

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Fernanda Gonçalves da Silva

**Síntese de derivados da Boc-Alanina conjugados aos derivados da N-
Piperazina Alquilada como potenciais inibidores da lipase pancreática e
da alfa-Amilase**

Juiz de Fora

2020

Fernanda Gonçalves da Silva

Síntese de derivados da Boc-Alanina conjugados aos derivados da N-Piperazina Alquilada como potenciais inibidores da lipase pancreática e da alfa-Amilase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos e Sintéticos Ativos.

Orientador: Prof. Dr. Giovanni Wilson Amarante

Juiz de Fora

2020

Fernanda Gonçalves da Silva

Síntese de derivados da Boc-Alanina conjugados aos derivados da N-Piperazina Alquilada como potenciais inibidores da lipase pancreática e da alfa-Amilase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 30 de outubro de 2020

BANCA EXAMINADORA



Doutor Giovanni Wilson Amarante - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Doutor Róbson Ricardo Texeira
Universidade Federal de Viçosa



Doutora Fernanda Maria Pinto Vilela
Universidade Federal de Juiz de Fora

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Fernanda Gonçalves da.

Síntese de derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados da N-piperazina alquilada, como potenciais inibidores da lipase pancreática e da alfa-amilase / Fernanda Gonçalves da Silva. -- 2020.

146 f.

Orientador: Giovanni Wilson Amarante

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2020.

1. Derivados da Boc-alanina . 2. Lipase pancreática. 3. ?-amilase. 4. Obesidade. 5. Diabetes tipo 2. I. Amarante, Giovanni Wilson, orient. II. Título.

Dedico este trabalho à minha família
pelo apoio incondicional em todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conduzir minha vida de forma segura e livre de qualquer mau, e por conservar minha personalidade e meus posicionamentos, Amém.

Aos meus pais, que tenho uma admiração imensurável, Miguel (pela paciência, bondade e compreensão) e Maria Alba (força, incentivo e persistência), pela a confiança e por proporcionarem a realização desta etapa da minha vida.

Ao meu irmão, Cristiano (Cris) e sua família (minha cunhada Nídia e aos meus sobrinhos Arthur, Hugo e Matheus), por todos os momentos de descontração e alegria, extremamente necessários durante a pós-graduação.

Ao professor Dr. Giovanni Wilson Amarante pela a oportunidade e orientação.

Ao professor Dr. Orlando Vieira de Sousa e sua aluna de iniciação de científica Fernanda Kelly da Costa, por terem tornado possível à realização dos testes biológicos *in vitro*, o que foi essencial para o desfecho deste trabalho.

À minha amiga Pós-doc, Dra. Juliana Alves dos Santos, pelo carisma e pela cumplicidade, e por dispor de todo seu conhecimento e experiência, e por acompanhar durante todo o desenvolvimento do Projeto.

À minha amiga, Mestre Isabella Flores de Souza Marra, pela receptividade, por ser diariamente a força motriz, sua presença foi o diferencial para contornar todas as durezas e/ou impasses da pesquisa e da vida.

Aos meus colegas e/ou ex-colegas de laboratório Camilinha, Adriane, Larissinha, Larissa, Viviane, Luíza (Inorgânica), Guilherme (Analítica), Marcelo, Pedro, Bernardo, Luan, Arthur e aos funcionários Fauzia, Tereza e Fernando por terem contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, Gabriel e Nathan pelo carinho e companheirismo.

À UFJF pela a infraestrutura e pelo desenvolvimento deste trabalho.

À agência de fomento FAPEMIG, pela a bolsa concedida.

RESUMO

A Obesidade e o Diabetes do tipo 2 são doenças crônicas com alto índice de prevalência no mundo todo e estão intimamente associadas ao desenvolvimento da síndrome metabólica. Logo, a compreensão da etiologia e fisiopatologia dessas doenças é importante para a aplicação de estratégias profiláticas, além da identificação de alvos terapêuticos. Por exemplo, as enzimas lipase pancreática e α -amilase estão envolvidas na modulação de lipídios e carboidratos, respectivamente. O presente trabalho teve por finalidade sintetizar derivados da Boc-alanina com variação isomérica (*L*, *D*, e *D*, *L*) conjugados aos derivados alquilados da *N*-piperazina e, posteriormente, avaliar a ação destes através de um ensaio *in vitro* frente à lipase pancreática e α -amilase, por meio da espectrofotometria. Foram sintetizados oito derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados alquilados da *N*-piperazina, dentre eles, quatro *L*-enantiômeros, dois *D*-enantiômeros e duas misturas racêmicas, sendo estes estruturalmente, compostos inéticos. Todos apresentaram efeito sobre as enzimas lipase pancreática e α -amilase, destaque para os compostos **3b** (*L*), **3c** (*L*) e **4b** (*D*) que apresentaram valores de IC₅₀: $26,48 \pm 4,04$; $96,20 \pm 2,04$ e $12,68 \pm 1,53$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo estes, inferiores ao do Orlistate ($295,30 \pm 11,22$ $\mu\text{g/mL}$). Para os ensaios da α -amilase destaque para o composto **4b** (*D*) que apresentou valor de IC₅₀ de $134,50 \pm 1,55$ $\mu\text{g/mL}$, valor este, inferior ao da Acarbose ($448,30 \pm 13,26$ $\mu\text{g/mL}$). Portanto, os resultados demonstraram que os derivados da Boc-alanina foram capazes de inibir a atividade da lipase e α -amilase. O composto **4b** foi efetivo para ambas as enimas, representando um agente terapêutico promissor para o controle do impacto das desordens metabólicas, inclusive da síndrome metabólica.

Palavras-chave: Derivados da Boc-alanina. Lipase pancreática. α -amilase. Obesidade. Diabetes tipo 2. Síndrome Metabólica.

ABSTRACT

Obesity and type 2 Diabetes are chronic diseases with a high prevalence rate worldwide and are closely associated with the development of metabolic syndrome. Therefore, the understanding of their etiology and pathophysiology of these diseases is important for the application of prophylactic strategies, in addition to the identification of therapeutic targets. For example, pancreatic lipase and α -amylase enzymes are involved in the modulation of lipids and carbohydrates, respectively. This present work aimed to synthesize Boc-alanine derivatives with isomeric variation (*L*, *D*, and *D*, *L*) conjugated to the alkylated derivatives of *N*-piperazine and, subsequently, to evaluate their action through an *in vitro* assays against pancreatic lipase and α -amylase enzymes, through spectrophotometry. Eight derivatives of Boc-alanine were synthesized in conjunction with the alkylated derivatives of *N*-piperazine, among them, four *L*-enantiomers, two *D*-enantiomers and two racemic mixtures, these being structurally, new compounds. All of them had an effect on the pancreatic lipase and α -amylase enzymes, with emphasis on compounds **3b** (*L*), **3c** (*L*) and **4b** (*D*) that presented IC 50 values: $26,48 \pm 4,04$; $96,20 \pm 2,04$ and $12,68 \pm 1,53$ $\mu\text{g/mL}$, respectively, which are lower than that of Orlistat ($295,30 \pm 11,22$ $\mu\text{g/mL}$). For the α -amylase tests, the highlight was compound **4b** (*D*), which presented an IC50 value of $134,50 \pm 1,55$ $\mu\text{g/mL}$, which is lower than that of Acarbose ($448,30 \pm 13,26$ $\mu\text{g/mL}$). Therefore, the results demonstrated that Boc-alanine derivatives were able to inhibit lipase and α -amylase activity. Compound 4b was effective for both enzymes, representing a promising therapeutic agent for controlling the impact of metabolic disorders, including metabolic syndrome.

Keywords: Boc-alanine derivatives. Pancreatic lipase. α -amylase. Obesity. Diabetes. Metabolic Syndrome.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	-	Derivados de aminoácidos duplamente protegidos.....	21
Esquema 1	-	Mecanismo catalítico da lipólise mediado pela lipase.....	28
Esquema 2	-	Mecanismo de ação do Orlistate sobre a lipase.....	29
Esquema 3	-	Proposta de mecanismo da hidrólise da ligação glicosídica.....	35
Esquema 4	-	Formação do carbocátion (A) e do íon oxocarbênio (B) durante a clivagem da ligação glicosídica pela ação de glicosidases.....	36
Figura 2	-	Estrutura da Acarbose e o modo esperado de ligação da LPH..	37
Esquema 5	-	Síntese dos derivados: da Boc-alanina, alquilados da <i>N</i> -piperazina e da Boc-alanina conjugada aos derivados alquilados da <i>N</i> -piperazina.....	42
Esquema 6	-	.Síntese da Boc-alanina.....	51
Esquema 7	-	Proposta de mecanismo da síntese da Boc-alanina.....	52
Figura 3	-	Espectro de RMN de ¹ H da Boc- <i>L</i> -alanina (500 MHz, CDCl ₃)....	53
Figura 4	-	Espectro de RMN de ¹³ C da Boc- <i>L</i> -alanina (125 MHz, CDCl ₃)..	54
Esquema 8	-	Reação de alquilação da piperazina.....	55
Esquema 9	-	Proposta de mecanismo da alquilação da piperazina.....	56
Figura 5	-	Espectro de RMN de ¹ H do composto 2c (500 MHz, CDCl ₃).....	58
Figura 6	-	Espectro de RMN de ¹³ C do composto 2c (125 MHz, CDCl ₃)....	58
Esquema 10	-	Síntese dos derivados da Boc-alanina acoplados aos derivados alquilados da <i>N</i> -piperazina.....	59
Esquema 11	-	Proposta de mecanismo da síntese dos derivados da Boc-alanina conjugados derivados alquilados da <i>N</i> -piperazina.....	61
Figura 7	-	Espectro de RMN de ¹ H do composto 3b (500 MHz, CDCl ₃)....	63
Figura 8	-	Espectro de RMN de ¹³ C do composto 3b (125 MHz, CDCl ₃)....	65
Figura 9	-	Espectro de DEPT-135 do produto 3b (125 MHz, CDCl ₃).....	66
Figura 10	-	Mapa de contorno COSY ¹ H- ¹ H do composto 3b (CDCl ₃).....	68

Figura 11	- Mapa de contorno HSQC ^1H - ^{13}C do composto 3b (CDCl_3).....	69
Figura 12	- Mapa de contorno HMBC ^1H - ^{13}C do composto 3c (CDCl_3).....	70
Figura 13	- Espectro no infravermelho do composto 3b	71
Figura 14	- a) Cromatograma HPLC do composto 5a . b) Cromatograma HPLC do composto 4a e c) Cromatograma HPLC do composto 3c	72
Esquema 12	- Proposta de mecanismo das fragmentações do derivado da Boc-alanina (composto 3b) via rearranjo de McLafferty.....	73
Figura 15	- Espectro de Massa de alta resolução do composto 3b	74
Esquema 13	- Hidrólise do <i>p</i> -nitrofenolpalmitato.....	77
Figura 16	- Estrutura do Orlistate (16A) e dos derivados da Boc-alanina acoplados aos derivados alquilados da <i>N</i> -piperazina (16B).....	79
Figura 17	- Gráficos de concentração <i>versus</i> resposta dos compostos 3a , 3c , 3d e 3e frente à lipase pancreática.....	80
Figura 18	- Gráficos de concentração <i>versus</i> resposta dos compostos 4a , 4b , 5a e 5b frente à lipase pancreática.....	80
Figura 19	- Gráficos de concentração <i>versus</i> resposta dos compostos 3a , 3c , 3d e 3e frente à α -amilase.....	87
Figura 20	- Gráficos de concentração <i>versus</i> resposta dos compostos 4a , 4b , 5a e 5b frente à α -amilase.....	87

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	- Exemplos de medicamentos antiobesidade.....	26
Tabela 2	- Exemplos de medicamentos antidiabéticos.....	33
Tabela 3	- Representação dos componentes utilizados nos ensaios <i>in vitro</i>	47
Tabela 4	- Derivados alquilados da <i>N</i> -piperazina.....	55
Tabela 5	- Valores da % de inibição dos compostos testados frente à lipase.....	81
Tabela 6	- Valores de IC50 dos compostos testados frente à lipase pancreática.....	83
Tabela 7	- Resumo dos resultados dos enantiômeros frente à lipase.....	84
Tabela 8	- Valores da % de inibição dos compostos testados frente à α -amilase.....	88
Tabela 9	- Valores de IC50 dos compostos testados frente à α -amilase.....	89
Tabela 10	- Resumo dos resultados do composto 4b frente à lipase e α -amilase.....	91

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(+/-)-ACS	Ácido canforsulfônico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCS	Cromatografia em Camada de Sílica
CLAE-FEQ	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral
cm	Centímetros
COSY	Correlation Spectroscopy
<i>D</i>	Dextrógiro
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dl	Decilitro
<i>D, L</i>	Racemato ou mistura racêmica
EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
FDA	Food and Drug Administration
E.P.M	Erro padrão médio
FF	Faixa de fusão
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
IC50	Concentração Inibitória Semimáxima
IFN- γ	Interferon gama

IMC	Índice de massa corporal
IV	Espectroscopia no infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
kDA	Kilodalton
Kg	Kilograma
kg/m ²	Kilograma por metro quadrado
<i>L</i>	Levógiro
L	Litro
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
m	Multiplete
m ²	Metro quadrado
M	Molar
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócito 1
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
mg/dl	Miligrama por decilitro
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
MM	Massa Molar
mmHg	Milímetros de mercúrio
mmol	Milimol
mol/L	Mol por litro
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico

pKa	Constante de acidez
ppm	Partes por milhão
m/v	Massa por volume
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
r.t	Rotação
s	Simpleto
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
t	Tripleto
t.a	Temperatura ambiente
TCD $^{4+}$	Linfócito T auxiliar CD $^{4+}$
TCD $^{8+}$	Linfócito T citotóxico CD $^{8+}$
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRIS-HCl	Cloridrato de TRIS (hidroximetil) aminometano
TRITON-X	Polietileno glicol <i>p</i> -(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil éter
VLDL	Lipoproteína de muito baixo
v/v	Volume por volume
μL	Microlitro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μmol	Micromol

LISTAS DE SÍMBOLOS

α	Alpha
β	Beta
δ	Delta
γ	Gama
μ	Micro
ρ	Para
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
\geq	Maior ou igual
\pm	Mais ou menos
$\%$	Porcentagem
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 ASPECTOS GERAIS DA OBESIDADE E O PAPEL DA LIPASE PANCREÁTICA.....	23
2.1.1 Obesidade	23
2.1.2 A lipase pancreática	26
2.1.2.1 A inibição da lipase pancreática e seus efeitos	29
2.2 ASPECTOS GERAIS DO DIABETES E O PAPEL DA α -AMILASE PANCREÁTICA.....	30
2.2.1 Diabetes Mellitus	30
2.2.2 A α-amilase pancreática	34
2.2.2.1 A inibição da α-amilase pancreática e seus efeitos	36
2.3 ASPECTOS GERAIS DA SÍNDROME METABÓLICA	38
2.4 ASPECTOS GERAIS DOS AMINOÁCIDOS	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 PARTE EXPERIMENTAL QUÍMICA	42
4.1.1 Técnicas utilizadas para a caracterização dos compostos sintetizados	43
4.1.1.1 <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	43
4.1.1.2 <i>Espectroscopia na região do infravermelho (IV)</i>	43
4.1.1.3 <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ)</i>	44
4.1.1.4 <i>Espectrometria de massas de Alta Resolução (EMAR)</i>	44

4.1.1.5 Faixa de Fusão (FF).....	44
4.1.2 Procedimento para o preparo dos compostos	44
4.1.2.1 Síntese dos derivados da alanina contendo o grupo Boc.....	44
4.1.2.2 Síntese dos derivados alquilados da N-piperazina.....	45
4.1.2.3 Síntese dos derivados da Boc-alanina acoplados aos derivados alquilados da N-piperazina	46
4.2 PARTE EXPERIMENTAL BIOLÓGICA	46
4.2.1 Determinação da atividade inibitória sobre as enzimas	47
4.2.1.1 Preparo das amostras e dos controle positivos.....	47
4.2.1.2 Ensaio de inibição da lipase pancreática.....	47
4.2.1.3 Ensaio de inibição da α -amilase.....	48
4.2.1.4 Preparo da microplaca	48
4.2.1.5 Determinação da Porcentagem (%) inibitória e IC50	49
4.2.1.6 Análise estatística	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 PARTE EXPERIMENTAL QUÍMICA	50
5.1.1 Síntese e caracterização dos derivados da Boc-alanina	50
5.1.1.1 Síntese dos derivados da Boc-alanina	50
5.1.1.2 Caracterização da Boc-L-alanina.....	52
5.1.2 Síntese e caracterização dos derivados alquilados da N-piperazina	54
5.1.2.1 Síntese dos derivados alquilados da N-piperazina.....	54
5.1.2.2 Caracterização dos derivados alquilados da N-piperazina.....	57
5.1.3 Síntese e caracterização dos derivados da Boc-alanina acoplados aos derivados alquilados da N-piperazina	59
5.1.3.1 Síntese dos derivados da Boc-alanina acoplados os derivados alquilados da N-piperazina	59
5.1.3.2 Caracterização dos derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados alquilados da N-piperazina	62

5.2.1 PARTE EXPERIMENTAL BIOLÓGICA	75
5.2.1 Determinação da atividade inibitória <i>in vitro</i> sobre as enzimas lipase pancreática e α-amilase	75
5.2.1.1 <i>Ensaio de inibição da lipase pancreática</i>	76
5.2.1.2 <i>Ensaio de inibição da α-amilase</i>	86
6 CONCLUSÃO	92
7 REFERÊNCIAS.....	95
8 ANEXO.....	114

1 INTRODUÇÃO

As enzimas digestivas são produzidas e secretadas pelo sistema gastrointestinal para degradar gorduras, proteínas e carboidratos, realizar a digestão e, posteriormente, a absorção de nutrientes (IANIRO *et al*, 2016). Especificamente, a α -glicosidase e α -amilase são as principais enzimas envolvidas na hidrólise de carboidratos e a lipase pancreática de lipídios (ERCAN; EL, 2016).

A α -amilase é uma enzima essencial do sistema digestivo, pois catalisa o passo inicial da hidrólise do amido, degradando-o em uma mistura de oligossacarídeos menores - maltose, maltotriose e α -(1-6) e α -(1-4) oligoglicanos - e estes por sua vez, sofrem ação das α -glicosidases que os degradam ainda mais em glicose, e que por absorção, entra na corrente sanguínea, em seguida, a degradação prossegue rapidamente levando ao aumento da hiperglicemia pós-prandial (KAJARIA *et al*, 2013; SUDHA *et al*, 2011).

O controle dos níveis pós-prandiais de glicose no plasma é muito importante no tratamento precoce do Diabetes (TAN; CHANG; ZHANG, 2017). Logo, inibidores da α -glicosidase e da α -amilase são capazes de atrasar a absorção e, conseqüentemente, a digestão de carboidratos, diminuindo assim, as quantidades de glicose pós-prandial (OBOH *et al*, 2016; TASLIMI *et al*, 2018). Acarbose, Voglibose e o Miglitol são inibidores da α -amilase e usados no tratamento do Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (RAFIQUE *et al*, 2020).

Outra enzima digestiva importante é a lipase pancreática, isso porque, ela desempenha um papel fundamental na digestão e absorção de gorduras, sendo responsável pela hidrólise de cerca de 50 a 70% do total de gorduras da dieta (LIM *et al*, 2014). Conseqüentemente, a inibição dessa enzima é um passo importante para a prevenção da obesidade e de doenças também relacionadas à obesidade (OMBRA *et al*, 2018).

Um inibidor comumente utilizado é o Orlistate, um medicamento comercializado e aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para perda de peso (GLISAN *et al*, 2017).

A obesidade é um contribuinte patogênico dominante para o diabetes, doenças cardiovasculares e a combinação desses fatores de risco, para a síndrome metabólica (SM), que é caracterizada por um conjunto de condições, incluindo aumento de açúcar no sangue e/ou pressão arterial, excesso de gordura corporal e níveis anormais de colesterol ou triglicerídeos. Além de estar intimamente ligada à obesidade e ao sedentarismo, bem como, a resistência à insulina (HUNG *et al*, 2017).

Nesse contexto, o histórico familiar de doenças metabólicas, o estilo de vida sedentário e a ingestão excessiva de alimentos altamente calóricos constituem os principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da SM (FERNANDO *et al*, 2020).

Nota-se que, todos esses distúrbios estão interligados, logo, os fatores de risco também estão relacionados, e uma das estratégias adotadas para o gerenciamento desses distúrbios, está na redução e/ou no controle desses fatores, abrangendo, portanto, todo o universo dessas desordens.

Visto que, o Orlistate apresenta muitos efeitos colaterais, como esteatorreia, inchaço, manchas oleosas, urgência fecal, incontinência fecal, além de efeitos adversos hepáticos (DUARTE *et al*, 2020). Somado a isso, os efeitos indesejáveis atribuídos ao uso da Acarbose, Voglibose e do Miglitol, como flatulência, inchaço, dor de estômago e diarreia (BUKHARI, 2017).

Logo, há uma necessidade no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Desta forma, este trabalho abordou como uma das estratégias para a diminuição do impacto desses distúrbios, a busca de novos agentes que possam apresentar influência nas atividades das enzimas lipase e α -amilase, podendo representar possivelmente, novos inibidores. O estudo direcionou-se na síntese de derivados da alanina, com base na sua quiralidade.

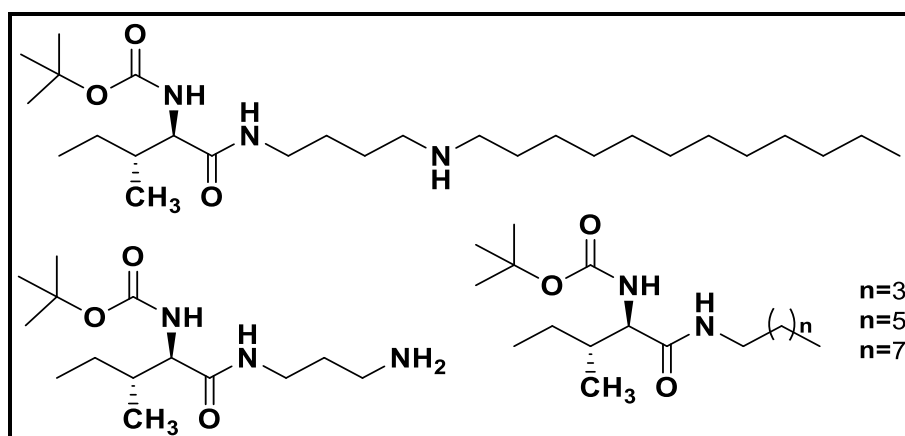
BLASKOVICH (2016) destaca que os aminoácidos têm desempenhado um papel significativo na descoberta moderna de fármacos, pois, possuem um bloco de construção disponível com dois grupos funcionais, que podem ser modificados quimicamente (via acilação, alquilação ou amidação), com um ou dois elementos de diversidade diretamente no mesmo centro estereogênico.

De maneira geral, a quiralidade pode ser definida como o potencial de uma molécula ocorrer em duas formas assimétricas que são imagens invertidas não espelhadas umas das outras sem alterar a composição atômica, as conexões átomo-átomo ou as ordens de ligação. Esse fenômeno geralmente ocorre devido a uma diferença na orientação tridimensional dos quatro substituintes diferentes ligados a um único átomo central, criando o que pode ser considerado uma versão esquerda e outra direita da mesma molécula (BROOKS; GUIDA; DANIEL, 2011). Essas duas versões da molécula são conhecidas como enantiômeros (BROOKS; GUIDA; DANIEL, 2011; NGUYEN; HE; PHAM-HUY, 2006).

Embora enantiômeros sejam constitucionalmente idênticos, existem diferenças topológicas que fazem com que esses apresentem interações diferenciadas com macromoléculas quirais e, portanto, desempenham atividades biológicas também diferenciadas (SANGI, 2016).

Derivados de aminoácidos duplamente protegidos - com uma variedade de Boc-aminoácidos e aminas diferentes - foram sintetizados anteriormente por nosso grupo de pesquisas (Figura 1) e avaliados em ensaios *in vitro*, para a determinação do efeito inibitório frente à α -amilase, α -glicosidase e lipase.

Figura 1 - Derivados de aminoácidos duplamente protegidos



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

A partir dos resultados observou-se que os derivados apresentaram

influência significativa sobre a atividade dessas enzimas, inclusive, destacando-se quando comparado aos inibidores de referência, como a Acarbose e o Orlistate, nas condições de ensaio utilizadas. O estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, em colaboração com professor Dr. Orlando Vieira de Sousa.

E assim, impulsionando a continuidade do estudo, agora explorando a esteroquímica, e assim, abordando a síntese de novos derivados, a partir da alanina duplamente protegida com variação isomérica (*L, D*, e *D, L*). Observe que, no estudo anterior foi utilizado a isoleucina e aminas e/ou diaminas alifáticas, já no presente estudo, a piperazina, uma diamina heterocíclica, foi usada devido suas propriedades químicas e/ou biológicas já descritas na literatura.

A alanina foi escolhida como o aminoácido protótipo, por apresentar um centro estereogênico, e ainda, por ser estruturalmente um dos o mais simples dentre os 20 aminoácidos existentes. O presente estudo consistiu inicialmente na síntese dos derivados da Boc-alanina, e principalmente, na aplicação destes, além da exposição de aspectos gerais de temas relevantes, através de uma revisão da literatura, que são essenciais para o entendimento da proposta do trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA OBESIDADE E O PAPEL DA LIPASE PANCREÁTICA

2.1.1 Obesidade

Sobrepeso e a obesidade são definidos pelo o acúmulo anormal ou excessivo de gordura que pode representar um risco à saúde, e são caracterizados pelo o Índice de Massa Corporal (IMC) (CHU *et al*, 2018), que é calculado pela a razão entre o peso corporal em quilogramas (Kg) e o quadrado da altura em metros (m²) (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019).

Em adultos, as diretrizes atuais da OMS define a faixa normal de IMC entre 18,5 a 24,9, enquanto um IMC ≥ 25 kg/m² é considerado sobrepeso e um IMC ≥ 30 kg/m² é classificado como obeso, e obesidade grave definida com IMC ≥ 40 kg/m² (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019). Uma tendência crescente na prevalência da obesidade desde o início da década de 1980 representou uma carga significativa para saúde em todo o mundo (INOUE *et al*, 2018).

A obesidade é uma doença multifatorial que resulta do desequilíbrio energético, ou seja, quando o gasto energético é menor que o consumo energético da dieta (ALMASRI, 2020), e o excesso de energia é convertido em triglicerídeo, que é armazenado no tecido adiposo, resultando em aumento da gordura corporal e, portanto, ganho de peso (ADEYEMI *et al*, 2020).

Nota-se que, muitos fatores incluindo a genética, epigenética e fatores do estilo de vida, têm sido implicados na patogênese da obesidade. A interação desses fatores pode variar ao longo do tempo e entre os indivíduos (LONGO *et al*, 2020). E ainda, estar relacionada a muitas doenças com risco de vida, incluindo Diabetes mellitus tipo 2, doenças cardíacas, hipertensão, câncer (BLÜHER, 2019; SHEIKHPOUR *et al*, 2020).

Além disso, está associada à aceleração do processo de envelhecimento, redução da longevidade, depressão e redução da qualidade de vida (SHEIKHPOUR *et al*, 2020). Em pessoas com obesidade, foi relatado o acúmulo

de dano no DNA e sugerido que esse dano esteja envolvido no desenvolvimento de doenças relacionadas à obesidade (WŁODARCZYK; NOWICKA, 2019). E recentemente, foi descrito que a obesidade aumenta exponencialmente o risco de mortalidade dos pacientes com Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-Cov-2) (PETRAKIS *et al*, 2020).

A fisiopatologia distinta entre as pessoas com obesidade resulta de potentes mecanismos homeostáticos que impedem a perda e promovem o ganho de peso e, esses mecanismos alterados podem explicar o porquê de comportamentos em curto prazo ou intervenções médicas frequentemente não serem suficientes para a perda de peso (BLÜHER, 2019). A homeostase do peso corporal envolve o eixo intestino-cérebro, um sistema complexo e altamente coordenado de hormônios periféricos do apetite e regulação neuronal mediada centralmente (LEAN; MALKOVA, 2016).

Existem muitos hormônios envolvidos na regulação e fisiopatologia da obesidade e, os principais hormônios reguladores são: Grelina, Adiponectina, Colecistocinina (CCK), Leptina, Peptídeo YY (PYY) e o GLP-1 (*Glucagon-like peptide*). A grelina é um hormônio peptídico circulante derivado do estômago, é o único hormônio orexigênico de ação periférica conhecido, e é responsável por estimular o apetite (KAILA; RAMAN, 2008).

Todos os outros estão relacionados com a saciedade. De maneira geral, a adiponectina leva a uma sensibilização corporal total à insulina sem alterar a quantidade circulante de insulina (MCCAFFERTY; HILL; GUNN, 2020). A CCK é produzida principalmente nas células L do duodeno e intestino delgado, em resposta à alimentação, regula o esvaziamento gástrico; além de, afetar a motilidade gastrointestinal, e ter função secretora exócrina de enzimas pancreáticas e da vesícula biliar (ADAMSKA *et al*, 2014).

A leptina é um polipeptídeo de 16 kDA produzida principalmente nos tecidos adiposos brancos e secretado na circulação. Seus níveis circulantes são proporcionais à massa de gordura corporal, servindo assim como um sinal de adiposidade do estoque total de energia corporal, logo, é necessária para a manutenção da homeostase energética e do peso corporal (ZHOU; RUI, 2013).

Como o PYY possui liberação pós-prandial pelas células L intestinais, acredita-se que esse peptídeo seja um sinal da saciedade, que ajusta seu efeito para reduzir a ingestão de alimentos (HOLZER; REICHMANN; FARZI, 2012). Os efeitos fisiológicos do hormônio gastrointestinal GLP-1 são a melhoria do controle glicêmico, bem como uma redução do apetite e, conseqüentemente, a ingestão de alimentos (EVERS *et al*, 2017). Os principais mecanismos de ação do GLP-1 envolvem o estímulo da secreção de insulina pelas células β nas ilhotas de Langerhans e a inibição da secreção de glucagon pelas células α (ADAMSKA *et al*, 2014).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou que em 2016, 18% das crianças e adolescentes e 39% dos adultos (aproximadamente 1,9 bilhão) apresentavam sobrepeso ou obesidade, e isto por sua vez, é um importante fator de risco para o desenvolvimento da síndrome metabólica (HUANG *et al*, 2020).

Além disso, há uma estimativa que o número de adultos com 18 anos ou mais com sobrepeso ou obesidade seja elevado para aproximadamente 3,3 bilhões até 2030 (cerca de 1,7 vezes) e de acordo com essa tendência atual, o ônus econômico da obesidade (custos diretos e indiretos de assistência médica, incluindo monitoramento da saúde, suplementos nutricionais e gerenciamento cirúrgico) deve crescer a cada ano (KIM *et al*, 2016).

Apesar das melhorias na compreensão da fisiopatologia e do aumento do número de terapias para a obesidade, sua prevalência continua crescente, isso pode estar relacionado ao fato de ser uma doença multifatorial, e que requer diferentes formas de tratamento entre eles: não farmacológico que inclui, intervenções alimentares e/ou atividade física, e ainda, modificação comportamental além do tratamento farmacológico (MCCAFFERTY; HILL; GUNN, 2020).

A Tabela 1 representa os principais medicamentos antiobesidade atualmente utilizados: Lorcaserina, Fentermina+Topiramato, Naltrexona+Bupropiona e o Liraglutido, recentemente aprovados nos EUA (OH, 2019; SINGH; SINGH, 2020) e na Europa. No entanto, podem causar vários efeitos adversos (MARRELLI; STATTI; CONFORTI, 2020).

Tabela 1 - Exemplos de medicamentos antiobesidade

Medicamento	Mecanismo	Efeitos adversos	Complicações
Orlistate	Inibidor da lipase pancreática	Distúrbios Gastrointestinais (GI);	Insuficiência hepática, nefropatia;
Lorcaserina	Agonista de 5HT* (*receptor específico de Serotonina)	Dor de cabeça, tontura, boca seca, náusea;	Síndrome da serotonina, efeitos depressivos;
Fentermina+ Topiramato	Simpaticomimético e antiepilético	Parestesia, tontura e (GI);	Eventos cardiovasculares teratogênicos;
Naltrexona/ Bupropiona	Antagonista e antidepressivo opióide	Náusea, dor de cabeça, tontura e (GI);	Risco de convulsão; evitar o uso de álcool;
Liraglutido	Agonista do GLP-1	Náusea, dor de cabeça, hipoglicemia, (GI) e fadiga;	Pancreatite, suicídio, câncer na tireoide, insuficiência renal;

Fonte: Adaptado de MCCAFFERTY; HILL; GUNN (2020).

2.1.2 A lipase pancreática

A lipase pancreática (triacilglicerol hidrolase; EC 3.1.1.3) é uma glicoproteína de 50 KDA (KAWAGUCHI *et al*, 2018) composta por uma cadeia polipeptídica de 449 aminoácidos dobrada em dois domínios estruturais: um domínio N-terminal maior (resíduos 1-336) e um domínio C-terminal menor (resíduos 337-449) (ACHOURI *et al*, 2020).

O domínio N-terminal pertence às dobras α/β -hidrolase e contém a tríade catalítica formada por Serina (Ser), Ácido aspártico (Aps) e Histidina (Hist). Já o domínio C-terminal permite a interação com a coenzima anfifílica, denominada de colipase, e essa interação facilita a ancoragem entre a enzima e a interface óleo/água (MUKHERJEE, 2014).

É considerada uma enzima essencial para a hidrólise de triglicerídeos no trato gastrointestinal (HUANG *et al*, 2020). A lipólise descreve a hidrólise de triacilgliceróis (gorduras) e por ser um ciclo catalítico é capaz de fornecer ácidos graxos livres (AGLs) de acordo com a necessidade metabólica e os remover

quando estão em excesso. Os AGLs são essenciais como substratos para a produção de energia e a síntese da maioria dos lipídios, incluindo lipídios de membrana e os envolvidos na sinalização celular (ZECHNER *et al*, 2012). Dos principais constituintes gordurosos da dieta, 90% são triacilglicerídeos (éster derivado de uma única molécula de glicerol e três ácidos graxos), e para serem absorvidos devem ser hidrolisados (BUCHHOLZ; MELZIG, 2015).

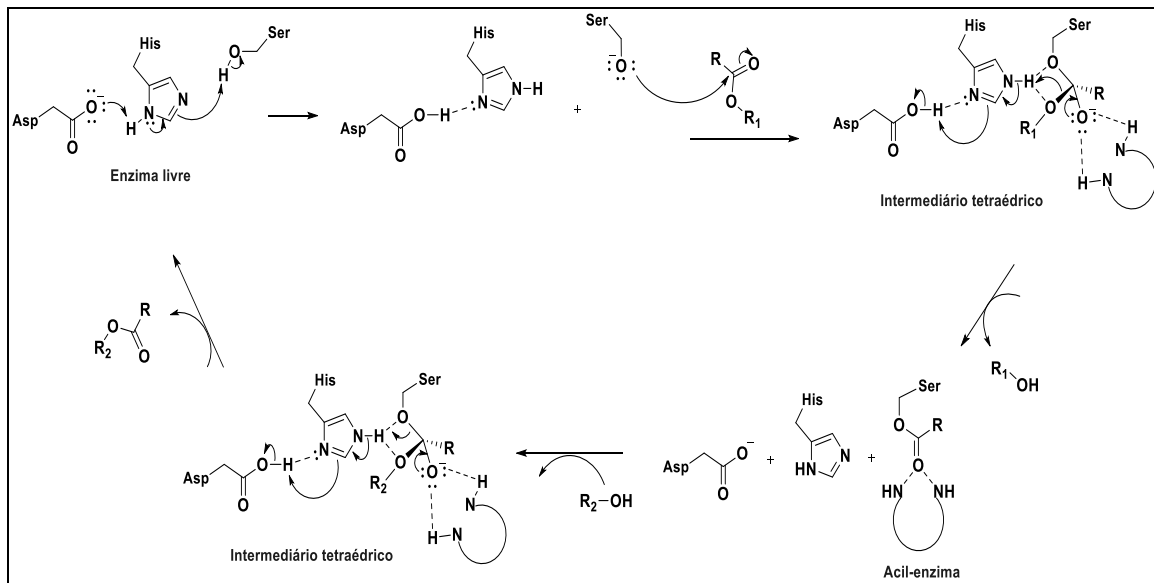
A degradação da gordura pela lipase lingual é muito pequena e a hidrólise em ácidos graxos livres e monoacilglicerol é realizada por ação da lipase gástrica (decomposição de 10-30%) e da lipase pancreática (50-70%) no trato gastrointestinal e no intestino delgado. Posteriormente, o colesterol e a lipoproteína são formados no corpo, e as partículas mistas de lipídios, com ácido biliar, são absorvidas pelo intestino delgado e ocorre a re-síntese do triacilglicerol armazenando na forma de energia no tecido adiposo (LIU *et al*, 2020).

A lipase utiliza a colipase, como cofator, para facilitar a atividade lipolítica, a fosfatidilcolina inibe o complexo substrato-lipase e, a colipase reverte essa inibição, permitindo a interação entre a lipase e a superfície do substrato, estabilizando sua conformação (LUNAGARIYA, 2014).

O mecanismo lipolítico (Esquema 1) envolve a interação do resíduo com carga negativa do Asp com o resíduo His, e este atuará como uma base que pode remover um próton do grupo hidroxil do sítio ativo Ser. E a nucleofilicidade do resíduo hidroxil da Ser é aprimorada, atacando o grupo carbonila do acilglicerol formando um intermediário tetraédrico (acil-enzima), que é estabilizado por um "oxaniônico" (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

Em seguida, ocorre uma desacilação que é controlada pela nucleofilicidade das moléculas que estão na interface, nesse processo, um nucleófilo (H₂O) ataca a enzima acilada, promovendo a liberação do ácido graxo de cadeia longa e regeneração do sítio catalítico (REIS *et al*, 2009).

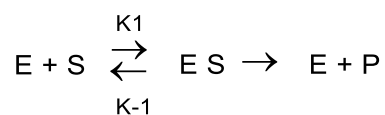
Esquema 1 - Mecanismo catalítico da lipólise mediado pela lipase



Fonte: Adaptado de MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO (2012).

As lipases são adaptadas para operar nas interfaces de sistemas bifásicos, fenômeno conhecido como ativação interfacial, em que a característica do substrato é um agregado de moléculas de éster, micelas ou filme monomolecular, que interagem com o meio aquoso (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012). Os locais ativos da enzima são protegidos do solvente por uma estrutura móvel, uma “tampa” ou “aba”, que é deslocada após a interação com o substrato na interface óleo/água, a fim de obter uma conformação da enzima ativa com o centro catalítico acessível aos substratos (ALBAYATI *et al*, 2020; LOTTI; ALBERGHINA, 2007).

O processo inicia-se com a adsorção da enzima solúvel em água (E) na interface óleo/água levando a enzima a um estado energético mais favorável (E*), posteriormente, a enzima presente na interface se liga ao substrato (S), resultando na formação de um complexo enzima-substrato (E*S), após o processo catalítico bidimensional o produto (P*) é gerado e solubilizado na fase aquosa (REIS *et al*, 2009). Resumidamente:



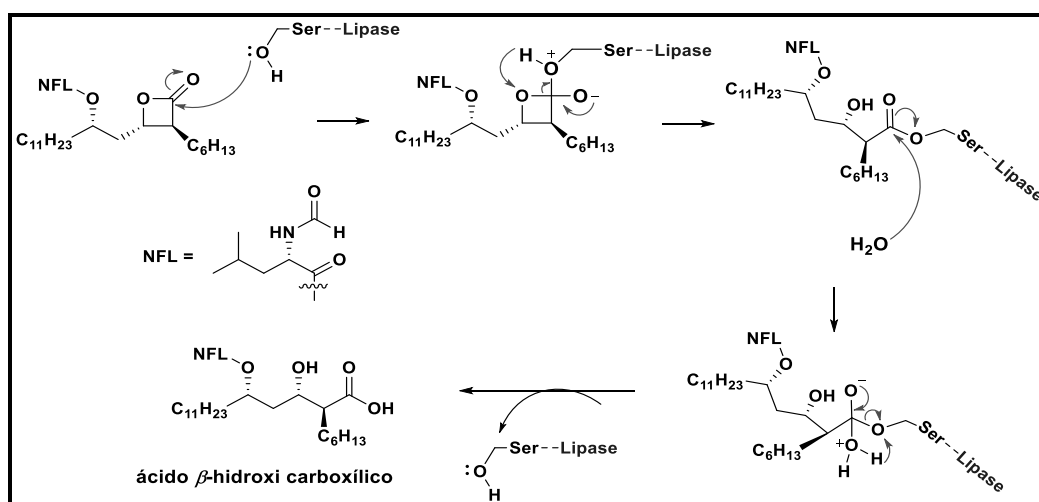
2.1.2.1 A inibição da lipase pancreática e seus efeitos

A lipase pancreática é considerada um modulador primário do metabolismo lipídico e o alvo mais adequado de agente antiobesidade, a inibição dessa enzima reduz a absorção de lipídios por meio de mecanismo gastrointestinais, sem alterar nenhum mecanismo central (PARK *et al*, 2019).

O Orlistate, aprovado em 1999 pelo FDA, é o único medicamento antiobesidade de ação periférica (OH, 2019). Por muitos anos, foi o único medicamento usado a longo prazo, trata-se de um potente inibidor da lipase, com capacidade de impedir a absorção de gordura da dieta em aproximadamente 30%. Entretanto, possui muitos efeitos colaterais, como diarreia, incontinência fecal, flutulência e inchaço (MARRELLI; STATTI; CONFORTI, 2020).

De acordo com RAJAN *et al* (2020) exerce seu efeito ao ligar-se covalente e irreversivelmente ao sítio ativo da lipase pancreática e formar um complexo estável, e este por sua vez, induz a alteração conformacional dessa enzima, expondo assim o sítio catalítico (Esquema 2). Sua eficácia está associada a sua estrutura anfifílica, podendo ser encontrado na interface óleo/água e em micelas mistas com surfactantes (BÉNAROUICHE *et al*, 2014).

Esquema 2 - Mecanismo de ação do Orlistate sobre a lipase



Fonte: Adaptado de BÉNAROUICHE *et al* (2014).

O anel β -lactona do Orlistate sofre um ataque nucleofílico pelo resíduo de serina do sítio ativo da enzima, levando à formação do complexo covalente acil-

enzima de longa duração, em seguida, este sofre uma hidrólise liberando a enzima e fornecendo como produto o ácido β -hidroxi carboxílico (BÉNAROUICHE *et al*, 2014).

2.2 ASPECTOS GERAIS DO DIABETES E O PAPEL DA α -AMILASE PANCREÁTICA

2.2.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico complexo cuja principal característica clínica diagnóstica é hiperglicemia (ZACCARDI *et al*, 2016) crônica acompanhada de maior ou menor comprometimento do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (BAYNES, 2015).

Pode ser classificada principalmente em diabetes mellitus tipo 1 (DM T1) e diabetes mellitus do tipo 2 (DM T2), o DM T1 está tipicamente associado a uma falha na produção de insulina resultante da destruição de células β pancreáticas por autoimunidade mediada por células T. Por outro lado, o DM T2 é caracterizado pela resistência à insulina e a redução de sua produção (TAN *et al*, 2019).

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), estima-se atualmente que o número de pessoas com diabetes seja em torno de 425 milhões, e com a previsão de aumento para 629 milhões até 2045, e esse número está aumentando acentuadamente em países de baixa e média renda (AZHARUDDIN *et al*, 2020).

O DM T2 representa aproximadamente 90% do total de casos (BAYNES, 2015; SAEEDI *et al*, 2019). Com uma tendência crescente, que pode ser atribuída ao envelhecimento da população, a um rápido aumento da urbanização e de ambientes obesogênicos, além disso, nota-se um crescente número de adultos jovens com DM T2 nos últimos anos; o índice de DM T1 também é crescente devido a uma melhor sobrevivência (em algumas populações) de pessoas com diabetes, pois contam com uma detecção precoce e melhor

controle da doença (SAEEDI *et al*, 2019).

O DM T1 é um distúrbio crônico causado por níveis insuficientes de insulina como resultado da destruição autoimune de células β pancreáticas. O início da doença geralmente ocorre na infância, mas também pode ocorrer na fase adulta, e está entre as doenças crônicas mais frequentes em crianças (TAHERI *et al*, 2020).

Sua etiologia pode estar relacionada com uma predisposição genética ligada ao antígeno específico leucocitário humano (HLA) e aos alelos (DR e DQ) (KHURSHEED *et al*, 2019). Estes estão presentes em cerca de 90% dos pacientes com DM T1, um ou mais fatores ambientais levam ao reconhecimento de componentes das células β como autoantígenos que o sistema imunológico reconhece erroneamente como estranhos, levando a um ataque autoimune, esses autoantígenos são apresentados pelos principais complexos de histocompatibilidade (MHC) I e II das células apresentadoras de antígenos (APCs) às células T autorreativas diabetogênicas (GIWA *et al*, 2020).

As células TCD⁴⁺ autorreativas estimulam APCs, incluindo células B a produzirem autoanticorpos de alta afinidade contra células β , essas células também ajudam as células TCD⁸⁺ diabetogênicas a adquirir atividade citolítica e atacar as células β através da liberação de citocinas (incluindo TNF- α e IFN- γ). Estas, por sua vez, também estimulam os macrófagos e outras células a danificar ainda mais as células β , produzindo um *loop* de *feedback* positivo (GIWA *et al*, 2020).

Como o DM T1 é uma doença crônica que leva à completa perda de insulina devido à destruição das células β , a reposição de insulina é atualmente a opção terapêutica de primeira linha para o seu tratamento (PATHAK *et al*, 2019).

O DM T2 está principalmente ligado a resistência à insulina, e a obesidade é um dos fatores que pode desencadear essa resistência (TAN *et al*, 2019; YE, 2013).

Isso está associado à circulação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) em um ambiente com condições hiperglicêmicas podendo levar à expressão reduzida do gene da insulina. Além disso, lipoproteínas de baixa

densidade (LDL) que sofrem oxidação podem diminuir a expressão da pré-pró-insulina das células β , enquanto as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) podem induzir a apoptose dessas células (TAN *et al*, 2019).

Na obesidade, há uma inflamação crônica e de baixo grau que está envolvida na patogênese de várias doenças crônicas, como exemplo, o DM T2 (YE, 2013). O tecido adiposo visceral (IVA) está intimamente ligado a uma incidência crescente de resistência à insulina e a uma alta produção de adipocitocinas pró-inflamatórias. Assim, observar-se que o excesso calórico crônico causa um aumento da massa de gordura visceral devido à hipertrofia de adipócitos e hiperplasia dos precursores dos adipócitos, conseqüentemente, esses adipócitos liberam a proteína quimioatraente de monócito 1 (MCP-1) e o TNF- α , que modulam uma resposta inflamatória no tecido adiposo (ORMAZABAL *et al*, 2018).

O MCP-1 inicia a migração de monócitos para o IVA e promove sua diferenciação em macrófagos, e estes por sua vez, secretam grandes quantidades de TNF- α , aumentando a lipólise e reduzindo o transporte de glicose estimulado pela insulina; a biossíntese de triglicerídeos e o armazenamento de adipócitos, resultando em um aumento nos níveis circulantes de triglicerídeos. Este evento pode resultar na deposição lipídica ectópica de espécies de ácidos graxos tóxicos (ou seja, diacilglicerol, ceramida) em tecido extra-adiposo (ORMAZABAL *et al*, 2018).

Para alcançar um bom controle metabólico do diabetes e mantê-lo em longo prazo, é necessária uma combinação de fatores que incluem mudanças no estilo de vida (alimentação e/ou atividade física), além da introdução da farmacoterapia (MARÍN-PEÑALVER *et al*, 2016). A Tabela 2 representa os principais agentes antidiabéticos e suas respectivas ações e efeitos.

Tabela 2 - Exemplos de medicamentos antidiabéticos

Medicamento(s) (Classe)	Mecanismo de ação	Efeitos/complicações
----------------------------	-------------------	----------------------

Metformina (Biguanida)	Sensibilização à insulina (ativação da expressão do receptor de insulina)	Náusea, vômito ou diarreia (alterações de eletrólitos/ pH); deficiência de vitamina B ₁₂ , que pode causar anemia e neuropatia;
Lingliptina, Sitagliptina, Vidagliptina, Saxagliptina (Inibidores da DPP-4)	Inibição da degradação do GLP-1	Infecção do trato respiratório superior por pancreatite;
Glimepirida, Glicazida (Sulfonilureias)	Aumenta a secreção de insulina no pâncreas, bloqueando os canais de K ⁺ _{ATP}	Aumento do risco de doença cardiovascular (em geral, devido à hipoglicemia);
Pioglitazona (Tiazolidinediona)	Sensibilização à insulina (aumento da captação de glicose nos tecidos adiposo, muscular e hepático);	Terapia combinada com insulina exógena pode causar insuficiência cardíaca;

Fonte: Adaptado de CHAUDHURY *et al* (2017).

A Metformina é o medicamento de primeira escolha para o tratamento de DM T2, enquanto as Sulfonilureias, em geral, são de segunda escolha (MARÍN-PEÑALVER *et al*, 2016), entretanto, podem ser recomendadas como primeira opção, caso o paciente não seja obeso ou sensível à insulina. A Tiazolidinediona (TZD) pode ser como estratégia de tratamento de segunda ou terceira linha, porém, não é muito utilizada por causa de seus efeitos colaterais (KHURSHEED *et al*, 2019).

Inibidores da dipeptidil peptidase 4 (DDP-4) podem ser usados em monoterapia/combinados à Metformina, Sulfonilureias ou TZD (CHAUDHURY *et al*, 2017). Os inibidores do cotransportador de sódio e glicose (SGLT2) (Canagliflozina, Dapagliflozina) são novos agentes que atuam bloqueando a reabsorção de glicose no sangue pelos rins (KHURSHEED *et al*, 2019).

2.2.2 A α -amilase pancreática

A α -amilase é uma metaloenzima que contém o íon cálcio (Ca⁺²) (HAMEED *et al*, 2019; SHAMIM *et al*, 2020) composta por 512 aminoácidos em uma única

cadeia de oligossacarídeos com massa molecular de 57,6 kDA, (SOUZA; MAGALHÃES, 2010), pertencendo à família dos glicosídeos hidrolases 13 (GH13) (YOUSUF *et al*, 2020). Esta família também é conhecida como “família α -amilase”, cuja principal característica estrutural é o centro catalítico em forma de barril $(\beta/\alpha)_8$, outras enzimas de importância biológica também fazem parte dela, como por exemplo, a α -glicosidase (JANEČEK; SVENSSON; MACGREGOR, 2007).

Estruturalmente, a α -amilase apresenta três domínios característicos: A, B e C, sendo o domínio A aquele que contém os resíduos catalíticos e é o domínio mais conservado, com uma estrutura em forma de barril $(\beta/\alpha)_8$ composto por oito folhas β paralelas em cadeia cercadas por oito hélices α , já o domínio B está inserido entre a terceira cadeia β e a terceira hélice α do barril $(\beta/\alpha)_8$; enquanto o domínio C se dobra em oito fitas β antiparalelas, e está conectado ao domínio A por *loops*. O sítio ativo localiza-se em uma cavidade aberta entre os domínios A e B, contendo um ácido carboxílico invariavelmente (Asp206, Glu230 e Asp297), sendo essencial para a catálise, atuando como nucleófilo e como ácido geral e estabilizador do estado de base e de transição, respectivamente (SARIAN *et al*, 2017).

Cada aminoácido possui uma função: o Asp206 situado no β_4 do barril $(\beta/\alpha)_8$ atua como um nucleófilo catalítico, o Glu230 localizado em β_5 é um doador de prótons e o Asp297 (em β_7) é responsável por estabilizar o estado de transição durante a catálise. Os íons Ca^{2+} estão associados em manter a integridade estrutural e a conexão entre os domínios A e B, e podem ainda interagir com íons de Ca^{2+} livres aumentando a taxa catalítica e/ou termoestabilidade (PINTO; DORN; FELTES, 2020).

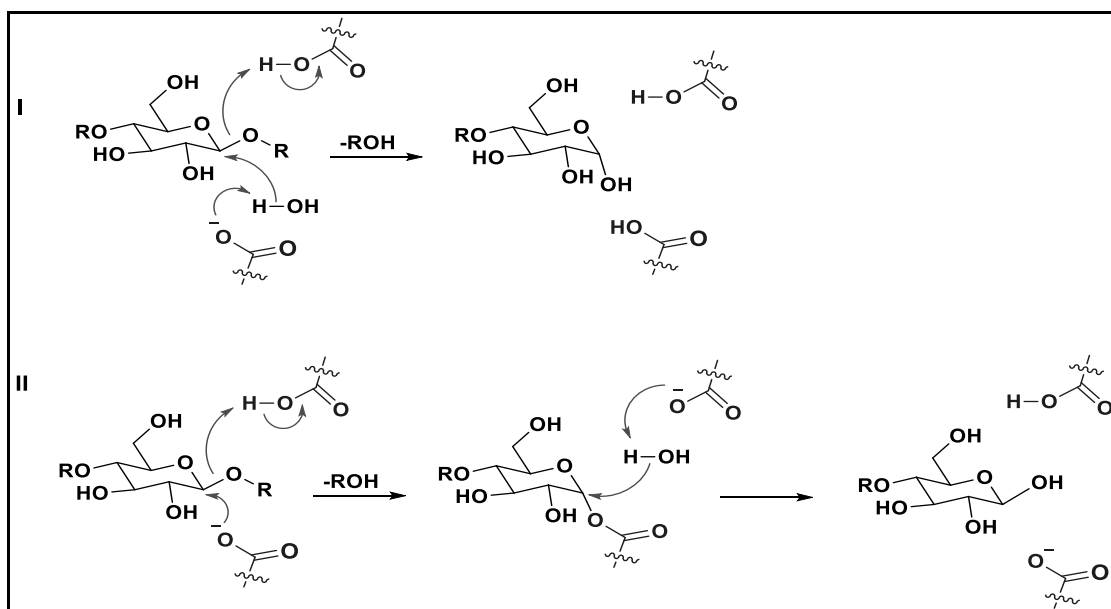
O amido é a maior fonte de carboidratos para os seres humanos e consiste em dois tipos de moléculas: amilose (polímero linear de unidades de α -D-glicose unidas por ligações α -1,4) e amilopectina (polímero ramificado de monômeros de α -D-glicose unidas por ligações α -1,4 e α -1,6). Inicialmente a α -amilase salivar age de maneira bastante eficiente sobre o amido, mas é rapidamente degradada no ambiente ácido do estômago, desta forma, a maior parte da hidrólise é realizada pela amilase pancreática, que é liberada no intestino

delgado, a α -amilase (1,4 α -D-glicano hidrolase, E.C.3.2.1) degrada o amido (ataque *endo*) nas ligações α -(1,4) em polímeros (amilose e amilopectina). Os produtos finais dessa hidrólise são principalmente maltose, maltotriose e maltotetraose (SINGH; DARTOIS; KAUR, 2010).

Portanto, as enzimas que removem os resíduos de carboidratos por hidrólise de ligações glicosídicas são chamadas de glicosídeo hidrolases (GHs) (SHAMSI KAZEM ABADI *et al*, 2017).

A clivagem da ligação glicosídica envolvendo α ou β -glicosidases pode ocorrer por dois mecanismos via substituição nucleofílica biomolecular (S_N2) direta por molécula de água no carbono anomérico C-1 da glicose, com inversão de estereoquímica (I) ou por S_N2 com formação de intermediário covalente, que resulta em retenção de configuração (II) (Esquema 4) (MELO; CARVALHO, 2006).

Esquema 3 - Proposta de mecanismo da hidrólise da ligação glicosídica

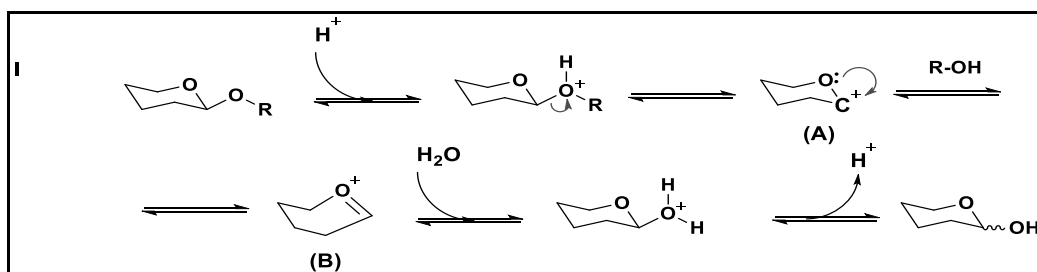


Fonte: Adaptado de MELO; CARVALHO (2006).

No mecanismo I, um grupo carboxílico age como ácido e outro como base, em II, um grupo de ácido carboxílico age como ácido e base e o outro, como nucleófilo. No entanto, algumas evidências têm sugerido a geração de íon no

estado de transição, pelo mecanismo S_N1 , com participação de ambos os aminoácidos do sítio catalítico contendo grupos carboxílicos, com clivagem da ligação entre o carbono anomérico e o oxigênio glicosídico, gerando espécies carregadas positivamente, como carbocátion (A) e íon oxocarbênio (B). O estado de transição é caracterizado pela orientação pseudo-axial da ligação C-O a ser quebrada e conformação distorcida “skew” (MELO; CARVALHO, 2006).

Esquema 4 - Formação do carbocátion (A) e do íon oxocarbênio (B) durante a clivagem da ligação glicosídica pela ação de glicosidases



Fonte: Adaptado de MELO; CARVALHO (2006).

2.2.2.1 A inibição da α -amilase e seus efeitos

A amilase pancreática humana é a principal enzima responsável pela digestão do amido e, portanto, um alvo importante para a regulação da glicemia pós-prandial (XIE *et al*, 2020). Os inibidores dessa enzima podem ser usados para no tratamento do diabetes tipo 2 (YOUSUF *et al*, 2020) e também da obesidade (HAMEED *et al*, 2019).

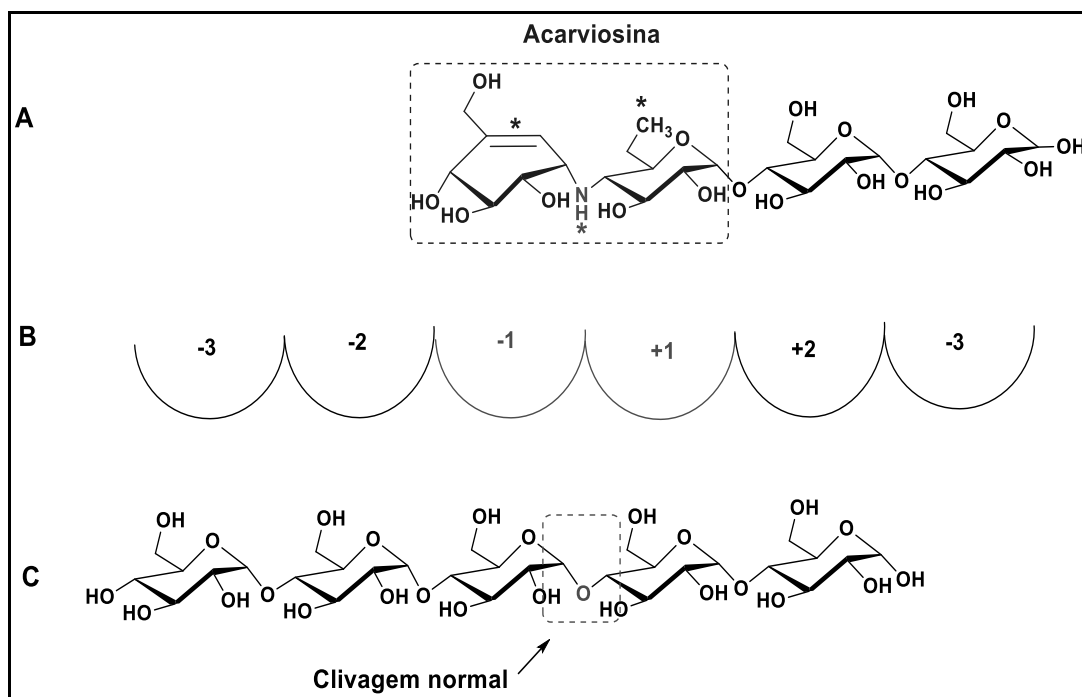
Por exemplo, a Acarbose (Figura 2A) constituída por uma molécula de maltose ligada ao grupo acarviosina, a valienamina (ciclitol insaturado). As porções 4,6-didesoxiglicose estão ligadas através de um átomo de nitrogênio (N) (LI *et al*, 2005).

Pode ser obtida através de um processo de fermentação do *Actinoplanes* sp, sendo responsável por atrasar a produção de monossacarídeos, principalmente a glicose, uma vez que inibe a ação da α -amilase. Isso pode

ajudar a melhorar a resistência à insulina e o controle do índice glicêmico (SELLAMI *et al*, 2017). Apesar de sua eficiência, é comum relatos de efeitos colaterais, como flatulência, dor abdominal e diarreia (YOUSUF *et al*, 2020).

A Figura 2A destaca a estrutura da acarviosina e as três características que a distinguem da maltose equivalente, que incluem uma espécie de anel insaturado distorcido, um grupo metil no lugar do grupo hidroximetil exocíclico, e uma ligação glicosídica ligada ao N. Além disso, os subsítios (-1 e +1) de ligação no sítio ativo da α -amilase foram identificados de acordo com a convenção indicados na (Figura 2B), e ainda, a Figura 2C destaca o modo de ligação esperado para um substrato normal do amido (LI *et al*, 2005).

Figura 2 - Estrutura da Acarbose e o modo de ligação da α -amilase



Fonte: Adaptado de LI *et al* (2005).

Devido à presença do nitrogênio intramolecular, a Acarbose liga-se ao local de ligação normalmente ocupado pela a enzima, por exemplo, α -glicosidase, no

carboidrato, com uma afinidade muito maior do que substrato normal. Desta forma, a reação enzimática é interrompida, pois a ligação C-N na unidade de acarviosina não pode ser clivada (LI *et al*, 2018) e, enquanto o inibidor permanece ligado à enzima, não há hidrólise do amido e, conseqüentemente, a glicose, por exemplo, não é formada, logo, não há absorção e, a cinética da inibição ocorre de forma competitiva e reversível (BISCHOFF, 1994).

2.3 ASPECTOS GERAIS DA SÍNDROME METABÓLICA

A síndrome metabólica (SM) é um conjunto de anormalidades clínicas que incluem hipertensão, resistência à insulina, dislipidemia, obesidade, regulação deficiente da glicose. Além disso, contribui para um risco aumentado de diabetes (CICERO; COLLETTI, 2016).

São os principais critérios para a manifestação da SM de acordo com a Federação Internacional de Diabetes (FID): I) obesidade central (circunferência da cintura ≥ 90 cm em homens e ≥ 80 cm em mulheres - origem asiática), além de dois ou mais dos seguintes: i) pressão arterial ≥ 130 mmHg e/ou ≥ 85 mmHg; ii) Níveis de triglicerídeos ≥ 150 mg/dl; iii) níveis de colesterol da lipoproteína de alta densidade ≥ 40 mg/dl para homens e ≥ 50 mg/dl para mulheres e iv) glicemia de jejum ≥ 100 mg/dl (ANJUM; BATHLA; PANCHAL, 2019).

A SM afeta entre 20-30% da população adulta na maioria dos países, essa taxa aumenta com a idade. Apresenta prevalência de 5% entre indivíduos com peso normal, 22% entre indivíduos com sobrepeso e 60% entre obesos e, as causas dessa síndrome são complexas e resultam de uma associação entre fatores genéticos, ambientais e epigenéticos (AWWAD *et al*, 2020).

A obesidade, o diabetes e a hipertensão são doenças que estão associadas ao crescente número da morbimortalidade e, portanto, a compreensão da etiologia e fisiopatologia destas é de grande importância para o desenvolvimento de estratégias preventivas e identificação de alvos terapêuticos, uma vez que, a fisiopatologia da SM está associada à principalmente ao fluxo excessivo de lipídios e a resistência à insulina (FERNANDO *et al*, 2020).

Visto que, a obesidade abdominal é marcada por um aumento de ácidos graxos livres no sangue promove a produção de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6, levando a uma inflamação crônica de baixo grau (AWWAD *et al*, 2020).

A superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos tecidos adiposos leva à perda de sua homeostase redox e contribui para um estado pró-inflamatório. A obesidade e a inflamação crônica associadas iniciam um estado de resistência à insulina através da interrupção da cascata de sinalização causando um ciclo vicioso que leva ao DM T2 a médio prazo (AWWAD *et al*, 2020). O controle inicial da SM envolve modificações no estilo de vida, incluindo atividades físicas e controle da dieta - baixa em calorias - (CICERO; COLLETTI, 2016).

Conseqüentemente, a perda de peso, o controle da hiperglicemia, dislipidemia e da hipertensão arterial, constituem em medidas que possam evitar o surgimento do DM T2, eventos cardiovasculares e/ou outros problemas relacionados à síndrome (AGUILAR-SALINAS; VIVEROS-RUIZ, 2019).

2.4 ASPECTOS GERAIS DOS AMINOÁCIDOS

Aminoácidos (AAs) são compostos orgânicos que contêm os grupos funcionais, amino (-NH₂) e carboxila (-COOH), ligados a uma cadeia lateral (grupo R) que é única para cada aminoácido (AZAD, 2018; CANAJ *et al*, 2018).

Existem cerca de 500 aminoácidos naturais que podem ser classificados de acordo com a polaridade, nível de pH e o tipo de grupo da cadeia lateral (alifático, acíclico, aromático, contendo hidroxila ou enxofre) e, os AAs com os grupos amino e ácido carboxílico ligados ao primeiro átomo de carbono são conhecidos como α -aminoácidos, e estes são importantes, pois contêm os 22 AAs proteinogênicos ("construção de proteínas"), que se combinam em cadeias de peptídeos ("polipeptídeos") para formar o blocos de construção de uma vasta gama de proteínas (AZAD, 2018; BISCHOFF; SCHLÜTER, 2012).

Os AAS estão na forma de *zwitterion* na qual a amina é protonada e

carregada positivamente (se o pH for inferior ao valor de pKa), e o ácido carboxílico é desprotonado e carregado negativamente (pH estiver acima do valor de pKa) (CANAJ *et al*, 2018).

Todos os AAS, exceto a glicina, são moléculas quirais. Eles existem em duas formas assimétricas opticamente ativas (enantiômeros), um *D*-enantiômero e o outro *L*-enantiômero (AZAD, 2018; GRISHIN *et al*, 2020). E estes, têm diferentes atividades fisiológicas e biológicas, e na natureza, prevalecem principalmente os *L*-enantiômeros, que também são chamados de aminoácidos proteinogênicos (GRISHIN *et al*, 2020).

Ressalta-se que, o meio celular é uma mistura de biomoléculas opticamente ativas (aminoácidos, carboidratos e lipídios) e a base molecular dos processos biológicos envolve interações proteína-ligante, em que a maioria das proteínas é específica apenas para um estereoisômero do seu respectivo ligante/substrato e inerte para o outro (KUNCHA; KRUPARANI; SANKARANARAYANAN, 2019).

De acordo com GHOSH; BRINDIS, 2015 composto à base de peptídeos podem ser consideradas um importante ponto de partida para a descoberta de medicamentos, especialmente no projeto de inibidores de enzimas, devido à sua alta afinidade e especificidade em relação às funções biológicas.

De acordo com CASTRO *et al* (2020) os AAS são interessantes compostos na síntese orgânica e seu uso apresenta algumas vantagens: baixo custo (de origem natural), fácil acesso, a presença de um/mais estereocentros, além de uma dupla funcionalidade (porções amino e carboxila).

Dessa maneira, os derivados de aminoácidos parecem representar uma alternativa para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar através de um ensaio *in vitro* a ação dos derivados sintéticos da Boc-alanina com variação isomérica (*L*, *D*, e *D, L*) conjugados aos derivados da *N*-piperazina alquilada frente às enzimas lipase pancreática e α -amilase.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Proteger a *L*, *D* e *D, L*-alanina na extremidade *N*-terminal com o dicarbonato de di-*tert*-butila (*t*-Boc);
- Sintetizar e caracterizar derivados da piperazina: decanopiperazina, tetradecanopiperazina, hexadecanopiperazina e octadecanopiperazina;
- Sintetizar e caracterizar derivados da Boc-alanina acoplados aos derivados piperazínicos;
- Determinar e analisar o percentual de inibição e a IC50 dos derivados de Boc-alanina conjugados aos derivados piperazínicos frente às atividades das enzimas lipase pancreática e α -amilase.

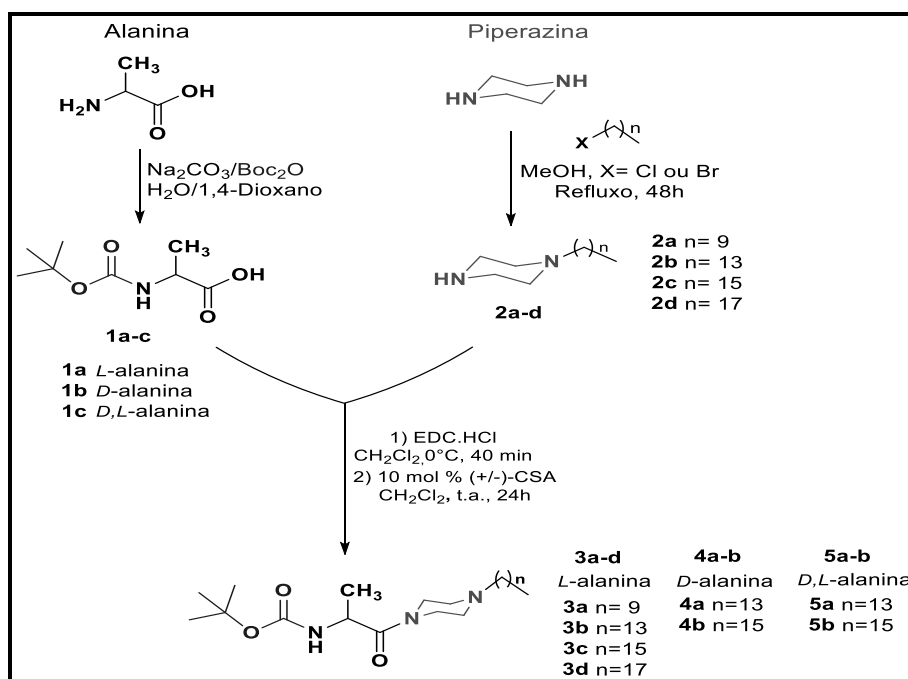
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PARTE EXPERIMENTAL QUÍMICA

A síntese e análise dos compostos foram realizadas no laboratório do Grupo de Pesquisas em Metodologias Sintéticas - GPMS (Departamento de Química - Instituto de Ciências Exatas) Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Todos os reagentes e solventes utilizados para a síntese dos compostos foram adquiridos comercialmente: Alphatec® e Sigma Aldrich®.

Este trabalho desenvolveu-se a partir de uma síntese convergente, onde foi necessário sintetizar dois intermediários-chave e, posteriormente, conjugá-los. O plano de síntese (Esquema 5) resume-se em: 1) Proteção da alanina na porção *N*-terminal com o grupo protetor dicarbonato de di-*tert*-butila (*t*-BOC); 2) Alquilação da piperazina e 3) Acoplamento dos derivados da Boc-alanina com os derivados da *N*-piperazina alquilada.

Esquema 5. Síntese dos derivados: da Boc-alanina, alquilados da *N*-piperazina e da Boc-alanina conjugada aos derivados alquilados da *N*-piperazina



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

4.1.1 Técnicas utilizadas para a caracterização dos compostos sintetizados

A caracterização dos compostos sintetizados foi realizada por meio das

técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia na região do infravermelho (IV), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ), Faixa de Fusão (FF) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR).

4.1.1.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e 2D (Bidimensional) foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III (500 MHz), com frequência de 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), e o registro dos deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm), tendo como referência o tetrametilsilano (TMS) e as constantes de acoplamento dadas em Hertz (Hz). As análises dos espectros foram realizadas com auxílio do programa MestReNova[®] versão 6.0.

4.1.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho dos compostos sintetizados foram obtidos em um espectrofotômetro HYPERION 300-Infranred Microscope, compreendendo a região entre 4000 e 400 cm^{-1} , com frequências de absorção expressas em cm^{-1} ("filme em NaCl"). O estudo foi realizado no Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora. As análises dos espectros foram realizadas por meio do programa Origin versão 8.0.

4.1.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ)

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase

Estacionária Quiral (CLAE-FEQ) foi realizada com três derivados da Boc-alanina acoplados aos derivados da *N*-piperazina alquilada (*L*, *D* e *D, L*). A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo IA empacotada com partículas de 5 µm. A fase móvel foi o hexano-isoprano, 90/10% (v/v) com fluxo da bomba de 0,5 mL min⁻¹ e volume injetado de 5 µL. A análise foi efetuada no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química da UFJF.

4.1.1.4 Espectrometria de massas de Alta Resolução (EMAR)

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas de alta resolução microTOF QII/ESI-TOF (Bruker Daltonics), mediante uso da ionização por *electrospray* (ESI), a análise foi realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). As amostras foram dissolvidas em diclorometano e submetidas para análise por meio de bomba de infusão (modo positivo e negativo com adição de ácido fórmico ou hidróxido de amônio, quando necessário). Os espectros foram obtidos no modo positivo e os valores expressos em *m/z* teóricos.

4.1.1.5 Faixa de Fusão (FF)

A Faixa de Fusão (FF) foi obtida por meio do Aparelho digital MQAPF-302 Microquímica, medida em graus Celsius (°C) e foi realizada no Laboratório de Química Orgânica, Departamento de Química da UFJF.

4.1.2 Procedimento para o preparo dos compostos

4.1.2.1 Síntese dos derivados da alanina contendo o grupo Boc

A obtenção dos derivados da *tert*-butóxicarbonil-alanina seguiu o procedimento descrito por DE CASTRO (2016). Em um balão de fundo redondo foram adicionados 1 equivalente do aminoácido *L*-alanina (24,0 mmol) e 1,4

equivalentes de carbonato de sódio (34,0 mmol), além de água destilada. A esta mistura foi acrescentada uma solução de 1,4-dioxano (10 mL) contendo dicarbonato de *tert*-butila (36,0 mmol; 1,5 equivalentes). A mistura de reação permaneceu sob agitação magnética por uma hora a 0 °C, seguido por mais 24 horas de agitação à temperatura ambiente. O progresso da reação de preparação da *N*-Boc-*L*-alanina foi monitorado por CCD - sílica gel - eluente diclorometano/metanol (9:1 v/v). A revelação das placas cromatográficas foi realizada empregando ninidrina como revelador.

Após o término da reação, a mistura foi transferida para um funil de separação utilizando água destilada e acetato de etila para remover o excesso de dicarbonato de *tert*-butila na fase orgânica (FO). Após ajuste do pH da fase aquosa (FA) com solução de HCl 10% (m/v), a FA foi extraída com acetato de etila (3x20mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, resultando no produto desejado, sem a necessidade de purificação por cromatografia em coluna.

4.1.2.2 Síntese dos derivados alquilados da *N*-piperazina

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 4 equivalentes de piperazina (23,2 mmol) solubilizada em metanol (10 mL), e em seguida, foi acrescentado 1 equivalente de brometos ou cloretos de alquila (5,8 mmol). A reação permaneceu durante 48 horas sob agitação e refluxo, e monitorada por CCD, eluente diclorometano/metanol (9:1 v/v), revelada com ninidrina. Após o término da reação, a mistura foi transferida para um funil de separação e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida, resultando no produto desejado, sem a necessidade de purificação por cromatografia em coluna. A síntese seguiu o procedimento descrito por DE CASTRO *et al* (2018).

4.1.2.3 Síntese dos derivados da Boc-alanina acoplados derivados alquilados da *N*-piperazina

A obtenção dos derivados seguiu o procedimento descrito por CASTRO *et al* (2017). Em um balão de fundo redondo adicionaram-se 1 equivalente da Boc-alanina (1,5 mmol), previamente preparada, 10 mL de diclorometano anidro, e 1,1 equivalente de 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida [EDC.HCl] (1,65 mmol). A reação permaneceu durante 30 minutos a 0 °C, sob agitação. Posteriormente, a mistura foi deixada em temperatura ambiente, sob agitação, quando foram acrescentados 2,5 equivalentes da *N*-piperazina alquilada (3,75 mmol), previamente preparada, e 10 mol % de (+/-)-ácido canforsulfônico.

A reação permaneceu por mais 24 horas e monitorada via CCD, eluente CH₂Cl₂/MeOH (9:1 v/v), revelada com ninidrina. Após o tempo de reação, foi realizada uma extração do bruto de reação com água destilada e diclorometano, à fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio anidro, que foi filtrada e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O bruto de reação foi submetido à purificação por Cromatografia em Coluna de Sílica - (eluente: gradiente de CH₂Cl₂/MeOH v/v).

4.2 PARTE EXPERIMENTAL BIOLÓGICA

A avaliação *in vitro* do efeito dos compostos sintetizados sobre a lipase pancreática e α -amilase foi realizada no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, com colaboração do professor Dr. Orlando Vieira de Sousa.

Para a avaliação foi utilizado a técnica espectrofotométrica (Equipamento Thermo Plate[®], TP-READER). A Tabela 3 representa os reagentes, solventes e enzimas utilizadas para a execução dos testes biológicos *in vitro* fentes às enzimas lipase pancreática e α -amilase.

Tabela 3. Representação dos componentes utilizados nos ensaios *in vitro*

Solução	Lipase	α -amilase
---------	--------	-------------------

Controle	Orlistate (Sigma®)	Acarbose (Sigma®)
Tampão	TRIS-HCl (0,05 mol/L) pH 8	TRIS-HCl (0,05 mol/L) pH 7
TRITON-X 100	TRITON 0,5 % (p/v)	-
Substrato	<i>p</i> -nitrofenolpalmitato (8 mmol/L)	Amido 1 %
Enzimática	Lipase pancreática suína (10 g/L)	α -amilase pancreática suína (1 mg/mL)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

4.2.1 Determinação da atividade inibitória sobre as enzimas

4.2.1.1 Preparo das amostras e dos controles positivos

A partir de 2 mg da amostra, preparou-se uma solução estoque diluída em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) - Sigma Aldrich®, com o intuito de obter uma concentração de 1 mg/mL. Em seguida, a solução foi homogeneizada até dissolução completa. Foi utilizada como controle positivo da α -amilase, a Acarbose (Sigma®) e para a lipase pancreática o Orlistate (Sigma®), e esses controles foram preparados na mesma faixa de concentração das amostras (25, 50, 100, 150, 200 μ g/mL).

4.2.1.2 Ensaio de inibição da lipase pancreática

O ensaio in vitro seguiu o procedimento descrito por PEREIRA *et al* (2011). Em um balão volumétrico (1000mL) foi preparada uma solução tampão TRIS-HCl 0,05 mol/L (pH 8,0), contendo solução de CaCl₂ com concentração de 0,010 mol/L e de NaCl com concentração de 0,025 mol/L, previamente preparadas. Separadamente, foi preparada uma da enzima lipase pancreática suína (Sigma®) na concentração de 10 g/L em tampão TRIS-HCl 0,05 mol/L (pH 8,0).

Em seguida, preparou-se a solução de TRITON-X 100 0,5 % (p/v) que foi utilizada para o preparo da solução substrato de ρ -nitrofenolpalmitato (8 mmol/L). Posteriormente, a partir da solução estoque de cada amostra foram preparadas diluições em concentrações crescentes (25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$) solubilizadas em DMSO.

4.2.1.3 Ensaio de inibição da α -amilase

O ensaio in vitro seguiu o procedimento descrito por PEREIRA *et al* (2011). Em um balão volumétrico (1000 mL) foi preparado uma solução tampão TRIS 0,05 mol/L, acrescida de solução de CaCl_2 (0,010 mol/L) e NaCl (0,025 mol/L), preparadas previamente, ao final, a solução teve seu pH ajusta para 7 (pH 7). À parte em um balão volumétrico (250 mL) foi preparada uma solução de amido 1 % (substrato) em solução tampão TRIS 0,05 mol/L (pH 7) e, em seguida, preparou-se uma solução da enzima α -amilase pancreática suína -Sigma® (1 mg/mL) em tampão TRIS 0,05 mol/L (pH 7). Por fim, os testes seguiram o mesmo procedimento descrito para a lipase.

4.2.1.4 Preparo da microplaca

Os ensaios foram realizados em microplacas com 96 poços, em formato U, com capacidade de 0,2 mL/poço e, para cada ensaio e amostra foi realizada uma mistura com 100 μL da solução enzimática, 50 μL da solução substrato e 50 μL de amostra, a microplaca foi incubada em estufa a 37 °C, por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos) e as absorbâncias dos produtos presentes no meio reacional foram medidas em espectrofotômetro a 405 nm.

4.2.1.5 Determinação da Porcentagem (%) inibitória e IC50

A porcentagem de inibição (I%) foi obtida a partir da elaboração de gráficos (absorbância *versus* tempo). O estudo permitiu ainda, a determinação da IC50 a

partir do gráfico de concentração *versus* resposta. Segundo PEREIRA *et al* (2011) por meio de análises de regressão linear, pode-se determinar as equações das retas, bem como, os coeficientes angulares, que foram utilizados no cálculo da inibição das atividades enzimáticas conforme a equação:

$$I\% = 100 \times (A-a) - (B-b)/(A-a)$$

Onde:

A: valor do coeficiente angular da leitura: enzima + substrato;

a: valor do coeficiente angular da leitura: substrato;

B: valor do coeficiente angular da leitura: enzima + substrato + amostra;

b: valor do coeficiente angular da leitura: enzima + amostra.

4.2.1.6 Análise estatística

Os testes foram realizados em triplicata e os dados obtidos expressos em média \pm E.P.M (n=3). As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0, e as diferenças estatísticas calculadas usando a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey em relação ao inibidor padrão das respectivas enzimas, e as diferenças estatísticas estabelecidas com grau de significância $p < 0,001$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE EXPERIMENTAL QUÍMICA

Os compostos sintetizados são estruturalmente semelhantes (ANEXO) e, portanto, a caracterização e a discussão foram efetuadas por meio da seleção de um produto obtido de cada etapa do processo, e toda a análise foi baseada nos métodos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV), Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ). E para o melhor entendimento, a numeração das estruturas para a atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C foi realizada de forma unicamente didática.

5.1.1 Síntese e caracterização dos derivados da Boc-alanina

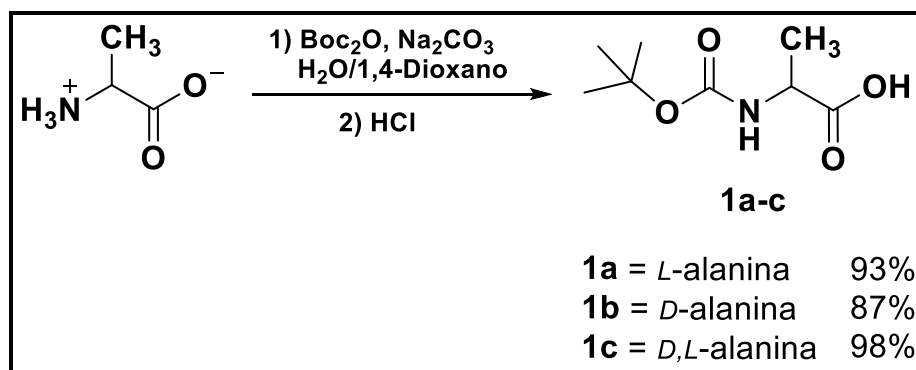
5.1.1.1 Síntese dos derivados da Boc-alanina

A proteção de um grupo funcional pode ser essencial na química de moléculas polifuncionalizadas, quando uma reação deve ser realizada em uma das partes do composto, evitando a formação de outras substâncias não desejadas durante o processo (CHERAÏET *et al*, 2012).

O dicarbonato de di-*tert*-butil (Boc-anidrido) é um reagente amplamente utilizado na síntese orgânica, e tem sido usado na conversão de aminas em isocianatos, carbamatos e derivados de ureia (AUGUSTINE *et al*, 2009). É extremamente eficiente por introduzir o grupo protetor (Boc) na substância de interesse (MOHAPATRA; DATTA, 1999; AUGUSTINE *et al*, 2009). Além disso, o *N*-Boc é bastante estável em meio básico e inerte a reagentes nucleofílicos (INGALE *et al*, 2018).

Com isso, a introdução de um grupo protetor (Boc) na extremidade *N*-terminal da alanina (Esquema 6) foi necessária, para que a porção do grupo do ácido carboxílico ficasse livre para sofrer uma condensação com os derivados *N*-piperazina alquilada e, conseqüentemente, formar os compostos finais de interesse.

Esquema 6. Síntese da Boc-alanina



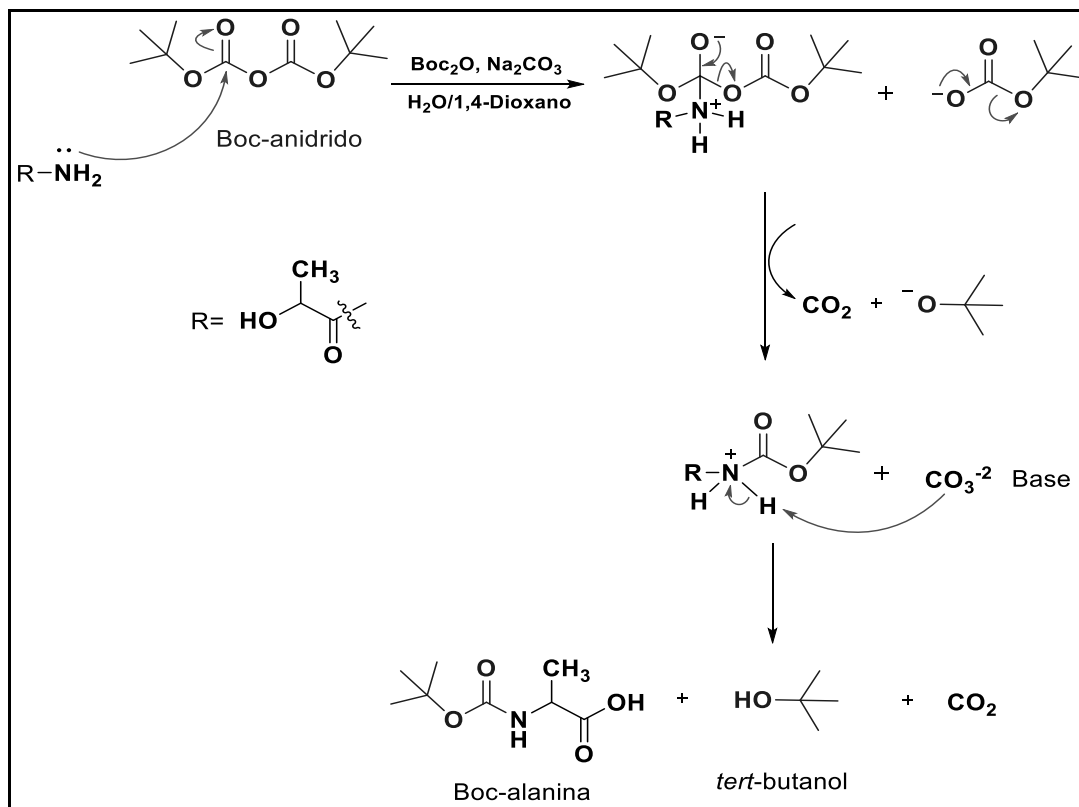
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os compostos desejados foram obtidos e isolados sem grandes dificuldades e com excelentes rendimentos, e ainda, sem a necessidade de purificação por CCS, evitando desta forma, inicialmente um uso significativo de solventes e/ou perda do produto durante a execução do processo. Os resultados e a forma de isolamento deste estudo corroboram com os dados descritos por DE CASTRO (2016) na síntese da Boc-*L*-isoleucina, por exemplo.

O Esquema 7 mostra uma proposta de mecanismo para a formação da Boc-alanina. Onde mostra o ataque nucleofílico da amina à carbonila do Boc anidrido, resultando na ligação amida (VISWANADHAM *et al*, 2017). Nota-se ainda, a saída do carbamato de *tert*-butil, que posteriormente se decompõe em dióxido de carbono (CO₂) e *tert*-butóxido (subprodutos). O carbonato de sódio atua como base, que ataca o hidrogênio da amina protonada, formando assim a Boc-alanina.

As aminas protegidas com o grupo *N*-BOC são frequentemente encontradas em moléculas farmacêuticas biologicamente ativas (VISWANADHAM *et al*, 2017).

Esquema 7. Proposta de mecanismo da síntese da Boc-alanina



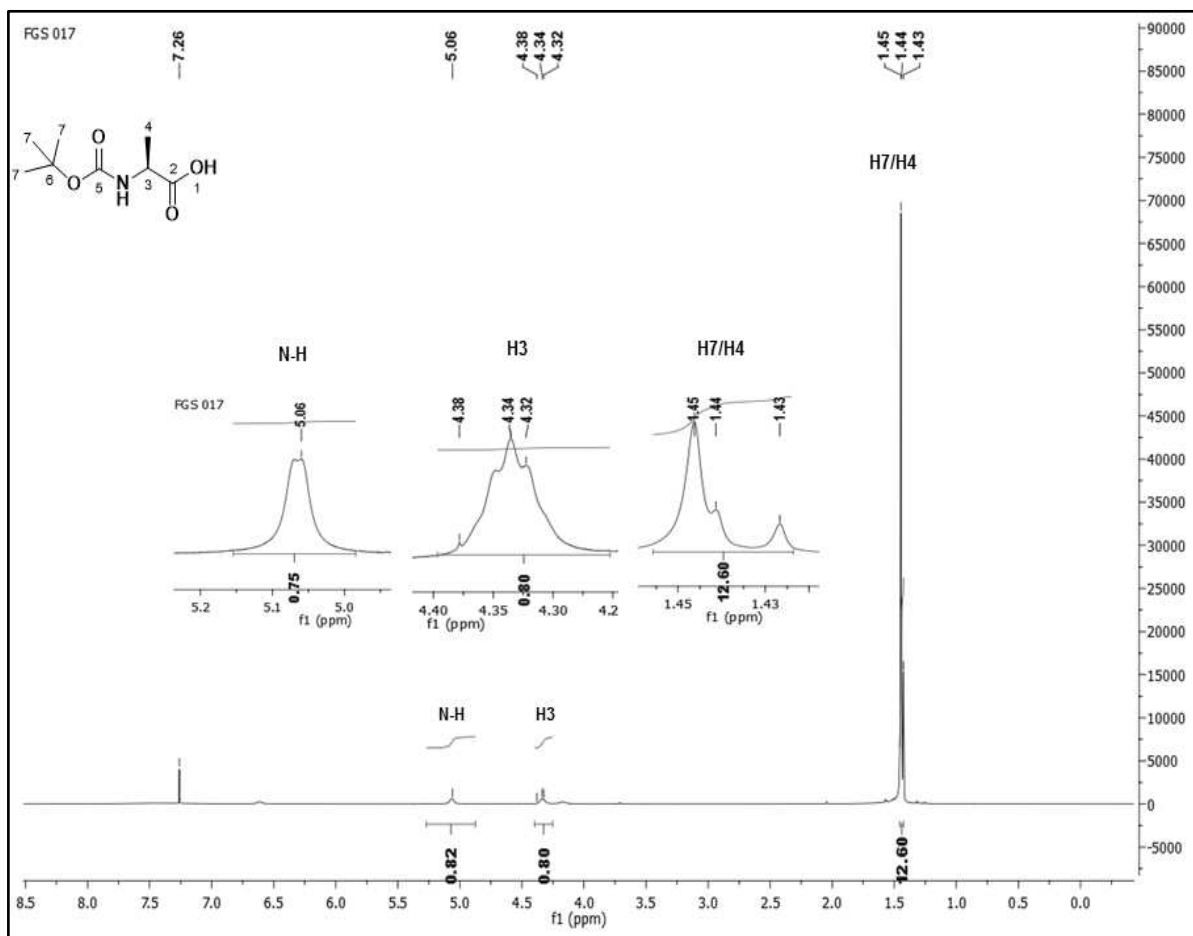
Fonte: Adaptado de VISWANADHAM *et al* (2017).

5.1.1.2 Caracterização da Boc-L-alanina

Os produtos **1a**, **1b** e **1c** foram obtidos como sólidos brancos com rendimento de 93, 87 e 98%, respectivamente e com faixas de fusão: 77,3-77,9 °C; 77,3-78,3 °C e 77,6-78,8 °C. Como exemplo, a seguir será descrita a caracterização do composto **1a** (*tert*-butóxicarbonil-*L*-alanina) e a identificação estrutural foi realizada por meio da Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Desta forma, a partir dos espectros de RMN de ¹H (Figura 3) observa-se a presença de um simpleto em δ 5,06 ppm (s, 1H), referente ao hidrogênio do do grupo N-H. Além disso, foram observados sinais na região em δ 4,38 - 4,32 ppm que corresponde ao hidrogênio metínico (mutipletto). Os grupos metila do grupo Boc₂O estão representados como um pico agudo em δ 1,45 ppm (s, 9H). Além de, um dupletto centrado na região δ 1,42 ppm (d, 3H, *J*=5 Hz) sobreposto a este simpleto, referente aos hidrogênios metílicos ligados ao carbono α.

Figura 3. Espectro de RMN de ¹H da Boc-*L*-alanina (500 MHz, CDCl₃)

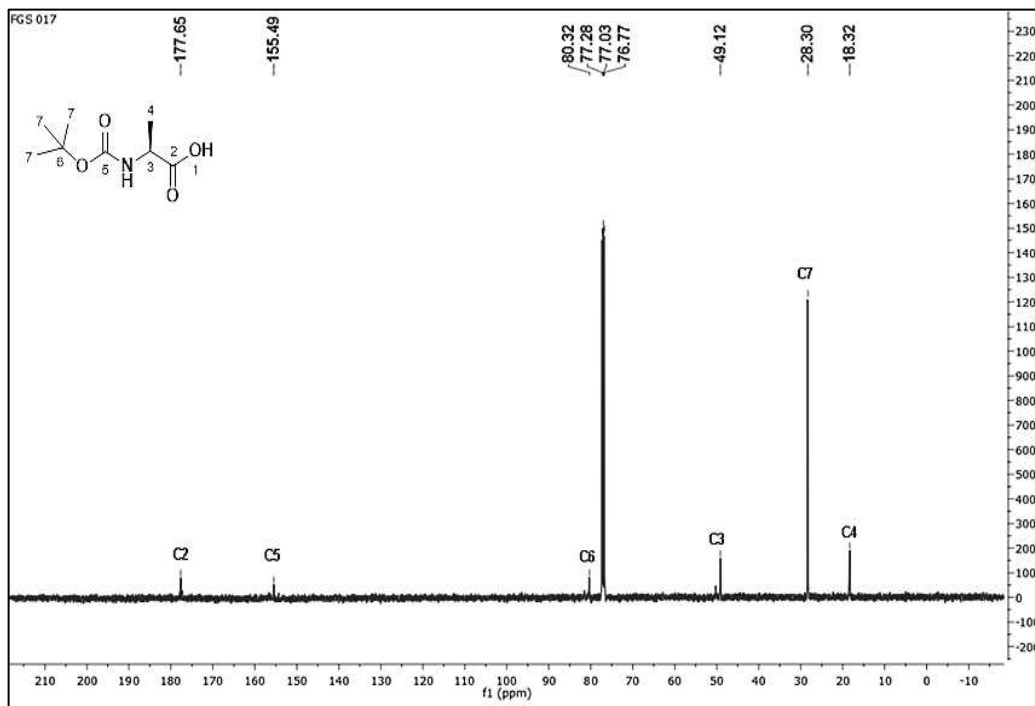


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 4) observam-se sinais em δ 177,7 ppm que corresponde às carbonilas do ácido carboxílico (C2) e em δ 155,5 ppm à carbonila da amida (C5).

Tem-se ainda, sinais em δ 80,3 ppm referente ao carbono (C6) e um sinal (28,3 ppm) mais intenso devido ao número de hidrogênios (9H) que corresponde ao carbono do grupo Boc. O sinal em δ 49,1 ppm corresponde ao carbono α (C-H), ligado a este carbono está o grupo metil (CH₃) que aparece com sinal em δ 18,3 ppm.

Figura 4. Espectro de RMN de ¹³C da Boc-L-alanina (125 MHz, CDCl₃)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

5.1.2 Síntese e caracterização dos derivados alquilados da *N*-piperazina

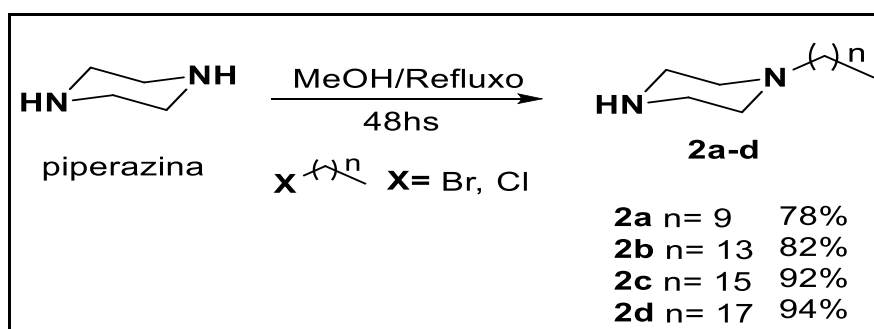
5.1.2.1 Síntese dos derivados alquilados da *N*-piperazina

Os anéis heterocíclicos apresentam uma ampla gama de aplicações em diversas áreas, como na química orgânica, medicinal, farmacêutica e industrial. Entre os heterocíclicos que contêm nitrogênio, a piperazina se destaca, pois é amplamente usada como base estrutural de alguns medicamentos comercializados ou ainda, candidatos a novos medicamentos (HALIMEHJANI; BADALI, 2019). Trata-se de um composto heterocíclico com dois átomos de nitrogênio em posições opostas em um anel de seis membros (SHAH *et al*, 2016). Ela é considerada um suporte básico para o projeto de muitas moléculas bioativas, além disso, compostos que contêm a piperazina, apresentam baixa toxicidade; capacidade de formação de múltiplas ligações de hidrogênio, de modular a constante de equilíbrio ácido-base e do coeficiente de partição óleo/água do fármaco (TAHA; WADOOD, 2018).

Os derivados piperazínicos possuem as seguintes propriedades:

antidepressivo, antineoplásico, antibacteriano, antifúngico, antimalárico, anticonvulsivante (SHAQUIQUZZAMAN *et al*, 2015) e antiobesidade (HALIMEHJANI; BADALI, 2019). Diante do exposto, a piperazina foi utilizada neste trabalho como base para o desenvolvimento dos derivados *N*-piperazínicos (Esquema 8).

Esquema 8. Reação de alquilação da piperazina



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os derivados foram obtidos em uma única etapa de reação e isolados a partir da extração líquido-líquido ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$). A formação do produto de interesse foi acompanhada por CCD, eluente diclorometano/metanol (9:1 v/v), revelada com ninidrina. A Tabela 4 resume os derivados piperazínicos obtidos, bem como, suas respectivas características.

Tabela 4 - Derivados alquilados da *N*-piperazina

Composto	n	Aspecto	Faixa de fusão (°C)	Rendimento (%)
2a	9	óleo	-	78
2b	13	sólido	47,8 - 50,1	82
2c	15	sólido	50,5 - 52,6	92
2d	17	sólido	53,5 - 54,8	94

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

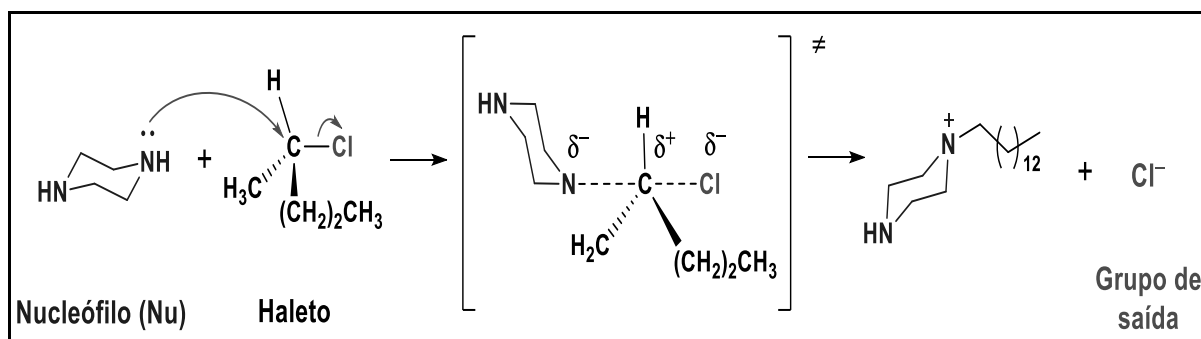
As forças de dispersão de London são um tipo de interação de van der

Waals, onde são criados dipolos induzidos decorrentes da polarização eletrônica entre os átomos (ADAIR; SUVACI; SINDEL, 2001).

De acordo OUELLETTE; RAWN (2015) os alcanos interagem apenas por forças fracas de London, e são essas forças que governam as propriedades físicas desses compostos orgânicos. Desta forma, com o aumento da massa molecular, há um aumento dessas interações e, conseqüentemente, maior a superfície de contato entre as moléculas, tornando as forças de London mais fortes. Logo, isso pode explicar ao aumento da faixa de fusão com o aumento da cadeia carbônica entre os derivados alquilados da *N*-piperazina.

A reação de formação dos derivados alquilados da *N*-piperazina seguiu o mecanismo de Substituição Nucleofílica Bimolecular (S_N2) (Esquema 9). Neste mecanismo, ocorre o ataque nucleofílico do lado posterior, o que significa que o nucleófilo se aproxima do substrato a partir de uma posição a 180° do grupo de saída. Esta abordagem minimiza a repulsão estérica e eletrônica do substrato e do nucleófilo de entrada. O processo ocorre em uma etapa sem a formação de um intermediário. A ligação Carbono-Nucleófilo é formada quando a ligação Carbono-Haleto é quebrada gerando um estado de transição pentacoordenado, se o nucleófilo for neutro, o produto será carregado positivamente (SMITH, 2013).

Esquema 9. Proposta de mecanismo da alquilação da piperazina



Fonte: Adaptado de OUELLETTE; RAWN (2014).

5.1.2.2 Caracterização dos derivados alquilados da *N*-piperazina

Os derivados da piperazínicos foram caracterizados por meio da Ressonância Magnética Nuclear. No espectro de RMN de ^1H (Figura 5) observa-se a formação de um tripleto (t, 4H) centrado em δ 2,89 ppm, que pode corresponder aos hidrogênios H1 ou H2, sem distinção, da piperazina.

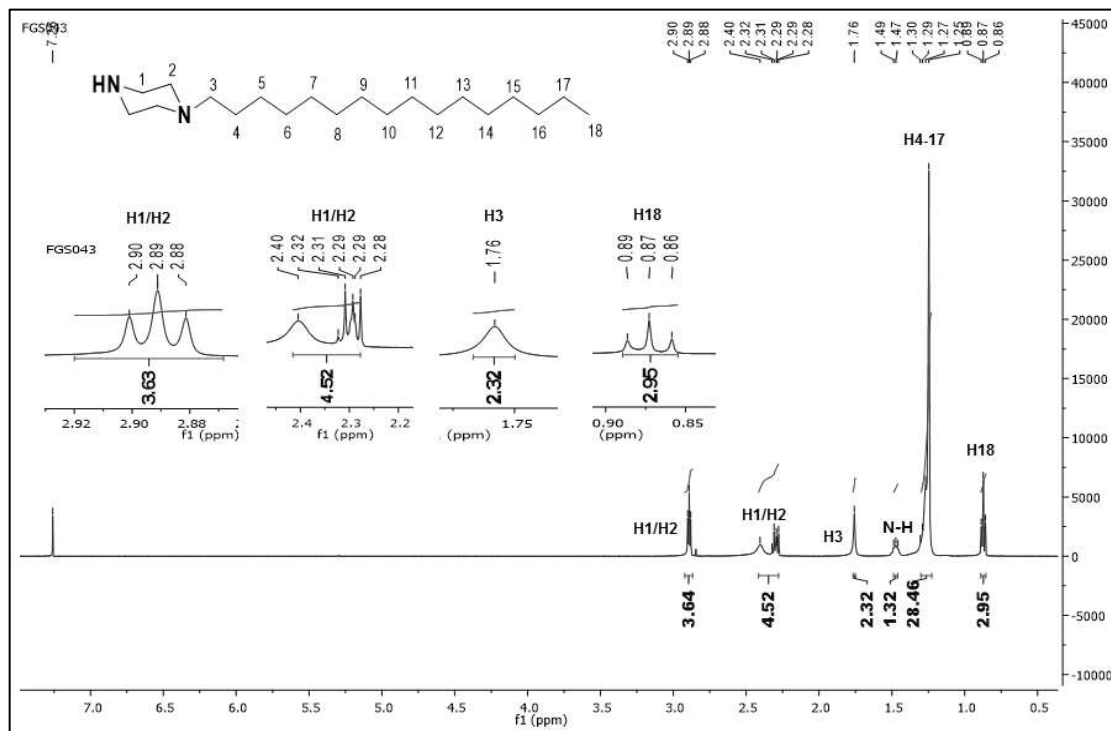
Nota-se um mutipletto na região entre δ 2,40-2,28 ppm (m, 4H) corresponde aos hidrogênios H1 ou H2 da piperazina, também sem distinção. Observa-se também um simpleto alargado em δ 1,76 ppm correspondente ao hidrogênio H3, e ainda, na região de δ 1,49-1,43 ppm um multipletto correspondente ao hidrogênio do grupo **N-H**. Além de um sinal intenso entre δ 1,29-1,25 ppm (s, 28H) que corresponde aos hidrogênios metilênicos (H4 ao H17).

Segundo PAVIA *et al* (2012) o hidrogênio α (-CH-N-) é levemente desblindado por causa da eletronegatividade do nitrogênio. E ainda, em cadeias longas, todas as absorções de metileno (CH_2) se sobrepõem em um único pico sem resolução. Nota-se ainda, um tripleto na região δ 0,89-0,86 ppm (t, 3H, $J=5$ Hz) corresponde ao hidrogênio H18.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 6) observar-se um sinal em δ 59,51 ppm correspondente ao carbono C3 (-C-N) por estar diretamente ligado ao nitrogênio, desta forma, apresentando um maior deslocamento químico. Pode-se observar ainda, os sinais em δ 54,61 e 46,0 ppm, que correspondem aos carbonos C1 e C2, sem distinção, da piperazina.

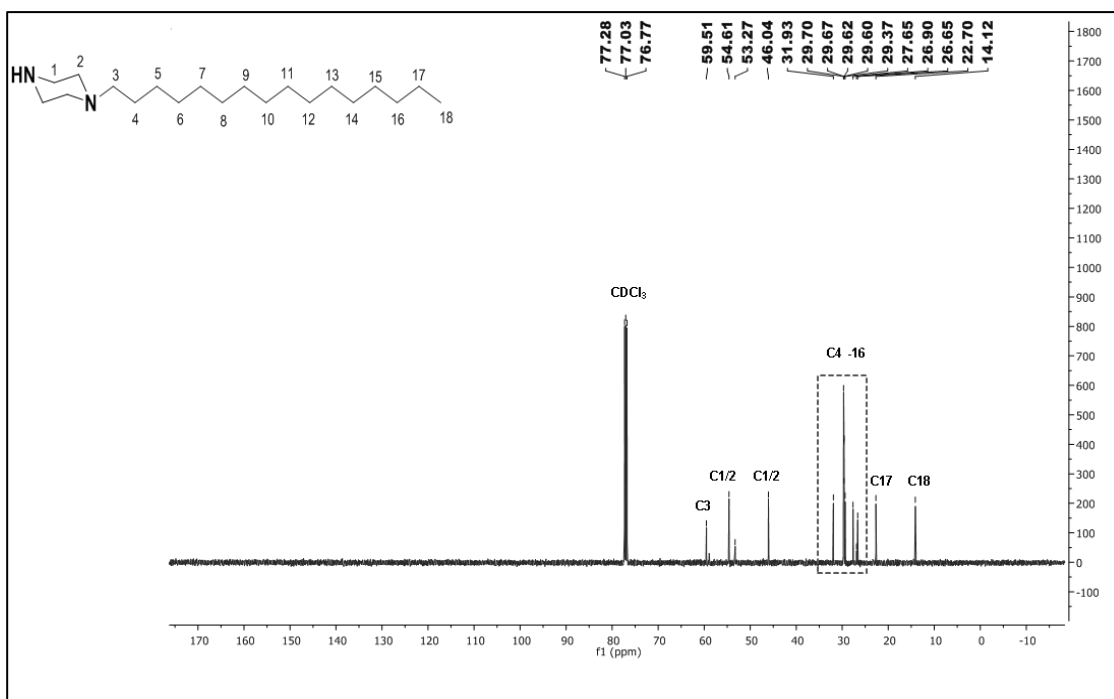
Nota-se ainda, sinais na região entre δ 31, 93 e 26,65 ppm, que corresponde aos carbonos da cadeia alquil C4 a C16. Neste caso, não há distinção entre eles. Além disso, nota-se um sinal em δ 22,7 ppm correspondente ao carbono C17 (metilênico), e outro sinal em δ 14,12 ppm correspondente ao carbono metílico (C18).

Figura 5. Espectro de RMN de ^1H do composto **2c** (500 MHz, CDCl_3)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 6. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2c** (125 MHz, CDCl₃)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

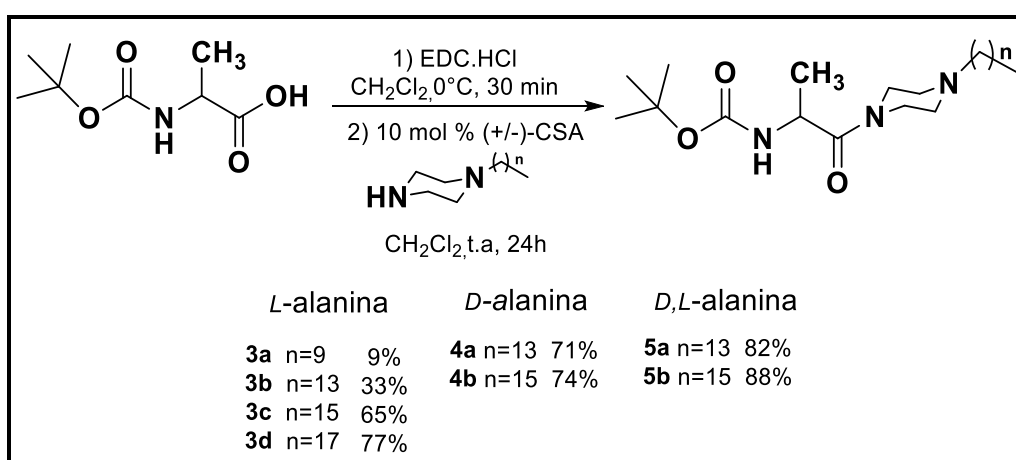
5.1.3 Síntese e caracterização dos derivados da Boc-alanina conjugados derivados alquilados da *N*-piperazina

5.1.3.1 Síntese dos derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados alquilados da *N*-piperazina

Os compostos heterocíclicos conjugados a aminoácidos ou peptídeos representam uma importante classe de agentes terapêuticos, como por exemplo, antimicrobiano, anti-helmíntico e anticâncer (ANIL *et al*, 2020). Além disso, fármacos a base de aminoácidos ou peptídeos apresentam baixa toxicidade, ampla biodisponibilidade e permeabilidade, potência moderada e boas propriedades metabólica e farmacocinética, portanto, esses derivados são essenciais para o desenvolvimento de estratégias sintéticas que possam levar à descoberta de novos compostos bioativos (WANG *et al*, 2018).

Neste contexto, os derivados da Boc-alanina foram conjugados aos os derivados alquilados da *N*-piperazina, levando assim, a formação dos produtos finais de interesse (Esquema 10).

Esquema 10. Síntese dos derivados da Boc-alanina acoplados aos derivados alquilados da *N*-piperazina



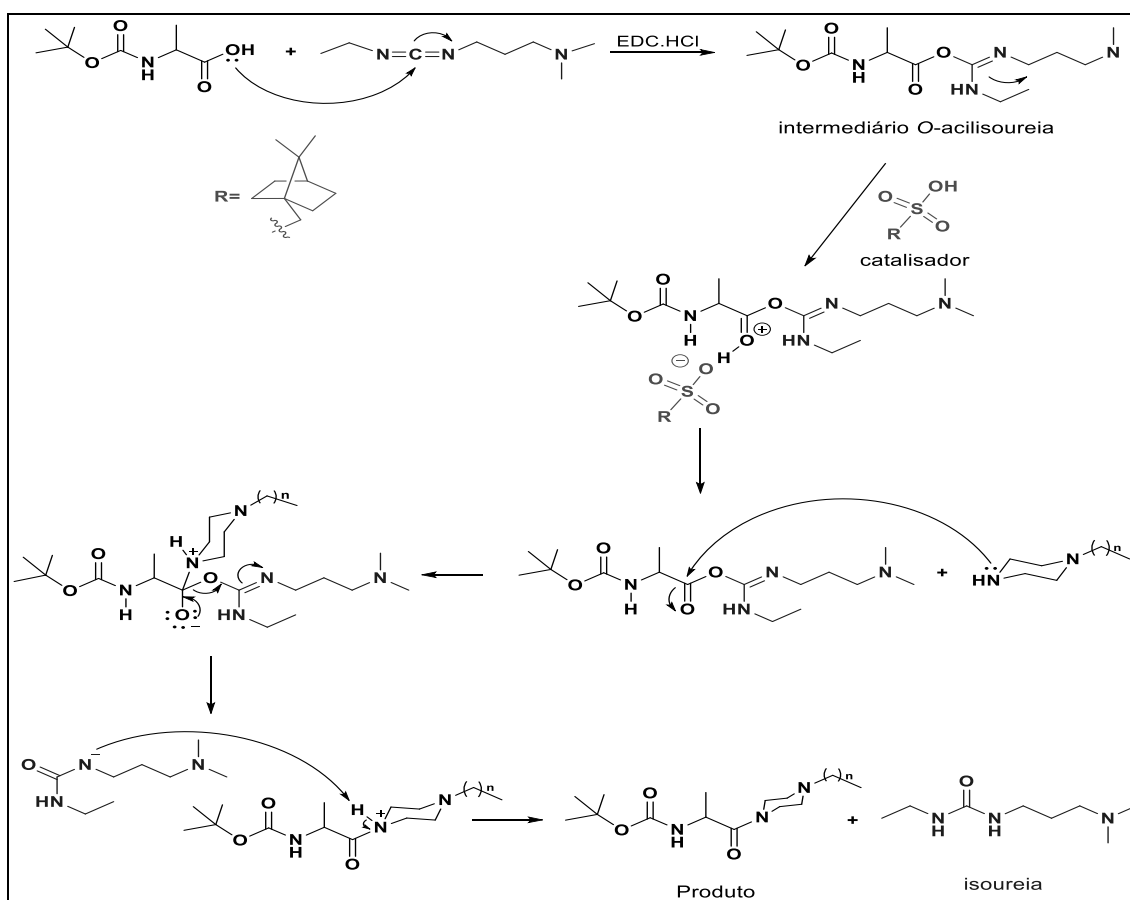
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

As amidas são usualmente sintetizadas pela união de ácidos carboxílicos e aminas, entretanto, a conjugação destes dois grupos funcionais não ocorre de maneira espontânea à temperatura ambiente, uma vez que, é preciso a eliminação de água, o que ocorre em altas temperaturas (160-180 °C) e perda de água, condições estas, em geral, prejudiciais aos substratos. Conseqüentemente, é necessária uma prévia ativação do ácido, que consiste, na conversão da hidroxila (-OH) do carbono acila em um bom grupo abandonador antes do tratamento com a amina, e entre os agentes ativadores (ou de acoplamento) utilizados, estão as carbodiimidas (SANTOS, 2015). O EDC (1-etil-3-dimetilaminopropil carbodiimida) é um dos agentes ativadores mais utilizados na conjugação de compostos que possuam grupos carboxílicos e/ou aminas (GONÇALVES BRASIL JÚNIOR, 2010).

O Esquema 11 representa uma proposta de mecanismo para reação entre os derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados *N*-piperazina alquilada. Inicialmente ocorre uma reação ácido-base (SANTOS, 2015) entre o EDC (agente ativador) e o grupo ácido carboxílico da Boc-alanina para formar o intermediário *O*-acilisourea (MONTALBETTI; FALQUE, 2005), e este por sua vez, pode ser identificado/acompanhado por cromatografia em camada delgada durante a reação (DE CASTRO *et al*, 2017). Este intermediário apresenta elevada reatividade, o que promove o ataque nucleofílico da amina na carbonila do éster formado, resultando na ligação amida, com liberação de ureia (GONÇALVES BRASIL JÚNIOR, 2010).

A reação ocorreu na presença do CSA [(+/-)-ácido canforsulfônico], um ácido de Brønsted, que é utilizado como catalisador da reação química (DE CASTRO *et al*, 2017). A catálise por ácidos de Brønsted é capaz de acelerar reações orgânicas de duas maneiras distintas: i) através da ativação de um substrato por ligação de hidrogênio (podendo ser mono ou bifurcada) ou ii) por meio de uma protonação de um substrato, esta última, pode proceder através de uma protonação reversível do eletrófilo em uma etapa de pré-equilíbrio, anterior ao ataque do nucleófilo (catálise ácida específica) ou por meio da transferência de próton no estado de transição na etapa determinante da velocidade de reação (DE CASTRO, 2016).

Esquema 11. Proposta de mecanismo para reação entre os derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados alquilados da *N*-piperazina



Fonte: Adaptado de MONTALBETTI; FALQUE (2005).

Os produtos foram obtidos com rendimentos entre 9 a 88%, na forma de óleo **3a** e sólidos **3b-3d**, **4a-4b** e **5a-5b**. Note que, os baixos rendimentos obtidos (ou seja, não corrigidos), se devem inicialmente pela investigação da proporção do eluente CH₂Cl₂/MeOH empregado na CCS, além da baixa resolução da CCD revelada com ninidrina, usada no acompanhamento da CCS, dificultando assim, a identificação do produto final e conseqüentemente, até mesmo a perda da quantidade do mesmo. Ressalta-se que, a partir da elucidação da proporção adequada, os rendimentos tornaram-se mais satisfatórios. O direcionamento dos testes em maior quantidade em relação aos derivados da Boc-*L*-alanina, se deve ao fato por ser um enantiômero puro e de baixo custo e mais acessível.

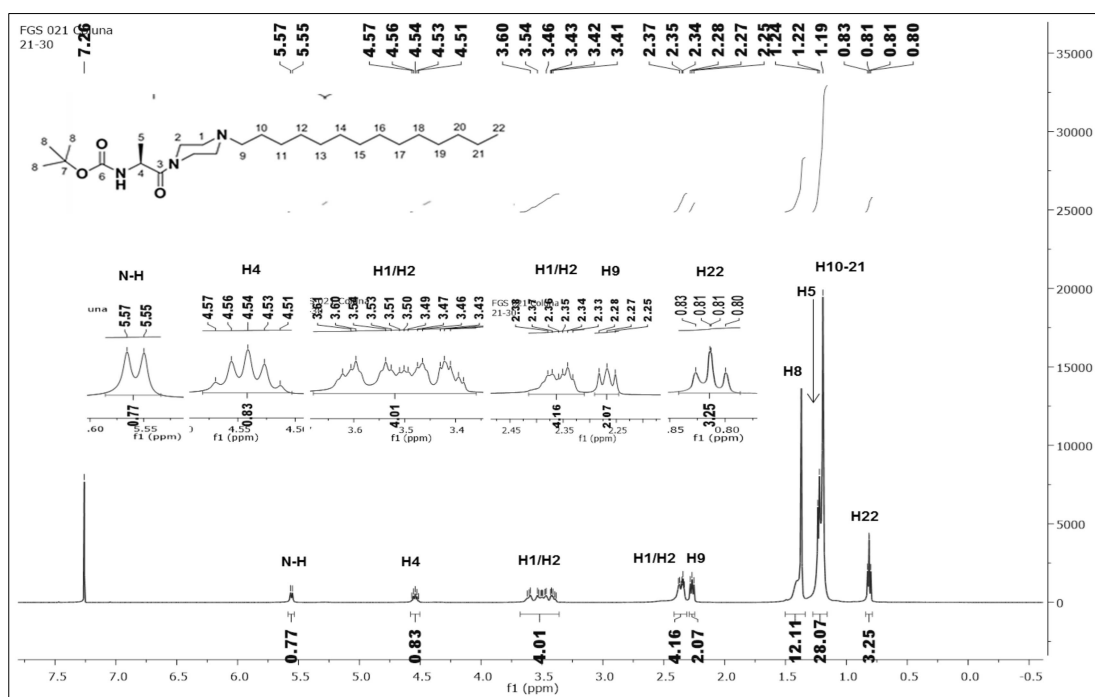
5.1.3.2 Caracterização dos derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados

alquilados da *N*-piperazina

A identificação, bem como, a elucidação estrutural dos derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados *N*-piperazina alquilada foi realizada por meio das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): 1D e 2D, Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV), Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O composto **3b** (*L*-enantiômero) foi utilizado como exemplo de caracterização dos derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados piperazínicos.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 7) do composto **3b** nota-se a formação de um duplete centrado em δ 5,56 ppm (d, 1H, $J= 10$ Hz) correspondente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio (N-H), além da formação de um quinteto centrado em δ 4,54 ppm referente ao hidrogênio α (H4), resultado do acoplamento entre o hidrogênio do N-H e os hidrogênios do grupo metil (CH_3) também ligados ao carbono α . Na região entre δ 3,61 e 3,41 ppm há a presença de um multiplete correspondente aos hidrogênios H1 ou H2, sem distinção, essa relação também se repete na região entre δ 2,38 e 2,34 ppm. Nota-se ainda, que o hidrogênio H9 acopla com os hidrogênios H10 formando, assim, um triplete centrado em δ 2,27 ppm (t, 2H, $^3J= 5$ Hz). Observar-se ainda, que os hidrogênios H9 por estarem mais próximos ao nitrogênio (está há três ligações do nitrogênio), portanto, apresenta um maior deslocamento químico diferentemente dos hidrogênios da cadeia alquila (H10-H21).

O hidrogênio H8 do grupo Boc_2O apresentou deslocamento químico entre δ 1,39-1,37 ppm, formando um pico único, ou seja, um simpleto, enquanto, o hidrogênio H5 (metílico) apresentou deslocamento químico na mesma região δ 1,24-1,19 ppm dos outros hidrogênios metílicos H10-H21, formando também um único pico. Finalmente, nota-se a presença de um triplete na região entre δ 0,83-0,80 ppm, resultado do acoplamento em 3J entre os hidrogênios H22 e H21.

Figura 7. Espectro de RMN de ^1H do composto **3b** (500 MHz, CDCl_3)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

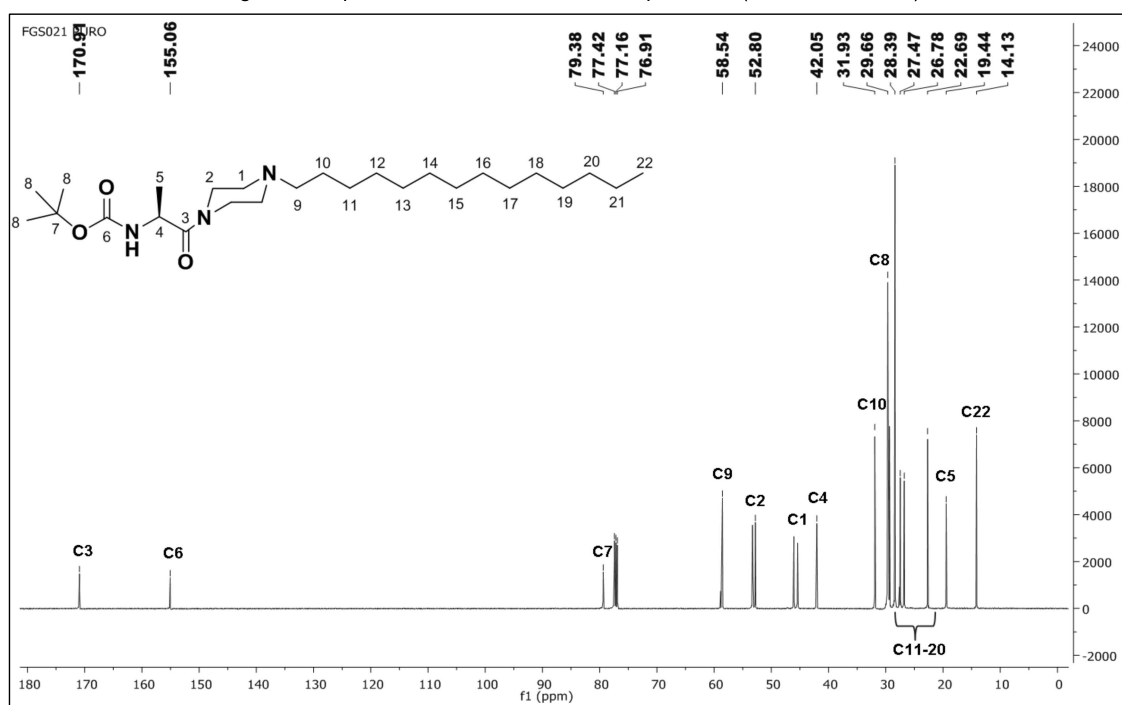
Em RMN de ^{13}C , os carbonos dos grupos carbonila têm os maiores deslocamentos químicos, pois a hibridização sp^2 e um oxigênio eletronegativo estão diretamente ligados ao grupo carbonila, desblindando-o ainda mais. Além disso, carbonos com hibridização sp^3 e com efeito da eletronegatividade (carbono ligado diretamente a um elemento eletronegativo) apresentam maiores deslocamentos químicos PAVIA *et al* 2012.

Desta forma, no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 8) do produto **3b** observa-se um sinal na região δ 155,0 ppm, correspondente à carbonila do grupo amida (-CONH-) conjugada a porção *N*-piperazina (C3). Além do sinal em δ 170,9 ppm atribuído à carbonila acoplada ao grupo Boc₂O (C6). Observe que os carbonos com hibridização sp^3 C7 (terciário e ligado diretamente ao oxigênio) e C9 (primário e ligado diretamente ao nitrogênio) apresentam respectivamente os seguintes deslocamentos químicos: δ 79,38 ppm e 58,54 ppm. Nota-se ainda, que os sinais em δ 52,80 e 42,0 ppm correspondentes aos carbonos C2 e C1 respectivamente, estão duplicados, pois são da piperazina. O C2 possui maior deslocamento químico, pois está mais próximo ao grupo amida (-CON-), logo, maior efeito da eletronegatividade.

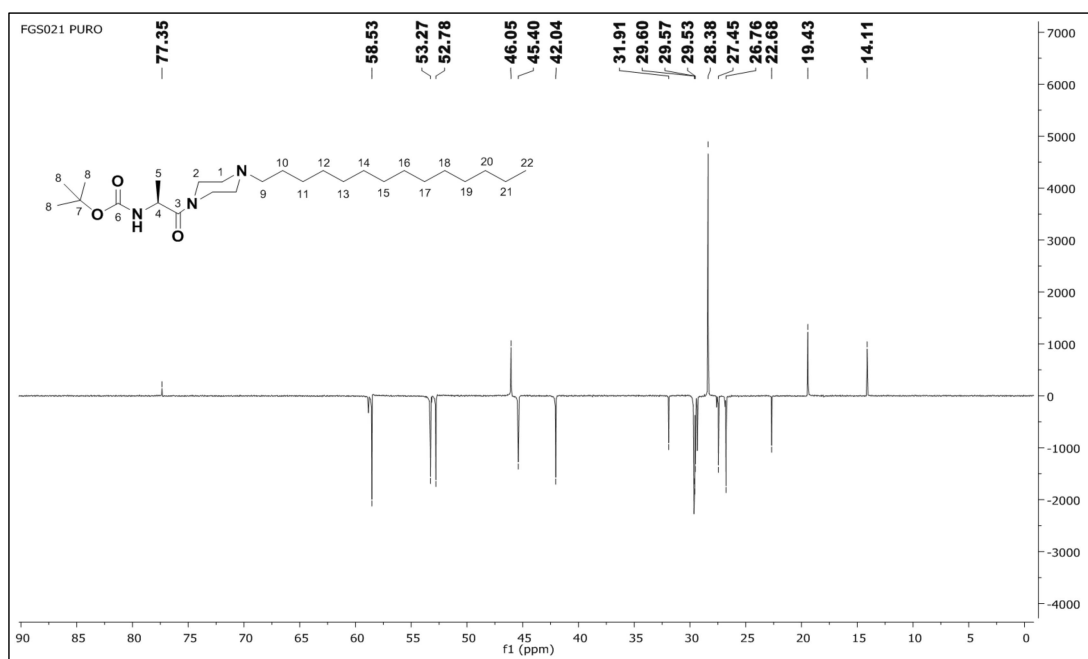
Assim, os deslocamentos químicos de carbonos com hibridização sp^3 e com menor efeito da eletronegatividade são menores. Portanto, os carbonos C4 (δ 42,05 ppm), C8 (δ 31,93 ppm), C11 a C21 (δ 29,66 a 26,78 ppm), C5 (δ 19,44 ppm) e C22 (δ 14,10 ppm) apresentaram menores deslocamentos.

Já no espectro de DEPT-135 (Figura 9) pode-se observar um sinal em δ 46,05 ppm correspondente ao carbono metínico C4 (-CH), além de outros sinais que correspondem aos carbonos metílicos (-CH₃) C8 (δ 28,38 ppm), C5 (δ 19,44 ppm) e C22 (δ 14,10 ppm). Nota-se que estes sinais apresentam picos positivos, enquanto os sinais dos carbonos metilênicos (-CH₂) tanto cadeia alquil quanto da piperazina estão em fase oposta. Além disso, percebe-se a ausência do carbono C7 (carbono não hidrogenado), o que é esperado para espectro de DEPT-135.

Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3b** (125 MHz, CDCl_3)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 9. Espectro de DEPT-135 do produto **3b** (125 MHz, CDCl₃)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Além da caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C , também foi realizada uma análise bidimensional (2D) para identificação/formação do composto **3b**, e conseqüentemente, consolidar a elucidação da sua estrutura.

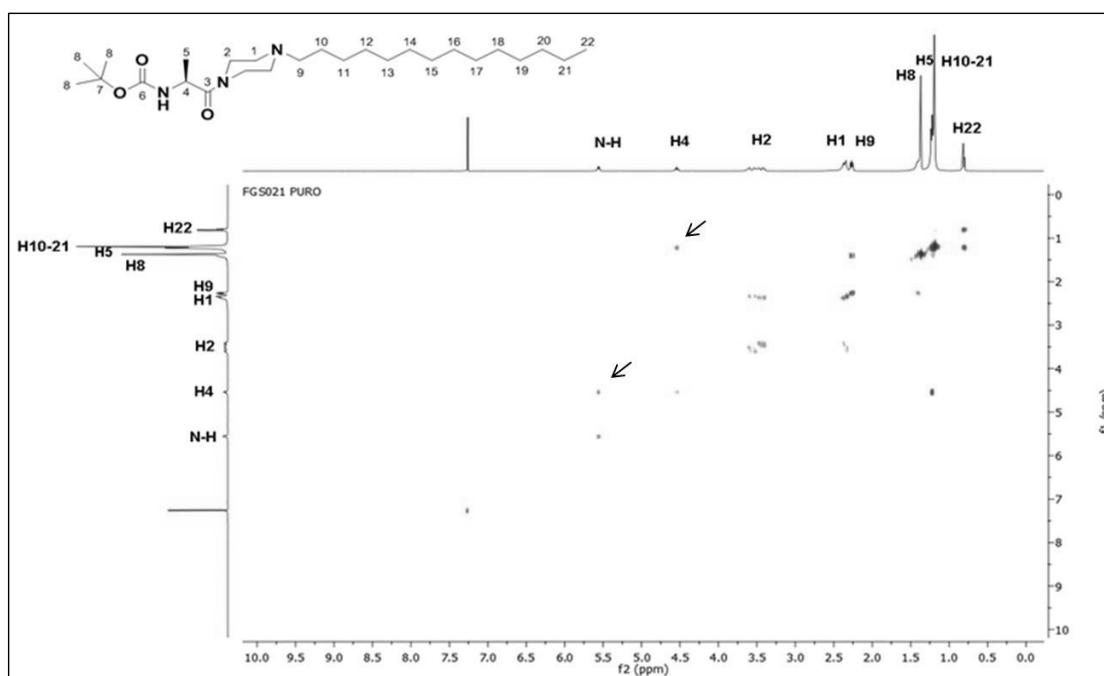
De acordo com KAISER (2000) as técnicas 2D permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuem alguma relação escalar ($^nJ_{\text{H,H}}$; $^nJ_{\text{H,C}}$ e $^nJ_{\text{C,C}}$) entre si e, assim, é possível fazer um mapeamento estrutural mais preciso, principalmente na análise de estruturas mais complexas. Neste estudo, foi utilizado as seguintes técnicas:

- COSY ^1H - ^1H (Homonuclear **C**orrelation **S**pectroscopy)
- HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation)
- HMBC (Heteronuclear Multiplet-Bond Correlation)

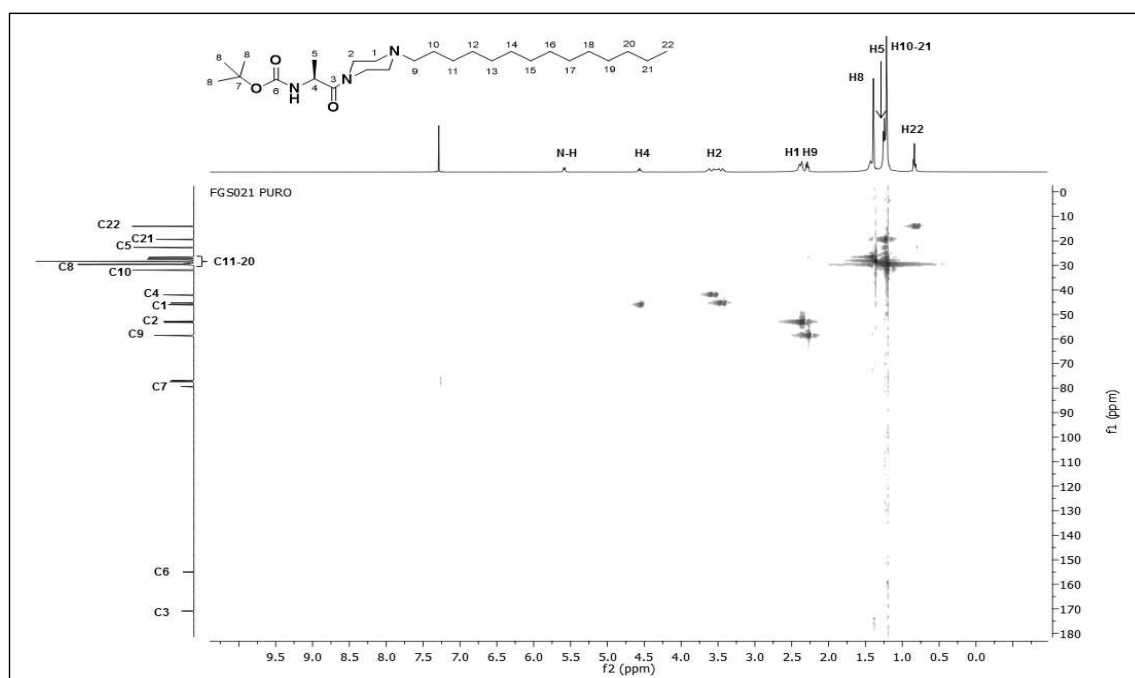
No mapa de contorno COSY ^1H - ^1H (Figura 10) pode-se observar a correlação entre os hidrogênios do composto **3b**. Desta forma, nota-se a correlação em 3J entre o hidrogênio H4 e o hidrogênio do grupo amida (-CONH-) da Boc-alanina. Também nota-se, a correlação em 3J entre os hidrogênios H4 e H5.

Enquanto no mapa de contorno HSQC ^1H - ^{13}C (Figura 11) pode-se observar a correlação entre os hidrogênios e os carbonos do composto **3b**. Assim, destaca-se a correlação em 2J entre o hidrogênio H2 e o carbono C1, da mesma forma, a correlação entre o hidrogênio H1 e o carbono C1. J

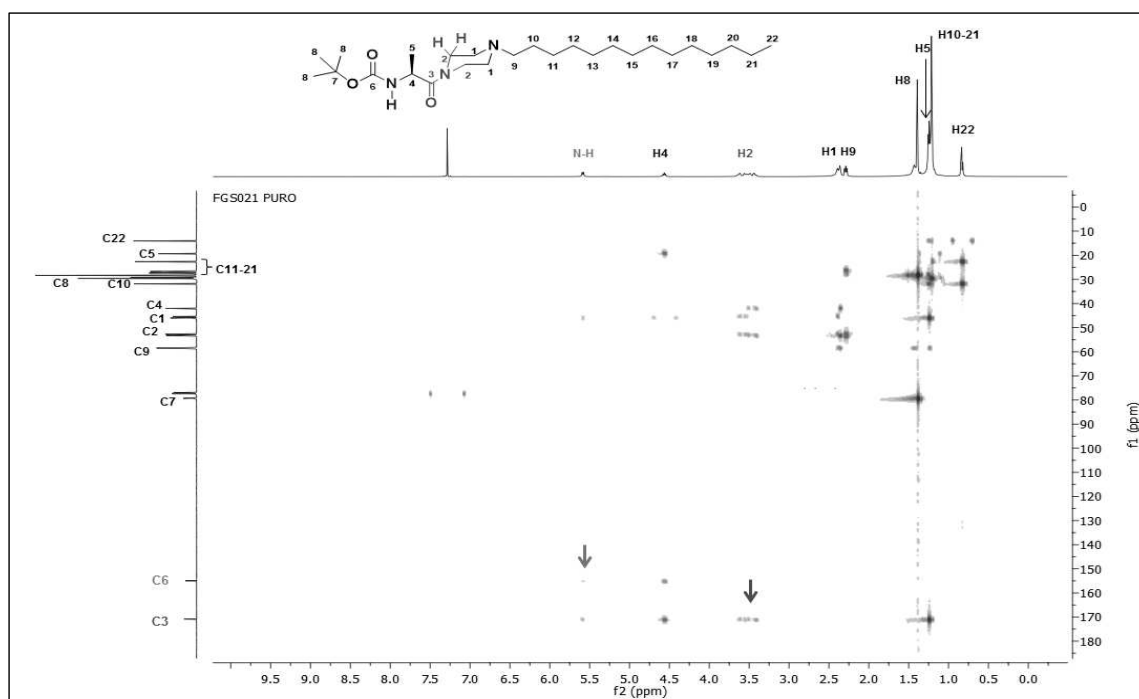
Já o mapa de contorno de HMBC ^1H - ^{13}C (Figura 12) também mostra a correlação entre hidrogênios e carbonos. Destaque para a correlação entre o hidrogênio do grupo amida ligado ao grupo Boc₂O e o carbono C6 da carbonila do grupo Boc₂O, demonstrando assim, a proteção desse grupo protetor na porção *N*-terminal da alanina (sinal mais fraco). Outra correlação importante ocorre entre o hidrogênio H2 da piperazina e o carbono do grupo amida ligado à piperazina, indicando a formação do composto de interesse.

Figura 10. Mapa de contorno COSY ^1H - ^1H do composto **3b** (CDCl_3)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 11. Mapa de contorno HSQC ^1H - ^{13}C do composto **3b** (CDCl_3)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

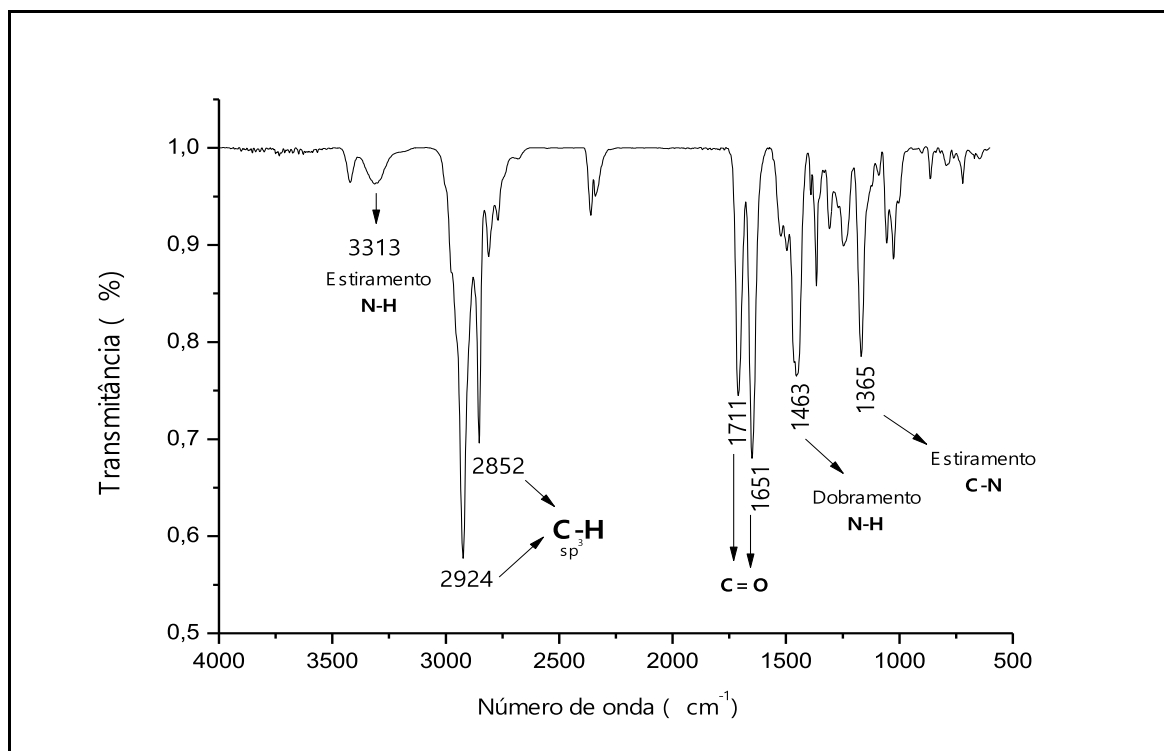
Figura 12. Mapa de contorno HMBC ^1H - ^{13}C do composto **3b** (CDCl_3)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O infravermelho é um método espectroscópico de análise que fornece informações quanto aos grupos funcionais que podem estar presentes na estrutura das substâncias (RIBEIRO; SOUZA, 2007; RODRÍGUEZ; CREWS; JASPARS, 2012). Assim, espera-se que com essa análise, o aparecimento de bandas de absorção características de amins secundárias e carbonilas, por exemplo, que são grupos presentes nos derivados de interesse.

A Figura 13 representa o espectro no infravermelho do composto **3b**, onde nota-se a presença da deformação axial N-H com absorção de 3313 cm^{-1} e a formação apenas de uma banda, característico de amidas secundárias. Observa-se também, o surgimento das bandas de absorção entre 2927 e 2852 cm^{-1} que correspondem aos estiramentos $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, e ainda, absorções em 1711 e 1651 cm^{-1} , representando o estiramento ($\text{C}=\text{O}$). Além disso, há o aparecimento da banda de absorção em 1463 cm^{-1} que corresponde ao dobramento N-H e estiramento C-N em 1365 cm^{-1} .

Figura 13. Espectro no infravermelho do composto **3b**



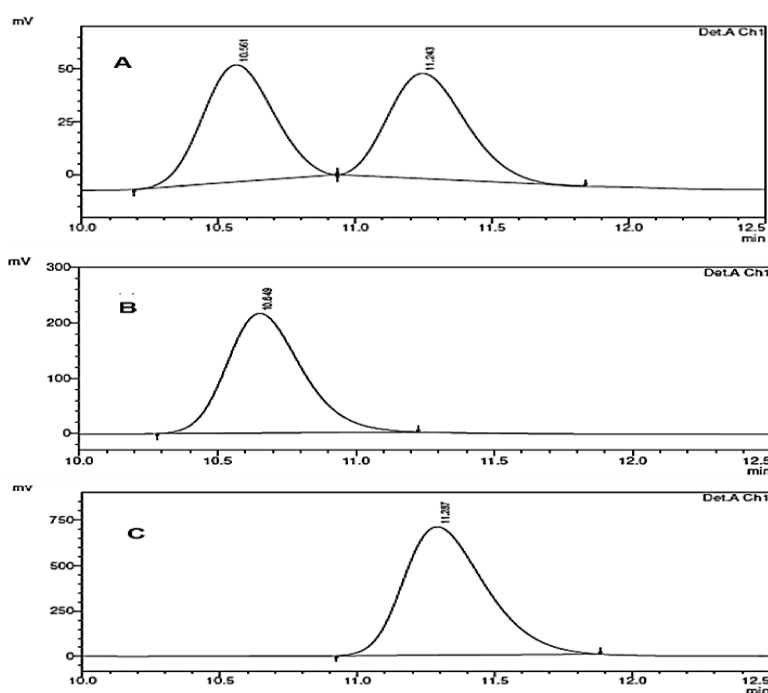
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica analítica utilizada para a separação, identificação e quantificação de cada constituinte de uma mistura (THAMMANA, 2016).

Para a separação de enantiômeros é necessário um tipo específico, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ). Basicamente existem dois tipos: i) o primeiro tipo consiste em pequenas moléculas opticamente ativas, que em geral, são immobilizadas em um gel de sílica ou gel de polímero orgânico como suporte aquiral e ii) o segundo tipo consiste em polímeros opticamente ativos (sintéticos ou naturais), esses polímeros são em geral revestidos em gel de sílica a fim de melhorar a eficiência de resolução e a força mecânica (OKAMOTO; IKAI, 2008).

A Figura 14 representa os cromatogramas da CLAE-FEQ dos compostos **5a**, **4a** e **3b**, demonstrando suas configurações químicas (*D*, *L*; *D*; *L*), respectivamente.

Figura 14. a) Cromatograma do composto **5a**. b) Cromatograma do composto **4a** e c) Cromatograma do composto **3b**

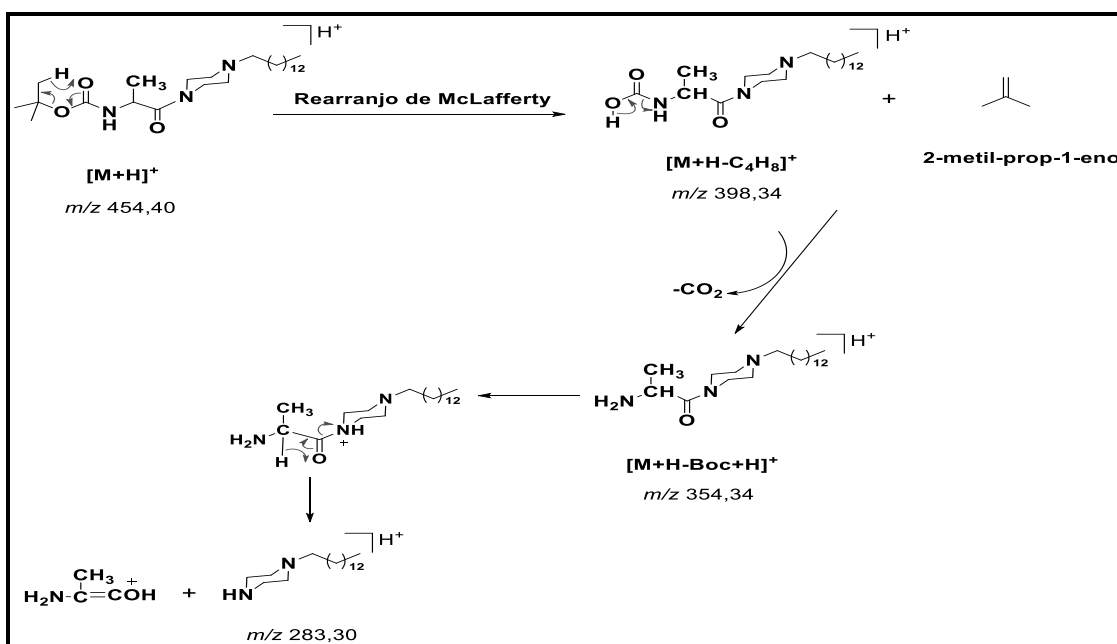


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

A espectrometria de massa (EM) depende da formação de íons na fase gasosa (carregados positivamente ou negativamente) que podem ser isolados eletricamente (ou magneticamente) com base em sua razão massa/carga (m/z). Em um espectro de EM, a coordenada x representa os valores m/z , enquanto o eixo y indica a contagem total de íons. Fornece informações importantes sobre os analitos, incluindo sua estrutura, pureza e composição. (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009). A Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR), alta resolução devido à capacidade de resolução de banda larga $> 10.000^2$. Apresenta uma ampla faixa de massa, velocidade de varredura rápida, alta sensibilidade (modo de varredura completa), resolução de alta qualidade e peso molecular preciso (LIN *et al*, 2015).

O Esquema 12 representa uma proposta de mecanismo das fragmentações do composto **3b** via rearranjo de McLafferty, com a formação dos principais íons moleculares e, conseqüentemente, os valores da razão massa/carga (m/z).

Esquema 12. Proposta de mecanismo das fragmentações do derivado da Boc-alanina (composto **3b**) via rearranjo de McLafferty



Fonte: Adaptado de BABU *et al* (2016).

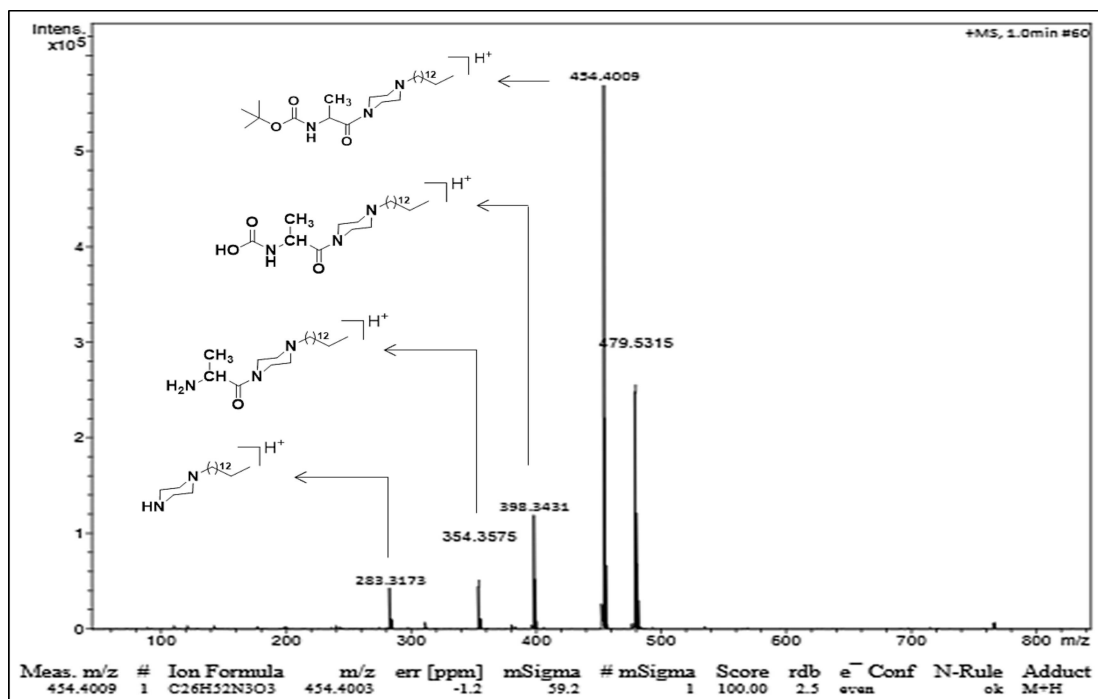
Os espectros de massa com íons positivos obtidos a partir da ionização por

electrospray (ESI) de compostos que com grupo protetor Boc, formam os seguintes íons moleculares: $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ e $[M + H - Boc + H]^+$ e, este último é formado a partir de um rearranjo do tipo McLafferty envolvendo uma migração do hidrogênio (γ -H) do grupo terc-butil para o oxigênio carbonil na porção Boc-N seguido da perda do 2-metil-prop-1-eno (C_4H_8) e perda subsequente de dióxido de carbono (CO_2) do íon molecular $[M + H]^+$ (BABU *et al*, 2016). Posteriormente, há um novo rearranjo com formação do fragmento da *N*-piperazina alquilada com razão m/z 283,30.

De acordo com PAVIA *et al* (2012) a EMAR é capaz de determinar a massa exata do íon molecular, além de permitir que se saiba a fórmula molecular exata da substância analisada.

A Figura 15 mostra uma boa relação entre o valor da massa calculado m/z 454,4003 e o encontrado m/z 454,4009, conseqüentemente, apresentando como fórmula molecular: $[C_{26}H_{52}N_3O_3]$ ($[M+H]^+$) e razão m/z : 454,4009.

Figura 15. Espectro de Massa de Alta Resolução do composto **3b**



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

5.2.1 PARTE EXPERIMENTAL BIOLÓGICA

5.2.1 Determinação da atividade inibitória *in vitro* sobre as enzimas lipase pancreática e α -amilase

Ressalta-se que esta parte do trabalho foi interrompida devido à suspensão das atividades acadêmicas presenciais em decorrência da pandemia COVID-19, de acordo com as RESOLUÇÕES Nº 10/2020, 11/2020 e 17/2020 do Conselho Superior da Universidade Federal de Juiz de Fora.

A síntese dos derivados da Boc-alanina acoplados aos derivados alquilados da *N*-piperazina foi desenvolvida com base na quiralidade do aminoácido alanina e, conseqüentemente, todos os derivados, apresentam a mesma estrutura química, porém, apresenta diferentes arranjos espaciais.

Segundo GOGOI (2019) as proteínas, aminoácidos e outros elementos básicos da vida, são quirais, e ainda, que os enantiômeros de um composto quiral interagem de maneira diferente com o receptor ou molécula enzimática complementar em um ambiente biológico, sendo altamente estereosseletivo ou enantiosseletivo.

Além disso, o uso de alguns grupos como bloco de construção dos derivados da Boc-alanina se justifica devido suas propriedades biológicas e/ou físico-químicas. De acordo com SHAMIM *et al* (2020) os compostos heterocíclicos são os suportes-chave para muitas avaliações biológicas, e têm sido implicados na descoberta de novas moléculas biologicamente importantes. Por exemplo, heterociclos com átomo (s) de nitrogênio e/ou enxofre estão sendo usados na síntese de agentes antidiabéticos (SHAMIM *et al*, 2020).

Compostos com o grupo carbamato desempenham um papel importante na descoberta de medicamentos e na química medicinal, estruturalmente, sua funcionalidade está relacionada às características híbridas de amida-éster e, em geral, apresentam boas estabilidades químicas e proteolíticas, além da capacidade de modular interações inter ou intramoleculares com as enzimas ou receptores-alvo (GHOSH; BRINDIS, 2015).

A síntese visou o desenvolvimento de moléculas que possam apresentar algum efeito inicialmente sobre a enzima lipase pancreática e, posteriormente, sobre a α -amilase, a fim de produzir inibidores capazes de atuar na minimização e/ou no gerenciamento não só do diabetes e/ou obesidade, mas considerando também o conjunto desses distúrbios.

Desta forma, acentua-se que a síndrome metabólica é um conjunto de anormalidades que incluem obesidade visceral, dislipidemia, tolerância à glicose diminuída e hipertensão e, está associada aos fatores de risco de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (WANG *et al*, 2020). Portanto, o desenvolvimento de novos inibidores dessas enzimas são essenciais para o manejo da homeostase desses distúrbios.

A partir dos resultados dos ensaios de inibição das enzimas α -amilase e da lipase pancreática, foram obtidos valores da porcentagem (%) de inibição e IC50 para cada composto testado.

A concentração inibitória semimáxima (IC50) é a medida mais amplamente utilizada e informativa da eficácia de um agente terapêutico, e indica a quantidade de uma substância necessária para inibir um processo biológico pela metade, fornecendo uma medida de potência (AYKUL; MARTINEZ-HACKERT, 2016).

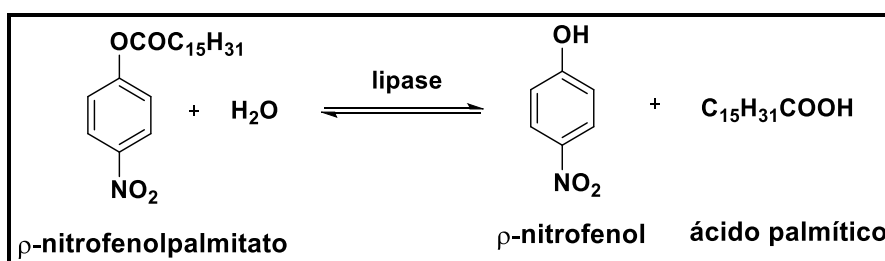
5.2.1.1 Ensaio de inibição da lipase pancreática

A inibição enzimática foi determinada a partir das inclinações das retas do gráfico (absorbância x tempo), a inclinação é decorrente da velocidade de formação de produto por minuto de reação e, a presença do inibidor ocasiona uma diminuição dessa inclinação, a partir disso, os valores de absorbância foram convertidos em μ mol de produto por meio de uma curva padrão de *p*-nitrofenol (PEREIRA *et al*, 2011). Os ésteres de *p*-nitrofenol são usados como substrato cromogênico para a determinação da atividade da lipase pancreática (POHANKA, 2019).

A hidrólise de ésteres de *p*-nitrofenol (incolor) libera a fração de ácido graxos livre correspondente e o cromogênio *p*-nitrofenol (amarelo) (BLAKE; KOKA; WEIMER, 1996) que pode ser detectado por espectrofotometria, com absorvância em 405 nm.

Os ácidos graxos derivados do *p*-nitrofenol (ácido palmítico/láurico), por exemplo, são comumente utilizados nos ensaios (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009) (Esquema 13).

Esquema 13. Hidrólise do *p*-nitrofenolpalmitato



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Alguns parâmetros precisam ser adotados para a determinação da atividade inibitória *in vitro*, por serem considerados essenciais para atividade da lipase pancreática, como por exemplo: pH, surfactantes, temperatura, força iônica, entre outros (MCCLEMENTS; LI, 2010).

A catálise da lipase em solução tampão é necessária, pois uma mudança no pH resulta em alterações conformacionais da enzima, também pode alterar a concentração de substrato na interface, a ionização do substrato livre e a ionização do complexo lipase-substrato; a temperatura também pode provocar a desnaturação de proteínas, alterar o estado de ionização de proteínas e a solubilidade dos substratos, desta forma, em uma temperatura específica, a hidrólise geral se torna máxima e essa será o padrão (GOSWAMI; DE; BASU, 2012).

Um outro aspecto importante é a presença de íons metálicos, os cátions de sais inorgânicos formam sais com ácidos graxos, removendo-os da interface óleo/água e, conseqüentemente, a disponibilidade da área interfacial em relação à lipase aumenta, a formação do complexo ácido graxo-lipase permanece baixa e a hidrólise aumenta (GOSWAMI; DE; BASU, 2012; MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

Além disso, íons monovalentes e multivalentes presentes no trato gastrointestinal podem ser simulados usando soluções de NaCl e CaCl₂, esses íons podem criar uma força iônica e afetar as interações eletrostáticas do sistema e, conseqüentemente, alterar as propriedades físico-químicas, a solubilidade e o estado de agregação dos componentes do sistema, auxiliando no processo digestivo de triglicerídeos (MCCLEMENTS; LI, 2010).

A lipase pancreática é secretada como parte do suco pancreático com pH aproximadamente igual a 8 (BROWNLEE *et al*, 2010), isto justifica o fato das soluções preparadas e usadas nos testes terem seus pH ajustados em 8 e serem solubilizadas em tampão TRIS-HCl, e ainda, a microplaca contendo as amostras foi incubada em estufa a 37 °C, por quatro períodos de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos), simulando a temperatura do corpo humano.

O TRITON X-100 é um surfactante não iônico comumente utilizado para induzir a alteração da conformação da enzima (MESA *et al*, 2018). Em geral, os surfactantes são aplicados em reações catalisadas por lipase, porque aumentam a área interfacial água-óleo, ou seja, melhorando a estabilidade da emulsão, também aumentam a solubilidade do substrato, isso é importante, pois esses substratos não são solúveis em água e a reação é catalisada na interface óleo/água, portanto, o mecanismo catalítico envolve uma ativação interfacial (GUNCHEVA; ZHIRYAKOVA, 2011).

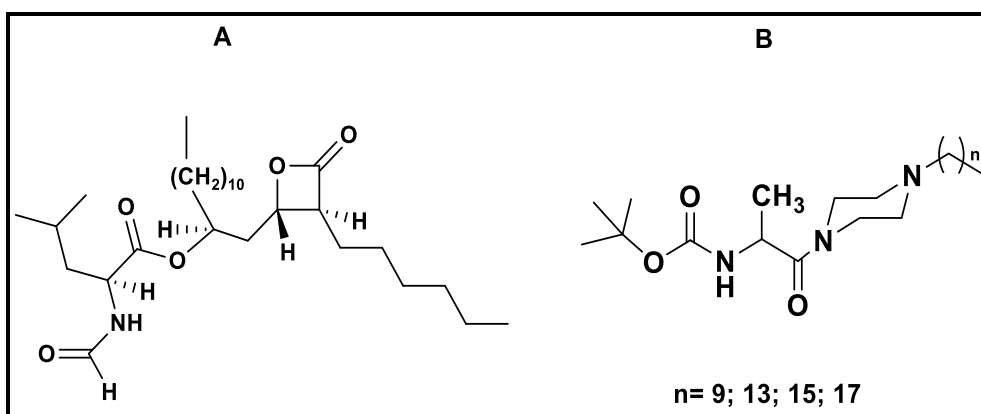
A ativação interfacial resulta principalmente de alterações da conformação da “tampa” ou “aba” presente ao redor do sítio ativo da enzima em resposta ao solvente do meio, isso expõe o sítio ativo e fornece uma superfície hidrofóbica para interação com o substrato lipídico, aumentando assim, sua permeabilidade (SAIFUDDIN; RAZIAH, 2008).

O Orlistate foi utilizado como inibidor de referência (controle positivo), e preparado na mesma faixa de concentração das amostras (25, 50, 100, 150, 200 µg/mL). Atualmente, apenas o Orlistate atua como inibidor da enzima lipase pancreática, e é usado para tratamento a longo prazo da obesidade, a inibição dessa enzima impede a absorção de aproximadamente 30% da gordura da dieta (SEYEDAN *et al*, 2015).

Apesar do seu bom perfil de segurança, seu uso é limitado por seus efeitos adversos gastrointestinais, incluindo fezes/manchas oleosas, flatulência e urgência fecal, além de ser recomendado a utilização de suplemento multivitamínico diário para compensar a absorção reduzida de vitaminas lipossolúveis (GADDE *et al*, 2018).

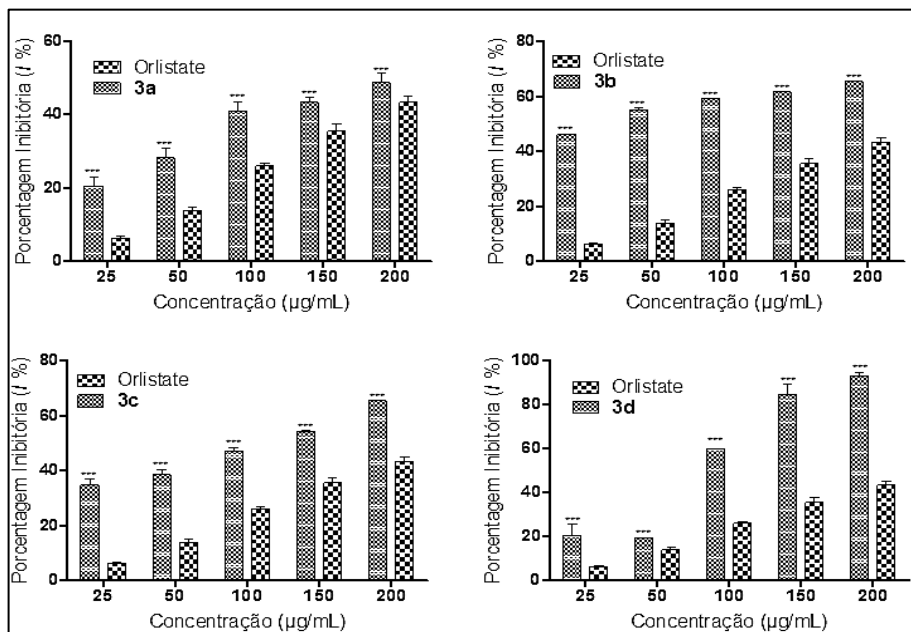
A Figura 16 representa as estrutura do Orlistate (16A) e a dos derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados da *N*-piperazina alquilada (16B), que mostra em destaque o grupo carbamato e o heterociclo. As Figuras 17 e 18 representam os gráficos de concentração *versus* resposta dos compostos analisados.

Figura 16 - Estrutura do Orlistate (16A) e dos derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados alquilados da *N*-piperazina alquilada (16B)



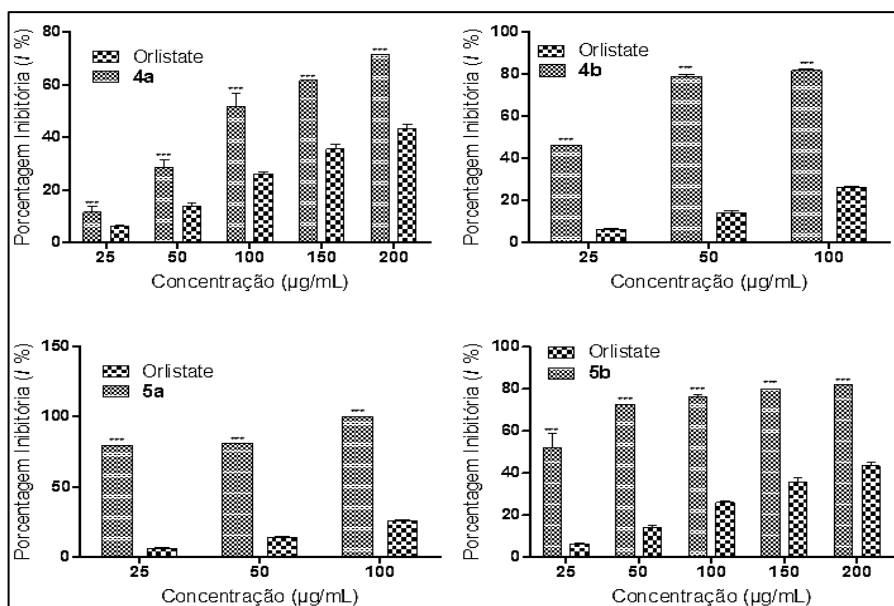
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 17 - Gráficos de concentração *versus* resposta dos compostos **3a**, **3b**, **3c** e **3d** frente à lipase pancreática



Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Figura 18 - Gráficos de concentração *versus* resposta dos compostos **4a**, **4b**, **5a** e **5b** frente à lipase pancreática



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

O estudo realizou testes com diferentes enantiômeros, inclusive misturas racêmicas, uma vez que se trata de um ensaio incipiente, portanto, uma investigação geral dos efeitos benéficos ou até mesmo sinérgicos, para assim, posteriormente, a partir de resultados satisfatórios, realizar estudos complementares, que poderão viabilizar o uso desses derivados como inibidores das enzimas lipase pancreática e/ou α -amilase.

Os valores da porcentagem (%) máxima de inibição de cada derivado da Boc-alanina estão representados na Tabela 5. Nota-se que todos os valores da % inibitória foram obtidos na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, exceto, para os compostos **4b** e **5a** que tiveram sua % de inibição obtida na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando, um excelente efeito sobre a lipase.

Tabela 5 - Valores da % de inibição dos compostos testados frente à lipase

Composto	n	Variação Isomérica	% de inibição	
			Composto	Orlistate
3a	9	<i>L</i>	48,71	43,30
3b	13	<i>L</i>	65,38	43,30
3c	15	<i>L</i>	65,38	43,30
3d	17	<i>L</i>	91,91	43,30
4a	13	<i>D</i>	71,53	25,97
4b	15	<i>D</i>	81,73	43,30
5a	13	<i>D,L</i>	100	25,97
5b	15	<i>D,L</i>	81,81	43,30

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Observar-se que, todos os compostos apresentaram efeito sobre a lipase pancreática, e ainda, que apresentam % de inibição superior ao do Orlistate, exceto, o composto **3a**, para a condição de ensaio realizada.

E ainda, que os enantiômeros dos derivados da Boc-alanina apresentaram diferentes % de inibição entre si. Destaque, para o composto **3d**, um enantiômero puro, apresentou um valor de inibição de 91,91 %, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$.

O composto **5a**, um racemato, na concentração de 200 µg/mL, foi capaz de inibir 100,0 % da atividade da lipase pancreática, e por ser uma mistura racêmica, inicialmente não seria o mais indicado a um novo candidato à inibidor, devido as características da mistura racêmica, já que trata-se de um ensaio de investigação preliminar.

Ressalta-se que, a quiralidade é uma propriedade extremamente importante de uma molécula quiral, especialmente para medicamentos ou candidatos a medicamentos, porque os enantiômeros (ABRAM; JAKUBIEC; KAMIŃSKI, 2019) exibem diferenças marcantes em suas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas, toxicológicas e biológicas (LAPLANTE *et al*, 2011).

Logo, um enantiômero de um medicamento quiral pode ser eficiente para uma determinada doença, enquanto, o outro não pode ser apenas inativo, como também tóxico (JAYAKUMAR; VADIVEL; ANANTHI, 2018). Portanto, os derivados **3d** (*L*) e **4b** (*D*) que apresentaram uma maior % de inibição foram considerados os mais efetivos inicialmente.

Nota-se ainda que, a taxa de inibição foi diretamente proporcional ao aumento da concentração, ou seja, dose-dependente. Entre os *L*-enantiômeros, nota-se que com o aumento da cadeia carbônica lateral (derivados *N*-piperazínicos) a porcentagem de inibição também aumentou, e que o composto **3d**, na concentração de 200 µg/mL, inibiu 91,91 % a atividade da lipase; não houve diferença significativa entre os compostos **3b** e **3c**.

Entre os *D*-enantiômeros, também observou-se o mesmo. Diante do exposto, temos que os enantiômeros, ou seja, tanto a forma *L* quanto a *D*, demonstraram ter efeito sobre a atividade da lipase, logo os dois, são possivelmente são ativos, sendo o **3d** (*L*) com a maior capacidade inibitória. Naturalmente as proteínas são constituídas exclusivamente a partir de *L*-isômeros (PUNDIR; LATA; NARWAL, 2018). Com isso, espera-se que, resultados mais promissores entre os *L*-enantiômeros.

A partir dos resultados obtidos foi possível realizar o cálculo dos valores de IC50, expressos em $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 6). Nota-se que, os derivados apresentaram valores de IC50 inferiores ao inibidor padrão, nas condições de ensaio utilizadas, e destaque para os compostos **3b**, **3c** e **4b** que apresentaram os seguintes valores de IC50: $26,48 \pm 4,04$; $96,20 \pm 2,04$ e $12,68 \pm 1,53$, respectivamente e, conseqüentemente, são potenciais inibidores da lipase.

Tabela 6 - Valores de IC50 dos compostos frente à lipase pancreática

Composto	n	Varição Isomérica	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)
3a	9	<i>L</i>	$194,10 \pm 12,21$
3b	13	<i>L</i>	$26,48 \pm 4,04$
3c	15	<i>L</i>	$116,00 \pm 5,32$
3d	17	<i>L</i>	$96,20 \pm 2,04$
4a	13	<i>D</i>	$119,7 \pm 5,04$
4b	15	<i>D</i>	$12,68 \pm 1,53$
5a	13	<i>D,L</i>	$53,15 \pm 0,09$
5b	15	<i>D,L</i>	$157,4 \pm 15,44$
Orlistate	-	-	$295,30 \pm 11,22$

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Os compostos **3b**, **4a** e **5a** que são enantiômeros demonstraram diferentes perfis de inibição (Tabela 7), e que o *L*-enantiômero apresentou o menor valor de IC50, enquanto a *D*, *L*-enantiômero demonstrou ser capaz de inibir 100,0 % da atividade da lipase pancreática e que o *D*-enantiômero possui o maior valor de IC50, mas ainda assim, menor do que apresentado pelo o Orlistate.

Em uma análise preliminar, o *L*-enantiômero parece ser o mais efetivo frente à lipase pancreática entre os outros derivados da Boc-alanina.

Tabela 7 - Resumo dos resultados dos enantiômeros frente à lipase

Composto	n	Variação isomérica	Lipase pancreática	
			% de inibição	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)
3b	13	<i>L</i>	65,38	26,48 \pm 4,04
4a	13	<i>D</i>	71,53	119,7 \pm 5,04
5a	13	<i>D, L</i>	100	53,15 \pm 0,09
Orlistate	-	-	43,30	295,30 \pm 11,22

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Com base nos valores de porcentagem inibitória e de IC50 dos compostos **3b** (*L*), **3c** (*L*) e **4b** (*D*) demonstraram maior capacidade de inibir a atividade da lipase pancreática. Sendo o composto **4b**, um *D*-enantiômero, o mais efetivo, pois apresentou um excelente valor de IC50: 12,68 \pm 1,53, portanto, o composto mais promissor a um novo inibidor da lipase pancreática, e possivelmente, um candidato a agente antiobesidade.

Visto que, um enantiômero pode interagir com mais eficácia a um determinado local alvo do que o outro, devido à diferença na configuração espacial, assim, o isômero que gera uma resposta terapêutica pela interação com o local-alvo é chamado de eutômero. Já o que se liga menos eficazmente ao local-alvo é referido como o distômero (pode não exibir atividade); ser menos ativo; exibir uma atividade antagonista, ou ainda, outra atividade por meio da interação com outros locais-alvo, ou até mesmo efeitos tóxicos (DE KLERCK; MANGELINGS; VANDER HEYDEN, 2012).

SEKHON (2013) destaca algumas vantagens dos fármacos (enantiômeros puros) como: nível de toxicidade (administração de doses menores); mais simples e mais seletivo perfil farmacodinâmico; menos complexo perfil farmacocinético; menos efeitos colaterais (eliminação de distômeros); redução das interações medicamentosas, menos efeitos adversos, uma forma é mais propensa a interações adversas; carga metabólica reduzida ao longo o sistema enzimático; potencial para um melhor índice terapêutico e relacionamento menos complexo entre a concentração plasmática e o efeito.

A inibição da lipase é um dos mecanismos mais amplamente estudados

para a descoberta de agentes antiobesidade (ALMASRI, 2020). Uma vez que, essa enzima é responsável pela digestão de aproximadamente 50-70 % do total de lipídios da dieta (JARADAT *et al*, 2017). Além disso, possui uma serina no sítio ativo que participa diretamente da reação de hidrólise, e um inibidor covalente que tem como alvo esse sítio é o Orlistate, que possui um anel β -lactona (GHOSH *et al*, 2019).

Inibidores seletivos e covalentes potentes para os membros da família da serina hidrolase baseiam-se em um suporte de carbamato que resulta na carbamilação irreversível do nucleófilo serina do sítio ativo, o quimiótipo de carbamato emergiu como um suporte privilegiado para inibidores potentes da serina hidrolase devido à sua eletrofilicidade moderada e estabilidade hidrolítica após a carbamilação (JOHNSON; WEERAPANA; CRAVATT, 2010).

A ação dos derivados da Boc-alanina sobre a lipase pancreática pode ser explicada a princípio pela interação entre o grupo carbamato do composto teste e a hidroxila (-OH) dos resíduos de serina no sítio catalítico da lipase, formando também um complexo estável, e de mesma maneira como ocorre no mecanismo do Orlistate, levando a inativação da enzima. E ainda, sugere que o *D*-enantiômero foi mais suscetível ao ataque da serina devido a possivelmente a sua configuração espacial e, conseqüentemente, o mais efetivo. Assim, um estudo de *docking* poderia ser conduzido para corroborar com isso.

Os derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados alquilados da *N*-piperazina sintetizados neste trabalho são moléculas estruturalmente inéditas e, conseqüentemente, não há ensaios publicados relacionados a inibição da atividade da lipase pancreática e α -amilase.

Portanto, limita comparações e/ou discussões entre estudos anteriores e o presente trabalho de forma direta e coerente. Recentemente um estudo realizado por EMIMMAL; SANKAR (2019) pôde ser associado ao tema, foi avaliado três séries de ésteres fenacílicos de aminoácidos *N*-substituídos sintéticos quanto à atividade inibitória frente a lipase pancreática, e todos os derivados apresentaram efeito sobre essa enzima.

5.2.1.2 Ensaio de inibição da α -amilase

A partir dos resultados satisfatórios com os derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados alquilados da *N*-piperazina alquilada em relação à atividade da lipase, estes foram submetidos à avaliação do perfil de inibição frente à α -amilase pancreática. Alguns parâmetros essenciais para atividade dessa enzima foram considerados.

Por exemplo, o pH ideal para a atividade hidrolítica da amilase pancreática suína é em torno da neutralidade (pH 7), o íon cálcio (Ca^{2+}) é essencial para sua atividade e estabilidade, ou seja, é necessário para manter sua integridade estrutural e, conseqüentemente, a remoção desse íon leva à redução da termoestabilidade e/ou atividade enzimática (GOPAL; MURALIKRISHNA, 2009).

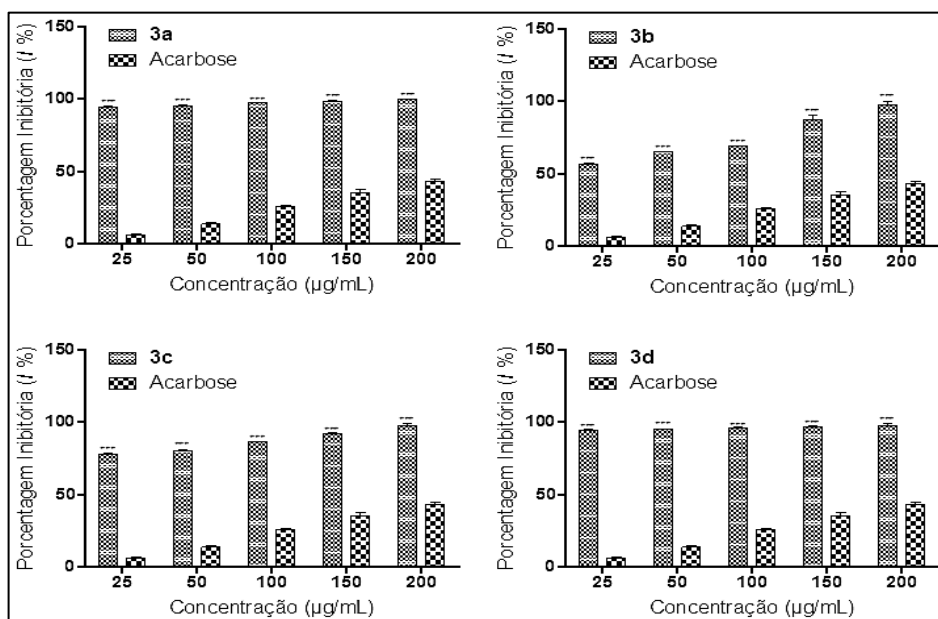
De acordo com MAURUS *et al* (2008) a α -amilase pancreática humana, é ativada alostericamente por íons cloreto (Cl^-), a ligação com cloreto modula a atividade máxima e pH ótimo dessa enzima.

Para a realização dos testes, justificou-se o uso da solução da enzima α -amilase pancreática suína (Sigma®) em tampão TRIS 0,05 mol/L (preparado em solução de CaCl_2 0,010 mol/L e NaCl 0,025 mol/L) com pH ajustado em 7, a fim de garantir a atividade ótima da enzima.

A Acarbose foi utilizada como inibidor padrão (controle positivo), e preparada na mesma faixa de concentração das amostras (25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$).

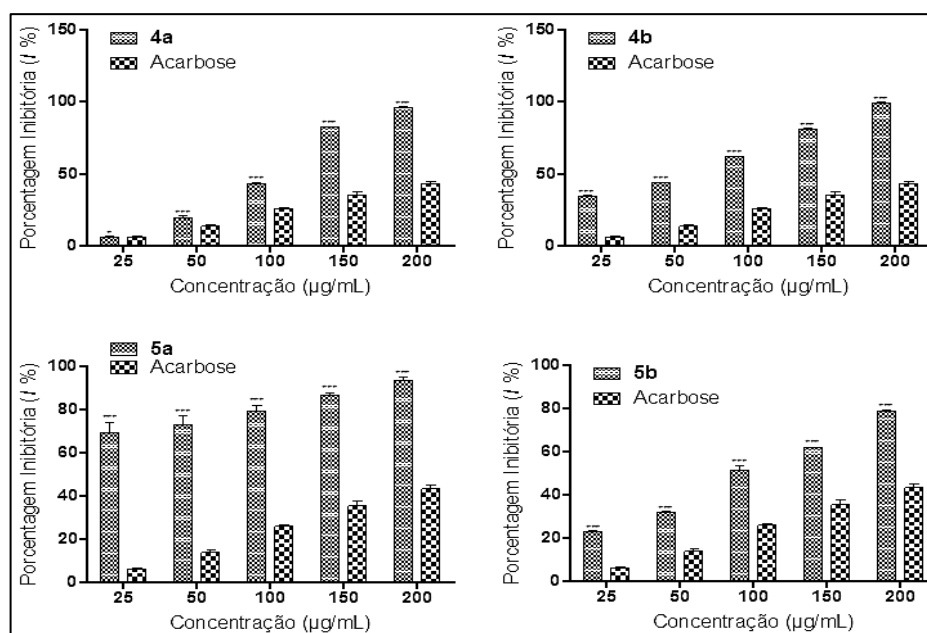
As Figuras 19 e 20 representam os gráficos de concentração *versus* resposta dos derivados, e os valores da % máxima de inibição de cada derivado sintético estão representados na Tabela 8.

Figura 19 - Gráficos de concentração *versus* resposta dos compostos **3a**, **3b**, **3c** e **3d** frente à α -amilase pancreática



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Figura 20 - Gráficos de concentração *versus* resposta dos compostos **4a**, **4b**, **5a** e **5b** frente à α -amilase pancreática



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Tabela 8- Valores da % de inibição dos compostos testados frente à α -amilase

Composto	n	Variação Isomérica	% de inibição	
			Composto	Acarbose
3a	9	<i>L</i>	100	43,30
3b	13	<i>L</i>	97,58	43,30
3c	15	<i>L</i>	97,70	43,30
3d	17	<i>L</i>	97,70	43,30
4a	13	<i>D</i>	96,28	43,30
4b	15	<i>D</i>	99,09	43,30
5a	13	<i>D,L</i>	93,80	43,30
5b	15	<i>D,L</i>	78,76	43,30

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Apesar de não haver semelhanças/características estruturais entre a Acarbose e os derivados da Boc-alanina, nota-se que ainda sim, estes demonstraram efeito sobre a atividade da α -amilase.

Observar-se que, a taxa de inibição foi diretamente proporcional ao aumento da concentração, ou seja, dose-dependente. E ainda, que entre os *L*-enantiômeros (pouco expressiva) e a mistura racêmica, a % inibitória diminuiu com o aumento da cadeia carbônica lateral (derivados *N*-piperazínicos).

Assim, o composto **3a** (menor cadeia carbônica lateral), na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, inibiu 100,0 % a atividade da α -amilase, não havendo diferença significativa entre os compostos **3c** e **3d**. Entretanto, entre os *D*-enantiômeros o aumento da % inibitória foi proporcional ao aumento da cadeia carbônica lateral, e o composto **4b** apresentou maior porcentagem de inibição de 99,09 %, na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$.

A partir dos resultados obtidos dos gráficos (concentração *versus* resposta) foi possível realizar o cálculo dos valores de IC₅₀, expressos em $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 9). Os valores são apresentados como média \pm E.P.M (n = 3). $p < 0,001$ após análise de variância seguida do teste de Tukey em relação à Acarbose.

Tabela 9 - Valores de IC50 dos compostos frente à α -amilase

Composto	n	Varição Isomérica	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)
3a	9	<i>L</i>	192,00 \pm 4,20
3b	13	<i>L</i>	232,00 \pm 12,45
3c	15	<i>L</i>	222,07 \pm 11,32
3d	17	<i>L</i>	100,70 \pm 0,54
4a	13	<i>D</i>	180,80 \pm 17,91
4b	15	<i>D</i>	134,50 \pm 1,55
5a	13	<i>D,L</i>	259,90 \pm 28,74
5b	15	<i>D,L</i>	285,70 \pm 32,53
Acarbose	-	-	448,30 \pm 13,26

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Nota-se que a partir dos gráficos a faixa de concentração utilizada no ensaio para os compostos **3a**, **3b**, **3c**, **3d** e **5a** foram ineficientes para análise e cálculo da IC50, logo, sendo necessário a utilização de uma faixa de concentração mais ampla (5,10, 25, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$, por exemplo).

Desta forma, para análise da IC50, foi considerado os resultados obtidos dos compostos **4a**, **4b** e **5b**, que apresentaram respectivamente os seguintes valores de IC50: 180,80 \pm 17,91, 134,50 \pm 1,55 e 285,70 \pm 32,53 $\mu\text{g/mL}$. Todos inferiores ao do inibidor padrão, nas condições de ensaio utilizadas. Destaque para o composto **4b** (*D*) que apresentou o menor valor de IC50 (134,50 \pm 1,55 $\mu\text{g/mL}$). E conseqüentemente um potencial inibidor da α -amilase pancreática.

Ressalta-se que, uma abordagem promissora para o controle do diabetes, em especial do diabetes tipo 2, é diminuir a hiperglicemia pós-prandial pela inibição das enzimas que hidrolisam os carboidratos no trato gastrointestinal (LI *et al*, 2018).

A α -amilase pancreática é uma endo-hidrolase que degrada o amido em vários oligossacarídeos, liberando açúcares mais simples que são convertidos em glicose por outras enzimas (α -glicosidases) para absorção intestinal, portanto, a inibição da atividade da α -amilase resulta na diminuição da biodisponibilidade de oligossacarídeos e açúcares absorvíveis e,

consequentemente, na diminuição da hiperglicemia pós-prandial. E inibidores dessa enzima, como a Acarbose, atuam de forma competitiva e reversível (MATTIO *et al*, 2019). Uma vez que, são estruturalmente semelhantes aos oligossacarídeos naturais (ROSAK; MERTES, 2012).

Apesar de ser comumente utilizada para o tratamento do diabetes tipo 2, o uso da Acarbose, está relacionado a alguns efeitos colaterais, que incluem flatulência e dores abdominais e, assim, havendo uma necessidade em desenvolver moléculas potentes e com menos efeitos colaterais, ou seja, com melhor custo benefício (HAMEED *et al*, 2019).

Desta maneira, com base nos valores de % inibitória (99,09 %) e de IC50 ($134,50 \pm 1,55 \mu\text{g/mL}$), nota-se que o composto **4b** (*D*) demonstrou maior capacidade de inibir a atividade da α -amilase, portanto, o composto mais promissor a um novo inibidor da α -amilase, e possivelmente, um candidato a agente antidiabético.

A capacidade dos derivados da Boc-alanina de inibir a α -amilase, pode estar relacionada inicialmente pela presença do heterociclo que contém dois átomos de nitrogênios, que poderiam evitar a ligação enzima-substrato e, consequentemente, a clivagem em oligossacarídeos.

BRAYER *et al* (2000) destacam que a forte inibição das amilases pela a Acarbose é atribuído tanto a planaridade parcial da valienamina, que provavelmente imita o anel achatado de glicose no oxocarbênio semelhante a íon estado de transição durante a clivagem do amido, e para a presença de fortes interações eletrostáticas entre o grupos carboxila no sítio ativo e o nitrogênio protonado do inibidor.

Nota-se que, os enantiômeros apresentaram diferentes resultados frente às enzimas lipase pancreática e α -amilase, e o *D*-enantiômero foi mais efetivo para ambas as enzimas. E ainda, que as diferenças estruturais entre os derivados da Boc-alanina e a Acarbose por si só não influenciaram na capacidade de inibição, sugerindo que há outros aspectos envolvidos no mecanismo de ação e, consequentemente, no perfil de inibição da enzima.

Um aspecto importante dos resultados obtidos foi à efetividade de um único derivado da Boc-alanina tanto para a lipase quanto para a α -amilase, simultaneamente, já que o estudo visa o controle das desordens metabólicas de uma maneira geral, inclusive a síndrome metabólica.

A Tabela 10 resume os resultados do composto **4b** (*D*-enantiômero) que apresentou ação para as duas enzimas, com excelentes resultados, inclusive em relação aos inibidores de referência, nas condições de ensaio utilizadas.

Embora *D*-aminoácidos (*D*-AAs) não existam na natureza amplamente como seus *L*-enantiômeros, os que ocorrem naturalmente possuem funções diferentes e específicas em diferentes organismos, como o papel estrutural como componentes do peptídeoglicano da parede celular de bactérias, além de neuromoduladores no cérebro de mamíferos (POLLEGIONI; ROSINI; MOLLA, 2020).

Os *D*-AAs estão se tornando cada vez mais importantes blocos de construção de produtos farmacêuticos e químicos finos, além de serem componentes-chave em antibióticos β -lactâmicos, insumos para fertilidade, anticoagulantes e pesticidas; antibióticos semissintéticos, como ampicilina e amoxicilina, que contêm *D*-fenilglicina e *D*- ρ -hidroxi-fenilglicina, respectivamente (POLLEGIONI; ROSINI; MOLLA, 2020).

Tabela 10 - Resumo dos resultados do composto **4b** frente à lipase e α -amilase

Composto	Lipase		α -amilase	
	% de inibição	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	% de inibição	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)
4b	81,73	12,68 \pm 1,53	99,09	134,50 \pm 1,55
Orlistate	43,30	295,30 \pm 11,22	-	-
Acarbose	-	-	43,30	448,30 \pm 13,26

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

6 CONCLUSÃO

- Foram sintetizados 15 compostos: 3 derivados da Boc-alanina (**1a-c**), 4 derivados da *N*-piperazina alquilada (**2a-d**) e 8 derivados da Boc-alanina conjugada aos derivados da *N*-piperazina alquilada (**3a-d**; **4a-b** e **5a-b**);
- Os derivados da Boc-alanina com variação isomérica (*L*, *D* e *D, L*) conjugados aos derivados da *N*-piperazina-alkilada são moléculas estruturalmente inéditas (sítio de busca *SciFinder*) até a presente data;
- Os métodos utilizados para o preparo tanto para os derivados da Boc-alanina quanto para os derivados da piperazina mostraram-se eficiente e com bons rendimentos, como segue:
 - I. derivados da Boc-alanina: *L*-alanina, *D*-alanina e *D, L*-alanina foram obtidos com rendimento de 93, 87 e 98%, respectivamente;
 - II. derivados da piperazina: com rendimentos que variaram entre 78 a 94%;
- A técnica utilizada para o preparo dos derivados da Boc-alanina conjugados aos derivados alquilados da *N*-piperazina também se mostrou eficiente e reprodutiva;
- A partir da análise das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (1D e 2D); Infravermelho e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral foi possível efetuar a caracterização e, conseqüentemente a elucidação estrutural do composto **3b**, utilizado como exemplo para análise total;
- Além da Espectrometria de Massas de Alta Resolução que definiu a massa molecular e a fórmula estrutural exatas do composto em questão;

- Todos os derivados da Boc-alanina apresentaram efeito sobre a atividade da lipase pancreática, com base nos valores de IC₅₀ ($12,68 \pm 1,53 \mu\text{g/mL}$) e de porcentagem inibitória (81,81 %) e por ser um enantiômero puro, acredita-se que o derivado **4b** seja um potente inibidor da lipase pancreática e promissor candidato a agente antiobesidade;
- Acredita-se que ação dos derivados da Boc-alanina sobre a lipase pode estar relacionada com a interação entre o grupo carbamato destes derivados e a hidroxila (-OH) dos resíduos de serina no sítio catalítico da lipase, formando também um complexo estável, levando a inativação da enzima;
- Todos os derivados da Boc-alanina apresentaram efeito sobre a atividade da α -amilase, destaque para **4b** (*D*) com porcentagem de inibição de 99,09 % e IC₅₀ de $134,50 \pm 1,55 \mu\text{g/mL}$, portanto, o composto mais promissor a um novo inibidor da α -amilase, e possivelmente, um candidato a agente antidiabético.
- Acredita-se que a ação dos derivados da Boc-alanina sobre a α -amilase, pode está associada à presença da piperazina (composto heterocíclico com dois átomos de nitrogênio em posições opostas em um anel de seis membros), e estes poderiam influenciar na ligação enzima-substrato, e assim, impedindo a clivagem do amido em oligossacarídeos;
- O composto **4b**, um *D*-enantiômero, apresentou efetividade para ambas as enzimas e, assim, um promissor candidato tanto a agente antiobesidade e antidiabético;
- Conseqüentemente, representando um promissor candidato para a minimização e/ou controle do impacto das desordens metabólicas de maneira geral, inclusive a síndrome metabólica;
- O estudo demonstra toda a versatilidade dos aminoácidos na síntese (a

partir da inserção de grupos com propriedades físico-químicas e biológicas importantes) e, conseqüentemente, no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, inclusive antiobesidade e antidibéticos;

- Ressalta-se que, há necessidade de estudos complementares que possam verificar mais especificamente o perfil de efetividade de cada derivado da Boc-alanina, como por exemplo:
 - Investigação da estabilidade frente ao fluído gástrico;
 - Toxicidade celular e/ou ensaio *in vivo*,
 - Avaliação da afinidade dos derivados da Boc-alanina à lipase pancreática e α -amilase por meio de estudo de *docking* molecular.

7 REFERÊNCIAS

ABRAM, M., JAKUBIEC, M., KAMIŃSKI, K. Chirality as an important factor for the development of new antiepileptic drugs. **ChemMedChem**, v.14, n.20, p.1744-1761, 2019.

ACHOURI, N., TOMÀS-GAMISANS, M., TRIKI, S., VALERO, F., MILED, N., FENDRI, A., SMICHI, N. Dissecting the Interaction Deficiency of a Cartilaginous Fish Digestive Lipase with Pancreatic Colipase: Biochemical and Structural Insights. **BioMed Research International**, v.2020, 2020.

ADAIR, J. H., SUVACI, E., SINDEL, J. Surface and Colloid Chemistry. **Encyclopedia of Materials: Science and Technology**, p.1-10, 2001.

ADAMSKA, E., OSTROWSKA, L., GÓRSKA, M., KRĘTOWSKI, A. The role of gastrointestinal hormones in the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes. **Przegląd Gastroenterologiczny**, v.9, n.2, p.69, 2014.

ADEYEMI, W. J., OLAYAKI, L. A., ABDUSSALAM, T. A., TORIOLA, A. P., OLOWU, A. B., YAKUB, A. J., RAJI, A. O. Investigation of the effects of dietary modification in experimental obesity: low dose of virgin coconut oil has a potent therapeutic value. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.126, p.110110, 2020.

AGUILAR-SALINAS, C. A.; VIVEROS-RUIZ, T. Recent advances in managing/understanding the metabolic syndrome. **F1000Research**, v.8, 2019.

ALBAYATI, S. H., MASOMIAN, M., ISHAK, S. N. H., MOHAMAD ALI, M. S. B., THEAN, A. L., SHARIFF, M., RAJA ABD RAHMAN, R. N. Z. Main Structural Targets for Engineering Lipase Substrate Specificity. **Catalysts**, v.10, n.7, p.747, 2020.

ALMASRI, I. M. Computational approaches for the discovery of natural pancreatic lipase inhibitors as antiobesity agents. **Future Medicinal Chemistry**, v.12, n.8, p.741-757, 2020.

ANIL, S. M., RAJEEV, N., KIRAN, K. R., SWAROOP, T. R., MALLESHA, N., SHOBITH, R., SADASHIVA, M. P. Multi-pharmacophore Approach to Bio-therapeutics: Piperazine Bridged Pseudo-peptidic Urea/Thiourea Derivatives as Anti-oxidant Agents. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v.26, n.1, p.151-158, 2020.

ANJUM, S.; BATHLA, M.; PANCHAL, S. Prevalence and predictors of metabolic syndrome in drug naïve bipolar patients. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v.13, n.1, p.12, 2019.

AUGUSTINE, J. K., NAIK, Y. A., VAIRAPERUMAL, V., NARASIMHAN, S. Di-tert-butyl dicarbonate: a versatile carboxylating reagent. **Tetrahedron**, v.65, n.1, p.134-138, 2009.

AWWAD, A., POUCHERET, P., IDRES, A. Y., BIDEL, L., TOUSCH, D. The bitter Asteraceae: An interesting approach to delay the metabolic syndrome progression. **NFS Journal**, v.18, p.29-38, 2020.

AYKUL, S., MARTINEZ-HACKERT, E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. **Analytical Biochemistry**, v.508, p.97-103, 2016.

AZAD, S. Amino Acids: Its types and uses. **International Journal of Clinical and Diagnostic Pathology**, v.1, n.1, p.13-16, 2018.

AZHARUDDIN, M., KAPUR, P., ADIL, M., GHOSH, P., SHARMA, M. The impact of sleep duration and sleep quality on glycaemic control in Asian population with type 2 diabetes mellitus: A systematic literature review and meta-analysis of observational studies. **Clinical Epidemiology and Global Health**, 2020.

BABU, A. R., RAJU, G., CHANDER, C. P., BABU, B. S., SRINIVAS, R., SHARMA, G. V. M. Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Study of Protonated and Alkali-Cationized α/ϵ -Hybrid Peptides: Differentiation of a Pair of Dipeptide Positional Isomers. **European Journal of Mass Spectrometry**, v.22, n.4, p.181-191, 2016.

BAYNES, H. W. Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Metabolism**, v.6, n.5, p.1-9, 2015.

BÉNAROUCHE, A.; POINT, V.; CARRIÈRE, F.; CAVALIER, J. F. Using the reversible inhibition of gastric lipase by orlistat for investigating simultaneously lipase adsorption and substrate hydrolysis at the lipid-water interface. **Biochimie**, v.101, p.221-231, 2014.

BISCHOFF, H. B. A. G. Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. **European Journal of Clinical Investigation**, v.24, p.3-10, 1994.

BISCHOFF, R.; SCHLÜTER, H. Amino acids: chemistry, functionality and selected non-enzymatic post-translational modifications. **Journal of Proteomics**, v.75, n.8, p.2275-2296, 2012.

BLAKE, M. R.; KOKA, R.; WEIMER, B. C. A semiautomated reflectance colorimetric method for the determination of lipase activity in milk. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.7, p.1164-1171, 1996.

BLASKOVICH, M. A. Unusual amino acids in medicinal chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.59, n.24, p.10807-10836, 2016.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v.15, n.5, p.288-298, 2019.

BRAYER, G. D., SIDHU, G., MAURUS, R., RYDBERG, E. H., BRAUN, C., WANG, Y., WITHERS, S. G. Subsite mapping of the human pancreatic α -amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques. **Biochemistry**, v. 39, n. 16, p. 4778-4791, 2000.

BROOKS, H. W.; GUIDA, W.; DANIEL, K. The significance of chirality in drug design and development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.11, n.7, p.760-770, 2011.

BROWNLEE, I. A., FORSTER, D. J., WILCOX, M. D., DETTMAR, P. W., SEAL, C. J., PEARSON, J. P. Physiological parameters governing the action of pancreatic lipase. **Nutrition Research Reviews**, v.23, n.1, p.146-154, 2010.

BUCHHOLZ, T. MELZIG, M. F. Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. **Planta Medica**, v.81, n.10, p.771-783, 2015.

BUKHARI, D. A. M., SIDDIQUI, M. J., SHAMSUDIN, S. H., RAHMAN, M. M., SO'AD, S. Z. M. α -Glucosidase inhibitory activity of selected Malaysian plants. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v.9, n.3, p.164, 2017.

CANAJ, A. B., KAKARONI, F. E., COLLET, A., MILIOS, C. J. α -Amino acids: Natural and artificial building blocks for discrete polymetallic clusters. **Polyhedron**, v.151, p.1-32, 2018.

CHAUDHURY, A., DUVOOR, C., REDDY DENDI, V. S., KRALETI, S., CHADA, A., RAVILLA, R., SASAPU, A. Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. **Frontiers in Endocrinology**, v.8, p.6, 2017.

CICERO, A. F. G.; COLLETTI, A. Role of phytochemicals in the management of metabolic syndrome. **Phytomedicine**, v.23, n.11, p.1134-1144, 2016.

CHERAIET, Z., OUARNA, S., HESSAINIA, S., BERREDJEM, M., AOUF, N. E. *N*-tert-Butoxycarbonylation of Structurally Diverse Amines and Sulfamides under Water-Mediated Catalyst-Free Conditions. **International Scholarly Research Network Organic Chemistry**, v.2012, 2012.

CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, v.92, p.6-10, 2019.

CHU, D. T., NGUYET, N. T. M., DINH, T. C., LIEN, N. V. T., NGUYEN, K. H., NGOC, V. T. N., TRAN, Q. H. An update on physical health and economic consequences of overweight and obesity. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v.12, n.6, p.1095-1100, 2018.

DE CASTRO, Pedro P. Uma Abordagem Organocatalítica utilizando o (+/-)-ácido canforsulfônico, para a síntese de dipeptídeos de azalactonas, 136f. Dissertação (Mestrado), **Universidade Federal de Juiz de Fora**, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2016.

DE CASTRO, P. P., RIMULO, I. M., DE ALMEIDA, A. M., DINIZ, R., AMARANTE, G. W. Brønsted Acid-Catalyzed Epimerization-Free Preparation of Dual-Protected Amino Acid Derivatives. **ACS Omega**, v.2, n.6, p.2967-2976, 2017.

DE CASTRO, P. P., CAMPOS, D. L., PAVAN, F. R., AMARANTE, G. W. Dual-protected amino acid derivatives as new antitubercular agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v.92, n.2, p.1576-1580, 2018.

DE CASTRO, P. P., SIQUEIRA, R. P., CONFORTE, L., FRANCO, C. H., BRESSAN, G. C., AMARANTE, G. W. Cytotoxic Activity of Synthetic Chiral Amino Acid Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.31, n.1, p.193-200, 2020.

DE KLERCK, K.; MANGELINGS, D.; VANDER HEYDEN, Y. Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.69, p.77-92, 2012.

DUARTE, A. M., GUARINO, M. P., BARROSO, S., GIL, M. M. Phytopharmacological Strategies in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. **Foods**, v.9, n.3, p.271, 2020.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v.44, n.3, p.210-230, 2009.

EMIMMAL, M. E. S., SANKAR, V. Synthesis and Pancreatic Lipase Inhibitory Activity of Phenacyl Esters of *N*-Aroyl Amino Acids. **Current Enzyme Inhibition**, v.15, n.2, p.133-143, 2019.

ERCAN, P.; EL, S. N. Inhibitory effects of chickpea and *Tribulus terrestris* on lipase, α -amylase and α -glucosidase. **Food Chemistry**, v.205, p.163-169, 2016.

EVERS, A., HAACK, T., LORENZ, M., BOSSART, M., ELVERT, R., HENKEL, B., LORENZ, K. Design of novel exendin-based dual glucagon-like peptide 1 (GLP-

1)/glucagon receptor agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.60, n.10, p.4293-4303, 2017.

FERNANDO, I. P. S., RYU, B., AHN, G., YEO, I. K., JEON, Y. J. Therapeutic potential of algal natural products against metabolic syndrome: A review of recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, v.97, p.286-299, 2020.

GADDE, K. M., MARTIN, C. K., BERTHOUD, H. R., HEYMSFIELD, S. B. Obesity: pathophysiology and management. **Journal of The American College of Cardiology**, v.71, n.1, p.69-84, 2018.

GHOSH, A. K.; BRINDISI, M. Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.58, n.7, p.2895-2940, 2015.

GHOSH, A. K., SAMANTA, I., MONDAL, A., LIU, W. R. Covalent inhibition in drug discovery. **ChemMedChem**, v.14, n.9, p.889, 2019.

GIWA, A. M., AHMED, R., OMIDIAN, Z., MAJETY, N., KARAKUS, K. E., OMER, S. M., HAMAD, A. R. A. Current understandings of the pathogenesis of type 1 diabetes: Genetics to environment. **World Journal of Diabetes**, v.11, n.1, p.13, 2020.

GLISAN, S. L., GROVE, K. A., YENNAWAR, N. H., LAMBERT, J. D. Inhibition of pancreatic lipase by black tea theaflavins: Comparative enzymology and *in silico* modeling studies. **Food Chemistry**, v.216, p.296-300, 2017.

GOGOI, A., MAZUMDER, N., KONWER, S., RANAWAT, H., CHEN, N. T., ZHUO, G. Y. Enantiomeric recognition and separation by chiral nanoparticles. **Molecules**, v.24, n.6, p.1007, 2019.

GONÇALVES BRASIL JÚNIOR, A. Desenvolvimento de processos de bioconjugação empregando pontos quânticos fluorescentes de semicondutores II-VI. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2010.

GOPAL, A. B.; MURALIKRISHNA, G. Porcine pancreatic α -amylase and its isoforms: Purification and kinetic studies. **International Journal of Food**

Properties, v.12, n.3, p.571-586, 2009.

GOSWAMI, D.; DE, S.; BASU, J. K. Effects of process variables and additives on mustard oil hydrolysis by porcine pancreas lipase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.29, n.3, p.449-460, 2012.

GRISHIN, D. V., ZHDANOV, D. D., POKROVSKAYA, M. V., SOKOLOV, N. N. *D*-amino acids in nature, agriculture and biomedicine. **All Life**, v.13, n.1, p.11-22, 2020.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.68, n.1, p.1-21, 2011.

HALIMEHJANI, A. Z.; BADALI, E. DABCO bond cleavage for the synthesis of piperazine derivatives. **RSC Advances**, v.9, n.62, p.36386-36409, 2019.

HAMEED, S., SERAJ, F., RAFIQUE, R., CHIGURUPATI, S., WADOOD, A., REHMAN, A. U., KHAN, K. M. Synthesis of benzotriazoles derivatives and their dual potential as α -amylase and α -glucosidase inhibitors *in vitro*: Structure-activity relationship, molecular docking, and kinetic studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.183, p.111677, 2019.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v.27, n.6, p.782-798, 2009.

HOLZER, P.; REICHMANN, F.; FARZI, A. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut–brain axis. **Neuropeptides**, v.46, n.6, p.261-274, 2012.

HUANG, R., ZHANG, Y., SHEN, S., ZHI, Z., CHEN, H., CHEN, S., YE, X. Antioxidant and pancreatic lipase inhibitory effects of flavonoids from different citrus peel extracts: an *in vitro* study. **Food Chemistry**, p.126785, 2020.

HUNG, W. C., LING, X. H., CHANG, C. C., HSU, H. F., WANG, S. W., LEE, Y. C., HOUNG, J. Y. Inhibitory effects of *Siegesbeckia orientalis* extracts on

advanced glycation end product formation and key enzymes related to metabolic syndrome. **Molecules**, v.22, n.10, p.1785, 2017.

IANIRO, G., PECERE, S., GIORGIO, V., GASBARRINI, A., CAMMAROTA, G. Digestive enzyme supplementation in gastrointestinal diseases. **Current Drug Metabolism**, v.17, n.2, p.187-193, 2016.

INGALE, A. P., MORE, V. K., GANGARDE, U. S., SHINDE, S. V. Chemoselective *N-tert*-butyloxycarbonylation of amines in glycerol. **New Journal of Chemistry**, v.42, n.12, p.10142-10147, 2018.

INOUE, Y., QIN, B., POTI, J., SOKOL, R., GORDON-LARSEN, P. Epidemiology of obesity in adults: latest trends. **Current Obesity Reports**, v.7, n.4, p.276-288, 2018.

JANEČEK, Š.; SVENSSON, B.; MACGREGOR, E. A. A remote but significant sequence homology between glycoside hydrolase clan GH-H and family GH31. **FEBS letters**, v.581, n.7, p.1261-1268, 2007.

JARADAT, N., ZAID, A. N., HUSSEIN, F., ZAQZOUQ, M., ALJAMMAL, H., AYESH, O. Anti-lipase potential of the organic and aqueous extracts of ten traditional edible and medicinal plants in Palestine; a comparison study with orlistat. **Medicines**, v.4, n.4, p.89, 2017.

JAYAKUMAR, R., VADIVEL, R., ANANTHI, N. Role of chirality in drugs. **Organic & Medicinal Chemistry International Journal**, v.5, n.3, p.1-6, 2018.

JOHNSON, D. S., WEERAPANA, E., CRAVATT, B. F. Strategies for discovering and de-risking covalent, irreversible enzyme inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v.2, n.6, p.949-964, 2010.

KAILA, B.; RAMAN, M. Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v.22, 2008.

KAISER, C. R. 2D NMR: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v.23, n.2, p.231-236, 2000.

KAJARIA, D., RANJANA, J. T., TRIPATHI, Y. B., TIWARI, S. *In-vitro* α amylase and glycosidase inhibitory effect of ethanolic extract of antiasthmatic drug - Shirishadi. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v.4, n.4, p.206, 2013.

KAWAGUCHI, N., DATE, K., SUZUKI, Y., TOMITA, C., NARADATE, R., HIGAMI, T., OGAWA, H. A novel protocol for the preparation of active recombinant human pancreatic lipase from *Escherichia coli*. **The Journal of Biochemistry**, v.164, n.6, p.407-414, 2018.

KHURSHEED, R., SINGH, S. K., WADHWA, S., KAPOOR, B., GULATI, M., KUMAR, R., DUA, K. Treatment strategies against diabetes: Success so far and challenges ahead. **European Journal of Pharmacology**, v.862, p.172625, 2019.

KIM, G. N., SHIN, M. R., SHIN, S. H., LEE, A. R., LEE, J. Y., SEO, B. I., ROH, S. S. Study of antiobesity effect through inhibition of pancreatic lipase activity of *Diospyros kaki* fruit and *Citrus unshiu* peel. **BioMed Research International**, v.2016, 2016.

KUNCHA, S. K.; KRUPARANI, S. P.; SANKARANARAYANAN, R. Chiral checkpoints during protein biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.294, n.45, p.16535-16548, 2019.

LAPLANTE, S. R., FADER, L. D., FANDRICK, K. R., FANDRICK, D. R., HUCKE, O., KEMPER, R., EDWARDS, P. J. Assessing atropisomer axial chirality in drug discovery and development. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.54, n.20, p.7005-7022, 2011.

LEAN, M. E. J.; MALKOVA, D. Altered gut and adipose tissue hormones in overweight and obese individuals: cause or consequence?. **International Journal of Obesity**, v.40, n.4, p.622-632, 2016.

LI, C., BEGUM, A., NUMAO, S., PARK, K. H., WITHERS, S. G., BRAYER, G. D. Acarbose Rearrangement Mechanism Implied by the Kinetic and Structural Analysis of Human Pancreatic α -Amylase in Complex with Analogues and Their

Elongated Counterparts. **Biochemistry**, v.44, n.9, p.3347-3357, 2005.

LI, K., YAO, F., XUE, Q., FAN, H., YANG, L., LI, X., LIU, Y. Inhibitory effects against α -glucosidase and α -amylase of the flavonoids-rich extract from *Scutellaria baicalensis* shoots and interpretation of structure–activity relationship of its eight flavonoids by a refined assign-score method. **Chemistry Central Journal**, v.12, n.1, p.82, 2018.

LIM, S. M., GOH, Y. M., KUAN, W. B., & LOH, S. P. Effect of germinated brown rice extracts on pancreatic lipase, adipogenesis and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids in Health and Disease*. **Lipids in Health and Disease**, v.13, n.1, p.1-9, 2014.

LIN, L., LIN, H., ZHANG, M., DONG, X., YIN, X., QU, C., NI, J. Types, principle, and characteristics of tandem high-resolution mass spectrometry and its applications. **RSC advances**, v.5, n.130, p.107623-107636, 2015.

LIU, T. T., LIU, X. T., CHEN, Q. X., SHI, Y. Lipase Inhibitors for Obesity: A Review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.128, p.110314, 2020.

LOTTI, M.; ALBERGHINA, L. Lipases: molecular structure and function. In: **Industrial Enzymes**. Springer, Dordrecht, p.263-281, 2007.

LONGO, M., ZATTERALE, F., NADERI, J., PARRILLO, L., FORMISANO, P., RACITI, G. A., MIELE, C. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.9, p.2358, 2019.

LUNAGARIYA, N. A.; PATEL, N. K.; JAGTAP, S. C.; BHUTANI, K. K. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. **Journal Experimental and Clinical Sciences**, v.13, p. 897–921, 2014.

MARÍN-PEÑALVER, J. J., MARTÍN-TIMÓN, I., SEVILLANO-COLLANTES, C., DEL CAÑIZO-GÓMEZ, F. J. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v.7, n.17, p.354, 2016.

MARRELLI, M.; STATTI, G.; CONFORTI, F. A Review of Biologically Active Natural Products from Mediterranean Wild Edible Plants: Benefits in the Treatment of Obesity and Its Related Disorders. **Molecules**, v.25, n.3, p.649, 2020.

MATTIO, L. M., MARENGO, M., PARRAVICINI, C., EBERINI, I., DALLAVALLE, S., BONOMI, F., PINTO, A. Inhibition of pancreatic α -amylase by resveratrol derivatives: biological activity and molecular modelling evidence for cooperativity between viniferin enantiomers. **Molecules**, v.24, n.18, p.3225, 2019.

MAURUS, R., BEGUM, A., WILLIAMS, L. K., FREDRIKSEN, J. R., ZHANG, R., WITHERS, S. G., BRAYER, G. D. Alternative Catalytic Anions Differentially Modulate Human α -Amylase Activity and Specificity. **Biochemistry**, v.47, n.11, p.3332-3344, 2008.

MCCAFFERTY, B. J.; HILL, J. O.; GUNN, A. J. Obesity: Scope, Lifestyle Interventions, and Medical Management. **Techniques in Vascular and Interventional Radiology**, v.23, n.1, p.100653, 2020.

MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. **Food & function**, v.1, n.1, p.32-59, 2010.

MELO, E. B.; CARVALHO, I. alpha and beta-glucosidases as molecular targets for drug development. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 840-843, 2006.

MENDES, A. A., OLIVEIRA, P. C., DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.78, p.119-134, 2012.

MESA, M., PEREAÑEZ, J. A., PRECIADO, L. M., BERNAL, C. How the Triton X-100 modulates the activity/stability of the *Thermomyces lanuginose* lipase: Insights from experimental and molecular docking approaches. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.120, p.2410-2417, 2018.

MUKHERJEE, A. K. Hydrophobic-hydrophilic interaction in lipase catalytic triad and possibility of a cofactor mediated catalysis. **International Journal of Food Sciences and Nutrition Basingstoke**, v.4, n.3, p.84, 2014.

MOHAPATRA, D.K.; DATTA, A. Di-*tert*-butyl dicarbonate: A novel reagent for the efficient synthesis of dipeptides under mild conditions. Di-*tert*-butyl dicarbonate: A novel reagent for the efficient synthesis of dipeptides under mild conditions. **The Journal of Organic Chemistry**, v.64, n.18, p.6879-6880, 1999.

MONTALBETTI, C.A.G.N; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v.61, n.46, p.10827-10852, 2005.

NGUYEN, L. A., HE, H., PHAM-HUY, C. Chiral drugs: an overview. **International Journal of Biomedical Science**, v.2, n.2, p.85, 2006.

OBOH, G., OGUNSUYI, O. B., OGUNBADEJO, M. D., ADEFEGHA, S. A. Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.24, n.3, p.627-634, 2016.

OH, T. J. The role of anti-obesity medication in prevention of diabetes and its complications. **Journal of Obesity & Metabolic Syndrome**, v.28, n.3, p.158, 2019.

OKAMOTO, Y.; IKAI, T. Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers. **Chemical Society Reviews**, v.37, n.12, p.2593-2608, 2008.

OMBRA, M. N., D'ACIERNO, A., NAZZARO, F., SPIGNO, P., RICCARDI, R., ZACCARDELLI, M., FRATIANNI, F. Alpha-amylase, α -glucosidase and lipase inhibiting activities of polyphenol-rich extracts from six common bean cultivars of Southern Italy, before and after cooking. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.69, n.7, p.824-834, 2018.

ORMAZABAL, V., NAIR, S., ELFEKY, O., AGUAYO, C., SALOMON, C., ZUÑIGA, F. A. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. **Cardiovascular Diabetology**, v.17, n.1, p.122, 2018.

OUELLETTE, R. J.; RAWN, J. D. 10-Nucleophilic Substitution and Elimination Reactions. **Organic Chemistry**, p.333-356, 2014.

OUELLETTE, R. J., RAWN, J. D. Alkanes and Cycloalkanes. **Principles of Organic Chemistry**, p. 65–94, 2015.

PARK, J. Y., KIM, C. S., PARK, K. M., CHANG, P. S. Inhibitory characteristics of flavonol-3-O-glycosides from *Polygonum aviculare* L.(common knotgrass) against porcine pancreatic lipase. **Scientific Reports**, v.9, n.1, p.1-10, 2019.

PATHAK, V., PATHAK, N. M., O'NEILL, C. L., GUDURIC-FUCHS, J., MEDINA, R. J. Therapies for type 1 diabetes: current scenario and future perspectives. **Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes**, v.12, p.1-13, 2019.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

PEREIRA, C. A.; PEREIRA, L. L. S.; CORRÊA, A. D.; CHAGAS, P. M. B.; SOUZA, S. P.; SANTOS, C. D. Inibição de enzimas digestivas por extratos de pó comercial de *Hoodia gordonii* utilizado no tratamento da obesidade. **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, n.3, p.265-269, 2011.

PETRAKIS, D., MARGINĂ, D., TSAROUHAS, K., TEKOS, F., STAN, M., NIKITOVIC, D., TSATSAKIS, A. Obesity-a risk factor for increased COVID-19 prevalence, severity and lethality. **Molecular Medicine Reports**, v.22, n.1, p.9-19, 2020.

PINTO, É. S. M.; DORN, M.; FELTES, B. C. The tale of a versatile enzyme: Alpha-amylase evolution, structure, and potential biotechnological applications for the bioremediation of n-alkanes. **Chemosphere**, p.126202, 2020.

POHANKA, M. Biosensors and bioassays based on lipases, principles and applications, a review. **Molecules**, v.24, n.3, p.616, 2019.

POLLEGIONI, L.; ROSINI, E.; MOLLA, G. Advances in Enzymatic Synthesis of D-Amino Acids. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.9, p.3206, 2020.

PUNDIR, C. S.; LATA, S.; NARWAL, V. Biosensors for determination of D and L-amino acids: a review. **Biosensors and Bioelectronics**, v.117, p.373-384, 2018.

RAFIQUE, R., KHAN, K. M., CHIGURUPATI, S., WADOOD, A., REHMAN, A. U., SALAR, U., PERVEEN, S. Synthesis, *in vitro* α -amylase inhibitory, and radicals (DPPH & ABTS) scavenging potentials of new *N*-sulfonohydrazide substituted indazoles. **Bioorganic Chemistry**, v.94, p.103410, 2020.

RAJAN, L., PALANISWAMY, D., MOHANKUMAR, S. K. Targeting obesity with plant-derived pancreatic lipase inhibitors: A comprehensive review. *Pharmacological Research*, 155, 104681. **Pharmacological Research**, v.155, p.104681, 2020.

REIS, P., HOLMBERG, K., WATZKE, H., LESER, M. E., MILLER, R. Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.147, p.237-250, 2009.

RIBEIRO, C. M. R.; SOUZA, N. A. Esquema Geral para Elucidação de Substâncias Orgânicas usando Métodos Espectroscópico e Espectrométrico. **Química Nova**, v.30, n.4, p.1026-1031, 2007.

RODRÍGUEZ, J., CREWS, P., JASPARS, M. Contemporary strategies in natural products structure elucidation. In: **Handbook of Marine Natural Products**. Springer Netherlands, p.423-517, 2012.

ROSAK, C.; MERTES, G. Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: targets and therapy**, v. 5, p. 357, 2012.

ROSE, A. J. Amino Acid Nutrition and Metabolism in Health and Disease. **Nutrients**, v.11, n. 2623, 2019.

SAEEDI, P., PETERSOHN, I., SALPEA, P., MALANDA, B., KARURANGA, S., UNWIN, N., SHAW, J. E. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.157, p.107843, 2019.

SAIFUDDIN, N.; RAZIAH, A. Z. Enhancement of lipase enzyme activity in non-aqueous media through a rapid three phase partitioning and microwave irradiation. **Journal of Chemistry**, v.5, n.4, p.864-871, 2008.

SANGI, D. P. Estratégias de síntese na descoberta de fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. **Química Nova**, v.39, n.8, p.995-1006, 2016.

SANTOS, J. A. D. Preparação e avaliação biológica de conjugados esteroides/bases de Schiff. 278f. Tese (Doutorado), **Universidade Federal de Juiz de Fora**, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2015.

SARIAN, F. D., JANEČEK, Š., PIJNING, T., NURACHMAN, Z., RADJASA, O. K., DIJKHUIZEN, L., VAN DER MAAREL, M. J. A new group of glycoside hydrolase family 13 α -amylases with an aberrant catalytic triad. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.1-10, 2017.

SEKHON, B. S. Exploiting the Power of Stereochemistry in Drugs: An Overview of Racemic and Enantiopure Drugs. **Journal of Modern Medicinal Chemistry**, v.1, p.10-36, 2013.

SELLAMI, M., LOUATI, H., KAMOUN, J., KCHAOU, A., DAMAK, M., GARGOURI, Y. Inhibition of pancreatic lipase and amylase by extracts of different spices and plants. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.68, n.3, p.313-320, 2017.

SEYEDAN, A., ALSHAWSH, M. A., ALSHAGGA, M. A., KOOSHA, S., MOHAMED, Z. Medicinal plants and their inhibitory activities against pancreatic lipase: a review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2015, 2015.

SHAH, A., SHAH, A. H., PARVEEN, N., REHMAN, Z. U., KHAN, S. Z., RANA, U. A., QURESHI, R. Synthesis and electrochemical investigations of piperazines. **Electrochimica Acta**, v.220, p.705-711, 2016.

SHAMIM, S., KHAN, K. M., ULLAH, N., CHIGURUPATI, S., WADOOD, A., REHMAN, A. U. PERVEEN, S. Synthesis and Screening of (E)-3-(2-

Benzylidenehydrazinyl)-5, 6-diphenyl-1, 2, 4-triazine Analogs as Novel Dual Inhibitors of α -Amylase and α -Glucosidase. **Bioorganic Chemistry**, p.103979, 2020.

SHAMSI KAZEM ABADI, S., TRAN, M., YADAV, A. K., ADABALA, P. J. P., CHAKLADAR, S., BENNET, A. J. New class of glycoside hydrolase mechanism-based covalent inhibitors: glycosylation transition state conformations. **Journal of The American Chemical Society**, v.139, n.31, p.10625-10628, 2017.

SHAQUIQUZZAMAN, M.; VERMA, G.; MARELLA, A.; AKHTER, M.; AKHTAR, W.; KHAN, M. F.; ALAM, M. M. Piperazine scaffold: A remarkable tool in generation of diverse pharmacological agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 102, p. 487-529, 2015.

SHEIKHPOUR, M., ABOLFATHI, H., KHATAMI, S., MESHKANI, R., BARGHI, T. S. The Interaction between gene profile and obesity in type 2 diabetes: A review. **Obesity Medicine**, p.100197, 2020.

SMITH, M.B. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure. **John Wiley & Sons**, 7th edição, 2013.

SINGH, J.; DARTOIS, A.; KAUR, L. Starch digestibility in food matrix: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, n 4, p.168-180, 2010.

SINGH, A. K.; SINGH, R. Pharmacotherapy in obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of anti-obesity drugs. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v.13, n.1, p.53-64, 2020.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of Microbial α -Amylase in Industry - A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.850-861, 2010.

SUDHA, P., ZINJARDE, S. S., BHARGAVA, S. Y., KUMAR, A. R. Potent α -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, n.1, p.5, 2011.

TAHA, M.; WADOOD, A. Synthesis and molecular docking study of piperazine derivatives as potent urease inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v.78, p.411-417,

2018.

TAHERI, M., EGHTEADARIAN, R., DINGER, M. E., GHAFOURI-FARD, S. Emerging roles of non-coding RNAs in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.129, p.110509, 2020.

TAN, Y., CHANG, S. K., ZHANG, Y. Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. **Food Chemistry**, v.214, p.259-268, 2017.

TAN, S. Y., WONG, J. L. M., SIM, Y. J., WONG, S. S., ELHASSAN, S. A. M., TAN, S. H., CANDASAMY, M. Type 1 and 2 diabetes mellitus: a review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v.13, n.1, p.364-372, 2019.

TASLIMI, P., ASLAN, H. E., DEMIR, Y., OZTASKIN, N., MARAŞ, A., GULÇİN, İ., GOKSU, S. Diarylmethanon, bromophenol and diarylmethane compounds: Discovery of potent aldose reductase, α -amylase and α -glucosidase inhibitors as new therapeutic approach in diabetes and functional hyperglycemia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.119, p.857-863, 2018.

THAMMANA, M. A review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Res Rev J Pharm Anal**, v.5, n.2, p.22-28, 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA. Conselho Superior. **Resolução Nº 10/2020, de 18 de março de 2020**. Dispõe sobre a suspensão das atividades acadêmicas e administrativas no âmbito da UFJF, em decorrência da pandemia COVID-19. JUIZ DE FORA: Conselho Superior, 2020. Disponível em: <https://www2.ufjf.br/consu/wp-content/uploads/sites/33/2020/03/RESOLU%C3%87%C3%83O-10.2020-CONSU.pdf>. Acesso em: 18 de dezembro de 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA. Conselho Superior. **Resolução Nº 11/2020, de 29 de maio de 2020**. Dispõe sobre Aprova a prorrogação da suspensão das atividades presenciais na Universidade Federal de Juiz de Fora.

JUIZ DE FORA: Conselho Superior, 2020. Disponível em: https://www2.ufjf.br/consu/wp-content/uploads/sites/33/2020/06/Resolu%C3%A7%C3%A3o_11.2020_CONSU-U-Prorroga%C3%A7%C3%A3o-Suspens%C3%A3o-das-atividades.pdf. Acesso em: 18 de dezembro de 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA. Conselho Superior. **Resolução Nº 17/2020, de 30 de junho de 2020**. Dispõe sobre Aprova a prorrogação da suspensão das atividades presenciais na Universidade Federal de Juiz de Fora. JUIZ DE FORA: Conselho Superior, 2020. Disponível em: https://www2.ufjf.br/consu/wp-content/uploads/sites/33/2020/06/Resolu%C3%A7%C3%A3o_17.2020_CONSU-U-Prorroga%C3%A7%C3%A3o-Suspens%C3%A3o-das-atividades-30.06.2020.pdf. Acesso em: 18 de dezembro de 2020.

VISWANADHAM, B., MAHOMED, A. S., FRIEDRICH, H. B., SINGH, S. Efficient and expeditious chemoselective BOC protection of amines in catalyst and solvent-free media. **Research on Chemical Intermediates**, v.43, n.3, p.1355-1363, 2017.

WANG, M., RAKESH, K. P., LENG, J., FANG, W. Y., RAVINDAR, L., GOWDA, D. C., QIN, H. L. Amino acids/peptides conjugated heterocycles: A tool for the recent development of novel therapeutic agents. **Bioorganic Chemistry**, v.76, p.113-129, 2018.

WANG, H. H., LEE, D. K., LIU, M., PORTINCASA, P., WANG, D. Q. H. Novel Insights into the Pathogenesis and Management of the Metabolic Syndrome. **Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition**, v.23, n.3, p.189, 2020.

WŁODARCZYK, M.; NOWICKA, G. Obesity, DNA damage, and development of obesity-related diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.5, p.1146, 2019.

XIE, L., MO, J., NI, J., XU, Y., SU, H., XIE, J., CHEN, W. Structure-based design of human pancreatic amylase inhibitors from the natural anthocyanin database for type 2 diabetes. **Food & Function**, v.11, n.4, p.2910-2923, 2020.

YE, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Frontiers of Medicine**, v.7, n.1, p.14-24, 2013.

YOUSUF, H., SHAMIM, S., KHAN, K. M., CHIGURUPATI, S., HAMEED, S., KHAN, M. N., ARFEEN, M. Dihydropyridines as potential α -amylase and α -glucosidase inhibitors: synthesis, *in vitro* and *in silico* studies. **Bioorganic Chemistry**, v.96, p.103581, 2020.

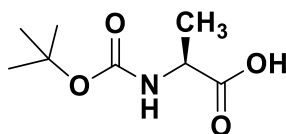
ZACCARDI, F., WEBB, D. R., YATES, T., DAVIES, M. J. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. **Postgraduate Medical Journal**, v.92, n.1084, p.63-69, 2016.

ZECHNER, R., ZIMMERMANN, R., EICHMANN, T. O., KOHLWEIN, S. D., HAEMMERLE, G., LASS, A., MADEO, F. FAT SIGNALS-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. **Cell Metabolism**, v.15, n.3, p.279-291, 2012.

ZHOU, Y.; RUI, L. Leptin signaling and leptin resistance. **Frontiers of Medicine**, v.7, n.2, p.207-222, 2013.

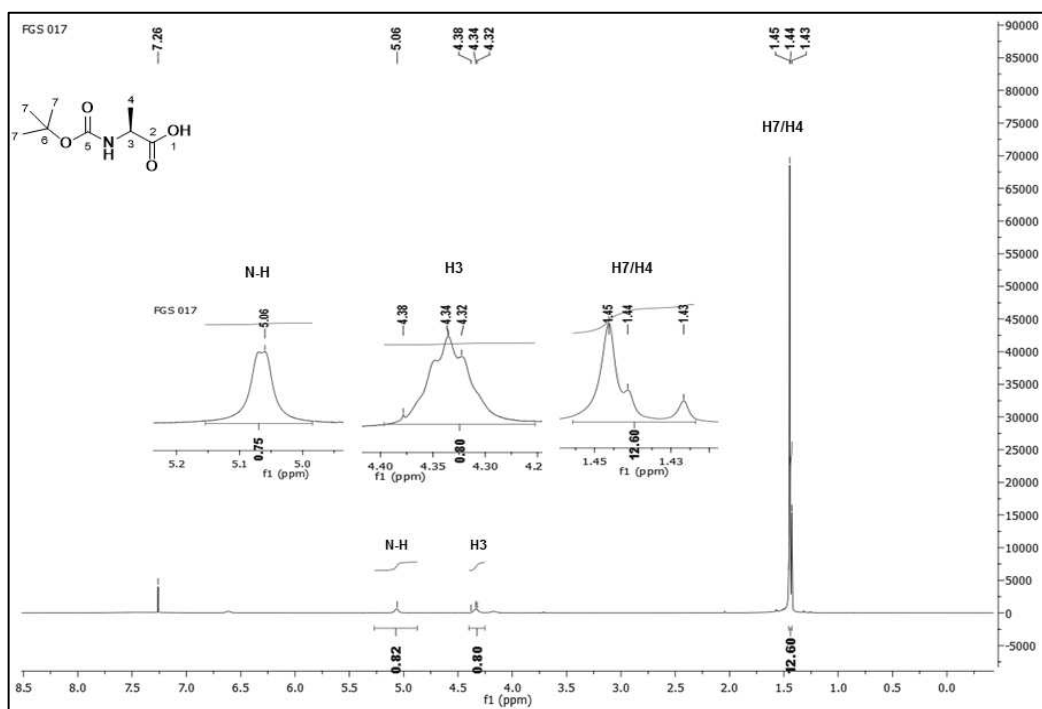
8 ANEXO

8.1 Caracterização dos derivados da Boc-alanina

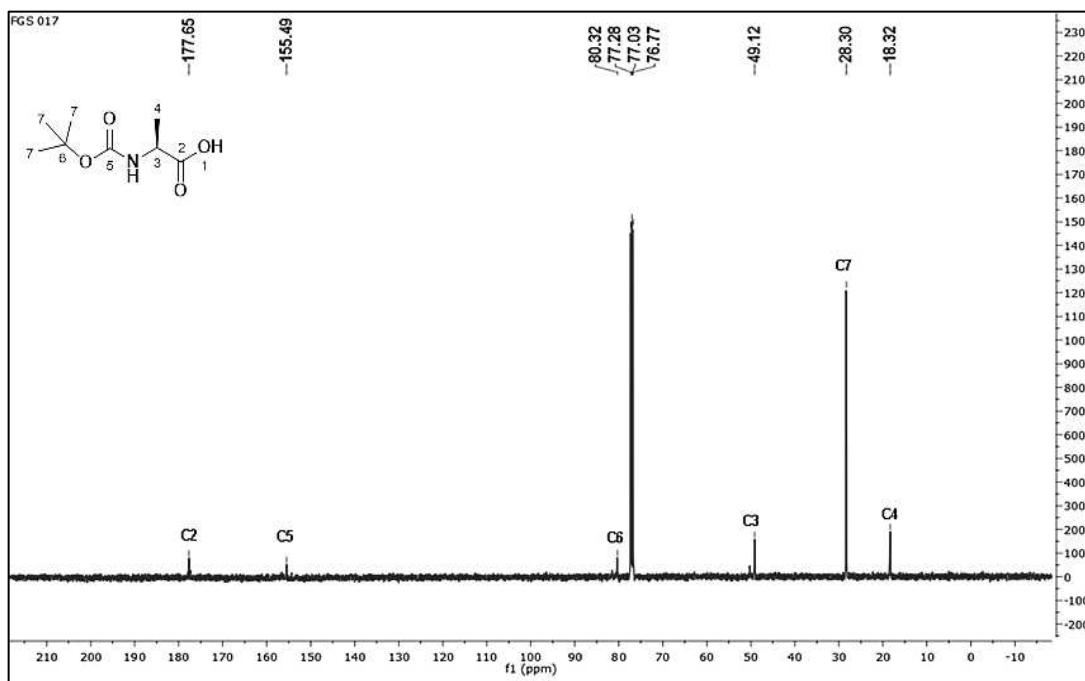


Boc-L-alanina (1a)

Aspecto: sólido branco; **Rendimento:** 93%; **Faixa de Fusão (°C):** 77,3-77,9; **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5,06 (s, 1H); 4,38 - 4,32 (m, 1H); 1,45 - 1,42 (m, 12H); **RMN de ^{13}C** (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 177,6; 155,4; 80,3; 49,1; 28,3 e 18,3; **IV (NaCl, cm^{-1}):** 3334, 2981, 2934, 1717, 1395, 1369, 1165. **Fórmula molecular:** $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_4$

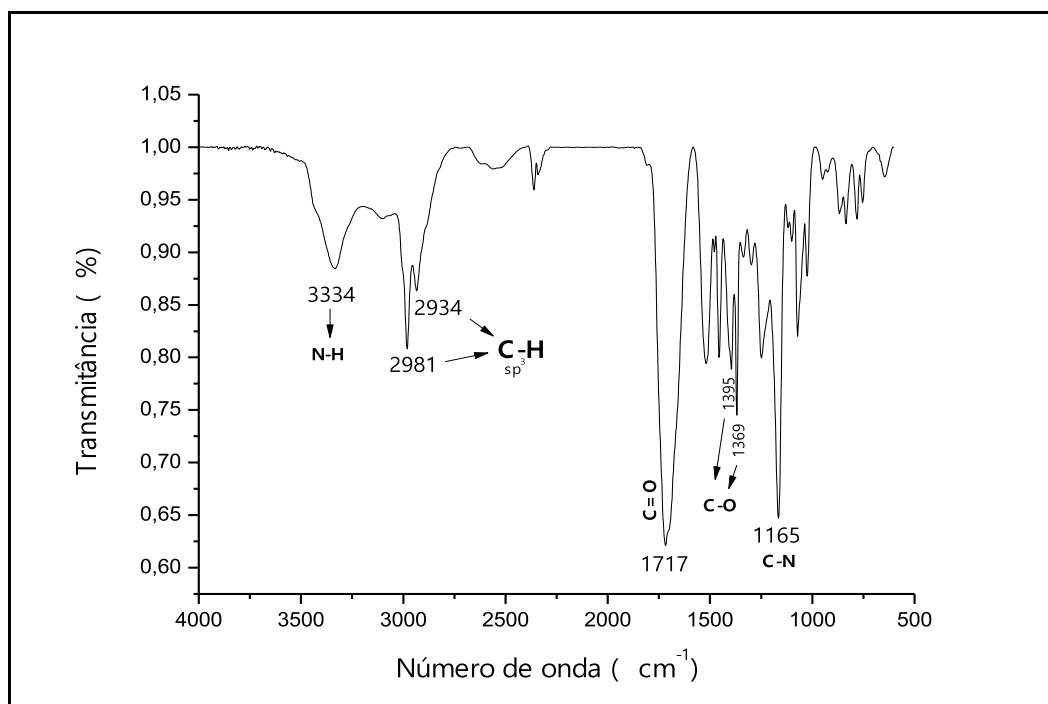
Espectro de RMN de ^1H da Boc-L-alanina (500 MHz, CDCl_3)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).
Espectro de RMN de ^{13}C da Boc-L-alanina (125 MHz, CDCl_3)

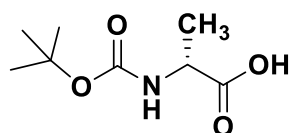


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

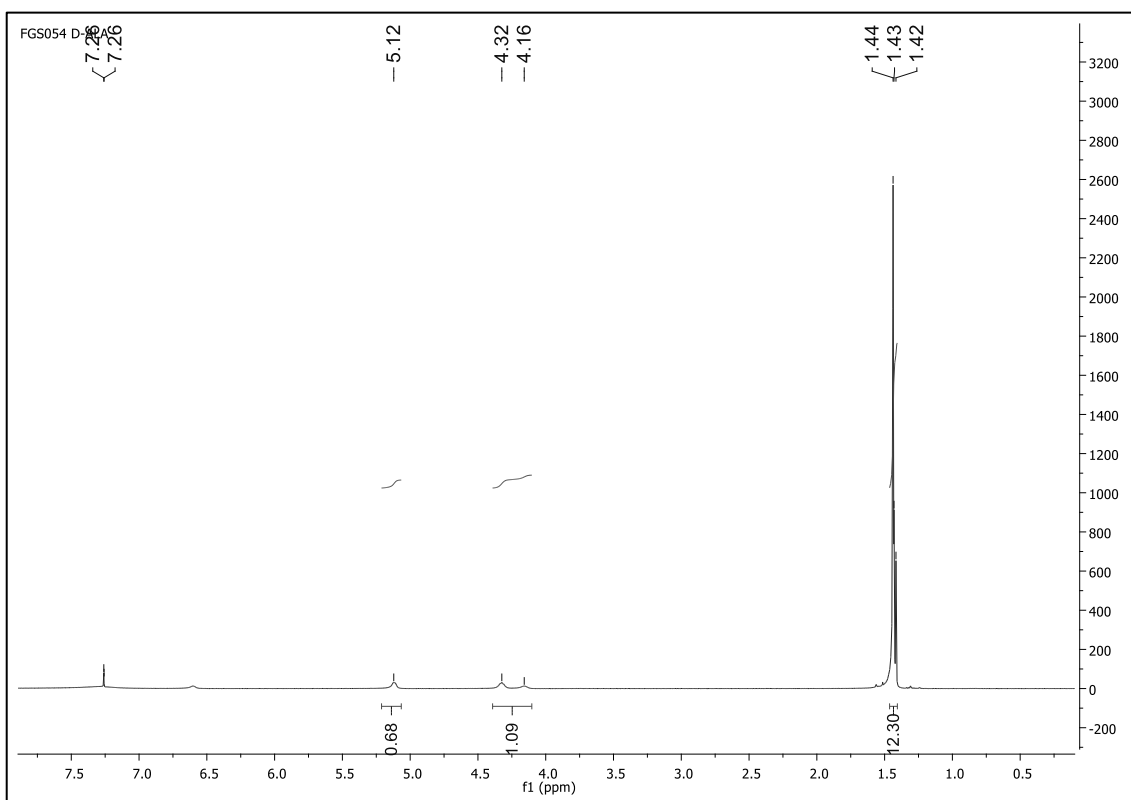
Espectro no infravermelho da Boc-L-alanina



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

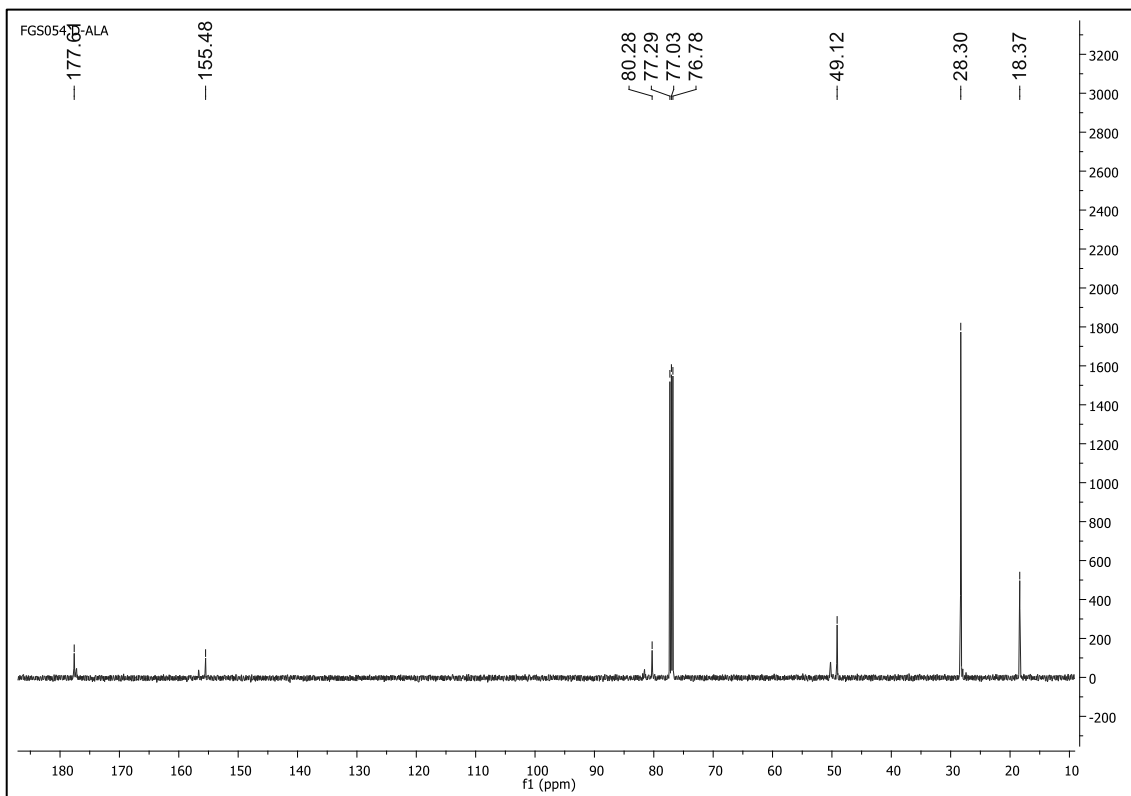
Boc-*D*-alanina (**1b**)

Aspecto: sólido branco; **Rendimento:** 87%; **Faixa de Fusão (°C):** 77,3 - 78,3; **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,12 (s, 1H); 4,32 - 4,16 (m, 1H); 1,44 - 1,42 (m, 12H); **RMN de ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177,6; 155,4; 80,2; 49,1; 28,3 e 18,3. **Fórmula molecular:** C₈H₁₅NO₄

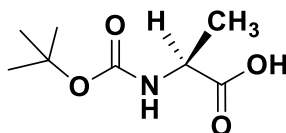
Espectro de RMN de ¹H da Boc-*D*-alanina (500 MHz, CDCl₃)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ¹³C da Boc-*D*-alanina (125 MHz, CDCl₃)



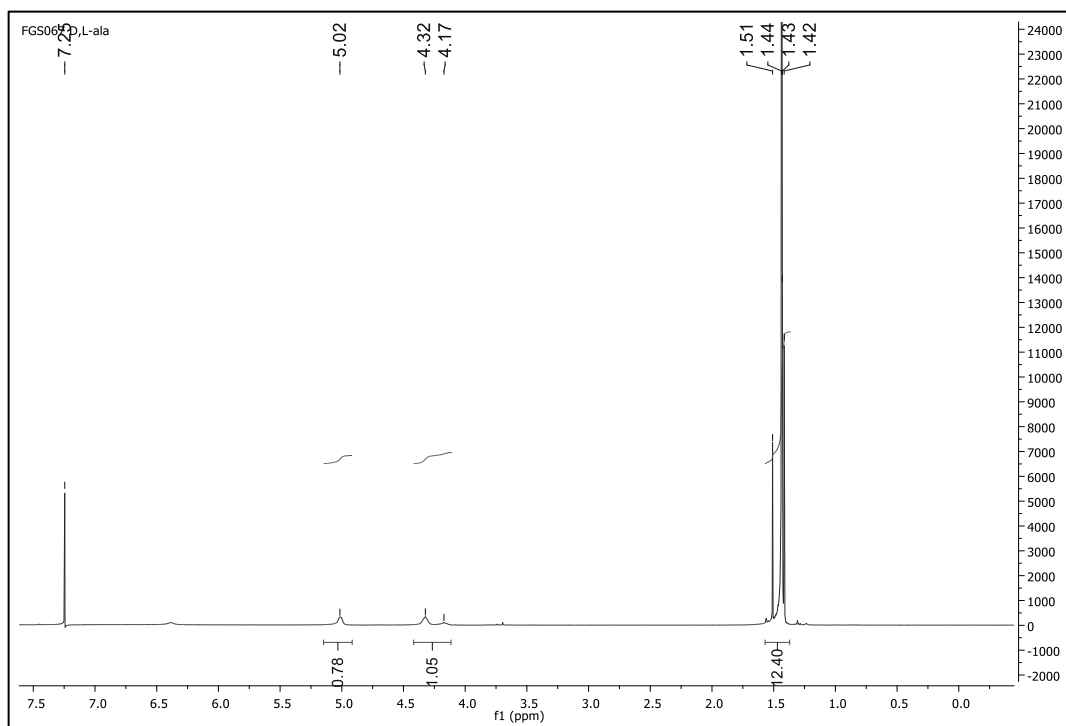
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).



Boc-*D,L*-alanina (**1c**)

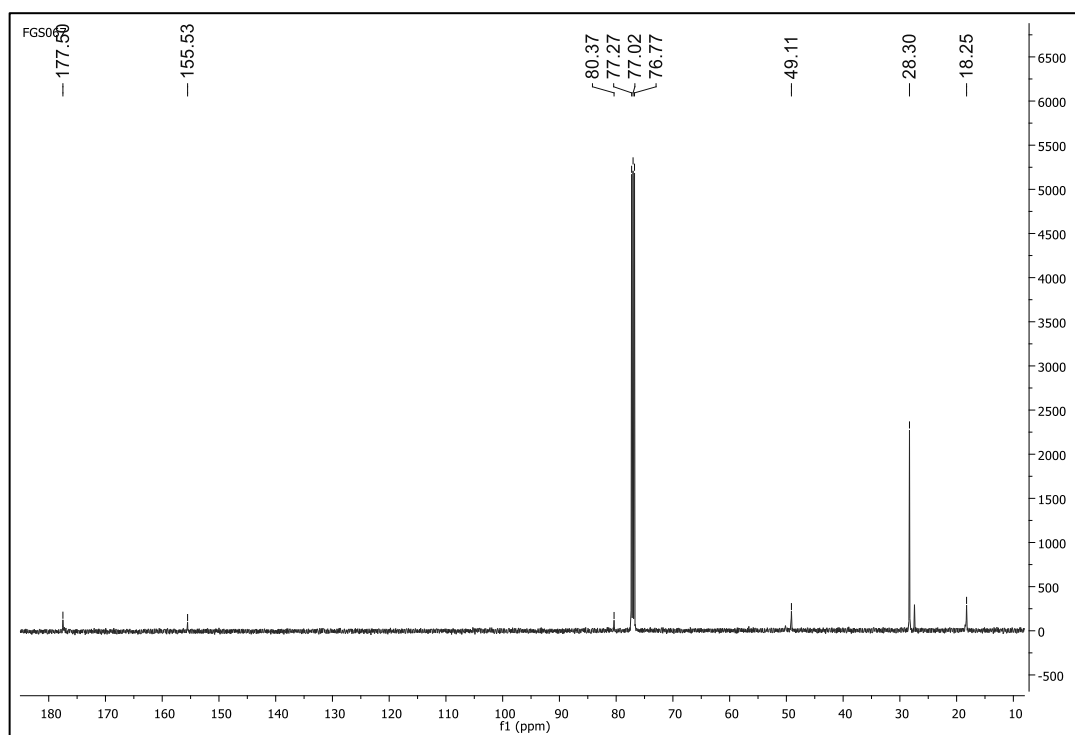
Aspecto: sólido branco; **Rendimento:** 87%; **Faixa de Fusão (°C):** 77,6 - 78,8; **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,02 (s, 1H); 4,32 - 4,17 (m, 1H); 1,51 - 1,42 (m, 12H); **RMN de ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177,6; 155,4; 80,2; 49,1; 28,3 e 18,3. **Fórmula molecular:** C₈H₁₅NO₄

Espectro de RMN de ¹H da Boc-*D,L*-alanina (500 MHz, CDCl₃)



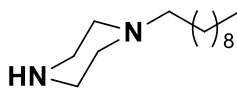
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ^{13}C da Boc-*D,L*-alanina (125 MHz, CDCl_3)



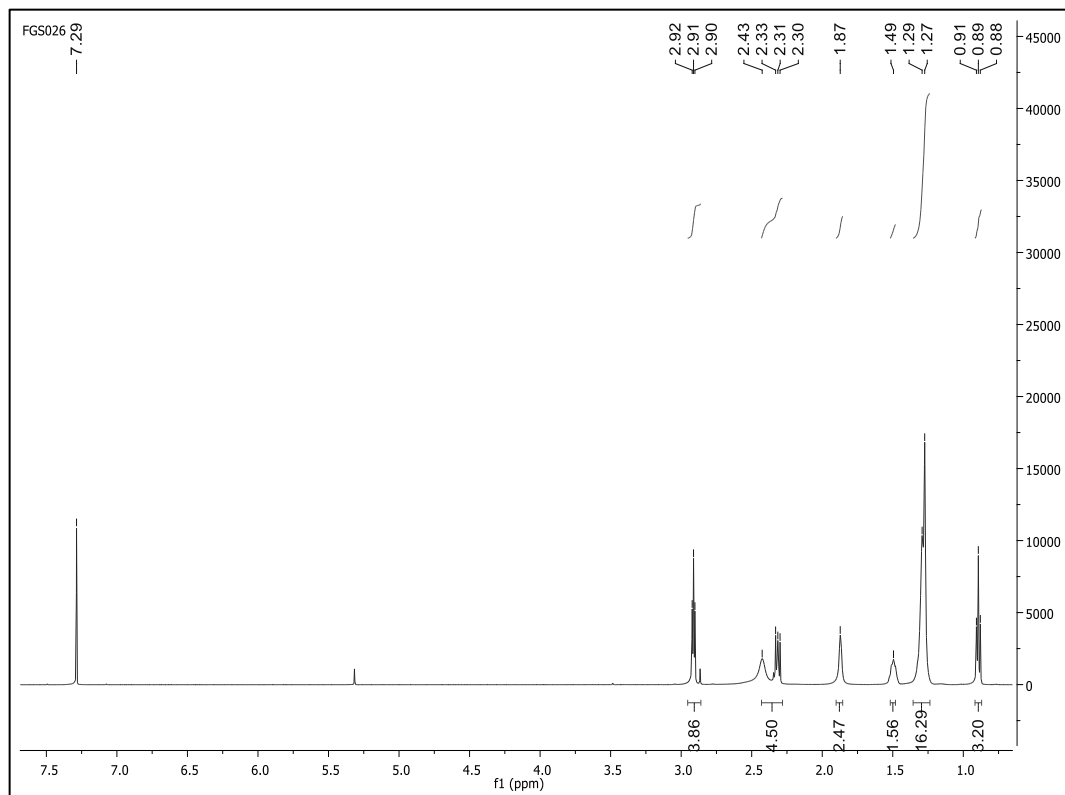
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

8.2 Caracterização dos derivados da *N*-piperazina alquilada

decanopiperazina (**2a**)

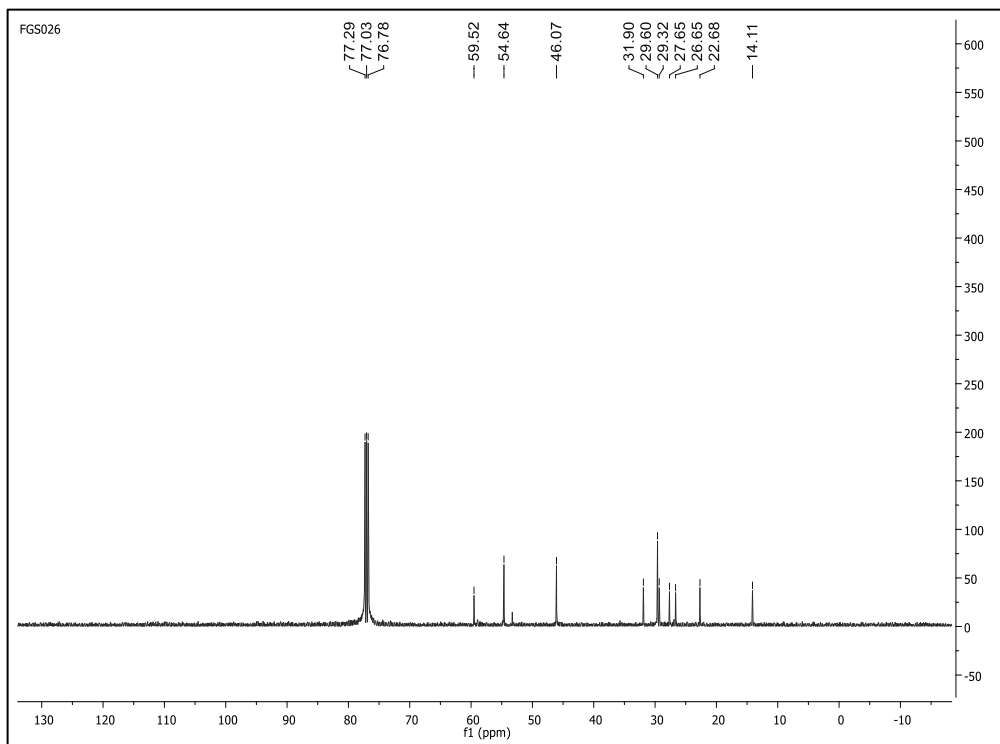
Aspecto: óleo; **Rendimento:** 78%; **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,92-2,90 (t, 4H); 2,43-2,30 (m, 4H); 1,87 (s, 2H); 1,49 (S, 1H) 1,29-1,27 (s, 28H); 0,91-0,88 (t, 3H); **RMN de ^{13}C** (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 59,5; 54,6; 46,0; 31,9; 29,6 29,3; 27,6; 26,6; 22,6; 14,1; **IV (NaCl, cm^{-1}):** 3257, 2920, 2850, 1550, 1467.

Fórmula molecular: $\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{N}_2$.

Espectro de RMN de ^1H do composto **2a** (500 MHz, CDCl_3)

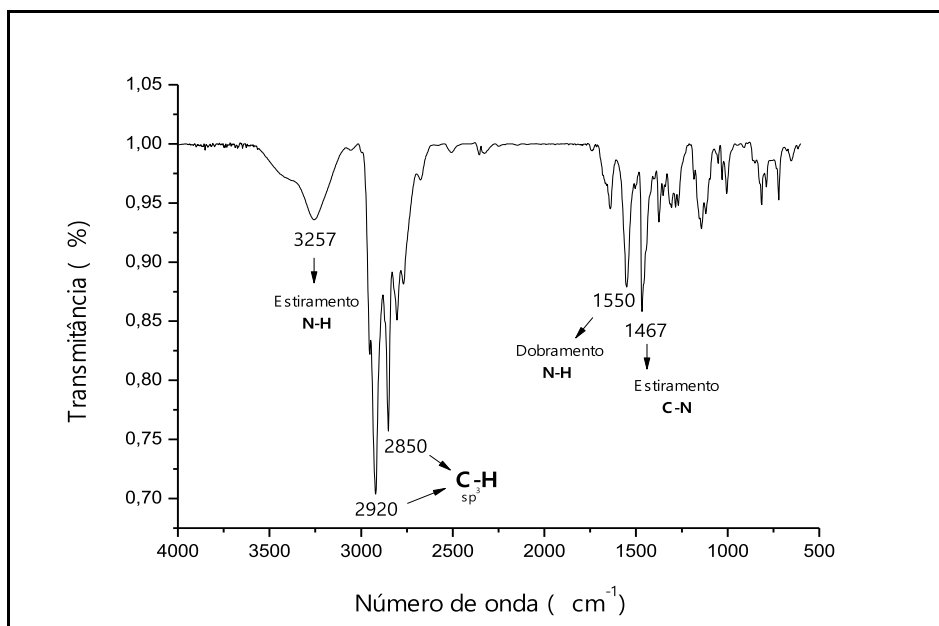
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2a** (125 MHz, CDCl_3)

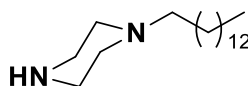


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

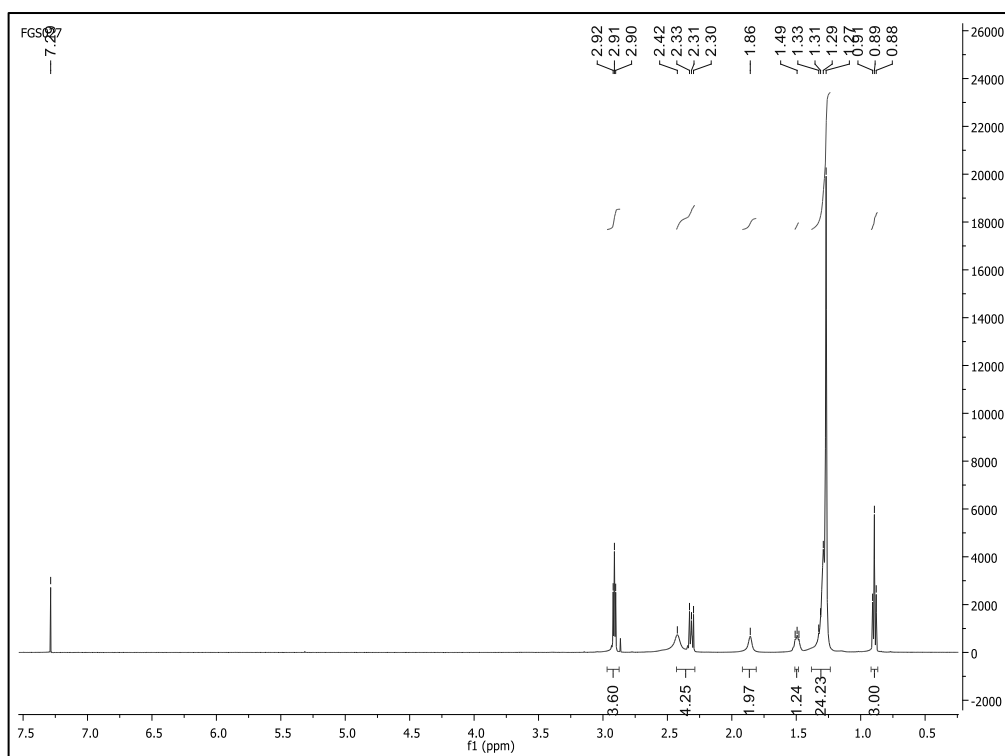
Espectro no infravermelho do composto **2a**



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

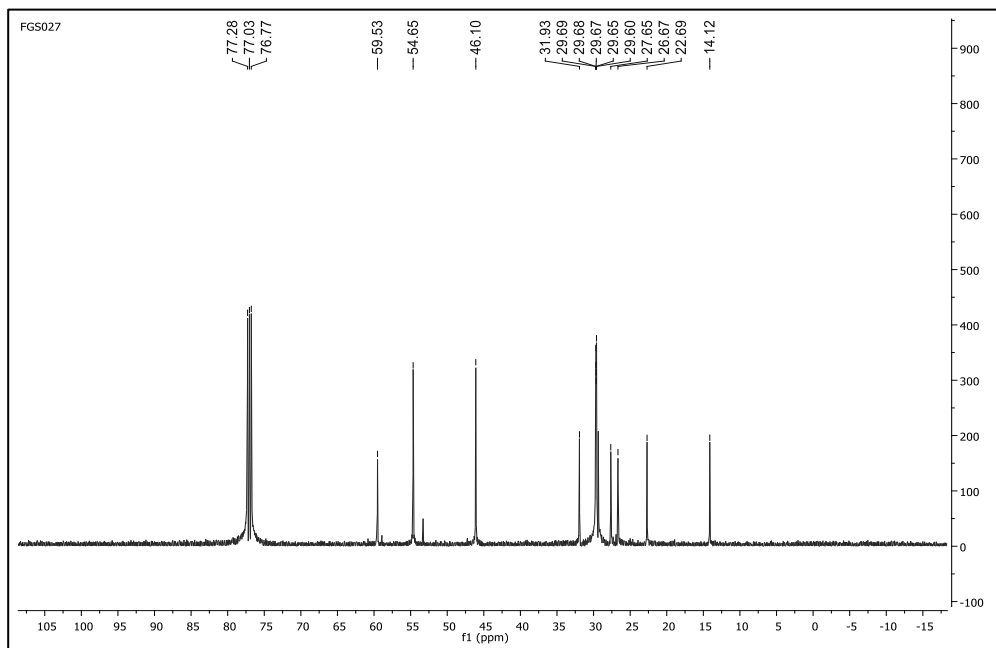
tetradecanopiperazina (**2b**)

Aspecto: sólido branco; **Rendimento:** 82%; **Faixa de Fusão (°C):** 47,8 - 50,1 °C; **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,92-2,90 (t, 4H); 2,42-2,30 (m, 4H); 1,86 (s, 2H); 1,51-1,48 (s, 1H) 1,33-1,27 (s, 28H); 0,91-0,88 (t, 3H); **RMN de ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 59,5; 54,6; 46,1; 31,9; 29,68 29,67; 29,65; 27,67; 26,6; 22,6; 14,1; **IV (NaCl, cm⁻¹):** 3244, 2919, 2852, 1558, 1541, 1466, 1458. **Fórmula molecular:** C₁₈H₃₈N₂

Espectro de RMN de ¹H do composto **2b** (500 MHz, CDCl₃)

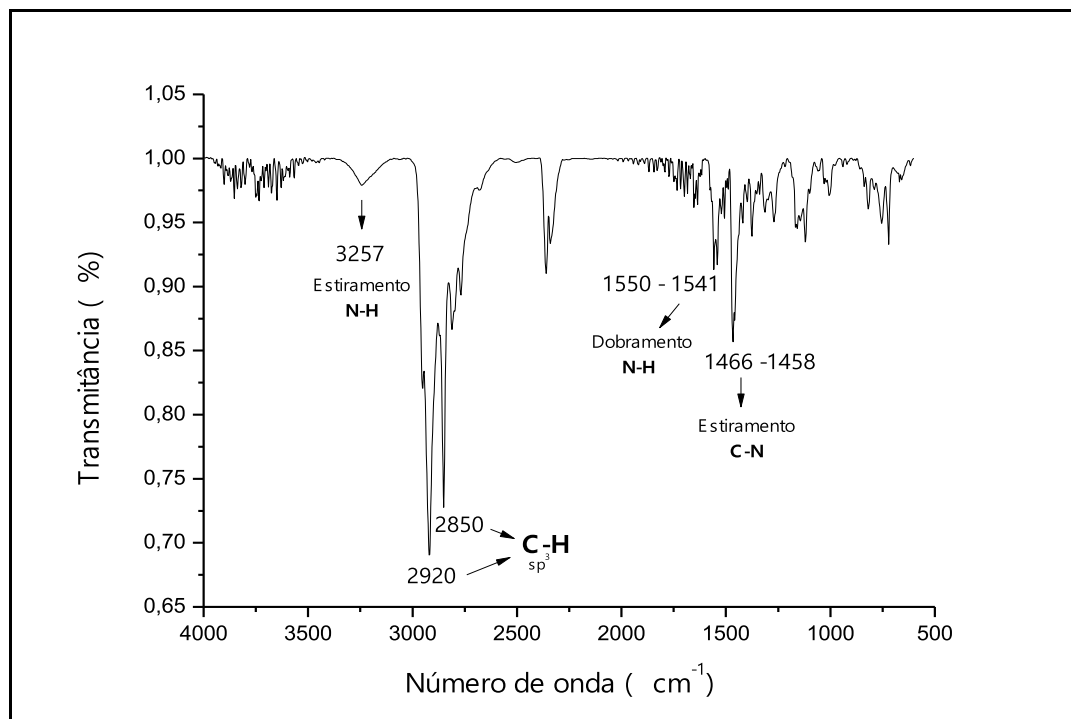
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ¹³C do composto **2b** (125 MHz, CDCl₃)

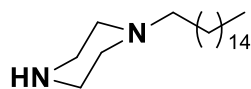


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

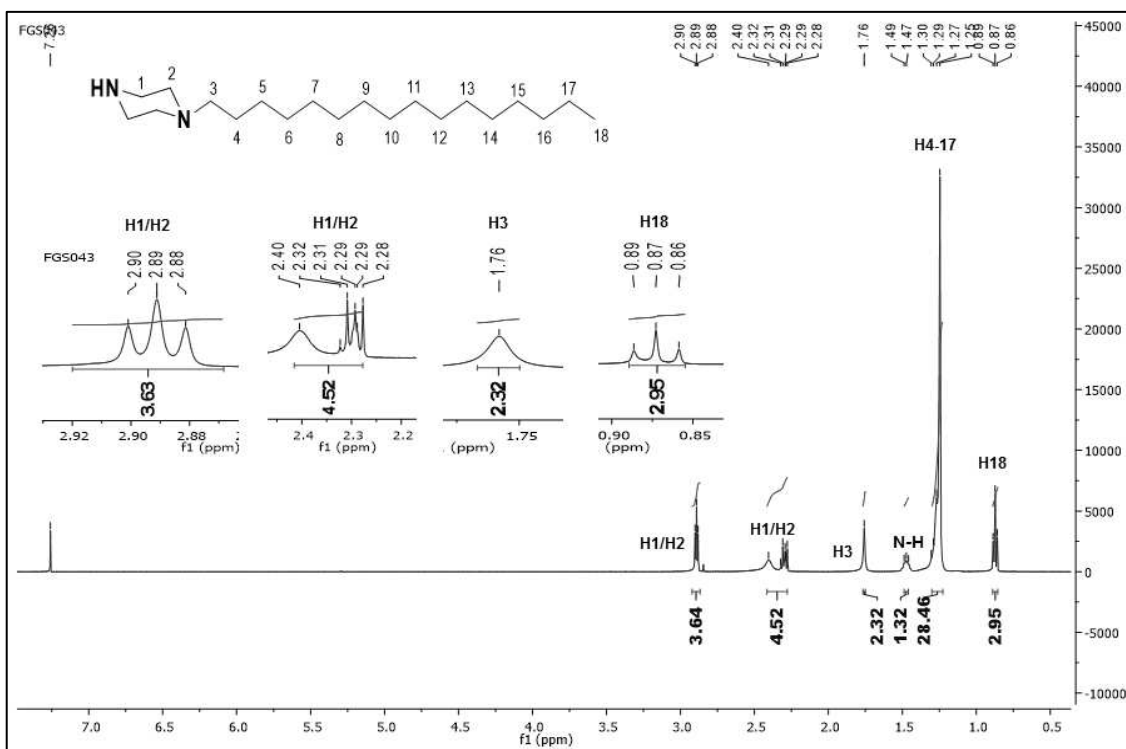
Espectro no infravermelho do composto **2b**



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

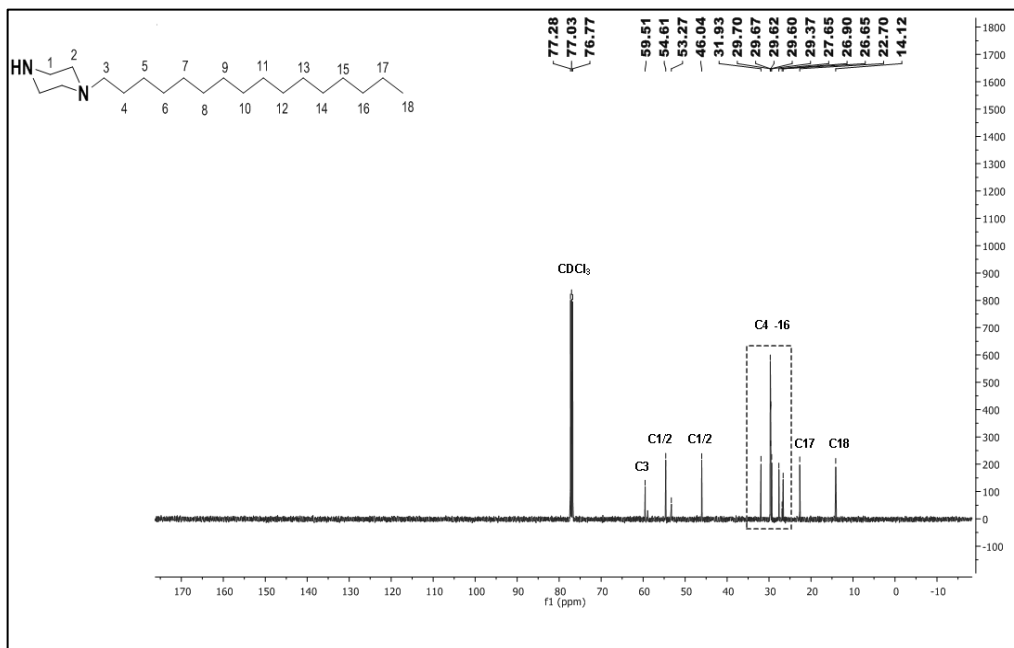
Hexadecanopiperazina (**2c**)

Aspecto: sólido branco; **Rendimento:** 92%; **Faixa de Fusão (°C):** 50,5 - 52,6 °C; **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2,90-2,88 (t, 4H); 2,40-2,28 (m, 4H); 1,76 (s, 2H); 1,49-1,47 (m, 1H) 1,30-1,25 (s, 28H); 0,89-0,86 (t, 3H); **RMN de ^{13}C** (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 59,5; 54,6; 53,2; 46,0; 31,9; 29,7; 29,6; 29,3; 27,6; 26,6; 22,7; 14,1; **IV (NaCl, cm^{-1}):** 3241, 2918, 2849, 1550, 1467. **Fórmula molecular:** $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{N}_2$

Espectro de RMN de ^1H do composto **2c** (500 MHz, CDCl_3)

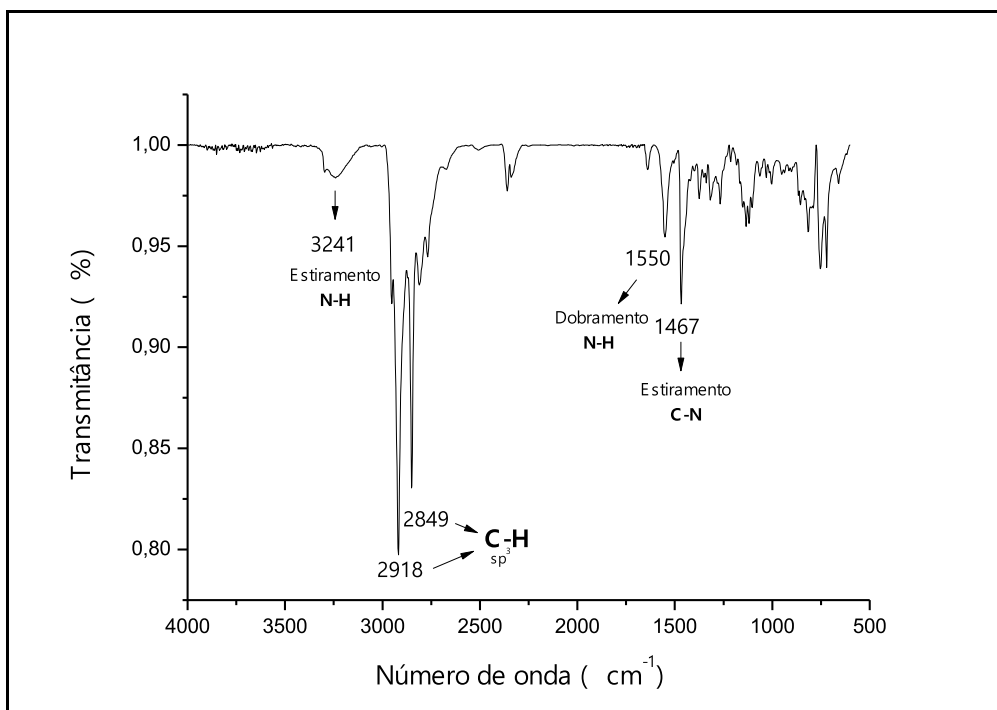
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2c** (125 MHz, CDCl_3)

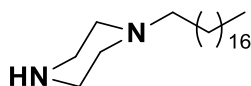


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

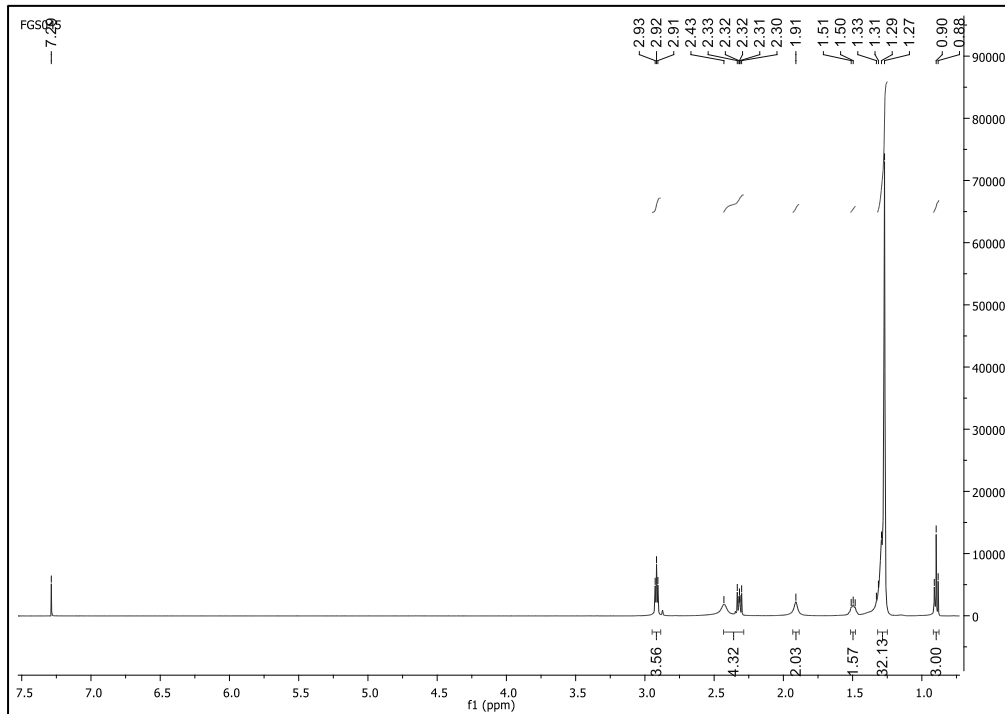
Espectro no infravermelho do composto do composto **2c**



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

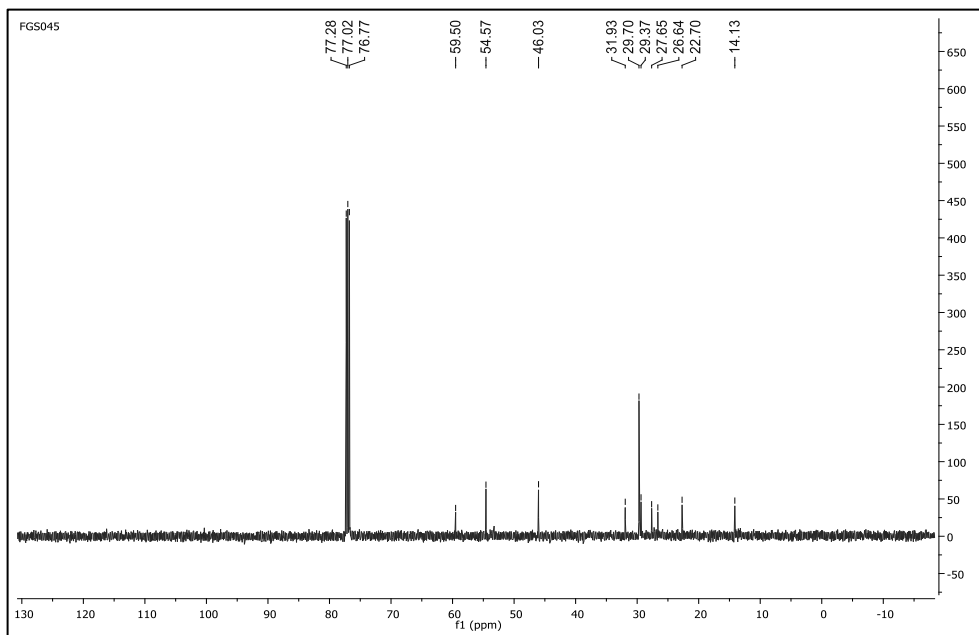
Octadecanopiperazina (**2d**)

Aspecto: sólido branco; **Rendimento:** 94%; **Faixa de Fusão (°C):** 53,5 - 54,6 °C; **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,90-2,84 (t, 4H); 2,43-2,30 (m, 4H); 1,91 (s, 2H); 1,51-1,48 (s, 1H) 1,33-1,27 (s, 32H); 0,91-0,88 (t, 3H); **RMN de ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 59,5; 54,5; 46,0; 31,9; 29,7; 29,3; 27,6; 22,7; 27,6; 26,6; 22,7; 14,1; **IV (NaCl, cm⁻¹):** 3276, 2918, 2848, 1542, 1466. **Fórmula molecular:** C₂₂H₄₆N₂

Espectro de RMN de ¹H do composto **2d** (500 MHz, CDCl₃)

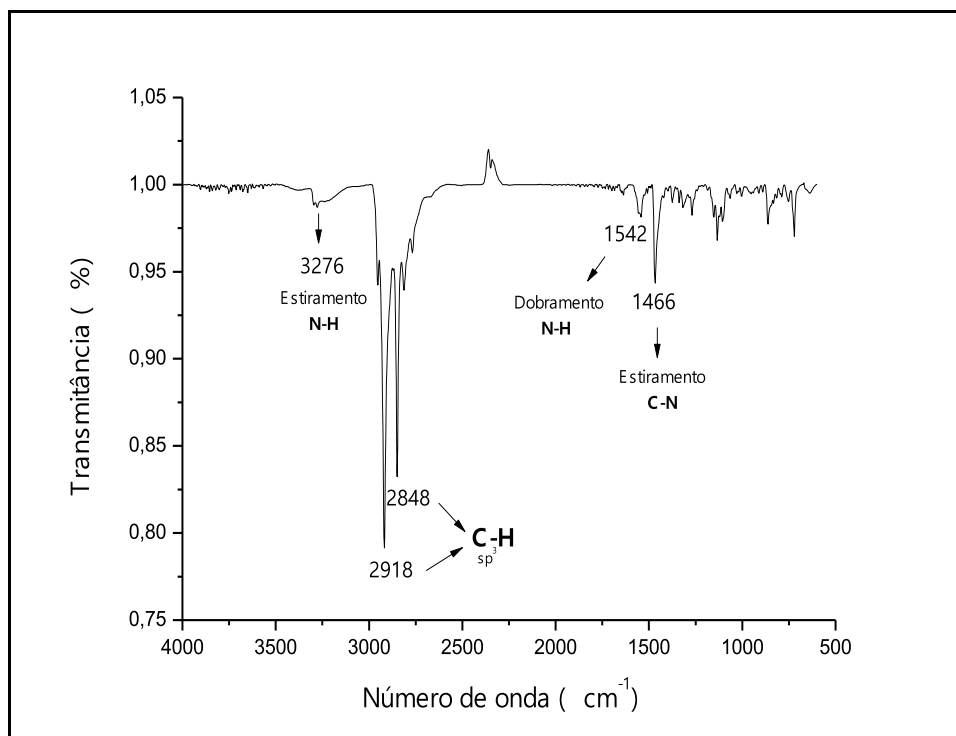
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ¹³C do composto **2d** (125 MHz, CDCl₃)



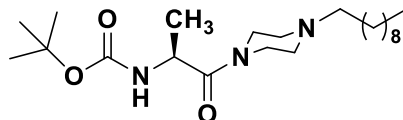
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro no infravermelho do composto do composto **2d**

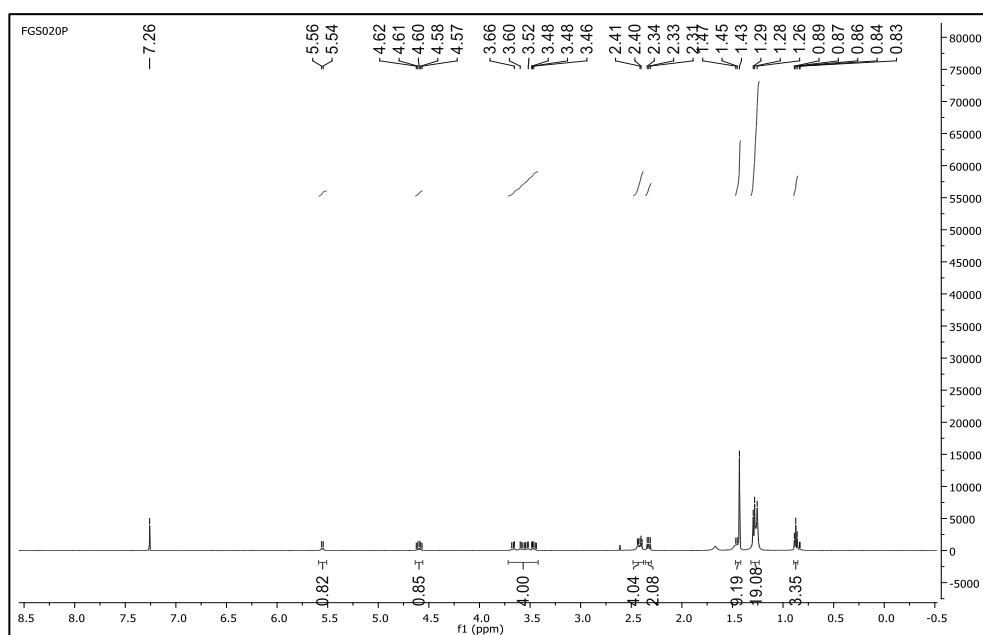


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

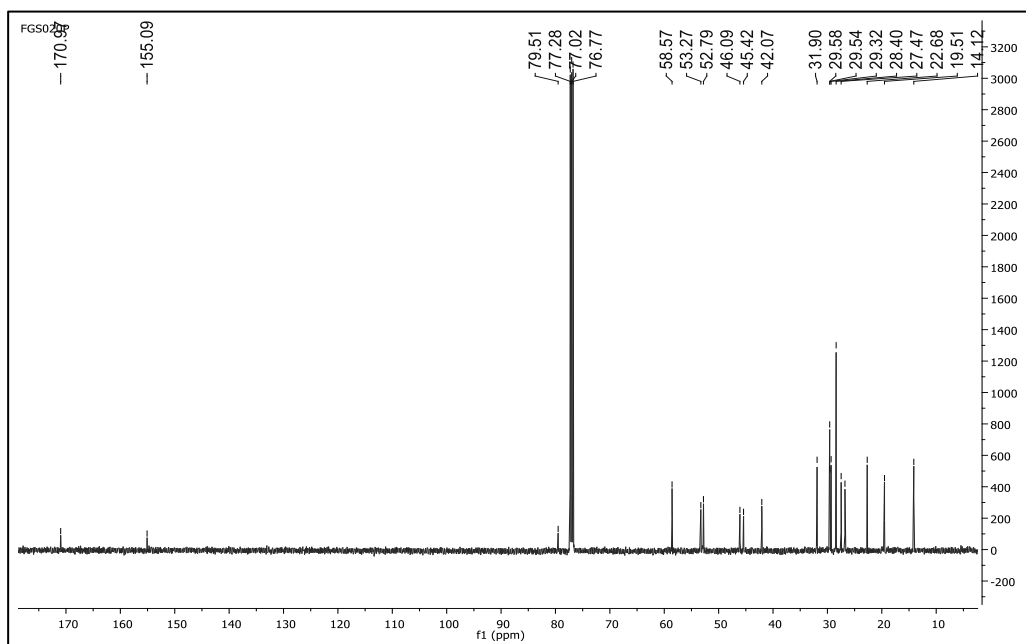
8.3 Caracterização dos derivados da Boc-alanina conjugados aos

derivados da *N*-piperazina alquilada*tert*-butil-*L*-(1-oxo-1-(4-decanopiperazin-1-yl)propan-2-yl) carbamato (**3a**)

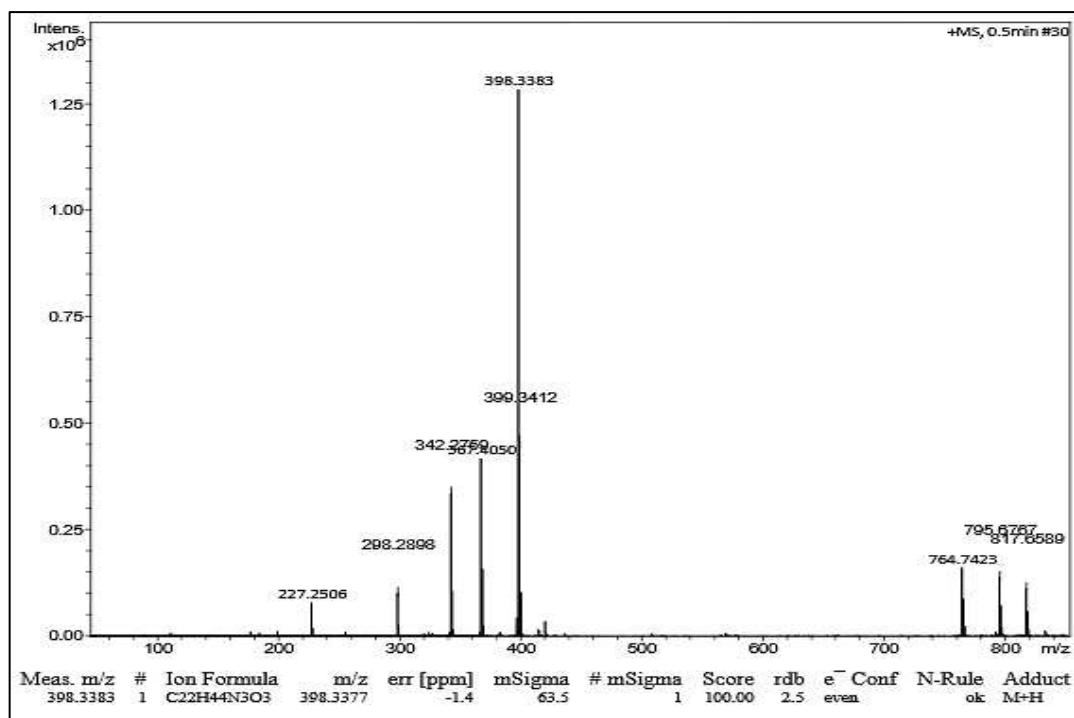
Aspecto: óleo levemente amarelo; **Rendimento:** 9%; **RMN de ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5,56-5,54 (d, 1H); 4,61-4,58 (qui, 1H); 3,66-3,46 (m, 4H); 2,44-2,39 (m, 4H); 2,34-2,31 (t, 2H); 1,41-1,37 (s, 9H); 1,24-1,19 (m, 24H); 0,83-0,8 (t, 3H); **RMN de ^{13}C** (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170,9; 155,0; 79,5; 77,2; 77,0; 76,7; 58,5; 53,2; 52,7; 46,0; 45,4; 42,0; 31,9; 29,58; 29,54; 31,9; 28,5; 29,3; 28,40; 27,47; 22,6; 19,5; 14,1; **IV (NaCl, cm^{-1}):** 3313, 2927, 2854, 1710, 1452, 1168. **EMAR:** calculado para $[\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_3]$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): m/z: 398,3383, encontrado 398,3377.

Espectro de RMN de ^1H do composto **3a** (500 MHz, CDCl_3)

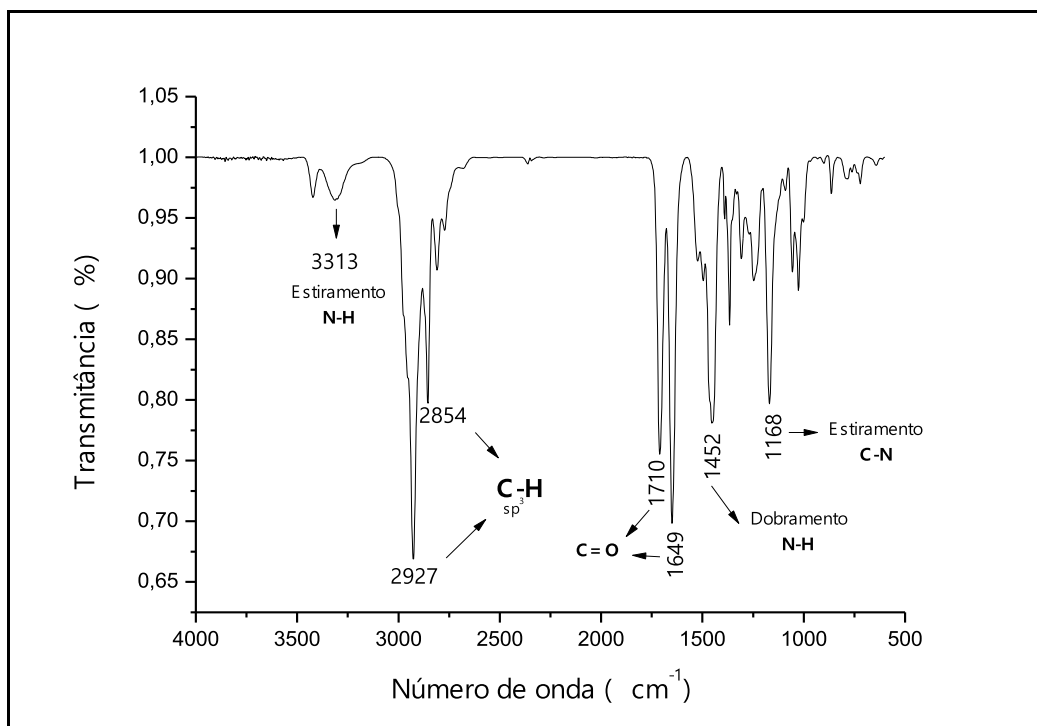
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3a** (125 MHz, CDCl_3)

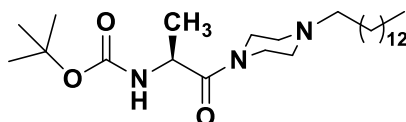
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de Massa de Alta Resolução do composto **3a**

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

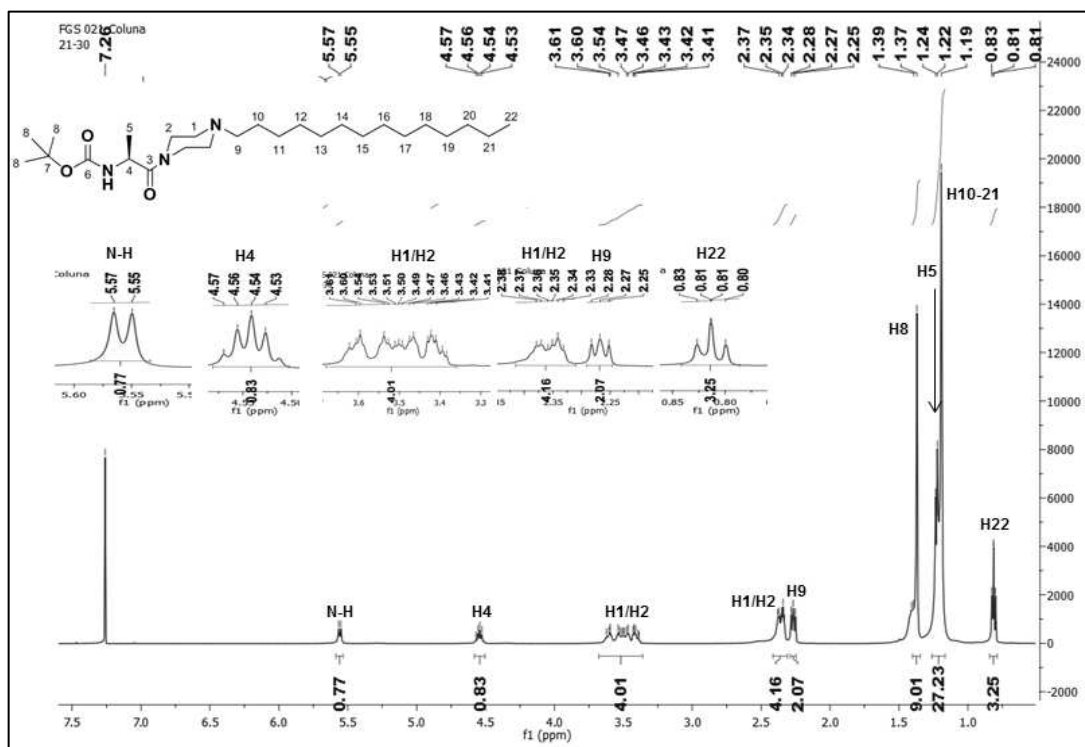
Espectro no infravermelho do composto do composto **3a**

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

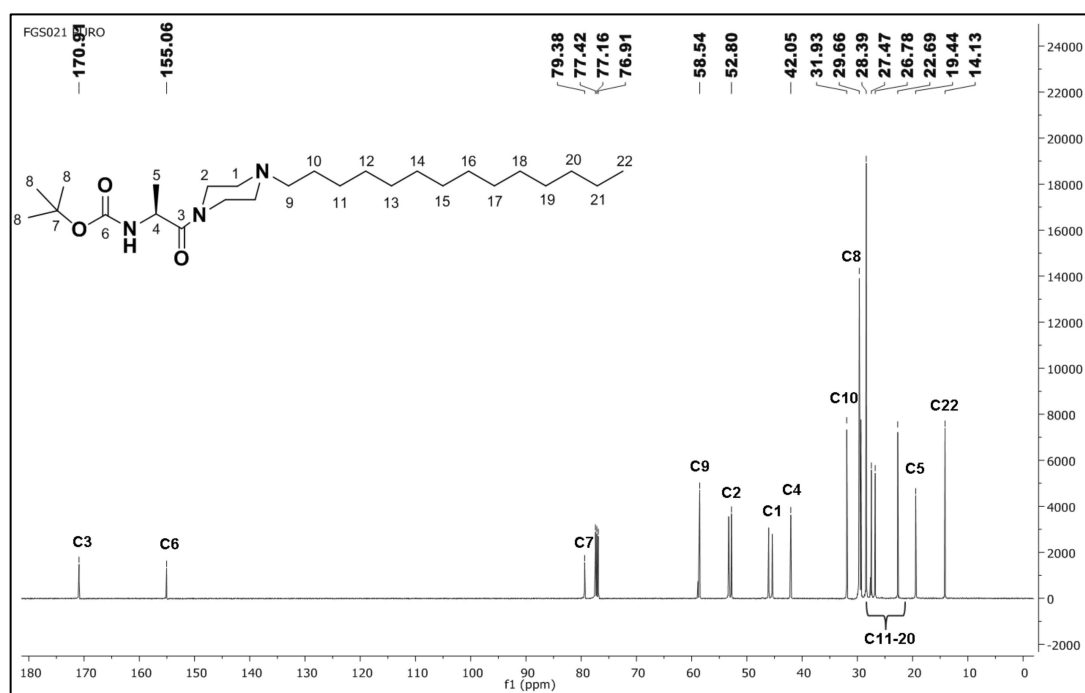


tert-butil-*L*-(1-oxo-1-(4-tetradecanopiperazin-1-il) propan-2-il) carbamato (**3b**)

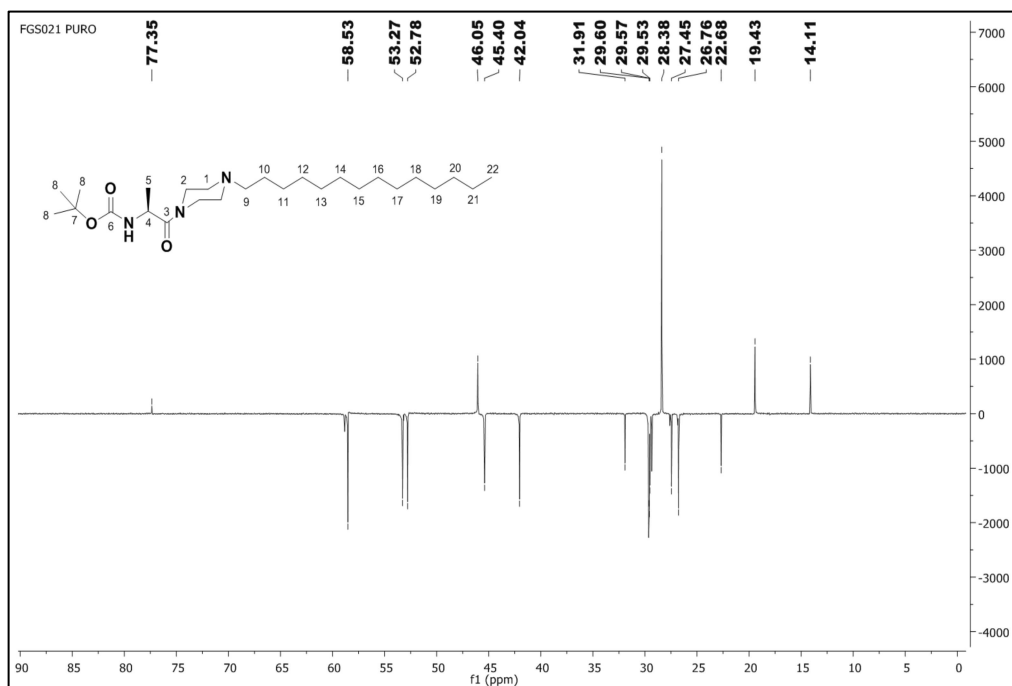
Aspecto: sólido levemente amarelo; **Rendimento:** 33%; **Faixa de Fusão (°C):** 88,3-89,3; **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,57-5,55 (d, 1H); 4,57-4,53 (qui, 1H); 3,60-3,42 (m, 4H); 2,38-2,33 (m, 4H); 2,28-2,25 (t, 2H); 1,41-1,37 (s, 9H); 1,24-1,19 (m, 24H); 0,83-0,8 (t, 3H); **RMN de ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,9; 155,0; 79,3; 77,42; 77,16; 76,9; 58,54; 52,80; 42,0; 31,93; 29,66; 28,39; 27,47; 26,78; 22,69; 19,44; 14,13; **IV (NaCl, cm⁻¹):** 3421, 3313, 2924, 2852, 2810, 2769, 2360, 2340, 1711, 1651, 1463. **EMAR:** calculado para [C₂₆H₅₂N₃O₃] ([M+Na]⁺): m/z: 454,4009, encontrado 454,4003.

Espectro de RMN de ^1H do composto **3b** (500 MHz, CDCl_3)

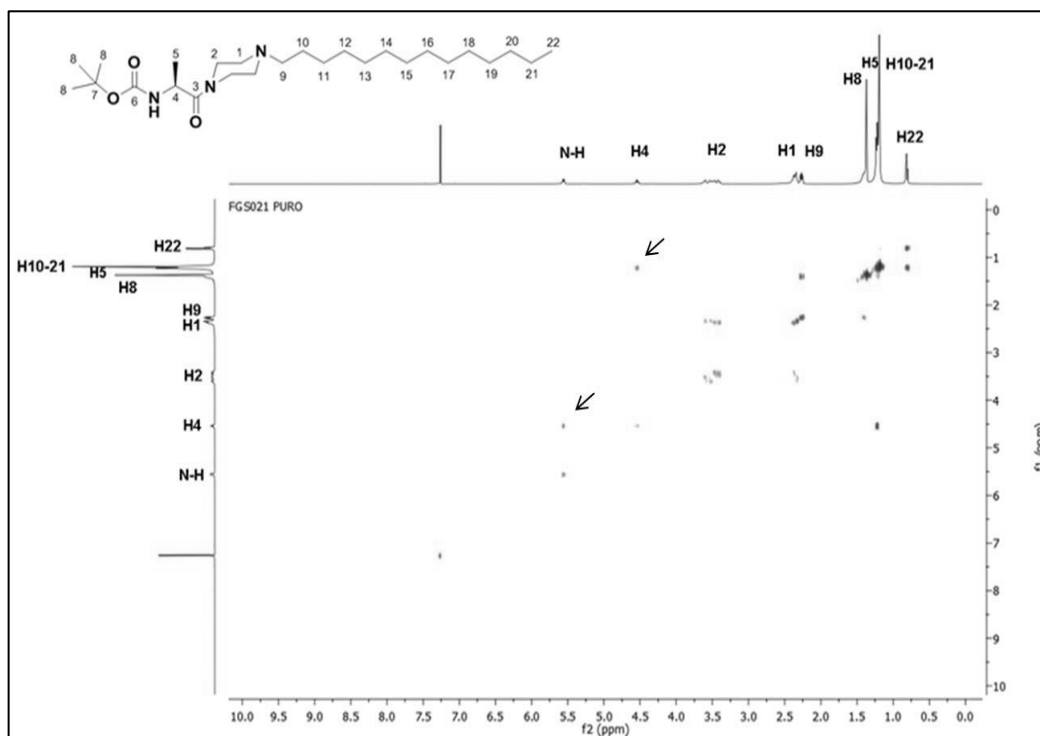
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3b** (125 MHz, CDCl_3)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

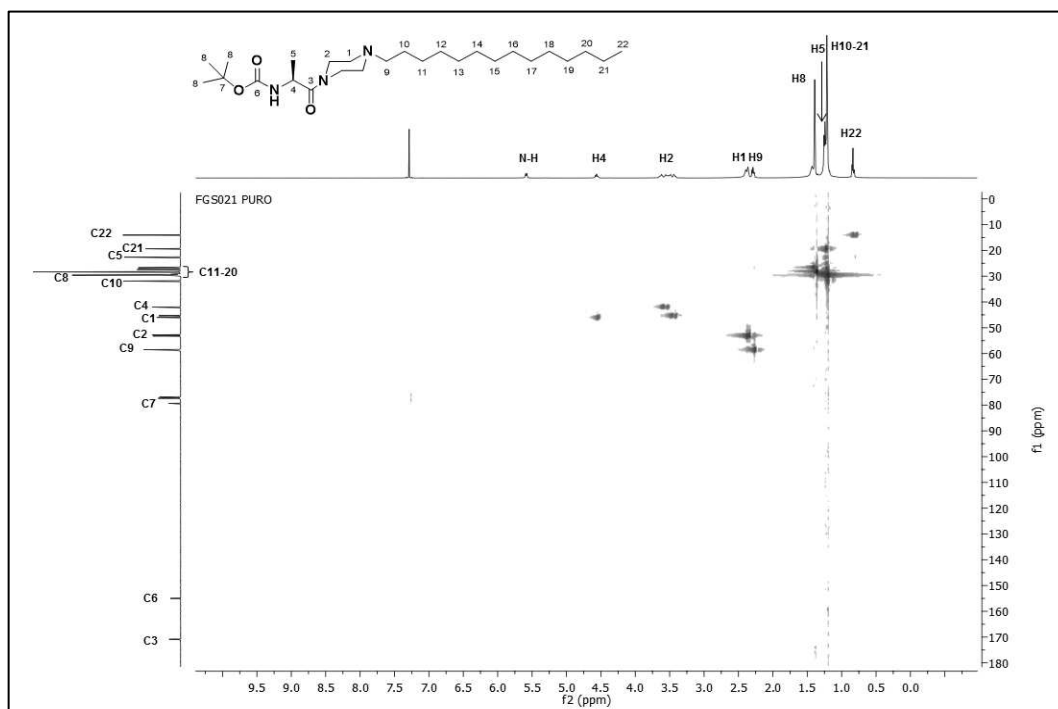
Espectro de DEPT-135 do produto **3b** (125 MHz, CDCl₃)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Mapa de contorno COSY ¹H - ¹H do composto **3b** (CDCl₃)

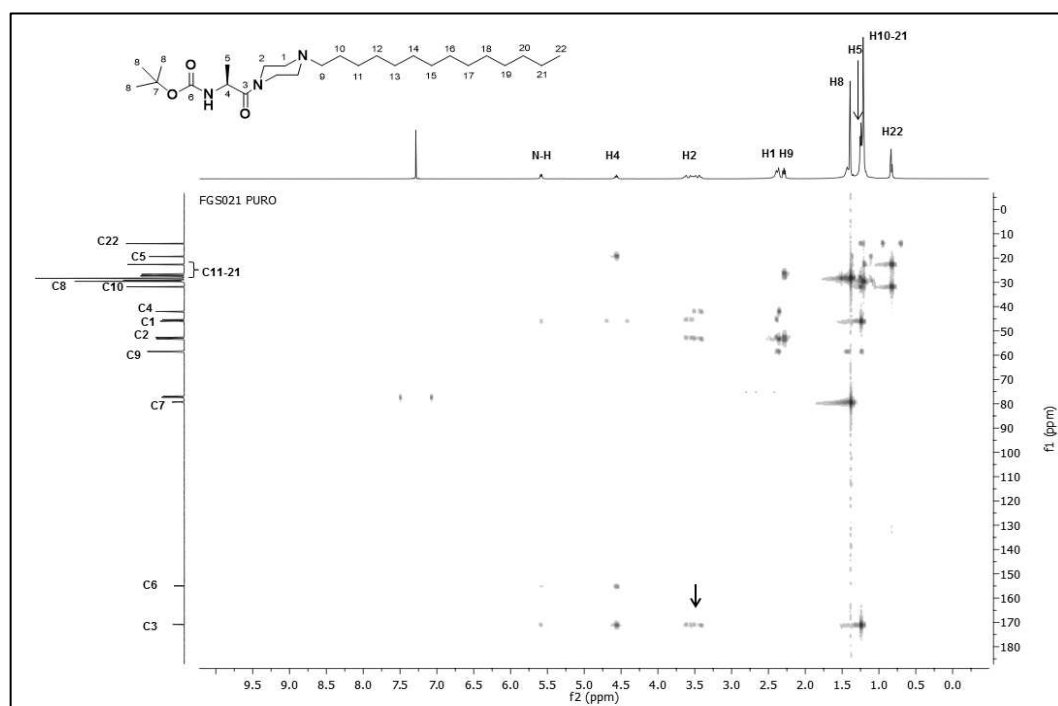
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Mapa de contorno HSQC ^1H - ^{13}C do composto **3b** (CDCl_3)

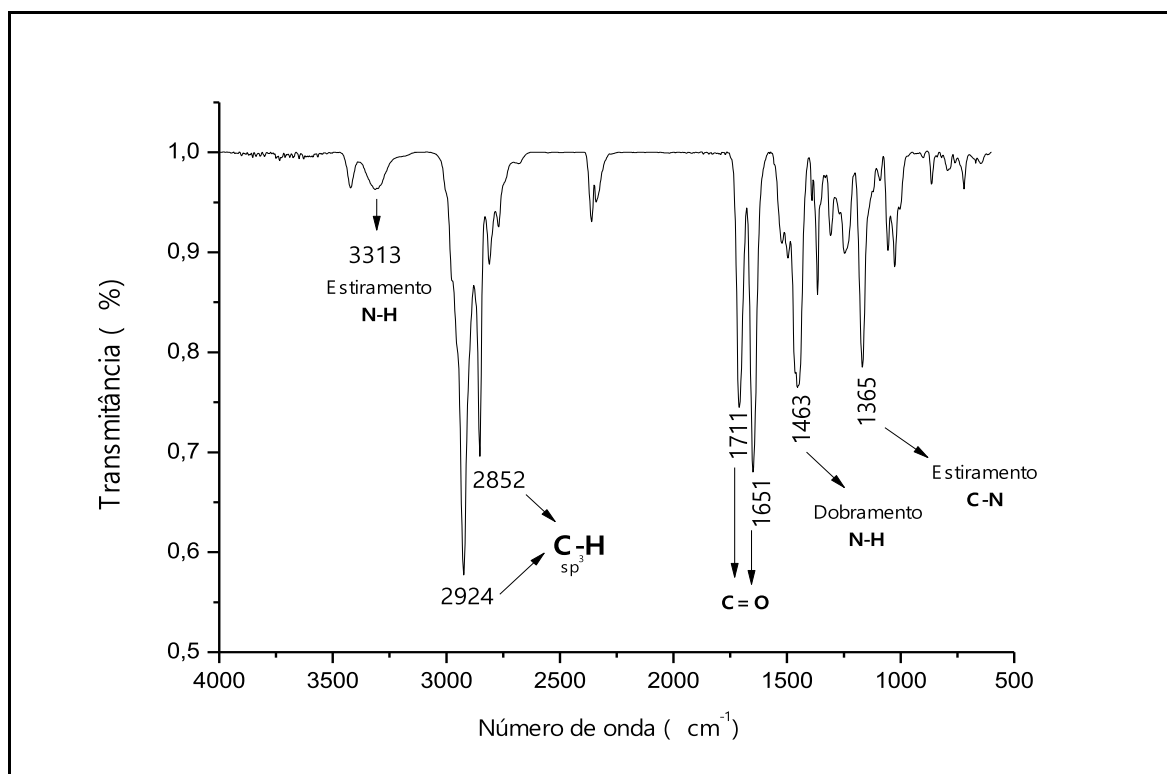


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

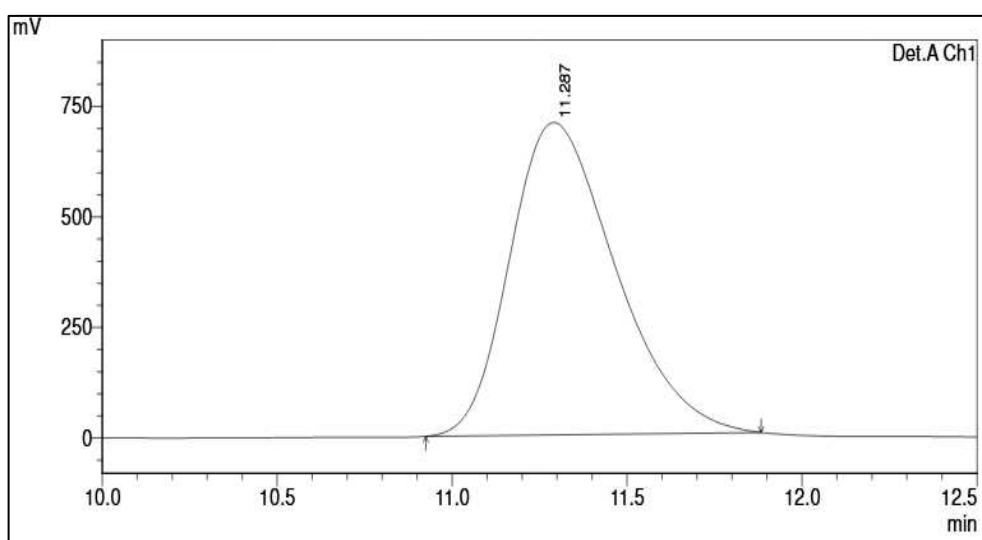
Mapa de contorno HMBC ^1H - ^{13}C do composto **3b** (CDCl_3)



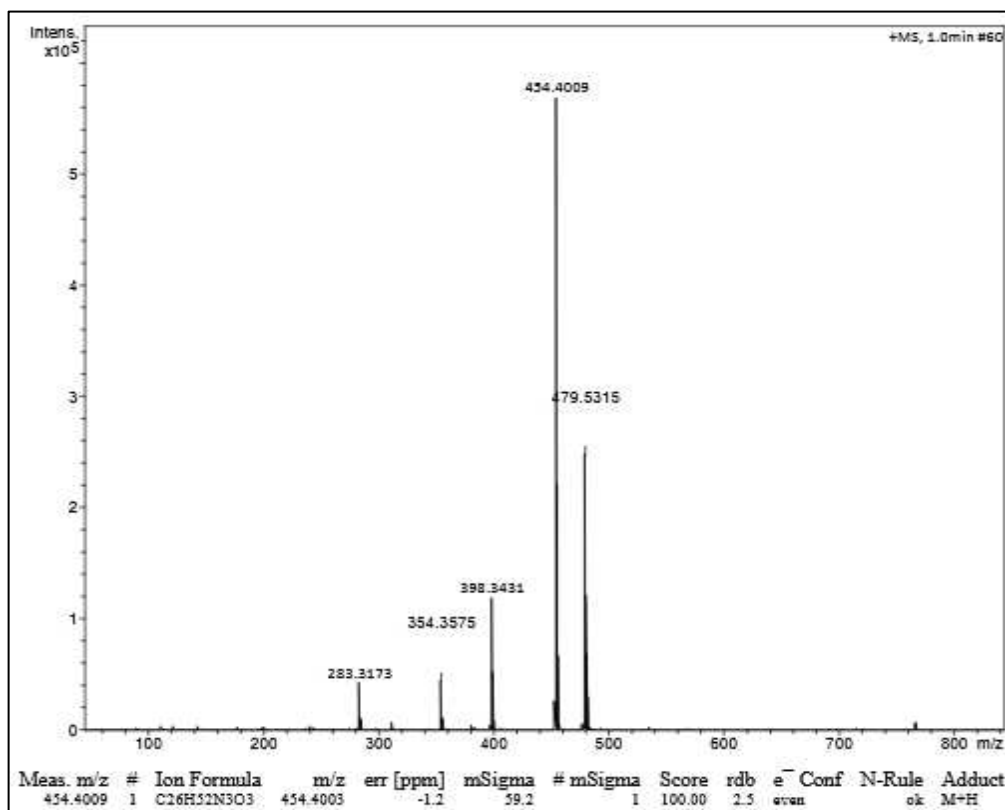
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro no infravermelho do composto **3b**

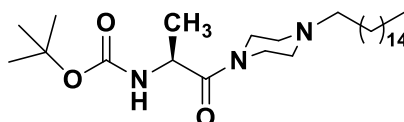
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ) - Cromatograma do composto **3b**

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

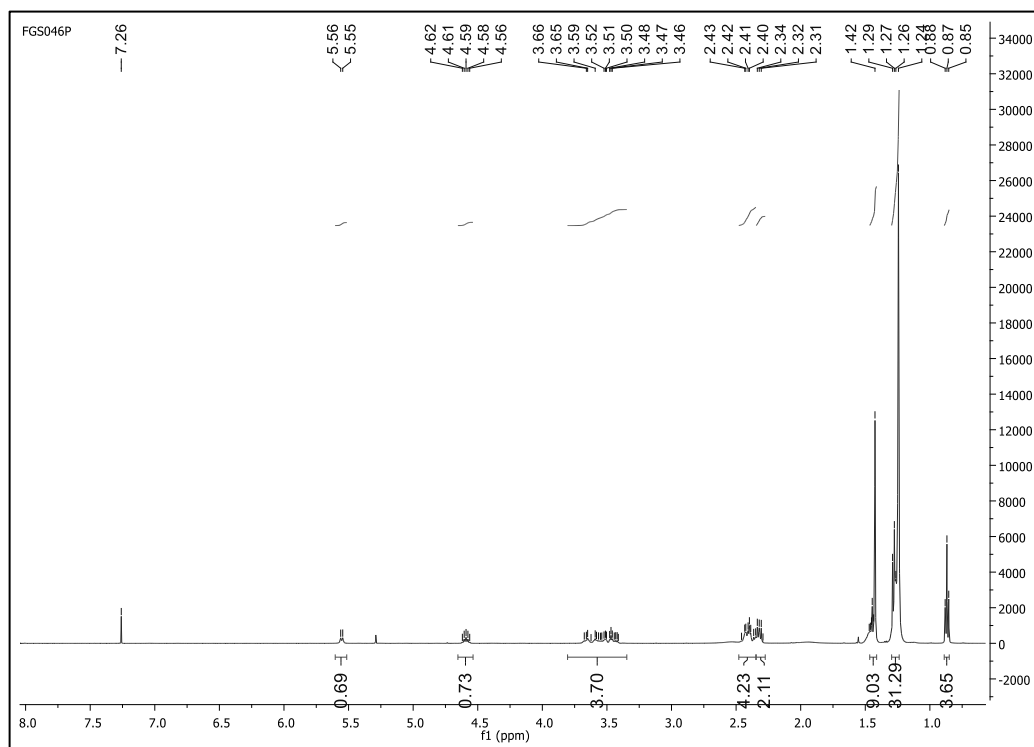
Espectro de Massa de Alta Resolução do composto **3b**

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

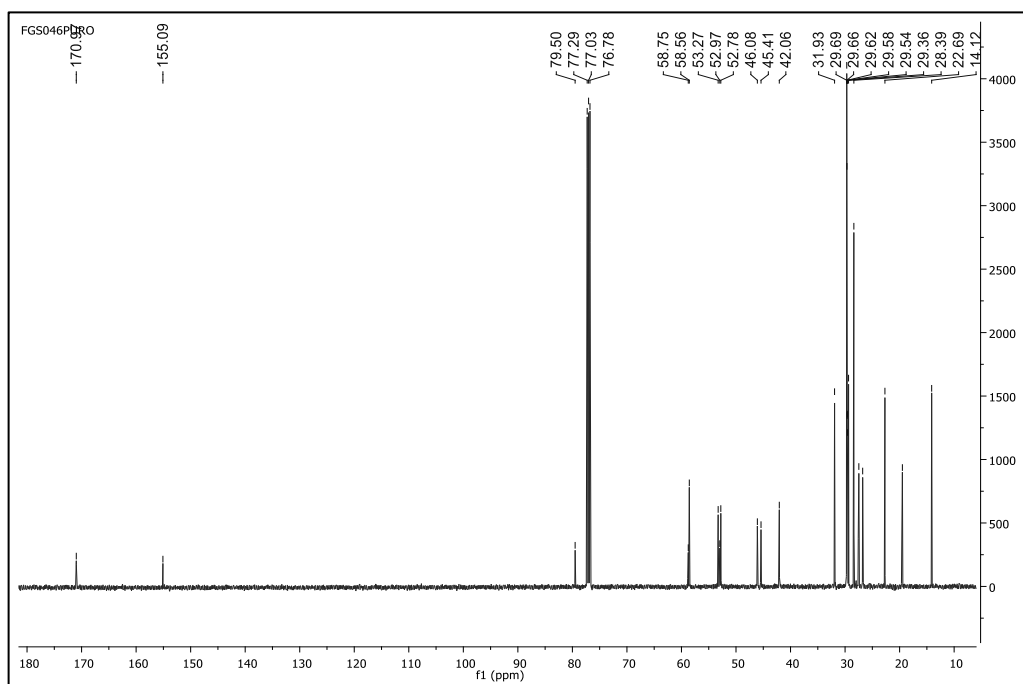


tert-butil-*L*-(1-oxo-1-(4-hexadecanopiperazin-1-il) propan-2-il) carbamato (**3c**)

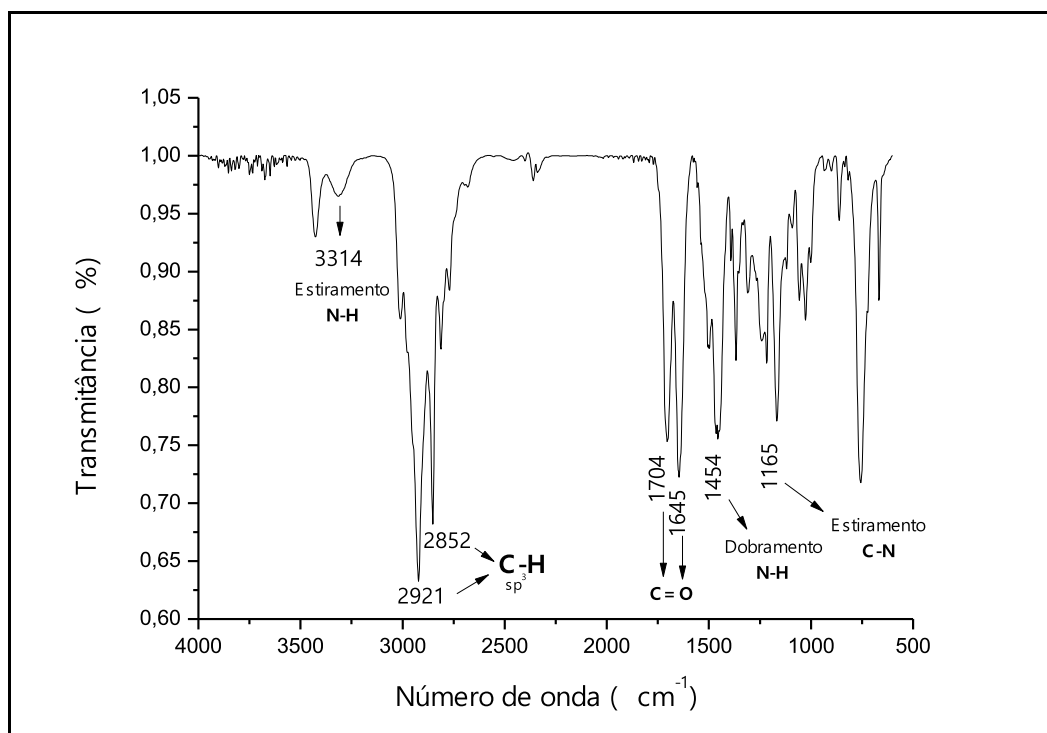
Aspecto: sólido; **Rendimento:** 65%; **Faixa de Fusão (°C):** 90,2-91,5; **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,56-5,55 (d, 1H); 4,62-4,55 (qui, 1H); 3,68-3,41 (m, 4H); 2,46-2,35 (m, 4H); 2,34-2,29 (t, 2H); 1,47-1,42 (s, 9H); 1,29-1,24 (m, 31H); 0,88-0,85 (t, 3H); **RMN de ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,9; 155,0; 79,5; 77,2; 77,0; 76,7; 58,7; 58,5; 53,2; 52,9; 52,7; 46,0; 45,4; 42,0; 31,9; 29,69; 29,66; 28,5; 28,3; 27,4; 26,7; 19,4; 14,1; **IV (NaCl, cm⁻¹):** 3314, 2921, 2852, 1704, 1645, 1165, 756. **EMAR:** calculado para [C₂₈H₅₆N₃O₃] ([M+H]⁺): m/z: 482,4322, encontrado 482,4316.

Espectro de RMN de ^1H do composto **3c** (500 MHz, CDCl_3)

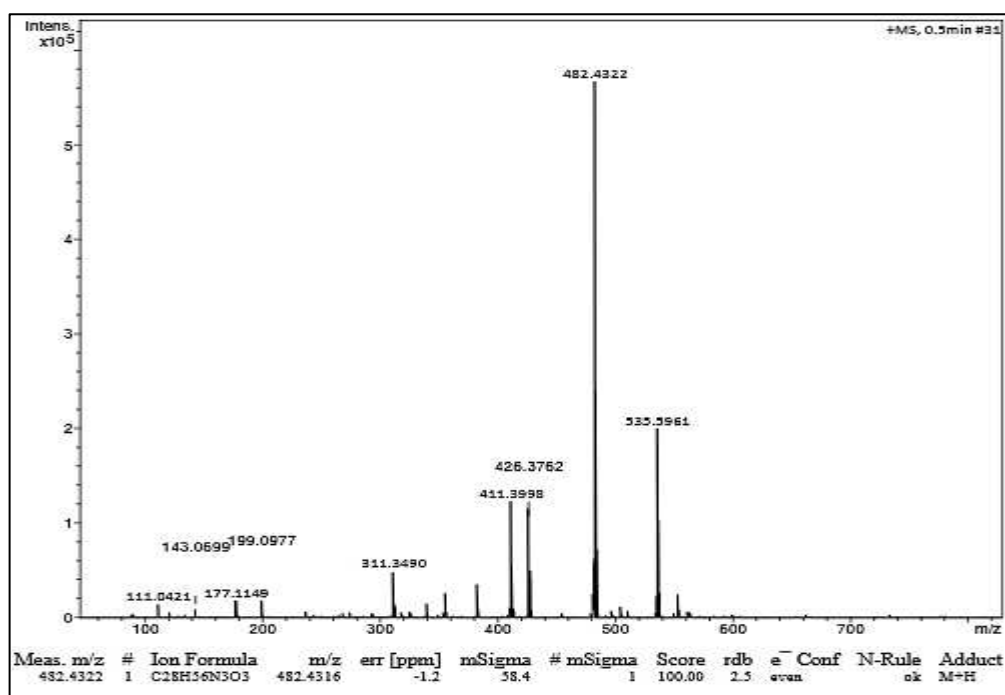
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3c** (125 MHz, CDCl_3)

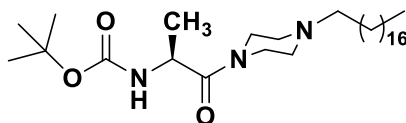
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro no infravermelho do composto **3c**

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de Massa de Alta Resolução do composto **3c**

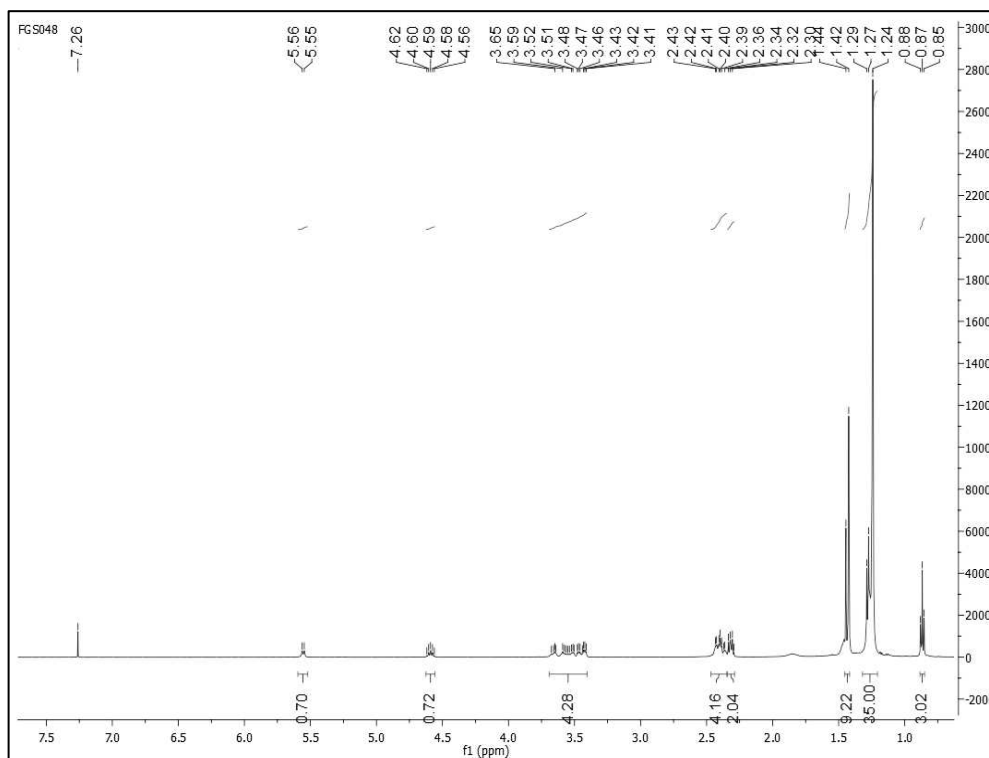
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).



tert-butil-*L*-(1-oxo-1-(4-octadecanopiperazin-1-yl) propan-2-yl) carbamato (**3d**)

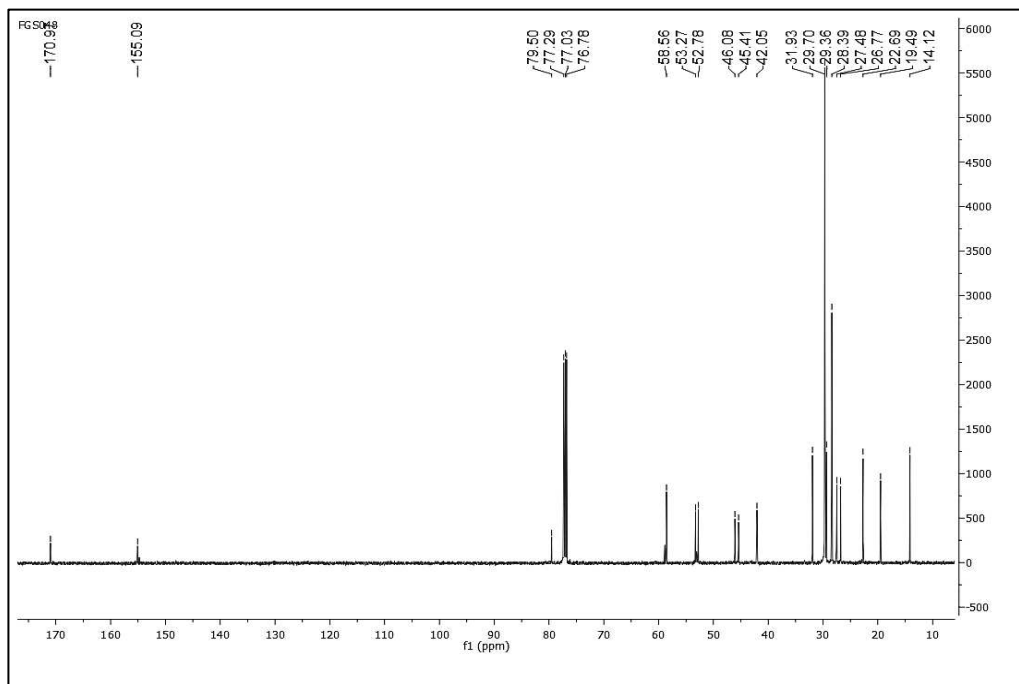
Aspecto: sólido; **Rendimento:** 65%; **Faixa de Fusão (°C):** 91,3-92,5; **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,56-5,55 (d, 1H); 4,62-4,56 (qui, 1H); 3,68-3,41 (m, 4H); 2,46-2,36 (m, 4H); 2,34-2,29 (t, 2H); 1,44-1,42 (s, 9H); 1,29-1,24 (m, 31H); 0,88-0,85 (t, 3H); **RMN de ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,9; 155,0; 79,5; 77,2; 77,0; 76,7; 58,7; 58,5; 53,2; 52,9; 52,7; 46,0; 45,4; 42,0; 31,9; 29,69; 29,66; 28,5; 28,3; 27,4; 26,7; 19,4; 14,1; **IV (NaCl, cm⁻¹):** 3314, 2925, 2853, 1705, 1650, 1454, 1171. **EMAR:** [C₃₀H₅₉N₃O₃] ([M+H]⁺): m/z: 510,4641.

Espectro de RMN de ¹H do composto **3d** (500 MHz, CDCl₃)



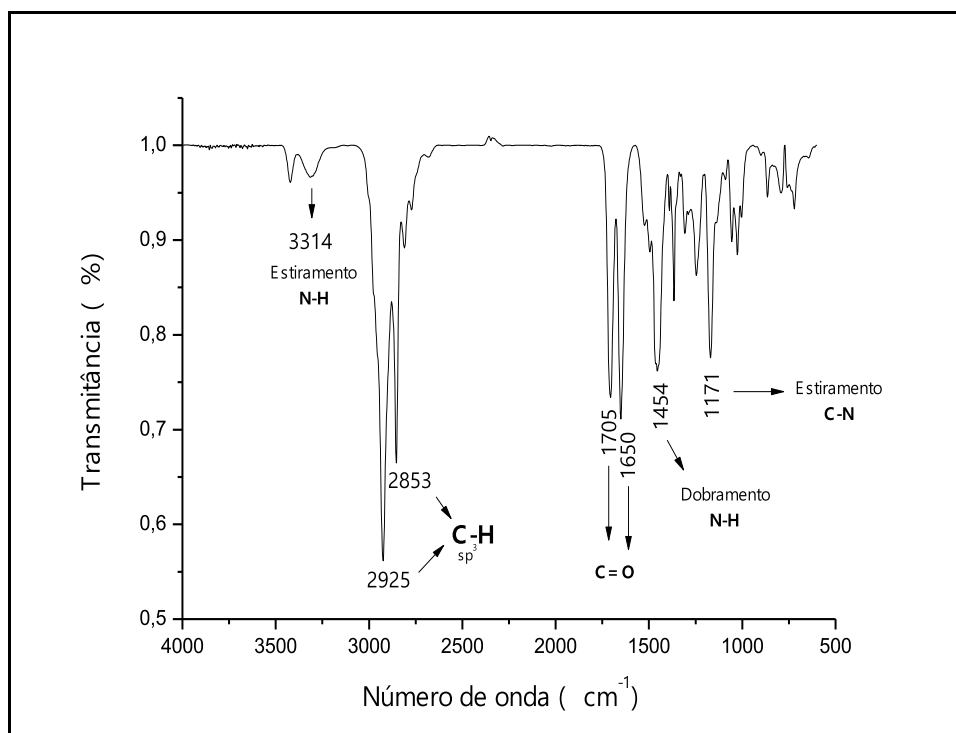
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ¹³C do composto **3d** (125 MHz, CDCl₃)



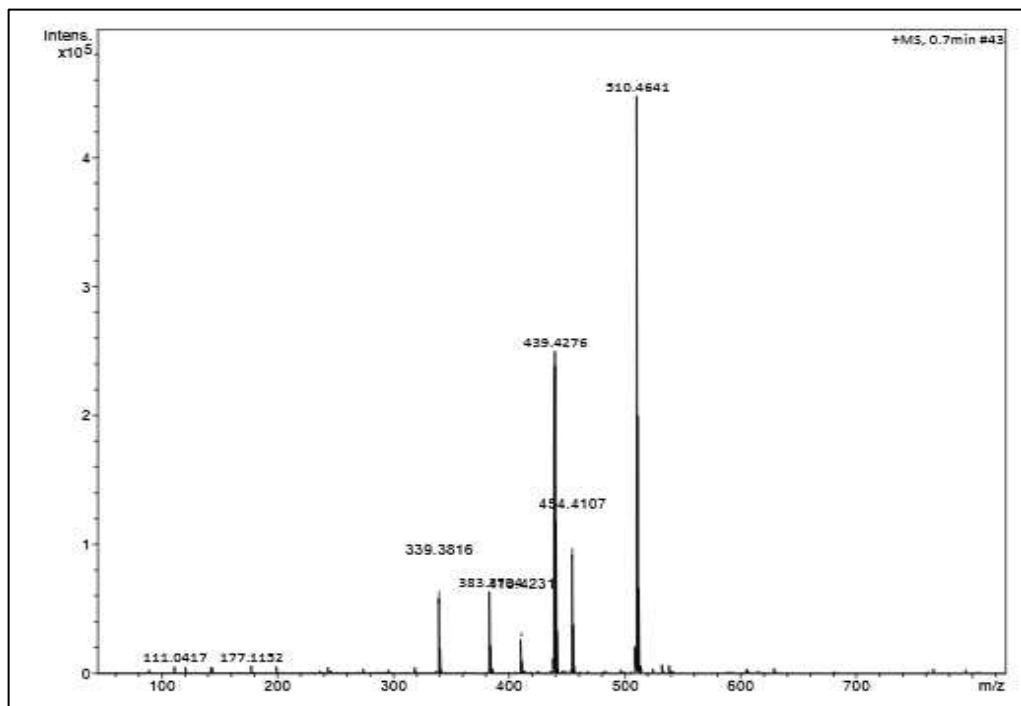
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro no infravermelho do composto 3d

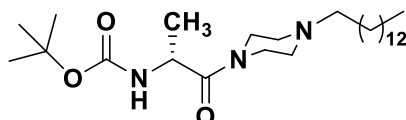


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de Massa de Alta Resolução do composto 3d



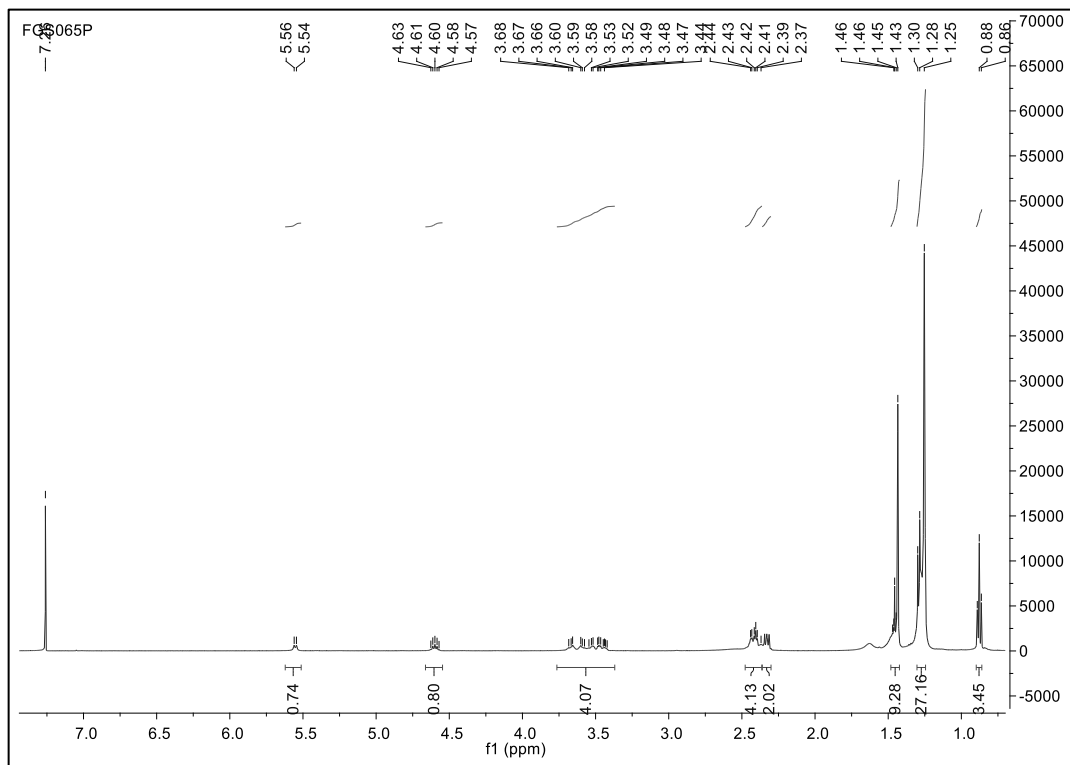
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).



tert-butil-*D*-(1-oxo-1-(4-tetradecanopiperazin-1-il) propan-2-il) carbamato (**4a**)

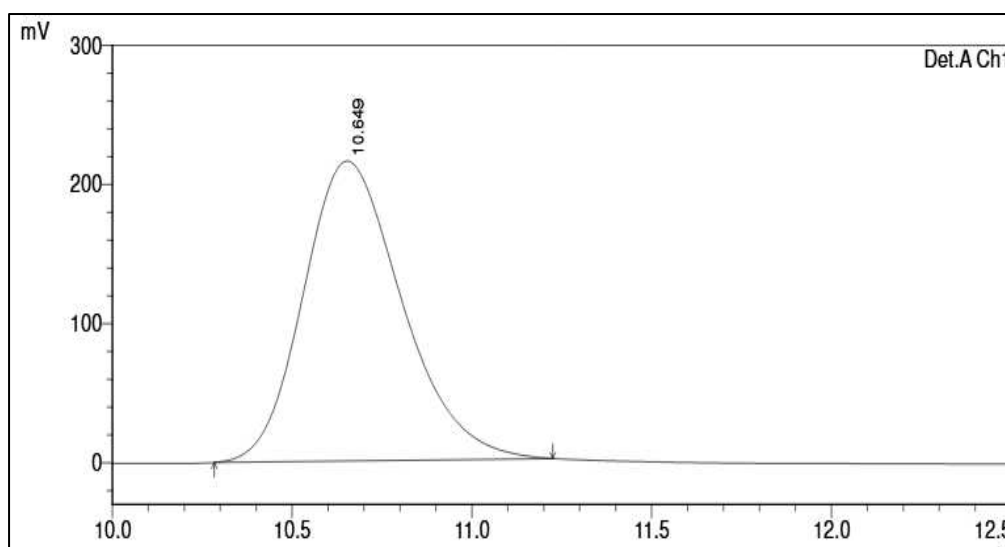
Aspecto: sólido; **Rendimento:** 71%; **Faixa de Fusão (°C):** 88,5-89,2; **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,56-5,54 (d, 1H); 4,63-4,57 (qui, 1H); 3,68-3,42 (m, 4H); 2,44-2,37 (m, 4H); 2,34-2,29 (t, 2H); 1,46-1,43 (s, 9H); 1,30-1,25 (m, 31H); 0,88-0,86 (t, 3H); **RMN de ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,9; 155,0; 79,4; 77,2; 77,0; 76,7; 58,5; 53,2; 52,7; 52,7; 46,0; 42,4; 42,0; 31,9; 29,69; 29,66; 28,5; 28,3; 27,4; 26,7; 19,4; 14,1.

Espectro de RMN de ¹H do composto **4a** (500 MHz, CDCl₃)

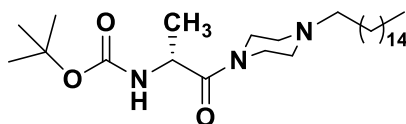


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ) - Cromatograma do composto 4a



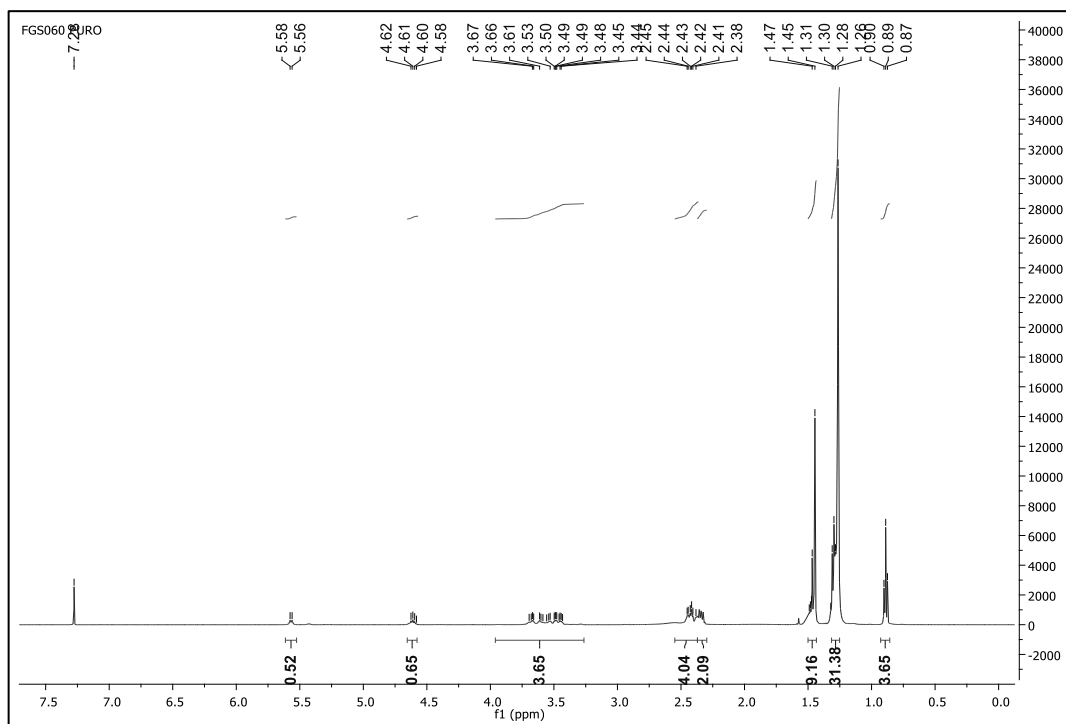
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).



tert-butil-*D*-(1-oxo-1-(4-hexadecanopiperazin-1-yl)propan-2-yl) carbamato (**4b**)

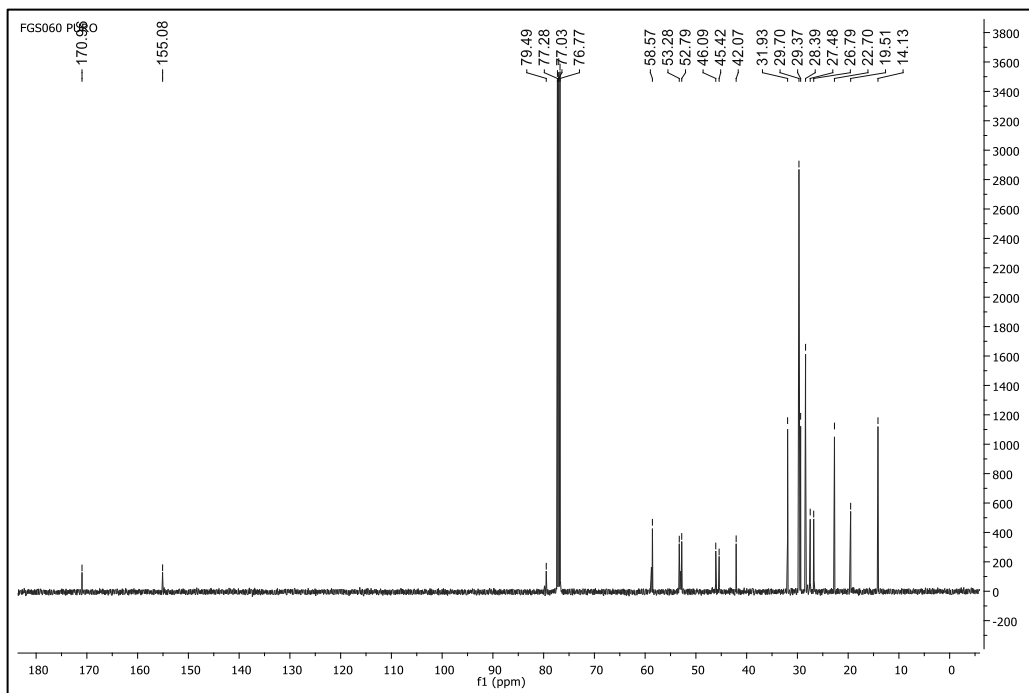
Aspecto: sólido; **Rendimento:** 74%; **Faixa de Fusão (°C):** 90,4-91,4; **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,56-5,55 (d, 1H); 4,62-4,56 (qui, 1H); 3,68-3,41 (m, 4H); 2,46-2,36 (m, 4H); 2,34-2,29 (t, 2H); 1,44-1,42 (s, 9H); 1,29-1,24 (m, 31H); 0,88-0,85 (t, 3H); **RMN de ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,9; 155,0; 79,5; 77,2; 77,0; 76,7; 58,7; 58,5; 53,2; 52,9; 52,7; 46,0; 45,4; 42,0; 31,9; 29,69; 29,66; 28,5; 28,3; 27,4; 26,7; 19,4; 14,1. **EMAR:** calculado para [C₂₈H₅₆N₃O₃] ([M+H]⁺): m/z: 482,4320, encontrado 482,4316.

Espectro de RMN de ¹H do composto **4b** (500 MHz, CDCl₃)



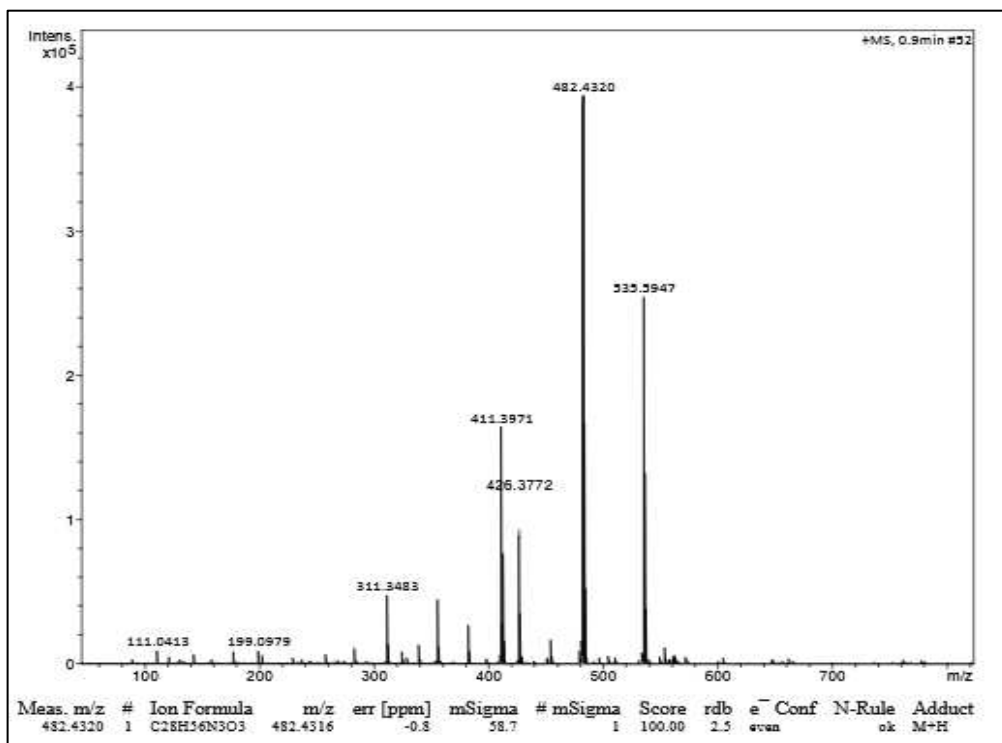
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ¹³C do composto **4b** (125 MHz, CDCl₃)

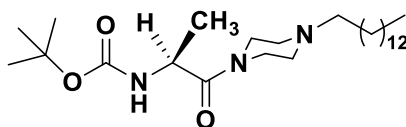


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de Massa de Alta Resolução do composto **4b**



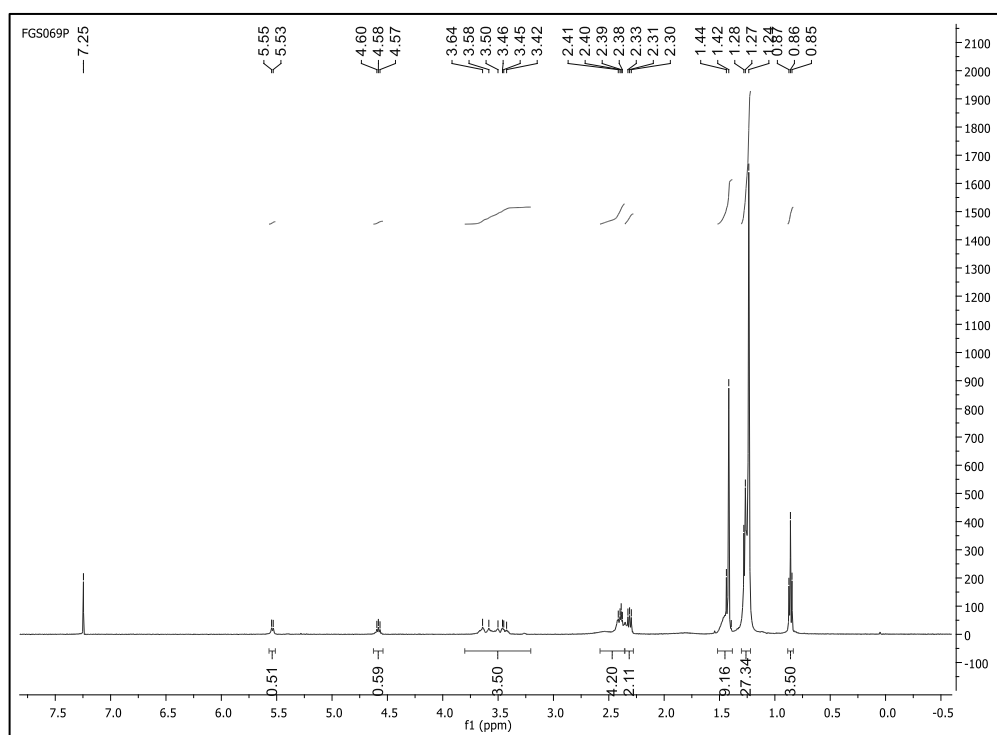
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).



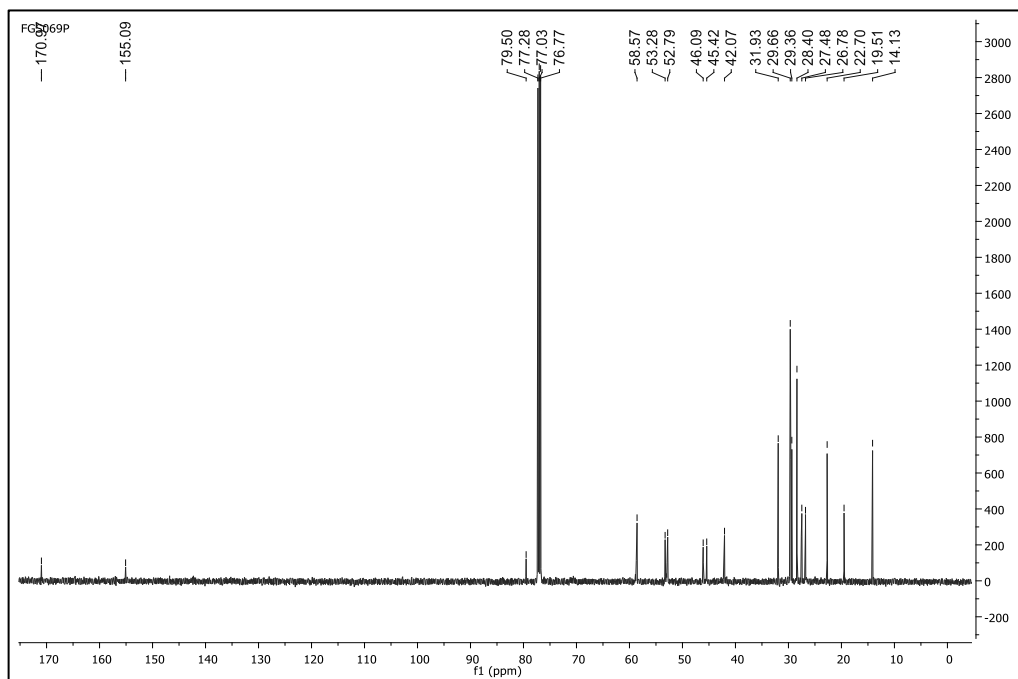
tert-butil-*D,L*-(1-oxo-1-(4-tetradecanopiperazin-1-il) propan-2-il) carbamato (**5a**)

Aspecto: sólido; **Rendimento:** 82%; **Faixa de Fusão (°C):** 88,4-89,5; **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,55-5,53 (d, 1H); 4,60-4,57 (qui, 1H); 3,64-3,42 (m, 4H); 2,41-2,38 (m, 4H); 2,33-2,30 (t, 2H); 1,44-1,39 (s, 9H); 1,28-1,24 (m, 31H); 0,87-0,85 (t, 3H); **RMN de ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,9; 155,0; 79,5; 77,2; 77,0; 76,7; 58,5; 53,2; 52,7; 46,0; 45,4; 42,0; 31,9; 29,66; 29,3; 27,4; 26,7; 22,7; 19,5; 14,1.

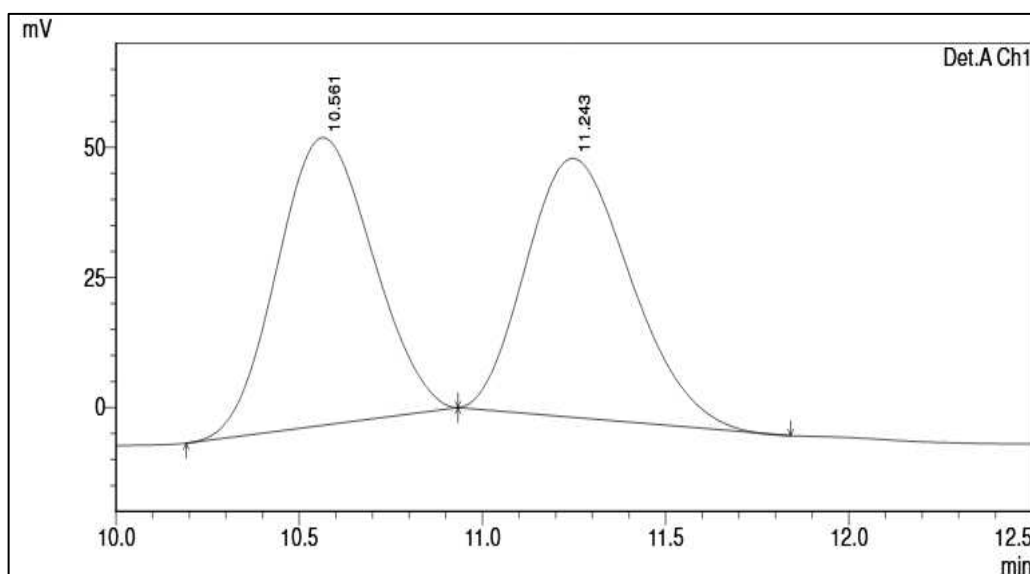
Espectro de RMN de ¹H do composto **5a** (500 MHz, CDCl₃)



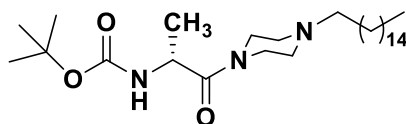
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ^{13}C do composto **5a** (125 MHz, CDCl_3)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Estacionária Quiral (CLAE-FEQ) - Cromatograma do composto **5a**

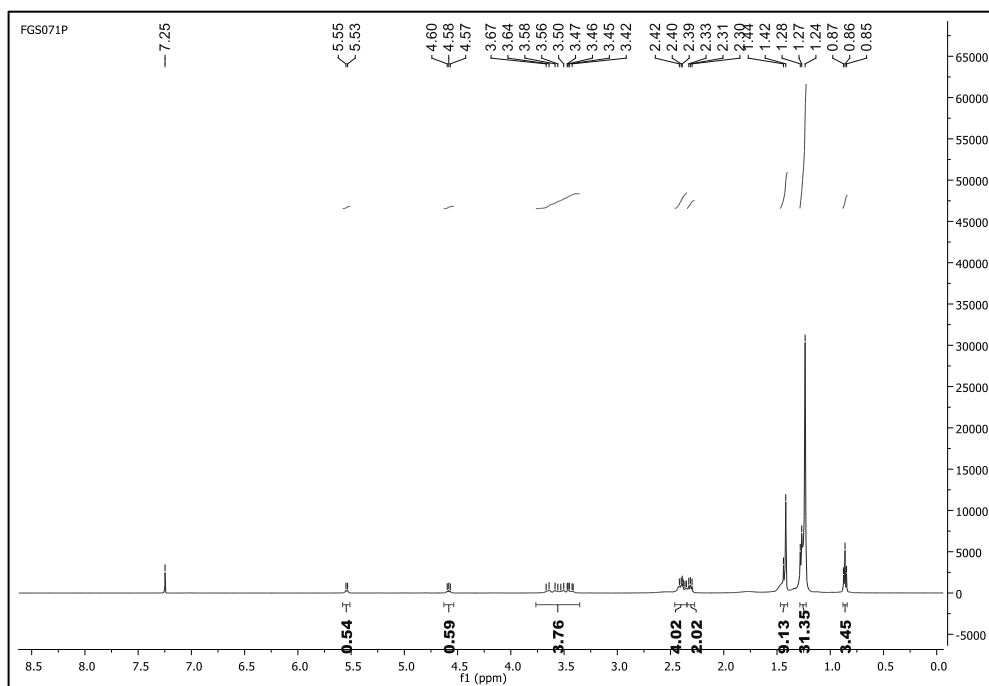
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).



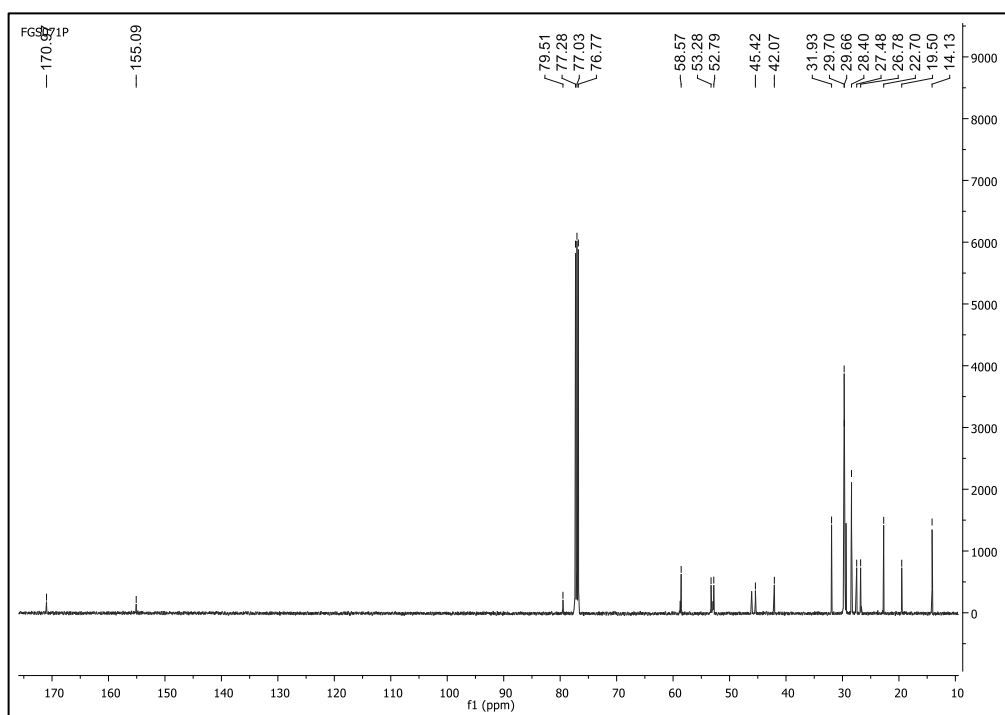
tert-butil-*D,L*-(1-oxo-1-(4-hexadecanopiperazin-1-il) propan-2-il) carbamato (**5b**)

Aspecto: sólido; **Rendimento:** 88%; **Faixa de Fusão (°C):** 90,3-91,5; **RMN de ¹H** (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5,55-5,53 (d, 1H); 4,60-4,57 (qui, 1H); 3,67-3,41 (m, 4H); 2,42-2,35 (m, 4H); 2,33-2,30 (t, 2H); 1,44-1,42 (s, 9H); 1,28-1,24 (m, 31H); 0,87-0,85 (t, 3H); **RMN de ¹³C** (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170,9; 155,0; 79,5; 77,2; 77,0; 76,7; 58,5; 53,2; 52,7; 45,4; 42,0; 31,9; 29,6; 28,4; 27,4; 26,7; 19,5; 14,1.

Espectro de RMN de ¹H do composto **5b** (500 MHz, CDCl₃)



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Espectro de RMN de ^{13}C do composto **5b** (125 MHz, CDCl_3)

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).