

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

LUANA PIRES VIDA LEAL

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA REAÇÃO DE COMPOSTOS
IMIDAZO[4,5-C]-4,5,6,7-TETRAIDROPIRIDINA FRENTE AOS RADICAIS
DPPH· E ABTS·**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APUCARANA

2015

LUANA PIRES VIDA LEAL

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DA REAÇÃO DE COMPOSTOS
IMIDAZO[4,5-C]-4,5,6,7-TETRAIDROPIRIDINA FRENTE AOS RADICAIS
DPPH E ABTS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado ao curso superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná câmpus Apucarana, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Química

Orientadora: Prof^a Dra. Lilian Tatiani
Dusman Tonin

APUCARANA

2015

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Prof^a. Dra. Lilian Tatiani Dusman Tonin

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientador

Prof^a. Dra. Alessandra Machado Baron

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Membro

Prof^a. Dra. Patrícia Salomão Garcia

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Membro

AGRADECIMENTOS

Em um primeiro momento, é sempre bom ressaltar a importância de ter duas famílias. Aos meus pais Rosa e Marcelo, agradeço todo o apoio que me deram desde o começo, inclusive quando pensei que não fosse aguentar os cinco anos acadêmicos e todas as experiências que vieram junto, especialmente nesta reta final, quando não achei que fosse conseguir chegar até aqui. Ainda, não bastando ter uma família, meus pais me deram a oportunidade de ter mais um apoio, respectivamente Amarildo e Herica, que também souberam ser apoio e incentivo nesse tempo todo.

Agradeço aos meus irmãos, Manuella, Amanda Luisa e Luiz Eduardo por aguentarem as minhas oscilações de humor, os dias de nervoso e choro, mas também por saberem compartilhar as alegrias comigo. Essa caminhada seria impossível se eu não tivesse vocês comigo.

A todos os professores que passaram pela minha vida, vocês foram inspiração para que pudesse decidir exercer uma função desta pro resto dos meus dias.

Indispensavelmente, agradeço a paciência e a sabedoria da minha orientadora, Dra. Lilian Tatiani Dusman Tonin, que desde o início da graduação me acompanhou.

Fundamentalmente, não posso deixar de agradecer ao Orivaldo. Pela ajuda, pela motivação na reta final. Por acreditar em mim, diversas vezes muito mais do que eu. Por suportar os desabafos, os desesperos, as lágrimas, por estar comigo nas alegrias e nas tristezas e me ensinou a não tirar o sorriso do rosto por razão alguma.

Aos bons companheiros de caminhada, mais conhecido como amigos que me mostraram muitos valores e ajudaram a construir ou repensar outros, agradeço pela compreensão, os empurrões, os puxões de orelha, as risadas e até mesmo as lágrimas... Anna Zaffalão, Ana Moreno, Ana Pedrozo, Ana Carla, Beatriz Schulz, Bruno Machado, Camila Sabrina, Larissa Farias, Jordana Barbosa, Michelle e Renata Abramides (que longe dos olhos estavam o tempo todo presentes no coração), Nayane e Olavo Codina, Pedro Costa, Adelaide e Juliana Christmann e todos os familiares. Também agradeço à todas as

pessoas que passaram pela minha vida e me ensinaram alguma coisa, não citadas aqui, mas não menos importantes, meu muito obrigada.

“O trabalho dos químicos amplia-se para os processos de síntese de substâncias com as propriedades de interesse do químico. A reação química, em seu diálogo com a técnica, avança no processo de realização do possível. Nesse caso, o possível nunca é gratuito, mas está incluído em um programa de realização e ordena experiências para realização. O possível não é o que existe naturalmente, mas certamente pode ser produzido artificialmente” (Bachelard, 1972).

RESUMO

VIDA LEAL, Luana P. Síntese e avaliação da cinética da reação de compostos imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina frente aos radicais DPPH e ABTS. 2015. 69 p. Trabalho de Conclusão de Curso II – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2015.

Nos últimos anos, a pesquisa em torno dos radicais livres e atividade antioxidante de compostos orgânicos vem aumentando, devido à possibilidade de se desenvolver uma terapia alternativa para doenças como o câncer, por exemplo. Alguns compostos orgânicos possuem destaque para as atividades apresentadas, como é o caso de compostos que contém os grupos imidazol, que apresentam atividades anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antitubercular, entre outras. Este trabalho apresenta a síntese de quatro compostos imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina, que foram obtidos por meio da reação de condensação da L-histidina com o benzaldeído, 3-nitrobenzaldeído, 3-hidróxibenzaldeído e 4-metóxibenzaldeído, com rendimentos de 79%, 97,1%, 35% e 35%, respectivamente. Os compostos imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina tiveram suas estruturas confirmadas através da análise dos dados espectrais de RMN ^1H e RMN ^{13}C . Os derivados foram submetidos à análise da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, e um estudo da cinética da reação destes compostos com os radicais foi realizada avaliando-se a porcentagem de atividade antioxidante *versus* tempo. Os compostos **(20-23)** apresentaram atividade antioxidante pelos dois métodos. Pelo método DPPH observou-se que os padrões testados (Ácido Ascórbico, Ácido Gálico, BHT e Trolox) em concentrações menores que as dos compostos obtidos, os padrões exibem atividade antioxidante superior à atividade dos compostos e observou-se que os compostos **(22)** e **(23)** foram mais ativos. Pelo método ABTS, os padrões em menores concentrações do que os compostos testados exibiram menor atividade antioxidante e, por este método, os compostos **(21)** e **(23)** foram os mais ativos. A análise estatística comprovou também que os substituintes do grupo fenil influencia a atividade antioxidante. Baseado nos resultados obtidos, o presente estudo ressalta a necessidade de se utilizar mais um método para avaliar o potencial antioxidante de compostos e a indicação de estudos posteriores para estes compostos como fármacos biologicamente ativos.

Palavras-chave: imidazol, atividade antioxidante, síntese orgânica.

ABSTRACT

VIDA LEAL, Luana P. Synthesis and evaluation of kinetic reaction of imidazole-[4,5-c]4,5,6,7-tetrahydropyridine compounds ahead DPPH[·] and ABTS[·] radicals. 2015. 69 p. Work Course Conclusion II - Federal Technological University of Paraná. Apucarana, 2015.

In recent years, research surrounding the free radicals and antioxidant activity of organic compounds has increased because of the possibility of developing an alternative therapy for diseases such as cancer, for example. Some organic compounds have especially the activities presented, as is the case of compounds containing the imidazole group, which have anti-inflammatory activity, antioxidant, antitumor, antitubercular, among others. This paper presents the synthesis of four compounds imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahydropyridine, which were obtained by the condensation reaction of L-histidine with benzaldehyde, 3-nitrobenzaldehyde, 3-hydroxybenzaldehyde and 4-methoxybenzaldehyde, with yields of 79%, 97.1%, 35% and 35% respectively. The compounds imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahydropyridine had their structures confirmed by analyzing the spectral data ¹H NMR and ¹³C NMR. Derivatives were analyzed the antioxidant activity by DPPH[·] and ABTS[·] methods, and reaction kinetics studies of these compounds with radicals was carried out by evaluating the percentage of antioxidant activity versus time. The compounds **(20-23)** had antioxidant activity by two methods. By the method DPPH was observed that the tested standards (Ascorbic acid, Gallic acid, BHT and Trolox) in lower concentrations than the compounds obtained, the patterns exhibit antioxidant activity higher than the activity of the compounds and it was observed that the compounds **(22)** and **(23)** were more active. By the ABTS method, the patterns in lower concentrations than the compounds tested exhibited a lower antioxidant activity, and by this method, compounds **(21)** and **(23)** were the most active. The statistical analysis also proved that the substituents of the phenyl group influences the antioxidant activity. Based on these results, the present study evidence the importance of using more than one method to evaluate the antioxidant potential of compounds and indications of subsequent studies for these compounds as biologically active agents.

Keywords: imidazole, antioxidant activity, organic synthesis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição da cinética de compostos frente ao radical DPPH.....	26
Tabela 2 – Tempos reacionais para a síntese de (20-23).....	28
Tabela 3 – Concentrações dos antioxidantes sintéticos que foram testados com DPPH.....	29
Tabela 4 – Concentrações dos compostos (20-23) que foram analisados com DPPH.....	30
Tabela 5 – Concentrações dos antioxidantes sintéticos que foram testados com ABTS.....	31
Tabela 6 – Concentrações das amostras que foram analisadas com ABTS....	32
Tabela 7 – Rendimentos obtidos na síntese dos compostos (20-23).....	33
Tabela 8 – Dados de RMN ¹ H para 6-carbóxi-4-fenil-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (20).....	35
Tabela 9 - Dados de RMN ¹³ C para 6-carbóxi-4-fenil-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (20).....	36
Tabela 10 - Dados de RMN ¹ H para 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (21).....	39
Tabela 11 - Dados de RMN ¹³ C para 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (21).....	40
Tabela 12 - Dados de RMN ¹ H para 6-carbóxi-4-(3-nitrofenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (22).....	43
Tabela 13 - Dados de RMN ¹³ C para 6-carbóxi-4-(3-nitrofenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (22).....	43
Tabela 14 - Dados de RMN ¹ H para 6-carbóxi-4-(4-metóxifenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (23).....	46
Tabela 15 - Dados de RMN ¹³ C para 6-carbóxi-4-(4-metóxifenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (23).....	46
Tabela 16 – Descrição da cinética dos compostos (20-23) frente ao método DPPH:.....	54
Tabela 17 – Valores de %AA para o método DPPH em 30 minutos de reação.....	55
Tabela 18 – Descrição da cinética dos compostos (20-23) frente ao método DPPH:.....	59

Tabela 19 – Valores de %AA para o método DPPH em 30 minutos de reação.....60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anel imidazol.....	16
Figura 2 - Derivados com atividade antibacteriana.....	20
Figura 3 - Compostos com atividade antimicrobial.....	21
Figura 4 - Compostos com atividade anti-inflamatória.....	21
Figura 5 - Compostos com atividade antidepressiva.....	22
Figura 6 - Imidazóis com atividade antitumoral.....	22
Figura 7 - Grupo imidazol com atividade antioxidante.....	23
Figura 8 - Oxidação do ABTS do persulfato de potássio para gerar o cátion ABTS ^{•+} e sua reação com um composto anti-radical (AOH).....	24
Figura 9 - Representação esquemática da reação do radical DPPH e um antioxidante.....	25
Figura 10 - Rota sintética para compostos imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina. Condições: L-histidina, Aldeído, etanol e refluxo.....	27
Figura 11 - Mecanismo para obtenção dos compostos (20-23).....	33
Figura 12 - Espectro de RMN ¹ H (300 MHz) de 6-carbóxi-4-fenil-imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (20) em DMSO-d ₆	34
Figura 13 - Expansão do espectro de RMN ¹ H (300 MHz) de (20) em DMSO-d ₆	35
Figura 14 – Espectro de RMN ¹³ C para o derivado 6-carbóxi-4-fenil-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (20).....	37
Figura 15 - Expansão de RMN ¹³ C para o derivado 6-carbóxi-4-fenil-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (20).....	37
Figura 16 - Espectro de RMN ¹ H para 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina em DMSO-d ₆ (21).....	38
Figura 17 - Expansão do espectro de RMN ¹ H (300 MHz) em DMSO-d ₆ para o composto (21).....	39
Figura 18 - Espectro de RMN ¹³ C para o derivado 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (21).....	40
Figura 19 - Expansão do espectro de RMN ¹³ C para 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina em DMSO-d ₆ (21).....	41

Figura 20- Espectro de RMN ^1H (300 MHz) de 6-carbóxi-4-(3-nitrofenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetrahidropiridina (22) em DMSO- d_6	42
Figura 21 - Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz) em DMSO- d_6 para o composto (22).....	42
Figura 22 - Espectro de RMN ^{13}C para o derivado 6-carbóxi-4-(3-nitrofenil)-[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahidropiridina (22).....	44
Figura 23 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C para o derivado 6-carbóxi-4-(3-nitrofenil)-[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahidropiridina (22).....	44
Figura 24 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) para 6-carbóxi-4-(4-metoxifenil)-[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahidropiridina (23) em CD_3OD	45
Figura 25 - Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD) para 6-carbóxi-4-(4-metóxifenil)-[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahidropiridina (23).....	45
Figura 26 - Espectro e expansão de RMN ^{13}C para o derivado 6-carbóxi-4-(4-metóxifenil)-[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahidropiridina (23).....	47
Figura 27 - Cinética de consumo do DPPH para o Ácido Ascórbico.....	49
Figura 28 - Cinética de consumo do DPPH para o Ácido Gálico.....	49
Figura 29 – Cinética de consumo do DPPH para o BHT.....	50
Figura 30 - Cinética de consumo do DPPH para o Trolox.....	50
Figura 31 – Cinética de consumo do DPPH para o composto (20).....	52
Figura 32 - Cinética de consumo do DPPH para o composto (21).....	53
Figura 33 – Cinética de consumo do DPPH para o composto (22).....	53
Figura 34 – Cinética de consumo do DPPH para o composto (23).....	54
Figura 35 - Interação do radical ABTS \cdot com as soluções padrões de antioxidantes sintéticos.....	57
Figura 36 – Cinética de consumo do radical ABTS \cdot para os compostos (20-23).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico
BHT	Di-terc-butil metil fenol
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
IC ₅₀	Concentração Inibitória
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucleico
%S	Porcentagem e sequestro de radical livre ABTS
SOD	Superóxido dismutase
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E RADICAIS LIVRES	18
3.2 COMPOSTOS CONTENDO O GRUPO IMIDAZOL E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	20
3.3 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	23
3.3.1 MÉTODO DO RADICAL ABTS.....	24
3.3.2. MÉTODO DO RADICAL DPPH.....	25
4. METODOLOGIA	27
4.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS IMIDAZO [4,5-C]-4,5,6,7-TETRAIDROPIRIDINA	27
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS	28
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	29
4.3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO CINÉTICO FRENTE AO RADICAL DPPH·	29
4.3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO CINÉTICO FRENTE AO RADICAL ABTS	30
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	Erro! Indicador não definido.
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS	33
5.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	47
5.2.1.1 ESTUDO CINÉTICO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO MÉTODO DPPH·	47
5.2.1.2 ESTUDO CINÉTICO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO MÉTODO ABTS·	Erro! Indicador não definido.
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
7. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

Sabe-se que, atualmente, existe a busca incessante pela inovação no tratamento de doenças como câncer, artrite, diabetes, inflamações, entre outras e, por esse motivo, há a busca por medicamentos ou rotas alternativas que sejam cada vez mais eficazes, minimizando os efeitos das doenças associadas aos radicais livres e ao estresse oxidativo (RAJ; MRUTHYUNJAYASWAMY, 2014).

Os antioxidantes vêm sendo muito estudados nos últimos anos por possuírem a propriedade de retardar ou prevenir a oxidação de moléculas, protegendo a célula de danos causados pelos radicais livres, que são átomos com elétrons livres que conferem à célula uma toxicidade relativamente alta, alterando a estrutura biológica de proteínas, DNA, fosfolípidios de membrana, entre outros, por meio de uma série de reações de peroxidação através do estresse oxidativo (LLACUNA; MACH, 2012; WENZEL, 2012; BAE et al., 1999).

Sendo assim, relatos recentes na literatura confirmam que os radicais livres estão diretamente associados ao câncer, mutagênese, genotoxicidade (GODFREY, 1957), doenças degenerativas (LLACUNA; MACH, 2011), doenças cardiovasculares, catarata e disfunções cognitivas (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992). Isso acontece devido a um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) que aumentam a concentração de radicais livres nas células, gerando o estresse oxidativo, o principal processo causador de doenças como as citadas. (ARBOS, 2009).

Neste sentido, os antioxidantes atuam na prevenção ou minimização da proliferação dessas doenças (SAN-MIGUEL; MARTIN-GIL, 2009). Estão presentes no organismo para defender o corpo de radicais livres. Enzimas como a superóxido dismutase (SOD), por exemplo, convertem peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, minimizando a quantidade do radical peróxido no organismo. Enzimas antioxidantes são encontradas nas mitocôndrias e no citosol (HALLIWELL, 1994).

A formação de espécies com capacidade de decomposição oxidativa pode ser ativada por processos térmicos, absorção de raios gama ou radiação

ionizante, bem como a iniciação química envolvendo íons metálicos ou metaloproteínas (KANNER et al., 1987).

O imidazol **(1)** é um grupo heterocíclico aromático que possui uma variedade de estudos relatando diversas propriedades terapêuticas, como por exemplo atividade tripanocida (OLMO et al., 2015), atividade analgésica (ACHAR et al., 2010; GOYAL et al., 2010), atividade antimicrobiana e antioxidante (NAYAK et al., 2015), entre outras. A atividade antioxidante do anel imidazol se deve aos elétrons livres do nitrogênio (carga negativa ou elétrons desemparelhados), o que confere ao anel propriedades oxidorrredutoras, reagindo com diversos radicais que podem auxiliar na quantificação da atividade antioxidante (NAYAK et al., 2015).

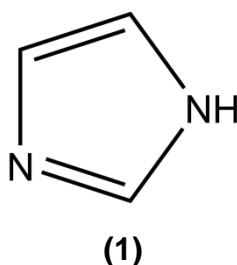


Figura 1 – Anel imidazol
Fonte: Den Store Danske (2010)

Com o objetivo de se descobrir compostos que possuam atividade antioxidante e que possam atuar na prevenção de doenças, o trabalho descreve a síntese de compostos contendo o grupo imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina e avalia a cinética de reação frente aos radicais livres DPPH[·] e ABTS[·]. O intuito é de que estes derivados possam servir de protótipos para se tornarem fármacos biologicamente ativos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar compostos que contenham o grupo imidazol, e realizar um estudo da cinética da reação destes compostos frente aos radicais DPPH e ABTS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar derivados imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina, através da reação de condensação de Pictet-Spengler da L-histidina com o benzaldeído, 3-hidróxibenzaldeído, 3-nitrobenzaldeído e 4-metóxibenzaldeído.
- Confirmar as estruturas dos compostos sintetizados, através da análise de dados por RMN ^1H e RMN ^{13}C .
- Realizar a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante dos compostos sintetizados, utilizando as metodologias do sequestro do radical livre DPPH e ABTS.
- Realizar um estudo da cinética da reação dos compostos sintetizados com os radicais DPPH e ABTS.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E RADICAIS LIVRES

De acordo com Wenzel (2012) antioxidantes já são utilizados de longa data como fitoterápicos e também possuem utilidade como conservantes de alimentos, no intuito de retardar uma possível deterioração e descolorimento devido à oxidação.

Os antioxidantes são utilizados para minimizar as deteriorações causadas pelos danos oxidativos. Quando as espécies antioxidantes não conseguem combater todos os radicais livres, o processo de estresse oxidativo nas células é desencadeado, oxidando as biomoléculas, o que resulta em morte celular e até mesmo danos graves aos tecidos (YÜKSEK et al, 2015).

Halliwell e Gutteridge (2000) definem como antioxidantes todas as substâncias que existam em baixas concentrações, ao se comparar com a concentração de proteínas, lipídios, carboidratos (substratos oxidáveis), prolonga de maneira efetiva ou, em alguns casos, impede a oxidação desse substrato.

Os antioxidantes estão presentes no organismo para defender o corpo de radicais livres, e conseqüentemente possíveis doenças que possam comprometer o metabolismo celular. Por exemplo, enzimas como a superóxido dismutase (SOD), por exemplo, convertem peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, minimizando a quantidade do radical peróxido no organismo. Enzimas como estas são encontradas nas mitocôndrias e no citosol (HALLIWELL, 1994).

Estes compostos antioxidantes são classificados em relação à sua utilidade, porém, como um antioxidante pode desempenhar várias funções, alguns estudiosos como Sies e Stahl (1995) criaram um quadro dividindo antioxidantes em enzimáticos e não enzimáticos (Quadro 1).

Não-enzimáticos	Vitamina E (α -tocoferol), β -caroteno, licopeno, ácido ascórbico, flavonoides, proteínas plasmáticas, selênio, glutathione, clorofilina, curcumina, L-cisteína, óleos essenciais, ácidos fenólicos, polifenóis.
Enzimáticos	Superóxido dismutase (SOD), catalase, NADPH-quinona oxidoreductase, glutathione peroxidase, enzimas de reparo.

Quadro 1. Classificação de antioxidantes

Fonte: Adaptado de Wenzel (2012)

De acordo com Wenzel (2012) e Rufino (2007), os antioxidantes enzimáticos impedem a formação das espécies reativas de oxigênio, também denominadas ROS, que são constituídas pelos radicais superóxido (O_2^-), radical oxidrila ($\bullet OH$), óxido nítrico (NO), radical lipídico ($L\bullet$), o peróxido (H_2O_2), entre outros, causadores do dano oxidativo.

Já os antioxidantes não-enzimáticos podem ser classificados em naturais, como a vitamina C, por exemplo, e sintéticos, como o BHT. São compostos químicos que atuam na proteção de alimentos contra a degradação química proveniente da auto-oxidação/peroxidação da parte lipídica, proteica e DNA (WENZEL, 2012).

Radicais livres, como mencionados anteriormente, são espécies químicas produzidas durante os processos metabólicos que possuem elétrons livres na sua camada de valência, tornando-as muito reativas. Em grandes quantidades, causa a oxidação, que por sua vez, deteriora células como DNA e proteínas, através do estresse oxidativo (WENZEL, 2012; BAE et al., 1999).

Este excesso de radicais livres, além de causar danos como os citados anteriormente, também estão aliados à outras patologias, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cognitivas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1992; YÜKSEK et al., 2015). A formação de espécies com capacidade de decomposição oxidativa pode ser ativada por processos

térmicos, absorção de raios gama ou radiação ionizante, bem como a iniciação química envolvendo íons metálicos ou metaloproteínas (KANNER et al.,1987).

3.2 COMPOSTOS CONTENDO O GRUPO IMIDAZOL E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O grupo imidazol **(1)**, é uma estrutura heterocíclica de 5 membros, que possui nitrogênio na posição 1 e 3. Este anel está presente em uma variedade de produtos naturais, como a purina, histamina, histidina e ácidos nucleicos, por exemplo. Sua incorporação às novas drogas sintéticas constitui em um avanço na descoberta da síntese de novos medicamentos, já que suas propriedades terapêuticas são variadas (SHALINI; SHARMA; KUMAR, 2010).

Suas propriedades medicinais incluem anticâncer, inibidores de β -lactamase, inibidores de carboxipeptidase, hemeoxigenases, agentes rejuvenescedores, anticoagulantes, anti-inflamatórias, antibióticas, antifúngicas, antivirais, antitubercular, antidiabéticas e antimalarial (SHALINI, SHARMA E KUMAR, 2010).

Camacho et al. (2011) mostraram que uma série de compostos contendo o grupo imidazol **(2-3)** (Figura 2) apresentaram atividade antimalarial frente a *Plasmodium berghei* e antibacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, apresentando valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

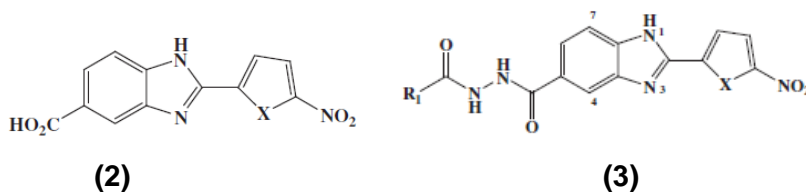
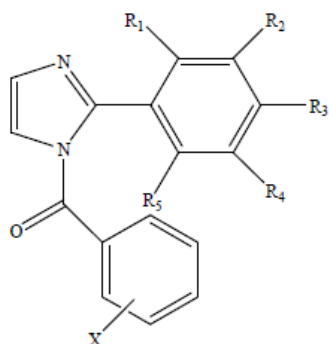


Figura 2 –Derivados com atividade antimalarial e antibacteriana
Fonte: Camacho et al. (2011)

Sharma et al. (2009) sintetizaram os compostos **(4-7)** (Figura 3) e verificaram atividade antimicrobial contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e algumas espécies fúngicas.



(4-7)

- 4)** R₁=Cl, R₂=H, R₃=H, R₄=H, R₅=H, X=4-NO₂
- 5)** R₁=COOH, R₂=H, R₃=H, R₄=H, R₅=H, X=4-NO₂
- 6)** R₁=H, R₂=H, R₃=Cl, R₄=H, R₅=H, X=2-Br
- 7)** R₁=H, R₂=H, R₃=NO₂, R₄=H, R₅=H, X=2-Br

Figura 3 -Compostos com atividade antimicrobial
Fonte: Sharma et al. (2009)

Achar et al. (2010), estudaram uma série de derivados que foram analisadas quanto às suas atividades analgésicas e anti-inflamatória. Os compostos **(8)** e **(9)** apresentaram valores altos de atividade analgésica, quando comparada à droga padrão nimesulida.

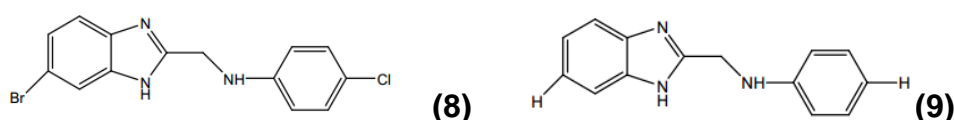
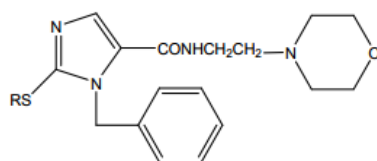


Figura 4—Compostos com atividade anti-inflamatória
Fonte: Achar et al (2010).

Hadizadeh et al. (2008) sintetizaram análogos da moclobemida substituindo seu anel fenil por imidazol, resultando no composto **(10)** (Figura 5). Sua atividade antidepressiva foi avaliada e os autores afirmam que sua ação foi bem mais potente que a moclobemida.

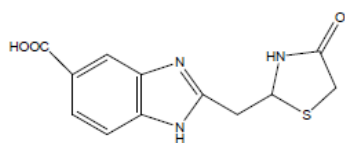


(10)

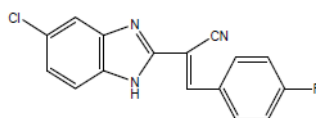
Figura 5- Compostos com atividade antidepressiva

Fonte: Hadizadeh et al. (2008).

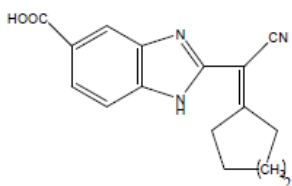
Refaat (2010) mostrou em seu trabalho a síntese de vários 2-benzimidazóis substituídos e avaliaram atividade anticâncer. Os compostos (11) e (12) foram os que apresentaram a maior atividade anticâncer frente ao carcinoma hepatocelular humano. Os compostos (13-16) demonstraram melhor desempenho frente às células de carcinoma mamário humano e os compostos (15-16) mostraram atividade moderada contra o carcinoma de cólon humano (Figura 6).



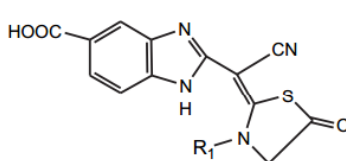
(11)



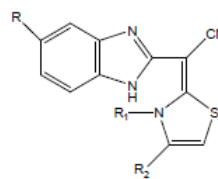
(12)



(13)

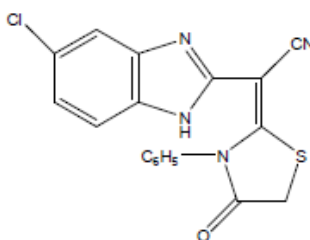


(14)

R₁ = Ciclohexil

(15)

R=COOH

R₁= 4-Br-C₆H₄R₂=2-OCH₃- C₆H₄

(16)

Figura 6 – Imidazóis com atividade antitumoral

Fonte: Refaat et al. (2010).

De acordo com Lakshmanan et al. (2010), o grupo imidazol também mostrou atividade antioxidante ao ser avaliado pelo método DPPH, apresentando valores de IC_{50} entre 18,11 e 27,66 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os compostos **(17)** e **(18)** (Figura 7). Alguns valores de IC_{50} de antioxidantes comerciais, como por exemplo vitamina C e Trolox utilizando o método DPPH são 43 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 2,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (ALMEIDA et al., 2013).

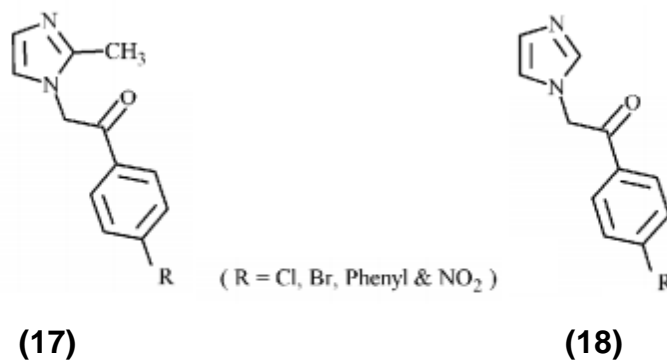


Figura 7 – Grupo imidazol com atividade antioxidante.

Fonte: Lakshmanan et al. (2010).

Acima, foram mostradas algumas atividades biológicas do composto imidazol, o que apenas confirma sua potencialidade para futuros estudos e síntese de novos compostos.

3.3 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Vários métodos para se determinar a capacidade antioxidante são descritos na literatura. (FLOEGEL et al., 2011; THAIPOONG et al., 2006; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995; RE et al., 1999). Estas metodologias estão sujeitas a interferências mesmo que se baseiem em fundamentos teóricos diversos. Sendo assim, é necessária a utilização de mais de uma técnica, tendo em vista que nenhum ensaio isolado reflete a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (PRIOR; CAO, 1999).

3.3.1 MÉTODO DO RADICAL ABTS

De acordo com Miller et al. (1993), o radical ABTS \cdot é um composto quimicamente estável, que possui solubilidade alta em água (50 mg mL^{-1}). Este radical é advindo de seu precursor: ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico. Possui uma coloração esverdeada e se forma através da reação de redução de persulfato de potássio (SIGMA-ALDRICH, 1996; RE et al., 1999).

Bergamaschi (2010) descreve que o método de determinação da atividade antioxidante total de compostos utilizando este método se dá através da captura de seu radical livre, que ao capturar o antioxidante, resulta na descoloração da solução esverdeada. O estudo para o radical ABTS utiliza o espectrofotômetro com comprimento de onda único de 734 nm (RUFINO, 2007).

Este método, representado pela Figura 8 é um dos mais rápidos para se determinar a atividade antioxidante, podendo ser realizado em espécies lipofílicas e hidrofílicas (KUSKOSKI et al, 2005).

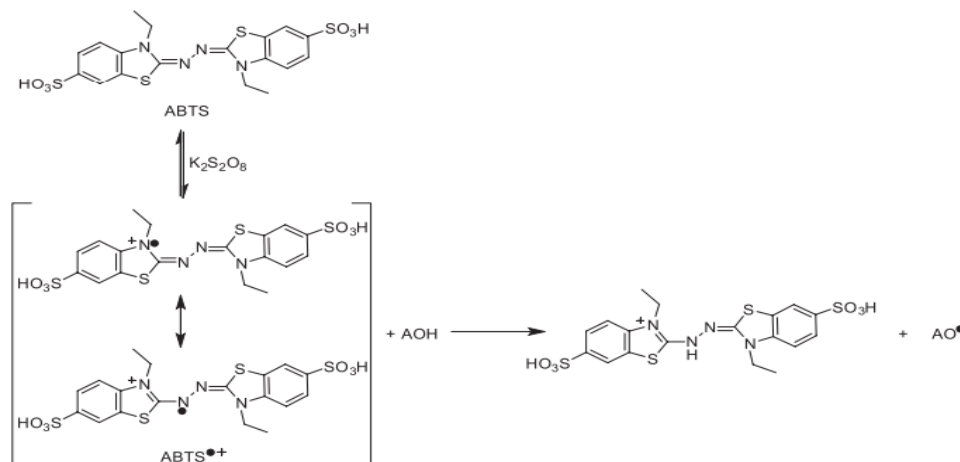


Figura 8 - Oxidação do ABTS do persulfato de potássio para gerar o cátion ABTS \cdot e sua reação com um composto anti-radical (AOH)
 Fonte: Oliveira et al. (2014).

3.3.2. MÉTODO DO RADICAL DPPH

O DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é um radical livre estável que tem sido utilizado como reagente colorimétrico em testes para determinação da atividade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres (REZENDE, 2010).

Este radical tem como vantagens avaliar rapidamente e precisamente uma grande quantidade de amostras, já que avalia a capacidade antioxidante até em pequenas concentrações e permite analisar amostras lipofílicas, portanto independe da polaridade do substrato. O estudo com o DPPH é utilizado em diversas pesquisas quando se deseja isolar antioxidantes e/ou quantificar os antioxidantes de uma amostra (REZENDE, 2010).

O DPPH possui a cor violeta, é um radical de nitrogênio orgânico, estável, que possui absorção na faixa de 515-520 nm. Sua redução é observada por meio do decréscimo da absorbância. Quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre a mudança de cor para amarela (PRADO, 2009), como mostrado na Figura 9.

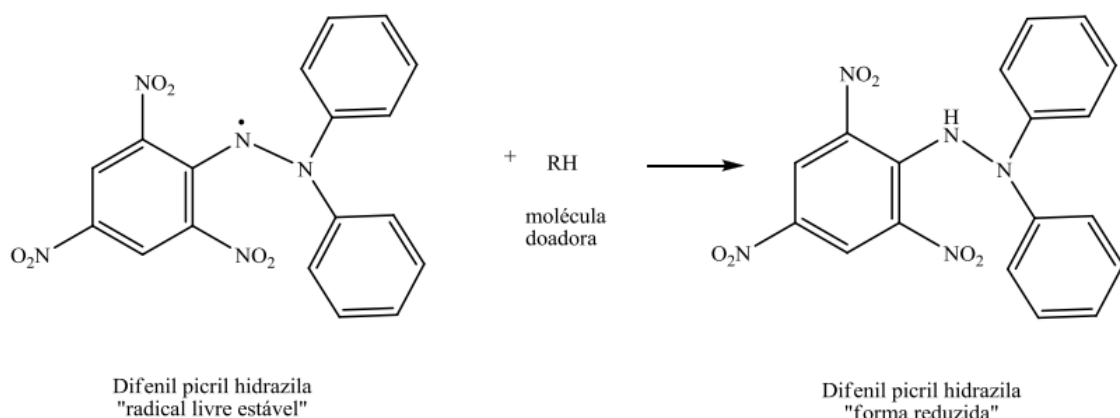


Figura 9 – Representação esquemática da reação do radical DPPH e um antioxidante
 Fonte: Cavinatto (2010).

Através do decréscimo da absorbância é possível monitorar a redução do radical DPPH• e conseqüentemente a determinação da porcentagem da atividade

antioxidante dos compostos e/ou qual o valor de DPPH radicalar remanescente na amostra (ARBOS, 2009).

Conforme ocorre a redução do radical livre DPPH•, a coloração da amostra passa de roxo intenso para amarelo devido ao emparelhamento dos elétrons livres do radical aos elétrons da amostra. A intensidade da cor varia proporcionalmente à concentração de antioxidantes presentes e, a partir da mudança de cor, constata-se que quanto mais amarelo, maior a atividade antioxidante na solução analisada (ARBOS, 2009).

Existem três tipos de cinética que podem ser observadas ao realizar estudos com DPPH, devido às interações diferenciadas das amostras com o radical. A literatura descreve compostos que possuem cinética lenta (que demoram mais de uma hora para reagir), cinética intermediária (levam de 5 a 30 minutos) e cinética rápida que levam poucos segundos para observar a redução do radical (CARPES, 2008; ARBOS, 2009; REZENDE, 2010).

A Tabela 1 mostra alguns antioxidantes e seu tipo de cinética frente ao radical DPPH:

Tabela 1 - Descrição da cinética de compostos frente ao radical DPPH

Antioxidante	Cinética
Ácido Ascórbico	Rápida
BHT	Lenta
Ácido Gálico	Rápida
Trolox	Intermediária

Fonte: Adaptado de Rezende (2010)

4. METODOLOGIA

4.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS IMIDAZO [4,5-C]-4,5,6,7-TETRAIDROPIRIDINA

Os compostos foram obtidos a partir da metodologia empregada por outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa (CARVALHO, 2014; TONIN, 2014; NUNES, 2014; BATISTA, 2014).

Os derivados imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina foram preparados pela rota sintética mostrada na Figura 10.

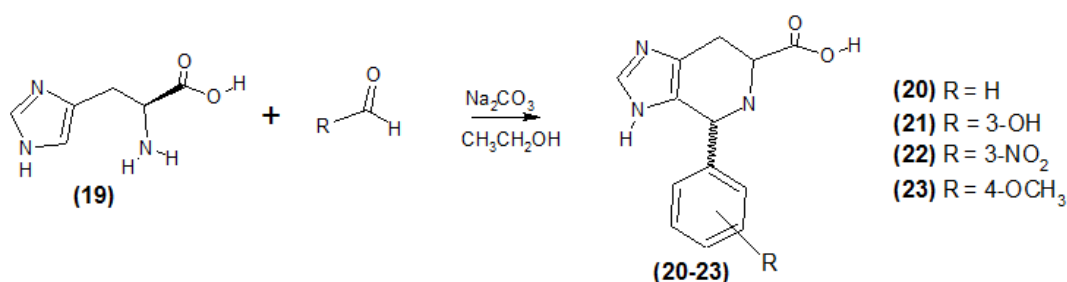


Figura 10 – Rota sintética para compostos imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina. Condições: L-histidina, Aldeído, etanol e refluxo.

Fonte: Autoria própria

À uma solução de 5,0 g (0,032 mol) de L-histidina (19) em 150 mL de EtOH adicionou-se um equivalente do aldeído correspondente e 6 equivalentes de Na_2CO_3 . As misturas reacionais foram mantidas sob refluxo e acompanhadas por CCD (Cromatografia em Camada Delgada). A Tabela 2 apresenta os tempos reacionais para síntese de cada composto. Após o tempo de refluxo, as amostras foram resfriadas, filtradas para retirada do carbonato de sódio e concentradas em evaporador rotatório. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna (CC), sendo os eluentes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20%, 40%, 60% e MeOH 100%. Para todos os compostos foram obtidos uma mistura de diastereoisômeros.

Tabela 2 – Tempos reacionais para a síntese de (20-23).

Composto	Tempo (h)
20	48
21	24
22	7
23	48

Fonte: Autoria própria

Uma metodologia alternativa foi empregada (SMITH et al., 2013) para a síntese de **(20)**: adicionou-se 1,0 g de cloridrato de histidina dissolvida em 10 mL de água a um balão de fundo redondo de 50 mL sob agitação magnética à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado cautelosamente (gota-a-gota) à solução 0,80g de KOH (hidróxido de potássio) dissolvidos em 3 mL de água. Após a adição total de KOH, foi adicionado 1,0 equivalente de benzaldeído dissolvido em 3 mL de etanol, e a mistura reacional foi deixada em refluxo pelo período de 1h e em uma segunda tentativa por 8h. Para remoção completa do solvente, utilizou-se evaporador rotatório. Após resfriamento, a mistura foi acidificada até atingir o pH 6,8 sob agitação magnética. Não foi obtido o precipitado esperado.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS

A caracterização estrutural dos compostos sintetizados foi realizada através da análise dos dados espectrais de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN). Os espectros foram obtidos no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, em espectrômetro VARIAN modelo Mercury Plus BB 300 MHz tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos referentes aos espectros foram dados em ppm e os solventes utilizados foram DMSO-d₆ e CD₃OD.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a determinação da atividade antioxidante foram utilizados dois métodos: DPPH[·] e ABTS[·].

4.3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO CINÉTICO FRENTE AO RADICAL DPPH[·]

A atividade antioxidante dos compostos sintetizados **(20-23)** e dos padrões Ácido Ascórbico, Ácido Gálico, BHT e Trolox frente ao método DPPH[·] foi determinada pelo método colorimétrico segundo os procedimentos descritos por Kulisic et al. (2004).

A Tabela 3 apresenta as concentrações trabalhadas com os padrões. Os valores das concentrações variaram de um padrão para o outro em função dos seus resultados.

Tabela 3 – Concentrações dos antioxidantes sintéticos que foram testados com DPPH[·]

Compostos	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ácido Ascórbico	10.000, 100, 50, 25, 10
Ácido Gálico	10.000, 10, 5, 2,5; 1
BHT	10.000, 100
Trolox	10.000, 100, 50, 25, 10

Fonte: Autoria própria

Para os compostos sintetizados **(20-23)** foram testadas diferentes concentrações, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentrações dos compostos (20-23) que foram analisadas com DPPH:

Compostos	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
(20)	10.000
(21)	5.000, 20.000
(22)	2.500
(23)	10.000

Fonte: Autorial própria

Para avaliar a atividade antioxidante de cada amostra, utilizou-se uma solução $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DPPH (em metanol HPLC). A absorvância foi determinada em espectrofotômetro UV (Cary 60 - Agilent) a 517 nm, utilizando-se 2,0 mL da solução de DPPH e 2,0 mL das soluções das amostras. Como controle negativo utilizou-se 2,0 mL da solução de DPPH $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 2,0 mL de metanol HPLC. Todas as análises foram realizadas em triplicata. As leituras das absorvâncias foram realizadas com tempo mínimo de 120 minutos.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi calculada em relação ao controle negativo (2 mL de DPPH, 2 mL de MeOH), de acordo com a equação (1) abaixo:

$$\% \text{ AA} = [(A_c - A_a)/A_c] \times 100 \quad (1)$$

Onde:

A_c = absorvância do controle negativo

A_a = absorvância da amostra em um determinado instante.

Os valores obtidos para a análise cinética foram plotados em um gráfico de %AA versus tempo, utilizando-se o programa Kinetics[®]. Para análise dos dados de %AA de uma determinada amostra utilizou-se o software Excel[®].

4.3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTUDO CINÉTICO FRENTE AO RADICAL ABTS

A solução de ABTS foi preparada dissolvendo-se 192 mg de ABTS em 50,0 mL água destilada e armazenada em frasco de vidro âmbar sob refrigeração.

Uma solução de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) foi preparada (140 mM) dissolvendo-se 378,4 mg de persulfato de potássio em 10,0 mL de água destilada e posterior armazenamento em frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado em temperatura ambiente. Ambas as soluções têm validade de 30 dias.

O radical $ABTS^+$ foi preparado a partir da reação de 5,0 mL da solução estoque de ABTS com 88,0 μ L da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, diluiu-se 1,0 mL desta mistura em álcool etílico até obter-se uma absorvância de 0,70 nm \pm 0,05 nm a 734 nm.

Para avaliar a porcentagem de atividade antioxidante de cada uma das amostras, adicionou-se 3,0 mL do radical preparado $ABTS^+$ a 30,0 μ L das amostras nas concentrações mostradas na Tabela 5. O controle negativo foi preparado substituindo-se 30,0 μ L das amostras, por etanol. As leituras das absorvâncias foram realizadas em um tempo médio de 100 minutos, no comprimento de onda de 734 nm, utilizando-se álcool etílico HPLC como branco. Nos testes preliminares para as amostras, inicialmente testou-se a concentração de 100 μ g mL⁻¹ para os padrões e de 10000 μ g mL⁻¹ para os compostos sintetizados e em função do comportamento obtido de cada composto nos testes para as concentrações foram ajustadas. A Tabela 5 apresenta as concentrações trabalhadas com os padrões de análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 5 – Concentrações dos antioxidantes sintéticos que foram testados com $ABTS^+$

Compostos	Concentrações (μg mL⁻¹)
Ácido Ascórbico	10, 100
Ácido Gálico	100
BHT	100
Trolox	100

Fonte: Autoria própria

Tabela 6 – Concentrações das amostras que foram analisadas com ABTS

Compostos	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
(20)	10.000
(21)	10.000, 100, 10
(22)	10.000, 100
(23)	10.000, 100

Fonte: Autoria própria

A porcentagem de sequestro (%S) do radical ABTS foi calculada em relação ao controle negativo (3 mL de ABTS, 30,0 μL de EtOH), de acordo com a equação **(2)** abaixo:

$$\%S = [(A_c - A_a)/A_c] \times 100 \quad \mathbf{(2)}$$

Onde:

A_c = absorvância do controle negativo

A_a = absorvância da amostra em determinado tempo

Os dados foram obtidos por meio de comprimento de onda único (437 nm) em espectrofotômetro UV-Vis e os dados para construção da curva cinética foram obtidos por meio do software Kinetics[®]. Para análise dos dados de %AA de uma determinada amostra utilizou-se o software Excel[®].

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos acima descritos foram realizados em triplicata. A análise estatística das absorvâncias foram determinadas a partir do software STATISTICA, versão 13.0, sendo os resultados apresentados por média \pm desvio padrão, com $n=3$, e considerados com diferenças estatísticas quando apresentaram a probabilidade de hipótese de nulidade menor que 5% ($p \leq 0,05$). Em seguida, aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA), posteriormente houve comparações múltiplas pelo teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS

As reações para obtenção dos compostos **(20-23)** foram realizadas a partir da reação de Pictet-Spengler do aldeído correspondente com a L-histidina, catalisada por uma base (Na_2CO_3), formando o íon imínio como intermediário, conforme mecanismo proposto na Figura 11.

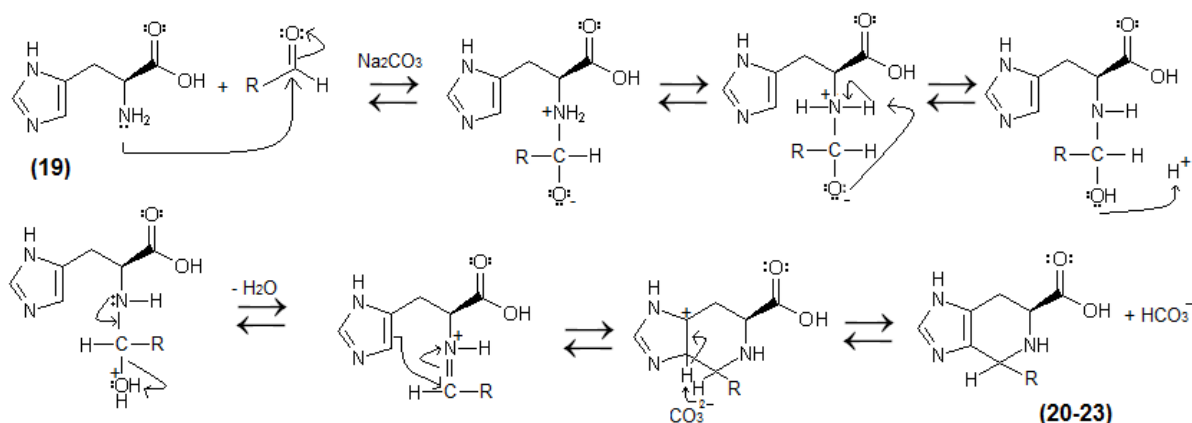


Figura 11 – Mecanismo para obtenção dos compostos (20-23)

Fonte: Autoria própria

Os rendimentos obtidos na preparação dos derivados **(20-23)** estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Rendimentos obtidos na síntese dos compostos (20-23)

Composto	Rendimento (%)
(20)	79
(21)	35
(22)	97,1
(23)	35

Fonte: Autoria própria

A formação dos derivados 6-carbóxi imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina contendo diferentes substituintes na posição-4 (**20-23**) foram confirmadas a partir dos sinais dos seus espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C mostrados nas Figuras 12-26.

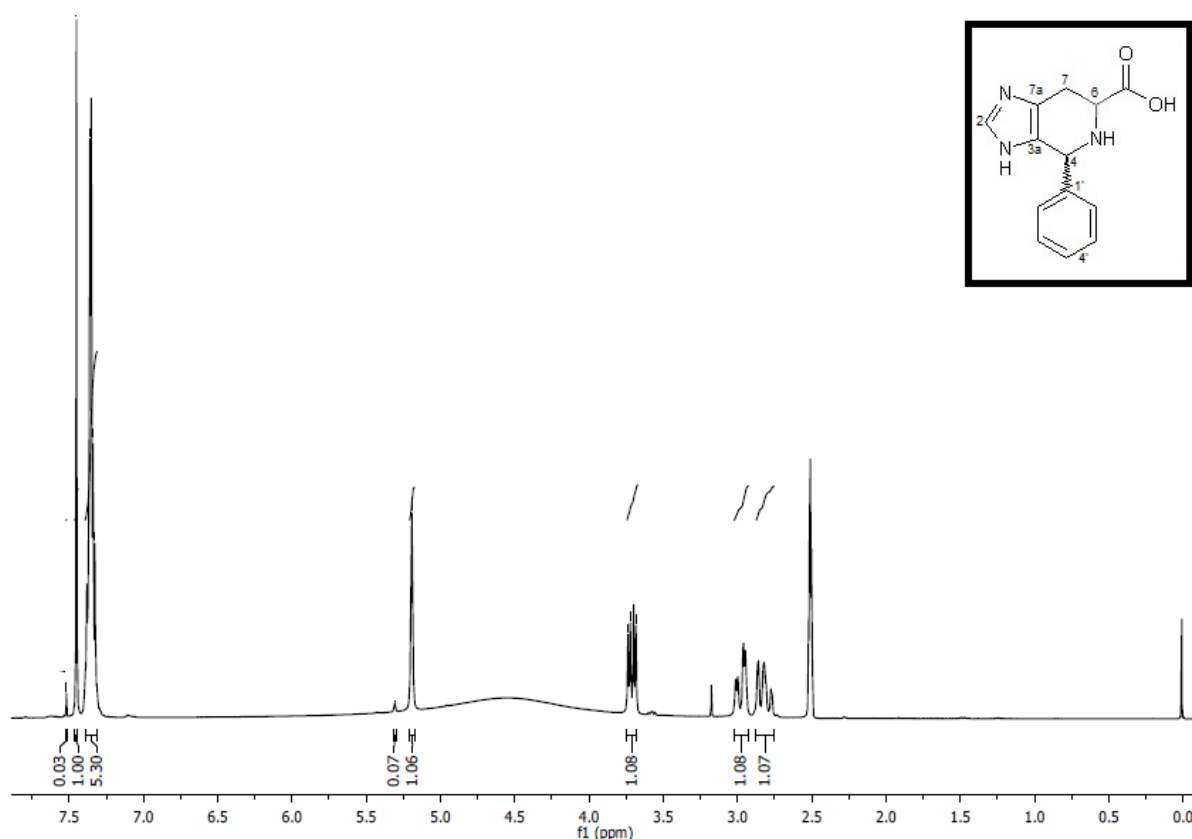


Figura 12 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) de 6-carbóxi-4-fenil-imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (**20**) em DMSO-d_6
Fonte: Autoria própria

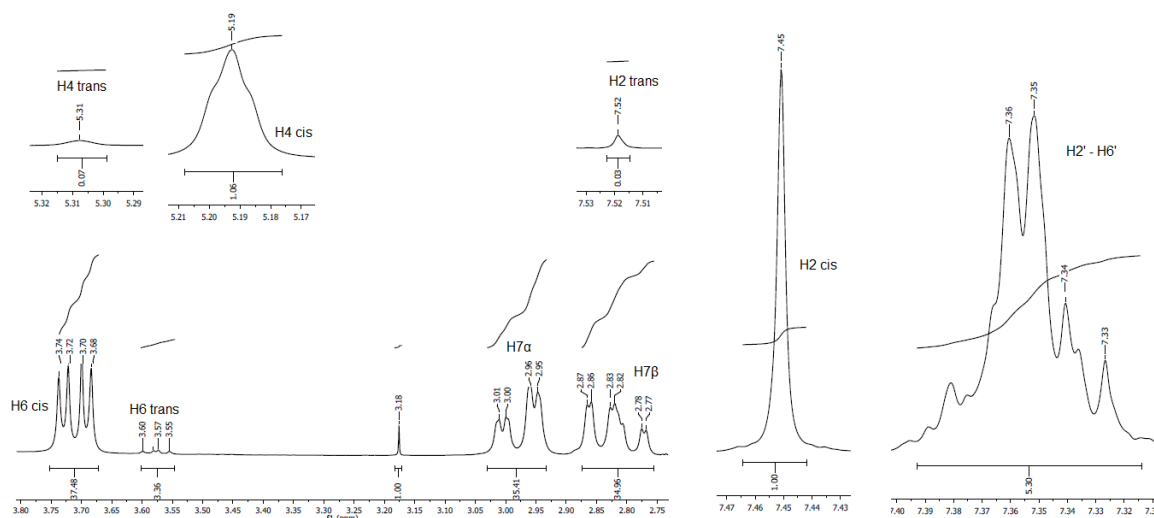


Figura 13 - Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz) de (20) em DMSO-d_6
Fonte: Autoria própria

A formação do composto **(20)** foi confirmada pelos sinais no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 7,52 para H2-*trans* e δ_{H} 7,45 para H2-*cis*, δ_{H} 5,19 (*cis*) e 5,31 (*trans*) foram atribuídos para o H4, δ_{H} 3,68-3,70 para o H6 (*cis*) e δ_{H} 3,55-3,60 para o H6-*trans*, δ_{H} 2,95-3,01 para H7 α e para o H7 β δ_{H} 2,77-2,87. Além da presença dos hidrogênios aromáticos do substituinte na posição-4 na região de δ_{H} 7,33-7,36. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados de RMN ^1H para 6-carbóxi-4-fenil-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (20)

H	<i>cis</i>	<i>trans</i>
	δ_{H} (multiplicidade, J=Hz)	δ_{H} (multiplicidade, J=Hz)
2	7,45 (s)	7,52 (s)
4	5,19 (s)	5,31 (s)
6	3,71 (<i>dd</i> , 6,0; 12,0)	3,55-3,60 (<i>m</i>)
7 α	2,95-3,01 (<i>m</i>)	2,95-3,01 (<i>m</i>)
7 β	2,77-2,87 (<i>m</i>)	2,77-2,87 (<i>m</i>)
2'/6'	7,33-7,36 (<i>m</i>)	7,33-7,36 (<i>m</i>)
3'/5'	7,33-7,36 (<i>m</i>)	7,33-7,36 (<i>m</i>)
4'	7,33-7,36 (<i>m</i>)	7,33-7,36 (<i>m</i>)

Fonte: Autoria própria

O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 14 e 15) apresentou sinais de deslocamento químico δ_{C} em 134,1 para o C2, para o C4 δ_{C} 57,8 (*cis*) e 53,5 (*trans*), para o C6 (*cis* e *trans*) δ_{C} 58,1 e δ_{C} 26,0 para o C7 (*cis* e *trans*). Além dos carbonos do substituinte fenil da posição-4 na região de 127,6-134,4 e da carbonila relativa ao ácido carboxílico em δ_{C} 172,4 (Tabela 9).

Tabela 9 - Dados de RMN ^{13}C para 6-carbóxi-4-fenil-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (20)

	<i>cis</i>	<i>trans</i>
C	δ_{C}	δ_{C}
2	134,1 (CH)	134,1 (CH)
3a	141,2 (C)	141,2 (C)
4	57,8 (CH)	52,5 (CH)
6	58,1 (CH)	58,1 (CH)
7 α	26,0 (CH ₂)	26,0 (CH ₂)
1'	134,4 (C)	134,4 (C)
2'/6'	127,9 (CH)	127,6 (CH)
3'/5'	129,0 (C)	128,6 (C)
4'	128,0 (CH)	128,0 (CH)
C=O	172,4 (C)	172,4 (C)

Fonte: Autoria própria

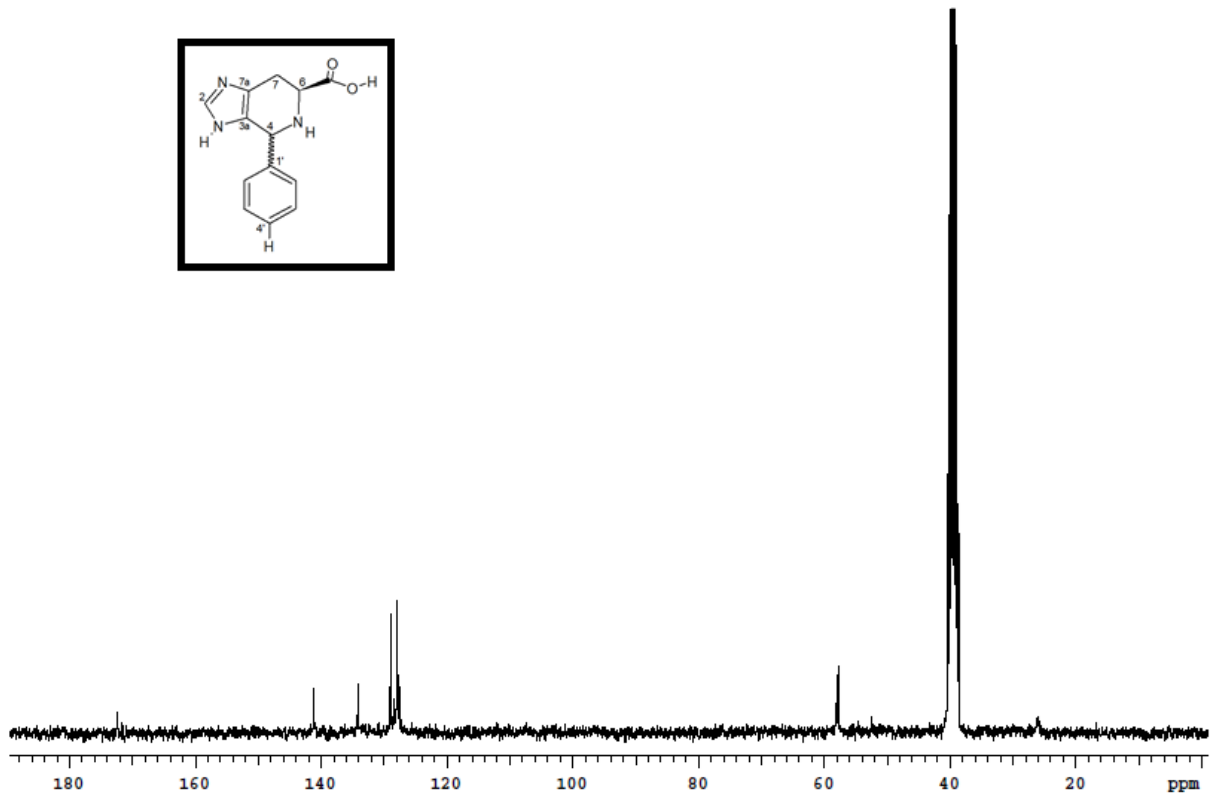


Figura 14 – Espectro de RMN ^{13}C para o derivado 6-carbóxi-4-fenil-[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahidropiridina (20)

Fonte: Autoria própria

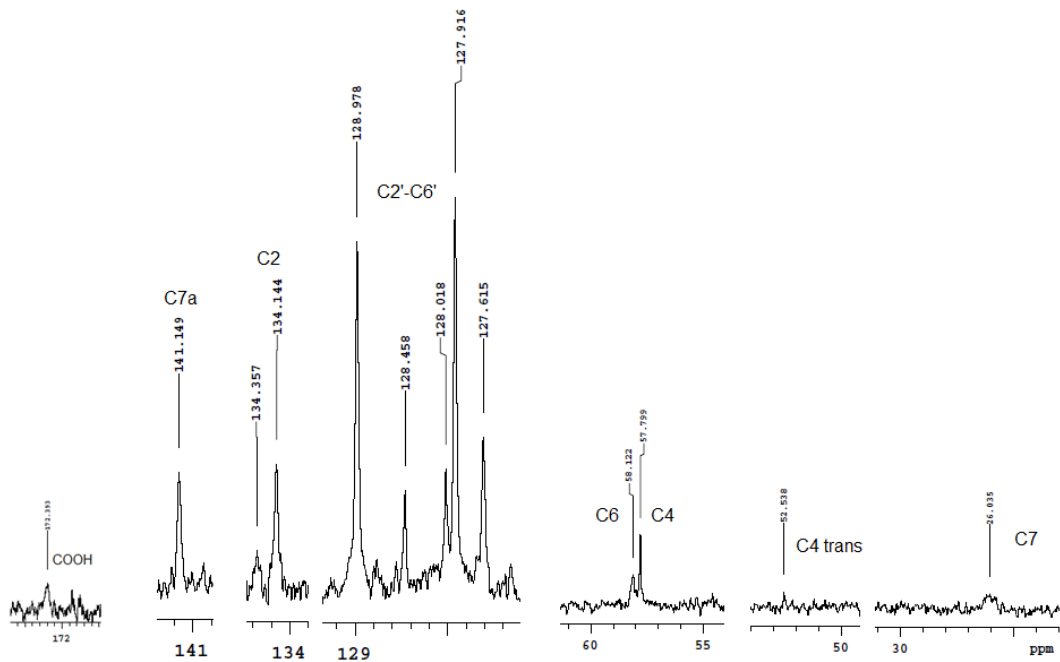


Figura 15 –Expansão de RMN ^{13}C para o derivado 6-carbóxi-4-fenil-[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahidropiridina (20)

Fonte: Autoria própria

De acordo com Dusman et al. (2005), pode-se afirmar que o deslocamento químico do C-4 (diastereoisômero *cis*) é o mais desblindado devido à estudos de cálculos previamente realizados para compostos análogos.

A formação dos compostos **(21-23)** foram confirmadas pelos sinais dos hidrogênios e carbonos nas mesmas regiões do espectro (Figuras 16-26). As Tabelas 10-15 apresentam os valores de deslocamento químico para cada composto.

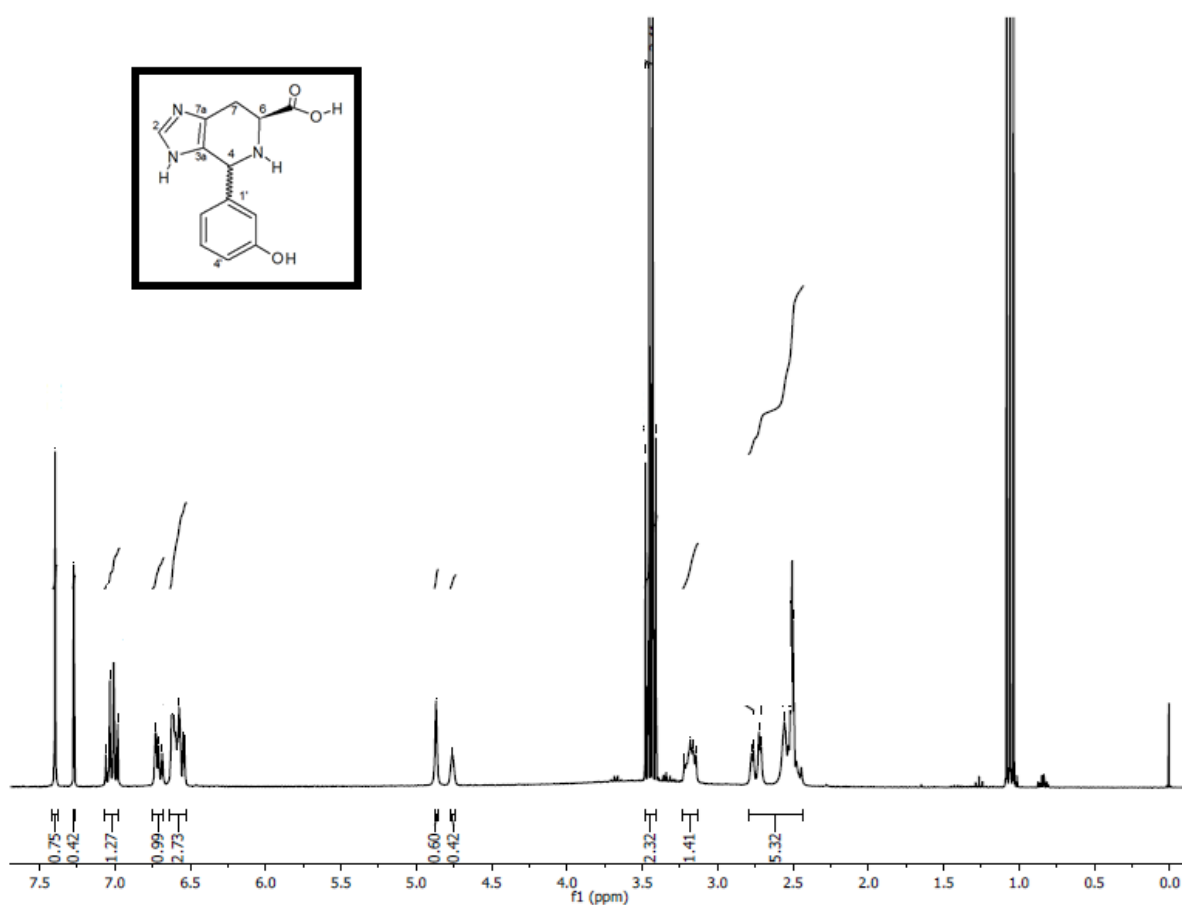


Figura 16– Espectro de RMN ¹H para 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahidropiridina (21) em DMSO-d₆
Fonte: Autoria própria

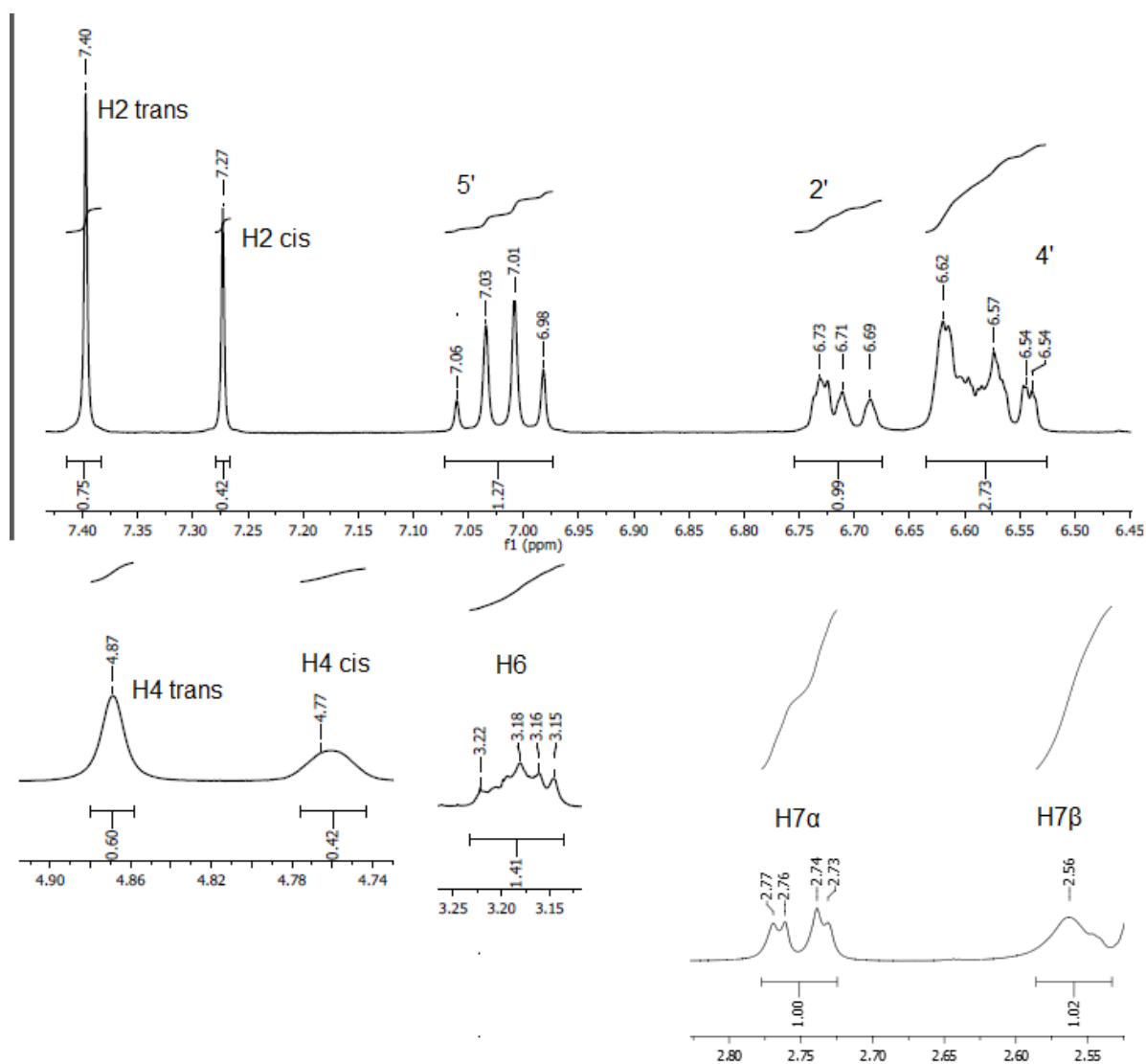


Figura 17 – Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz) em DMSO-d_6 para o composto (21)
 Fonte: Autoria própria

Tabela 10 - Dados de RMN ^1H para 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (21)

	<i>cis</i>	<i>trans</i>
H	δ_{H} (multiplicidade, J=Hz)	δ_{H} (multiplicidade, J=Hz)
2	7,27(s)	7,40(s)
4	4,77(s)	4,87(s)
6	3,15-3,22(m)	3,15-3,22(m)
7 α	2,75 (dd, 6,0; 15)	2,75 (dd, 6,0; 15)
7 β	2,56 (m)	2,56 (m)
2'	6,54-6,62 (m)	6,54-6,62 (m)
4'	6,54-6,62 (m)	6,54-6,62 (m)

5'	7,01 (<i>t</i> , 7,0)	7,03 (<i>t</i> , 7,0)
6'	6,69-6,73(<i>m</i>)	6,69-6,73(<i>m</i>)

Fonte: Autoria própria

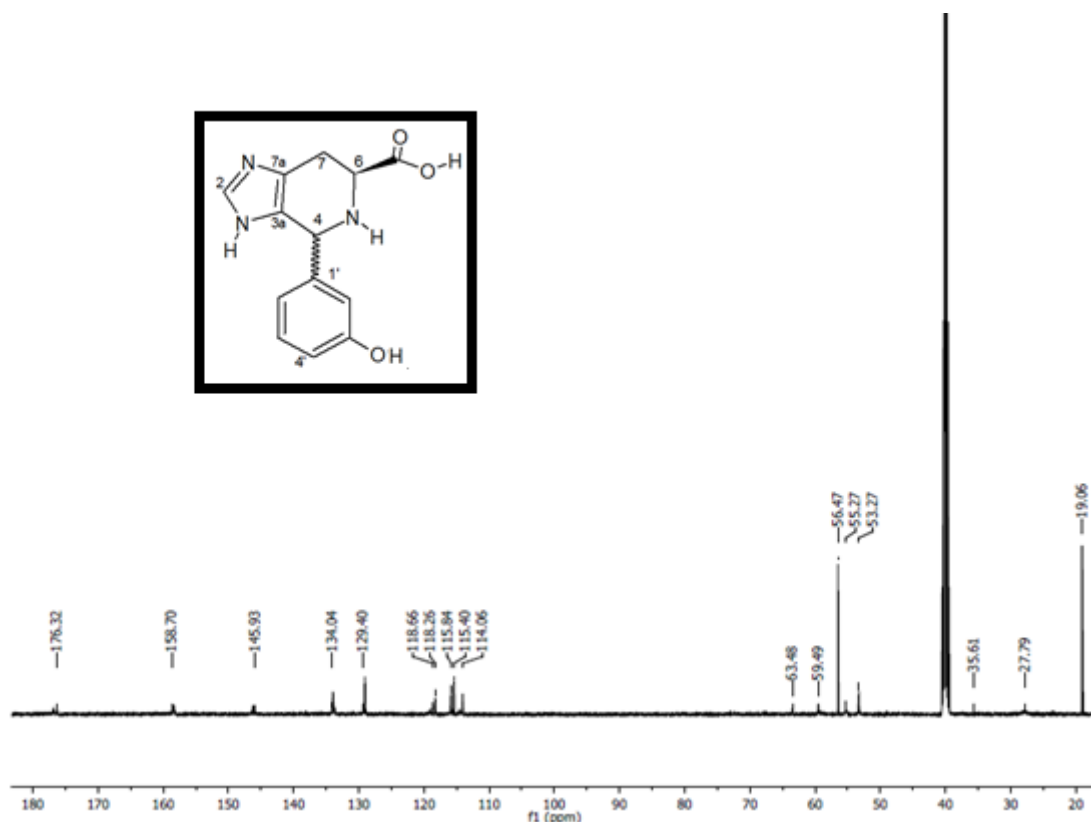


Figura 18– Espectro de RMN ^{13}C para o derivado 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (21)

Fonte: Autoria própria

Tabela 11- Dados de RMN ^{13}C para 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (21)

C	<i>cis</i>	<i>trans</i>
	δ_{C}	δ_{C}
2	133,7 (CH)	133,9 (CH)
3a	146,2 (C)	146,2 (C)
4	59,5 (CH)	53,2 (CH)
6	56,5 (CH)	56,5 (CH)
7	27,8 (CH ₂)	27,8 (CH ₂)
1'	133,7 (C)	133,9 (C)
2'	114,1 (CH)	114,6 (CH)

3'	158,3 (C)	158,3 (C)
4'	115,4 (CH)	115,9 (CH)
5'	118,3 (CH)	119,0 (CH)
6'	129,0 (CH)	129,0 (CH)

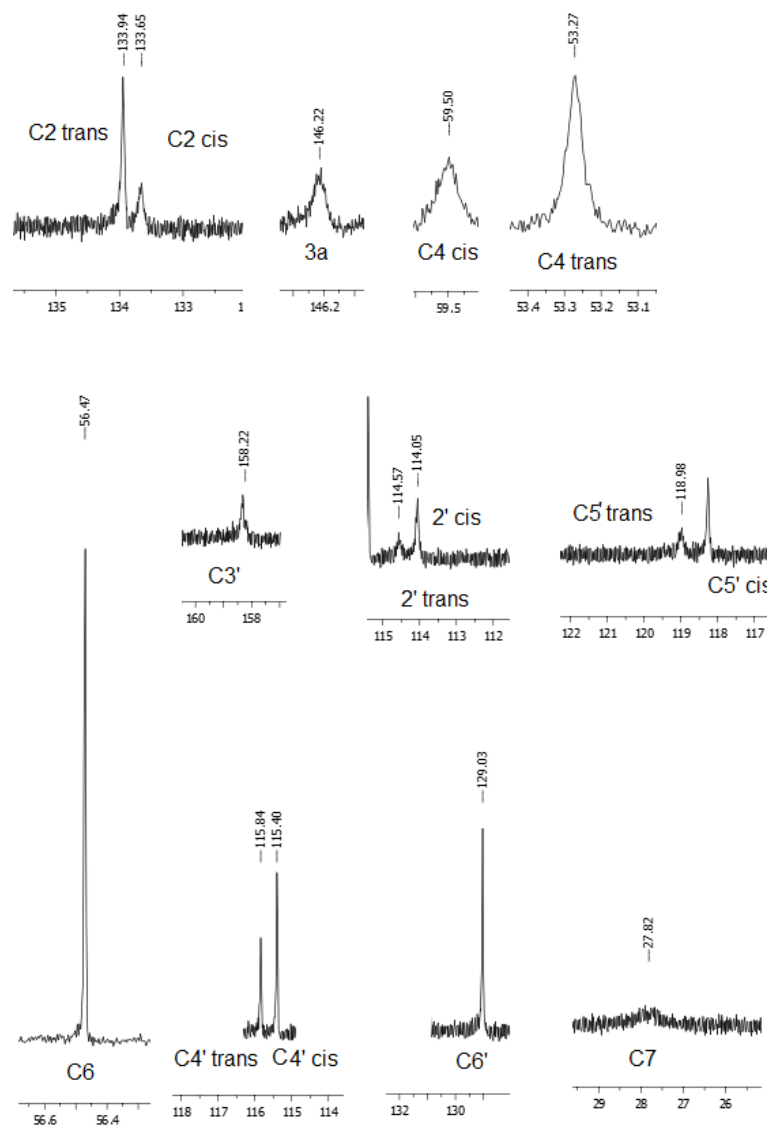


Figura 19 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C (300 MHz) em DMSO-d_6 para 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (21)

Fonte: Autoria própria

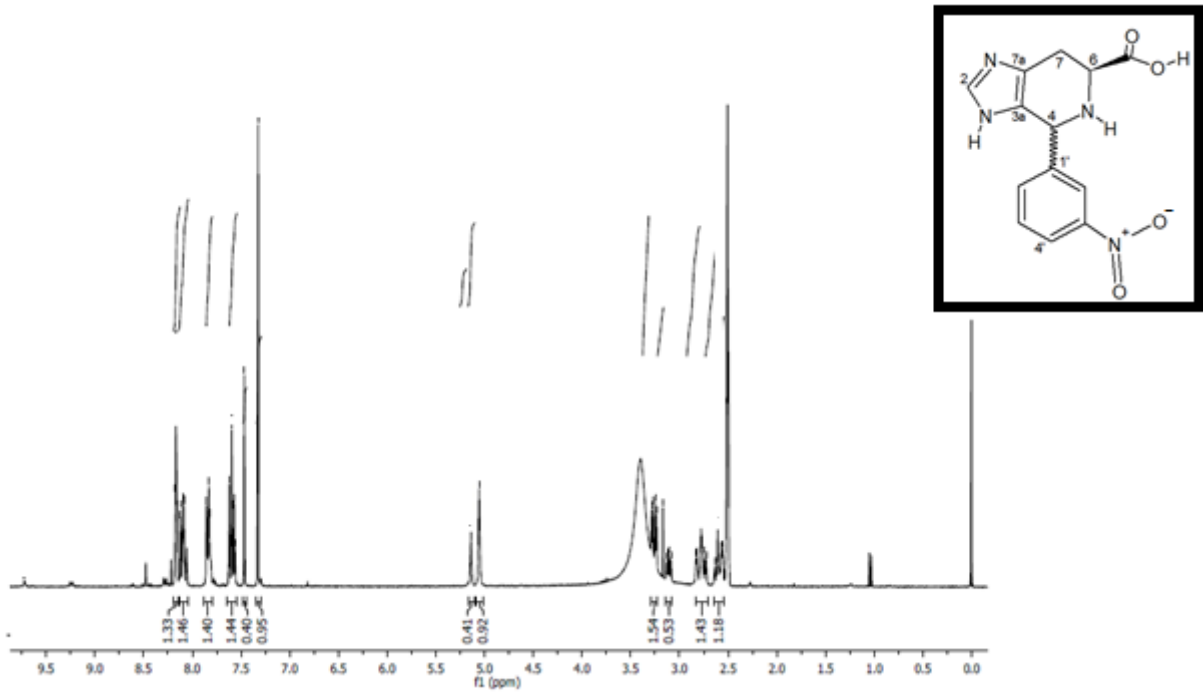


Figura 20 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) de 6-carbóxi-4-(3-nitrofenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7tetraidropiridina em DMSO-d_6 (22)
 Fonte: Autoria própria

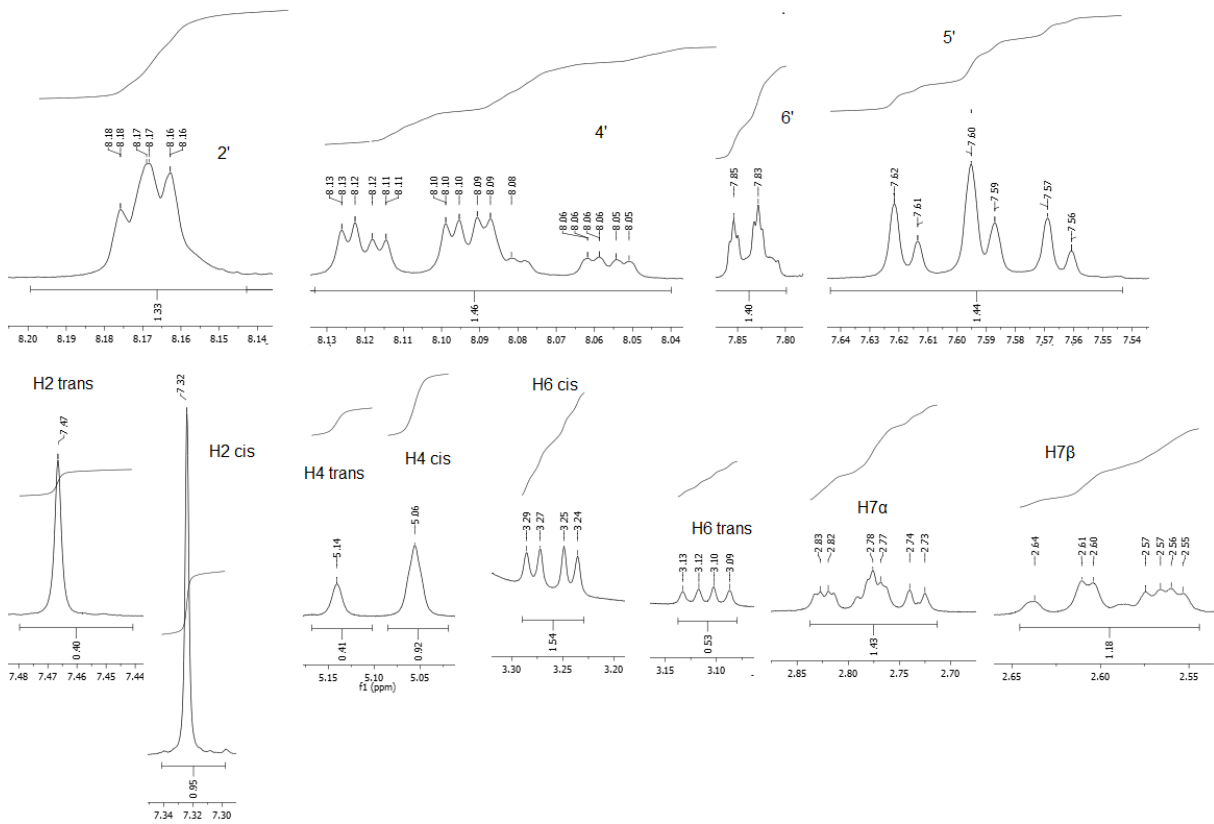


Figura 21 – Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz) em DMSO-d_6 para o composto (22)
 Fonte: Autoria própria

Tabela 12 - Dados de RMN ^1H para 6-carbóxi-4-(3-nitrofenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetrahidropiridina (22)

	<i>cis</i>	<i>trans</i>
H	δ_{H} (multiplicidade, J=Hz)	δ_{H} (multiplicidade, J=Hz)
2	7,32 (s)	7,47 (s)
4	5,06 (s)	5,14 (s)
6	3,26 (dd, 3,0; 9,0)	3,11 (dd, 3,0; 9,0)
7 α	2,72-2,83 (m)	2,72-2,83 (m)
7 β	2,55-2,64 (m)	2,55-2,64 (m)
2'	8,17 (d, 3,0)	8,17 (d, 3,0)
4'	8,09-8,12 (m)	8,09-8,12 (m)
5'	7,60 (t, 7,0)	7,59 (t, 7,0)
6'	7,84 (d, 6,0)	7,84 (d, 6,0)

Fonte: Autoria própria

Tabela 13. Dados de RMN ^{13}C para 6-carbóxi-4-(3-nitrofenil)-imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahidropiridina (22)

	<i>cis</i>	<i>trans</i>
C	δ_{C}	δ_{C}
2	134,0 (CH)	134,3 (CH)
3a	147,1 (C)	147,6 (C)
4	59,0 (CH)	58,3 (CH)
6	53,7 (CH)	54,3 (CH)
7	27,3 (CH ₂)	27,3 (CH ₂)
1'	134,9 (C)	134,9 (C)
2'	122,5 (CH)	121,8 (CH)
3'	148,0 (C)	148,0 (C)
4'	123,2 (CH)	122,3 (CH)
5'	129,7 (CH)	129,7 (CH)
6'	135,9 (CH)	135,9 (CH)

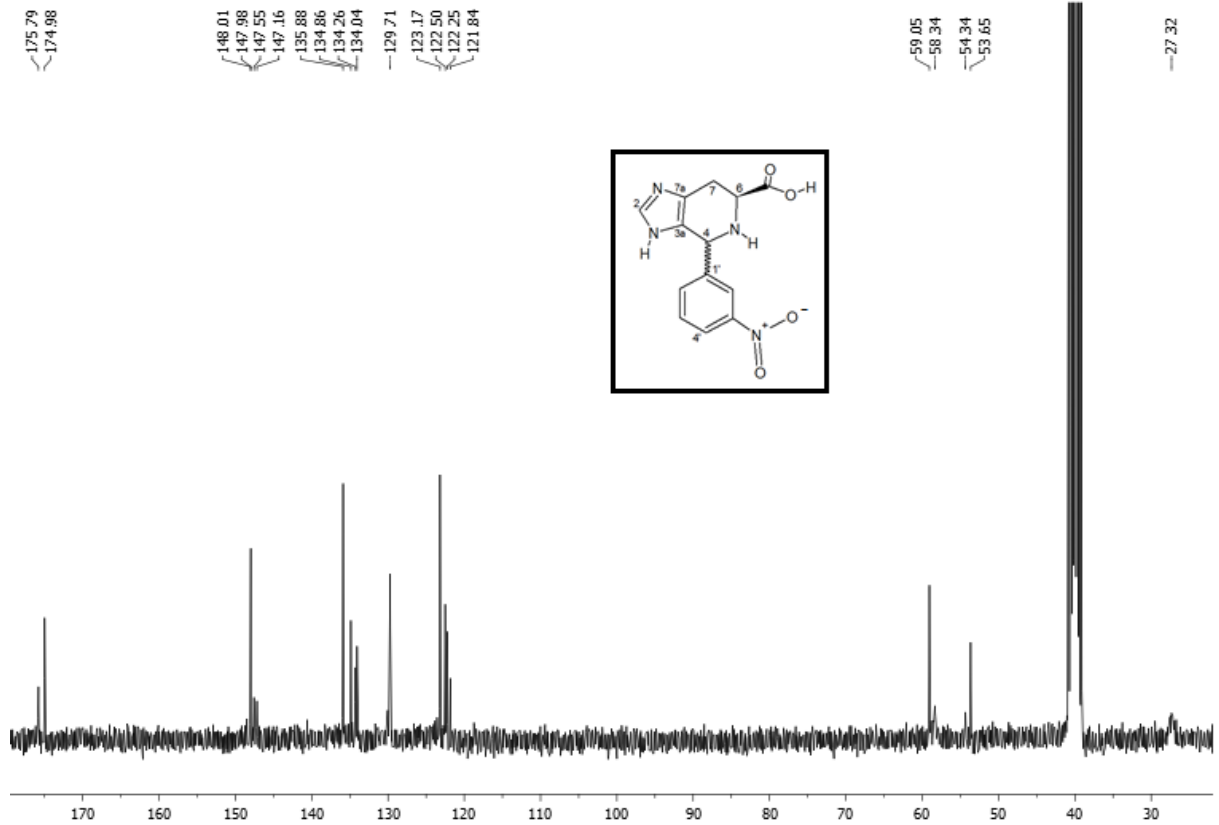


Figura 22 - Dados de RMN ^{13}C para 6-carbóxi-4-(3-nitrofenil)-imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (22)

Fonte: Autoria própria

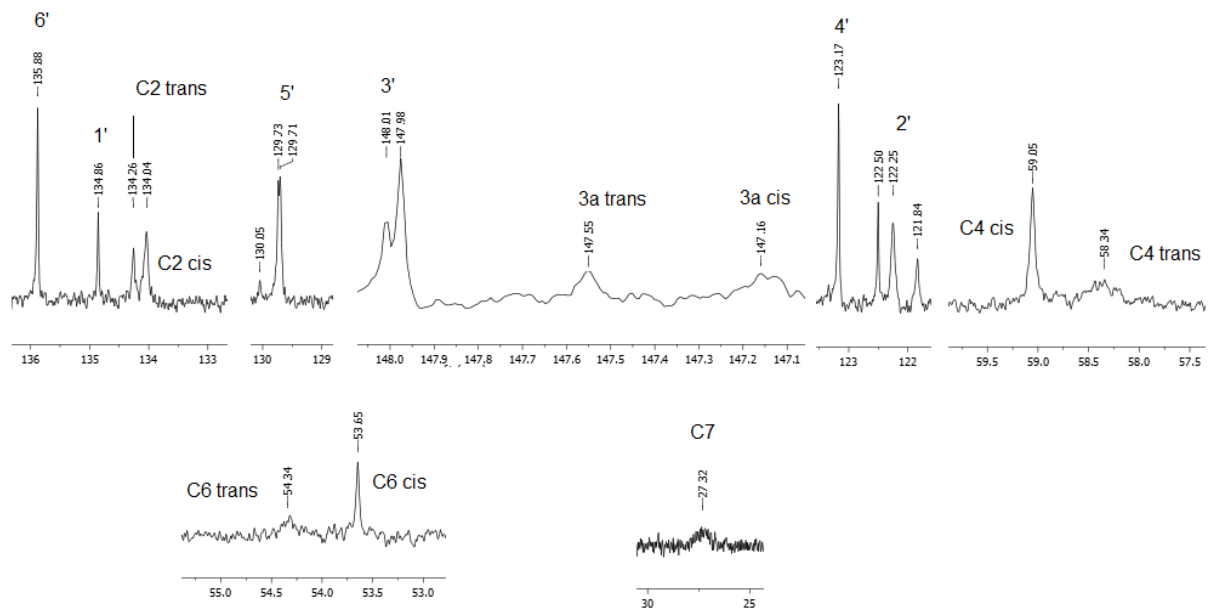


Figura 23 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (300 MHz) em DMSO-d_6 para o composto (22)

Fonte: Autoria própria

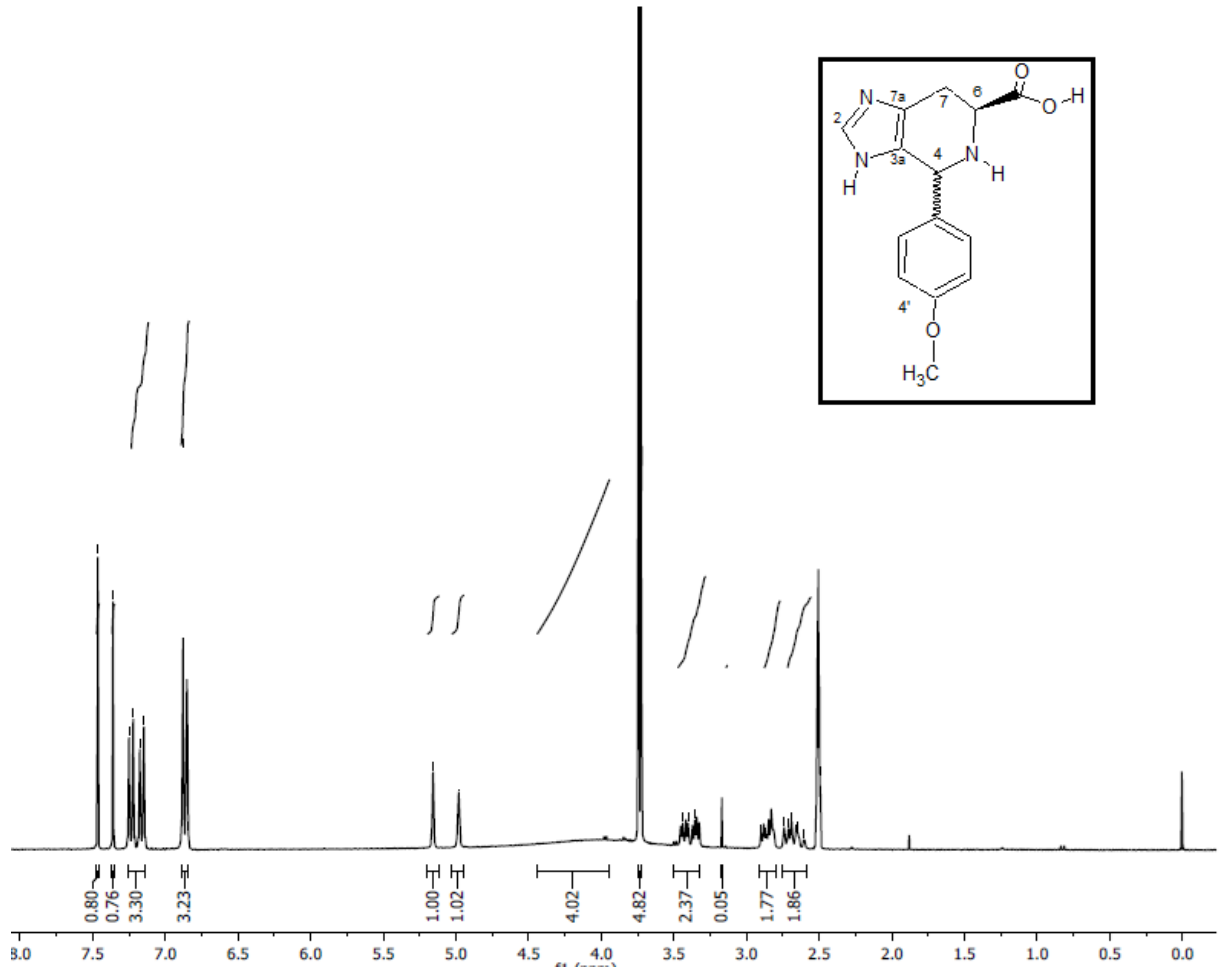


Figura 24 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz) para 6-carbóxi-4-(4-metoxifenil)-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina em CD_3OD (23)
Fonte: Autoria própria

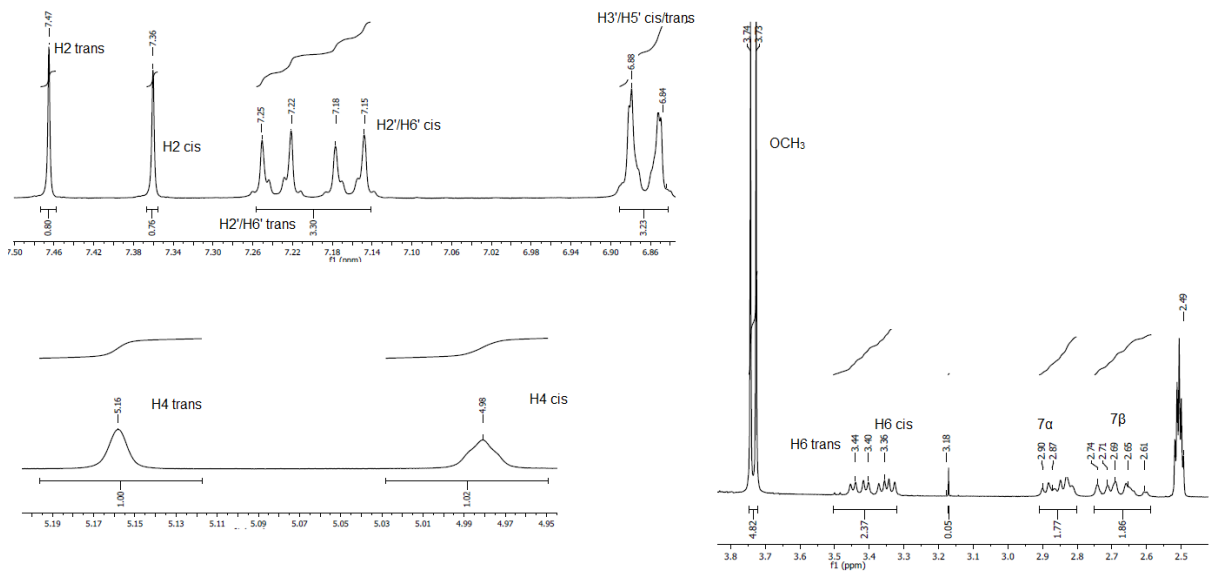


Figura 25 – Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD) para 6-carbóxi-4-(4-metóxiifenil)-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (23)
Fonte: Autoria própria

Tabela 14 - Dados de RMN ^1H para 6-carbóxi-4-(4-metóxi-fenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (23)

	<i>cis</i>	<i>trans</i>
H	δ_{H} (multiplicidade, J=Hz)	δ_{H} (multiplicidade, J=Hz)
2	7,36 (s)	7,47 (s)
4	4,98 (s)	5,16 (s)
6	3,35 (dd, 3,0; 9,0)	3,43 (dd, 3,0; 9,0)
7 α	2,81-2,90 (m)	2,81-2,90 (m)
7 β	2,60-2,74 (m)	2,60-2,74 (m)
2'/6'	7,17 (d, 9,0)	7,24 (d, 9,0)
3'/5'	6,87 (d, 9,0)	6,87 (d, 9,0)
OCH ₃	3,73 (s)	3,74 (s)

Fonte: Autoria própria

Tabela 15 - Dados de RMN ^{13}C para 6-carbóxi-4-(4-metoxifenil)-imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (24)

	<i>cis</i>	<i>trans</i>
C	δ_{C}	δ_{C}
2	134,3 (CH)	133,9 (CH)
4	58,1 (CH)	57,6 (CH)
6	54,1 (CH)	52,5 (CH)
7	26,4 (CH ₂)	25,6 (CH ₂)
1'	133,4 (C)	133,3 (C)
2'/6'	130,0 (CH)	129,6 (CH)
3'/5'	113,3 (CH)	113,2 (CH)
4'	158,7 (C)	158,6 (C)
C=O	173,1 (C)	173,1 (C)
OCH ₃	55,1 (CH ₃)	55,1 (CH ₃)

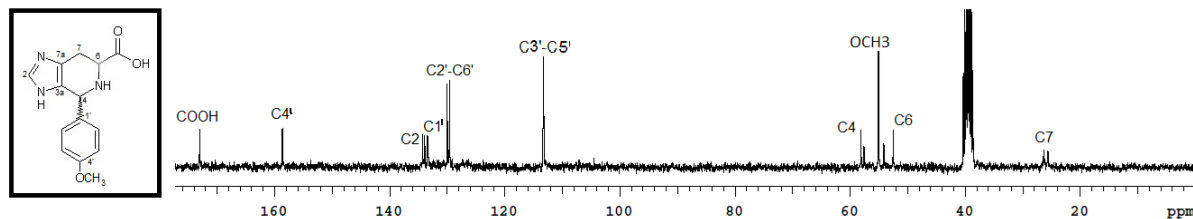


Figura 26– Espectro de RMN ^{13}C para o derivado 6-carbóxi-4-(4-metóxi-fenil)-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (23)
Fonte: Autoria própria

5.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os compostos antioxidantes tem sua eficiência medida através de um estudo cinético que é possível revelar se este favorece o sequestro dos radicais livres ou a reação dos processos oxidativos (JARDINI e MANCINI-FILHO, 2007; GALVÃO et al., 2008).

5.2.1.1 ESTUDO DA CINÉTICA FRENTE AO RADICAL DPPH \cdot

Sabe-se que o radical DPPH \cdot é utilizado como método colorimétrico para a determinação de atividade antioxidante em extratos. De acordo com Brizola (2010), ao adicionar um antioxidante observa-se a diminuição da absorbância, proporcional à concentração analisada, tornando-se possível avaliar a taxa de atividade antioxidante de um composto.

O ensaio com DPPH leva em conta a influência da estrutura do composto. Para cada composto químico o DPPH apresenta uma cinética diferente devido ao seu radical de nitrogênio estável e por essa razão, alguns antioxidantes podem reagir de forma diferente ou até mesmo não reagir (MISHRA et al, 2012).

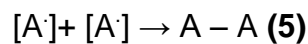
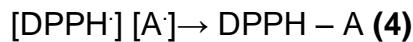
O estudo cinético realizado para determinação de atividade antioxidante é de suma importância porque apesar de o DPPH \cdot ser um método que avalia a atividade antioxidante de diversos compostos, é necessário verificar se não há a interferência do composto com o radical. Outra justificativa para a presença do estudo cinético é a de o próprio radical se degradar rapidamente, portanto é necessário acompanhar as

reações cinéticas afim de se conhecer o comportamento da amostra frente à atividade antioxidante (PRADO, 2009).

Mishra et al., (2012) mostram a equação de captação do elétron do DPPH e um antioxidante qualquer [A] está representado na equação 3:



Caso a espécie [A·] seja menos reativa, pode interagir com outro DPPH, formando as reações subsequentes mostradas nas equações 4 e 5:



A ordem de reação para o DPPH· e um antioxidante é classificada de acordo com a concentração dos reagentes. Para Mishra et al. (2012), se para um estudo a concentração do DPPH· for fixa e for observado que em decorrência do tempo a quantidade de antioxidante é maior que a quantidade de DPPH, a cinética é classificada como de pseudo-primeira ordem.

De acordo com Oliveira et al., (2016) a cinética para verificar a interação do DPPH frente a diversos compostos pode ser classificada como **rápida** quando toda a reação ocorre em um tempo inferior a 5 minutos, **intermediária** quando o tempo da reação ocorre entre 5 e 30 minutos e por fim, **lenta**, quando a reação ocorre em tempo superior a 30 minutos.

As Figuras (27-30) exibem os gráficos que apresentam o comportamento do radical DPPH· frente à soluções dos padrões: Ácido Ascórbico, Ácido Gálico, BHT e Trolox, analisando-se o tempo *versus* a porcentagem de atividade antioxidante (%AA).

Para o Ácido Ascórbico (Figura 27) a reação é observada instantaneamente, o que é explicado pela presença de um grupo fenólico que reage com o DPPH· em minutos. O Ácido Gálico apresenta um comportamento que a ciência ainda tenta compreender o que acontece: ao reagir com o DPPH, reduz cerca de 7 radicais DPPH·, entretanto o ácido gálico possui apenas três grupos fenólicos (MISHRA et al, 2012).

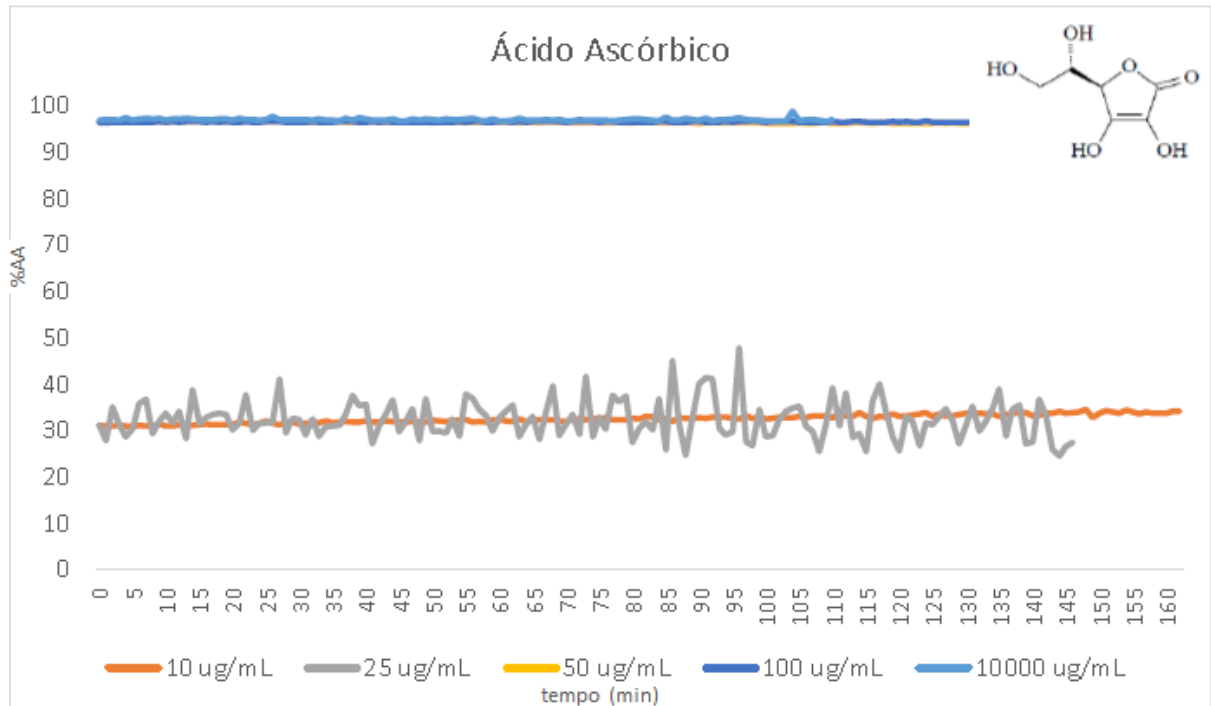


Figura 27 – Cinética de consumo do DPPH· para o Ácido Ascórbico
 Fonte: Autoria própria

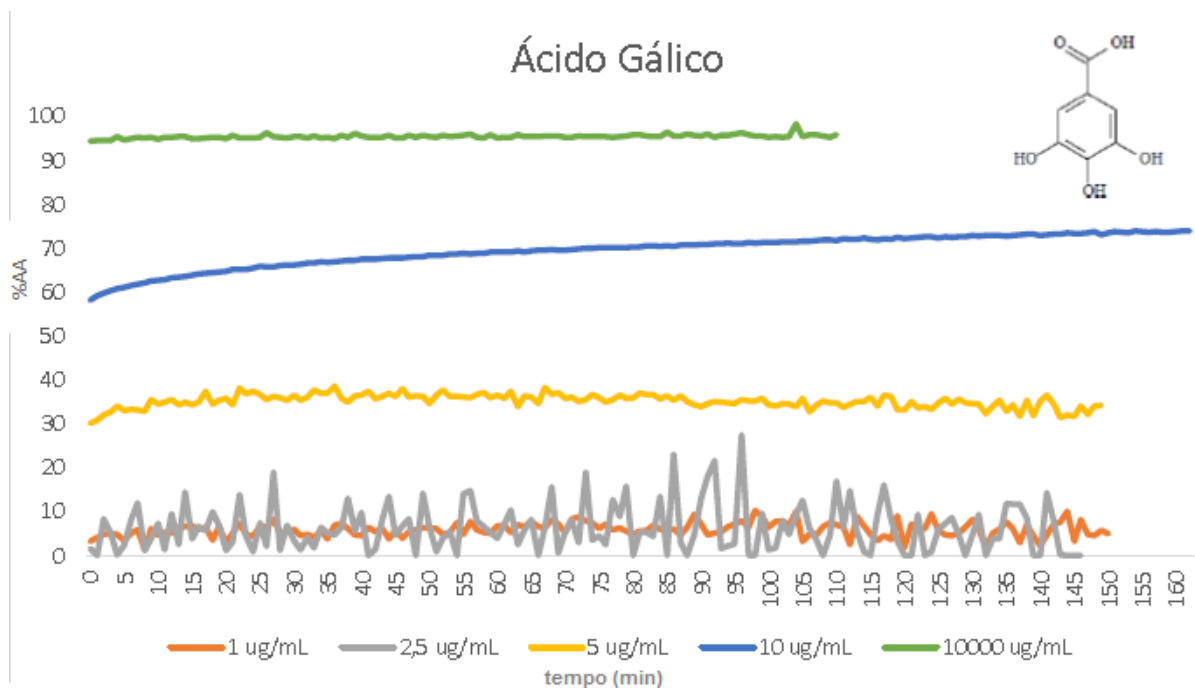


Figura 28 – Cinética de consumo do DPPH· para o Ácido Gálico
 Fonte: Autoria própria

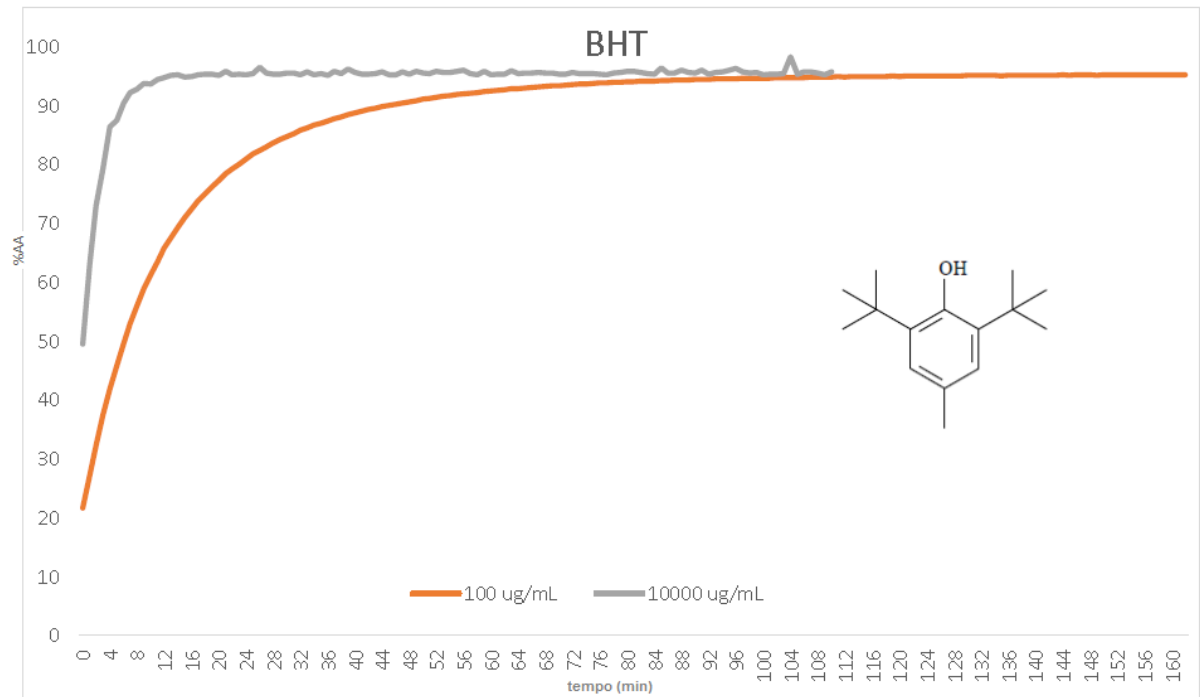


Figura 29 – Cinética de consumo do DPPH[•] para o BHT
 Fonte: Autoria própria

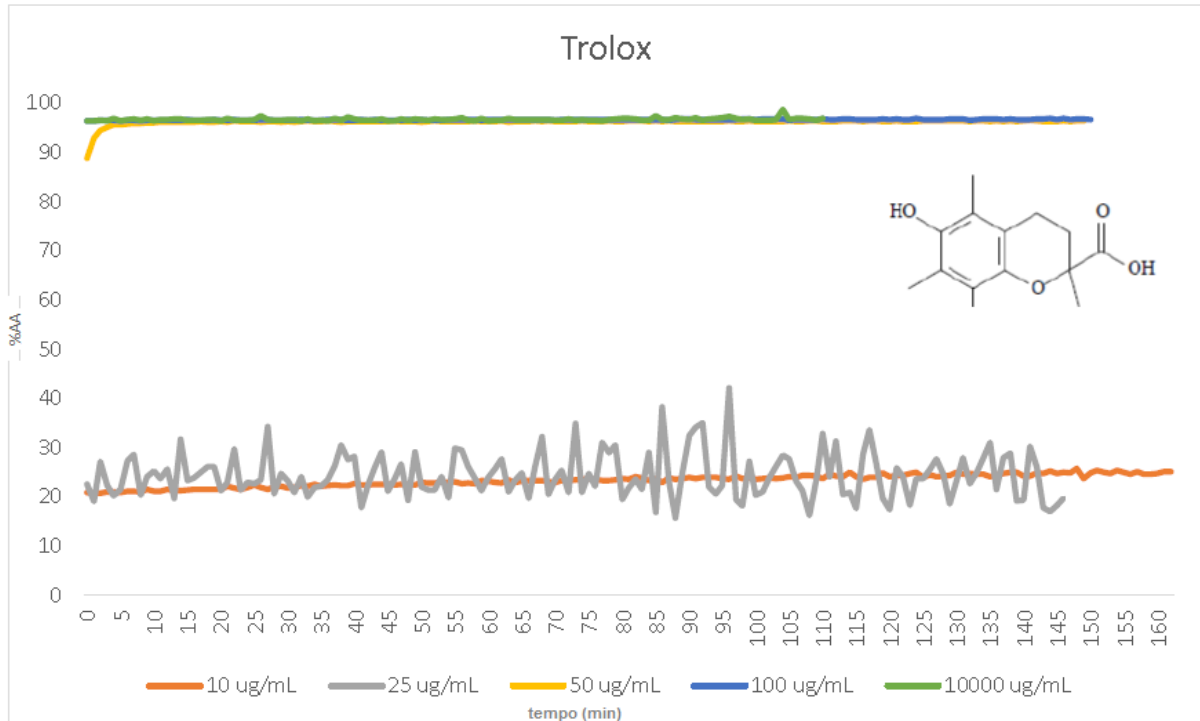


Figura 30 – Cinética de consumo do DPPH[•] para o Trolox
 Fonte: Autoria própria

A curva cinética para o BHT (Figura 29) demonstrou que na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ sua cinética foi lenta, consumindo 94% do DPPH em 80 minutos, concordando com Rezende (2010), enquanto na concentração de $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ sua cinética foi intermediária, pois o consumo de 94% do DPPH ocorreu em 10 minutos.

Analisando a curva cinética para o Trolox (Figura 30), observa-se que em todas as concentrações testadas a reação ocorreu no primeiro minuto, indicando cinética rápida, contrapondo Rezende (2010) que indicou cinética intermediária para este composto.

De maneira geral, todas as soluções metanólicas dos padrões apresentaram uma boa AA para concentrações mais elevadas, algumas com início imediato e em poucos minutos foram consumidas, mantendo seu valor de %AA constante. Isso se deve ao caráter redox do radical. Para o BHT, por exemplo, antes dos 30 minutos iniciais a reação já aconteceu 100%.

Conforme as concentrações dos compostos foram diluídas, nota-se que houve uma menor interação com o radical, demonstrando a influência da concentração para a execução do método de determinação da atividade antioxidante (CARMONA-JIMÉNEZ, 2004).

O composto 6-carbóxi-4-fenil-[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (**20**), testado na concentração de $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ no período de aproximadamente 150 minutos (Figura 31) apresentou uma cinética lenta, pois levou um tempo superior a 60 minutos para a reação química se completar, consumindo lentamente 48% do radical DPPH.

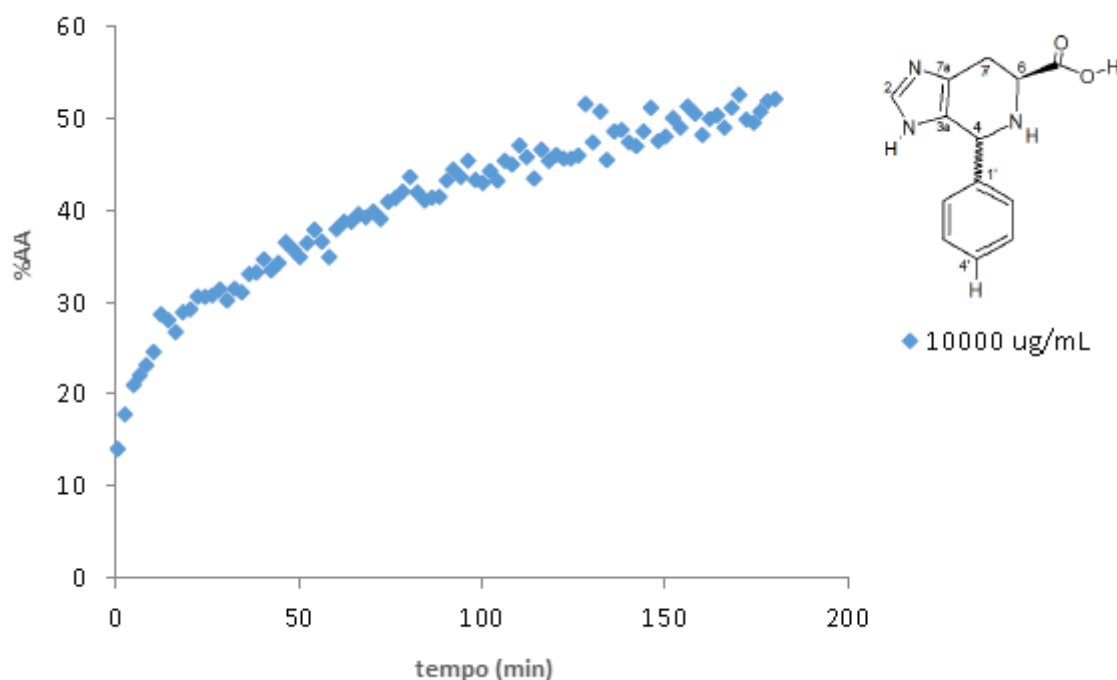


Figura 31 – Cinética de consumo do DPPH para o composto (20)
Fonte: Autoria própria

Para o composto **(21)**, observou-se pela cinética de reação (Figura 32) que a interação com o radical DPPH \cdot foi mais efetiva em concentrações mais baixas ($5000 \mu\text{g mL}^{-1}$), pois observou-se que em altas concentrações ($10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $20000 \mu\text{g mL}^{-1}$) o radical interagiu instantaneamente com o composto, porém apresentando comportamentos cinéticos diferentes: para $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ observou-se um decréscimo na curva cinética após manter 20 minutos a %AA, o que supõe a presença de dímeros, ou subprodutos do radical, e para $20000 \mu\text{g mL}^{-1}$ a porcentagem de AA manteve o consumo de DPPH praticamente constante durante o tempo de análise.

Desta forma, as oscilações para as curvas de 10000 e $20.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ podem indicar a formação de subprodutos após a reação com o radical DPPH \cdot .

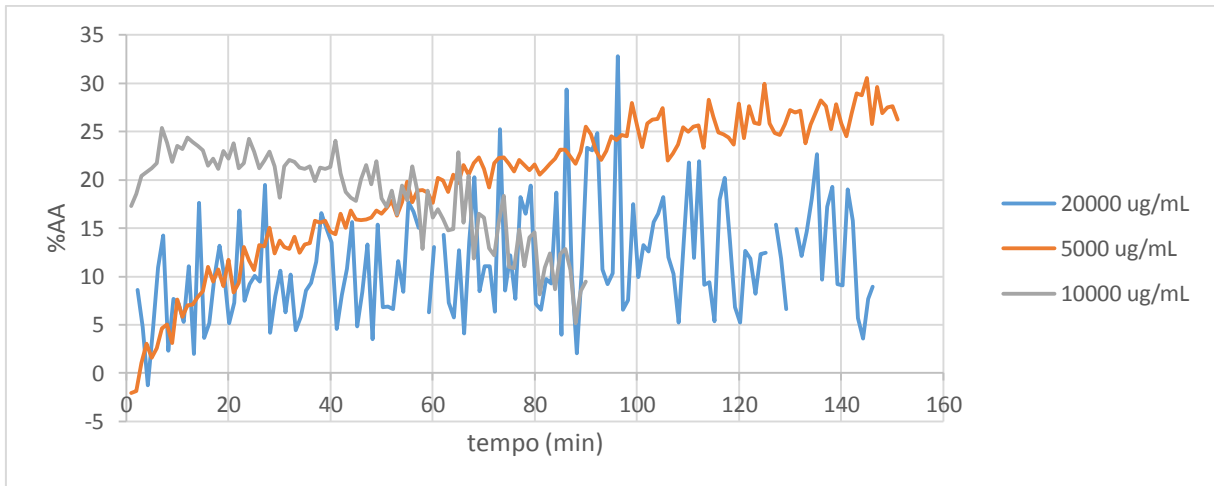


Figura 32 – Cinética de consumo do DPPH para o composto (21)
 Fonte: Autoria própria

Para o composto (22) (Figura 33), observou-se uma cinética lenta, pois ocorreu o consumo gradativo de 80% de DPPH em 140 minutos de reação para a concentração de 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já na concentração maior (10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) a reação foi de cinética intermediária, pois o consumo de 89% do radical ocorreu em 10 minutos permanecendo constante até os 140 minutos de leitura.

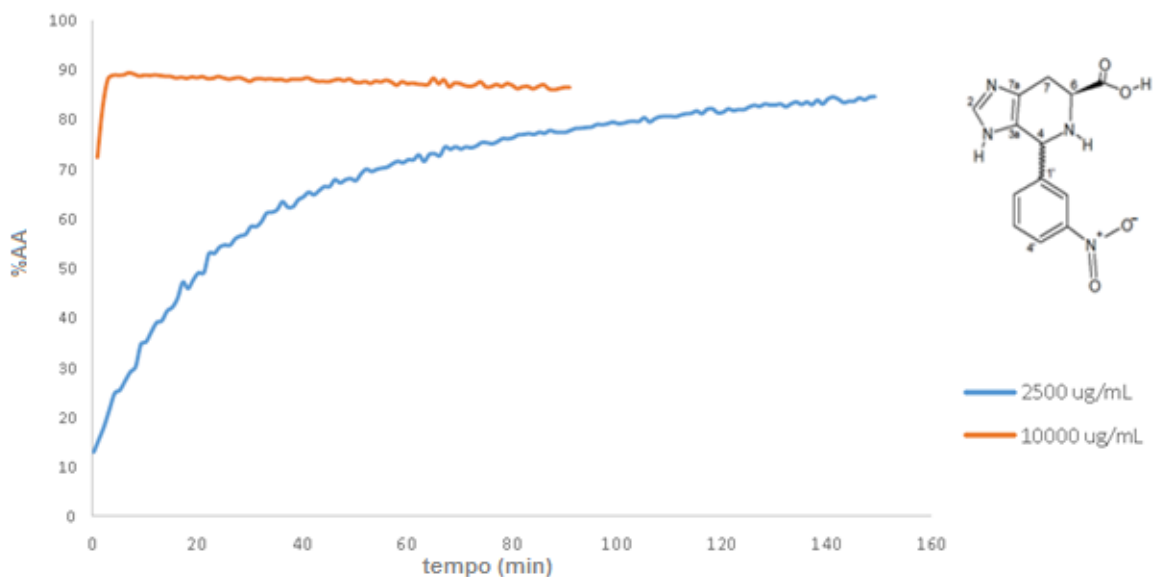


Figura 33 – Cinética de consumo do DPPH para o composto (22)
 Fonte: Autoria própria

Para o composto 6-carbóxi-4-(4-metóxfenil)-[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina, **(23)** verificou-se que na concentração de $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ o composto consumiu 90% do radical DPPH \cdot em 60 minutos de análise, indicando cinética lenta (Figura 34).

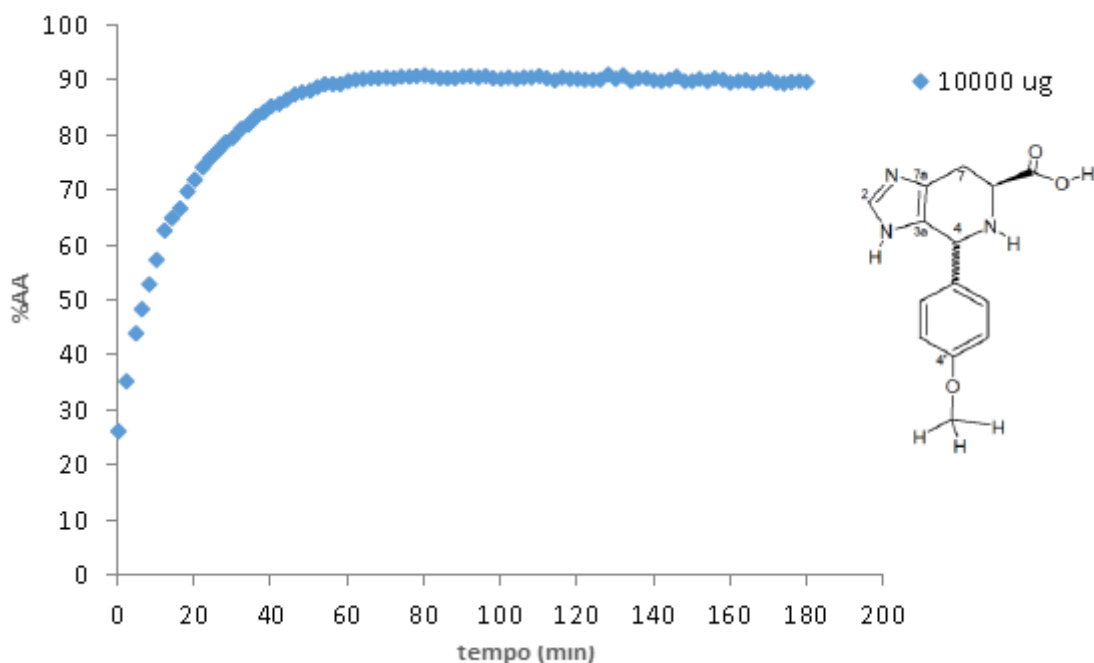


Figura 34 – Cinética de consumo do DPPH \cdot para o composto (23)
Fonte: Autoria própria

Na tabela 16 estão apresentadas as cinéticas dos compostos **(20-23)** frente ao radical DPPH \cdot nas concentrações testadas.

Tabela 16 - Descrição da cinética dos compostos (20-23) frente ao método DPPH

Compostos	[] $\mu\text{g mL}^{-1}$	Descrição da cinética
(20)	10.000	lenta
(21)	5.000	lenta
(22)	10.000; 2.500	intermediária; lenta
(23)	10.000	lenta

Fonte: Autoria própria

Pela análise dos dados observou-se que a presença do grupo 3-nitrofenil na posição-4 da unidade imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina influencia positivamente

na atividade antioxidante frente ao radical DPPH. Diversos estudos estipulam o tempo de análise como 30 minutos para determinação da atividade de sequestro do radical DPPH. Baseados nesta informação, a Tabela 17 mostra os valores de %AA para os compostos sintetizados e os padrões neste tempo.

Tabela 17 – Valores de %AA pelo método DPPH em 30 minutos de reação

Compostos	[] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	%AA
(20)	10.000	$30,15 \pm 2,17^e$
(21)	10.000	$21,44 \pm 1,23^f$
(22)	10.000	$88,71 \pm 0,26^b$
(23)	10.000	$79,19 \pm 2,79^c$
Ác. Ascórbico	100	$96,44 \pm 0,17^a$
Ác. Gálico	100	$66,12 \pm 2,42^d$
BHT	100	$84,70 \pm 1,23^b$
Trolox	100	$96,48 \pm 0,06^a$

Resultados expressos em (media desvio padrão)

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ao nível de 95% de confiança de acordo com Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

Fonte: Autoria própria

Os valores descritos na Tabela 17 indicam que mesmo em concentração menor quando comparadas às concentrações dos compostos obtidos, os padrões exibem atividade antioxidante superior à atividade dos compostos **(20-23)**.

Os resultados obtidos estão de acordo com Mishra et al. (2012), que relatam que a relação entre a estrutura e atividade antioxidante pelo método DPPH não é única e exclusivamente atribuída aos grupos fenólicos de uma molécula, podendo ser afetada por outros grupos funcionais.

Observou-se que o composto **(21)** que possui o grupo –OH foi o menos ativo, enquanto que os compostos contendo os grupos –NO₂ e –OCH₃ **(22)** e **(23)** foram os mais ativos. O composto **(22)** exibiu maior atividade antioxidante e possui diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparado aos demais derivados, comprovando a influência dos substituintes do grupo fenil para estes compostos quando analisados a atividade antioxidante frente ao DPPH.

5.2.1.2 ESTUDO DA CINÉTICA DA REAÇÃO FRENTE AO RADICAL ABTS^{••}

De acordo com Re et al., (1999) o radical ABTS^{••} (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) é formado pela oxidação do ABTS com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e ao entrar em contato com espécies doadoras de hidrogênio o radical é reduzido. Este ensaio é aplicável tanto para sistemas hidrofílicos e lipofílicos.

Diversos trabalhos que empregam o ABTS^{••} divergem quanto ao tempo empregado para quantificar a atividade antioxidante. Re et al., (1999) relatam que o tempo de 2 minutos é suficiente para o radical reagir quase por completo com o antioxidante. Outros estudos utilizam tempos de até 1 hora, pois percebem que após 2 minutos de reação os antioxidantes continuam a neutralizar os radicais livres presentes na solução (LIMA, 2008). Van denberget et al., (1999) explicam que tempos mais longos podem ser justificados pois alguns antioxidantes podem seguir uma reação bifásica frente ao radical ABTS^{••}, com uma fase inicial rápida e a outra considerada lenta. Tendo em vista essas considerações, neste trabalho as leituras das absorbâncias foram monitoradas por até 2 horas, a fim de se avaliar o comportamento dos compostos sintetizados e dos padrões frente ao radical ABTS^{••}.

Os resultados dos estudos cinéticos foram obtidos analisando-se o tempo *versus* a porcentagem de AA (%AA) tanto para as soluções de antioxidantes sintéticos quanto em relação aos compostos imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina.

De acordo com Henriquez, Aliaga e Lissi (2004), poucos estudos são feitos quanto à cinética do ABTS com diversas espécies químicas devido à sua complexidade, sendo possível apenas observar a inibição para o ABTS, explicada em termos de um mecanismo que envolve uma etapa inicial parcialmente reversível.

Esta reação é seguida de diversas reações radical-radical. Os autores indicam que a possibilidade de reversibilidade parcial nestas reações podem complicar ainda mais a análise cinética dos resultados. Campos e Lissi (1999) identificaram que a ordem de reação para o ABTS é 1,2.

Verificou-se o comportamento da interação da mistura reacional do radical ABTS^{••} em relação à diversas soluções de antioxidantes sintéticos: Ácido Ascórbico, Ácido Gálico, BHT e Trolox. Os resultados estão mostrados na Figura 35.

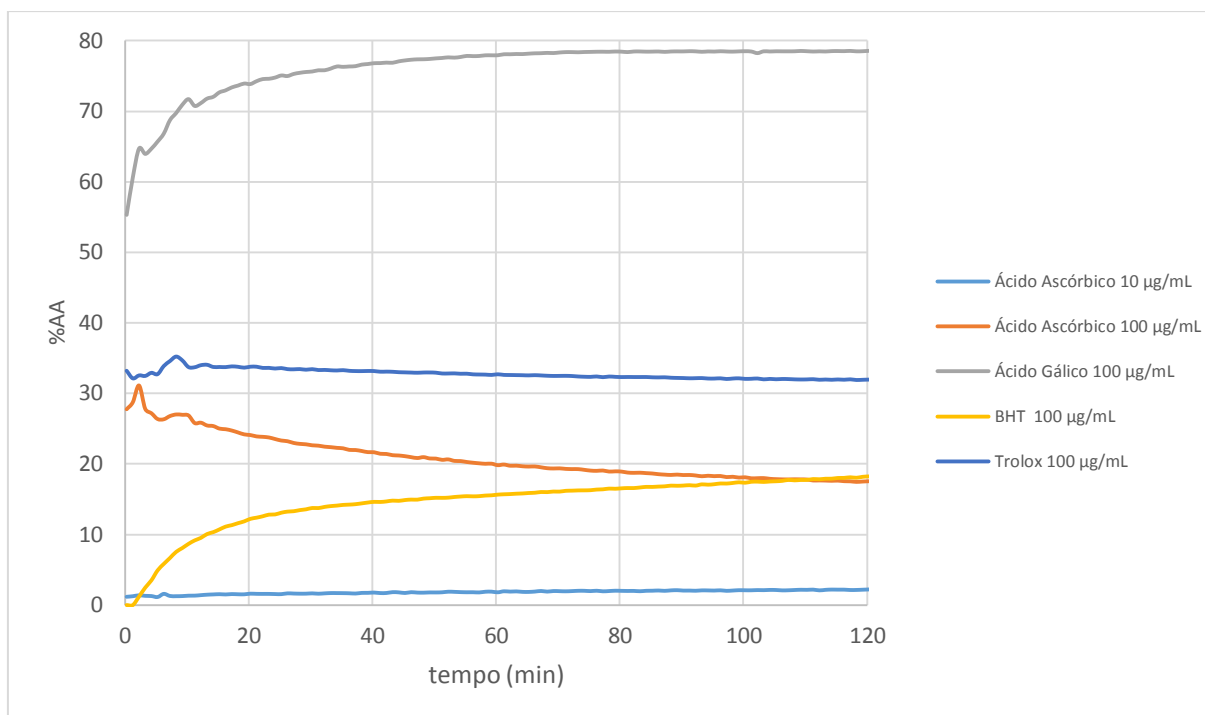


Figura 35 – Interação do radical ABTS[•] com antioxidantes sintéticos
Fonte: Autoria própria

Para o Ácido Ascórbico, em baixas concentrações ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) observou-se que durante os 120 minutos de análise o percentual de atividade antioxidante apresentou valores mínimos de sequestro do radical. Já para a concentração de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, observou-se que o radical ABTS[•] teve sua coloração alterada no tempo de 6 minutos, o que indica uma cinética rápida, e a potencialidade deste compostos como agente antioxidante. A curva apresentada indica uma possível formação de subprodutos ao longo dos 120 minutos de análise.

Campos e Lissi (1999) apresentam que a reação de certos compostos com o radical ABTS[•] também podem formar ligações entre radicais, gerando subprodutos e alterando a cinética.

Para a cinética do Ácido Gálico (Figura 36), é possível observar que na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ocorreu o consumo de 74% do ABTS durante 20 minutos, estabilizando depois deste período, indicando uma cinética intermediária.

Para o radical BHT, foi possível observar o consumo gradativo do radical ABTS[•] ao longo dos 120 minutos de análise, indicando uma cinética lenta.

O Trolox apresentou um perfil cinético diferente dos padrões analisados que mostraram aumento de atividade antioxidante ao longo do tempo. Acredita-se que este decréscimo na porcentagem de atividade antioxidante esteja relacionado à formação de subprodutos, já que observa-se pela mudança de coloração a reação instantânea do radical ABTS: logo nos primeiros minutos de reação.

Observou-se que o comportamento cinético das reações do radical ABTS^{•+}, com os antioxidantes sintéticos avaliados exibiram resultados de aumento da %AA no decorrer do tempo apenas para os padrões de BHT e Ácido Gálico. Acredita-se que o ABTS tenha reagido imediatamente com o ácido ascórbico e Trolox nas concentrações testadas, e após ocorrendo a formação de subprodutos, corroborando com Zheng et al. (2016), que descrevem a ocorrência deste fenômeno quando os substratos reagem imediatamente e totalmente com o radical gerado após 6 minutos, entrando em outras reações adicionais, resultando na formação de dímeros, de ligações covalentes ou subprodutos derivados do substrato.

As curvas cinéticas que descrevem o comportamento dos compostos **(20)** a **(23)** em suas respectivas concentrações estão mostradas na Figura 36.

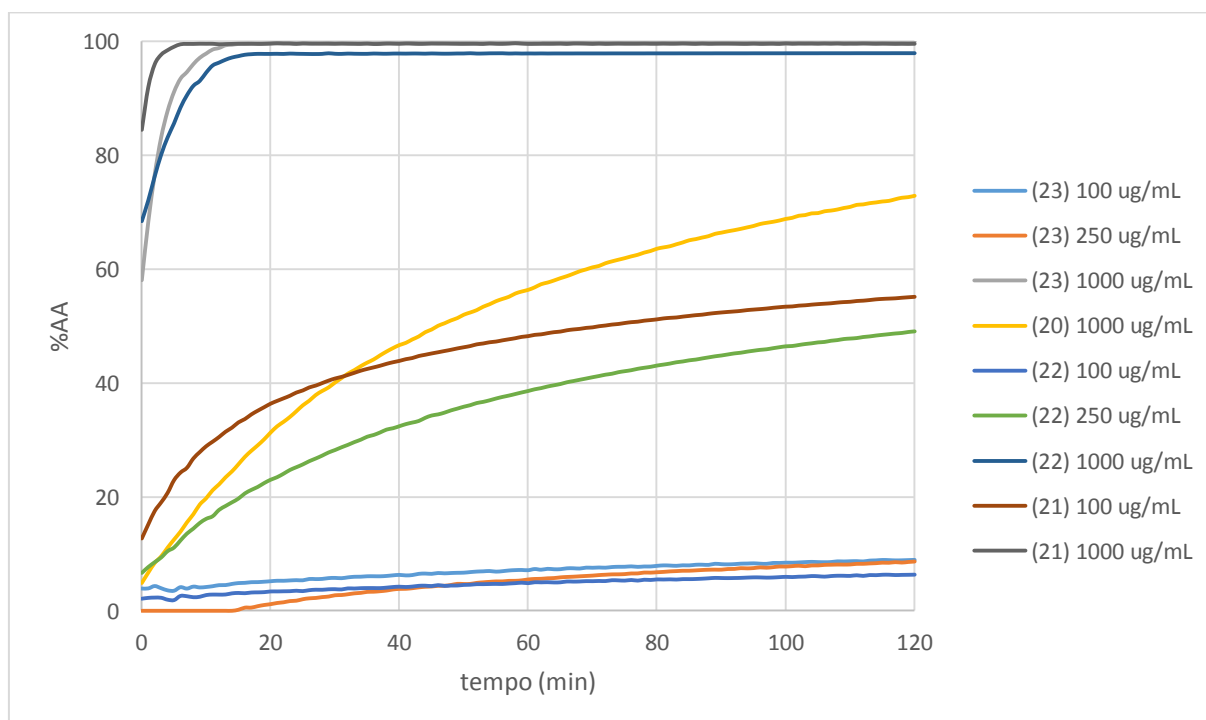


Figura 36 – Interação do radical ABTS^{•+} com os compostos (20-23)

Fonte: Autoria própria

De acordo com a Figura 36, para a curva cinética do composto **(20)** observou-se que para a concentração de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ no tempo aproximado de 100 minutos foi detectado em torno de 50% de consumo do radical ABTS, caracterizando uma cinética lenta.

Para o composto **(21)** observou-se que em concentrações maiores ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), o ABTS· reagiu quase que instantaneamente e mostrou uma alta capacidade antioxidante, reagindo totalmente com o radical ABTS· em torno de 20 minutos, indicando uma cinética intermediária. Em concentrações menores ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) observou-se o consumo gradativo do radical ABTS· que em 120 minutos reagiu por volta de 50%, caracterizando uma cinética lenta (Figura 36).

Para o composto **(22)** observou-se que para a concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ tem-se valores baixos de atividade antioxidante, aproximadamente 6% durante 120 minutos de análise. Para a concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, observou-se uma cinética lenta ao apresentar 49% de sequestro do radical ABTS· durante duas horas de análise. Para a concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ observou-se uma cinética intermediária ao apresentar 97% de consumo em 12 minutos (Figura 36).

Para o composto **(23)** observou-se que em concentrações menores ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$) tem-se a mesma porcentagem de atividade antioxidante para os 120 minutos de análise, consumindo apenas 8% do radical ABTS· (Figura 36) e na concentração maior ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) observou-se o consumo imediato do radical ABTS· em torno de 11 minutos, o que caracteriza uma cinética intermediária.

A partir dos resultados obtidos, resume-se as cinéticas dos compostos **(20-23)** em relação ao radical ABTS· nas diversas concentrações testadas (Tabela 18).

Tabela 18 – Descrição da cinética dos compostos (20-23)

Compostos	[] $\mu\text{g mL}^{-1}$	Descrição da cinética
(20)	1.000	lenta
(21)	1.000; 100	intermediária; lenta
(22)	1.000; 250	intermediária; lenta
(23)	1.000	intermediária

Os resultados apresentados revelam novamente, assim como para o ensaio com DPPH·, a influência positiva do grupo nitro na atividade antioxidante.

Observando-se na literatura, diversos autores utilizam a metodologia com ABTS com um tempo de reação de 6 minutos, por essa razão, estão apresentados na Tabela 19 os valores de %AA neste tempo.

Tabela 19 – Valores de %AA pelo método ABTS em 6 minutos de reação

Compostos	[] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	%AA
(20)	1.000	23,44 \pm 3,48 ^e
(21)	1.000	99,56 \pm 0,45 ^a
(22)	1.000	89,45 \pm 3,13 ^b
(23)	1.000	95,46 \pm 0,94 ^{a,b}
Ác. Ascórbico	100	26,33 \pm 3,20 ^{d,e}
Ác. Gálico	100	68,73 \pm 2,70 ^c
BHT	100	5,83 \pm 1,75 ^f
Trolox	100	33,88 \pm 5,74 ^d

Resultados expressos em (media desvio padrão)

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ao nível de 95% de confiança de acordo com Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

Fonte: Autoria própria

Através dos valores de %AA para os padrões observa-se que a ordem de atividade foi ácido gálico > trolox > ácido ascórbico > BHT na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para os compostos sintetizados na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ observa-se o composto contendo o grupo 3-hidróxifenil na posição-4 **(21)** apresentando maior atividade, seguido do composto contendo o grupo 4-metóxifenil na posição-4 **(23)**. Os compostos apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre si em relação à %AA. O composto **(21)** mostrou AA significativamente maior que o **(20)**, possivelmente em função de apresentar grupo hidroxila na sua estrutura. O composto **(22)** contendo o grupo 3-nitrofenil na posição-4 apresentou boa atividade antioxidante com 89,45% de consumo do radical ABTS em 6 minutos de reação. O composto menos ativo foi o **(20)**, que possui o grupo fenil na posição-4, indicando que a presença de um grupo doador ou captor de elétrons no anel influencia significativamente na atividade antioxidante pelo método ABTS em relação ao Ácido Ascórbico, Ácido Gálico, BHT e Trolox.

É importante salientar a diferença observada para a potencialidade de atividade antioxidante para os compostos sintetizados quando comparados os dois

métodos de sequestro dos radicais DPPH[·] e ABTS[·]; ressaltando a importância de se utilizar mais de um método para avaliar o potencial antioxidante de compostos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram sintetizados e caracterizados os derivados 6-carbóxi imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (**20-23**) a partir da reação de Pictet-Spengler da L-histidina com os aldeídos: benzaldeído, 3-hidróxibenzaldeído, 3-nitrobenzaldeído e 4-metóxibenzaldeído com rendimentos de 79%, 35%, 97,1% e 35%, respectivamente. A confirmação da formação dos derivados foi realizada pela análise dos espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C.

Os resultados de estudo cinético da atividade antioxidante obtidos pelo método de sequestro do radical livre DPPH[·] e ABTS[·] demonstraram que os compostos (**20-23**) apresentaram atividade antioxidante em diferentes concentrações através dos dois métodos, o que indica que os compostos estudados podem ser indicados a fármacos biologicamente ativos. O presente trabalho também apresentou o estudo pelos dois métodos à soluções de antioxidantes sintéticos, verificando questões como a dependência da concentração, tempo de reação como variáveis que influenciam neste processo. Também foi possível observar a atividade antioxidante pelos dois métodos além de observar pelo método ABTS que ao reagir totalmente com Trolox e Ácido Ascórbico podem formar subprodutos reacionais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram sintetizados e caracterizados os derivados 6-carbóxi imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (**20-23**) a partir da reação de Pictet-Spengler da L-histidina com os aldeídos: benzaldeído, 3-hidróxibenzaldeído, 3-nitrobenzaldeído e 4-metóxibenzaldeído com rendimentos de 79%, 35%, 97,1% e 35%, respectivamente. A confirmação da formação dos derivados foi realizada pela análise dos espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C.

Os resultados de estudo cinético da atividade antioxidante obtidos pelo método de sequestro do radical livre DPPH \cdot e ABTS \cdot demonstraram que os compostos **(20-23)** apresentaram atividade antioxidante em diferentes concentrações através dos dois métodos, o que indica que os compostos estudados podem ser indicados a fármacos biologicamente ativos. O presente trabalho também apresentou o estudo pelos dois métodos à soluções de antioxidantes sintéticos, verificando questões como a dependência da concentração, tempo de reação como variáveis que influenciam neste processo. Também foi possível observar a atividade antioxidante pelos dois métodos além de observar pelo método ABTS que ao reagir totalmente com Trolox e Ácido Ascórbico podem formar subprodutos reacionais.

7. REFERÊNCIAS

ACHAR, K.C.S; HOSAMANI, K.M; SEETHARAMAREDDY. In-vivo analgesic and anti-inflammatory activities of newly synthesized benzimidazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p. 2048–2054. 2010

ALMEIDA, M. C. S; SOUZA, L.G.S; SOUZA, J.M.O; AGUIAR, G.R; LEMOS, T.L.G; BRAZ-FILHO, R. Alcalóide de Bauhinia pentandra e atividade antioxidante. In: REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 36., 2013, Águas de Lindóia. **Painel**. Águas de Lindóia: Cubo, 2013.

ALMEIDA, V.L; LEITÃO, A; REINA, L.C.B; MONTANARI, C.A; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005

APAK, R; GUÇLU, K; OZYUREK, M. KARADEMIR, S.E. Novel total antioxidante capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, n. 26, p. 7970-7981, 2004.

ARBOS, K.A. **Qualidade sanitária e nutricional de hortícolas orgânicas**. 2009. 161 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia da UFPR, UFPR, Curitiba, 2009.

BAE, G.U.; SEO, D.W.; KWON, H.K.; LEE, H.Y.; HONG, S.; LEE, Z.W.; HA, K.S.; LEE, H.W.; HAN, J.W. Hydrogen peroxide activates p70(S6k) signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 46, p. 32596-32602, 1999.

BARBOSA, V.A; FORMAGIO, A.S.N; SAVARIZ, F.C; FOGLIO, M.A; SPINDOLA, H.M; CARVALHO, J.C; MEYER, E; SARRAGIOTTO, M.H. Synthesis and antitumor activity of β -carboline 3-(substituted-carbohydrazide) derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p.6400-6408, 2011.

BATISTA, P.L.T. **Síntese de compostos 4-(3-hidróxifenil)-imidazo-[4,5-c]-1,2,3,4-tetraidropiridina contendo diferentes grupos na posição-6**. Apucarana: Utfpr, 2014. 29 p.

BERGAMASCHI, K.B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 97 f. Dissertação

(Mestrado em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M.E; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**. v, 28, n.1, p.25-30

BRIZOLA, V.R; BRIENZA, S.M.B. **Avaliação da composição e da atividade antioxidante de extratos de Piperregnellii**. In: 8ª mostra acadêmica da UNIMEP, 2010.

CAMACHO, J; BARAZARTE, A; GAMBOA, N; RODRIGUES, J; ROJAS, R; VAISBERG, A; GILMAN, R; CHARRIS, J. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole-5-carbohydrazide derivatives as antimalarial, cytotoxic and antitubercular agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p.2023-2029, 2011.

CARMONA-JIMÉNEZ, Y; GARCÍA-MORENO, V; IGARTUBURU, J.M; BARROSO, C.G. Simplification of the DPPH assays for estimating the antioxidant activity of wine and Wine by-products. **Food Chemistry**. v. 165, p. 198-204, 2014.

CARPES, S.T; PRADO, A; MORENO, I.A.M; MOURÃO, G.B; ALENCAR, S.M; MASSON, M.L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, 2008.

CARVALHO, P.G.C de. **Preparação de novos compostos imidazo[4,5-c]-piridina contendo os grupos fenil e 4-dimetilaminofenil na posição-4, avaliação de suas atividades antioxidante e ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina***. 2014. 58 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Processos Químicos, Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, UTFPR, Apucarana, 2014.

DEN STORE DANSKE. Disponível em <http://www.denstoredanske.dk/It,_teknik_og_naturvidenskab/Kemi/Cykliske_forbindelser/imidazol>. Acesso em 13/11/2014

DUSMAN, L.T.D. Síntese, estudos conformacionais e avaliação da atividade biológica frente *Trypanosoma cruzi* e *Artemia salina* de tetraidro-beta-carbolinas-3-carbometóxi e 3-amido-1-benzossobstituídas. 2005.103 p. Dissertação (Mestrado

em Química). Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

FLOEGEL, A; KIM, D.O; CHUNG, S. KOO, S. I; CHUN, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.24, p.1043–1048, 2011

GALVÃO, E.L; SILVA, D.C.F; SILVA, J.O; MOREIRA, A.V.B; SOUSA, E.M.B.D. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.28, n.3, p. 551-557, 2008.

GODFREY, D.G. Antiparasitic action of dietary cod liver oil upon *Plasmodium berghei* and its reversal by vitamin E. **Experimental Parasitology**, v.6, n.6, p.555-565, 1957.

GOYAL, P.K; BHANDARI, A; RANA, A.C; JAIN, C.B. Synthesis, characterization and analgesic activity of some 4H-1,2,4-triazole derivatives. **International Journal of ChemTech Research**. v.2, p.1992-1997, 2010.

HADIZADEH, F; HOSSEINZADEH, H; MOTAMED-SHARIATY, V.S; SEIFI, M; KAZEMI, S. Synthesis and antidepressant activity of n-substituted imidazole-5-carboxamides in forced swimming test model. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 1, p.29-33, 2008.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Oxford – Clarendon, 2000. 936 p.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants and human diseases: Where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 119, p. 598, 1992.

HENRIQUEZ, C; ALIAGA, C; LISSI, E. Kinetics profiles in the reaction of abts derived radicals with simple phenols and polyphenols. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 49, n. 1, p. 65-67, 2004.

JARDINI, F.A; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.) **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.43, n.1, p. 137-147, 2007.

KANNER, J; GERMAN, B. KINSELLA, J. E; HULTIN, H.O. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 25, n.4, p, 1987. 317-364

KUSKOSKI, E.M; ASUERO, A.G; TRONCOSO, A.M; MANCINI-FILHO, J; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n.4, p.726-732, 2005.

LLACUNA, L. MACH, N. Papel de los antioxidantes en la prevención del câncer. **Rev Esp. Nutr. Hum. Diet.** v. 16(1), p.16-24, 2012.

MILLER, N.J; RICE-EVANS, C.A; DAVIES M.J; GOPINATHANN, V. MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin. Sci.** v. 84, p. 407-412. 1993

MISHRA, K; OJHA, H; CHAUDHURY, N.K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**. v. 130, p.1036-1043, 2012.

NAYAK, P.S; NARAYANA,B; SAROJINI, B.K;SHEIK, S; SHASHIDHARA, K.S; CHANDRASHEKAR, K.R. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of imides, pyridazines and imidazoles derived from itaconic anhydride for potential antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Taibah University for Science**. No prelo, 2015.

NUNES, A.C.S. **Síntese e avaliação da atividade antioxidante de novos derivados imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina e imidazo[4,5-c]piridina contendo os grupos 4-metóxfenil e 4-hidróxfenil na posição-4**. Apucarana: Ufpr, 2014. 51 p.

OLIVEIRA, G.K.F; TORMIN, T.F; SOUSA, R.M.F; OLIVEIRA, A; MORAIS, S.A.L; RICHTER, E.M; MUNOZ, R.A.A. Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v.192, 691-697, 2016.

OLIVEIRA, S.; SOUZA, G.A; ECKERT, C.R; SILVA, T.A; SOBRAL, E.S; FÁVERO, O.A; FERREIRA, M.J.P; ROMOFF, P; BAADER, W.J. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, 497-503, 2014.

OLMO, F; GÓMES-CONTRERAS, F; NAVARRO, P; MARÍN, C; YUNTA, M.J.R; CANO, C; CAMPAYO, L; MARTÍN-OLIVA, D; ROSALES, M.J; SÁNCHEZ-MORENO, M. Synthesis and evaluation of *in vitro* and *in vivo* trypanocidal properties of a new-imidazole-containing nitrophthalazine derivative. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 106, p. 106-119, 2015.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PRIOR, R.L; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 27, n. 11-12, p. 1173-1181, 1999.

RAJ, M.K; MRUTHYUNJAYASWAMY, B.H.M. Synthesis, spectroscopic characterization, electrochemistry and biological evaluation of some metal (II) complexes with ONO donor ligand containing benzo[b]thiophene and coumarin moieties. **Journal of Molecular Structure**, v. 1074, p. 572–582, 2014.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REFAAT, H. M. Synthesis and anticancer activity of some novel 2-substituted benzimidazole derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 2949-2956, 2010.

REZENDE, L.C. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia**. 2010. 118 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química Orgânica, Instituto de Química, UFBA, Salvador, 2010.

SAN-MIGUEL, A; MARTIN-GIL, F.J. Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. **Gaceta Médica de Bilbao**. v. 106, n.3, p. 106-113, 2009.

SHALINI, K; SHARMA, P.K; KUMAR, N. Imidazole and its biological activities: A review. **Der Chemica Sinica**, v. 1 (3), p. 36-47, 2010.

SHARMA, D; NARASIMHAN, B; KUMAR, P; JUDGE, V; NARANG, R; DE CLERCG, E; BALZARINI, J. Synthesis, antimicrobial and antiviral evaluation of substituted imidazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 44, p. 2347–2353, 2009

SIES, H; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 62, n.4, p.1315s-1321s.1995.

SIGMA-ALDRICH. **ABTS**. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a1888pis.pdf>. Acesso em 26/11/2015.

SMITH, D.D; GALLAGHER, A.T; CROWLEY, V.M; GERGENS, W.M; ABEL, P.W; HULCE, M. An Efficient Synthesis of 4(5)-Benzyl-L-histidines Employing Catalytic Transfer Hydrogenolysis at Elevated Temperatures. **Synthesis**. v.46, p. 515-521, 2014.

THAIPONG, K; BOONPRAKOB, U; CROSBY, K; CISNEROS-ZEVALLOS, L; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.19, n.6-7, p. 669-675, 2006

TONIN, A.P.P; **Síntese e avaliação da atividade antioxidante de novos derivados imidazo [4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina contendo os grupos 4-fluorfenil e 3-hidroxifenil na posição-4**. 2014. 50 p. TCC (Graduação) – Curso de Licenciatura em Química, Coordenação do Curso de Licenciatura em Química. UTFPR, Apucarana, 2014.

WENZEL, G. E. **Radicais livres, antioxidantes nutracêuticos fenólicos e polifenólicos vegetais** – São Leopoldo : Ed. UNISINOS, 2012.

YÜKSEK, H; KOCA, E; GÜR SOY-KOL, Ö; AKYILDIRIM, O; ÇELEBIER, M. Synthesis, *in vitro* antioxidant activity and physicochemical properties of novel 4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives. **Journal of Molecular Liquids**. v. 206, p. 359-366, 2015

ZHENG, L; ZHAO, M; XIAO, C; ZHAO, Q; SU, G. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. **Food Chemistry**. v.192, p. 288-294, 2016.