

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Elaine de Freitas Castro Reis

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE IMUNOSSUPRESSORA DE DIAMINAS E
AMINOÁLCOIS LIPOFÍLICOS**

JUIZ DE FORA

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Elaine de Freitas Castro Reis

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE IMUNOSSUPRESSORA DE DIAMINAS E
AMINOÁLCOOIS LIPOFÍLICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Saúde.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

JUIZ DE FORA

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

ELAINE DE FREITAS CASTRO REIS

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOSSUPRESSORA DE DIAMINAS E AMINOÁLCOOIS LIPOFÍLICOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Saúde.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida (Orientador)

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa Dra. Ana Paula Ferreira (Co-orientador)

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Ricardo José Alves

Universidade Federal de Belo Horizonte

Profa. Dra. Mireille Le Hyaric

Universidade Federal de Juiz de Fora

“Não importa onde você vai parar...

Em que momento da vida você cansou...

O que importa é que sempre é possível
e necessário recomeçar.

Recomeçar é dar uma chance a si mesmo...

É renovar as esperanças na vida e,

Mais importante...

Acreditar em você de novo!”

Carlos Drummond de Andrade

Dedico este trabalho:

Ao meu filho **Otávio**, por ser a realização do meu maior sonho.

Ao meu grande amor e companheiro, **Júlio**.

A meus queridos pais, **José e Irani**, por serem tão maravilhosos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **DEUS**, por ter me dado forças para alcançar esta vitória e realizar este grande sonho.

Aos meus pais, José e Irani, pelo amor sem medida, doação, e eterno apoio. Obrigado por cuidarem do meu filho com tanto amor e dedicação, sem vocês eu não teria conseguido. Mãe, a senhora é a minha referência de coragem e determinação. Pai, o senhor é o meu grande incentivador nas horas difíceis, suas palavras de carinho são sempre fundamentais.

Ao meu esposo Júlio, pela demonstração diária do seu amor, respeito, confiança, companheirismo, paciência, e pela dedicação ao nosso filho nos finais de semana para eu estudar.

Ao prezado professor Dr. Mauro Vieira de Almeida, pela confiança em me aceitar em seu laboratório, pelos valiosos ensinamentos, pela amizade, e por ser um “exemplo” de orientador e professor.

À professora Dra. Ana Paula Ferreira, pela grande colaboração na realização dos experimentos biológicos, pela atenção dispensada e pela oportunidade.

À querida Lívia, pela colaboração nos experimentos biológicos, companheirismo, dedicação, que se tornaram ótimos momentos de convivência e amizade. Ao Caio, pela presteza em nos ajudar sempre que necessário.

Ao Celso, pela relevante contribuição neste trabalho.

À amiga de todas as horas Taís pela ajuda, apoio e amizade sincera. Aos admiráveis amigos Maurício, Cristiane e Débora, que sem medirem esforços, me passaram vários conhecimentos. A todos os amigos do laboratório de química e da imuno, pela colaboração, companheirismo e carinho.

À professora Mireille pela cooperação, atenção e amizade.

À pesquisadora Maria Cristina S. Lourenço da Fundação Osvaldo Cruz- IPEC/ Fiocruz e a Dra Elaine Soares Coimbra do Laboratório de Parasitologia do ICB/UFJF, pela colaboração nos experimentos biológicos.

À querida Darcília, Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Saúde Brasileira e ao secretário Carlos, pelo auxílio sempre prestado.

A FAPEMIG e UFJF pelo suporte financeiro.

RESUMO

Os fármacos imunossupressores se apresentam como as principais substâncias que afetam a resposta imune, diminuindo tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida. As drogas imunossupressoras são geralmente utilizadas no tratamento de várias doenças auto-imunes, algumas alergias, e prevenção e/ ou tratamento da rejeição de transplantes. O objetivo do presente trabalho foi sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade biológica de novos aminoálcoois lipofílicos. Para síntese destes compostos foi realizada a reação de um diol comercial (1,2-tetradecanodiol) com cloreto de mesila em piridina para formação do 1-*o*-monomesilato correspondente. Este, por sua vez, foi tratado com duas diaminas (1,2- etanodiamina e 1,3-propanodiamina), formando assim as diaminas monoalquiladas correspondentes. O referido monomesilato foi também tratado com quatro aminoálcoois para fornecer os correspondentes derivados *N*-alquilados. Após a purificação, foi feita a caracterização dos produtos por espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C . A avaliação “in vitro” da atividade biológica das substâncias obtidas foi realizada utilizando-se a linhagem de macrófagos J774, estimulada com BCG e IFN- γ . Avaliou-se a produção de óxido nítrico (NO) através do Método de Griess, a viabilidade celular e a citotoxicidade pelo Método do MTT. Os compostos **10** na concentração 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$; os compostos **11**, **12**, **16**, **19** nas concentrações 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e o composto **14** nas concentrações 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se destacaram por diminuírem a produção de NO, sem interferirem na proliferação celular e sem serem citotóxicos, com resultados sugestivos de atividade imunossupressora. A avaliação “in vivo” dos compostos **12** e **19**, foi realizada utilizando o modelo de Reação de Hipersensibilidade Tardia (RHT) para a proteína ovalbumina. Ambos os compostos apresentaram atividade imunossupressora.

PALAVRAS CHAVES: Aminoálcoois. Diaminas. Atividade imunossupressora.

ABSTRACT

Immunosuppressant drugs are the main drugs that can affect the immune response, reducing the activation of the innate and acquired immunities. The immunosuppressive drugs are used in the treatment of several autoimmune diseases, some allergies, and in the prevention and/or treatment of the rejection of transplanted organs and tissues. The objective of the present work is the synthesis, characterization and evaluation of the biological activity of new lipophilic aminoalcohols. For synthesis of the desired compounds, a commercial diol (1,2-tetradecanediol) was treated with mesyl chloride leading to the corresponding monomesylate. The late compound was treated with a diamine (1,2-ethanediamine or 1,3-propanediamine), to furnish the corresponding *N*-monoalkylated diamines. The monomesylate was also treated with four aminoalcohols, leading to the correspondings *N*-alkylated derivatives. After purification, the compounds were characterized by IR and ^1H NMR and ^{13}C NMR spectroscopy. The *in vitro* evaluation of the biological activity of the compounds was carried out using the lineage cell J774.1, stimulated with BCG and IFN- γ . The Griess Method was used for determining the production of nitric oxide (NO), and the cytotoxicity of the compounds was evaluated by the MTT Method. Compound **10** at the concentration of 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$; compounds **11**, **12**, **16**, **19** at the concentrations of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and compound **14** at the concentrations of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ decreased significantly the production of NO, but did not decrease the cell proliferation and were not cytotoxic. These results suggest an immunosuppressive activity. The *in vivo* evaluation of compounds **12** and **19** was realized using the delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction against ovalbumin (OA), where both compounds showed immunosuppressive activity.

KEYWORDS: Aminoalcohols. Diamines. Immunosuppressive activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina.....	4
Figura 1.2. Estruturas químicas da ISP-1(miriocina) e do FTY720.....	9
Figura 3.1. Grupo de camundongos da linhagem Balb/C e acondicionamento em estantes ventiladas.....	28
Figura 3.2. Cultura de macrófagos murinos J774.A-1 e observação das células através do microscópio invertido.....	29
Figura 3.3. Ensaio da viabilidade celular através do Método MTT.....	30
Figura 3.4. Leitor de microplacas Spectramax, utilizado no Método do MTT e no Método de Griess.....	31
Figura 3.5. Medida da pata posterior do camundongo utilizando especímetro.....	33
Figura 4.1. Espectro de IV do composto 2 em KBr.....	36
Figura 4.2. Espectro de RMN de ^1H do composto 2 (CDCl_3 , 300MHz).....	37
Figura 4.3. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2 (CDCl_3 , 75 MHz).....	37
Figura 4.4. Espectro de infravermelho do composto 6 em KBr.....	39
Figura 4.5. Espectro de RMN de ^1H do composto 6 (CDCl_3 , 300 MHz).....	39
Figura 4.6. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6 (CDCl_3 , 75 MHz).....	40
Figura 4.7. Espectro de infravermelho do composto 8 em KBr.....	42
Figura 4.8. Espectro de RMN de ^1H do composto 8 (CDCl_3 , 300 MHz).....	42
Figura 4.9. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8 (CDCl_3 , 75 MHz).....	43
Figura 4.10. Espectro de infravermelho do composto 10 em KBr.....	44
Figura 4.11. Espectro de RMN de ^1H do composto 10 (CDCl_3 , 300 MHz).....	44
Figura 4.12. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 10 (CDCl_3 , 300 MHz).....	45
Figura 4.13. Espectro de infravermelho do composto 15 em KBr.....	47
Figura 4.14. Espectro de RMN de ^1H do composto 15 (CDCl_3 , 300 MHz).....	47
Figura 4.15. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 15 (CDCl_3 , 75 MHz).....	48
Figura 4.16. Espectro de infravermelho do composto 17 em KBr.....	50
Figura 4.17. Espectro de RMN de ^1H do composto 17 (CDCl_3 , 300 MHz).....	50
Figura 4.18. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 17 (CDCl_3 , 75 MHz).....	51

Figura 4.19. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) da diamina <u>6</u> em diferentes concentrações.....	53
Figura 4.20. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) da diamina <u>7</u> em diferentes concentrações.....	54
Figura 4.21. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool <u>10</u> em diferentes concentrações.....	54
Figura 4.22. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) da diamina <u>11</u> em diferentes concentrações.....	55
Figura 4.23. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool <u>12</u> em diferentes concentrações.....	56
Figura 4.24. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool <u>13</u> em diferentes concentrações.....	56
Figura 4.25. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool <u>14</u> em diferentes concentrações.....	57
Figura 4.26. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool <u>15</u> em diferentes concentrações.....	57
Figura 4.27. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool <u>16</u> em diferentes concentrações.....	58
Figura 4.28. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool <u>17</u> em diferentes concentrações.....	58
Figura 4.29. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool <u>18</u> em diferentes concentrações.....	59
Figura 4.30. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de No (B) do aminoálcool <u>19</u> em diferentes concentrações.....	59
Figura 4.31. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de No (B) do aminoálcool <u>20</u> em diferentes concentrações.....	60
Figura 4.32. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de No (B) do aminoálcool <u>21</u> em diferentes concentrações.....	61
Figura 4.33. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de No (B) do aminoálcool <u>22</u> em diferentes concentrações.....	61
Figura 4.34. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de No (B) do aminoálcool <u>23</u> em diferentes concentrações.....	62
Figura 4.35. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de No (B) da diamina <u>24</u> em diferentes concentrações.....	62

Figura 4.36. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de No (B) do composto 25 em diferentes concentrações.....	63
Figura 4.37. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de No (B) do composto 26 em diferentes concentrações.....	63
Figura 4.38. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de No (B) do composto 27 em diferentes concentrações.....	64
Figura 4.39. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de No (B) do composto 28 em diferentes concentrações.....	64
Figura 4.40. Avaliação da RHT em patas de camundongos imunizados e tratados com OA.....	67
Figura 7.1.1. Espectro no IV do composto 2	74
Figura 7.1.2. Espectro no IV do composto 3	74
Figura 7.1.3. Espectro no IV do composto 5	75
Figura 7.1.4. Espectro no IV do composto 6	75
Figura 7.1.5. Espectro no IV do composto 7	76
Figura 7.1.6. Espectro no IV do composto 8	76
Figura 7.1.7. Espectro no IV do composto 9	77
Figura 7.1.8. Espectro no IV do composto 10	77
Figura 7.1.9. Espectro no IV do composto 11	78
Figura 7.1.10. Espectro no IV do composto 12	78
Figura 7.1.11. Espectro no IV do composto 13	79
Figura 7.1.12. Espectro no IV do composto 14	79
Figura 7.1.13. Espectro no IV do composto 15	80
Figura 7.1.14. Espectro no IV do composto 16	80
Figura 7.1.15. Espectro no IV do composto 17	81
Figura 7.1.16. Espectro no IV do composto 18	81
Figura 7.1.17. Espectro no IV do composto 19	82
Figura 7.2.1. Espectros de RMN de ^1H do composto 2	83
Figura 7.2.2. Espectros de RMN de ^{13}C do composto 2	83
Figura 7.2.3. Espectros de RMN de ^1H do composto 3	84
Figura 7.2.4. Espectros de RMN de ^{13}C do composto 3	84
Figura 7.2.5. Espectros de RMN de ^1H do composto 5	85
Figura 7.2.6. Espectros de RMN de ^{13}C do composto 5	85
Figura 7.2.7. Espectros de RMN de ^1H do composto 6	86

Figura 7.2.8. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>6</u>	86
Figura 7.2.9. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>7</u>	87
Figura 7.2.10. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>7</u>	87
Figura 7.2.11. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>8</u>	88
Figura 7.2.12. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>8</u>	88
Figura 7.2.13. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>9</u>	89
Figura 7.2.14. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>9</u>	89
Figura 7.2.15. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>10</u>	90
Figura 7.2.16. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>10</u>	90
Figura 7.2.17. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>11</u>	91
Figura 7.2.18. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>11</u>	91
Figura 7.2.19. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>12</u>	92
Figura 7.2.20. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>12</u>	92
Figura 7.2.21. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>13</u>	93
Figura 7.2.22. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>13</u>	93
Figura 7.2.23. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>14</u>	94
Figura 7.2.24. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>14</u>	94
Figura 7.2.25. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>15</u>	95
Figura 7.2.26. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>15</u>	95
Figura 7.2.27. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>16</u>	96
Figura 7.2.28. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>16</u>	96
Figura 7.2.29. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>17</u>	97
Figura 7.2.30. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>17</u>	97
Figura 7.2.31. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>18</u>	98
Figura 7.2.32. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>18</u>	98
Figura 7.2.33. Espectros de RMN de ^1H do composto <u>19</u>	99
Figura 7.2.34. Espectros de RMN de ^{13}C do composto <u>19</u>	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Estequiometria das reações de obtenção e rendimento dos compostos <u>2</u> , <u>3</u> e <u>5</u>	13
Tabela 3.2. Estequiometria das reações de obtenção e rendimento dos compostos <u>6</u> e <u>7</u>	16
Tabela 3.3. Estequiometria das reações de obtenção e rendimento dos compostos <u>8</u> e <u>9</u>	18
Tabela 3.4. Estequiometria das reações de obtenção e rendimento dos compostos <u>12-15</u>	22
Tabela 3.5. Estequiometria das reações de obtenção e rendimento dos compostos <u>16-19</u>	25
Tabela 4.1. Valores de faixa de fusão e rendimentos dos mesilatos de alquila.....	35
Tabela 4.2. Valores de faixa de fusão e rendimentos das diaminas <u>6</u> e <u>7</u>	38
Tabela 4.3. Valores de rendimento e faixa de fusão dos compostos <u>8-11</u>	41
Tabela 4.4. Valores de rendimento e faixas de fusão dos compostos <u>12-15</u>	46
Tabela 4.5. Valores de rendimento e faixa de fusão dos aminoálcoois <u>16-19</u>	49
Tabela 4.6. Avaliação da inibição da proliferação celular e citotoxicidade de amino-álcoois e diaminas.....	65
Tabela 4.7. Resultados experimento RHT utilizando modelo OA em camundongos....	66
Tabela 4.8. Triagem para detecção da atividade antituberculose.....	68
Tabela 4.9. Resultado dos testes contra <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i>	69

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 2.1. Plano de síntese de diaminas e aminoálcoois <i>N</i> - alquilados.....	11
Esquema 3.1. Síntese dos compostos <u>2</u> , <u>3</u> e <u>5</u>	13
Esquema 3.2. Síntese das diaminas <u>6</u> e <u>7</u>	15
Esquema 3.3. Síntese das azidas <u>8</u> e <u>9</u>	17
Esquema 3.4. Síntese dos compostos <u>10</u> e <u>11</u>	19
Esquema 3.5. Síntese dos aminoálcoois <u>12-15</u>	21
Esquema 3.6. Síntese dos aminoálcoois <u>16-19</u>	25
Esquema 4.1. Síntese dos metanossulfonatos de alquila <u>2</u> , <u>3</u> e <u>5</u>	35
Esquema 4.2. Síntese das diaminas <u>6</u> e <u>7</u>	38
Esquema 4.3. Síntese do amino álcool <u>10</u> e da diamina <u>11</u>	41
Esquema 4.4. Síntese dos compostos <u>12-15</u>	46
Esquema 4.5. Síntese dos aminoálcoois <u>16-19</u>	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS

- δ : Deslocamento químico
- CDCl_3 : Clorofórmio deuterado
- CCD: Cromatografia em camada delgada
- Hz: Hertz
- IFN- γ : Interferon gama
- IL-2: Interleucina 2
- J: Constante de acoplamento
- IV: Infravermelho
- MHz: megahertz
- Mmol: milimol
- MsCl : Cloreto de mesila
- MTT: brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio
- NADPH: Fosfato dinucleótido adenina nicotinamida
- NK: Células natural killer
- NO: Óxido nítrico
- NOS: Óxido nítrico sintetase
- OA: Ovalbumina
- Pi: Piridina
- RHT: Reação de hipersensibilidade tardia
- RMN de ^1H : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
- RMN de ^{13}C : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS E ARTIGOS PUBLICADOS

RELACIONADOS A ESTE TRABALHO

- ✓ Taveira, A.F.; Le Hyaric, M.; Reis, E.F.C.; Araújo, D.P.; Ferreira, A.P.; Souza, M. A.; Alves, L.L.; Lourenço, M.C.S.; Vicente, F.R.C.; Almeida, M.V. "Preparation and antitubercular activities of alkylated amino alcohols and their glycosylated derivatives". *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (2007) 7789–7794.

- ✓ Júnior, C. O. R.; Reis, E. F. C.; Ferreira, A. P.; Almeida, M. V." Síntese, caracterização e avaliação da atividade imunossupressora de diaminas e aminoálcoois lipofílicos". 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-MG, 26/05 a 29/05/2008.

- ✓ Reis, E. F. C.; Júnior, C. O. R.; Alves, L.L.; Ferreira, A. P.; Almeida, M. V. "Synthesis and immunosuppressive activity of the lipophilic amino alcohols and diamines". *Chemical Biology & Drug Design*. 2008 (submetido).

- ✓ Leite, Livia; Reis, E. F. C.; Almeida, M. V.; Ferreira, A. P. "Down-modulation of nitric oxide in J774A.1 cells treated with *N*-(2-hidroxy-tetradecyl)-1,3-propanodiamine and *N*-di-(2-hydroxy-ethyl)-tetradecylamine". XXXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia- ImmunoRib 2008. Ribeirão Preto- SP, 18/10 a 22/10/2008. Ribeirão Preto- SP, 18/10 a 22/10/2008.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Resposta imune	1
1.2 Óxido nítrico	3
1.3 Reação de Hipersensibilidade Tardia	5
1.4 Fármacos imunossupressores e resposta imune	6
1.5 Aminoálcoois lipofílicos como potenciais agentes imunossupressores	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivos gerais	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Materiais e Métodos de Caracterização	12
3.2 Síntese dos metanossulfonatos de alquila <u>2</u> , <u>3</u> e <u>5</u>	13
3.3 Síntese das diaminas monoalquiladas <u>6</u> e <u>7</u>	15
3.4 Síntese das azidas <u>8</u> e <u>9</u>	17
3.5 Síntese do amino-álcool <u>10</u> e da diamina <u>11</u> a partir das azidas <u>8</u> e <u>9</u>	19
3.6 Síntese dos amino álcoois <u>12-15</u> derivados do 1,2-tetradecanodiol	21
3.7 Síntese dos amino-álcoois <i>N</i> -alquilados <u>16-19</u> , a partir do mesilato <u>5</u>	25
3.8 Avaliação biológica	28
3.8.1 Animais	28
3.8.2 Preparação e utilização dos compostos para testes “in vitro”	28
3.8.3 Cultura de macrófagos murinos J774.A-1	29
3.8.4 Determinação da viabilidade celular pelo Método do MTT	30
3.8.5 Dosagem de nitrito pelo Método de Griess	31

3.8.6 Preparação e utilização dos compostos para testes “in vivo”	32
3.8.7 Desencadeamento da Reação de Hipersensibilidade Tardia (RHT)	32
3.8.8 Avaliação da atividade antileishmania	33
3.9 Análise estatística	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Síntese e caracterização dos metanossulfonatos de alquila <u>2</u> , <u>3</u> e <u>5</u>	35
4.2 Síntese das diaminas <u>6</u> e <u>7</u>	38
4.3 Síntese do aminoálcool <u>10</u> e diamina <u>11</u>	40
4.4 Síntese dos aminoalcoois <u>12-15</u> a partir do monomesilato <u>2</u>	45
4.5 Síntese e caracterização dos aminoalcoois <i>N</i> -alquilados <u>16-19</u>	48
4.6 Avaliação da atividade biológica	51
4.6.1 Avaliação da inibição da viabilidade celular pelo Método MTT e da produção de óxido nítrico (NO) dos aminoalcoois e diaminas	53
4.6.2 Reação de Hipersensibilidade tardia (RHT) em camundongos	66
4.6.3 Outros testes biológicos realizados	67
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÃO	73
7 ESPECTROS	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resposta imune

O conhecimento dos principais mecanismos de defesa imune permite a compreensão da resposta imune do organismo contra várias patologias (MACHADO et al, 2004). O sistema imunológico atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares, onde uma falha na organização, manutenção e funcionalidade podem ocasionar alterações nos mecanismos de resposta imune (FERREIRA & TEIXEIRA, 2005). Algumas destas alterações podem levar à maior susceptibilidade às infecções, alergias, doenças auto-imunes, tumores, e rejeições de órgãos e tecidos (MACHADO et al, 2004).

O sistema imune consiste da resposta imune inata, inespecífica ou natural, e da resposta adquirida ou específica, que estão envolvidas na proteção do hospedeiro contra patógenos (BARTON, 2008). A funcionalidade da resposta imune inata independe da exposição prévia do hospedeiro a agentes infecciosos, e incluem mecanismos como: barreiras naturais (mucosa, epitélio, pele, enzimas e outros) e componentes celulares (principalmente macrófagos, neutrófilos e células natural killer-NK). Em contraste com a resposta imune inata, a resposta imune adaptativa é específica na defesa do hospedeiro contra patógenos, sendo que uma prévia exposição aos mesmos pode intensificar esta resposta. Neste tipo de imunidade estão envolvidos mecanismos celulares e moleculares (linfócitos T, linfócitos B, anticorpos/Imunoglobulinas) para reconhecimento específico do agente invasor, levando a geração de uma memória imunológica, que é uma propriedade individual depois do contato com o antígeno pela primeira vez, conferindo a capacidade de responder melhor e mais rapidamente quando re-exposto a este mesmo antígeno (WOLOWCZUK et al, 2008; ROBERTSON & COOPERSMITH, 2006).

Ambos os mecanismos de resposta imune inata e adaptativa são baseados no processo geral de reconhecimento antigênico, que sempre tem sido um dos pontos de maior interesse na imunologia. Entretanto, existe uma diferença na natureza genética dos receptores e distinção do envolvimento dos dois tipos de respostas nos mecanismos de reconhecimento antigênico (WOLOWCZUK et al, 2008). O reconhecimento antigênico envolvido na resposta imune inata depende de

um número limitado de receptores, invariáveis, que são chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), e estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002; MEDZHITOV, 2007). Esses sinais servem para duas principais funções: iniciação do processo inflamatório em resposta à infecção e início da resposta imune adaptativa, que demora de 4 a 7 dias pós- infecção para se desenvolver completamente. O reconhecimento específico do agente invasor é baseado no rearranjo e expansão clonal de um vasto repertório de receptores antígeno-específico expressos nos linfócitos B (receptores de células B: BCR) e linfócitos T (receptores de células T: TCR) (BARTON, 2008).

Embora existam duas classificações de resposta imune, a habilidade da resposta imune inata sobre a regulação da resposta imune adaptativa é bem conhecida. Muitas citocinas liberadas pelas células envolvidas na resposta imune inata atuam sobre células dendríticas, que alteram seu fenótipo e função. Em adição, elas induzem a liberação de numerosas citocinas, como IL-12, IL-18 e IL-10 que influenciam a resposta de células T (ROBERTSON & COOPERSMITH, 2006). A maioria das células dendríticas presentes em tecidos linfóides, particularmente em áreas de linfócitos T, são imaturas ou semimaduras e são eficientes em processar antígenos próprios para indução e manutenção da tolerância. Em condições inflamatórias, as células dendríticas passam por um complexo processo de maturação, que é específico e dependente do estímulo, influenciando assim nas imunidades inata e adaptativa (LUTZ & SCHULER, 2002). As células dendríticas possuem privilegiada localização na maioria dos tecidos, facilitando a captura, processamento e apresentação dos antígenos para linfócitos, com papel na instrução da resposta imune adaptativa sobre a infecção (ROSSI & YOUNG, 2005). Os PRRs expressos pelas células dendríticas incluem os receptores Toll like (TLR), lectinas tipo C e o CD1a, os quais reconhecem características moleculares específicas expressas em patógenos (COLLONA et al, 2006). Além disto, esses receptores também estão envolvidos no reconhecimento de antígenos relacionados a doenças auto-imunes como, por exemplo, o TLR7 (LAU et al, 2005).

Os TLR são aqueles que melhor caracterizam os PRRs, e são amplamente expressas em células do sistema imune inato, assim como os macrófagos, células endoteliais, epiteliais, e em células parenquimatosas. (ANDONEGUI et al, 2003). Vários TLRs são expressos também em células do sistema imune adaptativo

incluindo células B, mastócitos, células T e células dendríticas, que são as células importantes para o início da resposta imune adaptativa (WATTS et al, 2007). Na verdade, sinais TLRs induzem a diferenciação de células dendríticas e produção de citocinas, conseqüentemente influenciando o resultado de sua interação com células T e, portanto, o subsequente desenvolvimento da resposta imune adaptativa (LEFOND et al, 2005; WOLOWCZUK et al, 2008).

Assim como as células dendríticas, os macrófagos estão envolvidos tanto na resposta imune inata quanto na resposta adaptativa, podendo influenciar as características T_{H1}/T_{H2} da imunidade adquirida e, por sua vez, respondem tanto a linfócitos T ativados como a linfócitos B, através de interações celulares e produtos solúveis tais como IFN- γ , IL-4 e IL-13, e anticorpos que regulam suas atividades microbicidas e fagocíticas (GORDON, 1998).

Desta forma podemos perceber que todas as células citadas acima são de suma importância na indução da imunidade e na indução da tolerância imunológica central e periférica, funcionando como eixo de ligação entre a resposta imune inata e adaptativa, e controlando a iniciação de diversas funções efetoras que são capazes de eliminar um amplo número de patógenos (DIEBOLD, 2008).

1.2 Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (MORRIS & BILLIAR, 1994). O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (BECKMAN & KOPPENOL, 1996) que, até meados da década de 1980, era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais. O interesse pelas funções biológicas do NO, como mediador de processos intra e extracelulares, foi responsável pelo conhecimento de suas importantes atividades biológicas (JAMES, 1995).

O NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, sendo uma importante molécula reguladora do sistema imune. Tem o papel de mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto, o NO em níveis elevados é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente,

particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de espécies de oxigênio e deficiência do sistema oxidativo (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003). O NO é sintetizado pela ação de uma enzima, a óxido nítrico sintase (NOS) a partir do aminoácido L-arginina, que produz óxido nítrico e L-citrulina (GUZIK et al, 2003), necessitando de dois cofatores, o oxigênio e o fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH), como demonstrado na Figura 1.1 (ROBBINS & GRISHAM, 1997). O NO é produzido por uma ampla variedade de tipos celulares que incluem células epiteliais, nervosas, endoteliais e inflamatórias (YU, 1994).

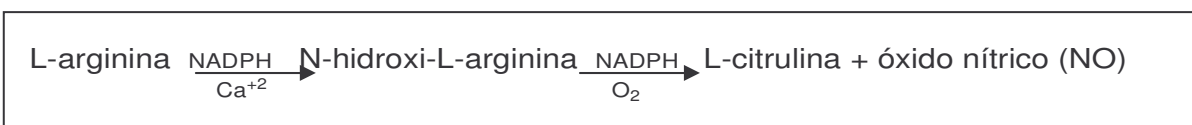


Figura 1.1- Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina

Estudos bioquímicos e análise seqüencial de aminoácidos revelaram que as três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS): neuronal, endotelial e induzível, representam uma família de proteínas que aparentemente são produtos de três genes distintos, agrupados em duas categorias (MARLETTA, 1994). Estas isoformas NOS, são produtos de diferentes genes em neurônios (nNOs;NOS1), células endoteliais (eNOs;NOS3) e são expressas constitutivamente, dependendo de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e produzem pequenas quantidades de NO em resposta a agonistas. A maioria das células também pode produzir NO através da via induzível de NO (iNOs; NOS2), cuja expressão é induzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. Numerosas citocinas e outros agentes suprimem a expressão de iNOs, embora garantindo a homeostasia. Porém, NO modula a produção de muitas destas citocinas (SCHWENTKER et al, 2002).

A forma induzível (iNOs) da NO sintase é a principal isoforma envolvida nas reações inflamatórias (COLEMAN, 2001), sendo que praticamente todas as células inflamatórias expressam esta isoforma em resposta à estimulação de citocinas (BRINKMANN, 2004). Os principais efeitos do NO na fase inflamatória são: vasodilatação, atividade antimicrobiana, efeitos antiplaquetários e aumento da permeabilidade vascular (SCHWENTKER et al, 2002). O NO atua como importante molécula de defesa contra microrganismos infecciosos. Ele também regula a atividade funcional, desenvolvimento e destruição de muitos tipos celulares

envolvidos na inflamação e imunidade, incluindo macrófagos, linfócitos T, células apresentadoras de antígenos, mastócitos, neutrófilos e células natural killer (COLEMAN,2001).

1.3 Reação de Hipersensibilidade Tardia (RHT)

O termo hipersensibilidade é aplicado para designar uma resposta imune adaptativa que ocorre de forma exagerada ou inapropriada. As reações de hipersensibilidade podem ser induzidas por vários antígenos e variam de um indivíduo para outro. A hipersensibilidade não se manifesta ao primeiro contato com o antígeno, aparecendo, geralmente, nos contatos subseqüentes. Existem quatro tipos de reação de hipersensibilidade, tipos I, II, III e IV, mas na prática estes não ocorrem necessariamente de forma isolada (ROITT, 1997). Os primeiros três tipos são mediados por anticorpos, enquanto o quarto tipo depende de diversos eventos que caracterizam a resposta imunológica celular e são mediadas principalmente por células T e macrófagos (WAAGA, 2001).

Os linfócitos T *helper* possuem duas subclasses de linfócitos T_{H1} e T_{H2} , que apresentam algumas atividades biológicas específicas. A síntese de IL-2 e IFN- γ pelas células T_{H1} auxiliam principalmente as outras células T e macrófagos, e a síntese de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 ocorre pelas células T_{H2} , que auxiliam linfócitos B na ativação, diferenciação e produção de anticorpos. Ambos os tipos de células T *helper* são específicas para a apresentação feita através das moléculas de MHC classe II. (MOSSMANN et al, 1986).

A reação de hipersensibilidade tardia tipo IV, mediada por células, consiste do reconhecimento do antígeno e ativação dos macrófagos que tenham fagocitado microorganismos, pelas células T $CD4^+ T_{H1}$ de memória, com conseqüente aumento da atividade microbicida dos fagócitos e morte dos microorganismos ingeridos (FAQUIM-MAURO & MACEDO, 1998). Podem ser demonstradas na patogênese de muitas doenças auto-imunes e infecciosas (tuberculose, lepra, toxoplasmose, leishmaniose, etc.). A hipersensibilidade tardia não pode ser transferida de um animal para outro através do soro, mas pode ser transferida pelos linfócitos T. As células T necessárias para a resposta tardia são células que se tornaram

sensibilizadas a um antígeno em particular através de um encontro prévio (WAAGA, 2001).

Essa mesma reação pode ser observada no teste da tuberculina, que é provocado pela injeção subcutânea de uma proteína purificada (PPD) preparada a partir do *Mycobacterium tuberculosis*, na pele de um indivíduo que tenha sido imunizado para aquele microorganismo, por uma infecção prévia ou vacinação. Esta reação é chamada tardia, pois ocorre de 24 a 72 horas após o indivíduo imunizado ser testado com a proteína microbiana, tempo gasto para as células T efetoras voltarem ao local de teste do antígeno, responderem ao antígeno (peptídeo MHC classe II) neste local e induzirem uma reação detectável através da liberação de citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-8, TNF- α , IL-3, GM-CSF) (DANNENBERG AM, 1991). A inflamação granulomatosa é uma forma de hipersensibilidade do tipo tardia crônica, geralmente em resposta aos microorganismos presentes e alguns fungos, ou em resposta aos antígenos particulados que não sofrem prontamente a fagocitose. Ocorre um acúmulo de linfócitos ativados e macrófagos com tecidos necróticos e fibrose em torno do microorganismo, formando o granuloma (AHMED & BLOSE, 1983).

1.4 Fármacos imunossupressores e resposta imune

A modificação de algumas funções da resposta imune através de agentes farmacológicos está emergindo como uma importante área da terapêutica (GILMAN, 1991). Os fármacos imunossupressores vêm sendo utilizadas em pacientes transplantados e no tratamento de várias doenças auto-imunes, como: lúpus eritematoso, artrite reumatóide e psoríase (ABBAS, LICHTMAN & POBER, 2000).

Os fármacos imunossupressores se apresentam como os principais fármacos que podem alterar a resposta imune (JAWETZ et al, 1991). Tais fármacos inibem a produção de interleucina-2 (IL-2), inibem a expressão dos genes das citocinas, atuam através de mecanismos citotóxicos, inibindo a síntese de purinas ou pirimidinas (RANG, DALE & RITTER, 2001). Podem também induzir a tolerância, através da depleção de linfócitos, desviando o tráfego destas células ou bloqueando suas vias de sinalização (GUIMARÃES et al, 1996).

A introdução da ciclosporina A (CSA) na terapêutica como fármaco imunossupressor, em 1976, trouxe grandes benefícios na sobrevivência de pacientes e de enxertos nos transplantes de órgãos sólidos, bem como uma nova opção no tratamento de doenças auto-imunes e glomerulopatias primárias (CURVELLO NETO et al, 2000). Em 1983, a liberação da fórmula original da ciclosporina (Sandimmun®) para uso em transplantes pelo “Food and Drug Administration-FDA” constituiu o marco do progresso no resultado em transplantes (HALLORRAN, 2004). Porém, sua nefrotoxicidade continua sendo seu maior efeito colateral, limitando o seu uso. Desde então, uma série de novos fármacos imunossupressores vem sendo estudadas, algumas já liberadas para uso clínico e outras ainda em fase de estudo experimental e pré-clínica (CURVELLO NETO et al, 2000).

Os principais fármacos utilizadas como imunossupressores são:

- Ciclosporina A (CSA) inibe a ativação de linfócitos T, pela interação com uma imunofilina citoplasmática específica: a ciclofilina. A CSA desativa o sinal cálcio dependente da via de transdução de linfócitos T, inativando a transcrição genômica de interleucina-2 (IL-2). Com isso há inibição de proliferação de células T, da produção de IL-2 e outras citocinas, e redução na amplificação da resposta imune (MORRIS, 1994).
- Tacrolimus (FK 506): É um antibiótico macrolídeo isolado da cultura de um microrganismo denominado *Streptomyces tsukubaensis*, com mecanismo de ação virtualmente idêntico ao da ciclosporina (VELLA & SAYEGH, 1997). Entretanto, ao contrário da ciclosporina, que se liga à ciclofilina, une-se à FKBP12 (FK binding protein 12), proteína citoplasmática imunossupressora da família das imunofilinas. O complexo FKBP12-tacrolimus inibe diretamente a calcineurina, inibe respostas celulares e humorais, determinando a inibição de sinais de tradução cálcio-dependentes nas células T, diminuindo a transcrição de gene de linfocinas. Isso acarreta a conseqüente redução da produção das IL-2, responsável pela ativação dos linfócitos T. Como resultado desta ação molecular, a droga inibe especialmente a resposta imune mediada por células. Experimentos “in vitro” demonstraram que o tacrolimus é mais potente que outros imunossupressores na inibição da proliferação dos linfócitos T (PETER et al, 1993; MORRIS, 1996).
- Micofenolato de monofetil (MMF): Constitui um imunossupressor não-nefrotóxico e não-aterogênico. Seu mecanismo de ação decorre de uma inibição da síntese das

purinas, que é indispensável para a proliferação dos linfócitos T e B (ALLISON, EUGNI & SOLLINGER, 1993).

- Sirolimus (Rapamicina): Também é um antibiótico macrolídeo do fungo *Streptomyces higroscopicus* encontrado na ilha Rapa Nui. Penetra livremente nas células, unindo-se à mesma imunofilina do tacrolimus (FKBP12). Este complexo sirolimus-FKBP12 não inibe a calcineurina, mas bloqueia o sinal de transdução de uma proteína denominada mTOR (mammalian target of rapamycin), essencial para a proliferação dos linfócitos na fase G1 e S do ciclo celular (BRUNN et al, 1997).

- Anticorpos bloqueadores dos receptores da interleucina-2 (antiCD 25): São anticorpos monoclonais que bloqueiam a fixação da interleucina-2 no receptor do linfócito ativado, impedindo sua proliferação. Portanto, atuam em sinergismo com as drogas imunossupressoras inibidoras da calcineurina (MC ALISTER et al, 2000).

- Azatioprina: É um precursor da 6-mercaptopurina, sendo um imunossupressor citotóxico clássico que age inibindo a síntese do DNA. Foi um dos primeiros imunossupressores utilizados em doenças autoimunes, e é utilizada também para evitar rejeição de transplantes de órgãos, no tratamento de alguns tipos de câncer e de algumas condições como artrite reumatóide, colite ulcerativa, lúpus eritematoso sistêmico e hepatite. Na esclerose múltipla, estudos sugerem que age na redução das taxas de surto e na progressão da doença (HALLORAN, 2004; CONFAVREUX, 1991).

Os corticosteróides (ex: prednisona), ciclofosfamida e outros fármacos também são utilizadas na imunossupressão.

1.5 Aminoálcoois lipofílicos como potenciais agentes imunossupressores

Novos fármacos ainda se encontram em desenvolvimento para serem utilizadas em associação com os fármacos imunossupressores existentes, com a finalidade de minimizar ou evitar os efeitos colaterais (GALLO, 2006). Um destes compostos recentemente estudados é o aminoálcool FTY720 (Figura 2), cuja descoberta de sua ampla ação nas doenças auto-imunes e transplantes têm atraído a atenção de vários pesquisadores para novas sínteses e caracterizações de compostos análogos (OLMO et al, 2006).

Fujita e colaboradores, em 1989, isolaram o ISP-1 (miriocina) (Figura 1), um metabólito do caldo do fungo *Isaria sinclairii* (HIROSE et al, 1996). Estes autores descreveram a atividade imunossupressora deste composto, que era cinco vezes mais potente e menos tóxico que a Ciclosporina A, já utilizada em transplantes (FUJITA et al, 1995-A). Eles trabalharam a relação estrutura-atividade deste composto e concluíram que a presença de um grupo aminoálcool 2-alkil-2-aminoetanol, era importante (FUJITA, 1995-B). Eles também destacaram a necessidade de uma cadeia longa para a manutenção da atividade, e com isso desenvolveram a síntese do composto FTY720 {Cloridrato de 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]1,3-propanodiol} (ADACHI et al, 1995) (Figura 2).

O mecanismo de ação do FTY720 ainda não está completamente esclarecido. A hipótese mais aceita é que atue alterando o tráfego dos linfócitos no sangue periférico através de uma redistribuição reversível dos linfócitos do sangue periférico para estruturas linfóides secundárias, como linfonodos e placas de Peyer, determinando a linfopenia (YOPP et al, 2004; CHIBA et al, 1998). Contudo, Sugito e colaboradores (2005) verificaram que mesmo em camundongos sem órgãos linfóides secundários (baço e linfonodo), houve diminuição dos linfócitos do sangue periférico, sugerindo que o mecanismo do FTY720 não pode ser explicado unicamente por este seqüestro de linfócitos circulantes e aprisionamento destas células no tecido linfóide.

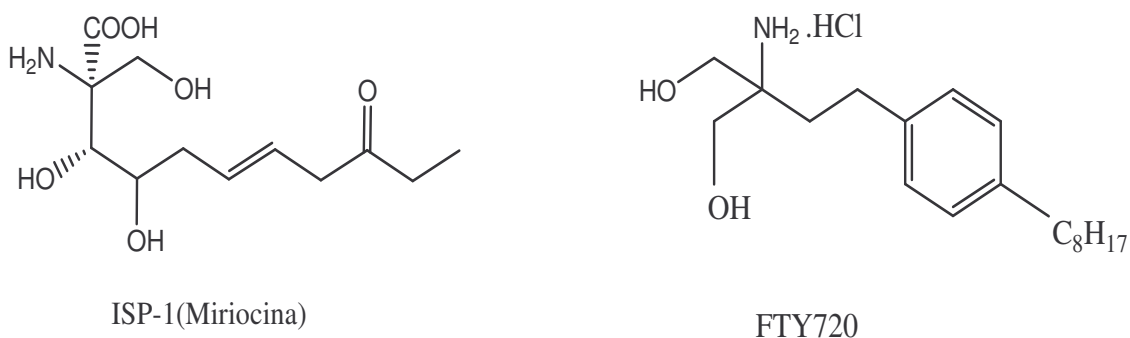


Figura 1.2. Estruturas químicas da ISP-1(miriocina) e do FTY720.

Baseado nos estudos expostos acima objetivou-se neste trabalho a síntese de diferentes derivados de compostos *N*-alquilados com cadeias alifáticas longas, estudou-se a relação da estrutura dos diferentes compostos com a possível atividade imunossupressora, visando sempre a síntese de compostos com maior eficácia e menor toxicidade.

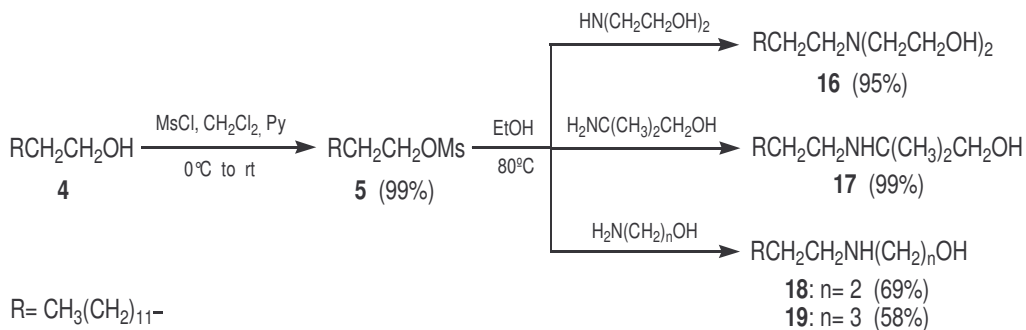
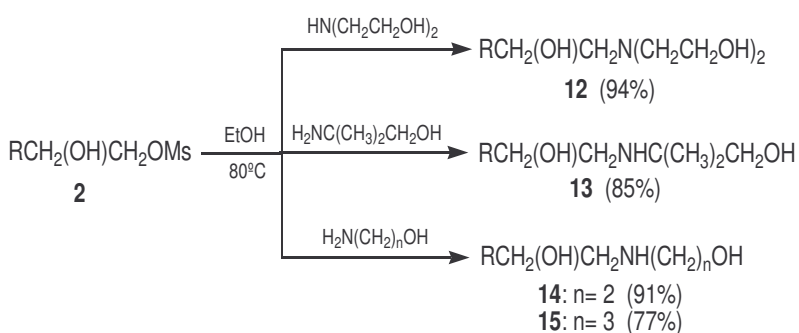
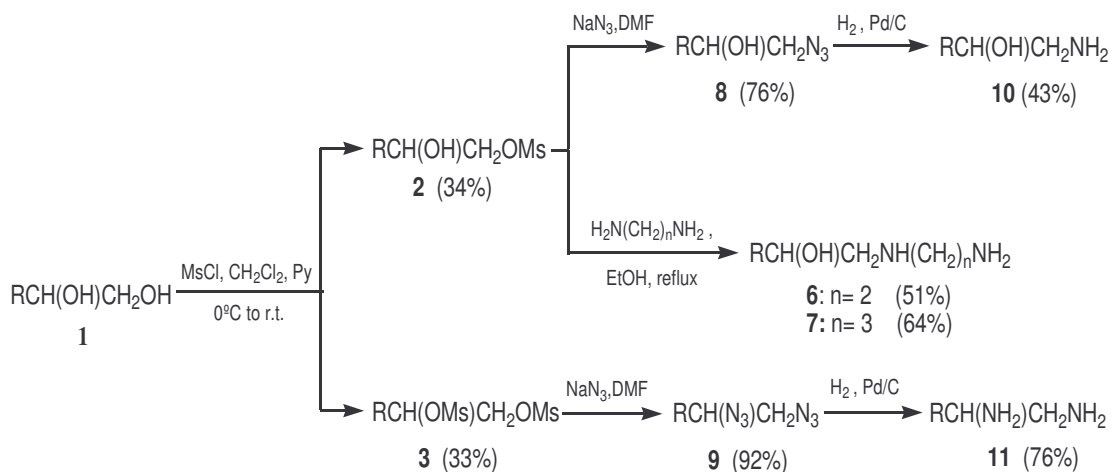
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Preparar, caracterizar e avaliar a potencial atividade imunossupressora das diaminas e aminoálcoois lipofílicos a partir do 1,2- tetradecanodiol e 1- tetradecanol.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e purificar novas diaminas e aminoálcoois por reações químicas de substituição nucleofílica tipo SN2.
- Caracterizar as diaminas e aminoálcoois sintetizados pelos métodos de Espectroscopia no Infravermelho (IV), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Faixa de Fusão (PF).
- Avaliar as atividades das diaminas e aminoálcoois preparados na viabilidade celular da linhagem de macrófagos J774, estimulados com BCG e/ ou IFN- γ .
- Avaliar a atividade das diaminas e aminoálcoois na produção de NO por macrófagos J774 estimulados com BCG e/ ou IFN- γ .
- Avaliar a atividade das diaminas e aminoálcoois na Reação de Hipersensibilidade Tardia à ovalbumina.



R= CH₃(CH₂)₁₁-

Ms= CH₃SO₂-

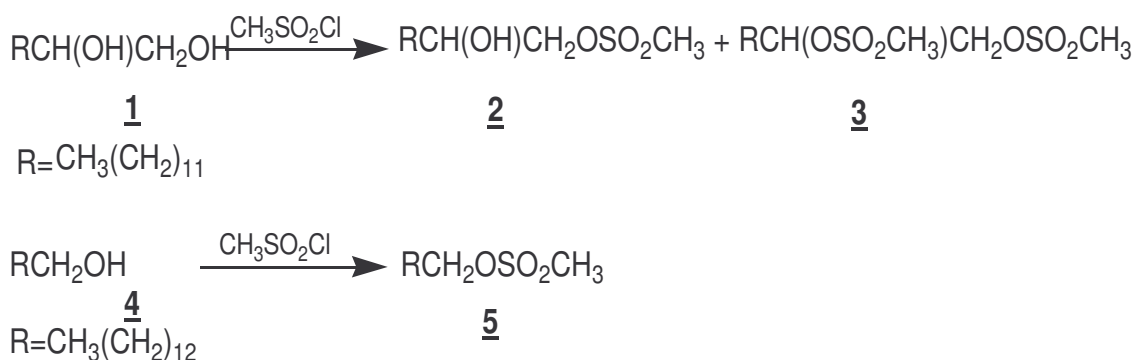
Esquema 2.1. Plano de síntese de diaminas e aminoálcoois *N*-alquilados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e Métodos de Caracterização

- Faixas de fusão: foram obtidas em aparelho digital MQAPF-Microquímica no Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas (ICE), UFJF.
- Espectros no infravermelho: foram registrados em espectrômetro BOMEM-FTIR MB-102 no Departamento de Química, ICE, UFJF, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr) para compostos sólidos e janelas de iodeto de cério (CsI) para compostos oleosos. Os valores para a absorção são referidos em números de onda, utilizando como unidade cm^{-1} .
- Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN de ^1H e de ^{13}C): foram obtidos a 300 MHz e 75 MHz, respectivamente, em espectrômetro BRUKER AVANCE DRX300 no Departamento de Química, ICE, UFJF, utilizando como referência interna o tetrametilsilano (TMS), ou o hidrogênio residual do solvente deuterado. Os valores de deslocamento químico (δ) foram referidos em partes por milhão (ppm), e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e suas multiplicidades descritas como: s = simpleto; d = duplete; t = triplete; q = quarteto; qu = quinteto; dd = duplete duplo; m = multiplete; sl = simpleto largo.
- Cromatografia em coluna de sílica: utilizou-se sílica-gel 60G 0,063-0,200mm (70-230 mesh ASTM) MERCK.
- Cromatografia em camada delgada de sílica: utilizou-se sílica-gel 60G MERCK em lâminas de vidro.
- Reveladores utilizados: vapores de iodo, solução etanólica de ácido sulfúrico a 20% v/v e solução etanólica de ninidrina a 1 % p/v.
- Procedimentos de purificação: extração, coluna cromatográfica e/ou recristalização. Para tal foram utilizados solventes P.A. Vetec ou Isofar.

3.2 Síntese dos metanossulfonatos de alquila 2, 3 e 5

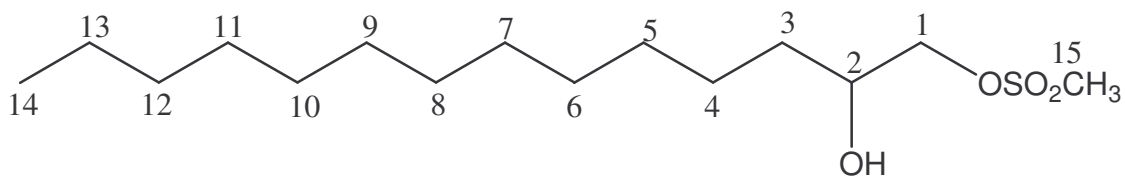


Esquema 3.1. Síntese dos compostos 2, 3 e 5.

Os álcoois 1,2-tetradecanodiol 1 e 1-tetradecanol 4 (50 mmol) foram solubilizados em 25 mL de diclorometano. A esta solução foi adicionado, lentamente, a 0°C, cloreto de metanossulfonila (60 mmol) e piridina (5-10 mL). Após 24 horas sob agitação magnética à temperatura ambiente foi verificado que todo material de partida havia sido consumido, através de cromatografia em camada delgada de sílica gel (eluente: diclorometano; revelador: iodo). Em seguida, foi realizada uma extração líquido-líquido em diclorometano/ água e o solvente da fase orgânica foi removido sob pressão reduzida, fornecendo os mesilatos 2 e 5 e o dimesilato 3. A estequiometria e os rendimentos das reações estão na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Estequiometria das reações de obtenção e rendimento dos compostos 2, 3 e 5.

Composto	Quantidade do álcool	CH ₃ SO ₂ Cl (mL/mmol)	Rend. (g;mmol;%)
<u>2</u>	50 mmol (11,52g) de 1-tetradecanodiol <u>1</u>	4,7/60	5,2; 16,9; 34
<u>3</u>	50 mmol (11,52g) de 1-tetradecanodiol <u>1</u>	4,7/60	6,2; 16,8 ; 33
<u>5</u>	50 mmol (10,7g) de 1-tetradecanol <u>4</u>	4,7/60	14,32; 49; 99

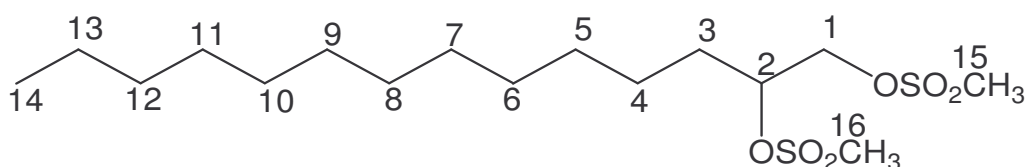


1-O-Metanossulfonil-1,2-tetradecanodiol **2**: $C_{15}H_{32}SO_4$; MM: 308 g/ mol; FF: 77-79°C.

IV (KBr) ν (cm^{-1}): 3500 (estiramento-OH), 2919-2850 (deformação axial C-H alifático), 1470 (deformação angular C-H alifático), 1344 e 1172 (estiramento $-SO_2^-$), 855 (estiramento SO).

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 4,25 (dd, 1H, $J_{1a,2}=2,6Hz$, $J_{1a,1b}=10,2Hz$, H1a); 4,09 (dd, 1H, $J_{1b,2}=7,0Hz$, H1b); 3,90 (m, 1H, H2); 3,07 (s, 3H, H15), 2,09 (sl, 1H, OH); 1,49 (m, 2H, H3); 1,26 (m, 20H, H4-13); 0,88 (t, 3H, $J=6,8Hz$, H14).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 73,9 (C2); 69,8 (C1); 37,7 (C15); 32,9-25,5 (C3-12); 22,8 (C13); 14,3 (C14).

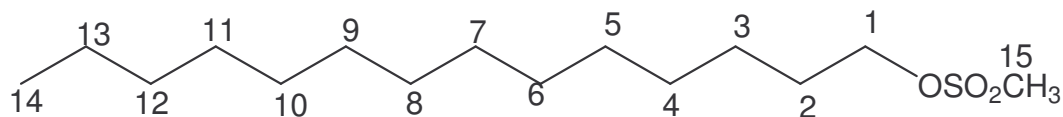


1,2- Di- O- metanosulfonil-1,2- tetradecanodiol **3** : $C_{16}H_{34}S_2O_6$: MM: 386 g/mol; FF: 51-53°C.

IV (KBr) ν (cm^{-1}): 2917-2851 (deformação axial C-H alifático), 1468 (deformação angular C-H alifático), 1355 e 1171 (estiramento $-SO_2^-$), 916 (estiramento S-O).

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 4,88 (m, 1H, H2); 4,40 (dd, 1H, $J_{1a,2}=2,6Hz$, $J_{1a,1b}=11,4Hz$, H1a); 4,27 (dd, 1H, $J_{1b,2}=6,4Hz$, H1b); 3,08 (s, 6H, H15 e H16); 1,69 (m, 2H, H3); 1,26 (m, 20H, H4-13); 0,88 (t, 3H, $J=6,8Hz$, H14).

RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 79,4 (C2); 69,7 (C1); 38,9 e 37,7 (C 15 e C16); 32,1- 25,0 (C 3-12); 22,8 (C13); 14,3 (C14).



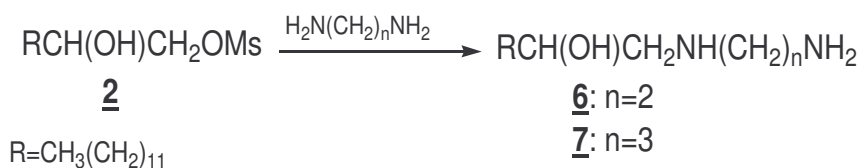
1-O-Metanosulfonil-1-tetradecanol 5: C₁₅H₃₂O₃S; MM: 292 g/mol; FF: 45-48 °C.

IV(KBr) ν (cm⁻¹): 2920-2852 (deformação axial C-H alifático), 1473 (deformação angular C-H alifático), 1342 e 1168 (estiramento -SO₂-), 854 (estiramento S-O).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4,24 (t, 2H, J=6,6Hz, H1); 3,00 (s, 3H, H15); 1,74 (qu, 2H, J=6,6 Hz, H2); 1,34-1,28 (m, 22H, H3-13); 0,90 (t, 3H, J=7,1 Hz, H14).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 70,4 (C1); 37,5 (C15); 32,1-22,9 (C2-13); 14,3 (C14).

3.3 Síntese das diaminas monoalquiladas 6 e 7

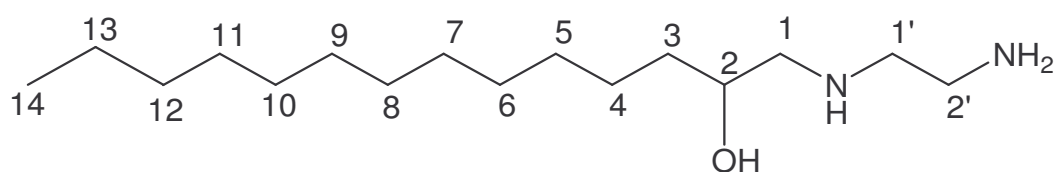


Esquema 3.2. Síntese das diaminas 6 e 7

A uma solução etanólica (30 ml) em refluxo contendo 1,2-etanodiamina (1,01 mL, 15 mmol) ou 1,3- propanodiamina (1,25 mL, 15 mmol) foi adicionado lentamente o mesilato 2. A mistura reagente foi mantida em refluxo por 24 horas sob agitação magnética. A evolução foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente diclorometano ou uma mistura de diclorometano/ metanol 8:2, e como revelador o iodo. Após o término da reação a mistura foi concentrada sob pressão reduzida e o composto obtido foi extraído com diclorometano e água. A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida e os compostos gerados 6 e 7 foram isolados por recristalização em uma mistura de hexano e acetato de etila (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Estequiometria das reações de obtenção e rendimento dos compostos **6** e **7**.

Composto	Quantidade da diamina (g/mmol)	Quantidade do mesilato 2 (g/mmol)	Rend.(g;mmol;%)
6	0,9g/15 mmol de 1,2 etanodiamina	0,924g/ 3 mmol	0,74; 2,89; 51
7	1,11g/15 mmol de 1,3 propanodiamina	0,770g/ 2,5 mmol	0,72; 2,52; 64

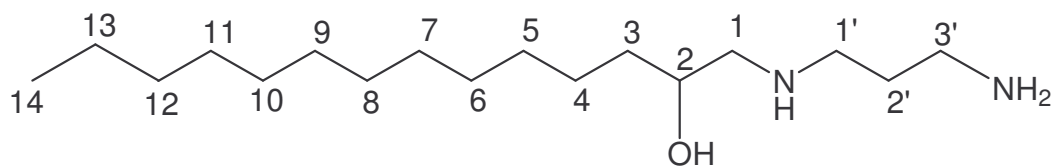


N-(2-Hidroxitetradecil)-1',2'- etanodiamina **6**: C₁₆H₃₆N₂O; MM: 272 g/ mol; FF: 78-80°C

IV (KBr) ν (cm⁻¹): 3340-3271 (deformação axial N-H e O-H), 2920-2850 (deformação axial C-H alifático), 1465 (deformação angular C-H alifático), 1108 (deformação C-O e/ ou C-N alifático).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,61 (m, 1H, H₂); 2,82 (m, 2H, H₂'); 2,70 (m, 4H, H₁',H₁); 2,49 (sl, 4H, NH, NH₂ e OH); 1,41 (m, 2H, H₃); 1,26 (m, 20H, H₄-13); 0,88 (t, 3H, J=6,8Hz, H₁₄).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 69,8 (C₂); 55,5 e 52,1 (C₁ e C₁'); 41,8 (C₃'); 35,3 (C₃); 32,1- 25,9 (C₄-12); 22,8 (C₁₃); 14,3 (C₁₄).



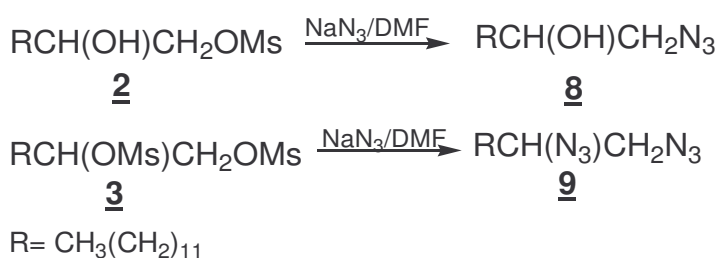
N-(2-Hidroxitetradecil)-1',3'- propanodiamina **7**: C₁₇H₃₈N₂O; MM: 286 g/ mol; FF: 82-84°C

IV (KBr) ν (cm⁻¹): 3380 (deformação axial N-H e O-H), 2921 -2848 (deformação axial C-H alifático), 1465 (deformação angular C-H alifático), 1116 (deformação C-O e/ ou C-N alifático).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,60 (m, 1H, H₂); 2,80 (m, 6H, H₃', H₁ e H₁'); 1,91 (sl, 4H, NH, NH₂, OH); 1,64 (qu, 2H, H₂'); 1,41 (m, 2H, H₃), 1,26 (m, 20H, H₄-13); 0,87 (t, 3H, J=6,8Hz, H₁₄).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 69,7 (C₂); 55,6 e 47,5 (C₁ e C₁'); 40,5 (C₃'); 33,8 (C₃); 32,1 (C₂'); 31,5- 25,9 (C₃-12); 22,9 (C₁₃); 14,3 (C₁₄).

3.4 Síntese das azidas 8 e 9

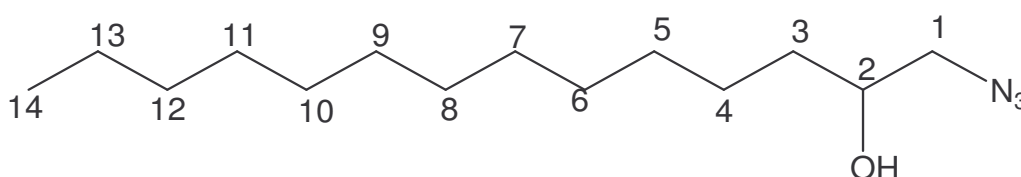


Esquema 3.3. Síntese das azidas 8 e 9

Adicionou-se azida de sódio às soluções dos mesilatos 2 ou 3 em 10 mL de DMF. A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética a 120°C por 24 horas quando por CCD evidenciou-se o consumo total do material de partida (eluente: diclorometano; revelador: iodo). Em seguida foi realizada uma extração éter/água. Após concentração sob pressão reduzida da fase orgânica, o composto obtido foi purificado por coluna cromatográfica (eluente: diclorometano), fornecendo os compostos 8 e 9, respectivamente (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Estequiometria das reações de obtenção e rendimento dos compostos **8** e **9**.

Composto	Quantidade de NaN ₃ (g/mmol)	Quantidade do mesilato (g/mmol)	Rend. (g;mmol;%)
8	1,3g/20 mmol	0,924g/ 3 mmol do 2	0,77; 2,75 ; 76
9	1,95g/30 mmol	1,85g/5 mmol do 3	1,40; 5,0 ; 92

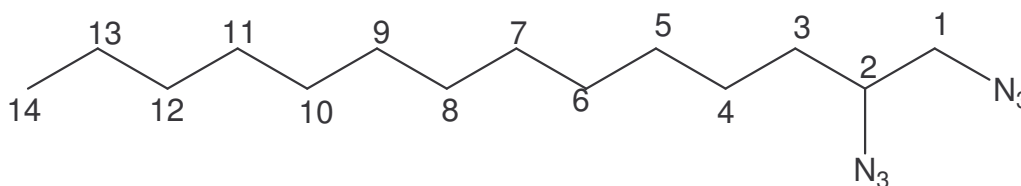


1-Azido-2-tetradecanol **8**: C₁₄H₂₉N₃O; MM; 255g/ mol; FF: 36-38°C

IV (KBr) ν (cm⁻¹): 3352 (deformação axial O-H), 2916 -2849 (deformação axial C-H alifático), 2097 (estiramento C-N₃).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,72 (m, 1H, H₂); 3,35 (dd, 1H, J_{1a,2}=3,3Hz, J_{1a,1b}=12,3Hz, H_{1a}); 3,19 (dd, 1H, J_{1b,2}=7,2Hz, H_{1b}); 2,33 (d, 1H, OH); 1,43 (m, 2H, H₃); 1,22 (m, 20H, H₄₋₁₃); 0,85 (t, 3H, J=7,0 Hz, H₁₄).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 71,3 (C₂); 57,5 (C₁); 34,7 (C₃); 32,1- 22,8 (C 4-13); 14,2 (C₁₄).



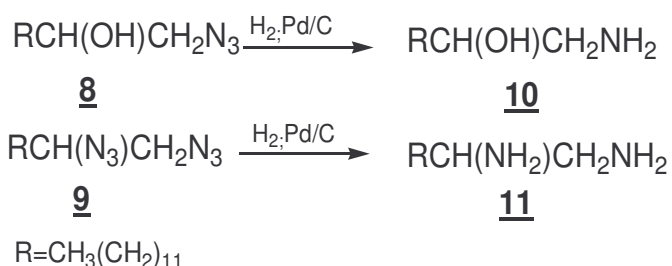
1,2- Diazidotetradecano **9**: C₁₄H₂₈N₆; MM; 280g/ mol; Óleo

IV (KCsI) ν (cm⁻¹): 2925-2854 (deformação axial C-H alifático), 2102 (estiramento C-N ou C-N₃).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,77 (m, 1H, H2); 3,46 (dd, 1H, J_{1a,2}=3,3Hz, J_{1a,1b}=12,5Hz, H1a); 3,25 (dd, 1H, J_{1b,2}=7,4Hz, H1b); 1,65 (m, 2H, H3); 1,48 (m, 2H, H4); 1,27 (m, 18H, H5-13); 0,89 (t, 3H, J=6,8 Hz, H14).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 71,1 (C2); 57,4 (C1); 34,5 (C3); 32,1- 22,8 (C4-13); 14,3 (C14).

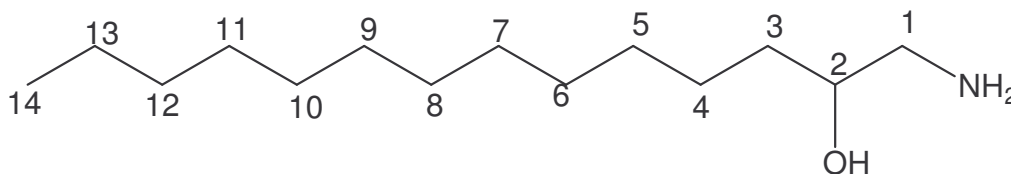
3.5 Síntese do aminoálcool **10** e da diamina **11** a partir das azidas **8** e **9**



Esquema 3.4. Síntese dos compostos **10** e **11**

Em um balão de fundo redondo foram solubilizados 3 mmol das azidas **8** ou **9** em etanol (10 mL) e, em seguida, foram adicionados 20 mg do catalisador Pd/C (Paládio em carvão ativo 10%). A mistura reagente permaneceu sob agitação magnética e sob atmosfera de hidrogênio durante 48 h à temperatura ambiente. A evolução da reação foi acompanhada por CCD, usando como eluente uma mistura de hexano/ acetato de etila 9:1 e diclorometano/ metano (8:2) (reveladores: solução etanólica de ácido sulfúrico 20% v/v e solução etanólica de ninidrina). Após o término da reação, foi feita uma filtração para eliminar o catalisador e o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida. O composto obtido foi purificado por coluna cromatográfica utilizando-se como eluente diclorometano/metanol (9:1), obtendo

assim o amino-álcool **10** e a diamina **11**, com rendimentos de 76% e 43%, respectivamente.

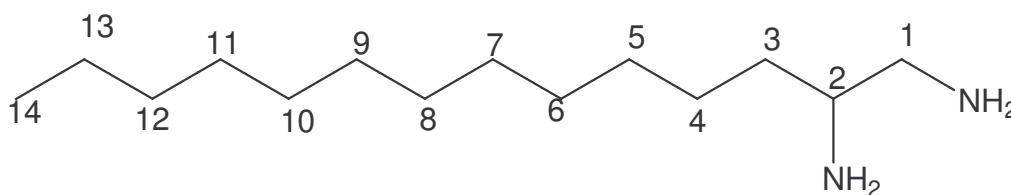


1-Amino-2-hidroxitetradecano **10**: $C_{14}H_{31}NO$; MM: 229,0 g/mol; FF: 81-83°C.

IV (KBr) ν (cm⁻¹): 3326 (deformação axial O-H e/ou N-H), 2916-2848 (deformação axial C-H alifático), 1591 (deformação angular N-H), 1471 (deformação angular C-H alifático), 1026 (deformação axial C-O e/ou C-N).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,50 (m, 1H, H₂); 2,80 (dd, 1H, $J_{1a,2}=3,5\text{Hz}$, $J_{1a,1b}=12,7\text{Hz}$, H_{1a}); 2,50 (dd, 1H, $J_{1b,2}=7,3\text{Hz}$, H_{1b}); 2,30 (sl, 3H, OH e NH₂); 1,24 (m, 22H, H₃₋₁₃); 0,86 (t, 3H, $J=7,0\text{ Hz}$, H₁₄).

RMN de ¹³C (75MHz, CDCl₃) δ (ppm): 72,3 (C₂); 50,7 (C₁); 35,7-25,8 (C₃₋₁₂); 22,8 (C₁₃), 14,3 (C₁₄).



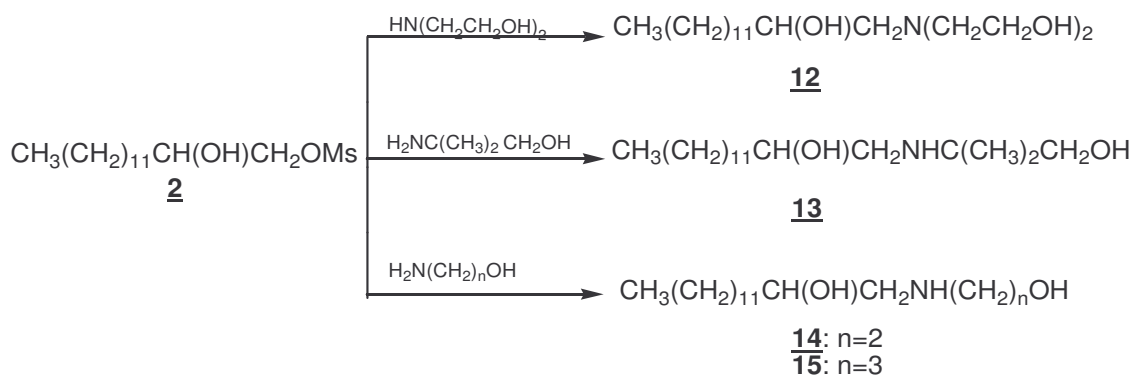
1,2-Diaminotetradecano **11**: $C_{14}H_{32}N_2$; MM: 228,0 g/mol; FF: 111-113°C.

IV (KBr) ν (cm⁻¹): 3292(deformação axial N-H), 2919-2850 (deformação axial C-H alifático), 1560 (deformação angular N-H), 1484(deformação angular C-H alifático).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2,75 (m, 2H, H_{1a} e H₂); 2,48 (m, 1H, H_{1b}); 1,85 (sl, 4H, 2 NH₂); 1,27-1,40 (m, 22H, H₃₋₁₃); 0,89 (t, 3H, $J=6,8\text{Hz}$, H₁₄).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 53,6 (C2); 48,5 (C1); 35,9-22,8 (C3-13); 14,3 (C14).

3.6 Síntese dos aminoálcoois 12-15 derivados do 1,2-tetradecanodiol.

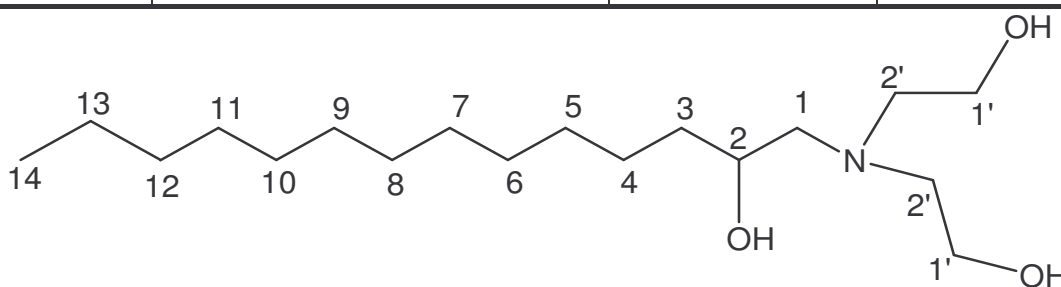


Esquema 3.5. Síntese dos aminoálcoois 12-15.

O mesilato 2 (0,924g; 3 mmol) foi adicionado lentamente a soluções etanólicas em refluxo contendo os aminoálcoois 2-aminoetanol, 3-amino-1-propanol, dietanolamina ou 2-amino-2-metil-1-propanol (6 mmol). A mistura reagente foi mantida em refluxo por 24 h sob agitação magnética. A evolução da reação foi acompanhada por CCD, utilizando-se como eluentes diclorometano puro ou uma mistura de diclorometano/metanol 8:2 (revelador: iodo ou solução etanólica de ácido sulfúrico 20% v/v). Após o término da reação, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida e o composto obtido foi extraído com diclorometano e água. A fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida e os compostos gerados de 12-15 foram isolados por recristalização em hexano.

Tabela 3.4. Estequiometria das reações de obtenção e rendimento dos compostos **12-15**

Composto	Amino-álcool (mL ou g/mmol)	Quantidade do <u>2</u>	Rend. (g;mmol; %)
12	0,6mL/ 6 (1,2-dietanolamina)	0,924g/ 3 mmol	1,0; 2,98; 95
13	0,4mL/ 6 (2-amino-2-metil-1-propanol)	0,924g/ 3 mmol	0,82; 2,72; 69
14	0,5mL/ 6 (2-aminoetanol)	0,924g/ 3 mmol	0,86; 3,15; 58
15	0,534g/ 6 (3-amino-1-propanol)	0,924g/ 3 mmol	0,75; 2,61; 99

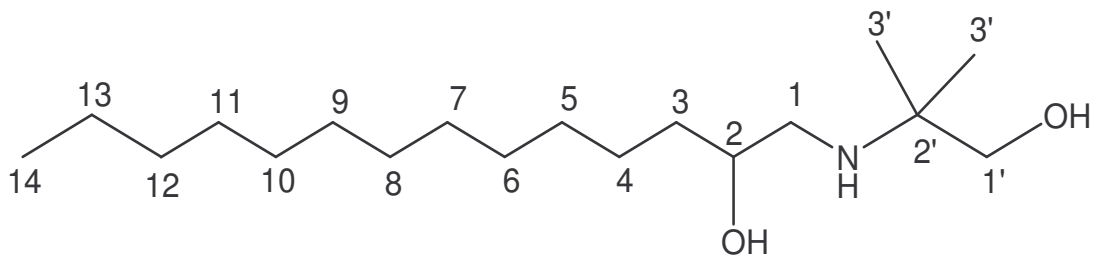


N-(2-Hidroxitetradecil) dietanolamina **12**: C₁₈H₃₉O₃N; MM: 317 g/mol; FF: 33-35 °C

IV (KBr) ν (cm⁻¹): 3292 (deformação axial O-H), 2921-2851 (deformação axial C-H alifático), 1468 (deformação angular C-H alifático), 1078 (estiramento C-O e/ou C-N alifático).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,73 (m, 4H, H1'), 3,54 (m, 1H, H2), 2,82 (m, 4H, H1); 2,44 (m, 2H, H2'); 1,48 (m, 2H, H3) 1,25 (m, 20H, H4-13); 0,88 (t, 3H, J=6,8Hz, H14).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 68,3 (C2); 62,1 (C2'); 59,4 e 57,5 (C1 e C1'); 34,7 – 25,5 (C3-12); 22,6 (C13); 14,1 (C14).

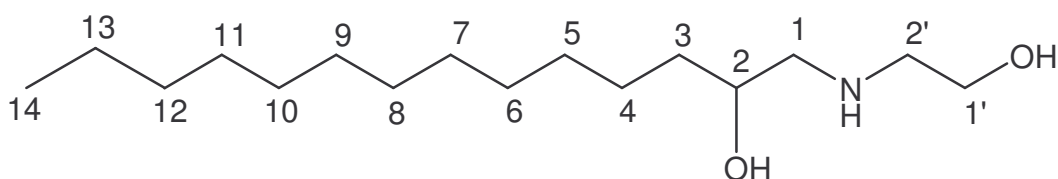


(2-Hidroxitetradecilamino)-2'-metil-1'-propanol **13**: $C_{18}H_{39}O_2N$; MM: 301 g/mol; FF: 62-64 °C

IV (KBr) ν (cm⁻¹): 3306 (deformação axial N-H e O-H), 2964-2848 (deformação axial C-H alifático), 1469 (deformação angular C-H alifático), 1077 (estiramento C-O e/ou C-N alifático).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, D₂O) δ (ppm): 3,56 (m, 1H, H₂); 3,35 (2d, 2H, $J_{1,1'}=11,2$ Hz, H_{1'}); 2,93 (sl, 3H, NH e OH); 2,62 (dd, 1H, $J_{1a,1b}=11,2$ Hz, H_{1a}); 2,39 (dd, 1H, $J_{1b,2}=2,4$ Hz, H_{1b}); 1,43 (m, 2H, H₃); 1,25 (m, 20H, H₄₋₁₃); 1,05 (sl, 6H, H_{3'}); 0,87 (t, 3H, $J=7,0$ Hz, H₁₄).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 70,2,0 (C₂); 61,6 (C_{1'}); 55,5 e 51,5 (C_{2'} e C₁); 35,5 – 22,9 (C₃₋₁₃); 14,3 (C₁₄).



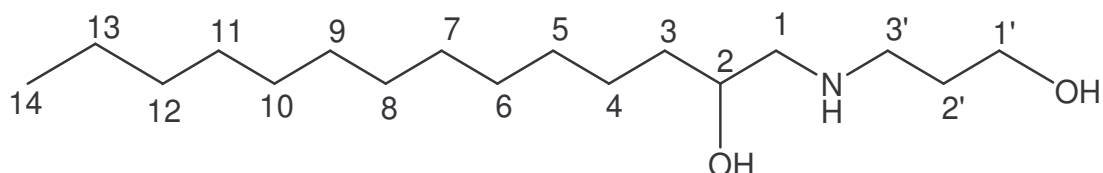
(2-Hidroxitetradecilamino)- etanol **14**: $C_{16}H_{35}O_2N$; MM: 273 g/mol; FF: 73-75 °C

IV (KBr) ν (cm⁻¹): 3343 (deformação axial N-H e O-H), 2915-2847 (deformação axial C-H alifático), 1470 (deformação angular C-H alifático), 1070 (deformação axial C-O e/ou C-N alifático).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,69 (m, 3H, H₂ e H_{1'}); 3,20 (sl, 3H, NH e OH); 2,81 (dd, 1H, $J_{1a,2}=4,8$ Hz, $J_{1a,1b}=10,1$ Hz, H_{1a}); 2,69 (dd, 1H, $J_{1b,2}=2,4$ Hz, H_{1b});

2,52 (t, 2H, H2'); 1,42 (m, 2H, H3) 1,25 (m, 20H, H4-H13); 0,88 (t, 3H, J=6,8Hz, H14).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 70,3 (C2); 61,3 (C1'); 55,5 e 51,5 (C1 e C2'); 35,5 – 25,9 (C3-12); 22,9 (C13); 14,3 (C14).



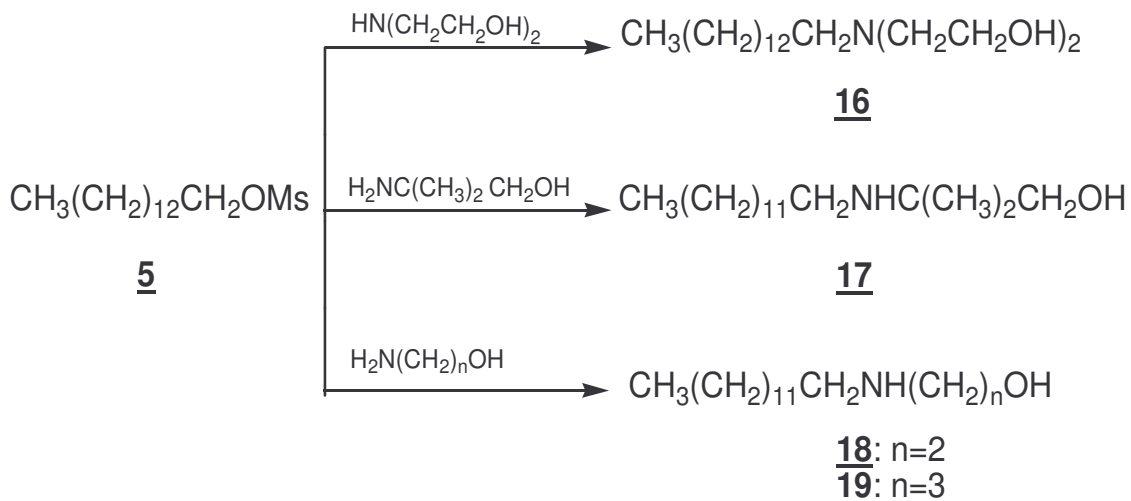
3'-(2-Hidroxi-tetradecilamino)-1'-propanol **15**: $\text{C}_{17}\text{H}_{37}\text{O}_2\text{N}$; MM: 287 g/mol; FF: 76-78°C

IV (KBr) ν (cm $^{-1}$): 3435 (deformação axial N-H e O-H), 2922-2848 (deformação axial C-H alifático), 1466 (deformação angular C-H alifático), 1057 (estiramento C-O e/ou C-N alifático).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,67 (t, 2H, J=5,7Hz, H1'); 3,57 (m, 1H, H2); 3,24 (sl, 1H, NH e OH); 2,74 (t, 2H, J=6,1Hz, H3'); 2,61 (dd, 1H, $J_{1a,2}=2,9\text{Hz}$, $J_{1a,1b}=12,1\text{Hz}$, H1a); 2,40 (dd, 1H, $J_{1b,2}=9,0\text{Hz}$, H1b); 1,63 (qui, 2H, H2'); 1,39 (m, 2H, H3); 1,18 (m, 22H, H4-13); 0,80 (t, 3H, J=6,8Hz, H14).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 70,2 (C2); 63,0 (C1'); 55,8 e 48,9 (C1 e C3'); 35,6 (C2'); 32,1 – 25,9 (C3-12); 22,9 (C13); 14,2 (C14).

3.7 Síntese dos aminoálcoois *N*-alquilados 16-19 a partir do mesilato 5.

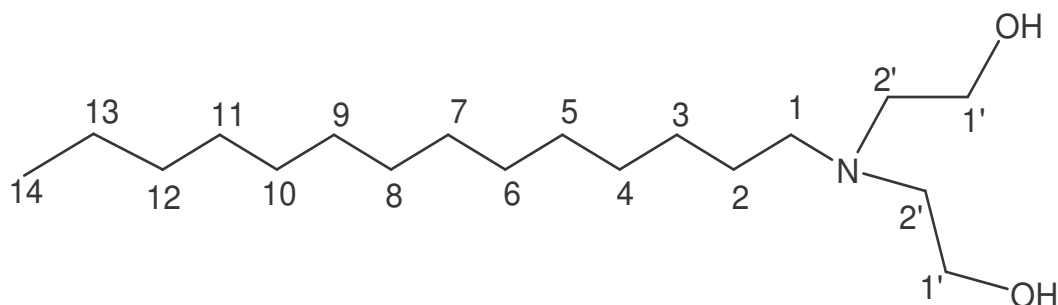


Esquema 3.6. Síntese dos aminoálcoois 16-19

O mesilato 5 (2,94g; 10 mmol) foi adicionado lentamente a soluções etanólicas em refluxo dos amino álcoois 2-amino-1-etanol, 3-amino-1-propanol, dietanolamina ou 2-amino-2-metil-1-propanol (20 mmol) (Tabela 3.5). A mistura reagente foi mantida sob refluxo e agitação magnética por 24 horas. A evolução das reações foi acompanhada por CCD, utilizando-se como eluentes diclorometano ou diclorometano/metanol 9:1 (revelador: iodo). Após o término das reações, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo formado foi purificado por recristalização em hexano.

Tabela 3.5. Estequiometria das reações de obtenção e rendimento dos compostos 16-19

Composto	Amino álcool (g/mmol)	Quantidade do <u>5</u>	Rend.(g;mmol; %)
<u>16</u>	2,103/ 20 (dietanolamina)	10 mmol (2,643 g) de <u>5</u>	2,86; 9,4; 94
<u>17</u>	1,783/ 20 (2-amino-2-metil-1-propanol)	10 mmol (2,643 g) de <u>5</u>	2,53; 8,87; 85
<u>18</u>	1,222/ 20 (2-amino-etanol)	10 mmol (2,643 g) de <u>5</u>	2,34; 9,1; 91
<u>19</u>	1,182/ 20 (3-amino-1-propanol)	10 mmol (2,643 g) de <u>5</u>	2,09; 7,71; 77

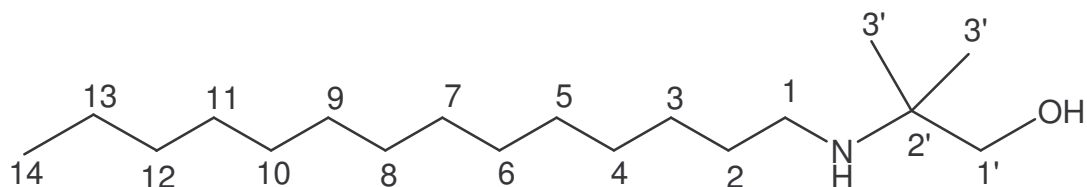


N-Tetradecildietanolamina **16**: C₁₈H₃₉O₂N; MM: 301 g/mol; Óleo

IV (Csl) ν (cm⁻¹): 3374 (deformação axial O-H), 2953-2851 (deformação axial C-H alifático), 1467 (deformação angular C-H alifático), 1041 (deformação axial C-O e/ou C-N).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,61 (t, 4H, J=6,4Hz, H1'); 2,65 (t, 4H, J=5,3Hz, H2'); 2,52 (t, 2H, J=7,9Hz, H1); 1,46 (m, 2H, H2); 1,26 (m, 22H, H3-H13); 0,88 (t, 3H, J=7,0Hz, H14).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 59,7 (C1'); 56,3 e 55,0 (C2' e C1); 32,0 (C2); 29,8 – 22,8 (C3-13); 14,2 (C14).

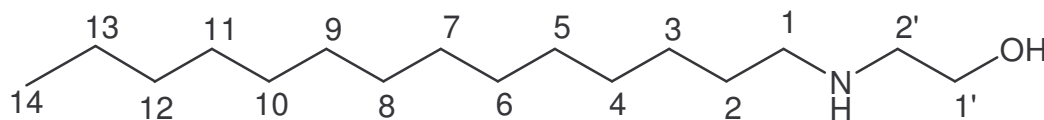


2-(Tetradecilamino)-2'-metil-1-propanol **17**: C₁₈H₃₉ON; MM: 285 g/mol; FF: 61-63 °C

IV (KBr) ν (cm⁻¹): 3286 (deformação axial N-H), 3084 (deformação axial O-H), 2918-2848 (deformação axial C-H alifático), 1468 (deformação angular C-H alifático), 1077 (deformação angular C-O e/ou C-N alifático).

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3,26 (m, 2H, H1'); 2,46 (t, 3H, J=7,0Hz, H1); 1,41 (m, 2H, H2); 1,24 (m, 20H, H3-H13); 1,04 (sl, 6H, H3'); 0,86 (t, 3H, J=6,8Hz, H14).

RMN de ^{13}C (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 68,5 ($\text{C}1'$); 53,6 ($\text{C}2'$); 41,9 ($\text{C}1$); 32,1– 22,8 ($\text{C}2$ -13); 14,2 ($\text{C}14$).

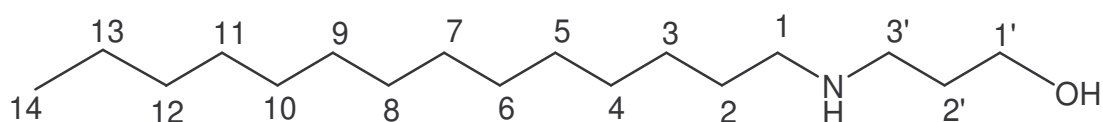


N-Tetradecil-2-aminoetanol **18**: $\text{C}_{16}\text{H}_{35}\text{ON}$; MM: 257 g/mol; FF: 51-53 °C

IV (Csl) ν (cm^{-1}): 3271 (deformação axial NH e OH), 2915-2852 (deformação axial C-H alifático), 1471 (deformação angular C-H alifático), 1127 e 1078 (deformação axial C-O e/ou C-N).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,63 (t, 2H, $J=5,2\text{Hz}$, $\text{H}1'$); 2,74 (t, 2H, $J=5,0\text{Hz}$, $\text{H}2'$); 2,59 (t, 2H, $J=7,3\text{Hz}$, $\text{H}1$); 2,47 (sl, 2H, OH e NH); 1,47 (m, 2H, $\text{H}2$); 1,25 (m, 22H, $\text{H}3$ - $\text{H}13$); 0,87 (t, 3H, $J=6,8\text{Hz}$, $\text{H}14$).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 60,9 ($\text{C}1'$); 51,4 e 49,8 ($\text{C}1$ e $\text{C}2'$); 29,8 – 32,0 ($\text{C}2$ -12); 22,8 ($\text{C}13$); 14,2 ($\text{C}14$).



N-Tetradecil-2-aminopropanol **19**: $\text{C}_{17}\text{H}_{37}\text{ON}$; MM: 271 g/mol; FF: 52-54 °C

IV (KBr) ν (cm^{-1}): 3260 (deformação axial N-H), 3159 (deformação axial O-H), 2914-2848 (deformação axial C-H alifático), 1472 (deformação angular C-H alifático), 1067 e 1051 (deformação axial C-O e/ou C-N).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3,78 (t, 2H, $J=5,3\text{Hz}$, $\text{H}1'$); 3,14 (sl, 2H, NH e OH); 2,85 (t, 2H, $J=5,9\text{Hz}$, $\text{H}3'$); 2,57 (t, 2H, $J=7,0\text{Hz}$, $\text{H}1$); 1,68 (qui, 2H, $J=5,5\text{Hz}$, $\text{H}2'$); 1,44 (m, 24H, $\text{H}2$ - $\text{H}13$); 0,85 (t, 3H, $J=6,8\text{Hz}$, $\text{H}14$).

RMN de ^{13}C (75MHz, CDCl_3) δ (ppm): 64,5 ($\text{C}1'$); 50,2 e 50,1 ($\text{C}1$ e $\text{C}3'$); 32,1 e 30,9 ($\text{C}2$ e $\text{C}2'$); 30,1 – 27,5 ($\text{C}3$ -12); 22,9 ($\text{C}13$); 14,3 ($\text{C}14$).

3.8 Avaliação biológica

3.8.1 Animais

Foram utilizados 36 camundongos da linhagem Balb/c, com peso médio de 25 gramas, 06-08 semanas de idade e pertencentes à colônia do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB/ UFJF, em estantes ventiladas (temperatura de 19-25°C) (Figura 3.1). Os animais tiveram água e alimento “ad libitum”. Todo experimento foi conduzido de acordo com o guia de “Princípios e cuidados no uso de animais de laboratório” e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFJF (**Protocolo: 049/ 2007**).



Figura 3.1. Grupo de camundongos da linhagem Balb/C e acondicionamento em estantes ventiladas.

3.8.2 Preparação e utilização dos compostos para testes “in vitro”

Todos os compostos finais sintetizados foram avaliados “in vitro”. Os mesmos foram diluídos inicialmente em dimetilsulfóxido (DMSO), filtrado em filtro milipore 13mm de diâmetro (Miliporo Japão), e as diluições sucessivas foram feitas em meio RPMI – 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos essenciais e 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (Gibco – Invitrogen, CA, USA). Os compostos foram testados nas concentrações finais de 0,5 µg /mL, 0,05 µg / mL e 0,005 µg /mL.

3.8.3 Cultura de macrófagos murinos J774.A-1

As células da linhagem J774.A-1 foram descongeladas e mantidas em cultura, em garrafas plásticas de cultura (NUNC) (Figura 3.2) em meio RPMI-1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF), 1% de antibiótico penicilina - estreptomicina (Gibco – Invitrogen, CA, USA) e 1% de aminoácidos não-essenciais, por 72 horas em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ à temperatura de 37° C . Após as células atingirem confluência, foram coletadas e lavadas em RPMI-1640 suplementado, por centrifugação a 1200 rpm a 4°C por 10 minutos e a viabilidade determinada utilizando o corante vital Azul de Trypan pela contagem em câmara hemocitométrica. As células foram ressuspensas na concentração de 4×10^5 células/ mL de meio RPMI-1640 suplementado e distribuídas em poços de placas de cultura de 96 poços (100 uL/ poços- NUNC). Em seguida, as células foram cultivadas por 48 horas, na presença ou não dos estímulos (sobrenadante enriquecido com IFN- γ 9 ng/ mL e/ ou BCG a 20 μ g/ mL- Fundação Atauilpho de Paiva), pela adição de 10 μ L de cada estímulo nos poços, seguida da adição de 10 μ L dos compostos sintetizados, nas concentrações 0,5 μ g/mL, 0,05 μ g/mL e 0,005 μ g/mL. Após incubação, os sobrenadantes foram coletados e analisados quanto à produção de NO pelo método de Griess, e a viabilidade celular foi determinada pelo método MTT.

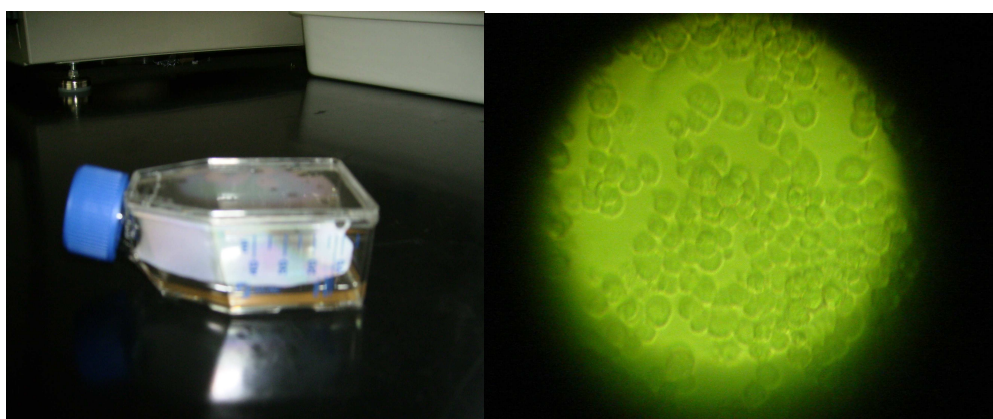


Figura 3.2. Cultura de macrófagos murinos J774.A-1 e observação das células através do microscópio invertido.

3.8.4 Determinação da viabilidade celular pelo Método do MTT

A viabilidade celular e a citotoxicidade foram determinadas pelo método colorimétrico do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]}, baseado na redução do tetrazólio sódico em formazan pelas desidrogenases mitocondriais (MOSSMAN, 1983).

Após 48 horas de cultivo das células e coleta do sobrenadante para dosagem do NO, foi adicionado 100 µL de meio RPMI-1640 suplementado, em seguida 10 µL da solução de MTT a 5 mg/ mL às células restantes (Figura 3.3). Estas foram incubadas por 4 horas em estufa de CO₂ umidificada à temperatura de 37° C. A reação do MTT foi interrompida utilizando-se 100 µL de uma solução de isopropanol-ácido clorídrico (50 µL isopropanol + 50 µL HCl 10N) e incubada por 10 minutos. A leitura foi realizada a 570 nm em leitor de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Devices – US).

Para a determinação da Inibição da proliferação celular (IP) e da citotoxicidade (CTX) foram utilizadas as fórmulas descritas abaixo (OLMO et al, 2006):

$$IP (\%) = [1 - (OD^1 (J774A.1 / IFN / composto) / OD (J774A.1 / IFN))] \times 100$$

$$CTX (\%) = [1 - (OD (J774A.1 / composto) / OD (J774A.1))] \times 100$$

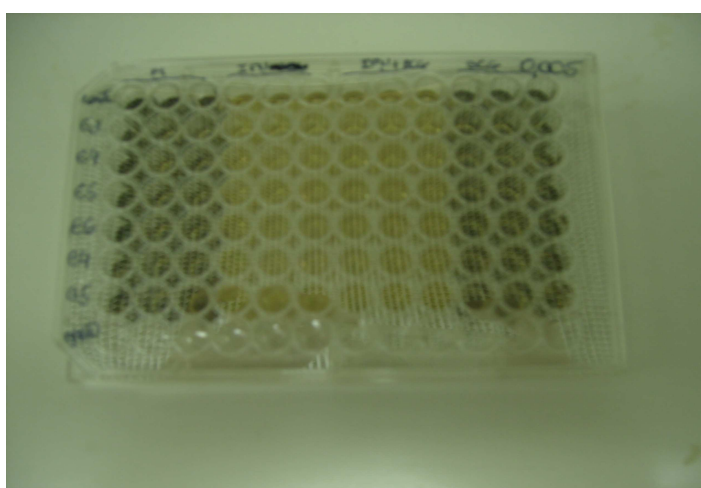


Figura 3.3. Ensaio da viabilidade celular através do Método MTT.

¹ OD: Densidade ótica

3.8.5 Dosagem de nitrito pelo Método de Griess

O NO (óxido nítrico) é biossintetizado através da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase. Como o NO possui uma vida curta, a produção de NO foi estimada pelo acúmulo de nitrito (NO_2), um produto estável da oxidação do NO, usando o reagente de Griess (GREEN et al, 1982).

Para as dosagens de NO foram utilizadas alíquotas de 50 μL das amostras de sobrenadantes da cultura de células da linhagem J774.A-1, colhidas anteriormente. As amostras foram colocadas em poços de placas de 96 poços, em triplicata, e em seguida adicionado 100 μL do reagente de Griess: 50 μL de sulfanilamida (Sigma) 1% + 50 μL de dicloridrato de α -naftiletilenodiamina (Sigma) 0,1% em ácido fosfórico 2,5% (Sigma)- NEED. O reagente também foi adicionado à curva. Foi feita uma solução estoque inicial de NaNO_2 1M, para realização da curva-padrão. Esta solução foi diluída a 200 μM para dar início à curva até 11^a diluição na razão dois, em água destilada. Foram utilizados 100 μL da diluição em cada poço. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas, com comprimento de onda de 540 nm (Spectramax 190–Molecular Devices – US) (Figura 3.4). A produção do NO_2 foi quantificada através de comparação à curva-padrão.



Figura 3.4. Leitor de microplacas Spectramax, utilizado no Método do MTT e no Método de Griess.

3.8.6 Preparação e utilização dos compostos para testes “in vivo”

Os compostos **12** e **19** sintetizados e a Azatioprina (AZA) obtida da Microbiológica-Química e Farmacêutica (Rio de Janeiro), foram diluídos inicialmente em DMSO, filtrados em filtro milipore 13 mm de diâmetro (Miliporo Japão) e as diluições sucessivas foram feitas em água destilada. Os compostos foram testados nas concentrações finais de 0,5 mg /Kg/dia e 0,25 mg /Kg/dia.

3.8.7 Desencadeamento da Reação de Hipersensibilidade Tardia (RHT)

A RHT foi desenvolvida segundo as seguintes etapas: imunização, desafio e leitura da reação. Os animais foram imunizados com aplicação de 0,2 mL de uma suspensão contendo Adjuvante de Freund (CFA) (Sigma Co., St Louis) e Ovalbumina (0,2 mg/ mL) (Grau V) (Sigma) emulsificados na base da cauda (via subcutânea). Os animais foram tratados por 5 dias, conforme grupos abaixo, por gavagem. A reação de hipersensibilidade tardia foi induzida no coxim plantar posterior esquerdo de todos os grupos de camundongos após seis dias de imunização, através da inoculação de 30 µL de suspensão contendo 600 µg de OA agregada (Grau II) (Sigma). O controle de fidelidade foi feito administrando-se de maneira similar 30 µL de salina no coxim plantar posterior direito. A intensidade da RHT foi expressa pela diferença de espessura das patas posteriores, medida em 48 horas após o desafio, com o auxílio do especímetro (Starret, Athol, MA) (Figura 3.5). Os resultados representam a média de 6 animais por grupo mais ou menos erro padrão, expressos em unidades RHT, definida como a diferença de 0,01 mm na espessura das patas direita e esquerda de cada animal.

Grupo I (controle positivo): Ovalbumina (OA) na imunização e no desafio

Grupo II: OA na imunização e tratamento com AZA na concentração 1 mg/kg/dia

Grupo III: OA na imunização e tratamento com composto **12** na concentração 0,25 mg/kg/dia

Grupo IV: OA na imunização e tratamento com composto **12** na concentração 0,50 mg/kg/dia

Grupo V: OA na imunização e tratamento com composto **19** na concentração 0,25 mg/kg/dia

Grupo VI: OA na imunização e tratamento com composto **19** na concentração 0,50 mg/kg/dia



Figura 3.5. Medida da pata posterior do camundongo utilizando o especímetro.

3.8.8 Avaliação da atividade antileishmania

Foram utilizadas duas cepas referência de leishmania: contra *L. amazonensis* (cepa MHOM/Br/75/Josefa, isolada de paciente com leishmaniose cutânea) e *L. chagasi* (cepa MHOM/Br/74/PP75, isolada de paciente com leishmaniose visceral). As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio Warren (infuso de coração e cérebro, hemina e ácido fólico) e as de *L. chagasi* foram cultivadas em meio 199 (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino e à 24 °C, sendo coletadas em fase exponencial de crescimento.

A atividade antipromastigota foi realizada em *L. amazonensis* e *L. chagasi* e determinada de acordo com o método colorimétrico com MTT25 (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, baseado na redução do tetrazólio sódico em formazan pelas desidrogenases mitocondriais. Os parasitos foram distribuídos em placa de 96 poços à 2×10^6 células/mL de meio Warren com 10% de SBF para *L. amazonensis* e 3×10^6 células/mL de meio 199 com 10% de SBF para *L. chagasi*. Os compostos testados foram adicionados após 1 hora em concentrações variadas. Os testes foram feitos em triplicatas. Em três poços não houve adição de drogas (controle) e outros três poços foi utilizada uma concentração final de DMSO (solvente de solubilização dos compostos) de 0,08 %, que é a concentração máxima utilizada nas diluições dos compostos. Após três dias de incubação em estufa à 24°C, foi adicionado 10 µL de MTT à 5mg/mL em cada poço e incubado durante quatro horas. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de isopropanol/ácido (100 mL de isopropanol/0,4 mL de HCl 10 N) e lida em um espectrofotômetro à 570 nm-SPECTRAMAX 190, Molecular Devices. Os resultados foram mostrados em porcentagem de inibição em relação ao padrão (controle). A partir do teste de viabilidade, foi determinado o valor de IC₅₀ (concentração mínima necessária para inibir 50 % do crescimento do parasita) de cada composto. A anfotericina B foi utilizada como fármaco de referência e os valores de IC₅₀ foram 0,9 µM e 1,9 µM para promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente.

3.9 Análise estatística

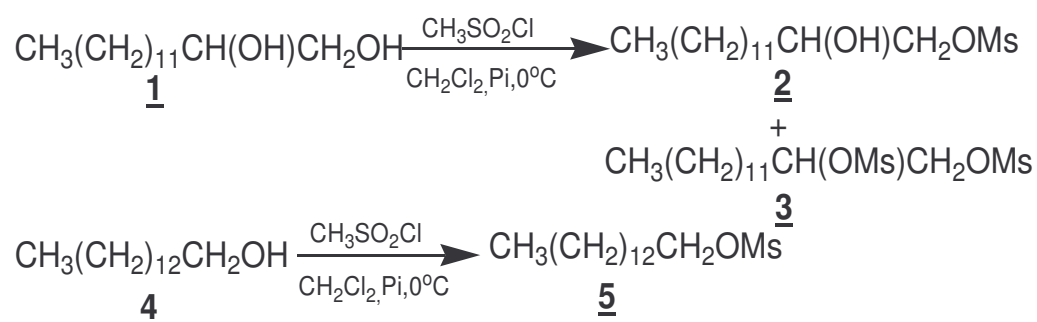
Para os testes “in vitro” as amostras foram processadas em triplicata, utilizando análise de variância ANOVA e pós-teste Bonferroni, com nível de significância $p < 0,05$. O programa utilizado foi o GraphPadPrism versão 5.0.

Para os testes “in vivo” as amostras foram processadas em sextuplicata, utilizando o Teste t Student com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Síntese e caracterização dos metanossulfonatos de alquila 2, 3 e 5

Os metanossulfonatos 2, 3 e 5 foram sintetizados utilizando metodologia simples, que consiste em transformar a hidroxila alcoólica em grupo abandonador, através da reação dos álcoois 1,2-tetradecanodiol 1 e 1-tetradecanol 4 com cloreto de mesila em diclorometano e presença de piridina, a 0° C, durante 24 horas (Esquema 4.1). O uso do álcool tetradecílico como material de partida resultou no composto 5, enquanto a utilização do álcool 1,2- tetradecanodiol forneceu uma mistura dos compostos 2 e 3. Para separar esses dois últimos mesilatos utilizou-se inicialmente recristalização em hexano à quente para obter o composto 2 e, em seguida, cromatografia em coluna de sílica para isolar o restante da mistura fornecendo, no total, 34% de 2 e 33% de 3 (Tabela 4.1).



Esquema 4.1. Síntese dos metanossulfonatos de alquila 2, 3 e 5

Tabela 4.1. Valores de faixa de fusão e rendimentos dos mesilatos de alquila

Composto	Rendimento (%)	Faixa de Fusão (°C)
<u>2</u>	34	77-79
<u>3</u>	33	51-53
<u>5</u>	99	43-45

Esses compostos foram caracterizados pela análise dos espectros no IV, de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C . Como os espectros destes compostos são bastante similares, discutiremos abaixo a caracterização de apenas um deles, o monomesilato de alquila **2**.

No espectro no infravermelho do composto **2** (Figura 4.1), verificou-se a presença de uma banda de absorção na região de 3500 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação $-\text{OH}$ e outra banda intensa referente à deformação axial de C-H alifático na região de 2919 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} . Observou também uma banda de absorção intensa em 1344 cm^{-1} correspondente a ligação $\text{R-OSO}_2\text{R}'$.

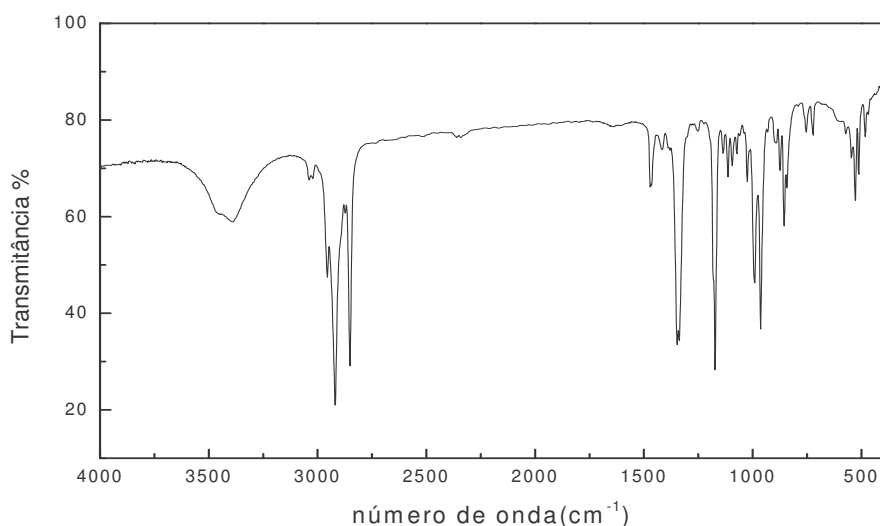


Figura 4.1. Espectro no IV do composto **2** em KBr.

No espectro de RMN de ^1H do composto **2** (Figura 4.2) observam-se dois dupletos duplos em δ 4,25 ppm e em δ 4,09 ppm correspondentes aos hidrogênios do grupo CH_2O ; um multipletto em δ 3,90 ppm referente ao hidrogênio do grupo CH-OH ; um simpleto em δ 3,07 ppm correspondente aos hidrogênios do grupo mesila; um simpleto em δ 2,09 ppm atribuído ao hidrogênio hidroxílico; um multipletto na região de δ 1,26 ppm a δ 1,49 referente a hidrogênios metilênicos da cadeia carbônica e um triplete em δ 0,88 ppm correspondente ao CH_3 da cadeia carbônica .

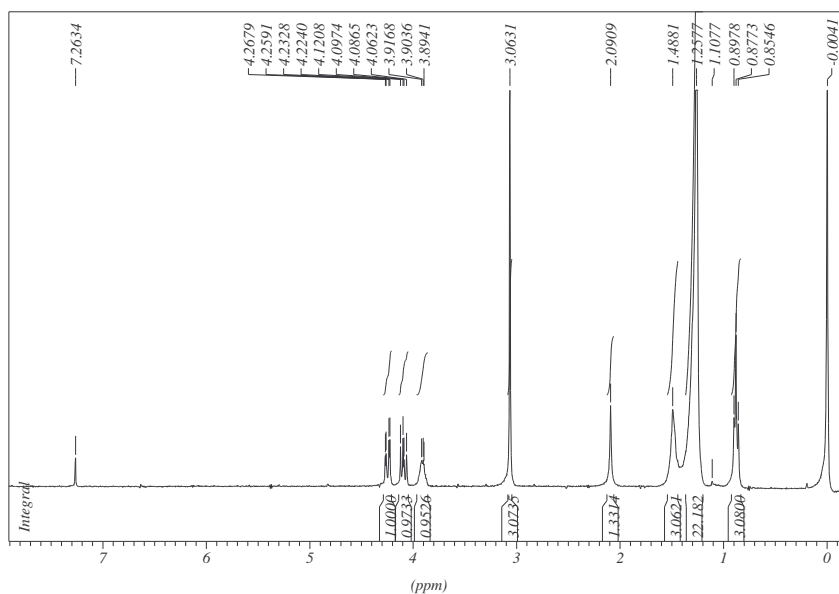


Figura 4.2. Espectro de RMN de ^1H do composto **2** (CDCl_3 , 300 MHz)

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** (Figura 4.3), observa-se a presença de um sinal em δ 14,3 ppm referente ao grupo CH_3 da cadeia carbônica e um sinal em δ 37,7 ppm correspondente ao CH_3 ligado diretamente ao enxofre, além dos outros sinais entre δ 22,8 e δ 32,9 referentes a carbonos metilênicos. Nos deslocamentos δ 69,8 e δ 73,9 observamos os sinais referentes aos carbonos dos grupos CHOH e CH_2OMs .

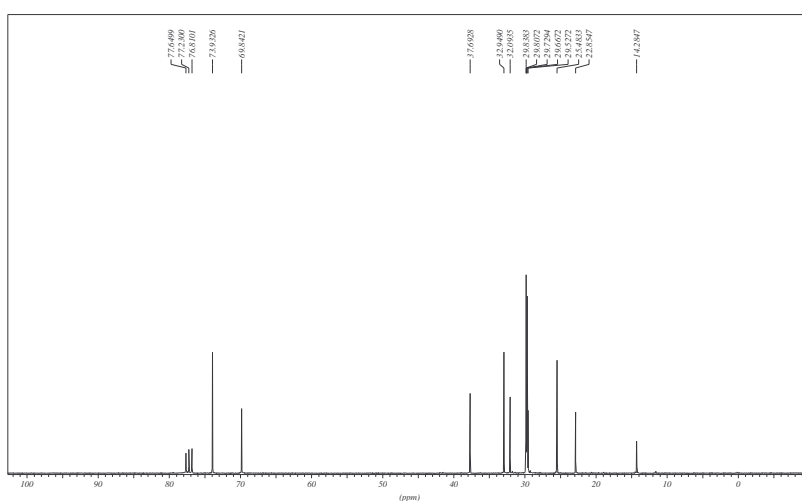
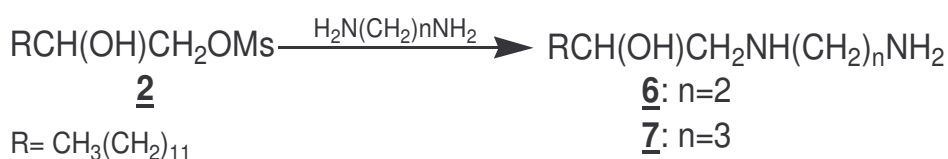


Figura 4.3. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** (CDCl_3 , 75 MHz)

4.2 Síntese das diaminas 6 e 7

As diaminas *N*-alquiladas 6 e 7 foram obtidas a partir do mesilato 2, pelo tratamento com as diaminas 1,2-etanodiamina ou 1,3-propanodiamina em etanol sob refluxo (Esquema 4.2). Foi utilizado excesso de diamina, no intuito de minimizar a formação dos respectivos derivados *N,N*-dissubstituídos.



Esquema 4.2. Síntese das diaminas 6 e 7.

Tabela 4.2. Valores de faixa de fusão e rendimentos das diaminas 6 e 7

Composto	Rendimento (%)	Faixa de Fusão (°C)
<u>6</u>	47	78-80
<u>7</u>	64	82-84

Ambas diaminas foram caracterizadas pela análise de seus espectros no IV, de RMN de ^1H e de ^{13}C . Por apresentarem estruturas químicas semelhantes, discutiremos apenas a caracterização do composto 6.

No espectro no infravermelho do composto 6 (Figura 4.4), a presença do grupo amina e do grupo hidroxila é evidenciada pelas bandas intensas em 3340 cm^{-1} e 3271 cm^{-1} , respectivamente, inerentes aos modos de estiramento N-H e O-H. Observa-se também uma banda referente à deformação axial da ligação C-H alifático em 2920 e 2850 cm^{-1} e um sinal de absorção referente a deformação angular C-H alifático na região de 1465 cm^{-1} . Observa-se a ausência da banda em 1344 cm^{-1} correspondente a ligação R-OSO₂R, evidenciando a reação de substituição do grupo mesila pelo aminoálcool.

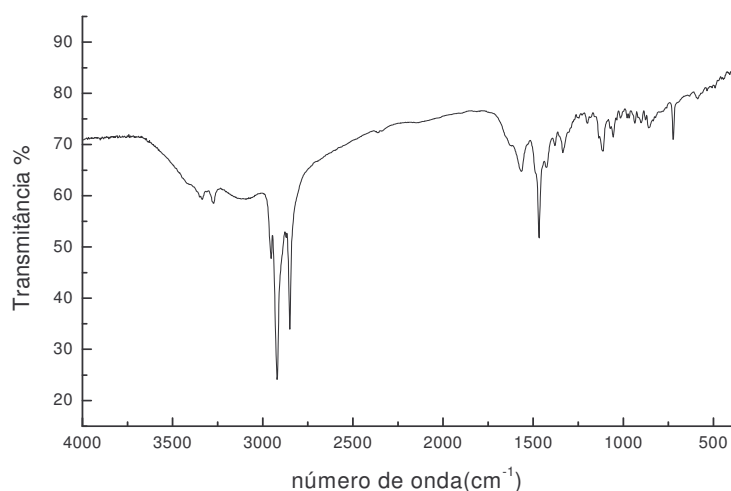


Figura 4.4. Espectro no infravermelho do composto **6** em KBr

No espectro de RMN de ^1H do composto **6** (Figura 4.5) observa-se sinais que evidenciam a formação do composto desejado, são eles: um tripleto em δ 0,88 ppm correspondente aos hidrogênios do grupo CH_3 ; um multipletto em δ 1,26 ppm e em δ 1,41 ppm correspondente aos hidrogênios metilênicos alifáticos; três multiplettos em δ 2,85, δ 2,80 e δ 2,68 ppm referentes a CH_2 , NH e OH , além de um multipletto em δ 3,65 ppm correspondente ao CHOH . Observa-se, igualmente, a ausência de simpleto em δ 3,06 ppm referente ao CH_3 do grupo mesila presente no material de partida.

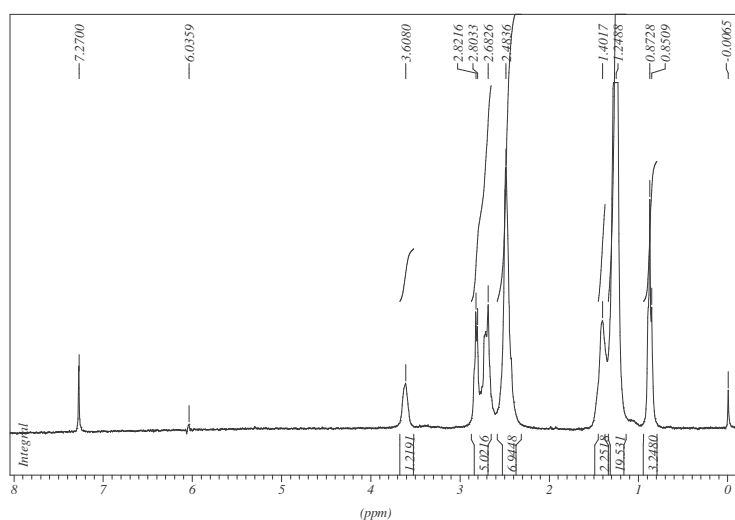


Figura 4.5. Espectro de RMN de ^1H do composto **6** (CDCl_3 , 300 MHz)

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **6** (Figura 4.6), atribui-se os seguintes sinais de ressonância: um sinal em δ 14,3 ppm que corresponde ao carbono do grupo CH_3 ; sinais entre δ 22,8 e δ 35,3 ppm atribuídos a carbonos metilênicos da cadeia carbônica alifática; um sinal em δ 41,8 ppm referente ao carbono CH_2NH_2 ; dois sinais em δ 52,1 e δ 55,5 ppm referentes aos dois carbonos CH_2NH ; além de um sinal em δ 69,8 ppm referente ao carbono CHOH .

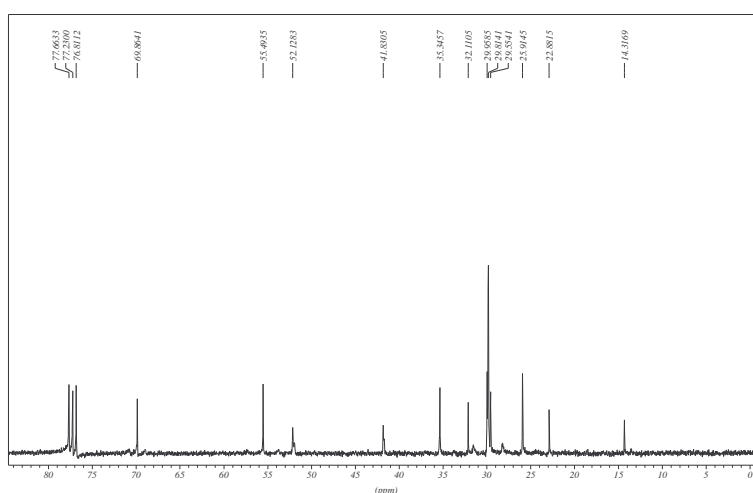
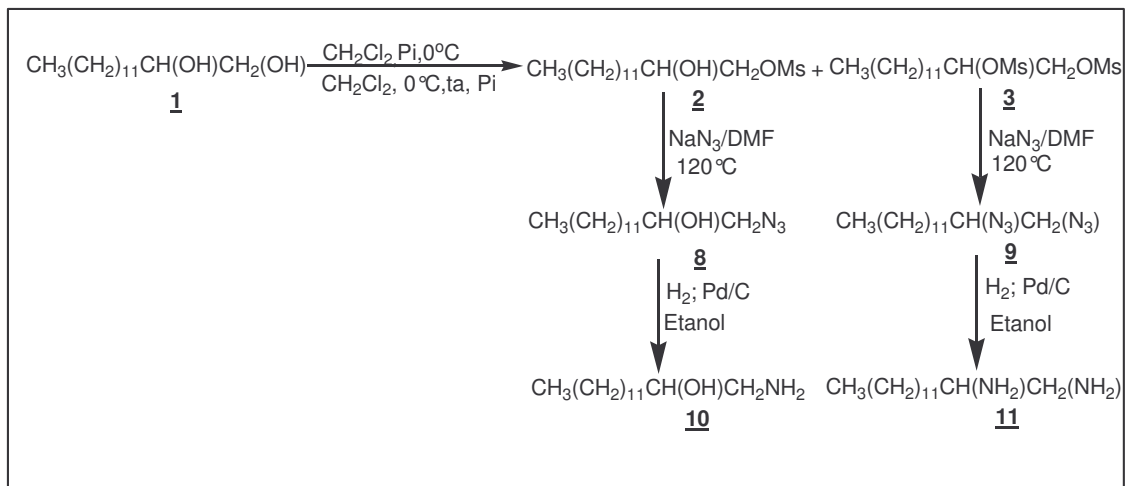


Figura 4.6. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **6** (CDCl_3 , 75 MHz)

4.3 Síntese do aminoálcool **10** e da diamina **11**

O tratamento dos compostos **2** e **3** com azida de sódio em DMF a 120°C por 24 horas forneceu os compostos **8** e **9**, respectivamente. Essas duas azidas foram reduzidas por hidrogenação em etanol e presença de paládio obtendo-se os compostos finais **10** e **11** (Esquema 4.3). Os rendimentos e as faixas de fusão estão sumariados na Tabela 4.3.



Esquema 4.3. Síntese do amino álcool **10** e da diamina **11**

Tabela 4.3. Valores de rendimento e faixa de fusão dos compostos **8-11**.

Composto	Rendimento (%)	Faixa de Fusão (°C)
8	76	36-38
9	94	-
10	50	81-83
11	45	111-113

Os compostos **8** e **9** foram caracterizados pela análise de seus espectros de IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Por apresentarem estruturas semelhantes, será discutida a seguir apenas a caracterização do composto **8**.

Ao analisar o espectro no infravermelho do composto **8** (Figura 4.7) observou-se em 2097 cm^{-1} uma banda intensa referente ao estiramento da ligação C-N₃, evidenciando assim a formação da azida almejada, e uma banda em 3352 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação O-H. A presença da cadeia alifática nesse composto pode ser evidenciada pelas bandas intensas em 2916 e 2849 cm^{-1} referentes à deformação axial de C-H.

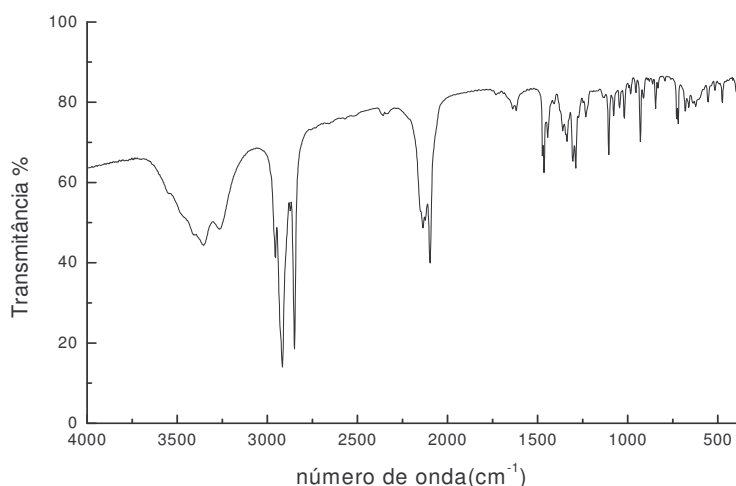


Figura 4.7. Espectro no infravermelho do composto **8** em KBr.

Analisando o espectro de RMN de ^1H do composto **8** (Figura 4.8) observa-se sinais de ressonância que foram atribuídos aos seguintes hidrogênios: metílicos de cadeia alifática em δ 0,85 ppm (triplete); metilênicos de cadeia alquílica na região de δ 1,22 a δ 1,43 ppm (multiplete); hidroxílico em δ 2,33 ppm; metilênico ligado a grupo azido, desdobrado em dois dupletos duplos centrados em δ 3,19 e δ 3,35 ppm, e CH-OH em δ 3,72 ppm (multiplete). Comparando-se esse espectro com o do mesilato de partida observa-se um deslocamento significativo dos sinais dos hidrogênios H1a e H1b para região mais próxima do TMS, conforme esperado, evidenciando a substituição do grupo mesila por grupamento azido.

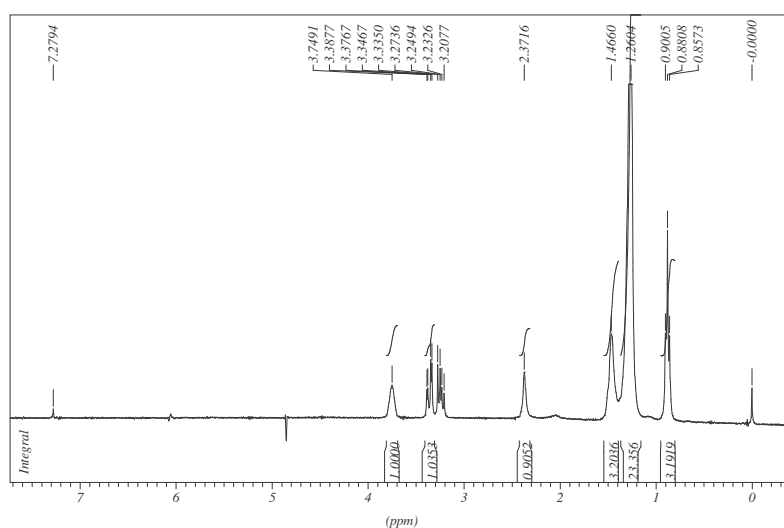


Figura 4.8. Espectro de RMN de ^1H do composto **8** (CDCl_3 , 300 MHz)

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C do composto **8** (Figura 4.9) observa-se um sinal em δ 14,2 ppm, atribuído ao carbono do grupo metila; sinais correspondentes a carbonos metilênicos da cadeia alquila na região de δ 22,8 a δ 34,7 ppm; um sinal em δ 57,5 ppm inerente a carbono ligado ao grupamento azido e um sinal em δ 71,3 ppm proveniente do carbono ligado a hidroxila (CH-OH). Dessa forma, observa-se o deslocamento do sinal do carbono mesilado (C1), anteriormente em δ 73,9 ppm para δ 57,5 ppm, evidenciando a introdução do grupo azido nesse carbono.

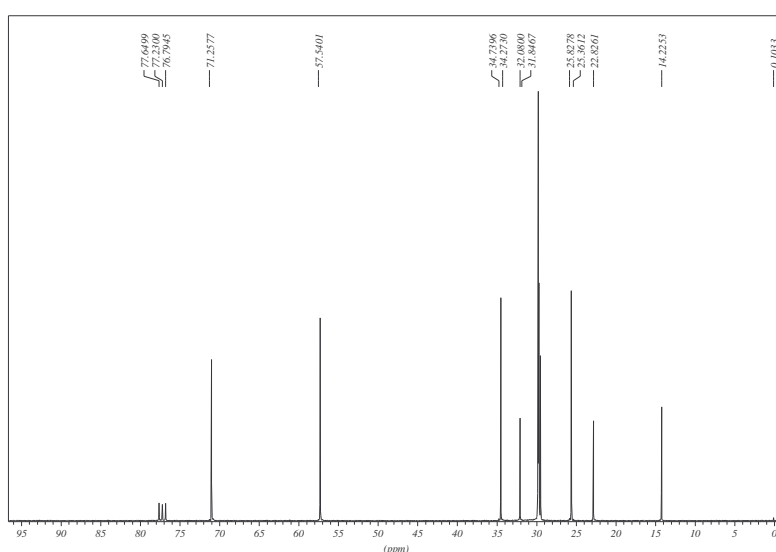


Figura 4.9. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **8** (CDCl_3 , 75 MHz).

Os compostos **10** e **11** também foram caracterizados pela análise de seus espectros de IV, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C . Por apresentarem estruturas semelhantes, será discutida a seguir somente a caracterização do composto **10**.

O espectro no infravermelho do composto **10** (Figura 4.10) não apresenta a banda de absorção em 2097 cm^{-1} presente no material de partida e característica de estiramento da ligação C-N_3 , sugerindo que ocorreu a redução deste grupamento a amino. Verifica-se também uma banda intensa e larga em 3326 cm^{-1} atribuída ao estiramento das ligações N-H e OH e bandas intensas em 2916 e 2848 cm^{-1} , referentes à deformação axial de ligação C-H .

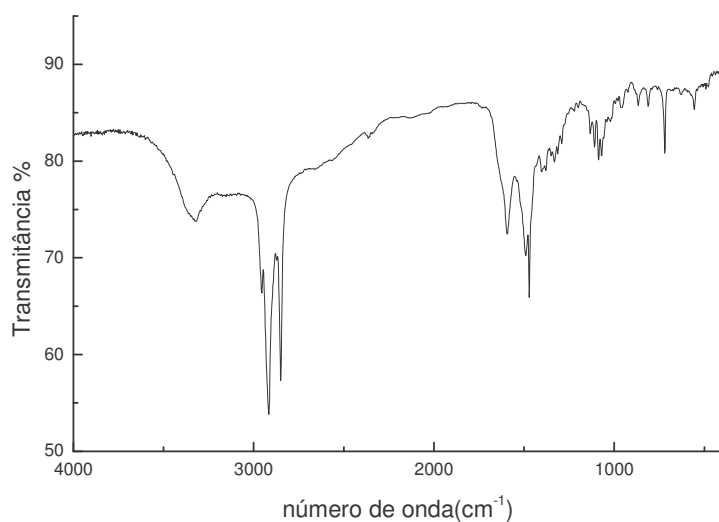


Figura 4.10. Espectro no infravermelho do composto **10** em KBr.

Analisando o espectro de RMN de ^1H do composto **10** (Figura 4.11) pode-se verificar: um tripleto em δ 0,86 ppm referente aos hidrogênios do grupo metila; um multipletto centrado em δ 1,24 ppm característico de hidrogênios metilênicos de cadeia alquila; dois dupletos duplos em δ 2,50 e δ 2,82 ppm, correspondentes aos hidrogênios metilênicos do grupo CH_2NH_2 e um multipletto em δ 3,50 ppm oriundo de hidrogênio de CHOH , OH e NH_2 .

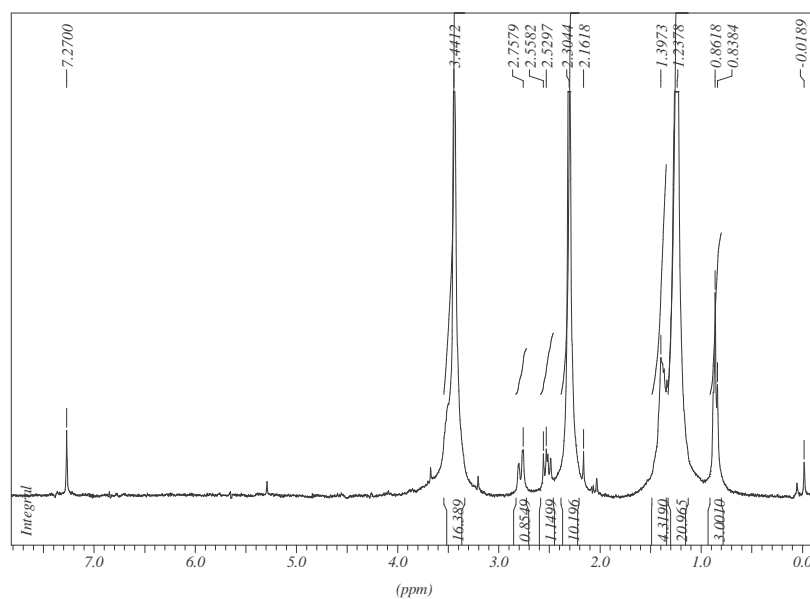


Figura 4.11. Espectro de RMN de ^1H do composto **10** (CDCl_3 , 300 MHz).

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** (Figura 4.12), observa-se a existência de um sinal em δ 72,3 ppm referente ao carbono hidroxilado e um sinal em δ 50,7 ppm correspondente ao carbono aminado. Verifica-se ainda a presença dos sinais referentes aos carbonos da cadeia alquila que são: um sinal em δ 14,3 ppm (CH_3) e sinais na região de δ 22,8 a δ 35,7 ppm oriundos dos outros carbonos metilênicos.

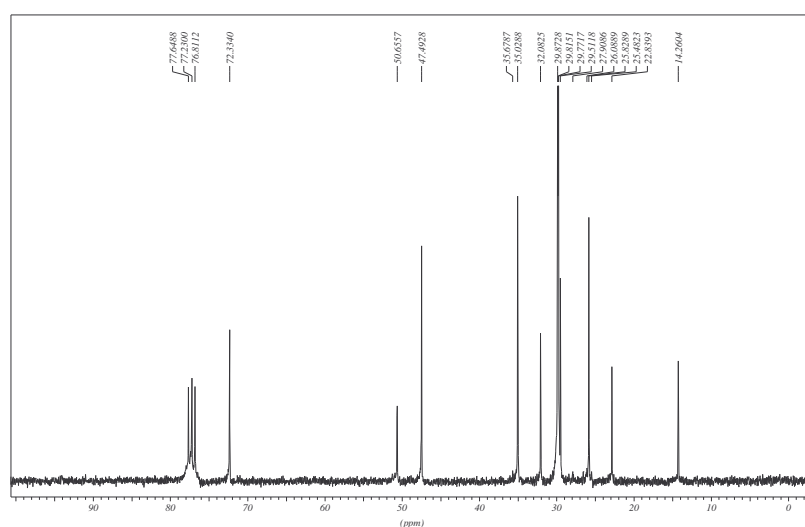


Figura 4.12. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** (CDCl_3 , 300 MHz).

4.4 Síntese dos aminoálcoois **12-15** a partir do monomesilato **2**.

Foi realizada a síntese dos aminoálcoois de **12** a **15** pelo tratamento do composto **2** com excesso de 2-amino-1-etanol, 3-amino-1-propanol, dietanolamina ou 2-amino-2-metil-1-propanol em etanol sob refluxo por 24 horas. Esses compostos foram purificados por recristalização em hexano e obtidos em rendimentos satisfatórios (Tabela 4.4).

Analisando-se o espectro de RMN de ^{13}C do composto **15** (Figura 4.15), pode-se observar: um sinal em δ 14,2 ppm que corresponde ao carbono do grupo CH_3 ; sinais entre δ 22,9 e δ 35,6 ppm atribuídos a carbonos metilênicos; dois sinais em δ 48,9 e δ 55,8 ppm referentes aos dois carbonos CH_2N e sinais em δ 63,0 ppm e δ 70,2 ppm referentes aos carbonos ligados a oxigênio (CH_2OH e CHOH , respectivamente).

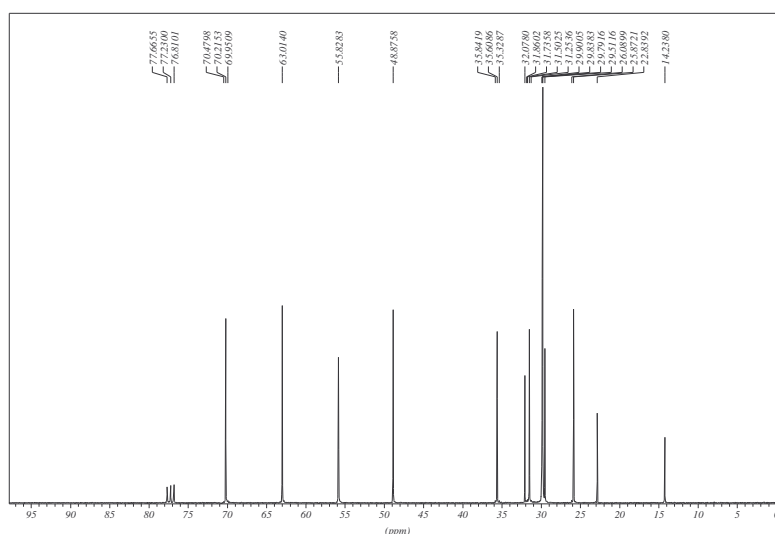
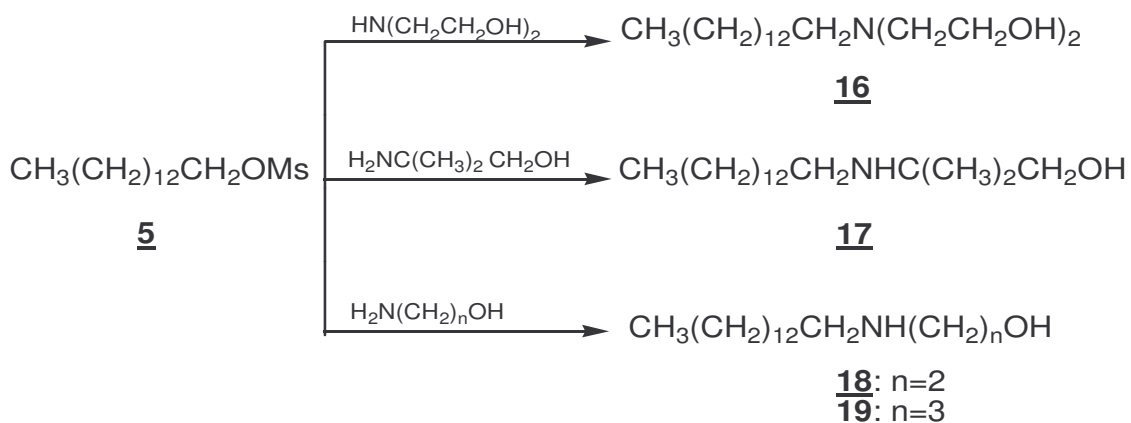


Figura 4.15. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **15** (CDCl_3 , 75 MHz)

4.5 Síntese e caracterização dos aminoálcoois *N*-alquilados **16-19**

Partindo-se do mesilato de tetradecila **5**, foram obtidos os aminoálcoois *N*-alquilados **16** a **19** através de reação de substituição do grupo mesila por quatro aminoálcoois diferentes (dietanolamina, 2-amino-2-metil-1-propanol, 2-amino-1-etanol e 3-amino-1-propanol) em etanol sob refluxo por 24 horas (Esquema 4.5). Foi usado excesso dos aminoálcoois de partida no intuito de minimizar a formação dos respectivos derivados *N,N*-dissubstituídos. A Tabela 4.5 mostra os rendimentos para obtenção dos compostos **16-19** após purificação, bem como seus valores de faixa de fusão.



Esquema 4.5. Síntese dos aminoálcoois **16-19**.

Tabela 4.5. Valores de rendimento e faixa de fusão dos aminoálcoois **16-19**.

Composto	Rendimento (%)	Faixa de Fusão (°C)
16	94	-
17	85	60-62
18	91	53-55
19	77	54-56

Todos os aminoálcoois *N*-alquilados foram caracterizados pela análise de seus espectros no IV, de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C . Como os espectros desses aminoálcoois são bastante semelhantes discutiremos a seguir apenas os espectros do composto **17**. Nota-se no espectro no infravermelho desse composto (Figura 4.16), além de outras bandas, uma estreita em 3286 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H, uma de baixa intensidade em 3084 que corresponde ao estiramento da ligação O-H e uma banda intensa de deformação axial da ligação C-H alifático em $2918 - 2848\text{ cm}^{-1}$.

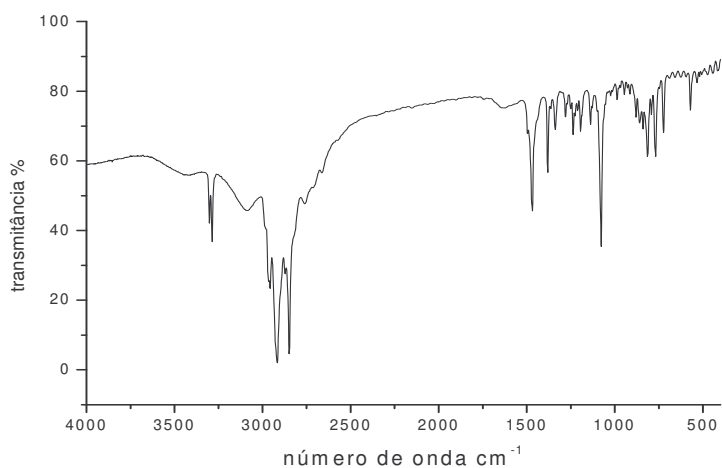


Figura 4.16. Espectro no infravermelho do composto **17** em KBr.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 4.17) observa-se um tripleto em δ 0,86 ppm que foi atribuído aos hidrogênios de CH_3 da cadeia carbônica; um simpleto em δ 1,04 ppm que corresponde aos hidrogênios dos dois grupos metila da porção aminoálcool; sinais entre δ 1,24 e δ 1,41 ppm referentes a vários hidrogênios metilênicos da cadeia carbônica; um tripleto em δ 2,46 ppm referente aos hidrogênios do grupamento CH_2N e um simpleto em δ 3,26 ppm correspondente aos hidrogênios do grupo CH_2O .

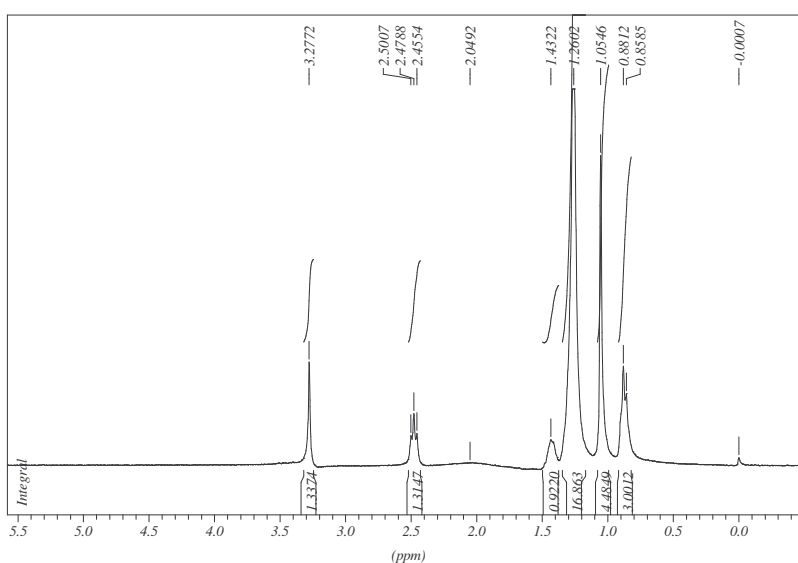


Figura 4.17. Espectro de RMN de ^1H do composto **17** (CDCl_3 , 300 MHz)

No espectro de RMN de ^{13}C de **17** (Figura 4.18) observa-se um sinal atribuído ao carbono metílico em δ 14,2 ppm; sinais na região de δ 22,8 a δ 32,1 ppm atribuídos aos carbonos metilênicos da cadeia alifática e aos grupos metila da porção aminoálcool; um sinal em δ 41,9 ppm corresponde ao carbono de CH_2N ; um sinal em δ 53,6 ppm referente ao carbono não hidrogenado e um sinal a δ 68,5 ppm atribuído ao carbono do grupo CH_2O .

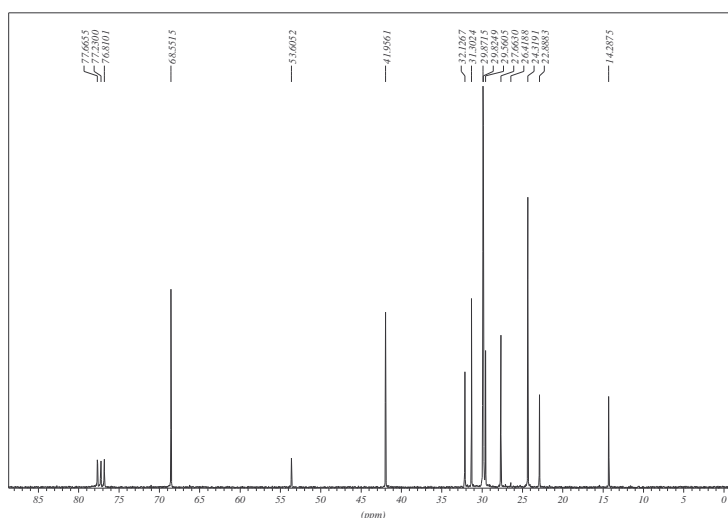


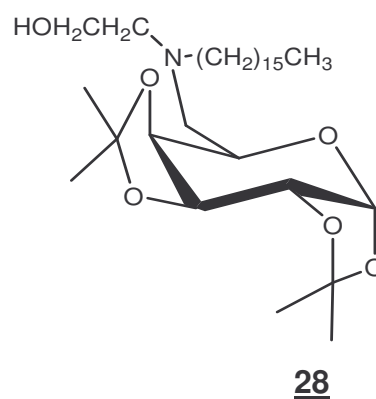
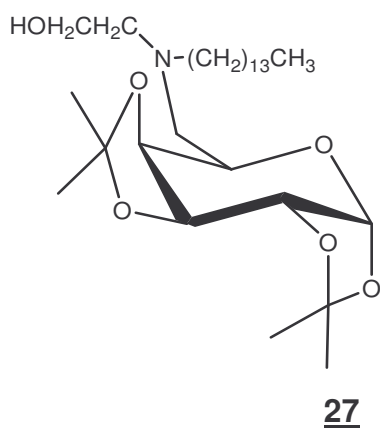
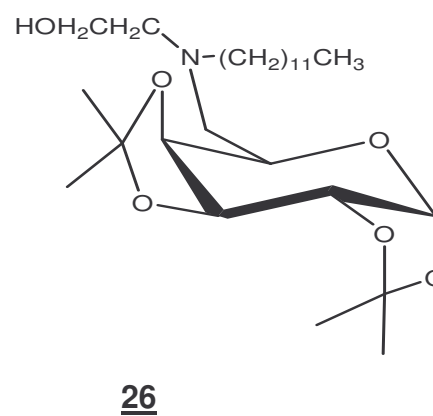
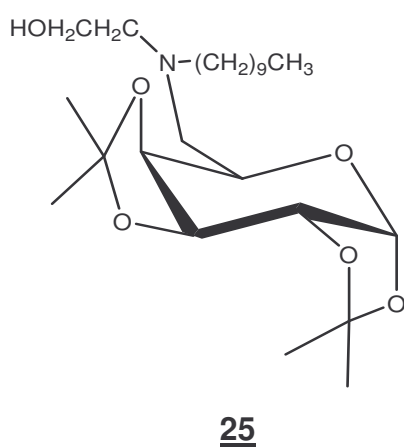
Figura 4.18. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **17** (CDCl_3 , 75 MHz)

4.6 Avaliação da atividade biológica

Segundo a metodologia proposta, foram testados “in vitro” os compostos **6**, **7**, e **10** a **19**, nas seguintes concentrações cada: 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,005 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi avaliada a proliferação celular e a citotoxicidade pelo Método do MTT e a produção de óxido nítrico (NO) pelo Método de Griess.

Além dos compostos preparados nesse trabalho foram também avaliados os aminoálcoois e diamina **20** a **28** abaixo, sintetizados no Núcleo de Pesquisa em Química-NUPEQ/UFJF por Taveira e colaboradores (TAVEIRA et al, 2007). Tais aminoálcoois, além de apresentarem uma cadeia alifática longa, alguns possuem igualmente uma porção carboidrato ligada ao grupo amino.

- Composto **20**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
- Composto **21**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
- Composto **22**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
- Composto **23**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$
- Composto **24**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{NH}_2$



4.6.1 Avaliação da viabilidade celular pelo Método MTT e da produção de óxido nítrico (NO) pelo Método de Griess dos aminoácidos e diaminas.

Os compostos **6**, **7**, **10-28** foram testados sem estímulo e frente aos estímulos IFN- γ , IFN- γ + BCG e BCG, em três diferentes concentrações, para avaliação da viabilidade celular e da produção de NO.

- Composto **6**

Na Figura 4.19-A observa-se que a diamina **6** apresentou citotoxicidade nas 3 concentrações utilizadas, sendo que este fato foi dose dependente, quando observa-se as células na ausência dos estímulos. Entretanto, apenas a concentração mais alta (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentou diminuição da proliferação celular quando os estímulos foram utilizados. Com relação à produção de NO (Figura 4.19-B), as concentrações 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram um potencial em diminuir a produção de NO na presença dos estímulos IFN- γ e IFN- γ + BCG.

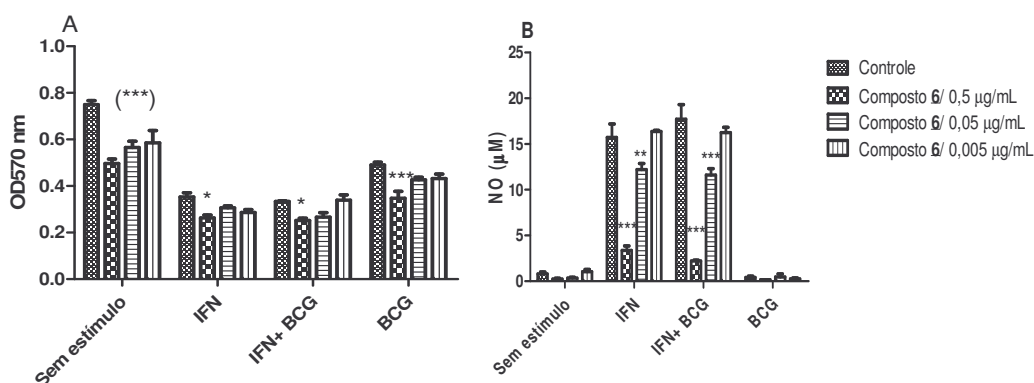


Figura 4.19. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) da diamina **6** em diferentes concentrações. * $p < 0,05$

- Composto **7**

A diamina **7** foi citotóxica em todas as concentrações avaliadas na ausência de estímulos (Figura 4.20-A). Observa-se uma diminuição da proliferação celular em todas as concentrações frente ao estímulo IFN- γ , e na concentração 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente aos estímulos IFN- γ + BCG e BCG. A presença da diamina **7** levou a

diminuição da produção de NO nas concentrações 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ quando estimulados com IFN- γ e IFN- γ + BCG (Figura 4.20-B).

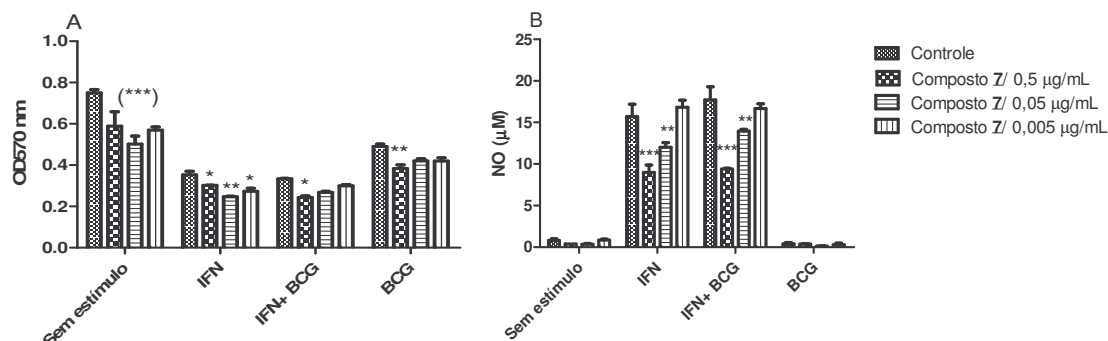


Figura 4.20. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) da diamina 7 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 10

Observa-se que o aminoálcool 10, além de ter sido citotóxico na concentração 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, induziu proliferação celular nas concentrações 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,005 $\mu\text{g}/\text{mL}$, quando as culturas foram realizadas na ausência de estímulo. Entretanto, quando se utilizou apenas IFN- γ observa-se uma diminuição da proliferação celular na concentração 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e aumento da proliferação celular na concentração 0,005 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aumento observado também na concentração 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente ao IFN- γ + BCG (Figura 4.21-A). O aminoálcool 10, em todas as concentrações testadas, levou à diminuição na produção de NO frente ao estímulo IFN- γ + BCG, o que ocorreu também frente ao estímulo IFN- γ quando testadas as concentrações 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 4.21-B).

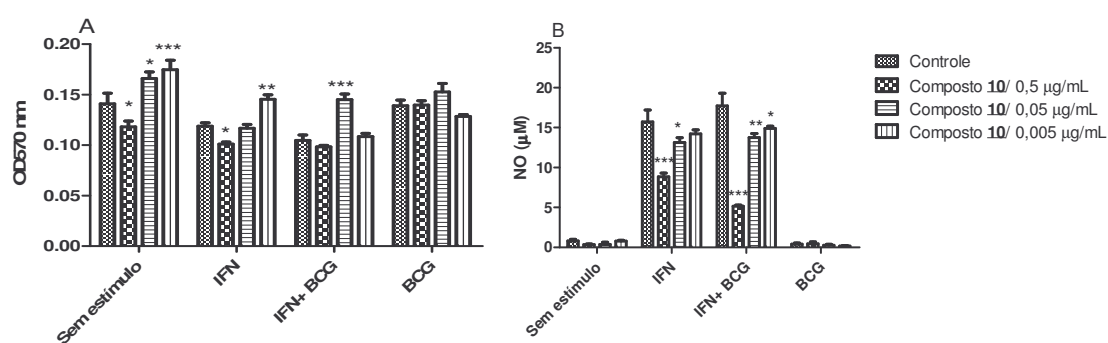


Figura 4.21. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 10 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 11

Pode-se observar que a diamina 11 nas diferentes concentrações, frente aos diferentes estímulos, não apresentou alteração na proliferação celular e não foi citotóxico na ausência de estímulo (Figura 4.22-A). Ocorreu um aumento da proliferação celular apenas na concentração 0,005 µg/ mL, quando utilizado o estímulo IFN-γ. Além disso, observou-se uma diminuição na produção de NO nas concentrações 0,5 µg/ mL e 0,05 µg/ mL frente aos estímulos IFN-γ e IFN-γ+ BCG (Figura 4.22-B).

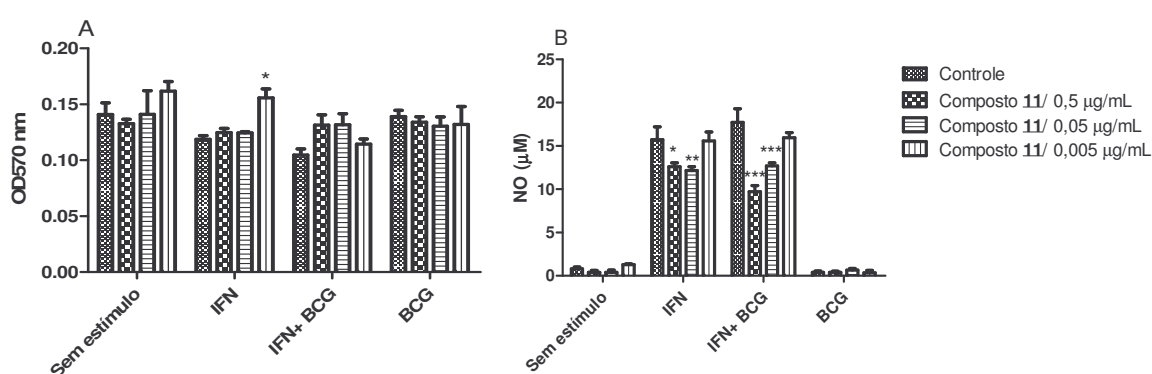


Figura 4.22. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) da diamina 11 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 12

O aminoálcool 12, além de não ter sido citotóxico, levou ao aumento na proliferação celular em todas as concentrações quando testado sem estímulo, ou frente ao estímulo BCG (Figura 4.23-A). Ocorreu também uma diminuição na produção de NO nas concentrações 0,5 µg/ mL e 0,05 µg/ mL frente aos estímulos IFN-γ e IFN-γ+ BCG, diminuição esta observada também em todas as concentrações frente apenas ao estímulo BCG (Figura 4.23-B).

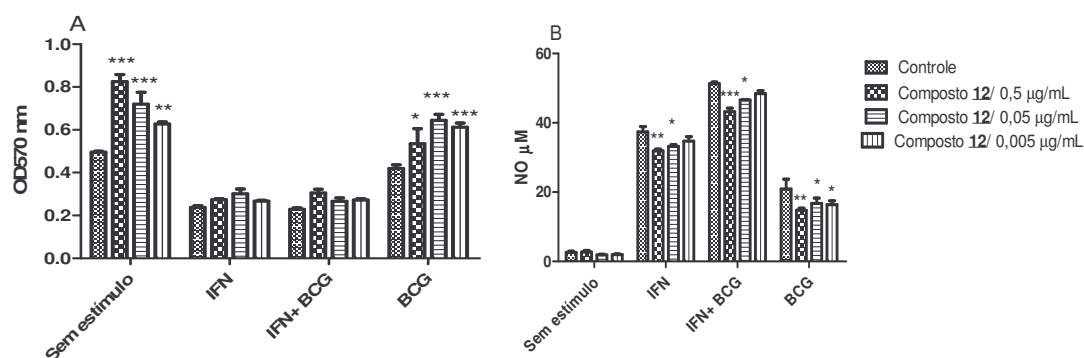


Figura 4.23. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 12 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 13

O aminoálcool 13, além de não ser citotóxico, levou ao aumento na proliferação celular em todas as concentrações quando testado sem estímulo, ou frente ao estímulo BCG (Figura 4.24-A). Porém não apresentou diminuição na produção de NO, em nenhuma das concentrações testadas (Figuras 4.24- B).

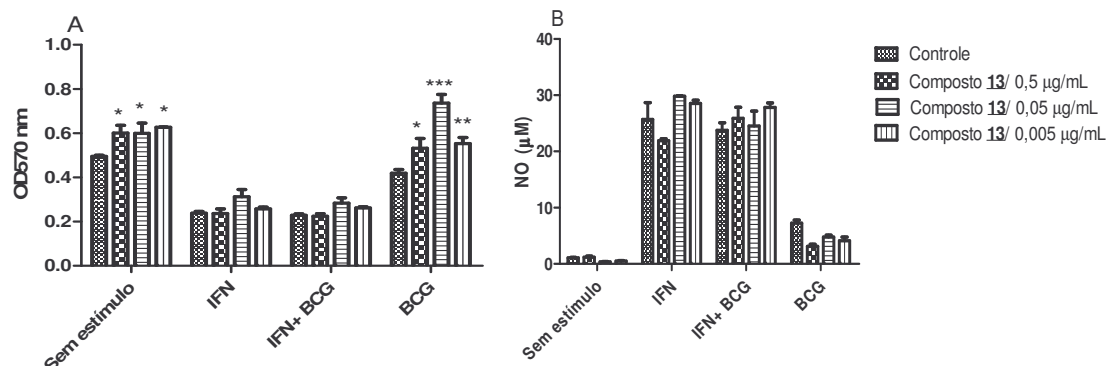


Figura 4.24. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 13 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 14

O aminoálcool 14, além de não ser citotóxico, levou a um aumento na proliferação celular em todas as concentrações quando testado sem estímulo, ou frente ao estímulo BCG (Figura 4.25-A). Houve diminuição na produção de NO nas concentrações 0,5 μg/ mL e 0,005 μg/ mL quando utilizou- se apenas IFN- γ como estímulo e na concentração 0,5 μg/ mL quando utilizou- se IFN- γ + BCG (Figura 4.25- B).

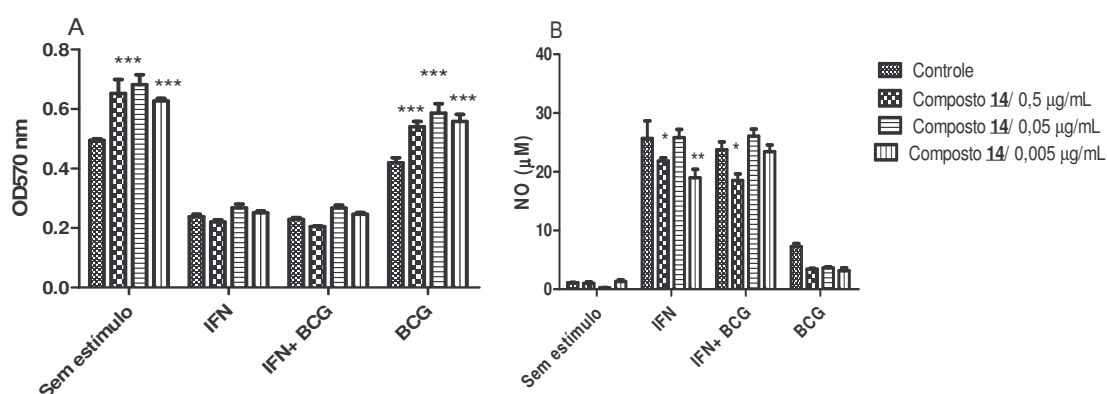


Figura 4.25. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 14 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 15

O aminoálcool 15 levou ao aumento na proliferação celular em todas as concentrações quando testados sem estímulo, ou frente ao estímulo BCG (Figura 4.26-A). Porém não apresentou alteração significativa na produção de NO em nenhuma concentração testada, frente aos diferentes estímulos (Figura 4.26-B).

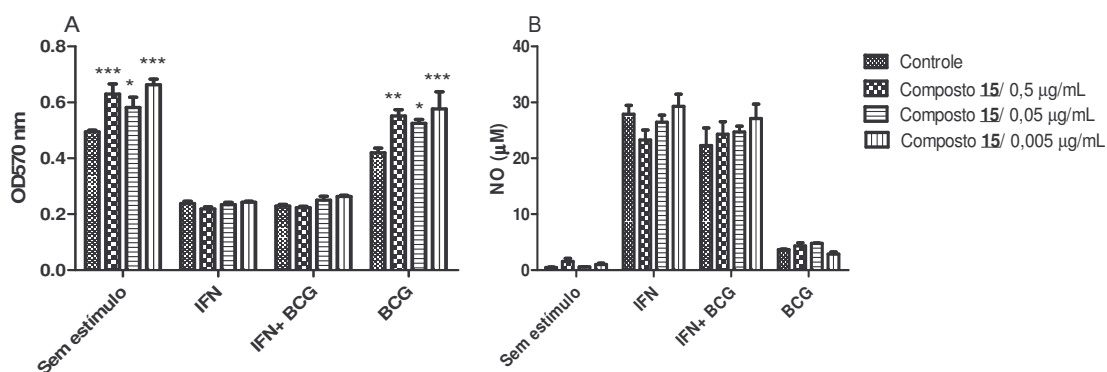


Figura 4.26. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 15 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 16

O aminoálcool 16, além de não ser citotóxico, não alterou a proliferação celular em nenhuma das concentrações testadas (Figura 4.27-A). Diminuiu a produção de NO nas concentrações de 0,5 µg/ mL e 0,05 µg/ mL frente ao estímulo

IFN- γ e em todas concentrações testadas frente aos estímulo IFN- γ + BCG (Figura 4.27- B).

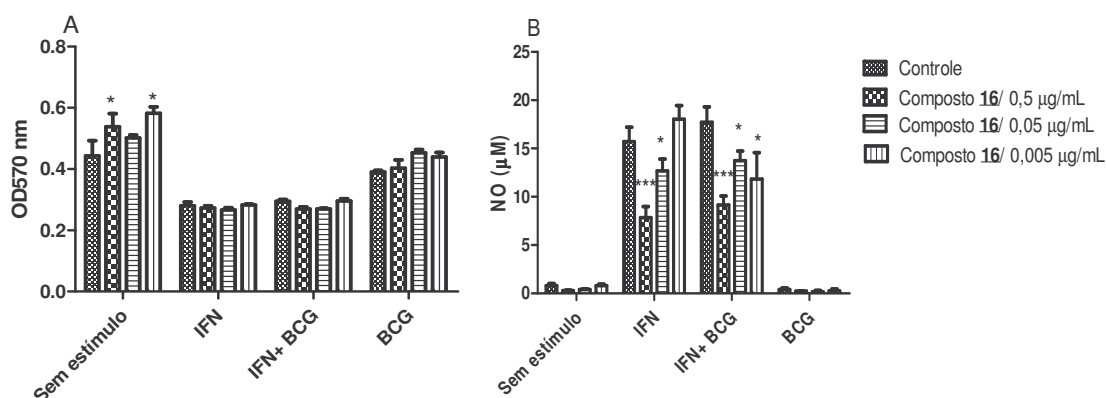


Figura 4.27. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 16 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Compostos 17

O aminoálcool 17 não foi citotóxico e também não alterou a proliferação celular em nenhuma das concentrações testadas (Figura 4.28-A). Observou-se uma diminuição na produção de NO apenas na concentração 0,005 µg/ mL frente ao BCG e um aumento na produção do mesmo, nas concentrações 0,05 µg/ mL e 0,005 µg/ mL do aminoálcool, frente ao estímulo IFN- γ (Figura 4.28-B).

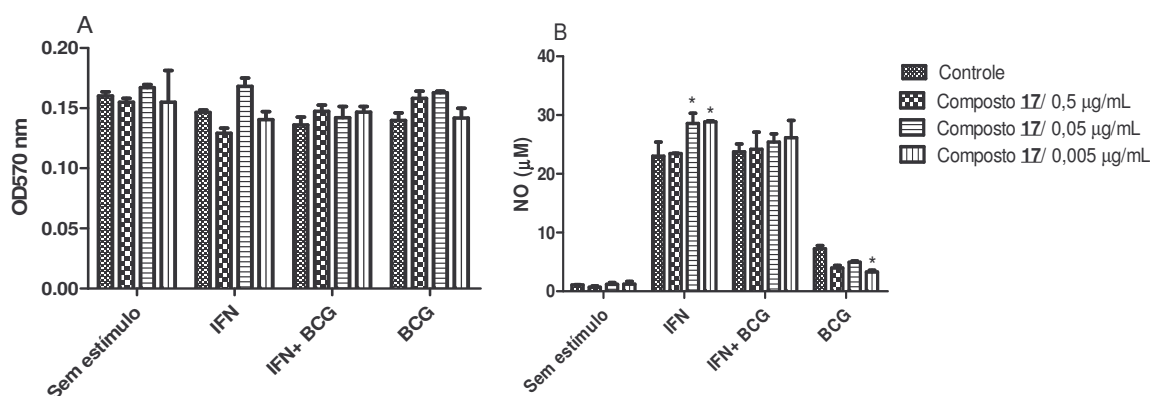


Figura 4.28. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 17 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 18

O aminoálcool 18, além de não ser citotóxico, levou a um aumento da proliferação celular na concentração 0,05 µg/ mL na ausência de estímulo, e nas concentrações 0,05 µg/ mL e 0,005 µg/ mL frente ao estímulo BCG (Figura 4.29-A).

Apresentou aumento na produção de NO, nas concentrações 0,05 µg/ mL e 0,005 µg/ mL, frente ao estímulo IFN-γ, e na concentração 0,005 µg/ mL frente ao estímulo IFN-γ+ BCG. A diminuição da produção de NO foi observada apenas na concentração 0,5 µg/ mL frente aos estímulos IFN-γ+ BCG(Figura 4.29-B).

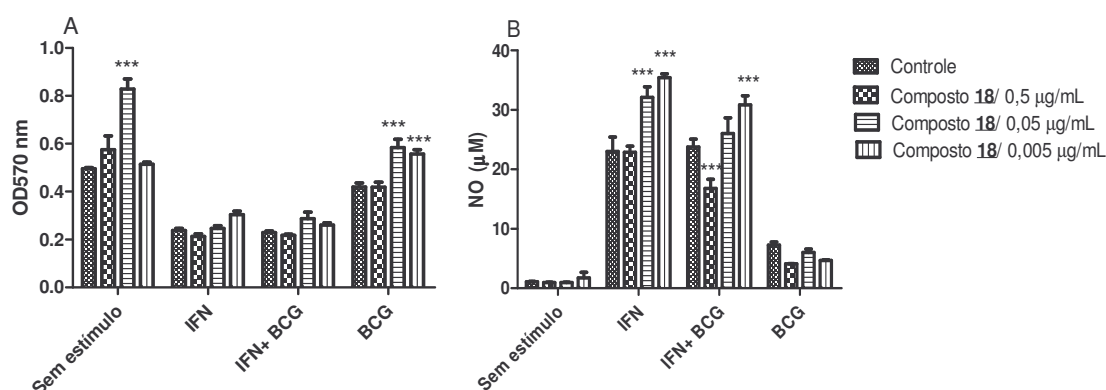


Figura 4.29. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 18 em diferentes concentrações. *p< 0,05.

- Composto 19

O aminoálcool 19, além de não ser citotóxico, levou a um aumento da proliferação celular em todas as concentrações testadas, na ausência de estímulos (Figura 4.30-A). Observa-se uma diminuição na produção de NO em todas as concentrações testadas, frente aos estímulos IFN-γ+ BCG. Essa diminuição foi também observada nas concentrações 0,5 µg/ mL e 0,05 µg/ mL, frente ao estímulo IFN-γ (Figura 4.30-B).

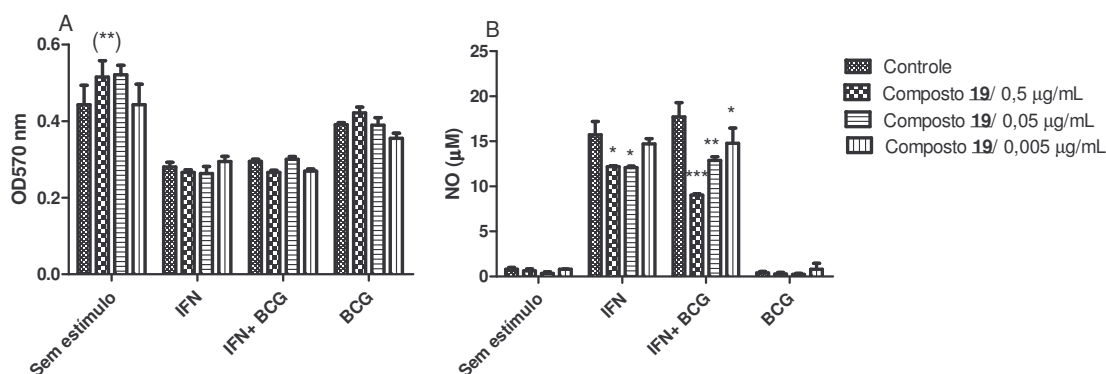


Figura 4.30. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 19 em diferentes concentrações. *p< 0,05.

- Composto 20

O aminoálcool 20, além de não ser citotóxico, não alterou a proliferação celular (Figura 4.31-A) em nenhuma concentração. Com relação à produção de NO, observou-se uma diminuição quando se utilizou a concentração 0,5 µg/mL frente aos estímulos IFN γ e em todas as concentrações utilizadas frente aos estímulos IFN γ +BCG (Figura 4.31-B).

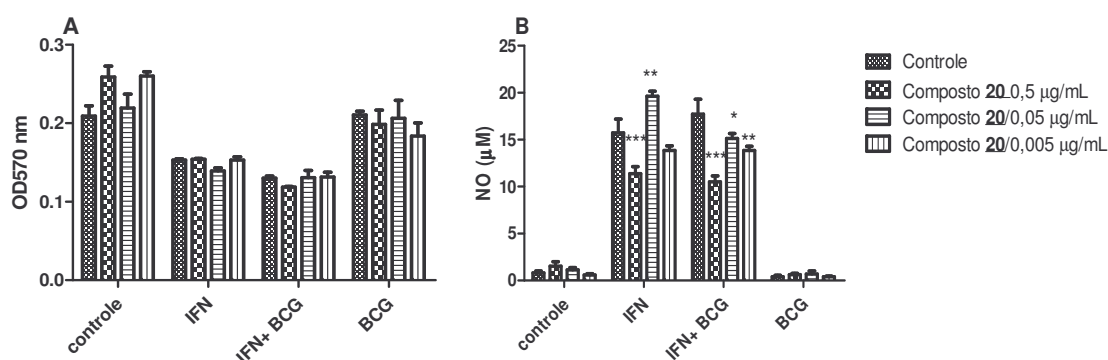


Figura 4.31. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 20 em diferentes concentrações. *p< 0,05.

- Composto 21

O composto 21 não apresentou citotoxicidade e levou a um aumento na proliferação celular nas menores concentrações (0,05 µg/mL e 0,005 µg/mL), na ausência dos estímulos (figura 4.32-A). Entretanto observou-se uma diminuição da produção de NO nas concentrações 0,5 µg/ mL e 0,05 µg/ mL frente ao estímulo IFN γ +BCG e na concentração 0,5 µg/ mL frente ao IFN γ (Figura 4.32-B).

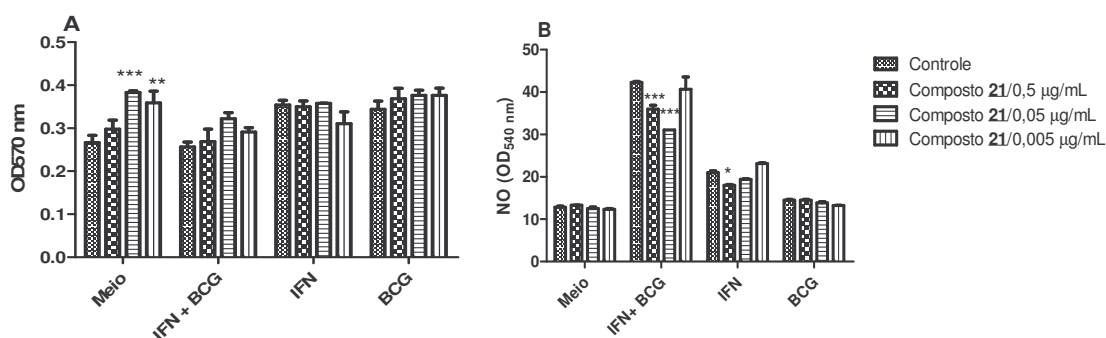


Figura 4.32. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 21 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 22

O aminoálcool 22 não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas. Observou-se um aumento da proliferação celular quando testado frente ao estímulo IFN γ na concentração 0,05 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4.33-A). Já em relação à produção de NO, observou-se uma diminuição em todas as concentrações utilizadas, frente a todos os estímulos testados (Figura 4.33-B).

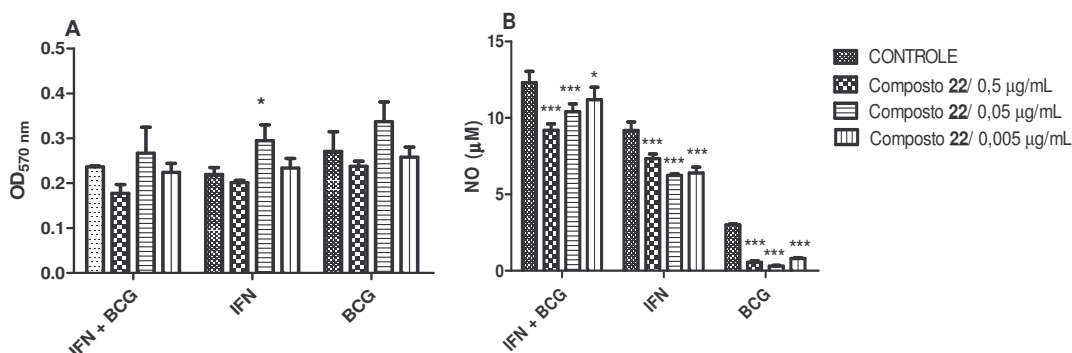


Figura 4.33. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 22 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 23

O aminoálcool 23, além de não ser citotóxico, não alterou a proliferação celular em nenhuma concentração (Figura 4.34-A). O mesmo apresentou diminuição na produção de NO em todas as concentrações utilizadas, frente a todos os estímulos testados (Figura 4.34-B).

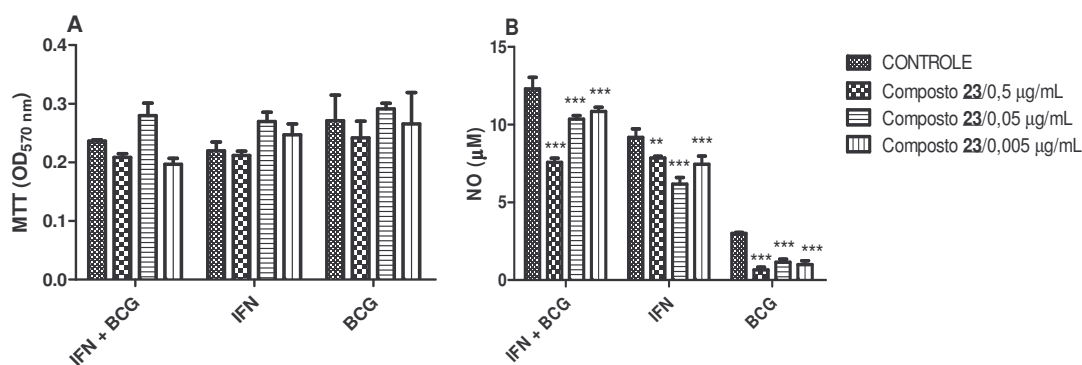


Figura 4.34. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do aminoálcool 23 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 24

A diamina 24 levou a um aumento da proliferação celular na concentração 0,05 µg/ mL frente a todos os estímulos testados (Figura 4.35-A). Contudo, diminuiu a produção de NO em todas as concentrações avaliadas, frente a todos os estímulos, exceto na concentração 0,5 µg/mL frente ao estímulo BCG (Figura 4.35-B).

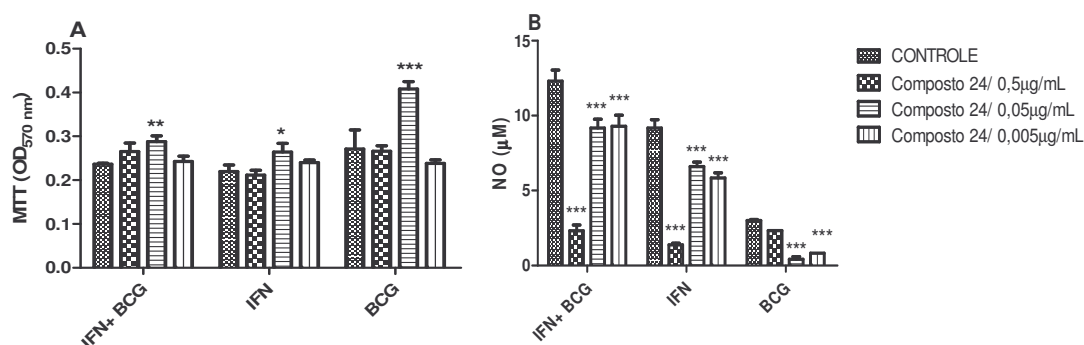


Figura 4.35. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) da diamina 24 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 25

O Composto 25 não apresentou citotoxicidade na ausência dos estímulos, porém diminuiu a proliferação celular em todas as concentrações testadas quando se utilizou o estímulo BCG (Figura 4.36-A). Ocorreu uma diminuição da produção de NO na concentração 0,5 µg/mL frente a todos os estímulos, na concentração 0,05

$\mu\text{g/mL}$ frente ao $\text{IFN}\gamma$ +BCG e BCG, e na concentração $0,005 \mu\text{g/mL}$ frente ao $\text{IFN}\gamma$ e BCG (Figura 4.36-B).

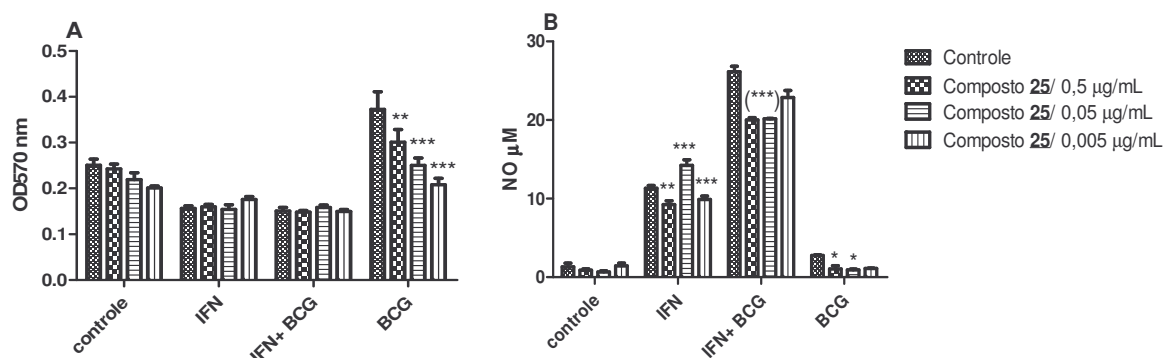


Figura 4.36. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do composto 25 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 26

Na Figura 4.37-A observa-se que além do composto 26 não ser citotóxico e não alterar a proliferação celular, o mesmo diminuiu a produção de NO apenas na concentração $0,5 \mu\text{g/mL}$ frente ao estímulo $\text{IFN}\gamma$ +BCG (Figura 4.37-B).

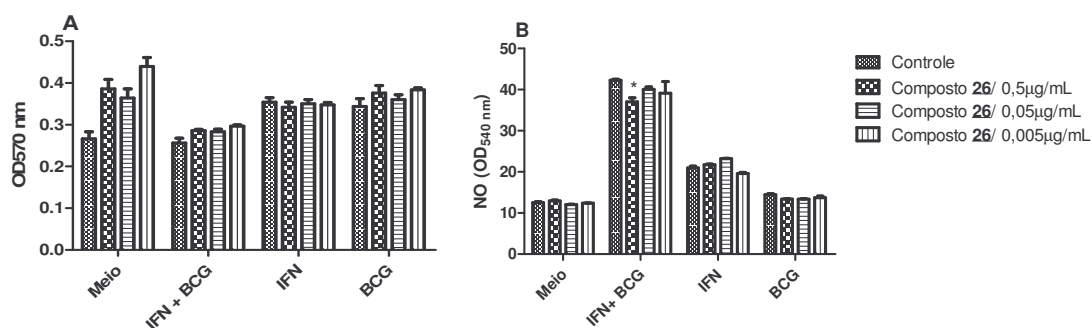


Figura 4.37. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do composto 26 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 27

O composto 27, além de não ser citotóxico, aumentou a proliferação celular frente aos estímulos $\text{IFN}\gamma$ e BCG nas concentrações $0,05 \mu\text{g/mL}$ e frente ao estímulo $\text{IFN}\gamma$ + BCG na concentração $0,5 \mu\text{g/mL}$ (Figura 4.38-A). Entretanto, levou a uma diminuição da produção de NO nas concentrações $0,5 \mu\text{g/mL}$ e $0,05 \mu\text{g/mL}$ frente a todos os estímulos testados (Figura 4.38-B).

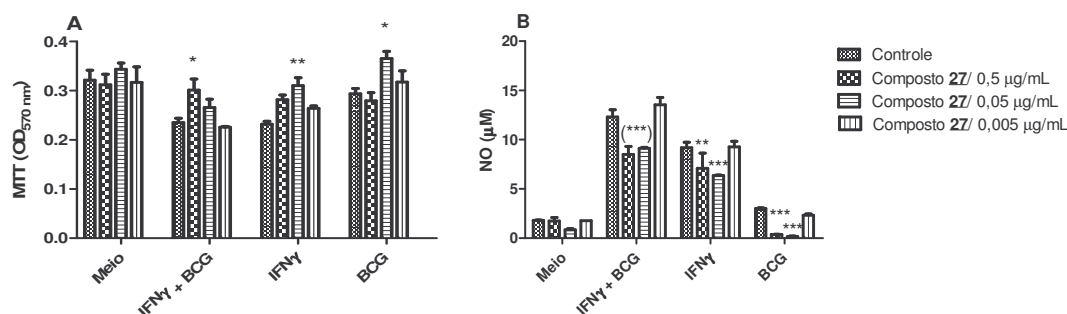


Figura 4.38. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do composto 27 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

- Composto 28

O composto 28, além de não ser citotóxico, levou a aumento da proliferação celular na concentração 0,5 µg/ mL frente ao estímulo IFN γ (Figura 4.39-A). O mesmo apresentou diminuição na produção de NO nas concentrações 0,5 µg/ mL e 0,05 µg/ mL frente a todos os estímulos e também na menor concentração testada (0,005 µg/ mL) frente ao IFN γ (Figura 4.39-B).

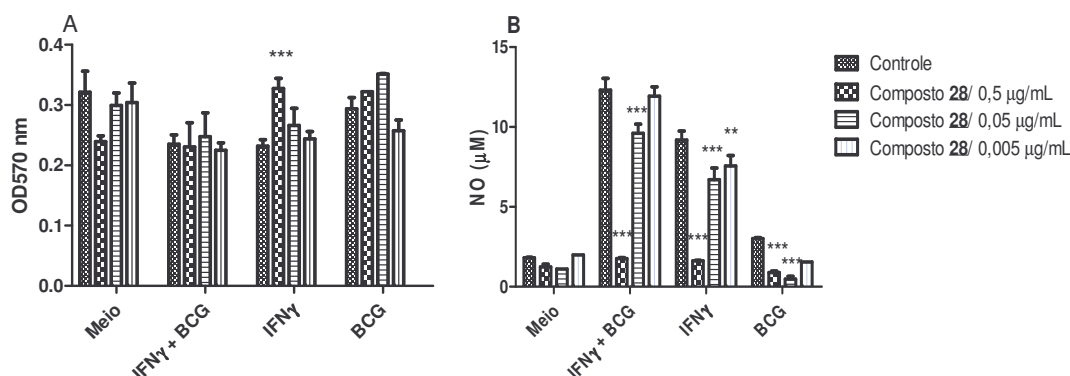


Figura 4.39. Avaliação da viabilidade celular (A) e da produção de NO (B) do composto 28 em diferentes concentrações. * $p < 0,05$.

Na Tabela 4.6 é mostrada a porcentagem de inibição da proliferação celular quando as culturas foram estimuladas apenas com IFN γ e também a porcentagem de citotoxicidade quando os compostos foram colocados nas culturas na ausência dos estímulos.

Foi avaliada a inibição da proliferação celular frente aos aminoálcoois e diaminas cultivados com células J774 A.1 estimulados com IFN γ em relação às células J774A.1 estimuladas com IFN γ sem a presença dos compostos. Com base na Tabela 4.6, observa-se que a maioria dos compostos não apresentou inibição da proliferação celular, com exceção dos compostos **6** e **10** na concentração 0,5 μ g/mL, e **7** nas três concentrações testadas. A citotoxicidade foi avaliada comparando a cultura das células J774 A.1 em presença dos aminoálcoois e diaminas e a cultura de células J774A.1 na ausência dos mesmos. Em relação à citotoxicidade, ela mostrou-se elevada quando testados os compostos **6** e **7** em todas as concentrações, e para o composto **10** mostrou-se elevada apenas na concentração de 0,5 μ g/mL.

Tabela 4.6. Avaliação da inibição da proliferação celular e citotoxicidade de aminoálcoois e diaminas.

Concentrações						
	0,5 μ g/mL		0,05 μ g/mL		0,005 μ g/mL	
	Inibição da Proliferação (%)	Citotoxicidade (%)	Inibição da Proliferação (%)	Citotoxicidade (%)	Inibição da Proliferação (%)	Citotoxicidade (%)
6	13*	29*	7	24*	5	14*
7	14*	23*	29*	30*	22*	20*
10	14*	16*	7	nc	0	nc
11	0	nc	0	nc	0	nc
12	0	nc	0	nc	0	nc
13	0	nc	0	nc	0	nc
14	7	nc	0	nc	0	nc
15	8	nc	0	nc	2	nc
16	4	nc	0	nc	0	nc
17	6	nc	0	nc	0	3
18	8	nc	0	nc	2	6
19	7	nc	0	nc	0	nc

nc= não citotóxico

*Aumento estatisticamente significativo, $p < 0,05$ (ANOVA, pós teste Bonferroni)

4.6.2 Reação de Hipersensibilidade tardia (RHT) em camundongos

Levando-se em consideração os resultados de viabilidade celular, citotoxicidade e produção de NO dos compostos sintetizados neste trabalho, os compostos **12** e **19** foram avaliados quanto à Reação de Hipersensibilidade Tardia (RHT), utilizando-se o Modelo da Ovalbumina (OVA). Esses aminoálcoois foram escolhidos porque não apresentaram citotoxicidade, diminuíram a produção de óxido nítrico e não diminuíram a proliferação celular, além de induzirem a proliferação celular na ausência de estímulo.

Utilizamos neste experimento a azatioprina (AZA) como um fármaco de referência, por sua conhecida atividade imunossupressora, conforme citado anteriormente, e por já existirem vários estudos de RHT envolvendo este composto (HALLORAN, 2004; ROUDEBUSH E BRYANT, 1993).

Foram utilizados a média de 6 animais por grupo \pm desvio padrão, expressos em unidades de RHT, definida como a diferença de 0,1 mm na espessura das patas direita e esquerda de cada animal (Tabela 4.7).

A RHT apresentou um pico de reação em 48 horas após o desafio, sendo que houve uma diminuição significativa da mesma quando foi feito o tratamento por gavagem com a AZA (concentração 1 mg/kg/dia), com o composto **12** (concentração 0,25 mg/Kg) e com o composto **19** (concentração 0, 5 mg/kg) (Figura 4.40).

Tabela 4.7. Resultados do experimento RHT utilizando modelo OA em camundongos

Grupos	Imunização	Tratamento por gavagem	Leitura
			Medida em Unidade de RHT/ 48 horas
I (n=6)	Ovalbumina	Sem tratamento	28,5
II (n=6)	Ovalbumina	Azatioprina 1mg/kg/dia	9,2
III (n=6)	Ovalbumina	Composto 12 / 0,25 mg/ kg/ dia	8,0
IV (n=6)	Ovalbumina	Composto 12 / 0,5 mg/ kg/ dia	15,4
V (n=6)	Ovalbumina	Composto 19 / 0,25 mg/ kg/ dia	10,4
VI (n=6)	Ovalbumina	Composto 19 / 0,5 mg/ kg/ dia	4,5

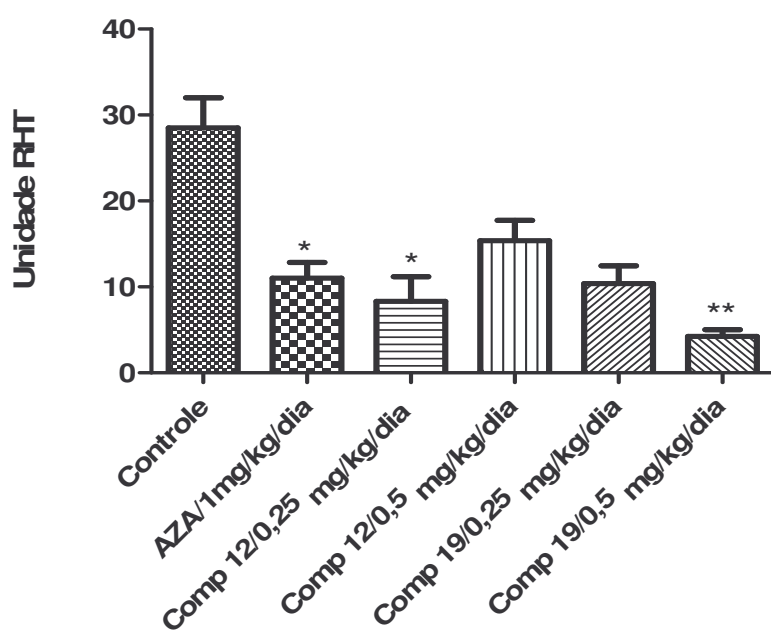


Figura 4.40. Avaliação da RHT em patas de camundongos imunizados e tratados com OA. * $p < 0,05$

4.6.3 Outros testes biológicos realizados

a) Avaliação antituberculose: Atualmente, fármacos promissores de diferentes classes de compostos estão em desenvolvimento, apresentando potencial atividade contra *Micobacterium tuberculosis* (Taveira et al, 2007). Baseado na similaridade estrutural dos aminoálcoois e diaminas **6**, **7**, **10**, **12-19** com compostos de reconhecida ação antituberculose, tais substâncias também passaram por ensaios de triagem para detecção da atividade antimicrobiana frente ao *M. tuberculosis*, nas concentrações de 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 4.8), na Fundação Oswaldo Cruz-Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas-IPEC/ Fiocruz em colaboração com a pesquisadora Maria Cristina S. Lourenço.

Os aminoálcoois **17** e **18** demonstraram maior sensibilidade na metodologia utilizada (MABA), apresentando concentração inibitória mínima (MIC) igual a 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabela 4.8. Triagem para detecção da atividade antituberculose

Metodologia : MABA											
Microorganismo utilizado: <i>M.tuberculosis</i> H37Rv ATCC nº 27294											
Concentração/ composto	6	7	10	12	13	14	15	16	17	18	19
100 mg / mL	Sen	Sen	Res	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen
50 mg / mL	Sen	Sen	Res	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen
25 mg / mL	Sen	Sen	Res	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen	Sen
12,5 mg / mL	Res	Sen	Res	Res	Sen	Sen	Res	Sen	Sen	Sen	Sen
6,25 mg / mL	Res	Res	Res	Res	Res	Res	Res	Res	Sen	Sen	Res
3,12 mg / mL	Res	Res	Res	Res	Res	Res	Res	Res	Res	Res	Res
Sen- Sensível / Res- Resistente / NR- Não Realizado											
Controle interno: 7H9, cepa padrão e Rifampicina – 1,0 µg/mL											
Controle do crescimento: 7H9 e cepa padrão											

b) Atividade antileishmania: Baseado na analogia entre diaminas lipofílicas preparadas por Costa et al (2008), as quais apresentaram promissora atividade antileishmanicida, com as substâncias preparadas nesse trabalho, os compostos **12** a **19**, foram submetidos a teste contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, no Laboratório de Parasitologia do ICB/UFJF, sob coordenação da professora Dra Elaine Soares Coimbra.

Através da análise dos resultados biológicos verificou-se que entre os compostos testados, os aminoálcoois **12** e **16** apresentaram atividade contra *Leishmania amazonensis*. Acredita-se que a presença do grupo dietanolamina em ambos compostos seja o responsável pela atividade apresentada. Os aminoálcoois **15** e **16** apresentaram moderada atividade contra *Leishmania chagasi* em relação a anfotericina B, droga utilizada como referência.

Tabela 4.9. Resultado dos testes contra *L. amazonensis* e *L. chagasi*

Composto	Fórmula estrutural	<i>L. amazonensis</i> IC ₅₀ (μM)	<i>L. chagasi</i> IC ₅₀ (μM)
12	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CH(OH)CH ₂ N(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	8,07 (± 0,11)	16,40 (± 1,37)
13	CH ₂ (CH ₂) ₁₁ CH(OH)CH ₂ NHC(CH ₃) ₂ CH ₂ OH	> 227	45,6 (± 0,94)
14	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CH(OH)CH ₂ NH(CH ₂) ₂ OH	> 227	> 227
15	CH ₂ (CH ₂) ₁₁ CH(OH)CH ₂ NH(CH ₂) ₃ OH	> 227	7,7 (± 0,03)
16	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	4,9 (± 0,06)	9,22 (± 0,93)
17	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ NHC(CH ₃) ₂ CH ₂ OH	> 227	> 227
18	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ NH(CH ₂) ₂ OH	> 227	> 227
19	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ NH(CH ₂) ₃ OH	> 227	> 227
	Anfotericina B	0,9	1,9

5 DISCUSSÃO

O sucesso no resultado dos transplantes e tratamento de doenças auto-imunes levou a um aumento substancial na sobrevivência dos pacientes a curto e longo prazo. Uma série de fatores contribuiu para este resultado, dentre eles a descoberta de potentes agentes antimicrobianos utilizados no tratamento das infecções, e o aparecimento de novos e poderosos fármacos imunossupressores (ROCHA et al, 2003).

OLMO et al (2006) descreveram a síntese e a avaliação imunossupressora de diferentes aminoálcoois, os quais têm também apresentado diferentes propriedades bioquímicas, farmacológicas e antimicrobianas. Baseados no estudo desses autores e na analogia dos compostos preparados neste trabalho com os preparados por esses pesquisadores, os compostos **6**, **7**, **10-19**, após síntese e caracterização, foram testados “in vitro” para avaliação da inibição da proliferação celular, citotoxicidade e produção de NO, como investigações preliminares na seleção de potenciais imunossupressores. Merecem destaque o aminoálcool **10** em todas as concentrações testadas frente ao estímulo IFN γ +BCG; a diamina **11** e o aminoálcool **12** nas concentrações 0,5 μ g/ mL e 0,05 μ g/ mL frente aos estímulos IFN γ e IFN γ +BCG; o aminoálcool **14** nas concentrações 0,5 μ g/ mL frente aos estímulos IFN γ e IFN γ +BCG e 0,005 μ g/ mL frente ao IFN γ ; os aminoálcoois **16** e **19** nas concentrações 0,5 μ g/ mL e 0,05 μ g/ mL frente ao IFN γ e em todas as concentrações testadas frente ao IFN γ +BCG. Estes compostos diminuíram a produção de NO, sem inibir a proliferação celular e sem serem citotóxicos, demonstrando sugestivos efeitos como imunossupressores e antiinflamatórios. Acredita-se que a atividade destes compostos esteja relacionada ao tamanho da cadeia alifática, e a presença de certos grupos funcionais, como: o grupo amino primário nos compostos **10** e **11**, o grupo dietanolamina nos aminoálcoois **12** e **16**, o grupo etanolamina e propanolamina nos aminoálcoois **14** e **19**, respectivamente.

Baseado nos resultados “in vitro”, os aminoálcoois **12** e **19** foram selecionados para avaliação da Reação de Hipersensibilidade Tardia “in vivo”, utilizando o modelo da ovalbumina (FAQUIM-MAURO & MACEDO et al, 1998; MACEDO et al, 1998). Os mesmos não apresentaram citotoxicidade, estimularam a proliferação celular quando cultivados apenas com meio sem estímulo, não inibiram

a proliferação celular quando estimulados, e ainda diminuíram a produção de NO frente aos principais estímulos utilizados. A AZA foi utilizada como droga de referência pela conhecida atividade imunossupressora, e por já existirem outros estudos de RHT a envolvendo (ROUDEBUSH & BRYANT, 1993).

A associação de uma ou mais fármacos imunossupressores, principalmente em transplantes, possibilita a administração de doses mais baixas de um fármaco individual e tem a finalidade de diminuir seus efeitos tóxicos. Além do mais, esta redução na dose da droga administrada ao paciente diminui a resistência de um fármaco específico, fazendo com que diminuam os casos de ausência de resposta a um tratamento com apenas um imunossupressor (TAMURA et al, 2000). Os resultados deste trabalho mostraram que em 48 horas o aminoálcool **12** apresentou atividade imunossupressora na concentração 0,25 mg/kg/dia, diminuindo a RHT em relação ao grupo controle e a AZA. Tal diminuição da RHT não foi observada quando aumentamos a dose de 0,25 mg/kg/dia para 0,5 mg/kg/dia, demonstrando um efeito muito almejado, onde a maior eficácia imunossupressora do composto ocorreu na menor concentração testada (0,25 mg/kg/dia), o que provavelmente diminui seus efeitos tóxicos e facilita o uso em associação com outros fármacos. Nesta concentração o aminoálcool **12** ainda apresentou atividade imunossupressora 3,6 vezes maior que o grupo controle e 15% mais ativa que a AZA. Já o aminoálcool **19** apresentou elevada atividade imunossupressora quando aumentamos a concentração testada de 0,25 mg/kg/dia para 0,5 mg/kg/dia, apresentando um efeito dose-resposta, onde se destacou pela atividade imunossupressora 6,33 vezes maior que o grupo controle e duas vezes maior que a azatioprina.

Avaliando também a similaridade dos compostos sintetizados neste trabalho aos sintetizados por TAVEIRA (2007), percebemos que quando comparamos os aminoálcoois **18**, **20**, **21** e **22**, os quais diferem apenas no tamanho da cadeia alifática, observamos que o aminoálcool **22**, que possui uma cadeia alifática com 12 carbonos, apresentou maior probabilidade de atividade imunossupressora, pois conduziu a uma diminuição da produção de NO em todas as concentrações e estímulos utilizados, sem diminuir a proliferação celular. Já o aminoálcool **23** e a diamina **24**, compostos com cadeias alifáticas com 12 carbonos, apresentaram melhores resultados comparados aos compostos **10** e **11**, que apresentam 14 carbonos adicionais ao grupo alquila.

TRIPATHI et al (2002) sintetizaram aminoálcoois derivados da D-galactose cuja diferença principal entre os mesmos estava no tamanho da cadeia alifática. Estes compostos demonstraram possuir atividade antituberculose e antifúngica. Mediante tal informação avaliamos “in vitro” a possível atividade imunossupressora dos compostos **25**, **26**, **27** e **28**, grupo de aminoálcoois derivados da galactose em ordem crescente de tamanho de cadeia alifática. O composto **27**, além de não ter diminuído a proliferação celular, apresentou elevação da mesma na concentração 0,5 µg/ mL frente ao IFN γ +BCG e na concentração 0,05 µg/ mL frente ao IFN γ e BCG. Levou também a uma diminuição da produção de NO nas concentrações 0,5 µg/ mL e 0,05 µg/ mL com todos os estímulos testados. O composto **28**, que apresenta maior cadeia alifática deste grupo, não alterou a proliferação celular e levou à diminuição da produção de NO nas concentrações 0,5 µg/ mL e 0,05 µg/ mL frente aos estímulos IFN γ +BCG e BCG, e em todas as concentrações frente ao estímulo IFN γ . Sendo assim, observamos que à medida que o tamanho da cadeia alifática aumentou, elevou-se também sua potencial atividade imunossupressora.

Portanto, baseado nos resultados aqui apresentados, observou-se que o tamanho da cadeia alifática e a relação estrutura-atividade de vários aminoálcoois e diaminas lipofílicos foram de fundamental importância para efetiva atividade imunossupressora.

6 CONCLUSÃO

- Neste trabalho foram sintetizados 17 compostos: 03 mesilatos de alquila (**2**, **3** e **5**), 3 diaminas (**6**, **7** e **11**), 2 azidas (**8** e **9**) e 12 aminoálcoois (**10**, **12-19**), obtidos com rendimentos satisfatórios e caracterizados pelas análises espectrais de Infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C , além do Ponto de Fusão. Entre eles os compostos **9**, **13** e **15** são inéditos.

- Os testes biológicos realizados “in vitro”, demonstraram que os compostos **10**, **11**, **12**, **14**, **16** e **19**, sintetizados neste trabalho, não foram citotóxicos, além de aumentarem a proliferação celular e diminuíram a produção de NO concomitantemente, demonstrando sugestiva atividade imunossupressora.

- O teste biológico realizado “in vivo”, demonstrou que os compostos **12** (0,25 mg/kg/dia) e **19** (0, 5 mg/kg/dia), além de apresentarem as características acima citadas no teste “in vitro”, apresentaram também diminuição da reação de hipersensibilidade tardia, confirmando sua atividade imunossupressora.

- Os aminoálcoois **17** e **18** apresentaram atividade antimicrobiana frente ao *Micobacterium tuberculosis* na concentração inibitória mínima (MIC) igual a 6,25 $\mu\text{g/ml}$.

- Os aminoálcoois **12** (IC_{50} 8,07 μM) e **16** (IC_{50} 4,9 μM) apresentaram atividade contra *Leishmania amazonensis*. Os compostos **15** e **16** apresentaram atividade contra *Leishmania chagasi* nos IC_{50} 7,7 μM e 9,22 μM , respectivamente.

7 ESPECTROS

7.1 Espectros no infravermelho

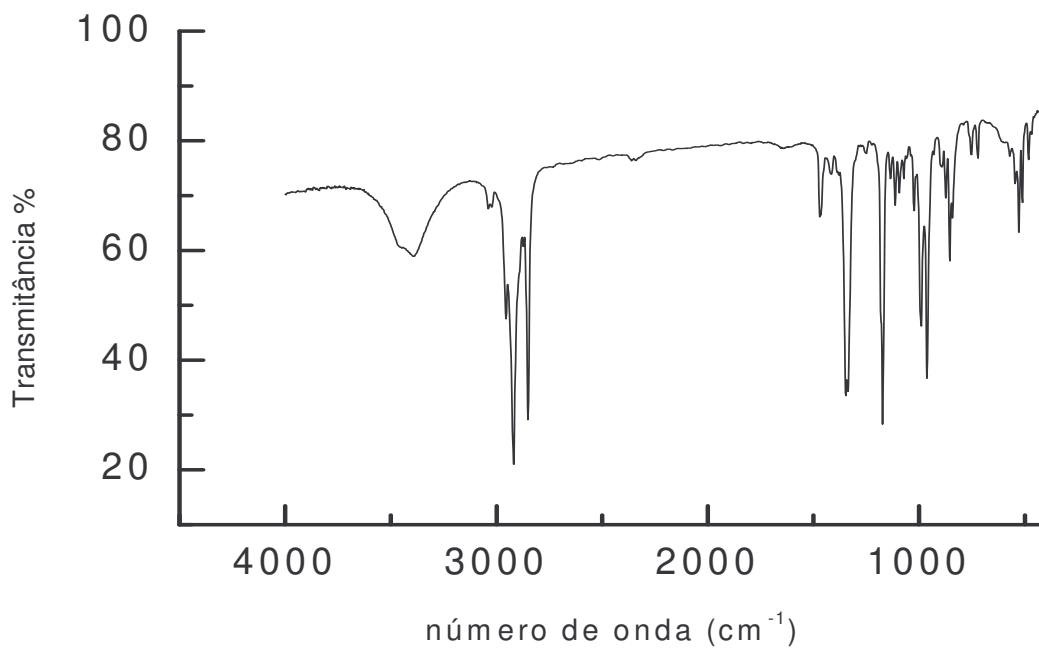


Figura 7.1.1. Espectro no IV do composto **2**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CH}_3$

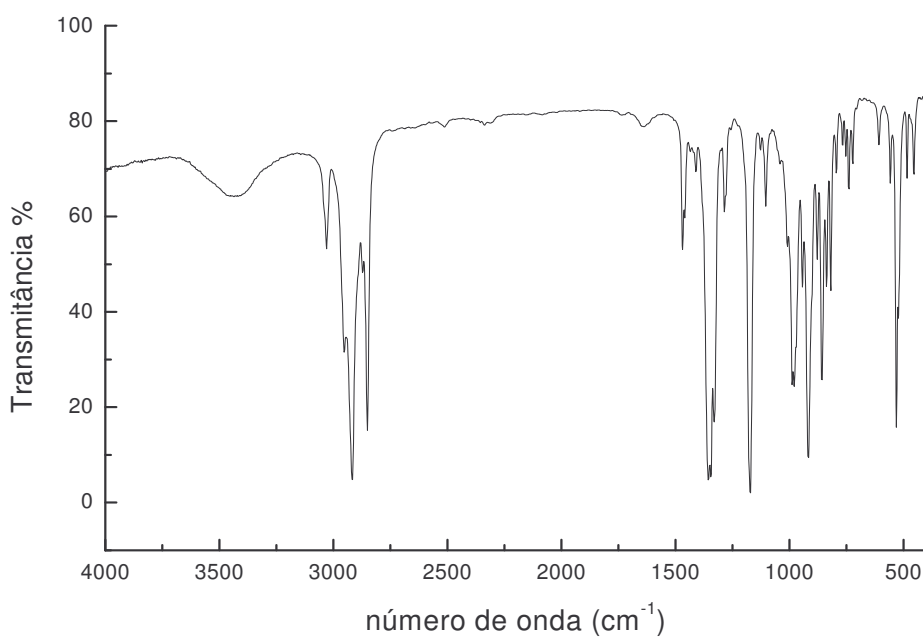


Figura 7.1.2. Espectro no IV do composto **3**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{OSO}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CH}_3$

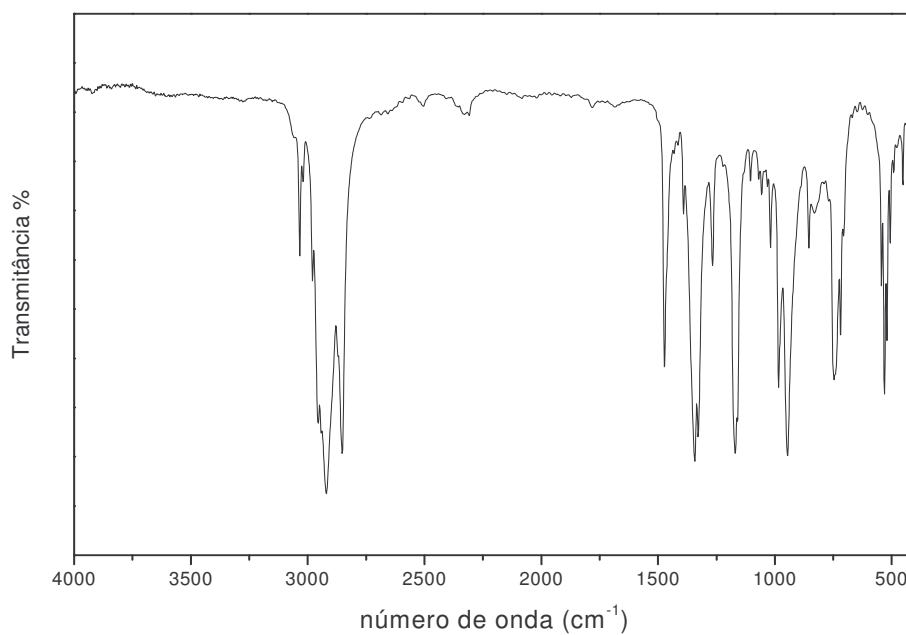


Figura 7.1.3. Espectro no IV do composto **5**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CH}_3$

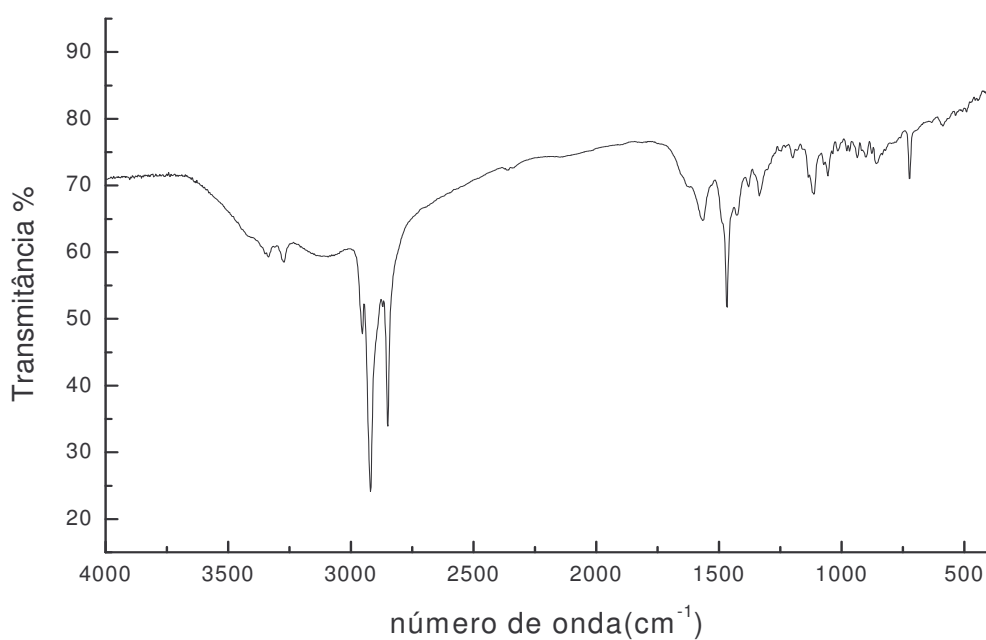


Figura 7.1.4. Espectro no IV do composto **6**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$

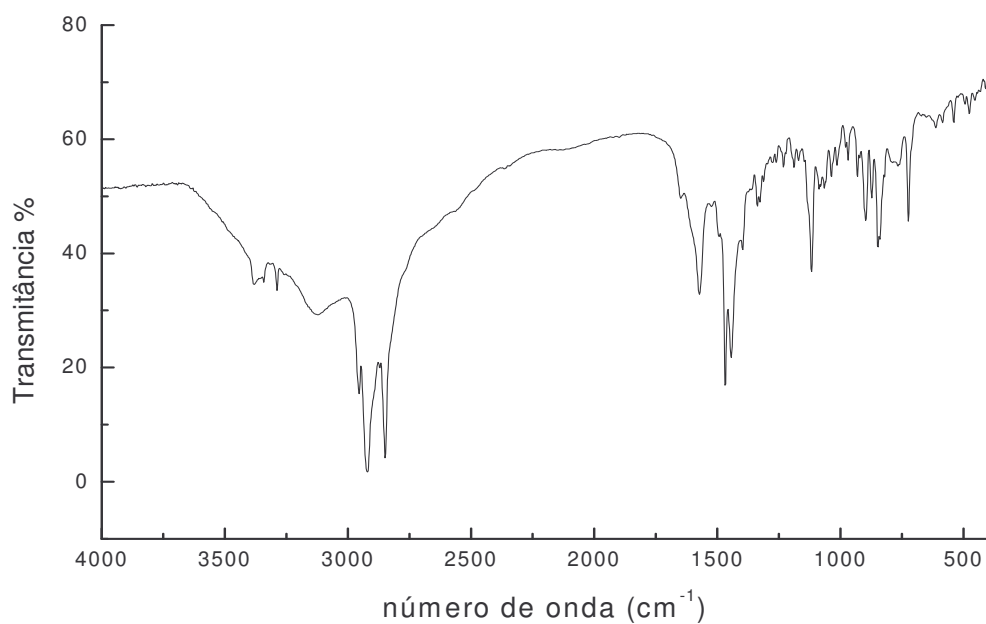


Figura 7.1.5. Espectro no IV do composto **7**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

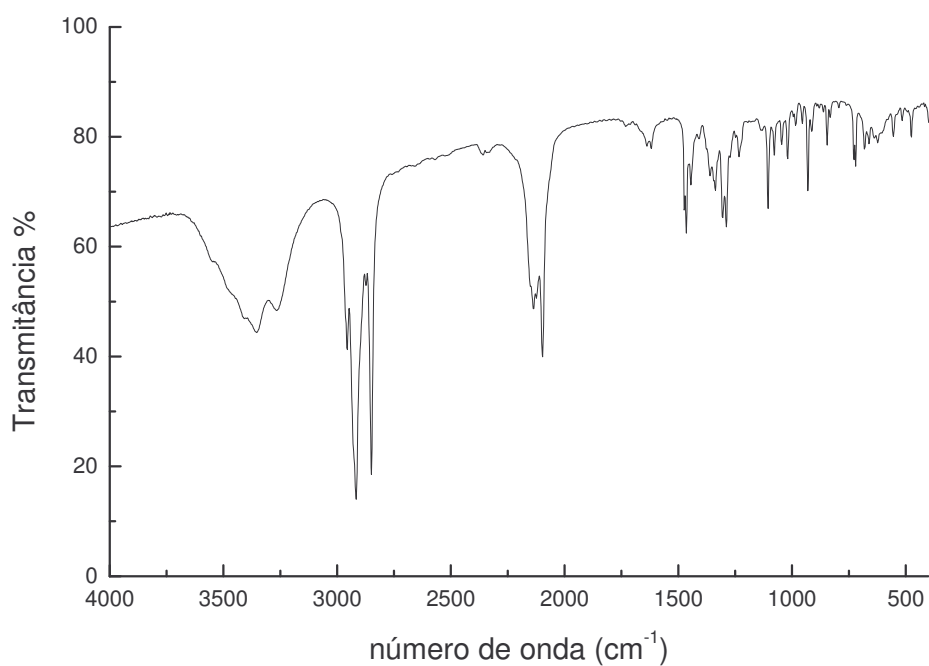


Figura 7.1.6. Espectro no IV do composto **8**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{N}_3$

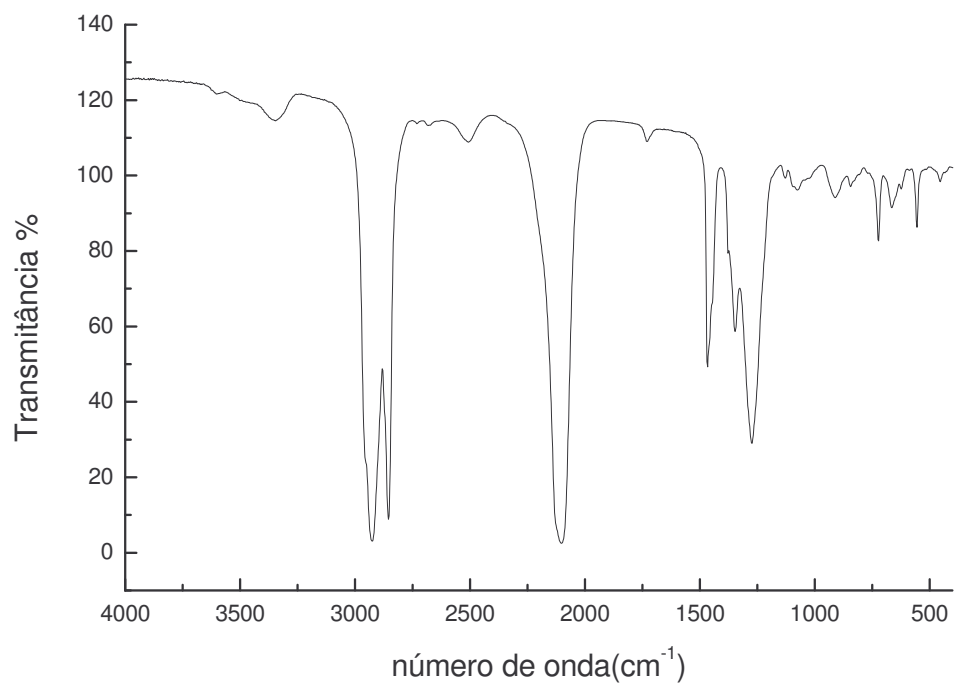


Figura 7.1.7. Espectro no IV do composto **9**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{N}_3)\text{CH}_2\text{N}_3$

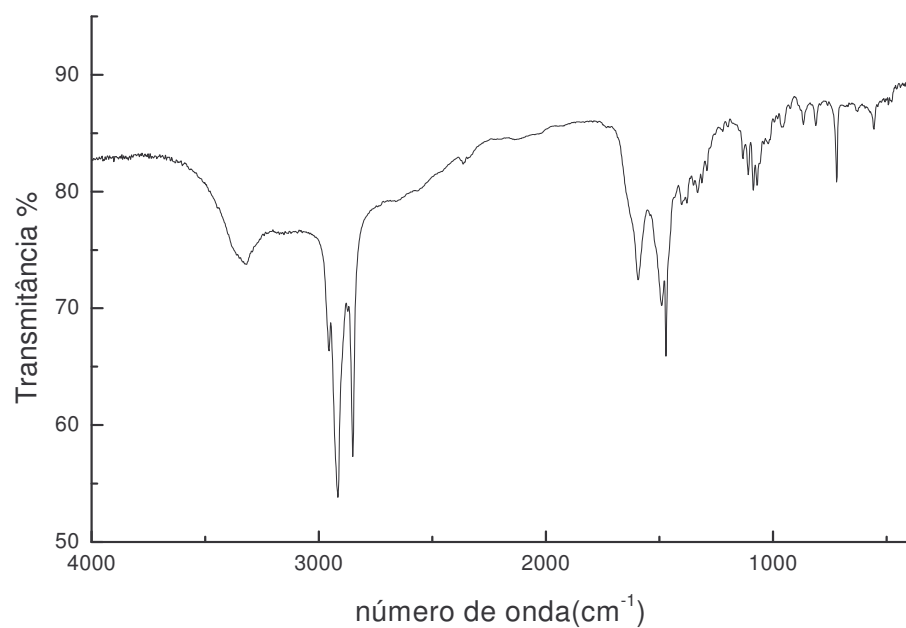


Figura 7.1.8. Espectro no IV do composto **10**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$

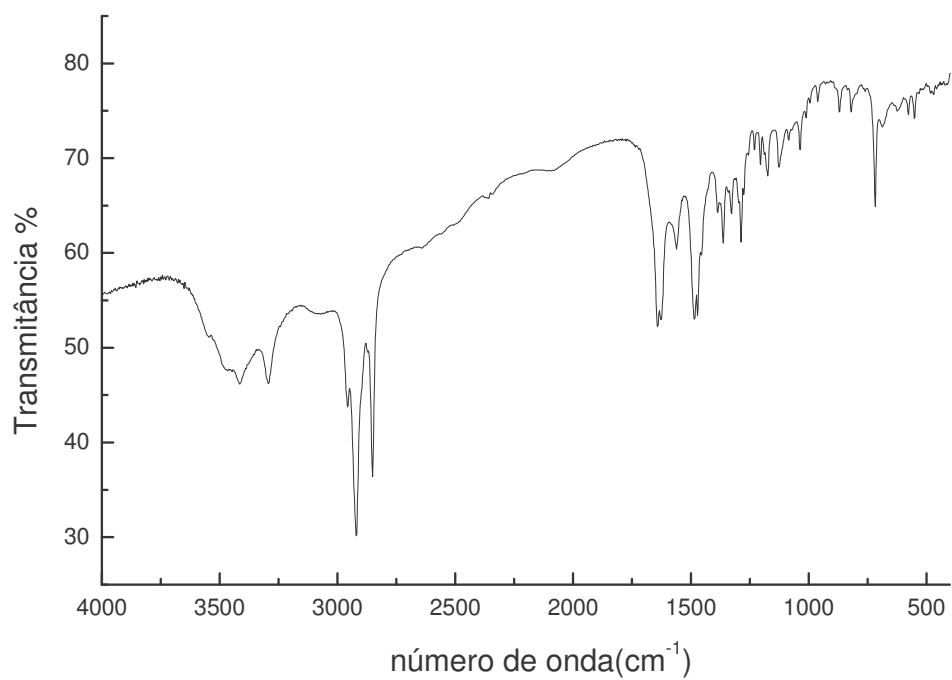


Figura 7.1.9. Espectro no IV do composto **11**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{NH}_2$

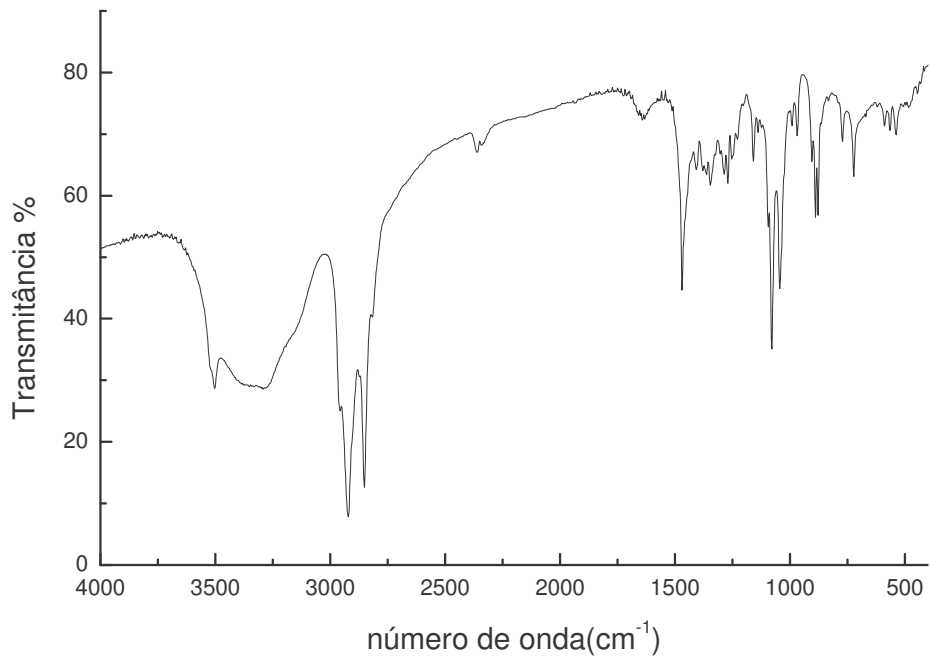


Figura 7.1.10. Espectro no IV do composto **12**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$

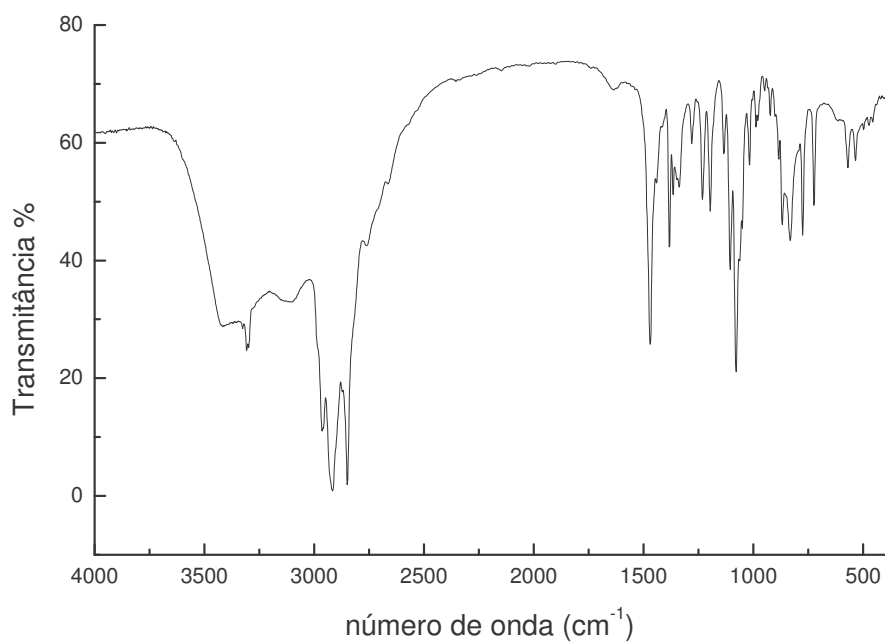


Figura 7.1.11.Espectro no IV do composto **13**:

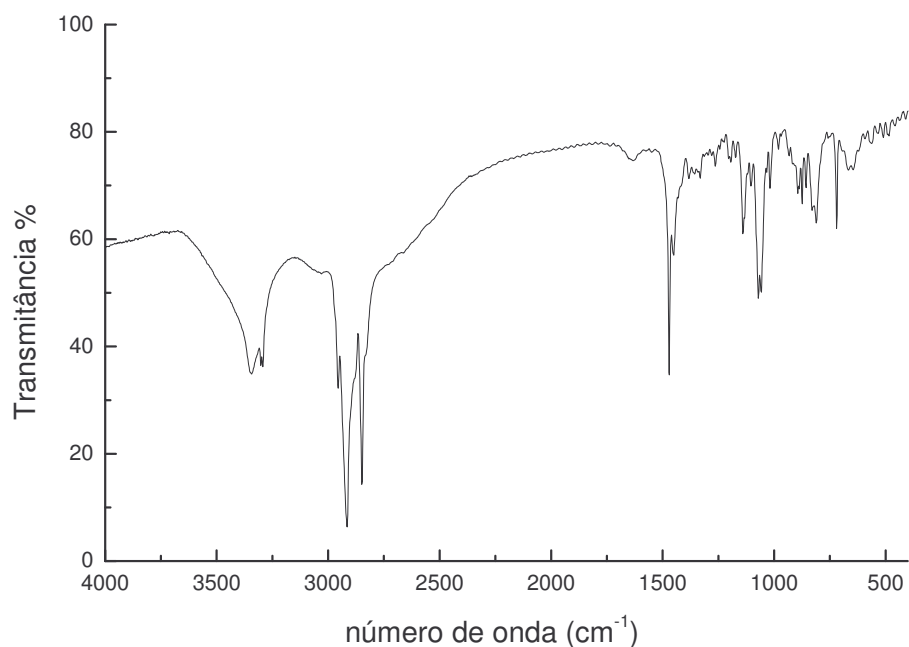
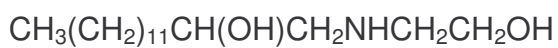


Figura 7.1.12.Espectro no IV do composto **14**:



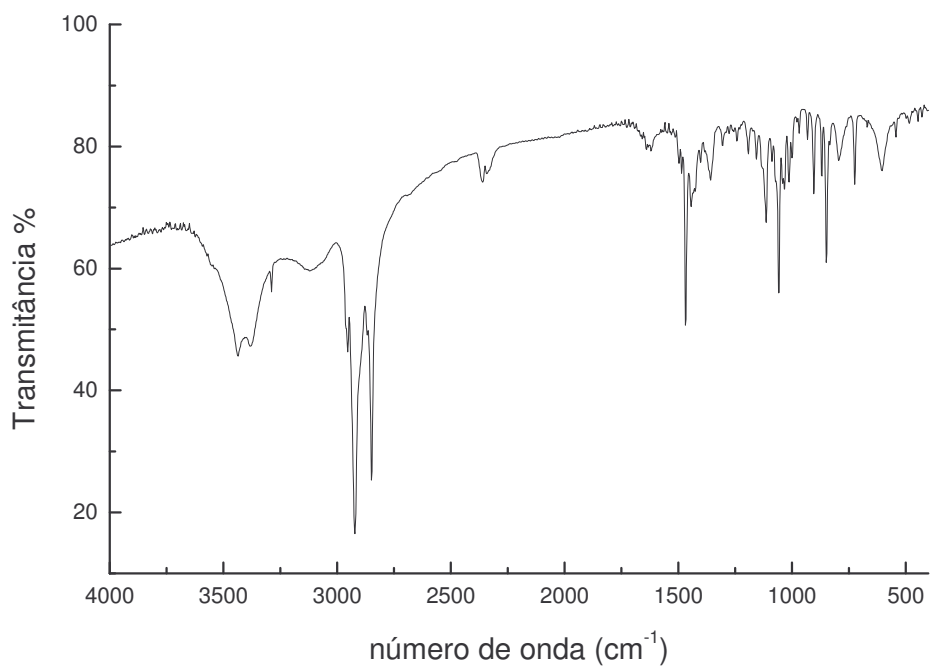


Figura 7.1.13. Espectro no IV do composto **15**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$

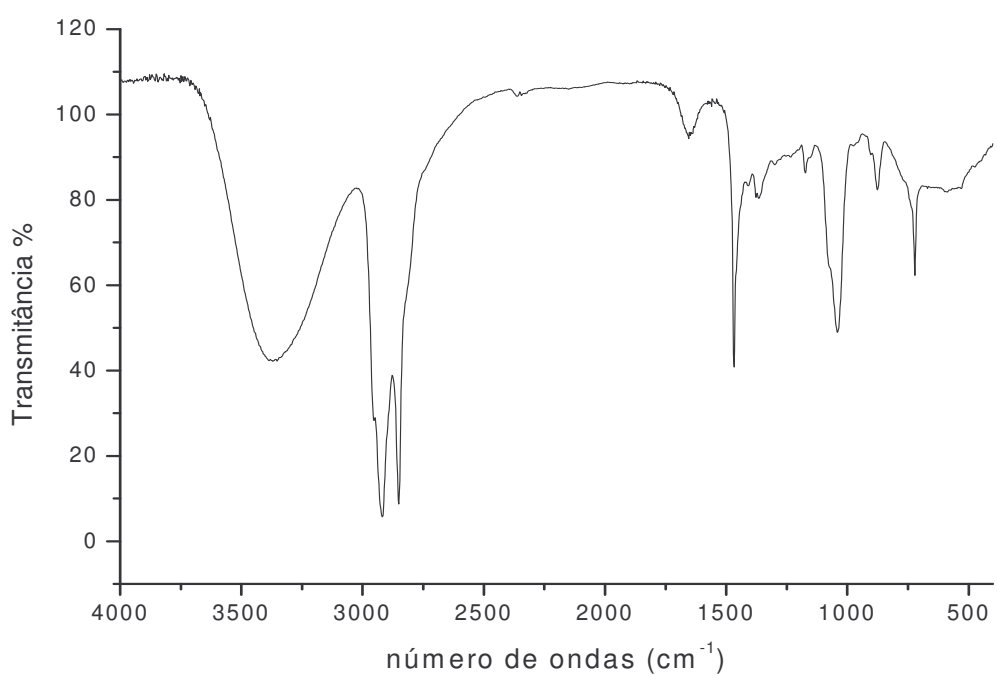


Figura 7.1.14. Espectro no IV do composto **16**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$

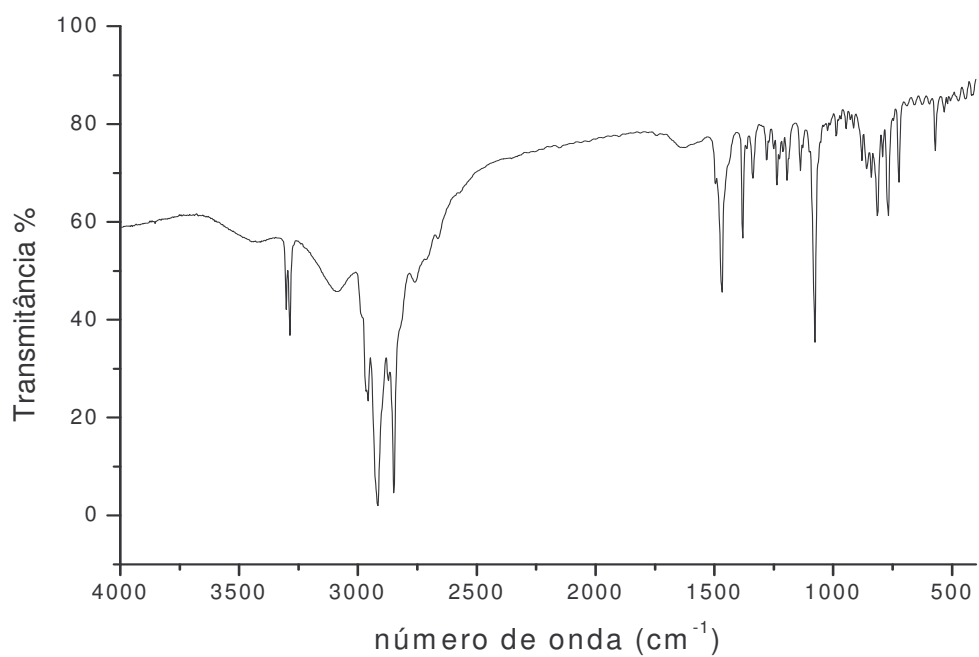


Figura 7.1.15. Espectro no IV do composto **17**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2\text{NHC}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{OH}$

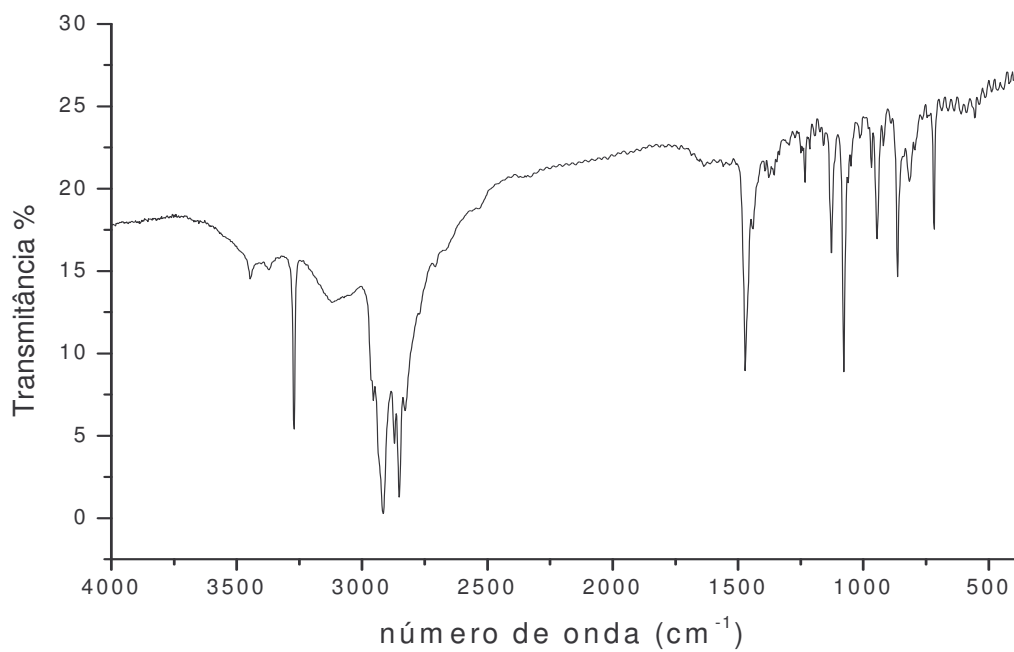


Figura 7.1.16. Espectro no IV do composto **18**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$

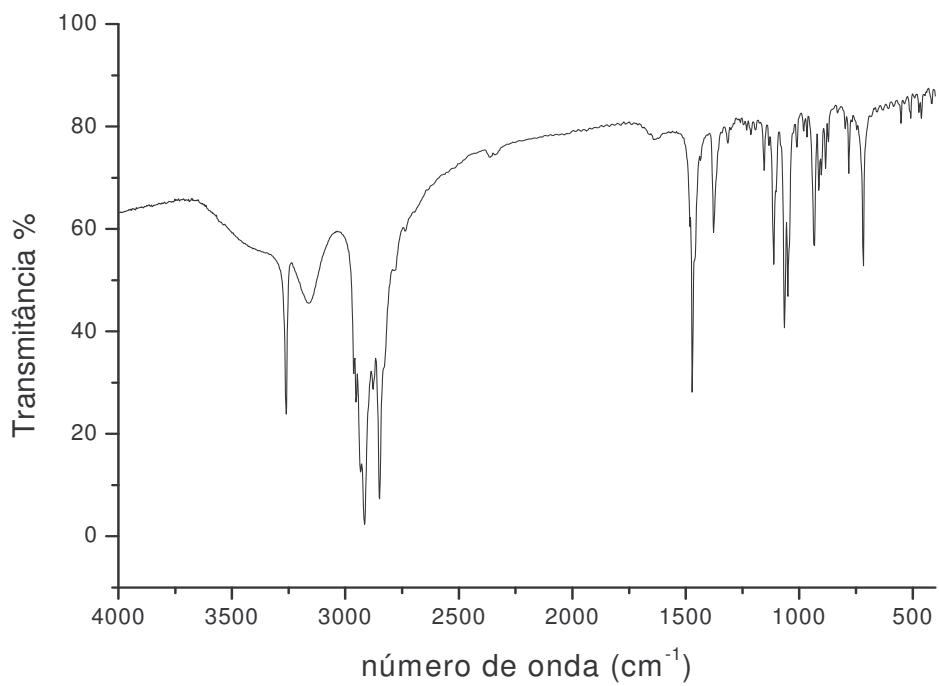


Figura 7.1.17. Espectro no IV do composto **19**: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{OH}$

7.2 Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C

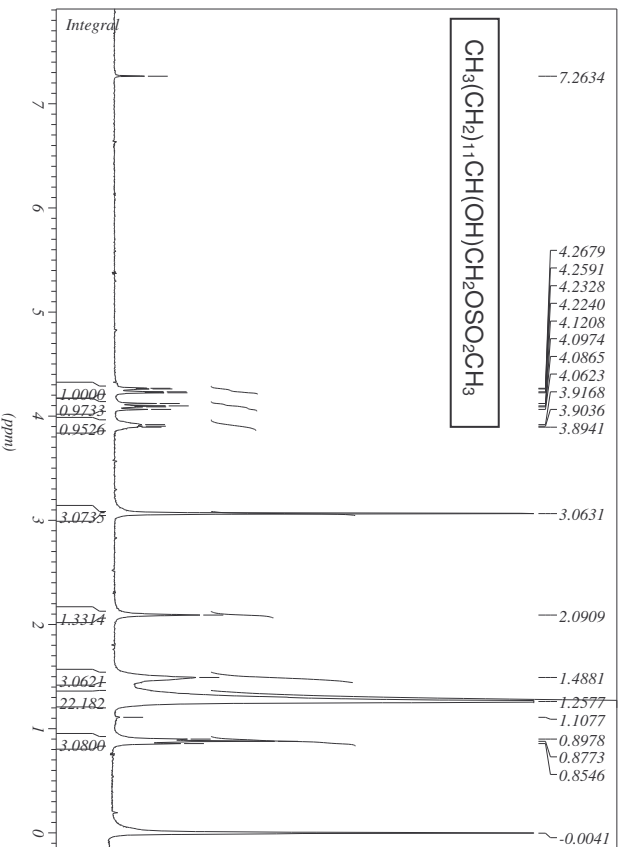


Figura 7.2.1. Espectro de RMN de ^1H do composto **2** (CDCl_3 , 300MHz).

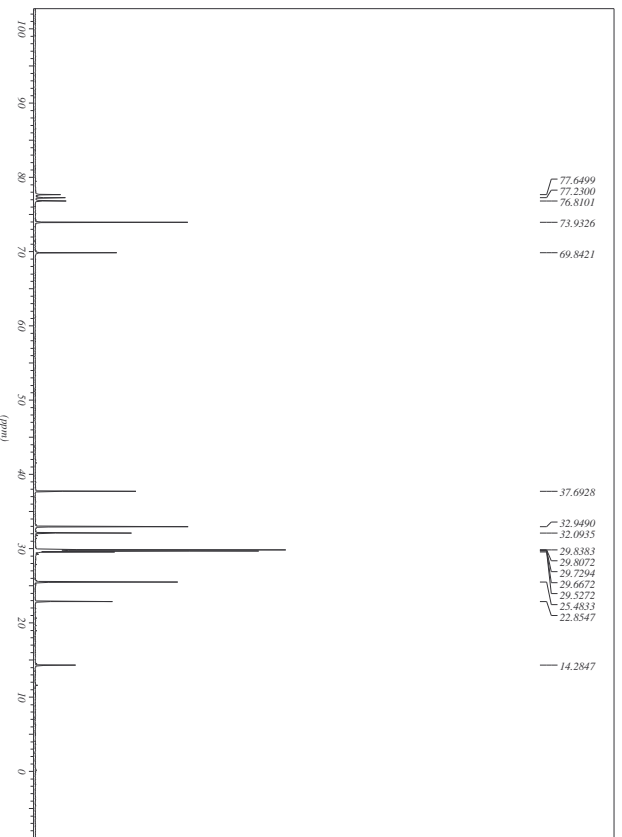


Figura 7.2.2. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** (CDCl_3 , 75MHz).

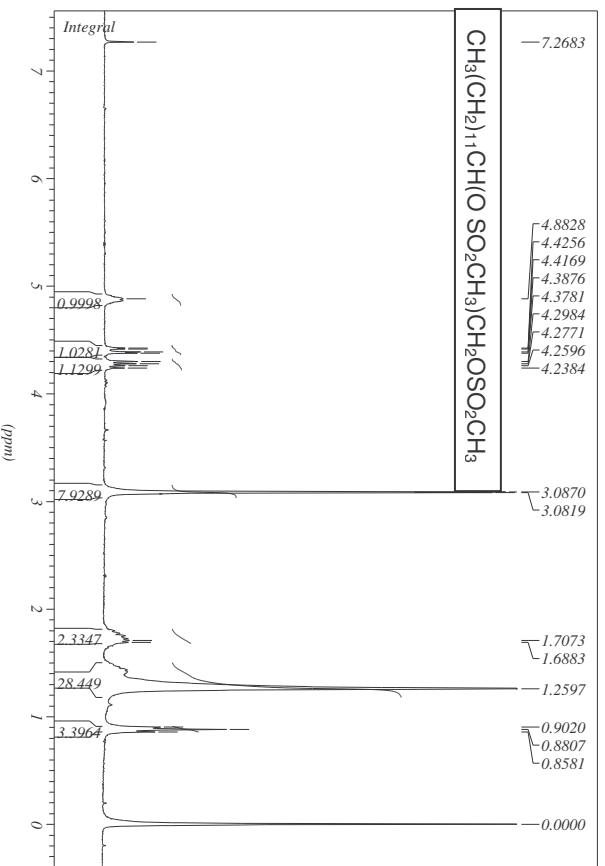


Figura 7.2.3. Espectro de RMN de ^1H do composto **3** (CDCl_3 , 300MHz).

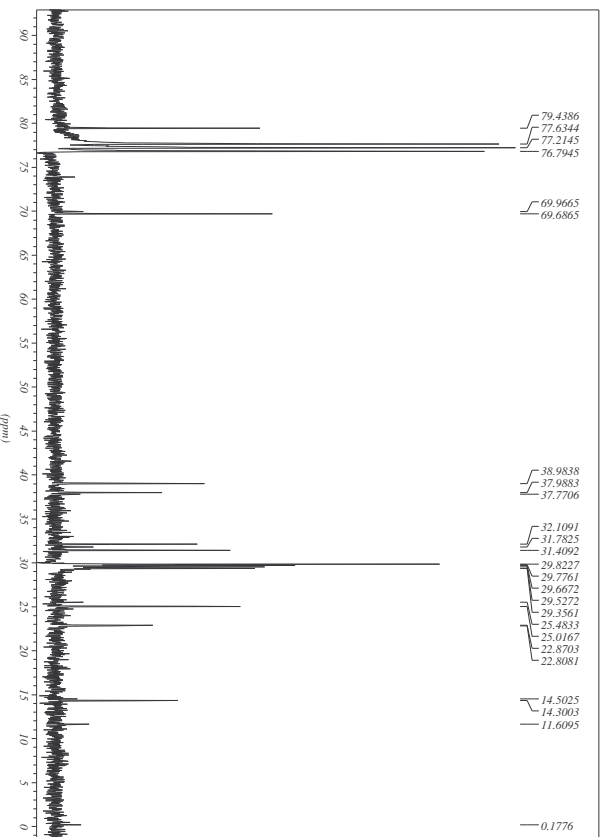


Figura 7.2.4. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3** (CDCl_3 , 75MHz).

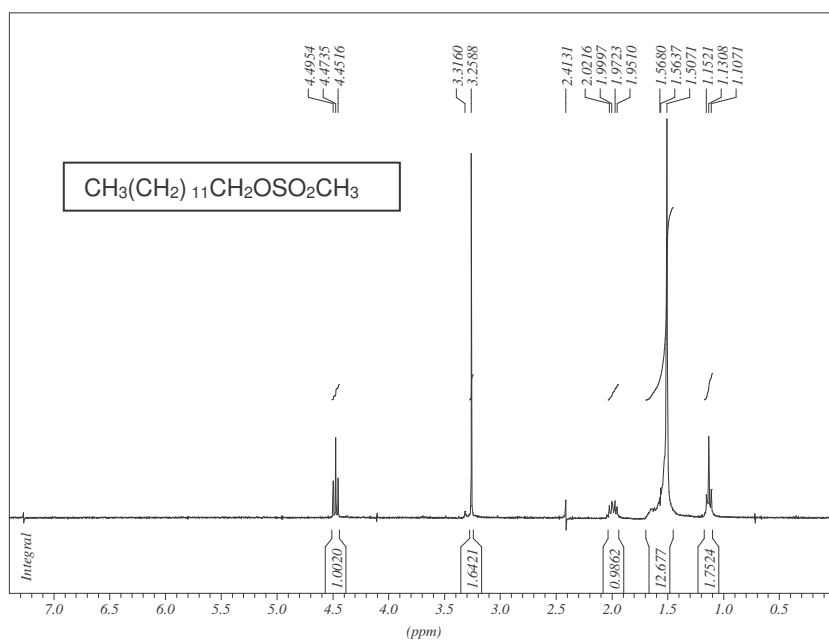


Figura 7.2.5. Espectro de RMN de ^1H do composto **5** (CDCl_3 , 300MHz).

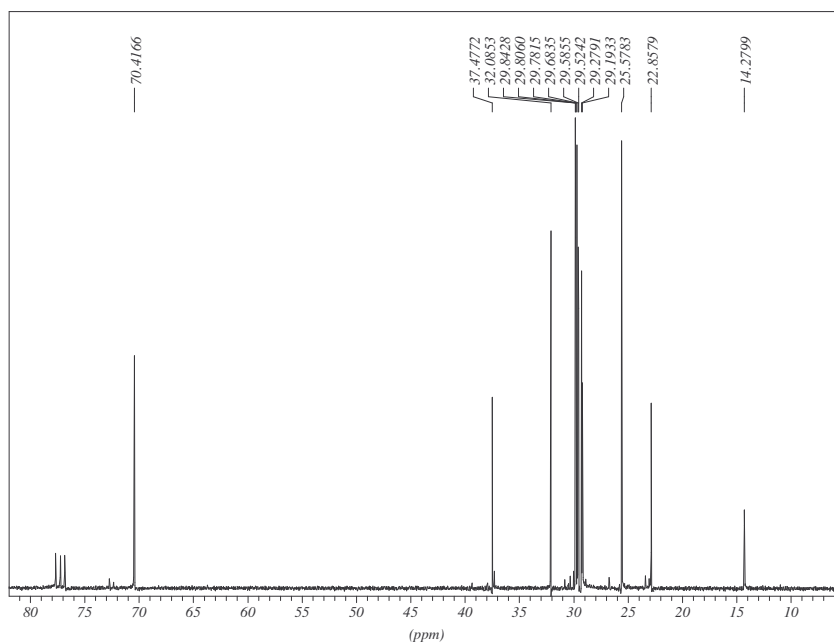


Figura 7.2.6. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **5** (CDCl_3 , 75MHz).

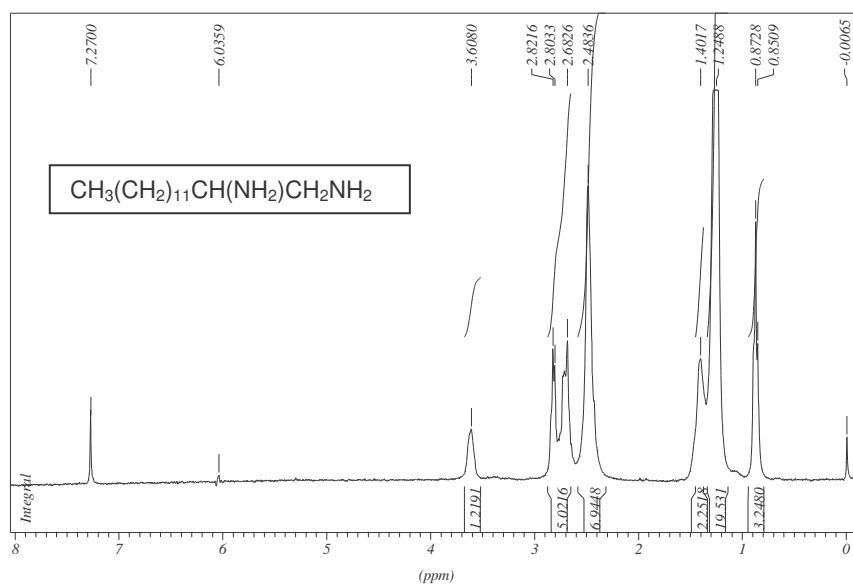


Figura 7.2.7. Espectro de RMN de ^1H do composto **6** (CDCl_3 , 300MHz).

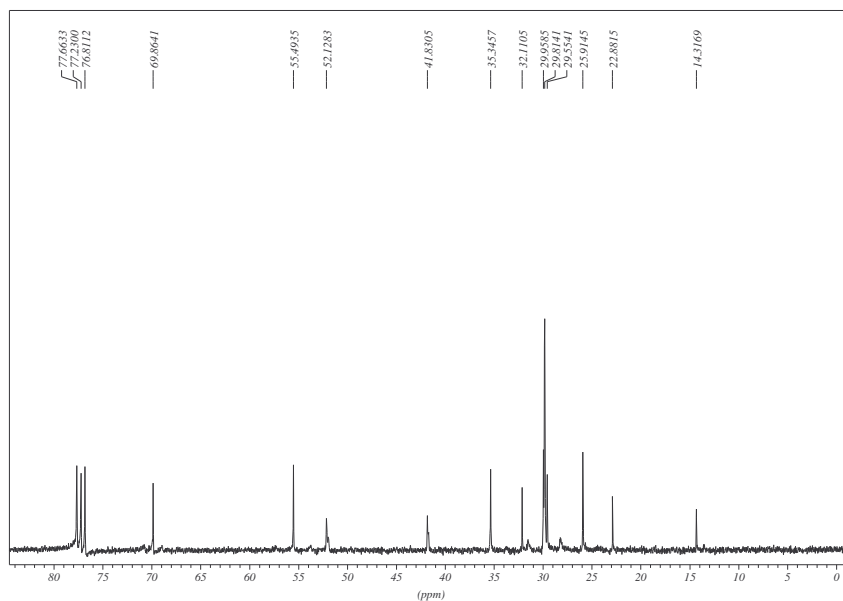


Figura 7.2.8. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **6** (CDCl_3 , 75 MHz).

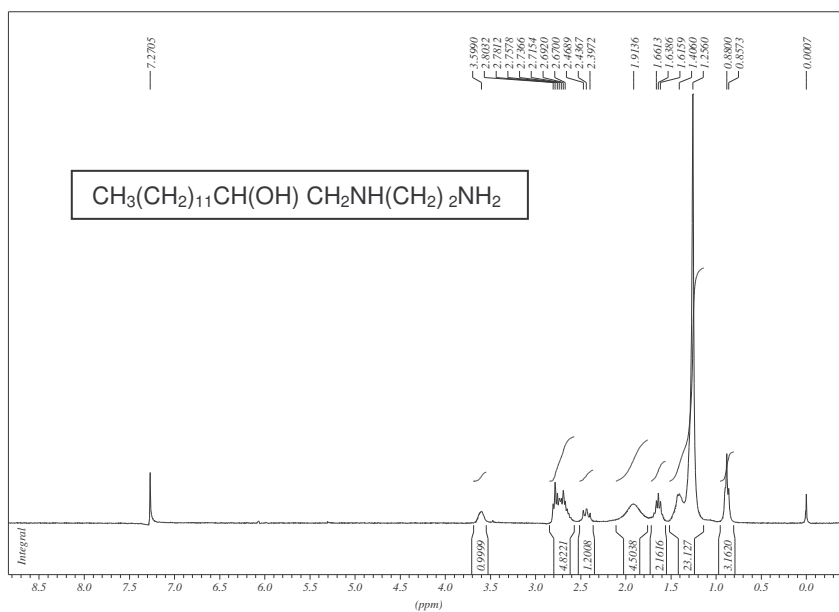


Figura 7.2.9. Espectro de RMN de ^1H do composto **7** (CDCl_3 , 300MHz).

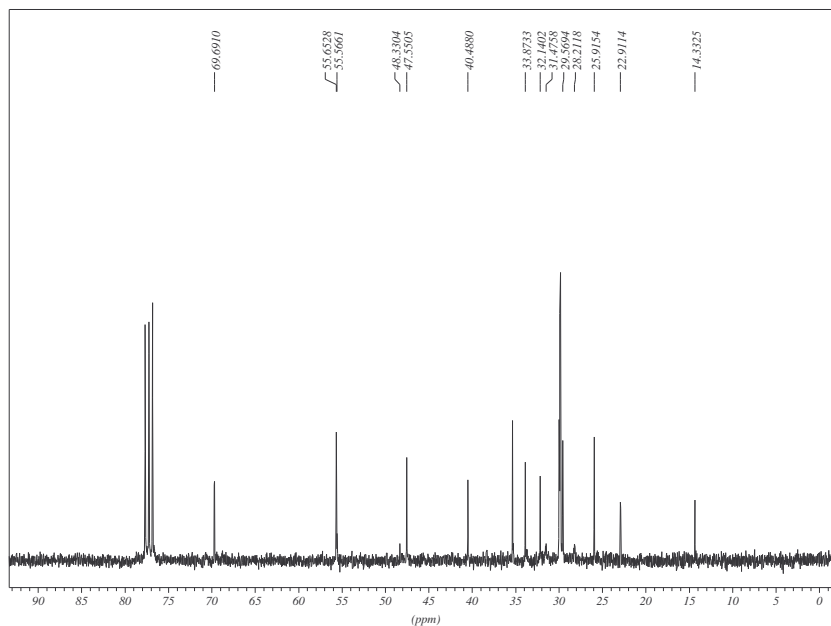


Figura 7.2.10. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **7** (CDCl_3 , 75 MHz).

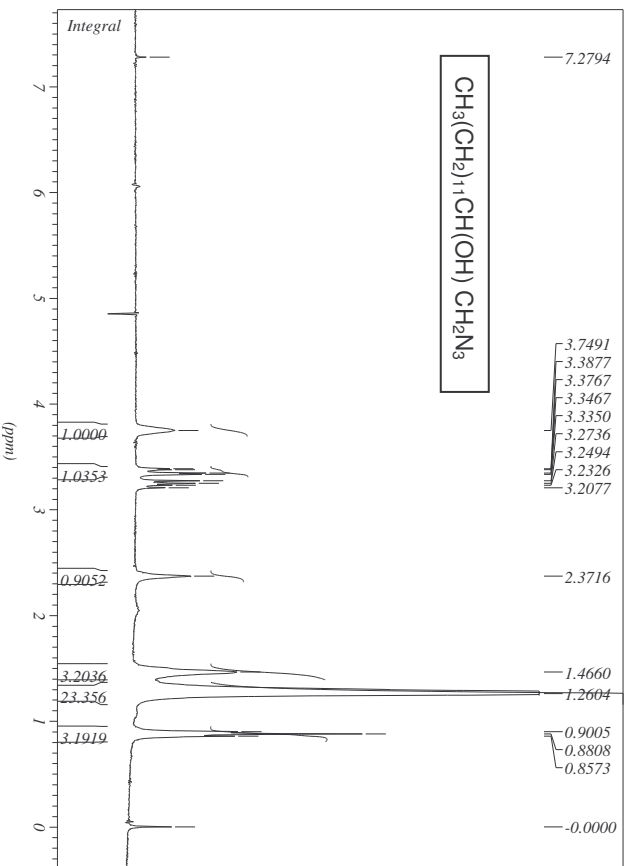


Figura 7.2.11. Espectro de RMN de ^1H do composto **8** (CDCl_3 , 300MHz).

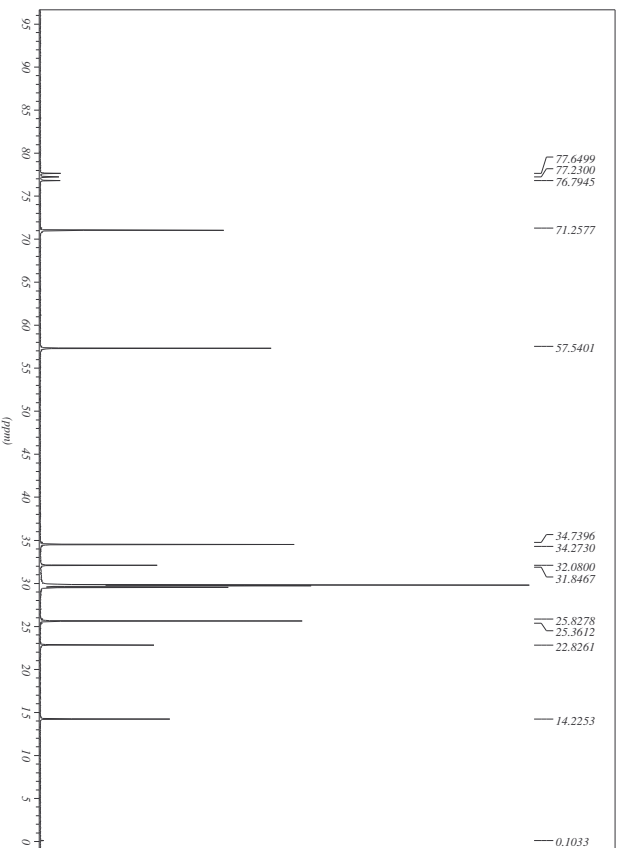


Figura 7.2.12. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **8** (CDCl_3 , 75 MHz).

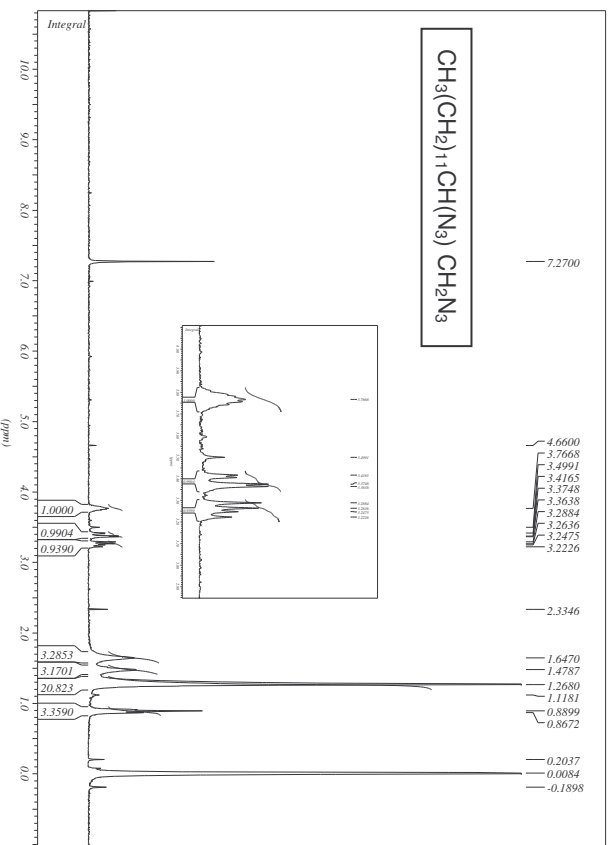


Figura 7.2.13. Espectro de RMN de ^1H do composto **9** (CDCl_3 , 300MHz).

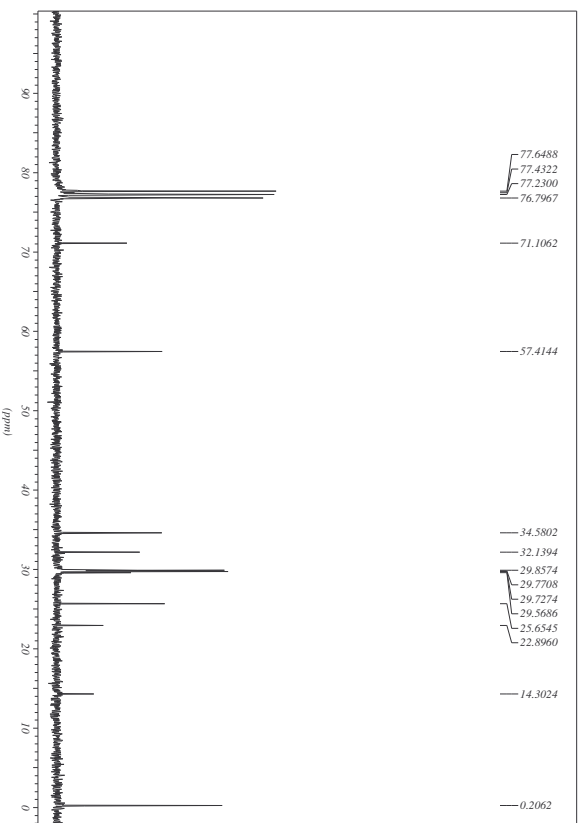


Figura 7.2.14. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **9** (CDCl_3 , 75 MHz).

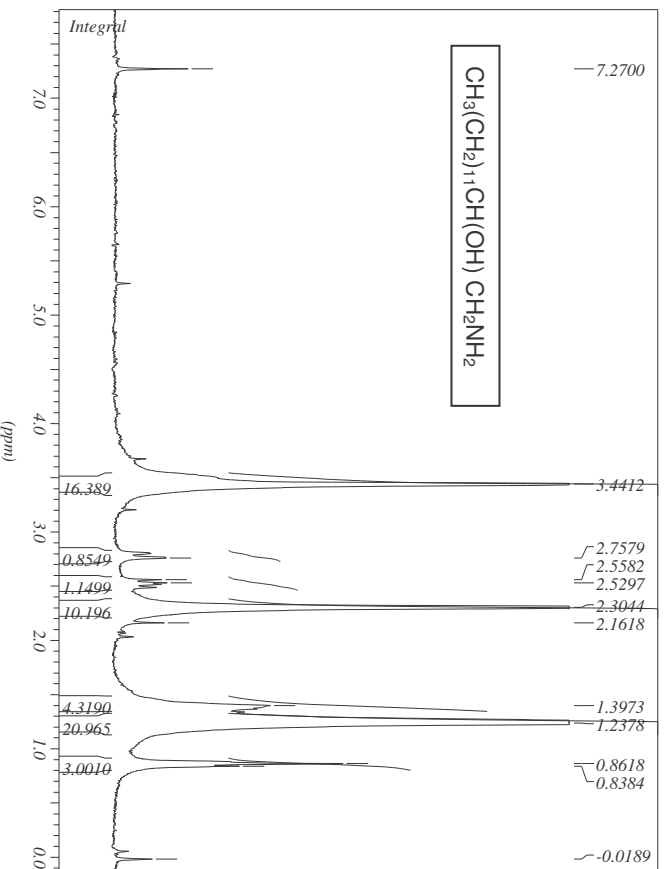


Figura 7.2.15. Espectro de RMN de ^1H do composto **10** (CDCl_3 , 300MHz).

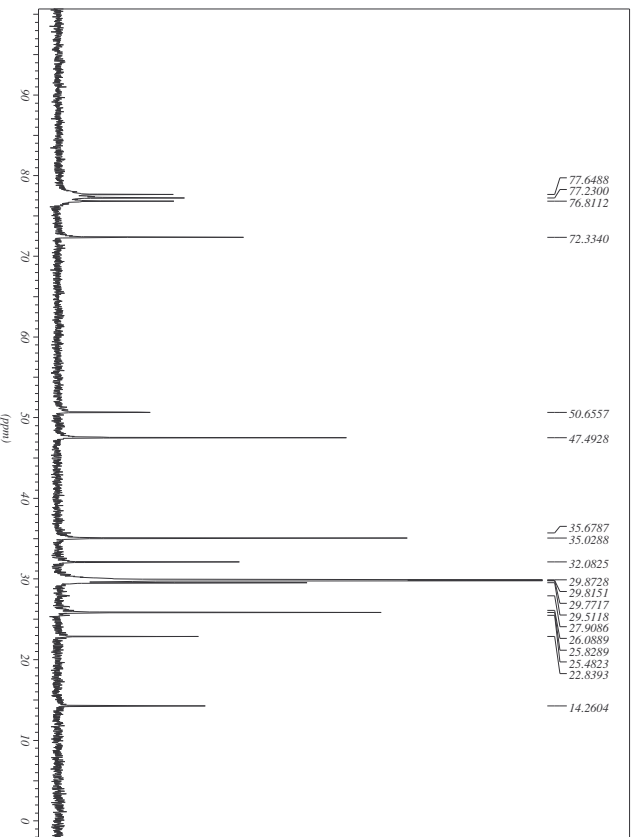


Figura 7.2.16. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** (CDCl_3 , 75 MHz).

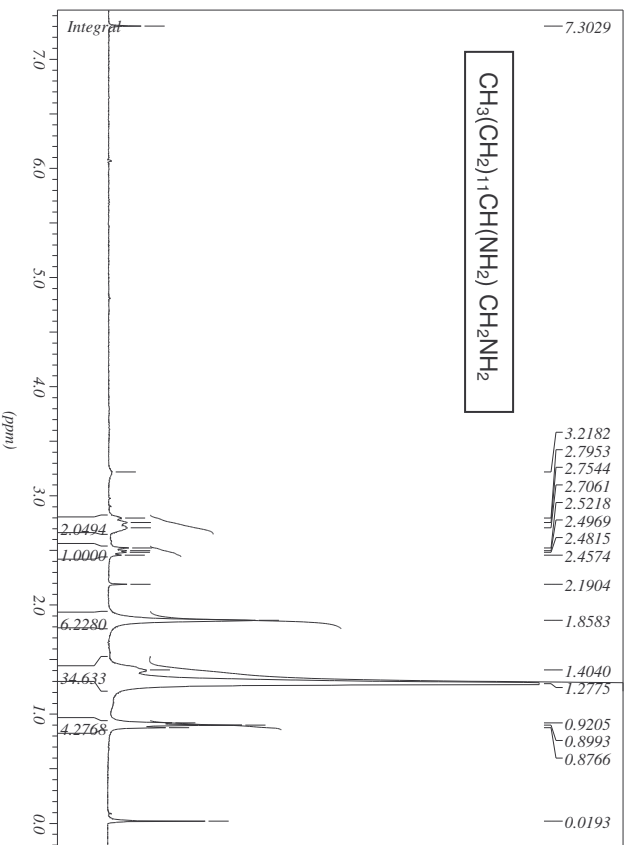


Figura 7.2.17. Espectro de RMN de ^1H do composto **11** (CDCl_3 , 300MHz).

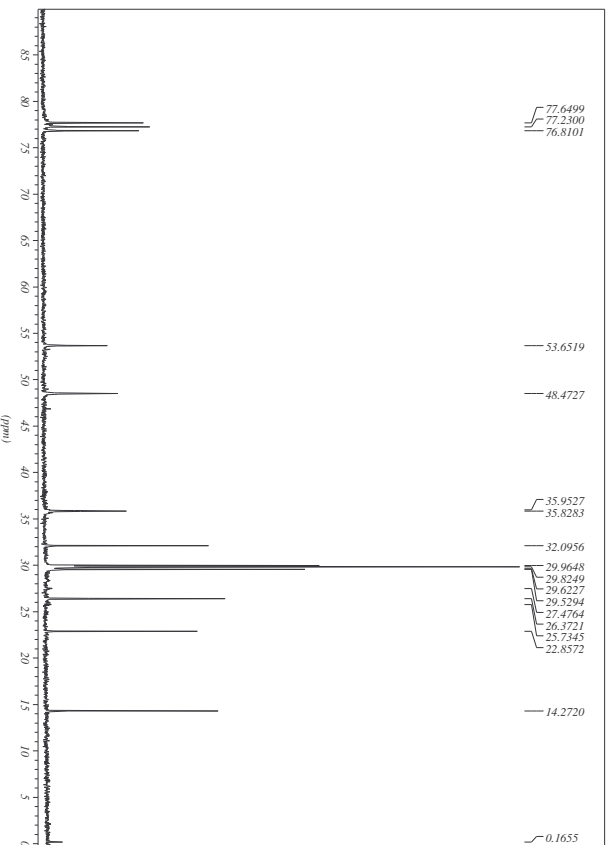


Figura 7.2.18. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **11** (CDCl_3 , 75 MHz).

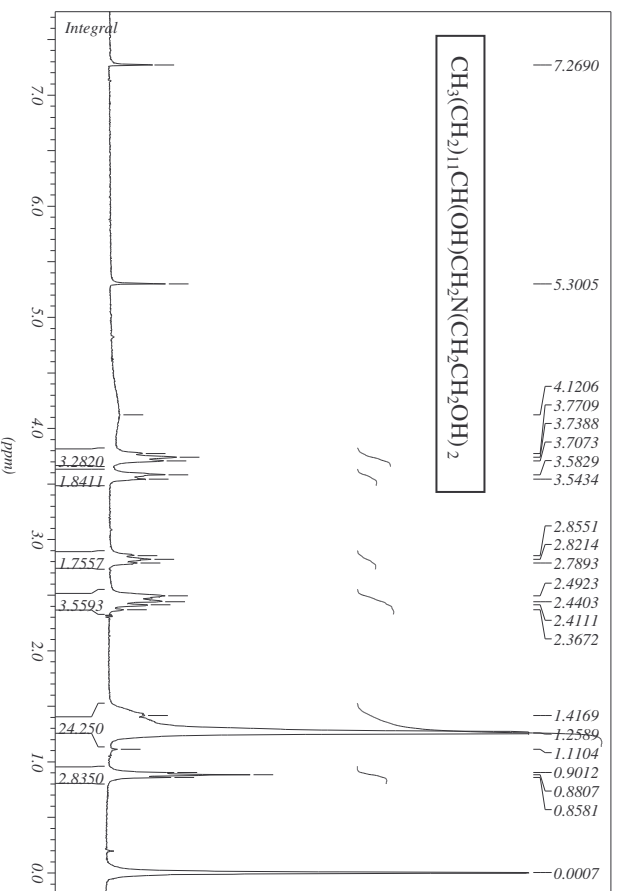


Figura 7.2.19. Espectro de RMN de ^1H do composto **12** (CDCl_3 , 300MHz).

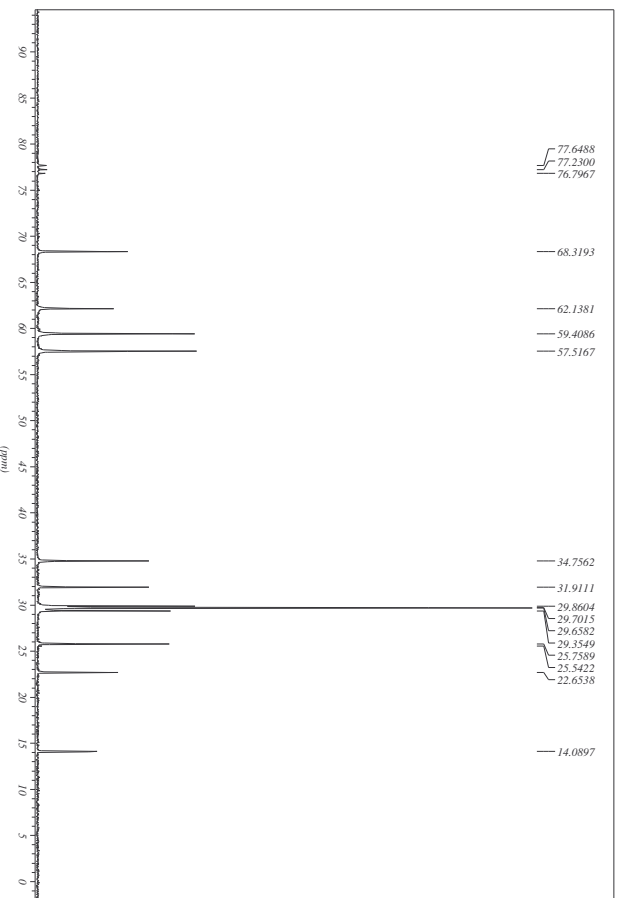


Figura 7.2.20. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **12** (CDCl_3 , 75 MHz).

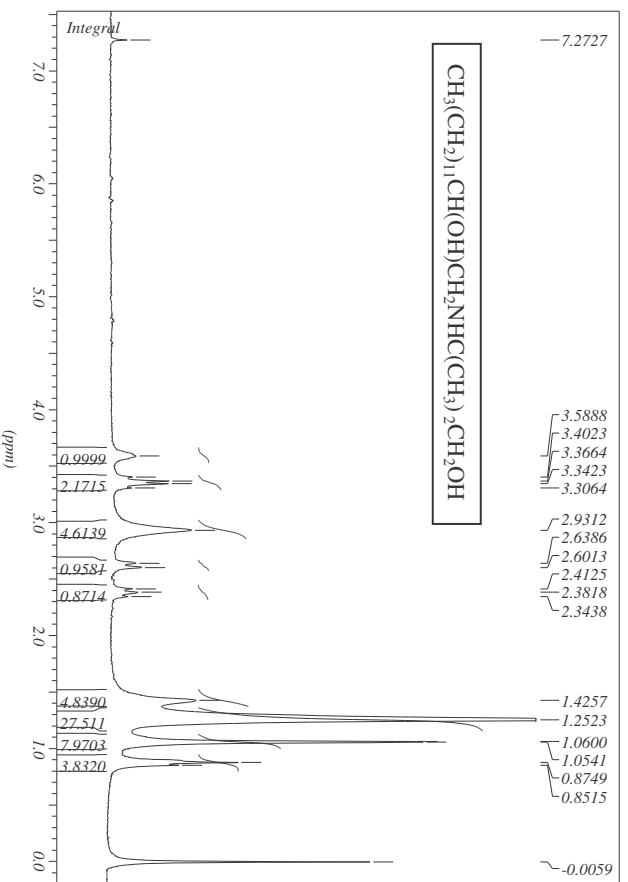


Figura 7.2.21. Espectro de RMN de ^1H do composto **13** (CDCl_3 , 300MHz).

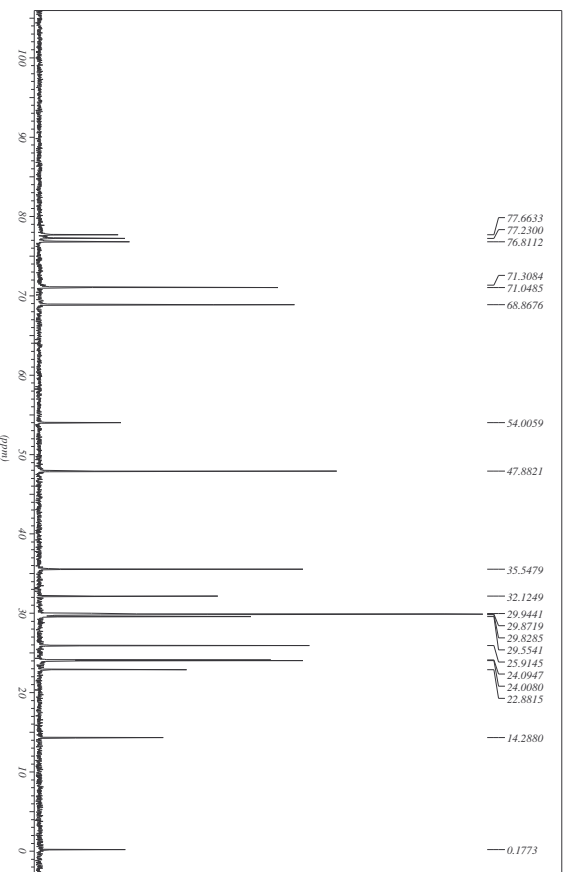


Figura 7.2.22. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **13** (CDCl_3 , 75 MHz).

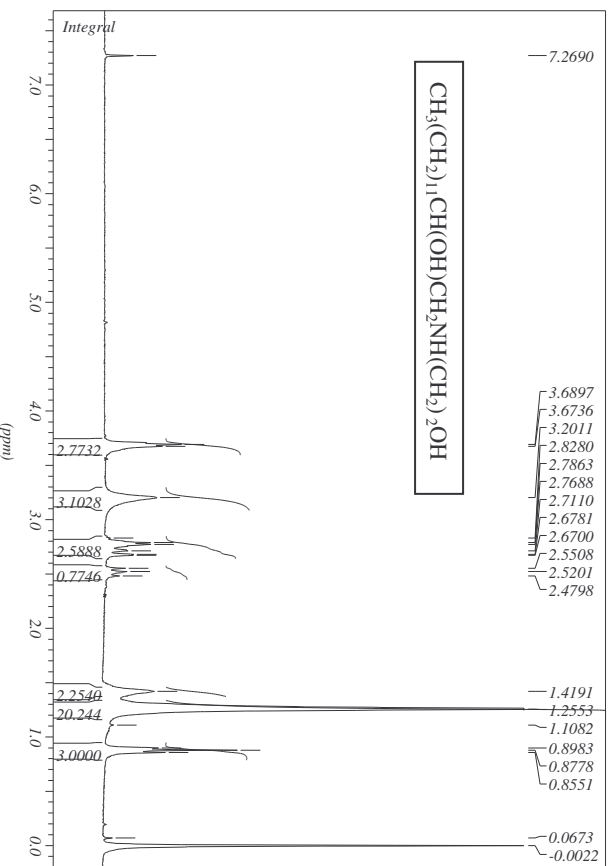


Figura 7.2.23. Espectro de RMN de ^1H do composto **14** (CDCl_3 , 300MHz).

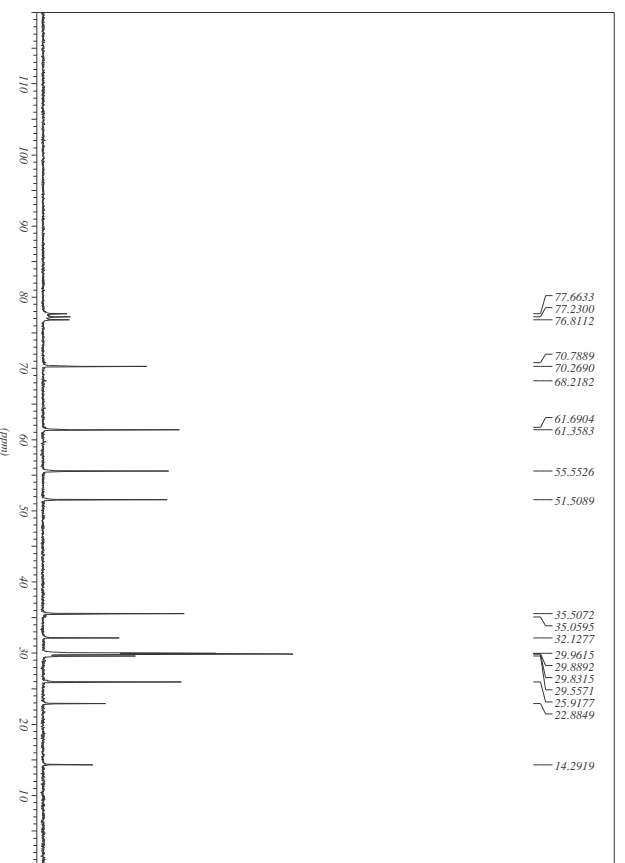


Figura 7.2.24. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **14** (CDCl_3 , 75 MHz).

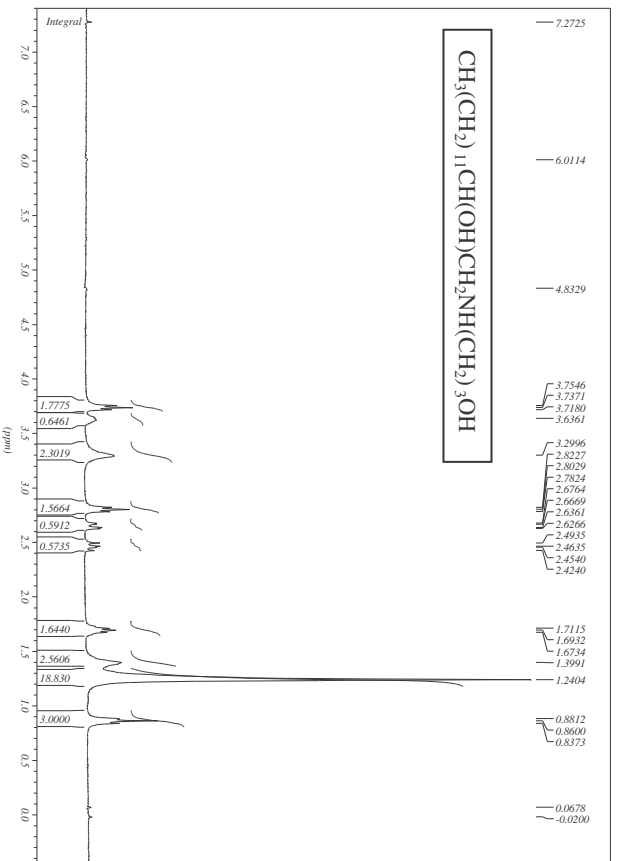


Figura 7.2.25. Espectro de RMN de ^1H do composto **15** (CDCl_3 , 300MHz).

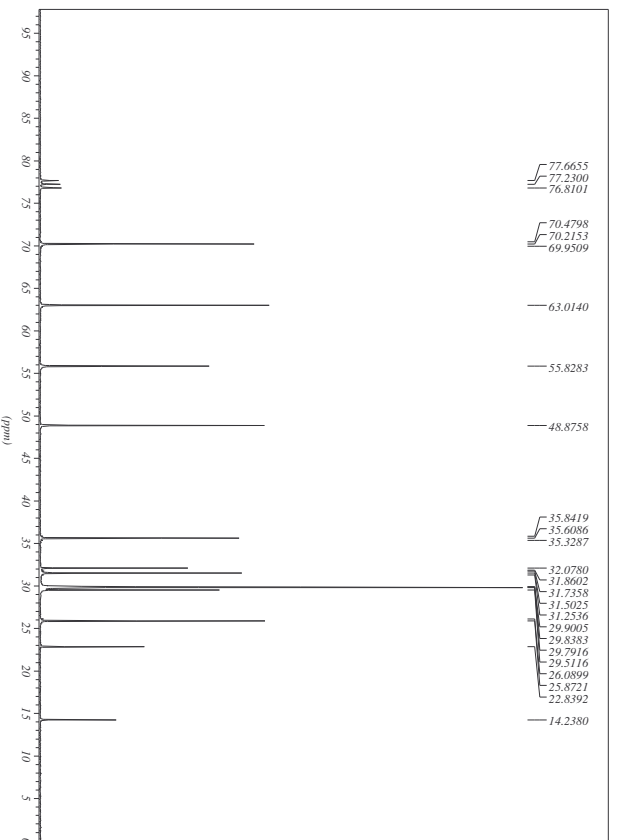


Figura 7.2.26. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **15** (CDCl_3 , 75 MHz).

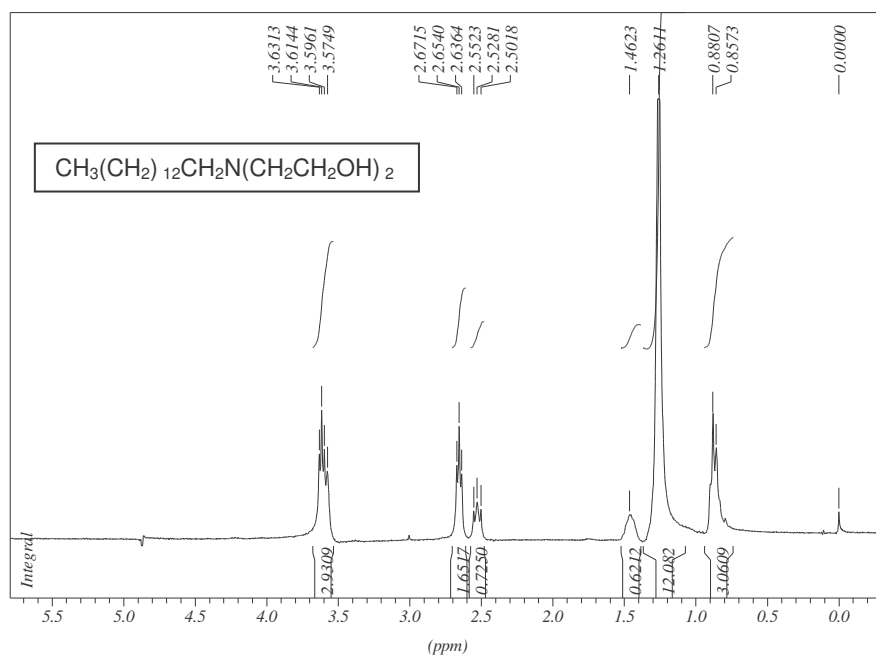


Figura 7.2.27. Espectro de RMN de ^1H do composto **16** (CDCl_3 , 300MHz).

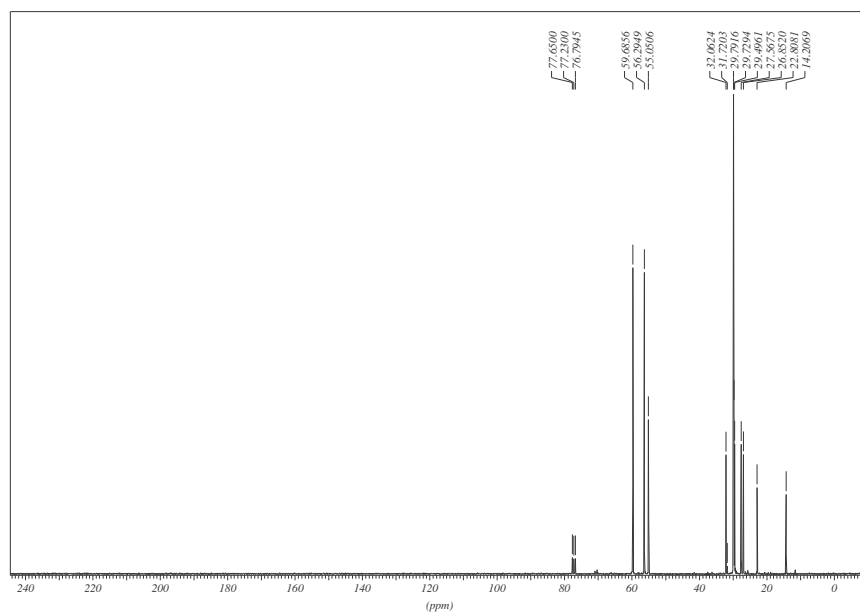


Figura 7.2.28. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **16** (CDCl_3 , 75 MHz).

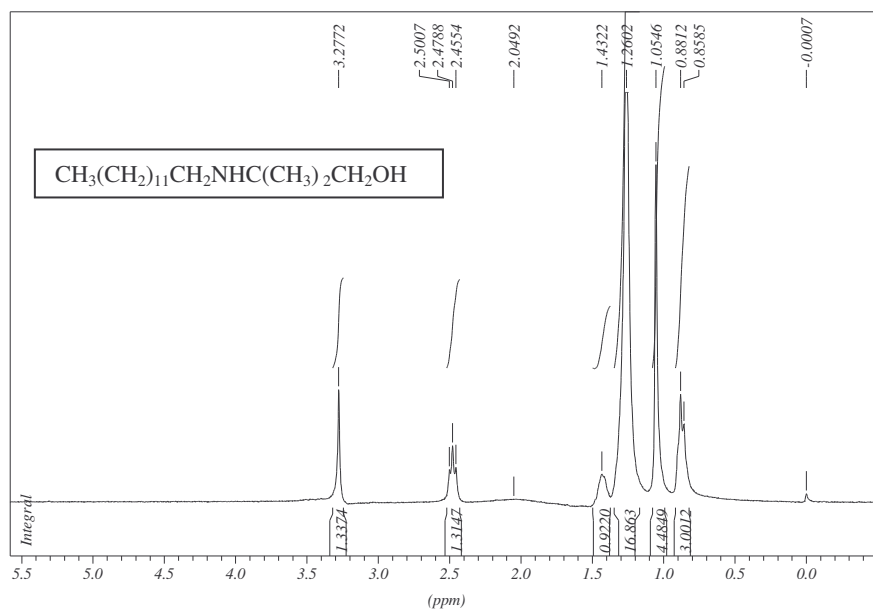


Figura 7.2.29. Espectro de RMN de ^1H do composto **17** (CDCl_3 , 300MHz).

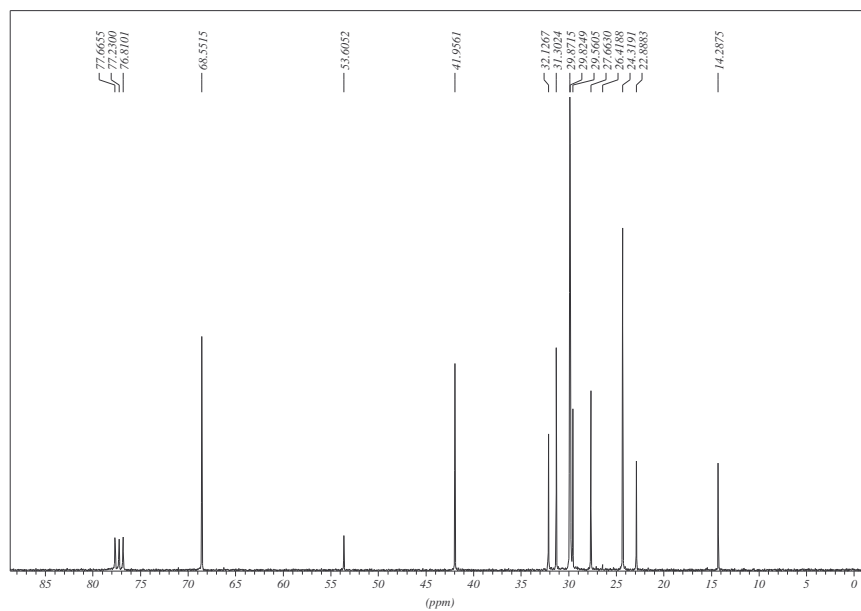


Figura 7.2.30. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **17** (CDCl_3 , 75 MHz).

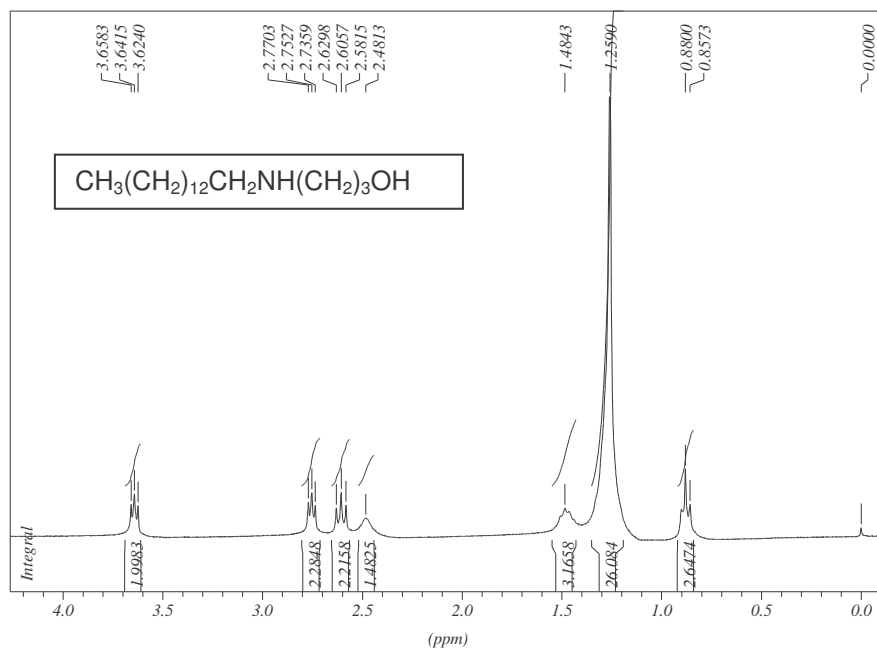


Figura 7.2.31. Espectro de RMN de ^1H do composto **18** (CDCl_3 , 300MHz).

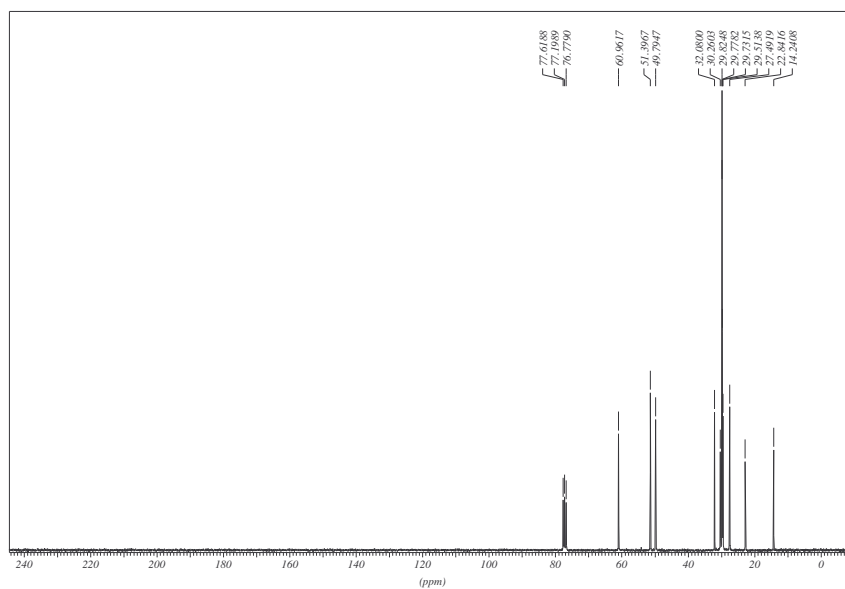


Figura 7.2.32. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **18** (CDCl_3 , 75 MHz).

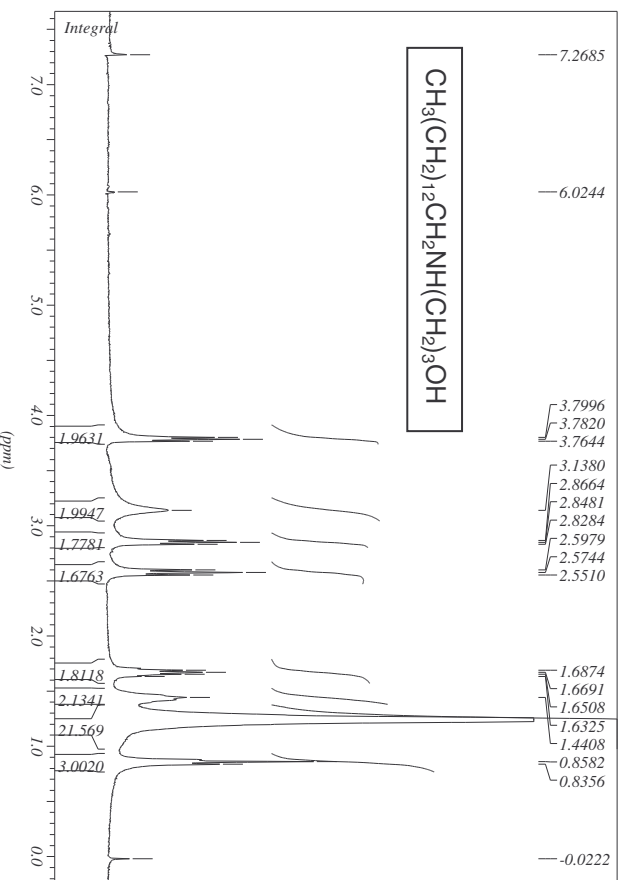


Figura 7.2.33. Espectro de RMN de ^1H do composto **19** (CDCl_3 , 300MHz).

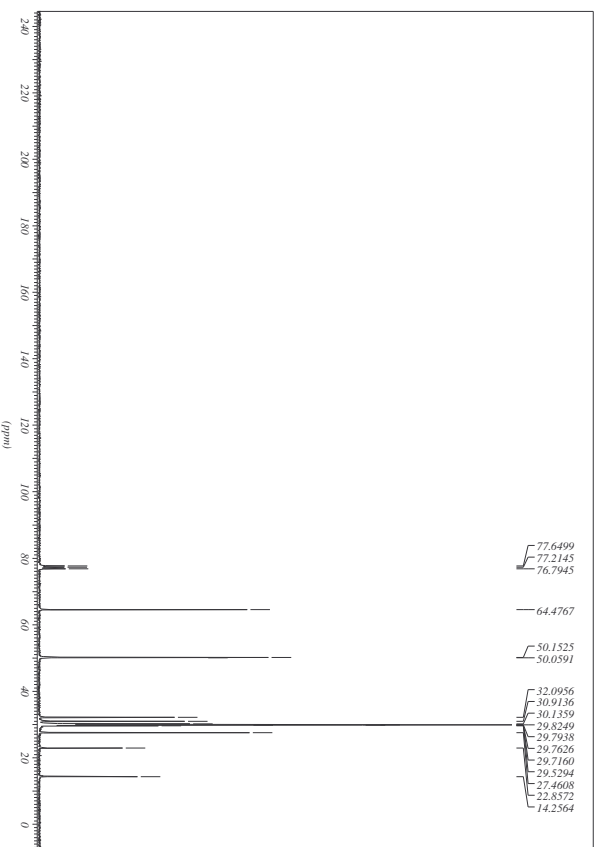


Figura 7.2.34. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **19** (CDCl_3 , 75 MHz).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 486p.

ADACHI, K. et al. Design, synthesis, and structure- activity relationships of 2-substituted- 2- amino- 1,3-propanediols: discovery of a novel immunosuppressant, FTY720. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n.8, p. 853-856.1995.

AHMED, R. A.; BLOSE, D. A. Delayed hypersensitivity skin testing: review. **Archives of Dermatology**, v.119, p.934-937. 1983.

ALLISON, A. C.; EUGNI, E. M., SOLLINGER, H. W. Mycophenolate mofetil: Mechanisms of action and effects in transplantation. **Transplantation Reviews**, v. 7, p.129-132. 1993.

ANDONEGUI, G. et al. Endothelium- derived Toll- like receptor-4 is the key molecule in LPS- induced neutrophil sequestration into lungs. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 7, p. 1011- 1020. 2003.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 413-420. 2008.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **American Journal Physiology**, v. 271, p. 1424-1437. 1996.

BRINKMANN, V. FTY720: Mechanism of action and potential benefit in organ transplantation. **Yonsei Medical journal**, v. 45, n. 6, p. 991-997. 2004.

BRUNN, G. J. et al. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-1 by the mammalian target of rapamycin. **Science**, v. 277, p. 99-101. 1997.

CHIBA et al. FTY720, a novel immunosuppressant, induce sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. **Journal Immunology**, v.160, p. 5037-5044. 1998.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 1, n.8, p. 1397- 1406. 2001.

COLONNA, M.; PULENDRAN, B; IWASAKI, A. Dendritic cells at the host- pathogen interface. **Nature Immunology**, v.7, n.2, p. 117-120. 2006.

CONFAVREUX, C. et al. Overview of azathioprine treatment in multiple sclerosis. **Lancet**, v. 338, p. 1051-1055. 1991.

COSTA, C. F. et al. Preparation and antileishmanial activity of lipophilic *N*-alkyl diamines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, in press. doi: 10.1016/j.biopha.2007.12.013. 2008.

CURVELLO NETO, A. L. et al. Atualização em insuficiência renal aguda: Nefrotoxicidade aguda de drogas imunossupressoras. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, V. 22, n. 2, p. 114-120. 2000.

DANNENBERG, A. M. Delayed-type hypersensitivity and cell mediated immunity in pathogenesis of tuberculosis. **Immunology Today**, v.12; p.228. 1991.

DIEBOLD, S. S. Determination of T- cell fate by dendritic cells. **Immunology and cell biology**, v. 86, n. 5, p. 389-397. 2008.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350. 2003.

FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 114, n. 2, p. 245–251. 1998.

FERREIRA, A. P.; TEIXEIRA, H. C. **Tópicos de Imunologia básica**. Juiz de Fora: Próprio autor, 74 p.2005.

FUJITA, T. et al. Simple compounds, 2- alkyl- 2- amino- 1,3- propanediols have potent immunosuppressive activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n.8, p. 847-852. 1995.

FUJITA, T. et al. 2- substituted 2- aminoethanol: minimum essential structure for immunosuppressive activity of ISP-1 (Myriocin). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n.16, p. 1857-1860. 1995.

GALLO, A. P. **Tacrolimus associado ao FTY720: avaliação sangüínea e renal**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo, 2006.

GILMAN, A. G. et al. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1232 p.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Research in Immunology**, v. 149, p. 685-688. 1998.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGWSKI, J., SKIPPER, P. L., WISHNOK, J. S., TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, p.131-138. 1982.

GUIMARÃES, V. C. et al. Immunossuppression of Thyroiditis. **Endocrinology**, v. 137, p. 2199-2207. 1996.

GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and pharmacology**, v. 54, n.4, p. 469-487. 2003.

HALLORRAN, P. F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 2715-2729. 2004.

HIROSE, R. et al. 2- aminoalcohol immunosuppressants: structure-activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.6, n. 22, p. 2647- 2650. 1996.

JAMES, S. L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiology Reviews**, v. 59, n. 4, p. 533- 547. 1995.

JANEWAY, C. A. J.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197-216. 2002.

JAWETZ, E. et al. **Microbiologia médica**. 18. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 519p.

LABADIE, G. R.; CHOI, S. R.; AVERY, M. A. Diamine derivatives with antiparasitic activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, n. 3, p.615-619. 2004.

LAU, C. M. et al. RNA - associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/ Toll-like receptor 7 engagement. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 9, p. 1171- 1177. 2005.

LEFOND, C. A. et al. Innate immunity for biodefense: A strategy whose time has come. **Journal allergy clinical immunology**. v. 116, n.6, p. 1334-1342. 2005.

LUTZ, M. B.; SCHULER, G. Immature, semi- mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? **Trends Immunology**, v.23, p. 445-449. 2002.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismo de resposta imune as infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.9, n.6, p.647-664, 2004.

MACEDO, M. S. et al. Immunomodulation induced by *Ascaris suum* extract in mice: effect of anti-interleukin-4 and anti-interleukin-10 antibodies. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 47, n.1, p. 10-18. 1998.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, p. 927-930. 1994.

MARTINEZ, S.; MARR, J. J. Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v.326, p.741-744. 1992.

MC ALISTER, V. C. et al. Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression. **Lancet**, v. 355, n. 9201, p. 376-377. 2000.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, p. 819- 826. 2007.

MORRIS, R. E. Mechanisms of action of new immunosuppressive drugs. **Kidney International Supplement**, v. 49, p. 26-38. 1996.

MORRIS, S. M.; BILLIAR, T. R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. 829- 839. 1994.

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

MOSSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. **The journal of Immunology**, v.136, n.7, p. 2348-2357. 1986.

OLMO, E. D. et al. Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and amino-Alcohols. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.12, p.659-662, 2002.

OLMO, E. D. et al. Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.8, p. 113- 118. 2006.

PAULA, C. D. R. et al. Estudo comparativo de eficácia de isotionato de pentamidina administradas em três doses durante uma semana e de *N*-metil-glucamina 20mg/SbV/kg/dia durante vinte dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p.365-371, maio/jun.2003.

PETER, D. et al. Tacrolimus. **Drugs**. V. 46, p. 746-794. 1993.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703p.

ROBERTSON, C. M.; COOPERSMITH, C. M. The systemic inflammatory response syndrome. **Microbes and Infection**, v.8, p. 1382-1389. 2006.

ROBBINS, R. A.; GRISHAM, M. B. Nitric Oxide. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 29, n. 6, p. 857-860. 1997.

ROCHA, P. N. et al. Effector mechanisms im transplant rejection. **Immunological reviews**, v. 196, p. 51-64. 2003.

ROITT, I.; BROSTOFF, J; MALE, D. **Imunologia**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997.317p.

ROSSI, M.; YOUNG, J. W. Humandendritic cells: potent antigen- presenting cells at the crossroads of innate and adaptative immunity. **The Journal of Immunology**, v.175, n.3, p.1373-1381. 2005.

ROUDEBUSH R. E., BRYANT, H. U. Pharmacologic manipulation of a four day murine delayed type hypersensitivity model. **Agents and Actions**, v. 38, n. 1, p.116-21. 1993.

SCHWENTKER, A. et al. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? **Nitric oxide**, v. 7, n.1, p. 1-10. 2002.

SUGITO et al. The effect of a novel immunosuppressant, FTY720, in mice without secondary lymphoid organs. **Surgery today**, v. 35, p. 662-667. 2005.

WAAGA, A. M. et al. Regulatory functions of self-restricted MHC class II allopeptide-specific Th2 clones in vivo. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 7, p. 909-916. 2001.

WATTS, C. et al. Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n.1, p. 73-78. 2007.

WOLOWCZUK, I., et al. Feeding Our Immune System: Impacto in Metabolism. **Clinical and Developmental Corporation**, v.2008, p.1-13. 2008.

YOPP, A. C. et al. FTY720 enhanced T cell home is dependent on CCR2, CCR5, CCR7, CXCR4: evidence for distinct chemokine compartments. **Journal Immunology**, v. 173, p. 855-865. 2004.

YU, S. M. Thaliporphine selectively inhibits expression of the inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase. **Biochemical Journal**, v. 303, p. 289-294. 1994.

TAMURA, A. et al. Immunosuppressive therapy using FTY720 combined with tacrolimus in rat liver transplantation. **Surgery**. v.127, p. 47-54. 2000.

TAVEIRA, A. F. et al. Preparation and antitubercular activities of alkylated amino alcohols and their glycosylated derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, p.7789-7794. 2007.

TAVEIRA, A.F. **Síntese de aminoáclois acoplados com derivados da D-galactose da D- glicose, potenciais agentes antituberculose**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

TRIPATHI, R. P. et al. Synthesis of glycosylated β -amino acids as new class of antitubercular agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 773-777. 2002.

TRIPATHI, A.; SODHI, A. Production of nitric oxide by murine peritoneal macrophage *in vitro* on treatment with prolactin and growth hormone: involvement of protein tyrosine kinase, Ca^{++} and MAP kinase signal transduction pathways. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 3185-3194, 2007.

VELLA, J. P.; SAYEGH, M. H. Maintenance pharmacological immunosuppressive strategies in renal transplantation. **Postgraduated Medical Journal**, v. 73, p. 386-390. 1997.