

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

CLEUDIOMAR INÁCIO LINO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE
ANÁLOGOS DA CURCUMINA E HETEROCICLOS TIAZÓLICOS.**

Belo Horizonte, MG

2015

CLEUDIOMAR INÁCIO LINO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE
ANÁLOGOS DA CURCUMINA E HETEROCICLOS TIAZÓLICOS.**

Dissertação, como requisito parcial, para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora: Profa. Renata Barbosa de Oliveira

Belo Horizonte, MG

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

“SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DE ANÁLOGOS DA CURCUMINA E HETERECICLOS TIAZÓLICOS”

CLEUDIOMAR INÁCIO LINO

Dissertação submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2015, pela Comissão constituída pelos membros:

Prof. Renata Barbosa de Oliveira - Orientadora
UFMG

Dr. Thiago Belarmino de Souza
UNIFAL

Prof. Geraldo Célio Brandão
UFOP

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Renata Barbosa de Oliveira, pelo incentivo, pessoa chave para a realização desse trabalho. Ao Professor Ricardo pelo otimismo e esclarecimentos;

Aos amigos do Laboratório de Química Farmacêutica pelo companheirismo, ajuda, risos e brincadeiras em especial ao Bruno, Stefânia e Saulo Braga pelas discussões a respeito de melhores rotas das reações;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos concedida;

A Faculdade de Farmácia, pela infraestrutura disponibilizada para a realização desse trabalho;

A mestranda Marina Ferrara de Resende, pela parceria desde trabalho;

Aos demais colaboradores que possibilitou que o projeto se tornasse um trabalho com grandes resultados;

Aos professores do PPGCF, pelos ensinamentos e determinação para a excelência do programa.

A Raquel, pela amizade e disposição em ajudar com a organização do laboratório e disponibilidade sempre que precisava;

Ao secretário do PPGCF, Eduardo, pela disponibilidade e disposição em ajudar sempre;

Maior que a tristeza de não haver vencido é a vergonha de não ter lutado!

Rui Barbosa.

RESUMO

Substâncias com propriedades antioxidantes são largamente estudadas em razão de seu potencial terapêutico no tratamento e/ou prevenção de diversos tipos de doenças, inclusive o câncer. Uma das substâncias antioxidante muito estudada é a curcumina. A atividade antioxidante de derivados hidrazino-tiazólicos também vem sendo estudada. Neste trabalho foi planejada a síntese de análogos da curcumina e heterociclos hidrazino-tiazólicos com potenciais atividades antioxidante e citotóxica. A síntese dos análogos da curcumina foi realizada por meio da reação de condensação aldólica entre a ciclohexanona ou acetona e aldeídos alifáticos ou aromáticos. Já os derivados tiazólicos foram obtidos pela condensação entre cetonas ou aldeídos e a tiossemicarbazida, seguida da reação da tiossemicarbazona correspondente com 2-bromo-acetofenona. Os compostos foram avaliados por meio dos ensaios *in vitro* de atividade antioxidante usando o método de captura do radical DPPH, radical ABTS e do método de redução do ferro FRAP e atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais humanas: HL60 (leucemia mielóide aguda), HCT (carcinoma colorretal), JURKAT (leucemia linfoblástica aguda), MCF7 e MDA (adenocarcinoma de mama), THP1 (leucemia monocítica). O teste também foi feito utilizando células Vero, modelo que mimetiza as células normais. No ensaio antioxidante (DPPH), os derivados tiazólicos **5a**, **5e** e **5g** apresentaram os melhores resultados com CI_{50} de 97,1; 95,4 e 60,4 μM , respectivamente, com atividade superior à da curcumina ($CI_{50} = 167,8 \mu\text{M}$). No ensaio de citotoxicidade, dois análogos da curcumina se destacaram: **1f** (HL60 $CI_{50} = 9,8 \mu\text{M}$, JURKAT $CI_{50} = 6,4 \mu\text{M}$, MDA $CI_{50} = 26 \mu\text{M}$, THP1 $CI_{50} = 7,3 \mu\text{M}$ e VERO $CI_{50} > 100 \mu\text{M}$) e **2b** (HL60 $CI_{50} = 3,2 \mu\text{M}$, HCT $CI_{50} = 2,7 \mu\text{M}$, MCF7 $CI_{50} = 6,4 \mu\text{M}$, MDA $CI_{50} = 18,9$, THP1 $CI_{50} = 11,7 \mu\text{M}$ e VERO $CI_{50} = 49 \mu\text{M}$). Além disso, o composto **1f** apresentou baixa citotoxicidade para células normais (células Vero), indicando boa seletividade.

Palavras-chave: atividade antioxidante, bis-(benzilideno)-ciclohexanona, heterociclos hidrazino-tiazólicos, curcumina, atividade citotóxica.

ABSTRACT

Substances with antioxidant properties have been extensively studied because of their therapeutic potential in the treatment and/or prevention of numerous types of diseases, including cancer. Curcumin is one of the most studied antioxidant compound. The antioxidant activity of hydrazino-thiazoles derivatives has also been studied. In this work, the synthesis of curcumin analogues and hydrazino-thiazole derivatives with potential antioxidant and cytotoxic activities was planned. The synthesis of curcumin analogues was performed by aldol condensation reaction between cyclohexanone or acetone and *aliphatic or aromatic aldehydes*. The thiazole derivatives were obtained by condensation of aldehydes or ketones and thiosemicarbazide, followed by reaction of corresponding thiosemicarbazone with 2-bromoacetophenone. Compounds were assayed *in vitro* for antioxidant activity using the DPPH radical capture method, ABTS radical and iron reduction method FRAP and for cytotoxic activity against a panel of human tumor cell lines, including HL60 (acute myeloid leukemia), HCT (colorectal carcinoma), JURKAT (acute lymphoblastic leukemia), MCF7 and MDA (breast) and THP1 (monocytic leukemia). The cytotoxicity of the compounds using Vero cell line was also established as a model to evaluate toxicity on normal cell lines. In antioxidant assay (DPPH), thiazole derivatives **5a**, **5e** and **5g** showed the best results with IC_{50} of 97.1; 95.4 and 60.4 μ M, respectively, over the activity of curcumin ($IC_{50} = 167.8$ μ M). In the cytotoxicity assay, two of curcumin analogues displayed results more promising: **1f** (HL60 $IC_{50} = 9.8$ μ M, JURKAT $IC_{50} = 6.4$ μ M, MDA $IC_{50} = 26$ μ M, THP1 $IC_{50} = 7.3$ μ M and VERO $IC_{50} > 100$ μ M) and **2b** (HL60 $IC_{50} = 3.2$ μ M, HCT $IC_{50} = 2.7$ μ M, MCF7 $IC_{50} = 6.4$ μ M, MDA $IC_{50} = 18.9$, THP1 $IC_{50} = 11.7$ μ M and VERO $IC_{50} = 49$ μ M). Besides, compound **1f** showed no cytotoxic effect on normal cells (Vero cells), indicating a good selectivity.

Keywords: antioxidant activity, bis-(benzylidene)-cyclohexanone, hydrazino-thiazoles heterocycles, curcumin, cytotoxic activity.

LISTA DE FIGURAS

1 – Exemplo de formação do radical hidroxila por meio da reação do H ₂ O ₂ com metais de transição.....	20
2 – Conversão, catalisada pela xantina oxidase, da hipoxantina a ácido úrico	20
3 – Síntese endógena do óxido nítrico.....	21
4 - Curcumina e representação do equilíbrio ceto-enólico estabilizado por ligação de hidrogênio.....	23
5 – Derivados fenólicos da curcumina com baixa atividade antioxidante.....	24
6 – Análogos da curcumina mono e dialquilados no carbono central.....	24
7 – Mecanismo de ação de neutralização de radicais da curcumina e análogos não fenólicos.....	25
8 – Mecanismo de ativação do NF- κ B pela via clássica (CECON, 2010).....	27
9 – Série de análogos da curcumina mais estáveis sem a presença do grupo metileno.....	30
10 – Reação entre o antioxidante BHT e o radical DPPH'	31
11 – Exemplos de alguns análogos da curcumina avaliados com antioxidantes e inibidor da atividade de NO.....	32
12 – Estruturas das substâncias XIIIa-XIII f	33
13 – Formação do radical ABST e sua redução por um agente antioxidante (HUANG, e PRIOR, 2005).....	35
14 – Compostos apresentando atividade citotóxica e antioxidante mais promissora.....	36
15 – Núcleo tiazolínico.....	37
16 – Exemplos de derivados tiazólicos biologicamente ativos.....	38
17 – Estrutura geral dos hidrazino-tiazóis.....	38
18 – Reação dos derivados tiazólicos com um radical.....	39
19 – Derivados hidrazino-tiazólicos com atividade antioxidante avaliada	40
20 - Derivados hidrazo-tiazólicos apresentando atividade citotóxica e antioxidante.....	41
21 – Estrutura química dos análogos da curcumina planejados	42
22 – Nova série de análogos da curcumina para estudos de REA	43
23 – Estrutura química dos heterociclos hidrazino-tiazólicos planejados	44
24 – Exemplos de substituintes ligados ao anel hidrazino-tiazólico planejados para estudos de REA.....	44
25 – Esquema de síntese para obtenção de 1a, 1b, 1c, 1e e 1g.....	92

26 – Mecanismo proposto para a reação de condensação aldólica em meio básico (COSTA, et al, 2003).	93
27 - Mecanismo proposto para a reação de condensação aldólica em meio ácido (SOLOMONS e FRYHLE, 2006).	95
28 – Efeitos da conjugação em ligação dupla vizinha a uma carbonila	97
29 – Obtenção de 3a e 3d.	103
30 – Obtenção de 3b e 3c.	105
31 – Equação geral para obtenção das tiossemicarbazonas	108
32 – Mecanismo proposto para a reação de formação da tiossemicarbazona.	109
33 – Conformação anti e sinperiplanar na tiossemicarbazona.	111
34 – Mecanismo proposto para a reação de formação do heterociclo tiazólico.	114
35 – Valores de deslocamento químico simulados para o carbono hidrogenado do anel tiazólico, referente aos regioisômeros a e b.	117
36 – Isômeros <i>E</i> e <i>Z</i> do composto 5p	117
37 – Espectro de RMN de ¹³C de 5p, mostrando o desdobramento dos sinais de carbono dos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i> dos heterociclos tiazólicos.	118
38 – Espectro de RMN de ¹H de 5f com destaque para o deslocamento químico do sinal de H-7 nos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>, majoritariamente o isômero <i>E</i>.	119
39 – Espectro de RMN de ¹H de 5f com destaque para o deslocamento químico do sinal de H-7 nos isômeros <i>E</i> e <i>Z</i>, majoritariamente o isômero <i>Z</i>.	119
40– Proposta de representação esquemática da ligação de hidrogênio intramolecular do isômero <i>E</i> de 5f.	120
A.1 - Espectro no infravermelho de 1a	139
A.2 – Espectro de RMN de ¹H de 1a (200 MHz, CDCl₃)	139
A.3 – Espectro de RMN de ¹³C e experimento DEPT 135 de 1a (50 MHz, CDCl₃)	140
A.4 - Espectro no infravermelho de 1e	140
A.5 – Espectro de RMN de ¹H de 1e (200 MHz, CDCl₃)	141
A.6 – Espectro de RMN de ¹³C e experimento DEPT 135 de 1e (50 MHz, CDCl₃)	141
A.7 - Espectro no infravermelho de 1d	142
A.8– Espectro de RMN de ¹H de 1d (200 MHz, CDCl₃)	142
A.9 – Espectro de RMN de ¹³C e experimento DEPT 135 de 1d (50 MHz, CDCl₃)	143
A.10 - Espectro no infravermelho de 1f	143
A.11 – Espectro de RMN de ¹H de 1f (200 MHz, DMSO-D₆)	144
A.12 – Espectro de RMN de ¹³C e experimento DEPT 135 de 1f (50 MHz, DMSO-D₆)	144
A.13 - Espectro no infravermelho de 2a	145

A.14 – Espectro de RMN de ^1H de 2a (200 MHz, MeOD)	145
A.15 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 2a (50 MHz, MeOD).....	146
A.16 - Espectro no infravermelho de 2b.....	146
A.17 – Espectro de RMN de ^1H de 2b (200 MHz, DMSO- D_6).....	147
A.18 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 2b (50 MHz, DMSO- D_6)	147
A.19 - Espectro no infravermelho de 2c	148
A.20 – Espectro de RMN de ^1H de 2c (200 MHz, DMSO- D_6).....	148
A.21 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 2c (50 MHz, DMSO- D_6)	149
A.22 - Espectro no infravermelho de 3a	149
A.23 - Espectro no infravermelho de 3b.....	150
A.24 – Espectro de RMN de ^1H de 3b (200 MHz, DMSO- D_6).....	150
A.25 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 3b (50 MHz, DMSO- D_6)	151
A.26 - Espectro no infravermelho de 3c	151
A.27 - Espectro no infravermelho de 3d.....	152
A.28 – Espectro de RMN de ^1H de 3d (200 MHz, CDCl_3).....	152
A.29 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 3d (50 MHz, CDCl_3).....	153
A.30 - Espectro no infravermelho de 4a	153
A.31 – Espectro de RMN de ^1H de 4a (200 MHz, DMSO- D_6).....	154
A.32 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4a (50 MHz, DMSO- D_6)	154
A.33 - Espectro no infravermelho de 4b.....	155
A.34 – Espectro de RMN de ^1H de 4b (200 MHz, DMSO- D_6).....	155
A.35 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4b (50 MHz, DMSO- D_6)	156
A.36 - Espectro no infravermelho de 4c	156
A.37 - Espectro no infravermelho de 4d.....	157
A.38 – Espectro de RMN de ^1H de 4d (200 MHz, DMSO- D_6).....	157
A.39 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4d (50 MHz, DMSO- D_6)	158
A.40 - Espectro no infravermelho de 4e	158
A.41 – Espectro de RMN de ^1H de 4e (200 MHz, DMSO- D_6).....	159
A.42 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4e (50 MHz, DMSO- D_6)	159
A.43 - Espectro no infravermelho de 4f.....	160
A.44 – Espectro de RMN de ^1H de 4f (200 MHz, CDCl_3).....	160
A.45 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4f (50 MHz, CDCl_3)	161
A.46 - Espectro no infravermelho de 4g.....	161

A.47 – Espectro de RMN de ^1H de 4g (200 MHz, DMSO- D_6).....	162
A.48 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4g (50 MHz, DMSO- D_6)	162
A.49 - Espectro no infravermelho de 5a	163
A.50 – Espectro de RMN de ^1H de 5a (200 MHz, DMSO- D_6).....	163
A.51 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5a (50 MHz, DMSO- D_6)	164
A.52 - Espectro no infravermelho de 5b.....	164
A.53 – Espectro de RMN de ^1H de 5b (200 MHz, DMSO- D_6).....	165
A.54 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5b (50 MHz, DMSO- D_6)	165
A.55 - Espectro no infravermelho de 5c.....	166
A.56 – Espectro de RMN de ^1H de 5c (200 MHz, DMSO- D_6).....	166
A.57 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5c (50 MHz, DMSO- D_6)	167
A.58 - Espectro no infravermelho de 5d.....	167
A.59 – Espectro de RMN de ^1H de 5d (200 MHz, DMSO- D_6).....	168
A.60 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5d (50 MHz, DMSO- D_6)	168
A.61 - Espectro no infravermelho de 5e	169
A.62 - Espectro no infravermelho de 5f.....	169
A.63 – Espectro de RMN de ^1H de 5f (200 MHz, DMSO- D_6).....	170
A.64 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5f (50 MHz, DMSO- D_6)	170
A.65 - Espectro no infravermelho de 5g.....	171
A.66 - Espectro no infravermelho de 5h.....	171
A.67 – Espectro de RMN de ^1H de 5h (200 MHz, DMSO- D_6).....	172
A.68 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5h (50 MHz, DMSO- D_6)	172
A.69 - Espectro no infravermelho de 5i.....	173
A.70 – Espectro de RMN de ^1H de 5i (200 MHz, DMSO- D_6).....	173
A.71 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5i (50 MHz, DMSO- D_6)	174
A.72 - Espectro no infravermelho de 5j.....	174
A.73 – Espectro de RMN de ^1H de 5j (200 MHz, DMSO- D_6).....	175
A.74 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5j (50 MHz, DMSO- D_6)	175
A.75 - Espectro no infravermelho de 5k.....	176
A.76 – Espectro de RMN de ^1H de 5k (200 MHz, DMSO- D_6).....	176
A.77 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5k (50 MHz, DMSO- D_6)	177
A.78 - Espectro no infravermelho de 5l.....	177
A.79 – Espectro de RMN de ^1H de 5l (200 MHz, DMSO- D_6).....	178

A.80 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5l (50 MHz, DMSO- D_6)	178
A.81 - Espectro no infravermelho de 5m	179
A.82 – Espectro de RMN de ^1H de 5m (200 MHz, DMSO- D_6).....	179
A.83 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5m (50 MHz, DMSO- D_6)	180
A.84 - Espectro no infravermelho de 5n	180
A.85 – Espectro de RMN de ^1H de 5n (200 MHz, CDCl_3).....	181
A.86 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5n (50 MHz, CDCl_3)	181
A.87 - Espectro no infravermelho de 5o	182
A.88 – Espectro de RMN de ^1H de 5o (200 MHz, CDCl_3).....	182
A.89 – Espectro de RMN de ^1H de 5o (200 MHz, CDCl_3).....	183
A.90 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5o (50 MHz, CDCl_3)	183
A.91 - Espectro no infravermelho de 5p	184
A.92 – Espectro de RMN de ^1H de 5p (200 MHz, CDCl_3).....	184
A.93 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5p (50 MHz, CDCl_3)	185

LISTA DE TABELAS

1 – Comparação entre as bandas de C=O e C=C dos compostos 1a-1g e 2a-2c.....	96
2 - Dados do espectro de RMN de ¹ H da substância 1a.....	98
3 – Dados dos espectros de RMN de ¹ H das substâncias 1b-1f e 2a-2c.....	99
4 – Dados do espectro de RMN de ¹ H da substância 1g.....	100
5 – Dados do espectro de RMN de ¹³ C das substâncias 1a-1f.....	101
6 – Dados do espectro de RMN de ¹³ C da substância 1g.....	102
7 – Dados do espectro de RMN de ¹³ C das substâncias 2a e 2b.....	103
8 – Principais diferenças na forma de obtenção dos produtos de condensação mono e dissustituídos.....	104
9 – Comparação dos dados de infravermelho dos produtos monoarilados hidroxilados e não hidroxilados.....	105
10 – Dados dos espectros de RMN de ¹ H das substâncias 3b e 3d.....	106
11 – Dados comparativos do espectro de RMN de ¹³ C de 3b hidroxilado e 3d não hidroxilado.....	107
12- Dados do espectro no infravermelho dos compostos 4a-4g.....	110
13 – Diferença de descolamento observada para os sinais dos hidrogênios da porção tiossemicarbazona.....	111
14 – Dados do espectro de RMN de ¹³ C das tiossemicarbazonas 4a-4g.....	112
15 – Dados característicos de RMN de ¹ H e ¹³ C, indicativos da formação dos heterociclos 5a-5p.....	115
16 – Resultados obtidos nos ensaios biológicos nos testes de antioxidantes para os diferentes métodos testados.....	122
17 – Quantidade necessária de substância para inibir 50% da concentração inicial de radicais de DPPH.....	124
18 – Resultados do ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> das substâncias sintetizadas, da curcumina e o controle positivo, etoposideo (CI ₅₀ μM).....	126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS ⁺⁺	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
assim.	Assimétrico
ATP	adenosina trifosfato
BHT	butil-hidroxitolueno
CCD	Cromatografia de camada delgada
CCS	Cromatografia em coluna de sílica
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50% de ação.
d	duplete
dd	duplo duplete
DMSO	dimetilsulfóxido
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DPPH [·]	2,2-difenil-1-picrilhidrazina
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERs	espécies reativas
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FF	Faixa de fusão
FM	Fórmula molecular
FT	Fatores de Transcrição
FRAP	<i>ferric reducing antioxidant power</i>
GSH	Glutathiona redutase
IL-1	Interleucina 1
LPL	Lipoproteína lipase
MM	Massa molar
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAIP	<i>Proteína inibidora de apoptose neural</i>
NF-KB	<i>Fator nuclear kaapa beta</i>
Rend.	Rendimento
Rf.	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

ARN	Ácido ribonucleico
s	Simpleto
sim.	Simétrico
sl.	Simpleto largo
Subst.	Substância
TNF	Fator de Necrose Tumoral
THF	Tetrahidrofurano
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Curcumina e seus análogos.....	23
1.2	Heterociclos Tiazólicos	37
2	JUSTIFICATIVA	42
3	OBJETIVO GERAL.....	46
3.1	Objetivos específicos	46
4	PLANO DE SÍNTESE	47
5	MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1	Síntese de 2,6-bis-(ciclohexilmetileno)-ciclohexanona (1a).....	51
5.2	Metodologia geral para a síntese das bis-(arilmetilidenos)-ciclohexanonas 1b, 1c, 1e e 1g (WEBER et al., 2005a).	52
5.2.1	<u>Síntese de 2,6-bis-(benzilideno)-ciclohexanona (1b)</u>	53
5.2.2	<u>Síntese de 2,6-bis-(piridin-4-ilmetileno)-ciclohexanona (1c)</u>	53
5.2.3	<u>Síntese de 2,6-bis-(3,4-dimetoxibenzilideno)-ciclohexanona (1e)</u> ..	54
5.2.4	<u>Síntese de 2,6-bis-(quinolin-4-ilmetileno)-ciclohexanona (1g)</u>	55
5.3	Síntese de 2,6-bis-(4-metoxibenzilideno)-ciclohexanona (1d).....	56
5.4	Síntese de 2,6-bis-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)-ciclohexanona (1f).....	57
5.5	Metodologia geral para a síntese das bis-(arilmetilidenos)-ciclohexanonas 2a, 2b, e 2c (DU et al., 2006).	58
5.5.1	<u>Síntese de 1,5-bis(4-hidroxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (2a)</u>	58
5.5.2	<u>Síntese de 1,5-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (2b) e 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-but-3-en-2-ona (2c)</u>	59
5.6	Síntese de 2-benzilideno-ciclohexanona (3a).....	61
5.7	Metodologia geral para a síntese das 2-(arilmetilideno)-ciclohexanona 3b-3d (WEBER et al., 2005).	62
5.7.1	<u>Síntese de 2-(hidroxi-(piridin-4-il)-metil)-ciclohexanona (3b)</u>	62
5.7.2	<u>Síntese de 2-(hidroxil-(3-nitrofenil)-metil)-ciclohexanona (3c)</u>	63
5.7.3	<u>Síntese de 2-(4-(dimetilamino)-benzilideno)-ciclohexanona (3d)</u>	64
5.8	Metodologia geral para a síntese das tiossemicarbazonas 4a-4d..	65
5.8.1	<u>Síntese de 2-benzilideno-(ciclohexilideno)hidrazino-carbotioamida (4a)</u>	65

5.8.2	<u>Síntese de 2-(2-(hidroxi(piridin-4-il)metil)ciclohexilideno)hidrazino-carbotioamida (4b)</u>	66
5.8.3	<u>Síntese de 2-(2-(hidroxi-(3-nitrofenil)-metil)-ciclohexilideno)-hidrazino-carbotioamida (4c)</u>	68
5.8.4	<u>Síntese de 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-but-3-en-2-ilideno)-hidrazino-carbotioamida (4d)</u>	69
5.9	Metodologia geral para a síntese das tiossemicarbazonas 4e-4f...	70
5.9.1	<u>Síntese de 2-(2,2-dimetilpropilideno)hidrazino-carbotioamida (4e)</u>	70
5.9.2	<u>Síntese de 2-(hexan-3-ilideno)-hidrazino-carbotioamida (4f) e 2-(propan-2-ilideno)hidrazino-carbotioamida (4g)</u>	71
5.10	Metodologia geral para a síntese dos heterociclos tiazólicos 5a-5j	72
5.10.1	<u>Síntese de 2-(benzilideno-ciclohexilidene)-hidrazinil-4-(4-clorofenil)-tiazol (5a)</u>	73
5.10.2	<u>Síntese de (2-(2-(4-feniltiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-(piridin-4-il)-metanol (5b)</u>	74
5.10.3	<u>Síntese de (2-(2-(4-(4-clorofenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-(piridin-4-il)-metanol (5c)</u>	75
5.10.4	<u>Síntese de (2-(2-(4-(4-metoxifenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-(piridin-4-il)-metanol (5d)</u>	76
5.10.5	<u>Síntese de nitrofenil-(2-(2-(4-feniltiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-metanol (5e)</u>	77
5.10.6	<u>Síntese de 2-(2-(4-(4-clorofenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-(3-nitrofenil)-metanol (5f)</u>	78
5.10.7	<u>Síntese de 2-(2-(4-(4-metoxifenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-(3-nitrofenil)-metanol (5g)</u>	79
5.10.8	<u>Síntese de 2-metoxi-4-(3-(2-(4-feniltiazol-2-il)-hidrazona)-but-1-en-1-il)-fenol (5h)</u>	80
5.10.9	<u>Síntese de 4-(3-(2-(4-(4-clorofenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-but-1-en-1-il)-2-metoxifenol (5i)</u>	81
5.10.10	<u>Síntese de 2-metoxi-4-(2-(4-(4-metoxifenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-but-1-en-1-il)-fenol (5j)</u>	82
5.10.11	<u>Síntese de 2-(2-(2,2-dimetilpropilideno)-hidrazinil)-4-feniltiazol (5k)</u>	83

<u>5.10.12</u>	<u>Síntese de 4-(4-clorofenil)-2-(2-(2,2-dimetilpropilideno)-hidrazinil)-tiazol (5l)</u>	84
<u>5.10.13</u>	<u>Síntese de 2-(2-(2,2-dimetilpropilideno)-hidrazinil)-4-(4-metoxifenil)-tiazol (5m)</u>	85
<u>5.10.14</u>	<u>Síntese de 2-(2-(hexan-3-ilideno)-hidrazinil)-4-feniltiazol (5n)</u>	86
<u>5.10.15</u>	<u>Síntese de 4-(4-clorofenil)-2-(2-(hexan-3-ilideno)-hidrazinil)-tiazol (5o)</u>	87
<u>5.10.16</u>	<u>Síntese de 2-(2-(hexan-3-ilideno)-idrazinil)-4-(4-metoxifenil)-tiazol (5p)</u>	88
5.11	Ensaio Biológico	89
<u>5.11.1</u>	<u>Avaliação da atividade antioxidante</u>	89
<u>5.11.2</u>	<u>Avaliação da atividade citotóxica</u>	90
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
6.1	Síntese dos compostos <i>via</i> reação de condensação aldólica em meio básico	92
<u>6.1.1</u>	<u>Síntese das 2,6-bis-(metilideno)-ciclohexanona 1a, 1b, 1c, 1e e 1g</u>	92
6.2	Síntese dos compostos <i>via</i> reação de condensação aldólica em meio ácido	94
<u>6.2.1</u>	<u>Síntese de 2,6-bis-(4-metoxibenzilideno)-ciclohexanona 1d</u>	94
<u>6.2.2</u>	<u>Síntese das 2,6-bis-(arilmetilideno)-cicloalcanonas 1f, 2a, 2b e da 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-but-3-en-2-ona 2c</u>	94
6.3	Caracterização dos compostos 1a-1g e 2a-2c	97
6.4	Síntese dos compostos monoarilados	103
<u>6.4.1</u>	<u>Síntese das 2-benzilideno-ciclohexanona 3a e 3d</u>	103
<u>6.4.2</u>	<u>Síntese das 2-benzilideno-ciclohexanona 3b e 3c</u>	104
6.5	Caracterização dos compostos 3a-3d	105
6.6	Síntese das tiossemicarbazonas 4a, 4b, 4c, 4d, 4e 4f e 4g	107
6.7	Caracterização das tiossemicarbazonas 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f e 4g	109
6.8	Síntese dos heterociclos tiazólicos 5a-5p	113
6.9	Caracterização dos heterociclos tiazólicos 5a-5p	115
6.10	Ensaio Biológico	120
<u>6.10.1</u>	<u>Ensaio antioxidante <i>in vitro</i></u>	120

<u>6.10.2</u> <u>Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i></u>	125
7 CONCLUSÃO	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
APÊNDICE A	139

1 INTRODUÇÃO

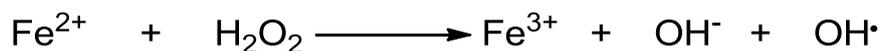
Inúmeras pesquisas são realizadas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, aterosclerose, inflamação e câncer. A finalidade dos radicais livres no organismo é combater microrganismos invasores, além de estarem envolvidos na produção de energia, fagocitose, sinalização intercelular, síntese de substâncias biológicas importantes e regulação do crescimento celular. No entanto, os radicais livres podem também provocar danos teciduais (BABIOR, 2000; BARREIROS *et al.*, 2006), estando envolvidos com dezenas de doenças (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Radicais livres são moléculas orgânicas e inorgânicas ou átomos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados e existem independentes (HALLIWELL, 1994). Tais características fazem dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curta e extremamente reativas (POMPELLA, 1997). Devido à sua alta reatividade podem reagir com biomoléculas (proteínas, lipídeos, carboidratos e ADN), inativando-as. Os radicais livres são gerados nas próprias células, no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana (ANDERSON, 1996; YU e ANDERSON, 1997). A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) *in vivo* é devido à catálise enzimática associada à transferência de elétrons no metabolismo celular ou exposição a fatores exógenos. Dentre as principais ERO podemos citar o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), e o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$).

Os radicais hidroxila são conhecidos por serem os mais reativos e deletérios de todas as ERO, porém apresentam baixa capacidade de difusão (ANDERSON, 1996). A alta reatividade dos radicais hidroxila está relacionada ao fato de possuírem uma meia-vida muito curta e dificilmente serem neutralizados pelas defesas antioxidantes endógenas, a menos que seja administrada uma alta dose de um antioxidante. Esses radicais atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e podem ser gerados por meio da reação do H_2O_2 com metais de transição (**Figura 1**) ou pela hemólise da água quando exposta à radiação

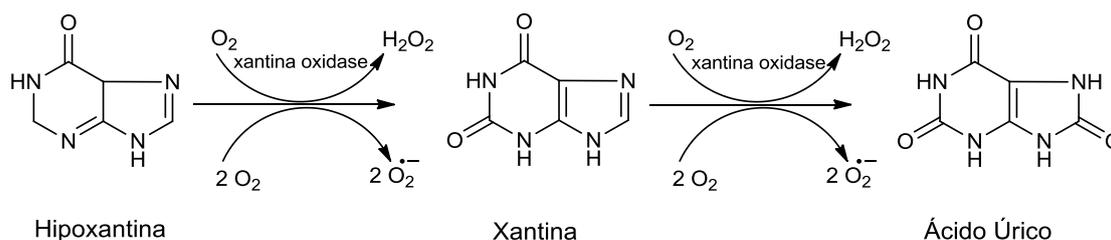
ionizante. Esses radicais são os mais agressivos no que se refere à iniciação de dano celular *in vivo* (ROLLET-LABELLE, 2008, SARMA e SHARMA, 1999).

Figura 1 – Exemplo de formação do radical hidroxila por meio da reação do H₂O₂ com metais de transição.



Já o radical superóxido, além causar danos celulares, tem seus efeitos ampliados, uma vez que ele pode produzir outros tipos de radicais livres e agentes oxidantes. O superóxido é produzido *in vivo*, por exemplo, por meio de reações enzimáticas catalisadas pela xantina oxidase (HSU, 2006). A xantina oxidase é a enzima responsável pela transformação da hipoxantina em xantina e da xantina em ácido úrico. Como subprodutos dessa reação têm-se a formação de peróxido de hidrogênio e do radical superóxido (**Figura 2**). Devido a essas conversões catalíticas, a xantina oxidase é considerada como uma das principais fontes geradoras de radicais livres no organismo (DEW, DAY e MORGAN, 2005).

Figura 2 – Conversão, catalisada pela xantina oxidase, da hipoxantina a ácido úrico.

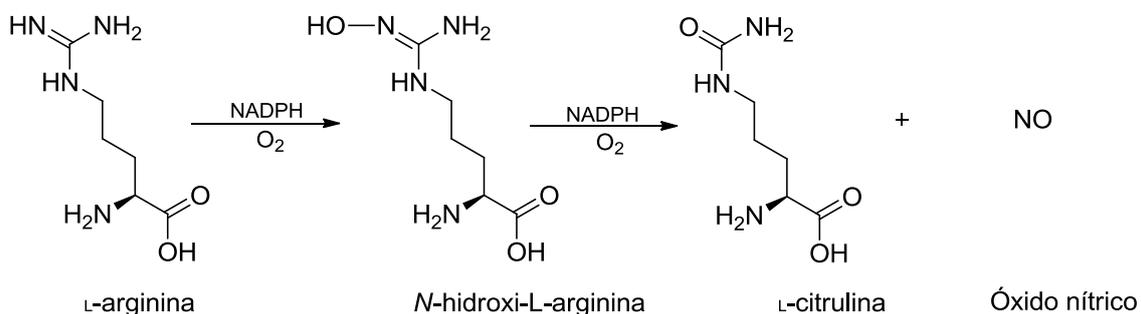


Assim como os radicais hidroxila e os radicais superóxidos, o radical óxido nítrico também pode levar a lesões celulares. Algumas implicações podem ocorrer como inflamação, câncer e outras condições patológicas (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991). O óxido nítrico é considerado uma das moléculas mais simples biossintetizadas e é considerado um radical livre por possuir oito elétrons no átomo de oxigênio e sete elétrons no átomo de nitrogênio, restando

então, um elétron desemparelhado (BECKMAN e KOPPENOL, 1996; MORRIS e BILLIAR, 1994).

A síntese endógena do óxido nítrico (**Figura 3**) passa pela reação de oxidação de um dos nitrogênios guanidínicos da *L*-arginina. Na primeira etapa um desses nitrogênios passa por uma hidroxilação resultando na formação da *N*-hidróxi-*L*-arginina. A reação é dependente de NADPH e oxigênio (O₂) e especula-se que é nessa etapa que envolve a ação da NO-sintase, uma heme proteína do citocromo P450, numa reação típica de *N*-hidroxilação catalisada por enzimas desse complexo. Na segunda etapa, além da dependência do NADPH e do O₂, a reação utiliza a flavina adenina dinucleotídeo, flavina mononucleotídeo e a tetraidrobiopterina como cofatores para formação da *L*-citrulina e do NO (MARLETTA, 1993).

Figura 3 – Síntese endógena do óxido nítrico.



Geralmente o organismo se defende quando há formação, em quantidades fisiológicas, de radicais livres. Ele possui inúmeros mecanismos para se defender do estresse oxidativo, com o desencadeamento de apoptose (MCCONKEY, 1998), visto que as vias clássicas de apoptose ocorrem por acúmulo moderado de espécies reativas de oxigênio.

A apoptose pode ser definida como sendo a morte celular programada, que provoca a morte da célula para evitar alterações celulares que levam a prejuízos ao organismo como, por exemplo, o desenvolvimento de um câncer (ZHOU e ELLEDGE, 2000). A apoptose pode ser induzida por uma grande quantidade de estímulos dos quais podemos citar o estresse oxidativo que

pode ser gerado por fatores internos ou externos ao organismo (MATÉS e SÁNCHEZ-JIMENEZ, 2000).

Nas células viáveis, comandos apoptóticos permanecem “inativos”. A proteína inibidora de apoptose neuronal (NAIP) presente no sistema nervoso central é responsável por essa função. Dessa forma, não haverá morte celular enquanto não houver estímulos de morte e ligação aos receptores de apoptose da célula (RAFF *et al.*, 1993; AMEISEN *et al.*, 2002). Este é um processo que ocorre de forma eficaz e é necessário para a manutenção das populações celulares (LEIST e JAATTELA, 2001).

A ocorrência de um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a capacidade do organismo em neutralizá-los gera o estresse oxidativo e, para compensar, há um aumento das defesas enzimáticas antioxidantes. Todavia, quando o organismo não consegue controlar a grande produção de radicais livres, podem ocorrer danos e até morte celular (ANDERSON, 1996). A etiologia de várias doenças como as cardiopatias, aterosclerose, problemas pulmonares, doenças neurodegenerativas e processos mutagênicos e carcinogênicos podem estar relacionados aos danos induzidos por radicais livres (AMES *et al.*, 1993; POULSEN *et al.*, 1998; WITZUM, 1994).

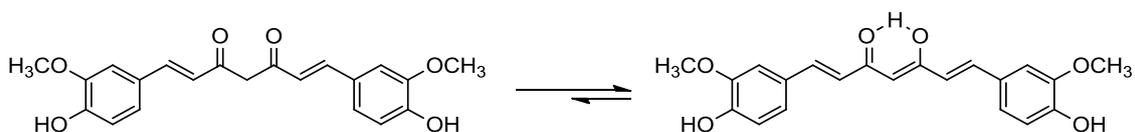
Um dos mecanismos de defesa contra as ERO é exercido por compostos antioxidantes oriundos da dieta ou compostos sintéticos. Dessa forma pode-se dizer que substâncias antioxidantes são responsáveis pela inativação de radicais livres de forma a minimizar ou evitar danos celulares (HALLIWELL *et al.*, 1995). Substâncias com propriedades antioxidantes têm sido largamente estudadas em razão de sua ação quimioprotetora e seu potencial terapêutico para tratamento e/ou prevenção de diversos tipos de doenças. Dentre as substâncias antioxidantes encontradas em alimentos pode-se citar as vitaminas A, C e E, a clorofilina, os flavonóides, carotenóides e a curcumina (STAVRIC, 1994), além de várias classes de origem sintética.

1.1 Curcumina e seus análogos

A curcumina é um pigmento amarelo-alaranjado extraído da raiz do açafrão-da-Índia (*Curcuma longa*) que tem sido utilizado há séculos como especiaria na culinária asiática. A curcumina apresenta uma variedade de atividades biológicas incluindo atividade antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana, neuroprotetora, antidiabética e antiangiogênica. Algumas dessas atividades podem estar relacionadas às suas propriedades antioxidantes. A curcumina sequestra os radicais livres e ERO agindo, assim, na proteção das biomoléculas (lipídeos, proteína, DNA) contra o estresse oxidativo (ANAND *et al.*, 2008; WEBER *et al.*, 2005a).

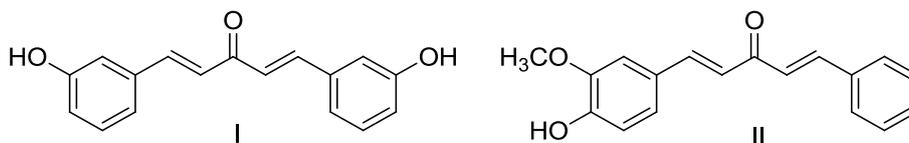
A curcumina se apresenta quimicamente como um composto bis- α,β -insaturado e possui em sua estrutura duas hidroxilas fenólicas e dois grupos metoxilas ligados aos anéis aromáticos (**Figura 4**). Além disso, exibe uma cadeia heptadiena com dois grupos que podem atuar como aceptores de Michael. Existe em solução como uma mistura em equilíbrio entre uma dienona simétrica e um tautômero ceto-enólico, estabilizado por ligação de hidrogênio (ANAND *et al.*, 2008; WEBER *et al.*, 2005a).

Figura 4 - Curcumina e representação do equilíbrio ceto-enólico estabilizado por ligação de hidrogênio.



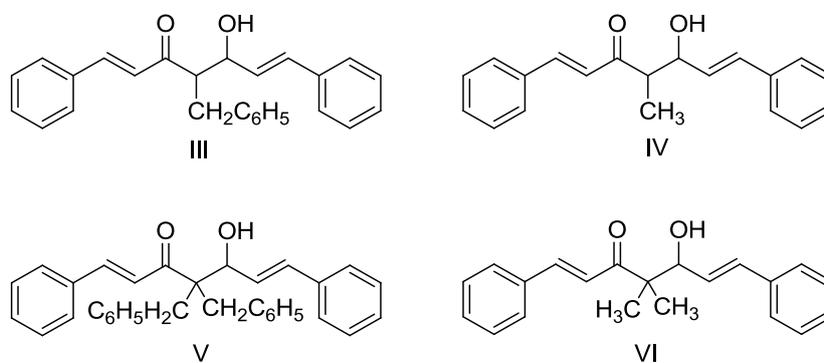
Inicialmente se pensava que a atividade antioxidante da curcumina e seus análogos estaria condicionada apenas à presença de grupos fenólicos. Entretanto, há exemplos de análogos contendo um grupo fenólico que não apresentam atividade antioxidante. Compostos fenólicos como **I** e **II**, por exemplo (**Figura 5**), não apresentaram atividade significativa quando comparados com o protótipo, a curcumina (WEBER *et al.*, 2005).

Figura 5 – Derivados fenólicos da curcumina com baixa atividade antioxidante.



Com o objetivo de encontrar o farmacóforo da curcumina, novos análogos foram avaliados quanto à atividade antioxidante. Derivados sem substituintes no anel apresentaram atividade antioxidante considerável quando comparados com o protótipo. Esses compostos, estruturas III e IV (**Figura 6**), apresentam um grupo alquila ligado ao carbono metínico central. Já os compostos V e VI, apresentando um carbono central tetrassubstituído não apresentaram atividade. Com base nesses resultados sugere-se que a presença de um hidrogênio no carbono central é essencial para a atividade antioxidante (WEBER *et al.*, 2005; LITWINIENKO e INGLOD, 2004).

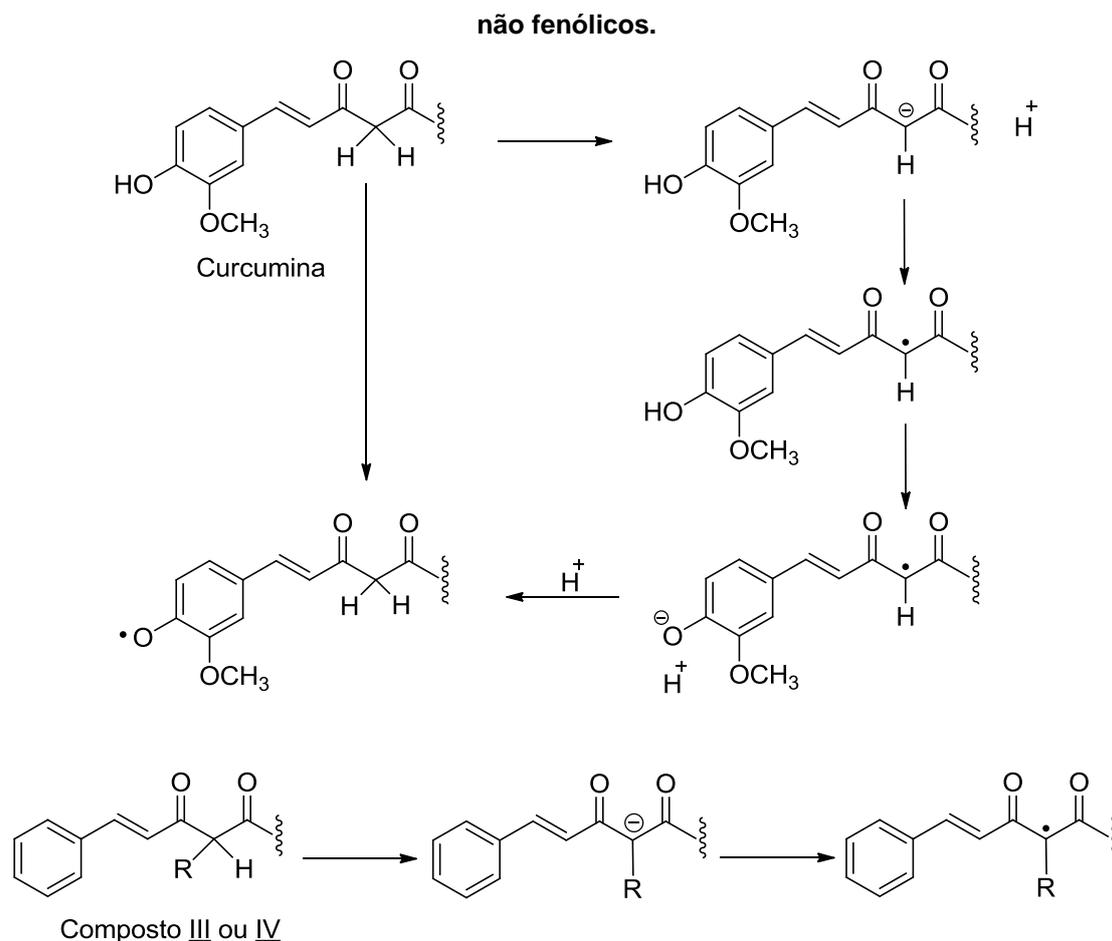
Figura 6 – Análogos da curcumina mono e dialquilados no carbono central.



De acordo com estudos realizados por Litwinienko e Inglood, a formação de radicais livres a partir da curcumina pode ocorrer por dois mecanismos: a) formação de um radical fenoxila estável *via* abstração do hidrogênio fenólico ou b) ionização inicial do próton ácido do metileno central, seguido por transferência de elétrons para a formação de um carbono radicalar que poderá isomerizar a radical fenoxila (**Figura 7**). Em comparação com os compostos III e IV monoalquilados é possível a formação do radical no carbono central, o que não seria possível nos compostos dialquilados V e VI, já que não apresentam

um hidrogênio ácido nessa posição (LITWINIENKO e INGLOD, 2004). Portanto, a presença de tais grupos facilita a formação de radicais, protegendo as biomoléculas susceptíveis e justificando, assim, ação antioxidante da curcumina e seus análogos.

Figura 7 – Mecanismo de ação de neutralização de radicais da curcumina e análogos



Com relação à atividade antitumoral apresentada pela curcumina, acredita-se que se deva à sua capacidade em induzir a apoptose por inibir a atividade de fatores de transcrição (FT). Esses FT estão inativos e quando ativados são deslocados em direção ao núcleo para se ligarem a genes específicos. Um desses FT é o fator nuclear kappa β (NF- κ B) que é expresso em todos os tipos celulares e desempenha uma ampla variedade de papéis vitais na inflamação, imunidade, proliferação celular, migração e apoptose (DAS e VINAYAK, 2012; MONTERA, 2007; SEN, e BALTIMORE, 1986).

NF- κ B corresponde a um heterodímero formado por duas subunidades de proteínas, uma de 50 kDa, a proteína p50 ou NF- κ B1 e outra de 65 kDa, a proteína p65 (ou RelA). Em organismos que não possuem leucócitos, por exemplo, insetos, os dímeros do NF- κ B podem ocorrer em combinações heterodiméricas (p50/p105, p100/p129) e nos mamíferos podem ocorrer combinações homodiméricas (p50/p50). Posterior à identificação do NF- κ B, foi isolada outra proteína de 60 a 70 kDa denominada I κ B, com atividade inibitória, cuja associação é específica a dímeros de NF- κ B para a formação de trimeros (p50/p60/I κ B) impedindo a ligação do NF- κ B com DNA quando este está no núcleo. Por ser um complexo de tamanho maior, a forma trimérica é retida no citoplasma não sendo translocada para o núcleo (BAEUERLE e BALTIMORE, 1988).

Devido ao seu variado estímulo de ativação e a quantidade de genes que o regula, o fator de transcrição NF- κ B possui uma quantidade bem maior de ações que os demais fatores de transcrição até então elucidados (GLEZER *et al.*, 2000).

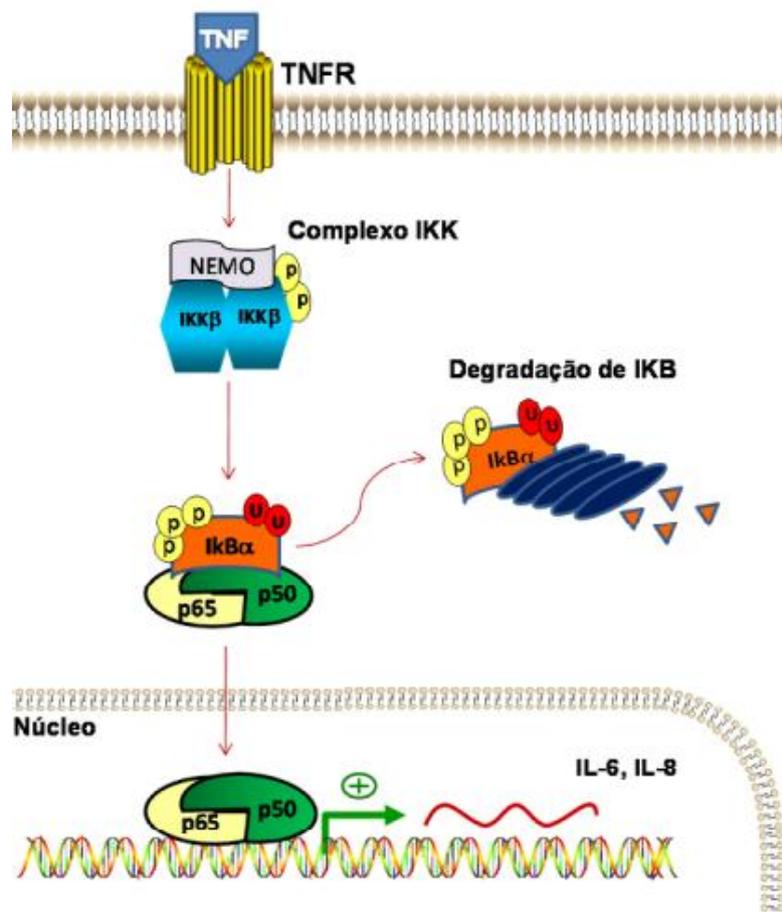
Para que o NF- κ B seja ativado e atinja o núcleo é necessário a conversão da forma trimérica na forma dimérica, que pode ser realizada por três vias de sinalização, e isso só é possível após fosforilação de duas serinas da I κ B, serina 32 e serina 36. Após a fosforilação, a porção inibitória, I κ B, é então degradada. Como mecanismo indireto de ativação, a porção NF- κ B também é fosforilada. Dessa forma, o NF- κ B está ativado e pode ser translocado para o interior do núcleo e exercer sua ação de regulador de transcrição gênica (MERIKA *et al.*, 1998)

Apesar do seu variado estímulo de ativação as vias de sinalização do NF- κ B são apenas três, a via clássica ou canônica, a via alternativa ou não canônica e uma via atípica.

Na **via clássica** há a participação do complexo IKK. Do complexo IKK participam subunidades catalíticas IKK α e IKK β e ainda uma subunidade IKK γ , conhecida como NEMO. Essas subunidades se agrupam como homo ou

heterodímero e são responsáveis por fosforilar as IKBs (KARIN e BENNERIAH, 2000). A IKK β realiza a fosforilação da IKB α (**Figura 8**) levando à sua degradação por proteassoma e a liberação do heterodímero p50/RelA. É por essa via que o NF- κ B é ativado pela maioria de seus estímulos como TNF, IL-1, e LPS de bactérias gram-negativas (BEG *et al.*, 1995).

Figura 8 – Mecanismo de ativação do NF- κ B pela via clássica (CECON, 2010).



A **via alternativa** é induzida por linfotóxina B, levando à ativação da IKK α pela quinase (NIK), indutora de NF- κ B. Essa indução levará a fosforilação da subunidade p100 e processamento desta a p52. Nesta via o dímero que será descolado será o Rel1B/p52. A ativação dessa via está relacionada aos processos de desenvolvimento, maturação e seleção de linfócitos B e T e participam da diferenciação de células dendríticas, apresentadoras de antígeno (BURKLY *et al.*, 2007).

Em relação à terceira via, a **via atípica**, sua ativação se dá pelo reconhecimento de DNA danificado. Esses danos podem ser oriundos de radiação ultravioleta, estímulos redox de radicais livres ou em situação de hipóxia. Um mecanismo independente com complexo IKK é ativado levando à fosforilação de IKB. Nessa via também haverá desprendimento do complexo IKK do NF- κ B, porém sem haver degradação do complexo IKK por proteassoma (TERGAONKAR, 2006).

A ativação e a translocação nuclear de NF- κ B pode resultar de uma série de fatores externos ou internos, incluindo uma ampla gama de estímulos tais como citocinas, fatores de crescimento, tirosina-quinases, toxinas bacterianas, infecção viral, estresse oxidativo e alguns produtos químicos farmacêuticos. A ativação do NF- κ B pelo estresse oxidativo é uma importante causa na progressão do câncer. O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, levando a modificação nas propriedades bioquímicas de biomoléculas nas células, o que resulta na disfunção fisiológica. Um dos oxidantes geradores dessa disfunção é o H₂O₂ que normalmente é convertido em água pelas enzimas, catalase e GPx (glutathione peroxidase). O que ocorre é que no estresse oxidativo o sistema de defesa antioxidante está esgotado e o peróxido de hidrogênio que era para ser degradado continua provocando danos oxidativos além de serem potentes ativadores do NF- κ B (SUBUDHI e CHAINY, 2010).

Há evidências de que uma das funções dos ERO é atuar como segundos mensageiros envolvidos na ativação do NF- κ B, em resposta a estímulos, tais como citocinas e fatores de crescimento que, por sua vez, ativam genes nos estágios iniciais da progressão do ciclo celular (DAS e VINAYAK, 2012).

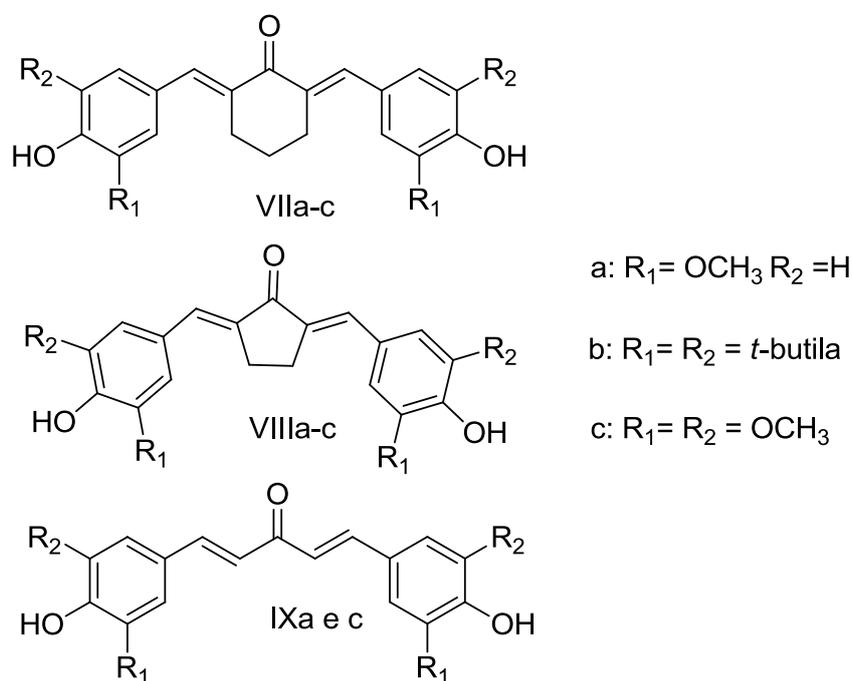
Estudos mostram que o NF- κ B é um importante regulador da transcrição de proteínas oncogênicas e que a adição de antioxidantes ou numa superexpressão de enzimas antioxidantes, pode levar à inativação do NF- κ B e até a prevenção do câncer.

Estudos realizados por Das e colaboradores mostraram o papel anticancerígeno da curcumina pela modulação da ativação de NF- κ B por meio da defesa antioxidante. Foi demonstrado que a produção intracelular de H₂O₂ em microambiente oxidativo promove a ativação do NF- κ B. A curcumina é capaz de inibir o estado oxidativo por perturbar o ciclo vicioso da produção de ERO, responsável pelo elevado microambiente oxidativo para o crescimento do tumor, ou seja, a remoção de H₂O₂ é considerada um passo eficaz na inibição do aparecimento do tumor e pode evitar a metástase.

Conforme citado acima, a curcumina apresenta um grande potencial como antioxidante e antitumoral, entretanto, suas aplicações ainda são bem limitadas, uma vez que ela possui sensibilidade em meio alcalino, a tratamento térmico, a íons metálicos e possui baixa solubilidade em água. Além disso, a curcumina apresenta propriedades farmacocinéticas inadequadas, como baixa absorção por via oral e é rapidamente metabolizada e eliminada (LIN *et al.*, 2009; MISHRA, MOHAMMADA e MISHRA, 2008; PARAMERA, KONTELES e KARATHANOS, 2011). Para contornar esses problemas, vários análogos da curcumina estão sendo sintetizados e avaliados e, alguns deles, serão descritos a seguir.

Apesar da importância para a atividade antioxidante do grupo metileno ácido presente na estrutura da curcumina, esse grupo confere instabilidade em valores de pH acima de 6,5. Para contornar esse problema, Sardjiman e colaboradores sintetizaram uma série de análogos da curcumina (**Figura 9**), resultando na obtenção de compostos mais estáveis e mantendo as propriedades antioxidantes (SARDJIMAN *et al.*, 1997).

Figura 9 – Série de análogos da curcumina mais estáveis sem a presença do grupo metileno.



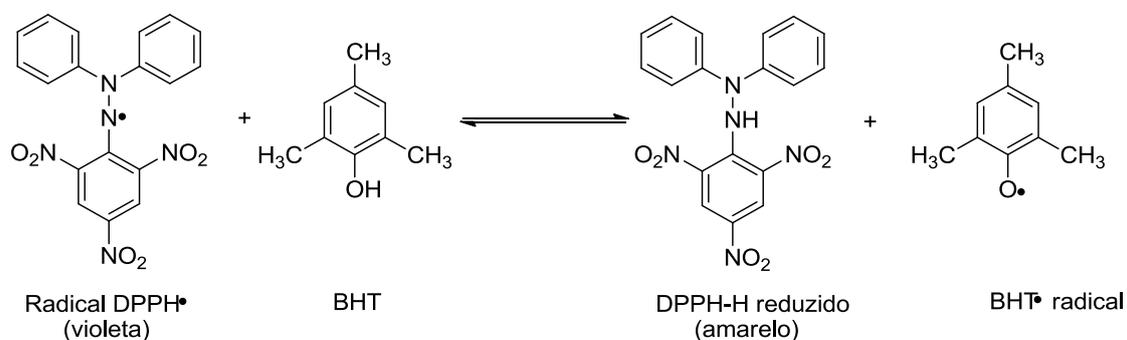
A remoção do carbono metilênico em IXa diminuiu sua potência quando comparado com a curcumina. Os derivados VIIb e VIIIb apresentaram baixa atividade quando comparados com os análogos VIIa e VIIIc. Com base em estudos adicionais, observou-se uma redução da acidez da hidroxila fenólica quando grupos volumosos, como o grupo *t*-butila, estão próximos, alterando, assim, parâmetros físico-químicos e dificultando a formação do radical nessa posição por impedimento estérico. Portanto, grupos volumosos em R1 e R2 podem diminuir a potência dos compostos sintetizados. Dentre os análogos testados, VIIc e VIIIc apresentaram maior potência antioxidante.

Em 2012, Lam e colaboradores avaliaram a atividade antioxidante de análogos da curcumina com base na sua capacidade em atuar como armadilha para radical DPPH (2,2-difenil-1-picrisil-hidrazina) (*DPPH radical scavenging*) e inibir a atividade de NO (LAM *et al.*, 2012).

O método *DPPH radical scavenging* é muito utilizado para avaliação da atividade antioxidante e baseia-se no princípio de que o radical DPPH[•] capta

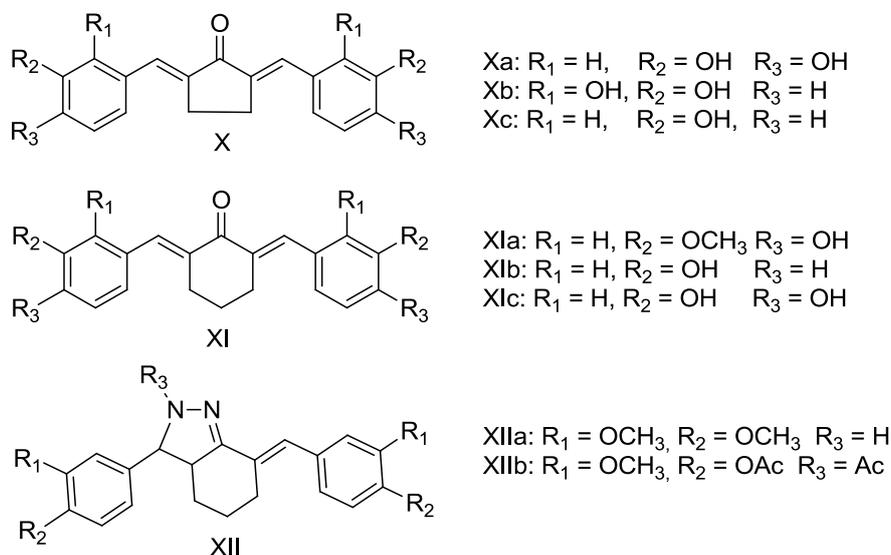
um radical hidrogênio de uma molécula antioxidante (OLIVEIRA, VALENTIM e GOULART, 2009), por exemplo, o BHT (butil hidroxitolueno), um antioxidante sintético comumente utilizado nas formulações cosméticas (LANGE, HEBERLÉ e MILÃO, 2009) (**Figura 10**), para se tornar uma molécula mais estável. O DPPH reduzido apresenta uma coloração amarela, enquanto o radical DPPH[•] apresenta coloração violeta. Dessa forma, a medida da capacidade de redução do composto antioxidante poderá ser medida espectrometricamente por meio da leitura da absorvância. Quanto mais amarelo, maior a capacidade antioxidante do composto.

Figura 10 – reação entre o antioxidante BHT e o radical DPPH[•].



Utilizando esse método, Lam e colaboradores avaliaram a atividade antioxidante de uma série de 33 derivados de 2,6-bisbenzilidenos-cicloalcanonas e pirazolina (**Figura 11**) (LAM *et al.*, 2012).

Figura 11 – Exemplos de alguns análogos da curcumina avaliados com antioxidantes e inibidores da atividade de NO.

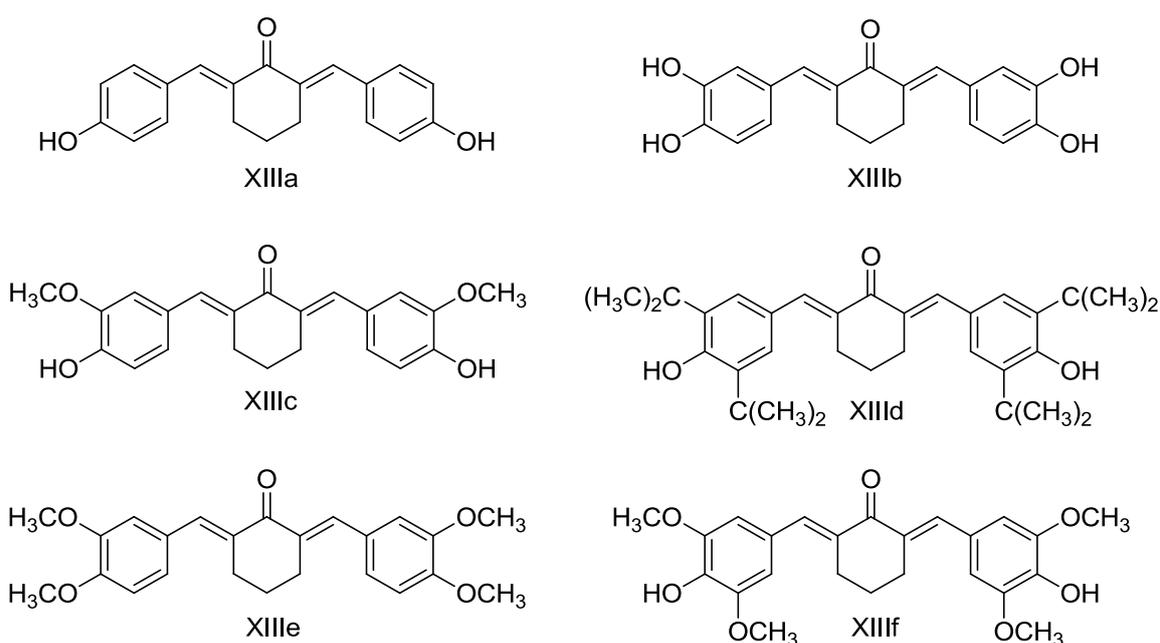


Nesse estudo ficou demonstrado que compostos contendo hidroxilas fenólicas vizinhas apresentaram melhor atividade frente à captura do radical DPPH. Os compostos Xa, Xb e Xlc, por exemplo, apresentaram resultados comparáveis ao do controle positivo, quercetina, ($CI_{50} = 21,46 \pm 0,85 \mu M$) com valores de $CI_{50} = 13,27 \pm 1,78, 14,81 \pm 2,09$ e $20,71 \pm 1,11 \mu M$, respectivamente. Já os compostos que não possuem hidroxilas em posições adjacentes apresentaram atividade bem inferior, com CI_{50} entre 50 a 75 μM . Já no teste de inibição de produção de NO, os compostos XIa e XIb suprimiram a produção de óxido nítrico com valores de CI_{50} de $6,68 \pm 0,16$ e $6,09 \pm 0,46 \mu M$, respectivamente, se mostrando quase quatro vezes mais potente que a curcumina que apresentou CI_{50} de $21,58 \pm 2,06 \mu M$. A maior rigidez da estrutura contendo o anel ciclohexanona, além de maior estabilidade pela ausência do hidrogênio metilênico ácido, pode ter contribuído na modulação dos parâmetros físico-químicos, justificando, assim, a maior atividade de XIa e XIb. Nesse estudo, observou-se, também, que a atividade dos compostos estava relacionada ao seu valor de coeficiente de partição (P), representado na forma de $\log P$. Compostos apresentando valores de $\log P$ inferiores a 5, foram mais ativos com relação à inibição de NO, o que pode estar relacionado, também, à melhores características físico-químicas. Por fim, os derivados de pirazolínicos foram planejados na tentativa de mimetizar o grupo dicetônico existente na

curcumina, todavia todos os derivados foram menos ativos que as bis(benzilideno)alcanonas correspondentes. Uma explicação para a menor atividade dos derivados pirazolínicos seria pela violação de algumas das regras de Lipinski incluindo $\log P$ e peso molecular. Os compostos XIIIa e XIIIb, por exemplo, apresentaram valores elevados de $\text{Log}P$ (maior que 5), e peso molecular acima de 500 g/mol, superior aos valores preconizados por Lipinski (LIPINSKI, 2001). Mesmo assim, intercambiar o grupo carbonila do anel ciclohexano por um anel pirazolínico, é uma possibilidade interessante e que merece novas investigações com uma nova série de compostos, pois, apesar da baixa atividade dos derivados pirazolínicos, eles se destacaram por apresentar baixa citotoxicidade.

Com relação à atividade citotóxica, vários análogos da curcumina já foram testados avaliando a inibição do crescimento e apoptose de células tumorais de próstata humana PC-3 (WEI, X *et al.*, 2012) (**Figura 12**). Dentre os compostos avaliados, os compostos XIIIb-XIII f foram os mais potentes, sendo capazes de inibir o crescimento das células PC-3 em 87%, 78%, 95%, 82% e 85%, respectivamente, quando testados na concentração de 5 μM , enquanto a curcumina, na mesma concentração, inibiu apenas 66% do crescimento.

Figura 12 – Estruturas das substâncias XIIIa-XIII f.



Nesse caso, ao contrário do observado por Sardjiman e colaboradores (**Figura 12**) (SARDJIMAN *et al.* 1997), a presença do grupo *tert*-butila foi importante para a atividade citotóxica, sendo o análogo XIIIId um dos mais promissores nesse estudo. Pode-se concluir, também, que, corroborando com os resultados descritos por Lam e colaboradores (**Figura 12**) (LAM *et al.*, 2012), o aumento da atividade do composto XIIIc, quando comparado à curcumina, pode estar associado ao aumento da rigidez da molécula pela presença do anel ciclohexanona, conferindo maior estabilidade à molécula. Todos os análogos testados, com exceção de XIIIa, apresentaram atividade citotóxica mais potente e efeitos mais pronunciados na via apoptótica de células PC-3, em comparação com a curcumina.

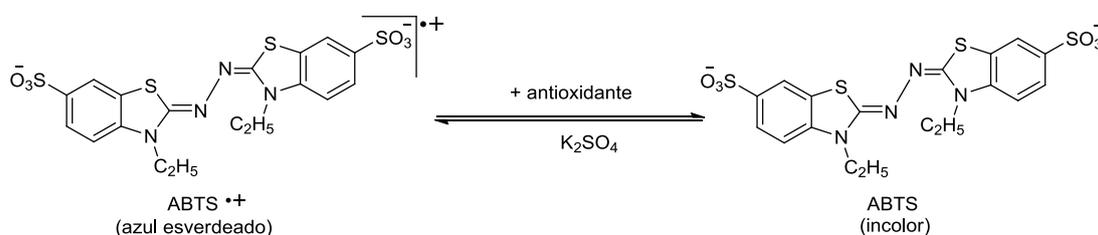
A avaliação da indução de apoptose de células PC-3 pela curcumina resultou num pequeno aumento de células apoptóticas. Já o tratamento com os compostos XIIIa-XIIIId estimulou a apoptose em células PC-3 de um modo dependente da concentração. Os compostos XIIIb e XIIId demonstraram melhores efeitos sobre a apoptose em comparação com os outros compostos. O efeito desses dois compostos mais ativos sobre a ativação de caspase-3, uma protease pro-apoptótica, em comparação com a curcumina foi também determinado. O tratamento de células PC-3 com a curcumina causou apenas um pequeno aumento na atividade da caspase-3, enquanto que o tratamento com XIIIb e XIIId causou um aumento de aproximadamente 8 vezes na atividade de caspase-3 (WEI, X *et al.*, 2012).

Associado a esses resultados, foi possível, também, estabelecer uma correlação entre ativação do fator κ B com diminuição da via apoptótica e aumento de crescimento celular. Quando as células PC-3 foram tratadas com a curcumina e o análogo XIIIa, observou-se apenas ligeira diminuição na atividade do fator κ B. Ao ser avaliado com os análogos XIIIb-XIIIId percebeu-se que houve uma maior diminuição na atividade de transcrição de fator κ B, com conseqüente inibição de crescimento celular e estimulação da via apoptótica. Pode-se concluir, portanto, que substâncias antioxidantes apresentam potencial uso terapêutico no tratamento de doenças associadas à ação do NF- κ B, no sentido de inibir sua ação. Entretanto, novos análogos são

necessários para um melhor estudo de relação estrutura e atividade (WEI, X *et al.*, 2012).

Bayomi e colaboradores descreveram um estudo explorando as atividades antioxidante e antitumoral de derivados da curcumina (BAYOMI *et al.*, 2013). Vinte e quatro novos derivados foram preparados utilizando a curcumina como protótipo. Os compostos foram testados contra células de carcinoma hepático (hepatite G2), células de fibroblasto de pulmão humano (WI38), células epiteliais de rim de macaco (VERO) e células de adenocarcinoma de mama humano (células MCF-7). Para a avaliação da atividade antioxidante utilizou-se a capacidade da substância de capturar o radical (ABTS^{•+}), conforme fundamento ilustrado na **Figura 13**. Nesse ensaio, a medida da capacidade antioxidante de um composto é medida espectrometricamente, por meio da leitura da absorvância. Quanto menor a intensidade da cor, maior a capacidade antioxidante do composto.

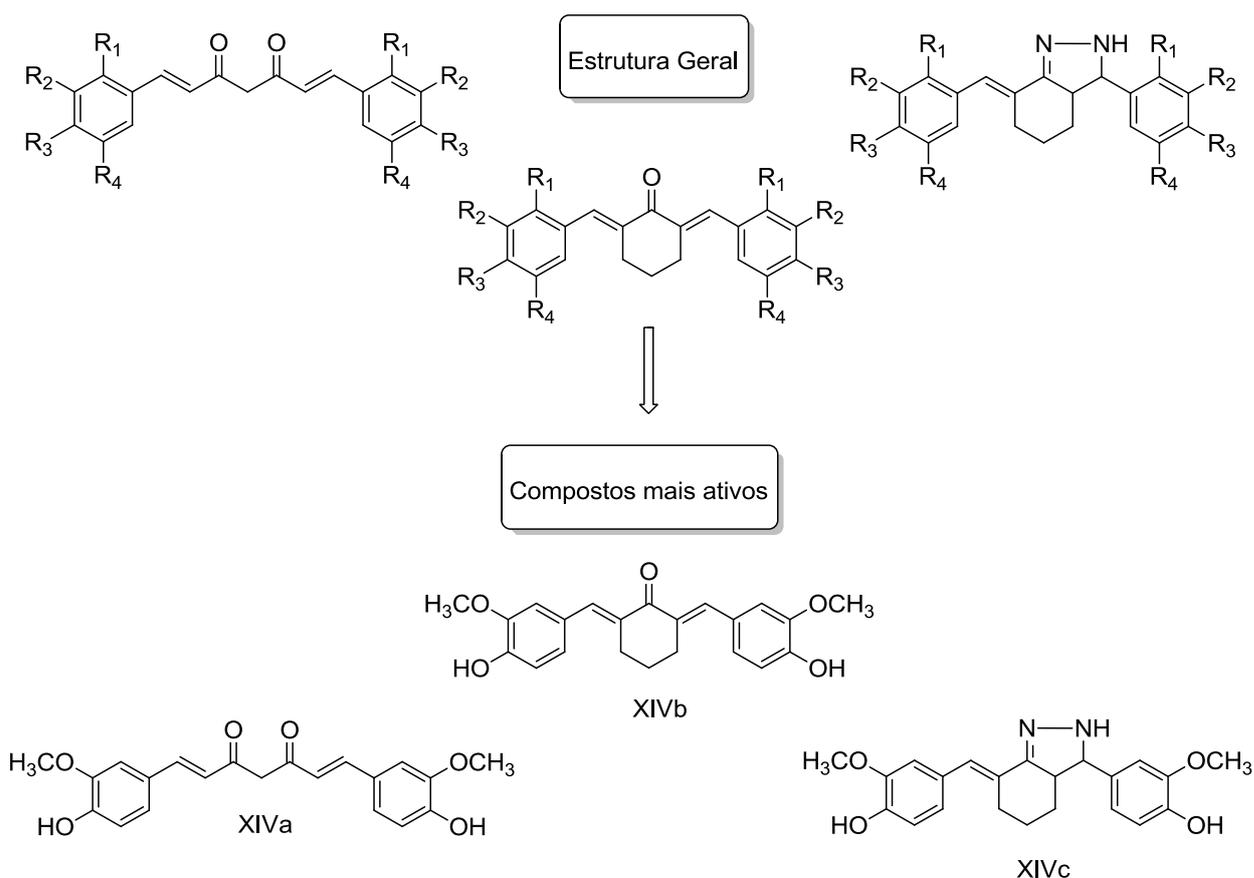
Figura 13 – Formação do radical ABST e sua redução por um agente antioxidante (HUANG, e PRIOR, 2005).



Dentre os compostos sintetizados os que apresentaram melhor resultado de atividade citotóxica e melhor atividade quanto a capacidade de sequestrar o radical ABTS foram os que possuíam metoxila vizinha à hidroxila na posição 4 do anel aromático (**Figura 14**). A porcentagem de células viáveis, após tratamento com XIVa, XIVb e XIVc, na concentração de 20 μ M, foi de 47%, 28%, 21% para células (hepatite G2), 78%, 58% 65% para células (W138), 55%, 32%, 19% para células MCF-7 e 82%, 69%, 12% para células (VERO), respectivamente. Além dos compostos não terem sido ativos contra todas as linhagens em estudo, o composto XIVc apresentou alta toxicidade para células

VERO com viabilidade celular de apenas 12%. No teste de avaliação da atividade antioxidante, os mesmos compostos XIVa-XIVc apresentam inibição de mais de 50% do radical ABTS^{•+}, isso mostra uma boa correlação entre ação antioxidante e atividade antitumoral.

Figura 14 – Compostos apresentando atividade citotóxica e antioxidante mais promissora.



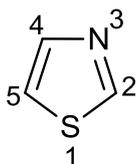
Apesar desse e de outros estudos (ATMANI *et al.*, 2011; VECCHIA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2006; CAI *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 1998), a correlação entre as atividades antioxidante e antitumoral é um assunto que merece ser abordado com maior profundidade, pois, em alguns casos, os resultados são ainda conflitantes (BOOT *et al.*, 2012).

1.2 Heterociclos Tiazólicos

Além da curcumina e seus derivados, outra classe de substâncias com atividade antioxidante e antitumoral promissora e bastante explorada pela indústria farmacêutica são os heterociclos (MINH-AN, *et al.*, 2014; HASSAN, 2012; MOHANA e KUMAR, 2013; SHIH, SU e WU, 2007).

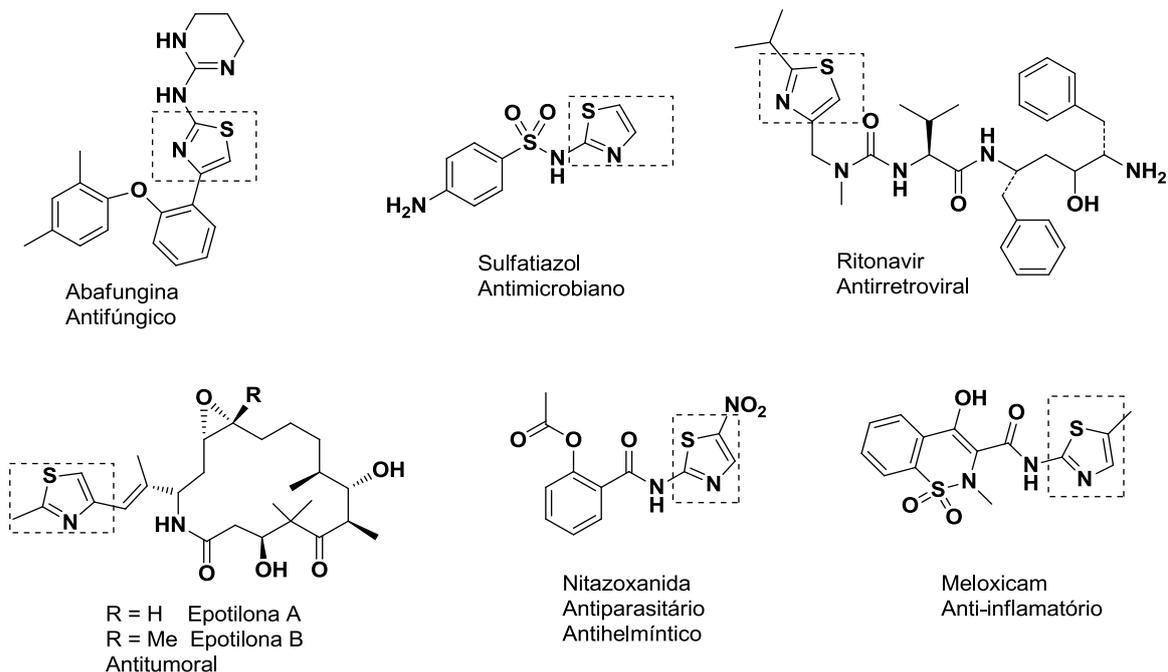
Desses, merecem destaques, os heterociclos tiazólicos (**Figura 15**) por representam uma classe importante de compostos heterocíclicos que vêm sendo investigada por muito tempo em razão de suas significativas propriedades medicamentosas.

Figura 15 – Núcleo tiazolínico.



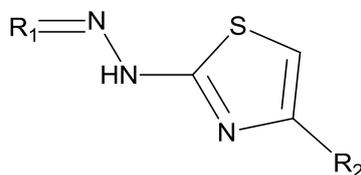
Derivados tiazólicos têm atraído a comunidade científica por estarem presentes em uma variedade de produtos naturais e moléculas biologicamente ativas, tais como abafungina, sulfatiazol, ritonavir, epotilonas, nitazoxanida e meloxicam (KASHYAP *et al.*, 2012; GULSORY e GUZELDEMIRCI, 2007) (**Figura 16**), apresentando uma diversidade de atividades biológicas como antibacterianos, antifúngicos, anti-HIV, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, anticancerígeno, anticonvulsivante, antihelmintico, antidepressivo e atividade antituberculose (BHUSARI *et al.*, 2000; GONG *et al.*, 2014; KASHYAP *et al.*, 2012; MARUSAWA *et al.*, 1999; PAGET *et al.*, 1969; SINGH *et al.*, 2010;).

Figura 16 – Exemplos de derivados tiazólicos biologicamente ativos.



Dentre os heterociclos tiazólicos, merecem destaque os hidrazino-tiazóis (**Figura 17**), derivados cíclicos de tiossemicarbazonas. A facilidade de síntese, alto rendimento, baixo custo e variedade de ações farmacológicas tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral, antituberculose e citotóxica (MAHLER *et al.*, 2006; ABDEL-WAHAB, ABDEL-AZIZ e AHMED, 2009), tornam essa classe bastante promissora na Química Medicinal.

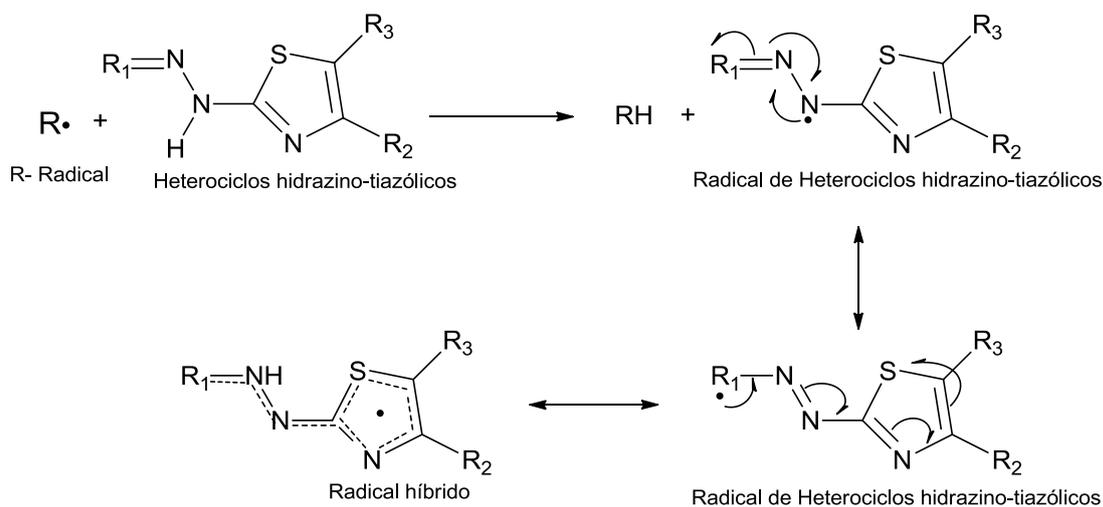
Figura 17 – Estrutura geral dos hidrazino-tiazólicos.



Shih e colaboradores estudaram a atividade antioxidante de hidrazino-tiazólicos utilizando os métodos de DPPH e ABTS descritos anteriormente (**Figuras 10 e 13**) e concluíram que a presença do grupo N-H na porção hidrazino é importante para a atividade, em razão da possibilidade de formação de um radical nessa posição (**Figura 18**). Dessa forma, esses compostos podem atuar

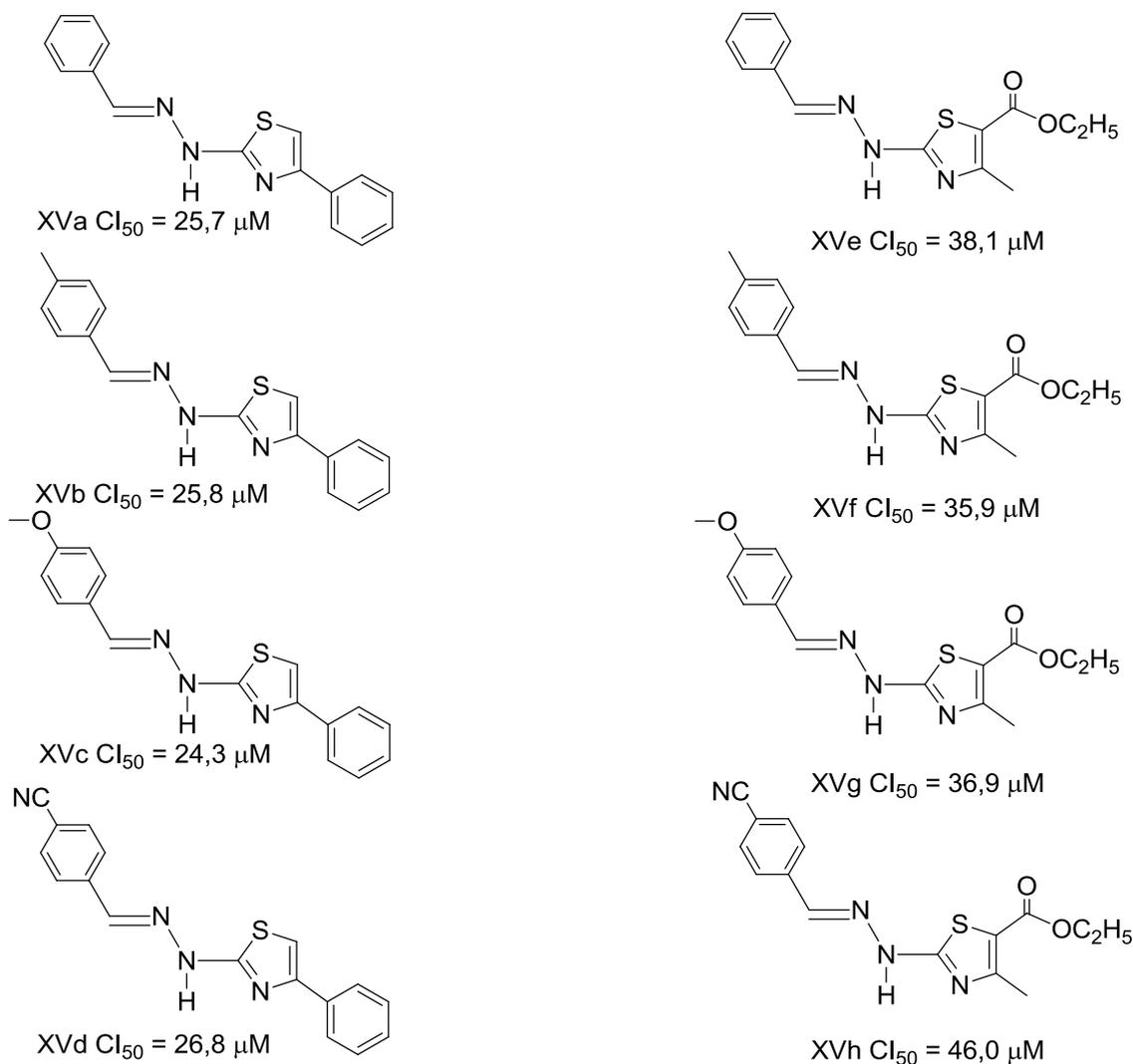
como agentes antioxidantes por reagir rapidamente com radicais livres, neutralizando-os e evitando, assim, danos às biomoléculas (SHIH, SU e WU, 2007).

Figura 18 – Reação dos derivados tiazólicos com um radical.



Estudos experimentais avaliaram a atividade antioxidante de alguns derivados hidrazino-tiazólicos (**Figura 19**) e, com base nos resultados, foi possível identificar alguns compostos com atividade bastante promissora (SHIH, SU e WU, 2007). Os compostos XVa-XVd, causaram diminuição instantânea da absorvância do DPPH, ou seja, apresentou boa atividade antioxidante e semelhante à vitamina E ($CI_{50} = 26,3 \mu M$), o que sugere uma boa ação antioxidante dessa série de compostos. Já os compostos XVe-XVh, com substituinte éster no anel tiazólico, causaram redução gradual do radical DPPH indicando uma reatividade mais lenta quando comparados com a substância de referência. Essas observações sugerem que os compostos da série XVa-XVd se apresentam como bons sequestradores de radicais livres (MOHANA e KUMAR, 2013; SHIH, SU e WU, 2007).

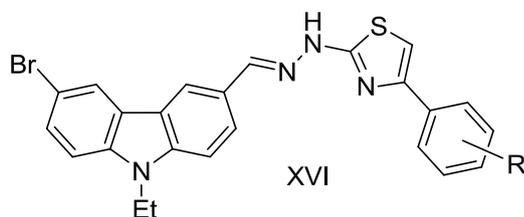
Figura 19 – Derivados hidrazino-tiazólicos com atividade antioxidante avaliada.



Estudos recentes mostraram que os heterociclos hidrazino-tiazólicos apresentaram resultados promissores quando testados contra três linhagens de células tumorais MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), HT29 (carcinoma de cólon) e A549 (adenocarcinoma de pulmão humano) (MINH AN, *et al.*, 2014). Nesse trabalho, a atividade antioxidante dos compostos também foi avaliada utilizando o método do radical DPPH. Os resultados obtidos se mostram animadores, com três compostos apresentando Cl_{50} contra uma das células tumorais, na faixa de micromolar baixo ($< 10 \mu\text{M}$) e, no caso da atividade antioxidante, seis compostos foram mais ativos quando comparados ao controle positivo, o BHT ($Cl_{50} = 207 \mu\text{M}$). Os resultados de atividade dos

compostos mais ativos nesse estudo estão ilustrados na **Figura 20**. Observe-se uma boa correlação entre a atividade citotóxica e antioxidante.

Figura 20 - Derivados hidrazino-tiazólicos apresentando atividade citotóxica e antioxidante.



Atividade citotóxica

- a R = 4-CH₃ Cl₅₀ = 7,8 μM (Células HT29)
- b R = 3-NO₂ Cl₅₀ = 9,7 μM (Células A549)
- c R = 4-CN Cl₅₀ = 8,5 μM (Células A549)

Atividade antioxidante

- BHT Cl₅₀ = 207 μM
- a R = 4-CH₃ Cl₅₀ = 86 μM
- c R = 4-CN Cl₅₀ = 158 μM
- d R = H Cl₅₀ = 111 μM
- e R = 4-OCF₃ Cl₅₀ = 139 μM
- f R = 4-Cl Cl₅₀ = 141 μM
- g R = 4-Br Cl₅₀ = 172 μM

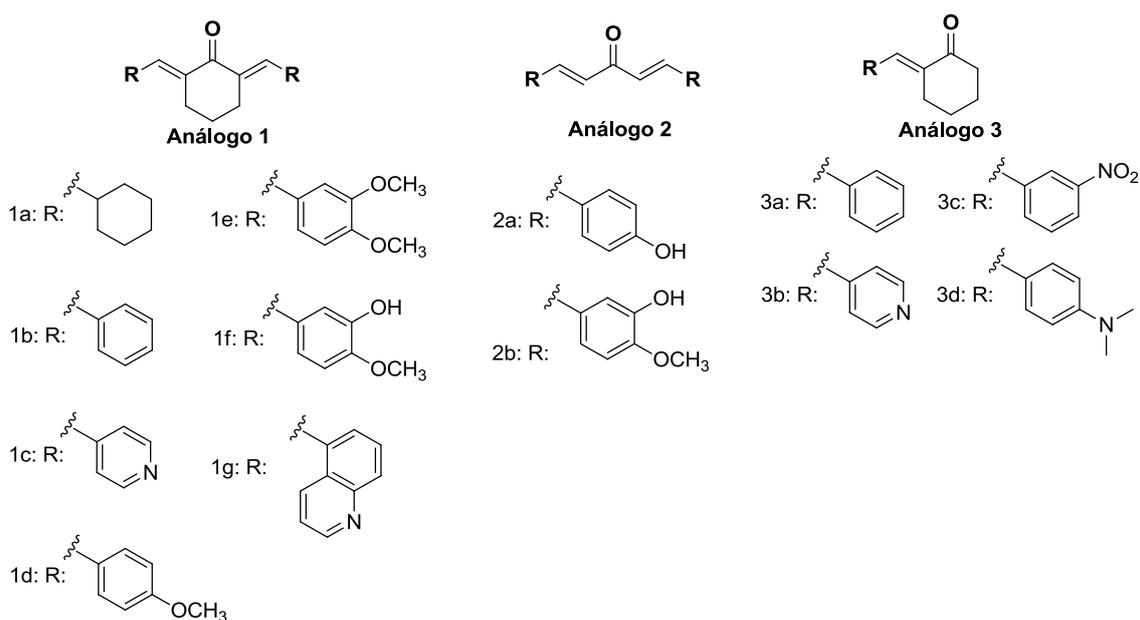
Com base nos exemplos mostrados, é possível concluir que os heterociclos hidrazino-tiazólicos apresentam grande potencial farmacológico e a síntese de novos derivados se torna, portanto, de interesse.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente a correlação entre agentes antioxidantes e radicais livres se tornou relevante devido ao surgimento de várias doenças decorrentes de espécies radicalares. Apesar dos radicais, em pequena quantidade, serem desejáveis para um bom funcionamento do organismo, seu aumento pode levar a diversos danos celulares como a aterosclerose, inflamações crônicas, Alzheimer e ainda pode gerar lesões no DNA, RNA e proteínas causando citotoxicidade e tumores (JIMENÉZ *et al*, 2000).

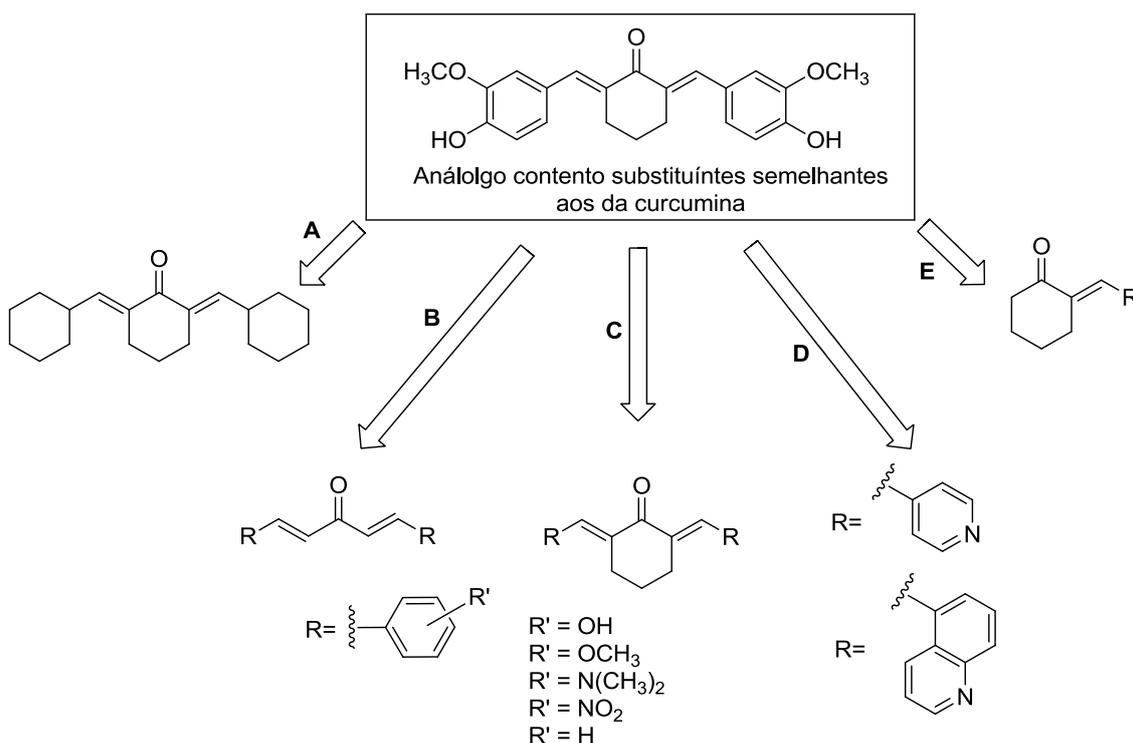
Nesse sentido, a curcumina e seus análogos bis(benzilideno)alcanonas representam uma classe bastante relevante que, apesar de largamente estudada, merece investigações adicionais na busca por análogos mais efetivos, apresentando melhores características físico-químicas, baixa toxicidade e conhecimentos adicionais sobre relação estrutura-atividade e/ou mecanismo de ação. A estrutura dos novos análogos (**Figura 21**) foi planejada utilizando-se a ciclohexanona e diversos aldeídos via reação de condensação aldólica.

Figura 21 – Estrutura química dos análogos da curcumina planejados.



A importância do sistema aromático e a presença do anel central ou uma cadeia alifática pentadienila foi investigada. Assim, o anel aromático foi substituído por uma cadeia alifática cíclica (**Figura 22**) (etapa A) e o anel central ciclohexanona foi substituído por uma cadeia aberta (etapa B). Substituição por outros grupos, que não contenham um hidrogênio ácido, foi planejada para confirmar a importância do fenol (etapa C). Substituição do anel aromático por um sistema heterocíclico também foi planejado (etapa D) para avaliar a importância desse grupo na molécula. Derivados monossubstituídos foram sintetizados para fins de comparação (etapa E).

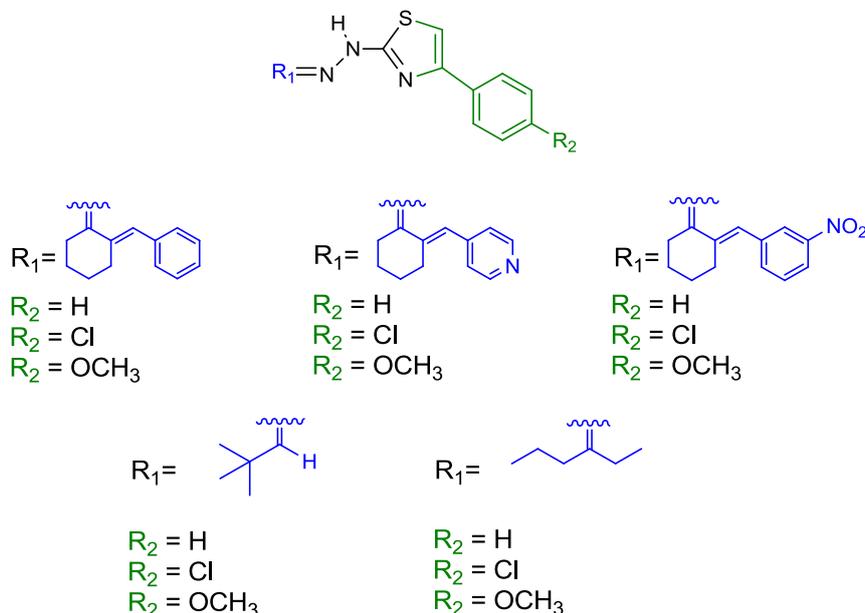
Figura 22 – Nova série de análogos da curcumina para estudos de REA



Outra classe que merece destaque, nesse contexto, são os heterociclos hidrazino-tiazólicos que se mostram bastante promissoras com base no pouco que já foi investigado. A grande possibilidade de variação dos substituintes ligados à porção hidrazino-tiazólica torna possível a obtenção de uma diversidade de novos análogos com consequente modulação de parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos, essenciais para um bom candidato a fármaco. A estrutura dos derivados tiazólicos (**Figura 23**) foi planejada

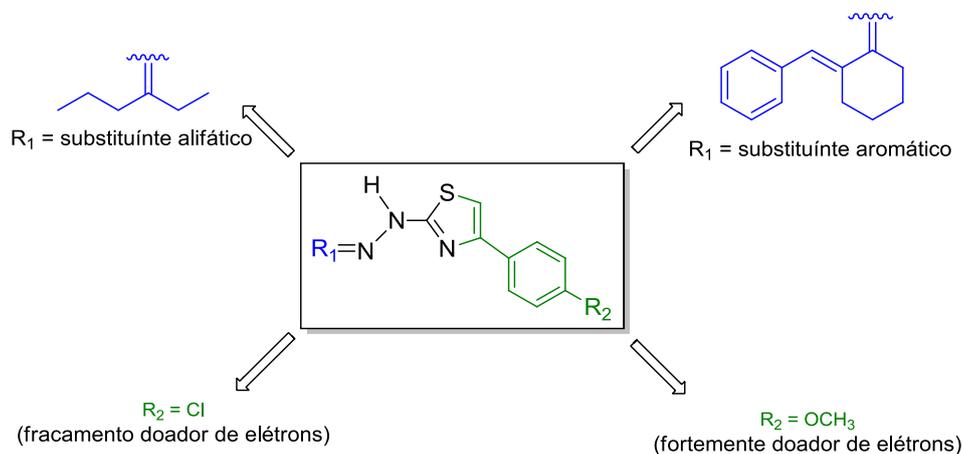
utilizando-se a tiossemicarbazida e uma variedade de cetonas e aldeídos e alfa-bromoacetofenona.

Figura 23 – Estrutura química dos heterociclos hidrazino-tiazólicos planejados.



Os heterociclos hidrazino-tiazólicos foram planejados com o intuito de se avaliar o efeito dos substituintes na atividade biológica. Planejou-se, então, a obtenção de derivados contendo substituintes alifáticos, aromáticos, doadores ou retiradores de elétrons. Análogos não substituídos foram considerados para fins de comparação (**Figura 24**).

Figura 24 – Exemplos de substituintes ligados ao anel hidrazino-tiazólico planejados para estudos de REA.



Associada às justificativas acima abordadas, outro quesito que merece ser ressaltado é a praticidade e facilidade de síntese das bis(benzilideno)alcanonas e dos hidrazino-tiazólicos. Em Química Medicinal essa vantagem é extremamente importante, pois permite o desenvolvimento de novas moléculas bioativas com baixo custo e possibilidade de produção em larga escala.

Com base no exposto, objetivou-se, no presente trabalho, a síntese e a avaliação das atividades antioxidante e citotóxica de uma série de derivados da curcumina e heterociclos tiazólicos.

3 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e avaliar as atividades antioxidante e citotóxica de análogos da curcumina e heterociclos hidrazino-tiazólicos.

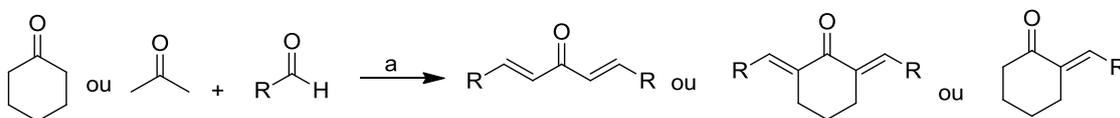
3.1 Objetivos específicos

- a - Sintetizar derivados da curcumina *via* reação de condensação aldólica;
- b - Sintetizar heterociclos tiazólicos partindo-se de condensação de carbonilas de aldeídos e cetonas com tiossemicarbazidas e posterior ciclização;
- c - Sintetizar derivados da curcumina e heterociclos contendo diferentes substituintes para estudos de relação estrutura-atividade;
- d - Avaliar *in vitro* a atividade antioxidante das moléculas sintetizadas;
- e - Avaliar a citotoxicidade das substâncias sintetizadas frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas;
- f - Avaliar a citotoxicidade das substâncias contra células normais, utilizando modelo de células Vero e calcular o índice de seletividade;

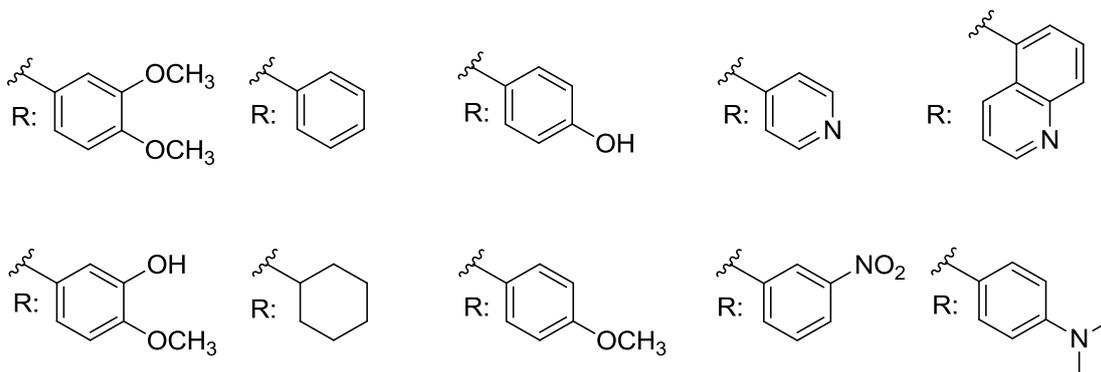
4 PLANO DE SÍNTESE

A etapa-chave para obtenção das bis alcanonas consiste em uma reação de condensação aldólica, utilizando-se ciclohexanona ou acetona e uma variedade de aldeídos alifáticos e aromáticos (variação do grupo R – **Esquema 1**). A obtenção dos derivados mono ou dissustituídos foi proposta variando-se a proporção do aldeído e da cetona presente no meio da reação.

Esquema 1– Rota de síntese proposta para a obtenção dos análogos da curcumina.

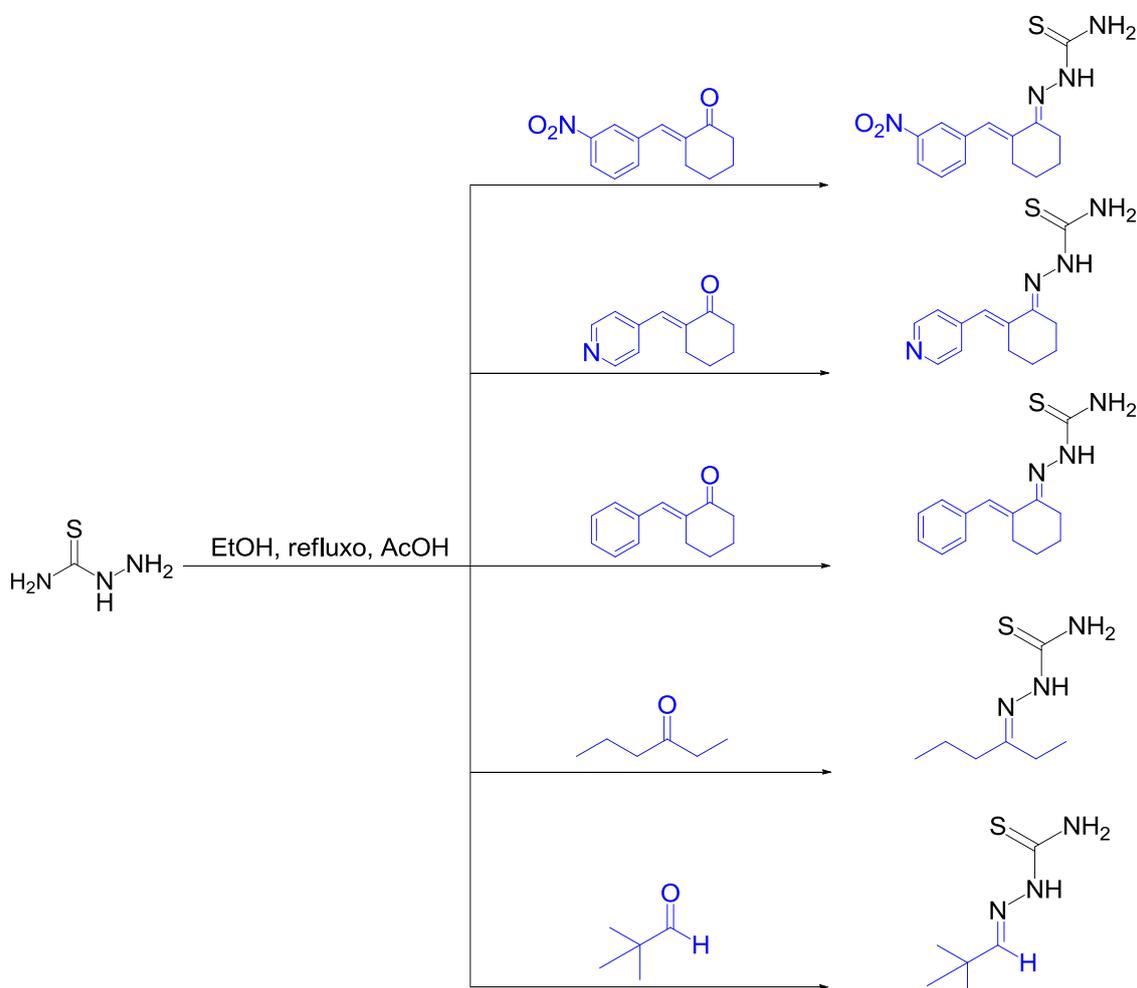


a = NaOH, EtOH ou HCl



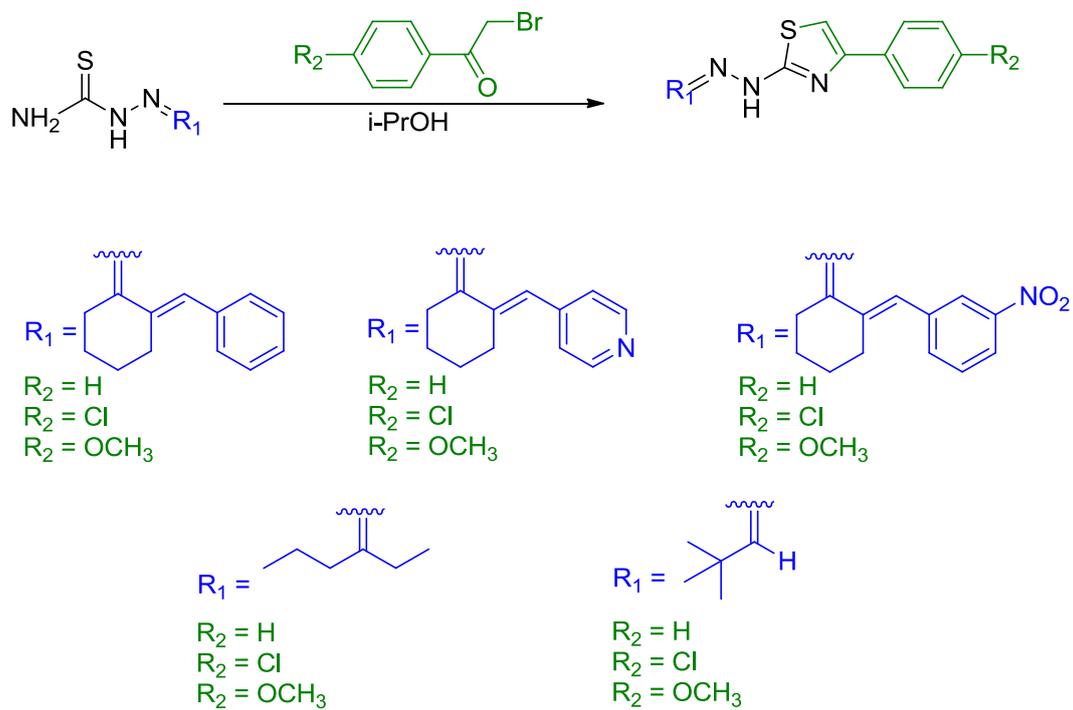
A obtenção dos derivados hidrazino-tiazólicos foi proposta em duas etapas. Inicialmente, cetonas e aldeídos alifáticos são submetidos à reação de condensação com a tiossemicarbazida para obtenção das tiossemicarbazonas correspondentes (**Esquema 2**).

Esquema 2 – Rota de síntese proposta para a obtenção das tiossemicarbazonas.



Posteriormente, as tiossemicarbazonas obtidas na etapa anterior, são submetidas à reação com alfa-bromo-acetofenona substituída ou não substituída para obtenção dos heterociclos tiazólicos (**Esquema 3**).

Esquema 3– Rota de síntese proposta para a obtenção dos heterociclos hidrazino-tiazólicos.



5 MATERIAIS E MÉTODOS

As temperaturas das faixas de fusão das substâncias sintetizadas foram determinadas em aparelho Microquímica MQAPF 301 no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG e não foram corrigidas.

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro com transformada de Fourier Spectrum One Perkin Elmer, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT 135 foram realizados em aparelho Bruker AVANCE DPX200, no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução – LAREMAR, no Departamento de Química da UFMG. Para o processamento dos espectros foi utilizado o programa TOPSPIN 1.3 – Bruker.

Para atribuição das bandas dos espectros no IV bem como dos sinais dos espectros de RMN utilizou-se como base as referências Silverstein e colaboradores e Pavia e colaboradores (PAVIA, LAMPMAN e KRIZ, 2001; SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005).

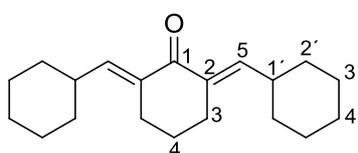
Para análise em cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se sílica gel 60 G Merck[®] em camadas de 0,25 mm de espessura sobre placas de vidro. Para cromatografia em coluna de sílica (CCS) utilizou-se sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/70-230 mesh) Merck[®].

Utilizou-se como reveladores vapores de iodo, solução de ninhidrina 0,3% p/v em álcool etílico, solução de 2,4-dinitrofenilidrazina 1% p/v em álcool metílico contendo 3% de ácido sulfúrico concentrado e solução de CAM contendo 5% p/v de molibdato de amônio, 14% v/v de H_2SO_4 , 1% p/v de sulfato de cério em solução aquosa.

Os ensaios para avaliação da atividade citotóxica foram realizados em colaboração com Professora Elaine Maria de Souza Fagundes do Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados em colaboração com a Professora Renata Adriana Labanca do Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia da UFMG.

5.1 Síntese de 2,6-bis-(ciclohexilmetileno)-ciclohexanona (**1a**)



1a

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 69 mg (0,7 mmol) de ciclohexanona, foram adicionados 314 mg (2,80 mmol) de ciclohexanocarboxaldeído e 2 mL de etanol. Posteriormente, 15 gotas de solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L foram adicionadas à mistura e o balão foi mantido sob agitação em temperatura ambiente. Após 1 hora de reação, observou-se a formação de uma fase imiscível e a análise por CCD (eluente: hexano/acetato 6:4, reveladores: 1) vapor de iodo, 2) solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento) revelou a presença de um produto e dos materiais de partida. Adicionaram-se então 4 gotas de THF, para completa solubilização do reagente e, após 40 minutos, observou-se o consumo completo da cetona e do aldeído de partida. Adicionaram-se à mistura, gelo e água gelada e transferiu-se para o congelador por 4 horas. A mistura foi extraída com acetato de etila (3 x 30 mL). Reuniram-se as fases orgânicas e adicionou-se sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e ao solvente foi removido em evaporador rotatório, obtendo-se 132 mg de uma mistura do produto e de um subproduto. O resíduo obtido foi então purificado por CCS (eluente: hexano 100% e hexano/acetato de etila 99:1). Foram obtidos 102 mg (51% de rendimento) do produto **1a** na forma de um sólido amarelo claro e ceroso.

FM: C₂₀H₃₀O

MM: 286,2297 g/mol

FF: 76,3-77,5 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2920, 2843 ($sp^3\text{C-H}$), 1674 (C=O), 1622 (C=C), 1594, 1444 (C=C arom.).

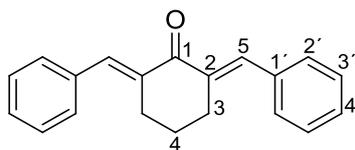
RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 6,63 (2H, d, $J_{5,1'} = 10$ Hz, 2 x H-5); 2,52-2,48 (4H, m, 2 x H-3); 2,25 (2H, m, 2 x H-1'); 1,72-1,63 (10H, m, 2 x H-4, 8 x H-2'); 1,25-1,21 (12H, 8 x H-3', 4 x H-4').

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 190,45 (C=O); 145,46 (2 x C-5); 134,29 (2 x C-2); 37,35 (2 x C-1'); 31,96 (4 x C-2'); 26,46 (2 x C-3), 26,08 (2 x C-4'); 25,83 (4 x C-3'); 22,84 (C-4).

5.2 Metodologia geral para a síntese das bis-(arilmetilidenos)-ciclohexanonas 1b, 1c, 1e e 1g (WEBER *et al.*, 2005a).

Em um balão de fundo redondo contendo 2 equivalentes do aldeído correspondente, 1 equivalente de ciclohexanona e 1 mL, por equivalente da ciclohexanona, de álcool etílico 95%, adicionou-se lentamente 1 mL, por equivalente, de solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L (0,2 mmol). A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente até que o consumo dos reagentes fosse observado por CCD. Ao final da reação a elaboração foi feita eliminando-se parte do solvente e o precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

5.2.1 Síntese de 2,6-bis-(benzilideno)-ciclohexanona (1b)



1b

Foram obtidos 77 mg (77% de rendimento) de **1b**, na forma de um sólido amarelo, conforme metodologia descrita na seção 5.2, após 30 minutos de reação. A reação foi acompanhada por CCD utilizando hexano/acetato 6:4 como eluente e 1– vapor de iodo, 2 – 2,4 dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento, como reveladores.

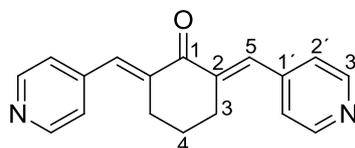
FM: C₂₀H₁₈O

MM: 274,1358 g/mol

FF.: 112-113,3 °C; F.FLit.:113,2-114,4 (BRAGA, 2012)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3056 (sp^2 C-H), 2932, 2862 (sp^3 C-H), 1665 (C=O), 1604 (C=C), 1574, 1488, 1443 (C=C arom.).

5.2.2 Síntese de 2,6-bis-(piridin-4-ilmetileno)-ciclohexanona (1c)



1c

Foram obtidos 130 mg (75% de rendimento) de **1c**, na forma de um sólido amarelo, de acordo com metodologia geral descrita na seção 5.2, após 1 hora de reação. A reação foi acompanhada por CCD utilizando acetato de

etila/metanol 8:2 como eluente e 1) vapor de iodo; 2) 2,4 dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento, como reveladores.

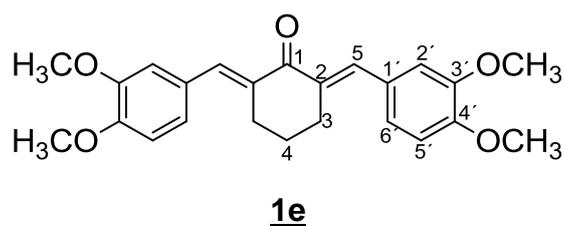
FM: C₁₈H₁₆N₂O

MM: 276,1263 g/mol

FF.: 144,9-145,2 °C; FF.: lit 142,3-144,5 (VATSADZE *et al.*, 2006)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3052, 3020 (sp^2 C-H), 2941, 2890, 2837 (sp^3 C-H), 1666 (C=O), 1611 (C=C), 1590, 1576, 1542 (C=C arom.).

5.2.3 Síntese de 2,6-bis-(3,4-dimetoxibenzilideno)-ciclohexanona (1e)



Foram obtidos 69 mg (69% de rendimento) de **1e**, na forma de um sólido amarelo, seguindo a metodologia descrita na seção 5.2, após 3 horas de reação. A reação foi acompanhada por CCD utilizando diclorometano/metanol 99:1 como eluente 1 – vapor de iodo; 2 – 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento, como reveladores.

FM: C₂₄H₂₆O₅

MM: 394,1780 g/mol

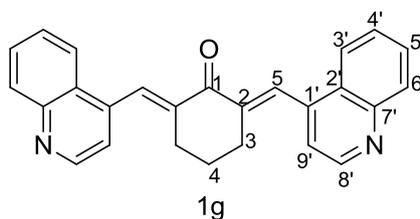
FF: 141,8-143,1 °C; FF Lit.: 138-140 °C (DU *et al.*, 2006)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3074 (sp^2 C-H), 2989, 2931, 2837 (sp^3 C-H), 1651 (C=O), 1594, 1575 (C=C), 1510, 1448 (C=C arom.), 1245, 1136 (C-O).

RMN de ^1H (200 MHz, MeOD), δ /ppm: 7,75 (2H, s, 2 x H-5); 7,12 (2H, dd, $J_{6',5'} = 8$ Hz; $J_{6',2'} = 2$ Hz, 2 x H-6'); 7,02 (2H, d, $J_{2',6'} = 2$ Hz 2 x H-2'); 6,90 (2H, d, $J_{5',6'} = 8$ Hz, 2 x H-5'); 3,92 (3h, s, OCH_3); 3,91 (OCH_3); 2,96-2,91 (4H, m, 4 x H-3); 1,89-1,78 (2H, m, H-4).

RMN de ^{13}C (50 MHz, MeOD), δ /ppm: 189,93 (C=O); 149,76 (2 x C-3'); 148,83 (2 x C-4'); 136,70 (2 x C-5); 134,58 (4 x C-2); 129,10 (2 x C-1'); 123,91 (2 x C-6'), 114,01 (2 x C-2'); 111,16 (2 x C-5'); 55,93 (4 x OCH_3); 28,45 (2 x C-3); 23,03 (C-4).

5.2.4 Síntese de 2,6-bis-(quinolin-4-ilmetileno)-ciclohexanona (**1g**)



1g

Seguindo a metodologia geral da seção 5.2, foram obtidos 93 mg (93% de rendimento) de **1g**, na forma de um sólido amarelo cristalino. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila/metanol 7:3 e como reveladores: 1 – vapor de iodo; 2 – 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento.

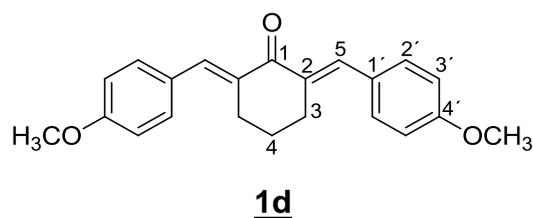
FM: $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$

MM.: 376,1576 g/mol

FF: 156,2-157,2 °C; FF Lit.: 153,4-154,3 (BRAGA, 2012).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3056 (sp^2 C-H); 2957 (sp^3 C-H); 1672 (C=O); 1613 (C=C); 1580, 1562, 1504 (C=C arom.).

5.3 Síntese de 2,6-bis-(4-metoxibenzilideno)-ciclohexanona (**1d**)



A um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 44 mg (0,45 mmol) de ciclohexanona e 120 mg (0,88 mmol) de 4-metoxibenzaldeído, foram adicionados 30 mg (0,089 mmol) de ácido *p*-toluenosulfônico (TSA). A mistura reagente foi mantida sob agitação à 80 °C. Após 2 horas de reação observou-se o completo consumo dos reagentes por CCD (eluente: diclorometano/hexano 96:4; reveladores 1) vapor de iodo, 2) solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento). Adicionou-se água destilada (aproximadamente 10 mL) e manteve sob agitação por mais 10 minutos para a solubilização do catalisador TSA. O precipitado formado foi filtrado à vácuo obtendo-se 152 mg de um produto preto e pastoso. O resíduo foi, então, lavado várias vezes com acetona obtendo-se ao final 138 mg (92% de rendimento) de um sólido amarelo claro e cristalino, correspondente ao produto desejado (**1d**).

FM: C₂₂H₂₂O₃

MM: 334,1569 g/mol

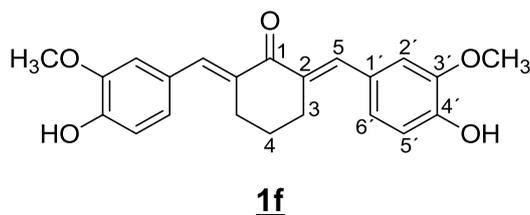
FF: 158-159,4 °C; Lit.: 160-162 °C (JABERI-KARIMI e POOLADIAN, 2012); 160-162 °C (LI *et al.*, 2003)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2939, 2828 (sp^3 C-H), 1657 (C=O), 1592 (C=C), 1553, 1507, 1451 (C=C arom.), 1429, 1417 (dobramento de -CH₂-)

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 7,77 (2H, s, 2 x H-5); 7,45 (4H, d, $J_{2,3} = 10$ Hz, 2 x H-2'); 6,94 (4H, d, $J_{3',2'} = 10$ Hz, 2 x H-3'); 3,84 (6H, s, 2 x OCH₃); 2,92 (4H, t, $J_{3,4} = 6$ Hz, 2 x H-3); 1,80 (2H, q, $J_{4,3} = 6$ Hz 2 x H-4).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6), δ /ppm: 190,20 (C=O); 160,00 (2 x C-4'); 136,59 (2 x C-5); 134,39 (2 x C-2); 132,35 (4 x C-2'); 128,79 (2 x C-1'), 113,99 (4 x C-3'); 55,65 (2 x OCH₃); 28,62 (2 x C-3), 23,11 (C-4).

5.4 Síntese de 2,6-bis-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)-ciclohexanona (**1f**)



Em um balão de fundo redondo contendo 50 mg (0,53 mmol) de ciclohexanona foram adicionados 161 mg (1,06 mmol) de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído e 1,5 mL de etanol. O balão foi mantido em banho de gelo e, em seguida, adicionou-se, gota a gota, 0,06 mL de ácido clorídrico concentrado. A mistura reacional foi mantida sob refluxo e após 2 horas verificou por CCD (eluente: diclorometano/metanol 99,5:0,5% e reveladores: 1) vapor de iodo; 2) 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento) a presença do aldeído de partida. Foram adicionadas mais 20 gotas de ciclohexanona. Após 9 horas de reação verificou-se o consumo completo do aldeído de partida. A mistura de reação foi resfriada à temperatura ambiente e, em seguida, foram adicionados 20 mL de água destilada e extraiu-se com acetato de etila (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram reunidas. Adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e o solvente foi removido em evaporador rotatório. O produto obtido foi recristalizado em solução etanólica 70% resultando em 174,84 mg (93% de rendimento) de **1f**.

FM: C₂₂H₂₂O₅

MM: 366,1467 g/mol

FF: 175,5-176,3 °C; FF lit.: 177–178 °C (WEBER, *et al.*, 2005a); 179-181°C (TANAKA, *et al.*, 1987).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3358 (O-H), 3048 (sp^2 C-H), 2988, 2952, 2928, 2830 (sp^3 C-H), 1639 (C=O), 1575 (C=C), 1513, 1467, 1451 (C=C arom.), 1429, 1395 (dobramento de $-\text{CH}_2-$), 1161, 1127 (C-O).

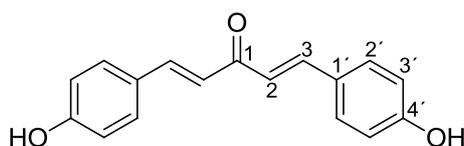
RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 7,57 (2H, s, 2 x H-5); 7,09 (2H, s, 2 x H-2'); 7,02 (2H, d, $J_{6',5'} = 8$ Hz, 2 x H-6'); 6,85 (2H, d, $J_{5',6'} = 8$ Hz, 2 x H-5'); 4,07 (2H, s, 2 x OH); 3,81 (6H, s, 2 x OCH $_3$); 2,88 (4H, m, 2 x H-3); 1,71 (2H, m, H-4)

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 188 (C=O); 147,87 (2 x C-3'); 147,48 (2 x C-4'); 136,24 (2 x C-5); 133,53 (2 x C-1'); 127,01 (2 x C-2), 124,27 (2 x C-2'); 115,60 (2 x 6'); 114,81 (2 x C-5'), 55,65 (2 x OCH $_3$); 28,03 (2 x C-3), 22,65 (C-4).

5.5 Metodologia geral para a síntese das bis-(arilmetilidenos)-ciclohexanonas 2a, 2b, e 2c (DU *et al.*, 2006).

Em um balão de fundo redondo contendo 2 equivalentes do aldeído correspondente e 1 equivalente de acetona foi adicionado 1 mL, por equivalente da ciclohexanona, de álcool etílico 95%. O balão foi mantido em banho de gelo e, em seguida, adicionou-se uma gota de ácido clorídrico concentrado. A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética à temperatura de 40 °C até que o consumo dos reagentes fosse observado por CCD. Ao final da reação a elaboração foi feita adicionando-se 20 mL de água destilada e realizando a extração com acetato de etila (3 x 30 mL). As fases orgânicas foram reunidas, adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e o solvente foi removido em evaporador rotatório.

5.5.1 Síntese de 1,5-bis(4-hidroxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (2a)



2a

Após 2 horas de reação e seguindo a metodologia geral da seção 5.5, observou-se por CCD (eluente: diclorometano/metanol 98:2; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento), a formação de dois produtos e a presença do aldeído de partida. Adicionaram-se então mais 15 gotas de acetona. Após 22 horas de reação, observou-se o consumo completo do aldeído. Foi obtido um resíduo pastoso que foi purificado por CCS (eluentes: diclorometano/metanol 99:1). Foram obtidos 65 mg (65% de rendimento) de **2a**, na forma de um sólido roxo. O segundo produto não foi caracterizado.

FM: C₁₇H₁₄O₃

MM: 266,0943 g/mol

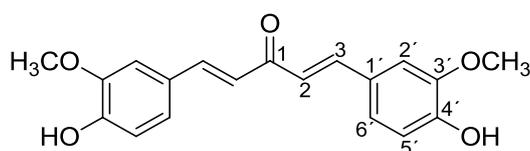
FF: > 300 °C; FF Lit.: > 300 °C (DU *et al.*, 2006)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3158 (O-H), 1634 (C=O), 1593, 1578 (C=C), 1509, 1436 (C=C arom.), 1168, 1119 (C-O).

RMN de ¹H (200 MHz, MeOD), δ/ppm : 7,57 (1H, d, $J_{3,2} = 16$ Hz, 2 x H-3); 7,43 (2H, d, $J_{2,3'} = 8$ Hz, 2 x H-2'); 6,91 (2H, d, $J_{2,3} = 16$ Hz, 2 x H-2); 6,71 (2H, d, $J_{3,2'} = 8$ Hz, 2 x H-3'); 4,8 (2H, s, 2 x OH, sobreposto ao sinal do solvente).

RMN de ¹³C (50 MHz, MeOD), δ/ppm : 191,84 (C=O); 161,66 (2 x C-4'); 145,30 (2 x C-3); 131,82 (4 x C-2'); 127,83 (2 x C-1'); 123,59 (2 x C-2), 117,06 (4 x C-3').

5.5.2 Síntese de 1,5-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (2b) e 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-but-3-en-2-ona (2c)



2b

Seguindo a metodologia descrita na seção 5.5, observou-se por CCD (eluente: diclorometano contendo 0,5 % de metanol; reveladores: 1 - vapor de iodo, 2 - solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento), a formação de dois produtos e a presença do aldeído de partida. Foram adicionadas, então, mais 10 gotas de acetona. Após 30 horas, observou-se o consumo do aldeído. Foram obtidos 282 mg de um resíduo pastoso de cor preta, que foi, posteriormente, purificado por CCS (eluente: diclorometano/metanol 99,7:0,3%). Foram obtidos 182 mg (60,7% de rendimento) de **2b** e 68 mg (22,7% de rendimento) do produto **2c**.

FM: C₁₉H₁₈O₅

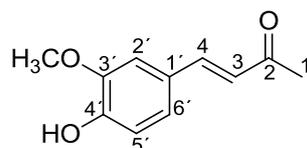
MM: 326,1154 g/mol

FF: 85,5-86,6 °C; FF Lit.: 84–86 °C (WEBER, *et al.*, 2005a); 82-83°C (MASUDA, *et al.*, 1993)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3391 (O-H), 2929 (sp^3 C-H), 1618 (C=O), 1582 (C=C), 1509, 1444, 1451 (C=C arom.), 1425 (dobramento de $-\text{CH}_2-$), 1161, 1127 (C-O).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 9,66 (2H, s, 2 x OH); 7,66 (2H, d, $J_{3,2} = 16$ Hz, 2 x H-3); 7,86 (2H, d, $J_{2',6'} = 2$ Hz, H-2'); 7,21 (2H, dd, $J_{6',2'} = 2$ Hz; $J_{6',5'} = 8$ Hz, 2 x H-6'); 7,15 (2H, d, $J_{2,3} = 16$ Hz, 2 x H-2); 6,64 (2H, d, $J_{5',6'} = 8$ Hz, 2 x H-5'); 3,78 (6H, s, 2 x OCH₃).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 188,04 (C=O); 149,52 (2 x C-3'); 147,97 (2 x C-4'); 142,78 (2 x C-3); 126,37 (2 x C-1'); 123,36 (2 x C-6'), 123,04 (2 x C-2); 115,69 (2 x C-5'); 111,42 (2 x C-2'); 55,73 (2 x OCH₃).



2c

FM: C₁₁H₁₂O₃

MM: 192,0786 g/mol

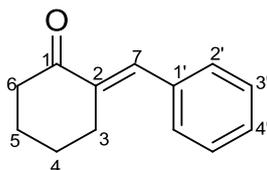
FF: 120-120,9 °C; FF Lit.: 119 °C (JIRÁSEK, *et al.*, 2014); 123-125 °C (WANG *et al.*, 2011)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3241 (O-H), 3002 (sp^2 C-H), 2949, 2849 (sp^3 C-H), 1674(C=O), 1634, 1580 (C=C), 1516, 1465, 1461, (C=C arom.), 1122, 1024 (C-O).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 7,45 (1H, d, $J_{4,3} = 16$ Hz, H-4); 7,10 (1H, s, OH); 7,07 (1H, d, $J_{5',6'} = 8$ Hz, H-5'); 6,92 (1H, d, $J_{6',5'} = 8$ Hz, H-6'); 6,58 (1H, d, $J_{3,4} = 16$ Hz, H-3); 6,25 (1H, s, H-2'); 3,91 (3H, s, OCH₃); 2,36 (3H, s, 3 x H-1).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 198,48 (C=O); 148,60 (C-3'); 147,20 (C-4'); 143,92 (C-4); 127,13 (C-1'); 125,15 (C-3), 123,63 (C-6'); 115,11 (C-5'); 109,78 (C-2'); 56,16 (OCH₃), 27,40 (C-1).

5.6 Síntese de 2-benzilideno-ciclohexanona (3a)



3a

Em um balão de fundo redondo contendo 106 mg (1,08 mmol) de ciclohexanona foram adicionados 57 mg (0,54 mmol) de benzaldeído e adicionou-se, lentamente, 0,5mL de solução de hidróxido de sódio 1 mol/L. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e refluxo por 24 horas. A evolução da reação foi monitorada por CCD (eluyente: acetato de etila/hexano 9:1; reveladores: 1) -vapor de iodo, 2) - solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento). Após término da reação, adicionaram-se 20 mL de

água e extraiu-se o produto com diclorometano (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas, adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. Foram obtidos 92 mg (92% de rendimento) de uma mistura de **3a** mais impurezas que não foi possível a purificação. A mistura foi obtida na forma de um óleo amarelo.

FM: C₁₃H₁₄O

MM: 186,1045 g/mol

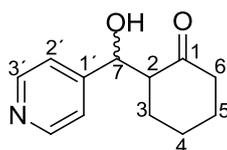
F.F Lit.: 49,4-53,6 °C (FALCK et al, 2006); 36-39 °C (TAKEISHI *et al.*, 2004)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3053, 3023 (sp^2 C-H), 2936, 2863 (sp^3 C-H), 1678 (C=O), 1590, 1572 (C=C), 1490, 1445, (C=C arom.).

5.7 Metodologia geral para a síntese das 2-(arilmetilideno)-ciclohexanona 3b-3d (WEBER *et al.*, 2005).

Em um balão de fundo redondo contendo 2 equivalentes de ciclohexanona e 1 equivalente do aldeído correspondente, adicionou-se lentamente solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L (1 equivalente). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente. A evolução da reação foi monitorada por CCD até observar o consumo completo dos reagentes. Após término da reação, elaborou-se da seguinte maneira, exceto quando especificado: adicionou-se à mistura reagente água gelada e o precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

5.7.1 Síntese de 2-(hidroxi-(piridin-4-il)-metil)-ciclohexanona (3b)



3b

Seguindo a metodologia geral descrita na seção 5.7 e após 2 horas de reação foram obtidos 132 mg (66% de rendimento) de um sólido branco cristalino. A evolução da reação foi monitorada por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 7:3; reveladores: 1) - vapor de iodo, 2) - solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento).

FM: C₁₂H₁₅NO₂

MM: 205,1103 g/mol

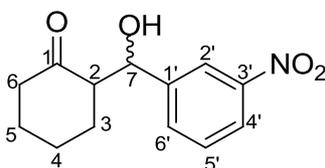
FF: 165,8-166,7 °C; FF Lit.: 108-109 °C (WEBER *et al*, 2005a)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3098 (O-H), 2936, 2859 (sp^3 C-H), 1703 (C=O), 1605 (C=N) 1445, 1413 (C=C arom.), 1121, 1063 (C-O).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 8,46 (2H, d, $J_{3',2'} = 6,0$ Hz, 2 x H-3'); 7,31 (2H, d, $J_{2',3'} = 6,0$ Hz, 2 x H-2'); 5,38 (1H, d, $J_{OH,7} = 4$ Hz, OH); 5,13 (1H, t, $J_{7,OH} = 4$ Hz, H-7); 2,63-2,57 (1H, m, H-2); 2,30-2,26 (2H, m, H-6); 2,09-1,53 (6H, m, H-3, H-4, H5).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 210,28 (C=O); 154,09 (C-1'); 149,45 (2 x C-3'); 121,77 (2 x C-2'); 68,26 (C-7); 56,41 (C-2); 41,84 (C-6); 26,82 (C-5); 25,88 (C-4); 23,94 (C-3).

5.7.2 Síntese de 2-(hidroxil-(3-nitrofenil)-metil)-ciclohexanona (3c)



3c

Seguindo a metodologia geral descrita na seção 5.7 e após 1 hora de reação, foram obtidos 182 mg (91% de rendimento) de uma mistura de **3c** mais impurezas que não foi possível a purificação. A mistura se apresentou na forma de um óleo amarelo. A evolução da reação foi monitorada por CCD (eluente:

hexano/acetato de etila 6:4; reveladores 1) - vapor de iodo, 2) solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina, seguido de aquecimento).

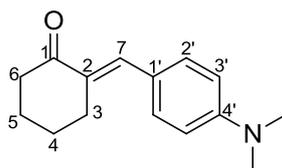
FF:Lit.: 69-71°C (WEBER *et al*, 2005a)

FM: C₁₃H₁₆NO₄

MM: 250,1079 g/mol

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3472 (OH), 3090 (sp^3 C-H), 2940, 2865 (sp^2 C-H); 1697 (C=O), 1524 e 1347 (NO₂ assim. e sim.), 1480, 1448 (C=C arom.).

5.7.3 Síntese de 2-(4-(dimetilamino)-benzilideno)-ciclohexanona (3d)



3d

Seguindo a metodologia geral descrita na seção 5.7, observou o final da reação após 19 horas por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4; reveladores: 1 – vapor de iodo, 2 - solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina. A reação foi mantida sob agitação e refluxo. Após resfriado, adicionou-se 20 mL e fez-se a extração com acetato de etila (3 x 50 mL). As fases orgânicas foram reunidas, adicionou-se sulfato de sódio seguido de filtração. O solvente foi eliminado e o sólido obtido foi recristalizado em solução etanólica 70%. Foram obtidos 192 mg (64% de rendimento) de **3b**, na forma de um sólido alaranjado e cristalino.

FM: C₁₅H₁₉NO

MM: 229,1467 g/mol

FF.: 123,2-124,5 °C; FF lit.: 127,0-127,5° (DU *et al*, 2006)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2964, 2934, 2895, 2807 (sp^2 C-H); 1657 (C=O), 1608 (C=C), 1560, 1516, 1463 (C=C arom.).

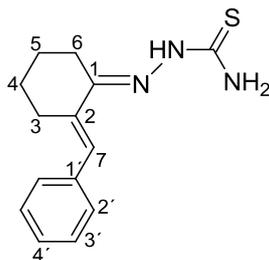
RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 7,74 (1H, s, H-7); 7,37 (2H, d, $J_{2',3'} = 10,0$ Hz, 2 x H-2'); 6,67 (2H, d, $J_{3',2'} = 10$ Hz, 2 x H-3'); 2,98 (6H, s, 2 x CH_3); 2,84 (2H, m, 2 x H-6); 2,64-2,48 (2H, m, 2 x H-3); 1,93-1,69 (4H, m, 2 x H-4, 2 x H-5).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 201,15 (C=O); 150,73 (C-4'); 137,26 (C-7) 132,74 (2 x C-2'); 131,94 (C-2); 123,80 (C-1'); 111,80 (2 x C-3'); 40,23 (2 x CH_3); 40,10 (C-6); 29,23 (C-3), 24,04 (C-4), 23,36 (C-5).

5.8 Metodologia geral para a síntese das tiossemicarbazonas 4a-4d.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 1 equivalente de tiossemicarbazida e 1 equivalente do aldeído ou cetona correspondente, adicionou-se, gota a gota, ácido acético concentrado até pH na faixa de 4-4,5 e 5 mL por equivalente de álcool etílico. O balão contendo a mistura reacional foi mantido sob agitação magnética e refluxo. O final da reação foi monitorado por CCD. Após o término da reação a elaboração foi realizada da seguinte maneira, exceto quando especificado: transferiu-se o balão para um banho de gelo e após resfriado, adicionou-se 20 mL de água gelada. O precipitado formado foi filtrado à vácuo e lavado com água destilada.

5.8.1 Síntese de 2-benzilideno-(ciclohexilideno)hidrazino-carbotioamida (4a)



4a

Após 2 horas de reação seguindo a metodologia geral descrita na seção 5.8 e utilizando-se acetato de etila como eluente para a CCD e vapor de iodo como revelador, obteve-se um precipitado amarelo. O resíduo foi recristalizado em etanol obtendo-se 260 mg (87% de rendimento) de **4a** na forma de um sólido cristalino de cor amarelo-palha.

FM: C₁₄H₁₇N₃S

MM: 259,1143 g/mol

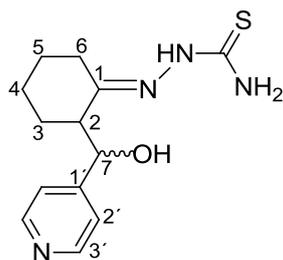
FF: 157-158,8 °C. Lit.: 154–156° C. (KLOCHKOVA e ANIS' KOV, 2009).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3406 (NH e NH₂), 3234 e 3145 (N-H e NH₂), 3022 (*sp*² C-H); 2928, 2960(*sp*³ C-H), 1593 (C=N), 1492, (C=C), 1446, 1419 (C=C arom.), 1074 (C=S).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 10,09 (1H, s, N-H); 8,21 (1H, s; NH₂); 7,78 (1H, s, NH₂); 7,36-7,21 (6H, m, 2 x H-2', 2 x H-3', H-4', H-7); 2,64-2,50 (4H, m, 2 x H-3, 2 x H-6, sobreposto ao sinal do solvente); 1,62-1,59 (4H, m, 2 x H-4 e 2 x H-5).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 178,76 (C=S); 152,44 (C-1); 136,72 (C-1'); 136,31 (C-2); 129,72 (2 x C-3'); 128,19 (2 x C-2'); 127,75 (C-7); 127,15 (C-4'); 28,49 (C-3), 27,12 (C-6); 23,52 (C-5); 22,42 (C-4).

5.8.2 Síntese de 2-(2-(hidroxipiridin-4-il)metil)ciclohexilideno)hidrazino-carbotioamida (4b)



4b

Seguindo a metodologia geral descrita na seção 5.8, foram obtidos, ao final de 4 horas de reação, 158 mg (79% de rendimento) de **4b** na forma de um sólido branco cristalino. A reação foi monitorada por CCD (eluente: acetato de etila e revelador: vapor de iodo).

FM: C₁₃H₁₈N₄OS

MM: 278,1201 g/mol

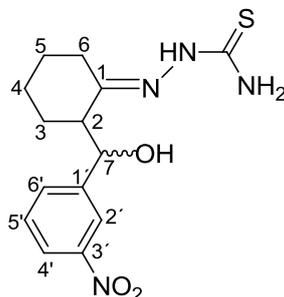
FF: 187,2-188,1 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3454 (O-H), 3331 e 3221 (N-H e NH₂), 3038 (*sp*² C-H); 2948, 2932, 2863 (*sp*³ C-H), 1606, 1583, 1497 (C=N), 146, 1452 (C=C arom.), 1042 (C=S), 1005 (C-O).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 10,12 (1H, s, N-H); 8,45 (2H, d, $J_{3',2} = 8,0$ Hz, 2 x H-3'); 8,02 (1H, s, NH₂); 7,34 (3H, d, $J_{2',3} = 8,0$ Hz, 2 x H-2', NH₂); 5,37 (1H, d, $J_{\text{OH},7} = 4$ Hz, OH); 5,17 (1H, t, $J_{7,\text{OH}} = J_{7,2} = 4$ Hz, H-7); 2,78-2,69 (1H, m, H-2); 2,14-2,09 (1H, m, H-3a); 1,64-1,37 (7H, m, H-3b, 2 x H-6, 2 x H-4, 2 x H-5).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 178,57 (C=S); 156,79 (C-1); 154,12 (C-1'); 149,07 (2 x C-3'); 121,59 (2 x C-2'); 68,90 (C-7); 49,97 (C-2); 27,03 (C-6); 26,01 (C-3), 25,76 (C-5), 23,26 (C-4).

5.8.3 Síntese de 2-(2-(hidroxi-(3-nitrofenil)-metil)-ciclohexilideno)-hidrazino-carbotioamida (4c)



4c

Seguindo a metodologia geral descrita na seção 5.8, foram obtidos, ao final de 3 horas de reação, 123 mg (61% de rendimento) de **4c** na forma de um sólido branco cristalino. A reação foi monitorada por CCD (eluente: acetato de etila e revelador: vapor de iodo). Apesar dos esforços não foi possível purificar o produto devido à sua alta instabilidade e por isso não foram incluídos dados de RMN de ^1H e ^{13}C .

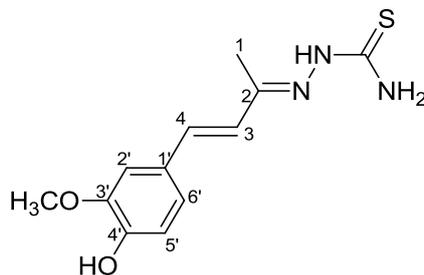
FM: $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$

MM: 322,1100 g/mol

FF: 171,5-174,9 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3392 (O-H), 3238 e 3153 (N-H e NH_2), 3026 (sp^2 C-H); 2985 (sp^3 C-H), 1603 (C=N), 1521 e 1346 (NO_2 , assim. e sim.), 1471, 1434 (C=C arom.).

5.8.4 Síntese de 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-but-3-en-2-ilideno)-hidrazino-carbotioamida (4d)



4d

Seguindo a metodologia geral descrita na seção 5.8, foram obtidos, ao final de 15 horas de reação e após purificação por CCS (eluente: hexano/acetato de etila 1:1), 197 mg (98,5% de rendimento) de **4d** na forma de um sólido amarelo. A reação foi monitorada por CCD (eluente: acetato de etila e revelador: vapor de iodo).

FM: C₁₂H₁₅N₃O₂S

MM: 265,0885 g/mol

FF: 165-166 °C. Lit.: 167 °C (BUU-HOI, XUONG, e TIEN, 1956)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3450 (O-H), 3336 e 3212 (N-H e NH₂), 1601, 1498 (C=N), 1588 (C=C), 1517, 1430 (C=C arom.), 1033 (C-O).

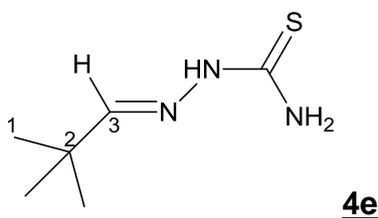
RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 10,20 (1H, s, OH); 9,32 (1H, s, NH); 8,21 (1H, s, NH₂); 7,75 (1H, s, NH₂); 7,12-6,95 (3H, m, H-4, H-2', H-3); 6,79-6,68(2H, m, H-5', H-6'); 3,80 (3H, s, OCH₃); 2,10 (3H, s, CH₃).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 178,51 (C=S); 149,50 (C-2); 147,91 (C-3'); 147,49 (C-4'); 134,22 (C-3); 127,92 (C-1'), 125,95 (C-6'); 120,84 (C-4); 115,71 (C-5'); 110,07 (C-2'), 55,61 (OCH₃); 12,21 (C-1).

5.9 Metodologia geral para a síntese das tiossemicarbazonas 4e-4f.

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 1 equivalente de tiossemicarbazida e 1 equivalente do aldeído ou cetona correspondente, adicionou-se, gota a gota, ácido acético concentrado até pH na faixa de 4-4,5 e 5 mL por equivalente de álcool etílico. O balão contendo a mistura reacional foi mantido sob agitação magnética e refluxo. O final da reação foi monitorado por CCD. Após o término da reação a elaboração foi realizada da seguinte maneira, exceto quando especificado: A mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente. Parte do solvente foi eliminada em evaporador rotatório e então foram adicionados 20 mL de água. Posteriormente, procedeu-se a extração com diclorometano (3 x 30 mL). Reuniram-se as fases orgânicas e adicionou sulfato de sódio. Após filtração o solvente foi eliminado em evaporador rotatório

5.9.1 Síntese de 2-(2,2-dimetilpropilideno)hidrazino-carbotioamida (4e)



Após 1 hora e 30 minutos de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.9, foram obtidos 569 mg (94,8% de rendimento) de **4e**, na forma de um sólido branco ceroso. Utilizou-se como eluente para CCD hexano/acetato de etila 6:4 e revelador solução de CAM, seguido de aquecimento.

FM: C₆H₁₃N₃S

MM: 159,0830 g/mol

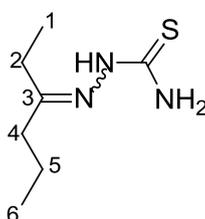
FF: 111,1-111,8 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3430 (N-H), 3213 e 3138 (NH_2), 3017 (sp^2 C-H), 2961, 2867 (sp^3 C-H), 1597, 1520 (C=N), 1451 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 11,00 (1H, s, H-3); 8,00 (1H, s, N-H); 7,32 (2H, s, NH_2); 1,03 (9H, s, 9 x H-1).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 177,75 (C=S); 154,19 (C-3); 34,36 (C-2); 27,24 (3 x C-1).

5.9.2 Síntese de 2-(hexan-3-ilideno)-hidrazino-carbotioamida (4f) e 2-(propan-2-ilideno)hidrazino-carbotioamida (4g)



4f

Após 2 horas de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.9 foram obtidos 285 mg de uma mistura de sólido contendo dois produtos. O eluente utilizado para a CCD foi hexano/acetato de etila 6:4 e revelador solução de CAM seguido de aquecimento. Posteriormente o resíduo foi purificado por CCS (eluente: hexano/acetato de etila 8:2. Foram obtidos 180 mg (60% de rendimento) de **4f**, na forma de um sólido branco ceroso e 57 mg (19% de rendimento) do produto **4g** na forma de um sólido cinza.

FM: $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_3\text{S}$

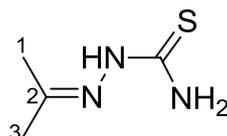
MM: 173,0987 g/mol

FF: 59,5-60,8 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3407 (N-H), 3108 e 3144 (NH_2), 2955, 2934, 2871 (sp^3 C-H), 1593, 1497, 1453 (C=N), 1077, 1041 (C=S).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6), δ /ppm: 8,79 (1H, s, N-H); 7,29 (1H, s, NH₂); 6,81 (1H, s, NH₂); 2,32-2,15 (4H, m, H-2, H-4); 1,62-1,45 (2H, m, H-5); 1,12-0,92 (6H, m, H-1, H-6).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6), δ /ppm: 178,87 (C=S); 157,83 (C-3); 38,05 e 29,80 (C-4); 31,33 e 22,50 (C-2); 19,19 e 18,78 (C-5); 13,98 e 13,50 (C-1 ou C-6), 10,20 e 9,67(C-6 ou C-1).



4g

FM: C₄H₉N₃S

MM: 131,0517 g/mol

FF: 179,5-180,1 °C; FF Lit.: 180-181 °C (BUU-HOI, XUONG, e TIEN, 1956)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3376 (N-H), 3226 e 3150 (NH₂), 2924, 2853 (sp^3 C-H), 1593 (C=N), 1105, 1074 (C=S).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6), δ /ppm: 9,88 (1H, s, N-H); 7,97 (1H, s, NH₂); 7,50 (1H, s, N-H₂); 1,90 (3H, s, H-3); 1,89 (3H, s, H-1).

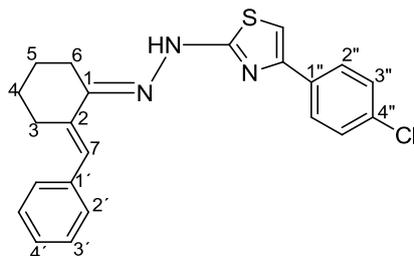
RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6), δ /ppm: 178,39 (C=S); 151,72 (C-2); 25,05(C-3); 17,52 (C-1).

5.10 Metodologia geral para a síntese dos heterociclos tiazólicos 5a-5p

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 1 equivalente da tiossemicarbazona correspondente e 1 equivalente de α -bromo-acetofenona correspondente, foram adicionados 2 mL de isopropanol por equivalente de reagente. A mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação magnética até observar o completo consumo dos reagentes por CCD. Após o término da

reação, a mistura foi colocada em banho de gelo. O precipitado formado foi filtrado à vácuo, lavado com água destilada gelada e mantido em dessecador por 24 horas.

5.10.1 Síntese de 2-(benzilideno-ciclohexilidene)-hidrazinil-4-(4-clorofenil)-tiazol (5a)



5a

Após 2 horas de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10, foram obtidos 144,7 mg (95,3 % de rendimento) de **5a**, na forma de um sólido marrom claro. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila e como revelador vapor de iodo.

FM: 393,1066

FF: 180,1-181,4°C

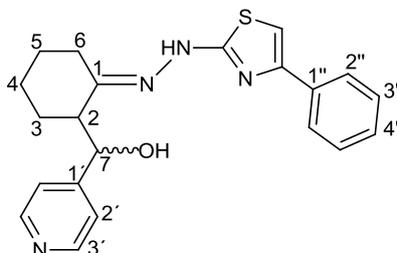
IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3028 (sp^2 C-H), 2938, 2865, (sp^3 C-H), 1614 (C=N), 1486, 1451, 1443, (C=C arom.), 782 (C-Cl).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 7,85 (2H, d, $J_{2'',3''}= 8,0$ Hz, 2 x H-2''); 7,46 (2H, d, $J_{3'',2''}= 8,0$ Hz, 2 x H-3''); 7,38-7,23 (6H, m, 2 x H-2', 2 x H-3', H4' e H-tiazol); 7,05 (1H, s, H-7); 6,70 (1H, s, NH); 2,65 (4H, m, 2 x H-3, 2 x H-6); 1,67-1,56 (4H, m, 2 x H-4 e 2 x H-5).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 170,34 (C=N tiazol); 152,64 (C=CH – tiazol); 148,39 (C-1), 136,96 (C-2); 136,10 (C-1'); 133,27 (C-4''); 132,49 (C-1''); 129,96 (C-7); 129,01 (2 x C-3''); 128,66 (2 x C-2'' ou 2 x C-3'); 127,70 (2 x C-2''

ou 2 x C-3'); 127,53 (2 x C-2'); 127,19 (C-4''); 105,29 (C=C_H tiazol), 28,80 (C-3), 27,84 (C-4); 23,96 (C-6); 22,77 (C-5).

5.10.2 Síntese de (2-(2-(4-feniltiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-(piridin-4-il)-metanol (5b)



5b

Após 2 horas de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10, foram obtidos 95 mg (95% de rendimento) de **5b**, na forma de um sólido amarelo-palha. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila e revelador vapor de iodo.

FM: C₂₁H₂₂N₄OS

MM: 378,1514 g/mol

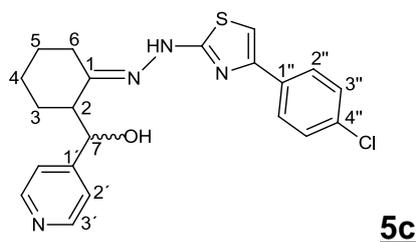
FF: 195-195,8 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3345 (O-H), 3062 (sp^2 C-H), 2940, 2925, 2854 (sp^3 C-H), 1602, 1571 (C=N), 1475, 1443 (C=C arom.).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 10,83 (1H, s, N-H); 8,46(2H, d, $J_{3'',2''} = 8$ Hz, H-3''); 7,82 (2H, d; $J_{2'',3''} = 8$ Hz, 2 x H-2''); 7,41-7,26 (5H, m, 2 x H-3'', 2 x H-3', H-4''); 7,17 (1H, s, H-tiazol); 5,28 (1H, sl, OH); 5,04 (1H, d, $J_{7,2} = 6$ Hz, H-7); 2,66(1H, m, H-2); 2,37-2,28 (1H, m, H-6a); 1,81-1,59 (7H, m, H-6b, 2 x H-3, 2 x H-5, 2 x H-4).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 170,14 (C=N tiazol); 154,63 (C-1); 153,48 (C=CHtiazol); 150,19 (C-1'); 148,98 (2 x C-3'); 134,91 (C-1''); 128,55 (2 x C-3''); 127,33 (C-4''); 125,46 (2 x C-2''); 121,89 (2 x C-2'); 103,30 (C=CHtiazol); 70,27 (C-7), 50,16 (C-2), 27,27 (C-6); 26,74 (C-3); 25,91 (C-5); 22,78 (C-4).

5.10.3 Síntese de (2-(2-(4-(4-clorofenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-(piridin-4-il)-metanol (5c)



Após 2 horas de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10, foram obtidos 132 mg (88% de rendimento) de **5c**, na forma de um sólido marrom. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila e revelador vapor de iodo.

FM: $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{OS}$

MM: 412,1125 g/mol

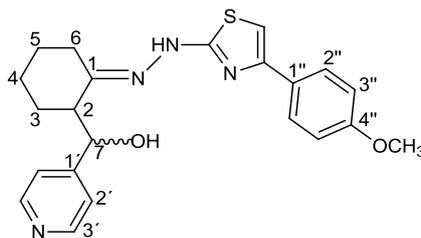
FF: 215,3-215,8 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3393 (O-H), 3102(sp^2 C-H), 2939, 2854 (sp^3 C-H), 1577, 1567 (C=N), 1473 (C=C arom.), 730 (C-Cl)

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 8,44 (2H, m; 2 x H-3'); 7,77 (2H, d, $J_{2'',3''} = 8$ Hz, 2 x H-2''); 7,36-7,30 (4H, m, 2 x H-2', 2 x H-3''); 7,04 (1H, s, H-tiazol); 5,11 (1H, s, OH); 4,99 (1H, m, H-7); 2,69 (1H, m, H-2); 2,19-1,30 (8H, m, 2 x H-6, 2 x H-3, 2 x H-4, 2 x H-5).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO-d₆), δ /ppm: 170,24 (C=N tiazol); 154,75 (C-1); 153,41 (C=CHtiazol); 148,98 (2 x C-3'); 133,75 (C-4''); 131,72 (2 x C-1''); 128,56 (2 x C-3''); 127,13 (2 x C-2''); 121,85 (2 x C-2'); 104,14 (C=C_H-tiazol); 70,26 (C-7), 50,14 (C-2), 27,27 (C-6); 26,74 (C-3); 25,91 (C-5); 22,78 (C-4).

5.10.4 Síntese de (2-(2-(4-(4-metoxifenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-(piridin-4-il)-metanol (5d)



5d

Após 2 horas de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10, foram obtidos 142 mg (94,7% de rendimento) de **5d**, na forma de um sólido amarelo-palha. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila e revelador vapor de iodo.

FM: C₂₂H₂₄N₄O₂S

MM: 408,1620 g/mol

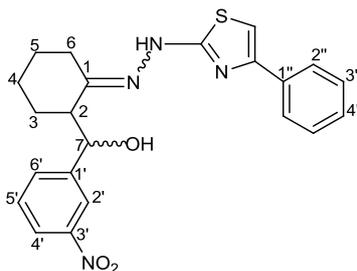
FF:195,2-196,4 °C

IV, $\bar{\nu}$ /cm⁻¹: 3498 (O-H), 3145 (N-H), 3030(sp² C-H), 2941, 2852, 2835 (sp³ C-H), 1605, 1568 (C=N), 1488, 1457 1442 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO-d₆), δ /ppm: 10,77(1H, s, N-H); 8,46 (2H, m; 2 x H-3'); 7,73 (2H, d, $J_{2'',3''} = 8$ Hz, 2 x H-2''); 7,36 (2H, m, 2 x H-2'); 6,97 (2H, d, $J_{3'',2''} = 8$ Hz, 2 x H-3''); 6,91 (1H, s, H-tiazol); 5,28 (1H, s, OH); 5,04 (1H, m, H-7); 3,78 (3H, s, OCH₃); 2,57-2,33 (3H, m, 2 x H-6, H-2); 1,71-1,60 (6H, m, 2 x H-3, 2 x H-4, 2 x H-5).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6), δ /ppm: 169,99 (C=N tiazol); 158,62 (C-4''); 154,44 (C-1); 153,69 (C=CH-tiazol); 148,79 (2 x C-3'); 127,75 (C-1'); 126,74 (2 x C-2'); 121,92 (2 x C-2''); 113,88 (2 x C-3''); 101,12 (C=CH-tiazol); 70,24 (C-7), 55,07 (OCH₃), 50,11 (C-2); 27,25 (C-6); 26,67 (C-3); 25,87 (C-5); 22,75 (C-4).

5.10.5 Síntese de nitrofenil-(2-(2-(4-feniltiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-metanol (5e)



5e

Após 2 horas de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10 e purificação do sólido por CCS (diclorometano 100%), foram obtidos 4 mg (1,3% de rendimento) de **5e**, na forma de um sólido amarelo-palha. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila/hexano 1:1 e como revelador vapor de iodo. Apesar dos esforços não foi possível a purificação de uma quantidade considerada do composto **5e** e, por essa razão, os dados dos espectros de ^1H e ^{13}C de RMN dessas substâncias não foram incluídos na caracterização.

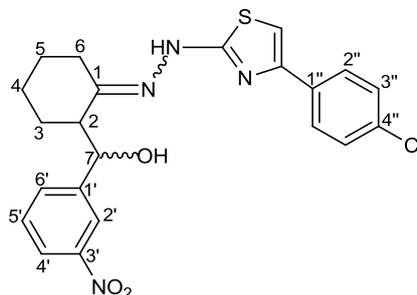
FM: C₂₂H₂₂N₄O₃S

MM: 422,1413 g/mol

FF: 168,4-169 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3428 (O-H), 3050(sp^2 C-H), 2936, 2865 (sp^3 C-H), 1609 (C=N), 1526 e 1345 (NO₂ assim. e sim.), 1480, 1457, 1445 (C=C arom.).

5.10.6 Síntese de 2-(2-(4-(4-clorofenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-(3-nitrofenil)-metanol (5f)



5f

Após 2 horas de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10 e purificação do sólido por CCS (diclorometano 100%), foram obtidos 28 mg (9% de rendimento) de **5f** (isômero E) e 3 mg (1% de rendimento) de **5f** (isômero Z) na forma de um sólido alaranjado. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila/hexano 1:1 e como revelador vapor de iodo.

FM: C₂₂H₂₁ClN₄O₃S

MM: 456,1023 g/mol

FF: 182,1-182,9 °C

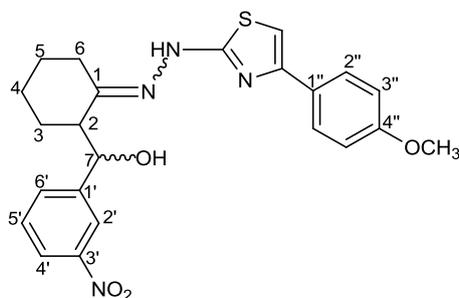
IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3376 (O-H), 3037(sp^2 C-H), 2936, 2857 (sp^3 C-H), 1619 (C=N), 1536 e 1348 (NO₂ assim. e sim.), 1479, 1445 (C=C arom.), 737 (C-Cl).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 8,29 (1H, s; H-2'); 8,18 (1H, d, $J_{4'',5''} = 8$ Hz, H-4'); 7,88-7,84 (3H, m, 2 x H-2'', NH); 7,65-7,57 (2H, M, H-5', H-6'); 7,44 (2H, d, $J_{3',2'} = 8$ Hz, H-3''); 7,29 (1H, s, H-tiazol); 5,21 (1H, d, $J_{7,2} = 8$ Hz, H-7); 2,61 (2H, m, OH, H-2); 1,73-1,16 (8H, m, H-3, H-4, H-5, H-6).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 169,62 (C=N tiazol); 156,77 (C-1); 149,36 (C=CHtiazol); 147,44 (2 x C-3'); 143,17 (C-1'); 132,80 (C-4''); 132,54 (C-1''); 132,35 (C-5'); 128,39 (C-6'); 128,06 (2 x C-3''); 126,46 (2 x C-2'');

121,88 (2 x C-2'); 121,43 (2 x C-4'); 102,72 (C=C_H tiazol); 74,16 (C-7), 50,03 (C-2), 30,05 (C-6); 26,76 (C-3); 24,73 (C-5); 23,74 (C-4).

5.10.7 Síntese de 2-(2-(4-(4-metoxifenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-ciclohexil)-(3-nitrofenil)-metanol (5g)



5g

Após 2 horas de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10 e purificação do sólido por CCS (diclorometano 100%), foram obtidos 2,8 mg (0,9% de rendimento) de **5g**, na forma de um sólido amarelo-palha. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila/hexano 1:1 e como revelador vapor de iodo. Apesar dos esforços não foi possível a purificação de uma quantidade considerada do composto **5g** e, por essa razão, os dados dos espectros de ^1H e ^{13}C de RMN dessa substância não foram incluídos na caracterização.

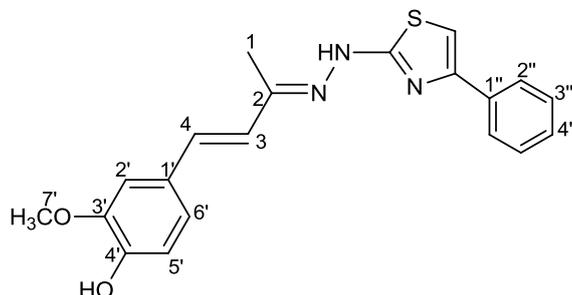
FM: $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$

MM: 452,1518 g/mol

FF: 177,7-178,2 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3463 (O-H), 3052(sp^2 C-H), 2936 (sp^3 C-H), 1608 (C=N), 1537 e 1349 (NO_2 assim. e sim.), 1509, 1490, 1461 (C=C arom.), 1026 (C-O).

5.10.8 Síntese de 2-metoxi-4-(3-(2-(4-feniltiazol-2-il)-hidrazona)-but-1-en-1-il)-fenol (5h)



5h

Após 30 minutos de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.11, foram obtidos 120 mg (76% de rendimento) de **5h** como um sólido alaranjado. Utilizou-se como eluente para CCD hexano/ acetato de etila 8:2 e como revelador vapor de iodo.

FM: C₂₀H₁₉N₃O₂S

MM: 365,1198 g/mol

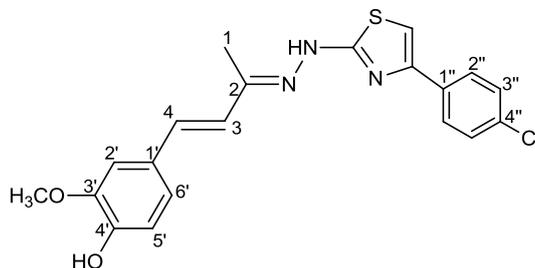
FF: 155,5-156,5 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3485 (O-H), 3069(sp^2 C-H), 2965 (sp^3 C-H), 1615 (C=N), 1574 (C=C), 1516, 1489, (C=C arom.), 1282, 1266 (C-O).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 11,11 (1H, s, OH); 9,22 (1H, s, NH); 7,85 (2H, d, $J_{2'',3''}= 8$ Hz, 2 x H-2''); 7,43-7,12 (5H, , 2 x H-3'', H-4'', H-tiazol, H-4); 7,01-6,76 (3H, m, H-2', H-5', H-6'); 3,83 (3H, s, OCH₃); 2,15 (3H, s, 3 x H-1).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 169,19 (C=N tiazol); 150,45 (C-2); 148,71 (C=CH tiazol); 147,88 (C-3'); 147,20 (C-4'); 134,81 (C-1''), 132,33 (C-3); 128,56 (2 x C-3''); 128,05 (C-1'); 127,44 (C-6'); 125,52 (2 x C-2'' e C-4''); 120,70 (C-4); 115,61 (C-5'); 110,01 (C-2'); 103,81 (C=CH tiazol), 55,63 (OCH₃); 12,26 (C-1).

5.10.9 Síntese de 4-(-3-(2-(4-(4-clorofenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-but-1-en-1-il)-2-metoxifenol (5i)



5i

Seguindo a metodologia geral descrita na seção 5.10 e após 1 hora de reação, foram obtidos 266 mg (88% de rendimento) de **5i** na forma de um sólido alaranjado. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila/hexano 1:1 e revelador vapor de iodo.

FM: C₂₀H₁₈ClN₃O₂S

MM: 399,0808 g/mol

FF: 166,2-166,8 °C

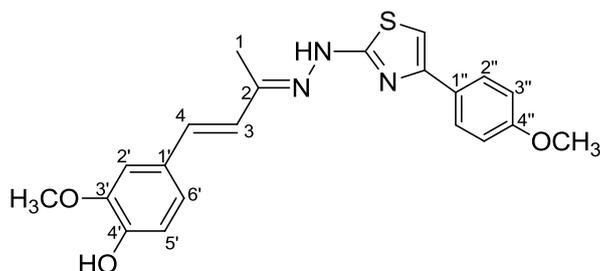
IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3487 (O-H), 2964 (sp^3 C-H), 1616 (C=N), 1591 (C=C), 1513, 1489, (C=C arom.), 1280, 1257 (C-O), 755 (C-Cl).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 11,12 (1H, s, OH); 9,21(1H, s, NH); 7,87(2H, d, $J_{2'',3''} = 8$ Hz, 2 x H-2''); 7,45 (1H, d, $J_{3'',2''} = 8$ Hz, 2 x H-3''); 7,37 (1H, d, $J_{4,3} = 18$ Hz, H-4); 7,17 (H-tiazol); 6,98 (1H, d, $J_{5',6'} = 8$ Hz, H-5'); 6,91 (1H, d, $J_{3,4} = 18$ Hz, H-3); 6,78-6,69 (2H, m, H-2' e H-6'); 3,83 (3H, s, OCH₃); 2,14 (3H, s, 3x H-1).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 169,70 (C=N tiazol); 149,66(C-2); 149,23 (C=CH tiazol); 148,26 (C-3'); 147,61 (C-4'); 134,07 (C-3), 132,84 (C-4''); 132,24 (C-1''); 128,97 (2 x C-3''); 128,40 (C-1'); 127,61 (2 x C-2''); 126,00 (C-

6'); 121,11 (C-4); 115,99 (C-5'); 110,42 (C-2'); 105,01 (C=CH tiazol), 50,02 (OCH₃); 12,65 (C-1).

5.10.10 Síntese de 2-metoxi-4-(2-(4-(4-metoxifenil)-tiazol-2-il)-hidrazona)-but-1-en-1-il)-fenol (5j)



5j

Após 40 minutos de reação seguindo a metodologia geral descrita na seção 5.10, foram obtidos 165 mg (82% de rendimento) de **5j** na forma de um sólido alaranjado. A reação foi monitorada por CCD (eluente: acetato de etila/hexano 6:4 e revelador vapor de iodo).

FM: C₂₁H₂₁N₃O₃S

MM: 395,1304 g/mol

FF: 188-189,6 °C

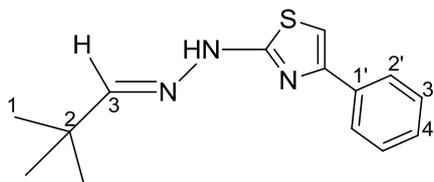
IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3202 (O-H), 3113 (sp^2 C-H), 2927, 2837 (sp^3 C-H), 1609 (C=N), 1510, 1457, (C=C arom.), 1256 (C-O).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 11,09 (1H, s, OH); 9,25 (1H, s, NH); 7,79 (2H, d, $J_{2,3} = 8$ Hz, 2 x H-2'); 7,41-7,36 (2H, m, H tiazol, H-4); 7,18-6,97 (3H, m, H-5', H-6', H-3); 6,87-6,68 (3H, m, 2 x H-3'', H-2'); 3,83 (3H, s, OCH₃); 3,77 (3H, s, OCH₃); 2,14 (3H, s, 3 x H-1)

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 169,01 (C=N tiazol); 158,72 (C-4''); 150,19 (C-2); 148,55 (C=CH tiazol); 147,85 (C-3'); 147,14 (C-4'), 132,19 (C-3); 128,03 (C-1'); 127,65 (C-1''); 126,81 (2 x C-2''); 125,70 (C-6'); 120,63 (C-4);

115,58 (C-5'); 113,91 (2 x C-3''); 110,02 (C-2'); 101,63 (C=CH tiazol), 55,61 (OCH₃); 55,07 (OCH₃); 12,19 (C-1).

5.10.11 Síntese de 2-(2-(2,2-dimetilpropilideno)-hidrazinil)-4-feniltiazol (**5k**)



5k

Após 1 hora de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10, foram obtidos 294 mg (90,1 % de rendimento) do produto **5k** como um sólido lilás, utilizando-se hexano/acetato de etila 8:2 como eluente para CCD e revelador vapor de iodo.

FM: C₁₄H₁₇N₃S

MM: 259,1143 g/mol

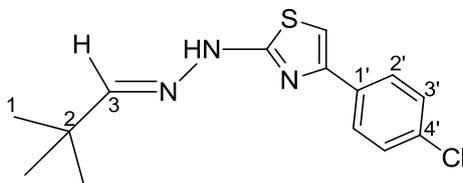
FF: 101,2-102,1 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3062 (sp^2 C-H), 2959, 2901, 2865 (sp^3 C-H), 1626, 1603 (dobramento de C-N), 1584, 1576 (C=N), 1483, 1443, (C=C arom.).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 7,81-7,78 (3H, m, 2 x H-2', H-3); 7,42-7,30 (4H, m, 2 x H-3', H-4', N-H); 7,24 (1H, s, H-tiazol); 1,07 (9H, s, 9 x H-1).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 169,08 (C=N tiazol); 154,86 (C-3); 148,09 (C=CH tiazol); 133,46 (C-1'); 128,69 (2 x C-3'), 127, 95 (C-4'); 125,72 (2 x C-2'); 103,49 (C=CH tiazol); 34,59 (C-2); 27,26 (3 x C-1).

5.10.12 Síntese de 4-(4-clorofenil)-2-(2-(2,2-dimetilpropilideno)-hidrazinil)-tiazol (5I)



5I

Após 1 hora de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10, foram obtidos 322 mg (87,3% de rendimento) de **5I**, na forma de um sólido bege-claro utilizando-se hexano/acetato de etila 8:2 como eluente para CCD e revelador vapor de iodo.

FM: C₁₄H₁₆ClN₃S

MM: 293,0753 g/mol

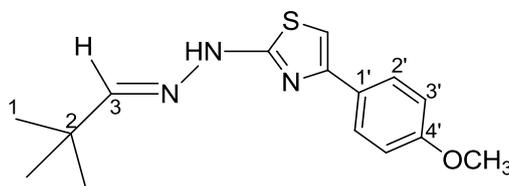
FF: 148,5-149,6 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3162, 3116 (N-H), 3078 (sp^2 C-H), 2963, 2863 (sp^3 C-H), 1568 (C=N), 1479 (C=C arom.), 727 (C-Cl).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 11,57 (1H, s, H-3); 7,82 (2H, d, $J_{3',2'} = 8$ Hz, 2 x H-3'); 7,42 (2H, d, $J_{2',3'} = 8$ Hz, 2 x H-2'); 7,30 (1H, s, H-tiazol ou N-H); 7,24 (1H, s, N-H ou H-tiazol); 1,07 (9H, s, 9 x H-1).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 169,00 (C=N tiazol); 152,88 (C-3); 149,01 (C=CH tiazol); 133,61 (C-1'); 131,81 (C-4'); 128,54 (2 x C-3'), 127,16 (2 x C-2'); 103,78 (C=CH tiazol); 34,38 (C-2); 27,31 (3 x C-1).

5.10.13 Síntese de 2-(2-(2,2-dimetilpropilideno)-hidrazinil)-4-(4-metoxifenil)-tiazol (5m)



5m

Após 1 hora de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10, foram obtidos 178 mg (94,2% de rendimento) do produto **5m**, na forma de um sólido amarelo-claro utilizando-se hexano/acetato de etila 8:2 como eluente para CCD e revelador vapor de iodo.

FM: C₁₅H₁₉N₃OS

MM: 289,1249 g/mol

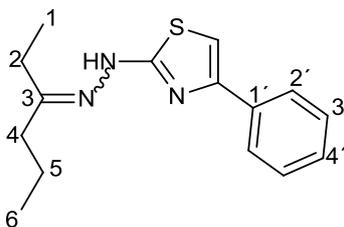
FF: 104,5-105,8 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3061 (sp^2 C-H), 2960, 2836 (sp^3 C-H), 1624 (C=N), 1574, 1510, 1493, 1462 (C=C arom.), 1248 (C-O).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 7,72 (2H, d, $J_{2',3'} = 8$ Hz, 2 x H-2'); 7,47 (1H, s, H-3); 7,09 (1H, s, H-tiazol); 6,97(2H, d, $J_{3',2'} = 8$ Hz, 2 x H-3'); 3,77 (3H, s, OCH₃); 1,07 (9H, s, 9 x H-1).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 169,06 (C=N tiazol); 159,26 (C-4'); 155,87 (C-3); 146,73 (C=CH tiazol); 127,22 (2 x C-2'); 125,47 (C-1'); 114,10 (2 x C-3'), 101,59 (C=CH tiazol); 55,25 (OCH₃); 34,67 (C-2); 27,19 (3 x C-1).

5.10.14 Síntese de 2-(2-(hexan-3-ilideno)-hidrazinil)-4-feniltiazol (5n)



5n

Após 1 hora de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10, foram obtidos 282 mg (94% de rendimento) do produto **5n**, na forma de um sólido amarelo utilizando-se hexano/acetato de etila 8:2 como eluente para CCD e revelador vapor de iodo.

FM: C₁₅H₁₉N₃S

MM: 273,1300 g/mol

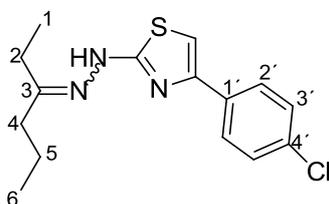
FF: 105,1-106,5 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2960, 2933, 2869 (sp^3 C-H), 1616 (C=N), 1493, 1450 (C=C arom.).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 13,76 (1H, s, NH protonado); 12,50 (1H, s, NH protonado); 7,72 (2H, m, H-2'); 7,47 (3H, m, H-3' e H-4'); 6,73 (1H, s, H-tiazol); 2,58-2,30 (4H, m, H-2, H-4); 1,77-1,58 (2H, m, H-5); 1,29-0,96 (6H, m, H-1, H-6).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 170,14 (C=N tiazol); 162,33 (C-3); 145,03 (C=CH tiazol); 130,72 (C-1'); 129,21 (2 x C-3'); 125,83 (2 x C-2'); 102,04 (C=CH tiazol); 32,77 (C-4); 29,99 (C-2); 19,19 (C-5); 14,28 (C-1); 10,46 (C-6).

5.10.15 Síntese de 4-(4-clorofenil)-2-(2-(hexan-3-ilideno)-hidrazinil)-tiazol (5o)



5o

Após 1 hora de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10, foram obtidos 100 mg (100% de rendimento) do produto **5o**, um sólido bege utilizando-se hexano/acetato de etila 8:2 como eluente para CCD e revelador vapor de iodo.

FM: C₁₅H₁₈ClN₃S

MM: 307,0910 g/mol

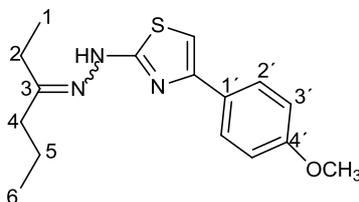
FF: 148,2-149,1 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3156 (N-H), 3108 (sp^2 C-H), 2961, 2931, 2871 (sp^3 C-H), 1558 (C=N), 1477, 1457 (C=C arom.), 731 (C-Cl).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 13,80 (1H, s, NH protonado); 12,36 (1H, s, NH protonado); 7,66 (2H, d, $J_{2',3'} = 8$ Hz, H-2'); 7,43 (2H, d, $J_{3',2'} = 8$ Hz, H-3'); 6,81 (1H, s, H-tiazol); 2,59-2,31 (4H, m, H-2, H-4); 1,73-1,56 (2H, m, H-5); 1,29-1,05 (6H, m, H-1, H-6).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 170,15 (C=N tiazol); 167,30 (C-3); 139,35 (C=CH tiazol); 136,54 (C-4'); 129,93 (2 x C-2'); 127,02 (2 x C-3'), 125,89 (C-1'); 101,76 (C=CH tiazol); 38,09 e 30,08 (C-4); 33,62 e 25,03 (C-2); 19,54 e 19,36 (C-5); 14,27 e 13,79 (C-1); 10,34 (C-6).

5.10.16 Síntese de 2-(2-(hexan-3-ilideno)idrazinil)-4-(4-metoxifenil)-tiazol (5p)



5p

Após 1 hora de reação seguindo a metodologia descrita na seção 5.10, foram obtidos 152 mg (97% de rendimento) do produto **5p**, como um sólido bege utilizando-se hexano/acetato de etila 8:2 como eluente para CCD e revelador vapor de iodo.

FM: C₁₆H₂₁N₃OS

MM: 303,1405 g/mol.

FF: 106,8-107,4 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3504 (N-H), 2960, 2934 (sp^3 C-H), 1607, 1590 (C=N), 1508, 1455 (C=C arom.), 1256, 1188 (estiramento de C-O).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 13,71 (1H, s, NH protonado); 12,44 (1H, s, NH protonado); 7,65 (2H, d, $J_{2',3'} = 8$ Hz, H-2'); 6,98 (2H, d, $J_{3',2'} = 8$ Hz, H-3'); 6,54 (1H, s, H-tiazol); 3,84 (3H, s, OCH₃); 2,56-2,30 (4H, m, H-2, H-4); 1,73-1,56 (2H, m, H-5); 1,29-1,13 (6H, m, H-1, H-6).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 170,04 (C=N tiazol); 165,19 (C-3); 161,00 (C-4'); 141,84 (C=CH tiazol); 127,26 (2 x C-2'); 121,28 (C-1'); 114,92 (2 x C-3'), 99,28 (C=CH tiazol); 55,51 (OCH₃); 38,07 e 30,00 (C-4); 33,28 e 24,64 (C-2); 19,39 (C-5); 14,25 e 13,75 (C-1); 10,38 e 10,13 (C-6).

5.11 Ensaios Biológicos

5.11.1 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante das substâncias sintetizadas foi avaliada *in vitro* pelos métodos de captura dos radicais ABTS, DPPH e método de redução do ferro (FRAP). Esses ensaios foram realizados no Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal (FAFAR) Minas Gerais pela mestranda Marina Ferrara de Resende, conforme descrito a seguir.

5.11.1.1 Método de captura do radical DPPH•

Avaliou-se a capacidade das substâncias sintetizadas de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH[•]) utilizando o método descrito por Lue et al. (2010) com modificações de Bhullar et al. (2013), em microescala e triplicata. As soluções de DPPH 0,2 mM e solução de trolox, curcumina e substâncias sintéticas 0,1 mM, foram preparadas em DMSO (dimetilsulfóxido). Para a reação, 150 µL da solução de DPPH 0,2 mM e 150 µL das diferentes amostras testes a 0,1 mM foram pipetados para uma microplaca de 96 poços. Como controle utilizou-se 300 µL de DMSO e outro controle contendo 150 µL de solução de DPPH 0,2 mM e 150 µL de DMSO. A microplaca foi então agitada levemente na vertical sobre a bancada e, após 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, leu-se a absorvância a 515 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, California, USA). Posteriormente, calculou-se a CI_{50} (concentração necessária para inibição de 50% de radical DPPH) de todas as substâncias com porcentagem de atividade antioxidante igual ou superior à da curcumina.

5.11.1.2 Método de captura do radical ABTS

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS, foi utilizado o método descrito por Re et al. (1999). O cátion estável do radical ABTS foi formado pela reação de persulfato de potássio com

ABTS, ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína)-6-sulfônico, armazenado por 16 horas ao abrigo da luz. O radical formado foi então adicionado à substância em estudo e, posteriormente, teve-se a redução do radical ABTS^{•+} a ABTS. Na reação, foram utilizados 20 µL de cada amostra testada em concentração de 0,1 mM em DMSO. A mistura foi adicionada aos poços de uma microplaca de 96 poços, acrescentando-se 180 µL do radical ABTS^{•+} diluído. Agitou-se levemente a microplaca na vertical sobre a bancada e após cinco minutos em temperatura ambiente no escuro, leu-se a absorvância a 734 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, Califórnia, USA). A fração de radical eliminado pelas substâncias foi calculada e o resultado expresso em porcentagem de atividade antioxidante.

5.11.1.3 Método de redução do ferro (FRAP)

Para execução do ensaio foram utilizados 20 µL de cada substância (curcumina e substâncias sintéticas) em concentração de 0,1 mM em DMSO e adicionados aos poços de uma microplaca de 96 poços, acrescentando-se 180 µL do reagente de trabalho que foi pré-aquecido a 37°C e preparado na proporção de 10:1:1 de tampão acetato 300 mM (pH 3,6), solução de tripiridiltriazina (TPTZ) 10 mM em ácido clorídrico 40 mM e cloreto férrico 20 mM, respectivamente. Após agitação levemente na vertical sobre a bancada e tempo de reação de 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, leu-se a absorvância a 593 nm em espectrofotômetro com leitor em microplacas automático (Molecular Devices, VersaMaxProgram, Sunnyvale, Califórnia, USA). A capacidade antioxidante das substâncias foi calculada por meio da curva padrão de trolox.

5.11.2 Avaliação da atividade citotóxica

Os compostos sintetizados foram testados contra seis linhagens de células tumorais: HL60 (leucemia mielóide aguda), HCT (carcinoma colorretal), JURKAT (leucemia linfoblástica aguda), MCF7 e MDA (adenocarcinoma de mama humano), THP1 (leucemia monocítica humana) e uma linhagem de

célula normal, oriunda de rim de macaco-verde africano (células Vero). Como controle positivo utilizou-se a curcumina e o etoposídeo.

Esse experimento foi realizado em parceria com a Profa. Elaine Maria de Souza-Fagundes do Departamento de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – UFMG. De forma breve, as suspensões celulares foram utilizadas na concentração de 50.000 células por poço (placas de 96 poços) e foram incubadas por no mínimo 6h a 37°C para estabilização. Após estabilização, todas as células foram incubadas com as substâncias puras por 24 h em atmosfera de CO₂ e 100% de umidade. Os testes foram realizados em triplicata utilizando-se como controle positivo o etoposídeo. Foi realizado também um controle do solvente (DMSO) na mesma concentração das amostras testes. A proliferação e viabilidade celular foram avaliadas pelo ensaio de MTT, que se baseia na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (MONKS *et al.*, 1991) e permitiu avaliar tanto a proliferação quanto a viabilidade celular. Faltando 4 horas para o final do período de incubação das culturas, foram adicionados a cada poço (contendo 200 µL finais), 20 µL de uma solução de MTT (5 mg/mL) em meio RPMI, preparada na hora do uso. Após as 4 horas de incubação e formação dos cristais, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado com pipeta multicanal e a cada poço foram adicionados 200 µL de uma solução de HCl 0,04 mol/L em isopropanol. Após solubilização dos cristais formados pela metabolização do MTT pelas células viáveis, as placas foram lidas em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 590 nm. Apenas as substâncias que apresentarem atividade significativa a 50 µM serão posteriormente submetidas a determinação do CI₅₀, empregando-se diluições decimais (100, 10, 1 e 0,1, 0,01, 0,001 µM).

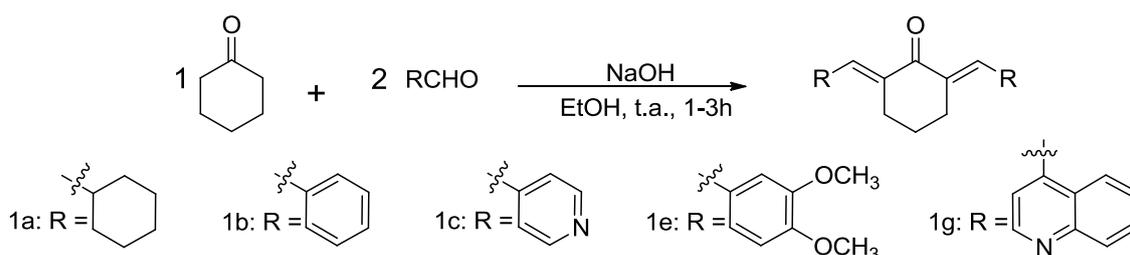
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Síntese dos compostos *via* reação de condensação aldólica em meio básico

6.1.1 Síntese das 2,6-bis-(metilideno)-ciclohexanona 1a, 1b, 1c, 1e e 1g

Os compostos dissustituídos foram sintetizados por meio da reação de condensação aldólica entre o aldeído correspondente e a ciclohexanona (**Figura 25**) utilizando solução de NaOH em etanol. Inicialmente, a reação foi testada utilizando uma solução de NaOH 2 mol/L. Nesse caso, observou-se o escurecimento da reação e o produto desejado não foi isolado. Acredita-se que tenha ocorrido a degradação do produto no meio reacional. Decidiu-se, então, utilizar uma solução de hidróxido de sódio menos concentrada. A técnica foi modificada utilizando-se solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L, com adição lenta ao balão reacional. Dessa forma, os produtos desejados foram obtidos com sucesso e padronizou-se, assim, as condições de reação.

Figura 25—Esquema de síntese para obtenção de 1a, 1b, 1c, 1e e 1g.



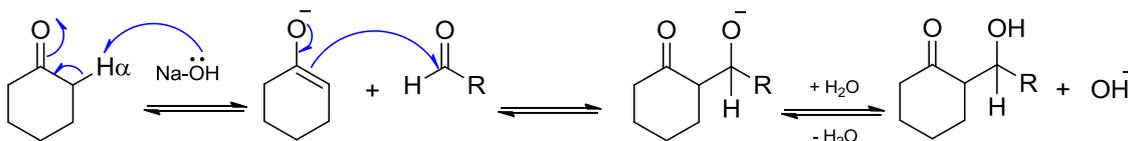
O mecanismo da reação de condensação aldólica em meio básico ocorre inicialmente com a abstração de um hidrogênio α à carbonila da cetona por um íon hidróxido formando o íon enolato (**Figura 26**). O ataque nucleofílico à carbonila do aldeído é promovido pelo equilíbrio do íon enolato, nucleofílico, com a cetona, o que resulta na formação de uma ligação carbono-carbono (primeira etapa – reação aldólica – **Figura 26**). Por meio de mais uma reação

ácido-base, a base capta um hidrogênio da hidroxila formando o íon enolato. Esse enolato capta o hidrogênio alfa à carbonila, formando um ânion estabilizado por ressonância. Apesar da existência desse equilíbrio, a eliminação é desejável, já que haverá a formação de um sistema conjugado, estabilizando ainda mais o composto formado, resultando no produto de condensação aldólica (etapa de desidratação - **Figura 26**).

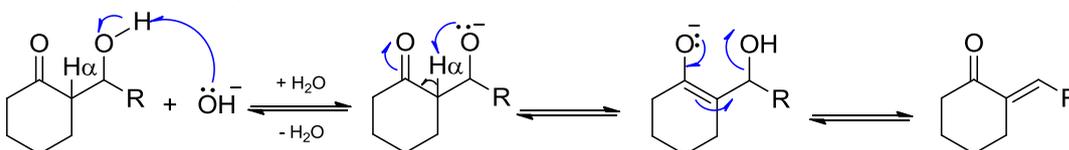
Dependendo das condições, tais como a proporção dos reagentes, o mecanismo pode ser repetido, formando as 2,6-bis-(metilideno)-ciclohexanona correspondentes (segunda condensação aldólica - **Figura 26**).

Figura 26 – Mecanismo proposto para a reação de condensação aldólica em meio básico (COSTA *et al.*, 2003).

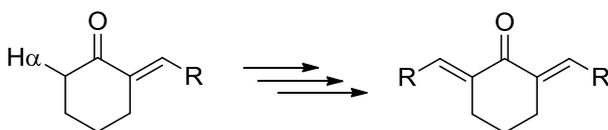
Reação aldólica:



Etapa de desidratação:



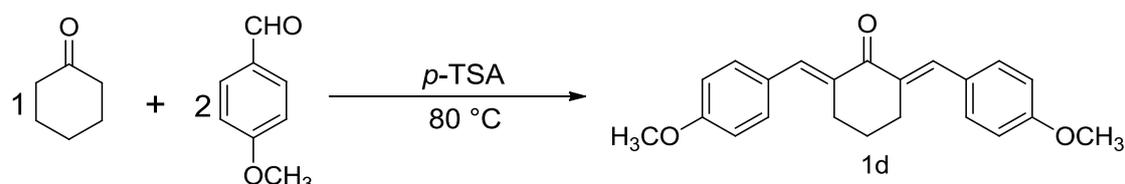
Segunda condensação aldólica:



Os compostos **1a**, **1b**, **1c**, **1e** e **1g** foram obtidos com rendimentos que variaram entre 51-93%

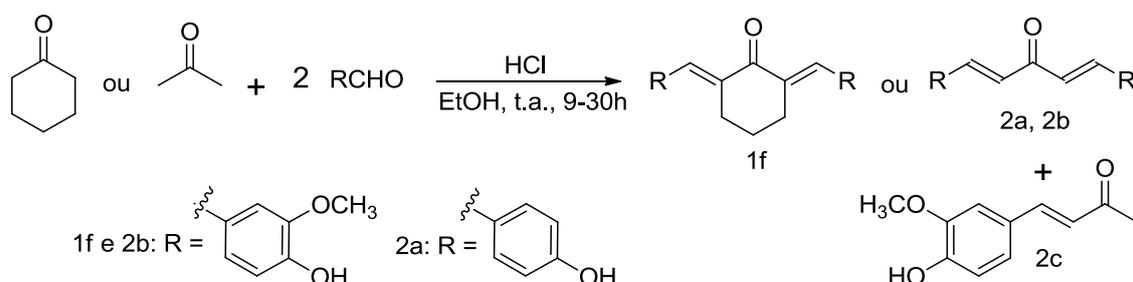
6.2 Síntese dos compostos *via* reação de condensação aldólica em meio ácido

6.2.1 Síntese de 2,6-bis-(4-metoxibenzilideno)-ciclohexanona 1d



Inicialmente, a tentativa de obtenção de **1d** foi realizada utilizando-se a técnica de condensação em meio básico, conforme descrito anteriormente. Após 24 horas de reação, observou-se por CCD que não havia sido formado nenhum produto. A reação foi repetida substituindo-se a catálise básica por catálise ácida. Utilizou-se, então, o ácido *p*-toluenosulfônico (TSA) como catalisador, em meio isento de solvente. Após 2 horas de reação observou-se o consumo completo dos reagentes e a formação de um só produto. O sucesso da reação pode estar relacionado à não utilização de solvente aquoso que, além de facilitar a dissolução dos reagentes, facilita o progresso da reação, já que a água é um subproduto da reação. O produto **1d** foi obtido com 94,7% de rendimento.

6.2.2 Síntese das 2,6-bis-(arilmetilideno)-cicloalcanonas 1f, 2a, 2b e da 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-but-3-en-2-ona 2c

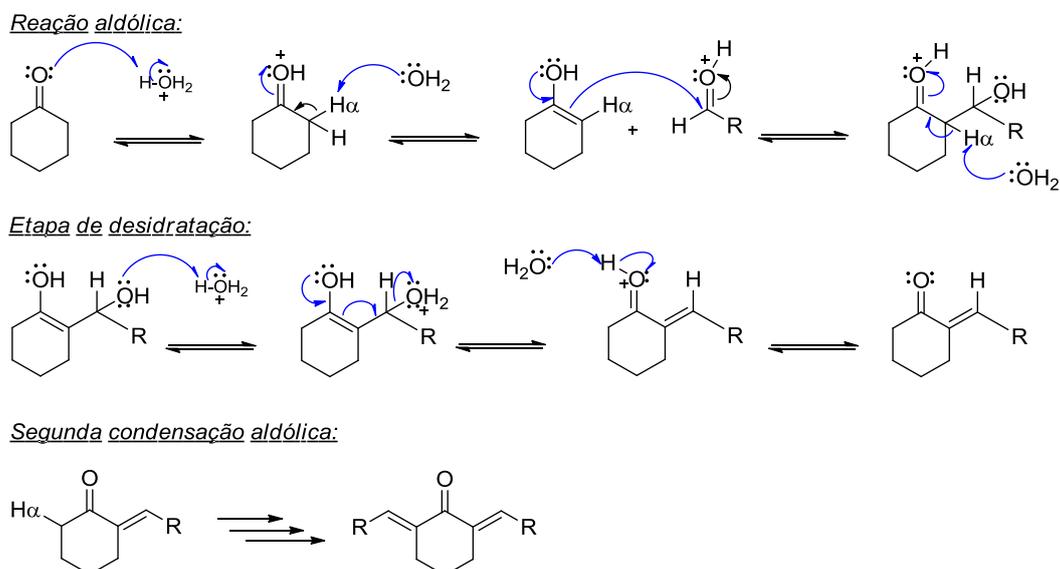


Os compostos **1f**, **2a**, **2b** e **2c**, contendo uma hidroxila fenólica, também foram sintetizados por meio de reação de condensação aldólica com catálise ácida, mas, nesses casos, utilizou-se ácido clorídrico concentrado como catalisador, em etanol.

Os compostos **1f**, **2a** e **2b** foram obtidos com rendimentos que variaram de 60,7-93 %. O subproduto **2c** foi isolado, junto ao produto desejado **2b** com 22,7 % de rendimento.

O mecanismo da reação de condensação aldólica em meio ácido ocorre inicialmente com abstração de um próton do ácido pela carbonila da cetona. Com a carbonila ativada, a água abstrai um hidrogênio alfa da ciclohexanona para a formação do enol correspondente. O passo seguinte é o ataque à carbonila protonada do aldeído, promovido pelo equilíbrio ceto-enólico da ciclohexanona. A etapa posterior é formação do equilíbrio ceto-enólico novamente quando uma molécula de água abstrai o segundo hidrogênio alfa da ciclohexanona (etapa – reação aldólica – **Figura 27**). Finalmente, ocorre a protonação de uma das hidroxilas com posterior desidratação, que é favorecida em razão da formação de um sistema conjugado (etapa de desidratação – **Figura 27**).

Figura 27 - Mecanismo proposto para a reação de condensação aldólica em meio ácido (SOLOMONS e FRYHLE, 2006).



Um mecanismo semelhante ocorre quando a ciclohexanona é substituída pela acetona (síntese dos compostos **2a** e **2b**). O mecanismo de formação do composto monoarilado **2c** é o mesmo ilustrado na **Figura 27**, entretanto, nesse caso, não ocorreu a segunda condensação aldólica.

6.3 Caracterização dos compostos 1a-1g e 2a-2c

Os compostos **1a**, **1b**, **1c**, **1d**, **1e**, **1f**, **1g**, **2a**, **2b** e **2c** foram caracterizados pela determinação do seu ponto de fusão e análises dos espectros no infravermelho e de RMN de ^1H e ^{13}C .

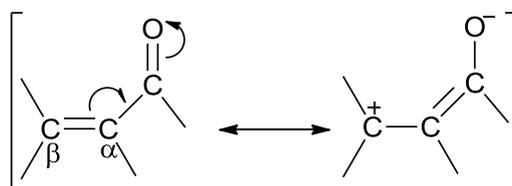
Pode-se observar um padrão semelhante no espectro no infravermelho, no que se refere às bandas características de carbonila (C=O) e olefina (C=C) de sistema carbonílico- α,β -insaturado, conforme ilustrado na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Comparação entre as bandas de C=O e C=C dos compostos 1a-1g e 2a-2c.

Substância	$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$	
	C=O	C=C
1a	1674	1622
1b	1665	1604
1c	1666	1611
1d	1657	1592
1e	1651	1594
1f	1639	1575
1g	1672	1613
2a	1634	1585
2b	1618	1582
2c	1674	1634

Observa-se que todas as carbonilas possuem número de onda compatível com uma carbonila de cetona α,β -insaturada ($< 1700\text{ cm}^{-1}$). Já as bandas de C=C aparecem em número de onda menor do que o esperado para um alceno ($1670\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$). Isso se justifica pela intensificação do caráter de ligação simples pela conjugação com a carbonila. Quando se introduz uma ligação C=C vizinha a um grupo C=O há deslocamento de elétrons π nas ligações C=O e C=C no híbrido de ressonância (**Figura 28**) diminuindo as constantes de força, resultando na diminuição da frequência tanto da carbonila quanto da ligação dupla.

Figura 28 – Efeitos da conjugação em ligação dupla vizinha a uma carbonila

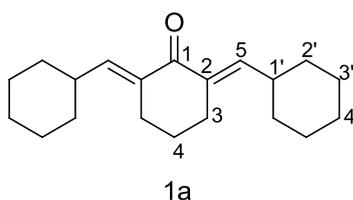


Geralmente a ligação C=C possui intensidade bastante fraca, bem mais fraca do que a ligação C=O. Entretanto, nos espectros das substâncias em questão observa-se intensidades de absorção fortes tanto para a ligação C=O quanto para a ligação C=C. Isso porque, se a ligação dupla estiver conjugada com um grupo carbonila, a absorção C=C move-se para frequências mais baixas, que a normal de um alceno e é também intensificada devido o dipolo elevado do grupo carbonila (PAVIA *et al.*, 2012).

No caso do composto monossustituído **2c** as bandas referentes à carbonila e à ligação dupla aparecem em um número de onda maior devido à menor extensão da conjugação. Observa-se, também, que a conjugação adicional com o anel aromático exerce uma influência na posição dessas bandas, já que o composto **1a**, que possui um anel ciclohexano ao invés de um anel aromático, apresentou, no espectro no IV, bandas referentes às ligações C=O e C=C em posições similares às de **2c**.

Os compostos **1a-1g** e **2a-2c** foram caracterizados, também, pela análise de seus espectros de RMN de ^1H . Uma comparação entre os deslocamentos químicos dos principais sinais observados nos espectros de RMN de ^1H desses compostos estão mostrados nas **Tabelas 2, 3 e 4**. Os compostos **1b, 1c e 1g** foram caracterizados de acordo com o trabalho de BRAGA, 2012.

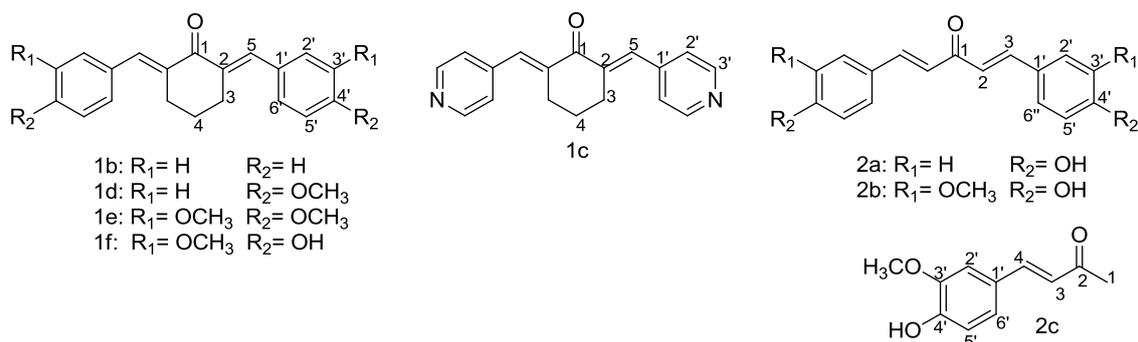
Tabela 2 - Dados do espectro de RMN de ^1H da substância 1a.



Subst.	Anel cetônico		Hidrogênios do anel ciclohexila				
	H-3	H-4	Olefina	H-1'	H-2'	H-3'	H-4'
	2,52-	1,72-			1,72-	1,25-	1,25-
1a	2,48	1,63	6,63	2,25	1,63	1,21	1,21

Os hidrogênios do anel ciclohexanona H-3 e H-4 de **1a** são observados da forma de um multipeto em σ 2,52-2,48 ppm e 1,72-1,63 ppm, respectivamente. O sinal da olefina se encontra na forma de um dupeto com constante de acoplamento de 10 Hz, uma vez que o hidrogênio olefínico acopla com H-1'. Os hidrogênios do anel ciclohexila são observados na forma de multipeto conforme deslocamentos especificados na **Tabela 2**.

Tabela 3 – Dados dos espectros de RMN de ^1H das substâncias 1b-1f e 2a-2c.



Subst.	Anel cetônico		Olefina	Hidrogênios aromáticos		H do substituinte
	H-3	H-4		aromáticos		
				Orto	Meta	
1b	2,95	1,8	7,83	7,50-7,31	7,50-7,32	-
1c	2,88	1,85-1,76	7,62	7,26	8,62	-
1d	2,92	1,8	7,77	7,45	6,94	3,84 (OCH_3)
1e	2,98-291	1,89-1,76	7,75	7,14-7,09	7,03-7,00	3,92 (OCH_3), 4,07 (OH),
1f	2,88	1,71	7,57	7,09-7,03	7,85	3,81 (OCH_3)
2a	-	-	7,57-H-2, 6,91-H-3	7,43	6,71	4,8 (OH) 9,66 (OH),
2b	-	-	7,22-H-3, 7,15-H-2	7,86-7,21	6,64	3,78 (OCH_3) 7,10 (OH),
2c	-	-	7,45-H-4, 6,58-H-3	6,92-6,25	7,07	3,91 (OCH_3)

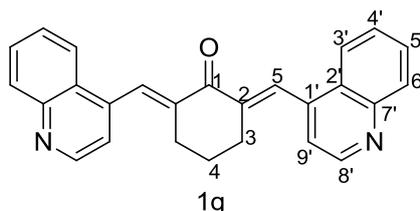
No espectro de RMN de ^1H de **1e**, **1f** e **2b** observam-se sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos na forma de multiplete entre σ 7,86-7,03. No espectro do composto **2b**, em σ 7,21, observa-se a presença de um duplete duplo indicando que o sinal referente à H-6' que acopla em *meta* com H-2' com constante de acoplamento de 2 Hz e em *orto* com H-5' com constante de acoplamento de 8 Hz. Foram observados dois dupletos com constantes de acoplamento 16 Hz para os hidrogênios olefínicos H-4 com σ 7,45 ppm e H-3 com σ 6,58 ppm para o composto **2c**.

Com base no deslocamento químico do sinal referente aos hidrogênios olefínicos (δ 7,0-7,7) pode-se concluir que foram obtidos isômeros geométricos com a configuração *E*, uma vez que o sinal dos hidrogênios nos isômeros com a configuração *Z* teria deslocamento químico próximo a δ 6,8 (VATSADZE *et al.*, 2006).

Os sinais referentes aos hidrogênios do anel ciclohexanona dos compostos **1d**, **1e** e **1f** nem sempre se mostraram com boa resolução e o que se observa são dois multipletos na região de δ 2,98-2,88 e δ 1,89-1,71, referente aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente.

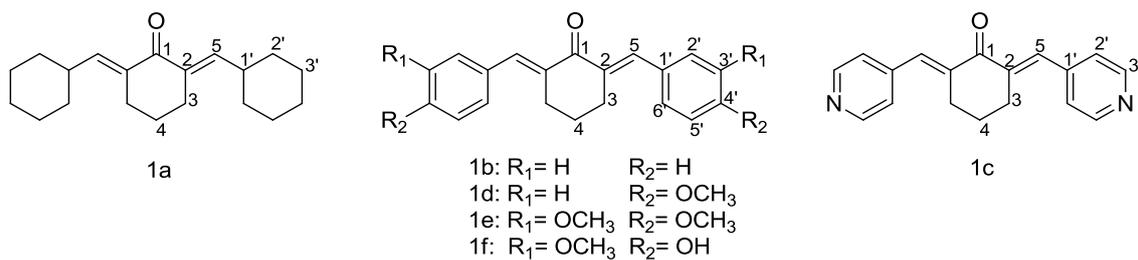
Os dados de RMN de ^1H de **1g** encontram-se resumidos na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Dados do espectro de RMN de ^1H da substância 1g

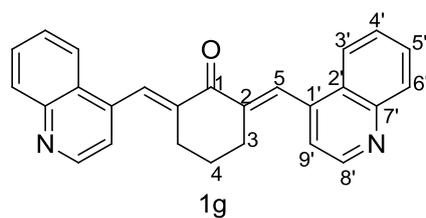


Subst.	Anel cetônico			Hidrogênios do anel quinolínico					
	H-3	H-4	Olefina	H-3'	H-4'	H-5'	H-6'	H-8'	H-9'
			8,17-	8,32-	7,99-	8,17-	8,32-	9,31-	7,99-
1g	2,74	1,68	8,08	8,23	7,89	8,08	8,23	9,29	7,89

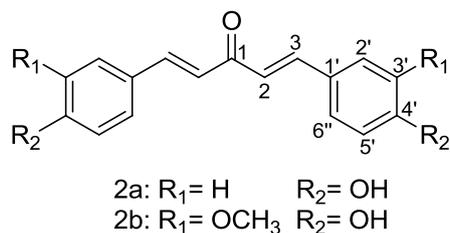
Nas **Tabelas 5, 6 e 7** estão descritos os valores de deslocamento químico dos sinais de carbono das substâncias **1a-1f**, **1g** e **2a-2c**, respectivamente. As atribuições dos sinais de carbono de todas as substâncias foram auxiliadas pela análise dos respectivos espectros de DEPT 135.

Tabela 5 – Dados do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 1a-1f

Subst.	Anel cetônico				Olefina	Carbonos aromáticos/Ciclohexila					
	C=O	C=2	C=3	C=4		1'	2'	3'	4'	5'	6'
1a	190,5	134,3	26,46	22,84	145,5	37,35	31,96	25,83	26,08	-	-
1b	190,3	136,1	28,4	22,9	136,9	135,9	128,3	130	128,5	-	-
1c	189,3	139,3	28,3	22,5	134,4	143,2	124,1	150,1	-	-	-
1d	190,2	134,4	28,62	23,11	136,6	128,8	132,4	114	-	-	-
1e	189,9	134,6	28,45	23,03	136,7	129,1	114	149,8	148,8	111,2	123,9
1f	188	127	28,03	22,65	136,2	133,5	124,3	147,9	147,5	114,8	115,6

Tabela 6 – Dados do espectro de RMN de ^{13}C da substância 1g

Substância		
1g		
187,7	C=O	Anel cetônico
139,7	C-2	
28,0	C-3	
22,1	C-4	
134,0	Olefina	Carbonos aromáticos
150,4	C-1'	
127,0	C-2'	
123,2	C-3'	
126,0	C-4'	
130,2	C-5'	
129,8	C-6'	
143,1	C-7'	
145,8	C-8'	
122,1	C-9'	

Tabela 7 – Dados do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 2a e 2b

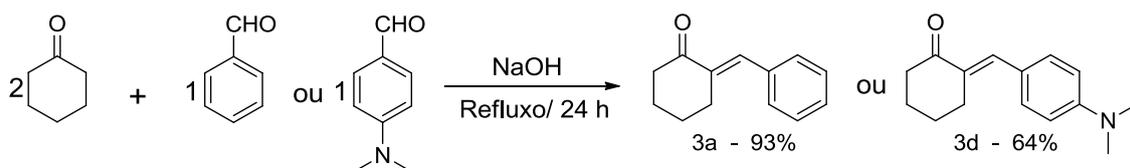
Subst.	Olefina			Carbonos aromáticos					
	C=O	C=2	C=3	1'	2'	3'	4'	5'	6'
2a	191,84	123,59	145,3	127,83	131,82	117,06	161,66	-	-
2b	188,04	123,04	142,78	126,37	111,42	149,52	147,97	115,69	123,36

6.4 Síntese dos compostos monoarilados

6.4.1 Síntese das 2-benzilideno-ciclohexanonas 3a e 3d

Diferentemente das 2,6-bis-(arilmetilideno)-cicloalcanonas, as substâncias **3a** e **3d** foram sintetizadas utilizando um equivalente do benzaldeído e dois equivalentes da ciclohexanona em meio isento de etanol ou qualquer outro solvente orgânico (**Figura 29**). As reações foram realizadas com catálise básica, sob refluxo.

Figura 29 – Obtenção de 3a e 3d.



Uma comparação entre as metodologias utilizadas para obtenção das mono e di- aril-alcanonas são resumidas na **Tabela 8**.

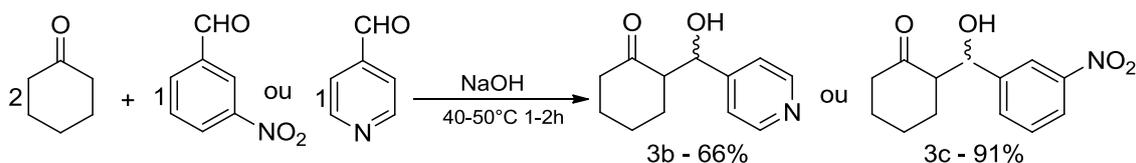
Tabela 8 – Principais diferenças na forma de obtenção dos produtos de condensação mono e dissustituídos.

Composto sintetizado		
Condições de síntese	Monossustituído	Dissustituído
Uso de solvente orgânico	não	sim
Temperatura	refluxo	ambiente
Tempo de reação	24 horas	30 a 120 min.

A ausência de solvente orgânico parece ser um ponto-chave para se obter os produtos monoarilados, já que toda vez que a reação foi realizada em solvente orgânico, obteve-se os produtos diarilados. Especula-se que, uma vez que ocorra a primeira condensação aldólica, o produto seja insolúvel no meio aquoso e precipite, dificultando, assim, a ocorrência de uma segunda reação de condensação aldólica. A reação é conduzida sob refluxo para favorecer a solubilidade dos reagentes no meio aquoso.

6.4.2 Síntese das 2-benzilideno-ciclohexanona 3b e 3c

Para a obtenção dos produtos **3b e 3c**, inicialmente tentou-se seguir a técnica de obtenção dos produtos **3a e 3d**. Após 2 horas de reação foi observado um escurecimento da mistura reacional. O monitoramento por CCD revelou uma possível degradação dos reagentes com a presença de várias manchas na placa. Após essas observações repetiu-se a reação em banho de gelo e, nesse caso, o consumo total dos reagentes foi detectado por CCD após 1 ou 2 duas horas. O produto isolado foi analisado por espectroscopia no IV, que demonstrou a presença de uma banda intensa e larga por volta de 3400 cm^{-1} , indicando a formação de um produto hidroxilado, compatível com a estrutura representada na **Figura 30**. As condições brandas da reação (baixa temperatura) dificultaram a ocorrência da etapa de desidratação.

Figura 30 – Obtenção de 3b e 3c.

O produto isolado foi submetido à nova reação de forma a favorecer a etapa de desidratação, em condições de catálise ácida e básica e aumento de temperatura (50 °C), porém o que se observou foi a degradação do produto.

Posteriormente, a reação foi repetida a temperatura de 40 °C na tentativa de viabilizar a etapa de desidratação. Entretanto, nessas condições, isolou-se novamente o produto hidroxilado.

6.5 Caracterização dos compostos 3a-3d

Uma comparação dos espectros no infravermelho dos produtos hidroxilados e não hidroxilados pode ser observada na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Comparação dos dados de infravermelho dos produtos monoarilados hidroxilados e não hidroxilados.

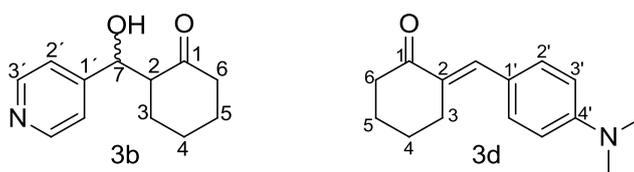
Substância	$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$		
	C=O	C=C	O-H
3a	1678	1590	-
3b	1703	-	3098
3c	1697	-	3472
3d	1657	1608	-

A frequência de absorção do grupo C=O para os compostos **3b** e **3c** está de acordo com o esperado, que, segundo Pavia, se encontra por volta de 1715 a 1700 $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$ quando esse grupo não está conjugado (PAVIA *et al.*, 2012). Já

nos casos em que há conjugação da carbonila com um grupo C=C, essa banda aparece em valores mais baixos, o que pode ser visto nos compostos **3a** e **3d**. No espectro no infravermelho de **3c** também foram observadas bandas características do grupo nitro com deformação axial assimétrica em 1524 cm^{-1} e simétrica em 1347 cm^{-1} .

Os dados mais característicos observados no espectro de RMN de ^1H de **3b** e **3d** estão mostrados na **Tabela 10**. Apesar das várias tentativas não foi possível a purificação dos compostos **3a** e **3c** e, por essa razão, os dados dos espectros de ^1H e ^{13}C de RMN dessas substâncias não foram incluídos na Tabela.

Tabela 10 – Dados dos espectros de RMN de ^1H das substâncias **3b** e **3d**.

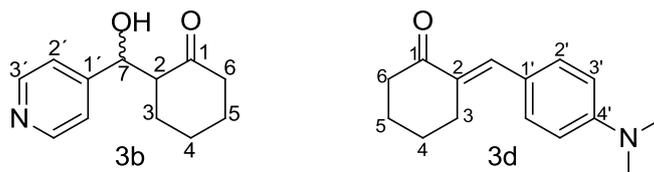


Subst.	Anel cetônico					Olefina
	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	
3b	2,09-1,53	2,09-1,53	2,09-1,53	2,30-2,26	5,13	-
3d	2,64-2,48	1,93-1,69	1,93-1,69	2,84	-	7,74

Assim como nos espectros dos compostos dissustituídos, os dos monossustituídos apresentaram os sinais dos hidrogênios metilênicos na faixa de δ 2,84-1,69. O sinal referente ao hidrogênio da olefina foi observado na mesma faixa do sinal correspondente no espectro dos compostos dissustituídos **Tabela 3**, indicando que também foram obtidos os isômeros *E*. No caso do composto **3b**, que não possui olefina, observa-se a presença de um sinal próximo a δ 5,1, compatível com hidrogênio ligado a carbono hidroxilado. Esse sinal aparece como um tripleto com constante de acoplamento $\sim 4\text{ Hz}$, em razão do acoplamento entre H-7 e os hidrogênios H-2 e OH.

Ainda para reforçar as evidências de que o composto **3b** foi obtido na forma hidroxilada, na **Tabela 11** estão descritas as principais diferenças observadas nos espectro de RMN de ^{13}C dos compostos monossustituído hidroxilado e olefínico.

Tabela 11 – Dados comparativos do espectro de RMN de ^{13}C de **3b** hidroxilado e **3d** não hidroxilado.



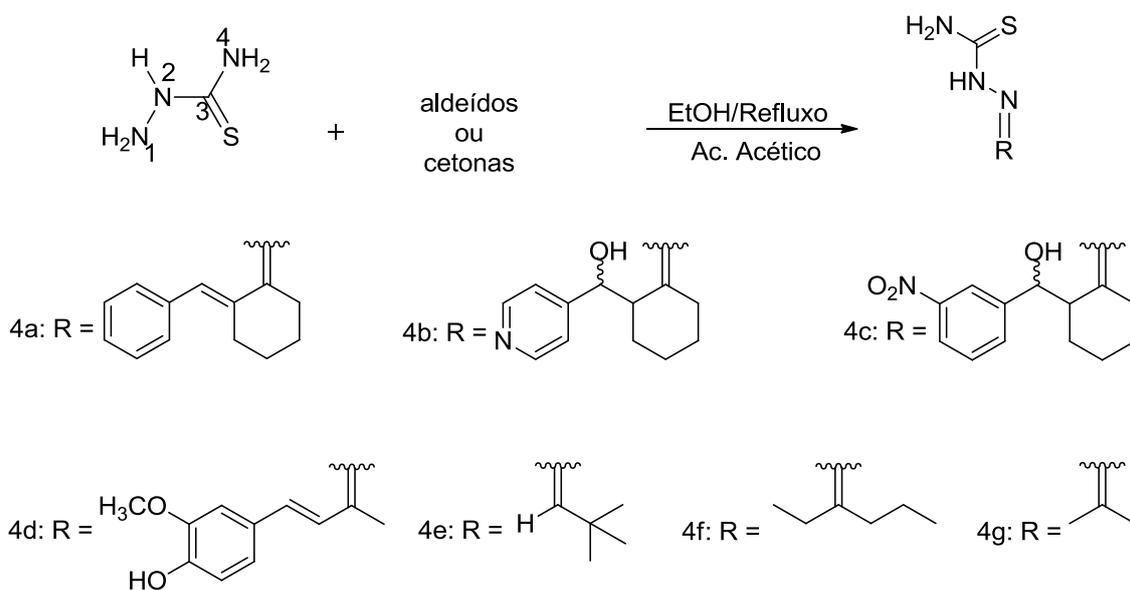
Subst.	Ciclohexanona							Olefina
	C=O	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	
3b	210,28	56,41	23,94	25,88	26,82	41,84	68,26	-
3d	201,15	131,94	29,23	24,04	23,36	40,1	-	137,26

Como pode ser observado na **Tabela 11**, o sinal do carbono carbonílico de **3b** encontra-se em $\sim \delta$ 210, quase 10 unidades acima do valor do sinal do carbono carbonílico do compostos α,β -insaturado **3d**. Os valores estão de acordo com o esperado segundo Pavia e colaboradores: cetona α,β -insaturada $\sim \delta$ 210-190 e cetona cíclica $\sim \delta$ 220-200 (PAVIA *et al.*, 2012).

6.6 Síntese das tiossemicarbazonas **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **4e** **4f** e **4g**

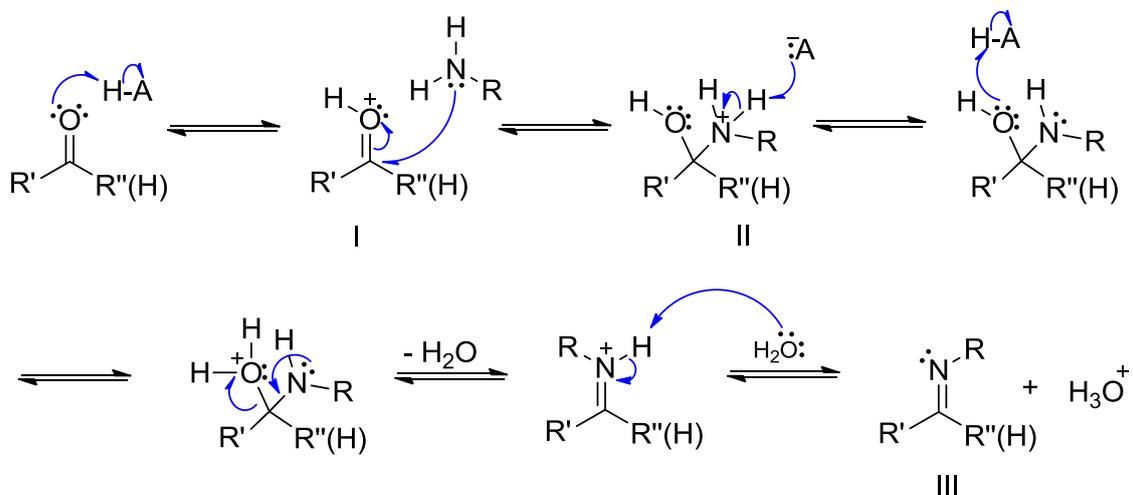
As tiossemicarbazonas foram sintetizadas por meio de reação de condensação entre a tiossemicarbazida e aldeídos e cetonas, utilizando-se ácido acético em etanol 95% (**Figura 31**).

Figura 31 – Equação geral para obtenção das tiossemicarbazonas.



Nessa reação, o ácido acético é utilizado como catalisador para obtenção de $\text{pH} = 4,5 \pm 0,5$. Esse valor de pH é fundamental para o bom andamento da reação, uma vez que, em pH acima dessa faixa, não haveria a protonação da carbonila do aldeído ou cetona, o que é importante para acelerar a reação. Já o pH abaixo dessa faixa, poderia ocorrer a protonação do nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida, impedindo, assim, que atue como nucleofílico. O mecanismo da reação para obtenção das tiossemicarbazonas se inicia com a protonação do composto carbonílico pelo catalisador, o íon hidrônio, seguido de ataque nucleofílico à carbonila ativada pelo nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida. Em seguida tem-se então a formação da ligação entre o nitrogênio e o carbono da carbonila (I) com a formação do intermediário hidroxilado (II), conforme mostrado no mecanismo representado na **Figura 32**. Na etapa seguinte, ocorre a protonação da hidroxila, transformando-a em um bom grupo abandonador, com conseqüente perda de uma molécula de água e formação da imina (III), com regeneração do íon hidrônio catalítico (SOLOMONS e FRYHLE, 2006).

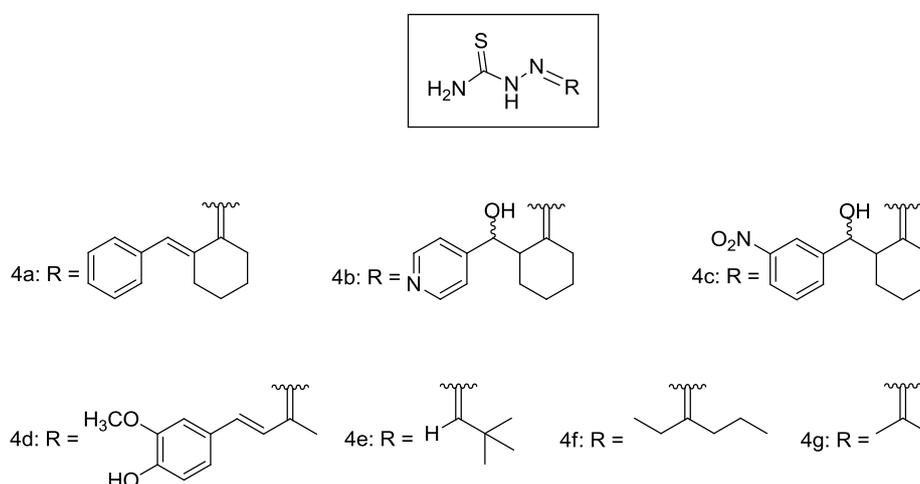
Figura 32 – Mecanismo proposto para a reação de formação da tiossemicarbazona



As tiossemicarbazonas **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **4e**, **4f** e **4g** foram obtidas com rendimentos que variaram entre 19-98,5 %.

Um fato curioso foi observado após a etapa de purificação da tiossemicarbazona **4f**, quando foram isoladas, além de **4f**, a tiossemicarbazona **4g**, derivada da acetona. Vale ressaltar que em momento algum foi usada acetona como solvente na reação. A reação foi repetida e, novamente, foram isoladas as duas tiossemicarbazonas, **4f** e **4g**, com 60 e 19 % de rendimento, respectivamente. O que se pode presumir é que o reagente (henan-3-ona) possui como contaminante, a acetona.

6.7 Caracterização das tiossemicarbazonas **4a**, **4b**, **4c**, **4d**, **4e**, **4f** e **4g**



As tiossemicarbazonas **4a-4g** foram caracterizadas pela determinação do seu ponto de fusão e análises dos espectros no IV e de RMN de ^1H e ^{13}C , exceto a tiossemicarbazona **4c** que não foi possível realizar sua purificação. No espectro no infravermelho dos compostos **4a-4g** são observadas bandas correspondentes à deformação axial de C=N na região de 1593-1606 cm^{-1} . Nos espectros no IV das tiossemicarbazonas **4a** e **4d** observa-se, ainda, banda característica de olefina (C=C) α,β -insaturada (**Tabela 12**). Para os compostos **4b** e **4c** se observa a presença de uma banda em $\sim 3400\text{cm}^{-1}$, indicando a presença do grupo funcional hidroxila. Essas informações são essenciais para diferenciar os produtos **4a** e **4d** dos produtos **4b** e **4c** que não possuem a conjugação do grupo C=C com o grupo C=S. No espectro no IV do produto **4d** também se observa uma banda característica de O-H, nesse caso, relacionada à hidroxila fenólica. Esses dados estão resumidos na **Tabela 12**.

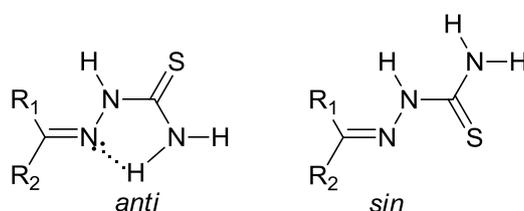
Tabela 12- Dados do espectro no infravermelho dos compostos 4a-4g.

Substância	$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$		
	C=N	C=C	O-H
4a	1593	1492	-
4b	1606-1583	-	3454
4c	1603	-	3392
4d	1601-1498	1588	3450
4e	1597-1520	-	-
4f	1593-1497	-	-
4g	1593	-	-

De acordo com o descrito na literatura, as tiossemicarbazonas que não possuem substituintes no N-4, apresentam uma estrutura aproximadamente planar e possuem preferencialmente o átomo de enxofre na posição *anti* em relação ao nitrogênio imínio. Vários fatores contribuem para esse arranjo estrutural, porém o que talvez seja mais plausível é a possibilidade da molécula adotar uma conformação que propicie a formação de uma ligação de

hidrogênio entre o átomo de nitrogênio da ligação N=C e os hidrogênios do grupo -NH₂. Essa ligação de hidrogênio é favorecida em razão da formação de um anel de cinco membros, conforme ilustrado na **Figura 33** (TENÓRIO *et al.*, 2005).

Figura 33 – Conformação anti e sinperiplanar na tiossemicarbazona.



Na **Tabela 13** estão descritos os valores de deslocamento químico dos sinais referentes aos hidrogênios do grupo NH e -NH₂ da porção tiossemicarbazida, observados no espectro de RMN de ¹H das tiossemicarbazonas.

Tabela 13 – Diferença de deslocamento observada para os sinais dos hidrogênios da porção tiossemicarbazona.

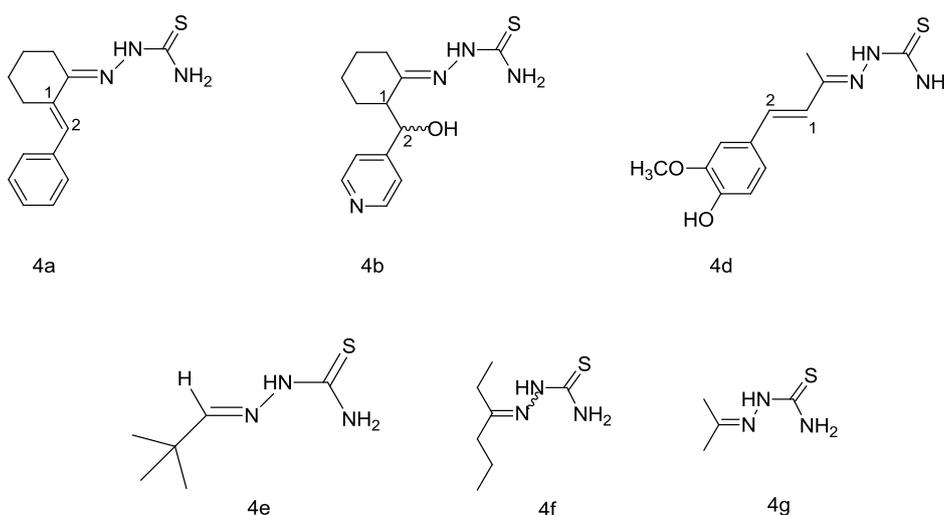
Substância	N-H	-NH ₂	
4a	10,29	8,21	7,78
4b	10,12	8,02	7,34
4d	9,32	8,21	7,75
4e	8,00	7,32	
4f	8,79	7,29	6,81
4g	9,88	7,97	7,5

As tiossemicarbazonas sintetizadas **4a**, **4b** e **4d-4g** não possuem substituição no N-4 e isso as tornam com uma estrutura aproximadamente planar como descrito por Tenório (TENÓRIO *et al.*, 2005). Dessa forma elas terão uma estrutura preferencialmente *anti*, com o átomo de enxofre *anti* em relação ao nitrogênio imínio possibilitando uma interação intramolecular por meio de uma ligação de hidrogênio formando um ciclo de cinco membros conforme mostrado

na **Figura 33**. Todas as tiossemicarbazonas foram obtidas como um único isômero, apenas a tiossemicarbazona **4f** foi obtida como mistura *E* e *Z*.

O resumo dos dados do espectro de RMN de ^{13}C das tiossemicarbazonas **4a**, **4b**, **4d-4g** está representado na **Tabela 14**

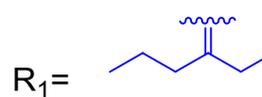
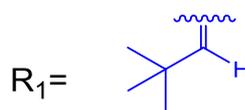
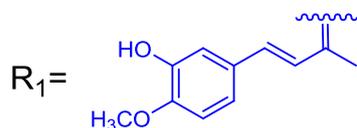
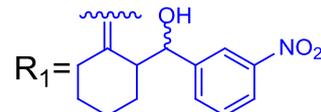
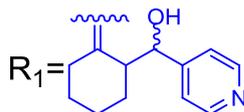
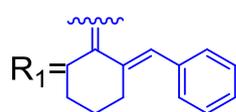
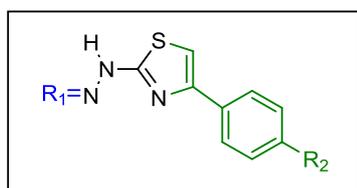
Tabela 14 – Dados do espectro de RMN de ^{13}C das tiossemicarbazonas 4a-4g.



4a	4b	4d	4e	4f	4g	
152,44	156,79	149,50	154,19	157,83	151,72	C=N
136,31	49,97	134,22	-	-	-	C-1
127,80	68,90	120,84	-	-	-	C-2
178,76	178,57	178,51	177,75	178,87	178,39	C=S

Observa-se que os deslocamentos químicos para o grupo C=S mantêm-se, aproximadamente, na mesma faixa, σ 178,87-177,75. Os sinais observados para a ligação C=N variaram entre σ 157,83-149,50. Para o produto hidroxilado, **4b** o deslocamento químico do carbono C-2, encontra-se próximo a σ 68,90, característico de carbono hidroxilado. Já para **4a** e **4d** os deslocamentos dos carbonos C-1 e C2 encontram-se em σ 136,31-127,80 e 134,22-120,84, respectivamente, característicos de carbonos olefínicos.

6.8 Síntese dos heterociclos tiazólicos 5a-5p



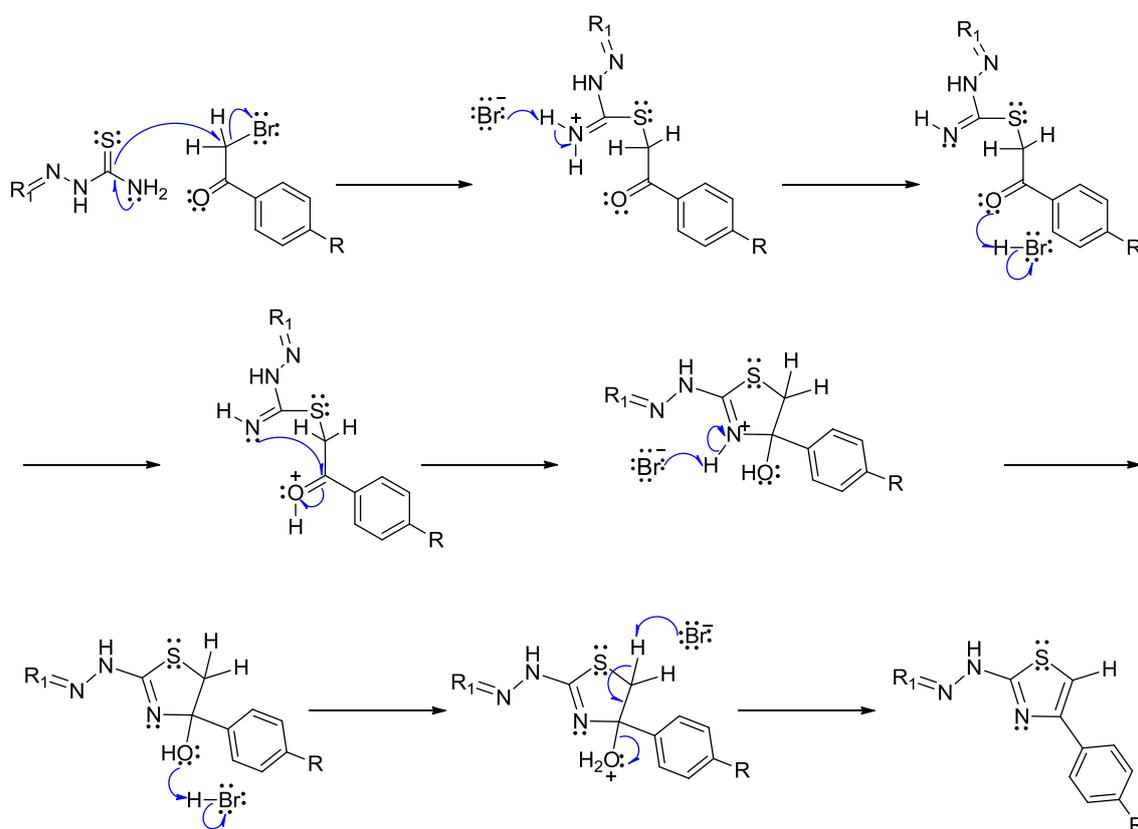
Os heterociclos hidrazino-tiazólicos **5a-5p** foram obtidos por meio da reação de ciclização entre as tiossemicarbazonas com a 2-bromo-acetofenona não substituída, substituída na posição 4 do anel aromático por um átomo de cloro ou por um grupo metoxila, utilizando isopropanol como solvente da reação. Os heterociclos foram obtidos com rendimento que variaram de 9-95,3 %.

A finalidade de se introduzir um substituinte no anel aromático é para estabelecer uma relação estrutura atividade. A presença de um grupo metoxila, por exemplo, pode introduzir um ponto de interação adicional com o alvo molecular, atuando como aceptor de ligação de hidrogênio e, aumentando assim, o número e a força de interação, além de poder modular a solubilidade. A inserção de um átomo de cloro também pode ser importante para atividade, principalmente no bloqueio de possíveis reações metabólicas no anel aromático e, dessa forma, pode constituir uma vantagem nos parâmetros

farmacocinéticos, como aumentar a meia vida do composto prolongando o tempo de ação.

O mecanismo proposto para a reação de formação dos heterociclos se inicia com o ataque nucleofílico do átomo de enxofre, preferencialmente, ao carbono eletrofílico, contendo um bom grupo abandonador (-Br), da 2-bromoacetofenona. A carbonila vizinha ao carbono recentemente atacado pelo enxofre é ativada abstraindo um próton do meio reacional. Em seguida, o par de elétrons do nitrogênio promove, *via* reação de ciclização intramolecular, um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila ativada, levando à formação de um anel de cinco membros. Na etapa final ocorre uma reação de desidratação, que é favorecida pela formação de um sistema aromático, levando à obtenção do núcleo tiazólico (**Figura 34**) (HATZSCH e WEBER, 1887).

Figura 34 – Mecanismo proposto para a reação de formação do heterociclo tiazólico.

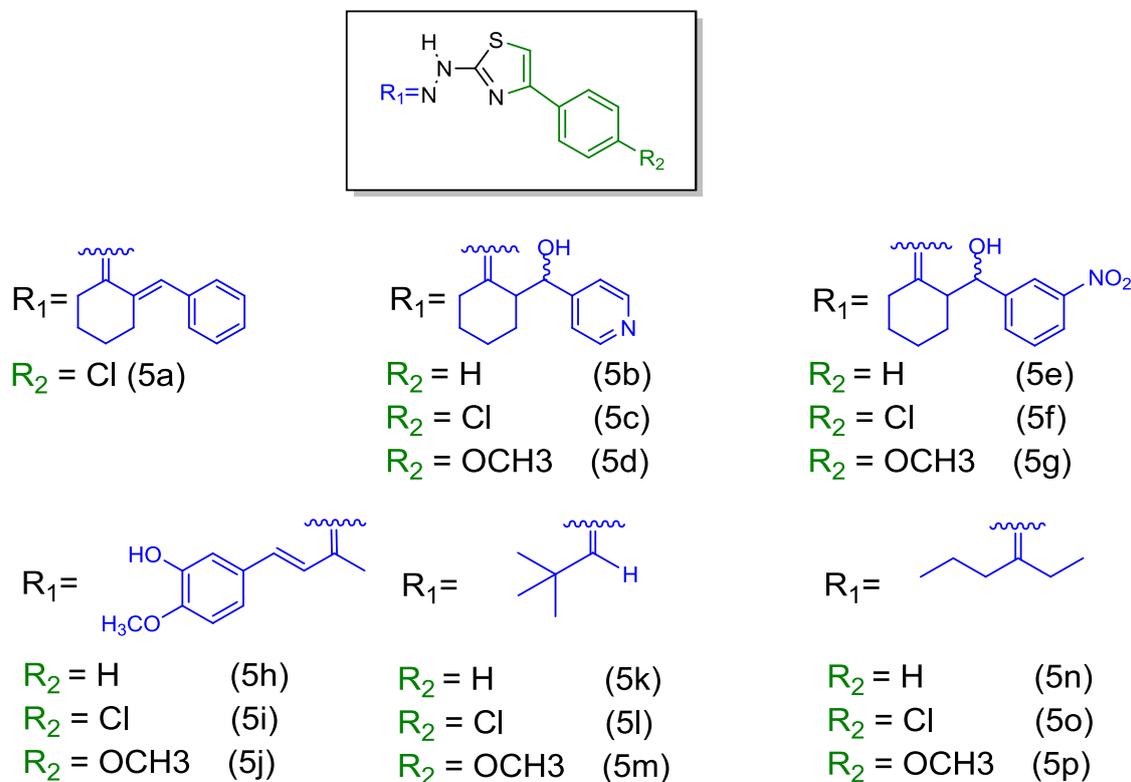


6.9 Caracterização dos heterociclos tiazólicos 5a-5p

Os heterociclos hidrazino-tiazólicos obtidos foram caracterizados pela determinação do ponto de fusão e análises dos espectros no infravermelho e de RMN de ^1H e ^{13}C .

No espectro no infravermelho dos heterociclos, as bandas relevantes são as mesmas discutidas para as tiossemicarbazonas, principalmente as bandas de $\text{C}=\text{N}$ com frequências observadas entre $1620\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$. A confirmação das estruturas se deu, principalmente pela análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . Uma representação dos sinais característicos observados nos espectros de RMN e que evidenciam a formação do anel tiazólico dos heterociclos **5a-5p** está mostrada na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Dados característicos de RMN de ^1H e ^{13}C , indicativos da formação dos heterociclos 5a-5p.



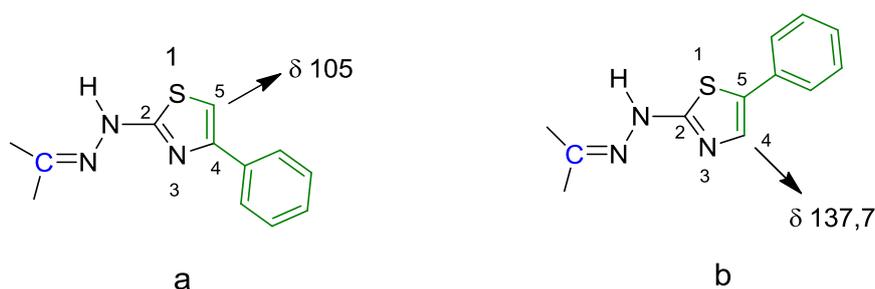
Subst.	H-5	C-2	C-4	C-5	Subst.	H-5	C-2	C-4	C-5
	7,38-								
5a	7,23	170,33	152,64	105,29	5i	7,17	169,70	149,23	105,01
						7,41-			
5b	7,17	170,14	153,48	103,30	5j	7,36	169,01	148,55	101,63
5c	7,04	179,24	153,41	104,14	5k	7,24	169,08	148,09	103,49
5d	6,91	169,99	153,69	101,12	5l	7,30	169,00	149,01	103,78
5e	-	-	-	-	5m	7,09	169,06	146,73	101,59
5f	7,05	169,62	102,72	103,67	5n	6,73	170,14	145,03	102,04
5g	-	-	-	-	5o	6,81	170,15	139,35	101,76
	7,50-								
5h	7,12	169,19	148,71	103,81	5p	6,54	170,04	141,84	99,28

Os dados do espectro de RMN de ^{13}C dos heterociclos **5a-5d**, **5f**, **5h-5p**, mostram que há um padrão de deslocamento químico dos carbonos tiazólicos C-2, (σ 170,33-169,00) e C-5 (σ 99,28-105,29). O deslocamento químico de C-4 variou de σ 139,35-153,69. Os deslocamentos mais fora do padrão são atribuídos aos compostos **5n**, **5o** e **5p** que pode ser influência do grupo substituinte, uma cadeia alquila constituída apenas por carbonos metílicos e metilênicos que exercem menor influência em desblindar o núcleo de átomos vizinhos.

No espectro de RMN de ^1H de **5a**, **5h** e **5j**, os sinais referentes ao hidrogênio tiazólico estão sobrepostos aos sinais dos hidrogênios aromáticos. O deslocamento químico referente ao carbono $\text{C}=\text{C}$ (C-5) do anel tiazólico ($\sim \delta$ 102) é compatível com a formação do regioisômero 2,4-dissubstituído, indicando que houve um ataque nucleofílico do átomo de enxofre ao carbono eletrofílico da 2-bromo-acetofenona. Os deslocamentos químicos dos carbonos do anel tiazólico 2,4-dissubstituído (regioisômero a) e 2,5-dissubstituído (regioisômero b) foram simulados utilizando o programa ChemBioDraw Ultra, conforme mostrado na **Figura 35**. Com base nesses valores percebe-se que se

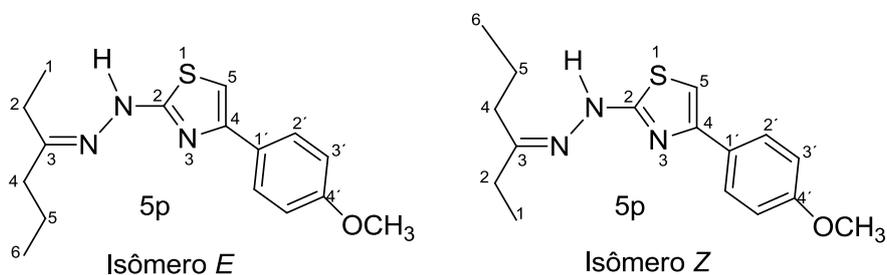
o regioisômero b tivesse sido formado, o sinal referente ao carbono $\underline{C}H=C$ (C-4) seria mais desblindado por estar vizinho a um átomo mais eletronegativo, o nitrogênio. Essa regioseletividade já era esperada, visto que o átomo de enxofre possui um caráter mais nucleofílico quando comparado com o átomo de nitrogênio.

Figura 35 – Valores de deslocamentos químicos simulados para o carbono hidrogenado do anel tiazólico, referente aos regioisômeros a e b.



Tenório e colaboradores mostraram em seus estudos que as tiossemicarbazonas podem ser obtidas como misturas de isômeros geométricos *E* e *Z* (Figura 36) no estado sólido. Quando em solução há uma tendência de isomerização da configuração *Z* para *E*, o que se justifica pela maior estabilidade termodinâmica do isômero *E* (TENÓRIO *et al.*, 2005). Tal fato foi observado para os heterociclos **5f**, **5n**, **5o** e **5p**.

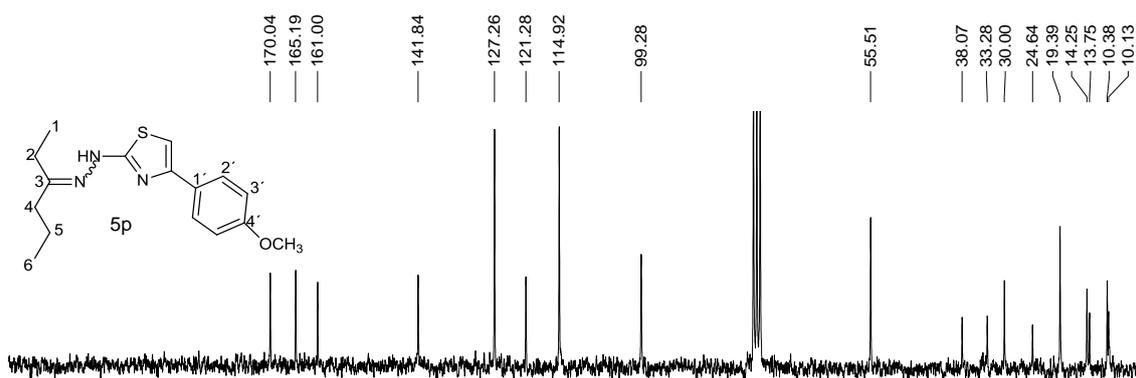
Figura 36 – Isômeros *E* e *Z* do composto **5p.**



No espectro de RMN de ^{13}C de **5n**, **5o** e **5p** pode-se observar os sinais dos carbonos encontram-se duplicados, sendo esse fenômeno mais pronunciado nos compostos **5o** e **5p**. Pegando-se o espectro do composto **5p** como

exemplo (**Figura 37**), observa-se que os sinais referentes aos carbonos metílicos C-1 e C-6, por estarem mais distantes da ligação dupla C=N, sofrem menor influência de um isômero para o outro, quase nem se desdobrando. O próximo carbono com influência crescente do efeito da mistura de isômeros é o carbono metilênico C-5, que por estar mais próximo da ligação dupla em relação à C-1 e C-6, apresenta um desdobramento mais significativo do sinal de seu carbono. Já os sinais referentes aos carbonos metilênicos C-4 e C-2 são os que apresentam um desdobramento mais pronunciado, nessa ordem, chegando a apresentar uma diferença de quase 10 ppm de variação no deslocamento químico de um isômero para o outro isômero. Vale lembrar que os isômeros geométricos desses compostos não foram separados.

Figura 37 – Espectro de RMN de ^{13}C de **5p**, mostrando o desdobramento dos sinais de carbono dos isômeros *E* e *Z* dos heterociclos tiazólicos.



No espectro de RMN de ^{13}C de **5f**, esses desdobramentos dos sinais não foram tão pronunciados. A confirmação da presença dos isômeros *E* e *Z* só pôde ser realizada quando houve separação dos isômeros por cromatografia em coluna de sílica. Observando-se os espectros dos isômeros, após separação (**Figuras 38 e 39**), percebe-se que já havia iniciado a conversão de um isômero em outro, de forma que já se observa sinal duplicado, em destaque, referente ao hidrogênio H-7. Houve uma pequena diferença de deslocamento do sinal de H-7, σ 5,23 para o isômero *E* e σ 5,19 no isômero *Z* (**Figuras 38 e 39**).

Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H de 5f com destaque para o deslocamento químico do sinal de H-7 nos isômeros *E* e *Z*, majoritariamente o isômero *E*.

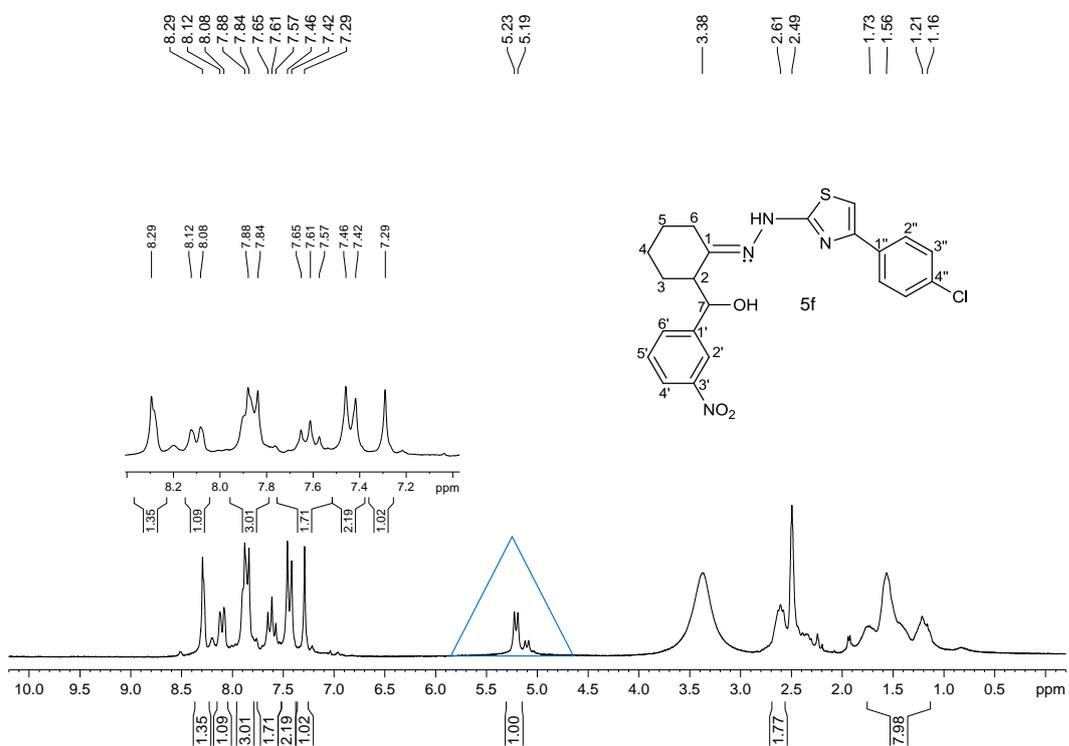
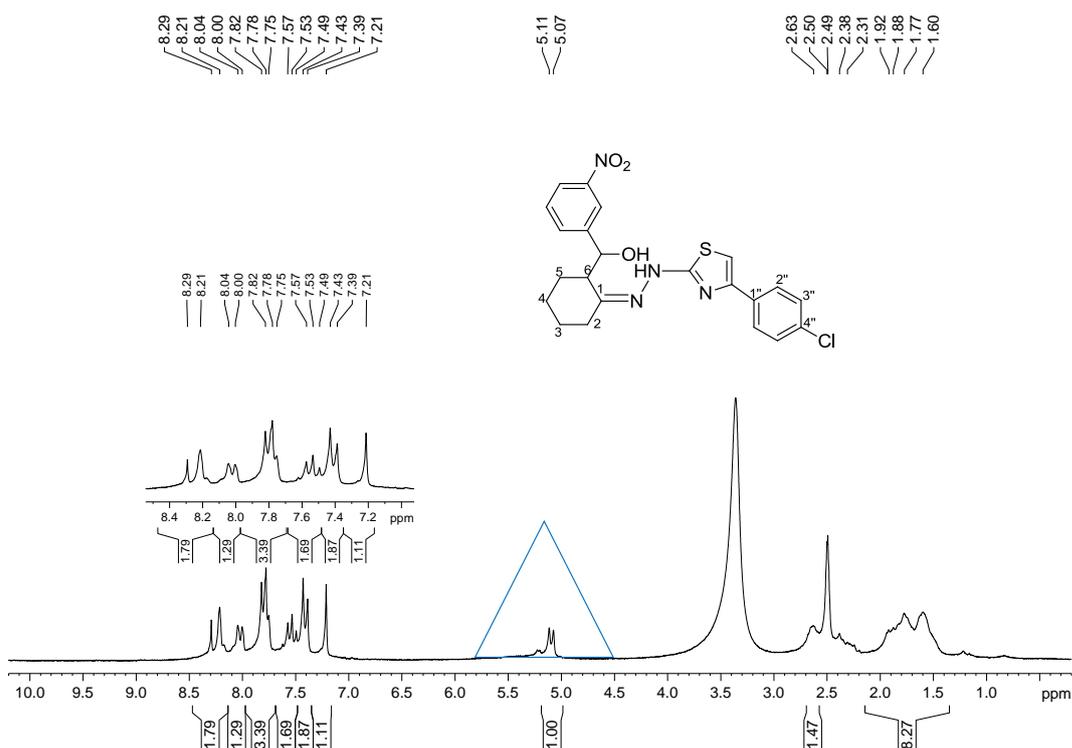
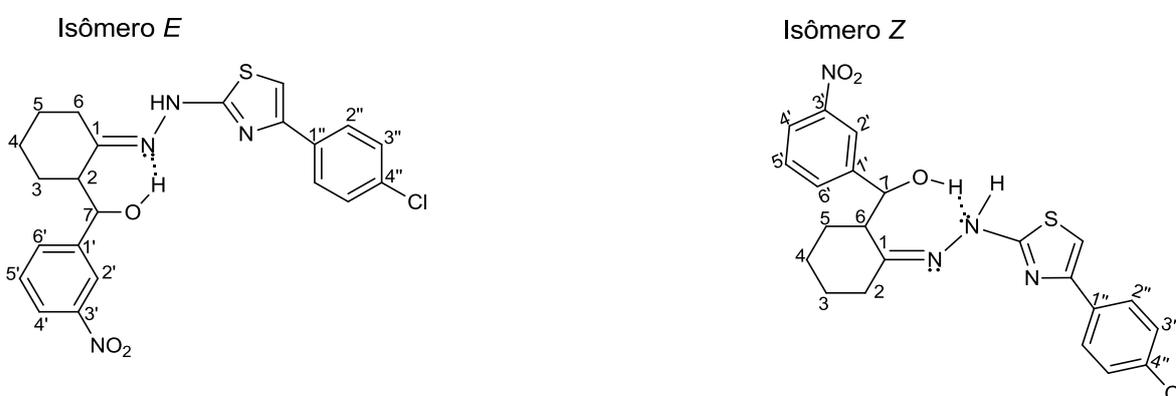


Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H de 5f com destaque para o deslocamento químico do sinal de H-7 nos isômeros *E* e *Z*, majoritariamente o isômero *Z*.



A diferença de deslocamento do sinal de H-7 pode estar associada à possibilidade de uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o par de elétrons do nitrogênio da imina com o hidrogênio da hidroxila de C-7, com a formação de um anel de seis membros (**Figura 40**). Essa interação só é possível na conformação do isômero *E*. Na conformação *Z*, essa interação resultaria na formação de um anel de sete membros, pouco favorecida.

Figura 40– Proposta de representação esquemática da ligação de hidrogênio intramolecular do isômero *E* de 5f.



Assim, o sinal mais desblindado em σ 5,23 foi atribuído ao isômero *E*, já que o par de elétrons do nitrogênio da imina está sendo utilizado para fazer a ligação com o hidrogênio da hidroxila, deixando o nitrogênio parcialmente positivo, o que torna o núcleo dos átomos vizinhos menos blindado devido o efeito retirador de elétrons. Os demais isômeros não foram separados em virtude da baixa estabilidade dos produtos que sofriam degradação na coluna quando se tentava realizar a separação.

6.10 Ensaios Biológicos

6.10.1 Ensaios antioxidante *in vitro*

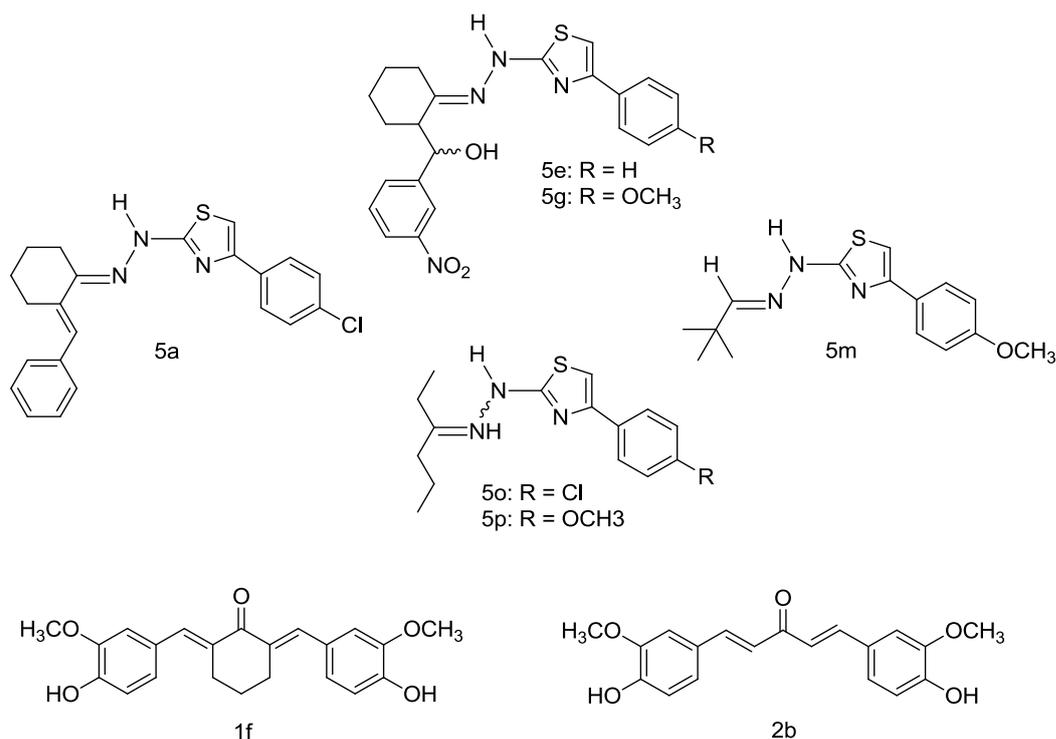
O potencial antioxidante de análogos da curcumina e derivados hidrazino-tiazólicos foram testados na concentração de 100 μ M utilizando-se três testes

in vitro: DPPH, ABTS e FRAP. Os testes de DPPH e ABTS se baseiam no consumo dos radicais DPPH e ABTS por meio de uma substância antioxidante. Já o teste do FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) se baseia na capacidade de substâncias antioxidantes, em meio ácido, reduzirem o complexo férrico tripiridiltriazina $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ a complexo ferroso $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{+2}$.

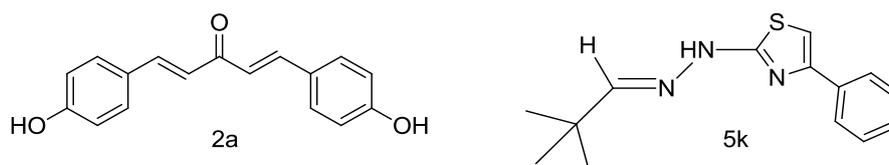
Os resultados dos ensaios estão resumidos na **Tabela 16** para os ensaios DPPH, ABTS e FRAP. Para efeito de comparação a curcumina foi utilizada como controle positivo. Os dados são expressos na forma de porcentagem de captura dos radicais DPPH e ABTS e porcentagem da capacidade de redução do ferro no método FRAP. No caso do ensaio FRAP, a porcentagem de redução do ferro foi calculada em relação ao padrão utilizado, o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-ácido carboxílico), um análogo da α -tocoferol (vitamina E) solúvel em água. Substâncias com atividade superior ao Trolox apresentaram valores de porcentagem superiores a 100%.

Tabela 16 – Resultados obtidos nos ensaios biológicos *in vitro* nos testes de antioxidantes para os diferentes métodos testados.

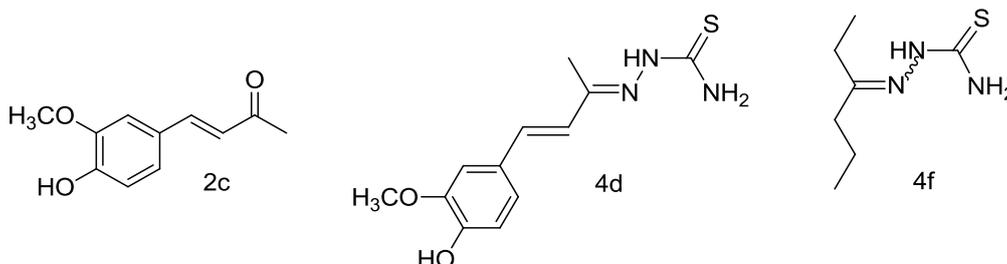
Substância	% inibição (radical DPPH)	% inibição (radical ABTS)	% Redução do Ferro FRAP
Curcumina	40,1	30,2	102,6
1d	0,1	0,0	9,2
1e	0,0	0,0	5,2
1f	<u>38,7</u>	24,2	97,8
2a	0,2	<u>29,4</u>	18,5
2b	<u>41,1</u>	17,1	91,3
2c	27,3	13,0	<u>130,6</u>
4d	22,6	11,8	<u>152,3</u>
4e	25,8	12,6	13,4
4f	10,1	27,0	<u>150,1</u>
5a	<u>67,8</u>	9,8	53,8
5b	20,8	9,5	68,0
5c	39,3	9,1	58,6
5e	<u>61,4</u>	26,0	64,8
5f	38,9	18,3	64,1
5g	<u>74,8</u>	13,0	65,2
5k	37,2	<u>32,6</u>	82,4
5l	16,1	22,7	28,9
5m	<u>57,3</u>	18,7	63,0
5n	38,3	10,7	62,1
5o	<u>53,9</u>	10,6	75,7
5p	<u>61,6</u>	11,4	68,7



Com base nos resultados mostrados na **Tabela 16** pode-se observar que sete substâncias sintetizadas apresentaram atividade antioxidante igual ou superior à curcumina no ensaio de DPPH (valores sublinhados na Tabela 16). Entre os derivados da curcumina que mais se destacaram estão os compostos **1f** e **2b** apresentando atividade de 38,7 e 41,1 %, respectivamente, de inibição do radical DPPH. Isso pode ser inferido porque nas estruturas desses compostos permanece o anel aromático 3-metoxi-4-hidroxi-dissubstituído, o mesmo padrão observado para a curcumina, confirmando que esses substituintes são importantes para a atividade antioxidante. Com base nesses resultados observa-se que os compostos hidrazino-tiazólicos apresentaram atividade superior aos análogos da curcumina, sendo os compostos **5a**, **5e**, **5g**, **5m**, **5o** e **5p** os mais ativos, com destaque para o composto **5g**, que apresentou 74,7 % de inibição do radical DPPH contra 40,1 % da curcumina.



Já no ensaio do radical ABTS, apenas o análogo da curcumina **2a** apresentou atividade similar (29,4 %) ao da curcumina (30,2 %), entretanto não apresentou atividade no ensaio de DPPH. Mais uma vez vale ressaltar que os melhores resultados foram atribuídos aos derivados tiazólicos, sendo que o composto **5k** apresentou 32,8 % de atividade antioxidante, além de apresentar atividade (37,2 %) próxima à da curcumina (40,1 %) no ensaio DPPH.



No terceiro ensaio, método da redução do ferro, FRAP, os melhores resultados foram atribuídos, inesperadamente, a duas tiossemicarbazonas, o composto **4d** e **4f**, com atividade superior à da curcumina com inibição de 152,3 % e 150 %, respectivamente.

Para os compostos que apresentaram resultados similares ou superiores à curcumina, a CI_{50} foi determinada no ensaio de captura do radical DPPH. Os resultados são mostrados na **Tabela 17**.

Tabela 17 – Quantidade necessária de substância para inibir 50% da concentração inicial de radicais de DPPH.

Substância	CI_{50} μ M
Curcumina	167,8
1f	194,4
2b	166,9
5a	97,1
5c	118,8
5e	95,4
5f	139,2
5g	60,4
5k	209,1
5m	162,1
5n	126,0
5o	110,6
5p	126,6

Os valores de CI_{50} indicam a concentração da substância capaz de reduzir pela metade a concentração de radicais de DPPH existentes no início da reação. Pela análise dos dados da **Tabela 17** conclui-se que todos os compostos, exceto **1f** e **5k** apresentaram atividade antioxidante superior à curcumina. Os compostos **5a**, **5e** e **5g** apresentaram os melhores resultados com CI_{50} de 97,1; 95,4 e 60,4 μ M, respectivamente. Vale destacar a atividade apresentada pelo composto **5g**, que foi o que melhor apresentou atividade antioxidante no ensaio DPPH, já que em uma menor concentração foi capaz de reduzir em 50% a concentração do radical DPPH.

Dentre as substâncias testadas, nenhuma se destacou por apresentar atividade antioxidante nos três ensaios. O que se observa, pela análise dos dados da **Tabela 16** é que o composto **5k** mostrou atividade antioxidante similar ao da curcumina no ensaio de DPPH, resultado significativo no ensaio FRAP e resultado superior ao da curcumina no ensaio ABTS.

6.10.2 Avaliação da atividade citotóxica in vitro

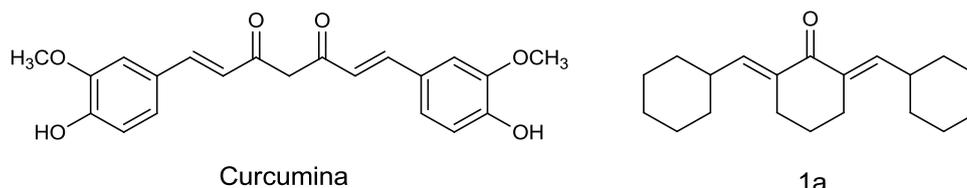
Os compostos sintetizados foram testados contra seis linhagens de células tumorais: HL60 (leucemia mielóide aguda), HCT (carcinoma colorretal), JURKAT (leucemia linfoblástica aguda), MCF7 e MDA (adenocarcinoma de mama humano), THP1 (leucemia monocítica humana). Inicialmente os testes foram submetidos à triagem em uma concentração de 50 μ M e as CI_{50} foram determinadas para as substâncias que foram capazes de inibir mais que 50% do crescimento das células. O teste também foi feito utilizando células Vero (oriundas de rim de macaco-verde africano) modelo que mimetiza as células normais. Para fins de comparação, a curcumina foi utilizada como controle positivo.

Os resultados da determinação da CI_{50} dos compostos contra as linhagens de células tumorais e células Vero estão mostrados na **Tabela 18**. As substâncias que apresentaram $CI_{50} > 100 \mu$ M foram consideradas inativas.

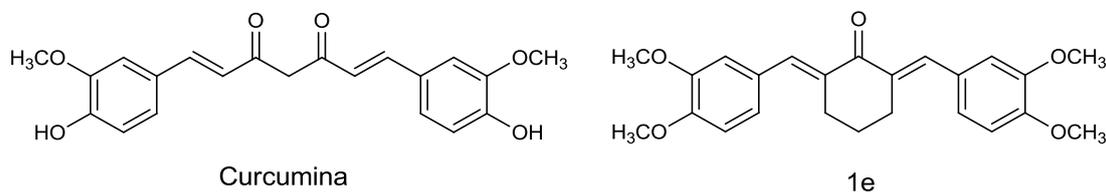
Tabela 18 – Resultados do ensaio de citotoxicidade *in vitro* das substâncias sintetizadas, da curcumina e o controle positivo, etoposídeo (CI₅₀ μM)

Substância	HL60	HCT	JURKAT	MCF7	MDA	THP1	VERO
Etoposídeo	8,3	-	3,8	>100	-	-	>100
Curcumina	11,6	34,5	23,7	97,7	55,5	24,9	81,1
1a	30,7	87,0	50,5	29,6	15,4	-	>100
1d	-	93,0	-	>100	91,0	-	94,0
1e	-	94	-	>100	>100	-	97
1f	9,8	-	6,4	-	26,0	7,3	>100
2a	-	41,0	-	57,0	54,0	-	55,0
2b	3,2	2,7	-	6,4	18,9	11,7	49,0
2c	-	94,0	-	86,0	95,0	-	>100
3b	98,0	>100	>100	-	-	-	>100
3d	-	92,0	-	94,0	95,0	-	98,0
4a	30,4	>100	40,4	>100	>100	>100	>100
4b	-	>100	-	90,0	96,0	-	96,0
4c	-	94,0	-	>100	94,0	-	95,0
5a	18,3	58,8	-	97,4	32,0	-	-
5c	>100	>100	-	>100	69,9	-	>100
5e	>100	-	-	>100	-	-	>100
5f	>100	-	-	>100	-	-	>100
5g	>100	-	-	>100	-	-	>100
5o	85,0	>100	-	>100	>100	-	>100

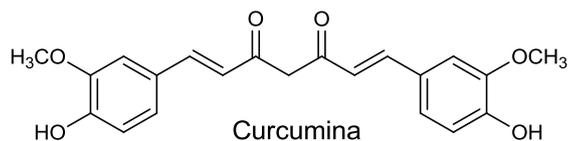
Com base nos resultados apresentados na **Tabela 18** pode-se observar que várias substâncias apresentaram atividade superior à da curcumina em todas as linhagens testadas e apresentaram resultados similares ao etoposídeo. O composto **1a**, por exemplo, apresentou atividade superior à curcumina contra duas linhagens tumorais, MCF7 e MDA com CI₅₀ de 29,6 e 15,4 μM, respectivamente. Isso mostra que a substituição da porção 3-metoxi-4-hidroxi-benzilideno por um anel metil-ciclohexila diminuiu o espectro de atividade, porém tornou-o mais seletivo e mais ativo para as linhagens MCF7 e MDA além de apresentar menor citotoxicidade contra células VERO (CI₅₀ >100).



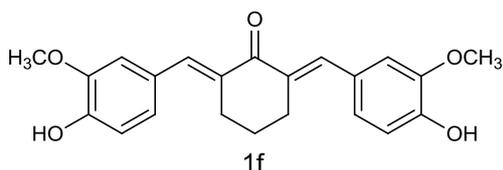
Outra observação importante é que a presença da hidroxila fenólica parece de fato ser essencial para a atividade das bis(benzilideno)alcanonas, conforme já demonstrado por Anad e colaboradores (ANAD *et al.*, 2008). A substituição da hidroxila por um grupo metoxila levou a uma queda na atividade da molécula conforme pode ser visto pelos resultados de **1e**.



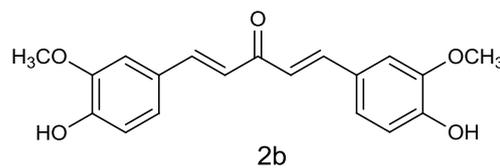
Já a substituição da cadeia heptadiena, com dois hidrogênios metilênicos ácidos da curcumina por um anel central ciclohexano ou por uma cadeia aberta penta-1,4-dien-3-ona, levou a um aumento significativo da atividade das moléculas em todas as linhagens de células tumorais testadas, além de apresentar atividade similar ao etoposídeo contra a linhagem HL60 para o composto **1f**. Já o composto **2b** apresentou atividade quase três vezes maior que o etoposídeo para a linhagem HL60 e 10 vezes mais ativo contra a linhagem MCF7. Esse fato pode ser explicado primeiramente por ter aumentado a rigidez das moléculas (**1f** e **2b**) além de aumentar a estabilidade com a remoção do carbono metilênico central que confere instabilidade à curcumina em pH acima de 6,5, conforme já descrito também por Sardjiman (SARDJIMAN *et al.*, 1997). A substituição do anel ciclohexano central, composto **1f**, pela cadeia aberta penta-1,4-dien-3-ona do composto **2b** aumentou a atividade da molécula, contudo esse aumento de atividade veio também com o aumento da citotoxicidade do composto contra células normais.



HL60 = 11,6 μ M
 MDA = 55,5 μ M
 THP1 = 24,9 μ M
 VERO = 81,1 μ M



HL60 = 9,8 μ M
 MDA = 25,9 μ M
 THP1 = 7,3 μ M
 VERO >100 μ M



HL60 = 3,2 μ M
 MDA = 18,9 μ M
 THP1 = 11,6 μ M
 VERO = 49 μ M

Os derivados monossustituídos, **3b** e **3d** não apresentaram atividade antitumoral. Isso mostra a importância do sistema dissubstituído nos compostos análogos da curcumina. Foram testados também três compostos contendo o grupo tiossemicarbazona. Da mesma forma que os compostos monossustituídos, as tiossemicarbazonas, compostos **4b** e **4c**, não apresentaram atividade citotóxica. Já a tiossemicarbazona **4a** apresentou atividade moderada contra as linhagens HL60 e JURKAT com valores de Cl_{50} de 30,4 e 40,4 μ M, respectivamente.

Quanto aos heterociclos hidrazino-tiazólicos, não houve uma molécula que se destacasse, apenas o composto **5a** apresentou atividade contra as linhagens HL60, HCT e MDA com valores de Cl_{50} de 18,3; 58,5 e 32,0 μ M, respectivamente.

Uma correlação entre a atividade antioxidante e a atividade antitumoral não pôde ser estabelecida com os resultados encontrados nesse trabalho, exceto para os análogos mais próximos à curcumina, **1f** e **2b**. Nesse caso, houve uma boa correlação entre a atividade citotóxica e a atividade antioxidante pelo método DPPH. Nos demais resultados, uma mesma substância que apresentou atividade antioxidante, não foi ativa contra linhagens de células tumorais, e vice-versa. Entretanto, tanto as substâncias ativas no ensaio de

citotoxicidade quanto as substâncias ativas nos ensaios de atividade antioxidante, podem ser utilizadas como protótipos no planejamento de novos análogos promissores para o tratamento dessas patologias.

7 CONCLUSÃO

Os compostos análogos da curcumina di **1a-1g**, **2a-2b** e monossustituídos **2c**, **3b** e **3d**, as tiossemicarbazonas **4a-4g** e os heterociclos hidrazino-tiazólicos **5a-5p** foram sintetizados com bons rendimentos, exceto para **5e** e **5g** que sofreram degradação na coluna durante a etapa de purificação. Os compostos foram sintetizados utilizando-se materiais de partida de fácil acesso. Foram sintetizadas 37 moléculas sendo que dessas, 20 são inéditas.

Os compostos sintetizados foram submetidos a ensaios *in vitro* para avaliação das atividades antioxidante e citotóxica. No ensaio de atividade antioxidante, os derivados hidrazino-tiazólicos **5a**, **5e** e **5g** foram os que apresentaram atividade mais promissora no ensaio com o radical DPPH, com valores de CI_{50} de 97,1; 95,4 e 60,4 μ M, respectivamente, sendo mais ativos que a curcumina. Esses resultados se mostraram bastante relevantes por ser uma atividade relativamente nova para essa classe de substâncias.

No ensaio de avaliação da atividade citotóxica utilizando seis linhagens de células tumorais e uma de células normais, duas substâncias, análogas à curcumina, se destacaram, **1f** e **2b** com atividade superior à curcumina contra todas as linhagens de células tumorais e resultados superiores ao etoposídeo para as linhagens HL60 e MCF7 para o composto **2b**. E no caso de **1f**, baixa citotoxicidade para células normais.

A substância **1a**, contendo anéis ciclohexila no lugar dos anéis aromáticos dos demais análogos da curcumina, apresentou um resultado interessante contra as células de câncer de mama, MCF-7 e MDA, sendo mais de três vezes mais ativa que a curcumina. Esses resultados indicam uma seletividade potencial para o tratamento desse tipo de tumor, que é um dos mais prevalentes entre as mulheres.

A substituição da cadeia heptadiena da curcumina por um anel ciclohexano central ou por uma cadeia central pentadiena, aumenta significativamente a

atividade dos derivados da curcumina, porém a intercambialidade pela cadeia pentadiena aumenta significativamente a citotoxicidade da molécula.

Os resultados obtidos nesse trabalho se mostraram promissores, abrindo novas perspectivas para síntese de outros análogos com possibilidade de otimização da atividade biológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHAB, B. F., ABDEL-AZIZ, H. A., AHMED, E. M. Synthesis and antimicrobial evaluation of 1-(benzofuran-2-yl)-4-nitro-3-arylbutan-1-ones and 3-(benzofuran-2-yl)-4,5-dihydro-5-aryl-1-[4-(aryl)-1,3-thiazol-2-yl]-1H-pyrazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry.**, v. 44, p. 2632-2635, 2009.

AMEISEN, J. C. On the origin, evolution, and nature of programmed death: a timeline of four years. **Cell Death differ.**, v. 9(4), p. 367-393, 2002.

AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K., HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v.90, n.17, p.7915-7922, 1993.

ANAND, P. *et al.* Biological activities of curcumina and its analogues (Congeners) made by man Mother **Nature.**, v. 76, p. 1590-1611, 2008

ANDERSON, D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research.** v. 350, n.1, p.103-108, 1996.

ATMANI, D. *et al.* **J. Med. Pl. Res.**, 5, 589-598, 2011.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine.**, v. 109, p. 33-44, 2000.

BAEUEERLE, P. A., BALTIMORE D. I. Kappa B: specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. **Science.**, v. 242, p. 540-546, 1988).

BARREIROS, A. L. B. S. *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova.**, v. 29(1), p. 113-123, 2006.

BAYOMI, S. M. *et al.* Synthesis and biological evaluation of new curcumin derivatives as antioxidant and antitumor agents. **Med. Chem. Res.**, v. 22, p. 1147-1162, 2013

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.

BEG, A. A. *et al.* Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. **Nature.**, v. 376(6536), p. 167-170, 1995

BHUSARI, K. P. *et al.* Synthesis of 8-bromo-9-substituted-1,3 benzothi-zolo[5,1-b] 1,3,4-triazoles and their anthelmintic activity. **Indian Journal of Heterocyclic Chemistry.**, v. 9. p. 275-278, 2000 .

BOOTH, G. M.; PARKER, T. L.; LE, C. M. Antioxidant, Anticancer Activity, and Other Health Effects of a Nutritional Supplement (Galaxy®); In: **Structure and Function of Food Engineering.**, Capítulo 1, p. 404.

BRAGA, S. F. P. Síntese de inibidores potenciais da tripanotona redutase: base para o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento da doença de chagas e leishmaniose. Dissertação apresentada no PPGCF – UMFG-MG. 219 p., 2012.

BURKLY, L. *et al.* Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. **Nature.**, 373(6514), p. 531-536, 1995).

BUU-HOI, N. P.; XUONG, N. D.; TIEN, N.B. **J. Org. Chem.**, v.21 , p. 415-418, 1956.

CECON, Erika. Fator de transcrição NFkB em glândulas pineais de ratos. Dissertação de mestrado – **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.**, p. 17, 2010.

CHUNG, K. T. *et al.* **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 38, 421-464, 1998.

COSTA, P. *et al.* **Substâncias carboniladas e derivados.**, Porto Alegre: Bookman, 2003.

DAS. L.; VINAYAK M. Anti-carcinogenic action of curcumin by activation of antioxidant defence system and inhibition of NF- κ B signalling in lymphoma-bearing mice. **Bioscience Reports.**, v. 32, p. 161-170, 2012.

DEW, T. P.; DAY, A. J.; MORGAN, M. R. A. Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, v. 53, n. 16, p. 6510-6515, 2005.

DINKVA-KOSTOVA, A. T. *et al.* **Med. Chem.** 3, 261-268, 2007.

DU, Z.*et al.* **Eur. J. Med. Chem.**, 41, 213-218, 2006.

FALCK, J. R. *et al.* Ring expansion/homologation – aldehyde condensation cascade using tert-trihalomethylcarbinols. **Organic Letters.**, v. 8(20), p. 4645-4647, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira.**, v. 43, p. 61-68, 1997.

GLEZER, Isaias *et al.* O fator de transcrição NF-kapaB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira de Psiquiatria.**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 26-30, jan./ mar. 2000.

GULSORY, E.; GUZELDEMIRCI, N. U. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new imidazo[2,1-*b*]thiazole derivatives. **European journal medicinal chemistry.**, v. p. 320-326, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews.**, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B. *et al.* The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology.**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HASSAN F. Synthesis, characterization, anti-inflammatory, and antioxidant activities of some new thiazole derivatives. **International Journal of Applied Science and Technology.**, v.2 p. 180-187, 2012.

HATZCH, A.; WEBER, J. H. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. **European Journal of Inorganic Chemistry.**, v. 20, n. 2, p. 3118–3132, 1887

HSU, C. Y. Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. **Biological Research.**, v. 39, n. 2, p. 281–288, 2006.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L.; The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agricultural and Food Chemistry.**, v. 53, n. 6, 1841-1856, 2005

JABERI-KARIMI, Z; POOLADIAN, B. A facile synthesis of α,α' -bis(substituted benzylidene) cycloalkanones catalyzed by p-TSA under solvent-free conditions. **Green Chemistry Letters and Reviews.**, v. 5 n.2 p. 187-193, 2012.

JIMENÉZ, I. *et al.* Protective effects of boldine against free radical-induced erythrocyte lysis. **Phytotherapy Research.**, v. 14, p. 339-343, 2000.

JIRÁSEK, P. *et al.* Synthesis of natural and non-natural curcuminoids and their neuroprotective activity against glutamate-induced oxidative stress in HT-22 cells. **Journal of natural products.**, v. 77 p. 2206-2217, 2014.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. **Annual Review of Immunology.**, v. 18, p. 621-663, 2000.

KASHYAP, S. J. *et al.* Thiazoles: having diverse biological activities. **Medicinal chemistry research.**, v. 21. p. 2123-2132, 2012.

KLOCHKOVA, N E ANIS' KOV, A.A. Intramolecular Heterocyclization of α,β -Unsaturated Ketone Thiosemicarbazones. **Russian Journal of Organic Chemistry.**, v.45 (1). p. 146-150, 2009.

LAM, K. M. *et al.* Synthesis and evaluation of DPPH and anti-inflammatory activities of 2,6-bisbenzylidenecyclohexanone and pyrazoline derivatives. **Med Chem Res.**, v. 21, p. 333–344, 2012.

LANGE, M. K.; HEBERLÉ, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 45, n. 1, p. 145-151, 2009.

LEIST, M.; JAATTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanism. **Nature Ver. Cell Bio.**, v. 2(8), p. 589-598, 2001

LI, J. *et al.* **Synth. Commun.**, v. 33 p. 2619-2625, 2003.

LIN, C-C.; LIN, H-Y.; C., H-C.; YU, M-W.; LEE, M-H. Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. **Food Chemistry.**, v. 116, p. 923-928, 2009.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate **Revistas SP.**, v. 46., p. 3-26, 2001.

LITWINIENKO, G.; INGLOD, K. U. Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstraction. 2. Resolution of the Curcumin Antioxidant Controversy. The Role of Sequential Proton Loss Electron Transfer. **Journal Organic Chemistry.**, v. 69, n.18, p. 5888-5896, 2004.

MAHLER, G. *et al.* Synthesis and biological evaluation of simplified mycothiazole analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.**, v. 16, p. 1309-1311, 2006.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 268, n. 17. p. 2231-2234, 1993.

MARUSAWA, H. *et al.* Synthesis and biological activity of 4-methyl-3,5-dioxane derivatives as thromboxane a₂ receptor antagonists. **Bioorganic medicinal chemistry.**, v. 7, p. 2635-2645, 1999.

MASUDA, T. *et al.* **S. Phytochemistry.**, v. 32 p. 1557, 1993.

MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMENEZ, F. M. Role of active oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. **Intern. J. Biochem. Cell Biol.**, n. 32, p. 157-170, 2000.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters.**, n. 99, p. 157-168, 1998.

MERIKA, M. *et al.* Recruitment of CBP/p300 by the INF-B enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. **Molecular Cell.**, v. 1(2), p. 277-287, 1998.

MINH AN, T. N, *et al.* Synthesis, Anticancer and Antioxidant Activity of Novel 2,4-Disubstituted Thiazoles. **Bulletin Korean Chemistry.**, v. 35, n. 6, p. 1619-1624, 2014.

MISHRA, V. K.; MOHAMMADA, G.; MISHRA, S. K. Downregulation of telomerase activity may enhanced by nanoparticle mediated curcumin delivery. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.**, v. 3, n. 4, p. 163-169. 2008.

MOHANA, K N.; KUMAR, C. B. P. Synthesis and antioxidant activity of 2-Amino-5-methylthiazol derivatives containing 1,3,4-Oxadiazole-2-thiol Moiety. **ISRN Organic Chemistry.**, v. 2013. p. 620718-620726, 2013.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumour cell lines. **Journal of National Cancer Institute.**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MONTERA, V. S. P. Benefícios dos nutrientes antioxidantes e seus cofatores no controle do estresse oxidativo e inflamação na insuficiência cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro.**, v. 20, n. 1, p. 20-27, 2007

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

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova.**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PAGET, C.J. *et al.* Heterocyclic substituted ureas. II. Immunosuppressive and antiviral activity of benzothiazolyl- and benzoxazolylureas. **Journal Medicinal Chemistry.**, v. 12, P. 1016-1018, 1969.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. **Food Chemistry.**, v. 125, p. 913–922. 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy.** 3rd edition. Toronto: Nelson Thomson Learning, 2001.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research.**, v.67, n.5, p.289-297, 1997.

POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention.**, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

RAFF, M. C. *et al.* Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from nervous system. **Science.**, v. 262(5134), p. 695-700, 1993.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine.**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

ROLLET-LABELLE, E. *et al.* "Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis," **Free Radical Biology and Medicine.**, v. 24, no. 4, p. 563–572, 1998.

SARDJIMAN, R. M. S., *et al.* 1,5-diphenyl-1,4-pentadiene-3-ones and cyclic analogues as antioxidative agents. Synthesis and structure activity relationship, **Eur. J. Med. Chem.**, v. 32, p. 625-630, 1997.

SARMA, A. D.; SHARMA, R.; Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. **Phytochemistry.**, v. 52, p. 1313-1318, 1999

SEN, R; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cellular.**, v. 46, n. 5, p. 706-716, 1986;

SHIH, M-H.; SU, Y-S.; WU, C-L. Syntheses of aromatic substituted hydrazino-thiazole derivatives to clarify structural characterization and antioxidant activity between 3-arylsydnonyl and aryl substituted ydrazino-thiazoles. **Chemical Pharmaceutical Bulletin.**, v.55 (8). p. 1126-1135, 2007.

SILVA, E. M. *et al.* **Food Chem.**, 101, 1012-1018, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds.**, 7th edition. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

SINGH, N. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of some novel 2-amino thiazole derivatives. **Journal of chemical and pharmaceutical research.**, v. 2(3). p. 691-698, 2010.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. Química orgânica, 8. ed., LTC – **Livros técnicos científicos.**, Ed. S. A: Rio de Janeiro/RJ.,v.2, 1996.

STAVRIC, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. **Food Chemical toxicology.**, v. 32, n.1, p.79-90, 1994.

SUBUDHI, U.; CHAINY, G. B. N. Expression of hepatic antioxidant genes in L-thyroxine induced hyperthyroid rats: regulation by vitamin E and curcumin. **Chem. Biol. Interact.**, v. 183, 304-316, 2010.

TAKEISHI, K. *et al.* Rhodium-Catalyzed Intramolecular Hydroacylation of 5- and 6-Alkynals: Convenient Synthesis of α -Alkylidenecycloalkanones and Cycloalkanones. **Chemistry European Journal.**, v. 10, p. 5681-5688, 2004.

TANAKA, T. *et al.* **Heterocycles.**, v.25 p. 463-484, 1987

TENÓRIO, R. P. *et al.* Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova.**, v. 28, n.6, 1030-1037, 2005.

TERGAONKAR, V. NF κ B pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target. In. **J. Biochem. Cell Bio.**, v. 38, p. 1647-1653, 2006

VATSADZE, S. Z. *et al.* Synthesis and spectroscopic and structural studies of cross-conjugated dienones derived from cyclic ketones and aromatic aldehydes. **Russ. Chem. Bull.**, v. 55, p. 1184-1194, 2006.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. **Quim. Nova.**, v. 32, 1245-1252, 2009.

WANG, Y. *et al.* Synthesis, structure and tyrosinase inhibition of natural phenols derivatives. **Journal of Chinese Pharmaceutical Science.**, v. 20 p.235–244, 2011.

WANG J. *et al.* **Bioorg. Med. Chem.**, 13, 1285-1291, 2005b.

WEBER, W. M. *et al.* Anti-oxidant activities of curcumin and related enones. **Bioorgan. Med. Chem.**, v.13 p. 3811–3820, 2005a.

WEBER, V. *et al.* **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, p. 4552-4564, 2005b.

WEI, X. *et al.* Effects of cyclohexanone analogues of curcumin on growth, apoptosis and NF- κ B activity in PC-3 human prostate cancer cells. **Oncology Letters.**, v. 4, p. 279-284, 2012.

WITZUM, J. L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet.**, v.344, n.8926, p.793-795, 1994.

YU, T-W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research.**, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

ZHOU, B. B.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature.**, v. 408(6811), p. 433-439, 2000.

APÊNDICE A – ESPECTROS NA REGIÃO NO INFRAVERMELHO E DE RMN ^1H E DE ^{13}C

Figura A.1 - Espectro no infravermelho de 1a

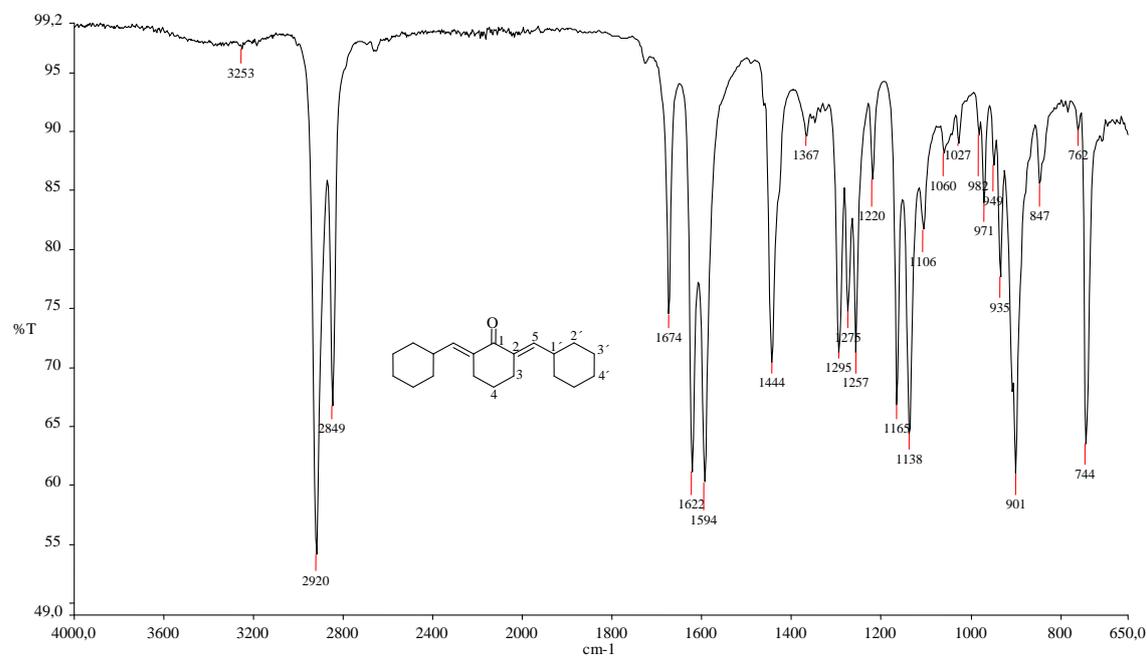


Figura A.2 – Espectro de RMN de ^1H de 1a (200 MHz, CDCl_3)

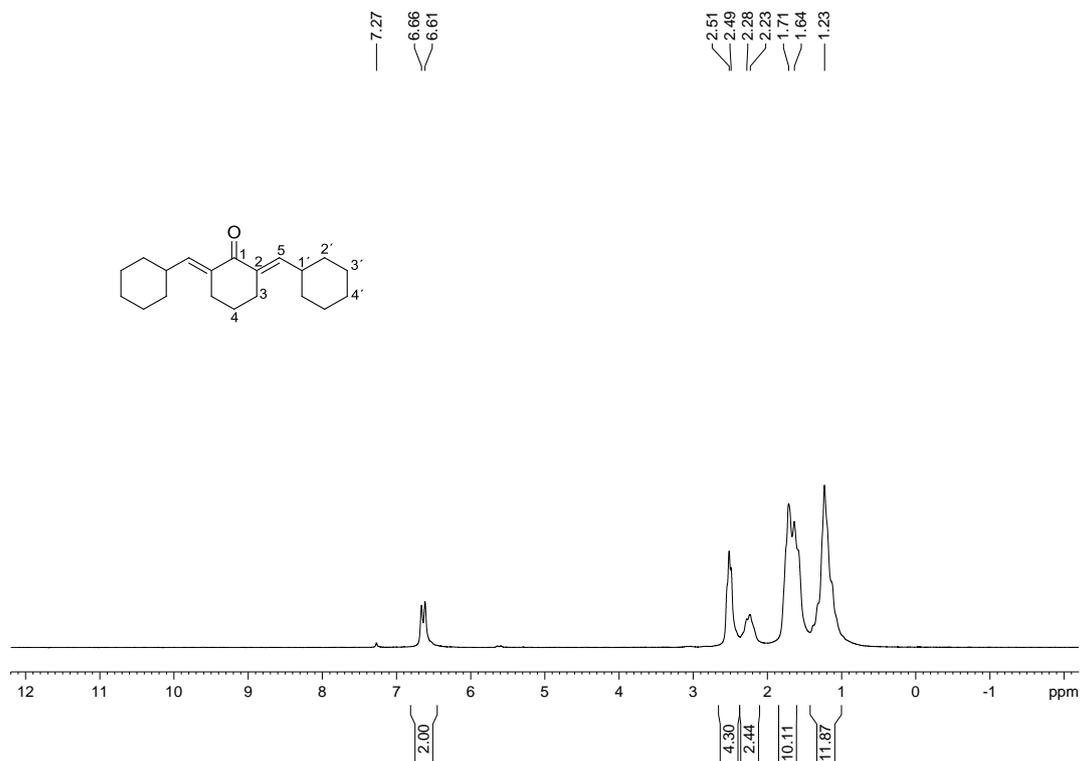


Figura A.3 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 1a (50 MHz, CDCl_3)

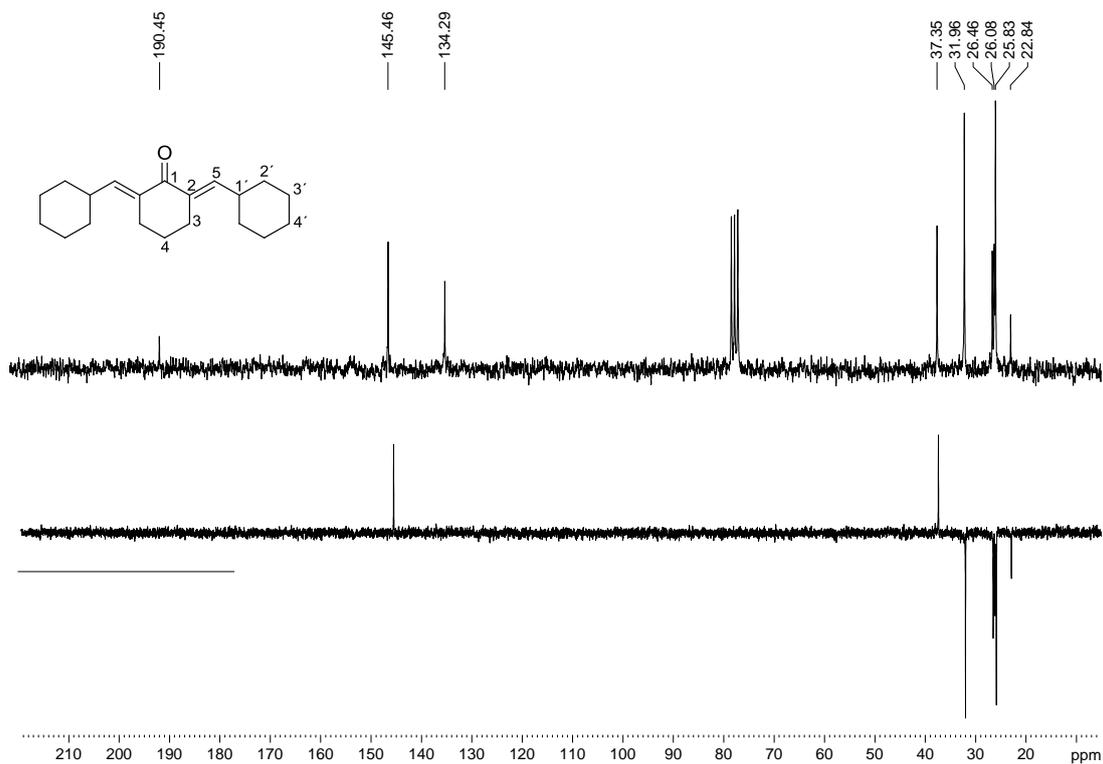


Figura A.4 - Espectro no infravermelho de 1e

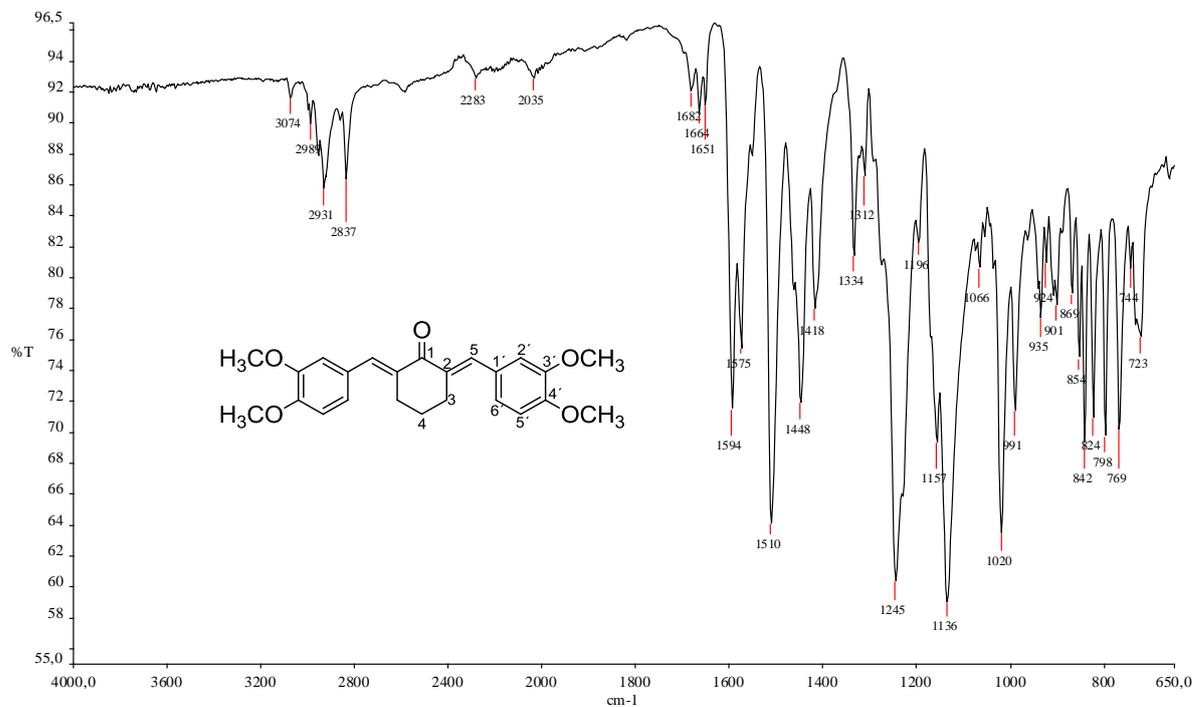


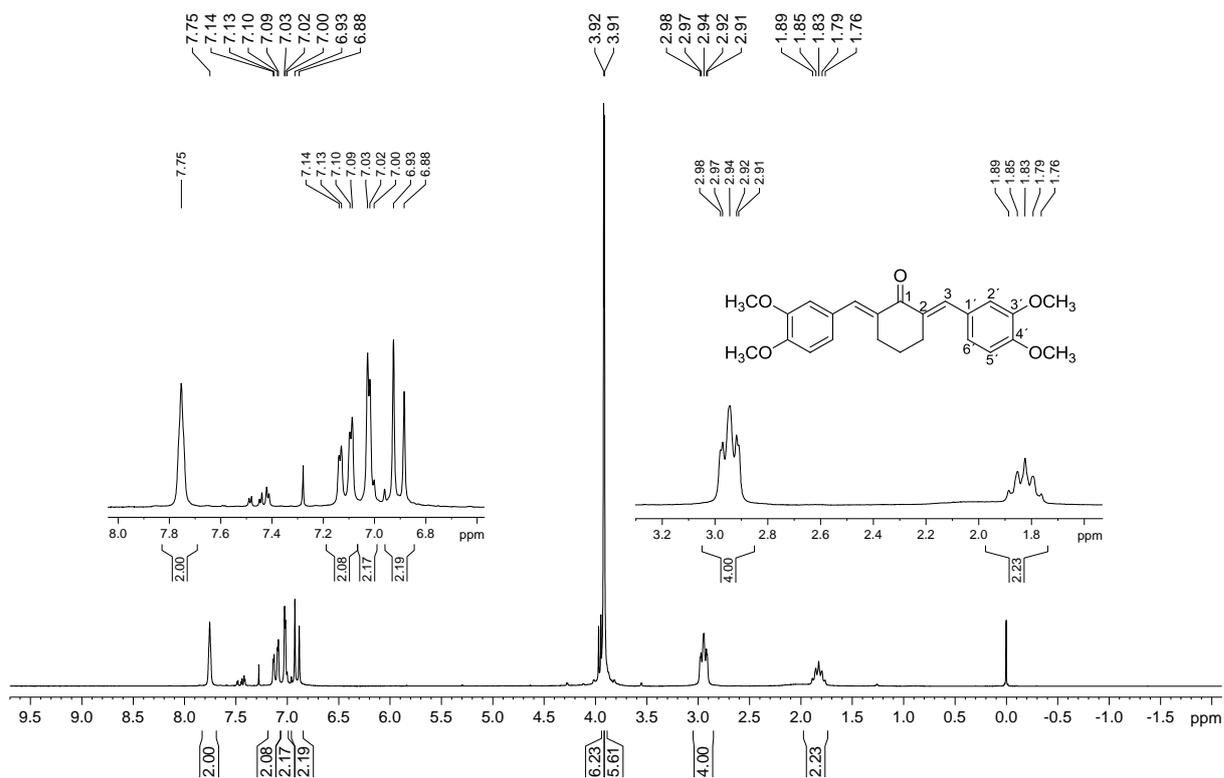
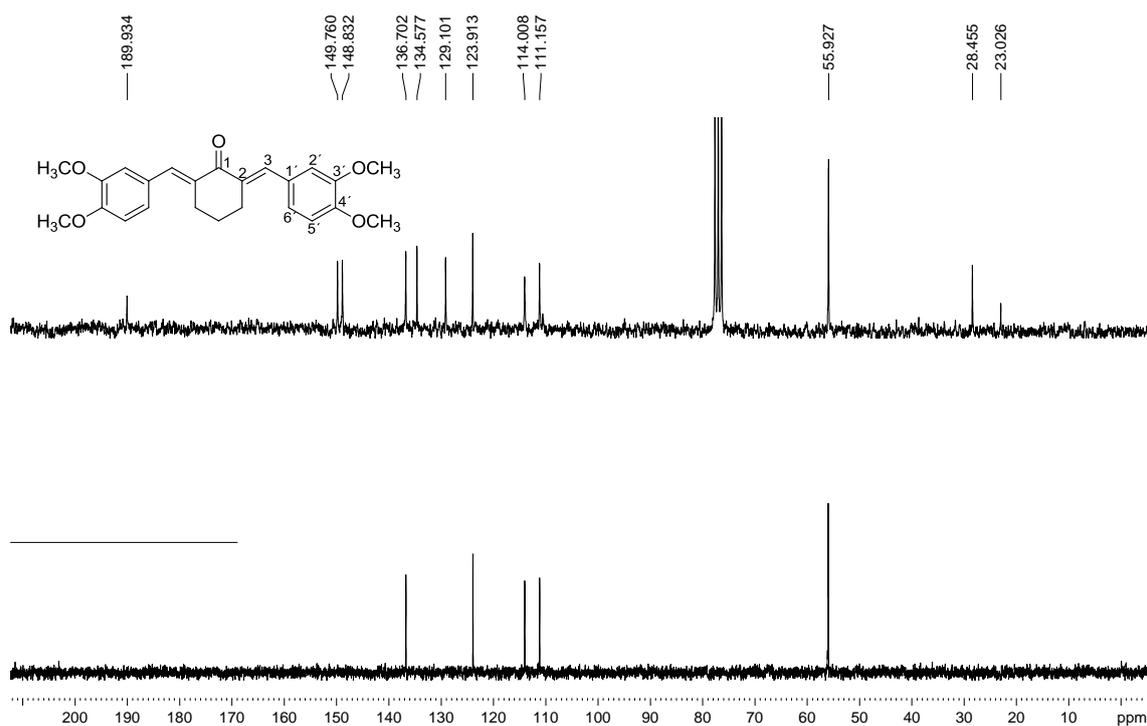
Figura A.5 – Espectro de RMN de ^1H de 1e (200 MHz, CDCl_3)Figura A.6 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 1e (50 MHz, CDCl_3)

Figura A.7 - Espectro no infravermelho de 1d

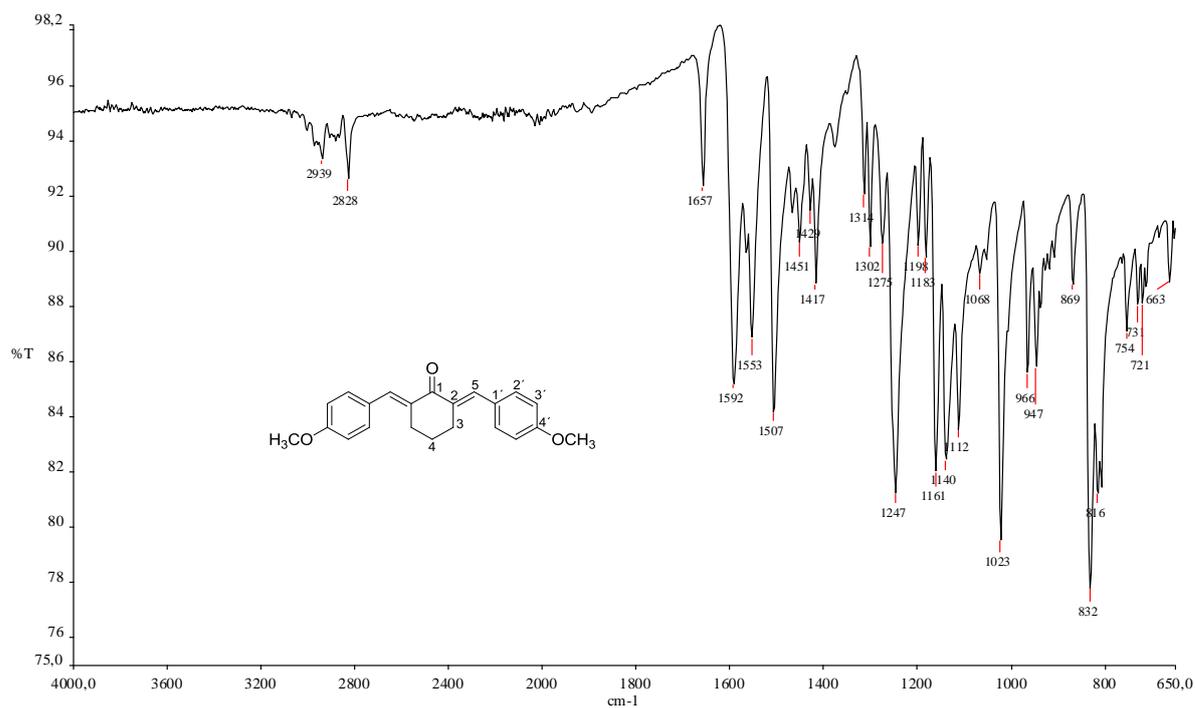
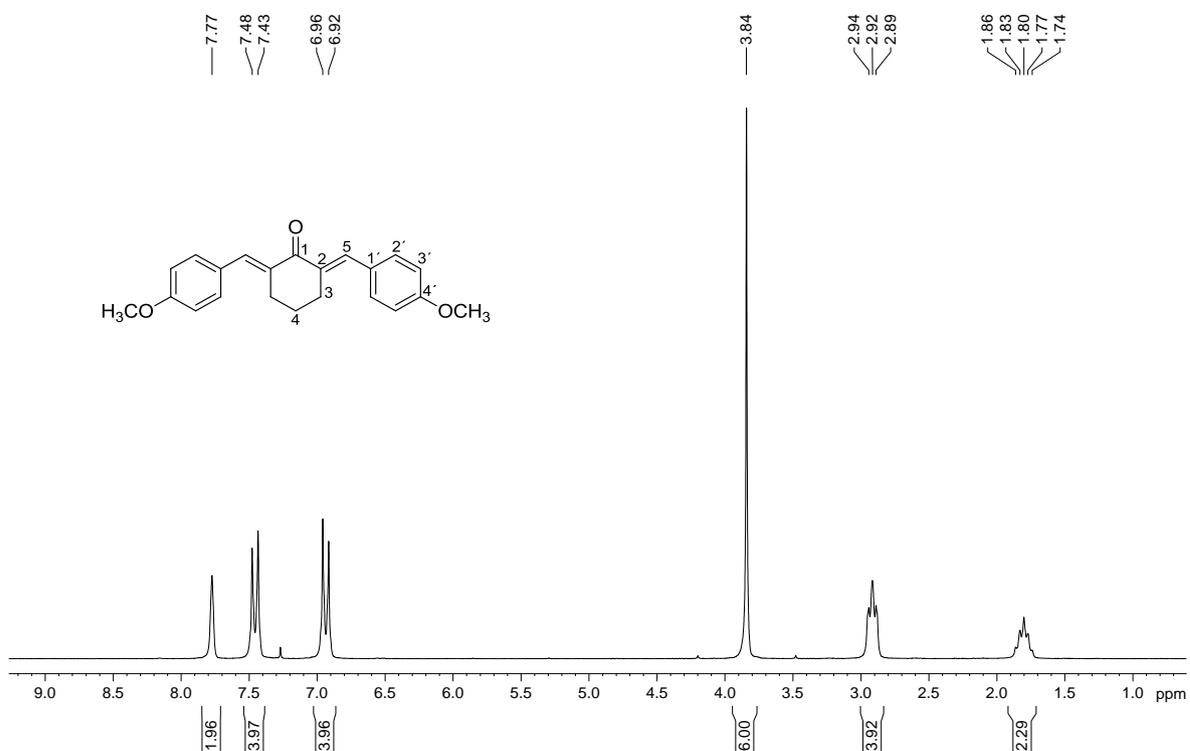
Figura A.8– Espectro de RMN de ¹H de 1d (200 MHz, CDCl₃)

Figura A.9 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 1d (50 MHz, CDCl_3)

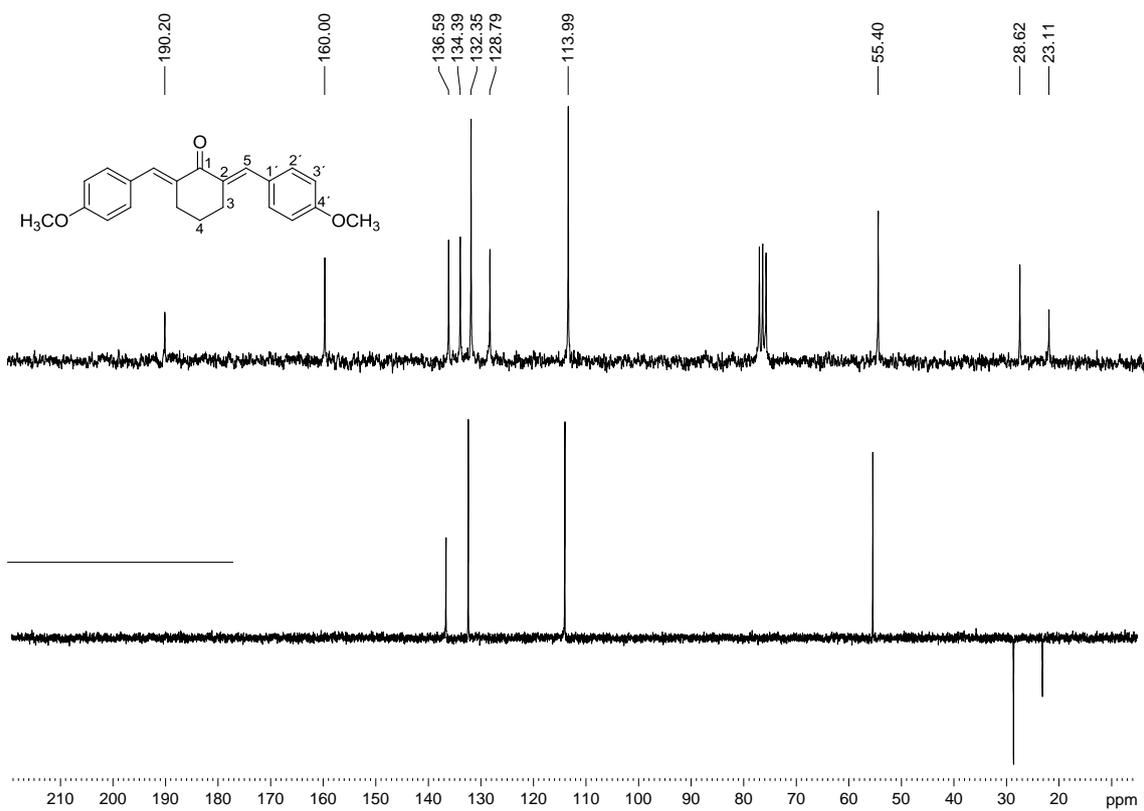


Figura A.10 - Espectro no infravermelho de 1f

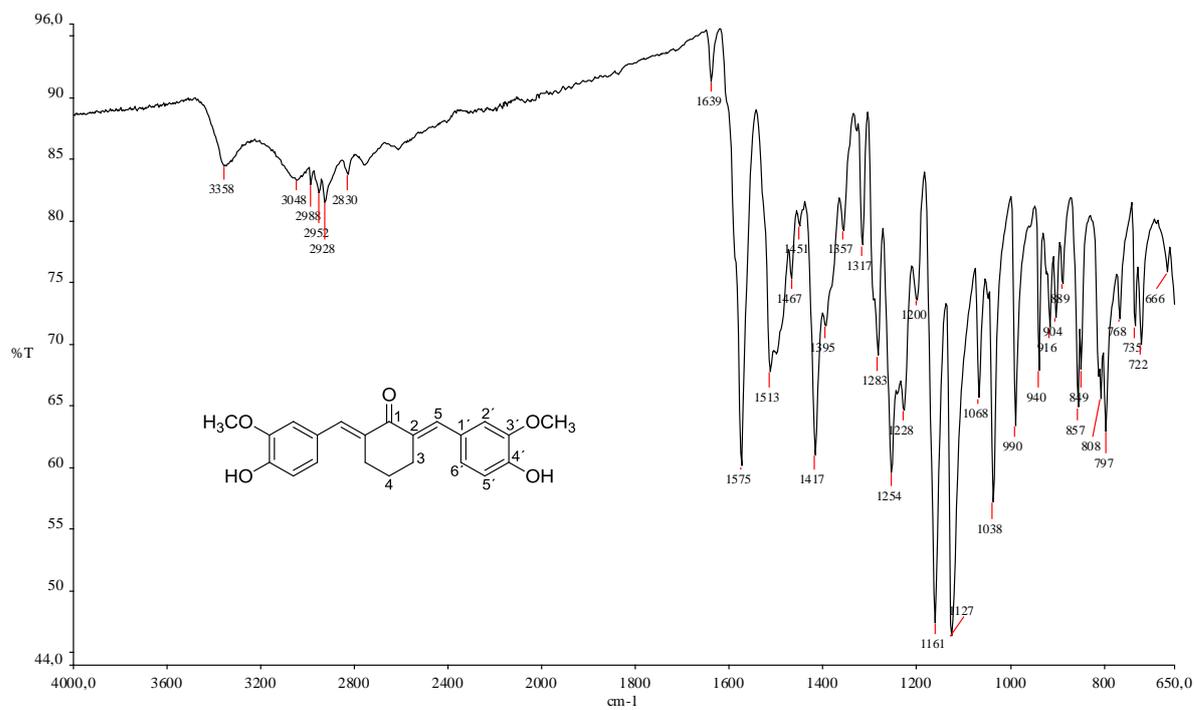


Figura A.11 – Espectro de RMN de ^1H de 1f (200 MHz, DMSO-D_6)

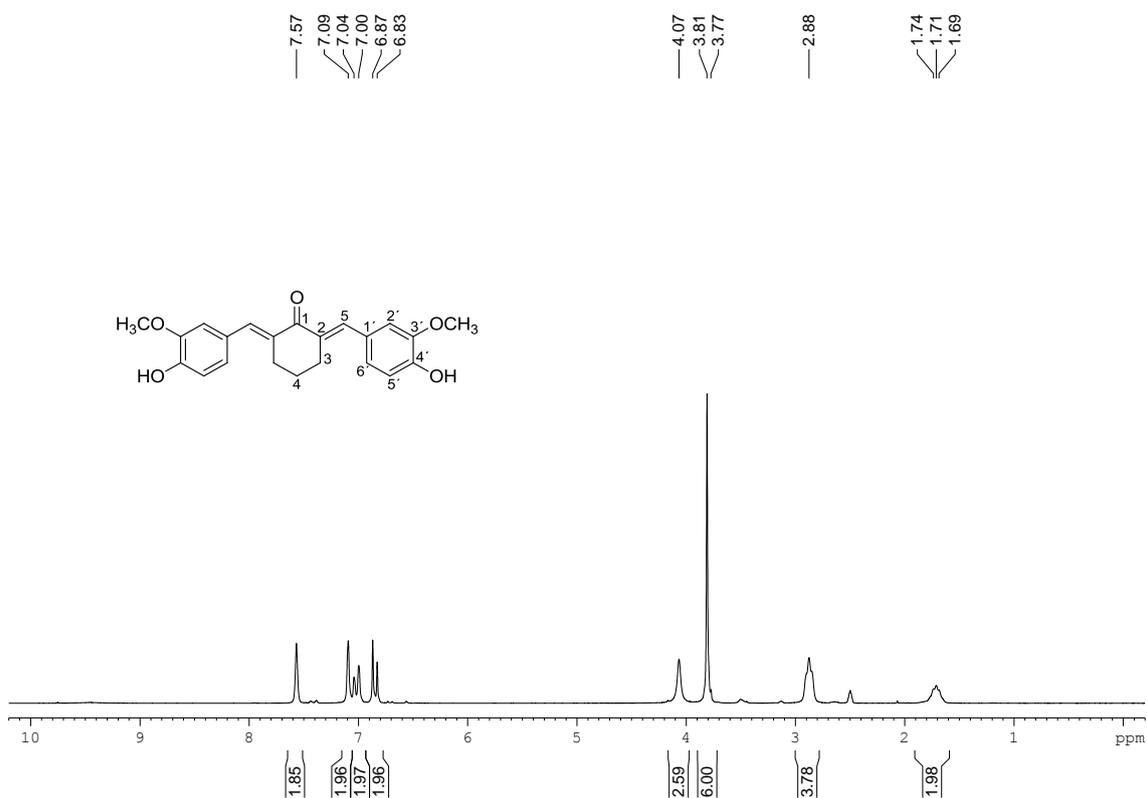


Figura A.12 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 1f (50 MHz, DMSO-D_6)

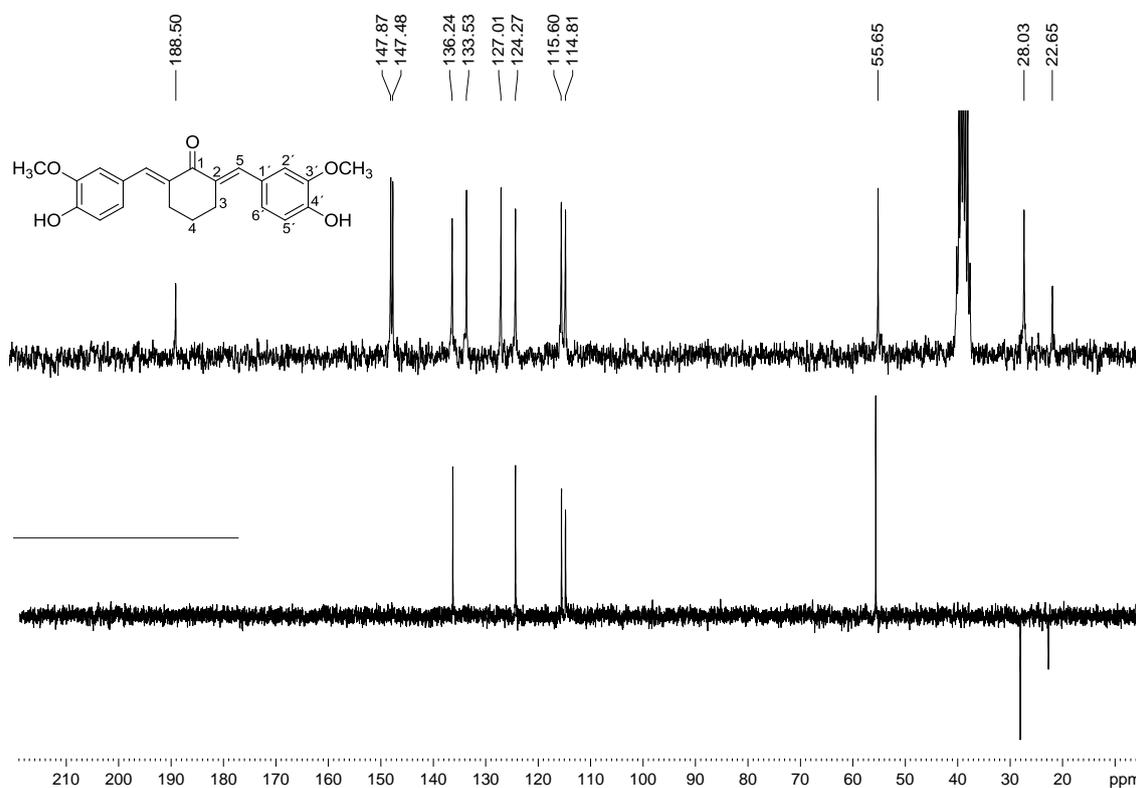


Figura A.13 - Espectro no infravermelho de 2a

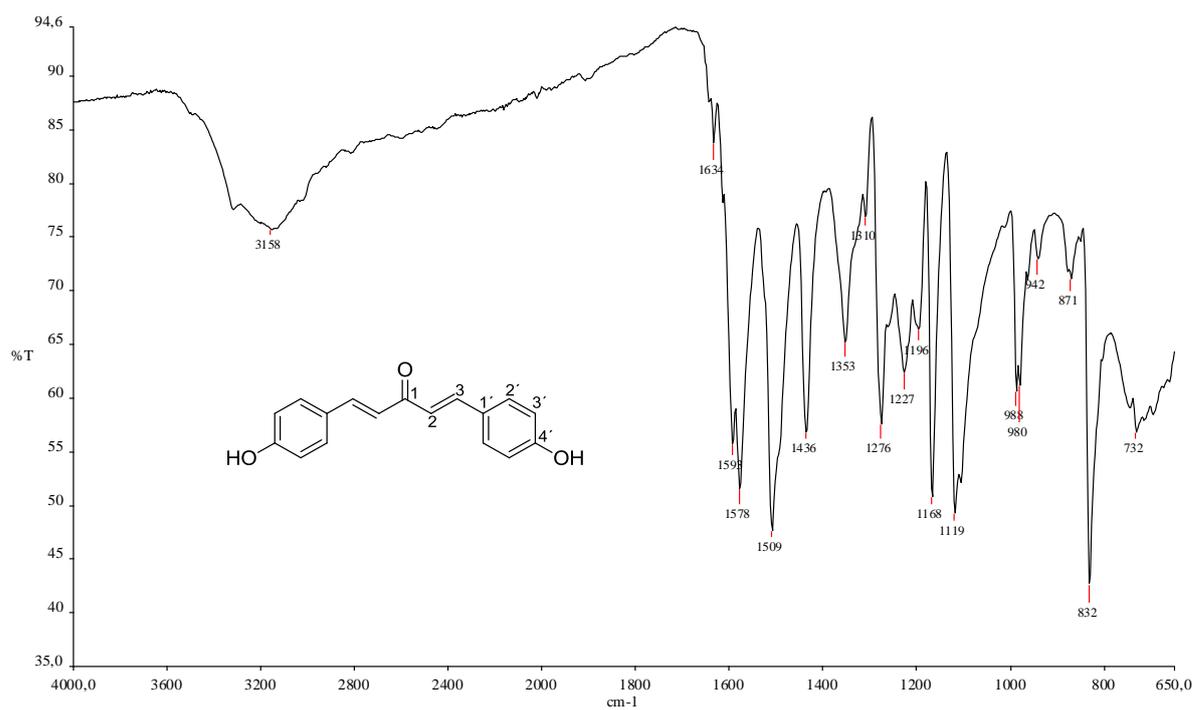
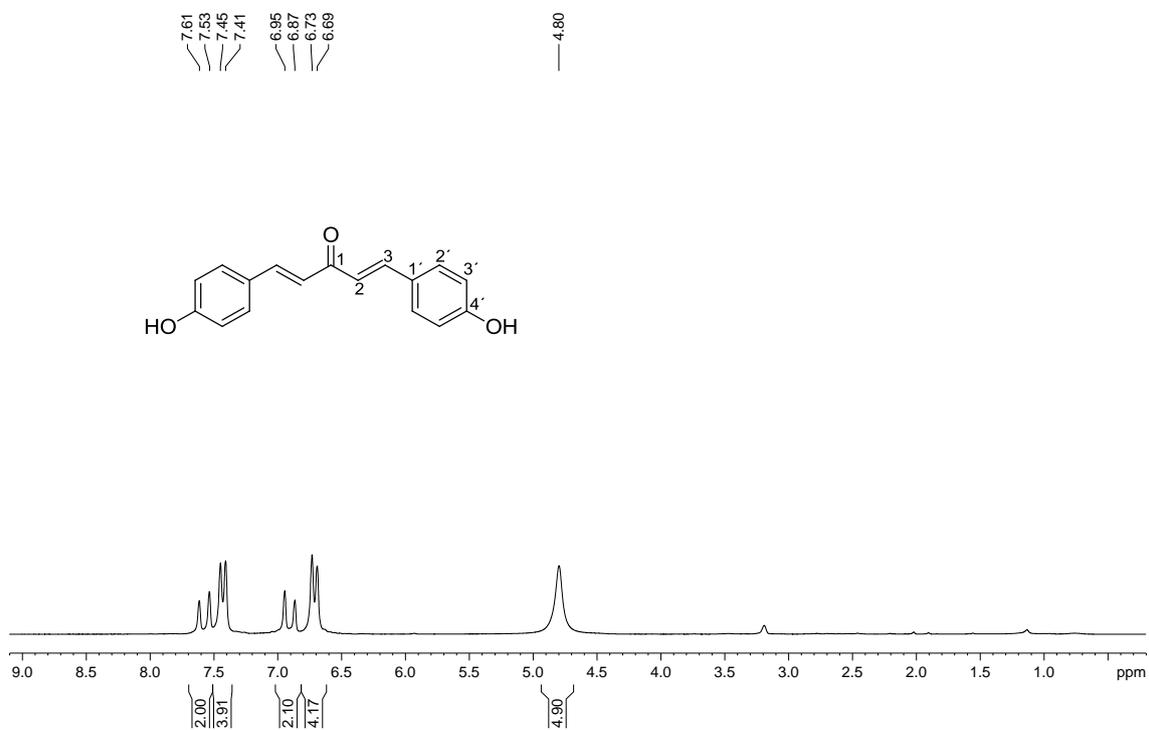
Figura A.14 – Espectro de RMN de ¹H de 2a (200 MHz, MeOD)

Figura A.15 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 2a (50 MHz, MeOD)

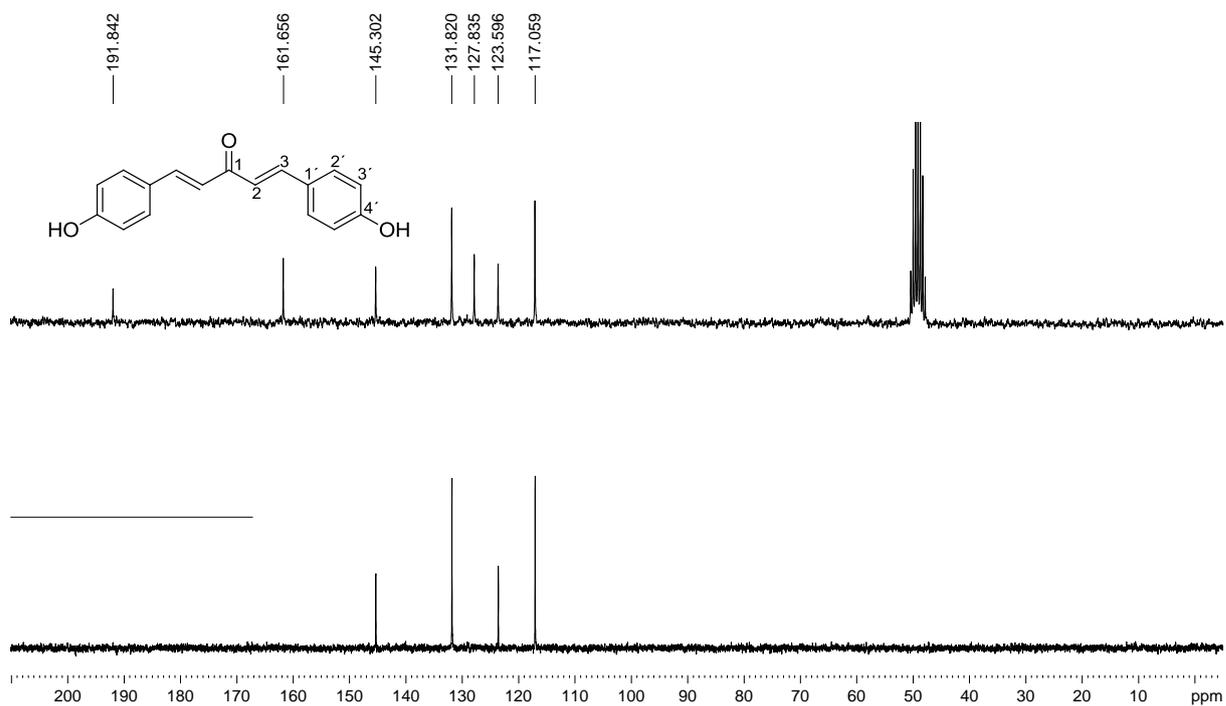


Figura A.16 - Espectro no infravermelho de 2b

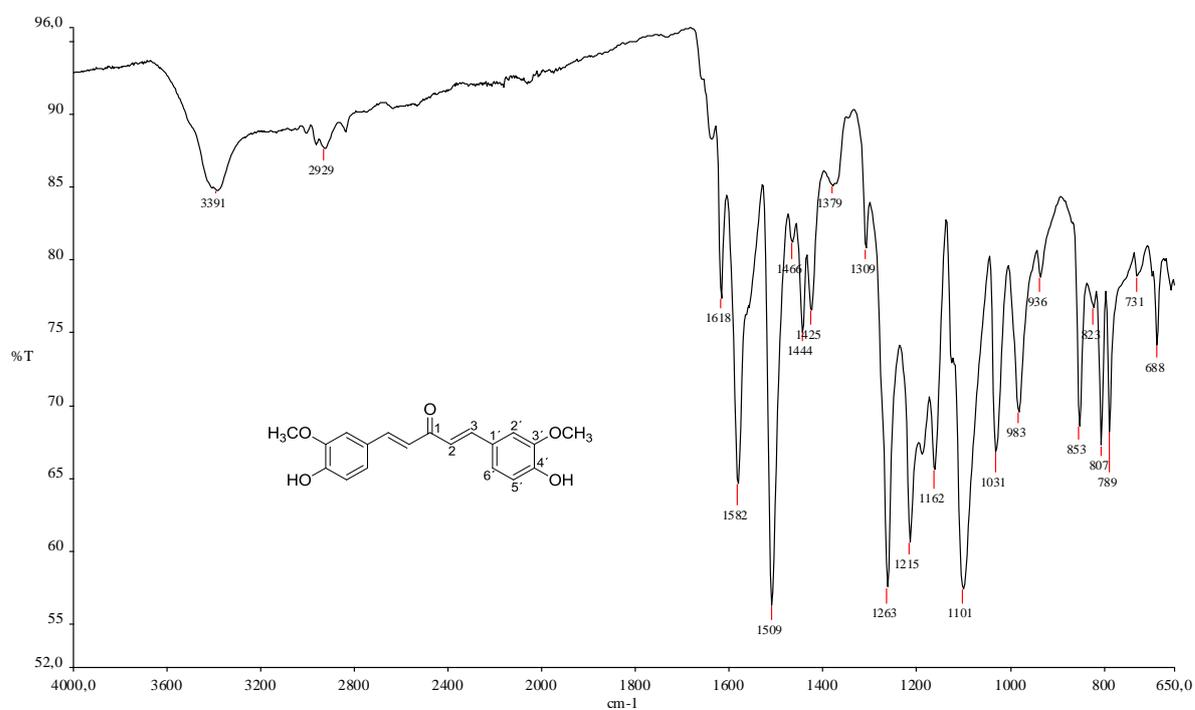


Figura A.17 – Espectro de RMN de ^1H de 2b (200 MHz, DMSO-D_6)

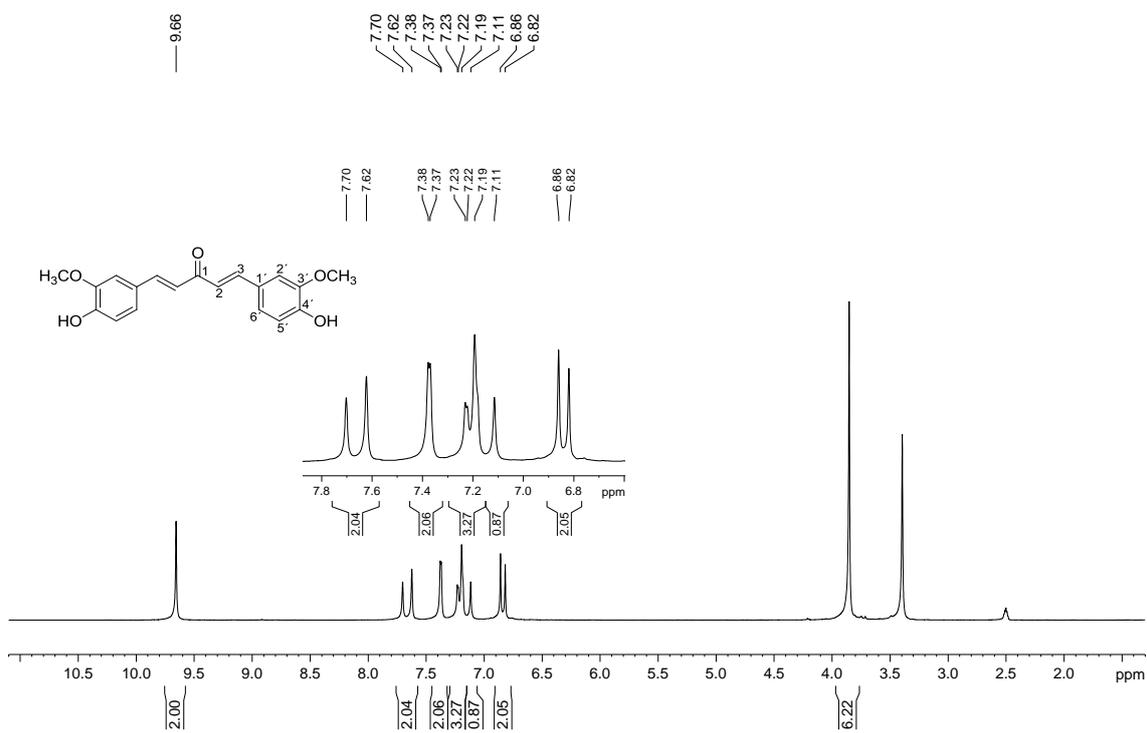


Figura A.18 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 2b (50 MHz, DMSO-D_6)

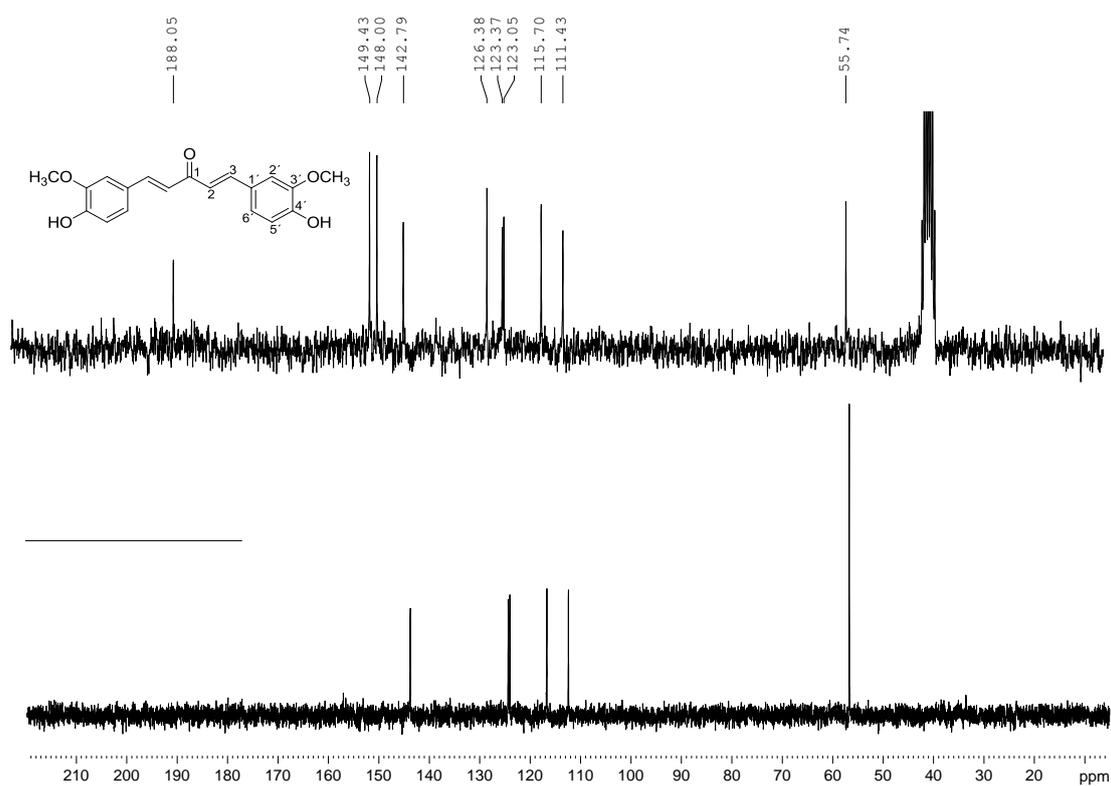


Figura A.19 - Espectro no infravermelho de 2c

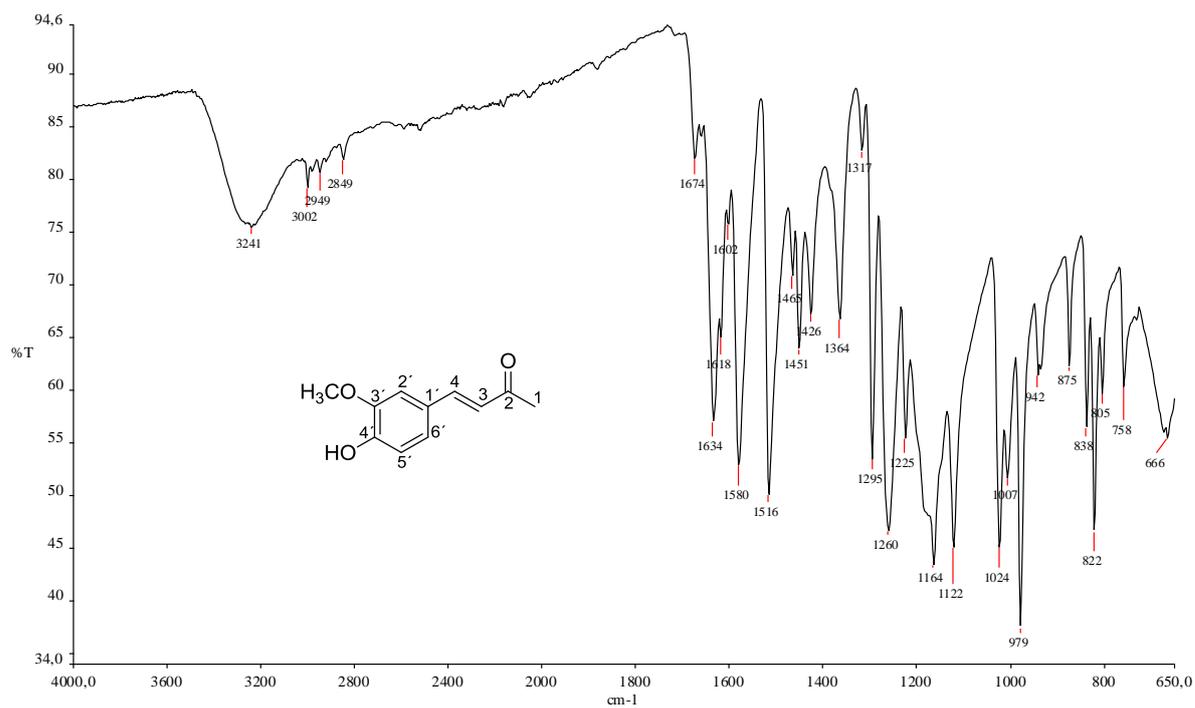
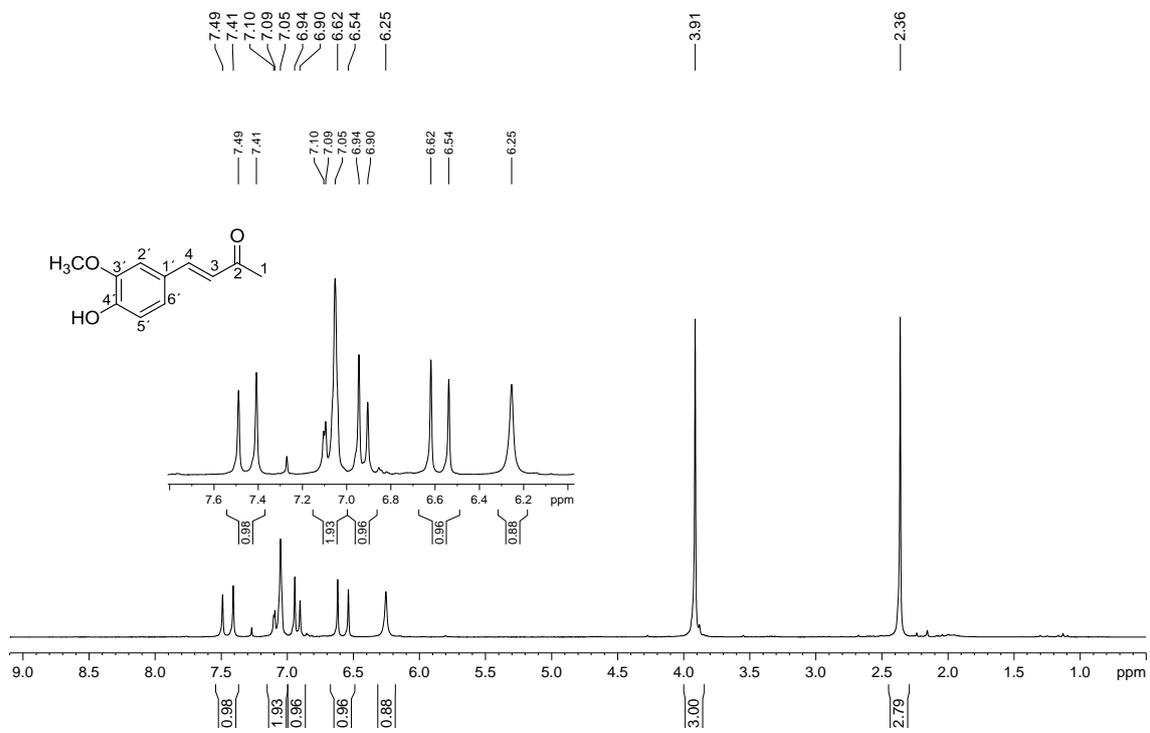
Figura A.20 – Espectro de RMN de ¹H de 2c (200 MHz, DMSO-D₆)

Figura A.21 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 2c (50 MHz, DMSO- D_6)

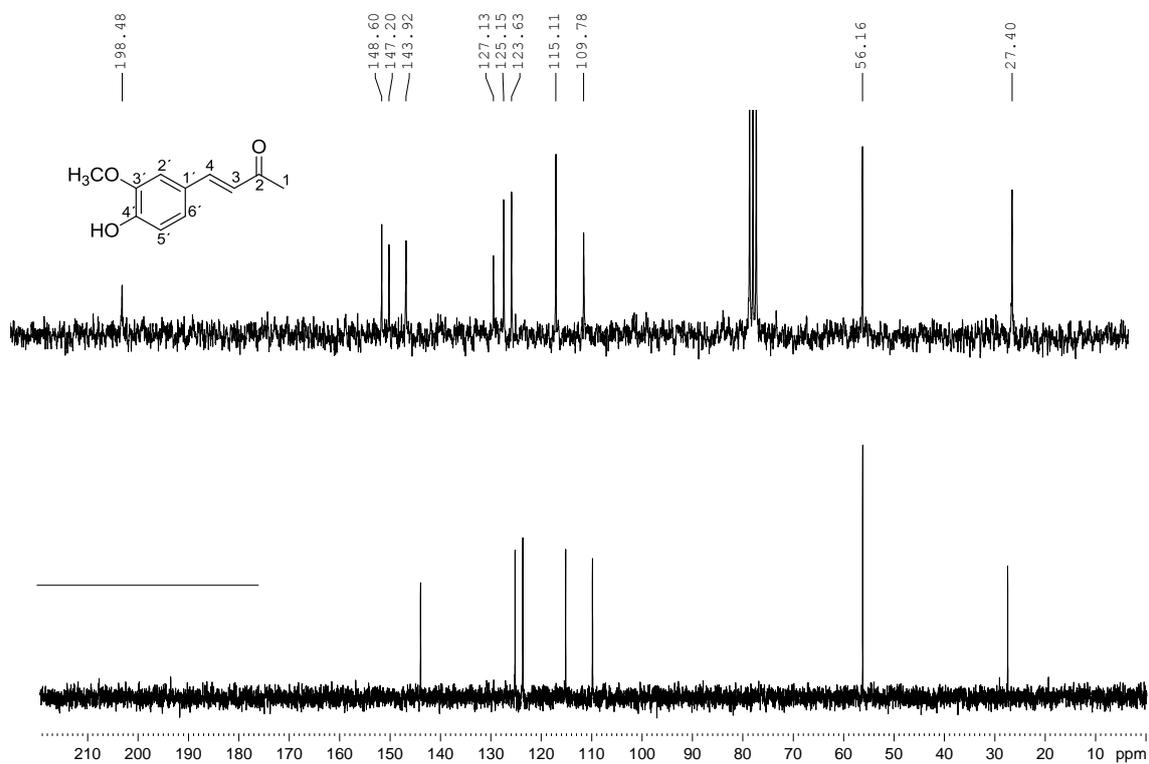


Figura A.22 - Espectro no infravermelho de 3a

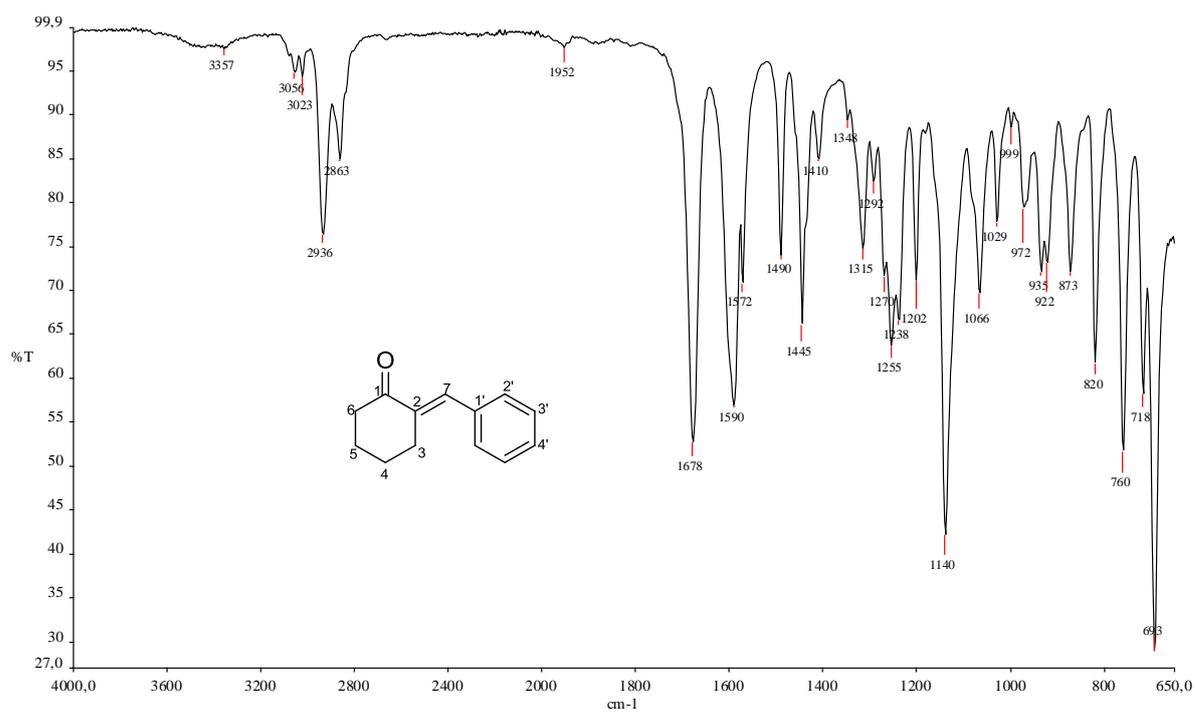


Figura A.23 - Espectro no infravermelho de 3b

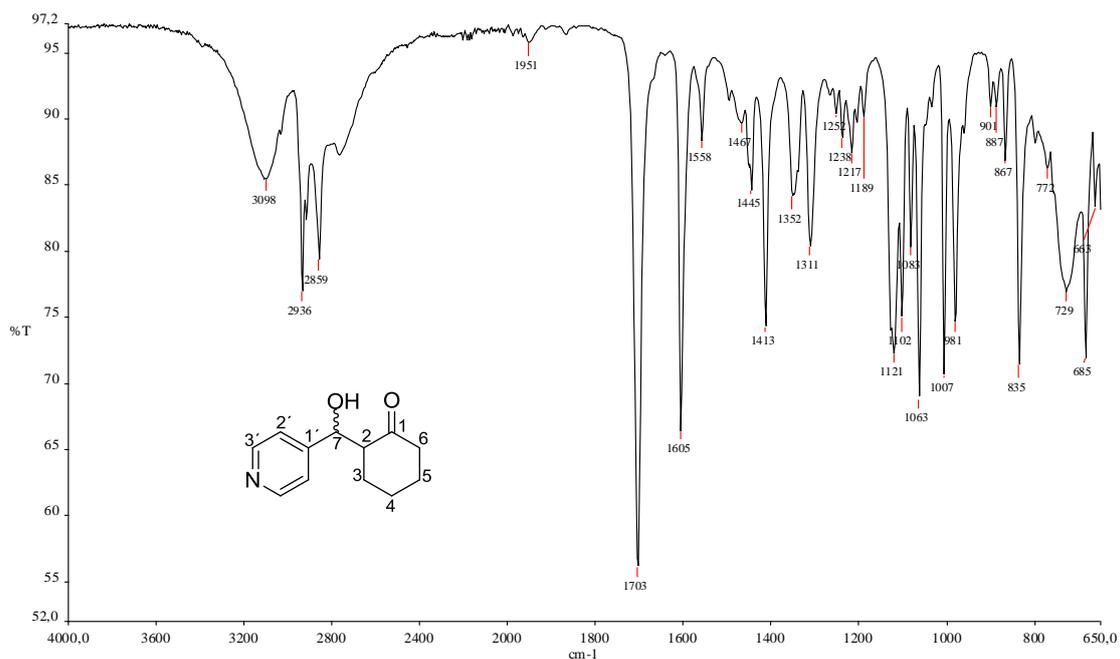
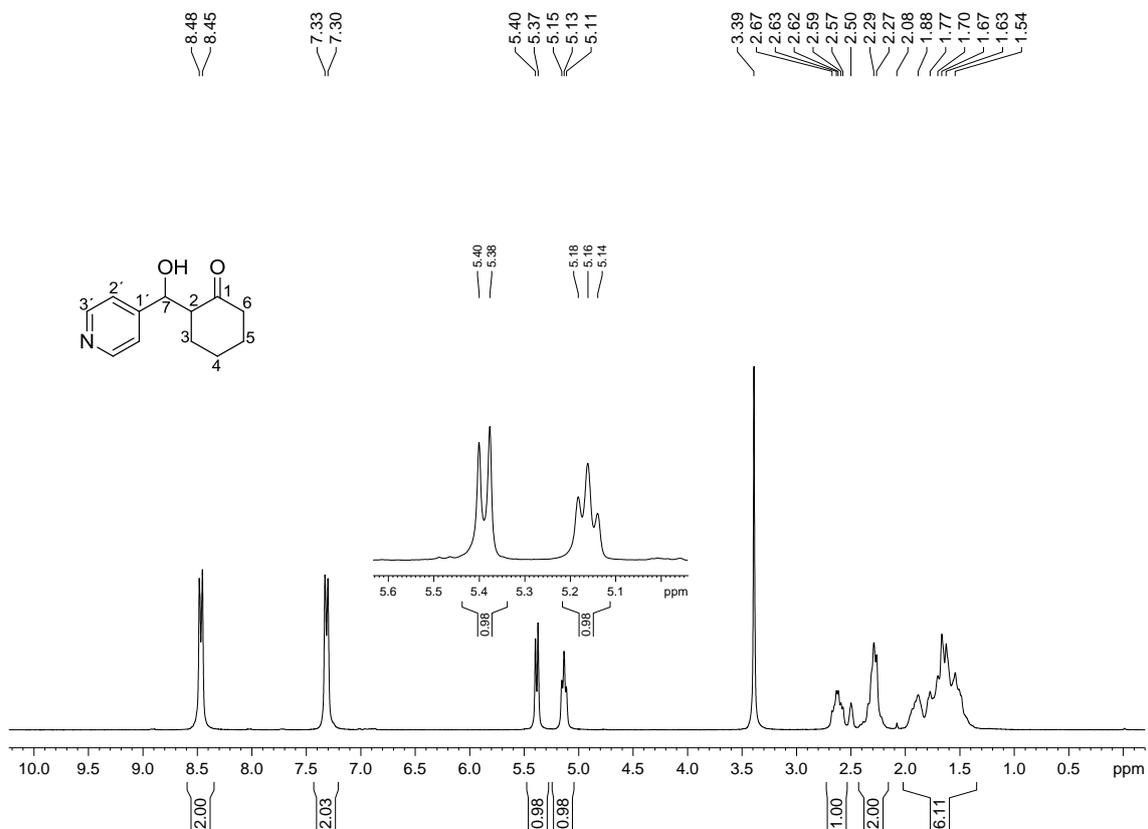
Figura A.24 – Espectro de RMN de ¹H de 3b (200 MHz, DMSO-D₆)

Figura A.25 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 3b (50 MHz, DMSO- D_6)

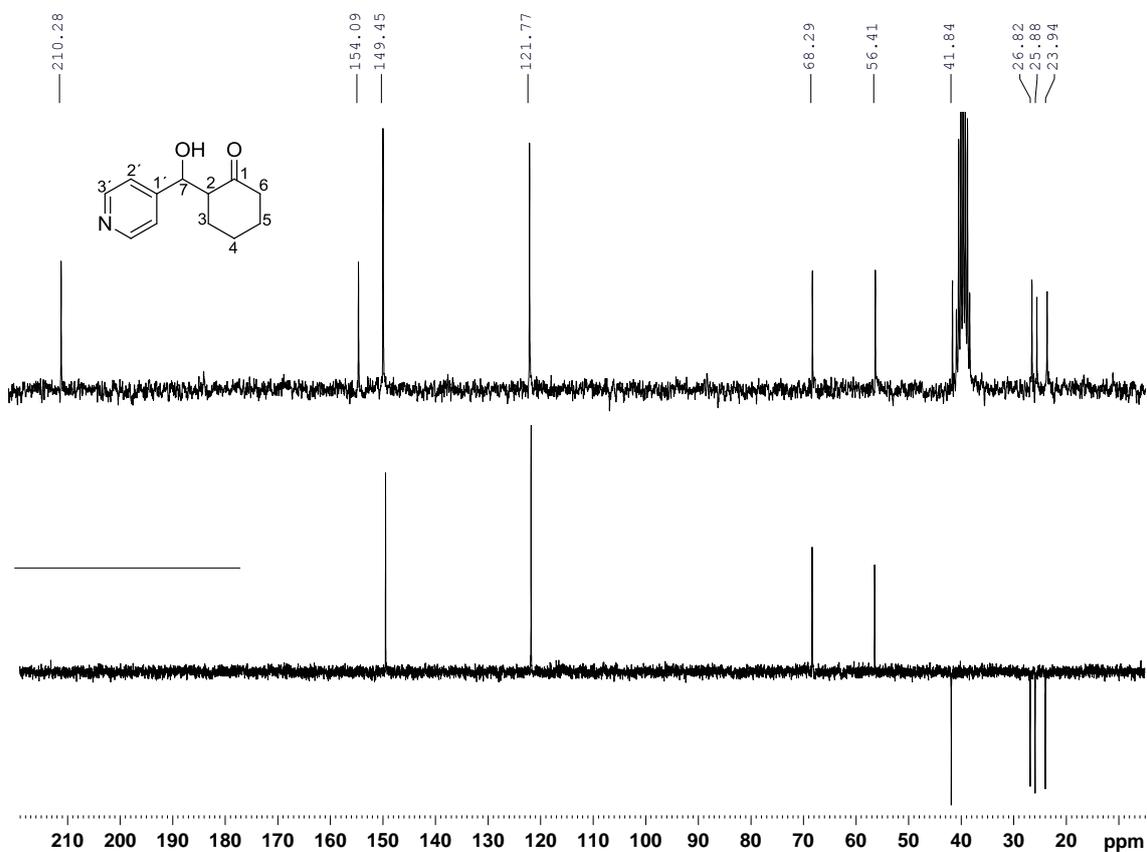


Figura A.26 - Espectro no infravermelho de 3c

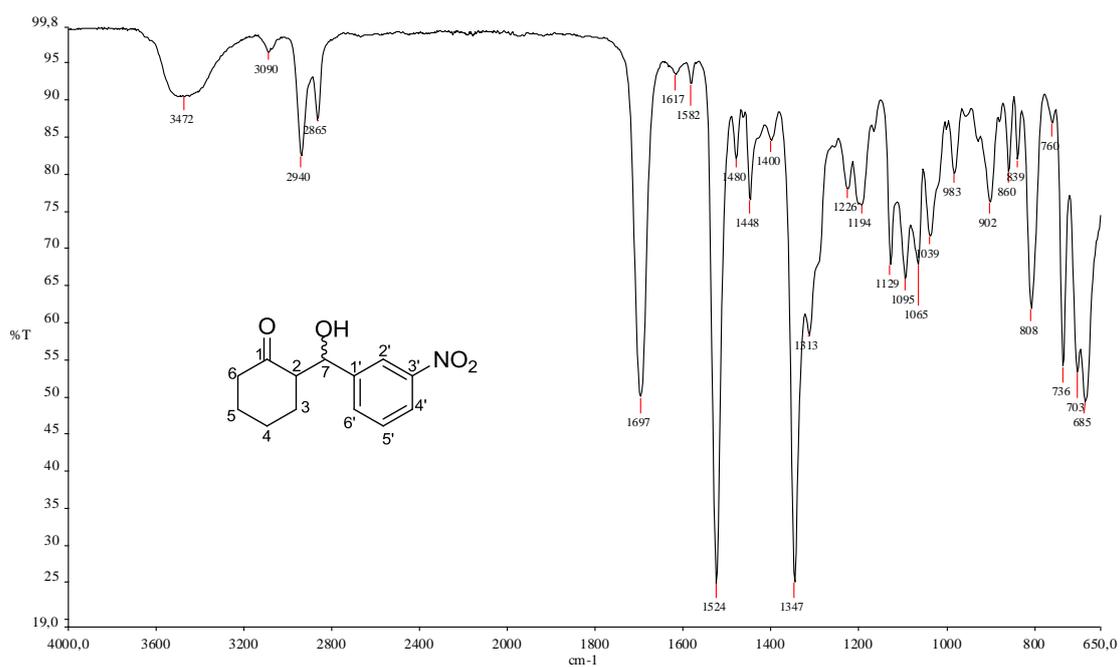


Figura A.27 - Espectro no infravermelho de 3d

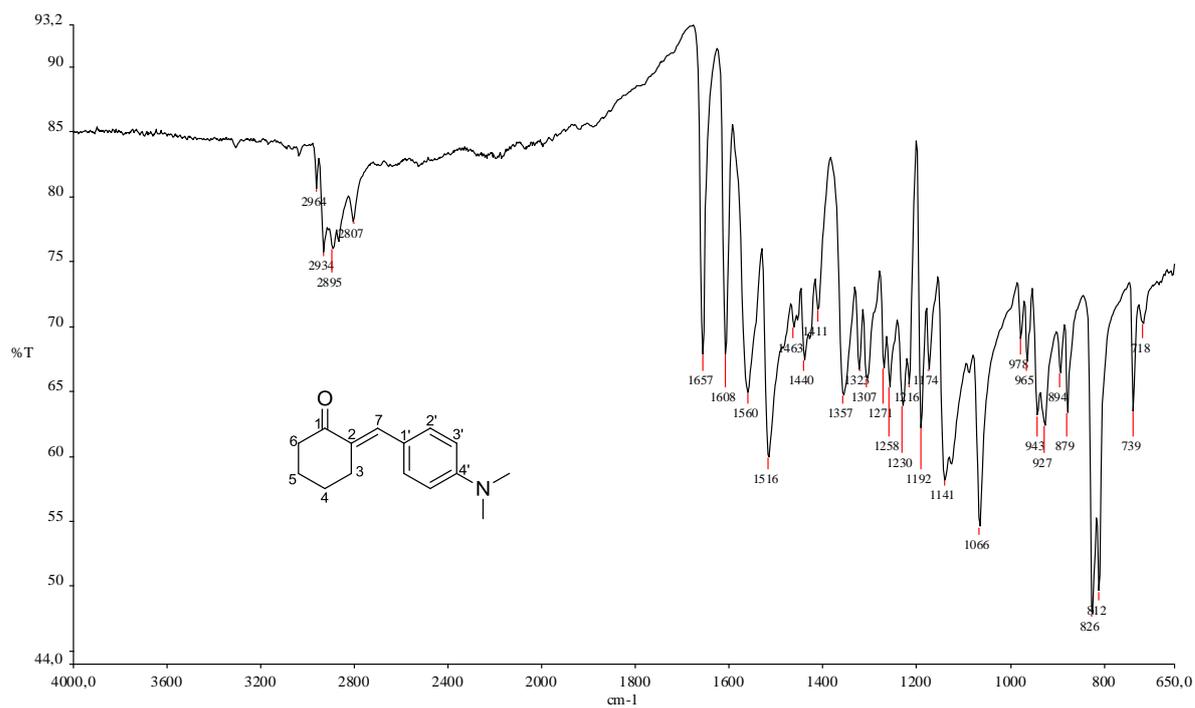
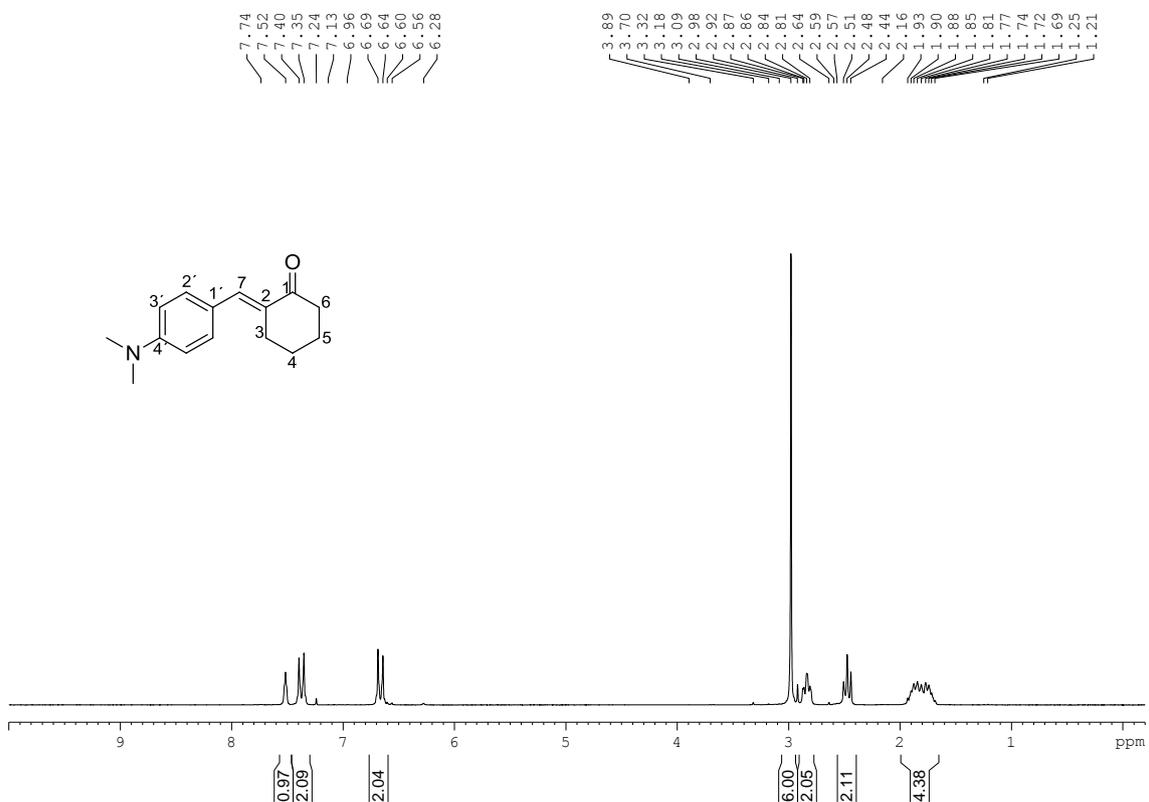
Figura A.28 – Espectro de RMN de ¹H de 3d (200 MHz, CDCl₃)

Figura A.29 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 3d (50 MHz, CDCl_3)

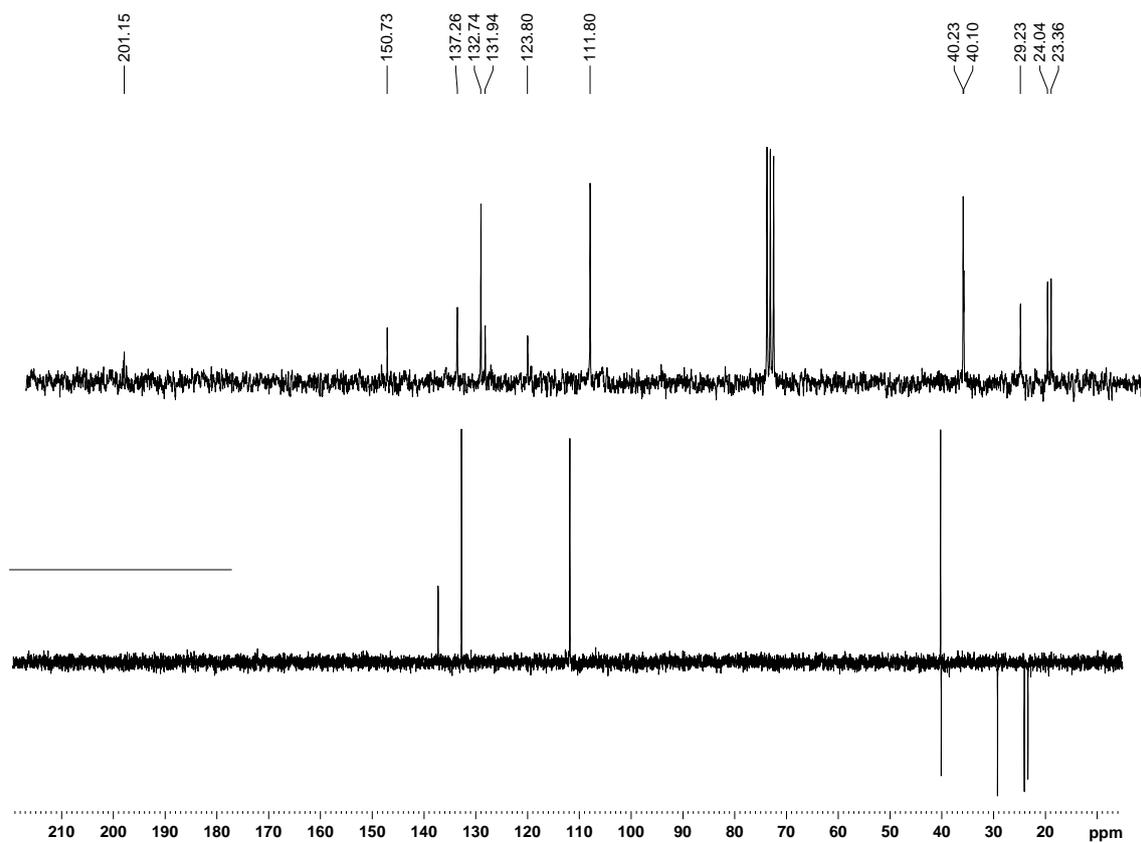


Figura A.30 - Espectro no infravermelho de 4a

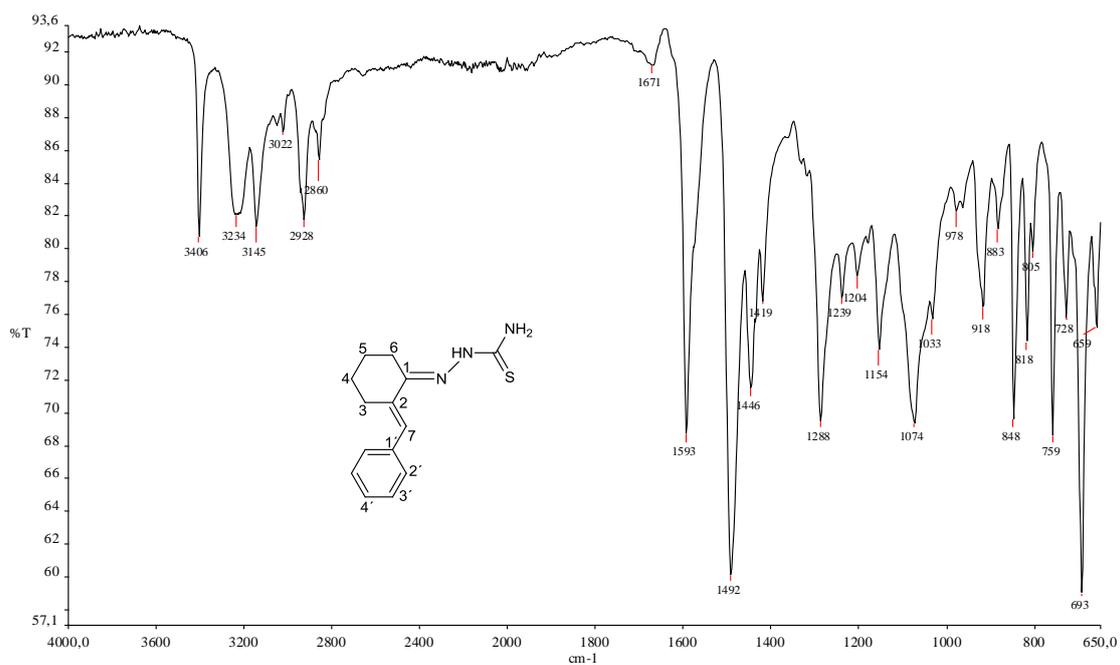


Figura A.31 – Espectro de RMN de ^1H de 4a (200 MHz, DMSO-D_6)

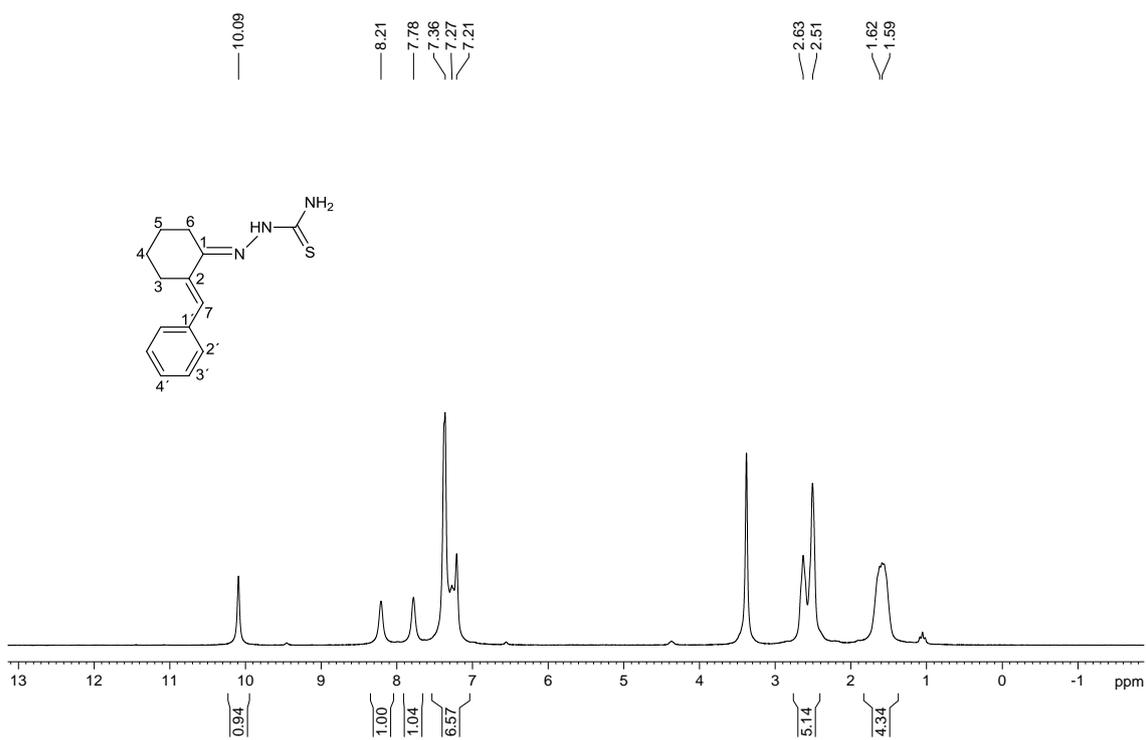


Figura A.32 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4a (50 MHz, DMSO-D_6)

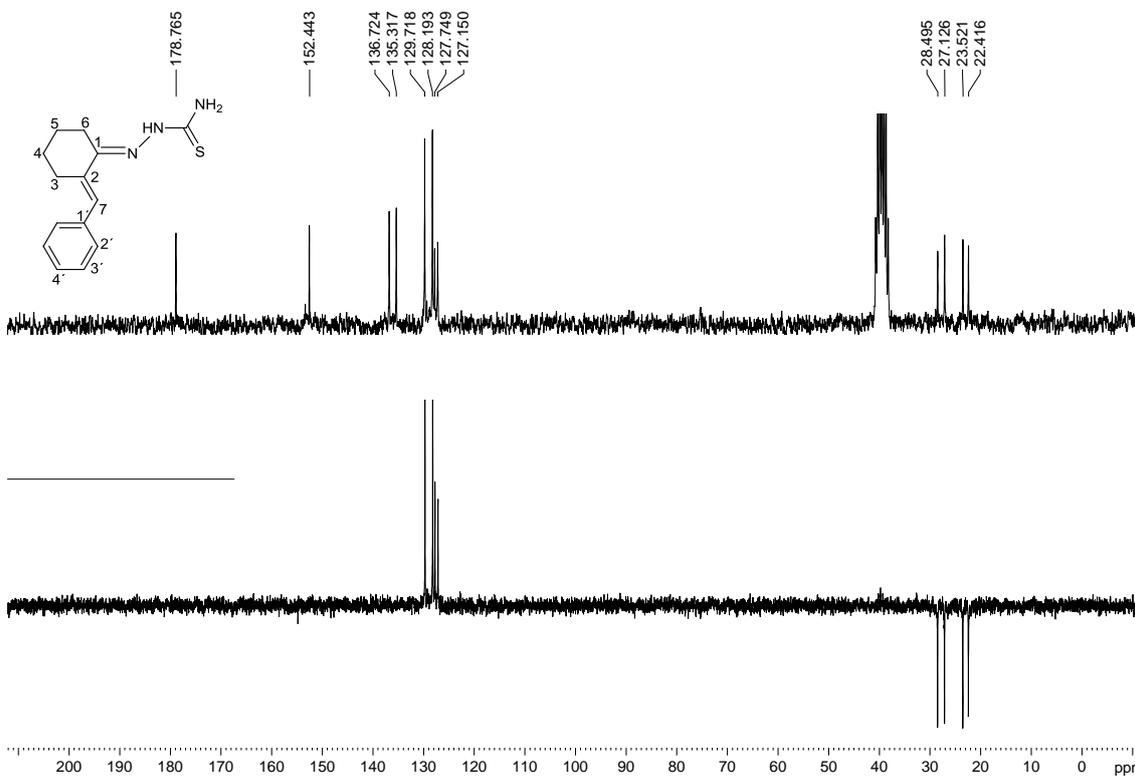


Figura A.33 - Espectro no infravermelho de 4b

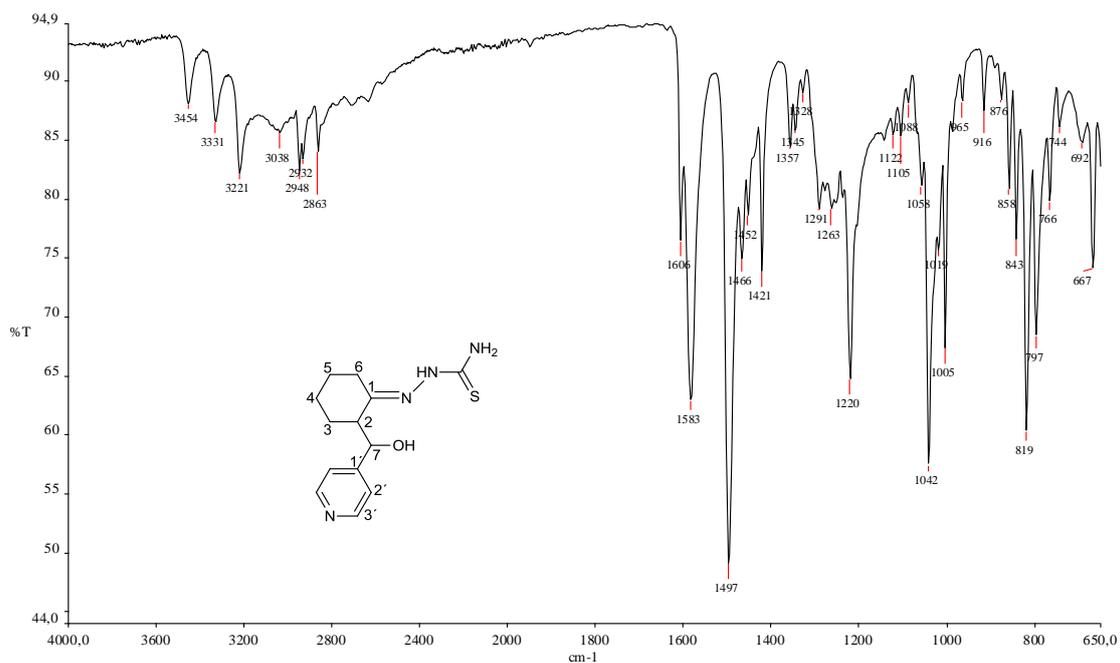
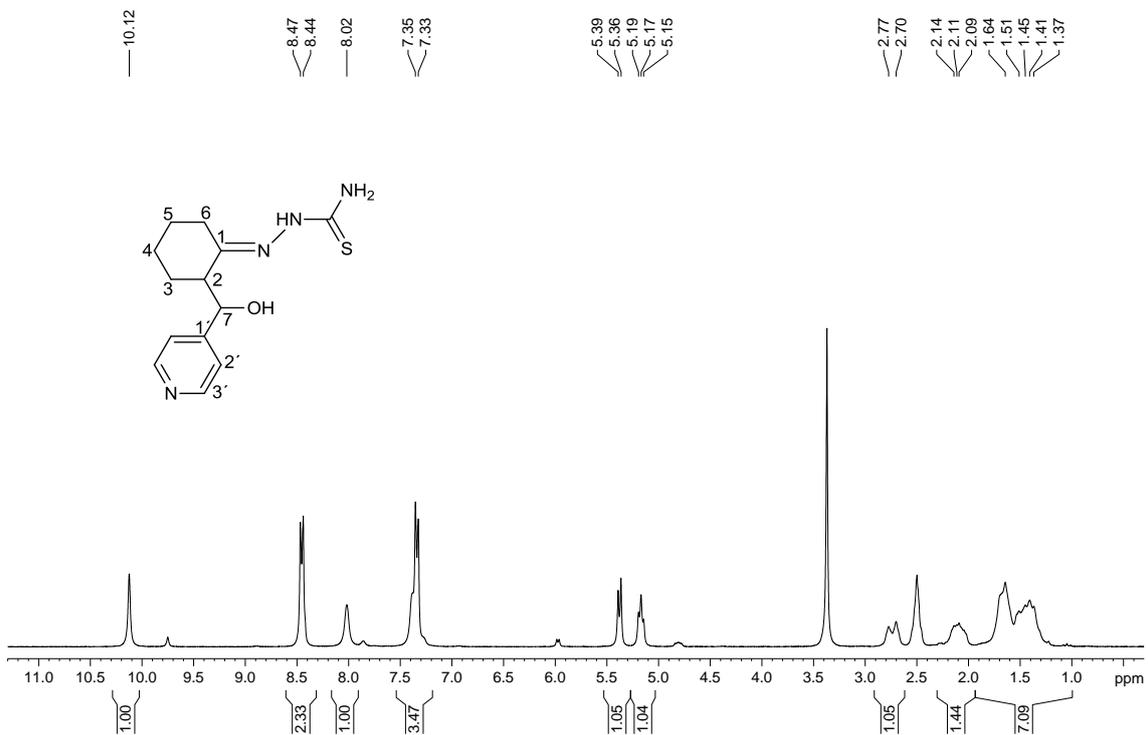
Figura A.34 – Espectro de RMN de ¹H de 4b (200 MHz, DMSO-D₆)

Figura A.35 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4b (50 MHz, DMSO- D_6)

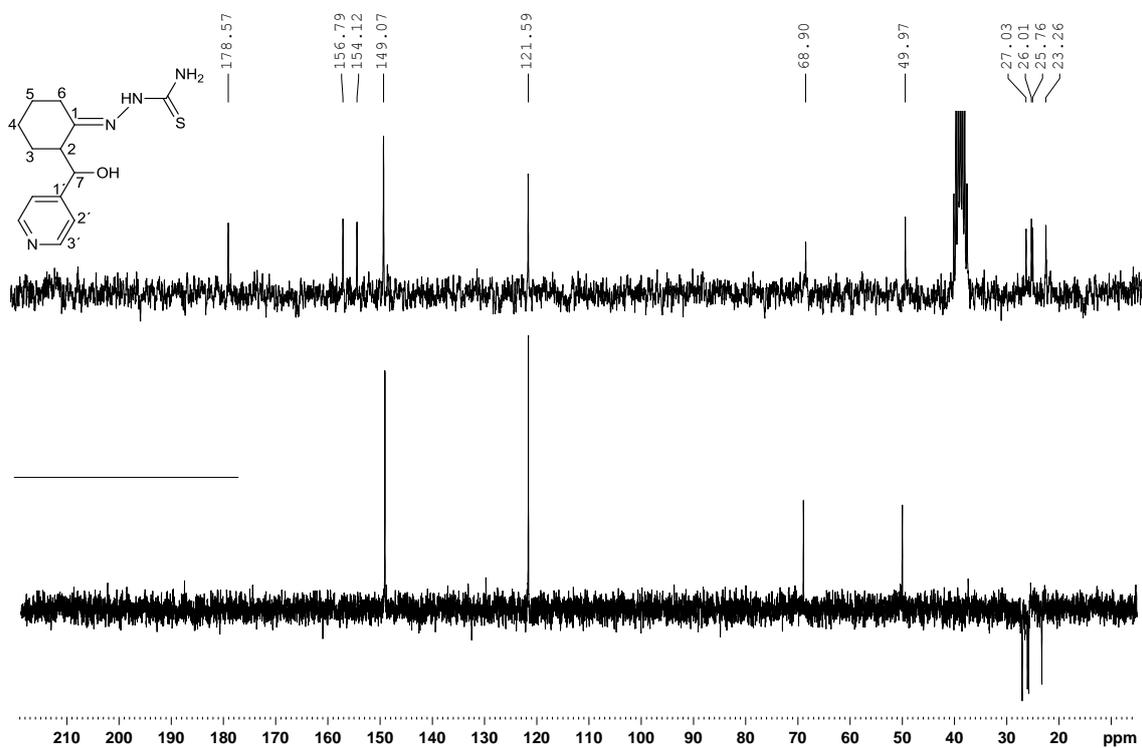


Figura A.36 - Espectro no infravermelho de 4c

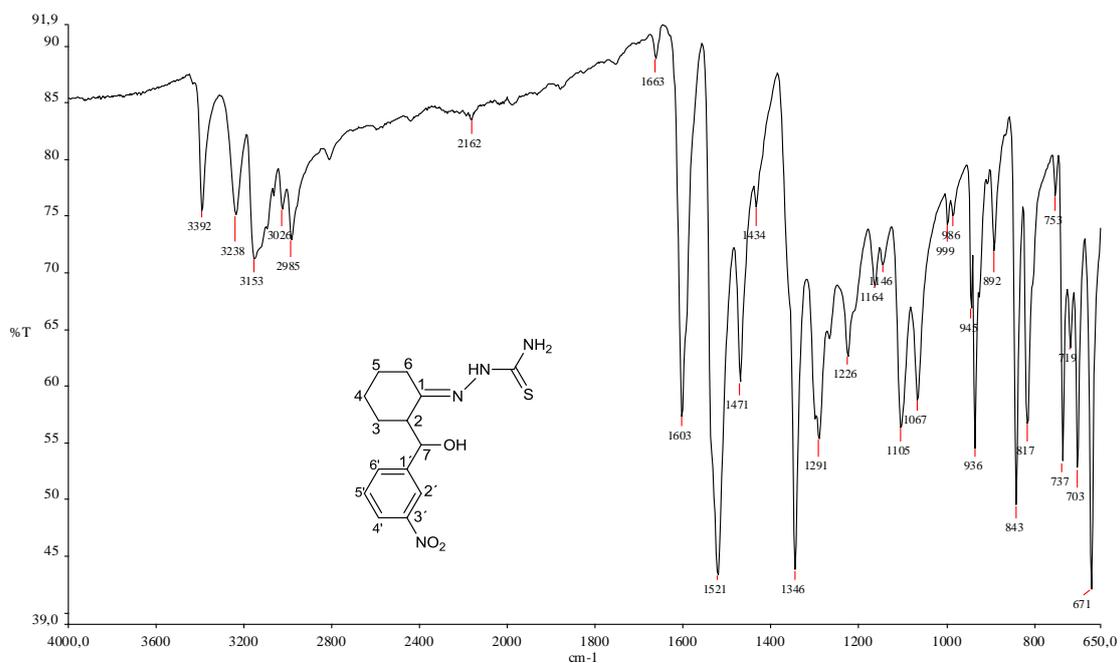


Figura A.37 - Espectro no infravermelho de 4d

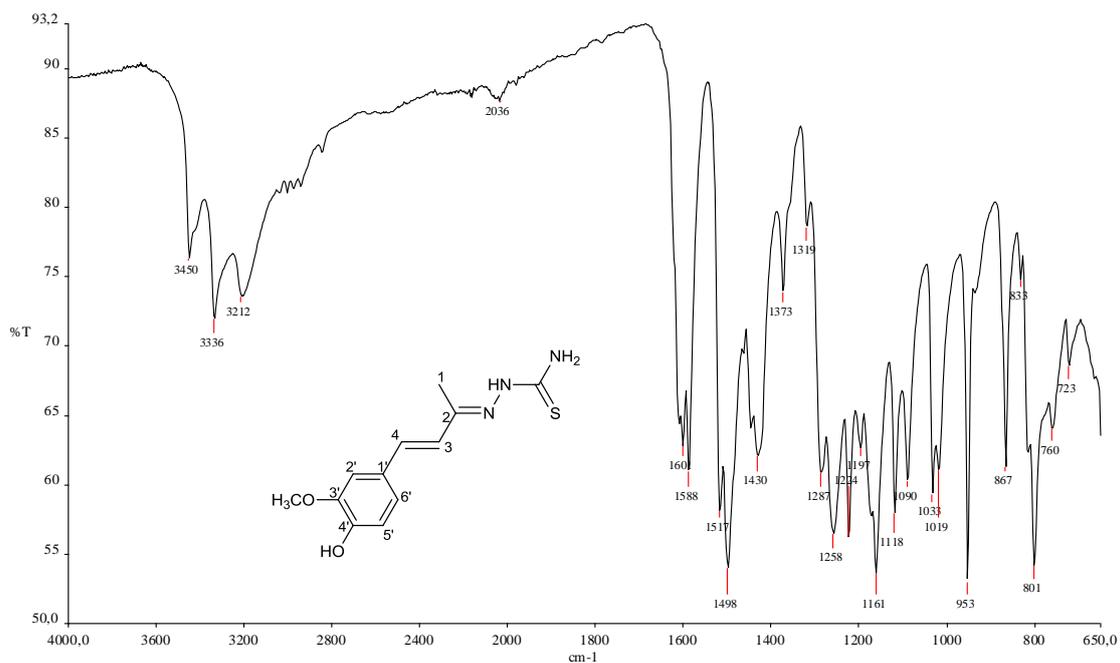
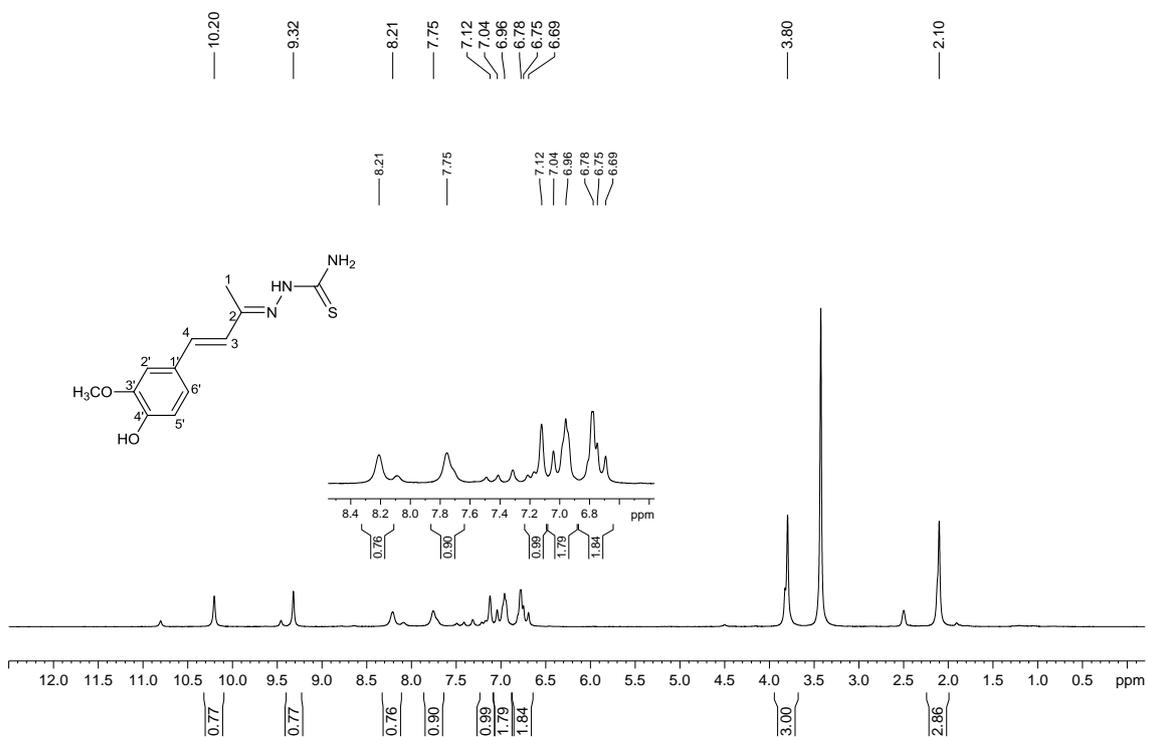
Figura A.38 – Espectro de RMN de ¹H de 4d (200 MHz, DMSO-D₆)

Figura A.39 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4d (50 MHz, DMSO- D_6)

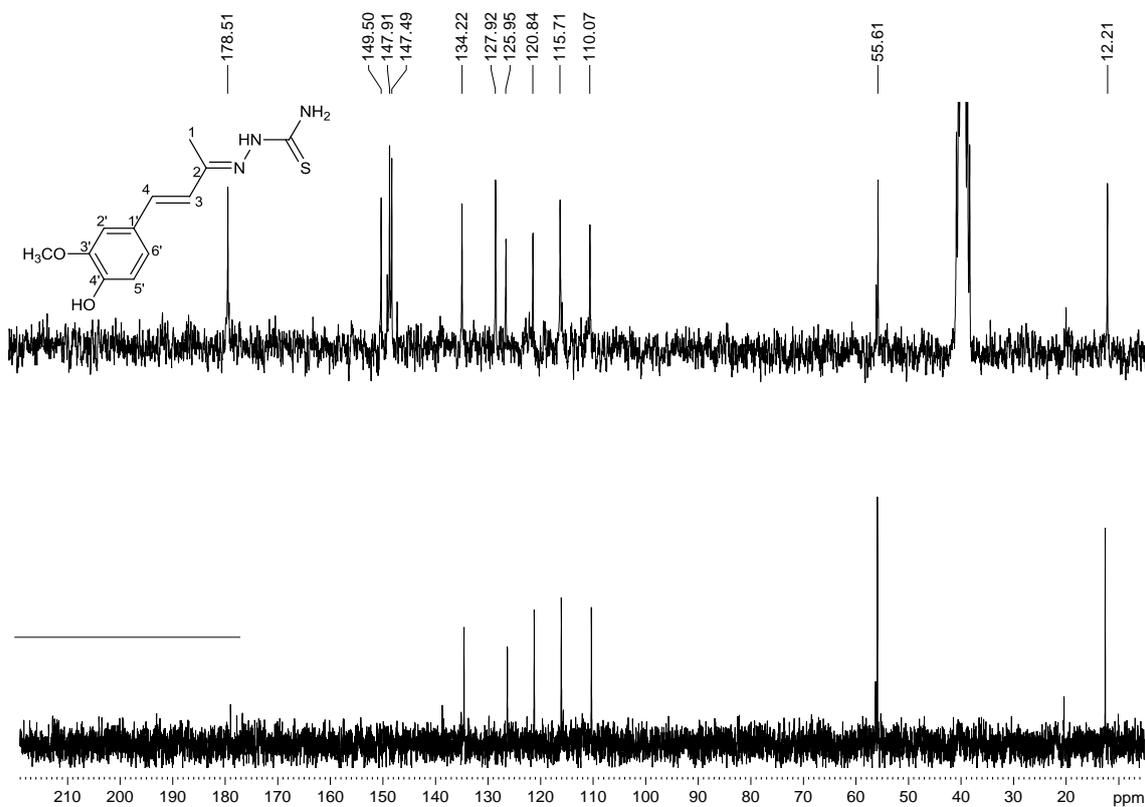


Figura A.40 - Espectro no infravermelho de 4e

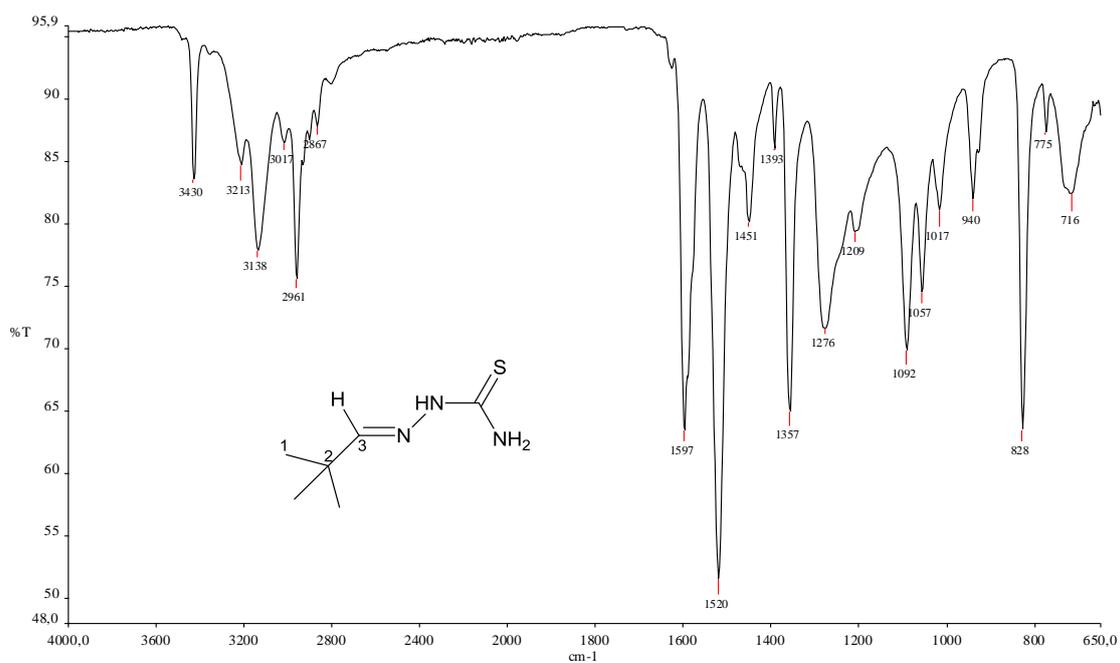


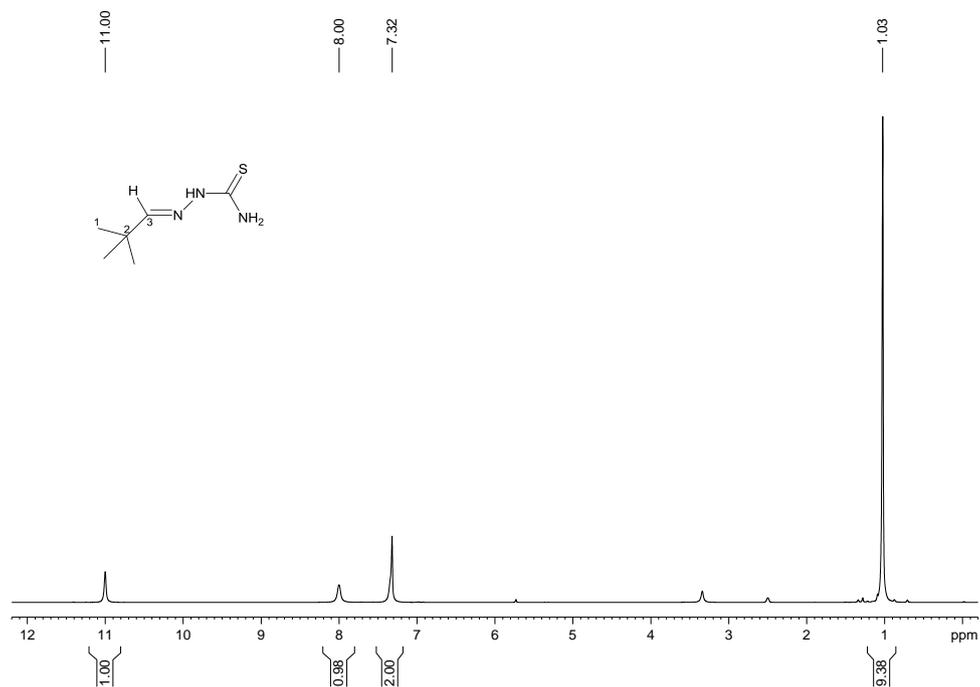
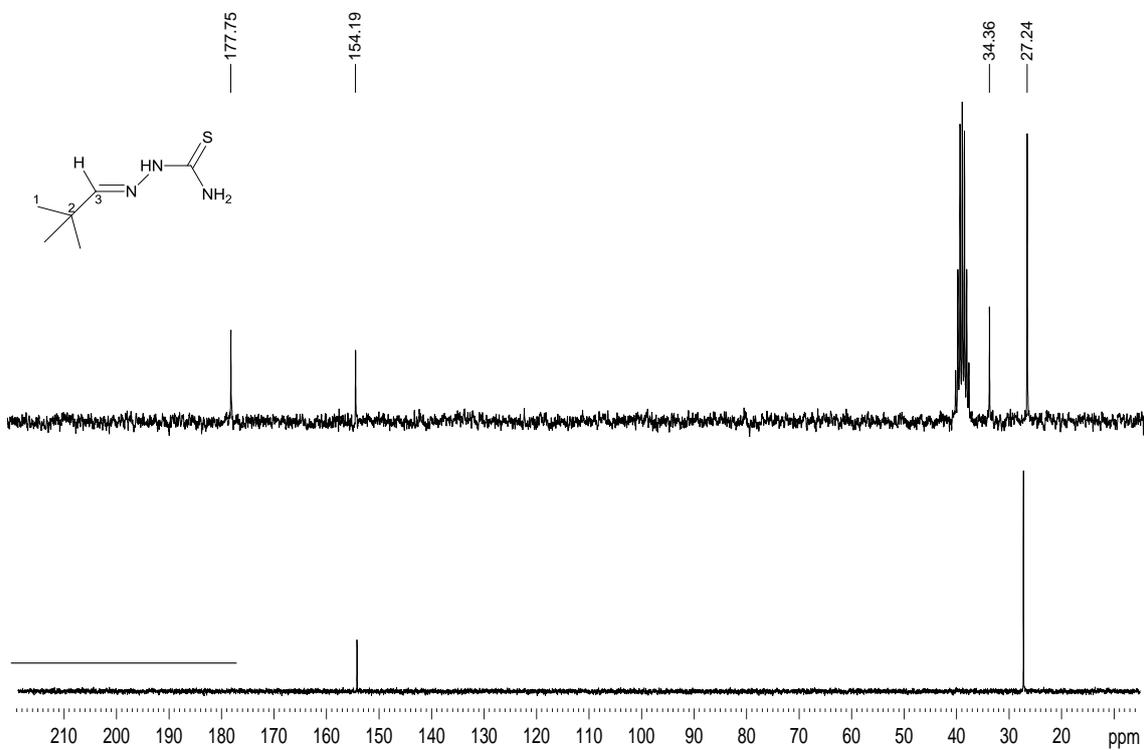
Figura A.41 – Espectro de RMN de ^1H de 4e (200 MHz, DMSO-D_6)**Figura A.42 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4e (50 MHz, DMSO-D_6)**

Figura A.43 - Espectro no infravermelho de 4f

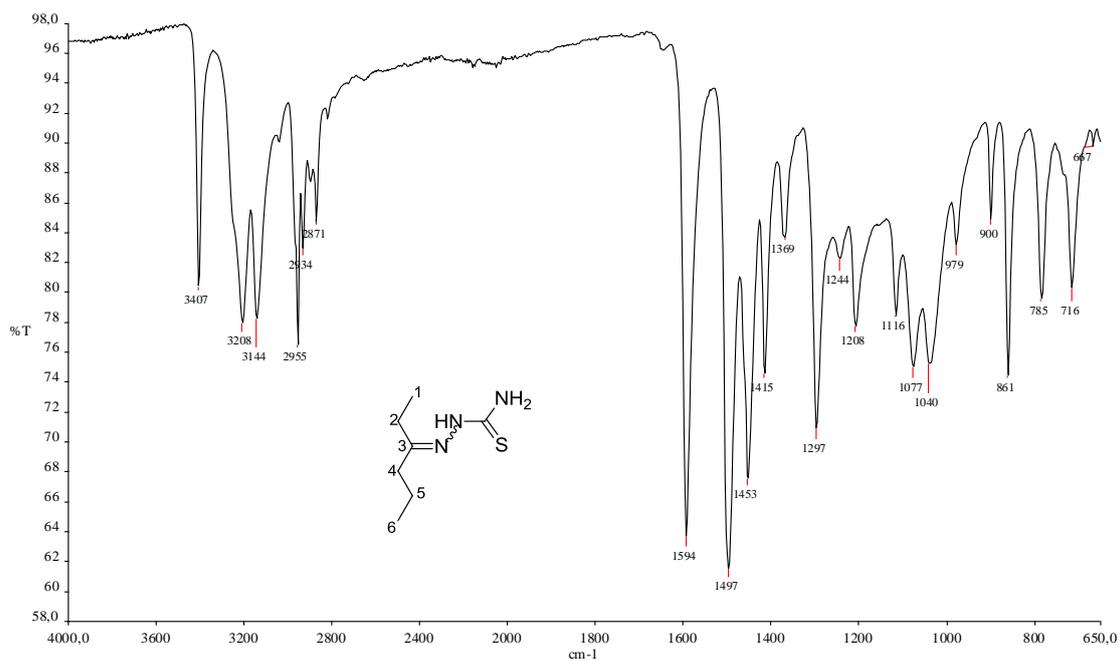
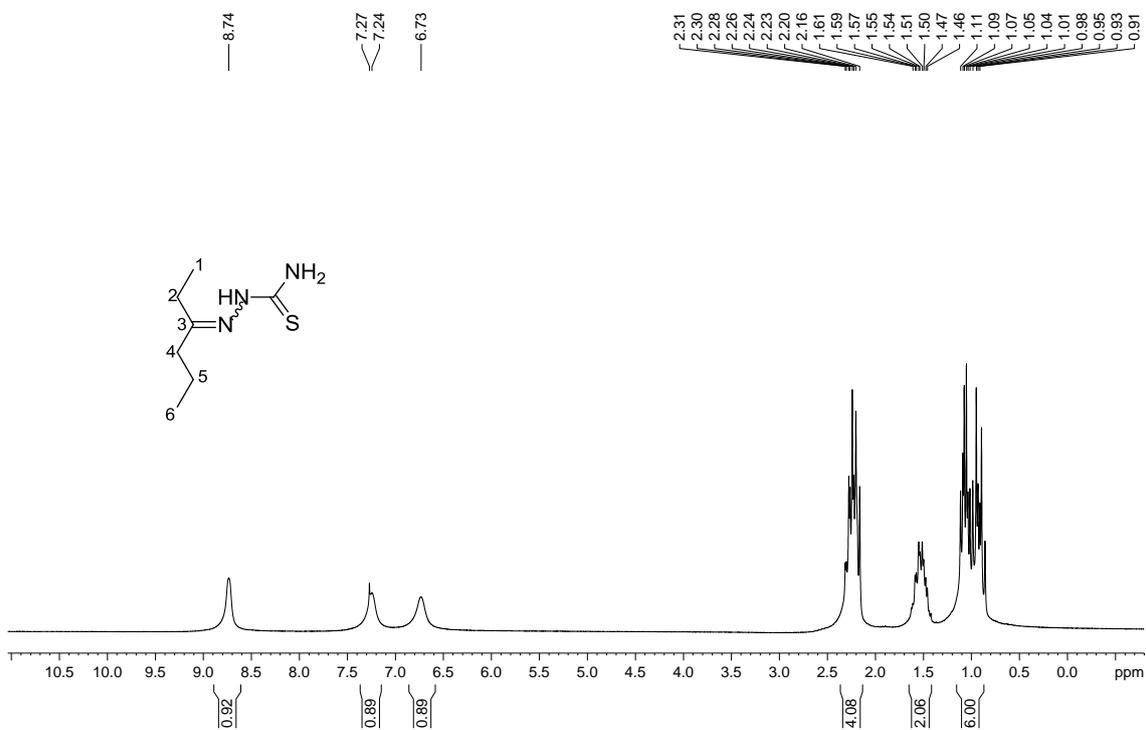
Figura A.44 – Espectro de RMN de ¹H de 4f (200 MHz, CDCl₃)

Figura A.45 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4f (50 MHz, CDCl_3)

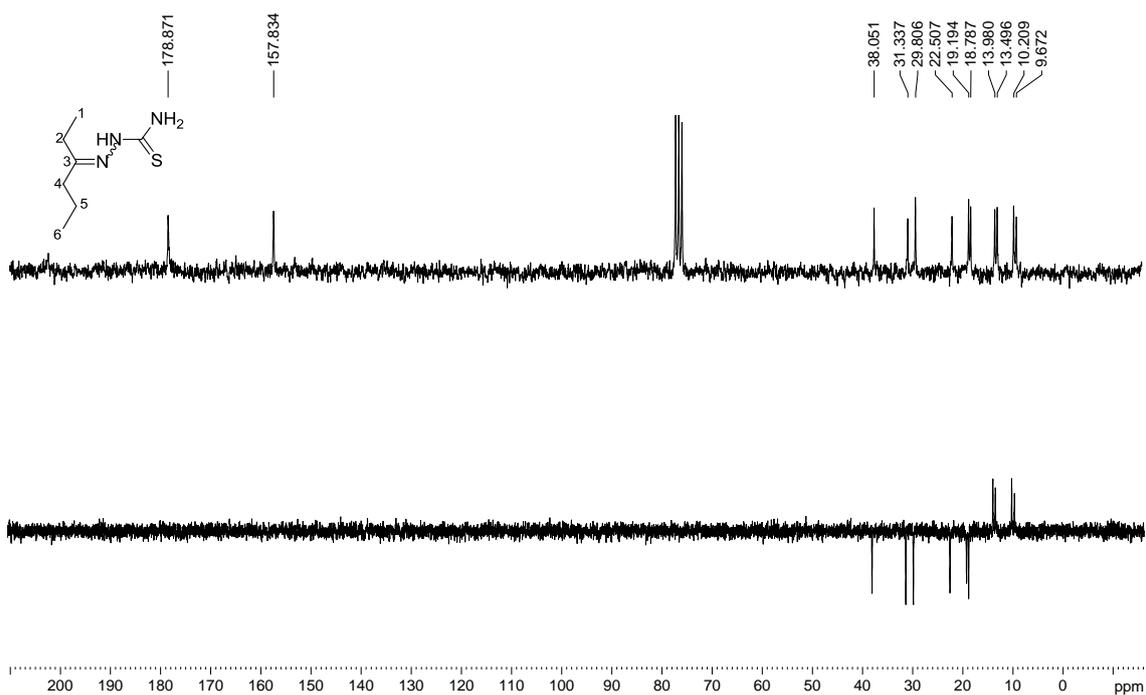


Figura A.46 - Espectro no infravermelho de 4g

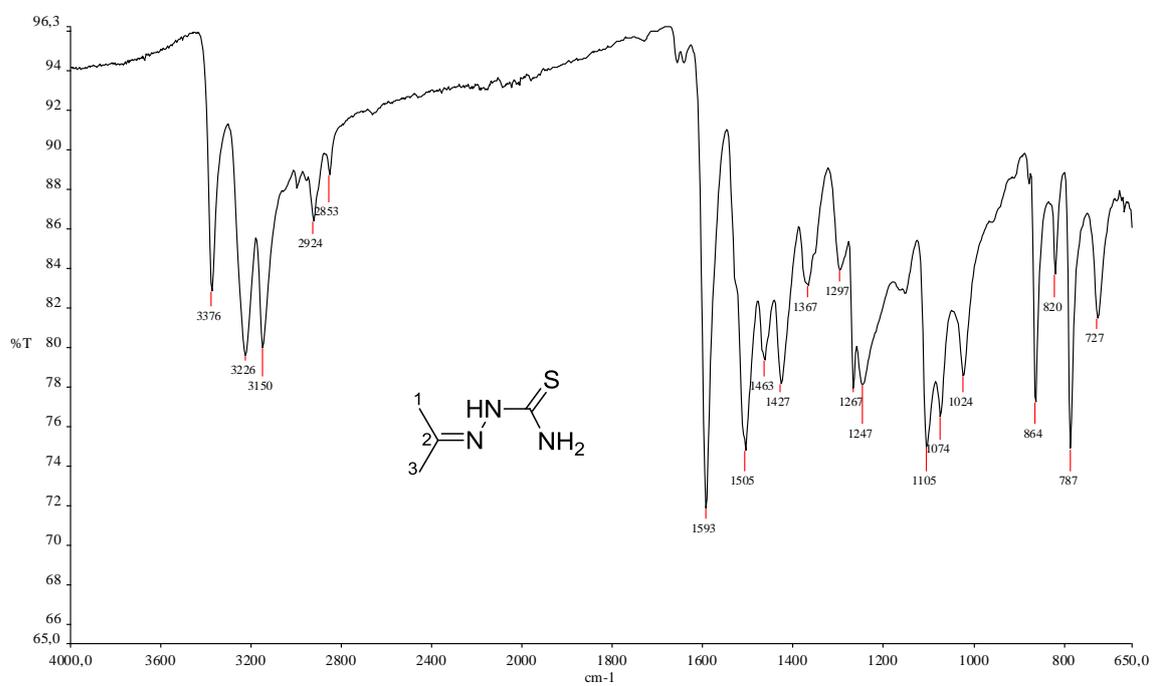


Figura A.47 – Espectro de RMN de ^1H de 4g (200 MHz, DMSO-D_6)

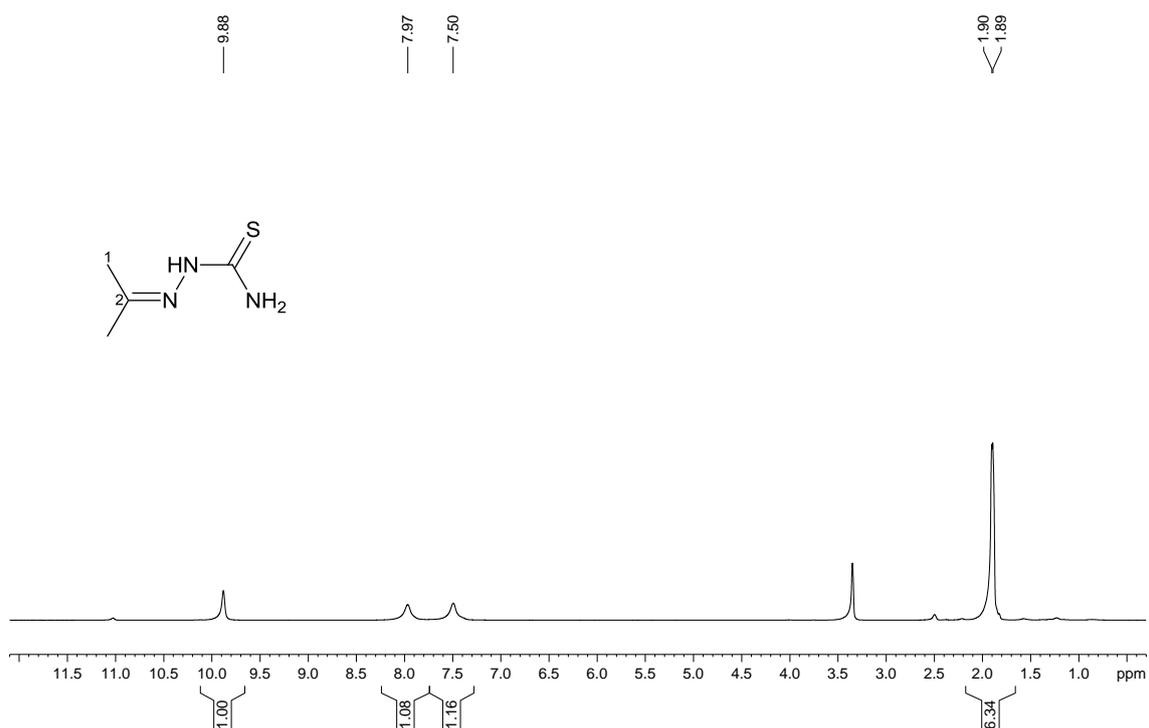


Figura A.48 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 4g (50 MHz, DMSO-D_6)

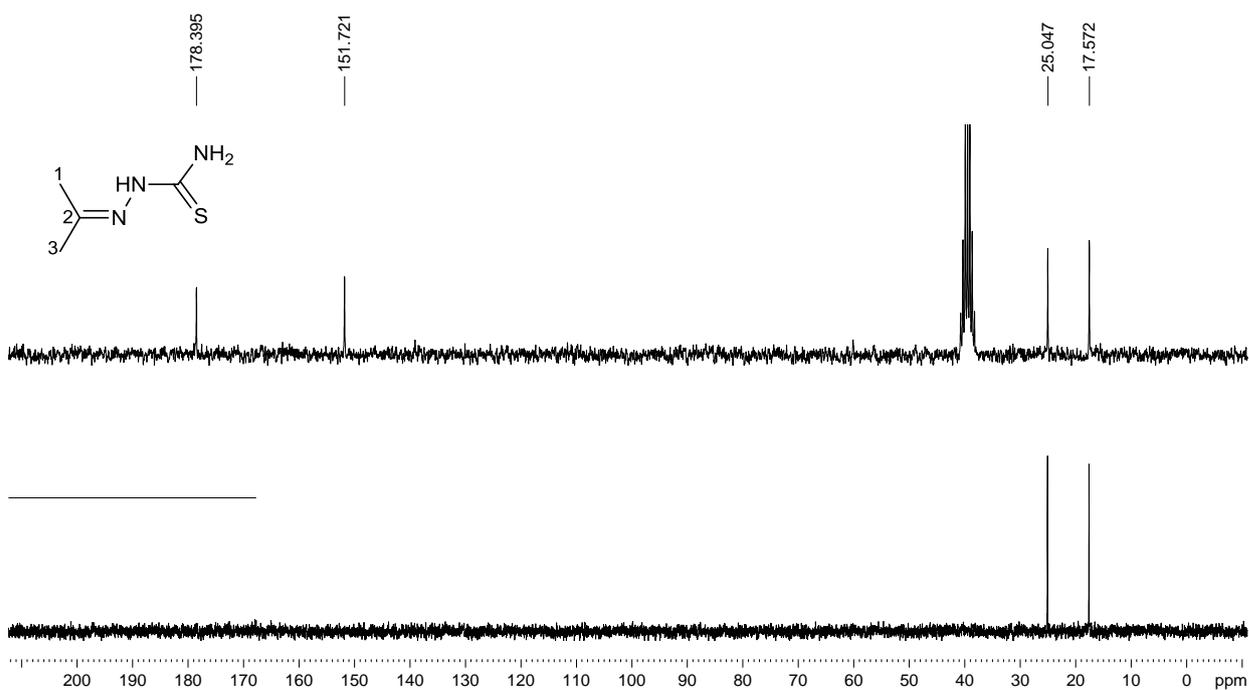


Figura A.49 - Espectro no infravermelho de 5a

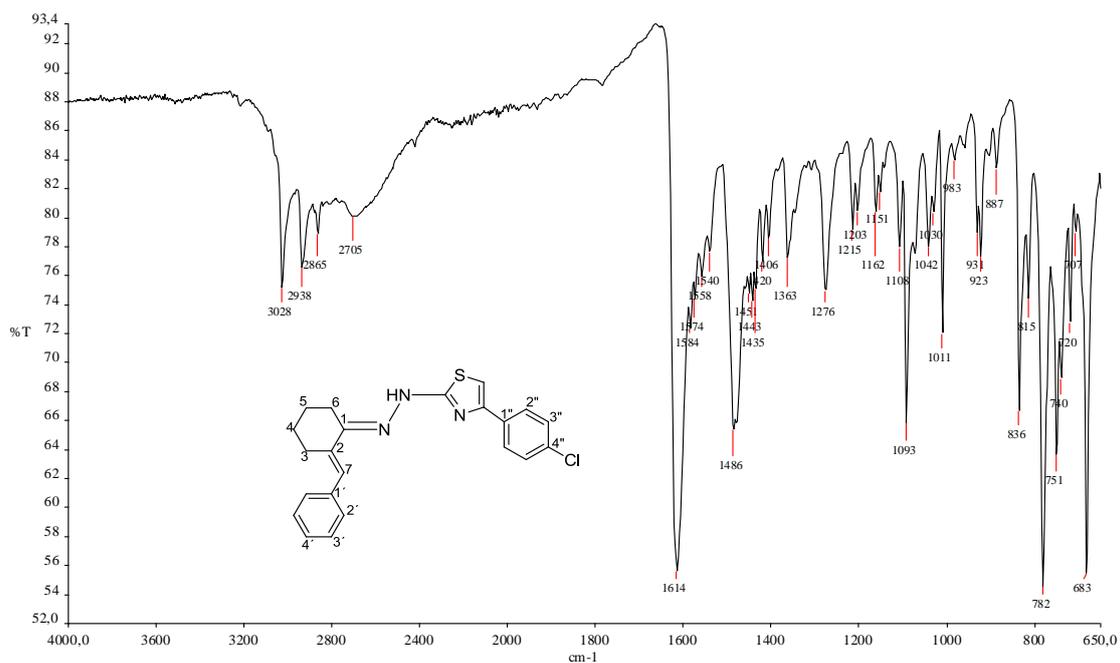
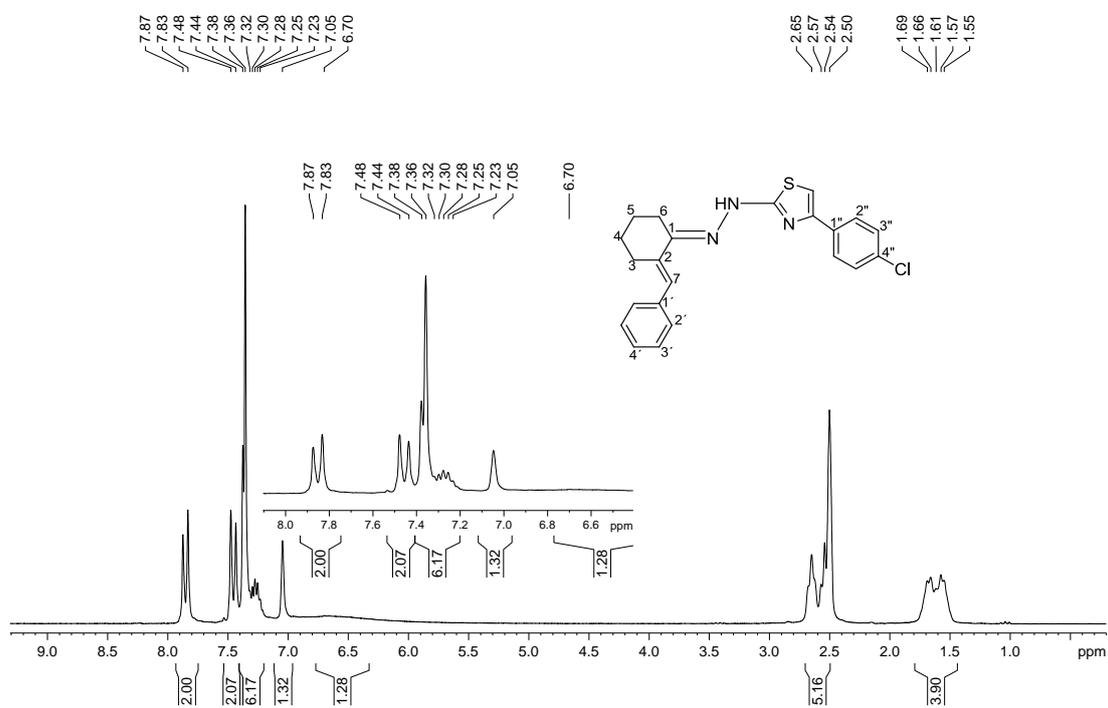
Figura A.50 – Espectro de RMN de ¹H de 5a (200 MHz, DMSO-D₆)

Figura A.51 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5a (50 MHz, DMSO- D_6)

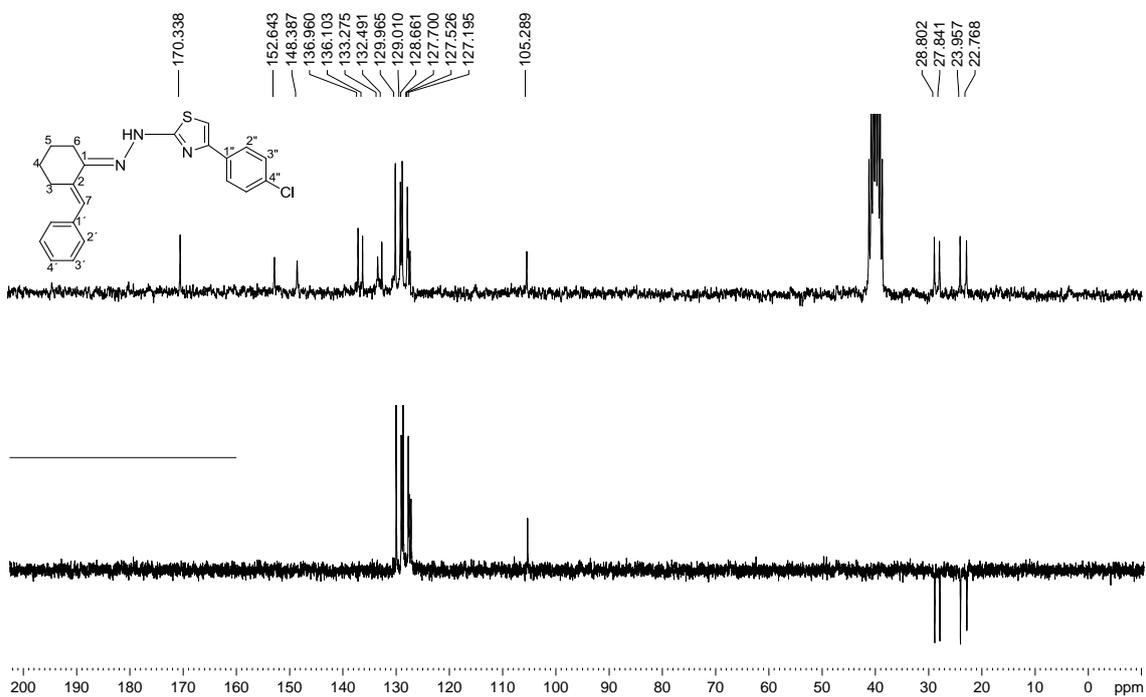


Figura A.52 - Espectro no infravermelho de 5b

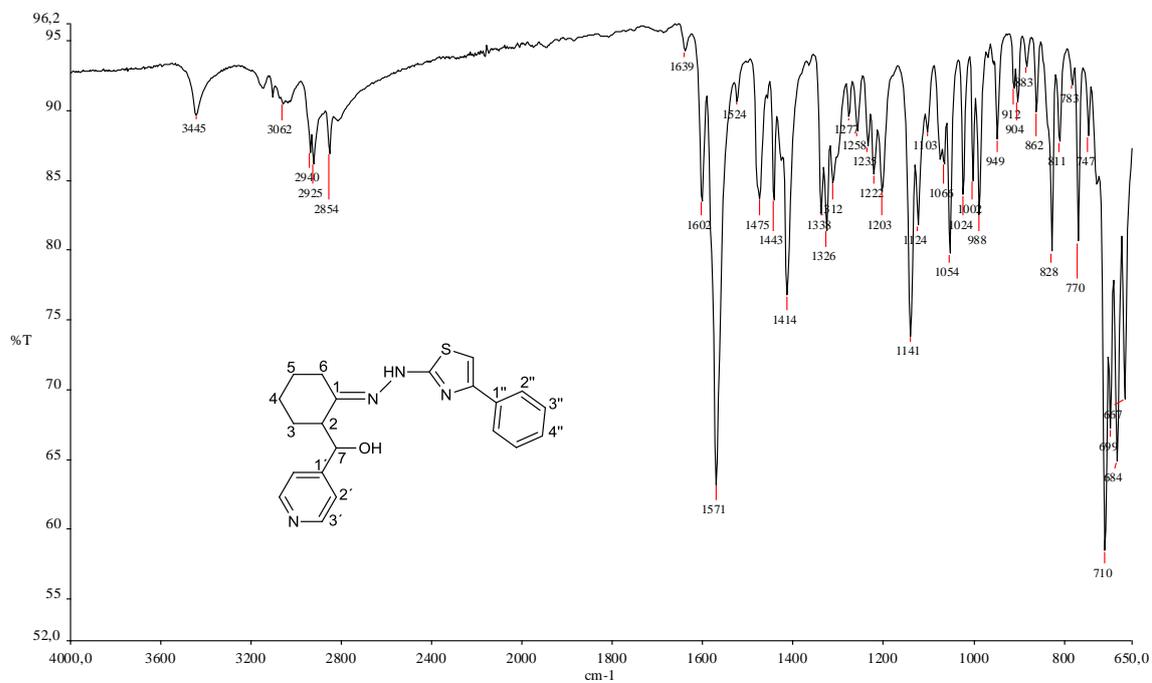


Figura A.53 – Espectro de RMN de ^1H de 5b (200 MHz, DMSO-D_6)

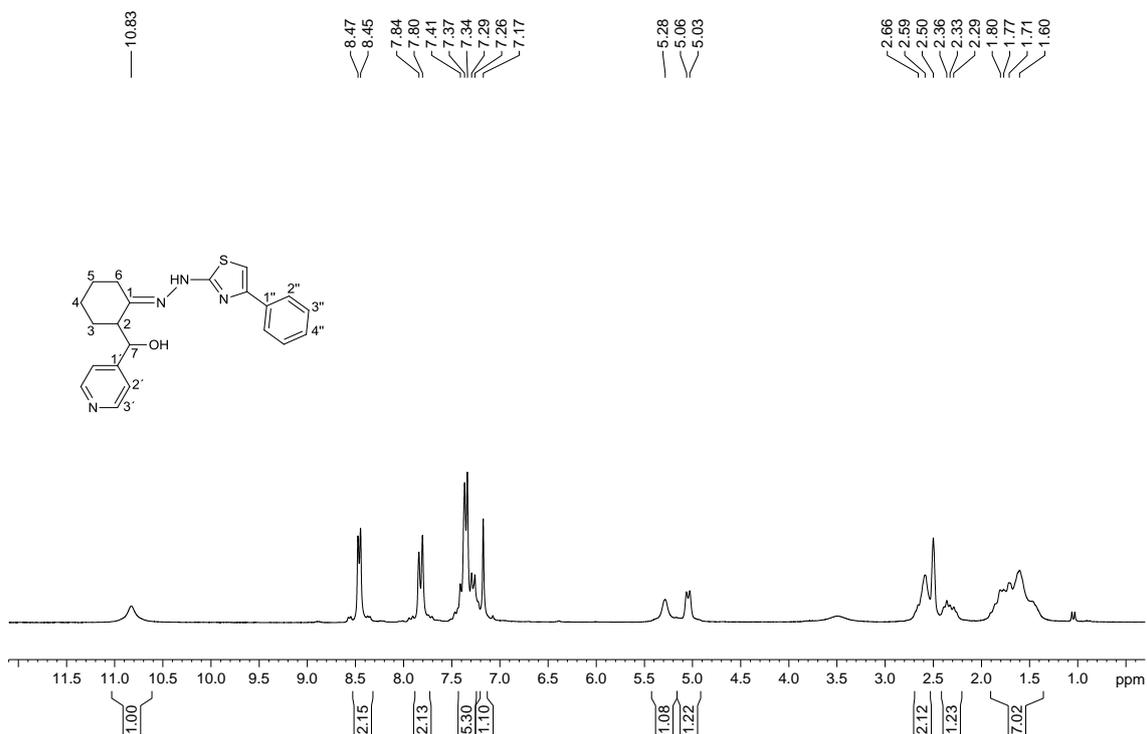


Figura A.54 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5b (50 MHz, DMSO-D_6)

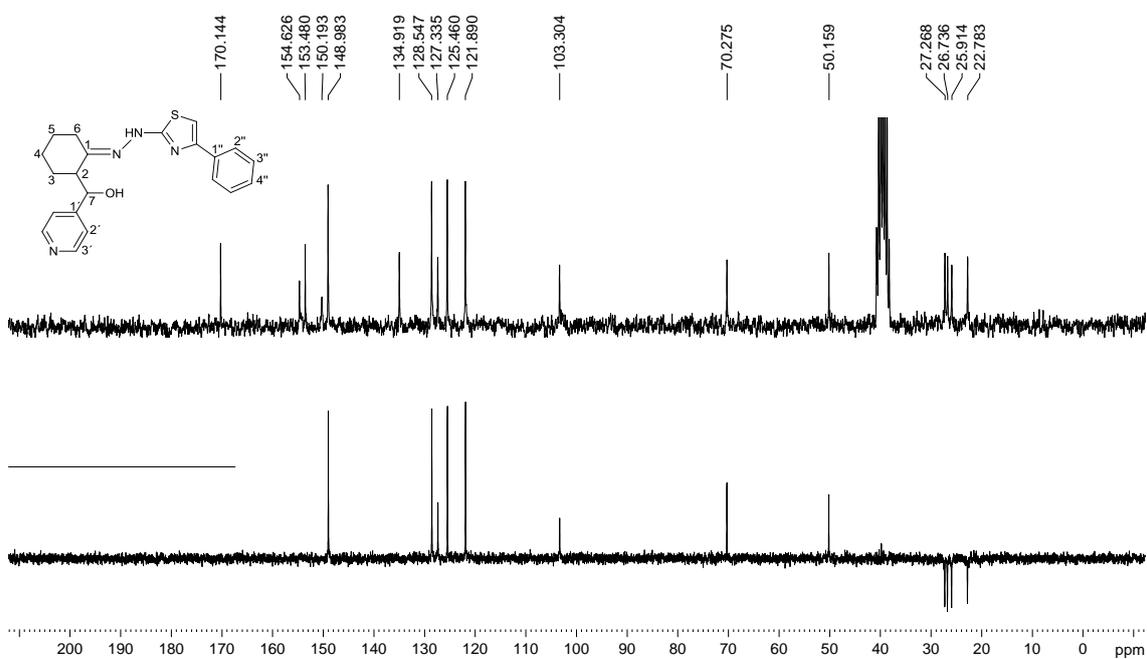


Figura A.55 - Espectro no infravermelho de 5c

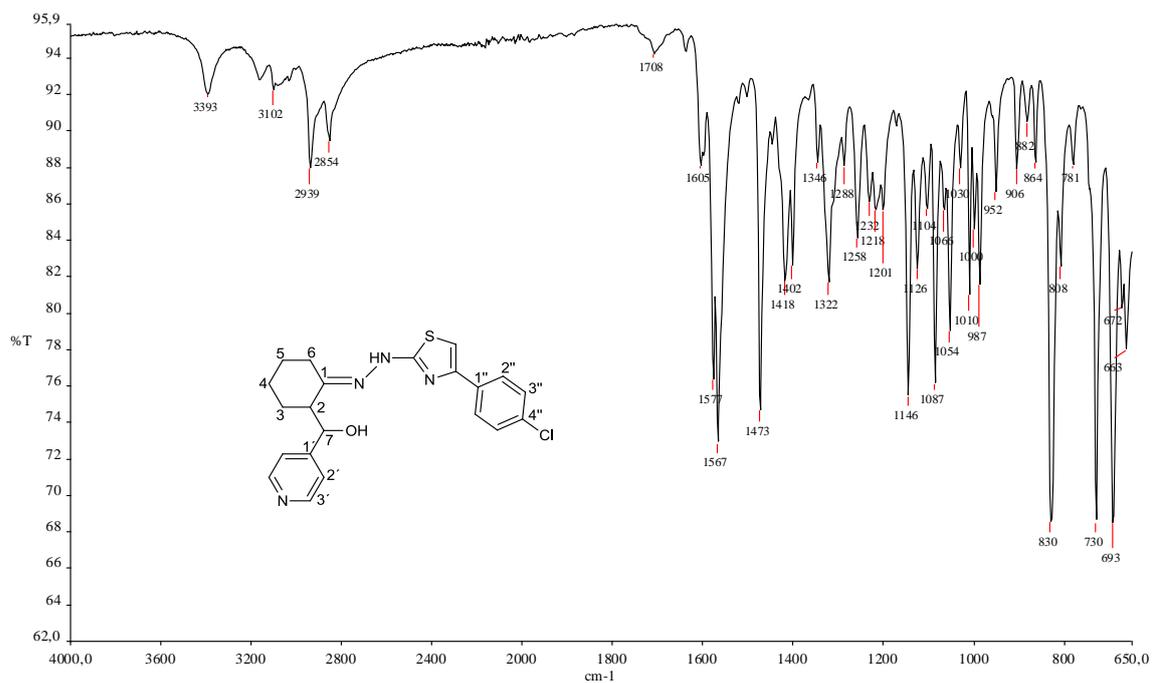
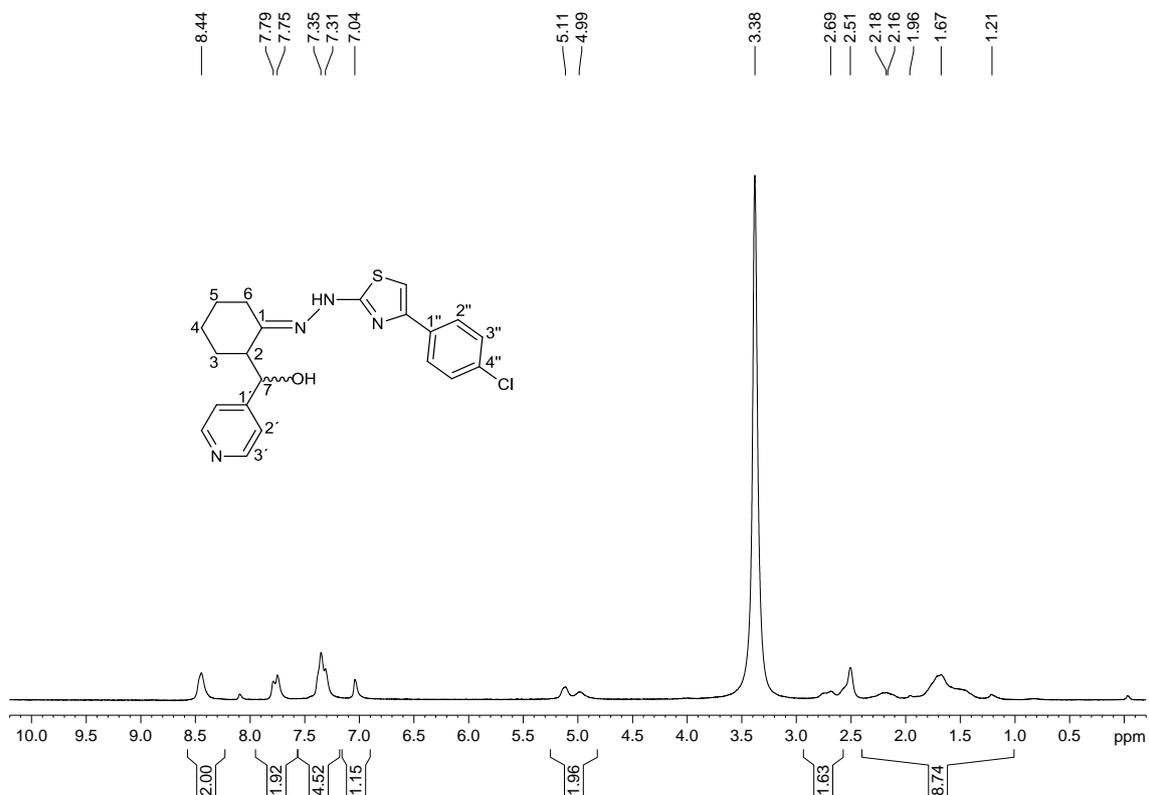
Figura A.56 – Espectro de RMN de ¹H de 5c (200 MHz, DMSO-D₆)

Figura A.57 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5c (50 MHz, DMSO-D_6)

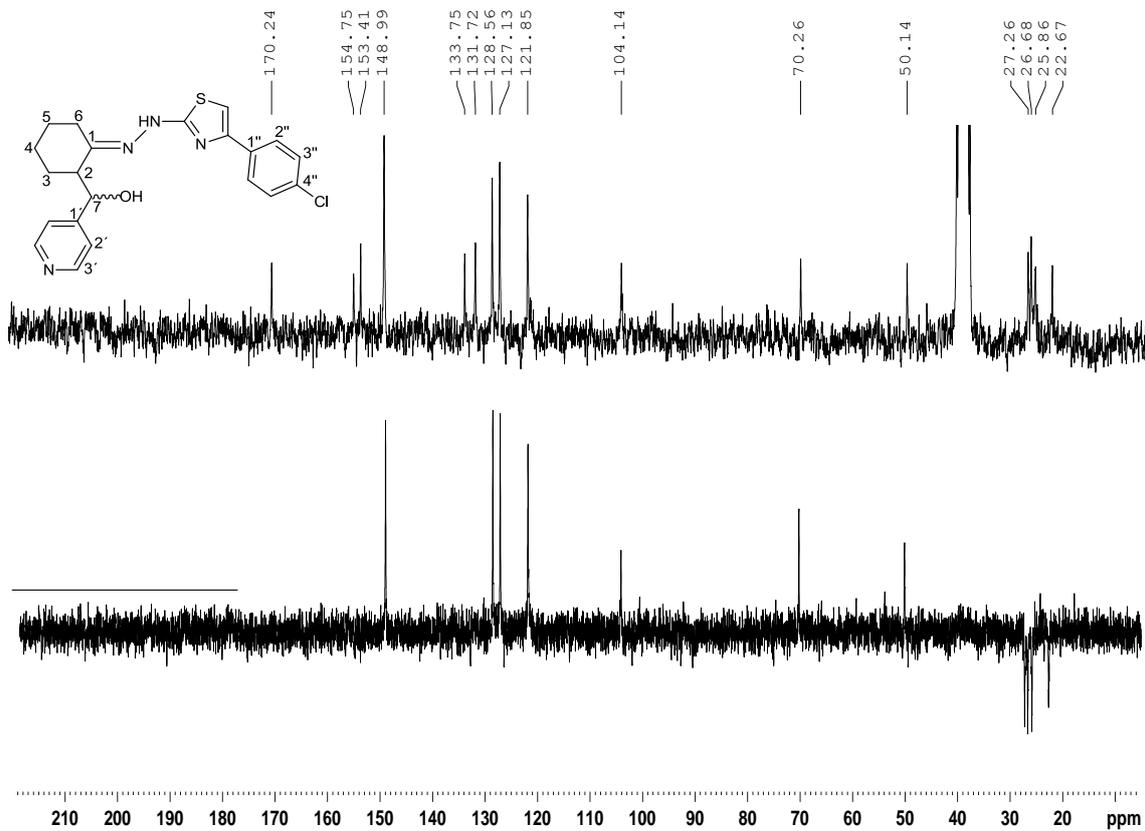


Figura A.58 - Espectro no infravermelho de 5d

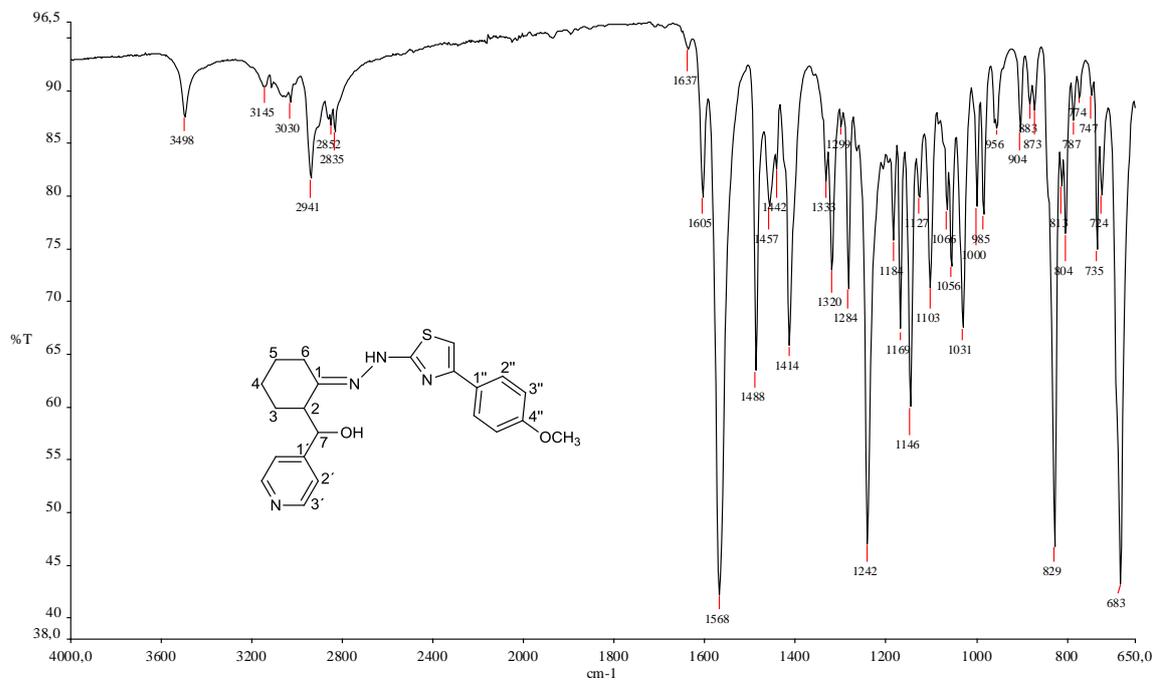


Figura A.59 – Espectro de RMN de ^1H de 5d (200 MHz, DMSO-D_6)

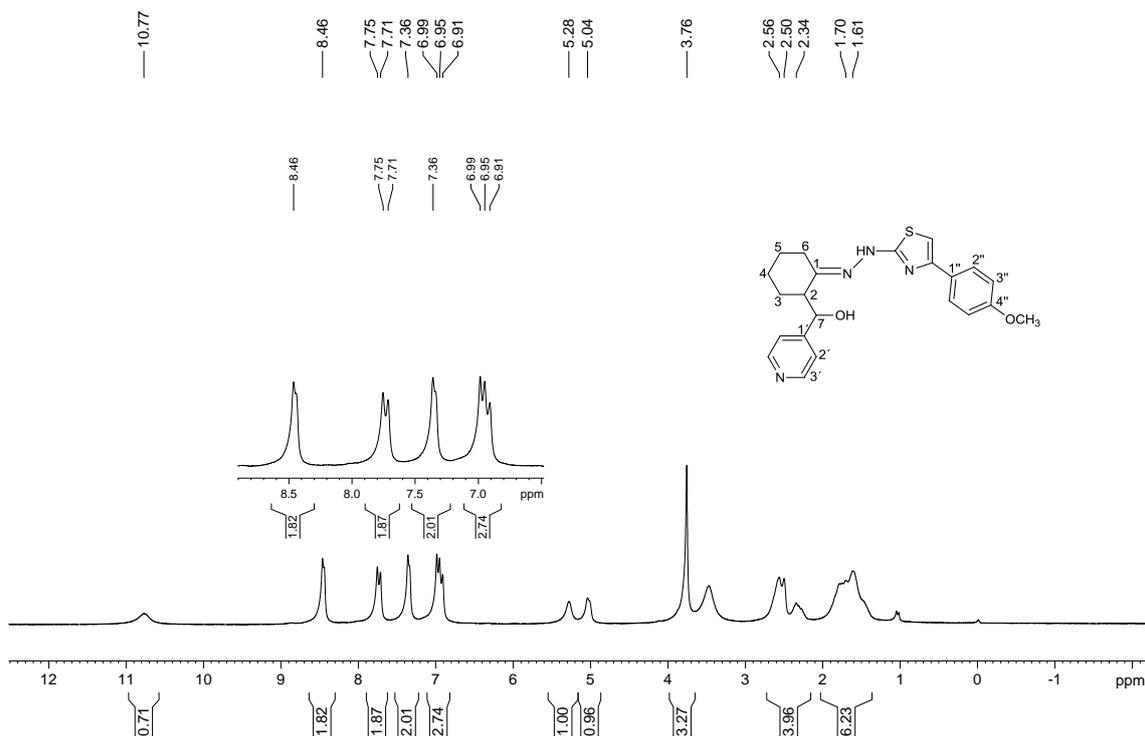


Figura A.60 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5d (50 MHz, DMSO-D_6)

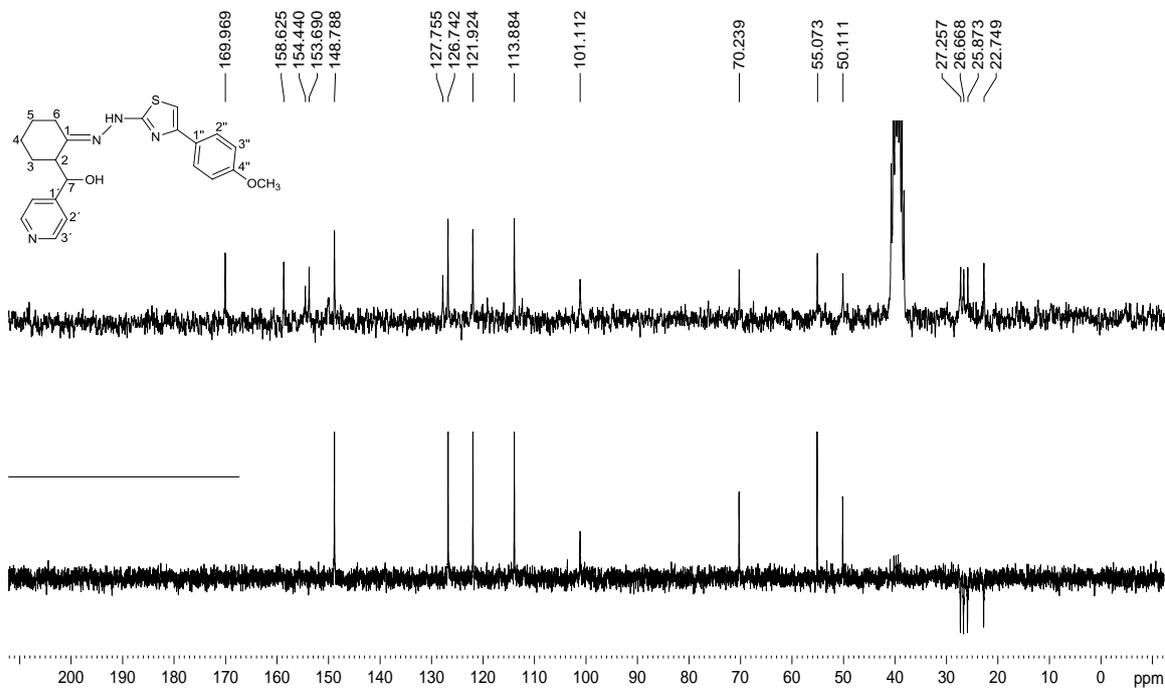


Figura A.61 - Espectro no infravermelho de 5e

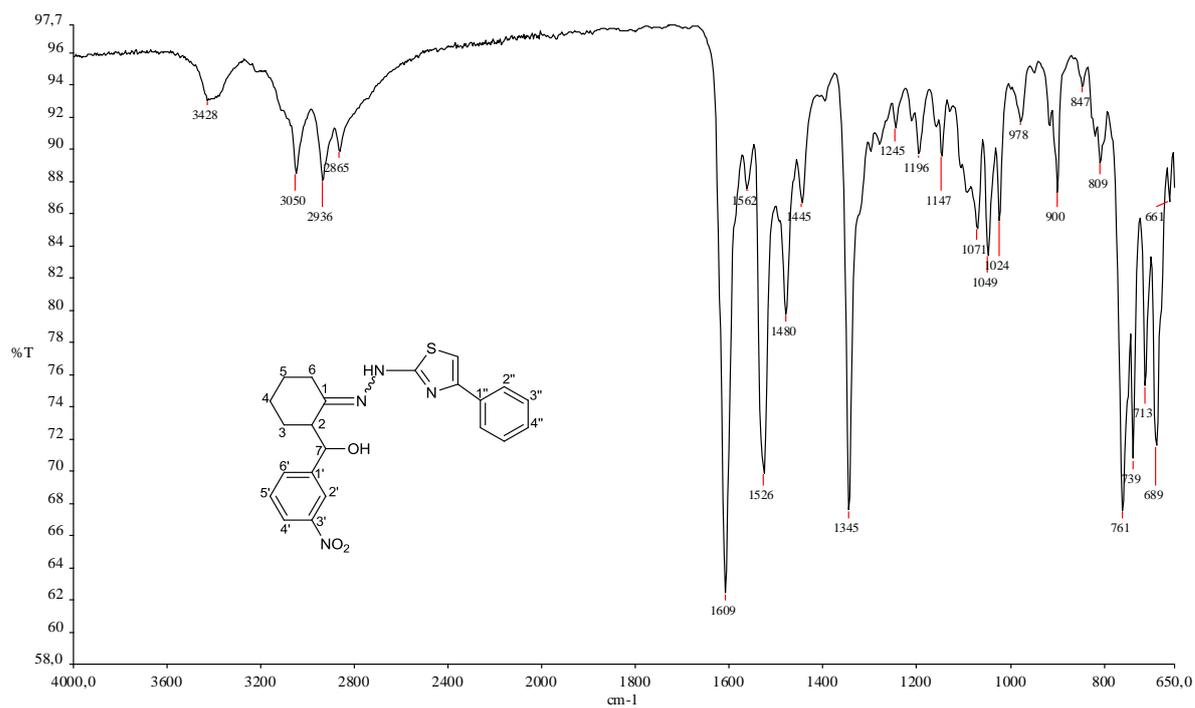


Figura A.62 - Espectro no infravermelho de 5f

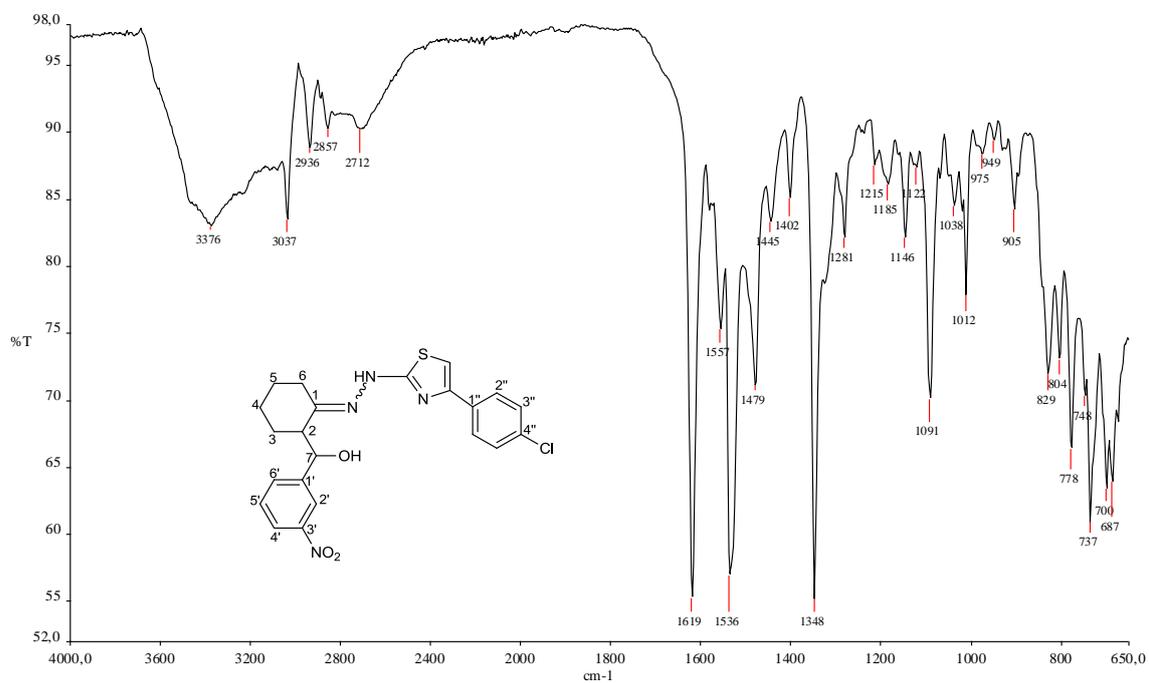


Figura A.63 – Espectro de RMN de ^1H de 5f (200 MHz, DMSO-D_6)

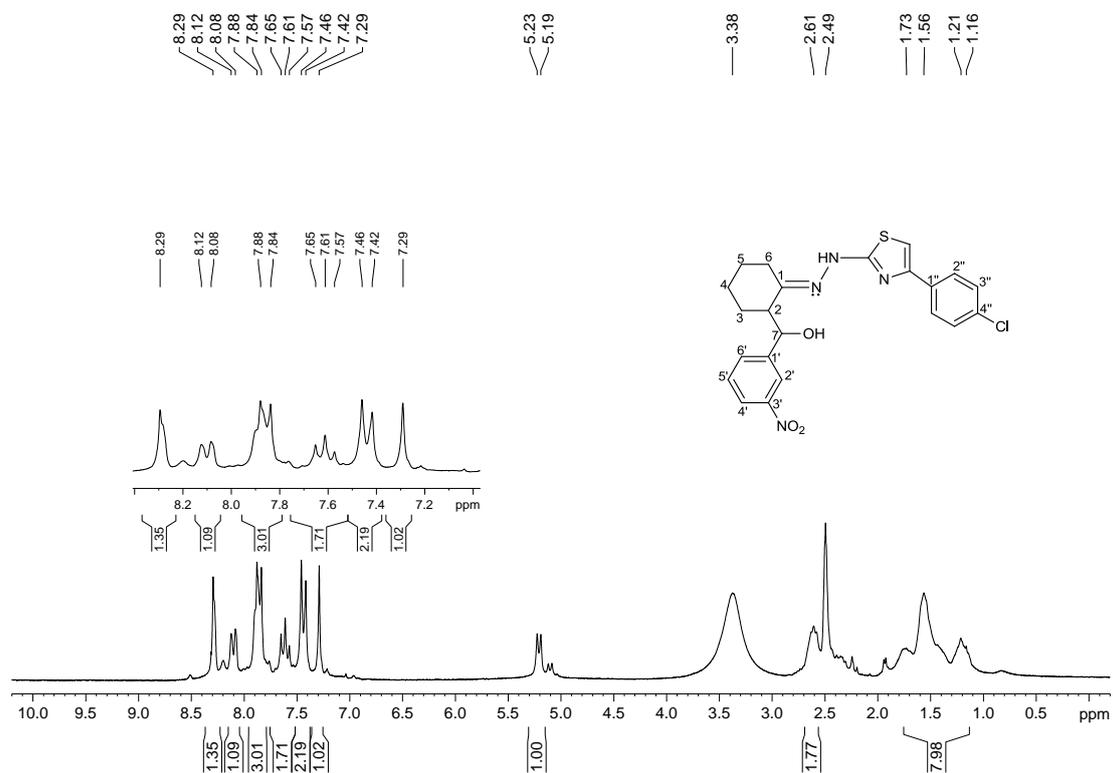


Figura A.64 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5f (50 MHz, DMSO-D_6)

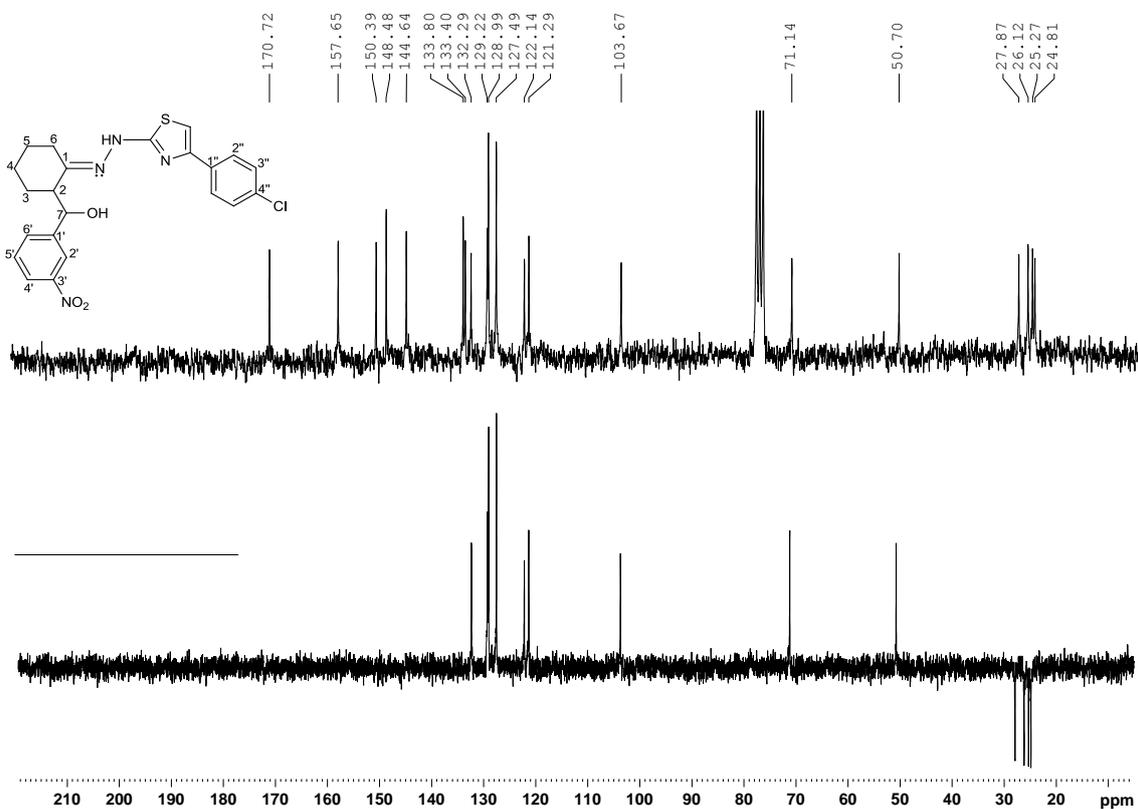


Figura A.65 - Espectro no infravermelho de 5g

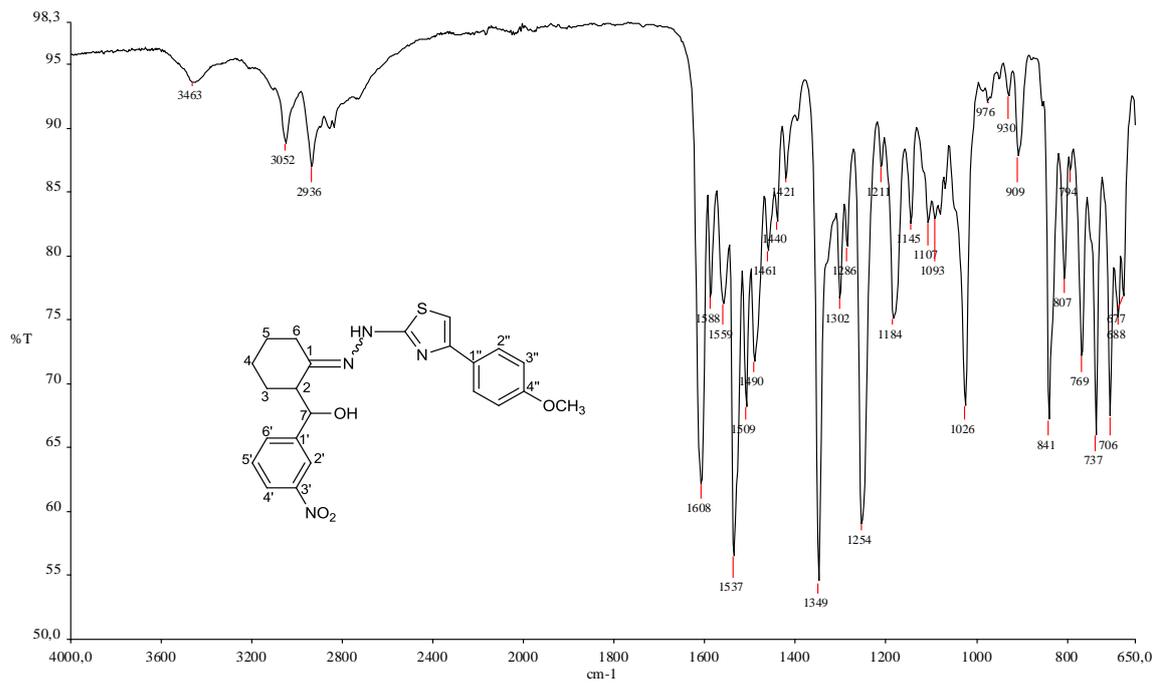


Figura A.66 - Espectro no infravermelho de 5h

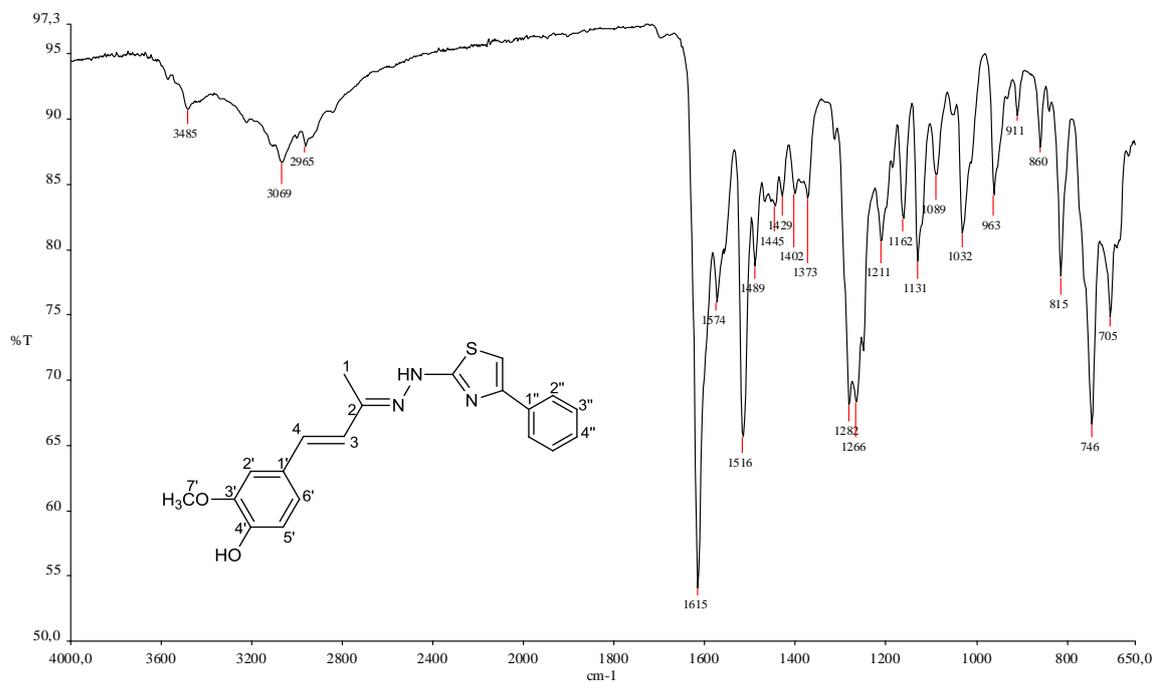


Figura A.67 – Espectro de RMN de ^1H de 5h (200 MHz, DMSO-D_6)

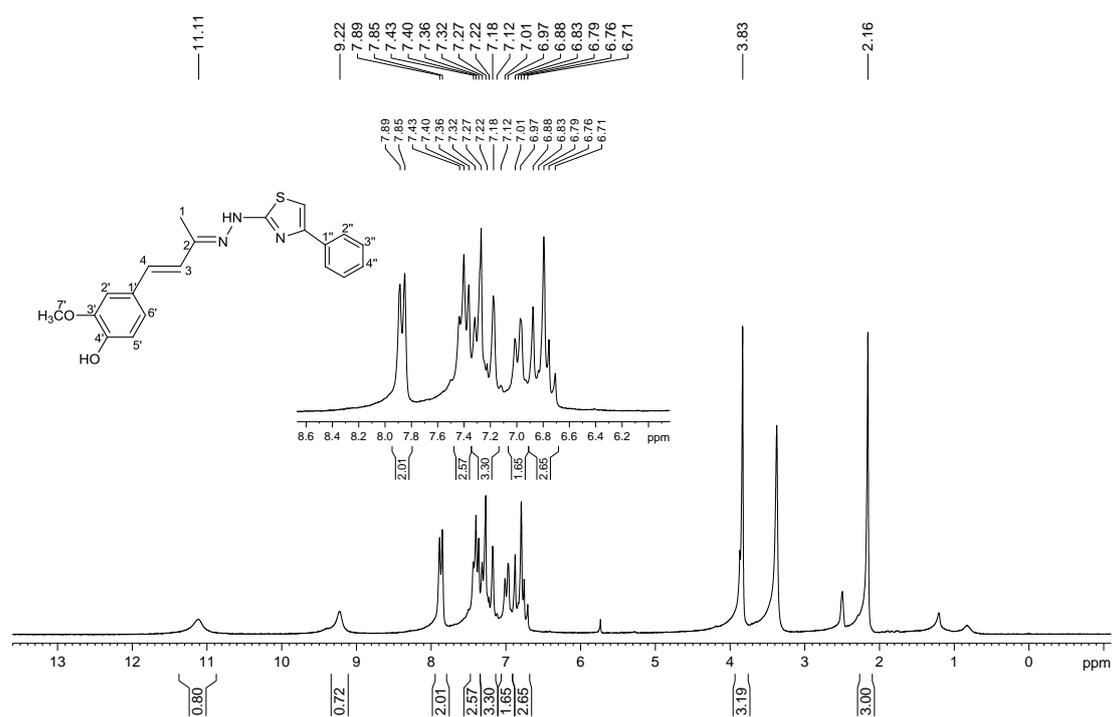


Figura A.68 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5h (50 MHz, DMSO-D_6)

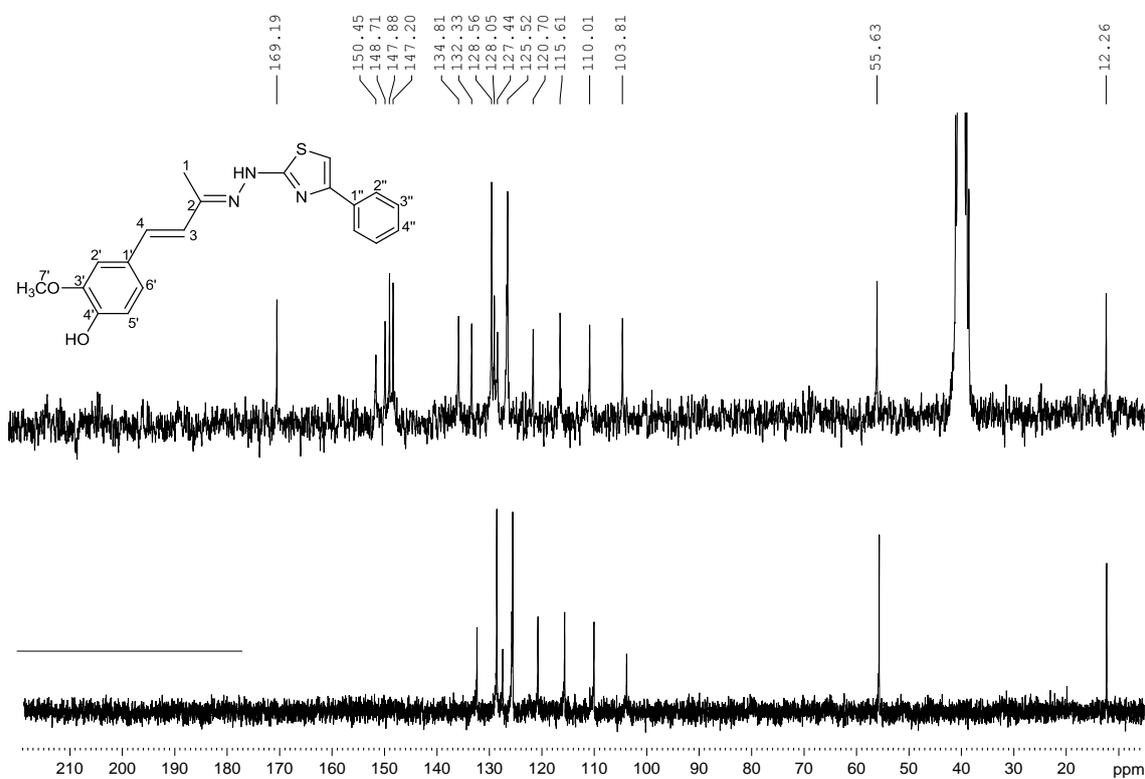


Figura A.69 - Espectro no infravermelho de 5i

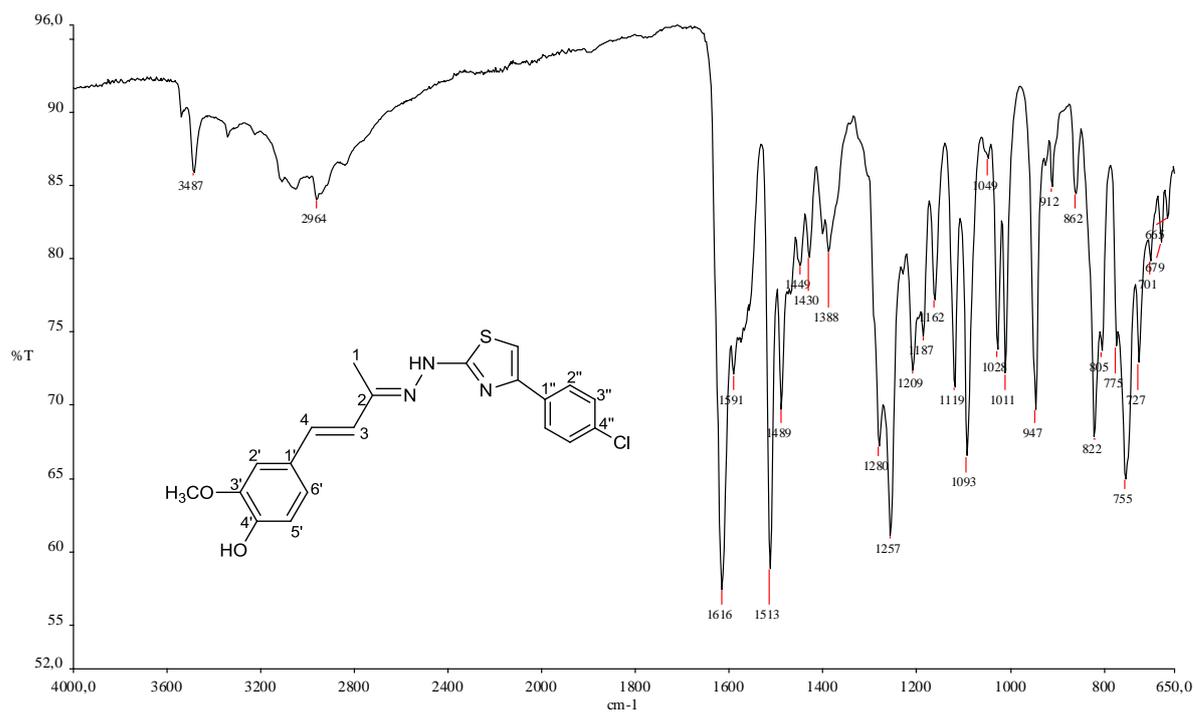
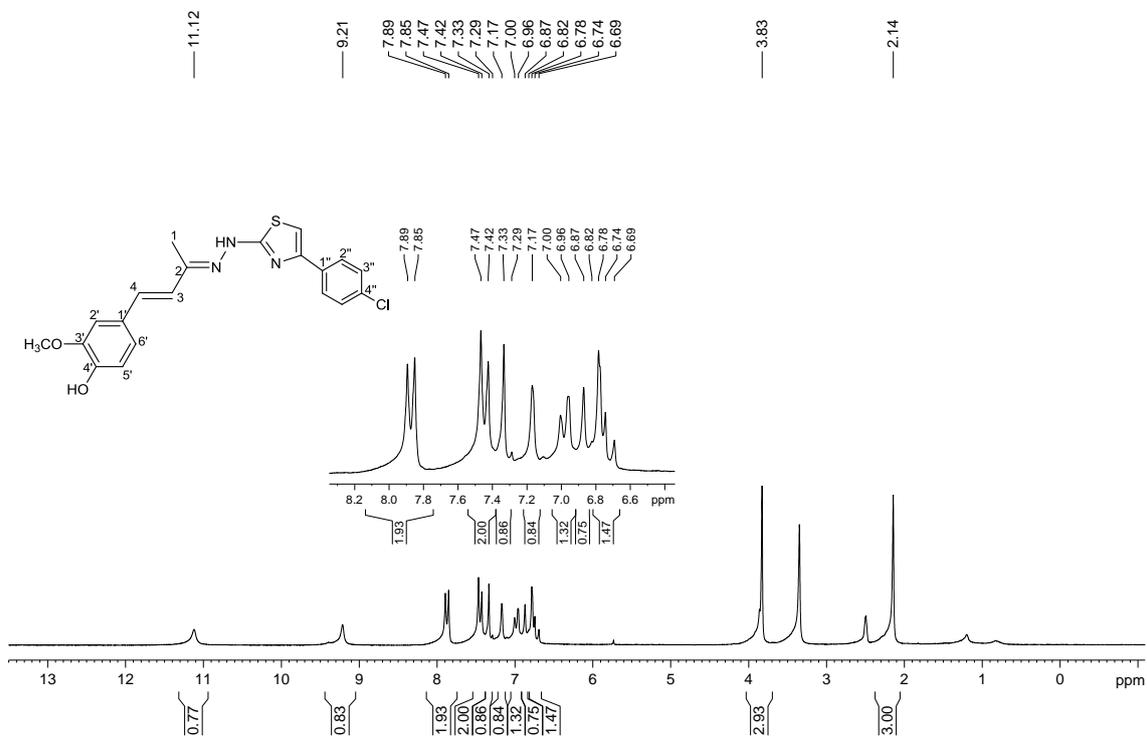
Figura A.70 – Espectro de RMN de ¹H de 5i (200 MHz, DMSO-D₆)

Figura A.71 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5i (50 MHz, DMSO- D_6)

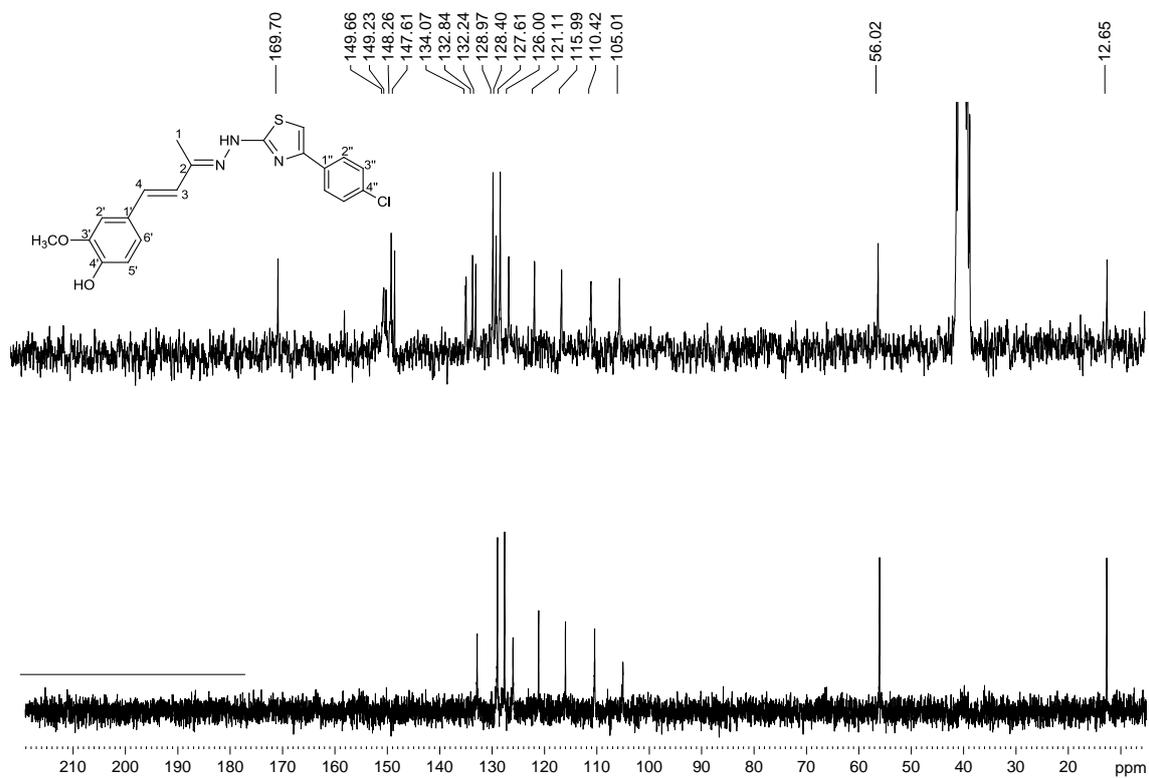


Figura A.72 - Espectro no infravermelho de 5j

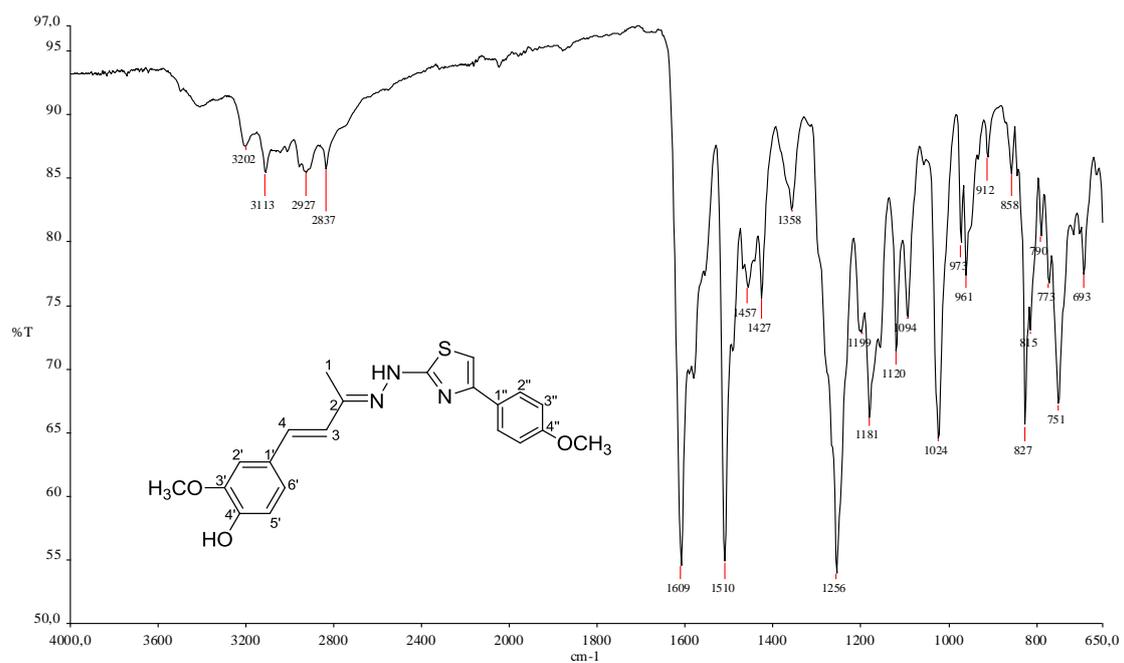


Figura A.73 – Espectro de RMN de ^1H de 5j (200 MHz, DMSO-D_6)

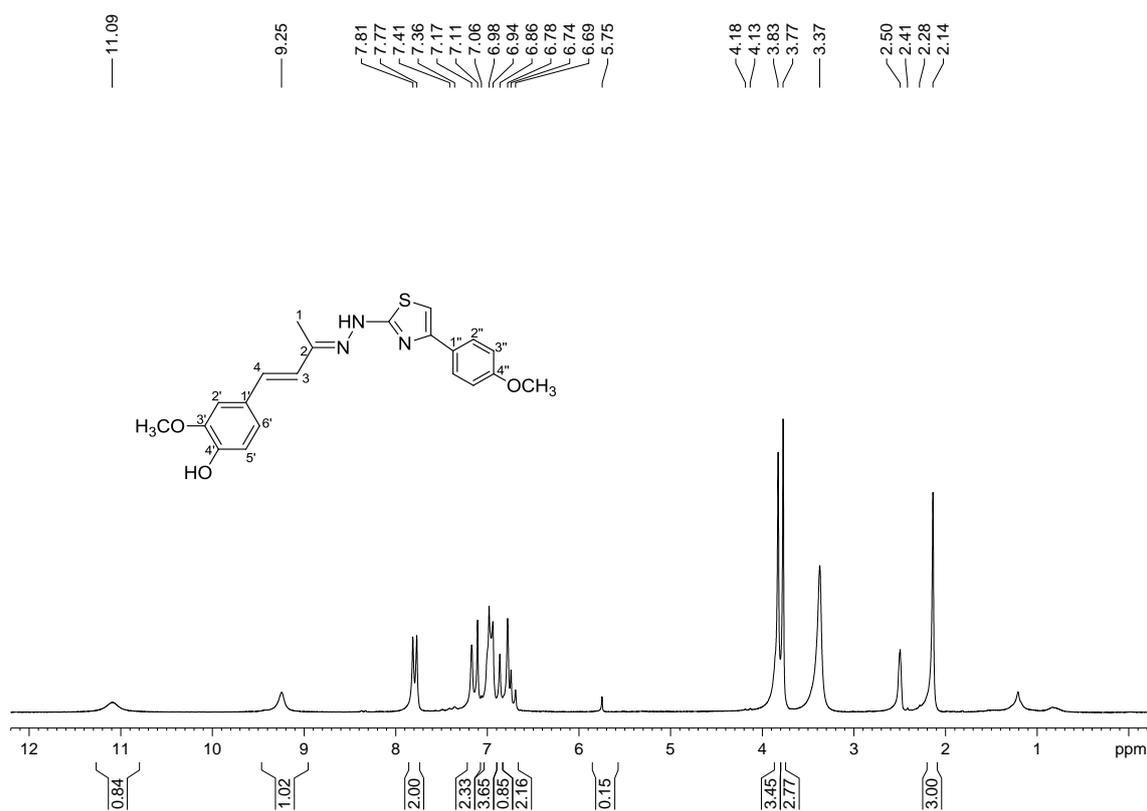


Figura A.74 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5j (50 MHz, DMSO-D_6)

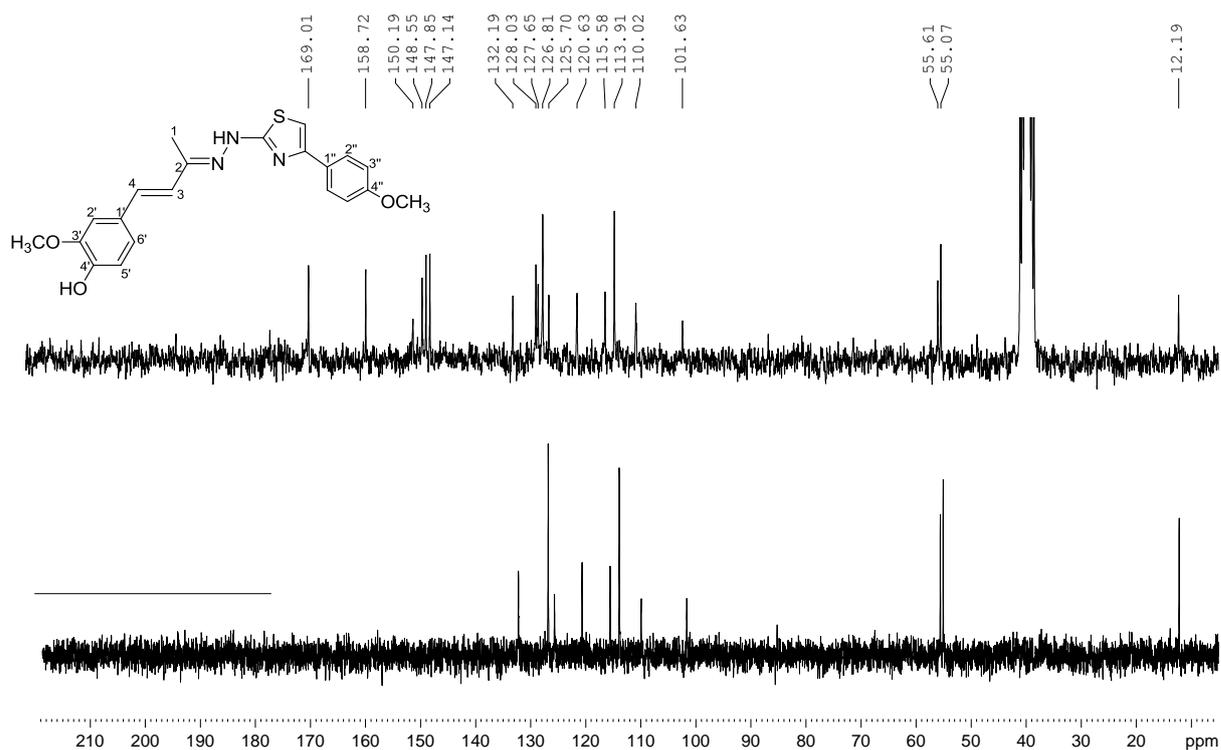


Figura A.75 - Espectro no infravermelho de 5k

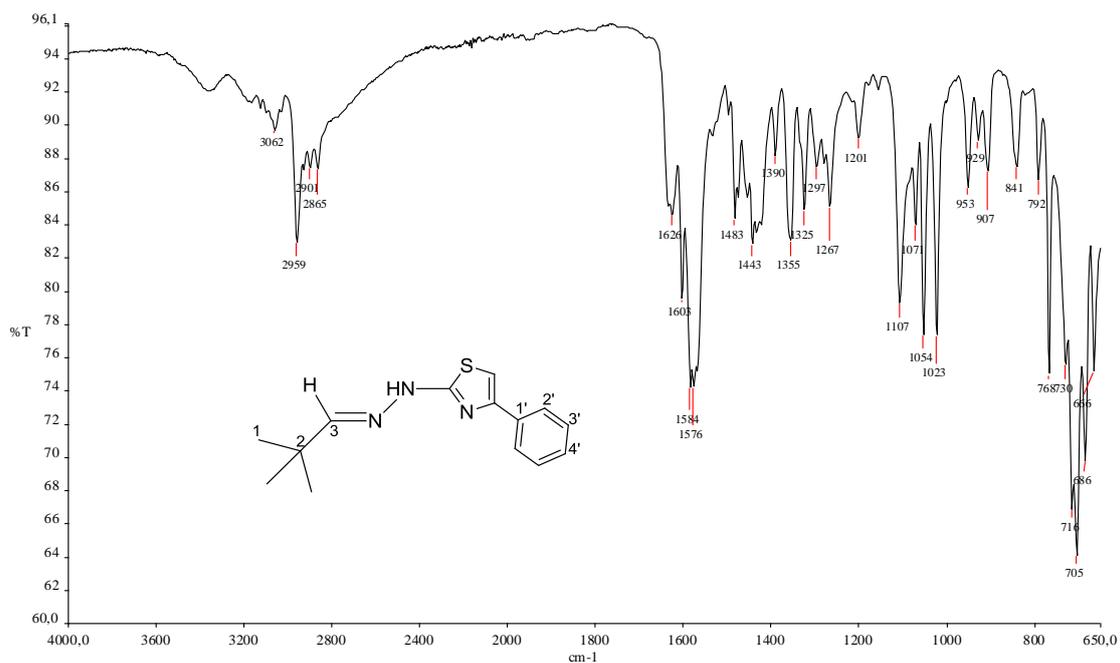
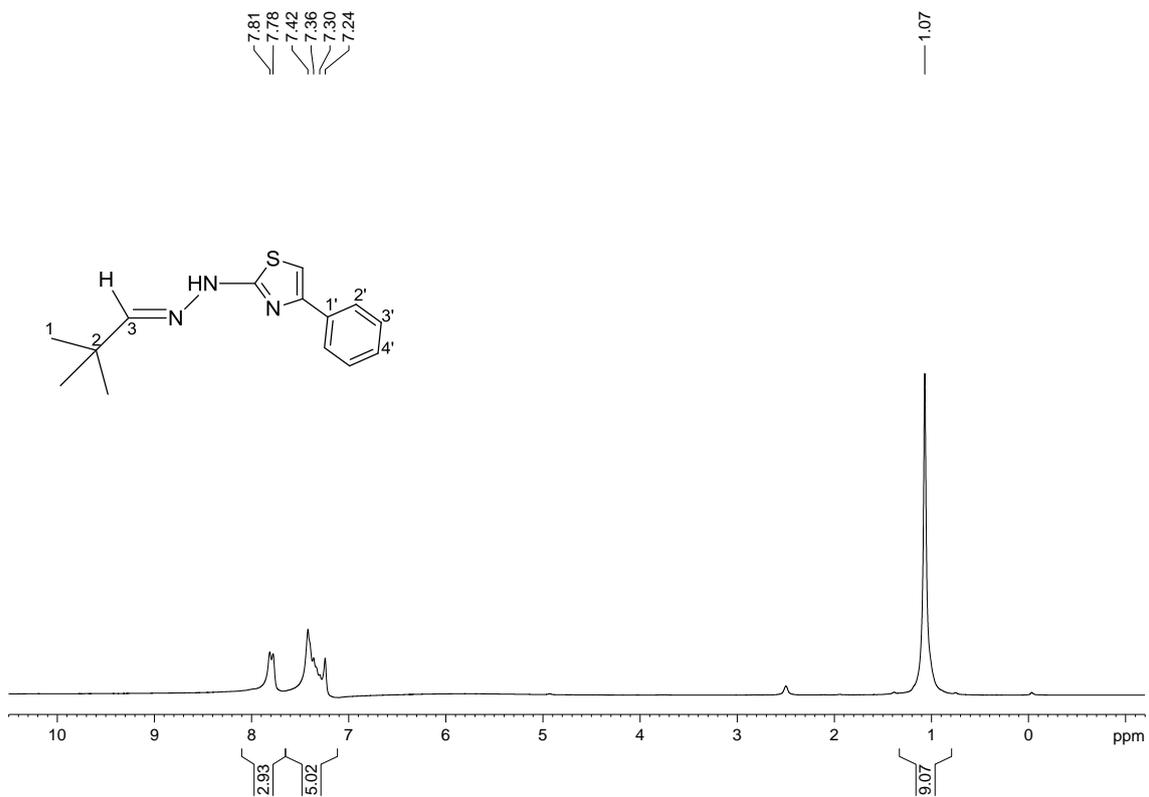
Figura A.76 – Espectro de RMN de ^1H de 5k (200 MHz, DMSO-D_6)

Figura A.77 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5k (50 MHz, DMSO- D_6)

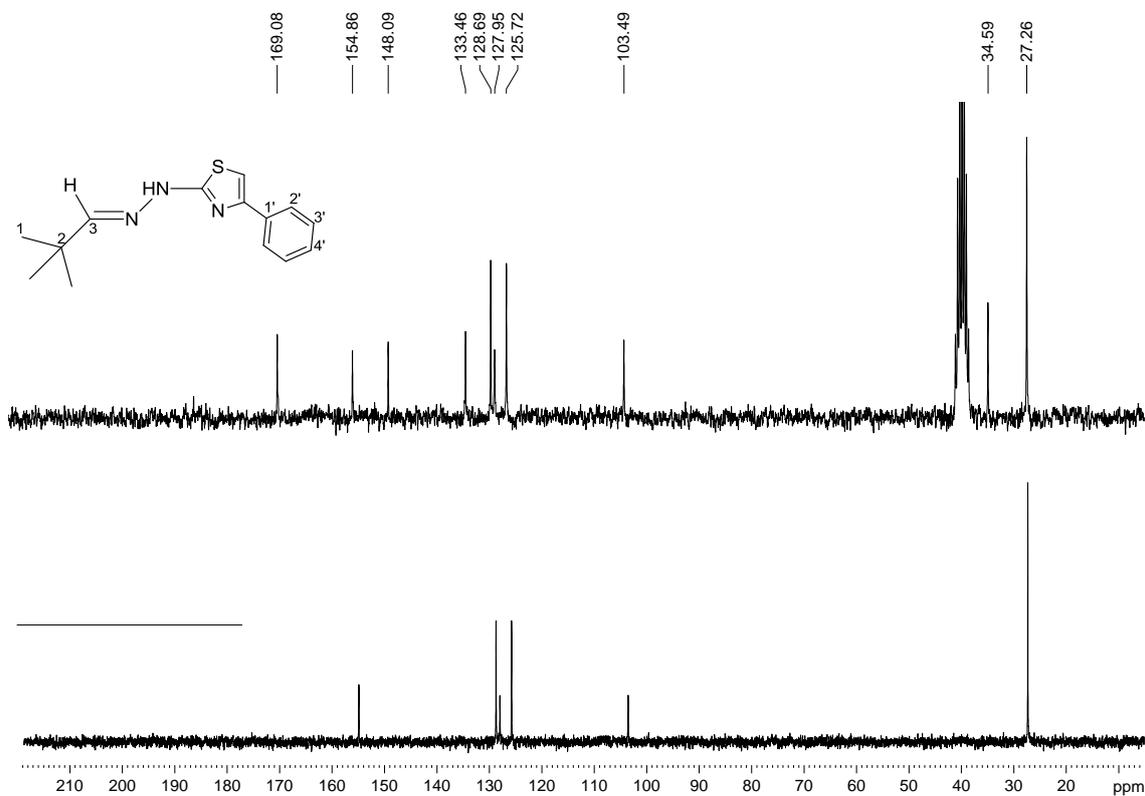


Figura A.78 - Espectro no infravermelho de 5l

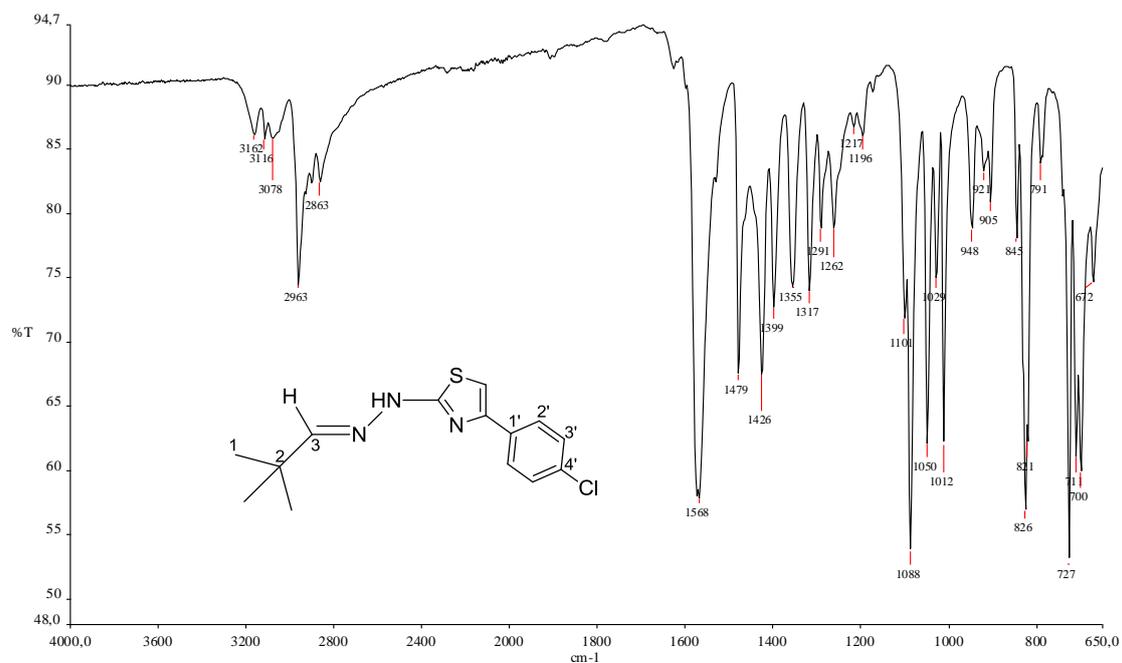


Figura A.79 – Espectro de RMN de ^1H de 5I (200 MHz, DMSO-D_6)

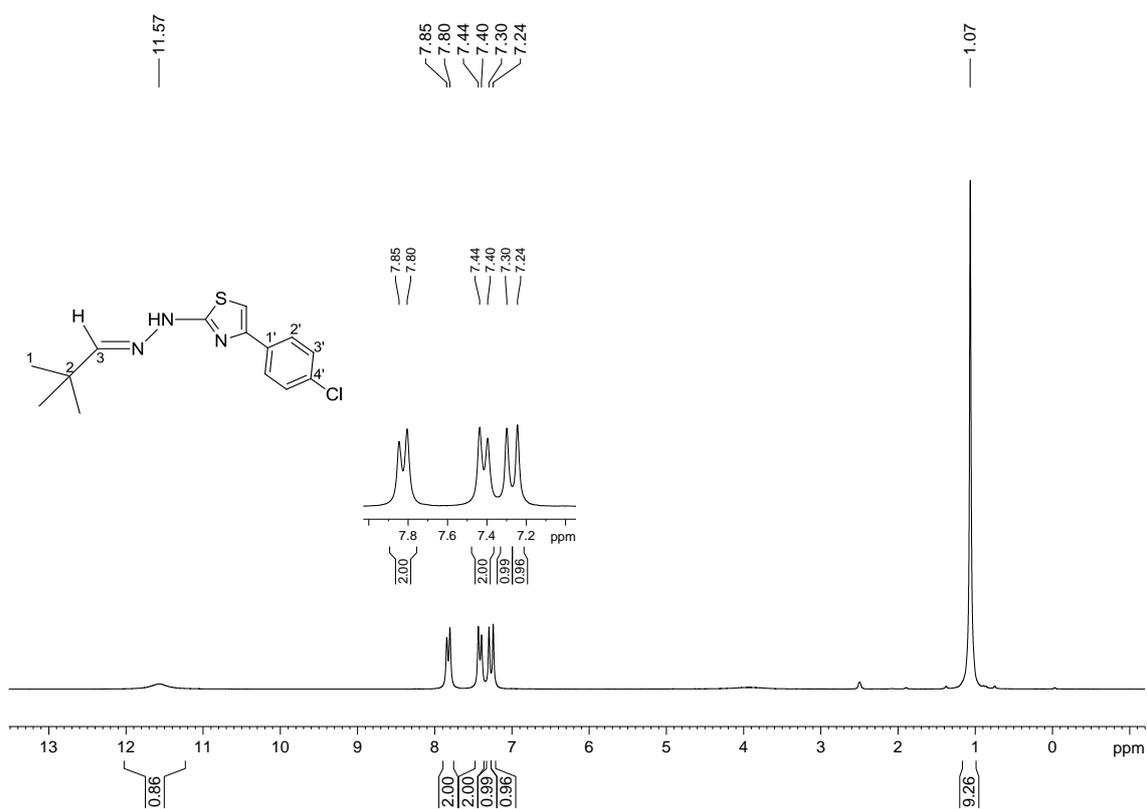


Figura A.80 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5I (50 MHz, DMSO-D_6)

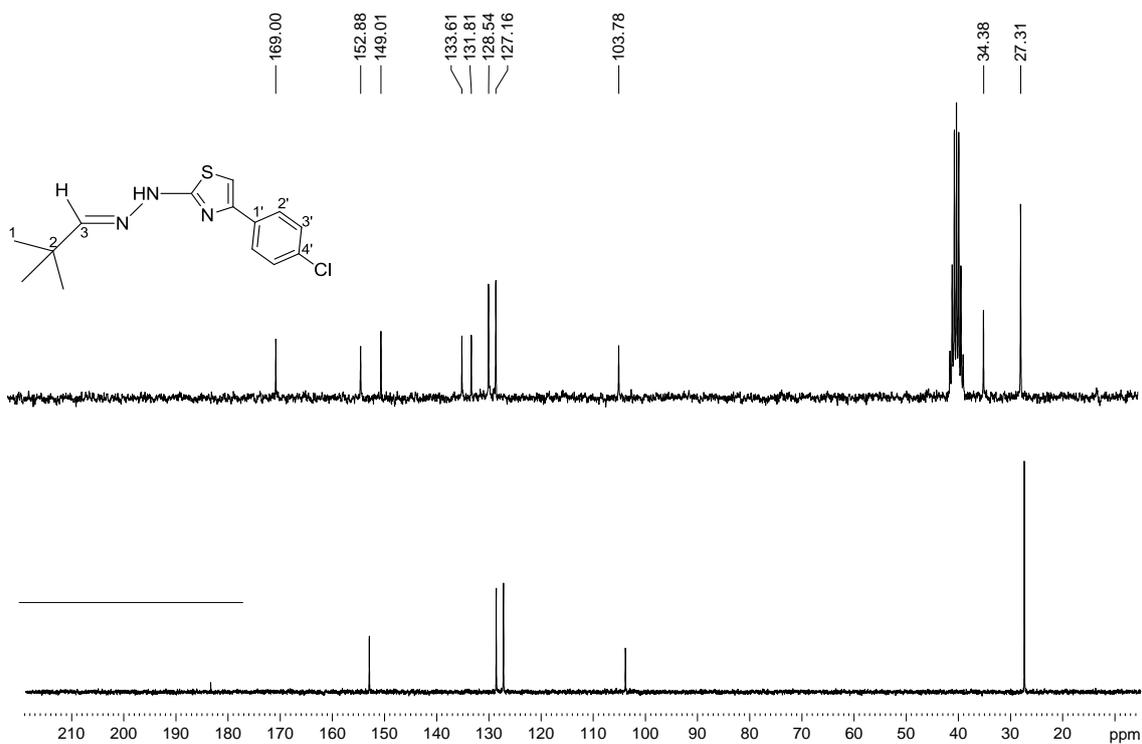


Figura A.81 - Espectro no infravermelho de 5m

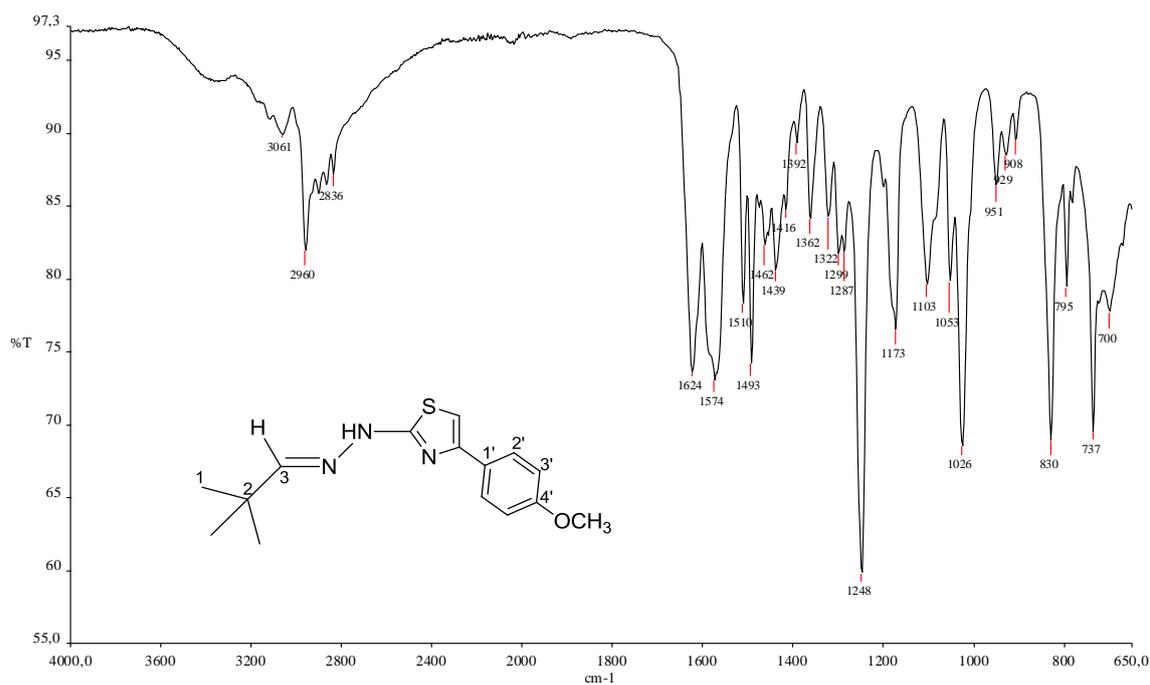
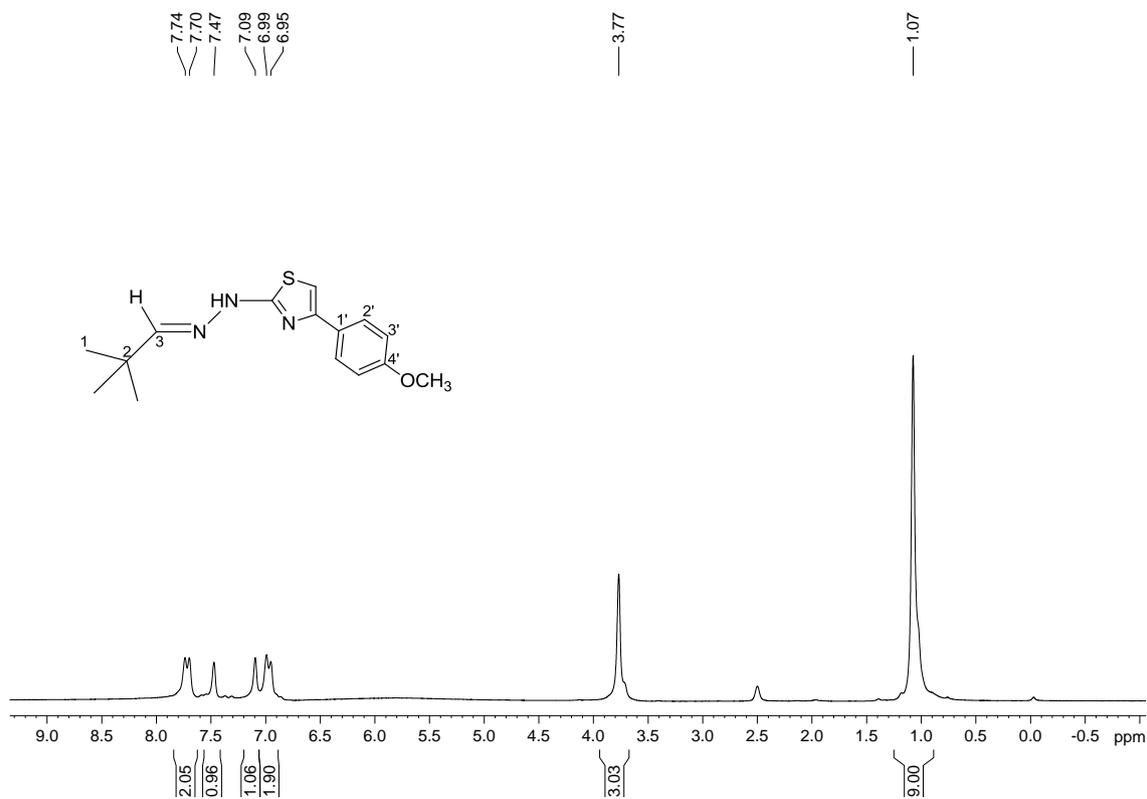
Figura A.82 – Espectro de RMN de ¹H de 5m (200 MHz, DMSO-D₆)

Figura A.83 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5m (50 MHz, DMSO-

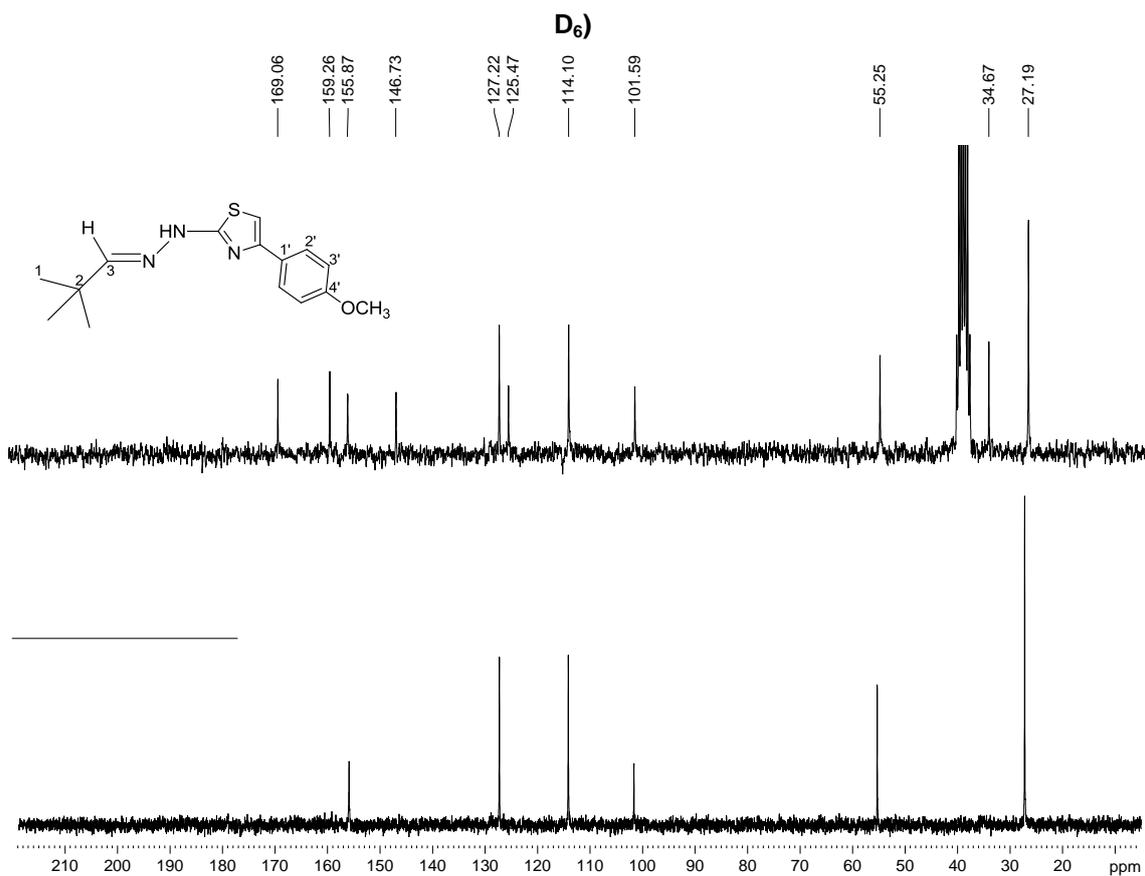


Figura A.84 - Espectro no infravermelho de 5n

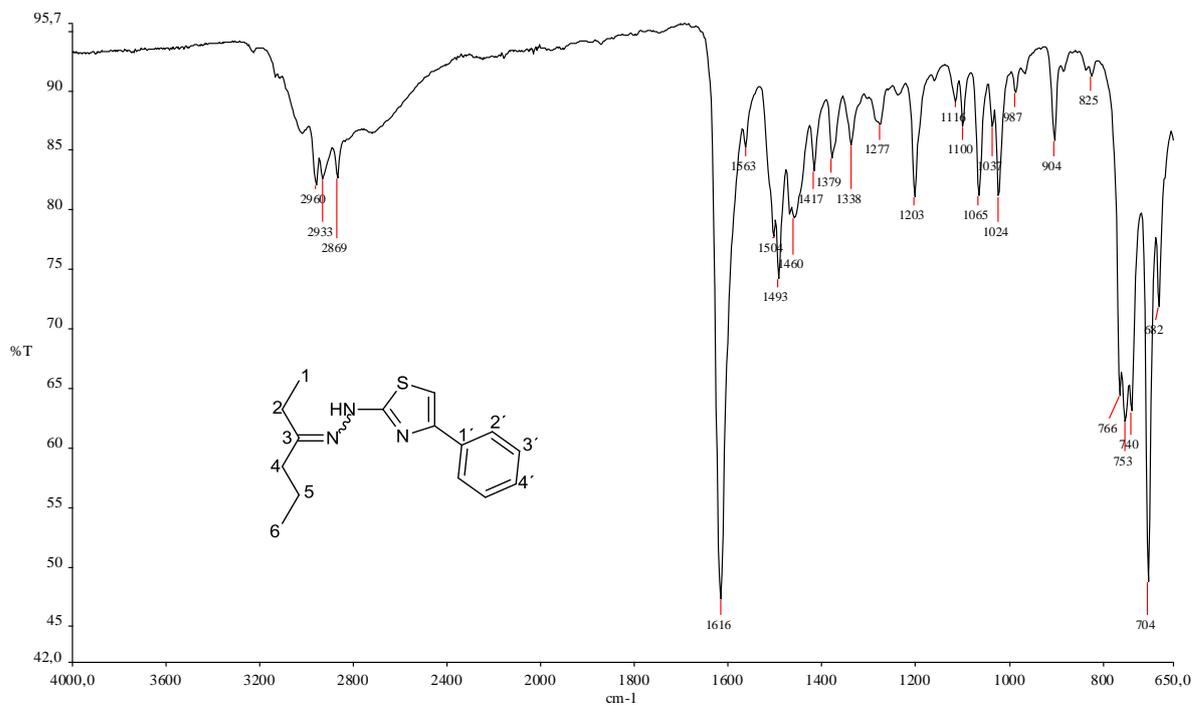


Figura A.85 – Espectro de RMN de ^1H de 5n (200 MHz, CDCl_3)

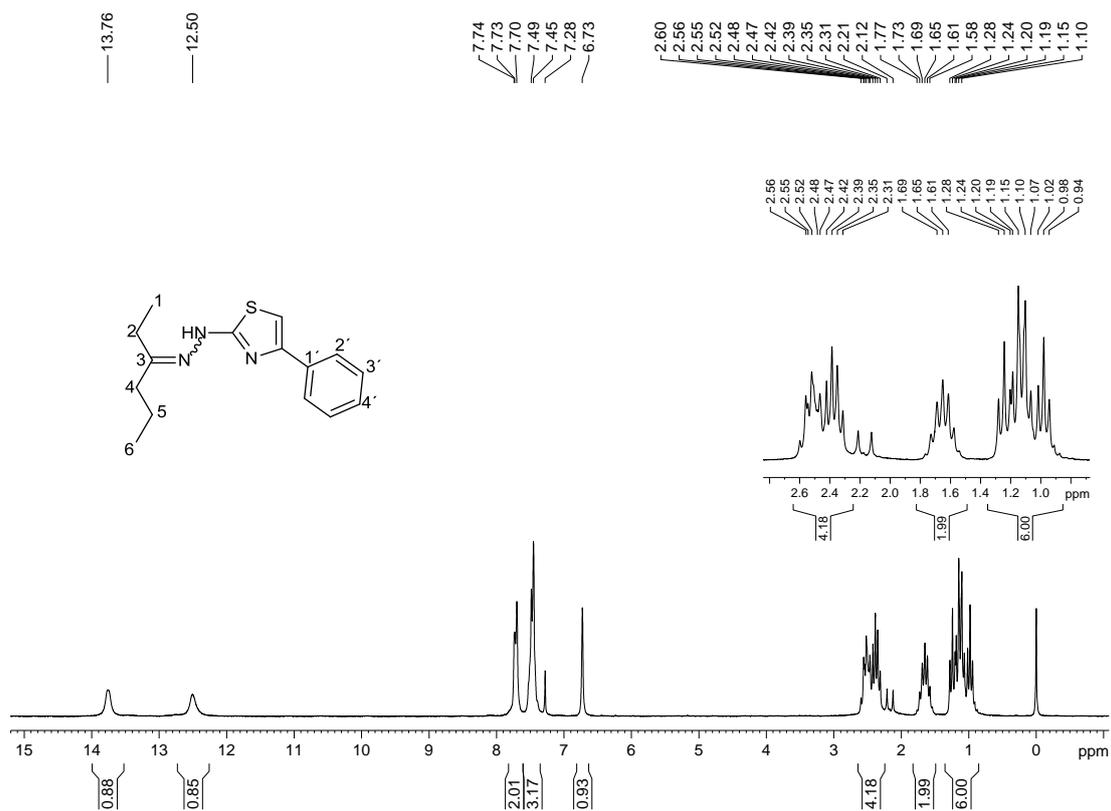


Figura A.86 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5n (50 MHz, CDCl_3)

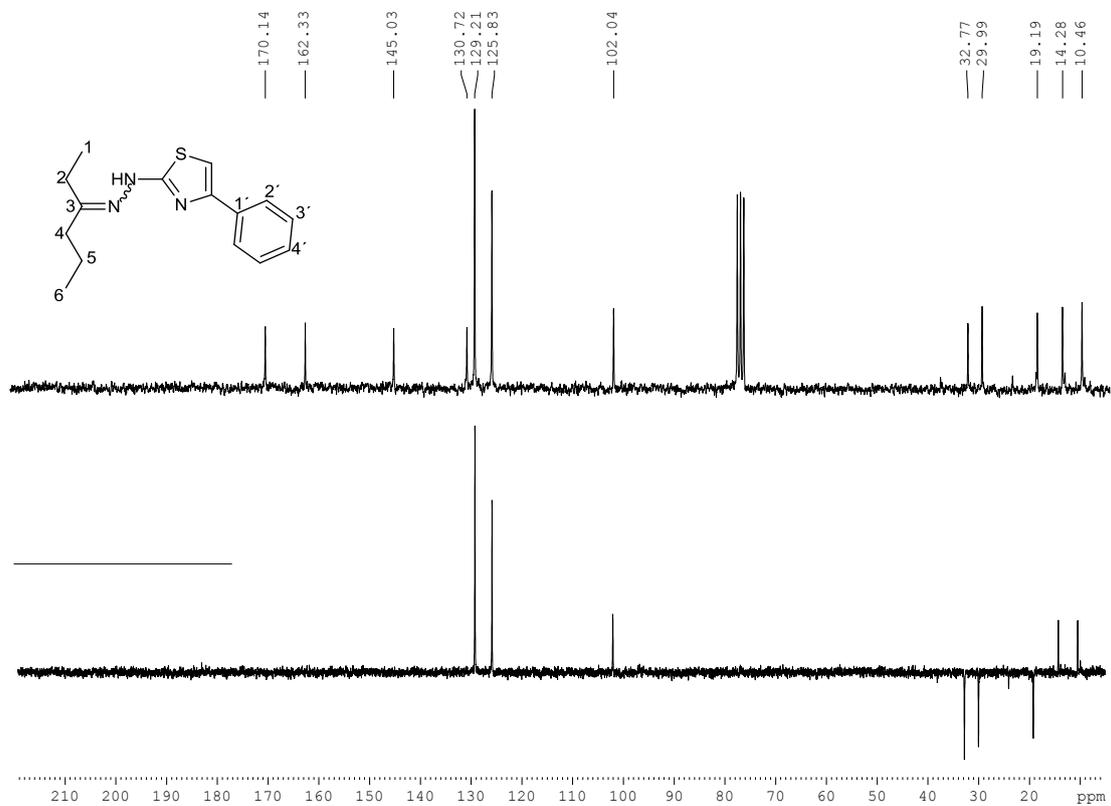


Figura A.87 - Espectro no infravermelho de 5o

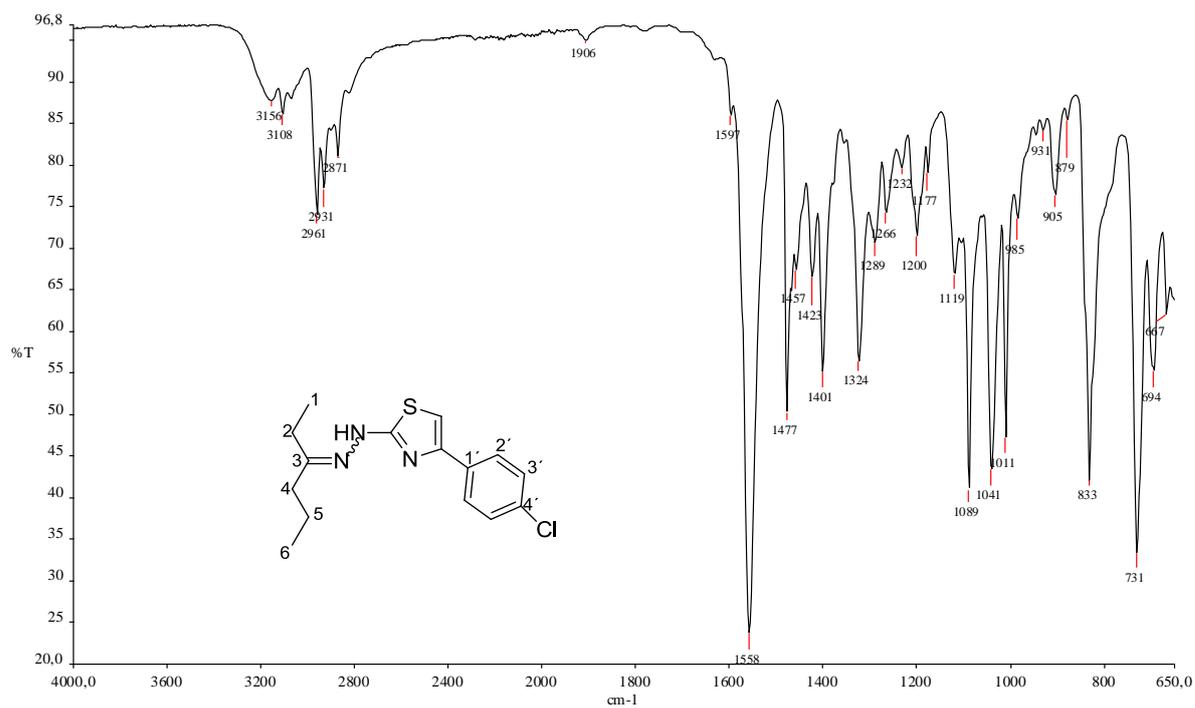
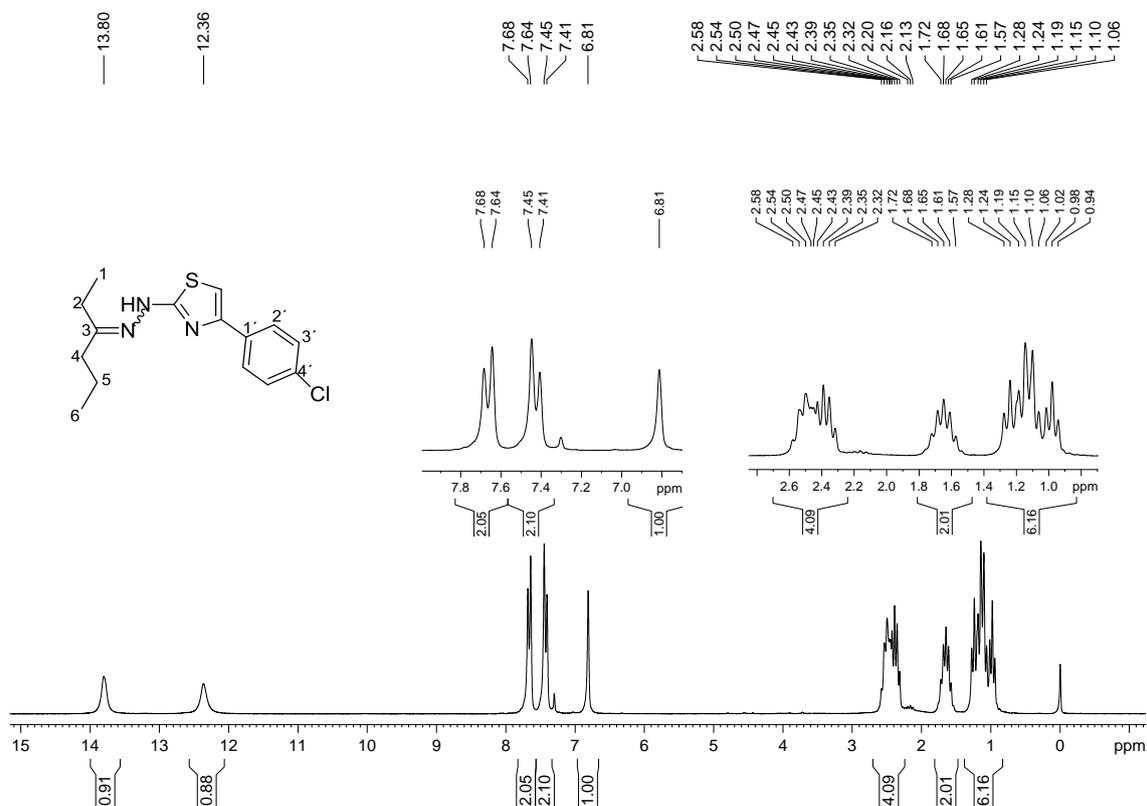
Figura A.88 – Espectro de RMN de ¹H de 5o (200 MHz, CDCl₃)

Figura A.89 – Espectro de RMN de ^1H de 5o (200 MHz, CDCl_3)

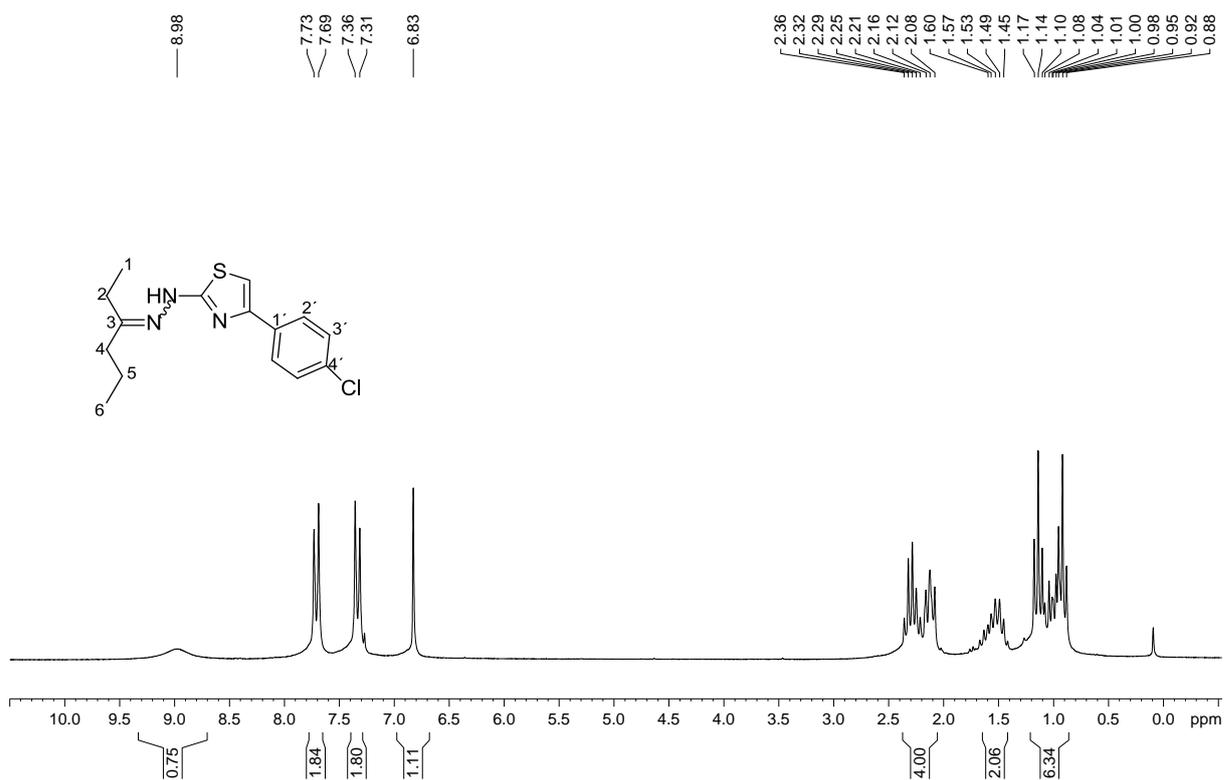


Figura A.90 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5o (50 MHz, CDCl_3)

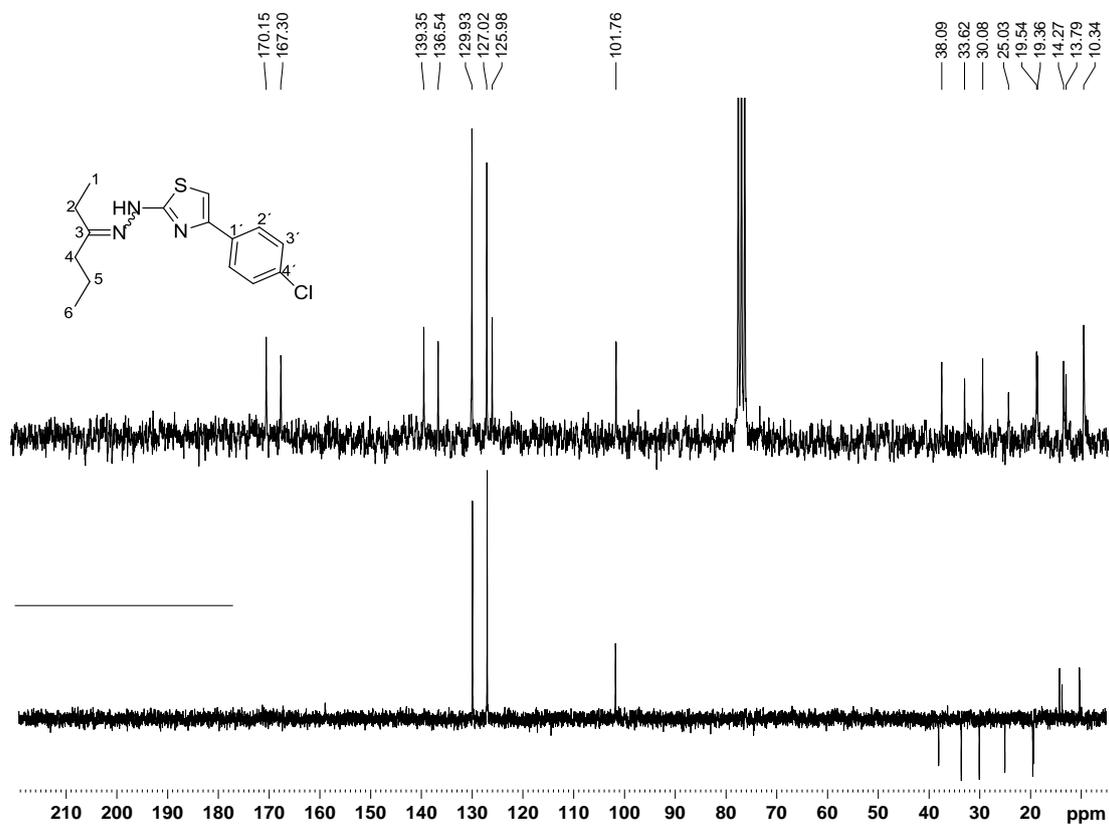


Figura A.91 - Espectro no infravermelho de 5p

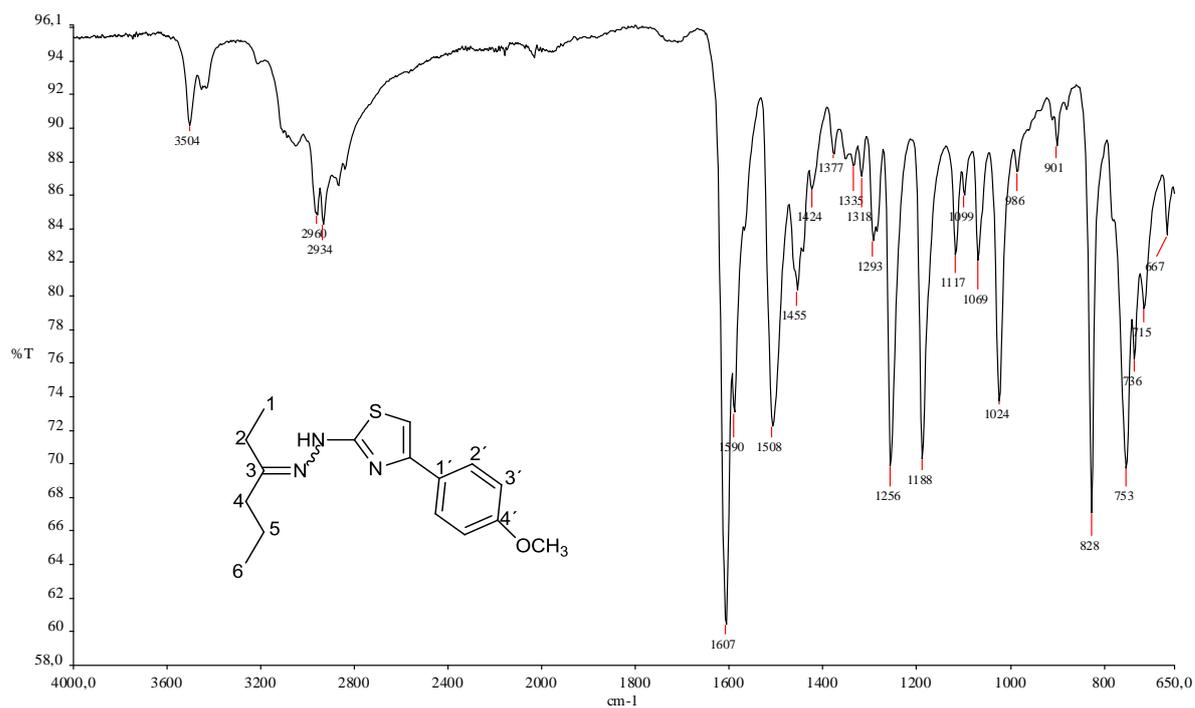
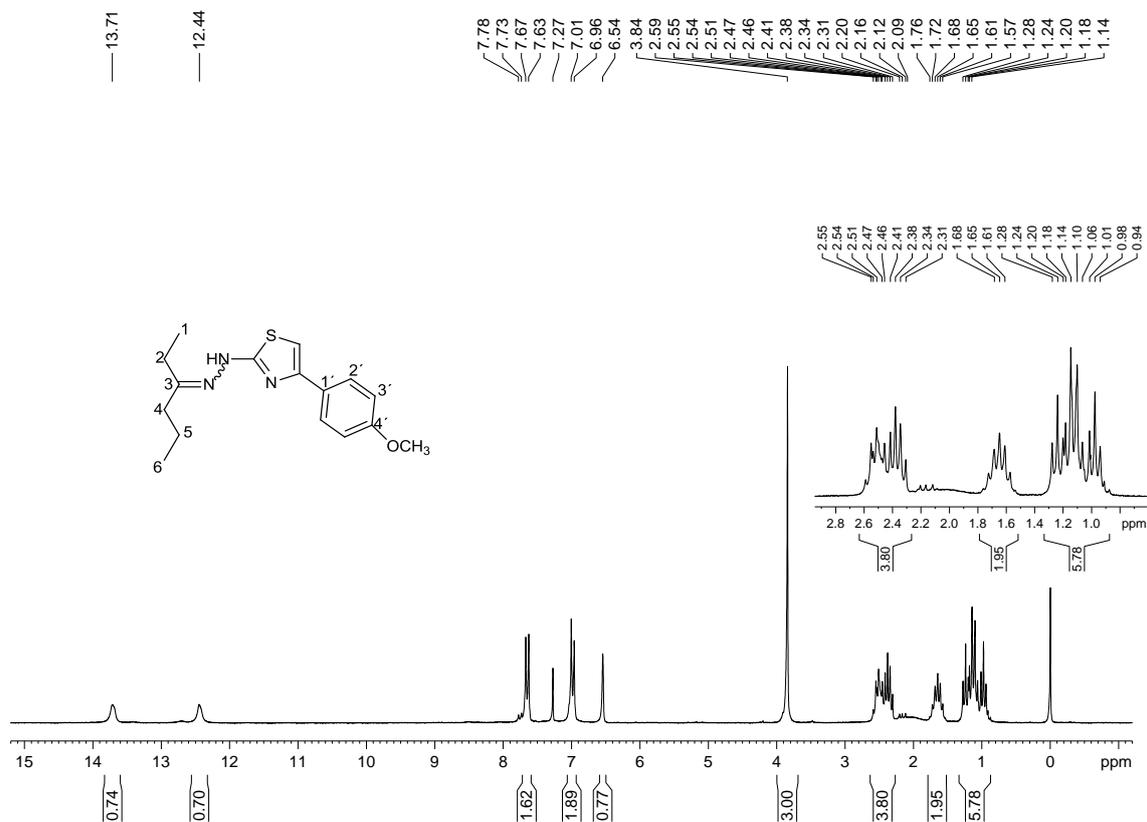
Figura A.92 – Espectro de RMN de ¹H de 5p (200 MHz, CDCl₃)

Figura A.93 – Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5p (50 MHz, CDCl_3)