. Moreover, these eugenol derivatives did not present toxicity against the murine RAW 264.7 macrophage-like cell line at $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. It deserves comment the fact that the evaluated eugenol derivatives are equipotent to amphotericin B used as positive control [36].

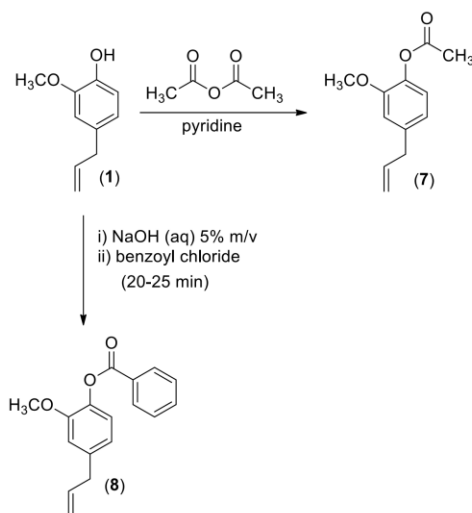


Figure 4. Preparation of *O*-acetyl and *O*-benzoyl eugenol derivatives.

In a recent publication, Coelho and collaborators also synthesized a series of esters from eugenol (**1**) presenting the general structure (**9**) shown in Figure 5.

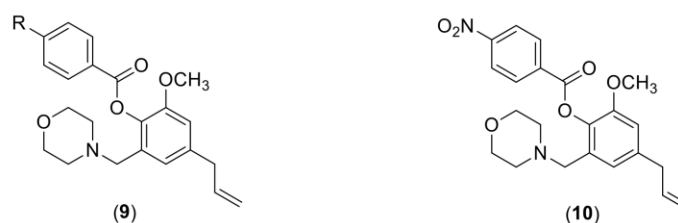
58 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

Table 3. Leishmanicidal effect of compounds (1), (7) and (8) against *L. infantum chagasi*

Compound	Promastigote IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Amastigote IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Toxicity% RAW 264.7 cells survival at 100 µg mL ⁻¹
1	56.13 ± 2.09	20.81 ± 1.59	29 ± 1.30
7	23.21 ± 3.46	18.53 ± 4.79	97.7 ± 5.60
8	10.58 ± 0.18	14.93 ± 4.50	> 100
amphotericin B	Nd	20.44 ± 0.98	36.5 ± 0.50
pentamidine	5.30 ± 0.81	Nd	85.6 ± 6.90

Nd: not determined.

(±): Standard deviation.



R = H; NO₂; CH₃; OCH₃; Br, CF₃; F, NH₂, *t*-butyl

Figure 5. General structure of esters (9) and the most active derivative (10) prepared by Coelho and co-authors [37].

In this study, the esters were evaluated against the cysteine protease rCPB 2.8. This enzyme was chosen because cysteine proteases are important targets since they are involved in: i) the infectivity of the parasite during its interaction with the host; ii) the invasion of macrophages by promastigote forms; iii) the evasion of the immune system, degrading components of the host's extracellular matrix; iv) the transformation of the vector promastigote form to the intracellular amastigote one and in their nutrition. A total of nine eugenol ester derivatives were prepared and the most active derivative (10) (Figure 5) was capable of inhibiting the enzymatic activity by 88.2% at 100 µmol L⁻¹ (IC₅₀ = 30 ± 1 µmol L⁻¹) [37]. Even though it would be interesting to evaluate the compounds directly against the *Leishmania* parasite, this was not made in this investigation.

Complimentary Contributor Copy

The eugenol derivatives (**11**), (**12**), and (**13**) were prepared as depicted in Figure 6.

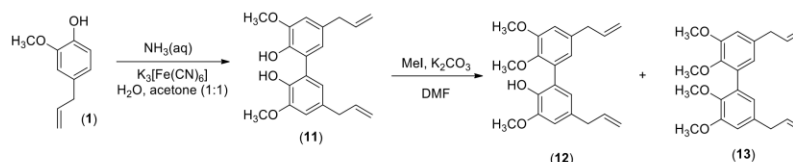


Figure 6. Preparation of neolignans (**11**), (**12**) and (**13**).

Thus, the oxidative coupling of eugenol (**1**) afforded the neolignan dehydrodieugenol (**11**) in 70% yield. Subsequently, the treatment of one equivalent of (**11**) with one equivalent of methyl iodide gave the dehydrodieugenol monomethyl ether (**12**) as the major product (48.5% yield) along with the dimethyl ether (**13**) (14.1%) [38]. The synthesized compounds were evaluated against the promastigote form of *Leishmania amazonensis* and the results are shown in Table 4.

Compared to the positive controls meglumine antimoniate and amphotericin B, the compounds (**11**), (**12**), and (**13**) presented much lower efficiency. The monomethyl ether (**12**) corresponded to the most active derivative [38]. As previously mentioned, eugenol (**1**) presented $IC_{50} = 85 \mu\text{g mL}^{-1}$ as evaluate against *L. amazonensis* [25]. Based on this result, the compounds (**11**), (**12**), and (**13**) are more potent than eugenol (**1**).

Table 4. Leishmanicidal activity of compounds (11**), (**12**), and (**13**) against *L. amazonensis***

Compound	Leishmanicidal activity (IC_{50} in $\mu\text{g mL}^{-1}$)
11	42.20
12	13.68
13	47.75
meglumine antimoniate	> 4.00
amphotericin B	0.13

The Baylis-Morita Hillman reaction [39-42] was utilized as the key process for the preparation of the eugenol adducts (**14-16**) as shown in

60 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

Figure 7 [43]. Thus, eugenol was initially converted to an ester via reaction with acrylic acid. Subsequent treatment of the ester with different aldehydes in the presence of DABCO afforded the corresponding Baylis-Hilman adducts (**14-16**) [43].

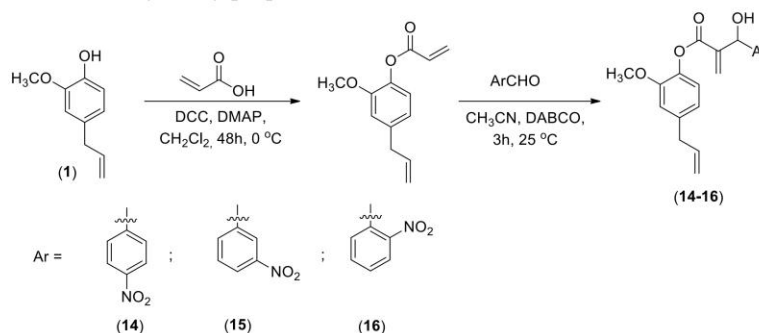


Figure 7. Steps involved in the preparation of adducts (**14-16**).

As can be seen in Table 5, the leishmanicidal activity of adducts against *L. amazonensis* depends on the position of the nitro group (-NO₂). Moreover, all of them are more active than eugenol (**1**) (reference compound) and glucantime (positive control) [43]. The most potent compound (**16**) presents the nitro group at the *ortho* position of the aromatic ring.

Table 5. Leishmanicidal activity of eugenol (1**) and Baylis-Hillman adducts (**14-16**) against *L. amazonensis* promastigote form**

Compound	Promastigote IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Red blood cell CC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Selective Index (SI)
1	77.15 ± 1.77	> 400	> 5.18
14	8.75 ± 0.44	> 400	> 45.71
15	10.49 ± 0.52	> 400	> 38.13
16	4.71 ± 0.24	> 400	84.92
glucantime	1633 ± 437.29	1175.02	1.39
amphotericin B	0.52 ± 0.03	11.61	22.34

SI = CC₅₀/IC₅₀ promastigotes.

(±): Standard deviation.

Even though the compounds were not evaluated against the amastigote form of *L. amazonensis*, the authors reported the selective index (SI) based

Complimentary Contributor Copy

on the activity of the compounds on promastigote form and on red blood cells. Considering that, the most active compound (**16**) also presented the best selective index [43].

Debnath, Mapathra, and co-workers [44] prepared three sets of compounds derived from eugenol (**1**) (Figure 8). All of these derivatives were tested on promastigote and amastigote forms of *Leishmania donovani*. Eugenol (**1**) and 4-allyl-1,2-dimethoxybenzene (**53**) were used as reference substances in the bioassays; miltefosine and amphotericin B were utilized as positive controls [44].

Considering the anti promastigote activity (Table 6), it can be noticed that derivatives (**17-30**) were more potent than eugenol (**1**) and compound (**53**). As a general trend, the potency of substances (**17-30**) increased with the size of chain length and the best activity was observed for compound **27**. Therefore, the C10 chain length is the best in terms of anti promastigote activity of derivatives (**17-30**). In terms of the second set (**31-49**) of eugenol derivatives, they also presented superior activity against promastigote form than the reference compounds eugenol (**1**) and (**53**) (Table 6). The IC_{50} varied from $20.13 \pm 0.91 \mu\text{mol L}^{-1}$ to $162.00 \pm 4.92 \mu\text{mol L}^{-1}$ and the most potent was derivative (**49**).

Regarding the third series (**50-52**) of eugenol derivatives, once again they were most active than eugenol (**1**) and (**53**), and compound (**52**) presented best activity ($IC_{50} = 52.97 \pm 1.57 \mu\text{mol L}^{-1}$, Table 6).

The results of anti amastigote activity are presented in Table 7. For the set of compounds (**17-30**), the IC_{50} values of derivatives (**17-21**) were comparable to eugenol (**1**) and (**53**), while substances (**22-30**) were more potent than the reference compounds. The best activity was observed for compound (**29**), which has a C16 chain length. Although compound (**29**) was less active than the positive controls miltefosine and amphotericin B, its selective index was superior.

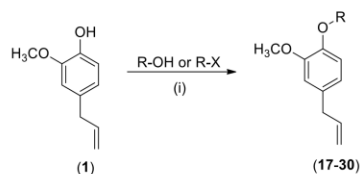
For the compounds containing aromatic groups in the second set of substances, while for compounds (**31-33**) the anti amastigote activity was comparable to the anti promastigote effect, the anti amastigote activity for derivatives (**34-38**) was significantly enhanced. As a general trend, the anti amastigote activity increased with the chain length. The most active

62 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

compound (34) was more efficient than miltefosine and presented better selective index (SI) than the positive controls.

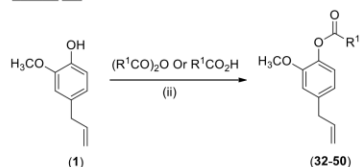
In terms of the third set o compounds, the anti amastigote activity was moderate, with compound (52) being the most effective.

First Set





Compound	R	Compound	R
17	C ₃ H ₅	24	C ₇ H ₅
18	C ₅ H ₉	25	C ₈ H ₁₇
19	C ₂ H ₅	26	C ₉ H ₁₉
20	C ₃ H ₇	27	C ₁₀ H ₂₁
21	C ₄ H ₉	28	C ₁₂ H ₂₅
22	C ₅ H ₁₁	29	C ₁₆ H ₃₃
23	C ₆ H ₁₃	30	C ₁₈ H ₃₅ (cys only)

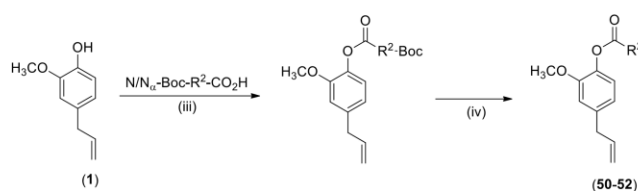
Second Set



Compound	R ¹	Compound	R ¹
31	CH ₃	41	C ₄ H ₉
32		42	C ₅ H ₁₁
33		43	C ₆ H ₁₃
34		44	C ₇ H ₁₅
35		45	C ₈ H ₁₇
36		46	C ₉ H ₁₉

Complimentary Contributor Copy

Compound	R ¹	Compound	R ¹
37		47	C ₈ H ₂₃
38		48	C ₁₅ H ₃₁
39	C ₂ H ₅	49	C ₁₇ H ₃₅ (cys only)
40	C ₃ H ₇		

Third Set



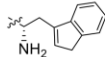
Compound	R ²
50	
51	
52	

Figure 8. Synthesis of eugenol derivatives described by Debnath, Mopathra, and co-workers [44]. Reagents and conditions: (i) DIAD/PPh₃, THF, 7-8 h, rt (for R-OH) or NaH, DMF, 3-4 h, rt (for R-X); (ii) Pyridine/CHCl₃, 6 h, rt (for R₁CO₂O) or DCC/DMAP (for R₁CO₂H); (iii) DCC/DMAP, DMF, 6-8 h, rt; (iv) HCl gas (dry), MeOH, 3 h, rt.

It is also presented in Table 7 the results of nitric oxide (NO) production. The clearance of intracellular amastigotes within the macrophages is solely mediated by NO generation [45]. As can be seen in Table 7, in addition of being the most active derivative, compound (34) was one of the best in inducing NO generation. In fact, further bioassays revealed that (34) induces NO generation in BALB/c derived peritoneal macrophages in a concentration dependent manner [44]. Compound 34 also stimulated iNOS2 mRNA expression and decreased the arginase-1 activity in *L. donovani* infected peritoneal macrophages.

64 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

Table 6. Results of *L. donovani* anti promastigote evaluation of eugenol (1) and derivatives (17-53)

Compound	Promastigote IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	RAW 264.7 cell CC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Selective Index (SI)
1	441.66 ± 13.28	527.04 ± 14.62	1.19 ± 0.01
17	237.58 ± 13.51	384.78 ± 16.74	1.64 ± 0.15
18	242.08 ± 5.47	358.51 ± 8.65	1.48 ± 0.07
19	71.67 ± 5.83	101.79 ± 5.05	1.43 ± 0.08
20	133.07 ± 9.02	110.04 ± 6.98	0.83 ± 0.066
21	308.93 ± 20.65	328.67 ± 4.04	1.07 ± 0.05
22	90.81 ± 5.55	178.37 ± 7.04	1.96 ± 0.04
23	80.28 ± 6.28	291.63 ± 23.31	3.63 ± 0.11
24	61.32 ± 8.65	197.79 ± 20.06	3.28 ± 0.14
25	62.30 ± 6.98	357.14 ± 22.14	5.85 ± 0.39
26	81.94 ± 8.81	332.07 ± 23.69	4.27 ± 0.73
27	49.92 ± 7.06	411.73 ± 22.24	8.61 ± 0.95
28	52.51 ± 4.87	299.34 ± 16.00	5.76 ± 0.23
29	58.05 ± 1.62	291.69 ± 7.90	5.02 ± 0.02
30	60.24 ± 3.16	423.80 ± 30.89	7.04 ± 0.42
31	165.92 ± 10.57	356.09 ± 20.32	2.15 ± 0.06
32	61.26 ± 1.71	363.85 ± 17.32	5.93 ± 0.12
33	64.48 ± 2.97	251.10 ± 4.36	3.91 ± 0.13
34	82.38 ± 6.19	260.57 ± 7.63	3.18 ± 0.15
35	76.86 ± 4.15	255.15 ± 6.32	3.33 ± 0.12
36	60.45 ± 4.75	484.76 ± 5.76	8.11 ± 0.51
37	33.36 ± 2.05	391.30 ± 5.63	11.8 ± 0.68
38	28.86 ± 1.14	395.66 ± 7.11	13.73 ± 0.30
39	145.82 ± 8.81	448.40 ± 12.44	3.1 ± 0.20
40	64.45 ± 5.42	232.91 ± 24.97	3.61 ± 0.22
41	106.31 ± 8.78	368.27 ± 19.37	3.49 ± 0.12
42	162.00 ± 4.92	516.72 ± 26.11	3.21 ± 0.25
43	103.27 ± 8.03	511.69 ± 40.92	4.95 ± 0.08
44	68.32 ± 8.57	580.09 ± 13.67	8.95 ± 1.24
45	93.62 ± 5.52	316.92 ± 28.78	3.37 ± 0.14
46	67.45 ± 6.94	373.05 ± 19.48	5.66 ± 0.53
47	56.16 ± 4.24	528.76 ± 53.53	9.36 ± 0.38
48	43.27 ± 1.44	374.27 ± 6.23	8.56 ± 0.19
49	20.13 ± 0.91	305.46 ± 2.38	15.2 ± 0.62
50	97.35 ± 3.90	278.43 ± 6.31	2.87 ± 0.08
51	89.01 ± 5.92	261.34 ± 5.45	2.96 ± 0.16
52	52.97 ± 1.57	450.56 ± 5.82	8.6 ± 0.09
53	475.45 ± 19.08	517.42 ± 6.51	1.09 ± 0.05
miltefosine	10.38 ± 0.32	44.78 ± 0.98	4.3 ± 0.21
amphotericin B	1.36 ± 0.16	10.02 ± 0.45	7.4 ± 0.58

SI = CC₅₀/IC₅₀ promastigotes. (±): Standard deviation.

Complimentary Contributor Copy

Table 7. Results of *L. donovani* anti amastigote evaluation of eugenol (1) and derivatives (17-53)

Compound	Amastigote IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)	Macrophages (CC ₅₀ μmol L ⁻¹)	Selective Index (SI)	NO generation (μmol L ⁻¹)
1	173.26 ± 7.37	475.76 ± 13.52	2.75 ± 0.07	7.45 ± 0.32
17	120.28 ± 5.34	353.56 ± 15.76	2.95 ± 0.12	13.86 ± 0.68
18	157.20 ± 7.36	371.94 ± 4.69	2.38 ± 0.08	8.37 ± 0.85
19	162.13 ± 12.69	90.50 ± 9.31	0.55 ± 0.05	10.43 ± 1.03
20	155.71 ± 9.26	110.72 ± 6.40	0.71 ± 0.03	10.64 ± 0.59
21	147.15 ± 4.90	345.06 ± 10.71	2.35 ± 0.07	14.23 ± 0.92
22	83.38 ± 6.14	163.87 ± 9.17	1.97 ± 0.04	12.95 ± 1.56
23	36.40 ± 4.15	272.26 ± 18.16	7.60 ± 0.41	20.81 ± 1.70
24	41.08 ± 5.37	197.15 ± 20.66	4.88 ± 0.34	22.43 ± 1.82
25	48.69 ± 6.26	392.66 ± 30.86	8.30 ± 0.81	26.01 ± 2.21
26	51.78 ± 6.13	326.29 ± 15.18	6.47 ± 0.48	25.19 ± 1.01
27	28.97 ± 3.48	272.37 ± 23.15	9.67 ± 0.91	26.17 ± 1.45
28	25.98 ± 2.74	292.43 ± 23.19	11.41 ± 0.74	28.12 ± 1.55
29	17.06 ± 1.57	250.93 ± 6.51	14.47 ± 0.91	29.1 ± 1.26
30	25.51 ± 2.94	393.66 ± 23.00	15.94 ± 1.79	28.94 ± 1.95
31	99.11 ± 5.38	352.21 ± 6.64	3.59 ± 0.21	12.44 ± 1.84
32	78.41 ± 9.78	400.00 ± 5.13	5.24 ± 0.45	14.56 ± 1.01
33	57.94 ± 3.14	275.01 ± 4.26	4.79 ± 0.29	14.58 ± 1.14
34	26.68 ± 1.69	244.26 ± 8.75	9.21 ± 0.69	27.28 ± 2.69
35	26.24 ± 1.34	217.64 ± 3.54	8.36 ± 0.43	24.58 ± 2.62
36	25.31 ± 1.07	496.11 ± 8.20	19.7 ± 0.83	26.24 ± 1.97
37	9.28 ± 0.46	385.39 ± 9.63	41.77 ± 1.92	36.45 ± 1.78
38	7.17 ± 0.50	390.90 ± 4.35	55.14 ± 3.34	39.02 ± 2.49
39	111.77 ± 6.90	429.20 ± 14.30	3.86 ± 0.14	12.19 ± 0.84
40	72.09 ± 5.98	190.70 ± 10.33	2.71 ± 0.34	23.08 ± 1.34
41	65.56 ± 3.54	352.85 ± 10.75	5.41 ± 0.17	24.39 ± 1.08
42	101.20 ± 9.30	476.85 ± 33.73	4.76 ± 0.29	18.29 ± 1.22
43	59.56 ± 13.88	491.14 ± 42.23	8.3 ± 0.74	25.84 ± 2.62
44	53.27 ± 5.65	565.28 ± 21.45	10.96 ± 1.23	24.23 ± 1.34
45	52.92 ± 3.22	343.36 ± 17.38	6.52 ± 0.36	27.14 ± 2.25
46	33.10 ± 2.79	404.26 ± 19.50	12.38 ± 0.83	27.31 ± 2.28
47	19.60 ± 1.36	497.88 ± 26.12	25.87 ± 2.69	34.28 ± 2.45
48	8.54 ± 0.67	356.84 ± 5.39	42.17 ± 2.60	39.45 ± 1.85
49	4.25 ± 0.26	346.20 ± 6.02	82.24 ± 3.77	38.83 ± 2.11
50	72.90 ± 3.18	325.54 ± 5.28	4.49 ± 0.25	21.87 ± 1.37
51	66.32 ± 2.87	306.74 ± 5.41	4.66 ± 0.29	21.55 ± 1.22
52	21.55 ± 1.23	471.12 ± 10.10	22.06 ± 1.27	28.78 ± 1.28
53	203.28 ± 9.03	485.05 ± 18.46	2.39 ± 0.08	10.82 ± 0.78
miltefosine	6.40 ± 0.42	40.66 ± 2.18	6.34 ± 0.45	26.01 ± 2.85
amphotericin B	1.18 ± 0.13	9.18 ± 0.85	7.78 ± 0.59	Nd

SI = CC₅₀/IC₅₀ amastigotes. (±): Standard deviation. Nd: not determined.

Complimentary Contributor Copy

66 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

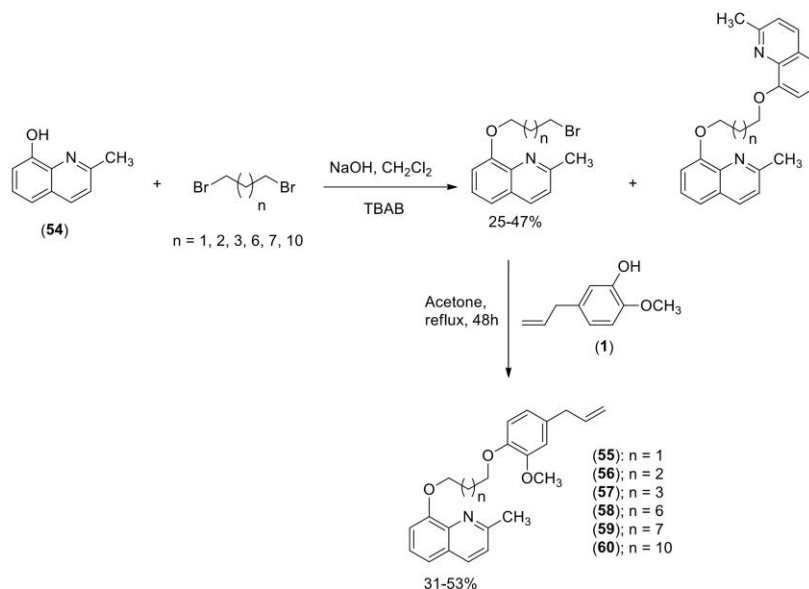


Figure 9. Preparation of molecular hybrids (**55-60**).

Moreover, this derivative increased IL-12 and decreased the IL-10 mRNA expression and release *in vitro*. Experiments *in vivo* with BALB/c mice were also carried and it was found that (**34**) cleared the hepatic and splenic parasite burden and enhances Th1 response.

The molecular hybridization is a strategy that has been explored in drug discovery and medicinal chemistry. In this case, two pharmacological agents are combined into a single molecule [46].

The quinolinic moiety is found in a variety of compounds possessing several biological activities, including leishmanicidal. In this regard, the quinolinic derivative 2-methylquinolin-8-ol (**55**) and eugenol (**1**) were combined, as shown in Figure 9, and the leishmanicidal profile of the hybrids was investigated on *Leishmania panamensis* [47].

The preparation of compounds (**55-60**) was achieved via Williamson ether synthesis followed by alkylation reactions of eugenol (**1**).

Table 8. Leishmanicidal activity of compounds 1, 55-61 on *L. panamensis*

Compound	Cytotoxicity U937 cells CC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Leishmanicidal activity IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Selective Index (SI)	Classification
1	14.2 ± 1.6	21.4 ± 4.1	0.7	Cytotoxic, moderate activity
54	7.6 ± 0.2	2.6 ± 0.3	2.9	Cytotoxic, active
55	6.8 ± 0.3	6.9 ± 0.5	1.0	Cytotoxic, active
56	31.3 ± 0.1	38.9 ± 5.8	0.5	Cytotoxic, moderate activity
57	10.5 ± 2.1	9.5 ± 0.7	1.0	Cytotoxic, active
58	14.7 ± 1.8	29.6 ± 1.3	0.5	Cytotoxic, moderate activity
59	14.1 ± 2.8	21.1 ± 2.2	0.7	Cytotoxic, moderate activity
60	82.9 ± 5.4	> 100	> 0.81	Cytotoxic, not active
amphotericin B	38.8 ± 2.2	0.05 ± 0.01	776	Cytotoxic, active
glucantime	> 1,000.0	> 1,000.0	> 1.0	No cytotoxic, not active

SI = CC₅₀/IC₅₀.

Table 8 presents the results of the leishmanicidal evaluation of compounds (**55-60**) on the axenic amastigotes of *L. panamensis*. The compounds were classified as active (compounds presenting IC₅₀ < 20 µg mL⁻¹), moderate active (compounds with IC₅₀ ranging from 21 µg mL⁻¹ to 39 µg mL⁻¹) and inactive (compounds presenting IC₅₀ > 100 µg mL⁻¹). In this regard, the compounds **54** and **55** were very active against *L. panamensis*. All the hybrid compounds were considered cytotoxic against the U937 cell line and presented low selective index [47].

TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF EUGENOL AND DERIVATIVES

Chagas disease (CD), also termed American trypanosomiasis, is a potentially life-threatening illness caused by the flagellate protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. It was discovered in 1909 by the Brazilian doctor Carlos Justino Chagas and the disease was named after him [48].

Complimentary Contributor Copy

68 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

According to the World Health Organization (WHO), 6 million to 7 million people are infected with the parasite worldwide. CD is mainly found in endemic areas of 21 Latin America countries. It is mainly transmitted by triatomine bugs (vectors that carry the parasite), also known as kissing bugs [48].

To date, there is no approved vaccine against CD and vector control remains the most useful method to prevent infection. Benznidazole (**61**) and nifurtimox (**62**) (Figure 10) are the first- and second line drugs, respectively, for infection treatment. They were made available in the market in the '70s, and they are the only two drugs available for the treatment of this illness. However, the therapeutic use of these compounds is limited and there is a necessity to find new alternatives to treat CD [49-51]. Within this context, eugenol (**1**) and derivatives have been evaluated for their activity against CD.

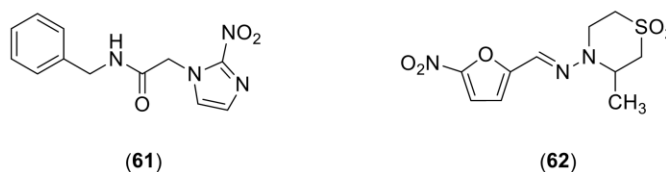


Figure 10. Drugs used in the treatment of Chagas Disease.

Soares and collaborators investigated the trypanocidal activity of clove (*Syzygium aromaticum* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and yarrow (*Achillea millefolium* L.) essential oils against *Trypanosoma cruzi* epimastigote and bloodstream trypomastigote forms. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analyses revealed that the main components of the essential oils were eugenol (**1**) (86.34%), linalool (46.97%) and chamazulene (48.32%), respectively. Eugenol (**1**) had its trypanocidal activity evaluated against *T. cruzi*, resulting in IC₅₀ values of 246 µg mL⁻¹ for epimastigote and 76 µg mL⁻¹ for trypomastigote, after 24 h of incubation. Clove essential oil trypanocidal activity, however, was superior (IC₅₀ of 99.5 µg mL⁻¹ for epimastigote and 57.5 µg mL⁻¹ for

bloodstream trypomastigote). These results suggest a synergistic effect between eugenol (**1**) and other components of the essential oil [52].

Dehydrodieugenol (**11**) was isolated from the hexane extract of *Nectandra leucantha* (Nees & Mart.) (Lauraceae) leaves. The dimethylated derivative (**13**) was prepared from compound (**11**). The structures of these compounds were already shown in Figure 6. They were evaluated *in vitro* against *T. cruzi* (trypomastigote and amastigote forms) and analyzed for the potential effect in host cells through the production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species [53]. In Table 9 are presented the results of the biological evaluation of (**11**) and (**13**) against amastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* as well as their cytotoxicity.

Table 9. Results of trypanocidal activity of compounds (11) and (13)

Compound	Amastigote (IC ₅₀ μmol L ⁻¹)	Trypomastigote (IC ₅₀ μmol L ⁻¹)	NCTC (CC ₅₀ μmol L ⁻¹)	Selective Index (SI)
11	15.1 (13.3-17.1)*	11.5 (9.3-14.2)	58.2	3.9
13	>100	55.6 (40.6-79.0)	> 200	-
61	5.5 (3.5-8.6)	16.4 (13.7-19.6)	> 200	> 36

* The values between parentheses represent confidence interval (95%).
SI = CC₅₀/IC₅₀ amastigotes.

While compound (**13**) and benznidazole (**61**) did not present cytotoxicity on NCTC cell line, the isolated natural compound (**11**) was significantly cytotoxic (IC₅₀ = 58.2 μmol L⁻¹). Concerning the trypanocidal activity, dehydroeugenol (**11**) presented superior activity than the dimethylated counterpart (**13**) and both compounds were less active than benznidazole (**61**) used as positive control. Taking the activities against amastigote form and NCTC cell line, it was possible to calculate the selective index (3.9 for compound (**11**) versus >36 for benznidazole (**61**)). It was found that the production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) of host cells were unaltered, suggesting an antiparasitic activity other than host cell activation.

70 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

ANTIMALARIAL ACTIVITY OF 4-ALLYL-1,2-DIMETHOXYBENZENE

Malaria is another import parasitic disease caused by protozoa species of the *Plasmodium* genus. It is transmitted to people by the bites of infected female of Anopheles mosquitoes. According to the World Health Organization (WHO), in 2017 there were an estimated 219 million cases of malaria in 90 countries and deaths reached 435,000 [54].

Malaria is caused by four different species of protozoan parasites. *Plasmodium falciparum* is the most dangerous and responsible for the lethal form of the disease. *P. falciparum* is also the most resistant species to the currently employed treatments [55]. There are several available drugs for the treatment of malaria [56]. However, the development of resistance by some *Plasmodium* strains makes necessary the search for new antimalarial agents.

To date, it was found only one report concerning the antimalarial activity of one eugenol derivative, namely 4-allyl-1,2-dimethoxybenzene (**53**) [57]. This compound was evaluated against *P. falciparum* strains TM4/8.2 and the observed antimalarial activity was weak ($IC_{50} > 17.8 \mu\text{g mL}^{-1}$) as compared to the positive control chloroquine ($IC_{50} = 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$).

CONCLUSION

The exploitation of eugenol and its derivatives as antiprotozoal agents has disclosed compounds with interesting activities, especially against leishmaniasis. In this regard, simple structural modifications have afforded compounds with remarkable leishmanicidal activity and low toxicity against mammalian cells. Moreover, the synthetic modifications on eugenol have provided substances with important immunomodulatory activity compared to the available antileishmanial drugs. Even though evaluation of eugenol and derivatives as trypanocidal and antimalarial has

Complimentary Contributor Copy

been less rewarding, it can be stated that they may represent interesting targets that can be optimized towards the development of new chemotherapeutic compounds to be used in the treatment of malaria and Chagas disease. Finally, it can be predicted that new studies exploring the antiprotozoal potential of eugenol and derivatives will be published in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support (Grant number CEX-APQ-02957-17) and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) for fellowships to Alex Ramos de Aguiar and Poliana A. R. Gazola. We are also grateful to Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) for financial support (Grant number 649/2016; Process 76438724).

REFERENCES

- [1] Colley, D. G. (2000). Parasitic Diseases: Opportunities and challenges in the 21st century. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 79–87.
- [2] Cox, F. E. G. (2004). History of human parasitic diseases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 18, 171–188.
- [3] Wright, C. W. & Phillipson, J. D. (1990). Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytotherapy Research*, 4, 127–139.
- [4] Cragg, G. M., Newman, D. J. & Snader, M. K. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60, 52–60.

Complimentary Contributor Copy

72 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

- [5] Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141–2153.
- [6] Koehn, F. E. & Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews*, 4, 206–220.
- [7] Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 Years. *Journal of Natural Products*, 70, 461–477.
- [8] Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, 311–335.
- [9] Harvey, A. L., Edrada-ebel, R. & Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14, 111–129.
- [10] Newman, D. J. & Cragg, M. G. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629–661.
- [11] Cheuka, P. M., Mayoka, G., Mutai, P. & Chibale, K. (2016). The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. *Molecules*, 22, 1–42.
- [12] Tullius, M., Luciana, S., Hamilton, I., Fávoro, F., Duarte, M., de Oliveira, M. P. & Mendonça Júnior, J. B. (2016). Natural products as a source for antileishmanial and antitrypanosomal agents. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 19, 1–17.
- [13] Kaufman, T. S. (2015). 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*, 26, 1055–1085.
- [14] Kamatou, G. P., Vermaak, I. & Viljoen, A. M. (2012). Eugenol—From the remote Maluku islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17, 6953–6981.

Complimentary Contributor Copy

- [15] Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, F., Cano, J., Jannin, J. & den Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*, 7, e35671.
- [16] World Health Organization. (2015). *Leishmaniasis*, No. 375. Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Accessed 01 November 2018.
- [17] Frédéric, F., Demicheli, C. & Ribeiro, R. R. (2009). Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. *Molecules*, 14, 2317–36.
- [18] Bustos, M. F. G., Barrio, A., Prieto, G. G., de Raspi, E. M., Cimino, O. R., Cardozo, R. M., Parada, L. A., Yeo, M., Soto, J., Uncos, D. A., Paraodi, C. & Basombrío, M. A. (2014). *In vivo* antileishmanial efficacy of miltefosine against *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*.” *Journal of Parasitology*, 100, 840–847.
- [19] Croft, S. L., Sundar, S. & Fairlamb, A. H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 111–1126.
- [20] Monzote, L. (2009). Current treatment of leishmaniasis: A review. *The Open Antimicrobial Agents Journal*, 1, 9–19.
- [21] Croft, S. L. & Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis – Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs.” *Trends in Parasitology*, 19, 502–508.
- [22] Ouellette, M., Drummelsmith, J. & Papadopoulou, B. (2004). Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, 7, 257–66.
- [23] Mcgwire, B. S. & Satoskar, A. R. (2013). Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *QJM*, 107, 7–14.
- [24] Chimnoi, N., Reuk-ngam, N., Chuysinuan, P., Khlaychan, P., Khunnawutmanotham, N., Chokchaichamnankit, D., Thamniyom, W., Klayraung, S., Mahidol, C. & Techasakul, S. (2018). Characterization of Essential Oil from *Ocimum gratissimum* leaves: Antibacterial and mode of action against selected gastroenteritis pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 118, 290–300.
- [25] Ueda-Nakamura, T., Mendonça-Filho, R. R., Morgado-Díaz, J. A., Maza, P. K., Filho, B. P. D., Cortez, D. A. G., Alviano, D. S., Rosa,

74 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

- M. S. S., Lopes, A. H. C. S., Alviano, C. S. & Nakamura, C. V. (2006). Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitology International*, 55, 99–105.
- [26] Islamuddin, M., Sahal, D. & Afrin, D. (2014). Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*. *Journal of Medical Microbiology*, 63, 74–85.
- [27] Misra, P., Kumar, A., Khare, P., Gupta, S., Kumar, N. & Dube, A. (2009). Pro-apoptotic effect of the landrace bangla mahoba of *Piper Betle* on *Leishmania Donovani* may be due to the high content of eugenol. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 1058–1066.
- [28] Teixeira, R. R., Gazolla, P. A. R., da Silva, A. M., Borsodi, M. P. G., Bergmann, B. R., Ferreira, R. S., Vaz, B. G., Vasconcelos, G. A. & Lima, W. P. (2018). Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 146, 274–286.
- [29] Morten, M. & Tornøe, C. W. (2008). Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chemical Reviews*, 108, 2952–3015.
- [30] Hein, J. E. & Fokin, V. V. (2010). Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chemical Society Reviews*, 39, 1302–1315.
- [31] Moses, J. E. & Moorhouse, A. D. (2007). The growing applications of click chemistry. *Chemical Society Reviews*, 36, 1249–1262.
- [32] Hartmuth, C. K., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 2004–2021.
- [33] Worrell, B. T., Malik, J. A. & Fokin, V. V. (2014). Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science*, 340, 457–460.
- [34] Wu, P. & Fokin, V. V. E. (2007). Catalytic azide—alkyne cycloaddition: Reactivity and applications. *Aldrichimica Acta*, 40, 7–17.
- [35] Ioset, J. R., Brun, R., Wenzler, T., Kaiser, M. & Yardley, V. (2009). Drug screening for kinetoplastids diseases - A training manual for

Complimentary Contributor Copy

- screening in neglected diseases. *The Pan-Asian Screening Network*, 1–74.
- [36] de Morais, S. M., Vila-Nova, N. S., Bevilaqua, C. M. L., Rondon, F. C., Lobo, C. H., Moura, A. A. A. N., Sales, A. D., Rodrigues, A. P. R., de Figueiredo, J. R., Campello, C. C., Wilson, M. E. & de Andrade, Jr. H. F. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22, 6250–6255.
- [37] Coelho, C. M., dos Santos, T., Freitas, P. G., Nunes, J. B., Marques, M. J., Padovani, C. G. D., Júdice, W. A. S., Campus, I., da Silveira, N. J. F., Carvalho, D. T. & Veloso, M. P. (2018). Design, synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of novel eugenol esters as leishmanicidal agents. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29, 715–728.
- [38] Rodrigues, L. C., Barbosa-Filho, J. M., de Oliveira, M. R., Nérís, P. L. N., Borges, F. V. P. & Mioso, R. (2016). Synthesis and antileishmanial activity of natural dehydrodieugenol and its mono- and dimethyl ethers. *Chemistry & Biodiversity*, 13, 870–74.
- [39] Bhowmik, S. & Batra, S. (2014). Applications of Morita-Baylis-Hillman reaction to the synthesis of natural products and drug molecules. *Current Organic Chemistry*, 18, 3078–3119.
- [40] Basavaiah, D., Rao, P. D. & Hyma, R. S. (1996). The Baylis-Hillman Reaction: A novel carbon-carbon bond forming reaction. *Tetrahedron*, 52, 8001–8062.
- [41] Reddy, T. N. & Rao, J. V. (2018). Importance of Baylis-Hillman adducts in modern drug discovery. *Tetrahedron Letters*, 59, 2859–2875.
- [42] Basavaiah, D., Rao, A. J. & Satyanarayana, T. (2003). “Recent Advances in the Baylis-Hillman reaction and applications. *Chemical Reviews*, 103, 811–891.
- [43] Xavier, F. J., Rodrigues, K. A. F., de Oliveira, R. G., Lima Junior, C. G., Rocha, J. C., Keesen, T. S. L., de Oliveira, M. R., Silva, F. P. L. & Vasconcellos, M. L. A. A. (2016). Synthesis and *in vitro* anti *Leishmania Amazonensis* biological screening of Morita-Baylis-

76 Róbson R. Teixeira, Poliana A. R. Gazolla, Silma F. da Silva et al.

- Hillman adducts prepared from eugenol, thymol and carvacrol. *Molecules*, *21*, 1483–1495.
- [44] Raja, M. R. C., Velappan, A. B., Chellappan, D., Debnath, J. & Mahapatra, S. K. (2017). Eugenol derived immunomodulatory molecules against visceral leishmaniasis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *139*, 503-518.
- [45] Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M. & Moncada, S. (1990). Macrophage killing of leishmania parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *The Journal of Immunology*, *144*, 4794–4797.
- [46] Viegas-Junior, C., Danuello, A., Silva, V. B., Barreiro, E. J. & Fraga, C. A. M. (2007). Molecular hybridization: A useful tool in the design of new Drug prototypes. *Current Medicinal Chemistry*, *14*, 1829–1852.
- [47] Arango, V., Domínguez, J. J., Cardona, W., Robledo, S. M., Muñoz, D. L., Figadere, B. & Sáez, J. (2012). Synthesis and leishmanicidal activity of quinoline–triclosan and quinoline–eugenol hybrids. *Medicinal Chemistry Research*, *21*, 3445–34454.
- [48] World Health Organization. (2018). *Chagas Disease (American Trypanosomiasis)*. [www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Accessed December 6 2018.
- [49] Pinheiro, E., Brum-Soares, L. & Reis, R. (2017). Chagas disease: Review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *50*, 296–300.
- [50] Sales Junior, P. A., Molina, I., Murta, S. M. F., Montalvá-Sánchez, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R. & Carneiro, C. M. (2017). Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *97*, 1289–1303.
- [51] Muñoz, M. J., Murcia, L. & Segovia, M. (2011). The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *9*, 5–7.

Complimentary Contributor Copy

- [52] Santoro, G. F., Cardoso, M. G., Guimarães, L. G. L., Mendonça, L. Z. & Soares, M. J. (2007). *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea Millefolium* L., *Syzygium Aromaticum* L. and *Ocimum Basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, 116, 283–290.
- [53] Grecco, S. S., Costa-Silva, T. A., Jerz, G., de Sousa, F. S., Alves Conserva, G. A., Mesquita, J. T., Galuppo, M. K., Tempone, A. G., Neves, B. J., Andrade, C. H., Uemi, M., Sartorelli, P. & Lago, J. H. (2017). Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of dehydrodieugenol isolated from *Nectandra Leucantha* (Lauraceae) and its methylated derivative against *Trypanosoma Cruzi*. *Phytomedicine*, 24, 62–67.
- [54] World Health Organization. (2018). *Malaria*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. Accessed December 9, 2018.
- [55] Naranjo-Montoya, O. A., Martins, L. M., da Silva-Filho, L. C., Batagin-Neto, A. & Lavarda, F. C. (2015). The correlation between electronic structure and antimalarial activity of tetrahydropyridines. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26, 255–65.
- [56] WHO. (2015). *Guidelines for the Treatment of Malaria*. Edited by WHO. 3rd edition. Geneva.
- [57] Wangchuk, P., Pyne, S. G., Keller, P., Taweechotipatr, M. & Kamchonwongpaisan, S. (2014). Phenylpropanoids and furanocoumarins as antibacterial and antimalarial constituents of the bhutanese medicinal plant *Pleurospermum Amabile*. *Natural Product Communications*, 9, 957–60.

Eugenol

Biosynthesis, Toxicity
and Uses

Contributors

Florencia Muratore
María L. Goñi
Miriam C. Strumia
Silvia E. Barbosa
Nicolás A. Gañan
Raquel E. Martini
Róbson R. Teixeira

Poliana A. R. Gazolla
Silma F. da Silva
Alex Ramos Aguiar
Adilson V. Costa
Dailyn Guzmán
Angels Serra
Xavier Ramis

Megan Shelton
Editor



ISBN 978-1-53615-429-0



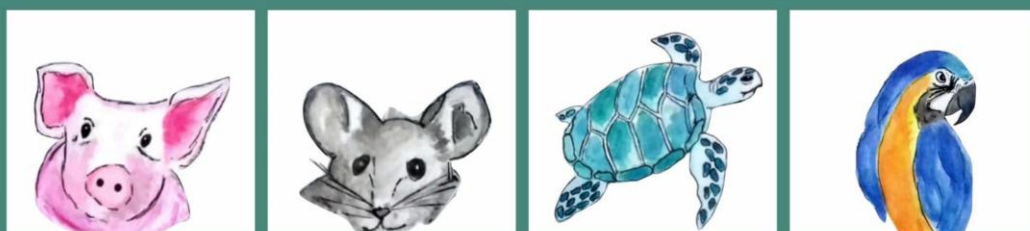
Complimentary Contributor Copy



Tópicos Especiais em Ciência Animal VII

 **PPGCV**
Programa de Pós-graduação
em Ciências Veterinárias
CCA-E-UFES

ORGANIZADORES
Leonardo Oliveira Trivilin
Leonardo Demier Cardoso
Maria Aparecida da Silva
Pedro Pierro Mendonça



LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN
LEONARDO DEMIER CARDOSO
MARIA APARECIDA DA SILVA
PEDRO PIERRO MENDONÇA
(ORGANIZADORES)

TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL VII

1ª EDIÇÃO

ALEGRE-ES

CAUFES

2018

CCAUE-UFES
Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo
Alto Universitário, s/n, Guararema, Alegre-ES
Telefone: (28) 3552-8955 – Fax (28) 3552-8903
www.alegre.ufes.br/ccae
ISBN: 978-85-54343-12-5
Editor: CAUFES
Dezembro 2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial Sul da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

T674 Tópicos especiais em ciência animal VII [recurso eletrônico] /
organizadores, Leonardo Oliveira Trivilin... [et al]. - Dados
eletrônicos. Alegre, ES : CAUFES, 2018.
302 p. : il.

Inclui bibliografia.

ISBN: 978-85-54343-12-5

Modo de acesso: [http://www.cienciasveterinarias.ufes.br/
topicos-especiais-em-ciencia-animal-teca](http://www.cienciasveterinarias.ufes.br/topicos-especiais-em-ciencia-animal-teca)

1. Ciência. 2. Medicina veterinária. 3. Zootecnia. 4. Nutrição
Animal. 5. Reprodução Animal. 6. Diagnóstico. 7. Veterinária –
Doenças – Tratamento. I. Trivilin, Leonardo Oliveira, 1981 - .

CDU: 619

Elaborado por Claudia Regina da Rocha Oliveira – CRB-6 ES-576/O

Os textos apresentados nessa edição são de inteira responsabilidade dos autores. Os organizadores não se responsabilizam pela revisão ortográfica, gramatical e autenticidade do conteúdo dos capítulos apresentados.

REITOR – UFES

REINALDO CENTODUCATTE

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – UFES

DIRCEU PRATISSOLI

COORDENADOR - PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JOSÉ DE OLIVEIRA CARVALHO

ORGANIZADORES DESTA OBRA

LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN

LEONARDO DEMIER CARDOSO

MARIA APARECIDA DA SILVA

PEDRO PIERRO MENDONÇA

ILUSTRADOR DA CAPA E CONTRACAPA

MARIETA CRISTINA COUTO KUSTER

A graphic element for the chapter title, consisting of a green shield-like shape with a white border. Inside the shield, the word "Capítulo" is written in a bold, black, sans-serif font, and the number "12" is written below it in a larger, bold, black, sans-serif font.**Atividade leishmanicida de 1,2,3-triazóis via “click chemistry”**

Bianca de Oliveira Botelho¹
Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla²
Roberta Tristão Pinto³
Róbson Ricardo Teixeira⁴
Adilson Vidal Costa⁵
Vagner Tebaldi de Queiroz⁶

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: biancabotelho93@hotmail.com

² Universidade Federal de Viçosa, e-mail: poliana.gazolla@ufv.br

³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: roberta_tristao@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Viçosa, e-mail: robsonr.teixeira@ufv.br

⁵ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: avcosta@hotmail.com

⁶ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vagnertq@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose, também conhecida como calazar indiano, botão do oriente, ferida brava e úlcera de Bauru, é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida através da picada de insetos flebotomíneos. Esta doença é considerada um dos maiores problemas de saúde pública de países em desenvolvimento já que afeta seres humanos e animais (DE SOUSA et al., 2015; GIL et al., 2008).

A quimioterapia é o principal método de tratar a doença. A maioria dos fármacos utilizados para o tratamento da Leishmaniose, desde os mais antigos, como os antimonialis, ao mais recente, amiltefosina, apresentam desvantagens como custo elevado, efeitos colaterais graves e desenvolvimento de resistência dos parasitos aos fármacos. Desta forma, os problemas relacionados aos tratamentos disponíveis fazem com que seja crescente a busca por novas substâncias que possam ser utilizadas na terapia da doença (ANDRADE et al., 2016; MAHMOUDVAND et al., 2015).

Os 1,2,3-triazóis são substâncias heterocíclicas aromáticas nitrogenadas de cinco membros, de origem exclusivamente sintética, notavelmente estáveis e essencialmente inertes à oxidação, redução e hidrólise (STRUTHERS; MINDT; SCHIBLI, 2010). Essa classe de compostos tem atraído a atenção de pesquisadores devido à sua estabilidade, baixa toxicidade e um número variado de atividades, dentre elas atividade leishmanicida.

Considerando o desafio ao tratamento da leishmaniose, o objetivo deste capítulo foi realizar uma abordagem sobre a síntese e potencial da atividade de derivados 1,2,3-triazólicos no controle de espécies de *Leishmania*.

2 LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma antroponose transmitida por animais silvestres e, mais raramente, por animais domésticos. Porém, o cão é considerado o principal reservatório nas áreas urbanas, de forma que assim como o ser humano, representa um hospedeiro acidental do protozoário (NEUBER, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses integram o conjunto das seis doenças tropicais mais preocupantes no Velho Mundo e Américas, e constituem um crescente problema de saúde pública, não somente no Brasil, onde é considerada uma das endemias de interesse prioritário, como em grande parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano (COSTA, 2005).

É uma das doenças dermatológicas mais importantes em humanos, tanto pela ampla ocorrência, como pelo risco de lesões deformantes e incapacitantes (MARCONDES, 2016). Em cães, a doença pode ser fatal se não tratada, pois o hospedeiro falha em montar uma resposta protetora eficiente contra o parasito (SILVA JR, 2008).

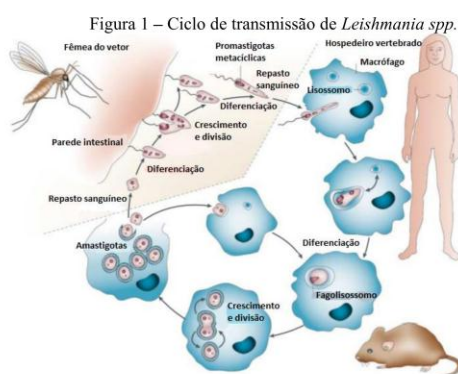
A Leishmaniose é uma doença de caráter crônico, e o período de incubação varia de 2 a 12 meses (OLIVEIRA; SANTORO; SADIGUSKY, 1993). A infecção em cães e humanos por espécies de *Leishmania* é clinicamente semelhante (KRAUSPENHAR et al., 2007).

O gênero *Leishmania* e suas diversas espécies podem se manifestar no organismo em duas formas principais, denominadas Leishmaniose Tegumentar ou Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral. As manifestações clínicas da primeira forma incluem as formas cutânea localizada, cutânea disseminada e cutânea difusa, além da forma mucosa ou mucocutânea (BAÑULS et al., 2011).

A apresentação clínica da doença é variável, e depende em grande parte da capacidade de resposta imune do hospedeiro e da virulência da cepa do parasito infectante (MICHALICK et al., 2005).

2.1 ETIOLOGIA

A Leishmaniose apresenta distribuição mundial, sendo causada por distintas espécies de *Leishmania* no Velho e no Novo Mundo. É uma doença infecciosa causada por protozoários pertencentes ao Reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, ordem Kinetoplastidae, sub-ordem Trypanosomatina, família Trypanosomatidae, e gênero *Leishmania* (LAINSON, 2010). Estes protozoários possuem um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e invertebrados (CAROSELLI, 2012) (FIGURA 1).



Fonte: Sacks e Noben-Trauth (2002).

Os parasitos são transmitidos durante o repasto de flebotomíneos infectados, que inoculam um pequeno número de promastigotas metacíclicas na pele. Essas formas são fagocitadas por macrófagos, onde residem em fagolisossomos e se transformam em amastigotas replicantes. Macrófagos infectados são capturados por flebotomíneos durante um novo repasto sanguíneo; essas células são lisadas no intestino do inseto, liberando parasitas que se transformam em promastigotas pró-cíclicas proliferativas. Essas formas passam por um processo de fixação na parede do intestino médio do inseto, multiplicação e migração anterior,

seguindo de sua diferenciação em promastigotas metacíclicas, que podem ser transmitidas quando o vetor efetuar um novo repasto sanguíneo (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

As formas do parasito são morfologicamente similares, sendo estas formas amastigotas (flagelo não exteriorizado) quando no interior das células dos hospedeiros definitivos e promastigotas (flagelo exteriorizado) quando no tubo digestivo do hospedeiro intermediário (SEHGAL et al., 2012).

São conhecidas mais de 30 espécies de *Leishmania*, sendo mais de vinte patogênicas ao homem (MORAIS, 2015). No Velho Mundo as espécies responsáveis pela Leishmaniose cutânea são as do complexo *Leishmania tropica*; (*Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) aethiopica*). A maioria das espécies é zoonótica, exceto *L. (L.) tropica*, que é antroponótica (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012). A espécie responsável pela Leishmaniose visceral é a *Leishmania (Leishmania) donovani*.

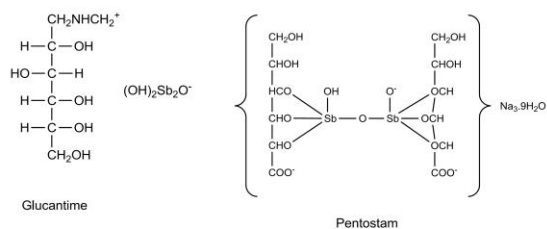
No Novo Mundo, são conhecidas oito espécies de *Leishmania*, responsáveis por causar leishmaniose cutânea ao homem, pertencentes ao subgênero *Vianna (V)* e *Leishmania (L)*: *Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania (V) guyanensis*, *Leishmania (V) panamensis*, *Leishmania (V) lainsoni*, *Leishmania (L) mexicana*, *Leishmania (L) amazonenses* e *Leishmania (L) venezuelensis*. A espécie responsável pela Leishmaniose visceral é a *Leishmania (L) chagasi*, sendo todas as espécies zoonóticas (GRIMALDI; TESH, 1993).

No Brasil tanto a Leishmaniose visceral (LV) como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ocorrem em todo o território nacional, apresentando-se de forma endêmica em estados como Rondônia, Pará, Amazonas, Bahia, Maranhão, Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul (MENDES et al., 2016).

2.2 TRATAMENTO

O tratamento da quimioterápico das leishmanioses em seres humanos é baseado na utilização de medicamentos antimoniais pentavalentes. Dentre eles, o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®) (FIGURA 2), têm sido utilizados no tratamento das leishmanioses desde o início do século XX e continuam sendo os fármacos de escolha para a doença cutânea e visceral (CHAN-BACAB; PENA-RODRÍGUEZ, 2001).

Figura 2 – Estruturas dos quimioterápicos antimoniais pentavalentes.



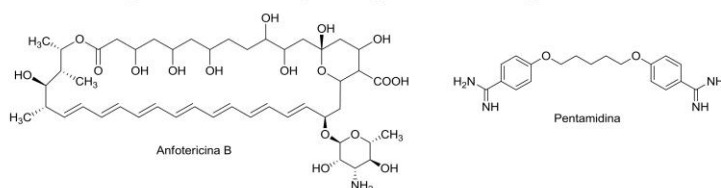
Fonte: O autor.

No Brasil, o medicamento de primeira escolha é o antimonio de meglumina (Glucantime[®]) o qual, se administrado de forma contínua e com posologia adequada, é eficaz no tratamento das leishmanioses. Por sua vez, baixas dosagens e tratamentos descontínuos levam a falhas na terapia e ao aparecimento de formas resistentes do parasito (RATH et al., 2003).

Além da elevada toxicidade, dificuldades de administração e alto custo, os antimoniais pentavalentes apresentam graves efeitos colaterais que incluem mialgia, artralgia, aumento sérico das enzimas hepáticas, pancreatite, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancitopenia, insuficiência renal reversível e cardiotoxicidade (SILVA-LÓPEZ, 2010).

A anfotericina B e a pentamidina (FIGURA 3) tem sido as drogas alternativas nos casos de resistência do parasito aos antimoniais pentavalentes. Estes medicamentos são de administração injetável e necessitam de supervisão clínica ou hospitalização, devido à severidade dos efeitos colaterais. Além disso, estes fármacos não possuem um índice terapêutico favorável (CHAN-BACAB; PENA-RODRÍGUEZ, 2001).

Figura 3 – Estruturas dos quimioterápicos anfotericina B e pentamidina.



Fonte: O autor.

Portanto, todos os fármacos disponíveis atualmente são de administração parenteral, o que exige colaboração dos pacientes, e infelizmente, muitos abandonam o tratamento, fator que favorece o aparecimento de cepas resistentes do parasito (SILVA-LÓPEZ, 2010).

Em 2008, no Brasil, o Ministério da Saúde através da Portaria Interministerial ANVISA-MAPA 1.426 de 11/07/2008, proibiu o tratamento de animais com medicamentos humanos ou medicamentos não registrados no Ministério da Pecuária e Abastecimento (MAPA), devido ao risco de seleção de cepas resistentes do parasito. Desde então, o serviço público brasileiro utilizava a eutanásia como único método de controle em cães sorologicamente positivos (AMARAL, 2009).

Em setembro de 2016, por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016-MAPA/MS, assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde, foi autorizado o registro do produto Milteforan® (miltefosina), indicado para o tratamento da leishmaniose visceral de cães (MAPA, 2016). A miltefosina provoca alguns efeitos colaterais e alto nível de resistência pelos animais ao tratamento, devido ao seu pequeno índice terapêutico e longo tempo de meia vida (7 dias) (GRIENSVEN et al., 2010). De acordo com Soto et. al., 2004, outro problema relacionado ao fármaco é que ele não apresenta atividade contra *L. braziliensis*, que no Brasil é a principal causadora da LTA. Portanto, o tratamento da Leishmaniose canina não é satisfatório em termos de custo, efetividade, toxicidade e resistência dos parasitos, evidenciando uma grande necessidade de busca por alternativas ao tratamento da doença.

Considerando as dificuldades do tratamento da doença, há urgência na busca de novos agentes terapêuticos mais efetivos, de baixo custo e com reações adversas menos agressivas, para substituir ou suplantar aqueles já em uso clínico.

Atualmente o desenvolvimento de medicamentos com atividade leishmanicida lança mão das seguintes abordagens: a investigação das vias metabólicas do parasito para encontrar e validar alvos terapêuticos; avaliação de compostos naturais (a maioria oriundo de plantas) e sintéticos com as diferentes formas do parasito; a avaliação da atividade leishmanicida de outros compostos de uso clínico (por exemplo, medicamentos contra o câncer) (DE MORAIS et al., 2014).

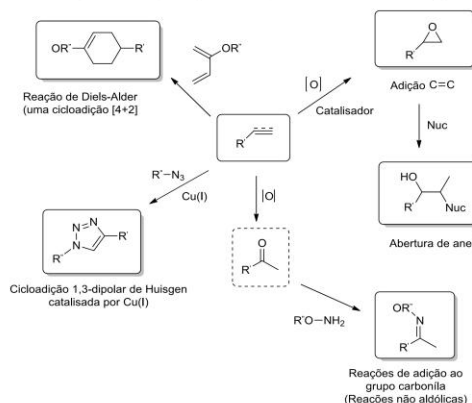
3 A QUÍMICA “CLICK” (*CLICK CHEMISTRY*) E A FORMAÇÃO DOS 1,2,3-TRIAZÓIS

O conceito de química “click” (*click chemistry*) foi introduzido em 2001 por Karl Barry Sharpless e colaboradores para descrever reações termodinamicamente favoráveis, de fácil execução e que forneçam produtos com elevados rendimentos sendo, portanto, de grande aplicabilidade (FREITAS et al., 2011; SHARPLESS; KOLB; FINN 2001).

Para que uma reação seja considerada um processo “click” ela deve apresentar as seguintes características: ser modular; ser rápida; ser capaz de unir duas moléculas de forma simples; gerar produtos com elevados rendimentos; ser estereoespecífica, mas não necessariamente enantiosseletiva; não necessitar de cuidados especiais (tais como emprego de atmosfera inerte e solventes anidros); utilizar reagentes simples e solventes ambientalmente benignos; levar à formação de produtos que sejam de fácil isolamento e produzir produtos secundários inofensivos que possam ser removidos, preferencialmente, sem uso de cromatografia (HOU et al., 2012; SHARPLESS; KOLB; FINN, 2001; WANG et al., 2016).

Os exemplos mais comuns de reações que pertencem a esta categoria são: substituições nucleofílicas (especialmente reações de abertura de anéis de epóxidos e de aziridinas), adições a ligações múltiplas carbono-carbono, reações de compostos carbonílicos que não envolvam reações aldólicas, e reações de cicloadição de Diels-Alder e 1,3-dipolares (ESQUEMA 1) (MOSES; MOORHOUSE, 2007; SHARPLESS; KOLB; FINN, 2001).

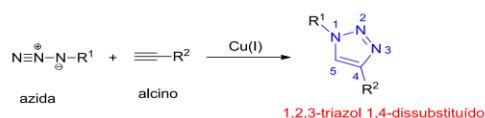
Esquema 1 – Exemplos de reações que se enquadram no conceito de química “click”.



Fonte: O autor.

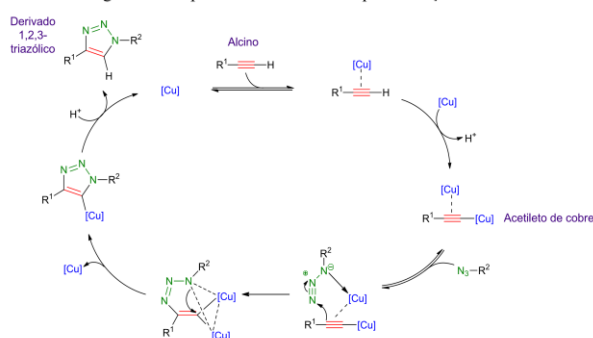
Dentre as transformações que se encontram na definição de reação “click” a cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, catalisada por Cu (I), gerando exclusivamente o isômero 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído, é considerada o exemplo perfeito (MOSES; MOORHOUSE, 2007). A transformação é conhecida como reação de cicloadição (C) entre um alcino (A) e uma azida (A) catalisada por cobre (reação CuAAC) ou reação “click” (ESQUEMA 2).

Esquema 2 – Reação “click” ou CuAAC. O anel 1,2,3-triazólico é destacado em azul.



Conforme mencionado anteriormente, a reação “click” (CuAAC) é catalisada por Cu(I). No entanto, a transformação é tipicamente conduzida empregando-se como fonte de cobre o sal sulfato de cobre(II) pentaidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), além de um agente redutor fraco como o ascorbato de sódio. Nessas condições, o Cu(II) é continuamente reduzido a Cu(I) pelo ascorbato de sódio, mantendo-se assim uma concentração relativamente elevada de Cu(I) na reação. A utilização da água como solvente é atrativa, pois além de ser um solvente benigno, universal, dissolve os sais inorgânicos de Cu(II) e o ascorbato de sódio, além de preservar o acetileno de cobre em seu estado reativo quando o mesmo é formado *in situ* (HEIN; FOKIN, 2010). O ciclo catalítico atualmente aceito para a reação “click” (FIGURA 4) foi proposto por Worrell, Malik e Fokin (2013) e é corroborado por estudos teóricos.

Figura 4 – Proposta de ciclo catalítico para a reação “click”.



A reação “click” (CuAAC) é um método amplamente utilizado para a preparação de compostos 1,2,3-triazólicos, os quais tem despertado grande interesse por possuírem uma ampla gama de aplicações, tais como explosivos, agroquímicos e principalmente fármacos (BORGATI et al., 2013; HEIN; FOKIN, 2010; MAO et al., 2015; ZHANG et al., 2014).

Além de atuarem como grupo farmacofórico de substâncias bioativas, um fato importante relacionado ao núcleo 1,2,3-triazólico é a sua utilização em estratégias de acoplamento de duas ou mais substâncias a fim de promover a potencialização de suas atividades farmacológicas (DHEER; SINGH; SHANKAR, 2017; MANETSCH et al., 2004; WHITING et al., 2006).

Dentre as várias atividades biológicas relatadas na literatura para os compostos 1,2,3-triazólicos e seus derivados, destacam-se: anti-HIV (DA SILVA et al., 2009), antimicrobiana (THOMAS; ADHIKARI; SHETTY, 2010), antibacteriana (BOECHAT et al., 2011), citotóxica (ANJOS et al., 2009), antitumoral (DA CRUZ et al., 2014), antiproliferativa (DEMCHUK et al., 2014), antiprotozoária (BAKUNOV et al., 2010), antifúngica (COSTA et al., 2017), antimalárica (GUANTAI et al., 2010), tripanocida (SILVA JR. et al., 2008;), anti-inflamatória (DHEER; SINGH; SHANKAR, 2017), citotóxica (GAZOLLA et al., 2018), fitotoxicidade (BORGATI et al., 2013; COSTA et al., 2017), além de leishmanicida.

Conforme será descrito a seguir, a reação “click” (CuAAC) vem sendo utilizada para a preparação de compostos 1,2,3-triazólicos com atividade leishmanicida e que podem ser úteis como novos agentes quimioterápicos para o tratamento da leishmaniose.

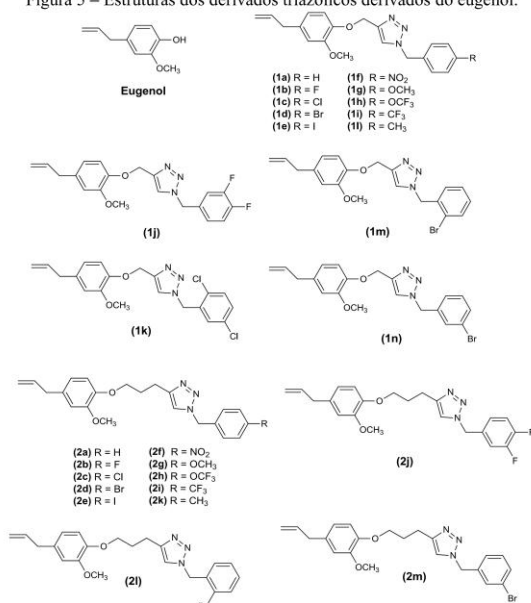
4 ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS CONTENDO O NÚCLEO 1,2,3-TRIAZÓLICO

A necessidade de desenvolvimento de tratamentos mais efetivos contra a *Leishmania*, de administração por via oral, e com menos efeitos colaterais se impõe. A busca por uma nova opção terapêutica com o objetivo de aumentar a taxa de cura, diminuir a morbidade e o absenteísmo causados pela doença, além de diminuir o custo e facilitar a adesão do paciente ao tratamento, principalmente nas áreas da zona rural, é necessária. Desse modo, dentre as drogas alternativas em potencial destacam-se os antifúngicos azólicos, drogas com atividade *in vitro* e *in vivo* já evidenciadas contra o gênero *Leishmania* (AL-ABDELY et al., 1999; SOUSA et al., 2011). Com ação semelhante à Anfotericina B, os antifúngicos azólicos inibem a 14-alfa-demetilação do lanosterol, mediada pelo citocromo P450. Desta forma, estas medicações causam o acúmulo de 14-alfa-metil-esteróis, bloqueando a síntese de ergosterol, o principal

esterol da *Leishmania* (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Desta maneira, os compostos azólicos, como os 1,2,3-triazóis, são uma fonte de inspiração para a busca de novos compostos para o tratamento da Leishmaniose.

Teixeira e colaboradores (2018), em função da ação leishmanicida do eugenol previamente descrita na literatura, avaliaram a atividade leishmanicida de novos derivados 1,2,3-triazólicos do eugenol (FIGURA 5).

Figura 5 – Estruturas dos derivados triazólicos derivados do eugenol.



Fonte: O autor.

A avaliação dos derivados triazólicos do eugenol contra a forma promastigota de *L. amazonensis* revelou que os compostos **1a**, **1b**, **1k**, **2a**, **2b**, **2k** apresentaram valores de IC₅₀ inferiores a 100 µmol L⁻¹, sendo a substância **2k** aquela que apresentou maior eficácia (IC₅₀ de 7,4 µmol.L⁻¹).

Devido à sua melhor atividade contra a forma promastigota, o composto **2k** foi selecionado para a avaliação do seu efeito contra a forma amastigota intracelular. O Glucantime foi utilizado como controle positivo e mostrou eficácia inferior à substância **2k** (TABELA 1).

Capítulo 12. Atividade leishmanicida de 1,2,3-triazóis via “click chemistry”

Tabela 1 - Atividade leishmanicida do composto **2k** e de quimioterápicos comerciais contra a forma amastigota de *L. amazonensis*.

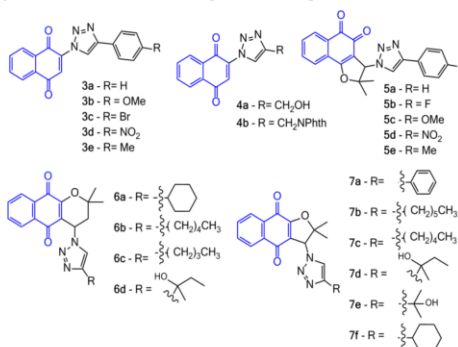
Amostra	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹)			
	Promastigotas	Amastigotas	Macrófagos	IS
Anfotericina B	0,2 ± 0,1	Nd	nd	nd
7k	7,4 ± 0,8	1,6 ± 0,2	211,9 ± 2,3	132,5
*Glucantime	nd	45,5 ± 1,6	75,5 ± 2,6	1,6

Média ± SD (n = 3). IS= Índice seletividade (IS= IC₅₀ contra macrófagos/IC₅₀ contra amastigotas) *Glucantime [μg/ml] nd = não determinado.

As amastigotas são as formas parasitárias persistente no hospedeiro, e responsáveis pelos sintomas causados pela doença. Logo, este deve ser o principal alvo quimioterápico em estudos de novos agentes leishmanicidas (DE MORAIS et al., 2014). Assim, comparando-se os valores de IC₅₀ apresentados na Tabela 1, observa-se que embora o composto **2k** tenha apresentado menor atividade contra as formas promastigotas em relação ao medicamento Anfotericina B, o mesmo apresentou atividade leishmanicida superior ao quimioterápico comercial Glucantime para as formas amastigotas. Além disso, é possível observar que o composto apresenta baixa citotoxicidade frente a macrófagos (IC₅₀ 212 μmol L⁻¹), com índice de seletividade IS>132. Cumpre ressaltar que para ser considerado atrativo como um possível composto a ser utilizado no tratamento clínico da leishmaniose, o mesmo deve apresentar índice de seletividade superior a 10. Deste modo, considerando a baixa toxicidade de **2k** frente a células de macrófagos, bem como seu elevado índice de seletividade, sugere-se que este é uma substância que possa ser explorada como um possível agente no tratamento das leishmanioses.

Tomando-se como estrutura base o núcleo naftoquinona (destacado em azul na Figura 6), Guimaraes e colaboradores (2013) sintetizaram cinco grupos de derivados 1,2,3-triazólicos.

Figura 6 – Estruturas das naftoquinonas com porções 1,2,3-triazólicas.



Fonte: O autor.

Os compostos sintetizados foram avaliados contra as formas promastigota em cepas sensíveis (WT) e resistentes (2700R) a antimônio de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), agente etiológico da leishmaniose visceral e *L. amazonensis* que está relacionado com a forma cutânea da doença. Essas espécies levam a diferentes manifestações clínicas de Leishmaniose, sugerindo metabolismo e consequentemente sensibilidade distinta aos fármacos. Sendo assim, nota-se a importância do uso de diferentes espécies de *Leishmania* na triagem de novas substâncias frente aos parasitos, bem como cepas com diferentes graus de suscetibilidades aos fármacos antimoniais.

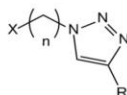
Considerando os compostos apresentados na Figura 6, os ensaios de avaliação da atividade leishmanicida revelaram que os compostos **3a**, **3b**, **3c**, **3e**, **4a** e **4b** apresentaram atividade contra as duas cepas de *Leishmania*, com valores IC_{50} variando de 5,80 a 57,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. No entanto, estes compostos foram tóxicos para macrófagos peritoneais com valores de CC_{50} na faixa de 5,39 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, resultando em valores de IS (índice de seletividade) entre 0,37 e 1,72.

O grupo de compostos **5a-5e** contém diferentes substituintes doadores e retiradores de elétrons ligados ao grupo fenila do anel triazólico. Todos os compostos deste grupo mostraram atividade contra *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) e *L. amazonensis*, com valores de IC_{50} entre 1,00 a 5,57 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e valores de CC_{50} para macrófagos peritoneais, aproximadamente iguais a 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os compostos **6a-6d** e **7a-7f** foram os mais eficientes, indicando que a presença dos anéis pirano e furano é importante para a atividade leishmanicida no que tange à classe de compostos mostradas na Figura 6. Vale ressaltar que o grupo de compostos **7a-7f** apresentou a menor toxicidade frente aos macrófagos peritoneais, com valores CC_{50} de 8,01 a 19,81 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com exceção do composto **7b** (CC_{50} 2,77 μM). Os compostos **7c**, **7e** e **7f**, em particular, apresentaram alto índice de seletividade, com valores de 15,02, 12,78 e 10,23 respectivamente, e podem ser considerados os candidatos mais promissores para desenvolvimento de fármacos contra cepas de leishmaniose resistentes a antimônio.

Um total de dezesseis derivados triazólicos contendo diferentes porções alquílicas foi preparado por Gontijo e colaboradores (2015) via reação “click” (FIGURA 7).

Figura 7 – Estruturas dos triazóis com porções alquílicas.



8a - n= 12, X= OMs, R= -(CH ₂) ₃ OMs	8i - n= 12, X= F, R= -(CH ₂) ₃ OH
8b - n= 12, X= OMs, R= -(CH ₂) ₃ OCOCH ₃	8j - n= 12, X= OMs, R= -COOCH ₂ CH ₃
8c - n= 9, X= OMs, R= -(CH ₂) ₃ OH	8k - n= 12, X= OMs, R= -CH ₂ OH
8d - n= 12, X= OMs, R= -(CH ₂) ₃ OH	8l - n= 6, X= OMs, R= -(CH ₂) ₃ OH
8e - n= 9, X= OMs, R= -COOCH ₂ CH ₃	8m - n= 12, X= OMs, R= -(CH ₂) ₂ COOH
8f - n= 9, X= I, R= -(CH ₂) ₃ OH	8n - n= 6, X= OMs, R= -COOCH ₂ CH ₃
8g - n= 12, X= I, R= -(CH ₂) ₃ OH	8o - n= 9, X= I, R= -COOCH ₂ CH ₃
8h - n= 9, X= F, R= -(CH ₂) ₃ OH	8p - n= 12, X= I, R= -COOCH ₂ CH ₃

Fonte: O autor.

Avaliou-se a atividade desses compostos contra formas promastigota de *L. amazonensis*. Os compostos que obtiveram o melhor desempenho foram posteriormente avaliados contra a forma amastigota e sua citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos foi testada. Também verificou-se o potencial antiproteolítico desses compostos frente a protease de cisteína de *L. mexicana* (r-CPB2.8).

Diversas proteases de cisteína foram identificadas em diferentes espécies de *Leishmania* e são consideradas essenciais para sobrevivência e infectividade do parasita em seu hospedeiro humano. Essas proteases estão envolvidas no mecanismo de invasão dos macrófagos, subsequente transformação para a forma amastigota e evasão do sistema imune do hospedeiro. Diante da importância das proteases de cisteína na sobrevivência e ciclo de vida de espécies de *Leishmania*, elas são consideradas importantes alvos para o desenvolvimento de fármacos com ação leishmanicida.

Os valores de IC₅₀ da atividade antipromastigota dos dezesseis alquiltriazóis (FIGURA 7) variaram de 4,01 μmol L⁻¹ (**8b**) a 229,35 μmol L⁻¹ (**8l**). Apenas sete compostos (**8a**, **8b**, **8d**, **8e**, **8g**, **8i** e **8p**) exibiram atividades inibitórias igual ou inferior a dez vezes o IC₅₀ da anfotericina B (4,70 μmol L⁻¹) usada como controle positivo.

Os compostos mais ativos contra a forma promastigota foram testados contra a forma amastigota não móvel de *L. amazonensis* e os resultados encontrados divergem substancialmente daqueles observados para a forma promastigota, sendo o composto **8d** o mais ativo, com IC₅₀ de 14,25 μmol L⁻¹. Isso demonstra que não é adequado relacionar os resultados obtidos da atividade entre ambas as formas do parasita. A modulação da resposta mediada por células e as vias celulares e bioquímicas da forma amastigota diferem das da forma promastigota, sendo que o potencial quimioterápico dos fármacos leishmanicida está correlacionado aos seus efeitos contra amastigota. Os compostos mais ativos contra amastigota,

a saber, **8d**, **8i** e **8p**, apresentam como característica estrutural comum ao comprimento da cadeia alquílica (FIGURA 7, n=12).

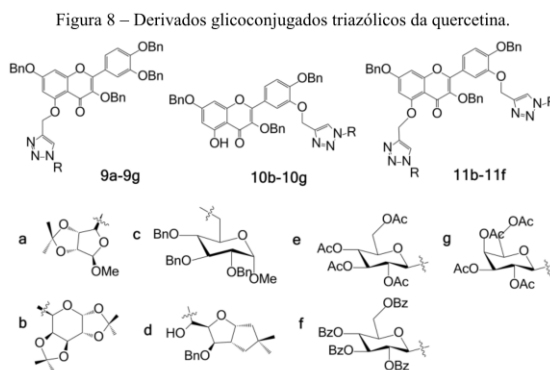
Ao investigar um possível mecanismo de ação antiproteolítico, observou-se que o composto **8e** foi o inibidor mais potente, com valor de IC_{50} de $0,8571 \mu\text{mol L}^{-1}$; no entanto, foi sete vezes menos ativo que o composto E64 (IC_{50} $0,125 \mu\text{mol L}^{-1}$) usado como termo de comparação. Percebe-se que os compostos exibem uma correlação inversa entre atividade antiamastigota e antiproteolítica. Diante desse fato, especula-se que a ação antiproteolítica não é essencial para evitar que macrófagos sejam infectados.

Apesar dos compostos **8i** e **8p** exercerem significativa atividade antiamastigota, os mesmos não podem ser considerados bons candidatos a fármacos, pois apresentam valores calculado de LogP (cLogP) superiores a 4, indicando elevada lipofilicidade. Compostos com essas características estão correlacionados com má absorção oral e dificuldade em ser excretado, com tendência a serem tóxicos. Para um programa de seleção de fármacos, é desejável que o valor de LogP esteja compreendido no intervalo entre 2 e 3, para que o composto seja satisfatoriamente absorvido e excretado. Sendo assim, o composto **8d** foi o único que se mostrou promissor, com baixa lipofilicidade (cLogp = 3,31), baixa toxicidade a macrófagos peritoneais ($163,4 \mu\text{mol L}^{-1}$) e significativa atividade antiamastigota com valor de Índice de seletividade de 11,47. Vale ressaltar que os derivados alquiltriazóis são atraentes por serem facilmente sintetizados e podem representar uma nova classe para o desenvolvimento de agentes leishmanicida.

Dwivedi e colaboradores (2015) sintetizaram compostos triazólicos glicoconjugados derivados da quercetina (FIGURA 8) e avaliaram sua atividade leishmanicida contra as formas promastigota (extracelular) e amastigota (intracelular) de *Leishmania donovani*.

A quercetina é um flavonóide conhecido por exercer efeito leishmanicida na forma amastigota de *L. donovani*, porém, apresenta pouca atividade contra forma promastigota. A presença de carboidratos ligados a flavonóides influencia na absorção, distribuição e metabolismo dessas moléculas, potencializando sua atividade biológica.

Em vista das propriedades medicinais da quercetina e da utilidade de carboidratos em compostos biologicamente ativos, realizou-se a síntese de dezoito derivados triazólicos, via reação de cicloadição 1,3-dipolar entre azido-açúcares e alcinos de *O*-benzilquercetina, catalisada por Cu(I).



Fonte: O autor.

Os valores de IC_{50} da atividade antipromastigota e antiamastigota de todos os derivados triazólicos foram determinados e comparados com o fármaco miltefosina, que foi utilizado como controle positivo. Os compostos **9a-9g** e **11b-11d** demonstraram atividade com valores de IC_{50} variando entre 7,76 a 47,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra a forma promastigota e 6,08 a 36,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra a forma amastigota, enquanto os compostos **10b**, **10e**, **10f**, **11e** e **11f** foram inativos ($IC_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$) contra ambas as formas. O composto **9d** apresentou maior atividade entre todos os compostos testados, com valores de IC_{50} iguais a 7,76 e 6,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra as formas extra e intracelular, respectivamente. O composto **9d** apresentou atividade leishmanicida um pouco inferior àquela do fármaco miltefosina, contra ambas as formas. Entretanto, ao comparar a citotoxicidade frente aos macrófagos, o composto **9d** se mostrou menos tóxico que o medicamento padrão, com CC_{50} de 53,95 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e índice de seletividade (IS) de 8,87, sendo superior ao fármaco miltefosina, com IS de 5,71.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente capítulo objetivou mostrar a potencialidade de compostos 1,2,3-triazólicos como agentes quimioterápicos para serem utilizados no tratamento da leishmaniose. Não se buscou fazer uma discussão exaustiva de compostos 1,2,3-triazólicos descritos na literatura apresentando atividade leishmanicida. Porém, os exemplos aqui abordados demonstram que os anéis 1,2,3-triazóis podem ser uma alternativa a ser explorada no que tange ao desenvolvimento de novos leishmanicidas. Os compostos descritos foram avaliados *in vitro* e é desejável que ensaios *in vivo* sejam conduzidos para corroborar os efeitos *in vitro* aqui descritos. Vislumbra-

se que novos compostos 1,2,3-triazólicos serão futuramente reportados na literatura demonstrando a utilidade desta funcionalidade na busca por novos fármacos contra a leishmaniose.

6 REFERÊNCIAS

- AL-ABDELY, H. M. et al. Efficacy of triazole SCH56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmaniadonovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, p. 2910-2914, 1999.
- AMARAL, T. Leishmaniose visceral canina: um alerta para saúde pública. **Revista Cães e Gatos**, v. 123, p.20-25, 2009.
- ANDRADE, M. A. et al. Essential oils: *in vitro* activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 444, p. 1-8, 2016.
- BAKUNOV, S. A. et al. Synthesis and antiprotozoal activity of cationic 1,4-diphenyl-1*H*-1,2,3-triazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 254-272, 2010.
- BAÑULS, A. L. et al. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1451-1461, 2011.
- BOECHAT, N. et al. Novel 1,2,3-triazole derivatives for use against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) strain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 5988-5999, 2011.
- BORGATI, T. F. et al. Synthesis and phytotoxic activity of 1,2,3-triazole derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 953-961, 2013.
- CAROSELLI, E. E. **Caracterizacao da atividade peptidastica de lisado e celulas integras de amastigotas e promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis**. 2012. 84f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)) Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2012.
- CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanial activity. **Royal Society of Chemistry**, v. 18, p. 674-688, 2001.
- COSTA, A. V. et al. Synthesis of novel glycerol-derived 1,2,3-triazole and evaluation of their fungicide, phytotoxic and cytotoxic activities. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1666-1681, 2017.
- COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 3-17, 2005.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 111-26, 2006.

Capítulo 12. Atividade leishmanicida de 1,2,3-triazóis via “click chemistry”

DA CRUZ, E. H. G. et al. 1,2,3-triazole-arylamino and thio-substituted 1,4-naphthoquinones: potent antitumor activity, electrochemical aspects, and bioisosteric replacement of C-ring-modified lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 1608-1619, 2014.

DA SILVA, F. C. et al. Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 373-383, 2009.

DEMCHUK, D. V. et al. Synthesis and antiproliferative activity of conformationally restricted 1,2,3-triazole analogues of combretastatins in the sea urchin embryo model and against human cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 738-755, 2014.

DE MORAIS, S. M. et al. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 6250-6255, 2014.

DE SOUSA, T. C., et al. Leishmaniose canina em Brasília, DF: uma Revisão da literatura. **Tempus Actas de Saúde Coletiva**, v. 9, p. 187-202, 2015.

DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: current developments. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 30-54, 2017.

DWIVEDI, P. et al. Click inspired synthesis of antileishmanial triazolyl-*O*-benzyl quercetinglycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, 2015.

FREITAS, R. P. et al. A reação “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. **Química Nova**, v. 34, p. 1791-1804, 2011.

GAZOLLA, P. A. R. et al. Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. **Química Nova**, v. 41, p. 497-506, 2018.

GIL, E. S. et al. Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Revista de Ciências Farmacêuticas. Básica e Aplicada**, v. 29, p. 223-230, 2008.

GONTIJO, V. S. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic, and mutagenicity evaluation of alkyltriazoles and alkylphosphocholines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 24-33, 2015.

GRIENSVEN, S.V. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet infect dis**, v. 10, p. 184-194, 2010.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 230-250, 1993.

GUANTAI, E. M. et al. Design, synthesis and *in vitro* antimalarial evaluation of triazole-linked chalcone and dienone hybrid compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 8243-8256, 2010.

GUIMARÃES, T. T. et al. ; *Leishmania* parasites : synthesis of novel α -and nor- α -lapachone-based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azide e alkyne cycloaddition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 523–530, 2013.

HEIN, J. E.; FOKIN, V. V. Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper (I) acetylides. **Chemistry Society Review**, v. 39, p. 1302–1315, 2010.

HOU, J. et al. The impact of clickchemistry in medicinal chemistry. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, p. 489-501, 2012.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVÁ, M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1443-1474, 2012.

KRAUSPENHAR, C. et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 907-910, 2007.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica. **Revista Pan-Amaz Saude**, v. 1, p. 13-32, 2010.

MAHMOUDVAND, H. et al. In *vitro* and *In vivo* antileishmanial activities of pistaciavera essential oil. New York: Planta Med, 2015.

MANETSCH, R. et al. *In Situ* click chemistry: enzyme inhibitors made to their own specifications. **Journal of the America Chemical Society**, v. 126, p. 12809-12818, 2004.

MAO, M. et al. Synthesis and biological evaluation of novel N-pyridylpyrazole derivatives containing 1,2,3-triazole moieties. **Journal of Pesticide Science**, v. 40, p. 138-142, 2015.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Nota Técnica nº 11/2016/cpv/dfip/sda/gm/mapa. **Coordenação De Fiscalização De Produtos Veterinários**. Bairro Zona Cívico-Administrativa - DF, 2016.

MARCONDES, M. Leishmanioses. In: LARSSON, R.. L. **Tratado de Medicina Externa**. 1. ed. São Paulo. Interebook Editorial, 2016. p. 313-344.

MENDES, C. S. et al. Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, p. 263-272, 2016.

MICHALICK, M. S. M. et al. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, v. 11, 2005. p. 56-72.

MORAIS, R. C. S. et al. **Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de *Leishmania***. 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

MOSES, J. E.; MOORHOUSE, A. D. The growing applications of “click” chemistry. **Chemistry Society Review**, v. 36, p. 1249-1262, 2007.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologis Chen Gesellschaft**, v. 9, p. 754-765, 2008.

OLIVEIRA, G. G. S.; SANTORO, F.; SADIGUSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, p. 243-248, 1993.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, p. 550-553, 2003.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845, 2002.

SEHGAL, R. et al. Immunology of leishmaniasis and future prospective of vaccines. **Intech**, 2012.

SHARPLESS, K. B.; KOLB, H. C.; FINN, M. G. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, p. 2004-2021, 2001.

SILVA JR., E. N. et al Naphthoquinoidal [1,2,3]-triazole, a new structural moiety active against *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1774-1780, 2008.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, p. 1541-1548, 2010.

SOTO, J. B. et al.. Miltefosine for the new world cutâneos leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1266-1272, 2004.

SOUSA, A. Q. et al. High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis is dueto *Leishmania (Vianna) braziliensis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, p. 693-5, 2011.

STRUTHERS, H.; MINDT, T. L.; SCHIBLI, R. Metal chelating systems synthesized using the copper (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **Dalton Transactions**, v. 39, p. 675-696 2010.

TEIXEIRA, R. R. et al. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 146, p. 274-286, 2018.

THOMAS, K. D.; ADHIKARI, A. V.; SHETTY, N. S. Design, synthesis and antimicrobial activities of some new quinoline derivatives carrying 1,2,3-triazole moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3803-3810, 2010.

WANG, C. et al. Metal-catalyzed azide-alkyne “click” reactions: Mechanistic overview and recent trends. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 316, p. 1–20, 2016.

WHITING, M. et al. Click SAR profiling of new onhibitors of HIV 1 protease enabled by the Cu(I)-Cat Syn 1,2,3-Triazole. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 7697-7710, 2006.

WORRELL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, V. V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. **Science**, v. 340, p. 457-460, 2013.

ZHANG, W. et al. Synthesis and biological evaluation of 4-(1,2,3-triazol-1-yl)coumarin derivatives as potential antitumor agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 799-807, 2014.



ORGANIZADORES

Leonardo Oliveira Trivilin
Leonardo Demier Cardoso
Maria Aparecida da Silva

Tópicos Especiais em Ciência Animal VIII



Programa de Pós-graduação
em Ciências Veterinárias
CCA-E-UFES



LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN
LEONARDO DEMIER CARDOSO
MARIA APARECIDA DA SILVA
(ORGANIZADORES)

TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL VIII

1ª EDIÇÃO

ALEGRE-ES

CAUFES

2019

CCAUE-UFES

Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo

Alto Universitário, s/n, Guararema, Alegre-ES

Telefone: (28) 3552-8955 – Fax (28) 3552-8903

www.alegre.ufes.br/ccae

ISBN: 978-85-54343-22-4

Editor: CAUFES

Novembro 2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Seção de Biblioteca Setorial Sul da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

T674 Tópicos especiais em ciência animal VIII [recurso eletrônico] /
organizadores, Leonardo Oliveira Trivilin... [et al]. - Dados
eletrônicos. Alegre, ES: CAUFES, 2019.
431 p. : il.

Inclui bibliografia.

ISBN: 978-85-54343-22-4

Modo de acesso: <http://www.cienciasveterinarias.ufes.br/>

[topicos-especiais-em-ciencia-animal-teca](http://www.cienciasveterinarias.ufes.br/topicos-especiais-em-ciencia-animal-teca)

1. Ciências. 2. Medicina veterinária. 3. Zootecnia. 4. Nutrição
Animal. 5. Reprodução Animal. 6. Diagnóstico. I. Trivilin,
Leonardo Oliveira, 1981 - .

CDU: 619

Elaborado por Raniere Barros Barreto – CRB-6 ES - 000861/O

Os textos apresentados nessa edição são de inteira responsabilidade dos autores. Os organizadores não se responsabilizam pela revisão ortográfica, gramatical e autenticidade do conteúdo dos capítulos apresentados.

REITOR – UFES

REINALDO CENTODUCATTE

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – UFES

DIRCEU PRATISSOLI

COORDENADOR - PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JOSÉ DE OLIVEIRA CARVALHO

ORGANIZADORES DESTA OBRA

LEONARDO OLIVEIRA TRIVILIN

LEONARDO DEMIER CARDOSO

MARIA APARECIDA DA SILVA

ILUSTRADOR DA CAPA E CONTRACAPA

MARIETA CRISTINA COUTO KUSTER



Capítulo
15

Tratamento da endometrite fúngica em éguas

Priscila de Oliveira Lorenzoni¹
Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla²
Délia Chaves Moreira dos Santos³
Róbson Ricardo Teixeira⁴
Adilson Vidal Costa⁵
Vagner Tebaldi de Queiroz⁶

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: priscilalorenzoni@gmail.com
² Universidade Federal de Viçosa, e-mail: poliana.gazolla@ufv.br
³ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: deliachavesmoreira@gmail.com
⁴ Universidade Federal de Viçosa, e-mail: robsonr.teixeira@ufv.br
⁵ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: avcosta@hotmail.com
⁶ Universidade Federal do Espírito Santo, e-mail: vagnertq@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A reprodução equina no Brasil é de grande importância devido a dinâmica da equinocultura nos últimos anos. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2016), a renda gerada no complexo do agronegócio do cavalo no Brasil totalizou R\$ 16,15 bilhões em abril de 2015 e apresenta indicativo de crescimento nos anos seguintes. Isso ocorre devido ao aumento da aquisição de cavalos pelo público rural e urbano, seja no esporte ou para lazer (MAPA, 2016).

A procura por animais puros de raça ao longo das décadas, levou os criadores a investirem em técnicas para aumentar o índice reprodutivo desses animais (inseminação artificial e transferência de embriões) e garantir maior taxa de prenhez. Para tal, torna-se fundamental a manutenção da saúde reprodutiva desses animais. Por outro lado, algumas enfermidades podem comprometer a fertilidade em éguas (SIEME et al., 2018).

A endometrite é a causa mais comum de infertilidade e subfertilidade em éguas. Dentre os tipos de endometrites, é notável a dificuldade de tratamento da endometrite causada por fungos, devido a crescente resistência dos microrganismos frente aos antifúngicos utilizados na rotina clínica destes animais. Estudos apontam maior resistência dos fungos frente aos compostos antifúngicos azólicos, e maior sensibilidade e potencial terapêutico frente aos compostos polienos (BELTAIRE; CHEONG; COUTINHO DA SILVA, 2012). No entanto, os compostos azólicos causam menos efeitos colaterais quando comparados aos polienos, que possuem alto potencial nefrotóxico (CAMPOY; ADRIO, 2017). Este cenário aponta para uma necessidade em se desenvolver novas terapias medicamentosas que sejam efetivas no tratamento da endometrite micótica e que causem menos efeitos colaterais.

O objetivo deste capítulo é fornecer informações a respeito da endometrite fúngica em éguas, sobretudo, as causas da doença, as formas de diagnóstico bem como as terapias medicamentosas utilizadas e novas perspectivas para o tratamento da doença.

2 ENDOMETRITE FÚNGICA EM ÉGUAS

2.2 ETIOLOGIA

As endometrites são alterações inflamatórias agudas ou crônicas do endométrio uterino, as quais podem, ou não, estar associadas à presença de patógenos. Nos equinos, os

espermatozoides são depositados no interior do útero, incluindo outros componentes do sêmen. A endometrite pós inseminação é um processo inflamatório fisiológico nestes animais, o propósito deste mecanismo é limpar o útero de excedentes de espermatozoides e de outros agentes contaminantes (LEBLANC et al., 2010).

Após a ovulação, quando a cérvix encontra-se fechada, o sistema linfático tem a função de drenagem dos subprodutos do processo inflamatório gerado pela inseminação, no entanto, para que este mecanismo seja eficaz, é necessário que se tenha uma boa contratilidade endometrial. A duração da inflamação uterina após o quinto dia pós fertilização leva à liberação de prostaglandinas responsáveis pela desintegração do corpo lúteo, com consequente diminuição da progesterona e morte embrionária (TROEDSSON, 1999).

Quando a inflamação pós coito ou inseminação artificial é persistente, a endometrite é classificada como persistente pós-cobertura. Neste caso, os animais raramente são mantidos na reprodução, por não se fazerem aptos a manter uma gestação e por serem suscetíveis a desenvolver outros tipos de endometrites (MCCUE, 2008).

A endometrite pode ser classificada segundo o agente etiológico em bacterianas, sexualmente transmissíveis ou fúngicas. Sendo que estas também podem ocorrer simultaneamente (TROEDSSON, 1999). As endometrites em éguas, causadas por fungos, correspondem entre 1 a 5% das endometrites (DASCANIO; LEY; SCHWEIZER, 2000). Porém, estudos mais recentes efetuados no Brasil revelam taxas entre 5,9% e 13,5% (BERNADINO et al., 2007; RIBAS; CARVALHO; STUSSI, 2014). Estes números podem estar relacionados ao fato de as doenças micóticas serem mais comuns em regiões tropicais, devido ao clima propenso ao desenvolvimento de fungos (CARRIS; LITTLE; STILES, 2012).

De caráter oportunista, a colonização uterina por fungos pode estar associada a um ou mais defeitos nas barreiras de proteção uterina. O uso prolongado e/ou equivocado de antibióticos, afeta a microflora vaginal e predispõe ao desenvolvimento de fungos. Outros fatores predisponentes estão ligados a defeitos anatômicos do aparelho reprodutor caudal, deficiências fisiológicas no mecanismo de imunidade uterina ou ainda fatores hormonais (LEBLANC, 2008).

Dentre os fungos já descritos como causadores da endometrite destacam-se a *Candida guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. albicans*, *C. galbrata*, *Mucor* spp., *Penicillium*, *Aspergillus fumigatus*. As infecções mais frequentes são causadas por *Candida* spp. e, em segundo, lugar as endometrites causadas por *Aspergillus* spp. (RIBAS; CARVALHO; STUSSI, 2014).

As infecções causadas por fungos leveduriformes geram infecções mais superficiais, já as infecções causadas por fungos filamentosos tendem a causar infecções mais profundas. No entanto, as candidíases uterinas mostram maior capacidade de formar biofilmes (ALVARENGA, 2008). Os biofilmes são compostos por material polimérico entrelaçado às estruturas fúngicas, adquirindo grande capacidade mucoadesiva no endométrio e tornando a ação de medicamentos antifúngicos dificultada (RAMAGE et al., 2001).

2.4 DIAGNÓSTICO

As éguas com endometrite micótica, geralmente, apresentam histórico clínico de infertilidade, não emprenhando a uma ou mais estações de monta. Estas podem apresentar corrimento vaginal esbranquiçado e mostrar aumento de líquido intrauterino com floculações ao exame de palpação retal, ultrassonografia e/ou lavado uterino. Deve-se observar se existem alterações na conformação perineal e outras barreiras físicas uterina. Os métodos de diagnóstico definitivo mais utilizados são a cultura microbiológica, citologia e biópsia uterina (MCAULIFFE, 2013).

A cultura fúngica é o método ideal para identificação dos patógenos, porém, apresenta pouca viabilidade na rotina clínica, uma vez que as culturas fúngicas necessitam de meios especializados, condições adequadas e demoram cerca de 30 dias ou mais para o crescimento das colônias. Em ágar dextrose Sabouraud, *Candida* spp. tipicamente apresentará colônias brancas e de aspecto liso; *Aspergillus* spp. apresentará colônias azul-verde/cinza-verde com bordas brancas e textura semelhante a veludo (SCOTT, 2018).

Por outro lado, a citologia uterina é um método mais rápido, menos oneroso, permite a visualização dos patógenos e possibilita a visualização de células inflamatórias como neutrófilos, hemácias e linfócitos. Utilizando a citologia uterina são geradas informações mais concisas da gravidade da doença (COUTO; HUGHES, 1984; ROSZEL; FREEMAN, 1988).

Para coleta de material com escova de citologia uterina, esta deve ser acoplada à pinça de citologia que deve ser introduzida no lúmen de forma asséptica, entrando em contato com a mucosa apenas ao atravessar a cérvix da égua. Dentro do útero deve-se realizar a coleta na parede uterina (JORGE; ORLANDI; SANTANA, 2017).

O lavado de baixo volume é uma opção para realizar a coleta para citologia uterina, não sendo restrito a apenas um local como quando se realiza a coleta com pinça. Este deve ser realizado em sistema fechado e garante exame global do ambiente uterino. Porém, a técnica

de lavado uterino demanda maior tempo, pois o material coletado necessita de passar por centrifugação antes de ser realizado o imprint na lâmina de citologia (COCCHIA et al., 2012; LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007).

Nas infecções por *C. albicans* verifica-se a presença de leveduras e menos comum a forma filamentosa, já nas aspergiloses observa-se a forma filamentosa. É importante fazer o rastreamento minucioso das amostras, pois os elementos fúngicos podem ser raros (ALVARENGA, 2008). As inflamações causadas por fungos costumam ser crônicas, apresentando mais macrófagos e linfócitos do que as endometrites agudas (COUTO; HUGHES, 1984).

A biópsia uterina é um método confiável, todavia, possui custo elevado, relativamente invasivo e não apresenta diferença significativa de diagnóstico quando comparado a técnica com escova de citologia uterina. É recomendado realizar a técnica de escova citológica associada a cultura microbiológica para se obter um diagnóstico completo da doença (BUCZKOWSKA et al., 2014).

3 TRATAMENTO DA ENDOMETRITE FÚNGICA NA ÉGUA

O tratamento das éguas com endometrite micótica é realizado através da associação de terapias, que irá depender diretamente da causa e gravidade da doença. Inclui correção de defeitos anatômicos de vulva ou perineo, lavagem uterina e/ou infusão intrauterina de antifúngicos, além da terapia sistêmica que geralmente acompanha o tratamento local (MCAULIFFE, 2013).

Casos crônicos ou recorrentes requerem tratamento multifacetado e duradouro, devendo-se atentar para o tratamento das desordens anatômicas, como pneumovagina e lacerações perineais, recomendando-se a vulvoplastia de Caslick. O tratamento tópico, adicional, da vagina e fossa clitoriana é prudente, pois estes podem atuar como reservatório de microrganismos (DASCANIO; LEY; SCHWEIZER, 2000).

As Lavagens uterinas são efetuadas para garantir a limpeza do endométrio uterino, auxiliando na remoção de muco, colônias fúngicas e biofilmes. São eficazes na remoção mecânica do conteúdo uterino, recomenda-se pelo menos 4 lavagens por 3 dias consecutivos quando usar apenas solução salina estéril (MATTOS et al., 1997). Para auxiliar na drenagem de fluido uterino pode-se estimular a contração uterina utilizando ocitocina via intramuscular ou via endovenosa (FERRIS, 2017)

Algumas substâncias não específicas, são utilizadas para a lavagem uterina como solução de N-acetilcisteína, DMSO, peróxido de hidrogênio, Tris-EDTA e ácido acético (vinagre) em combinação com 0,9% solução salina estéril ou Ringer Lactato (FERRIS, 2017; LIU; TROEDSSON, 2008) . Já foi comprovado que o vinagre não causa alteração significativa do pH intraluminal uterino, mostrando segurança para o seu uso quanto a alteração de pH (THOMPSON et al., 2018). Iodopolvidona foi recomendada por alguns pesquisadores, porém, devido aos riscos associados de fibrose e formação de aderências no endométrio, é preferível utilizar outros métodos (SCOTT, 2018).

A estrutura da membrana dos fungos contém polissacarídeos e lipídeos, tendo como principal esteroide da camada de membrana o ergosterol, além de apresentarem a membrana plasmática circundada por uma parede celular formada por quitina (CAMPOY; ADRIANO, 2017).

As classes de medicamentos antifúngicos mais utilizadas na rotina clínica em equinos são os compostos azólicos e os polienos (FERRIS, 2017), ambos atuam na membrana plasmática dos fungos. Enquanto os azóis atuam alterando a síntese do ergosterol, os polienos ligam-se diretamente ao ergosterol, desestabilizando a membrana. Acredita-se que o mecanismo de ação destes fármacos explica a crescente resistência aos compostos azólicos, uma vez que os fungos conseguem desenvolver novas formas de sintetizar o ergosterol. A dificuldade em se administrar os polienos via sistêmica no tratamento é a alta hepatotoxicidade e nefrotoxicidade que esses medicamentos causam, quando comparados aos compostos azólicos (CAMPOY; ADRIANO, 2017).

As doses e terapias antifúngicas em equinos são realizadas com base em cálculos alométricos ao uso em humanos. A administração oral de fluconazol demonstrou alcançar boas concentrações endometriais para o tratamento de *C. albicans* em éguas (DASCANIO; LEY; SCHWEIZER, 2000), sendo recomendada dose de ataque de 14mg/kg via oral no primeiro dia, seguido de administração de 5mg/kg a cada 24 horas durante 2 a 3 semanas. O Itraconazol também pode ser administrado na dose de 3-5mg/kg via oral a cada 24 horas durante 2 a 3 semanas (FERRIS, 2017).

O tratamento sistêmico deve ser realizado de acordo com a sensibilidade do microrganismo ao fármaco e a fim de combater formas sistêmicas ou invasivas no endométrio que não são alcançadas pela terapia local. Devido ao uso difundido do fluconazol, a resistência ao medicamento é uma realidade, não se recomenda seu uso para o tratamento da endometrite fúngica causada por fungos com hifas septadas, como *Aspergillus* spp. (BELTAIRE; CHEONG; COUTINHO DA SILVA, 2012).

Capítulo 15. Tratamento da endometrite fúngica em éguas

As infusões uterinas com medicamentos antifúngicos (Tabela 1) podem ser efetivas no tratamento da endometrite equina, porém podem ocorrer recidivas quando não acompanhadas de tratamento sistêmico ou quando não realizada a correção de eventual defeito no aparelho reprodutor externo. A infusão com nistatina durante 5 dias consecutivos mostra-se eficiente no tratamento de candidíases uterinas (MARTIN; SHULL; BOWEN, 1986). Beltaire, Cheong e Coutinho da Silva (2012) mostraram que compostos polienos: anfotericina B, natamicina e nistatina foram eficientes no combate de fungos isolados do endométrio de éguas *in vitro*.

Tabela 1 – Medicamentos antifúngicos utilizados na terapia intrauterina, recomenda-se uma infusão por dia durante 3 a 5 dias consecutivos durante o estro.

Antifúngico	Terapia intrauterina
Anfotericina B	100-200mg reconstituídos em 50mL de solução salina estéril
Clotrimazol	500-700mg reconstituídos em 50mL de solução salina estéril
Fluconazol	100-250 mg em 50 mL de água estéril; para reconstituir, adicionar 5 mL de DMSO a 1 grama (5 comprimidos) de fluconazol para dissolver
Miconazol	Inserir 1200mg no útero
Nistatina 100.000ui/mL	5g reconstituídos em 50mL de água estéril
Outro	
Lufenuron (Program®)	540mg suspenso em 50mL de solução salina estéril

Fonte: Ferris (2017).

Nota: Adaptado pelo autor.

O lufenuron, é um medicamento comumente usado no controle de carrapatos por interferir na biossíntese de quitina presente em grande quantidade nesses ectoparasitas e também apresentou sucesso no tratamento intrauterino em quatro éguas com endometrite fúngica, provavelmente por atuar na parede celular dos fungos (HESS et al., 2006). Porém, quando realizado estudo de atividade *in vitro*, o lufenuron não apresentou evidência de inibição fúngica sob condições experimentais (HECTOR; DAVIDSON; JOHNSON, 2005).

3.1 RESISTÊNCIA AOS MEDICAMENTOS ANTIFÚNGICOS

Com o propósito de determinar a eficiência das terapias no tratamento da endometrite fúngica em éguas, em 102 isolados fúngicos, obtidos de 92 amostras uterinas retiradas de éguas, determinaram suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos frequentemente utilizados. Os fungos leveduriformes foram 100% sensíveis a polienos, entretanto a sensibilidade aos azóis foi variável: cetoconazol (90%), fluconazol (61%) e miconazol (48%). A suscetibilidade dos fungos filamentosos aos compostos polienos variou de 69 a 100%, todavia, a suscetibilidade aos compostos azólicos foi menor quando comparados aos isolados de levedura, com 54% dos fungos filamentosos apresentando resistência ou baixa sensibilidade ao itraconazol e 100% de resistência ao fluconazol (BELTAIRE; CHEONG; COUTINHO DA SILVA, 2012).

Os mecanismos de resistência dos fungos estão relacionados às mutações gênicas, alteração da composição da membrana celular, ação de enzimas oxidativas, a formação de bombas de efluxo e a capacidade de formar biofilmes (VIEIRA; SANTOS, 2017). Um estudo de suscetibilidade de *C. albicans* a antifúngicos antes e após a formação de biofilmes revelou que a atividade do fluconazol foi reduzida em 250 vezes, quando comparada a ação em colônia sem formação de biofilmes (RAMAGE et al., 2001).

A ubiquidade do uso de compostos azólicos tanto em seres vivos como em plantas para consumo, pode estar atrelada a disseminação da resistência dos agentes fúngicos. A pesquisa realizada por Fisher et al. (2018) coletou registros espaço-temporais, relatando a ocorrência de casos de resistência de fungos aos compostos azólicos em humanos e plantas até o ano de 2017, na qual observou-se crescimento amplamente significativo da resistência medicamentosa. Apesar do estudo ter se baseado em plantas e animais, na lista de fungos estavam as espécies *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. auris*, *C. glabrata*.

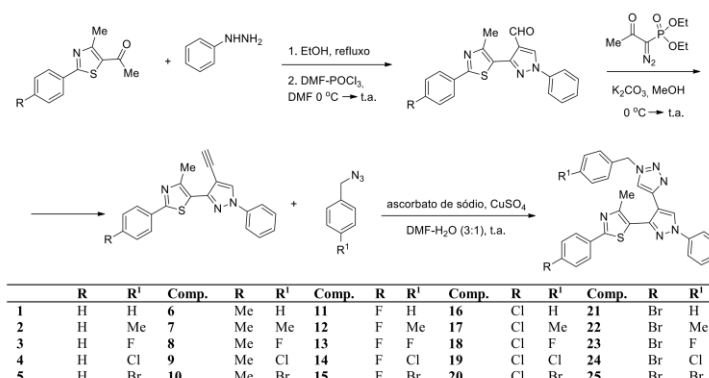
4 NOVAS PERSPECTIVAS PARA O TRATAMENTO DA ENDOMETRITE FÚNGICA EQUINA

4.1 NOVOS 1,2,3-TRIAZÓIS

Os 1,2,3-triazóis são substâncias heterocíclicas aromáticas nitrogenadas de cinco membros, de origem exclusivamente sintética, notavelmente estáveis e essencialmente inertes à oxidação, redução e hidrólise (STRUTHERS; MINDT; SCHIBLI, 2010). Essa classe de

compostos tem atraído a atenção de pesquisadores devido à sua estabilidade, baixa toxicidade e um número variado de atividades, dentre elas atividade fungicida.

Nalawade e colaboradores (2019) sintetizaram derivados tiazolil-pirazolil-1,2,3-triazólicos empregando a sequência sintética mostrada no Esquema 1.



Esquema 1 – Rota sintética utilizada para a síntese dos compostos triazólicos (1-25).

Comp., = composto

Fonte: Nalawade e colaboradores (2019)

A atividade antifúngica dos derivados triazólicos foi avaliada contra as espécies *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Rhodotorula glutinis*. Os resultados da avaliação da atividade com relação ao método de difusão em ágar e com relação à concentração mínima inibitória (MIC) são apresentados, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Atividade antifúngica dos compostos 1-25 conforme determinado pelo método de difusão. Os fungos foram desafiados contra as substâncias avaliadas em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada. A inibição dos compostos triazólicos é apresentada em (mm) (continua).

Composto	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>R. glutinis</i>
1	n.a	n.a	n.a
2	11,8	14,0	19,5
3	15,8	16,4	14,6
4	11,5	13,6	19,0
5	16,4	14,0	17,5
6	15,8	-	18,4

Tabela 2. Atividade antifúngica dos compostos 1-25 conforme determinado pelo método de difusão. Os fungos foram desafiados contra as substâncias avaliadas em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada. A inibição dos compostos triazólicos é apresentada em (mm) (conclusão).

Composto	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>R. glutinis</i>
1	n.a	n.a	n.a
2	11,8	14,0	19,5
3	15,8	16,4	14,6
4	11,5	13,6	19,0
5	16,4	14,0	17,5
6	15,8	-	18,4
7	13,0	-	22,3
8	12,5	16,3	16,2
9	10,0	16,0	19,0
10	14,0	14,4	18,8
11	16,2	15,8	16,0
12	12,2	13,0	16,2
13	12,8	11,0	13,3
14	10,4	13,5	14,5
15	14,4	16,8	16,5
16	15,2	12,3	15,2
17	13,8	11,4	11,4
18	13,8	12,5	20,0
19	11,3	12,3	14,0
20	17,6	12,0	18,8
21	14,6	13,4	16,2
22	14,6	12,4	13,3
23	12,0	17,0	11,7
24	14,8	13,5	14,8
25	15,0	-	-
Estreptomicina	-	-	-
Fluconazol	20,25	18,35	25,30
Ravuconazol	28,64	20,18	20,15

n.a. = não se aplica; (-) = inativo;
 Concentração utilizada para avaliar os compostos = 1000 µg/mL
 Fonte: Nalawade e colaboradores (2019)

Tabela 3. Valores da concentração mínima inibitória (MIC) para os compostos triazólicos 1-25.

Composto	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>R. glutinis</i>
1	n.a	n.a	n.a
2	-	31,25	-
3	125	125	125
4	-	31,25	62,5
5	125	62,5	62,5
6	125	62,5	125
7	62,5	31,25	125
8	-	62,5	125
9	-	31,25	62,5
10	125	31,25	62,5
11	125	31,25	62,5
12	-	31,25	62,5
13	125	31,25	62,5
14	-	31,25	125
15	125	125	62,5
16	500	31,25	125
17	250	125	125
18	250	62,5	125
19	-	125	62,5
20	250	62,5	62,5
21	125	62,5	62,5
22	-	31,25	125
23	125	62,5	62,5
24	125	62,5	125
25	-	-	-
Fluconazol	7,81	7,81	7,81
Ravuconazol	7,81	31,25	15,625

n.a. = não se aplica

Fonte: Nalawade e colaboradores (2019)

Dentre os compostos avaliados, os tiazolil-pirazolil-1,2,3-triazólicos **2**, **4**, **7**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14**, **16** e **22** exibiram as maiores atividades antifúngicas contra *Aspergillus niger* com valores de MIC igual a 31,25 µg/mL. Sendo assim, estes compostos apresentaram atividade equivalente ao controle positivo Ravuconazol. Cabe ressaltar que foi ainda realizado o ensaio de avaliação da atividade de inibição da síntese de ergosterol contra *Aspergillus niger* para os compostos **7**, **9**, **11**, **12** e **13** utilizando concentração igual de 31,25 µg/mL. Observou-se uma diminuição da biossíntese do ergosterol em fungos tratados com os compostos triazólicos. Os resultados encontrados mostram a potencialidade destes compostos para serem utilizados como agentes antifúngicos.

Inspirados na relação estrutura-atividade já estabelecida para o fármaco cetoconazol (**26**), Miniyar e colaboradores (2017), avaliaram a atividade antifúngica de uma série de derivados triazólicos (**27-36**) sintetizados a partir do glicerol e da 2,4-cloroacetofenona (Figura 1).

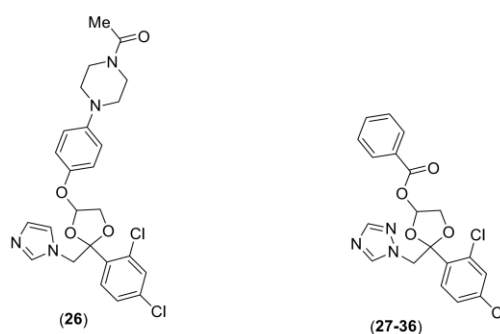


Figura 1: Estrutura do cetoconazol e do agente antifúngico alvo.
Fonte: Miniyar e colaboradores (2017)

Um total de dez compostos triazólicos foram submetidos a testes *in vitro* contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Penicillium notatum*. Os resultados no que diz respeito à zona de inibição e concentração mínima inibitória (MIC) estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Zona de inibição (mm) dos compostos triazólicos **27-36** avaliados nas concentrações de 100 e 50 µg/mL contra *Aspergillus niger*, *Penicillium notatu*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*

Composto	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium notatu</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>		<i>Candida albicans</i>	
	100	50	100	50	100	50	100	50
27	5	3	4	3	6	4	7	4
28	8	6	5	3	7	5	6	4
29	10	8	9	7	9	5	8	6
30	17	12	24	18	14	10	25	19
31	9	7	6	5	10	8	9	7
32	9	6	8	5	11	8	10	7
33	7	4	6	3	7	6	8	6
34	6	4	6	5	6	3	7	6
35	5	4	6	4	7	5	7	5
36	7	4	9	7	10	8	8	6
Cetoconazol	10	7	18	14	18	12	20	15

Fonte: Miniyar e colaboradores (2017)

A avaliação destes compostos triazólicos revelou atividade antifúngica promissora para os derivados **28, 29, 30, 31, 32** e **36**, que apresentaram valores de MIC entre 6,5 e 25 µg/mL. O composto **29** (MIC = 12,5 µg/ml) se mostrou igualmente ativo contra todas as espécies de fungos quando comparado ao fármaco cetoconazol (controle positivo), enquanto o composto **30** se destacou por apresentar atividade superior com MIC igual a 6,5 µg/mL. Deste modo, sugere-se que estas substâncias sejam candidatas para o desenvolvimento de antifúngicos ainda mais eficientes, apresentando maior atividade e menor resistência.

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (MIC) para os compostos **27-36** (continua).

Composto	MIC (µg/mL)			
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium notatu</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Candida albicans</i>
27	>50	>50	>50	>50
28	25	>50	25	25
29	12,5	12,5	12,5	12,5
30	6,5	6,5	6,5	6,5
31	25	25	25	25

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (MIC) para os compostos 27-36 (conclusão).

Composto	MIC (µg/mL)			
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium notatu</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Candida albicans</i>
32	25	25	25	25
33	>50	>50	>50	>50
34	>50	>50	>50	>50
35	>50	>50	>50	>50
36	25	12.5	12.5	25
Cetoconazol	12.5	12.5	12.5	12.5

Fonte: Miniyar e colaboradores (2017)

4.2 SISTEMAS NANOPARTICULADOS PARA ENTREGA DE ANTIFÚNGICOS

Atualmente, muitos dos agentes antifúngicos têm limitações relacionadas ao seu espectro de atividade, propriedades físico-químicas, biofarmacêuticas, farmacocinética e propriedades farmacodinâmicas. São fármacos com características hidrofóbicas, normalmente, as quais comprometem sua solubilidade em água, propiciando baixa biodisponibilidade oral e limitações no desenvolvimento de formulações (LEWIS, 2011). Dos antifúngicos comumente utilizados para o tratamento da endometrite micótica, a anfotericina B (AmB), o clotrimazol e o miconazol são hidrofóbicos e apresentam baixa solubilidade em água (BELTAIRE; CHEONG; COUTINHO DA SILVA, 2012).

Toxicidade e interações medicamentosas são outros obstáculos que limitam a utilização dos agentes antifúngicos (ASHLEY et al., 2006; BELTAIRE; CHEONG; COUTINHO DA SILVA, 2012). A AmB é um exemplo de fármaco que pode propiciar ação hemolítica e nefrotoxicidade dose-limitadas, as quais podem ser extremas em alguns casos e podem determinar, muitas vezes, a interrupção do tratamento (JAIN et al., 2012).

Sistemas de distribuição de fármacos racionalmente desenvolvidos têm a capacidade de melhorar o desempenho do medicamento e superar muitas dessas limitações. Essas novas formulações inspiraram a utilização de vários novos sistemas de entrega para melhorar o perfil de segurança dos agentes antifúngicos. Dentre esses novos sistemas, atualmente sob investigação, as nanopartículas (NPs) surgiram como uma alternativa inovadora e promissora

capaz de minimizar efeitos indesejáveis dos medicamentos, com o objetivo de manter ou aumentar sua eficácia (ZAZO; COLINO; LANAO, 2016; ZHANG et al., 2010).

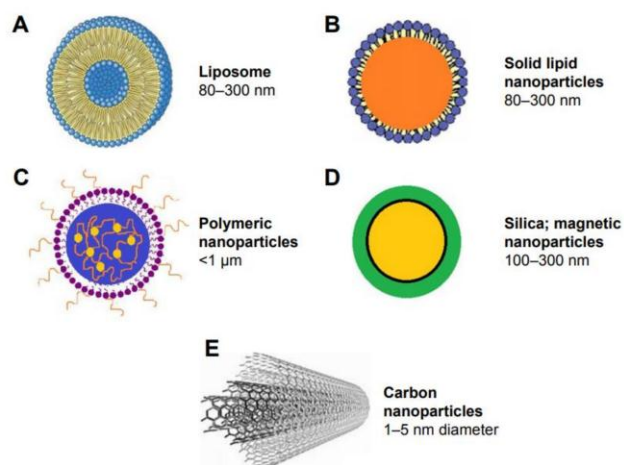


Figura 2: Sistemas de entrega de fármacos nanoestruturados
Fonte: Voltan et al. (2016).

A nanotecnologia é definida como a área de pesquisa que estuda sistemas no tamanho de intervalo nanométrico, ou seja, de 1-1000 nm (KUMAR; RANDHAWA, 2013). As NPs usadas para entrega de fármacos são geralmente chamadas de nanocarreadores, os quais podem aumentar a atividade farmacológica, diminuir a toxicidade e permitir a administração *in vivo* de fármacos encapsulados. Outras características atrativas das NPs incluem liberação sustentada de fármacos, redução dos seus efeitos adversos, prolongamento do seu tempo de permanência no sangue, maior eficácia e estabilidade do fármaco, visando o tecido infectado (CHANG et al., 2015; WICKI et al., 2015). Além disso, as NPs podem aumentar a penetração da droga através da pele e assim, ajudar a erradicar infecções fúngicas profundas (MBAH; BUILDERS; ATTAMA, 2014).

Existem muitos tipos de materiais que podem ser usados para produzir NPs para entrega de fármacos antifúngicos. De acordo com a sua composição, as NPs podem ser amplamente classificadas em lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), NPs poliméricas, sílica e NPs magnéticas, NPs de carbono, nanoemulsões (NE), dentre outras

(Figura 2) (SOLIMAN, 2017; VOLTAN et al., 2016). Entretanto, ainda não houve relatos da sua utilização no tratamento da endometrite uterina fúngica em éguas.

Os lipossomas foram as primeiras NPs contendo fosfolípidos a serem usadas na entrega de medicamentos, no início dos anos 80. São sistemas caracterizados por apresentarem uma bicamada lipídica, contendo uma ou mais membranas fosfolipídicas concêntricas, contendo um núcleo aquoso. Esta estrutura permite que os lipossomas atuem como sistemas de distribuição eficazes para fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006; SOLIMAN, 2017; VOLTAN et al., 2016).

O Ambisome® é um sistema lipídico lipossomal contendo AmB, considerado como formulação lipídica comercial que obteve maior sucesso dentre os fármacos antifúngicos. Esse sistema é capaz de interagir fortemente com as moléculas de AmB ancorando-a fortemente na bicamada lipídica devido a interações favoráveis com os lípidos. Essa forte associação é responsável pela liberação lenta da AmB para a corrente sanguínea, modificando sua biodistribuição. Isto possibilita a redução da sua captação por células renais e, conseqüentemente, ocorre diminuição da nefrotoxicidade (IMAN et al., 2011; ROMERO; MORILLA, 2008; VYAS; GUPTA, 2006). É importante destacar que a AmB é o único medicamento antifúngico comercializado em nanoformulações (WEISSIG; GUZMAN-VILLANUEVA, 2015).

Formulações lipossomais de antifúngicos triazólicos ainda estão sob investigação e não disponíveis comercialmente. Vale destacar os lipossomas de fluconazol. Entretanto, estas formulações foram testadas apenas em coelhos através da via ocular, demonstrando taxas de cura superiores que a formulação convencional para doenças fúngicas oculares (HABIB et al., 2010; VELPANDIAN et al., 2006).

As SLN são formadas por gotículas lipídicas dispersas em uma fase aquosa estabilizada por uma camada de surfactante e apresenta os mesmos constituintes de uma NE, diferindo quanto aos lípidos que constituem as gotículas, que são líquidos. No caso da SLN, os lípidos são sólidos à temperatura ambiente (ex. ceras, glicerídeos e ácidos graxos). Os lípidos sólidos geram liberação controlada do fármaco encapsulado, além de oferecer uma maior proteção dos fármacos contra a degradação, levando a uma melhor estabilidade (BUNJES, 2010; KUMAR; RANDHAWA, 2013; MULLER; SHEGOKAR; KECK, 2011).

Existe ainda outro tipo de sistema, no qual as gotículas são compostas tanto por lípidos sólidos quanto por líquidos, denominado por carreadores lipídicos nanoestruturados (NLC) (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002). Algumas formulações de antifúngicos triazólicos vêm sendo investigadas tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, destacando-se as SLNs e NLCs de

itraconazol (ITZ) (LIM et al., 2014; MIRZA et al., 2016; PARDEIKE et al., 2016) e de fluconazol (GUPTA; VYAS, 2012). Embora vários destes produtos já estejam disponíveis no mercado de cosméticos, nenhuma das formulações de antifúngicos azólicos foi testada clinicamente em éguas com endometrite fúngica.

As NE têm sido utilizadas há anos para a nutrição parenteral e como carreadora de fármacos devido à sua biocompatibilidade, capacidade de solubilizar altas quantidades de compostos hidrofóbicos, capacidade para reduzir a toxicidade de fármacos citotóxicos e de protegê-los a partir da hidrólise e degradação enzimática em condições fisiológicas (ARAÚJO et al., 2011). Dentre as NE carreadoras de antifúngicos triazólicos, as NE contendo ITZ foram desenvolvidas e incorporadas em um gel mucoadesivo para tratamento de candidíase intravaginal, utilizando ratos infectados com *C. albicans*. Os resultados demonstraram que o gel de NE contendo ITZ apresentou uma permeabilidade significativamente maior em comparação com o gel convencional (MIRZA et al., 2013; MONDELLO et al., 2006).

Além de aumentar a permeabilidade tópica do ITZ, as NE também foram responsáveis pelo aumento da biodisponibilidade oral do fármaco. A ação antifúngica das NE de ITZ foi superior em relação a suspensão do fármaco contra *Aspergillus niger*.

Além disso, as NE de ITZ tiveram uma melhor permeação através do estômago e do intestino em comparação com a suspensão do fármaco e sua formulação comercial (Sporanox[®]). Estudos *in vivo* em ratos Wistar machos saudáveis mostraram uma biodisponibilidade cerca de 2 vezes superior para as NE de ITZ em comparação com a suspensão do fármaco (THAKKAR et al., 2015).

Quanto a ação de nanopartículas em biofilmes, estudos apontam que a aplicação da nanotecnologia em sistemas de liberação de fármacos possui grande potencial para o tratamento de biofilmes fúngicos. A capacidade das nanopartículas de potencializar moléculas ativas inibidoras de biofilmes revela-se como uma alternativa eficaz, possibilitando o uso de fármacos disponíveis na prática clínica de forma melhorada (DOS SANTOS et al., 2018).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A dificuldade de tratamento em doenças fúngicas causadas pelos gêneros *Candida* e *Aspergillus* é uma realidade global, acometendo muitas mulheres em vaginoses e as éguas nas endometrites micóticas. O desenvolvimento de formulações que revertam a situação da resistência e aumentem biodisponibilidade de fármacos, com redução dos efeitos colaterais

são de extrema importância para melhorar a eficiência do tratamento, tanto para a saúde humana quanto das éguas.

6 AGRADECIMENTOS

O presente capítulo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior - Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

7 REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M. A. Diagnóstico e tratamento da endometrite fúngica em éguas. **Ix Conferência Anual Da Abraveq**, 2008.
- ARAÚJO, F. A. et al. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 238-245, 2011.
- ASHLEY, E. S. D. et al. Pharmacology of systemic antifungal agents. **Clinical Infection Disease**, v. 43, S28 - S39, 2006.
- BELTAIRE, K. A.; CHEONG, S. H.; COUTINHO DA SILVA, M. A. Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999-2011). **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 43, p. 84-87, 2012.
- BERNADINO, M. L. A. et al. Endometrite equina. Fungos e bactérias. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, p. 875-884, 2007.
- BUCZKOWSKA, J. et al. Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2014.
- BUNJES, H. Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, p.1637 – 45, 2010.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology Journal**, v. 86-96, p. 471-489, 2017.
- CARRIS, L. M.; LITTLE, C. R.; STILES, C. M. Introduction to fungi. **The Plant Health Instructor**, p. 1-29, 2012.
- CHANG, E. H. et al. Nanomedicine: past, present and future - a global perspective. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 468, p. 511 - 517, 2015.

COCCHIA, N. et al. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 89–98, 2012.

COUTO, M. A.; HUGHES, J. P. Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 4, n. 6, p. 265–273, 1984.

DASCANIO, J.; LEY, W.; SCHWEIZER, C. How to diagnose and treat fungal endometritis. **AAEP Proceedings**, v. 46, p. 316–318, 2000.

DOS SANTOS, M. A. R. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: A review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 1179–1213, 2018.

FERRIS, R. A. Therapeutics for infectious endometritis: a clinical perspective. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 175–179, 2017.

FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, p. 739–742, 2018.

GUPTA, M.; VYAS, S. P. Development, characterization and *in vivo* assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, p. 454–461, 2012.

HABIB, F. S. et al. Liposomes as an ocular delivery system of fluconazole: *in vitro* studies. **Acta Ophthalmologica**, v. 88, p. 901 – 904, 2010.

HECTOR, R. F.; DAVIDSON, A. P.; JOHNSON, S. M. Comparison of susceptibility of fungal isolates to lufenuron and nikkomycin Z alone or in combination with itraconazole. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 6, p. 1090–1093, 2005.

HESS, M. B. et al. Use of lufenuron as a treatment for fungal endometritis in four mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 2, p. 266–267, 2006.

IMAN, M. et al. Characterization of the colloidal properties, *in vitro* antifungal activity, antileishmanial activity and toxicity in mice of a distigmasterylhemisuccinoyl-glicero phosphocholine liposome-intercalated amphotericin B. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 163–172, 2011.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 297 – 315, 2006.

JAIN, S. et al. Gelatin coated hybrid lipid nanoparticles for oral delivery of amphotericin B. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 2542–2553, 2012.

JORGE, M. L. N.; ORLANDI, C. M. B.; SANTANA, A. E. Citocentrifugação e métodos convencionais na citologia uterina de éguas em estro e diestro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 4, p. 802–806, 2017.

- KUMAR, S.; RANDHAWA, J. K. High melting lipid based approach for drug delivery: solid lipid nanoparticles. **Materials Science and Engineering**, v. 3, p. 1842–1852, 2013.
- LEBLANC, M. M. et al. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 2, p. 109–113, 2010.
- LEBLANC, M. M.; MAGSIG, J.; STROMBERG, A. J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 403-412, 2007.
- LEBLANC, M. M. The chronically infertile mare. **AAEP Proceedings**, v. 54, p. 391–407, 2008.
- LEWIS, R. E. Current concepts in antifungal pharmacology. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 8, p. 805 – 817, 2011.
- LIM, W. M. et al. Formulation and delivery of itraconazole to the brain using a nanolipid carrier system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 2117 – 2126, 2014.
- LIU, I. K. M.; TROEDSSON, M. H. T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 415–420, 2008.
- MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. 2016. p. 1–45, Brasília: MAPA
- MARTIN, M. T.; SHULL, J. W.; BOWEN, J. M. Endometrial candidiasis in five mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 6, n. 1, p. 40–43, 1986.
- MATTOS, R. et al. Uterine lavage with saline in mares as treatment for endometritis. **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v. 13, n. 5, p. 521–524, 1997.
- MBAH, C. C.; BUILDERS, P. F.; ATTAMA, A. A. Nanovesicular carriers as alternative drug delivery systems: ethosomes in focus. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, p. 45 - 59, 2014.
- MCAULIFFE, S. Reproductive disorders. **Knottenbelt and Pascoe's Color Atlas of Diseases and Disorders of the Horse**, p. 443–513, 2013.
- MCCUE, P. M. The problem mare: management philosophy, diagnostic procedures, and therapeutic options. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, p. 619–626, 2008.
- MINIYAR, P. B. et al. Triazole hybrids as new type of anti-fungal agents. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 295-299, 2017.
- MIRZA, M. A. et al. A vaginal drug delivery model. **Drug Delivery**, p. 1-12, 2016.

MIRZA, M. A. et al. Development of a novel synergistic thermosensitive gel for vaginal candidiasis: an *in vitro*, *in vivo* evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 275 - 282, 2013.

MONDELLO, F. et al. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 158, 2006.

MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 1, n. 54, Suppl 1, p. 131-55, 2002.

MULLER, R. H.; SHEGOKAR, R.; KECK, C. M. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. **Current Drug Discovery Technologies**, n. 3, p. 207-227, 2011.

NALAWADE, J. et al. Synthesis of new thiazolyl-pyrazolyl-1, 2, 3-triazole derivatives as potential antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019.

PARDEIKE, J. et al. Itraconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary treatment of aspergillosis in falcons. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 108, p. 269-276, 2016.

RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, n. 4, p. 163-70, 2001.

RIBAS, J. A.; CARVALHO, E. Q.; STUSSI, J. P. Endometrite fúngica em éguas: diagnóstico e implicações clínico-patológicas. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 204-212, 2014.

ROMERO, E. L.; MORILLA, M. J. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 5, p. 805-823, 2008.

ROSZEL, J. F.; FREEMAN, K. P. Equine endometrial cytology. **The Veterinary Clinics of North America. Equine practice**, v. 4, n. 2, p. 247-262, 1988.

SCOTT, C. J. A review of fungal endometritis in the mare. **Equine Veterinary Education**, p. 1-5, 2018.

SIEME, H. et al. Equine embryo transfer. **Animal Biotechnology**, v. 1, p. 179-192, 2018.

SOLIMAN, G. M. Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: Achievements and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, p. 15-32, 2017.

STRUTHERS, H.; MINDT, T. L.; SCHIBLI, R. Metal chelating systems synthesized using the copper (I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 3, p. 675-696, 2010.

- THAKKAR, H. P. et al. Formulation and evaluation of itraconazole nanoemulsion for enhanced oral bioavailability. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, p. 559-569, 2015.
- THOMPSON, R. L. et al. Assessment of uterine luminal pH in mares and the effect of dilute vinegar lavage on uterine luminal pH and endometrial health. **Theriogenology**, v. 117, p. 7–15, 2018.
- TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, p. 461–471, 1999.
- VELPANDIAN, T. et al. Retinal toxicity of intravitreally injected plain and liposome formulation of fluconazole in rabbit eye. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 54, p. 237 - 240, 2006.
- VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. dos. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p. 235–239, 2017.
- VOLTAN, A. et al. Fungal diseases: could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy? **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3715-3730, 2016.
- VYAS, S. P.; GUPTA, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, p. 417-432, 2006.
- WEISSIG, V., GUZMAN-VILLANUEVA, D. Nanopharmaceuticals (part 2): products in the pipeline. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1245 – 1257, 2015
- WICKI, A. et al. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 200, p. 138-157, 2015.
- ZAZO, H.; COLINO, C. I.; LANA, J. M. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 224, n. 86-102, 2016.
- ZHANG, L. et al. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 585 - 594, 2010.

ARTIGO SUBMETIDO
À REVISTA BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY

Eugenol derivatives with 1,2,3-triazole moieties: Oral treatment of cutaneous leishmaniasis and QSAR model for their leishmanicide activity

Róbson Ricardo Teixeira^{1,#}; Poliana Aparecida Rodrigues Gazolla^{1*}; Maria Paula Gonçalves Borsodi^{2*}; Márcia Miguel Castro Ferreira³; Maria Cristina Andreazza Costa³; Adilson Vidal Costa⁴; Beatriz Cabral Abreu Grijó⁵; Bartira Rossi Bergmann²; Wallace Pacienza Lima^{2,5,#}

¹Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

²Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

³Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

⁴Departamento de Química e Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, Brazil

⁵Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Grande Rio, Rio de Janeiro, Brazil.

*These authors contributed equally to this paper

#Corresponding authors

E-mail: robsonr.teixeira@ufv.br; wallaceplima@unigranrio.edu.br;

Abstract

Leishmaniasis is a group of neglected vector-borne tropical diseases with a broad spectrum of clinical manifestations caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* that multiply within phagocytic cells. Cutaneous leishmaniasis (CL) is a serious public health in more than 98 countries and it is estimated that 350 million people are at risk. There are no validated vaccines to prevent CL and the treatment relies on drugs that often present severe side effects, which justify the efforts to find new potential antileishmanial drugs. In the present investigation, it is demonstrated that 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole (**7k**) presents significant antileishmanial activity (IC_{50} of $7.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $1.6 \mu\text{mol L}^{-1}$ for promastigote and amastigote forms, respectively), low cytotoxicity against macrophage cells (IC_{50} of $211.9 \mu\text{mol L}^{-1}$), and selective index of 132.5. Under similar conditions, compound **7k** was more effective than glucantime and pentamidine, two drugs currently used in the clinic. *In vivo* assays using CL infected female BALB/c mice demonstrated that when administered orally, compound **7k** displayed activity similar to intralesional glucantime, with decreased lesion and parasitic load as well as low systemic toxic effect. Taking into account that the understanding of the relationship between compound structure *versus* biological activity is important in the context of research and development of new drugs it is also herein described the development of a QSAR model regarding the leishmanicide activity presented by the eugenol derivatives with 1,2,3-triazole functionalities. This study shows the therapeutic potential of orally active eugenol derivatives against CL and provides useful insights in terms of the relation of chemical structures of triazolic eugenol derivatives and their biological profile.

1. Introduction

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a serious public health concern in more than 98 countries and it is estimated that 350 million people are at risk. Even though the exact incidence of CL is not known, it is likely 600,000-1,200,000 cases every year and the overall prevalence is 12 million cases.¹⁻³ This vector borne disease is caused by different species of *Leishmania* parasites that infect skin macrophages producing a slow-growing and disfiguring ulcer in exposed areas of the body that in the American continent show a low spontaneous cure rate.⁴ Antimony-containing drugs remained the first-line treatment for leishmaniasis around the world for about 70 years. The mainstay CL treatment requires daily injections with antimonials, pentamidine or amphotericin B drugs that produce unacceptable systemic toxicity and make patient compliance an obstacle to effective treatment.⁵ In spite of the development of miltefosine and novel formulations of conventional drugs, little impact on disease incidence has been observed in endemic areas. This trend may be explained partially by the high cost of the new alternatives, which hampers their use in developing countries. Furthermore, there are some concerns about the teratogenicity of, and the induction of resistance to miltefosine.⁶ Thus, the development of new, safer, cheaper and orally available drug treatments for leishmaniasis is urgently needed.

Our research group has been involved in the search for compounds that can be used in the treatment of leishmaniasis.^{7,8} Within this context, we have investigated the leishmaniasis activity of twenty six eugenol derivatives possessing 1,2,3-triazole functionalities. It was found that the compounds presented activity against the promastigote forms of *Leishmania amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) with varying degrees of effectiveness. In addition, the most active compound, namely 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole (**7k**) showed significant antileishmanial activity ($IC_{50} = 7.4$ and $1.6 \mu\text{mol L}^{-1}$, for promastigote and amastigote activities, respectively). The cytotoxicity of **7k** against macrophage cells presented IC_{50}

of $211.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ and the selective index was equal to 132.5. Under similar conditions, compound **7k** was more effective than glucantime and pentamidine, two drugs currently used in the clinic.⁹

Considering the premises, we herein report the results of the *in vivo* investigation of the antileishmanial activity of compound **7k**. It was determined that when this substance is administered orally, it presents similar efficacy as compared to intralesional glucantime activity. This eugenol derivative also decreased lesion and parasitic load in the treatment of murine CL.

Taking into account that the understanding of the relationship between compound structure *versus* biological activity is important in the context of research and development of new drugs, it is also herein described the development of a QSAR model regarding the leishmanicide activity presented by the eugenol derivatives with 1,2,3-triazole functionalities.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Compounds

The 1,2,3-triazolic eugenol derivatives were synthesized and fully characterized as previously described.⁹ Glucantime was kindly provided by Sanofi-Aventis.

2.2. Biological Assays

2.2.1. Parasites

Promastigotes of *L. amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa), transfected with the gene of green fluorescent protein (GFP), were cultured in M199 medium, supplemented with 50 UI mL^{-1} of penicillin, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of streptomycin, 10% ($v v^{-1}$) of heat-inactivated fetal calf serum, and 2% ($v v^{-1}$) of human urine at 26 °C. Promastigotes were periodically cultured in 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of geneticin (G418) for bright green fluorescence selection.¹⁰

2.2.2. *In vitro* antileishmanial activity

For evaluation of the antipromastigote activity, fluorescent promastigotes were plated in triplicate at 5×10^5 parasites/well with varying concentrations of the tested compound (0, 0.1, 1, 10, and $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) in a final volume of 200 μL of medium M199 containing 5% (v v⁻¹) of HIFCS and 1% (v v⁻¹) of dimethyl sulfoxide (DMSO). After 72 h at 27 °C, the fluorescence intensity of the cultures was measured using a plate-reader fluorometer (Fluoroskan) set at 435 nm excitation/538 nm emission. All treatments were performed in triplicate, and the results were expressed as percentage inhibition in relation to control treatment in medium alone.

For anti-amastigote activity, mouse peritoneal macrophages were collected from the peritoneal cavities of BALB/c mice in ice-cold DMEM medium (Sigma Aldrich). The cells were plated at $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ in Lab-Tek 8-chamber slides (Nunc® Lab-Tek®, Naperville, IL) and incubated at 37 °C and 4% CO₂ for 1 h. No adherent cells were removed by washing with pre-warmed phosphate-buffered saline (PBS). Adherent macrophages were infected with *L. amazonensis* promastigotes (stationary growth phase) at a 5:1 parasite/macrophage ratio and incubated for 1 h at 37 °C and 4% CO₂. After 4 h, the chambers were washed three times with pre-warmed PBS to remove free parasites. The monolayers were incubated with compound **7k** up to $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ for 72 h at 37 °C and 4% CO₂. The Glucantime was used at concentrations varying from 0.1 to $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. The anti-amastigote activity was evaluated microscopically after staining the chambers with the Instant Prov haematological dye system (Newprov, Curitiba, Brazil); at least 200 macrophages were counted per sample. The results were expressed as the infection index (IF) using the equation 1.

$$\text{IF} = \frac{\% \text{ infected cells} \times \text{number of amastigotes}}{\text{total macrophages}} \quad (\text{eq. 1})$$

The calculation of the IC₅₀ was performed by logarithmic regression, and the statistical analysis was performed using Student's t test in GraphPad Prism 5.0 software.

2.2.3. Cytotoxicity against macrophages

To identify if the **7k** could cause cytotoxicity, we measured the release of the cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant of cultures, indicative of cell lyses. The release of LDH into the culture medium was quantified using an assay kit (Doles Reagents, Brazil) and a plate-reader spectrometer (SpectraMax M5) at 340 nm. The specific release percentage was calculated using equation 2

$$\text{Specific release percentage} = \frac{\text{test release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximal release} - \text{spontaneous release}} \times 100 \text{ (eq.2)}$$

where maximum release corresponds to (macrophages + 1% triton X-100) and release spontaneous relates to non-treated macrophages. The IC₅₀ values were calculated by linear regression analysis. Data were analyzed using Student's t-test when comparing two groups or one-way ANOVA for more than two groups followed by Tukey's multiple comparisons post-hoc test, using the GraphPad Program; p-values less than 0.05 were considered statistically significant.

2.2.4. Animals

Female Balb/c mice at the age of 8 weeks, weighting approximately 25 g, were maintained in our facilities at Federal University of Rio de Janeiro under controlled temperature, standard hygiene conditions, light-dark cycle, with free access to filtered water and pelleted food. The animal protocols for this study were approved by the Federal University of Rio de Janeiro Institutional Animal Care and Use Committee (protocol number CAUAP 118). All experiments were conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.¹¹

2.2.5. *In vivo* antileishmanial efficacy

Parasites at stationary growth phase of culture (mostly metacyclics) were washed with isotonic buffer to remove immunogenic bovine serum proteins and suspended at $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ in the same buffer for mouse infection. The CL model used female BALB/c mice infected in the ear with 2×10^6 promastigotes of *L. amazonensis*-GFP transfected with Green Fluorescence Protein (herein *L. amazonensis*-GFP).

On day 7 of infection, animals were treated orally with 40 mg/kg/dose (800 μg in 100 μL of PBS) of **7k** (5 doses/week, 25 doses) or intralesional 1.5 mg/kg/dose (300 μg in 10 μL of PBS) of Glucantime (1 dose/week, 5 doses). Controls received the same doses of PBS. For lesion growth measurements, ear thicknesses were measured every 2-3 days with a caliper gauge, and the lesion sizes were expressed as the difference between the thickness of infected and non-infected ears. On day 52 of infection, animals were euthanized and the infected ears were removed and ground in PBS (1 mL/ear) to form a single cell suspension. The parasite load was measured by limiting dilution assay (LDA).¹² The serum was collected in order to assay biomarkers of cardiac, hepatic and renal toxicity. Aspartate transaminase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), and creatinine were measured in the serum using laboratory colorimetric diagnostic kits (Labtest, Brazil).

2.2.6. *Statistical analysis*

One-way ANOVA and the Bonferroni post test were performed to demonstrate statistical differences ($p < 0.05$). To compare the difference between two groups, the non parametric T test was used. IC_{50} values were calculated from a curve of sigmoidal dose-response. All analysis were conducted using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.3. Quantitative Structure–Activity Relationship study (QSAR)

2.3.1. Conformational analysis

The crucial step for a QSAR study is the conformational analysis of the compounds, when the bioactive conformation is unknown. The set of compounds shown in Table 1 presents the eugenol portion (red) connected to the 1,2,3-triazole functionality (blue) via one or three carbon link, thus generating two or more free rotation axes (Fig. 1). The triazole ring, in turn is connected to the benzyl moiety (magenta).

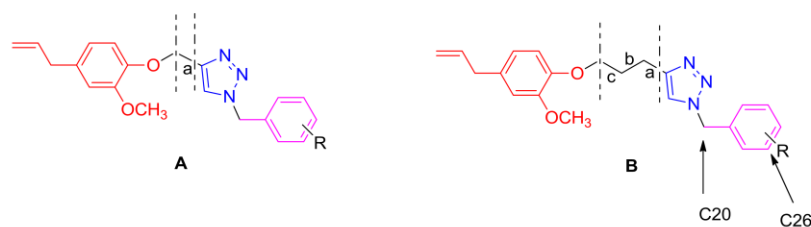


Fig. 1. Basic structures of eugenol derivatives tested against *Leishmania amazonensis*.

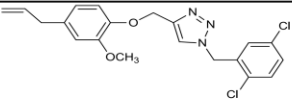
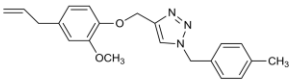
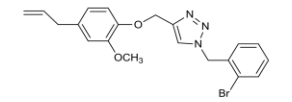
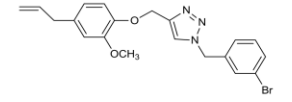
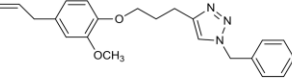
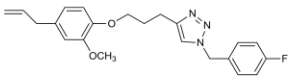
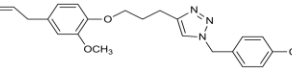
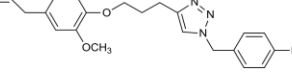
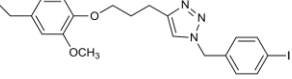
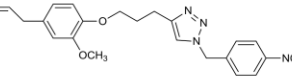
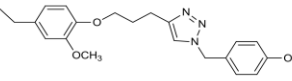
It was found in the protein data bank (PDB) the crystal structure of eugenol oxidase in complex with isoeugenol (code 5FXD, ligand H7Y) and the structure of 1-benzyl-*N*-[*cis*-4-(2-[[4-fluorophenyl)methyl] [2-(methylamino)-2-oxoethyl]amino)-2-oxoethyl]cyclohexyl]-5-methyl-1*H*-1,2,3-triazole-4-carboxamide containing the 1-benzyl-1,2,3-triazole portion in complex with the DNA from mycobacterium tuberculosis (code 5G0T, ligand S72). These two structures, isoeugenol and 1-benzyl-1,2,3-triazole were used as starting point to the conformational analysis of the eugenol derivatives shown in Table 1 and previously reported by our research group.⁹ A preliminary conformational search was performed with the PM3 semi-empirical method using the keyword *scan* through Gaussian 9.0.¹³ The axis *a* of basic structure **A**, and axes *a*, *b* and *c* from

structure **B** (Fig. 1) were rotated with 15 degrees increment, in order to determine the local minima conformations. Such local minima conformers were previously optimized by the same semi-empirical method. Then, the most stable conformation for each basic structure was optimized by DFT/B3LYP method, with the def2-TZVPP basis set,¹⁴ using Gaussian 9.0.¹³ This triple zeta valence basis set was chosen mainly due to the presence of iodine in some of the studied compounds (Table 1). This is a high quality Gaussian basis set optimized for atoms from H to Rn. After the basic structures **A** and **B** being optimized, the other derivatives presented in Table 1 were prepared by the substituents insertion in the benzene ring of the benzyl group attached to the 1,2,3-triazole functionality. The substituents were rotated (PM3 semi-empirical method, keyword scan) on the binding axis with the basic structure to find the local minima and thereafter, the lower energy conformation was optimized with DFT/B3LYP method, basis set def2-TZVPP.

Physicochemical descriptors of electronic, steric and hydrophobic character were obtained. Several electronic descriptors, such as frontier orbital energies, dipole moment, atomic charges derived from electrostatic potential, among others, resulted from the optimized geometry by using Gaussian software.¹³ Surface area, logP and volume were calculated using HyperChem 7.¹⁵

Table 1. Structures and effect of eugenol derivatives on promastigote forms of *L. amazonensis*

^a Compound	Structure	IC ₅₀ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	^b pIC ₅₀
6a		30.2 ± 1.5	4.52
6b		59.4 ± 1.7	4.23
6c		1780 ± 3.0	2.75
6d		993 ± 3.0	3.00
6e		2013 ± 3.0	2.70
6f		130.2 ± 2.1	3.89
6g		424.9 ± 2.6	3.37
6h		322.1 ± 2.5	3.49
6i		2013 ± 3.0	2.70
6j		969 ± 3.0	3.01

6k		49.2 ± 1.7	4.31
6l		106.2 ± 2.1	3.97
6m		159.6 ± 2.2	3.80
6n		155.8 ± 2.1	3.81
7a		37.9 ± 1.5	4.42
7b		32.2 ± 1.5	4.49
7c		817 ± 3.0	3.00
7d		286.7 ± 2.5	3.54
7e		278.9 ± 2.4	3.55
7f		173.3 ± 2.3	3.76
7g		119.5 ± 2.0	3.92

7h		145.9 ± 2.1	3.84
7i		295.2 ± 2.5	3.53
7j		177.5 ± 2.3	3.75
7k		7.4 ± 0.8	5.13
7l		913.3 ± 2.9	3.04
7m		980.2 ± 2.9	3.01

^aNumbers of the compounds are the same ones as previously reported;⁹

^bpIC₅₀ means -logIC₅₀.

2.3.2. Partial least square (PLS) regression and principal component analysis (PCA)

From the twenty-seven eugenol derivatives listed in Table 1, fourteen were from basic structure type **A** and thirteen from type **B** (Fig. 1). Among them, six presented IC₅₀ lower than 60 μmol L⁻¹, while for the other twenty-one, the IC₅₀ was higher 100 μmol L⁻¹. In order to build a reasonable PLS regression model, it was necessary to remove the derivatives **6e**, **6i**, **6c**, **6d**, **6g**, **6l**, **7c**, **7j** and **7g** (Table 1) from the set. They were removed due to the fact that the descriptors showed inconsistent values compared to the other derivatives. It should be noted that five of them presented very low activity (pIC₅₀ ≤ 3.00 μmol L⁻¹). The calculated descriptors for the eighteen

remaining compounds were organized in an \mathbf{X} matrix, and the pIC_{50} values (IC_{50} in $\mu\text{mol L}^{-1}$) were arranged in a column \mathbf{y} vector. The \mathbf{y} vector was correlated with the \mathbf{X} descriptors through the QSAR modeling software.¹⁶ Those descriptors presenting Pearson correlation with pIC_{50} ($-\log \text{IC}_{50}$) lower than 0.3 were eliminated.¹⁷ The OPS algorithm was then applied for variable selection.¹⁸ The main idea of this algorithm is to attribute an importance to each descriptor, so that the columns of \mathbf{X} matrix are reordered in such a way that the most important descriptors are presented in the first columns. Then, successive PLS regressions were built with increasing number of descriptors in order to find the best PLS model. The number of factors in each model was determined by leave-one-out cross-validation (LOO) method.

The final regression model's performance was accessed by the coefficient of multiple determination (R^2), standard error of calibration (SEC), cross validated correlation coefficient (Q^2) and standard error of cross validation (SEV).

In order to validate the model, the presence of chance correlation between the randomized dependent variable and descriptors was investigated by y -randomization method.¹⁹ For this test, the \mathbf{X} matrix is left untouched, and only the \mathbf{y} vector is randomized (\mathbf{y}_{rand}). The models obtained under such conditions should be of poor quality and without real meaning. It is expected that the statistical parameters from the randomized models (Q_{yrand}^2 and R_{yrand}^2) should be significantly lower than those obtained for non-scrambled data (Q_{LOO}^2 and R^2). In this work, 40 randomization runs were carried out. To judge whether the real model is characterized by chance correlation, the absolute value of the Pearson correlation coefficient, $R(\mathbf{y}, \mathbf{y}_{\text{rand}})$, between the original \mathbf{y} vector and randomized vector (\mathbf{y}_{rand}) were calculated. Two \mathbf{y} randomization plots, $R(\mathbf{y}, \mathbf{y}_{\text{rand}})$ vs Q^2 and $R(\mathbf{y}, \mathbf{y}_{\text{rand}})$ vs R^2 , were drawn for all randomized and real models. Two linear equation lines of $R(\mathbf{y}, \mathbf{y}_{\text{rand}})$ vs Q^2 and $R(\mathbf{y}, \mathbf{y}_{\text{rand}})$ vs R^2 were obtained. It has been recommended that for a model free of chance correlation, the intercepts are $a_Q < 0.05$ and $a_R < 0.3$.

A PCA analysis was applied to the autoscaled selected descriptors, using the Pirouette® 4.5 software, in order to evaluate the descriptors capability to discriminate the compounds into different activity classes.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. *In vitro* antileishmanial activity

To date, there is no approved vaccine for Leishmaniasis. The control of *Leishmania* infection relies on chemotherapy. For years, the antimonial pentavalent drugs, such as glucantime, meglumine antimoniate, pentostam and sodium stibogluconate, have been used for the treatment of CL.²⁰ In fact, these chemical agents continued to be the first-line treatment of all clinical forms of leishmaniasis in several countries.²¹ The treatment of leishmaniasis with pentavalent antimonials requires high doses, which results in several side effects and require long-time treatment.²⁰ Miltefosine and new formulations of amphotericin B represented a breakthrough for leishmaniasis treatment. However, the risk of emergence of resistant strains and the high cost of these new alternatives are actual concerns regarding their widespread use in developing countries.^{5,21} Therefore, research on a safer, more effective, less invasive and shorter-course treatment for CL is urgent. Nevertheless, the development of new medicines for treatment of this disease is challenging because of the variety of parasite species, pathology and immune responses.²² Within this context, our studies showed an inhibitory activity of compound **7k** when was tested against the amastigote and promastigote forms of *L. amazonensis* (Table 2). The substance displayed good antipromastigote activity ($IC_{50} = 7.4 \mu\text{mol L}^{-1}$) and produced a concentration-dependent reduction in parasite load of macrophages infected, with an IC_{50} of $1.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 2). Regardless of the developmental form of the parasites, significant mitochondrial alterations at the ultrastructural level, such as remarkable swelling and disorder of the inner membrane, have been reported for *L.*

amazonensis.²³ Other studies have reported similar changes in the epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*.²³ Eugenol derivatives promoted a decrease in the number of parasites in macrophages infected by *Leishmania infantum*, indicating that their target action is conserved in other leishmania species.²⁵

The strong effect on all parasite stages suggest severe damage caused to the target(s), which cannot be repaired by the parasite and reinforces the importance of identifying the parasite death pathways involved in this compound's mechanism of action. Furthermore, the viability of uninfected macrophages was unaffected by concentrations up to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The IC_{50} for the activity of **7k** on uninfected macrophages was found to be 211.9 $\mu\text{mol L}^{-1}$, which is 124-fold higher than the IC_{50} obtained against intracellular amastigotes ($\text{IC}_{50} = 1.7 \mu\text{mol L}^{-1}$). In this experiment, compound **7k** drastically reduced survival rates of *L. amazonensis* in macrophages. Eugenol derivative **7k** exhibited a very high selectivity index (SI) of 124.7 which was 77-fold higher than glucantime (SI = 1.6); at similar conditions, glucantime exhibited IC_{50} of 45.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against intracellular amastigotes and IC_{50} of 75.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ on uninfected macrophages.

The essential oils of *Achillea millefolium*, which contains eugenol among its components, was able to induce nitric oxide production and kill *L. amazonensis* in J774G8 macrophages.²⁶ In the present study, however, **7k** was not able to induce macrophages to produce nitric oxide (data not shown) before or after interactions, reinforcing the hypothesis that under these conditions the compound acts directly on the parasite. It is crucial that parasitic chemotherapeutic agents exhibit highly selective activity. The **7k**-treated macrophages showed no significant change in viability at concentrations much higher than the concentrations that damaged internalized parasites. Therefore, the derivative **7k** presents lower toxicity when compared to drugs currently used in the treatment of leishmaniasis.

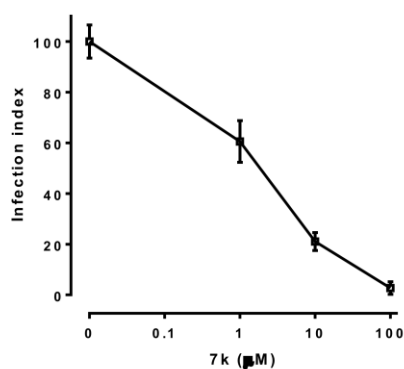


Fig. 2. Activity of compound **7k** against intracellular amastigotes. Murine peritoneal macrophages were infected with *L. amazonensis* and incubated with compound **7k** at different concentrations (0.01–100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). After 72 h, the slides were stained, and the infection index was established by counting at least 100 macrophages under a light microscope. Mean \pm SD; n=3.

Table 2. Antileishmanial activity of compound **7k**

Compounds	IC ₅₀ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		SI
	Promastigotes	Amastigotes	
Amphotericin B	0.2 \pm 0,1	ND	ND
7k	7.4 \pm 0,8	1.7 \pm 0,2	211.9 \pm 2,3
*Glucantime	ND	45.5 \pm 1,6	75.5 \pm 2,6

Mean \pm SD (n = 3).

SI= Selectivity index (SI = IC₅₀ against macrophages/IC₅₀ on amastigotes)

*Glucantime [$\mu\text{g mL}^{-1}$]

ND = not determined.

3.2. *In vivo* studies

Most investigations on antileishmanial drug development describe the *in vitro* measure of growth inhibition and cytotoxicity; typically, these studies are not accompanied by *in vivo* assays.

For studies reporting *in vivo* assays, the parenteral routes are normally utilized. The vast majority of CL cases are uncomplicated, with localized single lesions. Available drugs are often administered by systemic routes that unacceptably expose patients to systemic toxicity. Due to the difficult permeation of injured skin, making topical application and rapid clearance of circulation impossible after intralesional injections, the production of useful oral medication for the patient is urgently required for CL. In the present study, we evaluated the oral activity of **7k** in *L. amazonensis* infected BALB/c mice, a species that causes difficult to treat cutaneous leishmaniasis in Latin America. Considering the results of the *in vitro* experiments, the efficacy of **7k** was evaluated in a murine model of cutaneous leishmaniasis infected with *L. amazonensis*. The groups orally treated with 40 mg/kg/dose (800 µg in 100 µL of PBS) of **7k** (5 doses/week, total of 25 doses), demonstrated a similar decrease in the lesion development compared to the groups treated with intralesional 1.5 mg/kg/dose (300 µg in 10µL of PBS) of Glucantime (1 dose/week, total of 5 doses), a reference drug (Fig. 3a).

It is shown in Fig. 3a the evolution of lesion size during treatment as a function of time. Lesion size of animals treated with **7k** was significantly decreased after ten-dose during the evaluation period until the completion of the assay. All animal lesions treated with **7k** showed signs of wound healing and no signs of oral toxicity throughout the observation period. On the other hand, a gradual increase in mean lesion size could be observed for the control group. When administered orally, **7k** was as effective as glucantime in preventing lesion development and parasite burden. In addition, compound **7k** promoted a significant reduction in the parasite burden compared with the PBS group (Fig. 3b).

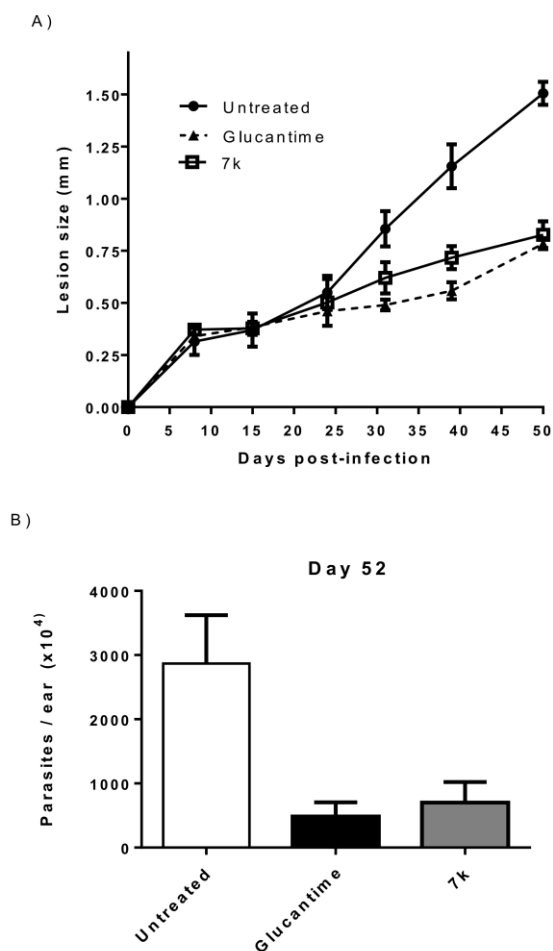


Fig. 3. Effect of 7k on murine cutaneous leishmaniasis. Mice were infected in the ear with *L. amazonensis* and treated orally with 40 mg/kg/dose (800 μ L in 100 μ L of PBS) of 7k (5 doses/week, 25 doses), or intralesional subcutaneous injections with 1.5 mg/kg/dose (300 μ L in 10 μ L of PBS) of glucantime (1 dose/week, 5 doses). A) Lesion development was measured with a dial calliper twice a week. B) At the end of the experiment, the mice were euthanized and the parasite burden was estimated by dilution analysis. Means \pm SEM (n = 5).

The animals were also checked daily for signs of morbidity and death according to the international guidelines (WHO/OECD), and any unusual aspect was noticed. Moreover, no abnormal differences in body weight changes were observed (Fig. 4). Serological markers of cardiac (AST), hepatic (ALT), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and renal (creatinine) toxicity were not significantly altered by the twenty five-dose treatment with **7k** (Fig. 5). During the five-dose meglumine antimoniate treatment, a slight weight loss was noticed, and an increase in AST and ALT was observed at the end of treatment, a finding indicative of hepatotoxicity. This is in line with several studies showing that systemic absorption of meglumine antimoniate occurs after intralesional administration, leading to systemic adverse effects during and after intralesional meglumine antimoniate that include nausea, vomiting, dyspnea, dizziness, and anaphylactic shock,²⁷ as well as altered hepatic function and white cell count changes.²⁸

Miltefosine was the first oral compound approved for visceral leishmaniasis chemotherapy, and its efficacy against *L. donovani* was well documented. On the other hand, other species such as *L. amazonensis* were much less susceptible to miltefosine, as they had genes previously associated with resistance to this drug.²⁹ The FDA approval miltefosine is limited to three species, all three are from the New World species of the subgenus *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. panamensis* and *L. guyanensis*. The effectiveness of miltefosine for other species has not been evaluated in clinical trials. Even for FDA approved species, effectiveness has been variable in different geographical regions. The most common adverse effects of miltefosine are vomiting, diarrhea and transient liver enzymes level up. Its susceptibility data for *L. amazonensis* strains are limited, mainly in Brazil, where the drug has not yet been approved for the treatment of leishmaniasis.³⁰ The difficulty to obtain this product prevented its use as a control in the present investigation. It is important to mention that triazoles can be used as an alternative treatment for leishmaniasis, as they have a spectrum of effects on several *Leishmania* species. For example, ketoconazole has

demonstrated clinical efficacy on CL caused by *L. mexicana*, *L. panamensis* and *L. major*. Fluconazole has also been shown to be effective against CL caused by *L. major* and *L. braziliensis*.³¹, and itraconazole displayed efficacy in treating *L. major*.³². In a case report, posaconazole was successfully used in a patient with *L. infantum* infection.³³ A study conducted with Iranian patients presenting CL caused by *L. major* revealed that the use of a higher dose of 400 mg fluconazole resulted in greater wound healing after 6 weeks treatment compared to the 200 mg dose. The patient received oral fluconazole (5mg/kg/d) for a period of 20 days and was discharged 2 days later. The red blood cell count returned to normal after 15 days. No complications were observed during treatment with fluconazole, including liver changes.³⁴ Another study showed that ketoconazole was effective at a dose of 600 mg/day for 30 days on CL caused by *L. mexicana*, *L. panamensis* and *L. major*. These azole compounds also presented antileishmanial activity against *Leishmania* spp.³⁵ All the examples demonstrate the potential of triazoles for the treatment of leishmaniasis.

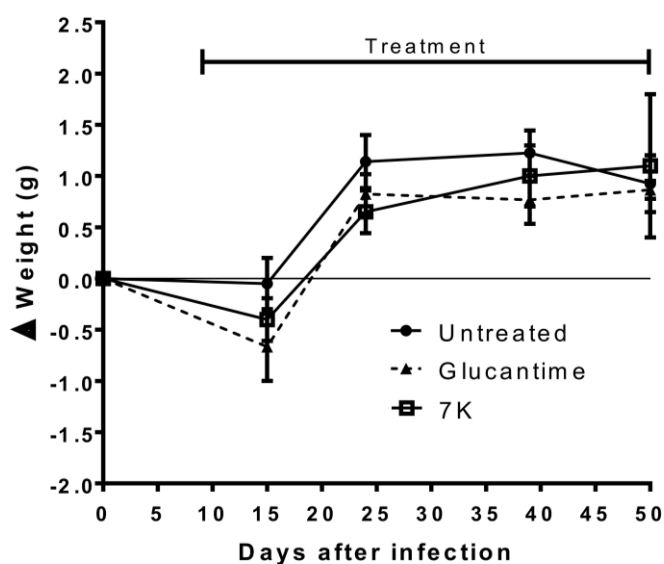


Fig. 4. Body-weight gain. Mice were infected and treated as described in Fig. 3. The animals were periodically weighed on the indicated days. Means \pm SEM (n = 5).

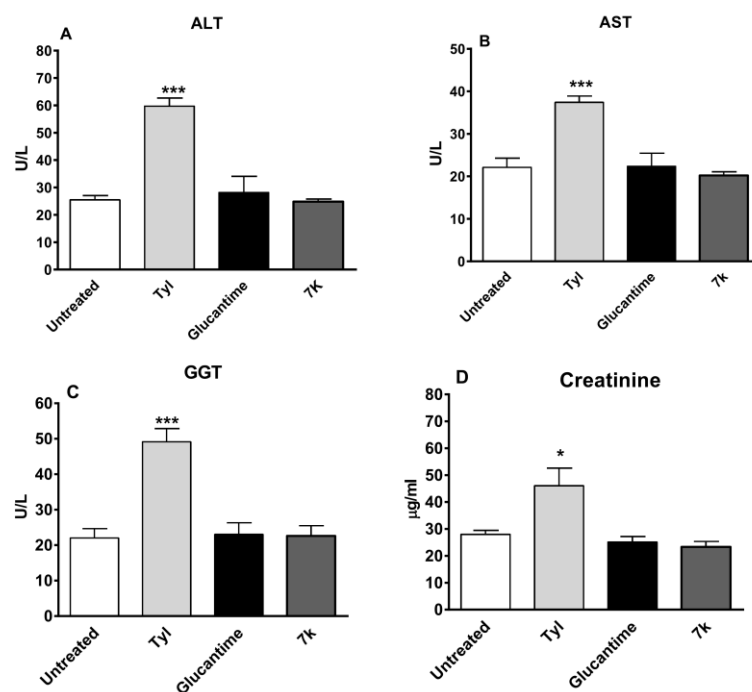
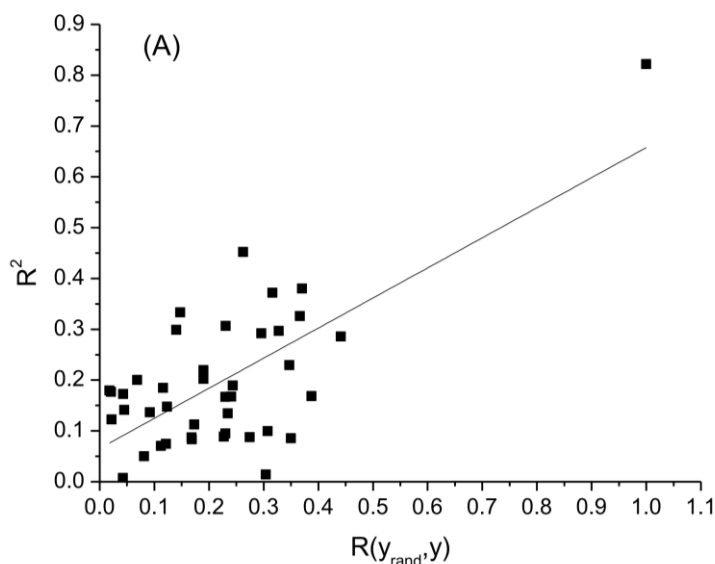


Fig. 5. Evaluation of systemic toxicity. Mice were infected and treated as described in Fig. 3. On day 52 of infection, serum was collected for the colorimetric determination of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) and creatinine. They were measured in the serum using laboratory colorimetric diagnostic kits. Positive controls were animals received a single dose of 300 mg kg⁻¹ of acetaminophen (TyI) by oral administration. Means \pm SD (n = 3), * p < 0.05 and *** p < 0.001 in relation to untreated controls.

3.3. QSAR model for the leishmanicide activity of eugenol derivatives

The best model for the eighteen eugenol derivatives was built with two factors and the selected descriptors, partial atomic charge at carbons 20 and 26 (C20, C26, Fig. 1), total dipole moment (DIP) and the energy of the second lowest unoccupied molecular orbital (LUMO+1), describing 70.42% of the variance. The minimal requirements for QSAR studies ($R^2 > 0.6$ and $Q^2 > 0.5$)³⁶ were satisfied by the model statistical parameters, $R^2 = 0.82$ and $Q^2 = 0.71$. The standard errors of calibration and cross-validation were $SEC = 0.26$ and $SEV = 0.31$, respectively. The results for y-randomization test, (Fig. 6, graphs A-C), show that the model presents only a discrete chance correlation. According to Eriksson *et al.*,³⁷ the intercepts for R^2 vs $R(y_{\text{rand}}, \mathbf{y})$ and Q^2 vs $R(y_{\text{rand}}, \mathbf{y})$, y-randomization plots in Fig. 6A and 6B, must be lower than 0.3 and 0.05, respectively. The values found for this model were 0.06 for R^2 vs $R(y_{\text{rand}}, \mathbf{y})$ and -0.76 for Q^2 vs $R(y_{\text{rand}}, \mathbf{y})$. On the other hand, in order to have no chance correlation, Q^2 and R^2 for randomized \mathbf{y} (Fig. 6C) must be below 0.2; the Q^2 value found for this model was approximately 0.2, but for R^2 there are some points close to 0.4, indicating a tolerable chance correlation. However, the purpose of this study it is not to validate a model for predicting new analogues, since the regression model was built with a small set of compounds, but instead, to obtain some information on the mechanism of action of these derivatives in the activity against *L. amazonensis*.



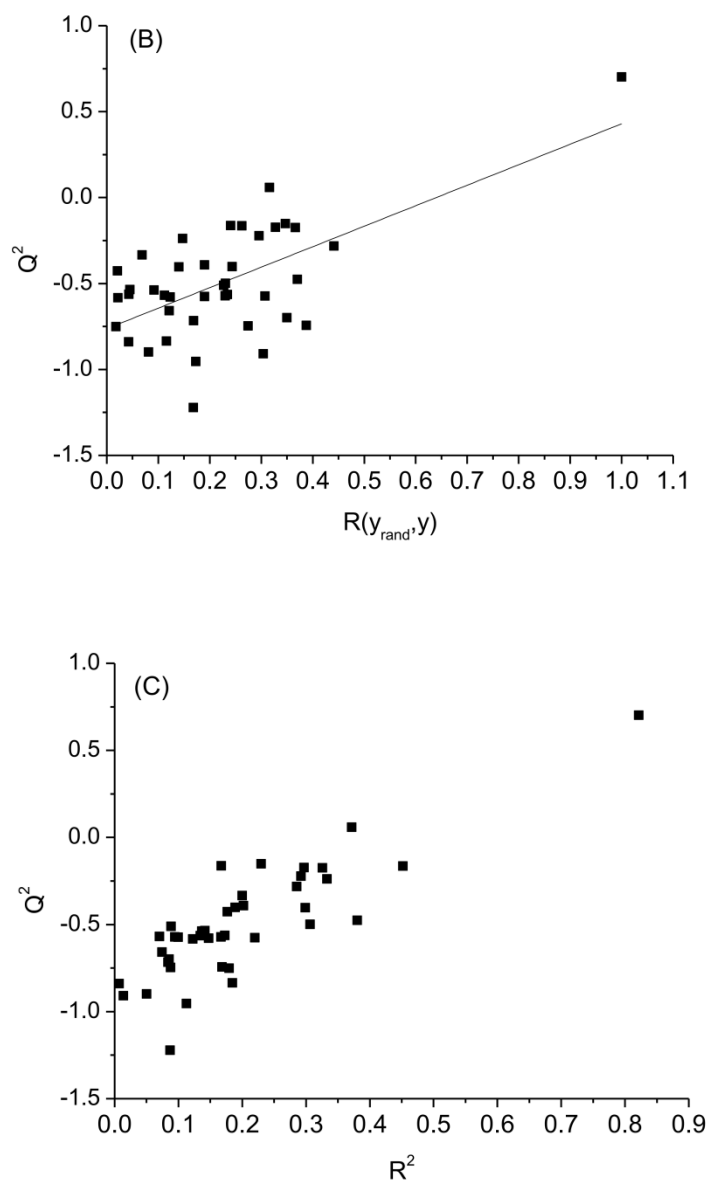


Fig. 6. Plots of y -randomization test for 40 repetitions, where $R(y_{rand}, y)$ means $R(pIC_{50 randomized}, pIC_{50})$. (A) R^2 vs $R(y_{rand}, y)$; (B) Q^2 vs $R(y_{rand}, y)$; (C) Q^2 vs R^2 , where Q^2 is the coefficient of determination for LOO cross-validation.

From the autoscaled regression coefficients (eq. 1), the second lowest unoccupied molecular orbital energy (LUMO+1) is the most important descriptor followed by the total dipole moment (DIP). It can be noticed from this equation that pIC_{50} increases when LUMO+1 and DIP increases. In order to evaluate the consistency of the model, the signals of the coefficients for the correlation between pIC_{50} and the descriptors were investigated.³⁶ This model proved to be self-consistent

since there is a coincidence of the signals for the regression coefficients in the model (eq. 3) and the signal of correlation coefficient between each respective descriptor and pIC_{50} (-0.59 C26; $+0.57$ DIP; $+0.50$ LUMO+1; -0.56 C20).

$$pIC_{50} = -0.29 \text{ C26} + \mathbf{0.32 \text{ DIP}} + \mathbf{0.54 \text{ LUMO+1}} -0.26 \text{ C20} \quad (\text{eq. 3})$$

The eugenol 1,2,3-triazolic compounds studied in this article are composed by the eugenol fragment attached to a 1,2,3-triazole functionality which, in turn, is connected to different benzyl groups. The benzyl groups differ from each other only by the substituents attached to the aromatic ring. Among the selected descriptors, two of them are the partial atomic charge at carbons 20 and 26 (C20, C26) of the benzyl group (Fig. 1), demonstrating the importance of this moiety to the biological response. Almost all derivatives, in particular the most active, present negative charges at these positions (Table 3). Moreover, from equation 1, pIC_{50} increases with decreasing of charges at C20 and C26. This is an indicative that substituents on the ring that result in high negative charges at carbons 20 and 26 are important concerning the antileishmanial activity.

Table 3. The selected descriptor values for the eighteen eugenol derivatives used to build the PLS regression model

Compound	Charge at C26	Dip	LUMO+1	Charge at C20	pIC₅₀
6a	-0.044	4.45	-0.026	-0.211	4.52
6b	-0.187	3.82	-0.030	-0.134	4.23
6f	-0.065	4.87	-0.052	-0.210	3.89
6h	-0.167	4.08	-0.041	-0.137	3.49
6j	0.286	2.64	-0.035	-0.005	3.01
6k	-0.049	4.26	-0.044	-0.378	4.31
6m	-0.033	3.69	-0.038	0.007	3.80
6n	0.116	2.68	-0.039	-0.180	3.81
7a	-0.070	4.03	-0.026	-0.238	4.42
7b	-0.198	3.52	-0.029	-0.184	4.49
7d	-0.004	3.49	-0.038	-0.126	3.54
7e	-0.003	3.55	-0.043	-0.151	3.55
7f	-0.079	4.82	-0.051	-0.194	3.76
7h	-0.175	3.69	-0.041	-0.158	3.84
7i	-0.043	3.79	-0.042	-0.230	3.53
7k	-0.175	4.35	-0.026	-0.204	5.13
7l	-0.062	3.42	-0.038	0.025	3.04
7m	0.095	2.27	-0.038	-0.160	3.01

From equation 3, the frontier orbital energy LUMO+1 is the most important descriptor. Some other QSAR studies of related antileishmanial compounds showed high correlation between the activity and the LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) energy, corroborating the results obtained in this work. A QSAR study of twenty-one derivatives of 1,3,4-thiadiazole with known antileishmanial activity showed that the activity increases with the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energy,³⁸ in accordance with the present results. A series of compounds (twenty-seven tryptanthrin analogues) containing benzenic ring and nitrogen atoms in their structures, has also shown high correlation between the antileishmanial activity and this frontier molecular orbital energy,³⁹ indicating that the antileishmanial compounds may interact with the receptor through an electron transfer reaction.

In addition, it is known that eugenol presents dual effect on the oxidative stress, acting as antioxidant and pro-oxidant agent.⁴⁰ The consequences of pro-oxidant activity could be the possible damage to the biomolecules such as DNA, proteins and lipids, and the consequent cellular death.⁴¹ These processes involve reactive oxygen species (ROS) and charge transfer, that can explain the importance of the unoccupied molecular orbital energy (LUMO+1) in the activity.

From the results presented in the equation 1, one can suggest that the interaction drug-receptor of the studied antileishmanial eugenol derivatives occurs by charge transfer and dipole-dipole interaction.

Fig. 7 shows the scores plot resulted from PCA applied to the autoscaled selected descriptors. It can be concluded that, except by one, all the active compounds are discriminated from moderate and inactive in PC2, such that the most active compounds present high positive scores. PC1 shows a tendency to discriminate the compounds into three groups, so that the inactive compounds with pIC₅₀ values between 3.01 and 3.04 (▲) have high positive scores in

PC1, while the most active ones ($pIC_{50} > 4.23$) have negative scores (\bullet) and the majority of compounds presenting pIC_{50} between 3.49 and 3.89 occupy the center of the graph (*).

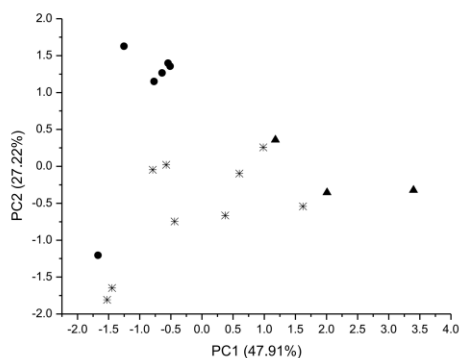


Fig. 7. PC1 vs. PC2 scores plot of the eugenol derivatives tested against *L. amazonensis*. The active molecules are represented by \bullet . The inactive and moderate activity compounds are represented by (\blacktriangle) and (*), respectively.

The loadings from PCA analysis are in equations 3 and 4, for PC1 and PC2, respectively. LUMO+1 is the most important descriptor in PC2 that is responsible for the discrimination of the most active compounds from the others. Dipole moment and the charges over atoms 20 and 26 are important in PC1 that has only a tendency to discriminate the compounds into the three categories, active, inactive and moderately active.

$$PC1 = +0.58 C26 -0.64 DIP + 0.08 LUMO+1 +0.49 C20 \quad (\text{eq. 3})$$

$$PC2 = -0.37 C26 -0.08 DIP + 0.91 LUMO+1 +0.16 C20 \quad (\text{eq. 4})$$

In light of these findings, it can be stated that the mechanism of action of these eugenol derivatives on *L. amazonensis* occurs mainly by transfer of charge, although dipole-dipole interactions may also occur. Furthermore, from equation 1, negative charges at carbons 20 and 26 is favorable to the activity. The importance of LUMO+1 energy in the antileishmanial activity is in accordance with the literature.

4. CONCLUSIONS

In summary, the present study demonstrates that the compound 4-(3-(4-allyl-2-methoxyphenoxy)propyl)-1-(4-methylbenzyl)-1*H*-1,2,3-triazole (**7k**) present significant antileishmanicidal activity concerning CL. *In vitro* assays revealed that this eugenol derivative is more potent than antimonial drugs that are currently used in the treatment of CL. The *in vivo* bioassays carried out with CL infected female BALB/c mice demonstrated that oral administration of compound **7k** lead to decreased lesion and parasitic load. These effects were comparable to the results achieved with intralesional glucantime. Moreover, compound **7k** present low systemic effect. Taking together, these results show the therapeutic potential of orally active eugenol derivatives against CL. The QSAR investigation points to the fact that the mechanism of action of the investigated eugenol derivatives on *L. amazonensis* occurs mainly by transfer of charge, which is in accordance with the literature, although dipole-dipole interactions may also occur. The charges at carbons 20 and 26 are also related to the leishmanicidal activity, such that substituents on the ring that result in high negative charges on these positions are favorable to increase the biological activity.

Conflict of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

We are grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES) for a fellowship to PARG. We are also would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support (Grant APQ-02957-17).

REFERENCES

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PlosOne*, 2012; 7:e35671.
2. de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HDFH. Cutaneous leishmaniasis: Recent developments in diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol*, 2015; 16, 99-109.
3. Disease Background – Cutaneous leishmaniasis. Drugs for Neglected Diseases initiative. Available <http://www.dndi.org> Accessed first december 2019.
4. Cota GF, de Sousa MR, Fereguetti TO, Saleme PS, Alvarisa TK, Rabello A. The cure rate after placebo or no therapy in American cutaneous leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. *PlosOne*, 2016, 19; e0149697.
5. Iqbal H, Ishfaq M, Wahab A, Abbas MN, Ahmad I, Rehman A, Zakir M. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. *Asian Pac J Trop Dis*, 2016; 6, 1-5.
6. Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC. Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. *Parasitol Res*, 2008; 103, 1-10.
7. Pereira WL, de Souza RV, Moura CM, Saar GR, Firmino RC, da Silva AM, Júnior AS, Bressan GC, Almeida, MR, Afonso LCC, Teixeira RR, Fietto JLR. The antileishmanial potential of C-3 functionalized isobenzofuranones against *Leishmania (Leishmania) infantum* Chagasi. *Molecules*, 2015; 20, 22435-22444.
8. Rodrigues MP, Tomaz DC, de Souza LA, Onofre TS, de Menezes WA, Silva JA, Fontes MAS, de Almeida, M R, da Silva AM, Bressan GC, Santos MAV, Fietto JLR, Teixeira RR. Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis*. *Eur J Med Chem*, 2019; 183, 111688.
9. Teixeira, RR, Gazolla PAR, da Silva AM, Borsodi MPG, Bergmann BR, Ferreira RS, Vaz BG,

- Vasconcelos GA, Lima WP. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. *Eur J Med Chem*, 2018; 146, 274-286.
10. Bergmann, BR, Lenglet CR, Santos D, Pinto YMC, TraubCzeko, A. Use of fluorescent leishmania for faster quantitation of parasite growth in vitro and in vivo. In: XXVI Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, Caxambu, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. II) (1999) 74.
11. National Academy of Sciences. 2011. GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS.
12. Lima HC, Bleyenbergh JA, Titus RG. A simple method for quantifying Leishmania in tissues of infected animals. *Parasitology Today*, 1997; 13, 80-82.
13. Gaussian 09, Revision A.02, Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Petersson GA, Nakatsuji H, Li X, Caricato M, Marenich A, Bloino J, Janesko BG, Gomperts R, Mennucci B, Hratchian HP, Ortiz JV, Izmaylov AF, Sonnenberg JL, Williams-Young D, Ding F, Lipparini F, Egidi F, Goings J, Peng B, Petrone A, Henderson T, Ranasinghe D, Zakrzewski VG, Gao J, Rega N, Zheng G, Liang W, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Throssell K, Montgomery JA, Peralta JE Jr., Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Keith T, Kobayashi J, Normand K, Raghavachari A, Rendell JC, Burant SS, Iyengar J, Tomasi M, Cossi R, Millam JM, Klene M, Adamo C, Cammi R, Ochterski JW, Martin R L, Morokuma K, Farkas O, Foresman JB, Fox DJ, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

14. Weigend, Ahlrich R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, v. 7, 3297-3305.
 15. HyperChem Software Version 7.1. Hyper Co., USA, 2002.
 16. Martins JPA, Ferreira MMC. QSAR modeling: A new open source computational package to generate and validate QSAR models. *Quim Nova*, 2013; 36, 554-560.
 17. Ferreira MMC. Multivariate QSAR. *J Braz Chem Soc* 2002; 13, 742-753.
 18. Teófilo RF, Martins JPA, Ferreira MMC. Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression. *J Chemometrics*, 2009; 23, 32-48.
 19. OECD (2014), *Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models*, OECD Series on Testing and Assessment, No. 69, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264085442-en>. Accessed 25 January 2020.
 20. Silva-Jardim I, Thiemann OH, Anibal FF. Leishmaniasis and Chagas disease chemotherapy: a critical review. *J Braz Chem Soc* 2014; 25, 1810-1823.
 21. Goodwin LG. Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89, 339–341.
 22. WHO Expert Committee. Control of the Leishmaniasis; WHO Technical Report Series, No. 949; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2010.
 - 23 Ueda-Nakamura T, Mendonça-Filho RR, Morgado-Díaz JA, Korehisa Maza P, Prado DFB, Aparício Garcia Cortez D, Alviano DS, Rosa Mdo S, Lopes AH, Alviano CS, Nakamura CV.
-

Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol Int* 2006; 55, 99–105.

24. Lazardi K, Urbina JA, de Souza W. Ultrastructural alterations induced by ICI 195,739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35,736–40.

25. de Moraes SM, Vila-Nova NS, Bevilaqua CM, Rondon FC, Lobo CH, Moura AA, Sales AD, Rodrigues AP, de Figueiredo JR, Campello CC, Wilson ME, de Andrade Jr HF. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2014; 22, 6250–6255.

26. Santos AO, Santin AC, Yamaguchi MU, Cortez LE, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Nakamura CV. Antileishmanial activity of an essential oil from the leaves and flowers of *Achillea millefolium*. *Ann Trop Med Parasitol* 2010; 104, 475–483.

27. Esfandiarpour I, Farajzadeh S, Rahnama Z, Fathabadi EA, Heshmatkhah A. Adverse effects of intralesional meglumine antimoniate and its influence on clinical laboratory parameters in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 2012; 51, 1221–1225.

28. Neves DB, Caldas ED, Sampaio RN. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis: relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. *Trop Med Int Health* 2009; 14, 1515–1522.

29. dos Santos MG, Muxel SM, Zampieri RA, Pomorski TG, Floeter-Winter LM. Transbilayer dynamics of phospholipids in the plasma membrane of the *Leishmania* genus. *PLoS One* 2013; 8, e55604.

30. Morais-Teixeira Ed, Damasceno QS, Galuppo MK, Romanha AJ, Rabello A. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106, 475–478.
 31. Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N Engl J Med* 2002; 346, 891–895.
 32. Sousa AQ, Frutuoso MS, Moraes EA, Pearson RD, Pompeu MM. High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis*. *Clin Infect Dis* 2011; 53, 693–695.
 33. Paniz Mondolfi AE, Starvropoulos C, Gelenew T, Loucas E, Perez Alvarez AM, Benaim G, Polsky B, Schoenian G, Sordillo EM. Successful treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* with posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55, 1774–1776.
 34. Toubiana J, Armengaud JB, Dupouy Camet J, Gendrel D. Oral fluconazole treatment for extensive cutaneous leishmaniasis in an 11-year-old child. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25, 1083-1084.
 35. Galvão EL, Rabello A, Cota GF. Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and metaanalysis. *PLoS ONE* 2017; 12, e0186117.
 36. Kiraj R, Ferreira MMC. Basic validation procedures for regression models in QSAR and QSPR studies: Theory and application. *J Braz Chem Soc* 2009; 20, 770-787.
-

30. Morais-Teixeira Ed, Damasceno QS, Galuppo MK, Romanha AJ, Rabello A. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106, 475–478.
31. Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N Engl J Med* 2002; 346, 891–895.
32. Sousa AQ, Frutuoso MS, Moraes EA, Pearson RD, Pompeu MM. High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Vianna) braziliensis*. *Clin Infect Dis* 2011; 53, 693–695.
33. Paniz Mondolfi AE, Starvropoulos C, Gelenew T, Loucas E, Perez Alvarez AM, Benaim G, Polsky B, Schoenian G, Sordillo EM. Successful treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* with posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55, 1774–1776.
34. Toubiana J, Armengaud JB, Dupouy Camet J, Gendrel D. Oral fluconazole treatment for extensive cutaneous leishmaniasis in an 11-year-old child. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25, 1083-1084.
35. Galvão EL, Rabello A, Cota GF. Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and metaanalysis. *PLoS ONE* 2017; 12, e0186117.
36. Kiraj R, Ferreira MMC. Basic validation procedures for regression models in QSAR and QSPR studies: Theory and application. *J Braz Chem Soc* 2009; 20, 770-787.

37. Eriksson L, Jaworska J, Worth AP, Cronin MTD, Mcdowell RM, Gramatica P. Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSAR. *Environ Health Persp* 2003; 111, 1361-1375.
38. Hemmateenejad B, Miri R, Niroomand U, Foroumadi A, Shafieek A. A mechanistic QSAR study on the leishmanicidal activity of some 5-substituted-1,3,4-thiadiazole derivatives. *Chem. Biol Drug Des* 2007; 69 435-443.
39. Bhattacharjee AK, Skanchy DJ, Jennings B, Hudson TH, Brendle JJ, Werbovetz KA. Analysis of stereoelectronic properties, mechanism of action and pharmacophore of synthetic indolo[2,1-b]quinazoline-6,12-dione derivatives in relation to antileishmanial activity using quantum chemical, cyclic voltammetry and 3-D-QSAR catalyst procedures. *Bioorg Med Chem* 2002; 10 1979-1989.
40. Bezerra DP, Militão GCG, de Moraes MC, de Sousa DP. The dual antioxidant/prooxidant effect of eugenol and its action in cancer development and treatment. *Nutrients* 2017; 9, 1367.
41. Aruoma OI. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat Research* 2003; 523-524, 9-20.