

ANA CRISTINA MENDES MIRANDA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS E
CITOTÓXICAS DE ANÁLOGOS AOS RUBROLÍDEOS E SUAS LACTAMAS
DERIVADAS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

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

T

Miranda, Ana Cristina Mendes, 1987-
M672s Síntese e avaliação das atividades antibacterianas e
2016 citotóxicas de análogos aos rubrolídeos e suas lactamas
 derivadas / Ana Cristina Mendes Miranda. – Viçosa, MG, 2016.
 xv, 140f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Compostos orgânicos. 2. Rubrolídeos - Síntese. 3. Câncer
- Tratamento. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Química. Programa de Pós-graduação em Agroquímica.
II. Título.

CDD 22. ed. 547

ANA CRISTINA MENDES MIRANDA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS E
CITOTÓXICAS DE ANÁLOGOS AOS RUBROLÍDEOS E SUAS LACTAMAS
DERIVADAS**

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

APROVADA: 22 de dezembro de 2016.



Antônio Jacinto Demuner
(Coorientador)



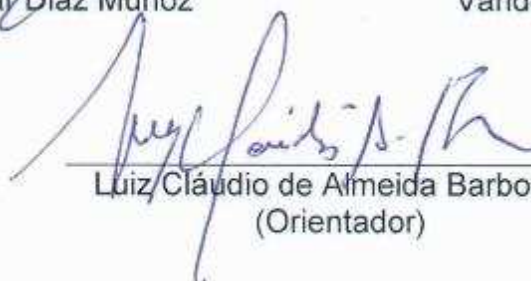
Eduardo Vinícius Vieira Varejão
(Coorientador)



Gaspar Díaz Muñoz



Vanderlúcia Fonseca de Paula



Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conduzir e conceder força necessária para cumprir cada etapa desta longa e árdua jornada.

A toda minha família, em especial, aos meus pais pelo apoio e carinho.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), pela oportunidade de realização deste treinamento.

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

Ao professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, pela confiança, apoio e dedicação incansável na orientação de excelência.

Aos coorientadores professores Antônio J. Demuner e Eduardo V. V. Varejão, pela amizade e valiosos conselhos durante toda jornada da pós-graduação.

À professora Andrea de Lima Pimenta e a aluna Mariana Sordi do Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários da Universidade Federal de Santa Catarina, pela realização dos ensaios para avaliação da atividade antibacteriana.

Aos Professores Cláudia do Ó Pessoa e Francisco Washington Araújo Barros Nepomuceno do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, pela realização dos ensaios biológicos para avaliação da atividade citotóxica.

Ao meu querido esposo Marcos, que foi o meu porto seguro, minha calma e esteve ao meu lado incondicionalmente em todos os momentos.

Ao amigo e técnico José Luiz Pereira, do Departamento de Química da UFV, pela amizade e aquisição dos espectros de massas.

À amiga e técnica Cristiane Isaac Cerceau do Departamento de Química da UFV, pela amizade e aquisição dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao técnico Márcio José Gomes Alvarenga do Departamento de Química da UFV pela aquisição dos espectros no infravermelho.

A todos professores e funcionários do Departamento de Química da UFV que contribuíram muito para minha formação.

A todos os colegas do LASA pelo convívio, amizade e pelas contribuições.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ESQUEMAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1	3
1 Introdução.....	4
1.1 Rubrolídeos.....	4
1.2 γ -Hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas	6
2 Material e Métodos.....	9
2.1 Técnicas experimentais	9
2.2 Técnicas espectroscópicas.....	9
2.3 Procedimentos sintéticos	10
3 Resultados e Discussão	42
3.1 Síntese do 2,5-dimetoxibenzaldeído	42
3.2 Síntese da lactona 3,4-dibromofuran-2(5 <i>H</i>)-ona.....	43
3.3 Síntese das 4-aryl-3-bromofuran-2(5 <i>H</i>)-onas pelo acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura	44
3.4 Síntese dos análogos aos rubrolídeos pela reação de alquilidenação	48
3.5 Síntese das γ -hidroxipirrol-2(5 <i>H</i>)-onas.....	58
3.6 Síntese das γ -alquilidenopirrol-2(5 <i>H</i>)-onas	67
4 Conclusões.....	82
5 Referências bibliográficas.....	83

CAPÍTULO 2	88
1 Introdução.....	89
1.1 Antibióticos.....	89
1.2 Biofilmes bacterianos.....	92
2 Material e Métodos.....	98
2.1 Procedimentos sintéticos	98
2.2 Preparo de soluções utilizadas no ensaio biológico.....	99
2.3 Material biológico e meio de cultura.....	99
2.4 Ensaio de inibição do crescimento bacteriano e da formação de biofilme.....	99
3 Resultados e Discussão	101
3.1 Efeito dos compostos sobre o crescimento planctônico	101
3.2 Inibição da formação do biofilme bacteriano.....	106
4 Conclusões.....	111
5 Referências bibliográficas.....	112
CAPÍTULO 3	117
1 Introdução.....	118
2 Material e Métodos.....	122
2.1 Procedimentos sintéticos	122
2.2 Ensaio biológico para avaliação da atividade citotóxica	122
3 Resultados e Discussão	124
4 Conclusões.....	128
5 Referências bibliográficas.....	129
CONCLUSÕES GERAIS.....	131
APÊNDICE	132

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 - Estruturas dos rubrolídeos A-H (1-8).	4
Figura 1.2 - Estruturas dos rubrolídeos I-N (9-14) e do rubrolídeo O (15).....	5
Figura 1.3 - Estruturas dos rubrolídeos P (16), Q (17), 3''-bromorubrolídeo F (18), 3'-bromo-rubrolídeo E (19), 3'-bromorubrolídeo E (20) e 3',3''-dibromorubrolídeo E (21)....	5
Figura 1.4 - Estrutura do análogo ao rubrolídeo ativo sobre a inibição da fotossíntese.....	6
Figura 1.5 - Estrutura geral de γ -hidroxi- γ -lactamas 23 e γ -alquilideno- γ -lactamas 24.....	6
Figura 1.6 - Estruturas de γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas sintéticas.	7
Figura 1.7 - Espectro no infravermelho do composto 32h.	49
Figura 1.8 - Espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto 32h.	50
Figura 1.9 - Valores para constantes de acoplamento entre hidrogênios e hidrogênio e flúor.	50
Figura 1.10 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 32h.	51
Figura 1.11 - Valores para constantes de acoplamento entre carbono e flúor.	52
Figura 1.12 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 32h.....	53
Figura 1.13 - Mapa de contornos HSQC (expandido) do composto 32h.....	54
Figura 1.14 - Mapa de contornos HSQC do composto 32h.....	55
Figura 1.15 - Mapa de contornos NOESY (expandido) do composto 32h.....	56
Figura 1.16 - Espectro no IV do composto 33h.	59
Figura 1.17 - Espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto 33h. ...	60
Figura 1.18 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto 33h.	61
Figura 1.19 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) do composto 33h.	63
Figura 1.20 - Mapa de contornos HSQC do composto 33h.....	64
Figura 1.21 - Mapa de contornos HSQC (expandido) do composto 33h.....	65

Figura 1.22 - RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura dos isômeros (<i>E</i>) e (<i>Z</i>) 34h obtido imediatamente após a síntese.....	69
Figura 1.23 - RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura dos isômeros (<i>E</i>) e (<i>Z</i>) 34h obtido após 4 dias em clorofórmio.....	70
Figura 1.24 - RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura dos isômeros (<i>E</i>) e (<i>Z</i>) 34h obtido após 8 dias em clorofórmio.....	71
Figura 1.25 - RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura dos isômeros (<i>E</i>) e (<i>Z</i>) 34h obtido após 5 dias em sílica e hexano/diclorometano 1:6 (v/v).	72
Figura 1.26 - Espectro no IV do composto (<i>Z</i>)34h.....	73
Figura 1.27 - Espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto (<i>Z</i>)34h.	73
Figura 1.28 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto (<i>Z</i>)34h.....	75
Figura 1.29 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura dos isômeros (<i>E</i>) e (<i>Z</i>) 34h.....	76
Figura 1.30 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto (<i>Z</i>)34h.	78
Figura 1.31 - Mapa de contornos HSQC (expandido) do composto (<i>Z</i>)34h.	79
Figura 1.32 - Mapa de contornos HSQC do composto (<i>Z</i>)34h.	80
Figura 1.33 - Mapa de contornos NOESY do composto (<i>Z</i>)34h.	81
Figura 2.1 - Primeiros antibióticos sintéticos salvarsan e proflavina.....	89
Figura 2.2 - Estrutura da penicilina.....	89
Figura 2.3 - Estrutura dos antibióticos sintéticos isoniazida, trimetropim e metronidazol.....	90
Figura 2.4 - Estrutura dos antibióticos imipenem (derivado β -lactâmico) e eritromicina.....	90
Figura 2.5 - Estrutura dos compostos daptomicina (44), dalbavancina (45) e teixobactina (46).....	92

Figura 2.6 - Ciclo de vida do biofilme. 1) Fixação; 2) Secreção de substâncias e adesão irreversível; 3) Crescimento; 4) Maturação; 5) Dispersão (MUSK e HERGENROTHER, 2006).	93
Figura 2.7 - Estruturas do benzimidazol ABC-1 (47) furanonas halogenadas isoladas de <i>Delisea pulchra</i> (48-51) e furanona sintética (52).....	96
Figura 2.8 - Curva sigmoideal correspondente a inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> pelo composto (Z)34b.	102
Figura 2.9 - Efeito dos compostos 32a-m, 33a-m, 34a-m e (Z)34a-m a 44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre a formação do biofilme de <i>S. aureus</i> (ATCC 25923).....	107
Figura 2.10 - Efeito dos compostos 32a-m, 33a-m, 34a-m e (Z)34a-m a 44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre a formação do biofilme de <i>S. epidermidis</i> (ATCC 35547).....	108
Figura 3.1 - Análogos dos rubrolídeos 53 e 54 que apresentaram atividade citotóxica. .	120
Figura 3.2 - Estruturas das miceliotermofilinas A (55), C (56) e E (57) isoladas a partir do fungo termófilo <i>Myceliophthora thermophila</i>	120
Figura 3.3 - Conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tretrazólio (MTT) para o produto de cor azul formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase.....	123
Figura 3.4 - Citotoxicidade das 4-aril-5-benzilideno-3-bromofuran-2(5H)-onas 32a-m em linhagens celulares de câncer humano.	124
Figura 3.5 - Citotoxicidade das γ -hidroxi- γ -lactamas 33a-m em linhagens celulares de câncer humano.....	125
Figura 3.6 - Citotoxicidade das (Z) γ -alquilideno- γ -lactamas (Z)34a-m em linhagens celulares de câncer humano.	126
Figura 3.7 - Citotoxicidade das misturas (Z/E) γ -alquilideno- γ -lactamas 34a-m em linhagens celulares de câncer humano.	127

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1 - 4-aril-3-bromofuran-2(5 <i>H</i>)-onas sintetizadas pelo acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura	44
Tabela 1.2 - γ -alquilidenofuran-2(5 <i>H</i>)-onas sintetizadas.	48
Tabela 1.3 - γ -hidroxipirrol-2(5 <i>H</i>)-onas sintetizadas	58
Tabela 1.4 - γ -alquilidenopirrol-2(5 <i>H</i>)-onas sintetizadas.....	67

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1- Estrutura dos compostos 32a-m, 33a-m e 34a-m.	98
Tabela 2.2 - Concentração dos compostos 32a-m, 33a-m, (<i>Z</i>) e (<i>E</i>) 34a-m e (<i>Z</i>)34a-m capazes de inibir em 50% (IC ₅₀) o crescimento bacteriano de <i>S. aureus</i>	103
Tabela 2.3 - Concentração dos compostos 32a-m, 33a-m, (<i>Z</i>) e (<i>E</i>) 34a-m capazes de inibir em 50% (IC ₅₀) o crescimento bacteriano de <i>S. epidermidis</i>	104
Tabela 2.4 - Atividade dos rubrolídeos naturais sobre a inibição do crescimento bacteriano.....	105
Tabela 2.5 - Valores de IC ₅₀ para a inibição da formação de biofilme de <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) apresentados pelos compostos (<i>Z</i>)34a-h.	109

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, estimados para 2016 por sexo (exceto pele não melanoma) (INCA 2016).	118
---	-----

APÊNDICE

Tabela A 1 - Efeito dos compostos 32a-m, 33a-m, 34a-m e (<i>Z</i>)34a-m nas concentrações de 87,5, 43,8, 21,8, 10,9, 5,5, 2,7, 1,4, 0,68, 0,34 e 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre o crescimento planctônico de <i>S. aureus</i>	133
---	-----

Tabela A 2 - Efeito dos compostos 32a-m, 33a-m, 34a-m e (Z)34a-m nas concentrações de 87,5, 43,8, 21,8, 10,9, 5,5, 2,7, 1,4, 0,68, 0,34 e 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sobre o crescimento planctônico de <i>S. epidermidis</i>	135
Tabela A 3 - Efeito dos compostos 32a-m, 33a-m, 34a-m e (Z)34a-m sobre a formação do biofilme bacteriano de <i>S. aureus</i>	137
Tabela A 4 - Efeito dos compostos 32a-m, 33a-m, 34a-m e (Z)34a-m sobre a formação do biofilme bacteriano de <i>S. epidermidis</i>	139

LISTA DE ESQUEMAS

CAPÍTULO 1

Esquema 1.1 - Análise retrossintética para preparação das γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas derivadas dos análogos aos rubrolídeos.....	8
Esquema 1.2- Síntese do 2,5-dimetoxibenzaldeído 35.	42
Esquema 1.3 - Preparo da 3,4-dibromofuran-2(5 <i>H</i>)-ona 30.	43
Esquema 1.4 - Redução do ácido mucobrômico.....	44
Esquema 1.5 - Reações da 3,4-dibromofuranona 30 em meio básico forte.....	46
Esquema 1.6 - Mecanismo plausível para a reação catalisada por paládio mediada por Ag ₂ O entre 30 e ácidos arilborônicos (BELLINA et al., 2001b).	47
Esquema 1.7 - Proposta para o mecanismo da reação de alquilidação utilizada na síntese das (<i>Z</i>)-5-alquilideno-4-aril-3-bromofuran-2(5 <i>H</i>)-onas.	57
Esquema 1.8 - Mecanismo de formação das γ -hidroxipirrol-2(5 <i>H</i>)-onas.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia a gás/Espectrometria de massas
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
ddd	Duplo dupleto duplo
δ	Deslocamento químico
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilamina
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
MHz	Megahertz
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
ppm	Partes por milhão
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico
QS	Quorum sensing
R _f	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	simpleto
TMS	Tetrametilsilano
TBDMSOTf	<i>tert</i> -butildimetilsililtrifluorometanossulfonato
T _f	Temperatura de fusão
THF	Tetrahidrofurano
v/v	Volume/volume

RESUMO

MIRANDA, Ana Cristina Mendes, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2016. **Síntese e avaliação das atividades antibacterianas e citotóxicas de análogos aos rubrolídeos e suas lactamas derivadas.** Orientador: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa. Coorientadores: Antônio Jacinto Demuner e Eduardo Vinícius Vieira Varejão.

Os rubrolídeos naturais e seus análogos sintéticos, bem como as γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas, apresentam grande variedade de atividades biológicas. Neste trabalho, eles foram usados como modelo para o desenvolvimento de novos compostos com potenciais atividades biológicas. Uma série de análogos aos rubrolídeos foi sintetizada e convertida nas γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas correspondentes. A rota sintética escolhida para a síntese desses compostos teve como material de partida o ácido mucobrômico, cuja redução com boroidreto de sódio levou à formação da 3,4-dibromofuran-2(5*H*)-ona com 81% de rendimento. Esse composto foi posteriormente submetido à reação de acoplamento de Suzuki com diferentes ácidos arilborônicos para a obtenção regioseletiva de quatro novas 4-aryl-3-bromofuran-2(5*H*)-onas, com rendimentos que variaram de 43% a 70%. Numa etapa posterior, as 4-aryl-3-bromofuran-2(5*H*)-onas foram submetidas a reações de adição aldólica com diferentes aldeídos aromáticos. Essas reações foram realizadas na temperatura ambiente e na presença de *N,N*-diisopropiletilamina e *tert*-butildimetilsililtrifluorometanossulfonato. O tratamento dos adutos aldólicos obtidos com 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno sob refluxo resultou na obtenção estereosseletiva de 13 γ -alquilidenobutenólídeos análogos aos rubrolídeos na configuração *Z*, com rendimentos variando de 58% a 93%. Esses compostos foram convertidos nas γ -hidroxi- γ -lactamas correspondentes, por meio da reação de lactamização com isobutilamina a 0 °C, apresentando rendimentos que variaram de 81% a 97%. Finalmente, a desidratação das γ -hidroxi- γ -lactamas com ácido *p*-toluenossulfônico levou à formação das (*Z*) e (*E*)- γ -alquilideno- γ -lactamas, com rendimentos totais que variaram entre 77% e 94%. Após a purificação por coluna cromatográfica, apenas o isômero *Z* foi isolado. Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por espectrometria de massas, espectroscopia no IV e RMN de ¹H e ¹³C. Técnicas bidimensionais como HSQC e NOESY auxiliaram na atribuição de

sinais dos espectros de RMN de hidrogênio e de carbono e na elucidação da configuração da ligação dupla das unidades γ -alquilideno. Cinquenta e dois compostos foram sintetizados, sendo 51 inéditos. Todos os compostos foram submetidos a ensaios para avaliação da inibição do crescimento planctônico e inibição da formação de biofilme de duas bactérias de grande importância médica, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Para *S. aureus*, a maioria dos compostos apresentaram IC₅₀ maior que 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Apenas **(Z)34a** e **(Z)34b** inibiram fortemente o crescimento bacteriano (IC₅₀ = 5,6 e 1,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), e **32m** e **33l** apresentaram atividades moderadas (IC₅₀ = 13,8 e 18,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Para *S. epidermidis*, os compostos exibiram, em sua maioria, IC₅₀ maior que 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O composto **34b** foi o único que demonstrou elevada atividade (IC₅₀ 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). De forma geral, os compostos não demonstraram atividade sobre a formação do biofilme de *S. epidermidis*. Entretanto, para *S. aureus*, cinco compostos foram capazes de inibir em 50% a formação de biofilme em concentrações menores que 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, destacando-se os compostos **(Z)34e** e **(Z)34f**, com valores de IC₅₀ iguais a 0,9 e 1,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os derivados lactâmicos aqui descritos apresentaram valores de IC₅₀ até quatro vezes menores do que os descritos anteriormente. Foi avaliada, ainda, a citotoxicidade dos compostos sintetizados sobre as linhagens de células tumorais SF-295 (glioblastoma), HCT-116 (carcinoma de cólon) e PC-3 (adenocarcinoma de próstata). Os compostos demonstraram baixo potencial de diminuição da viabilidade celular na concentração avaliada, e apenas o composto **32k** apresentou atividade moderada, com redução de 50,4% da viabilidade celular sobre a linhagem HCT-116. Os compostos **33f**, **33h**, **33j**, **33k**, **34a**, **34c**, **34f** e **34k** apresentaram redução da viabilidade celular maior que 40% sobre, pelo menos, uma linhagem testada.

ABSTRACT

MIRANDA, Ana Cristina Mendes, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, December, 2016. **Synthesis and evaluation of antibacterial and cytotoxic activities of rubrolide analogs and their derived lactams.** Adviser: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa. Co-advisers: Antônio Jacinto Demuner and Eduardo Vinícius Vieira Varejão.

Natural rubrolides and their synthetic analogs, as well as γ -hydroxy- γ -lactams and γ -alkylidene γ -lactams, present a wide variety of biological activities. In this work, they were used as a model for the development of new compounds with potential biological activities. A series of analogs to the rubrolides was synthesized and converted into the corresponding γ -hydroxy- γ -lactams and γ -alkylidene- γ -lactams. The synthetic route chosen for the synthesis of these compounds had the starting material mucobromic acid, which reduction with sodium borohydride led to the formation of 3,4-dibromofuran-2-(5*H*)-one in 81% yield. This compound was subsequently subjected to the Suzuki coupling reaction with different arylboronic acids for the regioselective production of four novel 4-aryl-3-bromofuran-2-(5*H*)-ones in yields ranging from 43% to 70%. In a subsequent step, the 4-aryl-3-bromofuran-2-(5*H*)-ones were subjected to aldol addition reactions with different aromatic aldehydes. These reactions were carried out at room temperature and in the presence of *N,N*-diisopropylethylamine and *tert*-butyldimethylsilyltrifluoromethanesulfonate. Treatment of aldol adducts obtained with 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene under reflux resulted in the stereoselective generation of 13 γ -alkylidenobutenolides analogous to the rubrolides in the *Z* configuration, in yields ranging from 58% to 93%. These compounds were converted to the corresponding γ -hydroxy- γ -lactams by the lactamization reaction with isobutylamine at 0 °C, yields ranging from 81% to 97%. Finally, dehydration of γ -hydroxy- γ -lactams with *p*-toluenesulfonic acid led to the formation of (*Z*) and (*E*)- γ -alkylidene- γ -lactams, in total yields ranging from 77% to 94%. After purification by column chromatography, only the *Z* isomer was isolated. All synthesized compounds were characterized by mass spectrometry, IR spectroscopy and ¹H and ¹³C NMR. Two-dimensional techniques such as HSQC and NOESY aided the assignment of signals from the hydrogen and carbon NMR spectra and elucidation of the γ -alkylidene unit double bond configuration. Fifty-two compounds were synthesized, 51 of which were

unpublished. All the compounds were tested for inhibition of planktonic growth and inhibition of biofilm formation of two highly important bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. For *S. aureus*, most of the compounds had IC₅₀ greater than 40 µg mL⁻¹. Only **(Z)34a** and **(Z)34b** strongly inhibited bacterial growth (IC₅₀ = 5.6 and 1.8 µg mL⁻¹, respectively), and **32m** and **33l** presented moderate activities (IC₅₀ = 13.8 and 18.9 µg mL⁻¹, respectively). For *S. epidermidis*, the compounds exhibited, for the most part, IC₅₀ greater than 40 µg mL⁻¹. Compound **34b** was the only one that demonstrated high activity (IC₅₀ 6.0 µg mL⁻¹). In general, the compounds did not demonstrate activity on the formation of the *S. epidermidis* biofilm. However, for *S. aureus*, five compounds were able to inhibit biofilm formation in concentrations lower than 10 µg mL⁻¹ by 50%, with the compounds **(Z)34e** and **(Z)34f**, with the same IC₅₀ values To 0.9 and 1.3 µg mL⁻¹, respectively. The lactam derivatives described herein have IC₅₀ values up to four times lower than those described above. Cytotoxicity of the compounds synthesized on SF-295 (glioblastoma), HCT-116 (colon carcinoma) and PC-3 (prostate adenocarcinoma) tumor cell lines was also evaluated. The compounds showed low potential for decreased cell viability in the evaluated concentration, and only **32k** showed moderate activity, with a reduction of 50.4% in cell viability over the HCT-116 lineage. Compounds **33f**, **33h**, **33j**, **33k**, **34a**, **34c**, **34f** and **34k** showed reduction of cell viability greater than 40% on at least one tested lineage.

INTRODUÇÃO GERAL

Na busca por novas moléculas biologicamente ativas, os compostos eficientes no tratamento de doenças infecciosas e neoplasias têm despertado grande interesse devido ao impacto da mortalidade associada a esses quadros clínicos e ao desenvolvimento de resistência, o que limita o tempo de vida útil dos medicamentos e resulta na necessidade de constante introdução de novos compostos (SPELLBERG; SHLAES, 2014; BUSH et al., 2011).

A descoberta de medicamentos antimicrobianos é singularmente difícil em razão, principalmente, da baixa penetração dos compostos nas células bacterianas (PAYNE et al., 2007). Apesar dos enormes esforços dedicados ao desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento do câncer, ainda há necessidade urgente de elaboração de fármacos antitumorais ativos contra tumores não tratáveis, com menos efeitos secundários e, ou, maior eficiência terapêutica (DEMAIN; VAISHNAV, 2011).

Diversas estratégias e metodologias podem ser empregadas para a síntese de moléculas bioativas. Não surpreendentemente, a química de produtos naturais representa grande fonte de inspiração, uma vez que seres vivos, como plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias, sintetizam metabólitos secundários com diversas atividades biológicas (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Os fármacos em uso clínico atualmente são, em sua grande maioria, de origem natural ou sintetizados a partir de um planejamento sintético fundamentado em produtos naturais (BARREIRO; BOLZANI, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2007; CRAGG; NEWMAN, 2013).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, vem utilizando produtos naturais como modelos para desenvolver várias pesquisas voltadas para a descoberta de novos compostos com atividade herbicida reguladora do crescimento de plantas, antitumoral e, mais recentemente, com atividade inibitória sobre o crescimento planctônico e sobre a formação de biofilmes bacterianos. Entre os produtos naturais utilizados como modelo estão os rubrolídeos, e grande número de análogos a eles foram sintetizados e avaliados quanto às suas atividades biológicas. Algumas lactamas derivadas de rubrolídeos foram sintetizadas e apresentaram atividade inibitória sobre a formação de biofilme bacteriano e citotoxicidade sobre linhagens de células tumorais. Entretanto, devido ao pequeno grupo de lactamas sintetizadas,

ainda é necessária uma investigação mais ampla e criteriosa sobre essa classe de compostos.

Neste trabalho foram realizadas a síntese e avaliação das atividades antibacterianas e citotóxicas de novos análogos aos rubrolídeos e suas lactamas derivadas, e os resultados foram descritos na forma de capítulo, com a seguinte organização: no Capítulo 1, foram descritas as etapas envolvidas na síntese de novos análogos dos rubrolídeos e suas γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas derivadas. Todos os compostos sintetizados e purificados foram identificados conforme descrito neste capítulo. No Capítulo 2, foram avaliadas as potenciais atividades antibacterianas e antibiofilmes dos compostos sintetizados sobre duas bactérias de importância médica: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. No Capítulo 3, os compostos sintetizados foram avaliados quanto à citotoxicidade sobre três linhagens celulares de câncer humano SF-295 (glioblastoma), HCT-116 (carcinoma de cólon) e PC-3 (adenocarcinoma de próstata).

CAPÍTULO 1

SÍNTESE DE NOVAS γ -HIDROXI- γ -LACTAMAS E γ -ALQUILIDENO- γ -LACTAMAS A PARTIR DE ANÁLOGOS DOS RUBROLÍDEOS

1 Introdução

1.1 Rubrolídeos

A subunidade furan-2(5H)-ona está presente em um grande número de produtos naturais conhecidos como butenolídeos. Compostos pertencentes a essa família podem ser isolados das mais diversas fontes, como esponjas, algas, animais, plantas e insetos (KUANG et al., 2008). Essa subunidade corresponde à estrutura responsável pela indução de uma grande variedade de atividades biológicas como fungicida, bactericida, anti-inflamatória, citotóxica e reguladora de germinação de sementes (MURTHY et al., 2009).

Um importante membro da família dos butenolídeos são os rubrolídeos. Isolados pela primeira vez por Miao e Andersen (1991) a partir da ascídia marinha *Rutereella rubra*, os compostos foram identificados como rubrolídeos A-H (1-8) e correspondem a butirolactonas com duas unidades *p*-hidroxifenil, com ou sem átomos de halogênios, conforme apresentado na Figura 1.1. Esses compostos demonstraram elevada atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus*.

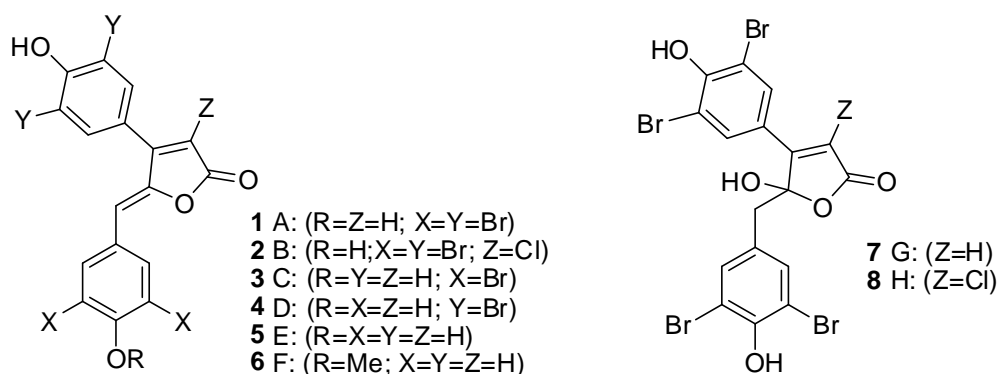


Figura 1.1 - Estruturas dos rubrolídeos A-H (1-8).

Na busca por produtos naturais farmacologicamente ativos, Ortega et al. (2000) investigaram a ascídia marinha *Synoicum blochmanni* e isolaram seis novos rubrolídeos que foram caracterizados como rubrolídeos I-N (Figura 1.2). Essas substâncias demonstraram significativa citotoxicidade contra algumas linhagens de células tumorais. Já em 2007, o rubrolídeo O (Figura 1.2) foi identificado em estudos

realizados com extratos da ascídia da Nova Zelândia *Synoicum* n. sp. e apresentou atividade anti-inflamatória (PEARCE et al., 2007).

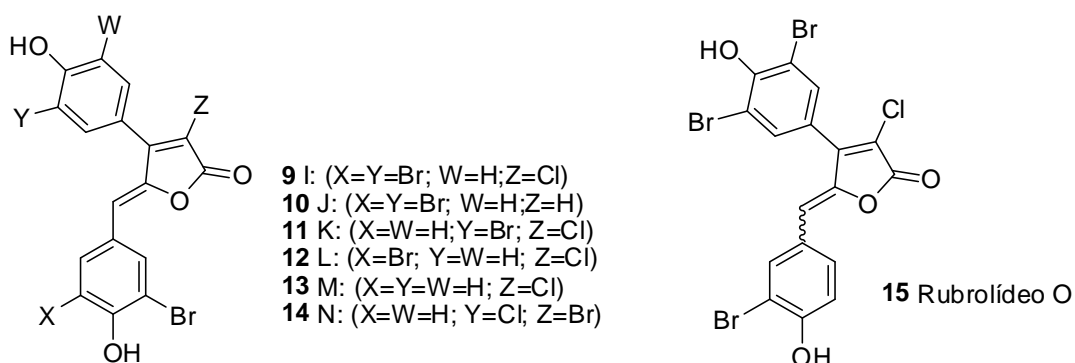


Figura 1.2 - Estruturas dos rubrolídeos I-N (**9-14**) e do rubrolídeo O (**15**).

Também foram isolados os rubrolídeos P e Q da ascídia *Pseudodistoma antioja* por Wang et al. (2012) e os rubrolídeos 3''-bromorubrolídeo F, 3'-bromorubrolídeo E, 3'-bromorubrolídeo F e 3',3''-dibromorubrolídeo E (Figura 1.3) foram isolados da ascídia *Synoicum globosum* por Sikorska et al. (2012).

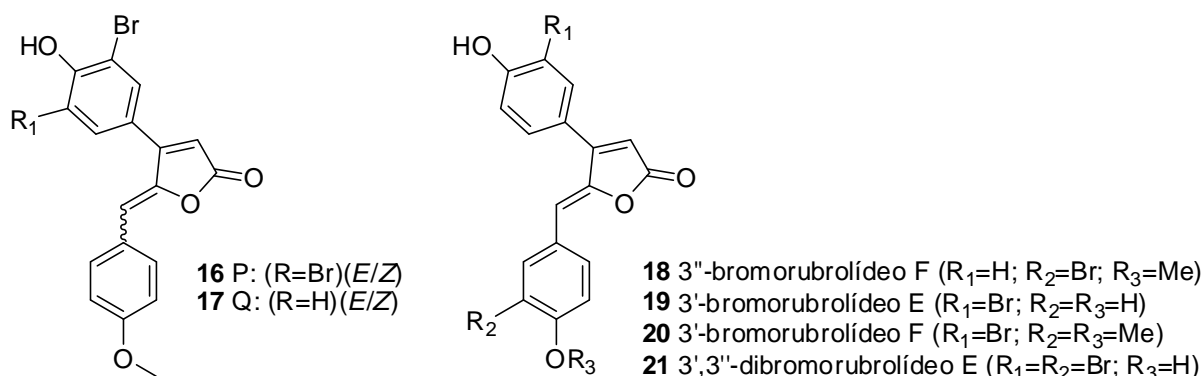


Figura 1.3 - Estruturas dos rubrolídeos P (**16**), Q (**17**), 3''-bromorubrolídeo F (**18**), 3'-bromo-rubrolídeo E (**19**), 3'-bromorubrolídeo E (**20**) e 3',3''-dibromorubrolídeo E (**21**).

Recentemente foi relatada a síntese e a atividade de inibição da fotossíntese de uma série de análogos aos rubrolídeos (BARBOSA et al., 2012; VAREJÃO et al., 2014a, 2014b, 2015; PEREIRA et al., 2015). A grande maioria dos análogos sintéticos interfere na cadeia de transporte de elétrons dos cloroplastos inibindo a fotossíntese. O composto mais ativo mostrou valor de IC₅₀ (concentração que provoca 50% de inibição) iguais a 1,1±0,2 μM (**22**) (Figura 1.4), apenas uma ordem de grandeza maior do que o herbicida comercial diuron (0,27 μM) (BARBOSA et al., 2012; VAREJÃO et al., 2014b,

2015). Estes resultados mostram claramente que os análogos aos rubrolídeos podem ser protótipos promissores para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas.

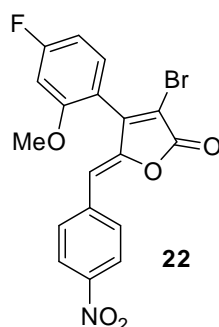


Figura 1.4 - Estrutura do análogo ao rubrolídeo ativo sobre a inibição da fotossíntese.

Estudos de correlação estrutura-atividade (QSAR) mostraram uma relação direta entre a atividade de inibição da fotossíntese e o potencial redox dos análogos aos rubrolídeos. Os compostos mais ativos foram aqueles com maior capacidade de aceitar elétrons, seja por redução ou por um mecanismo de reação eletrofílica (BARBOSA et al., 2012; VAREJÃO et al., 2014a).

1.2 γ -Hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas

Substâncias de ocorrência natural contendo nitrogênio são largamente distribuídas em plantas, fungos, animais, organismos marinhos e insetos. Muitas dessas substâncias exibem atividades biológicas como antibióticas, antitumorais, analgésicas, herbicidas, entre outros (KIBAYASHI, 2005).

Dentre a enorme variedade de classes de compostos que possuem átomos de nitrogênio, podem-se destacar as γ -hidroxi- γ -lactamas (**23**) e as γ -alquilideno- γ -lactamas (**24**) (Figura 1.5). Essas unidades estruturais estão presentes em vários produtos naturais biologicamente ativos (NAY et al., 2009).

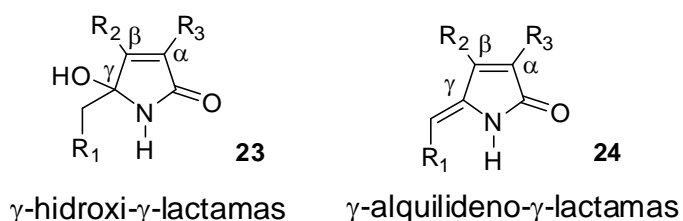


Figura 1.5 - Estrutura geral de γ -hidroxi- γ -lactamas **23** e γ -alquilideno- γ -lactamas **24**.

Também conhecidas como 5-hidroxi-3-pirrolin-2-onas e 5-alkilideno-3-pirrolin-2-onas, essas lactamas são encontradas como produtos do metabolismo de fungos, plantas e animais marinhos. Suas estruturas podem variar de simples heterociclos a sistemas mais complexos, incluindo longas cadeias carbônicas abertas ou esqueletos policíclicos fundidos.

Recentemente, Pereira et al. (2014a e 2014b) sintetizaram uma série de lactamas que demonstraram atividade sobre a inibição da formação de biofilme por bactérias de importância médica Gram-positivas, como a *Staphylococcus epidermidis*, que é responsável por infecções hospitalares associadas ao uso de cateteres, e a *Staphylococcus aureus*, patógeno humano oportunista responsável por infecções hospitalares comumente envolvendo a pele. As lactamas demonstraram também atividade sobre bactérias Gram-negativas como a *Pseudomonas aeruginosa* que estão associadas a infecções pulmonares persistentes em pacientes com fibrose cística (RICHARDS e MELANDER, 2008).

As lactamas apresentadas na Figura 1.6 foram capazes de inibir em 50% a formação de biofilme das bactérias *P. aeruginosa* em concentração tão baixa quanto $0,6 \mu\text{M}$ **3d** (**25**), enquanto o composto **2f** (**26**) inibiu em 50% a formação de biofilme da *S. aureus* na concentração de $3,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ e os compostos **2c** (**27**) e **4a** (**28**) da *S. epidermidis* nas concentrações de $13,3$ e $12,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (PEREIRA et al., 2014a).

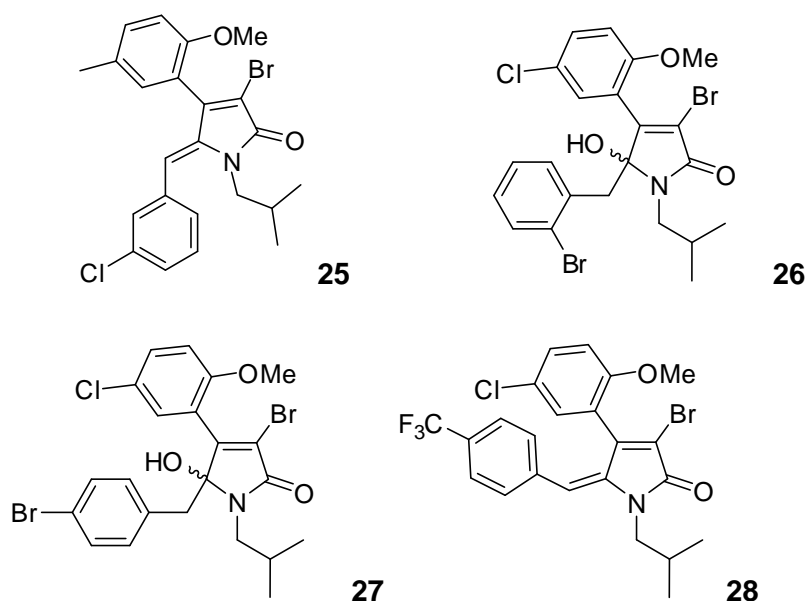
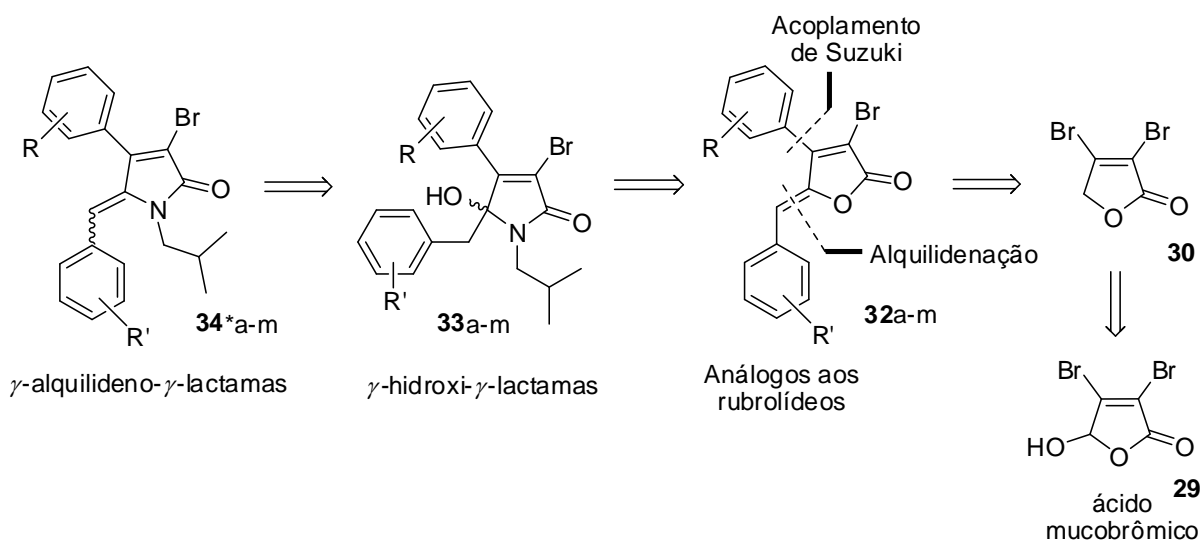


Figura 1.6 - Estruturas de γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alkilideno- γ -lactamas sintéticas.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar novos análogos aos rubrolídeos, convertê-los nos derivados γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas e submetê-los a ensaios para avaliação de suas atividades sobre a inibição da formação de biofilme bacteriano e citotoxicidade sobre linhagens de células tumorais.

No plano sintético desenvolvido para o preparo das γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas, os análogos aos rubrolídeos foram utilizados como precursores dos γ -alquilidenobutenolídeos. A metodologia foi baseada nos trabalhos de Bellina et al. (2001b), Goh et al. (2007), Pereira et al. (2014a e 2014b) e Barbosa et al. (2015) e a análise retrossintética é apresentada no Esquema 1.1.



Esquema 1.1 - Análise retrossintética para preparação das γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas derivadas dos análogos aos rubrolídeos.

As γ -alquilideno- γ -lactamas (**34**) foram obtidas a partir da desidratação das γ -hidroxi- γ -lactamas (**33**) correspondentes, preparadas pela reação dos compostos análogos aos rubrolídeos com isobutilamina. Os análogos aos rubrolídeos (**32**) foram sintetizados pela reação de alquilidenação entre as 4-aryl-3-bromofuran-2(5H)-onas (**31**) e diferentes aldeídos aromáticos. As 4-aryl-3-bromofuran-2(5H)-onas (**31**) foram obtidas pela reação de substituição regioseletiva através do acoplamento de Suzuki entre diferentes ácidos fenilborônicos substituídos e a 3,4-dibromofuran-2(5H)-ona (**30**), que foi obtida pela redução do ácido mucobrômico (**29**).

2 Material e Métodos

2.1 Técnicas experimentais

Os solventes utilizados apresentavam grau de pureza analítica e os solventes anidros empregados foram secados de acordo com a metodologia de Perrin e Armarego (1994).

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas empregando-se placas cromatográficas de sílica-gel impregnadas sobre alumínio (Polygram-UV₂₅₄ 0,20 mm Macherey – Nagel).

As placas de CCD, após observadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm), foram reveladas com solução alcoólica de ácido fosfomolibdico ou solução aquosa de permanganato de potássio.

As separações cromatográficas em coluna foram feitas utilizando-se sílica-gel 60 (70-230 mesh ou 230-400 mesh) como fase estacionária. As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF-302 e não foram corrigidas.

2.2 Técnicas espectroscópicas

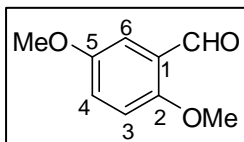
Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro VARIAN 660-IR equipado com acessório PIKE Gladi ATR (Departamento de Química - UFV).

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em aparelho Varian Mercury 300 (300 MHz). Utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3), acetona deuterada ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) ou dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) como solventes, e os espectros foram referenciados pelo sinal do padrão de referência interna tetrametilsilano (TMS) ($\delta = 0,00$). As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

Os espectros de massas foram obtidos em equipamento CG-EM SHIMADZU GCMS-QP5050A utilizando irradiação por impacto de elétrons (70 eV).

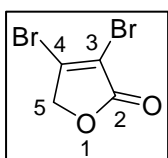
2.3 Procedimentos sintéticos

2.3.1 Síntese do 2,5-dimetoxibenzaldeído



A um balão bitubulado de 25 mL, acoplado a um condensador, adicionou-se 2,5-diidroxibenzaldeído (0,900 g; 6,52 mmol) e K_2CO_3 (3,604 g; 26,08 mmol). O sistema foi submetido a atmosfera de nitrogênio e em seguida acetona anidra (15 mL) e CH_3I (4,00 mL; 65,20 mmol) foram também adicionados. O sistema foi mantido sob agitação e refluxo, e o progresso da reação foi acompanhado por CCD. Ao final de 4 horas todo material de partida foi consumido. A mistura reacional foi transferida para um funil de separação com acetato de etila (50 mL) e lavada com solução saturada de cloreto de amônio (2 x 25 mL). A fase orgânica resultante foi secada com $MgSO_4$, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O material obtido foi purificado por cromatografia em coluna, utilizando como mistura de solventes hexano/acetato de etila 3:2 (v/v). Obteve-se 1,029 g (6,52 mmol) do composto **35** na forma de cristais brancos com 95% de rendimento. **Tr**: 47,5-48,0 °C. **CCD**: **R_f** = 0,33 hexano/acetato de etila, 3:2, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{max}$ 3328; 3103; 3068; 3046; 2991; 2972; 2879; 2841; 2773; 2058; 1976; 1861; 1672; 1617; 1586; 1504; 1473; 1433; 1292; 1225; 1046; 939; 887; 813; 717; 647; 529. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 3,77 (s, 3H, 5-OCH₃); 3,86 (s, 3H; 2-OCH₃); 6,92 (d, 1H, $J_{3,4} = 9,1$; H-3); 7,11 (dd, 1H, $J_{4,3} = 9,1$ e $J_{4,6} = 3,3$; H-4); 7,30 (d, 1H, $J_{6,4} = 3,3$; H-6); 10,43 (s, 1H; CHO). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 55,7 (5-OCH₃); 56,1 (2-OCH₃); 110,4 (C-3); 113,3 (C-6); 123,4 (C-4); 124,9 (C-1); 153,5 (C-5); 156,6 (C-2); 189,5 (CHO). **EM, m/z (%)**: 166 ([M]⁺, C₉H₁₀O₃, 100); 165 (14); 151 (32); 123 (27); 120 (27); 95 (39); 65 (26); 63 (40); 53 (39); 41 (27); 39 (18).

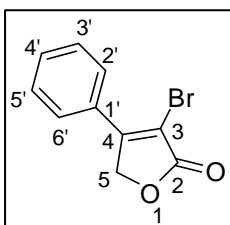
2.3.2 Síntese da lactona 3,4-dibromofuran-2(5H)-ona (30)



A um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL), conectado a um tubo contendo cloreto de cálcio, adicionou-se o ácido mucobromônico **29** (1,000 g; 3,88 mmol) e metanol anidro (15 mL). A mistura foi colocada sob agitação magnética a 0 °C e em seguida iniciou-se a adição de $NaBH_4$ (0,220 g; 5,82 mmol) em pequenas porções. Após o término da adição, a mistura resultante foi

mantida sob agitação por 15 minutos a 0 °C. Em seguida, adicionou-se 10 mL de uma solução metanólica de ácido sulfúrico 10% (v/v), previamente resfriada a 0 °C, mantendo-se a mistura resultante sob agitação por 15 minutos. Decorrido esse período, a mistura foi diluída em éter dietílico (100 mL), transferida para um funil de separação e lavada com solução saturada de NaCl (4 x 20 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio (MgSO₄) anidro e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O sólido levemente amarelo resultante foi recristalizado em uma mistura de hexano:éter dietílico 1:1 (v/v), levando à formação da lactona **30** como cristais brancos (0,798 g, 85% de rendimento). **T_f**: 89,5-90,1 °C. **CCD**: **R_f** = 0,36 hexano:diclorometano, 1:2, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\max}$ 1748; 1603; 1428; 1337; 1215; 1095; 1021; 979; 990; 746; 866; 715; 470. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 4,87 (s, 2H, H-5). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 74,5 (C-5); 115,0 (C-3); 143,9 (C-4); 166,9 (C-2). **EM, m/z (%):** 244 ([M+4]⁺, 15); 242 ([M+2]⁺, 30); 240 ([M]⁺, C₄H₂Br₂O₂, 11); 215 (8); 213 (17); 211 (9); 163 (99); 161 (100); 133 (22); 131 (19); 119 (25); 117 (27); 107 (16); 105 (22); 81 (14); 79 (14); 53 (29); 38 (78); 37 (63); 36 (15).

2.3.3 Procedimento para a síntese da 3-bromo-4-fenilfuran-2(5H)-ona (**31a**)



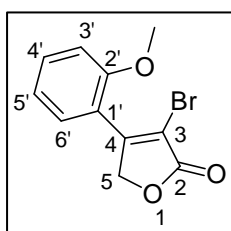
A um balão bitubulado de fundo redondo (50 mL) acoplado a um condensador, adicionou-se a lactona 3,4-dibromofuran-2(5H)-ona **30** (1,209 g; 5,00 mmol), ácido fenilborônico (0,793 g; 6,50 mmol), bisacetoneitriladicloropaládio(II) (PdCl₂(CH₃CN)₂) (0,065 g; 0,25 mmol), trifenilarsina (AsPh₃) (0,306 g; 0,100 mmol) e óxido de prata (Ag₂O) (3,48 g; 15,00 mmol). O sistema foi submetido a atmosfera de nitrogênio e adicionou-se THF anidro (20 mL), em seguida foi colocado sob agitação magnética a 65 °C por 24 horas.

A mistura reacional foi resfriada à temperatura ambiente, diluída com acetato de etila (100 mL) e filtrada a vácuo sobre terra de diatomáceas. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório para obtenção do material bruto da reação, que foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se gradiente de eluição com as misturas de solventes hexano/diclorometano 5:1; 3:1 e 1:2 (v/v). Esse procedimento resultou na formação do composto **31a** como um sólido branco com rendimento de 61% (1,107g; 3,05 mmol). **T_f**: 104,1-106,0 °C. **CCD**: **R_f** = 0,20

hexano:diclorometano, 1:1, (v/v). **IV** (cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 2923; 2851; 1751; 1609; 1439; 1337; 1189; 1059; 983; 765; 691. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 5,19 (s, 2H, H-5); 7,44-7,62 (m, 3H, H-3', H-5' e H-4'); 7,84 (dd, 2H, $J_{2',3'} = J_{6',5'} = 7,6$, $J_{2',4'} = J_{6',4'} = 2,0$, H-2' e H-6'). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 71,8 (C-5); 108,2 (C-3); 106,6 (C-3); 127,0 (C-2' e C-6'); 129,2 (C-3' e C-5'); 131,8 (C-4'); 155,9 (C-4); 169,7 (C-2). EM, m/z (%): 240 ($[\text{M}+2]^+$, 31); 238 ($[\text{M}^+]$, $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrO}_2$, 37); 211 (48); 209 (48); 129 (58); 115 (22); 105 (29); 103 (21); 102 (100); 101 (29); 75 (39); 74 (28); 63 (32); 62 (23); 51 (84); 50 (71).

Os compostos **31b-d** foram preparados empregando procedimento similar ao descrito para a síntese do composto **31a**. Todos os compostos foram caracterizados por espectroscopia no IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , experimento bidimensionais de HSQC e espectrometria de massas.

3-bromo-4-(2-metoxifenil)furan-2(5H)-ona (**31b**)

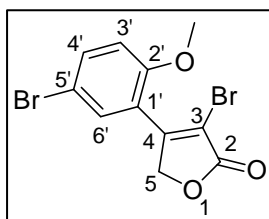


O produto **31b** (1,28 g, 4,76 mmol) foi obtido como um sólido branco com 70% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se gradiente de eluição com as misturas de solventes hexano/diclorometano 1,5:1; 1:1 e 1:1,5 (v/v).

T_f: 107,1-108,2 °C. **CCD**: **R_f** = 0,37 hexano/diclorometano, 1:2, (v/v).

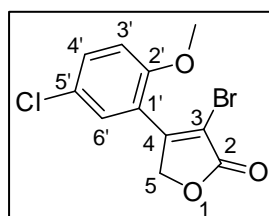
IV (cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3072; 2958; 1769; 1614; 1598; 1486; 1264; 1248; 1178; 1012; 978; 744; 721. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 3,87 (s, 3H, 2'-OCH₃); 5,26 (s, 2H, H-5); 6,99 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 8,4$, $J_{3',5'} = 0,9$, H-3'); 7,09 (ddd, 1H, $J_{5',3'} = 0,9$, $J_{5',4'} = 7,5$, $J_{5',6'} = 7,5$, H-5'); 7,48 (ddd, 1H, $J_{4',3'} = 8,4$, $J_{4',5'} = 7,5$, $J_{4',6'} = 1,5$, H-4'); 7,80 (dd, 1H, $J_{6',4'} = 1,5$, $J_{6',5'} = 7,5$, H-6'). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 55,8 (2'-OCH₃); 73,8 (C-5); 108,2 (C-3), 111,6 (C-3'); 118,9 (C-1'); 121,1 (C-5'); 130,3 (C-6'); 132,8 (C-4'); 157,4 (C-4); 157,7 (C-2'), 170,0 (C-2). **EM, m/z (%)**: 270 ($[\text{M}+2]^+$, 35); 268 ($[\text{M}^+]$, $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{BrO}_3$, 36); 241 (32); 239 (33); 189 (100); 161 (19); 145 (27); 133 (38); 132 (18); 131 (52); 118 (17); 115 (24); 105 (87); 103 (21); 102 (39); 89 (39); 88 (28); 71 (49); 76 (19); 75 (28); 74 (25); 63 (37); 62 (30); 51 (39); 50 (28); 39 (43); 38 (18).

3-bromo-4-(5-bromo-2-metoxifenil)furan-2(5H)-ona (31c)



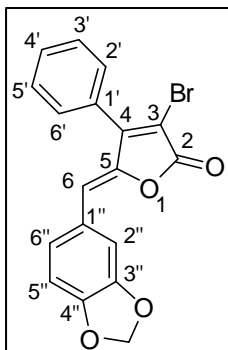
O produto **31c** (0,830 g, 1,71 mmol) foi obtido como um sólido branco com 49% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se gradiente de eluição com as misturas de solventes hexano/diclorometano 1,5:1; 1:1 e 1:1,5 (v/v). **T_f**: 169,2-171,5 °C. **CCD**: **R_f** = 0,28 hexano/diclorometano, 1:1,5, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 2997; 2964; 1769; 1618; 1591; 1482; 1470; 1401; 1266; 1245; 1181; 1139; 1062; 1012; 983; 880; 805; 749; 621. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 3,86 (s, 3H, 2'-OCH₃); 5,21 (s, 2H, H-5); 6,88 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,8$, H-3'); 7,56 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 8,8$, $J_{4',6'} = 2,4$, H-4'); 7,88 (d, 1H, $J_{6',4'} = 2,4$, H-6'). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 56,1 (2'-OCH₃); 73,5 (C-5); 109,5 (C-3); 113,3 (C-5'); 113,4 (C-3'); 120,7 (C-1'); 132,6 (C-6'); 135,2 (C-4'); 156,0 (C-4); 156,5 (C-2'); 169,5 (C-2). **EM, m/z (%)** 350 ([M+4]⁺, 3); 348 ([M+2]⁺, 9); 346 ([M]⁺, C₁₁H₈Br₂O₃, 2); 269 (21); 267 (19); 132 (100); 131 (32); 102 (27); 101 (15); 99 (11); 89 (14); 88 (14); 87 (33); 77 (11); 75 (26); 74 (20); 63 (24); 62 (14); 51 (33); 50 (34); 44 (22).

3-bromo-4-(5-cloro-2-metoxifenil)furan-2(5H)-ona (31d)



O produto **31d** (0,587 g, 1,93 mmol) foi obtido como um sólido branco com 43% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se gradiente de eluição com as misturas de solventes hexano/diclorometano 2:1 e 1:1 (v/v). **T_f**: 159,4-160,6 °C. **CCD**: **R_f** = 0,24 hexano/diclorometano, 1:1, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 2997; 2961; 2855; 1769; 1615; 1596; 1485; 1471; 1441; 1407; 1266; 1245; 1182; 1012; 982; 880; 808; 749; 679; 640. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 3,87 (s, 3H, -OCH₃); 5,23 (s, 2H, H-5); 6,95 (d, 1H, $J_{3',4'} = 9,0$, H-3'); 7,43 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 9,0$, $J_{4',6'} = 2,7$, H-4'); 7,77 (d, 1H, $J_{6',4'} = 2,7$, H-6'). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 56,2 (2'-OCH₃); 73,5 (C-5); 109,4 (C-3); 113,0 (C-3'); 120,2 (C-1'); 126,2 (C-5'); 129,8 (C-6'); 132,3 (C-4'); 156,0 (C-4); 156,1 (C-2'); 169,6 (C-2). **EM, m/z (%)** 306 ([M+4]⁺, 21); 304 ([M+2]⁺, 85); 302 ([M]⁺, C₁₁H₈BrClO₃, 64); 275 (71); 273 (54); 260 (30); 225 (35); 223 (100); 179 (42); 167 (57); 165 (62); 139 (48); 136 (35); 132 (49); 101 (54); 87 (46); 75 (53).

2.3.4 Procedimento para a síntese do (Z)-3-bromo-4-fenil-5-(3,4-metilenodioxibenzilideno)furan-2(5H)-ona (32a)

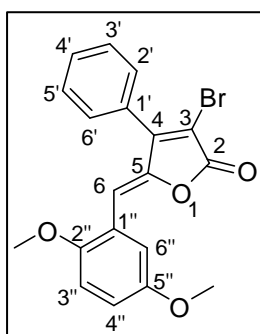


A um balão bitubulado de fundo redondo (25 mL) acoplado a um condensador, adicionou-se a 3-bromo-4-fenilfuran-2(5H)-ona **31a** (0,191 g; 0,8 mmol) e o aldeído piperonal (0,140 g; 0,96 mmol). O sistema foi então submetido a atmosfera de nitrogênio e em seguida adicionaram-se diclorometano anidro (10 mL), TBDMSOTf (0,240 mL; 1,04 mmol) e DIPEA (0,29 mL; 1,60 mmol). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente por uma hora. Decorrido esse período, a mistura reacional foi refluxada e adicionou-se DBU (0,240 mL; 1,60 mmol) mantendo-se o refluxo por 2 horas.

A mistura reacional foi transferida para um funil de separação empregando-se 50 mL de DCM. A fase orgânica resultante foi lavada com solução aquosa de HCl 3 mol L⁻¹ (2 x 30 mL) e solução saturada de NaCl (2 x 30 mL). Em seguida, a mesma foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para obtenção do material bruto da reação, que foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:1 (v/v) para obtenção do composto **32a** como um sólido amarelo com 78% de rendimento (0,232 g; 0,624 mmol). **T_f**: 107,6-109,3 °C. **CCD: R_f** = 0,38 hexano:diclorometano, 1:1,5, (v/v) **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\max}$ 3055; 3004; 2962; 2894; 1755; 1640; 1615; 1599; 1565; 1501; 1484; 1444; 1363; 1326; 1253; 1212; 1183; 1150; 1129; 1105; 1035; 980; 924; 875; 795; 770; 749; 734; 718; 698; 684. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 6,0 (s, 2H, -O-CH₂-O-); 6,04 (s, 1H, H-6); 6,79 (d, 1H, *J*_{5'',6''} = 8,1, H-5''); 7,12 (dd, 1H, *J*_{6'',5''} = 8,1, *J*_{6'',2''} = 1,6, H-6''); 7,48 (d, 1H, *J*_{2'',6''} = 1,6, H-2''); 7,49-7,58 (m, 5H, Ph). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 101,6 (-O-CH₂-O-); 107,5 (C-3); 108,6 (C-6); 110,0 (C-2''); 114,7 (C-5''); 126,7 (C-6''); 126,9 (C-1''); 128,9 (C-2' e C-6')*; 128,9 (C-3' e C-5')*; 129,04 (C-1') 130,4 (C-4'); 146,1 (C-5); 148,3 (C-4''); 149,0 (C-3''); 153,7 (C-4); 165,0 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 372 ([M+2]⁺, 72); 371 (15); 370 ([M]⁺, C₁₈H₁₁BrO₄, 74); 261 (18); 236 (18); 235 (100); 233 (55); 205 (32); 176 (24); 162 (35); 134 (69); 129 (42); 104 (32); 101 (28); 77 (16); 76 (78); 75 (40); 74 (17); 51 (32); 50 (50).

Os compostos **32b-m** foram preparados utilizando-se procedimento experimental similar ao descrito para a síntese do composto **32a**. Todos os compostos foram caracterizados por espectroscopia no IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , experimentos bidimensionais (HSQC, COSY e NOESY) e espectrometria de massas.

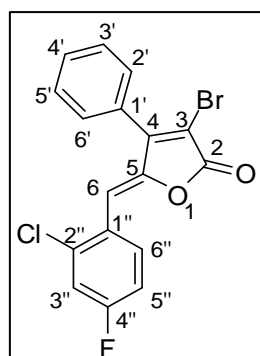
(Z)-3-bromo-5-(2,5-dimetoxibenzilideno)-4-fenilfuran-2(5H)-ona (32b)



O produto **32b** (0,298 g, 0,77 mmol) foi obtido como um sólido amarelo com 70% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente a mistura de solvente hexano/diclorometano 2:1 (v/v). **T_f**: 118,8-120,7 °C. **CCD**: **R_f** = 0,34 hexano:diclorometano, 2:1, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3061; 2998; 2967; 2933; 2836; 1762; 1633; 1561; 1491; 1462; 1418; 1262; 1228; 1180; 1045; 987; 931; 858; 804;

697; 647; 569. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl₃)** δ 3,74 (s, 3H, 2''-OCH₃); 3,83 (s, 3H, 5''-OCH₃); 6,68 (s, 1H, H-6); 6,79 (d, 1H, $J_{3'',4''} = 9,0$, H-3''); 6,90 (dd, 1H, $J_{4'',3''} = 9,0$, $J_{4'',6''} = 3,0$, H-4''); 7,55 (s, 5H, Ph); 7,79 (d, 1H, $J_{6'',4''} = 3,0$, H-6''). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl₃)** δ 55,9 (5''-OCH₃); 56,1 (2''-OCH₃); 108,1 (C-3); 108,6 (C-6); 111,7 (C-3''); 115,7 (C-6''); 117,3 (C-4''); 122,1 (C-1''); 128,5 (C-1'); 128,8 (C-2' e C-6'); 129,1 (C-3' e C-5'); 130,4 (C-4'); 147,3 (C-5); 152,5 (C-5'')*; 153,7 (C-2'')*; 153,9 (C-4); 165,0 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 388 ([M+2]⁺, 19); 386 ([M]⁺, C₁₉H₁₅BrO₄, 17); 182 (40); 180 (42); 178 (32); 164 (16); 163 (100); 135 (37); 129 (75); 101 (58); 92 (48); 77 (66); 76 (26); 75 (66); 74 (25); 64 (26); 115 (45); 63 (33).

(Z)-3-bromo-5-(2-cloro-4-fluorobenzilideno)-4-fenilfuran-2(5H)-ona (32c)

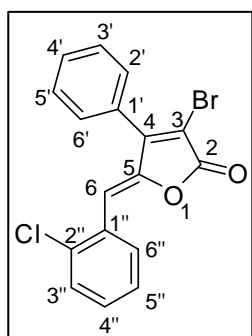


O produto **32c** (0,220 g, 0,58 mmol) foi obtido como um sólido amarelo com 58% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente a mistura de solvente hexano/acetato de etila, 3:2 (v/v). **T_f**: 134,2-135,3 °C. **CCD**: **R_f** = 0,33 hexano:acetato de etila, 3:2 (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3079; 2968; 2935; 2927; 1777; 1642; 1597; 1576; 1486; 1445; 1397; 1346; 1267; 1243; 1207; 1179; 1162;

1129; 1077; 1040; 990; 956; 909; 876; 813; 768; 746; 724. **RMN de ^1H (300 MHz,**

CDCl₃ δ 6,59 (s, 1H, H-6); 7,07 (m, 1H, H-5''); 7,15 (m, 1H, H-3''); 7,57 (s, 5H, Ph); 8,23-8,31 (m, 1H, C-6''). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 109,0 (C-6); 109,6 (C-3); 115,3 (d, J_{C-F} = 21,3, C-5''); 117,6 (d, J_{C-F} = 25,0, C-3''); 127,3 (d, J_{C-F} = 3,8, C-1''); 128,9 (C-1'); 129,3 (C-3' e C-5')*; 129,4 (C-2' e C-6')*; 131,1 (C-4'); 133,5 (d, J_{C-F} = 8,9, C-6''); 136,1 (d, J_{C-F} = 10,1, C-2''); 148,5 (C-5); 154,1 (C-4); 162,8 (d, J_{C-F} = 255,4, C-4''); 165,0 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 382 ([M+4]⁺, 25); 380 ([M+2]⁺, 100); 378 ([M]⁺, C₁₇H₉BrClFO₂, 75); 245 (31); 244 (16); 243 (90); 236 (37); 207 (38); 118 (22); 172 (15); 170 (43); 142 (27); 129 (80); 107 (51); 103 (18); 101 (22); 75 (25); 51 (16).

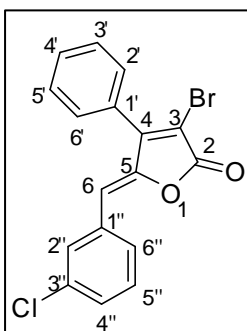
(Z)-3-bromo-5-(2-clorobenzilideno)-4-fenilfuran-2(5H)-ona (32d)



O produto **32d** (0,434 g, 1,2 mmol) foi obtido como um sólido amarelo claro com 60% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente a mistura de solvente hexano/diclorometano, 3:2 (v/v). **T_f**: 136,1-138,2 °C. **CCD: R_f** = 0,34 hexano/diclorometano, 3:2, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3076; 3047; 1779; 1642; 1586; 1563; 1488; 1469; 1439; 1350; 1334; 1293; 1274; 1228; 1190; 1157; 1126; 1076;

1049; 1036; 987; 957; 925; 877; 863; 833; 765; 732; 695; 682. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 6,67 (s, 1H, H-6); 7,27 (ddd, 1H, $J_{4'',3''} = J_{4'',5''} = 7,6$, $J_{4'',6''} = 1,7$, H-4''); 7,33 (ddd, 1H, $J_{5'',6''} = J_{5'',4''} = 7,6$, $J_{5'',3''} = 1,5$, H-5''); 7,39 (dd, 1H, $J_{3'',4''} = 7,6$, $J_{3'',5''} = 1,5$, H-3''); 7,58 (m, 5H, Ph); 8,24 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 7,6$, $J_{6'',4''} = 1,7$, H-6''). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 109,3 (C-3); 109,9 (C-6); 127,3 (C-5''); 128,7 (C-1'); 129,0 (C-2', C-6', C-5' e C-3''); 129,7 (C-3''); 130,4 (C-4''); 130,5 (C-1''); 130,7 (C-4'); 131,9 (C-6''); 134,8 (C-2''); 148,4 (C-5); 153,8 (C-4); 164,8 (C-2). **EM, m/z (%)** 362 ([M+4]⁺, 13); 362 ([M+2]⁺, 57); 360 ([M]⁺, C₁₇H₁₀BrClO₂, 40); 227 (28); 226 (15); 225 (87); 218 (42); 189 (18); 152 (37); 129 (100); 126 (18); 124 (47); 101 (49); 94(30); 89 (93); 75 (41); 74 (21); 63 (37); 62 (21); 51 (48); 50 (27).

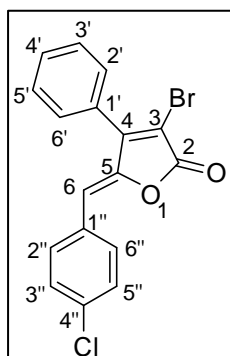
(Z)-3-bromo-5-(3-clorobenzilideno)-4-fenilfuran-2(5H)-ona (32e)



O produto **32e** (0,448 g, 1,24 mmol) foi obtido como um sólido amarelo claro com 62% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente a mistura de solvente hexano/diclorometano, 3:2 (v/v). **T_f**: 129,7-131,9 °C. **CCD**: **R_f** = 0,34 hexano/diclorometano, 3:2, (v/v) **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3062; 2962; 2921; 1773; 1640; 1558; 1485; 1466; 1445; 1426; 1342; 1330; 1269; 1225; 1191; 1181; 1147; 1092; 1079; 987; 955; 907; 891;

879; 837; 768; 750; 724. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 6,06 (s, 1H, H-6); 7,30-7,32 (m, 2H, H-4'' e H-5''); 7,53 (sl, 2H, H-2' e H-6'); 7,57 (sl, 3H, H-4', H-3' e H-5'); 7,65 (sl, 1H, H-6''); 7,73 (s, 1H, H-2''). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 109,8 (C-3); 113,1 (C-6); 129,0 (C-1'); 129,1 (C-6''); 129,3 (C-2' e C-6'); 129,4 (C-5' e C-3'); 129,8 (C-5''); 130,4 (C-4''); 130,7 (C-2''); 131,0 (C-5'); 134,5 (C-3''); 135,2 (C-1''); 148,6 (C-5); 154,0 (C-4); 164,9 (C-2). **EM, m/z (%)** 364 ([M+4]⁺, 4); 362 ([M+2]⁺, 18); 360 ([M]⁺, C₁₇H₁₀BrClO₂, 14); 227 (16); 226 (9); 225 (55); 189 (22); 152 (17); 129 (59); 126 (9); 123 (21); 101 (35); 94 (11); 89 (100); 87 (8); 75 (54); 74 (25); 63 (45); 62 (21); 51 (34); 50 (17).

(Z)-3-bromo-5-(4-clorobenzilideno)-4-fenilfuran-2(5H)-ona (32f)



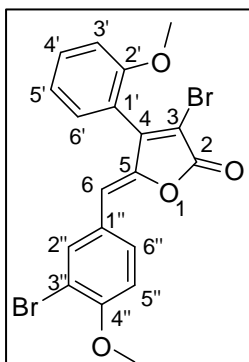
O produto **32f** (0,528 g, 1,46 mmol) foi obtido como um sólido amarelo claro com 73% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente a mistura de solvente hexano/diclorometano, 3:2 (v/v). **T_f**: 135,2-137,0 °C.

CCD: **R_f** = 0,35 hexano/diclorometano, 3:2, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3056; 2968; 2923; 1769; 1700; 1639; 1589; 1488; 1445; 1408; 1341; 1304; 1279; 1227; 1183; 1093; 1012; 991; 950; 880; 839; 820; 772; 750; 731.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 6,08 (s, 1H, H-6); 7,35 (d, 2H, $J_{5'',6''} = J_{3'',2''} = 8,6$, H-5'' e H-3''); 7,50-7,59 (m, 5H, Ph); 7,70 (d, 2H, $J_{6'',5''} = J_{2'',3''} = 8,6$, H-6'' e H-2''). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 109,0 (C-3); 113,1 (C-6); 128,8 (C-1'); 128,9 (C-2' e C-6'); 129,0 (C-3' e C-5'); 129,2 (C-3'' e C-5''); 130,6 (C-4'); 131,0 (C-1''); 131,9 (C-2'' e C-6''); 135,6 (C-4''); 147,8 (C-5); 153,7 (C-4); 164,7 (C-2). **EM, m/z (%)** 364 ([M+4]⁺, 14); 362 ([M+2]⁺, 61); 360 ([M]⁺,

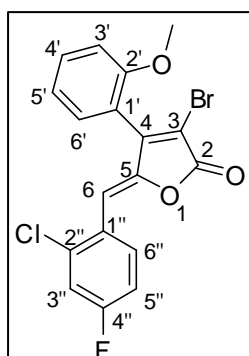
C₁₇H₁₀BrClO₂, 41); 227 (32); 226 (17); 225 (100); 218 (15); 189 (27); 152 (40); 129 (82); 126 (20); 124 (52); 101 (39); 89 (80); 75 (36); 74 (18); 63 (32); 62 (19); 51 (42); 50 (23).

(Z)-3-bromo-5-(3-bromo-4-metoxibenzilideno)-4-(2-metoxifenil)furan-2(5H)-ona (32g)



O produto **32g** (0,419 g, 0,90 mmol) foi obtido como um sólido amarelo com 90% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se gradiente de eluição com as misturas de solventes hexano/diclorometano, 2:2 e 2:3 (v/v). **T_f**: 111,4-113,5 °C. **CCD**: **R_f** = 0,36 hexano/diclorometano, 2:3, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3066; 2995; 2968; 2941; 2836; 1755; 1648; 1583; 1491; 1460; 1435; 1403; 1283; 1247; 1181; 1109; 1049; 991; 959; 813; 750. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 3,84 (s, 3H, 2'-OCH₃); 3,92 (s, 3H, 4''-OCH₃); 5,82 (s, 1H, H-6); 6,88 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8,6$, H-5''); 7,05-7,12 (m, 2H, H-5' e H-3'); 7,24 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 7,5$, $J_{6',4'} = 1,5$, H-6'); 7,52 (ddd, 1H, $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 8,6$, $J_{4',6'} = 1,5$, H-4'); 7,75 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8,6$, $J_{6'',2''} = 2,0$, H-6''); 7,61 (d, 1H, $J_{2'',6''} = 2,0$, H-2''). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 55,6 (4''-OCH₃); 56,3 (2'-OCH₃); 110,1 (C-3); 111,6 (C-3'); 111,88 (C-6)*; 111,94 (C-5''); 112,1 (C-3''); 117,7 (C-1'); 120,6 (C-5'); 126,9 (C-1''); 130,3 (C-6'); 131,3 (C-6''); 131,9 (C-4'); 135,4 (C-2''); 147,0 (C-5); 152,3 (C-4''); 156,6 (C-4 e C-2'); 165,2 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 468 ([M+4]⁺, 13); 466 ([M+2]⁺, 30); 464 ([M]⁺, C₁₉H₁₄Br₂O₄, 14); 228 (20); 226 (21); 213 (34); 211(41); 131(50); 119(100); 103(26); 102(21); 89(60); 88(72); 87(23); 77(86); 76(60); 75(50); 74(22); 63(44); 62(36); 51(37); 50(40).

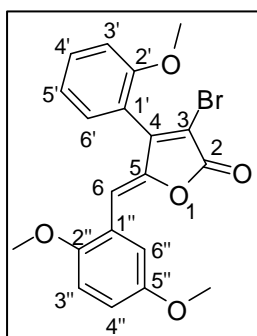
(Z)-3-bromo-5-(2-cloro-4-fluorobenzilideno)-4-(2-metoxifenil)furan-2(5H)-ona (32h)



O produto **32h** (0,375 g, 0,91 mmol) foi obtido como um sólido amarelo com 61% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente a mistura de solvente hexano/diclorometano, 3:2 (v/v). **T_f**: 132,8-134,1 °C. **CCD**: **R_f** = 0,31 hexano/diclorometano, 3:2, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3076; 2966; 2926; 2838; 1769; 1649; 1596; 1572; 1484; 1460; 1433; 1395; 1241; 1206; 1177; 1163; 1126; 1107;

1043; 1019; 977; 957; 907; 880; 857; 812; 785; 751; 734. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 3,86 (s, 3H, 2'-OCH₃); 6,39 (s, 1H, H-6); 7,00-7,15 (m, 4H, H-3', H-5', H-3'' e H-5''); 7,30 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 7,5$, $J_{6',4'} = 1,7$, H-6'); 7,53 (ddd, 1H, $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 8,1$, $J_{4',6'} = 1,7$, H-4'); 8,26 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8,9 = J_{6'',F} = 6,2$, H-6''). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 55,5 (2'-OCH₃); 107,7 (C-6); 111,2 (C-3); 111,6 (C-3'); 114,9 (d, $J_{\text{C-F}} = 21,3$, C-5''); 117,2 (d, $J_{\text{C-F}} = 25,0$, C-3''); 117,4 (C-1'); 120,7 (C-5'); 127,1 (d, $J_{\text{C-F}} = 3,7$, C-1''); 130,4 (C-6'); 132,2 (C-4'); 133,2 (d, $J_{\text{C-F}} = 8,8$, C-6''); 135,5 (d, $J_{\text{C-F}} = 10,2$, C-2''); 148,2 (C-5); 152,5 (C-2'); 156,5 (C-4); 152,3 (d, $J_{\text{C-F}} = 255,0$, C-4''); 165,0 (C-2). **EM, m/z (%)** 412 ([M+4]⁺, 8); 410 ([M+2]⁺, 32); 408 ([M]⁺, C₁₈H₁₁BrClFO₃, 24); 329 (24); 237 (16); 209 (16); 207 (16); 143 (16); 142 (32); 131 (59); 119 (36); 116 (16); 115 (33); 107 (100); 103 (25); 102 (19); 88 (28); 77 (46); 62 (18); 57 (19); 51 (23).

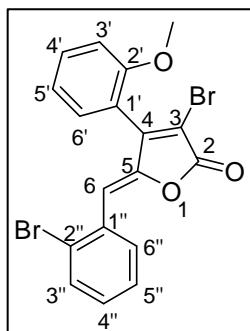
(Z)-3-bromo-5-(2,5-dimetoxibenzilideno)-4-(2-metoxifenil)furan-2(5H)-ona (32i)



O produto **32i** (0,735 g, 1,76 mmol) foi obtido como um sólido amarelo com 88% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente a mistura de solvente hexano/diclorometano, 1:2 (v/v). **T_f** = 103,6-104,3 °C. **CCD: R_f** = 0,24 hexano/diclorometano, 2:3, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3067; 3000; 2936; 2834; 1761; 1605; 1578; 1488; 1460; 1432; 1238; 1228; 1163; 1107; 1021; 982; 930; 880; 807;

753; 716; 649. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 3,71 (s, 3H, 2''-OCH₃); 3,82 (s, 3H, 5''-OCH₃); 3,84 (s, 3H, 2'-OCH₃); 6,49 (s, 1H, H-6); 6,77 (d, 1H, $J_{3'',4''} = 9,0$, H-3''); 6,88 (dd, 1H, $J_{4'',3''} = 9,0$, $J_{4'',6''} = 3,0$, H-4''); 7,05-7,13 (m, 2H, H-5' e H-3'); 7,29 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 7,5$, $J_{6',4'} = 1,7$, H-6'); 7,51 (ddd, 1H, $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 8,5$, $J_{4',6'} = 1,7$, H-4'); 7,79 (d, 1H, $J_{6'',4''} = 3,0$, H-6''). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 55,5 (2'-OCH₃)^{*}; 55,9 (5''-OCH₃)^{*}; 56,1 (2''-OCH₃); 107,7 (C-6); 110,1 (C-3); 111,6 (C-3'); 111,8 (C-3''); 115,7 (C-6''); 117,1 (C-4''); 118,0 (C-1'); 120,6 (C-5'); 122,3 (C-1''); 130,5 (C-6'); 131,8 (C-4'); 147,5 (C-5); 152,4 (C-5''); 152,6 (C-2''); 153,7 (C-2'); 156,7 (C-4); 165,3 (C-2). ^{*}As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 418 ([M+2]⁺, 64); 416 ([M]⁺, C₂₀H₁₇BrO₅, 65); 266 (21); 251 (24); 207 (24); 178 (22); 163 (100); 136 (55); 135 (60); 131 (42); 115 (28); 107 (19); 103 (17); 92 (31); 88 (21); 77 (72); 64 (17); 63 (22); 51 (32); 50 (17).

(Z)-3-bromo-5-(2-bromobenzilideno)-4-(2-metoxifenil)furan-2(5H)-ona (32j)

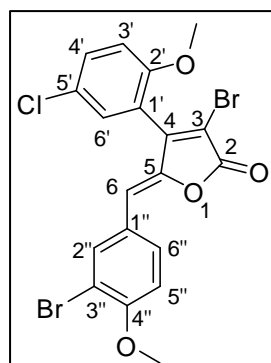


O produto **32j** (0,279 g, 0,64 mmol) foi obtido como uma pasta amarela com 64% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente a mistura de solvente hexano/diclorometano, 3:2 (v/v).

CCD: $R_f = 0,36$ hexano/diclorometano, 1:1, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{max}$ 3065; 3006; 2964; 2935; 2837; 1766; 1606; 1580; 1488; 1461; 1433; 1249; 1182; 1021; 974; 833; 749; 670. **RMN de ¹H (300**

MHz, CDCl₃) δ 3,87 (s, 3H, 2'-OCH₃); 6,45 (s, 1H, H-6); 7,19-7,06 (m, 3H, H-4'', H-5'' e H-3''); 7,31-7,39 (m, 2H, H-5'' e H-6''); 7,50-7,58 (m, 2H, H-3'' e H-4'); 8,21 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8,0$, $J_{6'',4''} = 1,5$, H-6''). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 55,9 (2'-OCH₃); 111,2 (C-3); 111,6 (C-3'); 111,7 (C-6); 117,4 (C-1'); 120,7 (C-5'); 125,4 (C-2''); 127,8 (C-5''); 130,3 (C-4''); 130,4 (C-6'); 132,0 (C-6''); 132,1 (C-4'); 132,3 (C-1''); 133,0 (C-3''); 148,4 (C-5); 152,5 (C-2'); 156,6 (C-4); 165,1 (C-2). **EM, m/z (%)** 438 ([M+4]⁺, 15); 436 ([M+2]⁺, 29); 434 ([M⁺], C₁₈H₁₂Br₂O₃, 16); 357 (12); 248 (15); 219 (19); 205 (14); 189 (14); 176 (15); 131 (29); 115 (16); 103 (16); 102 (15); 89 (100); 88 (39); 77 (47); 75(13); 63 (33); 62 (18); 51 (13).

(Z)-3-bromo-5-(3-bromo-4-metoxibenzilideno)-4-(5-cloro-2-metoxifenil)furan-2(5H)-ona (32k)



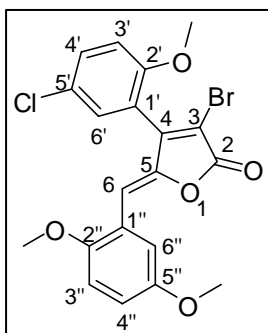
O produto **32k** (0,450 g, 0,90mmol) foi obtido como um sólido amarelo com 90% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente a mistura de solvente hexano/diclorometano, 2:3 (v/v).

T_f: 140,6-151,8 °C. **CCD:** $R_f = 0,27$ hexano/diclorometano, 2:3, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{max}$ 3010; 2971; 2940; 2841; 1764; 1644; 1593; 1494; 1460; 1405; 1284; 1264; 1182; 1124; 1054; 1018; 985;

886; 812; 641. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 3,83 (s, 3H, 2'-OCH₃); 3,93 (s, 3H, 4''-OCH₃); 5,80 (s, 1H, H-6); 6,89 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8,7$, H-5''); 6,99 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,9$, H-3'); 7,22 (d, 1H, $J_{6',4'} = 2,6$, H-6'); 7,46 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 8,9$, $J_{4',6'} = 2,6$, H-4'); 7,75 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8,7$, $J_{6'',2''} = 2,1$, H-6''); 7,90 (d, 1H, $J_{2'',6''} = 2,1$, H-2''). **RMN de ¹³C (75 MHz,**

CDCl₃ δ 56,0 (2'-OCH₃); 55,4 (4''-OCH₃); 110,6 (C-3); 111,9 (C-6); 112,0 (C-5''); 112,1 (C-3''); 112,9 (C-3'); 119,2 (C-1'); 125,7 (C-1''); 126,6 (C-5'); 129,8 (C-6'); 131,4 (C-6''); 131,6 (C-4'); 135,5 (C-2''); 146,5 (C-5); 150,7 (C-4''); 155,3 (C-2'); 156,8 (C-4); 164,9 (C-2). **EM, m/z (%)** 504 ([M+6]⁺, 7); 502 ([M+4]⁺, 38); 500 ([M+2]⁺, 58); 498 ([M]⁺, C₁₉H₁₃Br₂ClO₄, 24); 228 (25); 226 (28); 213 (48); 211 (48); 201 (20); 165 (24); 122 (23); 119 (100); 102 (40); 101 (35); 89 (44); 87 (30); 76 (39); 75 (34); 63 (23); 51 (23); 50 (30).

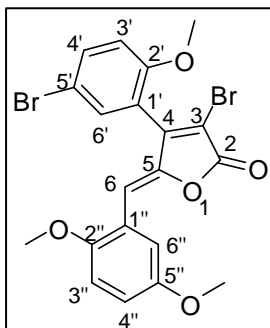
(Z)-3-bromo-5-(2,5-dimetoxibenzilideno)-4-(5-cloro-2-metoxifenil)furan-2(5H)-ona (32I)



O produto **32I** (0,470 g, 1,04 mmol) foi obtido como um sólido alaranjado com 79% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente a mistura de solvente hexano/diclorometano, 2:3 (v/v). **T_f**: 123,6-125,3 °C. **CCD: R_f** = 0,27 hexano/diclorometano, 2:3, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3066; 2998; 2943; 2908; 2840; 1758; 1634; 1606; 1569; 1485; 1439; 1418; 1391; 1279; 1254; 1226; 1184;

1157; 1127; 1047; 1025; 990; 944; 905; 875; 855; 807; 750; 720; 710; 691; 642. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 3,74 (s, 3H, 2''-OCH₃); 3,82 (s, 3H, 2'-OCH₃); 3,83 (s, 3H, 5'-OCH₃); 6,45 (s, 1H, H-6); 6,78 (d, 1H, $J_{3'',4''} = 9,0$, H-3''); 6,89 (dd, 1H, $J_{4'',3''} = 9,0$, $J_{4'',6''} = 3,0$, H-4''); 6,99 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,7$, H-3'); 7,27 (d, 1H, $J_{6',4'} = 2,6$, H-6'); 7,46 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 8,7$, $J_{4',6'} = 2,6$, H-4'); 7,76 (d, 1H, $J_{6'',4''} = 3,0$, H-6''). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 55,91 (5''-OCH₃); 55,94 (2'-OCH₃); 56,2 (2''-OCH₃); 107,8 (C-6); 110,6 (C-3); 111,8 (C-3''); 112,9 (C-3'); 115,7 (C-6''); 117,3 (C-4''); 119,5 (C-1'); 122,1 (C-1''); 125,6 (C-5'); 130,0 (C-6'); 131,4 (C-4'); 147,0 (C-5); 151,0 (C-2''); 152,5 (C-5''); 153,7 (C-2'); 155,3 (C-4); 165,0 (C-2). **EM, m/z (%)** 454 ([M+4]⁺, 16); 452 ([M+2]⁺, 65); 450 ([M]⁺, C₂₀H₁₆BrClO₅, 50); 285 (14); 178 (21); 165 (39); 164 (13); 163 (100); 136 (31); 135 (46); 122 (16); 107 (16); 102 (33); 101 (29); 92 (44); 87 (18); 77 (52); 64 (17); 63 (17); 51 (21).

(Z)-3-bromo-4-(5-bromo-2-metoxifenil)-5-(2,5-dimetoxibenzilideno)furan-2(5H)-ona (32m)

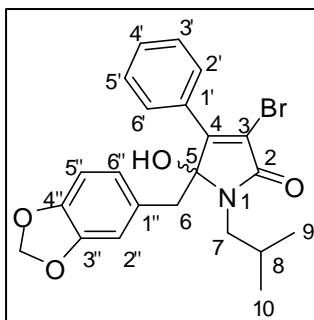


O produto **32m** (0,482 g, 0,972 mmol) foi obtido como um sólido alaranjado com 72% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente a mistura de solvente hexano/diclorometano, 2:3 (v/v).

T_f: 148,1-150,3 °C. **CCD**: **R_f** = 0,26 hexano/diclorometano, 2:3, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3070; 3000; 2940; 2906; 2838; 1754; 1632; 1601; 1482; 1384; 1253; 1227; 1183; 1123; 1025; 990; 876; 750;

620. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 3,75 (s, 3H, -OCH₃); 3,83 (s, 3H, -OCH₃); 6,45 (s, 1H, H-6); 6,79 (d, 1H, $J_{3'',4''} = 9,0$, H-3''); 6,89 (dd, 1H, $J_{4'',3''} = 9,0$, $J_{4'',6''} = 3,0$, H-4''); 6,95 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,9$, H-3'); 7,40 (d, 1H, $J_{6',4'} = 2,4$, H-6'); 7,60 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 8,9$, $J_{4',6'} = 2,4$, H-4'); 7,76 (d, 1H, $J_{6'',4''} = 3,0$, H-6''). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 55,9 (2'-OCH₃ e 5''-OCH₃); 56,2 (2''-OCH₃); 107,8 (C-6); 110,6 (C-3); 111,8 (C-3''); 112,6 (C-5'); 113,4 (C-3'); 115,7 (C-6''); 117,3 (C-4''); 119,9 (C-1'); 122,1 (C-1''); 132,8 (C-6'); 134,4 (C-4'); 147,0 (C-5); 150,9 (C-2'); 152,5 (C-2'')*; 153,7 (C-5'')*; 155,8 (C-4); 165,0 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 498 ([M+4]⁺, 55); 496 ([M+2]⁺, C₂₀H₁₆Br₂O₅, 100); 494 ([M]⁺, C₂₀H₁₆Br₂O₅, 54); 336 (15); 281 (12); 265 (27); 249 (14); 178 (16); 164 (13); 163 (90); 136 (42); 135 (32); 102 (27); 92 (29); 87 (16); 77 (35); 76 (12); 63 (14); 51 (17).

2.3.5 Procedimento para a síntese da 3-bromo-4-fenil-5-hidroxi-1-isobutil-5-(3,4-metilenodioxibenzilideno)-1H-pirrol-2(5H)-ona (33a)

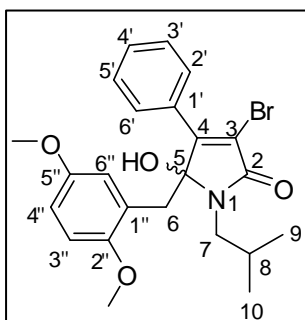


A um balão de fundo redondo (25 mL) foram adicionados (Z)-3-bromo-4-fenil-5-(3,4-metilenodioxibenzilideno)furan-2(5H)-ona **32a** (0,360 g; 0,97 mmol) e diclorometano (10 mL), e a solução resultante foi colocada sob agitação magnética e resfriada a 0 °C em banho de gelo. Em seguida a isobutilamina (0,355 g; 4,85 mmol) solubilizada em diclorometano (5 mL) foi adicionada gota a gota ao sistema, que foi mantido a 0 °C por 3h. Ao término da reação, foi adicionado DCM (40 mL) à

mistura reacional e a mesma foi transferida para um funil de separação. A fase orgânica foi lavada com HCl 2 mol L⁻¹ (2 x 30 mL), solução saturada de NaHCO₃ (2 x 30 mL) e solução saturada de NaCl (1 x 30 mL). A fase orgânica resultante foi seca com MgSO₄ anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida para obtenção do material bruto da reação, que foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solvente hexano:acetona 3:1 (v/v) para obtenção do composto **33a** como cristais incolores com 85% de rendimento (366 mg; 0,82 mmol). **T_f**: 142,6-144,3 °C. **CCD**: **R_f** = 0,21 hexano:acetona, 3:1 (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3221 (3093-3432); 3064; 2959; 2894; 2865; 1678; 1607; 1385; 1488; 1413; 1241; 1118; 1032; 928; 686; 537. **RMN de ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO)** δ 0,95 (d, 3H, *J*_{9,8} = 6,8, H-9); 0,98 (d, 3H, *J*_{10,8} = 6,8, H-10); 2,24-2,40 (m, 1H, H-8); 3,03 (d, 1H, *J*_{6a,6b} = 14,2, H-6a); 3,32 (dd, 1H, *J*_{7a,7b} = 13,9, *J*_{7a,8} = 7,5 H-7a); 3,33 (d, 1H, *J*_{6b,6a} = 14,2, H-6b); 3,50 (dd, 1H, *J*_{7b,7a} = 13,9, *J*_{7b,8} = 7,5, H-7b); 5,87 (s, 1H, -OH); 5,90 (dl, 2H, *J* = 3,4, -O-CH₂-O-); 6,26 (dd, 1H, *J*_{6'',5''} = 7,9, *J*_{6'',2''} = 1,3, H-6''); 6,30 (d, 1H, *J*_{2'',6''} = 1,3, H-2''); 6,60 (d, 1H, *J*_{5'',6''} = 7,9, H-5''); 7,46-7,55 (m, 3H, H-3', H-4' e H-5'); 7,94-8,03 (m, 2H, H-2' e H-6'). **RMN de ¹³C (75 MHz, (CD₃)₂CO)** δ 20,2 (C-10); 20,2 (C-9); 28,1 (C-8); 40,7 (C-6); 47,8 (C-7); 94,3 (C-5); 100,9 (-O-CH₂-O-); 107,5 (C-5''); 109,6 (C-2''); 117,0 (C-3); 123,0 (C-6''); 127,8 (C-1'); 128,2 (C-2' e C-6')*; 129,0 (C-3' e C-5')*; 129,7 (C-4'); 131,6 (C-1''); 146,5 (C-4''); 147,2 (C-3''); 151,9 (C-4); 164,0 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 427 ([M+2]⁺ - H₂O, 69); 425 ([M]⁺ - H₂O, 84); 345 (41); 317 (33); 300 (19); 299 (14); 289 (19); 202 (18); 186 (15); 167 (22); 163 (37); 159 (31); 158 (43); 135 (18); 131 (81); 119 (54); 115 (45); 103 (30); 102 (25); 101 (17); 91 (27); 89 (53); 77 (100); 63 (24); 62 (24); 39 (35).

Os compostos **33b-m** foram preparados utilizando-se procedimento experimental similar ao descrito para a síntese do composto **33a**. Todos os compostos foram caracterizados por espectroscopia no IV, RMN de ¹H e de ¹³C, experimentos bidimensionais (HSQC, COSY e NOESY) e espectrometria de massas.

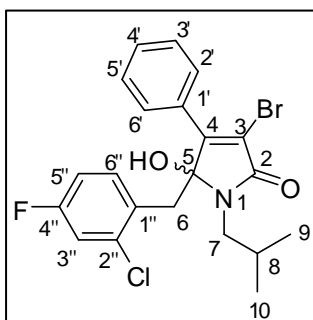
3-bromo-5-(2,5-dimetoxibenzil)-5-hidroxi-1-isobutil-4-fenil-1H-pirrol-2(5H)-ona (33b)



O produto **33b** (0,405 g, 0,88 mmol) foi obtido como um sólido amarelo claro com 88% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente o solvente diclorometano. **T_f**: 160,6-161,8 °C. **CCD: R_f** = 0,24 diclorometano. **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3245 (3403-3110); 2954; 2892; 2865; 2828; 1673; 1605; 1503; 1412; 1385; 1297; 1223; 1123; 1075; 1043; 922; 854; 809; 674; 536. **RMN de ¹H (300**

MHz, CDCl₃) δ 0,93 (d, 3H, $J_{9,8} = 6,6$, H-9); 0,95 (d, 3H, $J_{10,8} = 6,6$, H-10); 2,17-2,37 (m, 1H, H-8); 3,01 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 14,4$, H-6a); 3,09 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 14,1$, $J_{7a,8} = 7,6$ H-7a); 3,38 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 14,4$, H-6b); 3,43 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 14,1$, $J_{7b,8} = 7,6$, H-7b); 3,57 (s, 3H, 5''-OCH₃); 3,68 (s, 3H, 2''-OCH₃); 4,87 (s, 1H, -OH); 6,21 (d, 1H, $J_{6'',4''} = 2,2$, H-6''); 6,45-6,73 (m, 2H, H-3'' e H-4''); 7,21-7,29 (m, 3H, H-3', H-4' e H-5'); 7,55-7,75 (m, 2H, H-2' e H-6'). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 20,5 (C-10); 20,7 (C-9); 27,6 (C-8); 38,6 (C-6); 47,8 (C-7); 55,5 (-OCH₃); 55,9 (-OCH₃); 94,2 (C-5); 111,2 (C-3''); 113,5 (C-4''); 117,1 (C-3); 117,5 (C-6''); 123,3 (C-1'); 127,8 (C-3' e C-5'); 128,5 (C-2' e C-6'); 129,2 (C-4'); 131,6 (C-1''); 150,8 (C-2''); 153,5 (C-5''); 153,6 (C-4); 164,8 (C-2). **EM, m/z (%)** 443 ([M+2]⁺ - H₂O, 23); 441 ([M]⁺ - H₂O, 20); 368 (22); 366 (17); 363 (28); 362 (100); 356 (22); 355 (18); 354 (25); 306 (30); 207 (25); 165 (17); 151 (22); 129 (25); 115 (16); 77 (16); 44 (31); 43 (22); 41 (61); 40 (18).

3-bromo-5-(2-cloro-4-fluorobenzil)-5-hidroxi-1-isobutil-4-fenil-1H-pirrol-2(5H)-ona (33c)

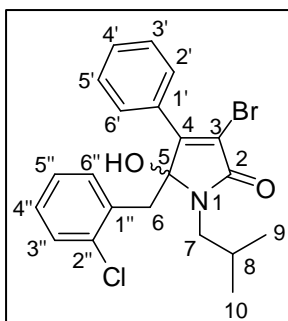


O produto **33c** (0,222 g, 0,49 mmol) foi obtido como um sólido branco com 91% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solvente hexano:acetona 5:1 (v/v). **T_f**: 170,8-171,7 °C. **CCD: R_f** = 0,25 hexano:acetona, 5:1, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3246 (3365-3087); 2989; 2959; 2921; 2866; 1692; 1675; 1606; 1385; 1369; 1492; 1417; 1237; 1096; 1063; 914; 891; 819; 754;

670. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,90 (d, 3H, $J_{9,8} = 6,6$, H-9); 0,92 (d, 3H, $J_{10,8} = 6,6$,

H-10); 2,10-2,28 (m, 1H, H-8); 3,16 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 14,0$, $J_{7a,8} = 7,8$, H-7a); 3,24 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 14,6$, H-6a); 3,38 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 14,6$, H-6b); 3,44 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 14,0$, $J_{7b,8} = 7,8$, H-7b); 4,22 (s, 1H, -OH); 6,66-6,81 (m, 2H, H-3'' e H-5''); 7,09 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 9,5$, $J_{6'',F} = 6,1$, H-6''); 7,17-7-39 (m, 3H, H-3', H-4' e H-5'); 7,52-7,59 (m, 2H, H-2', H-6'). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 20,6 (C-10); 20,7 (C-9); 27,9 (C-8); 37,5 (C-6); 47,7 (C-7); 93,7 (C-5); 113,7 (d, $J_{C,F} = 20,8$, C-5''); 116,3 (d, $J_{C,F} = 24,5$, C-3''); 117,0 (C-3); 127,1 (C-3' e C-5'); 128,0 (d, $J_{C,F} = 3,6$, C-1''); 128,7 (C-2' e C-6'); 129,5 (C-4'); 130,6 (C-1'); 131,6 (d, $J_{C,F} = 8,6$, C-6''); 135,3 (d, $J_{C,F} = 10,0$, C-2''); 153,6 (C-4); 161,2 (d, $J_{C,F} = 249,4$, C-4''); 164,6 (C-2). **EM, m/z (%)** 435 ($[\text{M}+4]^+$ - H_2O , 4); 435 ($[\text{M}+2]^+$ - H_2O , 31); 433 ($[\text{M}]^+$ - H_2O , 17); 344 (20); 337 (12); 336 (38); 281 (29); 243 (18); 209 (48); 208 (12); 207 (100); 143 (17); 133 (13); 129 (26); 107 (19); 91 (13); 75 (15); 73 (15); 57 (19); 51 (24); 44 (54); 43 (23); 41 (67).

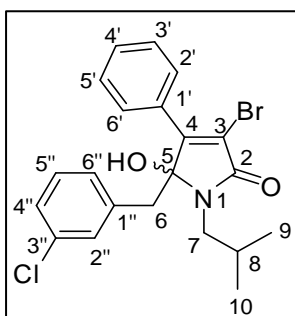
3-bromo-5-(2-clorobenzil)-5-hidroxi-1-isobutil-4-fenil-1H-pirrol-2(5H)-ona (33d)



O produto **33d** (0,216 g, 0,498 mmol) foi obtido como um sólido branco com 83% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente o solvente diclorometano. **T_f**: 181,1-182,6 °C. **CCD: R_f** = 0,18 diclorometano. **IV (cm^{-1})** $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3256 (3382-3111); 3052; 2962; 2927; 2888; 2869; 1688; 1674; 1611; 1571; 1429; 1470; 1432; 1417; 1385; 1366; 1297; 1264; 1187; 1170; 1091; 1062;

1032; 942; 923; 892; 807; 755; 734; 686; 646; 545. **RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)** δ 0,93 (d, 3H, $J_{9,8} = 6,6$, H-9); 0,93 (d, 3H, $J_{10,8} = 6,6$, H-10); 2,12-2,42 (m, 1H, H-8); 3,23 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 14,0$, $J_{7a,8} = 7,0$, H-7a); 3,40-3,49 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-7b) 5,95 (s, 1H, -OH); 7,10-7,14 (m, 4H, H-3'', H-4'', 5'' e 6''); 7,31-7,41 (m, 3H, H-3', H-4' e H-5'); 7,76 (m, 2H, H-2' e H-6'). **RMN de ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)** δ 20,1 (C-10); 20,2 (C-9); 27,9 (C-8); 37,1 (C-6); 47,5 (C-7); 93,6 (C-5); 117,2 (C-3); 126,6 (C-6''); 128,0 (C-3' e C-5'); 128,3 (C-5''); 128,7 (C-2' e C-6'); 129,2 (C-4'); 129,5 (C-4'); 130,2 (C-3''); 131,2 (C-2''); 132,5 (C-1'); 134,5 (C-1''); 153,3 (C-4); 164,3 (C-2). **EM, m/z (%)** 417 ($[\text{M}+2]^+$ - H_2O , 2); 415 ($[\text{M}]^+$ - H_2O , 1); 310 (100); 309 (12); 308 (79); 254 (68); 252 (62); 129 (48); 127 (26); 125 (62); 103 (16); 102 (30); 101 (17); 91 (14); 89 (28); 75 (13); 57 (36); 56 (14); 51 (12); 43 (37); 41 (91).

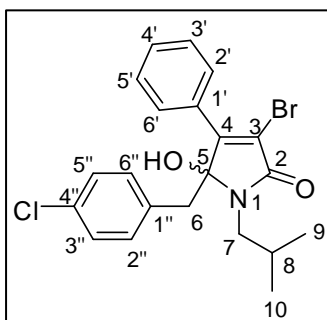
3-bromo-5-(3-clorobenzil)-5-hidroxi-1-isobutil-4-fenil-1*H*-pirrol-2(5*H*)-ona (33e)



O produto **33e** (0,293 g, 0,67 mmol) foi obtido como um sólido branco com 87% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solvente hexano:acetona 3:1 (v/v). **T_f**: 173,7-174,9 °C. **CCD**: **R_f** = 0,33 hexano:acetona, 3:1, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\max}$ 3293 (3454-3105); 3062; 2959; 2927; 2868; 1679; 1492; 1415; 1386; 1368; 1118; 1078; 817; 769; 690; 647. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)**

δ 0,93 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 2,21-2,35 (m, 1H, H-8); 3,07 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 14,2$, H-6a); 3,16 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 13,8$, $J_{7a,8} = 7,7$, H-7a); 3,18 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 14,2$, H-6b); 3,53 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 13,8$, $J_{7b,8} = 7,7$, H-7b); 3,80 (s, 1H, -OH); 6,57 (s, 1H, H-2''); 6,63 (dl, 1H, $J_{4'',5''} = 7,8$, H-4''); 7,00 (t, 1H, $J_{5'',6''} = J_{5'',4''} = 7,8$, H-5''); 7,09 (dl, 1H, $J_{6'',5''} = 7,8$, H-6''); 7,32-7,50 (m, 3H, H-3', H-4' e H-5'); 7,68-7,99 (m, 2H, H-2' e H-6'). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 20,6 (C-10); 20,6 (C-9); 27,8 (C-8); 40,8 (C-6); 48,0 (C-7); 94,1 (C-5); 117,0 (C-3); 127,3 (C-4' e C-6''); 128,4 (C-3' e C-5'); 128,9 (C-2' e C-6'); 129,3 (C-5''); 130,0 (C-2''); 130,1 (C-4'); 130,9 (C-3''); 133,6 (C-1'); 135,3 (C-1''); 152,4 (C-4); 165,1 (C-2). **EM, m/z (%)** 417 ([M+2]⁺ - H₂O, 12); 415 ([M]⁺ - H₂O, 7); 229 (9); 228 (10); 226 (13); 217 (9); 202 (12); 191 (23); 189 (12); 129 (41); 114 (14); 112 (11); 102 (10); 101 (24); 89 (19); 76 (10); 75 (24); 63 (13); 57 (9); 56 (16); 55 (11); 51 (21); 43 (25); 41 (100).

3-bromo-5-(4-clorobenzil)-5-hidroxi-1-isobutil-4-fenil-1*H*-pirrol-2(5*H*)-ona (33f)

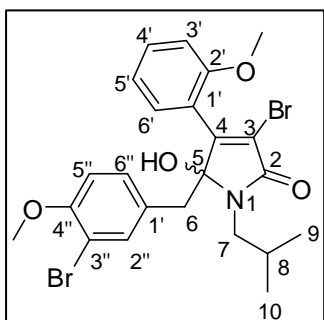


O produto **33f** (0,328 g, 0,75 mmol) foi obtido como um sólido branco com 91% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como eluente o solvente diclorometano. **T_f**: 180,8-182,0 °C. **CCD**: **R_f** = 0,18 diclorometano. **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\max}$ 3324 (3427-3151); 3055; 2955; 2923; 2869; 1688; 1490; 1409; 1388; 1369; 1272; 1161; 1129; 1073; 1014; 824; 730; 690; 553. **RMN de ¹H (300**

MHz, CDCl₃) δ 0,93 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 2,21-2,35 (m, 1H, H-8); 3,07 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 14,2$, H-6a); 3,16 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 13,6$, $J_{7a,8} = 6,9$, H-7a); 3,22 (d, 1H,

$J_{6b,6a} = 14,2$, H-6b); 3,53 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 13,6$ $J_{7b,8} = 7,9$, H-7b); 5,29 (s, 1H, -OH); 6,58 (d, 2H, $J_{2'',3''} = J_{6'',5''} = 8,4$, H-2'' e H-6''); 7,03 (d, 2H, $J_{5'',6''} = J_{3'',4''} = 8,4$, H-5'' e H-3''); 7,36-7,47 (m, 3H, H-2', H-4' e H-6'); 7,76-7,96 (m, 2H, H-3' e H-5'). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 20,6 (C-10); 20,7 (C-9); 27,8 (C-8); 40,4 (C-6); 48,1 (C-7); 94,2 (C-5); 117,0 (C-3); 128,2 (C-2' e C-6'); 128,4 (C-3'' e C-5''); 128,9 (C-3' e C-5'); 130,0 (C-4'); 130,7 (C-6'' e C-2''); 130,8 (C-4''); 131,8 (C-1'); 133,1 (C-1''); 151,8 (C-4); 165,0 (C-2). **EM, m/z (%)** 417 ($[\text{M}+2]^+ - \text{H}_2\text{O}$, 18); 415 ($[\text{M}]^+ - \text{H}_2\text{O}$, 13); 281 (35); 230 (45) 207 (87); 191 (29); 174 (19); 129 (33); 127 (18); 125 (47); 115 (20); 102 (21); 101 (20); 91 (22); 89 (19); 75 (20); 73 (30); 57 (28); 51 (20); 43 (47); 41 (100).

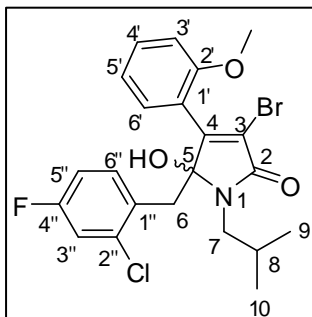
3-bromo-5-(3-bromo-4-metoxibenzil)-5-hidroxi-1-isobutil-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2(5H)-ona (33g)



O produto **33g** (0,480 g, 0,89 mmol) foi obtido como um sólido branco com 89% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solvente hexano:acetona 3:1 (v/v). **T_f**: 125,8-126,7 °C. **CCD: R_f** = 0,25 hexano:acetona, 3:1, (v/v) **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3322 (3407-3190); 2953; 2928; 2868; 2836; 1688; 1673; 1386; 1366; 1496; 1413; 1249; 1179; 1100; 1053; 1022; 813;

669; 638; 568. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 0,96 (d, 3H, $J_{9,8} = 6,6$, H-9); 0,97 (d, 3H, $J_{10,8} = 6,6$, H-10); 2,25-2,39 (m, 1H, H-8); 3,0 (s, 2H, H-6a e H-6b); 3,13 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 13,9$, $J_{7a,8} = 7,2$, H-7a); 3,53 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 13,9$, $J_{7b,8} = 8,1$, H-7b); 3,81 (s, 6H, 2'-OCH₃ e 4''-OCH₃) 5,16 (s, 1H, -OH); 6,63 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8,5$, H-5''); 6,84 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8,5$, $J_{6'',2''} = 2,1$, H-6''); 6,89 (dl, 1H, $J_{3',4'} = 8,4$, H-3'); 6,99-7,10 (m, 3H, H-2'', H-5' e H-6'); 7,32-7,41 (m, 1H, H-4'). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 20,5 (C-10); 20,7 (C-9); 27,7 (C-8); 41,6 (C-6); 48,1 (C-7); 56,1 (4''-OCH₃)*; 56,2 (2'-OCH₃)*; 93,4 (C-5); 110,6 (C-3); 111,3 (C-5''); 111,4 (C-3'); 120,5 (C-1'); 121,4 (C-5'); 121,6 (C-1''); 127,6 (C-3''); 129,5 (C-6''); 131,2 (C-4'); 131,4 (C-6'); 135,1 (C-2''); 153,1 (C-2'); 154,7 (C-4''); 155,6 (C-4); 164,4 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 523 ($[\text{M}+4]^+ - \text{H}_2\text{O}$, 13); 521 ($[\text{M}+2]^+ - \text{H}_2\text{O}$, 33); 519 ($[\text{M}]^+ - \text{H}_2\text{O}$, 20); 398 (28); 386 (16); 384 (15); 305 (30); 199 (16); 176 (20); 131 (22); 91 (16); 89 (27); 88 (18); 77 (39); 75 (19); 57 (20); 55 (26); 51 (24); 44 (57); 41 (100); 40 (34).

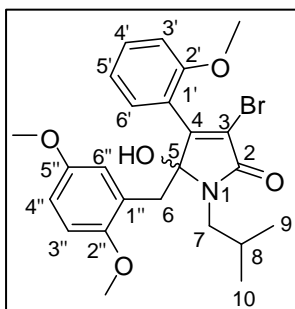
3-bromo-5-(2-cloro-4-fluorobenzil)-5-hidroxi-1-isobutil-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2(5H)-ona (33h)



O produto **33h** (0,238 g, 0,49 mmol) foi obtido como um sólido branco com 81% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:8 (v/v). **T_f**: 134,6-135,7 °C. **CCD**: **R_f** = 0,53 diclorometano. **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3302 (3460-3143); 2957; 2927; 2869; 2834; 1688; 1679; 1598; 1490; 1413; 1387; 1368; 1232; 1180; 1121; 1026; 925; 893; 816; 734; 640; 575.

RMN de ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO) δ 0,89 (d, 3H, $J_{9,8} = 6,6$, H-9); 0,90 (d, 3H, $J_{10,8} = 6,6$, H-10); 2,10-2,24 (m, 1H, H-8); 3,09 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 14,0$, $J_{7a,8} = 7,1$, H-7a); 3,29 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 15,6$, H-6a); 3,35 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 15,6$, H-6b); 3,38 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 14,0$, $J_{7b,8} = 7,9$, H-7b); 3,70 (s, 3H, 2'-OCH₃); 5,70 (s, 1H, -OH); 6,87-7,02 (m, 3H, H-3', H-5', H-5'') 7,09, (dd, 1H, $J_{3'',F} = 8,8$, $J_{3'',5''} = 2,7$, H-3''); 7,33-7,40 (m, 2H, H-6'' e H-4'); 7,51 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 7,6$, $J_{6',4'} = 1,5$, H-6'). **RMN de ¹³C (75 MHz, (CD₃)₂CO)** δ 20,0 (C-10); 20,2 (C-9); 27,8 (C-8); 36,5 (C-6); 47,5 (C-7); 54,6 (2'-OCH₃); 93,3 (C-5); 111,0 (C-3'); 113,4 (d, $J_{C,F} = 20,9$, C-5''); 115,8 (d, $J_{C,F} = 24,7$, C-3''); 119,9 (C-5'); 120,0 (C-3)*; 120,4 (C-1')*; 129,2 (d, $J_{C,F} = 3,7$, C-1''); 129,4 (C-6'); 130,8 (C-4'); 131,7 (d, $J_{C,F} = 8,7$, C-6''); 135,0 (d, $J_{C,F} = 10,0$, C-2''); 152,8 (C-4); 156,3 (C-2'); 161,0 (d, $J_{C,F} = 247,1$, C-4''); 164,6 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 465 ([M+2]⁺ - H₂O, 3); 463 ([M]⁺ - H₂O, 4); 401 (13); 366 (25); 281 (16); 280 (13); 259 (14); 207 (32); 148 (14); 145 (15); 143 (37); 135 (13); 133 (15); 131 (22); 107 (13); 91 (13); 77 (20); 57 (19); 56 (19); 55 (13); 43 (74); 41 (100).

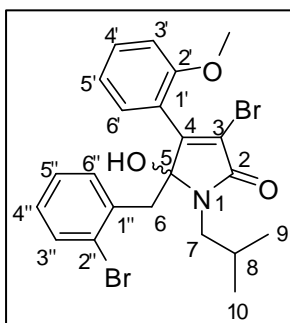
3-bromo-5-(2,5-dimetoxibenzil)-5-hidroxi-1-isobutil-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2(5H)-ona (33i)



O produto **33i** (0,465 g, 0,95 mmol) foi obtido como um sólido amarelo claro com 95% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solvente diclorometano. **T_f**: 120,1-122,0 °C. **CCD**: **R_f** = 0,33 diclorometano. **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3317 (3452-3147); 2953; 2866; 2830; 1677; 1503; 1410; 1385; 1366; 1250; 1220; 1180;

1045; 1027; 925; 857; 802; 751; 637. **RMN de ^1H (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)** δ 0,87 (d, 3H, $J_{9,8} = 6,6$, H-9); 0,88 (d, 3H, $J_{10,8} = 6,6$, H-10); 2,08-2,28 (m, 1H, H-8); 3,07 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 14,0$, $J_{7a,8} = 7,0$, H-7a); 3,16 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 14,5$, H-6a); 3,23 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 14,5$, H-6b); 3,29 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 14,0$, $J_{7b,8} = 8,0$, H-7b); 3,65 (s, 6H, 5''-OCH₃ e 2''-OCH₃); 3,75 (s, 3H, 2'-OCH₃); 5,54 (s, 1H, -OH); 6,67 (dd, 1H, $J_{4'',3''} = 8,9$, $J_{4'',6''} = 2,9$, H-4''); 6,74 (d, 1H, $J_{3'',4''} = 8,9$, H-3''); 6,79 (d, 1H, $J_{6'',4''} = 2,9$, H-6''); 6,94 (t, 1H, $J_{5',6'} = J_{5',4'} = 7,5$, H-5'); 7,03 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,4$, H-3'); 7,37 (ddd, 1H, $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 8,7$, $J_{4',6'} = 1,6$, H-4'); 7,50 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 8,7$, $J_{6',4'} = 1,6$, H-6'). **RMN de ^{13}C (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)** δ 20,0 (C-10); 20,2 (C-9); 27,7 (C-8); 33,7 (C-6); 47,5 (C-7); 54,8 (5''-OCH₃)*; 54,9 (2''-OCH₃)*; 55,2 (2'-OCH₃)*; 93,8 (C-5); 117,0 (C-3); 111,0 (C-3''); 111,1 (C-3'); 112,5 (C-4''); 115,9 (C-6''); 119,9 (C-5'); 120,1 (C-1'); 120,4 (C-1''); 129,4 (C-6'); 130,6 (C-4') 151,3 (C-2''); 153,3 (C-5''); 156,4 (C-4); 164,5 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 473 ([M+2]⁺ - H₂O, 18); 471 ([M]⁺ - H₂O, 17); 393 (16); 392 (69); 384 (113); 349 (20); 348 (23); 336 (23); 334 (15); 305 (28); 302 (14); 151 (16); 138 (15); 77 (15); 115 (15); 55 (30); 43 (28); 41 (100).

3-bromo-5-(2-bromobenzil)-5-hidroxi-1-isobutil-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2(5H)-ona (33j)

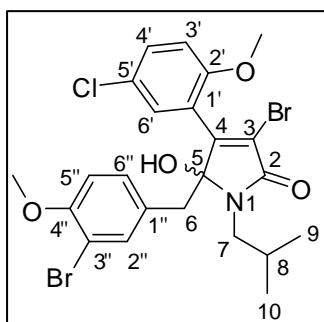


O produto **33j** (0,278 g, 0,546 mmol) foi obtido como um sólido branco com 91% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:10 (v/v). **T_f**: 150,3-151,4 °C. **CCD**: **R_f** = 0,45 hexano:diclorometano, 1:10, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3316 (3525-3131); 3054; 2955; 2923; 2868; 2834; 1679; 1595; 1489; 1434; 1410; 1385; 1366; 1239; 1248; 1121; 1051;

1023; 923; 807; 747; 642. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 0,90 (d, 3H, $J_{9,8} = 6,7$, H-9); 0,94 (d, 3H, $J_{10,8} = 6,7$, H-10); 2,17-2,31 (m, 1H, H-8); 3,01 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 14,0$, $J_{7a,8} = 7,4$, H-7a); 3,30 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 15,3$, H-6a); 3,38 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 15,3$, H-6b); 3,48 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 14,0$, $J_{7b,8} = 7,9$, H-7b); 3,81 (s, 3H, 2'-OCH₃); 5,01 (s, 1H, -OH); 6,86-6,96 (m, 3H, H-5', H-3' e H-6'); 7,01 (ddd, 1H, $J_{4'',5''} = J_{4'',3''} = 7,6$, $J_{4'',6''} = 1,5$, H-4''); 7,07 (ddd, 1H, $J_{5'',6''} = J_{5'',4''} = 8,7$, $J_{5'',3''} = 1,2$, H-5''); 7,22 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 7,6$, $J_{6'',4''} = 1,5$, H-6''); 7,33 (ddd, 1H, $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 8,7$, $J_{4',6'} = 1,8$, H-4'); 7,38 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 7,5$, $J_{3',5'} = 1,2$, H-3'). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 20,5 (C-10); 20,6 (C-9); 27,5 (C-8); 41,3 (C-6); 48,0 (C-7); 56,1 (2'-OCH₃); 93,2 (C-5); 111,3 (C-3'); 120,3 (C-3); 121,6 (C-5');

121,8 (C-1'); 126,1 (C-2''); 127,1 (C-5''); 128,4 (C-6'); 130,0 (C-6''); 130,8 (C-4'); 131,0 (C-4''); 132,7 (C-3'') 134,2 (C-1''); 153,7 (C-2'); 155,5 (C-4); 164,5 (C-2). **EM, m/z (%)** 493 ([M+4]⁺ - H₂O, 53); 491 ([M+2]⁺ - H₂O, 100); 489 ([M]⁺ - H₂O, 51); 412 (43); 410 (41); 369 (57); 368 (90); 367 (56); 366 (82); 356 (72); 354 (76); 322 (27); 288 (44); 275 (70); 273 (26); 272 (89); 246 (31); 233 (28); 217 (29); 216 (25); 202 (28); 189 (49); 115 (39); 102 (25); 77 (35); 41 (79).

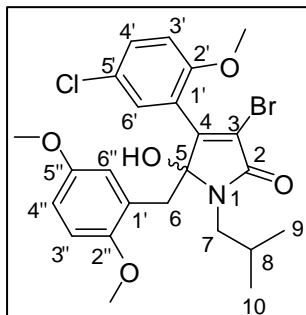
3-bromo-5-(3-bromo-4-metoxibenzil)-4-(5-cloro-2-metoxifenil)-5-hidroxi-1-isobutil-1H-pirrol-2(5H)-ona (33k)



O produto **33k** (0,419 g, 0,73 mmol) foi obtido como um sólido branco com 87% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:8 (v/v). **T_f**: maior que 350 °C. **CCD: R_f** = 0,50 diclorometano. **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\max}$ 3322 (3419-3159); 3006; 2959; 2826; 2867; 2843; 1692; 1678; 1498; 1416; 1278; 1247; 1180; 1098; 1053; 1021; 875;

800; 784; 737; 653. **RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆)** δ 0,95 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 2,17-2,31 (m, 1H, H-8); 2,99 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 14,5$, H-6a); 3,22 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 14,5$, H-6b); 3,18 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 13,7$, $J_{7a,8} = 7,8$, H-7a); 3,35 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 13,7$, $J_{7b,8} = 7,8$, H-7b); 3,80 (s, 3H, 4''-OCH₃); 3,82 (s, 3H, 2'-OCH₃); 6,52 (s, 1H, -OH); 6,80 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,5$, H-3'); 7,01 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8,9$, H-5''); 7,06 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 8,5$, $J_{4',6'} = 1,8$, H-4'); 7,20 (d, 1H, $J_{6',4'} = 1,8$, H-6'); 7,30 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8,9$, $J_{6'',2''} = 2,7$, H-6''); 7,57 (d, 1H, $J_{2'',6''} = 2,7$, H-2''). **RMN de ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆)** δ 20,3 (d, C-9, C-10); 27,9 (C-8); 41,0 (C-6); 47,5 (C-7); 55,3 (2'-OCH₃); 55,7 (4''-OCH₃); 93,3 (C-5); 110,0 (C-3); 111,3 (C-3'); 112,5 (C-5''); 120,8 (C-3''); 122,2 (C-1'); 124,1 (C-5'); 128,4 (C-1''); 128,8 (C-2''); 129,9 (C-6''); 130,4 (C-4'); 134,5 (C-6'); 150,8 (C-2'); 154,5 (C-4''); 154,8 (C-4); 164,3 (C-2).

3-bromo-4-(5-cloro-4-metoxifenil)-5-(2,5-dimetoxifenil)-5-hidroxi-1-isobutil-1H-pirrol-2(5H)-ona (33l)

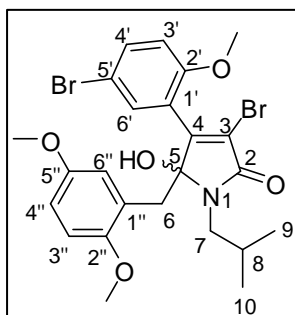


O produto **33l** (0,378 g, 0,72 mmol) foi obtido como um sólido amarelo claro com 80% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:10 (v/v). **T_f**: 108,8-110,1 °C.

CCD: **R_f** = 0,33 hexano:diclorometano, 1:10, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3332 (3492-3147); 2954; 2924; 2868; 2833; 1680; 1591; 1499; 1460; 1388; 1368; 1218; 1179; 1134; 1044; 805; 736; 657. **RMN**

de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0,96 (d, 3H, $J_{9,8}$ = 6,6, H-9); 0,97 (d, 3H, $J_{10,8}$ = 6,6, H-10); 2,21-2,35 (m, 1H, H-8); 2,90 (d, 1H, $J_{6a,6b}$ = 14,2, H-6a); 3,11 (dd, 1H, $J_{7a,7b}$ = 14,1, $J_{7a,8}$ = 7,6, H-7a); 3,40 (d, 1H, $J_{6b,6a}$ = 14,2, H-6b); 3,46 (dd, 1H, $J_{7b,7a}$ = 14,1, $J_{7b,8}$ = 7,8, H-7b); 3,63 (s, 3H, 2'-OCH₃); 3,76 (s, 3H, 2''-OCH₃)*; 3,78 (s, 3H, 5''-OCH₃)*; 5,65 (s, 1H, -OH); 6,49-6,59 (m, 3H, H-3'', H-6'' e H-4''); 6,64 (d, 1H, $J_{3',4'}$ = 8,9, H-3'); 7,11 (dd, 1H, $J_{4',3'}$ = 8,9, $J_{4',6'}$ = 2,6, H-4'); 7,22 (d, 1H, $J_{6',4'}$ = 2,6, H-6'). *As atribuições podem estar invertidas. **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 20,5 (C-10); 20,6 (C-9); 27,7 (C-8); 39,1 (C-6); 47,8 (C-7); 56,5 (5''-OCH₃)*; 56,7 (2''-OCH₃)*; 56,8 (2'-OCH₃)*; 93,6 (C-5); 110,5 (C-3''); 111,7 (C-3'); 112,7 (C-4''); 117,9 (C-6''); 121,4 (C-3); 122,3 (C-1'); 123,5 (C-5'); 125,0 (C-1''); 129,1 (C-6'); 129,8 (C-4') 150,6 (C-2'); 151,2 (C-2''); 153,3 (C-5''); 154,1 (C-4); 164,5 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 509 ([M+4]⁺ - H₂O, 11); 507 ([M+2]⁺ - H₂O, 40); 505 ([M]⁺ - H₂O, 32); 428 (37); 427 (26); 426 (100); 420 (19); 419 (17); 418 (18); 384 (17); 383 (21); 382 (24); 370 (28); 368 (16); 352 (18); 339 (31); 338 (18); 336 (20); 136 (21); 115 (30); 41 (50).

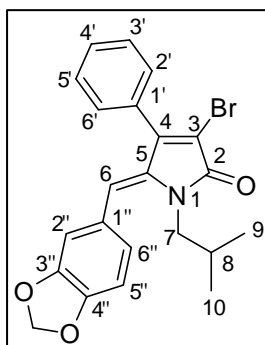
3-bromo-4-(5-bromo-2-metoxifenil)-5-(2,5-dimetoxifenil)-5-hidroxi-1-isobutil-1H-pirrol-2(5H)-ona (33m)



O produto **33m** (0,461 g, 0,81 mmol) foi obtido como um sólido amarelo claro com 90% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando-se como solvente diclorometano. **T_f**: 133,8-135,4 °C. **CCD**: **R_f** = 0,26 diclorometano. **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3356 (3496-3158); 2955; 2924; 2868; 2833; 1687; 1588; 1499; 1460; 1385; 1219; 1179; 1134;

1019; 940; 891; 802; 733; 650. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 0,96 (d, 3H, $J_{9,8} = 6,6$, H-9); 0,97 (d, 3H, $J_{10,8} = 6,6$, H-10); 2,22-2,36 (m, 1H, H-8); 2,89 (d, 1H, $J_{6a,6b} = 14,4$, H-6a); 3,11 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 14,0$, $J_{7a,8} = 7,5$, H-7a); 3,42 (d, 1H, $J_{6b,6a} = 14,4$, H-6b); 3,46 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 14,0$, $J_{7b,8} = 7,8$, H-7b); 3,65 (s, 3H, 2'-OCH₃); 3,77 (s, 3H, 5''-OCH₃); 3,78 (s, 3H, 2''-OCH₃); 5,68 (s, 1H, -OH); 6,49-6,62 (m, 4H, H-3', H-3'', H-6'' e H-4''); 7,24 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 8,9$, $J_{4',6'} = 2,6$, H-4'); 7,36 (d, 1H, $J_{6',4'} = 2,6$, H-6'). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 20,5 (C-10); 20,6 (C-9); 27,7 (C-8); 39,3 (C-6); 47,7 (C-7); 55,5 (2'-OCH₃); 55,6 (5''-OCH₃); 56,9 (2''-OCH₃); 93,6 (C-5); 110,5 (C-3''); 112,2 (C-3'); 112,3 (C-3); 112,7 (C-4''); 118,0 (C-6''); 121,4 (C-5'); 122,8 (C-1'); 123,5 (C-1''); 131,8 (C-6'); 132,7 (C-4') 150,5 (C-2'); 151,0 (C-2''); 153,3 (C-5''); 154,6 (C-4); 164,5 (C-2). **EM, m/z (%)** 553 ($[\text{M}+4]^+ - \text{H}_2\text{O}$, 12); 551 ($[\text{M}+2]^+ - \text{H}_2\text{O}$, 25); 549 ($[\text{M}]^+ - \text{H}_2\text{O}$, 15); 549 (11); 472 (19); 470 (20); 427 (9); 392 (13); 391 (42); 385 (11); 383 (10); 348 (10); 207 (16); 151 (18); 138 (9); 136 (17); 102 (12); 57 (37); 56 (9); 55 (28); 43 (40); 41 (100).

2.3.6 Procedimento para a síntese da (Z)-3-bromo-4-(5-bromo-2-metoxifenil)-5-(2,5-dimetoxifenil)-5-hidroxi-1-isobutil-1H-pirrol-2(5H)-ona (34a)

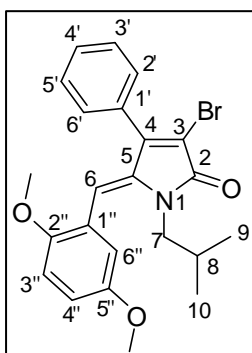


A um balão de fundo redondo (25 mL) acoplado a um condensador adicionou-se a 3-bromo-4-fenil-5-hidroxi-1-isobutil-5-(3,4-metilenodioxibenzilideno)-pirrol-2(5H)-ona **33a** (0,250 g; 0,502 mmol), clorofórmio (8 mL) e ácido *p*-toluenossulfônico (PTSA) (14 mg; 0,075 mmol). A mistura foi refluxada por duas horas. Em seguida adicionou-se clorofórmio (30 mL) à mistura reacional e fez-se extração com solução saturada de bicarbonato de sódio (3 x 20 mL) e solução saturada de NaCl (3 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para obtenção do material bruto da reação, que foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:5 (v/v) para obtenção do isômero (**Z**)**34a** 0,052 g (0,106 mmol) e de uma mistura dos isômeros *Z* e *E* 0,107 g (0,218 mmol) com rendimento total de 81%. **T_f**: 115,3-116,7 °C. **CCD: R_f** = 0,31 hexano:diclorometano, 1:5, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3055; 2957; 2925; 2870; 1659; 1630; 1485; 1440; 1385; 1368; 1259; 1234; 1092; 1036; 931; 907; 698. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 0,58 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 1,45-1,59 (m, 1H, H-8);

3,57 (d, 1H, $J_{7,8} = 7,4$ H-7); 5,99 (s, 2H, -O-CH₂-O-); 6,17 (s, 1H, H-6); 6,72-6,83 (m, 3H, H-2'', H-5'' e H-6''); 7,35-7,56 (m, 6H, Ph). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 19,6 (C-10 e C-9); 27,7 (C-8); 49,5 (C-7); 101,3 (-O-CH₂-O-); 108,1 (C-5''); 109,5 (C-2''); 114,0 (C-3); 116,3 (C-6); 123,6 (C-6''); 128,1 (C-1''); 128,4 (C-3' e C-5'); 129,3 (C-4'); 129,6 (C-2' e C-6'); 130,9 (C-1'); 138,5 (C-5); 147,5 (C-3'' e C-4''); 148,6 (C-4); 166,8 (C-2). **EM, m/z (%)** 427 ([M+2]⁺, 34); 425 ([M]⁺, C₂₂H₂₀BrNO₃, 40); 371 (19); 369 (20); 303 (24); 302 (26); 290 (75); 260 (54); 245 (17); 217 (32); 216 (25); 204 (19); 203 (20); 189 (32); 176 (18); 135 (29); 129 (34); 51 (25); 43 (22); 41 (100).

Os compostos **34b-m** e foram preparados utilizando-se procedimento experimental similar ao descrito para a síntese dos compostos **34a**. Na tentativa de purificação dos isômeros por cromatografia em coluna de sílica gel, apenas os isômeros *Z* puderam ser isolados, sendo que uma mistura contendo os isômeros *E* e *Z* também foi obtida. Todos os compostos purificados foram caracterizados por espectroscopia no IV, RMN de ¹H e de ¹³C, experimentos bidimensionais (HSQC, COSY e NOESY) e espectrometria de massas. As misturas dos isômeros foram quantificadas por espectroscopia de RMN de ¹H.

(*Z*)-3-bromo-5-(2,5-dimetoxibenzilideno)-1-isobutil-4-fenil-1H-pirrol-2(5*H*)-ona (**34b**)

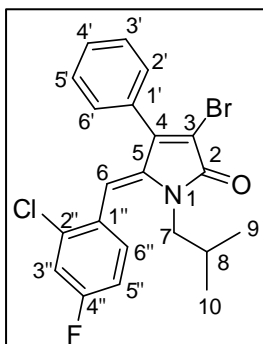


Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:0,85 com rendimento de 94%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:6 (v/v) apenas o isômero (**Z**)**34b** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 128,3-129,1 °C. **CCD**: **R_f** = 0,23 hexano:diclorometano 1:5 (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3055; 2997; 2955; 2869; 2833; 1697; 1631; 1490; 1461; 1386; 1368; 1279; 1219;

1093; 1044; 907; 808; 699; 658. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 0,54 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 1,41-1,55 (m, 1H, H-8); 3,50 (d, 1H, $J_{7,8} = 7,3$ H-7); 3,74 (s, 3H, 2''-OCH₃); 3,77 (s, 3H, 5''-OCH₃); 6,21 (s, 1H, H-6); 6,74 (d, 1H, $J_{6'',4''} = 2,8$, H-6''); 6,79 (d, 1H, $J_{3'',4''} = 8,9$, H-3''); 6,85 (dd, 1H, $J_{4'',3''} = 8,9$, $J_{4'',6''} = 2,8$, H-4''); 7,48 (m, 5H, Ph). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 19,7 (C-10 e C-9); 27,7 (C-8); 49,2 (C-7); 55,9 (5''-OCH₃ e 2''-OCH₃); 111,4 (C-3''); 113,0 (C-6); 114,0 (C-3); 114,8 (C-4''); 116,6 (C-6''); 124,0 (C-1''); 128,4 (C-3' e C-5'); 129,2 (C-4'); 129,8 (C-2' e C-6'); 130,9 (C-1'); 138,9 (C-5); 148,2 (C-4); 151,5 (C-2'');

152,9 (C-5''); 165,5 (C-2). **EM, m/z (%)** 443 ([M+2]⁺, 15); 441 ([M]⁺, C₂₃H₂₄BrNO₃, 15); 369 (12); 368 (19); 366 (15); 363 (25); 362 (100); 356 (19); 355 (15); 354 (24); 353 (13); 306 (30); 304 (12); 151 (14); 129 (24); 57 (18); 55 (18); 43 (25); 41(86).

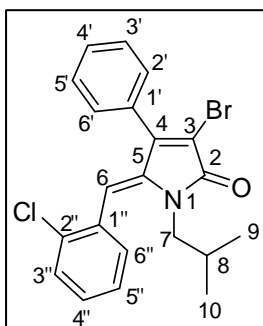
(Z)-3-bromo-5-(2-cloro-4-fluorobenzilideno)-1-isobutil-4-fenil-1H-pirrol-2(5H)-ona (34c)



Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:0,87 com rendimento de 83%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:3 (v/v) apenas o isômero **(Z)34c** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 127,3-128,5 °C. **CCD: R_f** = 0,45 hexano:diclorometano, 1:5, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\max}$ 3057; 2957; 2927; 2870; 1704; 1637; 1484; 1387; 1368;

1242; 1181; 1093; 1051; 905; 856; 698. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 0,56 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 1,36-1,50 (m, 1H, H-8); 3,40 (d, 1H, $J_{7,8} = 7,3$, H-7); 6,11 (s, 1H, H-6); 7,03 (dd, 1H, $J_{5'',6''} = J_{5'',F} = 8,3$, $J_{5'',3''} = 2,5$, H-5''); 7,18 (dd, 1H, $J_{3'',F} = 8,3$, $J_{3'',5''} = 2,5$, H-3''); 7,27 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8,3$, $J_{6'',F} = 6,0$, H-6''); 7,49 (m, 5H, Ph). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 19,6 (C-10 e C-9); 27,7 (C-8); 49,2 (C-7); 111,7 (C-6); 113,7 ($J_{C,F} = 21,5$, C-5''); 114,9 (C-3); 116,8 ($J_{C,F} = 24,8$, C-3''); 128,6 (C-3' e C-5'); 129,4 ($J_{C,F} = 3,8$, C-1''); 129,4 (C-4'); 129,6 (C-2' e C-6'); 130,5 (C-1'); 132,4 ($J_{C,F} = 8,7$, C-6''); 135,0 ($J_{C,F} = 10,2$, C-2''); 139,7 (C-5); 148,2 (C-4); 162,2 ($J_{C,F} = 252,3$, C-4''); 166,4 (C-2). **EM, m/z (%)** 437 ([M+4]⁺, 7); 435 ([M+2]⁺, 28); 433 ([M]⁺, C₂₁H₁₈BrClFNO, 22); 357 (20); 356 (29); 355 (20); 354 (29); 344 (33); 342 (31); 247 (22); 235 (13); 234 (18); 220 (33); 129 (35); 101 (14); 57 (18); 55 (21); 51 (16); 43(16); 41 (100).

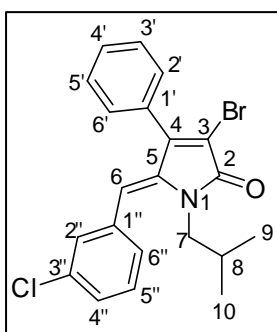
(Z)-3-bromo-5-(2-clorobenzilideno)-1-isobutil-4-fenil-1H-pirrol-2(5H)-ona (34d)



Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:0,64 com rendimento de 88%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:4 (v/v) apenas o isômero **(Z)34d** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 109,2-110,1 °C. **CCD: R_f** = 0,44 hexano:diclorometano, 1:5, (v/v). **IV (cm⁻¹)**

$\bar{\nu}_{\max}$ 3056; 2957; 2868; 1702; 1634; 1467; 1386; 1368; 1324; 1262; 1169; 1094; 1047; 907; 734; 696; 656. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 0,53 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 1,36-1,50 (m, 1H, H-8); 3,41 (d, 1H, $J_{7,8} = 7,3$, H-7); 6,21 (s, 1H, H-6); 7,27-7,29 (m, 3H, H-4'', H-5'' e H-6''); 7,38-7,43 (m, 1H, H-3''); 7,50 (m, 5H, Ph). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 19,6 (C-10 e C-9); 27,7 (C-8); 49,2 (C-7); 113,0 (C-6); 114,7 (C-3); 126,2 (C-5'') 128,5 (C-3' e C-5'); 129,3 (C-6'')*; 129,4 (C-4')*; 129,6 (C-4'')*; 129,7 (C-2' e C-6'); 130,6 (C-1'); 131,4 (C-3''); 133,2 (C-1''); 134,1 (C-2''); 139,4 (C-5); 148,1 (C-4); 166,3 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 419 ($[\text{M}+4]^+$, 19); 417 ($[\text{M}+2]^+$, 72); 415 ($[\text{M}]^+$, $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrClNO}$, 56); 339 (41); 338 (63); 337 (42); 336 (62); 326 (63); 324 (65); 292 (40); 290 (24); 280 (23); 229 (38); 217 (24); 202 (51); 200 (23); 189 (29); 129 (48); 101 (32); 43 (25); 41 (100).

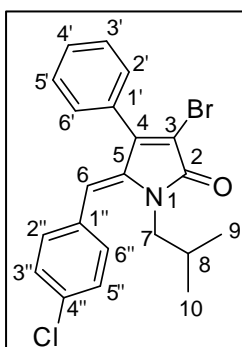
(Z)-3-bromo-5-(3-clorobenzilideno)-1-isobutil-4-fenil-1H-pirrol-2(5H)-ona (34e)



Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:0,72 com rendimento de 80%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:4 (v/v) apenas o isômero (**Z**)**34e** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 99,0-100,3 °C. **CCD**: **R_f** = 0,47 hexano:diclorometano, 1:5, (v/v). **IV** (cm^{-1}) $\bar{\nu}_{\max}$ 3057; 2957; 2926; 2870; 1705; 1630; 1466; 1324;

1167; 1092; 1050; 910; 775; 734; 690. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 0,55 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 1,35-1,50 (m, 1H, H-8); 3,48 (d, 1H, $J_{7,8} = 7,4$, H-7); 6,19 (s, 1H, H-6); 7,18-7,11 (m, 1H, H-6''); 7,33-7,24 (m, 3H, H-2'', H-4'' e H-5''); 7,41-7,51 (m, 5H, Ph). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 19,5 (C-10 e C-9); 27,8 (C-8); 49,3 (C-7); 114,1 (C-6); 114,8 (C-3); 127,44 (C-6''); 128,1 (C-2''); 128,5 (C-3' e C-5'); 129,2 (C-4')*; 129,3 (C-4'')*; 129,4 (C-5'')*; 129,6 (C-2' e C-6'); 130,6 (C-1'); 134,1 (C-3''); 136,3 (C-1''); 139,5 (C-5); 148,5 (C-4); 166,6 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 419 ($[\text{M}+4]^+$, 8); 417 ($[\text{M}+2]^+$, 31); 415 ($[\text{M}]^+$, $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrClNO}$, 25); 338 (22); 336 (24); 326 (22); 324 (23); 292 (28); 229 (21); 280 (23); 216 (18); 202 (40); 200 (18); 189 (20); 129 (38); 101 (27); 75 (17); 55 (17); 51 (20); 43 (18); 41 (100).

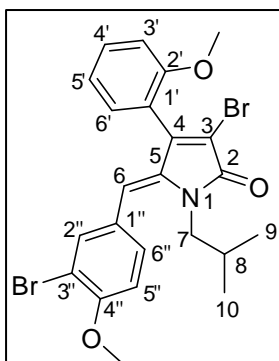
(Z)-3-bromo-5-(4-clorobenzilideno)-1-isobutil-4-fenil-1H-pirrol-2(5H)-ona (34f)



Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:0,68 com rendimento de 83%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:4 (v/v) apenas o isômero (**Z**)**34f** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 125,1-126,4 °C. **CCD**: **R_f** = 0,43 hexano:diclorometano, 1:5, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\max}$ 3055; 2957; 2928; 2870; 1701; 1630; 1487; 1451; 1386; 1368; 1088; 1050; 1013; 907;

838; 733; 698. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 0,54 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 1,35-1,49 (m, 1H, H-8); 3,48 (d, 1H, $J_{7,8} = 7,4$, H-7); 6,19 (s, 1H, H-6); 7,19 (d, 2H, $J_{2',3''} = J_{6'',2''} = 8,4$, C-2'' e C-6''); 7,35 (d, 2H, $J_{3'',2''} = J_{5'',6''} = 8,4$, C-3'' e C-5''); 7,53-7,42 (m, 5H, Ph). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 19,5 (C-10 e C-9); 27,7 (C-8); 49,4 (C-7); 114,1 (C-6); 114,6 (C-3); 128,3 (C-3'' e C-5''); 128,5 (C-3' e C-5'); 129,4 (C-4'); 129,6 (C-2' e C-6'); 130,6 (C-1', C-2'' e C-6''); 132,9 (C-4''); 134,1 (C-1''); 139,3 (C-5); 148,5 (C-4); 166,6 (C-2). **EM, m/z (%)** 419 ([M+4]⁺, 9); 417 ([M+2]⁺, 32); 415 ([M]⁺, C₂₁H₁₉BrClNO, 24); 339 (18); 338 (31); 337 (20); 336 (33); 326 (24); 324 (27); 292 (25); 280 (32); 229 (25); 216 (20); 202 (41); 200 (19); 189 (20); 129 (44); 115 (18); 101 (30); 51 (20); 41 (100).

(Z)-3-bromo-5-(3-bromo-4-metoxibenzilideno)-1-isobutil-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2(5H)-ona (34g)

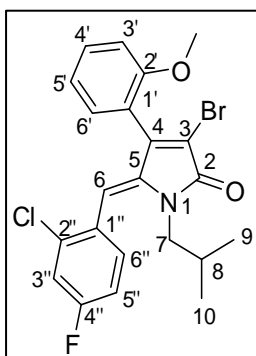


Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:1,94 com rendimento de 91%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:6 (v/v) apenas o isômero (**Z**)**34g** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 120,1-122,0 °C. **CCD**: **R_f** = 0,23 hexano:diclorometano, 1:5, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\max}$ 3052; 3006; 2957; 2870; 2838; 1698; 1630; 1492; 1460;

1385; 1368; 1252; 1087; 1051; 1020; 910; 753. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 0,57 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 1,42-1,55 (m, 1H, H-8); 3,50 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 14,4$, $J_{7,8} = 7,4$, H-7a); 3,56 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 14,4$, $J_{7,8} = 7,4$, H-7b); 3,82 (2'-OCH₃); 3,91 (4''-OCH₃); 5,97 (s, 1H, H-6); 6,87 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8,5$, H-5''); 7,00-7,07 (m, 2H, H-3' e H-5');

7,17 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 8,5$, $J_{6'',2''} = 1,7$, H-6''); 7,21 (dd, 1H, $J_{6',5'} = 7,5$, $J_{6',4'} = 1,7$, H-6'); 7,45 (m, 2H, H-2'' e H-4'). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 19,5 (C-10 e C-9); 27,6 (C-8); 49,5 (C-7); 55,7 (2'-OCH₃); 56,3 (4''-OCH₃); 111,1 (C-5''); 111,3 (C-3''); 111,5 (C-3'); 113,4 (C-6); 115,6 (C-3); 119,7 (C-1'); 120,4 (C-5'); 128,3 (C-1''); 129,7 (C-6''); 130,9 (C-4' e C-6'); 134,1 (C-2''); 138,8 (C-5); 146,8 (C-4); 155,5 (C-4''); 156,9 (C-2'); 167,1 (C-2). **EM, m/z (%)** 523 ([M+3]⁺, 11); 521 ([M+2]⁺, 25); 519 ([M]⁺, C₂₃H₂₃Br₂NO₃, 12); 399 (10); 398 (18); 397 (12); 396 (14); 386 (15); 384 (14); 305 (31); 302 (13); 201 (10); 199 (10); 115 (15); 102 (11); 77 (15); 57 (31); 55 (17); 43 (22); 41 (100).

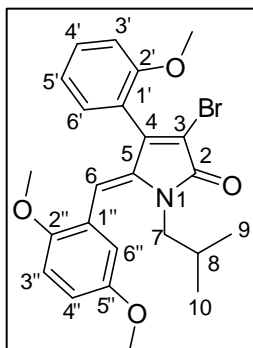
(Z)-3-bromo-5-(2-cloro-4-fluorobenzilideno)-1-isobutil-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2(5H)-ona (34h)



Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:0,30 com rendimento de 77%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:6 (v/v) apenas o isômero **(Z)34h** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 134,4-126,5 °C. **CCD: R_f** = 0,27 hexano:diclorometano, 1:6, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\text{max}}$ 3066; 3037; 3004; 2960; 2925; 2867; 2842; 1696; 1595;

1486; 1433; 1387; 1367; 1251; 1164; 1079; 1018; 903; 863; 842; 764; 689; 570. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 0,57 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 1,42-1,55 (m, 1H, H-8); 3,35 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 14,2$, $J_{7,8} = 7,4$, H-7a); 3,43 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 14,2$, $J_{7,8} = 7,4$, H-7b); 3,83 (s, 3H, 2'-OCH₃); 5,94 (s, 1H, H-6); 6,97-7,09 (m, 3H, H-5', H-3' e H-5''); 7,16 (dd, 1H, $J_{3'',\text{F}} = 8,4$, $J_{3'',5''} = 2,5$, H-3''); 7,24-7,29 (m, 2H, H-6'' e H-6'); 7,45 (ddd, 1H, $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 8,4 = J_{4',3'} = 1,7$, H-4'). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 19,6 (C-10 e C-9); 27,7 (C-8); 49,2 (C-7); 55,6 (2'-OCH₃); 111,7 (C-6); 111,4 (C-3'); 113,6 ($J_{\text{C-F}} = 21,4$, C-5''); 116,1 (C-3); 116,8 ($J_{\text{C-F}} = 24,8$, C-3''); 119,4 (C-1'); 120,5 (C-5'); 129,6 ($J_{\text{C-F}} = 3,7$, C-1''); 131,0 (C-4')*; 131,1 (C-6')*; 132,5 ($J_{\text{C-F}} = 8,7$, C-6''); 134,9 ($J_{\text{C-F}} = 10,3$, C-2''); 139,6 (C-5); 146,5 (C-4); 156,9 (C-2'); 162,1 ($J_{\text{C-F}} = 252,0$, C-4''); 166,8 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 467 ([M+4]⁺, 8); 465 ([M+2]⁺, 34); 463 ([M]⁺, C₂₂H₂₀BrClFNO₂, 22); 387 (11); 386 (20); 385 (14); 384 (30); 374 (24); 372 (24); 341 (13); 340 (14); 293 (17); 290 (16); 207 (17); 131 (11); 115 (13); 77 (15); 57 (26); 55 (23); 43 (23); 41 (100).

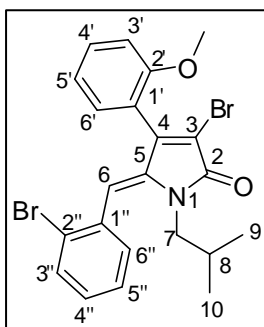
(Z)-3-bromo-5-(2,5-dimetoxibenzilideno)-1-isobutil-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2(5H)-ona (34i)



Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:0,85 com rendimento de 89%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:7 (v/v) apenas o isômero **(Z)34i** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 105,2-106,9 °C. **CCD**: **R_f** = 0,29 hexano:diclorometano, 1:7, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3000; 2957; 2927; 2875; 2834; 1635; 1698; 1492; 1462;

1386; 1369; 1249; 1221; 1047; 1024; 909; 810; 755. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 0,55 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 1,43-1,57 (m, 1H, H-8); 3,51 (dd, 2H, $J_{7a,7b} = J_{7b,7a} = 14,7$, $J_{7,8} = 7,2$, H-7); 3,73 (2''-OCH₃)*; 3,76 (5''-OCH₃)*; 3,83 (2'-OCH₃); 6,05 (s, 1H, H-6); 6,74 (d, 1H, $J_{6'',4''} = 2,8$, H-6''); 6,77 (d, 1H, $J_{3'',4''} = 9,0$, H-3''); 6,83 (d, 1H, $J_{4'',3''} = 9,0$, $J_{4'',6''} = 2,8$, H-4''); 7,00-7,07 (m, 2H, H-5' e H-3'); 7,27 (d, 1H, $J_{6',5'} = 7,2$, $J_{6',4'} = 1,7$, H-6'); 7,43 (ddd, 1H, $J_{4',3'} = J_{4',5'} = 8,2 = J_{4',6'} = 1,7$, H-4'). *As atribuições podem estar invertidas. **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 19,6 (C-10) 19,7 (C-9); 27,6 (C-8); 49,3 (C-7); 55,6 (2'-OCH₃); 55,9 (2''-OCH₃ e 5''-OCH₃); 111,5 (C-3'' e C-3'); 112,0 (C-6); 114,6 (C-4''); 115,3 (C-3); 116,6 (C-6''); 120,0 (C-1''); 120,3 (C-5'); 124,3 (C-1'); 130,8 (C-4'); 131,2 (C-6'); 138,8 (C-5); 146,5 (C-4); 151,6 (C-2''); 152,9 (C-5''); 157,0 (C-2'); 166,9 (C-2). **EM, m/z (%)** 473 ([M+2]⁺, 24); 471 ([M]⁺, C₂₄H₁₆BrNO₄, 21); 394 (16); 392 (66); 349 (17); 348 (20); 336 (18); 334 (14); 318 (16); 305 (23); 302 (14); 151 (13); 138 (13); 77 (17); 57 (26); 55 (24); 43 (32); 41 (100).

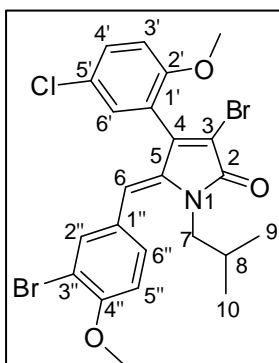
(Z)-3-bromo-5-(2-bromobenzilideno)-1-isobutil-4-(2-metoxifenil)-1H-pirrol-2(5H)-ona (34j)



Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:0,23 com rendimento de 79%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:3 (v/v) apenas o isômero **(Z)34j** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 136,2-138,0 °C. **CCD**: **R_f** = 0,33 hexano:diclorometano, 1:3, (v/v). **IV (cm⁻¹)**

$\bar{\nu}_{\max}$ 3061; 2952; 2924; 2862; 2832; 1704; 1644; 1463; 1385; 1370; 1248; 1121; 1090; 1023; 905; 815; 715; 724. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 0,54 (d, 3H, $J_{9,8} = 6,7$, H-9); 0,53 (d, 3H, $J_{10,8} = 6,7$, H-10); 1,39-1,52 (m, 1H, H-8); 3,42 (dd, 1H, 2H, $J_{7a,7b} = 14,1$, $J_{7a,8} = 7,4$, H-7a); 3,42 (dd, 1H, 2H, $J_{7b,7a} = 14,1$, $J_{7b,8} = 7,4$, H-7b); 3,84 (2'-OCH₃); 6,00 (s, 1H, H-6); 7,02 (dl, 1H, $J_{3',4'} = 8,4$, H-3'); 7,8 (dd, 1H, $J_{6'',5''} = 7,5$, $J_{6'',4''} = 0,7$, H-6''); 7,13-7,21 (m, 1H, H-4''); 7,25-7,34 (m, 3H, H-4', H-5' e H-6'); 7,45 (ddd, 1H, $J_{5'',6''} = J_{5'',4''} = 8,4$, $J_{5'',3''} = 1,7$, H-5''); 7,58 (dl, 1H, $J_{3'',4''} = 8,1$, H-3''). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 19,5 (C-10) 19,6 (C-9); 27,7 (C-8); 49,3 (C-7); 55,7 (2'-OCH₃); 111,4 (C-3'); 114,0 (C-6); 115,9 (C-3); 119,5 (2''); 120,4 (C-6''); 124,3 (C-1'); 126,7 (C-5'); 129,5 (C-4''); 131,0 (C-5'')*; 131,1 (C-4'')*; 131,5 (C-6'); 132,4 (C-3''); 135,3 (C-1''); 138,9 (C-5); 146,5 (C-4); 157,0 (C-2'); 166,7 (C-2). *As atribuições podem estar invertidas. **EM, m/z (%)** 493 ([M+4]⁺, 10); 491 ([M+2]⁺, 24); 489 ([M]⁺, C₂₂H₂₁Br₂NO₂, 11); 410 (11); 369 (16); 368 (25); 367 (16); 366 (23); 356 (19); 354 (23); 275 (21); 272 (26); 202 (12); 189 (20); 115 (22); 77 (16); 57 (24); 55 (25); 43 (23); 41 (100).

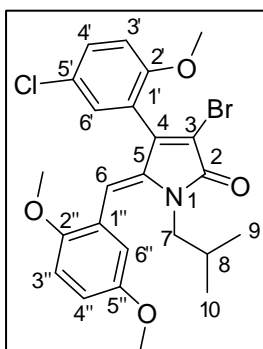
(Z)-3-bromo-5-(3-bromo-4-metoxibenzilideno)-1-isobutil-4-(5-cloro-2-metoxifenil)-1H-pirrol-2(5H)-ona (34k)



Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:1,09 com rendimento de 82%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:7 (v/v) apenas o isômero **(Z)34k** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 145,3-147,2 °C. **CCD: R_f** = 0,31 hexano:diclorometano, 1:7, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\max}$ 3052; 2958; 2870; 2840; 1697; 1630; 1593; 1491; 1460; 1439; 1386; 1368; 1250; 1137; 1080; 1050; 1018; 919; 808; 733; 640. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 0,56 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$, H-9 e H-10); 1,40-1,54 (m, 1H, H-8); 3,48 (d, 2H, $J_{7,8} = 7,4$ H-7); 3,80 (4''-OCH₃); 3,91 (2'-OCH₃); 5,95 (s, 1H, H-6); 6,88 (d, 1H, $J_{5'',6''} = 8,5$, H-5''); 6,94 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,9$, H-3'); 7,14-7,21 (m), 2H, H-6' e H-6''); 7,39 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 8,9$, $J_{4',6'} = 2,6$, H-4'); 7,46 (s, 1H, H-2''). **RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 19,4 (C-10); 19,5 (C-9); 27,6 (C-8); 49,5 (C-7); 56,0 (4''-OCH₃); 56,3 (2'-OCH₃); 111,2 (C-5''); 111,4 (C-3''); 112,7 (C-3'); 113,5 (C-6); 116,2 (C-3); 121,3 (C-1'); 125,4 (C-5'); 128,0 (C-1''); 129,7 (C-6''); 130,5 (C-6'); 130,6 (C-4'); 134,1 (C-2''); 138,5

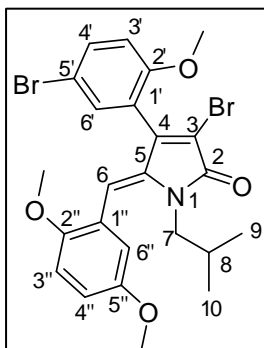
(C-5); 145,3 (C-4); 155,6 (C-2' e C-4''); 166,8 (C-2). **EM, m/z (%)** 557 ([M+4]⁺, 20); 555 ([M+2]⁺, 29); 553 ([M]⁺, C₂₃H₂₂Br₂ClNO₃, 12); 433 (12); 432 (15); 430(10); 420 (12); 418 (12); 336 (11); 201 (13); 199 (11); 102 (13); 101 (10); 57 (26); 55 (14); 43 (20); 41 (100).

(Z)-3-bromo-4-(5-cloro-2-metoxifenil)-5-(2,5-dimetoxibenzilideno)-1-isobutil-1H-pirrol-2(5H)-ona (34I)



Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:0,72 com rendimento de 84%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:6 (v/v) apenas o isômero **(Z)34I** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 118,8-119,8 °C. **CCD: R_f** = 0,29 hexano:diclorometano, 1:7, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}$ max 3013; 2953; 2868; 2834; 1701; 1636; 1487; 1454; 1385; 1368; 1217; 1085; 1039; 1020; 917; 895; 838; 753; 705; 671; 641; 505. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 0,54 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,6$, H-9 and H-10); 1,57-1,40 (m, 1H, H-8); 3,47 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 14,0$, $J_{7a,8} = 7,0$, H-7a); 3,53 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 14,0$, $J_{7b,8} = 7,0$, H-7b); 3,74 (s, 3H, 2''-OCH₃); 3,77 (s, 3H, 5''-OCH₃); 3,82 (s, 3H, 2'-OCH₃); 6,02 (s, 1H, H-6); 6,74 (s, 1H, $J_{6'',4''} = 1,5$, H-6''); 6,79 (d, 1H, $J_{3'',4''} = 8,9$, H-3''); 6,84 (dd, 1H, $J_{4'',3''} = 8,9$, $J_{4'',6''} = 1,5$, H-4''); 6,94 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,8$, H-3'); 7,25 (d, 1H, $J_{6',4'} = 2,6$, H-6'), 7,38 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 8,8$, $J_{4',6'} = 2,6$, H-4'). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 19,55 (C-10); 19,64 (C-9); 27,6 (C-8); 49,3 (C-7); 56,0 (5''-OCH₃); 55,9 (2'-OCH₃; and 2''-OCH₃); 111,4 (C-3''); 112,0 (C-6); 112,7 (C-3'); 114,8 (C-4''); 115,9 (C-3); 116,6 (C-6''); 121,5 (C-1''); 123,9 (C-1'); 125,3 (C-5'); 130,5 (C-4'); 130,7 (C-6'); 138,4 (C-5); 144,9 (C-2''); 151,5 (C-5''); 152,8 (C-2'); 155,7 (C-4); 166,6 (C-2). **EM, m/z (%)** 507 ([M+2]⁺, 18); 505 ([M]⁺, C₂₄H₂₅BrClNO₄, 12); 428 (17); 427 (11); 426 (45); 339 (16); 383 (11); 382 (12); 370 (15); 352 (9); 336 (10); 151 (17); 138 (13); 136 (14); 102 (9); 57 (28); 56 (10); 55 (28); 43 (33); 41 (100).

(Z)-3-bromo-4-(5-bromo-2-metoxifenil)-5-(2,5-dimetoxibenzilideno)-1-isobutil-1H-pirrol-2(5H)-ona (34m)

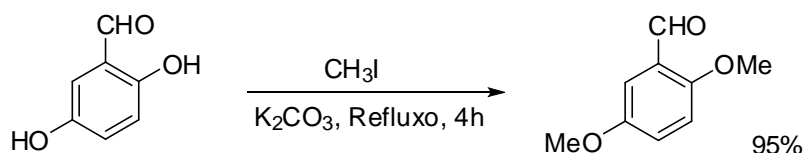


Os isômeros *Z* e *E* foram obtidos na proporção de 1:0,9 com rendimento de 91%. Após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel empregando a mistura de solvente hexano:diclorometano 1:6 (v/v) apenas o isômero **(Z)34m** foi isolado, apresentando-se como um sólido amarelo. **T_f**: 134,8-135,9 °C. **CCD**: **R_f** = 0,29 hexano:diclorometano, 1:7, (v/v). **IV (cm⁻¹)** $\bar{\nu}_{\max}$ 2958; 2926; 2836; 1698; 1580; 1486; 1453; 1386; 1277; 1244; 1214; 1177; 1138; 1091; 1044; 1022; 944; 913; 878; 808; 754; 712; 658; 620. **RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃)** δ 0,54 (d, 6H, $J_{9,8} = J_{10,8} = 6,6$, H-9 and H-10); 1,54-1,41 (m, 1H, H-8); 3,46 (dd, 1H, $J_{7a,7b} = 14,0$, $J_{7a,8} = 7,0$, H-7a); 3,53 (dd, 1H, $J_{7b,7a} = 14,0$, $J_{7b,8} = 7,0$, H-7b); 3,74 (s, 3H, 2''-OCH₃); 3,76 (s, 3H, 5''-OCH₃); 3,81 (s, 3H, 2'-OCH₃); 6,02 (s, 1H, H-6); 6,73 (d, 1H, $J_{6'',4''} = 2,8$, H-6''); 6,78 (d, 1H, $J_{3'',4''} = 8,9$, H-3''); 6,84 (dd, 1H, $J_{4'',3''} = 8,9$, $J_{4'',6''} = 2,8$, H-4''); 6,89 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8,9$, H-3'); 7,38 (d, 1H, $J_{6',4'} = 2,6$, H-6'); 7,52 (dd, 1H, $J_{4',3'} = 8,9$, $J_{4',6'} = 2,6$, H-4'). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 19,5 (C-10); 19,6 (C-9); 27,6 (C-8); 49,3 (C-7); 55,9 (2'-OCH₃; 5''-OCH₃ and 2''-OCH₃); 111,4 (C-3''); 112,0 (C-6); 112,4 (C-5'); 113,2 (C-3'); 114,7 (C-4''); 115,9 (C-3); 116,6 (C-6''); 121,9 (C-1''); 123,9 (C-1'); 133,4 (C-4'); 133,5 (C-6'); 138,4 (C-5); 144,8 (C-2''); 151,5 (C-5''); 152,8 (C-2'); 156,2 (C-4); 166,6 (C-2), **EM, m/z (%)** 549 ([M+4]⁺, 12); 551 ([M+2]⁺, 24); 553 ([M]⁺, C₂₄H₂₅Br₂NO₄; 12); 472 (17); 470 (17); 428 (8); 414 (9); 398 (8); 392 (9); 391 (36); 385(10); 383 (12); 151 (16); 136 (11); 102 (11); 57 (31); 56 (9); 55 (23); 43 (38); 41 (100).

3 Resultados e Discussão

3.1 Síntese do 2,5-dimetoxibenzaldeído

O aldeído hidroxilado 2,5-diidroxibenzaldeído foi tratado com iodeto de metila e carbonato de potássio em acetona, e mantido sob refluxo por 4 horas, para obtenção do produto 2,5-dimetoxibenzaldeído. A reação de substituição nucleofílica bimolecular (BARBOSA e VELOSO, 1994) se mostrou eficiente, levando à formação do produto de interesse com 95% de rendimento (Esquema 1.2).



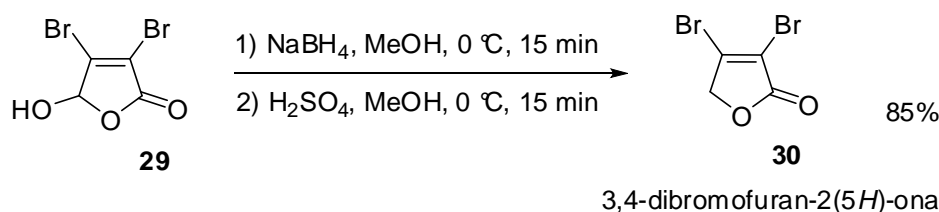
Esquema 1.2 - Síntese do 2,5-dimetoxibenzaldeído **35**.

O composto foi caracterizado por espectroscopia no IV onde foi observada uma intensa banda de absorção correspondente ao grupo carbonila em 1672 cm⁻¹. No espectro de RMN de ¹H, o sinal correspondente ao hidrogênio ligado ao grupo carbonila foi observado em $\delta = 10,43$. Os sinais referentes os átomos de hidrogênio dos grupos metoxila foram observados em $\delta = 3,77$ e $\delta = 3,86$. No espectro de RMN de ¹³C, o sinal correspondente ao grupo carbonila foi observado em $\delta = 189,5$ e os sinais referentes aos carbonos das metoxilas em $\delta = 55,7$ e $\delta = 56,1$. No espectro de massas, a presença do pico em m/z 166 é consistente com a fórmula molecular deste composto (C₉H₁₀O₃). Os dados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura (TEIXEIRA, 2008b).

Essa etapa fez-se necessária porque em meio básico ocorre a formação dos íons fenóxidos que diminuem a eletrofilicidade da carbonila e, conseqüentemente, a reatividade do aldeído e o rendimento das reações empregando compostos hidroxilados.

3.2 Síntese da lactona 3,4-dibromofuran-2(5H)-ona

A síntese da 3,4-dibromofuran-2(5H)-ona **30** foi realizada pela redução do ácido mucobrômico **29**. Uma solução metanólica deste ácido foi tratada a 0 °C com borohidreto de sódio e em seguida com ácido sulfúrico concentrado em metanol. O produto bruto dessa reação foi recristalizado obtendo-se a lactona **30** em 85% de rendimento (Esquema 1.3) (BELLINA et al., 2001b).



Esquema 1.3 - Preparo da 3,4-dibromofuran-2(5H)-ona **30**.

O espectro no IV da 3,4-dibromofuran-2(5H)-ona apresentou uma intensa banda de absorção em 1748 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação C=O. A presença da ligação C=C foi evidenciado por uma banda em 1603 cm⁻¹. No espectro de RMN de ¹H da 3,4-dibromofuran-2(5H)-ona foi observado um simpleto em $\delta = 4,87$ referente aos hidrogênios metilênicos H-5. No espectro de RMN de ¹³C foi possível observar o sinal da carbonila em $\delta = 166,9$ e os sinais de C-4 e C-3 se apresentam em $\delta = 143,9$ e 115,0, respectivamente. No espectro de massas observou-se o pico referente ao íons molecular [M]⁺ em $m/z = 240$, consistente com a fórmula molecular do composto (C₄H₂Br₂O₂). Todos os dados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura (BELLINA et al., 2001b; BARBOSA et al. 2012).

O ácido mucobrômico ocorre em equilíbrio entre o aldeído α,β -insaturado e a forma pseudo γ -lactona (Esquema 1.4). Dados de infravermelho indicam que a forma cíclica é predominante tanto no estado sólido quanto em solução. Entretanto, o padrão de reatividade é melhor explicitado considerando-se sua forma acíclica (CUNHA e OLIVEIRA, 2011; BELLINA et al., 2004b).

O aldeído da forma acíclica é seletivamente reduzido com boroidreto de sódio (CLAYDEN et al., 2001). Após a acidificação do meio com ácido sulfúrico concentrado, o álcool gerado *in situ* sofre ciclização intramolecular com o grupo ácido carboxílico (Esquema 1.4).

Os compostos **31a-d** foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho, RMN de ^1H , de ^{13}C , HSQC e espectrometria de massas. Os espectros obtidos para as 4-aryl-3-bromofuran-2(5*H*)-onas sintetizadas apresentaram grande semelhança. No espectro no infravermelho do composto **31a** foi possível observar uma intensa banda de absorção em 1751 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$, enquanto para **31b**, **31c** e **31d** a mesma banda apareceu em 1769 cm^{-1} .

No espectro de RMN de ^1H de **31a** foi possível observar um simpleto em $\delta = 5,19$ referente aos hidrogênios metilênicos H-5, enquanto para **31b**, **31c** e **31d** o mesmo sinal apareceu em $\delta = 5,26$, $\delta = 5,21$ e $\delta = 5,23$, respectivamente. No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar o sinal da carbonila de **31a** em $\delta = 169,7$, de **31b** em $\delta = 170,0$, **31c** em $\delta = 169,5$ e de **31d** em $\delta = 169,6$.

Nos espectros de massas dos compostos **31a-d** foram observados picos referentes à presença dos íons $[\text{M}]^+$, consistentes com a fórmula molecular de cada composto. Para **31a** $m/z = 238$ ($\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrO}_2$), para **31b** $m/z = 268$ ($\text{C}_{11}\text{H}_9\text{BrO}_3$), **31c** $m/z = 346$ ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{Br}_2\text{O}_3$) e para **31d** $m/z = 302$ ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{BrClO}_3$). Todos os dados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura (BELINA et al. 2001a; CHEN, et al., 2011; KAR et al., 2009; BARBOSA et al. 2012).

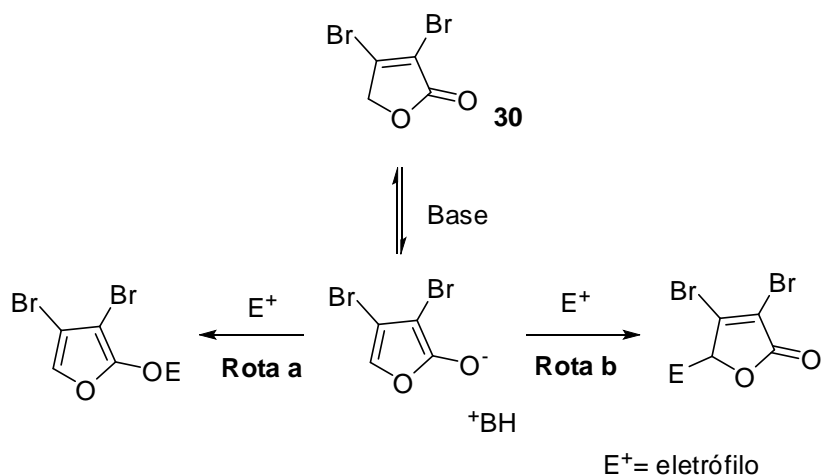
As 4-aryl-3-bromofuran-2(5*H*)-onas foram preparadas com rendimento de 43% a 70%. Tal variação pode ser explicada pelo fato de que ácidos arilborônicos deficientes em elétrons são menos nucleofílicos e transmetalam a uma taxa mais lenta do que os ricos em elétrons (BARDER et al., 2005). Logo, o ácido fenilborônico levou a rendimento de 61%, enquanto o 2-metoxifenilborônico, que possui um grupo doador de elétrons, forneceu rendimento de 70%. Por fim, os compostos 5-bromo-2-metoxifenilborônico e 3-cloro-2-metoxifenilborônico, que além de possuírem um grupo doador de elétrons na posição 2 apresentam um grupo retirador de elétrons na posição 5, levaram a rendimentos de 49% e 43%, respectivamente.

As condições empregadas para reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura demonstraram alta regioseletividade ao carbono 4 da 3,4-dibromofuran-2(5*H*)-ona. O ataque preferencial do catalisador de $\text{Pd}(0)$ a essa posição pode ser explicado pela maior deficiência de elétrons em relação ao carbono 3, causada pela ressonância do sistema carbonílico α,β -insaturado, o que é evidenciado pelo fato que C-4 ($\delta = 143,9$) é mais desblindado que C-3 ($\delta = 115,0$) (BELLINA e ROSSI, 2007; HUSSAIN et al., 2011).

Entretanto, em todas as reações de acoplamento de Suzuki-Miyaura realizadas neste estudo, foram isolados biarilas resultantes do homoacoplamento dos ácidos borônicos, com rendimentos que variaram de 15% a 21%. De acordo com a literatura, a presença de grupos doadores de elétrons no ácido borônico favorecem o homoacoplamento (MORENO-MAÑAS et al., 1996), o que também é descrito quando há presença de oxigênio no meio reacional, evidenciando a importância da realização dessas reações em atmosfera inerte a fim de evitar a formação desses subprodutos (LENNOX & LLOYD-JONES, 2014).

A reação de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura é considerada como um dos métodos mais úteis para formação de ligação carbono-carbono catalisada por metais de transição (ROSSI et al., 2011). Apresenta uma série de vantagens como as condições brandas em que as reações são conduzidas, alta tolerância a uma grande variedade de grupos funcionais, disponibilidade comercial dos ácidos borônicos, estabilidade destes compostos ao aquecimento, água e ar, facilidade de separação dos subprodutos contendo boro da mistura reacional e a degradação final dos compostos organoboranos em produtos ambientalmente seguros (SUZUKI, 2011).

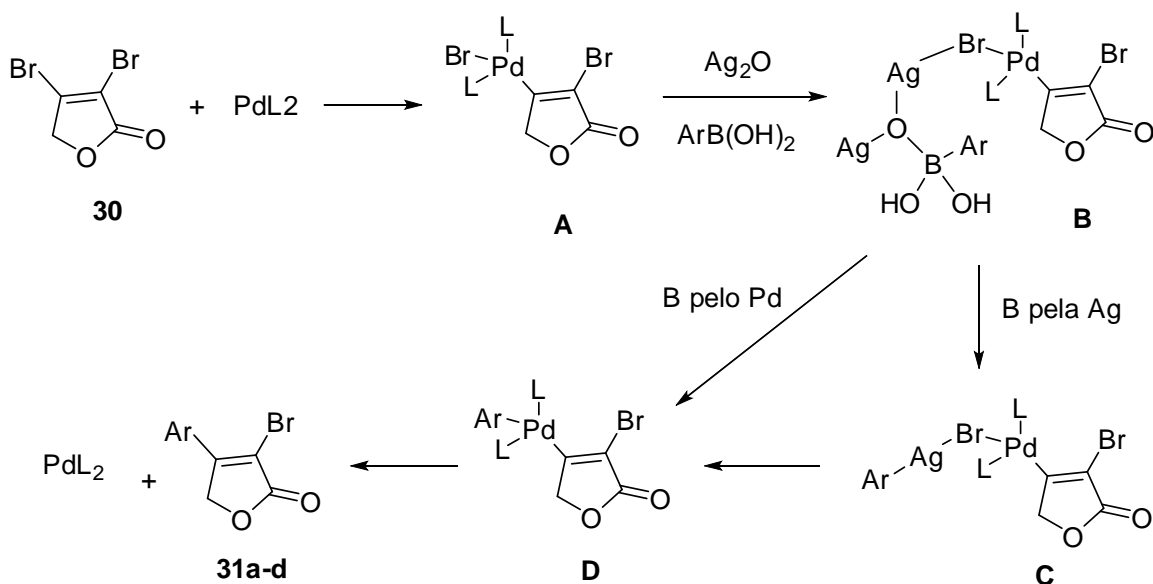
A base empregada tem como função formar uma espécie de boronato, aumentando a nucleofilicidade do grupo orgânico ligado ao átomo de boro, o que facilita o processo de transmetalização do ácido borônico (MIYAURA e SUZUKI, 1995; MARTIN e BUCHWALD, 2008). Uma grande variedade de bases podem ser utilizadas e sua escolha é empírica. Entretanto, em meio básico forte e na presença de um eletrófilo, a 3,4-dibromofuran-2(5H)-ona pode reagir via ataques nucleofílicos (rota a e b), ou ainda sofrer decomposição (Esquema 1.5) (CUNHA e OLIVEIRA, 2011).



Esquema 1.5 - Reações da 3,4-dibromofuranona **30** em meio básico forte.

Para contornar a reatividade da lactona **30** com bases fortes, a reação foi realizada em THF na presença da base fraca Ag_2O (YAO e DENG, 2000; BELLINA et al., 2004a). O sistema catalítico $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2/\text{AsPh}_3$ em THF também provou ser o mais eficiente quando comparados com outros catalisadores em outros solventes (BELLINA et al., 2001b).

Bellina et al. (2001b) apresentaram uma proposta para o ciclo catalítico da reação de acoplamento entre a 3,4-dibromofuran-2(5H)-ona **30** e os ácidos borônicos (Esquema 1.6). Segundo esses autores, a primeira etapa consiste na adição oxidativa do complexo de paládio(0) (em que o ligante é AsPh_3) no carbono 4 da lactona **30**, levando à formação do complexo de paládio(II) **A**. A próxima etapa corresponde à transmetalção, onde foi proposto que o intermediário **A** interage com o óxido de prata e o ácido borônico resultando na formação do intermediário **B**. A transmetalção do boro pelo paládio, que gera o complexo **D**, pode ocorrer antes da transmetalção do boro pela prata, via **C** ou diretamente do complexo **B**. Finalmente, tem-se a eliminação redutiva. Nessa etapa ocorre a formação da nova ligação carbono-carbono resultando nas 4-aril-3-bromofuran-2(5H)-onas **31a-d** e regeneração do catalisador de paládio(0).



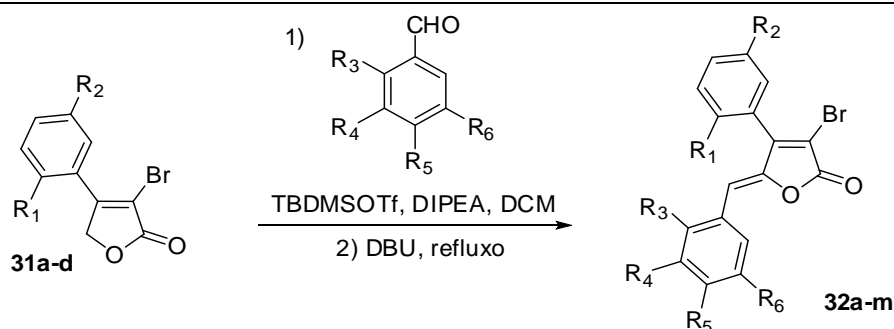
Esquema 1.6 - Mecanismo plausível para a reação catalisada por paládio mediada por Ag_2O entre **30** e ácidos arilborônicos (BELLINA et al., 2001b).

3.4 Síntese dos análogos aos rubrolídeos pela reação de alquilidação

Os análogos aos rubrolídeos, também conhecidos como 5-alkilideno-4-aryl-3-bromofuran-2(5*H*)-onas ou γ -alkilidenofuran-2(5*H*)-onas, foram sintetizados de acordo com a metodologia proposta por BOUKOUVALAS et al. (1994; 1998), e amplamente utilizada pelo grupo de pesquisa do LASA (UFV) para a síntese de análogos aos nostoclídeos e aos rubrolídeos (TEIXEIRA et al., 2008; BARBOSA et al., 2010; BARBOSA et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; VAREJÃO et al., 2014).

As lactonas **31a-d** foram submetidas à reação de adição aldólica com diferentes aldeídos aromáticos, utilizando DIPEA, TBDMSOTf, e temperatura ambiente, levando à formação do intermediário sililado que não foi isolado. Em seguida, a reação foi submetida a refluxo e tratamento com DBU (base de Lewis), resultando na β -eliminação e concomitante formação dos compostos **32a-m**, com rendimentos de 58% a 93% (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 - γ -alkilidenofuran-2(5*H*)-onas sintetizadas.



Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Rendimento (%)
32a	H	H	H	O-CH ₂ -O	H	H	78
32b	H	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	70
32c	H	H	Cl	H	F	H	58
32d	H	H	Cl	H	H	H	60
32e	H	H	H	Cl	H	H	62
32f	H	H	H	H	Cl	H	73
32g	OCH ₃	H	H	Br	OCH ₃	H	93
32h	OCH ₃	H	Cl	H	F	H	61
32i	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	88
32j	OCH ₃	H	Br	H	H	H	64
32k	OCH ₃	Cl	H	Br	OCH ₃	H	90
32l	OCH ₃	Cl	OCH ₃	H	H	OCH ₃	79
32m	OCH ₃	Br	OCH ₃	H	H	OCH ₃	72

Todas as γ -alquilidenofuran-2(5H)-onas sintetizadas foram caracterizadas por espectroscopia no IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , experimentos bidimensionais (HSQC e NOESY) e espectrometria de massas. Os espectros obtidos apresentaram grande semelhança, sendo que as únicas variações observadas referem-se aos substituintes presentes nos anéis aromáticos provenientes do ácido borônico, inicialmente utilizado na reação de Suzuki, e do aldeído aromático utilizado nas reações de alquilidação. Portanto, a discussão feita a seguir é baseada nos dados do composto **32h**, mas pode ser estendida aos demais compostos sintetizados.

O espectro no IV de **32h** (Figura 1.7) apresentou uma banda de absorção intensa em 1769 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo carbonila de lactona α,β -insaturada (BARBOSA, 2007).

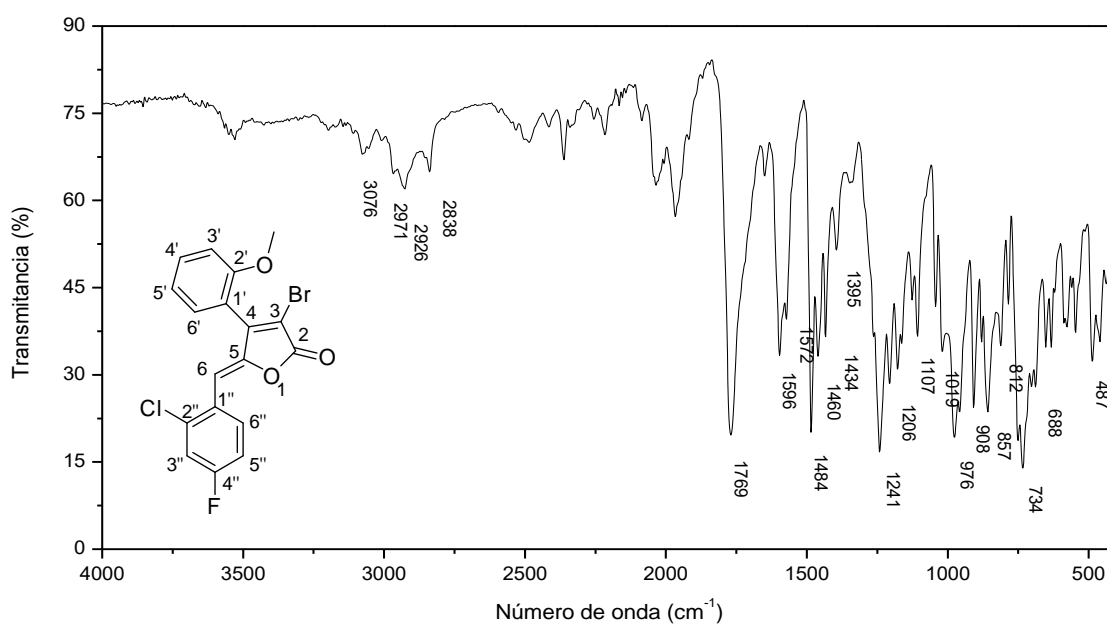


Figura 1.7 - Espectro no infravermelho do composto **32h**.

No espectro de massas de **32h** (Figura 1.8) foi observado o pico referente ao íon molecular em $m/z = 408$ e os sinais em $m/z = 410$ e 412 referentes aos íons $[\text{M}+2]^+$, e $[\text{M}+4]^+$, o que está de acordo com a presença de um átomo de bromo e um de cloro na mesma molécula.

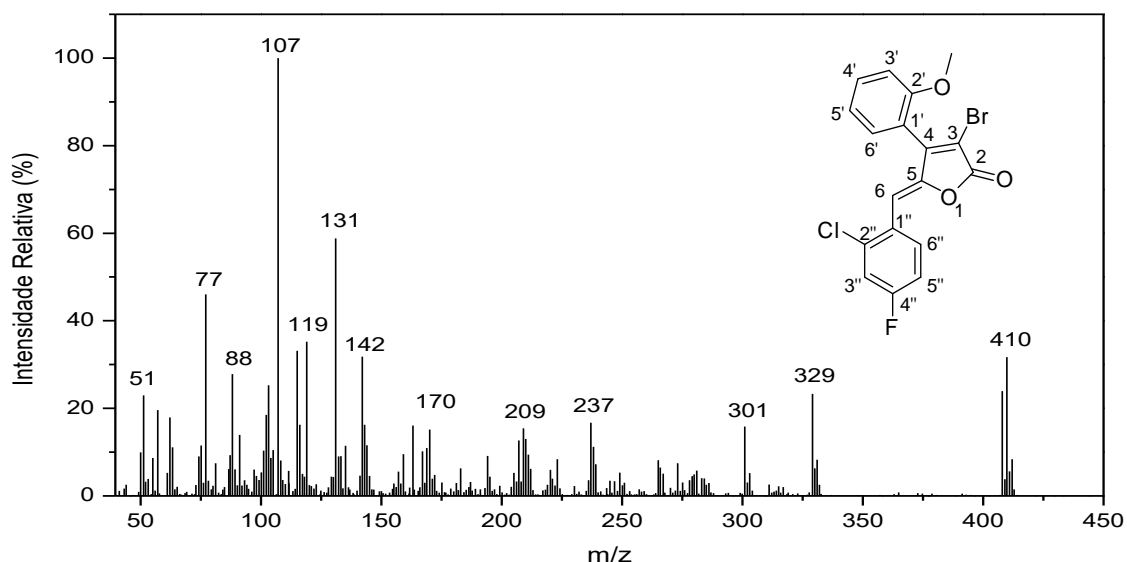


Figura 1.8 - Espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto **32h**.

A presença do átomo de flúor na estrutura leva ao desdobramento dos sinais no espectro de RMN devido ao acoplamento entre átomos de hidrogênio e flúor, obedecendo à mesma regra de multiplicidade de acoplamento entre hidrogênios (Figura 1.9). O acoplamento entre hidrogênio e flúor se dá concomitantemente aos já esperados acoplamentos entre hidrogênios aromáticos e, em geral, apresentam constantes de acoplamento (J) maiores do que aquelas observadas no acoplamento entre hidrogênios (PRETSCH et al., 1989; SILVERSTEIN et al., 2000).

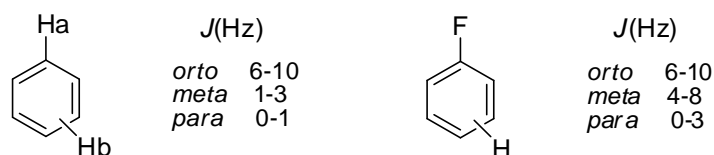


Figura 1.9 - Valores para constantes de acoplamento entre hidrogênios e hidrogênio e flúor.

Assim, no espectro do composto **32h** (Figura 1.10) destaca-se um duplete duplo integrado para um átomo de hidrogênio em $\delta = 8,26$ ($J_{6'',5''} = 8,9$ Hz; $J_{6'',F} = 6,2$ Hz) referente ao H-6''. Os demais sinais referentes aos hidrogênios provenientes do aldeído aromático H-3'' e H-5'' se sobrepuseram juntamente com os sinais de H-5' e H-3' do anel aromático proveniente do ácido fenilborônico utilizado, levando à formação de um multiplete em $\delta = 7,01-7,16$ que impediu a visualização dos desdobramentos dos sinais referentes aos acoplamentos entre átomos de hidrogênio-hidrogênio e hidrogênio-flúor. O Hidrogênio H-6' foi observado como um duplete duplo integrado para um átomo de hidrogênio em $\delta = 7,30$ ($J_{6',5'} = 7,5$ Hz; $J_{6',4'} = 1,6$ Hz).

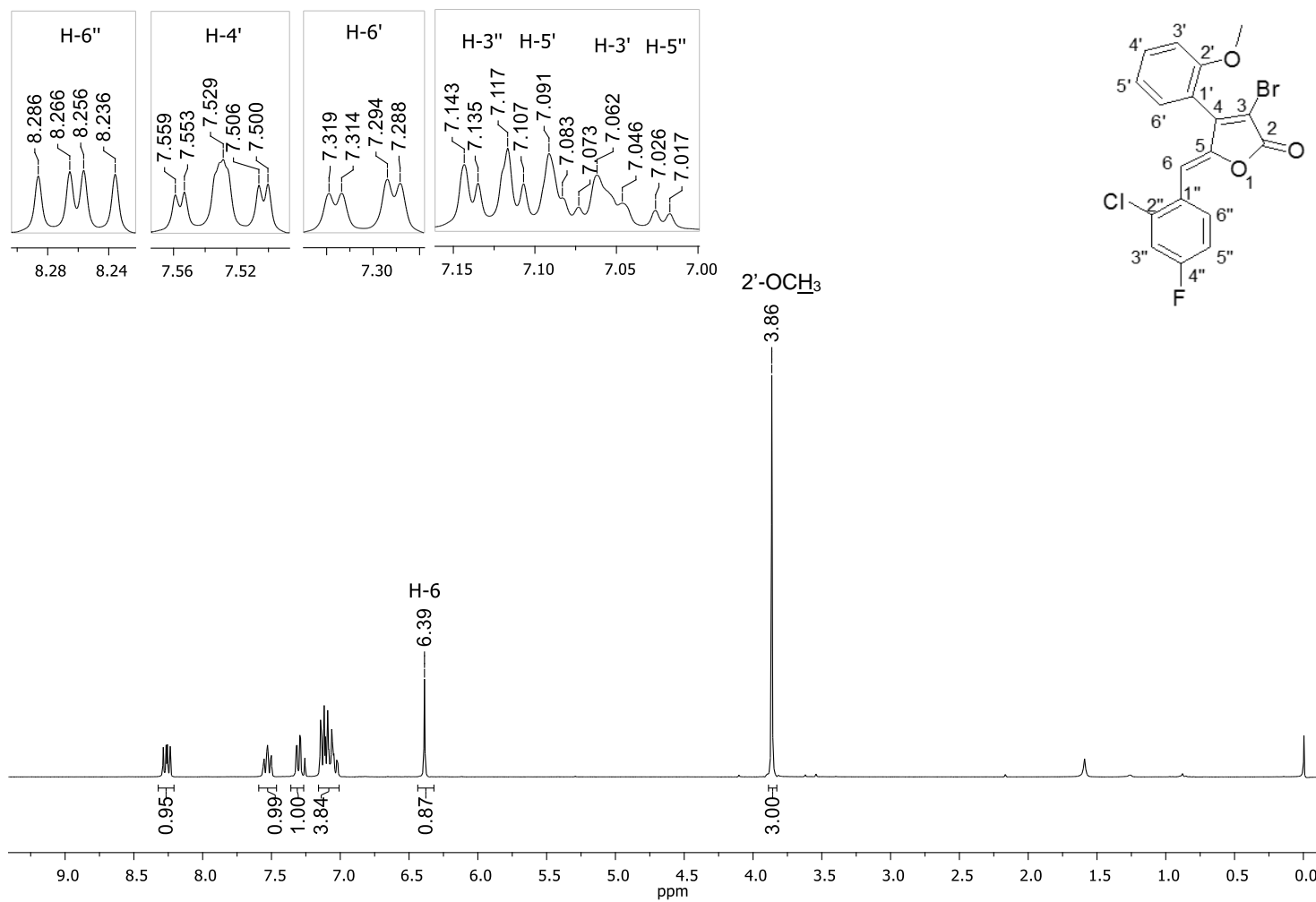


Figura 1.10 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **32h**.

A presença do átomo de flúor na molécula gerou o desdobramento de alguns sinais no espectro de RMN de ^{13}C de **32h** (Figura 1.12). Os valores característicos das constantes de acoplamento entre os átomos de carbono e flúor em um anel aromático podem ser observados na Figura 1.11 (PRETSCH et al., 1989).

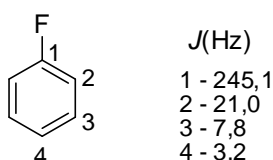


Figura 1.11 - Valores para constantes de acoplamento entre carbono e flúor.

Assim, os sinais de carbono do anel aromático proveniente do aldeído foram identificados devido aos dupletos formados a partir do acoplamento dos mesmos com o F ligado na posição *para* do mesmo anel aromático. O sinal do carbono C-4'' apareceu como duplete em $\delta = 162,3$ ($J_{\text{C-F}} = 255,0$ Hz), C-2'' em $\delta = 135,5$ (duplete, $J_{\text{C-F}} = 10,2$ Hz), C-6'' em $\delta = 133,2$ (duplete, $J_{\text{C-F}} = 8,8$ Hz), C-1'' em $\delta = 127,1$ (duplete, $J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz), C-3'' em $\delta = 117,2$ (duplete, $J_{\text{C-F}} = 25,0$ Hz), e C-5'' em $\delta = 114,9$ (duplete, $J_{\text{C-F}} = 21,3$ Hz). O sinal em $\delta = 107,7$ foi atribuído ao carbono 6. Os sinais referentes aos carbonos do anel lactônico e do grupo aril ligado ao carbono C-4 apresentaram deslocamentos químicos próximos aos sinais de carbono da 3-bromo-4-(2-metoxifenil)furan-2(5*H*)-ona **31b**. O mapa de contornos HSQC (Figura 1.13 e Figura 1.14) foi analisado para atribuição de todos os sinais referentes ao composto **32h**.

O Experimento bidimensional de NOESY foi utilizado para definir a estereoquímica da ligação dupla C(5)=C(6), o que permitiu observar a interação entre o hidrogênio H-6 ($\delta = 6,39$) e o hidrogênio aromático H-6' ($\delta = 7,30$), mostrando que ambos estão próximos no espaço (Figura 1.15), o que seria possível apenas para a configuração *Z*. O mesmo tipo de experimento foi feito para os demais compostos que também apresentaram configuração *Z*, comprovando a estereosseletividade da reação. Com esses resultados é possível confirmar que a reação de acoplamento de Suzuki-Miyaura, realizada anteriormente entre a 3,4-dibromofuran-2(5*H*)-ona e os ácidos borônicos, aconteceu em C-4. Caso o acoplamento tivesse ocorrido em C-3, não haveria a interação do sinal do hidrogênio aromático H-6' com H-6, devido à distância espacial que esses hidrogênios apresentariam nessa situação.

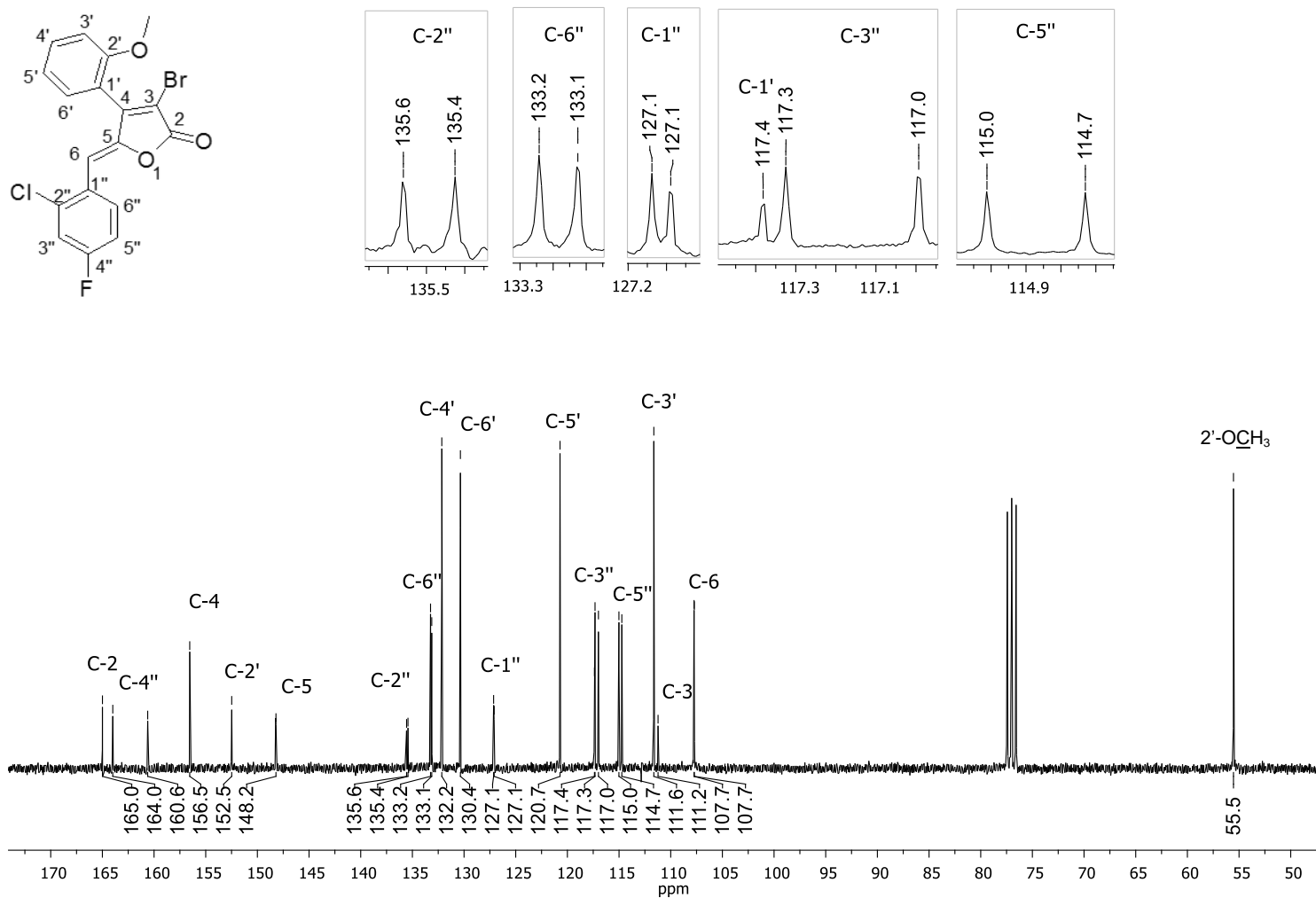


Figura 1.12 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **32h**.

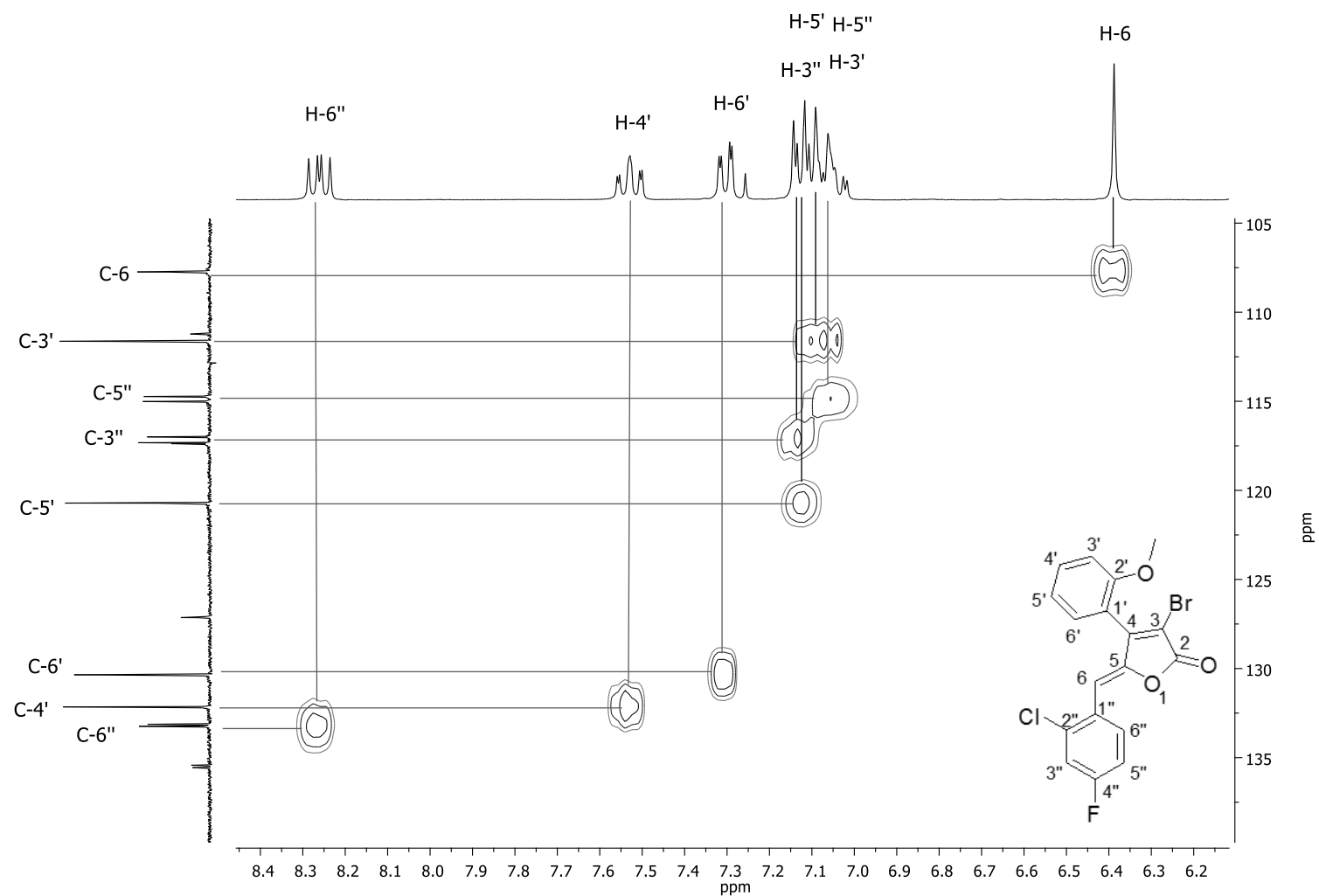


Figura 1.13 - Mapa de contornos HSQC (expandido) do composto **32h**.

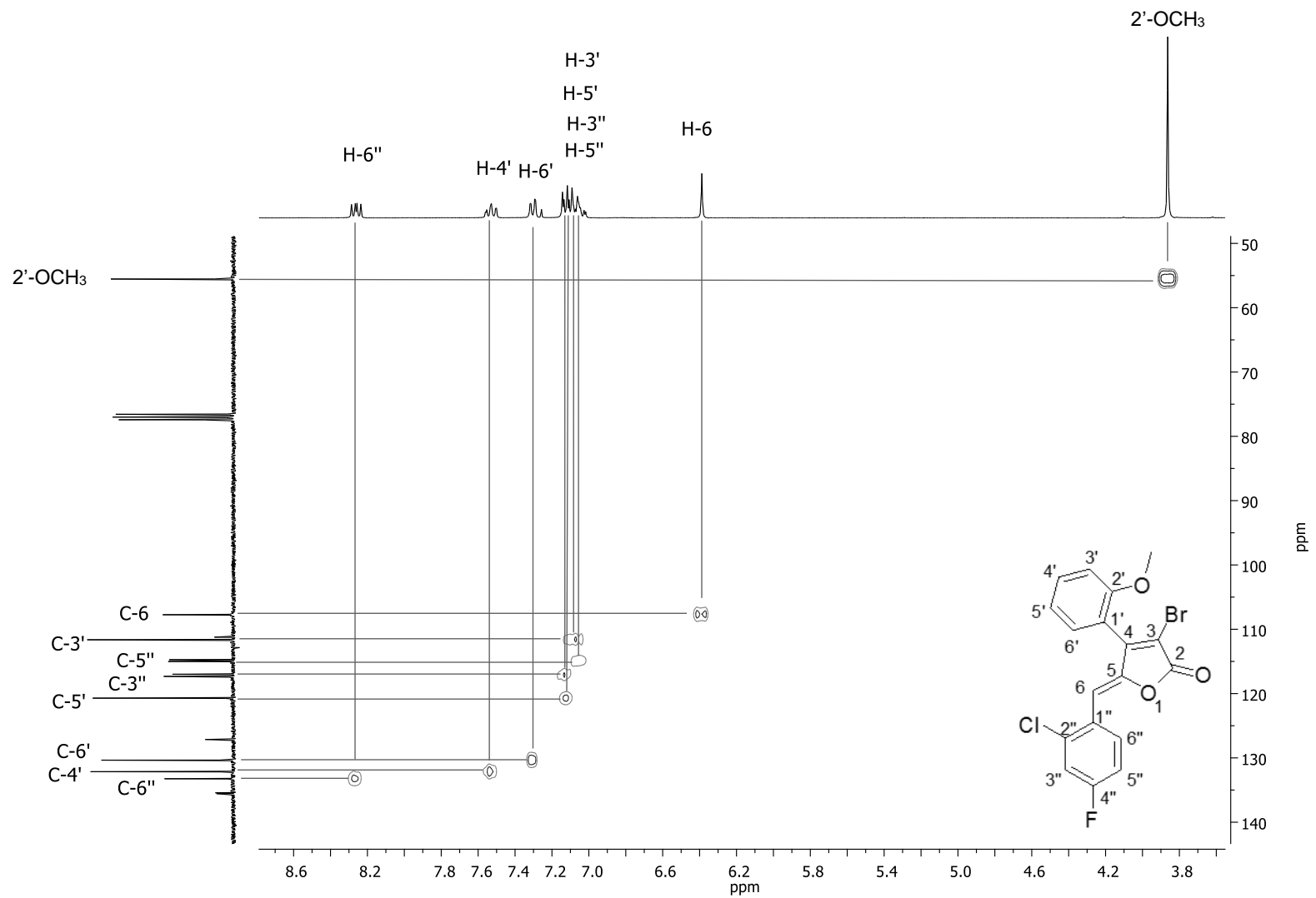


Figura 1.14 - Mapa de contornos HSQC do composto **32h**.

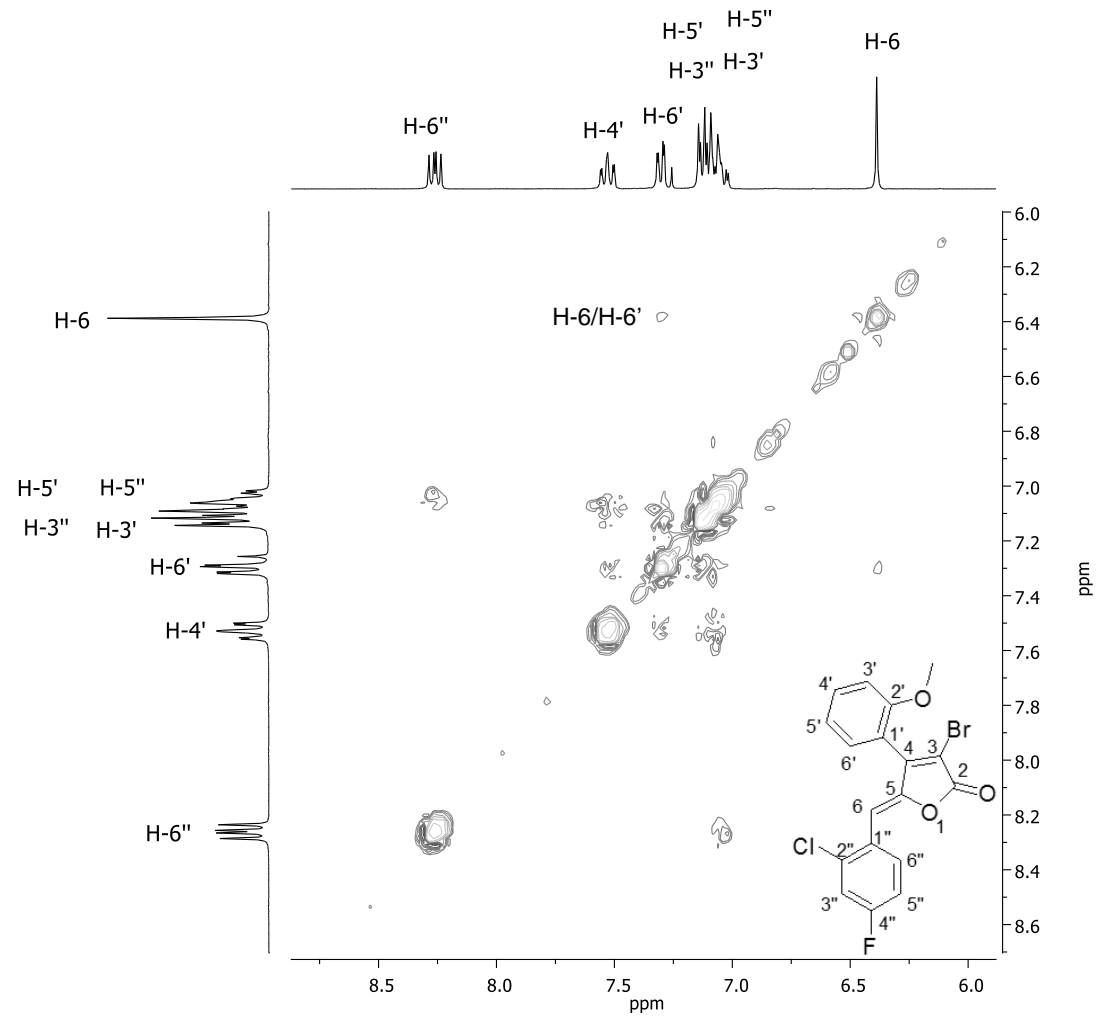
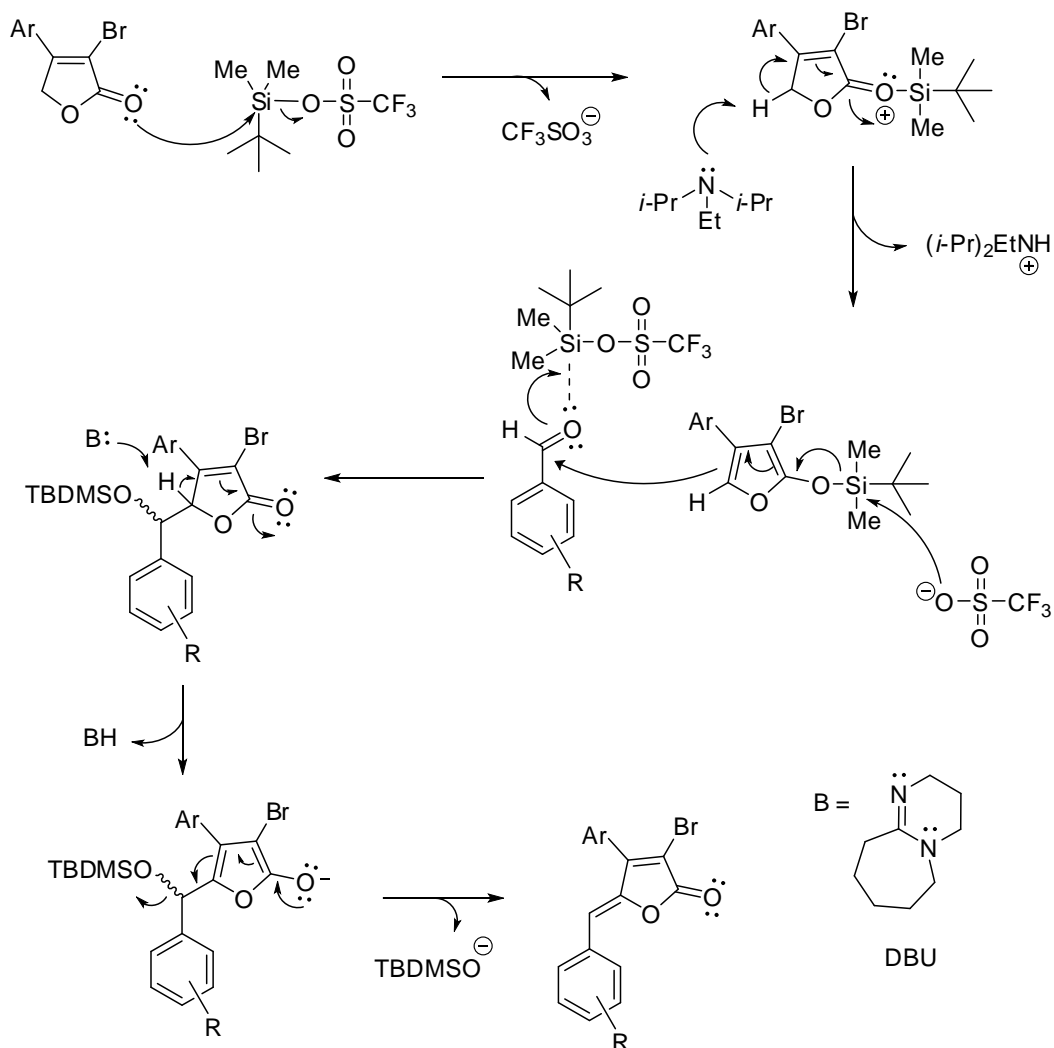


Figura 1.15 - Mapa de contornos NOESY (expandido) do composto **32h**.

TEIXEIRA et al. (2008b) propuseram um mecanismo para a reação de alquilidação empregada (Esquema 1.7), em que, inicialmente, ocorre um ataque do par de elétrons do oxigênio da carbonila da 3,4-diclorofuran-2(5H)-ona ao TBDMSOTf, com eliminação do triflato. Em seguida, a DIPEA captura um dos hidrogênios ácido H-5 do intermediário anterior, levando à formação *in situ* do éter de silila, que na próxima etapa ataca a carbonila do aldeído, resultando na formação dos intermediários aldólicos correspondentes, não isolados. Essa etapa ocorre via regeneração do ácido de Lewis TBDMSOTf, já que o silício sofre ataque nucleofílico do íon triflato (CLAYDEN et al., 2001).



Esquema 1.7 - Proposta para o mecanismo da reação de alquilidação utilizada na síntese das (Z)-5-alkilideno-4-aryl-3-bromofuran-2(5H)-onas.

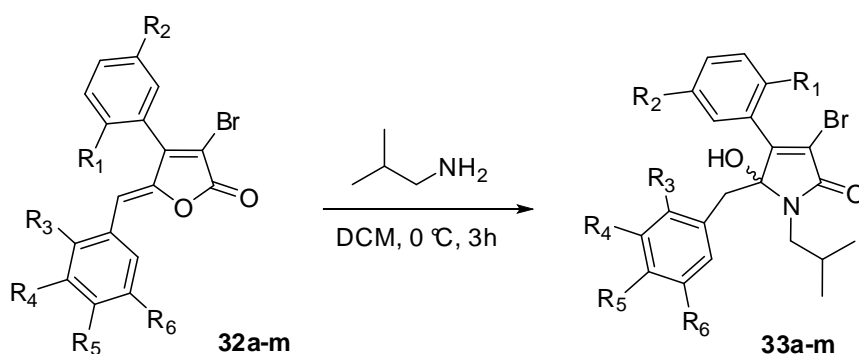
Na eliminação do grupo *tert*-butildimetilsililoxila, a base DBU captura o segundo hidrogênio ácido H-5 do anel lactônico com formação estereoseletiva da dupla exocíclica. Esta estereoseletividade pode ser explicada pela presença de um grupo

aromático na posição β do anel lactônico, como também pela formação de ligações de hidrogênio não clássica entre os hidrogênios na posição *orto* do anel benzilidênico e o oxigênio do núcleo γ -lactônico, fatos esses que aumentam a estabilidade da configuração *Z* em relação à *E* (BOUKOUVALAS et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2008).

3.5 Síntese das γ -hidroxipirrol-2(5*H*)-onas

Para o preparo das γ -hidroxipirrol-2(5*H*)-onas a partir das γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas foi utilizada a reação de conversão lactona-lactama, também conhecida como reação de lactamização (GOH et al., 2007). Para isso, as γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas **32a-m** foram tratadas com excesso de isobutilamina em diclorometano a 0 °C, obtendo-se os produtos de interesse **33a-m** com rendimentos que variaram de 81% a 97% (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 - γ -hidroxipirrol-2(5*H*)-onas sintetizadas



Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Rendimento (%)
33a	H	H	H	O-CH ₂ -O	H	H	85
33b	H	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	97
33c	H	H	Cl	H	F	H	91
33d	H	H	Cl	H	H	H	83
33e	H	H	H	Cl	H	H	87
33f	H	H	H	H	Cl	H	91
33g	OCH ₃	H	H	Br	OCH ₃	H	89
33h	OCH ₃	H	Cl	H	F	H	81
33i	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	95
33j	OCH ₃	H	Br	H	H	H	91
33k	OCH ₃	Cl	H	Br	OCH ₃	H	87
33l	OCH ₃	Cl	OCH ₃	H	H	OCH ₃	80
33m	OCH ₃	Br	OCH ₃	H	H	OCH ₃	90

Todos os produtos obtidos foram caracterizados por espectroscopia no IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , experimento bidimensional HSQC e espectrometria de massas. A discussão feita a seguir é baseada nos dados da γ -hidroxipirrol-2(5H)-ona **33h**, mas pode ser estendida às demais γ -hidroxipirrol-2(5H)-onas sintetizadas.

O espectro no IV de **33h** (Figura 1.16) apresentou uma banda de intensidade média alargada em $3460\text{-}3143\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento da hidroxila. Também foi possível observar uma banda intensa referente ao estiramento da carbonila em 1688 cm^{-1} .

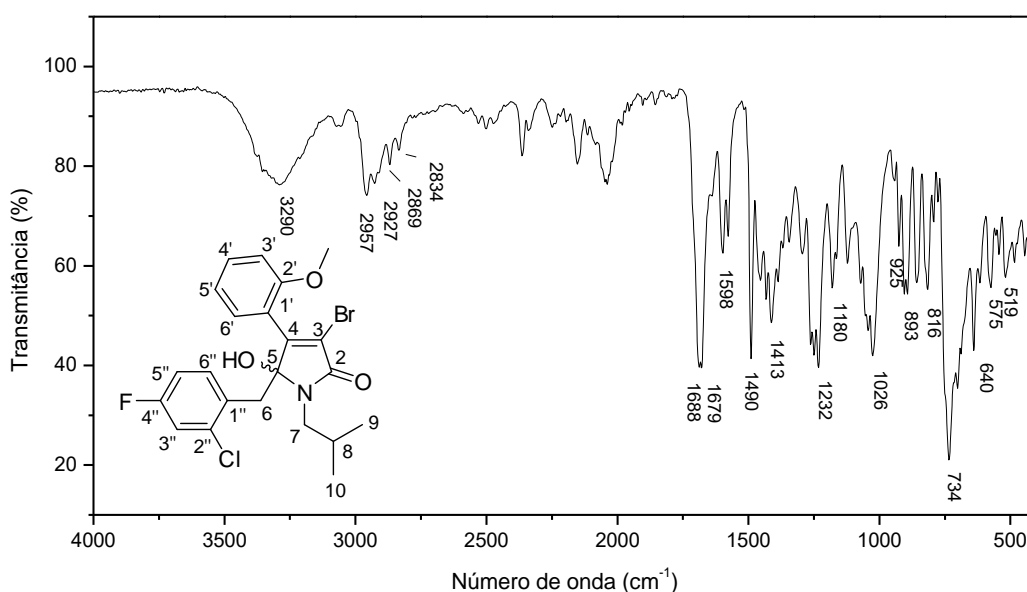


Figura 1.16 - Espectro no IV do composto **33h**.

No espectro de massas de **33h** (Figura 1.17), embora não tenha sido possível observar o pico do íon molecular, foram observados picos em $m/z = 463$ referente ao íon $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ e $m/z = 338$ referente à perda do fragmento benzil ligado ao anel lactâmico.

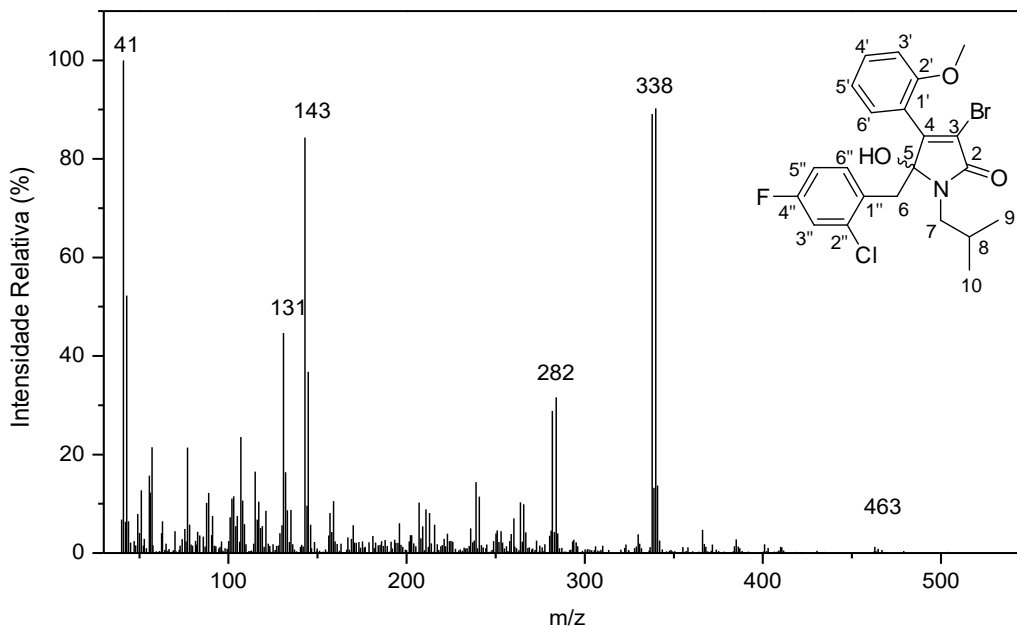


Figura 1.17 - Espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto **33h**.

Pelo espectro de RMN de ^1H de **33h** (Figura 1.18) foi possível confirmar a estrutura do produto desejado. O simpleto em $\delta = 5,70$ é referente ao hidrogênio da hidroxila. Para os hidrogênios geminais H-6 foram observados dois dupletos, sendo um em $\delta = 3,29$ ($J_{6a,6b} = 15,6$ Hz) e outro em $\delta = 3,35$ ($J_{6b,6a} = 15,6$ Hz), devido à presença do centro de quiralidade no carbono C-5.

Os sinais referentes aos hidrogênios do grupo alquil da isobutilamina utilizada na reação de lactamização foram identificados no espectro do produto. Os dois hidrogênios H-7 também apresentaram diferentes deslocamentos químicos devido à presença do centro de quiralidade na molécula. Além do acoplamento geminal entre os hidrogênios H-7a com H-7b, foi possível observar o acoplamento desses hidrogênios com H-8. Portanto para H-7a foi observado um duplete duplo em $\delta = 3,09$ ($J_{7a,7b} = 14,0$ Hz, $J_{7a,8} = 7,1$ Hz) e para H-7b outro duplete duplo em $\delta = 3,38$ ($J_{7b,7a} = 14,0$ Hz, $J_{7b,8} = 7,9$ Hz). O multiplete em $\delta = 2,10$ - $2,24$ foi atribuído ao H-8, e os dois dupletos em $\delta = 0,89$ e $0,90$ foram atribuídos a H-9 ($J_{9,8} = 6,6$ Hz) e H-10 ($J_{10,8} = 6,6$ Hz) respectivamente. Os baixos valores de deslocamento químico observados para esses hidrogênios podem ser resultado do efeito de blindagem gerado pela anisotropia produzida pelos elétrons π do anel benzenico.

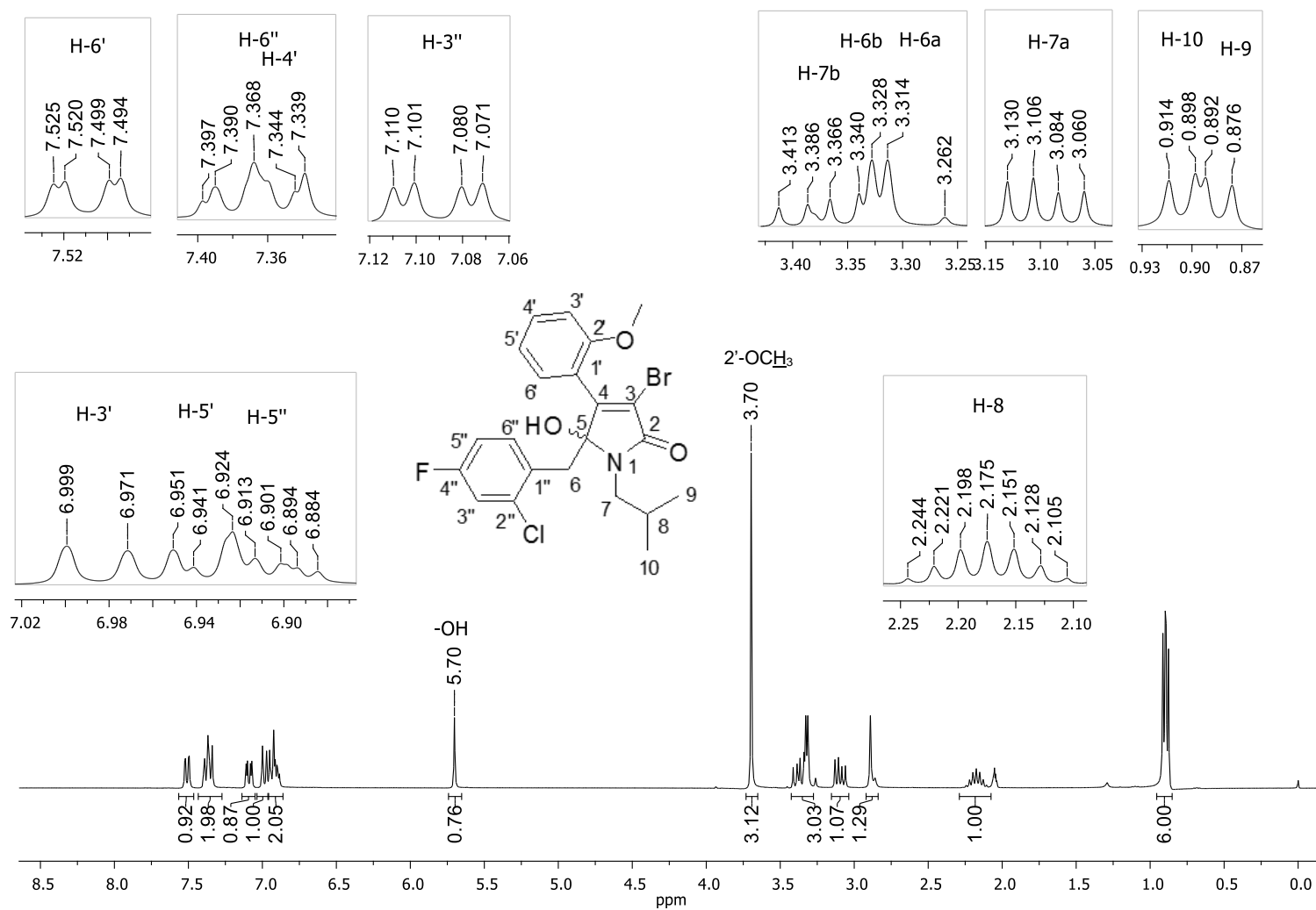


Figura 1.18 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, (CD₃)₂CO) do composto **33h**.

No espectro de RMN de ^{13}C de **33h** (Figura 1.19) foram observados dois sinais próximos em $\delta = 20,0$ e $20,2$ atribuídos a C-9 e C-10. O sinal em $\delta = 36,5$ é referente à C-6 e foi distinguido do sinal em $\delta = 47,5$ referente à C-7 pela análise do mapa de contornos HSQC (Figura 1.20 e Figura 1.21), onde é possível observar a correlação entre os átomos H-7a e H-7b com C-7. O mesmo foi feito para C-8 em $\delta = 27,8$. Da mesma forma, as atribuições dos átomos de carbono dos anéis aromáticos foram auxiliadas pela análise do mapa de contornos HSQC.

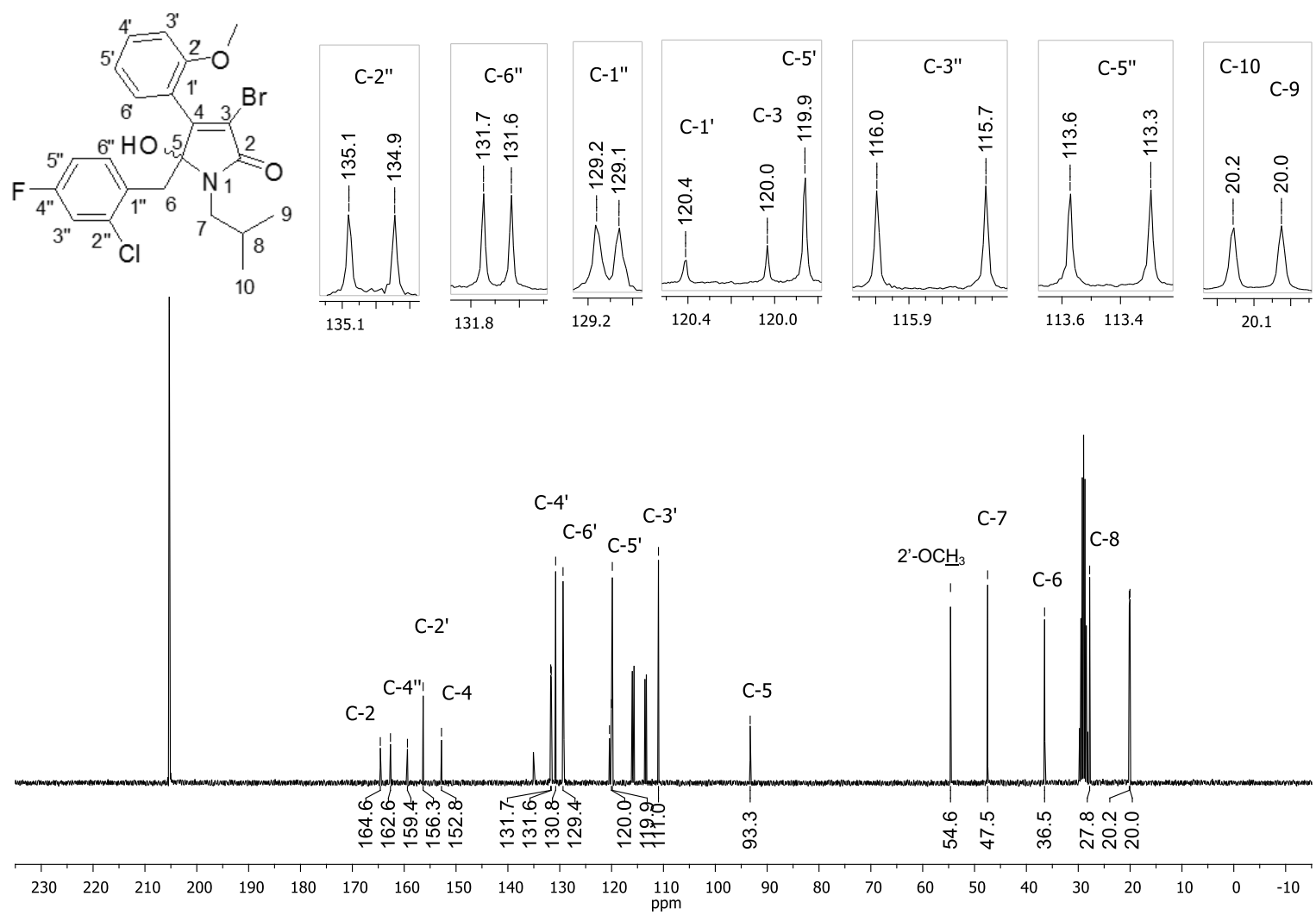


Figura 1.19 - Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, (CD₃)₂CO) do composto **33h**.

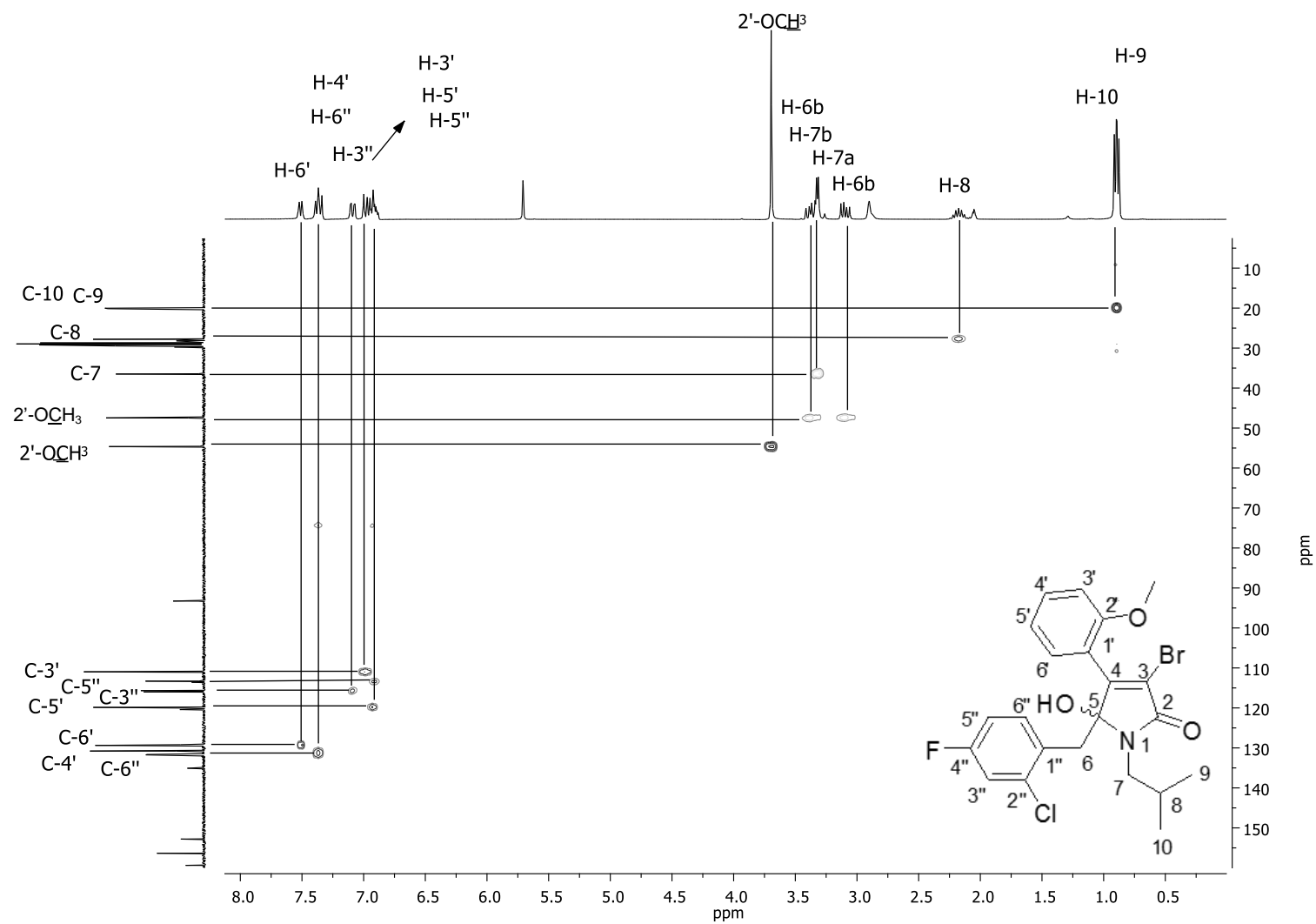


Figura 1.20 - Mapa de contornos HSQC do composto **33h**.

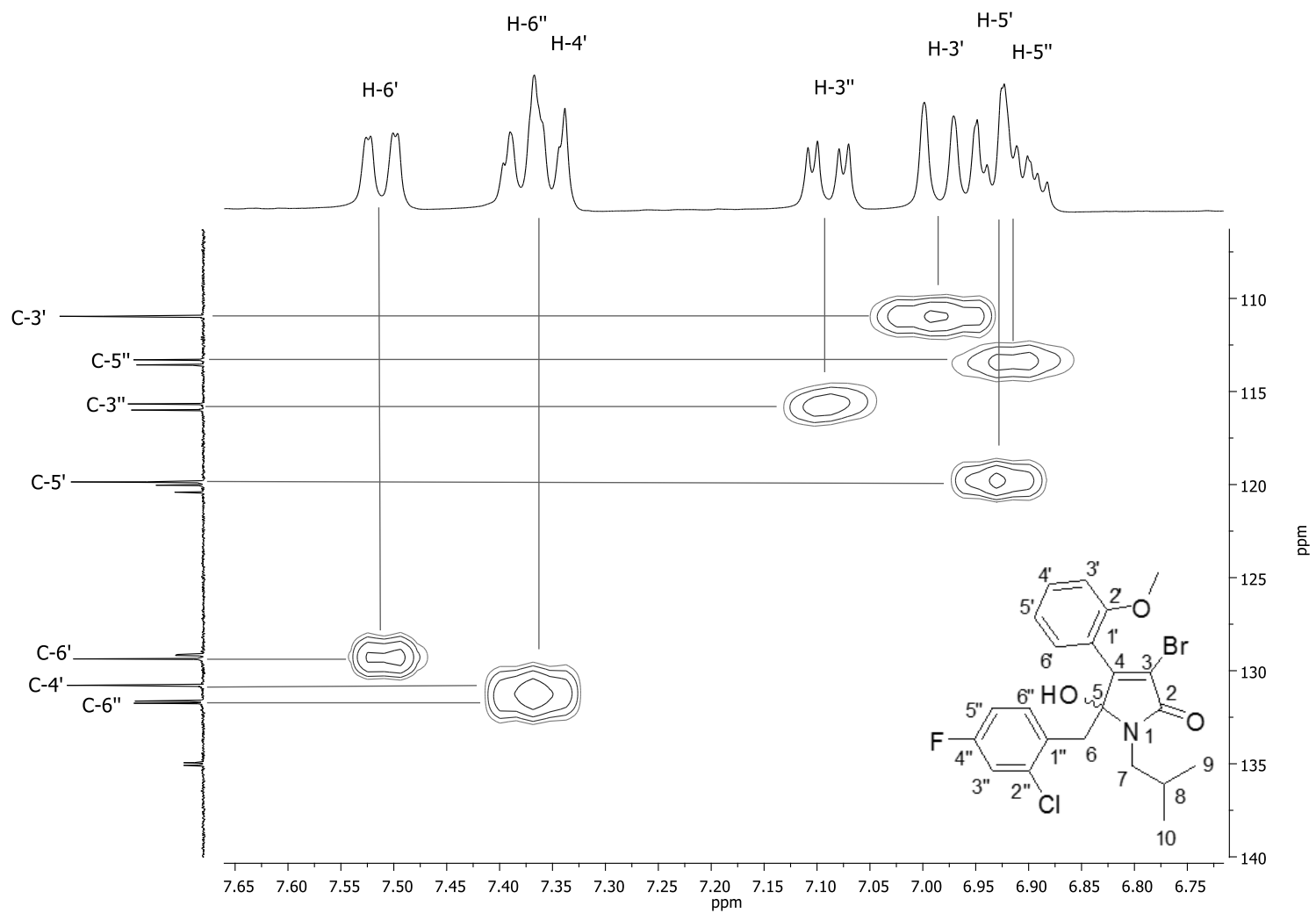
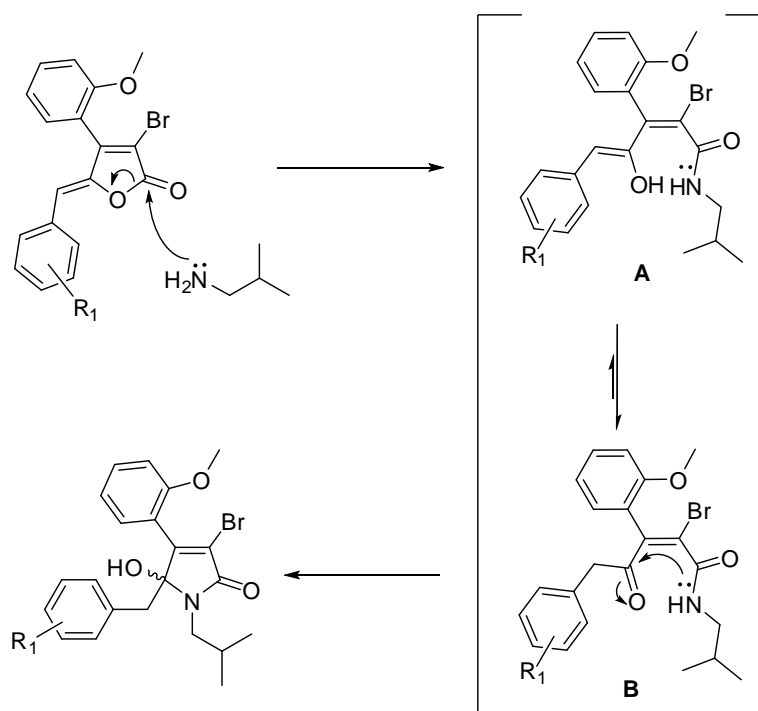


Figura 1.21 - Mapa de contornos HSQC (expandido) do composto **33h**.

As γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas podem reagir por uma reação de adição 1,2 ou 1,4, sendo que o uso de nucleófilos fortes favorecem a adição 1,2. Além disso, a temperatura da reação é mantida a 0 °C para controlar a regioespecificidade da reação no átomo de carbono da carbonila (C-2), uma vez que temperaturas mais baixas permitem o controle cinético o que favorece a ocorrência da adição simples.

Devido aos muitos sítios reativos potenciais nas moléculas das γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas a temperatura da reação foi mantida a 0 °C para controlar a regioespecificidade da reação no átomo de carbono da carbonila (C-2).

O mecanismo da reação de lactamização (Esquema 1.8) se inicia com o ataque da amina à carbonila da lactona, levando à abertura do anel e formação da amida como o intermediário **A**. O equilíbrio ceto-enólico permite a formação do isômero mais estável na forma ceto **B**, que então ciclizará para formação do anel lactâmico. Na etapa de ciclização, o ataque nucleofílico da amina à carbonila pró-quiral ocorre tanto pela face *Si* como pela face *Re* da carbonila, obtendo-se uma mistura de enantiômeros.

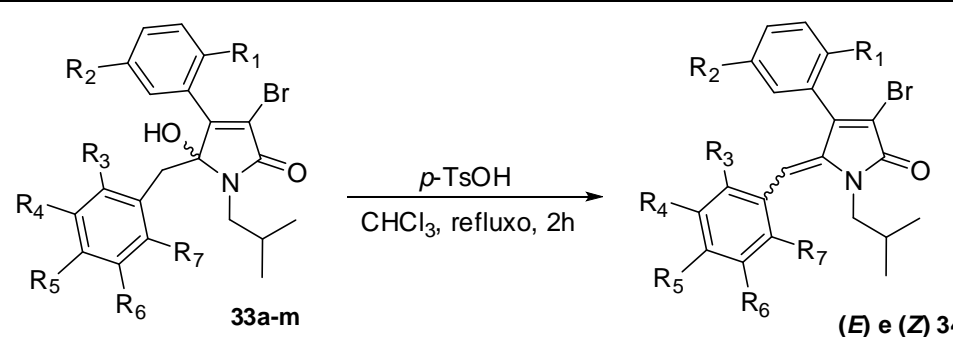


Esquema 1.8 - Mecanismo de formação das γ -hidroxipirrol-2(5*H*)-onas.

3.6 Síntese das γ -alquilidenopirrol-2(5H)-onas

Para obtenção das γ -alquilidenopirrol-2(5H)-onas foi utilizada a metodologia desenvolvida por GOH et al. (2007), pela qual a desidratação das γ -hidroxipirrol-2(5H)-onas com ácido *p*-toluenossulfônico (PTSA) em quantidade catalítica levou à formação das γ -alquilidenopirrol-2(5H)-onas nas configurações *Z* e *E* **34a-m** (Tabela 1.4).

Tabela 1.4 - γ -alquilidenopirrol-2(5H)-onas sintetizadas.



Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Rendimento total (%)	Proporção Z:E
34*a	H	H	H	O-CH ₂ -O	H	H	81	1:0,26
34*b	H	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	94	1:0,85
34*c	H	H	Cl	H	F	H	83	1:0,87
34*d	H	H	Cl	H	H	H	88	1:0,64
34*e	H	H	H	Cl	H	H	80	1:0,72
34*f	H	H	H	H	Cl	H	83	1:0,68
34*g	OCH ₃	H	H	Br	OCH ₃	H	91	1:1,94
34*h	OCH ₃	H	Cl	H	F	H	77	1:0,30
34*i	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	89	1:0,85
34*j	OCH ₃	H	Br	H	H	H	79	1:0,23
34*k	OCH ₃	Cl	H	Br	OCH ₃	H	82	1:1,09
34*l	OCH ₃	Cl	OCH ₃	H	H	OCH ₃	84	1:0,72
34*m	OCH ₃	Br	OCH ₃	H	H	OCH ₃	91	1:0,9

* Mistura entre os isômeros (*E*) e (*Z*)- γ -alquilidenopirrol-2(5H)-onas

As mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*)- γ -alquilidenopirrol-2(5H)-onas, foram submetidas a cromatografia em coluna de sílica-gel, no entanto, apenas os isômeros *Z* puderam ser isolados na forma pura. A dificuldade de purificação do isômero *E* pode

ser explicada pela isomerização desses compostos em meio ácido. Para confirmar esta hipótese, foram realizados experimentos RMN de ^1H imediatamente após a síntese dos compostos **34h**, o que mostrou uma proporção entre os isômeros *E/Z* igual a 1:0,51 (Figura 1.22). A mistura foi então deixada em solução de clorofórmio por 4 dias, uma nova análise por RMN de ^1H mostrou que a proporção entre os isômeros *E/Z* subiu para 1:0,80 (Figura 1.23). O experimento foi realizado novamente após 8 dias em que a mistura de isômeros estava em contato com clorofórmio, e dessa vez a proporção subiu para 1:1,57 (Figura 1.24), provando assim que os compostos sofrem isomerização a favor do isômero *Z* na presença de clorofórmio.

Para confirmar a isomerização em sílica-gel, a mistura de isômeros quantificada inicialmente foi deixada sob agitação por 4 dias na presença de sílica-gel e da mistura eluente que foi utilizada na primeira tentativa de separação dos compostos, hexano/diclorometano 1:6 (v/v). O resultado da análise por RMN de ^1H mostrou que a proporção inicial que era de 1:0,51 (Figura 1.22) subiu para 1:0,99 (Figura 1.25), provando que os compostos sofrem isomerização a favor do isômero *Z* na presença de sílica-gel e hexano/diclorometano 1:6 (v/v).

Uma série de 20 γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas sintetizada por Gupton et al. (2010) demonstraram o mesmo comportamento observado no presente estudo, os compostos variaram a proporção dos isômeros *Z/E* em valores iniciais de 3:2 para até 14:1 em favor do isômero *Z* após uma noite sob agitação em clorofórmio. Gupton et al. (2010) constataram ainda que a velocidade da isomerização pode estar relacionada com a natureza estérica dos substituintes do anel benzilideno.

As estruturas dos compostos (**Z**)**34a-m** foram elucidadas mediante análises espectroscópicas no IV, RMN de ^1H e ^{13}C , experimentos bidimensionais (NOESY e HSQC) e espectrometria de massas, cujos resultados confirmaram as estruturas propostas. Como exemplo, será feita uma discussão dos dados espectroscópicos obtidos para o composto (**Z**)**34h**.

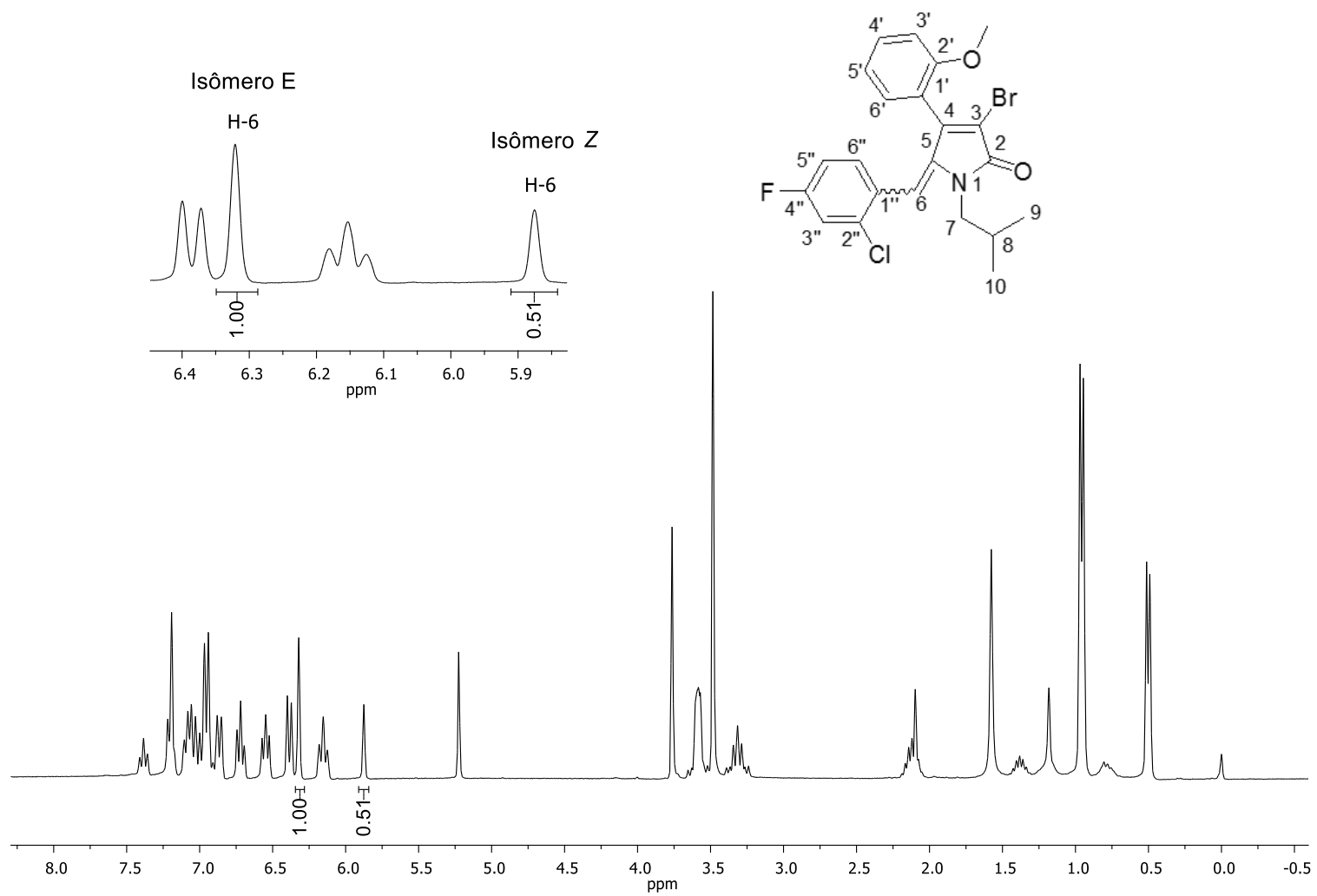


Figura 1.22 - RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*) **34h** obtido imediatamente após a síntese.

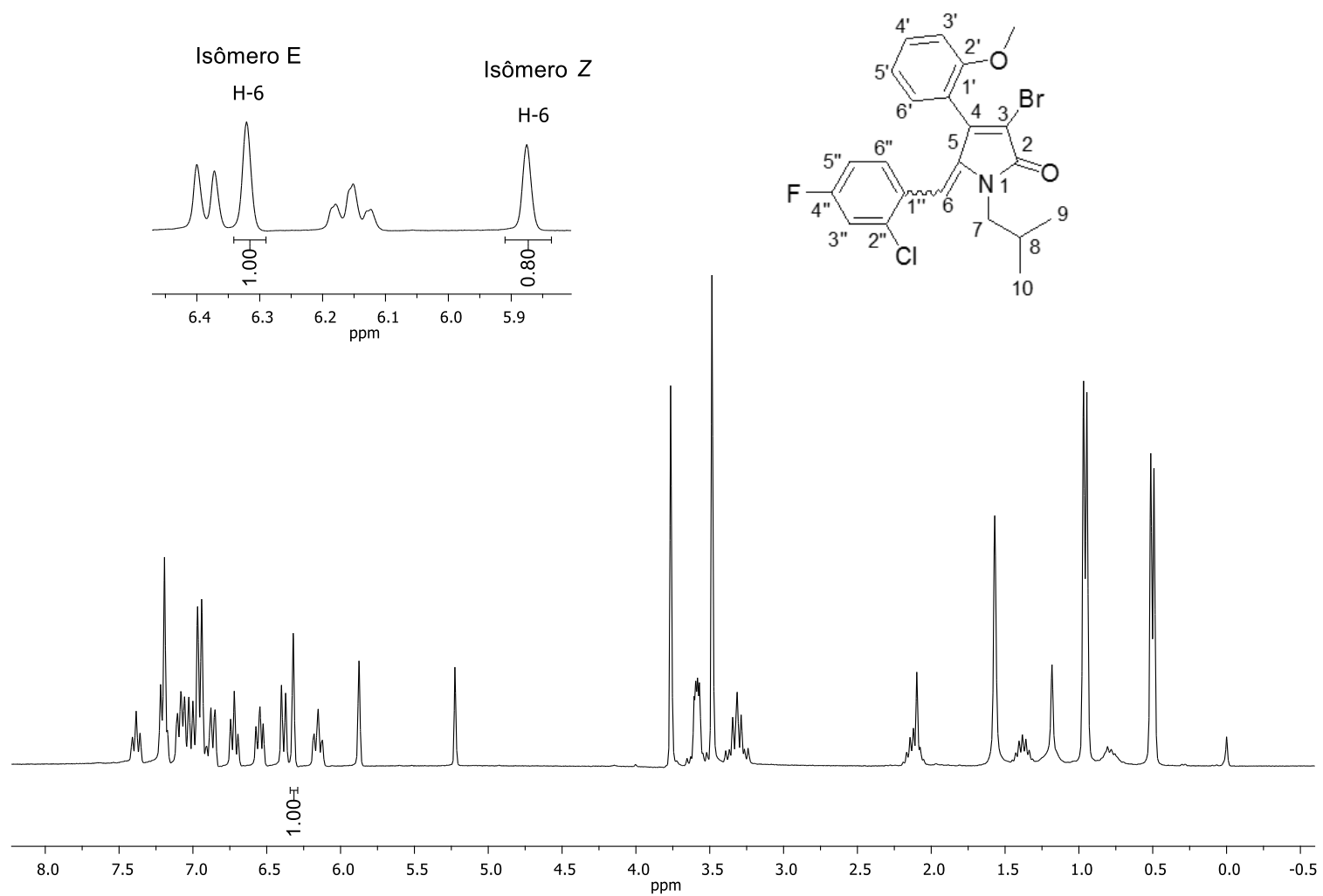


Figura 1.23 - RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*) **34h** obtido após 4 dias em clorofórmio.

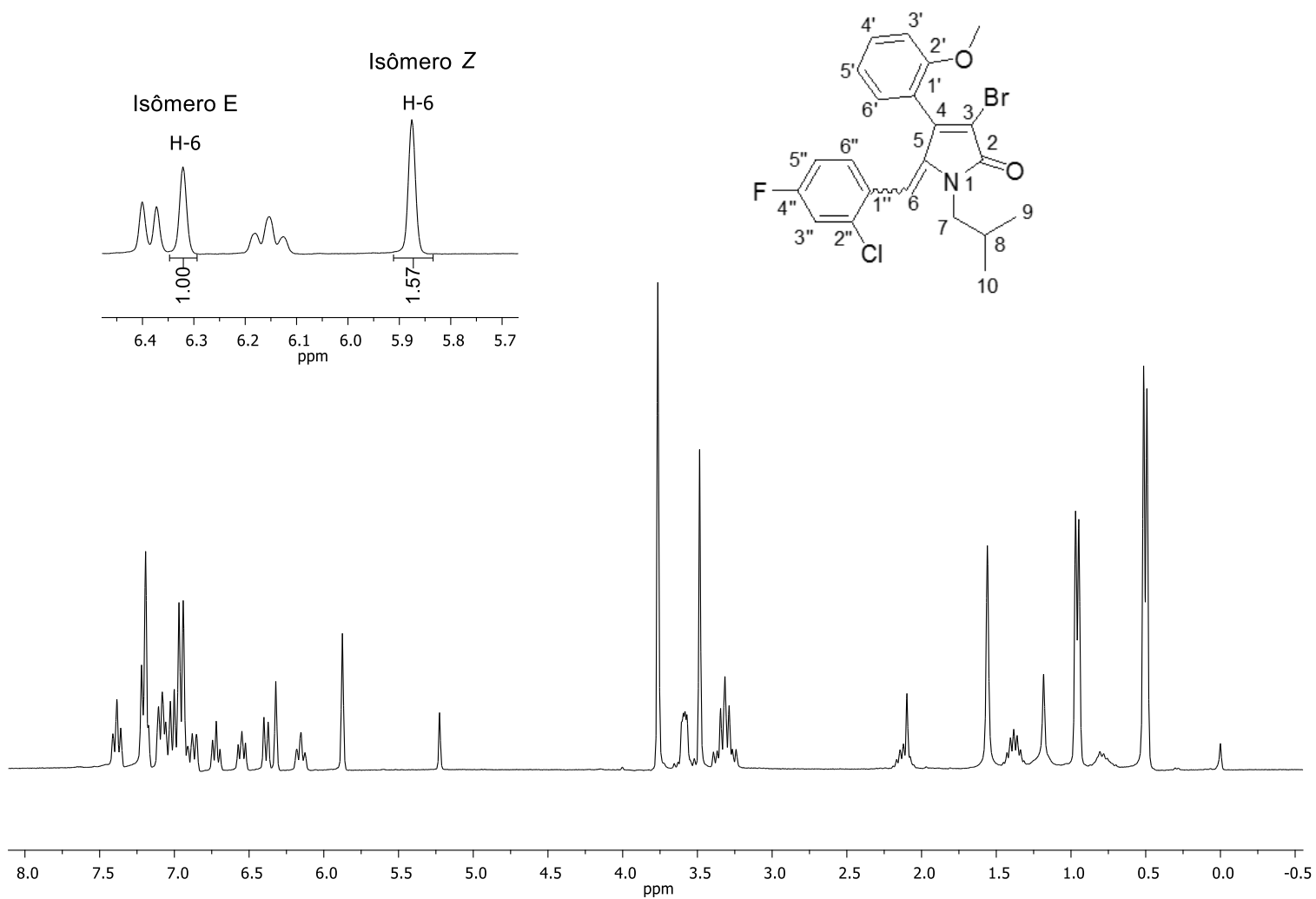


Figura 1.24 - RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*) **34h** obtido após 8 dias em clorofórmio.

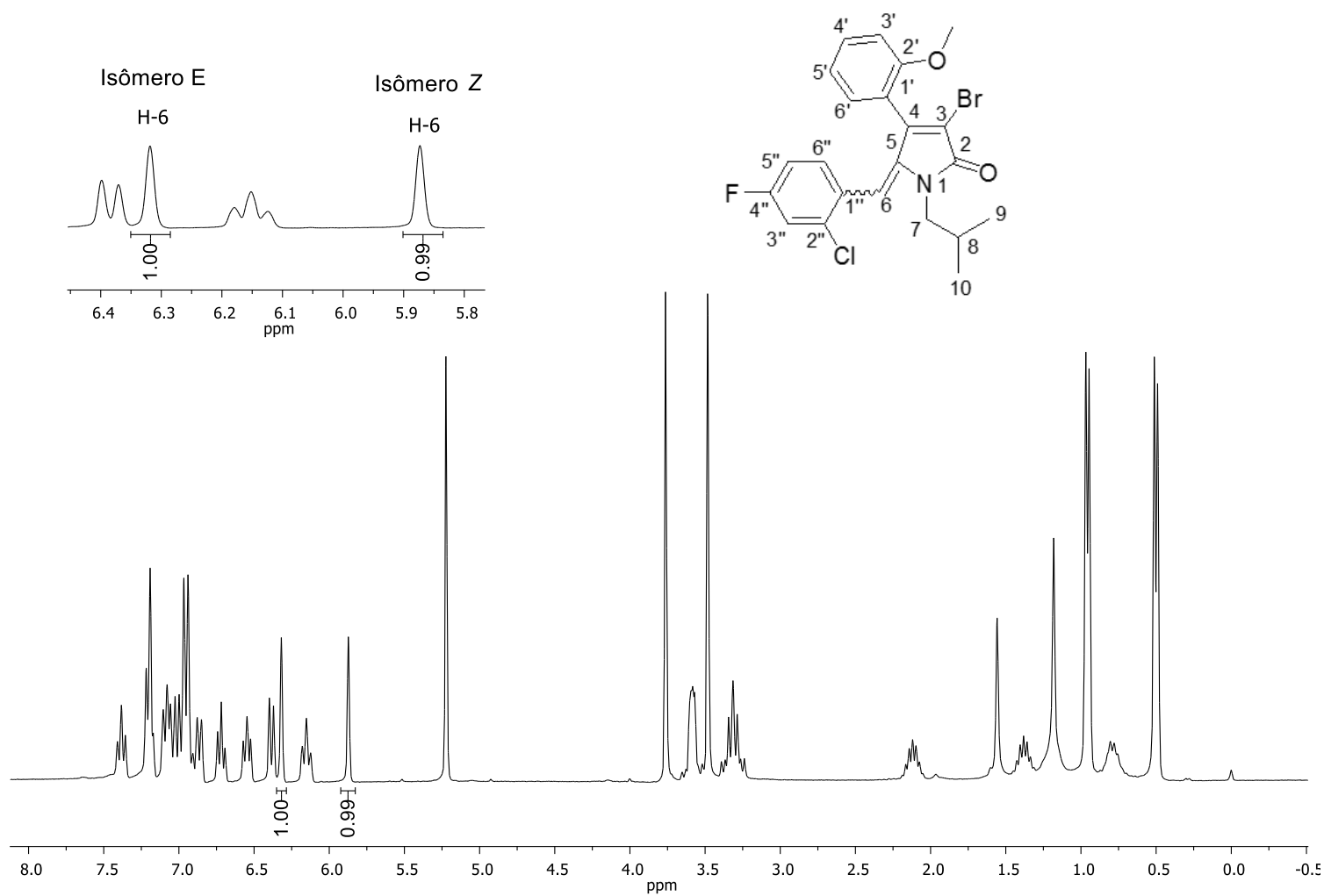


Figura 1.25 - RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*) **34h** obtido após 5 dias em sílica e hexano/diclorometano 1:6 (v/v).

A confirmação inicial da estrutura se deu pela análise de seu espectro no IV (Figura 1.26), no qual é possível observar uma banda intensa referente ao estiramento da carbonila em 1696 cm^{-1} .

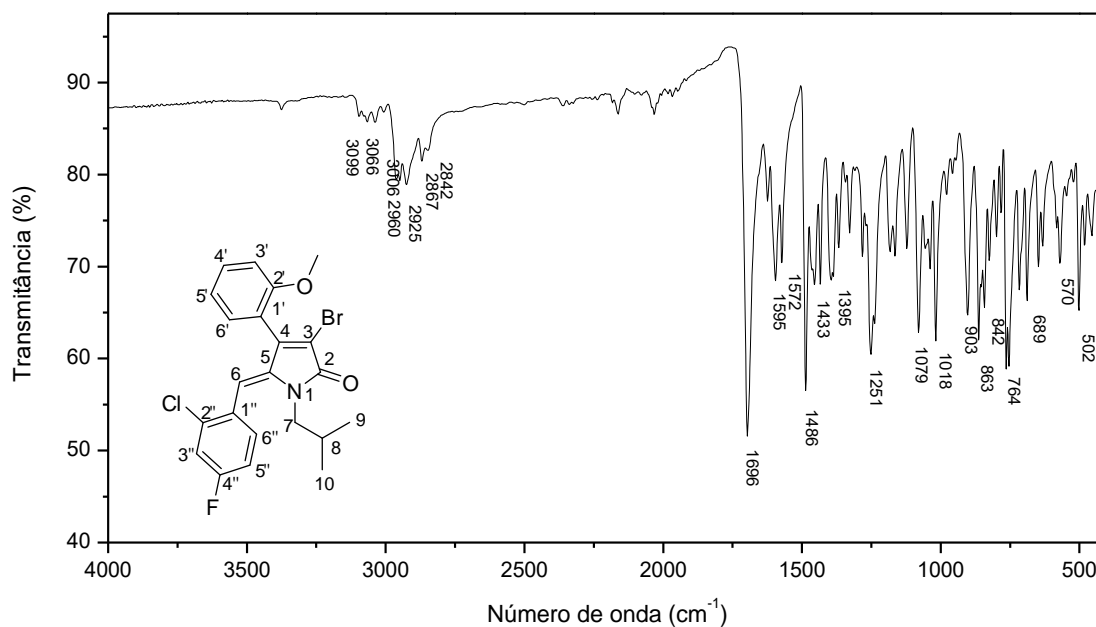


Figura 1.26 - Espectro no IV do composto **(Z)34h**.

No espectro de massas do **(Z)34h** (Figura 1.27) é possível observar o sinal do íon molecular em $m/z = 463$ e o pico base em $m/z = 41$ proveniente da fragmentação do grupo isopropil. O fragmento que corresponde ao sinal em $m/z = 384$ é referente à perda de um radical bromo $\text{Br}\cdot$ pelo íon molecular.

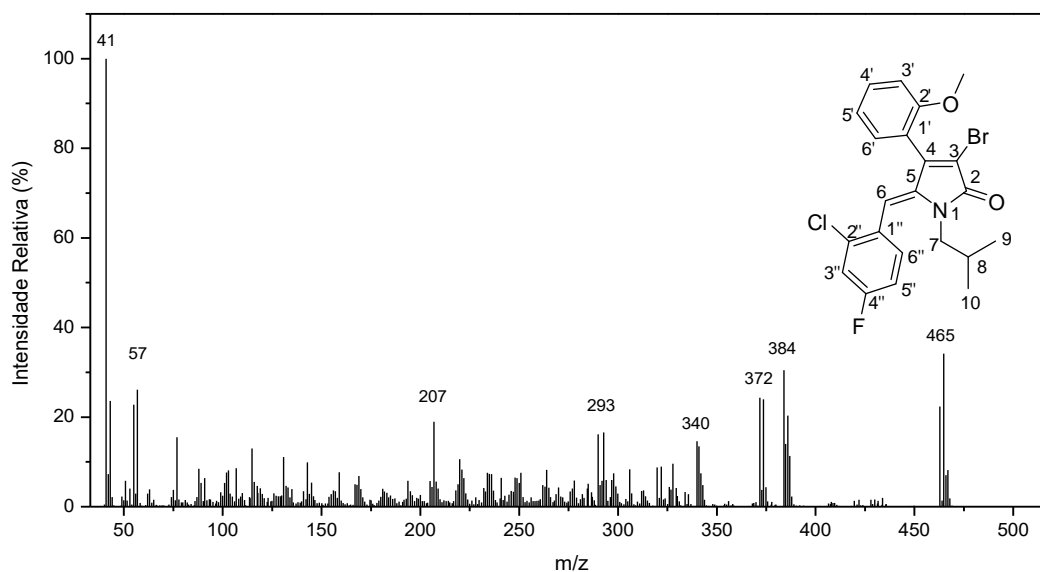


Figura 1.27 - Espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) do composto **(Z)34h**.

No espectro de RMN de ^1H de (**Z**)**34h**, apresentado na Figura 1.28, é possível observar dois dupletos duplos próximos, um em $\delta = 3,35$ referente a H-7a ($J_{7a,7b} = 14,2$ Hz, $J_{7a,8} = 7,4$ Hz) e outro em $\delta = 3,42$ referente a H-7b ($J_{7b,7a} = 14,2$ Hz, $J_{7b,8} = 7,4$ Hz). Também foi possível observar um multipletos para H-8 em $\delta = 1,38-1,52$ e um dupletos integrado para seis hidrogênios referente a H-9 e H-10 em $\delta = 0,58$ ($J_{9,8} = J_{10,8} = 6,7$ Hz). Em relação aos hidrogênios ligados aos anéis aromáticos, foi possível observar que a presença do átomo de flúor no anel benzilidênico também gerou o desdobramento de sinais devido ao acoplamento entre hidrogênio e flúor, como o dupletos duplo referente ao H-3'' em $\delta = 7,16$ ($J_{3'',F} = 8,4$, $J_{3'',5''} = 2,5$, H-3''). No entanto, alguns sinais se sobrepuseram formando multipletos que impediram a visualização dos desdobramentos dos sinais devido ao acoplamento entre átomos de hidrogênio-hidrogênio e hidrogênio-flúor, em $\delta = 7,24-7,29$ para H-6'' e H-6' e em $\delta = 6,97-7,09$ H-5', H-3' e H-5''.

Para quantificar a mistura dos isômeros (*Z*) e (*E*)- γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas foi obtido um espectro de ^1H (Figura 1.29), e as proporções entre os isômeros *Z* e *E* em cada mistura foram determinadas pela razão entre os valores das integrações dos sinais de um mesmo hidrogênio para os dois isômeros. No caso da mistura de **34h**, foi utilizado o sinal referente ao H-6, que ocorre em $\delta = 5,95$ para o isômero *Z* e em $\delta = 6,40$ para o isômero *E*. Provavelmente, o maior valor de deslocamento químico apresentado por H-6 do isômero *E* é resultante da proximidade desse hidrogênio em relação átomo de nitrogênio nesses isômeros. As análises mostraram que, para os isômeros (*E*) e (*Z*) **34h** a proporção foi de 1:0,59. Na maioria dos casos, os rendimentos foram superiores para as (*Z*)- γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas, semelhante ao que foi descrito na literatura para algumas γ -alquilideno- γ -lactonas, para as quais os isômeros *Z* se mostraram mais estáveis devido a presença de um grupo aromático na posição β do anel lactônico, como também pela formação de ligações de hidrogênio não clássica entre os hidrogênios na posição *orto* do anel benzilidênico e o oxigênio do núcleo γ -lactônico (LEE e BROWN, 1998; BROWN e WONG, 2004; TEIXEIRA et al., 2007; WANG et al., 2012).

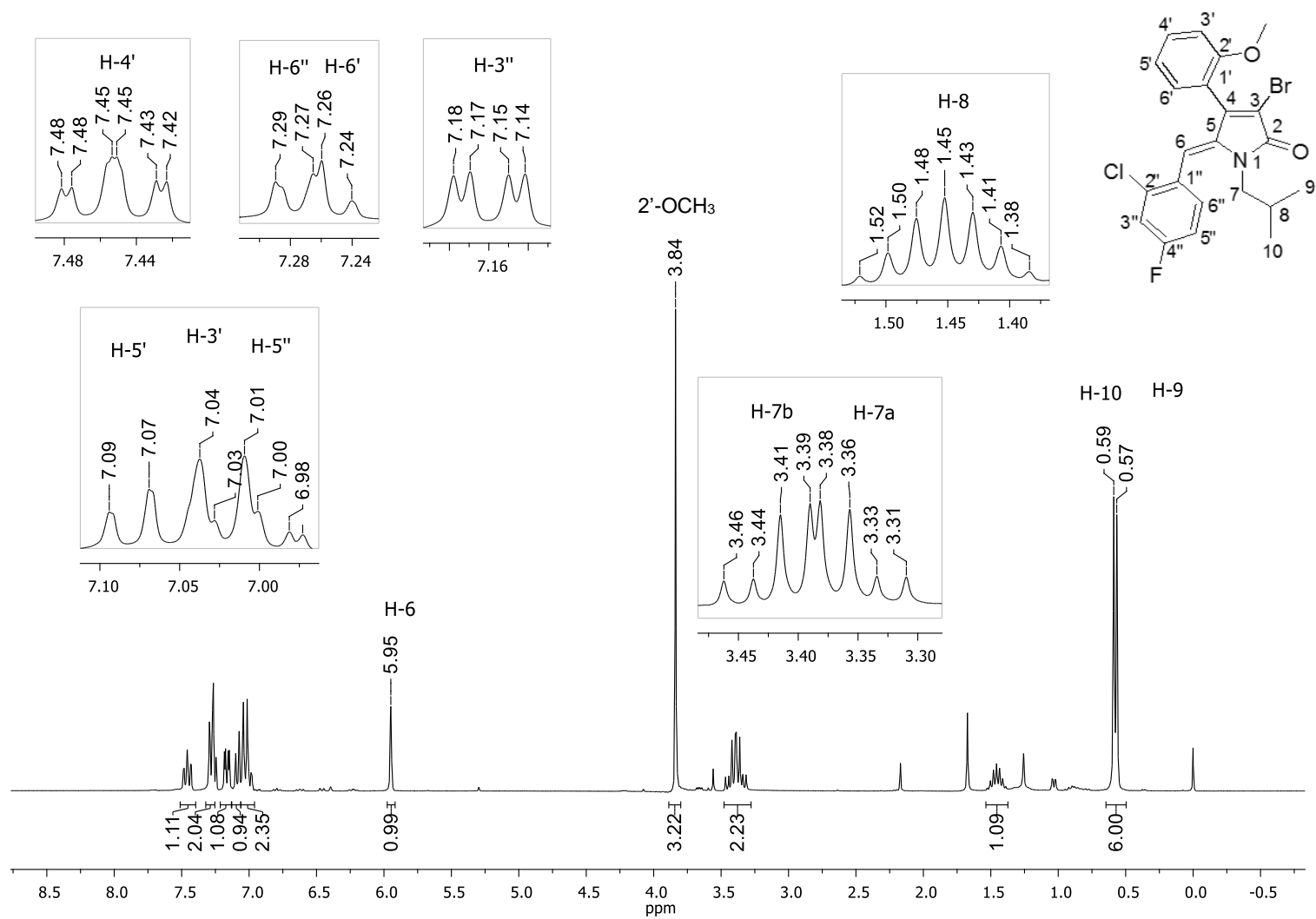


Figura 1.28 - Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto (Z)34h.

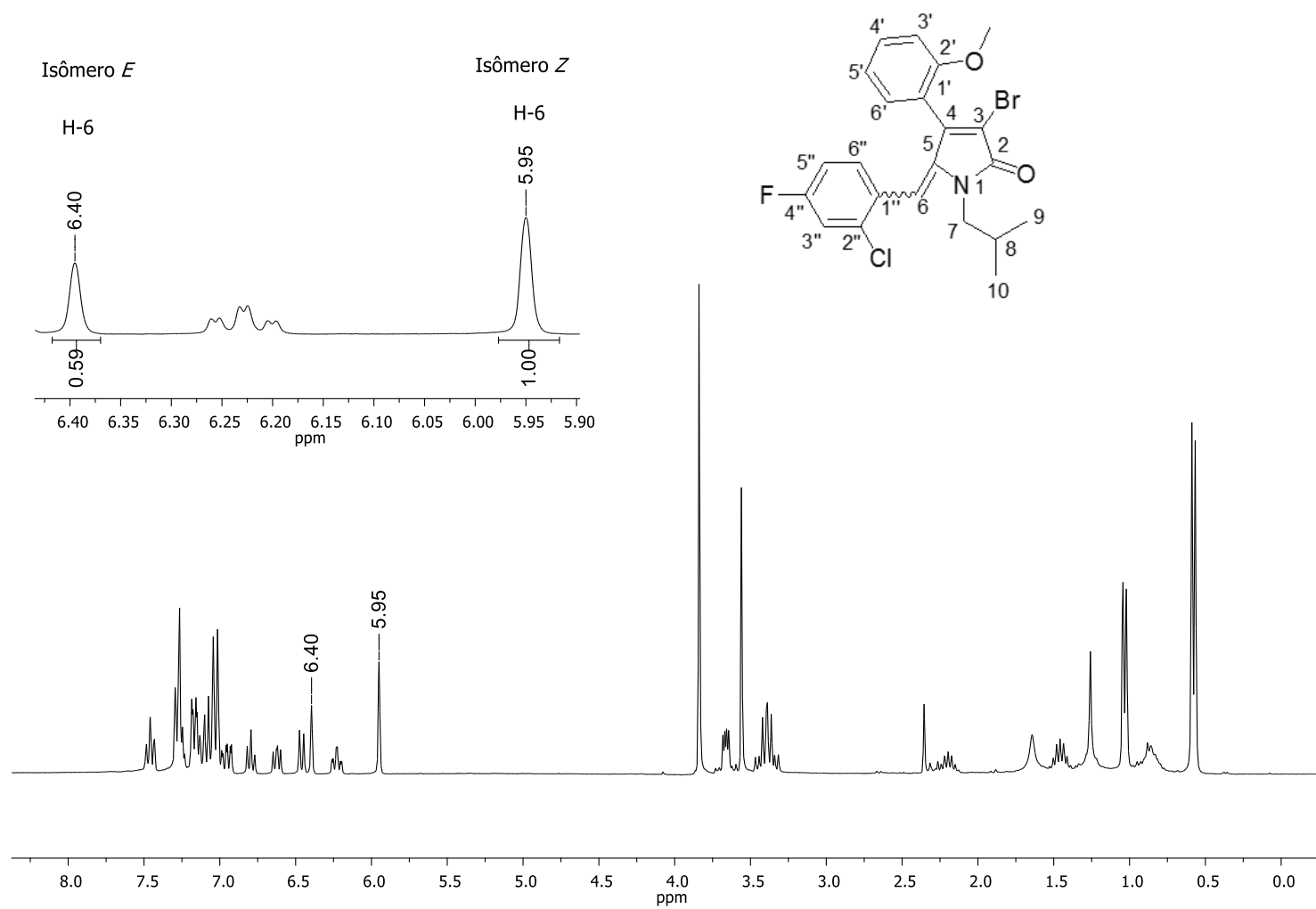


Figura 1.29 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da mistura dos isômeros (*E*) e (*Z*) **34h**.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 1.30) de **(Z)34h** é possível observar o sinal referente à carbonila em $\delta = 166,8$. O sinal referente à metoxila foi observado em $\delta = 55,6$. Como já se esperava, o sinal do carbono C-7 ($\delta = 49,2$) é mais desblindado que C-8 ($\delta = 27,7$) pela maior proximidade entre C-7 e o nitrogênio. Para os carbonos C-9 e C-10 foram observados dois sinais diferentes ($\delta = 19,5$ e $\delta = 19,6$), provavelmente devido à rigidez da molécula que não permite a livre rotação do grupo isobutil. As atribuições dos sinais referentes aos carbonos aromáticos só puderam ser confirmadas pela análise do mapa de contornos HSQC (Figura 1.31 e Figura 1.32).

Para confirmar a estereoquímica da dupla ligação exocíclica das γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas, foram realizados experimentos de NOESY para todos os isômeros purificados. No caso do isômero **(Z)34h**, é possível observar a interação entre H-6 ($\delta = 5,94$) e o hidrogênio aromático H-6', evidenciando que esses hidrogênios estão próximos no espaço, o que confirma a configuração Z (Figura 1.33).

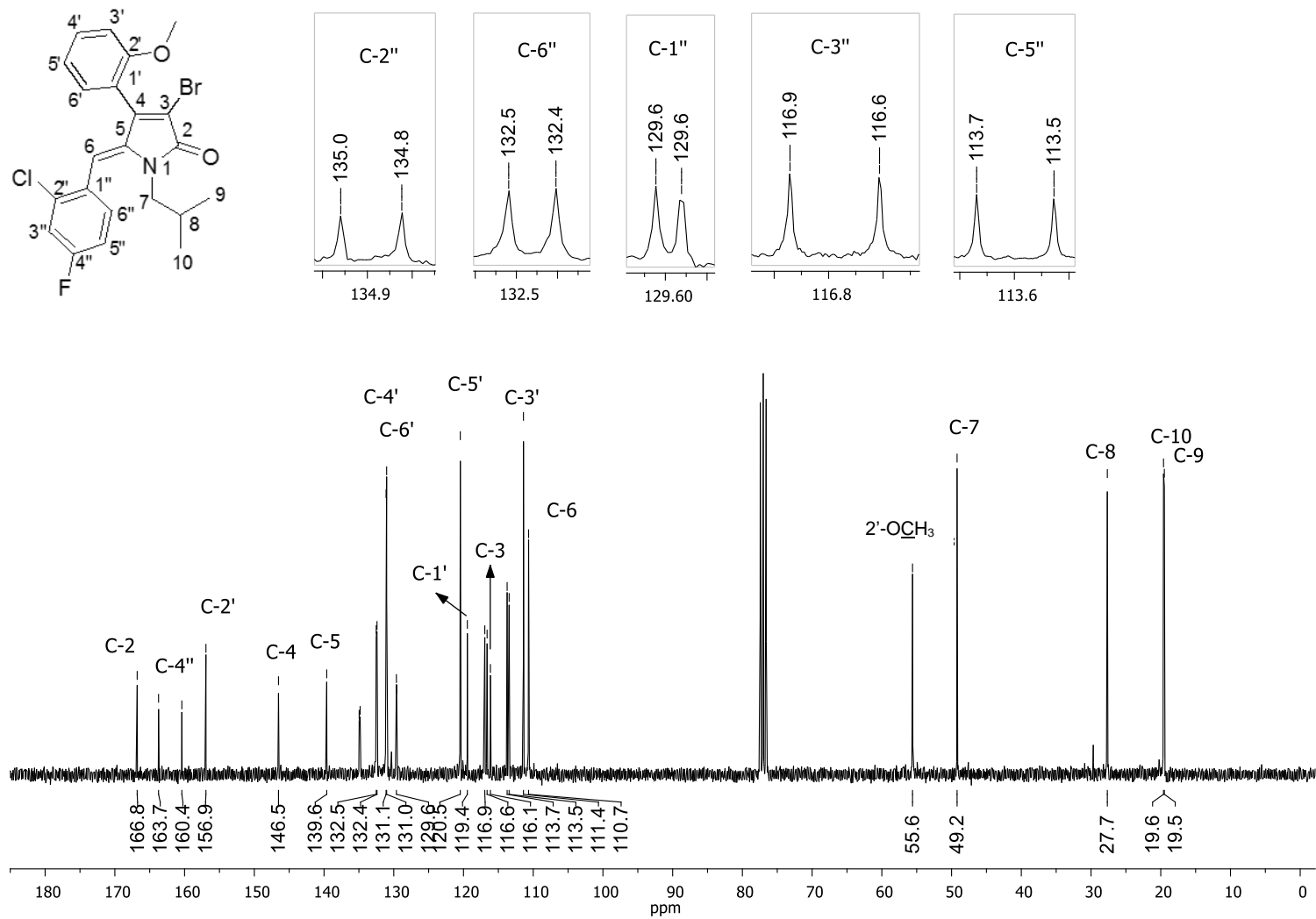


Figura 1.30 - Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto (Z)34h.

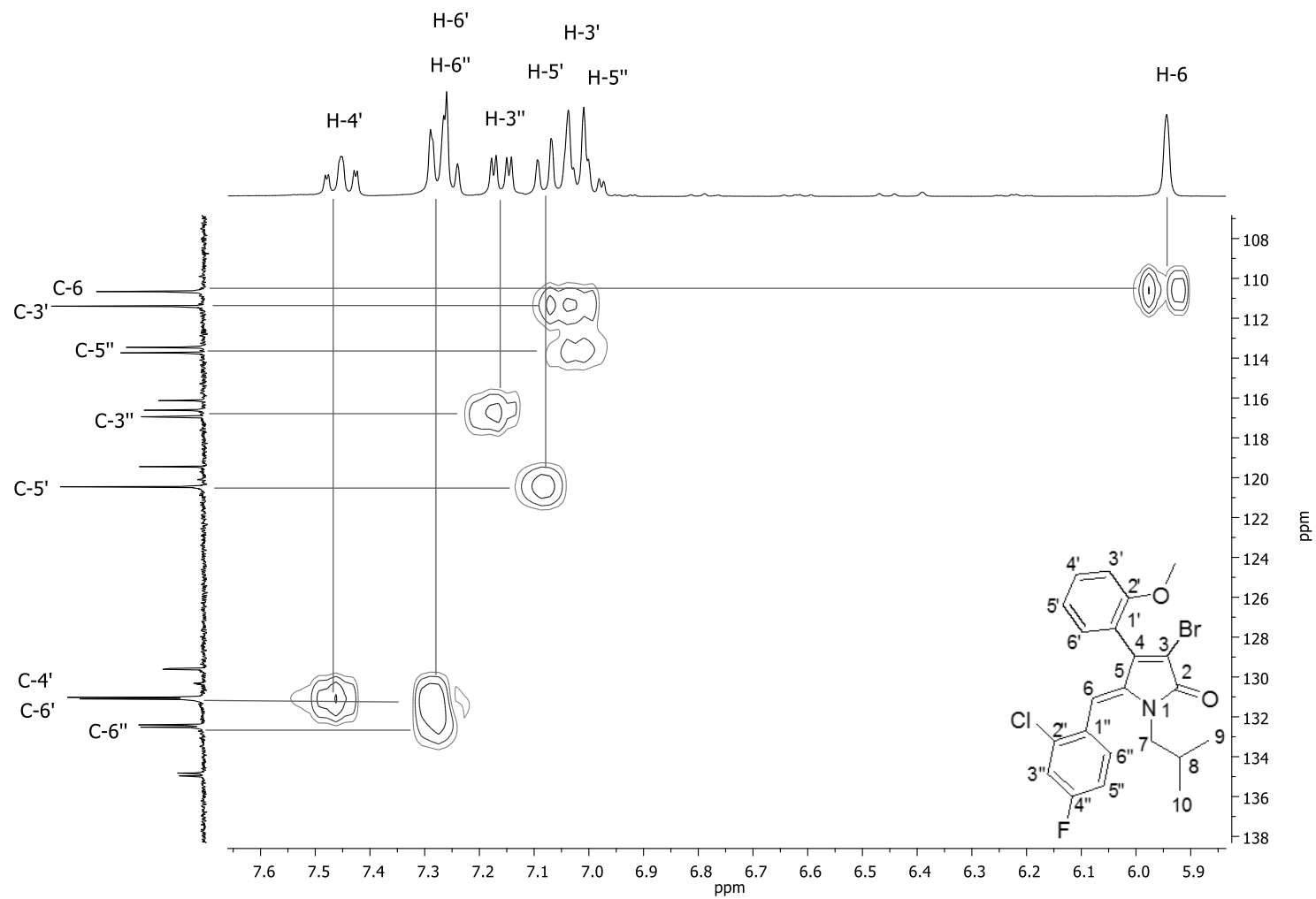


Figura 1.31 - Mapa de contornos HSQC (expandido) do composto **(Z)34h**.

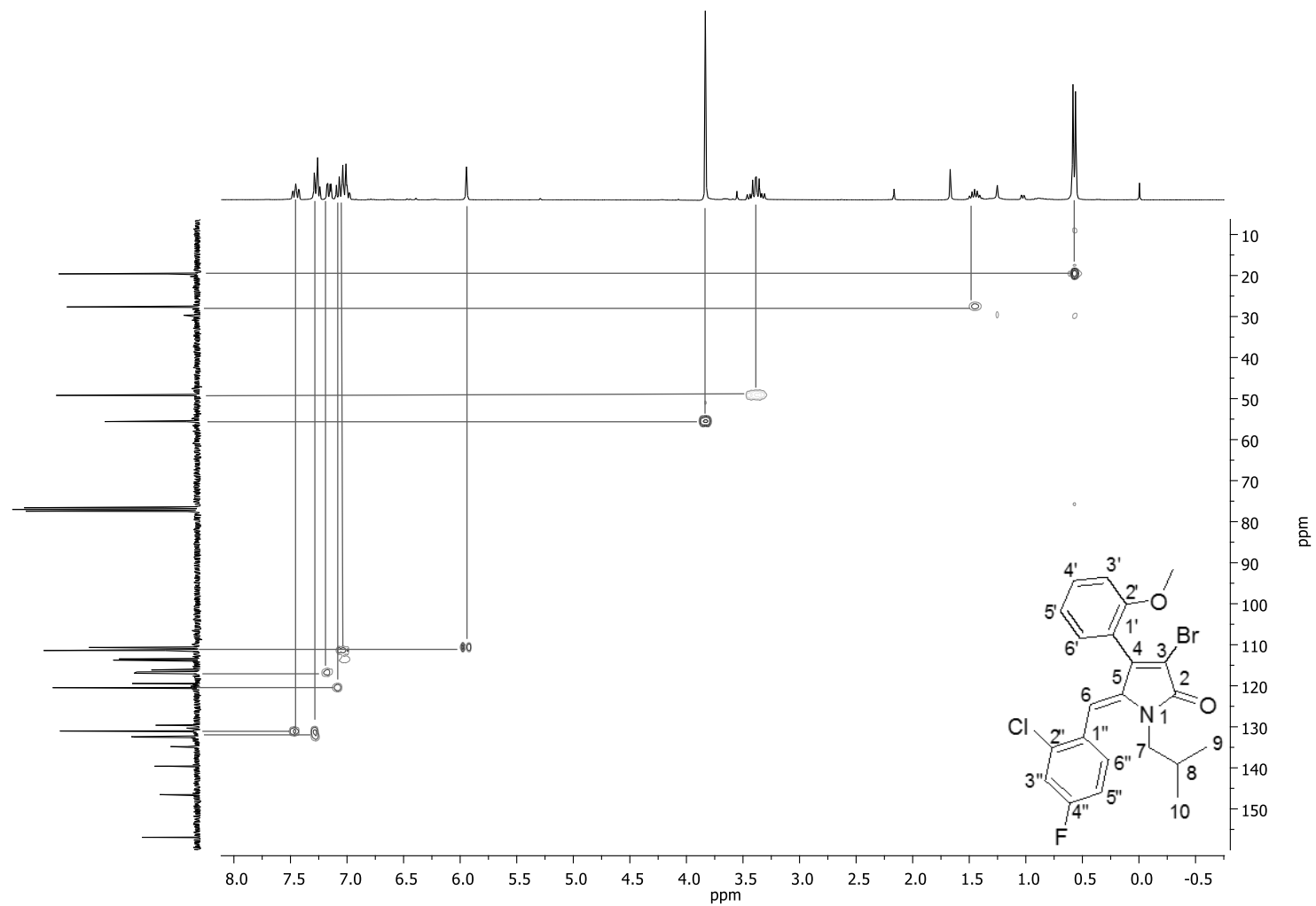


Figura 1.32 - Mapa de contornos HSQC do composto **(Z)34h**.

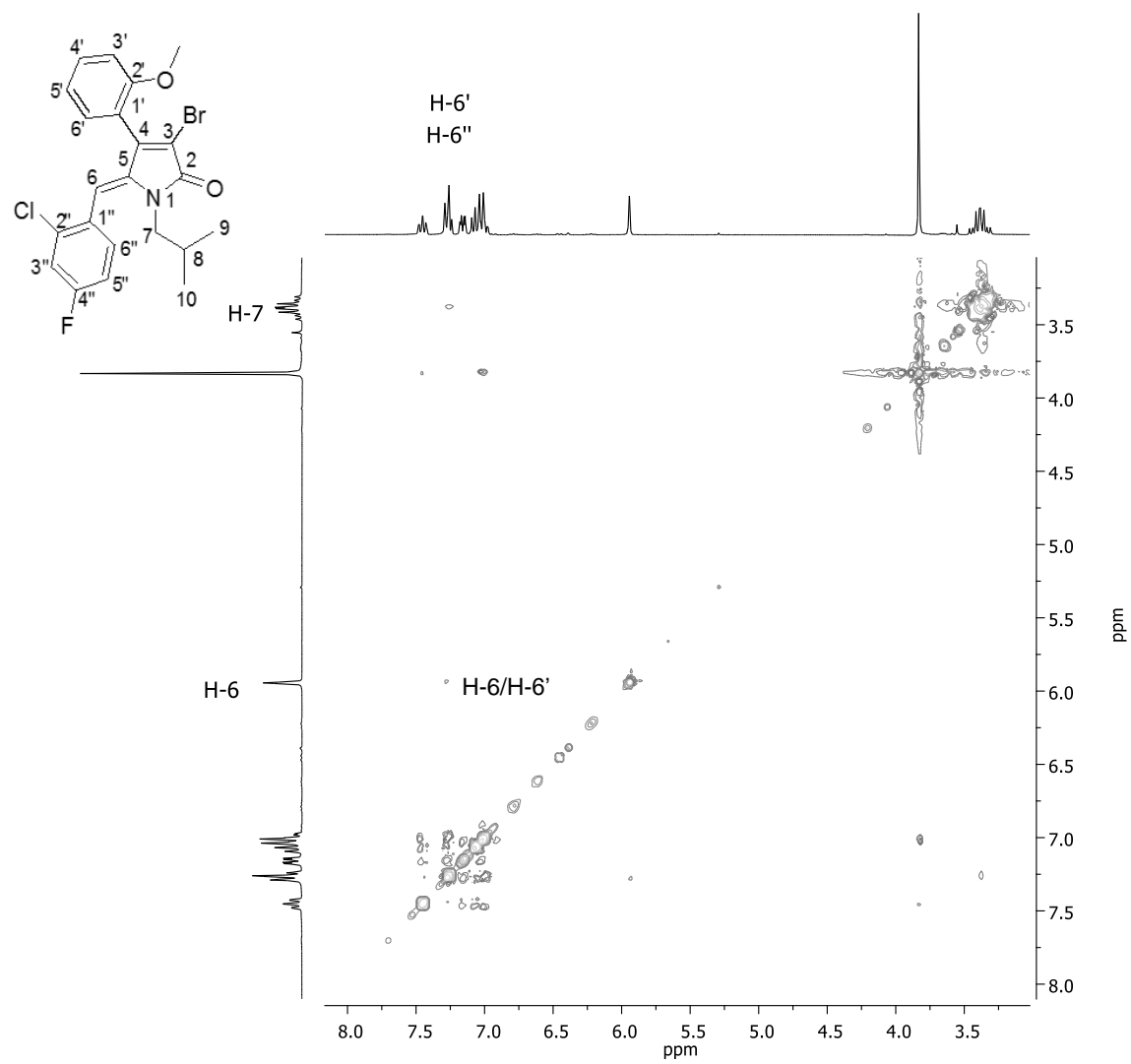


Figura 1.33 - Mapa de contornos NOESY do composto **(Z)34h**.

4 Conclusões

Neste trabalho foram descritas as etapas envolvidas na preparação das γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas análogas aos metabólitos secundários conhecidos como rubrolídeos, bem como a conversão desses compostos nas γ -hidroxipirrol-2(5*H*)-onas e γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas correspondentes.

Um total de cinquenta e duas moléculas (cinquenta e uma inéditas) foram sintetizadas, sendo treze (*Z*)- γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas, treze γ -hidroxipirrol-2(5*H*)-onas, treze (*Z*)- γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas e treze (*E*)- γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas.

Todos os compostos foram caracterizados por espectroscopia no IV, RMN de ^1H e ^{13}C e por espectrometria de massas. Técnicas bidimensionais HSQC e NOESY possibilitaram a atribuição de todos os sinais dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e a elucidação da configuração da ligação dupla exocíclica das γ -alquilidenofuran-2(5*H*)-onas e γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas.

Destaca-se ainda que as reações de acoplamento cruzado de Suzuki-Miyaura foram altamente regioseletivas. As reações de alquilidação e as reação de desidratação das γ -hidroxipirrol-2(5*H*)-onas foram estereosseletivas, resultando, na maioria dos casos na formação preferencial do isômero *Z*.

5 Referências bibliográficas

BARBOSA, L. C. A.; VELOSO, D. P. Sistema para representação simbólica de mecanismos de reação. **Quim. Nova**, v.17, p. 68-87, 1994.

BARBOSA L. C. A. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: UFV; 2007. p. 189

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

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; LAGE, M. R.; BARCELOS, R. C.; DONÀ, A. CARNEIRO, J. W. M.; FORLANI, G. Synthesis of rubrolides analogues as new inhibitors of the photosynthetic electron transport chain. **J. Agric. Food Chem.** v. 60, p. 10555-10563, 2012.

BARBOSA, L. C. A.; TEIXEIRA, R. R.; AMARANTE, G. W. Synthetic strategies for the preparation of butenolides and their transformation into other derivatives. **Curr. Org. Synth.**, v. 12, p. 746-771, 2015.

BARDER, T. E.; WALKER, S. D.; MARTINELLI, J. R.; BUCHWALD, S. L. Catalysts for Suzuki-Miyaura coupling processes: scope and studies of the effect of ligand structure. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 127, p. 4685-4696, 2005.

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

BELLINA, F.; ANSELMINI, C.; ROSSI, R. Synthesis of 4-alkyl-3-bromo-2(5*H*)-furanones and unsymmetrically disubstituted 3,4-dialkyl-2(5*H*)-furanones by palladium-catalyzed cross-coupling reactions. **Tetrahedron Lett.**, v. 42, p. 3851-3854, 2001a.

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

BELLINA, F.; CARPITA, A.; ROSSI, R. Palladium catalysts for the Suzuki cross coupling reaction: an overview of recent advances. **Synthesis**, v. 15, p. 2419-2440, 2004a.

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

BELLINA, F.; ROSSI, R. An efficient and inexpensive multigram synthesis of 3,4-dibromo- and 3,4-dichlorofuran-2(5*H*)-one. **Synthesis**, p. 1887-1889, 2007.

BOUKOUVALAS, J.; MALTAIS, F.; LANCHANCE, N. Furanolatebased strategy for sequential 2,3,4-trisubstitution of butenolide: total synthesis of nostoclides I and II. **Tetrahedron Lett.**, v. 35, p. 7897-7900, 1994.

BOUKOUVALAS, J.; LACHANCE, N.; OUELLET, M.; TRUDEAU, M. Facile access to 4-aryl-2(5H)-furanones by Suzuki cross coupling: efficient synthesis of rubrolides C and E. **Tetrahedron Lett.**, v.39, p.7665-7668, 1998.

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

BROWN, G. D.; WONG, H. Total synthesis of (\pm) maculalactone A, maculalactone B and maculalactone C and the determination of the absolute configuration of natural (+) maculalactone A by asymmetric synthesis. **Tetrahedron**, v. 60, p. 5439-5457, 2004.

CHEN, W.; LI, P.; WANG, L. Silica supported palladium-phosphine complex: recyclable catalyst for Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions at ambient temperature. **Tetrahedron**, v. 67, p. 318-325, 2011.

CLAYDEN, J.; GREEVS, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Organic chemistry, 1st ed, New York: Oxford University Press. 2001. 1512 p.

CRAGG, G. M.; NEWMAM, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

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

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

GUPTON, J. T.; TELANG, N.; BANNER, E. J.; KLUBALL, E. J.; HALL, K. E.; FINZEL, K. L.; JIA, X.; BATES, S. R.; WELDEN, R. S.; GIGLIO, B. C.; EATON, J. E.; BARELLI, P. J.; FIRICH L. T.; STAFFORD, J. A.; COPPOCK, M. B.; WORRALL, E. F.; KANTERS, R. P. F.; KEERTIKAR, K.; OSTERMAN, R. The application of (*Z*)-3-aryl-3-haloenoic acids to the synthesis of (*Z*)-5-benzylidene-4-arylpyrrol-2(5H)-ones. **Tetrahedron**, v. 66, p. 9113-9122, 2010.

HUSSAIN, M.; HUNG, N. T.; KHERA, R. A.; VILLINGER, A.; LANGER, P. Siteselective Suzuki-Miyaura reactions of 2,3-dibromo-1*H*-inden-1-one. **Tetrahedron Lett.**, v. 52, p. 184-187, 2011.

KAR, A.; MANGU, N.; KAISER, H. M.; TSE, M. K. Gold-catalyzed direct oxidative coupling reactions of non-activated arenes. **J. Organomet. Chem.**, v. 694, p. 524-537, 2009.

KIBAYASHI, C. Development of new synthetic methods and its application to total synthesis of nitrogen-containing bioactive natural products. **Chem. Pharm. Bull.** v. 53, p. 1375-1386, 2005.

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

LEE, S.; BROWN, G. D. Tribenzylbutyrolactones and Dibenzylidiphenyl-4,5,6,7-Tetrahydrobenzofuranones from *Kyrtuthrix maculans*. **J. Nat. Prod.** v. 61, p. 29-33, 1998.

LENNOX, A. L. L.; LLOYDE-JONES, G. C. Selection of boron reagents for Suzuki-Miyaura coupling. **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, p. 412-443, 2014.

MARTIN, R.; BUCHWALD, S. L. Palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura cross coupling reactions employing dialkylbiaryl phosphine ligands. **Acc. Chem. Res.**, v. 41, n. 11, p. 1461-1473, 2008.

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

MIYaura, N.; SUZUKI, A. Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. **Chem. Rev.**, v. 95, p. 2457-2483, 1995.

MORENO-MAÑAS, M.; PÉREZ, M.; PLEIXATS, R. Palladium-catalyzed Suzuki-type self-coupling of arylboronic acids. A mechanistic study. **J. Org. Chem.**, v. 61, p. 2346-2351, 1996.

MURTHY, S. N.; MADHAV, B.; KUMAR, V.; RAO, R.; NAGESWAR, Y. V. D. Facile and efficient synthesis of 3,4,5-substituted furan-2(5H)ones by using β -cyclodextrin as reusable catalyst. **Tetrahedron**, v. 65, p. 5251-5256, 2009.

NAY, B.; RIACHE, N.; EVANNO, L. Chemistry and biology of non-tetramic γ -hydroxy- γ -lactams and γ -alkylidene- γ -lactams from natural sources. **Nat. Prod. Rep.**, v. 26, p. 1044-1062, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.** v. 70, p. 461-477, 2007.

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

PEARCE, A. N.; CHIA, E. W.; BERRIDGE, M. V.; MAAS, E. W.; PAGE, M. J.; WEBB, V. L.; HARPER, J. L.; COPP, B. R. *E/Z*-Rubrolide O, an anti-inflammatory halogenated furanone from the New Zealand ascidian *Synoicum* n. sp. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 111-113, 2007.

PEREIRA, U. A.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J.; MASOUD, M. A.; PIMENTA, A. L. Inhibition of *Enterococcus faecalis* biofilm

formation by highly active lactones and lactams analogues of rubrolides. **Europ. J. of med. Chem.** v. 82, p. 127-138, 2014a.

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

PEREIRA, U. A.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; BERTAZZINI, M.; FORLANI, G. Rubrolides as model for the development of new lactones and their aza analogs as potential photosynthesis inhibitors. **Chem. Biodivers.** v. 12, p. 987-1006, 2015.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. Purification of laboratory chemicals. 3rd ed., Londres: Butterworth-Heinemann Ltd., 1994. 340p.

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

RICHARDS, J.; MELANDER, C. Small molecule approaches toward the non-microbicidal modulation of bacterial biofilm growth and maintenance. **Anti-Infect. Agents Med. Chem.** v. 8, p. 295-314, 2008.

ROSSI, R.; BELLINA, F.; LESSI, M. Highly selective palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura monocoupling reactions of ethene and arene derivatives bearing two or more electrophilic sites. **Tetrahedron**, v. 67, p. 6969-7025, 2011.

SIKORSKA, J.; PARKER-NANCE, S.; DAVIES-COLEMAN, M. T.; VINING, O. B.; SIKORA, A. E.; McPHAIL, K. L. Antimicrobial rubrolides from a south African species of *Syonicum tunicate*. **J. Nat. Prod.**, v. 75, n. 10, p. 1824-1827, 2012.

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

SUZUKI, A. Cross-coupling reactions of organoboranes: an easy way to construct C-C bonds (Nobel Lecture). **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 50, p. 6722-6737, 2011.

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

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

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

VAREJÃO, J. O. S.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; LAGE, M. R.; LANZMASTER, M.; CARNEIRO, J. W. M.; FORLANI, G. Voltammetric and theoretical study of the redox properties of rubrolide analogues. **Electrochimica Acta**, v. 120, p. 334-343, 2014a.

VAREJÃO, J. O. S.; BARBOSA, L. C. A.; VAREJÃO E. V. V.; MALTHA, C. R. A.; KING-DÍAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. Cyclopent-4-ene-1,3-diones: A new class of herbicides acting as potent photosynthesis inhibitors. **J. Agric. Food Chem.** v. 62, p.5772-5780, 2014b.

VAREJÃO, J. O. S.; BARBOSA, L. C. A.; RAMOS, G. A.; VAREJÃO, E. V. V.; KING-DÍAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. New rubrolide analogues as inhibitors of photosynthesis light reactions. **J. Photochem. Photobiol. B, Biol.** v. 145, p. 11-18, 2015.

WANG, W.; KIM, H.; NAM, S. -J.; RHO, B. J.; KANG, H. Antibacterial butenolides from the Korean tunicate *Pseudodistoma antinboja*. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 2049-2054, 2012.

YAO, M. -L.; DENG, M. -Z. Facile approach to 4-substituted 2(5*H*)-furanones. **J. Org. Chem.**, v. 65, p. 5034-5036, 2000.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DOS ANÁLOGOS AOS RUBROLÍDEOS E SUAS LACTAMAS DERIVADAS

1 Introdução

1.1 Antibióticos

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

Em 1910, Ehrlich desenvolveu o primeiro antibiótico de origem sintética, salvarsan (**36**), usado contra sífilis (Figura 3.1). Poucos progressos foram conseguidos nos 20 anos seguintes para o desenvolvimento de antibióticos, até a introdução da proflavina (**37**) (Figura 3.1), em 1934, agente amplamente utilizado na Segunda Guerra Mundial, principalmente contra infecções de feridas profundas. Entretanto, este composto era muito tóxico para ser usado em infecções bacterianas sistêmicas (PATRICK, 1995).

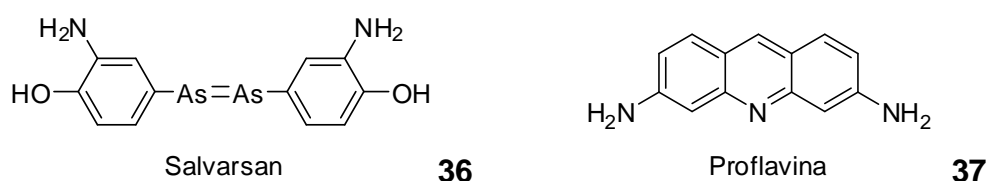


Figura 3.1 - Primeiros antibióticos sintéticos salvarsan e proflavina.

O grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina **38**, em 1928 (FLEMING, 1929; NICOLAOU e MONTAGNON, 2008).

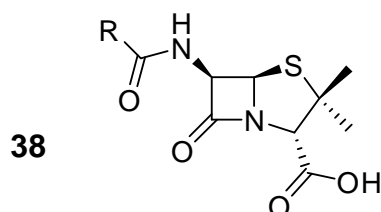


Figura 3.2 - Estrutura da penicilina

A demonstração de que fungos produzem substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antibióticos: a prospecção em culturas de microrganismos, especialmente fungos e actinobactérias. Após o processo de industrialização da penicilina, especialmente em

consequência da Segunda Guerra Mundial, foi observado um rápido crescimento na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (PROJAN e SHLAES, 2004).

Entre os anos 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram-positivas: β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, macrolídeos, glicopeptídeos entre outros. Neste período, apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida (**39**), trimetropim (**40**) e metronidazol (**41**) (FERNANDES, 2006).

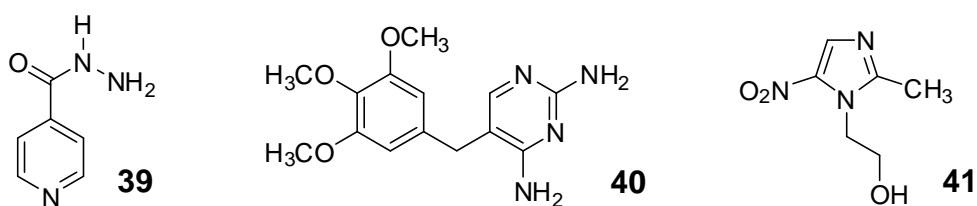


Figura 3.3 - Estrutura dos antibióticos sintéticos isoniazida, trimetropim e metronidazol

Entre os anos 1960-1980 foram introduzidos no mercado antibióticos semissintéticos eficazes para o tratamento de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, análogos aos antibióticos naturais já existentes (FERNANDES, 2006; GUIMARÃES et al., 2010).

Entre os anos 1980-2000 houve uma redução dramática na identificação de novos protótipos de antibióticos, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento na incidência de resistência bacteriana. Este período é marcado pela modificação do mercado de antibióticos pela introdução da classe das fluoroquinolonas sintéticas na metade dos anos 1980. Alguns antibióticos baseados em protótipos naturais, como imipenem **42** (derivado β -lactâmico) e análogos da eritromicina **43** (derivado macrolídeo) também foram introduzidos neste período (PAYNE et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2010).

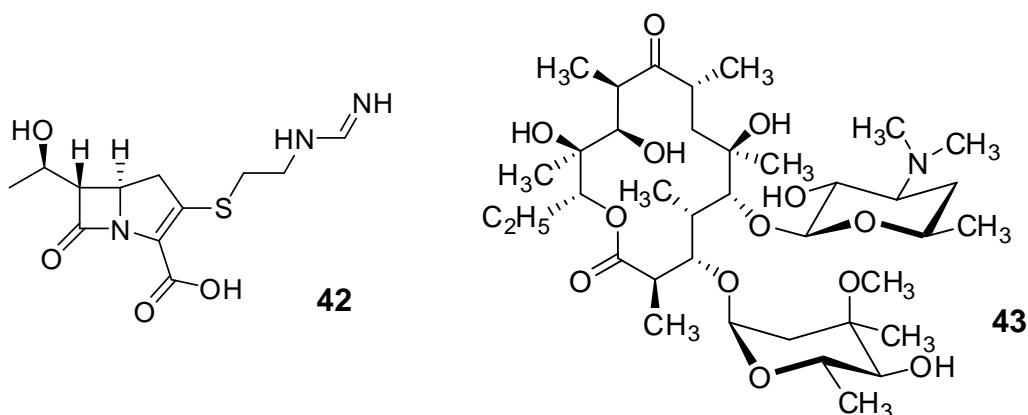
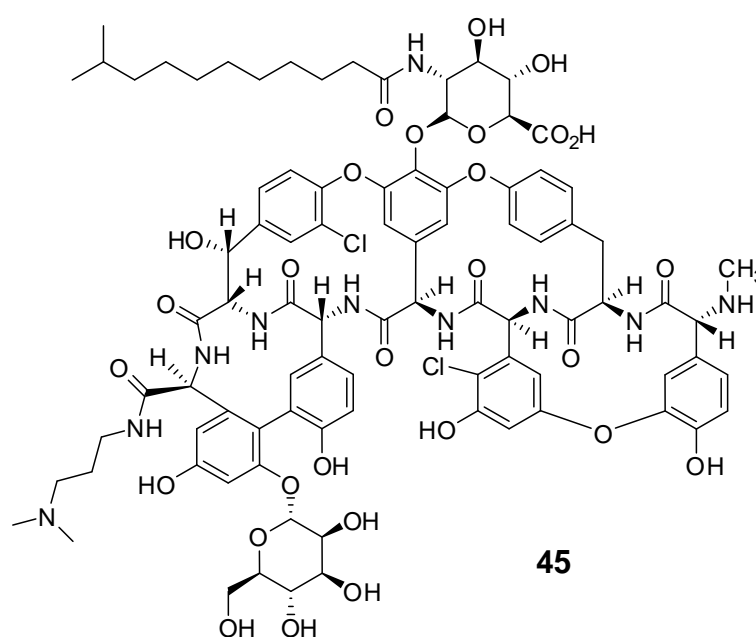
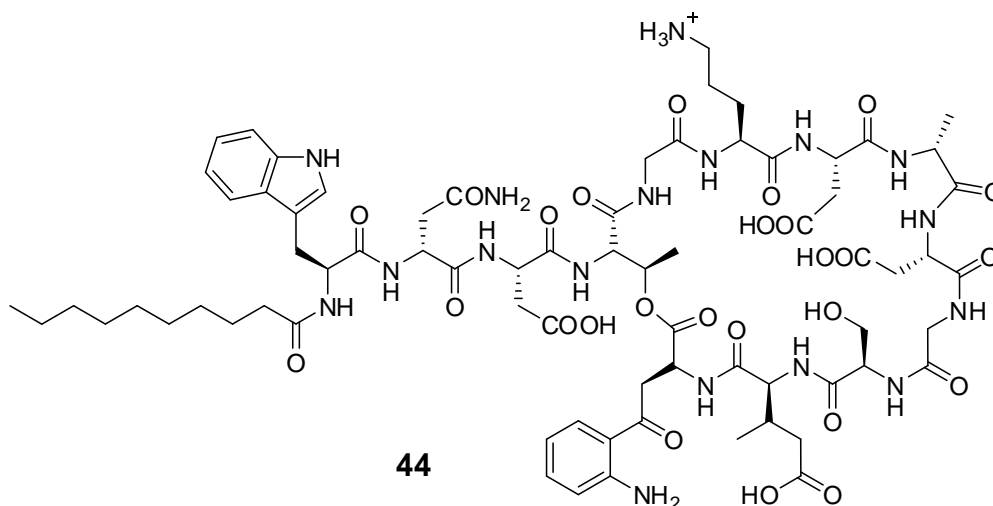


Figura 3.4 - Estrutura dos antibióticos imipenem (derivado β -lactâmico) e eritromicina

A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais foram retomados em algumas indústrias farmacêuticas, levando à aprovação do lipopeptídeo natural daptomicina (**44**) em 2003 (Figura 3.5) (FERNANDES, 2006; GUIMARÃES et al., 2010). O derivado semissintético glicopeptídico dalbavancina (**45**) foi aprovado em 2014 e mais recentemente foi descrita a atividade da teixobactina (**46**) em laboratório (Figura 3.5). Esse composto foi capaz de causar a morte de um grande número de bactérias patogênicas, inclusive as bactérias super-resistentes SARM (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e ERV (*Enterococcus* resistentes à vancomicina) (LING et al., 2015).



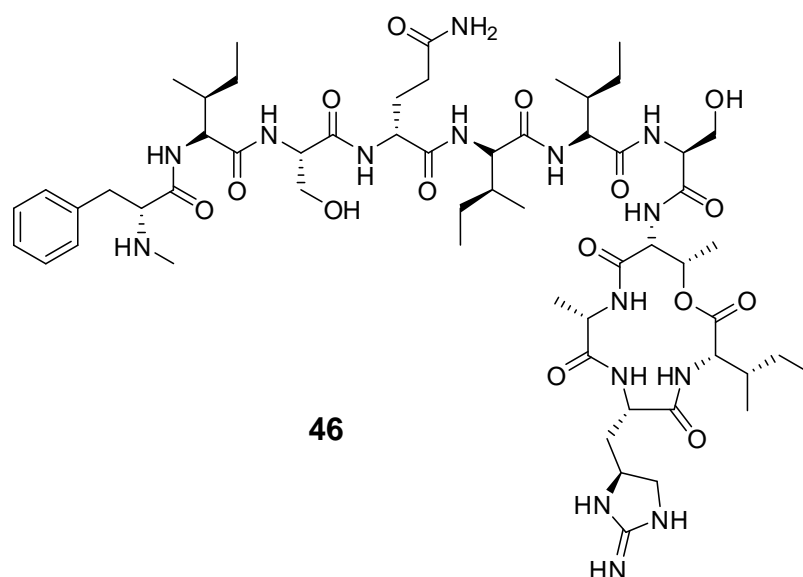


Figura 3.5 - Estrutura dos compostos daptomicina (**44**), dalbavancina (**45**) e teixobactina (**46**).

O desenvolvimento de resistência limita o tempo de vida útil dos antibióticos e resulta na necessidade de uma constante introdução de novos compostos (SPELLBERG e SHLAES, 2014; BUSH et al., 2011). No entanto, a descoberta de medicamentos antimicrobianos é singularmente difícil (PAYNE et al., 2007), principalmente devido à baixa penetração dos compostos nas células bacterianas. Produtos naturais evoluíram para romper as barreiras de penetração das bactérias alvo e a maioria dos antibióticos introduzidos na clínica foram descobertos por triagem de microrganismos (PAYNE et al., 2007).

1.2 Biofilmes bacterianos

A resistência bacteriana é um dos principais desafios na descoberta de drogas hoje, como cada vez mais os patógenos desenvolvem estratégias para escapar das respostas imunes e terapias (BOUCHER et al., 2009; THOMANN et al., 2016).

O biofilme bacteriano pode ser descrito como uma população bacteriana vivendo em uma estrutura organizada, complexa e dinâmica, associada a uma superfície em presença de umidade. Essa população bacteriana é encapsulada em uma matriz de substâncias exopoliméricas, polissacarídeos, proteínas e, em alguns casos, DNA extracelular, que se revelaram importantes para ocultar o patógeno dos mecanismos de defesa do hospedeiro e dos antibióticos, são capazes ainda de

conferir estabilidade, permitir a estruturação e proteção das células bacterianas envolvidas contra raios UV, exposição a ácidos, alvejantes, desidratação e salinidade (DAVIES, 2003; HALL-STOODLEY et al., 2004; ALHEDE et al., 2014; ROMERO et al., 2011; THOMANN et al., 2016).

De uma forma geral, o ciclo de vida de um biofilme pode ser dividido em cinco estágios diferentes (Figura 3.6) (MUSK e HERGENROTHER, 2006; MONTERO et al., 2016).

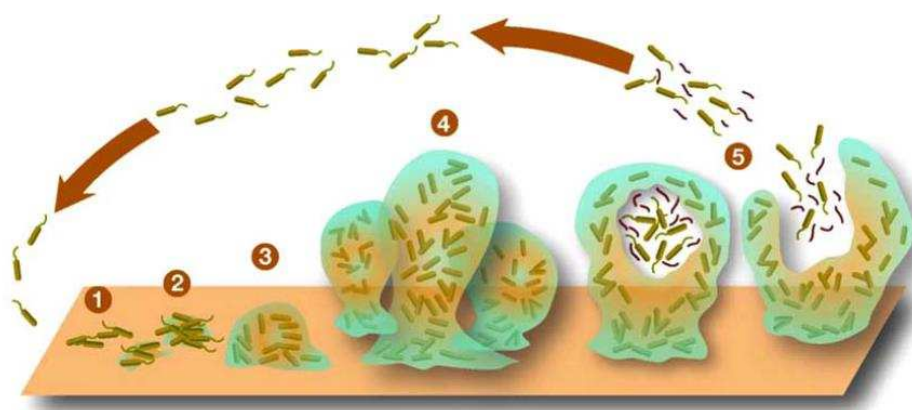


Figura 3.6 - Ciclo de vida do biofilme. 1) Fixação; 2) Secreção de substâncias e adesão irreversível; 3) Crescimento; 4) Maturação; 5) Dispersão (MUSK e HERGENROTHER, 2006).

O primeiro estágio consiste na fixação reversível de bactérias planctônicas a uma superfície. Os inibidores do biofilme que atuam nessa etapa previnem a aderência da bactéria à superfície (RICHARDS e MELANDER, 2009).

No próximo estágio a fixação das bactérias à superfície torna-se irreversível. Inicia-se a secreção da matriz extracelular que vai estruturar o biofilme (RICHARDS e MELANDER, 2009; MONTERO, et al., 2016).

Depois da fixação irreversível e do agrupamento de microcolônias inicia-se a etapa de maturação da comunidade bacteriana, que coincide com a secreção continuada de substâncias exopoliméricas e no recrutamento de bactérias planctônicas para integrarem o biofilme maduro e com a diferenciação metabólica das bactérias aderidas (MUSK e HERGENROTHER, 2006).

Na próxima fase, o biofilme assume uma forma tridimensional. Essa estrutura é resultado da organização otimizada de células a fim de facilitar ao máximo a

difusão de nutrientes e permitir o estabelecimento de uma comunidade microbiana. (MUSK e HERGENROTHER, 2006).

No último estágio ocorre a dispersão do biofilme. Bactérias que compõem a periferia do biofilme, ou ainda indivíduos localizados no interior do mesmo, têm sua diferenciação ao estado flagelar e desligam-se da matriz do biofilme quer individualmente, passando novamente ao estado planctônico, quer sob a forma de agregados, de forma a colonizar um novo ambiente.

O mecanismo de controle da expressão gênica que permite às populações bacterianas monitorar o tamanho da comunidade em que vivem é denominado “Quorum sensing” (QS), regulado por meio da concentração de moléculas sinalizadoras denominadas autoindutores (AIs), que são produzidas e liberadas por cada membro da população e acumulam à medida que o tamanho dessa população aumenta. Quando as moléculas autoindutoras atingem uma concentração limite, os genes controlados pelo QS são ativados ou desativados simultaneamente em todos os membros da comunidade (KELLER e SURETTE, 2006; MONTERO et al., 2016).

Embora o modelo geral de formação de biofilme dê um bom esboço geral que seja aplicável a muitas bactérias formadoras de biofilme, a maioria dos microrganismos produzem fatores de biofilme altamente específicos.

Tanto *S. aureus* quanto *S. epidermidis* produzem poli- β -(1,6)-*N*-acetil-d-glucosamina (PNAG), um exopolissacarídeo de superfície que é referido como adesina intracelular polissacarídica (PIA). PIA/PNAG é um homopolímero linear de *N*-acetilglucosamina com desacetilação parcial. Este polissacarídeo contribui para o acúmulo de células no biofilme e evasão da resposta imune dos patógenos (VUONG et al., 2004; KROPEC et al., 2005; MACK et al., 1996; CRAMTON et al., 1999).

Um grande número de proteínas também contribui para a formação da matriz de biofilme estafilocócica, como a proteína associada à acumulação Aap (CONRADY et al., 2008). A presença de DNA extracelular e de pequenas moléculas intracelulares liberadas está associada à estrutura, fixação e à estabilidade dos biofilmes (BAYLES, 2007; THOMAS et al., 2009; KIRKPATRICK e VIOLLIER, 2010).

Em resposta ao aumento da densidade populacional, *S. aureus* é capaz de reconhecer uma molécula sinal (PIA) envolvida no mecanismo de *quorum sensing*. Essa molécula foi primeiramente descrita como um regulador pleiotrópico de exotoxinas estafilocócicas, proteases e proteínas de superfície (LINDSAY e

FOSTER, 1999; VUONG et al., 2000). Com o aumento do número de células, o sistema de sinalização agr ativa a transcrição de genes envolvidos na produção de toxinas e, ao mesmo tempo, diminui a expressão de genes de proteínas de superfície, inibindo a formação de biofilmes ou liberando as células já aderidas (IWATSUKI et al., 2006).

O sistema agr controla a produção de enzimas que degradam a matriz do biofilme. O proteoma extracelular de agr inclui proteases múltiplas e pequenas toxinas formadoras de poros chamadas modulinas solúveis em fenol (PSMs). Embora o fenótipo das estirpes mutantes agr em biofilmes possa variar dependendo da variação genética e das condições de ensaio, a ativação do sistema agr está geralmente associada à inibição da maturação do biofilme (BOLES e HORSWILL, 2011). O sistema agr é mais ativo em células de *S. aureus* e *S. epidermidis* que foram liberadas do biofilme, fornecendo mais evidências de que a indução de agr resulta na desmontagem do biofilme (YARWOOD et al., 2004; WANG et al., 2011).

As bactérias envolvidas no biofilme podem ser de 10 a 1.000 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos do que a mesma bactéria no estado livre (EVANS e HOLMES, 1987; DAVIES, 2003; RASMUSSEN e GIVSKOV, 2006).

O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos estima que 80% de todas as infecções ocorrendo no corpo humano estão relacionadas a biofilmes (DAVIES, 2003; YAKANDAWALA et al., 2006). Exemplos comuns de patologias relacionadas aos biofilmes microbianos incluem: infecções em cateteres e implantes, cárie dentária, doença gengival, infecção crônica de feridas, além de contaminações de instrumentos médicos, etc (HALL-STOODLEY et al., 2004; STEWART e FRANKLIN, 2008; DAS et al., 2016).

A descoberta e o desenvolvimento de compostos que possam inibir o QS e, conseqüentemente, o biofilme, podem fornecer um tratamento para infecções microbianas com grande potencial não apenas para restaurar a eficácia dos antibióticos, mas também para permitir que o sistema imunológico humano elimine a infecção. Diferente dos antibióticos, os inibidores do QS não matam os patógenos, assim, a perturbação do QS é uma nova abordagem, que demonstrou diminuir a patogenicidade *in vivo* com um baixo potencial de pressão de seleção e, conseqüentemente, menor probabilidade de desenvolvimento de resistência pelas

bactérias (GERDT e BLACKWELL, 2014; PAN e REN, 2009; HENTZER e GIVSKOV, 2003).

Devido ao pequeno número de moléculas conhecidas que inibem a formação de biofilmes bacterianos, vários trabalhos têm buscado novos compostos com atividade antibiofilme (WORTHINGTON et al., 2012).

No trabalho de SAMBANTHAMOORTHY et al. (2011), aproximadamente 66.000 compostos, incluindo produtos naturais e sintéticos, foram avaliados quanto à capacidade de inibir o biofilme de diferentes espécies de bactérias, o que levou à descoberta do benzimidazol **47** (Figura 3.7) denominado de ABC-1.

Esse composto foi capaz de prevenir a formação do biofilme bacteriano de várias bactérias patogênicas, sem afetar o crescimento das mesmas. O valor de IC₅₀ (concentração necessária para inibir a formação do biofilme em 50%) desse composto para *Pseudomonas aeruginosa* foi 45,9 nM.

As furanonas halogenadas naturais também se destacam quanto a inibição do biofilme. Os fimbrolídeos **48-51** (Figura 3.7), foram isolados da alga vermelha *Delisea pulchra* e apresentaram atividade inibitória contra a formação de biofilme em *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (GIVSKOV et al., 1996; REN et al., 2001; REN et al., 2002). Atividade semelhante foi encontrada para a furanona sintética **52**, que é capaz de inibir a formação de biofilme da *E. coli* em 80% na concentração de 141 μM (HAN et al., 2008).

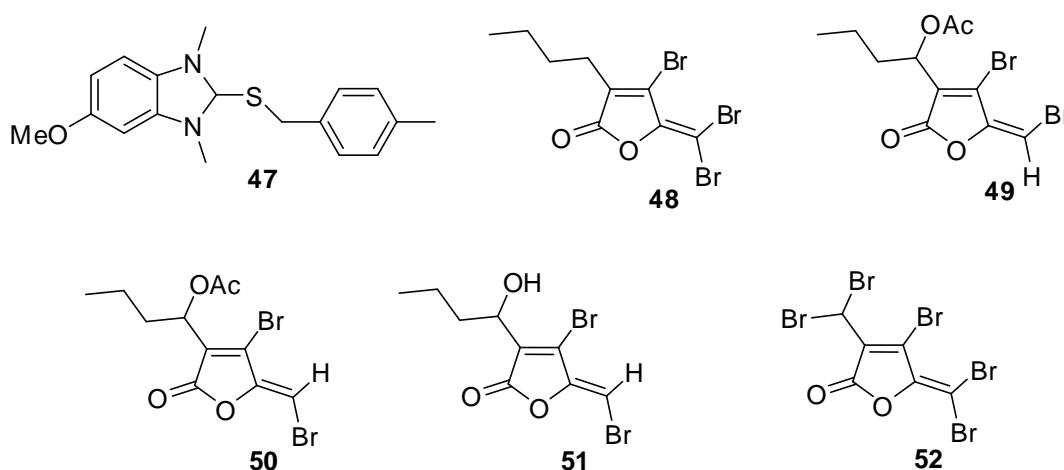


Figura 3.7 - Estruturas do benzimidazol ABC-1 (**47**) furanonas halogenadas isoladas de *Delisea pulchra* (**48-51**) e furanona sintética (**52**).

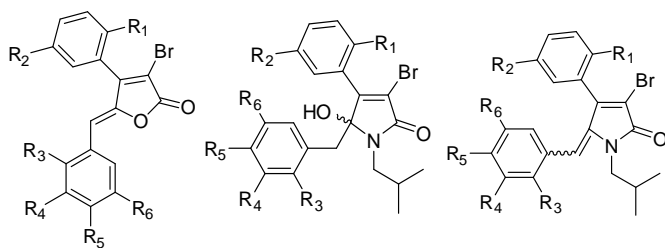
Visto que algumas furanonas halogenadas naturais e sintéticas são capazes de inibir a formação de biofilme bacteriano de diversos microrganismos patogênicos e considerando a similaridade estrutural entre essas lactonas halogenadas e os rubrolídeos, avaliou-se o potencial de inibição do crescimento bacteriano e da formação de biofilme das 4-aryl-5-benzilideno-3-bromofuran-2(5*H*)-onas análogas aos rubrolídeos (**32a-m**) e de seus derivados γ -hidroxi- γ -lactamas (**33a-m**) e γ -alquilideno- γ -lactamas (**34a-m**), sintetizados nesse estudo.

2 Material e Métodos

2.1 Procedimentos sintéticos

Os compostos **32a-m**, **33a-m** e **34a-m** (Tabela 3.1) foram preparados, conforme detalhado no capítulo 1, e submetidos a ensaios para avaliação do potencial de inibição do crescimento bacteriano e da formação de biofilme no Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários da Universidade Federal de Santa Catarina pela professora colaboradora Andrea de Lima Pimenta.

Tabela 3.1- Estrutura dos compostos **32a-m**, **33a-m** e **34a-m**.



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	γ -Alquilideno- γ -lactonas	γ -Hidroxi- γ -lactamas	γ -Alquilideno- γ -lactamas (Z:E)
H	H	H	O-CH ₂ -O	H	H	32a	33a	34*a (1:0,26)
H	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	32b	33b	34*b (1:0,85)
H	H	Cl	H	F	H	32c	33c	34*c (1:0,87)
H	H	Cl	H	H	H	32d	33d	34*d (1:0,64)
H	H	H	Cl	H	H	32e	33e	34*e (1:0,72)
H	H	H	H	Cl	H	32f	33f	34*f (1:0,68)
OCH ₃	H	H	Br	OCH ₃	H	32g	33g	34*g (1:1,94)
OCH ₃	H	Cl	H	F	H	32h	33h	34*h (1:0,30)
OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	32i	33i	34*i (1:0,85)
OCH ₃	H	Br	H	H	H	32j	33j	34*j (1:0,23)
OCH ₃	Cl	H	Br	OCH ₃	H	32k	33k	34*k (1:1,09)
OCH ₃	Cl	OCH ₃	H	H	OCH ₃	32l	33l	34*l (1:0,72)
OCH ₃	Br	OCH ₃	H	H	OCH ₃	32m	33m	34*m (1:0,9)

* Mistura entre os isômeros (*E*) e (*Z*)- γ -alquilidenopirrol-2(5*H*)-onas

2.2 Preparo de soluções utilizadas no ensaio biológico

As soluções aquosas de DMSO e sacarose foram preparadas em água destilada e autoclavadas a 120 °C por 20 minutos antes de serem adicionadas ao meio de cultura. Os compostos a serem testados foram solubilizados em DMSO 100% e posteriormente diluídos em meio Tryptic Soy Broth (TSB) na concentração inicial de 87,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizada para realização dos testes de inibição do crescimento bacteriano e inibição da formação de biofilme. A concentração de DMSO em todos os ensaios foi mantida constante a 3,5% (v/v).

2.3 Material biológico e meio de cultura

As linhagens bacterianas foram cultivadas em TSB (Tryptic Soy Broth, Acumedia) e, durante os ensaios, quando necessário, foi acrescentado ao meio sacarose (4% m/v) e DMSO (3,5% v/v). Resultados prévios mostraram que nessa concentração o DMSO não interfere no crescimento bacteriano e na formação do biofilme (PIMENTA et al., 2003).

As bactérias utilizadas nesse estudo foram a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35547).

2.4 Ensaio de inibição do crescimento bacteriano e da formação de biofilme

As cepas-teste foram cultivadas por 24 h em meio TSB a 37 °C sem a gitação e após as primeiras 8 h de incubação foram plaqueadas em meio ágar-sangue para verificação da pureza. As culturas puras foram diluídas a 10^8 UFC mL^{-1} e 100 μL destas suspensões foram depositadas nos poços das microplacas de poliestireno. Em seguida foram adicionados ao primeiro poço de cada série 100 μL de solução de cada composto a ser testado, resultando em uma concentração inicial de 87,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e realizadas diluições sucessivas, em razão de 2 para o preparo das soluções a 43,8, 21,9, 10,9, 5,5, 2,73, 1,37, 0,68, 0,34 e 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ destes compostos (**32a-m**, **33a-m**, **(Z)34a-m** e **34a-m**). O experimento controle foi realizado da mesma forma, mas sem a presença de algum composto. As microplacas foram então incubadas em câmara úmida a 37 °C pelo tempo necessário à formação do biofilme de cada

linhagem. Ao final da incubação, o crescimento bacteriano foi quantificado por densidade óptica através da absorbância a 630 nm usando um leitor de microplacas para avaliar os efeitos dos compostos testados sobre o crescimento bacteriano (PIMENTA et al., 2003; PEREIRA et al., 2014a, 2014b).

Após avaliação da inibição do crescimento bacteriano, as suspensões bacterianas presentes nos poços das microplacas de poliestireno foram descartadas e os poços foram repetidamente lavados com água destilada a fim de eliminar as bactérias não aderidas. Em seguida, as bactérias aderidas (biofilme) foram coradas com 120 μL de uma solução de cristal violeta 0,1% (m/v). Após lavagens sucessivas com água para retirada do excesso de corante, solubilizou-se o cristal violeta fixado nas bactérias com uma solução 1% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) para permitir a quantificação da coloração pelo leitor de microplacas a 595 nm. Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram calculados em relação ao tratamento controle no programa Oringín[®] 8.0 e os valores de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do crescimento bacteriano) foram determinados (PIMENTA et al., 2003; PEREIRA et al., 2014a, 2014b).

3 Resultados e Discussão

3.1 Efeito dos compostos sobre o crescimento planctônico

O efeito dos compostos **32a-m**, **33a-m**, **(Z)34a-m** e das misturas de isômeros (*Z*) e (*E*) **34a-m** (Tabela 3.1), sobre o crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis* foi avaliado. Essa análise é importante também para estabelecer se eventuais efeitos na formação do biofilme ocorreram especificamente devido à inibição da aderência bacteriana ou se poderia ser atribuído a um efeito dos compostos sobre a sua viabilidade. Para isso, o crescimento bacteriano foi quantificado na presença de cada composto nas concentrações de 87,5, 43,8, 21,8, 10,9, 5,5, 2,7, 1,4, 0,68, 0,34 e 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pela medida da densidade óptica por absorvância a 630 nm usando um leitor de microplacas (PIMENTA et al., 2003; PEREIRA et al., 2014a, 2014b). Os valores de porcentagem de inibição do crescimento planctônico para *S. aureus* e *S. epidermidis* são apresentados nas Tabelas A 1 e A 2 (APÊNDICE).

Os resultados obtidos mostram que, de uma forma geral, os compostos demonstraram eficiência na inibição do crescimento bacteriano. Na maior concentração testada (87,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) todos os compostos inibiram o crescimento bacteriano de *S. aureus*, apresentando valores de porcentagem de inibição que variaram de 35,4% a 92,6%. Na concentração de 43,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ as porcentagens de inibição foram baixas, no entanto, apenas **33h** e **33k** não causaram inibição do crescimento bacteriano.

Os compostos também demonstraram a capacidade de inibir o crescimento planctônico de *S. epidermidis*. Na concentração de 87,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, todos os compostos testados inibiram o crescimento bacteriano, apresentando valores de porcentagem de inibição que variaram de 10,0% a 91,4%.

A avaliação da influência dos compostos sintetizados sobre o crescimento planctônico dos microrganismos testados demonstrou que os compostos são capazes de inibir o crescimento planctônico em várias concentrações. Foram então calculados os valores de IC_{50} para os compostos testados sobre o crescimento bacteriano de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Todos os valores de IC_{50} calculados foram obtidos a partir de um desenho experimental em triplicata, curvas sigmoidais dose-resposta $\log[\text{composto}]$ versus

percentagem de inibição do crescimento foram inicialmente construídas para o cálculo dos valores de IC₅₀, como ilustrado para o composto **(Z)34b** (Figura 3.8).

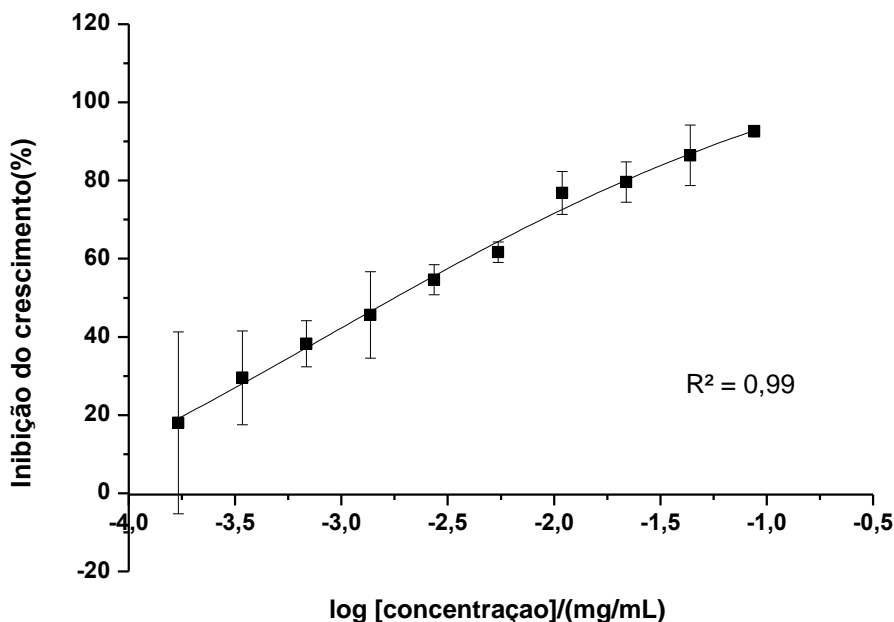


Figura 3.8 - Curva sigmoide correspondente a inibição do crescimento de *S. aureus* pelo composto **(Z)34b**.

Entretanto, para alguns compostos, esses valores não puderam ser obtidos, já que não houve uma correlação direta entre a inibição do crescimento e as concentrações dos compostos testados, indicando que o efeito observado não foi dependente da dose utilizada. Além disso, em alguns casos o valor de IC₅₀ calculado é superior à maior concentração testada. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabela 3.2 para *S. aureus* e Tabela 3.3 para *S. epidermidis*.

Tabela 3.2 - Concentração dos compostos **32a-m**, **33a-m**, (*Z*) e (*E*) **34a-m** e (*Z*)**34a-m** capazes de inibir em 50% (IC₅₀) o crescimento bacteriano de *S. aureus*.

Composto	IC ₅₀ μg mL ⁻¹ (μM)	Composto	IC ₅₀ μg mL ⁻¹ (μM)	Composto	IC ₅₀ μg mL ⁻¹ (μM)	Composto	IC ₅₀ μg mL ⁻¹ (μM)
32a	>87,5	33a	-	34*a	46,4 ± 16,2 (108,7)	(Z)34a	5,6 ± 1,4 (13,2)
32b	71,6 ± 5,3 (185,0)	33b	78,5 ± 4,0 (170,6)	34*b	59,4 ± 12,8 (134,4)	(Z)34b	1,8 ± 0,8 (4,0)
32c	69,9 ± 6,9 (184,0)	33c	80,0 ± 11,5 (176,6)	34*c	57,4 ± 3,9 (132,1)	(Z)34c	34,0 ± 4,2 (78,2)
32d	69,0 ± 4,4 (190,7)	33d	>87,5	34*d	78,2 ± 7,4 (187,8)	(Z)34d	44,3 ± 3,1 (106,3)
32e	82,1 ± 8,1 (227,2)	33e	80,3 ± 14,4 (184,7)	34*e	57,6 ± 3,8 (138,3)	(Z)34e	58,0 ± 5,9 (139,3)
32f	41,4 ± 3,4 (114,4)	33f	85,7 ± 8,4 (197,2)	34*f	41,4 ± 5,5 (99,3)	(Z)34f	68,4 ± 7,2 (164,1)
32g	63,1 ± 4,1 (135,3)	33g	>87,5	34*g	49,1 ± 3,9 (94,1)	(Z)34g	53,8 ± 9,9 (103,1)
32h	60,7 ± 5,2 (148,1)	33h	>87,5	34*h	50,0 ± 2,2 (107,6)	(Z)34h	71,4 ± 3,8 (153,7)
32i	>87,5	33i	83,8 ± 3,2 (171,0)	34*i	67,9 ± 6,2 (143,8)	(Z)34i	60,0 ± 5,0 (127,1)
32j	>87,5	33j	78,6 ± 6,6 (154,4)	34*j	84,4 ± 11,0 (171,9)	(Z)34j	66,7 ± 7,5 (135,8)
32k	-	33k	80,4 ± 7,1 (140,2)	34*k	48,7 ± 1,9 (87,6)	(Z)34k	64,9 ± 1,3 (116,8)
32l	-	33l	18,9 ± 0,2 (36,0)	34*l	70,7 ± 8,1 (139,6)	(Z)34l	>87,5
32m	13,8 ± 2,5 (27,8)	33m	55,9 ± 6,8 (98,2)	34*m	45,8 ± 7,5 (83,1)	(Z)34m	76,7 ± 6,6 (139,2)

* Mistura entre os isômeros (*Z*) e (*E*)-γ-alquilideno-γ-lactamas

Tabela 3.3 - Concentração dos compostos **32a-m**, **33a-m**, (*Z*) e (*E*) **34a-m** capazes de inibir em 50% (IC₅₀) o crescimento bacteriano de *S. epidermidis*.

Composto	IC ₅₀ μg mL ⁻¹ (μM)	Composto	IC ₅₀ μg mL ⁻¹ (μM)	Composto	IC ₅₀ μg mL ⁻¹ (μM)
32a	80,7 ± 15,1 (217,4)	33a	55,0 ± 8,6 (123,7)	34*a	21,4 ± 1,8 (50,1)
32b	63,3 ± 3,8 (163,4)	33b	25,4 ± 6,5 (55,2)	34*b	6,0 ± 1,1 (13,6)
32c	-	33c	86,4 ± 0,3 (190,8)	34*c	54,1 ± 4,7 (124,5)
32d	47,4 ± 4,3 (131,2)	33d	58,9 ± 7,6 (135,5)	34*d	72,0 ± 7,6 (172,8)
32e	79,8 ± 13,9 (220,6)	33e	68,5 ± 3,4 (157,7)	34*e	80,5 ± 10,8 (193,2)
32f	>87,5	33f	79,1 ± 12,5 (181,9)	34*f	79,3 ± 0,6 (190,3)
32g	54,4 ± 2,9 (116,7)	33g	-	34*g	-
32h	69,9 ± 11,0 (170,6)	33h	54,0 ± 1,3 (111,9)	34*h	48,9 ± 1,9 (105,3)
32i	82,4 ± 7,2 (197,4)	33i	>87,5	34*i	81,2 ± 12,1 (172,0)
32j	87,5 ± 4,4 (200,7)	33j	84,8 ± 1,7 (166,6)	34*j	>87,5
32k	64,9 ± 9,7 (129,7)	33k	-	34*k	43,9 ± 3,0 (79,0)
32l	43,4 ± 6,0 (96,0)	33l	>87,5	34*l	46,5 ± 0,7 (91,8)
32m	76,3 ± 3,0 (153,8)	33m	53,3 ± 9,1 (93,7)	34*m	32,1 ± 5,9 (58,2)

* Mistura entre os isômeros (*Z*) e (*E*)- γ -alquilideno- γ -lactamas

Os valores apresentados nas Tabela 3.2 e Tabela 3.3 indicam claramente que, embora todos os compostos fossem ativos sobre o crescimento planctônico, a maior parte deles apresentou baixa atividade contra a viabilidade bacteriana. Para *S. aureus*, entre todos os 52 compostos, apenas **(Z)34a** e **(Z)34b** inibiram fortemente o crescimento bacteriano ($IC_{50} = 5,6$ e $1,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) com a maioria dos compostos remanescentes apresentando IC_{50} maior que $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e **32m** e **33l** apresentando atividades moderadas ($IC_{50} = 13,8$ e $18,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

De modo semelhante, para *S. epidermidis* a maioria dos compostos apresentaram pouco efeito sobre o crescimento planctônico, com a maior parte deles apresentando IC_{50} maior que $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. A mistura de isômeros *E* e **Z 34b** foi a única a exibir elevada atividade sobre a viabilidade bacteriana ($IC_{50} 6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto a mistura **34a** inibiu o crescimento planctônico moderadamente ($IC_{50} 21,4 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para os compostos **(Z)34a-m**, não foi possível calcular os valores de IC_{50} , uma vez que todos os compostos causaram menos de 50% de inibição do crescimento planctônico mesmo na maior concentração testada.

Todos esses resultados estão de acordo com os relatos anteriores, que demonstraram o baixo efeito inibitório dos análogos rubrolídeos e suas lactamas derivadas sobre o crescimento planctônico bacteriano (PEREIRA et al. 2014a, 2014b). Apesar desta tendência geral, a comparação entre os valores de IC_{50} obtidos para os compostos **32-34** e os valores relatados por Sikorska et al. (2012) (Tabela 3.4) deixa claro que vários dos compostos sintéticos aqui descritos são mais eficientes contra as mesmas espécies de bactérias do que vários rubrolídeos naturais.

Tabela 3.4 - Atividade dos rubrolídeos naturais sobre a inibição do crescimento bacteriano.

Rubrolídeo	<i>S. aureus</i> IC_{50} (μM)	<i>S. epidermidis</i> IC_{50} (μM)
Rubrolídeo E (5)	105	21
Rubrolídeo F (6)	1006	79
3''-bromorubrolídeo F (18)	256	98
3'-bromorubrolídeo E (19)	82	38
3'-bromorubrolídeo F (20)	360	42
3',3''-dibromorubrolídeo E (21)	89	28

Para *S. aureus*, os rubrolídeos naturais apresentaram valores de IC₅₀ que variaram de 82 a 1006 μM , sendo que pelo menos 5 compostos sintéticos foram mais ativos do que o 3'-bromorubrolídeo E (**19**), que foi o composto natural mais eficiente (82 μM) na inibição do crescimento de *S. aureus*, destacando-se os compostos (**Z**)**34a** e (**Z**)**34b** com valores de IC₅₀ iguais a 13,2 e 4,0 μM , respectivamente. Quando os compostos são comparados para *S. epidermidis* o melhor valor de IC₅₀ obtido aqui foi 13,6 μM , referente a mistura de isômero *E* e *Z* **34b**, enquanto o valor relatado para o composto natural mais ativo foi de 21 μM para o rubrolídeo E (**21**).

3.2 Inibição da formação do biofilme bacteriano

Baseado no fato de que a maioria dos compostos apresentaram pouco efeito no crescimento planctônico de *S. aureus* e *S. epidermidis*, realizaram-se ensaios para avaliação da inibição de biofilme para as γ -alquilideno- γ -lactonas (**32a-m**), γ -hidroxi- γ -lactamas (**33a-m**), (*Z*)- γ -alquilideno- γ -lactamas ((**Z**)**34a-m**) e para as misturas entre os isômeros (*Z*) e (*E*)- γ -alquilideno- γ -lactamas (**34a-m**).

Os valores de porcentagem de inibição da formação de biofilme nas concentrações 87,5, 43,8, 21,8, 10,9, 5,5, 2,7, 1,4, 0,68, 0,34 e 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os compostos testados são apresentados nas Tabelas A 3 e A 4 (APÊNDICE).

Os resultados mostraram que, para ambas as bactérias testadas, o efeito observado na inibição do biofilme não foi dependente da concentração, impedindo assim cálculos dos valores de IC₅₀ para a maioria dos compostos.

Como a atividade desses compostos não foi estudada completamente, considerando seus efeitos sobre as bactérias em estudo, não foi demonstrado se, além de afetar a formação do biofilme, eles também interferem em outros caminhos metabólicos. Então, tem-se a hipótese de que a falta de correlação direta dose resposta da inibição do biofilme obtida para vários compostos pode ser devido a diferentes atividades desses compostos sobre esses microrganismos e que poderiam indiretamente afetar a formação desses biofilmes. Tal comportamento também foi observado em um estudo anterior (PEREIRA et al. 2014a) o que levou para fins comparativos, a apresentar o efeito de inibição de biofilme de todos os compostos na concentração de 44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3.9 e Figura 3.10).

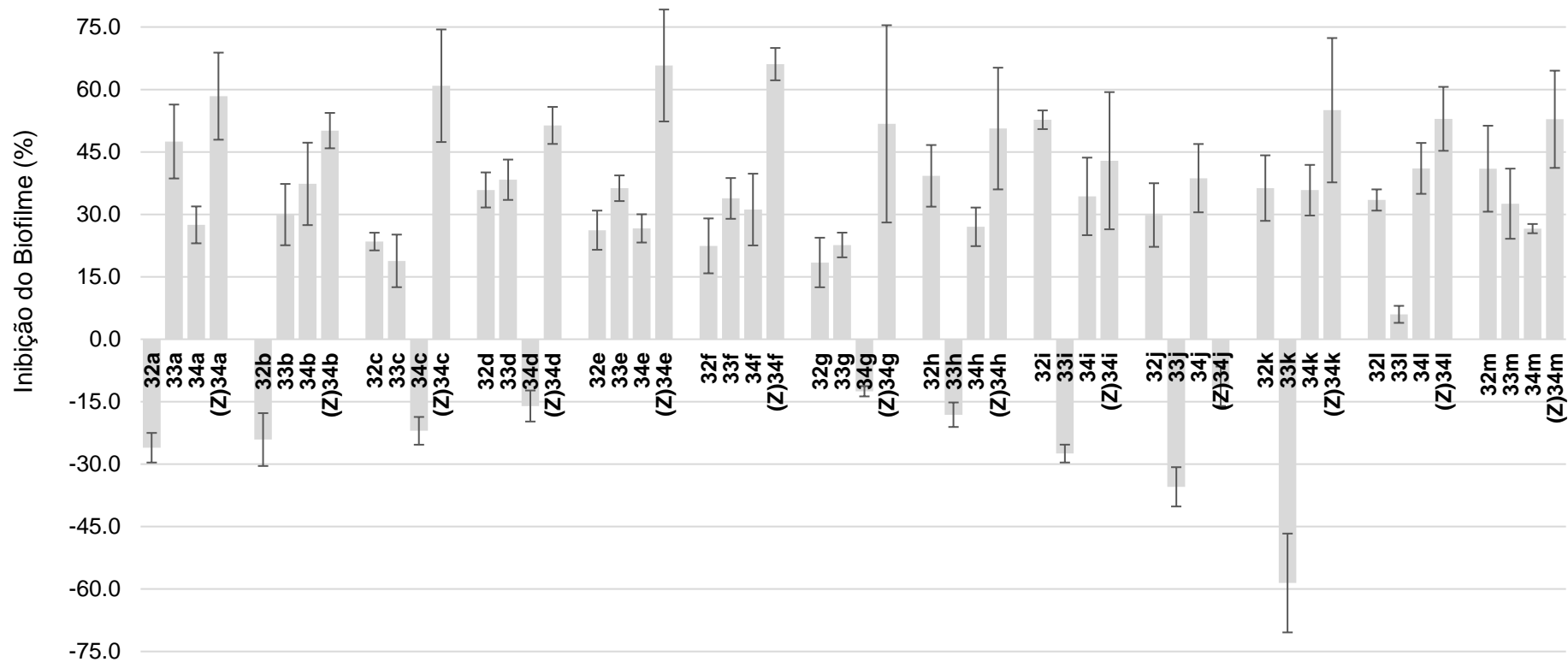


Figura 3.9 - Efeito dos compostos **32a-m**, **33a-m**, **34a-m** e **(Z)34a-m** a $44 \mu\text{g mL}^{-1}$ sobre a formação do biofilme de *S. aureus* (ATCC 25923)

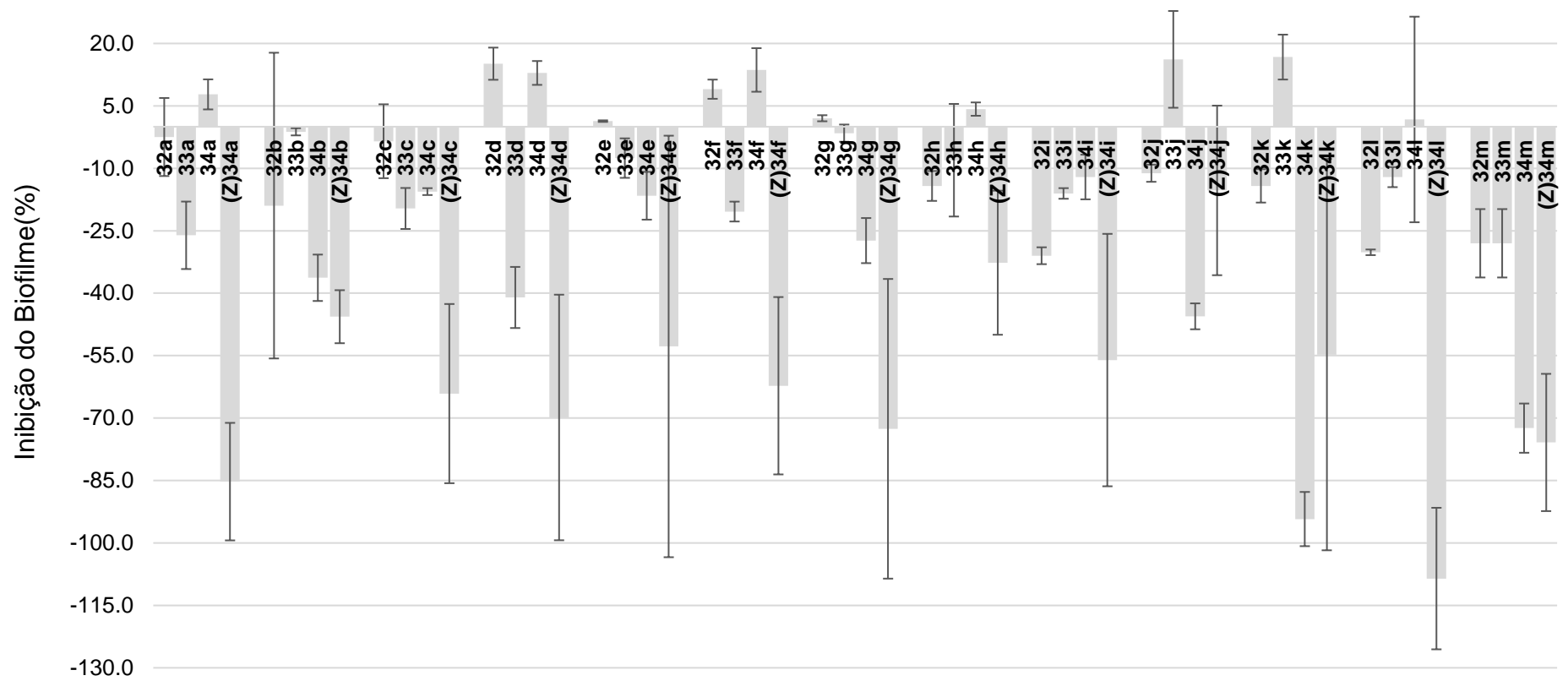


Figura 3.10 - Efeito dos compostos 32a-m, 33a-m, 34a-m e (Z)34a-m a 44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre a formação do biofilme de *S. epidermidis* (ATCC 35547)

Os dados apresentados nas Figura 3.9 e Figura 3.10 indicam que vários compostos foram ativos sobre a formação de biofilme de *S. aureus* a $44,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, mas, exceto para os compostos **(Z)34a-m**, na maioria dos casos o efeito de inibição foi inferior a 50%. O IC_{50} calculado para os compostos **(Z)34a-m** está apresentado na Tabela 3.5. Quando testado contra *S. epidermidis*, nenhum dos compostos foi capaz de inibir efetivamente a formação de biofilme. Por outro lado, é interessante notar que alguns compostos, em vez de inibir, induziram a formação de biofilmes, especialmente os da série **(Z)34a-m**, onde o composto **(Z)34i** levou a um aumento de 109% na formação de biofilme, seguido por **(Z)34a** e **(Z)34m** que induz a formação de biofilme em 85% e 76%, respectivamente.

Tabela 3.5 - Valores de IC_{50} para a inibição da formação de biofilme de *S. aureus* (ATCC 25923) apresentados pelos compostos **(Z)34a-h**.

Composto	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$
(Z)34a	$6,3 \pm 0,7$
(Z)34b	$57,7 \pm 5,1$
(Z)34c	$3,3 \pm 1,4$
(Z)34d	$12,8 \pm 0,04$
(Z)34e	$0,9 \pm 0,5$
(Z)34f	$1,3 \pm 1,4$
(Z)34g	$10,5 \pm 0,9$
(Z)34h	$17,2 \pm 1,1$
(Z)34i	-
(Z)34j	$>87,5$
(Z)34k	$22,4 \pm 0,8$
(Z)34l	$10,0 \pm 2,3$
(Z)34m	$29,2 \pm 1,7$

Vale ressaltar que, em relação à inibição do biofilme de *S. aureus*, sete compostos apresentaram IC_{50} menor que $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando uma atividade significativa sobre a formação de biofilmes. Os dois compostos mais ativos, **(Z)34e** e **(Z)34f**, têm um átomo de cloro nas posições *meta* e *para*, respectivamente. O análogo **(Z)34d** que possui um cloro na posição *orto* foi menos ativo, entretanto, a inclusão de

um átomo de flúor na posição *para* do composto **(Z)34c** levou a uma melhoria na atividade para um valor de IC₅₀ menor que 5 µg mL⁻¹.

No trabalho de Pereira et al. (2014a), nenhum dos isômeros *Z* estava entre os compostos mais ativos sobre os biofilmes de *S. aureus* e *S. epidermidis*, sendo que os três compostos mais ativos (Figura 1.6, Cap. 1) correspondiam a duas γ -hidroxi- γ -lactamas (**2c**, **2f**) e uma *E*-alquilideno- γ -lactamas (**4a**). O composto mais potente contra *S. aureus* foi uma γ -hidroxi- γ -lactama que apresentou IC₅₀ de 3,7 µg mL⁻¹ (**2f**), quatro vezes menos potente que o composto **(Z)34e** apresentado aqui. O mais potente sobre *S. epidermidis* foi uma *E*-alquilideno- γ -lactama com IC₅₀ = 12,2 µg mL⁻¹ (**4a**).

4 Conclusões

Os resultados aqui relatados para ensaios de inibição do crescimento bacteriano de *S. aureus* e *S. epidermidis* pelos análogos dos rubrolídeos γ -alquilideno- γ -lactonas e seus derivados γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas representam um avanço adicional nesta área, uma vez que foram descritos novos compostos que são mais ativos do que os da mesma classe anteriormente relatados, sendo que alguns compostos demonstraram ser mais eficientes do que rubrolídeos naturais.

Demonstrou-se ainda que a substituição no anel de benzilideno pode afetar a potência da atividade dos compostos e que a substituição no anel *p*-fenil não é um requisito para a atividade. Também, contrariamente aos relatos anteriores, verificou-se que o isômero *Z*, mais estável, é mais ativo do que a mistura de isômeros *E-Z* sobre a inibição do biofilme. No presente caso, não foi possível obter amostras puras de isômeros *E* para a avaliação biológica devido à dificuldades no processo de isolamento e também devido à sua isomerização espontânea à forma *Z*. Porém, considerando as atividades biológicas observadas para as misturas isoméricas **34a-m**, espera-se que os isômeros *E* sejam menos ativos em comparação com os isômeros *Z* correspondentes.

Três dos compostos mais ativos aqui avaliados apresentaram valores de IC₅₀ inferiores a 3 micromolar, estando entre os compostos mais ativos até agora relatados contra os microrganismos estudados. Outras modificações estruturais podem ainda conduzir à produção de compostos mais potentes.

5 Referências bibliográficas

ALHEDE, M.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; ALHEDE, M. Chapter one - *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. **Adv. Appl. Microbiol.** v. 86, p. 1-40, 2014.

BAYLES, K. W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature Rev. Microbiol.**, v.5, p. 721-726, 2007.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal biofilm disassembly. **Trends Microbiol.**, v. 19, p. 449-55, 2011.

BOUCHER, H. W.; TALBOT, G. H.; BRADLEY, J. S.; EDWARDS, J. E.; GILBERT, D.; RICE, L.B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, No drugs: No ESCAPE! An update from the infectious diseases society of américa. **Clin. Infect. Dis.** v. 48, p. 1-12, 2009.

BUSH, K.; COURVALIN, P.; DANTAS, G.; DAVIES, J.; EISENSTEIN, B.; HUOVINEN, P.; JACOBY, G. A.; KISHONY, R.; KREISWIRTH, B. N.; KUTTER, E.; LERNER, S. A.; LEVY, S.; LEWIS, K.; LOMOVSKAYA, O.; MILLER, J. H.; MOBASHERY, S.; PIDDOCK, L. J.; PROJAN, S.; THOMAS, C. M.; TOMASZ, A.; TULKENS, P. M.; WALSH, T. R.; WATSON, J. D.; WITKOWSKI, J.; WITTE, W.; WRIGHT, G.; YE, P.; ZGURSKAYA, H. I. Tackling antibiotic resistance. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 9, p. 894-896, 2011.

CONRADY, D. G.; BRESCIA, C. C.; HORII, K.; WEISS, A. A.; HASSETT, D. J.; HERR, A. B. A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biofilms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 105, p. 19456-19461, 2008.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F.; NICHOLS, W. W.; GOTZ, F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5427-5433, 1999.

DAS, M. C.; PAUL, S.; GUPTA, P.; TRIBEDI, P.; SARKAR, S.; MANNA, D.; BHATTACHARJEE S. 3-Amino-4-aminoximidofurazan derivatives: small molecules possessing antimicrobial and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **J. appl. Microbiol.** v. 120, p. 842-859, 2016.

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

EVANS, R. C.; HOLMES, C. J. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. **Antimicrob. Agents. Chemother.** v. 31, p. 889-894, 1987.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development - the failure of success? **Nat. Biotechnol.** v. 24, p. 1497-1503, 2006.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **Br. J. Exp. Pathol.** v. 10, p. 226-236, 1929.

GERDT, J. P.; BLACKWELL, H. E. Competition studies confirm two major barriers that can preclude the spread of resistance to quorum-sensing inhibitors in bacteria. **ACS Chem. Biol.** v. 9, p. 2291-2299, 2014.

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

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para descoberta de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, No. 3, p. 667-679, 2010.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HAN, Y.; HOU, S.; SIMON, K. A.; REN, D.; LUK, Y-Y. Identifying the important structural elements of brominated furanones for inhibiting biofilm formation by *Escherichia coli*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, p. 1006-1010, 2008.

HENTZER, M.; GIVSKOV, M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 1300-1307, 2003.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **J. Dermatol. Sci.**, v. 42, p. 203-214, 2006.

KELLER, L.; SURETTE, M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 4, p. 249-258, 2006.

KIRKPATRICK, C. L.; VIOLLIER, P. H. Cell dispersal in biofilms: an extracellular DNA masks nature's strongest glue. **Mol. Microbiol.**, v. 77, p.801-804, 2010.

KROPEC, A; MAIRA-LITRAN, T; JEFFERSON, K. K; GROUT, M; CRAMTON, S. E; GÖTZ, F; GOLDMANN, D. A; PIER, G. B. Poly-N-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 6868-6876, 2005.

LINDSAY, J. A.; FOSTER, S. J. Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 262, p. 323-331, 1999.

LING, L. L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A. J.; SPOERING, A. L.; ENGELS, I.; CONLON, B. P.; MUELLER, A.; SCHABERLE, T. F.; HUGHES, D. E.; EPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDES, L.; STEADMAN, V. A.; COHEN, D. R.; FELIX, C. R.;

FETTERMAN, K. A.; MILLETT, W. P.; NITTI, A. G.; ZULLO, A. M.; CHEN, C.; LEWIS, K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, p. 455-459, 2015.

MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A.; LEOPOLD, K.; HARTMANN, R.; EGGE, H.; LAUFS, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **J. Bacteriol.** v. 178 p. 175-183, 1996.

MONTERO, J. F. D.; BARBOSA, L. C. A.; PEREIRA, U. A.; BARRA, G. M.; FREDEL, M. C.; BENFATTI, C. A. M.; MAGINI, R. S.; PIMENTA, A. L. Chemical, microscopic, and microbiological analysis of a functionalized poly-ether-ether-ketone-embedding antibiofilm compounds. **J. Biomed. Mater. Res. A.** v. 104, p. 3015-3020, 2016.

MUSK, D. J.; HERGENROTHER, P. J. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. **Curr. Med. Chem.**, v. 13, p. 2163-2177, 2006.

NICOLAOU, K. C.; MONTAGNON, T.; Molecules that changed the world, Wiley-VCH: Weinheim, 2008, cap. 13.

PAN, J.; REN, D. Quorum sensing inhibitors: a patent overview. **Expert Opin. Ther. Pat.**, v. 19, p. 1-21, 2009.

PATRICK, G. L.; An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press: New York, 2005, cap.16; Patrick, G. L.; An introduction to medicinal chemistry, Oxford University Press: New York, 1995, cap. 10.

PAYNE, D. J.; GWYNN, M. N.; HOLMES, D. J.; POMPLIANO, D. L.; Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature Rev. Drug Discov.** v. 6, p. 29-40, 2007.

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

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

PIMENTA, A. L.; MARTINO, P.; BOUDER, E.; HULEN, C.; BLINGHT, M. A. In vitro identification of two adherence factors required for in vivo virulence of *Pseudomonas fluorescens*. **Microbes Infect.** v. 5, p. 1177-1187, 2003.

PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here. **Clin. Microbiol. Infec.** v. 10, p. 18-22, 2004.

RASMUSSEN, T. B.; GIVSKOV, M. Quorum-sensing inhibitors as antipathogenic drugs. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 296, p. 149-161, 2006.

REN, D.; SIMS, J. J.; WOOD, T. K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 34, p. 293-299, 2002.

REN, D.; SIMS, J. J.; WOOD, T. K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. **Environ. Microbiol.**, v. 3, p. 731-736, 2001.

RICHARDS, J.; MELANDER, C. Small molecule approaches toward the nonmicrobicidal modulation of bacterial growth and maintenance. **Anti-Infect. Agents Med. Chem.**, v. 8, p. 295-314, 2009.

ROMERO, D.; TRAXLER, M. F.; LÓPEZ, D.; KOLTER, R. Antibiotics as signal molecules. **Chem. Rev.**, v. 111, p. 5492-5505, 2011.

SAMBANTHAMOORTHY, K.; GOKHALE, A. A.; LAO, W.; PARASHAR, V.; NEIDITCH, M. B.; SEMMELHACK, M. F.; LEE, I.; WATERS, C. M. Identification of a novel benzimidazole that inhibits bacterial biofilm formation in a broad spectrum manner. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 55, p. 4369-4378, 2011.

SIKORSKA, J.; PARKER-NANCE, S.; DAVIES-COLEMAN, M. T.; VINING, O. B.; SIKORA, A. E.; McPHAIL, K. L. Antimicrobial rubrolides from a south African species of *Syonicum tunicate*. **J. Nat. Prod.**, v. 75, n. 10, p. 1824-1827, 2012.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, p. 199-210, 2008.

SPELLBERG, B.; SHLAES, D. Prioritized current unmet needs for antibacterial therapies. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 96, p. 151-153, 2014.

THOMANN, A.; BRENGEL, C.; BÖRGER C.; KAIL, D.; STEINBACH, A.; EMPTING, M. HARTMANN, R. W. Structure-activity relationships of 2-sufonylpyrimidines as quorum-sensing inhibitors to tackle biofilm formation and eDNA release of *Pseudomonas aeruginosa*. **ChemMedChem**. v. 11, p. 2522-2533, 2016.

THOMAS, V.C.; HIROMASA, Y.; HARMS, N.; THURLOW, L.; TOMICH, J.; HANCOCK, L.E. Afratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. **Mol. Microbiol.**, v. 72, p. 1022-1036, 2009.

VUONG, C.; SAENZ, H. L.; GOTZ, F.; OTTO M. Impact of the agr quorum sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 1688-1693, 2000.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J. M.; YAO, Y.; FISCHER, E. R.; DELEO, F. R.; OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm

formation, immune evasion, and virulence. **J. Biol. Chem.** v. 279 p. 54881-54886, 2004.

WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, ASM Press: Washington, 2003.

WANG, R.; KHAN, B. A.; CHEUNG, G. Y.; BACH, T. H.; JAMESON-LEE, M.; KONG, K. F.; QUECK, S. Y.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 121, p. 238-48, 2011.

WORTHINGTON, R. J.; RICHARDS, J. J.; MELANDER, C. Small molecule control of bacterial biofilms. **Org. Biomol. Chem.**, v. 10, p. 7457-7474, 2012.

YAKANDAWALA, N.; GAWANDE, P. V.; MADHYASTHA, L. K. Effect of ovotransferrin, protamine sulfate and EDTA combination on biofilm formation by catheter-associated bacteria. **J. Appl. Microbiol.** v. 102, p. 722-727, 2006.

YARWOOD, J. M.; BARTELS, D. J.; VOLPER, E. M.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.*, v. 186, p. 183850, 2004.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DOS ANÁLOGOS AOS RUBROLÍDEOS E SUAS LACTAMAS DERIVADAS SOBRE LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER HUMANO

1 Introdução

A transformação de uma única célula em um fenótipo tumorigênico é definida como câncer, no qual o equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular é interrompido. Como resultado, ocorre crescimento celular descontrolado, levando a invasão e a metástase (SEELIGER et al., 2007).

O câncer é a principal causa de morte na sociedade moderna. No Brasil, estimativas para o ano de 2016 (Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2016) apontam para o surgimento de 295.200 novos casos de câncer para o sexo masculino e 300.870 novos casos para o sexo feminino. Espera-se que o câncer de pele não-melanoma (175.760 casos) seja o mais incidente na população brasileira, seguido de tumores de próstata (61.200), mama feminina (57.960), cólon e reto (34.280), traqueia, brônquio e pulmão (28.220), estômago (20.520) e colo do útero (16.340) (Tabela 4.1).

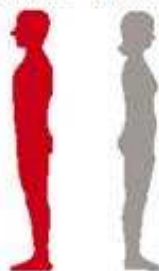
Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Tabela 4.1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, estimados para 2016 por sexo (exceto pele não melanoma) (INCA 2016).

A quimioterapia corresponde a uma das formas de tratamento disponíveis para se combater o câncer. Nesse sentido, fármacos são utilizados com o objetivo primário de destruir as células neoplásicas (células cancerígenas), preservando-se as células normais. O câncer está relacionado a um processo rápido e incontrolável de divisão e crescimento autônomo das células do organismo. Vários agentes antineoplásicos foram descobertos, como a cisplatina (comercialmente Platiniil[®] ou PlatinoI[®]), a doxorubicina (e seus congêneres), a procarbazina (Natulanar[®]), a mitoxantrona (Novantrone[®]), o mitotano (Lysodren[®]) e o taxol[®]. A busca por compostos cada vez mais eficientes no combate ao câncer é uma área de intensa pesquisa.

Apesar dos enormes esforços dedicados ao desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento do câncer, ainda há uma necessidade urgente de encontrar melhores tratamentos devido ao rápido desenvolvimento de resistência a fármacos quimioterapêuticos. Além disso, a elevada toxicidade, normalmente associada a algumas drogas e os seus efeitos secundários indesejáveis aumentam a procura por novos compostos quimioterápicos. Sendo assim, são necessários fármacos antitumorais ativos contra tumores não tratáveis, com menos efeitos secundários e/ou com maior eficiência terapêutica (DEMAIN e VAISHNAV, 2011).

Os produtos de origens naturais são utilizados como protótipos químicos importantes para a descoberta de novas moléculas ativas, sendo que o uso de metabólitos secundários de plantas e microrganismos tem sido a fonte mais promissora para o desenvolvimento de novas drogas, especialmente no campo anticancerígeno (DEMAIN e VAISHNAV, 2011; JUNIOR et al., 2012; ACOSTA et al., 2016).

Os rubrolídeos pertencem à classe das γ -alquilideno- γ -lactonas e são encontrados como metabolitos secundários de ascídias marinhas. Esses compostos e seus análogos sintéticos apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo antibiótica, anti-inflamatória, citotóxica, (MIAO e ANDERSEN 1991; ORTEGA et al., 2000; PEARCE et al., 2007; WANG et al., 2012; SIKORSKA, et al., 2012; PEREIRA, et al., 2016) inibidora da formação de biofilme bacteriano, (PEREIRA et al., 2014a; PEREIRA et al., 2014b) fitotóxica e inibidora da fotossíntese (BARBOSA et al., 2012; PEREIRA et al., 2015).

Os rubrolídeos A (1), B (2), C (3), (Figura 1.1) I(9), J (10), K(11), L(12), M (13) e N(14) (Figura 1.2) isolados da ascídia *Syonicum blochmanni* por Ortega et al. (2000) foram avaliados quanto a atividade citotóxica sobre as linhagens de células leucêmicas (P-388), células de carcinoma pulmonar (A-549), carcinoma de colón (HT-29) e melanoma (MEL-28). Os rubrolídeos K (11) I (9) L (12) e M (13) (Figura 1.2) demonstraram atividade com valores de IC_{50} menores que $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para pelo menos uma das linhagens celulares avaliadas. Os dois compostos que se destacaram foram o rubrolídeo M (13), que apresentou $IC_{50} = 1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as quatro linhagens testadas e o rubrolídeo K (11), com $IC_{50} = 1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para carcinoma de colón (HT-29).

Recentemente, Pereira et al. (2016) submeteram 46 compostos entre análogos aos rubrolídeos e seus derivados lactâmicos a ensaios para avaliação da atividade citotóxica sobre quatro linhagens de células tumorais, as leucêmicas (HL-60), células

de carcinoma de cólon (HCT-116), glioblastoma (SF-295) e carcinoma de ovário (OVCAR-8). Dos 46 compostos, 7 apresentaram redução da viabilidade celular maior que 80% na concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses sete compostos foram então submetidos a novos testes para avaliar a concentração do composto capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células testadas (IC_{50}). Os compostos **53** e **54** (Figura 4.1) se destacaram com valores de $\text{IC}_{50} = 3,00 \mu\text{M}$ e $3,58 \mu\text{M}$, respectivamente sobre a linhagem celular HL-60.

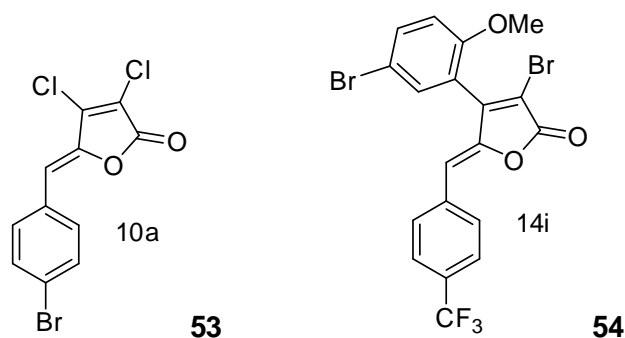


Figura 4.1 - Análogos dos rubrolídeos **53** e **54** que apresentaram atividade citotóxica.

Outras classes de produtos naturais contendo um heterociclo de cinco membros, tais como γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas também têm recebido atenção por parte da comunidade química, devido às suas propriedades biológicas, incluindo as atividades citotóxicas. As miceliotermofilinas A (**55**), C (**56**) e E (**57**) (Figura 4.2), isoladas a partir do fungo termófilo *Myceliophthora thermophila*, demonstraram citotoxicidade nas concentrações de 0,2-1,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre as linhagens de células tumorais de hepatoblastoma (HepG2), carcinoma hepatocelular (Hep3B), carcinoma de pulmão (A-549) e adenocarcinoma da mama (MCF-7) (YANG et al., 2007).

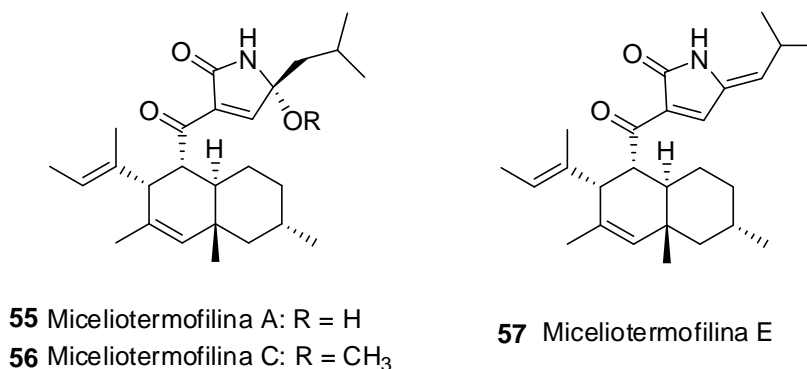


Figura 4.2 - Estruturas das miceliotermofilinas A (**55**), C (**56**) e E (**57**) isoladas a partir do fungo termófilo *Myceliophthora thermophila*.

Dadas as atividades citotóxicas apresentadas por rubrolídeos, análogos e derivados lactâmicos, foram avaliadas as atividades citotóxicas dos novos compostos sintetizados no presente estudo (**32a-m**, **33a-m**, **34a-m** e **(Z)34a-m**).

2 Material e Métodos

2.1 Procedimentos sintéticos

Os compostos **32a-m**, **33a-m** e **34a-m**, utilizados na avaliação da atividade citotóxica, foram preparados conforme detalhado no capítulo 1. Uma vez que não foi possível isolar o isômero *E*, os ensaios foram realizados com o isômero *Z* na forma pura e também com a mistura dos isômeros *Z* e *E*.

2.2 Ensaio biológico para avaliação da atividade citotóxica

Os ensaios biológicos para avaliação da atividade citotóxica foram realizados no do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará pelos professores colaboradores Cláudia do Ó Pessoa e Francisco Washington Araújo Barros Nepomuceno.

Os 52 compostos foram avaliados em concentração única (10 μM) sobre linhagens celulares SF-295 (glioblastoma), HCT-116 (carcinoma de cólon) e PC-3 (adenocarcinoma de próstata) que foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm^2 , volume de 500 mL para células aderidas, e 75 cm^2 , volume de 250 mL para células em suspensão), utilizando-se o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10% de soro fetal bovino, solução 2 mmol L^{-1} de glutamina, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina e 100 U mL^{-1} de penicilina. As células foram incubadas em estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO_2 , seguido da observação do crescimento celular com o auxílio de microscópio de inversão a cada 24 horas. Quando necessário, as células foram replicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5-1,0 $\times 10^6$ células mL^{-1} .

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades, numa densidade de 0,3 $\times 10^6$ células (para as células suspensas) e 0,7 $\times 10^5$ células (para as células aderidas). Os compostos dissolvidos em DMSO (5%) foram incubados por 72 horas, juntamente com a suspensão de células. O crescimento das células tumorais foi quantificado com base na habilidade das células vivas de converter o corante brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2*H*-tetrazólio (MTT) (Figura 4.3), de coloração amarelada, na substância formazan de

coloração azul pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMAN, 1983).

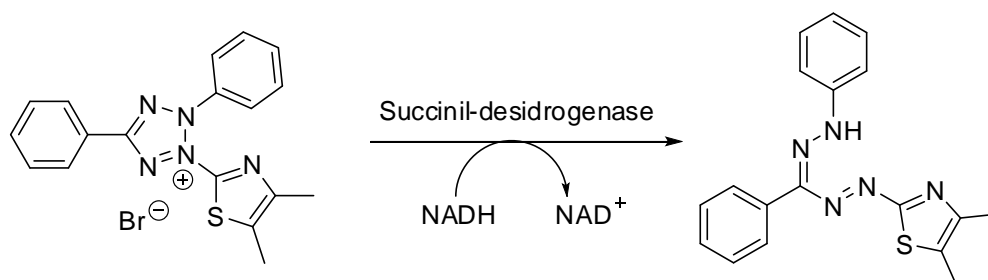


Figura 4.3 - Conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) para o produto de cor azul formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase.

Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1.500 rpm por 15 minutos) e o sobrenadante, descartado. Cada cavidade recebeu 200 μ L da solução de MMT (0,5 mg mL⁻¹ de MTT) e foi reincubada durante três horas, em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (3.000 rpm, 10 minutos), sendo o sobrenadante desprezado. O precipitado resultante foi ressuspensionado em 150 μ L de DMSO. Para quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram medidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para calcular o RVC % pelo programa *GraphPad Prism* versão 5.0. Cada amostra foi testada em triplicata a partir de dois experimentos independentes (PEREIRA et al., 2016).

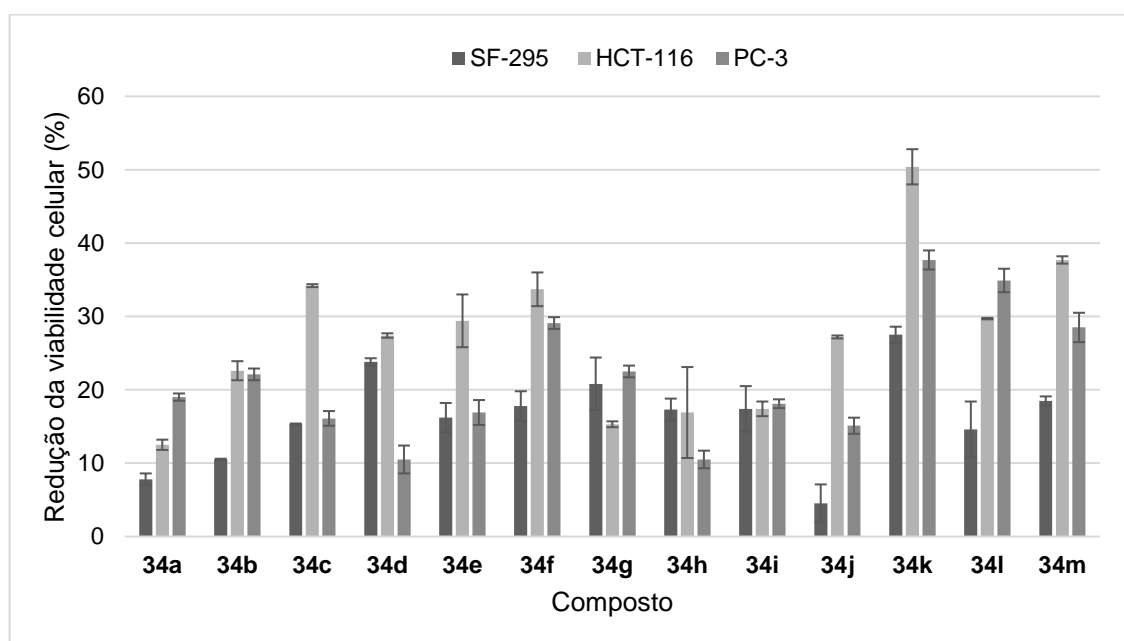
Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas, a partir do percentual de redução da viabilidade celular (RVC %) determinado:

- Amostra sem atividade (SA, percentual de redução da viabilidade celular menor que 1%);
- Amostra com pouca atividade (PA, percentual de redução da viabilidade celular variando de 1 a 50%);
- Amostra com atividade moderada (MO, percentual de redução da viabilidade celular variando de 50 a 75%);
- Amostra com muita atividade (MA, percentual de redução da viabilidade celular variando de 75 a 100%).

3 Resultados e Discussão

De uma forma geral, as 4-aril-5-benzilideno-3-bromofuran-2(5*H*)-onas **32a-m** apresentaram pouca atividade (Figura 4.4) na redução da viabilidade celular. Os percentuais de redução variaram de 4,5% a 37,7% para todas as linhagens testadas, exceto para **32k**, que apresentou atividade moderada de 50,4% sobre a linhagem de HCT-116 (carcinoma de cólon).

Figura 4.4 - Citotoxicidade das 4-aril-5-benzilideno-3-bromofuran-2(5*H*)-onas **32a-m** em linhagens celulares de câncer humano.



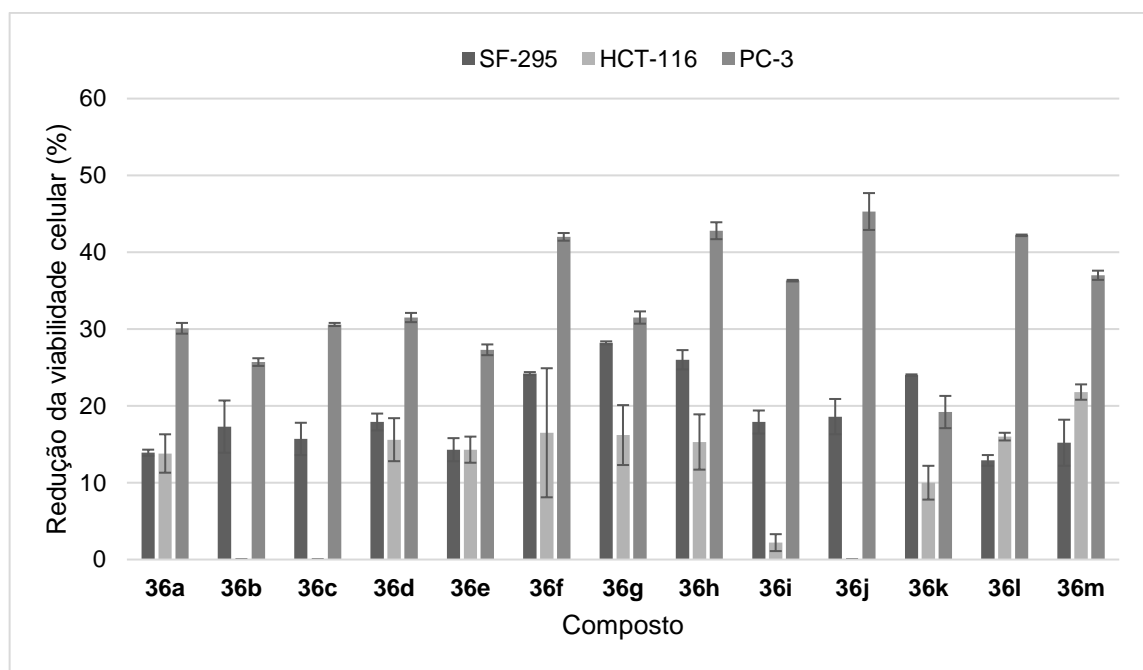
MO = moderada atividade; PA = pouca atividade.

As γ -hidroxi- γ -lactamas **33a-m** apresentaram pouca atividade ou foram inativas sobre a redução da viabilidade celular na concentração avaliada (Figura 4.5). Os percentuais de redução variaram de 2,2% a 42,8%, exceto para os compostos **33b**, **33c** e **33j** que foram inativos sobre a linhagem HCT-116 (carcinoma de cólon). De uma forma geral, os compostos foram mais ativos sobre a linhagem de células PC-3 (adenocarcinoma de próstata), sendo que **33f**, **33h**, **33j** e **33k** apresentaram percentuais de redução da viabilidade celular maiores que 40% para essa linhagem.

Para a linhagem PC-3, as γ -hidroxi- γ -lactamas foram mais ativas do que as lactonas precursoras, onde somente o composto **32k** foi mais ativo que o composto **33k**. O contrário foi observado para a linhagem HCT-116, em que as lactonas

precursoras foram mais ativas, sendo que somente os compostos **32a** e **32g** apresentaram valores de redução da viabilidade celular menores que as γ -hidroxi- γ -lactamas **33a** e **33g**.

Figura 4.5 - Citotoxicidade das γ -hidroxi- γ -lactamas **33a-m** em linhagens celulares de câncer humano.

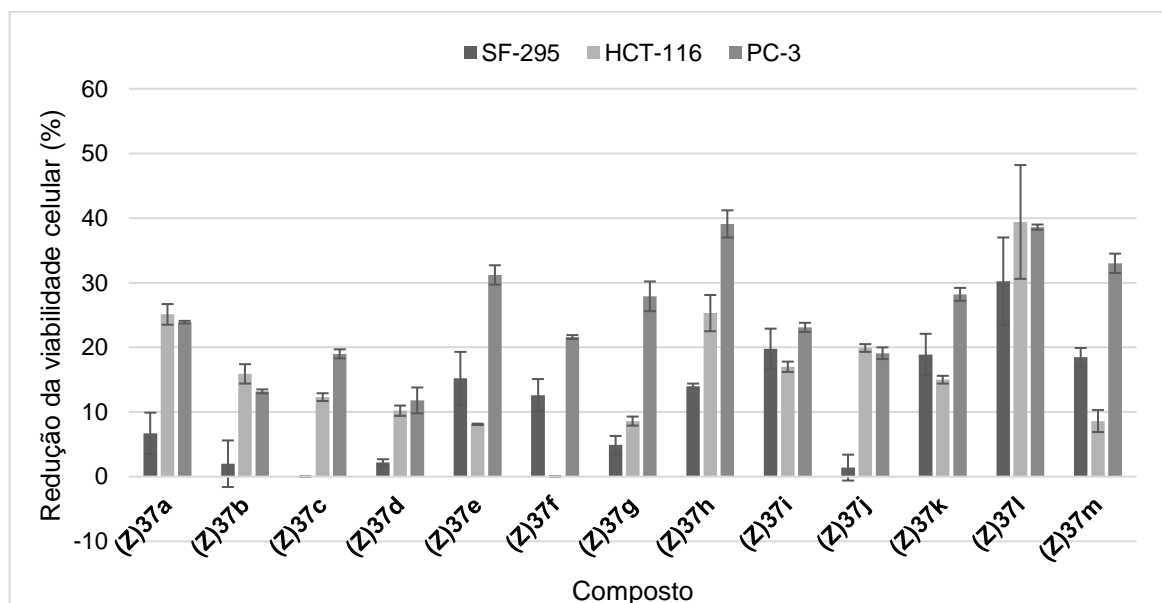


SA = sem atividade; PA = pouca atividade.

Da mesma forma, as (*Z*)- γ -alquilideno- γ -lactamas (**Z34a-m**) apresentaram pouca atividade ou foram inativas (Figura 4.6). Os percentuais de redução da viabilidade celular variaram de 2,0% a 39,4% e os compostos (**Z34c** e **Z34f**) não demonstraram nenhuma atividade sobre as linhagens SF-295 (glioblastoma) e HCT-116 (carcinoma de cólon), respectivamente. De uma forma geral, as (*Z*)- γ -alquilideno- γ -lactamas também foram mais ativas sobre a linhagem de células PC-3 (adenocarcinoma de próstata).

Quando comparadas as lactonas precursoras, as (*Z*)- γ -alquilideno- γ -lactamas demonstram maior atividade sobre a linhagem **PC-3**, apenas as lactonas (**Z32b**), (**Z32f**) e (**Z32k**) foram mais ativas que as lactamas derivadas. Para as linhagens SF-295 e HCT-116, as lactonas precursoras demonstram maior atividade que as (*Z*)- γ -alquilideno- γ -lactamas. Quando comparadas às γ -hidroxi- γ -lactamas, as (*Z*)- γ -alquilideno- γ -lactamas são menos ativas sobre as linhagens SF-295 e PC-3.

Figura 4.6 - Citotoxicidade das (*Z*) γ -alquilideno- γ -lactamas (**Z34a-m**) em linhagens celulares de câncer humano.



SA = sem atividade; PA = pouca atividade.

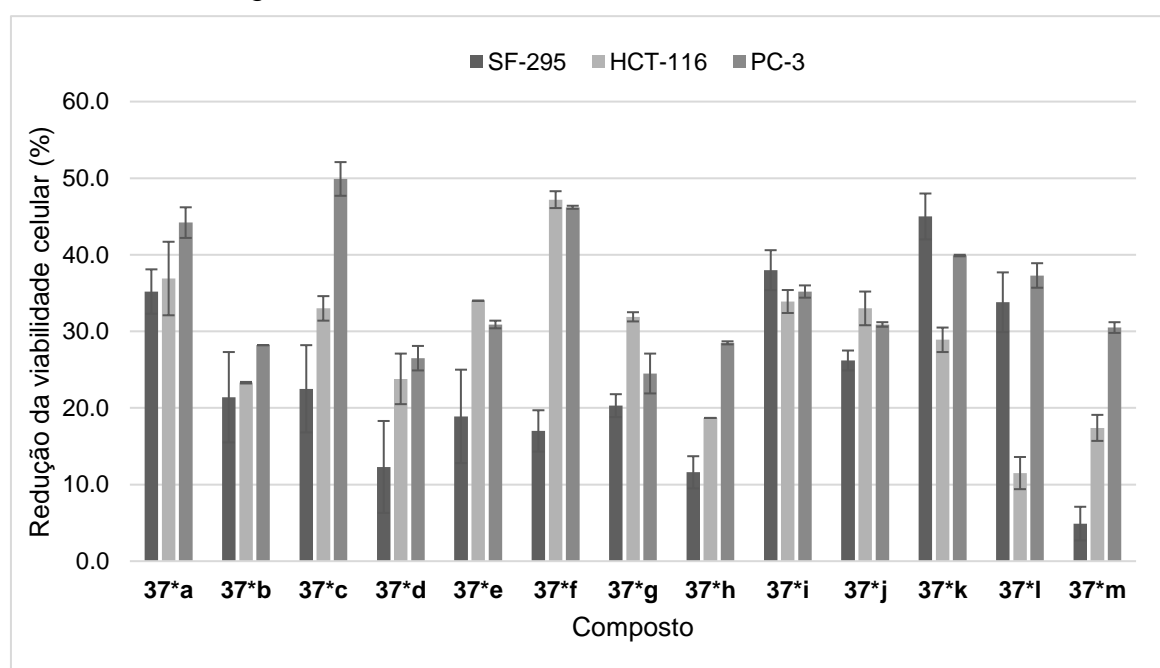
As misturas de isômeros (*Z*) γ -alquilideno- γ -lactamas e (*E*) γ -alquilideno- γ -lactamas **34a-m** demonstraram pouca atividade (Figura 4.7), com percentuais de redução da viabilidade celular variando de 4,85% a 49,90% para todas linhagens testadas. A maioria dos compostos demonstraram maior atividade sobre a linhagem PC-3 (adenocarcinoma de próstata), sendo que **34a**, **34c** e **34f** mostraram percentuais de redução da viabilidade celular maior que 40% para essa linhagem. As misturas **34f** e **34k** ainda apresentaram percentuais de redução da viabilidade celular maior que 40% para HCT-116 (carcinoma de cólon) e SF-295 (glioblastoma).

De uma forma geral, nas mesmas concentrações, as misturas dos os isômeros *Z* e *E* apresentaram maior atividade que as lactonas precursoras, sendo que para a linhagem PC-3 todas as γ -alquilideno- γ -lactamas foram mais ativas que as lactonas. As (*Z/E*) γ -alquilideno- γ -lactamas, quando comparadas às γ -hidroxi- γ -lactamas precursoras, demonstraram maior atividade sobre as linhagens SF-295 e HCT-116.

As misturas entre os isômeros *Z* e *E*, na maioria dos casos, demonstraram ainda maior atividade que os isômeros *Z* isolados, como pode ser observado para a linhagem PC-3. Enquanto a mistura de isômeros *Z* e *E* **34c** apresentou uma redução de viabilidade celular de 49,9% o isômero (**Z**)**34c** apresentou uma redução de 19,0%. Para a linhagem SF-295, um exemplo da maior atividade da mistura de isômeros pode

ser demonstrado por **34j** que apresentou uma redução de 26,2%, enquanto **(Z)34j** apresentou redução de viabilidade celular de 1,4%. E finalmente, para a linhagem HCT-116, enquanto a mistura **34f** apresentou uma redução de 47,2% o composto **(Z)34f** não apresentou nenhuma atividade. Apenas os compostos **(Z)34h**, **(Z)34i** e **(Z)34m** apresentaram maiores valores de redução de viabilidade celular do que a mistura correspondente entre os isômeros *E* e *Z* em pelo menos uma linhagem testada. Esses resultados sugerem que o isômero *E* seja mais ativo sobre a redução de viabilidade celular das linhagens testadas do que o isômero *Z*.

Figura 4.7 - Citotoxicidade das misturas (*Z/E*) γ -alquilideno- γ -lactamas **34a-m** em linhagens celulares de câncer humano.



* Mistura entre os isômeros (*Z*) e (*E*)- γ -alquilideno- γ -lactamas
PA = pouca atividade.

O Instituto Nacional do Câncer dos EUA considera que substâncias puras com $IC_{50} < 4 \mu\text{g mL}^{-1}$, em ensaios com linhagens de células, são considerados promissores para o desenvolvimento de drogas anticâncer (HALL et al., 1999). Os compostos aqui avaliados apresentaram pouca atividade ou foram inativos na concentração de $10 \mu\text{M}$, o que inviabilizou a avaliação dos valores de IC_{50} para estes compostos, sendo que o composto que apresentou maior atividade foi o composto **32k**, com redução de 50,4% da viabilidade celular na concentração de $10 \mu\text{M}$ ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) sobre a linhagem HCT-116 (carcinoma de cólon).

4 Conclusões

Todas as amostras testadas apresentaram pouca atividade citotóxica ou foram inativas contra as linhagens celulares de câncer humano empregadas nos ensaios biológicos. O composto **32k** foi o único que apresentou atividade moderada, com redução de 50,4% da viabilidade celular na concentração de 10 μM (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sobre a linhagem HCT-116 (carcinoma de cólon).

É importante ressaltar que as amostras **33f**, **33h**, **33j**, **33k**, **34a**, **34c**, **34f** e **34k** destacaram-se por apresentar redução da viabilidade celular maior que 40% sobre pelo menos uma linhagem testada.

De uma forma geral, os compostos avaliados foram mais ativos sobre a linhagem PC-3 do que sobre as linhagens HCT-116 e SF-295.

Não foi possível fazer qualquer correlação entre a estrutura das moléculas sintetizadas e suas atividades citotóxicas, uma vez que os compostos apresentaram pouca atividade de uma forma geral.

Foi possível observar que, de uma forma geral, as misturas entre os isômeros *E* e *Z* foram mais ativas do que os isômeros *Z* na forma pura, sugerindo que o isômero *E* possa ser mais ativo.

Também foi observado que a transformação das γ -alquilideno- γ -lactonas nas respectivas γ -hidroxi- γ -lactamas e γ -alquilideno- γ -lactamas é importante, já que pelo menos uma dessas lactamas demonstrou maior atividade que a lactona precursora. É evidente também que entre as lactamas, as γ -alquilideno- γ -lactamas são mais ativas que as outras, na maioria dos casos, o que sugere a importância da presença da ligação dupla exocíclica na estrutura dessas moléculas para a melhoria de suas atividades biológicas.

5 Referências bibliográficas

ACOSTA, J. A. M.; MUDDALA, R.; BARBOSA, L. C. A.; BOUKOUVALAS, J. Total synthesis of the antitumor antibiotic basidalin. **J. Org. Chem.**, v. 81, p. 6883-6886, 2016.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; LAGE, M. R.; BARCELOS, R. C.; DONÀ, A.; CARNEIRO, J. W. M.; FORLANI, G. Synthesis of rubrolides analogues as new inhibitors of the photosynthetic electron transport chain. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 10555-10563, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de prevenção e vigilância. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016. 126p.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microb. Biotechnol.**, v. 4, p. 687-699, 2011.

HALL, I. H.; PEATY, N. J.; HENRY, J. R.; EASMON, J.; HEINISCH, G.; PÜRSTINGER, G. Investigations on the mechanism of action of the novel antitumor agents 2-benzothiazolyl, 2-benzoxazolyl, and 2-benzimidazolyl hydrazones derived from 2-acetylpyridine. **Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.** v. 332, p. 115-123, 1999.

JUNIOR, M. L. C. F.; SILVA, R. B.; MOTHE, B.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F. Current status on natural products with antitumor activity from Brazilian marine sponges. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 13, p. 235-244, 2012.

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

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

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

PEARCE, A. N.; CHIA, E. W.; BERRIDGE, M. V.; MAAS, E. W.; PAGE, M. J.; WEBB, V. L.; HARPER, J. L.; COPP, B. R. *E/Z*-Rubrolide O, an anti-inflammatory halogenated furanone from the New Zealand ascidian *Synoicum n. sp.* **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 111-113, 2007.

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

PEREIRA, U. A.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; DEMUNER, A. J.; MASOOD, M. A.; PIMENTA, A. L. γ -Alkylidene- γ -lactones and isobutylpyrrol-2(5*H*)-ones

analogues to rubrolides as inhibitors of biofilm formation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, p. 1052-1056, 2014b.

PEREIRA, U. A.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; BERTAZZINI, M.; FORLANI, G. Rubrolides as model for the development of new lactones and their aza analogs as potential photosynthesis inhibitors. **Chem. Biodiversity**, v. 12, p. 987-1006, 2015.

PEREIRA, U. A.; MOREIRA, T. A.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; BOMFIM, I. S.; MARANHÃO, S. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. BARROS-NEPOMUCENO, F. W. A. Rubrolide analogues and their derived lactams as potential anticancer agentes. **Med. Chem. Commun.**, v. 7, p. 345-352, 2016.

SEELIGER, H.; GUBA, M.; KLEESPIES, A. JAUCH, K.-W.; BRUNS, C. J. Role of mTOR in solid tumor systems: a therapeutical target against primary tumor growth, metastases, and angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 26, p. 611-621, 2007.

SIKORSKA, J.; PARKER-NANCE, S.; DAVIES-COLEMAN, M. T.; VINING, O. B.; SIKORA, A. E.; MCPHAIL, K. L. Antimicrobial rubrolides from a South African species of *Synoicum tunicate*. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 1824-1827, 2012.

WANG, W.; KIM, H.; NAM, S.-J.; RHO B. J.; KANG, H. Antibacterial butenolides from the Korean tunicate *Pseudodistoma antinboja*. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 2049-2054, 2012.

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

CONCLUSÕES GERAIS

Para o cumprimento dos objetivos propostos neste estudo, foram sintetizados 52 novos compostos, entre eles treze análogos aos rubrolídeos e suas respectivas lactonas derivadas, todos devidamente caracterizados. Os compostos foram sintetizados apresentando rendimentos elevados. Devido a isomerização observada, as lactamas na configuração *E* não puderam ser purificadas.

Alguns dos compostos sintetizados foram mais ativos sobre o crescimento planctônico bacteriano de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* do que os rubrolídeos naturais descritos na literatura. Alguns compostos também foram capazes de inibir a formação do biofilme bacteriano de *S. aureus* em concentrações até quatro vezes mais baixas do que os análogos semelhantes descritos na literatura, sendo identificadas influências da estrutura sobre a atividade desses compostos.

A avaliação da citotoxicidade sobre linhagens celulares de câncer humano SF-295 (glioblastoma), HCT-116 (carcinoma de cólon) e PC-3 (adenocarcinoma de próstata) mostrou que na concentração de 10 μM os compostos apresentaram baixa atividade, o que inviabilizou a avaliação das correlações entre a estrutura das moléculas sintetizadas e suas atividades citotóxicas. No entanto, foi observado que a conversão dos análogos aos rubrolídeos nas respectivas lactamas derivadas é importante, já que pelo menos uma dessas lactamas demonstrou maior atividade que a lactona precursora.

Portanto, conforme os resultados apresentados neste estudo, existem evidências de que alguns análogos aos rubrolídeos e lactamas são compostos promissores para a inibição do biofilme e citotoxicidade sobre células tumorais, servindo de referência para trabalhos futuros que tentem identificar outros compostos ativos dentro deste grupo.

APÊNDICE

Tabela A 1 - Efeito dos compostos **32a-m**, **33a-m**, **34a-m** e **(Z)34a-m** nas concentrações de 87,5, 43,8, 21,8, 10,9, 5,5, 2,7, 1,4, 0,68, 0,34 e 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre o crescimento planctônico de *S. aureus*

Composto	Efeito sobre o crescimento planctônico (%)**									
	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)									
	87,50	43,75	21,88	10,94	5,47	2,73	1,37	0,68	0,34	0,17
32a	48,7	19,1	13,5	7,3	-1,6	-0,3	-2,8	-3,4	-4,4	-4,3
32b	57,7	33,8	31,3	29,2	25,9	20,4	20,7	20,2	15,1	16,4
32c	66,8	30,0	24,1	20,6	22,0	20,6	18,8	20,8	14,6	13,6
32d	66,6	31,0	23,7	23,6	17,9	17,3	16,1	21,0	15,8	17,9
32e	58,6	32,8	33,7	28,5	32,1	27,0	33,5	39,5	30,2	36,0
32f	71,1	48,8	43,0	39,3	34,4	33,1	37,6	38,6	35,7	24,6
32g	59,9	42,2	35,4	34,8	42,0	34,1	34,4	32,6	32,2	24,8
32h	57,9	41,5	38,0	41,9	32,1	27,4	32,1	30,5	32,4	24,7
32i	56,7	35,4	38,7	43,7	40,5	40,5	26,2	33,6	36,6	19,8
32j	44,7	34,3	32,8	34,5	30,6	25,2	30,2	25,7	27,6	31,3
32k	38,9	30,9	23,1	20,1	32,7	29,1	29,4	25,9	26,3	-10,0
32l	35,4	22,0	32,3	23,7	-1,6	6,2	-5,1	-5,3	11,2	-4,2
32m	72,5	52,3	41,3	48,0	46,9	44,2	33,6	20,4	36,3	9,1
33a	44,2	42,9	49,2	42,3	34,4	34,3	36,0	37,1	33,1	24,7
33b	60,0	24,2	18,8	15,1	17,9	16,5	18,6	15,9	17,7	16,6
33c	60,4	21,1	15,9	16,8	15,8	16,3	16,0	14,1	14,8	12,2
33d	41,6	12,9	4,0	5,7	6,1	-1,0	1,5	4,3	-3,7	-9,0
33e	55,3	22,8	15,3	16,2	12,1	13,6	13,8	16,6	15,8	14,1
33f	57,7	23,1	24,2	33,4	30,9	32,5	30,7	33,6	34,8	23,3
33g	42,7	17,7	13,4	14,6	12,3	8,6	15,1	11,3	12,1	9,7
33h	41,4	-31,8	-25,1	-12,8	-18,7	-24,7	-56,4	-19,7	-54,0	-28,8
33i	54,2	19,9	18,1	22,4	16,8	13,0	10,8	8,0	15,2	15,5
33j	59,3	16,4	11,5	12,5	8,0	2,1	6,5	3,5	-6,4	-12,5
33k	55,6	-3,8	15,8	19,2	14,8	20,6	15,2	15,4	12,1	5,5
33l	57,3	52,7	49,5	51,2	38,0	34,5	30,2	27,6	21,2	20,2
33m	58,0	43,2	38,1	37,6	27,9	23,0	17,9	15,5	13,0	8,6
34*a	68,2	44,1	37,2	35,9	25,5	27,9	19,0	19,4	24,6	26,3
34*b	73,0	30,3	24,3	21,1	14,3	7,3	7,6	5,9	2,2	4,7

Continua...

34*c	70,9	35,3	32,0	27,1	26,8	21,5	19,7	16,5	18,6	14,4
34*d	60,0	20,4	17,1	17,3	14,6	9,4	12,3	5,6	7,5	9,1
34*e	72,6	38,0	30,9	29,9	22,4	25,4	22,7	22,2	21,5	17,4
34*f	70,4	53,0	34,6	33,9	33,3	30,2	36,7	37,2	33,3	32,8
34*g	65,5	30,4	22,1	26,4	26,2	21,7	22,5	34,8	19,4	24,0
34*h	69,1	25,6	17,4	26,1	19,7	23,3	20,3	21,2	22,7	16,2
34*i	58,5	36,8	29,9	23,5	14,5	20,9	18,1	1,3	14,5	8,8
34*j	54,0	20,9	21,9	20,4	20,9	15,5	15,8	11,6	18,0	21,3
34*k	67,0	41,7	39,7	39,7	18,5	17,8	11,8	20,9	26,6	25,2
34*l	59,3	36,1	41,3	48,0	37,1	38,4	29,6	24,5	26,7	17,4
34*m	72,1	41,5	41,0	32,8	22,4	15,7	19,4	13,0	19,4	18,0
(Z)34a	89,5	85,8	69,4	67,8	49,0	32,5	31,5	6,3	12,4	6,6
(Z)34b	92,6	86,4	79,6	76,8	61,7	54,7	45,6	38,2	29,5	18,0
(Z)34c	79,8	47,4	38,6	21,0	19,7	24,1	19,7	15,1	-5,5	-15,7
(Z)34d	81,9	48,7	31,1	10,0	2,4	0,3	-5,3	-7,7	-10,8	-15,3
(Z)34e	70,7	31,1	25,8	3,4	-10,1	-16,5	-13,5	-19,4	-24,3	-25,9
(Z)34f	66,6	22,9	14,5	5,3	4,6	-3,2	-9,5	-10,6	-27,4	-14,9
(Z)34g	71,4	33,2	24,4	14,4	11,7	-2,4	-8,8	-4,5	-13,1	-13,4
(Z)34h	60,6	30,8	17,2	10,2	10,3	2,0	0,9	4,9	0,2	-1,0
(Z)34i	67,4	32,9	25,4	13,4	10,9	2,5	-0,8	-2,5	-10,4	-8,8
(Z)34j	58,1	36,2	17,5	9,0	6,1	4,4	-8,7	-8,7	-9,5	-18,9
(Z)34k	67,2	30,4	19,6	4,1	1,7	-3,8	-3,5	-5,4	-8,8	-6,5
(Z)34l	48,5	26,9	21,9	0,2	-7,6	-10,8	1,8	-11,5	-12,1	-10,5
(Z)34m	61,7	17,6	18,8	15,1	7,5	4,6	0,7	-6,3	-18,6	-6,2

* Mistura entre os isômeros (Z) e (E)- γ -alquilideno- γ -lactamas

** Valores positivos referem-se à inibição do crescimento planctônico

Tabela A 2 - Efeito dos compostos **32a-m**, **33a-m**, **34a-m** e **(Z)34a-m** nas concentrações de 87,5, 43,8, 21,8, 10,9, 5,5, 2,7, 1,4, 0,68, 0,34 e 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sobre o crescimento planctônico de *S. epidermidis*.

Composto	Efeito sobre o crescimento planctônico (%)**									
	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)									
	87,50	43,75	21,88	10,94	5,47	2,73	1,37	0,68	0,34	0,17
32a	53,9	30,8	21,8	22,7	5,1	26,9	21,7	-3,5	4,2	-15,6
32b	64,2	34,7	29,5	17,3	14,4	27,8	17,3	9,1	14,9	0,5
32c	46,3	26,4	30,0	36,1	-0,9	25,7	42,7	11,8	7,1	7,4
32d	51,8	21,7	-4,1	7,6	11,2	-3,3	-7,3	-18,3	-27,2	-31,0
32e	54,5	30,1	19,1	9,7	-9,8	-25,6	-38,1	-45,2	-34,6	-47,0
32f	47,4	-16,1	-23,2	-8,2	-31,3	-36,4	-40,3	-40,7	-59,9	-49,0
32g	60,5	-19,5	-33,1	-20,1	-19,6	-16,9	-12,1	-50,7	-32,1	-38,6
32h	64,3	26,0	16,8	30,0	0,3	-3,7	2,3	-6,3	-12,2	-23,3
32i	58,9	-5,9	-10,0	-19,1	-34,9	-26,1	-24,6	-31,9	-37,3	-30,8
32j	55,9	33,8	-12,8	-3,3	19,3	-28,7	-23,5	-32,4	-42,9	-46,8
32k	70,0	30,6	15,7	14,6	7,6	21,5	11,7	-2,9	-3,0	2,9
32l	73,9	34,2	40,9	35,5	18,5	13,1	14,2	7,8	-2,9	3,1
32m	62,3	13,3	15,4	-16,6	-11,2	-17,0	-12,1	-23,4	12,7	-15,1
33a	71,7	25,5	31,5	33,0	15,6	15,9	13,7	-0,6	-5,5	-2,4
33b	59,2	-8,1	19,3	6,7	12,4	-37,5	-3,7	-8,6	5,2	24,7
33c	53,9	8,8	-12,7	19,8	5,4	-26,2	-7,0	2,3	16,3	19,2
33d	90,4	23,6	7,7	6,4	3,1	-3,7	-13,0	2,4	-17,0	-26,7
33e	90,9	28,5	28,9	15,9	43,6	33,7	23,7	13,9	22,4	15,3
33f	56,2	12,8	-11,7	-17,4	-18,2	-16,9	-41,2	-33,3	10,9	-19,9
33g	45,7	-42,1	44,1	29,1	16,3	20,4	24,9	21,3	17,8	27,8
33h	61,2	44,8	41,1	36,3	46,6	18,9	46,9	35,5	36,7	27,3
33i	44,2	23,3	30,9	28,1	19,5	-5,0	13,5	5,4	-9,6	-0,3
33j	54,9	17,1	18,0	17,3	18,8	17,9	18,0	13,6	10,9	8,9
33k	35,5	35,4	15,4	-3,4	-2,9	2,0	-11,4	-4,5	-11,5	-15,3
33l	48,3	24,2	26,6	-12,8	28,8	32,1	78,2	15,6	23,6	64,8
33m	60,0	24,9	19,5	10,1	-8,0	3,0	85,3	-4,3	18,6	41,7
34*a	63,8	82,7	46,9	23,5	22,7	12,9	7,9	7,7	14,1	11,4
34*b	91,4	90,5	79,0	64,2	52,2	26,0	29,2	20,4	18,2	17,3
34*c	89,0	23,4	15,3	14,6	-6,8	-12,3	-11,4	-23,0	-21,8	-17,5
34*d	90,2	15,8	19,3	17,9	-2,1	6,7	16,3	11,4	14,4	3,7
34*e	55,2	26,6	20,6	22,0	14,8	6,2	6,2	-2,1	-4,2	-7,9
34*f	59,1	12,9	-5,0	-8,6	-27,3	-9,8	-12,7	-22,8	-24,1	-27,7

Continua...

34*g	41,5	-13,3	-16,1	-9,2	-21,2	-7,3	19,7	11,8	18,7	24,5
34*h	60,8	30,1	18,5	17,8	21,0	13,4	24,5	26,6	11,5	17,9
34*i	65,4	7,8	14,2	10,1	10,7	6,8	-2,3	8,6	-4,4	-1,4
34*j	43,7	-8,5	-10,0	-23,7	-35,6	-16,6	-26,1	-47,9	-41,3	-34,4
34*k	80,3	53,1	24,4	30,4	19,8	23,9	34,5	6,8	8,3	16,5
34*l	64,1	33,3	10,8	7,3	19,1	3,7	11,1	20,2	9,5	9,8
34*m	79,5	58,1	35,8	22,3	30,8	32,6	26,1	-19,7	2,1	15,2
(Z)34a	40,7	33,8	28,5	32,2	33,3	34,3	33,0	29,7	35,3	30,6
(Z)34b	49,9	34,3	20,4	30,3	23,9	39,4	30,8	38,6	36,8	38,8
(Z)34c	42,2	-19,0	-31,7	-6,0	-17,7	-1,7	-0,2	-2,5	9,4	4,6
(Z)34d	33,9	14,7	-12,3	5,1	10,0	26,9	28,8	21,2	-9,7	14,8
(Z)34e	15,5	-28,5	-25,1	-18,5	-18,5	-17,4	-21,6	10,9	12,6	-2,1
(Z)34f	29,3	18,4	9,2	11,3	18,0	13,2	16,7	19,9	14,6	19,9
(Z)34g	20,0	-35,9	-25,7	-8,5	4,0	3,5	10,0	8,6	-36,8	-24,9
(Z)34h	36,5	22,8	15,4	8,0	4,9	6,1	1,9	3,1	18,5	11,8
(Z)34i	34,2	18,8	-0,8	19,9	21,4	-54,4	6,6	9,4	-11,1	-3,9
(Z)34j	10,0	-7,2	-15,1	1,9	1,9	-20,4	-6,0	1,4	7,2	3,7
(Z)34k	41,7	33,6	20,3	15,0	13,9	-6,1	34,5	-18,7	-12,9	-12,3
(Z)34l	24,3	23,3	15,8	3,6	2,1	-15,3	11,8	22,4	-7,5	18,3
(Z)34m	49,9	27,4	33,6	23,9	-16,6	-32,9	-36,0	-6,2	-9,4	-14,3

* Mistura entre os isômeros (Z) e (E)- γ -alquilideno- γ -lactamas

** Valores positivos referem-se à inibição do crescimento planctônico

Tabela A 3 - Efeito dos compostos **32a-m**, **33a-m**, **34a-m** e **(Z)34a-m** sobre a formação do biofilme bacteriano de *S. aureus*

Composto	Efeito sobre formação de biofilme (%)**									
	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)									
	87,50	43,75	21,88	10,94	5,47	2,73	1,37	0,68	0,34	0,17
32a	-143,9	-26,1	-25,4	10,4	-13,6	-14,4	-21,5	-11,2	-15,0	-16,8
32b	-61,1	-24,1	-29,9	-8,5	-7,8	-10,3	-8,7	-10,4	-7,5	-30,9
32c	-63,4	23,5	18,8	23,3	22,1	14,8	19,7	8,2	8,0	-3,2
32d	-39,2	35,9	25,1	25,8	27,1	32,0	19,0	17,0	7,4	-6,4
32e	-27,1	26,2	26,7	37,6	16,8	2,4	3,8	8,9	24,1	-22,7
32f	-47,9	22,4	26,3	26,5	13,5	9,1	10,4	5,0	12,7	-4,5
32g	-50,6	18,4	38,0	19,5	18,8	10,6	-3,5	-14,7	4,6	-10,8
32h	-25,6	39,2	39,5	31,7	22,2	19,1	23,8	16,1	21,9	-2,5
32i	24,1	52,7	45,7	51,9	49,3	37,8	25,7	27,5	24,5	29,9
32j	-19,9	29,8	38,2	28,6	29,1	28,1	23,3	18,9	10,0	6,9
32k	-7,2	36,3	25,7	31,8	25,7	26,1	10,0	0,9	6,9	-7,8
32l	13,0	33,4	48,7	33,9	22,6	19,0	18,4	8,3	14,5	-3,6
32m	17,3	41,0	40,0	27,0	28,2	19,9	24,8	16,0	13,2	-26,8
33a	32,3	47,5	37,0	28,8	31,1	3,8	-1,8	1,0	0,5	11,4
33b	-63,1	29,9	21,8	-6,7	19,6	-0,5	-34,4	3,1	-5,9	1,3
33c	-98,2	18,8	11,7	23,1	-12,8	-56,0	-18,9	-5,0	-17,8	-11,8
33d	14,4	38,3	40,4	45,6	38,7	32,7	38,2	31,9	26,0	24,0
33e	-13,1	36,3	32,3	28,0	9,2	2,1	-13,0	-3,2	11,6	3,6
33f	-28,1	33,8	42,9	27,7	28,1	15,4	16,4	9,4	-1,2	8,3
33g	-68,0	22,6	38,3	27,1	29,3	20,2	20,3	12,2	13,7	19,0
33h	-92,0	-18,1	17,6	17,0	16,5	-0,4	-6,0	3,7	0,3	-19,2
33i	-45,8	-27,5	22,6	15,2	-8,4	14,1	7,5	-1,1	4,2	10,6
33j	-55,0	-35,5	-0,2	1,7	-3,3	-10,1	-20,7	-7,7	3,9	-2,7
33k	-122,1	-58,6	-39,8	-44,7	-81,5	-60,0	-33,6	-49,3	-20,4	-31,8
33l	-25,4	6,0	0,9	8,0	7,0	-15,2	-17,4	-36,6	-16,1	-13,8
33m	14,5	32,6	35,7	36,5	16,7	26,8	-6,8	0,7	-6,3	-6,6
34*a	-81,9	27,5	22,4	30,2	24,3	9,1	16,7	13,4	18,3	14,1
34*b	-23,5	37,3	35,3	32,8	25,2	21,5	13,8	4,3	23,4	22,3
34*c	-127,1	-22,0	-15,7	-19,8	-6,4	-57,6	-22,5	-19,6	-13,8	-10,2
34*d	-171,2	-16,0	-9,3	-27,7	-0,6	-16,8	-6,1	-0,4	1,8	-11,4
34*e	-74,5	26,6	31,0	31,2	7,1	-10,4	20,1	19,5	12,7	10,1
34*f	-69,7	31,2	23,9	18,7	15,7	7,8	-2,0	7,5	10,3	-1,9
34*g	-12,8	-12,5	38,7	27,7	25,6	23,9	8,9	6,0	14,6	8,1

Continua...

34*h	-100,6	27,0	28,3	35,8	36,8	29,1	30,8	29,5	30,7	26,6
34*i	31,0	34,3	38,8	32,4	17,0	0,0	32,7	33,0	21,2	7,0
34*j	-8,3	38,7	46,0	45,4	33,0	22,8	19,9	-6,6	-39,5	-7,1
34*k	29,0	35,8	41,2	43,5	40,3	34,7	12,0	17,2	10,1	-7,9
34*l	23,7	41,0	43,6	32,5	32,3	11,8	17,7	11,8	-4,4	-4,6
34*m	-46,2	26,6	4,8	6,4	12,9	8,6	19,8	-21,1	-1,4	-3,7
(Z)34a	56,4	58,4	58,3	-330,8	-111,2	12,1	32,5	33,8	36,5	29,6
(Z)34b	53,5	50,1	38,2	-247,2	-86,4	-8,8	20,2	21,2	11,2	13,3
(Z)34c	58,4	60,9	54,1	62,8	50,8	50,0	44,8	26,1	46,4	41,0
(Z)34d	53,2	51,4	49,9	49,9	46,5	40,9	37,2	30,2	25,6	27,9
(Z)34e	61,2	65,8	67,3	56,3	52,4	57,7	51,6	55,6	36,2	26,6
(Z)34f	64,5	66,1	63,0	71,9	53,9	57,0	54,4	37,8	29,7	20,8
(Z)34g	62,3	51,7	63,2	47,7	37,5	21,1	20,0	23,1	13,5	17,9
(Z)34h	54,5	50,6	47,5	56,8	39,9	44,2	33,4	30,1	18,4	4,8
(Z)34i	37,7	42,9	37,0	29,0	37,6	8,6	19,6	-37,4	5,5	-29,8
(Z)34j	19,7	-11,3	-4,7	-28,3	8,6	-49,2	6,0	-10,3	-36,3	-25,2
(Z)34k	57,3	55,0	45,1	9,7	27,2	21,9	24,8	26,8	-13,0	18,9
(Z)34l	66,0	52,9	52,6	50,6	43,4	24,9	23,8	18,7	16,2	26,5
(Z)34m	63,1	52,8	37,7	36,4	45,5	42,5	0,8	38,2	22,4	12,6

* Mistura entre os isômeros (Z) e (E)- γ -alquilideno- γ -lactamas

** Valores negativos referem-se à indução da formação de biofilme bacteriano

Tabela A 4 - Efeito dos compostos **32a-m**, **33a-m**, **34a-m** e **(Z)34a-m** sobre a formação do biofilme bacteriano de *S. epidermidis*

Composto	Efeito sobre a formação de biofilme (%)**									
	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)									
	87,50	43,75	21,88	10,94	5,47	2,73	1,37	0,68	0,34	0,17
32a	-21,7	-2,5	-5,1	-3,1	4,4	4,6	1,5	7,6	6,4	3,0
32b	-21,3	-19,0	-29,2	-15,7	-2,0	-3,7	4,9	5,2	9,3	-8,3
32c	-26,2	-3,5	-5,8	-8,3	7,5	1,5	0,3	4,8	-8,0	-6,8
32d	-14,3	15,1	-2,4	12,0	18,8	7,5	5,7	-0,1	-6,2	4,1
32e	1,3	1,3	2,2	6,1	3,8	2,9	-0,4	9,1	6,1	4,2
32f	-12,7	9,0	13,0	2,9	16,1	7,7	6,3	6,5	2,0	1,1
32g	-2,2	2,0	14,6	6,7	9,1	4,7	5,3	0,2	-12,3	5,6
32h	-50,4	-14,2	-7,5	-8,5	-3,6	-9,6	-2,8	-6,7	-8,6	-4,6
32i	-50,0	-31,0	-18,7	-3,2	2,3	-3,9	5,6	-0,7	-11,2	2,6
32j	-29,5	-11,2	-6,8	-17,3	7,2	-9,0	-0,9	2,7	-14,9	-5,2
32k	-38,3	-14,2	-8,2	-8,9	-0,5	4,2	-1,7	-8,3	-1,3	-3,7
32l	-117,5	-30,2	-39,4	-43,7	-20,7	-15,4	-10,0	-0,6	-15,2	-2,5
32m	-45,8	-43,9	-48,3	-47,4	-33,9	-16,3	-22,0	-15,5	-14,5	-16,4
33a	-93,3	-26,1	-52,0	-10,3	-37,9	-28,6	-34,4	-27,9	-1,4	7,3
33b	-67,2	-1,2	1,2	-1,9	1,1	-28,2	2,9	3,6	1,7	-2,8
33c	-56,6	-19,6	-26,1	-4,5	-2,2	-5,2	-2,9	-5,2	-14,8	-2,2
33d	-116,8	-41,0	-6,2	-7,6	13,9	-3,1	-9,8	-16,4	-4,0	-1,7
33e	-110,5	-7,5	3,6	3,3	11,8	8,9	10,5	11,9	7,1	12,5
33f	-56,7	-20,4	1,2	-10,4	-5,1	-11,3	-6,8	3,1	-5,8	-28,5
33g	-73,5	-1,5	-4,1	-13,2	1,4	-5,9	-3,8	-2,5	-20,7	-16,6
33h	-11,0	-8,0	-7,8	-23,4	0,0	-2,9	-7,7	3,0	9,1	2,9
33i	-18,2	-16,0	-1,7	-6,0	-6,4	-5,4	-3,3	1,7	-1,0	-4,4
33j	1,7	16,2	16,5	12,3	21,9	12,4	13,4	18,5	20,2	15,4
33k	-1,4	16,7	11,7	19,9	21,2	19,6	22,1	18,8	8,5	11,5
33l	-45,4	-12,1	-9,2	-8,4	1,4	-11,2	-1,8	-1,0	3,8	3,5
33m	-87,8	-28,0	-4,4	-8,6	-7,1	2,2	-0,2	3,4	1,8	-2,6
34*a	-25,5	7,8	-16,2	-49,0	-28,3	-4,6	-4,1	-64,6	-73,9	-27,7
34*b	-79,2	-36,3	-25,3	-18,3	-13,3	-12,5	-16,2	0,9	1,3	-6,9
34*c	-54,5	-15,6	-12,4	-12,4	-11,5	-7,7	-4,7	-15,4	-9,7	-6,8
34*d	-63,5	12,9	4,9	0,7	2,0	-4,4	13,3	-0,6	-2,8	-4,3
34*e	-39,2	-16,6	-11,9	1,8	3,5	6,6	-4,1	12,4	7,2	1,6
34*f	-10,0	13,6	9,7	13,0	12,7	8,3	8,5	10,1	1,0	-3,0
34*g	-84,3	-27,4	-8,9	-10,8	-2,0	10,6	-2,1	4,9	3,3	2,8

Continua...

34*h	-6,6	4,2	-1,1	-12,0	0,5	1,0	2,7	0,6	-4,0	-10,2
34*i	-6,9	-12,1	-20,6	-50,9	-1,4	8,4	-3,1	-16,9	-20,1	-2,2
34*j	-121,7	-45,6	-35,0	-32,6	-12,3	-27,5	-28,8	-40,4	-29,5	-8,4
34*k	-75,2	-94,3	-25,9	-18,1	-46,0	-58,3	-32,0	-4,8	-18,7	-4,8
34*l	-12,1	1,7	6,5	3,7	1,8	9,0	6,9	15,4	5,6	4,1
34*m	-62,0	-72,4	-58,1	-74,8	-55,2	-53,2	12,0	9,4	-8,7	-15,1
(Z)34a	-125,7	-85,3	-37,7	-35,9	-19,9	-17,1	-5,3	0,4	1,8	-15,9
(Z)34b	-178,1	-45,6	-47,7	3,2	-3,4	6,1	-4,6	5,3	3,4	-2,5
(Z)34c	-66,6	-64,1	-24,0	-2,7	-9,0	-7,7	-5,9	-7,0	-4,4	-5,1
(Z)34d	-150,3	-69,9	-38,3	-9,7	-9,2	-6,7	2,1	0,2	-1,4	-2,2
(Z)34e	-93,6	-52,8	-18,1	-8,4	-9,2	-4,1	7,5	2,9	2,4	0,6
(Z)34f	-123,7	-62,2	-29,2	-29,7	-9,6	-5,0	0,9	0,3	1,8	-0,7
(Z)34g	-118,7	-72,6	-22,7	-16,6	-6,6	-10,2	4,8	6,5	9,5	-0,6
(Z)34h	-116,5	-32,7	-16,7	-6,4	-1,1	6,6	5,5	4,7	1,6	-3,8
(Z)34i	-51,5	-56,1	-28,9	-21,6	-14,3	-3,5	-3,9	-8,6	-0,4	6,7
(Z)34j	-98,0	-15,3	-24,2	10,2	-3,5	6,0	4,3	10,8	14,1	6,5
(Z)34k	-37,7	-54,8	-42,5	-20,2	-2,2	-8,5	-0,9	-7,8	5,7	7,6
(Z)34l	-56,5	-108,6	-44,0	-12,3	-16,4	-16,0	-3,2	-4,7	-2,3	-7,6
(Z)34m	-36,7	-75,9	-52,2	-22,9	-15,8	3,2	5,5	-5,2	-12,5	-5,6

* Mistura entre os isômeros (Z) e (E)- γ -alquilideno- γ -lactamas

** Valores negativos referem-se à indução da formação de biofilme bacteriano.