

THAÍS ALTOÉ MOREIRA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E INIBITÓRIA DA
FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS DE GAMA-ALQUILIDENO-GAMA-
LACTONAS CLORADAS E GAMA-LACTAMAS DERIVADAS**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M835s
2015
Moreira, Thais Altoé, 1990-
Síntese e avaliação das atividades citotóxica e inibitória da
formação de biofilmes bacterianos de
gama-alquilideno-gama-lactonas cloradas e gama-lactamas
derivadas / Thais Altoé Moreira. – Viçosa, MG, 2015.
xii, 130f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.82-90.

1. Síntese orgânica. 2. Biofilmes bacterianos.
3. Gama-alquilideno-gama-lactona. 4. Gama-lactama.
5. Citotoxicidade. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em
Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547

THAÍS ALTOÉ MOREIRA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E INIBITÓRIA DA
FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS DE GAMA-ALQUILIDENO-GAMA-
LACTONAS CLORADAS E GAMA-LACTAMAS DERIVADAS**

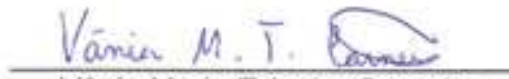
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2015.


Antônio Jacinto Demuner


Róbson Ricardo Teixeira


Gaspar Diaz Muñoz


Vânia Maria Teixeira Carneiro


Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(Orientador)

A Deus, à minha família, e em especial aos meus pais e ao meu irmão Thales.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado em todas as etapas desse trabalho, protegendo e iluminando.

Aos meus queridos pais Vanderléia e Daniel, e ao meu irmão Thales, pela educação que me foi dada, pelo amor incondicional, pelo incentivo e pela dedicação em todos os momentos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), pela disponibilização da infra-estrutura para realização dos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pelo apoio, pelo incentivo e pela dedicação na orientação.

Aos professores Antonio Jacinto Demuner, Róbson Ricardo Teixeira e Elson S. Alvarenga pela compreensão e apoio. Às professoras Andrea Pimenta e Cláudia Pessoa, pela parceria e colaboração nos ensaios biológicos.

Aos técnicos José Luiz, Márcio e Cristiane, pela aquisição dos espectros.

Aos amigos do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), pela convivência agradável e amizade.

A minha família, que mesmo distante estava torcendo pelo meu sucesso. Ao meu namorado Leonel, pelo apoio e companheirismo imensuráveis. Aos amigos de Viçosa, de Cachoeiro e a república 101, pela torcida e os momentos de descontração.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

THAÍS ALTOÉ MOREIRA, filha de Vanderléia Altoé Moreira e Daniel Moreira, nasceu em Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo, em 22 de fevereiro de 1990.

Em 2008, ingressou no Curso de Licenciatura e Bacharelado em Química na Universidade Federal de Viçosa, diplomando-se em julho de 2013.

Durante este período, foi bolsista de Iniciação Científica do programa Institucional de Bolsas do PIBIC/CNPq por três anos, desenvolvendo pesquisas na área de Síntese Orgânica no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA).

Em agosto de 2013 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração Química Orgânica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa. Desenvolveu pesquisas em Síntese Orgânica no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), e em fevereiro de 2015, submeteu-se à defesa de dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

CONTEÚDO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A NATUREZA COMO FONTE DE INSPIRAÇÃO PARA A BUSCA DE NOVOS FÁRMACOS	2
1.2. ESTUDOS SINTÉTICOS ENVOLVENDO γ LACTONAS E γ LACTAMAS	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1. GENERALIDADES METODOLÓGICAS.....	9
2.2. PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS.....	10
2.2.1. Síntese da γ -lactona 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona (20)	10
2.2.2. Síntese das γ -alquilideno- γ -lactonas 21-29	11
2.2.2.1. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(4-bromobenzilideno)furan- 2(5H)-ona (21)	12
2.2.2.2. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(2-bromobenzilideno)furan- 2(5H)-ona (22)	13
2.2.2.3. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(4-clorobenzilideno)furan- 2(5H)-ona (23)	14
2.2.2.4. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(3-clorobenzilideno)furan- 2(5H)-ona (24)	15
2.2.2.5. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(4-fluorobenzilideno)furan- 2(5H)-ona (25)	16
2.2.2.6. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(4- trifluorometilbenzilideno)furan-2(5H)-ona (26)	17
2.2.2.7. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(4-nitrobenzilideno)furan- 2(5H)-ona (27)	17
2.2.2.8. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(3,4- metilenodioxibenzilideno)furan-2(5H)-ona (28).....	18
2.2.2.9. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(3-bromo-4-	

metoxibenzilideno)furan-2(5 <i>H</i>)-ona (29)	19
2.2.3. Síntese das γ -hidroxi- γ -lactamas 30-33	20
2.2.3.1. Dados do composto 3,4-dicloro-5-(4-bromobenzil)-5-hidroxi-1- isobutilpirrol-2(5 <i>H</i>)-ona (30)	21
2.2.3.2. Dados do composto 3,4-dicloro-5-(4-bromobenzil)-5-hidroxi-1- propilpirrol-2(5 <i>H</i>)-ona (31)	22
2.2.3.3. Dados do composto 3,4-dicloro-5-(4-fluorobenzil)-5-hidroxi-1- propilpirrol-2(5 <i>H</i>)-ona (32)	23
2.2.3.4. Dados do composto 3,4-dicloro-5-(4-clorobenzil)-5-hidroxi-1- isobutilpirrol-2(5 <i>H</i>)-ona (33)	24
2.2.4. Síntese das γ -alquilideno- γ -lactamas 34-35	25
2.2.4.1. Dados dos compostos (5 <i>Z</i>)-3,4-dicloro-5-(4-bromobenzilideno)-1- isobutilpirrol-2(5 <i>H</i>)-ona (34 <i>Z</i>) e (5 <i>E</i>)-3,4-dicloro-5-(4-bromobenzilideno)-1- isobutilpirrol-2(5 <i>H</i>)-ona (34 <i>E</i>)	26
2.2.4.2. Dados dos compostos (5 <i>Z</i>)-3,4-dicloro-5-(4-fluorobenzilideno)-1- propilpirrol-2(5 <i>H</i>)-ona (35 <i>Z</i>) e (5 <i>E</i>)-3,4-dicloro-5-(4-fluorobenzilideno)-1- propilpirrol-2(5 <i>H</i>)-ona (35 <i>E</i>)	27
2.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	29
2.4. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1. SÍNTESE DO COMPOSTO 3,4-DICLOROFURAN-2(5 <i>H</i>)-ONA ATRAVÉS DA REAÇÃO DE REDUÇÃO	32
3.2. SÍNTESE DAS γ -ALQUILIDENO- γ -LACTONAS DE ESTRUTURA GERAL 3,4-DICLORO-5- ALQUILIDENOFURAN-2(5 <i>H</i>)-ONAS ATRAVÉS DA REAÇÃO DE ALQUILIDENAÇÃO	38
3.3. SÍNTESE DAS γ -HIDROXI- γ -LACTAMAS DE ESTRUTURA GERAL 3,4-DICLORO-5-BENZIL-5- HIDROXI-1-ALQUILPIRROL-2(5 <i>H</i>)-ONA ATRAVÉS DA REAÇÃO DE LACTAMIZAÇÃO	53
3.4. SÍNTESE DAS γ -ALQUILIDENO- γ -LACTAMAS DE ESTRUTURA GERAL (5 <i>Z/E</i>)-3,4- DICLORO-5-BENZILIDENO-1-ALQUILPIRROL-2(5 <i>H</i>)-ONA ATRAVÉS DA REAÇÃO DE DESIDRATAÇÃO	64
3.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	75
3.6. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS	78
4. CONCLUSÃO	83

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
6. ANEXOS	91

LISTA DE ABREVIATURAS

C-F	Carbono-Flúor
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia gasosa/Espectrometria de massas
d	Dupleto
d _{comp.}	Dupleto complexo
dd	Dupleto duplo
ddd	Dupleto duplo duplo
δ	Deslocamento químico
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
HETCOR	<i>Heteronuclear Correlation</i>
Hz	Hertz
H-H	Hidrogênio-Hidrogênio
H-F	Hidrogênio-Flúor
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
LASA	Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos
m	Multiplete
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Massa/carga
NOEDIF	<i>Nuclear Overhauser Effect Difference</i>
P.A.	Puro para análise
ppm	Partes por milhão
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
rpm	Rotações por minuto

s	Simpleto
t.a.	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
TBDMSOTf	Trifluorometanosulfonato de <i>tert</i> -butildimetilsilila
T _f	Temperatura de fusão
THF	Tetraidrofurano
t	Tripleto
t _{comp.}	Tripleto complexo
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
v/v	Volume/volume

RESUMO

MOREIRA, Thaís Altoé, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Síntese e avaliação das atividades citotóxica e inibitória da formação de biofilmes bacterianos de gama-alquilideno-gama-lactonas cloradas e gama-lactamas derivadas.** Orientador: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

Os butenólídeos, γ -lactonas insaturadas, estão presentes na estrutura de um grande número de produtos naturais e apresentam uma variedade de atividades biológicas, tais como fungicida, bactericida, anti-inflamatória, citotóxica e reguladora de germinação de sementes. Essas atividades também são descritas para as γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas que estão presentes em vários produtos naturais biologicamente ativos. Visando contribuir com o estudo dessas classes de compostos, esse trabalho teve como objetivo sintetizar novas γ -alquilideno- γ -lactonas e seus correspondentes γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas, além de avaliar suas atividades citotóxica e inibitória da formação de biofilmes bacterianos. Na rota sintética escolhida, o ácido mucoclórico, utilizado como material de partida, foi inicialmente reduzido a 3,4-diclorofuran-2(5*H*)-ona e posteriormente reagiu com diferentes aldeídos aromáticos por meio da reação de alquilidação, resultando no preparo de oito diferentes γ -alquilideno- γ -lactonas. Três desses análogos foram convertidos nas γ -hidroxi- γ -lactamas correspondentes pela reação de conversão lactona-lactama com isobutilamina e propilamina, e a subsequente desidratação das γ -hidroxi- γ -lactamas resultou na formação das (*Z*) e (*E*)- γ -alquilideno- γ -lactamas. Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia no IV, espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , técnicas bidimensionais COSY e HETCOR e espectrometria de massas, além de experimentos de NOEDIF para determinar a estereoquímica da ligação dupla das unidades γ -alquilideno- γ -lactamas. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com as linhagens celulares de câncer humano OVCAR-8, SF-295, HCT-116 e HL-60. Os resultados mostraram que as γ -lactonas são mais ativas do que as γ -lactamas. Os melhores efeitos citotóxicos observados estão relacionados a lactona (5*Z*)-3,4-dicloro-5-(4-bromobenzilideno)furan-2(5*H*)-ona (**21**), que apresentou significativa atividade contra as quatro linhagens celulares de câncer humano testadas. Em particular, a lactona **21** apresentou $\text{CR}_{50} = 0,66 \mu\text{g/mL}$ contra HL-60. No ensaio de

inibição da formação de biofilme bacteriano de *Streptococcus mutans*, o melhor resultado foi observado para a lactona (5*Z*)-3,4-dicloro-5-(4-trifluorometilbenzilideno)furan-2(5*H*)-ona (**26**) que apresentou IC₅₀ equivalente a 0,21 ± 0,05 µg/mL.

ABSTRACT

MOREIRA, Thaís Altoé, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Synthesis and evaluation of cytotoxic activities and inhibitory of the formation of bacterial biofilms of gamma-alkylidene-gamma-lactones chlorinated and gamma-lactams derivatives.** Adviser: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

The butenolides, γ -unsaturated lactones, are present in the structure of many natural products, and exhibit a variety of biological activities, such as fungicide, bactericide, anti-inflammatory, cytotoxicity and regulation of seed germination. These activities are also described for γ -hydroxy- γ -lactams and γ -alkylidene- γ -lactams which are present in many biologically active natural products. To contribute to the study of these classes of compounds, this study aimed to synthesize new γ -alkylidene- γ -lactones and their corresponding γ -hydroxy- γ -lactams and γ -alkylidene- γ -lactams and to evaluate their cytotoxicity and formation of bacterial biofilms inhibition. In the chosen synthetic route, the mucochloric acid was initially reduced to 3,4-dichlorofuran-2(5*H*)-one which subsequently reacted with various aromatic aldehydes through the reaction of aldol condensation, resulting in the preparation of eight different γ -alkylidene- γ -lactones. Three of these analogs were converted to the corresponding γ -hydroxy- γ -lactams by lactamization with isobutylamine and propylamine. Further dehydration of γ -hydroxy- γ -lactams resulted in the formation of (*Z*) and (*E*)- γ -alkylidene- γ -lactams. All the synthesized compounds were characterized by IR spectroscopy, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, COSY and HETCOR bidimensional techniques and mass spectrometry. NOEDIF experiments to determine the geometry of the double bond of the γ -alkylidene- γ -lactam units. The cytotoxicity assay was performed with OVCAR-8, SF-295, HCT-116 and HL-60 cancer cell lines. The results showed that the γ -lactones are more active than the γ -lactams. The best effects were associated with lactone (5*Z*)-3,4-dichloro-5-(4-bromobenzilidene)furan-2(5*H*)-one (**21**) which was active against all tested cell lines. Particularly, the compound **21** presented $\text{CR}_{50} = 0.66 \mu\text{g/mL}$ against HL-60. In the inhibition assay of bacterial biofilm formation of *Streptococcus mutans*, the compounds did not show good activity. Exception to this generalization is the lactone (5*Z*)-3,4-dichloro-5-(4-trifluoromethylbenzylidene)furan-2(5*H*)-one (**26**) which presented $\text{IC}_{50} = 0,21 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$.

1. Introdução

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou recentemente um amplo documento alertando sobre microrganismos resistentes a várias drogas em todo o mundo (OMS, 2014). Em entrevista, o diretor assistente geral de segurança da saúde da OMS, Dr. Keiji Fukuda, afirmou que infecções comuns e que causavam poucos danos, agora podem matar e, qualquer indivíduo, independente da idade ou do local onde vive, pode ser afetado (OMS, 2014). Além disso, a diminuição do mercado em pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos na última década é especialmente alarmante (MAY, 2014), o que contribui para necessidade de buscar novos fármacos para combater as diversas enfermidades existentes.

O câncer é uma das doenças mais preocupantes na atualidade, já que é a maior causa de morte no mundo na primeira década desse milênio (JEMAL *et al.*, 2011). A agência internacional de pesquisa sobre o câncer publicou em 2012 a estimativa total de incidência mundial, mortalidade e prevalência de 27 tipos de câncer que ameaçam o ser humano, revelando aproximadamente 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes naquele ano (FERLAY *et al.*, 2014).

Além do câncer, as bactérias também são responsáveis por diversas doenças nos seres humanos. Uma das maneiras que elas encontraram para aumentar sua patogenicidade é por meio da formação de biofilmes, que as mantêm protegidas aumentando sua resistência a antibióticos. O biofilme bacteriano está presente na maioria das superfícies úmidas da natureza, assim como tecidos humanos, superfície dentária, próteses médicas e tubulações de água (NUNES, 2007). Estima-se que 80% da biomassa bacteriana mundial exista na forma de biofilme e que 65-80% das infecções microbianas que ocorrem no corpo humano são mediadas por biofilme (DAVIES, 2003).

Como consequência desses problemas de saúde, há uma urgente necessidade de encontrar novas substâncias anticancerígenas e inibidoras da formação de biofilmes bacterianos. Para isso, muitas estratégias podem ser empregadas e o uso de produtos naturais como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos constitui-se em uma das possibilidades empregadas pelas empresas farmacêuticas (BARREIRO *et al.*, 2009).

1.1. A natureza como fonte de inspiração para a busca de novos fármacos

Pesquisas recentes mostram que das 175 moléculas aprovadas nas últimas décadas para uso como anticâncer, 48,6% são produtos naturais ou derivados (NEWMAN e CRAGG, 2012). Por isso, os produtos naturais são fonte de inspiração e modelos na busca por novos fármacos (CRAGG e NEWMAN, 2013; BAUER e BRONNSTRUP, 2014).

Os butenolídeos, γ -lactonas insaturadas, estão presentes na estrutura de um grande número de produtos naturais isolados de esponjas, algas, plantas, borboletas e outros insetos (DE SOUZA, 2005; KUANG *et al.*, 2008) e podem ser representados por anéis γ -lactônicos do tipo I e II (Figura 1, p. 3) (BARBOSA *et al.*, 2010b). Outros butenolídeos também foram isolados de produtos naturais como γ -alquilidenobutenolídeos, fimbrolídeos, nostoclídeos, rubrolídeos, e cadiolídeos, por exemplo (Figura 1, p. 3) (NEGISHI e KOTORA, 1997; XUEMIN *et al.*, 1993; MIAO e ANDERSEN, 1991; GIVSKOV *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 1998).

Essas classes de butenolídeos apresentam uma variedade de atividades biológicas tais como fungicida, bactericida, anti-inflamatória, citotóxica e reguladora de germinação de sementes (EI-TOMBARY *et al.*, 2011; FLEMATTI *et al.*, 2004; LIGHT *et al.*, 2009; WEBER *et al.*, 2002) e por isso têm atraído atenção como alvo sintético (BELLINA *et al.*, 2001). Os rubrolídeos I, K, L e M (Figura 1, p. 3) apresentaram significativa citotoxicidade contra quatro linhagens celulares de câncer humano (P-388, A-549, HT-29 e MEL-28). Entretanto, o rubrolídeo M foi o mais ativo, apresentando $IC_{50} = 1,2 \mu\text{g/mL}$ contra todas as quatro linhagens celulares testadas (Ortega *et al.*, 2000). Os goniobutenolídeos A e B (Figura 1, p. 3) também exibem atividade citotóxica, sendo o goniobutenolídeo B mais ativo do que o A contra a maioria das células testadas. Por exemplo, o goniobutenolídeo B apresentou $IC_{50} = 0,91 \mu\text{g/mL}$ contra A-549, enquanto o goniobutenolídeo A apresentou $IC_{50} = 3,73 \mu\text{g/mL}$ para a mesma célula (FANG *et al.*, 1991). Os fimbrolídeos **1** e **2** (Figura 1, p. 3) possuem o núcleo 4-halo-3-butil-5-halometilenofuran-2(5H)-ona em comum e apresentaram atividade inibitória contra a formação de biofilme e expressão da virulência de bactérias, causando redução na velocidade com que a colônia se espalha em uma superfície utilizando as concentrações de 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (GIVSKOV *et al.*, 1996).

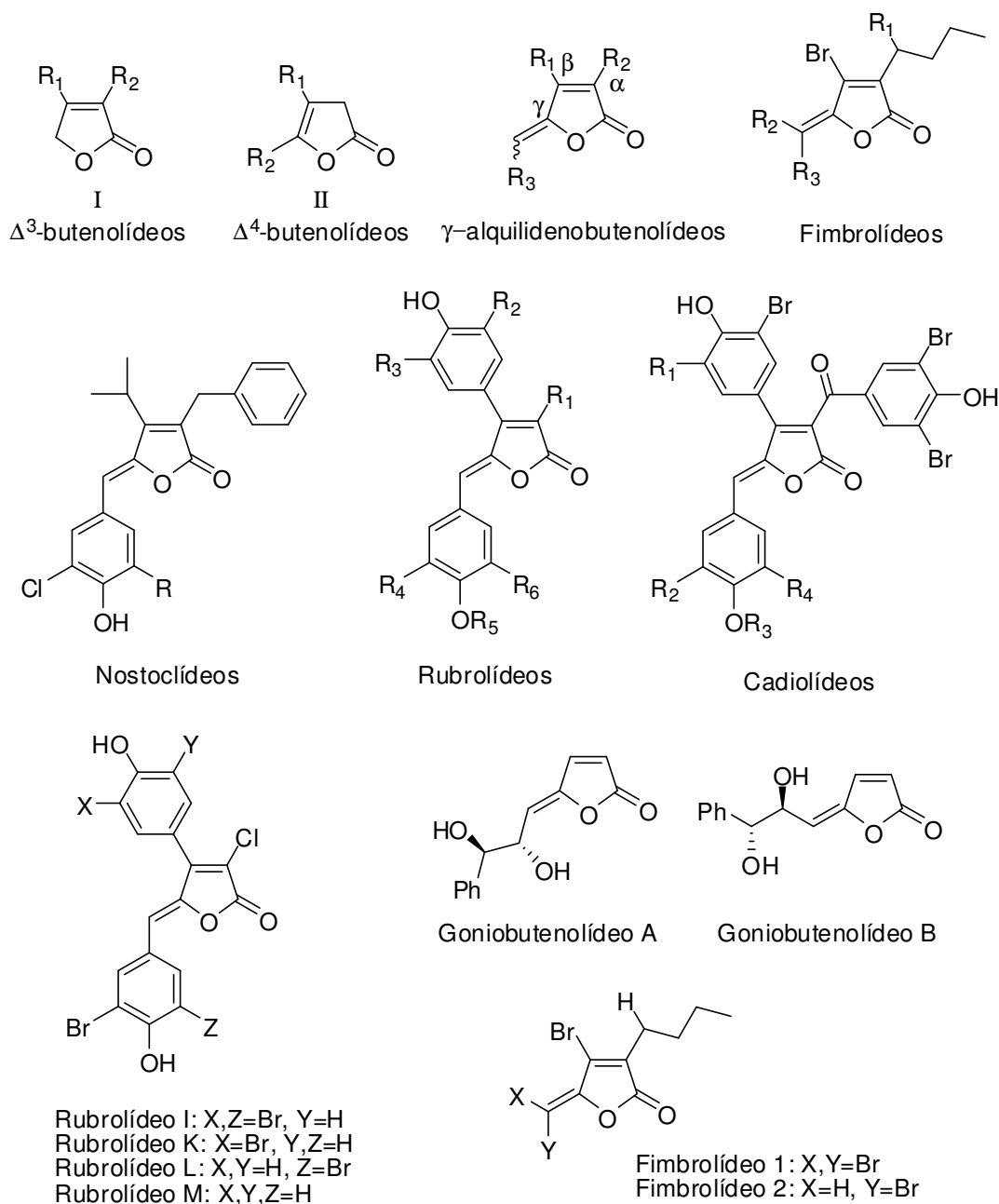


Figura 1 – Estruturas gerais dos butenolídeos, γ -alkilidenobutenolídeos, fimbrólídeos, nostoclídeos, rubrólídeos e cadiólídeos, e estruturas específicas de rubrólídeos, goniobutenolídeos e fimbrólídeos.

Outros produtos naturais bioativos pertencem à classe das γ -hidroxi- γ -lactamas (I) e γ -alkilideno- γ -lactamas (II) (Figura 2, p. 4), também conhecidas como 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas e 5-alkilideno-3-pirrolin-2-onas. Estas substâncias, frequentemente encontradas como metabólitos de fungos (NAY, 2009), ganharam destaque devido às múltiplas atividades biológicas (ALVI *et al.*, 1998; KIMURA *et al.*, 1990; SUZUKI *et al.*, 2000). As miceliotermofinas A e F (Figura 2), isoladas do fungo

Miceliotora termofina, foram citotóxicas na faixa de concentração de 0,2-1,3 µg/mL contra algumas linhagens de células cancerígenas (HepG2, A-549 e MCF-7) (YANG *et al.*, 2007). A Pulchellalactama (Figura 2) foi isolada do fungo marinho *Corollospora pulchella* e apresenta atividade inibitória contra a enzima tirosina fosfatase CD45, que atua na diferenciação celular (ALVI *et al.*, 1998). A Talaroconvolutina A (Figura 2) também foi isolada de um fungo e possui atividade antifúngica contra *Candida albicans* (SUZUKI *et al.*, 2000).

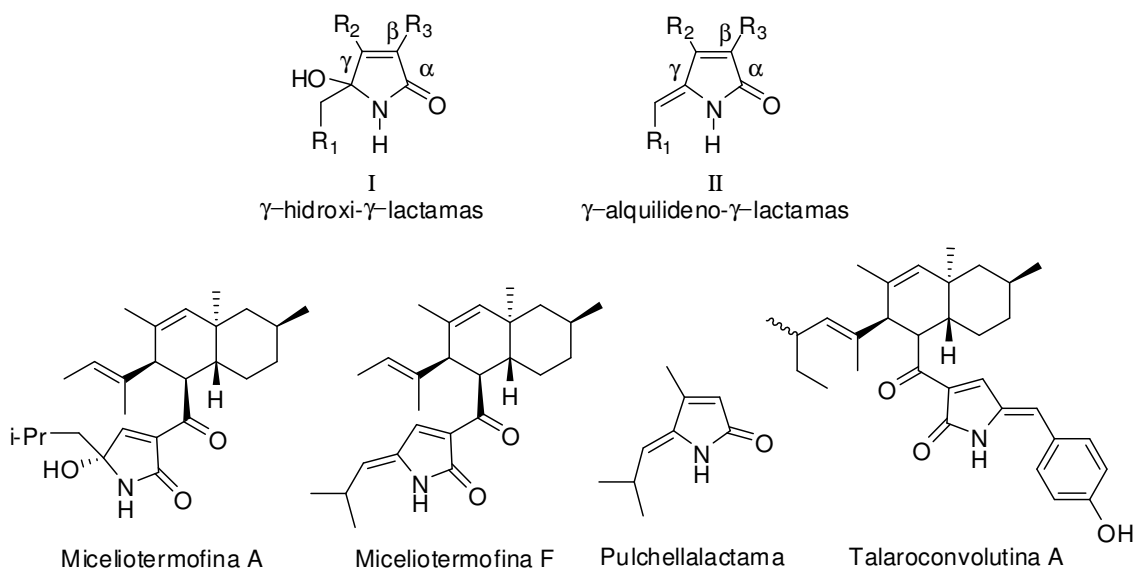
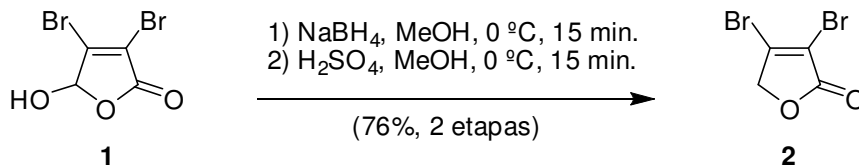


Figura 2 - Estruturas gerais das γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas e estruturas naturais específicas dessas classes de compostos.

1.2. Estudos sintéticos envolvendo γ -lactonas e γ -lactamas

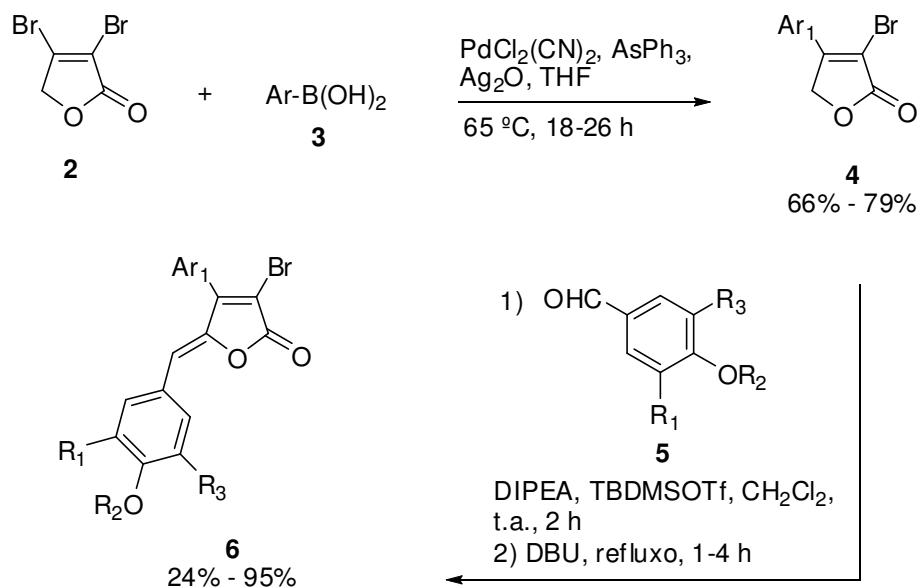
Diante das suas diversas propriedades biológicas, citadas no tópico 1.1, muitos esforços sintéticos têm sido realizados para a preparação de novas γ -lactonas. Em 2001, BELLINA descreveu uma rota para formação da γ -lactona dibromada 3,4-dibromofuran-2(5H)-ona (**2**) utilizando como material de partida o ácido mucobromico **1** (Esquema 1). A γ -lactona dibromada (**2**) foi sintetizada em duas etapas. A primeira envolveu a redução de **1** com boroidreto de sódio (NaBH_4) em metanol, e na segunda ocorreu uma lactonização catalisada por ácido sulfúrico, resultando em **2** com alto rendimento (76%). Em 2003, BELLINA e colaboradores

reportaram uma síntese similar usando ácido mucoclórico, obtendo uma γ -lactona diclorada como produto final.



Esquema 1 - Metodologia para síntese da γ -lactona **2**.

Nessa mesma linha de pesquisa, BELLINA *et al.* (2001) desenvolveu uma metodologia para obtenção de análogos aos rubrolídeos (**6**) a partir da γ -lactona **2** (Esquema 2).

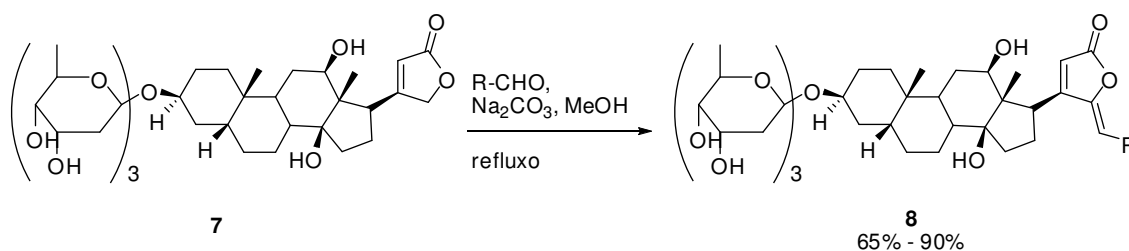


Esquema 2 - Metodologia para síntese dos análogos aos rubrolídeos **6**.

Nessa rota sintética, a γ -lactona **2** reage com diferentes ácidos fenilborônicos **3** substituídos através do acoplamento de Suzuki, formando a γ -lactona **4**. Posteriormente ocorre uma reação de alquilidação entre esta γ -lactona **4**, por meio de diversos aldeídos aromáticos substituídos **5**, resultando nos análogos aos rubrolídeos **6**.

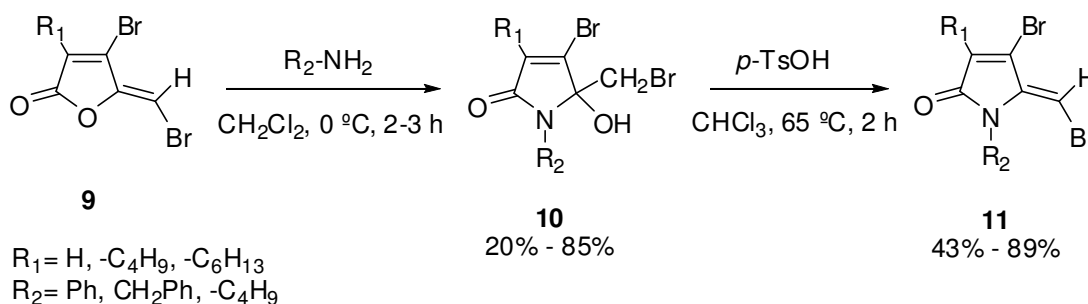
Outra metodologia que reporta a reação de alquilidação a partir de γ -

lactonas foi desenvolvida por XU e colaboradores (2007) utilizando reagentes de baixo custo, obtendo altos rendimentos (65%-90%) (Esquema 3). Assim, a γ -lactona **7**, na presença de carbonato de sódio (Na_2CO_3), reage com aldeídos formando os γ -alquilidenobutenolídeos **8**.



Esquema 3 - Metodologia para síntese de γ -alquilidenobutenolídeos **8**.

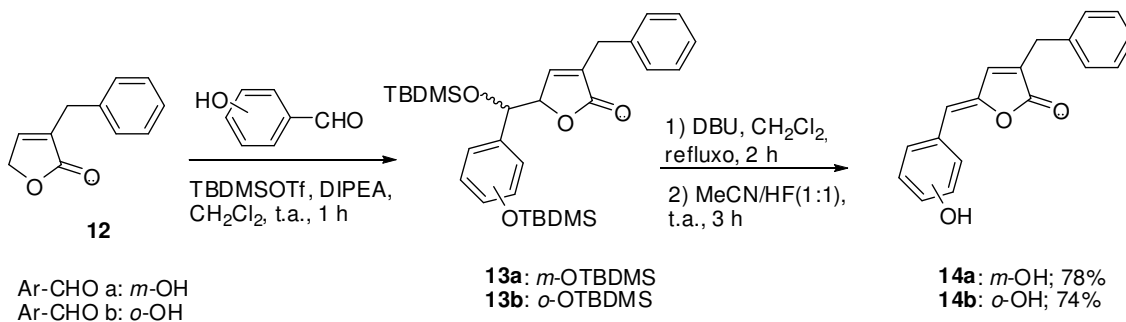
Em 2007, GOH e colaboradores reportaram a aminólise de γ -alquilidenobutenolídeos (Esquema 4). Nesse método, o fimbrolídeo **9** foi convertido na γ -hidroxi- γ -lactama **10** por meio da reação de lactamização em diclorometano a 0 °C, com excesso de aminas primárias, permitindo a troca do oxigênio da lactona pelo nitrogênio. Em seguida o composto **10** foi desidratado pelo ácido *p*-toluenossulfônico, resultando na formação das (*Z*)- γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas do tipo **11**.



Esquema 4 - Metodologia para síntese das γ -hidroxi- γ -lactamas (**10**) e γ -alquilideno- γ -lactamas (**11**).

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo trabalhos visando a síntese de algumas γ -lactonas e γ -lactamas. Em 2007, TEIXEIRA e colaboradores reportaram a síntese e a atividade citotóxica de análogos aos nostoclídeos (Ex. compostos **14a** e **14b**, Esquema 5) contra quatro linhagens celulares de câncer humano (HL-60, HCT-

8, MDA-MB-435, SF-295). Destes nostoclídeos, os mais ativos apresentam o grupo hidroxila em sua estrutura, sendo que o composto **14a** mostrou-se mais ativo contra SF-295 ($IC_{50} = 17,6 \mu\text{mol L}^{-1}$), e **14b** apresentou maior inibição contra HL-60 ($IC_{50} = 8,9 \mu\text{mol L}^{-1}$).

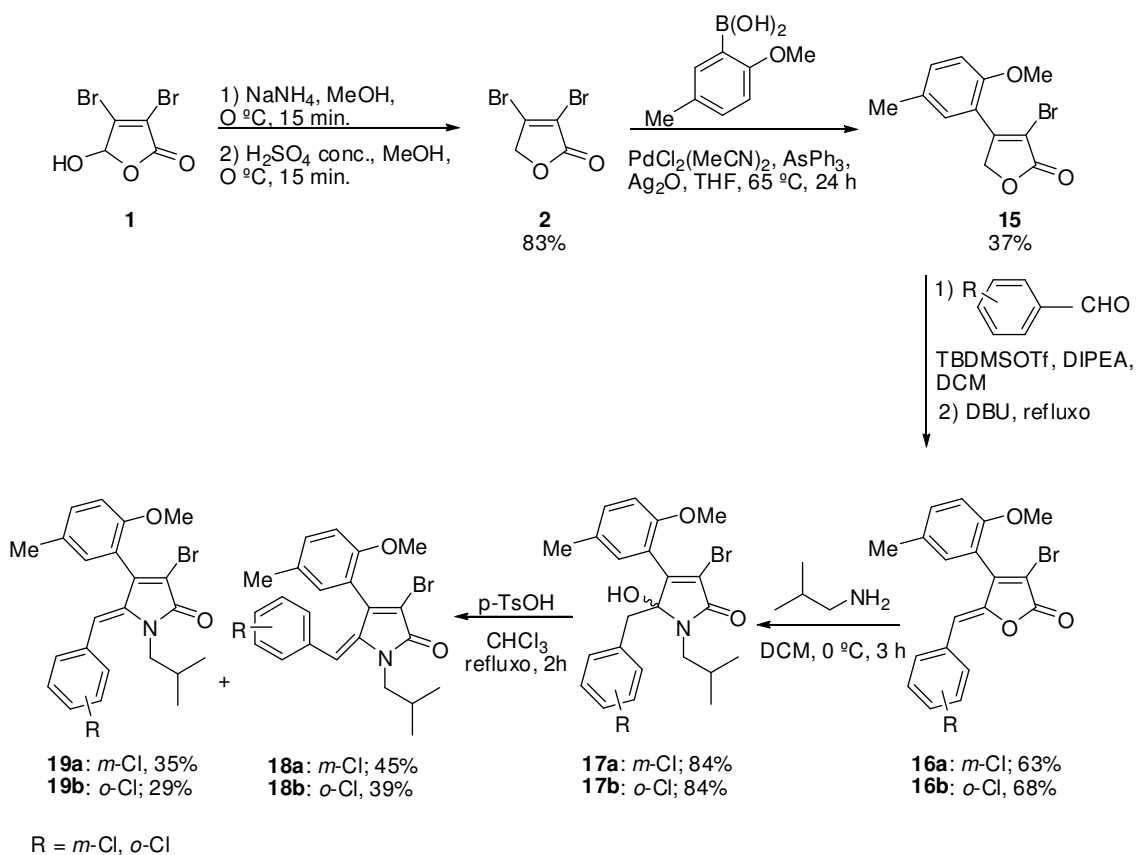


Esquema 5 - Inibidores de células de câncer humano.

Continuando o trabalho do nosso grupo de pesquisa, recentemente foi sintetizado e analisado o efeito de análogos aos rubrolídeos e γ -lactamas derivadas sobre a formação de biofilmes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* (Ex. compostos **16a**, **17b** e **19a**, Esquema 6, p. 8) (PEREIRA *et al.*, 2014a; PEREIRA *et al.*, 2014b). De forma geral, as lactamas foram mais ativas que os rubrolídeos. O rubrolídeo **16a**, apresentou valor de $IC_{50} = 1,51 \pm 0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *E. faecalis*. Já a γ -hidroxi- γ -lactama **17b**, inibiu a formação do biofilme de *E. faecalis* ($IC_{50} = 1,07 \pm 0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$). E a γ -alquilideno- γ -lactama **19a** foi ainda mais ativa, inibindo a formação do biofilme de *P. aeruginosa* em concentrações mais baixas ($IC_{50} = 0,6 \pm 0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados obtidos sugerem que os compostos atuam interferindo no mecanismo de comunicação entre as bactérias, conhecido como “quorum sensin (QS)”.

O QS capacita a bactéria patogênica a uma comunicação base célula-célula, visando regular a expressão genética e sincronizar processos vitais como formação de biofilme e secreção de fatores de virulência. Diferente de antibióticos, que obriga uma pressão seletiva de “vida ou morte” no patógeno alvo, os inibidores QS (terapia antivirulência) não matam o patógeno diretamente e sim, reduzem sua população pela interrupção da formação do biofilme. Sendo assim, é muito menos provável que

cause a seleção de biótipos resistentes (TANG e ZHANG, 2014).



Esquema 6 - Inibidores do QS.

Frente às atividades biológicas apresentadas pelos diversos produtos naturais contendo as unidades γ -alquilidenobutenolídeos, γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas, nossos esforços têm sido direcionados na descoberta de novos compostos que apresentem atividades significativas quanto a atividade citotóxica e inibitória da formação de biofilmes bacterianos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Generalidades metodológicas

Os solventes utilizados nas reações foram de grau P.A.

Os solventes hexano, éter dietílico, diclorometano e acetato de etila, usados nas colunas cromatográficas, não foram previamente destilados.

O metanol foi seco sob refluxo utilizando a mistura de 50 mL de metanol, 2,5 g de magnésio em pó, 0,25 g de iodo molecular até seu descoramento, aproximadamente 1 h. Posteriormente foram adicionados 250 mL de metanol, mantendo o refluxo por mais 2 h, quando o solvente foi destilado e armazenado sobre peneira molecular de 4 Å, em um recipiente fechado sob atmosfera de nitrogênio (PERRIN e ARMAREGO, 1998).

O diclorometano foi seco sob refluxo com hidreto de cálcio por três horas seguido de destilação, armazenado sobre peneira molecular de 4Å em recipiente fechado e sob atmosfera de nitrogênio (PERRIN e ARMAREGO, 1998).

A diisopropiletilamina (DIPEA) foi refluxada sobre lentilhas de hidróxido de potássio por duas horas e destilada, sendo armazenada sobre hidróxido de potássio (PERRIN e ARMAREGO, 1998).

O clorofórmio foi seco sob refluxo durante cinco horas utilizando a mistura de 500 mL de clorofórmio e 3 g de carbonato de potássio previamente seco em mufla por cinco horas a 300 °C. Em seguida destilou-se o clorofórmio anidro, que foi armazenado sobre peneira molecular de 4 Å em um frasco de vidro âmbar vedado sob atmosfera de nitrogênio (PERRIN e ARMAREGO, 1998).

Os aldeídos, aminas e os ácidos foram adquiridos comercialmente (Aldrich, Milwaukee, WI, USA), o mesmo ocorrendo para as substâncias 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) e trifluorometanossulfonato de *tert*-butildimetilsilila (TBDMSOTf). Estes compostos foram utilizados sem qualquer purificação prévia.

Foram utilizadas placas de sílica gel disponíveis comercialmente, com 0,25 mm de espessura, para cromatografia em camada delgada analítica (CCD) (sílica-gel 60 G-F254 contendo indicador de fluorescência).

As placas de CCD foram reveladas com solução aquosa de permanganato de potássio, após visualização em câmara de luz ultravioleta.

Os espectros no infravermelho foram obtidos por meio de um detector de reflectância difusa acentuada (PIKE GLADATR), em espectrofotômetro FT-IR-VARIAN 660 (Departamento de Química-UFV).

Os espectros de massas foram obtidos em um equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-PQ5050A do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química da UFV.

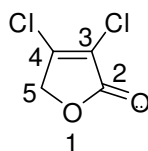
Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 300 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 75 MHz) foram obtidos em espectrômetro VARIAN MERCURY 300 do Departamento de Química - UFV. Utilizou-se como solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3), acetona deuterada ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) e dimetilsulfóxido deuterado ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$). As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho de ponto de fusão MQAPF-301 da Microquímica Ind. e Com. Ltda após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel e/ou por recristalização empregando-se os devidos eluentes e solventes para cada composto. As temperaturas registradas não foram corrigidas.

2.2. Procedimentos sintéticos

A síntese dos compostos **20-29** seguiram a metodologia descrita por BELLINA *et al.*, (2001), enquanto a síntese dos compostos **30-35** seguiram a metodologia descrita por GOH *et al.*, (2007).

2.2.1. Síntese da γ -lactona 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona (20)



20

A um balão bitubulado de 100 mL, adicionaram-se ácido mucoclórico (4,00 g; 23,68 mmol) e 24 mL de metanol anidro. O sistema foi resfriado a 0 °C, quando foi adicionado boroidreto de sódio (NaBH₄) (0,99 g; 26,07 mmol) em pequenas porções. A mistura resultante foi mantida sob agitação por 15 minutos a 0 °C. Uma solução de ácido sulfúrico (2,32 g; 23,68 mmol) em metanol anidro (8 mL), resfriada a 0 °C, foi adicionada à mistura resultante, que foi mantida sob agitação por 15 minutos. Decorrido esse período, adicionou-se 20 mL de éter dietílico à mistura para facilitar a transferência da mistura reacional para um funil de separação. Acrescentou-se éter dietílico (180 mL) ao funil de separação e a solução resultante foi lavada com solução saturada de NaCl (4 x 30 mL). As fases foram separadas e a fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona (**20**) foi purificado por recristalização utilizando a mistura hexano-éter dietílico 50:1 v/v e foi obtido como um sólido branco, com rendimento de 88% (3,20 g; 20,81 mmol).

Característica: sólido branco.

T_f = 48,3-49,7 °C. [(**T_f** literatura: 49-50 °C); BELLINA *et al.*, 2003].

CCD: R_f = 0,52 (hexano-DCM 3:2 v/v).

IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 2980, 2944, 1765, 1631, 1441, 1347, 1237, 1164, 1122, 1032, 1011, 915, 886, 748, 722, 597, 488.

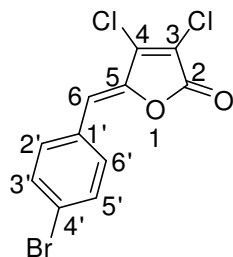
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (J/Hz): 4,87 (s, 2H, H-5).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (J/Hz): 70,7 (C-5); 121,2 (C-3); 148,7 (C-4); 165,6 (C-2).

EM, m/z (%): 156 ([M+4]⁺⁺, 5); 154 ([M+2]⁺⁺, 24); 152 (C₄H₂Cl₂O₂, [M]⁺⁺, 40); 125 (69); 123 (100); 117 (55); 87 (33); 73 (62); 61 (31); 60 (31); 59 (16); 53 (17); 37 (59).

2.2.2. Síntese das γ -alquilideno- γ -lactonas 21-29

Exemplo para o composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(4-bromobenzilideno)furan-2(5H)-ona (21)

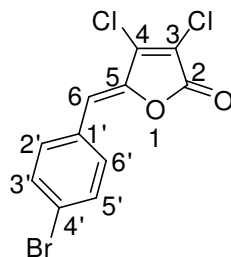


21

A um balão bitubulado de fundo redondo (50 mL), sob atmosfera de nitrogênio, adicionaram-se a 3,4-diclorofuran-2(5*H*)-ona (**20**) (0,66 g; 4,32 mmol), 18 mL de DCM anidro, TBDMSOTf (1,39 mL; 6,04 mmol), DIPEA (1,51 mL; 8,63 mmol) e 4-bromobenzaldeído (1,12 g; 6,04 mmol). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente por 1 h. Após este período, submeteu-se o sistema a refluxo e adicionou-se DBU (1,29 mL; 8,63 mmol) mantendo-se o refluxo por três horas. Na sequência, adicionou-se 20 mL de DCM a mistura para facilitar a transferência da mistura reacional para um funil de separação. Acrescentou-se DCM (80 mL) ao funil de separação e a fase orgânica resultante foi lavada com solução aquosa de HCl 3 mol L⁻¹ (2 x 40 mL) e solução saturada de NaCl (2 x 40 mL). Em seguida, a fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida, resultando em um óleo marrom que foi fracionado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-DCM 2:1 v/v. O composto desejado foi recristalizado, empregando-se como solvente uma mistura de hexano-DCM 50:1 v/v, resultando na obtenção de 0,23 g (0,70 mmol) do composto **21**, com 16% de rendimento.

Os compostos **22-29** foram preparados utilizando-se procedimento experimental similar ao descrito para a síntese do composto **21**.

2.2.2.1. Dados do composto (5*Z*)-3,4-dicloro-5-(4-bromobenzilideno)furan-2(5*H*)-ona (**21**)



21

O composto **21** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-DCM 2:1 v/v e recristalizado com hexano-DCM 50:1 v/v. Obteve-se 0,23 g (0,70 mmol) do composto **21**, com 16% de rendimento.

Característica: sólido amarelo.

$T_f = 124,2-125,8$ °C.

CCD: $R_f = 0,45$ (hexano-DCM 2:1 v/v).

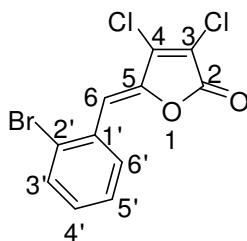
IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3046, 1774, 1648, 1586, 1573, 1487, 1407, 1312, 1224, 1183, 1073, 998, 981, 877, 838, 812, 740, 526.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 6,33 (s, 1H, H-6); 7,54 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 8,7$; H-3'/H-5'); 7,64 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 8,7$; H-2'/H-6').

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 111,3 (C-6); 119,8 (C-3); 124,7 (C-4'); 130,4 (C-1'); 132,3 (C-2'/C-3'/C-5'/C-6'); 142,6 (C-5); 143,6 (C-4); 161,9 (C-2).

EM, m/z (%): 324 ($[\text{M}+6]^{+}$, 6); 322 ($[\text{M}+4]^{+}$, 42); 320 ($[\text{M}+2]^{+}$, 91); 318 ($\text{C}_{11}\text{H}_5\text{Cl}_2\text{O}_2\text{Br}$, $[\text{M}]^{+}$, 57); 183 (27); 89 (100); 63 (39); 39 (28).

2.2.2.2. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(2-bromobenzilideno)furan-2(5H)-ona (22)



22

O composto **22** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura

de solvente hexano-DCM 3:1 v/v e recristalizado com hexano-DCM 50:1 v/v. Obteve-se 0,16 g (0,50 mmol) do composto **22**, com 27% de rendimento.

Característica: sólido amarelo.

$T_f = 126,5-128,1$ °C.

CCD: $R_f = 0,5$ (hexano-acetato de etila 10:1 v/v)

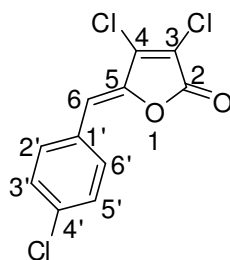
IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{max}$: 3057, 1779, 1644, 1574, 1461, 1432, 1222, 1189, 979, 750.

RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ (J/Hz): 6,88 (s, 1H, H-6); 7,23 (t, 1H, $J_{5',4'} = J_{5',6'} = 7,8$; H-5'); 7,38 (t, 1H, $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 7,8$; H-4'); 7,64 (d, 1H, $J_{6',5'} = 7,8$; H-6'); 8,12 (d, 1H, $J_{3',4'} = 7,8$; H-3').

RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ (J/Hz): 110,5 (C-6); 120,0 (C-3); 125,6 (C-2'); 127,8 (C-4'); 130,9 (C-5'); 131,0 (C-1'); 131,9 (C-3'); 133,1 (C-6'); 142,8 (C-5); 144,0 (C-4); 161,7 (C-2).

EM, m/z (%): 324 ($[M+6]^{++}$, 3); 322 ($[M+4]^{++}$, 18); 320 ($[M+2]^{++}$, 42); 318 ($C_{11}H_5Cl_2BrO_2$, $[M]^{++}$, 24); 241 (37); 239 (57); 198 (16); 196 (15); 183 (21); 176 (19); 113 (17); 87 (17); 63 (48); 62 (23); 39 (21).

2.2.2.3. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(4-clorobenzilideno)furan-2(5H)-ona (**23**)



23

O composto **23** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-DCM 3:1 v/v e recristalizado com hexano-DCM 50:1 v/v. Obteve-se 0,27 g (0,98 mmol) do composto **23**, com 23% de rendimento.

Característica: sólido amarelo.

$T_f = 129,9-131,1$ °C.

CCD: $R_f = 0,33$ (hexano-DCM 3:1 v/v).

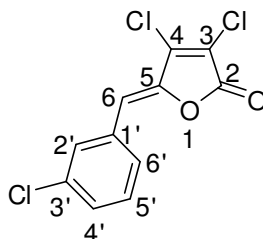
IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3068, 1775, 1649, 1590, 1577, 1484, 1408, 1225, 1088, 1013, 997, 982, 873, 837, 740, 604, 529.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 6,39 (s, 1H, H-6); 7,39 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 8,7$; H-3'/H-5'); 7,71 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 8,7$; H-2'/H-6').

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 111,3 (C-6); 119,7 (C-3); 129,3 (C-3'/C-5'); 129,9 (C-1'); 132,1 (C-2'/C-6'); 136,2 (C-4'); 142,6 (C-5); 143,5 (C-4); 161,9 (C-2).

EM, m/z (%): 278 ($[\text{M}+4]^+$, 15); 276 ($[\text{M}+2]^+$, 58); 274 ($\text{C}_{11}\text{H}_5\text{Cl}_3\text{O}_2$, $[\text{M}]^+$, 45); 239 (11); 185 (18); 183 (32); 152 (52); 124 (38); 89 (100); 87 (19); 63 (44); 39 (23).

2.2.2.4. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(3-clorobenzilideno)furan-2(5H)-ona (**24**)



24

O composto **24** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-DCM 3:1 v/v e recristalizado com hexano-DCM 50:1 v/v. Obteve-se 0,17 g (0,63 mmol) do composto **24**, com 32% de rendimento.

Característica: sólido amarelo.

T_f = 136,2-137,4 °C.

CCD: R_f = 0,84 (hexano-DCM 3:1 v/v).

IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3066, 1767, 1649, 1567, 1473, 1431, 1230, 1189, 982, 886, 778, 727, 678.

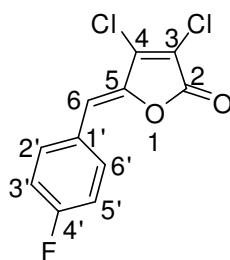
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 6,32 (s, 1H, H-6); 7,36-7,34 (m, 2H, H-4'/H-6'); 7,66-7,63 (m, 1H, H-5'); 7,76 (s, 1H, H-2').

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 111,0 (C-6); 120,3 (C-3); 129,1 (C-6'); 130,1 (C-5'); 130,3 (C-4'); 130,6 (C-2'); 133,2 (C-1')*; 135,1 (C-3')*; 142,7 (C-5); 144,0 (C-4); 161,9 (C-2).

* As atribuições podem estar invertidas.

EM, m/z (%): 280 ($[M+6]^{++}$, 2); 278 ($[M+4]^{++}$, 19); 276 ($[M+2]^{++}$, 63); 274 ($C_{11}H_5Cl_3O_2$, $[M]^{++}$, 43); 239 (27); 185 (31); 183 (51); 152 (54); 124 (35); 89 (100); 87 (22); 63 (46); 39 (17).

2.2.2.5. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(4-fluorobenzilideno)furan-2(5H)-ona (25)



25

O composto **25** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-DCM 3:1 v/v e recristalizado com hexano-DCM 50:1 v/v. Obteve-se 0,30 g (1,16 mmol) do composto **25**, com 25% de rendimento.

Característica: sólido branco.

T_f = 157,5-158,8 °C.

CCD: R_f = 0,32 (hexano-DCM 3:1 v/v).

IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{max}$: 3062, 1760, 1652, 1571, 1509, 1231, 1184, 1162, 1009, 982, 896, 821, 741, 530.

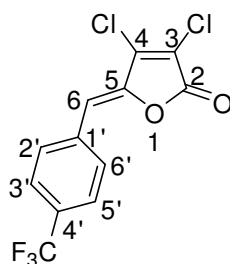
RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ (J/Hz): 6,37 (s, 1H, H-6); 7,12 ($t_{comp.}$, 2H, $J_{3',2'} = J_{3',F} = J_{5',6'} = J_{5',F} = 8,7$; H-3'/H-5'); 7,75-7,83 (m, 2H, H-2'/H-6').

RMN de ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ (J/Hz): 111,2 (C-6); 116,1 (d, $J_{C-F} = 21,8$; C-3'/C-5'); 119,3 (C-3); 128,7 (d, $J_{C-F} = 3,0$; C-1'); 132,9 (d, $J_{C-F} = 9,0$; C-2'/C-6'); 142,5 (C-5); 142,8 (C-4); 161,7 (C-2); 163,5 (d, $J_{C,F} = 233,3$; C-4').

EM, m/z (%): 262 ($[M+4]^{++}$, 8); 260 ($[M+2]^{++}$, 49); 258 ($C_{11}H_5Cl_2O_2F$, $[M]^{++}$, 76); 169 (17); 167 (54); 136 (68); 108 (100); 107 (57); 87 (17); 57 (22).

2.2.2.6. Dados do composto

(5Z)-3,4-dicloro-5-(4-trifluorometilbenzilideno)furan-2(5H)-ona (26)



26

O composto **26** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-DCM 2:1 v/v e recristalizado com hexano-DCM 50:1 v/v. Obteve-se 0,04 g (0,13 mmol) do composto **26**, com 10% de rendimento.

Característica: sólido verde.

T_f = 101,9-103,2 °C.

CCD: R_f = 0,4 (hexano-DCM 2:1 v/v).

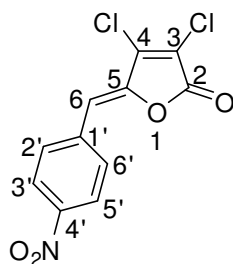
IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3077, 1791, 1576, 1417, 1322, 1223, 1159, 1098, 1063, 872, 821, 741, 592.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (J/Hz): 6,42 (s, 1H, H-6); 7,67 (d, 2H; $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 8,2$; H-3'/H-5'); 7,89 (d, 2H; $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 8,2$; H-2'/H-6').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (J/Hz): 110,7 (C-6); 120,9 (C-3); 124,0 (q, $J_{CF_3} = 271$; CF₃); 126,1 (q, $J_{C-F} = 3,8$; C-3'/C-5'); 131,2 (C-2'/C-6'); 132,1 (q, $J_{C-F} = 32,3$; C-4'); 135,0 (C-1'); 142,8 (C-5); 144,9 (C-4); 161,9 (C-2).

EM, m/z (%): 312 ([M+4]⁺, 10); 310 ([M+2]⁺, 67); 308 (C₁₂H₅Cl₂O₂F₃, [M]⁺, 60); 273 (13); 245 (25); 219 (18); 217 (55); 186 (85); 158 (100); 108 (18); 89 (30); 87 (28); 63 (26); 39 (15).

2.2.2.7. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(4-nitrobenzilideno)furan-2(5H)-ona (27)



27

O composto **27** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-DCM 3:1 v/v e recristalizado com hexano-DCM 50:1 v/v. Obteve-se 0,11 g (0,40 mmol) do composto **27**, com 10% de rendimento.

Característica: sólido amarelo.

T_f = 184,2-185,8 °C.

CCD: R_f = 0,28 (hexano-DCM 3:1 v/v).

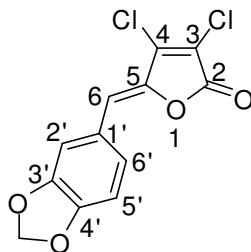
IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3108, 3051, 1797, 1649, 1577, 1508, 1337, 1222, 1187, 1110, 980, 875, 826, 687.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (J/Hz): 6,45 (s, 1H, H-6); 7,90 (d_{comp.}, 2H, $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 9,0$; H-3'/H-5'); 8,27 (d_{comp.}, 2H, $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 9,0$; H-2'/H-6').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (J/Hz): 109,2 (C-6); 121,3 (C-3); 123,9 (C-2'/C-6'); 131,2 (C-3'/C-5'); 137,3 (C-1'); 142,4 (C-5); 145,3 (C-4/C-4'); 161,2 (C-2).

EM, m/z (%): 289 ([M+4]⁺, 11); 287 ([M+2]⁺, 66); 285 (C₁₁H₅Cl₂NO₃, [M]⁺, 100); 257 (33); 255 (55); 183 (23); 176 (53); 133 (76); 113 (23); 87 (27); 63 (64); 62 (24); 51 (23); 50 (19); 39 (37); 30 (21).

2.2.2.8. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(3,4-metilenodioxibenzilideno)furan-2(5H)-ona (28)



28

O composto **28** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-DCM 1:1 v/v e recristalizado com hexano-DCM 50:1 v/v. Obteve-se 0,16 g (0,57 mmol) do composto **28**, com 58% de rendimento.

Característica: sólido amarelo.

T_f = 158,7-160,0 °C.

CCD: R_f = 0,32 (hexano-DCM 1:1 v/v).

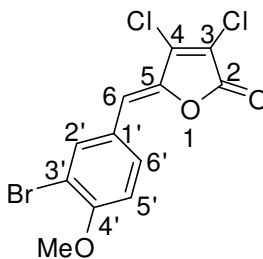
IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 3074, 3012, 2906, 1762, 1649, 1567, 1493, 1451, 1251, 1103, 1013, 980, 889, 801, 739, 715, 611.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (J/Hz): 6,03 (s, 2H, -O-CH₂-O-); 6,30 (s, 1H, H-6); 6,84 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8,1$; H-5'); 7,19 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8,1$; $J_{6',2'} = 1,6$; H-6'); 7,42 (d, 1H; $J_{2',6'} = 1,6$; H-2').

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (J/Hz): 101,7 (-O-CH₂-O-); 108,8 (C-5'); 110,1 (C-2'); 112,8 (C-6); 118,3, (C-3); 125,9 (C-1'); 127,2 (C-6'); 141,9 (C-5); 142,5 (C-4); 148,5 (C-4'); 149,5 (C-3'); 162,3 (C-2).

EM, m/z (%): 288 ([M+4]⁺⁺, 1); 286 ([M+2]⁺⁺, 33); 284 (C₁₂H₆Cl₂O₄, [M]⁺⁺, 65); 207 (19); 193 (52); 162 (30); 134 (53); 76 (100); 51 (15); 50 (92); 38 (23).

2.2.2.9. Dados do composto (5Z)-3,4-dicloro-5-(3-bromo-4-metoxibenzilideno)furan-2(5H)-ona (29)



29

O composto **29** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-DCM 2:1 v/v e recristalizado com hexano-DCM 50:1 v/v. Obteve-se 0,065 g (0,19 mmol) do composto **29**, com 17% de rendimento.

Característica: sólido amarelo.

$T_f = 207,9-209,3$ °C.

CCD: $R_f = 0,25$ (hexano-DCM 2:1 v/v).

IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3061, 2985, 2950, 1763, 1648, 1591, 1563, 1497, 1453, 1283, 1181, 1051, 1003, 984, 900, 813, 739, 583.

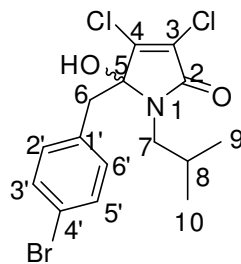
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 3,95 (s, 3H, $-\text{O}-\text{CH}_3$); 6,29 (s, 1H, H-6), 6,93 (d, 1H, $J_{5',6'} = 8,7$; H-5'); 7,76 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8,7$; $J_{6',2'} = 2,1$; H-6'); 7,97 (d, 1H, $J_{2',6'} = 2,1$; H-2').

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 56,6 ($-\text{O}-\text{CH}_3$); 111,1 (C-6); 111,9 (C-5'); 112,4 (C-3'); 125,6 (C-3); 131,7 (C-2'); 135,7 (C-1'/C-6'); 142,5 (C-4/C-5); 157,2 (C-2/C-4').

EM, m/z (%): 354 ($[\text{M}+6]^+$, 1); 352 ($[\text{M}+4]^+$, 34); 350 ($[\text{M}+2]^+$, 85); 348 ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{O}_3\text{Br}$, $[\text{M}]^+$, 48); 335 (42); 226 (14); 213 (40); 135 (28); 119 (91); 89 (80); 87 (53); 76 (91); 75 (69); 63 (53); 62 (32); 51 (37); 50 (100); 38 (40); 36 (62).

2.2.3. Síntese das γ -hidroxi- γ -lactamas 30-33

Exemplo para o composto 3,4-dicloro-5-(4-bromobenzil)-5-hidroxi-1-isobutilpirrol-2(5H)-ona (30)

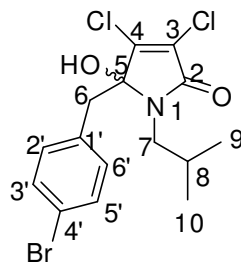


30

A um balão bitubulado de 25 mL, sob atmosfera de nitrogênio, foi adicionada a γ -alquilideno- γ -lactona **21** (0,31 g; 0,98 mmol) dissolvido em DCM anidro (5 mL) e a solução foi resfriada a 0 °C. Posteriormente, adicionou-se isobutilamina (0,36 g; 0,50 mL; 4,88 mmol) solubilizada em DCM (5 mL) gota à gota à solução por 15 min., e a mistura reacional foi mantida a 0 °C por 3 h. Na sequência, adicionou-se 20 mL de DCM à mistura para facilitar a transferência da mistura reacional para um funil de separação. Acrescentou-se DCM (80 mL) ao funil de separação e a fase orgânica resultante foi lavada com solução aquosa de HCl 2 mol L⁻¹ (2 x 30 mL), seguida de solução saturada de NaHCO₃ (2 x 30 mL) e de solução saturada de NaCl (2 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material foi fracionado em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solventes hexano-acetato de etila 3:1 v/v. Esse procedimento resultou na obtenção de 0,27 g (0,68 mmol) do composto **30**, com 70% de rendimento.

Os compostos **31-33** foram preparados utilizando-se procedimento experimental similar ao descrito para a síntese do composto **30**.

2.2.3.1. Dados do composto 3,4-dicloro-5-(4-bromobenzil)-5-hidroxi-1-isobutilpirrol-2(5H)-ona (**30**)



30

O composto **30** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-acetato de etila 3:1 v/v. Obteve-se 0,27 g (0,68 mmol) do composto **30**, com 70% de rendimento.

Característica: sólido branco.

$T_f = 216,3-218,1$ °C.

CCD: $R_f = 0,41$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3306, 2969, 2870, 1695, 1488, 1403, 1801, 1173, 1042, 845, 721.

RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ (J/Hz): 0,89 (d, 3H, $J_{9,8} = 6,6$; H-9)*; 0,93 (d, 3H, $J_{10,8} = 6,6$; H-10)*; 2,16-2,30 (m, 1H, H-8); 3,23 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 14,1$; H-6a); 6,61 (dd, 1H; $J_{7a,7b} = 14,1$; $J_{7a,8} = 6,6$; H-7a); 3,44 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 14,1$; H-6b); 3,46 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 14,1$; $J_{7b,8} = 8,4$; H-7b); 6,18 (s, 1H, -OH); 7,10 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 8,5$; H-3'/H-5'); 7,44 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 8,5$; H-2'/H-6').

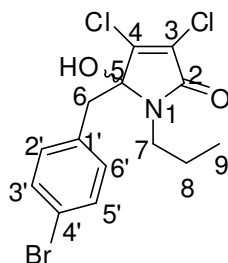
* As atribuições podem estar invertidas.

RMN de ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ (J/Hz): 20,1 (C-9)*; 20,2 (C-10)*; 28,3 (C-8); 39,6 (C-7); 48,1 (C-6); 91,9 (C-5); 121,1 (C-1'); 126,1 (C-3); 131,5 (C-2'/C-6'); 131,8 (C-3'/C-5'); 133,4 (C-4'); 145,0 (C-4); 161,6 (C-2).

* As atribuições podem estar invertidas.

EM, m/z (%): 224 (48); 222 (71); 172 (27); 170 (34); 168 (44); 166 (63); 90 (25); 89 (27); 57 (100); 41 (41).

2.2.3.2. Dados do composto 3,4-dicloro-5-(4-bromobenzil)-5-hidroxi-1-propilpirrol-2(5H)-ona (31)



31

O composto **31** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-acetato de etila 2:1 v/v. Obteve-se 0,17 g (0,44 mmol) do composto **31**, com 61% de rendimento.

Característica: sólido branco.

$T_f = 213,3-215,1$ °C.

CCD: $R_f = 0,45$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

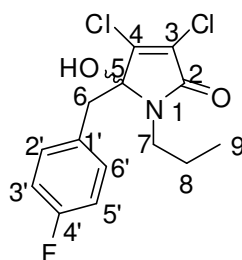
IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3310, 2967, 2931, 2874, 1699, 1684, 1629, 1488, 1422, 1405, 847.

RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ (J/Hz): 0,92 (t, 3H, $J_{9,8} = 7,5$; H-9); 1,66-1,79 (m, 2H, H-8); 3,23 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 14,4$; H-6a); 3,41 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 14,4$; H-6b), 3,41 (ddd, 1H, $J_{7a,7b} = 13,9$, $J_{7a,8a} = 9,1$, $J_{7a,8b} = 6,7$; H-7a); 3,55 (ddd, 1H, $J_{7b,7a} = 13,9$, $J_{7b,8b} = 9,1$, $J_{7b,8a} = 6,7$; H-7b); 6,03 (s, 1H, -OH); 7,11 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 8,4$; H-3'/H-5'); 7,45 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 8,4$; H-2'/H-6').

RMN de ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ (J/Hz): 11,2 (C-9); 22,4 (C-8); 39,5 (C-7); 42,4 (C-6); 91,8 (C-5); 121,1 (C-3); 126,1 (C-1'); 131,4 (C-2'/C-6'); 131,8 (C-3'/C-5'); 133,5 (C-4'); 145,1 (C-4); 161,3 (C-2).

EM, m/z (%): 210 (64); 208 (100); 172 (40); 171 (20); 170 (51); 169 (22); 168 (57); 166 (90); 90 (29); 89 (27); 43 (41).

2.2.3.3. Dados do composto **3,4-dicloro-5-(4-fluorobenzil)-5-hidroxi-1-propilpirrol-2(5H)-ona (32)**



32

O composto **32** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-acetato de etila 2:1 v/v. Obteve-se 0,43 g (1,35 mmol) do composto **32**, com 83% de rendimento.

Característica: sólido branco.

$T_f = 217,5-219,1$ °C.

CCD: $R_f = 0,40$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

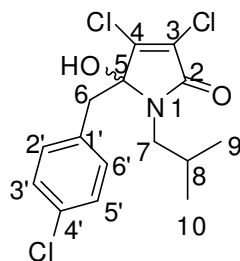
IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3290, 2940, 2878, 1685, 1631, 1511, 1415, 1220, 1041, 849, 658.

RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ (J/Hz): 0,92 (t, 3H, $J_{9,8} = 7,2$; H-9); 1,66-1,80 (m, 2H, H-8); 3,23 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 14,1$; H-6a); 3,41 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 14,1$; H-6b); 3,41 (ddd, 1H, $J_{7a,7b} = 13,9$, $J_{7a,8a} = 9,2$, $J_{7a,8b} = 6,6$; H-7a); 3,56 (ddd, 1H, $J_{7b,7a} = 13,9$, $J_{7b,8b} = 9,2$, $J_{7b,8a} = 6,6$; H-7b); 6,00 (s, 1H, -OH); 7,02 ($t_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{3',2'} = J_{3',F} = J_{5',6'} = J_{5',F} = 8,9$; H-3'/H-5'); 7,14-7,21 (m, 2H, H-2'/H-6').

RMN de ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ (J/Hz): 11,2 (C-9); 22,5 (C-8); 39,3 (C-7); 42,4 (C-6); 92,0 (C-5); 115,1 (d, $J_{\text{C-F}} = 21,2$; C-3'/C-5'); 126,1 (C-3); 130,2 (d, $J_{\text{C-F}} = 3,5$; C-1'); 131,6 (d, $J_{\text{C-F}} = 8,1$; C-2'/C-6'); 145,1 (C-4); 160,6 (C-2); 162,6 (d, $J_{\text{C-F}} = 186,5$; C-4').

EM, m/z (%): 210 (61); 208 (91); 168 (68); 166 (96); 148 (21); 110 (93); 109 (100); 87 (20); 83 (37); 43 (44); 41 (36).

2.2.3.4. Dados do composto 3,4-dicloro-5-(4-clorobenzil)-5-hidroxi-1-isobutilpirrol-2(5H)-ona (**33**)



33

O composto **33** foi isolado em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-acetato de etila 3:1 v/v. Obteve-se 0,046 g (0,13 mmol) do composto **33**, com 72% de rendimento.

Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,45$ (hexano-acetato de etila 4:1 v/v).

IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3310, 2968, 2872, 1699, 1632, 1497, 1401, 1306, 1179, 1087, 1047, 845, 658.

RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ (J/Hz): 0,82 (d, 3H, $J_{9,8} = 6,6$; H-9)*; 0,86 (d, 3H, $J_{10,8} = 6,6$; H-10)*; 2,00-2,13 (m, 1H, H-8); 3,06 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 14,1$; H-6a); 3,17-3,31 (m, 2H; H-7a/H-7b); 3,35 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 14,1$; H-6b); 7,04 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 8,4$; H-3'/H-5'); 7,29 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 8,4$; H-2'/H-6').

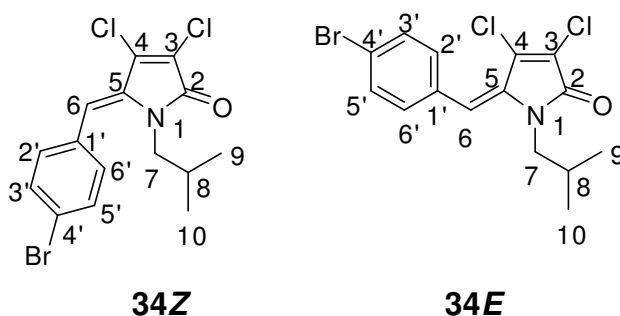
* As atribuições podem estar invertidas.

RMN de ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ (J/Hz): 18,2 (C-9/C-10); 28,5 (C-8); 39,7 (C-7); 48,1 (C-6); 92,2 (C-5); 125,4 (C-3); 128,8 (C-2'/C-6'); 131,8 (C-3'/C-5'); 132,6 (C-1'); 133,3 (C-4'); 145,8 (C-4); 161,8 (C-2).

EM, m/z (%): 224 (51); 222 (77); 168 (46); 166 (73); 128 (21); 126 (66); 125 (41); 89 (22); 57 (100); 41 (58).

2.2.4. Síntese das γ -alquilideno- γ -lactamas 34-35

Exemplo para os compostos isômeros (5Z)-3,4-dicloro-5-(4-bromobenzilideno)-1-isobutilpirrol-2(5H)-ona (34Z) e (5E)-3,4-dicloro-5-(4-bromobenzilideno)-1-isobutilpirrol-2(5H)-ona (34E)



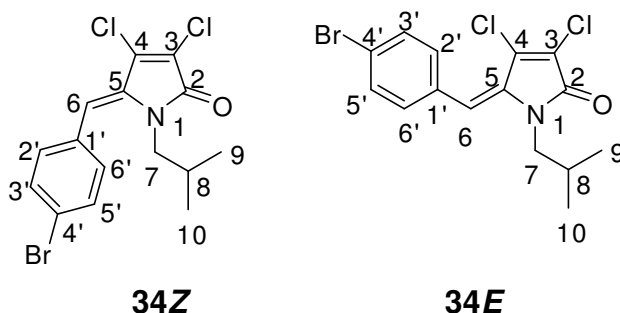
A um balão de fundo redondo bitubulado (25 mL), sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados a lactama **30** (0,10 g; 0,25 mmol) e o ácido *p*-toluenossulfônico (0,024 g; 0,13 mmol) dissolvendo-os em 7 mL de clorofórmio (CHCl_3). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e refluxo a 65 °C por 2 h. Após esse período percebeu-se o completo consumo da lactama **30**. A mistura reacional foi transferida para um funil de separação empregando-se 50 mL de clorofórmio. A fase orgânica resultante foi lavada com solução aquosa saturada de NaHCO_3 (3 x 15 mL) e de solução aquosa saturada de NaCl (3 x 15 mL). A fase

orgânica foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material foi fracionado em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solventes hexano-acetato de etila 6:1 v/v resultando na obtenção dos estereoisômeros:

Composto **34Z** (0,054 g; 0,14 mmol), com 56% de rendimento e composto **34E** (0,034 g; 0,091 mmol), com 36% de rendimento.

O composto **35** foi preparado utilizando-se procedimento experimental similar ao descrito para a síntese do composto **34**.

2.2.4.1. Dados dos compostos (5Z)-3,4-dicloro-5-(4-bromobenzilideno)-1-isobutilpirrol-2(5H)-ona (**34Z**) e (5E)-3,4-dicloro-5-(4-bromobenzilideno)-1-isobutilpirrol-2(5H)-ona (**34E**)



Os compostos **34Z** e **34E** foram fracionados em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-acetato de etila 6:1 v/v. Obteve-se:

Composto **34Z** (0,054 g; 0,14 mmol), com 56% de rendimento;

Composto **34E** (0,034 g; 0,091 mmol), com 36% de rendimento.

Dados do composto **34Z**

Característica: sólido amarelo.

T_f = 95,5-97,1 °C.

CCD: R_f = 0,65 (hexano-acetato de etila 6:1 v/v).

IV (ATR, cm⁻¹) $\bar{\nu}_{\max}$: 2957, 2921, 2851, 1714, 1638, 1592, 1457, 1250, 1064, 736.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (J/Hz): 0,50 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,9$; H-9/H-10); 1,28-1,41 (m, 1H, H-8); 3,41 (d, 2H, $J_{7,8} = 7,5$; H-7); 6,59 (s, 1H, H-6); 7,17 (d_{comp.}, 2H, $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 8,4$; H-3'/H-5'); 7,55 (d_{comp.}, 2H, $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 8,4$; H-2'/H-6').

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 19,4 (C-9/C-10); 27,6 (C-8); 49,1 (C-7); 112,5 (C-6); 122,7 (C-1'); 123,6 (C-3); 131,0 (C-3'/C-5'); 131,5 (C-2'/C-6'); 132,3 (C-4'); 134,8 (C-5); 137,0 (C-4); 164,4 (C-2).

EM, m/z (%): 379 ($[\text{M}+6]^+$, 3); 377 ($[\text{M}+4]^+$, 20); 375 ($[\text{M}+2]^+$, 44); 373 ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{BrNO}$, $[\text{M}]^+$, 27); 253 (41); 252 (71); 251 (62); 250 (100); 240 (43); 238 (74); 203 (21); 126 (20); 41 (53); 39 (29).

Dados do composto **34E**

Característica: sólido amarelo.

$T_f = 94,8\text{-}96,5\text{ }^\circ\text{C}$.

CCD: $R_f = 0,48$ (hexano-acetato de etila 6:1 v/v).

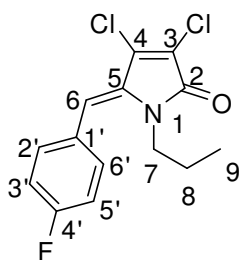
IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 2959, 2926, 1701, 1575, 1485, 1318, 1071, 1010, 739.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 0,97 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,6$; H-9/H-10); 2,01-2,15 (m, 1H, H-8); 3,57 (d, 2H, $J_{7,8} = 7,5$; H-7); 6,53 (s, 1H, H-6); 7,20 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{3',2'} = J_{5',6'} = 8,4$; H-3'/H-5'); 7,49 ($d_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 8,4$; H-2'/H-6').

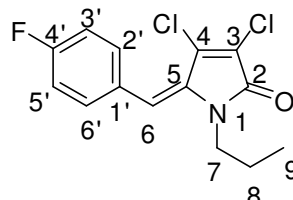
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 20,3 (C-9/C-10); 28,3 (C-8); 47,8 (C-7); 112,8 (C-3); 114,9 (C-6); 123,0 (C-5); 131,2 (C-1'); 131,5 (C-3'/C-5'); 131,7 (C-4'); 131,9 (C-2'/C-6'); 135,3 (C-4); 162,1 (C-2).

EM, m/z (%): 379 ($[\text{M}+6]^+$, 3); 377 ($[\text{M}+4]^+$, 18); 375 ($[\text{M}+2]^+$, 44); 373 ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{BrNO}$, $[\text{M}]^+$, 26); 319 (22); 253 (41); 252 (73); 251 (62); 250 (100); 240 (41); 238 (75); 203 (21); 126 (21); 39 (30).

2.2.4.2. Dados dos compostos **(5Z)-3,4-dicloro-5-(4-fluorobenzilideno)-1-propilpirrol-2(5H)-ona (35Z)** e **(5E)-3,4-dicloro-5-(4-fluorobenzilideno)-1-propilpirrol-2(5H)-ona (35E)**



35Z



35E

Os compostos **35Z** e **35E** foram fracionados em coluna de sílica-gel empregando-se a mistura de solvente hexano-acetato de etila 6:1 v/v. Obteve-se:

Composto **35Z** (0,21 g; 0,68 mmol), com 62% de rendimento;

Composto **35E** (0,091 g; 0,31 mmol), com 27% de rendimento.

Dados do composto **35Z**

Característica: sólido amarelo.

$T_f = 96,6-98,1$ °C.

CCD: $R_f = 0,53$ (hexano-acetato de etila 6:1 v/v).

IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 2959, 2928, 2872, 1695, 1591, 1504, 1343, 1217, 1135, 1055, 823, 526.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 0,49 (t, 3H, $J_{9,8} = 7,5$; H-9); 1,17 (sext, 2H, $J_{8,7} = J_{8,9} = 7,5$; H-8); 3,44-3,49 (m, 2H; H-7); 6,64 (s, 1H, H-6); 7,10 ($t_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{3',2'} = J_{3',F} = J_{5',6'} = J_{5',F} = 8,6$; H-3'/H-5'), 7,27-7,32 (m, 2H, H-2'/H-6').

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 10,8 (C-9); 21,6 (C-8); 43,9 (C-7); 112,9 (C-6); 115,7 (d, $J_{\text{C-F}} = 21,8$; C-3'/C-5'); 123,9 (C-3); 129,6 (d, $J_{\text{C-F}} = 3,5$; C-1'); 131,3 (d, $J_{\text{C-F}} = 8,0$; C-2'/C-6'); 134,8 (C-5); 137,2 (C-4); 162,8 (d, $J_{\text{C-F}} = 248,3$; C-4'); 164,6 (C-2).

EM, m/z (%): 303 ($[\text{M}+4]^{++}$, 8); 301 ($[\text{M}+2]^{++}$, 50); 299 ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{FNO}$, $[\text{M}]^{++}$, 75); 270 (33); 235 (50); 234 (35); 224 (31); 222 (100); 206 (26); 158 (22); 144 (30); 107 (21); 41 (39).

Dados do composto **35E**

Característica: sólido amarelo.

$T_f = 97,3-99,1$ °C.

CCD: $R_f = 0,38$ (hexano-acetato de etila 6:1 v/v).

IV (ATR, cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 2971, 2917, 2849, 1697, 1574, 1504, 1323, 1221, 1064, 830, 747, 532.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 0,97 (t, 3H, $J_{9,8} = 7,5$; H-9); 1,69 (sext, 2H, $J_{8,7} = J_{8,9} = 7,5$; H-8); 3,70-3,75 (m, 2H; H-7); 6,60 (s, 1H, H-6); 7,05 ($t_{\text{comp.}}$, 2H, $J_{3',2'} = J_{3',F} = J_{5',6'} = J_{5',F} = 8,6$; H-3'/H-5'); 7,29-7,34 (m, 2H, H-2'/H-6').

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (J/Hz): 11,5 (C-9); 22,2 (C-8); 42,0 (C-7); 115,0 (C-6); 115,4 (d, $J_{\text{C-F}} = 21,7$; C-3'/C-5'); 128,0 (C-3); 128,8 (d, $J_{\text{C-F}} = 3,5$; C-1'); 132,1 (d, $J_{\text{C-F}} = 8,1$; C-2'/C-6'); 132,6 (C-5); 134,7 (C-4); 161,8 (C-2); 163,0 (d, $J_{\text{C-F}} = 247,4$; C-4').

EM, m/z (%): 303 ($[\text{M}+4]^+$, 8); 301 ($[\text{M}+2]^+$, 47); 299 ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{FNO}$, $[\text{M}]^+$, 78); 270 (31); 235 (49); 234 (37); 224 (33); 222 (100); 206 (25); 158 (23); 144 (33); 107 (22); 41 (44).

2.3. Avaliação da atividade citotóxica

As lactonas **21-28** e lactamas, **30, 32, 34Z, 34E** e **35E**, sintetizadas neste trabalho, foram enviadas à Universidade Federal do Ceará - Brasil, para o Laboratório de Oncologia Experimental, e foram submetidas a ensaios biológicos para avaliar a atividade citotóxica das mesmas contra quatro linhagens celulares de câncer humano: HL-60 (leucemia), HCT-116 (cólon de intestino), SF-295 (sistema nervoso central) e OVCAR-8 (ovário), segundo o método MTT (MOSMAN, 1983).

As linhagens celulares utilizadas foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) e cultivadas em frascos plásticos para cultura, utilizando-se o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino, solução 2 mmol L^{-1} de glutamina, $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina e 100 U mL^{-1} de penicilina. As células foram incubadas em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO_2 , seguido da observação do crescimento celular com o auxílio de microscópio de inversão a cada 24 horas.

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades, numa densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL (para as células suspensas) e $0,7 \times 10^5$ células/mL (para as células aderidas). As lactonas **21-28** e as lactamas **30, 32, 34Z, 34E** e **35E**, dissolvidas em DMSO (concentração estoque de 5 mg mL^{-1}), foram incubadas por 72 horas, juntamente com as linhagens celulares. A quantificação do crescimento das células tumorais foi realizado de acordo com a habilidade das células vivas de converterem o corante brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), de coloração amarela, na substância de coloração azul formazan. Como controle positivo, foi utilizada a doxorubicina. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1.500

rpm por 15 minutos), e o sobrenadante, descartado. Cada cavidade recebeu 200 μL da solução de MMT (0,5 mg mL^{-1} de MTT) e foi reincubada durante três horas, em estufa a 37 °C e a 5% de CO_2 . Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3.000 rpm por 10 minutos), sendo o sobrenadante desprezado. O precipitado resultante foi dissolvido em 150 μL de DMSO. Para quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram medidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm.

2.4. Avaliação da inibição da formação de biofilmes bacterianos

As lactonas **20**, **21**, **23** e **25-29** e lactamas **30**, **32**, **35Z** e **35E**, sintetizadas neste trabalho, foram enviadas à Universidade Federal de Santa Catarina - Brasil, para um laboratório do Departamento de Odontologia, e foram submetidos a ensaios de inibição da formação de biofilme bacteriano em *Streptococcus mutans*.

Para realização do ensaio biológico foram utilizadas algumas soluções. As soluções aquosas de DMSO e sacarose foram preparadas em água destilada e autoclavadas a 120 °C por 20 minutos antes de serem adicionadas ao meio de cultura.

Os compostos a serem testados foram solubilizados em DMSO 100% e posteriormente diluídos em meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) na concentração inicial de 175 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizada para realização dos testes de inibição de biofilme. A concentração de DMSO em todos os ensaios (3,5% v/v) foi mantida constante. A linhagem bacteriana (*Streptococcus mutans*) foi cultivada em TSB, e durante os ensaios de inibição de biofilme, foi acrescentado ao meio sacarose (4% m/v) e DMSO (3,5% v/v). Resultados prévios mostraram que nessa concentração, DMSO não interfere no crescimento bacteriano e na formação do biofilme.

As cepas-teste (*Streptococcus mutans*) foram cultivadas por 24 h em meio TSB a 37 °C sem agitação e após as primeiras 8 h de incubação foram plaqueadas em meio ágar-sangue para verificação da pureza. As culturas puras foram diluídas a 10^8 UFC mL^{-1} e 100 μL destas suspensões foram depositadas nos poços das microplacas de poliestireno. Em seguida foram adicionados ao primeiro poço de cada série 100 μL de solução de cada composto a ser testado, resultando em uma concentração inicial de 87,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e realizadas diluições sucessivas, em razão de

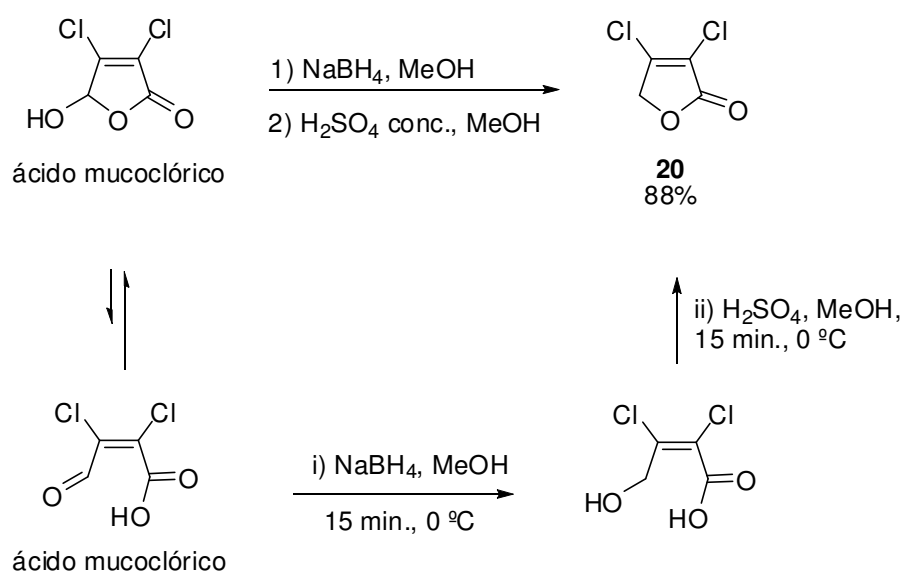
2 para o preparo das soluções a 43,8, 21,9, 10,9, 5,5, 2,73, 1,37, 0,68, 0,34 e 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ destes compostos (**20**, **21**, **23**, **25-29**, **30**, **32**, **35Z** e **35E**). O experimento controle foi realizado da mesma forma, mas sem a presença de algum composto. As microplacas de *S. mutans* foram então incubadas em ambiente de microaerofilia. Ao final da incubação, o crescimento bacteriano foi quantificado por absorbância a 630 nm usando um leitor de microplacas para avaliar os efeitos dos compostos testados sobre o crescimento bacteriano antes da quantificação do biofilme. As suspensões bacterianas foram então descartadas e os poços foram repetidamente lavados com água destilada a fim de eliminar as bactérias não aderidas.

As bactérias aderentes (biofilme) foram coradas com 120 mL de uma solução de cristal violeta 0,1% (m/v). Em seguida solubilizou-se o cristal violeta fixado nas bactérias aderidas com uma solução 1% (m/v) de dodecilsulfato de sódio (SDS) para permitir a quantificação da coloração pelo leitor de microplacas a 595 nm. Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram calculados em relação ao tratamento controle. Os dados foram tratados e os valores de IC_{50} (concentração necessária para inibir 50% da formação do biofilme bacteriano) foram determinados.

3. Resultados e discussão

3.1. Síntese do composto 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona através da reação de redução

A primeira etapa do desenvolvimento deste trabalho consistiu na síntese da 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona (**20**) pela redução do ácido mucoclórico, disponível comercialmente (Esquema 7).



Esquema 7 - Síntese da 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona (**20**).

O ácido mucoclórico pode ser visto em sua forma acíclica como um aldeído α,β -insaturado em equilíbrio com a sua forma cíclica γ -lactona (Esquema 7). Apesar da forma cíclica existir predominantemente, o padrão de reatividade é melhor compreendido considerando sua forma acíclica (CUNHA e OLIVEIRA, 2011; BELLINA e ROSSI, 2004; VALENTE *et al.*, 1998; MOORE e KATON, 1978).

A 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona (**20**) foi sintetizada por meio de reação com 1,1 equivalente de NaBH₄ em solução metanólica seguido de tratamento com solução de ácido sulfúrico concentrado em metanol. Após purificação por recristalização com hexano e diclorometano, a lactona **20** foi obtida com rendimento de 88% (Esquema 7). A função aldeído da forma acíclica do ácido mucoclórico é seletivamente reduzida com boroidreto de sódio (CLAYDEN *et al.*, 2001). Após a acidificação do

meio com ácido sulfúrico concentrado, o álcool anteriormente gerado *in situ* participa da reação de ciclização intramolecular juntamente com o ácido carboxílico da mesma molécula (Esquema 7, p. 32).

Para confirmação da estrutura **20** foram empregadas técnicas como: espectroscopia no infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .

Analisando o espectro no IV da lactona **20** (Figura 3, p. 34) foram observadas as bandas de absorção em 1765 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O da lactona e a banda em 1631 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=C.

No espectro de massas da lactona **20** (Esquema 8, p. 35), observa-se a presença do pico em m/z 152 ($[\text{M}]^{++}$), consistente com a fórmula molecular do composto ($\text{C}_4\text{H}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$), e os picos em m/z 154 ($[\text{M}+2]^{++}$) e em m/z 156 ($[\text{M}+4]^{++}$) confirmaram a presença de dois átomos de cloro na molécula, devido às abundâncias relativas dos isótopos de ^{35}Cl e ^{37}Cl . Além disso, é possível observar o sinal referente ao pico em $m/z = 117$, que corresponde à perda do radical ^{35}Cl do íon molecular e o pico base em $m/z = 123$.

Com relação ao espectro de RMN de ^1H do composto **20** (Figura 4, p. 36), observa-se um simpleto em $\delta = 4,87$ integrado para dois átomos de hidrogênio metilênicos referente ao H-5.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **20** (Figura 5, p.37), observam-se apenas quatro sinais. O sinal do carbono da carbonila é observado em $\delta = 165,6$. Os sinais de C-4 e C-3 são observados em $\delta = 148,7$ e $121,2$, respectivamente. O deslocamento químico de C-4 é maior do que o de C-3 uma vez que C-3 suporta uma carga parcial positiva devido à ressonância com a carbonila da lactona. Já o carbono C-5 é o mais blindado e encontra-se em $\delta = 70,7$.

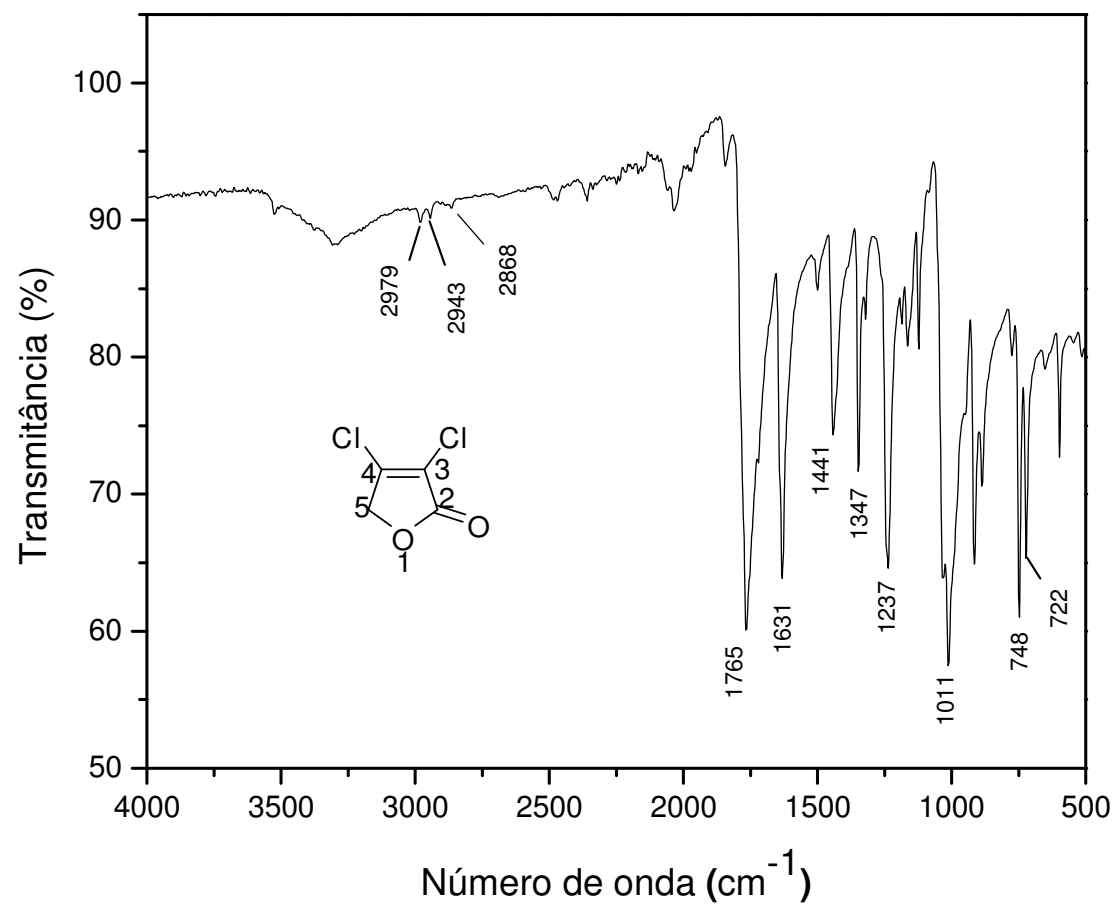
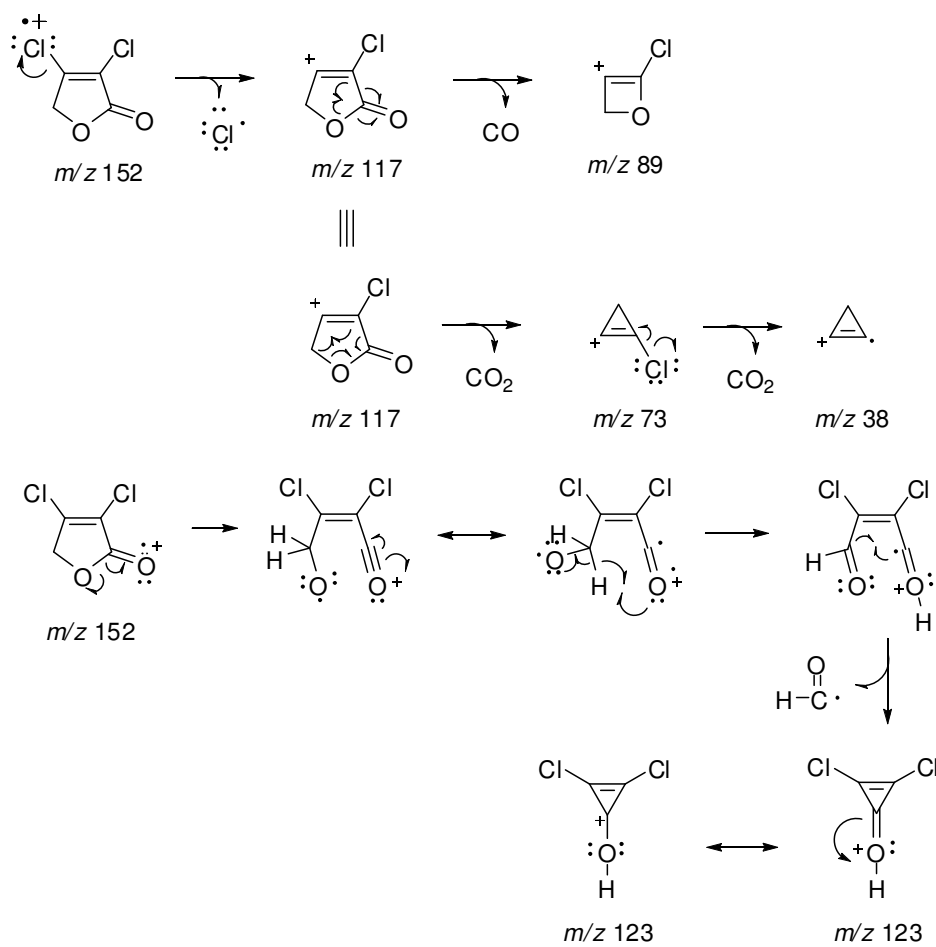
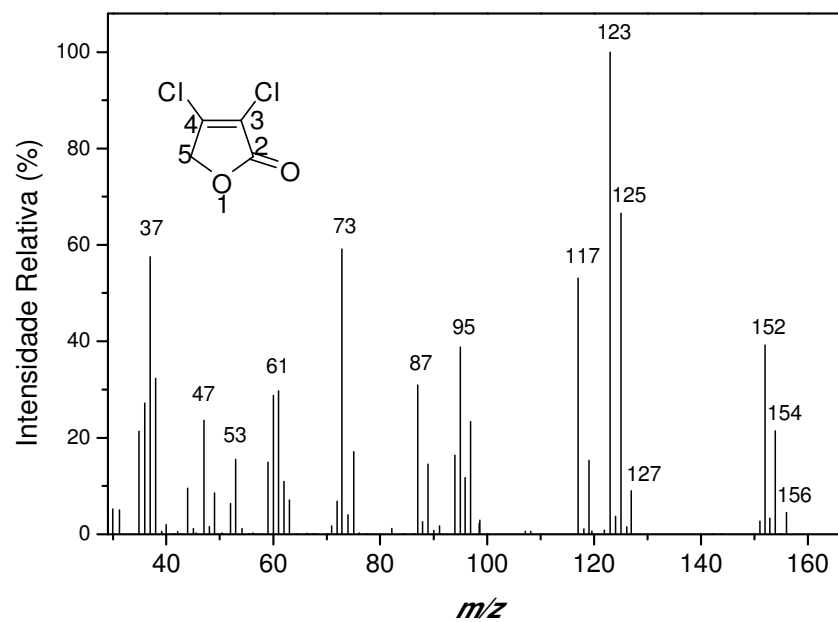


Figura 3 - Espectro no IV (ATR) da lactona **20**.



Esquema 8 - Espectro de massas e propostas mecánísticas de fragmentação da lactona **20**.

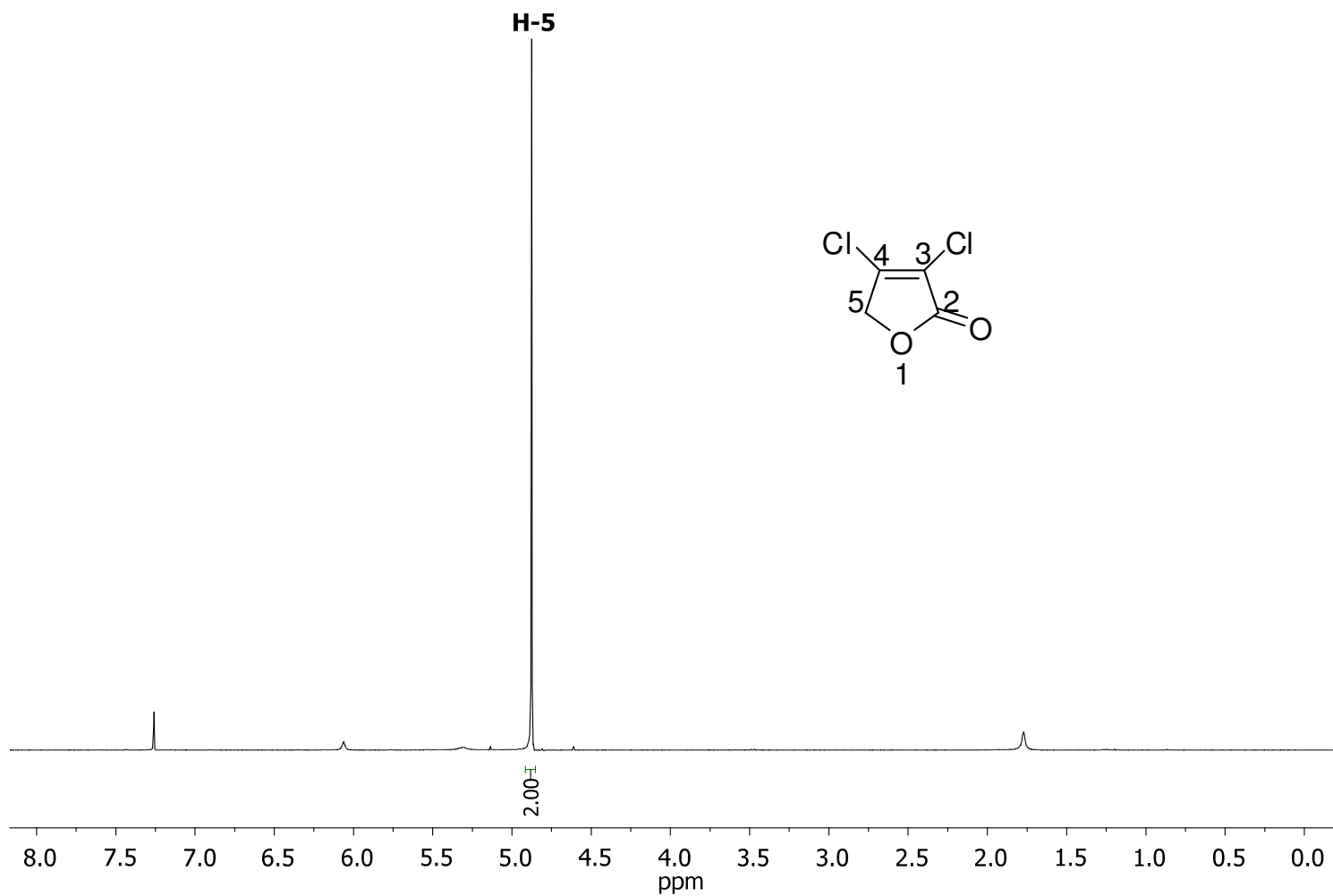


Figura 4 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da lactona **20**.

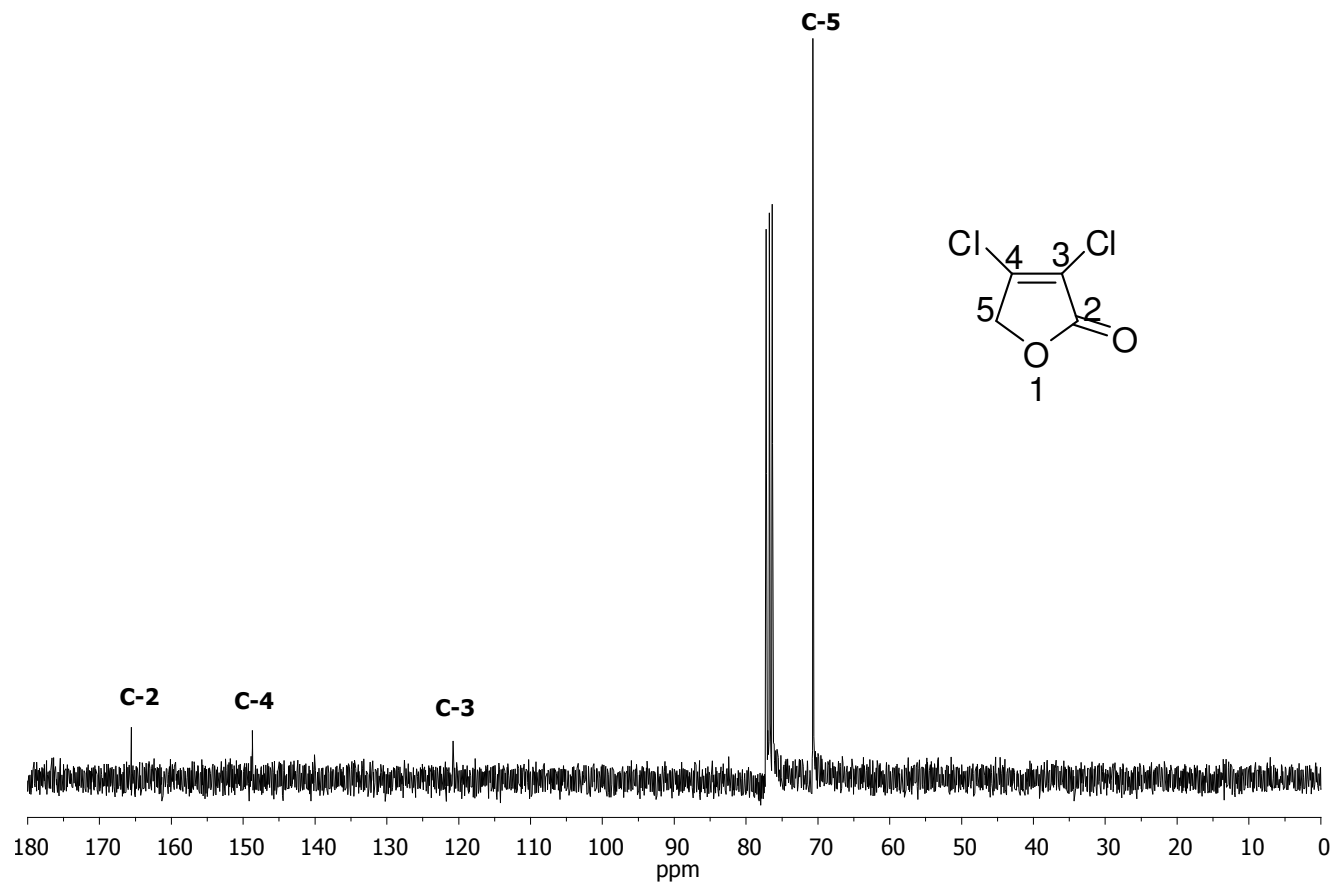


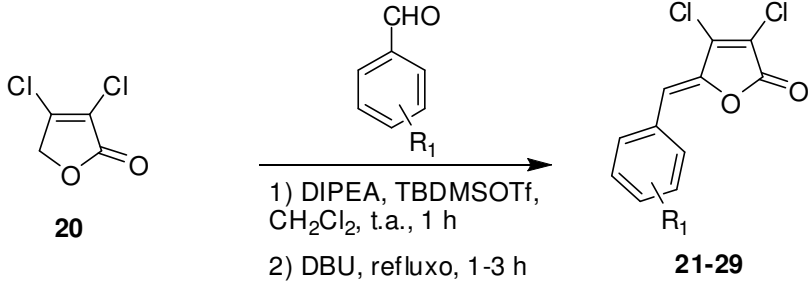
Figura 5 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da lactona 20.

3.2. Síntese das γ -alquilideno- γ -lactonas de estrutura geral 3,4-dicloro-5-alquilidenofuran-2(5H)-onas através da reação de alquilidação

As lactonas α,β -insaturadas que possuem um grupo alquilideno em anexo na posição γ , são frequentemente denominados γ -alquilidenobutenólídeos (BRUCKNER, 2001). Uma série de γ -alquilideno- γ -lactonas foram preparadas a partir da lactona **20**. Para isso, este composto foi submetido a processos de alquilidação utilizando-se diferentes aldeídos aromáticos. A metodologia utilizada foi semelhante àquela de TEIXEIRA e colaboradores (2008a) (Tabela 1).

As γ -alquilideno- γ -lactonas **21-29**, também chamadas de 3,4-dicloro-5-alquilidenofuran-2(5H)-onas ou γ -alquilidenofuran-2(5H)-onas, preparadas nesse trabalho, assim como os rendimentos em que foram obtidas, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Síntese das γ -alquilideno- γ -lactonas 21-29

		
Composto	R ₁	Rendimento
21	<i>p</i> -Br	16
22	<i>o</i> -Br	27
23	<i>p</i> -Cl	23
24	<i>m</i> -Cl	32
25	<i>p</i> -F	25
26	<i>p</i> -CF ₃	10
27	<i>p</i> -NO ₂	10
28	3,4-metilenodioxí	58
29	3-Br-4-OMe	17

Na síntese das γ -alquilideno- γ -lactonas, uma solução de diclorometano anidro da 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona (**20**) foi tratada com 1,4 equivalentes de

trifluorometanosulfonato de *tert*-butildimetilsilila (TBDMSOTf), 2,0 equivalentes de diisopropiletilamina (DIPEA) e 1,4 equivalentes de um aldeído aromático. Depois da agitação por uma hora a temperatura ambiente, a mistura reacional foi tratada com 2,0 equivalentes de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) sob refluxo por três horas e, então, uma solução 3 mol L⁻¹ de HCl foi adicionada para preparar as (*Z*)-3,4-dicloro-5-alkilidenofuran-2(5*H*)-onas **21-29** com rendimentos que variaram de 10-58%.

TEIXEIRA *et al.* (2008b) propôs um mecanismo para esta metodologia de alquilidação, utilizada no preparo dos compostos **21-29** (Esquema 9, p. 40). A princípio ocorre um ataque dos pares de elétrons do oxigênio da carbonila da 3,4-diclorofuran-2(5*H*)-ona (**20**) ao TBDMSOTf, com eliminação do bom grupo abandonador triflato. A seguir, a DIPEA captura um dos hidrogênios H-5 do intermediário anterior, levando a formação *in situ* do éter de silila, que na próxima etapa ataca a carbonila do aldeído, resultando na formação dos intermediários aldólicos correspondentes, não isolados. Essa etapa ocorre via regeneração do ácido de Lewis TBDMSOTf, já que o silício sofre ataque nucleofílico do íon triflato (CLAYDEN *et al.*, 2001). A eliminação do grupo *tert*-butildimetilsililoxila a partir desses adutos ocorreu empregando-se 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) sob refluxo, e subsequente adição de HCl 3 mol L⁻¹.

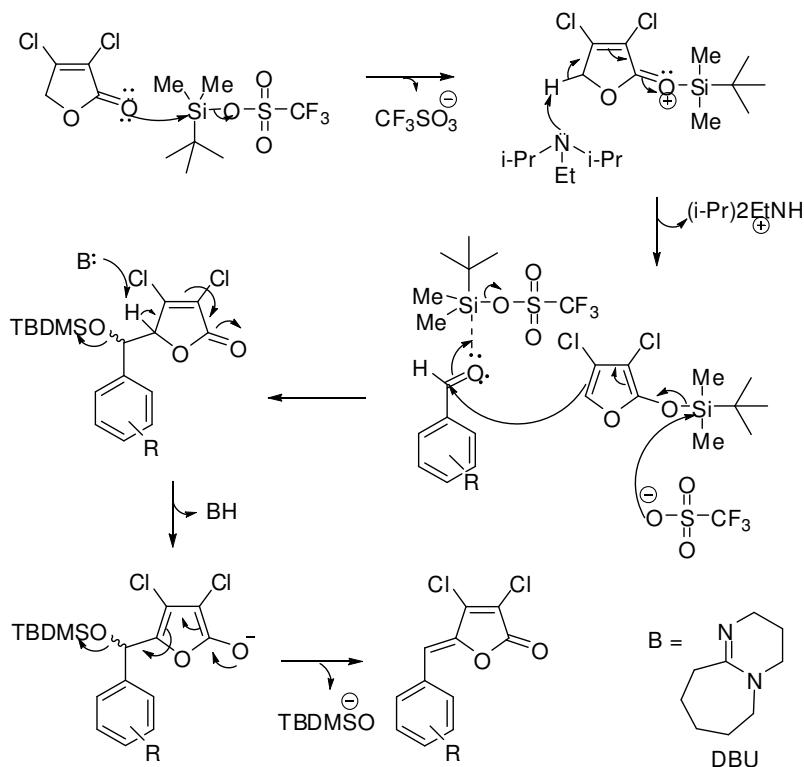
As γ -alkilidenofuran-2(5*H*)-onas **21-29** devem apresentar configuração *Z*, já que nos trabalhos anteriores de síntese de nostoclídeos e substâncias análogas (Esquema 5, p. 7; Esquema 6, p. 8), foi verificada alta estereosseletividade na etapa de alquilidação. A eliminação do grupo *tert*-butildimetilsililoxila, que ocorre na presença da base DBU, resulta na formação do estereoisômero com configuração *Z* para a dupla exocíclica (BOUKOUVALAS *et al.*, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 2008a). Segundo BOUKOUVALAS e colaboradores (2007), isso pode ser devido à presença de um grupo volumoso na posição β do anel lactônico. Além disso, para Teixeira e colaboradores (2008b), as ligações de hidrogênio intramoleculares não clássica entre o átomo de oxigênio do núcleo γ -lactônico e os hidrogênios ligados na posição *orto* do anel benzilideno exercem papel importante para a formação preferencial do isômero *Z* (Esquema 9, p. 40). E cálculos computacionais de análogos aos nostoclídeos **36-38** (Tabela 2, p. 40) confirmam a maior estabilidade dos compostos

com conformação *Z* em relação aos mesmos compostos com conformação *E* (VAREJÃO, 2011).

Tabela 2 - Diferença de energia entre os isômeros *Z/E* para os compostos **36-38**

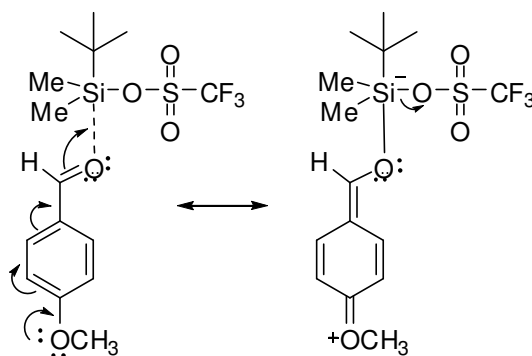
Composto	36	37	38
ΔE (Kcal/mol) ^a ; X = Br	4,31	NS ^b	3,96
ΔE (Kcal/mol) ^a ; X = Cl	4,41	3,96	3,98

^a Cálculo DFT; ^b NS: Não sintetizado



Esquema 9 - Proposta mecanística para formação das (*Z*)-3,4-dicloro-5-alquilidenofuran-2(5*H*)-onas **21-29**.

Um fato importante a se destacar na síntese dos compostos **21-29** é a variação no rendimento das reações de alquilidenação quando utiliza-se aldeídos com substituintes doadores de elétrons e retiradores de elétrons (Esquema 10). Observa-se um aumento no rendimento das reações com aldeídos que possuem grupos doadores de elétrons no anel aromático. Isso pode estar ocorrendo devido a deslocalização de elétrons no aldeído, gerada pelos grupos doadores de elétrons, uma vez que o oxigênio da carbonila aumenta a sua densidade de carga, facilitando sua ligação com o silício proveniente do TBDMSOTf. Assim, as carbonilas de aldeídos com grupos doadores de elétrons são ativadas mais facilmente, favorecendo o ataque do sililfurano, e conseqüentemente a finalização da reação de alquilidenação.



Esquema 10 - Deslocalização de elétrons no aldeído aromático com grupo doador de elétrons.

Essa variação no rendimento da reação de alquilidenação também pode ser observada no trabalho de BARBOSA *et al.* (2010a). Neste trabalho, a γ -alquilideno- γ -lactona **39** (Figura 6, p. 42) foi obtida com 65% de rendimento através de um aldeído com substituinte metilendioxi, um grupo doador de elétrons. Já a γ -alquilideno- γ -lactona **40** (Figura 6, p. 42) foi obtida com 13% de rendimento, sendo formada por um aldeído com substituinte nitro, um grupo retirador de elétrons.

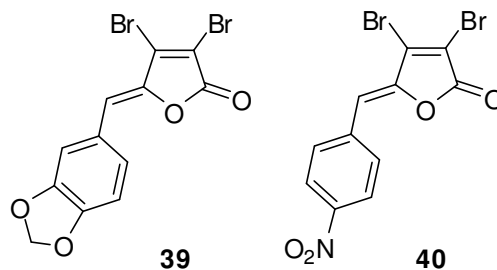


Figura 6 - Exemplos de γ -alquilideno- γ -lactonas sintetizadas por BARBOSA e colaboradores (2010a).

Embora alguns produtos dessa etapa tenham sido obtidos em rendimentos baixos, nenhum esforço para otimizar as condições de reação foi realizado uma vez que, nesta fase, a atenção estava focada na obtenção dos produtos finais para avaliação da atividade biológica. No entanto, paralelamente, nosso grupo de pesquisa iniciou uma tentativa de otimização da reação de condensação aldólica através da metodologia de adição aldólica utilizada por Xu et al. (2007) e SARMA et al. (2007), a fim de aumentar o rendimento dessas reações.

No trabalho de Xu e colaboradores (2007), foram testados vários solventes e bases para estudar os diferentes efeitos destes na reação de adição aldólica envolvendo diversos butenolídeos e diferentes benzaldeídos. Os solventes que os autores testaram foram acetona, CHCl_3 , CH_3CN , THF e metanol, e as bases foram piridina, 1,2-diaminocetona, DMAP, NaHCO_3 , K_2CO_3 e Na_2CO_3 . Assim, a melhor condição reportada pelos autores foi utilizando a base Na_2CO_3 em metanol, sob refluxo. SARMA et al. (2007) também contribuiu com o estudo da reação de adição aldólica, no entanto, partindo de lactonas dialogenadas. Neste trabalho foram testadas diversas bases, o número de equivalentes das bases e solventes. Inicialmente testou-se a base Et_3N em diferentes números de equivalentes que variaram entre 0,06 e 1. Posteriormente foram testados os solventes metanol, IPA, MeCN, DMSO, DMF, DCM, THF, CHCl_3 e MTB, seguidos das bases Et_3N , DIPEA, TMEDA, DBU e DABCO. Assim, a melhor condição reportada por SARMA et al. (2007) foi utilizando 0,3-0,5 equivalentes de Et_3N , sendo a Et_3N a melhor base e o metanol o melhor solvente, à temperatura ambiente. Alguns desses compostos sintetizados por SARMA e colaboradores (2007) (**41-43**) encontram-se na Figura 7 (p. 43), e seus rendimentos variaram entre 47% e 68%.

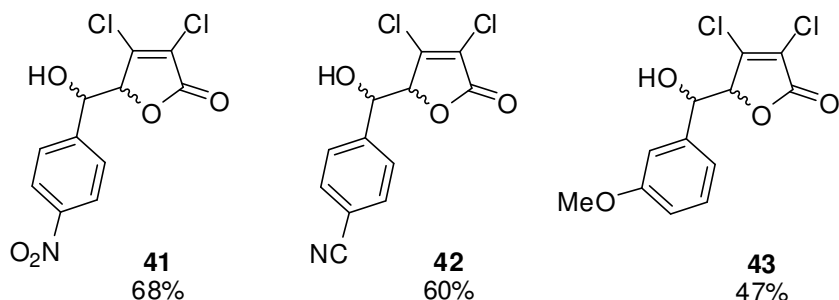
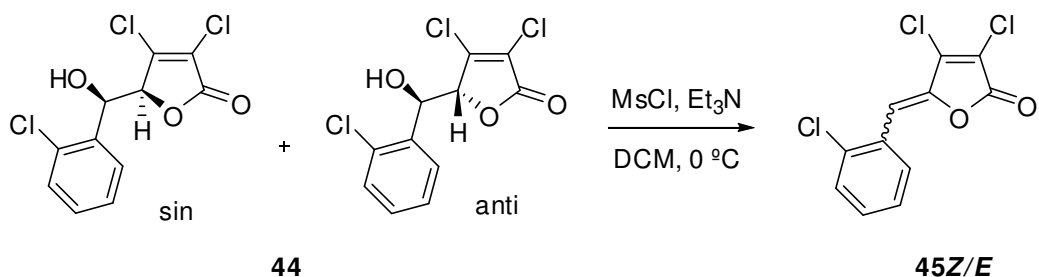


Figura 7 - Alguns dos compostos obtidos por SARMA e colaboradores (2007).

Com base nos resultados desses trabalhos publicados recentemente, nosso grupo de pesquisa iniciou os estudos de tentativa de otimização da reação de condensação aldólica utilizando 0,3 equivalentes de Na_2CO_3 em metanol, sob refluxo, obtendo a mistura de diastereoisômeros **44** com 40% de rendimento (Esquema 11) (COREAS, 2014). Sob essas condições, verificou-se que o composto final de interesse (**45Z/E**) não foi obtido a partir desta metodologia, uma vez que não ocorreu uma condensação aldólica e sim uma adição aldólica (Esquema 11). Entretanto, o produto final **45** pode ser formado a partir de uma desidratação do composto **44** com cloreto de mesila (MsCl) e Et_3N (Esquema 11) (BOUKOUVALAS et al., 2007; CLAYDEN et al., 2001). Estudos de otimização da reação de adição aldólica ainda seguem no nosso grupo de pesquisa, sendo encontrados até hoje rendimentos que variam entre 40-80% (dados ainda não publicados). No entanto, a tentativa de desidratação desses compostos hidroxilados ainda não foi concluída com êxito e está em andamento.

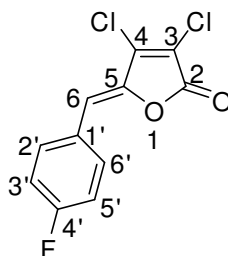


Esquema 11 - Metodologia para desidratação do composto **44**.

Para conclusão dessa etapa de síntese, as γ -alquilideno- γ -lactonas **21-29**

foram analisadas e caracterizadas por espectroscopia no infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . Experimentos bidimensionais como HETCOR também foram empregados.

Os espectros obtidos para as γ -alquilideno- γ -lactonas **21-29** sintetizadas apresentaram grande semelhança. As únicas variações observadas referem-se aos substituintes presentes no anel aromático proveniente dos diferentes aldeídos aromáticos utilizados nas reações de alquilidenação. Portanto, a discussão feita a seguir é baseada nos dados do composto **25**, mas pode ser estendida aos demais compostos sintetizados.



25

O espectro no IV de **25** (Figura 10, p. 47) mostrou uma banda em 3062 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-H de carbono sp^2 . A presença de uma banda de forte absorção observada em 1760 cm^{-1} confirma a presença do grupo carbonila de lactona α,β -insaturada.

No espectro de massas de **25** (Figura 11, p. 48), a presença do pico em m/z 258 ($[\text{M}]^{+}$) é consistente com a fórmula molecular do composto ($\text{C}_{11}\text{H}_5\text{Cl}_2\text{FO}_2$), e os picos em m/z 260 ($[\text{M}+2]^{+}$) e em 262 ($[\text{M}+4]^{+}$) confirmaram a presença de dois átomos de cloro na molécula, devido às abundâncias relativas dos isótopos de ^{35}Cl e ^{37}Cl . As propostas mecanísticas para a formação de alguns fragmentos razoavelmente estáveis de **25** são apresentadas no Esquema 12 (p. 49).

O espectro de RMN de ^1H de **25** é mostrado na Figura 12 (p. 50). Em consequência da presença do átomo de flúor na estrutura de **25**, era esperado o desdobramento dos sinais devido ao acoplamento entre átomos de hidrogênio e flúor, obedecendo à mesma regra de multiplicidade de acoplamento H-H (Figura 8). No entanto, ocorreu uma superposição entre alguns sinais de hidrogênio do anel

aromático, formando-se multipletos que impediu a visualização dos desdobramentos dos sinais devido ao acoplamento entre átomos de hidrogênio-hidrogênio e hidrogênio-flúor.

O acoplamento H-F se dá concomitantemente aos já esperados acoplamentos entre hidrogênios aromáticos e em geral apresentam constantes de acoplamento (J) maiores do que aquelas observadas no acoplamento H-H (SILVERSTEIN *et al.*, 2000). As constantes de acoplamento reais observadas entre H-F e H-H, deveriam apresentar valores próximos aos mostrados na Figura 8 (PRETSCH *et al.*, 1989).

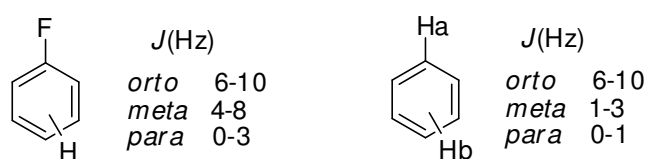


Figura 8 - Valores para constantes de acoplamento H-F e H-H.

Assim, no espectro de RMN de ^1H da γ -alquilideno- γ -lactona **25** (Figura 12, p. 50) destaca-se um simpleto integrado para um átomo de hidrogênio em $\delta = 6,37$, referente ao H-6 ligado a dupla exocíclica do composto. O tripleto complexo em $\delta = 7,12$ ($J_{3',2'} = J_{3',F} = J_{5',6'} = J_{5',F} = 8,7$ Hz), padrão de anel benzênico para-dissubstituído, integrado para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído a H-3'/H-5' e o multipletos em $\delta = 7,75-7,83$, integrado para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído a H-2'/H-6'.

Devido à presença do átomo de flúor na molécula, alguns sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C de **25** foram desdobrados. A Figura 9 mostra os valores característicos das constantes de acoplamento entre os átomos de C-F para um átomo de flúor ligado ao anel aromático (PRETSCH *et al.*, 1989).

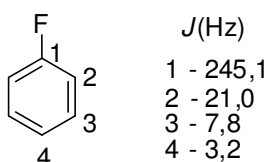


Figura 9 - Valores para constantes de acoplamento C-F.

Assim, no espectro de RMN de ^{13}C da γ -alquilideno- γ -lactona **25** (Figura 13, p. 51), os sinais de carbono do anel aromático foram identificados devido aos dupletos

formados a partir do acoplamento dos mesmos com o F ligado na posição *para* do mesmo anel aromático (Figura 9, p. 45). Então, o carbono C-4' apareceu como duplete em $\delta = 163,5$ ($J_{C-F} = 233,3$ Hz), os carbonos C-3'/C-5' em $\delta = 116,1$ (duplete, $J_{C-F} = 21,8$ Hz), os carbonos C-2'/C-6' em $\delta = 132,9$ (duplete, $J_{C-F} = 9,0$ Hz), e o carbono C-1' em $\delta = 128,7$ (duplete, $J_{C-F} = 3,0$ Hz). O sinal em $\delta = 111,2$ foi atribuído ao carbono 6. Os sinais referentes aos carbonos do anel lactônico apresentaram deslocamentos químicos próximos aos sinais de carbono da lactona **20**.

Pelos sinais observados no mapa de contornos HETCOR de **25** (Figura 14, p. 52), observam-se as correlações entre o C-6 e o H-6, C-3'/C-5' e o H-3'/H-5', e C-2'/C-6' e o H-2'/H-6', confirmando as atribuições realizadas.

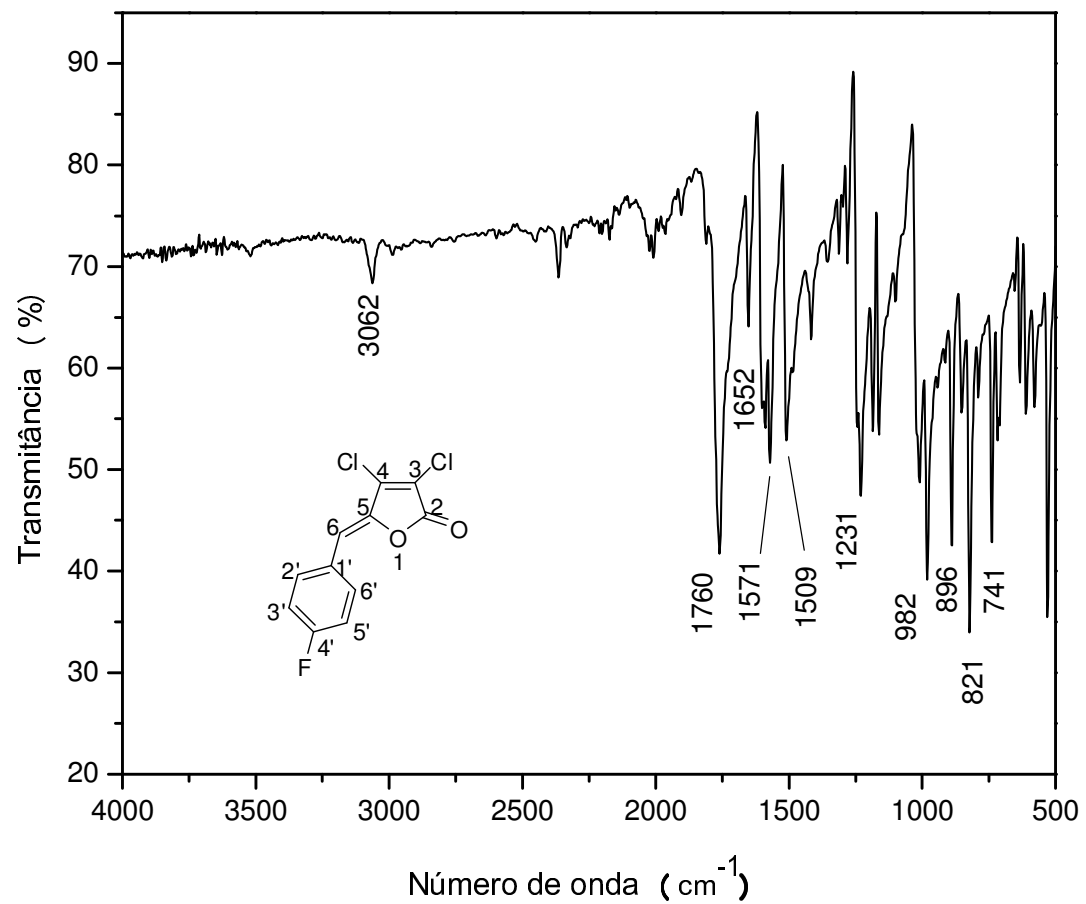


Figura 10 - Espectro no IV (ATR) da γ -alquilideno- γ -lactona **25**.

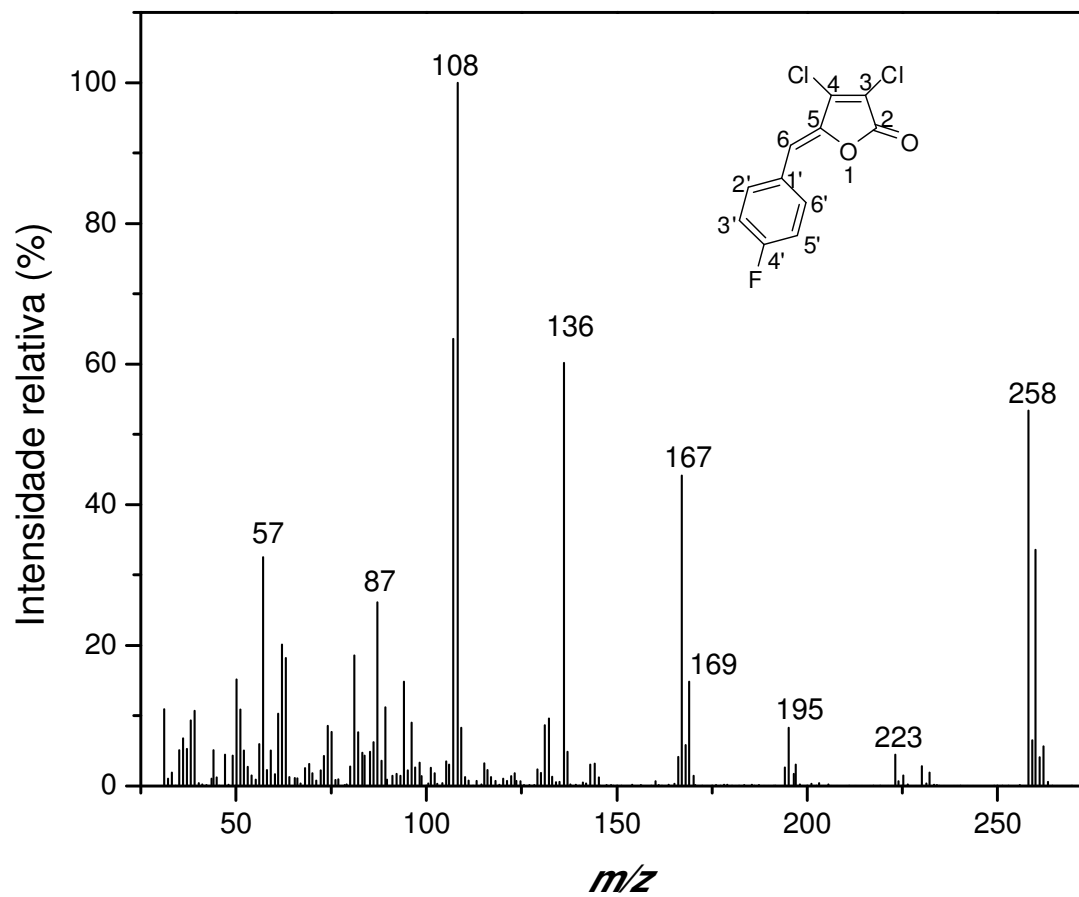
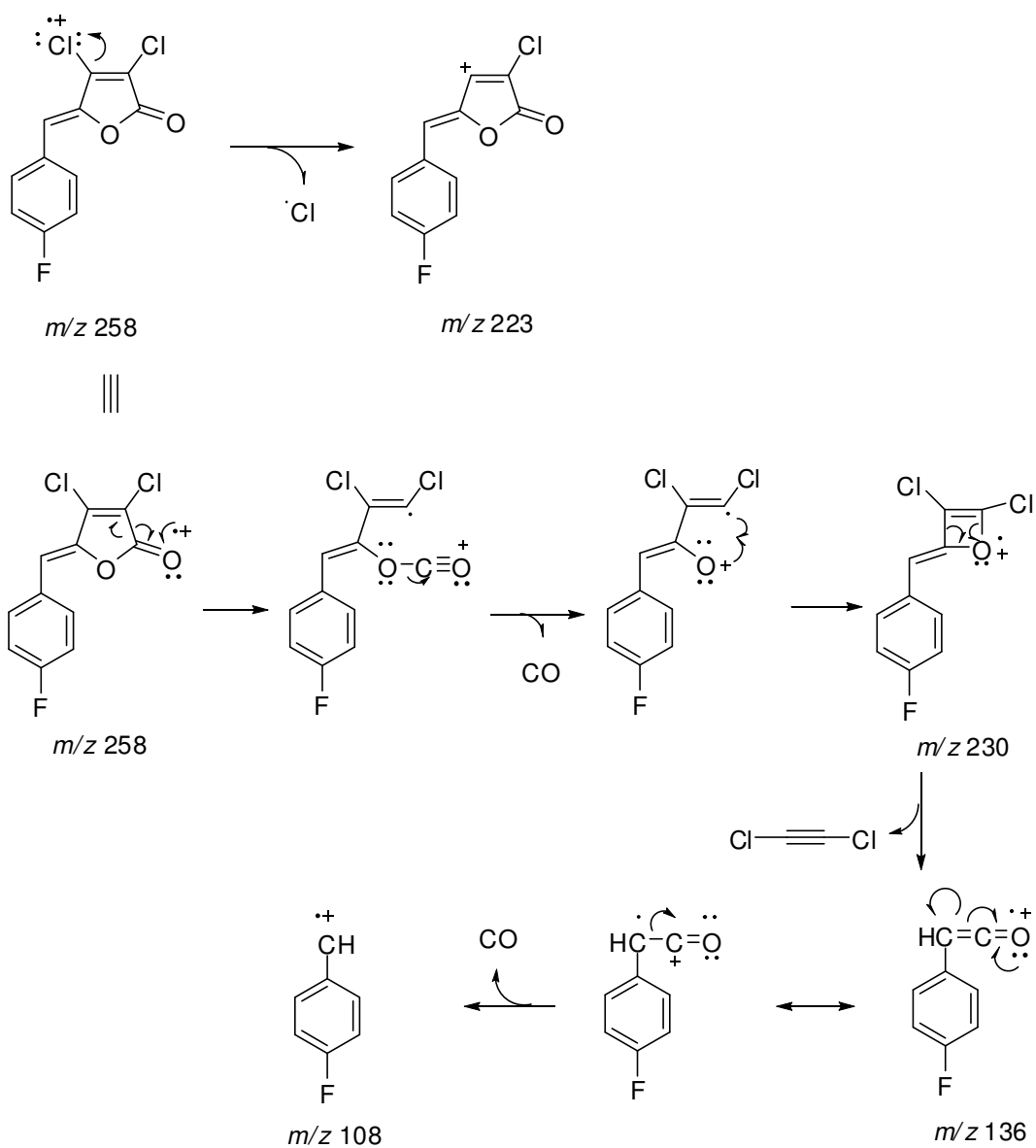


Figura 11 - Espectro de massas da γ -alquilideno- γ -lactona **25**.



Esquema 12 - Propostas mecânicas de fragmentação da γ -alquilideno- γ -lactona 25.

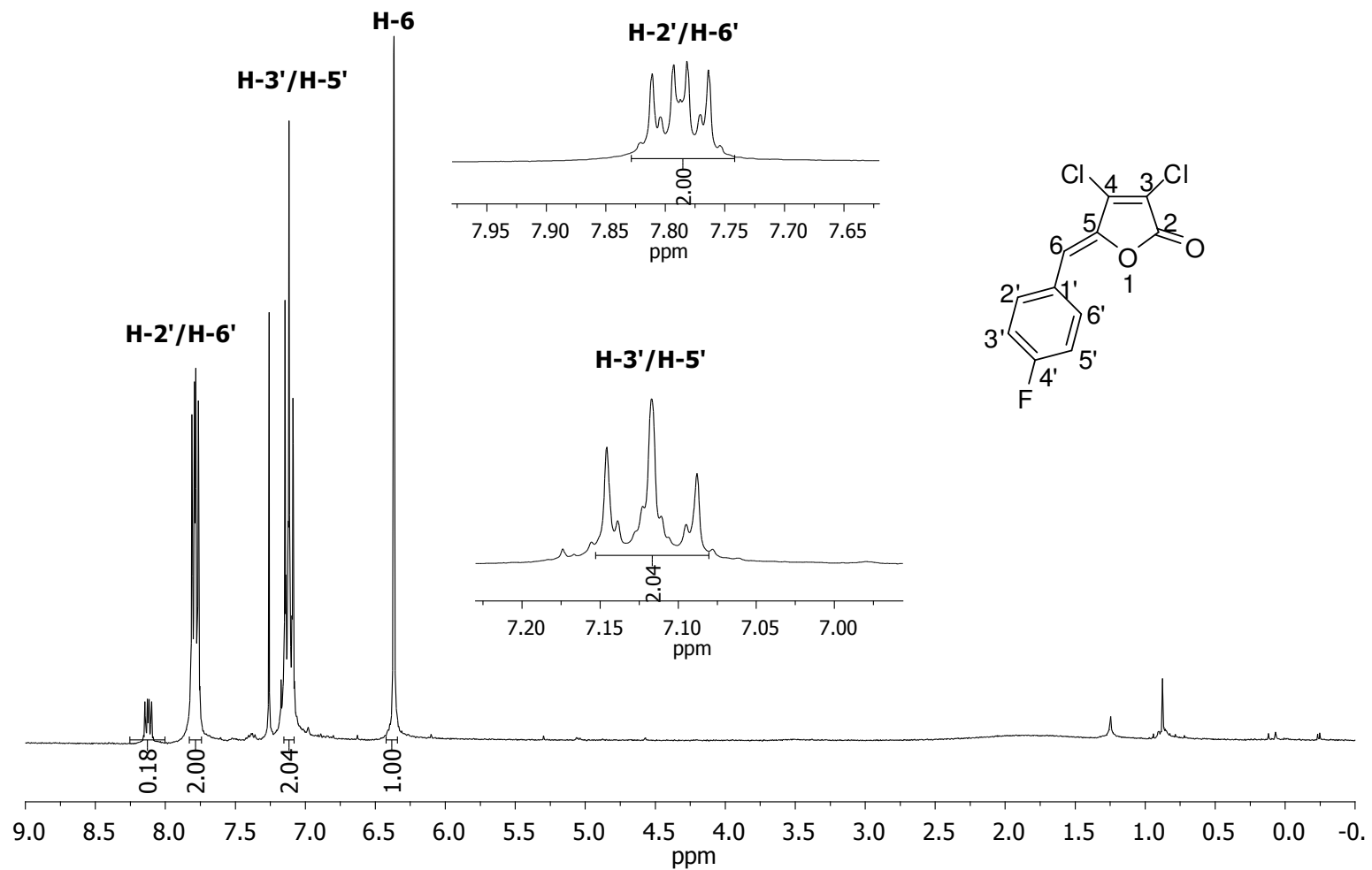


Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da γ -alquilideno- γ -lactona **25**.

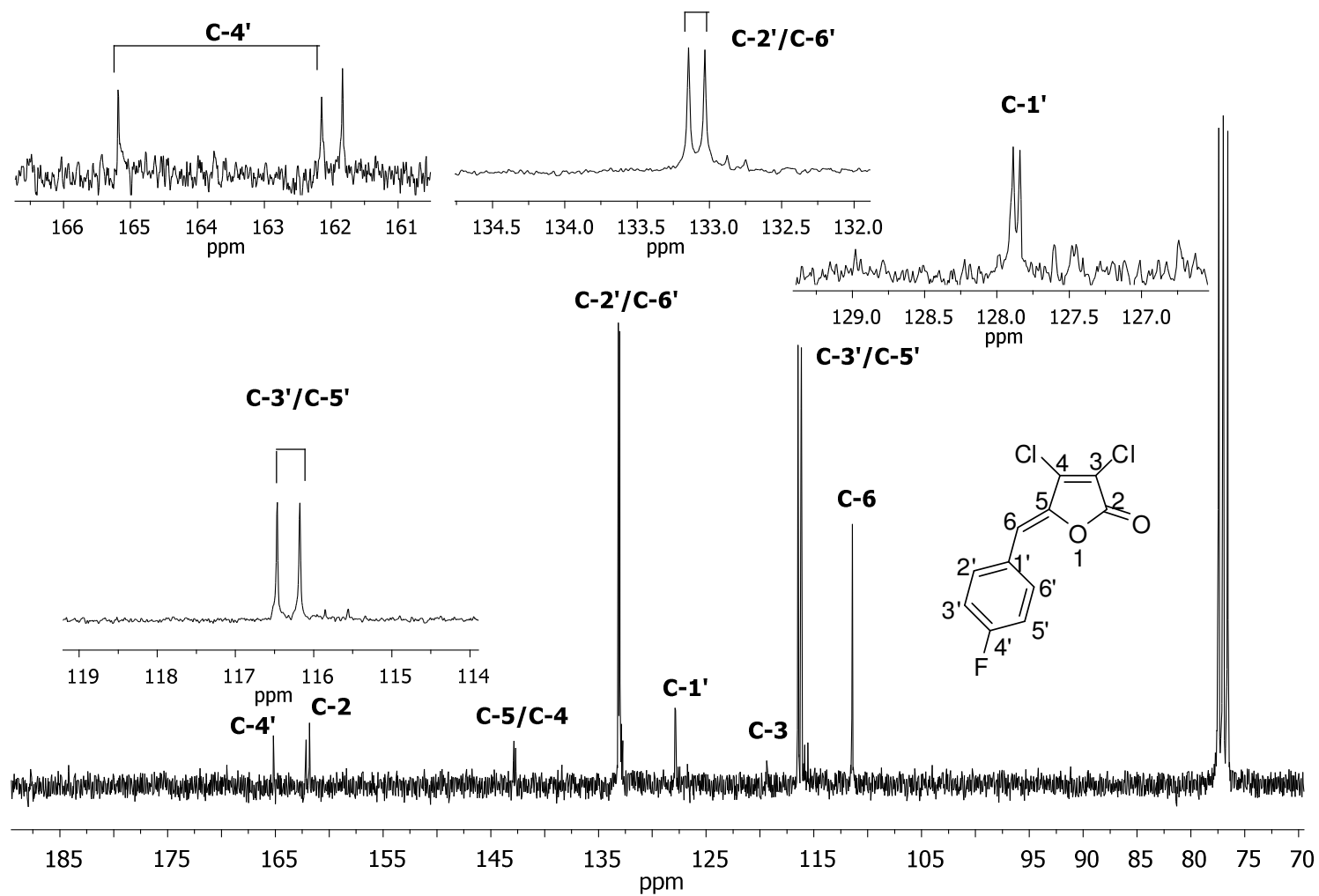


Figura 13 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da γ -alquilideno- γ -lactona **25**.

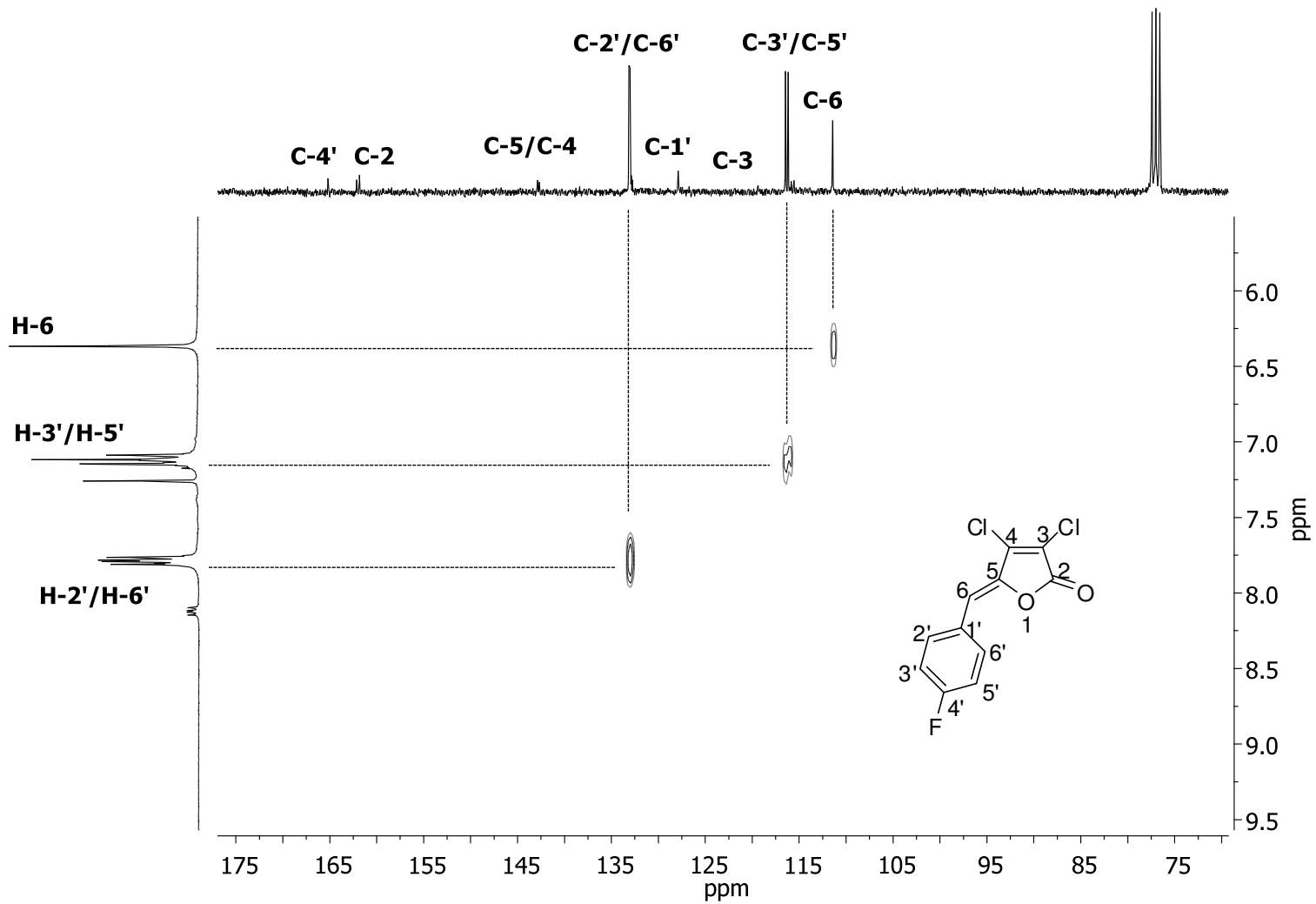


Figura 14 - Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) da γ -alquilideno- γ -lactona **25**.

3.3. Síntese das γ -hidroxi- γ -lactamas de estrutura geral 3,4-dicloro-5-benzil-5-hidroxi-1-alkuilpirrol-2(5H)-ona através da reação de lactamização

Visando a síntese de novas γ -hidroxi- γ -lactamas, as γ -alkuilideno- γ -lactonas **21**, **23** e **25** já sintetizadas anteriormente (discutido na seção 3.2) foram convertidas em γ -hidroxi- γ -lactamas **30-33** através da lactamização desenvolvida por GOH e colaboradores (2007).

As furanonas halogenadas **21**, **23** e **25** foram convertidas nas γ -hidroxi- γ -lactamas **30-33** de estrutura geral 3,4-dicloro-5-benzil-5-hidroxi-1-alkuilpirrol-2(5H)-onas, também chamadas de γ -hidroxipirrol-2(5H)-onas, por meio da reação de lactamização em diclorometano a 0 °C com excesso de aminas primárias (5 equivalentes) permitindo a troca do oxigênio da lactona pelo nitrogênio (Tabela 3).

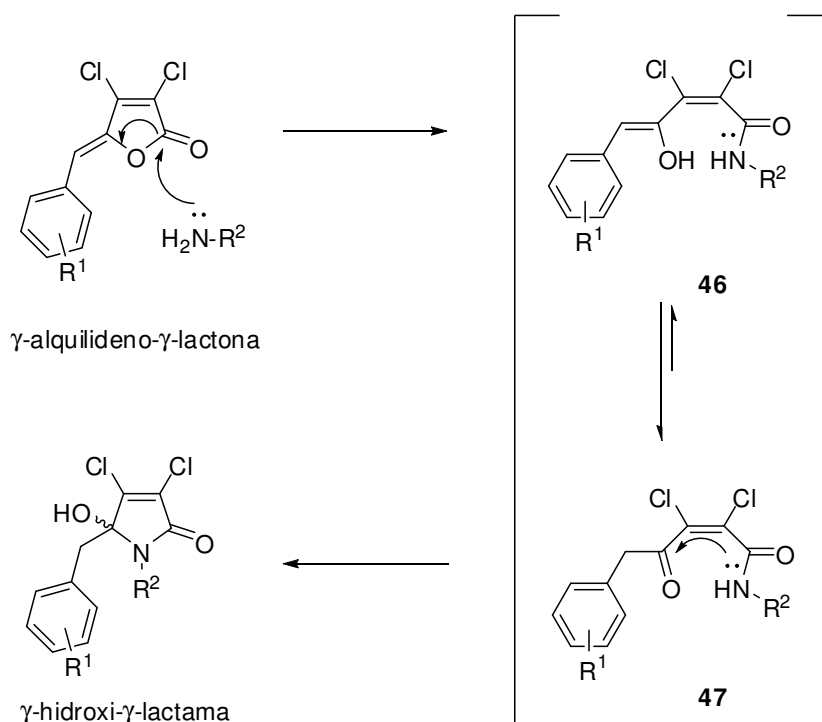
Tabela 3 - Metodologia para síntese das γ -hidroxipirrol-2(5H)-onas **30-33**

Composto	R ₁	R ₂	Rendimento (%)
30	<i>p</i> -Br	iso-C ₄ H ₉	70
31	<i>p</i> -Br	-C ₃ H ₇	61
32	<i>p</i> -F	-C ₃ H ₇	83
33	<i>p</i> -Cl	iso-C ₄ H ₉	72

The reaction scheme above the table shows the conversion of furanone derivatives **21, 23 e 25** to γ -hydroxypyrrolones **30-33**. The starting material is a furanone ring with chlorine atoms at positions 3 and 4, a carbonyl group at position 2, and a benzyl group at position 5. The benzyl group is substituted with R₁. The reaction conditions are DCM, R₂-NH₂, 0 °C for 3 hours. The product is a pyrrolone ring with chlorine atoms at positions 3 and 4, a carbonyl group at position 2, and a hydroxymethyl group at position 5. The nitrogen atom is substituted with R₂, and the benzyl group is substituted with R₁.

Devido aos potenciais sítios reativos nas γ -alkuilidenofuran-2(5H)-onas **18**, **20** e **22**, a temperatura da reação deve ser mantida a 0 °C para controlar a regioquímica da reação no átomo de carbono da carbonila (C-2), já que temperaturas mais baixas permitem o controle cinético. Todas as reações foram completadas em três horas e os rendimentos obtidos foram satisfatórios em todos os casos e variaram de 61% a 83%.

O mecanismo da reação de lactamização (Esquema 13) se inicia com o ataque da amina à carbonila da lactona, levando à abertura do anel e formação da amida como o intermediário **46**. Subseqüentemente, o equilíbrio ceto-enólico proporciona a formação do isômero mais estável na forma ceto **47**, que então ciclizará para formação do anel lactâmico. Na etapa de ciclização o ataque nucleofílico do nitrogênio à carbonila pode ocorrer por duas faces distintas da carbonila, por isso os produtos foram obtidos como mistura de enantiômeros.

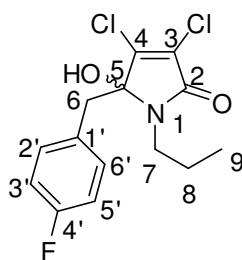


Esquema 13 - Proposta mecanística para formação das γ -hidroxi-pirrol-2(5H)-onas **30-33**.

Para análise e caracterização das γ -hidroxi-pirrol-2(5H)-onas **30-33**, foram empregadas técnicas como: espectroscopia no infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . Experimentos bidimensionais como COSY e HETCOR também foram empregados.

A discussão feita a seguir é baseada nos dados da γ -hidroxi-pirrol-2(5H)-ona **32**, mas pode ser estendida às demais γ -hidroxi-pirrol-2(5H)-onas sintetizadas já que as estruturas das mesmas diferem apenas com respeito aos substituintes ligados ao

anel aromático e o grupo alquila ligado ao nitrogênio.



32

O espectro no IV de **32** (Figura 15, p. 57) apresentou uma banda de intensidade média um pouco alargada em 3290 cm^{-1} referente ao estiramento da hidroxila. Também foi possível observar a banda intensa referente ao estiramento da carbonila em 1685 cm^{-1} .

No espectro de massas de **32** (Figura 16, p. 58) não foi possível observar a presença do pico do íon molecular, uma vez que a molécula possui um grupo hidroxila que confere instabilidade ao íon molecular. Entretanto foram observados picos em m/z 208 referente à perda do 4-fluorobenzil ligado ao anel lactâmico, em m/z 166 devido à contínua perda do grupo propileno, seguida da perda de uma molécula de água formando o pico em m/z 148. Também encontrou-se a formação do pico base em m/z 109. As propostas mecanísticas para as fragmentações dos íons citados anteriormente são apresentadas no Esquema 14 (p. 59).

O espectro de RMN de ^1H de **32** é mostrado na Figura 17 (p. 60). Em consequência da presença do átomo de flúor na estrutura de **32**, era esperado o desdobramento dos sinais devido ao acoplamento entre átomos de hidrogênio e flúor, obedecendo à mesma regra de multiplicidade de acoplamento H-H (Figura 8, p. 45). No entanto, ocorreu uma superposição entre alguns sinais de hidrogênio do anel aromático, formando-se multipletos que impediu a visualização dos desdobramentos dos sinais devido ao acoplamento entre átomos de hidrogênio-hidrogênio e hidrogênio-flúor.

Assim, no espectro de RMN de ^1H da γ -hidroxi- γ -lactama **32** (Figura 17, p. 60), destaca-se o simpleto em $\delta = 6,00$, integrado para um átomo de hidrogênio, referente ao hidrogênio da hidroxila. Para os hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-6 foram observados dois dupletos, um em $\delta = 3,23$ ($J_{6a,6b} = 14,1$

Hz), referente a um hidrogênio H-6 denominado como H-6a e outro em $\delta = 3,41$ ($J_{6b,6a} = 14,1$ Hz), referente ao outro hidrogênio H-6 denominado como H-6b. O mesmo ocorreu para o H-7, sendo observados dois dupletos duplo duplos, um em $\delta = 3,41$ ($J_{7a,7b} = 13,9$ Hz, $J_{7a,8a} = 9,2$ Hz, $J_{7a,8b} = 6,6$ Hz), denominado de H-7a e outro em $\delta = 3,56$ ($J_{7b,7a} = 13,9$ Hz, $J_{7b,8b} = 9,2$ Hz, $J_{7b,8a} = 6,6$ Hz), denominado de H-7b. O H-8, integrado para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído ao sinal de multipletos entre $\delta = 1,66-1,80$. E o hidrogênio H-9, do grupo alquil da propilamina, foi confirmado através do tripleto, integrado para três hidrogênios em $\delta = 0,92$ ($J_{9,8} = 7,2$ Hz). Foram observados também os hidrogênios ligados ao anel aromático. Em $\delta = 7,14-7,21$ observou-se um multipletos, integrado para dois átomos de hidrogênio, referente a H-2'/H-6' e em $\delta = 7,02$ ($J_{3',2'} = J_{3',F} = J_{5',6'} = J_{5',F} = 8,9$ Hz; H-3'/H-5') observou-se um tripleto complexo, padrão de anel benzênico para-dissubstituído, integrado para dois átomos de hidrogênio, referente a H-3'/H-5'. O mapa de contornos COSY de **32** (Figura 18, p. 61) ajuda a comprovar os acoplamentos entre os átomos de hidrogênio.

No espectro de RMN de ^{13}C da γ -hidroxi- γ -lactama **32** (Figura 19, p. 62), os sinais de carbono do anel aromático foram identificados devido aos dupletos formados a partir do acoplamento dos mesmos com o F ligado na posição *para* do mesmo anel aromático (Figura 9, p. 45). Então, o carbono C-4' foi atribuído ao $\delta = 162,6$ (dupletos, $J_{\text{C-F}} = 186,5$ Hz), os carbonos C-3'/C-5' ao $\delta = 115,1$ (dupletos, $J_{\text{C-F}} = 21,2$ Hz), os carbonos C-2'/C-6' foram atribuídos ao $\delta = 131,6$ (dupletos, $J_{\text{C-F}} = 8,1$ Hz), e o carbono C-1' ao $\delta = 130,2$ (dupletos, $J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz). O sinal em $\delta = 42,4$ foi atribuído ao carbono 6. Também foi observado o carbono C-7 em $\delta = 39,3$, C-8 em $\delta = 22,5$ e C-9 em $\delta = 11,2$ mostrando que o carbono C-7 está mais desblindado que C-8 e C-9 devido a sua maior proximidade com o nitrogênio. Os sinais referentes aos carbonos do anel lactônico apresentaram deslocamentos químicos próximos aos sinais de carbono da lactona **20**.

Com o auxílio do mapa de contornos HETCOR de **32** (Figura 20, p. 63), pode-se confirmar as atribuições de alguns sinais através das correlações entre os carbonos e os hidrogênios.

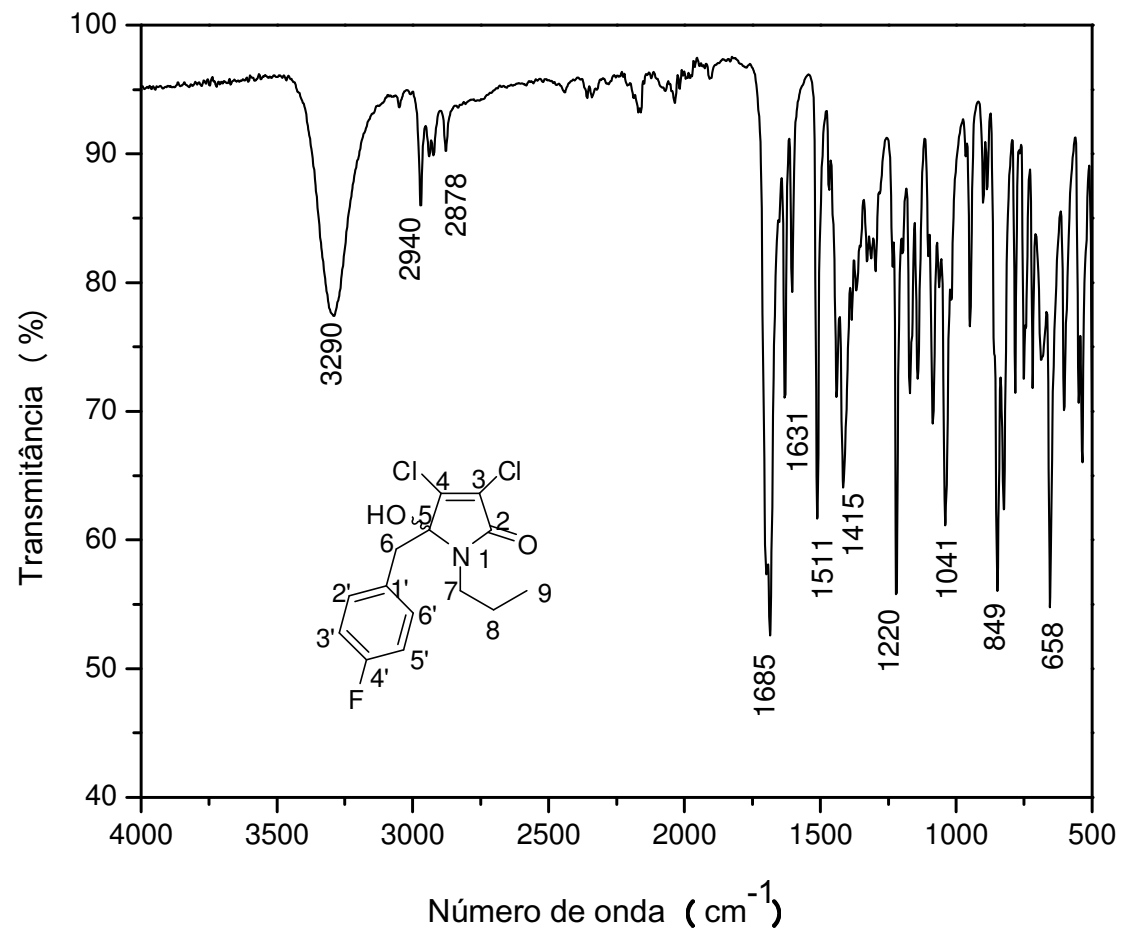


Figura 15 - Espectro no IV (ATR) da γ -hidroxi- γ -lactama **32**.

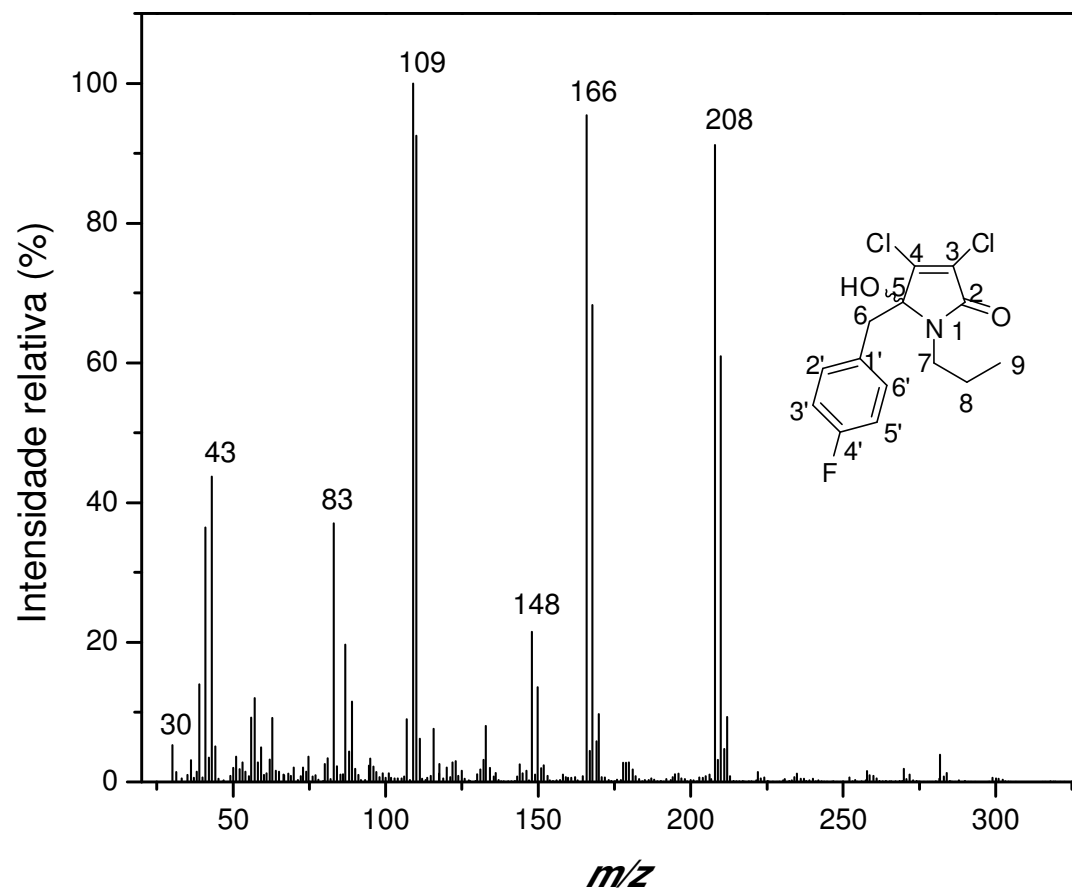
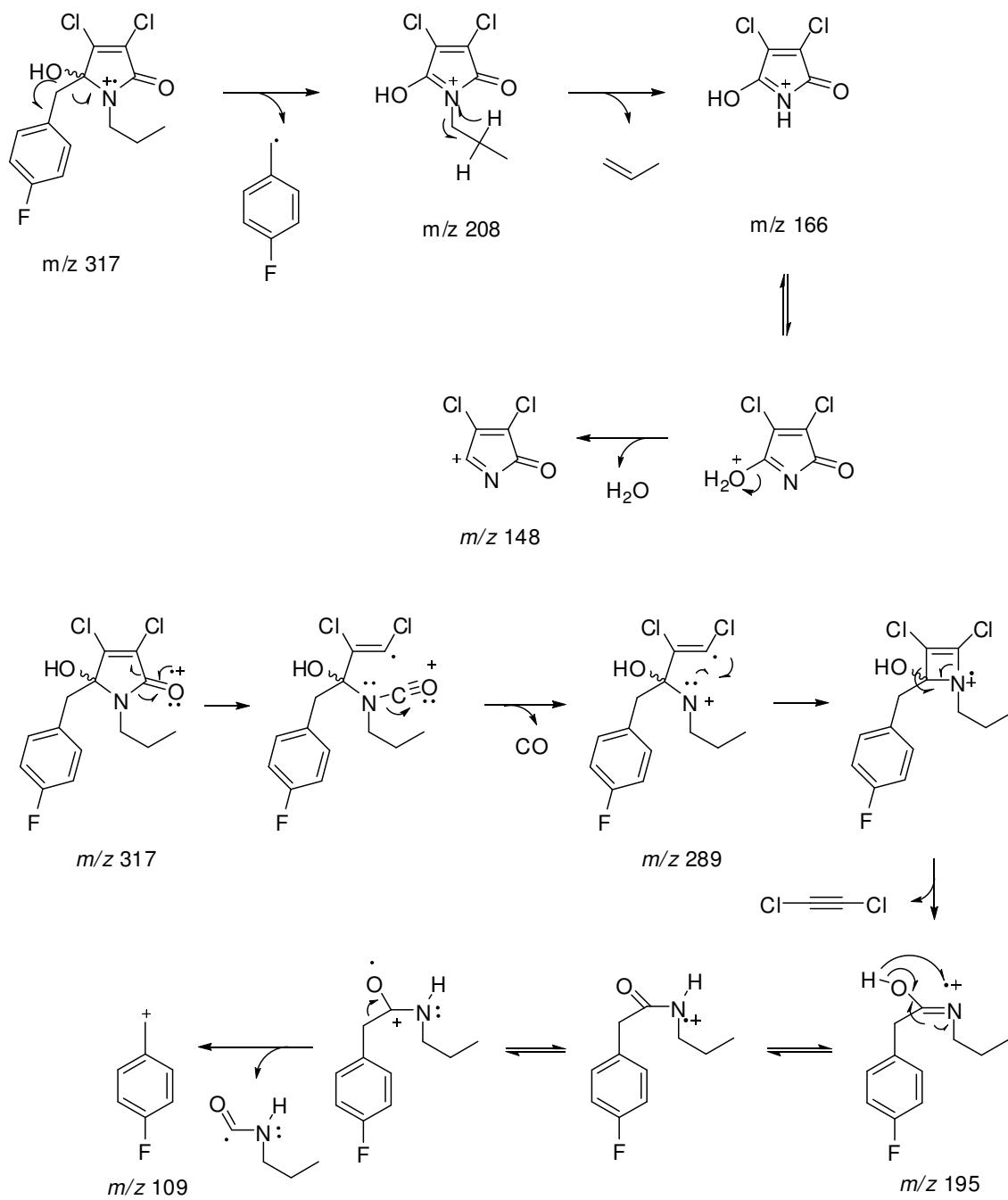


Figura 16 - Espectro de massas da γ -hidroxi- γ -lactama **32**.



Esquema 14 - Propostas mecânicas de fragmentação da γ -hidroxi- γ -lactama **32**.

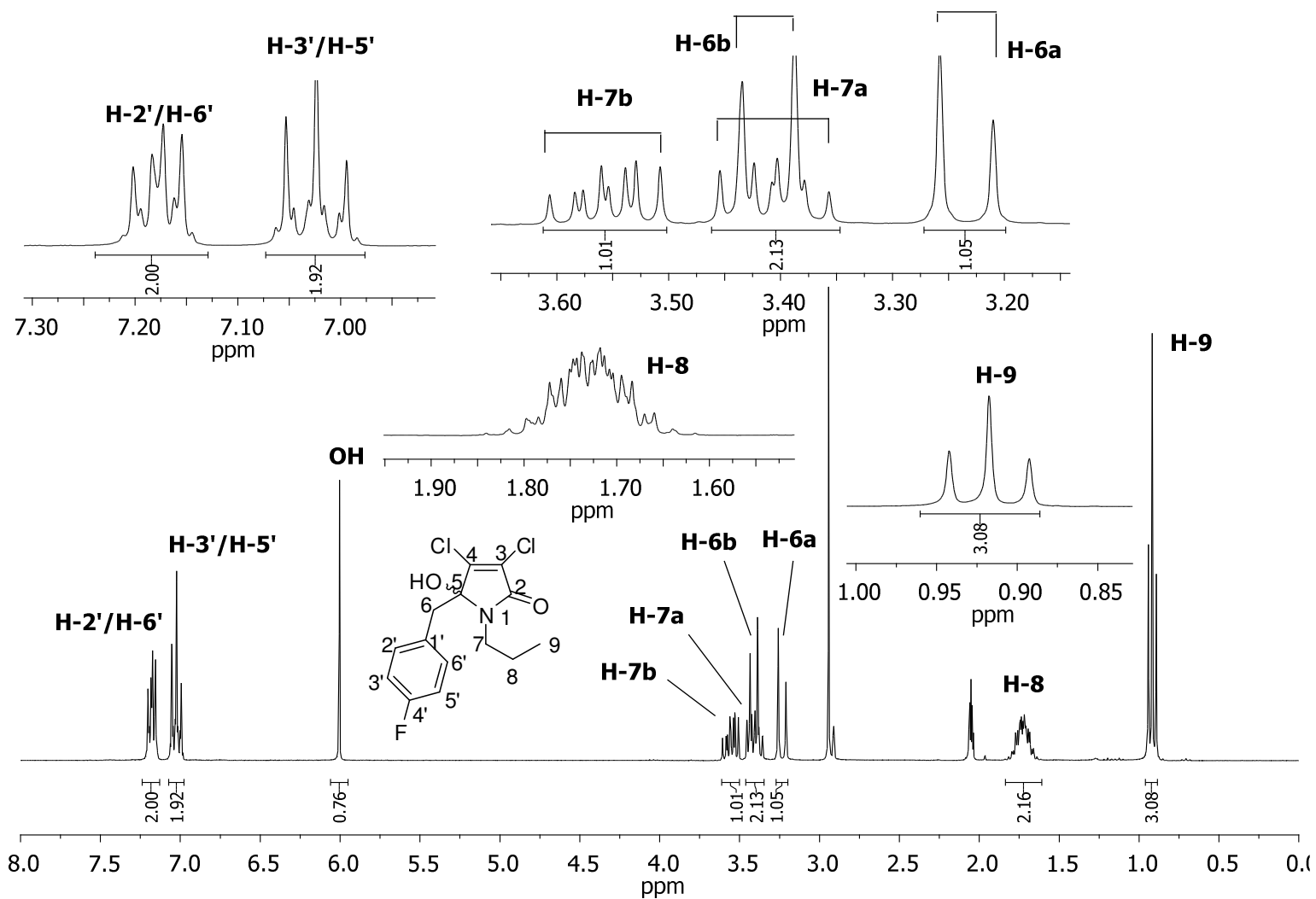


Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) γ -hidroxi- γ -lactama **32**.

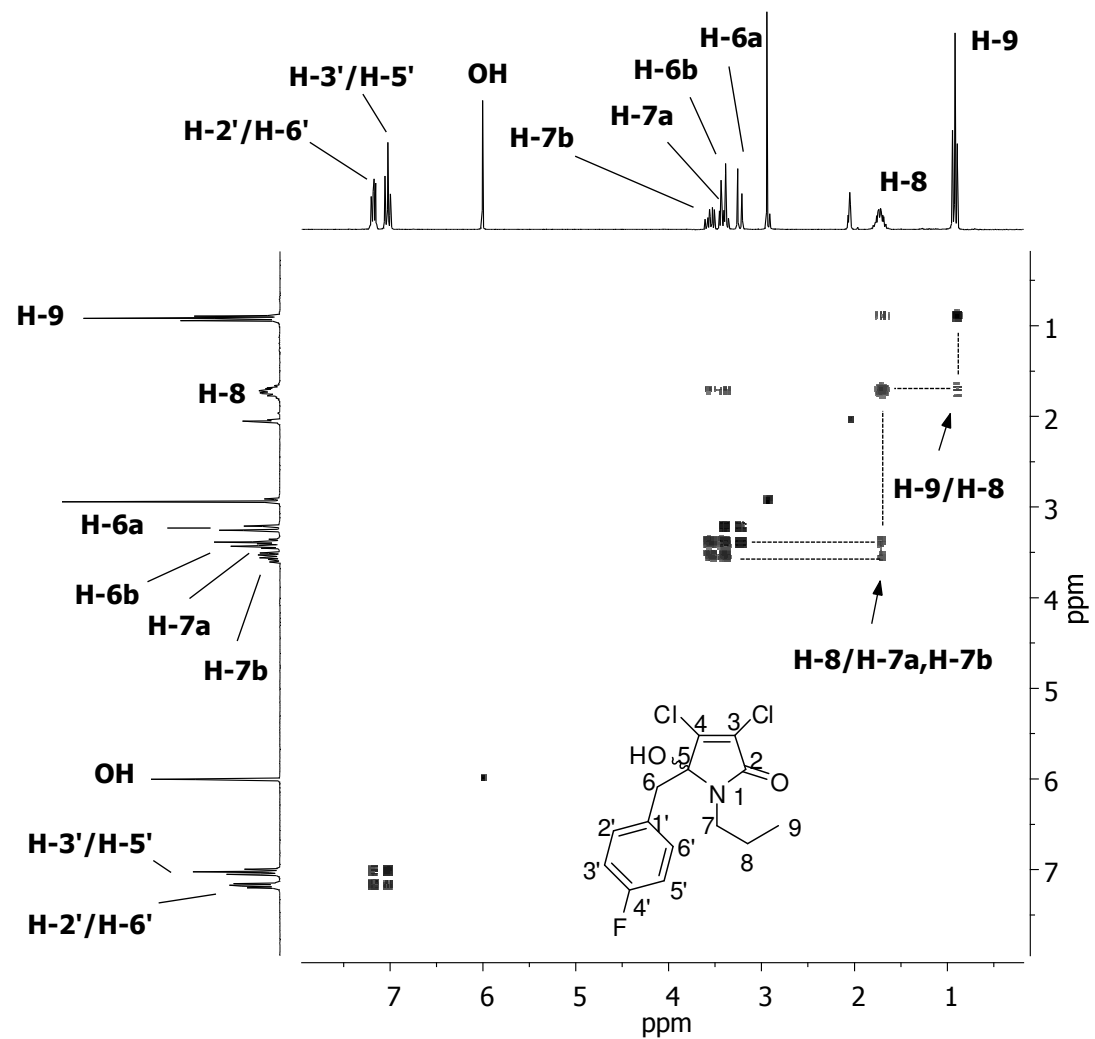


Figura 18 - Mapa de contornos COSY ((CD₃)₂CO) da γ -hidroxi- γ -lactama **32**.

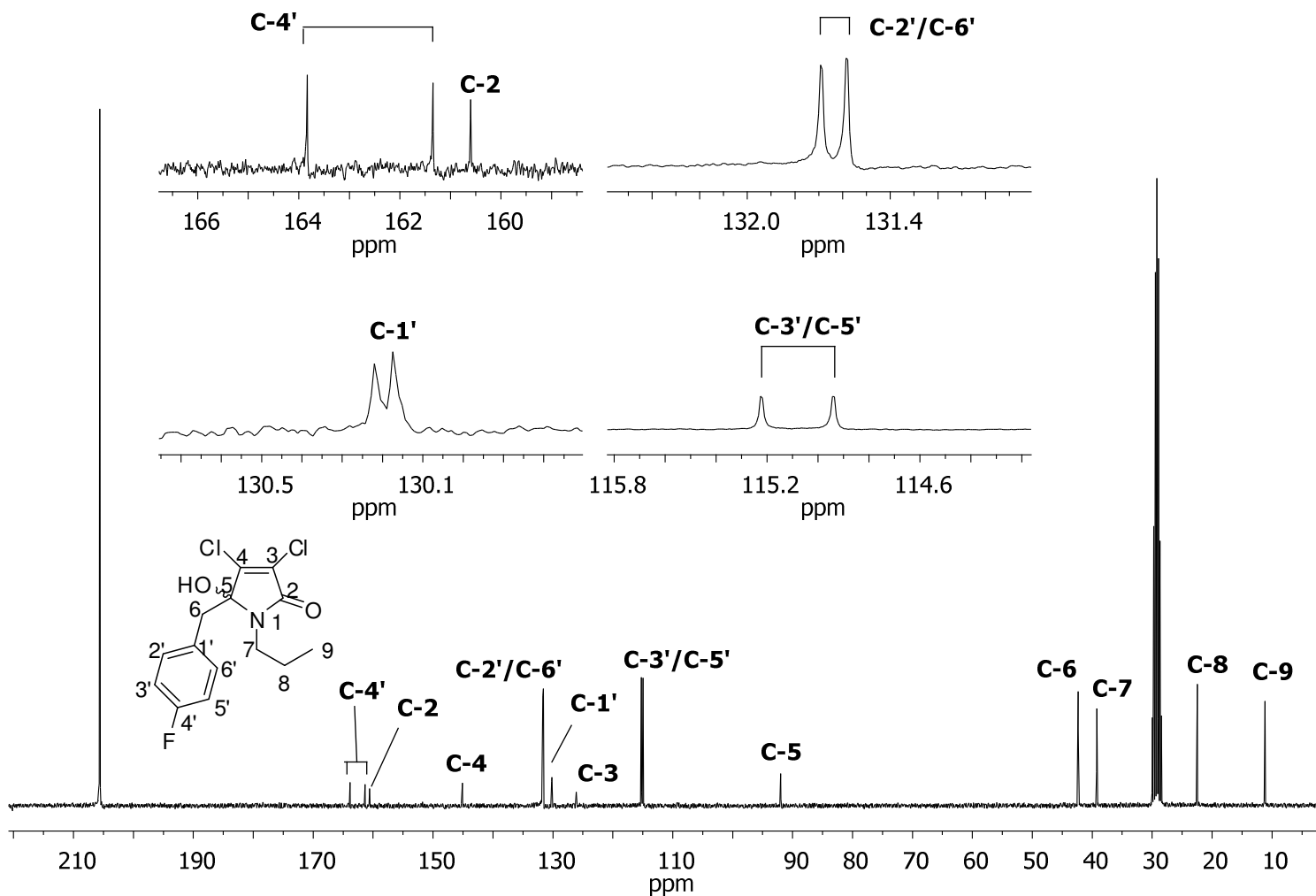


Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da γ -hidroxi- γ -lactama **32**.

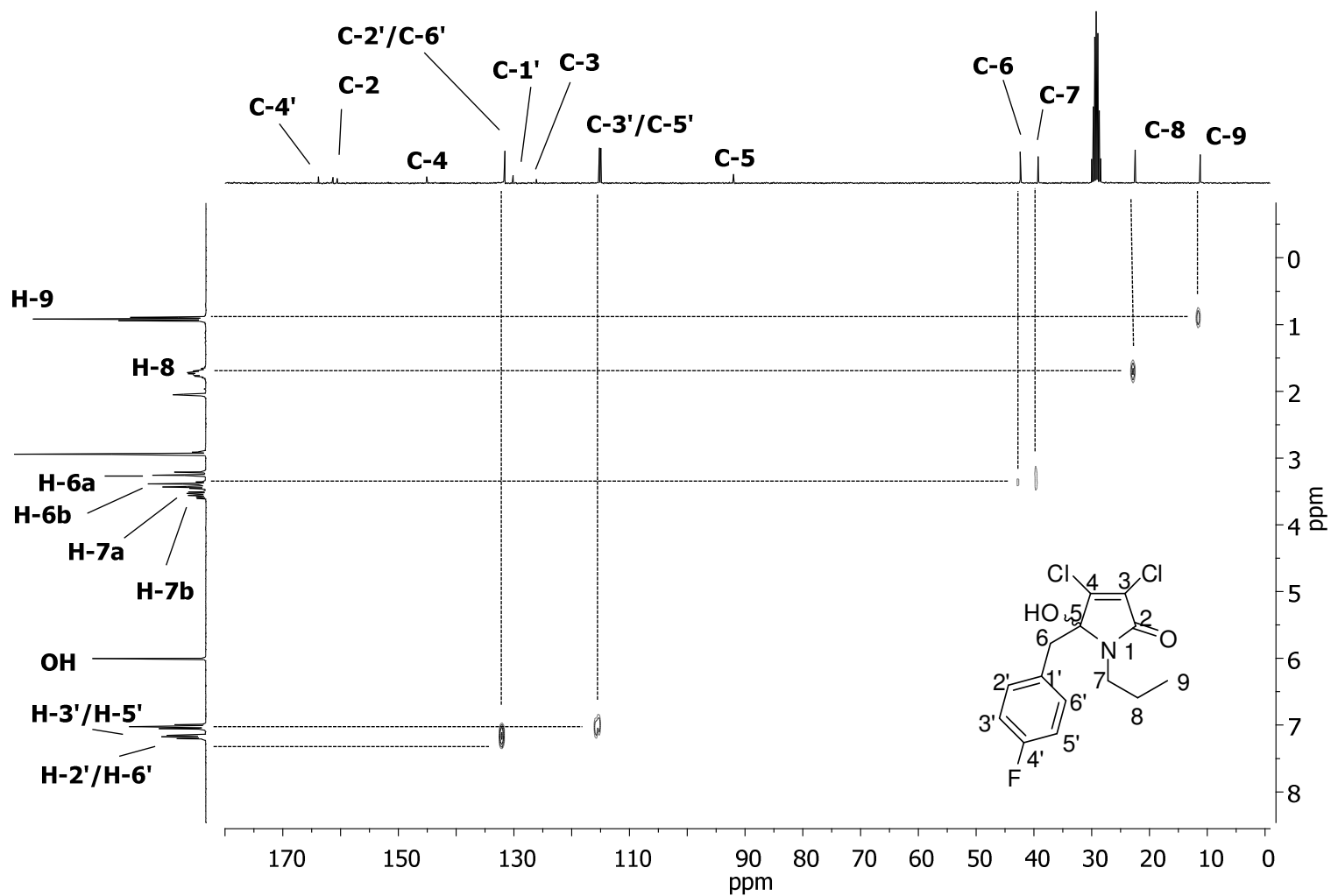
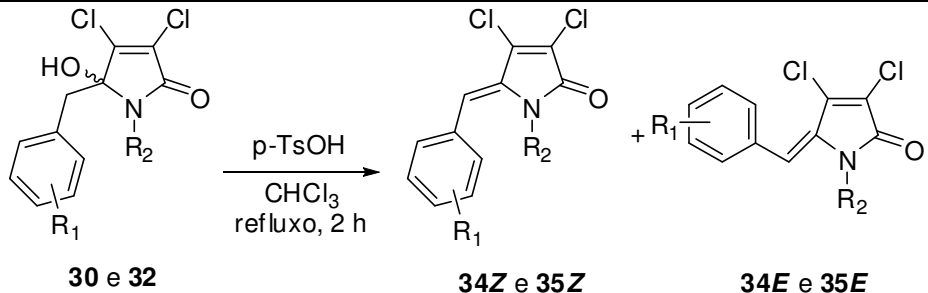


Figura 20 - Mapa de contornos HETCOR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da γ -hidroxi- γ -lactama **32**.

3.4. Síntese das γ -alquilideno- γ -lactamas de estrutura geral (5*Z/E*)-3,4-dicloro-5-benzilideno-1-alquilpirrol-2(5*H*)-ona através da reação de desidratação

Para a síntese dos compostos finais γ -alquilideno- γ -lactamas, também chamadas de γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas **34** e **35**, foi realizada uma reação de desidratação das γ -hidroxi- γ -lactamas **30** e **32**, previamente sintetizadas (discutido na seção 3.3). Os compostos **30** e **32**, solubilizados em clorofórmio anidro, foram tratados com 5 equivalentes de ácido *p*-toluenossulfônico (PTSA), sob refluxo por duas horas, formando os isômeros (*Z/E*) de **34** e **35** seguindo a metodologia de GOH e colaboradores (2007) (Tabela 4).

Tabela 4 - Metodologia para síntese das γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-ona **34** e **35**

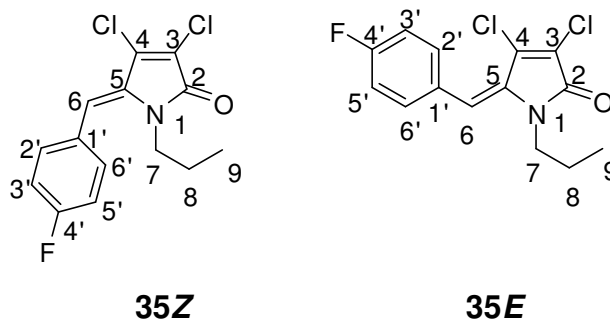


Composto/ Rendimento (%)	Composto/ Rendimento (%)	Rendimento total (%)	R ₁	R ₂	Relação (<i>Z</i> : <i>E</i>)
34Z / (56,0)	34E / (36,0)	92,0	<i>p</i> -Br	iso-C ₄ H ₉	1,56:1
35Z / (62,0)	35E / (27,0)	89,0	<i>p</i> -F	-C ₃ H ₇	2,30:1

Para análise e caracterização das γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas **34** e **35** foram empregadas técnicas espectroscópicas como: espectrometria de massas (EM), espectroscopia no infravermelho (IV), de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C. Experimentos bidimensionais como COSY e HETCOR também foram empregados. Para determinação da estereoquímica da dupla ligação exocíclica das lactamas realizou-se experimentos de NOEDIF.

A discussão feita a seguir é baseada nos dados da γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-ona **35Z**, mas pode ser estendida às demais alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas sintetizadas já que as estruturas das mesmas diferem apenas nos substituintes

ligados no anel aromático ou no substituinte alquila ligado ao nitrogênio. No entanto, será apresentado o espectro de NOEDIF do composto **35E** para a determinação da estereoquímica dos isômeros **35Z** e **35E**.



No espectro no IV de **35Z** observou-se uma banda em 1695 cm^{-1} confirmando a presença da carbonila de amida na estrutura desse composto (Figura 21, p. 67).

No espectro de massas de **35Z** (Figura 22, p. 68), a presença do pico em m/z 299 ($[M]^{+}$) é consistente com a fórmula molecular do composto ($C_{14}H_{12}Cl_2FNO$). Também é possível observar o pico em m/z 264, proveniente da perda de um radical cloro, e o pico base em m/z 222 que é formado pela perda de uma molécula de propileno. As propostas mecanísticas para as fragmentações dos íons citados anteriormente, assim como a proposta para a fragmentação do íon em m/z 270, são apresentadas no Esquema 15 (p. 69).

Devido à presença de um átomo de flúor na molécula **35Z**, esperava-se o desdobramento dos sinais no espectro de RMN de 1H (Figura 23, p. 70), devido ao acoplamento entre átomos de hidrogênio e flúor (Figura 8, p. 45). No entanto, ocorreu uma superposição entre os sinais de hidrogênio do anel aromático, formando-se multipletos que impediu a visualização dos desdobramentos dos sinais devido ao acoplamento entre átomos de hidrogênio-hidrogênio e hidrogênio-flúor.

Assim, no espectro de RMN de 1H da γ -alquilideno- γ -lactama **35Z** (Figura 23, p. 70), destaca-se os sinais de multipletos dos hidrogênios ligados ao anel aromático em $\delta = 7,27-7,32$ (multipletos, integrados para dois átomos de hidrogênio) referente a H-2'/H-6' e em $\delta = 7,10$ ($J_{3',2'} = J_{3',F} = J_{5',6'} = J_{5',F} = 8,6$ Hz), triplete complexo, padrão de anel benzênico *para*-dissubstituído, integrados para dois átomos de hidrogênio) referente a H-3'/H-5'. Também foi observado em $\delta = 6,64$ um simpleto integrado para um átomo de hidrogênio referente ao H-6 e em $\delta = 3,44-3,49$ um multipletos integrado

para dois átomos de hidrogênio referente ao H-7. O H-8 foi atribuído ao sinal de sexteto em $\delta = 1,17$ (integrado para dois átomos de hidrogênio, $J_{8,7} = J_{8,9} = 7,5$ Hz). E os hidrogênios do grupo alquil da propilamina H-9 foram confirmados através do tripleto em $\delta = 0,49$ (integrado para três átomos de hidrogênio, $J_{9,8} = 7,5$ Hz). O mapa de contornos COSY de **35Z** (Figura 24, p. 71) ajuda a comprovar os acoplamentos entre os átomos de hidrogênio.

Com o auxílio do espectro de NOEDIF de **35E** (Figura 25, p. 72) pode-se determinar a estereoquímica da dupla ligação exocíclica das lactamas **35Z** e **35E**. A irradiação do hidrogênio H-6 de **35E** produziu uma intensificação dos sinais dos hidrogênios H-7, H-8 e H-9 da lactama **35E** confirmando que tais hidrogênios estão próximos no espaço, logo refere-se ao isômero *E*. Já para o isômero **35Z** essa intensificação não acontece, mostrando que tais hidrogênios não estão tão próximos no espaço.

No espectro de RMN de ^{13}C da γ -alquilideno- γ -lactama **35Z** (Figura 26, p. 73), os sinais de carbono do anel aromático foram identificados devido aos dupletos formados a partir do acoplamento dos mesmos com o F ligado a posição *para* do mesmo anel aromático (Figura 9, p. 45). Então, o carbono C-4' foi atribuído ao $\delta = 162,8$ (duplete, $J_{\text{C-F}} = 248,3$ Hz), os carbonos C-3'/C-5' ao $\delta = 115,7$ (duplete, $J_{\text{C-F}} = 21,8$ Hz), os carbonos C-2'/C-6' foram atribuídos ao $\delta = 131,3$ (duplete, $J_{\text{C-F}} = 8,0$ Hz), e o carbono C-1' ao $\delta = 129,6$ (duplete, $J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz). Também foi observado o carbono C-7 em $\delta = 44,0$; C-8 em $\delta = 21,6$ e C-9 em $\delta = 10,1$ mostrando que o carbono C-7 está mais desblindado que C-8 e C-9 devido a sua maior proximidade com o nitrogênio.

Com o auxílio do mapa de contornos HETCOR de **35Z** (Figura 27, p. 74), pode-se confirmar as atribuições de alguns sinais através das correlações entre os carbonos e os hidrogênios.

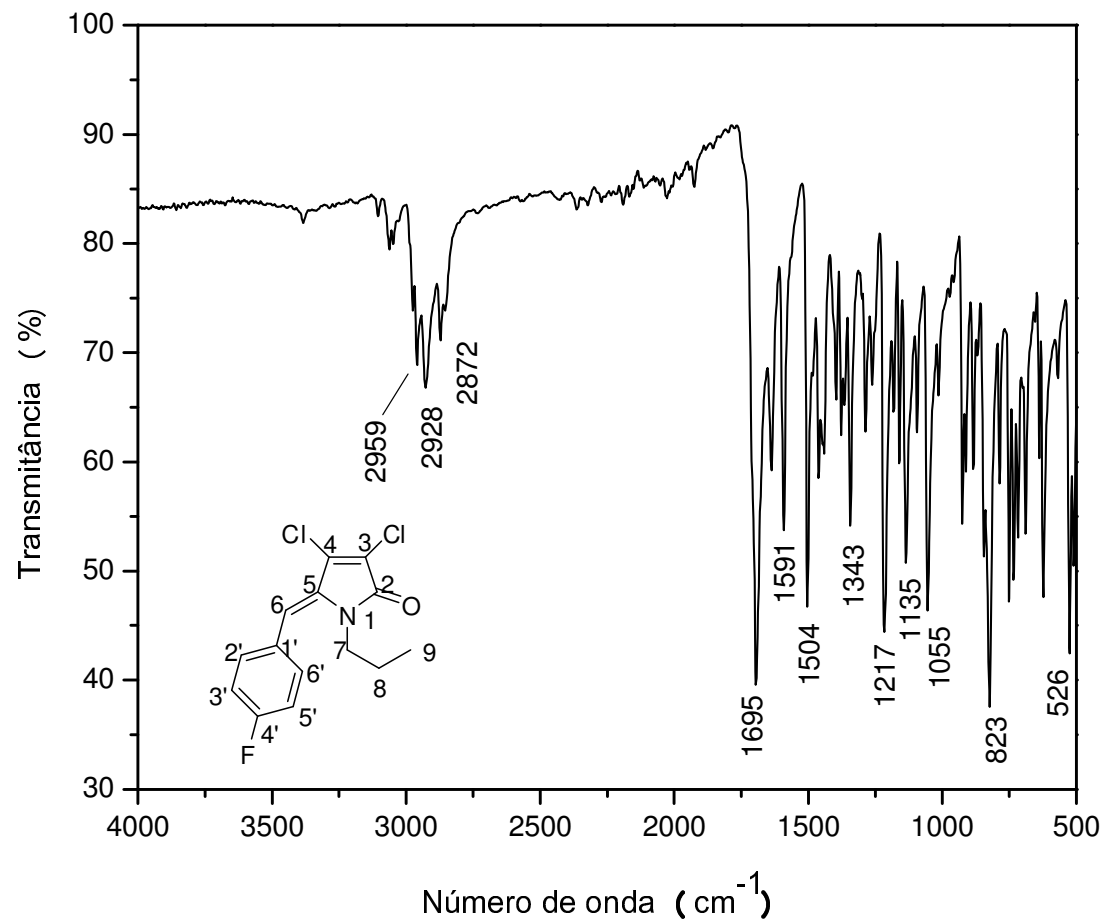


Figura 21 - Espectro no IV (ATR) da γ -alquilideno- γ -lactama **35Z**.

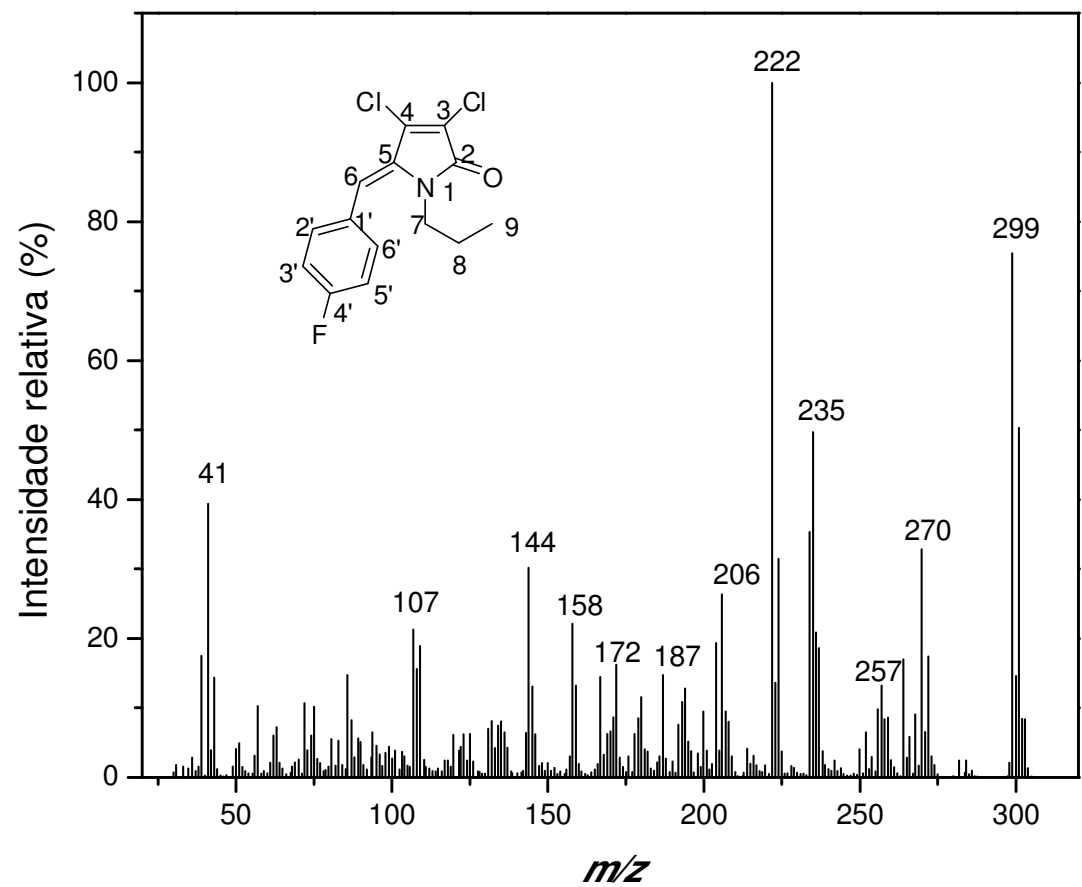
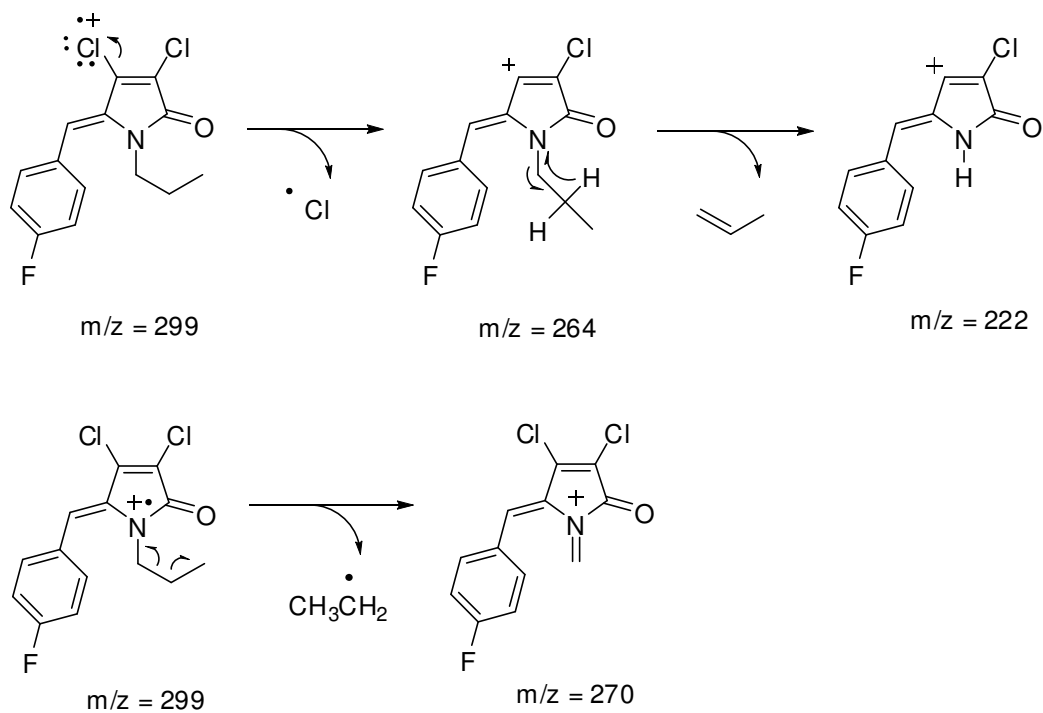


Figura 22 - Espectro de massas da γ -alkilideno- γ -lactama **35Z**.



Esquema 15 - Propostas mecánísticas de fragmentação da γ -alquilideno- γ -lactama 35Z.

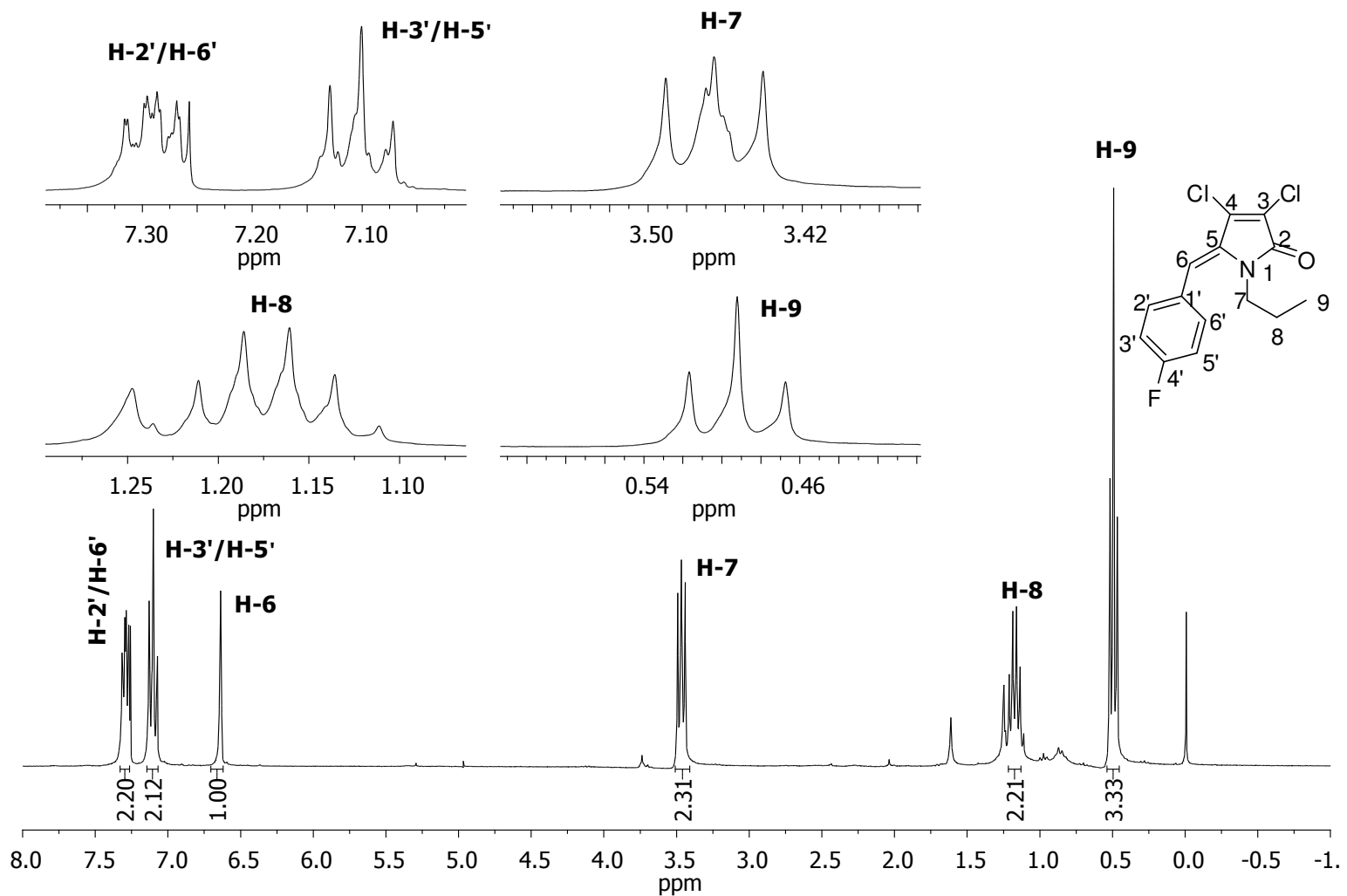


Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da γ -alquilideno- γ -lactama **35Z**.

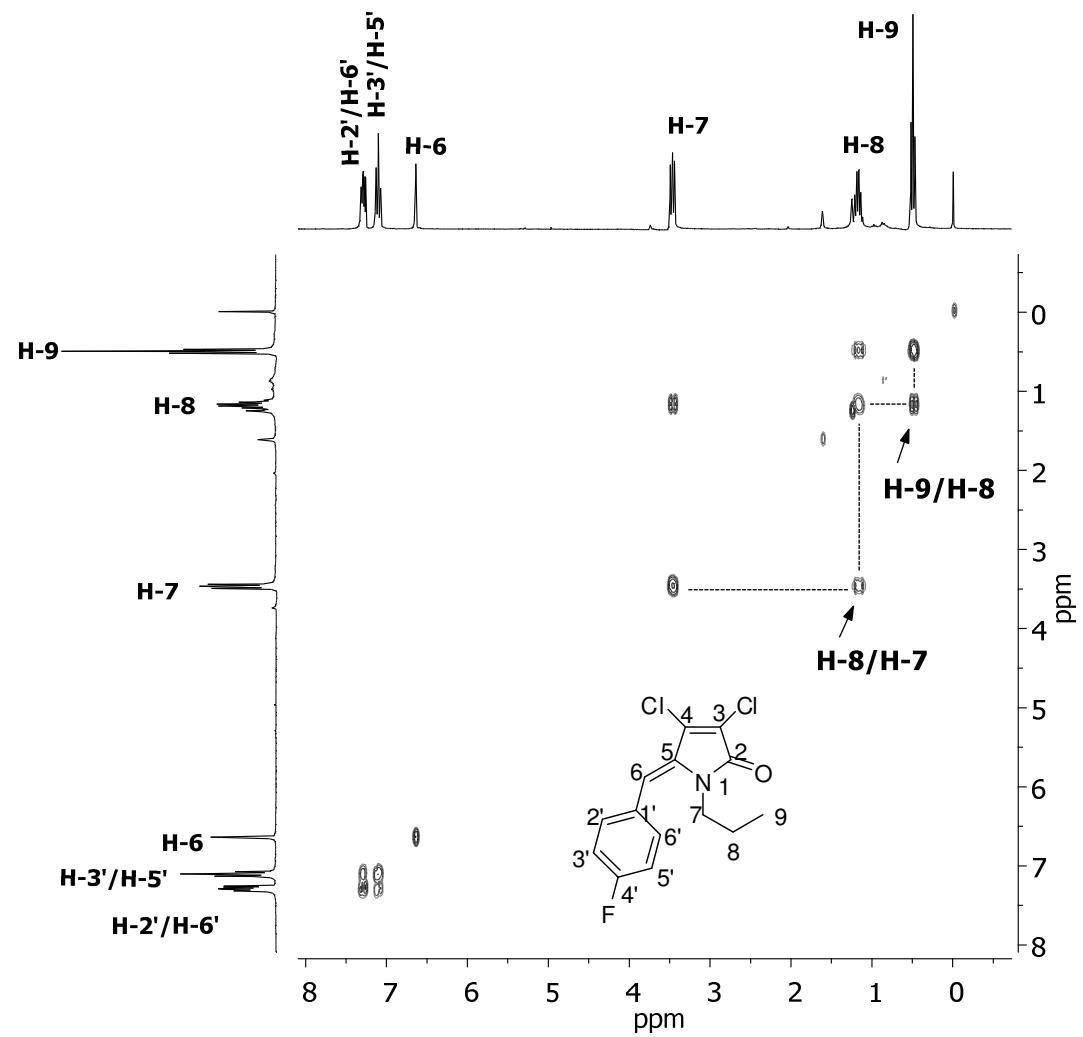


Figura 24 - Mapa de contornos COSY (CDCl₃) da γ -alquilideno- γ -lactama **35Z**.

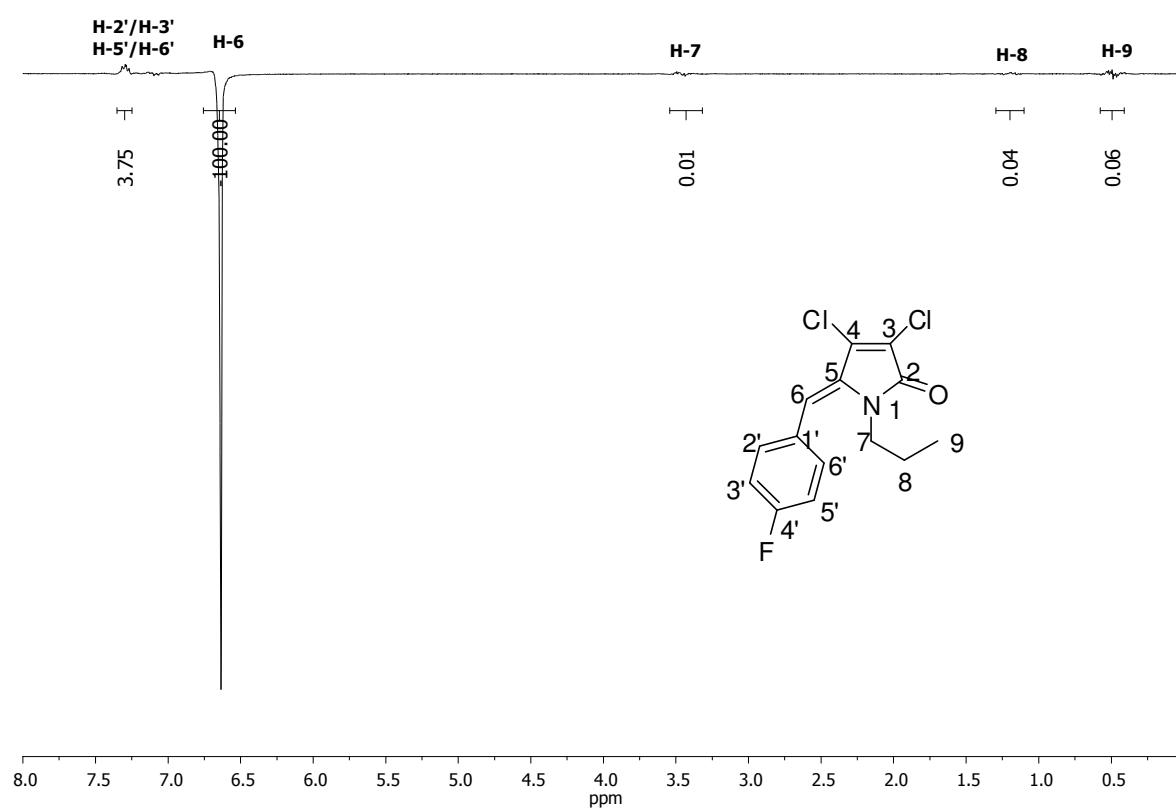
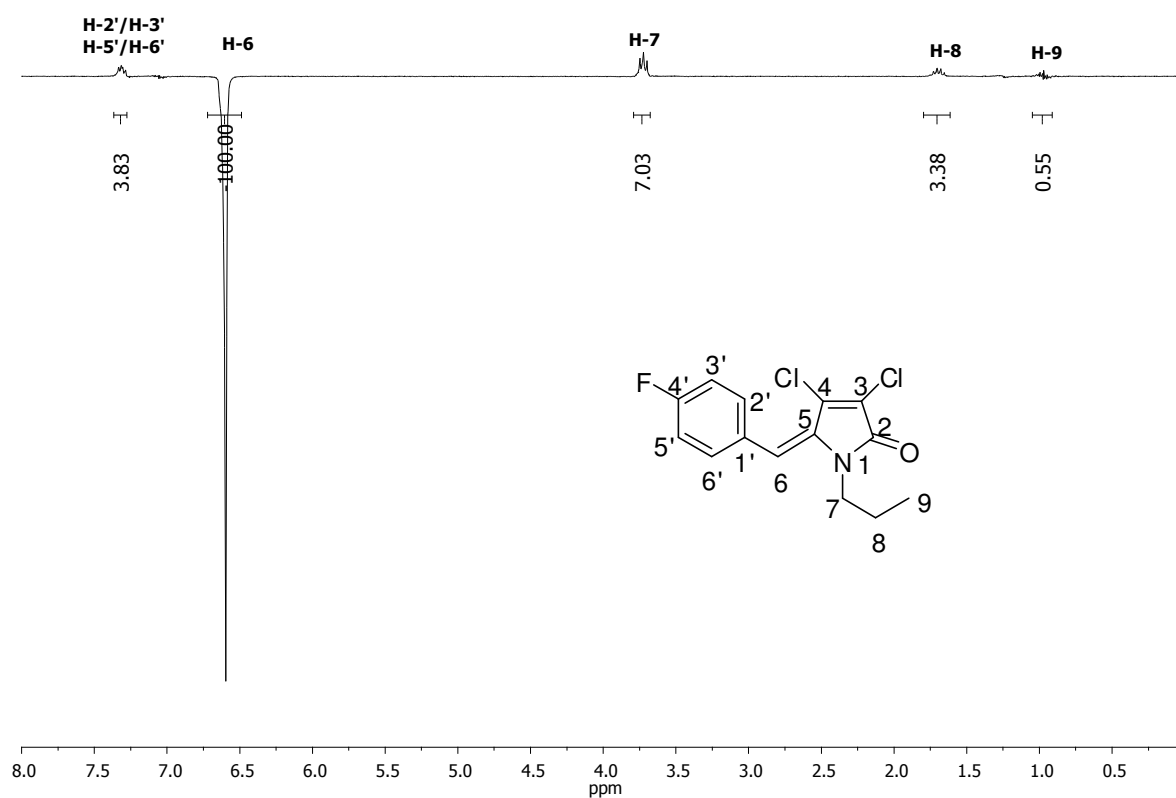


Figura 25 - Espectro de NOEDIF (CDCl_3) das γ -alquilideno- γ -lactamas **35E** e **35Z**, respectivamente.

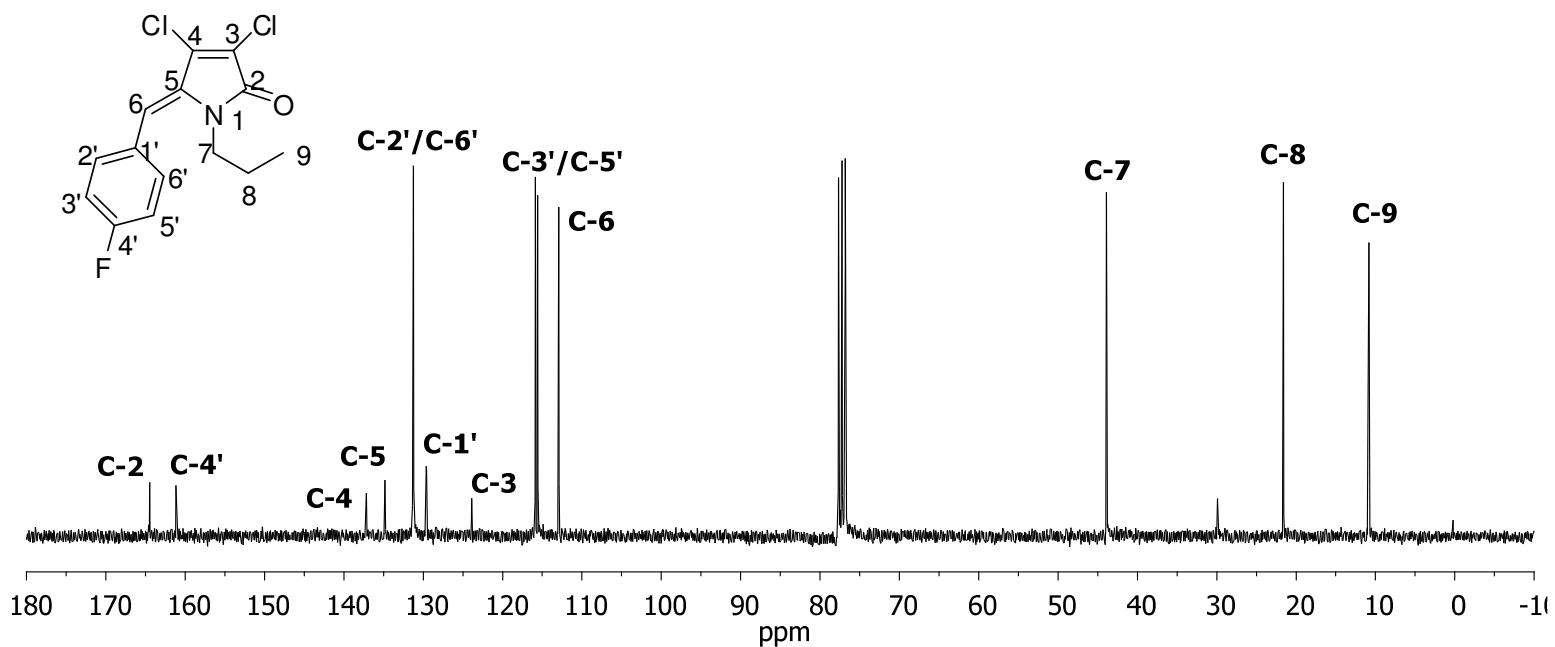
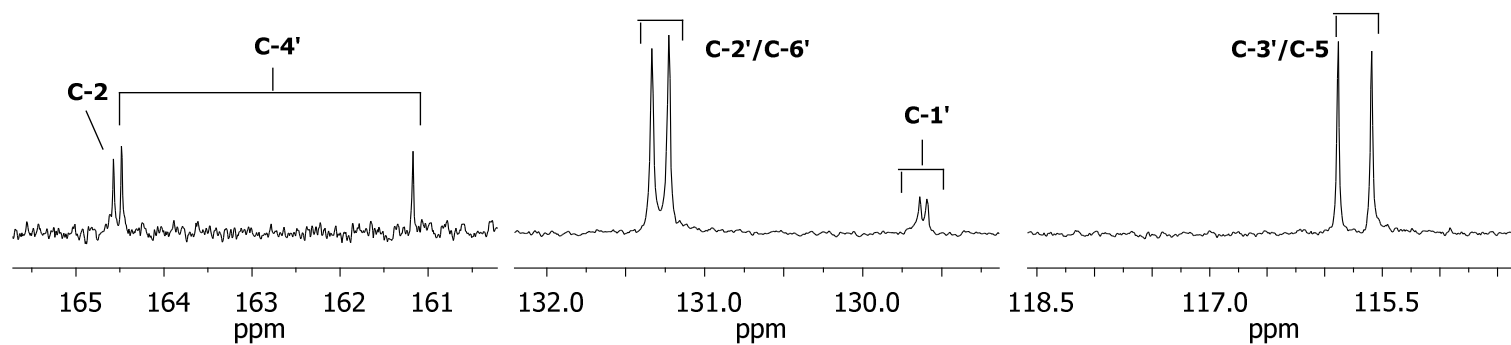


Figura 26 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da γ -alquilideno- γ -lactama **35Z**.

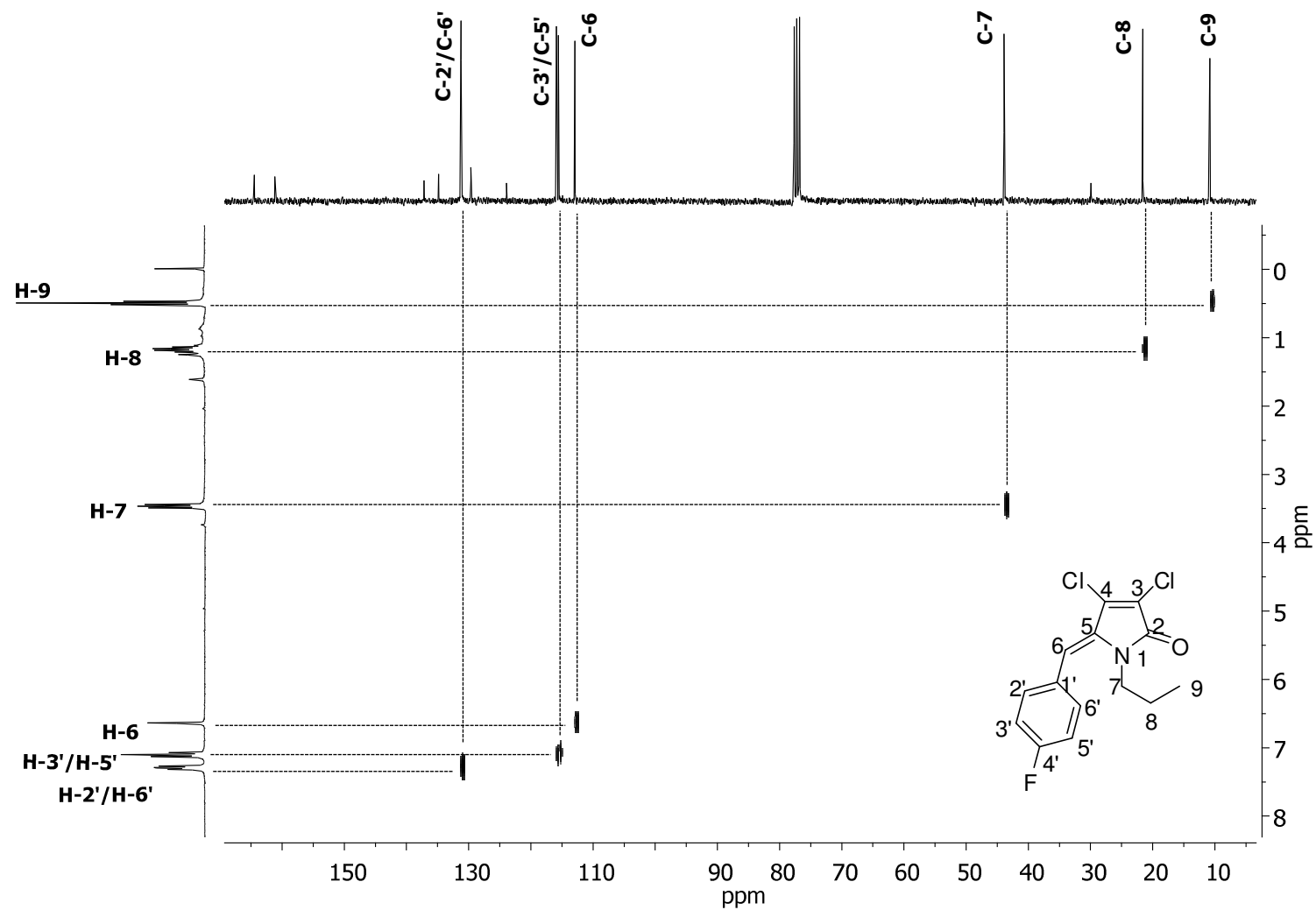


Figura 27 - Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) da γ -alquilideno- γ -lactama **35Z**.

3.5. Avaliação da atividade citotóxica

O ensaio de citotoxicidade foi realizado contra quatro linhagens celulares de câncer humano como HL-60 (leucemia), HCT-116 (côlon de intestino), SF-295 (sistema nervoso central) e OVCAR-8 (ovário). Essas linhagens celulares foram escolhidas pois são as linhagens tumorais mais agressivas, resistentes e estáveis segundo o painel de 60 linhagens tumorais existente no LOE (Laboratório Nacional de Oncologia Experimental). Apesar de serem oriundas de tecidos humanos diferentes, as células utilizadas apresentam características comuns de células neoplásicas (tumores malignos): alta taxa de proliferação, células não diferenciadas e alto número de mecanismos de evasão de apoptose.

A citotoxicidade das lactonas **21-28** e as lactamas **30, 32, 34Z, 34E e 35E** contra essas quatro linhagens celulares de câncer humano, foi avaliada segundo o método MTT (MOSMAN, 1983). Neste ensaio foi realizada uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal amarelo brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H tetrazólio (MTT) para o produto de cor púrpura formazan, através da atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável, permitindo quantificar a porcentagem de células vivas.

Inicialmente, as lactonas **21-28** e as lactamas **30, 32, 34Z, 34E e 35E** foram avaliadas em concentração única (25 µg/mL), em triplicatas, contra três linhagens celulares de câncer humano: HCT-116 (côlon de intestino), OVCAR-8 (ovário) e SF-295 (sistema nervoso central). Nesse caso, os experimentos foram analisados segundo suas médias de inibição. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 5 (p. 76).

Tabela 5 - Porcentagem de redução da viabilidade celular (RVC %) das lactonas **21-28** e as lactamas **30, 32, 34Z, 34E** e **35E** em três linhagens celulares de câncer humano

Compostos	Linhagens celulares RVC (%) [*]		
	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
21	98,27 (MA)	98,99 (MA)	94,12 (MA)
22	97,58 (MA)	93,14 (MA)	92,81 (MA)
23	95,81 (MA)	0,00 (SA)	48,84 (PA)
24	62,17 (Mo)	99,86 (MA)	86,08 (MA)
25	97,68 (MA)	98,99 (MA)	68,44 (MA)
26	76,92 (MA)	98,20 (MA)	92,21 (MA)
27	93,05 (MA)	98,20 (MA)	84,12 (MA)
28	53,64 (Mo)	94,90 (MA)	87,84 (MA)
30	49,89 (PA)	13,42 (PA)	42,06 (PA)
32	25,82 (PA)	9,25 (PA)	10,95 (PA)
34Z	97,93 (Mo)	54,45 (Mo)	48,29 (Mo)
34E	57,48 (Mo)	52,94 (Mo)	58,59 (Mo)
35E	64,83 (Mo)	99,07 (MA)	97,74 (MA)

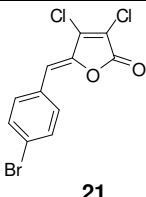
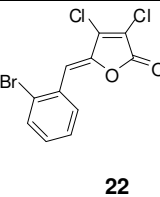
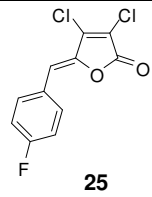
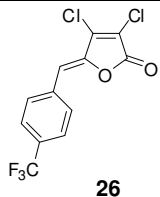
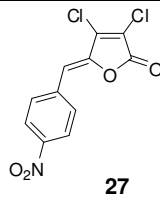
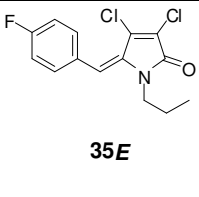
*0% = sem atividade (SA); 1% - 50% = pouca atividade (PA); 50% - 75% = atividade moderada (Mo); 75% - 100% = muita atividade (MA).

Dos treze compostos testados, oito são lactonas e cinco são lactamas. Desses compostos, seis apresentaram alta atividade (MA) citotóxica para as três linhagens celulares de câncer humano testadas (compostos sombreados na Tabela 5). Vale destacar que desses seis compostos mais ativos, cinco são lactonas e apenas um é lactama. Outro fator importante notado é que os compostos mais ativos possuem substituintes halogenados tais como F e Br ligados no anel aromático (Tabela 6, p. 77). Como as modificações estruturais de cada classe de compostos foram limitadas a poucas variações, não foi possível realizar uma relação estrutura-atividade muito precisa.

Assim, procedeu-se com uma investigação mais detalhada da citotoxicidade dos compostos mais ativos, as lactonas **21, 22, 25-27** e a lactama **35E** através da determinação do CR₅₀ (concentração capaz de reduzir a viabilidade celular a 50%). O efeito dessas substâncias foi avaliado contra quatro linhagens de células tumorais: HCT-116 (côlon de intestino), OVCAR-8 (ovário) e SF-295 (sistema nervoso central) e HL-60 (leucemia), usando doxorrubicina como controle positivo, um dos fármacos mais potentes e amplamente utilizado no tratamento do câncer (BRANNON-PEPPAS e BLANCHETTE, 2012). Os valores de CR₅₀ (µg/mL) são apresentados na Tabela 6.

Para determinação dos valores de CR₅₀ (µg/mL), diferentes concentrações foram utilizadas e os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 6 - Valores de CR₅₀ dos compostos **21**, **22**, **25-27** e **35E** em quatro linhagens celulares de câncer humano

Compostos	Linhagens celulares - CR ₅₀ (µg/mL)			
	HCT-116	OVCAR-8	SF-295	HL-60
 21	1,80 ± 1,30	3,01 ± 0,37	3,23 ± 2,09	0,66 ± 0,23
 22	7,09 ± 3,07	2,56 ± 1,22	7,18 ± 1,63	2,22 ± 0,49
 25	5,02 ± 0,51	4,62 ± 0,12	6,62 ± 0,46	2,83 ± 0,51
 26	5,46 ± 1,58	3,96 ± 0,99	8,83 ± 1,55	2,86 ± 0,37
 27	6,51 ± 1,61	2,72 ± 0,54	8,40 ± 2,60	2,57 ± 0,71
 35E	5,02 ± 2,63	3,67 ± 0,08	4,69 ± 0,05	3,33 ± 1,32
Doxorrubicina	0,02 ± 0,02	0,34 ± 0,05	0,24 ± 0,15	0,01 ± 0,01

Todos os compostos testados mostraram moderada atividade citotóxica contra as quatro linhagens celulares de câncer humano testadas. É importante registrar que a amostra **21** destacou-se por apresentar CR₅₀ < 4 µg/mL contra as quatro linhagens testadas e esse composto é uma lactona, produto com menor número de etapas para a síntese do que as lactamas.

Como as linhagens tumorais utilizadas são oriundas de tecidos humanos diferentes, isto permite verificar se o composto teste possui seletividade de ação para alguma linhagem tumoral específica. Assim, permite verificar se o composto teste é mais ativo contra HCT-116 (côlon de intestino), OVCAR-8 (ovário), SF-295 (sistema nervoso central) ou HL-60 (leucemia). Analisando as linhagens celulares separadamente, observa-se que o composto **21** foi muito ativo contra HL-60 (CR₅₀ = 0,66 ± 0,23 µg/mL).

Todos esses compostos foram analisados juntamente com outras lactonas, lactamas e algumas piridazinonas sintetizadas pelo nosso grupo de pesquisa, totalizando 45 compostos. Desses 45 compostos, 18 são lactonas, 21 são lactamas e 7 são piridazinonas. Nenhuma das piridazinonas foram muito ativas contra as linhagens celulares de câncer humano testadas, mas 9 lactonas e 3 lactamas mostraram-se muito ativas (dados ainda não publicados). Isso mostra que um maior

número de lactonas, produtos intermediários para a síntese das lactamas, foram mais ativas do que as lactamas, o que é de grande importância para o estudo de síntese e da atividade biológica pois as lactonas possuem menores números de etapas para sua síntese e ao mesmo tempo são muito ativas. Além disso, dessas lactonas, a maioria não possui substituintes aromáticos nas posições α e β do núcleo lactônico, que são as lactonas sintetizadas nesse trabalho, despertando ainda mais o interesse na síntese desses compostos, uma vez que diminui ainda o número de etapas na síntese das lactonas. E ao final desse ensaio com 45 compostos, a amostra **21** continuou sendo uma das mais ativas contra as linhagens celulares de câncer humano testadas e seletiva para HL-60 ($CR_{50} = 0,66 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$) (dados ainda não publicados).

Como a amostra teste **21** foi seletiva contra HL-60, um ensaio futuro poderá ser realizado com outras linhagens tumorais originárias do mesmo tipo de tecido de HL-60, para aprofundar o estudo de seletividade deste composto.

3.6. Avaliação da inibição da formação de biofilmes bacterianos

A avaliação da inibição da formação de biofilmes bacterianos foi realizada com a bactéria *Streptococcus mutans*. Esta é uma espécie de bactéria Gram-positiva encontrada na região bucal dos humanos e é o principal fator do desenvolvimento de cáries (MUNSON *et al.*, 2004).

Antes da quantificação da inibição da formação do biofilme pelas lactonas **20**, **21**, **23** e **25-29** e lactamas **30**, **32**, **35Z** e **35E**, foi avaliado o efeito desses compostos no crescimento planctônico de *S. mutans*. Essa análise é importante para estabelecer se eventuais efeitos na formação do biofilme ocorreram especificamente devido à inibição do biofilme ou poderia ser atribuída também a um efeito indireto dos compostos na viabilidade bacteriana. Para isso, o crescimento bacteriano foi quantificado na presença de cada composto nas concentrações de 87,5, 43,8, 21,9, 10,9, 5,5, 2,73, 1,37, 0,68, 0,34 e 0,17 $\mu\text{g/mL}$ pela absorbância a 630 nm usando um leitor de microplacas. Esses dados são apresentados na Tabela 7 (p. 79).

Tabela 7 - Efeito dos compostos **20, 21, 23, 25-30, 32, 35Z** e **35E** nas concentrações de 87,5, 43,8, 21,9, 10,9, 5,5, 2,73, 1,37, 0,68, 0,34 e 0,17 µg/mL sobre o crescimento planctônico de *S. mutans*

Compostos	Efeito sobre o crescimento planctônico (%)*									
	Concentração (µg/mL)									
	87,5	43,8	21,9	10,9	5,5	2,73	1,37	0,68	0,34	0,17
20	-16,9	-10,8	-6,6	1,7	-8,5	0,9	1,5	1,9	1,5	-2,4
21	26,8	29,8	19,5	25,2	22,9	15,0	6,0	7,2	2,0	-0,4
23	-26,0	0,8	-7,4	4,1	10,6	14,2	21,6	22,2	21,3	18,3
25	26,3	-4,9	12,1	15,7	23,1	16,7	10,8	16,3	10,5	3,3
26	21,8	-2,7	-15,2	-18,3	-10,6	-1,1	-2,5	7,3	2,6	2,8
27	0,0	1,4	2,6	12,4	13,0	18,9	24,4	20,9	24,3	25,4
28	-161,7	-80,0	-42,5	-19,4	1,1	11,9	18,9	15,9	16,7	10,9
29	-59,7	-49,2	-4,3	-16,1	-6,4	0,3	0,9	0,4	4,9	1,9
30	-70,6	-77,9	-62,4	-37,3	-32,8	-26,0	-21,8	-0,9	-6,8	-8,8
32	-12,3	-35,6	-24,8	-11,1	-8,6	-4,8	-5,0	-0,1	1,4	-0,4
35Z	-70,6	-77,9	-62,4	-37,3	-32,8	-26,0	-21,8	-0,9	-6,8	-8,8
35E	-12,3	-35,6	-24,8	-11,1	-8,6	-4,8	-5,0	-0,1	1,4	-0,4

* Valores positivos referem-se à indução do crescimento planctônico.

Os resultados da Tabela 7 mostram que a maioria dos compostos inibem o crescimento planctônico de *S. mutans*, variando de 0,4% a 80,0%. Também foi observada a indução do crescimento planctônico para alguns compostos, mas nenhum ultrapassou o valor de 30%.

Conforme mencionado, a análise prévia da atividade dos compostos sobre o crescimento bacteriano é importante para estabelecer se os efeitos na formação do biofilme ocorreram especificamente devido a uma inibição da aderência bacteriana ou se também é influenciado pela inibição do crescimento planctônico. Portanto, considerou-se que a atividade dos compostos sobre a inibição do biofilme bacteriano não é exclusiva pois o mesmo é capaz de inibir o crescimento planctônico.

Prosseguiu-se o ensaio analisando o efeito inibitório dos compostos **20, 21, 23, 25-30, 32, 35Z** e **35E** sobre a formação do biofilme bacteriano de *S. mutans* através do ensaio de coloração com cristal violeta. Assim, foram calculados os valores de IC₅₀ (concentração dos compostos necessária para inibir em 50% a formação do biofilme bacteriano), conforme apresentado na Tabela 8. Todos os

valores de IC₅₀ foram obtidos a partir de experimentos realizados em triplicatas.

Tabela 8 - Valores de IC₅₀ dos compostos **20**, **21**, **23**, **25-30**, **32**, **35Z** e **35E** sobre a formação do biofilme bacteriano de *S. mutans*

Compostos	IC ₅₀ (µg/mL) <i>S. mutans</i>	Compostos	IC ₅₀ (µg/mL) <i>S. mutans</i>
20	> 87,5	28	> 87,5
21	> 87,5	29	> 87,5
23	> 87,5	30	> 87,5
25	> 87,5	32	> 87,5
26	0,21 ± 0,05	35Z	> 87,5
27	> 87,5	35E	22,74 ± 24,64

Os ensaios de inibição do biofilme bacteriano de *S. mutans* revelaram que para a maioria dos compostos avaliados o valor de IC₅₀ é superior à maior concentração testada (87,5 µg/mL), indicando que o estudo dose-resposta não foi satisfatório. Entretanto, dentre os compostos testados, destaca-se o composto **26** como o mais promissor como inibidor do biofilme bacteriano, uma vez que apresentou um valor de IC₅₀ equivalente a 0,21 ± 0,05 µg/mL (Tabela 8). Além disso, a lactona **26** apresentou valores moderados para a inibição do crescimento planctônico de *S. mutans*, mostrando que o crescimento planctônico não afetou o resultado da inibição do biofilme bacteriano para essa espécie. Na literatura, foi reportado o composto sintético **48** como um bom inibidor do biofilme de *S. mutans* com um valor de IC₅₀ equivalente a 0,28 ± 0,02 µg/mL, após uma triagem de 506 compostos (Figura 29) (LIU et al., 2011), confirmando que o valor de IC₅₀ encontrado para o composto **26** é promissor para inibição do biofilme bacteriano de *S. mutans*. No entanto, o IC₅₀ de **26** não é tão expressivo frente a carolactona **49** (Figura 28, p. 81), isolada da bactéria *Sorangium cellulosum*, relatada como uma substância extremamente eficiente no combate a *S. mutans*, apresentando concentração equivalente a 0,02 µg/mL para a inibição de 60% do biofilme dessa espécie (WORTHINGTON et al., 2012).

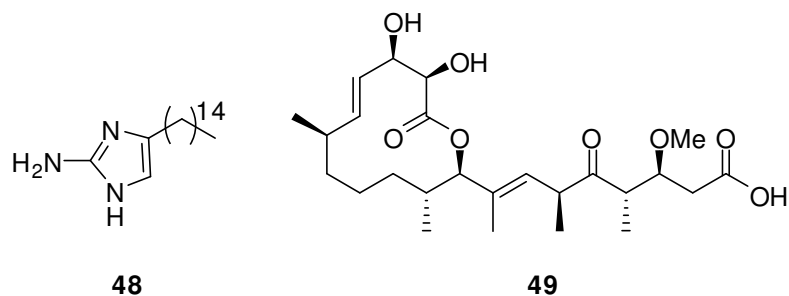


Figura 28 - Exemplos de inibidores do biofilme de *S mutans*.

Como os valores obtidos no cálculo de IC₅₀ para a maioria desses compostos não foram precisos, optou-se por apresentar os dados de inibição da formação desses biofilmes em que os compostos foram avaliados na concentração de 44 µg/mL, conforme o Gráfico 1.

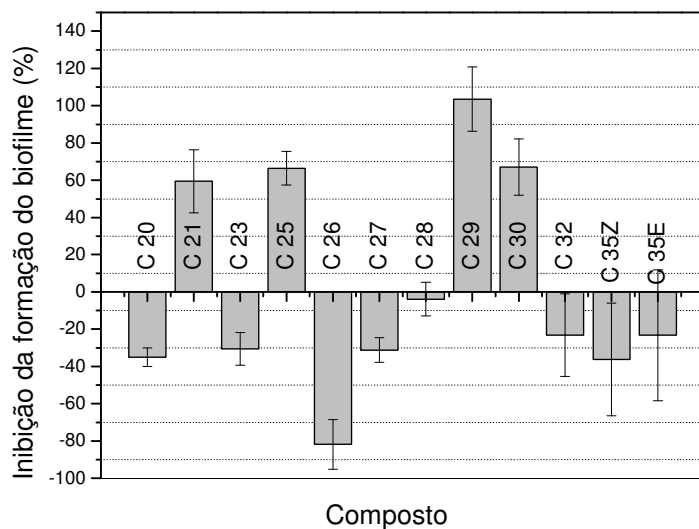


Gráfico 1 - Efeito dos compostos **20**, **21**, **23**, **25-30**, **32**, **35Z** e **35E** na concentração de 44 µg/mL sobre a formação do biofilme bacteriano de *S. mutans*.

Avaliando os dados de inibição da formação do biofilme de *S. mutans*, o composto mais ativo na concentração de 44 µg/mL foi a γ -alquilideno- γ -lactona **26** que foi capaz de inibir esse biofilme em 82%. E somente para esse composto **26**, foi possível calcular o valor de concentração capaz de inibir a formação do biofilme em 50% (IC₅₀), que foi de 0,21 µg/mL. No entanto, o composto **29** foi um inibidor do

biofilme bacteriano extremamente ruim, induzindo o crescimento do mesmo em 104%. As estruturas dos compostos **26** e **29** encontram-se na Figura 29.

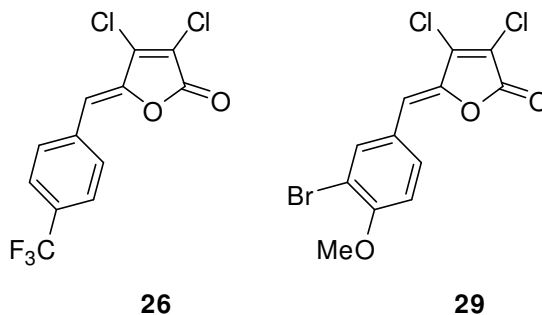


Figura 29 - Estruturas dos compostos **26** e **29**.

Considerando o resultado obtido para cada composto analisado, pode-se notar que nenhuma relação estrutura-atividade pode ser obtida desde que as modificações estruturais de cada classe de compostos foram limitadas a poucas variações e os valores de IC_{50} para a maioria dos compostos não foi precisa.

Como a atividade desses compostos não foi estudada completamente, considerando seus efeitos nas bactérias em estudo, não é sabido se, além de afetar a formação do biofilme, eles também interferem em outros caminhos metabólicos.

Para uma melhor investigação dessas lactonas e lactamas frente a inibição do biofilme bacteriano, é de interesse um futuro estudo desses compostos em diferentes linhagens bacterianas.

4. Conclusão

Foi descrita uma sequência de reações que resultou no preparo de γ -alquilideno- γ -lactonas cloradas e γ -lactamas derivadas **21-35**. A alquilidação da lactona **20** levou a formação mais eficiente das γ -alquilideno- γ -lactonas com substituintes doadores de elétrons. A lactamização de algumas dessas γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas permitiu a síntese de γ -hidroxipirrol-2(5*H*)-onas e dos isômeros de γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas com bons rendimentos.

No total, dezessete moléculas foram sintetizadas, das quais: nove são (*Z*)- γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas, quatro γ -hidroxipirrol-2(5*H*)-onas, dois (*Z*)- γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas e dois (*E*)- γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas. A estereoquímica *Z* das (*Z*)- γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas deve ser influenciada pela existência de ligações de hidrogênio intramoleculares não clássicas. Experimentos de NOEDIF determinaram a configuração da ligação dupla exocíclica das γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas.

Foi avaliada a atividade citotóxica dos compostos **21-27**, **30**, **32**, **34Z**, **34E** e **35E** em quatro linhagens celulares de câncer humano. Destes doze compostos, todos apresentaram atividade inibitória no crescimento de células cancerígenas, mesmo que moderadamente, sendo a substância **21** a mais ativa contra as quatro linhagens testadas. Além disso, **21** foi muito ativo especificamente contra uma linhagem celular, HL-60 ($CR_{50} = 0,66 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$).

Os ensaios de inibição do biofilme bacteriano de *S. mutans* pelos compostos **20**, **21**, **23**, **25-30**, **32**, **35Z** e **35E** não revelaram resultados muito satisfatórios, uma vez que, a maioria desses compostos apresentaram valores de IC_{50} superiores à maior concentração testada (87,5 $\mu\text{g/mL}$). No entanto, o composto **26** mostrou-se muito ativo, apresentado IC_{50} equivalente a $0,21 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$.

As γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas mostraram-se mais ativas do que as lactamas nos dois ensaios biológicos realizados. Como sabe-se que os rendimentos para obtenção de alguns desses compostos mais ativos são baixos, é interessante a busca por melhores rendimentos nas reações de condensação aldólica para obtenção das γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas.

5. Referências Bibliográficas

ALVI, K.A.; CASEY, A.; NAIR, B. G. *Pulchellalactam*: A CD45 protein tyrosine phosphatase inhibitor from the marine fungus *Corollospora pulchella*. *J. Antibiotics*, v. 51, p. 515-517, **1998**.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J.; PINHEIRO, P. F.; VAREJÃO, J. O. S.; MONTANARI, R. M. Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana de furanonas halogenadas e de compostos análogos aos nostoclídeos. *Quim. Nova*, v. 33, n. 10, p. 2020-2026, **2010a**.

BARBOSA, L. C. A.; TEIXEIRA, R. R.; PINHEIRO, P. F.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J. Estratégias para a síntese de γ -alquilidenobutenolídeos. *Quim. Nova*, v. 33, p. 1163-1174, **2010b**.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim. Nova*, v. 32, p. 679-688, **2009**.

BAUER, A.; BRONSTRUP, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Nat. Prod. Rep.*, v. 31, p. 35-60, **2014**.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug. Deliv. Ver.*, v. 64, p. 206-212, **2012**.

BELLINA, F.; ANSELMINI, C.; MARTINA, F.; ROSSI, R. Mucochoric Acid: A useful synthon for the selective synthesis of 4-aryl-3-chloro-2(5H)-furanones, (Z)-4-aryl-5-[1-(aryl)methylidene-3-chloro-2(5H)-furanones and 3,4-diaryl-2(5H)-furanones. *Eur. J. Org. Chem.*, v. 35, p. 2290-2302, **2003**.

BELLINA, F.; ANSELMINI, C.; VIEL, S.; MANNINA, L.; ROSSI, R. Selective synthesis of (Z)-4-aryl-5-[1-(aryl)methylidene]-3-bromo-2-(5H)-furanones. *Tetrahedron*, v. 57, 9997-10007, **2001**.

BELLINA, F.; ROSSI, R. Mucochloric and mucobromic acids: inexpensive, highly functionalized starting materials for the selective synthesis of variously substituted 2(5*H*)-furanone derivatives, sulfur- or nitrogen-containing heterocycles and stereodefined acyclic unsaturated dihalogenated compounds. *Curr. Org. Chem.*, v. 8, p. 1089-1103, **2004**.

BOUKOUVALAS, J.; BELTRAN, P.P.; LACHANCE, N.; COTE, S.; MALTAIS, F.; POULIOT, M. A new highly stereoselective synthesis of β -unsaturated (*Z*)- γ -alkylidenebutenolides using bromine as a removable stereocontrol element. *Synlett*, v. 2, p. 219-222, **2007**.

BOUKOUVALAS, J.; MALTAIS, F.; LACHANCE, N. Furanolate-Based Strategy for Sequential 2,3,4-Trisubstitution of Butenolide: Total Synthesis of Nostoclidin I and II. *Tetrahedron Lett.*, v. 35, p. 7897-7900, **1994**.

BRUCKNER, R. The synthesis of γ -alkylidenebutenolides. *Curr. Org. Chem.*, v. 5, p. 679-718, **2001**.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Organic Chemistry. New York: Oxford University Press, p. 1512, **2001**.

COREAS, N. M. G. Síntese de novos γ -alquilidenobutenólídeos como inibidores de uréase e tentativa de otimização de reações de alquilidação. Dissertação (Mestrado em Agroquímica – Química) – Universidade Federal de Viçosa, **2014**.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1830, p. 3670-3695, **2013**.

CUNHA, S.; OLIVEIRA, C. C. Aplicações sintéticas do ácido mucobromico e da 3,4-dibromofuran-2(5*H*)-ona. *Quim. Nova*, v. 34, p. 1425-1438, **2011**.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, v. 2, p. 114-122, **2003**.

DE SOUZA, M. V. N. The furan-2(5H)-ones: Recent synthetic methodologies and its application in total synthesis of natural products. *Mini-Rev. Org. Chem.*, v. 2, p. 139-145, **2005**.

EL-TOMBARY, A. A.; ABDEL-GHANY, Y. S.; BELAL, A. S. F.; EL-DINE, S. A. S.; SOLIMAN, F. S. G. Synthesis of some substituted furan-2(5H)-ones and derived quinoxalinones as potential anti-microbial and anti-cancer agents. *Med. Chem. Res.*, v. 20, p. 865-876, **2011**.

FANG, X.; ANDERSON, J. E.; CHANG, C.; McLAUGHLIN, J. L. Three new bioactive styryllactones from *Goniothalamus giganteus* (Annonaceae). *Tetrahedron*, v. 47, p. 9751-9758, **1991**.

FERLAY, J.; SHIN, H.-R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2012: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.*, v. 127, p. 2893-2917, **2014**.

FLEMATTI, G. R.; GHISALBERTI, E. L.; DIXON, K. W.; TRENGOVE, R. D. A compound from smoke that promotes seed germination. *Science*, v. 305, p. 977, **2004**.

GIVSKOV, M.; NYS, R.; MANEFIELD, M.; GRAM, L.; MAXIMILIEN, R.; EBERL, L.; MOLIN, S.; STEINBERG, P. D.; KJELLEBERG, S. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J. Bacteriol.*, v. 178, p. 6618-6622, **1996**.

GOH W.K., ISKANDER G., BLACK D.S., KUMAR N. An efficient lactamization of fimbrolides to novel 1,5-dihydropyrrol-2-ones. *Tetrahedron Lett.*, v. 48, p. 2287-2290, **2007**.

JEMAL, A; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. *A Cancer J. Clin.*, v. 61, p. 69-90, **2011**.

KIMURA, Y.; NAKAJIMA, H.; HAMASAKI, T.; MATSUMOTO, T.; MATSUDA, Y.; TSUNEDA, A. Ampullicin and isoampullicin, new metabolites from an *Ampulliferina-like* fungus sp. No. 27. *Agric. Biol. Chem.*, v. 54, p. 813-814, **1990**.

KUANG, H.; YANG, B.; XIA, Y.; FENG, W. Chemical constituents from the flower of *Datura metel* L. *Arch. Pharm. Res.*, v. 31, p. 1094-1097, **2008**.

LIGHT, M. E.; DAWS, M. I.; STADEN, J. V. Smoke-derived butenolide: towards understanding its biological effects. *S. Afr. J. Bot.*, v. 75, p. 1-7, **2009**.

LIU, C.; WORTHINGTON, R. J.; MELANDER, C.; WU, H. a new small molecule specifically inhibits the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* in multispecies biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 55, p. 2679–2687, **2011**.

MAY, M. Drug development: Time for teamwork. *Nature*, v. 509, p. S4, **2014**.

MIAO, S.; ANDERSEN, R. J. Rubrolides A-H, metabolites of the colônia Itunicate *Ritterella rubra*. *J. Org. Chem.*, v. 56, p. 6275-6280, **1991**.

MOORE, R. D.; KATON, J. E. The vibrational spectra and structure of mucochloric and mucobromic acids. *Appl. Spectrosc.*, v. 32, p. 145-151, **1978**.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v.65, p 55-63, **1983**.

MUNSON, M. A.; BANERJEE, A.; WATSON, T. F.; WADE, W. G. Molecular Analysis of the Microflora Associated with Dental Caries. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 3023-3029, **2004**.

NAY, B.; RIACHE, N.; EVANNO, L. Chemistry and biology of non-tetramic γ -hydroxy- γ -lactamas and γ -alkylidene- γ -lactamas from natural sources. *The R. Soc. Chem.*, v. 26, p.10 μ -1062, **2009**.

NEGISHI, E.; KOTORA, M. Regio and stereoselective synthesis of γ -alkylidenebutenolides and related compounds. *Tetrahedron*, v. 53, p. 6707-6738, **1997**.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, v. 75, p. 311-335, **2012**.

NUNES, M. C. P.; CASATI, M. Z.; VILLALPANDO, K. T.; CIRANO, F. R. Contribuição do estudo do biofilme dentário para o tratamento das doenças periodontais. *Rev. Inst. Ciênc. Saúde*, v. 25, p. 55-61, **2007**.

OMS (WHO, World Health Organization). Acessado em: 01 novembro, **2014**. Disponível: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.

ORTEGA, M. J.; ZUBÍA, E.; OCAÑA, J. M.; NARANJO, S.; SALVÁ, J. New rubrolides from the Ascidian *Synoicum blochmanni*. *Tetrahedron*, v. 56, p. 3963-3967, **2000**.

PEREIRA, U. A.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J.; MASOOD, M. A.; PIMENTA, A. L. γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5H)-ones analogues to rubrolides as inhibitors of biofilm formation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 24, p. 1052-1056, **2014a**.

PEREIRA, U. A.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J.; MASOOD, M. A.; PIMENTA, A. L. Inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by highly active lactones and lactams analogues of rubrolides. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 82, p. 127-138, **2014b**.

PERRIN, D.D.; ARMAREGO, W.L.F. Purification of Laboratory Chemicals, Oxford: Pergamon Press, p. 391, **1998**.

PRETSCH, E.; SIMON, W.; SEIBL, J.; CLERC, T. Tables of spectral data for structure determination of organic compounds, 2 ed., Berlin: Springer-Verlag, **1989**.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 6 ed., Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos, Editora S.A., p. 460, **2000**.

SMITH, C. J.; HETTICH, R. L.; JOMPA, J.; TAHIR, A.; BUCHANAN, M. V.; IRELAND, C. M. Cadiolides A and B, New Metabolites from an Ascidian of the Genus Botryllus. *J. Org. Chem.*, v. 63, p. 4147-4150, **1998**.

SUZUKI, S.; HOSOE, T.; NOZAWA, K.; KAWAI, K.; YAGUCHI, T.; UDAGAWA, S. Antifungal substances against pathogenic fungi, talaroconvolutins, from *Talaromyces convolutus*. *J. Nat. Prod.*, v. 63, p. 768-772, **2000**.

TANG, K.; ZHANG, X-H. Quorum Quenching Agents: Resources for Antivirulence Therapy. *Mar. Drugs*, v. 12, p. 3245, **2014**.

TEIXEIRA, R. R.; BARBOSA, L. C. A.; FORLANI, G.; PILÓ-VELOSO, D.; WALKIMAR, J.; CARNEIRO, M. Synthesis of photosynthesis-inhibiting nostoclides analogues. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 2321-2329, **2008a**.

TEIXEIRA, R. R. Síntese e avaliação das atividades fitotóxicas de compostos análogos aos nostoclídeos. Tese (Doutorado em Ciências - Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, p. 222, **2008b**.

TEIXEIRA, R. R.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; ROCHA, M. E.; BEZERRA, D. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M.O. Synthesis and Cytotoxic Activity of Some 3-Benzyl-5-Arylidenefuran-2(5H)-ones. *Molecules*, v. 12, p. 1101-1116, **2007**.

VALENTE, E. J.; FULLER, J. F.; BALL, J. D. Pseudoacids. I. 4- and 5-oxoacids. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, v. B54, p. 162-173, **1998**.

VAREJÃO, J. O. S. Síntese e avaliação da atividade fitotóxica de compostos heteroaromáticos análogos aos nostoclídeos. Dissertação (Mestrado em

Agroquímica – Química) – Universidade Federal de Viçosa, p. 74, **2011**.

WEBER, V.; COUDERT, P.; RUBAT, C.; DUROUX, E.; VALLÉE-GOYET, D.; GARDETTE, D.; BRIA, M.; ALBUISSON, E.; LEAL, F.; GRAMAIN, J.; COUQUELET, J.; MADESCLAIRE, M. Novel 4,5-diaryl-3-hydroxy-2(5*H*)-furanones as anti-oxidants and anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 10, p. 1647-1658, **2002**.

WORTHINGTON, R. J.; RICHARDS, J. J.; MELANDER, C. Small molecule control of bacterial biofilms. *Organic and Biomolecular Chemistry*. v. 10, p. 7457-7474, **2012**.

XU, H.W.; WANG, J.F.; LIU, G.Z.; HONG, G.F.; LIU, H.M. Facile synthesis of γ -alkylidenebutenolides. *Org. Biomol. Chem.*, v. 5, p. 1247-1250, **2007**.

XUEMIN, Y.; YUZURU, S.; STEINER, J. S.; CLARDY, J. Nostoclides I e II, Extracellular Metabolites from a Symbiotic Cyanobacterium, *Nostoc sp.*, from the Lichen *Peltigera canina*. *Tetrahedron Lett.*, v. 34, p. 761-764, **1993**.

YANG, Y.-L.; LU, C.-P.; CHEN, M.-Y.; CHEN, K.-Y.; WU, Y.-C.; WU, S.-H. Cytotoxic polyketides containing tetramic acid moieties isolated from the fungus *Myceliophthora thermophila*: elucidation of the relationship between cytotoxicity and stereoconfiguration. *Chem. Eur. J.*, v. 13, p. 6985-6991, **2007**.

6. Anexos

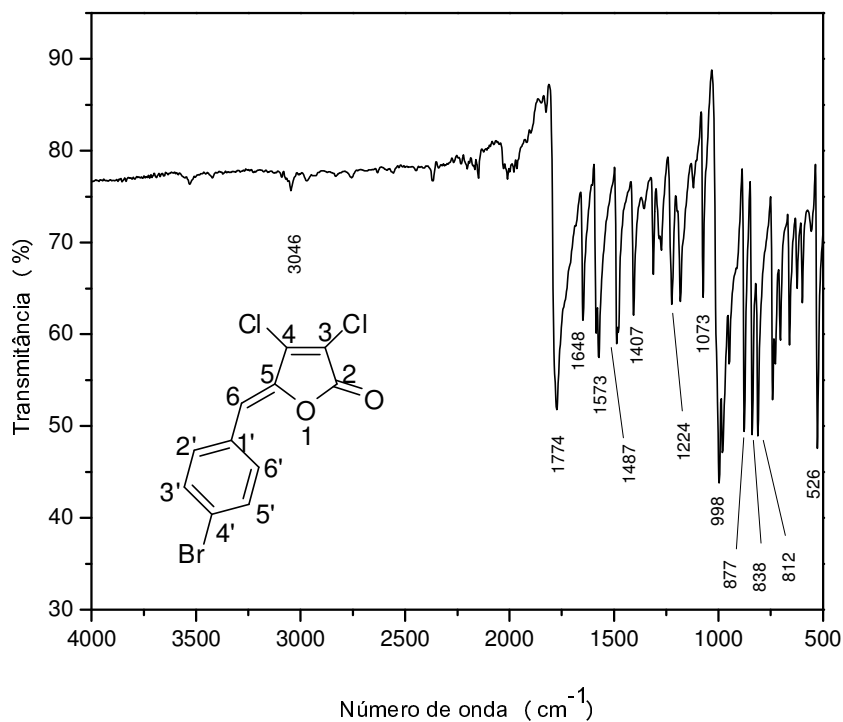


Figura 30: Espectro no IV (ATR) do composto **21**.

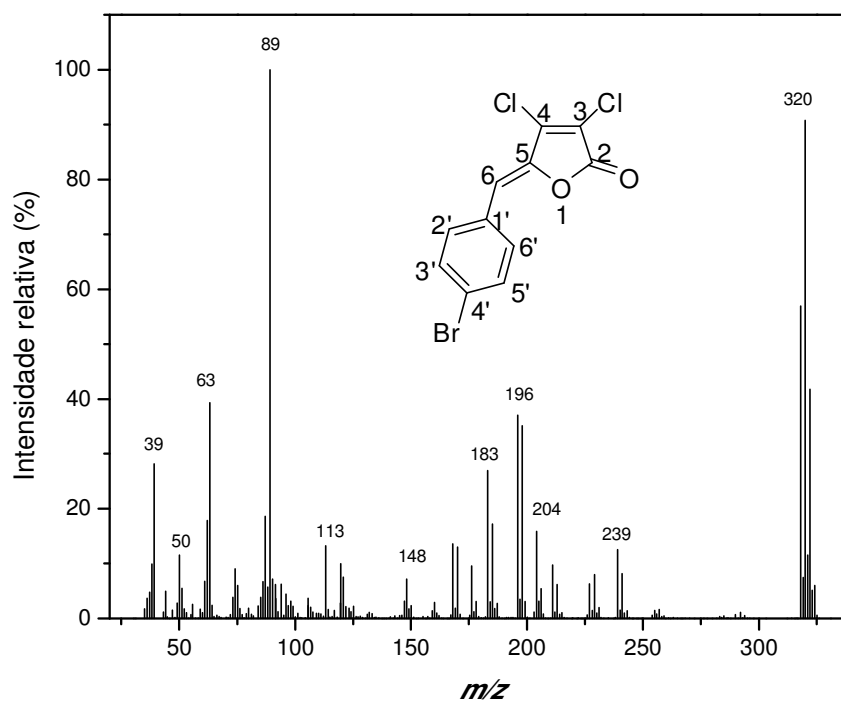


Figura 31: Espectro de massas do composto **21**.

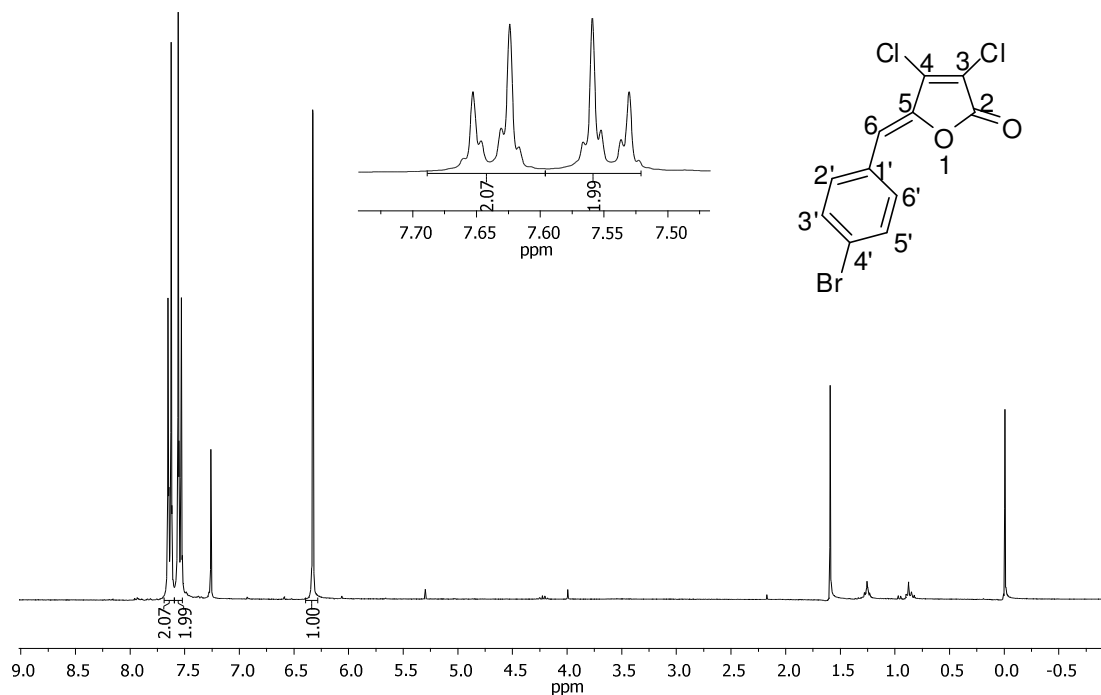


Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **21**.

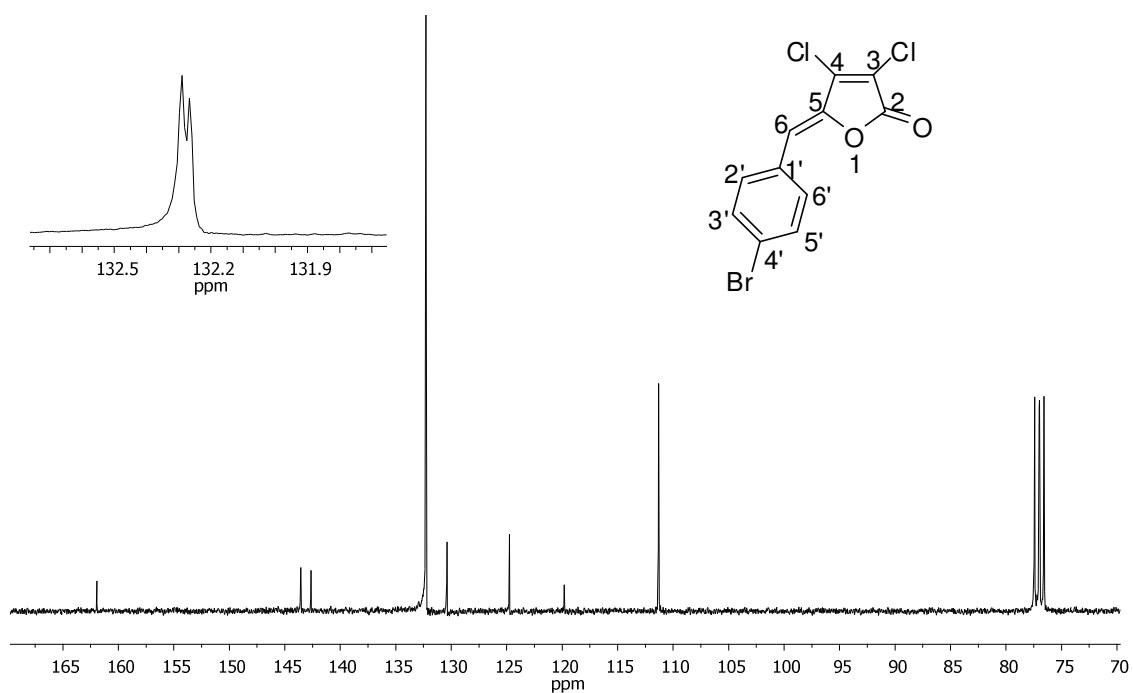


Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **21**.

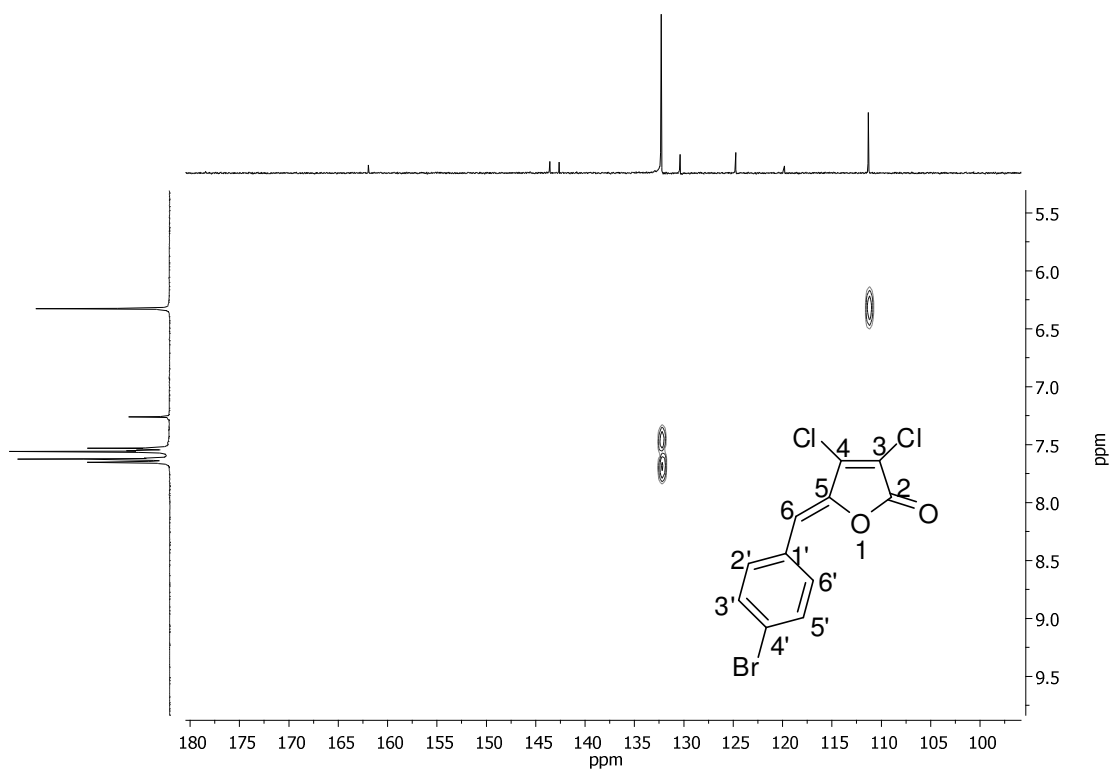


Figura 34: Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) do composto **21**.

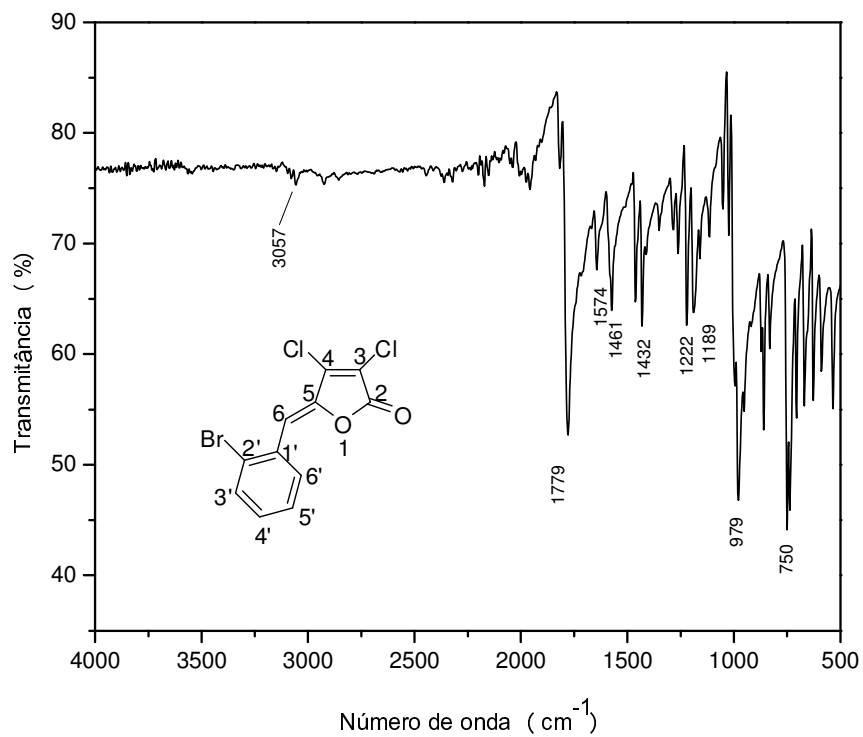


Figura 35: Espectro no IV (ATR) do composto **22**.

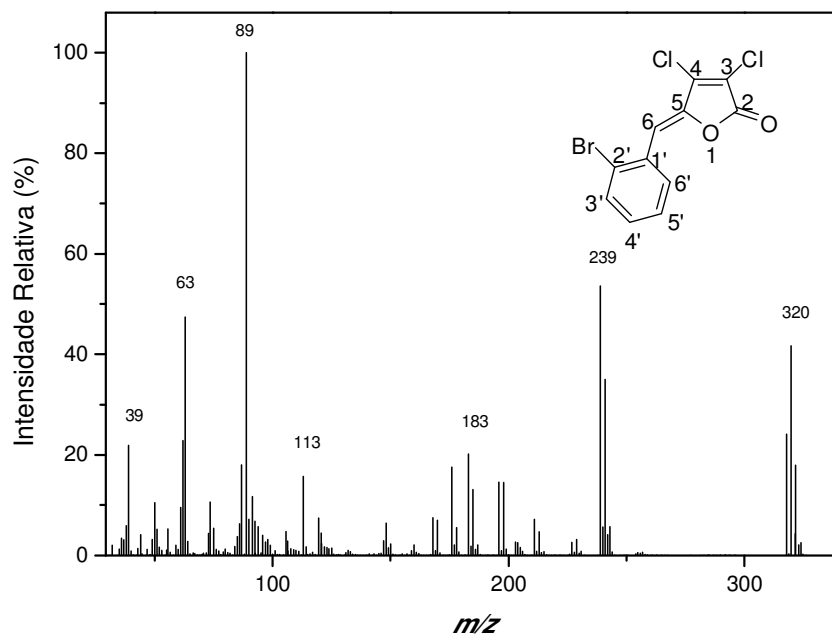


Figura 36: Espectro de massas do compso 22.

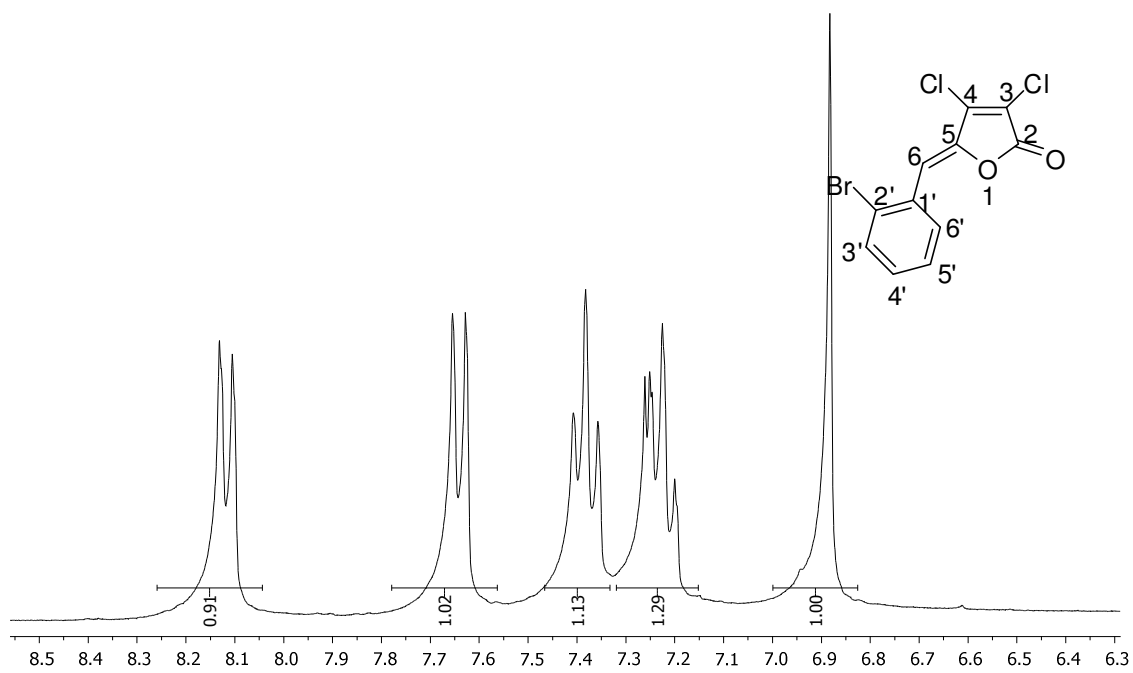


Figura 37: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do compso 22.

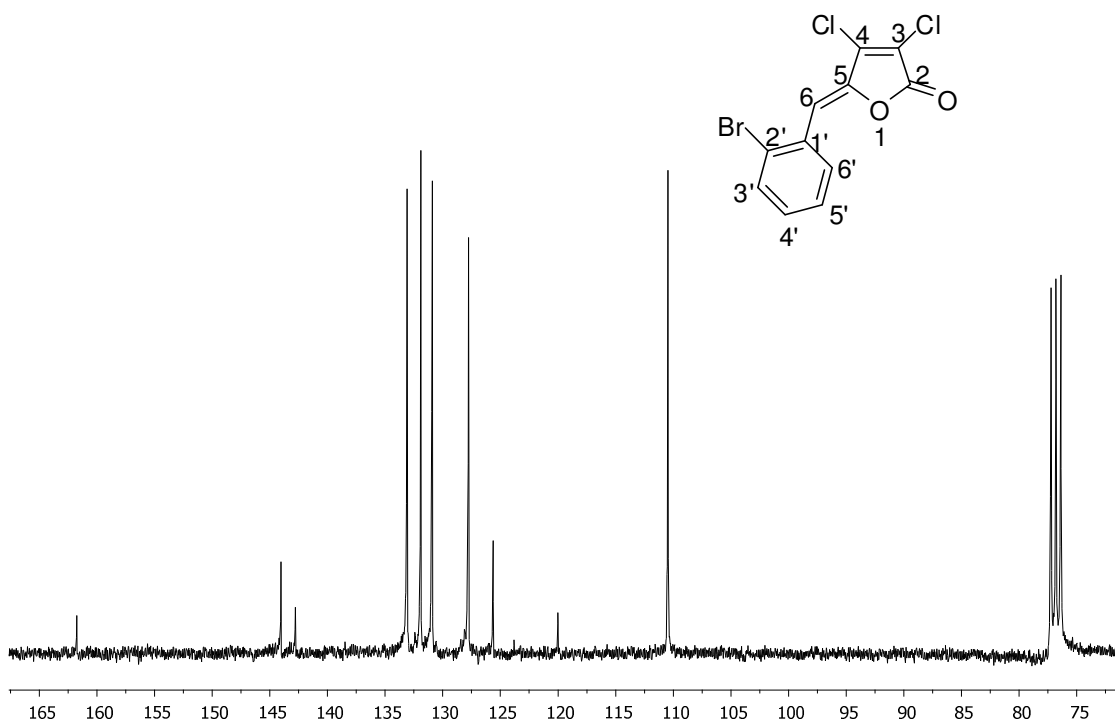


Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **22**.

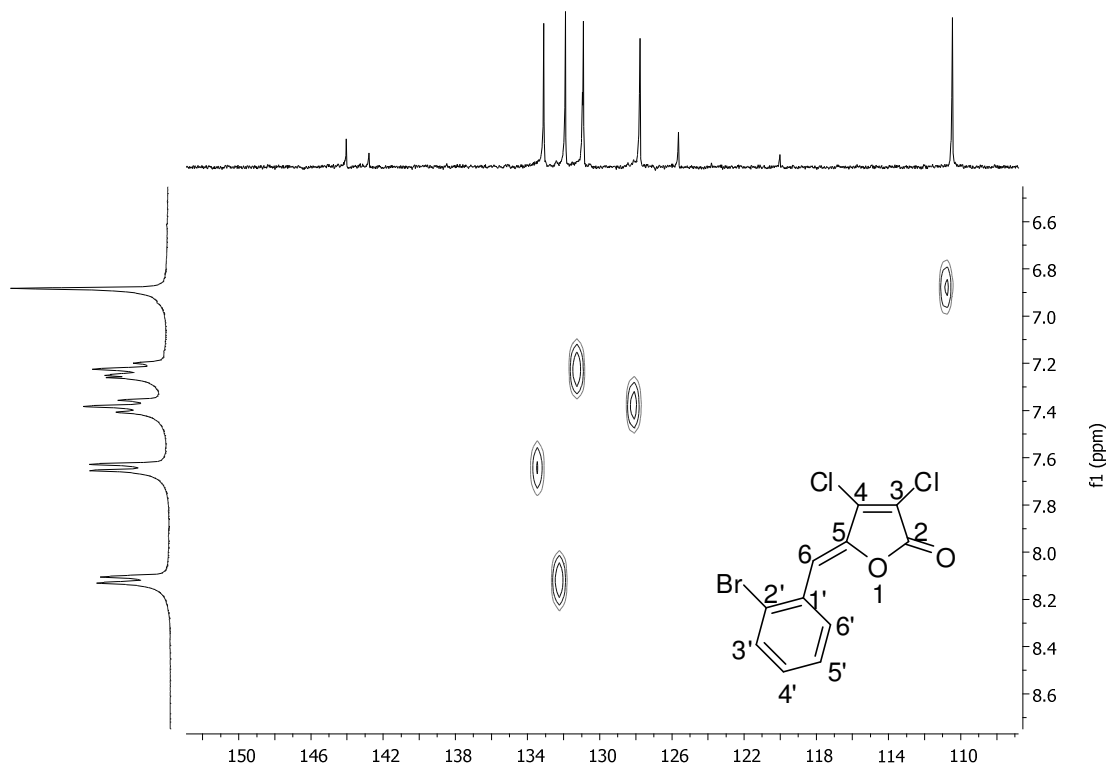


Figura 39: Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) do composto **22**.

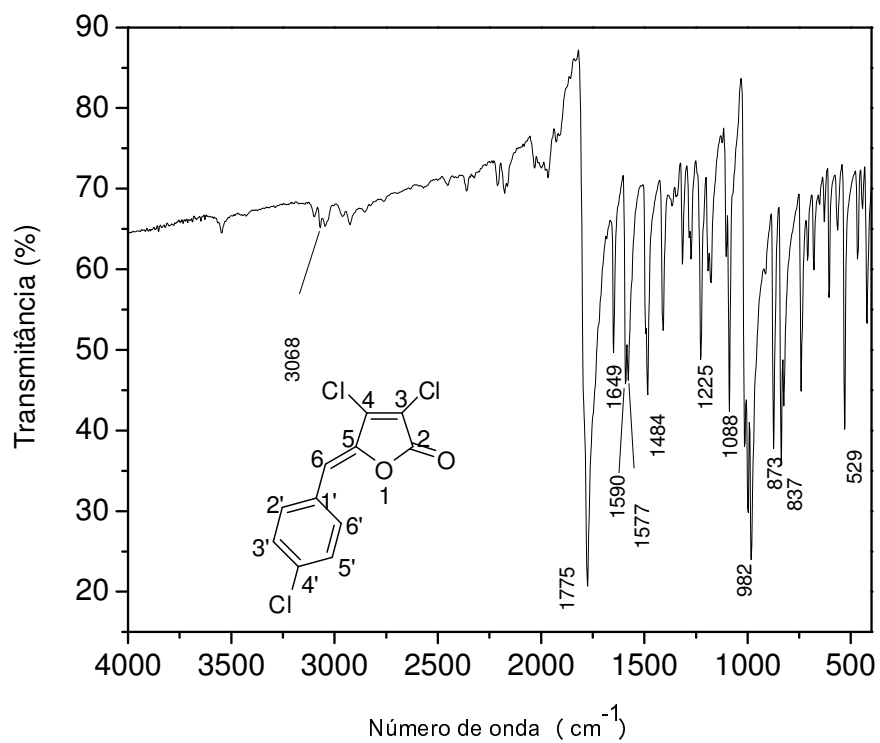


Figura 40: Espectro no IV (ATR) do composto **23**.

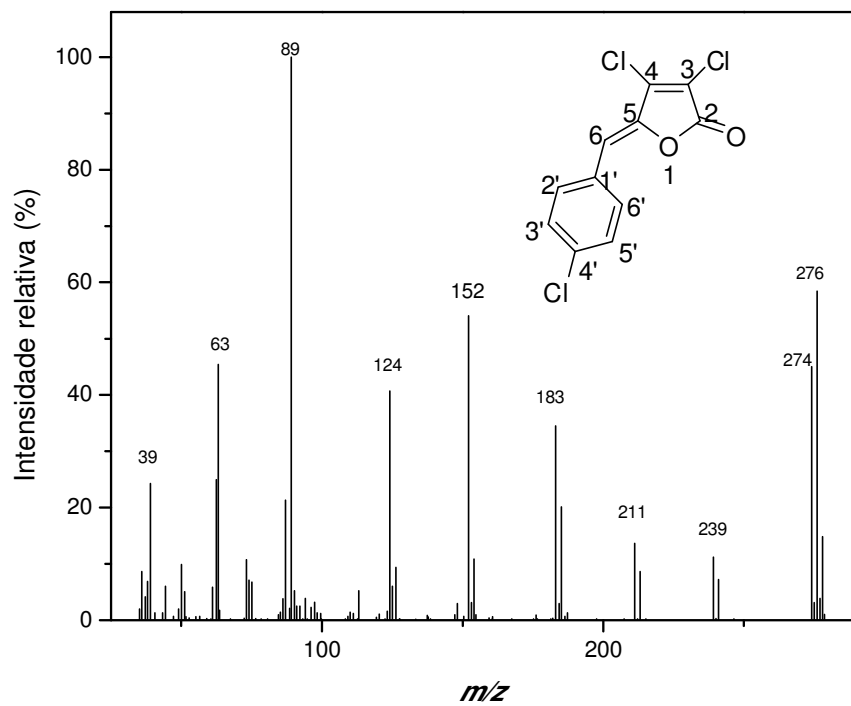


Figura 41: Espectro de massas do composto **23**.

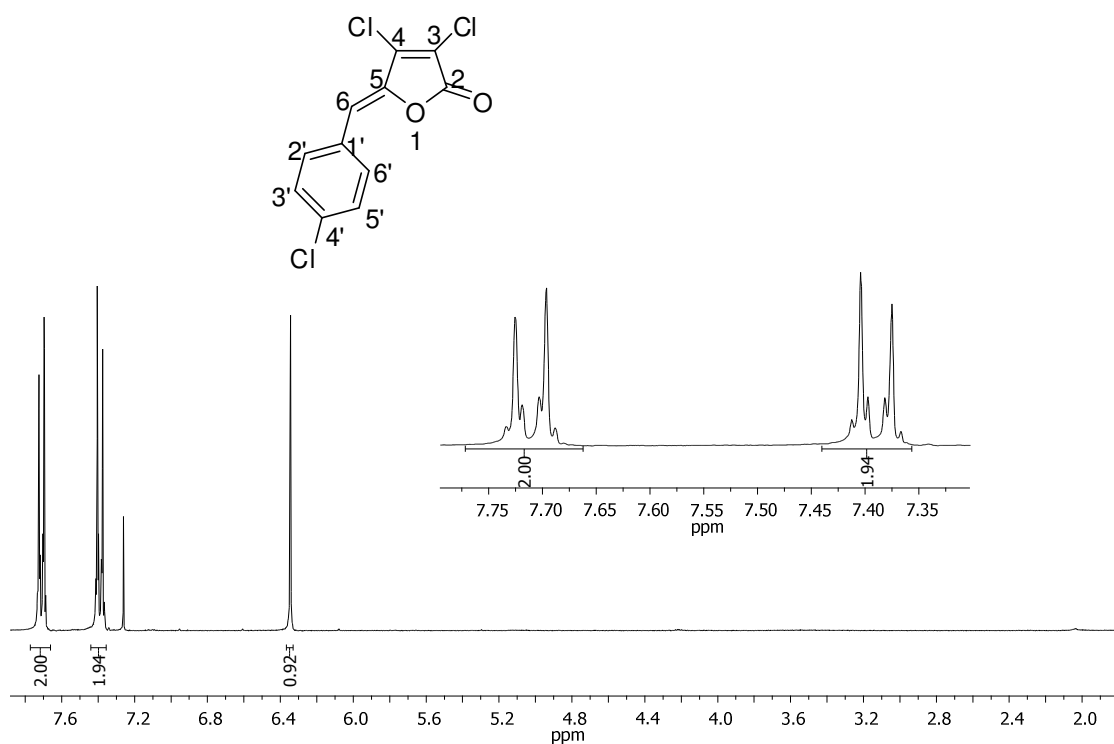


Figura 42: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **23**.

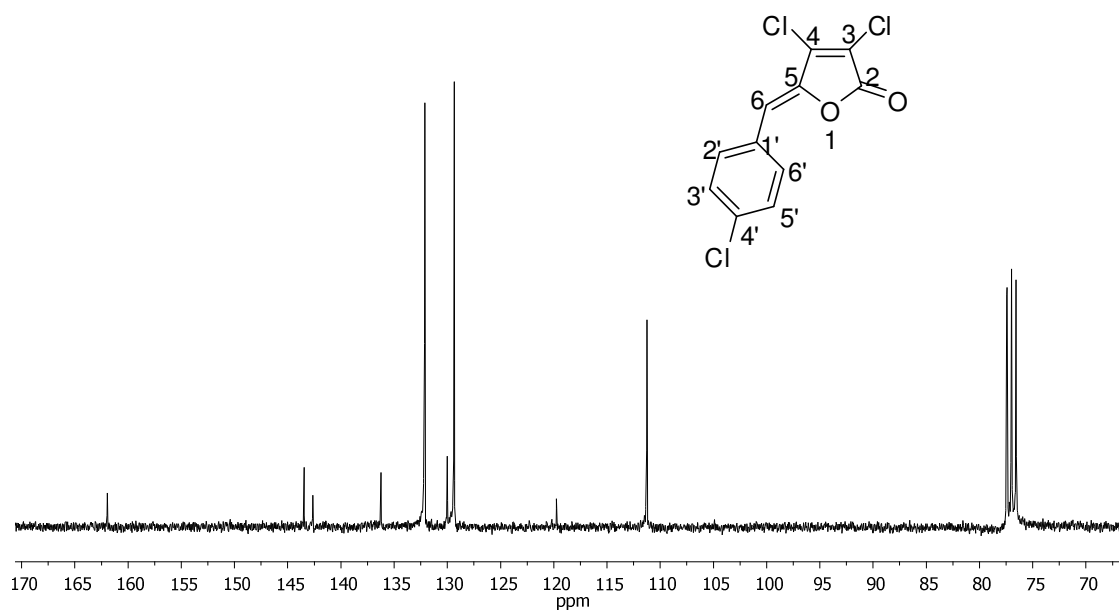


Figura 43: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **23**.

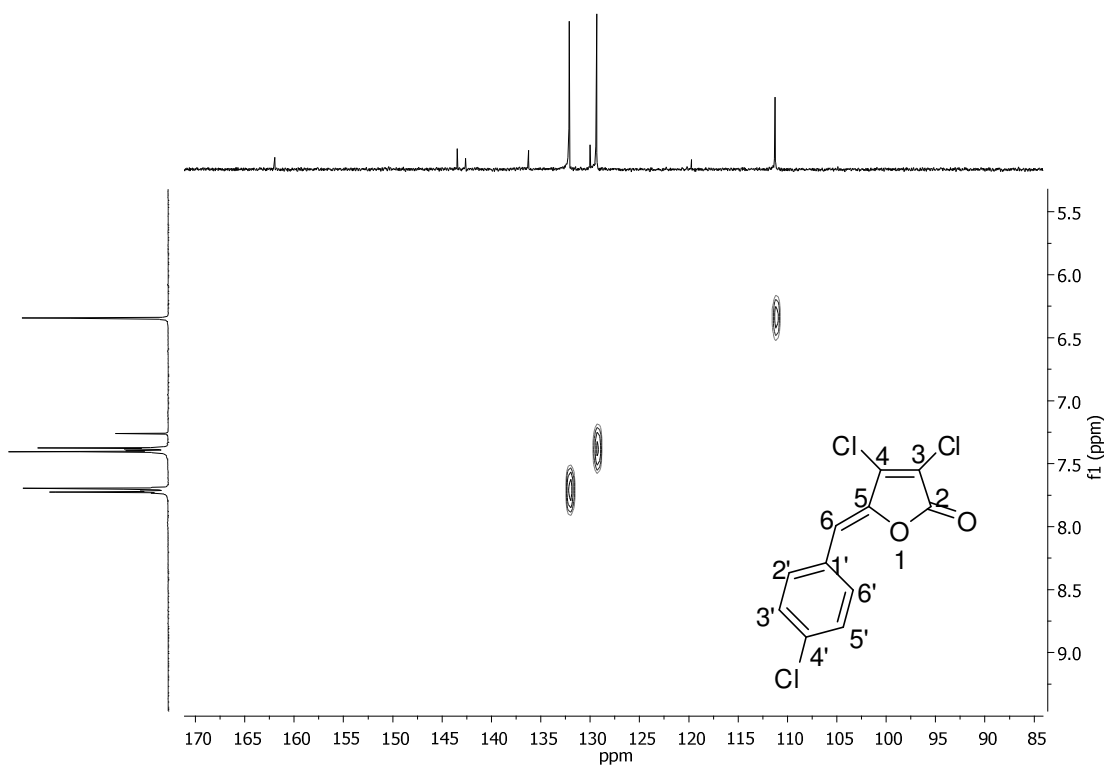


Figura 44: Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) do composto **23**.

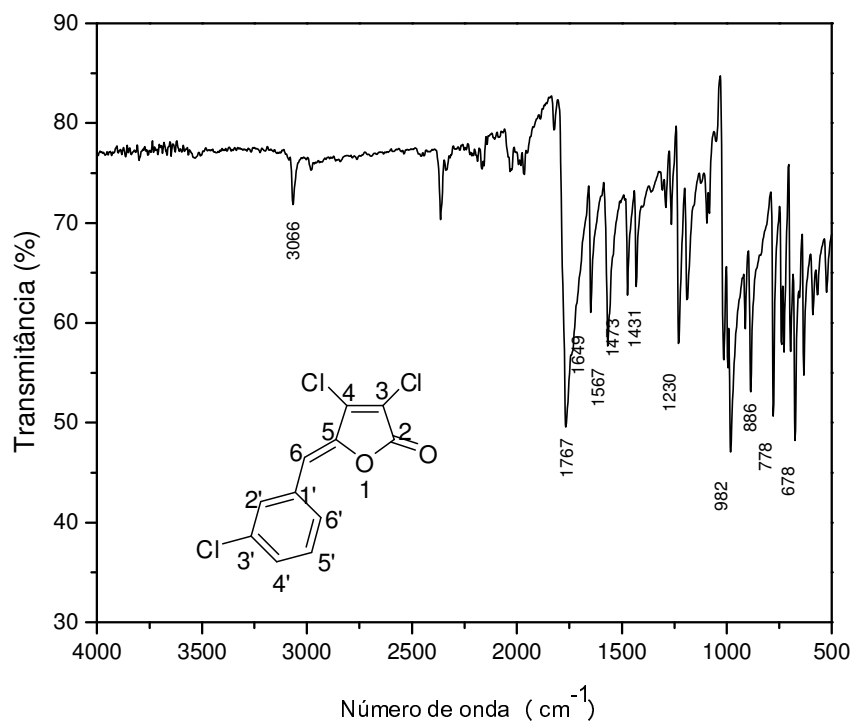


Figura 45: Espectro no IV (ATR) do composto **24**.

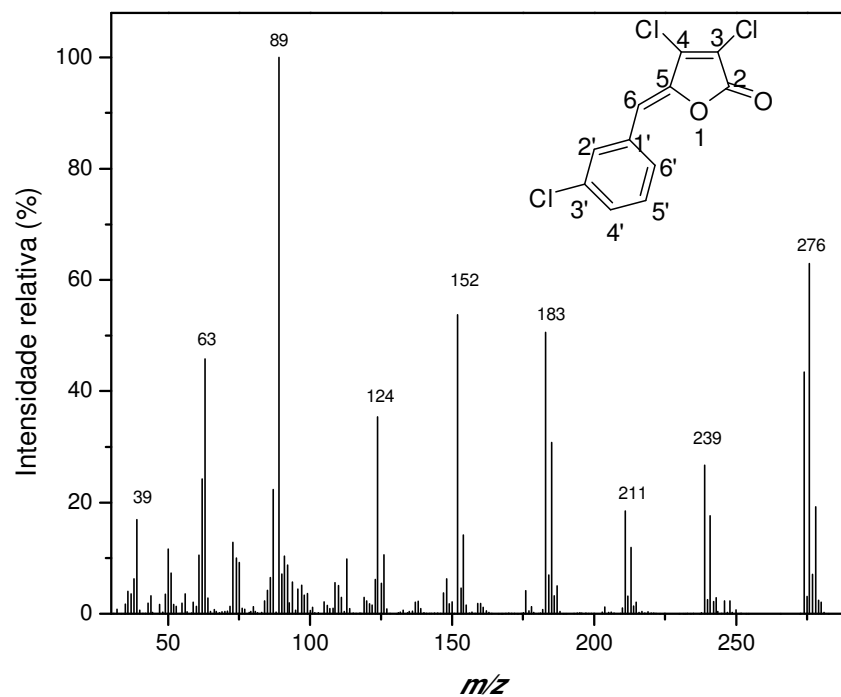


Figura 46: Espectro de massas do composto **24**.

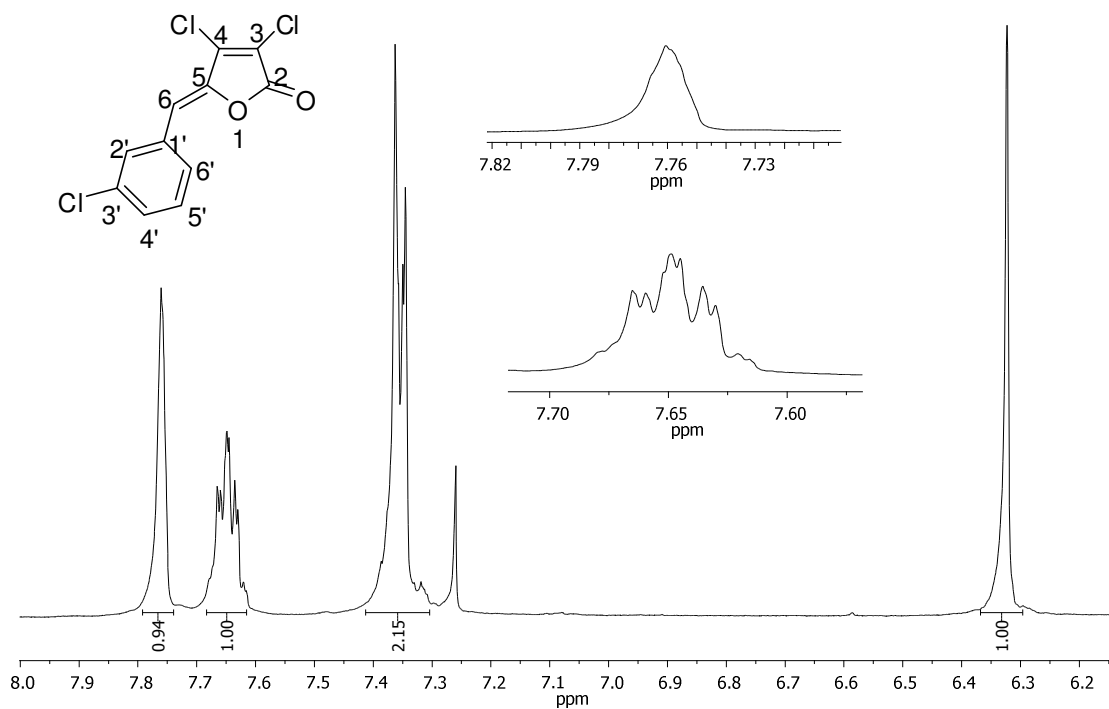


Figura 47: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **24**.

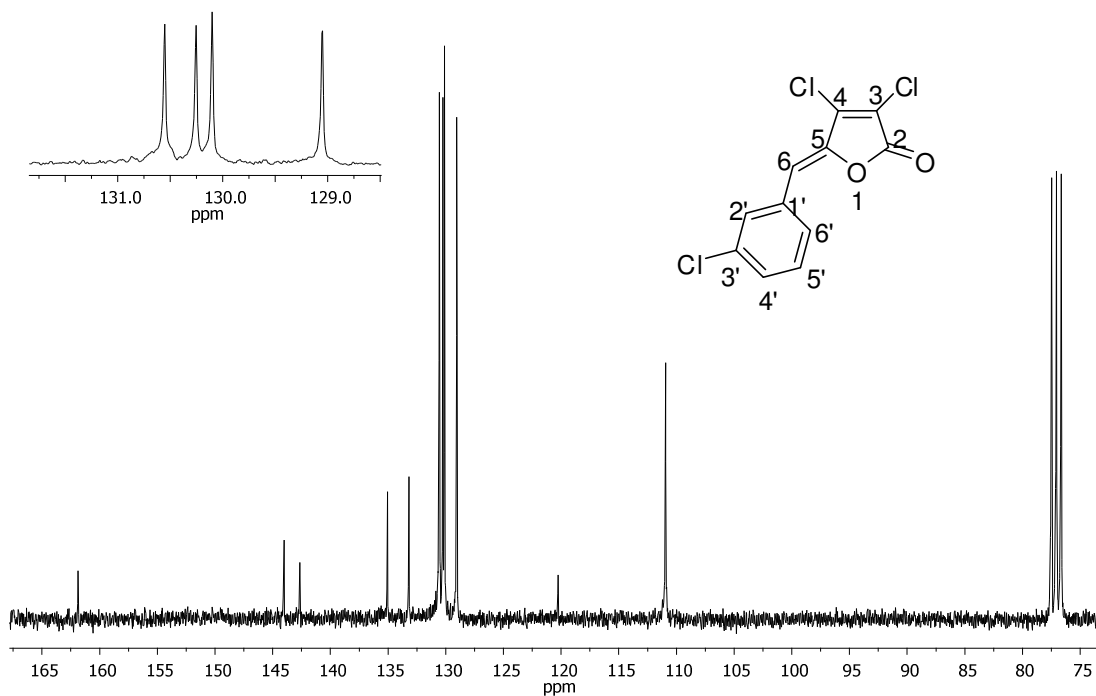


Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **24**.

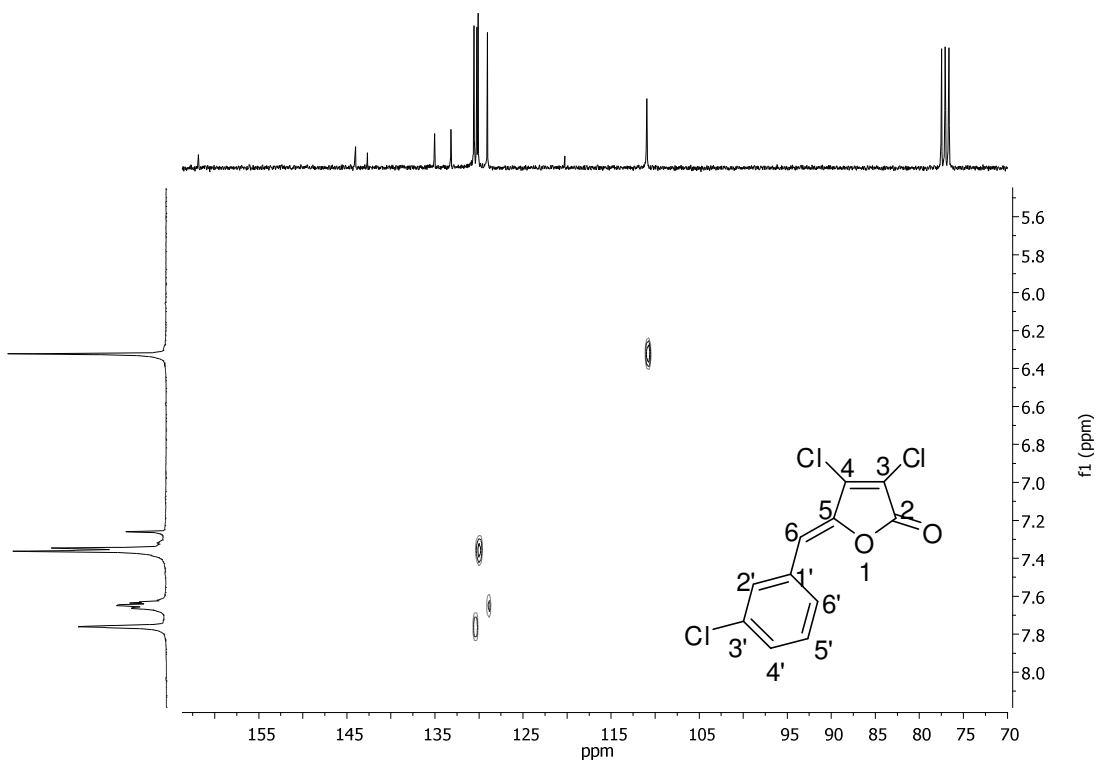


Figura 49: Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) do composto **24**.

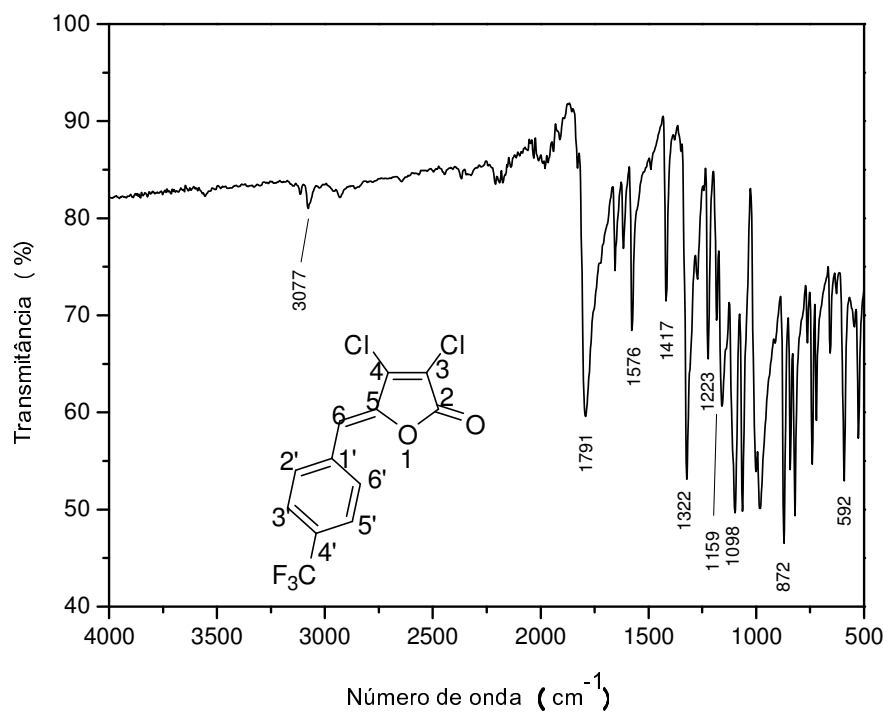


Figura 50: Espectro no IV (ATR) do composto **26**.

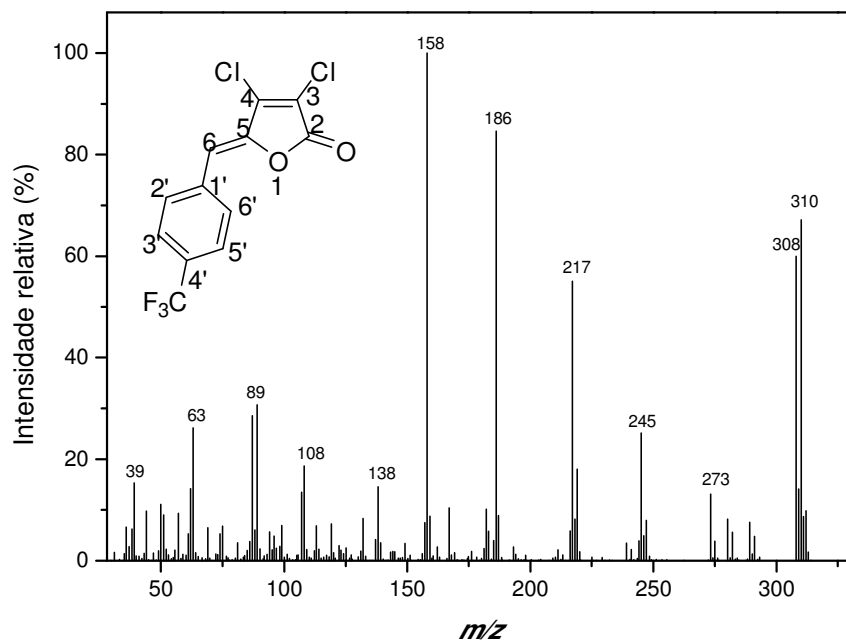


Figura 51: Espectro de massas do composto **26**.

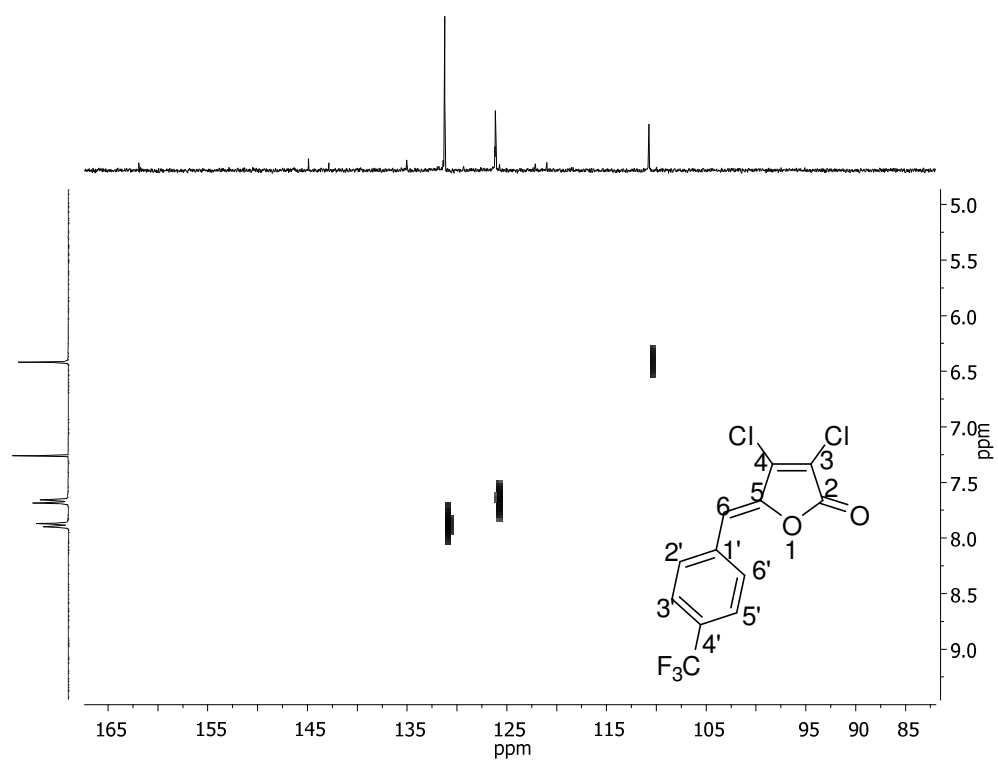


Figura 54: Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) do composto **26**.

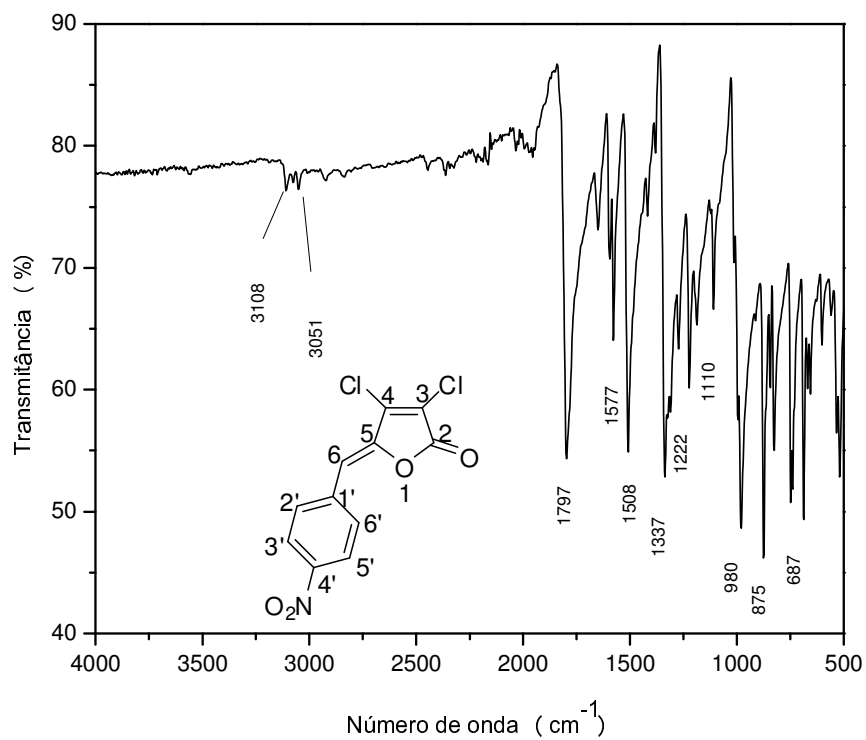


Figura 55: Espectro no IV (ATR) do composto **27**.

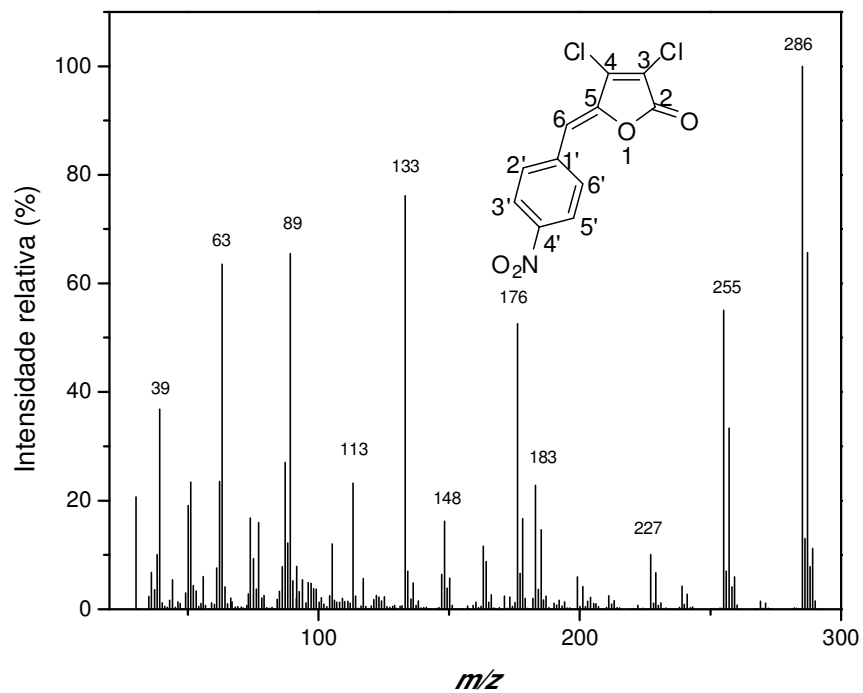


Figura 56: Espectro de massas do composto **27**.

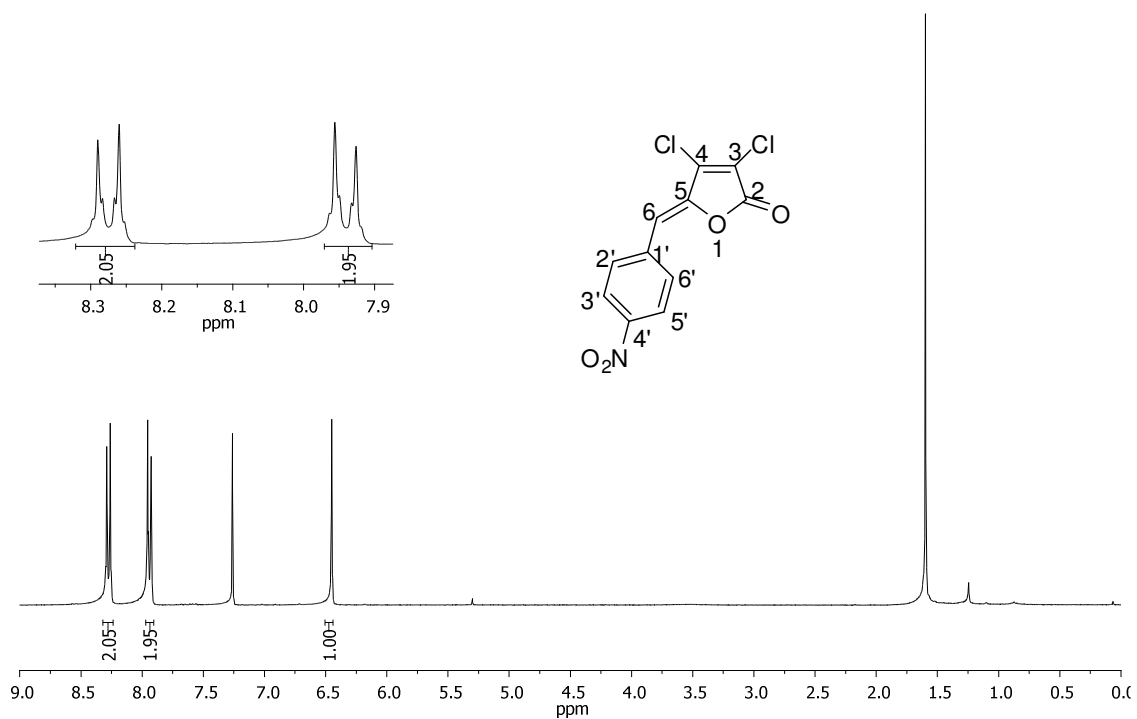


Figura 57: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **27**.

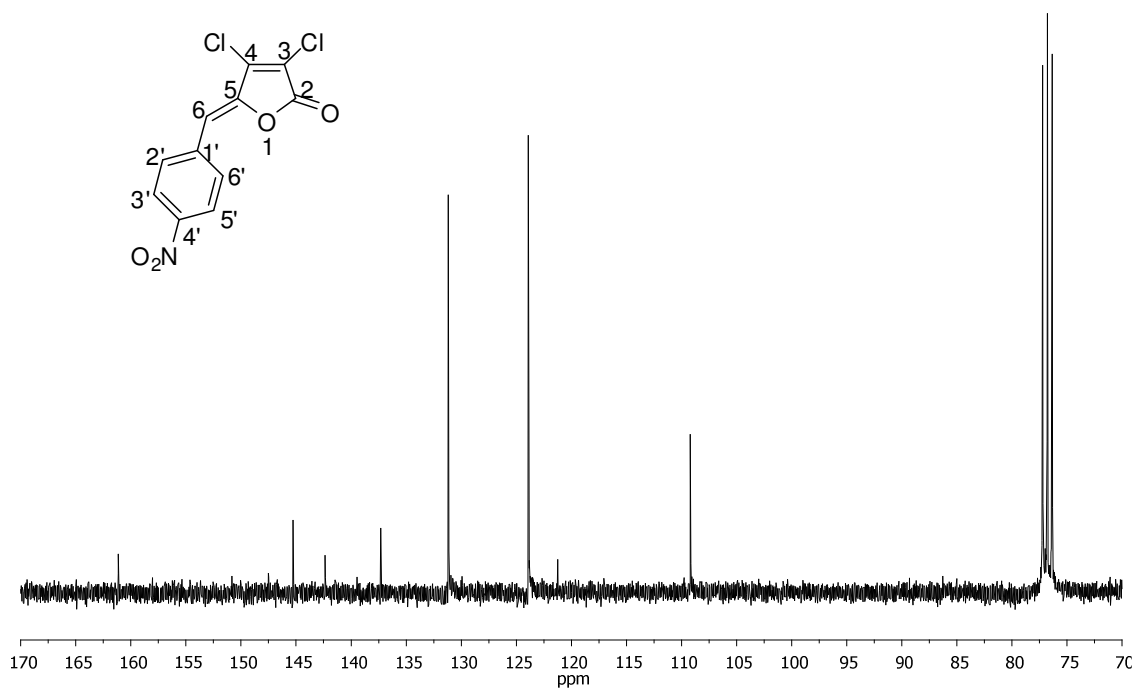


Figura 58: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **27**.

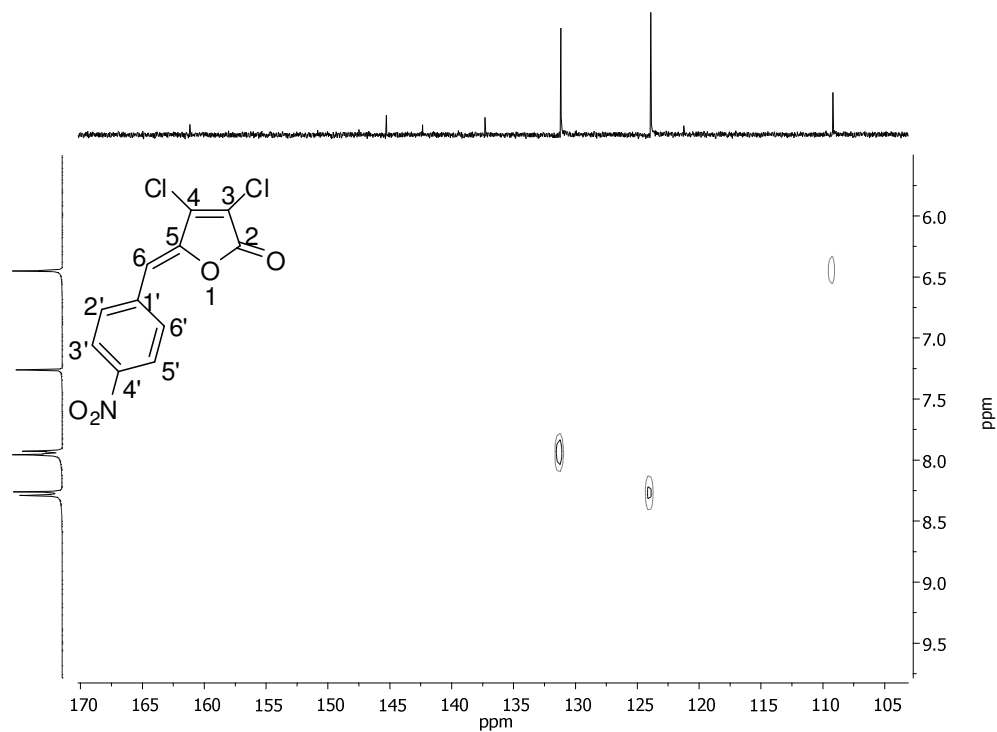


Figura 59: Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) do composto **27**.

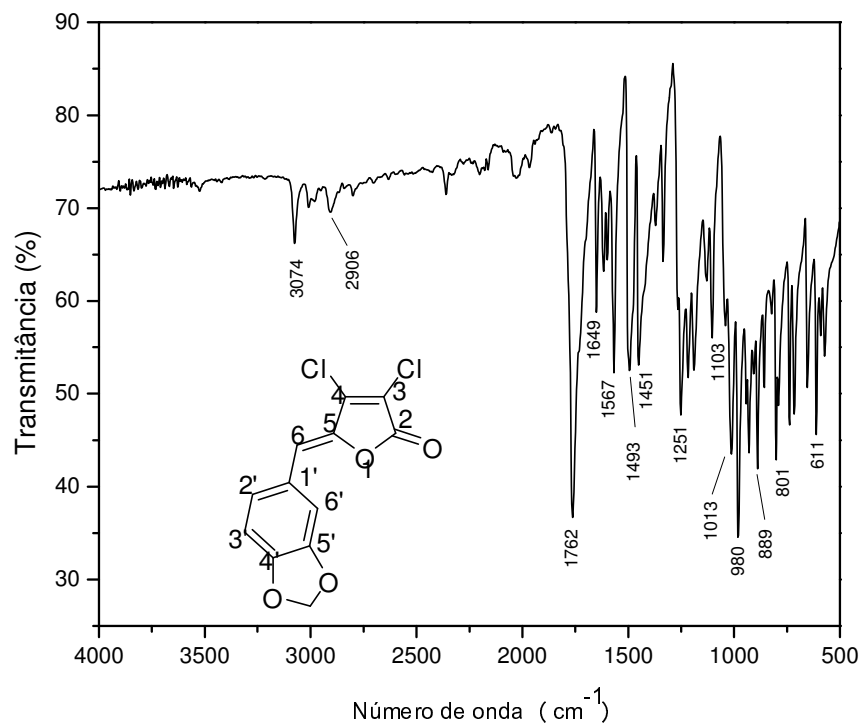


Figura 60: Espectro no IV (ATR) do composto **28**.

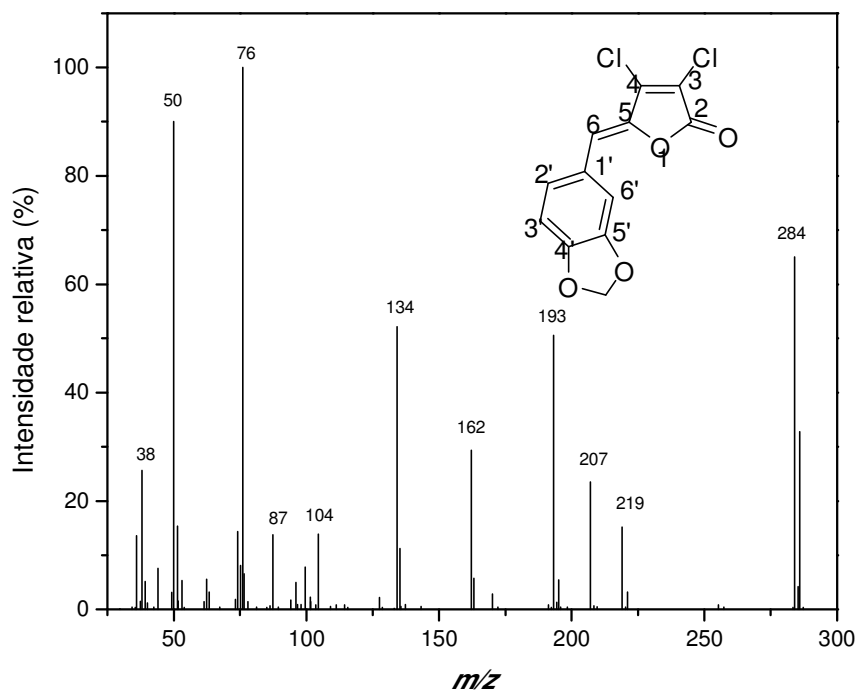


Figura 61: Espectro de massas do composto **28**.

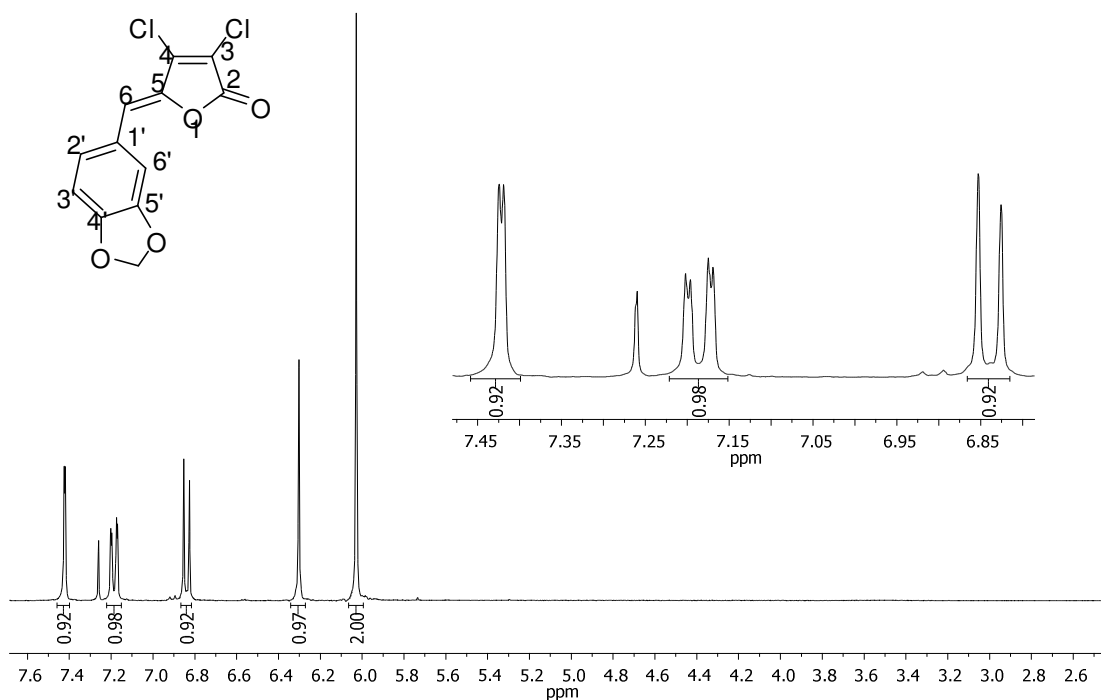


Figura 62: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **28**.

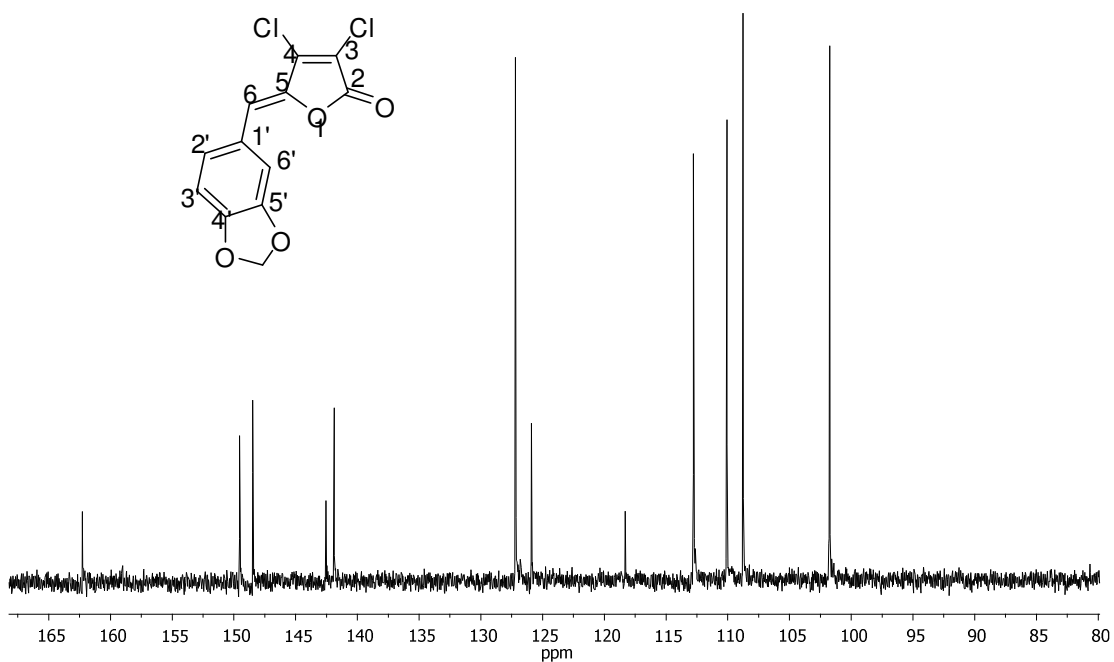


Figura 63: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **28**.

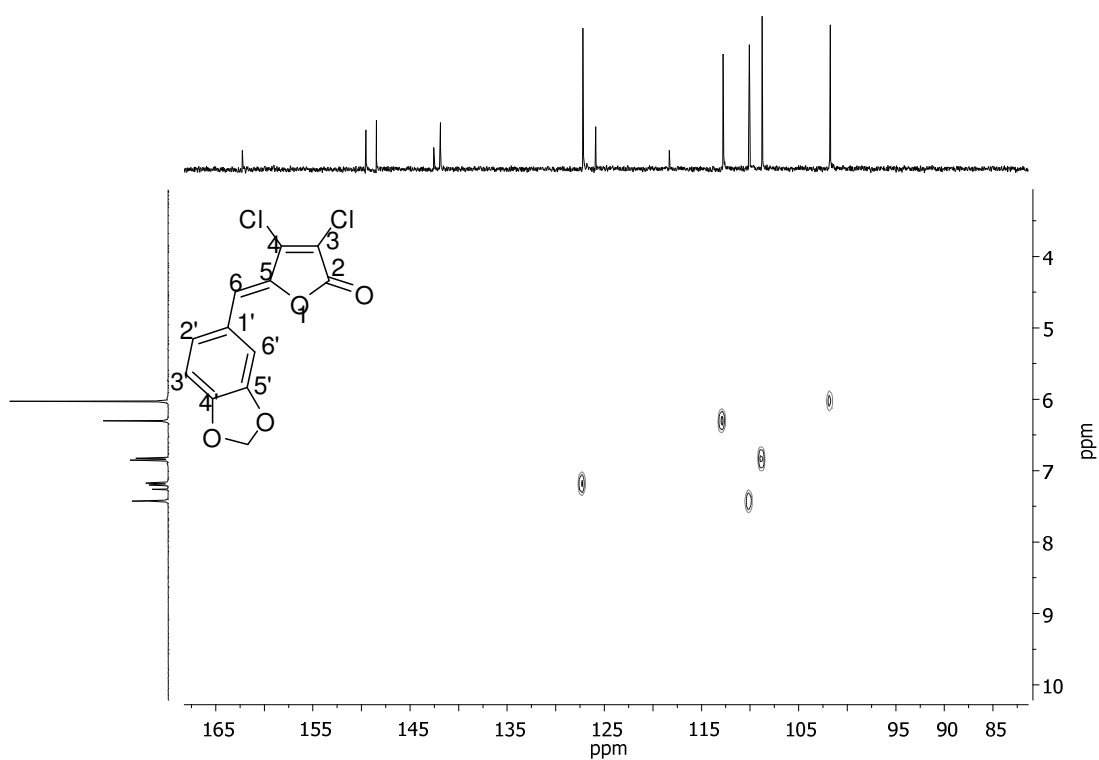


Figura 64: Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) do composto 28.

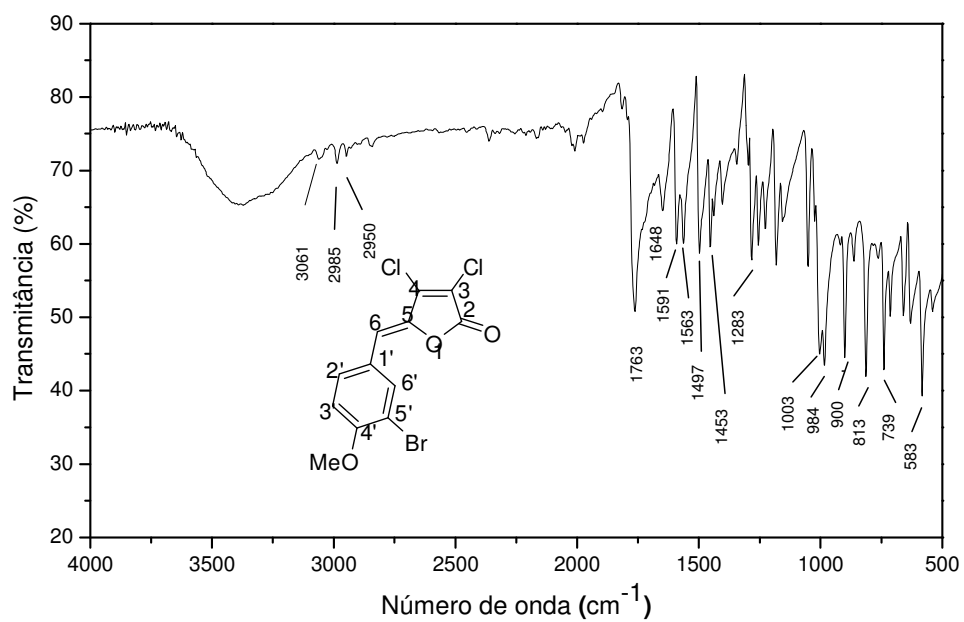


Figura 65: Espectro no IV (ATR) do composto 29.

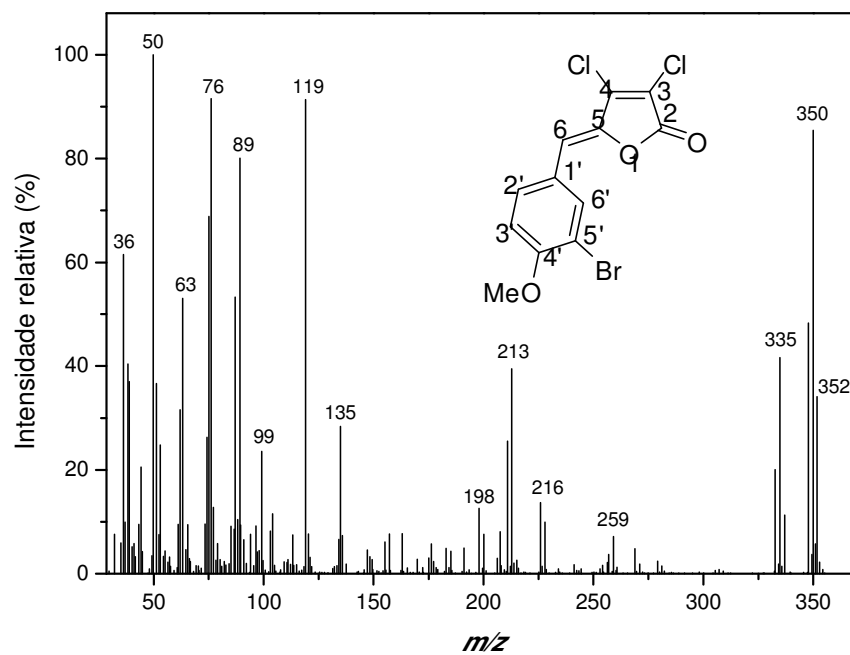


Figura 66: Espectro de massas do composto **29**.

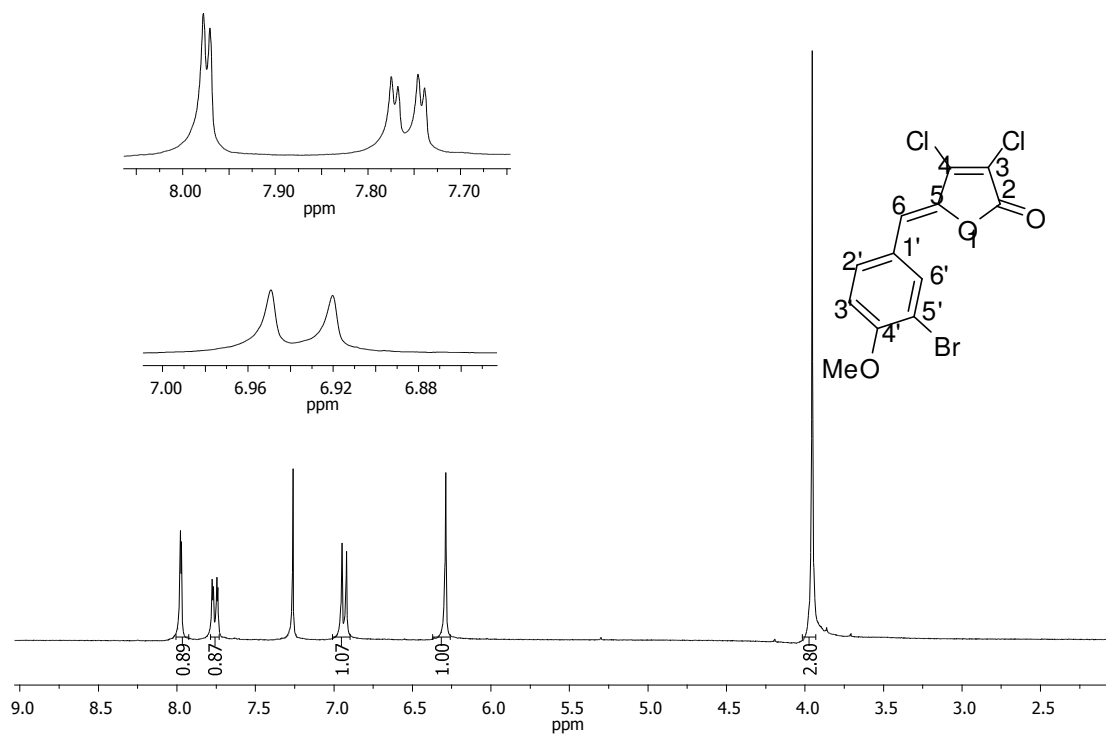


Figura 67: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **29**.

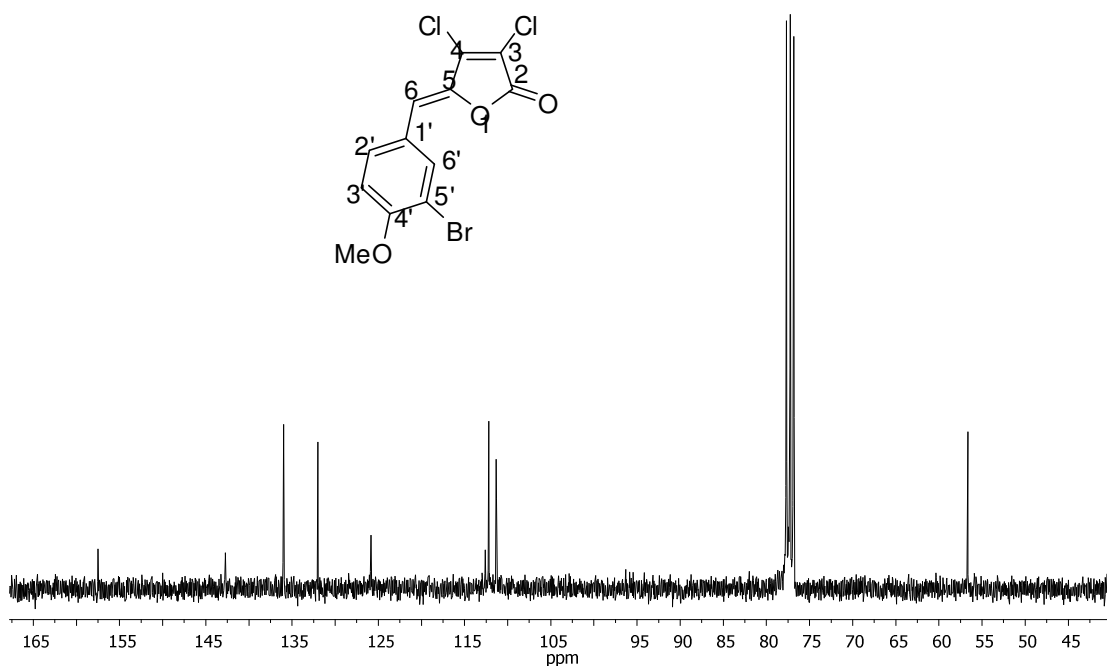


Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **29**.

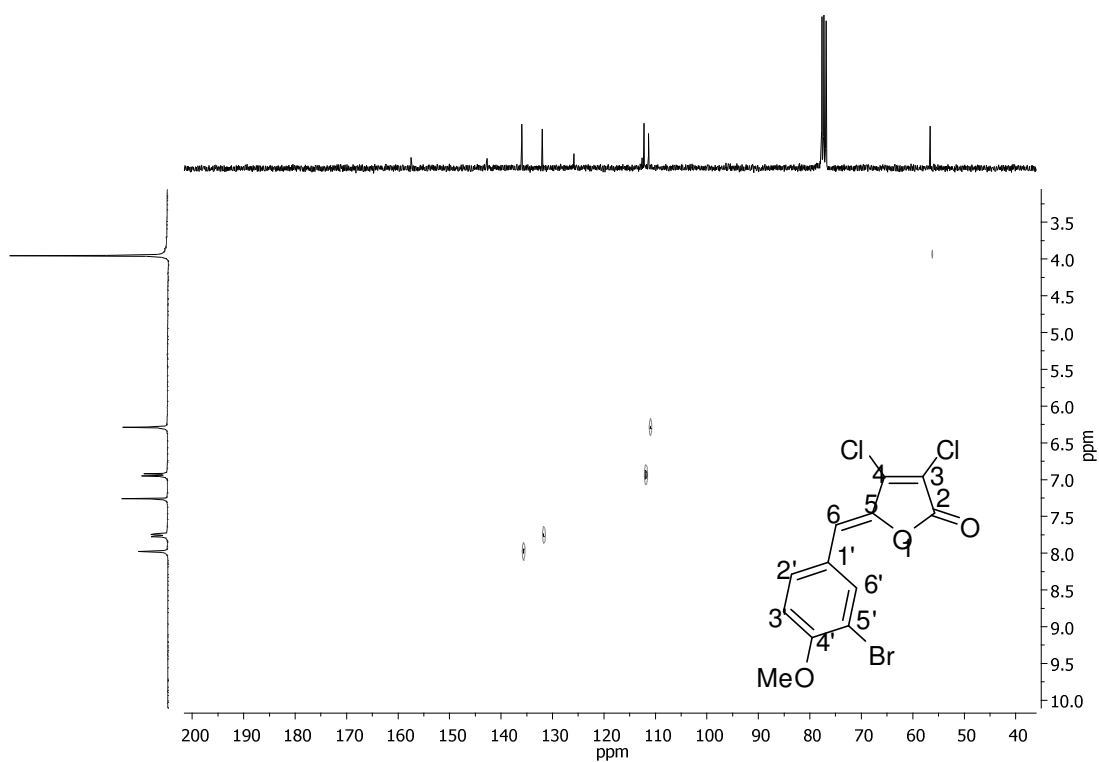


Figura 69: Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) do composto **29**.

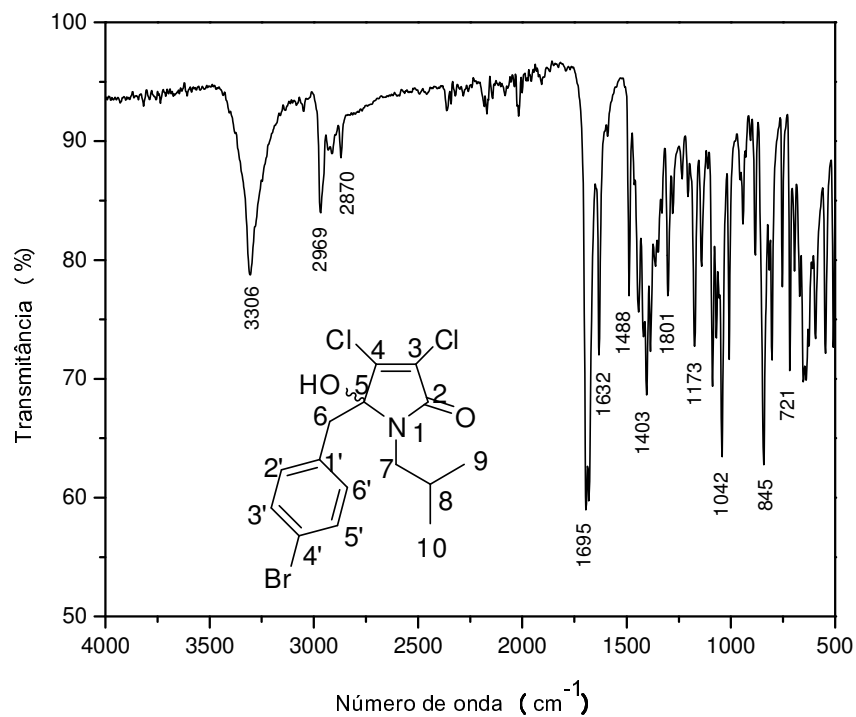


Figura 70: Espectro no IV (ATR) do composto **30**.

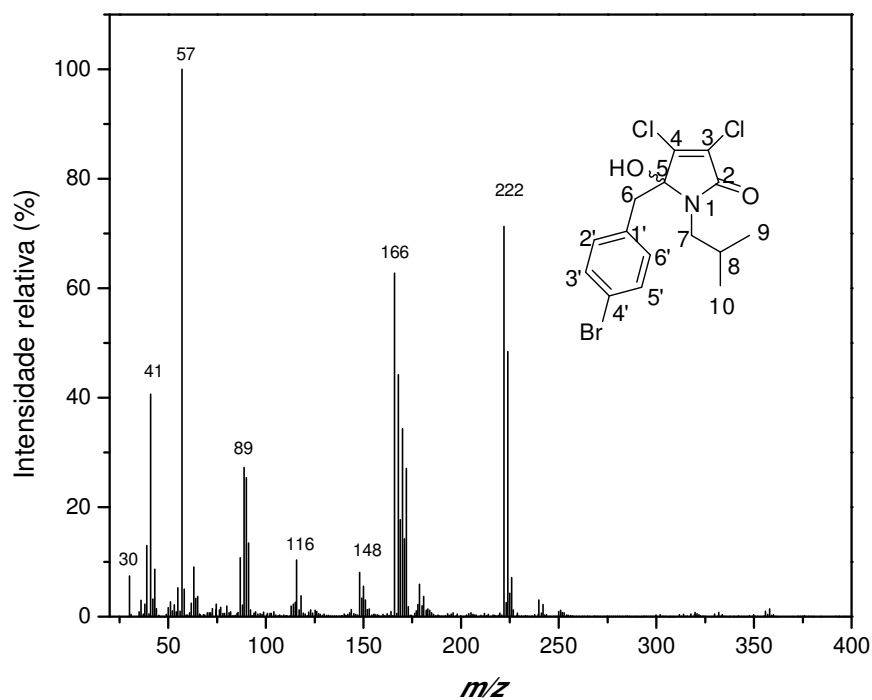


Figura 71: Espectro de massas do composto **30**.

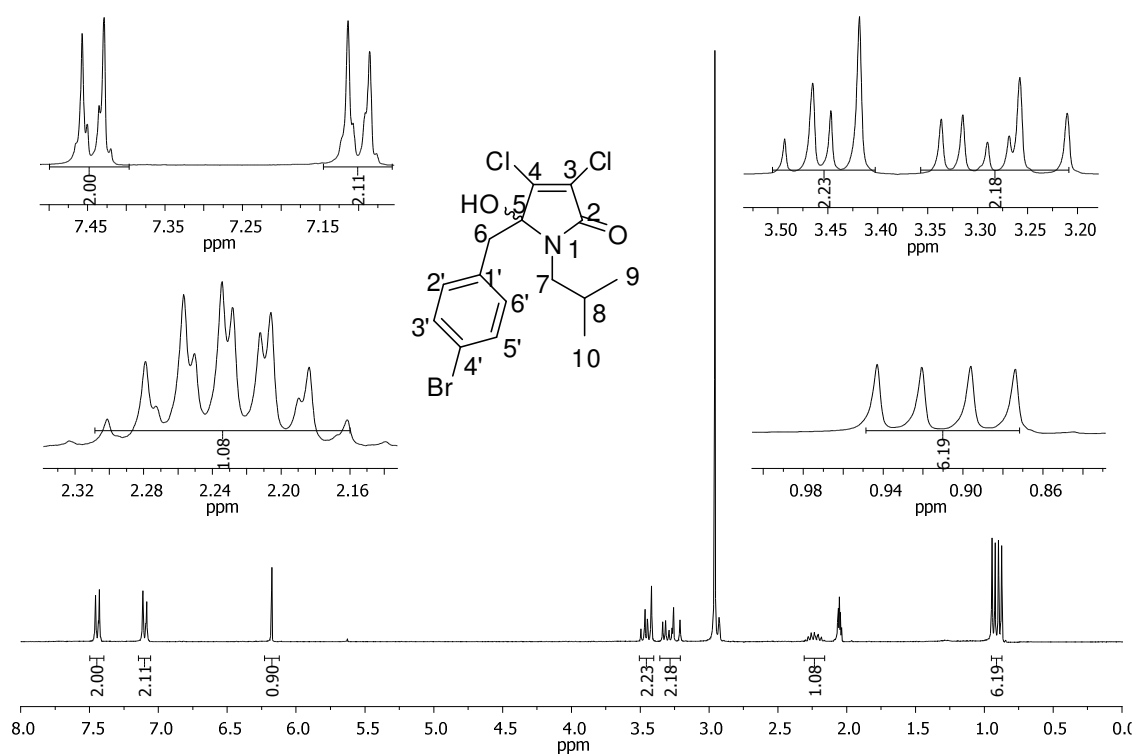


Figura 72: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **30**.

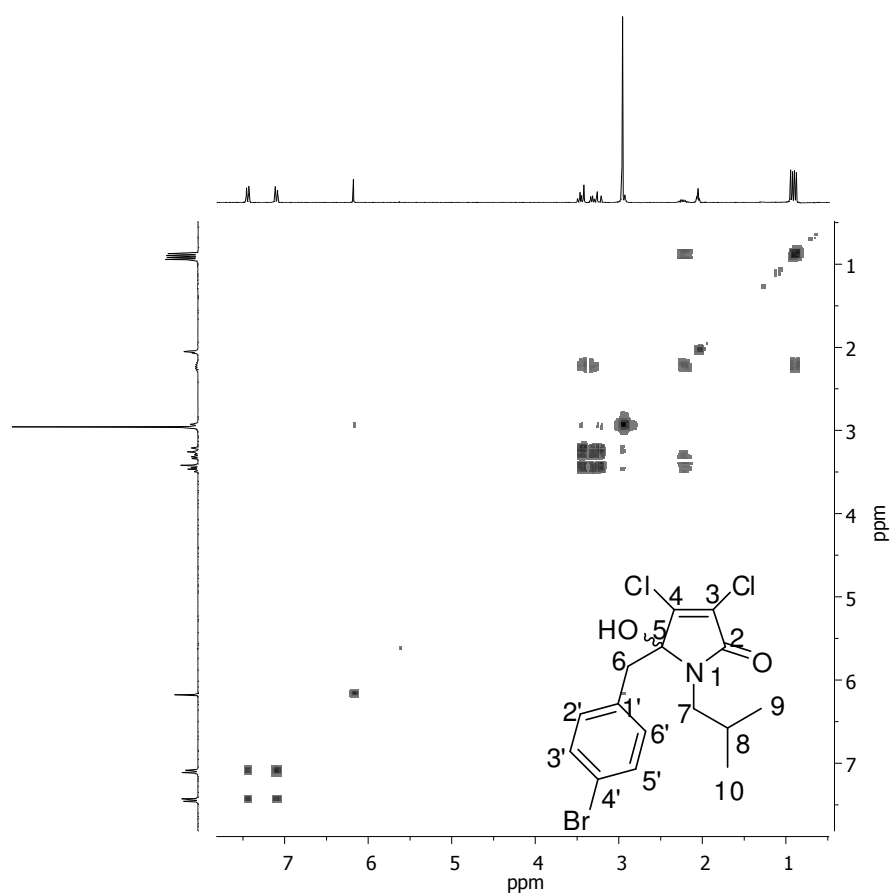


Figura 73: Mapa de contornos COSY ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **30**.

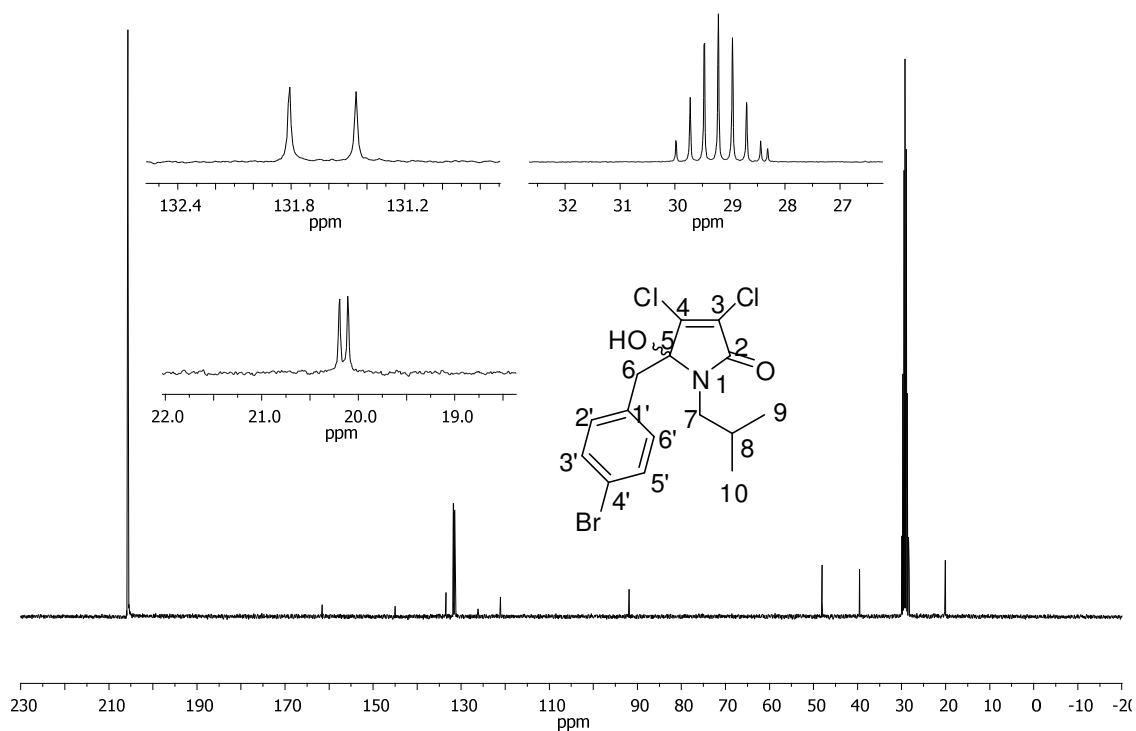


Figura 74: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **30**.

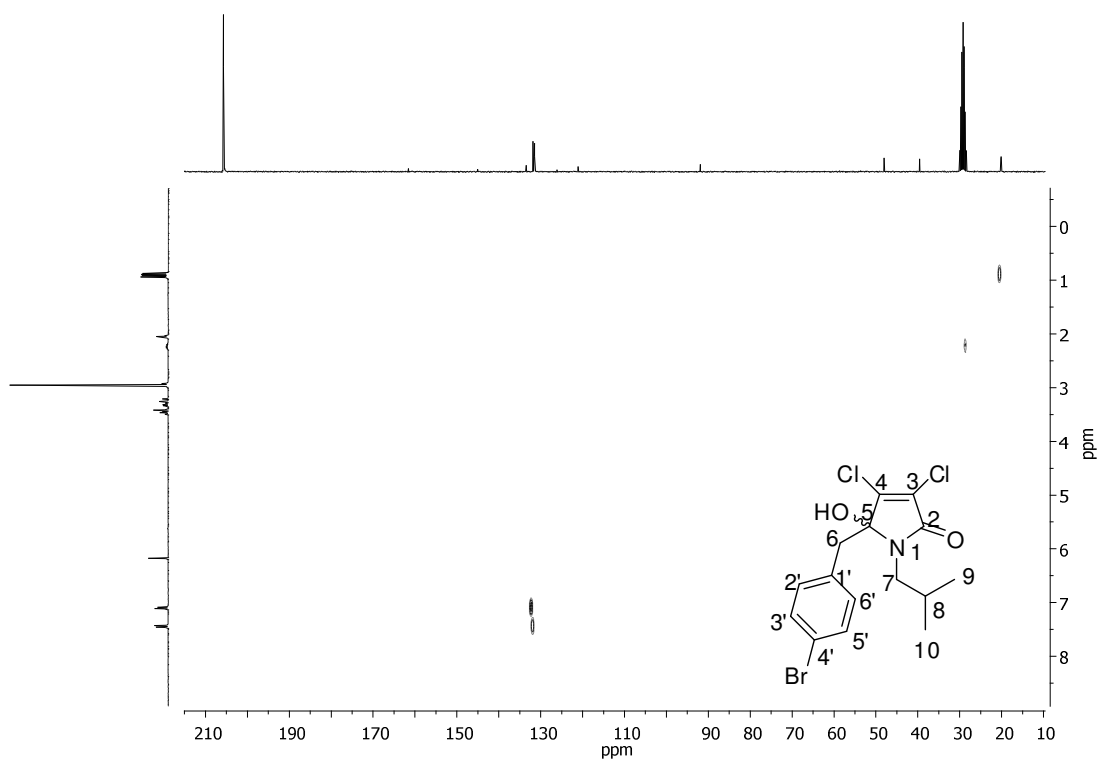


Figura 75: Mapa de contornos HETCOR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **30**.

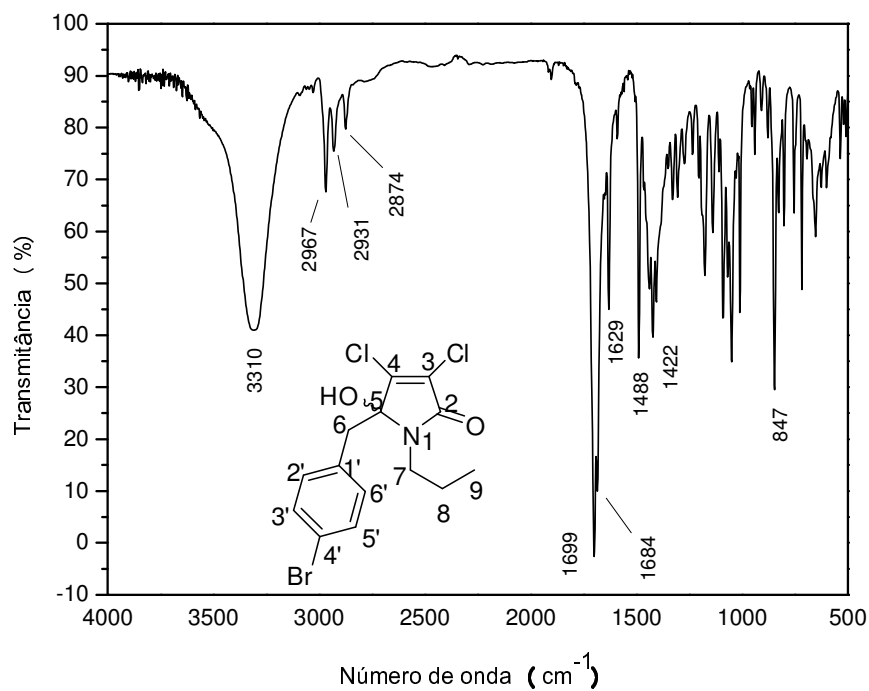


Figura 76: Espectro no IV (ATR) do composto **31**.

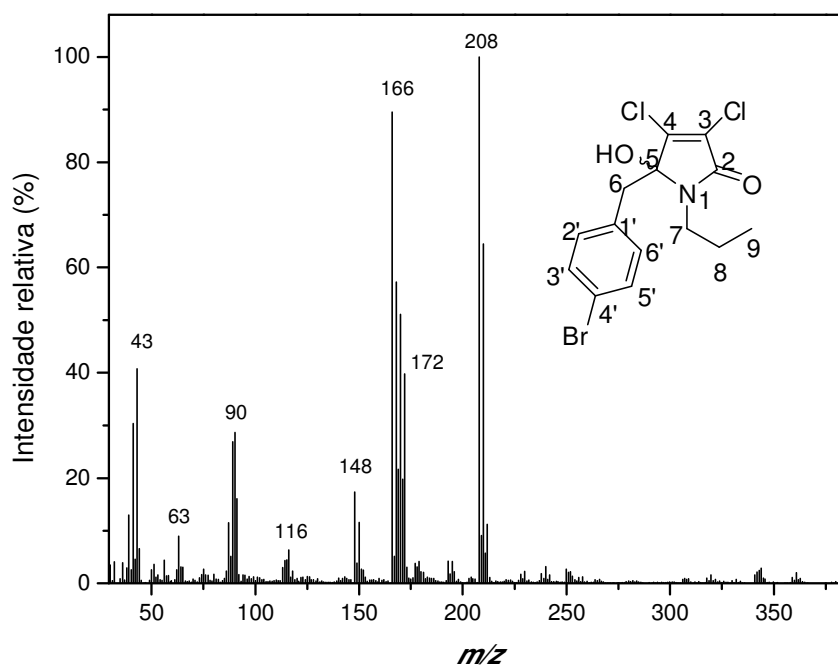


Figura 77: Espectro de massas do composto **31**.

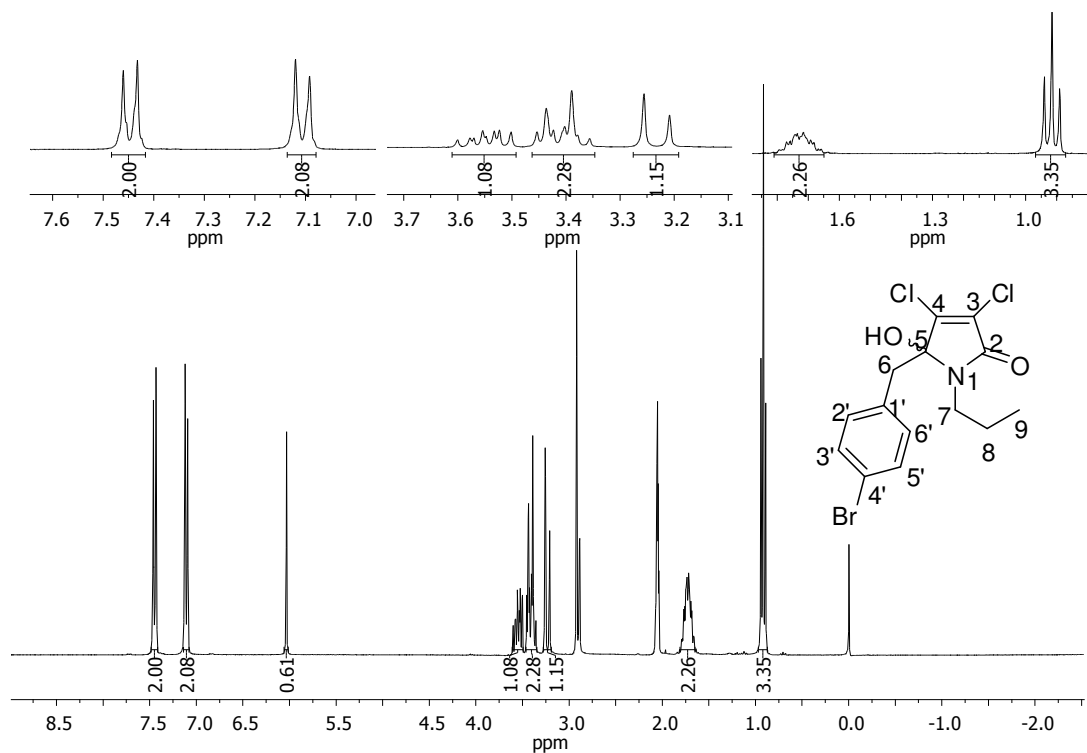


Figura 78: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **31**.

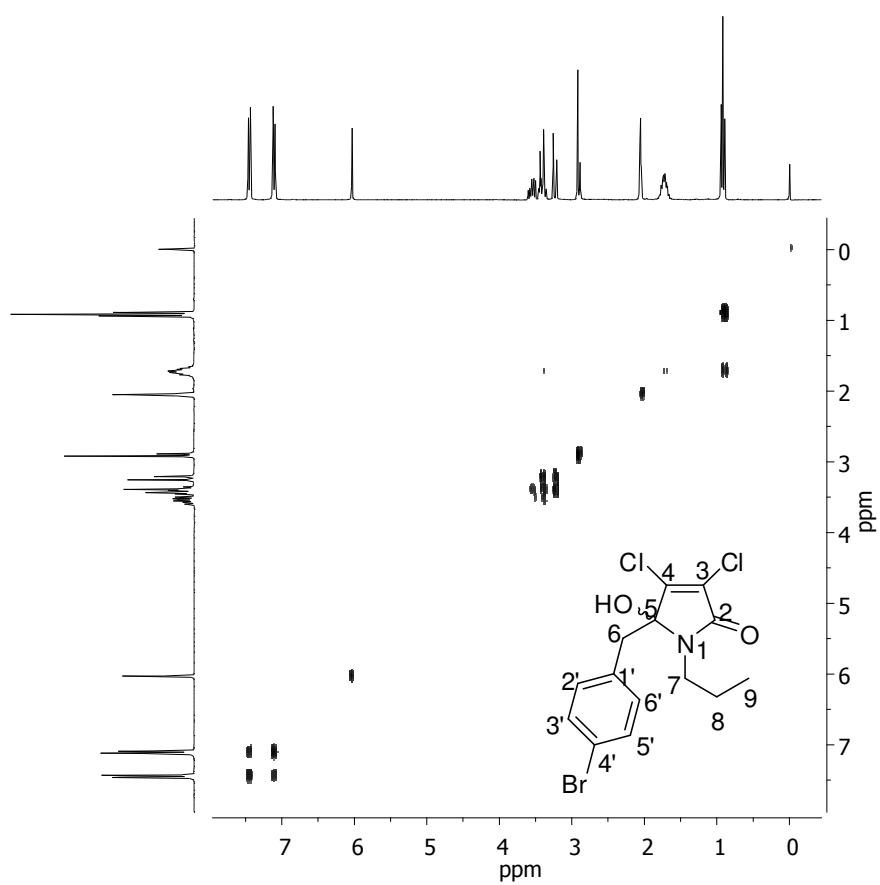


Figura 79: Mapa de contornos COSY ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **31**.

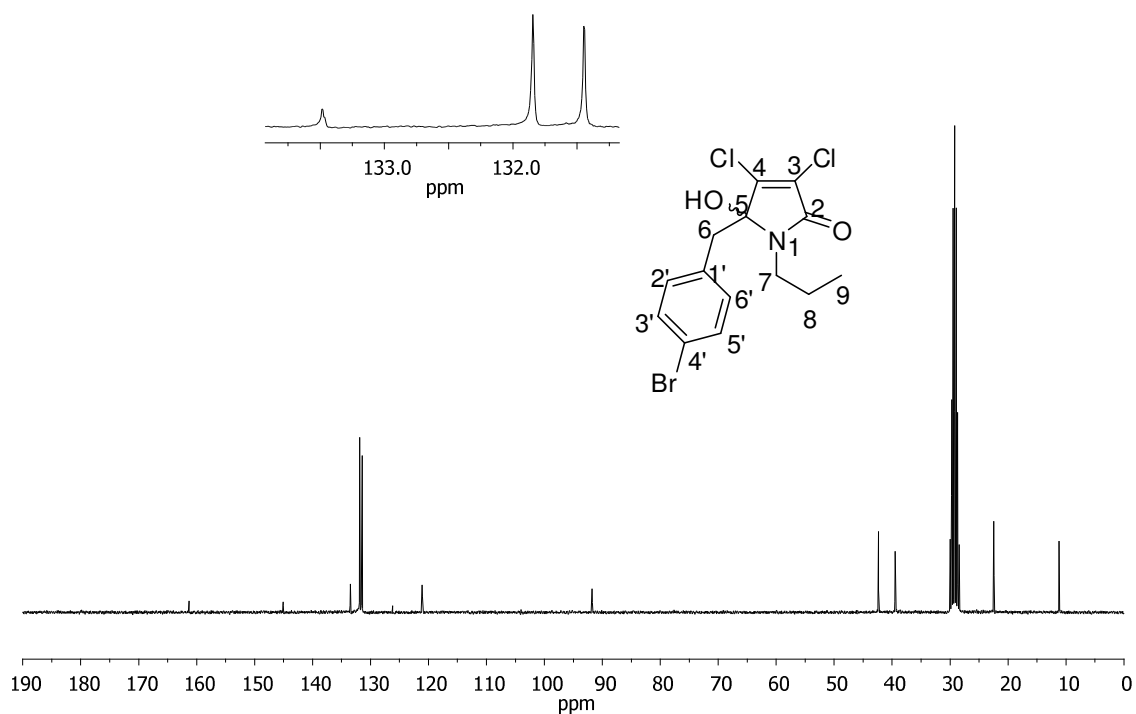


Figura 80: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **31**.

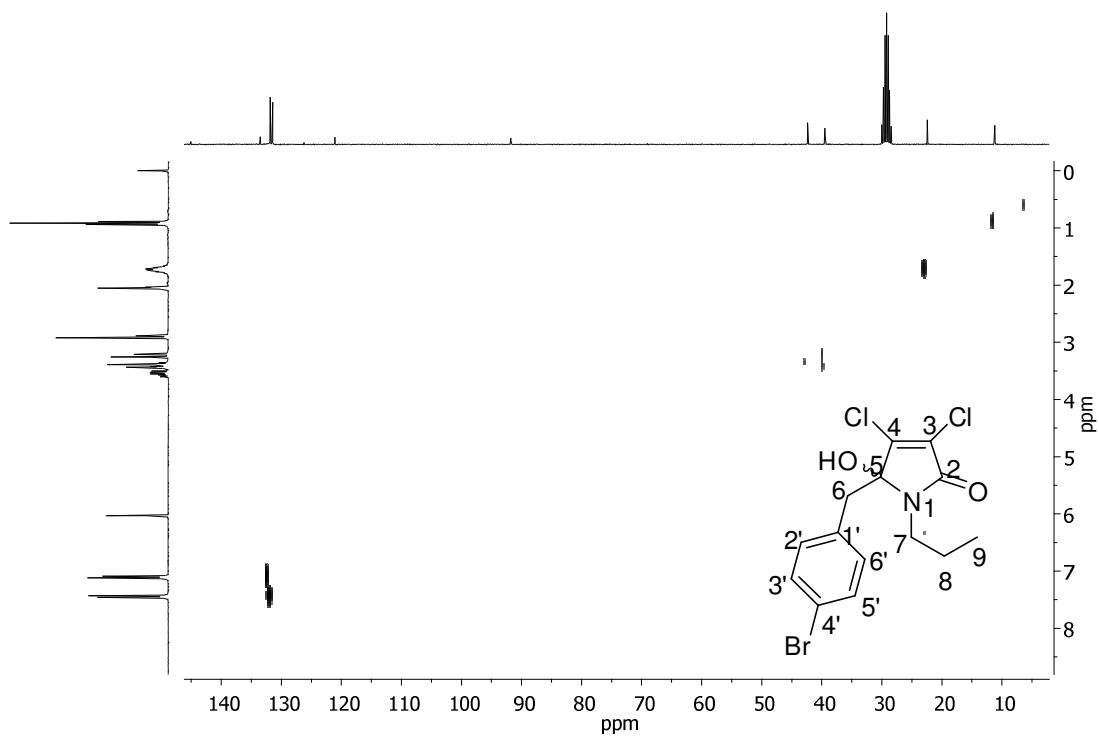


Figura 81: Mapa de contornos HETCOR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto **31**.

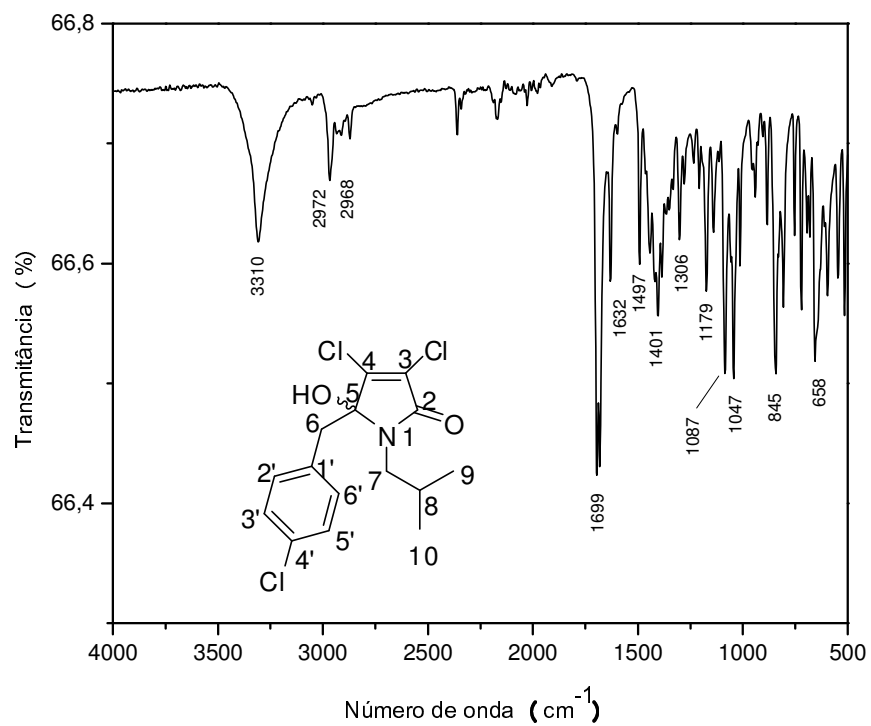


Figura 82: Espectro no IV (ATR) do composto **33**.

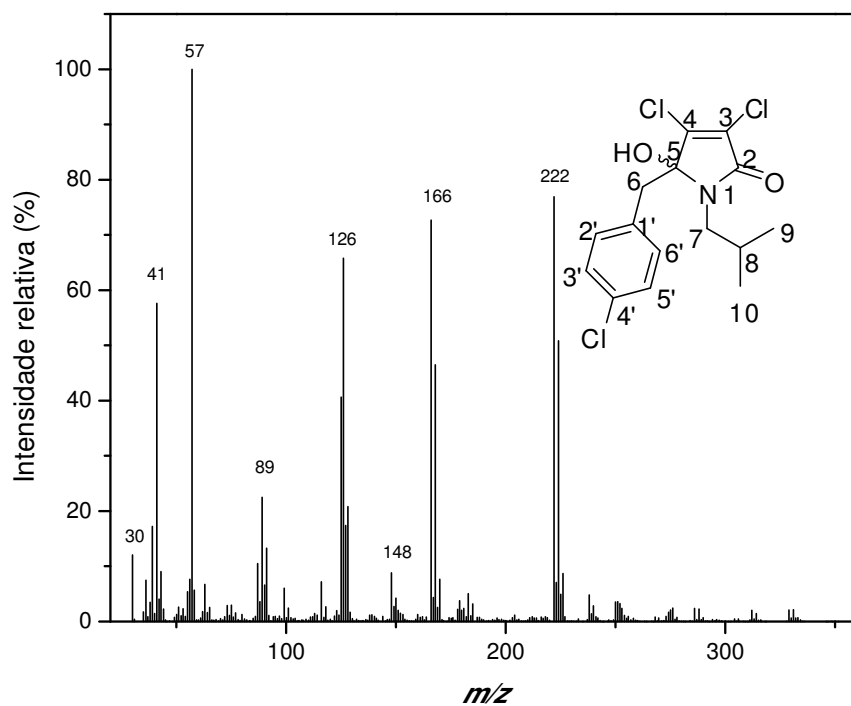
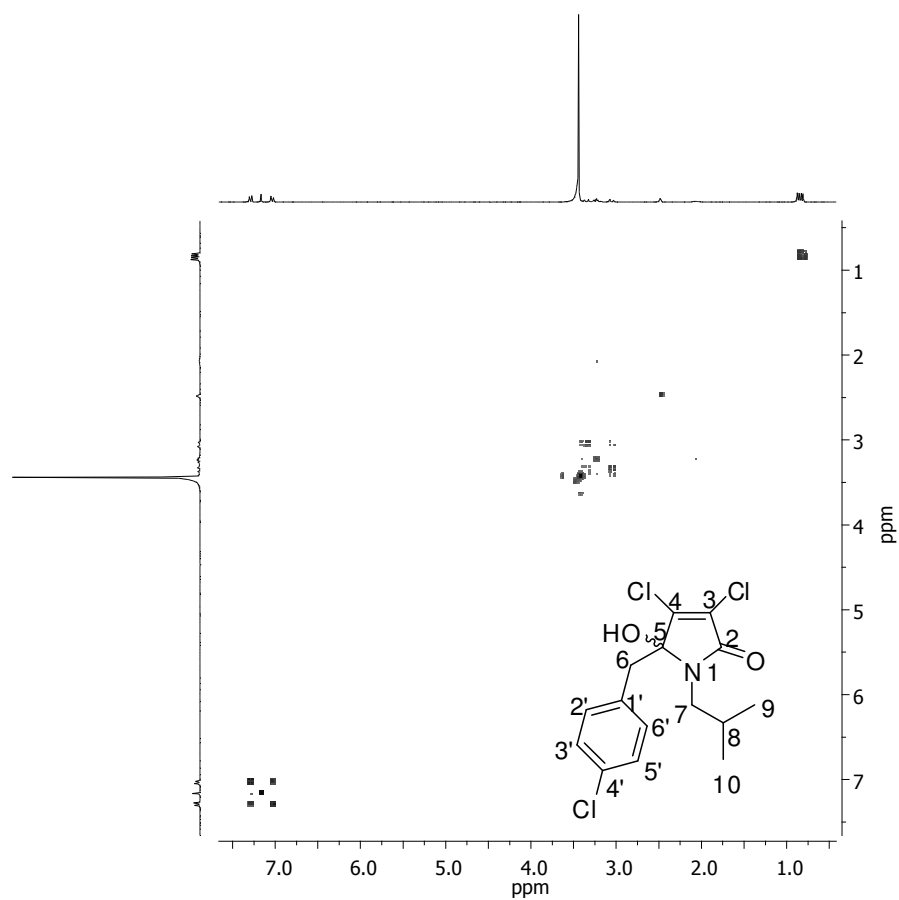
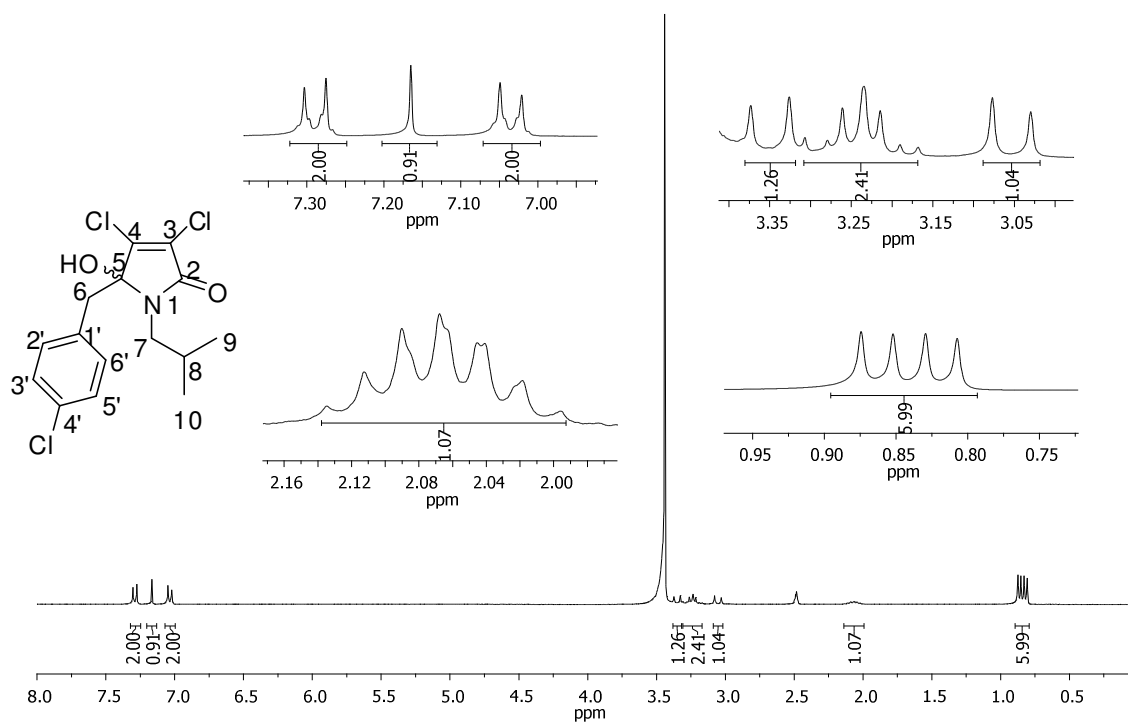


Figura 83: Espectro de massas do composto **33**.



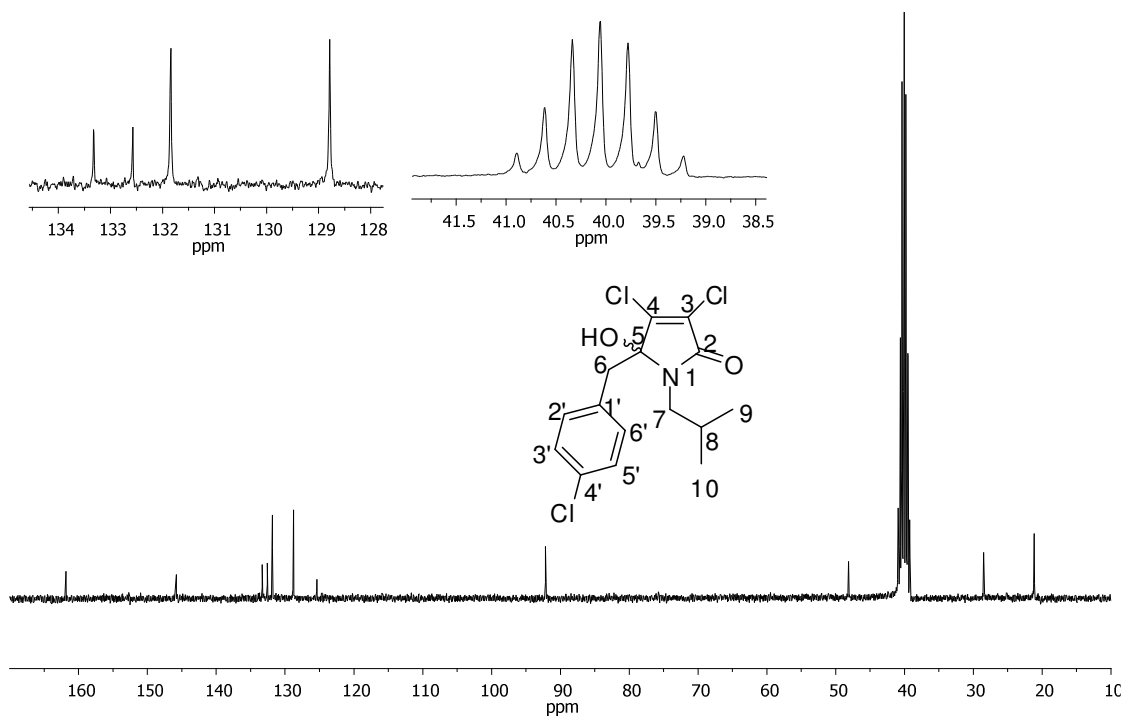


Figura 86: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **33**.

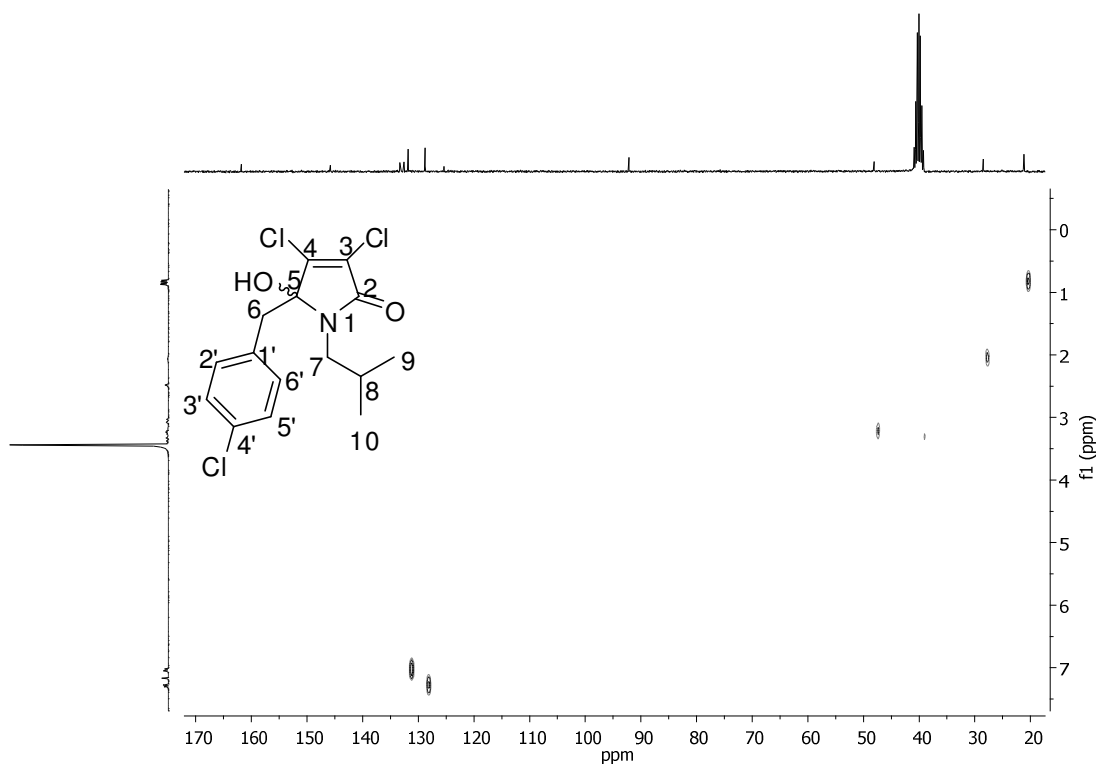


Figura 87: Mapa de contornos HETCOR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) do composto **33**.

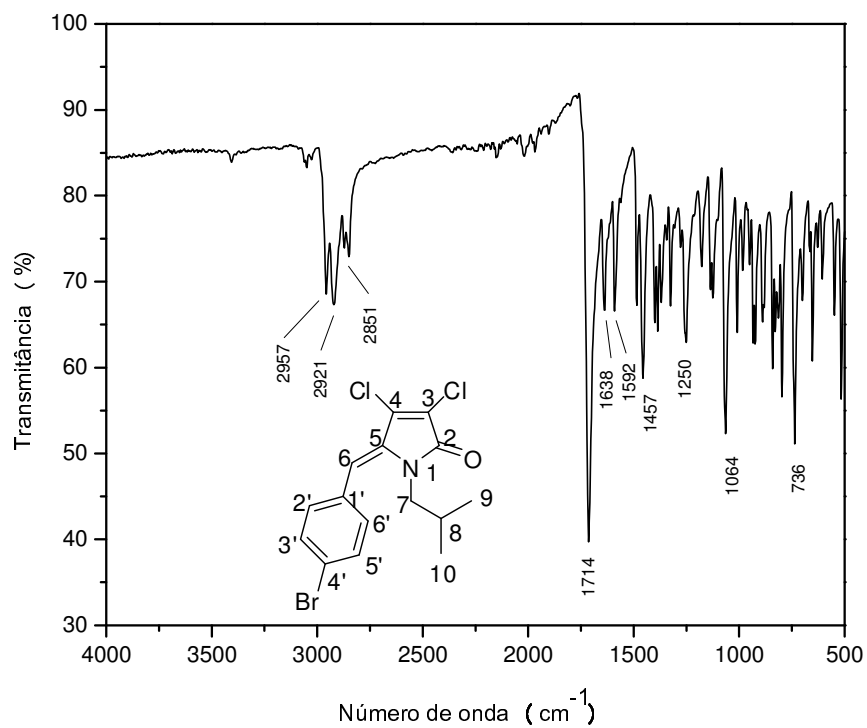


Figura 88: Espectro no IV (ATR) do composto **34Z**.

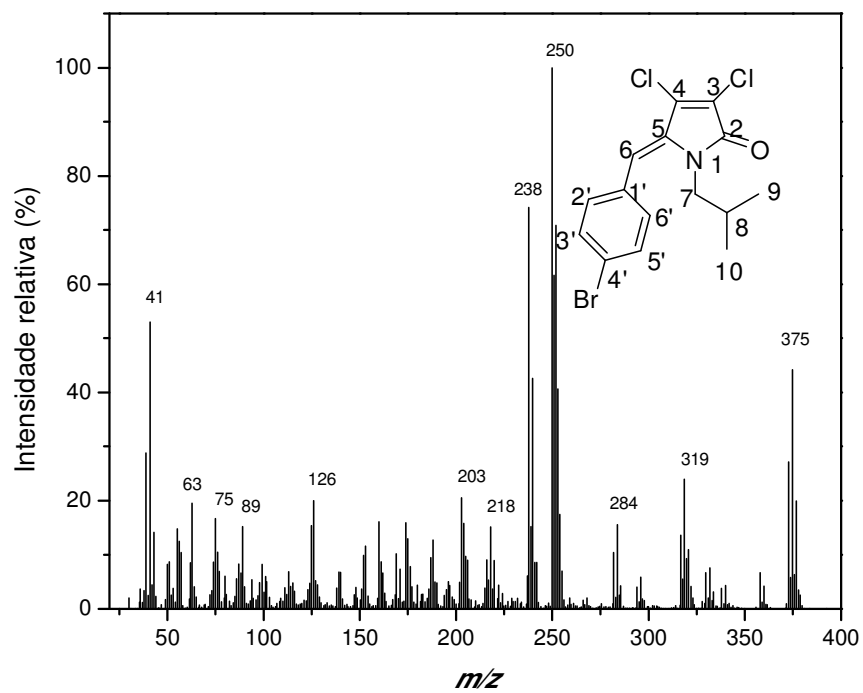


Figura 89: Espectro de massas do composto **34Z**.

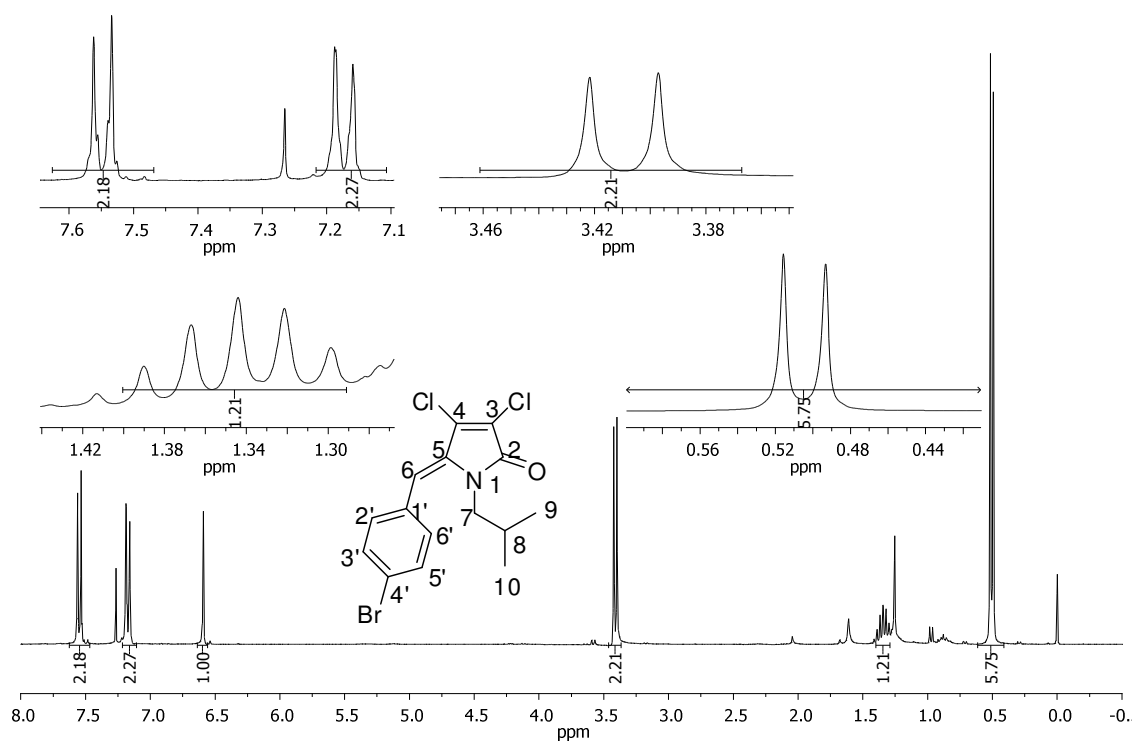


Figura 90: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **34Z**.

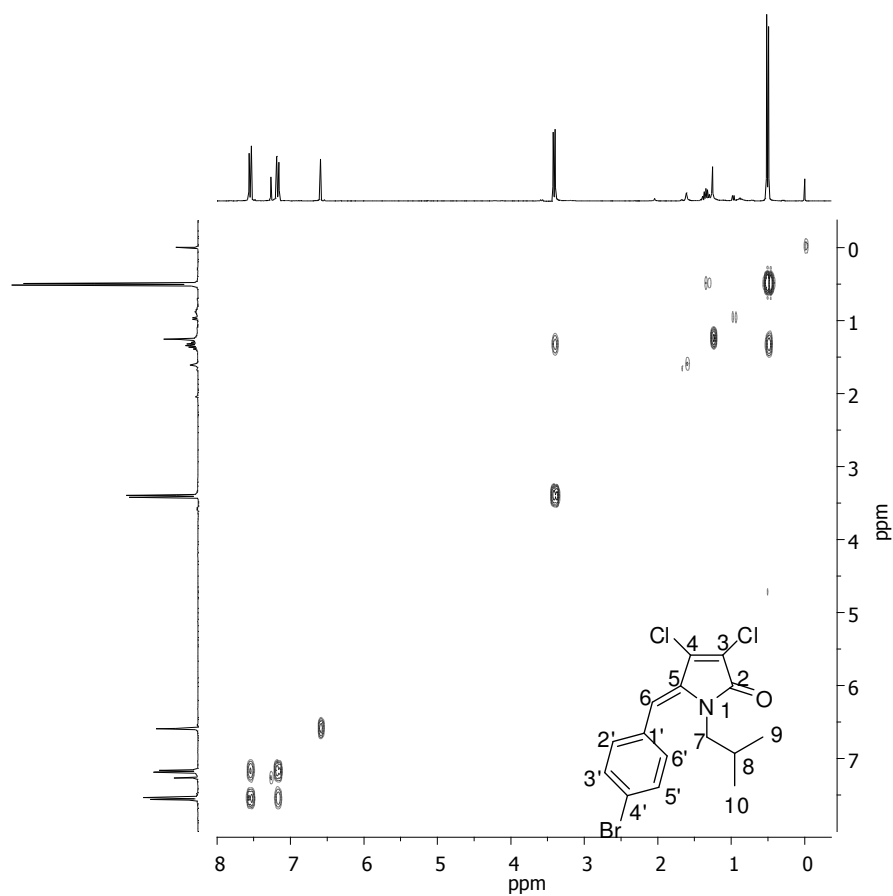


Figura 91: Mapa de contornos COSY (CDCl_3) do composto **34Z**.

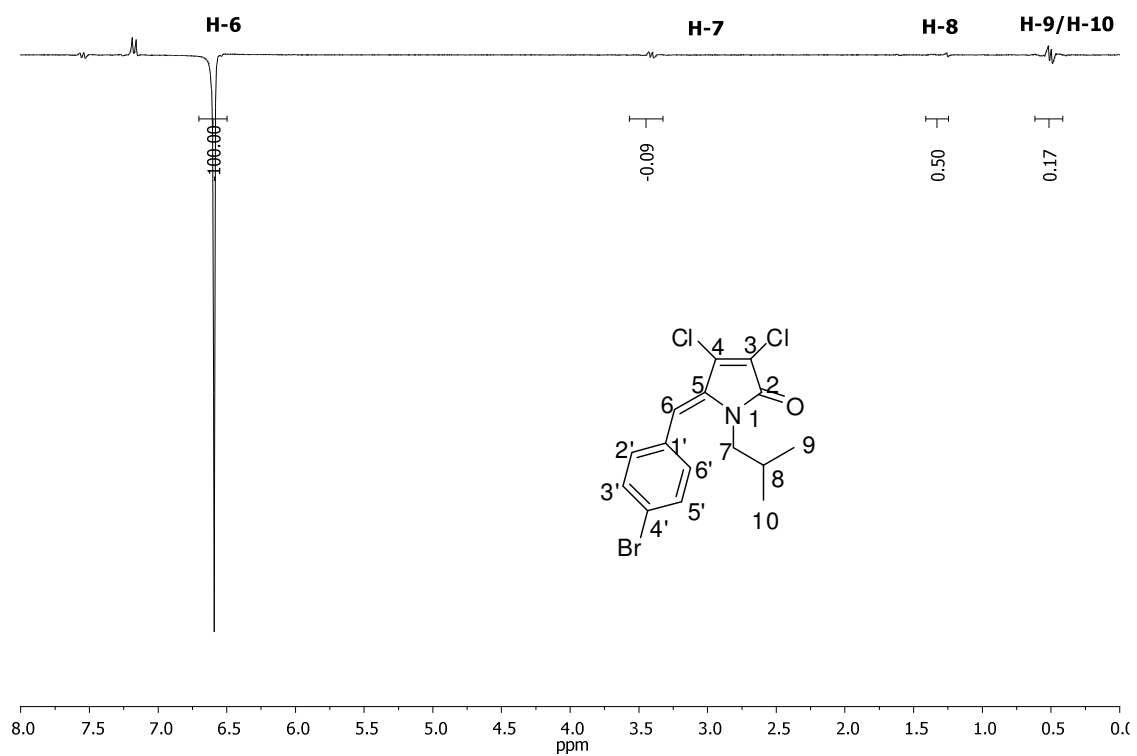


Figura 92: Espectro de NOEDIF (CDCl_3) do composto **34Z**.

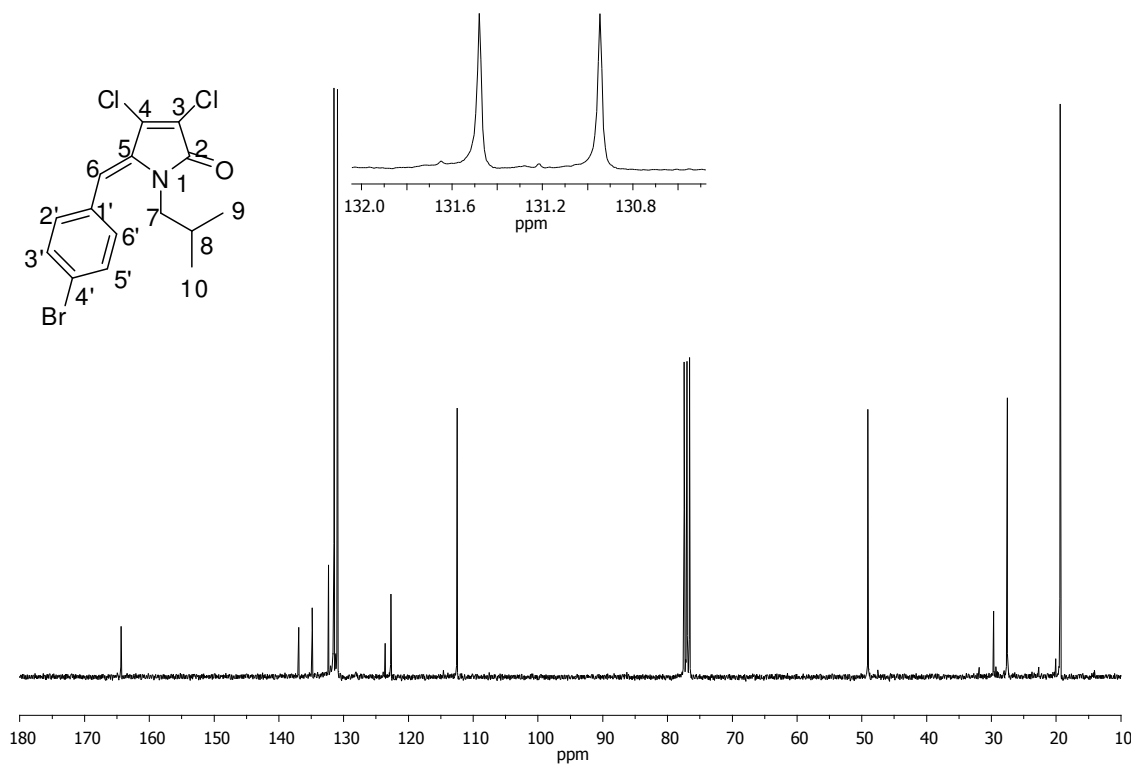


Figura 93: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **34Z**.

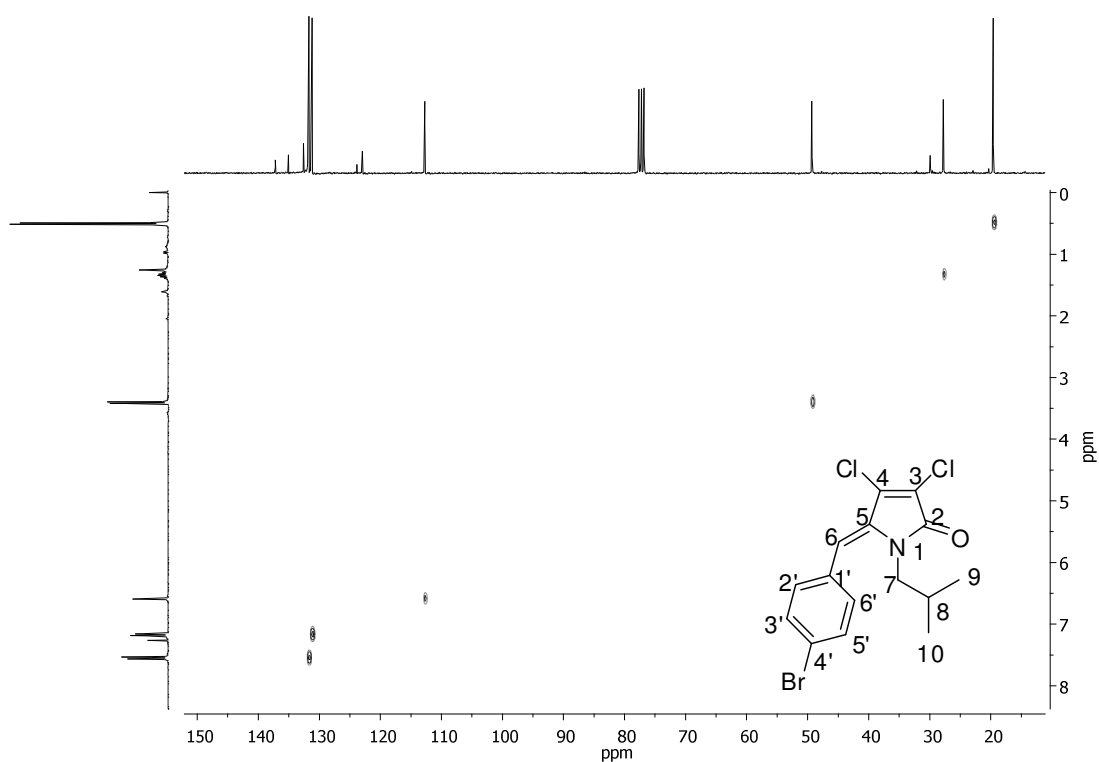


Figura 94: Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) do composto **34Z**.

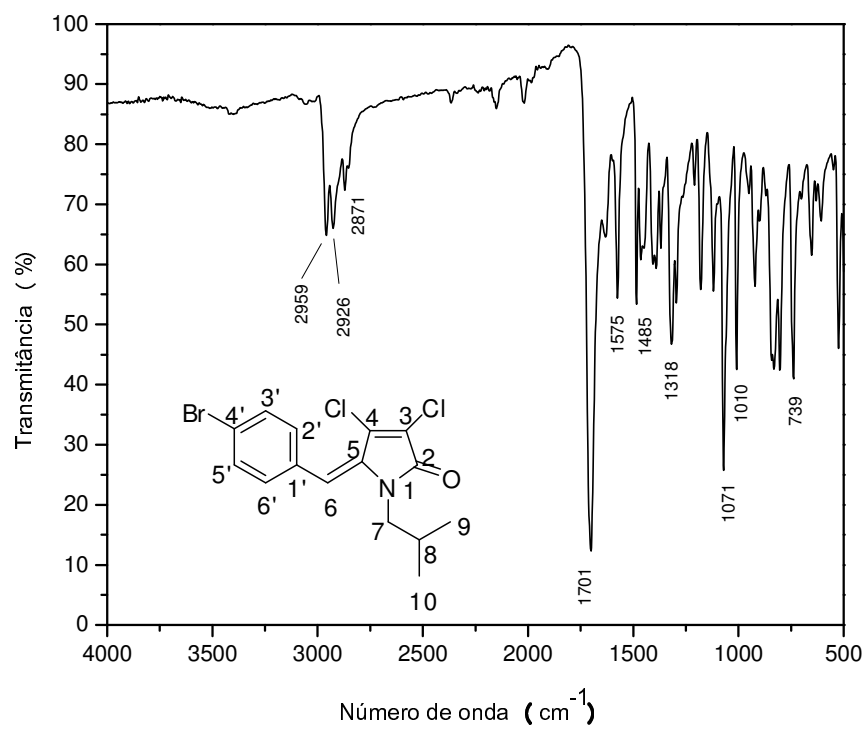


Figura 95: Espectro no IV do composto **34E**.

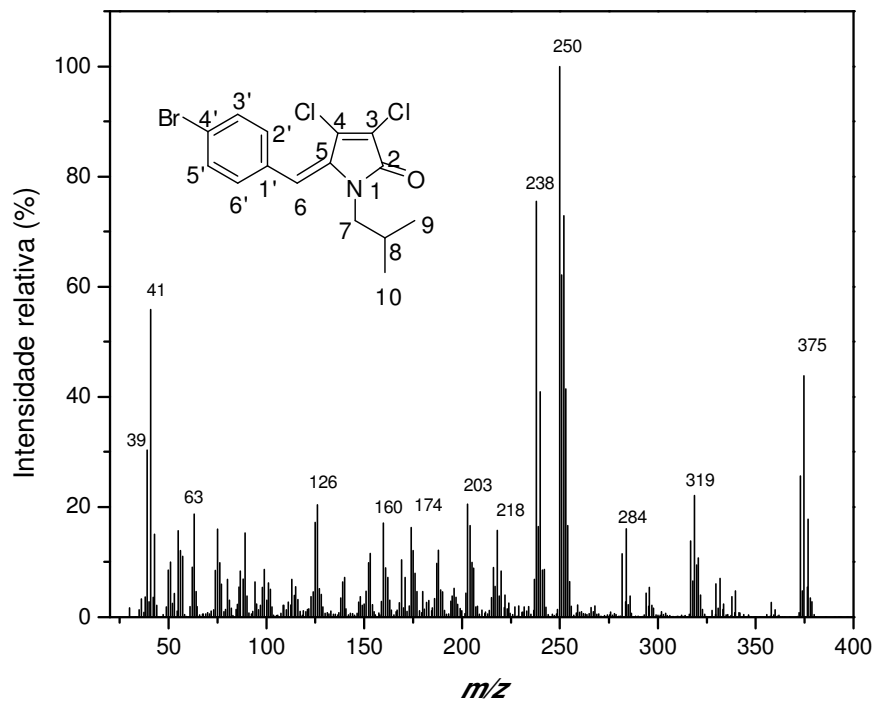


Figura 96: Espectro de massas do composto **34E**.

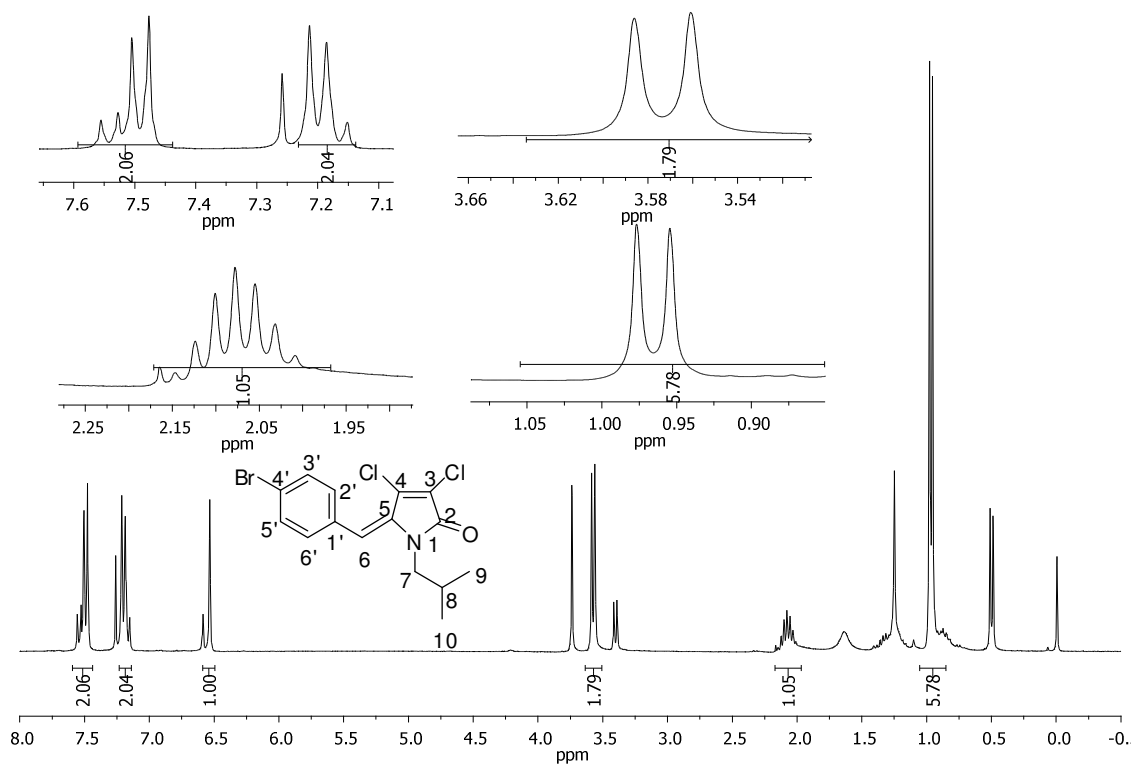


Figura 97: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **34E**.

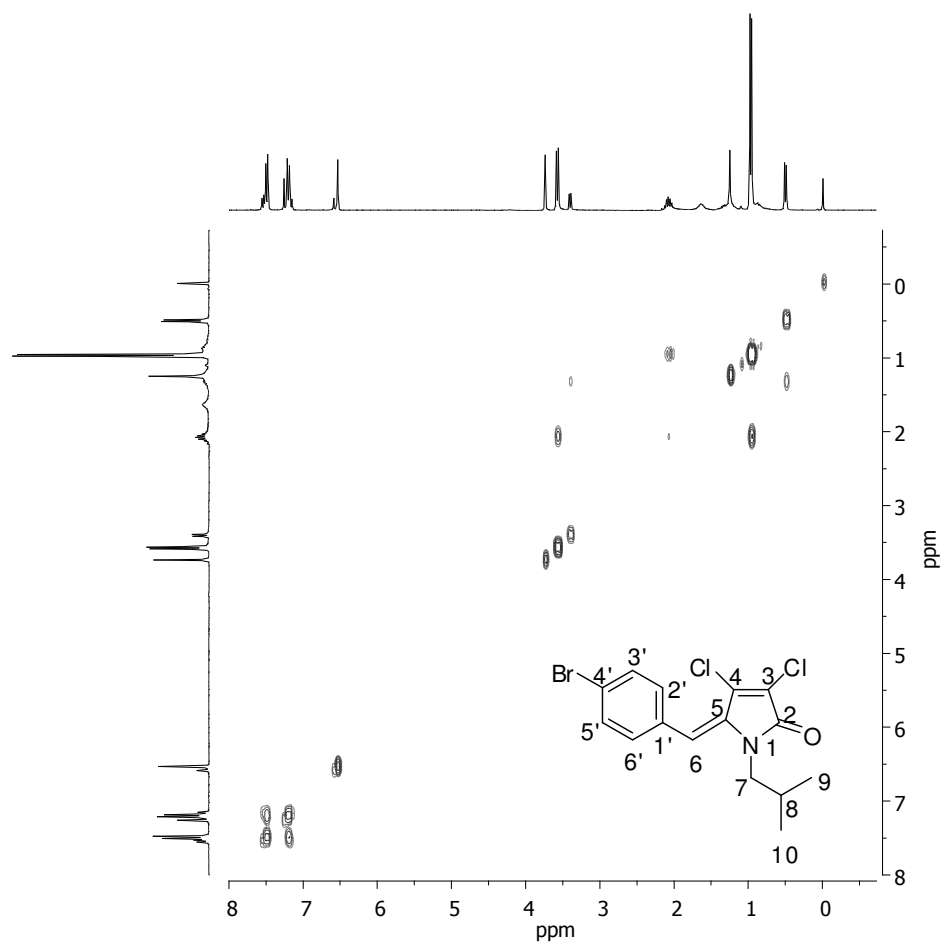


Figura 98: Mapa de contornos COSY (CDCl_3) do composto **34E**.

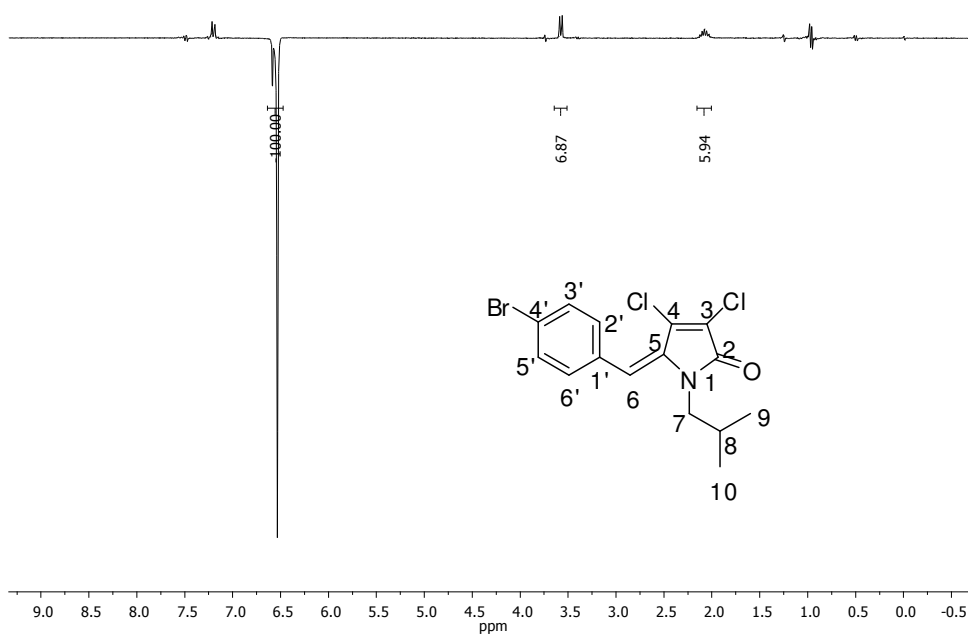


Figura 99: Espectro de NOEDIF (CDCl_3) do composto **34E**.

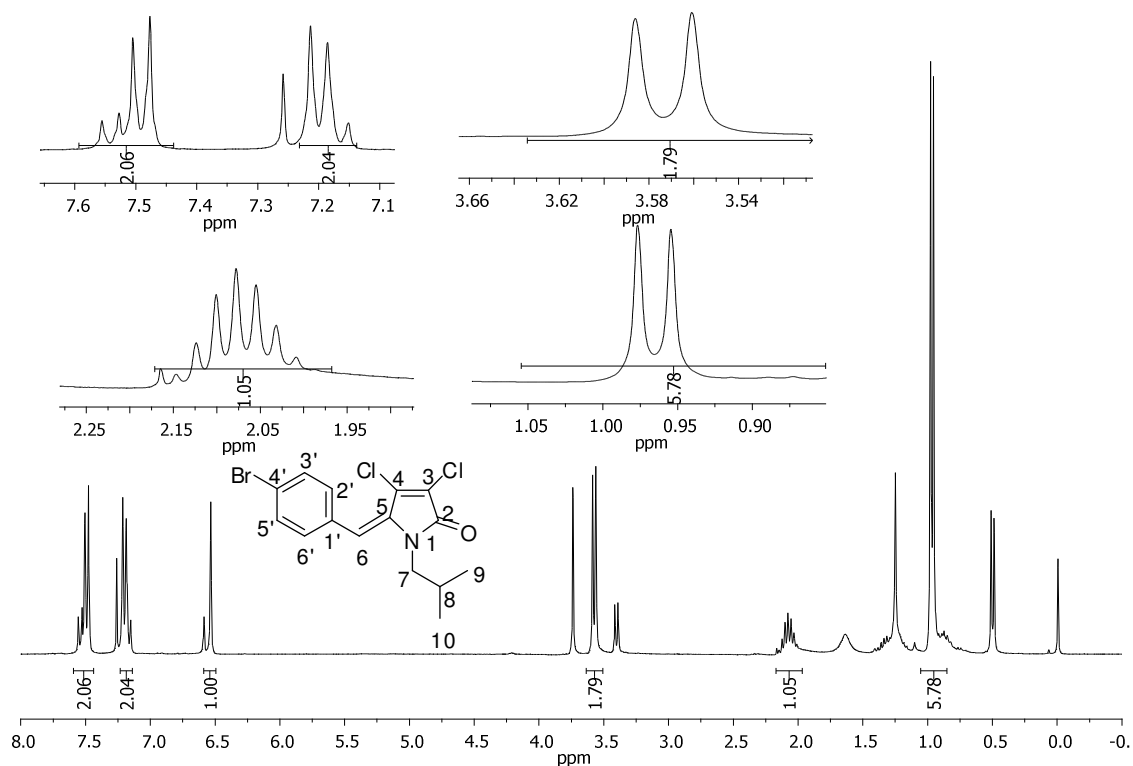


Figura 100: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **34E**.

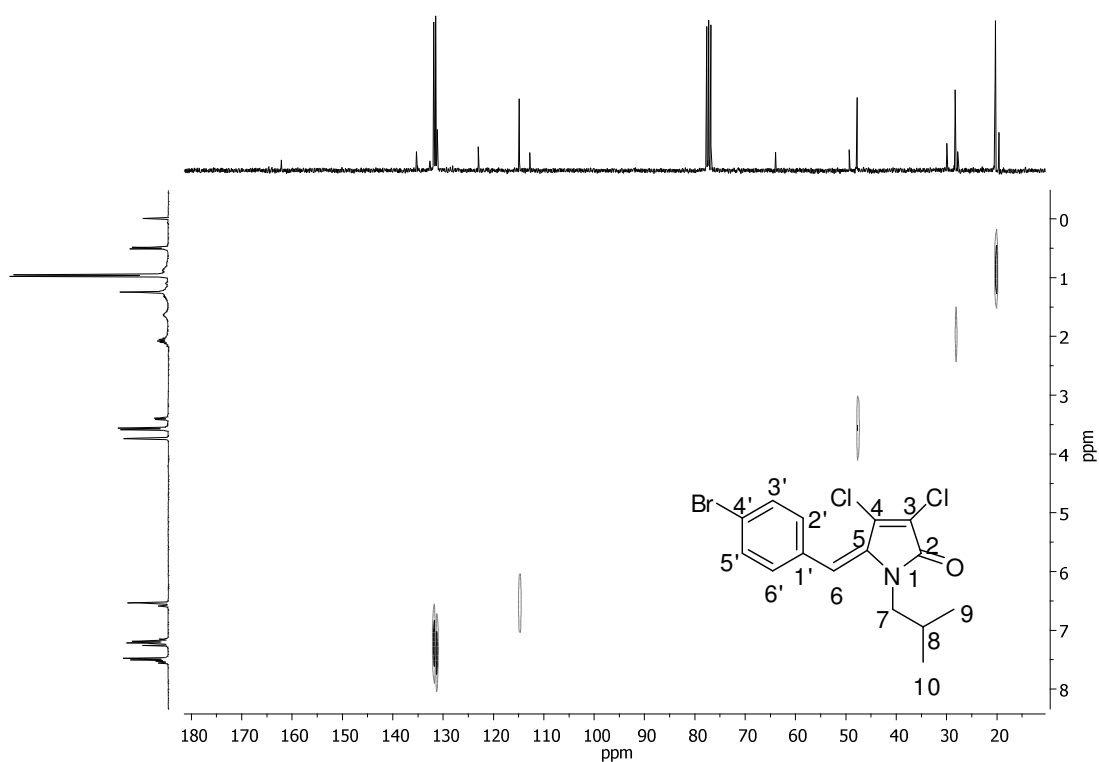


Figura 101: Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) do composto **34E**.

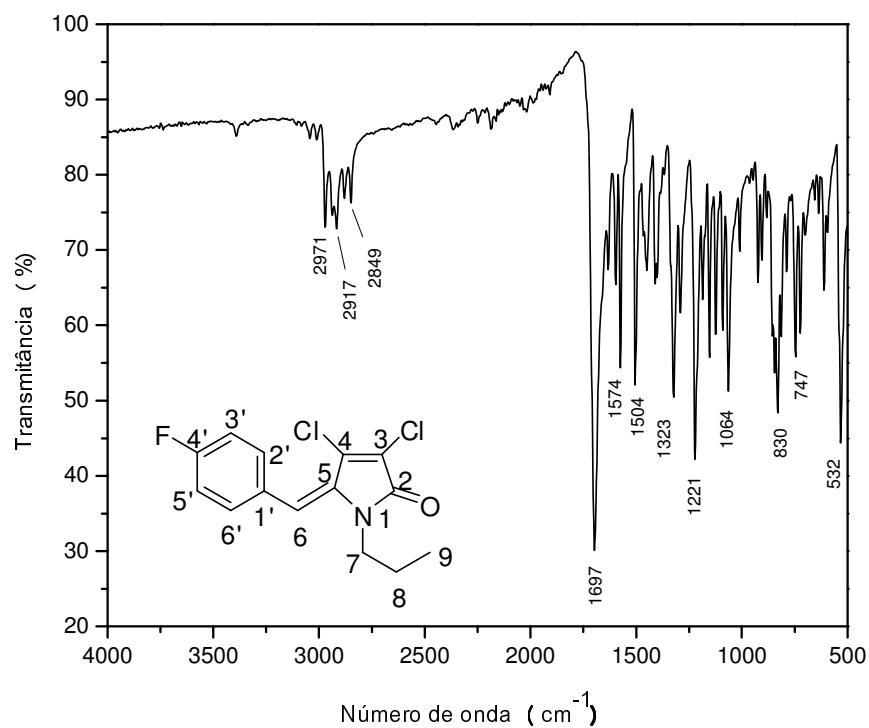


Figura 102: Espectro no IV do composto **35E**.

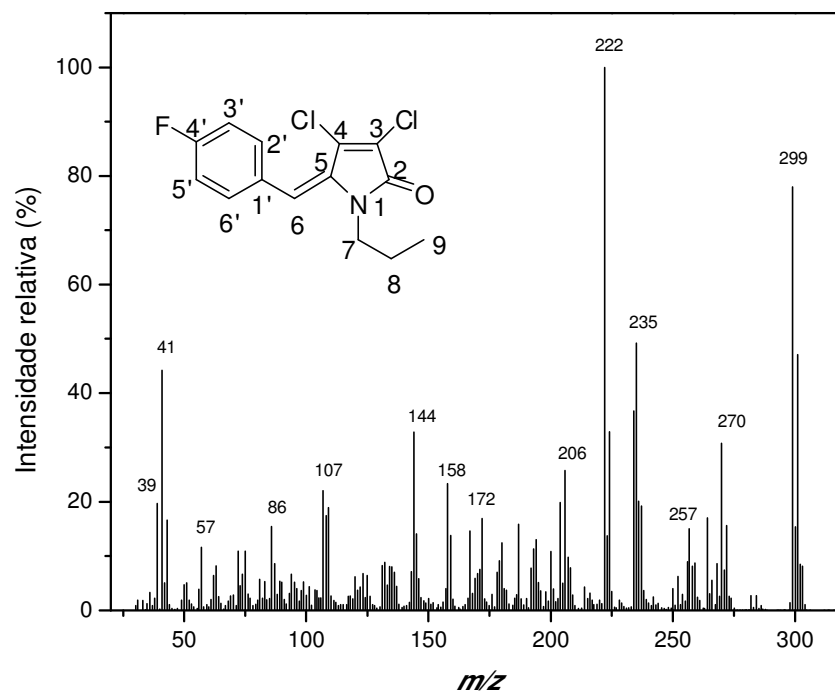


Figura 103: Espectro de massas do composto **35E**.

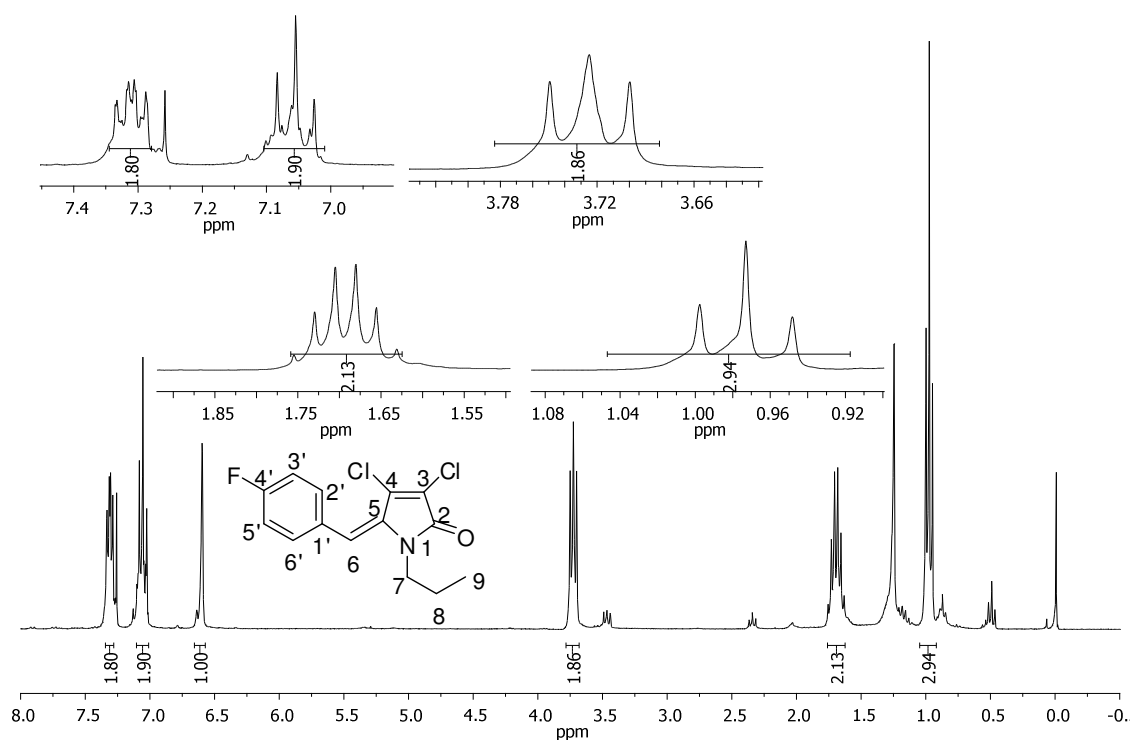


Figura 104: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **35E**.

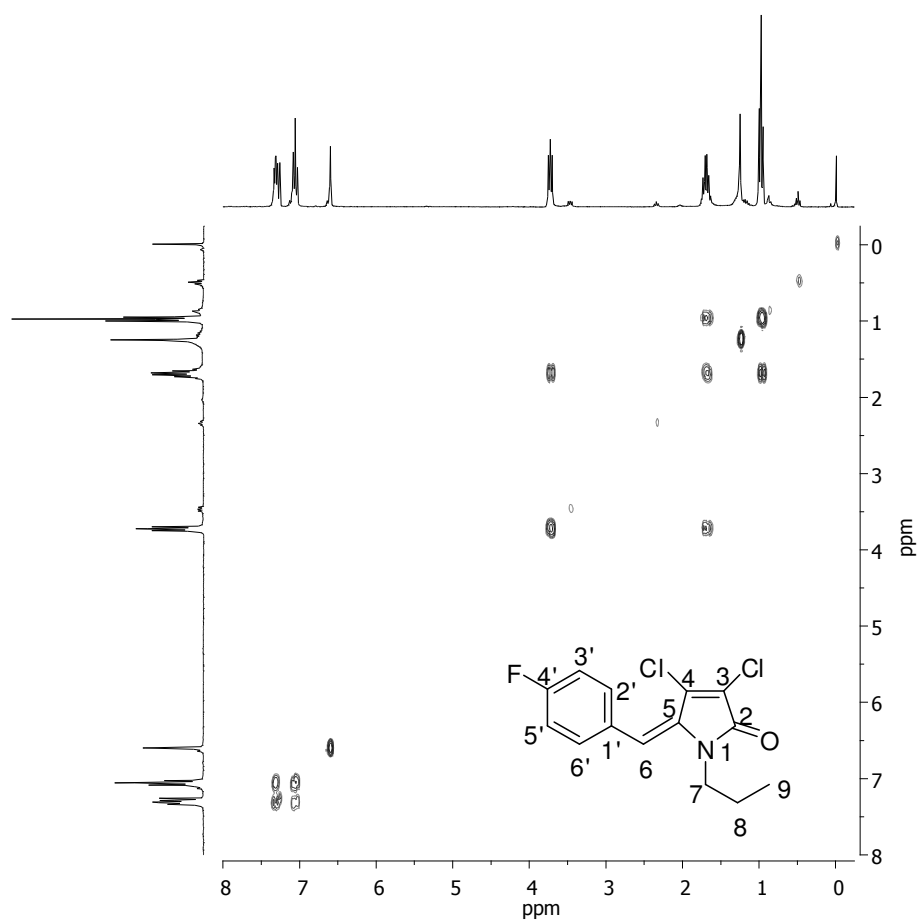


Figura 105: Mapa de contornos COSY (CDCl_3) do composto **35E**.

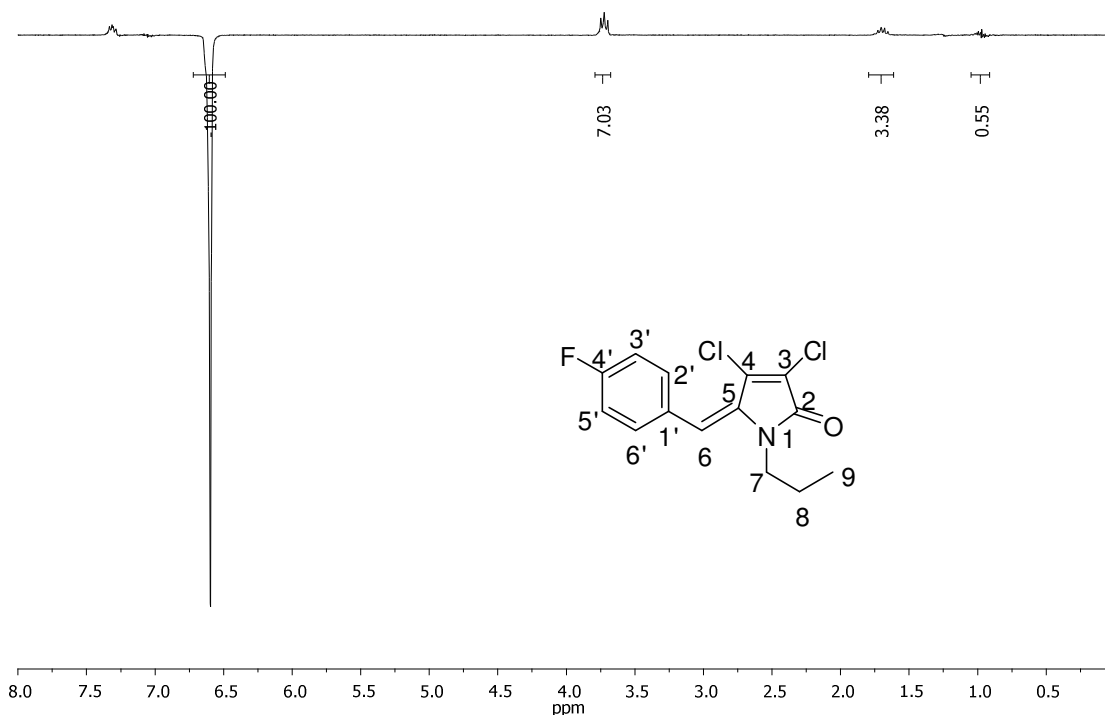


Figura 106: Espectro de NOEDIF (CDCl_3) do composto **35E**.

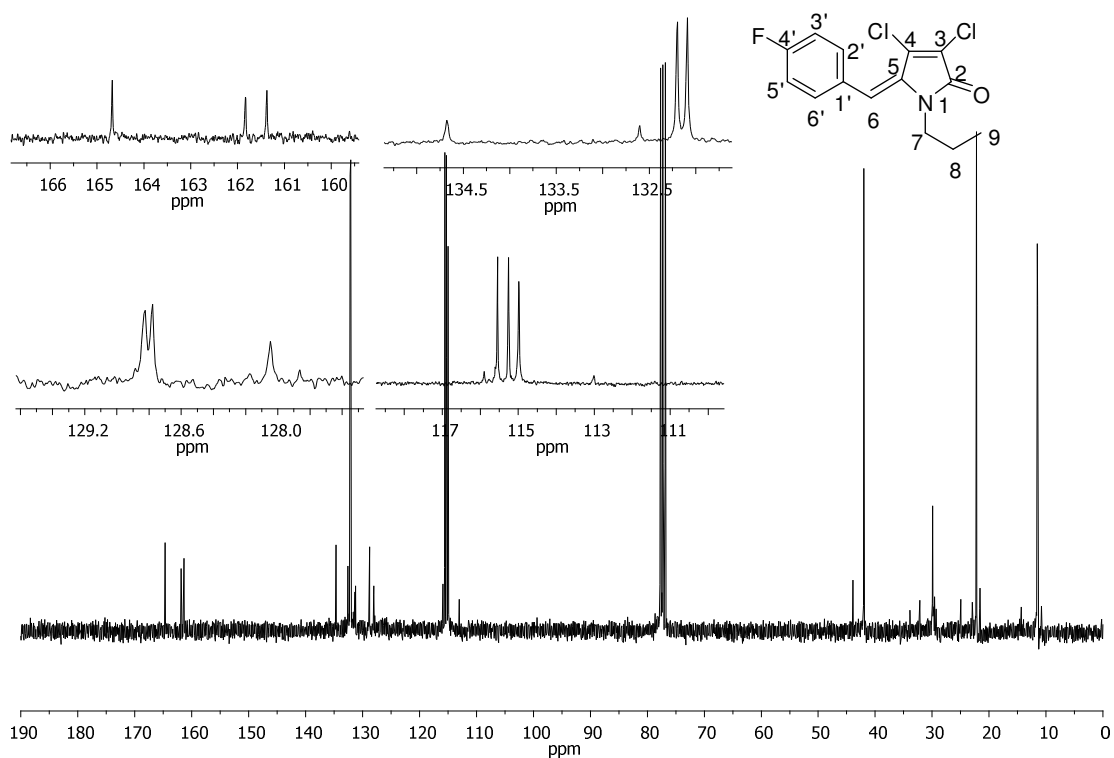


Figura 107: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **35E**.

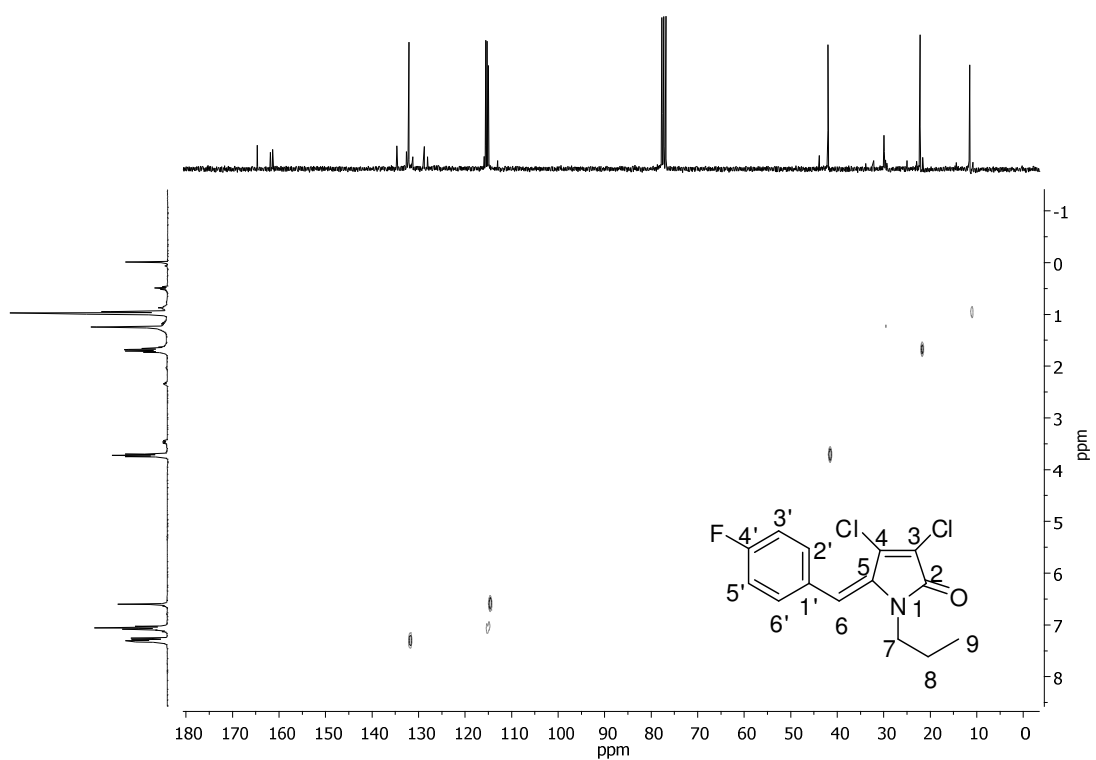


Figura 108: Mapa de contornos HETCOR (CDCl_3) do composto **35E**.