

ANA PAULA MARTINS DE SOUZA

**SÍNTESE DE 2-ARILIDENO INDAN-1,3-DIONAS E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIVIRAL, CITOTÓXICA E LEISHMANÍCIDA**

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
2016

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

T

S729s
2016 Souza, Ana Paula Martins de, 1988-
Síntese de 2-arilideno indan-1,3-dionas e avaliação das atividades
antiviral, citotóxica e leishmanicida / Ana Paula Martins de Souza. -
Viçosa, MG, 2016.
xvii, 169f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Robson Ricardo Teixeira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Compostos químicos. 2. Síntese orgânica. 3. β -dicarbonílicos.
4. β -dicetonas. 5. Indan-1,3-dionas. 6. Agentes antivirais.
7. Leishmania. 8. Toxicologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de pós-graduação em
Agroquímica. II. Título.

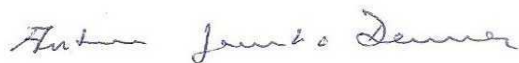
CDD 22. ed. 547.2

ANA PAULA MARTINS DE SOUZA

**SÍNTESE DE 2-ARILIDENO INDAN-1,3-DIONAS E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIVIRAL, CITOTÓXICA E LEISHMANICIDA**

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: 25 de julho de 2016.



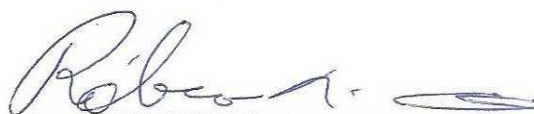
Antônio Jacinto Demuner



Tiago Antônio de Oliveira Mendes



Marcelo Henrique dos Santos



Róbson Ricardo Teixeira
(Orientador)

***Dedico essa dissertação primeiramente a Deus e à
Nossa Senhora***

***Aos meus pais José Francisco e Maria do Carmo pelo
amor incondicional e pelo exemplo de força e coragem***

***À minha irmã Valéria pela cumplicidade e amizade que
temos***

***E ao meu noivo Dionísio por todo amor, incentivo e
cuidado.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus simplesmente por tudo, porque sem Ele eu nada seria.

À Nossa Senhora por estar sempre me abençoando e protegendo.

Aos meus pais José Francisco e Maria do Carmo por caminharem comigo e não medirem esforços para a realização dos meus sonhos.

À minha irmã Valéria por todo amor, carinho, cumplicidade e amizade que temos.

Ao meu noivo Dionísio pela paciência, amor e companheirismo ao longo de todos esses anos juntos.

Aos meus sobrinhos João Vítor e Alice por alegrarem ainda mais os meus dias.

A todos os familiares pelas orações e por terem contribuído, mesmo de forma indireta, para a realização desse trabalho.

Ao professor Róbson Ricardo Teixeira pela atenção, apoio, incentivo e confiança ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Por ter me acolhido e compartilhado sua experiência, profissionalismo e motivação ao longo destes anos.

À minha amiga Betânia por estar sempre comigo, compartilhando alegrias, tristezas e confidências, provando que a amizade quando é sincera a distância não importa.

Aos amigos Wagner, Poliana, Francielle, Ângela e Milene pelo trabalho em equipe, amizade e por sempre estarem à disposição nos momentos em que eu precisei.

Às amigas Giovanna, Kariny, Michelle, Lívia, Cecília, Crístielle e Dayanapor todo carinho, torcida, risadas e por diversas vezes alegrarem os meus dias.

Às amigas Ingredy, Ruth e Sarah pela ajuda e pela companhia agradável ao longo desses anos.

Aos demais colegas do grupo “*orgânica é bão demais*” e do Laboratório 428 pela companhia e por compartilharem experiências profissionais e pessoais.

Aos professores Sérgio Fernandes, Luiz Cláudio Barbosa e aos colegas João Vítor e Tiago pela disposição e ajuda nos momentos de necessidade.

Ao professor Sérgio de Paula e aos estudantes André e Ana Flávia pela realização dos ensaios de avaliação de atividade antiviral.

Ao professor Gustavo Bressan e à estudante Graziela Domingues pela realização dos ensaios de avaliação de citotoxicidade.

Ao Dr. Wallace Pacienza Lima pela realização dos ensaios de avaliação de atividade leishmanicida.

Aos Técnicos José Luiz Pereira, Cristiane Isaac e Márcio Alvarenga pelas análises que ajudaram na caracterização dos compostos sintetizados nesse trabalho e também ao José Valdemir pela ajuda nos momentos de necessidade.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Química pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

Aos professores da banca examinadora que prontamente aceitaram participar da avaliação deste trabalho de pesquisa.

Muito obrigada.

BIOGRAFIA

Ana Paula Martins de Souza, filha de José Francisco de Souza e Maria do Carmo Martins de Souza, nasceu em Ponte Nova, Minas Gerais, em 28 de junho de 1988.

Em 2009 ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde concluiu o curso de Bacharelado em Química em agosto de 2014.

Neste mesmo ano ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica da UFV (mestrado *stricto sensu*), tendo como área de concentração Síntese de Agroquímicos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
BIOGRAFIA	v
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1	ix
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2	ix
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 3	ix
LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 4	x
LISTA DE ESQUEMAS	xi
LISTA DE ESQUEMAS DO CAPÍTULO 1	xi
LISTA DE ESQUEMAS DO CAPÍTULO 2	xi
LISTA DE ESQUEMAS DO CAPÍTULO 4	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2	xii
LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 4	xii
ANEXOS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
CAPÍTULO 1	1
APRESENTAÇÃO	1
1.1. ASPECTOS QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA INDAN-1,3-DIONA E SEUS DERIVADOS	1
1.2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO	4
1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO 2	8
SÍNTESE DE 2-ARILIDENO INDAN-1,3-DIONAS	8
2.1. INTRODUÇÃO	8
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.2.1. Generalidades Metodológicas	14
2.2.2. Difração de Raios X por monocristal (DRXM)	15
2.3. PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS	28
2.3.1. Síntese dos derivados da indan-1,3-diona	28
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

CAPÍTULO 3	73
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS 2-ARILIDENO INDAN-1,3-DIONAS CONTRA A PROTEASE NS2B-NS3 DO WEST NILE VIRUS E VÍRUS DENGUE.....	73
3.1. INTRODUÇÃO.....	73
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	77
3.2.1. Culturas Celulares	77
3.2.1.1. Células	77
3.2.1.2. Meio de cultura e reagentes	77
3.2.2. Vírus	78
3.2.2.1. Cepas Virais.....	78
3.2.2.2. Determinação dos títulos virais pelo método das placas de lise.....	78
3.2.3. Ensaio Enzimático: Inibição da protease NS2B-NS3 do WNV	79
3.2.3.1. Triagem de inibição de protease para WNV	80
3.2.3.2. Inibição enzimática na presença de várias concentrações das 2-arilideno indan-1,3-dionas	80
3.2.3.3. Ensaio de Cinética Enzimática na presença das 2-arilideno indan-1,3-dionas.....	81
3.2.4. Avaliação da Citotoxicidade.....	82
3.2.5. Avaliação da Ação Antiviral contra o vírus Dengue.....	83
3.3. RESULTADOS	84
3.3.1. Avaliação do efeito das 2-arilideno indan-1,3-dionas contra a protease NS2B-NS3 do WNV	84
3.3.2. Inibição enzimática na presença de várias concentrações dos compostos 14 e 17	85
3.3.3. Ensaio de cinética enzimática.....	86
3.3.4. Ensaio de Avaliação de Citotoxicidade.....	87
3.3.5. Ensaio de avaliação de atividade antiviral contra o vírus dengue	88
3.4. DISCUSSÃO	89
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
CAPÍTULO 4	99
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E LEISHMANICIDA DAS 2-ARILIDENO INDAN-1,3-DIONAS.....	99
4.1. INTRODUÇÃO.....	99
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	104
4.2.1. Ensaio de avaliação de citotoxicidade dos derivados 1-17	104
4.2.1.1. Cultivo Celular	104
4.2.1.2. Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT	104
4.2.2. Ensaio de avaliação de atividade leishmanicida.....	105

4.2.2.1. Parasitos e Reagentes.....	106
4.2.2.2. Metodologia.....	106
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
4.3.1. Avaliação da citotoxicidade dos derivados 1-17	107
4.3.2. Atividade antileishmanial dos derivados 1-17	113
4.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
ANEXOS	124

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 1

1	Estrutura química da indan-1,3-diona.....	1
2	Derivados bioativos da indan-1,3-diona.....	3
3	Derivados da indan,1-3-diona utilizados para conversão de energia solar em energia elétrica.....	4
4	Estrutura geral dos derivados da indan-1,3-diona sintetizados na presente investigação.....	5

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 2

1	Compostos contendo grupos metilênicos ativados e tipicamente empregados em condensações de Knoevenagel.....	9
2	Produtos naturais cujas sínteses totais envolveram a reação de Knoevenagel.....	11
3	Unidade assimétrica dos compostos 1 , 6 e 15 . Átomos não hidrogenóides são representados por elipsóides a uma probabilidade de 50%. Átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário. A numeração dos átomos das unidades assimétricas de 1 e 15 segue aquela mostrada para o composto 6 , exceto pelos seus átomos exclusivos, os quais estão rotulados na figura.....	18
4	Estruturas das 2-arilideno indan-1,3-dionas sintetizadas.....	52
5	Espectro no infravermelho (ATR) do composto 1	57
6	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 1	58
7	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 1	59
8	Espectro no infravermelho (ATR) do composto 14	62
9	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 14	63
10	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6 + \text{D}_2\text{O}$) do composto 14 ...	64
11	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto 14	65
12	Cadeia unidimensional formada no empacotamento cristalino do composto 1 . Somente os átomos de hidrogênio envolvidos nas interações intermoleculares (linhas pontilhadas pretas) são exibidos.....	67
13	Camada bidimensional formada no empacotamento cristalino do composto 6 . Somente os átomos de hidrogênio envolvidos nas interações intermoleculares (linhas pontilhadas pretas) são exibidos.....	68
14	Cadeia unidimensional característica do empacotamento cristalino do composto 15 . Somente os átomos de hidrogênio envolvidos nas interações intermoleculares (linhas pontilhadas pretas) são exibidos.....	69

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 3

1	Avaliação do efeito dos compostos 1-17 frente à protease NS2B-NS3 do WNV. Foi utilizado o teste estatístico de comparações múltiplas one-way ANOVA, com valor de $p < 0,05$	85
2	Inibição da protease NS2B-NS3 do WNV na presença de várias concentrações dos compostos 14 (Gráfico A) e 17 (GráficoB). O cálculo da regressão foi baseado no coeficiente de Hill. Os valores de IC_{50} são dados em μM	86

3	Investigação da cinética enzimática para a protease NS2B-NS3 do WNV na presença dos compostos 14 e 17 . Em A e B estão os gráficos de Michaelis-Menten para os compostos 14 e 17 , respectivamente. Em C e D estão os gráficos de Lineweaver-Burk para os compostos 14 e 17 , respectivamente.....	87
4	Ensaio de citotoxicidade para os compostos 14 e 17 frente a células VERO. A representa a viabilidade celular para o composto 14 e B a viabilidade celular para o composto 17 . O cálculo da regressão teve como base o coeficiente de Hill.....	88
5	Efeito antiviral dos compostos 14 e 17 em células VERO infectadas com o vírus DENV-1. A representa a inibição viral para o composto 14 e B a inibição viral para o composto 17 . O cálculo da regressão para determinação do valor de EC ₅₀ teve como base o coeficiente de Hill.....	89
6	Estruturas dos compostos que apresentaram atividade inibitória frente à protease NS2B-NS3 do WNV.....	90
7	Substâncias com atividade inibitória da protease NS3 de HCV. K_{inact} é a taxa de inativação da enzima e K_i é a constante do inibidor.....	91
8	Substâncias com atividade inibitória da enzima HIV-1 integrase.....	92
9	Substância com atividade inibitória da Proteína E1-E2 do HPV.....	92

LISTA DE FIGURAS DO CAPÍTULO 4

1	Casos de Leishmaniose cutânea e visceral reportados em 2014.....	100
2	Manifestações clínicas da Leishmaniose humana.....	103
3	Compostos com menores valores de IC ₅₀ contra a linhagem Nalm6	109
4	Derivados da indan-1,3-diona com atividade inibitória contra células K562 descritas por (LIU <i>et al.</i> , 2014).....	109
5	Perfil dose-resposta dos compostos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 14, 16 e 17 frente à linhagem HL60.....	111
6	Perfil dose-resposta dos compostos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 15, 16 e 17 frente à linhagem Nalm6.....	112
7	Perfil dose-resposta dos compostos 3 e 10 frente à linhagem HepG2.....	112
8	Perfil dose-resposta dos compostos 1 e 3 frente à linhagem B16-F10....	113
9	Estruturas dos compostos que apresentam os melhores efeitos antileishmanial.....	115
10	Chalcona com atividade leishmanicida.....	115
11	Nitrocompostos utilizados no tratamento de doenças.....	116
12	Percentual de crescimento obtidos durante a avaliação da atividade leishmanicida. Em A, controle positivo e compostos 1 a 5 . Em B, compostos 6 a 11 e em C, compostos 12 a 17	117

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE ESQUEMAS DO CAPÍTULO 1

1	Reação de auto-condensação da indan-1,3-diona.....	2
---	--	---

LISTA DE ESQUEMAS DO CAPÍTULO 2

1	Condensação do malonato de dietila com formaldeído.....	8
2	Condensação do benzaldeído com acetoacetato de etila.....	8
3	Síntese multicomponente de <i>bis</i> -espiro pirrolidinas.....	10
4	Síntese de um semi-condutor via condensação de Knoevenagel.....	11
5	Processo de Knoevenagel catalisado por suco de limão.....	12
6	Reações de Knoevenagel catalisadas por InCl_3	12
7	Reação da indan-1,3-diona com aldeídos aromáticos para a formação de derivados contendo grupos arilídenos.....	13
8	Reação envolvida na otimização das condições de reação de Knoevenagel catalisadas por $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	46
9	Proposta de mecanismo para a síntese das 2-arilídeno indan-1,3-dionas.....	54

LISTA DE ESQUEMAS DO CAPÍTULO 4

1	Esquema do protocolo do ensaio de avaliação da atividade leishmanicida.....	107
---	---	-----

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 2

1	Constantes de cela e determinação estrutural das amostras determinadas por DRXM.....	19
2	Comprimentos de ligação (Å) das substâncias 1 , 6 e 15 determinadas por DRXM.....	21
3	Ângulos de ligação (°) do composto 1 determinado por DRXM.....	22
4	Ângulos de ligação (°) do composto 6 determinado por DRXM.....	23
5	Ângulos de ligação (°) do composto 15 determinado por DRXM.....	24
6	Ângulos torsionais (°) do composto 1 determinado por DRXM.....	25
7	Ângulos torsionais (°) do composto 6 determinado por DRXM.....	26
8	Ângulos torsionais (°) do composto 15 determinado por DRXM.....	27
9	Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos 2-16.....	30
10	Otimização das condições de reação de Knoevenagel entre indan-1,3-diona e o 4-clorobenzaldeído.....	47

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO 4

1	Valores de IC ₅₀ (µM) obtidos para os derivados da indan-1,3-diona 1-17	108
2	Valores de IC ₅₀ (µM) obtidos para os derivados da indan-1,3-diona.....	114

ANEXOS

ESPECTROS.....	125
----------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

D ₂ O	Água deuterada
Å	Angström
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
CCD	Cromatografia em camada delgada
DRXM	Difração de Raios X por Monocristal
d	Dupleto
d _{ap}	Dupleto aparente
dd	Dupleto duplo
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
δ	Deslocamento químico
PMS	Fenazinametosulfato
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
MHz	Megahertz
m	Multiplete
$\bar{\nu}$	Número de onda
P.A.	Para análise
ppm	Partes por milhão
R _f	Fator de retenção
ATR	Reflectância Total Atenuada
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
BBr ₃	Tribrometo de Boro
t _{ap}	Triplete aparente
T _f	Temperatura de fusão
v/v	Volume/volume

RESUMO

de SOUZA, Ana Paula Martins, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2016. **Síntese de 2-arilideno indan-1,3-dionas e avaliação das atividades antiviral, citotóxica e leishmanicida.** Orientador: Róbson Ricardo Teixeira.

A indan-1,3-diona é uma β -dicetona sinteticamente útil e que apresenta atividade anticoagulante. Derivados desta substância também apresentam importantes aplicações biológicas e tecnológicas. Dentro deste contexto, o presente trabalho de pesquisa objetivou a síntese e a avaliação das atividades antiviral, citotóxica e leishmanicida de uma série de derivados da indan-1,3-diona. Para a preparação de dezessete derivados da indan-1,3-diona foi desenvolvida uma metodologia de condensação de Knoevenagel catalisada por cloreto de zirconila octaidratado ($ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$). Os compostos sintetizados foram obtidos com rendimentos variando de 53% a 95% e tempos de reação de 10 minutos a 45 minutos. As substâncias foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas e espectrométricas. Os resultados da avaliação do ensaio antiviral contra a protease NS2B-NS3 do West Nile Virus (WNV) e contra o vírus dengue-1 (DENV-1) mostraram que dos dezessete compostos submetidos aos ensaios, dois deles, 2-(4-hidroxibenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona (**14**) e 2-(3,4-diidroxibenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona (**17**) foram os mais ativos em inibir a protease do WNV e bem como o vírus DENV-1. Realizou-se também a avaliação da atividade citotóxica dos compostos sintetizados contra as linhagens celulares HL-60 (leucemia mieloide aguda), Nalm6 (leucemia linfóide aguda derivada de célula B) HepG2 (carcinoma hepatocelular) e B16F10 (melanoma murino). Os resultados mostraram que quatro compostos, 2-(4-nitrobenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(**4**), 4-((1,3-dioxo-1*H*-inden-2(3*H*)-ilideno)metil)benzonitrila(**10**), 2-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(**12**) e 2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(**15**) apresentaram citotoxicidade moderada contra a linhagem Nalm6. Avaliou-se também a atividade leishmanicida dos compostos sintetizados contra a forma promastigota da *Leishmania amazonensis*. Da série analisada, dois compostos, [2-(4-nitrobenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona (**4**) e 2-(4-hidroxi-3,5-

dimetoxibenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona (15), exibiram atividades moderadas contra promastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados alcançados com o desenvolvimento deste trabalho apontam para o fato de que os derivados arilideno da indan-1,3-diona podem ser considerados candidatos a novos agentes antivirais e quimioterápicos para o tratamento do câncer, da leishmaniose e de doenças causadas por arbovirus.

ABSTRACT

de SOUZA, Ana Paula Martins, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2016. **Synthesis of 2-arylidene indan-1,3-diones and antiviral, cytotoxic and leishmanicide activities.** Adviser: Róbson Ricardo Teixeira.

The indan-1,3-dione is a synthetic useful β -diketone displaying anticoagulant activity. Derivatives of this compound present important biological and technological applications. Within this context, the aim of the present investigation was to synthesize a series of 2-arylidene indan-1,3-diones and to evaluate their antiviral, cytotoxic and leishmanicide activities. To prepare the compounds, an alternative Knoevenagel condensation methodology, catalyzed by $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$, was developed. Seventeen compounds were synthesized and fully characterized by IR and NMR spectroscopy techniques. The indan-1,3-dione derivatives were obtained in synthetically useful yields ranging from 53% to 95% within 10 minutes to 45 minutes. The antiviral assays revealed that two compounds, namely 2-(4-hydroxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3-(2*H*)-dione (**14**) and 2-(3,4-dihydroxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione (**17**), present significant inhibitory effects against the NS2B-NS3 West Nile Virus protease as well as dengue-1 virus (DENV-1). The cytotoxic activity of the seventeen indan-1,3-dione derivatives was evaluated against HL-60 (promyelocytic leukemia cell line), Nalm6 (lymphoid acute leukemia pre cell line B), HepG2 (liver hepatocellular cell line) and B16F10 (murine melanoma). The best cytotoxic activity was associated with 2-(4-nitrobenzylidene)-1*H*-indene-1,3-(2*H*)-dione (**4**), 4-((1,3-dioxo-1*H*-indene-2(3*H*)-ylidene)methyl)benzotrile (**10**), 2-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione (**12**) and 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione (**15**) which presented moderate activity against Nalm 6 cell line. The leishmanicide activity of the arylidene indan-1,3-dione series was also evaluated against promastigote form of *Leishmaniza amazonensis*. The most activity compounds corresponded to 2-(4-nitrobenzilidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione (**4**) and 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione (**15**) which showed moderate activity against the parasite. The results found in this investigation point to the fact that 2-arylidene indan-1,3-diones may represent a scaffold to be explored towards the development of new antivirals as well as quimiotherapy drugs to the treatment of cancer and leishmaniasis as well as against arbovirus.

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO

1.1. ASPECTOS QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA INDAN-1,3-DIONA E SEUS DERIVADOS

Compostos β -dicarbonílicos desempenham papel importante em síntese orgânica. As β -dicetonas, também chamadas de 1,3-dicetonas, são moléculas que apresentam um grupo metileno entre duas carbonilas (BATISTA, 2011). Um exemplo de β -dicetona é a indan-1,3-diona, sintetizada pela primeira vez em 1887 (JACOB *et al.*, 2000) e cuja estrutura está representada na Figura 1.1.

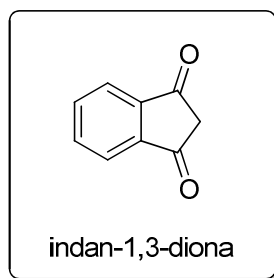
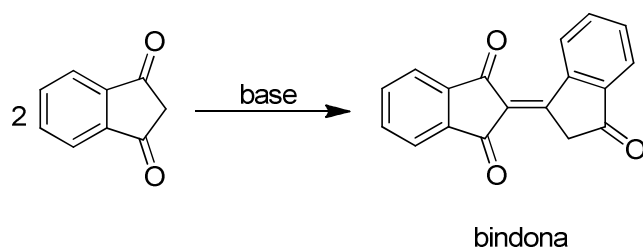


Figura 1.1 -Estrutura química da indan-1,3-diona.

Este composto é um ácido moderadamente forte, $pK_a = 7.2$ (C_{sp^3} -H), e seus enolatos, de coloração laranja, podem ser obtidos ao reagir-lo com bases em solução de etanol. Estes enolatos são instáveis e na presença de espécies neutras, um processo de auto-condensação da indan-1,3-diona ocorre (Esquema 1.1, pg. 2) resultando na formação da bindona (SIGALOV *et al.*, 2008). As estruturas formadas a partir da auto-condensação da indan-1,3-diona chamam a atenção, pois elas servem como material de partida para a síntese de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (JACOB *et al.*, 2000).



Esquema 1.1 – Reação de auto-condensação da indan-1,3-diona.

Sistemas aromáticos e heteroaromáticos derivados da indan-1,3-diona são importantes como potenciais agroquímicos biodegradáveis, assim como também potenciais produtos farmacêuticos (SINGH, 2016).

A química diversificada da indan-1,3-diona atrai constante interesse, uma vez que ela é um valioso precursor sintético e seus derivados têm sido utilizados como corantes; como semicondutores; em química forense, para detecção de impressões digitais, e também usados na síntese de fármacos (SIGALOV *et al.*, 2008).

A indan-1,3-diona apresenta propriedade anticoagulante, atuando na inibição das enzimas vitamina K epóxidoreductase e vitamina K reductase, impedindo a geração da forma reduzida da vitamina K, que é um dos cofatores envolvidos no processo de coagulação sanguínea (MITKA *et al.*, 2009).

A dicetona em questão tem sido utilizada como material de partida para a síntese de derivados bioativos como os compostos (I) e (II), Figura 1.2 (pg. 3), que apresentam, respectivamente, atividade antitubercular (KARTHIK *et al.*, 2008) e antitumoral (INAYAMA *et al.*, 1976).

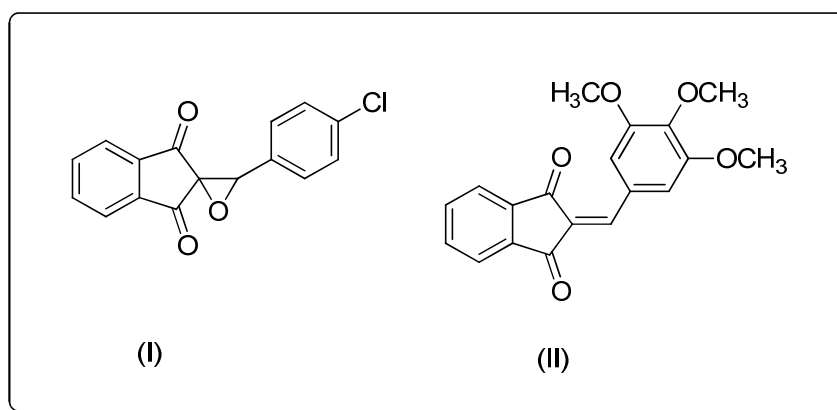


Figura 1.2 –Derivados bioativos da indan-1,3-diona.

Outras importantes bioatividades descritas para derivados da indan-1,3-diona incluem atividade antiinflamatória, antiviral, anti-hepatite, rodenticida, herbicida, antioxidante (JEYACHANDRAN e RAMESH, 2011), inseticida (KILGORE *et al.*, 1942), antibacteriana e antifúngica (MEENA *et al.*, 2006).

Derivados da indan-1,3-diona também são utilizados como biossensores fluorescentes. Com suas propriedades corantes, eles permitem a visualização e a quantificação de proteínas endógenas no interior de células vivas (MACNEVIN *et al.*, 2013).

Além dos aspectos biológicos, estudos recentes apontam para a possibilidade de utilização de derivados da indan-1,3-diona na produção de energia. WINZENBERG e colaboradores (2015) demonstraram que os compostos mostrados na Figura 1.3 (pg. 4) atuam como semicondutores em células solares, transformando energia solar em energia elétrica com uma eficiência de conversão superior a 2%.

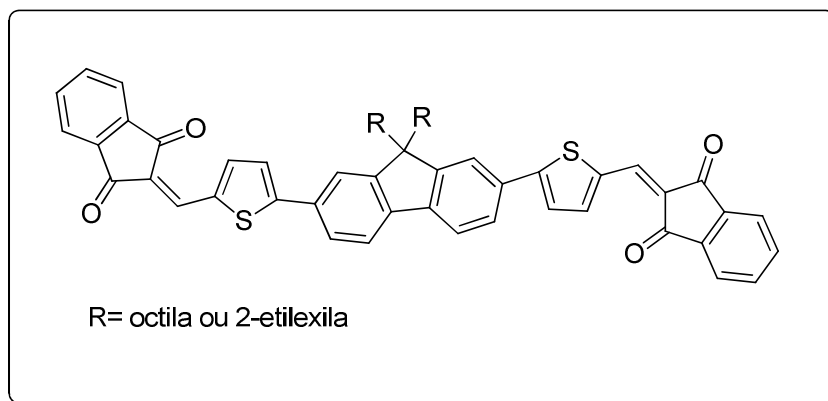


Figura 1.3-Derivados da indan-1,3-diona utilizado para conversão de energia solar em energia elétrica.

1.2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Muitas substâncias já foram sintetizadas como potenciais fontes de novos e seletivos agentes para o tratamento de várias doenças.

O tratamento de doenças causadas por vírus são de difícil tratamento, pois, de maneira geral, não existem medicamentos específicos e devido à mutação genética viral, o desenvolvimento de vacinas eficazes capazes de controlar e combater as infecções virais é um desafio.

A leishmaniose também é uma doença que atinge milhões de pessoas ao redor do mundo e as medicações atualmente disponíveis para o tratamento da mesma apresentam sérios problemas de toxicidade e administração aos pacientes.

Outra importante patologia é o câncer, que é uma das doenças que mais causam mortes ao redor do mundo.

Diante das várias aplicações biológicas e tecnológicas relacionadas à indan-1,3-diona e seus derivados, a presente investigação objetivou a síntese e avaliação das atividades antiviral, leishmanicida e citotóxica de um conjunto de

derivados da indan-1,3-diona. Foram sintetizados e avaliados um total de dezessete compostos apresentando a estrutura geral mostrada na Figura 1.4.

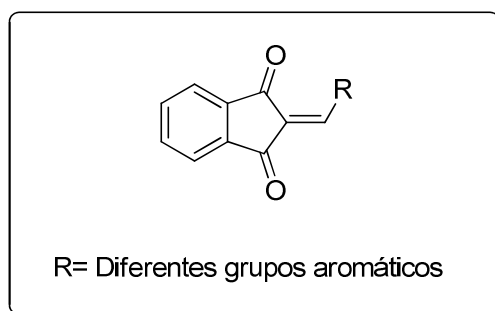


Figura 1.4 - Estrutura geral dos derivados da indan-1,3-diona sintetizados na presente investigação.

1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, P. K. Desenvolvimento de β -dicetonas e estudo das propriedades luminescentes de complexos com íons lantanídeos. 2011. 100f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.

INAYAMA, S.; MAMOTO, K.; SHIBATA, T.; HIROSE, T. Structure and antitumor activity relationship of 2-arylidene-4-cyclopentene-1,3-diones and 2-arylideneindan-1,3-diones. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.19, p.433-436, 1976.

JACOB, K; SIGALOV, M.; BECKER, J. Y.; ELLERN, A.; KHODORKOVSKY, V. Self-condensation of 1,3-indandione: a reinvestigation. *European Journal of Organic Chemistry*, p. 2047-2055, 2000.

JEYACHANDRAN, M.; RAMESH. Synthesis, antimicrobial, and anticoagulant activity of 2-(arylsulfonyl)indane-1,3-diones. *Organic Chemistry International*, v. 2011, Article ID 360810, 5 pages, 2011.

- KARTHIK, R.; JASMIN, S. R.; SASIKUMAR, S.; KALYAN, S. B.; CHRISTINA, A. J. M.; JAGAN, A.; SARAVANAN, K. S. Evaluation of anti-tubercular activity of some synthesized benzspiro-oxirane derivatives of indane-1,3-dione. *Pharmacologyonline*, v.2, p.176-191, 2008.
- KILGORE, L. B.; FORD, J. H.; WOLFE, W. C. Insecticidal properties of 1,3-indandiones: effect of acyl groups. *Industrial Engineering Chemistry*, v.34, p.494-497, 1942.
- MACNEVIN, C. J.; GREMYACHINSKIY, D.; HSU, C. W.; LI L.; ROUGIE, M.; DAVIS, T. T.; HAHN, K. M. Environment-sensing merocyanine dyes for live cell imaging applications. *Bioconjugate Chemistry*, v.24, p.215–223, 2013.
- MEENA. S.; SHANKAR, D.; RAMSESHU. K. V.; GILES. D.; PRAKASH. M. S.; VENKATARAMAN. S. Synthesis of 2-(arylmethylene)-(1*H*)-indane-1,3-(2*H*)-diones as potential fungicidal and bactericidal agents. *Indian Journal of Chemistry*, v.45B, p.1572-1575, 2006.
- MITKA, K.; KOWALSKI, P.; PAWELEC, D.; MAJKA, Z. Synthesis of novel indan-1,3-dione derivatives and their biological evaluation as anticoagulant agents. *CroaticaChemicaActa*, v.3, p.613-618, 2009.
- SIGALOV. M.; KRIEF. P.; SHAPIRO. L.; KHODORKOVSKY. V. Inter and intramolecular C-H-O bonding in the anions of 1,3-indandione derivatives. *European Journal of Organic Chemistry*, p.673-683, 2008.
- SINGH. K. Applications of indan-1,3-dione in heterocyclic synthesis. *Current Organic Synthesis*, v.13, p.385-407, 2016.
- WINZENBERG, K. N.; KEMPPINEN, P.; SCHOLES, F. H.; COLLIS, G. E.; SHU, Y.; SINGH, T. B.; BILIC, A.; FORSYTH, C. M.; WATKINS, S. E. Indan-1,3-

dione electron-acceptor small molecules for solution-processable solar cells: a structure–property correlation. *Chemical Communications*, v.49, p.6307-6309, 2013.

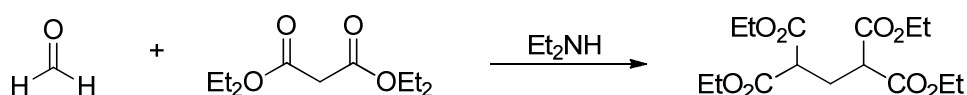
CAPÍTULO 2

SÍNTESE DE 2-ARILIDENO INDAN-1,3-DIONAS

2.1. INTRODUÇÃO

A condensação de Knoevenagel é uma importante reação em síntese orgânica no que tange à formação de ligações carbono-carbono.

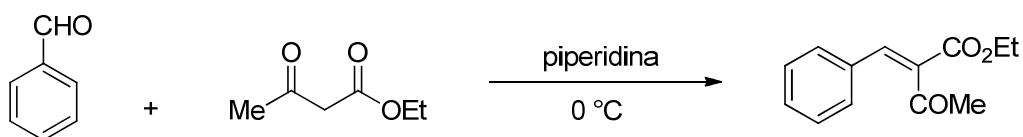
O pesquisador Emil Knoevenagel, em 1894, relatou a condensação do malonato de dietila com formaldeído, catalisada por dietilamina, o que resultou na obtenção do *bis* aduto mostrado no Esquema 2.1 (KURTI & CZAKO, 2005).



Esquema 2.1 - Condensação do malonato de dietila com formaldeído.

Posteriormente, ele obteve o mesmo tipo de aduto quando o formaldeído e outros aldeídos reagiram com benzoilacetato de etila ou acetilacetona, na presença de aminas primárias e secundárias (KURTI & CZAKO, 2005).

Dois anos mais tarde, em 1896, Knoevenagel promoveu a condensação do benzaldeído com acetoacetato de etila, a 0 °C, usando piperidina como catalisador, obtendo o acetoacetato de etila benzilideno como único produto (Esquema 2.2) (KURTI & CZAKO, 2005).



Esquema 2.2 - Condensação do benzaldeído com acetoacetato de etila.

A partir de então, a reação de aldeídos ou cetonas com compostos que possuem grupos metilênicos ativados, na presença de uma base fraca, para produzir compostos dicarbonílicos α,β -insaturados e compostos relacionados, ficou conhecida como condensação de Knoevenagel (KURTI & CZAKO, 2005).

De maneira geral, nesta condensação ocorre uma adição nucleofílica de compostos contendo grupos metilênicos ativados, como malononitrila, ácido barbitúrico, ácido de Meldrum, indan-1,3-dionas (Figura 2.1), aos grupos carbonila de aldeídos ou cetonas, seguida de desidratação originando os compostos dicarbonílicos α,β -insaturados (CUNHA e SANTANA, 2012).

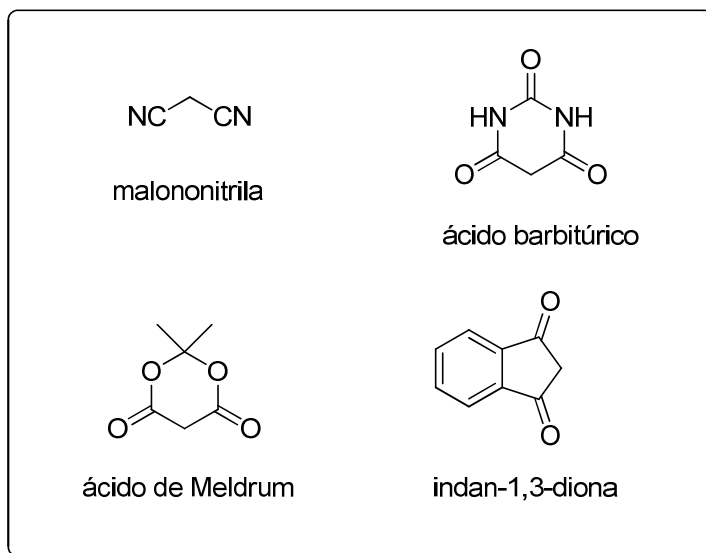
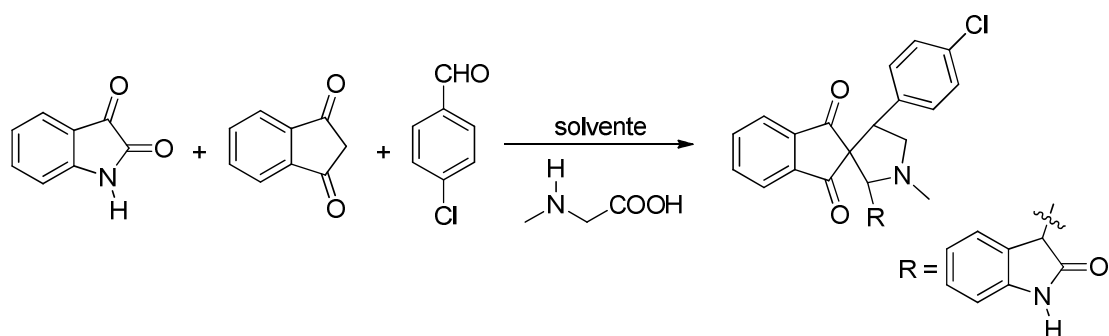


Figura 2.1 - Compostos contendo grupos metilênicos ativados e tipicamente empregados em condensações de Knoevenagel.

A reação de Knoevenagel pode ser classificada como homogênea ou heterogênea. As reações homogêneas são normalmente realizadas na presença de bases fracas como etilenodiamina, piperidina, fluoreto de potássio e aminoácidos. Nos processos heterogêneos, as reações são promovidas por

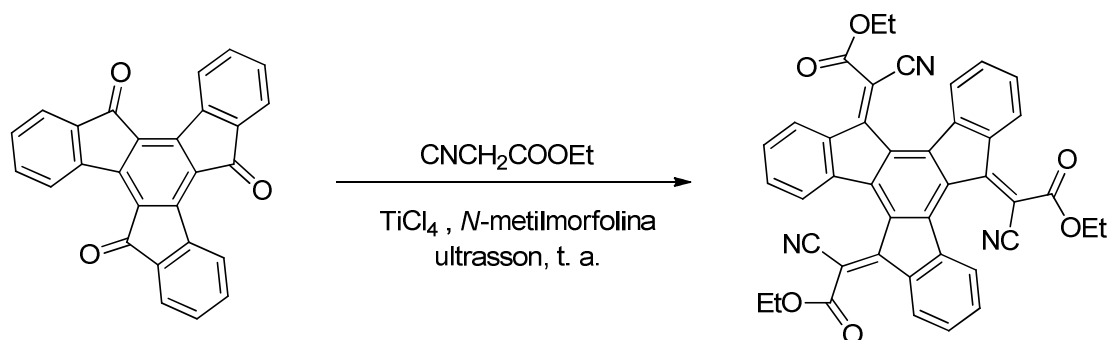
óxidos de alumínio ou magnésio, tetracloreto de titânio, calcita, fluorita, ácidos de Lewis, líquidos iônicos, dentre outros (RYABUKHIN *et al.*, 2007).

A reação de Knoevenagel vem sendo utilizada na preparação de um número variado de substâncias como, por exemplo, as cumarinas e seus derivados, que são intermediários importantes usados nas indústrias cosméticas e farmacêuticas (RYABUKHIN *et al.*, 2007). Em outro exemplo, Li *et al.* (2008) relataram a síntese multicomponente de *bis*-espiro pirrolidinas. Derivados arilideno foram obtidos a partir da indan-1,3-diona e diferentes aldeídos, na presença do aminoácido sarcosina. Estes derivados, por sua vez, foram submetidos a processos de cicloadição 1,3-dipolar (Esquema 2.3) resultando na obtenção das *bis*-espiro pirrolidinas. Cabe destacar que estas pirrolidinas apresentam importantes bioatividades tais como anticonvulsivante, antileucêmica, antiviral e ainda são precursoras úteis para a síntese de produtos naturais.



Esquema 2.3 – Síntese multicomponente de *bis*-espiro pirrolidinas.

Um exemplo interessante de aplicação do processo de condensação de Knoevenagel foi relatado por Zhang e colaboradores (2006) na síntese de um semiconductor (Esquema 2.4, pg. 11).



Esquema 2.4 – Síntese de um semi-condutor via condensação de Knoevenagel.

É importante também destacar a aplicação deste processo de condensação na síntese de diversos produtos naturais, alguns deles mostrados na Figura 2.2 (KURTI & CZAKO, 2005; CUNHA *et al.*, 2015).

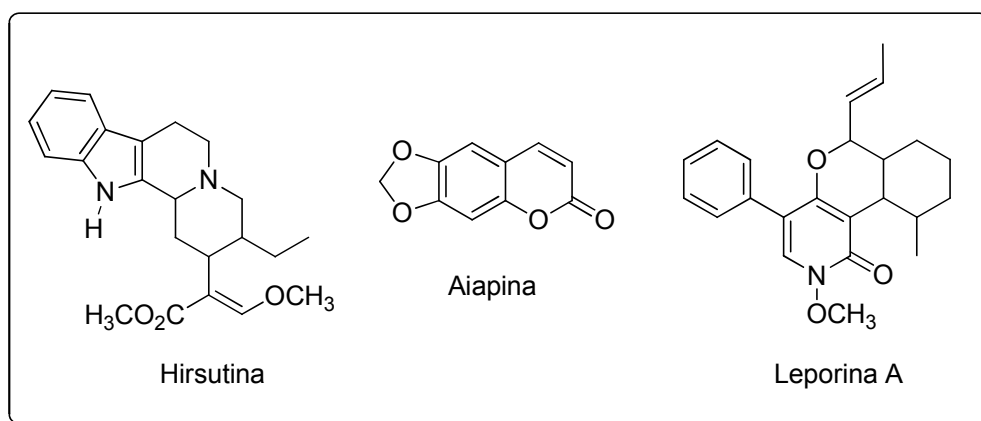
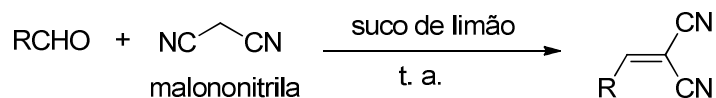


Figura 2.2 – Produtos naturais cujas sínteses totais envolveram a reação de Knoevenagel.

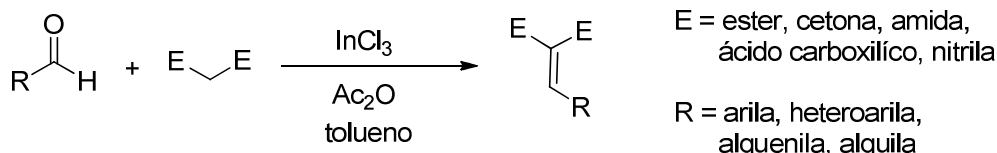
Mais recentemente a reação de Knoevenagel tem recebido atenção de vários grupos de pesquisa, resultando no desenvolvimento de novos procedimentos. Por exemplo, uma investigação publicada em 2012 relata a condensação de aldeídos aromáticos com malononitrila, utilizando suco de limão como catalisador em um processo isento de solventes (Esquema 2.5, pg. 12). O suco de limão tem natureza ácida (pH ~ 2 a 3), e seu conteúdo de ácido

cítrico varia de 5 a 7% m/v. Os produtos de condensação foram obtidos com rendimentos sinteticamente úteis (82 a 95%) para os compostos sintetizados. Merece destaque a simplicidade operacional das reações e o fato de o catalisador ser ambientalmente benigno (DESHMUKH *et al.*, 2012).



Esquema 2.5. – Processo de Knoevenagel catalisado por suco de limão.

Enquanto os produtos mostrados no Esquema 2.5 foram preparados via catálise ácida de Brønsted-Lowry, Ogiwara e colaboradores (2015) utilizaram o cloreto de índio(III), um ácido de Lewis, como catalisador em reações de Knoevenagel entre aldeídos e diversos compostos contendo grupos metilênicos ativados (Esquema 2.6). Os produtos de condensação foram obtidos com rendimentos de até 98% e as reações foram promovidas por anidrido acético.

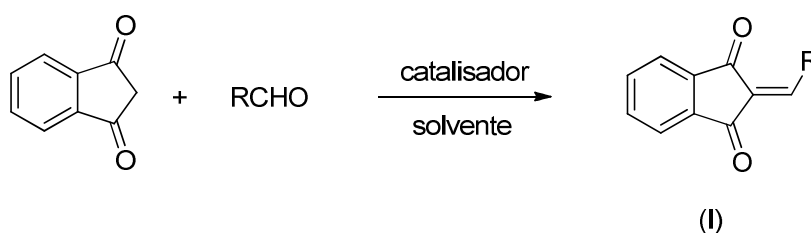


Esquema 2.6 – Reações de Knoevenagel catalisadas por InCl₃.

Considerando catalisadores ácidos de Lewis, o cloreto de zirconila octaidratado, ZrOCl₂·8H₂O, tem atraído a atenção dos químicos orgânicos devido à sua baixa toxicidade, por ser reciclável e ser um catalisador versátil que vem sendo utilizado em importantes reações envolvendo compostos orgânicos (MOSADDEGH *et al.*, 2010; NIKOOFAR & GORJI, 2016). Além disso, ele apresenta elevada estabilidade frente ao ar e à umidade, é de fácil manipulação e de baixo custo (MISHRA & GHOSH, 2011; DAS *et al.*, 2012).

Compostos a base de zircônio têm sido usados em várias transformações orgânicas, como, por exemplo, reações de adição, rearranjos, reações de proteção e desproteção de grupos funcionais tais como carbonila, grupos amino, hidroxila, dentre outros (DAS *et al.*, 2012). De maneira específica, a atividade catalítica do $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ já foi descrita para reações de oxidação de álcoois, em processos de acilação de amins, de fenóis e de alcoóis (DAS *et al.*, 2012), na esterificação de ácidos carboxílicos de cadeia longa (MANTRI *et al.*, 2005), dentre outras.

Quando a indan-1,3-diona reage com aldeídos aromáticos, em um processo de Knoevenagel, ocorre a formação de derivados denominados 2-arilideno indan-1,3-dionas (I) (Esquema 2.7).



Esquema 2.7 - Reação da indan-1,3-diona com aldeídos aromáticos para a formação de derivados contendo grupos arilidenos.

Embora transformações similares já tenham sido relatadas para vários compostos contendo grupos metilênicos ativados, ainda são poucas as informações a respeito da utilização da indan-1,3-diona nestes processos. As reações ocorrem sob várias condições, utilizando solventes como etanol e tolueno e variados tipos de catalisadores (YANG *et al.*, 2011; BARGE & SALUNKHE, 2014).

Apesar de diferentes transformações catalisadas por $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ já tenham sido descritas, ainda não foi relatada na literatura a condensação de

Knoevenagel, catalisada por $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$, com o objetivo de sintetizar derivados da substância indan-1,3-diona contendo grupos arilideno. Dentro deste contexto, descreve-se neste capítulo o desenvolvimento de uma metodologia, catalisada por $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$, para a síntese de 2-arilideno indan-1,3-dionas.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Generalidades Metodológicas

Os reagentes utilizados para a síntese dos compostos foram de grau P.A. e foram utilizados sem nenhuma prévia purificação.

As substâncias indan-1,3-diona, 4-clorobenzaldeído, 4-bromobenzaldeído, 4-nitrobenzaldeído, 4-fluorobenzaldeído, 4-metoxibenzaldeído, 1,3-benzodioxol-5-carbaldeído (piperonal), benzaldeído, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, furan-2-carbaldeído (furfuraldeído), 4-cianobenzaldeído, 4-dimetilaminobenzaldeído, 3,4,5-trimetoxibenzaldeído, 3,4-dimetoxibenzaldeído, 4-hidroxibenzaldeído, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído, 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído, cloreto de zirconila octaidratado ($ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$) e solução de BBr_3 1,0 mol L^{-1} em diclorometano foram adquiridas comercialmente da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e utilizados sem prévia purificação. Diclorometano, etanol, acetona, acetato de etila e hexano foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

A secagem do solvente diclorometano foi realizada adicionando-se peneira molecular 4Å ao solvente. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 24 horas à temperatura ambiente e sob atmosfera de nitrogênio.

Após este período, o solvente foi filtrado e armazenado em um frasco âmbar contendo peneira molecular 4Å e sob atmosfera de nitrogênio.

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se placas cromatográficas de sílica-gel impregnadas sobre alumínio. Após a eluição, as placas de CCD foram observadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$), não sendo realizada revelação por agentes químicos.

Os solventes utilizados nas recristalizações foram usados sem prévia purificação.

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos empregando-se a técnica reflectância total atenuada (ATR) em equipamento Varian 660 com acessório GladiATR.

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 um espectrômetro VARIAN MERCURY 300. Foram utilizados como solventes clorofórmio (CDCl_3) e dimetilsulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$) deuterados. As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF-302 e não foram corrigidas.

2.2.2. Difração de Raios X por monocristal (DRXM)

A determinação das celas unitárias foi conduzida no Grupo de Cristalografia do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás. Os monocristais isolados das amostras dos compostos **1**, **6**, **11** e **15** (estruturas apresentadas na Figura 2.4, pg. 52) foram submetidos à análise por DRXM em temperatura ambiente ($296 \pm 1 \text{ K}$) em um difratômetro APEX II QUAZAR Bruker

AXS™. Este difratômetro possui um detector por área, monocromador de espelhos em multicamadas, microfonte de raios X I μ S™ equipada com dupla fonte de tubos selados, sendo uma de cobre e outra de molibdênio. Para a coleta de dados utilizou-se fonte de molibdênio, MoK α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$).

Em um primeiro momento, os monocristais isolados tiveram a monocristalinidade verificada em um microscópio com polarizador e analisador acoplados. As amostras foram submetidas à pré-coleta para verificar a cela unitária antes da coleta completa de dados. Os parâmetros de cela foram determinados a partir de um conjunto de 36 imagens capturadas em modo de varredura em ω sob rotação de $0,5^\circ$ e tempo de exposição ao feixe de raios X de 10 segundos. Os parâmetros de cela da amostra **11** foram coincidentes (diferenças inferiores a 10^{-2} \AA e a 10^{-1}° para as dimensões e ângulos da cela unitária, respectivamente) com aqueles reportados previamente para a estrutura esperada (MAGOMEDOVA *et al.*, 1980), confirmando portanto a geometria intramolecular bem como o arranjo intermolecular da substância em questão.

A coleta das intensidades das amostras **1**, **6** e **15** (conjunto completo de dados) envolveu técnicas de varredura em ϕ e em ω , com tempo de exposição ao feixe de raios X de 20 segundos em todas as resoluções. A estratégia de coleta das reflexões foi calculada com uma redundância igual a 3 para reflexões cujos índices remetem a uma resolução de $0,78 \text{ \AA}$, com uma razão entre reflexões coletáveis e possíveis de serem coletadas de 100% para esta resolução. Após a coleta dos dados completos, as reflexões foram indexadas, integradas e corrigidas por fatores de escala físicos e geométricos, e cristalográficos, devido às equivalências por simetria do sistema do grupo de

ponto. Assim, foi possível obter reflexões independentes que foram utilizadas para determinação do grupo espacial, solução e refinamento da estrutura. Todo procedimento descrito foi realizado com auxílio dos programas Bruker Saint e SADABS.

Os métodos diretos foram utilizados para resolver as estruturas usando o programa SIR2004(BURLA *et al.*, 2005). Nas soluções obtidas, os átomos de cloro, oxigênio e carbono foram localizados em mapa de densidade eletrônica calculado por síntese de Fourier usando o programa citado anteriormente. As estruturas foram refinadas usando o programa SHELXL-97(SHELDRICK, 1997). O método dos mínimos quadrados de matriz completa foi utilizado para todos os ciclos de refinamentos das estruturas, e as diferenças entre os fatores de estrutura observados e calculados, em F^2 , foram minimizadas. Estes programas foram acessados por meio da interface de programas de cristalografia WinGX(FARRUGIA, 1999). Parâmetros anisotrópicos de deslocamento térmico foram refinados para os átomos não-hidrogenóides. Posições fixas e parâmetros térmicos isotrópicos fixos [$U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C_{sp^2})$ ou $1,5 U_{eq}(C_{sp^3}$ ou O)] foram adotados para os átomos de hidrogênio acompanhando as posições dos carbonos aos quais foram ligados. A unidade assimétrica dos compostos é mostrada na Figura 2.3 (pg. 18), enquanto que um sumário da coleta e processamento dos dados é exibido na Tabela 2.1 (pg. 19) junto aos parâmetros estatísticos do refinamento. Comprimentos e ângulos de ligação e ângulos torsionais são mostrados nas Tabelas 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7 e 2.8 (pg. 21-27), respectivamente. As numerações dos átomos de carbono e hidrogênio apresentadas nas Tabelas

2.2-2.8 estão em acordo com as numerações dos átomos das unidades assimétricas mostradas na Figura 2.3.

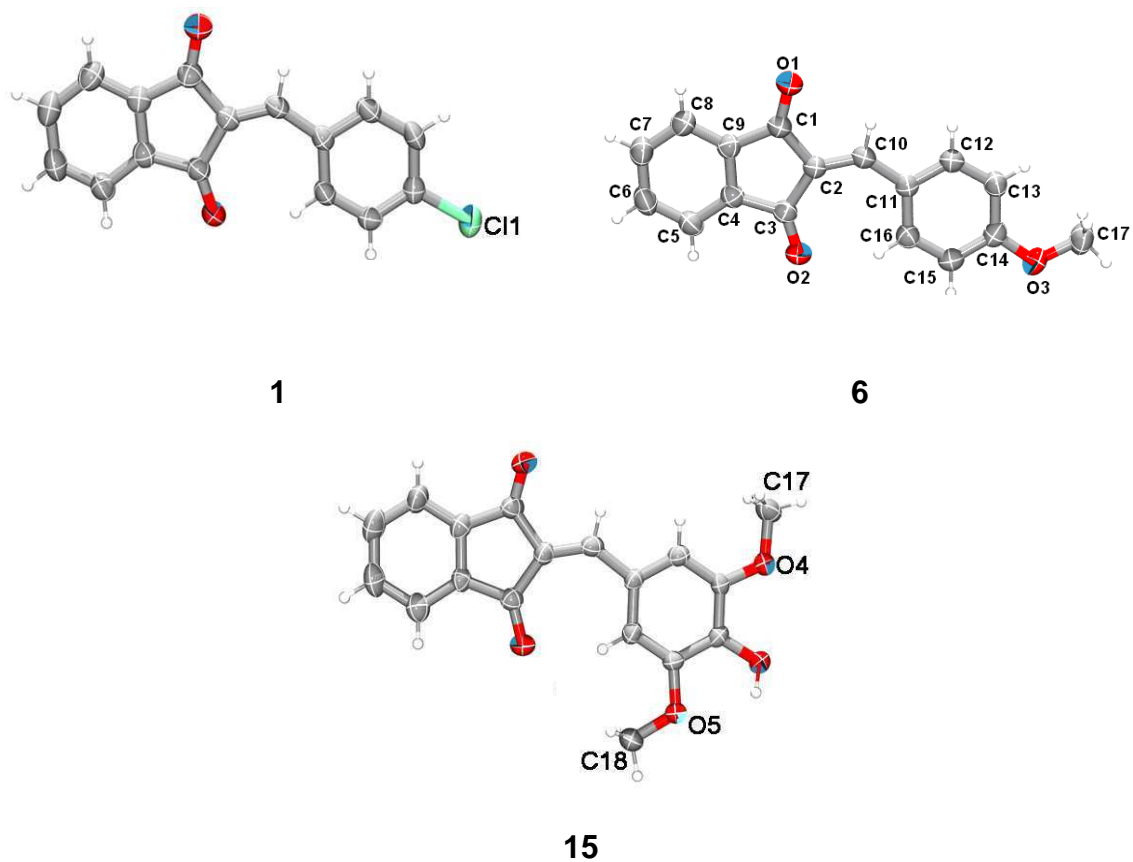


Figura 2.3 - Unidade assimétrica dos compostos **1**, **6** e **15**. Átomos não hidrogenóides são representados por elipsóides a uma probabilidade de 50%. Átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário. A numeração dos átomos das unidades assimétricas de **1** e **15** segue aquela mostrada para o composto **6**, exceto pelos seus átomos exclusivos, os quais estão rotulados na figura.

Tabela 2.1 - Constantes de cela e determinação estrutural das amostras determinadas por DRXM

	1	6	15	
Fórmula mínima	C ₁₆ H ₉ ClO ₂	C ₁₇ H ₁₂ O ₃	C ₁₈ H ₁₄ O ₅	
Massa da fórmula mínima (g/mol)	268,68	264,27	310,29	
Dimensões do cristal (mm ³)	0,22 x 0,09 x 0,08	0,20 x 0,15 x 0,06	0,30 x 0,12 x 0,10	
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico	
Grupo espacial	P2 ₁	P-1	P2 ₁ /c	
Z/Z'	2/1	2/1	4/1	
Temperatura (K)	296(1)	296(1)	296(1)	
Dimensões da cela unitária	<i>a</i> (Å)	11,0437(3)	7,5194(13)	7,221(4)
	<i>b</i> (Å)	4,83950(10)	7,9652(16)	13,900(7)
	<i>c</i> (Å)	12,7990(4)	12,281(2)	14,418(7)
	α (°)	90	96,182(6)	90
	β (°)	114,373(2)	95,568(6)	101,83(3)
	γ (°)	90	116,828(6)	90
Volume da cela unitária (Å ³)	623,09(3)	643,7(2)	1416,5(13)	
Densidade calculada (g/cm ³)	1,432	1,363	1,455	
Coefficiente de absorção μ (mm ⁻¹)	0,299	0,093	0,107	
Intervalo em θ (°)	1,75 – 25,35	1,69 – 25,24	2,06 – 25,46	
Intervalo dos índices	<i>h</i>	-13 a 13	-9 a 8	-8 a 8
	<i>k</i>	-5 a 5	-9 a 9	-16 a 16
	<i>l</i>	-15 a 15	-14 a 14	-17 a 16

Tabela 2.1 – Continuação

Reflexões coletadas	8160	7523	7702
Reflexões independentes	2280	2299	2486
Índice de simetria (R_{int})	0,0430	0,0183	0,0734
Completeza para $\theta_{\text{máx.}}$	99,8	99,0	95,0
F_{000}	276	276	648
Parâmetros refinados	172	182	209
Qualidade do ajuste sobre F^2	1,103	1,077	0,994
Índice residual para $I > 2\sigma(I)$	0,0391	R1 = 0,0398	0,0769
Índice residual para todos os dados	0,1035	wR2 = 0,1232	0,2765
$\Delta\rho_{\text{máx}} / \Delta\rho_{\text{mín}}$ ($e/\text{Å}^3$)	0,414 / -0,289	0,122 / -0,176	0,393 / -0,421
Número de depósito no CSD	1483268	1416384	1483267

Tabela 2.2 – Comprimentos de ligação (Å) das substâncias **1**, **6** e **15** determinadas por DRXM

Ligação	Composto		
	1	6	15
O1-C1	1.212(3)	1,221(2)	1.208(5)
O2-C3	1.215(3)	1,2164(19)	1.218(5)
O3(C11)-C14	1.740(3)	1,356(2)	1.348(5)
O3-C17	-	1,425(2)	-
O4-C13	-	-	1.356(5)
O4-C17	-	-	1.416(5)
O5-C15	-	-	1.360(5)
O5-C18	-	-	1.423(5)
C1-C9	1.484(3)	1.479(2)	1.493(6)
C2-C1	1.484(3)	1,486(2)	1.475(6)
C2-C10	1.346(3)	1.358(2)	1.357(6)
C3-C2	1.495(3)	1,484(2)	1.480(6)
C4-C3	1.483(3)	1.494(2)	1.476(6)
C4-C5	1.384(3)	1.385(2)	1.389(6)
C5-C6	1.368(4)	1.384(3)	1.380(7)
C6-C7	1.402(4)	1.384(3)	1.381(7)
C8-C7	1.380(4)	1.381(3)	1.376(7)
C8-C9	1.384(4)	1.387(2)	1.372(6)
C9-C4	1.389(3)	1.389(2)	1.375(6)
C10-C11	1.455(3)	1,442(2)	1.456(6)
C11-C12	1.406(3)	1,399(2)	1.401(6)
C11-C16	1.391(3)	1,403(2)	1.385(6)
C12-C13	1.366(4)	1,380(2)	1.383(6)
C14-C13	1.376(4)	1,387(2)	1.378(6)
C15-C14	1.383(3)	1,393(2)	1.414(6)
C16-C15	1.377(4)	1,372(2)	1.369(5)

Tabela 2.3 – Ângulos de ligação (°) do composto **1** determinados por DRXM

Ângulo	Valor em°
C(13)-C(14)-C(15)	121,0(2)
C(13)-C(14)-Cl(1)	119,77(19)
C(15)-C(14)-Cl(1)	119,27(19)
C(16)-C(15)-C(14)	119,3(2)
C(15)-C(16)-C(11)	121,2(2)
(16)-C(11)-C(12)	117,8(2)
C(16)-C(11)-C(10)	125,7(2)
C(12)-C(11)-C(10)	116,5(2)
C(2)-C(10)-C(11)	134,3(2)
C(10)-C(2)-C(1)	119,3(2)
C(10)-C(2)-C(3)	134,0(2)
C(1)-C(2)-C(3)	106,7(2)
O(2)-C(3)-C(4)	124,5(2)
O(2)-C(3)-C(2)	129,1(2)
C(4)-C(3)-C(2)	106,4(2)
C(5)-C(4)-C(9)	120,9(2)
C(5)-C(4)-C(3)	128,7(2)
C(9)-C(4)-C(3)	110,4(2)
C(6)-C(5)-C(4)	118,0(3)
C(5)-C(6)-C(7)	121,7(2)
C(13)-C(12)-C(11)	121,3(2)
C(12)-C(13)-C(14)	119,4(2)
C(8)-C(9)-C(4)	121,0(2)
C(8)-C(9)-C(1)	129,9(2)
C(4)-C(9)-C(1)	109,1(2)
O(1)-C(1)-C(9)	125,3(2)
O(1)-C(1)-C(2)	127,3(2)
C(9)-C(1)-C(2)	107,43(19)
C(7)-C(8)-C(9)	118,2(3)
C(8)-C(7)-C(6)	120,2(3)

Tabela 2.4 – Ângulos de ligação (°) do composto **6** determinados por DRXM

Ângulo	Valor em°
O1-C1-C2	126,74(16)
O1-C1-C9	125,68(16)
O2-C3-C2	129,33(15)
O2-C3-C4	124,49(15)
O3-C14-C13	124,72(16)
O3-C14-C15	115,81(15)
C2-C10-C11	134,95(15)
C2-C3-C4	106,14(13)
C3-C2-C1	106,95(13)
C4-C9-C1	108,91(14)
C5-C4-C9	120,71(16)
C5-C4-C3	128,98(15)
C6-C5-C4	117,95(17)
C7-C6-C5	121,24(17)
C7-C8-C9	117,85(17)
C8-C7-C6	121,06(17)
C8-C9-C1	129,93(16)
C8-C9-C4	121,16(16)
C9-C1-C2	107,57(14)
C9-C4-C3	110,30(14)
C10-C2-C1	119,01(14)
C10-C2-C3	134,03(15)
C12-C11-C10	117,68(15)
C12-C13-C14	119,00(16)
C12-C11-C16	117,18(15)
C13-C12-C11	122,59(16)
C13-C14-C15	119,47(15)
C14-O3-C17	118,45(15)
C15-C16-C11	120,61(16)
C16-C11-C10	125,13(15)
C16-C15-C14	121,12(16)

Tabela 2.5 – Ângulos de ligação (°) do composto **15** determinados por DRXM

Ângulo	Valor em °
C(15)-O(5)-C(18)	116,4(3)
C(13)-O(4)-C(17)	117,9(3)
O(5)-C(15)-C(16)	125,1(4)
O(5)-C(15)-C(14)	114,0(3)
C(16)-C(15)-C(14)	120,8(4)
C(15)-C(16)-C(11)	119,8(4)
C(16)-C(11)-C(12)	119,4(4)
C(16)-C(11)-C(10)	123,9(4)
C(12)-C(11)-C(10)	116,7(4)
C(2)-C(10)-C(11)	135,0(4)
C(10)-C(2)-C(1)	118,0(4)
C(10)-C(2)-C(3)	135,4(4)
C(1)-C(2)-C(3)	106,6(4)
O(1)-C(1)-C(2)	127,6(4)
O(1)-C(1)-C(9)	125,0(4)
C(2)-C(1)-C(9)	107,4(3)
C(8)-C(9)-C(4)	121,1(4)
C(8)-C(9)-C(1)	130,4(4)
C(4)-C(9)-C(1)	108,5(4)
C(9)-C(8)-C(7)	118,7(5)
C(8)-C(7)-C(6)	120,3(5)
O(4)-C(13)-C(14)	115,6(4)
O(4)-C(13)-C(12)	124,9(4)
C(14)-C(13)-C(12)	119,5(4)
C(13)-C(12)-C(11)	121,0(4)
O(3)-C(14)-C(13)	117,7(4)
O(3)-C(14)-C(15)	122,8(4)
C(13)-C(14)-C(15)	119,5(4)
C(5)-C(6)-C(7)	121,4(5)
C(6)-C(5)-C(4)	117,6(5)
C(9)-C(4)-C(5)	120,8(4)
C(9)-C(4)-C(3)	110,6(4)
C(5)-C(4)-C(3)	128,6(4)
O(2)-C(3)-C(4)	124,4(4)
O(2)-C(3)-C(2)	128,7(4)
C(4)-C(3)-C(2)	106,9(4)

Tabela 2.6 – Ângulos torsionais (°) do composto **1** determinados por DRXM

Ângulo torsional	Valor em °
C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	1,8(4)
Cl(1)-C(14)-C(15)-C(16)	-178,03(19)
C(14)-C(15)-C(16)-C(11)	-0,4(4)
C(15)-C(16)-C(11)-C(12)	-0,9(4)
C(15)-C(16)-C(11)-C(10)	178,9(2)
C(16)-C(11)-C(10)-C(2)	-0,8(4)
C(12)-C(11)-C(10)-C(2)	179,0(3)
C(11)-C(10)-C(2)-C(1)	-179,8(2)
C(11)-C(10)-C(2)-C(3)	0,8(5)
C(10)-C(2)-C(3)-O(2)	-1,0(5)
C(1)-C(2)-C(3)-O(2)	179,6(3)
C(10)-C(2)-C(3)-C(4)	178,6(3)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-0,9(3)
O(2)-C(3)-C(4)-C(5)	1,3(4)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-178,3(3)
O(2)-C(3)-C(4)-C(9)	179,6(3)
C(2)-C(3)-C(4)-C(9)	0,1(3)
C(9)-C(4)-C(5)-C(6)	0,2(4)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	178,3(2)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	0,4(5)
C(16)-C(11)-C(12)-C(13)	0,9(4)
C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	-179,0(2)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	0,5(4)
C(15)-C(14)-C(13)-C(12)	-1,9(4)
Cl(1)-C(14)-C(13)-C(12)	178,0(2)
C(5)-C(4)-C(9)-C(8)	-1,0(4)
C(3)-C(4)-C(9)-C(8)	-179,5(2)
C(5)-C(4)-C(9)-C(1)	179,2(2)
C(3)-C(4)-C(9)-C(1)	0,8(3)
C(8)-C(9)-C(1)-O(1)	-0,8(4)
C(4)-C(9)-C(1)-O(1)	178,9(3)
C(8)-C(9)-C(1)-C(2)	179,0(2)
C(4)-C(9)-C(1)-C(2)	-1,3(3)
C(10)-C(2)-C(1)-O(1)	1,5(4)
C(3)-C(2)-C(1)-O(1)	-178,9(3)
C(10)-C(2)-C(1)-C(9)	-178,2(2)
C(3)-C(2)-C(1)-C(9)	1,3(3)
C(4)-C(9)-C(8)-C(7)	1,3(4)
C(1)-C(9)-C(8)-C(7)	-179,0(2)
C(9)-C(8)-C(7)-C(6)	-0,8(4)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-0,1(5)

Tabela 2.7 – Ângulos torsionais (°) do composto **6** determinados por DRXM.

Ângulo torsional	Valor em °
O1-C1-C9-C4	-178,27(18)
O1-C1-C9-C8	1,1(3)
O2-C3-C2-C1	-174,12(16)
O2-C3-C2-C10	7,2(3)
O3-C14-C13-C12	-178,87(14)
C1-C2-C10-C11	-179,66(16)
C1-C9-C8-C7	-178,73(16)
C2-C1-C9-C4	1,11(19)
C2-C1-C9-C8	-179,56(16)
C2-C10-C11-C12	176,55(17)
C2-C10-C11-C16	-4,5(3)
C3-C2-C1-O1	176,38(18)
C3-C2-C1-C9	-3,00(18)
C3-C2-C10-C11	-1,1(3)
C3-C4-C9-C1	1,25(18)
C3-C4-C9-C8	-178,15(14)
C4-C3-C2-C1	3,66(16)
C4-C3-C2-C10	-175,02(18)
C4-C9-C8-C7	0,5(3)
C5-C4-C3-O2	-4,1(3)
C5-C4-C3-C2	178,01(16)
C5-C4-C9-C1	-179,76(15)
C5-C4-C9-C8	0,8(2)
C5-C6-C7-C8	0,0(3)
C6-C5-C4-C3	177,04(15)
C6-C5-C4-C9	-1,7(2)
C7-C6-C5-C4	1,3(3)
C9-C4-C3-O2	174,81(15)
C9-C4-C3-C2	-3,10(16)
C9-C8-C7-C6	-1,0(3)
C10-C2-C1-O1	-4,7(3)
C10-C2-C1-C9	175,92(14)
C10-C11-C16-C15	-178,04(14)
C10-C11-C12-C13	178,17(14)
C11-C12-C13-C14	-0,1(3)
C11-C16-C15-C14	0,0(3)
C12-C11-C16-C15	0,9(2)
C15-C14-C13-C12	1,1(2)
C16-C11-C12-C13	-0,8(2)
C16-C15-C14-O3	178,91(14)
C16-C15-C14-C13	-1,0(3)
C17-O3-C14-C13	5,7(3)
C17-O3-C14-C15	-174,26(15)

Tabela 2.8 – Ângulos torsionais (°) do composto **15** determinados por DRXM.

Ângulo torsional	Valor em °	Ângulo torsional	Valor em °
C(18)-O(5)-C(15)-C(16)	12,4(6)	C(5)-C(4)-C(3)-O(2)	1,8(6)
C(18)-O(5)-C(15)-C(14)	-168,9(3)	C(9)-C(4)-C(3)-C(2)	0,3(4)
O(5)-C(15)-C(16)-C(11)	179,3(3)	C(5)-C(4)-C(3)-C(2)	-179,5(4)
C(14)-C(15)-C(16)-C(11)	0,7(5)	C(10)-C(2)-C(3)-O(2)	-0,8(7)
C(15)-C(16)-C(11)-C(12)	0,4(5)	C(1)-C(2)-C(3)-O(2)	178,7(4)
C(15)-C(16)-C(11)-C(10)	-178,5(3)	C(10)-C(2)-C(3)-C(4)	-179,4(4)
C(16)-C(11)-C(10)-C(2)	-1,0(6)	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	0,0(4)
C(12)-C(11)-C(10)-C(2)	-179,8(4)		
C(11)-C(10)-C(2)-C(1)	179,8(4)		
C(11)-C(10)-C(2)-C(3)	-0,7(7)		
C(10)-C(2)-C(1)-O(1)	-0,2(6)		
C(3)-C(2)-C(1)-O(1)	-179,8(4)		
C(10)-C(2)-C(1)-C(9)	179,2(3)		
C(3)-C(2)-C(1)-C(9)	-0,4(4)		
O(1)-C(1)-C(9)-C(8)	-1,5(7)		
C(2)-C(1)-C(9)-C(8)	179,0(4)		
O(1)-C(1)-C(9)-C(4)	-179,9(4)		
C(2)-C(1)-C(9)-C(4)	0,6(4)		
C(4)-C(9)-C(8)-C(7)	-0,8(6)		
C(1)-C(9)-C(8)-C(7)	-179,1(4)		
C(9)-C(8)-C(7)-C(6)	0,3(6)		
C(17)-O(4)-C(13)-C(14)	-177,5(3)		
C(17)-O(4)-C(13)-C(12)	1,7(5)		
O(4)-C(13)-C(12)-C(11)	-179,2(3)		
C(14)-C(13)-C(12)-C(11)	-0,1(5)		
C(16)-C(11)-C(12)-C(13)	-0,7(5)		
C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	178,2(3)		
O(4)-C(13)-C(14)-O(3)	0,0(5)		
C(12)-C(13)-C(14)-O(3)	-179,2(3)		
O(4)-C(13)-C(14)-C(15)	-179,6(3)		
C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	1,1(5)		
O(5)-C(15)-C(14)-O(3)	0,2(5)		
C(16)-C(15)-C(14)-O(3)	178,9(3)		
O(5)-C(15)-C(14)-C(13)	179,8(3)		
C(16)-C(15)-C(14)-C(13)	-1,5(5)		
C(8)-C(7)-C(6)-C(5)	0,4(7)		
C(7)-C(6)-C(5)-C(4)	-0,5(6)		
C(8)-C(9)-C(4)-C(5)	0,6(6)		
C(1)-C(9)-C(4)-C(5)	179,3(3)		
C(8)-C(9)-C(4)-C(3)	-179,2(3)		
C(1)-C(9)-C(4)-C(3)	-0,6(4)		
C(6)-C(5)-C(4)-C(9)	0,0(6)		
C(6)-C(5)-C(4)-C(3)	179,8(4)		
C(9)-C(4)-C(3)-O(2)	-178,4(4)		

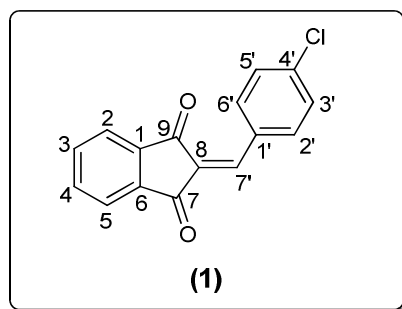
Os monocristais para análise por DRXM foram obtidos por meio de recristalização, com evaporação lenta, utilizando os solventes diclorometano-etanol 1:1 v/v para os compostos **1**, **6** e **11** e acetona-diclorometano 1:1 v/v para a substância **15**.

2.3. PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS

2.3.1. Síntese dos derivados da indan-1,3-diona

Os compostos **1-16** (estruturas apresentadas na pg. 52) foram sintetizados empregando-se condições otimizadas de reação. Cada reação foi conduzida misturando-se a indan-1,3-diona (**1**) e um aldeído (1 mmol de cada regente), 4 mol% do catalisador $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ e 3 mL de água. Todas as reações foram realizadas a 85 °C. Detalhes a respeito do processo de otimização são descritos na pg. 45.

Síntese da 2-(4-clorobenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(**1**)¹



A indan-1,3-diona (0,150 g, 1,00 mmol), o 4-clorobenzaldeído (0,143 g, 1,00 mmol), $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ (0,012 g, 0,04 mmol) e 3,00 mL de água destilada foram adicionados a um balão de fundo redondo (10 mL). A mistura de reação foi aquecida a 85 °C e mantida sob agitação magnética durante 65 minutos. A

¹ A numeração das estruturas dos compostos **1-17** não corresponde àquela recomendada pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

reação foi monitorada por CCD. Após o término da reação, a mistura foi filtrada a vácuo e o resíduo foi lavado com etanol gelado. O composto **1** foi obtido com 68% de rendimento (0,182 g, 0,677 mmol) após recristalização com diclorometano-etanol (1:1 v/v).

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,43$ (hexano-acetato de etila 8:1 v/v).

T_f = 176,3–177,8 °C.

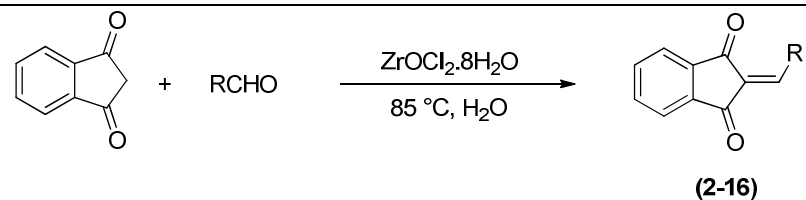
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3092, 3061, 1725, 1685, 1573, 1072, 733, 427. O espectro é apresentado na Figura 2.5 (pg. 57)

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 7,47 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2'/H6'); 7,81-7,83 (m, 3H, H-3/H-4/H-7'); 7,99-8,01 (m, 2H, H-2/H-5); 8,41 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3'/H-5'). O espectro é apresentado na Figura 2.6 (pg. 58).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 123,39; 123,41 (C-2/C-5); 129,1 (C-3'/C-5'); 129,4 (C-1'); 131,5 (C-3/C-4); 135,3 (C-2'/C-6'); 135,5 (C-4'); 139,5 (C-1); 140,1 (C-6); 142,5 (C-8); 145,1 (C-7'); 188,9 (C-9); 189,9 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 2.7 (pg. 59).

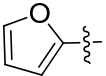
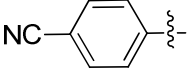
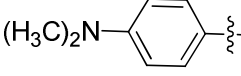
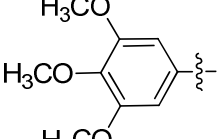
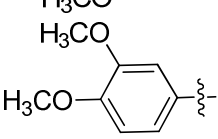
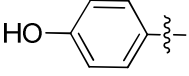
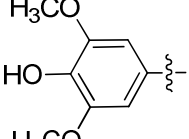
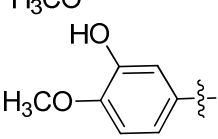
Os compostos **2-16** foram sintetizados empregando-se a mesma metodologia descrita para o preparo do composto **1**. Na Tabela 2.9 (pg. 30) estão apresentadas as informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos **2-16**. Os compostos hidroxilados foram recristalizados com os solventes acetona-diclorometano (1:1 v/v).

Tabela 2.9 - Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos 2-16



Composto	R	Quantidade de aldeído (g) ^a	Tempo de reação (minutos)	Massa de produto obtida (g)	Rendimento (%) ^b
2		0,106	45	0,124	53
3		0,185	20	0,201	64
4		0,151	10	0,266	81
5		0,129	10	0,185	73
6		0,136	20	0,206	78
7		0,151	10	0,189	68
8		0,152	20	0,240	86

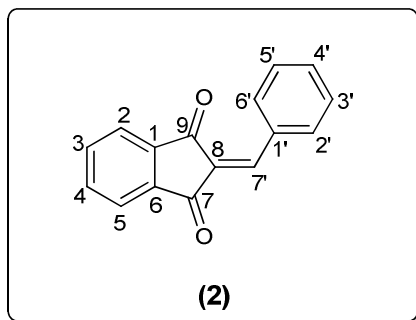
Tabela 2.9 – Continuação

Composto	R	Quantidade de aldeído (g) ^a	Tempo de reação (minutos)	Massa de produto obtida (g)	Rendimento (%) ^b
9		0,097	10	0,194	87
10		0,131	20	0,216	83
11		0,149	20	0,190	69
12		0,196	20	0,292	90
13		0,168	20	0,278	95
14		0,125	15	0,190	76
15		0,186	20	0,245	79
16		0,154	10	0,194	70

^a As reações foram conduzidas utilizando-se 1,00 mmol do aldeído; ^b Os rendimentos foram calculados a partir das massas dos produtos obtidas a partir do processo de recristalização.

As estruturas dos compostos **2-16** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

2-benzilideno-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(2)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,70$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

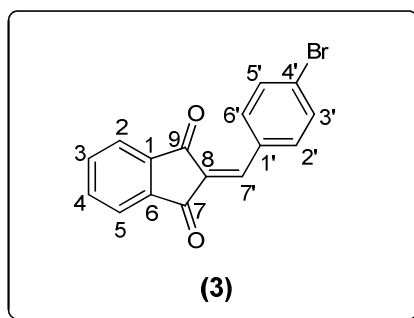
Tf = 150,6-150,8 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3066, 3026, 1726, 1681, 1609, 1584, 1564, 732, 683. O espectro é apresentado na Figura 1 pg. 125 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,48-7,58 (m, 3H, H-2'/H-6'/H-4'); 7,78-7,84 (m, 2H, H-3/H-4); 7,89 (s, 1H, H-7'); 7,98-8,04 (m, 2H, H-2/H-5); 8,44-8,46 (m, 2H, H-3'/H-5'). O espectro é apresentado na Figura 2 pg. 126 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 123,3 (C-2); 123,4 (C-5); 128,8 (C-3'/C-5'); 129,2 (C-8); 133,1 (C-1'); 133,2 (C-4'); 134,1 (C-2'/C-6'); 135,1 (C-3); 135,3 (C-4); 140,0 (C-1); 142,5 (C-6); 146,9 (C-7'); 188,9 (C-9); 190,2 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 3 pg. 127 do anexo.

2-(4-bromobenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(3)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,38$ (hexano-acetato de etila 8:1 v/v).

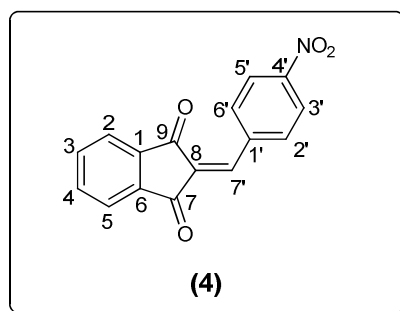
Tf = 169,7–170,3 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3088, 3055, 1725, 1685, 1574, 1069, 504. O espectro é apresentado na Figura 4 pg. 128 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,63 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-2'/H6'); 7,79 (s, 1H, H-7'); 7,81-7,83 (m, 2H, H-3/H-4); 7,99- 8,02 (m, 2H, H-2/H-5); 8,32 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-3'/H-5'). O espectro é apresentado na Figura 5 pg. 129 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 123,41; 123,43 (C-2/C-5); 128,3 (C-4'); 129,6 (C-8); 131,9 (C-1'); 132,1 (C-3/C-4); 135,4 (C-3'/C-5'); 135,5 (C-2'/C-6'); 140,1 (C-1); 142,5 (C-6); 145,2 (C-7'); 188,9 (C-9); 189,9 (C-7) . O espectro é apresentado na Figura 6 pg. 130 do anexo.

2-(4-nitrobenzilideno)-1H-indeno-1,3(2H)-diona(4)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,26$ (hexano-acetato de etila 8:1 v/v).

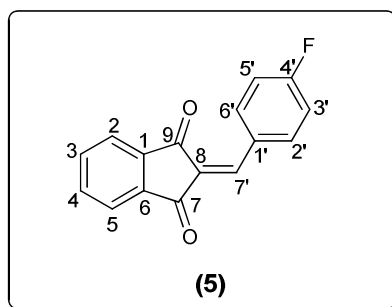
Tf = 233,1–233,6 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3109, 3076, 1732, 1688, 1566, 1514, 1345, 857. O espectro é apresentado na Figura 7 pg. 131 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,93 (s, 1H, H-7'); 7,96-8,04 (m, 4H, H-2/H-3/H-4/H-5); 8,33 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H-2'/H-6'); 8,58 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H-3'/H-5'). O espectro é apresentado na Figura 8 pg. 132 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 123,79; 123,86 (C-3'/C-5'/C-2/C-5); 132,9 (C-8); 134,6 (C-2'/C-6'); 136,7 (C-4); 136,8 (C-3); 138,9 (C-1'); 140,2 (C-1); 142,0 (C-6); 142,6 (C-7'); 149,3 (C-4'); 188,6 (C-9); 189,2 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 9 pg. 133 do anexo.

2-(4-fluorobenzilideno)-1H-indeno-1,3(2H)-diona(5)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,38$ (hexano-acetato de etila 8:1 v/v).

Tf = 181,7 °C. Não foi observada uma faixa de fusão.

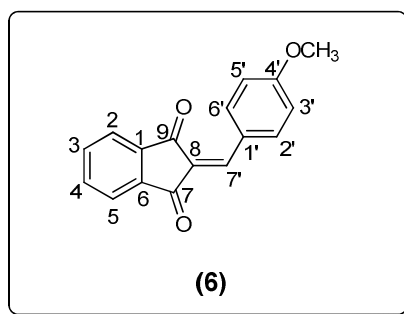
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3073, 3039, 1729, 1689, 1578, 1199, 834. O espectro é apresentado na Figura 10 pg. 134 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 7,18 (t_{ap} , 2H, $J = 8,7$ Hz, H-3'/H-5'); 7,79 (s, 1H, H-7'); 7,80-7,83 (m, 2H, H-3/H-4); 7,96-8,03 (m, 2H, H-2/H-5); 8,52 (dd_{ap} ,

2H, $J_1 = 8,7$ Hz, $J_2 = 5,6$ Hz, H-2'/H-6'). O espectro é apresentado na Figura 11 pg. 135 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 116,1 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,8$ Hz, C3'/C-5'); 123,32; 123,34 (C-2/C-5); 128,6 (C-8); 129,6 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz, C-1'); 135,3 (C-3); 135,4 (C-4); 136,9 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 9,0$ Hz, C-2'/C-6'); 140,0 (C-1); 142,4 (C-6); 145,4 (C-7'); 165,6 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 255,8$ Hz, C-4'); 189,1 (C-9); 190,1 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 12 pg. 136 do anexo.

2-(4-metoxibenzilideno)-1H-indeno-1,3(2H)-diona(6)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,31$ (hexano-acetato de etila 8:1 v/v).

Tf = 155,3–156,8 °C.

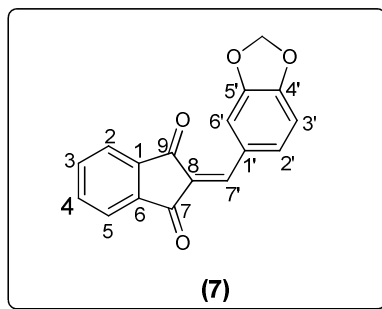
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3093, 3043, 2981, 1718, 1681, 1247, 1268, 1177, 1020, 1511, 833, 730. O espectro é apresentado na Figura 13 pg. 137 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,90 (s, 3H, OCH_3); 7,00 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H-3'/H-5'); 7,76-7,80 (m, 2H, H-3/H-4); 7,83 (s, 1H, H-7'); 7,93-8,00 (m, 2H, H-2/H-5); 8,53 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H-2'/H-6'). O espectro é apresentado na Figura 14 pg. 138 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 55,6 (OCH_3); 114,4 (C-3'/C-5'); 123,0 (C-2/C-5); 126,4 (C-1') 126,5 (C-8); 134,8 (C-4); 135,0 (C-3); 137,1 (C-2'/C-6'); 139,9

(C-1); 142,3 (C-6); 146,8 (C-7'); 164,0 (C-4'); 189,4 (C-9); 190,7 (C-7).O espectro é apresentado na Figura 15 pg. 139do anexo.

2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(7)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,26$ (hexano-acetato de etila 8:1 v/v).

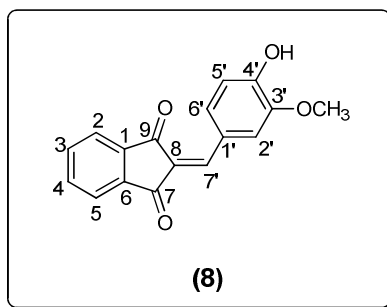
Tf = 207,1–207,8 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3099, 3075, 2908, 1715, 1673, 1562, 1276, 929, 724.O espectro é apresentado na Figura 16 pg. 140 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 6,09 (s, 2H, CH_2); 6,93 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-3'); 7,77-7,82 (m, 4H, H-3/H-4/H-2'/H-7'); 7,94-8,00 (m, 2H, H-2/H-5); 8,51 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, H-6'). O espectro é apresentado na Figura 17 pg. 141 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 102,1 (CH_2); 108,6 (C-6'); 112,8 (C-3'); 123,13; 123,10 (C-2/C-5); 126,8 (C-8); 128,1 (C-1'); 132,9 (C-2'); 134,9 (C-3); 135,1 (C-4); 139,9 (C-1); 142,4 (C-6); 146,9 (C-7'); 148,1 (C-5'); 152,4 (C-4'); 189,3 (C-9); 190,6 (C-7).O espectro é apresentado na Figura 18 pg. 142 do anexo.

2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(8)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,35$ (hexano-acetato de etila 2:1v/v).

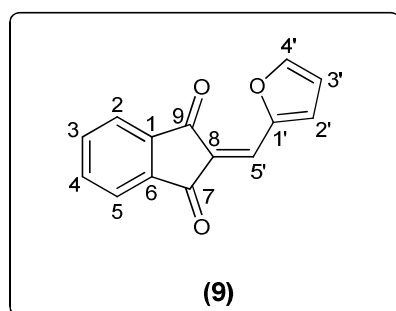
Tf = 215,6–216,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3535-3316 (banda larga), 3085, 2974, 1719, 1679, 1572, 1278, 1255, 1154, 1017, 731. O espectro é apresentado na Figura 19 pg. 143 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 3,90 (s, 3H, OCH_3); 6,93 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-5'); 7,72 (s, 1H, H-7'); 7,86-7,94 (m, 5H, H-2/H-3/H-4/H-5/H-6'); 8,68 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-2'). O espectro é apresentado na Figura 20 pg. 144 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 56,1 (OCH_3); 116,1 (C-2'); 117,2 (C-5'); 123,1 (C-2); 123,2 (C-5); 125,4 (C-6'); 125,5 (C-1'); 132,1 (C-8); 135,8 (C-3); 135,9 (C-4); 139,6 (C-1); 142,1 (C-6); 147,3 (C-7'); 147,8 (C-4'); 153,7 (C-3'); 189,6 (C-9); 190,4 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 21 pg. 145 do anexo.

2-(furan-2-ilmetileno)-1H-indeno-1,3(2H)-diona(9)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,65$ (hexano-acetato de etila 2:1v/v).

Tf = 202,1–203,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3138, 3099, 1725, 1681, 1585, 1462, 1346, 1158, 733.O

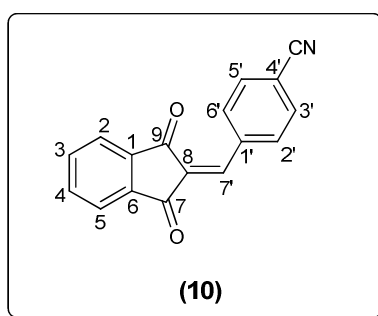
espectro é apresentado na Figura 122 pg. 146 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 6,68-6,80 (m, 1H, H-3'); 7,75-7,81 (m, 4H, H-3/H-4/H-2'/H-5'); 7,95-7,98 (m, 2H, H-2/H-5); 8,54-8,61 (m, 1H, , H-4'). O

espectro é apresentado na Figura 23 pg. 147 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 114,6 (C-2'); 122,9 (C-2); 123,1 (C-5); 124,8 (C-3'); 129,3 (C-5'); 134,9 (C-3); 135,1 (C-4); 140,4 (C-1); 142,3 (C-6); 149,0 (C-4'); 151,4 (C-1'); 188,9 (C-9); 190,1 (C-7).O espectro é apresentado na Figura 24 pg. 148 do anexo. O sinal para C-8 não foi observado no espectro de RMN de ^{13}C .

4-((1,3-dioxo-1*H*-inden-2(3*H*)-ilideno)metil)benzonitrila(10)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,55$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

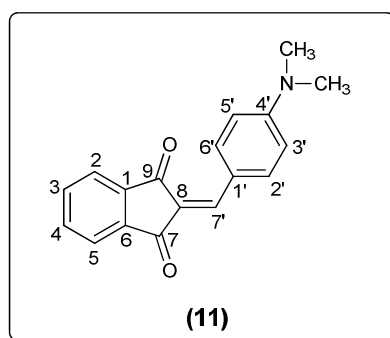
Tf = 233,6–235,2 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3099, 3053, 2226, 1726, 1684, 1586, 842, 730. O espectro é apresentado na Figura 25 pg. 149 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,88 (s, 1H, H-7'); 7,95-8,06 (m, 6H, H-2/H-3/H-4/H-5/H-2'/H-6'); 8,53 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3'/H-5'). O espectro é apresentado na Figura 26 pg. 150 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 114,4 (C-4'); 118,8 ($\underline{\text{CN}}$); 123,7 (C-2); 123,8 (C-5); 132,4 (C-8); 132,7 (C-2'/C-6'); 133,9 (C-3'/C-5'); 136,6 (C-3); 136,7 (C-4); 137,2 (C-1'); 140,1 (C-1); 142,5 (C-6); 142,7 (C-7'); 188,6 (C-9); 189,2 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 27 pg. 151 do anexo.

2-(4-(dimetilamino)benzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(11)



Característica: sólido vermelho.

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

Tf = 180,1–181,5 °C.

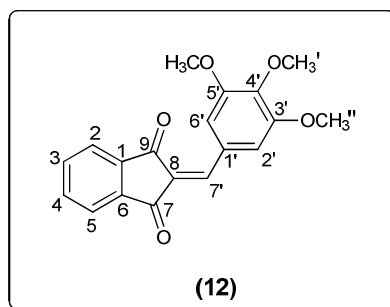
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3080, 3032, 2927, 1709, 1665, 1613, 1555, 1518, 1330, 1186, 815, 722. O espectro é apresentado na Figura 28 pg. 152 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,11 (s, 6H, $\text{N}(\underline{\text{CH}}_3)_2$); 6,71 (d, 2H, $J = 9,1$ Hz, H-3'/H-5'); 7,67-7,71 (m, 2H, H-3/H-4); 7,75 (s, 1H, H-7'); 7,87-7,94 (m, 2H, H-2/H-5); 8,50 (d, 2H, $J = 9,1$ Hz, H-2'/H-6'). O espectro é apresentado na Figura 29 pg. 153 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 40,0 ($\text{N}(\underline{\text{CH}}_3)_2$); 111,3 (C-3'/C-5'); 121,9 (C-1'); 122,4 (C-2/C-5); 122,9 (C-8); 134,0 (C-3); 134,3 (C-4); 137,9 (C-2'/C-6'); 139,8

(C-1); 142,2 (C-6); 147,5 (C-7'); 153,9 (C-4'); 189,9 (C-9); 191,7 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 30 pg. 154 do anexo.

2-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(12)



Característica: sólido laranja.

CCD: $R_f = 0,53$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

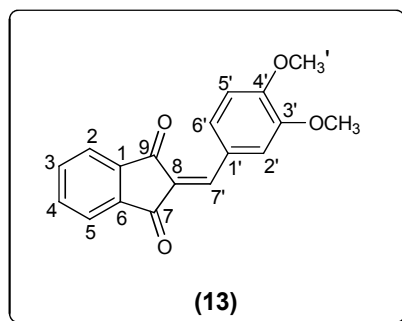
Tf = 185,4–185,6 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3099, 3002, 2972, 2936, 1715, 1678, 1561, 1499, 1307, 1240, 1223, 1128, 732. O espectro é apresentado na Figura 31 pg. 155 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,98 (s, 3H, OCH_3'); 3,99 (s, 6H, $\text{OCH}_3'/\text{OCH}_3''$); 7,78-7,81 (m, 3H, H-3/H-4/H-7'); 7,95 (s, 2H, H-2'/H-6'); 7,97-7,99 (m, 2H, H-2/H-5). O espectro é apresentado na Figura 32 pg. 156 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 56,3 ($\text{OCH}_3'/\text{OCH}_3''$); 61,0 (OCH_3'); 112,0 (C-2'/C-6'); 123,1 (C-2); 123,2 (C-5); 127,7 (C-1'); 128,4 (C-8); 135,0 (C-3); 135,2 (C-4); 139,8 (C-1); 142,4 (C-6); 143,0 (C-4'); 147,3 (C-7'); 152,8 (C-3'/C-5'); 189,4 (C-9); 190,4 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 33 pg. 157 do anexo.

2-(3,4-dimetoxibenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(13)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,48$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

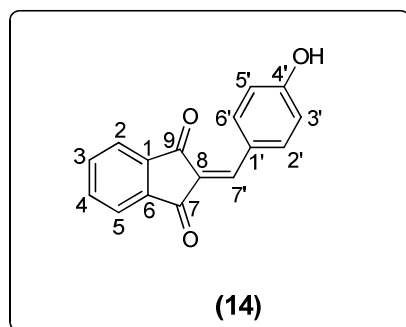
Tf = 205,0–205,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3088, 3010, 2972, 1712, 1671, 1565, 1505, 1271, 1247, 1141, 1019, 736. O espectro é apresentado na Figura 34 pg. 158 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,97 (s, 3H, OCH_3); 4,07 (s, 3H, OCH_3); 6,95 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-5'); 7,71-7,83 (m, 4H, H-3/H-4/H-6'/H-7'); 7,95-7,99 (m, 2H, H-2/H-5); 8,83 (d_{ap} , 1H, $J = 1,5$ Hz, H-2'). O espectro é apresentado na Figura 35 pg. 159 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 56,1 ($\text{OCH}_3/\text{OCH}_3$); 110,6 (C-5'); 115,5 (C-2'); 122,9 (C-2); 123,0 (C-5); 126,4 (C-1'); 126,9 (C-8); 131,3 (C-6'); 134,8 (C-3); 135,0 (C-4); 139,8 (C-1); 142,3 (C-6); 147,4 (C-7'); 148,8 (C-3'); 153,9 (C-4'), 189,7 (C-9); 190,7 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 36 pg. 160 do anexo.

2-(4-hidroxibenzilideno)-1H-indeno-1,3(2H)-diona(14)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,38$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

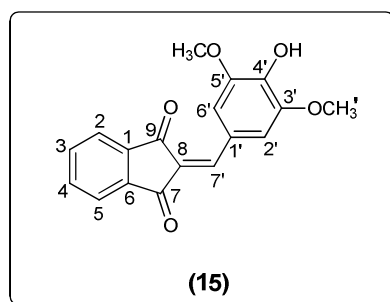
Tf = 235,8–236,0 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3361-3043 (banda larga), 3059, 1715, 1655, 1547, 1505, 1204, 737. O espectro é apresentado na Figura 2.8 (pg. 62).

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6,92 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-3'/H-5'); 7,72 (s, 1H, H-7'); 7,86-7,92 (m, 4H, H-2/H-3/H-4/H-5); 8,50 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-2'/H-6'); 10,86 (s, 1H, OH). O espectro é apresentado na Figura 2.9 (pg. 63).

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 116,4 (C-3'/C-5'); 123,1 (C-2); 123,2 (C-5); 125,0 (C-1'); 125,6 (C-8); 135,8 (C-3); 135,9 (C-4); 138,0 (C-2'/C-6'); 139,6 (C-1); 142,0 (C-6); 146,7 (C-7'); 163,7 (C-4'); 189,4 (C-9); 190,4 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 2.11 (pg. 65).

2-(4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(15)



Característica: sólido laranja.

CCD: $R_f = 0,20$ (hexano-acetato de etila 2:1v/v).

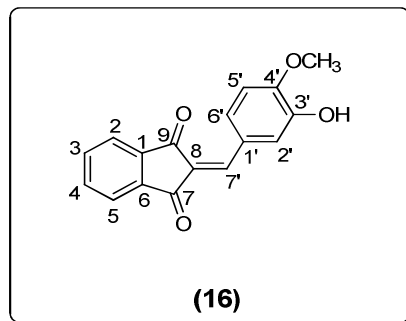
Tf = 222,4–223,1 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3545-3197 (banda larga), 3093, 3010, 2941, 1712, 1667, 1565, 1503, 1318, 1227, 1083, 732. O espectro é apresentado na Figura 37 pg. 161 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 3,88 (s, 6H, $\text{OCH}_3/\text{OCH}_3'$); 7,74 (s, 1H, H7'); 7,85-7,93 (m, 4H, H-2/H-3/H-4/H-5); 8,13 (s, 2H, H-2'/H-6'). O espectro é apresentado na Figura 38 pg. 162 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 56,5 ($\text{OCH}_3/\text{OCH}_3'$); 113,2 (C-2'/C-6'); 123,1 (C-2); 123,2 (C-5); 124,2 (C-1'); 125,7 (C-8); 135,8 (C-3); 135,9 (C-4); 139,6 (C-1); 142,2 (C-6); 143,1 (C-4'); 147,8 (C-7'); 147,9 (C-3'/C-5'); 189,7 (C-9); 190,4 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 39 pg. 163 do anexo.

2-(3-hidroxi-4-metoxibenzilideno)-1H-indeno-1,3(2H)-diona(16)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,28$ (hexano-acetato de etila 2:1v/v).

Tf = 219,0–219,2 °C.

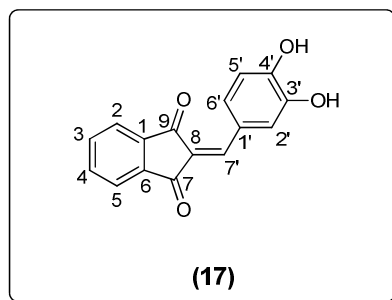
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3546-3288, 3072, 2989, 1718, 1681, 1574, 1498, 1276, 1219, 1137, 734. O espectro é apresentado na Figura 40 pg. 164 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 3,89 (s, 3H, OCH_3); 7,09 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H-5'); 7,67 (s, 1H, H-7'); 7,87-7,95 (m, 5H, H-2/H-3/H-4/H-5/H-6'); 8,28 (d_{ap} , 1H, $J = 1,9$ Hz, H-2'). O espectro é apresentado na Figura 41 pg. 165 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 56,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 112,2 (C-2'); 120,3 (C-5'); 123,2 (C-2/C-5); 126,4 (C-6'); 126,6 (C-1'); 130,0 (C-8); 135,9 (C-3); 136,1 (C-4); 139,7 (C-1); 142,2 (C-6); 146,7 (C-7'); 146,9 (C-4'); 153,7 (C-3'); 189,3 (C-9); 190,3 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 42 pg. 166 do anexo.

Com o intuito de se obter um derivado diidroxilado, o composto **13** foi submetido a uma reação de desmetilação com solução de BBr_3 1,00 mol L^{-1} em diclorometano (LIMA, 2014).

Síntese da 2-(3,4-diidroxibenzilideno)-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona(17)



A um balão bitubulado (150 mL), sob atmosfera de nitrogênio, adicionaram-se o composto **13** (0,200 g; 0,679 mmol) juntamente com 5,0 mL de diclorometano anidro. A mistura resultante foi mantida sob agitação magnética e resfriada em banho de gelo por 40 minutos. Em seguida foram adicionados, gota a gota, 2,7 mL de solução 1,00 mol L^{-1} de BBr_3 em diclorometano. Após a adição, a mistura de reação foi mantida sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 10,0 mL de água destilada e observou-se a formação de um precipitado marrom. A mistura resultante foi transferida para um funil de separação e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos, e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro,

filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto **17** foi obtido como um sólido, após lavagem com diclorometano e acetona, com 58% de rendimento. (0,105 g; 0,394 mmol).

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,05$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

Tf = 238,0–239,4 °C.

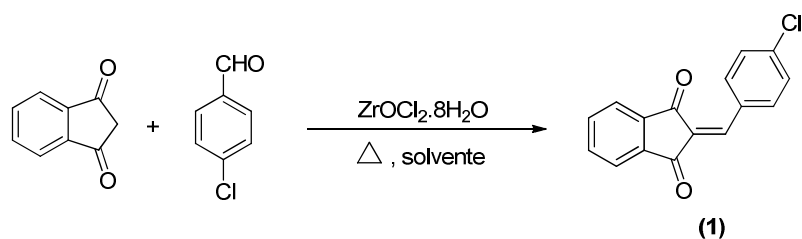
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3492-3109, 3093, 3039, 1720, 1666, 1555, 1384, 1182, 730. O espectro é apresentado na Figura 43 pg. 167 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 6,89 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-5'); 7,64 (s, 1H, H-7'); 7,83 (dd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, H-6'); 7,86-7,94 (m, 4H, H-2/H-3/H-4/H-5); 8,32 (d_{ap} , 1H, $J = 1,8$ Hz, H-2'). O espectro é apresentado na Figura 44 pg. 168 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 116,2 (C-5'); 121,0 (C-2'); 123,1 (C-2/C-5); 125,2 (C-6'); 125,5 (C-1'); 130,7 (C-8); 135,7 (C-3); 135,9 (C-4); 139,6 (C-1); 142,1 (C-6); 145,7 (C-3'); 147,3 (C-7'); 153,0 (C-4'); 189,4 (C-9); 190,5 (C-7). O espectro é apresentado na Figura 45 pg. 169 do anexo.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A etapa inicial do desenvolvimento desta investigação científica consistiu no desenvolvimento de uma metodologia, catalisada por $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, para a síntese de 2-arilideno indan-1,3-dionas via reação de Knoevenagel. Conforme comentado anteriormente, não há relatos na literatura de processos catalisados por $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ para a síntese destas substâncias. Para a otimização das condições, foi investigada a reação entre a indan-1,3-diona e o 4-clorobenzaldeído de acordo com o Esquema 2.8 (pg. 46).



Esquema 2.8 - Reação envolvida na otimização das condições de reação de Knoevenagel catalisadas por $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$.

Nesse sentido, foram avaliados os seguintes parâmetros: quantidade dos reagentes de partida (indan-1,3-diona e aldeído), quantidade do catalisador, solvente e fontes de aquecimento (convencional e por micro-ondas). Na Tabela 2.10 (pg. 47) estão apresentados os resultados obtidos neste processo de otimização.

Tabela 2.10 - Otimização das condições de reação de Knoevenagel entre a indan-1,3-diona e o 4-clorobenzaldeído

	Experimento	Tipo de Aquecimento	Quantidade de reagente (mmol)	Quantidade de catalisador (mol%)	Temperatura (°C)	Tempo (minuto)	Rendimento (%)
Isento de solvente	1	AC	1:1	4	85	70	33
	2	AC	1:1,2	4	85	90	31
	3	MO	1:1	4	85	10	24
	4	MO	1:1	4	85	30	36
	5	AC	1:1	4	85	90	43
Com solvente (água)	6	AC	1:1	4	85	65	68
	7	MO	1:1	4	85	30	70
	8	AC	1:1	-	85	420	27
	9	AC	1:1	4	40	120	86
	10	AC	1:1	4	t.a.	480	83
	11	AC	1:1	2	85	110	84
	12	AC	1:1	8	85	30	66

AC=aquecimento convencional; MO=aquecimento por micro-ondas

Conforme pode ser observado na Tabela 2.10 (pg. 47), a reação foi inicialmente realizada utilizando-se 1 mmol de cada reagente de partida (a indan-1,3-diona e o 4-clorobenzaldeído), aquecimento convencional (85 °C), 4 mol% do catalisador e sem o uso de solvente (Experimento 1). Neste caso, o composto **1** foi obtido com 33% de rendimento após 70 minutos de reação. O aumento da quantidade do aldeído (Experimento 2) não resultou em elevação do rendimento do produto **1**. Baseado nestes experimentos, todas as outras reações foram realizadas empregando-se a proporção de 1 mmol da indan-1,3-diona e 1 mmol do 4-clorobenzaldeído.

Com o intuito de diminuir os tempos de reação e aumentar o rendimento, outras reações foram conduzidas com aquecimento convencional em tubo selado e com aquecimento por micro-ondas. Mantendo a mesma quantidade de catalisador (4 mol%), a temperatura (85 °C) e não utilizando solvente, observou-se que o tempo para completar a reação em tudo selado (Experimento 5) foi maior do que as reações conduzidas com aquecimento em micro-ondas (10 e 30 min) (Experimentos 3 e 4). Entretanto, estas modificações produziram o composto **1** com rendimentos variando de 24% a 43%.

Para melhorar o contato entre os reagentes, uma quantidade de 3,00 mL de água destilada (YANG *et al.*, 2012) foi adicionada ao sistema. Foram realizadas reações utilizando aquecimento convencional e aquecimento por microondas. Mantendo a mesma quantidade de catalisador (4 mol%), a temperatura de 85 °C, observou-se que com o aquecimento convencional (Experimento 6) não houve mudança significativa no tempo de reação comparativamente à reação realizada na ausência de solvente (redução de

tempo de 70 min para 65 min); porém, houve um aumento significativo no rendimento da reação (de 33% para 68%). No experimento realizado com aquecimento por micro-ondas (Experimento 7), observou-se uma diminuição no tempo de reação (de 70 min para 30 min) e uma melhoria significativa do rendimento da reação comparado à reação realizada com aquecimento convencional e sem o uso de solvente (de 33% para 70%). Deve ser notado, contudo, que não houve uma diferença significativa de rendimento entre as reações relacionadas aos Experimentos 6 e 7 (Tabela 2.10, pg. 47).

As reações conduzidas no solvente água foram também avaliadas em diferentes temperaturas. Para a reação entre a indan-1,3-diona e o 4-clorobenzaldeído realizada a 40 °C (Experimento 9), observou-se um aumento do rendimento do produto **1** comparado à reação realizada a 85 °C (de 68% para 86%); no entanto, o tempo gasto para o término da reação praticamente dobrou (de 65 min para 120 min). Observou-se também um aumento do rendimento do produto para reação realizada à temperatura ambiente (Experimento 10) quando comparado à reação realizada a 85 °C (de 68% para 83%). Entretanto, o tempo de reação passou de 65 minutos (temperatura de 85 °C) para 8 horas (480 min). Portanto, mesmo que rendimentos maiores tenham sido alcançados a 40 °C e à temperatura ambiente, o menor tempo de reação foi um fator importante para escolher 85 °C como a melhor temperatura.

Em relação à quantidade de catalisador, além da quantidade de 4 mol%, foram feitas reações na ausência de catalisador e empregando-se as quantidades de 2 mol% e 8 mol%. Conforme pode ser observado na Tabela 2.10 (pg. 47), na ausência de catalisador o produto de condensação **1** foi obtido com um modesto rendimento de 27% após 7 horas (420 minutos) de reação

(Experimento 8). Deste modo, comparando-se as informações dos Experimentos 6 e 8, percebe-se o importante papel do catalisador nesta reação tanto com respeito ao tempo bem como com relação ao rendimento do produto de condensação. A diminuição da quantidade de catalisador para 2 mol% (Experimento 11) resultou em elevação do tempo de reação (110 minutos) e maior rendimento (84%) comparativamente a reação realizada a 85 °C (Experimento 6). Com respeito à reação na qual foi utilizada uma quantidade de catalisador igual a 8 mol% (Experimento 12), o tempo gasto para o término da reação foi reduzido praticamente pela metade em comparação ao Experimento 6 (de 65 min para 30 minutos) e os rendimentos obtidos foram praticamente idênticos. Observou-se, no entanto, que o processo de elaboração desta reação foi mais difícil uma vez que se observou a formação de uma emulsão na mistura de reação.

Assim sendo, as condições de reação que foram escolhidas para a preparação dos adutos de Knoevenagel mostrados na Figura 2.4 (pg. 52) podem ser assim descritas: aquecimento convencional à temperatura de 85 °C; uso de água como solvente (3,00 mL); emprego de 4 mol% do catalisador $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$; os reagentes de partida indan-1,3-diona e o aldeído misturados na proporção de 1 mmol:1 mmol. Estas condições correspondem àquelas do Experimento 6 da Tabela 2.10 (pg. 47).

Cabe salientar que, conforme observado na Tabela 2.10, alguns Experimentos resultaram em rendimentos do produto 1 superiores àquele observado no Experimento 6. No entanto, fatores como tempos de reação mais prolongados ou a necessidade de utilização de um instrumento mais sofisticado (aquecimento com micro-ondas) foram importantes para que as condições

associadas ao Experimento 6 fossem escolhidas como as condições otimizadas para sintetizar os demais adutos de Knoevenagel descritos neste trabalho.

A partir das condições otimizadas de reação, uma série de 2-arilideno indan-1,3-dionas (compostos **2-16**, Figura 2.4, pg. 52) foram sintetizadas.

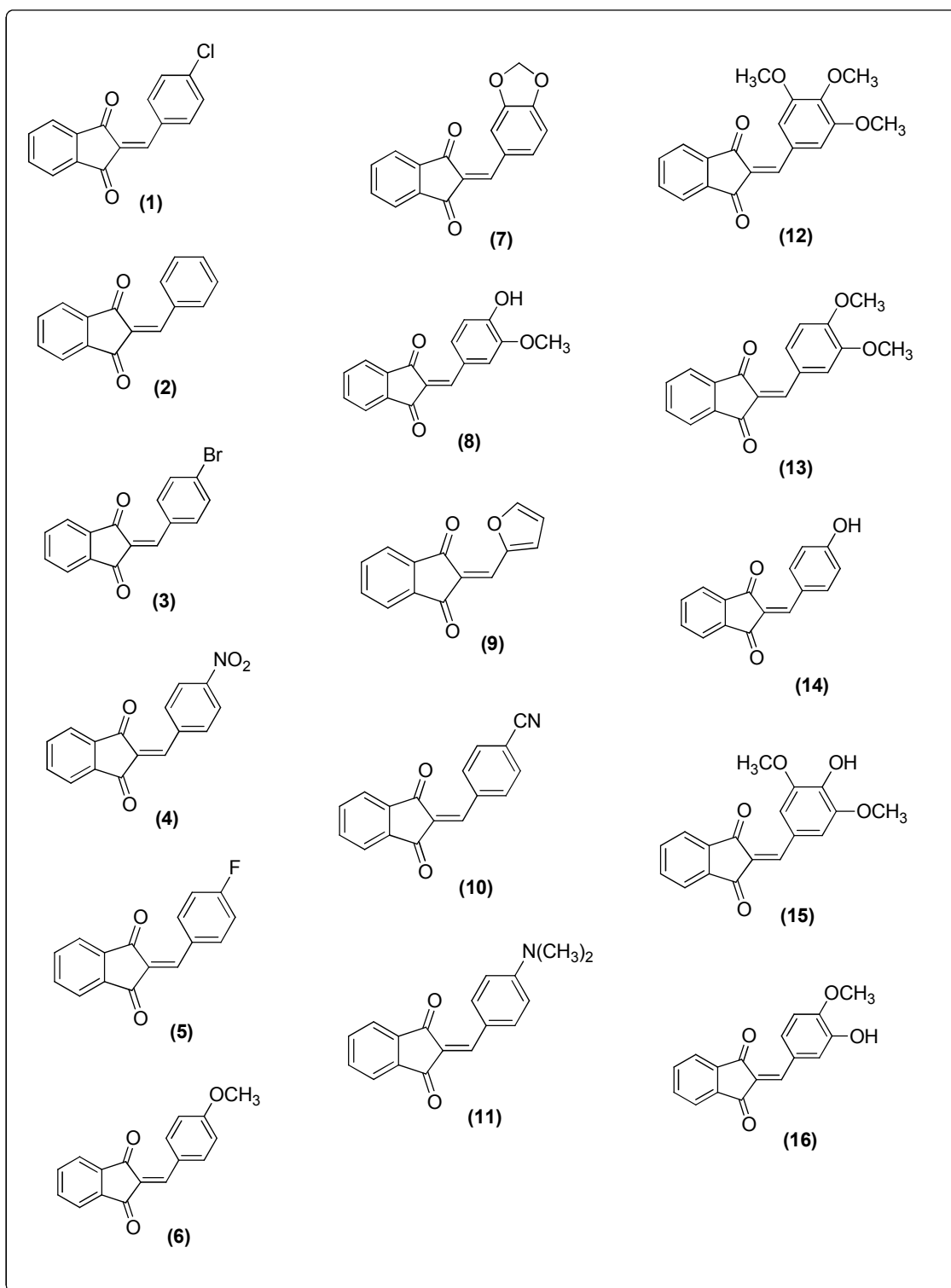
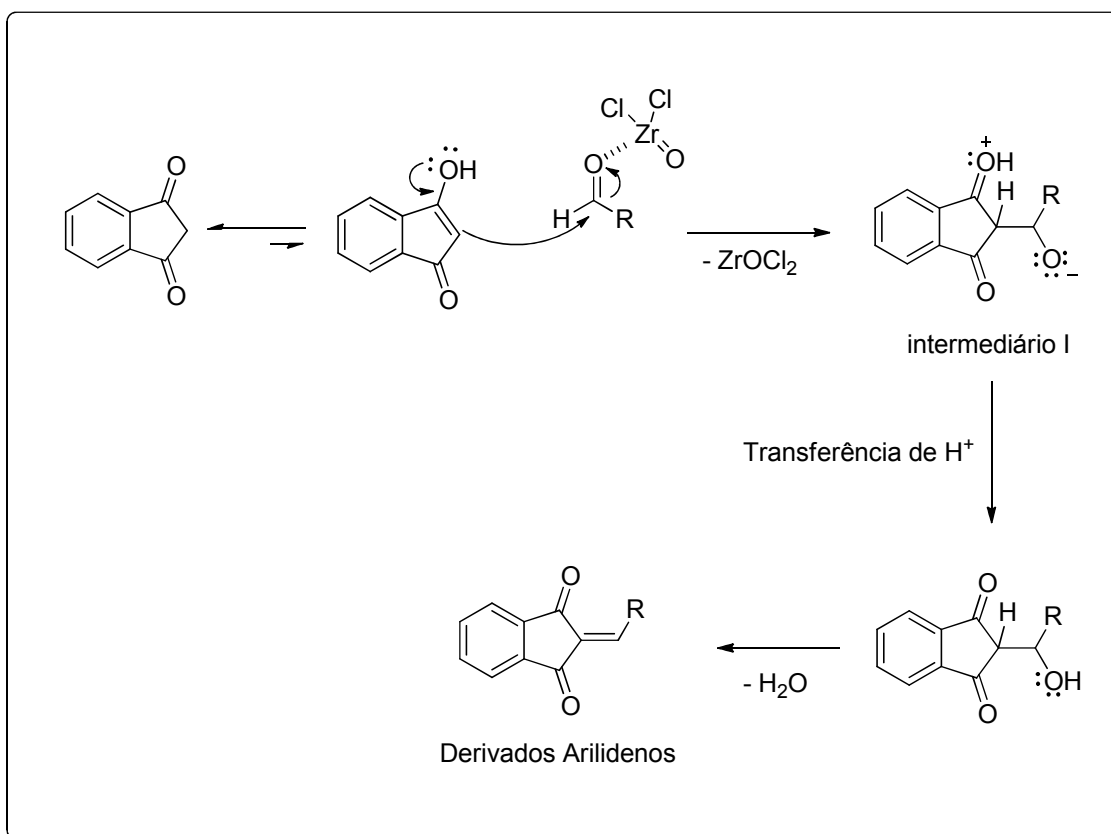


Figura 2.4 - Estruturas das 2-arilideno indan-1,3-dionas sintetizadas.

Conforme pode ser percebido pela inspeção da Figura 2.4, a metodologia desenvolvida pôde ser aplicada para a síntese de 2-arilideno indan-1,3-dionas contendo grupos retiradores e doadores de elétrons ligados ao anel

aromático da porção arilideno. Merece destaque o fato de a metodologia desenvolvida ser de fácil execução, não utilizar solventes tóxicos, não necessitar de precauções especiais (como por exemplo, uso de atmosfera inerte e solventes anidros) para sua realização, utilizar um catalisador de baixo custo e de fácil manipulação. Além disso, a metodologia fornece produtos com rendimentos sinteticamente úteis. Conforme apresentado na Tabela 2.9 (pg. 30), os compostos foram sintetizados com rendimentos variando de 53 a 95% e com tempos de reação variando de 10 a 45 minutos.

Embora nenhum estudo tenha sido conduzido para elucidar o mecanismo da reação catalisada por $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ para a preparação das 2-arilideno indan-1,3-dionas, uma proposta mecanística que procura racionalizar a formação destes compostos é apresentada no Esquema 2.9 (pg. 54) (ILANGO VAN *et al.*, 2011).



Esquema 2.9 - Proposta de mecanismo para a síntese das 2-arilideno indan-1,3-dionas.

De acordo com esta proposta, inicialmente ocorre uma adição da indan-1,3-diona, na sua forma enólica, ao aldeído que é ativado pelo $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, gerando o intermediário I. Após transferências de prótons, ocorre a perda de uma molécula de água que leva à formação das 2-arilideno indan-1,3-dionas.

O tratamento do composto **13** com BBr_3 (tribrometo de boro) levou à formação do derivado diidroxilado **17** com 58% de rendimento. Cabe ressaltar que a desmetilação mediada por BBr_3 consiste em uma metodologia bastante eficaz e é amplamente utilizada para promover a clivagem de éteres (LIMA, 2014).

Os derivados arilideno da indan-1,3-diona tiveram suas estruturas confirmadas por meio das espectroscopias no infravermelho e de ressonância

magnética nuclear (RMN de ^{13}C e ^1H). A caracterização dos compostos não será discutida para todas as substâncias da série sintetizada. Entretanto, os dados que confirmam as estruturas das substâncias **1-17** podem ser encontradas na seção 2.3.1. Os espectros dos compostos estão disponíveis no anexo (pg. 125 - pg. 169).

Considerando o composto **1**, observam-se em seu espectro no infravermelho (Figura 2.5, pg. 57) as bandas em 3092 e 3061 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos de ligação C-H para carbonos com hibridização sp^2 . As bandas em 1684 e 1724 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo carbonila e a banda em 1573 cm^{-1} foi relacionada ao estiramento da ligação C=C.

No espectro de RMN de ^1H do composto **1** (Figura 2.6, pg. 58), o duplete observado em δ_{H} 7,47 e integrado para dois átomos de hidrogênio ($J = 8,4$ Hz), foi atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6'. O multiplete observado em δ_{H} 7,81-7,83 e integrado para três átomos de hidrogênio foi atribuído aos átomos de hidrogênios aromáticos H-3 e H-4 e ao hidrogênio vinílico H-7'. Neste multiplete ocorreu uma sobreposição do sinal do hidrogênio vinílico com os hidrogênios aromáticos. O multiplete em δ_{H} 7,99-8,01 e integrado para dois átomos de hidrogênios, foi atribuído aos hidrogênios H-2 e H-5. O duplete em δ_{H} 8,41 e integrado para dois átomos de hidrogênio ($J = 8,4$ Hz), foi atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5'. Os valores das constantes de acoplamento estão em concordância com a literatura, uma vez que estão dentro da faixa de valores típica para acoplamentos de hidrogênios em posição *orto* ($J_{\text{orto}} = 7-10$ Hz) (PAVIA *et al.*, 2010).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.7, pg. 59), observa-se que o número de sinais está compatível com a estrutura do composto. Os sinais para os átomos de carbono ligados a átomos de hidrogênio foram observados em: δ_{C} 123,39 e δ_{C} 123,41 (carbonos C-2 e C-5); δ_{C} 129,1 (átomos C-3' e C-5'); δ_{C} 131,5 (carbonos C-3 e C-4); δ_{C} 135,3 (carbonos C-2' e C-6'); δ_{C} 145,1 (C-7'). Os sinais dos carbonos C-1 e C-6 foram observados em δ_{C} 139,5 e δ_{C} 140,1, respectivamente. O sinal em δ_{C} 129,4 foi atribuído ao átomo C-1'. O sinal δ_{C} 135,5 foi atribuído ao átomo de carbono C-4', sendo este um valor típico de deslocamento químico de carbono de aromático ligado diretamente a um halogênio, neste caso o átomo de cloro (PRETSCH *et al.*, 1989). O sinal em δ_{C} 142,5 foi atribuído ao C-8. E por fim, os sinais em δ_{C} 188,9 e δ_{C} 189,9 foram atribuídos, respectivamente, aos átomos C-9 e C-7. Estes valores de deslocamento químico estão compreendidos na faixa de valores típicos para átomos de carbono de grupos carbonila (155 a 220 ppm), confirmando a presença de dois grupos carbonila presentes na molécula (PAVIA *et al.*, 2010).

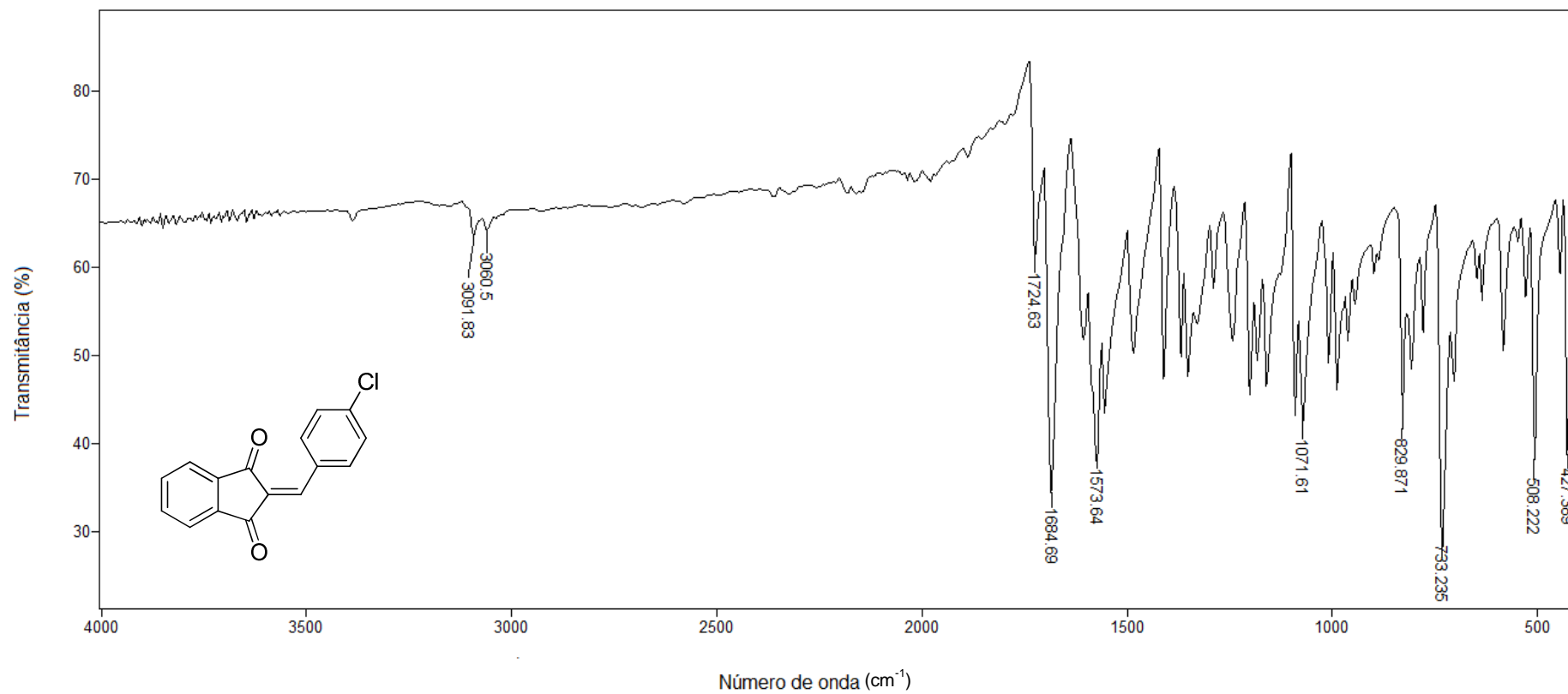


Figura 2.5 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 1.

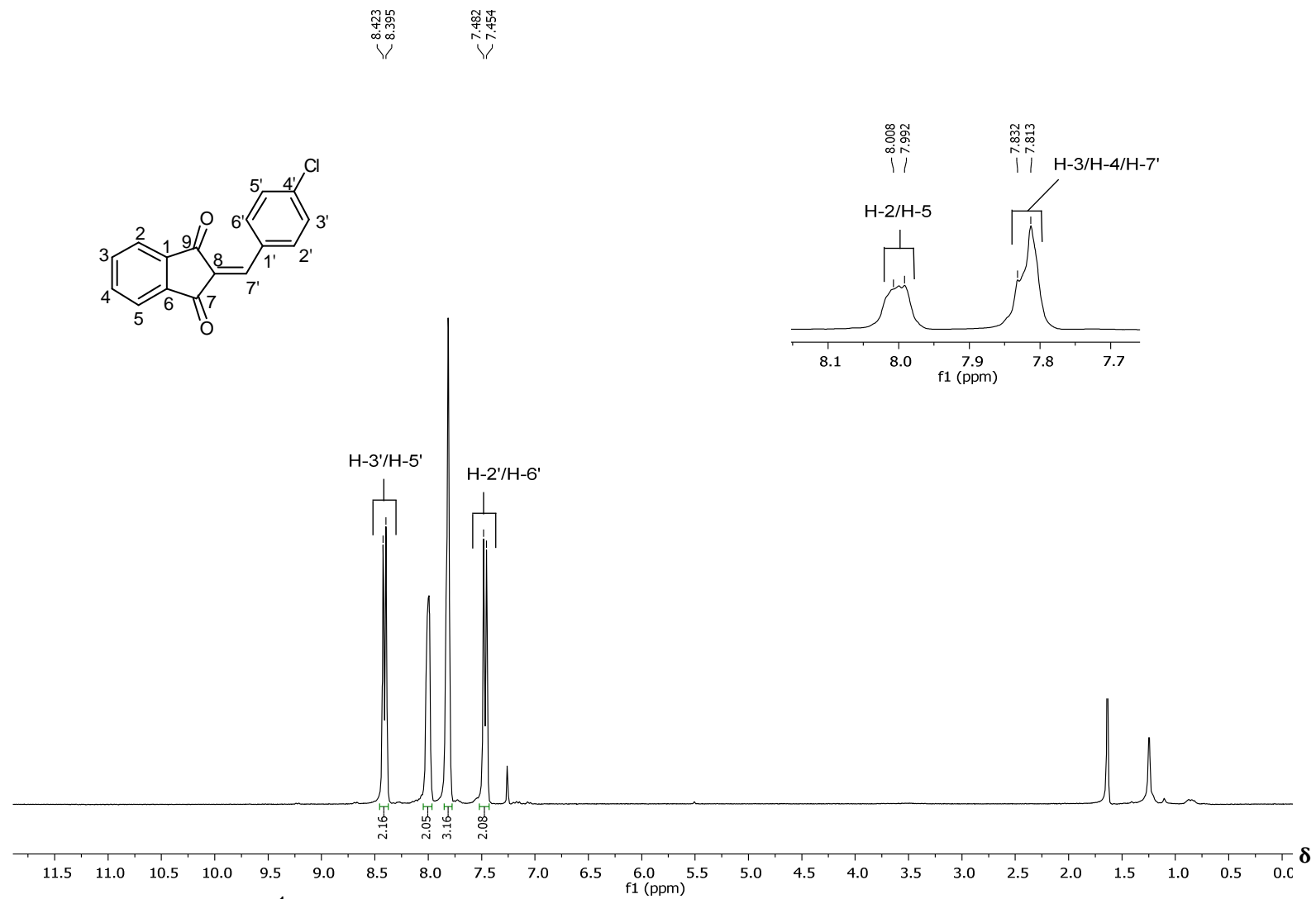


Figura 2.6 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **1**.

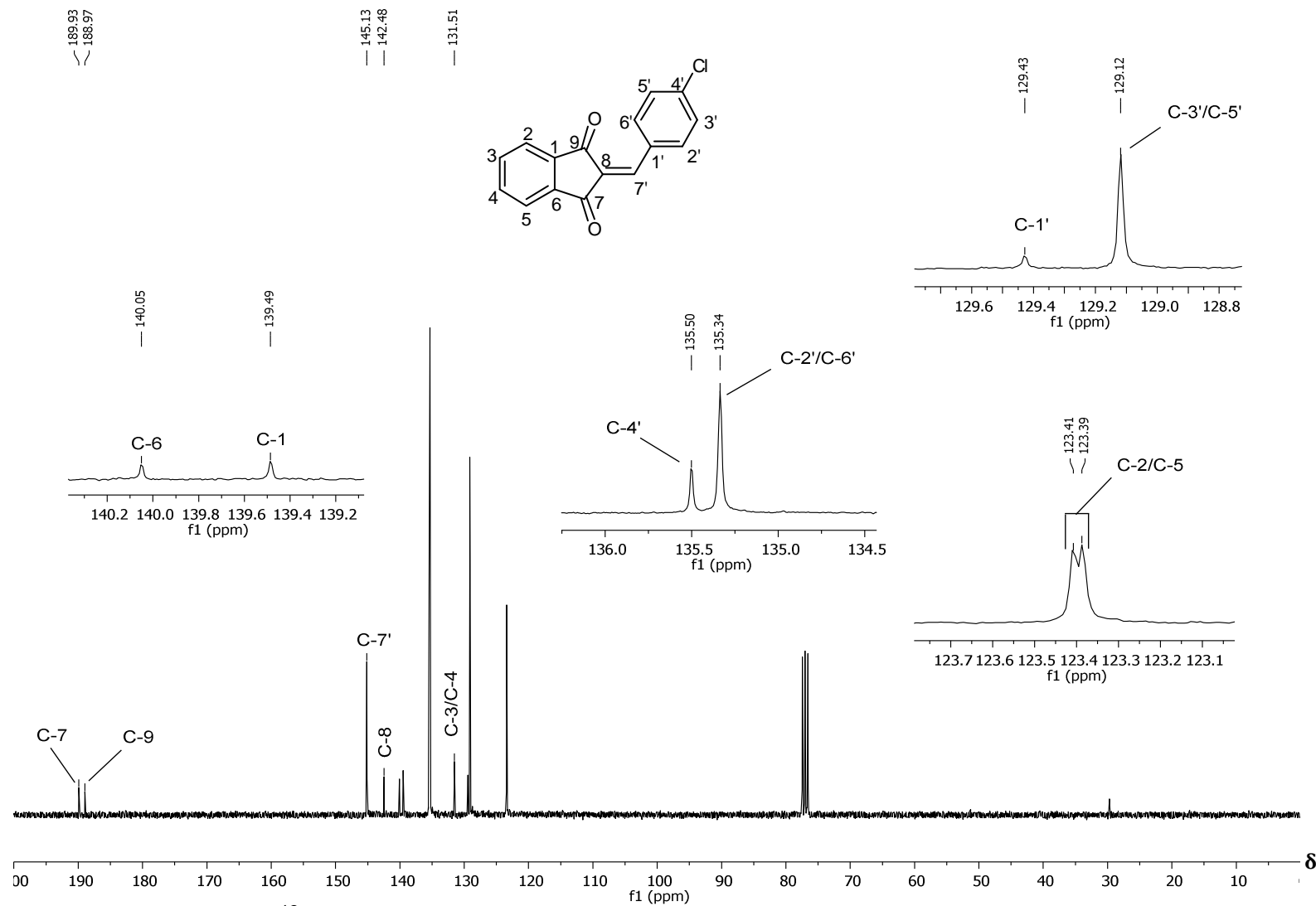


Figura 2.7 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 1.

Tomando-se outro derivado para uma discussão de seus dados espectroscópicos, observa-se no espectro no infravermelho do composto **14** (Figura 2.8, pg. 62) uma banda larga em 3361-3043 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H que está sobreposta à banda de estiramento de ligação C-H de carbonos sp^2 em 3058 cm^{-1} . A banda em 1655 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento do grupo carbonila e as bandas em 1547 e 1505 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento da ligação C=C. Outra banda característica deste composto é referente ao estiramento da ligação C-O, que aparece em 1204 cm^{-1} (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **14** (Figura 2.9, pg. 63), o duplete observado em δ_{H} 6,92 e integrado para dois átomos de hidrogênio ($J = 8,7$ Hz), foi atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5'. O simpleto em δ_{H} 7,72 e integrado para um hidrogênio, foi atribuído ao hidrogênio vinílico H-7'. O multiplete observado em δ_{H} 7,86-7,92 e integrado para quatro átomos de hidrogênio foi atribuído aos hidrogênios aromáticos H-2, H-3, H-4 e H-5. Em δ_{H} 8,50, outro duplete foi observado e integrado para dois átomos de hidrogênios ($J = 8,7$ Hz), sendo atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6'. O simpleto que aparece em δ_{H} 10,86 e integrado para um átomo de hidrogênio, foi atribuído ao hidrogênio do grupo O-H. Os valores das constantes de acoplamento também estão de acordo com a literatura, uma vez que estão dentro da faixa de valores típica para acoplamentos de hidrogênios em posição *orto* ($J_{\text{orto}} = 7-10$ Hz) (PAVIA *et al.*, 2010). Para confirmar a existência do grupo hidroxila na molécula, foi realizado um experimento de troca de hidrogênio por deutério. Neste caso, duas gotas de água deuterada (D_2O) foram adicionadas ao tubo de RMN contendo a solução do composto **14** em DMSO. Após a

agitação do tubo, outra análise via espectroscopia de RMN foi realizada e observou-se no espectro (Figura 2.10, pg. 64), que o sinal do hidrogênio referente ao grupo hidroxila desapareceu. De acordo com PAVIA *et al.* (2010), houve uma troca do hidrogênio por deutério e este é um método geralmente utilizado para identificar a absorção de O-H na espectroscopia de RMN de hidrogênio.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.11, pg. 65), o sinal em δ_{C} 163,7 foi atribuído ao carbono C-4', sendo este um valor próximo do deslocamento químico de carbono de aromático ligado diretamente a hidroxila (PRETSCH *et al.*, 1989). O sinal observado em δ_{C} 116,4 foi atribuído aos carbonos C-3' e C-5' enquanto que o sinal em δ_{C} 138,0 aos C-2' e C-6'. Os sinais em δ_{C} 125,6 e δ_{C} 146,7 foram atribuídos aos carbonos C-8 e C-7', respectivamente. Os sinais em δ_{C} 189,4 e δ_{C} 190,4 foram atribuídos aos carbonos C-9 e C-7, respectivamente.

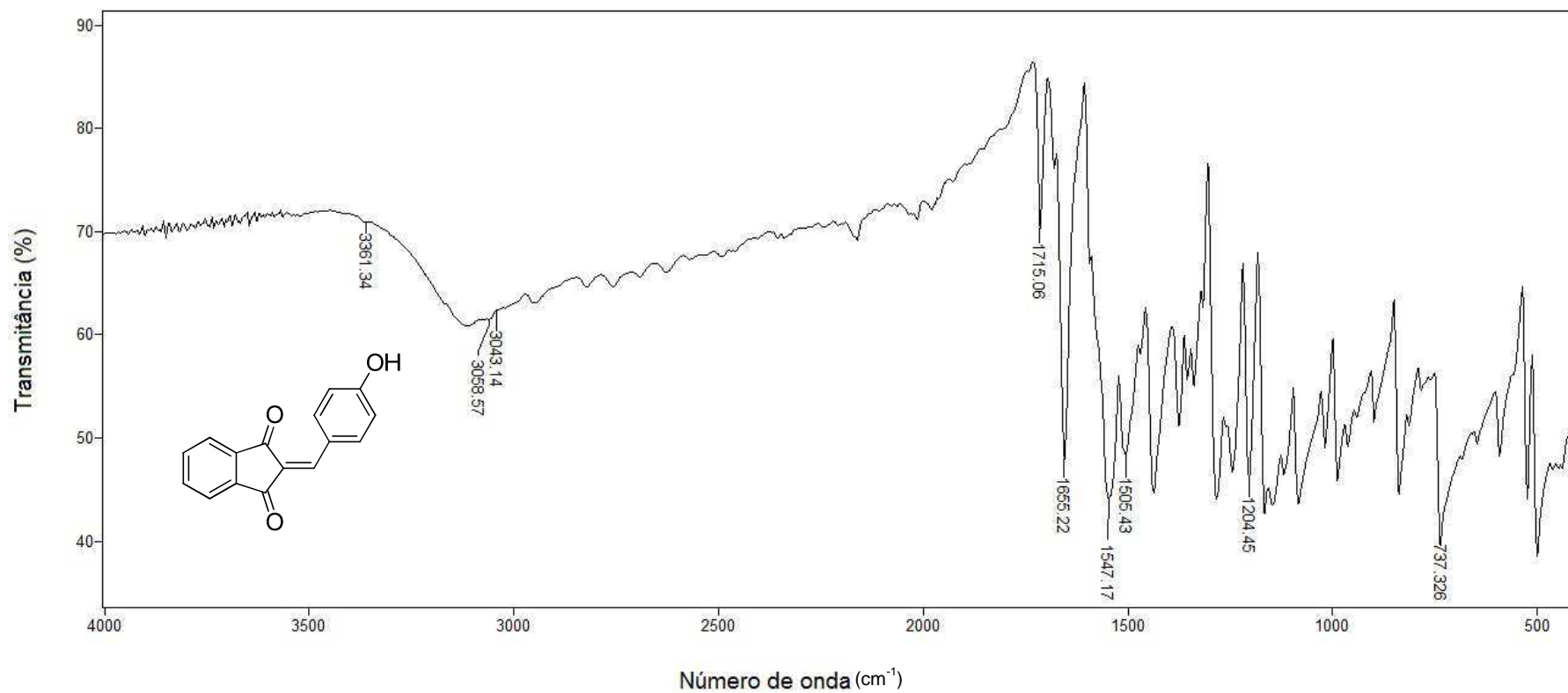


Figura 2.8 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **14**.

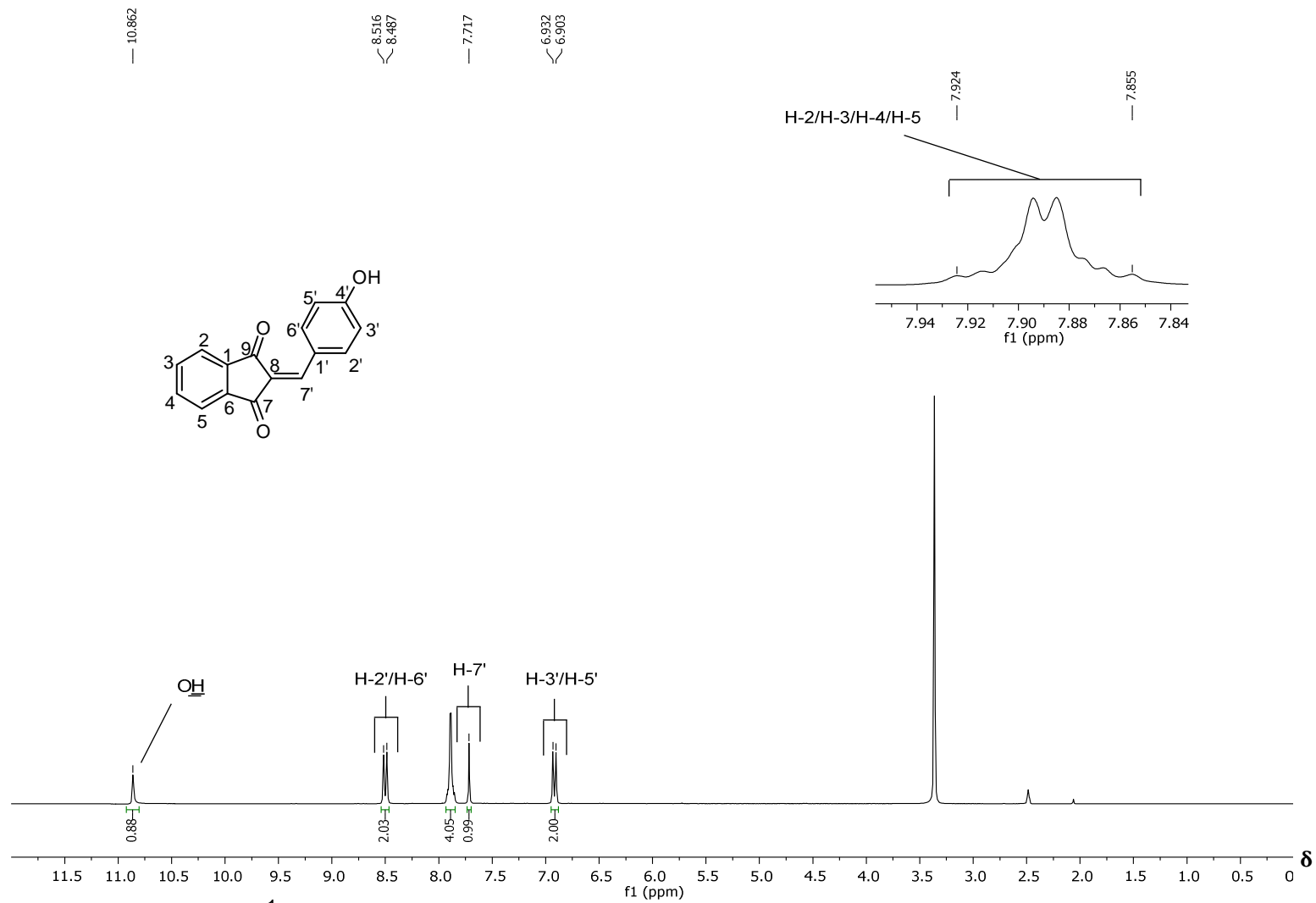


Figura 2.9 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **14**.

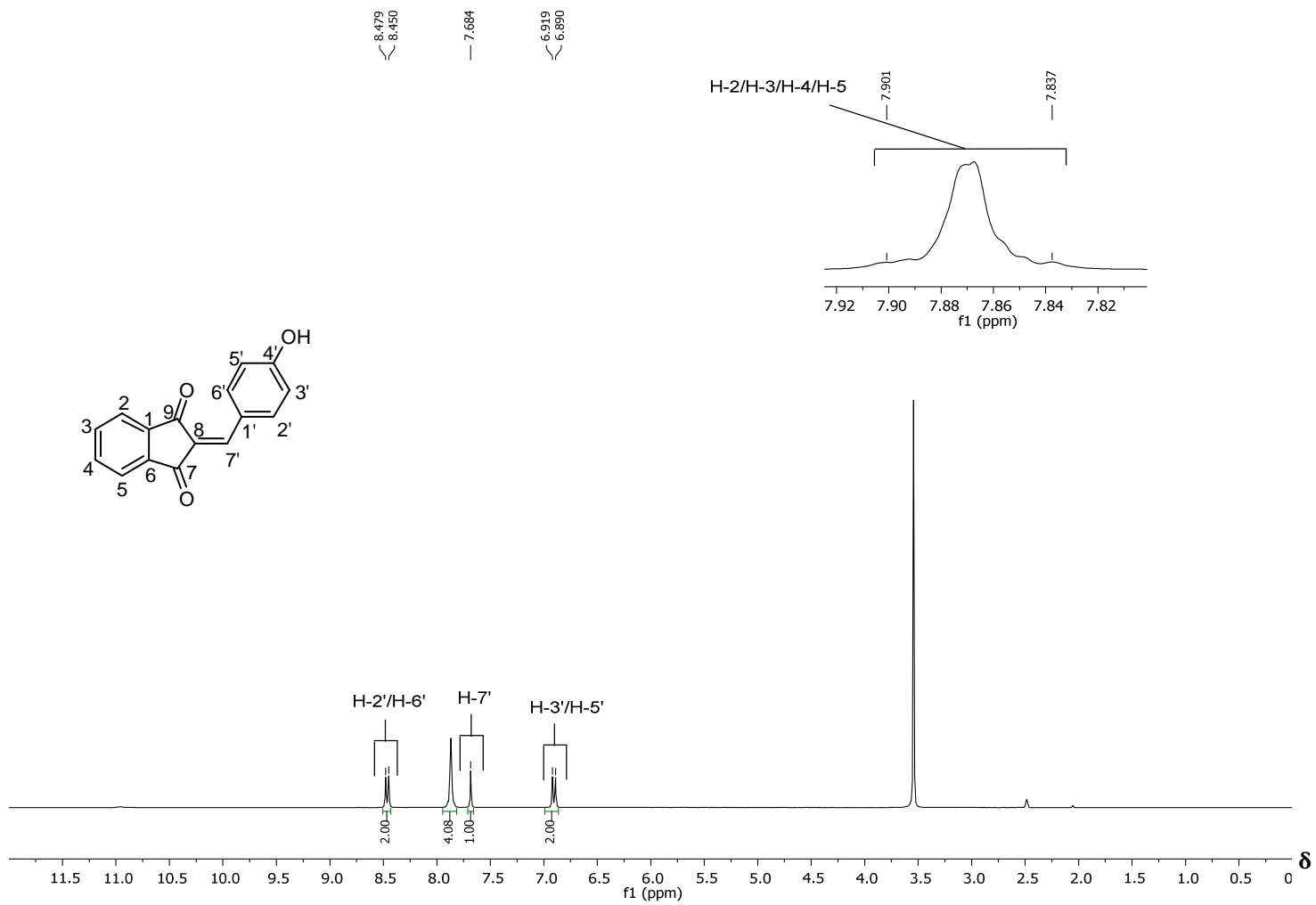


Figura 2.10 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O) do composto **14**.

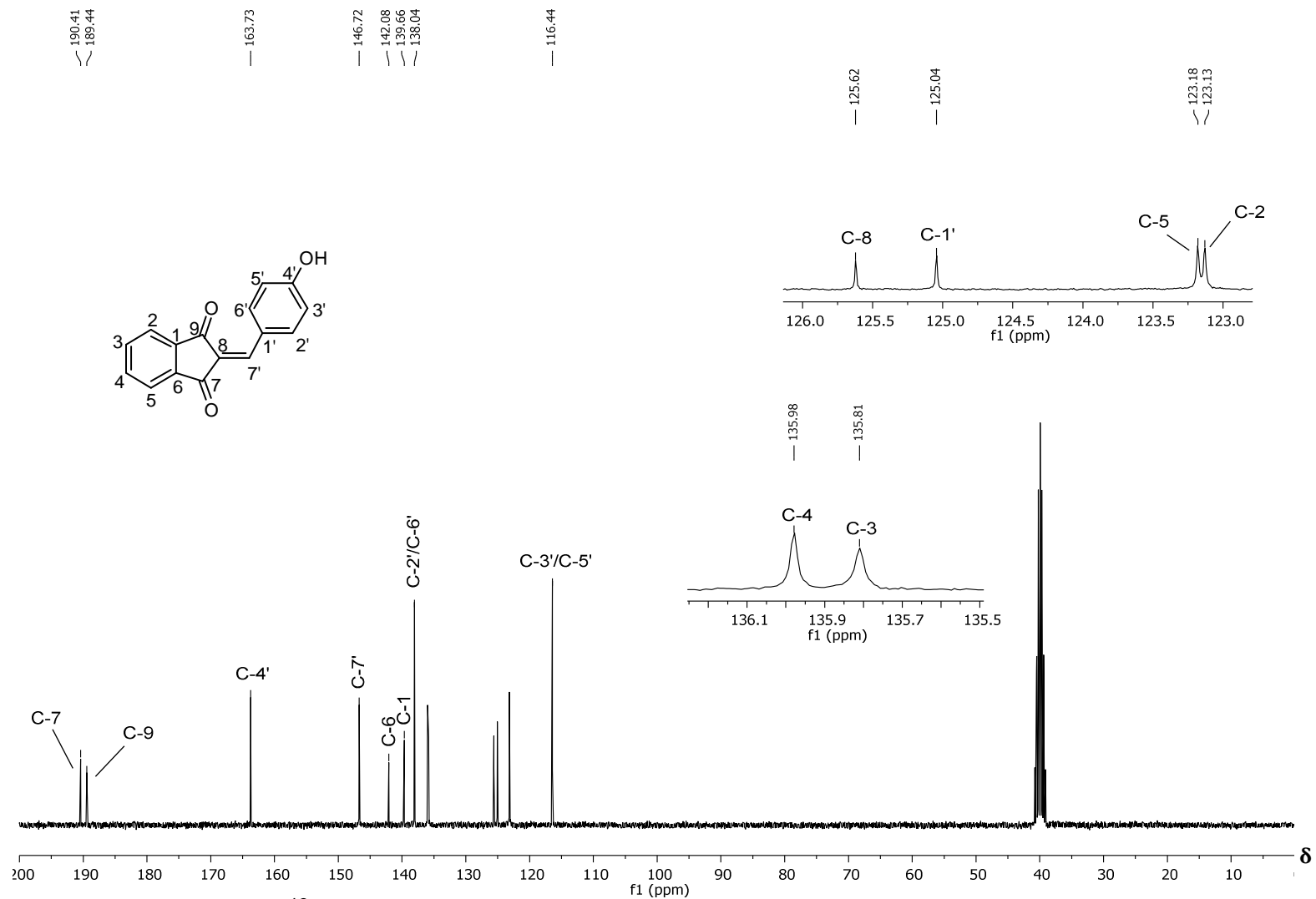


Figura 2.11 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **14**.

As substâncias **1**, **6**, **11** e **15**(Figura 2.4 pg. 52) tiveram suas estruturas cristalinas investigadas por difração de raios-X por monocristal (DRXM).

O composto **11** já possui estrutura cristalográfica descrita na literatura (MAGOMEDOVA *et al.*, 1980). As informações cristalográficas pertinentes aos compostos **1**, **6** e **15** são descritas a seguir.

Os compostos **1**, **6** e **15** cristalizaram nos grupos espaciais $P2_1$, $P-1$ e $P2_1/c$, respectivamente, com uma molécula cristalograficamente independente. Apesar dos diferentes substituintes nas posições 3, 4 e 5 do anel aromático do grupo arilideno, estas moléculas são praticamente planares, o que pode ser constatado pelo ângulo entre os planos médios quadráticos calculados para a porção indan-1,3-diona e o anel benzênio da porção arilideno ($0,64^\circ$, $6,58^\circ$ e $1,89^\circ$ para os compostos **1**, **6** e **15**, respectivamente). O empacotamento cristalino dos compostos **1** e **6** são estabilizados principalmente por ligações de hidrogênio não clássicas. Em **1**, grupos CH aromáticos nas posições 2 e 5 do anel fenílico são doadores de ligações de hidrogênio para ambos os oxigênios carbonílicos de moléculas vizinhas relacionadas por simetria roto-translacional de segunda ordem (eixo 2_1) (Figura 2.12, pg. 67). Este padrão de interações intermoleculares origina uma cadeia unidimensional infinita de moléculas de **1**, sendo esta a principal entidade supramolecular deste composto. Já em **6**, além de dois grupos CH aromáticos, agora do núcleo indano-1,3-diona, há também a participação do grupo metila como doador de ligação de hidrogênio não clássica para um dos oxigênios carbonílicos, o qual, por sua vez, está envolvido em uma ligação de hidrogênio bifurcada (Figura 2.13, pg. 68). Ainda na estrutura de **6**, o oxigênio do grupo metoxila é também um receptor de ligação de hidrogênio. Este padrão de interações intermoleculares conecta

moléculas relacionadas por simetria translacional dentro uma camada bidimensional infinita (Figura 2.13, pg. 68), originando uma estrutura cristalina lamelar. O empacotamento cristalino de **15** é o único caracterizado pela presença de ligações de hidrogênio intermoleculares clássicas, devido à presença de um grupo hidroxila na posição *para* do anel benzênico da porção arilideno deste composto. Este grupo OH é doador de ligações de hidrogênio para um dos oxigênios carbonílicos, estruturando, juntamente com uma ligação de hidrogênio não clássica entre um grupo CH aromático do núcleo indan-1,3-diona e um oxigênio do grupo metoxila, uma cadeia unidimensional de moléculas relacionadas por simetria roto-translacional de segunda ordem (Figura 2.14, pg. 69).

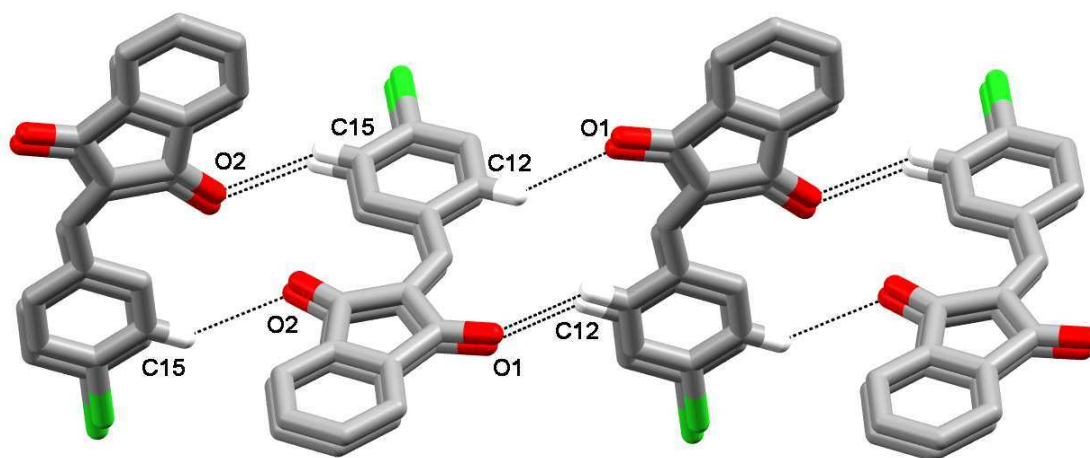


Figura 2.12 - Cadeia unidimensional formada no empacotamento cristalino do composto **1**. Somente os átomos de hidrogênio envolvidos nas interações intermoleculares (linhas pontilhadas pretas) são exibidos.

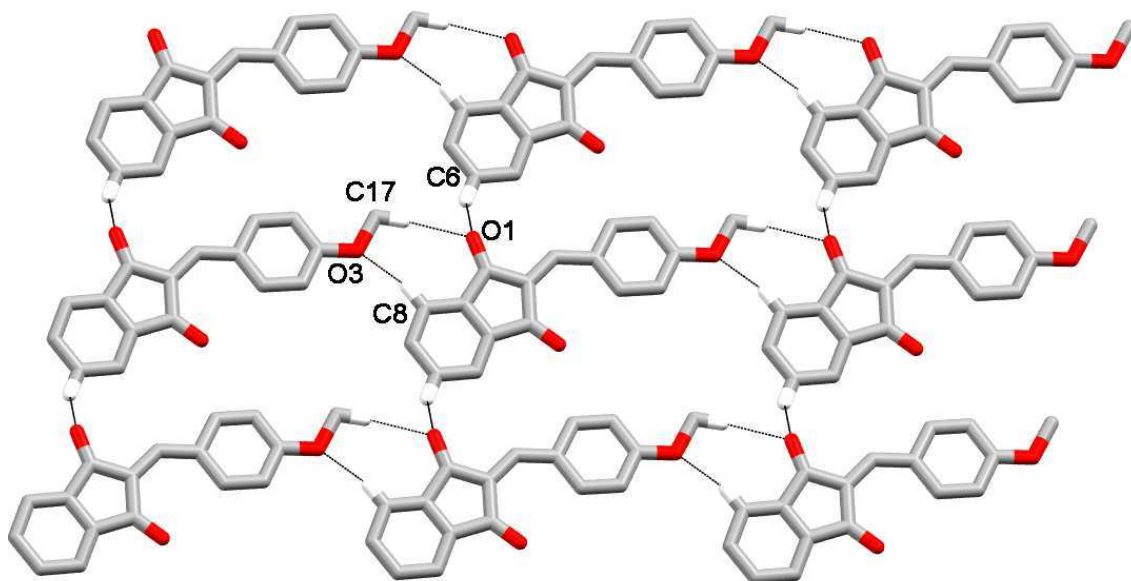


Figura 2.13 - Camada bidimensional formada no empacotamento cristalino do composto **6**. Somente os átomos de hidrogênio envolvidos nas interações intermoleculares (linhas pontilhadas pretas) são exibidos.

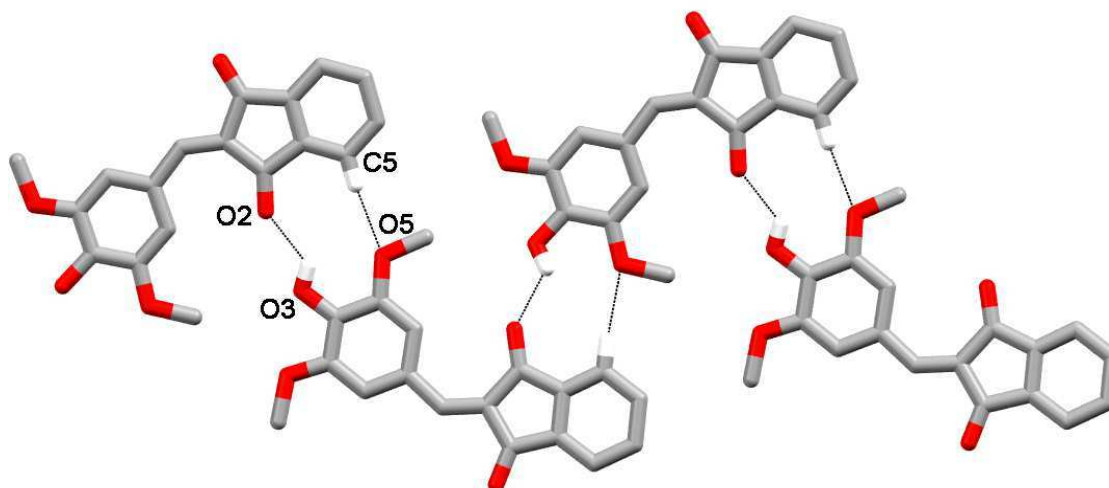


Figura 2.14 - Cadeia unidimensional característica do empacotamento cristalino do composto **15**. Somente os átomos de hidrogênio envolvidos nas interações intermoleculares (linhas pontilhadas pretas) são exibidos.

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, Luiz Cláudio de Almeida. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Editora UFV, 2008.

BARGE, M.; SALUNKHE, R. Aqueous extract of *Balanites roxburghii* fruit: a green dispersant for C-C bond formation. *RSC Advances*, p.31177-31183, 2014.

BURLA, M. C.; CALIANDRO, R.; CAMALLI, M.; CARROZZINI, B.; CASCARANO, G. L.; DE CARO, L.; GIACOVAZZO, C.; POLIDORI, G.; SPAGNA, R. SIR2004: an improved tool for crystal structure determination and refinement. *Journal of Applied Crystallography*, v.38, p.381-388, 2005.

CUNHA, S.; IUNES, C. E. M.; OLIVEIRA, C. C.; SANTANA, L. L. B. Síntese de ácidos cumarino-3-carboxílicos e sua aplicação na síntese total da aiapina, cumarina e umbeliferona. *Química Nova*, v.38, p.1125-1131, 2015.

- CUNHA, S.; SANTANA, L. L. B. Condensação de Knoevenagel de aldeídos aromáticos com ácido de Meldrum em água: uma aula experimental de química orgânica verde. *Química Nova*, v.35, p.642-647, 2012.
- DAS, V. K.; DAS, S.; THAKUR, A. J. Protection and deprotection chemistry catalysed by zirconium oxychloride octahydrate ($ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$). *Green Chemistry Letters and Reviews*, v.5. p.577-586, 2012.
- DESHMUKH, M. B.; PATIL, S. S.; JADHAV, S. D.; PAWAR, P. D. Green approach for Knoevenagel condensations of aromatic aldehydes with active methylene group. *Synthetic Communications*, v.42, p.1177-1183, 2012.
- FARRUGIA, L. J. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. *Journal of Applied Crystallography*, v. 32, p. 837-838, 1999.
- ILANGO VAN, A.; MALAYAPPASAMY, S.; MURALIDHARAN, S.; MARUTHAMUTHU, S. A highly efficient green of 1,8-dioxooctahydroxanthenes. *Chemistry Central Journal*, v. 5 ,2011.
- KURTI, L.; CZAKO, B. Strategic applications of named reactions in organic synthesis. Elsevier Academic Press, 2005.
- LIMA. Ângela Maria Almeida. Síntese e avaliação das atividades citotóxica e fungicida de isobenzofuranonas e de derivados do ácido cinâmico. 2014. 130 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Curso de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- LI, M.; YANG, W.; WEN, L.; LI, F. A first resource-efficient and highly flexible procedure for a four-component synthesis of dispiropyrrolidines. *European Journal of Organic Chemistry*, p.2751-2758, 2008.

- MAGOMEDOVA, N. S.; ZVONKOVA, Z. V.; NEIGAUZ, M. G.; NOVAKOVSKAYA, L. A. Crystal-structure of the gamma-modification of 2-para-dimethylaminobenzylidene of 1,3-indandione. *Kristallografiya*, v.25, p. 400-402, 1980.
- MANTRI, K.; KOMURA, K.; SUGI, Y. ZrOCl₂·8H₂O catalyst for the esterification of long chain aliphatic carboxylic acids and alcohols. The enhancement of catalytic performance by supporting on ordered mesoporous silica. *Green Chemistry*, v.7, p.677-682, 2005.
- MISHRA, S.; GHOSH, R. Ecofriendly and sustainable efficient synthesis of bis(indolyl)methanes based on recyclable Bronsted (CSA) or Lewis (ZrOCl₂·8H₂O) acid catalysts. *Indian Journal of Chemistry*, v.50B, p.1630-1636, 2011.
- MOSADDEGH, E.; ISLAMI, M. R.; HASSANKHANI, A. ZrOCl₂·8H₂O as an recyclable catalyst for the clean synthesis of xanthenedione derivatives under solvent-free conditions. *Arabian Journal of Chemistry*, p.77-80, 2010.
- NIKOOFAR, K.; GORJI, S. Zirconium oxy dichloride octahydrate: a green Lewis acid catalyst for the synthesis of novel 3-[(alkyl/arylthio)(aryl)methyl]-1*H*-indoles. *Research on Chemical Intermediates*. 2016.
- OGIWARA, Y.; TAKAHASHI, K.; KITAZAWA, T.; SAKAI, N. Indium(III)-Catalyzed Knoevenagel condensation of aldehydes and activated methylenes using acetic anhydride as a promoter. *Journal of Organic Chemistry*, v.80, p.3101-3110, 2015.
- PAVIA, Donald L *et al.* Introdução à espectroscopia. 4^a ed. São Paulo: Editora Cengage Learning, 2010.

- PRETSCH, Erno et al. Tables of spectral data for structure determination of organic compounds. 2^a ed. Berlin: Springer-Verlag, 1989.
- RYABUKHIN, S. V.; PLASKON, A. S.; VOLOCHNYUK, D. M.; PIKPO, S. E.; SHIVANYUK, A. N.; TOLMACHEV, A. A. Combinatorial Knoevenagel Reactions. *Journal of Combinatorial Chemistry*, p.1073-1078, 2007.
- SHELDRICK, G. M. SHELXL-97: program for crystal structure analysis. Göttingen, Germany: University of Göttingen, 1997.
- YANG, P. H.; ZHANG, Q. Z.; SUN, W. Clean synthesis of 2-arylideneindan-1,3-diones in water. *Research on Chemical Intermediates*, v.38, p.1063-1068, 2012.
- ZHANG, X. R.; CHAO, W.; CHUAY, Y. T.; MA, Y.; HAO, R.; ZOU, D. C.; WEI, Y. G.; WANG, Y. A new N-type organic semiconductor synthesized by Knoevenagel condensation of truxenone and ethyl cyanoacetate. *Organic Letters*, v.8, p.2563-2566, 2006.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS 2-ARILIDENO INDAN-1,3-DIONAS CONTRA A PROTEASE NS2B-NS3 DO WEST NILE VIRUS E VÍRUS DENGUE

3.1. INTRODUÇÃO

West Nile Virus (WNV)² é um arbovírus pertencente à família *Flaviridae*, do gênero *Flavivirus* e é principalmente transmitido por mosquitos da espécie *Culex*. Ele foi isolado pela primeira vez a partir de uma paciente em estado febril em Uganda em 1937. Aparentemente, este vírus estava restrito a regiões da África, Ásia e Oriente Médio, sendo introduzido posteriormente na Europa. Acredita-se que essa disseminação tenha sido promovida por aves migratórias provenientes da África. Em 1999, ele foi introduzido pela primeira vez nos Estados Unidos, causando milhares de infecções humanas devido à sua crescente proliferação (SCHULLER *et al.*, 2011; ZEINAD *et al.*, 2004; MUELLER *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2013).

No Brasil, em 2014, foi relatado o primeiro caso de infecção humana no estado do Piauí (AGUIAR *et al.*, 2015). O paciente desenvolveu encefalite, uma das formas mais graves da doença e é possível que tenham ocorrido outros casos de infecção em diferentes regiões do país, mas que não foram diagnosticados (VIEIRA *et al.*, 2015).

Além de mosquitos, o WNV pode infectar várias espécies de aves, nas quais apresenta viremia elevada. Em humanos, equinos e animais domésticos

² Optou-se por utilizar o nome não traduzido do vírus.

ele apresenta viremia baixa, não estando envolvidos no ciclo de vida do parasita no meio ambiente (ZEINAD *et al.*, 2004).

A transmissão do WNV também pode ocorrer por via oral, transfusão de sangue, transplante de órgãos, amamentação e, embora menos comum, por transmissão intra-uterina (CORREA & VARELLA, 2008).

Cerca de 70% dos casos de infecção pelo WNV são assintomáticas, mas quando sintomática, a infecção se caracteriza por febres, astenia, cefaléia, artralgia e mialgia. Casos de surdez bilateral e complicações oculares também foram atribuídos ao WNV. A forma mais severa da infecção causa meningite e encefalite (CORREA & VARELLA, 2008; SCHULLER *et al.*, 2011; BEHNAM *et al.*, 2015). A falta de uma vacina limita a profilaxia da doença, mas para cavalos, a vacina já existe e ajuda no controle da doença (CHANCEY *et al.*, 2015).

O genoma do WNV é composto por uma molécula de RNA de cadeia simples de sentido positivo, a qual codifica três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não-estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (SCHULLER *et al.*, 2011; MUELLER *et al.*, 2007). A proteína NS3 precisa da proteína NS2B como cofator para executar sua função e junto com a NS5 formam o complexo de replicação do vírus para amplificar o genoma viral. Portanto, em princípio, a inibição funcional destas proteínas e/ou perturbações na replicação viral, faz delas importantes alvos na busca de medicamentos contra *flavivirus* como o WNV (MURRAY *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2014; KANG *et al.*, 2013).

O vírus dengue (DENV), assim como WNV, também pertence à família *Flaviridae*, do gênero *Flavivirus*. Seu genoma também é composto por uma

molécula de RNA de cadeia simples de sentido positivo, a qual codifica as mesmas proteínas supracitadas (SCHULLER *et al.*, 2011).

Existem quatro sorotipos do vírus dengue, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, em adição a um quinto sorotipo emergente, sendo todos eles transmitidos pelo *Aedes aegypti* e mais raramente pelo mosquito *Aedes albopictus* (SCHULLER *et al.*, 2011; BEHNAM *et al.*, 2015).

A dengue é uma arbovirose que infecta milhares de pessoas ao redor do mundo. A introdução da dengue no Brasil, com confirmação laboratorial, data do início da década de 1980, em Boa Vista, Roraima. Na ocasião foram isolados os quatro sorotipos (DENV 1-4), com 11.000 casos confirmados. A partir daí, o Brasil passou por diversos surtos epidêmicos (VIANA & IGNOTTI, 2013).

Como doença endêmica ou pandêmica reemergente, a dengue ocorre basicamente em todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta. Essas regiões são mais suscetíveis às alterações e variabilidades climáticas, ao crescimento da população e à urbanização, que dentre outros, são os fatores que contribuem para a proliferação e desenvolvimento do mosquito vetor (VIANA & IGNOTTI, 2013).

“As principais formas clínicas da dengue são a Dengue Clássica (DC), a Dengue com Complicações (DCC) e a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), podendo evoluir para a forma mais grave que é a Síndrome do Choque da Dengue (SCD)” (DIAS *et al.*, 2010).

Há suspeitas de que a dengue também possa estar envolvida com problemas neurológicos e neste sentido, alguns estudos vêm sendo realizados e investigados em pacientes infectados pelo vírus DENV que apresentaram

também distúrbios do Sistema Nervoso Central. As taxas de mortalidade por dengue neurológica variam em muitos países e também variam com a gravidade nos casos de dengue (ARAÚJO *et al.*, 2012).

Em 2016, foram registrados 1.054.127 casos prováveis de dengue no Brasil até a semana epidemiológica 16 (03/01/2016 a 23/04/2016). Neste período destaca-se a região Sudeste, que apresentou maior número de casos prováveis (625.470 casos, 59,3%) em relação ao total do país. Em segundo lugar está a região Nordeste (205.470 casos, 19,5%), seguidas das regiões Centro-Oeste (113.909 casos, 10,8%), Sul (79.010 casos, 7,5%) e Norte (30.315 casos, 2,9%). No mesmo período 262.148 casos suspeitos foram descartados (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016).

A maior taxa de incidência de casos prováveis de dengue ocorreu em Minas Gerais (1.764 casos/100 mil hab.), seguida do Rio Grande do Norte (1.150,8 casos/100 mil hab.) e Goiás (940 casos/100 mil hab.) (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016).

Neste período foram confirmados 340 casos de dengue grave e 3.626 casos de dengue com sinais de alarme, destacando novamente a região Sudeste com 178 casos graves e 1505 casos com sinais de alarme. Foram confirmados 190 óbitos. Ainda estão sob investigação 433 casos de dengue grave ou com sinais de alarme e 476 óbitos, que poderão ser confirmados ou descartados nas próximas semanas (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016).

As infecções causadas pelo WNV e o vírus dengue não possuem um tratamento específico. Dentro deste contexto, um aspecto importante refere-se ao desenvolvimento de antivirais contra estas infecções. Diante disto, no presente trabalho avaliou-se o efeito antiviral das dezessete 2-arilideno indan-

1,3-dionas sintetizadas (Figura 2.4, pg. 52) contra a protease NS2B-NS3 do WNV e contra o vírus DENV-1.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio de avaliação da atividade antiviral dos derivados da indan-1,3-diona **1-17** foi realizado em colaboração com os discentes de doutorado Ana Flávia Costa da Silveira Oliveira e André Silva de Oliveira, o estudante de graduação Edjon Gonçalves Santos e o professor Dr. Sérgio Oliveira de Paula do Departamento de Biologia Geral da UFV, no Laboratório de Immunovirologia Molecular (LIVM).

3.2.1. Culturas Celulares

3.2.1.1. Células

Para a realização dos experimentos foram utilizadas células VERO, que são culturas contínuas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

3.2.1.2. Meio de cultura e reagentes

O meio utilizado para o crescimento e manutenção das células foi o meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium). Este meio foi suplementado com soro fetal bovino (SFB) na proporção de 10% v/v para promoção do crescimento e 2% v/v para manutenção da linhagem celular. Para prevenir a contaminação das culturas de células por bactérias e fungos, foi adicionado ao meio 1% de PSA (10.000 U de Penicilina, 10.000 µg de Estreptomicina e 25 µg de Anfotericina B). Para a obtenção de subculturas celulares, manutenção das células e realização dos experimentos com células VERO, foi utilizado como agente dissociativo a

tripsina (tripsina de pâncreas de porco preparada em solução de EDTA 1:250 m/v), que é uma enzima proteolítica que catalisa reações de quebra de cadeia polipeptídica em determinadas sequências de aminoácidos.

3.2.2. Vírus

3.2.2.1. Cepas Virais

O vírus utilizado neste estudo é pertencente à cepa Nauru Island (DENV-1 isolado em 1974). O estoque viral foi mantido e amplificado em cérebro de camundongo neonato e titulado em células VERO.

3.2.2.2. Determinação dos títulos virais pelo método das placas de lise

O diferencial da técnica das placas de lise está na adição de um meio semi-sólido (carboximetilcelulose-CMC) que evita a formação de placas secundárias, impedindo a difusão dos vírus do lugar de origem para novos lugares, assegurando que cada placa formada no teste seja originalmente de uma partícula viral infecciosa no inoculo inicial.

Células VERO, em uma densidade de 8×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 24 poços, com meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37 °C por 48 horas. Após confluência, essas células foram infectadas com 100 µL de diluições decimais seriadas dos estoques virais (diluições de 10^{-1} a 10^{-7} v/v), em meio DMEM sem SFB (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas por 1 hora, sob agitação para uma melhor distribuição viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e foi adicionado a cada cavidade 1500 µL de uma solução CMC (carboximetilcelulose) 3% m/v em meio DMEM (duas vezes concentrado) acrescido de 2% de SFB e

1% de PSA. As placas foram incubadas por 5-6 dias. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 2 a 3 gotas do corante cristal violeta 5% m/v por 40 minutos, à temperatura ambiente, em agitador mecânico. Posteriormente, o corante foi aspirado e as placas colocadas para secar à temperatura ambiente, sendo quantificadas através da visualização de placas de lise a olho nu. Para calcular o título, foram contadas as placas de lise na última diluição que apresentou placas. O título viral foi expresso em unidades formadoras de placas/mL (UFP/ML), e, portanto, de partículas virais, já que teoricamente cada placa é iniciada pela infecção de uma única partícula viral infectante. O título viral foi calculado por meio da equação

$$TV = NP \times \frac{1}{d} \times \frac{1}{V}$$

onde:

TV = Título viral

NP = Número de placas formadas na última diluição que apresenta placas de lise

d = Última diluição viral que apresenta placas

V = Volume da diluição viral utilizada para infectar a monocamada celular.

3.2.3. Ensaio Enzimático: Inibição da protease NS2B-NS3 do WNV

Nos ensaios enzimáticos, foi utilizada a protease NS2B-NS3 do WNV, purificada e ativada, fornecida pela R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), Recombinant Viral WNV NS3 Protease (número de catálogo 2907-SE). Como substrato fluorescente foi utilizado o pERTKR-AMC (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA, número de catálogo ES013).

3.2.3.1. Triagem de inibição de protease para WNV

Com o propósito de investigar se os compostos **1-17** (Figura 2.4, pg. 52) seriam capazes de inibir a protease NS2B-NS3 do WNV, um total de 50 μL da protease NS2B-NS3 purificada (concentração final de 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$) diluída em solução tampão (50 mM Tris, 30% (v/v) glicerol, pH 9,5) foi incubada com 50 μL de solução de cada composto (concentração final de 16,6 μM , em DMSO 1% v/v) em uma placa preta de 96 poços durante 30 min a 21-22 $^{\circ}\text{C}$, antes do início da reação por adição de 50 μL do substrato na concentração de 40 μM . Um controle positivo (sem a presença do composto) foi testado na mesma placa, com 50 μL de tampão, além de um controle negativo com 1% v/v de DMSO. O branco continha 50 μL de tampão e 100 μL do substrato. A intensidade de fluorescência foi registrada continuamente em um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm usando leitor SpectraMax® M5 (Molecular Devices) de fluorescência. Os compostos com melhor eficiência de inibição enzimática foram selecionados para testes subsequentes. A análise dos resultados foi conduzida empregando-se o programa Graphpad Prism 6 utilizando o teste de comparações múltiplas one-way ANOVA.

3.2.3.2. Inibição enzimática na presença de várias concentrações das 2-arilideno indan-1,3-dionas

Com o propósito de investigar o efeito de diferentes concentrações de 2-arilideno indan-1,3-dionas frente à protease NS2B-NS3 do WNV, um total de 50 μL da protease purificada (concentração final de 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$) foi incubada com 50 μL do composto sob avaliação, 8 diluições seriadas (concentração final de 66, 33,

16, 8, 4, 2, 1 e 0,5 μM) em uma placa preta de 96 poços durante 30 minutos à temperatura de 21-22 °C antes do início da reação por adição de 50 μL do substrato para a concentração final de 40 μM . Um controle positivo sem a presença do composto foi testado na mesma placa, com 50 μL de tampão (50 mM Tris, 30% (v/v) de glicerol, pH 9,5). O branco continha 50 μL de tampão e 50 μL do substrato. A intensidade de fluorescência foi registrada continuamente em um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm usando um leitor SpectraMax® M5 (Molecular Devices). O valor de IC_{50} foi calculado utilizando o Graphpad Prism 6.

3.2.3.3. Ensaio de Cinética Enzimática na presença das 2-arilideno indan-1,3-dionas

A fim de investigar a variação da velocidade enzimática ($V_{\text{máx}}$) e K_M da WNV NS2B-NS3 protease, um total de 50 μL da NS2B-NS3-protease purificada (concentração final de 1 ng/ μL) foi incubada com 50 μL de três variadas concentrações dos compostos (concentrações finais de 8, 4 e 2 μM), em uma placa preta de 96 poços durante 30 minutos à temperatura ambiente (21-22 °C) antes do início da reação por adição de 50 μL do substrato em várias concentrações (20, 40, 60, 80 e 100mM). Um controle positivo sem o composto foi testado na mesma placa utilizando no lugar do composto 50 μL de tampão (50 mM Tris, 30% (v/v) Glicerol, pH 9,5). O Branco continha 100 μL de tampão e 50 μL do substrato. A intensidade de fluorescência foi registrada continuamente em um comprimento de onda de excitação de 360 nm e um comprimento de onda de emissão de 460 nm usando o leitor M5 de fluorescência. O valor da $V_{\text{máx}}$ e K_M foi

calculado utilizando o GraphpadPrism 6 através da Equação de Michaelis-Menten. Posteriormente foi gerado o gráfico de Lineweaver-Burke.

3.2.4. Avaliação da Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade dos compostos **14** e **17** (vide discussão adiante) foi realizada contra células VERO. Foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT, conforme proposto por MOSMANN (1983). O MTT é um sal hidrossolúvel que é incorporado pelas mitocôndrias de células viáveis e reduzido pelas desidrogenases ao sal de formazana. O sal de formazana é armazenado no citoplasma celular e solubilizado após a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) ocorrendo a formação de um produto colorido, cuja intensidade de cor é lida em espectrofotômetro a 570 nm. A absorbância obtida é diretamente proporcional ao metabolismo celular.

Uma suspensão de células VERO, contendo aproximadamente 1×10^4 células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída em uma placa de 96 cavidades por poço (100 μ L/cavidade). A placa foi incubada por 24 h, a 37 °C. Após 24 h, com a monocamada celular confluenta, o meio DMEM foi substituído por 100 μ L das diversas concentrações dos compostos teste diluídos em meio DMEM incompleto (400, 200, 100, 50, 25, 12 e 6 μ M). A placa foi incubada por 72 h a 37 °C. O meio foi, então, removido e foi adicionado 50 μ L de MTT (1 mg/ml), e novo processo de incubação ocorreu por 4 h. O meio com MTT foi removido e substituído por 100 μ L de álcool isopropílico-HCl 0,1 mol L⁻¹/cavidade, a placa foi agitada por 10 minutos e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 570 nm. A absorbância obtida foi diretamente proporcional à viabilidade celular, a qual foi calculada utilizando-se as absorbâncias das

monocamadas tratadas com material-teste, comparados ao controle celular utilizando a seguinte equação:

$$V(\%) = \frac{DO_{mt}}{DO_{cc}} \times 100$$

onde:

V(%) = Viabilidade celular em porcentagem

DO_{mt} = Densidade óptica do material testado

DO_{cc} = Densidade Óptica do Controle Celular.

Os valores de CC₅₀, ou seja, a concentração de cada substância que reduziu em 50% a viabilidade celular, foram obtidos por análise de regressão dos percentuais referentes às diferentes concentrações dos compostos. As análises foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 6 e os valores de CC₅₀ representaram a média de três experimentos independentes.

3.2.5. Avaliação da Ação Antiviral contra o vírus Dengue

Células VERO foram cultivadas em placas de 24 cavidades conforme descrito no item 3.2.2.2. Um volume de 100 µL de suspensão viral (50 – 100 UFP) foi incubado com 100 µL de variadas concentrações dos compostos sob avaliação (3, 6, 12, 25, 50 e 100 µM) e incubados a 37 °C por 1 h. O meio foi retirado por aspiração das placas e foram adicionados 100 µL da mistura de vírus e composto à monocamada celular. As placas foram incubadas por 1 hora, sob agitação para uma melhor distribuição viral. Após esse tempo, a suspensão viral misturada às variadas concentrações do composto foi aspirada e foi adicionado a cada cavidade 1500 µL de uma solução CMC 3% em meio DMEM (duas vezes concentrado) acrescido de 2% de SFB e 1% de PSA. As placas foram incubadas

por 5-6 dias. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas como descrito no item 3.2.2.2. Neste ensaio foi possível calcular o valor do EC₅₀ por meio de regressão dos percentuais de inibição referentes às diferentes concentrações dos compostos teste com o Graphpad Prism 6.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Avaliação do efeito das 2-arilideno indan-1,3-dionas contra a protease NS2B-NS3 do WNV

A avaliação da atividade dos compostos **1-17** (Figura 2.4, pg. 52) teve início determinando-se o efeito dos compostos frente à protease NS2B-NS3 do WNV. A enzima foi incubada com os compostos sob avaliação por 30 minutos; posteriormente a reação foi iniciada com a adição do substrato fluorescente pERTKR-AMC e foi realizada a leitura em Unidades Relativas de Fluorescência (RFU) em leitor de microplacas.

A Figura 3.1(pg. 85) mostra o resultado da triagem frente a protease supracitada. A concentração dos compostos foi de 16,6 µM.

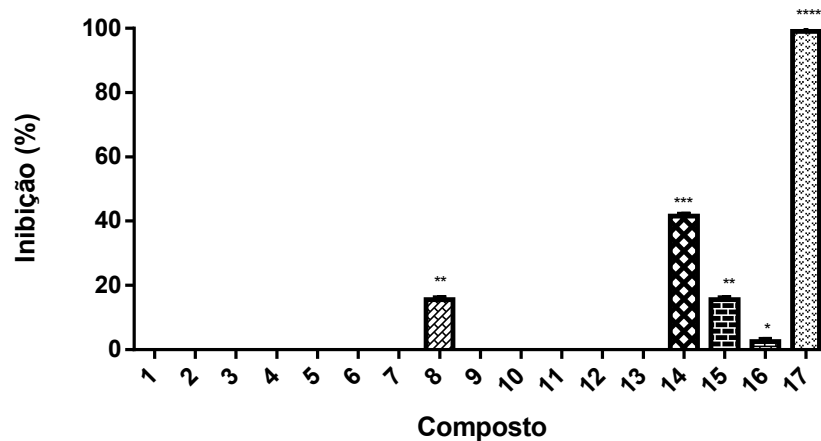


Figura 3.1 – Avaliação do efeito dos compostos 1-17 frente à protease NS2B-NS3 do WNV. Foi utilizado o teste estatístico de comparações múltiplas one-way ANOVA, com valor de $p < 0,05$.

3.3.2. Inibição enzimática na presença de várias concentrações dos compostos 14 e 17

A inibição enzimática da protease de WNV foi avaliada nas concentrações de 66, 33, 16, 8, 4, 2, 1 e 0,5 μM dos compostos **14** e **17**. Os dois compostos apresentaram inibição dose-resposta com valores de IC_{50} de 11,27 e 3,19 μM , respectivamente (Figura 3.2, pg. 86).

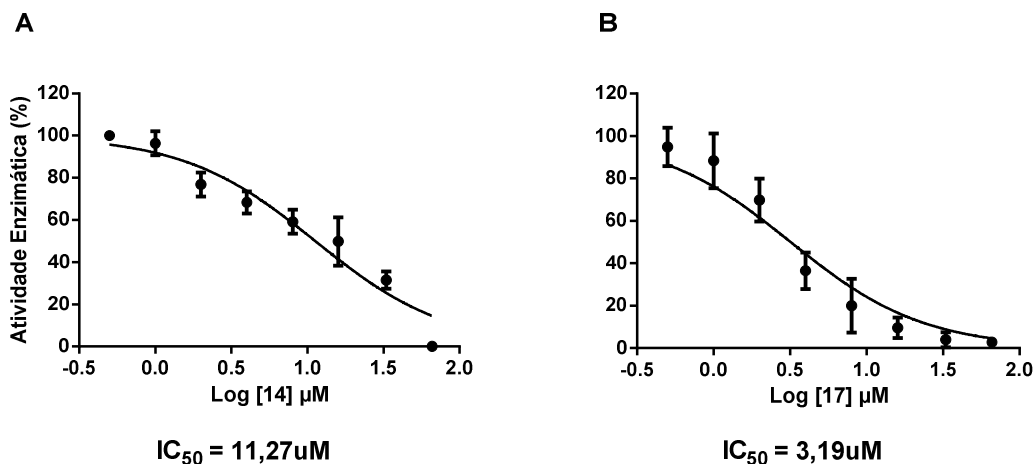


Figura 3.2 - Inibição da protease NS2B-NS3 do WNV na presença de várias concentrações dos compostos **14** (Gráfico **A**) e **17** (Gráfico **B**). O cálculo da regressão foi baseado no coeficiente de Hill. Os valores de IC_{50} são dados em μM .

3.3.3. Ensaio de cinética enzimática

O ensaio de cinética enzimática foi conduzido sob variadas concentrações de substrato (20, 40, 60, 80 e 100 μM) e três concentrações de cada composto (8, 4 e 2 μM). Foi utilizada a equação de Michaelis-Menten para que o valor de velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e K_M fossem encontrados. K_M é equivalente à concentração do substrato quando a velocidade corresponde à metade da velocidade máxima (LEHNINGER *et al.*, 2006). Posteriormente o gráfico de Lineweaver-Burk foi construído (Figura 3.3, pg. 87).

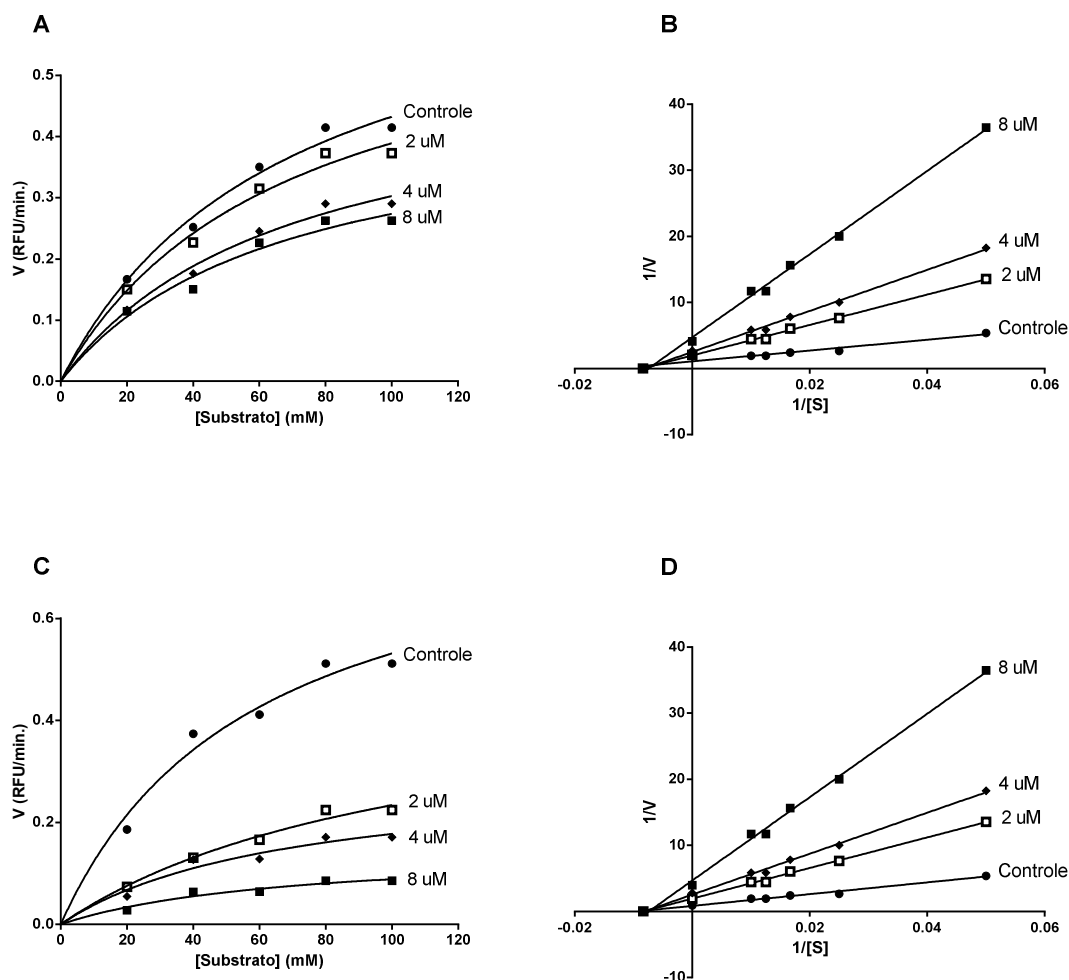


Figura 3.3 – Investigação da cinética enzimática para a protease NS2B-NS3 do WNV na presença dos compostos **14** e **17**. Em **A** e **C** estão os gráficos de Michaelis-Menten para os compostos **14** e **17**, respectivamente. Em **B** e **D** estão os gráficos de Lineweaver-Burk para os compostos **14** e **17**, respectivamente.

3.3.4. Ensaio de Avaliação de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi conduzido com concentrações diferentes dos compostos **14** e **17** (400, 200, 100, 50, 25, 12 e 6 μM). A avaliação da citotoxicidade dos compostos foi realizada contra células VERO utilizando ensaio colorimétrico do MTT.

O valor da concentração dos compostos teste que reduziu 50% da viabilidade celular (CC_{50}) foi obtido por regressão não-linear (Figura 3.4, pg. 88).

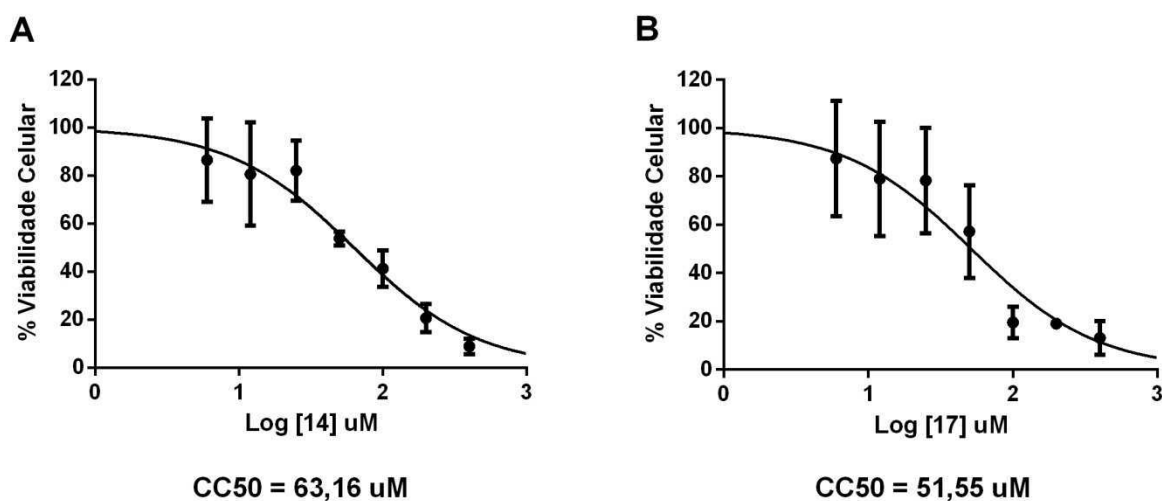


Figura 3.4 - Ensaio de citotoxicidade para os compostos **14** e **17** frente a células VERO. **A** representa a viabilidade celular para o composto **14** e **B** a viabilidade celular para o composto **17**. O cálculo da regressão teve como base o coeficiente de Hill.

3.3.5. Ensaio de avaliação de atividade antiviral contra o vírus dengue

O ensaio antiviral contra o vírus DENV-1 foi conduzido empregando-se diferentes concentrações dos compostos **14** e **17** (3, 6, 12, 25, 50 e 100 μ M), por meio de ensaio de placas de lise contra células VERO.

O valor da concentração dos compostos sob avaliação que inibiu 50% da infecção viral (EC_{50}) foi obtido por regressão não-linear, resultando, assim, na determinação do cálculo do Índice de Seletividade (IS) (Figura 3.5, pg. 89).

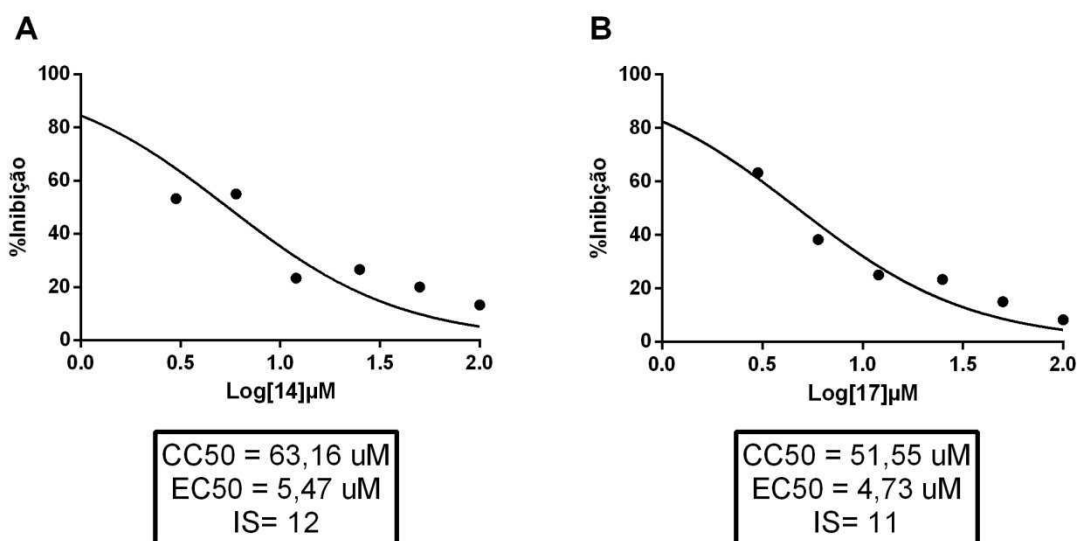


Figura 3.5 –Efeito antiviral dos compostos **14** e **17** em células VERO infectadas com o vírus DENV-1. **A** representa a inibição viral para o composto **14** e **B**, a inibição viral para o composto **17**. O cálculo da regressão para determinação do valor de EC₅₀ teve como base o coeficiente de Hill.

3.4. DISCUSSÃO

Dentre os dezessete derivados da indan-1,3-diona sintetizados (compostos **1-17**, Figura 2.4, pg. 52), os compostos **8**, **14**, **15**, **16** e **17** apresentaram comportamento inibitório da atividade enzimática, com redução de cerca de 15, 41, 16, 2 e 100%, respectivamente, para concentração de 16,6 μM do composto. Por apresentarem os melhores efeitos inibitórios, os compostos **14** (41% de inibição) e **17** (100% de inibição) foram selecionados para ensaios subsequentes.

Ao verificar as estruturas dos compostos que apresentaram atividade inibitória contra a protease NS2B-NS3 do vírus WNV, observou-se que todos eles possuem um grupo hidroxila na estrutura, seja na posição *para* ou *meta* do anel

aromático da porção arilideno, com destaque para o composto **17**, que contém grupos hidroxila nas duas posições (Figura 3.6).

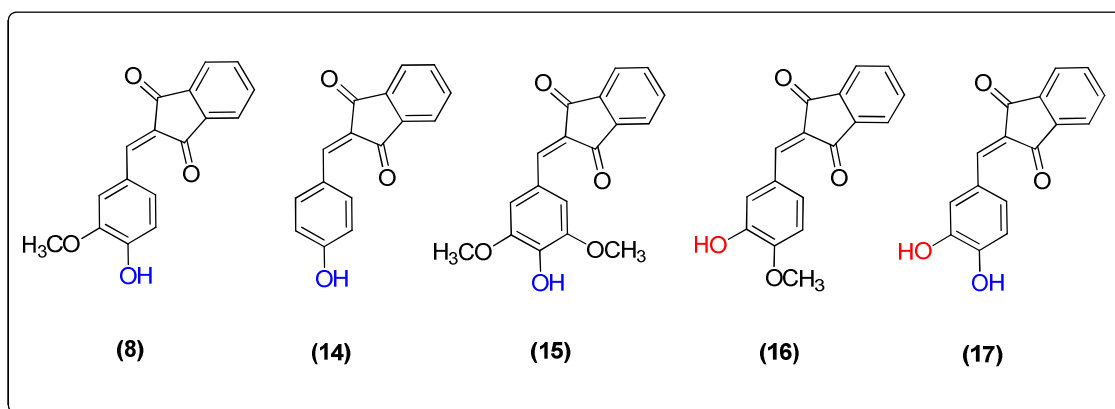


Figura 3.6 - Estruturas dos compostos que apresentaram atividade inibitória frente à protease NS2B-NS3 do WNV.

Alguns derivados da indan-1,3-diona (Figura 3.7, pg. 91) já foram descritas como inibidores de proteases virais. Liu e colaboradores (2003) relataram substâncias com atividade inibitória da protease NS3 de HCV, o Vírus da Hepatite C, que também pertence à Família *Flaviridae*. Algumas dessas substâncias contém grupos hidroxila e exibiram inibição dependente do tempo.

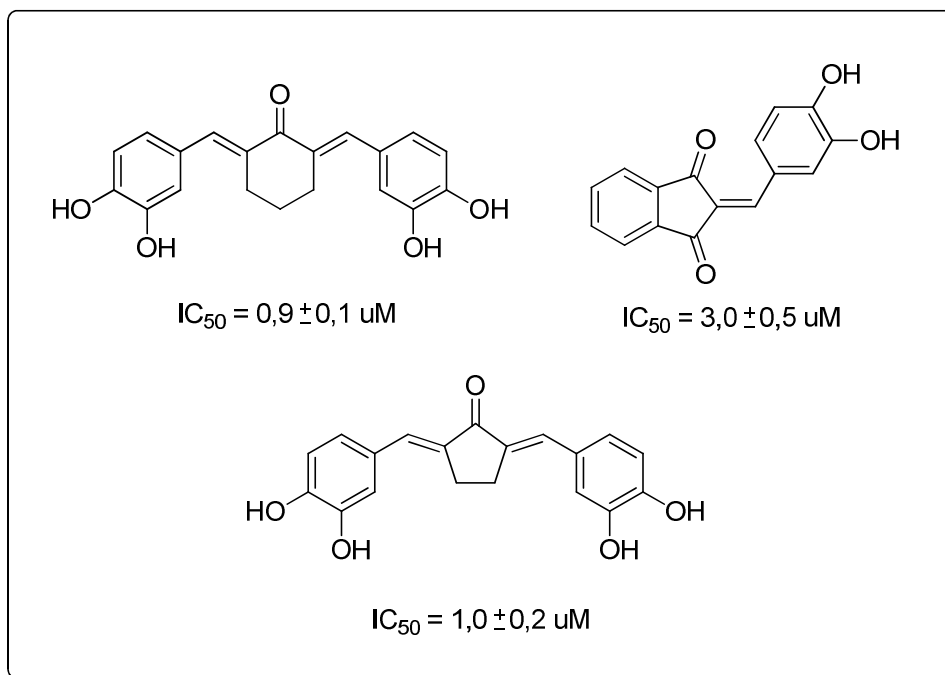


Figura 3.8 - Substâncias com atividade inibitória da enzima HIV-1 integrase.

Outro derivado da indan-1,3-diona (Figura 3.9) também foi capaz de inibir a interação entre as proteínas E1-E2 do HPV11, o vírus do papiloma humano (GOUDREAU *et al.*, 2001).

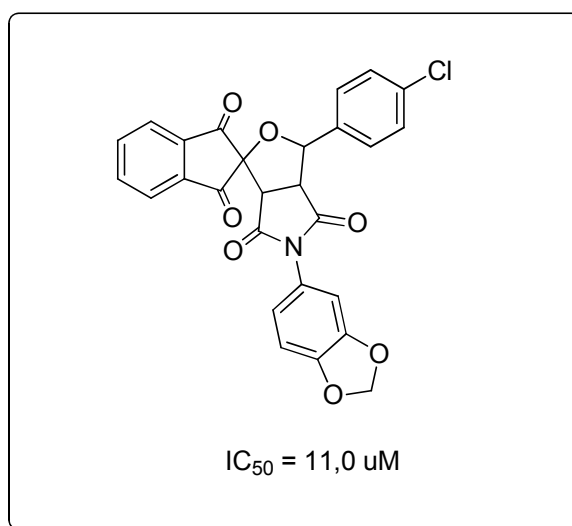


Figura 3.9 - Substância com atividade inibitória da Proteína E1-E2 do HPV.

Como pode ser observado nas Figuras 3.7, 3.8 e 3.9, os valores de IC_{50} dos compostos que apresentaram efeitos inibitórios contra proteases virais estão próximos aos valores encontrados neste trabalho, 11,27 μM para o composto **14** e 3,19 μM para o composto **17**. A inibição dos compostos **14** e **17** não foi dose dependente, apresentando inibição imediata. Esses resultados sugerem que essa classe de substâncias são importantes agentes inibitórios de proteases de vírus pertencentes à Família *Flaviridae*.

De acordo com o ensaio de cinética enzimática, os compostos **14** e **17** promoveram a diminuição significativa da velocidade máxima enzimática enquanto que o valor da K_M permaneceu inalterada. O gráfico de Lineweaver-Burk apresentou retas que se cruzam no eixo x, como pode ser visto na Figura 3.3 (pg. 87).

Esse perfil de inibição sugere uma inibição não-competitiva, na qual o inibidor pode se ligar tanto à enzima quanto ao complexo enzima-substrato. O complexo enzima-substrato-inibidor (ESI) formado, contudo, não consegue prosseguir para formar o produto. De maneira geral, o inibidor diminui a concentração da enzima funcional e o aumento na concentração do substrato não anula a inibição não-competitiva (BERG *et al.*, 2008).

O ensaio de citotoxicidade indicou valores de IC_{50} iguais a 63,16 μM para o composto **14** e 51,55 μM para o composto **17**. Esses valores indicam que os compostos apresentaram baixa toxicidade frente a células VERO. LYU *et al.* (2005) relataram a baixa toxicidade ($> 50 \mu M$) de flavonóides para a mesma linhagem celular.

O ensaio antiviral conduzido contra o vírus DENV-1 apresentou valores de EC_{50} de 5,47 e 4,73 μM e de IS de 12 e 11 respectivamente para **14** e **17**.

Para valores de índice de seletividade maiores que 4, considera-se que o composto apresenta um efeito antiviral (MULLER, 2011; LYU *et al.*, 2005).

Dada a semelhança estrutural entre DENV e WNV, alguns trabalhos já sugeriram que substâncias que fossem eficazes contra um, pudessem também ser para o outro (ELSEGINY, *et al.*, 2014; BEHNAM *et al.*, 2015). LIMA *et al.* (2015) relataram substâncias à base de tiazolidinadiona que inibiram tanto a protease do WNV quanto a de DENV.

Assim como a presença de hidroxilas foi fundamental para atividade contra a protease do WNV, TOMLINSON & WATOWICH (2012) demonstraram a participação de grupos hidroxila contra a protease de DENV. Interações significativas ocorreram entre os grupos hidroxila dos inibidores com resíduos que constituíam a tríade catalítica da protease.

Assim, os compostos que foram eficazes em inibir a protease NS2B-NS3 do WNV também apresentaram eficácia contra o vírus DENV-1. Os ensaios com os vírus DENV-2, DENV-3 e DENV-4 estão sendo realizados e os resultados obtidos até o momento indicam que esses compostos também apresentaram significativa inibição viral.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. A. X.; VIEIRA, M. A. C. S.; BORBA, A. S.; GUIMARÃES, H. C. L.; EULÁLIO, K. D.; ALBUQUERQUE-NETO, L. L.; SALMITO, M. A.; LIMA, O. B. West Nile fever in Brazil: sporadic case, silent endemic disease or epidemic in its initial stages? *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 57, p. 276, 2015.

- ARAÚJO, F.; NOGUEIRA, R.; ARAÚJO, M. S.; PERDIGÃO, A.; CAVALCANTI, L.; BRILHANTE, R.; ROCHA, M.; VILAR, D. F.; HOLANDA, S. S.; BRAGA, D. M.; SIDRIM, J. Dengue in patients with central nervous system manifestations, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.18, p. 677-679, 2012.
- ARTICO, M.; DI SANTO, R.; COSTI, R.; NOVELLINO, E.; GRECO, G.; MASSA, S.; TRAMONTANO, E.; MARONGIU, M. E.; DE MONTIS, A.; LA COLLA, P. Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl compounds as inhibitors of HIV-1 integrase: synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, p. 3948-3960, 1998.
- BEHNAM, M. A. M.; GRAF, D.; BARTENSCHLAGER, R.; ZLOTOS, D. P.; KLEIN, C. D. Discovery of nanomolar dengue and west nile virus protease inhibitors containing a 4-benzyloxyphenylglycine residue. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, p. 9354-9370, 2015.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Bioquímica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de vigilância em saúde – ministério da saúde, v. 47, p.1-10, 2016.
- CHANCEY, C.; GRINEV, A.; VOLKOVA, E.; RIOS, M. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *Biomed Research International*, 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/376230>.
- CORREA, A. P.; VARELLA, R. B. Aspectos epidemiológicos da febre do oeste do nilo. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 11, p. 463-472, 2008.

- DIAS, L. B. A.; ALMEIDA, S. C. L.; HAES, T. M.; MOTA, L. M.; RORIZ-FILHO, J. S. Dengue: transmissão, aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. *Medicina*, v. 43, p. 143-152, 2010.
- ELSEGINY, S. A.; MASSAROTI, A.; NAWWAR, G. A. M.; AMIN, K. M.; BRANCALE, A. Pointer small molecule inhibitors of west nile virus. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, v. 23, p. 179-187, 2014.
- GOUDREAU, N.; CAMERON, D. R.; DÉZIEL, R.; HACHÉ, B.; JAKALIAN, A.; MALENFANT, E.; NAUD, J.; OGILVIE, W. W.; O'MEARA, J.; WHITE, P. W.; YOAKIM, C. Optimization and determination of the absolute configuration of a series of potent inhibitors of human papillomavirus type-11 E1-E2 protein-protein interaction: a combined medicinal chemistry, NMR and computational chemistry approach. *Bioorganic&Medicinal Chemistry.*, v. 15, p. 2690-2700, 2007.
- KANG, C.; GAYEN, S.; WANG, W.; SEVERIN, R. CHEN, A. S.; LIM, H. A.; CHIA, C. S. B.; SCHULLER, A.; DOAN, D. N. P.; POULSEN, A.; HILL, J.; VASUDEVAN, S. G.; KELLER, T. H. Exploring the binding of peptidic west nile virus NS2B-NS3 protease inhibitors by NMR. *Antiviral Research*, v. 97, p. 137-144, 2013.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; SIMÕES, A. A.; LODI, W. R. N. Princípios de bioquímica, 4ª ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p. 2006.
- LIMA, A. B.; BEHNAM, M. A. M.; SHERIF, Y. E.; NITSCHKE, C.; VECHI, S. M. KLEIN, C. D. Dual inhibitors of the dengue and west nile virus NS2B-NS3 proteases: synthesis, biological evaluation and docking studies of novel peptide-hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 23, p. 5748-5755, 2015.

- LIU, Y.; SALDIVAR, A.; BESS, J.; SOLOMON, L.; CHEN, C. M.; TRIPATHI, R.; BARRETT, L.; RICHARDSON, P. L.; MOLLA, A.; KOHLBRENNER, W.; KATI, W. Investigating the origin of the slow-binding inhibition of HCV NS3 serine protease by a novel substrate based inhibitor. *Biochemistry*, v. 42, p. 8862-8869, 2003.
- LYU, S. Y.; RHIM, J. Y.; PARK, W. B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) e type 2 (HSV-2) in vitro. *Archives of Pharmacal Research*, v. 28, p. 1293-1301, 2005.
- MUELLER, N. H.; YON, C.; GANESH, V. K.; PADMANABHAN, R. Characterization of the west Nile virus protease substrate specificity and inhibitors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p. 606-614, 2007.
- MULLER. Vanessa Danielle Menjon. Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra o vírus da dengue e da febre amarela. 2011. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.
- MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, p. 699-708, 2008.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

- OLIVEIRA, A. S.; SILVA, M. L.; OLIVEIRA, A. F. C. S.; SILVA, C. C.; TEIXEIRA, R. R.; DE PAULA, S. O. NS3 and NS5 proteins: important targets for anti-dengue drug design. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 25, p. 1759-1769, 2014.
- SCHULLER, A.; YIN, Z.; CHIA, C. S. B.; DOAN, D. N. P.; KIM, H. K.; SHANG, L.; LOH, T. P.; HILL, J.; VASUDEVAN, S. G. Tripeptide inhibitors of dengue and west nile virus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Research*, v. 92, p. 96-101, 2011.
- TOMLINSON, S. M.; WATOWICH, S. J. Use of parallel validation high-throughput screens to reduce false positives and identify novel dengue NS2B-NS3 protease inhibitors. *Antiviral Research*, v. 93, p. 245-252, 2012.
- VIANA, D. V.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 16, p. 240-256, 2013.
- VIEIRA, M. A. C. S.; ROMANO, A. P. M.; BORBA, A. S.; SILVA, E. V. P.; CHIANG, J.O.; EULÁLIO, K. D.; AZEVEDO, R. S. S.; RODRIGUES, S. G.; ALMEIDA-NETO, W. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Case Report: West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. *The American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, p. 377-379, 2015.
- ZEINAD, A. K.; NOVARETTI, M. C. Z.; CHAMONE, D. A. F. Vírus do nilo ocidental – Nova ameaça à segurança transfusional? *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, p. 114-121, 2004.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E LEISHMANICIDA DAS 2-ARILIDENO INDAN-1,3-DIONAS

4.1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade nos seres humanos (GHORAB & AL-SAID, 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. São estimados mais de 20 milhões de novos casos da doença para 2025 (INCA, 2015).

A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta para a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos e os tipos mais frequentes serão os cânceres de próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%) para homens. Para as mulheres, os principais tipos de câncer serão os de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) (INCA, 2015).

A definição de câncer pode ser atribuída a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Ao se dividirem rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase) (ABC DO CÂNCER, 2011; INCA, 2016).

Os diferentes tipos de câncer podem ser agrupados em algumas categorias, que são (ONCOGUIA, 2016):

- Carcinoma – Câncer que começa na pele ou nos tecidos que revestem os órgãos internos.
- Sarcoma – Câncer que começa no osso, cartilagem, gordura, músculo, vasos sanguíneos ou outro tecido conjuntivo ou de suporte.
- Leucemia – Câncer que começa no tecido produtor de sangue, como a medula óssea.
- Linfoma e Mieloma – Cânceres que começam em células do sistema imunológico.
- Cânceres do Sistema Nervoso Central – Cânceres que começam nos tecidos do cérebro e da medula espinhal.

Existem três formas principais de tratamento do câncer: quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Elas podem ser usadas em conjunto ou não dependendo da necessidade de cada caso (ABC DO CÂNCER, 2011; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

A quimioterapia é a forma de tratamento do câncer que usa medicamentos denominados “quimioterápicos” (ou antineoplásicos) administrados em intervalos regulares, que variam de acordo com os esquemas terapêuticos. Embora importantes progressos tenham sido alcançados no desenvolvimento de novos quimioterápicos, a maioria dos medicamentos atualmente disponíveis, como o realtrixede (Tomudex[®]), o paclitaxel (Taxol[®]), cisplatina (Platinil ou Platinol[®]), dentre outros, ainda causam vários efeitos colaterais como diarreia, vômito, fraqueza, queda de cabelo, tonturas e resistência aos agentes quimioterápicos (ABC DO CÂNCER, 2011; GHORAB & AL-SAID, 2012; GAZOLLA, 2015). Portanto, há uma grande

urgência em desenvolver tratamentos mais eficazes e com medicamentos que apresentem poucos ou nenhum efeito colateral para os pacientes com câncer.

Assim como o câncer, a leishmaniose é uma doença que causa sérios danos à saúde das pessoas levando-as, algumas vezes, a óbito.

As leishmanioses estão entre as doenças tropicais de maior importância mundial, com cerca de 12 milhões de indivíduos infectados em 88 países e 360 milhões sob risco de desenvolver a infecção. No Brasil, a região Nordeste é a mais afetada pela doença (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2014; RATH *et al.*, 2003). A Figura 4.1 representa a incidência mundial de casos de leishmaniose cutânea e visceral reportados em 2014 (WHO, 2016).

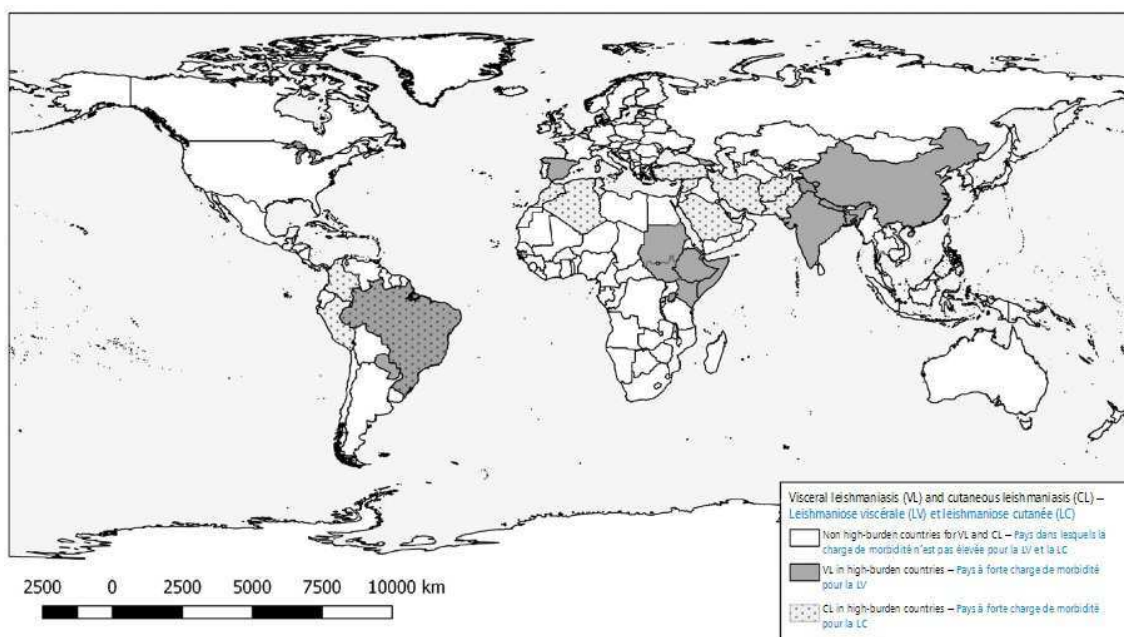


Figura 4.1 – Casos de Leishmaniose cutânea e visceral reportados em 2014.

Fonte: WHO, 2016.

A leishmaniose pode ser definida como um grupo de doenças causadas por espécies do gênero *Leishmania*, um protozoário que pertence à família *Trypanosomatidae*, sendo transmitida por insetos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (LOURENÇO, 2000). Esses protozoários são parasitas unicelulares

heteroxênicos que apresentam duas formas morfológicas no seu ciclo de vida, a promastigota e a amastigota. As formas promastigotas caracterizam-se por serem fusiformes e com longo flagelo, são extracelulares e vivem no trato digestivo do inseto vetor. As formas amastigotas, por sua vez, são arredondadas e com curto flagelo que não se exterioriza, são intracelulares e parasitam principalmente macrófagos do hospedeiro vertebrado (NAKAMURA *et al.*, 2006).

O modo de transmissão é pela picada dos vetores fêmeas que adquirem o parasito ao picar reservatórios (roedores, gambás, endentados, equinos, caninos e primatas), transmitindo-o ao homem (GUIA DE BOLSO, 2010; DUARTE *et al.*, 2010).

As manifestações clínicas desta doença dependerão das espécies de *Leishmania* e do estado imunológico do hospedeiro (Figura 4.2, pg. 103). A doença pode ser classificada como leishmaniose visceral ou tegumentar. A forma visceral ou Calazar é a mais grave, podendo atingir o fígado, o baço e a medula óssea, levando o paciente à morte. A forma tegumentar envolve três subtipos: leishmaniose cutânea, caracterizada por úlceras crônicas na pele, desenvolvidas no local da picada do inseto vetor; leishmaniose cutânea difusa, caracterizada por úlceras crônicas e disseminadas na pele, com aspecto hanseniforme e muito difíceis de curar; e leishmaniose mucocutânea, caracterizada por úlceras crônicas similares à forma cutânea, tendendo, porém, a reaparecer mesmo após cicatrização em mucosas do nariz e da boca, em geral associadas a infecções secundárias levando a destruição de grandes extensões de tecido, podendo ser extremamente mutilantes (GAZOLLA, 2015; NAKAMURA *et al.*, 2006).



Leishmaniose visceral



Leishmaniose cutânea



Leishmaniose cutânea difusa



Leishmaniose mucocutânea

Figura 4.2 – Manifestações clínicas da Leishmaniose humana.

Fonte: Organización Panamericana de la Salude, 2013.

Atualmente, os medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose no Brasil são os antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina), introduzidos como quimioterápicos desde a década de 1940, a anfotericina B e a petamidina (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2016). Infelizmente todos eles apresentam limitações com respeito aos seus custos, toxicidades elevadas e apresentam muitos efeitos colaterais (NAKAMURA *et al.*, 2006).

Uma vez que não há vacinas humanas disponíveis contra a leishmaniose, a busca por novos medicamentos, mais efetivos, de baixo custo e com efeitos colaterais menos agressivos, para substituir ou reforçar aqueles que já estão sendo utilizados é necessária e também de grande relevância.

Dentro deste contexto, avaliou-se o efeito citotóxico dos dezessete derivados da indan-1,3-diona (Figura 2.4, pg. 52) contra as linhagens celulares HL60 (leucemia mieloide aguda - LMA), Nalm6 (leucemia linfoide aguda

derivada de célula B), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e B16F10 (melanoma murino) e a atividade leishmanicida contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* GFP.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Ensaios de avaliação de citotoxicidade dos derivados 1-17

4.2.1.1. Cultivo Celular

O ensaio de avaliação da citotoxicidade dos derivados 1-17 (Figura 2.4, pg. 52) da indan-1,3-diona foi realizado em colaboração com a discente de doutorado Graziela Domingues Almeida Lima e o professor Dr. Gustavo Costa Bressan do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

As linhagens HL60 (leucemia mieloide aguda), Nalm6 (leucemia linfóide aguda do tipo B), HepG2 (hepatocarcinoma humano) e B16-F10 (melanoma murino) foram cultivadas no Laboratório de Bioquímica Celular e Bioprodutos da Universidade Federal de Viçosa. Todo o procedimento de cultivo foi realizado em condições assépticas, em capela de fluxo laminar com lâmpada ultravioleta e utilizando material estéril. As culturas celulares foram mantidas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), pH 7,2, suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB 10%), penicilina 100 UmL⁻¹ e estreptomicina 100 µg/mL a 37 °C sob tensão de 5% de CO₂.

4.2.1.2. Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT

As atividades citotóxicas dos compostos foram avaliadas segundo o método MTT. O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), um sal amarelo, para o sal de cor azul formazana, pela atividade da enzima

succinildesidrogenase presente na mitocôndria no citoplasma de células viáveis, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células metabolicamente ativas (RODRIGUES, 2015).

As linhagens celulares HL60 (6×10^4 células), Nalm6 (6×10^4 células), HepG2 (3×10^4 células) e B16-F10 (1×10^4 células) foram semeadas em placas de 96 poços, 100 μ L/poço em meio RPMI 1640 (10% SFB) por 24 horas. Em seguida, os compostos avaliados foram adicionados em diferentes concentrações (200; 150; 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 μ M) e as células foram incubadas a 37 °C sob tensão de 5% de CO₂ por 48 horas. Após o período de incubação, 10 μ L de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço, sendo as células incubadas por mais 4 horas a 37 °C. Posteriormente, o meio foi removido e foram adicionados 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço, sendo a placa novamente incubada a 37 °C por 20 minutos. A absorbância foi lida em comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro. Cada análise foi realizada em triplicata e os resultados foram normalizados considerando as culturas tratadas apenas com 0,4% de DMSO.

Os valores de IC₅₀ foram obtidos usando o software GraphPadPrism versão 6.1. Os compostos na concentração de 200 μ M que apresentaram efeito inibitório menor que 10% foram considerados não ativos (NA).

4.2.2. Ensaio de avaliação de atividade leishmanicida

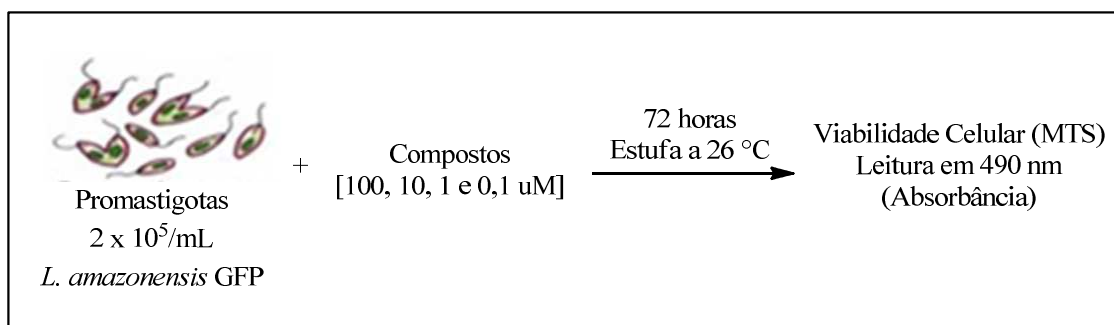
O ensaio de avaliação da atividade leishmanicida dos derivados da indan-1,3-diona **1-17** foi realizado em colaboração com o Dr. Wallace Pacienza Lima do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), na Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

4.2.2.1. Parasitos e Reagentes

Os parasitos, formas promastigota de *L. amazonenses* (P-5) foram cultivadas em meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino a 26 °C. O reagente utilizado foi o MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] e PMS (fenazinametossulfato), que é um agente acoplador de elétrons. Foram preparadas soluções-estoque dos compostos na concentração de 100 mM em DMSO e armazenadas em geladeira a -20°C.

4.2.2.2. Metodologia

Uma quantidade de 2×10^5 promastigotas de *L. amazonensis* GFP /mL foram colocadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações dos compostos (100, 10, 1 e 0,1 µM) e deixadas em estufa à temperatura de 26 °C. Como controle positivo foi utilizado a pentamidina nas mesmas concentrações e como controle negativo o meio de cultura sem a presença do composto. Após 72 horas, a viabilidade dos parasitos foi avaliada pelo método colorimétrico MTS. O MTS é reduzido pelas enzimas mitocondriais, formando cristais de formazana e sua concentração é quantificada por densidade óptica. Portanto, células viáveis têm maior atividade enzimática e tem uma maior produção desses cristais. Para esse método é necessário o preparo do reagente no momento do uso, seguindo uma proporção de 5:1 (MTS:PMS). O tempo de incubação foi de 3 horas e a leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490 nm. O esquema do protocolo é apresentado a seguir (Esquema 4.1, pg. 107).



Esquema 4.1 – Esquema do protocolo do ensaio de avaliação da atividade leishmanicida.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Avaliação da citotoxicidade dos derivados 1-17

Os compostos derivados da indan-1,3-diona **1-17** foram avaliados contra as linhagens HL60 (leucemia mieloide aguda - LMA), Nalm6 (leucemia linfóide aguda derivada de célula B), HepG2 (carcinoma hepatocelular) e B16F10 (melanoma murino). A Tabela 4.1 (pg. 108) apresenta os valores de IC₅₀ obtidos quando diferentes linhagens celulares foram tratadas por 48 horas com as substâncias **1-17**. De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.1, os compostos **1-17** apresentaram baixa eficiência (valores de IC₅₀ ≥ 118,70 μM) na inibição da viabilidade celular das linhagens HepG2 (carcinoma hepatocelular) e B16-F10 (melanoma murino). No que tange às linhagens HL-60 e Nalm6, os compostos apresentaram maior eficiência na inibição da viabilidade celular (os valores de IC₅₀ são, de modo geral, menores do que aqueles observados para as linhagens HepG2 e B16F10). No entanto, pode-se dizer que as atividades observadas são moderadas.

Tabela 4.1 - Valores de IC₅₀ (µM) obtidos para os derivados da indan-1,3-diona 1-17

Composto	HL60	Nalm6	HepG2	B16-F10
1	47,88	42,76	>200	144,60
2	61,79	80,19	>200	>200
3	45,08	46,58	184,60	118,70
4	41,99	33,92	>200	>200
5	71,85	66,76	>200	>200
6	111,60	88,90	>200	NA
7	126,90	>200	>200	>200
8	>200	NA	NA	NA
9	189,30	>200	>200	>200
10	45,10	27,30	135,40	NA
11	NA	NA	>200	>200
12	43,97	36,51	>200	>200
13	>200	NA	>200	NA
14	103,30	>200	>200	NA
15	>200	31,08	>200	NA
16	133,00	73,89	NA	>200
17	110,20	120,70	NA	>200

Dados normalizados frente a células tratadas com DMSO 0,4%. Não Ativo (NA): efeito inibitório <10% a 200 µM.

As melhores atividades inibitórias foram observadas frente à linhagem Nalm 6. Neste caso, os valores de IC₅₀ determinados foram 33,92; 27,30; 36,51 e 31,08 µM para os compostos **4**, **10**, **12** e **15**, respectivamente (Tabela 4.1 e Figura 4.3, pg. 109).

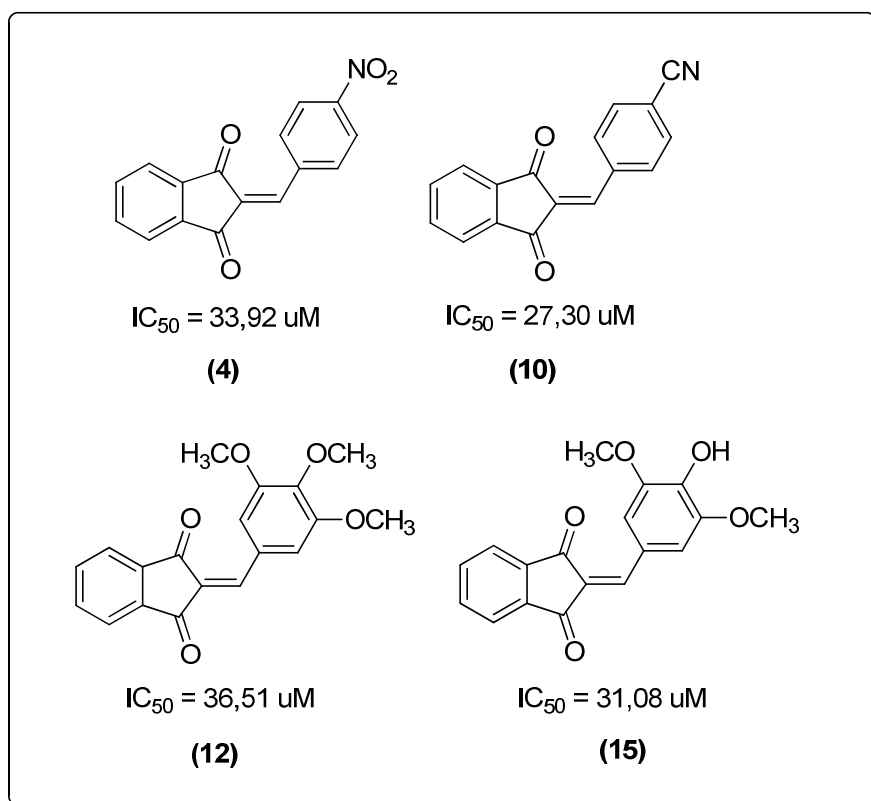


Figura 4.3 – Compostos com menores valores de IC_{50} contra a linhagem Nalm6.

Em termos de estrutura atividade, observa-se que os compostos mais ativos ou apresentam grupos metoxila ligados ao anel aromático da porção arilideno (caso dos compostos **12** e **15**) ou possuem grupos retiradores de elétrons (compostos **4** e **10**). Com respeito aos compostos **12** e **15** deve ser observado que a presença do grupo hidroxila não alterou de forma significativa a atividade biológica.

Deve ser salientado que em um estudo realizado por PATI *et al.* (2007) com compostos modificados a partir de 2-arilideno indan-1-ona, observou-se que compostos apresentando substituintes retiradores de elétrons apresentaram valores de IC_{50} da ordem de 7-8 μM contra linhagens de célula Molt4/C8 (Leucemia linfoblástica aguda T). No presente estudo, os compostos

contendo os grupos retiradores de elétrons apresentaram valores de IC_{50} da ordem de 30 μM .

Contudo, outros derivados da indan-1,3-diona já foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica (LIU *et al.*, 2014) contra a linhagem K562 (leucemia) apresentando valores de IC_{50} (Figura 4.4) menores do que os encontrados neste trabalho. Sendo assim, modificações estruturais nas moléculas avaliadas na presente investigação podem potencializar a atividade citotóxica das mesmas.

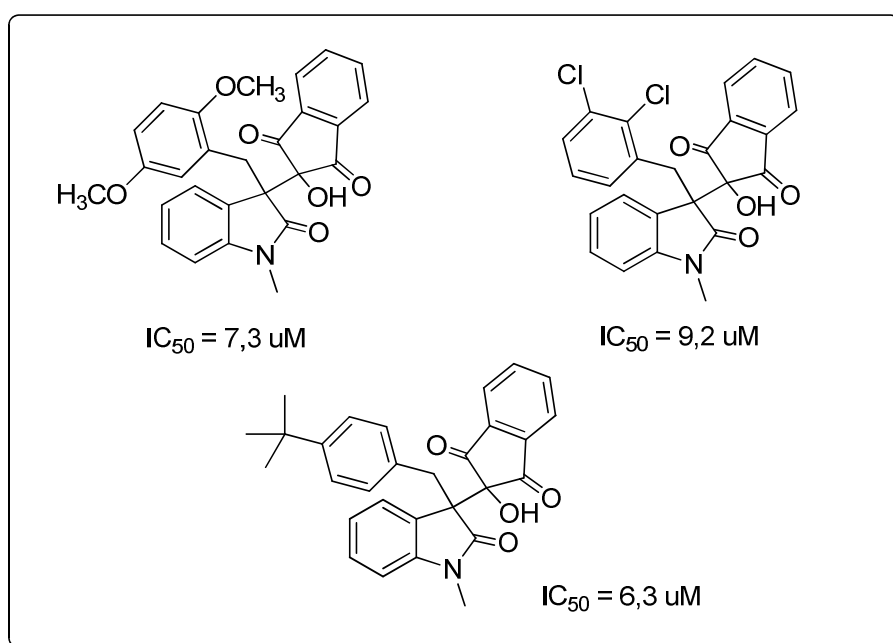


Figura 4.4 – Derivados da indan-1,3-diona com atividade inibitória contra células K562 descritas por (LIU *et al.*, 2014).

As representações gráficas do perfil dose-resposta das substâncias analisadas estão representadas nas Figuras 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 (pg. 111 – pg. 113), a seguir.

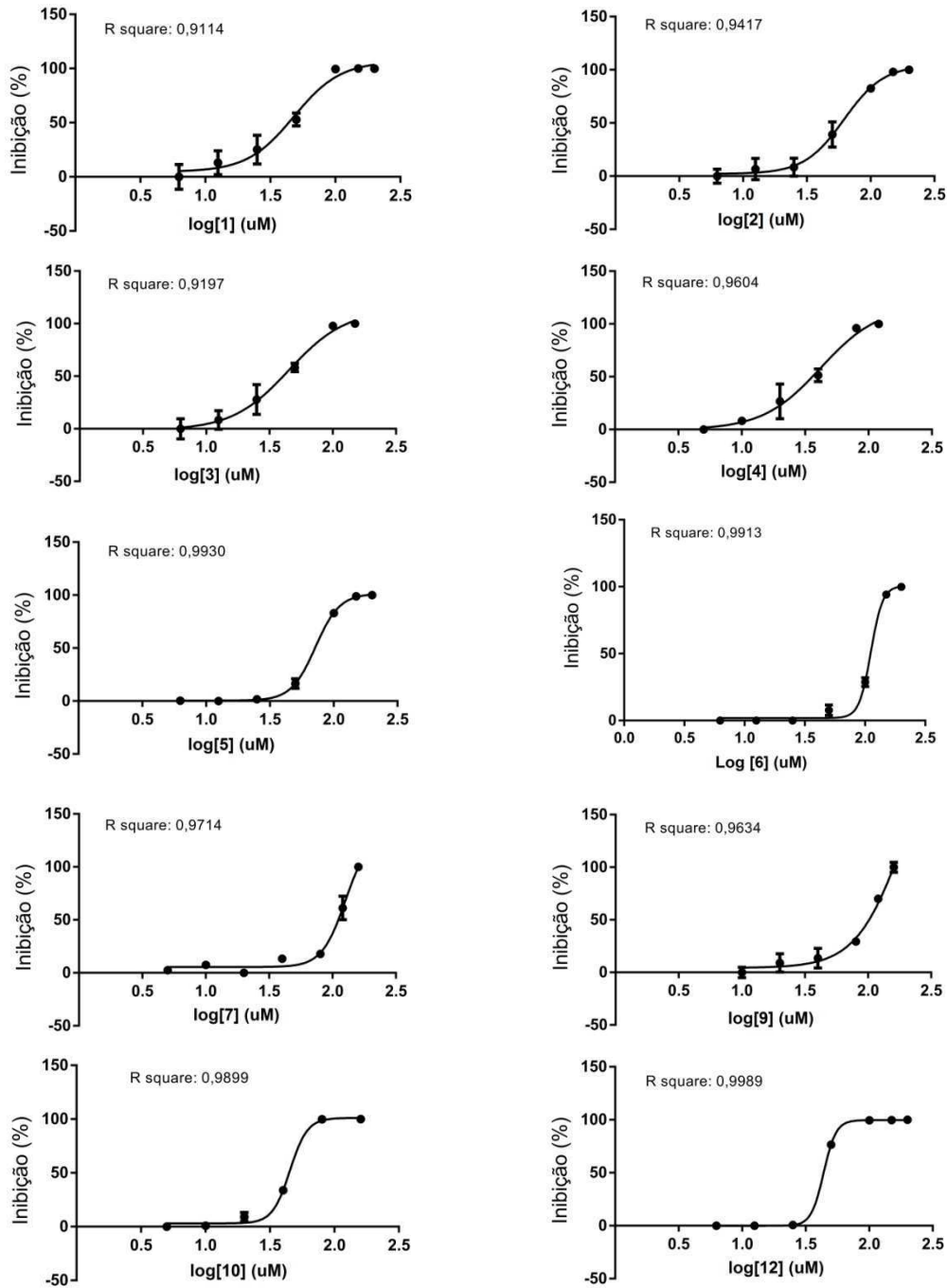


Figura 4.5 – Perfil dose-resposta dos compostos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 14, 16 e 17 frente à linhagem HL60.

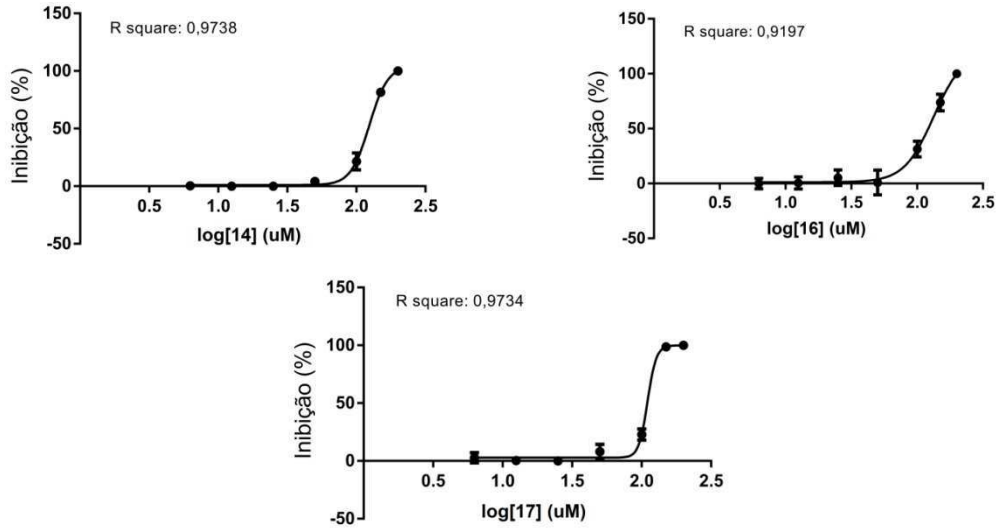


Figura 4.5 – Continuação

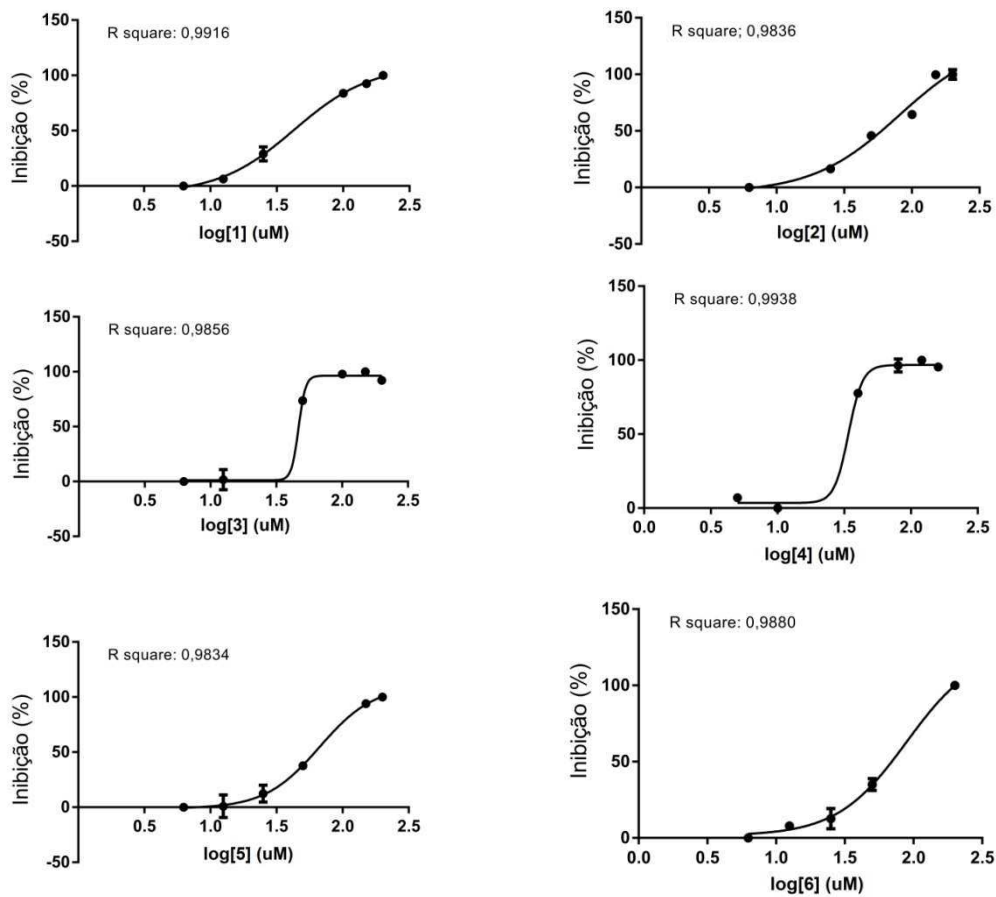


Figura 4.6 – Perfil dose-resposta dos compostos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 15, 16 e 17 frente à linhagem Nalm6.

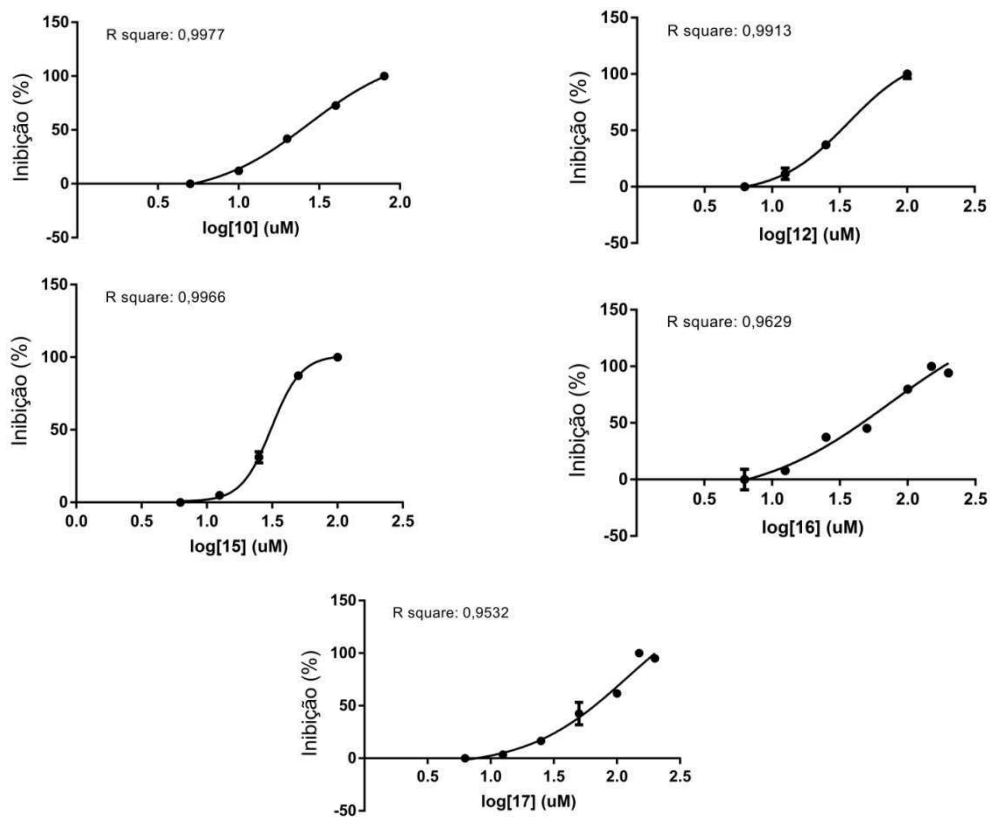


Figura 4.6 – Continuação

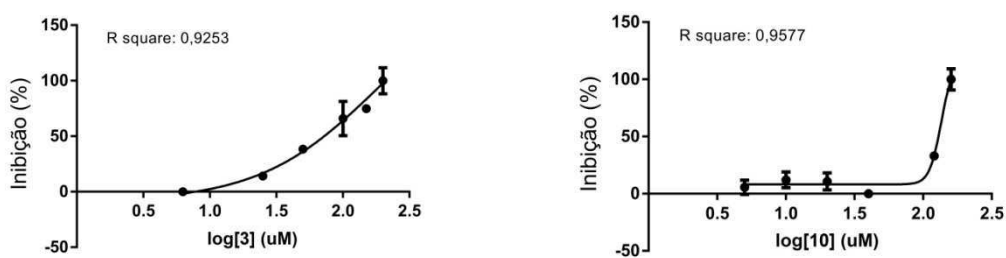


Figura 4.7 – Perfil dose-resposta dos compostos **3** e **10** frente à linhagem HepG2.

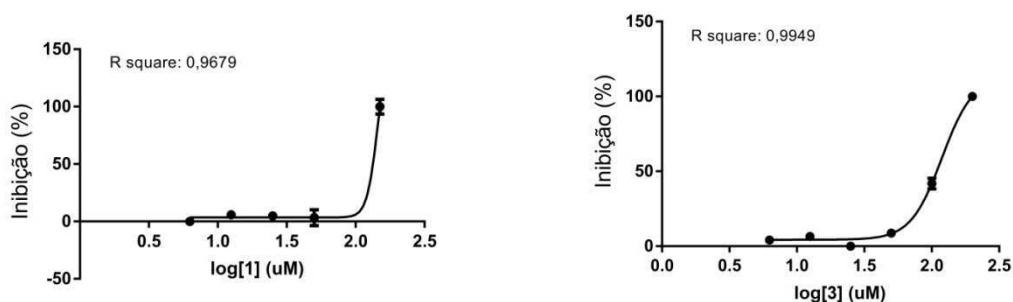


Figura 4.8 – Perfil dose-resposta dos compostos **1** e **3** frente à linhagem B16-F10.

4.3.2. Atividade antileishmanial dos derivados 1-17

Os derivados da indan-1,3-diona foram avaliados contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* GFP. A *L. amazonensis* é uma espécie que causa a leishmaniose cutânea (LC), na qual varia de pequenos nódulos cutâneos até a destruição dos tecidos (DOS SANTOS *et al.*, 2011).

A Tabela 4.2 (pg. 114) apresenta os valores de IC₅₀ obtidos após o tratamento da forma promastigota de *L. amazonensis* com diferentes concentrações dos compostos **1-17**. De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.2, os compostos, de maneira geral, apresentaram valores de IC₅₀ acima de 40 µM. As substâncias **4** e **15** (Figura 4.9, pg. 115) são exceções à esta generalização e apresentaram valores de IC₅₀ iguais a 16,6 e 24,8 µM, respectivamente. Ainda não foram relatados na literatura trabalhos envolvendo a indan-1,3-diona (e seus derivados) e avaliação da atividade leishmanicida, de modo que os resultados apresentados aqui são inéditos.

Tabela 4.2 - Valores de IC₅₀ (μM) obtidos para os derivados da indan-1,3-diona

Composto	IC₅₀ (μM)
1	49,0 ± 0,2
2	65,7 ± 0,1
3	44,9 ± 0,2
4	16,6 ± 0,2
5	80,9 ± 0,2
6	80,7 ± 0,1
7	125 ± 0,1
8	242 ± 0,3
9	197 ± 0,1
10	63 ± 0,1
11	1.618 ± 0,
12	81,1 ± 0,1
13	227 ± 0,2
14	67,6 ± 0,2
15	24,8 ± 0,3
16	83,1 ± 0,1
17	147 ± 0,2

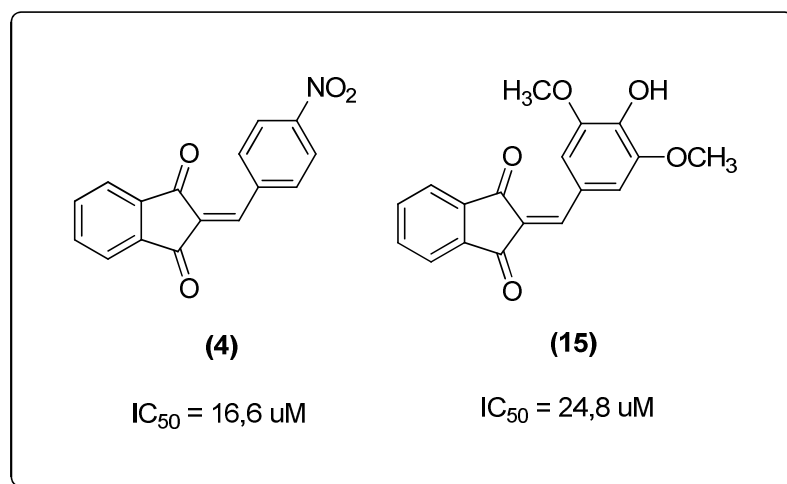


Figura 4.9 – Estruturas dos compostos que apresentam os melhores efeitos antileishmanial.

Enquanto o composto **4** apresenta um grupo retirador de elétrons na porção arilideno, a substância **15** possui grupos doadores (metoxila e hidroxila).

Algumas chalconas foram analisadas quanto à atividade antileishmania e apresentaram significativa atividade leishmanicida (BOECK *et al.*, 2006). O composto que mais se destacou apresentou um $IC_{50} = 0,7 \pm 0,1 \mu M$ contra a forma promastigota de *L. amazonensis* (Figura 4.10).

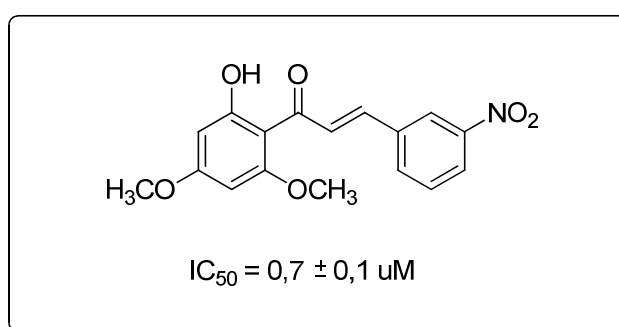


Figura 4.10 – Chalcona com atividade leishmanicida.

Neste composto estão presentes os grupos metoxila, hidroxila e nitro que, provavelmente, foram fundamentais para a atividade observada, principalmente a presença do grupo nitro.

Os nitrocompostos já foram utilizados em muitas classes terapêuticas e atualmente possuem várias aplicações clínicas, como antianginosos, anti-hipertensivos, anticoagulantes, antiinflamatórios, antibacterianos, antineoplásicos e antiparasitários (PAULA *et al.*, 2009; BOSQUESI *et al.*, 2008). A Figura 4.11 ilustra as estruturas de alguns nitrocompostos utilizados em tratamentos de doenças.

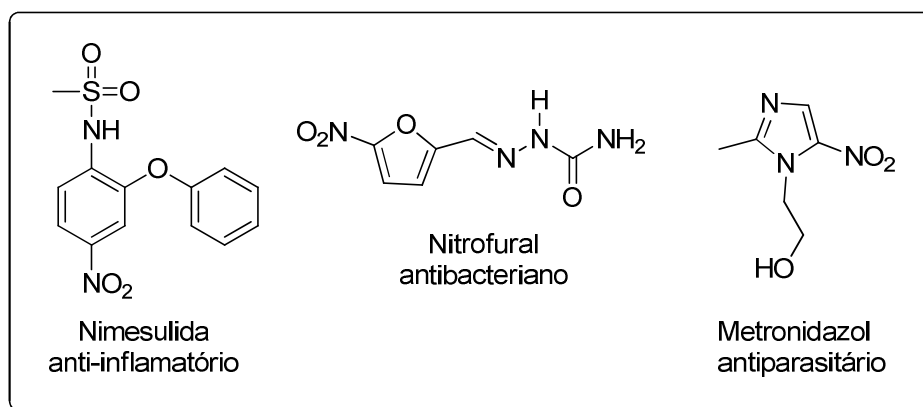


Figura 4.11 – Nitrocompostos utilizados no tratamento de doenças.

Algumas classes de nitrocompostos apresentam interesse biológico mais pronunciado como os nitrotiofênicos e nitrofurânicos, que são empregados no tratamento de, por exemplo, doenças causadas por *Leishmania sp*, *Trypanosoma sp*, *Plasmodium falciparum* entre outros (PAULA *et al.*, 2009).

A maioria dos nitrocompostos com ação antineoplásica, antiparasitária e antibacteriana apresentam o processo de biorredução enzimática do grupo nitro como provável mecanismo de ação ($\text{Ar-NO}_2 \rightarrow \text{Ar-NH}_2$), sendo este imprescindível para a atividade biológica (PAULA *et al.*, 2009).

Devido ao grande espectro de ação dos grupos nitro presentes em compostos bioativos, ele é denominado *parasitóforo* (PETRI *et al.*, 2015).

Diante disto, a melhor atividade apresentada para o composto **4** contra a forma promastigota de *L.amazonensis*, pode estar relacionada à presença do grupo nitro na molécula. Os ensaios contra a forma amastigota ainda estão sendo realizados.

As representações gráficas do percentual de crescimento obtida na análise encontram-se na figura a seguir (Figura 4.12).

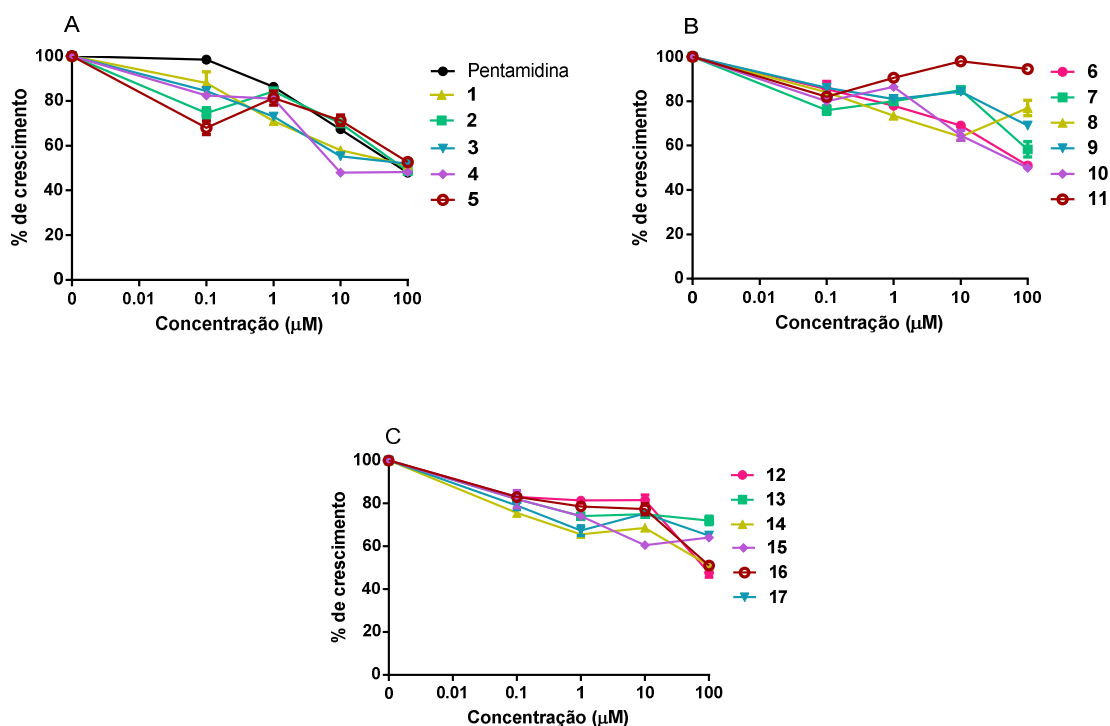


Figura 4.12 – Percentual de crescimento obtidos durante a avaliação da atividade leishmanicida. Em A, controle positivo e compostos **1** a **5**. Em B, compostos **6** a **11** e em C, compostos **12** a **17**.

4.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABC DO CÂNCER. Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. Ministério da Saúde - INCA. Rio de Janeiro, 128 p., 2011.

- BOECK, P.; FALCÃO, C. A. B.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; FILHO, V. C.; SANTOS, E. C. T.; BERGMANN, B. R. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 1538-1545, 2006.
- BOSQUESI, P. L.; ALMEIDA, A. E.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; SANTOS, J. L.; CHUNG, M. C. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicadas*, v. 29, p. 231-238, 2008.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N.N., MADEIRA, S. V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E.A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da universidade federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, v. 2, p. 47-58, 2010.
- DOS SANTOS, A. O.; COSTA, M. A.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, M. M. S.; NAKAMURA, C. V. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaíba oil in mice. *Experimental Parasitology*, v. 129, p. 145-151, 2011.
- DUARTE, I. R. M.; ARRUDA, C.C. P.; ANDRADE, A. R. O.; NUNES, V. L. B.; SOUZA, A. I.; DOURADO, D. M.; COSTA, S. C. G. Comportamento biológico de *Leishmania (L) amazonensis* isolada de um gato doméstico (*Felis catus*) de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 39, p. 33-40, 2010.
- GAZOLLA, Poliana A. R. Síntese e avaliação das atividades citotóxica e leishmanicida de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-

- triazólicos.2015. 260f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)- Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- GHORAB, M. M.; AL-SAID, M. Anticancer activity of novel indenopyridine derivatives. *Archives of Pharmacal Research*, v. 35, p. 987-994, 2012.
- GUIA DE BOLSO. Doenças infecciosas e parasitárias. Ministério da Saúde. 8ª ed., 2010.
- INCA. Estimativa 2016 – Incidência de câncer no Brasil. Ministério da saúde. Rio de Janeiro, 122 p., 2015.
- INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- LIMA JUNIOR, J. A. C.; COSTA, G. C.; REIS, A. S.; BEZERRA, J. L.; PATRICIO, F. J. B.; SILVA, L. A.; AMARAL, F. M. M.; NASCIMENTO, F. R. F. Inibição da infecção *in vitro* de macrófagos por *Leishmania amazonensis* por extração e frações de *Chenopodium ambrosioides* L. *Revista Ciência e Saúde*, v. 16, p. 46-53, 2014.
- LIU, X. L.; PAN, B. W.; ZHANG, W. H.; YANG, C.; YANG, J.; SHI, Y.; FENG, T. T.; ZHOU, Y.; YUAN, W. C. A highly efficient and eco-friendly method for synthesis of 1,3-indandione ring-fused 3-oxindoles bearing two contiguous quaternary stereocenters via aldol reaction in aqueous media. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 13, p. 601-611, 2014.
- LOURENÇO. Cecília de Oliveira. Avaliação da atividade de diferentes venenos de serpentes, nativos ou irradiados, com radiação gama de ^{60}Co , quanto ao poder inibitório do crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

2000. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) – Curso de Pós-Graduação em Ciências. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper Regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallecens* (C. DC.) Yunck. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 61-66, 2006.

ONCOGUIA. Instituto. Disponível em <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

ORAGANIZATION PANAMERICANA DE LA SALUDE. Leishmaniasis em las Américas: recomendaciones para El tratamiento. Washington, D. C.: OPS, 2013.

PATI, H. N.; DAS, U.; CLERCQ, E.; BALZARINI, J.; DIMMOCK, J. R. Molecular modifications of 2-arylidene-1-indanones leading to increased cytotoxic potencies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 37-42, 2007.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Química Nova*, v. 32, p. 1013 - 1020, 2009.

PETRI, Simone Carolina Soares. Efeitos de derivados nitro heterocíclicos sintéticos sobre formas promastigotas e amastigotas intracelular de *Leishmania (Leishmania) infantum*. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Medicina. Universidade de São Paulo. São Paulo.

- RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, v. 26, p. 550-555, 2003.
- RODRIGUES. Michelle Peixoto. Síntese e avaliação de bioatividades de derivados do ácido cinâmico contendo o núcleo 1,2,3-triazólico. 2015. 259f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- SILVA, S. C. S. P.; BERL, F. P.; TAVARES, L. C.; SOARES, S. R. C.; LINDOSO, J. A. L. Effects of nitro-heterocyclic derivatives against *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes and intracellular amastigotes. *Experimental Parasitology*, v. 163, p. 68-75, 2016.
- WHO. Weekly epidemiological Record. *World Health Organization*, v. 91, p. 285-296, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente investigação resultou no desenvolvimento de uma nova metodologia de condensação de Knoevenagel. O referido processo consiste na reação entre diferentes aldeídos e a indan-1,3-diona, sendo catalisado por $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$. Aldeídos contendo grupos doadores e retiradores de elétrons foram empregados nas sínteses. A metodologia apresenta como importantes vantagens o fato de ser ambientalmente benigna, uma vez que utiliza água como solvente, utilizar um catalisador de baixo custo e de fácil manipulação, além de não requerer precauções especiais (como por exemplo uso de solventes anidros ou atmosfera de nitrogênio) para sua execução. O processo de Knoevenagel descrito neste trabalho forneceu uma série de dezessete 2-arilideno inda-1,3-dionas com rendimentos sinteticamente úteis e tempos de reação variando de 10 minutos a 45 minutos.

Os ensaios de avaliação de atividade antiviral contra a protease NS2B-NS3 do WNV e também contra o vírus DENV-1 revelaram que dentre os dezessete compostos sintetizados dois deles (**14** e **17**) apresentaram efeitos significativos na inibição desta protease e do vírus dengue. Em termos de estrutura-atividade, ficou evidente o importante papel dos grupos hidroxila ligados à porção arilideno com respeito à resposta biológica.

Os ensaios de avaliação das atividades citotóxica e leishmanicida dos compostos sintetizados mostraram que algumas substâncias (**4**, **10**, **12** e **15**) tiveram efeitos moderados sobre a linhagem Nalm6 e contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*. Embora as atividades tenham sido moderadas, alterações estruturais nas substâncias podem resultar em melhoria das atividades observadas.

Diante de todos os resultados alcançados, pode-se concluir que o desenvolvimento do trabalho resultou na obtenção de compostos que podem ser explorados como modelos para o desenvolvimento de novos agentes antivirais e quimioterápicos para o tratamento do câncer e da leishmaniose.

ANEXOS

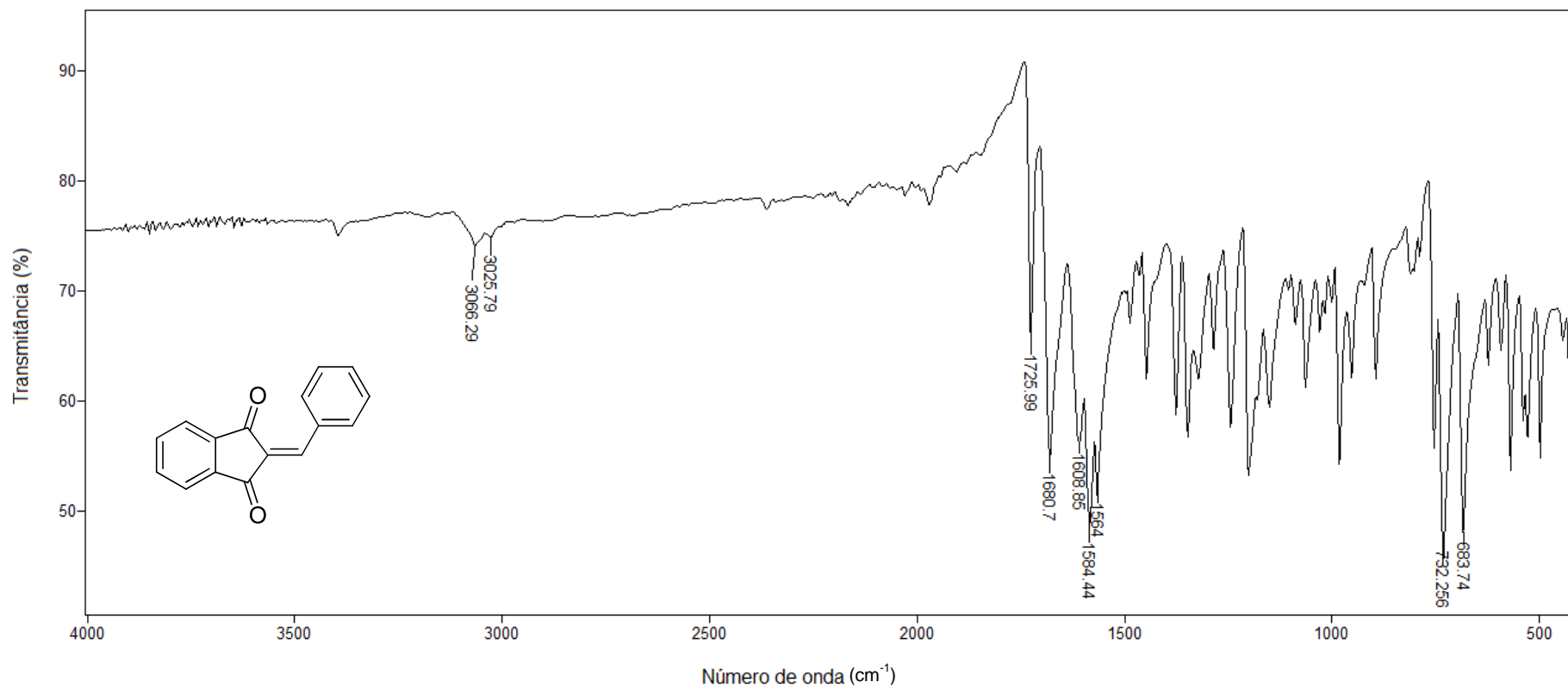


Figura 1 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 2.

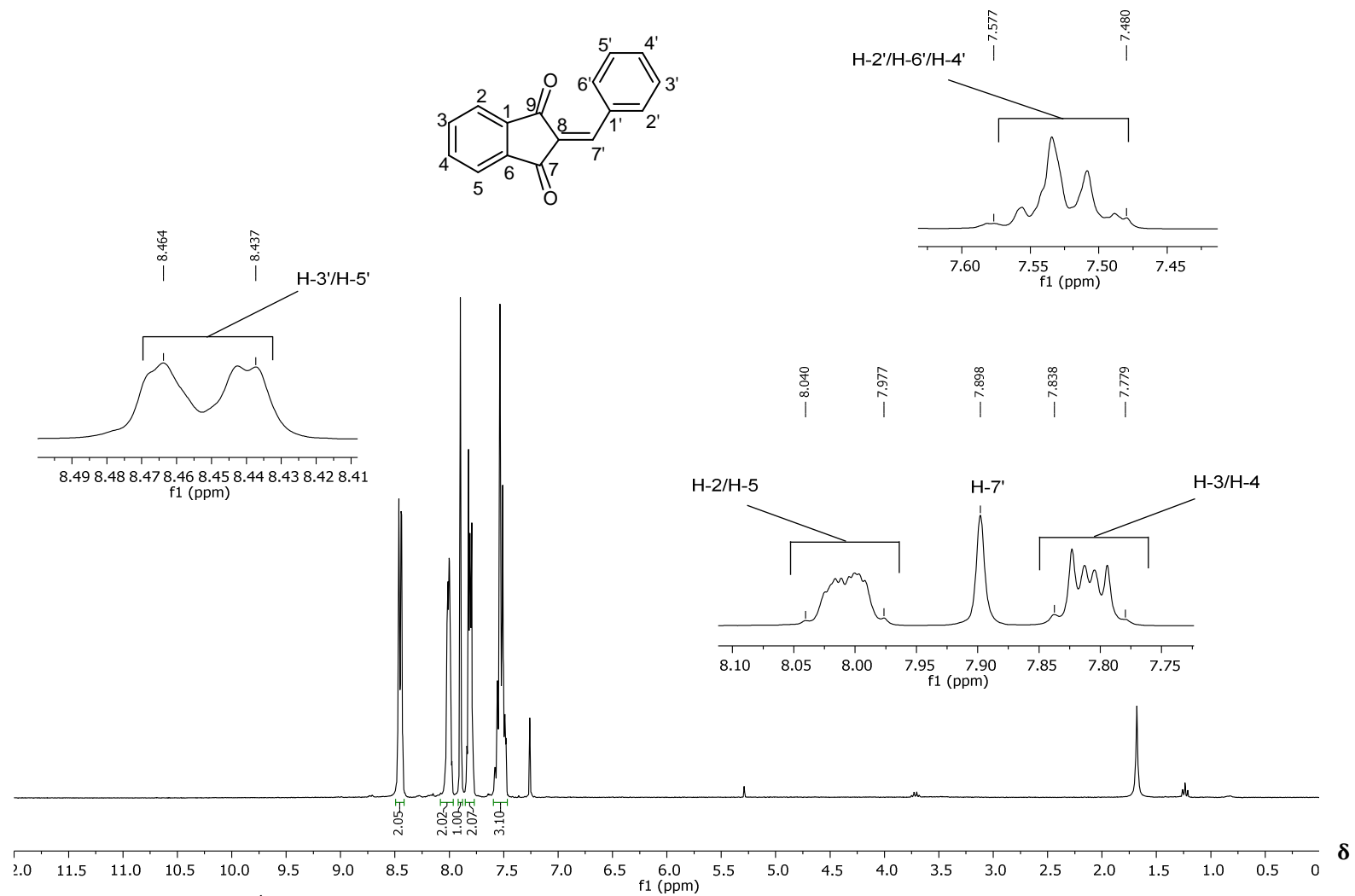


Figura 2 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **2**.

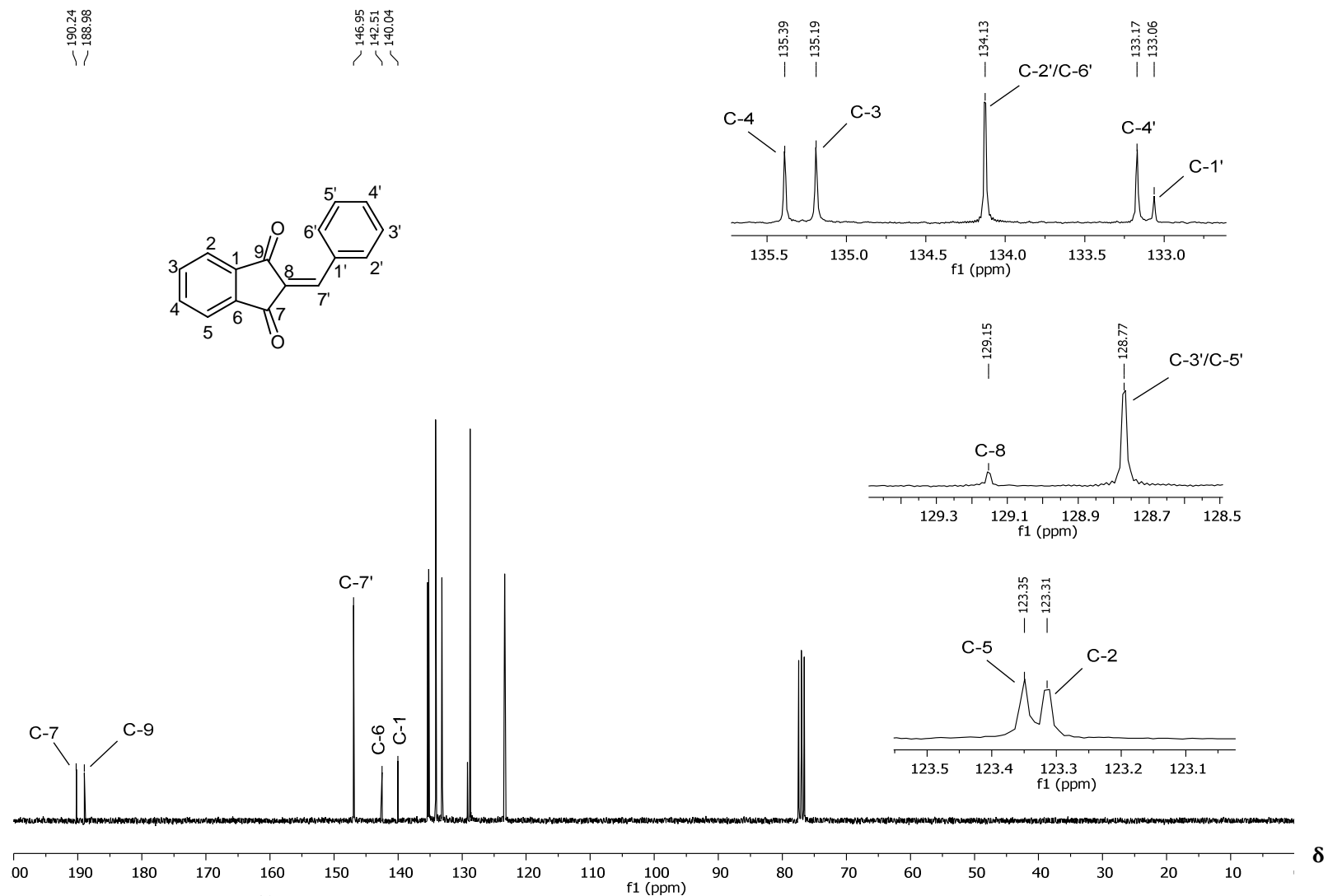


Figura 3 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 2.

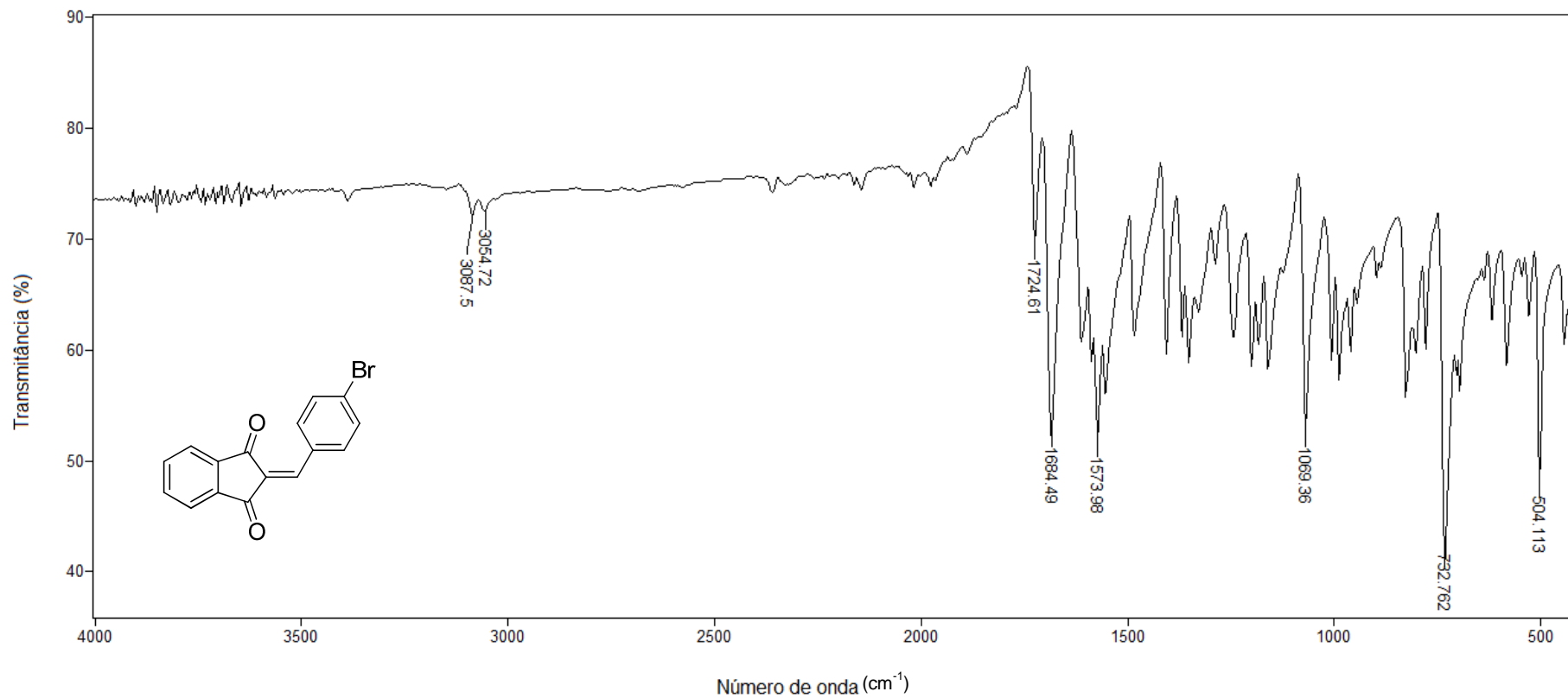


Figura 4 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3**.

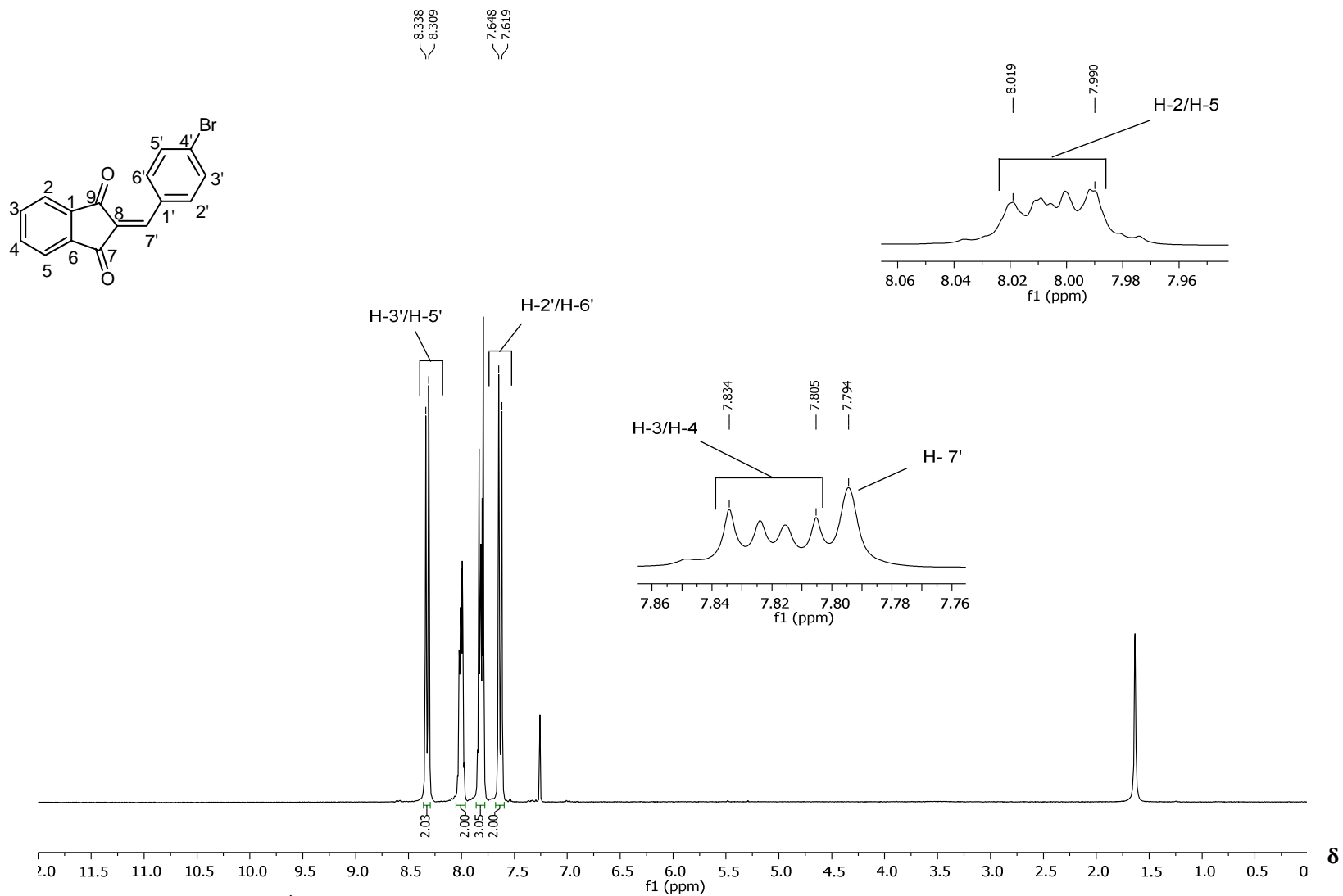


Figura 5 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **3**.

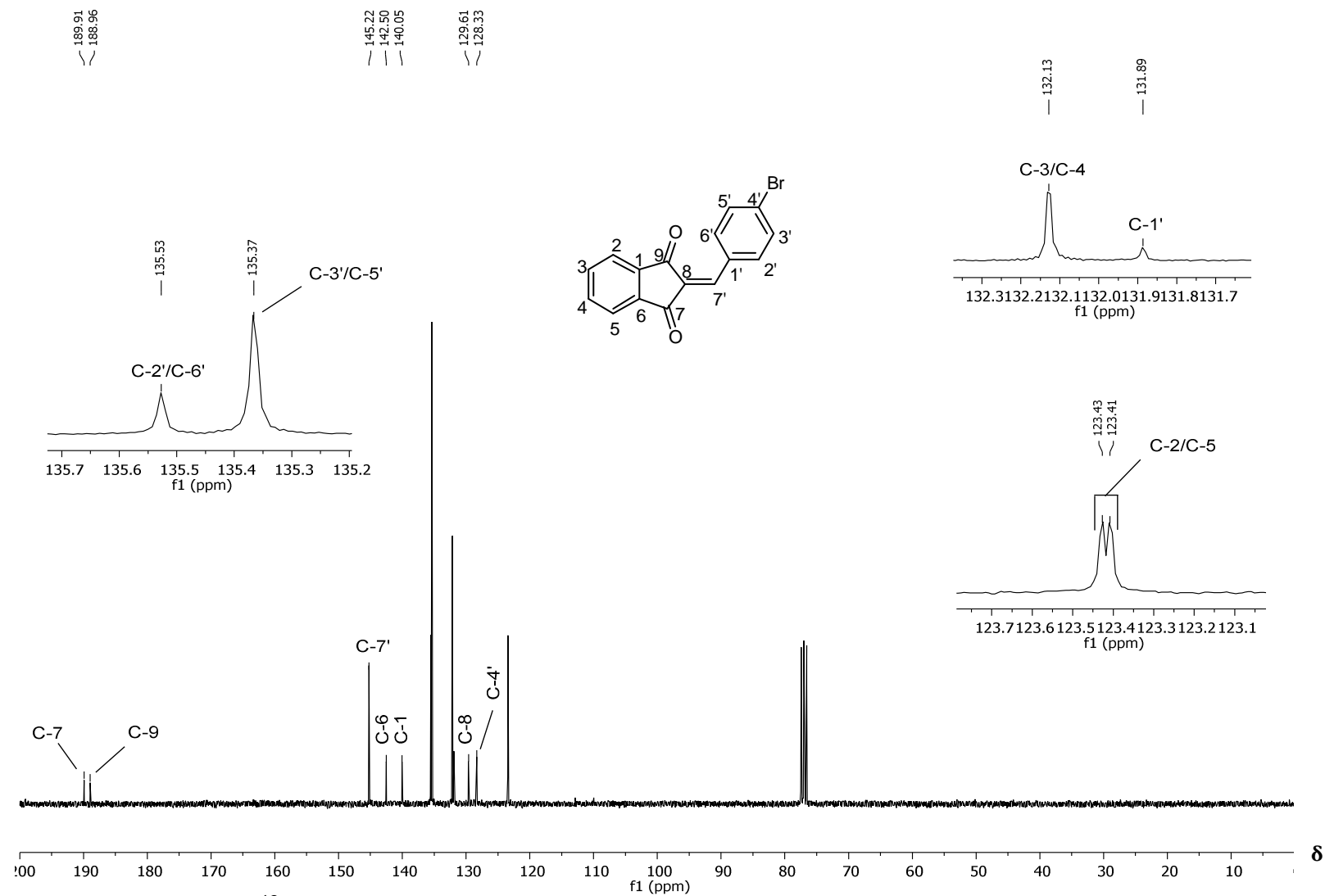


Figura 6 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **3**.

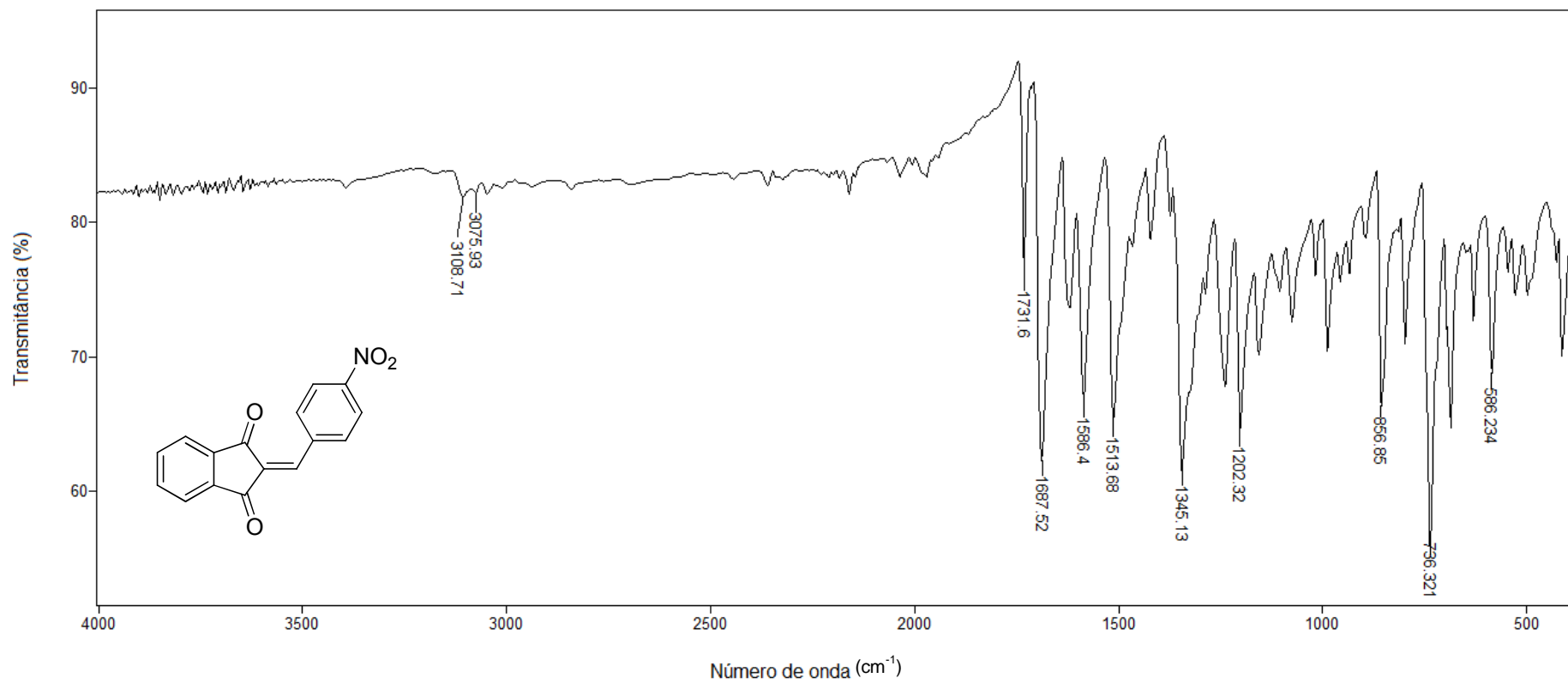


Figura 7 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 4.

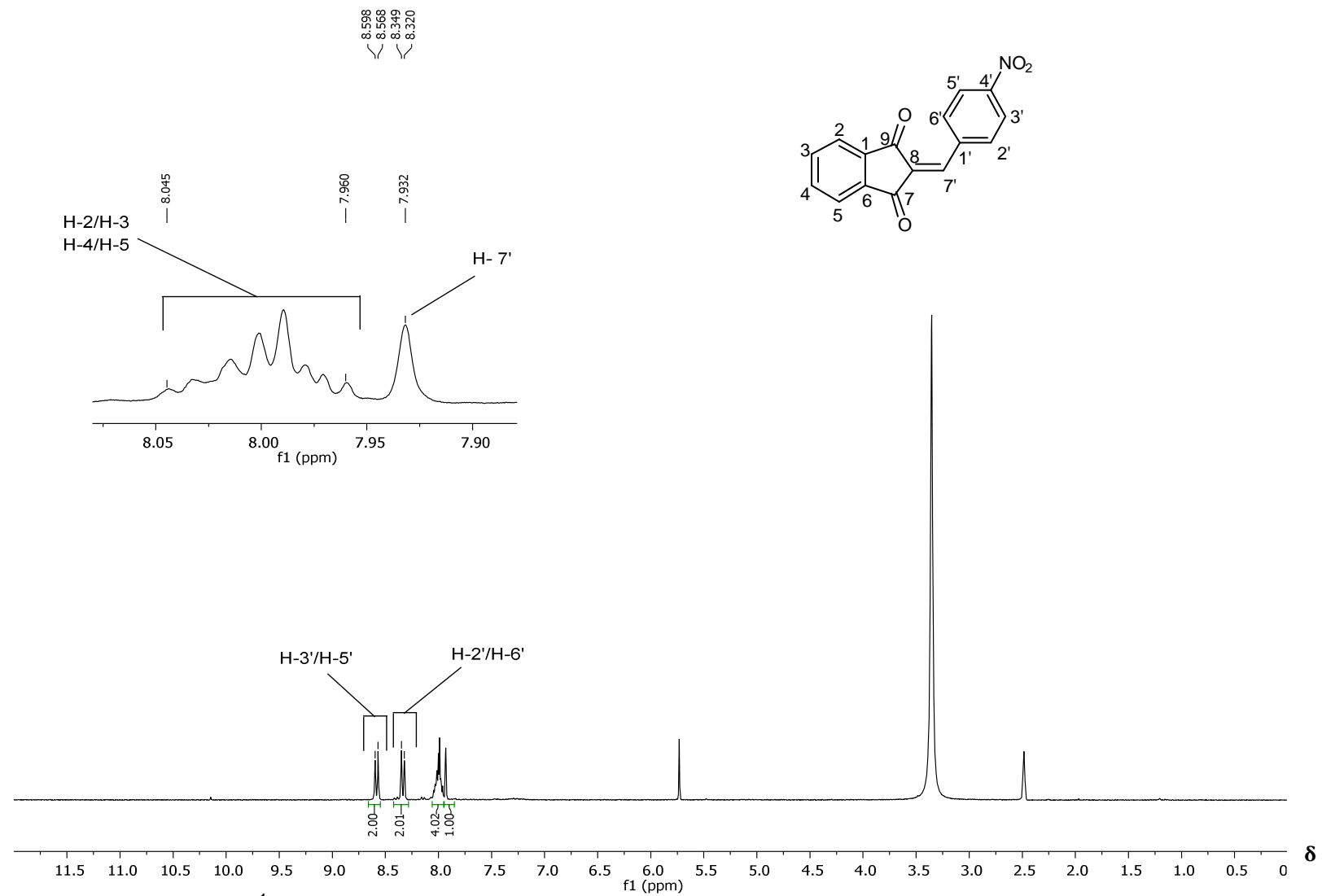


Figura 8 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **4**.

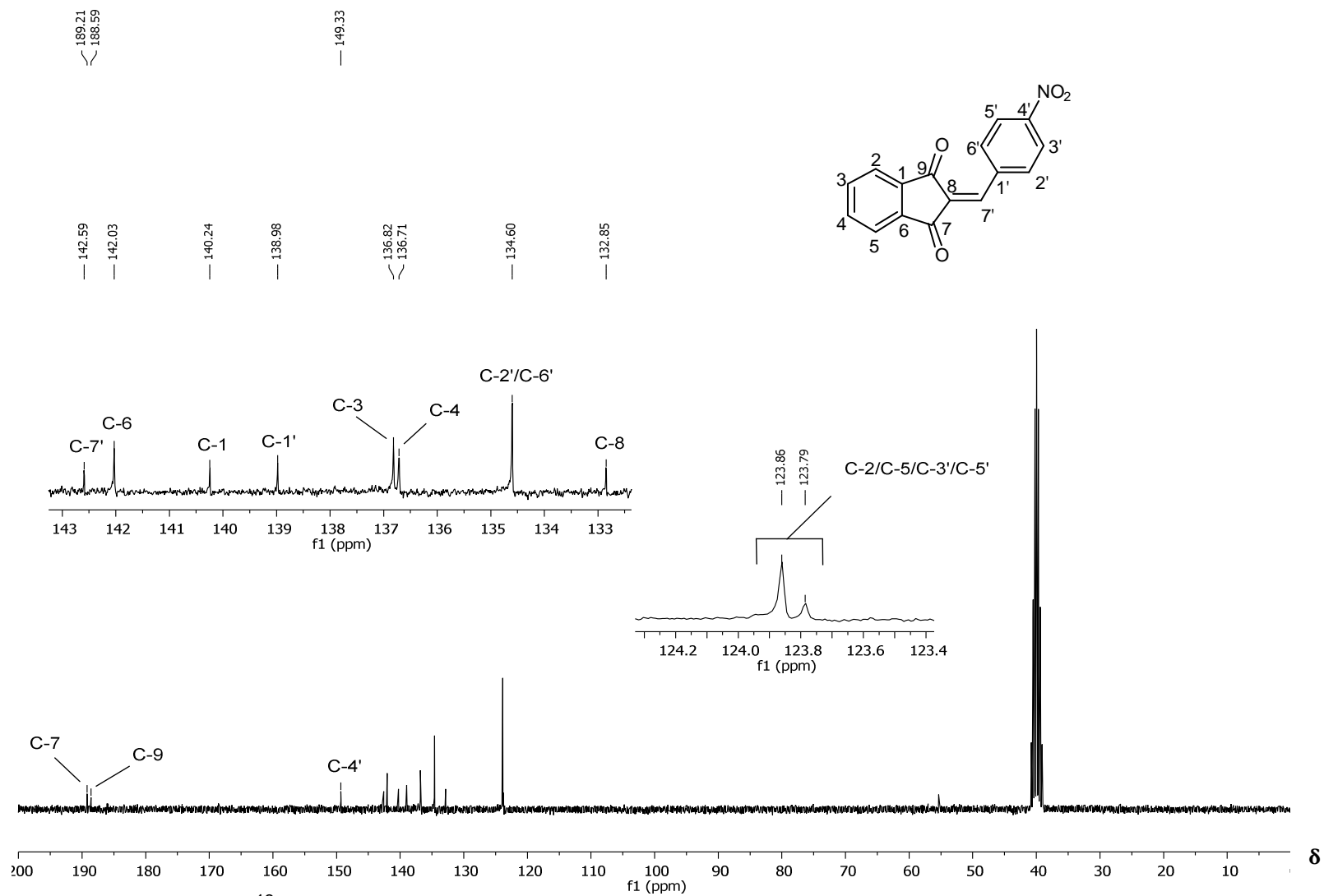


Figura 9 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 4.

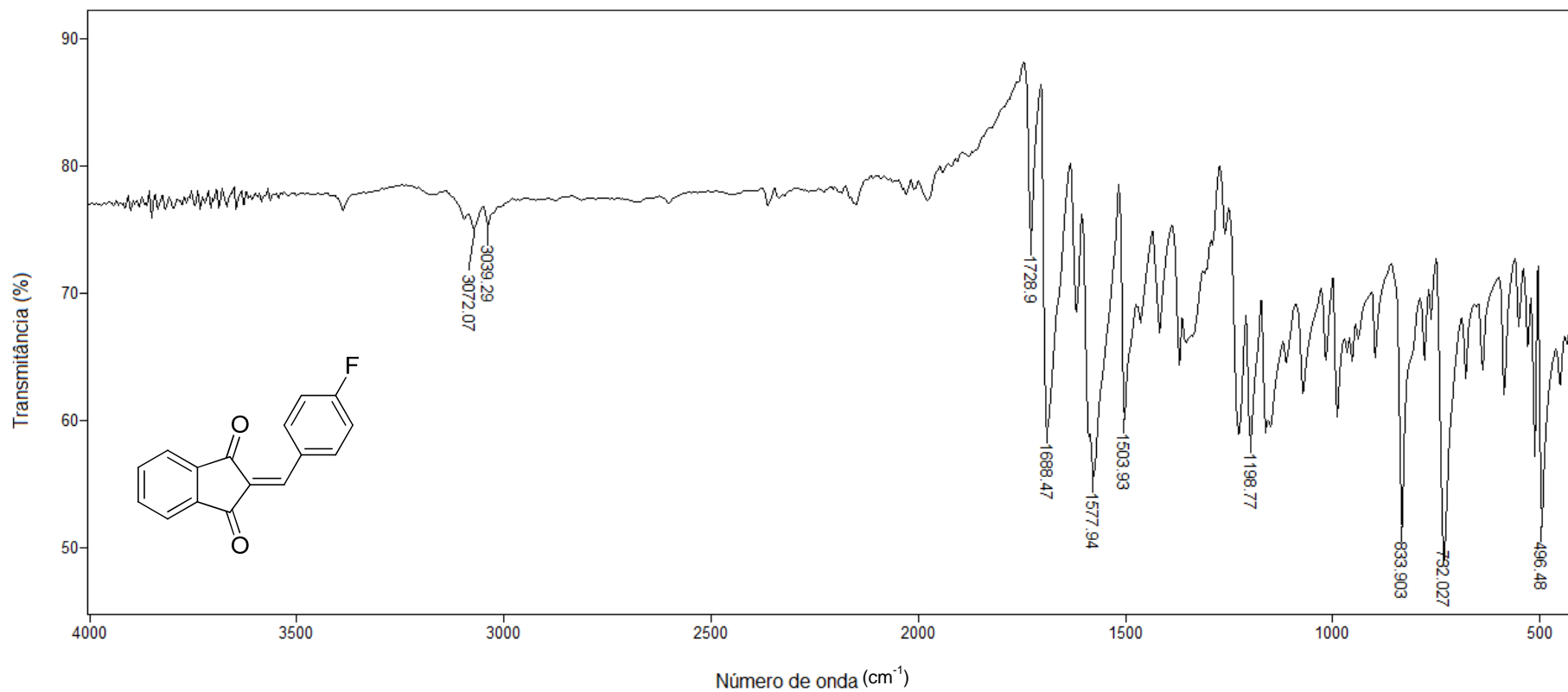


Figura 10 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5**.

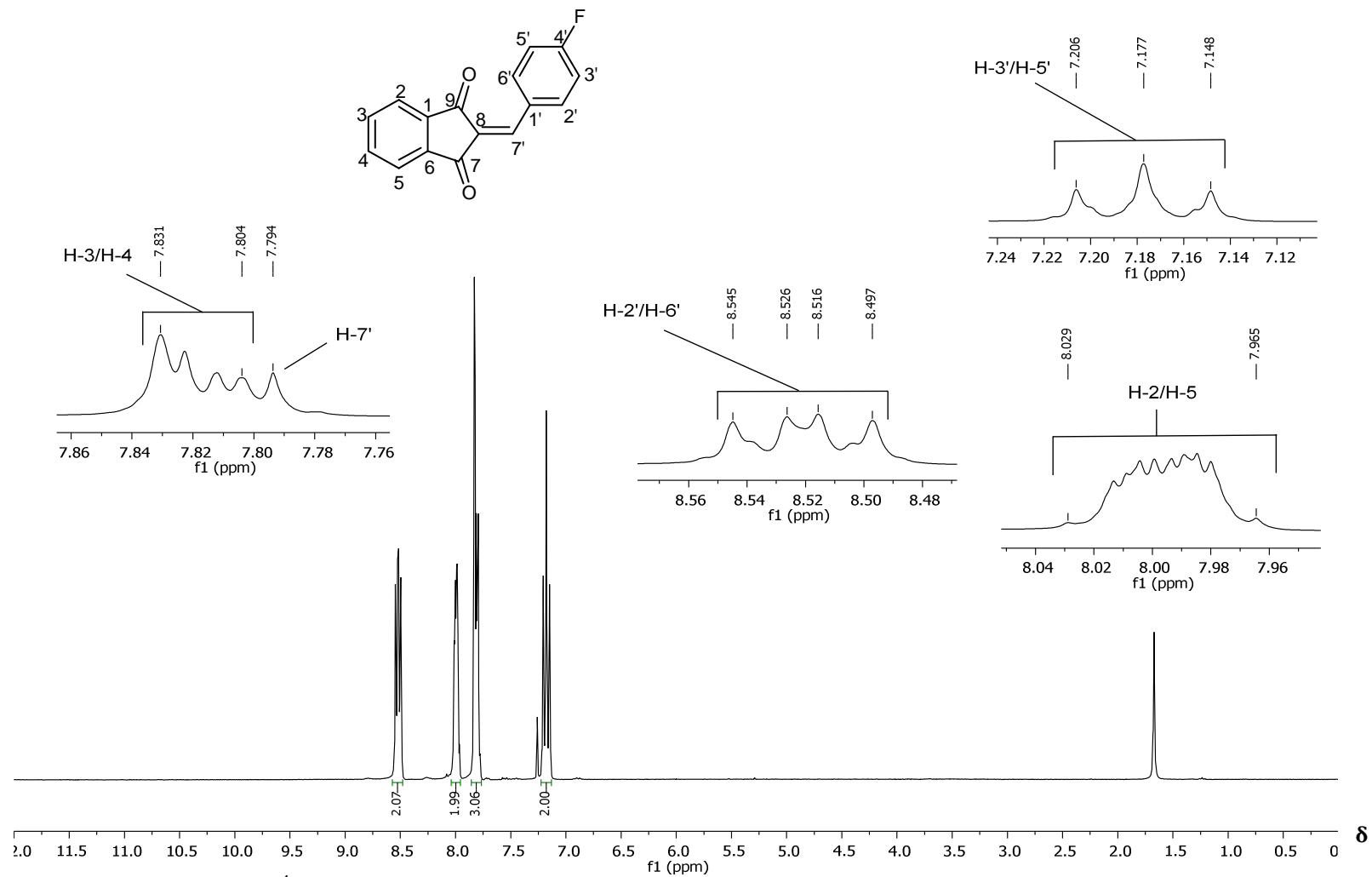


Figura 11 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **5**.

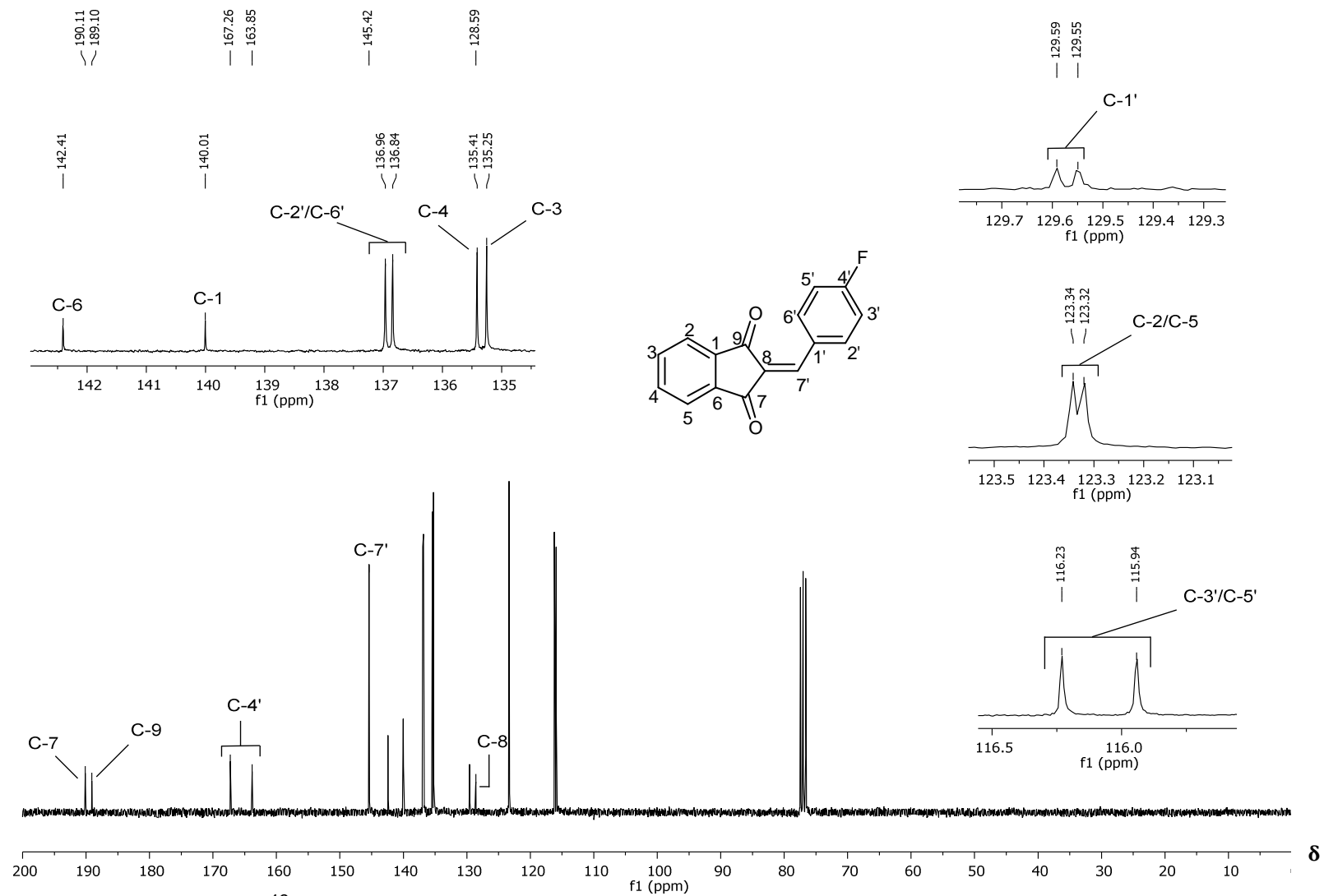


Figura 12 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 5.

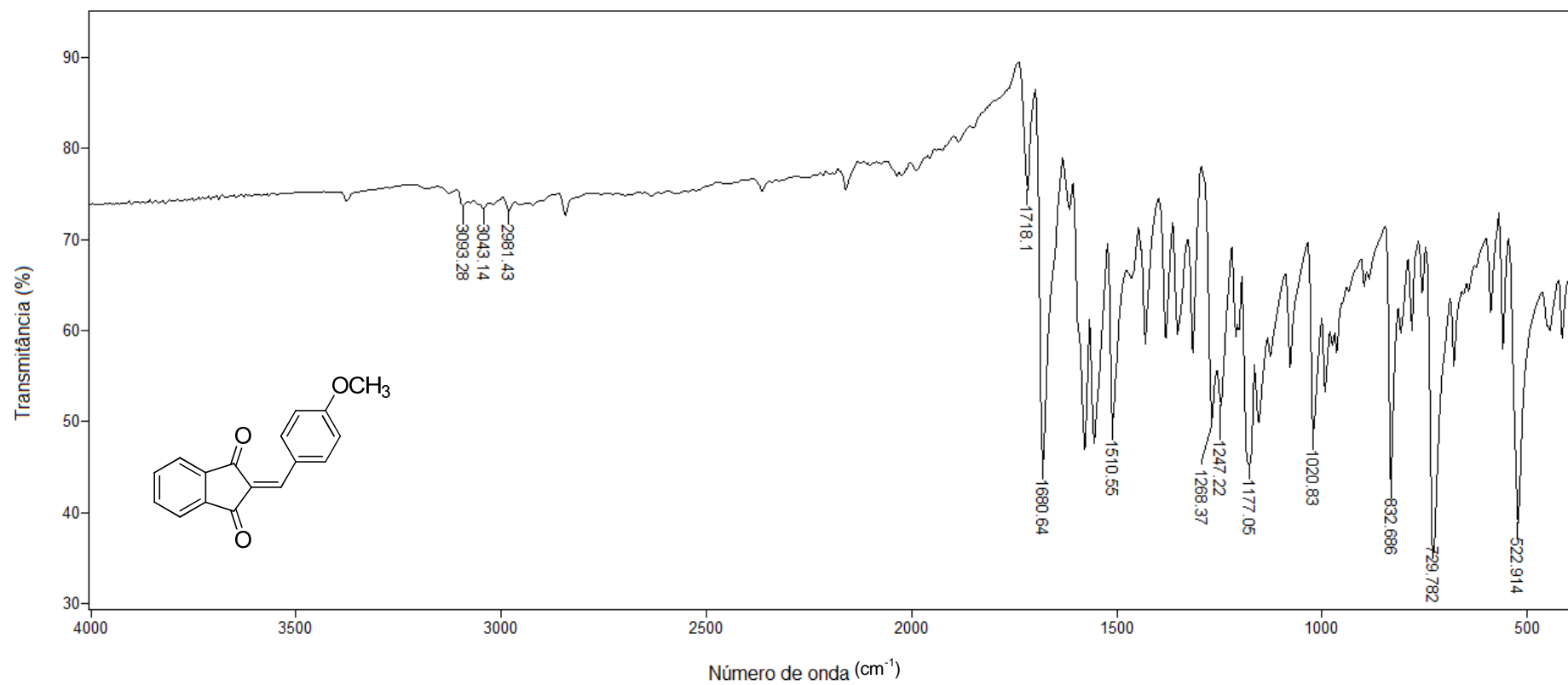


Figura 13 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **6**.

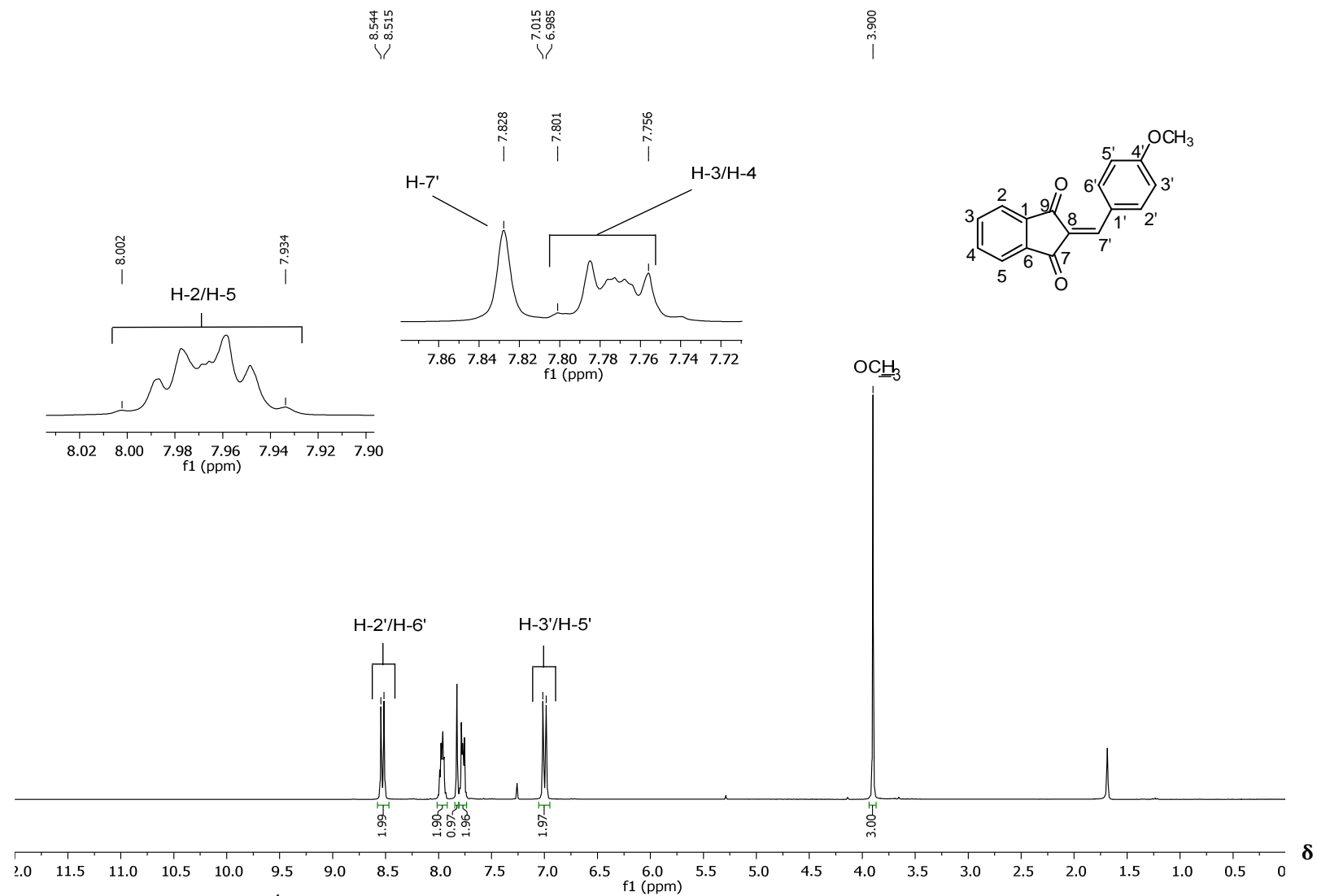


Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **6**.

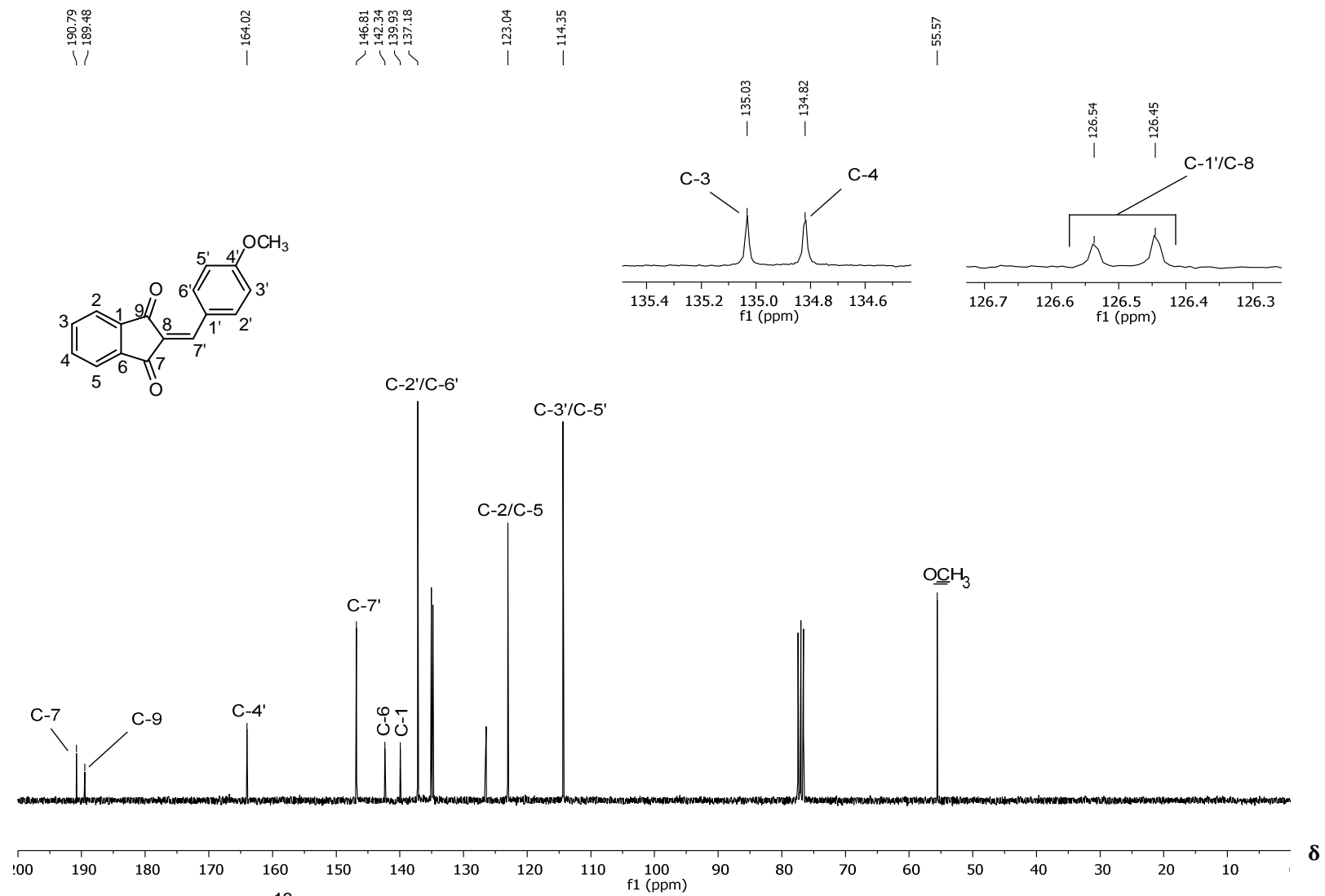


Figura 15 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **6**.

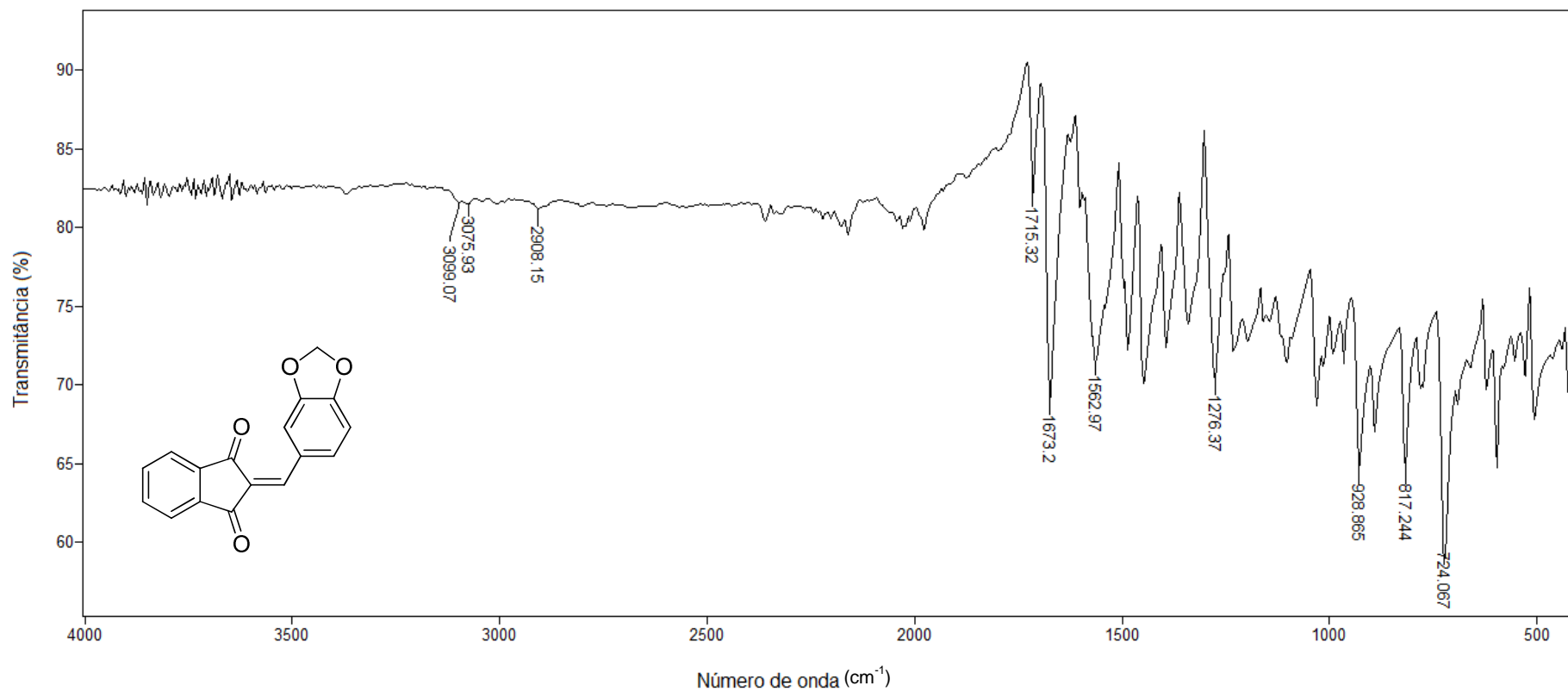


Figura 16 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 7.

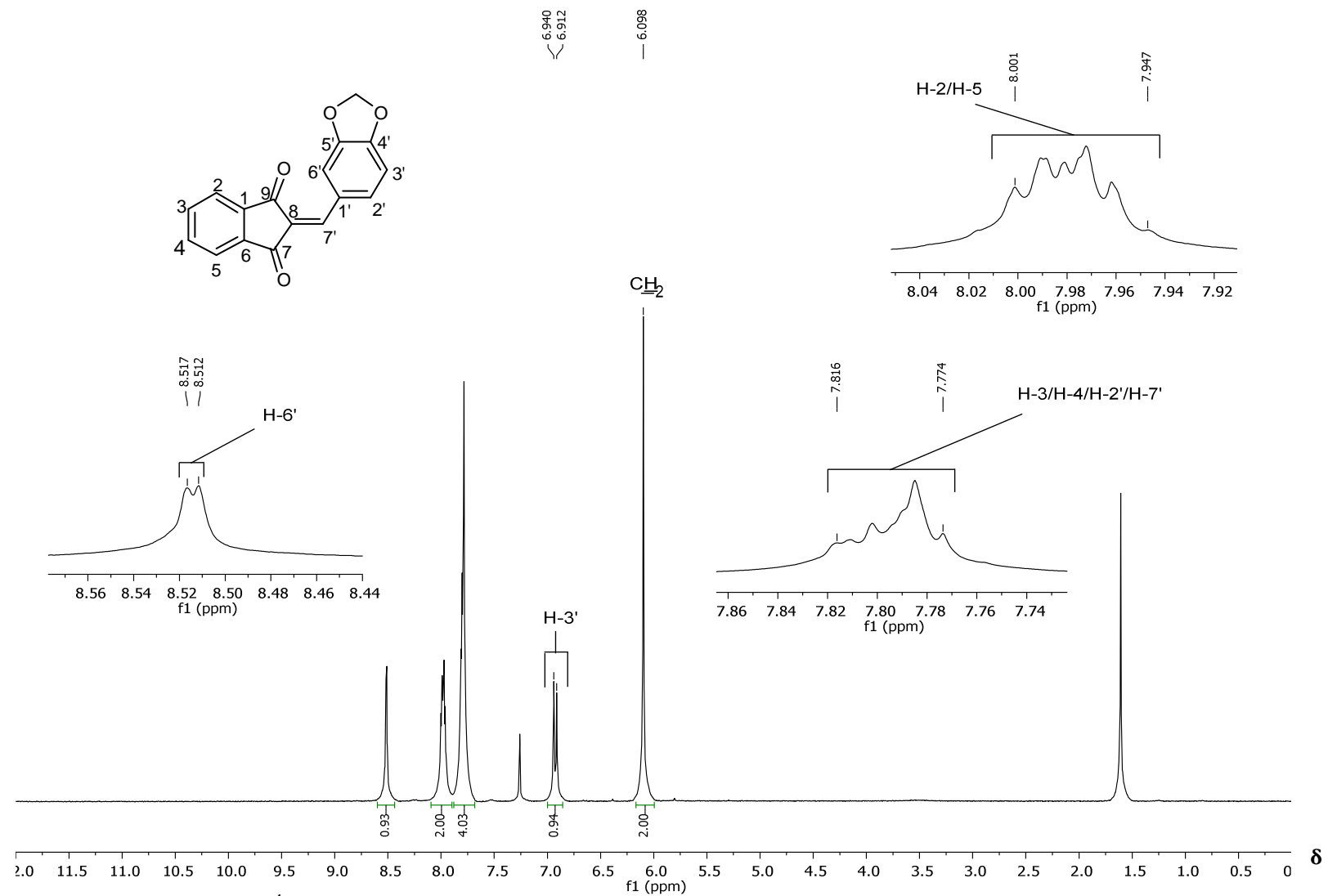


Figura 17 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto 7.

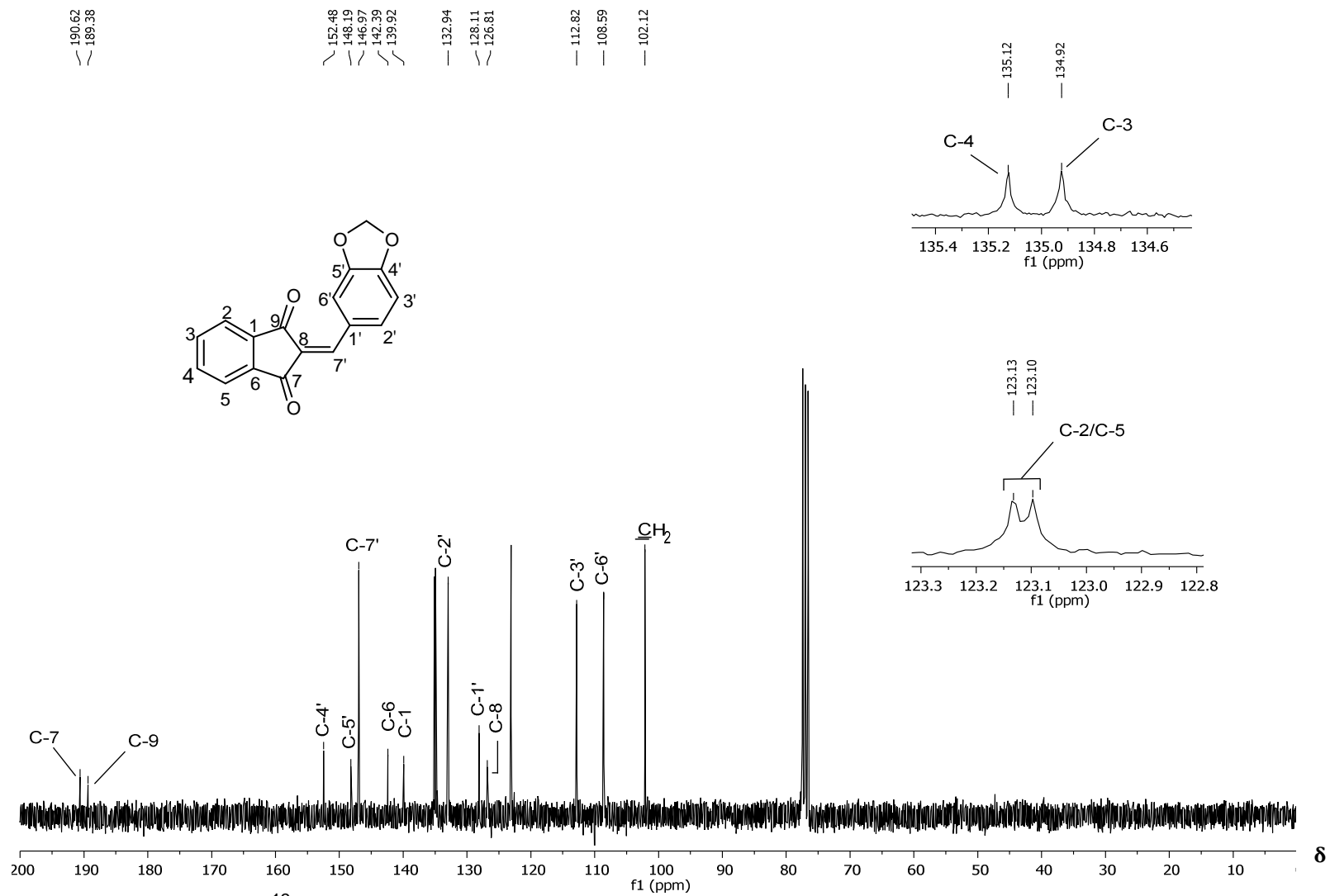


Figura 18 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 7.

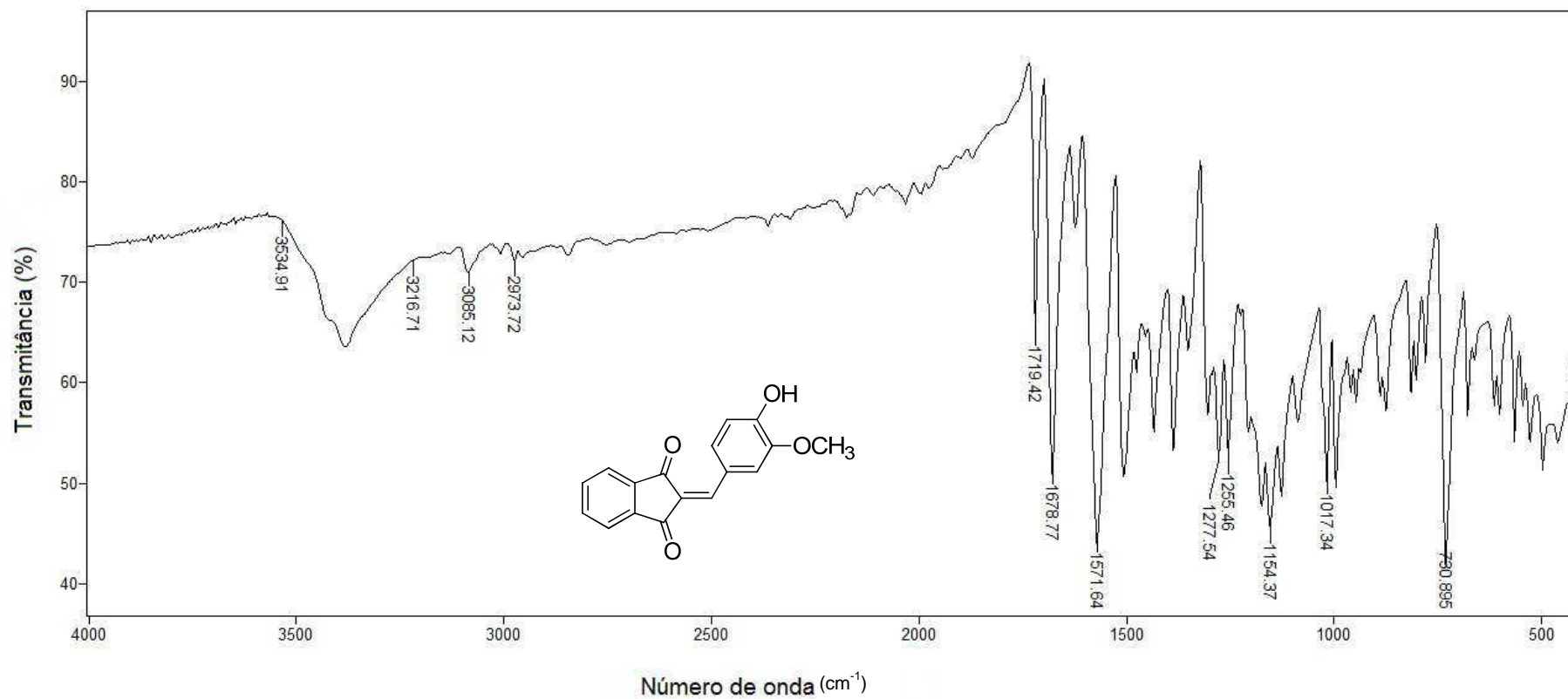


Figura 19 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 8.

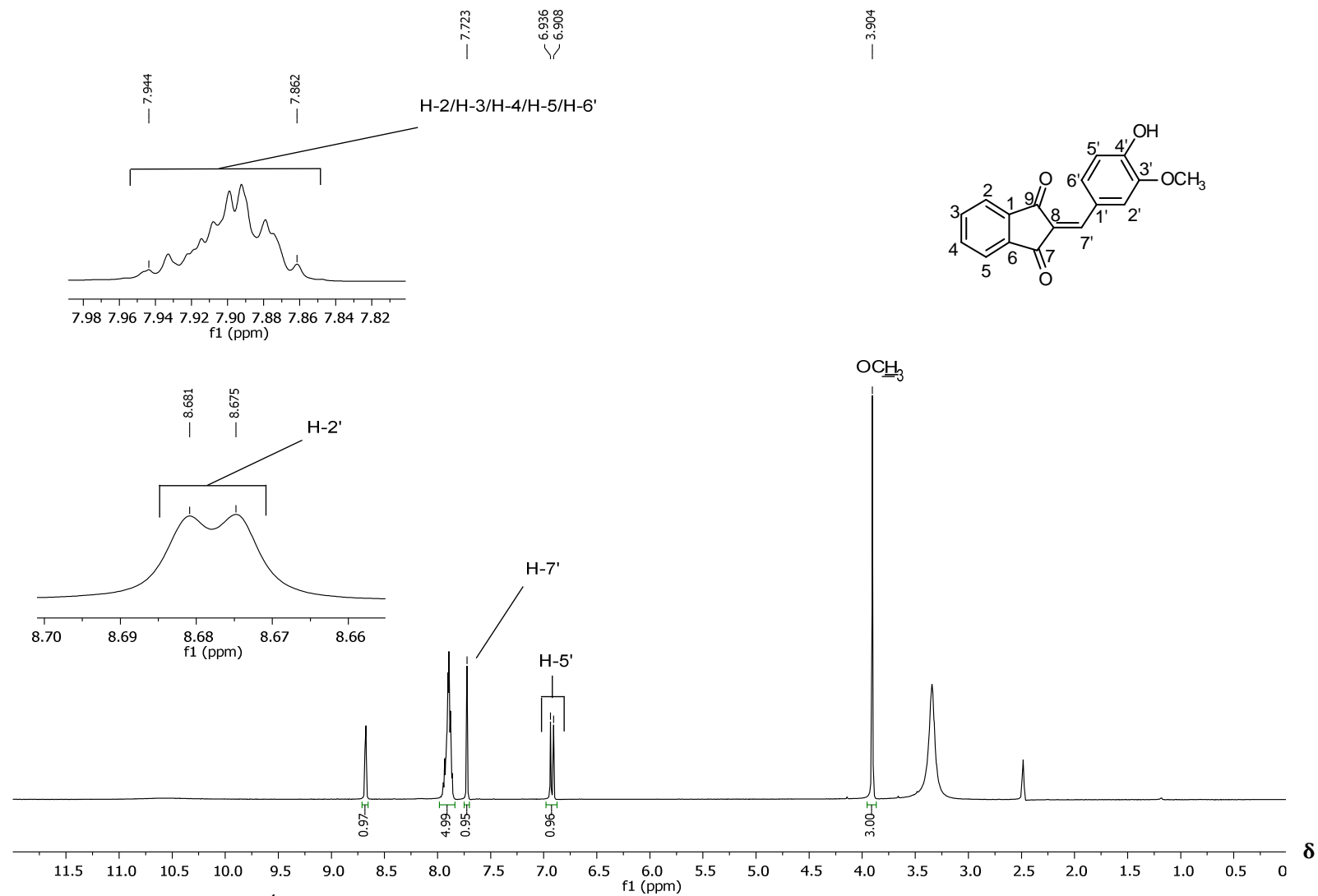


Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **8**.

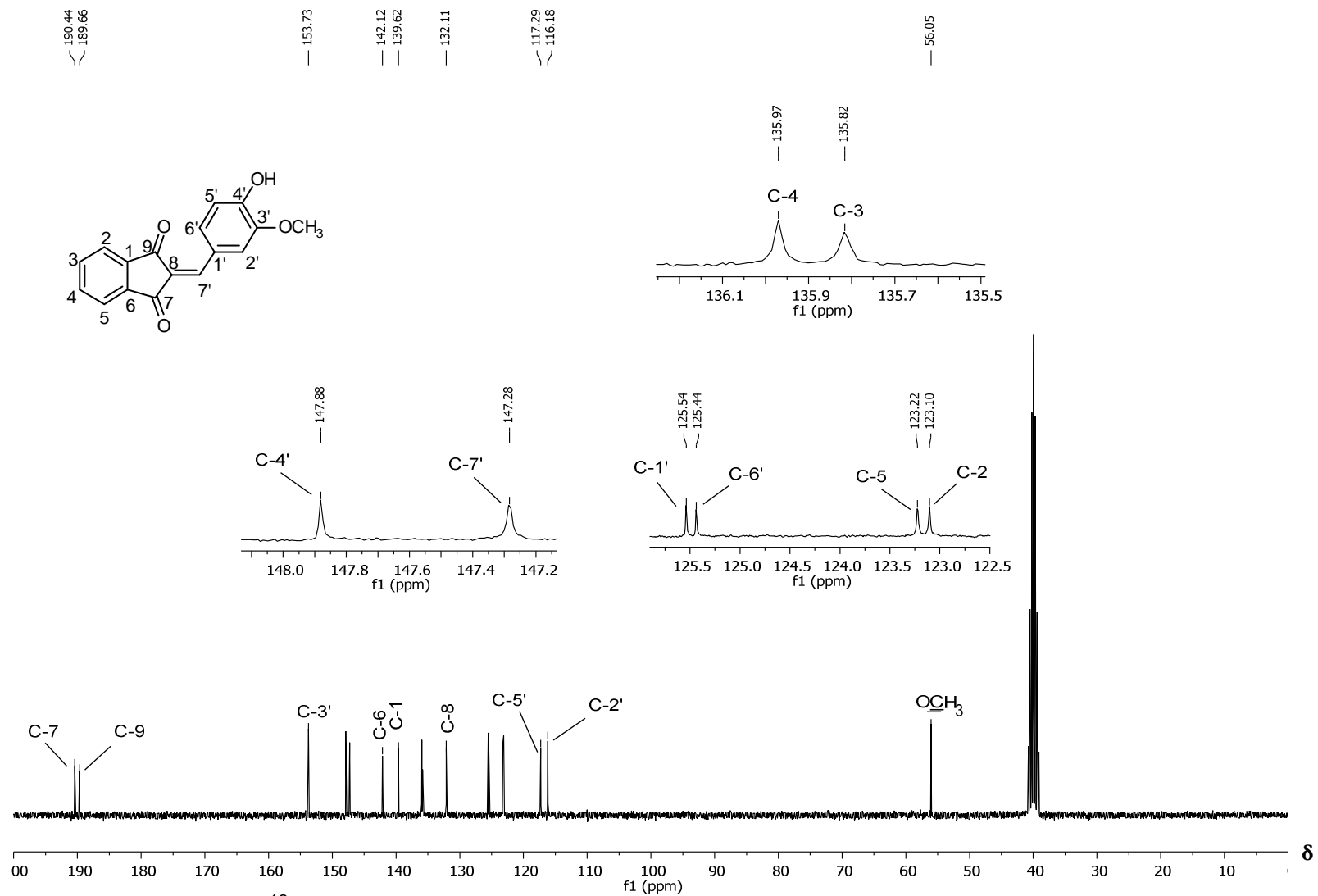


Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **8**.

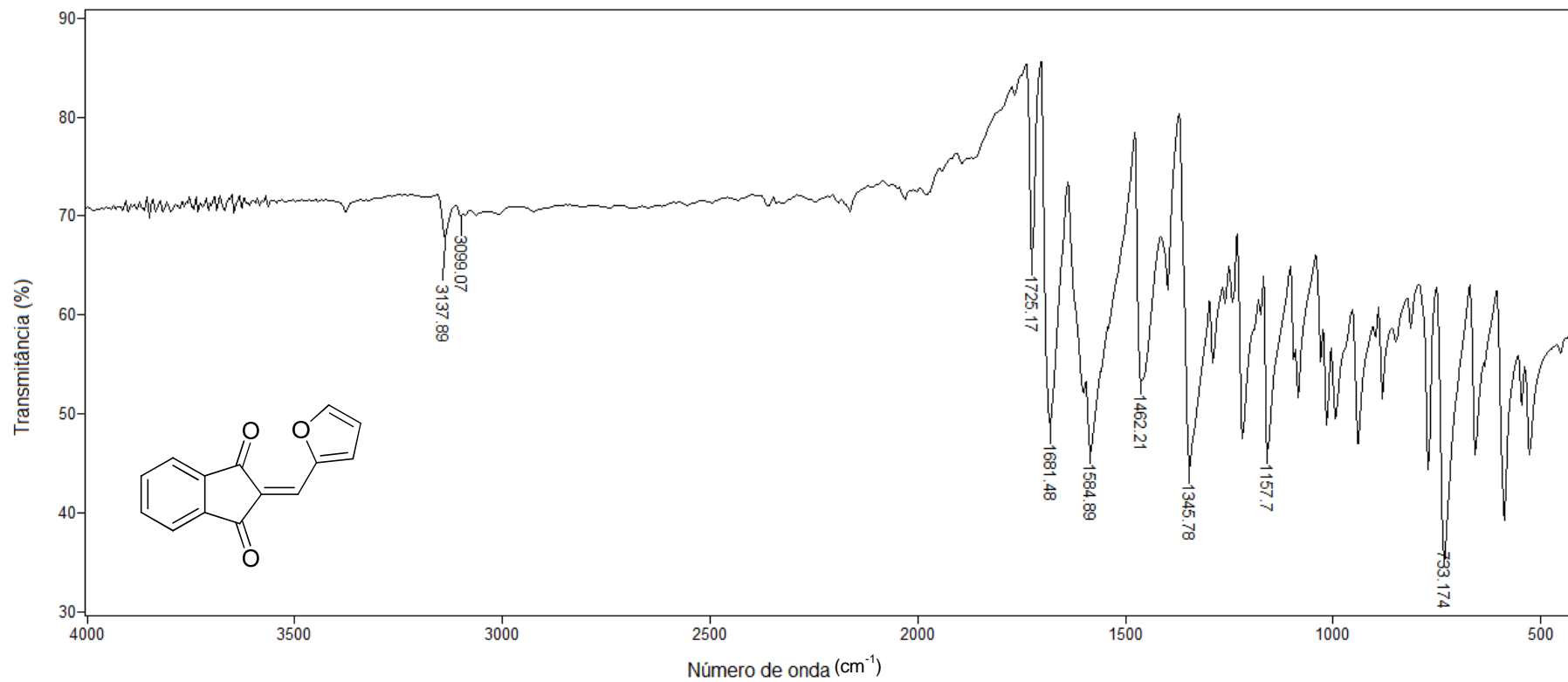


Figura 22 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **9**.

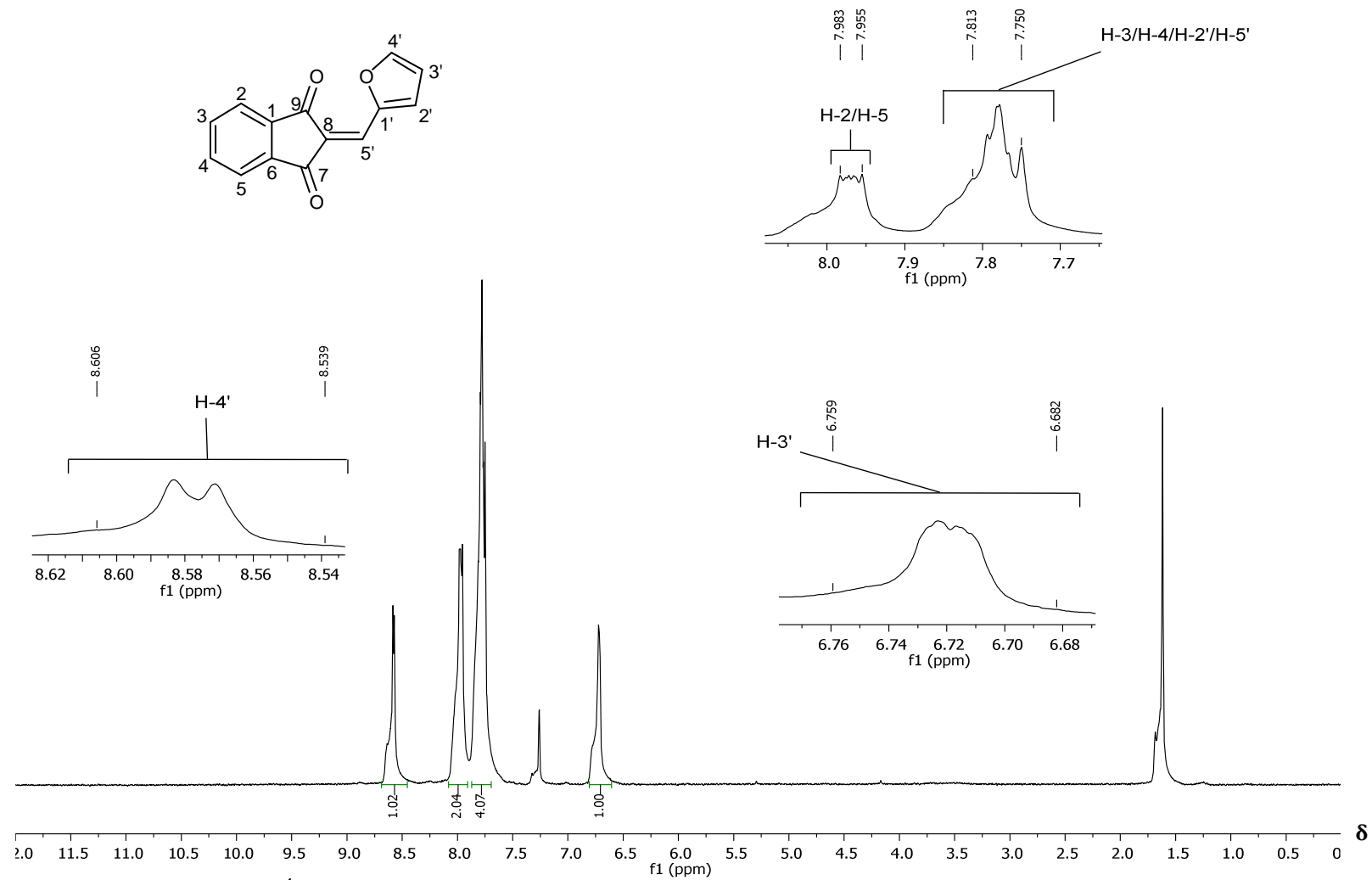


Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **9**.

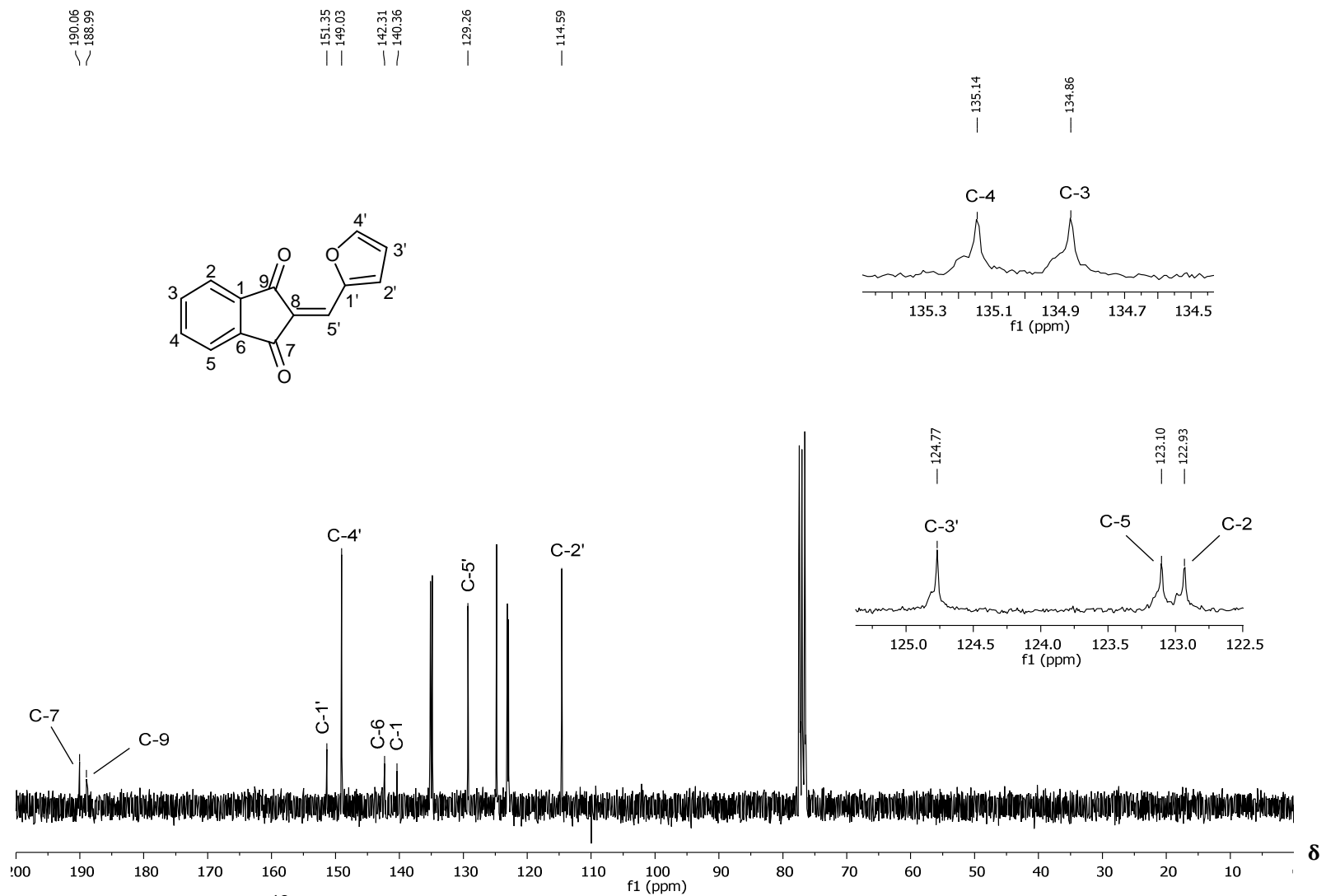


Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **9**.

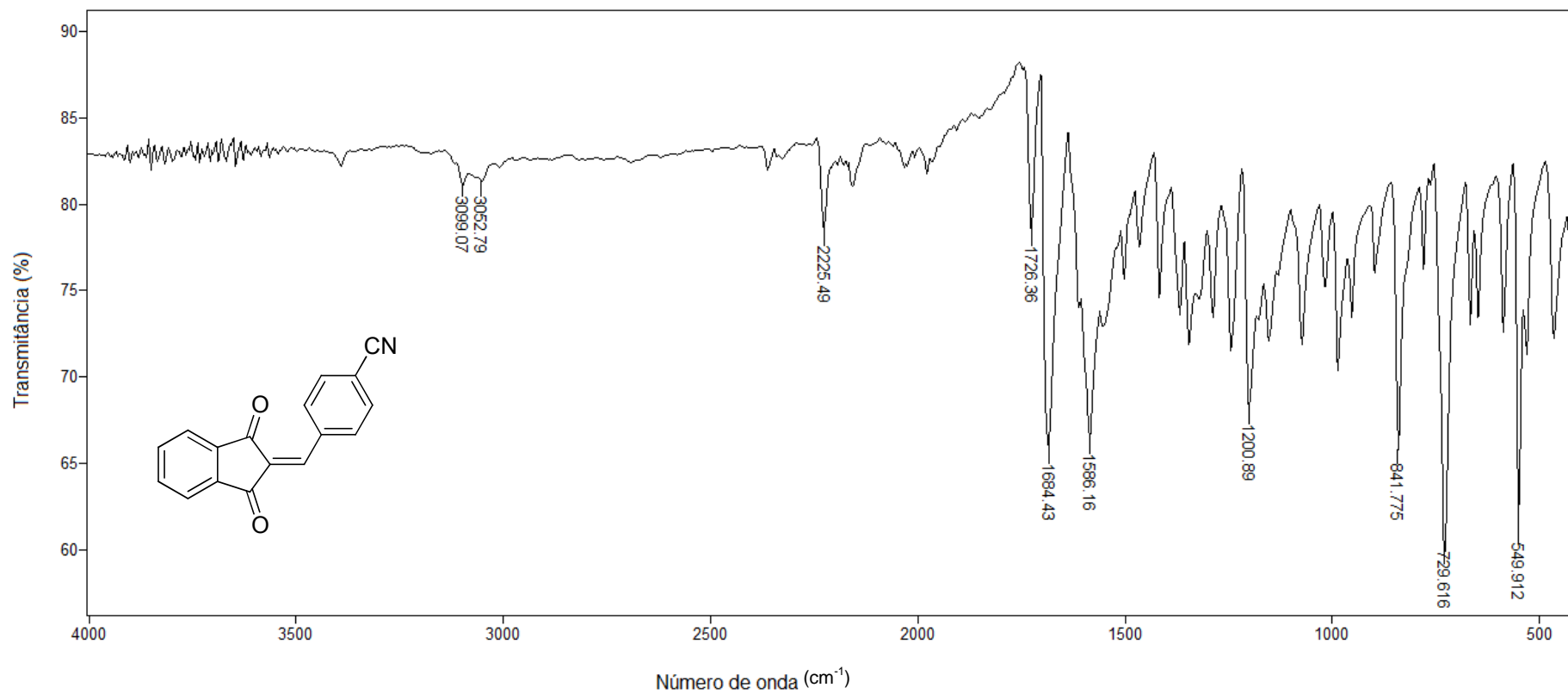


Figura 25 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **10**.

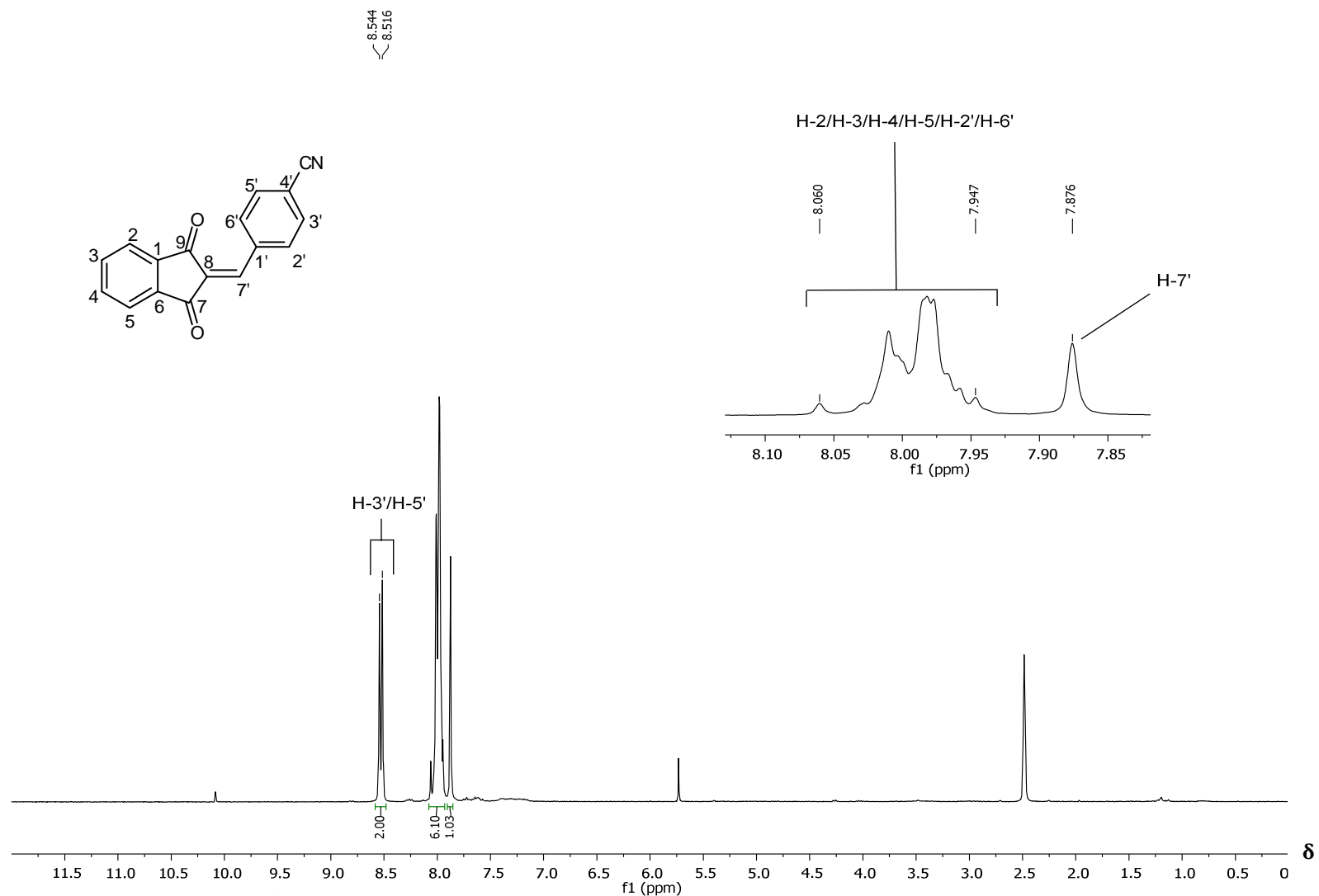


Figura 26 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **10**.

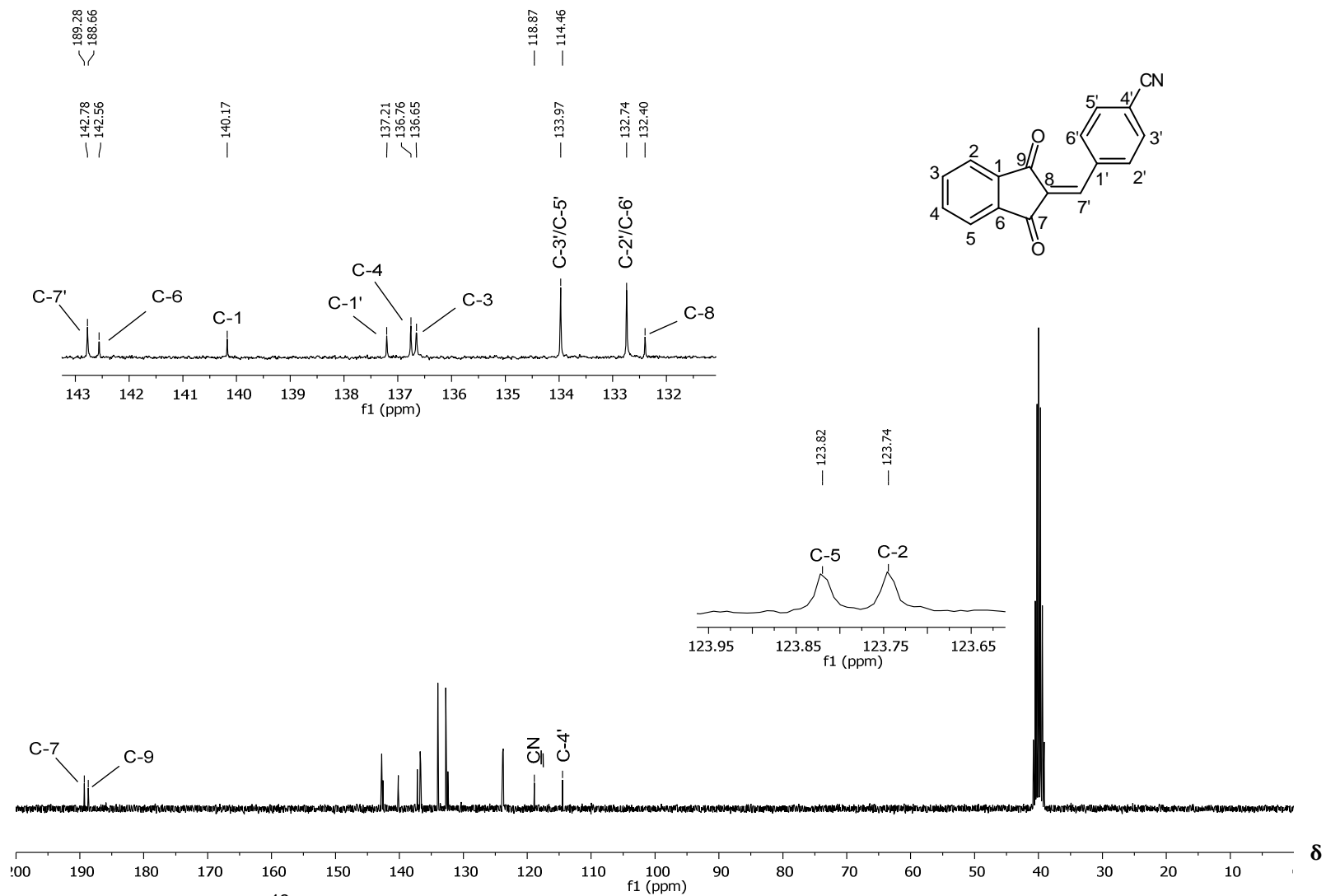


Figura 27 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 10.

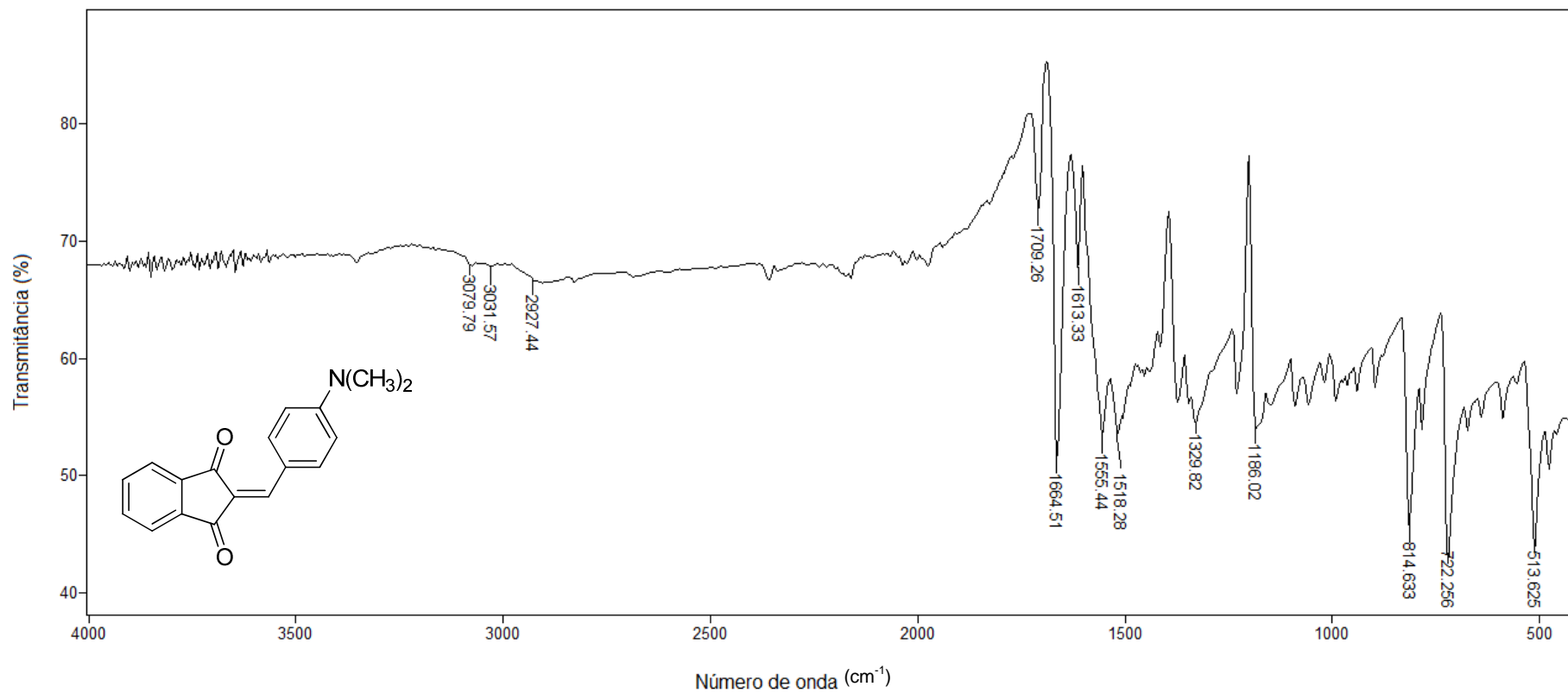


Figura 28 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **11**.

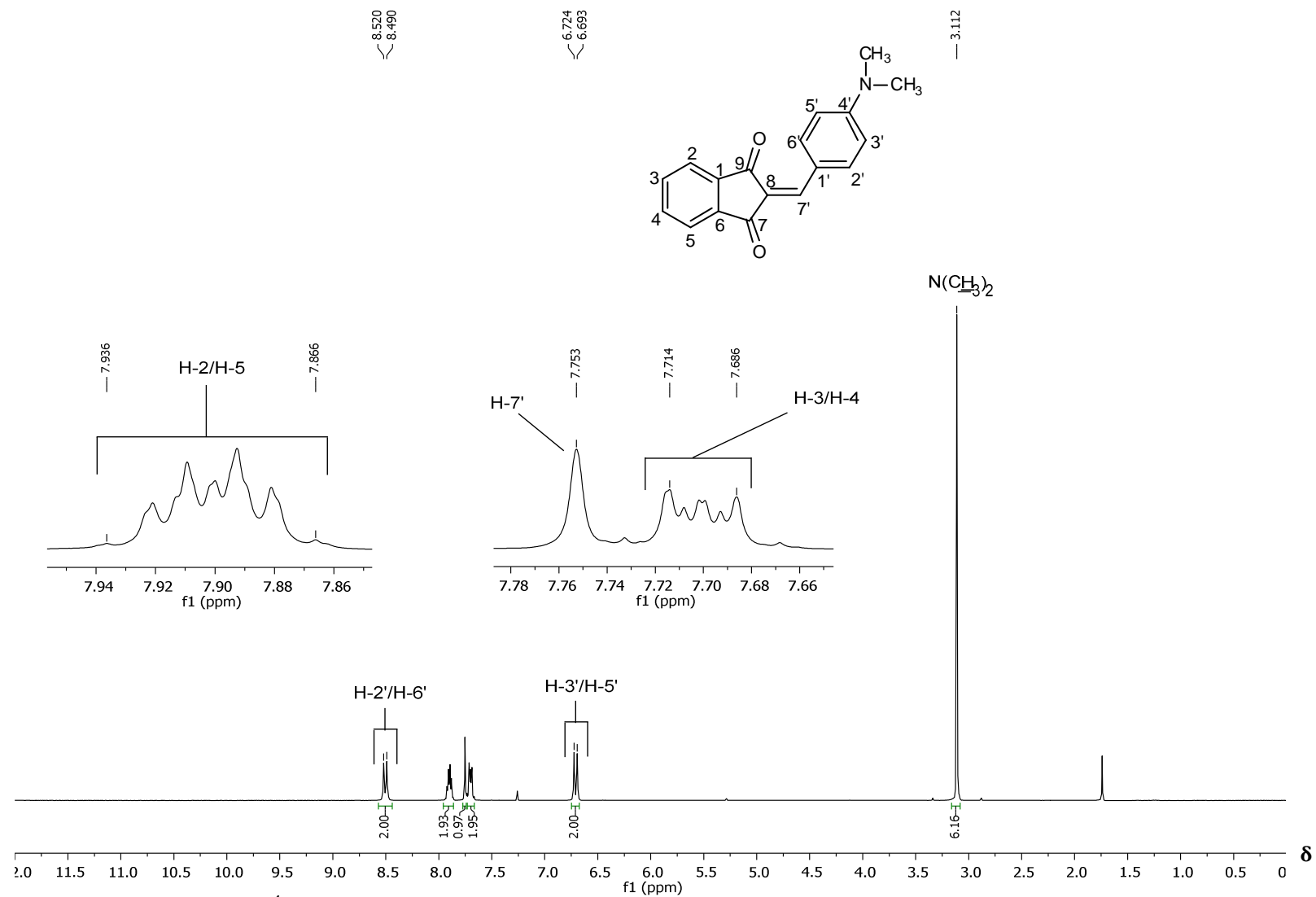


Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **11**.

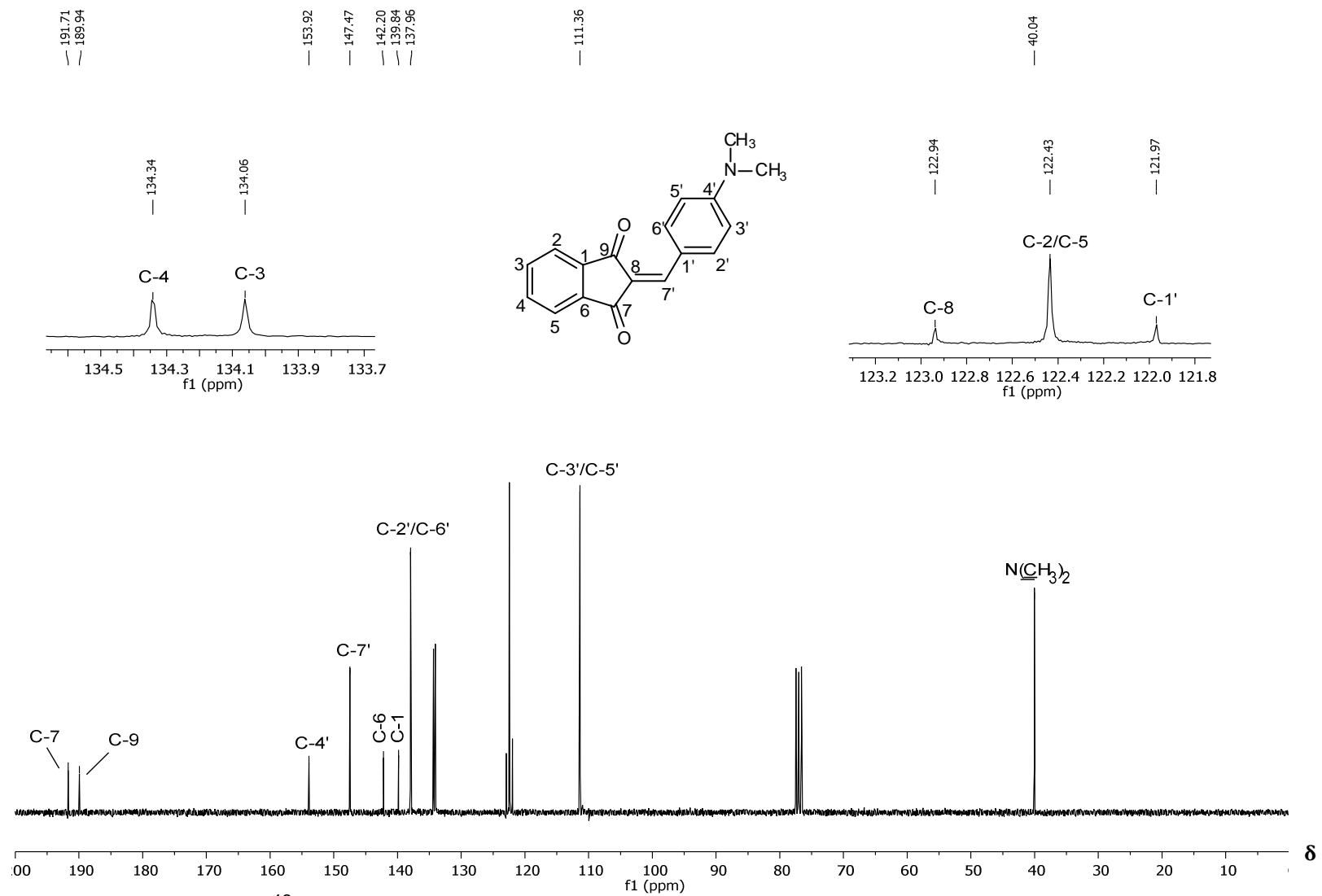


Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **11**.

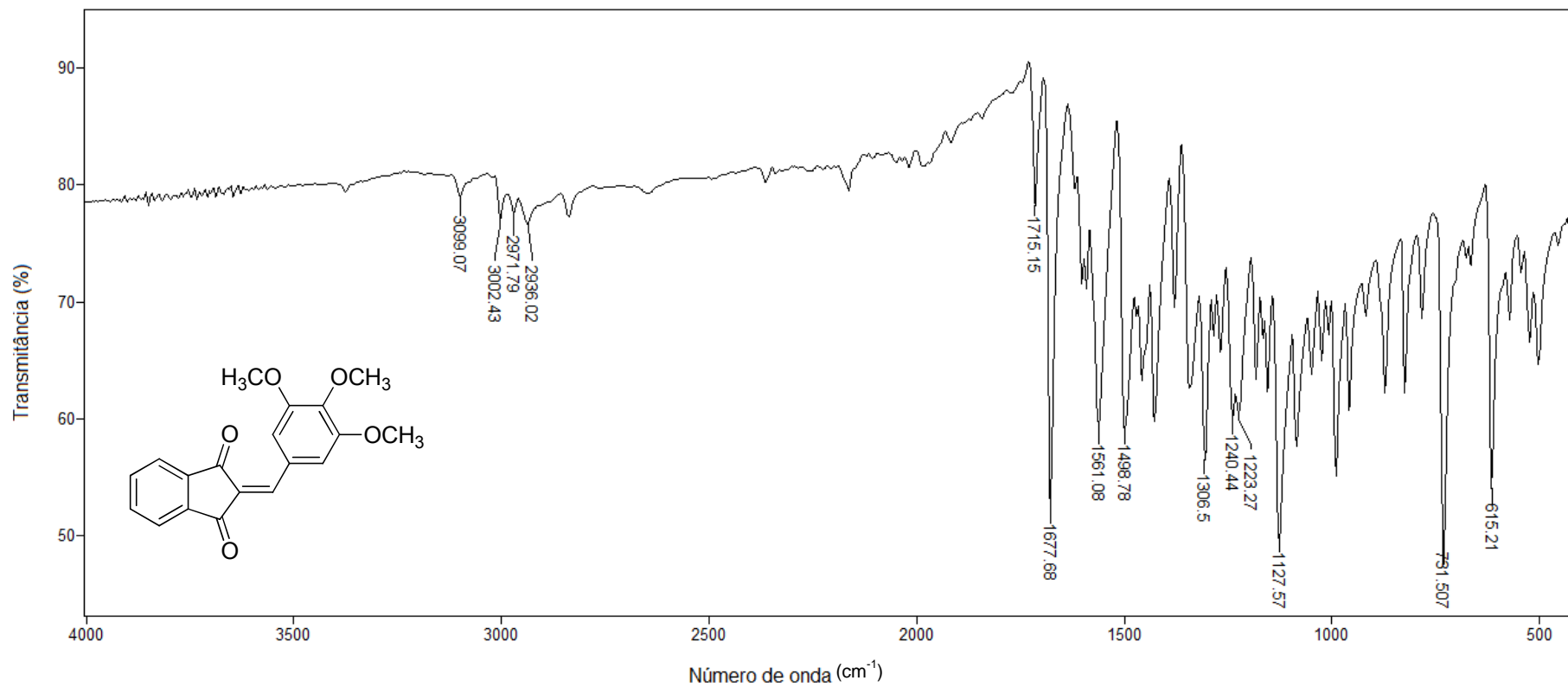


Figura 31 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **12**.

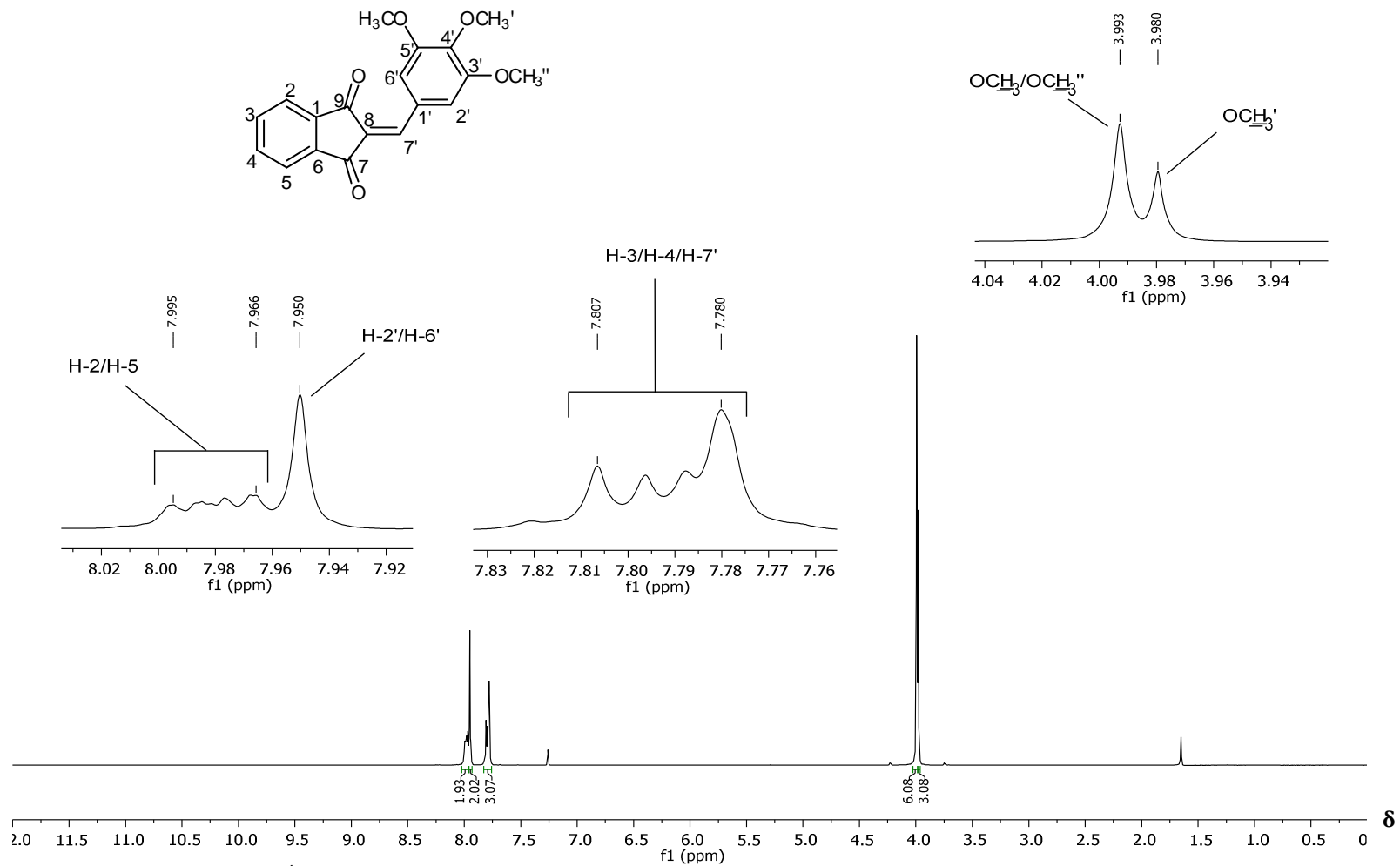


Figura 32 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **12**.

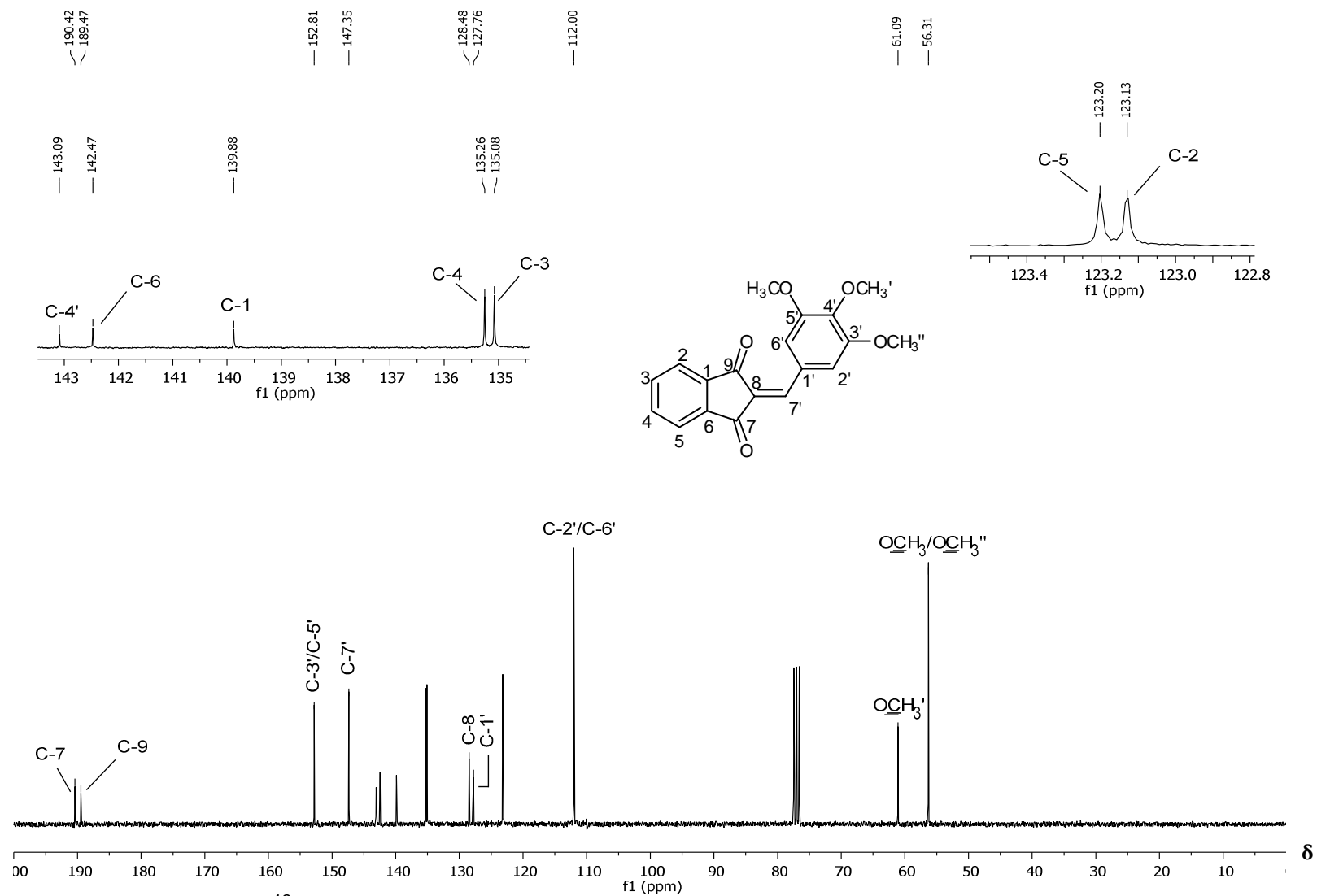


Figura 33 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **12**.

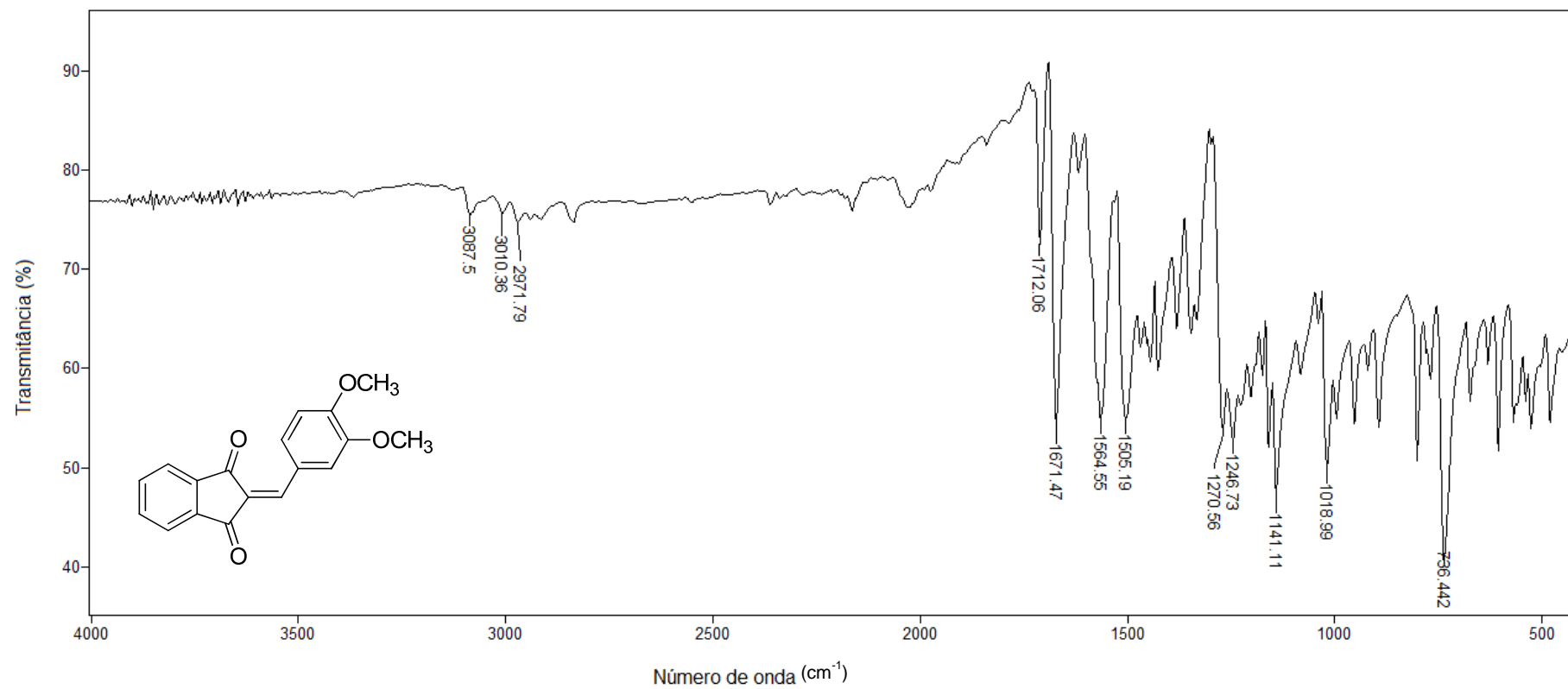


Figura 34 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **13**.

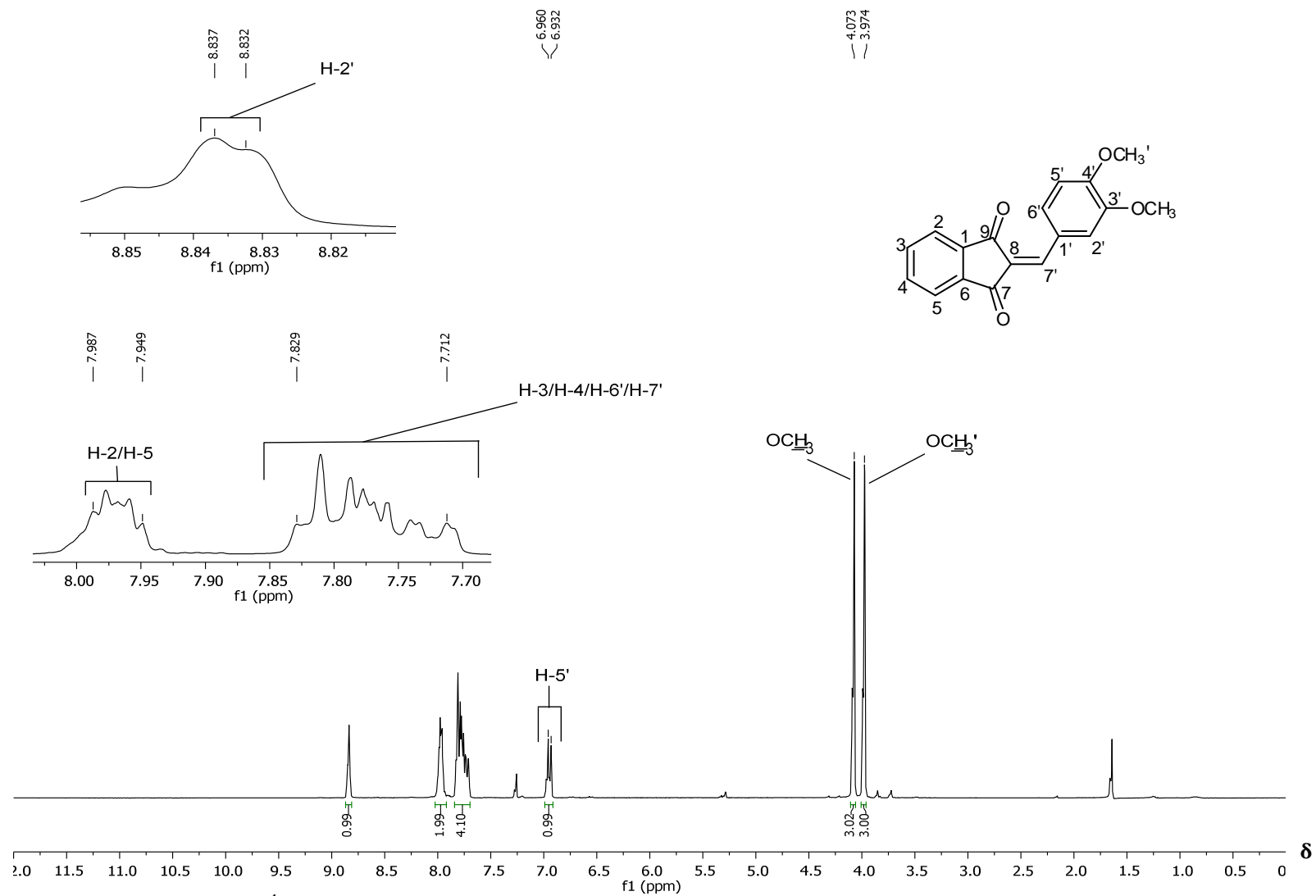


Figura 35 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **13**.

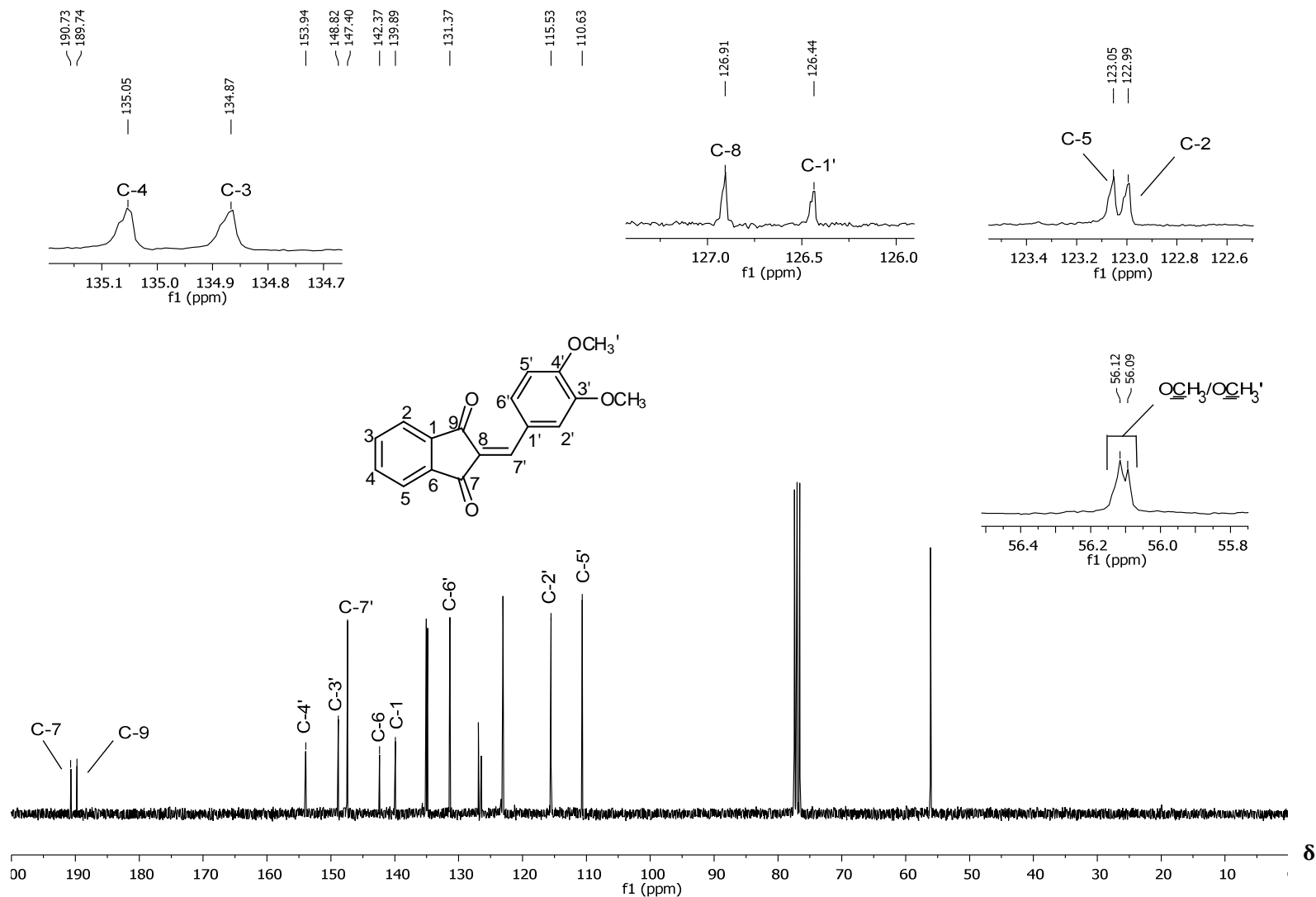


Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **13**.

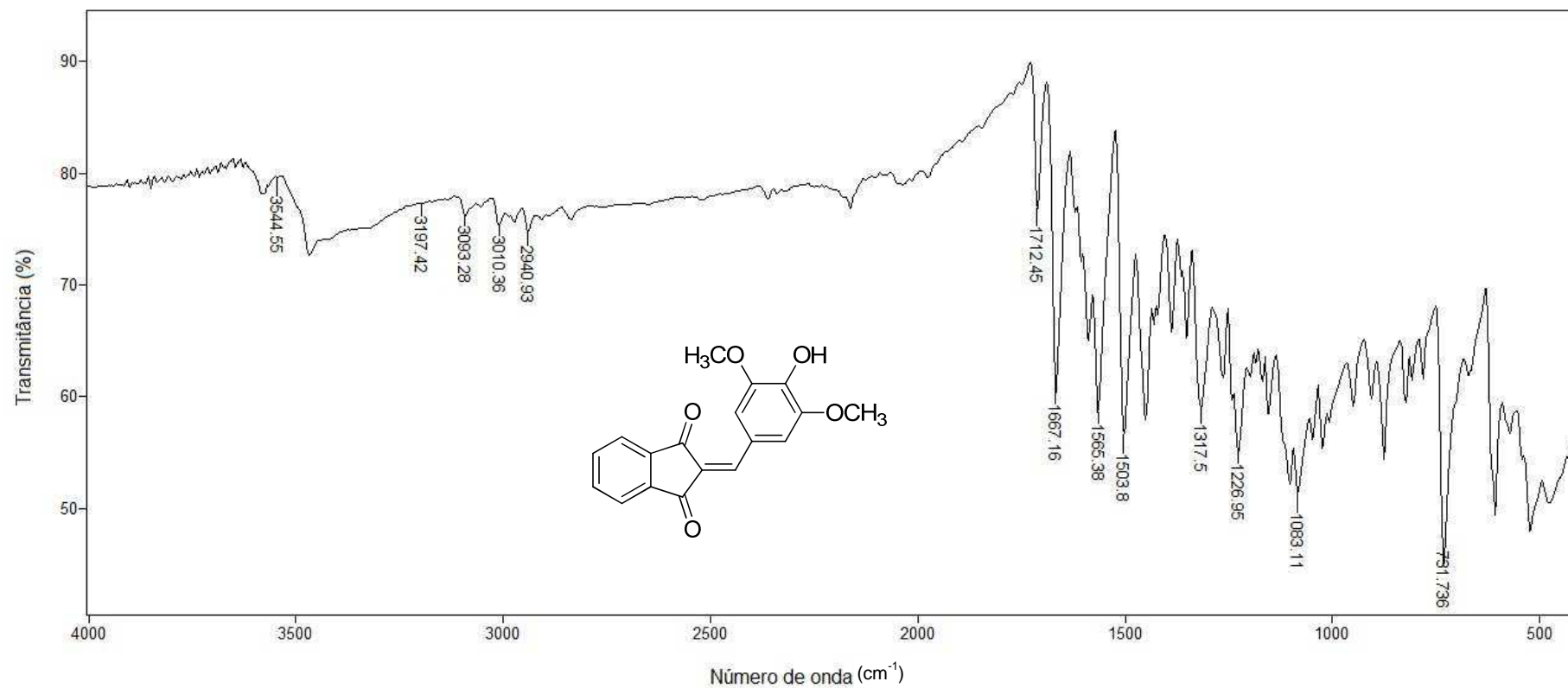


Figura 37 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **15**.

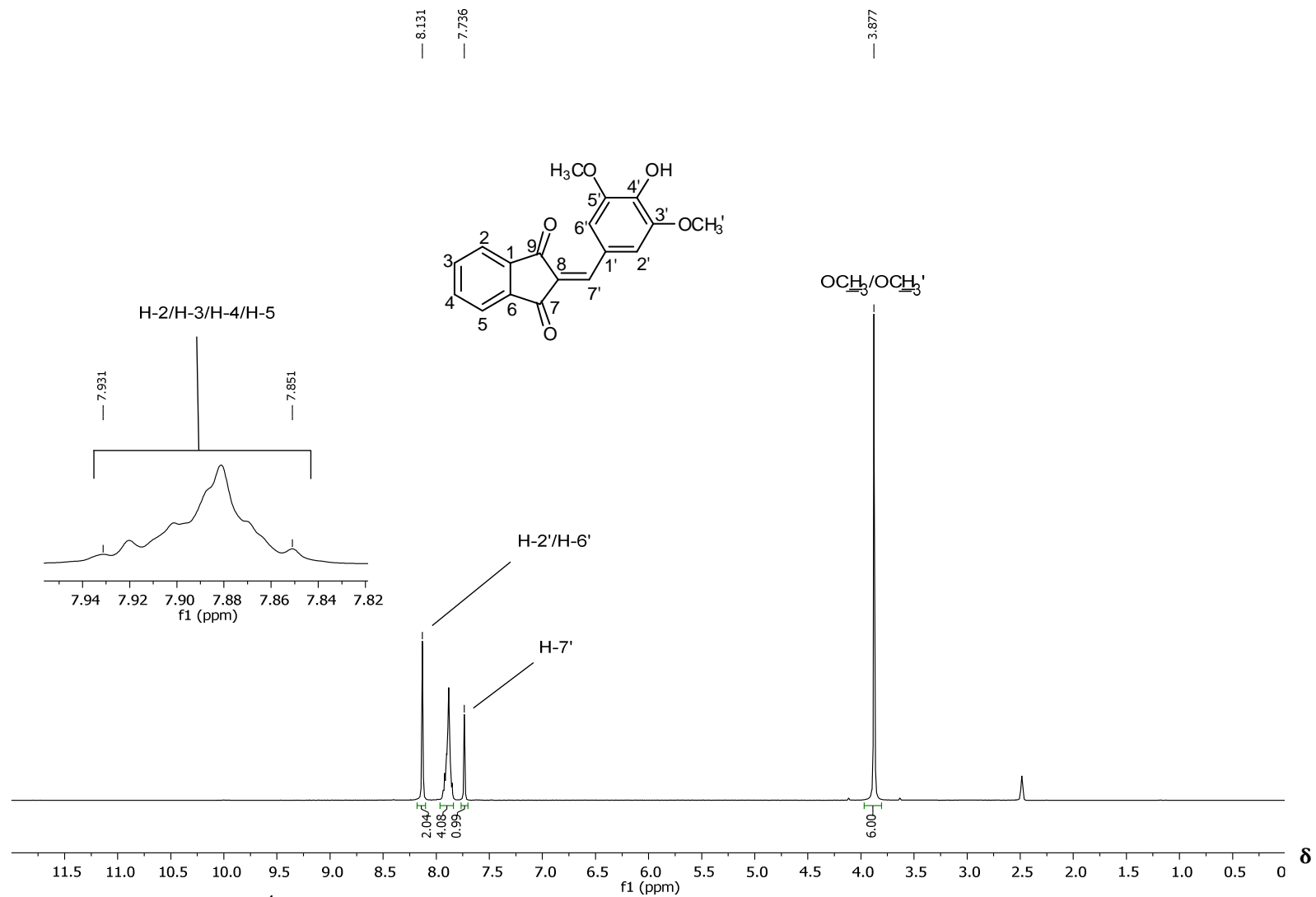


Figura 38 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **15**.

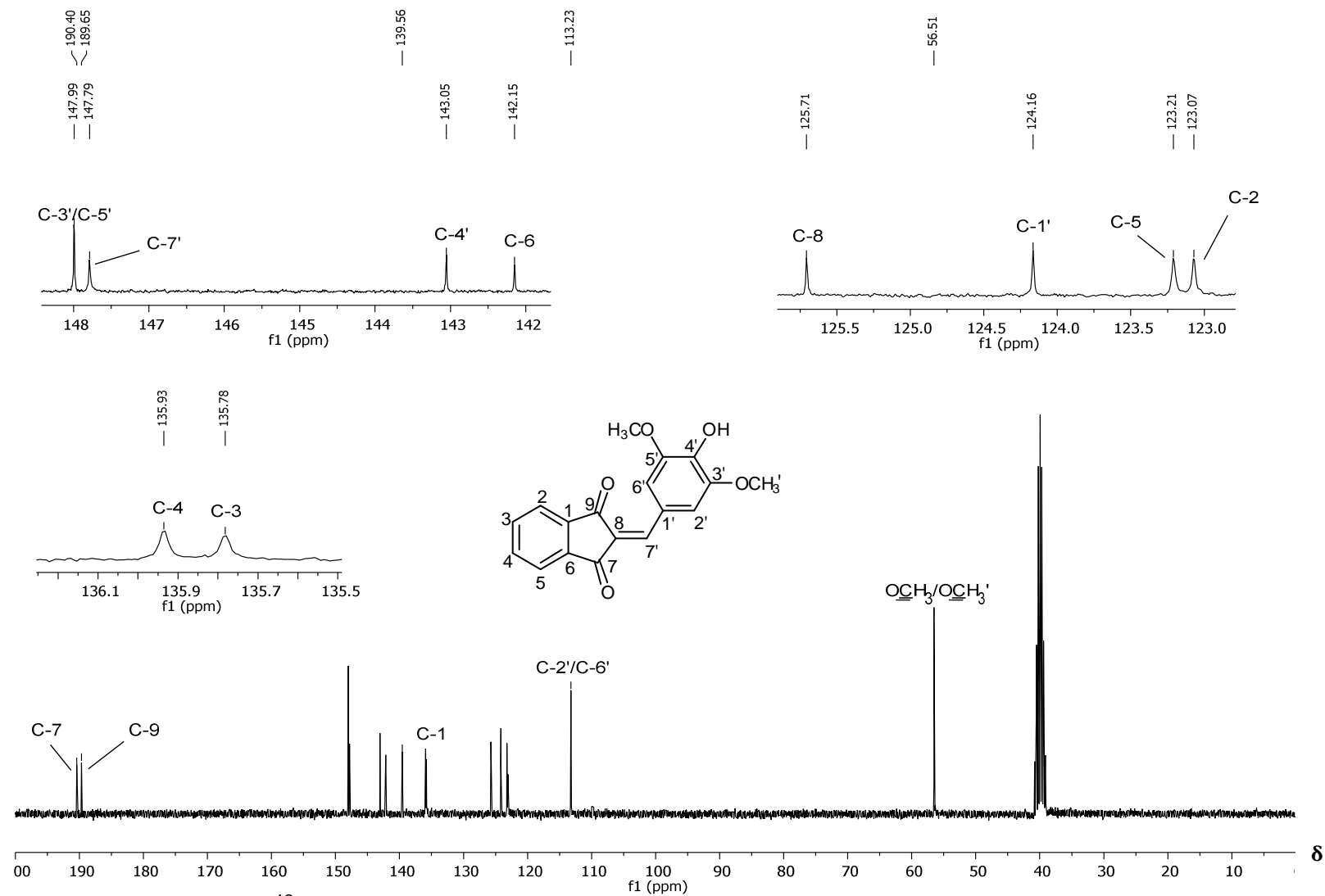


Figura 39 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) do composto 15.

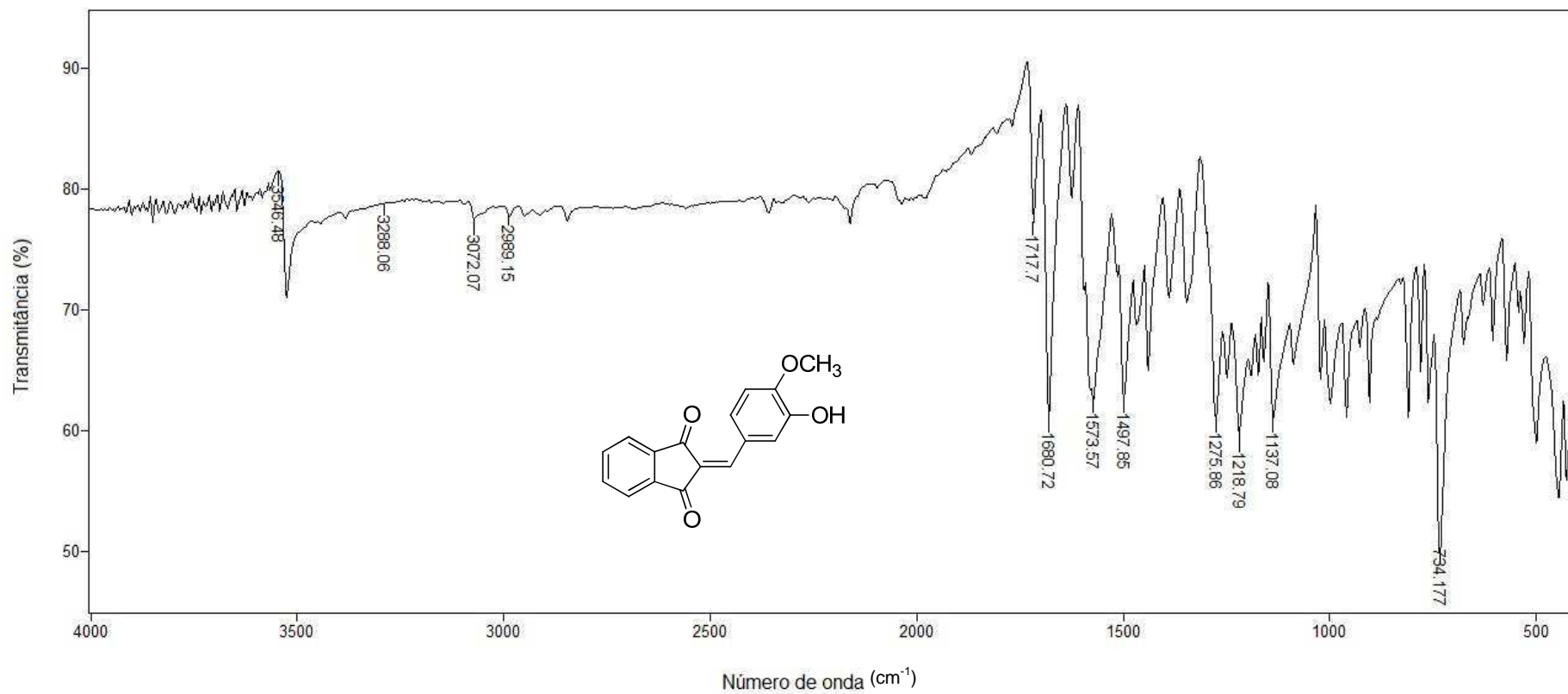


Figura 40 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **16**.

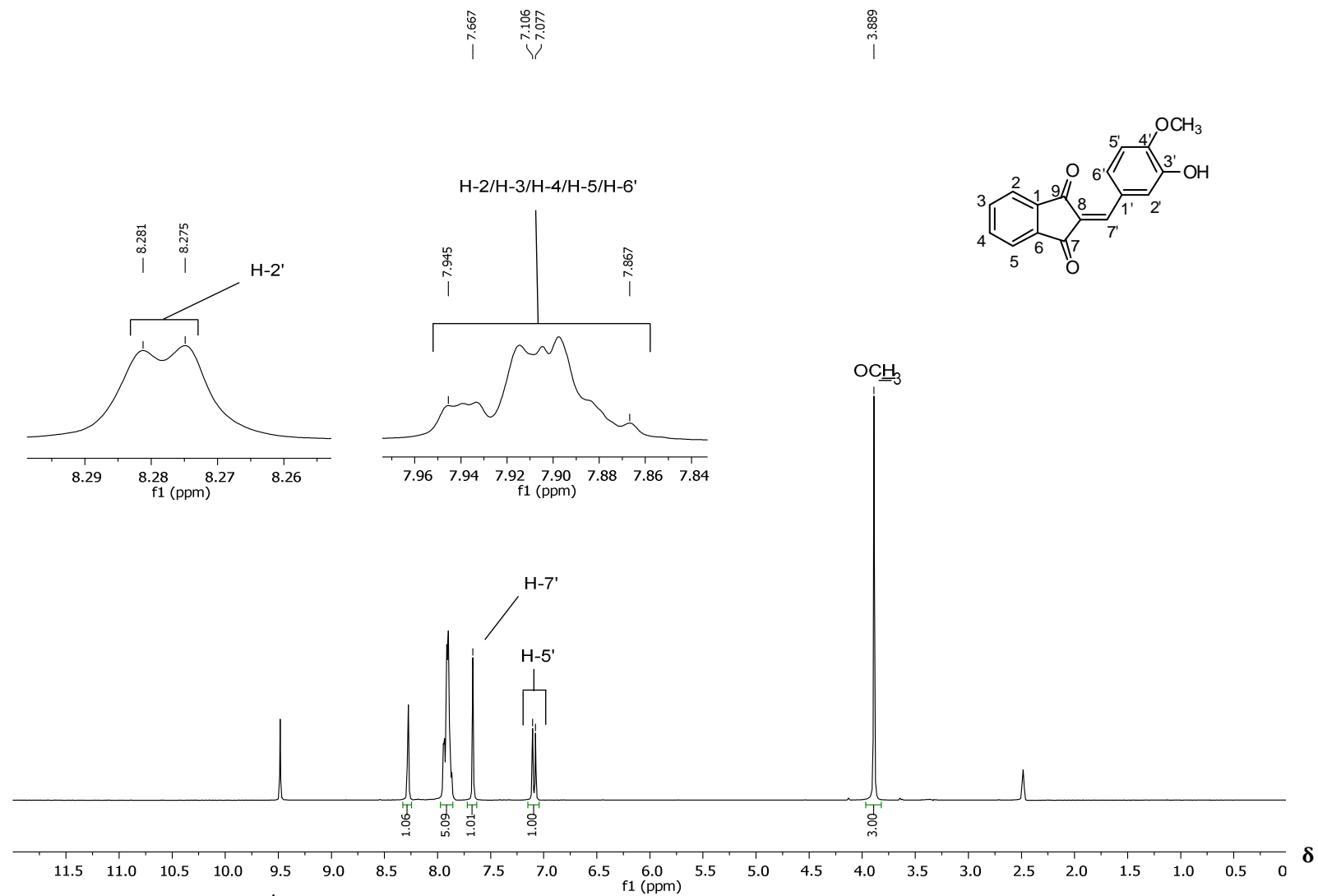


Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **16**.

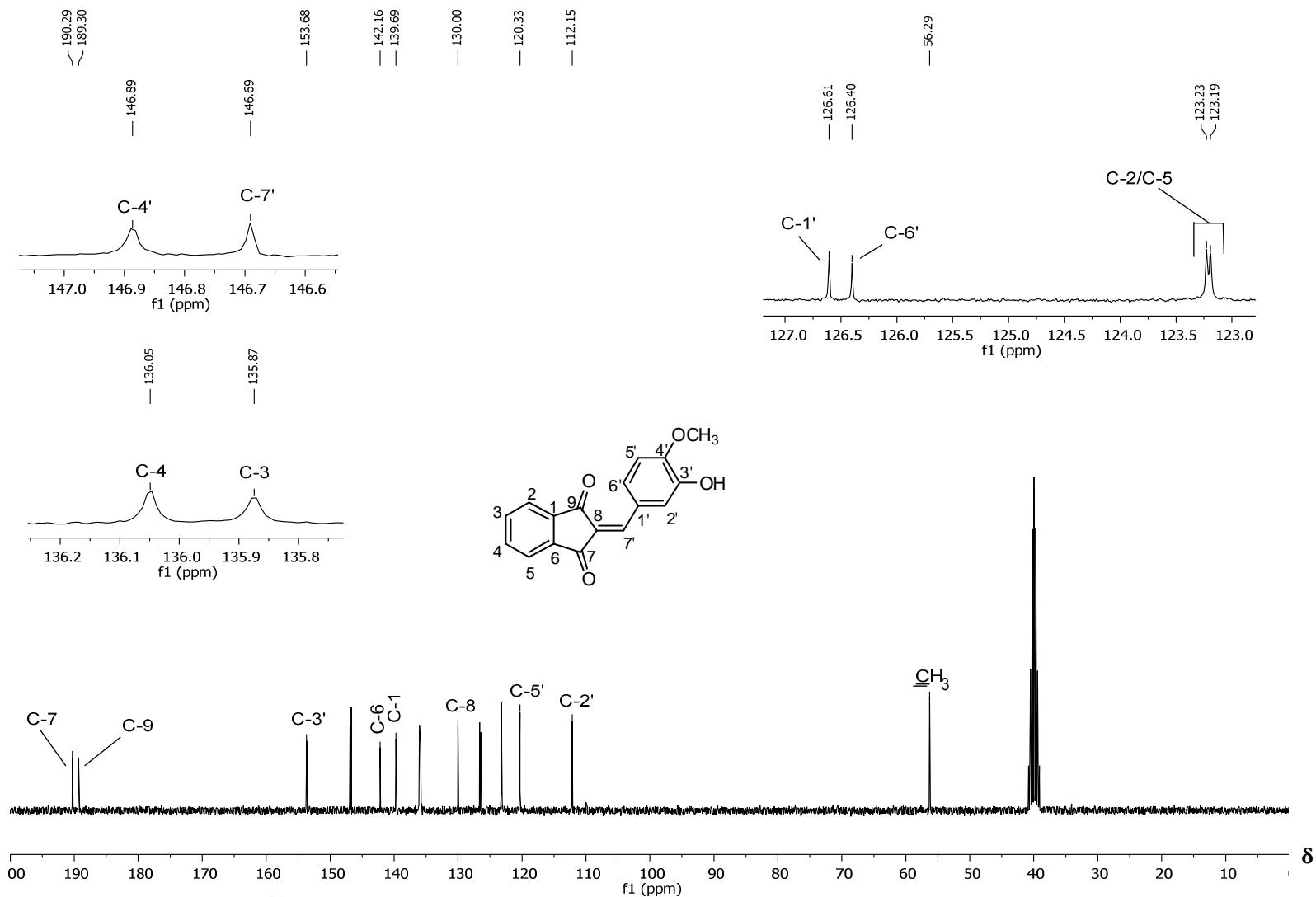


Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **16**.

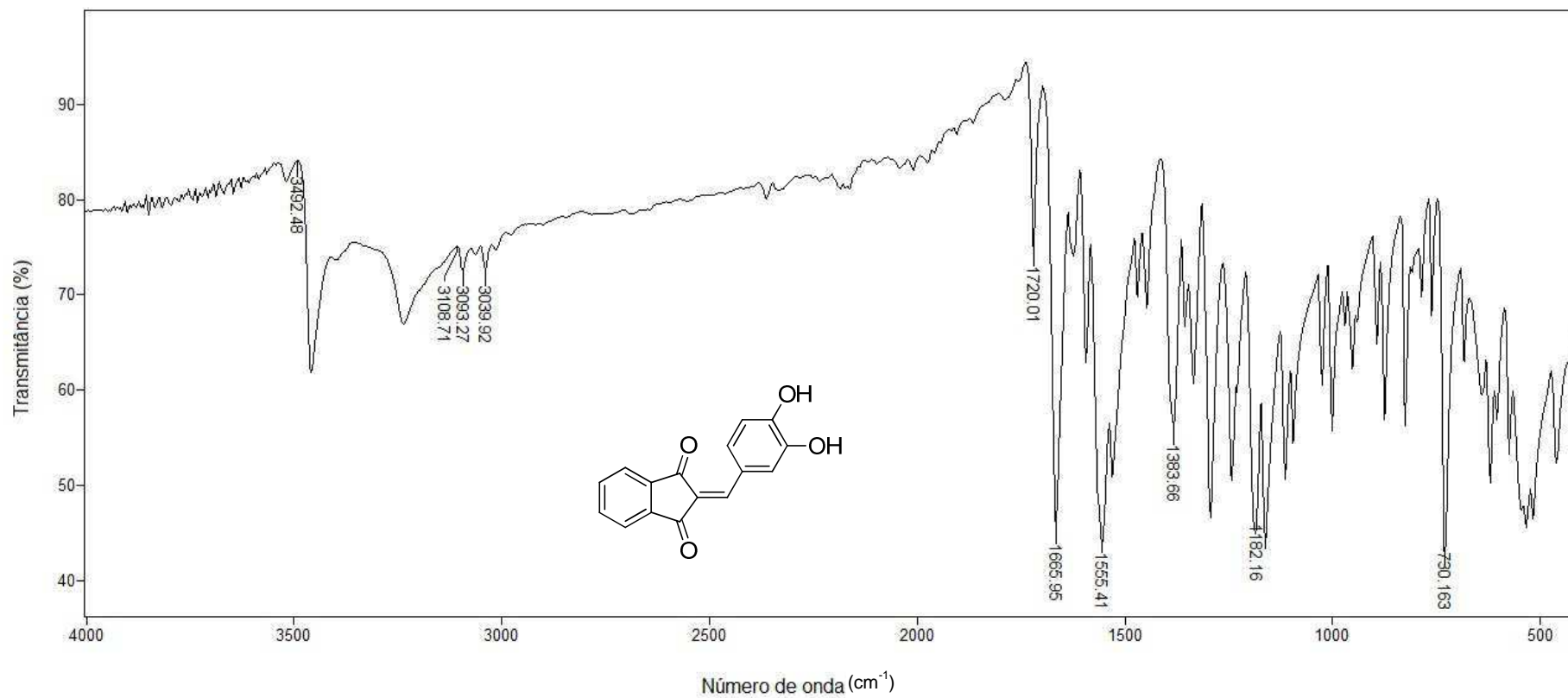


Figura 43 - Espectro no Infravermelho (ATR) do composto **17**.

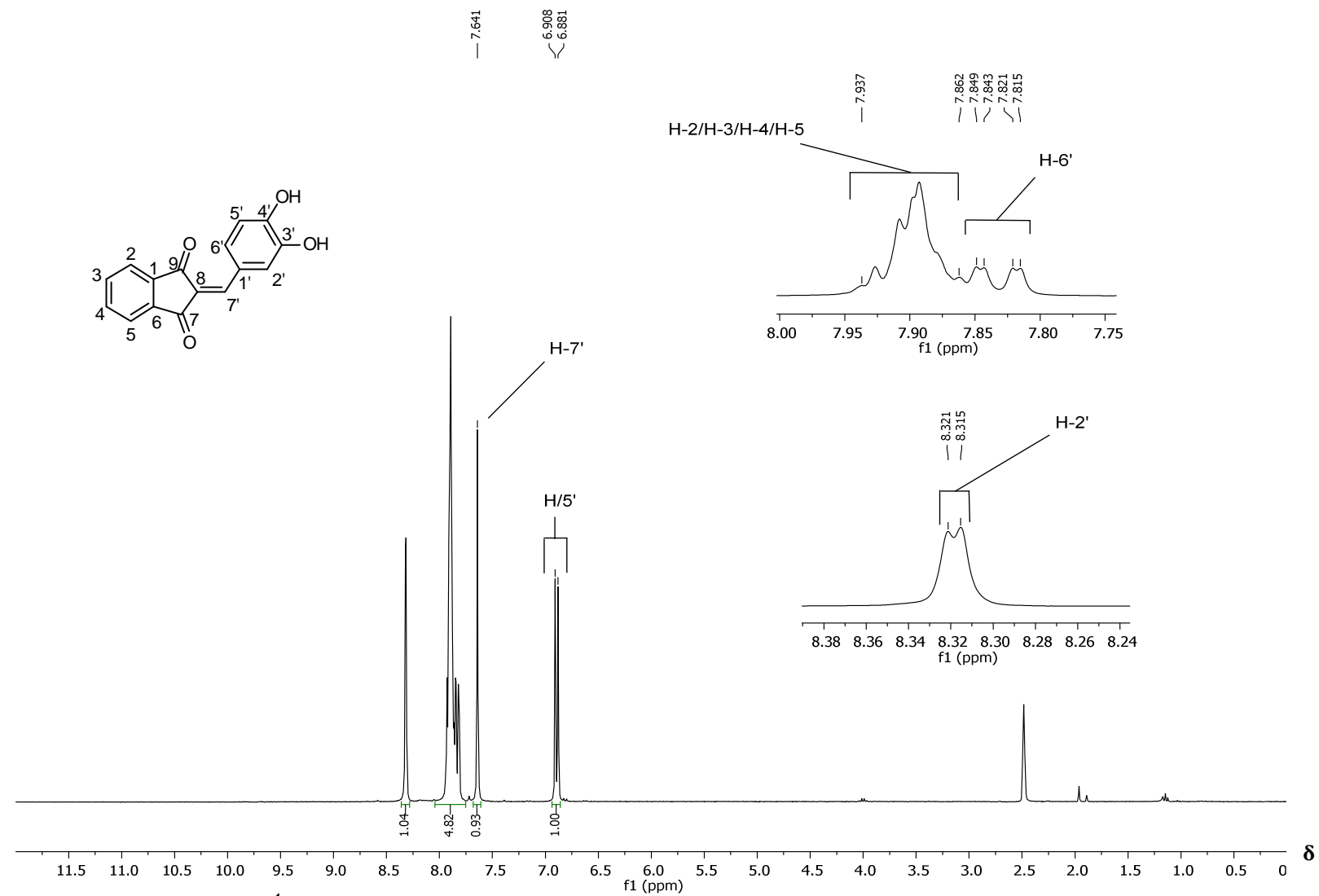


Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto **17**.

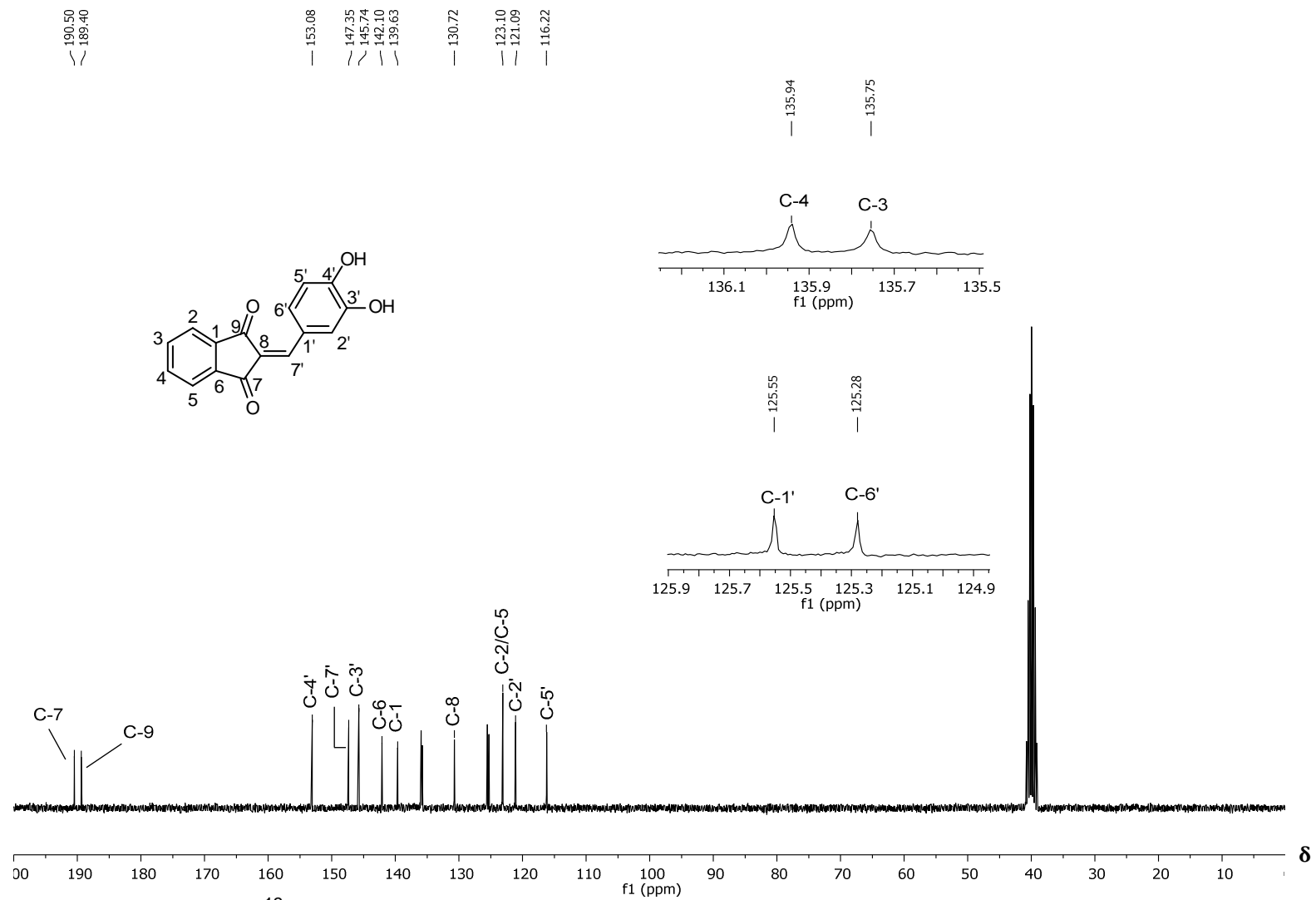


Figura 45 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do composto 17.