

Aldo Sena De Oliveira

**SÍNTESE DE DERIVADOS DA LAUSONA, CARVACROL, 1-
HIDROXIPIRAZOL E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, na área de concentração Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

OLIVEIRA, ALDO SENA DE
SÍNTESE DE DERIVADOS DA LAUSONA, CARVACROL, 1-
HIDROXIPIRAZOL E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS / ALDO SENA DE
OLIVEIRA ; orientadora, Inês Maria Costa Brighente ;
coorientador, Ricardo José Nunes. - Florianópolis, SC, 2014.
275 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. síntese. 3. lausona. 4. carvacrol. 5.
atividade biológica. I. Brighente, Inês Maria Costa. II.
Nunes, Ricardo José. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Aldo Sena de Oliveira

**SÍNTESE DE DERIVADOS DA LAUSONA, CARVACROL, 1-
HIDROXIPIRAZOL E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Química.

Florianópolis, 18 de julho de 2014.

Prof. Dr. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Inês M. C. Brighente
Orientadora (UFSC)

Prof. Dr. Rogério Corrêa
(UNIVALI)

Prof. Dr. Paulo César de Jesus
(DQ- FURB)

Prof. Dr. Rosendo A. Yunes
(DQ-UFSC)

Dr.^a Louise D. Chiaradia
(CEBIME- UFSC)

Prof. Bruno Szpoganicz
(DQ-UFSC)

Dedico este trabalho à minha família,
que é a base de todas as minhas
conquistas.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela saúde, por tudo que tem me dado estes anos e possibilidade de realização deste projeto.

À minha orientadora profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente não somente pelo excelente trabalho de orientação, mas pelo carinho, pela atenção e pela amizade no rico convívio deste período.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Ricardo José Nunes por guiar meus passos, por me dar muitas condições de trabalho e por ser um amigo sempre presente.

Ao prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes pela amizade e pelas sugestões de trabalho.

Ao meu pai José Sena de Oliveira, minha mãe Rosângela Teodoro dos Santos Oliveira e irmãos: Jonathan Pedro de Oliveira, Samuel Henrique dos Santos Oliveira e Sarah Marina Santos Oliveira, por serem a minha base, por compreender minhas ausências, pelo carinho e pelo amor.

Ao meu amigo e companheiro Anderson Luiz Machado, pela companhia, por estar sempre comigo e me incentivar ser alguém melhor a cada dia.

A todos os pesquisadores e alunos que colaboraram no desenvolvimento desta tese.

A todos amigos e colegas do LQPN e do LEAT que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de realizar este projeto e aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

À Central de Análises do Departamento de Química e ao CEBIME da UFSC pela obtenção dos espectros.

Aos professores membros da banca examinadora por terem aceitado o convite e pelas sugestões ao trabalho.

A todos que contribuíram para a realização desta tese.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

A Química medicinal no Brasil tem sido investigada na tentativa de encontrar novos compostos com propriedades terapêuticas úteis. Neste trabalho foram utilizadas metodologias sintéticas diversificadas, com vistas à obtenção de compostos inéditos ou buscando otimizar a síntese daqueles já descritos pela literatura. Foram sintetizadas diferentes classes de compostos, tais como derivados naftoquinônicos, pirazóis e sulfonamidas para os quais foram investigadas diferentes atividades biológicas, como: atividade antioxidante, inibição da enzima acetilcolinesterase, atividade antinociceptiva, leishmanicida, antimicrobiana, anti-hiperglicêmica. Foram obtidos, por reação de Mannich 12 adutos derivados da lausona, dentre os quais, 11 são inéditos. Foi otimizada a síntese de 9 dímeros, derivados da lausona, 2 inéditos, utilizando diferentes sistemas (refluxo, radiação ultrassônica e microondas), diferentes catalisadores e solventes. Dentre as diferentes metodologias propostas, a obtenção do hidróxi pirazol por reação de acoplamento de Suzuki foi eficiente e mostrou-se adequada para acesso a estes compostos. Foram obtidos, por reação de substituição e com ótimos rendimentos, 11 sulfonamidas inéditas derivadas do carvacrol. Em relação à atividade antioxidante, os resultados obtidos para a série das bases de Mannich demonstra o potencial destes compostos, para os quais a atividade antioxidante dos 5 mais ativos (**A5**, **A1**, **A4**, **A6**, **A2**) foi comparável aos padrões rutina e BHT. Para a série dos dímeros derivados da lausona destacam-se os compostos **DIM-2** e **DIM-1**. Quando correlacionados com os ensaios voltamétricos, pode-se observar uma correlação entre as atividades *in vitro* e o potencial anódico. As sulfonamidas **S-10**, **S-1** e **S-7** apresentaram atividade superior ao padrão rutina. As metodologias para investigação da atividade antioxidante foram bem correlacionadas ($r^2 > 0,8$). Em relação à inibição da enzima acetilcolinesterase, 8 dos compostos sintetizados, **DIM-1** (15,98 μM), **DIM-2** (12,23 μM), **DIM-7** (16,88 μM), **S-1** (5,64 μM), **S-5** (7,34 μM), **S-7** (9,24 μM), **S-9** (6,99 μM), **S-10** (8,74 μM), apresentaram valores de IC_{50} inferiores ao padrão galantamina (17,05 μM). Em relação à atividade antinociceptiva todas as sulfonamidas testadas, **S-1**, **S-2**, **S-9**, **S-10** e **S-11**, foram capazes de reduzir a nocicepção (dor) aguda induzida por glutamato em camundongos, sem interferir na atividade locomotora dos animais, com destaque ao composto **S-1**, que se mostrou o mais potente e eficaz. Em relação à atividade leishmanicida o composto **A-11** apresentou menor CI_{50} e baixa citotoxicidade (15,45

μM). Dentre as bases de Mannich os compostos mais ativos foram **A-1** (11,1 μM), **A-6** (13,0 μM) e **A-7** (20,7 μM) para a forma amastigota intracelular, com destaque para o composto **A-1** (IS = 12,09). Com relação à atividade antibacteriana, os dímeros derivados da lausona apresentaram melhores atividades contra o *Paracoccidioides brasiliensis*, para o qual 2 dos 9 compostos apresentaram valores muito significativos de concentração inibitória mínima, **DIM-2** (7,41 μM) e **DIM-5** (14,70 μM). As sulfonamidas apresentaram atividade mais relevante para a *Staphylococcus aureus* em especial o composto S-4 Em relação à atividade anti-hiperglicêmica somente a base de Mannich **A-1** reduziu significativamente a glicemia quando comparada ao controle. Essa ação demonstra um potencial efeito protetor das complicações do diabetes.

Palavras-chave: síntese, lausona, carvacrol, atividade biológica

ABSTRACT

The medicinal chemistry in Brazil have been investigated in an attempt to find new compounds with useful therapeutic properties. In this work, diverse synthetic methodologies were used, to obtained novel compounds or to optimize the synthesis of compounds described in the literature. Different classes of compounds, such as naphthoquinones derivatives, pyrazoles and sulfonamides were investigated for different biological activities such as antioxidant activity, inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, antinociceptive activity, antileishmanial, antimicrobial, anti hyperglycemic. By reaction of Mannich, were obtained 12 adducts derivatives of lawsone, among which 11 are new. Were synthesized 9 dimers of lawsone, two unpublished, using different systems (reflux, ultrasonic and microwave radiation), different catalysts and solvents were optimized. Among the different methods proposed, for obtaining hydroxy pyrazole, Suzuki coupling reaction was efficient and was adequate for access to these compounds. By substitution reaction were obtained 11 unpublished sulfonamides derived carvacrol. In relation to the antioxidant activity, the results obtained for the series of Mannich bases demonstrates the potential of these compounds to which the antioxidant activity of the 5 most active (**A5**, **A1**, **A4**, **A6**, **A2**) was comparable to the standards rutin and BHT. For the series of dimers derived from lawsone highlight the **DIM-1** and **DIM-2** compounds. When correlated with the voltammetric studies, we can observe a correlation between the activities in vitro and anodic potential. Sulfonamides **S-10**, **S-1** and **S-7** were superior to standard routine activity. Methodologies to investigate the antioxidant activity were well correlated ($r^2 > 0.8$). With respect to inhibition of acetylcholinesterase, eight of the synthesized compounds, **DIM-1** (15,98 μM), **DIM-2** (12,23 μM), **DIM-7** (16,88 μM), **S-1** (5,64 μM), **S-5** (7,34 μM), **S-7** (9,24 μM), **S-9** (6,99 μM), **S-10** (8,74 μM), showed IC_{50} values below the standard galantamine (17.05 μM). Antinociceptive activity in relation to all tested sulfonamides, **S-1**, **S-2**, **S-9**, **S-10** and **S-11** were able to reduce the acute nociception (pain) induced by glutamate in mice, without interfering with the activity locomotor animals, especially the compound **S-1**, which showed the most potent and effective. Regarding leishmanicidal activity compound **A-11** showed lower IC_{50} and cytotoxicity (15.45 μM). Among the Mannich bases the most active compounds were **A-1** (11.1 μM), **A-6** (13.0 μM) and **A-7** (20.7 μM) for intracellular amastigotes, especially for compound **A-1** (SI = 12.09). Regarding

antibacterial activity, dimers derived from lawsone showed better activity against *Paracoccidioides brasiliensis*, for which 2 of 9 compounds, **DIM-2** (7.41 μM) and **DIM-5** (14, 70 μM) showed many significant values of minimum inhibitory concentration, The sulfonamides presented more important activity for *Staphylococcus aureus* in particular the compound **S-4**. Regarding antihyperglycemic only Mannich base **A-1** showed activity when compared to blood glucose control. This action demonstrates a potential protective effect of diabetes complications.

Keywords: synthesis, lawsone, carvacrol, biological activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Estrutura da salicina (1), do ácido salicílico (2) e do ácido acetilsalicílico (3).	32
Figura 2. Estrutura do prontosil (4) e sulfonamida (5).	32
Figura 3.Estrutura do taxol (6).	33
Figura 4.Árvore de decisão de Topliss para otimização de substituintes aromáticos.	35
Figura 5.A cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, da lausona (7) e estrutura da ubiquinona (8).	38
Figura 6.Naftoquinonas com atividade antitumoral.	39
Figura 7.Compostos β -aminocarbonílicos naturais.	42
Figura 8.Aminoálcoois derivados de bases de Mannich.	43
Figura 9. Síntese de derivados da 1-(4-ariloxifenil)-3-dietilamino-1-propanona (18).	44
Figura 10.Isatina (19) e seus derivados aminoquinolínicos.	44
Figura 11.Bases de Mannich derivados da sulfonamida.	45
Figura 12.Acetofenona (22) e suas bases de Mannich derivadas.	45
Figura 13. : Complexos metálicos de diferentes bases de Mannich.....	46
Figura 14.Base Mannich formada a partir de (25) piperidinometil e tiuoreia e seu respectivo (26) complexo com U (IV).	46
Figura 15.Subprodutos formados da reação de Mannich clássica.	48
Figura 16. Estrutura de 3-nonilpirazol (33), β -(1-pirazolil)alanina (34) e 7-amino-3-(β -D-ribofuranosil)pirazol[4,3-d]pirimidina (35).	50
Figura 17.Estrutura do sildenafil (36) e o do celocoxib (37).	51
Figura 18.Estrutura do receptor GABAA. Fonte: Jacob et al. (2008)..	56
Figura 19.Estrutura do receptor GABAB. Fonte: Jacob et al. (2008). ..	56
Figura 20-Estrutura do receptor GABA _C . Fonte: Jacob et al. (2008)...	57
Figura 21-Sulfonamidas de grande importância na terapêutica antibiótica.	58
Figura 22.Fórmula estrutural do ácido p-aminobenzóico (PABA) (47), do ácido fólico (48) e sulfadoxina (49).	60
Figura 23-Fórmula estrutural do ácido diidropteróico (50).	60
Figura 24-Distâncias interatômicas, em Angstroms, no ácido p-aminobenzóico e na sulfonamida respectivamente.	61
Figura 25-Fórmula estrutural da sulfadimetoxina (51) e da sulfaguanidina (52).	62
Figura 26-Espectro de I.V. do composto A-1.....	73
Figura 27-Espectro de RMN de ¹ H para o composto A-1.	75
Figura 28- Expansão 1 do espectro de RMN de ¹ H para o composto A-1.	76

Figura 29-Expansão 2 do espectro de RMN de 1H para o composto A-1.	77
Figura 30-Expansão 3 do espectro de RMN de 1H para o composto A-1.	78
Figura 31-Expansão 4 do espectro de RMN de 1H para o composto A-1.	79
Figura 32-Expansão 5 do espectro de RMN de 1H para o composto A-1.	80
Figura 33-Espectro de RMN de 13C para o composto A-1.	80
Figura 34-Expansão 1 do espectro de RMN de 13C para o composto A-1.	81
Figura 35-Expansão 2 do espectro de RMN de 13C para o composto A-1.	82
Figura 36-Espectro de I.V. do composto DIM-1.	88
Figura 37-Numeração para o composto DIM-1.	89
Figura 38-Espectro de RMN de 1H para o composto DIM-1.	90
Figura 39-Espectro de RMN (expansão 1) de 1H para o composto DIM-1.	91
Figura 40-Espectro de RMN (expansão 2) de 1H para o composto DIM-1.	91
Figura 41-Espectro de RMN (expansão 3) de 1H para o composto DIM-1.	92
Figura 42-Espectro de RMN (expansão 4) de 1H para o composto DIM-1.	92
Figura 43-Espectro de COSY para o composto DIM-1.	93
Figura 44-Expansão do espectro de COSY para o composto DIM-1. ..	94
Figura 45-Espectro de RMN de 13C para o composto DIM-1.	94
Figura 46-Espectro de massas para o composto DIM-1.	96
Figura 47-Numeração para o composto S-1.....	105
Figura 48-Espectro de RMN de 1H para o composto S-1.....	106
Figura 49-Espectro de RMN (expansão 1) de 1H para o composto S-1.	107
Figura 50-Espectro de RMN (expansão 2) de 1H para o composto S-1.	108
Figura 51-Espectro de RMN de 13C para o composto S-1.....	108
Figura 52-Espectro de massas para o composto S-1.	110
Figura 53-Efeito do grupo R2 e do par de elétrons do nitrogênio no núcleo ativo da naftoquinona.	120
Figura 54-Estrutura da ferrozina utilizada nos ensaios de complexação para verificação da atividade antioxidante.....	122
Figura 55-Redução do DPPH por um composto fenólico.....	124

Figura 56-Estrutura da enzima AChE.	136
Figura 57-Efeito dos compostos sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos	143
Figura 58-Efeito dos compostos sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de glutamato.	145
Figura 59-Efeito do tratamento com os compostos sobre a atividade locomotora espontânea dos animais.	147
Figura 60-Ciclo da Leishmania visceral. Fonte http://WWW.dpd.cdc.gov/dpdx	150
Figura 61-Estrutura do estibogluconato de sódio (53) e antimoniato de meglumina (54)	152
Figura 62-Teste de tolerância oral a glicose com a base de Mannich A-1.	160
Figura 63-Teste de tolerância oral a glicose com a base de Mannich A-5	161
Figura 64-Efeito do composto A-1, na atividade de dissacaridases intestinais. Efeito in vivo do composto A-1 na atividade específica de maltase, sacarase e lactase.....	162
Figura 65-Efeito da naftoquinona A-5, na atividade de dissacaridases intestinais. Efeito in vivo da naftoquinona A-5 na atividade específica de maltase, sacarase e lactase.....	162
Figura 66-Lise enzimática da maltose em duas unidades de glicose... 163	163
Figura 67-Efeito do composto A-1 na glicação de albumina/glicose. Efeito do composto A-1 na fluorescência AGE-derivada, após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação	164
Figura 68-Efeito do composto A-1 na glicação de albumina/frutose. Efeito da base de Mannich A-1 na fluorescência AGE-derivada, após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação.....	164
Figura 69-Efeito do composto A-5 na glicação de albumina/glicose. Efeito da naftoquinona M34 na fluorescência AGE-derivada, após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação.....	165
Figura 70-Efeito do composto A-5 na glicação de albumina/frutose. Efeito do composto A-5 na fluorescência AGE-derivada, após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação.	165
Figura 71-Camundongos Swiss (A) Camundongo Swiss com aproximadamente 2 meses de idade. (B) Gaiola de acrílico transparente onde os animais são acomodados. Fonte: Elaborado pelo autor (2014).	175
Figura 72-Administração por gavagem. Fonte: Elaborado pelo autor (2014).	176

Figura 73-Teste do glutamato na pata. (A) Injeção intraplantar de glutamato. (B) Resposta nociceptiva provocada pela injeção de glutamato na pata.	177
Figura 74-Edema de pata. (A) Edema causado pela injeção intraplantar de glutamato na pata posterior direita em relação a pata não injetada (contralateral). (B) Mensuração da espessura de pata com o micrômetro eletrônico digital 0-25mm.	178
Figura 75-O aparato de campo aberto. (A) Arena circular de PVC dividida em quadrantes para avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto (Open-field). (B) Ampliação do animal na arena de Open-field.	179

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.Processo de redução enzimático das naftoquinonas.	39
Esquema 2.Formação geral de uma base de Mannich.....	40
Esquema 3.Mecanismo geral para a formação das bases de Mannich. .	41
Esquema 4.Derivados sintéticos obtidos a partir de Bases de Mannich. Na figura NuH refere-se ao nucleófilo e HNR2 corresponde à uma amina secundária.	42
Esquema 5.Síntese de bases de Mannich derivadas de sulfonamidas ...	44
Esquema 6.Primeiras publicações sobre a reação de Mannich.	47
Esquema 7.Formação da base Mannich a partir da (1R)-(+)-nopinona (28), piperidina (29) e formaldeído (21).	48
Esquema 8.Reação de Mannich entre a cânfora (30) e/ou norcanfor (32) com formaldeído (21) e dimetilamina (31).	49
Esquema 9.Método de síntese de pirazóis.....	52
Esquema 10.Obtenção do 5-(4-bromofenil)-3-(4-metoxifenil)-1H- pirazol (40) a partir da reação entre 3-(4-bromofenil)-1-(4-metoxifenil)- 1,3-propanodiona (38) e hidrazina (39).....	53
Esquema 11.Formação de dois isômeros na síntese de um pirazol.	53
Esquema 12.Metodologia de síntese de pirazóis.....	54
Esquema 13- Equações de síntese de cloretos de sulfonila.	63
Esquema 14-Mecanismo da reação de clorossulfonação.	63
Esquema 15-Formação dos adutos de Mannich A-1 a A-12.	71
Esquema 16-Mecanismo para formação dos dímeros derivados da lausona.....	83
Esquema 17-Síntese dos dímeros derivados da lausona (DIM1-DIM9) utilizando ultrassom (US), microondas e refluxo.....	84
Esquema 18-Mecanismo de formação dos dímeros DIM-1 a DIM-9. ..	86
Esquema 19-Síntese de hidroxí pirazóis por condensação intramolecular de nitrocompostos.	97
Esquema 20-Síntese de 1-hidroxí-pirazóis através da condensação de oximas.	97
Esquema 21- Síntese das amidas de Weinreb (ASO-1-7, ASO-1-9, ASO-1-15, ASO-1-25, ASO-1-41).....	98
Esquema 22-Redução das amidas de Weinreb.....	98
Esquema 23-Reações de Henry para obtenção dos intermediários na síntese de hidróxi-pirazóis.....	99
Esquema 24-Reação das amidas de Weinreb com o cloreto de fenil magnésio.	101
Esquema 25-Reações de acoplamento para síntese do 1- hidroxí-4-fenil pirazol (ASO-1-61) e 4-fenil-pirazol (ASO-1-53 e ASO-1-63).	101

Esquema 26-Síntese das sulfonamidas S-1 a S-11.....	103
Esquema 27-Síntese da sulfonamida S-1.....	105
Esquema 28-Formação das espécies radicalares derivadas do oxigênio.	112
Esquema 29-Formação das espécies reduzidas das quinonas.-.....	119
Esquema 30-Redução do grupamento nitro.	119
Esquema 31-Formação do complexo ferrocianeto férrico durante a realização do ensaio poder redutor.....	123
Esquema 32-Redução do molibdênio promovida pelo ácido gálico...	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Resultados das reações de síntese dos adutos de Mannich derivados da lausona (A-1 a A-12).....	72
Tabela 2-Análise de RMN 1H para o composto A-1.	74
Tabela 3-Resultados das reações de síntese dos dímeros derivados da lausona (DIM-1 a DIM-9) realizadas em microondas.....	84
Tabela 4-: Condições experimentais e rendimentos para a reação de formação do composto DIM-1.	85
Tabela 5-Otimização das condições reacionais para síntese do composto DIM-1.....	86
Tabela 6-Comparação entre as metodologias sintéticas para síntese dos dímeros derivados da lausona e porcentagem de economia atômica. ...	87
Tabela 7-Atribuição dos átomos de carbono para o composto DIM-1..	95
Tabela 8-Reações de Henry para obtenção dos intermediários da síntese do 1-hidroxi-4-fenil-pirazol.....	100
Tabela 9-Pontos de fusão experimentais e rendimentos para a síntese das sulfonamidas S-1 a S-11.....	104
Tabela 10-Potenciais de oxirredução para os compostos A-1 a A-12 e DIM-1 a DIM-9.....	116
Tabela 11-Valores de condutividade e pH para os compostos A-1 a A-12 e DIM-1 a DIM-9.....	118
Tabela 12-Atividade antioxidante para as bases de Mannich derivadas da lausona.....	126
Tabela 13- Correlação da atividade antioxidante para as bases de Mannich.....	129
Tabela 14-Atividade antioxidante para os dímeros derivados da Lausona.	130
Tabela 15-Correlação entre as metodologias de atividade antioxidante para os dímeros.	131
Tabela 16-Atividade antioxidante para as sulfonamidas S-1 a S-11...	133
Tabela 17-: Correlação entre as metodologias antioxidantes para as sulfonamidas.	135
Tabela 18-Atividade de inibição da enzima AChE.	137
Tabela 19-Atividade inibitória das formas promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	153
Tabela 20-Atividade inibitória das formas amastigotas intracelular de <i>Leishmania braziliensis</i>	154
Tabela 21-Porcentagem da atividade antifúngica na concentração de 250 µg/mL.....	156
Tabela 22-Concentração inibitória mínima (CIM) em µM.	157

Tabela 23-Valores de concentração inibitória mínima das sulfonamidas derivadas do carvacrol frente a diferentes microorganismos.	158
Tabela 24-Valores de concentração inibitória mínima das sulfonamidas derivadas do carvacrol frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes.	159

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ACh**- acetilcolina
AChE- acetilcolinesterase
AGE- (*Advanced glycation End-products*) produtos finais da glicação avançada
AMPA- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
ATP- adenosina trifosfato
BSA- albumina sérica bovina
CAT- catalase
CC- coluna cromatográfica
CCD- cromatografia em camada delgada
CI₅₀- concentração inibitória a 50%
CIM- concentração inibitória mínima
d- dubleto
DCM- diclorometano
dd- duplo dupleto
DI₅₀- dose inibitória a 50%
DIPEA- N,N-diisopropiletilamina
DL₅₀- dose letal a 50% da população em teste
DMA- dimetilamino
DNA- ácido desoxirribonucleico
DPPH- 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EDTA- ácido diamino tetracético dissódico
E_{pa}- potencial do pico anódico
E_{pc}- potencial do pico catódico
EPM- erro padrão da média
ERN- espécies reativas de nitrogênio
ERO- espécies reativas de oxigênio
Fz- ferrozina
GABA- ácido gama aminobutírico
GPOx- glutathiona peroxidase
HOMO- orbital molecular ocupado de mais alta energia
I%- porcentagem de inibição enzimática
I_{pa}- intensidade do pico anódico
I_{pc}- intensidade do pico catódico
IS- índice de seletividade
IV- infravermelho
J- constante de acoplamento
LT- leishmaniose tegumentar

LUMO- orbital molecular desocupado de mais baixa energia
LV- leishmaniose visceral
LVC- leishmaniose visceral canina
m- multiplete
mCPBA- ácido meta cloro per benzoico
NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NMDA- receptor n-metil-d-aspartato
PABA- ácido *p*-aminobenzóico
PdC- paládio carbono
ppm- partes por milhão
RAGE-(*Receptor for Advanced glycation End-products*) recetor de produtos finais da glicação avançada
s- simpleto
SNC- sistema nervoso central
SOD- superóxido dismutase
t- tripleto
TE- transferência de elétrons
TE-EO- transferência de elétrons- extresse oxidativo
THF- tetrahydrofurano
TMS- tetrametilsilano
TMS- tetrametilsilano
VC- voltametria cíclica
VDP- voltametria de pulso diferencial
VLC- cromatografia à vácuo
ε- absorvidade molar
v- frequência

SUMÁRIO

1	JUSTIFICATIVA E INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DA LITERATURA	31
2.1	QUÍMICA MEDICINAL	31
2.2	SÍNTESE ORGÂNICA E O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS.....	31
2.3	PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS	33
2.4	NAFTOQUINONAS	37
2.5	BASES DE MANNICH	40
2.5.1	A reação de Mannich.....	47
2.6	PIRAZÓIS	50
2.6.1	Síntese de pirazóis.....	52
2.6.2	Princípios de neurotransmissão gabaérgica.....	55
2.7	SULFONAMIDAS.....	58
2.7.1	Mecanismo de ação das sulfonamidas.....	59
2.7.2	Estrutura e atividade das sulfas	61
2.7.3	A reação de clorossulfonação em sistemas aromáticos	62
2.8	ELETROQUÍMICA EM QUÍMICA MEDICINAL.....	64
3	OBJETIVOS.....	67
3.1	OBJETIVOS GERAIS	67
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1	SÍNTESE DOS ADUTOS DE MANNICH DERIVADOS DA LAUSONA.....	69
4.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DIMÉRICOS DERIVADOS DA LAUSONA	82
4.3	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS PIRAZÓIS.....	97
4.3.1	Obtenção dos pirazóis a partir de reações de acoplamento	101
4.4	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS SULFONAMIDAS DERIVADAS DO CARVACROL	102
5	VERIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	111
5.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E OS RADICAIS LIVRES.	111
5.2	TESTES DE VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	113

5.2.1	Voltametria cíclica em meio aprótico	116
5.2.2	Correlação entre a atividade antioxidante e os ensaios eletroquímicos	122
5.2.3	Bases de Mannich	124
5.2.4	Dímeros da lausona.....	129
5.2.5	Sulfonamidas.....	132
5.3	ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	135
5.3.1	A enzima acetilcolinesterase.....	135
5.4	ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	139
5.4.1	Nocicepção e o estresse oxidativo	139
5.4.2	Sinalização glutamatérgica e dor	141
5.4.3	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato	141
5.4.4	Efeito dos compostos sobre a nocicepção induzida pelo glutamato	142
5.4.5	Avaliação locomotora: teste de campo aberto (<i>Open-field</i>)	146
5.5	ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA	149
5.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	155
5.7	ATIVIDADE ANTI-HIPERGLICÊMICA	159
6	METODOLOGIA.....	167
6.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	167
6.2	SÍNTESE DOS ADUTOS DE MANNICH DERIVADOS DA LAUSONA:	168
6.3	SÍNTESE DOS COMPOSTOS DIMÉRICOS DERIVADOS DA LAUSONA: DERIVADOS (3,3'-(ARILMETILENO)BIS(2-HIDROXINAFTALEN-1,4-DIONA).....	169
6.3.1	Procedimento para preparação utilizando irradiação ultrassônica	169
6.3.2	Procedimento para preparação utilizando microondas.....	169
6.3.3	Procedimento para preparação utilizando refluxo.....	169
6.4	SÍNTESE DE HIDROXI-PIRAZÓIS	169
6.4.1	Método geral para síntese das amidas de Weinreb (ASO-1-7, ASO-1-9, ASO-1-15, ASO-1-25, ASO-1-41)	170
6.4.2	Método geral para redução das amidas de Weinreb (ASO-1-11, ASO-1-13, ASO-1-27 e ASO-1-33).....	170
6.4.3	Método geral de preparação dos intermediários sintéticos ASO1-17 e ASO 1-43	170

6.4.4	Obtenção dos pirazóis a partir de reações de acoplamento	171
6.5	SÍNTESE DAS SULFONAMIDAS DERIVADAS DO CARVACROL	171
6.6	ENSAIOS ANTIOXIDANTES	172
6.6.1	Captura de radicais livres usando DPPH.....	172
6.6.2	Determinação do poder redutor.....	172
6.6.3	Quelação do ferro (II).....	173
6.6.4	Redução do Molibdênio	173
6.6.5	Voltametria cíclica	174
6.6.6	Cálculo da correlação da atividade antioxidante	174
6.7	ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE.....	174
6.8	ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	175
6.8.1	Reagentes	176
6.8.2	Nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato	176
6.8.3	Avaliação locomotora: teste do campo aberto (Open-field)	178
6.8.4	Análise estatística.....	179
6.9	ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA.....	179
6.9.1	Avaliação in vitro da atividade anti-leishmania contra formas promastigotas	179
6.9.2	Avaliação in vitro da atividade anti-leishmania contra formas amastigotas intracelulares	180
6.10	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	180
6.11	ATIVIDADE ANTI-HIPERGLICÊMICA.....	182

7 CONCLUSÕES 183

7.1	QUANTO À SÍNTESE DOS ADUTOS DE MANNICH E DÍMEROS DERIVADOS DA LAUSONA, PIRAZÓIS E SULFONAMIDAS	183
7.1.1	Em relação aos adutos de Mannich	183
7.1.2	Em relação aos dímeros da Lausona	183
7.1.3	Em relação aos pirazóis.....	184
7.1.4	Em relação às sulfonamidas derivadas do carvacrol ..	184
7.2	QUANTO À VERIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ADUTOS DE MANNICH E DÍMEROS DERIVADOS DA LAUSONA, PIRAZÓIS E SULFONAMIDAS ...	184
7.2.1	Em relação à atividade antioxidante.....	184
7.2.2	Em relação à inibição da enzima acetilcolinesterase..	185

7.2.3	Em relação à atividade antinociceptiva.....	186
7.2.4	Em relação à atividade anti-leishmania.....	186
7.2.5	Em relação à atividade antimicrobiana	187
7.2.6	Em relação à atividade anti-hiperglicêmica	187
8	PERSPECTIVAS.....	189
8.1	EM RELAÇÃO ÀS SÍNTESES.....	189
8.2	EM RELAÇÃO ÀS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS	189
8.2.1	Quanto às atividades antioxidante e de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	189
8.2.2	Quanto à atividade antinociceptiva.....	190
8.2.3	Quanto às atividades leishmanicida, antimicrobiana e anti-hiperglicêmica	190
8.3	PERPECTIVAS GERAIS	190
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	191
10	ANEXOS.....	209
10.1	ESPECTROS.....	209
10.2	TRABALHOS PUBLICADOS E APRESENTADOS	262
10.3	ARTIGOS ACEITOS.....	271
10.4	ARTIGOS SUBMETIDOS	274

1 JUSTIFICATIVA E INTRODUÇÃO

A Química Medicinal no Brasil tem ganhado importância nas últimas décadas, por sua tentativa de encontrar novos compostos com propriedades terapêuticas úteis. Neste sentido é importante o desenvolvimento de pesquisas pautadas na procura por novos compostos protótipos para os quais se observa a atividade biológica e espera-se menor efeito colateral ou menor toxicidade. Apesar dos esforços no país, com uma crescente preocupação com este ramo de pesquisa, observa-se de um modo geral a escassez de recursos humanos habilitados a trabalhar a temática. É urgente reverter este quadro, pois a pesquisa com a Química Medicinal pode contribuir para o que o Brasil se torne um centro importante no que tange a aprovação de novos fármacos efetivos e eficientes para o combate das mais variadas doenças.

Grande parte dos fármacos é de origem sintética apresentando alguma relação com os produtos naturais, principalmente daqueles pertencentes ao reino vegetal. O Brasil apresenta uma enorme biodiversidade que pode ser explorada. Dentre os compostos naturais ou baseados em produtos naturais e que são utilizados como candidatos a protótipos de fármacos, podem-se destacar algumas classes de compostos que serão abordados neste trabalho tais como quinonas, pirazóis e sulfonamidas.

As quinonas, em especial as antraciclina e naftoquinonas podem apresentar uma grande variedade de atividades biológicas tais como antitumoral, tripanossomicida, fungicida, moluscicida, leishmanicida, anti-malárica, entre outras. As quinonas também estão envolvidas em importantes etapas do ciclo vital dos seres vivos, como no processo respiratório e na fotossíntese. Derivados de quinonas podem ser tóxicos às células por diferentes mecanismos, incluindo inibição do transporte de elétrons, geração de espécies radiculares através do ciclo redox, bioalquilação, intercalação, indução de quebras nas fitas do DNA.

Os pirazóis, apesar de raros na natureza, historicamente vem sendo descritos como responsáveis por importantes atividades biológicas e como substância ativa de vários medicamentos como: antipirina® (antipirético), difenamizol (analgésico, anti-inflamatório, antipirético), betazol® (histamínico), difenzoquat e dimetilan (inseticidas). Os pirazóis possibilitam estudos que podem ser desenvolvidos em nível da sua estrutura e geometria molecular, em nível da sua reatividade em síntese orgânica, e até mesmo relativamente à sua aplicação em diversas áreas, o que têm despertado um grande interesse por parte dos químicos orgânicos.

Derivados sulfonamídicos exercem ampla faixa de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Aproximadamente cerca de 150 diferentes sulfonamidas já são comercializadas como agentes antibacterianos, sendo que as modificações são efetuadas principalmente para aumentar a sua potência, obtendo um espectro antibacteriano mais amplo e/ou uma ação mais prolongada. Sulfonamidas também tem demonstrado um amplo espectro de outras atividades biológicas como analgésica, antitumoral, antiparasitária, antiviral e anticonvulsante.

Neste trabalho explorou-se a síntese de derivados de naftoquinonas, especificamente a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona na forma de bases de Mannich e dímeros, derivados de pirazóis e sulfonamidas derivadas do carvacrol, para estudo eletroquímico e análise de atividades biológicas. Dentre as atividades biológicas que foram investigadas destacam-se antioxidante, inibição da enzima acetilcolinesterase, antibacteriana, antifúngica e antinociceptiva.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 QUÍMICA MEDICINAL

A Química Medicinal é uma área de estudos interdisciplinar que se dedica ao estudo das razões moleculares da ação dos fármacos descrevendo a relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica. Neste contexto, aplica-se o planejamento e o desenho estrutural de novas substâncias que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis e que viabilizem o processo de obtenção de novos fármacos cujos usos sejam seguros (BARREIRO & FRAGA, 2008).

A Síntese Orgânica e a Química de Produtos Naturais estão intrinsecamente ligadas no desenvolvimento da Química Medicinal. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos do isolamento de substâncias ativas de espécies vegetais utilizadas na medicina popular (VANHAELLEN & VANHAELLEN-FASTRE, 1989).

Em décadas anteriores grande parte dos fármacos foi proveniente da natureza, principalmente do reino vegetal. A fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas, como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais, adaptação ao meio, regulação e sobrevivência às situações de estresse, quando estudada para determinados fins, levou ao surgimento de novos fármacos. Em alguns casos, estes metabólitos permitiram a elaboração de novos protótipos a partir de modelagem molecular com o propósito de obtenção de compostos de elevada importância biológica. As plantas constituem, pois, um vasto laboratório de síntese orgânica, resultado de milhões de anos em processo evolutivo e de adaptação (LIMA, 2007).

2.2 SÍNTESE ORGÂNICA E O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

A descoberta dos salicilatos pode ter sido o mais importante marco no que tange o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais. A história da descoberta começa em 1757 quando Edward Stone provou o sabor amargo das cascas do salgueiro (*S. alba*) e associou-o ao sabor dos extratos de Cinchona. A descoberta levou-o a comunicar à Real Sociedade Inglesa, seis anos mais tarde, os resultados de suas observações clínicas mostrando as propriedades analgésicas e

antipiréticas do extrato daquela planta (YUNES et al, 2001). Depois de disputas entre a França e Alemanha nos cinquenta anos que se passaram, Johann A. Buchner isolou uma pequena quantidade de salicina (1). Em 1860, Hermann Kolbe e seus alunos sintetizaram o ácido salicílico (2) e seu sal sódico a partir do fenol. Vinte e oito anos depois, Felix Hofmann pesquisando a cura para a artrite que afligia seu pai, que era sensível aos efeitos colaterais do salicilato de sódio, descobriu o ácido acetil-salicílico (3, AAS, Figura 1), menos ácido que o ácido salicílico, mas com a mesma propriedade analgésica desejada. O descobrimento do AAS marcou de certa forma o final do primeiro período, onde a busca por substâncias naturais terapeuticamente úteis era feita ao acaso (WEISSMAN, 1991).

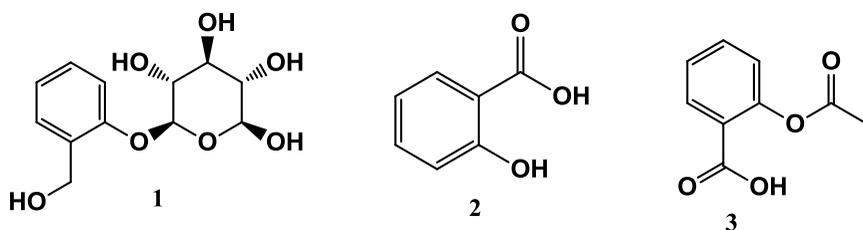


Figura 1. Estrutura da salicina (1), do ácido salicílico (2) e do ácido acetil-salicílico (3).

O planejamento racional de moléculas bioativas e os estudos de relação estrutura-atividade começaram a ser difundidos mais explicitamente durante a II Guerra Mundial. A pesquisa militar impulsionou muitos avanços na síntese orgânica para o tratamento de infecções, dor, processos alérgicos e depressivos. No ano de 1932 descobriu-se que o prontossil (4), antes utilizado como corante, quando se decompunha à forma sulfonamida (5), apresentava atividade contra os processos infecciosos (Figura 2). Iniciava-se a origem da era das sulfas, de extrema importância na II grande guerra (WEISSMAN, 1991).

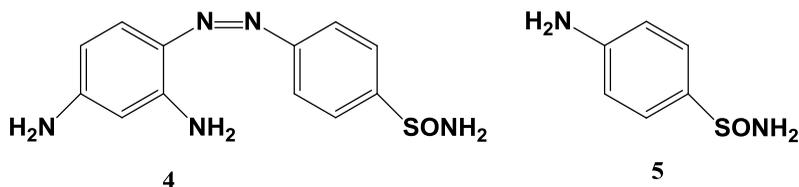
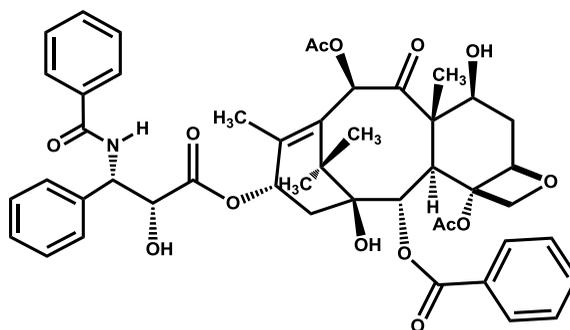


Figura 2. Estrutura do prontossil (4) e sulfonamida (5).

Um outro exemplo interessante de um fármaco obtido a partir de um produto natural é o taxol (6) (**Figura 3**), componente químico presente nas cascas da *Taxus brevifolia* (Taxaceae) que apresenta uma potencial atividade antineoplásica, mas cuja obtenção não é promissora, uma vez que é isolado com rendimento muito baixo (0,01 a 0,03 %) a partir de uma árvore pouco abundante e de crescimento lento. A utilização do taxol como agente antineoplásico é, portanto, impossível a partir da fonte natural de obtenção. Como alternativa é possível utilizar vias semissintéticas, que demonstram a importância da síntese orgânica no desenvolvimento de fármacos que tem sua origem nos produtos naturais (MANN, 2002).



6

Figura 3. Estrutura do taxol (6).

Grande parcela dos fármacos licenciados é proveniente ou derivada de produtos naturais. De acordo com Newman e colaboradores (2012) 53% dos fármacos são formalmente derivados de síntese orgânica, dos quais 24 % correspondem a moléculas contendo farmacóforo derivado diretamente de produtos naturais.

2.3 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

O processo que leva da obtenção de um fármaco até a sua comercialização como uma entidade terapêutica de uso seguro é longo, laborioso e dispendioso.

Químicos medicinais podem passar anos na tentativa de sintetizar análogos a partir de um composto inicial que apresente uma atividade biológica de interesse. A duração do processo, em última análise, tem

um grande impacto sobre os custos do desenvolvimento do fármaco e sendo assim, qualquer procedimento que possa acelerar o processo é altamente desejável (CECHINEL-FILHO & YUNES, 2001).

A etapa de otimização de um fármaco envolve a modificação de suas características estruturais. A simples substituição de um átomo de hidrogênio por um determinado substituinte (halogênio, grupo alquila, arila, ciano, nitro entre outros) altera profundamente as propriedades físico-químicas de um determinado fármaco como a hidrofobicidade, a densidade eletrônica e a conformação estrutural por modificar efeitos eletrônicos e estéricos. Neste sentido, a substituição de determinados grupos substituintes em anéis aromáticos é uma prática frequente, uma vez que a grande maioria dos fármacos é constituída desta unidade estrutural (CECHINEL-FILHO & YUNES, 2001).

Historicamente, o *design* de fármacos foi motivado pela experiência e intuição do químico e pela disponibilidade de materiais de partida. No entanto, entre os anos 1960 e 1970 o desenvolvimento de métodos de Hansch trouxeram uma abordagem mais racional e que permite uma análise quantitativa das relações estrutura-atividade (QSAR). Essencialmente, a abordagem QSAR pretende tomar um conjunto de análogos de uma molécula biologicamente ativa, identificar e quantificar as suas propriedades físico-químicas, e determinar qual ou quais propriedades tem uma maior relevância para a atividade biológica (KUO et al, 2002).

No entanto, deve-se salientar que as relações quantitativas não são tão facilmente mensuráveis como se pode pensar. Para obter-se uma boa correlação estatística é necessário um número relativamente grande de compostos, que nem sempre é tão simples de se conseguir quando a etapa de síntese é complexa. Além disto, nem sempre é fácil perceber os diferentes parâmetros (eletrofilicidade, nucleofilicidade, lipofilicidade etc) se a atividade varia em uma série homóloga. Modos de ligação do composto ao receptor biológico podem mudar através de uma série de compostos e assim interromper a continuidade da análise matemática que fundamenta as correlações. Como alternativa, é possível a utilização de procedimento simples e muito difundido entre químicos medicinais, que é a utilização da árvore de decisão de Topliss.

Na década de 1970, o professor J.G. Topliss preocupado com a utilização de métodos não-matemáticos, elaborou esquemas operacionais, projetados para a máxima simplicidade de aplicação do químico medicinal. Estes esquemas evitavam o uso de computadores e procedimentos estatísticos para selecionar o mais rápido possível os compostos possivelmente mais ativos de uma série. Com a base

fundamental dos métodos de Hansch, ele analisou as principais influências sobre a atividade quando a introdução de um substituinte resultava em modificações das propriedades lipofílicas (*p*), eletrônicas (σ) e estéricas (Es). Estes esquemas operacionais ficaram conhecidos como a árvore de decisão de Topliss (Figura 4) (HANSCH, 1971).

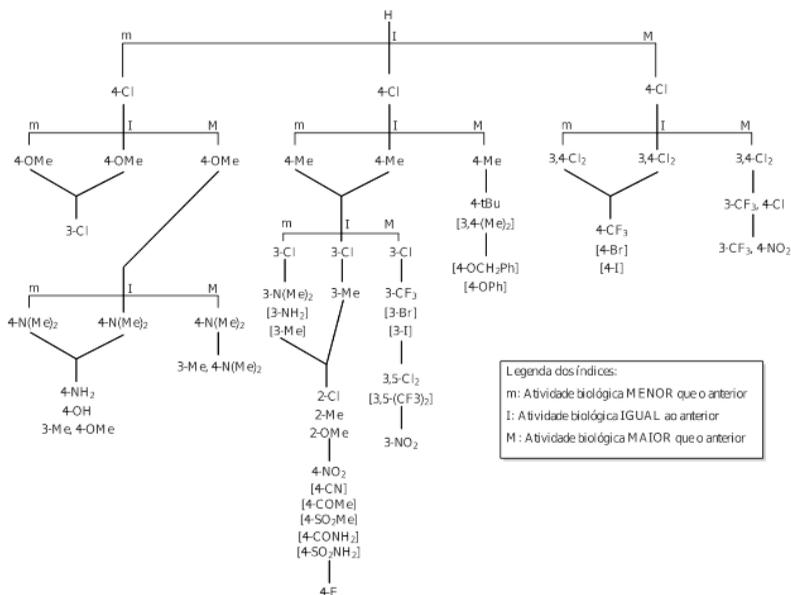


Figura 4.Árvore de decisão de Topliss para otimização de substituintes aromáticos.

A árvore de decisão de Topliss é um procedimento simples que permite a análise do ponto de vista qualitativo das relações estrutura-atividade. A atividade de um determinado análogo é comparada com o análogo que o precedeu no esquema anterior e assim por diante. O procedimento possibilita trabalhar com um número reduzido de compostos. Entretanto, a árvore de decisão não contempla todos os análogos possíveis de serem sintetizados e se limita à análise de compostos que apresentam em sua estrutura pelo menos um anel aromático não fusionado. Como a maior parte dos fármacos obedece a este requisito, ela se torna um procedimento muito usual na descoberta de análogos cada vez mais efetivos na elaboração de um protótipo e um candidato a fármaco (THOMAS, 2000).

Na seleção de um candidato a fármaco, geralmente adota-se um conjunto de regras conhecidas como “Regra de Lipinski” ou “regra dos

cinco”. As regras de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997) são um conjunto de parâmetros usados para avaliação do potencial que uma molécula apresenta de ser absorvida pelo organismo humano. Apesar de terem sido publicadas em 1997, essas regras já eram usadas há muito tempo pelo laboratório farmacêutico Pfizer. O seu sucesso na avaliação do potencial farmacológico é devido a sua facilidade de aplicação e de memorização, que são evidentes do ponto de vista físico-químico; e são baseadas em pesquisa básica sólida que funcionam efetivamente. As regras de Lipinski são baseadas nas propriedades físico-químicas de compostos que formam a base de dados USAN (*United States Adopted Names Directory*), que apresentam moléculas que passaram para a fase 1 de testes clínicos. Estudos de fase 1 envolvem determinação de aspectos relacionados à toxicidade e farmacocinética. Compostos que chegam à fase 2 são aqueles que apresentam absorção e toxicidade tolerável, o que sinaliza que investimentos podem ser realizados em mais testes.

As regras de Lipinski analisam: doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, a lipofilicidade (Log P) e a massa molecular. Segundo as regras de Lipinski, a atividade de um fármaco é devida à sua melhor absorção e permeabilidade, que devem ocorrer quando (LIPINSKI et al., 1997):

- Não há mais que 5 centros doadores de ligação de hidrogênio;
- Não há mais que 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio;
- O peso molecular ≤ 500 unidades;
- O Log P calculado ≤ 5 .
- Além destas regras, outras propriedades também podem ser observadas no planejamento de um fármaco, como (LEPRE, 2001):
- Índice de refração molar entre 40 e 130;
- Número de átomos pesados entre 10 e 70;
- Número de ligações que permitam rotatividade entre 2 e 8;
- Número de anéis entre 1 e 6.

Neste trabalho foram sintetizadas diferentes classes de compostos, tais como: derivados naftoquinônicos do tipo base de Mannich e compostos diméricos (ambos derivados da lausona), pirazóis e sulfonamidas. Para estes compostos destacou-se a sua importância sintética e verificou-se o potencial biológico através de alguns ensaios de atividade. Para facilitar a compreensão, apresentaremos a revisão por classes de compostos, para posterior discussão da síntese e da investigação das atividades biológicas destes compostos.

2.4 NAFTOQUINONAS

Os primeiros relatos sobre a utilização de extratos de plantas que possuíam naftoquinonas pelo homem, são do antigo Egito (cerca de 4000 anos). O extrato da folha de *Lawsonia inermis*, conhecida como Henna, que contém a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (lausona) (7) (Figura 5) era empregado como “cosmético” utilizado na pintura de cabelos, pele e unhas. Alguns anos depois, o extrato também passou a ser aproveitado no tratamento de micoses e feridas (PAPAGEORGIU *et al*, 1999).

As naftoquinonas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em bactérias, fungos, animais e, principalmente, em vegetais, e participam de diversos processos biológicos. São constituintes da membrana plasmática nas eubactérias e possuem elevada importância na cadeia de transporte de elétrons (Figura 5) como é o caso da ubiquinona (8), também chamada de Coenzima Q₁₀, de Coenzima Q e abreviada como CoQ₁₀, CoQ, Q₁₀ ou Q, que é uma benzoquinona presente em praticamente todas as células do organismo e que participa dos processos de produção de adenosina trifosfato (ATP) (KALCKAR, 1974).

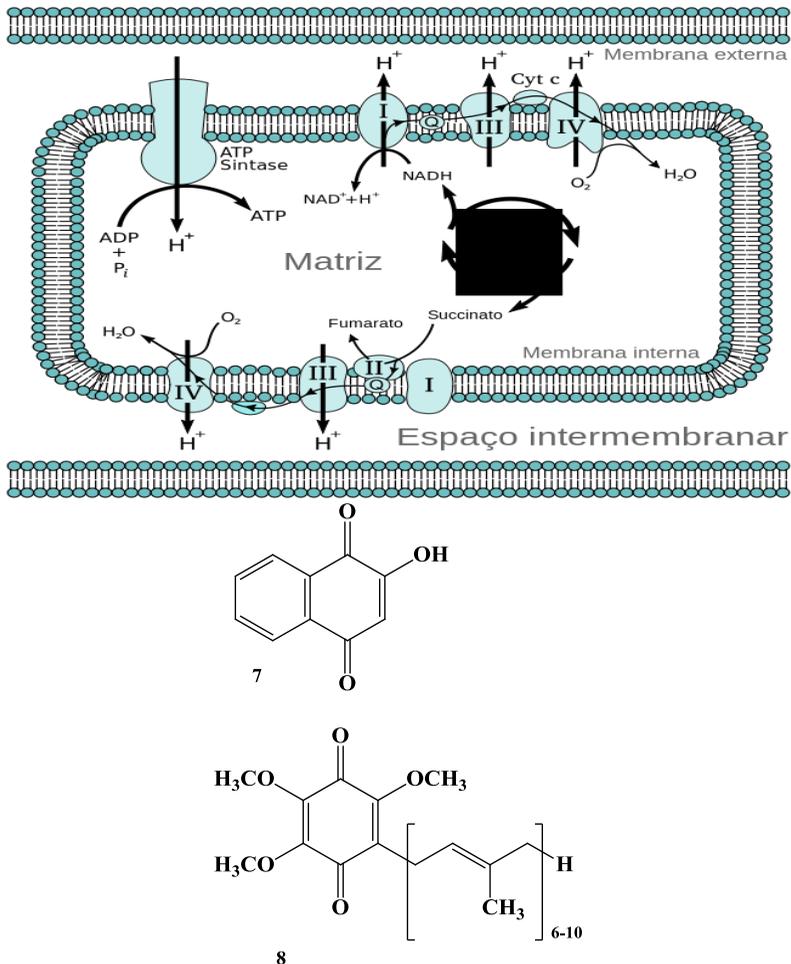
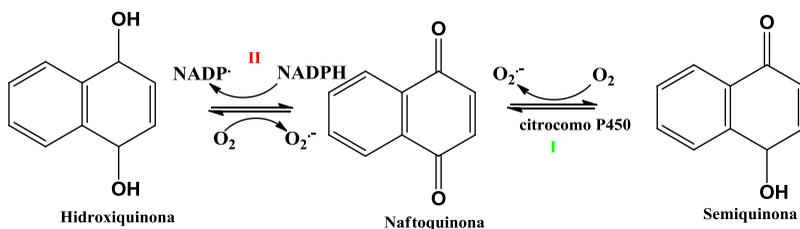


Figura 5. A cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, da launson (7) e estrutura da ubiquinona (8).

Quando presentes em fungos, as naftoquinonas podem ainda realizar funções diferenciadas como gerar espécies reativas de oxigênio no meio extracelular para auxiliar na degradação de lignina. Nos vegetais estão envolvidas na cadeia fotossintética além de serem produzidas para defesa de agentes infecciosos (ROBBINS et al, 1994). A citotoxicidade de algumas naftoquinonas pode ser explicada pela habilidade destas substâncias produzirem espécies reativas de oxigênio (ERO), como superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}); e reagirem

com componentes eletrofílicos que são os átomos de carbono dos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos.

O processo de formação de ERO pelas naftoquinonas nas células é possível porque estes compostos são reduzidos enzimaticamente formando uma semiquinona pelo ganho de um elétron (Esquema 1). A semiquinona formada apresenta a capacidade de auto-oxidar-se e de reagir com o oxigênio para oxidar a quinona (rota I). Este processo normalmente é promovido pelo citocromo P-450 redutase. Por outro lado, as naftoquinonas também podem ser reduzidas pela DT-diaforase ou NADPH: quinona oxi-redutase (rota II). Neste caso, ocorre a transferência de dois elétrons, formando uma hidroxiquinona, que é menos reativa, sendo esta uma das formas de eliminação destes compostos do organismo (Esquema 1) (SILVA et al, 2003).



Esquema 1. Processo de redução enzimática das naftoquinonas.

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol, 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (**9**), extraído do cerne do tronco de plantas do gênero *Tabebuia*, e especialmente os seus derivados isoméricos α -lapachona (**10**) e β -lapachona (**11**) que também possuem atividade antitumoral (Figura 6) (SILVA et al., 2003).

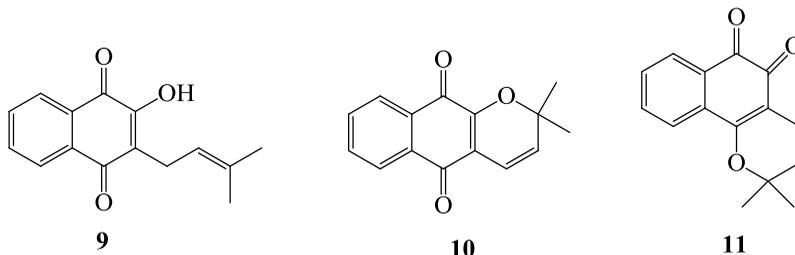
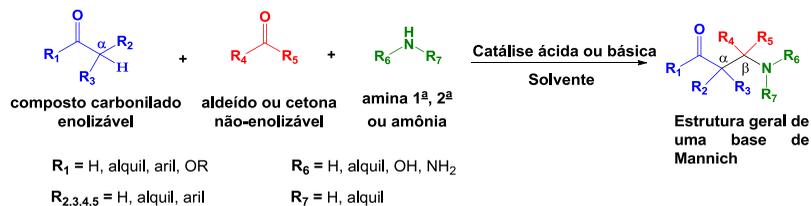


Figura 6. Naftoquinonas com atividade antitumoral.

O lapachol (9) e seus derivados têm sido extensivamente estudados principalmente por sua capacidade de induzir o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}). Estas espécies podem danificar alguns componentes celulares importantes, tanto de células normais como de malignas. A alteração da normalidade pode induzir a apoptose como alternativa, caso não se consiga eliminar por completo o estresse oxidativo (SILVA et al, 2003).

2.5 BASES DE MANNICH

Bases de Mannich são compostos β -aminocarbonílicos formados a partir de três componentes, a amônia ou uma amina primária ou secundária e compostos carbonílicos, sendo um deles não enolizável e outro enolizável. A formação geral de uma base de Mannich pode ser observada no Esquema 2.

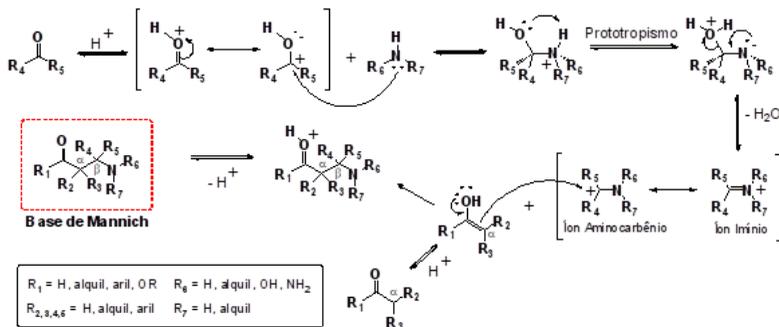


Esquema 2. Formação geral de uma base de Mannich.

De forma geral, a base de Mannich pode ser preparada através da adição de um carbono nucleofílico, representado pelo componente enolizável, estabilizado por ressonância, a um eletrófilo, que pode ser um sal de imínio, uma imina, um aminal ou um N,O-acetal. O componente enolizável usualmente é um aldeído ou cetona aromática ou alifática, mas também pode ser derivado de ácidos carboxílicos, compostos β -dicarbonilados, nitroalcanos, enolatos metálicos, silil-enol-éteres e alquinos terminais (TOCZKO & HEATHCOCK, 2000; BRUEGGEMANN et al., 2003; MARTIN & BARR, 1996).

O mecanismo geral proposto para a formação destes compostos envolve, inicialmente, o ataque nucleofílico da amina ao carbono da carbonila, seguido de transferência de próton intramolecular para formar um intermediário tetraédrico, que sofre eliminação de uma molécula de

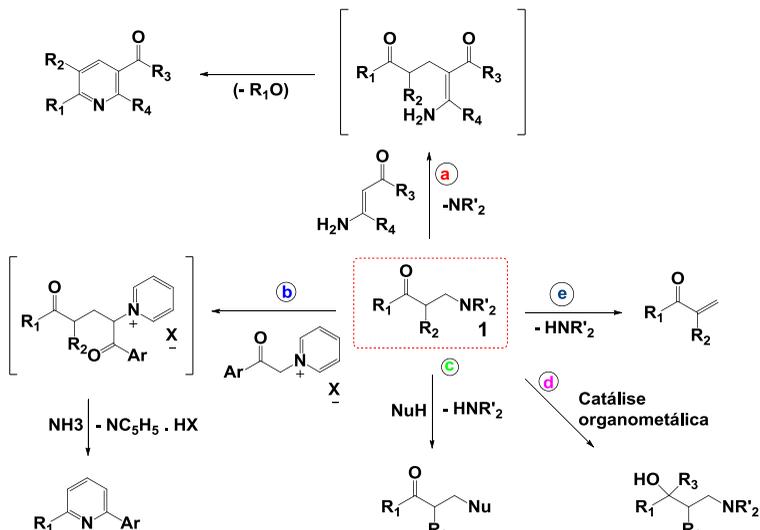
H₂O e leva a formação da espécie íon imínio. O íon imínio que está em ressonância com sua forma íon amino carbênio, é então atacado pela espécie enolato, formando o composto β-aminoalquilado (Esquema 3).



Esquema 3. Mecanismo geral para a formação das bases de Mannich.

As bases de Mannich são sólidas à temperatura ambiente e estáveis ao ar e à luz, no estado sólido. São coloridas, variando de laranja a vermelho escuro, apresentam caráter anfótero e são indicadores ácido-base em solução. As bases de Mannich de baixa massa molar, em contato com solução diluída de ácido clorídrico, dão origem aos seus respectivos hidrocloreto solúveis, de coloração amarela. As bases de alta massa molar, em solução ácida, também formam seus respectivos hidrocloreto de cor amarela, porém, insolúveis. Em solução alcalina, estão na forma não ionizada e se tornam insolúveis em água, originando soluções de cor vermelha escuro. Em geral, são facilmente recristalizadas em EtOH ou MeOH a quente. No estado sólido, ocorre decomposição em altas temperaturas, seguida de fusão (NEVES, 2007).

As bases de Mannich são intermediários sintéticos versáteis, podendo ser convertidas em um grande número de derivados de outras classes de compostos orgânicos, tais como: i) heterociclos de seis membros, a partir da reação com enonas com posterior deaminação e ciclização intramolecular (rota **a**) e a partir da reação com o sal de Eschenmoser seguida de deaminação e ciclização (rota **b**); ii) compostos carbonilados funcionalizados obtidos através da substituição de NR₂ por nucleófilos (rota **c**), iii) 1,3-aminoálcoois através da redução ou adição de compostos organometálicos (rota **d**) e iv) aceptores de Michael através da eliminação da amina HNR₂ (rota **e**). Tais conversões podem ser observadas a seguir (Esquema 4). Portanto, as bases de Mannich são de grande importância em química orgânica.



Esquema 4. Derivados sintéticos obtidos a partir de Bases de Mannich. Na figura NuH refere-se ao nucleófilo e HNR₂ corresponde à uma amina secundária.

Compostos β -aminocarbonílicos, como as bases de Mannich, ocorrem em grande número na natureza, principalmente na forma de alcalóides cujas estruturas estão, quase sempre, relacionadas com atividades biológicas. Entre os alcalóides com o sistema β -aminocarbonílico, destaca-se a lycopodina (**12**), utilizada no tratamento da obesidade, a cocaína (**13**), um dos primeiros anestésicos locais utilizados na medicina e a elaeocarpina (**14**), um poderoso relaxante do sistema nervoso central (MEERHOLZ et al., 1980) (Figura 7).

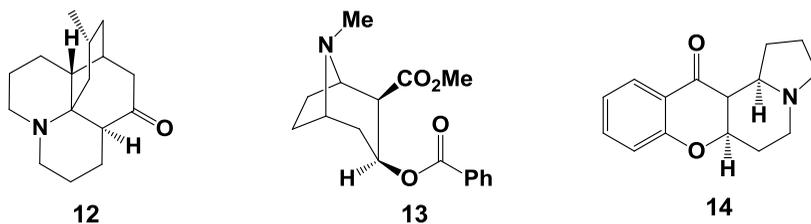


Figura 7. Compostos β -aminocarbonílicos naturais.

Uma das características mais importantes das bases de Mannich está ligada ao seu potencial farmacológico atuando como compostos

antineoplásicas, analgésicos, antidepressivos, antibióticos dentre outras aplicações (ETAYO *et al.*, 2007; MACHAN *et al.*, 2008). Derivados importantes das bases de Mannich são os aminoálcoois, que apresentam um grande potencial farmacológico. Como exemplos podemos citar o Nikkomycyn (**15**) utilizado como antibiótico, o tramadol® (**16**) utilizado como analgésico, e a (R)- prociclidina® (**17**), utilizada no tratamento da doença de Parkson (Figura 8).

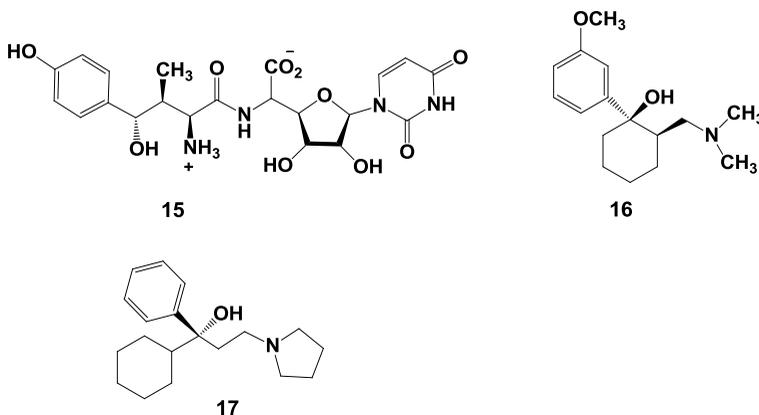


Figura 8. Aminoálcoois derivados de bases de Mannich.

Nos últimos 12 anos, muitos estudos foram realizados envolvendo a síntese de bases de Mannich, incluindo o desenvolvimento de novas metodologias sintéticas nas diversas áreas e estudos de atividade biológica.

O desenvolvimento de metodologias sintéticas para a preparação de pirrolidinas opticamente ativas e derivados da piperidina constitui uma área de grande interesse em química orgânica devido à presença desses heterociclos em muitos compostos naturais biologicamente ativos. Particularmente, a adição de carbonos nucleofílicos em íons N-aciliminio, tem sido a principal etapa em várias abordagens para a síntese de aza-heterociclos (D'OCCA *et al.*, 2000).

Vashishtha *et al.* (2004) demonstraram a síntese de compostos derivados da 1-(4-ariloxifenil)-3-dietilamino-1-propanona (**18**) (Figura 9). Todos estes compostos apresentaram citotoxicidade frente a células tumorais de linfoma e atividade anticonvulsante.

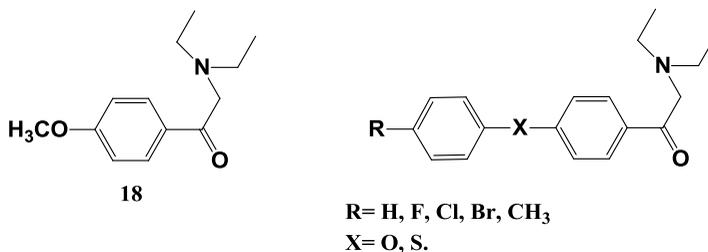


Figura 9. Síntese de derivados da 1-(4-ariloxifenil)-3-dietilamino-1-propanona (**18**).

Chiyanzu *et al.* (2005) sintetizaram uma série de derivados da aminoquinolínicos (Figura 10) baseadas no produto natural isatina (**19**) que apresentaram atividade antimalárica frente a *P. falciparum*.

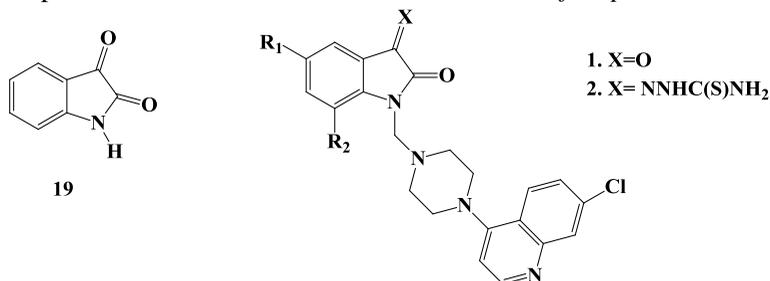
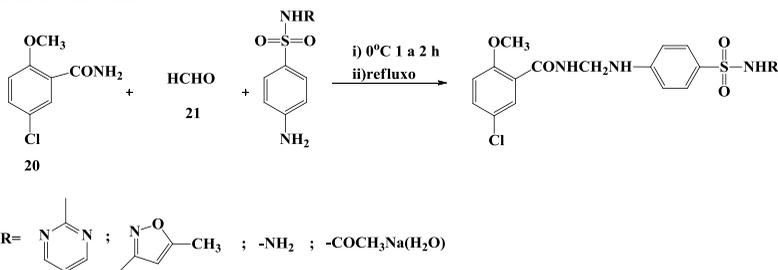


Figura 10. Isatina (**19**) e seus derivados aminoquinolínicos.

Joshi *et al.* (2005) sintetizaram bases de Mannich a partir da 5-cloro-2-metoxibenzamida (**20**), formaldeído (**21**) e sulfonamidas (Esquema 5), que apresentaram excelentes resultados de atividade antibacteriana.



Esquema 5. Síntese de bases de Mannich derivadas de sulfonamidas

Joshi *et al.* (2007) também escreveram a síntese e a atividade antibacteriana de bases de Mannich derivadas da uma sulfonamida

(Figura 11). Os compostos mostraram-se ativos contra os patógenos e não exibiram toxicidade aguda quando testados em camundongos.

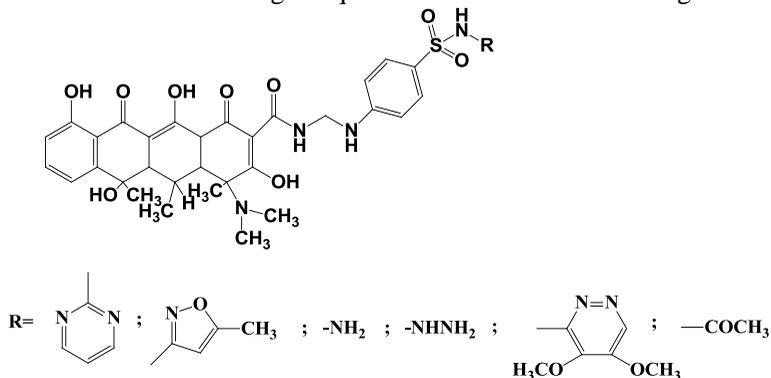


Figura 11. Bases de Mannich derivados da sulfonamida.

Wenzel *et al.* (2010) reportaram a síntese de diferentes bases de Mannich derivadas da acetofenona (22) (Figura 12). Os compostos mostraram pronunciada atividade antimalárica e citotoxicidade frente às células tumorais mamárias.

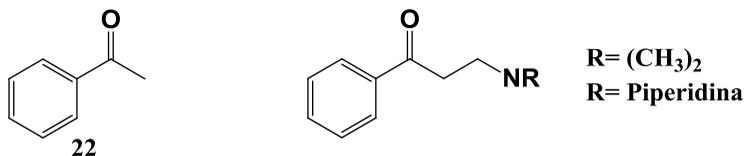


Figura 12. Acetofenona (22) e suas bases de Mannich derivadas.

A síntese de complexos metálicos a partir de bases de Mannich utilizando lausona como fonte de composto carbonílico enolizável, também tem sido bastante relevante como pode ser observado nos trabalhos de Neves *et al.* (2012) e Singh *et al.* (2012).

Neves *et al.* (2012), sintetizaram complexos de zinco e cobre de bases de Mannich derivados da 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (lausona) (7), piridinocarboxialdeído (23) e 2-aminometilpiridina (24) (Figura 13).

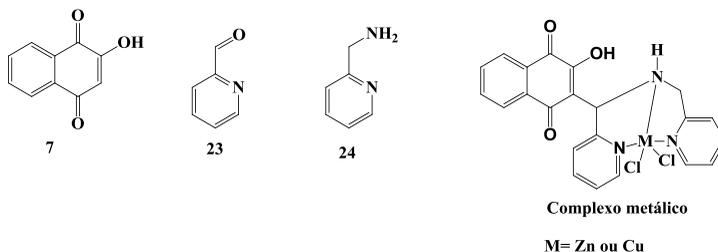


Figura 13. : Complexos metálicos de diferentes bases de Mannich

Singh *et al.* (2012) demonstraram a síntese de bases de Mannich a partir de morfolinobenzil, piperidinobenzil (**25**), morfolinometil, piperidinometil com uréia e tiouréia e a formação de complexos metálicos de urânio (**26**) com estas bases de Mannich (**Figura 14**). Tanto as bases de Mannich quanto seus complexos metálicos apresentaram atividade antifúngica.

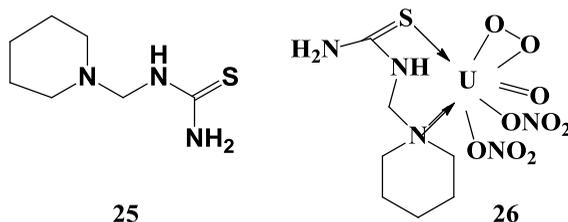
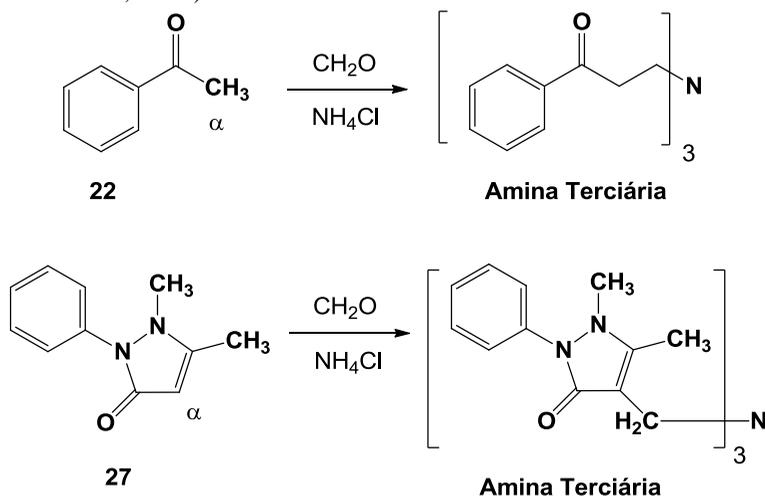


Figura 14. Base Mannich formada a partir de (25) piperidinometil e tiouréia e seu respectivo (26) complexo com U (IV).

A lausona é proveniente da *Lawsonia inermis*, (Lythraceae), comumente conhecida como Henna, que é utilizada na medicina indiana principalmente como agente diurético, antipirético, anti-inflamatório e cicatrizante (WARRIER, 2004; AHMED *et al.*, 2000; BICH *et al.*, 2004; REDDY, 1988). Esta planta tem uma grande variedade de constituintes fitoquímicos como derivados naftoquinônicos, compostos fenólicos, terpenóides, esteróis, xantonas, cumarinas, ácidos graxos, aminoácidos entre outros ((DIXIT *et al.*, 1980; AFZAL, 1984; GUPTA, 1993; TAKEDA, 1988; CUONG *et al.*, 2010; CHAKRABARTTY *et al.*, 1982; HANDA *et al.*, 1997; BHARDWAJ *et al.*, 1978; MUHAMMAD & MUHAMMAD, 2005).

2.5.1 A reação de Mannich

As reações de aminoalquilação têm sido descritas por diversos autores desde o século XIX. Em 1903, Tollens e von Marle observaram que a reação da acetofenona com formaldeído e cloreto de amônio levou a formação de uma amina terciária. Contudo, foi em 1917 que Carl Mannich isolou uma amina terciária através da reação da antipirina nas mesmas condições reacionais. Mannich interessou-se pela generalidade dessa reação sendo, portanto, o primeiro a dar o devido reconhecimento a este tipo de reação, que alguns anos mais tarde receberia o seu nome como forma de homenagem. No esquema 6 observa-se as reações realizadas por Tollens e von Marle a partir da acetofenona (**22**) e as realizadas por Mannich a partir da antipirina (**27**), ambas utilizando formaldeído e cloreto de amônio para obtenção de uma amina terciária (MANNICH, 1917).



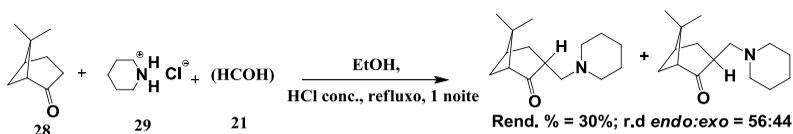
Esquema 6. Primeiras publicações sobre a reação de Mannich.

Desde então, esta reação passou a ser conhecida como reação de Mannich, sendo considerada um dos mais importantes métodos para a formação de ligação carbono-carbono. Devido a sua importância singular para a síntese orgânica, tem recebido atenção de muitos pesquisadores ao longo dos anos, traduzida na publicação de vários artigos de revisão (AREND et al., 1998).

Do ponto de vista sintético, a metodologia clássica pode apresentar algumas desvantagens. Grande parte dos trabalhos

encontrados na literatura emprega condições drásticas como utilização de meio fortemente ácido ou básico, altas temperaturas, necessidade de ambiente reacional com atmosfera inerte. As reações de Mannich clássicas em geral estão acompanhadas de baixo rendimento, principalmente quando o produto formado não se encontra no estado sólido. Além disto, em geral, apresentam longo tempo reacional, devido à baixa concentração do sal de imínio formado *in situ*.

A reação da (1R)-(+)-nopinona (28) na presença de piperidina (29) e formaldeído (21) (CRAIG *et al.*, 1963) é um bom exemplo para ilustrar as condições clássicas para a qual aplica-se o refluxo, tempo reacional elevado e utilização de meio fortemente ácido, fornecendo uma baixa razão diastereoisomérica (r.d) dos produtos (Esquema 7):



Esquema 7. Formação da base Mannich a partir da (1R)-(+)-nopinona (28), piperidina (29) e formaldeído (21).

As condições clássicas acima mencionadas podem favorecer reações indesejadas para as quais pode ocorrer, além da formação dos requeridos adutos, a formação de sub-produtos, tais como: 1,5-dicetonas, quando utiliza-se o meio fortemente básico; produtos de reações de retro-Mannich, também conhecida como fragmentação de Grob e que ocorre como um processo competitivo favorecido devido à baixa eletrofilicidade do carbono imínico; compostos carbonílicos di- e trissubstituídos com a utilização de aminas primárias e amônia e, ainda, bis-bases de Mannich quando há utilização de substratos carbonílicos não simétricos, contendo duas posições enolizáveis (TRAMONTINI & ANGIOLINI, 1990) (Figura 15).

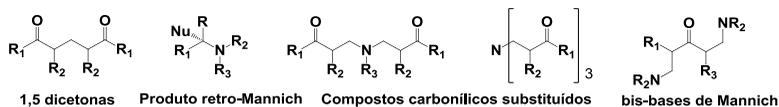
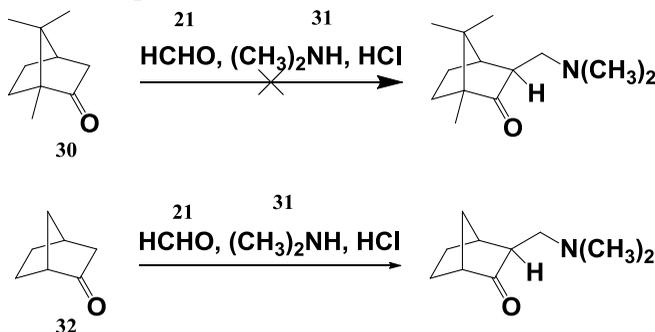


Figura 15. Subprodutos formados da reação de Mannich clássica.

Para cetonas não simétricas, o controle da estereosseletividade é na maioria das vezes ineficiente e altamente dependente das condições reacionais. Se o composto carbonilado apresenta um certo grau de

complexidade, como a presença de substituintes volumosos que causam algum tipo de impedimento estérico, a reprodutibilidade da reação é difícil e o método não é aplicável. Isto é o que acontece na reação da cânfora (**30**) que não reage com formaldeído (**21**) e dimetilamina (**31**) para a formação do aduto requerido. Já a reação destes mesmos reagentes com norcanfor (**32**) formou o aduto de Mannich como apresentado no Esquema 8 (McCLURE *et al.*, 1988).



Esquema 8. Reação de Mannich entre a cânfora (**30**) e/ou norcanfor (**32**) com formaldeído (**21**) e dimetilamina (**31**).

Neste sentido, é de extrema importância o desenvolvimento de metodologias sintéticas que visam às condições reacionais mais simples, menor número de etapas, com utilização de reagentes de menor custo, com a menor geração de resíduos possíveis, com vistas a um procedimento sintético elegante e menor impacto ambiental.

Nas últimas décadas vários grupos de pesquisa desenvolveram metodologias para sobrepor os problemas das condições clássicas. Grande parte das abordagens remete a utilização de iminas ou sais de imínio pré-formados com, na maioria das vezes, enolatos metálicos, como silil-enol-éteres ou silil-ceteno-acetais (AREND *et al.*, 1998).

Um grande avanço no escopo e eficiência da reação de Mannich foi alcançado com a utilização de sais de imínio pré-formados. A utilização pioneira de cátions imínio nas reações de Mannich foi através do uso de iodeto de N,N-dimetil (metileno) imínio $\text{CH}_2=\text{NMe}_2^+\text{I}^-$, conhecido como sal de Eschenmoser (GUENOUN *et al.*, 1997). Nesta metodologia, o sal de Eschenmoser e seus análogos são preparados separadamente e isolados, podendo ser armazenados por longos períodos. Diante disso, a reação com o sal imínio é rápida e pode ser feita sob condições reacionais suaves, com a utilização de solventes apróticos, o que permite o controle da regioespecificidade da reação.

Certos compostos carbonílicos reagem diretamente com sais imínio sem necessitar de ativação ou catálise. Timmons *et al.* (2005) demonstraram que a condensação de uma cetona com o sal de imínio resulta na β -aminocetona como único regioisômero em bons rendimentos.

2.6 PIRAZÓIS

Os pirazóis são compostos heterocíclicos que contêm dois átomos de nitrogênio adjacentes na sua estrutura e apresentam anéis compostos por cinco membros. Compostos contendo anéis do tipo pirazol são muito raros na natureza. O primeiro derivado natural, o 3-nonilpirazol (**33**), foi identificado em 1954 por investigadores japoneses. O composto foi isolado a partir da planta *Houttuynia Cordata* (típica da Ásia tropical) e revelou propriedades antimicrobianas. Posteriormente foi identificado um aminoácido contendo um núcleo pirazol a partir da planta *Citrullus Vulgaris*, o β -(1-pirazolil)alanina (**34**). Além destes o antibiótico formicina A[®] produzido pelo fungo *Streptomyces candidus* corresponde ao composto 7-amino-3-(β -D-ribofuranosil)pirazol[4,3-d]pirimidina (**35**) (Figura 16) (BEHR *et al.*, 1967).

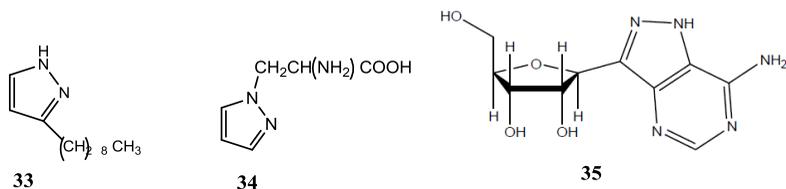


Figura 16. Estrutura de 3-nonilpirazol (**33**), β -(1-pirazolil)alanina (**34**) e 7-amino-3-(β -D-ribofuranosil)pirazol[4,3-d]pirimidina (**35**).

Os vários estudos que podem ser efetuados com pirazóis, no que tange à sua estrutura e geometria molecular, em nível de sua reatividade em síntese orgânica, e até mesmo relativamente à sua aplicação em diversas áreas, têm despertado um grande interesse nos químicos orgânicos. São várias as referências bibliográficas que nos reportam estudos sobre caracterização estrutural, tautomeria e isomeria, uso de pirazóis como ligantes em química organometálica e síntese de novos derivados bioativos (PINTO, 1996; STANOVNIK & SVETE, 2004).

Os pirazóis apresentam grande biodinamicidade e podem ser usados como agentes analgésicos, anti-inflamatórios, antipiréticos,

hipoglicêmicos, sedativos, hipnóticos, inseticidas, bactericidas, foto-estabilizadores, reguladores de crescimento de plantas e precursores na preparação de polímeros (ELGUERO, 1996; CATALÁN *et al*, 1992; CATALÁN *et al*, 1990; PALACIOS & RENATA, 1999).

Atualmente, fármacos comercializados pelos laboratórios Pfizer como o Celebrex® e o Viagra®, contêm como substâncias ativas derivados de pirazol, o sildenafil (Viagra®) (**36**) e o Celebra® (**37**) apresentados na Figura 17.

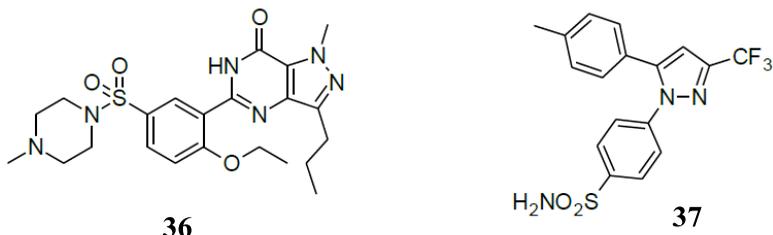


Figura 17. Estrutura do sildenafil (36) e o do celecoxib (37).

É importante destacar as atividades biológicas descritas para os pirazóis:

- agentes que atuam ao nível do sistema nervoso central (agentes antidepressivos, antipsicóticos, ansiolíticos, sedativos, hipnóticos, anticonvulsivos, analgésicos, medicamentos anti-Parkinson e anti-Alzheimer) (PINTO *et al*, 2000; ARAN *et al*, 1999)
- agentes farmacodinâmicos (agentes anti-arrítmicos, vasodilatadores, anti-hipertensivos, diuréticos, antitrombóticos, anti-alérgicos, anti-histamínicos) (ELGUERO, 1996);
- agentes de tratamento de doenças metabólicas e funções endócrinas (agentes anti-inflamatórios, anti-artríticos, hipoglicêmicos, hipolipidêmicos, anti-obesidade, hormônios peptídicos e esteróides) (ELGUERO, 1996; PINTO *et al*, 2000; KASHIMA *et al.*, 1993; ARRIETA *et al.*, 1998);
- agentes quimioterapêuticos (medicamentos usados no tratamento do câncer, agentes imunossupressores e imunostimulantes, antivirais, antibacterianos, antiparasitas, antiprotozoários e fungicidas) (POPSAVIN *et al.*, 2000).

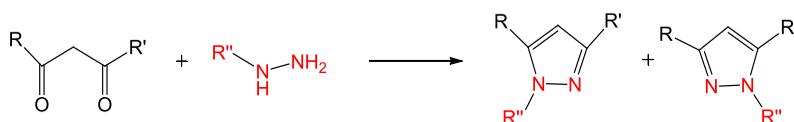
A vasta aplicabilidade dos pirazóis e seus derivados na indústria farmacêutica representa um estímulo ao desenvolvimento de novos candidatos a fármacos com propriedades terapêuticas úteis e de baixa toxicidade e tolerância com vistas à minimização de efeitos colaterais, que podem estar presentes na administração de um medicamento.

2.6.1 Síntese de pirazóis

A pequena quantidade de compostos naturais que contêm o núcleo pirazol nos leva a questionar sobre a formação de ligações heterocíclicas N-N na natureza. Alguns autores admitem que a unidade 1,3-diaminopropano deva ser o precursor do núcleo de pirazol em produtos naturais (JONES *et al.*, 1984).

As possibilidades sintéticas envolvendo o uso de pirazóis são múltiplas, e envolvem reações de ciclização, transformação de compostos heterocíclicos.

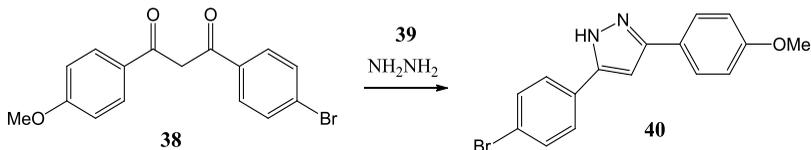
Classicamente os pirazóis podem ser sintetizados através da adição de hidrazinas monossustituídas a um composto 1,3-dicarbonílico. As reações apresentam como produtos intermediários, cetoximas ou hidrazonas. Frequentemente podem ser isolados produtos isoméricos quando se promove a reação de uma hidrazina monossustituída com o composto dicarbonílico assimétrico (Esquema 9).



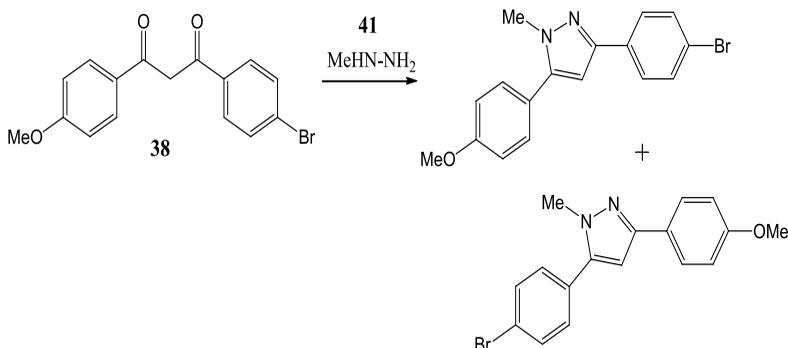
Esquema 9. Método de síntese de pirazóis.

Outra possibilidade sintética consiste na adição 1,3-dipolar de um diazoalcano a um acetileno com ligação tripla ativada pela presença de um substituinte elétron retirador. A reação de compostos β -dicarbonílicos e seus derivados (éteres, enol-éteres, acetais, enaminas, etc) com hidrazinas tem sido a metodologia mais usada para a síntese de pirazóis (PALACIOS & RENATA, 1999). Este método é extremamente rápido e quimiosseletivo. No caso de se partir de um composto β -dicarbonílico assimétrico e de uma hidrazina não substituída, é obtido apenas um único isômero (Esquema 10). A 3-(4-bromofenil)-1-(4-metoxifenil)-1,3-propanodiona (**38**) reage com a hidrazina (**39**) dando origem um isômero único, o 5-(4-bromofenil)-3-(4-metoxifenil)-1H-

pirazol (40). No entanto, quando a reatividade dos dois grupos carbonil não é significativamente diferente, podem formar-se outros regioisômeros (Esquema 11), como acontece na reação com a metil-hidrazina (41), obtendo-se os isômeros.



Esquema 10. Obtenção do 5-(4-bromofenil)-3-(4-metoxifenil)-1H-pirazol (40) a partir da reação entre 3-(4-bromofenil)-1-(4-metoxifenil)-1,3-propanodiona (38) e hidrazina (39).



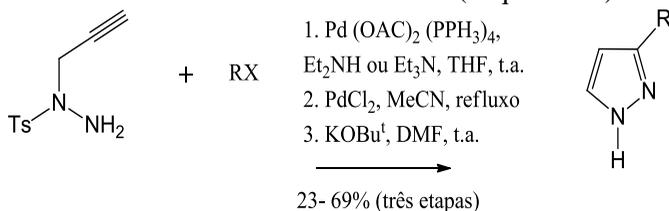
Esquema 11. Formação de dois isômeros na síntese de um pirazol.

Foram desenvolvidas propostas sintéticas pautadas no desenvolvimento de métodos de síntese seletiva de um dos dois possíveis isômeros do pirazol. Esses métodos baseiam-se na utilização de derivados funcionais de compostos β -dicarbonílicos como reagentes. Desses derivados, os mais usados são os acetais de β -cetoaldeídos, alcóxialcenos, éteres enólicos, enaminas e β -clorovinilcetonas e vários fatores poderão determinar a formação de um e/ou outro dos isômeros possíveis (HELLER e NATARAJAN, 2006; DENG, 2006).

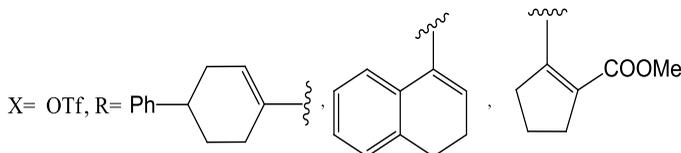
Outros métodos de síntese de pirazóis envolvem a reação de hidrazonas *N*-monossustituídas com nitro-olefinas, reações de hidrazinas com alcinos terminais, monóxido de carbono e um iodeto de arila (reações de acoplamento), reações de acoplamento C-N/hidroamidiação com catalisadores de cobre ou reações de compostos carbonílicos α,β -insaturados com hidrazinas. A síntese também pode ser

realizada a partir de epóxidos de cetonas α,β -insaturadas, de compostos carbonílicos acetilênicos ou de vários compostos heterocíclicos por reação com derivados de hidrazinas (JOULE e MILLS, 2000).

Uma estratégia baseada em reações catalisadas por paládio tem sido aplicada na síntese de uma grande variedade de 3-(5)aril/vinil-1H-pirazóis a partir de N-tosil-N-propargil hidrazinas e iodetos de vinil triflatos (JOULE & MILLS, 2000). Este processo permite a introdução de uma grande variedade de substituintes com características diversas como elétron doadores e elétron retiradores (Esquema 12).



X= I; R= Ph, 2/4-O₂NC₆H₄, 4-MeCOC₆H₄, 3-CF₃C₆H₄, 3/4- EtOOC₆H₄,
2/3-FC₆H₄, 4-MeC₆H₄, 3-HOCH₂C₆H₄, 4-MeOC₆H₄, 3/4-MeCONHC₆H₄



Esquema 12. Metodologia de síntese de pirazóis.

Pedersen et al. (2013) identificaram o sistema 4-aminometil-1-hidroxipirazol (4-AHP) como análogos bioisostéricos do muscimol, um receptor agonista do ácido gama aminobutírico (GABA). Vale salientar que um bioisostere é uma molécula resultante da troca de um átomo ou de um grupo de átomos com o objetivo de produzir uma nova molécula com propriedades biológicas semelhantes às do composto original. A substituição bioisostérica pode ser de modo físico-químico ou na superfície topológica com a finalidade de atenuar a toxicidade, modificar a atividade e/ou alterar a farmacocinética do composto.

Os análogos do muscimol (pirazóis) sintetizados e caracterizados por Pedersen et al. (2013) mostraram ser potentes agonistas (K_i 5 μ M a 3 nM) em receptores GABAérgicos. Estes compostos, então, estão sendo investigados por estes autores utilizando metodologias

quantitativas e em estudos de correlação (*docking* e QSAR). Estes estudos são de extrema relevância no que tange a obtenção de novos compostos candidados a fármacos destinados a diversas patologias ligadas ao sistema nervoso central.

2.6.2 Princípios de neurotransmissão gabaérgica

Os neurotransmissores inibitórios e excitatórios podem regular uma gama diversificada de processos do comportamento, incluindo sono, aprendizagem, memória e sensação da dor. Os neurotransmissores inibitórios e excitatórios também estão implicados em diversos processos patológicos, como a epilepsia e a neurotoxicidade. As interações entre os canais iônicos, os receptores que regulam esses canais e os neurotransmissores de aminoácidos no sistema nervoso central (SNC) constituem a base molecular desses processos (BRETON & STUART, 2009).

O SNC apresenta altas concentrações de determinados aminoácidos que estão habilitados a se ligar a receptores pós-sinápticos, atuando, assim, como neurotransmissores inibitórios ou excitatórios. Das duas classes principais de aminoácidos neuroativos, o ácido γ -aminobutírico (*Gamma-AminoButyric Acid*- GABA) é o principal aminoácido inibitório, enquanto o glutamato é o principal aminoácido excitatório.

O GABA desempenha um papel importante na regulação da excitabilidade neuronal ao longo de todo o sistema nervoso. Nos seres humanos, o GABA também é diretamente responsável pela regulação do tônus muscular. Em espécies de insetos o GABA atua apenas em receptores excitatórios nos nervos (WATANABE *et al.*, 2002).

Atualmente são conhecidas três classes de receptores GABA. Destes, o GABA_A e GABA_C, são receptores ionotrópicos, nos quais os neurotransmissores se ligam, mudando sua forma tridimensional e abrindo o canal iônico (parte do próprio receptor), ou seja, é uma ativação do canal pelo próprio neurotransmissor. O GABA_A é constituído de 5 subunidades (Figura 18) e o GABA_B constituído a partir de 2, GABA_{B1} e GABA_{B2} (Figura 19).

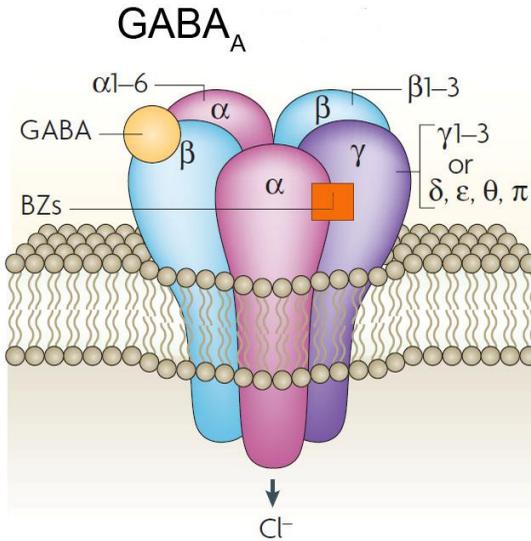


Figura 18. Estrutura do receptor GABA_A. Fonte: Jacob et al. (2008).

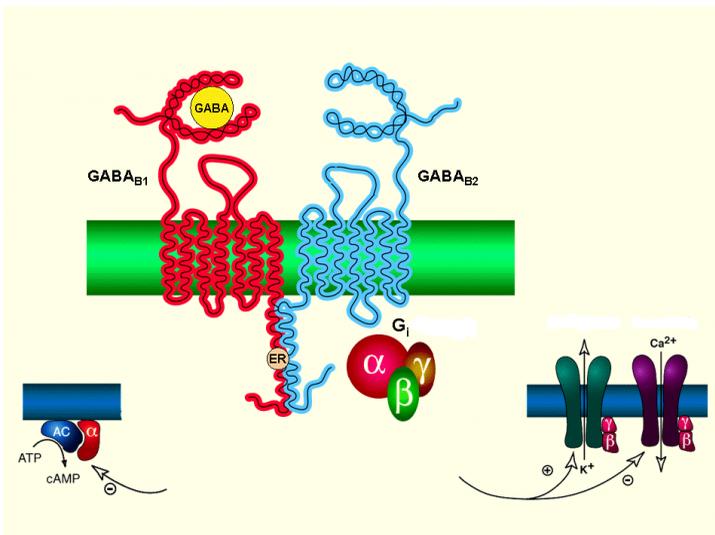


Figura 19. Estrutura do receptor GABA_B. Fonte: Jacob et al. (2008).

Já o GABA_B é um receptor metabotrópico, que não é um canal iônico e ao ser ativado, desencadeia reações intercelulares que ativam os

canais iônicos. Este receptor está convenientemente ligado a uma proteína G (Figura 20).

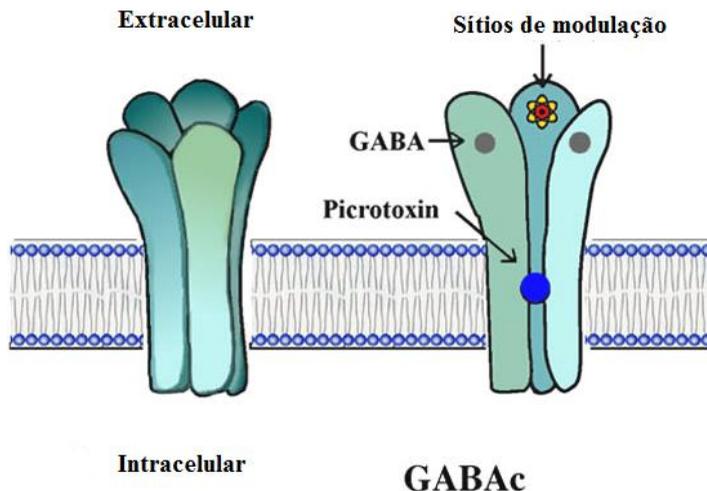


Figura 20-Estrutura do receptor GABA_A. Fonte: Jacob et al. (2008).

Os agentes farmacológicos que atuam sobre a neurotransmissão gabaérgica atuam, em sua maioria, sobre o receptor GABA_A ionotrópico e afetam o metabolismo do GABA ou a atividade e seu receptor. Os receptores GABA_A são regulados por diversas classes de fármacos, que interagem com os sítios de ligação do GABA ou com sítios locais onde se ligam de forma não-covalente um modulador alostérico (STUART et al, 2009). Vale ressaltar que o termo alostérico refere-se a qualquer alteração na estrutura terciária ou quaternária de uma [enzima](#) induzida pela ação de uma [molécula](#) ligante, que pode ser um ativador, um inibidor, um substrato, ou as três opções.

Os agentes terapêuticos que ativam os receptores GABA_A são utilizados para sedação, ansiedade, hipnose, neuroproteção após acidente vascular cerebral ou traumatismo crânio-encefálico e controle da epilepsia. Dos agentes farmacológicos que modulam a neurotransmissão gabaérgica, os benzodiazepínicos e os barbitúricos são as classes de fármacos de grande importância clínica.

Do ponto de vista farmacológico, a síntese do GABA não apresenta utilidade, uma vez que este é bastante hidrofílico o que impede sua passagem através da barreira hemato-encefálica, já que esta

é lipofílica. Isto justifica e incentiva a síntese de bioisósteres e análogos do GABA que possam atuar nos receptores específicos, mantendo a atividade desejada.

2.7 SULFONAMIDAS

As sulfonamidas são compostos que apresentam a estrutura geral $R-SO_2-NR'R''$, cuja variação dos grupos R produz compostos com propriedades físicas, químicas e farmacológicas diferentes (RANG et al. 1997). Investigações quimioterapêuticas das sulfonamidas tem sido desenvolvidas desde 1935, quando Domagh descobriu que o corante vermelho, denominado Prontosil (III) era eficaz contra infecções estreptocócicas. Este é considerado um marco no que tange à gênese de antibióticos. O interessante é que este composto era ineficaz em testes *in vitro*, mas que apresentava uma alta atividade *in vivo*. Um ano depois, Ernest Fourneau demonstrou que o Prontosil (III), no organismo sofre degradação e forma sulfanilamida e, que este composto era, na realidade, o agente ativo contra os estreptococos. Esta publicação incentivou novos trabalhos pautados na procura de agentes cada vez mais potentes. Os melhores resultados até então, foram aqueles obtidos quando o hidrogênio do grupo $-SO_2NH_2$ era substituído por outro grupo, comumente um heterociclo, como os êxitos obtidos para sulfapiridina (42), sulfametoxazol (43), sulfatiazol (44), sulfadiazina (45) e sulfacetamida (46) (Figura 21):

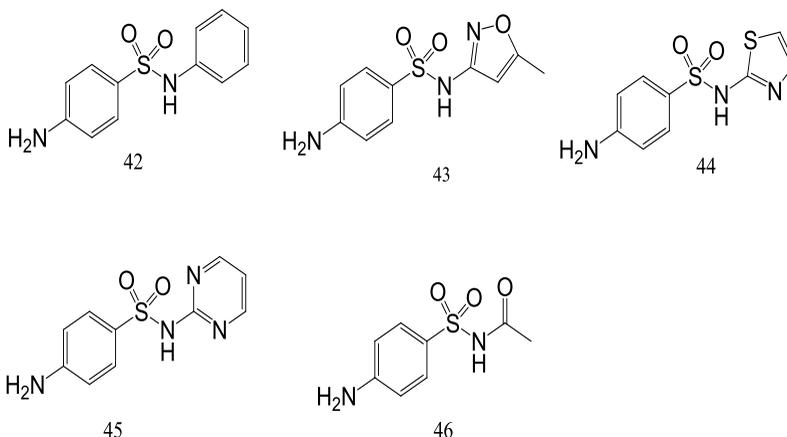


Figura 21-Sulfonamidas de grande importância na terapêutica antibiótica.

As sulfonamidas são largamente utilizadas no tratamento de infecções bacterianas. Elas têm sido utilizadas no tratamento de diversas patologias envolvendo *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pasteurella coli*, *Diplococcus pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurim*, *Salmonella schottmulleri*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus antracis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*. Ainda apresentam elevada eficiência contra as cepas de *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Aproximadamente cerca de 150 diferentes sulfonamidas são comercializados, como agentes antibacterianos, sendo que as modificações são efetuadas principalmente para aumentar a potência, obtendo um espectro antibacteriano mais amplo e maior solubilidade ou ação prolongada (RANG *et al.* 1997).

As sulfas de um modo geral apresentam baixa solubilidade em água, mas seus sais, principalmente, de sódio são rapidamente solubilizados. Todos os requisitos estruturais para a ação antibacteriana estão reunidos na própria sulfonamida. Em relação ao grupo $-SO_2NH_2$ é importante que o enxofre esteja diretamente ligado ao anel benzênico. O substituinte $p-NH_2$ no anel benzênico ligado ao enxofre é essencial e só pode ser substituído por radicais capazes de serem convertidos *in vivo* em grupo amino livre. As substituições feitas no grupo amino NH_2 possuem efeitos variáveis sobre a atividade antibacteriana da molécula. Todavia, a substituição dos núcleos aromáticos heterocíclicos no grupamento amino produz compostos altamente potentes (GOODMAN, 1996).

2.7.1 Mecanismo de ação das sulfonamidas

A atividade biológica das sulfonamidas está intimamente ligada à competição com o ácido *p*-aminobenzóico (PABA) (47) na síntese do ácido fólico (48) (RANG *et al.* 1997). De acordo com o mecanismo de ação, as sulfas podem ser classificadas como sulfas de ação curta, com meia-vida variando entre 5 e 15 horas, devendo ser administradas entre 4 e 6 horas, sulfas de ação prolongada, de meia-vida variando entre 35 e 40 horas e sulfas de ação ultraprolongada, possuindo uma meia vida de até 179 horas, como no caso da sulfadoxina (49) (Figura 22).

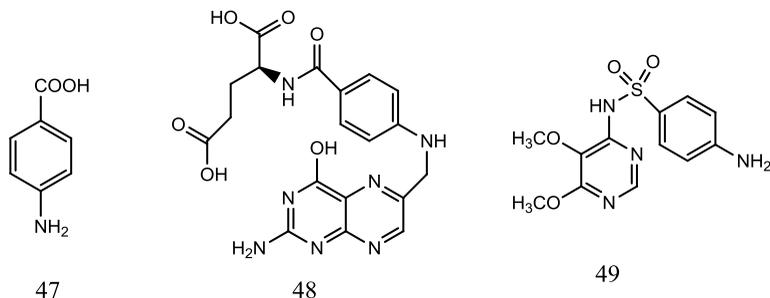
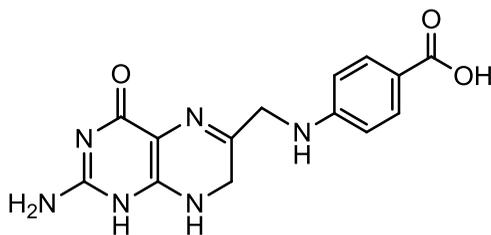


Figura 22. Fórmula estrutural do ácido p-aminobenzóico (PABA) (47), do ácido fólico (48) e sulfadoxina (49).

Para uma grande diversidade de organismos vivos o ácido fólico (48) é essencial para o desenvolvimento da célula. Para os seres humanos, o ácido fólico é uma vitamina que é essencial ao metabolismo animal requerida em pequenas quantidades. Muitas bactérias não requerem a fonte externa de toda a molécula do ácido fólico para o crescimento, mas apenas a porção que contém o PABA. As sulfonamidas são estruturas análogas ao ácido *p*-aminobenzóico e inviabilizam o desenvolvimento de muitas bactérias pela inibição competitiva de enzimas responsáveis pela incorporação do ácido p-aminobenzóico durante a biossíntese do ácido fólico.

Além disto, o ácido diidropteróico (50) é um intermediário na formação do ácido fólico (Figura 23) necessário ao metabolismo animal e das bactérias. Nas bactérias, é produzido através da condensação enzimática da pteridina e PABA. Neste sentido, a sulfonamida e seus derivados podem atuar como falsos substratos na reação enzimática, bloqueando a reação pela ocupação do local requerido pelo PABA. A ausência do ácido fólico acarreta a morte das bactérias.



50

Figura 23-Fórmula estrutural do ácido diidropteróico (50).

Não é novidade que as sulfonamidas e o PABA competem antagonicamente em certos processos metabólicos. Isto se deve a semelhança estrutural, para os quais há grande proximidade na distância interatômica entre os átomos de oxigênio nos grupos carbóxi e sulfonil e também, na distância entre os grupos oxigenados e o grupamento amina, conforme Figura 24:

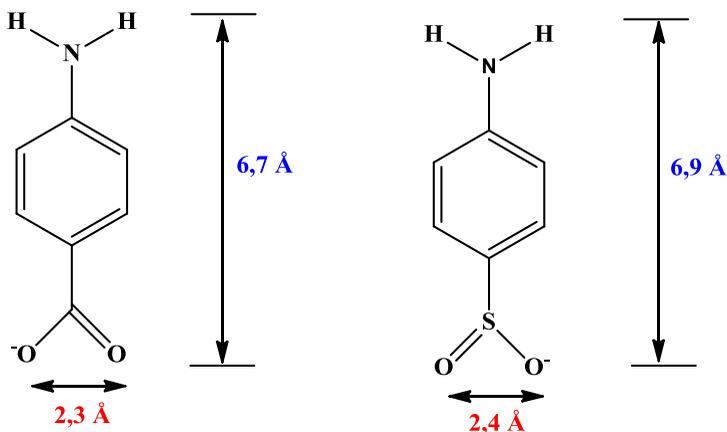


Figura 24-Distâncias interatômicas, em Angstroms, no ácido p-aminobenzóico e na sulfonamida respectivamente.

Desta forma, as sulfas de um modo geral não apresentam efeitos sobre os seres humanos, que não biosintetizam o ácido fólico, mas são prejudiciais a muitas bactérias e outros microorganismos.

2.7.2 Estrutura e atividade das sulfas

Alguns parâmetros físicos e químicos têm sido correlacionados com a atividade biológica das sulfonamidas tais como o pKa, ligação com proteínas, distribuição de carga eletrônica, etc. Quanto maior for o conjunto de parâmetros melhor será a explicação da atividade com melhores padrões de correlação.

Bell e Roblin (1942) demonstraram que a atividade antibacteriana das sulfonamidas está intrinsecamente ligada ao pKa do grupo sulfônico, para o qual se observou melhor atividade entre os valores de pH entre 6,0 e 7,5. De acordo com alguns autores, este é o pH de atividade máxima, pois as sulfonamidas penetram na parede celular como moléculas não dissociadas, mas atuam na forma ionizada. Vale

ressaltar que a hipótese de que somente a acidez ou ionização não explicam sozinhas a atividade das sulfonamidas. Para Cammarata e Allen (1967) há poucas evidências que sustentem a atividade máxima das sulfas definida em um intervalo máximo de pH próximo ao pKa do composto, já que algumas são altamente potentes em faixas diferentes de pH, especialmente aquelas que apresentam substituintes elétron retiradores na estrutura do sistema aromático.

Outra explicação para a ação das sulfonamidas é que estas se ligam de várias formas às proteínas plasmáticas para exercer sua atividade. Grande parte das ligações é estabelecida com os sítios básicos presentes nos resíduos de arginina, histidina e lisina da proteína. Nas sulfonamidas, estão envolvidos nas ligações os grupos alquílicos, alcoílicos, alquiltiólicos, halogênicos, arílicos e substituintes presentes no anel. Obviamente a porcentagem de ligação às proteínas é variável. Como exemplo, a sulfadimetoxina (51) (Figura 25) é fortemente ligada às proteínas plasmáticas (99,5-99,8%) enquanto a sulfaguanidina (52) apresenta uma baixa porcentagem de ligação, em torno de 5%.

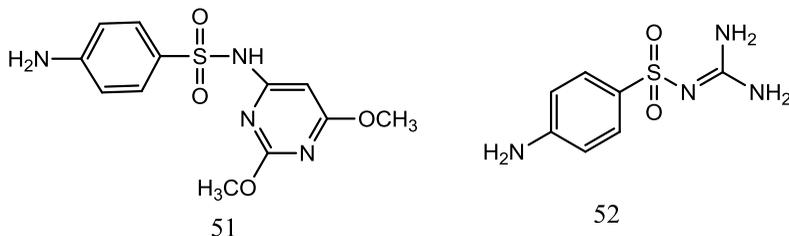


Figura 25-Fórmula estrutural da sulfadimetoxina (51) e da sulfaguanidina (52).

2.7.3 A reação de clorossulfonação em sistemas aromáticos

A reação de clorossulfonação tem sido investigada nas últimas décadas envolvendo principalmente espécies eletrofílicas (NUNES, 1986; BASSIN et al, 1991; PRATES, 1992).

Do ponto de vista termodinâmico quando um composto aromático (ArH) reage com quantidade equimolar de ácido clorossulfônico (ClSO₃H), a primeira etapa fornece o ácido arilsulfônico correspondente (ArSO₃H). Na presença de um excesso de reagente, porém, o ácido arilsulfônico é lentamente convertido no cloreto de sulfonila (ArSO₂Cl) correspondente, com liberação de ácido sulfúrico (YASNITSKII, 1953) (Esquema 13).

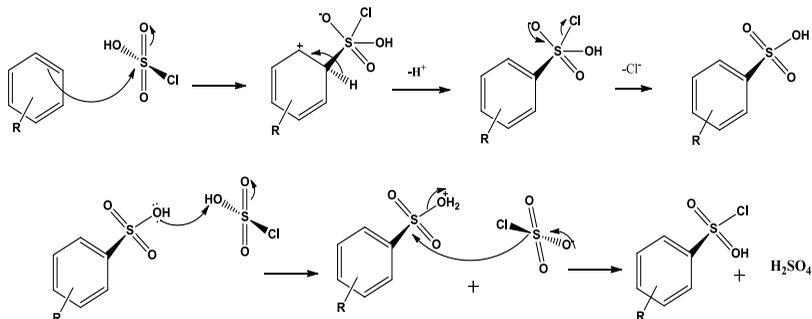


Esquema 13- Equações de síntese de cloretos de sulfonila.

A investigação do mecanismo da reação entre o benzeno e o ácido clorossulfônico em quantidades equimolares demonstrou que o produto majoritário foi o ácido benzenossulfônico (Eq. 1, Ar = C₆H₅, Esquema 13), juntamente com pequena quantidade de difenilsulfona ((C₆H₅)₂SO₂). Já com excesso de reagente, o cloreto de benzenossulfonila foi obtido (Eq. 2, Ar = C₆H₅, Esquema 13) (CHIZHIK e PASSET, 1975).

A reação de formação do cloreto de sulfonila (Eq. 2) foi investigada com diferentes substratos, sendo que para alguns destes observou-se reversibilidade da mesma (SPRYSKOV e KUZMINA, 1958). Isto significa que as condições experimentais devem ser ajustadas para se atingirem bons rendimentos dos produtos desejados. Uma alternativa viável é a utilização de um excesso de ácido clorossulfônico, com a finalidade de deslocar o equilíbrio no sentido da formação do produto desejado (NUNES, 1986; BASSIN et al, 1991; PRATES, 1992). Para esta reação observou-se que os rendimentos são otimizados quando se utiliza 5 equivalentes do ácido clorossulfônico para 1 equivalente do substrato e quando a reação é feita em baixas temperaturas com desaparecimento gradual do substrato (PRATES, 1992).

O mecanismo da reação de clorossulfonação investigado por Nunes (1986) e Prates (1992) é apresentado no Esquema 14:



Esquema 14-Mecanismo da reação de clorossulfonação.

Há uma grande variedade de metodologias para as reações de clorossulfonação decorrentes de diferentes substratos (GILBERT, 1977). Se houver a presença de substituintes doadores de elétrons no anel aromático, as reações seguem um caminho reacional em condições brandas, sendo a substituição orientada nas posições *orto* e *para*. Assim, um excesso relativamente pequeno de ácido clorossulfônico (mínimo de 2 equivalentes) é necessário a baixas temperaturas ($- 5^{\circ}\text{C}$ a 30°C), tanto na presença quanto na ausência de solvente. Da mesma forma, a presença de grupos substituintes retiradores de elétrons diminuem a possibilidade de ocorrência de reações de clorossulfonação. Essas reações passam a necessitar de elevadas temperaturas ($100 - 150^{\circ}\text{C}$), levando à sulfonação na posição *meta* (WAGNER e ZOOK, 1965).

A purificação de cloretos de arilsulfonila envolve a adição de água gelada, seguida de rápida filtração, ou a purificação pode ser feita ainda, por extração com solventes orgânicos. Os ácidos sulfônicos, que podem ser formados na reação, são solúveis em água. Contudo, os cloretos de arilsulfonila são, em geral, de difícil purificação e caracterização devido à sua alta reatividade, sendo muito sensíveis à umidade que leva à sua decomposição. Devido a sua alta reatividade, a caracterização dos cloretos de sulfonila substituídos deve ser realizada a partir do tratamento com reagentes nucleofílicos, como por exemplo, aminas, álcoois, fenóis, hidrazinas e azidas (NUNES, 1986). As sulfonamidas resultantes desta reação, após recristalização, são geralmente sólidos cristalinos bem definidos (ANDERSON, 1982).

2.8 ELETROQUÍMICA EM QUÍMICA MEDICINAL

Estudos envolvendo a transferência de elétrons são úteis à compreensão de vários processos que podem acontecer no meio biológico, o que possibilita o desenvolvimento de pesquisa nas áreas farmacêutica, toxicológica, bioquímica e biomédica.

Existe uma gama de similaridades entre as reações eletroquímicas e enzimáticas, no que tange aos processos de transferência de elétrons, como a natureza heterogênea (interface eletrodo-solução e enzima-solução); os processos podem acontecer tanto em meio prótico, para simular as regiões e condições hidrofílicas como citoplasma e meio intercelular, quanto aprótico, na tentativa de simular as regiões lipofílicas, tais como membranas, retículos endoplasmáticos e sítios ativos enzimáticos (MOURA, 2008).

Os mais importantes processos que ocorrem fisiologicamente são governados e estimulados por cadeias oxido-redutivas como a cadeia de

transporte de elétrons nas mitocôndrias e o processo de neurotransmissão. As enzimas redox que catalisam os processos de oxidação e redução são onipresentes nos organismos vivos. O ambiente redox é mantido por um complexo número de proteínas, peptídeos e genes e é baseado numa série de transformações redox e não redox, catalisadas ou não por enzimas, sendo que qualquer alteração neste equilíbrio pode causar alteração na homeostase celular e em outros ambientes (MOURA, 2008).

A eletroquímica estuda as reações redox cujos potenciais de redução ou oxidação de determinadas substâncias podem fornecer informações sobre a viabilidade de processos de transferência de elétrons (TE) *in vivo* ou *in vitro*.

Na tentativa de simular as condições celulares devem ser considerados o conteúdo de oxigênio na célula e sua participação em rotas metabólicas alternativas e laterais, o valor do pH e a temperatura na qual se desenvolve o experimento (HILLARD et al., 2008). Obviamente os comportamentos eletroquímicos são diversificados mesmo para uma determinada classe de substâncias, uma vez que mudanças estruturais afetam as curvas voltamétricas de diferentes maneiras. As alterações estruturais dos compostos podem causar deslocamento dos potenciais de oxirredução, mudanças no sentido eletródico, a reversibilidade química e a cinética reacional. Em termos qualitativos, a presença de substituintes eletrodoadores dificulta o processo de redução e grupos eletroretiradores facilitam este processo. Os substituintes eletroretiradores diminuem a energia do LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*- Orbital Molecular Desocupado de Mais Baixa Energia) facilitando assim a transferência de elétrons do eletrodo para a substância eletroativa, por um processo de redução. Os substituintes eletrodoadores aumentam a energia do LUMO, dificultando a transferência para esse orbital.

A oxidação envolve os elétrons que estão no HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*- Orbital Molecular Ocupado de Mais alta Energia), para a qual os substituintes influenciam a reação eletródica na direção oposta, uma vez que os substituintes eletrodoadores facilitam o processo de oxidação por aumentar a densidade eletrônica no orbital, enquanto os eletroretiradores a dificultam (ZUMAN, 1967).

Entre os mais importantes aspectos eletroquímicos, associados aos potenciais biomédicos a serem estudados, estão transferência de elétrons-extresse oxidativo (TE-EO), produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) e alquilação biorredutiva.

Neste contexto, determinou-se o potencial de oxirredução dos compostos sintetizados neste trabalho com intuito de estabelecer correlações com as atividades investigadas, em especial a atividade antioxidante.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Sintetizar derivados da lausona, carvacrol, 1-hidroxi-pirazol e investigar suas atividades biológicas

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar adutos a partir de reações de Mannich entre a lausona, diferentes aldeídos e diferentes aminas.
- Sintetizar uma série de compostos diméricos derivados da lausona.
- Sintetizar uma série de sulfonamidas derivadas do carvacrol.
- Sintetizar e otimizar metodologias sintéticas para análogos de 1-hidroxi-pirazóis.
- Caracterizar os compostos sintetizados através de métodos físicos-químicos e espectroscópicos: ponto de fusão, infra-vermelho, ressonância magnética de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas.
- Submeter os compostos sintetizados a análises de voltametria cíclica em meio aprótico e estudar o efeito dos diferentes grupos presentes na estrutura dos compostos no deslocamento dos potenciais redox.
- Avaliar a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados através do método de sequestro de radicais livres DPPH, verificação do potencial redutor do íon férrico, complexação do íon ferroso e redução do molibdênio.
- Determinar os potenciais de meia onda e a intensidade da corrente para correlacionar a atividade antioxidante com a voltametria cíclica.
- Avaliar o potencial inibitório dos compostos sintetizados frente à enzima acetilcolinesterase.
- Verificar o potencial antimicrobiano dos compostos através de testes antibacterianos e antifúngicos.
- Submeter alguns dos compostos sintetizados a outros ensaios de atividades biológicas, tais como antinociceptiva, leishmanicida e anti-hiperglicêmica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Síntese e caracterização dos compostos

4.1 SÍNTESE DOS ADUTOS DE MANNICH DERIVADOS DA LAUSONA

A reação de Mannich é um dos mais importantes métodos para a formação de ligação carbono-carbono. Como dito anteriormente, na revisão bibliográfica desta tese, do ponto de vista sintético, a metodologia clássica pode apresentar algumas desvantagens. Grande parte dos trabalhos encontrados na literatura emprega condições drásticas como a utilização de meio fortemente ácido ou básico, altas temperaturas e necessidade de ambiente reacional com atmosfera inerte. As reações de Mannich clássicas em geral estão acompanhadas de baixo rendimento, principalmente quando o produto formado não se encontra no estado sólido. Além disto, em geral, apresentam longo tempo reacional, devido à baixa concentração do sal de imínio formado *in situ* (NEVES, 2007).

Neste trabalho, investigaram-se variações da metodologia clássica da reação de Mannich com utilização de modificações sintéticas que visavam às condições reacionais mais simples, menor número de etapas, com utilização de reagentes de menor custo e com a menor geração de resíduos possível, com vistas a um procedimento sintético elegante e de menor impacto ambiental. Investigou-se o emprego de reações sem a utilização de aquecimento, realizadas sem a necessidade de atmosfera inerte e que utilizam etanol como solvente de forma a minimizar os custos operacionais e a geração de resíduos de grande toxicidade.

Na tentativa de se obter uma base de Mannich a partir da lausona e diferentes aldeídos e amina, com alto rendimento do produto e condições reacionais mais brandas, realizou-se um estudo sistemático dos métodos de obtenção para os quais as condições reacionais foram variadas.

Reação teste 1. Na primeira metodologia adotada reagiu-se o aldeído (1,2 mmol) e a amina (1 mmol) em 5 mL de EtOH, durante 30 min. Esta solução foi adicionada a uma solução de 1 mmol de lausona em 15 mL de EtOH, de cor amarela, que imediatamente ficou vermelha, provavelmente devido à reação ácido-base que origina o sal de amônio derivado da amina e o lausonato. Após 24h de reação a 25 °C,

contrariamente ao que está descrito na literatura, no caso da reação com várias aminas (BARAMEE et al.; 2006) o produto desejado não precipitou. Entretanto, a cromatografia em camada delgada (CCD) da reação indicou que a lausona havia sido consumida e que se formaram dois compostos de difícil separação e purificação.

Reação teste 2: Na segunda metodologia, a reação foi repetida invertendo-se a ordem de adição dos reagentes, mas mantendo-se constantes as concentrações dos mesmos. Reagiu-se a amina com a lausona e, após 30 min adicionou-se o aldeído. Desta vez, ocorreu a precipitação de um composto em baixo percentual de rendimento após 24h de reação a 25 °C. Ao se evaporar o filtrado, obteve-se, um óleo de cor laranja contendo vários produtos, de acordo com a CCD em MeOH. A tentativa de separar os produtos por cromatografia em coluna usando acetato de etila resultou em duas frações ainda impuras.

Reação teste 3: Seguindo outra metodologia descrita na literatura pelos mesmos autores anteriormente mencionados, realizou-se, então, a reação utilizando uma concentração de todos os reagentes quatro vezes maior que nas tentativas anteriores. Aqueceu-se a solução contendo lausona e a amina durante 5 min a 45 °C para total solubilização. Em seguida, adicionou-se o aldeído. Houve formação de um sólido de coloração violeta passando depois a preta, cujas análises espectroscópicas indicaram se tratar de um produto de decomposição.

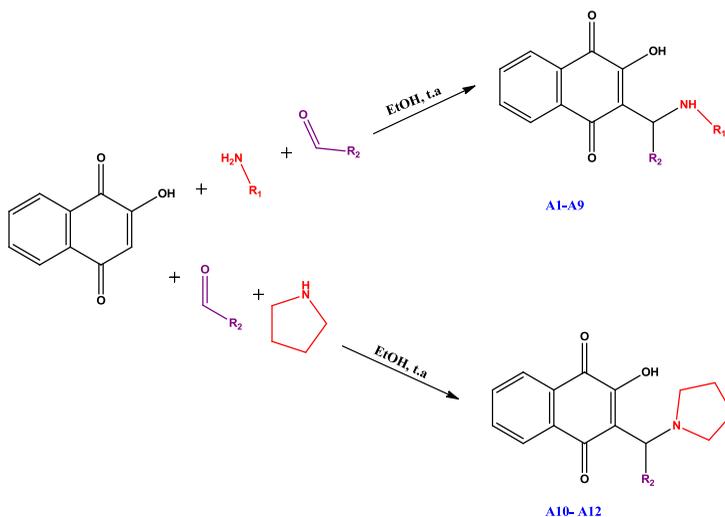
Reação teste 4: Na quarta tentativa, adicionou-se a lausona sólida em pequenas porções, durante 45 min, a uma solução contendo a amina (11 mmol) e o aldeído (12 mmol) em 15 mL de EtOH. As soluções apresentaram coloração vermelha após intervalo médio de 5 horas de reação sem a formação de precipitados. Evaporou-se o solvente e se obteve um óleo laranja avermelhado. Não foi possível separar os produtos através de cromatografia em coluna de sílica gel utilizando a mistura de solventes acetato de etila e hexano com polaridade crescente até o acetato de etila puro. O uso de metanol como eluente levou à decomposição da mistura. Constatou-se, então, que não seria viável purificar este tipo de composto por cromatografia em coluna.

Reação teste 5: Testou-se também um procedimento descrito na literatura (DALGLIESH, 1949) em que se prepara uma solução saturada contendo a lausona e a amina (1:1). Aquece-se a mistura e, em seguida,

adiciona-se o aldeído. Este procedimento levou à formação do mesmo produto de decomposição, formado no procedimento 3.

Reação teste 6: Seguindo metodologia de Baramee *et al.* (2006) com algumas modificações, o melhor rendimento foi obtido quando se usou excesso de 10% da amina e 20% do aldeído, em relação à lausona, possivelmente porque o excesso da amina mantém a lausona na forma de lausonato, favorecendo o ataque ao íon imínio, cuja formação, por sua vez, é favorecida pelo excesso do aldeído. Neste trabalho utilizou-se concentração de 1,15 mmol da lausona em 20 mL de EtOH. A reação foi realizada à temperatura ambiente, durante o intervalo de 24 horas e sem a incidência de luz, pois naftoquinonas, em geral, são fotossensíveis, para obtenção dos produtos A1- A12 (Esquema 15):

As condições ideais de concentração dos reagentes, temperatura e tempo de reação foram estabelecidas desta forma e obteve-se um produto estável, puro e em bom rendimento (Tabela 1).



Esquema 15-Formação dos adutos de Mannich A-1 a A-12.

Tabela 1-Resultados das reações de síntese dos adutos de Mannich derivados da lausona (A-1 a A-12).

Aduto de Mannich	R ₁	R ₂	P.M. (g/mol)	P. F. (°C) experimental	P.F . (°C) lit.	Ren d. (%)	Nº Registro CHEMCATS
A-1	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	-C ₆ H ₅	369,41	119,5	nd	52,0	1259091-75-2
A-2 ^a	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	-C ₆ H ₅	400,38	142,0	-	92,0	-
A-3 ^a	-C ₆ H ₅	2-OH C ₁₀ H ₇ O (naftil)	421,44	102,5	-	93,0	-
A-4 ^a	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	2-OH- C ₁₀ H ₇ O (naftil)	466,44	146,0	-	76,0	-
A-5 ^a	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	2-OH- C ₆ H ₄	385,41	118,0	-	87,4	-
A-6 ^a	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	2-OH- C ₆ H ₄	416,38	154,0	-	57,0	-
A-7 ^a	2,4-diNO ₂ -PhHidrazina	2-OH- C ₆ H ₄	476,40	210,0	-	73,1	-
A-8 ^a	2,4-diNO ₂ -PhHidrazina	-C ₆ H ₅	460,40	178,0-179,2	-	74,0	-
A-9 ^a	2,4-diNO ₂ -PhHidrazina	2-OH- C ₁₀ H ₇ O (naftil)	526,45	228,0-229,0	-	73	-
A-10 ^a	Pirrolidina	2-OH- C ₆ H ₄	349,38	136,1-137,2	-	44	-
A-11 ^a	Pirrolidina	2-OH- C ₁₀ H ₇ O (naftil)	399,44	143,2	-	40	-
A-12 ^a	Pirrolidina	-C ₆ H ₅	333,38	129,1	-	40	-

CHEMCATS= número de registro no CAS, obtido através do SciFinder. ^a Aduto de Mannich inédito, nd; não determinado

Com exceção ao composto A-1, todos os compostos desta série são inéditos.

Na sequência, será apresentada uma análise detalhada da caracterização do composto A-1 (2-hidroxi-3-(fenil(*p*-toluilamino)metil)naftalen-1,4-diona), obtido a partir da reação entre a lausona, *p*-toluidina e benzaldeído.

O espectro de infravermelho (I.V.) (Figura 26) foi obtido em pastilha de KBr e apresentou uma banda alargada em 3431 cm^{-1} , característica de deformação axial da ligação O-H. Uma absorção forte em 1673 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial das ligações C=O da naftoquinona. Em 3062 cm^{-1} aparece uma banda pouco pronunciada de deformação axial N-H. É possível observar também a deformação axial da ligação C-N em 1542 cm^{-1} ; a deformação axial da ligação C-N em 1274 cm^{-1} e a deformação angular fora do plano do anel benzênico em 699 cm^{-1} .

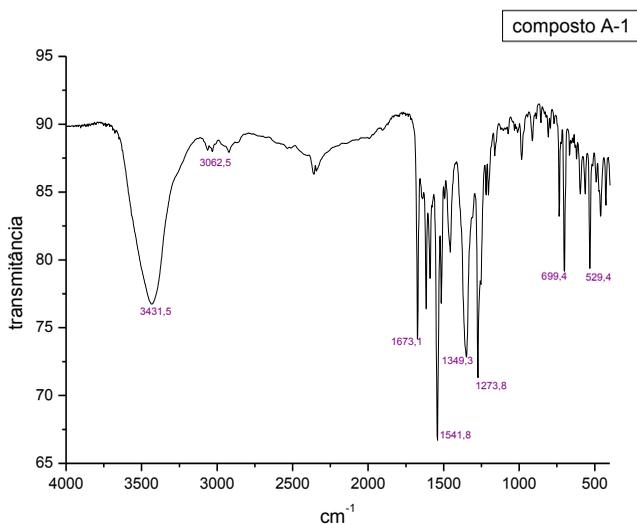
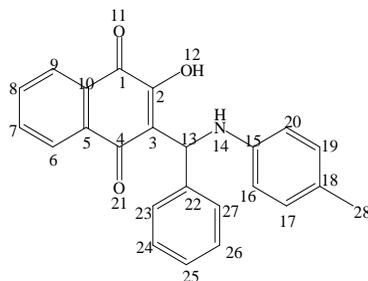


Figura 26-Espectro de I.V. do composto A-1.

O composto A-1 foi caracterizado por RMN de ^1H , a partir do qual se obtiveram os sinais esperados, compilados na Tabela 2:

Tabela 2-Análise de RMN ^1H para o composto A-1.

Hidrogênio	δ (^1H) ppm	Constante de Acoplamento (Hz)	Multiplicidade
H 9	7,95	$J_{9-8} = 7,6$	d
H8	7,93	$J_{8-7} = 4,1$ $J_{8-9} = 7,6$	dd
H7	7,92	$J_{7-8} = 4,1$ $J_{7-6} = 7,4$	dd
H6	7,89	$J_{6-7} = 7,4$	d
H23	7,79	$J_{23-24} = 7,4$	d
H27	7,77	$J_{27-26} = 7,4$	d
H24	7,74	$J_{24-23} = J_{24-25} = 7,4$	t
H25	7,72	$J_{25-26} = J_{25-24} = 7,4$	t
H26	7,68	$J_{26-27} = J_{26-25} = 7,4$	t
H16	7,15	$J_{16-17} = 6,4$	d
H20	7,11	$J_{20-19} = 5,1$	d
H19	6,96	$J_{19-20} = 5,1$	d
H 17	6,93	$J_{17-16} = 6,4$	d
H13	6,45	-	s
H28	2,48	-	s

Analisando a tabela acima e o espectro geral do composto A-1 (Figura 27), é possível observar os sinais esperados para os hidrogênios 9 e 8 em regiões de maior deslocamento químico, um dublete (7,95 ppm; $J = 7,6$ Hz) e um duplo dublete (7,94 ppm; $J = \text{Hz}$), respectivamente. Caso houvesse a utilização de um campo magnético com campo superior ao utilizado (200 MHz) e se fossem feitas modificações nas etapas de aquisição dos sinais, talvez fossem possíveis de ser visualizados os acoplamentos a longa distância 4J , que tem menores constantes de acoplamento. Estes acoplamentos são amplamente discutidos na literatura em função dos fenômenos anisotrópicos e acoplamentos em sistemas W que contribuem para a compreensão de

diversos tipos de acoplamento nos mais variados sistemas, como pode ser observado.

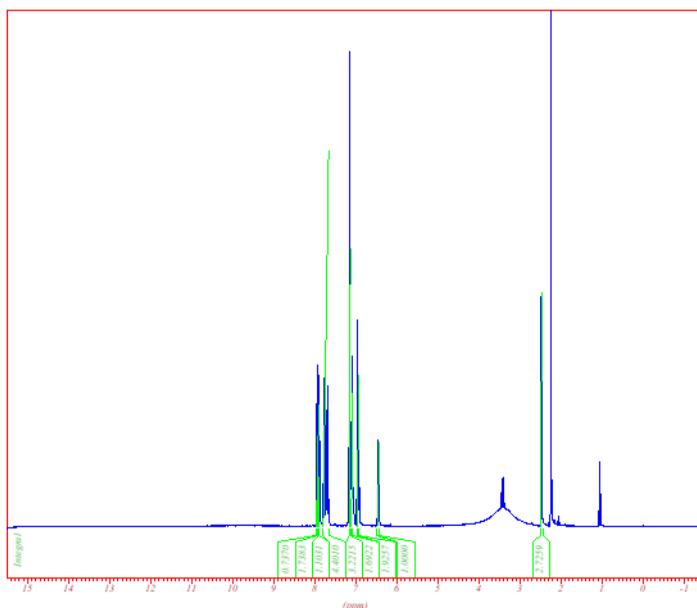


Figura 27-Espectro de RMN de ^1H para o composto A-1.

Claramente os sinais relativos aos hidrogênios ligados no núcleo naftoquinônico (H9, H8, H7 e H6) são os mais deslocados, já que se encontram próximos aos carbonos eletrofílicos das carbonilas presentes no sistema aromático, o que contribui para a diminuição da proteção eletrônica e leva o sinal para regiões de maior deslocamento químico (Figura 28).

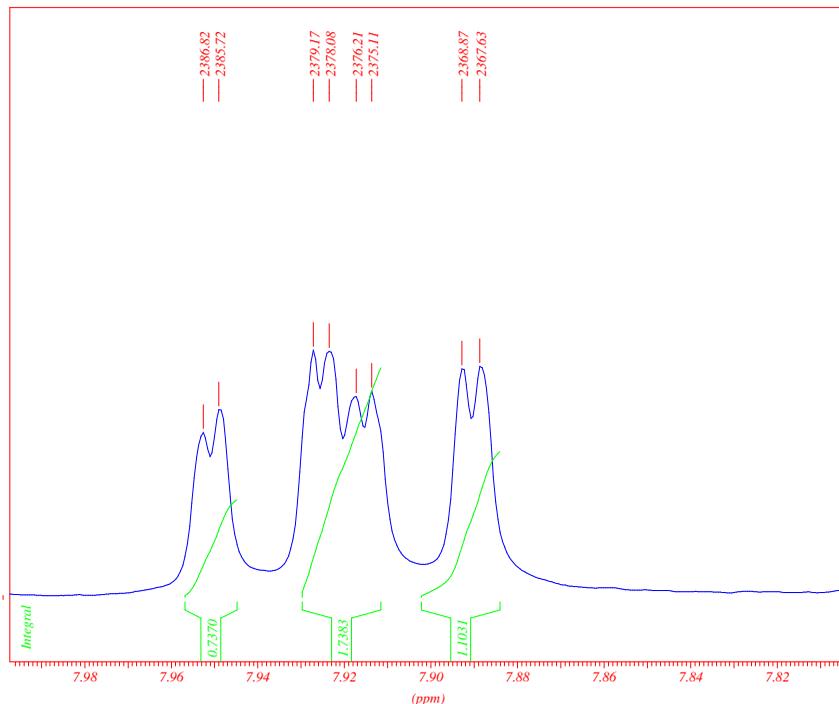


Figura 28- Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H para o composto A-1.

O sinal obtido para o hidrogênio 13, apareceu na região esperada (6,45 ppm) em função de sua ligação com o anel aromático e também por estar ligado a um átomo de considerável eletronegatividade, o átomo de nitrogênio. Este sinal característico praticamente confirma a síntese do aduto de Mannich. Para alguns compostos ao longo desta tese, será possível observar o acoplamento deste hidrogênio com o hidrogênio ligado ao nitrogênio adjacente formando um dubleto e em outros compostos não se observará o acoplamento, tendo como resultado um singleto para o hidrogênio em questão, como observado na Figura 29.

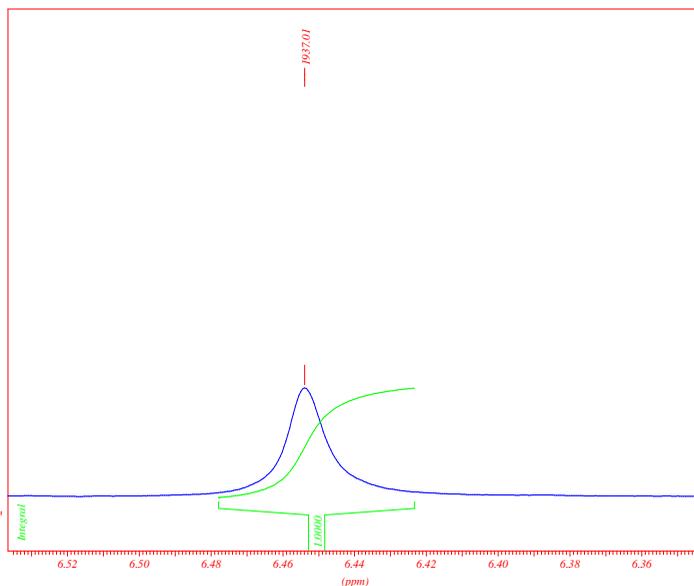


Figura 29-Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H para o composto A-1.

A presença de substituintes elétron-retiradores no anel tanto relativo ao aldeído quanto o relativo à amina irá deslocar as frequências para valores maiores, como poderá ser observado ao longo deste capítulo. Admite-se que apesar de não haver um sistema de conjugação eletrônica, o carbono sp^3 (H13) apresenta elevada acidez, o que deixa o carbono com caráter sp^2 .

Os sinais em δ 7,15 (1H, d, $J= 7,25$); 7,11 (1H, d, $J= 6,4$); 6,96 (1H, d, $J=6,4$) e 6,93 (1H, d, $J= 5,1$) foram atribuídos aos hidrogênios 16, 20, 19 e 17 respectivamente do anel aromático derivado da anilina (Figura 30).

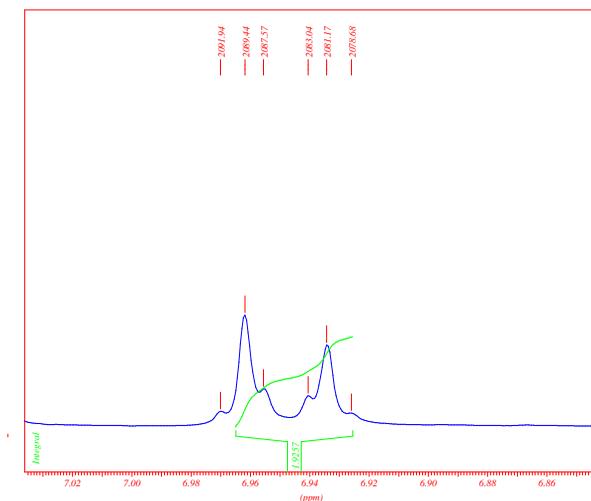


Figura 30-Expansão 3 do espectro de RMN de ^1H para o composto A-1.

Os sinais, 7,79 (1H, d, $J= 7,4$); 7,77 (1H, d, $J= 7,4$); 7,74 (1H, t, $J= 7,4$); 7,72 (1H, t, $J= 7,4$) e 7,68 (1H, t, $J= 7,4$) foram atribuídos aos hidrogênios 23, 27, 24, 25 e 26, respectivamente do anel aromático derivado do aldeído (Figura 31).

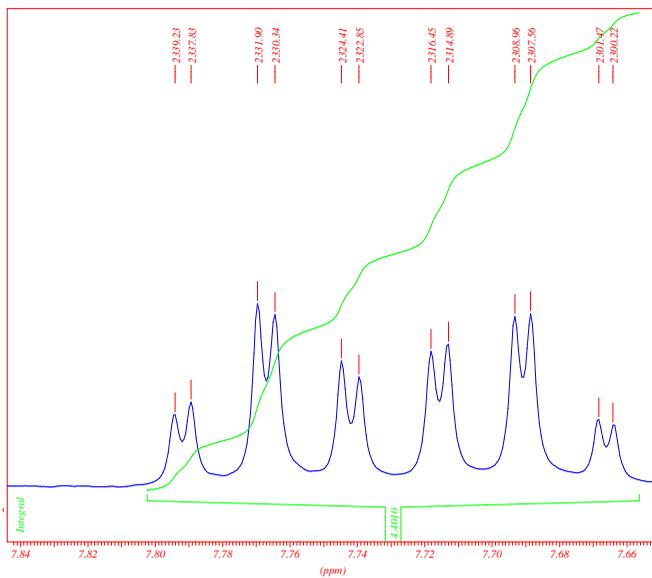


Figura 31-Expansão 4 do espectro de RMN de ¹H para o composto A-1.

O singlete em δ 2,48 foi atribuído ao hidrogênio da metila 28 (Figura 32).

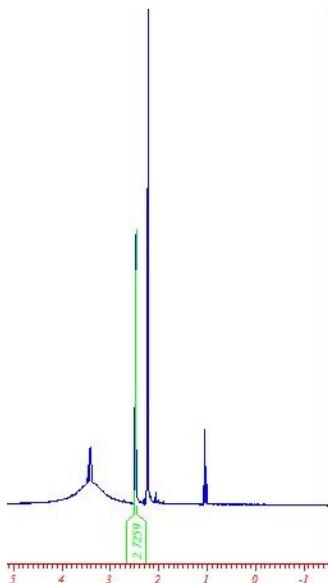


Figura 32-Expansão 5 do espectro de RMN de ^1H para o composto A-1.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 33) exibe os sinais característicos do composto A1. Ao todo, o composto apresenta 24 átomos de carbono, mas seu espectro apresenta número inferior de sinais. Este número se justifica pela existência de carbonos equivalentes, ou seja, átomos de carbono em um mesmo ambiente químico que levam a formação de um único sinal. Podem ser observados 16 sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, sendo 4 provenientes da amina, 4 do aldeído e 8 provenientes da lausona. Os outros dois sinais, em 56,5 e 20,8 ppm referem-se aos carbonos sp^3 C13 e C28 respectivamente.

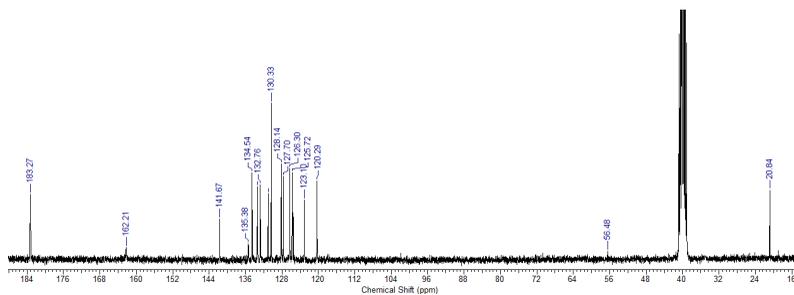


Figura 33-Espectro de RMN de ^{13}C para o composto A-1.

Para facilitar a visualização da atribuição dos carbonos aromáticos, o espectro será apresentado de forma expandida na região preterida (Figura 34).

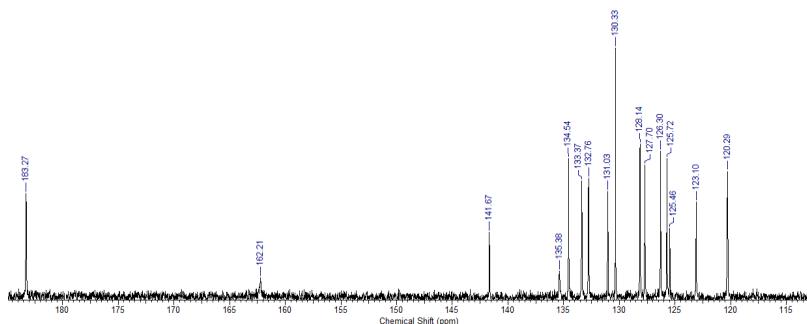


Figura 34-Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C para o composto A-1.

Através da análise da Figura 34 é possível perceber o sinal característico dos carbonos das carbonilas (1 e 4) em mesmo deslocamento químico, 183,3 ppm. O carbono 2, ligado ao grupo hidroxila, pode ser observado em 162,2 ppm. Estes átomos de carbono estão diretamente ligados a um átomo de oxigênio que, por ser muito eletronegativo, atrai sua densidade eletrônica, fazendo com que fiquem desprotegidos. O carbono 15 presente no anel derivado da amina aparece logo após em 141,7 ppm, seguido dos carbonos C8-C7 (135,4 ppm), C5 (134,5 ppm), C10 (133,4), C6 (132,8), C9 (131,0) e C3 (130,3) referentes ao núcleo naftoquinônico. Entre 128,1 e 120,3 ppm, se encontram os 7 sinais referentes aos carbonos derivados da amina e do aldeído.

Um outro sinal importante que mostra o sucesso da síntese é o sinal em 56,5 ppm referente ao carbono 13, demonstrando a efetiva formação da ligação C-C da reação de Mannich. Pode-se observar ainda o sinal referente ao carbono da metila em 20,8 ppm (Figura 35).

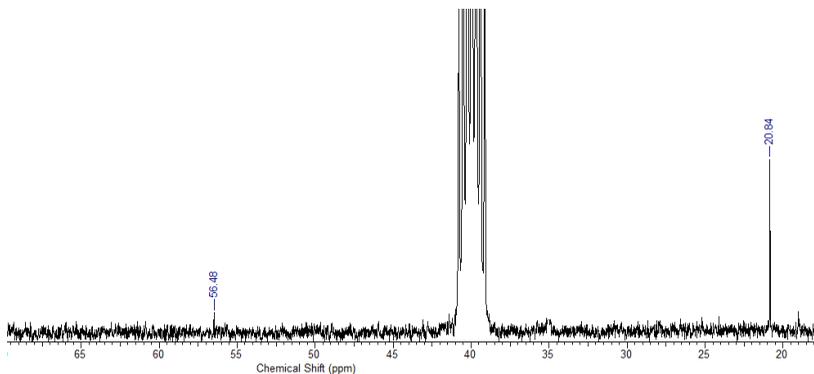


Figura 35-Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C para o composto A-1.

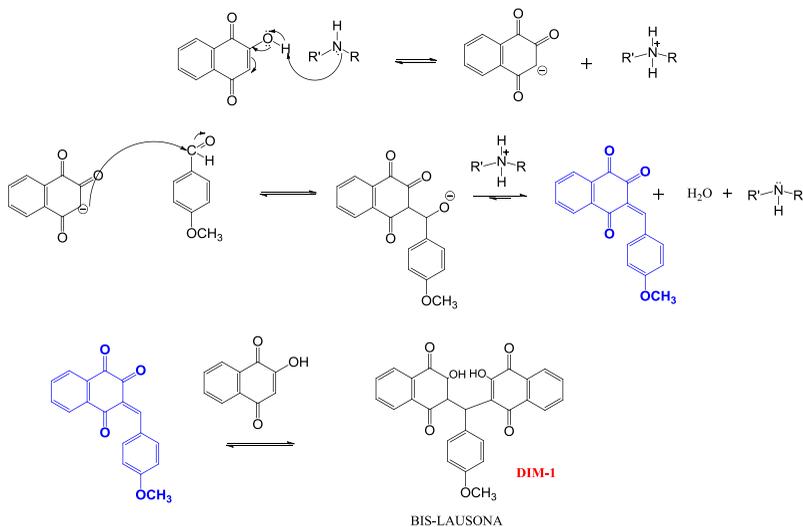
Os demais compostos da série foram igualmente caracterizados e serão apresentados no capítulo 6.

4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS DIMÉRICOS DERIVADOS DA LAUSONA

Na tentativa de se obter adutos de Mannich, foram feitas várias reações entre a lausona e diferentes aldeídos e aminas. Para a série que compreendia a reação entre a lausona, o p-metoxibenzaldeído e diferentes aminas, observou-se a formação de um único composto. Este composto foi analisado primeiramente por cromatografia em camada delgada utilizando combinações dos solventes hexano/acetato de etila em diferentes proporções para confirmar a pureza do produto formado. Após confirmação da pureza deste composto, observou-se seu comportamento térmico em um análise de DSC que determinou sua fusão em $222\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este composto, sólido amarelo, apresentou tempo de retenção no HPLC (por volta de 2,20 min) e pôde ser analisado por RMN de ^1H e ^{13}C .

Comparando com os dados da literatura concluiu-se que o produto formado era o composto 3,3'-((4-metoxifenil)metileno)bis(2-hidroxinaftalen-1,4-diona) (DIM-1).

O mecanismo proposto para esta reação é ilustrado abaixo, Esquema 16:



Esquema 16-Mecanismo para formação dos dímeros derivados da lausona.

Para explicar a formação deste produto, os adutos de Mannich insolúveis no meio reacional precipitaram, deslocando o equilíbrio no sentido da sua formação, enquanto que aquelas que fossem solúveis (ou parcialmente solúveis) regeneraram o intermediário, o qual reagiu com a lausona, para formar o composto do tipo dímérico da lausona.

Para confirmar a formação do dímero e obter um padrão para as análises, reagiu-se apenas o aldeído e a lausona (1:2) nas mesmas condições reacionais. Após 2 horas de reação observou-se a formação de um precipitado amarelo cujas análises confirmaram ser o mesmo composto observado anteriormente.

O composto DIM-1 foi avaliado primariamente segundo a atividade antioxidante e inibição da enzima acetilcolinesterase e demonstrou ótimos resultados, o que inspirou a síntese de outros derivados contendo o mesmo núcleo dímérico derivado da lausona.

Alguns compostos desta série já haviam sido sintetizados no ano de 2013 utilizando sistemas de refluxo em meio aquoso com catálise ácida (TISSEH e BAZGIR, 2013). Nosso grupo de pesquisa otimizou as condições reacionais e obtivemos 10 compostos (Esquema 17) em bons rendimentos (Tabela 3).



- i. US, H₂O, t.a., 5 min
 ii. Microondas, H₂O, 15 min
 iii. Refluxo, H₂O, 24 h

Esquema 17-Síntese dos dímeros derivados da lausona (DIM1-DIM9) utilizando ultrassom (US), microondas e refluxo.

Tabela 3-Resultados das reações de síntese dos dímeros derivados da lausona (DIM-1 a DIM-9) realizadas em microondas.

Comp.	R	P.M. (g.mol ⁻¹)	P.F. (°C) Exp.	P.F. (°C) Lit.	Rend. (%)	Nº Registro CHEMCATS
DIM-1	4-OCH ₃ - C ₆ H ₄	466,44	220- 222	220- 222	96	1234348-77-6
DIM-2	3,4,5- triOCH ₃ C ₆ H ₄	526,49	226- 227	*	97	177791-66-1
DIM-3	4-Br-C ₆ H ₄	515,31	216- 217	216- 218	91	1234350-67-4
DIM-4	-C ₆ H ₅	436,41	202- 204	202- 204	91	96306-50-2
DIM-5 ^a	2-OH-3- Br-C ₆ H ₃	531,31	215- 217	-	95	-
DIM-6	4-NO ₂ - C ₆ H ₄	481,41	177- 178	177- 179	84	1207380-26-4
DIM-7	4-CH ₃ - C ₆ H ₄	450,44	170- 172	170- 172	94	1234348-72-1
DIM-8	4-F-C ₆ H ₄	454,40	206- 207	*	86	1207380-23-1
DIM-9 ^a	3-CH ₃ -fur- 2-yl	440,40	182- 183	-	86	-

CHEMCATS= número de registro no CAS, obtido através do SciFinder. ^a Produto inédito *ponto de fusão não determinado na literatura

Pensando em otimizar as condições reacionais, primeiramente para a reação de obtenção do composto DIM-1 as reações foram

realizadas utilizando sistema convencional (refluxo e temperatura ambiente), em água ou etanol como solventes e na presença de um catalizador, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4-: Condições experimentais e rendimentos para a reação de formação do composto DIM-1.

Composto	Catalisador	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)
DIM-1	-	Etanol	25	26	57
DIM-1	AlCl ₃	Etanol	25	03	-
DIM-1	InCl ₃	Etanol	25	14	34
DIM-1	LiCl	Etanol	25	24	39
DIM-1	NaCl	Água	Refluxo	22	39
DIM-1	HCl	Água	Refluxo	24	Traços
DIM-1	FeCl ₃	Água	Refluxo	18	51
DIM-1	Ácido <i>p</i> -toluenosulfônico	Água	Refluxo	24	Traços
DIM-1	KCl	Água	Refluxo	21	58
DIM-1	AlCl ₃	Água	Refluxo	13	46
DIM-1	LiCl	Água	Refluxo	09	69
DIM-1	InCl ₃	Água	Refluxo	08	54

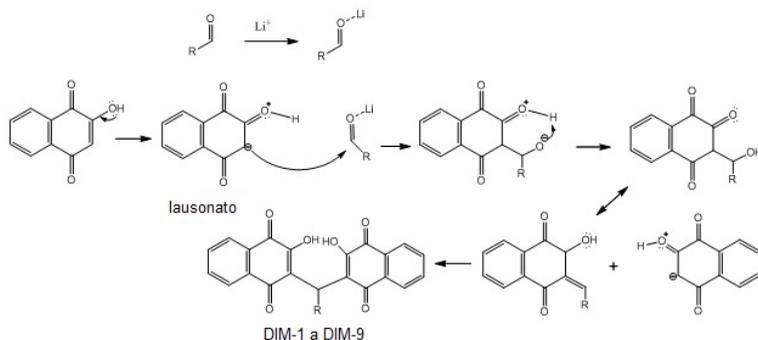
Vale salientar que devido à insolubilidade dos reagentes em água, as reações utilizando este solvente foram acompanhadas de aumento de temperatura. Observou-se em muitos casos baixos rendimentos devido a produtos de decomposição, uma vez que estes compostos são sensíveis a temperaturas muito elevadas.

Visando a otimização das condições experimentais, foram realizadas tentativas utilizando microondas. Os resultados podem ser analisados a partir da Tabela 5 a seguir.

Tabela 5-Otimização das condições reacionais para síntese do composto DIM-1.

Catalisador	Solvente	Temp. (°C)	Rend.(%)
-	Etanol	55	32
AlCl ₃	Etanol	55	traços
LiCl	Etanol	55	45
InCl ₃	Etanol	55	41
LiCl	Água	70	78
NaCl	Água	70	42
HCl	Água	70	traços
FeCl ₃	Água	70	40
Ácido p-toluenesulfônico	Água	70	traços
KCl	Água	70	58
AlCl ₃	Água	85	traços
InCl ₃	Água	85	76

A partir destes resultados, pode-se perceber que o melhor resultado foi obtido para as reações que utilizaram o cloreto de lítio e cloreto de índio como catalisadores, em meio aquoso a 70 e 85 °C, respectivamente. Sugere-se que o elemento metálico, como o lítio, ligue-se ao átomo de oxigênio presente na carbonila do aldeído deixando o carbono mais eletrofílico, o que propicia melhores condições para o ataque do nucleofílico, neste caso o lausonato (Esquema 18).



Esquema 18-Mecanismo de formação dos dímeros DIM-1 a DIM-9.

Além da utilização do microondas para a síntese dos compostos, testou-se a utilização de experimentos envolvendo radiação ultrassônica. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada e observou-se a formação dos produtos após 5 min. As metodologias foram comparadas e observou-se que houve uma considerável redução de tempo na obtenção dos compostos, quando utilizou-se o ultrassom e o microondas em detrimento das reações em refluxo (Tabela 6).

Tabela 6-Comparação entre as metodologias sintéticas para síntese dos dímeros derivados da lausona e porcentagem de economia atômica.

Composto	Refluxo ^a (%)	Microondas ^b (%)	Irradiação ultrassônica ^c (%)	Economia atômica (%)
DIM-1	81	94	96	96,28
DIM-2	85	95	97	96,69
DIM-3	84	89	91	96,62
DIM-4	83	87	91	96,04
DIM-5	84	93	95	96,72
DIM-6	80	81	84	96,39
DIM-7	91	92	96	96,16
DIM-8	73	82	86	96,18
DIM-9	75	82	86	96,07

^a H₂O, LiCl, 12-24 h. ^b H₂O, 70° C, LiCl, 15 min. ^c H₂O, 25° C, LiCl, 5 min.

A reação de obtenção dos compostos DIM-1 a DIM-9 pode ser considerada uma reação que faz uso de tecnologias limpas, sem uso de solventes tóxicos e cujo único sub-produto é água. Além do alto rendimento observado para os produtos, as reações exibem uma alta porcentagem de economia atômica (razão entre a massa molecular do produto em questão e a somatória dos reagentes). (Tabela 6). Foram obtidos compostos com uma diminuição considerável de tempo reacional, que também implica em menor consumo energético. Estes fatores demonstram que a proposta sintética vai de acordo com os princípios da Química Verde.

De um modo geral, os compostos foram obtidos impuros. Após os 15 minutos reacionais, utilizando-se o microondas confirmou-se a formação dos compostos por CCD. Estes compostos são sólidos coloridos que foram filtrados, lavados com água e recristalizados em acetato de etila, para dar origem aos compostos puros. Estes compostos foram caracterizados por seu ponto de fusão, infravermelho, espectrometria de massas e RMN de ¹H e ¹³C.

A discussão que envolve a caracterização dos compostos é muito similar para os compostos desta série e será realizada para o DIM-1 de maneira mais completa e que pode ser utilizada na compreensão dos demais.

O composto obtido apresentou-se na forma de um sólido amorfo amarelo. A reação envolvida apresentou um percentual de 94% de rendimento, quando sintetizado usando microondas. O sólido fundiu entre 220 e 222° C.

O espectro de IV (Figura 36) foi obtido em pastilha de KBr e apresentou uma banda alargada entre 3249 e 3395 cm^{-1} , característica de deformação axial da ligação O-H. Duas absorções fortes em 1665 e 1637 cm^{-1} atribuídas à deformação axial das ligações C=O da naftoquinona.

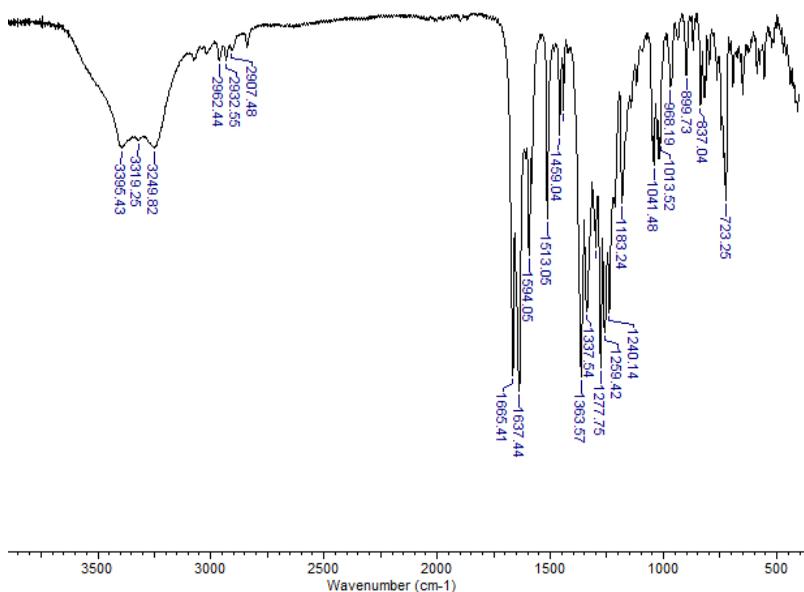


Figura 36-Espectro de I.V. do composto DIM-1.

O composto apresentou os sinais característicos quando analisados os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

Para facilitar a compreensão da discussão os átomos de hidrogênio e carbono foram numerados conforme mostrado na Figura 37:

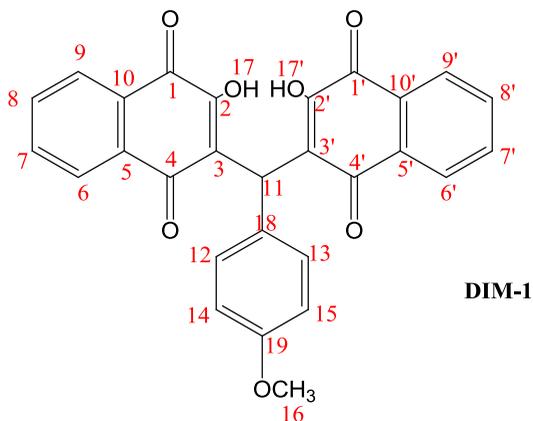


Figura 37-Numeração para o composto DIM-1.

Analisando o RMN de ^1H (Figura 38) pode-se observar o número correto de hidrogênios expressos por suas integrações. Em região de maior deslocamento químico, observam-se dois conjuntos de sinais com integração para 4 hidrogênios cada. Estes sinais referem-se aos hidrogênios diretamente ligados nas duas unidades do ciclo naftoquinônico, que apresenta dois centros altamente eletrofílicos (carbonilas), hidroxilas e portanto átomos eletronegativos, que contribuem para a desblindagem magnética e deslocamento para maiores frequências.

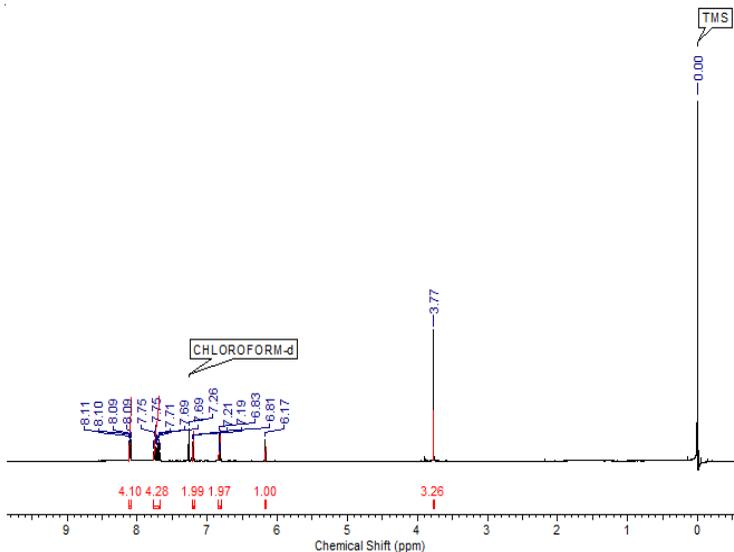


Figura 38-Espectro de RMN de 1H para o composto DIM-1.

O primeiro conjunto de sinais ($\delta = 8,09$ ppm, 4H, m) refere-se aos hidrogênios 7, 7', 8 e 8' da naftoquinona. A atribuição inequívoca do sinal é complexa e desnecessária, uma vez que o composto foi caracterizado também segundo outras técnicas espectroscópicas e espectrométricas como será abordado a seguir. O segundo conjunto de sinais ($\delta = 7,71$ ppm, 4 H, m) pode ser analisado como um conjunto de doublets de constantes de acoplamento próximas a 6 Hz e refere-se aos hidrogênios 6, 6', 9 e 9' também presentes no núcleo naftoquinônico. A análise destes hidrogênios pode parecer simples a primeira vista, mas denota uma tarefa complexa, já que são múltiplas as possibilidades de acoplamento em sistemas aromáticos deste tipo. A utilização de diferentes frequências de campos eletromagnéticos e a seleção de diferentes faixas de acoplamento nos espectrômetros é uma alternativa válida neste tipo de análise, mas que não está nos objetivos deste trabalho (Figura 39).

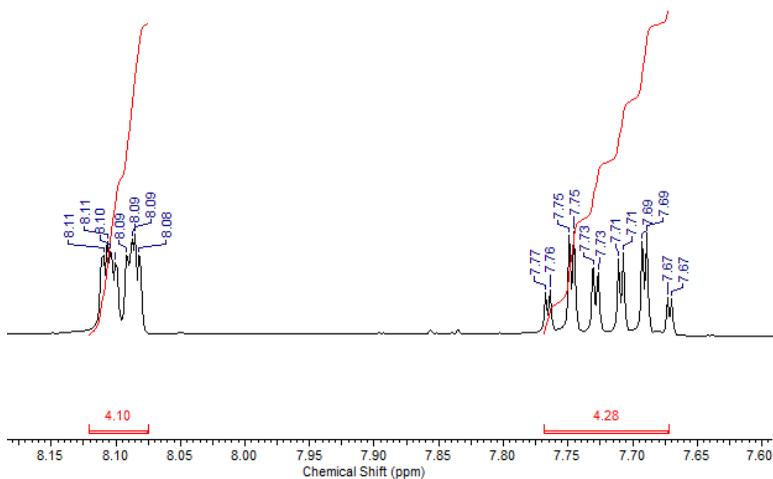


Figura 39-Espectro de RMN (expansão 1) de ^1H para o composto DIM-1.

Os dubletos registrados em 7,72 e 6,80 ppm são relativos aos hidrogênios H12, H13 e H14, H15, respectivamente que estão presentes no anel aromático derivado do *p*-metoxibenzaldeído (Figura 40). A atribuição destes hidrogênios foi confirmada pela análise de espectroscopia de correlação COSY, que será apresentada posteriormente.

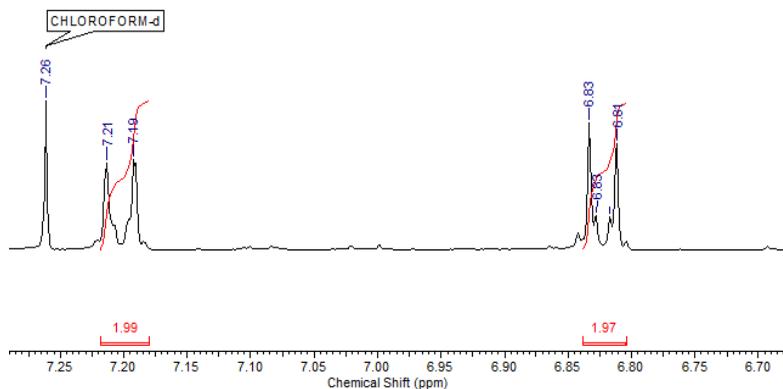


Figura 40-Espectro de RMN (expansão 2) de ^1H para o composto DIM-1.

Em região de menor deslocamento químico, pode-se observar a presença de um sinal em $\delta = 6,17$ ppm (1H, s) relativo ao hidrogênio 11 que confirma a síntese do dímero. Além deste, observa-se a presença do sinal característico dos hidrogênios da metoxila (H-16) em $\delta = 3,77$ ppm (3H, s) (Figuras 41 e 42).

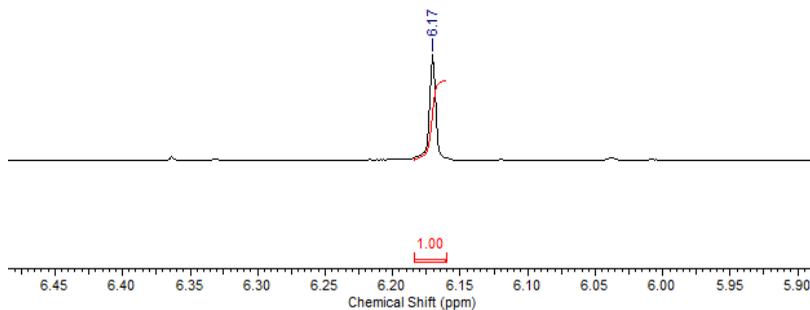


Figura 41-Espectro de RMN (expansão 3) de 1H para o composto DIM-1.

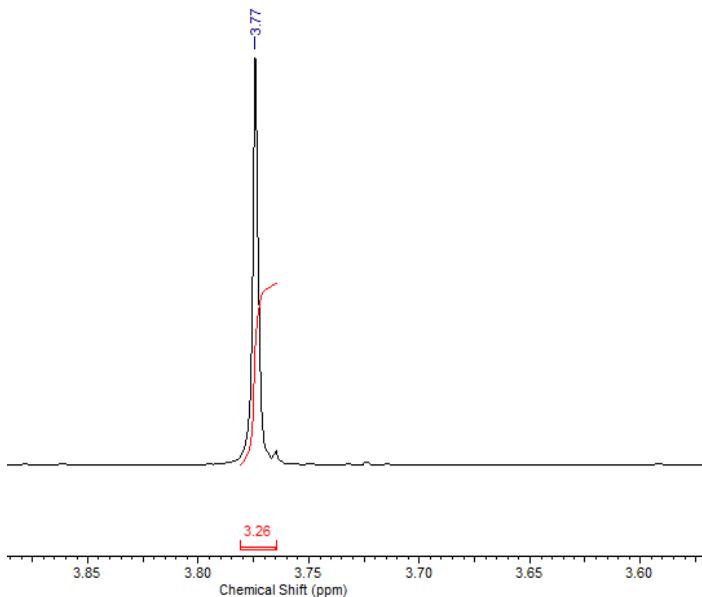


Figura 42-Espectro de RMN (expansão 4) de 1H para o composto DIM-1.

O composto foi analisado pela espectroscopia de correlação homonuclear (COSY) e a atribuição apresentada anteriormente foi confirmada (Figura 43).

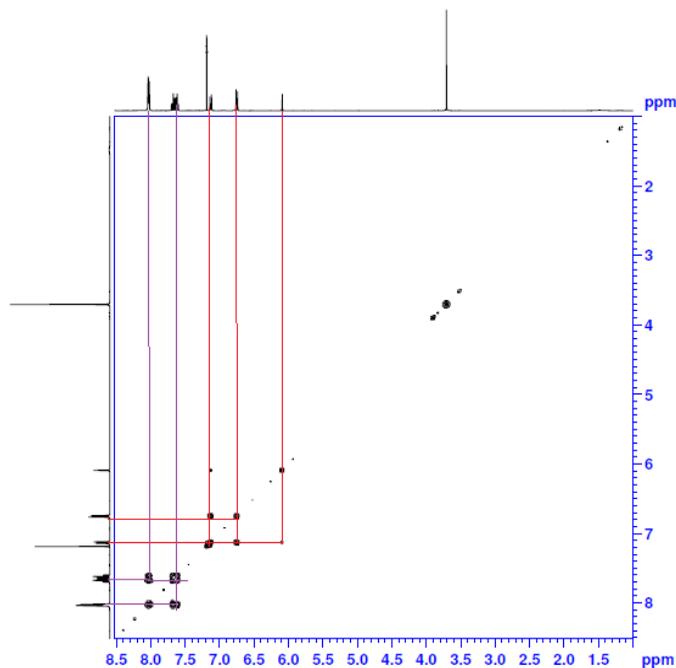


Figura 43-Espectro de COSY para o composto DIM-1.

Pode-se observar um pequeno acoplamento entre o hidrogênio H11 e os hidrogênios H12 e H13. Este pequeno acoplamento justifica-se pela maior distância escalar entre eles. O H11 não é capaz de acoplar com os hidrogênios H14 e H15 e isto confirma a atribuição feita anteriormente. Da mesma forma podemos observar o acoplamento mútuo entre os hidrogênios H9, H6 e H8, H7, com maior intensidade conforme a Figura 44:

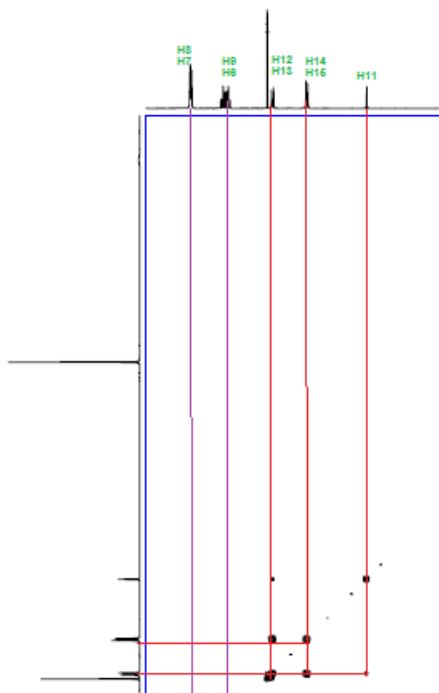


Figura 44-Expansão do espectro de COSY para o composto DIM-1.

O composto DIM-1 também foi caracterizado por espectroscopia de ^{13}C (Figura 45).

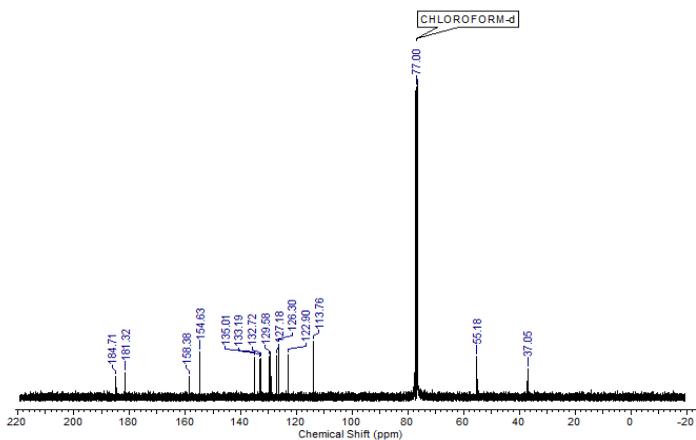


Figura 45-Espectro de RMN de ^{13}C para o composto DIM-1.

Analisando o espectro podemos observar os sinais característicos para os grupos presentes no composto. Para os compostos apresentados neste trabalho, alguns átomos de carbono quando presentes em regiões de mesmo ambiente químico serão atribuídos com os mesmos valores de deslocamento. Vale ressaltar a presença das carbonilas naftoquinônicas C1 e C4 em regiões de maior deslocamento químico (184,7 e 181,3 ppm); o carbono C19 contendo uma metoxila diretamente ligada em 158,4 ppm; os carbonos C17 e C17' em 154,6 ppm, o átomo de carbono da metoxila (C16) em 55,18 ppm e o carbono sp^3 C11 em 37,1 ppm. As demais atribuições para os carbonos relativos a esta estrutura estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7-Atribuição dos átomos de carbono para o composto DIM-1.

Carbono	δ (^{13}C) ppm
C4 e C4'	184,7
C1 e C1'	181,3
C19	158,4
C2 e C2'	154,6
C18	135,0
C8,8' e C7,7'	133,2
C5 e C5'	132,7
C10 e C10'	129,6
C12 e C13	127,2
C6,6' e C9,9'	126,3
C3 e C3'	122,9
C14 e C15	113,8
C16	55,2
C11	37,1

O composto DIM-1 também foi caracterizado por espectrometria de massas utilizando a ionização por eletrospray (ESI) em modo negativo, para o qual foi possível a determinação da massa molecular exata (M-H) de acordo com o esperado (466,11 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) como pode ser observado através da Figura 46:

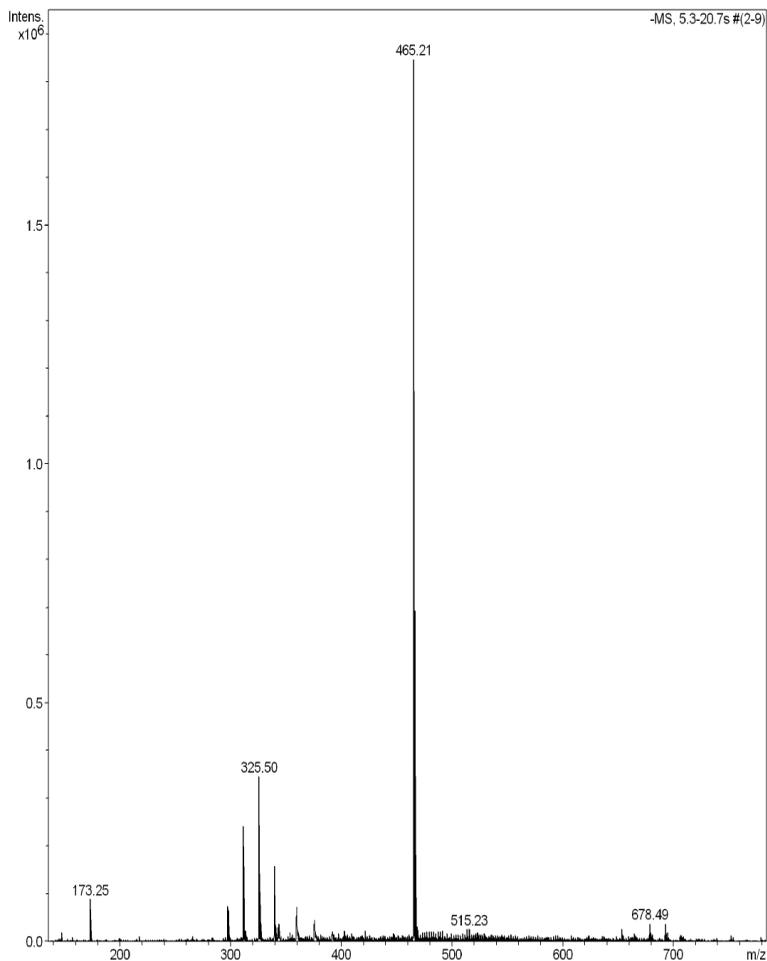


Figura 46-Espectro de massas para o composto DIM-1.

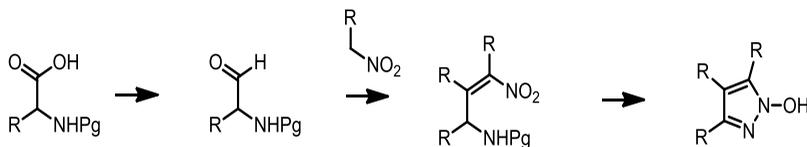
Os sinais próximos a 320 e de baixa intensidade são devidos às impurezas presentes no solvente acetona utilizada para a diluição e análise, uma vez que não havia disponibilidade deste solvente em grau MS (para espectroscopia de massa) e foi utilizada acetona própria para HPLC.

Para os demais compostos desta série a sequência de análises foi a mesma. Os espectros e a caracterização para estes compostos se encontram nos anexos deste trabalho.

4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS PIRAZÓIS

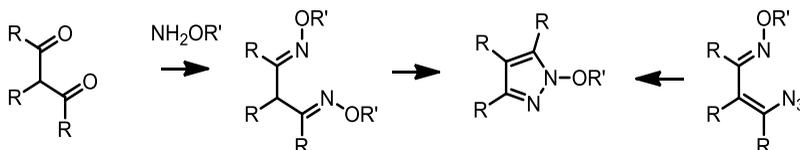
O método atual para a síntese dos análogos de 1-hidroxi-pirazóis incluiu etapas de elevado tempo reacional e de baixo rendimento. Então foram exploradas diferentes estratégias para a síntese de 1-hidroxi-pirazóis. Três estratégias diferentes são interessantes em relação à geração de 1-hidroxi-pirazóis e outros derivados N-hidroxi-azol.

1) A condensação intramolecular de nitrocompostos com aminas para a síntese de hidroxi-azóis (Esquema 19). Esta reação faz uso de aminoácidos protegidos como no esquema 19 o Pg (do inglês *protection group*) representando o grupo Boc, por exemplo.



Esquema 19-Síntese de hidroxi pirazóis por condensação intramolecular de nitrocompostos.

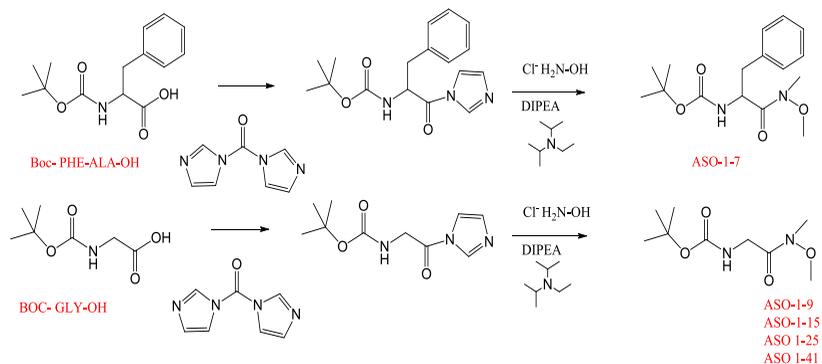
2) Síntese de 1-hidroxi-pirazóis através da condensação de oximas (Esquema 20). Na literatura há poucos exemplos da síntese de 1-hidroxi pirazóis através da condensação de bis-oximas em condições básicas ou azido oximas em aquecimento. Procurou-se explorar este método para síntese de 1-hidroxipirazóis e seus derivados.



Esquema 20-Síntese de 1-hidroxi-pirazóis através da condensação de oximas.

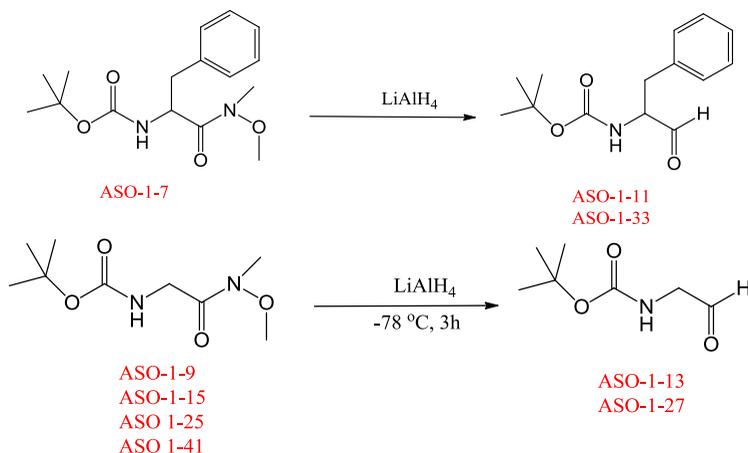
3) Síntese e oxidação do pirazol. Almejava-se a síntese dos pirazóis por meio de reações de acoplamento, para posteriormente sofrerem processos oxidativos. O método mais difundido para a geração de 1-hidroxipirazóis utiliza diretamente a oxidação do pirazol com mCPBA. Sabe-se que a reação apresenta baixo rendimento e o isolamento dos produtos é complicado.

Primeiramente foram sintetizados os intermediários da síntese do 1-hidroxipirazol. A reação inicia-se pela reação de aminoácidos protegidos (Boc-PHE-ALA-OH e Boc-GLY-OH) para formação das amidas de Weinreb (ASO-1-7, ASO-1-9, ASO-1-15, ASO-1-25, ASO-1-41) (Esquema 21). Vale ressaltar que diferentes números para um mesmo composto indicam que a reação foi desenvolvida repetidamente, com ou sem alteração da metodologia reacional.



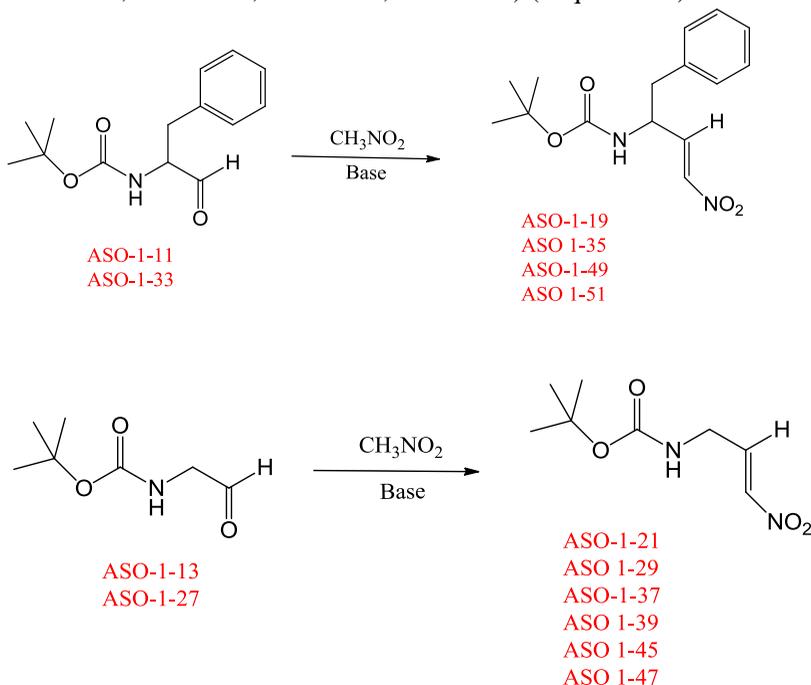
Esquema 21- Síntese das amidas de Weinreb (ASO-1-7, ASO-1-9, ASO-1-15, ASO-1-25, ASO-1-41).

As amidas de Weinreb foram reduzidas utilizando LiAlH_4 para obtenção dos compostos: ASO-1-11, ASO-1-13, ASO-1-27 e ASO-1-33 (Esquema 22):



Esquema 22-Redução das amidas de Weinreb.

Posteriormente foram realizadas reações de Henry (também conhecida como reação de nitroaldol) para obtenção dos compostos (ASO-1-19, ASO-1-35, ASO-1-49, ASO-1-51, ASO-1-21, ASO-1-29, ASO-1-37, ASO-1-39, ASO-1-45, ASO-1-47) (Esquema 23).



Esquema 23-Reações de Henry para obtenção dos intermediários na síntese de hidróxi-pirazóis.

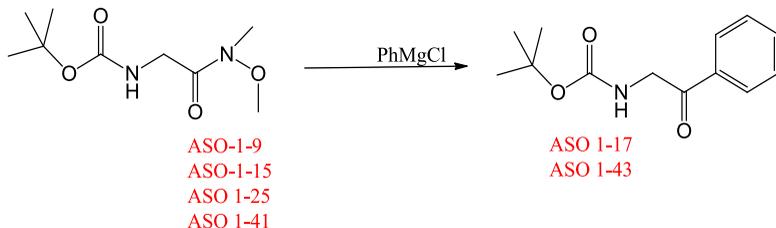
A etapa que envolveu as reações de Henry foi dificultada pela presença de vários produtos de difícil separação. Foram realizadas diversas cromatografias à vácuo (VLC), mas os produtos não foram isolados dos demais. A maioria dos exemplos apresentados para este tipo de reação envolve aldeídos não substituídos, o que faz com que a reação seja mais simples do ponto de vista reacional, já que estes aldeídos são de maior reatividade.

Foram utilizadas diferentes condições reacionais, modificando-se a catálise (ácida e básica), a temperatura, o solvente e o tempo reacional na tentativa de otimizar esta etapa. A Tabela 8 ilustra estas tentativas:

Tabela 8-Reações de Henry para obtenção dos intermediários da síntese do 1-hidroxi-4-fenil-pirazol.

Entrada	Catalisador	Quantidade	Temp (°C)	Tempo reacional (h)	Rendimento (%)
ASO-1-19 ASO-1-35 ASO 1-51	NaOtBU	1 eq.	0	2	95 (bruto)
ASO-1-49	N,N-Dietilenodiamina	160 eq.	Refluxo (125)	10	Zero
ASO-1-21	NaOtBU	1 eq.	0	2	Zero
ASO-1-29	NaOtBu	1 eq.	25	48	Zero
ASO 1-31	NaOtBu	1 eq.	0	3	Zero
ASO 1-37	NaOH	1 eq.	0	3	2
ASO 1-39	N,N-Dietilelenodiamina	160 eq.	Refluxo (125)	2	zero
ASO 1-45	Ácido acético/acetato de amônia	0,5 eq.	Refluxo (130)	3	Mistura complexa
ASO 1-47	NaOtBu	2 eq.	0	30	Zero
ASO 1-49	N,N-Dietilelenodiamina	160 eq.	Refluxo (125)	10	Mistura complexa
ASO 1-51	NaOtBu	2 eq.	1 eq.	2	Mistura complexa

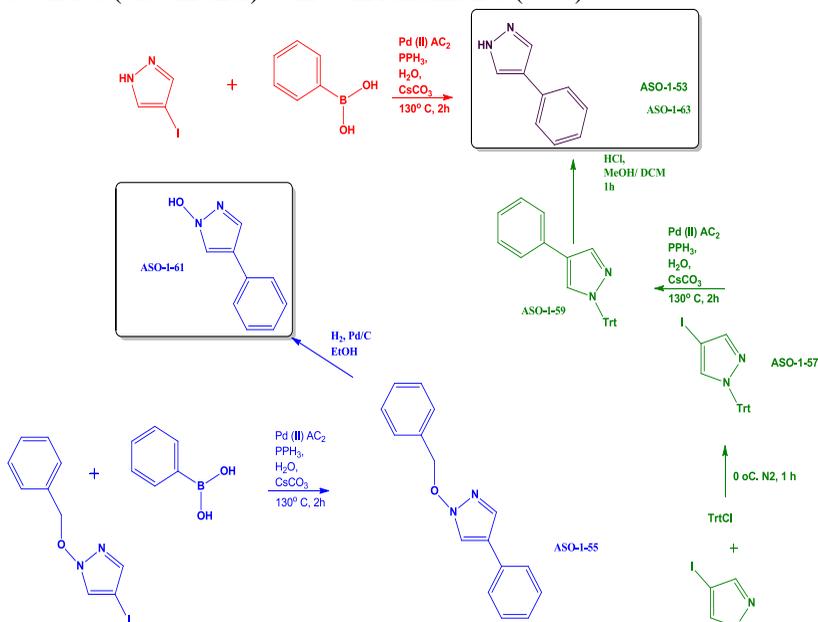
Além destas vias, as amidas de Weinreb (ASO 1-9, ASO1-15, ASO 1-21, ASO 1-41) foram submetidas a reações com Reagente de Grignard (Esquema 24), para dar origem aos intermediários sintéticos ASO1-17 e ASO 1-43, que estão serão investigados quanto às próximas etapas reacionais, para a síntese dos pirazóis requeridos.



Esquema 24-Reação das amidas de Weinreb com o cloreto de fenil magnésio.

4.3.1 Obtenção dos pirazóis a partir de reações de acoplamento

A outra via reacional para obtenção do 1-hidroxi 4- fenil pirazol (ASO-1-61), Esquema 25, foi realizada utilizando reações de acoplamento do tipo Suzuki seguida de redução catalítica. Foram desenvolvidas duas vias sintéticas alternativas (em vermelho e verde) para a síntese do 4-fenil pirazol (ASO-1-53 e ASO-1-63), submetido a reações de oxidação para obtenção do hidroxi-pirazol preterido (ASO-1-61), que foi sintetizado por reação de Suzuki seguida de hidrogenação catalítica (via em azul) com bom rendimento (78%).



Esquema 25-Reações de acoplamento para síntese do 1- hidroxi-4-fenil pirazol (ASO-1-61) e 4-fenil-pirazol (ASO-1-53 e ASO-1-63).

O hidroxipirazol ASO 1-61 preterido foi obtido a partir da redução do composto ASO 1-55. O composto ASO 1-55 (100 mg) foi solubilizado em 3mL de acetato de etila, adicionado a 10 mg de Pd/C 10% e imerso em atmosfera de H₂ (1 atm). Após uma noite, aproximadamente 18 horas de vigorosa agitação, a mistura foi filtrada em celite e concentrada a vácuo. Análises de massas mostraram a formação de dois compostos, o hidroxipirazol desejado e a sua forma reduzida. Provavelmente como o tempo reacional foi longo, a redução com hidrogênio foi a um estágio a mais que o esperado.

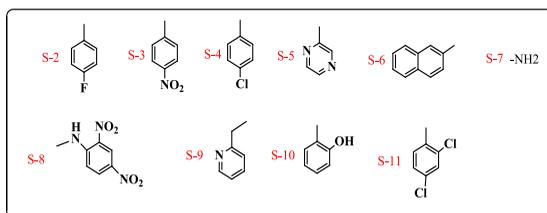
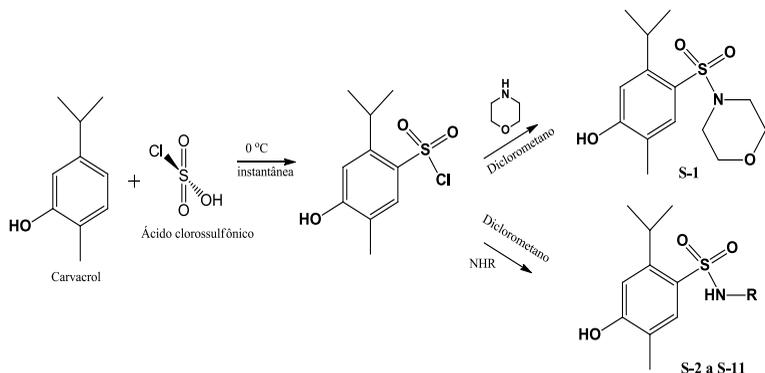
Primeiramente tentou-se a separação dos produtos utilizando VLC em fase normal e reversa, mas não se obteve êxito. Posteriormente, verificou-se que os produtos poderiam ser separados por uma extração ácido-base, já que apresentavam propriedades ácidas distintas. Desta forma, ASO 1-61 foi purificado extraindo-se o composto com dietil éter e HCl 1 mol.L⁻¹. O rendimento obtido pode ser considerado bom (75%). Por terem sido desenvolvidas no exterior, não serão apresentadas as caracterizações dos compostos obtidos nesta etapa.

4.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS SULFONAMIDAS DERIVADAS DO CARVACROL

O cloreto de sulfonila do carvacrol foi obtido através da reação entre o carvacrol com seis equivalentes de ácido clorossulfônico. O excesso de ácido em reações deste tipo, clorossulfonação de sistemas aromáticos, foi estudado anteriormente devido à reversibilidade que existe nos mecanismos propostos para essa reação, e foi verificado, também, que o excesso de seis equivalentes é a quantidade ideal para obtenção dos melhores rendimentos (NUNES, 1986).

Vale salientar que o cloreto de sulfonila foi de difícil caracterização, pois é uma espécie muito instável já que o cloro é um bom grupo de saída e pode ser facilmente trocado por água ou outras espécies nucleofílicas. Este composto sofre hidrólise facilmente e decompõe-se, o que impõe a necessidade de um rigoroso sistema de armazenamento e estocagem para utilização deste nas próximas etapas de síntese.

As sulfonamidas obtidas nesse trabalho foram preparadas a partir do cloreto de sulfonila do carvacrol em diclorometano e banho de gelo, e de dois equivalentes da amina adicionados lentamente (Esquema 26).



Esquema 26-Síntese das sulfonamidas S-1 a S-11.

Este excesso da amina tem por finalidade também neutralizar o HCl que se forma durante a reação. A temperatura baixa é recomendada quando as aminas são reativas. Como método geral o cloreto de sulfonila do carvacrol foi dissolvido em diclorometano e a amina foi adicionada na sequência. As soluções turvaram e após intervalos variando entre 3 e 24 horas, observou-se a formação de precipitados de colorações variadas. As reações foram acompanhadas por CCD. Evaporou-se o diclorometano e adicionou-se um pequeno volume de metanol. Esta solução foi vertida em um banho de gelo. A fase aquosa foi removida para dar origem às sulfonamidas ainda impuras que foram purificadas posteriormente através de extrações ácido-base.

Foram testadas várias aminas, para as quais observou-se que o pKa das mesmas é de extrema importância para o sucesso da reação. Para as aminas testadas que apresentavam pKa acima de 10, tais como as aminas alifáticas, metilamina, dimetilamina, etilamina, observou-se que ocorria uma reação indesejada, já que a amina era utilizada na desprotonação da hidroxila fenólica presente na estrutura do carvacrol, diminuindo a sua disponibilidade para ocorrência da reação desejada. Portanto, foram escolhidas aminas, em sua maioria aromáticas, com valores de pKa inferiores ao valor do pKa do grupo fenólico (tipicamente em torno de 9,98), tais como as aminas aromáticas e

heterocíclicas, 2,4-dinitrofenil hidrazina, 2-amino-1-picolilamina, morfolina, o-hidroxianilina, *p*-fluor anilina, *p*-cloro anilina, 2-aminopirazina, β -naftilamina, hidrazina, 2,4-dicloroanilina (Esquema 26).

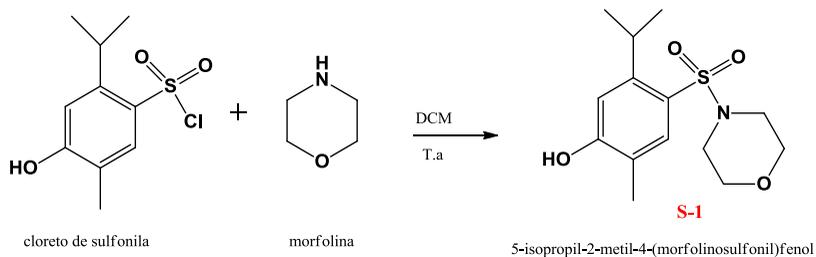
Todas as sulfonamidas sintetizadas neste trabalho são inéditas na literatura.

Os rendimentos obtidos para as sulfonamidas estão ilustrados na Tabela 9.

Tabela 9-Pontos de fusão experimentais e rendimentos para a síntese das sulfonamidas S-1 a S-11.

Composto	Ponto de fusão Experimental (°C)	Rendimento (%)
S-1	172-173	93
S-2	181-183	82
S-3	189-191	78
S-4	177-179	83
S-5	165-167	88
S-6	201-203	79
S-7	165-166	84
S-8	212-213	82
S-9	182-183	83
S-10	152-153	91
S-11	198-199	87

Assim como foi feito para os compostos das séries anteriores, será detalhada a seguir a caracterização do composto **S-1**. Os demais compostos apresentam caracterização bem similar e que poderá ser facilmente compreendida através da análise dos espectros que se encontram nos anexos. A reação preterida é entre o cloreto de sulfonila do carvacrol e a morfolina: síntese do 5-isopropil-2-metil-4-(morfolinossulfonil) fenol (S-1) (Esquema 27).



Esquema 27-Síntese da sulfonamida S-1.

Os átomos de hidrogênio do composto S-1 foram numerados para facilitar a compreensão da discussão, conforme Figura 47.

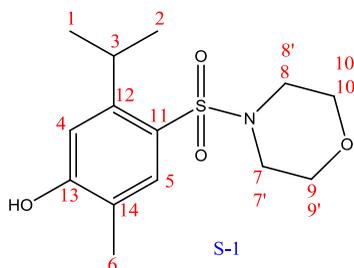


Figura 47-Numeração para o composto S-1.

Analisando o espectro de RMN de ^1H do composto S-1 (Figura 48) é possível observar os sinais esperados.

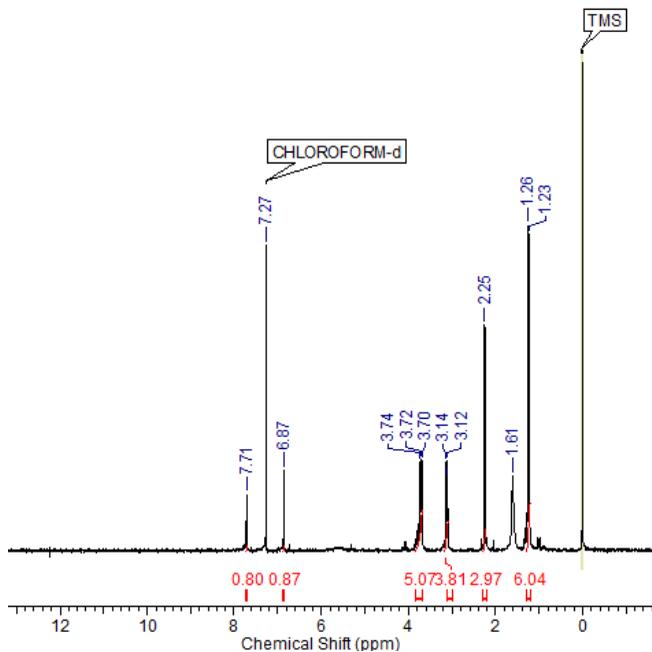


Figura 48-Espectro de RMN de 1H para o composto S-1.

Em regiões de maior deslocamento químico podemos observar dois sinais, ambos com integração para 1 átomo de hidrogênio relativos aos hidrogênios H5 ($\delta= 7,71$, s, H Arom.) e H4 ($\delta= 6,87$, 1H, s, H Arom.) (Figura 49), como esperado, já que os hidrogênios aromáticos não são blindados e absorvem energia em um campo magnético de baixa intensidade. Estes dois singletos confirmam a substituição na posição *para* ao grupo hidroxil presente no anel, posição menos impedida estericamente que a posição *orto* em relação ao grupo -OH. Caso a substituição ocorresse na posição *orto* ao grupo hidroxil, seria possível observar acoplamentos do tipo duplete para os hidrogênios aromáticos, que estariam vizinhos.

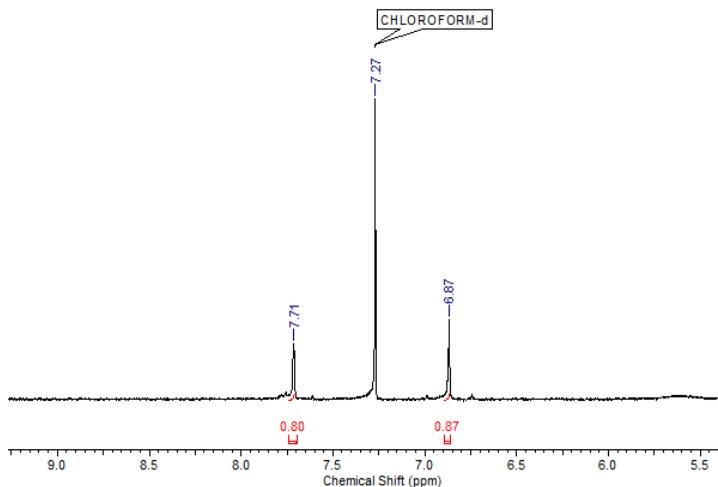


Figura 49-Espectro de RMN (expansão 1) de 1H para o composto S-1.

Os hidrogênios sp^3 H7,7', H8,8' do sistema heterocíclico, foram registrados em 3,12 ppm enquanto os hidrogênios H9,9' e H10,10' mais próximos ao átomo de oxigênio em 3,72 ppm, com destaque para o conjunto de sinais em 3,72 que mostrou claramente a sobreposição com o H2, para o qual observou-se integração para 5 hidrogênios (4 hidrogênios do sistema heterocíclico e mais um sinal do carbono terciário do substituinte isopropila). Para o conjunto de sinais em 3,12 ppm observou-se a integração para para 4 hidrogênios conforme o esperado (Figura 50).

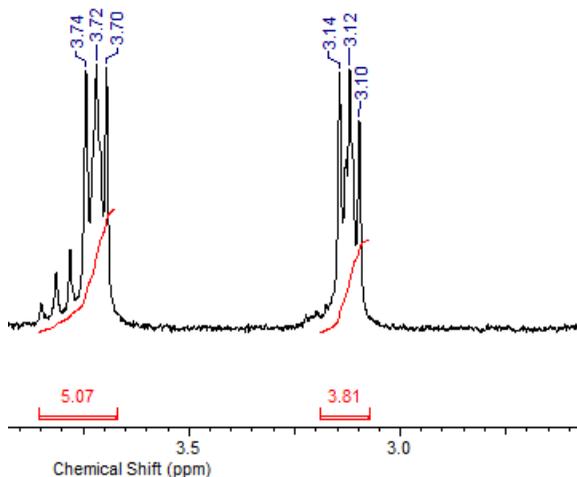


Figura 50-Espectro de RMN (expansão 2) de ^1H para o composto S-1.

A metila na posição 6 foi registrada em 2,25 ppm (3H, s) e as metilas nas posições 1 e 2 em 1,26 (3H, s) e 1,23 ppm (3H, s) conforme o esperado por simulações utilizando o programa ACD Labs.

Além do RMN de ^1H o composto foi analisado por RMN de ^{13}C (Figura 51):

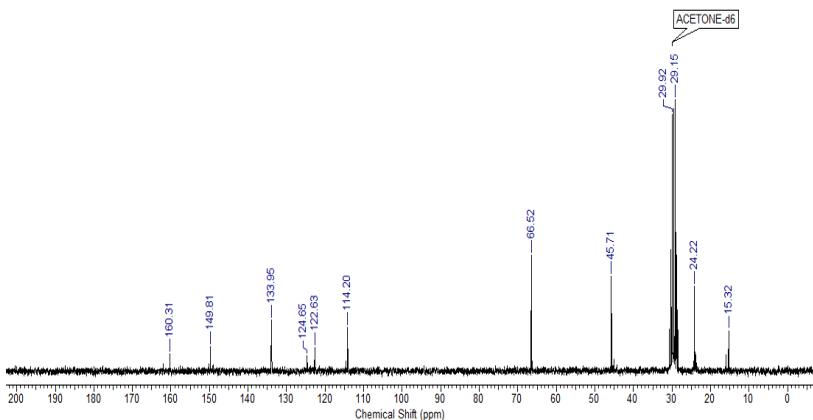


Figura 51-Espectro de RMN de ^{13}C para o composto S-1.

Analisando o espectro de ^{13}C para o composto S-1 é possível observar 10 sinais dos 11 esperados, já que o sinal relativo ao C3 alifático (do grupo isopropila) ficou sobreposto pelo sinal do solvente utilizado. Em região de maior deslocamento químico, observa-se os sinais relativos ao C13 (aromático diretamente ligado à hidroxila) em 160,3 ppm e o carbono C12 em 149,8 ppm. Além destes podem ser visualizados os carbonos C11, C5, C14 e C4 aromáticos em 133,9; 124,7; 122,6 e 114,2 ppm respectivamente. Os carbonos alifáticos C9 e C10, de mesmo deslocamento químico, podem ser observados em 66,5 ppm, de forma análoga aos carbonos C8 e C7 de deslocamento 45,7 ppm. As metilas C1, C2 e C6 podem ser identificadas em 24,2 e 15,3 ppm.

O composto S-1 também foi caracterizado por espectrometria de massas (Figura 52) utilizando o modelo de ionização ESI no modo negativo, para o qual foi possível a determinação da massa molecular exata a partir da visualização do íon molecular (M-H) em 298,18, muito próxima à esperada (299,12).

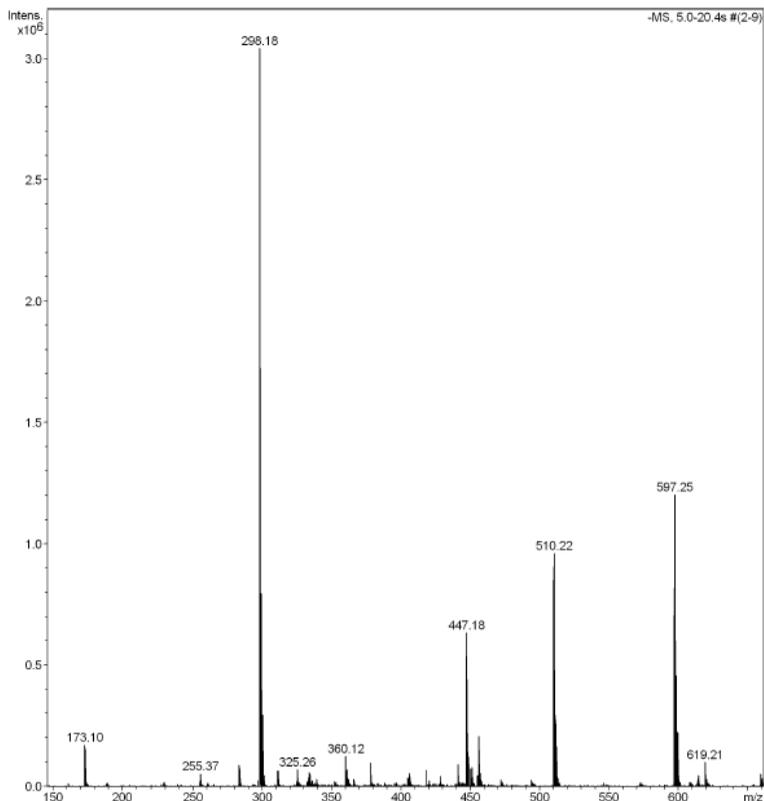


Figura 52-Espectro de massas para o composto S-1.

A pequena quantidade de amostra e o elevado tempo de análise dificultaram a realização dos experimentos de RMN de ^{13}C , para os derivados desta série de compostos, que estão sendo desenvolvidos na Central de Análises, do Departamento de Química da UFSC e que serão publicados juntamente com os artigos de divulgação posterior deste trabalho.

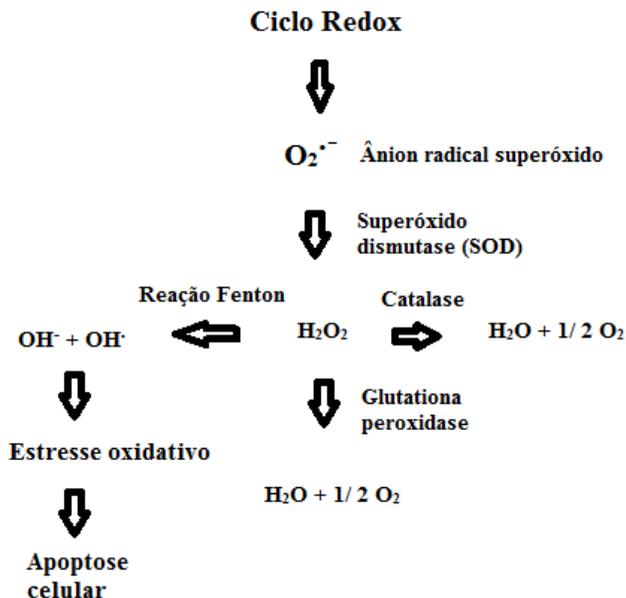
Prezando pela objetividade deste trabalho a caracterização dos demais compostos desta série foi realizada segundo os mesmos critérios e será apresentada de forma resumida. Os espectros de massas e de RMN de ^1H poderão ser consultados ao final do trabalho como anexos.

5 VERIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E OS RADICAIS LIVRES

Durante o metabolismo aeróbico da glicose, são produzidos 36 moles de ATP por mol de glicose que representam uma vantagem energética para os organismos que o realizam. Entretanto, durante o metabolismo aeróbico normal ocorre a formação de pequenas, mas significativas quantidades de radicais livres, também chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singleto (1O_2), os radicais superóxidos (O_2^-) e os radicais hidroxila (OH^\bullet) são os exemplos mais proeminentes de ROS que podem ser formados nos organismos aeróbicos. Os radicais hidroxila são formados a partir das outras espécies reativas num processo conhecido como reação de Fenton, que é catalisada principalmente por Fe^{2+} e leva a danos celulares por estresse oxidativo (WANG et al., 2006).

As células necessitam de defesas contra as ERO e, para isso, fazem uso de várias substâncias, como vitaminas e micronutrientes, as quais são necessárias nos processos de destoxicação enzimática. Além destas, existem as enzimas (Esquema 28), como a superóxido dismutase (SOD), glutationas peroxidases (GPOXs) e as catalases (CATs) que atuam juntamente com as vitaminas e os micronutrientes, como a primeira linha de defesa contra as ERO, sendo geralmente denominados antioxidantes primários (AHMAD, 2012).



Esquema 28-Formação das espécies radiculares derivadas do oxigênio.

Quando em condições de estresse, ocorre uma superprodução das espécies reativas e as enzimas responsáveis pela decomposição dessas espécies não conseguem transformar em moléculas inócuas os radicais produzidos. Essas moléculas (ERO) quando reagem com uma molécula normal, desencadeiam imediatamente uma reação em cascata, originando um grande número de novos radicais livres que só terminam na presença de substâncias antioxidantes (CAMPOS, 2005). Fatores ambientais, como poluentes do ar, radiação ionizante e produtos químicos industrializados, assim como o metabolismo de xenobióticos, contribuem para o aumento da concentração celular de ERO. Além disso, muitas células especializadas, como os eritrócitos, geram grandes quantidades de ERO pela auto-oxidação espontânea de substratos biológicos importantes como a hemoglobina (AHMAD, 1995).

Diversas condições patológicas e fisiológicas resultam da formação de ERO, havendo abundantes evidências experimentais que indicam que estas espécies reativas são mediadoras de lesões e disfunções celulares. Assim, os radicais livres desempenham papel importante nas doenças degenerativas e crônicas inflamatórias, na carcinogênese, aterosclerose, isquemia cerebral e cardíaca, doenças inflamatórias intestinais crônicas e envelhecimento. Muitos

pesquisadores acreditam que os efeitos cumulativos dos radicais livres têm grande importância no aparecimento de doenças tão diversas como o câncer, a artrite reumatóide e a doença de Parkinson (AHMAD, 1995; CADENAS, 2005).

5.2 TESTES DE VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Há uma grande diversidade de ensaios utilizados para mensurar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, que envolvem desde testes simples como ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos que fazem uso de diversas técnicas espectroscópicas e espectrométricas (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Nas últimas décadas, estes ensaios têm se tornado extremamente úteis na seleção inicial de substâncias candidatas a fármacos, que otimizam as etapas posteriores como avaliação de potencialidades biológicas de compostos isolados a partir de produtos naturais ou provenientes de síntese orgânica. Além disso, estes métodos podem servir como biomonitoramento na escolha de espécies de plantas para estudos químicos, biológicos e farmacológicos, além de permitir o planejamento de protótipos e candidatos a moléculas de grande potencial terapêutico (LIMA, 2007).

Dada a grande diversidade de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, praticamente inexistem um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser avaliada inequivocamente. Isto denota a necessidade de testes mais rápidos e eficientes, que tem sido objeto de investigação nas últimas décadas e tem gerado um grande número de métodos. Estes diferentes métodos, investigam então a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de uma grande variedade de sistemas geradores de radicais livres.

A não concordância com os resultados de atividades antioxidantes de espécies naturais e sintéticas implicou na elaboração de diferentes protocolos no sentido de trazer ordem e concordância a este importante campo de investigação (FRANKEL e FINLEY, 2008).

Uma avaliação mais precisa da atividade antioxidante de uma determinada substância, analisa o tipo de radical gerado e correlaciona em sua extensão com o dano que pode ser causado. Assim, a compreensão dos efeitos dos compostos antioxidantes só é validada se forem utilizadas técnicas específicas e capazes de definir quais produtos são formados e inibidos pelos antioxidantes, e em quais condições, sistemas e alvos de proteção (HALLIEWELL, 1995).

Halliwell (1995) propôs algumas questões que devem ser consideradas na avaliação antioxidante *in vivo*, e que podem ser respondidas por experimentos simples. O resultado destes experimentos permite a rejeição de um possível antioxidante, baseando-se na premissa de que um composto que exibe baixa atividade antioxidante *in vitro* provavelmente exibirá pouca atividade *in vivo*.

Um dos fatores a serem considerados na avaliação da atividade antioxidante de um composto é a concentração. Para ter-se uma ideia, muitos antioxidantes reagem rapidamente com o radical hidroxil, por um mecanismo antioxidante por exemplo, mas muitas moléculas biológicas, que são mais abundantes que os antioxidantes, reagem também rapidamente com esse radical. Por isso é praticamente impossível para algum antioxidante sequestrar o radical hidroxil efetivamente. Outro ponto importante é conhecer a gênese dos radicais livres para ver se é possível a interação com o antioxidante em seu local de origem (NIKI, 2002). Além destes, outro fator que deve ser considerado na seleção de compostos com possível atividade antioxidante é a sua solubilidade.

Os testes antioxidantes em alimentos e sistemas biológicos podem ser classificados em dois grupos: os ensaios usados para avaliar peroxidação lipídica, no qual um lipídio ou substrato lipoproteico sob condições padrão é usado e o grau de inibição da oxidação é medido, e os ensaios *in vitro* mais utilizados para avaliar a capacidade sequestradora de antioxidantes naturais sobre as espécies reativas do oxigênio ERO (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Além disto, para compostos isolados e sintetizados com elevado grau de pureza é possível realizar não somente uma caracterização eletroquímica, como também obter correlações entre aspectos estruturais e mecanismo de atividade antioxidante (ZARE et al, 2005). Assim, é possível utilizar técnicas eletroanalíticas para determinar a atividade antioxidante de substâncias de ampla distribuição em vegetais tais como ácidos ascórbico e elágico, resveratrol, flavonoides, hesperidina, taninos, antocianinas e derivados dos ácidos benzoico e cinâmico (BRETT e GHICA, 2003) e correlacioná-los com compostos sintéticos, por exemplo. Alguns aspectos podem ser determinados no que diz respeito aos mecanismos de oxidorredução. Entre eles pode-se destacar: avaliação do efeito de substituintes e conjugação de duplas no deslocamento de potenciais redox; efeito da participação do próton ou dependência do pH (HOTTA et al, 2002), efeito de solvente e, número de elétrons ou etapas envolvidas (ULRICOVA e WALTEROVA, 2002).

Estudos envolvendo os radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante (AA) têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. As novas informações acerca do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, tem impulsionado a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas (ALVES et al,2010).

Espécies radicalares podem atuar de maneira deletéria contra diversos organismos, inclusive sobre as plantas e consecutivamente sobre os alimentos. A peroxidação lipídica, que é a responsável pela modificação no odor e sabor dos alimentos, é a principal causa da deterioração dos corpos graxos e implica na perda da qualidade nutricional que leva à depreciação e/ou rejeição por parte dos consumidores (SILVA et al., 1999).

Na tentativa de oferecer ao consumidor alimentos de melhor qualidade, diversas metodologias foram testadas e são apresentadas na literatura para certificação da qualidade destes alimentos além de procedimentos adotados de modo a minimizar os efeitos da oxidação durante o processo de armazenamento (ALVES et al, 2010). Além destas medidas, a adição de antioxidantes aos alimentos industrializados tem sido prática corrente razão que justifica o atual interesse pela pesquisa de novos compostos antioxidantes (NIKI, 2002).

O conjunto de técnicas voltamétricas e eletroanalíticas pode correlacionar potenciais de oxidação, intensidade de corrente e/ou outros parâmetros eletroquímicos com a capacidade antioxidante, com maior seletividade e sensibilidade quando comparados aos demais métodos espectrométricos. Entre as técnicas mais difundidas destacam-se a voltametria cíclica (VC) e a voltametria de pulso diferencial (VPD). As informações mais importantes fornecidas pela voltametria cíclica são intensidade do pico anódico (I_{pa}), intensidade do pico catódico (I_{pc}), potencial do pico anódico (E_{pa}) e potencial do pico catódico (E_{pc}) (PAPANIKOS et al, 2002). Quanto maior o valor de E_{pa} , menor é o poder doador de elétron da espécie em estudo e, portanto, teoricamente, menor seu poder antioxidante.

Neste trabalho a atividade antioxidante foi investigada através da utilização de diferentes metodologias tais como, voltametria cíclica, sequestro de radicais livres pelo DPPH, habilidade de reduzir o molibdênio, habilidade de quelação de íons metálicos (Fe^{2+}) e habilidade de redução do ferro (poder redutor).

5.2.1 Voltametria cíclica em meio aprótico

As bases de Mannich e os dímeros derivados da lausona foram submetidos ao ensaio de voltametria cíclica. Os resultados são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10-Potenciais de oxirredução para os compostos A-1 a A-12 e DIM-1 a DIM-9.

Composto	Substituinte R	Substituinte R ₂	Picos catódicos (V)	Picos anódicos (V)
Branco	-	-	-0,71	-0,44
Lausona	-	-	-0,24; -0,63, -1,39	-1,16
Bases de Mannich				
A-1	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	-C ₆ H ₅	-0,40; -0,74; -0,99; -1,35	0,83; 1,14
A-2	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	-C ₆ H ₅	-0,47; -0,71; -1,40; -1,84	-1,73; -1,15
A-3	-C ₆ H ₅	2-OH C ₁₀ H ₇ O (naftil)	-0,03; -0,34; -0,66	-
A-4	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	2-OH-C ₁₀ H ₇ O (naftil)	-0,69; -1,18	-1,13; 0,18; 1,05
A-5	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	2-OH-C ₆ H ₄	0,01; -0,58; -0,76; -1,28, -1,52	-1,31; -0,61; 0,94, 1,20
A-6	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	2-OH-C ₆ H ₄	-0,64; -1,13; -1,42	-0,47; 0,96
A-7	2,4-diNO ₂ -PhHidrazina	2-OH-C ₆ H ₄	0,03; -0,80; -1,09	-0,25; 0,02; 0,62
A-8	2,4-diNO ₂ -PhHidrazina	-C ₆ H ₅	0,07; -0,68; -1,13; -1,47; -1,83	-1,42; -0,65; 0,04; 0,58
A-9	2,4-diNO ₂ -PhHidrazina	2-OH-C ₁₀ H ₇ O (naftil)	-0,82; -1,66	-1,35; -0,63; -0,06; 0,12
A-10	Pirrolidinil	2-OH-C ₆ H ₄	-0,09; -0,75; -1,52	-1,15; -0,23; 0,63
A-11	Pirrolidinil	2-OH-C ₁₀ H ₇ O (naftil)	-0,30; -0,63; -0,82; -1,29	-1,12; -0,15; 0,99; 1,27
A-12	Pirrolidinil	-C ₆ H ₅	-0,56	0,61

Composto	Substituinte R	Substituinte R ₂	Picos catódicos (V)	Picos anódicos (V)
Dímeros da lausona				
DIM-1	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄	-	-1,64; -1,19; 0,81	-1,80; - 1,34; -0,72
DIM-2	3,4,5-triOCH ₃ C ₆ H ₄	-	-1,26	-1,86; - 1,38; -0,74
DIM-3	4-Br-C ₆ H ₄	--	-1,32; -1,07; 0,44	-1,57; - 1,07; -0,73; 0,09
DIM-4	-C ₆ H ₅	-	-1,53; -0,64; - 0,19; 0,54	-1,76; - 1,05; -0,68; 0,04
DIM-5	2-OH-3-Br- C ₆ H ₃	-	-0,64; 0,93	-1,79; - 1,45; -0,78
DIM-6	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	-	-0,68; -0,12; 0,38	-1,53; - 0,73; 0,26
DIM-7	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	-	-0,61; 0,40	-1,79; -0,70
DIM-8	4-F-C ₆ H ₄	-	-1,23; 0,92	-1,49; -0,77
DIM-9	3-CH ₃ -fur-2-yl	-	-0,59; 0,98	-1,77; - 1,44; -0,67

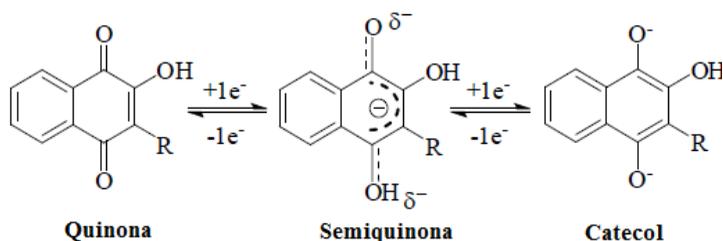
Para que fossem possíveis análises e correlações entre os grupos presentes nas estruturas dos compostos, estes foram submetidos à análise de suas condutividades e pH quando em solução. Os resultados podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11-Valores de condutividade e pH para os compostos A-1 a A-12 e DIM-1 a DIM-9.

	Cond.($\mu\text{S},\text{cm}^{-1}$)	pH
Branco	917,0	4,02
Lausona	998,9	5,25
Bases de Mannich		
A-1	829,5	4,45
A-2	871,3	5,81
A-3	1039,2	5,74
A-4	812,1	5,46
A-5	857,2	5,48
A-6	844,1	5,83
A-7	838,6	5,66
A-8	905,9	6,45
A-9	1216,1	5,90
A-10	846,8	5,80
A-11	1040,0	5,36
A-12	1186,2	7,01
Dímeros da lausona		
DIM-1	785,3	5,23
DIM-2	798,4	5,22
DIM-3	781,4	5,28
DIM-4	789,0	5,19
DIM-5	780,2	5,31
DIM-6	790,1	5,23
DIM-7	793,4	5,85
DIM-8	788,3	5,32
DIM-9	801,2	5,56

Consultando os dados da Tabela 10, observa-se o comportamento redox típico de quinonas, no qual pode ser observado, de maneira geral, a existência de duas ondas de redução. Estas ondas de redução ficam evidenciadas para a lausona e seus derivados naftoquinônicos. A primeira região de redução refere-se à formação da semi-quinona (Esquema 29) em um processo *quasi*-reversível, uma vez que semiquinonas são formadas pela redução de um elétron no meio aprótico. Vale ressaltar que a espécie semiquinona não é suficientemente básica para ser protonada e desta forma, o diânion radical formado na segunda etapa de redução deverá ter caráter mais básico e apresentar maior reatividade quando comparado à semiquinona, pois se torna

passível de sofrer reações de desproporcionamento ou reações do tipo ácido-base.



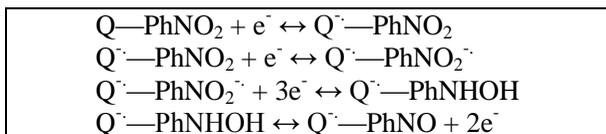
Esquema 29-Formação das espécies reduzidas das quinonas.-

Para a maior parte dos compostos, observam-se vários processos eletroquímicos ocorrendo, já que além do centro redox do núcleo quinônico os substituintes presentes apresentam comportamento redox, e são importantes no que tange ao comportamento eletroquímico destes compostos quando presentes em meio aprótico.

Pelos valores encontrados para os adutos de Mannich, percebe-se que as modificações sintéticas promovidas com o intuito de modificar o comportamento, de uma forma geral deslocam os potenciais redox, quando inseridos grupos doadores ou retiradores de elétrons. A heterogeneidade e a complexidade mecanística em termos redox se traduzem no aparecimento de uma série de regiões redox.

Com relação aos adutos de Mannich, para facilitar a compreensão da discussão dos dados, optou-se por analisar conjuntamente os adutos com similaridade estrutural, tanto em função do aldeído quanto da amina utilizados na reação de Mannich.

Iniciando pelos compostos A-2, A-4, A-6, (derivados da *p*-nitroanilina e diferentes aldeídos), A-7, A-8 e A-9 (derivados da 2,4-dinitrofenil hidrazina) que apresentam o grupo nitro ligado ao anel benzênico observa-se uma região de redução próxima a 0,5 V, característica da redução do grupo nitro presentes em quinonas em análises em meio aprótico (Esquema 30):



Esquema 30-Redução do grupamento nitro.

Uma forma de estudar o mecanismo eletródico para avaliar a influência da transferência de carga intramolecular na redução do potencial e a influência de efeitos estruturais em reações eletroquímicas, é possível utilizar relações livre de energia, nas quais é possível utilizar a equação descrita por Hammett-Zuman, $\Delta E_{1/2} = \rho_{\pi} \alpha$, utilizando a constante de Hammett α_p . Há de se ressaltar que, caso a sensibilidade estimada para os primeiros estágios ou potenciais de redução seja pequena (0,04 V, por exemplo), a correlação perde um pouco o sentido físico e não deverá ser utilizada para avaliação da condutividade eletrônica na escolha na avaliação de um determinado grupo.

De uma forma geral é possível analisar a influência de grupos em R_2 e do par de elétrons não ligante do nitrogênio não distantemente ligados ao centro reativo da naftoquinona (Figura 53):

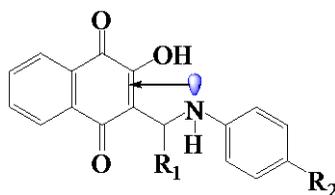


Figura 53-Efeito do grupo R_2 e do par de elétrons do nitrogênio no núcleo ativo da naftoquinona.

Observando os valores acima mencionados, é possível corroborar com a prerrogativa da literatura consultada que afirma que a sensibilidade eletrônica para os primeiros estágios de redução é pequena, o que implica em valores próximos para os picos de redução e oxidação, mesmo considerando-se os efeitos doador e retirador de elétrons.

De qualquer forma, a diferença no padrão de redução e oxidação apresentada na Tabela 10 demonstra a influência do substituinte que pode aumentar ou diminuir a densidade eletrônica no átomo de nitrogênio derivado das aminas utilizadas, anilina, *p*-toluidina, *p*-nitroanilina. Deverão ser, portanto, consideradas duas possibilidades para explicar esta hipótese: efeitos eletrônicos ao longo das ligações α ou por transferência de carga espacialmente. Se houver maior distanciamento entre os grupos e a naftoquinona ou se os efeitos forem auto-compensatórios a influência dos grupos em R_2 é praticamente desprezível e não se observa modificação significativa nos valores de potenciais de oxirredução.

Analisando os compostos derivados da *p*-toluidina **A-1** (com o benzaldeído) e **A-5** (com o 2-hidroxi-benzaldeído) observa-se um pico catódico em -0,74 para o primeiro e em -0,76 para o segundo demonstrando o efeito elétron-doador da metila ligada ao anel aromático deslocando o potencial de redução da lausona (naftoquinona de origem) em aproximadamente -0,11V.

Para uma boa elucidação mecanística dos compostos em análise deverão ser considerados dois efeitos opostos e que podem ocorrer simultaneamente: o efeito do resíduo aril da amina que facilita a redução de parte da quinona e o efeito de interação espacial, que dificulta o processo de eletrorredução da quinona. Em alguns casos, as quinonas eliminam o efeito dos substituintes por um rearranjo na superfície do eletrodo, sem qualquer interação espacial condizendo o comportamento eletroquímico de quinonas substituídas, como pode ser observado para os compostos **A-3** (derivado da anilina e β -hidroxinaftaldeído), **A-11** (derivada da pirrolidina e do β -hidroxinaftaldeído) e **A-12** (derivado da pirrolidina e benzaldeído) para os quais se observam um número reduzido de processos de oxidação e redução.

Prosseguindo na análise compararam-se os valores obtidos para o pico anódico da lausona e adutos em questão. Observou-se que de uma forma geral há um deslocamento considerável, exceto para os compostos **A-2**, **A-4**, e **A-10** para os quais observou-se variação irrisória de apenas 0,02 V. Estruturalmente estes compostos apresentam em sua estrutura a *p*-nitroanilina (**A-2** e **A-4**) ou a pirrolidina (**A-10** e **A-11**) sugerindo os efeitos auto compensatórios acima mencionados.

Além dos fatores explicitados, devem ser considerados a densidade eletrônica e a possível protonação do átomo de nitrogênio no resíduo da amina.

Da mesma forma, os dímeros derivados da lausona foram analisados e foi possível observar menores alterações nos valores de deslocamento dos potenciais redox. Os compostos apresentaram praticamente a mesma condutividade e exibiram quase que o mesmo valor de pH, reforçando a influência do componente derivado do composto nitrogenado, na modificação dos potenciais. Uma vez, que as alterações estruturais foram menos proeminentes, houve maior proximidade de comportamento eletroquímico.

Para os dímeros derivados da lausona, observou-se menores valores para os picos anódicos e portanto melhor atividade antioxidante, para os compostos **DIM-1** e **DIM-2** que apresentavam grupos elétron doadores presentes na estrutura e que eram derivados do *p*-metoxibenzaldeído e 3,4,5-trimetoxibenzaldeído. Da mesma forma, os

maiores valores para o pico anódico, e a considerada menor atividade antioxidante, foram encontrados para os compostos **DIM-6** e **DIM-8**, derivados do *p*-nitro e *p*-flúorbenzaldeído, respectivamente.

A análise dos potenciais de oxidação e redução foi comparada com os resultados de atividade antioxidante e será apresentada a seguir.

5.2.2 Correlação entre a atividade antioxidante e os ensaios eletroquímicos

Os métodos espectrofotométricos são relativamente simples e baseiam-se no descoloramento da amostra.

O ensaio envolvendo a quelação do ferro, também chamado metal quelante ou método da ferrozina trata-se de um método espectrofotométrico que quantifica a concentração de Fe(II) presente no meio reacional por meio da adição de um agente complexante, a Ferrozina (Fz). A Ferrozina, neste caso o sal dissódico do ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4',4''-dissulfônico reage com íons ferrosos para formar um complexo de coloração roxa altamente solúvel em água (STOOKEY,1970). Este complexo, de estequiometria 1:3 (Fe:Fz), possui pico de absorção máximo em 562 nm e, neste comprimento de onda, coeficiente de absorvidade molar (ϵ) $27.900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. A complexação do Fe(II) pela ferrozina ocorre pelo nitrogênio do grupo piridina e pelo nitrogênio 2- do grupo triazina (Figura 54).

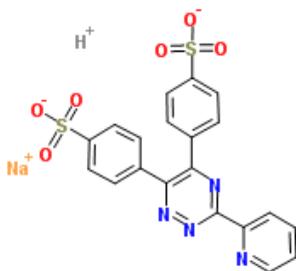
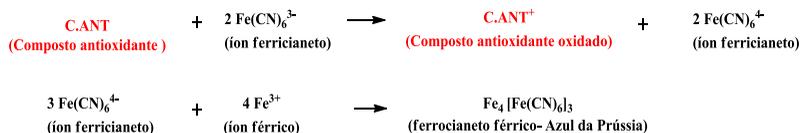


Figura 54-Estrutura da ferrozina utilizada nos ensaios de complexação para verificação da atividade antioxidante.

O cérebro é particularmente vulnerável à peroxidação lipídica, pois consome uma grande quantidade de oxigênio e é rico em ácidos graxos poli-insaturados altamente peroxidáveis; além disso, sua capacidade antioxidante é limitada (OBOH & HELEN, 2009). Em

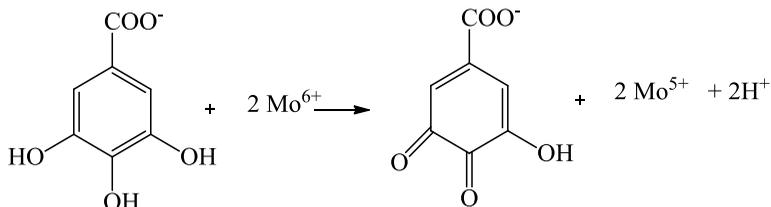
cérebros sob estresse oxidativo, o ferro pode ser liberado de proteínas de armazenamento, como ferritina ou heme proteínas, e contribuir para a iniciação e propagação da peroxidação lipídica. Acredita-se que o radical hidroxil esteja envolvido na iniciação da peroxidação lipídica. Entretanto, alguns investigadores têm questionado essa afirmação, sugerindo que Fe^{+2} e Fe^{+3} podem estar envolvidos em um complexo ferro-oxigênio, agindo como espécie oxidante.

Os métodos baseados na redução do Fe^{+3} , que determinam o poder redutor são também utilizados para avaliação da atividade antioxidante. Tais métodos avaliam a capacidade de compostos fenólicos reduzirem o Fe^{+3} , com conseqüente formação de um complexo colorido com Fe^{+2} (azul da Prússia) (ROGINSKY & LISSI, 2005), Esquema 31:



Esquema 31-Formação do complexo ferrocianeto férrico durante a realização do ensaio poder redutor.

Outro método para determinação da atividade antioxidante foi descrito por Prieto (1999) e fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, como o ácido gálico exemplificado no Esquema 32, e que leva formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695 nm.



Esquema 32-Redução do molibdênio promovida pelo ácido gálico.

Além destes, o ensaio utilizando o DPPH é um dos métodos indiretos mais simples sugerido, utilizado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados. A característica desse

Tabela 12-Atividade antioxidante para as bases de Mannich derivadas da lausona.

Amostra	R ₁	R ₂	Metal quelante (EC ₅₀ µM)	Poder redutor (mg AAE /g)	Capacidade antioxidante total (mg AAE/g)	Sequestro do radical DPPH (EC ₅₀ µM)
A-1	4-CH ₃ - C ₆ H ₄	-C ₆ H ₅	79,13± 0,15	976,23 ± 2,12	398,40 ± 0,32	24,20 ± 0,21
A-2	4-NO ₂ - C ₆ H ₄	-C ₆ H ₅	100,20 ± 0,22	712,95 ± 1,26	291,85 ± 0,22	30,57 ± 0,02
A-3	-C ₆ H ₅	2-OH C ₁₀ H ₇ O (naftil)	192, 96± 0,97	352,73 ± 2,76	142,61 ± 0,09	60,77 ± 0,05
A-4	4-NO ₂ - C ₆ H ₄	2-OH-C ₁₀ H ₇ O (naftil)	79,73± 0,44	771,23 ± 2,11	313,91 ± 0,73	24,33 ± 0,23
A-5	4-CH ₃ - C ₆ H ₄	2-OH-C ₆ H ₄	70,36± 0,13	1053,81 ± 2,06	430,41 ± 0,44	21,46 ± 0,02
A-6	4-NO ₂ - C ₆ H ₄	2-OH-C ₆ H ₄	95,63± 0,23	720,41 ± 0,90	292,15 ± 0,24	29,28 ± 0,09
A-7	2,4-diNO ₂ - PhHidrazin a	2-OH-C ₆ H ₄	119, 90± 0,77	501,18 ± 0,78	205,13 ± 0,29	37,01 ± 0,11
A-8	2,4-diNO ₂ - PhHidrazin a	-C ₆ H ₅	128,72 ± 0,33	483,94 ± 0,21	198,17 ± 1,21	39,29 ± 0,19
A-9	2,4-diNO ₂ - PhHidrazin a	2-OH-C ₁₀ H ₇ O (naftil)	174,78 ± 0,12	520,57 ± 0,74	210,13 ± 0,22	32,16 ± 0,14
A-10	Pirrolidimil	2-OH-C ₆ H ₄	195,06 ± 0,14	420,81 ± 0,29	172,83 ± 0,54	60,07 ± 0,26

Amostra	R ₁	R ₂	Metal quelante (EC ₅₀ μM)	Poder redutor (mg AAE /g)	Capacidade antioxidante total (mg AAE/g)	Sequestro do radical DPPH (EC ₅₀ μM)
A-11	Pirrolidinil	2-OH-C ₁₀ H ₇ O (naftil)	169,99 ± 0,72	422,36 ± 0,93	173,92 ± 0,07	50,87 ± 0,16
A-12	Pirrolidinil	-C ₆ H ₅	210,60 ± 0,78	408,36 ± 0,42	166,92 ± 0,11	64,76 ± 0,27
Rutina	---	---	67,73 ± 0,16	1622,10 ± 11,76	310,43 ± 1,87	4,56 ± 0,17
BHT	---	---	93,71 ± 0,29	1641,89 ± 14,23	548,24 ± 1,23	30,59 ± 0,21
EDTA	---	---	15,91 ± 0,02	---	---	---

Cada um dos valores foi expresso ± com seu desvio padrão.

Uma análise dos resultados obtidos para esta série de compostos demonstra a potencialidade desta classe de compostos quanto à sua ação antioxidante. A atividade antioxidante dos 5 compostos mais ativos da série (**A5**, **A1**, **A4**, **A6**, **A2**) é comparável aos padrões rutina e BHT utilizados nestas análises.

Para estes compostos podemos visualizar uma relação clara entre a estrutura dos compostos e sua atividade. Os dois compostos mais ativos tem em comum a *p*-toluidina em sua estrutura. Grupos que apresentam efeito indutivo doador de elétrons costumemente aumentam a atividade antioxidante. Vale lembrar que apesar de não haver um sistema de conjugação eletrônica entre os substituintes provenientes do aldeído e das diferentes aminas, estes influenciam decisivamente nos potenciais redox do centro da quinona, que pode ser observado no RMN de ^1H e também nas análises voltamétricas, provavelmente por haver um hidrogênio alifático sp^3 de elevada acidez que lhe confere característica de carbono sp^2 , deixando o sistema com maior conjugação. Isto significa dizer que planejar a síntese com diferentes grupos na estrutura de ambos os substituintes é uma alternativa válida para estudos de correlação, como desenvolvemos neste trabalho.

Da série sintetizada, os outros compostos a apresentarem alta atividade antioxidante são todos derivados da *p*-nitroanilina e seguem a ordem de atividade segundo os diferentes aldeídos: 2-hidroxi-naftaldeído > *o*-hidroxi benzaldeído > benzaldeído. Este padrão de atividade repete para os demais compostos da série e demonstra a importância da hidroxila fenólica para o aumento da atividade. É sabido que a hidroxila presente em compostos fenólicos pode atuar de forma a complexar e reduzir elementos metálicos e estabilizar o radical livre DPPH o que explica o aumento da atividade.

Os compostos derivados da 2,4-dinitrofenil hidrazina **A9** (β -hidroxi-naftaldeído), **A7** (2-hidroxi-benzaldeído) e **A8** (benzalaldeído) apesar da possibilidade de atuação como dinucleófilos apresentam dois grupamentos nitro presentes na estrutura do anel aromático o que contribui para a redução da nucleofilicidade dos átomos de nitrogênio, diminuindo a disponibilidade de elétrons para a complexação metálica, por exemplo, e a atividade antioxidante de um modo geral.

A substituição de um anel aromático por um heterociclo saturado, pirrolidina para os compostos **A11** (β -hidroxi-naftaldeído), **A12** (benzalaldeído) e **A10** (2-hidroxi-benzaldeído) acarretou em menor atividade, provavelmente por diminuir a eletrofilicidade do nitrogênio e

aumentar o impedimento estérico, dificultando os mecanismos de ação antioxidante.

Para avaliação da atividade antioxidante é necessário que se estabeleçam diferentes metodologias que estejam baseadas em diferentes mecanismos de ação, para que haja maior confiabilidade. Neste trabalho, a correlação feita entre as atividades antioxidantes acima mencionadas mostrou excelentes padrões de correlação linear ($r^2 > 0,84$) (Tabela 13).

Tabela 13- Correlação da atividade antioxidante para as bases de Mannich.

Atividades correlacionadas	Porcentagem de correlação (%)
Poder redutor e metal quelante	88,0
Poder redutor e antioxidante total	99,9
Poder redutor e DPPH	84,7
Metal quelante e DPPH	92,1
Antioxidante total e DPPH	84,4
Metal quelante e antioxidante total	87,9

A presença de vários picos catódicos e anódicos dificulta a correlação entre as atividades anteriormente mencionadas e os ensaios utilizando voltametria cíclica.

5.2.4 Dímeros da lausona

Para a série de dímeros derivados da lausona (**DIM-1 a DIM-9**) foram realizados os mesmos ensaios antioxidantes para os quais se buscou padrões de correlação para estas atividades. Os resultados estão expressos na Tabela 14.

Tabela 14-Atividade antioxidante para os dímeros derivados da Lausona.

Amostra	Substituinte	Metal quelante (EC ₅₀ μM)	Poder redutor (mg AAE /g)	Capacidade antioxidante total (mg AAE/g)	Sequestro do radical DPPH (EC ₅₀ μM)
DIM-2	3,4,5-triOCH ₃ C ₆ H ₄	61,01± 0,17	836,23 ± 0,99	325,12 ± 0,44	22,81 ± 0,11
DIM-1	4-OCH ₃ - C ₆ H ₄	81,25 ± 0,12	705,12 ± 0,86	275,99 ± 0,44	30,25 ± 0,22
DIM-5	2-OH-3-Br- C ₆ H ₃	98,71 ± 0,11	510,00 ± 1,26	197,88 ± 0,19	37,02 ± 0,12
DIM-7	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	120,12 ± 0,18	495,66 ± 1,88	192,11 ± 0,42	44,67 ± 0,09
DIM-9	3-CH ₃ -fur-2- il	129,20 ± 0,16	470,81 ± 0,88	181,13 ± 0,94	50,38 ± 0,17
DIM-4	-C ₆ H ₅	130,88 ± 0,21	468,09 ± 0,26	179,09 ± 0,66	51,61 ± 0,84
DIM-3	4-Br-C ₆ H ₄	115, 49± 0,13	450,11 ± 1,21	173,98 ± 0,12	44,86 ± 0,65
DIM-6	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	130,64 ± 0,33	426,12 ± 0,14	165,09 ± 0,38	50,23 ± 0,78
DIM-8	4-F-C ₆ H ₄	141,70 ± 0,65	417,08 ± 0,09	161,08 ± 0,24	55,18 ± 0,64
Rutina	---	67,73 ± 0,16	1622,10 ± 11,76	310,43 ± 1,87	4,56±0,17
BHT	---	93,71 ± 0,29	1641,89 ± 14,23	548,24 ± 1,23	30, 59 ± 0,21
EDTA	---	15,91 ± 0,02	---	---	---

Cada um dos valores foi expresso ± com seu desvio padrão.

Observando atentamente os dados apresentados na Tabela 14, é possível perceber que a atividade antioxidante para os compostos desta série apresentou excelentes valores quando avaliada por diferentes métodos, inclusive comparável em ordem de grandeza aos padrões utilizados (BHT e rutina).

Destacam-se para esta atividade os compostos **DIM-2** e **DIM-1**, derivados do 2,4,5-trimetoxibenzaldeído e 4-metoxibenzaldeído respectivamente. Como dito anteriormente, a presença destes substituintes tendem a aumentar a atividade antioxidante dos compostos

já que é um forte grupo doador de elétron, o que aumenta a estabilidade do anel benzênico, resultando em aumento da atividade sequestradora de radicais livres, por exemplo. Além disso, apresentam importância por aumentar a nucleofilicidade no átomo responsável pela formação de estruturas complexas do tipo quelato e ainda contribuir com o aumento da possibilidade de redução de espécies metálicas.

Mais uma vez, foi possível observar que a presença de elementos eletronegativos tende a diminuir a atividade antioxidante, como resultado exatamente oposto a aquele observado para os substituintes metila e metoxila, como é o caso dos compostos **DIM-3**, **DIM-6**, **DIM-8** derivados do 4-bromo, 4-nitro e 4-flúorbenzaléido respectivamente.

Os diferentes métodos de investigação para as atividades antioxidantes foram correlacionados entre si (Tabela 15), apresentando um mínimo de 93,6% de correlação demonstrando uma alta confiabilidade nos resultados obtidos. Vale ressaltar que estes valores de alta correlação são resultado de análises realizadas em triplicatas, com experimentos múltiplos.

Tabela 15-Correlação entre as metodologias de atividade antioxidante para os dímeros.

Atividades correlacionadas	Porcentagem de correlação (%)
Poder redutor e metal quelante	94,5
Poder redutor e antioxidante total	99,9
Poder redutor e DPPH	93,6
Metal quelante e DPPH	99,8
Antioxidante total e DPPH	93,9
Metal quelante e antioxidante total	94,7

Quando correlacionados com os ensaios voltamétricos, podemos observar uma correlação entre as atividades *in vitro* e o potencial anódico. Os compostos seguiram exatamente o previsto para a atividade com melhores resultados de atividade para os compostos na ordem **DIM-2> DIM-1> DIM-5 > DIM-7> DIM-9> DIM-4> DIM-3>DIM-6> DIM-8**, de acordo com o aumento no potencial anódico e exatamente na mesma sequência, com os valores extremos -1,86V para o **DIM-2** e -

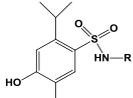
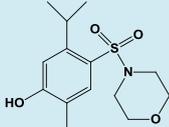
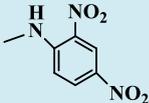
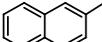
1,49V para o **DIM-8**. Como visto anteriormente, quanto maior o valor do potencial anódico, menor a atividade antioxidante observada para os compostos desta série.

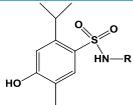
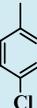
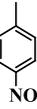
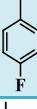
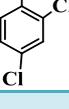
As atividades antioxidantes foram relacionadas ao potencial anódico e observou-se um bom padrão de correlação, como 65,9; 67,4; 66,9 e 66,4% para quelação do ferro, poder redutor, redução do molibdênio e sequestro de radicais livres DPPH, respectivamente.

5.2.5 Sulfonamidas

As sulfonamidas também foram avaliadas através dos mesmos testes de atividade antioxidante (Tabela 16).

Tabela 16-Atividade antioxidante para as sulfonamidas S-1 a S-11.

Amostra	 Substituinte R	Metal quelante (EC ₅₀ μM)	Poder redutor (mg AAE /g)	Capacidade antioxidante total (mg AAE/g)	Sequestro do radical DPPH (EC ₅₀ μM)
S-10		65,93 ± 0,37	988,13 ± 0,12	517,13 ± 0,24	82,31 ± 0,09
S-1		110,72 ± 0,24	631,71 ± 0,32	330,63 ± 0,11	138,21 ± 0,23
S-7	-NH ₂	144,46 ± 0,84	593,50 ± 0,99	310,67 ± 0,41	180,26 ± 0,32
S-8		151,81 ± 0,21	477,81 ± 0,31	250,82 ± 0,29	185,93 ± 0,63
S-9		160,65 ± 0,16	406,93 ± 0,21	213,63 ± 0,78	199,86 ± 0,12
S-5		234,09 ± 0,37	291,07 ± 0,98	152,78 ± 0,54	291,31 ± 0,27
S-6		227,12 ± 0,99	259,46 ± 1,01	136,19 ± 0,18	382,61 ± 0,76

Amostra	 Substituinte R	Metal quelante (EC ₅₀ μM)	Poder redutor (mg AAE /g)	Capacidade antioxidante total (mg AAE/g)	Sequestro do radical DPPH (EC ₅₀ μM)
S-4		400,30 ± 0,21	154,09 ± 0,18	80,93 ± 0,12	498,27 ± 0,09
S-3		417,49 ± 0,99	143,18 ± 0,75	75,16 ± 0,53	517,49 ± 0,93
S-2		465,39 ± 0,72	139,33 ± 0,99	73,05 ± 0,21	579,05 ± 0,25
S-11		507,77 ± 0,57	129,33 ± 0,88	67,89 ± 0,13	712,19 ± 0,96
Rutina	-	67,73 ± 0,16	1622,10 ± 11,76	310,43 ± 1,87	4,56 ± 0,17
BHT	-	93,71 ± 0,29	1641,89 ± 14,23	548,24 ± 1,23	30,59 ± 0,21
EDTA	-	15,91 ± 0,02	---	---	---

Cada um dos valores foi expresso ± com seu desvio padrão.

A análise da atividade antioxidante da série de sulfonamidas demonstra o alto potencial desta classe de compostos. Analisando a capacidade antioxidante total, pode-se observar que três dos compostos **S-10**, **S-1** e **S-7** apresentaram atividade igual ou superior ao padrão rutina. Isto demonstra a habilidade deles em reduzir átomos de molibdênio. Além disto, demonstraram boa atividade para as demais metodologias antioxidantes avaliadas. Obviamente os valores observados para o sequestro de radicais livres para os padrões são melhores porque acompanham o número de hidroxilas presentes nos compostos fenólicos que compõe a estrutura da rutina, por exemplo.

Assim como ocorreu nas análises antioxidantes para os adutos de Mannich e dímeros da Lausona, as metodologias foram correlacionadas e o resultado está apresentado na Tabela 17.

Tabela 17-: Correlação entre as metodologias antioxidantes para as sulfonamidas.

Atividades correlacionadas	Porcentagem de correlação (%)
Poder redutor e metal quelante	86,5
Poder redutor e antioxidante total	99,9
Poder redutor e DPPH	86,8
Metal quelante e DPPH	98,5
Antioxidante total e DPPH	86,7
Metal quelante e antioxidante total	86,6

A correlação mínima observada foi de 86,5%, que ainda pode ser considerada uma boa correlação, levando em consideração os diferentes mecanismos investigados para cada uma delas.

5.3 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

5.3.1 A enzima acetilcolinesterase

O sistema neurotransmissor mais importante envolvido na regulação das funções cognitivas, é o sistema colinérgico central. Assim, para contrariar a perda de neurônios colinérgicos na área do hipocampo, que é uma das principais características associadas à doença de Alzheimer, faz-se necessário induzir um aumento da atividade colinérgica central. Isto pode ser possível através do uso de agentes anticolinesterásicos, já que a enzima acetilcolinesterase (AChE) é fundamental neste processo (DI GIOVANNI et al, 2008).

A inibição da AChE é a uma das estratégias mais indicadas e investigadas para o tratamento de diversas doenças neurológicas, como a doença de Alzheimer, a demência senil, a ataxia, a miastenia grave e a doença de Parkinson (MUKHERJEE et al, 2007).

A inibição da enzima AChE não é simples, já que esta enzima (Figura 56) é de extrema complexidade. A AChE é uma serina hidrolase que reage seletivamente com o seu substrato natural, a acetilcolina (ACh). Estruturalmente esta enzima é composta por diversas formas moleculares, que podem ser divididas em formas assimétricas e formas globulares, com estas últimas existentes como monômeros, dímeros ou tetrâmeros catalíticos, quer secretados como formas solúveis ou ancoradas à membrana por um domínio hidrofóbico (RACCHI, 2008).

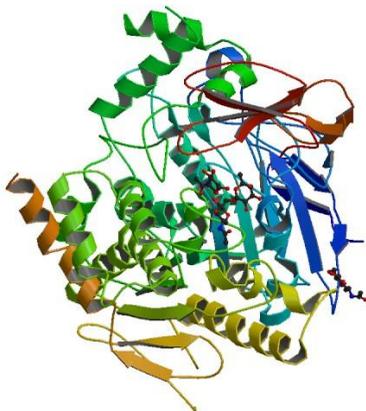


Figura 56-Estrutura da enzima AChE.

Vários estudos tem sido desenvolvidos utilizando as mais distintas técnicas, e estes demonstraram que o sítio da AChE é composto de vários domínios principais: (a) um domínio que contém a serina ativa, (b) um domínio aniônico que acomoda o pólo positivo da ACh e (c) domínios hidrofóbicos que ligam substratos aril, e outros ligantes sem carga (KOVARIK, 2003). A tríade catalítica é constituída pelos resíduos de aminoácido Ser 203, His 447 e Glu 334 (BOURNE et al, 2003). Em relação à inibição da AChE, alguns inibidores se ligam ao centro catalítico (inibidores competitivos), enquanto outros influenciam os parâmetros de estado estacionário pela associação com um domínio alostérico afastado do sítio ativo. Este domínio é referido como o centro aniônico periférico (BOURNE et al, 2003).

Compostos isolados de produtos naturais ou derivados semi-sintéticos que atuam como inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) podem ser utilizados no tratamento de neuropatias degenerativas, como Doença de Alzheimer e Parkinson, bem como outras desordens relativas à transmissão colinérgica como miastenia gravis, paralisias musculares causadas por agentes químicos, intoxicação por escopolamina e outras patologias associadas à perda de memória.

Neste trabalho foi investigada a atividade acetilcolinesterásica para as três séries de compostos e os resultados serão apresentados a seguir (Tabela 18).

Tabela 18-Atividade de inibição da enzima AChE.

Composto	Inibição da AChE [IC₅₀ (μM)]
Galantamina	17,05 ± 0,21
Bases de Mannich	
A-1	39,86 ± 0,11
A-2	70,16 ± 0,22
A-3	42,27 ± 0,32
A-4	65,90 ± 0,17
A-5	37,09 ± 0,13
A-6	67,24 ± 0,16
A-7	58,25 ± 0,09
A-8	59,32 ± 0,12
A-9	56,90 ± 0,11
A-10	29,12 ± 0,25
A-11	28,97 ± 0,06
A-12	30,99 ± 0,29
Dímeros da lausona	
DIM-1	15,98 ± 0,03
DIM-2	12,23 ± 0,07
DIM-3	45,12 ± 0,36
DIM-4	43,09 ± 0,22
DIM-5	23,49 ± 0,76
DIM-6	46,00 ± 0,11
DIM-7	16,88 ± 0,19
DIM-8	29,09 ± 0,04
DIM-9	27,99 ± 0,32
Sulfonamidas	
S-1	5,64 ± 0,33
S-2	36,72 ± 0,21

Composto	Inibição da AChE [IC ₅₀ (μM)]
S-3	34,91 ± 0,81
S-4	32,98 ± 0,11
S-5	7,34 ± 0,31
S-6	20,89 ± 0,08
S-7	9,24 ± 0,12
S-8	22,05 ± 0,32
S-9	6,99 ± 0,28
S-10	8,74 ± 0,02
S-11	24,18 ± 0,06

Dos cinco fármacos atualmente utilizados no tratamento da doença de Alzheimer, quatro atuam como agentes anticolinesterásicos. São eles, a tacrina, donezepila, rivastgminina e galantamina. Estruturalmente estes compostos apresentam algumas características comuns, tais como a presença grupos doadores de elétrons, anéis aromáticos, heterociclos aromáticos e não aromáticos contendo átomos de nitrogênio e centros carbonílicos.

Analisando primeiramente a série dos adutos de Mannich, pode-se observar uma boa atividade de inibição de modo geral. Os compostos com melhor atividade, menor IC₅₀, foram os compostos **A-11**, **A-10** e **A-12**, todos contendo, além de outras características estruturais, um heterociclo saturado derivado da pirrolidina. Dentre os demais, observa-se destaque para os compostos **A-5** e **A-1** que apresentam grupos metila doadores de elétrons e derivados da *p*-toluidina. Vale salientar que para uma mesma amina constituinte da base de Mannich, observou-se melhores resultados para os aldeídos constituintes da molécula, na ordem 2-hidroxinaftaldeído > 2-hidroxibenzaldeído > benzaldeído. Os compostos contendo grupos retiradores de elétrons, como nitro, apresentaram os piores índices de inibição e dentre estes aqueles contendo a hidrazina apresentaram-se com melhores valores de inibição enzimática.

Quando analisados os dímeros derivados da lausona podemos observar excelentes valores de inibição, principalmente para os compostos **DIM-2**, **DIM-1** e **DIM-7** derivados do 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, 4-metóxibenzaldeído e *p*-metilbenzalaldeído respectivamente, que se mostraram mais ativos que o padrão galantamina utilizado. Estruturalmente estes compostos se assemelham aos inibidores desta enzima no sentido de apresentarem grupos doadores

de elétrons (metoxila ou metila), anéis aromáticos, hidroxilas e carbonilas que parecem ser importantes para a atividade. Novamente para os compostos com substituintes com habilidade de retirar elétrons observou-se menor atividade, que são os compostos **DIM-3** e **DIM-6**, derivados do 4-bromo e 4-nitrobenzaldeído respectivamente.

Para a série das sulfonamidas observou-se uma atividade de inibição enzimática superior às demais classes investigadas neste trabalho. A análise dos valores de IC_{50} para os compostos **S-1**, **S-9**, **S-5**, **S-10** e **S-7** derivados da morfolina, 2-amino-1-picolilamina e 2-aminopirazina, *o*-hidóxi-anilina e hidrazina, respectivamente, demonstram valores de atividade superiores ao padrão galantamina. Para estas sulfonamidas observa-se, a presença dos heterociclos nitrogenados, grupos doadores de elétrons, hidroxilas e anéis aromáticos, que compõe o esqueleto básico de grande parte dos agentes anticolinesterásicos.

Maiores informações sobre a correlação estrutura atividade serão obtidas através da correlação destes dados experimentais com estudos quantitativos do tipo QSAR que serão desenvolvidos posteriormente.

5.4 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

A atividade nociceptiva foi investigada pela mestre Catharina Nucci, supervisionada pelo professor Dr. Adair R.S. Santos, do Departamento de Fisiologia da UFSC.

5.4.1 Nociceção e o estresse oxidativo

O desequilíbrio redox, com o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) em relação aos agentes do sistema de defesa antioxidante, causa estresse oxidativo e, conseqüentemente, muitos danos celulares (Halliwell e Gutteridge, 2007; Rao, 2009). Neste sentido, estudos têm demonstrado que as EROs participam da fisiopatologia de diversas doenças como a hemocromatose, β -talassemia, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, cirrose hepática, alguns tipos de câncer, na doença de Parkinson e na doença de Alzheimer (CAPPELLINI et al., 2006; Halliwell, 2007; ALLEN et al., 2008; Gorrini et al., 2013; Hsieh e Yang, 2013; Yan et al., 2013). Ademais, dados da literatura indicam que as EROs também estão envolvidas na dor de várias etiologias, incluindo a dor neuropática e inflamatória (KIM et al., 2004; WANG et al., 2004; Coderre et al., 2004; SCHWARTZ et al., 2006; BARRIÈRE et al., 2012). Em contrapartida, vários “sequestradores” (*scavengers*) de EROs, reduzem comportamentos de dor em diversas condições dolorosas (TAL, 1996;

KIM et al., 2006; HACIMUFTUOGLU A. et al. 2006; JANES et al., 2012; PARK et al., 2013).

O sistema nervoso apresenta características que o tornam particularmente suscetível ao estresse oxidativo por ter em sua constituição uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, tornando-se alvo considerável da lipoperoxidação mediada por radicais livres, bem como altas concentrações de ferro em algumas regiões e o grande consumo de oxigênio (Dugan e Kim-Han, 2006). O ferro é um catalisador importante de EROs e promove a formação do radical hidroxil, do ânion superóxido e da molécula peróxido de hidrogênio (Robbins et al., 2000). Em contrapartida, agentes quelantes de ferro, como a desferrioxamina, podem promover atividade anti-inflamatória em modelos animais de inflamação aguda e crônica (Blake et al., 1983).

Wang e colaboradores (2004) identificaram o superóxido como um novo mediador da hiperalgisia (cl clinicamente definida como uma sensibilidade aumentada a estímulos dolorosos) e expuseram as possíveis vias moduladoras desta resposta hiperalgésica. Para isto, os autores usaram o teste agudo da injeção intraplantar de carragenina em ratos e após o desenvolvimento da inflamação periférica, avaliaram o edema da pata, a liberação de citocinas no exsudato da pata, a formação de nitrotirosina (um marcador de formação de peroxinitrito e estresse oxidativo), a ativação da poli-ADP-ribose-polimerase (enzima nuclear ativada por superóxido/peroxinitrito) e a hiperalgisia, demonstrando que o M40403 (mimético da superóxido dismutase) foi capaz de bloquear, de forma tempo dependente, todos os parâmetros de inflamação e hiperalgisia medidos. Ainda, Khattab (2006) demonstrou que o TEMPOL, um *scavenger* de radical livre permeável à membrana, foi capaz de reduzir a hiperalgisia e o edema de pata induzido por carragenina, um potente indutor químico de inflamação.

Estudos sugerem que o estresse oxidativo aumenta a fosforilação dos receptores NMDA, um agonista glutamatérgico do tipo ionotrópico, na transmissão nociceptiva (dor) (GAO et al., 2007). Ademais, está bem estabelecido na literatura que a ativação do receptor NMDA induz despolarização prolongada dos neurônios, sendo que este mecanismo pós-receptor envolve a ativação de proteínas cinases, mobilização de Ca^{2+} intracelular, indução dos genes e ainda a produção de mediadores nociceptivos e/ou inflamatórios, tais como prostaglandinas e óxido nítrico (HILL, 2001). Assim, considerando os dados da literatura sobre a estreita relação do estresse oxidativo e do receptor glutamatérgico NMDA na dor, este estudo optou pela realização de um *screening* inicial na dor aguda utilizando o teste do glutamato intraplantar.

5.4.2 Sinalização glutamatérgica e dor

A dor atua como um mecanismo de alerta do corpo, “informando” que algo está ameaçando o bem-estar do indivíduo, para que a causa seja rapidamente identificada e afastada (WALL, 1999). Neste sentido, a dor é um sinal clinicamente importante para a detecção e avaliação de muitas doenças. A Associação Internacional para o Estudo da Dor a define como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER e TREEDE, 2008). Entretanto, sua percepção é complexa, envolvendo dois componentes distintos, um componente emocional e um componente fisiológico ou sensorial, denominado nocicepção (RUSSO e BROSE, 1998; JULIUS e BASBAUM, 2001). Assim, os modelos animais de analgesia avaliam a nocicepção pelo comportamento do animal frente ao estímulo nocivo.

Grandes evidências indicam que os aminoácidos, principalmente o glutamato, encontrado em fibras C e A δ , fibras nervosas de diâmetros menores e mais lentas que transportam os sinais aferentes dos nociceptores, apresenta um papel fundamental na transmissão da dor, pois provoca a despolarização pós-sináptica e propagação da informação nociceptiva (MILLAN, 1999; BARON, 2006). Existem dois grupos distintos de receptores glutamatérgicos denominados ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são canais iônicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e cainato e os receptores metabotrópicos são acoplados a proteína G (DICKENSON, 1997).

Ademais, uma excitabilidade anormal causada por inflamação ou lesão, normalmente pode decorrer pelo aumento da expressão ou da ativação de receptores, que podem ser estimulados pelo glutamato. Sendo assim, substâncias capazes de causar modificações seletivas na sinalização glutamatérgica podem dar origem a novos agentes analgésicos e anti-inflamatórios (Parsons, 2001; Bleich et al., 2003; ZHOU et al., 2011).

5.4.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato

O sistema glutamatérgico é um dos mais importantes sistemas de neurotransmissores envolvidos na estimulação e manutenção da nocicepção e da antinocicepção, tanto em nível periférico quanto

central (FUNDYTUS, 2001; RIEDEL e NEECK, 2001). Assim, para melhor compreensão do efeito antinociceptivo de algumas sulfonamidas derivadas do carvacrol, foi empregado o modelo da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato com o objetivo de também evidenciar a possível interação periférica do sistema glutamatérgico na ação antinociceptiva dos compostos analisados. Devido ao alto número de animais que seriam utilizados, caso fossem testados todos os compostos, esta parte do trabalho restringiu-se aos testes com as sulfonamidas **S-1** (morfolina), **S-2** (*p*-fluoranilina), **S-9** (2-amino-1-picolilamina) **S-10** (*o*-hidroxianilina) e **S-11** (2,4-dicloroanilina), por maior disponibilidade do composto, em termos de quantidade e por apresentarem maior variabilidade estrutural. Os demais compostos serão testados futuramente.

5.4.4 Efeito dos compostos sobre a nocicepção induzida pelo glutamato

Os resultados apresentados na Figura 57 mostram que o tratamento sistêmico dos animais com os compostos carvacrol, **S-1**, **S-2**, **S-9** e **S-11** inibe de forma significativa a nocicepção induzida pela injeção de 20 $\mu\text{mol/i.pl.}$ de glutamato, sugerindo que estes compostos apresentam importante efeito terapêutico para o tratamento da dor aguda e ainda que os mesmos são capazes de diminuir a sinalização glutamatérgica periférica.

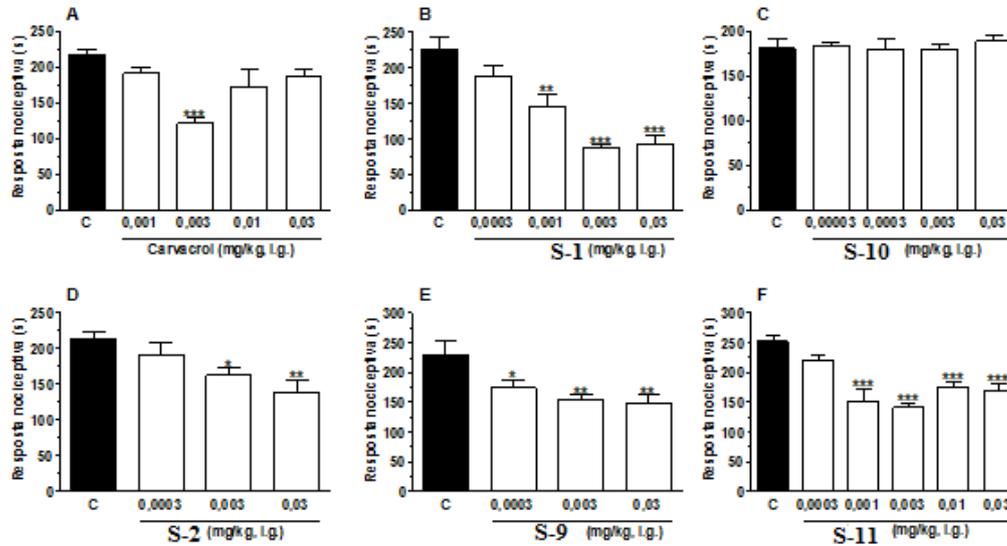


Figura 57-Efeito dos compostos sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. O comportamento nociceptivo foi avaliado 1 hora após o tratamento com carvacrol (A), S-1(B), S-10 (C), S-2 (D), S-9 (E) e S-11 (F), em doses que variaram de 0,00003 a 0,03 mg/kg (colunas abertas) ou veículo (controle: C, barra fechada), por via intragástrica. Os animais receberam a injeção intraplantar de glutamato e a nocicepção foi avaliada por 15 min. Cada coluna representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Em contraste, **S-10** (0,00003-0,03 mg/kg, i.g.) não foi capaz de reduzir de forma significativa a nocicepção induzida por glutamato. O tratamento com os compostos reduz significativamente o comportamento nociceptivo, traduzido pelo fato de lambe as patas, induzido pela injeção intraplantar de glutamato, apresentando inibições de: $44 \pm 3\%$ para o carvacrol na dose de 0,03 mg/kg, i.g.; $36 \pm 7\%$, $61 \pm 2\%$ e $59 \pm 6\%$ para o **S-1** nas doses de 0,001, 0,003 e 0,03 mg/kg, i.g., respectivamente; $24 \pm 5\%$ e $35 \pm 8\%$ para o **S-2** nas doses de 0,003 e 0,03 mg/kg, i.g., respectivamente; $24 \pm 6\%$, $33 \pm 3\%$ e $36 \pm 6\%$ para o **S-9** nas doses de 0,0003, 0,003 e 0,03 mg/kg, i.g., respectivamente e $40 \pm 8\%$, $44 \pm 3\%$, $30 \pm 4\%$ e $33 \pm 5\%$ para o **S-11** nas doses de 0,001, 0,003, 0,01 e 0,03 mg/kg, i.g., respectivamente. Assim, podemos sugerir que os compostos carvacrol, **S-1**, **S-2**, **S-9** e **S-11** podem ser alvos interessantes para o tratamento da dor aguda, principalmente o composto **S-1** (0,003 mg/kg), pois apresentou um efeito antinociceptivo mais pronunciado, se comparado com os outros compostos analisados. Os valores calculados de DI_{50} para o efeito antinociceptivo do composto **S-1** foram de 0,005 (0,002-0,01) mg/kg.

Além disso, nossos resultados demonstram que de todos os compostos analisados na dor aguda, o composto **S-1** (0,003 e 0,03 mg/kg, i.g.) foi o único capaz de reduzir o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de glutamato, com inibições de $40 \pm 6\%$ e $70 \pm 9\%$ em relação ao grupo controle, respectivamente, Figura 58. Os valores calculados de DI_{50} para o efeito antiedematogênico do composto **S-1** também foram de 0,005 (0,002-0,01) mg/kg, mostrando homogeneidade nos dados. Assim, podemos sugerir que o composto **S-1** também pode ser um alvo interessante para o tratamento da dor inflamatória.

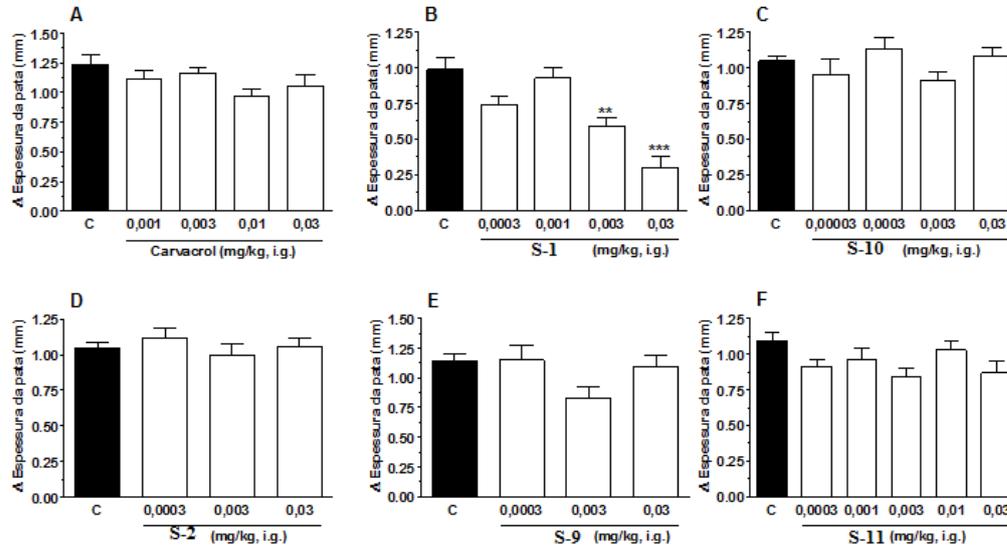


Figura 58-Efeito dos compostos sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de glutamato. O edema de pata foi avaliado 1 hora após o tratamento com carvacrol (A), S-1 (B), S-10 (C), S-2 (D), 2-S-9 (E) e S-11 (F), em doses que variaram de 0,00003 a 0,03 mg/kg (colunas abertas) ou veículo (controle: C, barra fechada), por via intragástrica. A diferença de espessura da pata do animal foi verificada imediatamente antes e depois do teste do glutamato. Cada coluna representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

5.4.5 Avaliação locomotora: teste de campo aberto (*Open-field*)

O teste do campo aberto foi realizado a fim de excluir a possibilidade de que a ação antinociceptiva das sulfonamidas derivadas do carvacrol poderia estar relacionada com efeitos inespecíficos, tanto em nível central quanto periférico, sobre a atividade locomotora dos animais.

A avaliação da atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto foi realizada em camundongos saudáveis que não foram submetidos a nenhum tipo de procedimento nocivo. Os resultados apresentados na Figura 59 mostram que a administração intragástrica dos compostos carvacrol, S-1, S-2, S-9, S-10 e S-11 em doses que variaram de 0,00003 a 0,03 mg/kg, não alterou a atividade locomotora dos animais, quando comparado ao grupo controle (Figura 59), sugerindo que estes compostos testados não induzem perda e/ou comprometimento das funções motoras quando administrados em doses até 0,03 mg/kg em camundongos.

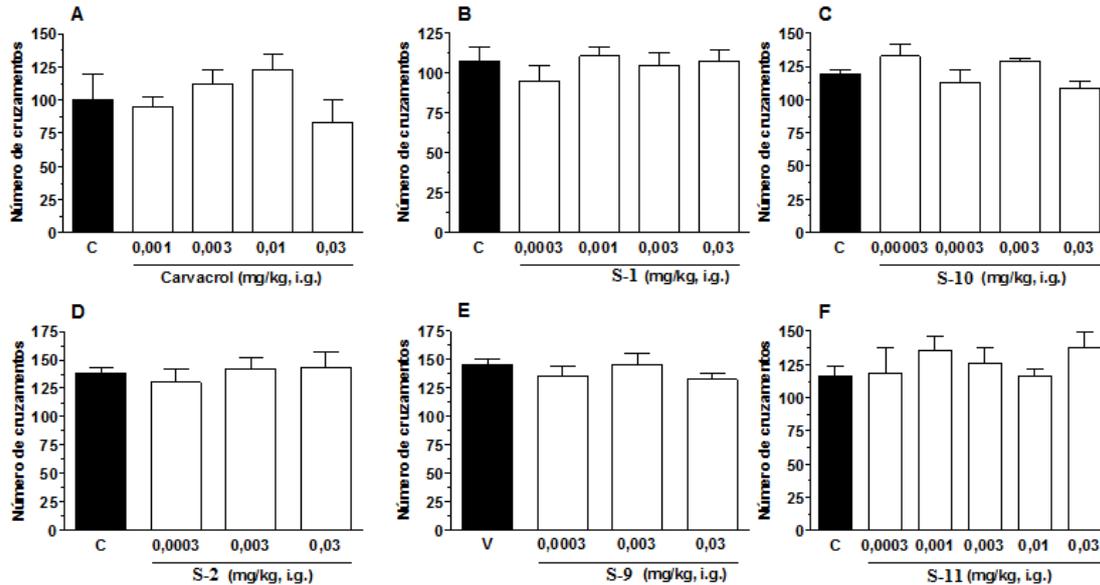


Figura 59-Efeito do tratamento com os compostos sobre a atividade locomotora espontânea dos animais.

A atividade locomotora dos animais foi avaliada 1 hora após o tratamento com carvacrol (A), S-1(B), S-10 (C), S-2(D), S-9 (E) e S-11 (F), em doses que variaram de 0,00003 a 0,03 mg/kg (colunas abertas) ou veículo (controle: C, barra fechada), por via intragástrica, no teste de campo aberto. O número de cruzamentos foi contado cumulativamente por 6 min. Cada coluna representa a média dos valores obtidos a partir de 6 - 8 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Fonte: Elaborado pela autora (2014).

Os resultados do presente estudo demonstram que o composto carvacrol e seus sintéticos **S-1**, **S-2**, **S-9** e **S-11** foram capazes de reduzir a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, mostrando que a inibição do mecanismo estimulatório, via neurotransmissão glutamatérgica periférica, pode estar contribuindo, pelo menos em parte, para o efeito antinociceptivo destes compostos. Neste sentido, estes dados sugerem a influência da inibição glutamatérgica no efeito antinociceptivo dos compostos testados.

É importante salientar que os compostos derivados do carvacrol, selecionados para a realização dos experimentos *in vivo*, foram escolhidos a partir dos resultados apresentados nas atividades testadas *in vitro* (antioxidantes). Também, nosso interesse em investigar o sistema glutamatérgico partiu do fato de que é o glutamato o principal mediador da neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central de mamíferos (Traynelis et al., 2010). Ademais, Brenner e colaboradores (2004) demonstraram que a estimulação nociceptiva periférica induz a fosforilação da subunidade NR1 do receptor NMDA no local dependente de PKC, serina-896, em neurônios do corno dorsal da medula espinhal, mostrando que a ativação de um mecanismo periférico, pelo aumento da estimulação do receptor NMDA, pode interferir em vias nociceptivas centrais.

O presente estudo também realizou o teste do campo aberto (*Open-field*) para excluir a possibilidade de que os compostos da síntese do carvacrol estudados estejam agindo, não somente como analgésicos, mas também como relaxantes musculares ou depressores do sistema nervoso central, causando alterações não específicas sobre a atividade locomotora dos animais. A literatura demonstra que diversos antagonistas glutamatérgicos, principalmente via receptor ionotrópico do tipo NMDA, tais como MK-801, produzem efeitos antinociceptivos significativos, porém diminuem o comportamento exploratório do animal (CODERRE e VAN EMPEL, 1994). Em contrapartida, nossos resultados demonstram que o tratamento intragástrico com alguns dos compostos testados é capaz de produzir um efeito antinociceptivo significativo, via inibição glutamatérgica periférica, sem causar qualquer disfunção motora detectável, não afetando, então, a atividade locomotora dos camundongos. Assim, o composto carvacrol e seus sintéticos **S-1**, **S-2**, **S-9** e **S-11** com doses até 0,03 mg/kg tem um potencial analgésico interessante para tratar a dor aguda sem causar sedação no sistema nervoso central.

5.5 ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA

Doenças tropicais negligenciadas são responsáveis, de um modo geral, por mais de um milhão de mortes humanas em todo o mundo por ano, sendo que 50.000 desses óbitos são devido às leishmanioses (OMS, 2013). Dentre estas, a leishmaniose visceral (LV) é apontada como problema de saúde pública, e o Brasil está entre os países da América Latina que apresenta maior número de casos humanos, representando aproximadamente 90% dos casos anuais diagnosticados (MONTEIRO et al., 2005).

A leishmaniose é uma doença infecciosa, porém, não contagiosa, causada por parasitas do gênero *Leishmania* e transmitida por insetos hematófagos (que se alimentam de sangue) conhecidos como flebótomos ou flebotomíneos. Os flebótomos medem de 2 a 3 milímetros de comprimento e devido ao seu pequeno tamanho são capazes de atravessar as malhas dos mosquiteiros e telas. Apresentam cor amarelada ou acinzentada e suas asas permanecem abertas quando estão em repouso. Seus nomes variam de acordo com a localidade; os mais comuns são: mosquito palha, tatuquira, birigüi, cangalhinha, asa branca, asa dura e palhinha. O mosquito palha ou asa branca é mais encontrado em lugares úmidos, escuros, onde existem muitas plantas (RIBEIRO, 2001). As espécies de *Leishmania* são capazes de induzir uma grande variedade de manifestações clínicas dependendo da interação entre a resposta imune do hospedeiro e a patogenicidade do parasito (ALMEIDA et al., 1996).

O ciclo de vida do parasita é heteroxênico, necessitando de dois tipos de hospedeiro, um inseto e outro vertebrado. A Leishmaniose é transmitida para o vertebrado através da picada de um inseto hematófago. O inseto injeta sangue com a forma infecciosa, os promastigotas, no vertebrado. As promastigotas sofrem fagocitose por macrófagos e se transformam em amastigotas. Estas se multiplicam por divisão binária simples aumentando o número de protozoários no interior do macrófago, que pela quantidade de amastigotas e pela destruição citoplasmática produzida, rompe-se liberando-as no meio intercelular ou corrente sanguínea, fazendo com que outras células sejam infectadas. O inseto se contamina ao ingerir sangue com células parasitadas por amastigotas. No intestino, os parasitas são liberados e se transformam em promastigotas. Essas formas se multiplicam por mitose no intestino médio ou posterior, dependendo da espécie da *Leishmania*, e migram para a região

da probóscide do vetor. O inseto ao realizar outra picadura repassa aos promastigotas, completando o ciclo (FRAGA et al., 2010) (Figura 60).

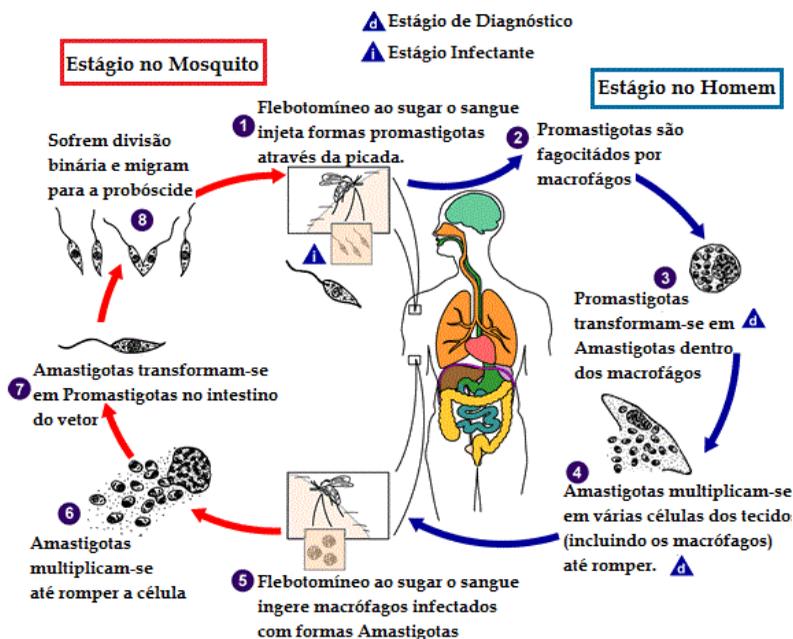


Figura 60-Ciclo da *Leishmania visceral*. Fonte <http://WWW.dpd.cdc.gov/dpdx>

Há dois tipos de leishmaniose: leishmaniose tegumentar (LT) ou cutânea e a leishmaniose visceral (LV) ou calazar. A leishmaniose tegumentar caracteriza-se por feridas na pele que se localizam com maior frequência nas partes descobertas do corpo. Tardiamente, podem surgir feridas nas mucosas do nariz, da boca e da garganta. Essa forma de leishmaniose é conhecida como "ferida brava". A leishmaniose visceral é uma doença sistêmica, pois, acomete vários órgãos internos, principalmente o fígado, o baço e a medula óssea.

Muitas espécies de vertebrados podem ser consideradas como hospedeiros reservatórios da LV, incluindo animais domésticos e selvagens. Embora o homem também possa atuar como reservatório do agente e tenha participação no ciclo de transmissão, o cão doméstico é apontado como o principal responsável pela manutenção em longo prazo da cadeia epidemiológica urbana da doença (REY, 2008).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é caracterizada por diferentes manifestações clínicas, variando de uma forma assintomática e subclínica a casos severos e sintomáticos, que levam o cão à morte. Estes diferentes quadros podem estar diretamente associados à resposta imunológica do animal (SILVA, 2007), que podem desencadear uma série de distúrbios fisiológicos, com alterações hematológicas e bioquímicas séricas, aumento na produção imunoglobulinas com formação de complexos imunes solúveis, além de alterações histológicas de órgãos linfóides (DESJEUX, 2004).

A Leishmaniose tegumentar representa um dos maiores problemas de saúde pública afetando cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países, com o registro de 1-2 milhões de novos casos anualmente. Entre todos os casos de LT que ocorrem no mundo, 90% ocorrem no Brasil, Peru, Afeganistão, Argélia, Arábia Saudita, Síria e Irã (GONTIJO e CARVALHO, 2003). No Brasil, a leishmaniose é uma antroponose, doença primariamente de origem animal que pode ser transmitida a humanos, emergente devido principalmente às mudanças ocorridas na cadeia epidemiológica, incluindo alterações nos reservatórios, vetores e hospedeiros, em decorrência das condições sociais, econômicas e culturais da população. Tem sido apontada em praticamente todos os estados brasileiros com aumento progressivo de casos nos últimos anos, registrando-se surtos nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul.

A LT apresenta-se sob três formas clínicas a leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutaneomucosa (LCM) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD). Na LC, as lesões de pele podem ser caracterizadas na forma localizada (única ou múltipla) sendo que, na maioria dos casos, a doença apresenta-se como uma lesão única ulcerada (NEVES, 1998). Além da espécie *L. amazonensis*, foram identificados no Brasil, como causadoras de LTA humana, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania shawi* e *Leishmania lainsoni* (NEVES, 1998; Ministério da Saúde, 2000).

O tratamento da leishmaniose é feito principalmente com medicamentos à base de antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio (53) (Figura 61) e antimoniato de meglumina (54), introduzidos como quimioterápicos na década de 40, enquanto anfotericina B® de segunda escolha na terapêutica. Contudo, a utilização destes fármacos é questionável em virtude da eficácia variável entre as espécies de *Leishmania*, o alto custo, a via de administração parenteral e a elevada toxicidade com efeitos adversos como mialgias, nefrites, alterações hepáticas, distúrbios gastrintestinais, respiratórios, cardiovasculares e

até arritmias fatais e morte súbita (CROFTE COOMBS, 2003; PAULA et al., 2003).

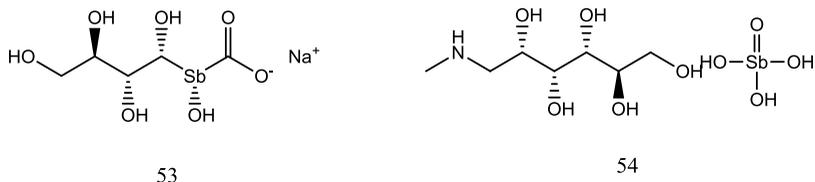


Figura 61-Estrutura do estibogluconato de sódio (53) e antimoniato de meglumina (54)

A necessidade de identificar novos compostos eficazes contra *Leishmania* e menos tóxicos em relação aos fármacos convencionais tem movido pesquisas na busca de produtos naturais isolados de espécies vegetais. Substâncias predominantemente das classes dos alcalóides, terpenos, flavonóides, benzopiranos, compostos fenólicos e lactonas sesquiterpênicas, vem sendo identificadas nas espécies vegetais com atividade anti-leishmanial (IWU et al., 1994; CARVALHO e FERREIRA, 2001). Em virtude da facilidade de manutenção e produção, cultura de formas promastigotas de *Leishmania* spp. tem sido muito empregada na triagem desses compostos naturais e seus derivados (NIASSY et al., 2004).

As bases de Mannich derivadas da lausona foram investigadas quanto a atividade de inibir as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e as formas amastigotas, forma intracelular do parasita. Os resultados encontram-se nas Tabelas 19 e 20.

Os compostos foram primeiramente investigadas quanto a sua atividade em inibir as formas promastigotas e amastigotas intracelulares na concentração de 50 µg/mL. Aqueles compostos que apresentaram um percentual de inibição maior que 50%, tiveram sua concentração inibitória determinada (CI₅₀). A partir da análise dos dados da **Tabela 19**, a maioria das bases de Mannich e a lausona inibiram em mais de 50% a forma promastigota de *L. braziliensis*, exceto os compostos **A-3**, **A-4**, **A-5** e **A-10**. Entre as bases de Mannich que tiveram sua concentração inibitória determinada, os compostos **A-11** e **A-8** apresentaram valores de CI₅₀ de 1,52 e 5,81 µM respectivamente. Porém, não se pode considerar para a atividade apenas os valores de CI₅₀, pois em alguns casos o composto apresenta baixo de CI₅₀ mas exibe alta toxicidade. Os adutos de Mannich foram testados quanto a sua toxicidade em macrófagos e tiveram seus valores de CC₅₀ determinados.

Destes, o composto **A-11** que havia apresentado melhor atividade apresentou também uma maior citotoxicidade (15,45 μM). Em contraste, o composto **A-8** que também apresentou um baixo valor de CI_{50} , apresentou uma baixa citotoxicidade (169 μM), o que o destaca na série. Além destes, os compostos **A-6** e **A-7** apresentaram baixa e moderada citotoxicidade respectivamente, também apresentaram moderados valores de CI_{50} .

Tabela 19-Atividade inibitória das formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*.

Composto	R ₁	R ₂	% inibição (50 $\mu\text{g/mL}$)	CI ₅₀ (μM)	Citotoxicidade CC ₅₀ (μM)*
A-1	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	-C ₆ H ₅	92,1	48,68	133,8
A-2	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	-C ₆ H ₅	90,3	21,04	68,87
A-3	-C ₆ H ₅	2-OH C ₁₀ H ₇ O (naftil)	-6,1	-	-
A-4	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	2-OH- C ₁₀ H ₇ O (naftil)	37,9	-	-
A-5	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	2-OH- C ₆ H ₄	33,9	-	-
A-6	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	2-OH- C ₆ H ₄	93,9	36,91	3,69
A-7	2,4-diNO ₂ - PhHidrazina	2-OH- C ₆ H ₄	100,0	25,42	17,74
A-8	2,4-diNO ₂ - PhHidrazina	-C ₆ H ₅	100,0	5,81	169,00
A-9	2,4-diNO ₂ - PhHidrazina	2-OH- C ₁₀ H ₇ O (naftil)	75,0	53,50	30,89
A-10	Pirrolidinil	2-OH- C ₆ H ₄	40,3	-	65,64
A-11	Pirrolidinil	2-OH- C ₁₀ H ₇ O (naftil)	98,1	1,52	15,45
A-12	Pirrolidinil	-C ₆ H ₅	97,1	23,64	368,00
Lausona			98,1	30,84	68,68
Anfotericina				0,08	

*Citotoxicidade em macrófagos THP-1

As bases de Mannich também foram testadas contra a forma amastigota intracelular (Tabela 20). Os compostos mais ativos foram A-1 (11,1 μM), A-6 (13,0 μM) e A-7 (20,7). Os índices de seletividade são calculados a partir da relação entre a citotoxicidade em células THP1, linhagens de células monicíticas de pacientes com leucemia monocítica aguda (valores não apresentados na Tabela 20) e atividade (CI_{50}), [$\text{IS} = \text{CC}_{50} / \text{CI}_{50}$]. O ideal para que um composto possa ser considerado um novo protótipo para o desenvolvimento de fármacos, é que seu índice de seletividade seja maior ou igual a 10. O composto A-1 ($\text{IS} = 12,09$) possui bom IS frente às formas amastigotas de *L. braziliensis*.

Tabela 20-Atividade inibitória das formas amastigotas intracelular de *Leishmania braziliensis*.

Composto	R ₁	R ₂	% inibição (50 $\mu\text{g/mL}$)	CI ₅₀ μM	Índice seletividade (IS)
A-1	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	-C ₆ H ₅	79,7	11,1	12,09
A-2	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	-C ₆ H ₅	85,8	35,8	1,92
A-3	-C ₆ H ₅	2-OH C ₁₀ H ₇ O (naftil)	AS	SA	SA
A-4	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	2-OH- C ₁₀ H ₇ O (naftil)	AS	SA	SA
A-5	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	2-OH- C ₆ H ₄	AS	SA	SA
A-6	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	2-OH- C ₆ H ₄	80,5	13,0	0,28
A-7	2,4-diNO ₂ - PhHidrazina	2-OH- C ₆ H ₄	86,7	20,7	0,85
A-8	2,4-diNO ₂ - PhHidrazina	-C ₆ H ₅	74,8	30,7	5,50
A-9	2,4-diNO ₂ - PhHidrazina	2-OH- C ₁₀ H ₇ O (naftil)	77,9	42,0	0,73
A-10	Pirrolidinil	2-OH- C ₆ H ₄	87,9	67,0	0,97
A-11	Pirrolidinil	2-OH- C ₁₀ H ₇ O (naftil)	74,6	50,7	0,3
A-12	Pirrolidinil	-C ₆ H ₅	57,1	>50	7,36
LAUS			67,5	>50	1,37

Anfotericina			0,05	0,11	
--------------	--	--	------	------	--

5.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O uso irracional de antimicrobianos ao longo das últimas décadas é um dos principais responsáveis pelo surgimento de cepas de microrganismos multirresistentes, impulsionando a comunidade científica à pesquisa conjunta nas áreas de química, farmacologia e microbiologia para descoberta de novos agentes antimicrobianos (CECHINEL FILHO, 2000; MACIEL et al., 2002; SOUZA et al., 2003). Neste sentido, várias pesquisas têm sido desenvolvidas na busca de compostos, por intermédio de propriedades anti-infecciosas/anti-inflamatórias de muitas plantas de utilização consagrada pela medicina popular e que poderão contribuir inovadoramente na terapêutica antimicrobiana (YAMAMOTO e OGAWA, 2002; HOLETZ et al., 2002; ZACCHINO et al., 2003). Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato recente, somente a partir da descoberta da penicilina é que esta busca teve grande impulso (TAVARES, 1984; COELHO et al., 2004).

Novas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, especialmente envolvendo pacientes imunocomprometidos, representam desafios para os pesquisadores. A forma indiscriminada de utilização dos fármacos contribui para o aumento da resistência dos microrganismos. Estudos que envolvam a busca de fármacos mais seguros, estáveis e eficientes podem contribuir para o tratamento de diversas patologias. Esta especificidade também contribui para que se reduzam efeitos colaterais e indesejáveis ao hospedeiro, fato este, que muitas vezes limita a terapia medicamentosa instituída aos pacientes (SOUZA et al., 2003).

Dois importantes conceitos devem ser utilizados ao se considerar o uso dos antimicrobianos:

- Espectro de ação: que abrange o percentual de espécies sensíveis.
- Potência ou concentração inibitória mínima (MIC, MIC50, MIC90): a concentração de antimicrobiano necessária para inibir o crescimento bacteriano, de forma que quanto menor o MIC, maior a potência e, quanto maior a potência, maior a dificuldade da bactéria em desenvolver resistência.

Os compostos sintetizados neste trabalho foram testados quanto à atividade antifúngica e antibacteriana.

Os dímeros derivados da lausona foram testados quanto à sua atividade antifúngica em diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) *Cryptococcus* (*C. gattii* e *C. neoformans*) e *Paracoccidioides brasiliensis*. Os testes foram realizados primeiramente na concentração de 250 µg/mL, cujos resultados podem ser observados na Tabela 21.

Tabela 21- Porcentagem da atividade antifúngica na concentração de 250 µg/mL.

Comp.	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>P. brasiliensis</i>
DIM-1	0	47,2	62,1	16,7	0	19,5	85,7
DIM-2	0	36,4	35,4	25,3	89,9	99,1	100
DIM-3	0	64,9	51,2	45,8	0	0	61,7
DIM-4	0	4,3	38,5	0	0	0	38,4
DIM-5	17,9	58,6	62,2	3,9	0	0	90,9
DIM-6	0	63,1	84,6	27,5	0	0	0
DIM-7	0	0	25,6	0	9,8	41,8	79,9
DIM-8	0	85,4	68	20,9	32,9	0	35,5
DIM-9	20,2	4,5	42,7	50,3	0	0	77,3
Itraconazol	98,2	70	98,9	98,2	97,8	90,2	100

Obs.: C. é a abreviação para *Candida* e *Cryptococcus* e P. é a abreviação para *Paracoccidioides*.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para os compostos que apresentaram porcentagem de inibição superior a 50% na concentração de 250 µg/mL e os resultados podem ser observados na Tabela 22.

Tabela 22-Concentração inibitória mínima (CIM) em μM .

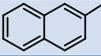
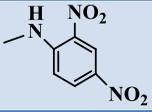
Comp.	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. gattii</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>P. brasiliensis</i>
DIM-1	-	267,91	-	-	-	67,00
DIM-2	-	-	-	59,35	14,83	7,41
DIM-3	121,28	242,57	-	-	-	242,57
DIM-4	-	-	-	-	-	-
DIM-5	235,27	235,27	-	-	-	14,70
DIM-6	259,65	129,83	-	-	-	-
DIM-7	-	-	-	-	-	62,5
DIM-8	137,54	275,09	-	-	-	-
DIM-9	-	-	283,83	-	-	141,92
Itraconazol	0,04	0,18	0,08	0,18	0,36	0,36

Obs.: C. é a abreviação para *Candida* e P. é a abreviação para *Paracoccidioides*.

Analisando a tabela acima é possível perceber que os dímeros derivados da lausona, apresentaram melhores atividades contra o *Paracoccidioides brasiliensis*, para o qual dois dos nove compostos apresentaram valores muito significativos de concentração inibitória mínima, que são DIM-2 (7,41 μM) e DIM-5 (14,70 μM). Dentre os compostos desta série, podemos destacar o composto **DIM-2**, derivado do 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, que apresentou atividade significativa também para *C. neoformans*(14,83 μM).

As sulfonamidas derivadas do carvacrol foram investigadas quanto a atividade antimicrobiana. O resultados relativos a concentração inibitória mínima (CIM) frente *Staphylococcus aureus* (coco gram-positivo), *Escherichia coli* (bacilo gram-negativo) e *Candida albicans* (fungo) podem ser observados na Tabela 23.

Tabela 23-Valores de concentração inibitória mínima das sulfonamidas derivadas do carvacrol frente a diferentes microorganismos.

Composto	Substituinte	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
S-1	morfolinil	250,0	> 500	> 500
S-2		31,3	>1000	>1000
S-3		15,6	1000	250
S-4		7,8	>1000	62,5
S-5		62,5	>1000	1000
S-6		31,3	>1000	>1000
S-7	-NH ₂	1000,0	250	1000
S-8		31,3	>1000	>1000
S-9		125,0	>1000	1000
S-10		15,6	>1000	>1000
S-11		31,3	>1000	1000

As sulfonamidas apresentaram atividade mais relevante para o *Staphylococcus aureus* em especial o composto **S-4**. Estes baixos valores de CIM observados para inibição do crescimento de *S. aureus*,

incentivaram uma nova investigação contra outras seis cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos isolados clinicamente, representados na tabela abaixo como **Staph 01, Staph 02, etc** (Tabela 24).

Tabela 24-Valores de concentração inibitória mínima das sulfonamidas derivadas do carvacrol frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes.

BACTÉR IA	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)								
	Car v.	S-6	S-8	S- 10	S-2	S-3	S-5	S-9	S-4
<i>S. aureus</i>	97,0	31,3	31,3	15, 6	31,3	15,6 2	62,5	31,2 5	7,81
Staph 01	62,5	7,8	15,6	7,8	7,8	3,9	31,2 5	7,81	3,9
Staph 02	62,5	250, 0	31,3	31, 3	62,5	62,5	100 0	31,2 5	7,81
Staph 03	125, 0	31,3	15,6	15, 6	7,81	125	31,2 5	31,2 5	3,9
Staph 05	31,3	62,5	62,5	31, 3	31,25	62,5	15,6 2	62,5	7,81
Staph 06	62,5	125, 0	125, 0	31, 3	7,81	31,2 5	31,2 5	15,6 2	7,81
Staph 08	31,3	125, 0	62,5	62, 5	31,25	62,5	500	62,5	15,6 2

Dentre os compostos analisados, o composto **S-4** apresentou os melhores valores de CIM para todas as variedade de *Staphylococcus aureus* resistentes.

A sulfonamida **S-4** apresentou resultados muito significativos para esta atividade. A série de sulfonamidas está sendo investigada contra outras bactérias gram-positivas e negativas.

5.7 ATIVIDADE ANTI-HIPERGLICÊMICA

A diabetes é um distúrbio metabólico que afeta 13, 4 milhões de brasileiros e 371 milhões de pessoas no mundo. O número de mortes registrados em função da doença também é alarmante, atingindo 4,8 milhões em 2012. Esta doença apresenta elevada letalidade por apresentar várias comorbidades associadas. Entre estas, destacam-se as alterações micro e macrovasculares. O princípio da disfunção do endotélio vascular é atribuído, entre outros fatores, à formação dos

produtos finais de glicação avançada (AGES). Os AGES são produto da reação não-enzimática de açúcares com o grupamento amino de proteínas. Esta reação acontece naturalmente no organismo, porém a condição hiperglicêmica do diabético exacerba o conteúdo de moléculas formadas. Este excesso promove efeitos altamente deletérios a diversos tecidos. Estes danos ocorrem principalmente por meio da ligação dos AGES ao seu receptor RAGE, promovendo a posterior ativação de uma cascata de sinalização, culminando com a produção de espécies reativas de oxigênio e consequente desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidante, além do aumento da expressão de proteínas responsáveis pela contração e relaxamento do endotélio, de citocinas pró-inflamatórias, mediadores de morte celular, entre outros.

O teste de tolerância oral a glicose (Figuras 62 e 63) é utilizado para avaliar a resposta de um composto frente a glicemia de ratos após administrada uma sobrecarga de glicose.

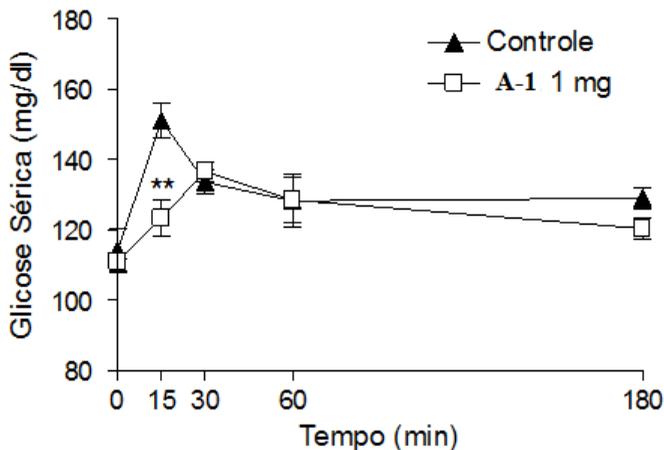


Figura 62-Teste de tolerância oral a glicose com a base de Mannich A-1. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo $n=5$.

Observou-se uma diminuição significativa (** $p < 0,01$) da glicemia do grupo tratado com o composto A-1 em relação ao controle, 15 min após sobrecarga de glicose.

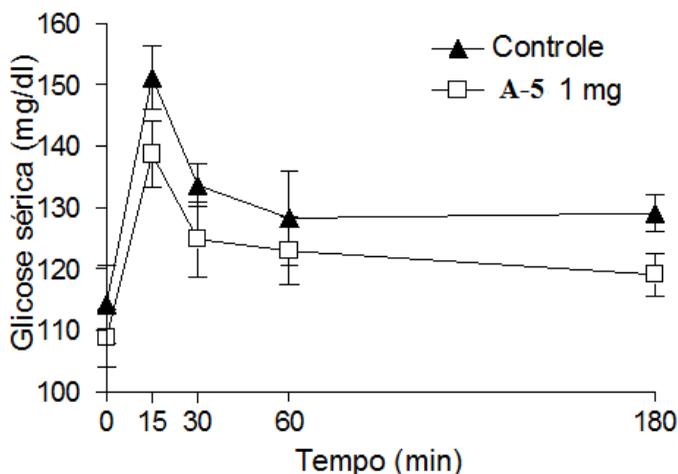


Figura 63-Teste de tolerância oral a glucose com a base de Mannich A-5
Efeito do composto na curva de tolerância oral a glicose. Os valores foram expressos como média \pm S.E.M, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo $n=5$. Não foram observadas diferenças significativas.

Como observado o composto **A-1** foi capaz de reduzir a glicemia, o que demonstra que ele pode apresentar um efeito anti-hiperglicêmico, ou seja, quando é dada a sobrecarga de glicose, observa-se um pico glicêmico resultante da absorção de glicose. O composto agiu neste início, impedindo a elevação da glicemia, sem causar hipoglicemia (uma redução drástica da glicemia). Existem vários mecanismos pelos quais esta base de Mannich possa estar agindo. Por exemplo, ela pode estar estimulando a secreção de insulina, aumentando a captação de glicose pelos tecidos periféricos e assim diminuindo a glicemia plasmática.

Outro mecanismo investigado foi a atividade das dissacaridases intestinais (Figuras 64 e 65).

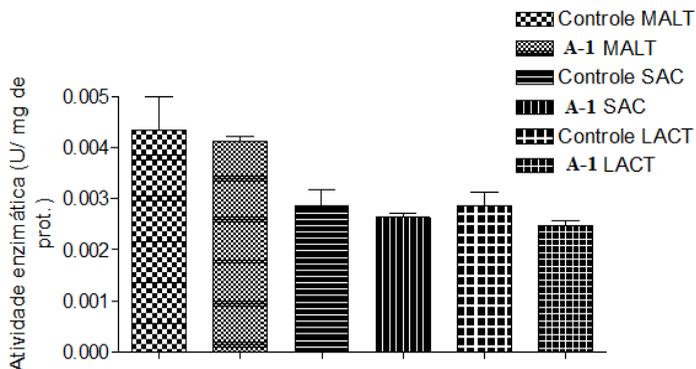


Figura 64-Efeito do composto A-1, na atividade de dissacaridasas intestinais. Efeito in vivo do composto A-1 na atividade específica de maltase, sacarase e lactase

Os valores foram expressos como média \pm S.E.M, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo $n=5$. Não foram observadas diferenças significativas.

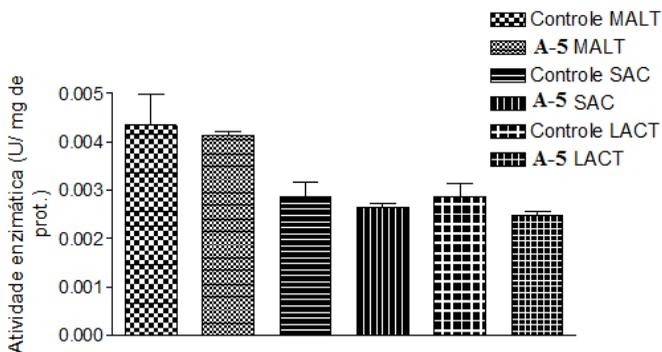


Figura 65-Efeito da naftoquinona A-5, na atividade de dissacaridasas intestinais. Efeito in vivo da naftoquinona A-5 na atividade específica de maltase, sacarase e lactase.

Os valores foram expressos como média \pm S.E.M, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo $n=5$. Não foram observadas diferenças significativas.

A população ingere muitos alimentos na forma de carboidratos, que são macromoléculas formadas por unidades de açúcares. A digestão destes ocorre por meio da quebra destas macromoléculas em unidades de açúcares mais simples, os dissacarídeos, que incluem a sacarose,

maltose e lactose (Figura 66). Porém estes dissacarídeos necessitam sofrer a ação das dissacaridases, para se tornarem absorvíveis. Esta reação acontece no enterócito. A maltase sofre ação da maltose, formando duas unidades de glicose. A sacarose sofre ação da sacarase, liberando um a molécula de glicose e uma de frutose. A lactose sofre ação da lactase, formando glicose e galactose. Dessa forma, compostos que possam agir inibindo estas enzimas são de interesse farmacêutico para o tratamento da diabetes, pois inibem a absorção de glicose, principalmente quando agem sobre a maltase, que libera duas moléculas de glicose. O fármaco acarbose age inibindo estas dissacaridases. Este não é o caso dos compostos **A-1** e **A-5**, pois não houve efeito in vivo.

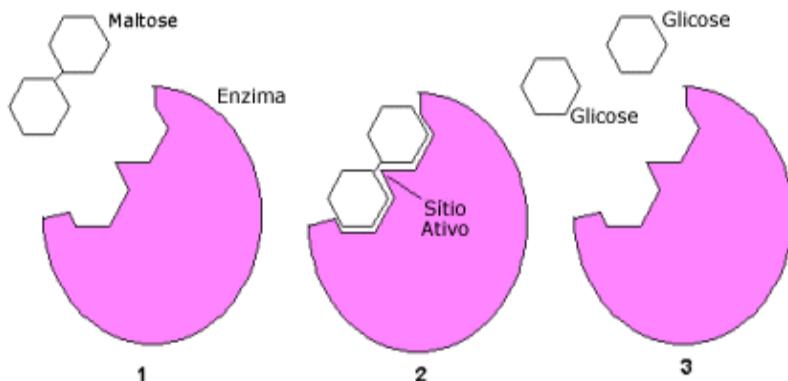


Figura 66-Lise enzimática da maltose em duas unidades de glicose.

A glicação (Figuras 67, 68, 69 e 70) define outro parâmetro de resposta, que não responde o efeito observado no teste de tolerância oral a glicose.

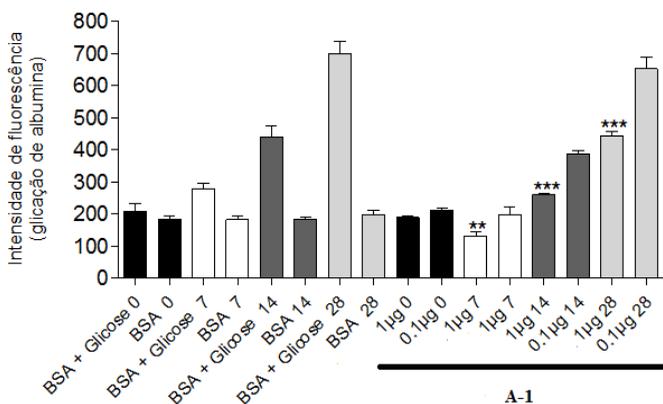


Figura 67-Efeito do composto A-1 na glicação de albumina/glicose. Efeito do composto A-1 na fluorescência AGE-derivada, após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação

Os valores foram expressos como média \pm S.E.M, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo $n=5$.

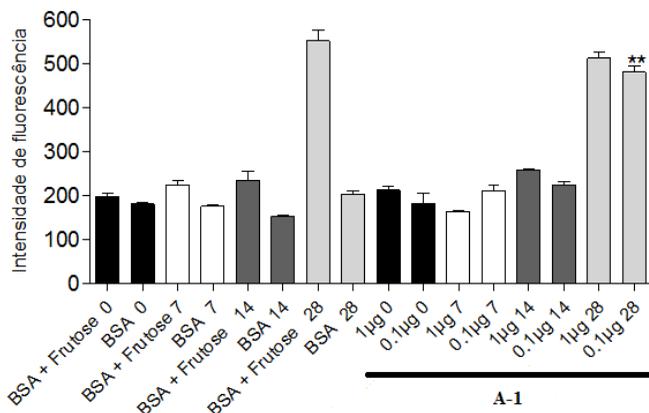


Figura 68-Efeito do composto A-1 na glicação de albumina/frutose. Efeito da base de Mannich A-1 na fluorescência AGE-derivada, após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação

Os valores foram expressos como média \pm S.E.M, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo $n=5$.

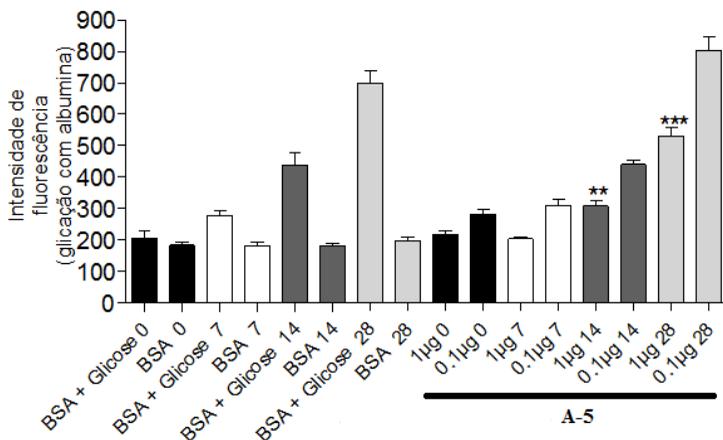


Figura 69-Efeito do composto A-5 na glicação de albumina/glicose. Efeito da naftoquinona M34 na fluorescência AGE-derivada, após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação.

Os valores foram expressos como média \pm S.E.M, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo $n=5$.

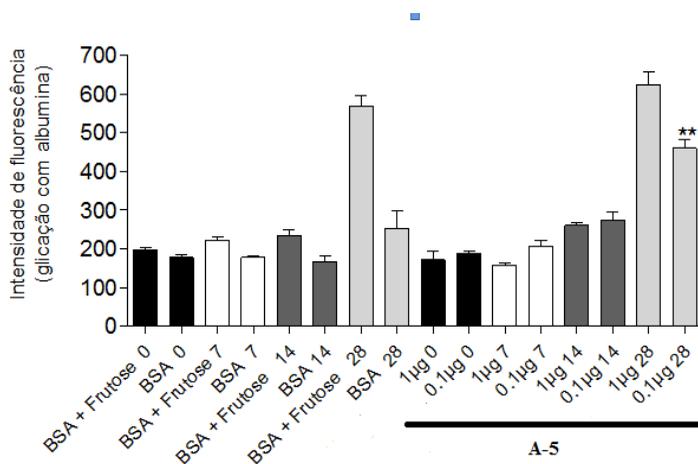


Figura 70-Efeito do composto A-5 na glicação de albumina/frutose. Efeito do composto A-5 na fluorescência AGE-derivada, após 0, 7, 14 e 28 dias de incubação.

Os valores foram expressos como média \pm S.E.M, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo $n=5$.

Incubou-se albumina com uma alta concentração de glicose e/ou frutose, condição encontrada nos diabéticos. A albumina por si própria possui fluorescência. Nas figuras cujos gráficos tem um grupo BSA é albumina. Porém, quando incubada com glicose a 37 °C, sob agitação, se forma a ligação entre albumina e glicose, ou forma-se um AGE (produto final de glicação avançada). Este AGE também emite fluorescência, mas em uma intensidade muito maior que a albumina sozinha. Portanto, na primeira parte do gráfico é possível observar esta diferença nos grupos do dia zero, 7, 14 e 28 dias de incubação com BSA e BSA+glicose. No dia zero, não há formação de AGES, portanto a intensidade de fluorescência está igual. A medida que aumentam os dias de incubação, aumenta a intensidade de fluorescência do grupo BSA+glicose, ou a formação de AGES.

Como pode ser observado, os compostos **A-1** e **A-5** são capazes de reduzir de forma significativa a formação dos AGES. O estudo da ação Anti-AGE é muito importante, pois as complicações provindas do diabetes são decorrentes da ação de proteínas glicadas. A hemoglobina glicada é muito utilizada em diabéticos para acompanhamento. Ela pode ser glicada e isso pode ser medido. Como a vida média de uma hemácia, na qual está contida a hemoglobina, é de 120 dias, os níveis de hemoglobina glicada predizem um monitoramento glicêmico de até 3 meses anteriores.

6 METODOLOGIA

6.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os solventes utilizados foram todos de grau analítico PA.

Para o procedimento de isolamento e purificação dos compostos por coluna cromatográfica (CC), foi utilizada como fase estacionária sílica gel 0,063 - 0,2 *mesh* para CC normal e 0,04 - 0,063 *mesh* para CC flash.

Os compostos obtidos foram analisados através de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de alumínio recobertas por sílica gel 60 GF254, de marca Merck, com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 μm de diâmetro. As substâncias separadas nas placas cromatográficas foram visualizadas utilizando vários métodos: revelação em câmara de iodo, revelação com reagente cloreto férrico 5% em etanol e revelação com reagente anisaldeído-sulfúrico (ácido sulfúrico concentrado, ácido acético glacial e anisaldeído 5:1:5 v/v/v em etanol) seguido de aquecimento a 110°C.

Para a realização dos ensaios antioxidantes foram utilizados reagentes Aldrich: cloreto férrico, cloreto ferroso, fosfato de sódio, molibdato de amônio, ácido dissulfônico hidratado 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina (ferrozina), ácido diamino tetracético dissódico (EDTA), 2,2-difenyl-1-picrilidrazil (DPPH) e ferricianeto de potássio.

Para o teste de inibição da enzima acetilcolinesterase foram utilizados o iodeto de acetilticolina, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (reagente de Ellman), a enzima acetilcolinesterase (na forma de pó liofilizado do peixe elétrico tipo VI-S), um tampão tris-HCl (tris[hidroximetilaminometano]), soro albumina bovina, cloreto de magnésio hexahidratado e cloreto de sódio (P.A), adquiridos da Sigma.

Para os demais testes de atividade biológica, realizados por nossos colaboradores, não serão descritos os reagentes.

Para medir o ponto de fusão dos compostos sintetizados, foi utilizado aparelho digital Micro Química MQA PF – 301. Este equipamento é provido de lupa para a visualização da fusão da amostra e uma chapa aquecida, sobre a qual é colocada a amostra entre a lâmina e lamínula.

Para a obtenção dos espectros dos compostos isolados na região do infravermelho (IV), foi utilizado o espectrômetro Perkin Elmer FTIR 16 PC, e as amostras preparadas em pastilhas de KBr.

Os espectros de RMN ^1H e de ^{13}C foram obtidos utilizando-se o espectrômetro Varian AS-400, operando em 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . As amostras foram dissolvidas em metanol, clorofórmio, dimetilsulfóxido e piridina deuterados, empregando-se tetrametilsilano (TMS) como referência. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em valores adimensionais, a constante de acoplamento J em Hz, a multiplicidade dos sinais foi indicada como s = simpleto, d = duplete, dd=duplo duplete, t = tripleto e m = multiplete.

As investigações de espécies redox ativas foram realizadas utilizando voltametria cíclica em um potenciostato-galvanostato PAR modelo Versastat3-200, no Laboratório de Equilíbrio Químico, Departamento de Química – UFSC.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em um espectrômetro amaZon speed ETD Trap Mass.

Foi utilizado um aparelho Milestone modelo Star Synth com uma potência de 1200 Watts para as reações desenvolvidas no microondas, e um micro probe Sonics Vibracell ultrasonic processor, 500W operando a 20 kHz para os experimentos com ultrassom.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos descritos foram atribuídos com o auxílio de simulações, empregando o ACD Labs e por comparação de dados da literatura (BARAMEE et al., 2006).

6.2 SÍNTESE DOS ADUTOS DE MANNICH DERIVADOS DA LAUSONA:

De um modo geral reagiu-se 1,15 mmol (considerando-se o excesso de 10%) das aminas: anilina, *p*-toluidina, *p*-nitroanilina, 2,4-dinitrofenilhidrazina e pirrolidina com 1,15 mmol (considerando-se o excesso de 20%) dos aldeídos: benzaldeído, 2-hidroxinaftaldeído, 2-hidroxi-benzaldeído, 4-metoxibenzaldeído, e 4-nitrobenzaldeído em 5 mL de etanol durante 30 minutos. Logo após, adicionou-se a lausona (1,15 mmol; 0,200 g) em 15 mL de etanol. Observou-se a formação de precipitados de diversas colorações. A reação foi realizada na ausência de luz, revestindo o frasco de reação com papel alumínio e a temperatura ambiente. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada e após um tempo médio de 24 horas, os sólidos formados foram filtrados e lavados com pequena quantidade de etanol e éter respectivamente. Obtiveram-se alguns produtos puros e outros foram recristalizados em acetato de etila.

6.3 SÍNTESE DOS COMPOSTOS DIMÉRICOS DERIVADOS DA LAUSONA: DERIVADOS (3,3'-(ARILMETILENO)BIS(2-HIDROXINAFTALEN-1,4-DIONA)

6.3.1 Procedimento para preparação utilizando irradiação ultrassônica

Em um béquer de 25 mL, a lausona (2 mmol), os aldeídos 4-metoxibenzaldeído, 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, 4-bromobenzaldeído, benzaldeído, 3-bromo-5-hidroxibenzaldeído, 4-nitrobenzaldeído, 4-metilbenzaldeído, 4-flúorbenzaldeído e 2-metilcarbaldeído (1 mmol) e LiCl (0,1 mmol) foram misturados com água (5 mL) e sonicados durante 5 min a temperatura ambiente (25 °C). O progresso da reação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada. Após a verificação que a reação tinha sido concluída, o béquer contendo os produtos foi resfriado no congelador. Os precipitados obtidos foram filtrados e lavados com água, seguida de pequena quantidade de álcool para obtenção dos produtos puros.

6.3.2 Procedimento para preparação utilizando microondas

Em um balão de 25 mL, a lausona (2 mmol), os aldeídos (1 mmol) e LiCl (0,1 mmol) foram misturados com água (5 mL) e submetidos à irradiação microondas durante 15 min, com aquecimento (70 °C). O progresso da reação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada. Os precipitados obtidos foram filtrados e lavados com água seguida de pequena quantidade de etanol para obtenção dos produtos puros.

6.3.3 Procedimento para preparação utilizando refluxo

Em um balão de 25 mL, a lausona (2 mmol), os aldeídos (1 mmol) e LiCl (0,1 mmol) foram misturados com água (5 mL) foram submetidos a um sistema de refluxo durante 24 horas. O progresso da reação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada. Os precipitados obtidos foram filtrados e lavados com água seguida de pequena quantidade de etanol para obtenção dos produtos puros.

6.4 SÍNTESE DE HIDROXI-PIRAZÓIS

Esta etapa foi realizada na *University of Copenhagen* (Dinamarca), sob a supervisão da professora Dra Bente Frolund e do Professor Dr. Frederik Diness do *Department of Drug Design and Pharmacology, Faculty of Health and Medical Sciences*.

6.4.1 Método geral para síntese das amidas de Weinreb (ASO-1-7, ASO-1-9, ASO-1-15, ASO-1-25, ASO-1-41)

Carbonildi-imidazol (18,2 mmol) foi adicionado em uma porção de aminoácido boc-glicina ou boc-fenilalanina (20 mmol) em 150 mL de THF. A mistura reacional foi agitada por 2 horas a temperatura ambiente. Após este intervalo o cloreto de N-O-dimetil-hidroxilamina (20 mmol) e di-isopropiletilamina (DIPEA) foram adicionados. A mistura ficou sob agitação por 2 horas e foi concentrada a vácuo. O extrato bruto foi dissolvido em diclorometano e lavado com ácido cítrico (20%), seguido de uma lavagem com solução NaHCO₃(aq) e salmoura. A fase orgânica foi separada em um funil de extração, seca com sulfato de sódio e o solvente foi removido à vácuo. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna à vácuo (VLC).

6.4.2 Método geral para redução das amidas de Weinreb (ASO-1-11, ASO-1-13, ASO-1-27 e ASO-1-33)

Uma solução das amidas de Weinreb (15 mmol), preparadas na etapa anterior em 50 mL de THF foi resfriada a -78 °C em um sistema constituído por acetona e gelo seco. O hidreto de lítio e alumínio (LiAlH₄) (23 mmol) foi adicionado e a mistura ficou sob agitação por 3 horas. A mistura foi vertida e misturada com 200 mL de diclorometano e 300 mL de uma mistura água/gelo. Após 35 minutos de agitação a fase orgânica foi separada e filtrada. O filtrado foi lavado três vezes com água, seco com sulfato de magnésio e o solvente foi removido à vácuo. Os produtos impuros foram purificados por cromatografia em coluna à vácuo (VLC).

6.4.3 Método geral de preparação dos intermediários sintéticos ASO1-17 e ASO 1-43

De uma forma geral, 35 mmol das amidas foram solubilizados em THF (seco e degaseificado com N₂) e resfriados em uma mistura contendo água, gelo e diclorometano. O cloreto de fenilmagnésio (2,0 molL⁻¹ em THF; 90 mmol) foi adicionado e a solução foi aquecida até a

temperatura ambiente ao longo das 2 primeiras horas reacionais. Após este período o solvente foi removido e ao extrato bruto formado nesta etapa, foi adicionado 100 mL de HCl 1 mol.L⁻¹, resfriado a 0 °C. A fase orgânica foi lavada com água, seca em sulfato de magnésio e o solvente foi removido à vácuo, para obtenção dos produtos. Os compostos foram purificados utilizando VLC.

6.4.4 Obtenção dos pirazóis a partir de reações de acoplamento

Acetato de paládio II (22mg; 0,15 eq.), trifenilfosfina (26 mg; 0,15 eq.) e água (1µL, 0,06 eq.) foram misturados com 1,0 mL de N,N-dimetilacetamida (DMA) (desgaseificada). A catálise foi realizada por aquecimento da mistura em um frasco fechado e selado, a 100 °C durante 1 minuto. Nesta etapa observa-se a mudança de coloração do meio, de amarelo a vermelho escuro. A mistura catalítica foi adicionada a um frasco reacional utilizado no microondas, *vial*, que continha ácido fenilborônico (121,93 mg; 1,1 eq.), o iodo-pirazol (200 mg, 1 eq.) e o carbonato de céσιο (434 mg, 2 eq.). O *vial* foi fechado e levado ao microondas a 130 °C durante 2 horas sob agitação. A mistura reacional foi misturada com 10 mL de água e extraída com éter etílico (4 vezes de 5 mL). O solvente foi removido e o produto ASO-1-55 foi purificado utilizando VLC (com os eluentes heptano e acetato de etila).

O hidroxipirazol ASO 1-61 foi obtido a partir da redução do composto ASO 1-55. O composto ASO 1-55 (100 mg) foi solubilizado em 3mL de acetato de etila, adicionado a 10 mg de Pd/C 10% e imerso em atmosfera de H₂ (1 atm). Após uma noite, aproximadamente 18 horas, de vigorosa agitação, a mistura foi filtrada em celite e concentrada a vácuo. O produto puro foi obtido a partir de três extrações ácido-base (utilizando éter-etílico e solução de ácido acético 0,01 mol.L⁻¹) consecutivas.

6.5 SÍNTESE DAS SULFONAMIDAS DERIVADAS DO CARVACROL

O cloreto de sulfonila foi obtido através da reação entre o carvacrol com 6 equivalentes de ácido clorossulfônico. O ácido clorossulfônico foi resfriado em banho de gelo durante 15 minutos e após este intervalo, o carvacrol foi gotejado cuidadosamente. A reação ocorreu instantaneamente e foi detectada por análise de cromatografia em camada delgada logo quando foi adicionado todo o volume de carvacrol. O produto foi vertido sobre um banho de gelo imediatamente.

Formou-se um sólido escuro e de aspecto gelatinoso e grumoso. O sólido foi exaustivamente macerado em água até a formação de um fino precipitado cinza, que foi filtrado para dar origem ao cloreto puro.

As sulfonamidas obtidas nesse trabalho foram preparadas a partir do cloreto de sulfonila do carvacrol em diclorometano e banho de gelo, com dois equivalentes das aminas (morfolina, 4-fluoranilina, 4-nitroanilina, 4-cloroanilina, 2-aminopirazina, naftilamina, hidrazina, 2,4-dinitrofenilhidrazina, 2-amino-1-picoliamina, 2-hidroxianilina e 2,4-dicloroanilina) adicionadas lentamente. Como método geral o cloreto foi dissolvido em diclorometano e a amina foi adicionada na sequência. As soluções turvaram e após intervalos variando entre 3 e 24 horas, observou-se a formação de precipitados de colorações variadas. As reações foram acompanhadas por CCD. Evaporou-se o diclorometano e adicionou-se um pequeno volume de metanol. Esta solução foi vertida em banho de gelo. A fase aquosa foi removida para dar origem às sulfonamidas ainda impuras que foram purificadas posteriormente através de extração ácido-base.

6.6 ENSAIOS ANTIOXIDANTES

6.6.1 Captura de radicais livres usando DPPH

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) segue a metodologia de Moresco et al. (2014).

O ensaio consistiu em preparar uma solução metanólica de DPPH 0,004% preparada momentos antes do uso e de soluções de diferentes concentrações dos compostos (50, 25, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A mistura de 2 mL de solução de DPPH com 1 mL de solução do composto, foi agitada e após 30 minutos, foi realizada a leitura em um espectrofotômetro a 517 nm, comparando-se esta leitura a um branco, que consistia na solução de DPPH na ausência do composto. A porcentagem de atividade antioxidante foi dada pela fórmula $(A_o - A_i / A_o) \times 100$, onde, A_o e A_i correspondem a absorbância da solução na ausência e presença do composto. O gráfico da % de decréscimo na absorbância do DPPH em função da concentração do composto forneceu a EC_{50} , a concentração do composto necessária para causar 50% de atividade antioxidante.

6.6.2 Determinação do poder redutor

O ensaio para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor baseia-se na metodologia de Moresco et al.(2014).

A 100 μL dos compostos na concentração de 1000 ppm foram adicionados 8,5 mL de água deionizada. Foram adicionados posteriormente 1,0 mL da solução de FeCl_3 0,1 M em HCl 0,1 M e após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferricianeto de potássio 0,008 M. Após 15 minutos, foi realizada a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia foi indicativo de potencial redutor. A análise foi feita em triplicata. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da amostra. Foi construída uma curva de calibração utilizando soluções padrões de ácido ascórbico. O potencial redutor das amostras foi expresso em mg de ácido ascórbico por g de amostra.

6.6.3 Quelação do ferro (II)

Este teste segue a metodologia proposta por WANG et al., 2008). Soluções dos compostos (1 mL) em diferentes concentrações foram misturadas com solução 0,05 mL FeCl_2 (2mM) e posteriormente foi adicionado 0,2 mL de solução 5mM de 2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazina (ferrozina). As soluções foram misturadas e deixadas em temperatura ambiente por 20 min. A absorbância das amostras foi mensurada em 562 nm. O metanol, ou solvente utilizado para solubilizar as amostras, foi utilizado como branco (Abranco) e Na_2EDTA foi utilizado como controle positivo. A porcentagem de quelação do íon ferroso foi dada pela equação:

$$\text{Fe}^{2+} \text{ quelação (\%)} = 100 \times [(\text{Abranco} - \text{Aamostra}) / \text{Abranco}]$$

Na equação o termo Aamostra corresponde à absorbância dos compostos da amostra.

6.6.4 Redução do Molibdênio

A redução do molibdênio pelos compostos foi avaliada pelo método do fosfomolibdênio, seguindo a metodologia de PRIETO et al. (1999). O volume de 0,3 mL de uma solução 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da amostra foi combinado com 3 mL da solução reagente (0,6 M de ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio, em mesma proporção). Os frascos contendo a mistura reacional foram incubados a 95° C por 90 min. A absorbância da mistura reacional foi mensurada a 695 nm após resfriamento a temperatura ambiente. O metanol (0,3 mL) foi utilizado como branco. A redução do molibdênio foi expressa em termos de equivalente de ácido ascórbico (AA)/ g de composto.

6.6.5 Voltametria cíclica

Os experimentos foram efetuados em solução de acetonitrila contendo $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ de cada composto, sob atmosfera de argônio à temperatura ambiente. Neste experimento foram utilizados tetrafluoroborato de tetrabutilamônio como eletrólito suporte e uma célula eletrolítica com três eletrodos: eletrodo de trabalho – carbono vítreo, eletrodo auxiliar platina e eletrodo de referência – Ag/Ag^+ . Para calibração do eletrodo de referência, foi utilizado o ferroceno como padrão interno.

6.6.6 Cálculo da correlação da atividade antioxidante

Os cálculos envolvendo a correlação entre as metodologias de verificação da atividade antioxidante foram feitos a partir de regressão linear.

6.7 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

O ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase foi realizado conforme Magina et al. (2012). Em uma cubeta foram colocados o tampão Tris-HCl 50 mM pH=8, o composto na concentração $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, e a enzima acetilcolinesterase ($0,25 \text{ U mL}^{-1}$). Após 15 min a temperatura ambiente foi adicionada nesta cubeta o iodeto de acetiltiocolina ($0,023 \text{ mg mL}^{-1}$ em água) e o reagente de Ellman (3 mmol L^{-1} em Tris-HCl, pH 8.0 tampão, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl, $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ MgCl_2). Após trinta minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro UV-VIS a 405 nm. Como controle positivo foi utilizado o fármaco Remynil® ($0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$) que contém 50% de galantamina. Como controle negativo o mesmo solvente em que foi dissolvida a amostra, para o qual a atividade enzimática foi considerada 100%. Na referência (ou branco) foram utilizados todos os reagentes exceto a enzima.

O resultado foi expresso em termos de % de inibição enzimática (I %):

$$I\% = 100 - \left(\text{Absorbância}_{\text{amostra}} / \text{Absorbância}_{\text{branco}} \right) \times 100$$

A concentração necessária para inibir a atividade enzimática em 50 %, IC_{50} , foi determinada a partir do gráfico plotado em função da concentração *versus* a absorbância.

6.8 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

A atividade nociceptiva foi investigada pela mestranda Catharina Nucci, supervisionada pelo professor Dr. Adair R. S. Santos do Departamento de Fisiologia da UFSC.

Para a realização dos experimentos comportamentais *in vivo* foram utilizados camundongos Swiss machos adultos (aproximadamente 2 meses de idade), pesando entre 25-35 g (Fig. 71), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mediante aprovação dos protocolos experimentais pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) desta mesma Universidade (protocolo PP00745). Uma vez recebidos do Biotério Central, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI) da UFSC, com temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 6:00 h) e com água e ração *ad libidum*. Os animais foram mantidos em microisoladores com circulação de ar constante, em gaiolas de acrílico transparente medindo 12 x 30 x 18 cm (Figura 71), com tampa superior revestida por barras de aço inox, contendo um frasco de polipropileno com água (300 mL) e espaço adequado para armazenamento da ração. O número de animais foi limitado a 6 por gaiola, proporcionando um alojamento cômodo exigido para esta espécie. Nos dias de experimento, os animais foram mantidos no laboratório para ambientação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo que os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo da dor com animais de laboratório (Zimmermann, 1983).

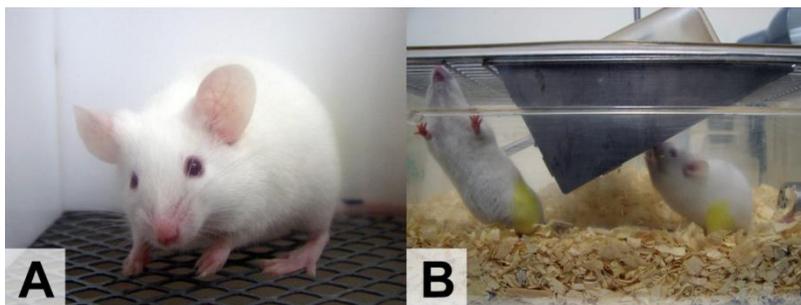


Figura 71-Camundongos Swiss (A) Camundongo Swiss com aproximadamente 2 meses de idade. (B) Gaiola de acrílico transparente onde os animais são acomodados. Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

6.8.1 Reagentes

Nos testes comportamentais *in vivo* o glutamato foi dissolvido em solução salina isotônica (0,9 % NaCl) e o carvacrol e suas sulfonamidas derivadas S-1 (morfolina), S-2 (p-fluoranilina), S-9 (2-amino-1-picolilamina) S-10 (o-hidroxianilina) e S-11 (2,4-dicloroanilina) foram dissolvidos em solução salina e Tween 80 (5% de modo a não influenciar na atividade exercida pelos compostos). Além disso, os grupos controles receberam pré-tratamento intragástrico com o veículo usado para diluir os compostos (solução salina com 5 % de Tween 80). A administração intragástrica dos compostos sintetizados a partir do carvacrol ou veículo foi realizada com volume de 10 mL/kg para não exceder o volume gástrico para esta espécie. Os compostos foram administrados 1 hora antes dos experimentos por via intragástrica, para mimetizar a via (oral) popularmente utilizada em seres humanos (Figura 72).



Figura 72-Administração por gavagem. Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

6.8.2 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato

Os animais foram pré-tratados com o composto pela via intragástrica (30 e 300 mg/kg, *i.g.*), 1 hora, antes da injeção intraplantar (*i.pl.*) de 20 μ L de uma solução pH ajustado (pH 7,4) de glutamato (20 μ mol/pata) de acordo com o método descrito anteriormente (Beirith et al., 2002; Meotti et al.; 2010). O grupo controle recebeu veículo pela via

intragástrica. Após a injeção de glutamato, os camundongos foram observados em funis de vidro individuais e o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada, durante 15 minutos, foi quantificado e considerado como indicativo de nocicepção (Figura 73).

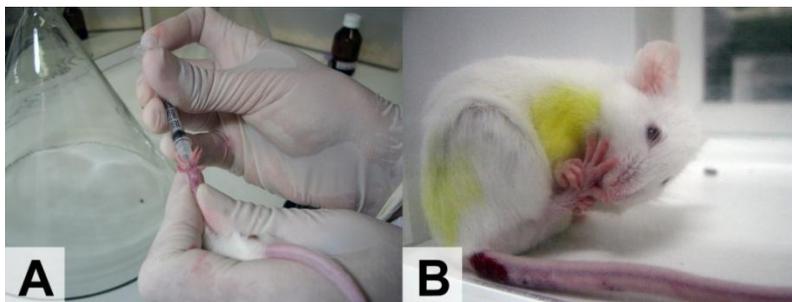


Figura 73-Teste do glutamato na pata. (A) Injeção intraplantar de glutamato. (B) Resposta nociceptiva provocada pela injeção de glutamato na pata.
Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

Antes e depois do tempo de observação da resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de glutamato, foi realizada a avaliação do edema, por meio da verificação da espessura da pata do animal, usando um micrômetro eletrônico digital 0-25mm (Figura 74). A diferença de espessura (mm) da pata posterior direita, imediatamente antes e depois do teste do glutamato foi considerada como índice do edema.

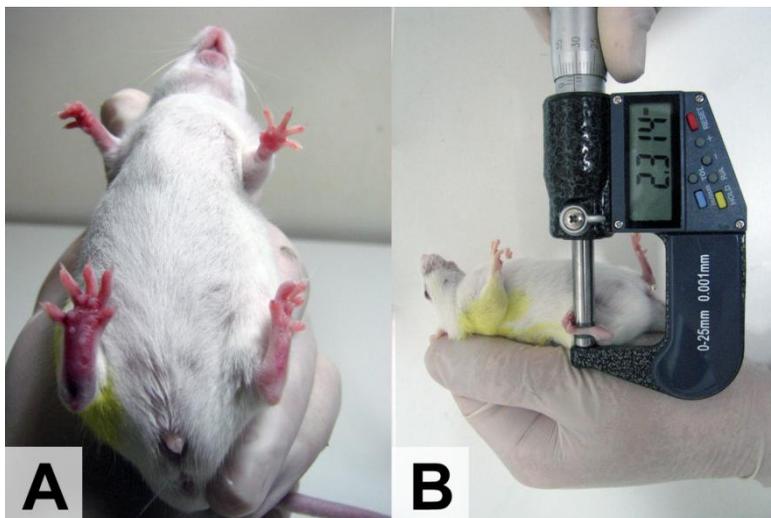


Figura 74-Edema de pata. (A) Edema causado pela injeção intraplantar de glutamato na pata posterior direita em relação a pata não injetada (contralateral). (B) Mensuração da espessura de pata com o micrômetro eletrônico digital 0-25mm.

Fonte: Elaborado pelo autor

6.8.3 Avaliação locomotora: teste do campo aberto (Open-field)

O comportamento dos animais foi verificado conforme descrito previamente (Rodrigues et al., 2002; Nucci et al., 2012). O aparato de avaliação consiste de uma arena circular de PVC medindo 62 cm de diâmetro por 29,5 altura. O piso da arena é dividido em quadrantes semelhantes (Figura 75), e o número de cruzamentos atravessados com todas as patas, foi contado cumulativamente durante 6 minutos. Os camundongos foram submetidos ao teste de campo aberto em uma avaliação após tratamento único com os compostos. Os camundongos foram tratados com os compostos (0,0003-0,03 mg/kg, ig) ou veículo 1 hora antes do teste.

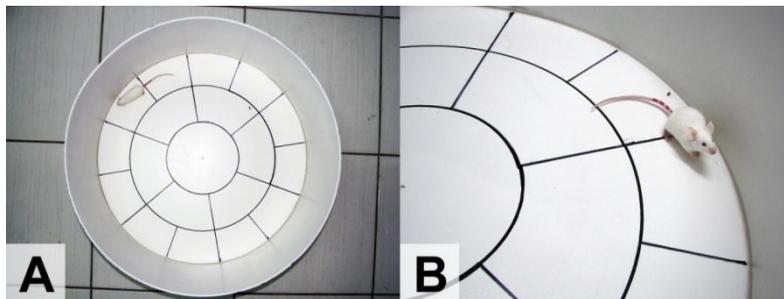


Figura 75-O aparato de campo aberto. (A) Arena circular de PVC dividida em quadrantes para avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto (Open-field). (B) Ampliação do animal na arena de Open-field.

Fonte: Elaborado pelo autor (2014).

6.8.4 Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Quando necessário foi calculada a DI_{50} (doses do EEPp necessárias para reduzir a resposta nociceptiva em 50%, quando comparados ao grupo controle), que foi expressa como a média geométrica acompanhada pelo limite de confiança de 95% e os valores foram determinados por regressão não-linear. As avaliações da nocicepção induzida por glutamato foi realizada pela análise de variância ANOVA de uma via seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. Em todas as análises, os valores de P foram considerados estatisticamente significantes, apenas quando inferior a 0,05 ($P < 0,05$). Para os cálculos estatísticos nos testes comportamentais *in vivo* foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

6.9 ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA

A atividade leishmanicida foi realizada pelo professor Dr. Mário Steindel do laboratório de protozoologia do departamento de microbiologia, imunologia e parasitologia (MIP) da UFSC.

6.9.1 Avaliação *in vitro* da atividade anti-leishmania contra formas promastigotas

As formas promastigotas foram semeadas em placas de 96 orifícios, em concentração de 5×10^6 parasitas/mL em meio Schneider

completo e incubadas por 48 horas a 26°C na presença de diferentes concentrações (100µM a 5µM) dos compostos a serem testados. A atividade leishmanicida de cada composto foi avaliada através da técnica do brometo de 3(4,5dimetiltiliazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), conforme Sieuwerts et al. (1995). Após o período de incubação, cada placa foi centrifugada a 1,700xg por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e 50µL de uma solução de MTT 1mg/mL em meio Schneider completo foi adicionada a cada poço. A placa foi então incubada a 26°C por 4 horas no escuro. O MTT foi então removido, 100µL de DMSO foram adicionados a fim de solubilizar os cristais de formazan e a densidade óptica foi determinada a 540nm em leitor de microplacas ELx800 (Bio-tek instruments, INC). Alternativamente, o número de protozoários foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer.

6.9.2 Avaliação in vitro da atividade anti-leishmania contra formas amastigotas intracelulares

Os amastigotas axênicos (5 ou 10 parasitos:célula) e os promonócitos em suspensão foram colocados em contato na concentração de 10^6 células e 5×10^6 ou 10×10^6 parasitas por mL de meio RPMI-1640 suplementado com 20% de SBF em tubo cônico de 15mL. Os protozoários e células foram então incubados a 34°C sem CO₂ por 16 horas sob agitação suave, a fim de permitir a interação e infecção. Após as 16 horas de incubação, a suspensão celular foi passada 3x por agulha 21G1½ a fim de desfazer os agregados celulares, e então diluída 10x em meio RPMI-1640 20% SBF. Cento e oitenta microlitros da suspensão foram semeados em orifícios de placa de 96 poços. Após 1 hora de incubação a 34°C a fim de permitir a adesão das células ao fundo da placa, 20µL das diferentes concentrações dos compostos foram adicionados e as células mantidas por 48 horas a 34 °C e 5% de CO₂. Após este período, o meio foi aspirado com bomba de vácuo, os orifícios foram secos com jato de ar, fixados com metanol e corados pelo Giemsa.

6.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As atividades antibacteriana e antifúngica foram testadas pelo professor Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco, do Departamento de Análises Clínicas (ACL) da UFSC, pela pesquisadora Dra. Susana Johann, do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de

Minas Gerais (UFMG) e pelo professor Alexandre Bella Cruz, da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI).

As cepas bacterianas utilizadas foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nos bancos de microrganismos da UFSC, UFMG e UNIVALI. Os microrganismos testados constituíram-se das cepas ATCC Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e Gram-negativas. Entre as bactérias provenientes de isolamentos clínicos, algumas apresentavam multirresistência aos antimicrobianos testados. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado utilizando metodologia manual através da disco difusão em ágar (Kirby-Bauer).

A atividade antibacteriana foi determinada para os compostos utilizando o método de microdiluição, baseado no documento M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI - antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS). Este método é denominado “microdiluição”, e envolve o uso de pequenos volumes de caldo Mueller Hinton colocados em placas de plástico estéreis retangulares com 96 poços, de fundo redondo. Anteriormente à realização do teste, as cepas bacterianas foram ativadas, com dois subcultivos em ágar Mueller Hinton (demais bactérias). O inóculo bacteriano foi preparado com turbidez idêntica a de uma solução padrão da Escala de McFarland, grau 0,5 ($1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL). Esta suspensão foi diluída em solução salina e utilizada nos ensaios até 15 minutos após sua preparação, de maneira que cada poço contivesse aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. As placas foram incubadas por 24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o período de incubação a CIM foi determinada visualmente, como a menor concentração dos compostos que inibiu completamente o crescimento dos microrganismos nos poços de microdiluição. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento destas subculturas. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

Todos os compostos estudados foram solubilizados em etanol: água na proporção 1:2 ou 1:3. Inicialmente foram preparadas soluções estoques dos compostos na concentração $2560\text{ }\mu\text{g/mL}$. Essas soluções quando aplicadas nas placas foram diluídas 20 vezes na concentração mais alta testada ($128\text{ }\mu\text{g/mL}$). A partir daí, foram feitas diluições na

razão de 2 para os demais poços. Assim, foram testadas 10 concentrações (128 a $0,25\text{ }\mu\text{g/mL}$). Essas concentrações correspondem às concentrações preconizadas pelo CLSI para determinação da CIM para a maioria dos antibacterianos. O etanol (solvente) ficou na concentração máxima de 2,5%.

Foram realizados controles do solvente a fim de verificar a possível atividade do etanol sobre as bactérias testadas, controle positivo (somente meio de cultura e inóculo) e controle negativo (somente meio de cultura). Nesta concentração utilizada o etanol não apresentou atividade frente às bactérias analisadas.

6.11 ATIVIDADE ANTI-HIPERGLICÊMICA

A atividade anti-hiperglicêmica foi testada pela doutoranda Delsi Altenhofen, supervisionada da Professora Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, do Departamento de Bioquímica da UFSC.

Teste de tolerância oral a glicose: Ratos Wistar em jejum de 16 h forma divididos em grupos de 6 animais como controles e tratados (com os respectivos compostos). Os ratos receberam uma sobrecarga de glicose (4 g/Kg por gavagem) 30 min após receberem as respectivas substâncias (grupos tratados). Amostras de sangue foram coletadas no tempo zero, 15, 30, 60 e 180 min após a sobrecarga de glicose e a glicemia avaliada pelo método da glicose oxidase (SILVA et al., 2002).

Determinação da glicação de proteína: Para determinação da glicação, a albumina 10 mg/mL contendo azida sódica 0,02% foi incubada com glicose (500 mM) ou frutose (100 mM) a 37 °C por 7, 14 e 28 dias na ausência (controle) ou presença do tratamento. A formação da glicação foi medida por fluorescência (excitação 370 nm e emissão 440 nm) em leitora Infiniti (TECAN) (KAPPEL et al., 2012).

Extração das dissacaridasas intestinais e ensaios de atividade enzimática: A partir de uma porção do duodeno foram preparadas amostras de tecidos e incubadas com os respectivos substratos para as enzimas lactase, maltase e sacarase. Após a incubação, a determinação da atividade enzimática foi feita pelo método da glicose oxidase, sendo a unidade de enzima (U) definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 μ mol de glicose por minuto (PEREIRA et al., 2012).

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram utilizadas metodologias sintéticas diversificadas, com vistas à obtenção de compostos inéditos ou buscando otimizar a síntese daqueles já descritos pela literatura. Foram sintetizadas diferentes classes de compostos, tais como derivados naftoquinônicos, pirazóis e sulfonamidas, para os quais foram investigadas diferentes atividades biológicas, como: antioxidante, inibição da enzima acetilcolinesterase, atividade antinociceptiva, leishmanicida, antimicrobiana e anti-hiperglicêmica.

7.1 QUANTO À SÍNTESE DOS ADUTOS DE MANNICH E DÍMEROS DERIVADOS DA LAUSONA, PIRAZÓIS E SULFONAMIDAS

7.1.1 Em relação aos adutos de Mannich

- Foram obtidos, por reação de Mannich e com ótimos rendimentos, 12 adutos derivados da lausona. Dentre estes, 11 são inéditos. Os compostos foram obtidos de forma a obter estruturas variadas para estudos de correlação estrutura-atividade.
- Todas as estruturas foram caracterizadas por IV, RMN de ^1H e de ^{13}C .

7.1.2 Em relação aos dímeros da Lausona

- Foi otimizada a síntese de 9 dímeros derivados da lausona, utilizando diferentes sistemas (refluxo, radiação ultrassônica e microondas), diferentes catalisadores e solventes. Destes 2 compostos são inéditos.
- As condições reacionais foram otimizadas visando minimizar os impactos ambientais, a geração de resíduos e seguindo os princípios da Química Verde. Neste sentido, o único subproduto da reação é água, as reações exibiram alta porcentagem de economia atômica e o tempo reacional foi reduzido, o que implica em menor consumo de energia elétrica.
- Todas as estruturas foram caracterizadas por IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas.

7.1.3 Em relação aos pirazóis

- Foi possível a síntese do 1-hidróxipirazol substituído.
- A primeira estratégia sintética, condensação intramolecular de nitrocompostos, mostrou-se ineficiente por dificuldade da separação dos compostos provenientes da reação de Henry.
- A segunda abordagem, condensação de oximas está sendo investigada.
- A obtenção do hidroxipirazol por reação de acoplamento de Suzuki foi eficiente e mostrou-se adequada para acesso à estes compostos.

7.1.4 Em relação às sulfonamidas derivadas do carvacrol

- Foram obtidos, por reação de substituição e com ótimos rendimentos, 11 sulfonamidas inéditas derivadas do carvacrol. Os compostos foram obtidos de forma a obter estruturas variadas para estudos de correlação estrutura-atividade.
- Todas as estruturas foram caracterizadas por RMN de ^1H e espectrometria de massas.

7.2 QUANTO À VERIFICAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ADUTOS DE MANNICH E DÍMEROS DERIVADOS DA LAUSONA, PIRAZÓIS E SULFONAMIDAS

7.2.1 Em relação à atividade antioxidante

Para a maior parte dos compostos derivados da lausona, bases de Mannich e dímeros, observam-se vários processos eletroquímicos ocorrendo, já que além do centro redox do núcleo quinônico os substituintes presentes apresentam comportamento redox, e são importantes no que tange ao comportamento eletroquímico destes compostos quando presentes em meio aprótico.

Uma análise dos resultados obtidos para a série das bases de Mannich demonstra a potencialidade desta classe de compostos quanto à sua ação antioxidante. A atividade antioxidante dos 5 compostos mais ativos da série (**A5**, **A1**, **A4**, **A6**, **A2**) foi comparável aos padrões rutina e BHT utilizados nestas análises. Para esta classe de compostos, a substituição de um anel aromático por um heterociclo saturado, pirrolidina para os compostos **A11** (β -hidroxinaftaldeído), **A12**

(benzaldeído) e **A10** (2-hidroxibenzaldeído) acarretou menor atividade, provavelmente por diminuir a eletrofilicidade do nitrogênio e aumentar o impedimento estérico, dificultando os mecanismos de ação antioxidante.

Para a série dos dímeros derivados da lausona destacam-se os compostos **DIM-2** e **DIM-1**, derivados do 3,4,5-trimetoxibenzaldeído e 4-metoxibenzaldeído respectivamente. Quando correlacionados com os ensaios voltamétricos, pode-se observar uma correlação entre as atividades *in vitro* e o potencial anódico. Os compostos seguiram exatamente o previsto para a atividade com melhores resultados de atividade para os compostos na ordem **DIM-2**> **DIM-1**> **DIM-5** > **DIM-7**> **DIM-9**> **DIM-4**> **DIM-3**>**DIM-6**> **DIM-8**, de acordo com o aumento no potencial anódico e exatamente na mesma sequência, com os valores extremos -1,86V para o **DIM-2** e -1,49V para o **DIM-8**.

A análise da atividade antioxidante da série de sulfonamidas demonstra o alto potencial desta classe de compostos. Analisando a capacidade antioxidante total, pode-se observar que três dos compostos **S-10**, **S-1** e **S-7** apresentaram atividade superior ao padrão rutina.

Os métodos de investigação da atividade antioxidante foram correlacionados com bons padrões de correlação ($r^2 > 0,8$), demonstrando confiabilidade nas análises realizadas por de diferentes mecanismos antioxidantes.

7.2.2 Em relação à inibição da enzima acetilcolinesterase

Os compostos com maior atividade, foram os compostos **A-11**, **A-10** e **A-12**, todos contendo, além de outras características estruturais, um heterociclo saturado derivado da pirrolidina. Dentre os demais, observa-se destaque para os compostos **A-5** e **A-1** que apresentam grupos metila doadores de elétrons e derivados da p-toluidina. Vale salientar que para uma mesma amina constituinte da base de Mannich, observou-se melhores resultados para os aldeídos constituintes da molécula, na ordem 2-hidroxinaftaldeído> 2-hidroxibenzaldeído> benzaldeído. Os compostos contendo grupos retiradores de elétrons, do tipo nitro, tiveram os piores índices de inibição e dentre estes aqueles contendo a hidrazina apresentaram-se com melhores valores de inibição enzimática.

Para os dímeros derivados da lausona podemos observar excelentes valores de inibição, principalmente para os compostos **DIM-**

2, DIM-1 e DIM-7 derivados do 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, 4-metóxi-benzaldeído e p-metilbenzaldeído respectivamente, que se mostraram mais ativos que o padrão galantamina utilizado.

Para a série das sulfonamidas observou-se uma atividade de inibição enzimática superior às demais classes investigadas neste trabalho. A análise dos valores de IC₅₀ para os compostos **S-1, S-9, S-5, S-10 e S-7** derivados da morfina, 2-amino-1-picolilamina e 2-aminopirazina, o-hidóxi-anilina e hidrazina, respectivamente, demonstram valores de atividade superiores ao padrão galantamina. Para estas sulfonamidas observa-se, a presença dos heterociclos nitrogenados, grupos doadores de elétrons, hidroxilas e anéis aromáticos, que compõe o esqueleto básico de grande parte dos agentes anticolinesterásicos.

7.2.3 Em relação à atividade antinociceptiva

O composto carvacrol e os sintetizados a partir dele, **S-1, S-2, S-9 e S-11**, foram capazes de reduzir a nocicepção (dor) aguda induzida por glutamato em camundongos, sem interferir na atividade locomotora dos animais, mostrando que o efeito antinociceptivo não é decorrente de efeitos inespecíficos tais como sedação ou disfunção locomotora, tidos como efeitos colaterais. Ademais, o estudo demonstrou que o efeito antinociceptivo destes compostos se deve, pelo menos em parte, pelo bloqueio dos receptores glutamatérgicos periféricos.

Desta forma, o conjunto de resultados nos testes comportamentais apresentados nesta tese fornece evidências inéditas na literatura sobre as propriedades analgésicas de alguns compostos sintetizados a partir do carvacrol, com destaque ao composto **S-1**, que se mostrou o mais potente e eficaz em relação aos outros compostos testados, para o tratamento da dor aguda e inflamatória.

7.2.4 Em relação à atividade anti-leishmania

As bases de Mannich derivadas da lausona foram investigadas quanto a atividade de inibir as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e as formas amastigotas, forma intracelular do parasita. Para os compostos analisados, observa-se destaque para o composto **A-8** que apresentou uma boa seletividade e uma baixa citotoxicidade.

7.2.5 Em relação à atividade antimicrobiana

Os dímeros derivados da lausona, apresentaram melhores atividades contra o *Paracoccidioides brasiliensis*, para o qual dois dos nove compostos apresentaram valores muito significativos de concentração inibitória mínima, que são DIM-2 (7,41 μ M) e DIM-5 (14,70 μ M). Dentre os compostos desta série, podemos destacar o composto **DIM-2**, derivado do 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, que apresentou atividade significativa também para *C. neoformans*(14,83 μ M).

As sulfonamidas apresentaram atividade mais relevante para a *Staphylococcus aureus* em especial o composto **S-4**. Estes baixos valores de CIM observados para inibição do crescimento de *S. aureus*, incentivaram uma nova investigação contra outras seis cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos isolados clinicamente, para os quais o composto S-4 apresentou melhores valores de CIM para todas as variedades de *Staphylococcus aureus* resistentes.

7.2.6 Em relação à atividade anti-hiperglicêmica

Somente a base de mannich **A-1** reduziu significativamente ($p < 0,001 - 23\%$) a glicemia quando comparada ao controle. O mecanismo anti-hiperglicêmico envolvido ainda necessita ser elucidado, embora trabalhos envolvendo naftoquinonas apontam para uma ação insulínomimética. No entanto, não foram observadas alterações no conteúdo total de glicogênio muscular e hepático, além de **A-1** e **A-5** não inibirem dissacaridases intestinais. Porém, **A-1** e **A-5** reduziram significativamente ($p < 0,001$) a formação de produtos "nais de glicação avançada" – AGES, na concentração de 1 μ g/ml. **A-1** reduziu a glicação em 52%, 41% e 37% em 7, 14 e 28 dias, respectivamente. **A-5** reduziu em 30% e 24% em 14 e 28 dias, respectivamente. Essa ação demonstra um potencial efeito protetor das complicações do diabetes, uma vez que os AGES estão diretamente envolvidos com a patogênese das alterações micro e macrovasculares comuns nesses pacientes. Porém, estudos ainda são necessários para estabelecer se esse efeito se reproduz *in vivo*.

8 PERSPECTIVAS

Almeja-se a continuidade dos estudos desenvolvidos nesta pesquisa, uma vez que foram sintetizados compostos inéditos e com potencial atividade biológica.

8.1 EM RELAÇÃO ÀS SÍNTESES

- Pretende-se sintetizar novos adutos de Mannich e dímeros derivados da lausona, empregando diferentes aminas e aldeídos alifáticos, heterocíclicos e aromáticos para estudos de correlação qualitativa (SAR) e quantitativa da estrutura-atividade. Estes novos compostos também poderão ser avaliados quanto às propriedades biológicas investigadas neste trabalho, a efeito comparativo com vistas a melhor compreensão do efeito da estrutura na atividade;
- Investigar novas vias sintéticas para a síntese dos hidroxipirazóis;
- Realizar a síntese de novas sulfonamidas e sulfonilidrazonas derivadas do carvacrol;
- Desenvolver novas metodologias reacionais para a síntese das bases de Mannich, pirazóis e sulfonamidas, utilizando radiação ultrassônica, microondas e diferentes formas de catálise, como foi feito como os dímeros da lausona.

8.2 EM RELAÇÃO ÀS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

8.2.1 Quanto às atividades antioxidante e de inibição da enzima acetilcolinesterase

Os ensaios *in vitro* para as bases de Mannich e dímeros derivados da lausona, e para as sulfonamidas derivadas do carvacrol, forneceram informações suficientes para uma triagem prévia dos compostos com atividade biológica. Esta triagem é necessária para uma utilização racional de animais para estudos *in vivo*, como previsto pelo comitê de ética no uso de animais. Com base nos resultados obtidos através das técnicas experimentais para investigação da atividade, será interessante a investigação, utilizando outros protocolos, da atividade antioxidante dos compostos que apresentaram melhor resultado nos testes *in vitro*.

Além, disto almeja-se a utilização de testes mais específicos e complementares aos resultados preliminares apresentados na investigação da enzima acetilcolinesterase.

8.2.2 Quanto à atividade antinociceptiva

- Fazer análises bioquímicas *in vivo* para demonstrar mais claramente a função antioxidante dos compostos sintetizados a partir do carvacrol, verificando por exemplo a concentração e atividade de agentes antioxidantes endógenos (SOD, CAT, GPx) entre outros;
- Ampliar os estudos sobre a atividade analgésica dos compostos sintetizados a partir do carvacrol, principalmente do composto **S-1**, utilizando modelos experimentais de dor inflamatória crônica ou dor neuropática;
- Aprofundar o estudo sobre o mecanismo de ação do composto **S-1**, utilizando os agonistas específicos dos receptores glutamatérgicos (NMDA, AMPA, cainato e transACPD) tanto em nível periférico (pata) como central (medula);
- Avaliar por meio do tratamento agudo e prologando com o morfocarvacrol, as possíveis alterações toxicológicas que podem ocorrer em órgãos nobres e no sangue.

8.2.3 Quanto às atividades leishmanicida, antimicrobiana e anti-hiperglicêmica

- Testar todos os compostos sintetizados ao longo deste trabalho, para melhor correlação da estrutura-atividade e para elaboração de novas estratégias sintéticas posteriores.

8.3 PERSPECTIVAS GERAIS

- Calcular os parâmetros farmacocinéticos dos compostos sintetizados, por intermédio de softwares para correlacionar estes parâmetros com as atividades biológicas investigadas.
- Investigar as constantes de associação dos metais e a lausona para melhor compreensão dos mecanismos de catálise.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, M. et al. Isolation of 1,2-dihydroxy-4glucosyloxynaphthalene from lawsonia innermis. **Heterocycles**, nº 22(4), p. 813, 1984.

AHMAD, P. **Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change**. New York: Springer, 2012.

AHMAD, S. **Oxidative stress and antioxidant defenses in biology**. New York: Chapman & Hall, 1995.

AHMED, S. et al. Evaluation of the efficacy of Lawsonia alba in the alleviation of carbon tetrachloride-induced oxidative stress. **Ethnopharmacol**, nº 69(2), p. 157-164, 2000.

ALLEN, K. J. et al. Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. **The New England Journal of Medicine**, nº 358 (3), p. 221-30, 2008.

ALMEIDA R. P. et al. Biological behavior of Leishmania amazonensis isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in: BALB/C mice. **Am J Trop Med Hyg**, nº 54(2), p. 178-184, 1996.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, nº 33 (10), p. 2202-2210, 2010.

ANDERSON, K. K. Sulfonic acid and derivatives. In: BARTON, D. H. R.; OLLIS, W. **Comprehensive organic chemistry**. vol. 3, cap. 1. Amsterdam, 1982.

ARAN, V. J. et al. Synthesis and protonation behavior of 26-membered oxaaza and polyaza macrocycles containing two heteroaromatic units of 3,5-disubstituted pyrazole or 1-benzylpyrazole. A potentiometric and ¹H and ¹³C NMR. **Study. J. Org. Chem**, nº 64(17), p. 6135-6146, 1999.

AREND, M. et al. Modern Variants of the Mannich Reaction. **Angew. Chem., Int. Ed.**, nº 37, p. 1044, 1998.

ARRIETA, A. et al. Efficient tautomerization hydrazone-azomethine imine under microwave irradiation. Synthesis of [4,3'] and [5,3']bipyrzoles. **Tetrahedron**, nº 54(43), p. 13167-13180, 1998.

BARAMEE, A. et al. Synthesis and in vitro activities of ferrocenic aminohydroxynaphthoquinones against *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. **Bioorg. Med. Chem.**, nº 14, p. 1294-1302, 2006.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BARRIÈRE D. A. et al. Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization. **Pain**, nº 153, p. 553-561, 2012.

BASSIN, J. P. et al. Chlorosulfonation of aromatic and hetero-aromatic Systems. **Phosphorus, Sulfur and Silicon**, nº 56, p. 245-275, 1991.

BEHR, L. C. et al. **Resonance a comprehensive treatise on experimental techniques**. New York: Interscience Publishers, 1967.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, vol. 924, nº. 2, p. 219-28, jan. 2002.

_____. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Research**, vol. 969, nº. 1-2, p. 110-116, abr. 2003.

BELL, P. H., ROBLIN, R. O., Studies in chemotherapy. VII. A theory of the relation of structure to activity of sulfanilamide type compounds. **J. Am. Chem. Soc.**, nº 64, p. 2905-2917, 1942.

BHARDWAJ, D. K. et al. 1-Hydroxy-3, 7-dimethoxy-6-acetoxanthone, a new xanthone from *Lawsonia inermis*. **Phytochemistry**, nº 17(8), p. 1440-1441, 1978.

- BICH, D. H. et al. **The medicinal plants and animals in Vietnam.** Science and Technology Publishing House, 2004.
- BLAKE, D. R. et al. Effect of a specific iron chelating agent on animal models of inflammation. **Annals of The Rheumatic Diseases**, n° 42 (1), p. 89-93, 1983.
- BLEICH, S. et al. Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. **Int J Geriatr Psychiatry**, vol. 18, n° 1, p. 33-40, set. 2003.
- BOURNE, Y. et al. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. **The EMBO Journal**, n° 22, p. 1-12, 2003.
- BRENNER, G. J. et al. Peripheral noxious stimulation induces phosphorylation of the NMDA receptor NR1 subunit at the PKC-dependent site, serine-896, in spinal cord dorsal horn neurons. **European Journal of Neuroscience**, n° 20(2), p. 375-384, 2004.
- BRETON, J. D.; STUART, G. J. Somatic and dendritic GABAB receptors regulate neuronal excitability via different mechanisms. **Journal of Neurophysiology**, n° 108, p. 2810-2818, 2012.
- BRETT, A. M. O.; GHICA, M. E. Electrochemical Oxidation of Quercetin. **Electroanalysis**, n° 15, p. 1745, 2003.
- BRUEGGEMANN, M. et al. Total synthesis of (+/-)-didehydrostemofoline (asparagine A) and (+/-)-isodidehydrostemofoline. **J. Am. Chem. Soc.**, n° 125, p. 15284, 2003.
- CADENAS, E. In: AHMAD, S. (ed.). **Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification.** New York: Chapman & Hall, 1995.
- CAMMARATA, A.; ALLEN, R. C. Observations concerning the correlation of *in vitro* sulfonamide activity with pKa and the hammett values. **J. Pharm. Sci.**, n° 56, p. 640-642, 1967.

CAPPELLINI, M. D. et al. A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. **Blood**, nº 107(9), p. 3455-3462, 2006.

CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, nº 72, p. 599-618, 2001.

CATALÁN, J. et al. Photoinduced Intramolecular Proton Transfer as the Mechanism of Ultraviolet Stabilizers: A Reappraisal. **J. Am. Chem. Soc.**, nº 112(2), p. 747-759, 1990.

CHAKRABARTTY, D. et al. Isolation of dihydroxylupene and dihydroxylupane from the bark of *Lawsonia inermis*. **Phytochemistry**, nº 21(7), p. 1814-1816, 1982.

CECHINEL-FILHO, V. et al. **Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica**. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. Chapecó: Argos, 2001.

CHIYANZU, I. et al. Design, synthesis and antiplasmodial evaluation in vitro of new 4-aminoquinoline isatin derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, nº 13, p. 3249-3326, 2005.

CHIZHIK, S. M.; PASSET, B. V. Zh. **Org. Khim.**, nº 11(8), p. 1649-1651, 1975.

CODERRE, T. J. et al. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-Type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. **Pain**, nº 112(1-2), p. 94-105, 2004.

CODERRE, T. J.; VAN EMPEL, I. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. I. Comparison of the antinociceptive activity of various classes of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. **Pain**, nº 59(3), p. 345-352, 1994.

COELHO, G. D. S. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J.Ethnopharmacol.**, nº 90, p. 135-143, 2004.

CRAIG, J. C. et al. Amine exchange reactions. Mannich bases from primary aliphatic amines and from amino acids. **J. Org. Chem.**, n° 28, p. 2779, 1963.

CROFT, S.; COOMBS, G. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.**, n° 19, p. 502-508, 2003.

CUONG, N. X. et al. Inhibitors of osteoclastogenesis from *Lawsonia inermis* leaves. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, n° 20(16), p. 4782-4784, 2010.

DALGLIESH, C. E. Naphthoquinone antimalarials. Mannich bases derived from lawsone. **J. Am. Chem. Soc.**, n° 71, p. 1697, 1949.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, vol. 65, n° 1, p. 1-105, set. 2001.

DENG, X.; MANI, N. S. A regioselective one-pot synthesis of substituted pyrazoles from *N*-monosubstituted hydrazones and nitroolefins gives products in good yields. A key nitropyrazolidine intermediate is characterized and a plausible mechanism is proposed. **Org. Lett.**, n° 8(14), p. 3505-3508, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. **Oxford**, n° 27(5), p. 305-318, 2004.

DI GIOVANNI, S. et al. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: thin layer chromatography versus microplate methods. **Eur J Pharm Sci**, n° 33, p.109-119, 2008.

DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In: BESSON, M. J.; DICKENSON, A. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, 1997.

DIXIT, S.N.; et al. Lawsonia inermis - From traditional use to scientific assessment. **Indian Phytopathological**, n° 31, p. 131-133, 1980.

DUGAN, L.; KIM-HAN, J. S. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In: BRADY, S. T. et al (ed.). **Academic Press**, nº 7, p. 559-573, 2006.

ELGUERO, J. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II* (Katritzky, A. R., Rees, C. W., Scriven, E. F., Eds), **Pergamon Press**, Oxford, 1996, Vol. 3, p1.

ETAYO, P., et al. Efficient stereoselective synthesis of enantiopure cis- and trans-1,2,4-trisubstituted piperidines. **Tetrahedron: Asymmetry** 2007, 18, 2812-2819.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH(*) radical in alcoholic solutions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 7, p. 2309-14, abr. 2004.

FRAGA, T. L.; et al. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 2010, 105 (3) 110-113.

FRANKEL, E. D.; FINLEY, J. W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. **J. Agric. Food Chem.**, nº 56, p. 4901, 2008.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**, vol. 15, nº. 1, p. 29-58, jan. 2001.

GAO X.; et al. Reactive oxygen species (ROS) are involved in enhancement of NMDA-receptor phosphorylation in animal models of pain. **Pain**, nº 131, p. 262-271, 2007.

GILBERT, E. E. **Sulfonation and related reactions**. New York: Robert E. Krieger Publishing Co., 1977.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, nº 36, p. 71-80, 2003.

GOODMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. New York: McGraw Hill, 1996.

GORRINI, C. et al. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, n° 12(12), p. 931-947, 2013.

GUENOUN, F. et al. Pyrrolidinopiperazinedione as chiral auxiliary and its use in asymmetric Mannich synthesis. **Tetrahedron Lett.**, n° 38(9), p. 1563, 1997.

GUPTA, S. et al. A naphthoquinone from *Lawsonia inermis* stem bark. **Phytochemistry**, n° 33(3), p. 723-724, 1993.

HACIMUFTUOGLU, A. et al. Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. **Behav Brain Res.**, n° 173(2), p. 211-216. 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B.; Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. **Biochem. Pharmacol.**, n° 49, p. 1341-1348, 1995.

HANDA, G. et al. Lawsonic acid a new anticomplementary triterpenoids from *Lawsonia inermis* seeds. **Indian J. Chem.**, n° 36(3), p. 252-256, 1997.

HANSCH, C. Drug design. Vol. I. E.J. New York: Academic Press, 1971.

HELLER, S. T.; NATARAJAN, S. R. 1,3-diketones from acid chlorides and ketones: a rapid and general one-pot synthesis of pyrazoles. **Org. Lett.**, n° 8(12), p. 2675-2678, 2006.

HILL, R. G. Molecular basis for the perception of pain. **Neuroscientist**, n° 7(4), p. 282-92, 2001.

HILLARD, E. A. et al. Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds **Chem. Commun.**, n° 23, p. 2612-28, 2008.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n° 97(7), p. 1027-1031, 2002.

HOTTA, H. et al. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, n° 1572, p. 123-132, 2002.

HSIEH, H. L.; YANG, C. M. Role of Redox Signaling in Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. **Biomed Research International** 484613, 2013.

IWU, M. M. et al. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitol Today**, n° 10, p. 65-68, 1994.

JACOB et al. **Nature Reviews Neuroscience**, 2008.

JANES, K. et al. Anti-superoxide and anti-peroxynitrite strategies in pain suppression. **Biochimica et Biophysica Acta.**, n° 1822(5), p. 815-821, 2012.

JONES, R. A. et al. The reaction of 1-phenyl-4 vinylpyrazole with diethyl azodicarboxylate. X-Ray molecular structure of 1,2-bisethoxycarbonyl-1-[2-hydroxy-2-(1-phenylpyrazol-4-yl)ethyl]hydrazine. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. I**, p. 1423-1425, 1984.

JOSHI, S. et al. Synthesis and in vitro study of novel Mannich bases as antibacterial agents **Bioorg. Med. Chem Lett.**, n° 15, p. 221-226, 2005.

_____. Synthesis and biological study of medicinally important Mannich bases derived from 4-(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro 3,6,10,12,12a pentahydroxy naphthacene carboxamide. **Bioorg. Med. Chem Lett.**, n° 17, p. 645-648, 2007.

JOULE, J. A.; MILLS, K. **Heterocyclic chemistry**. Oxford: Blackwell Publishing, 2000.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, vol. 413, n°. 6852, p. 203-10, set. 2001.

KALCKAR, H. M. Origins of the concept oxidative phosphorylation. *Mol. Cell. Biochem.* n° 5(1-2), p. 55-63, 1974.

KAPPEL, V. D. et al. Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasi. *Molecules*, n° 17, p. 6754-6768, 2012.

KASHIMA, C. et al. Stereoselective N-acylation of a new chiral auxiliary compound: 3-phenyl-1-menthopyrazole. *Tetrahedron Lett.*, n° 34(51), p. 8305-8308, 1993.

KHATTAB, M. M. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: A key role for superoxide anion. *European Journal of Pharmacology*, n° 548, p. 167-173, 2006.

KIM, H. K. et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, n° 111(1-2), p. 116-24, 2004.

_____. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain*, n° 122(1-2), p. 53-62, 2006.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. *Química Farmacêutica*, n° 513, p. 516-522, 1982.

KUO, H. S. et al. Efficient Synthesis of ‘Redox-Switched’ Naphthoquinone Thiol-Crown Ethers and Their Biological Activity Evaluation. *Bioorg. Med. Chem.*, n° 10, p. 1947-1952, 2002.

LEPRE, C. A. Library design for NMR-based screening. *Drug Discovery Today*, n° 6(3), p. 133-140, 2001.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. *Quim. Nova*, n° 30, p. 1456-1468, 2007.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Del. Reviews*, n° 23, p. 3-25, 1997.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, vol. 137, n° 3, p. 473-7, jul. 2008.

MACHAN, T. et al. The addition of 2 -tertbutyldimethylsilyloxyfuran to cyclic N-acyliminium ions containing cyclohexyl-based chiral auxiliaries. **Tetrahedron Lett.**, nº 41, p. 9709-9712, 2000.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim.Nova**, nº 25(3), p. 429-438., 2002

MAGINA, M. D. A. et al. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis* **Quim. Nova**, nº 35 6), p. 1184-1188, 2012.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nat. Rev. Cancer.**, nº 2, p. 143, 2002.

MANNICH, C. Eine Synthese von β -Ketonbasen. **Arch Pharm.**, nº 255, p. 261-262, 1917.

MARTIN, S. F.; BARR, K. J. Vinylogous Mannich Reactions. The Asymmetric Total Synthesis of (+)-Croomine. **J. Am. Chem. Soc.**, nº 118, p. 3299, 1996.

MCCLURE, N. L. et al. Exo, endo-3-[(Dimethylamino)methyl]-d-camphor: d-camphor Mannich products. **J. Org. Chem.**, nº 53, p. 2617-2620, 1988.

MEERHOLZS, C. A. et al. Vinylogous urethanes in alkaloid synthesis: formal syntheses of *Elaeocarpus* alkaloids. **Tetrahedron lett.**, nº 21, p. 1373-1374, 1980.

MEOTTI, F. C.; COELHO I. S.; SANTOS, A. R. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **Journal of Pain**, vol. 11, nº. 6, p. 570-8, jun. 2010.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, vol. 57, nº. 1, p. 1-164, jan. 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (FUNASA). **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia, FUNASA/MS, 2000.

MONTEIRO, E. M. et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotômíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, nº 38(2), p. 147-152, 2005.

MORESCO, H. H. et al. Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, nº 4(02), p. 1-7, 2014.

MOURA, M. A. B. F. de. **Atividade antitumoral de nitroquinona derivada da Nor- β -Lapachona**: contribuição da farmacoeletrorquímica na pesquisa do mecanismo de ação de novos fármacos. Tese de doutorado. Universidade Federal de Alagoas: Instituto de Química, Maceió. 2008.

MUHAMMAD, H.; MUHAMMAD, S. The use of *Lawsonia inermis* linn. (henna) in the management of burn wound infections. **Afr. J. Biotechnol.**, nº 4(9), p. 934-937, 2005.

MUKHERJEE, P. K. et al. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, nº 14, p. 289-300, 2007.

NEVES, A. P. et al. Novel zinc(II) and copper(II) complexes of a Mannich base derived from lawsone: Synthesis, single crystal X-ray analysis, *ab initio* density functional theory calculations and vibrational analysis. **Spectrochimica Acta Part A**, , nº 94, p. 152-163, 2012.

NEVES, A. P. **Síntese, caracterização e estudo da atividade farmacológica de 2-hidroxi-3-alkilaminonaftoquinonas e seus complexos metálicos**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Fluminense: Instituto de Química. 2007.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

NIASSY, B. et al. Flavonoids from *Tephrosia deflexa* and *T. albifoliolis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, nº 33, p. 309-312, 2005.

NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition** , nº 18, p. 524, 2002.

NUCCI, C. et al. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 143, n°. 1, p. 170-8, ago. 2012.

NUNES, R. J. **The Chemistry & Biological Activity of Cyclic Imidobenzenesulphonyl Derivatives**. Tese de Doutorado, The Hatfield Polytechnic, England, 1986.

OBOH, G.; HELEN, T. Antioxidant and Inhibitory Effects of Aqueous Extracts of *Salvia officinalis* Leaves on Pro-Oxidant-Induced Lipid Peroxidation in Brain and Liver *In Vitro*. **J. Med. Food**, n° 12, p. 77-84, 2009.

PALACIOS, F. et al. A regioselective synthesis of 5-pyrazolones and pyrazoles from phosphazenes derived from hydrazines and acetylenic esters. **Tetrahedron**, n° 55(50), p. 14451-14458, 1999.

PAPAGEORGIU, V. P. et al. The chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin and related naphatazarin natural products. **Angew Chem Intern edition.**, n° 38, p. 270-300, 1999.

PARK, J. M. et al. Antiallodynic effects of vitamin C and vitamin E in chronic post-ischemia pain rat model. **Korean Journal of Anesthesiology**, n° 65(5), p. 442-8, 2013.

PARSONS, C. G. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, vol. 429, n°. 1-3, p. 71-8, out. 2001.

PAULA, C.D.R., et al. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Brasil Med trop**, n° 36, p. 365-371, 2003.

PEREIRA, D. F. et al. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytotherapy**, n° 19, p. 868-877, 2012.

PETERSEN, J. G. et al. Synthesis and Biological Evaluation of 4-(Aminomethyl)-1-hydroxypyrazole Analogues of Muscimol as γ -Aminobutyric AcidA Receptor Agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, nº 56(3), p. 993, 2013.

PINTO, D. C. G. A. **2-Estirilcromonas - Síntese, Caracterização Estrutural e Transformações em Pirazóis**. Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, 1996.

PINTO, D. C. G. A. et al. Synthesis of 3-Benzoyl-4-styryl-2-pyrazolines and Their Oxidation to the Corresponding Pyrazoles. **Eur. J. Org. Chem.**, nº 14, p. 2593-2599, 2000.

_____. Synthesis and molecular structure of 3-(2-benzyloxy-6-hydroxyphenyl)-5-styrylpyrazoles. Reaction of 2-styrylchromones and hydrazine hydrate. **Tetrahedron**, nº 55(33), p. 10187-10200, 1999.

POPSAVIN, M. et al. Stereospecific synthesis of two novel cytotoxic pyrazole C-nucleosides from d-glucose. **Tetrahedron Lett.**, nº 41(30), p. 5737-5740, 2000.

PRATES, H. T. **Do estudo químico-biológico da acao carrapaticida do capim-gordura (Melilis minutiflora Beauv.) ao planejamento e sintese de derivados arilsulfonilicos, potencialmente biocidas, a partir de cetomas monoterpenicas abundantes**. Tese de Doutorado. Departamento de Química, UFMG, Belo Horizonte, 1992.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 25, nº. 6, p. 1268-1273, 1977.

PRIETO, P. et al. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**, nº 269, p. 337-341, 1999.

RACCHI, M.; et al. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules **Pharmacological Research**, nº 50, p. 441-451, 2004.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RAO, K. S. Free radical induce oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, nº 46(1), p. 9-15, 2009.

REDDY, K. R. Folk medicine from Chittoor district Andhra Pradesh, India used in the treatment of jaundice. **International Journal of Crude Drug Research**, nº 26(3), p. 137-140, 1988.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2008.

RIBEIRO, V. M. **Ciência animal**, nº10, p. 13-19, 2001.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Zeitschrift Fur Rheumatologie**, vol. 60, nº. 6, p. 404-15, dez. 2001.

ROBBINS, S. L. et al. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RODRIGUES, A. L. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sciences**, vol. 70, nº. 12, p. 1347-58, fev. 2002.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, nº 92, p. 235-254, 2005.

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**. vol. 49, p. 123-133, 1998.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Sci. Tech. Int.**, nº 8, p. 121, 2002.

SCHWARTZ, E. et al. Volatile female odors activate the accessory olfactory system of male mice without physical contact. **Neuroscience Abstract**, nº 21, p. 551-558, 2006.

SILVA, F. R. M. B. et al. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, vol.1-2, n°. 83, p. 33-37, 2002.

SILVA, M. N. da et al. Um panorama atual da química e farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Quim. Nova*, n° 26(3), p. 407-416, 2003.

SINGH, B. et al. DBU-catalyzed expeditious and facile multicomponent synthesis of N-arylquinolines under microwave. *Monatsh Chem*, n° 143, p. 91-99, 2012.

SOUZA, M. M. et al. **Ciências farmacêuticas**: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajai: Univali, 2003.

SPRYSKOV, A. A.; KUZMINA, I. L. Kinetics of desulfonation. *Journal of General Chemistry of the U.R.S.S.*, n° 28(1), p. 185-187, 1958.

STANOVNIK, B.; SVETE, J. Synthesis of heterocycles from alkyl 3-(dimethylamino) propenoates and related enamionones. *Chem. Rev.*, n° 104(5), p. 2433-2480, 2004.

STUART, A. F. et al. **Farmacologia da Neurotransmissão GABAérgica e Glutamatérgica**, 2009.

TAKEDA, Y; FATOPE, M. O. New Phenolic Glucosides from *Lawsonia inermis*. *J. Nat. Prod.*, n° 51(4), p. 725-729, 1988.

TAL, M. A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. *Neuroreport*, n° 7(8), p. 1382-4, 1996.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos**. 3. ed. Sao Paulo: Atheneu, 1984.

THOMAS, G. M. **New hampshire manual**. Chichester: John Wiley & Sons 2000. (Cap 2, 31-92; Cap 6, 215-254).

TIMMONS, C. et al. Asymmetric halo-Mannich-type reaction provides access to pyrrolidines and beta-proline derivatives. **J. Org. Chem.**, n° 70, p. 7634, 2005.

TOCZKO, M. A.; HEATHCOCK, C. H. Total Synthesis of (±)-Aspidospermidine. **J. Org. Chem.**, n° 65, p. 2642-2645, 2000.

TRAMONTINI, M.; ANGILIONI, L. Further advances in the chemistry of mannich bases. **Tetrahedron**, n°. 46, p. 1791, 1990.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacological Reviews**, n° 62(3), p. 405-96, 2010.

ULRICOVA, J.; WALTEROVA, D. Antioxidant properties of silybin glycosides. **Phytoter. Res.**, n° 16, p. 33-39, 2002.

VANHAELLEN, M.; VANHAELLEN-FASTRE, R. TLC-densitometric determination of 2,3-cis-procyanidin monomer and oligomers from hawthorn (*Crataegus laevigata* and *C. monogyna*). **J Pharm Biomed Anal.**, n° 7(12), p. 1871-5, 1989.

VILLANO, D. et al. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, vol. 71, n°. 1, p. 230-5, jan. 2007.

WAGNER, R. B.; ZOOK, H. D. **Synthetic organic chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1965.

WALL, P. D. Introduction to the fourth edition. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (ed.). **Textbook of Pain**. 4. ed. London: Churchill Livingstone, 1999.

WANG B.; et al. Low unidirectional sodium influx into root cells restricts net sodium accumulation in *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*. **J. Exp. Bot**, n° 57, p. 1161-1170, 2006.

WANG, J. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 42, n°. 2, p. 127-32, mar. 2008.

WANG, Z. Q. et al. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, n°. 309, p. 869–878, 2004.

WARRIER, P. K. **Chennai**: Orient longman private limited. 2004.

WATANABE, M. et al. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. **Int. Rev. Cytol**, n° 213, p. 1-47, 2002.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites (ecological methods and concepts)**. 1. Wiley-Blackwell, 1994. 248 ISBN 0632029692.

WEISSMANN, G. Aspirin. Scientific American 1991, WENZEL, N. I. et al. Antimalarial versus Cytotoxic Properties of Dual Drugs Derived From 4-Aminoquinolines and Mannich Bases: Interaction with DNA. **J. Med. Chem.**, n° 53, p. 3214-3226, 2010.

YAMAMOTO, H.; OGAWA, T. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. **Biochem.**, n° 66(4), p. 921-4, 2002.

YAN, M. H.; et al. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, n° 62, p. 90-101, 2013.

YASNITSKII, B. Y. Zhur. **Obshch Khim.**, n° 23, p. 107-116, 1953.

YUNES, R. A. et al. Fármacos e Fitoterápicos: A Necessidade do Desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, n° 24, p. 147-152, 2001.

ZACCHINO, S. A. et al. In vitro studies on mode of action of antifungal 8.0.4'- neolignans occurring in certain species of *Virola* and related genera of Myristicaceae. **The Haworth Press**, p. 1-41, 2003.

ZARE, H. R. et al. Electrochemical behavior of quercetin: Experimental and theoretical studies. **Electroanal. Chem.**, n° 584(2), p. 77-83, 2005.

ZHOU, H. Y.; CHEN, S. R.; PAN, H. L. Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. **Expert Rev Clin Pharmacol**. vol. 4, n°. 3, p. 379-388, maio, 2011.

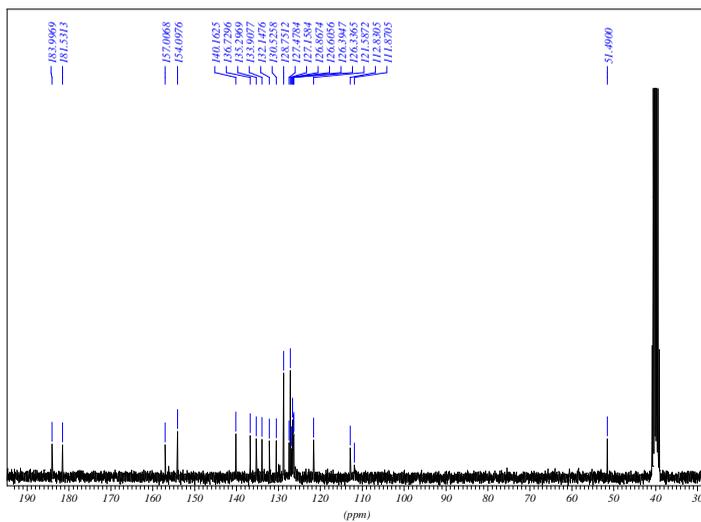
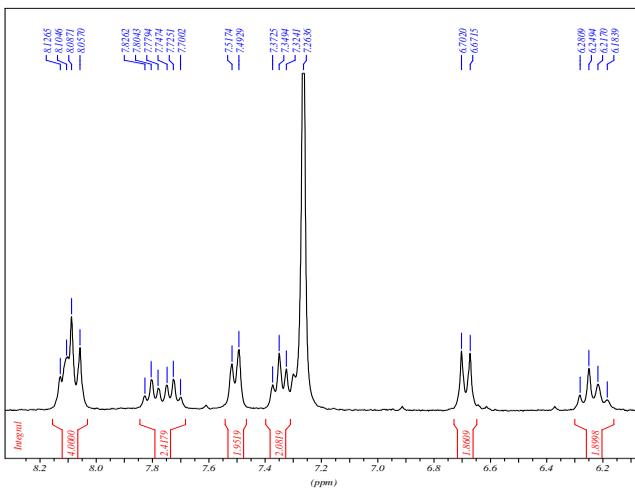
ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, vol. 16, n°. 2, p. 109-10, jun. 1983.

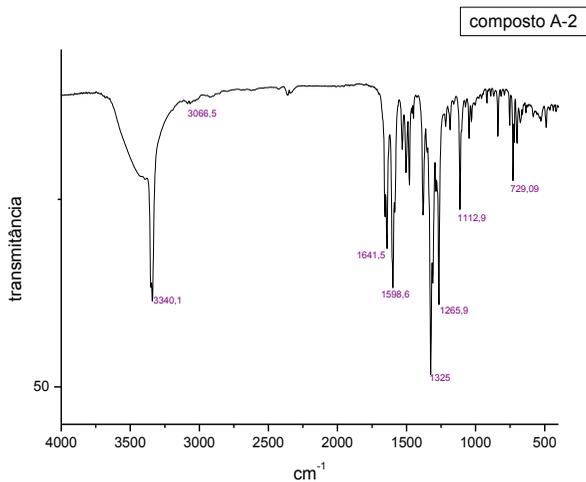
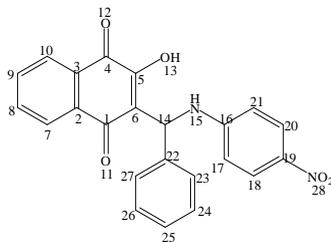
ZUMAN, P. Substituent effects in organic polarography. **Plenum Press**, n° 273, p. 46-48, 1967.

10 ANEXOS

10.1 ESPECTROS

Composto **A-2:** **A-2:** 2-hidroxi-3-((4-nitrofenilamino)(fenil)metil)naftalen-1,4-diona

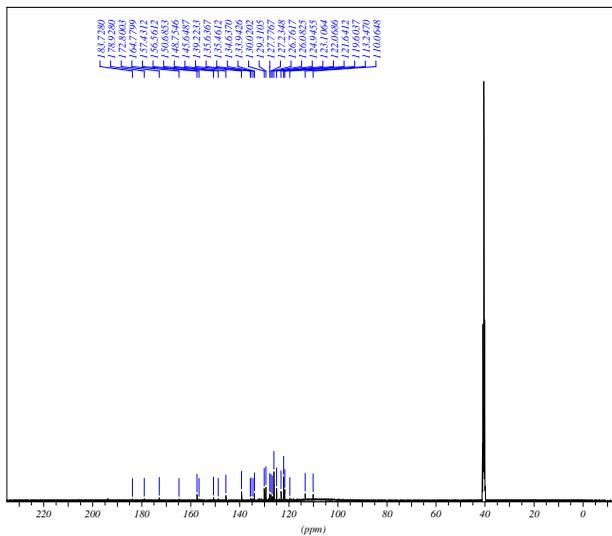
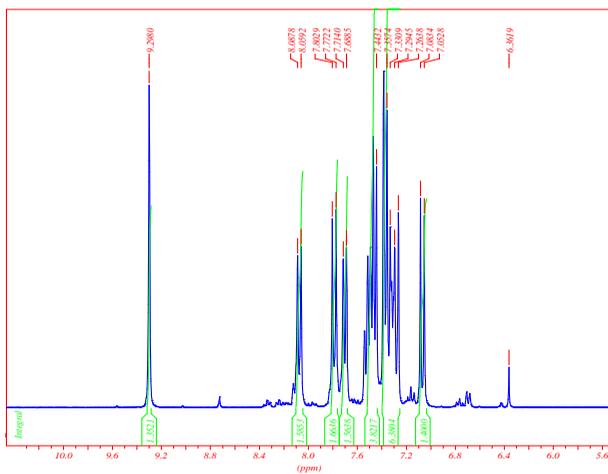


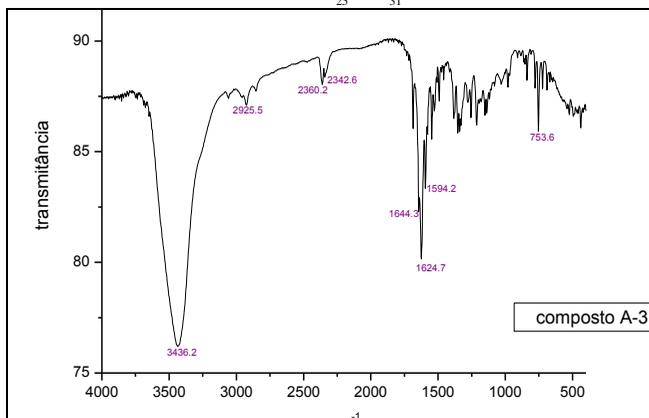
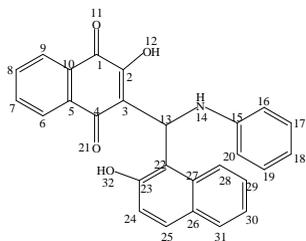


Análise de RMN ^1H para o composto A-2.

Hidrogênio	δ (^1H) ppm	Constante de Acoplamento (Hz)	Multiplicidade
H18	8,13	$J_{18-17} = 7,5$	d
H20	8,13	$J_{20-21} = 7,5$	d
H10	8,06	$J_{10-9} = 9,1$	d
H7	8,05	$J_{7-8} = 9,1$	d
H 24	7,82	$J_{24-23} = 6,6$ $J_{24-25} = 7,5$	dd
H25	7,74	$J_{25-26} = 6,6$ $J_{25-24} = 7,5$	dd
H23	7,37	$J_{23-24} = 6,6$	d
H26	7,33	$J_{26-25} = 6,6$	d
H9	6,69	$J_{9-10} = 9,1$	d
H8	6,69	$J_{8-7} = 9,1$	d
H27	6,27	-	d
H6	6,22	-	s

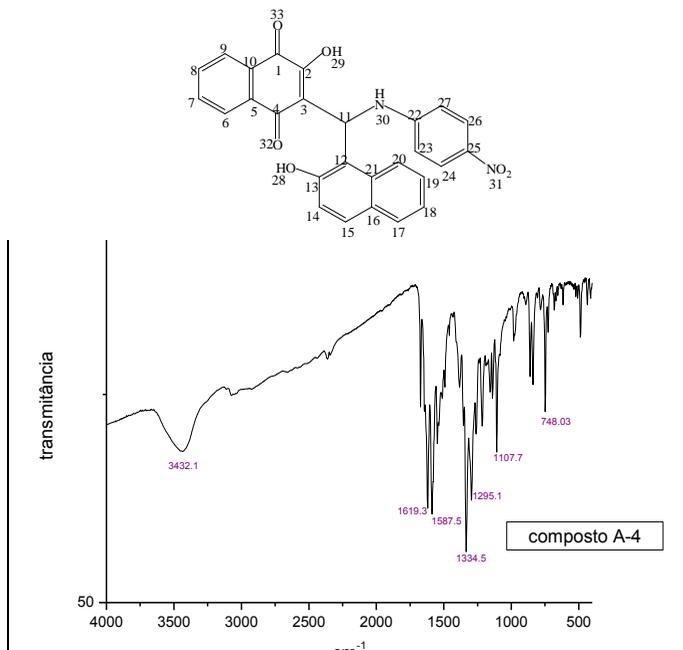
Composto A-3: 2-hidroxi-3-((2-hidroxi-naftalen-1-il)(fenilamino)metil)naftalen-1,4-diona





Análise de RMN ^1H para o composto A-3.

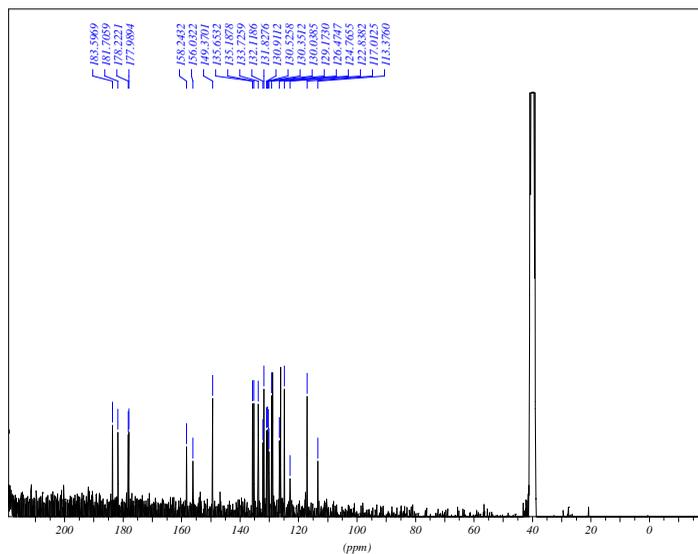
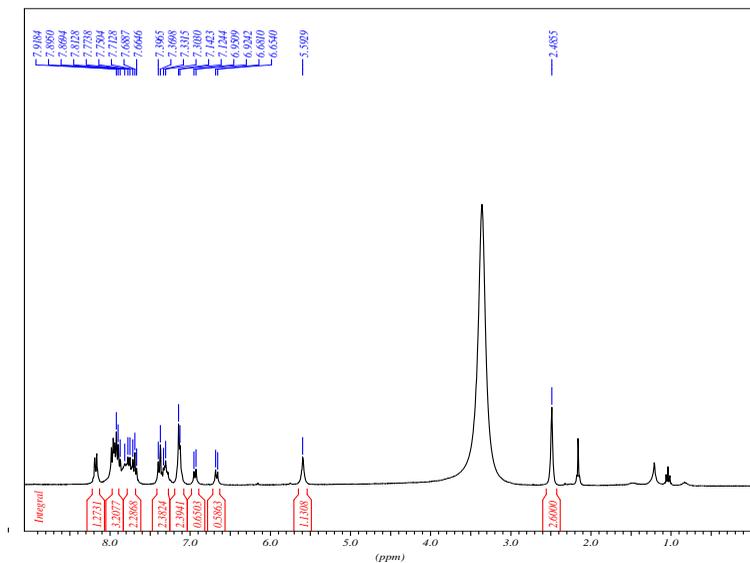
Hidrogênio	δ (^1H) ppm	Constante de Acoplamento (Hz)	Multiplicidade
H12 H32	9,29	-	s
H9	8,08	$J_{9-8}=8,5$	d
H6	8,05	$J_{6-7}=8,5$	d
H8	7,79	-	m
H7	7,76	-	m
H28	7,70	$J_{28-29}=7,2$	d
H 29	7,68	$J_{29-28}=7,2$	d
H 30	7,50	$J_{30-31}=J_{30-29}=7,2$	t
H24	7,48	$J_{24-25}=7,4$	d
H25	7,46	$J_{25-24}=7,4$	d
	7,43		
H19	7,37	$J_{20-19}=9,2$ $J_{19-18}=7,6$	dd
H17	7,35	$J_{17-18}=J_{17-16}=7,6$	dd
H 18	7,30	$J_{18-19}=J_{18-17}=7,6$	d
H 16	7,07	$J_{16-17}=7,6$	d
H 20	7,07	$J_{20-19}=9,2$	d
H13	6,37	-	s

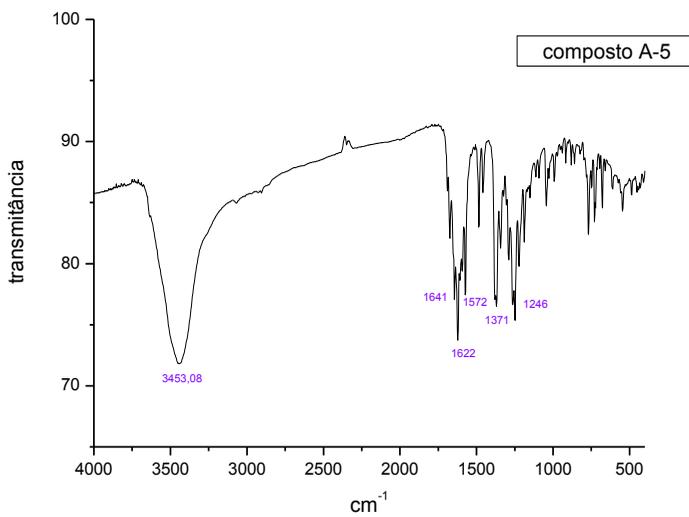
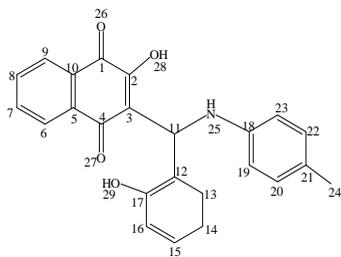


Análise de RMN ^1H para o composto A-4.

Hidrogênio	δ (^1H) ppm	Constante de Acoplamento (Hz)	Multiplicidade
H29, H28	9,66	-	s
H 26	8,52	$J_{26-27} = 8,5$	d
H24	8,31	$J_{24-23} = 8,9$	d
H 27	8,21	$J_{27-26} = 8,5$	d
H6- H9	8,12	$J_{6-7} = 3,4$ $J_{9-8} = 4,7$	d
H8	8,06	$J_{8-9} = 4,7$	d
H14	8,05	$J_{14-15} = 3,4$	d
H30	7,95	$J_{30-31} = 9,2$	d
H15	7,93	$J_{15-14} = 3,4$	d
H23	7,85	$J_{23-24} = 8,9$	d
H20	7,78	$J_{20-19} = 7,5$	d
H17	7,53	$J_{17-18} = J_{17-19} = 7,5$	t
H7	7,50	$J_{7-6} = 3,4$	d
H18	7,44	$J_{18-19} = J_{18-17} = 7,5$	t
H19	7,37	$J_{19-18} = J_{19-20} = 7,5$	t
H11	6,98	$J_{11-30} = 9,2$	d

Composto A-5 : 2-hidroxi-3-((2-hidroxifenil)(*p*-toluilamino)metil)naftalen-1,diona

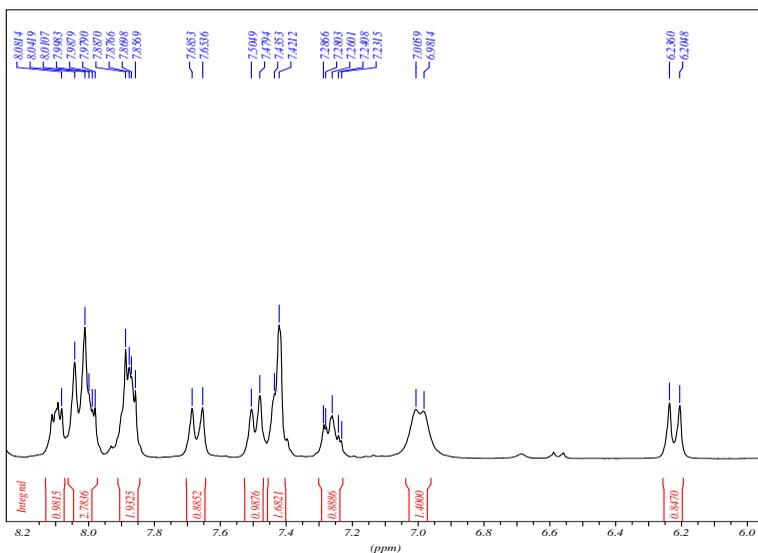


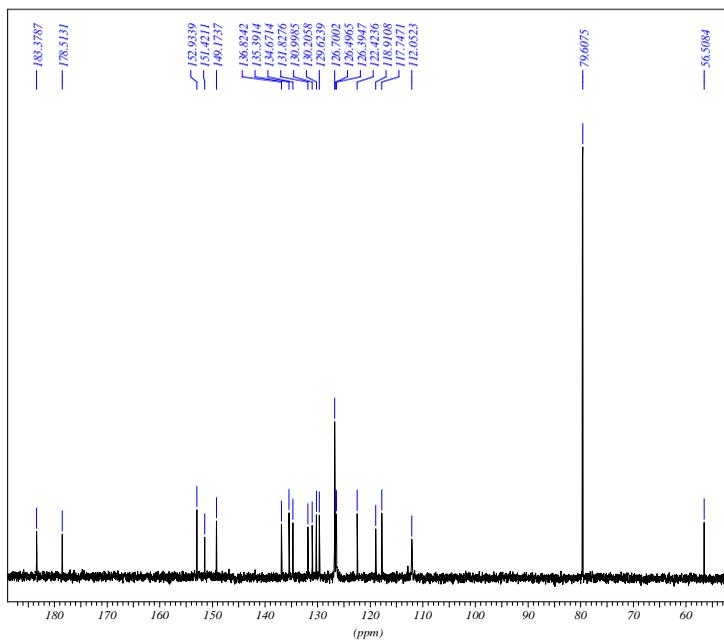


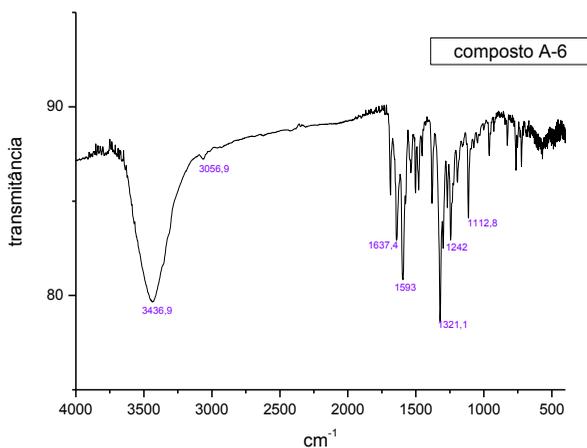
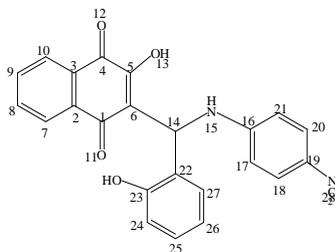
Análise de RMN ^1H para o composto A-5.

Hydrogênio	δ (^1H) ppm	Constante de Acoplamento (Hz)	Multiplicidade
H9	8,18	$J_{9-8} = 7,0$	d
H6	7,97	$J_{6-7} = 7,0$	d
H7	7,93	$J_{7-6} = J_{7-8} = 7,0$	t
H8	7,88	$J_{8-7} = J_{8-9} = 7,0$	t
H13	7,76	$J_{13-14} = 7,0$	d
H14	7,69	$J_{14-13} = J_{14-15} = 7,0$	t
H15	7,37	$J_{15-14} = 7,0$ $J_{15-16} = 5,5$	dd
H16	7,29	$J_{16-15} = 5,5$	d
H20	7,14	$J_{20-19} = 8$	d
H22	7,14	$J_{22-23} = 8$	d
H19	6,99	$J_{19-20} = 8$	d
H 23	6,94	$J_{23-22} = 8$	d
H 11	5,6	-	s

Composto A-6: 2-hidroxi-3-((2-hidroxifenil)(4-nitrofenilamino)metil)naftalen-1,4-diona



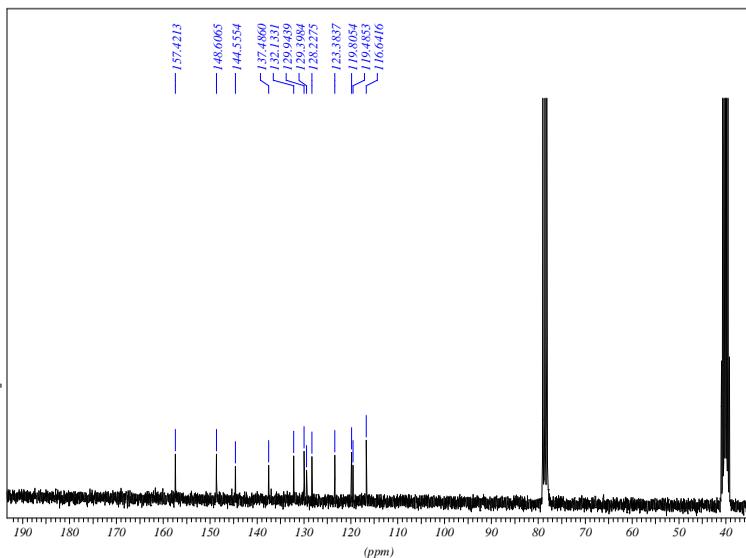
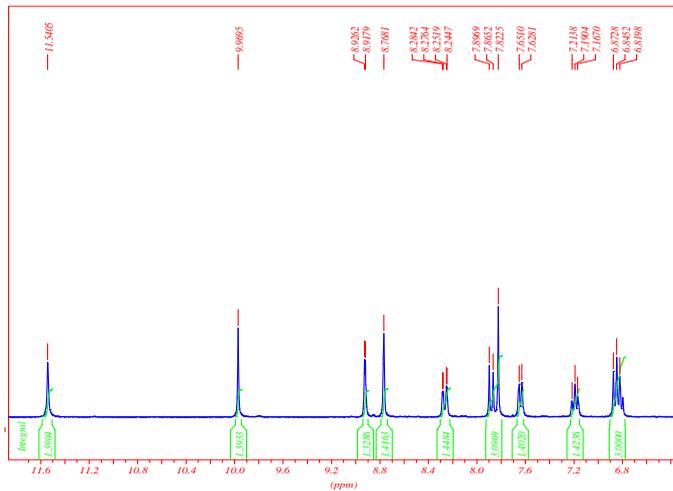


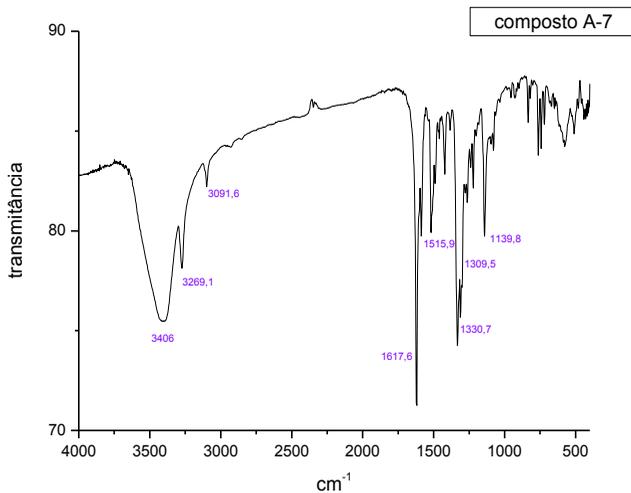
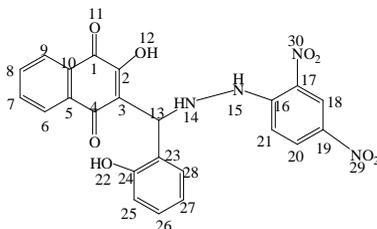


Análise de RMN ^1H para o composto A-6.

Hidrogênio	δ (^1H) ppm	Constante de Acoplamento (Hz)	Multiplicidade
H 10	8,11	$J_{10-9} = 5,6$	d
H18	8,03	$J_{18-17} = 7,0$	d
H20	8,03	$J_{20-21} = 7,0$	d
H7	7,99	$J_{7-8} = 5,6$	d
H9	7,89	$J_{9-8} = J_{9-10} = 5,6$	t
H8	7,87	$J_{8-9} = J_{8-7} = 5,6$	t
H15	7,67	$J_{15-14} = 9,4$	d
H27	7,49	$J_{27-26} = 5,6$	d
H26	7,43	$J_{26-27} = J_{26-25} = 5,6$	t
H25	7,43	$J_{25-24} = J_{25-26} = 5,6$	t
H 24	7,26	$J_{24-25} = 5,6$	d
H 21	7,00	$J_{21-20} = 7,0$	d
H 17	7,00	$J_{17-18} = 7,0$	d
H 14	6,23	$J_{14-15} = 9,4$	d

Composto A-7: 2-((2-(2,4-dinitrofenil)hidrazinil)(2-hidroxifenil)metil)-3-hidroxi-naftalen-1,4-diona

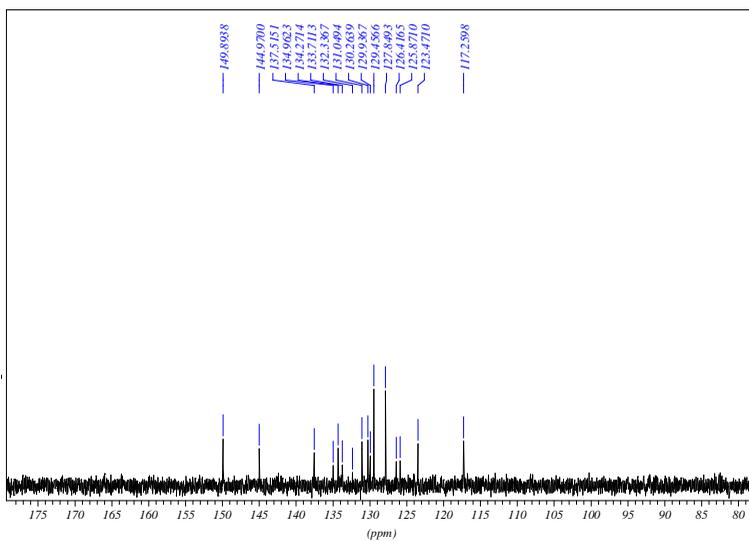
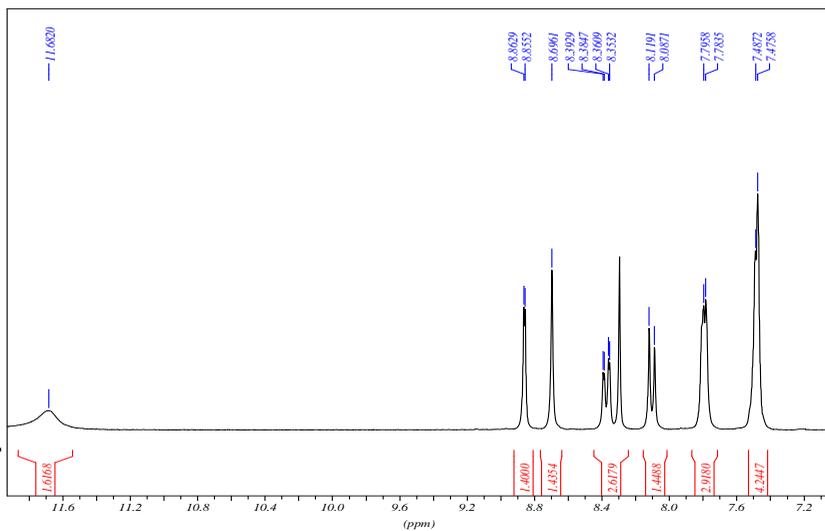


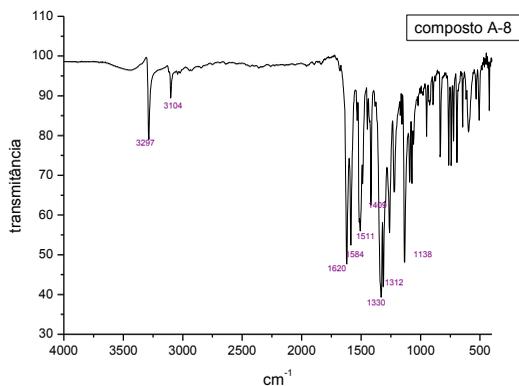
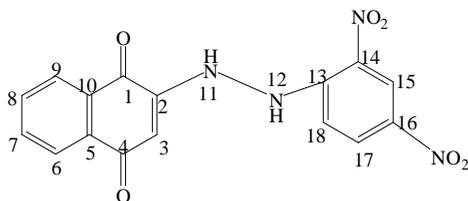


Análise de RMN ^1H para o **composto A-7**.

Hidrogênio	δ (^1H) ppm	Constante Acoplamento (Hz)	de	Multiplicidade
H12 ou H15 ou H22	11,54	-		s
H18	9,96	-		s
H9	8,92	$J_{8,9} = 9,6$		d
H20	8,76	-		s
H6	8,25	$J_{6,7} = 9,6$		d
H8	7,88	$J_{8,7} = J_{8,9} = 9,6$		t
H7	7,88	$J_{7,6} = J_{7,8} = 9,6$		t
H14	7,81	-		s
H28	7,64	$J_{28,27} = 7,0$		d
H27	7,19	$J_{27,28} = J_{27,26} = 7,0$		t
H21	6,87	$J_{21,20} = 8,3$		d
H26	6,85	$J_{26,25} = J_{26,24} = 7,0$		t
H25	6,83	$J_{25,26} = 7,0$		d
H 13	6,79	-		s

Composto A-8: 2-((2-(2,4-dinitrofenil) hidrazinil)(fenil)metil)-3-hidroxi-naftalen-1,4-diona

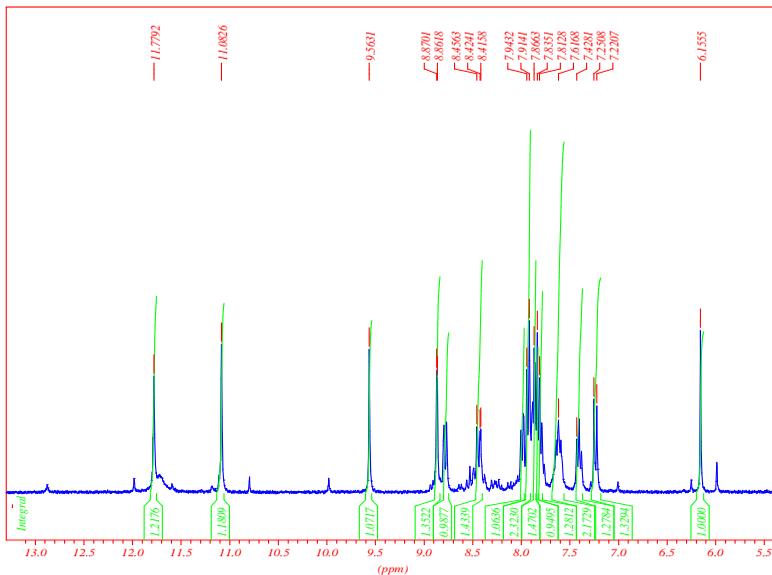


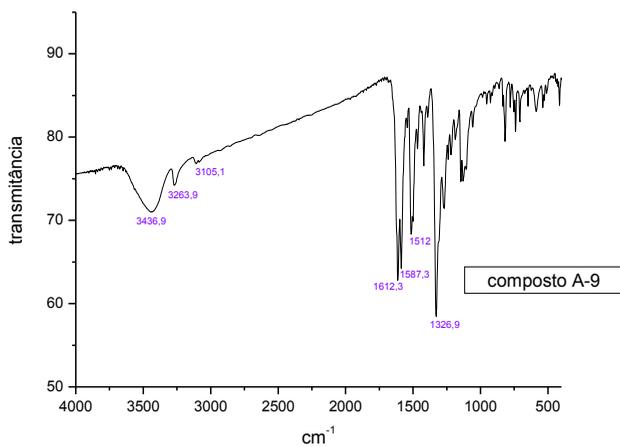
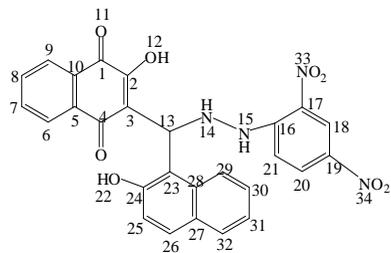


Análise de RMN ^1H para o composto A-8.

Hidrogênio	δ (^1H) ppm	Constante de Acoplamento (Hz)	Multiplicidade
H 15	8,86	-	s
H17	8,70	-	m
H6	8,38	J= 9,5	d
H18	8,3	-	m
H9	8,10	J=9,6	d
H7	7,80	-	m
H8	7,80	-	m
H3	7,48	-	s

Composto A-9: 2-((2-(2,4-dinitrofenil) hidrazinil)(2-hidroxi-naftalen-1-il)metil)-3-hidroxi-naftalen-1,4-diona



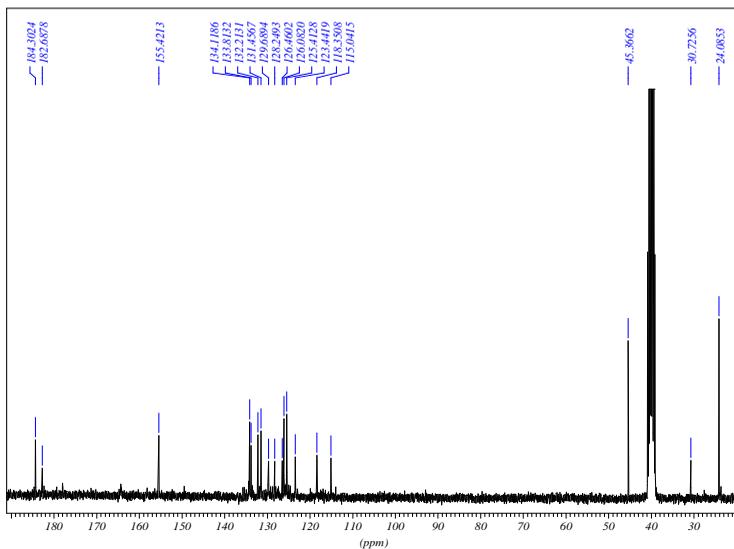
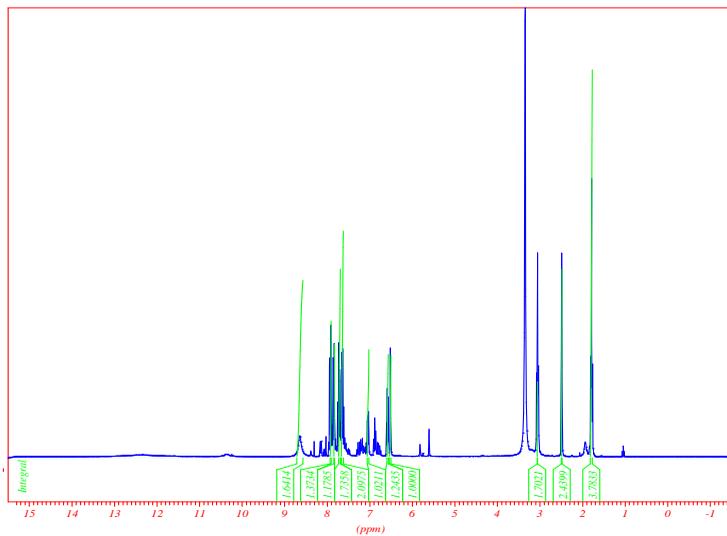


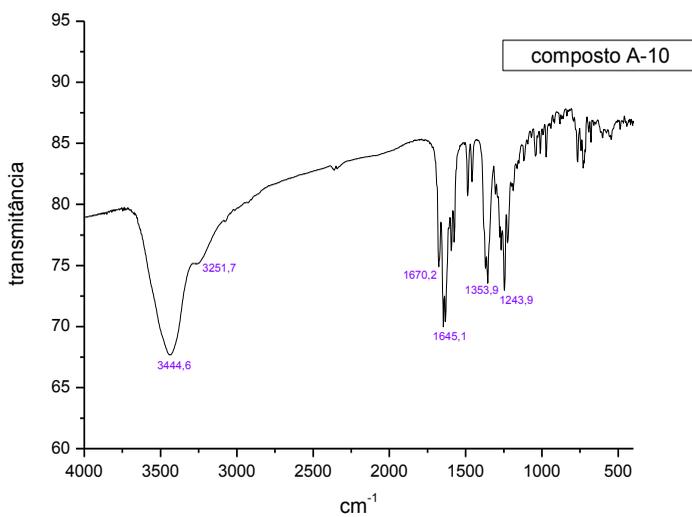
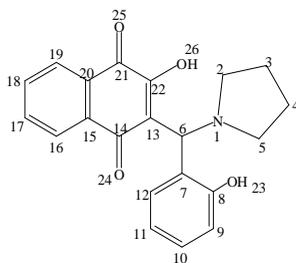
Análise de RMN ^1H para o **composto A-9**.

Hidrogênio	δ (^1H) ppm	Constante de Acoplamento (Hz)	de	Multiplicidade
H12*	11,78	-		s
H22*	11,08	-		s
H15 ou H14	9,56	-		s
H18	8,87	-		s
H 20	8,79	$J_{20-21} = 8,6$		d
H6	8,44	$J_{6-7} = 9,2$		d
H21	7,99	$J_{21-20} = 8,6$		d
H9	7,93	$J_{9-8} = 8,6$		d
H7	7,90	$J_{7-8} = 8,6$ $J_{7-6} = 9,2$		dd
H8	7,88	$J_{8-9} = 8,6$ $J_{8-7} = 8,6$		t
H26	7,87	$J_{26-25} = 9,1$		d
H32	7,81	$J_{32-31} = 7,3$		d
H30	7,63	$J_{30-31} = 7,3$		d
H31	7,63	$J_{31-30} = J_{31-32} = 7,3$		t
H 29	7,41	$J_{29-30} = 7,3$		d
H25	7,24	$J_{25-26} = 9,1$		d
H 13	6,15	-		s

*podem estar trocados

Composto A-10: 2-hidroxi-3-((2-hidroxifenil)pirrolidin-1-il)metilnaftalen-1,4-diona

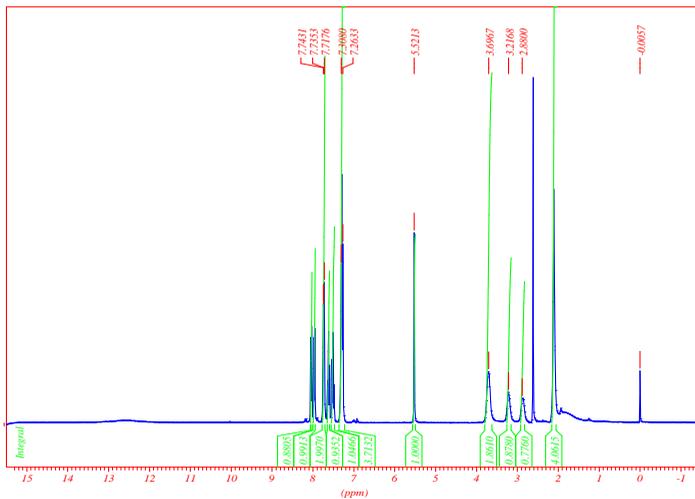


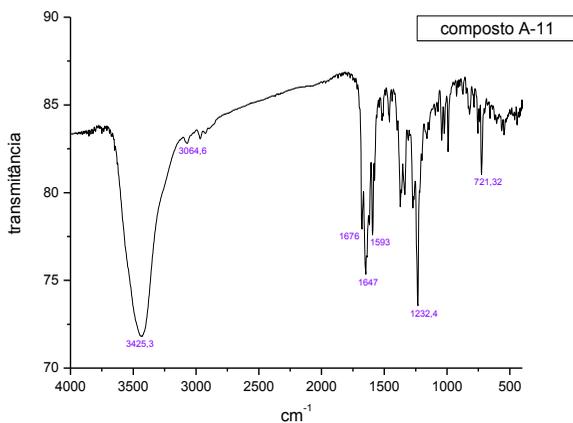
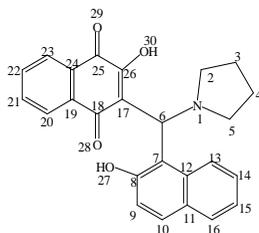


Análise de RMN ^1H para o composto A-10.

Hidrogênio	δ (^1H) ppm	Constante de Acoplamento (Hz)	Multiplicidade
H26 e H23	8,7	-	s
H19	7,93	$J_{19-18}=7,6$	d
H16	7,85	$J_{16-17}=7,6$	d
H18	7,72	$J_{18-17}=J_{18-19}=7,6$	t
H17	7,72	$J_{17-16}=J_{17-15}=7,6$	t
H10	7,65	$J_{10-11}=J_{10-9}=7,6$	t
H11	7,62	$J_{11-10}=J_{11-12}=7,6$	t
H9	7,04	$J_{9-10}=7,6$	d
H12	6,57	$J_{12-11}=7,6$	d
H6	6,52	-	s
H3α	3,06	-	m
H4α	3,06	-	m
H3β	2,48	-	m
H4β	2,48	-	m
H5α e H5β	1,81	-	m
H2α e H2β	1,81	-	m

Composto A-11: 2-hidroxi-3-((2-hidroxi-naftalen-1-il)(pirrolidin-1-il)metil) naftalen-1,4-diona

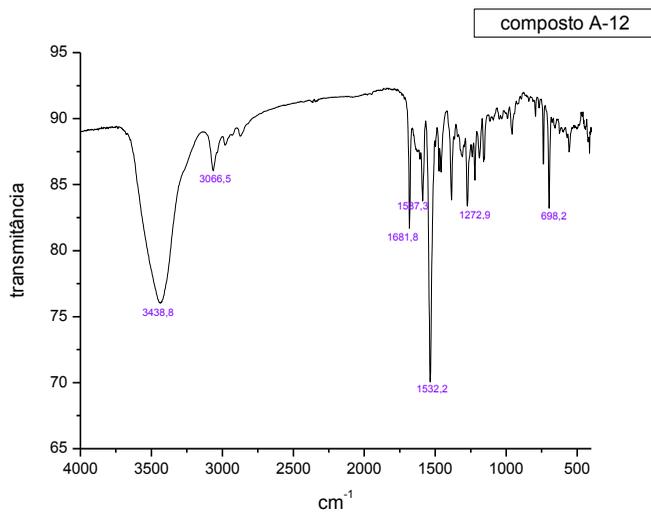
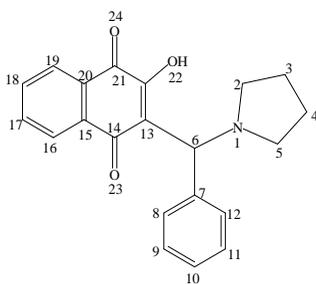




Análise de RMN ^1H para o composto A-11.

Hidrogênio	δ (^1H) ppm	Constante de Acoplamento (Hz)	de Multiplicidade
H 23	8,04	$J_{23-22} = 7,5$	d
H20	7,96	$J_{20-21} = 7,5$	d
H13	7,75	$J_{13-14} = 7,2$	d
H14	7,72	$J_{14-13} = J_{14-15} = 7,2$	t
H 22	7,63	$J_{22-21} = J_{22-23} = 7,5$	t
H21	7,52	$J_{21-20} = J_{21-22} = 7,5$	t
H16	7,32	$J_{16-15} = 7,2$	d
H15	7,32	$J_{15-14} = J_{15-16} = 7,2$	t
H10	7,28	$J_{10-9} = 7,2$	d
H9	7,28	$J_{9-10} = 7,2$	d
H6	5,52	-	s
H2e H5	3,71	-	m
H2*	3,20	-	m
H5*	2,88	-	m
H3 α e β	2,11	-	m

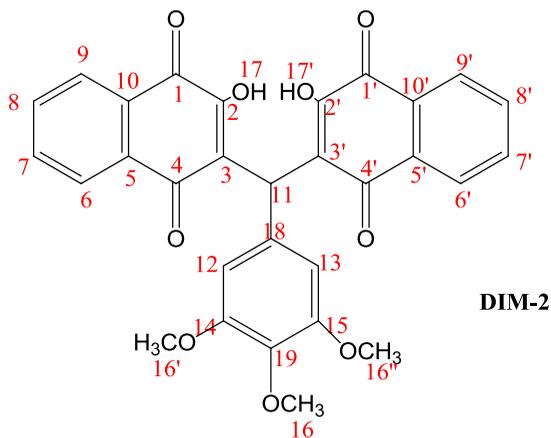
H4α e β	2,11	-	m
---	------	---	---



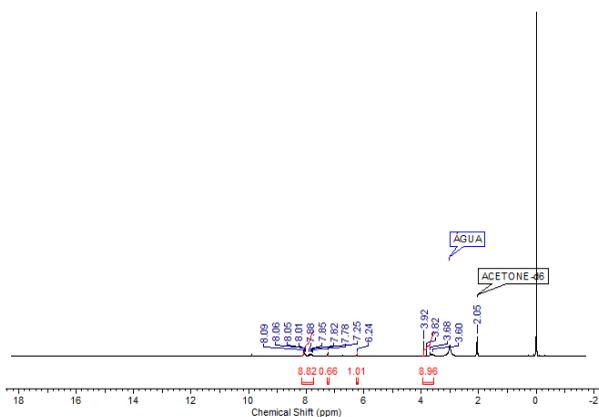
Análise de RMN ^1H para o composto A-12.

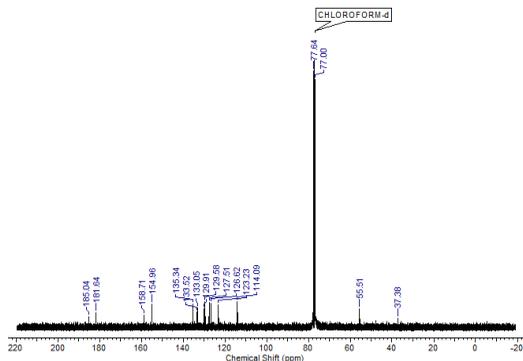
Hidrogênio	δ (^1H) ppm	Constante de Acoplamento (Hz)	Multiplicidade
H 19	8,04	$J_{19-20} = 7,5$	d
H 16	7,96	$J_{16-17} = 7,5$	d
H 12	7,76	$J_{12-11} = 7,6$	d
H8	7,72	$J_{8-9} = 6,9$	d
H 18	7,64	$J_{18-19} = J_{18-17} = 7,5$	t
H 17	7,60	$J_{17-16} = J_{17-18} = 7,5$	t
H9	7,30	$J_{9-8} = 6,9$ $J_{9-10} = 7,5$	dd
H 10	7,29	$J_{10-9} = 7,5$ $J_{10-11} = 7,5$	dd
H 11	7,27	$J_{11-12} = 7,6$ $J_{11-10} = 7,5$	dd
H6	5,52	-	s
H3 α	3,71	-	m
H4 α	3,71	-	m
H3 β	3,23	-	m
H4 β	2,92	-	m
H2 α	2,10	$J_{2\alpha-2\beta} = J_{2\alpha-5\alpha} = 7$	t
H2 β	2,10	$J_{2\beta-2\alpha} = J_{2\beta-5\alpha} = 7$	t
H5 α	2,10	$J_{5\alpha-5\beta} = J_{5\alpha-2\alpha} = 7$	t
H5 β	2,10	$J_{5\beta-5\alpha} = J_{5\beta-2\beta} = 7$	t

DIM-2: 3,3'-((3,4,5-trimetóxfenil)metileno) bis (2-hidroxi-naftalen-1,4-diona)

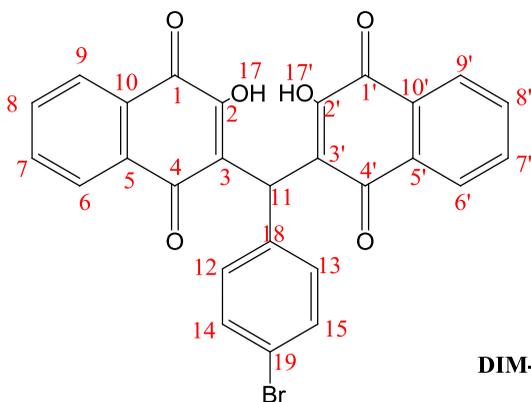


Sólido laranja com ponto de fusão 226-227° C. RMN de ^1H (Acetona deuterada) δ H 6,24 (1H, s, CH); 7,25 (2H,s, H-Arom.), 7,78- 8,09 (8H, m, H-Arom.). RMN de ^{13}C (Acetona deuterada): 37,4; 55,5; 114,1; 123,2; 126,6; 127,5; 129,9; 133,1; 133,5; 135,3; 155,0; 158,7; 181,6; 185,6; 185,0; MS (m/z, M-H, %): 525,20 (100).



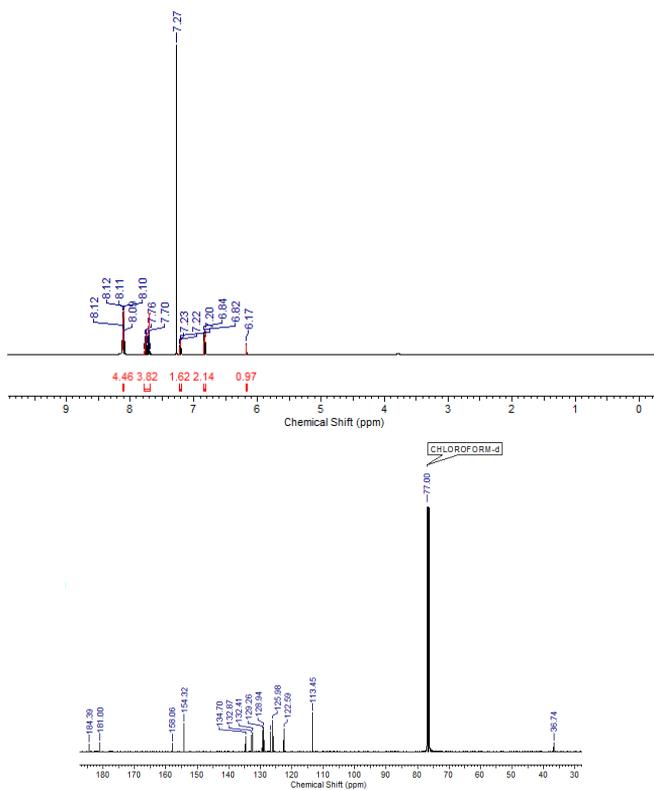


DIM-3: 3,3'-((4-bromofenil)metileno)bis(2-hidroxi-naftalen-1,4-diona)

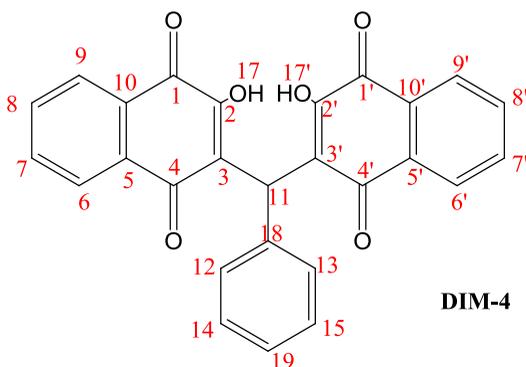


DIM-3

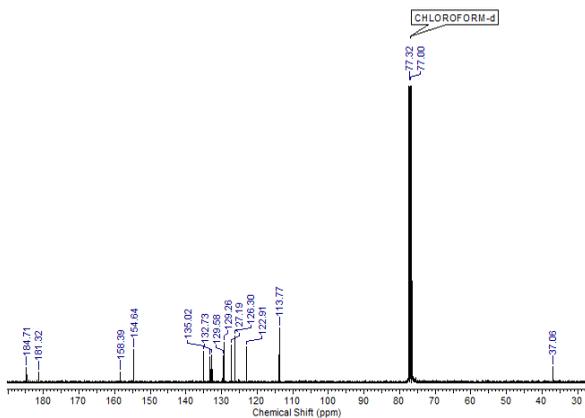
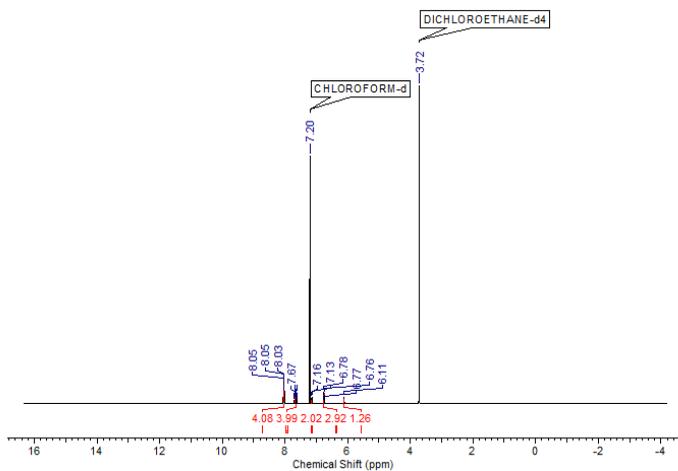
Sólido laranja com ponto de fusão 216-217° C. RMN de ^1H (Acetona deuterada): 6,17 (1H, s, CH); 6,83 (2H, d, $j = 9,03$ Hz, H-Arom.), 7,21 (2H, dd, $J = 1,0$ e $J = 8,03$ Hz, H-Arom.), 7,68- 8,12 (8H, m, H-Arom.). RMN de ^{13}C (Acetona deuterada): 36,7; 113,5; 122,6; 126,0; 128,9; 129,3; 132,4; 132,9; 134,7; 154,3; 158,1; 181,0; 184,4; MS (m/z , M-H, %): 515,18 (100).



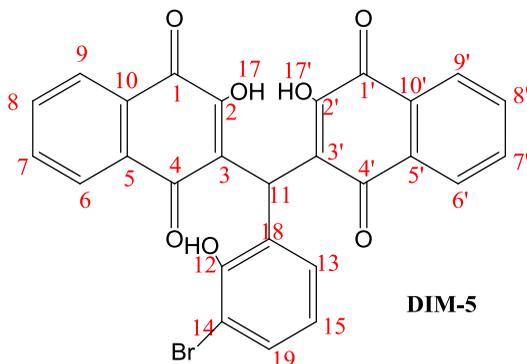
DIM-4: 3,3'-(fenilmetileno) bis (2-hidroksinaftalen-1,4-diona).



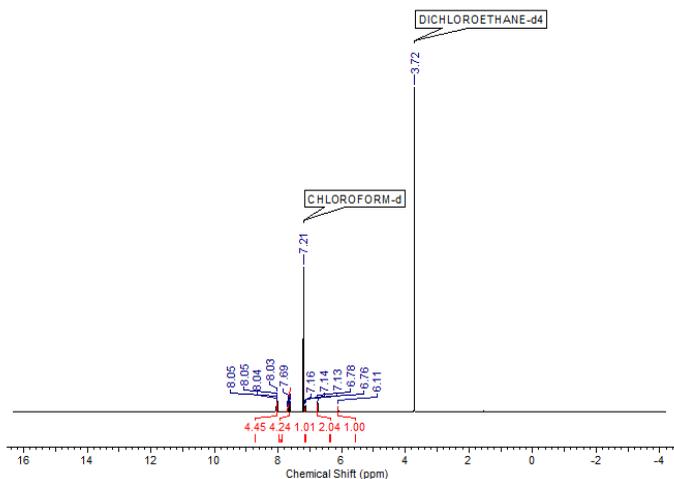
Sólido amarelo com ponto de fusão 202-204^o C. RMN de ¹H (Acetona deuterada): 6,11 (1H, s, CH); 6,77 (2H, d, j= 9,03 Hz, H-Arom.), 7,15 (2H, dd, J= 1,0 e J= 9,03Hz, H-Arom.), 7,61- 8,06 (8H, m, H-Arom.). RMN de ¹³C (Acetona deuterada): 37,1; 113,8; 122,9; 127,2; 129,3; 129,6; 132,7; 135,0; 154,6; 158,4; 181,3; 184,7. MS (m/z, M-H, %): 535,30 (100).

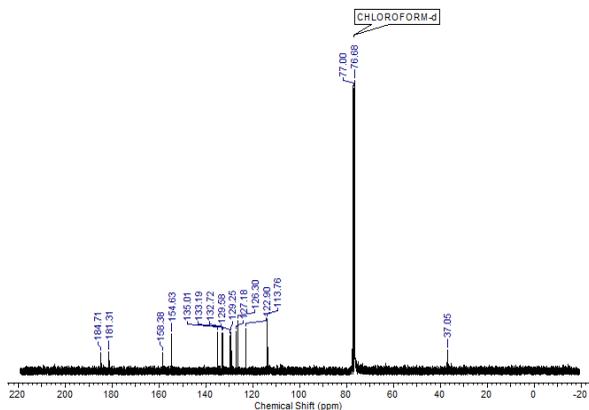


DIM-5: 3,3'-(3-bromo-2-hidroxifenil metileno) bis (2-hidroxi-naftalen-1,4-diona)

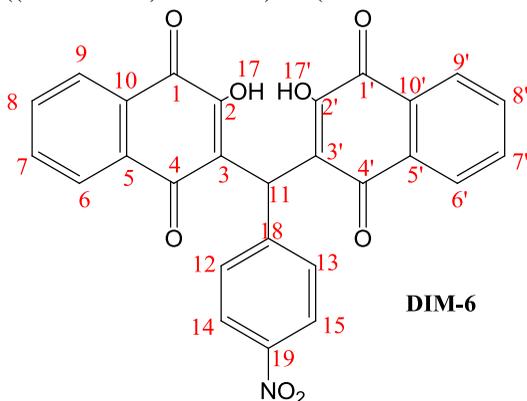


Sólido laranja amarronzado com ponto de fusão 215-217° C. RMN de ^1H (Acetona deuterada): 6,11 (1H, s, CH); 6,77 (2H, d, $j=8,78$ Hz, H-Arom.), 7,15 (2H, dd, $J=0,75$ e $J=8,28$ Hz, H-Arom.), 7,61- 8,06 (8H, m, H-Arom.). RMN de ^{13}C (Acetona deuterada): 37,1; 113,8; 122,9; 127,2; 129,3; 129,6; 132,7; 133,2; 135,0; 154,6; 158,4; 181,3; 184,7. MS (m/z , M+H, %): 531,13 (100).

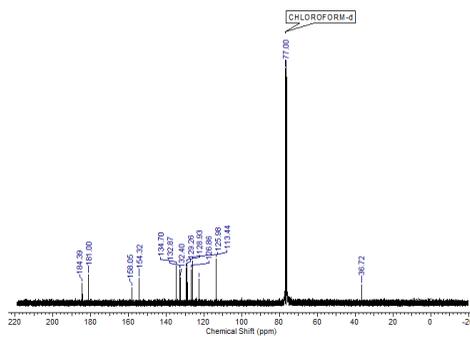
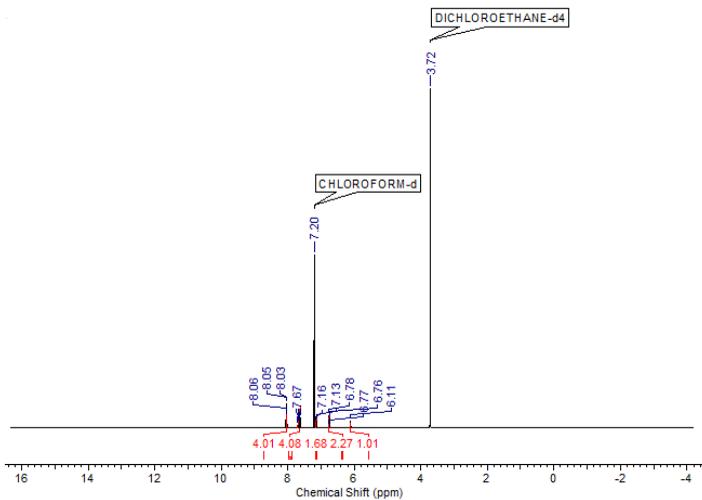




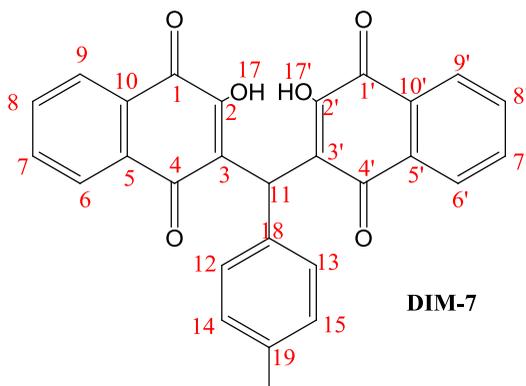
DIM-6: 3,3'-((4-nitrofenil) metileno) bis(2-hidroxi-naftalen-1,4-diona)



Sólido marrom avermelhado com ponto de fusão 177-178^o C. RMN de ¹H (Acetona deuterada): 6,11 (1H, s, CH); 6,77 (2H, d, j= 9,03 Hz, H-Arom.), 7,15 (2H, dd, J= 1,00 e J= 9,03 Hz, H-Arom.), 7,63- 8,06 (8H, m, H-Arom.). RMN de ¹³C (Acetona deuterada): 36,7; 113,4; 126,0; 126,9; 128,9; 129,3; 132,4; 132,9; 134,7; 154,3; 158,1; 181,0; 184,4. MS (m/z, M-H, %): 480,12 (100).

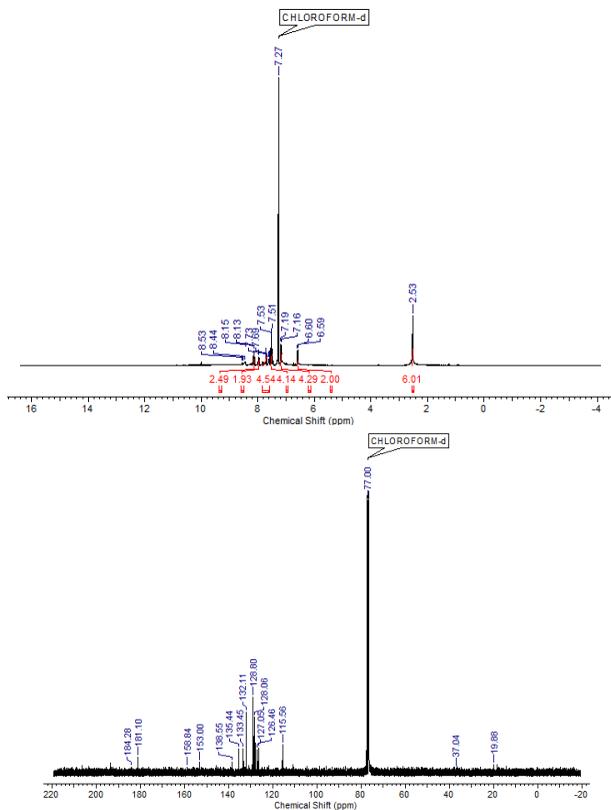


DIM-7: 3,3'-(p-toluilmetileno) bis (2-hidroksinaftalen-1,4-diona)

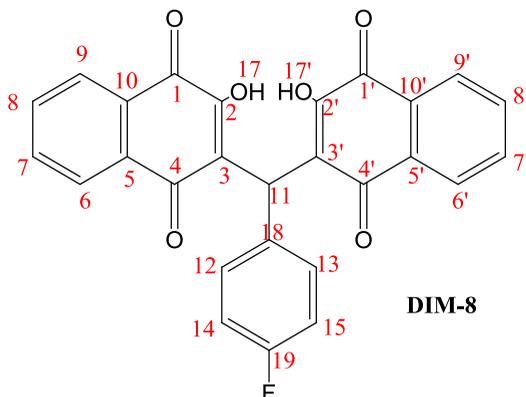


DIM-7

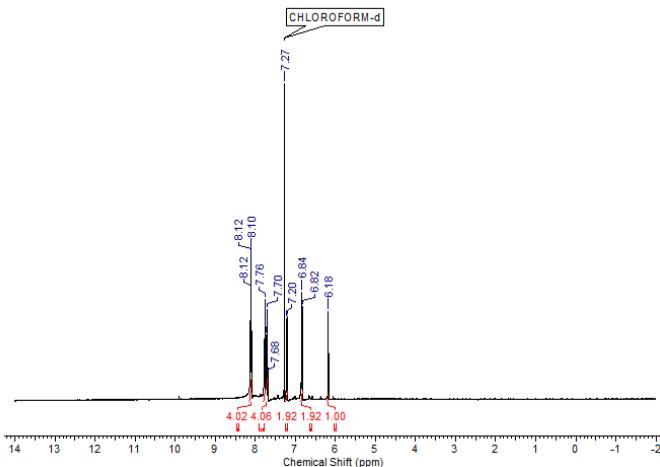
Sólido laranja com ponto de fusão 170-172° C. RMN de ^1H (Acetona deuterada): 6,59 (1H, s, CH); 6,60 (1H, s, CH); 7,16-7,19 (4H, m, H-Arom.); 7,51- 8,15 (14 H, m, H-Arom.). RMN de ^{13}C (Acetona deuterada): 19,9; 37,0; 115,6; 126,5; 127,1; 128,1; 128,8; 132,1; 133,5; 135,4; 138,6; 153,0; 158,8; 181,1; 184,3. MS (m/z, M-H, %): 449,34 (100).

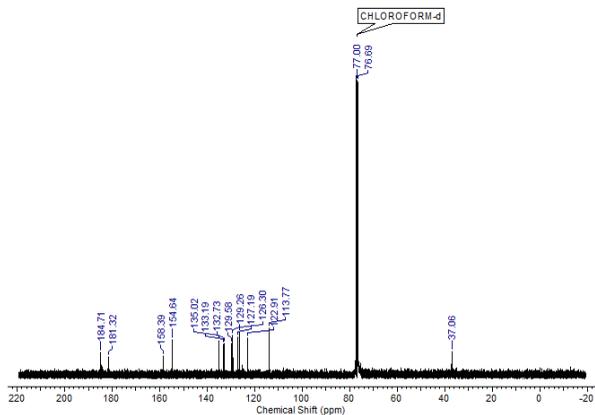


DIM-8: 3,3'-((4-fluorofenil) metileno) bis (2-hidroxi-naftalen-1,4-diona)

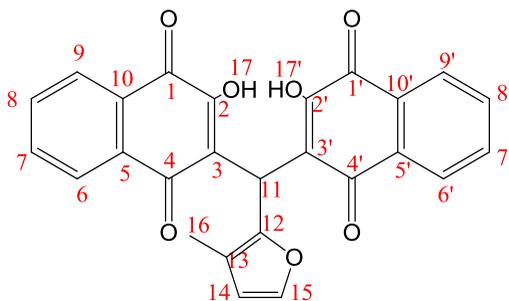


Sólido marrom avermelhado com ponto de fusão 206-207° C. RMN de ^1H (Acetona deuterada): 6,18 (1H, s, CH); 6,83 (2H, d, $j = 8,60$ Hz, H-Arom.), 7,21 (2H, d, $J = 8,60$ Hz, H-Arom.), 7,68- 8,12 (8H, m, H-Arom.). RMN de ^{13}C (Acetona deuterada): 37,1; 113,8; 122,9; 127,2; 129,3; 129,6; 132,7; 135,0; 154,6; 158,4; 181,3; 184,7. MS (m/z , M-H, %): 453,11 (100).



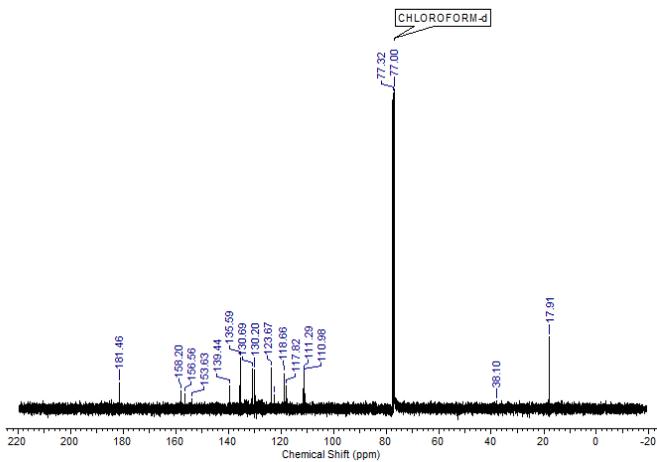
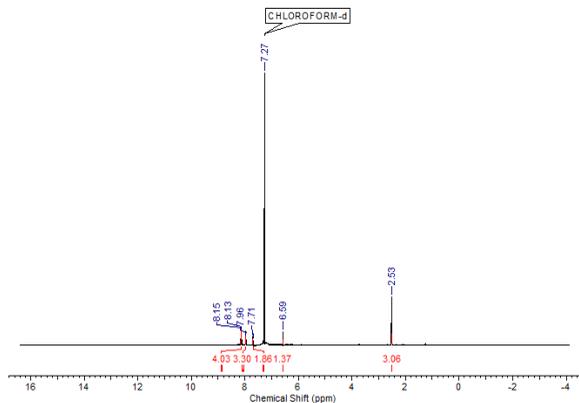


DIM-9: 3,3'-((3-metilfuran-2-il) metileno) bis (2-hidroxinaftalen-1,4-diona).

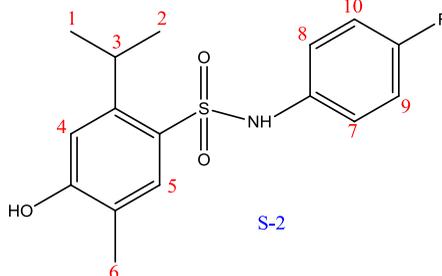


DIM-9

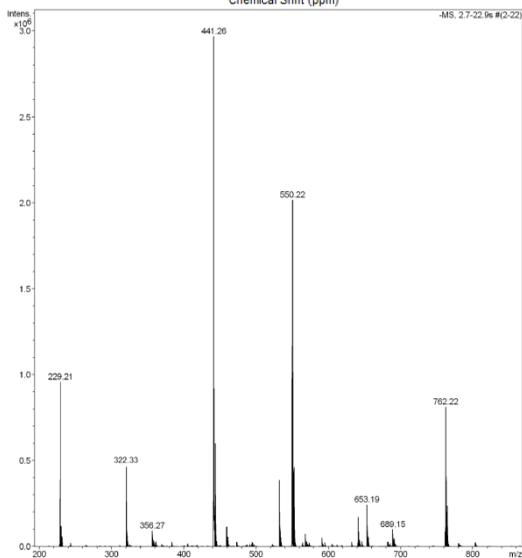
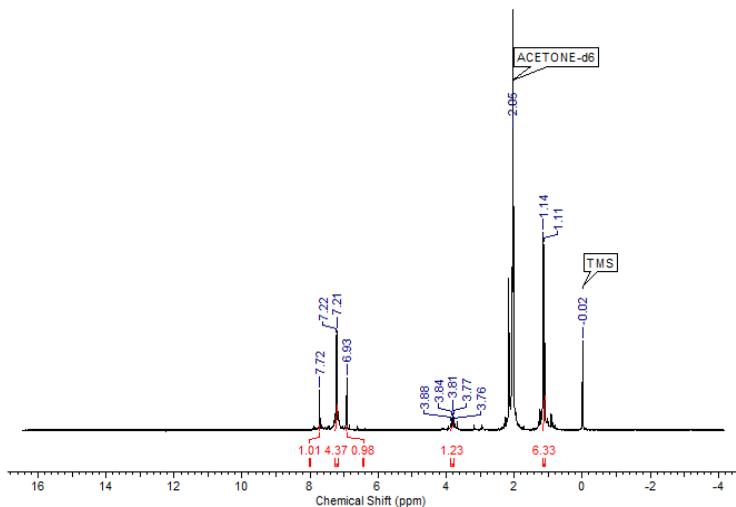
Sólido laranja com ponto de fusão 182-183° C. RMN de ^1H (Acetona deuterada): 2,53 (3H, s, CH_3), 6,59 (1H, s, CH); 7,70 (2H, dd, $J = 1,25$ e $J = 7,53$ Hz, H-Arom.); 7,97 (3H, m, H-Arom.); 8,14 (4H, m, H-Arom.). RMN de ^{13}C (Acetona deuterada): 17,9; 38,1; 111,0; 111,3; 117,9; 118,7; 123,7; 130,2; 130,7; 135,6; 139,4; 153,6; 156,7; 158,2; 181,5. MS (m/z, M-H, %): 439,13 (100).

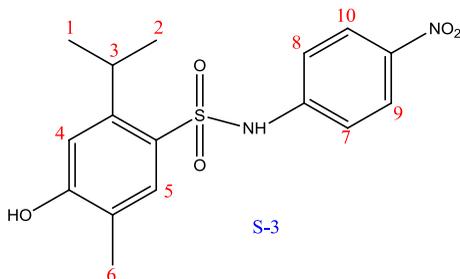


S-2: N-(4-fluorofenil)-4-hidroxi-2-isopropil-5-metilbenzenosulfonamida

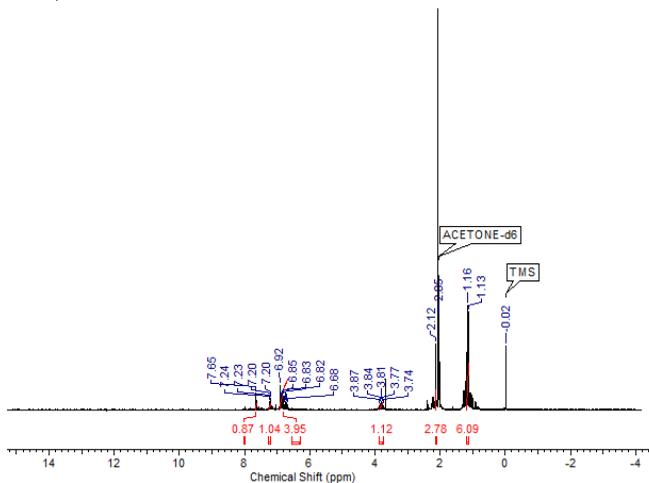


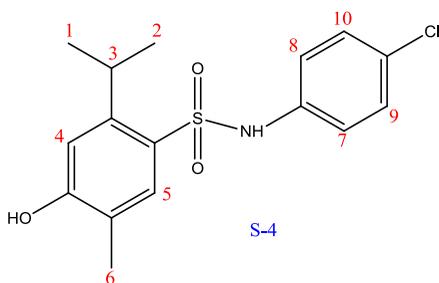
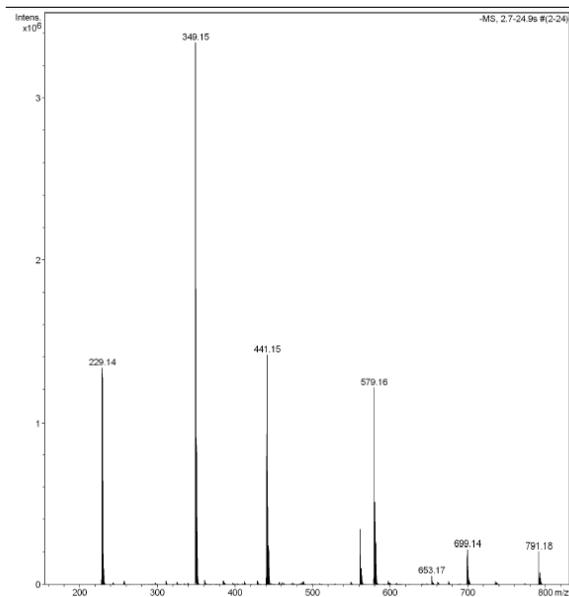
Sólido lilás com ponto de fusão 181-183 °C. RMN de ^1H (Acetona deuterada): 7,72 (1H, s, H Arom.); 7,21 (4H, m, H Arom.); 6,93 (1H, s, H Arom.); 3,81 (1H, quinteto, H Alif.); 2,15 (sopreposto); 1,14 (3H, s, metila); 1,11 (3H, s, metila). MS (m/z, M-H): 322,33.



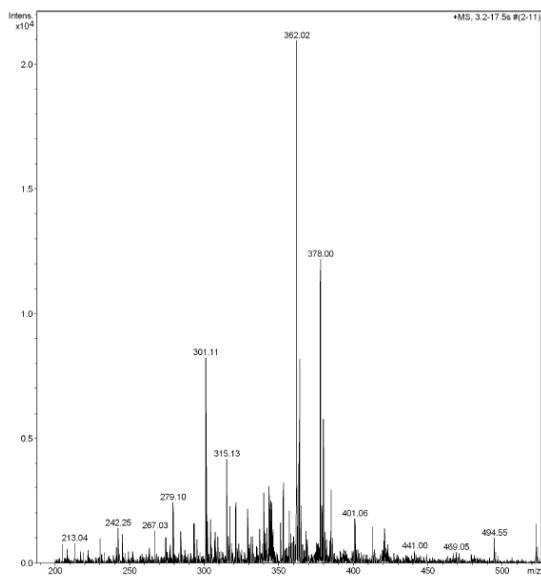
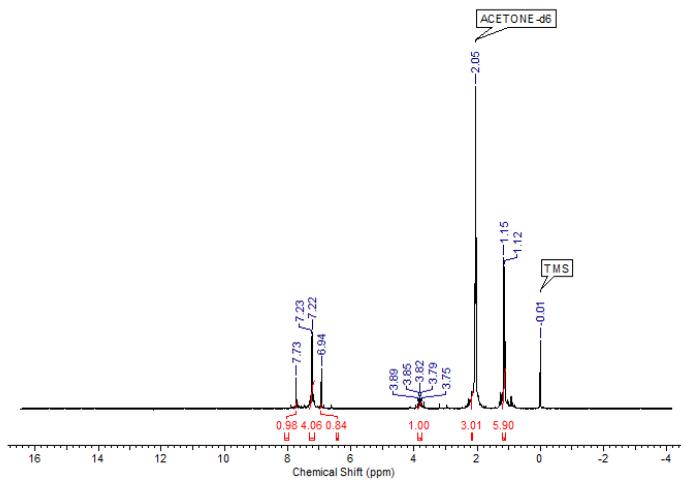


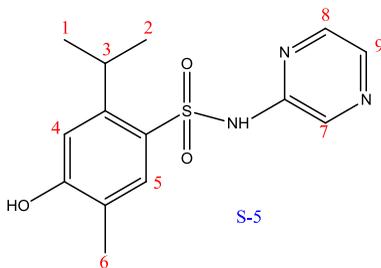
Sólido amarelo com ponto de fusão 179-180° C. RMN de ^1H (Acetona deuterada): 6,67-7,65 (6H, m, H Arom.); 3,81 (1H, quinteto, H Alif.); 2,12 (3H, s, metila); 1,16 (3H, s, metila); 1,13 (3H, s, metila). MS (m/z, M-H): 349,15.



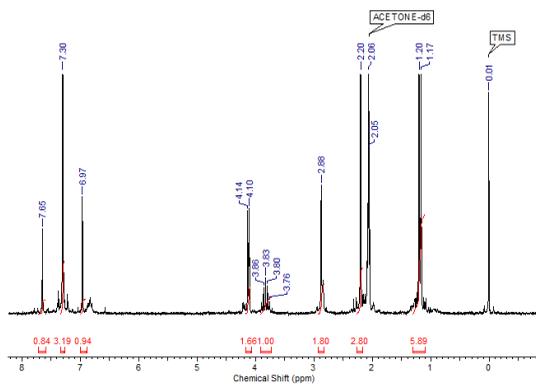


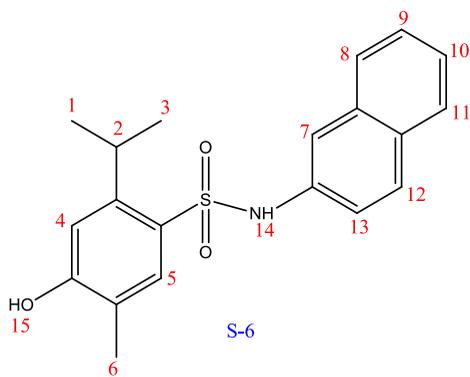
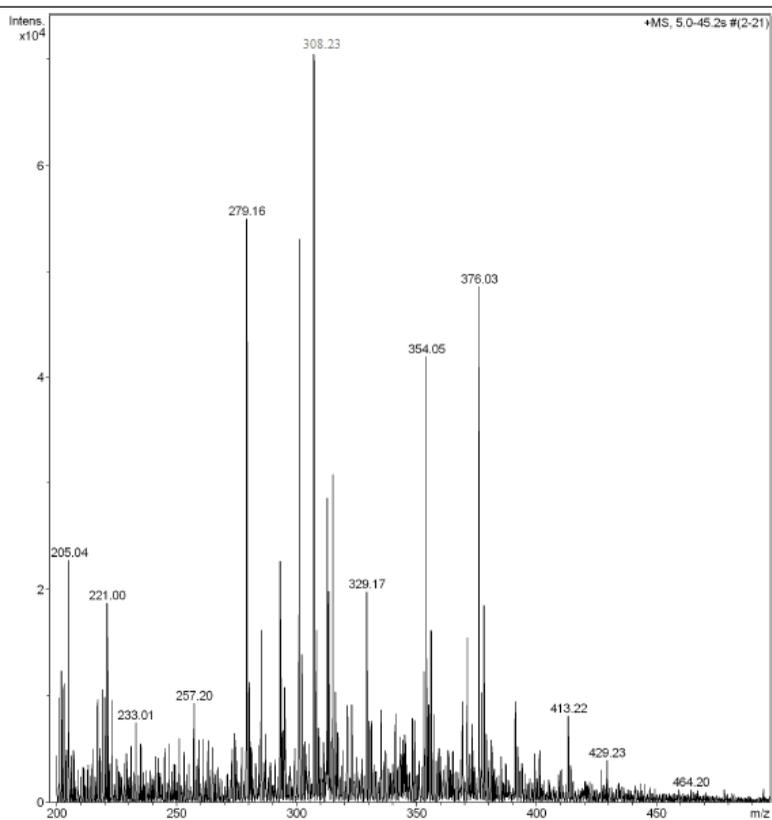
Sólido amarelo com ponto de fusão 179-180° C. RMN de ^1H (Acetona deuterada): 7,73 (1H, s, H Arom.); 7,22 (4H, m, H Arom.); 6,94 (1H, s, H Arom.); 3,82 (1H, quinteto, H Alif.); 2,16 (3H, s, metila); 1,15 (3H, s, metila); 1,12 (3H, s, metila). MS (m/z, M+Na,): 362,02.



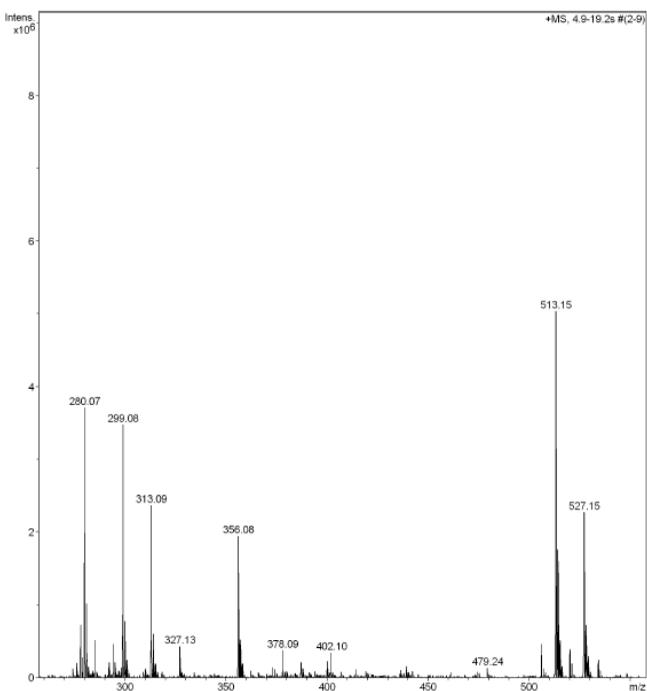
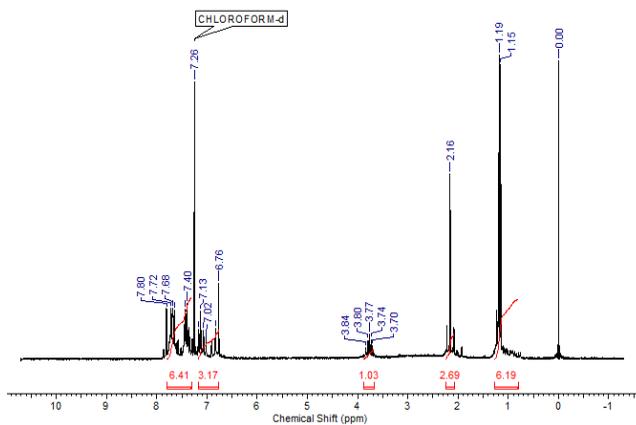


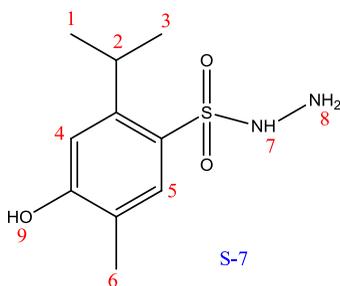
Sólido branco com ponto de fusão 165-167^o C. RMN de ¹H (Acetona deuterada): 7,65 (1H, s, H Arom.); 7,30 (3H, m, H Arom.); 6,97 (1H, s, H Arom.); 3,83 (1H, quinteto, H Alif.); 2,20 (3H, s, metila); 1,20 (3H, s, metila); 1,17 (3H, s, metila). MS (m/z, M+H,): 308,23.



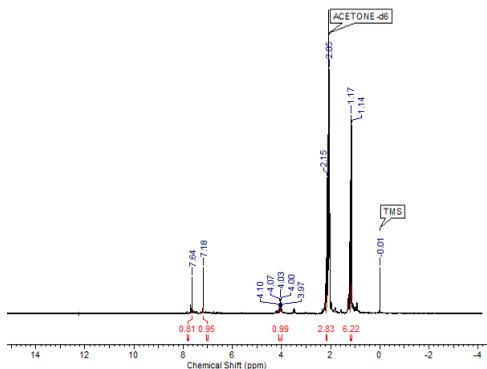


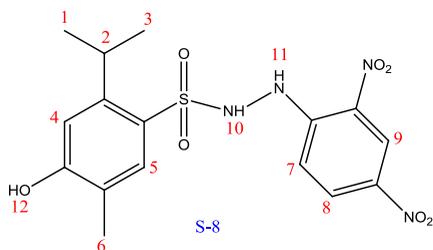
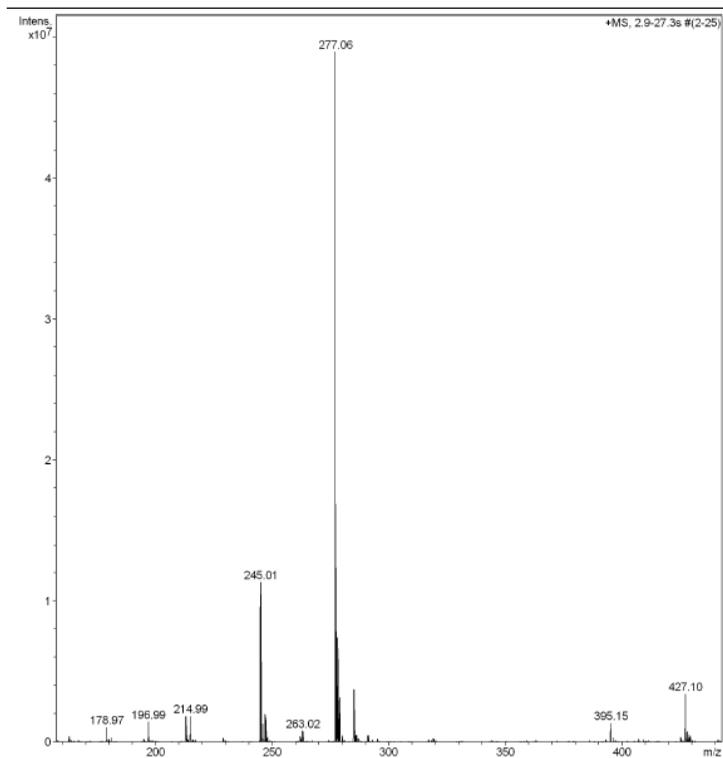
Sólido rosado com ponto de fusão 201-103° C. RMN de ^1H (Acetona deuterada): 6,76-7,80 (9H, m, H Arom.); 3,77 (1H, quinteto, H Alif.); 2,16 (3H, s, metila); 1,19 (3H, s, metila); 1,15 (3H, s, metila). MS (m/z, M+H,): 356,08.



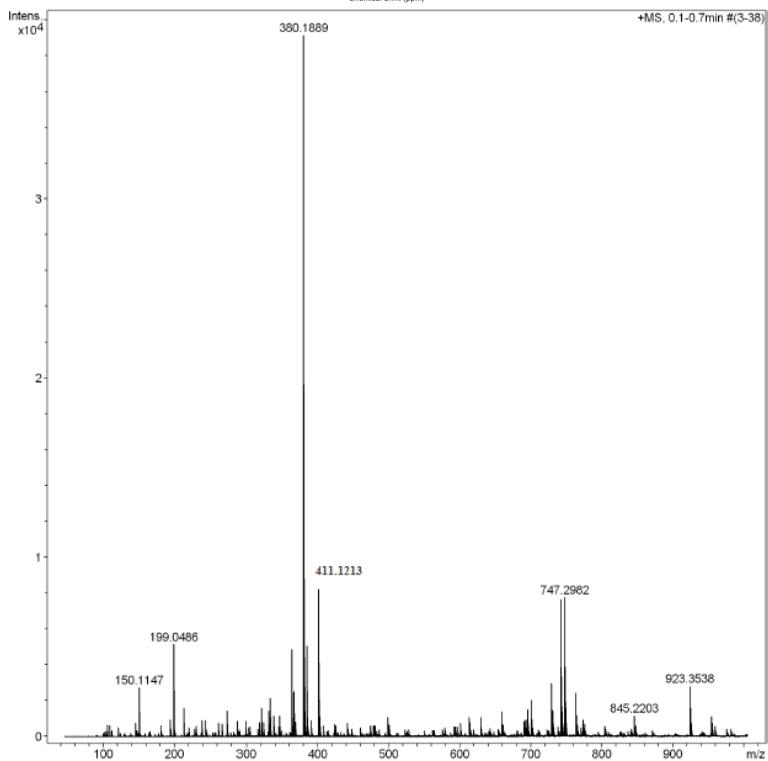
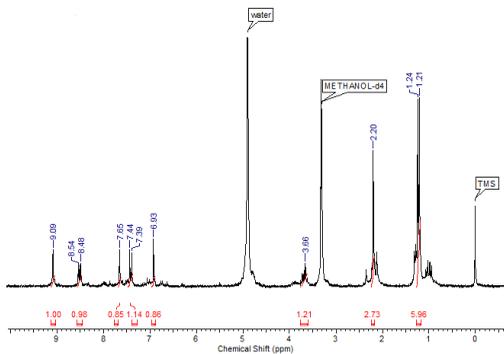


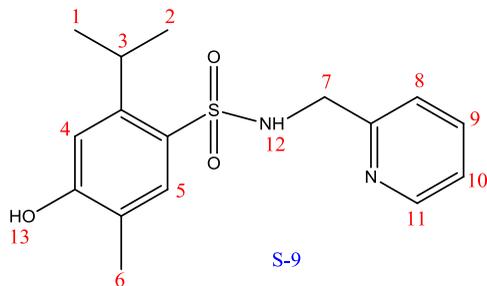
Sólido branco com ponto de fusão 165-166^o C. RMN de ¹H (Acetona deuterada): 7,64 (1H, s, H Arom.); 7,18 (1H, s, H Arom.); 4,03 (1H, quinteto, H Alif.); 2,15 (3H, s, metila); 1,17 (3H, s, metila); 1,14 (3H, s, metila). MS (m/z, M+H+ MeOH.): 277,06.



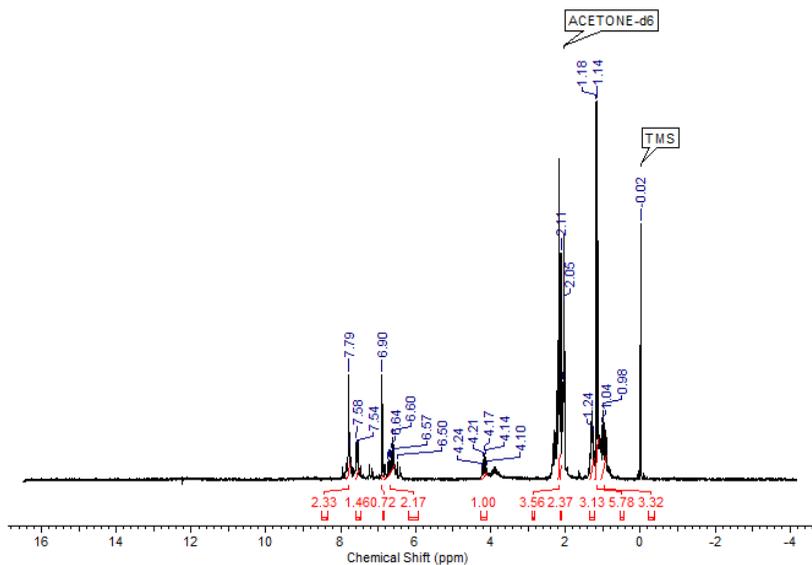


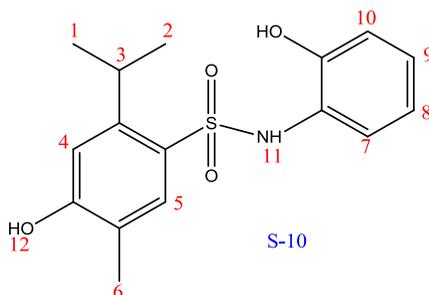
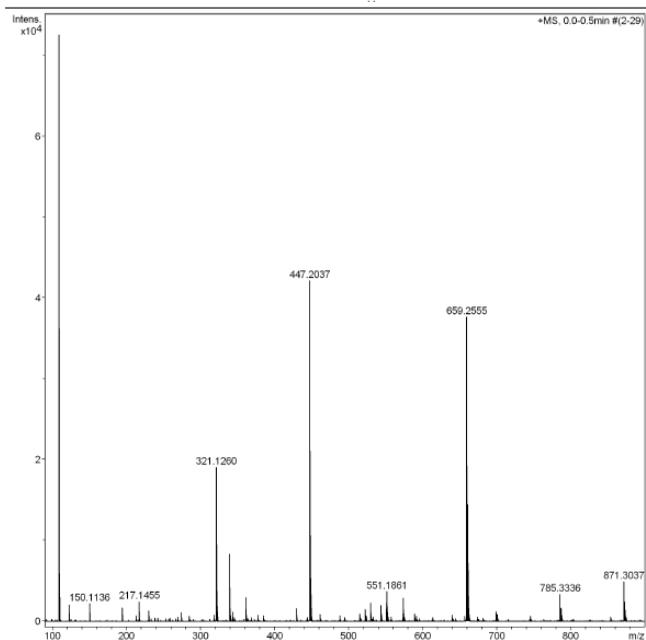
Sólido vermelho com ponto de fusão 212-113° C. RMN de ¹H (Metanol deuterado): 6,93-9,09 (5H, m, H Arom.); 3,66 (1H, quinteto, H Alif.); 2,20 (3H, s, metila); 1,24 (3H, s, metila); 1,21 (3H, s, metila). MS (m/z, M+H₊): 411,12.



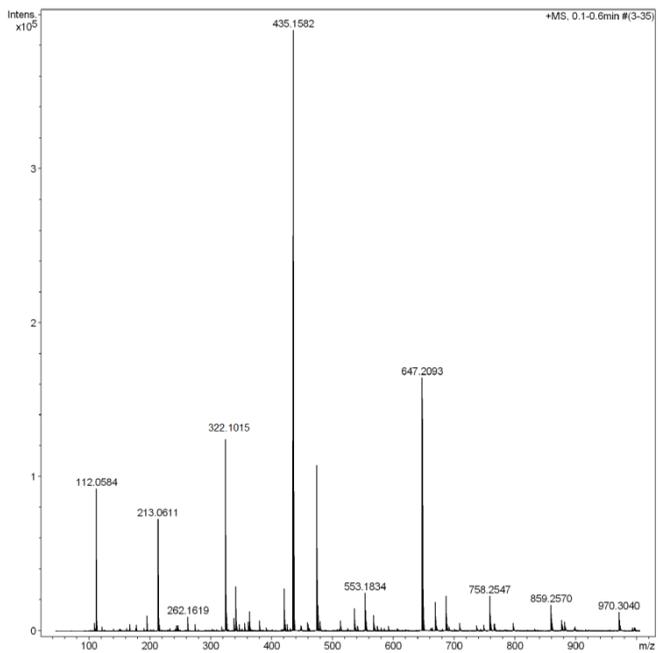
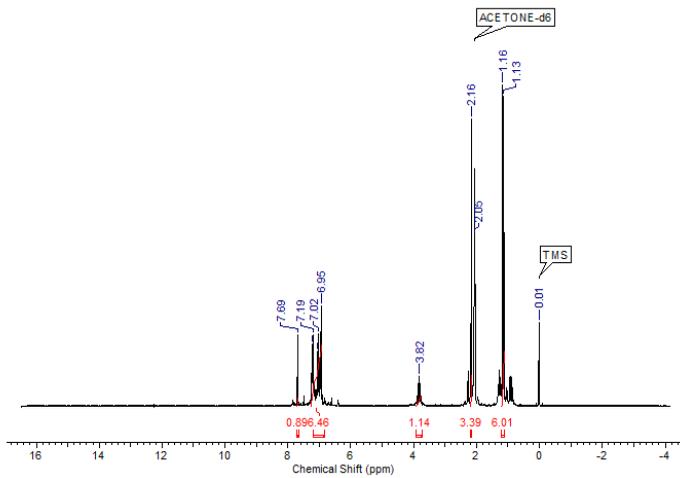


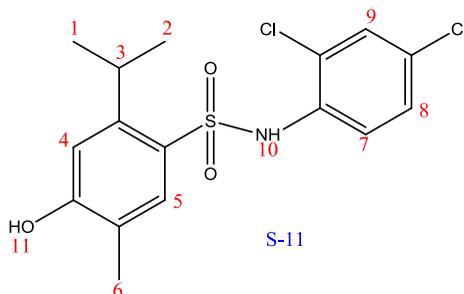
Sólido amarelo claro com ponto de fusão 182-183° C. RMN de ^1H (Acetona deuterada): 6,50-7,79 (6H, m, H Arom.); 4,18 (1H, quinteto, H Alif.); 2,11 (3H, s, metila); 1,18 (3H, s, metila); 1,14 (3H, s, metila). MS (m/z, M+H): 321,1260.



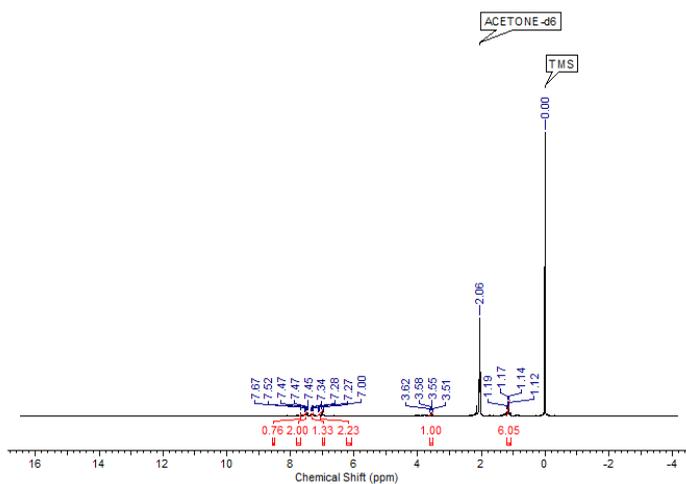


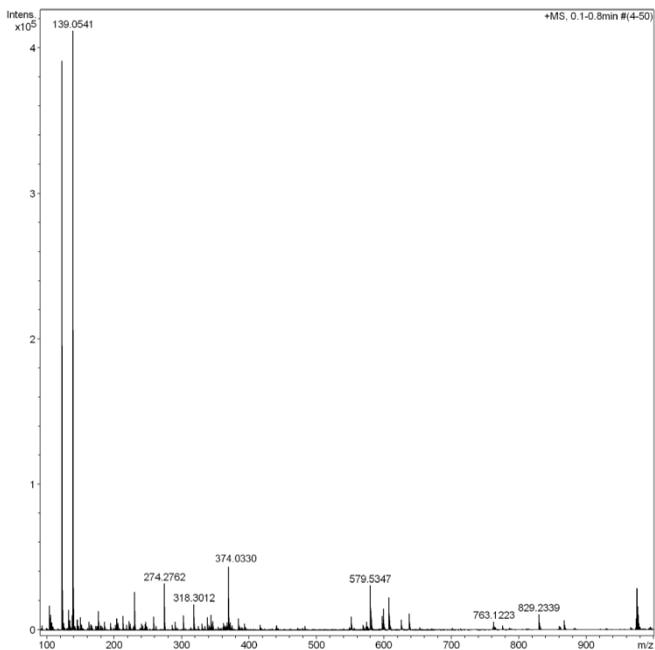
Sólido marrom com ponto de fusão 152-153° C. RMN de ¹H (Acetona deuterada): 6,95-7,69 (7H, m, H Arom.); 3,82 (1H, quinteto, H Alif.); 2,16 (3H, s, metila); 1,16 (3H, s, metila); 1,13 (3H, s, metila). MS (m/z, M+H⁺): 322,1015.





Sólido marrom com ponto de fusão 198-199° C. RMN de ^1H (Acetona deuterada): 6,95-7,54 (5H, m, H Arom.); 3,58 (1H, m, H Alif.); 2,06 (3H, s, metila); 1,12-1,19 (6H, m, metila). MS (m/z, M+H): 374,0330.





10.2 TRABALHOS PUBLICADOS E APRESENTADOS

- **JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY**
- ISSN: 1678-4790
- EXTRATO: A2



PAMPA Permeability, Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of Pyranoisoflavones from *Polygala molluginifolia* (Polygalaceae)

Dalila Venzke,^a Francieli K. Carvalho,^a Ana P. Ruani,^a Aldo S. Oliveira,^a Inês M. C. Brighente,^a Gustavo A. Mücke,^a Anderson Barison^b and Moacir G. Pizzolatti^{*a}

^a*Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil*

^b*Departamento de Química, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, 81530-900 Curitiba-PR, Brazil*

Uma investigação fitoquímica de *Polygala molluginifolia* (raiz, caule, folhas e flores) resultou no isolamento de quatro piranoisoflavonas das quais a isoflavona **1** é desconhecida na literatura. As isoflavonas **2-4**, embora sejam compostos sintéticos conhecidos são descritos neste trabalho como novos produtos naturais. Os compostos isolados foram avaliados em termos do seu efeito antioxidante e o potencial para inibir a enzima acetilcolinesterase. As isoflavonas **1** e **4** inibiram a acetilcolinesterase, exibindo valores de IC₅₀ de 68 μmol L⁻¹ e 84 μmol L⁻¹, respectivamente. No ensaio de DPPH, os mesmos compostos e a rutina **5** apresentaram valores de EC₅₀ de 61 μmol L⁻¹, 55 μmol L⁻¹ e 16 μmol L⁻¹, respectivamente. Além disso, a permeabilidade dos compostos **1-4** foi testada através do ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) com as isoflavonas **3** (9.25 × 10⁻⁶ cm s⁻¹) e **4** (3.48 × 10⁻⁶ cm s⁻¹) exibindo as maiores permeabilidades.



Design, synthesis and evaluation of seleno-dihydropyrimidinones as potential multi-targeted therapeutics for Alzheimer's disease†

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2014, 12, 2470

Rômulo F. S. Canto,^a Flavio A. R. Barbosa,^a Vanessa Nascimento,^a Aldo S. de Oliveira,^b Inês M. C. Brighente^b and Antonio Luiz Braga^{a*}

Received 19th March 2014,
Accepted 23rd March 2014
DOI: 10.1039/c4ob00598h
www.rsc.org/obc

In this paper we report the design, synthesis and evaluation of a series of seleno-dihydropyrimidinones as potential multi-targeted therapeutics for Alzheimer's disease. The compounds show excellent results as acetylcholinesterase inhibitors, being as active as the standard drug. All these compounds also show very good antioxidant activity through different mechanisms of action.

Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most prevalent of the neurodegenerative diseases, affects approximately 15 million people worldwide and nearly 50% of adults over the age of 85.¹

Because of the complex pathophysiology of AD, which involves many pathways, the development of a satisfactory therapy is problematic. The main therapy targets are reduced levels of the neurotransmitter acetylcholine (ACh), the diffuse loss of neurons, neurofibrillary tangles and formation of β -amyloid (A β) plaques.² Based on the cholinergic hypothesis, the mainstays of the current pharmacotherapy for AD are drugs aimed at increasing the levels of ACh through the inhibition of cholinesterases (ChEs).³ ChE inhibitors have been

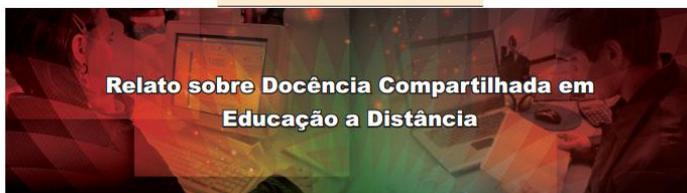
high oxygen consumption rate, high lipid content, and relatively limited antioxidant capacity compared to other organs, the brain is particularly susceptible to oxidative damage. Senile plaques release free radicals that are extremely toxic.¹⁰ The accumulation of reactive oxygen species (ROS) results in damage to major cell components, such as DNA, membranes and cytoplasmic proteins.¹¹ Oxidative stress is therefore included in all the pathophysiological hypotheses for AD, and studies have shown the efficacy of several antioxidant compounds.¹²

In addition to these two hypotheses, a third, known as the metal hypothesis, considers that metals (Fe and Cu) also play a role in the pathogenesis of AD.¹³ During the disease progression, metals progressively accumulate in the cerebrum.¹⁴ The abnormal accumulation of metals is closely associated

QUÍMICA NOVA NA ESCOLA

ISSN: 2175-2699
EXTRATO: C

RELATOS DE SALA DE AULA



Relato sobre Docência Compartilhada em Educação a Distância

**Aldo Sena de Oliveira, Natália Bruzamarello Caon Branco, Marcos Aires de Brito e
Teresa Cristina Rozone de Souza**

Neste relato, apresenta-se uma experiência em educação a distância de uma disciplina de química geral para o curso de licenciatura em física na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O curso, em parceria com o sistema Universidade Aberta do Brasil, tem sete polos de ensino no estado de Santa Catarina. Essa disciplina possuiu 80 horas-aula, 70% a distância e 30% presencial, e foi utilizado o modelo de docência compartilhada para o trabalho dos professores e tutores. Os professores realizaram duas visitas para aulas presenciais nos polos de ensino e duas videoconferências, e os tutores a distância e presenciais tiveram atribuições específicas. Os alunos contaram com livro-texto e material *on-line* hospedado na plataforma Moodle. O plano de ensino previu uma disciplina dinâmica e interativa, mas se observou uma pequena participação dos alunos, decorrente de vários aspectos, os quais podem ter contribuído para o baixo índice de aproveitamento na disciplina.

► educação a distância, docência compartilhada, recursos *on-line* ◀

Recebido em 30/08/2011, aceito em 29/10/2013

Arquivos Brasileiros de metabologia endocrinologia**ISSN:0004-2730****EXTRATO: B4****PT.045 EFEITO ANTI-HIPERGLICÊMICO DE
NAFTOQUINONAS**Allenhofen D¹, Da Luz G², Oliveira AS¹, Moraes ALL¹, Mendes CP²,
Castro AJG², Brich M¹, Postal BG¹, Brighente IMC³, Silva FRMB²¹ Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Departamento de Farmácia.² UFSC - Departamento de Bioquímica. ³ UFSC - Departamento de Química

Introdução: As formas terapêuticas para o tratamento da diabetes apresentam vários efeitos colaterais e não controlam eficientemente a glicemia, não prevenindo, dessa forma, a evolução letal da doença. Para tanto, é de interesse identificar compostos que possam melhorar a tolerância à glicose. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os potenciais efeitos antidiabéticos das naftoquinonas derivadas M32 e M34. **Métodos:** Ratos Wistar machos (50-55 dias) foram tratados com 1 mg/kg M32 ou M34 e o grupo controle, com o veículo (Protocolo CEUA PP00749). Os animais receberam os respectivos tratamentos pela via oral por gavagem. O sangue foi coletado (tempo zero) e imediatamente foi administrada uma sobrecarga de glicose (4 g/kg). Então, o sangue foi coletado nos próximos 15, 30, 60 e 180 min para a análise do perfil da curva de tolerância à glicose. A atividade de maltase, sacarase e lactase foi determinada pelo método da glicose oxidase e o glicogênio hepático e muscular por meio de reação com iodo. Para a determinação da glicação, medida por fluorescência, a albumina foi incubada com glicose (500 mM) 7, 14 e 28 dias na ausência (controle) ou presença do tratamento. **Resultados e discussão:** Somente a M32 reduziu significativamente ($p < 0,001$ - 23%) a glicemia quando comparada ao controle. O mecanismo anti-hiperglicêmico envolvido ainda necessita ser elucidado, embora trabalhos envolvendo naftoquinonas apontam para uma ação insulinoimética. No entanto, não foram observadas alterações no conteúdo total de glicogênio muscular e hepático, além de M32 e M34 não inibirem dissacaridases intestinais. Porém, M32 e M34 reduziram significativamente ($p < 0,001$) a formação de produtos finais de glicação avançada - AGES, na concentração de 1 µg/ml. M32 reduziu a glicação em 52%, 41% e 37% em 7, 14 e 28 dias, respectivamente. M34 reduziu em 30% e 24% em 14 e 28 dias, respectivamente. Essa ação demonstra um potencial efeito protetor das complicações do diabetes, uma vez que os AGES estão diretamente envolvidos com a patogênese das alterações micro e macrovasculares comuns nesses pacientes. Porém, estudos ainda são necessários para estabelecer se esse efeito se reproduz in vivo. **Apoio:** CNPQ, Capes, PPG-Farmácia/UFSC.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. OLIVEIRA, A. S., Brighente, I.M.C, VENZKE, D., PIZZOLATTI, M. G. Avaliação do perfil antioxidante das frações do extrato hidroalcoólico de *Verbena hirta* In: XX Encontro de Química da Região Sul, 2013, Lajeado- RS. Anais do XX Encontro de Química da Região Sul: química e biotecnologia: do ambiente à produção de alimentos. , 2013.
2. OLIVEIRA, A. S., VENZKE, D., RUANI, A. P., PIZZOLATTI, M. G., Brighente, I.M.C Determinação da permeabilidade passiva de piranoisoflavonas isoladas de *Polygala molluginifolia* por meio do ensaio PAMPA In: XX Encontro de Química da Região Sul, 2013, Lajeado- RS. Anais do XX Encontro de Química da Região Sul: química e biotecnologia: do ambiente à produção de alimentos. , 2013.
3. OLIVEIRA, A. S., Brito, M. A. de, Souza, T.C.R de, Branco, N.B.C Docência compartilhada em EaD: olhares para as relações de poder na prática docente In: XX Encontro de Química da Região Sul, 2013, Lajeado- RS. Anais do XX Encontro de Química da Região Sul: química e biotecnologia: do ambiente à produção de alimentos. , 2013.
4. RUANI, A. P., VENZKE, D., OLIVEIRA, A. S., PIZZOLATTI, M. G., Brighente, I.M.C Estudo comparativo da atividade antioxidante de duas espécies do gênero *Polygala* In: XX Encontro de Química da Região Sul, 2013, Lajeado- RS. Anais do XX Encontro de Química da Região Sul: química e biotecnologia: do ambiente à produção de alimentos. , 2013.
5. OLIVEIRA, A. S., Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M.C, VENZKE, D., RUANI, A. P. Estudo comparativo de inibição da enzima acetilcolinesterase das espécies *Polygala campestris* e *Polygala longicalis* In: XX

- Encontro de Química da Região Sul, 2013, Lajeado- RS.
Anais do XX Encontro de Química da Região Sul: química e biotecnologia: do ambiente à produção de alimentos. , 2013.
6. VENZKE, D., OLIVEIRA, A. S., Brighente, I.M.C, PIZZOLATTI, M. G., RUANI, A. P. Estudo fitoquímico da espécie *Polygala campestris* In: XX Encontro de Química da Região Sul, 2013, Lajeado- RS.
Anais do XX Encontro de Química da Região Sul: química e biotecnologia: do ambiente à produção de alimentos. , 2013.
 7. OLIVEIRA, A. S., VENZKE, D., RUANI, A. P., Brighente, I.M.C, PIZZOLATTI, M. G. Inibição de acetilcolinesterase e atividade antioxidante de isoflavonas isoladas de *Polygala molluginifolia* In: XX Encontro de Química da Região Sul, 2013, Lajeado- RS.
Anais do XX Encontro de Química da Região Sul: química e biotecnologia: do ambiente à produção de alimentos. , 2013.
 8. OLIVEIRA, A. S., VENZKE, D., Brighente, I.M.C, PIZZOLATTI, M. G., RUANI, A. P. Investigação da atividade antioxidante, teor de flavonóides e fenólicos totais da espécie vegetal *Salacia impressifolia* In: XX Encontro de Química da Região Sul, 2013, Lajeado- RS.
Anais do XX Encontro de Química da Região Sul: química e biotecnologia: do ambiente à produção de alimentos. , 2013.
 9. RUANI, A. P., VENZKE, D., OLIVEIRA, A. S., PIZZOLATTI, M. G., Brighente, I.M.C *Salacia impressifolia*: determinação in vitro da capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase In: XX Encontro de Química da Região Sul, 2013, Lajeado- RS.
Anais do XX Encontro de Química da Região Sul: química e biotecnologia: do ambiente à produção de alimentos. , 2013.
 10. OLIVEIRA, A. S., Branco, N.B.C, Brito, M. A. de, Souza, T.C.R de Educação a Distância e teorias psicogenéticas: um diálogo possível In: IV Seminário de Educação a Distância, 2012, Florianópolis.
IV Seminário de Educação a Distância. , 2012.

11. OLIVEIRA, A. S., Brighente, I.M.C
Lippia hirta (Verbenaceae): ESPÉCIE COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE In: 22 Simposio de Plantas Medicinais do Brasil, 2012, Bento Gonçalves. 22 Simposio de Plantas Medicinais do Brasil. , 2012.
12. OLIVEIRA, A. S., Brighente, I.M.C
Verbena hirta: UMA ESPÉCIE COM POTENCIAL ATIVIDADE In: 22 Simposio de Plantas Medicinais do Brasil, 2012, Bento Gonçalves. Simpósio de Plantas Medicinais. , 2012.
13. OLIVEIRA, A. S., Brighente, I. M.C, COLLA, G.
Atividade antioxidante e toxicidade aguda do extrato etanólico da Verbena hirta In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. Anais da Sociedade Brasileira de Química. , 2011.
14. OLIVEIRA, A. S., Brighente, I.M.C
Chemical and Biological Studies of Verbena hirta and Lippia hirta In: São Paulo Advanced School on Chemistry, 2011, Campinas. São Paulo Advanced School on Chemistry. , 2011.
15. OLIVEIRA, A. S., Brighente, I.M.C
Toxicity and Antioxidant Activity of Verbena hirta (Verbenacea) In: 3 Brazilian Conference on Natural Products, 2011, Ouro Preto. 3 Brazilian Conference on Natural Products. , 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. OLIVEIRA, A. S., Brighente, I.M.C
ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY OF M. SPLENDENS In: I International Symposium of Pharmacognosy, 2012, Ilhéus. I International Symposium of Pharmacognosy. , 2012.
2. OLIVEIRA, A. S., Brighente, I.M.C, Pizzolatti, M.G.
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DA ESPÉCIE Croton

- antisiphiliticus Martius In: Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais, 2012
Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais. , 2012.
3. OLIVEIRA, A. S., Brighente, I.M.C
Senecio brasiliensis: UMA ESPÉCIE COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIOXIDANTE In: VI Simposio Iberoamericano de Plantas Mediciniais, 2012, Ponta Grossa.
VI Simposio Iberoamericano de Plantas Mediciniais. , 2012.
 4. OLIVEIRA, A. S., Brighente, I.M.C, MORESCO, H. H.
Atividade antioxidante de Myrcia splendens por três diferentes métodos. In: 51 Congresso Brasileiro de Química, 2011, São Luiz- MA.
51 Congresso Brasileiro de Química. , 2011.
 5. OLIVEIRA, A. S., Brighente, I.M.C
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA E TOXICIDADE AGUDA DA Lippia hirta In: 51 Congresso Brasileiro de Química, 2011, São Luis- MA.
51 Congresso Brasileiro de Química. , 2011.
 6. OLIVEIRA, A. S., COLLA, G., Brighente, I.M.C
IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE Eugenia umbelliflora In: 51 Brasileiro de Química, 2011, São Luis- MA.
51 Brasileiro de Química. , 2011.

10.3 ARTIGOS ACEITOS

Anais do Congresso Brasileiro de Ensino Superior a Distância**ISSN: 2237-5996****EXTRATO: C**

ESUD 2014 – XI Congresso Brasileiro de Ensino Superior a Distância

Florianópolis/SC, 05 – 08 de agosto de 2014 - UNIREDE

**A QUÍMICA, O AVEA, O PENSAMENTO E O CONCEITO:
CONTRIBUIÇÕES DA TEORIA DA ATIVIDADE****Aldo Sena de Oliveira¹, Marcos Aires de Brito², Tereza Cristina Rozone de Souza³,
Natália Bruzamarello Caon Branco⁴**¹ Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, aldosenavix@gmail.com² Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, marcosqmc@gmail.com³ Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, tereza.cristina@ufsc.br⁴ Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, nataliabcranco@gmail.com

Resumo – O artigo tem como objetivo discutir algumas das concepções, práticas e perspectivas de avaliação da aprendizagem conceitual no contexto da educação a distância. Os subsídios teóricos que fundamentam as análises buscam respaldo nas inferências e teorizações propostas principalmente por Leontiev e Davidov no que diz respeito à formação dos conceitos, e tendo em vista o conteúdo que deve ser externalizado pelo aluno como indicador de sua aprendizagem. Discute-se em que medida, os Ambientes Virtuais de Ensino Aprendizagem (AVEA) podem ser concebidos como mediadores tecnológicos na viabilização dos processos escolares, que permitam a realização de uma prática pedagógica dialógica e significativa. Considera-se a Teoria da Atividade como orientação psicológica que

Anais do Congresso Brasileiro de Ensino Superior a Distância
ISSN: 2237-5996
EXTRATO: C

ESUD 2014 – XI Congresso Brasileiro de Ensino Superior a Distância
Florianópolis/SC, 05 – 08 de agosto de 2014 - UNIREDE

**APRENDIZAGEM EM EaD: O DIÁLOGO DA TEORIA
HISTÓRICO-CULTURAL NO DISCURSO DAS LINGUAGENS
E NO PARADOXO DAS DISTÂNCIAS**

**Aldo Sena de Oliveira¹, Marcos Aires de Brito², Tereza Cristina Rozone de Souza³,
Natália Bruzamarello Caon Branco⁴**

¹ Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, aldosena.vix@gmail.com

² Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, marcosqmc@gmail.com

³ Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, tereza.cristina@ufsc.br

⁴ Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, nataliabcrancho@gmail.com

Resumo – Neste artigo apresenta-se a importância da linguagem na mediação dos processos pedagógicos em EaD. Utilizam-se as contribuições da teoria histórico-cultural, partindo do pressuposto de que as necessidades sociais e educativas são intermediadas por questões da linguagem. Destaca-se a importância do desenvolvimento de práticas considerando as potencialidades de promoção de vínculos, inclusive afetivos, que proporcionem a minimização das “distâncias” em EaD. Os esforços se orientam no sentido de reconhecer a utilização dos ferramentas tecnológicas na comunicação virtual visando otimização do

Anais do Congresso Brasileiro de Ensino Superior a Distância
ISSN: 2237-5996
EXTRATO: C

ESUD 2014 – XI Congresso Brasileiro de Ensino Superior a Distância
Florianópolis/SC, 05 – 08 de agosto de 2014 - UNIREDE

**DOCÊNCIA COMPARTILHADA EM EAD: MÚLTIPLOS
OLHARES PARA A FORMAÇÃO DE PROFESSORES**

**Aldo Sena de Oliveira¹, Marcos Aires de Brito², Tereza Cristina Rozone de Souza³,
Natália Bruzamarello Caon Branco⁴**

¹ Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, aldosenavix@gmail.com

² Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, marcosqmc@gmail.com

³ Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, tereza.cristina@ufsc.br

⁴ Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Físicas e Matemáticas/Departamento de Química, nataliabcranco@gmail.com

Resumo – *É possível pensar as novas dinâmicas que se estabelecem no trabalho educacional em EaD, entendendo as relações de poder que permeiam a prática docente. As relações de poder propostas por Foucault podem ser pensadas para o entendimento de diversas relações envolvidas na EaD. Neste sentido, o artigo apresenta a experiência vivenciada por uma equipe de dois professores e dois tutores das disciplinas: Química Básica e Tópicos de Química, ofertadas ao curso de Licenciatura em Física, modalidade a distância, da Universidade Federal de*

10.4 ARTIGOS SUBMETIDOS

Use of ultrasound and microwave irradiation for clean and efficient synthesis of 3,3'-(arylmethylene)bis(2-hydroxynaphthalene-1,4-dione) derivatives

Aldo S. de Oliveira, Luana C. Llanes, Ricardo J. Nunes, Rosendo A. Yunes, Inês M. C. Brighente*

Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, SC- Brazil.

**Corresponding Author*

*Departamento de Química – Universidade Federal de Santa Catarina
Campus Universitário Trindade, 88040-900, Florianópolis/SC, Brazil.
Tel. +55 48 3721 6849; Fax: +55 48 3721 6850*

Synthesis, and antioxidant activity of 3,3'-(arylmethylene)bis(2-hydroxynaphthalene-1,4-dione) derivatives

Aldo S. de Oliveira, Luana C. Llanes, Patricia D. Neuenfeldt, Rosendo A. Yunes, Ricardo J. Nunes, Inês M. C. Brighente*

Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 88040-900, SC- Brazil.

Preparation, characterization, cytotoxicity and antioxidant activity of DOPA melanin modified by amino acids: melanin-like compounds

Thiago G. Costa^a, Mateus J. Feldhaus^a, Felipe S. Vilhena^a, Melina Heller^b, Gustavo A. Mücke^b, Aldo S. Oliveira^c, Inês M. C. Brighente^c, Fabiola B. F. Monteiro^d, Tânia B. Creczynski-Pasa^d, Bruno Szpoganicz^{a*}

^aLaboratory of Chemical Equilibrium, Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, CP476, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^bLaboratory of Capillary Electrophoresis, Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, CP476, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970– Florianópolis, SC, Brazil

^dDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina P.O. Box 476, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil. |

Ethanol extract of fruits of *Pterodon pubescens* inhibits mechanical and thermal hypersensitivity induced by neuropathic pain in mice: evidence for the mechanisms of action

NUCCI C.^a, MARTINS D.F.^b, NASCIMENTO L.F.^c, VENZKE D.^d, PIZZOLATTI M.G.^d, OLIVEIRA, A.S.^d, BRIGHENTE, I.M.C.^d, MACEDO-JUNIOR S.J.^e, FREDERICO M.J.S.^f, SANTOS A.R.S.^a

^aLaboratory of Neurobiology of Pain and Inflammation, Department of Physiological Sciences, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil.

^bLaboratory of Experimental Neuroscience, Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina, Pedra Branca, Palhoça, SC, 88137-270, Brazil.

^cDepartment of Medicine, Federal University of Rondônia, Porto Velho, RO, 78900-500, Brazil. |