

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

ANGÉLICA PRISCÍLA PARÚSSOLO TONIN

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE NOVOS
DERIVADOS IMIDAZO [4,5-c]4,5,6,7-TETRAIDROPIRIDINA
CONTENDO OS GRUPOS 4-FLÚORFENIL E 3-HIDRÓXIFENIL NA
POSIÇÃO-4**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

APUCARANA

2014

ANGELICA PRISCÍLA PARÚSSOLO TONIN

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE NOVOS
DERIVADOS IMIDAZO[4,5-c]4,5,6,7-TETRAIDROPIRIDINA
CONTENDO OS GRUPOS 4-FLÚORFENIL E 3-HIDRÓXIFENIL NA
POSIÇÃO-4**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, como requisito parcial para a Conclusão do Curso Superior de Licenciatura em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Apucarana..

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lilian Tatiani Dusman Tonin

APUCARANA

2014

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

Agradeço a Deus pela oportunidade, pelas dificuldades, pelo aprendizado e pela alegria de concluir mais uma etapa de vida.

Ao meu esposo Rogério por sempre ter acreditado em mim, ter sempre me apoiado e me incentivado a perseverar nos meus sonhos e a minha sogra e meu sogro pelo apoio e incentivo em todos os momentos

Aos meus pais, e a toda minha família pelo apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida.

À minha querida orientadora Prof.^a Dr.^a Lilian Tatiani Dusman Tonin pela sua amizade, pela sua orientação, pelos seus ensinamentos, pela sua paciência e por me ensinar a estudar. Muito obrigada, sem sua orientação esse trabalho não seria possível.

A todos os professores da UTFPR por todos os ensinamentos profissionais e de vida que me transmitiram em especial as professoras. Dra. Alessandra Machado Baron, Dra. Patrícia Salomão Garcia por sempre estarem dispostas a me ajudar. Muito obrigado as duas por tudo de bom que acrescentaram em de minha vida.

A todos meus amigos da licenciatura em Química e da UTFPR, em especial aos que acompanharam de perto minhas alegrias e frustrações: Ana, Bruna, Flavianny, Katlyn, Marisa, M^a Gabriela, Tayssa e Washington, muito obrigado por fazerem parte da minha vida.

As minhas colegas de laboratório Bruna S. e Jeniffer por estarem sempre dispostas a me ajudar. Obrigada por tudo meninas.

“Difícilmente temos consciência do que realmente é significativo em nossa própria existência, e isso certamente não deve preocupar nosso vizinho. Que sabe um peixe sobre a água em que nada a vida inteira? O amargo e o doce vêm de fora, o penoso vem de dentro, de nossos próprios esforços. Na maioria das vezes, faço aquilo que minha própria natureza me impele. É embaraçoso ganhar tanto respeito e amor por causa disso. Setas de ódio também foram disparadas contra mim; mas nunca me atingiram, porque de algum modo, pertenciam a um outro mundo, com o qual não tenho nenhuma ligação”.

Albert Einstein

RESUMO

TONIN, Angélica, 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. 52 p. Trabalho de Conclusão de Curso II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2014.

Atualmente têm-se evidenciado um aumento significativo no uso e na avaliação da capacidade antioxidante, tanto em fármacos e cosméticos quanto em alimentos e produtos naturais, em especial de compostos que contem o grupo imidazol em suas estruturas. Estes derivados possuem uma grande abrangência de atividades biológicas, tais como antibacteriana, antituberculose, antifúngica, anticonvulsivante, anti-inflamatória, antitumoral, analgésica e antioxidante. O presente trabalho apresenta a síntese e avaliação da atividade antioxidante de novos derivados contendo o núcleo imidazol. Os compostos foram sintetizados pela reação de condensação de Pictet-Spengler da L-histidina com o 4-flúorbenzaldeído e o 3-hidróxibenzaldeído, seguido da reação de esterificação. As estruturas dos compostos sintetizados foram confirmadas com base na análise dos dados espectrais de RMN ^1H . Foram sintetizados dois novos compostos 6-carbóxi-4-fenilssubstituído-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina **36a** e **36b** com os rendimentos de 86,4% e 49,4%, e um novo composto 6-carbometóxi-4-fenilssubstituído-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina **37b** com o rendimento de 93,3%. Os derivados foram submetidos a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres DPPH e ABTS. Os resultados de IC_{50} e %S do radical ABTS obtidos para os derivados sintetizados demonstraram que o composto **37b** foi o que apresentou maior atividade antioxidante pelo método DPPH e o derivado **36b** para o teste ABTS, contudo apresentaram menores potenciais que o padrão BHT.

Palavras-chave: Imidazol. Atividade antioxidante. DPPH. ABTS.

ABSTRACT

TONIN, Angelica, P.P. **Synthesis and evaluation of antioxidant activity of new derivatives imidazo [4,5-c]4,5,6,7-tetrahydropyridine containing the 4-fluorophenyl and 3-hydroxyphenyl group at position-4.** 2014. 52 p. Work Course Conclusion II. Federal Technological University of Paraná. Apucarana, 2014.

Currently have been shown a significant increase in the use and evaluation of antioxidant capacity, both in pharmaceuticals and cosmetics and in food and natural products, in particular compounds containing the imidazole group in their structures. These derivatives have a wide range of biological activities such as antibacterial, anti-tuberculosis, antifungal, anticonvulsant, anti-inflammatory, antitumor, analgesic and antioxidant. This paper presents the synthesis and evaluation of the antioxidant activity of new derivatives containing the imidazole ring. The compounds were synthesized by the condensation reaction of the Pictet-Spengler L-histidine to 4-fluorobenzaldehyde and 3-hydroxybenzaldehyde, followed by esterification reaction. The structures of synthesized compounds were confirmed based on analysis of the spectral data NMR ^1H . Two novel compounds were synthesized 6-carboxy-4-phenylsubstituted-imidazo[4,5-c] 4,5,6,7-tetrahydropyridine **36a** and **36b** in yields of 86.4% and 49.4%, and a new compound 6-carbomethoxy-4-phenylsubstituted-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetrahydropyridine **37b**, yield 93.3%. The derivatives were subjected to in vitro evaluation of antioxidant activity for the method of free radicals DPPH and ABTS. The results of IC_{50} and %S of ABTS radical, obtained for the synthesized derivatives have shown that the compound **37b** showed the highest antioxidant activity by DPPH method and **36b** showed better potential antioxidant by method ABTS, however showed potential smaller than the standard BHT.

Keywords: imidazole. Antioxidant activity. DPPH. ABTS.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ABTS	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico
BHT	Di-terc-butil metil fenol
BHA	Hidroxianisol butilado
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CHCl ₃	Clorofórmio
CL ₅₀	Concentração Letal
<i>d</i>	Dupleto
DMF	Dimetilformamida
DMAE	Dimetilaminoetanol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico,
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
EtOH	Etanol
GSH	Glutathiona
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
IC ₅₀	Concentração Inibitória
KMnO ₄	Permanganato de Potássio
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucleico
%S	Porcentagem e sequestro de radical livre ABTS

s	Simpleto
SOCl_2	Cloreto de Tionila
SOD	Superóxido dismutase
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E RADICAIS LIVRES.....	14
3.2	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	17
3.2.1	Método de Sequestro do Radical Livre DPPH.....	17
3.2.2	Método de Sequestro do Radical ABTS.....	18
3.3	COMPOSTOS CONTENDO O GRUPO IMIDAZOL E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	20
3.4	METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO DE COMPOSTOS CONTENDO O GRUPO IMIDAZOL	24
4	METODOLOGIA	27
4.1	PROCEDIMENTO GERAL PARA SÍNTESE DOS DERIVADOS	27
4.1.1	Síntese dos compostos 6-carbóxi-4-fenilsubstituído-imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (36a e 36b)	27
4.1.2	Síntese do composto 6-carbometóxi-4-fenilsubstituído-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (37b).....	28
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS	29
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	29
4.3.1	Determinação da atividade antioxidante através do método DPPH	29
4.3.2	Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS ^{•+}	30
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS	32
5.2	RESULTADOS DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	40
5.2.1	Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH	40
5.2.2	Atividade antioxidante pelo método ABTS	44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

As evidências sobre o efeito prejudicial dos radicais livres no organismo têm motivado cada vez mais as pesquisas em relação aos antioxidantes. O excesso desses radicais no organismo exibe efeitos maléficos, estando relacionados com várias patologias, tais como artrite, doença do coração, choque hemorrágico, catarata, câncer, AIDS, disfunções cognitivas (HALLIWEEL et al., 1995), doença de Alzheimer e Parkinson, doenças inflamatórias como asma, alergia e outras relacionadas com o processo de envelhecimento (TOMEI; SALVADOR, 2007), podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (HALLIWEEL et al., 1995).

No metabolismo humano a oxidação é parte fundamental para o processo de obtenção de energia e assim, os radicais livres são produzidos naturalmente, ou ainda por alguma disfunção biológica. Os efeitos prejudiciais dos mesmos devem-se ao fato de que os radicais livres apresentam um elétron desemparelhado centrado nos átomos de oxigênio (ERO – Espécie Reativa de Oxigênio) ou nitrogênio (ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio) (VISIOLI; KEANEY JR; HALLIWELL, 2000; FINKEL; HOLBROOK, 2000). Portanto, se a produção de radicais livres superar a capacidade antioxidante em um sistema vivo, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio podem reagir com lipídios, proteínas e com o DNA, provocando um dano estrutural e/ou funcional nas células, enzimas e material genético (BARREIROS e DAVID, 2006).

No organismo, os antioxidantes combatem o excesso desses radicais livres, e podem ser produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta, como por exemplo o β -caroteno (pro-vitamina-A), α -tocoferol (vitamina-E), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos, apresentando uma correlação entre atividade antioxidante de substâncias polares e capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral (HO et al., 1994).

Os compostos que possuem a unidade imidazol (Figura 1) apresentam diversas propriedades farmacológicas e desempenham papéis importantes em processos bioquímicos. Nos últimos anos, as grandes propriedades terapêuticas das drogas imidazol têm atraído a atenção para a síntese de um grande número de

medicamentos químicos, como novos agentes quimioterapêuticos. Os fármacos imidazólicos ampliaram o alcance para remediar várias disposições em medicamentos clínicos. Os compostos que possuem o grupo imidazol (1), apresentam propriedades medicinais que incluem anticancerígeno, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngico e antioxidante (ABDEL-WAHAB; AWAD e BADRIA, 2011).

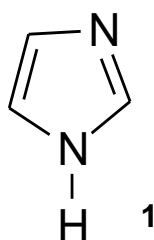


Figura 1- Imidazol.
Fonte: Autoria própria.

As potencialidades farmacológicas apresentadas pelos compostos que possuem o grupo imidazol descobertas até hoje, foi o que motivou-nos a realizar a síntese e avaliação da atividade antioxidante de novos compostos que apresentem esse grupo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar novos compostos contendo os núcleos imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina e avaliar a atividade antioxidante utilizando os métodos DPPH e ABTS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar novos derivados imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina a partir da L-histidina com os aldeídos: (a) 4-flúorzaldeído e (b) 3-hidróxibenzaldeído;
- Caracterizar os derivados obtidos a partir da análise dos espectros de RMN ^1H ;
- Avaliar a atividade antioxidante dos novos compostos sintetizados e de seus intermediários pelos métodos DPPH e ABTS.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E RADICAIS LIVRES

Os antioxidantes são definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou impede a oxidação deste substrato. No organismo encontram-se diversas enzimas responsáveis pela atividade antioxidante do organismo, entre elas destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das espécies reativas de oxigênio (EROS). Por intermédio destas enzimas, as células tentam reduzir as quantidades do radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical hidroxil. As defesas não enzimáticas são constituídas principalmente por antioxidantes, por exemplo, a glutathione (GSH), a vitamina A, vitamina C, vitamina E, zinco e selênio (OLIVEIRA et al., 2009).

Dentro da indústria farmacêutica os agentes antioxidantes ocupam um lugar de destaque, sendo importante a realização da pesquisa sistematizada desses compostos e de suas capacidades de neutralizar agentes nocivos a sistemas biológicos, como por exemplo, os radicais livres (BORGES et al, 2011). A oxidação é parte essencial da vida aeróbica e do nosso metabolismo e assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. No organismo, os radicais livres estão envolvidos na produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (HUSAIN; CILLARD; CILLARD, 1987).

O organismo humano sofre ação constante de ERO e ERN produzidas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou proveniente dos alimentos. As principais formas de ERO se distribuem em dois grupos principais, os radicalares: hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Já nos ERN,

encontram-se o óxido nítrico (NO^\cdot), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (HALLIWELL, 1999; CHATQILIALOGLU; O'NEILL, 2001; WISEMAN; KAUR; HALLIWELL, 1995; CADET et al, 1999). Ao passo que, alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem outros ainda, que são poucos reativos, mas podem gerar espécies danosas (BARREIROS ; DAVID; DAVID, 2006).

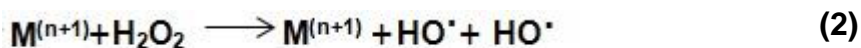
O radical HO^\cdot é o mais nocivo ao organismo, visto que possui uma meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Estes radicais normalmente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. Nos experimentos de laboratório o HO^\cdot pode facilmente ser sequestrado *in vitro* por inúmeras moléculas, devido a sua alta reatividade. Contudo, é preciso ministrar alta concentração do antioxidante para que este alcance o local onde o radical HO^\cdot está presente em concentração suficiente para suprimi-lo, para que os resultados *in vitro* se reproduzam *in vivo*. Existem duas maneiras de controlar a presença do radical HO^\cdot : reparar os danos causados por ele ou inibir sua formação (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O radical HO^\cdot se forma no organismo normalmente por dois mecanismos: reação de H_2O_2 com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992) (Equação 1). A incidência de radiação no ultravioleta, radiação γ e raios X podem levar a produção do radical HO^\cdot nas células da pele. O ataque intensivo e contínuo deste radical pode originar mutações no DNA e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de câncer em seres humanos no período de 15 a 20 anos.



O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inofensivo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares como, por exemplo, a membrana do núcleo. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre

geração do radical HO[•] em seu interior (HUSAIN; CILLARD; CILLARD, 1987) (Equação 2).



O radical OH[•] causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. No DNA ataca tão intensamente as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose (HALLIWELL, 1999; CHATQILIALOGLU; O'NEILL, 2001; WISEMAN; KAUR; HALLIWELL, 1995; CADET et al., 1999).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que dietas ricas em verduras e frutas estão relacionadas a uma menor incidência de doenças crônicas e degenerativas (GASIANO, 1996; ZIBADI et al., 2007;). Apesar de uma prova definitiva de que suplementos antioxidantes possam prevenir doenças crônicas não tenha sido obtida, há muita controvérsia nessa área de pesquisa, indicando a necessidade de obtenção de evidências inequívocas a respeito da eficácia, segurança e dosagem apropriada de antioxidantes em relação a doenças crônicas. Desta forma, apesar de não haver comprovação científica definitiva, é prudente e aconselhável, em termos de saúde pública, aumentar o consumo de alimentos vegetais (STANNER et al, 2004).

Nos alimentos, a deterioração de óleos e gorduras é responsável pelos odores e sabores rançosos, com conseqüente decréscimo da qualidade e segurança nutricionais, causado pela formação de produtos secundários, potencialmente tóxicos. Deste modo, a adição de antioxidantes é requerida para preservar sabor e odor, além de evitar a destruição de vitaminas. Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados para preservar alimentos, destacam-se o hidroxianisol butilado (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT), o galato de propila, a terc-butil-hidroquinona e os sorbatos (2,4-hexadienoatos) (DORKO, 1994).

A desorganização do mecanismo de defesa antioxidante é uma das maiores causas do envelhecimento cutâneo, provocando doenças na pele, resultantes das condições causadas por esse desequilíbrio e que são conseqüências de danos a estruturas neles presentes, como lipídios, proteínas e o DNA. Estima-se que por volta de 80% dos sinais causados no envelhecimento são conseqüências dos raios

ultravioletas e pelos radicais livres formados devido a exposição a estes (BUCHILI, 2002).

Os raios solares possuem radiação ultravioleta A, B e C, que incidem em comprimentos de onda que variam de 180 a 400 nm. A radiação UVC quase não atinge a superfície terrestre, sendo retida pela camada de ozônio. No entanto, essa barreira natural esta sendo destruída devido à poluição e a emissão de CFC (clorofluorcarbono). As radiações UVA e UVB promovem a formação de radicais livres, sendo que ainda não se tem certeza de qual das duas provoca mais o aparecimento destas espécies. Sabe-se que juntas são mais prejudiciais que isoladamente e que o estresse oxidativo provocado por elas nas camadas da pele depende da penetração dos raios (MAGALHÃES, 2000).

A utilização tópica de antioxidantes diminui os danos oxidativos causados pela radiação UV. No entanto, essa proteção será mais eficaz se ocorrer penetração destas substâncias antioxidantes nas camadas mais profundas do estrato córneo. Entre as substâncias mais ativas atualmente utilizadas em produtos cosméticos, destacam-se: carotenoides, vitamina C, glutathione, vitamina E, dimetilaminoetanol (DMAE), ácido α -lipóico, coenzima Q e compostos encontrados em extratos vegetais como: polifenóis, flavonoides, organosulfídeos e os indóis (SCOTTI et al., 2007).

3.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.

3.2.1 Método de sequestro do radical livre DPPH

O teste do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo. Foi sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em materiais naturais. O DPPH é um método químico, aplicado para determinar a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres, sendo um dos mais utilizados, pois ele é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade. (ROGINSKY; LISSI, 2005). Uma das características principais desse método é que ele não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (SILVA et al, 1999).

O método da análise de atividade antioxidante por DPPH é realizada através de medidas espectrofotométricas do consumo do radical, na presença de substâncias antioxidantes. O modelo para avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH· é um método amplamente utilizado e relativamente rápido quando comparado a outras técnicas, ele é baseado na capacidade do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil reagir com substâncias doadoras de hidrogênio. O consumo de DPPH· é um índice para estimar a capacidade antioxidante na captura de radicais livres presentes no meio. No ensaio espectrofotométrico, a absorvância a 515 nm diminui como um resultado de uma alteração na coloração violeta característica, para amarelo, uma vez que o radical é capturado por antioxidantes presentes na amostra através da doação de um átomo de hidrogênio para formar a molécula estável DPPH-H (Figura 2) (ROGINSKY; LISSI, 2005).

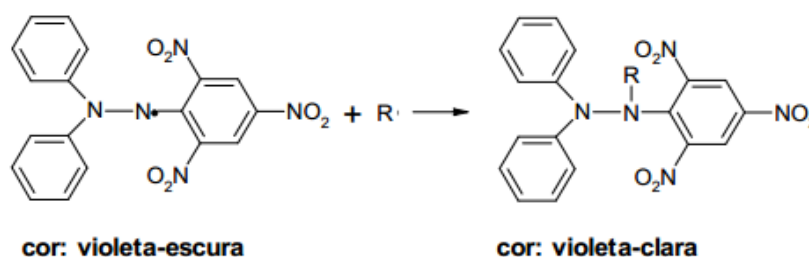


Figura 2- Reação entre a molécula de DPPH· e um antioxidante para formar DPPH reduzido.
 Fonte: RUFINO et al., (2007)

3.2.2 Método de sequestro do radical ABTS.

Outro método que pode ser utilizado para medir a atividade antioxidante é o teste ABTS, que é caracterizado pela captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico) (ABTS·+) (Figura 3). Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

O radical ABTS^{•+} é produzido a partir de um precursor, o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico. O radical ABTS é um composto cromóforo

quimicamente estável, apresenta alta solubilidade em água e um máximo de absorvância a 414 nm (MILLER et al., 1993).

O método do ABTS está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion $ABTS^{\bullet+}$. Esta captura provoca um decréscimo na absorvância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes tempos, sendo representadas graficamente (PÉREZ-JIMÉNEZ ; SAURA-CALIXTO, 2006).

É possível determinar a quantidade de $ABTS^{\bullet+}$ consumida devido à reação com antioxidantes. Esse valor é designado como TEAC (Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox), que fornece uma estimativa da quantidade de moléculas de radicais consumidas pelo antioxidante (CAMPOS; LISSI, 1997).

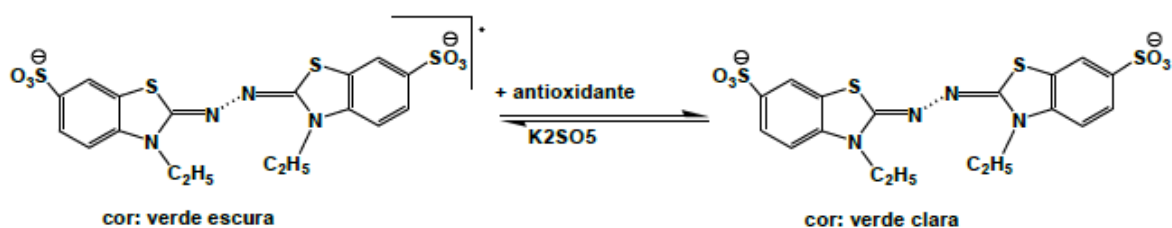


Figura 3: Estabilização do radical $ABTS^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Fonte: CAMPOS e LISSI (1997).

A vantagem desse teste consiste na sua relativa simplicidade que permite a aplicação na rotina de qualquer laboratório. O valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com $ABTS^{\bullet+}$, assim como em inibir processos oxidativos (CAMPOS; LISSI, 1997).

3.3 COMPOSTOS CONTENDO O GRUPO IMIDAZOL E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Atualmente, muitos trabalhos envolvendo a síntese e a avaliação da atividade biológica de novos compostos contendo o grupo imidazol estão sendo desenvolvidos, buscando a produção de novos fármacos mais eficazes no combate de diversas doenças.

Bollini et al., (2009) analisaram a atividade antitripanossômica frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* de uma nova série de compostos destacando-se os derivados **(2-4)** (Figura 4) com valores de IC₅₀ de 0,5, 1,0 e 3,0 µM, respectivamente. Carvalho et al., (2008) relataram a atividade antitripanossômica frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* para o Megazol **(5)** e seus derivados. O composto **(6)** apresentou significativa atividade, com IC₅₀ de 5,3 µM, e o Megazol **(5)** de 9,9 µM (Figura 4).

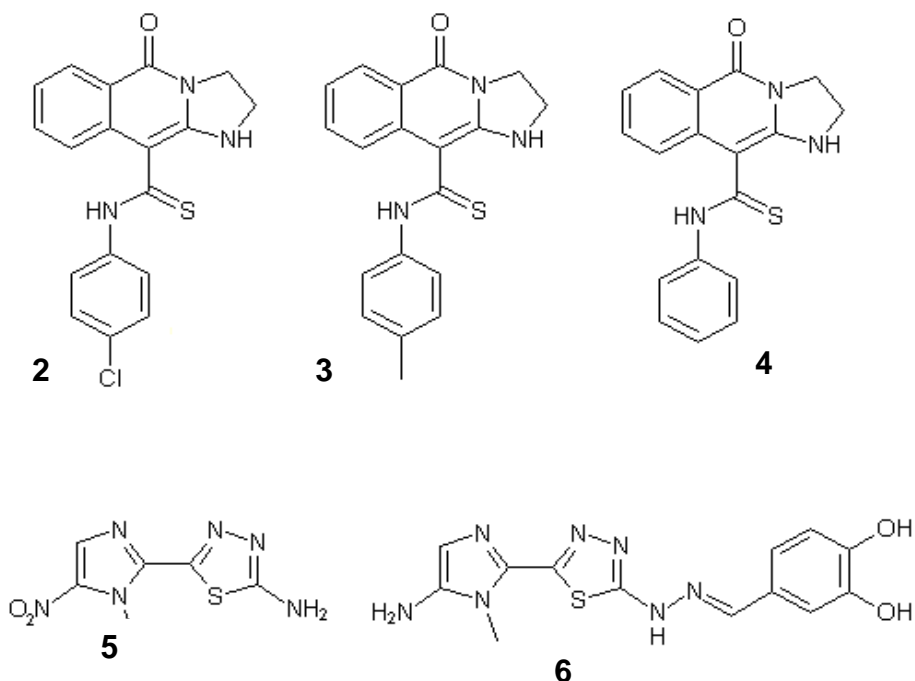


Figura 4- Compostos imidazólicos que apresentam atividade antitripanossômica.
Fonte: Bollini et al. (2009); Carvalho et al. (2008).

Spychala (2008) verificou em seus estudos que os compostos contendo o grupo imidazol (**7-8**) apresentam potente atividade antitumoral frente diversas linhagens de células tumorais humanas, com valores de IC_{50} de 1,9 μ M e 2,4 μ M, respectivamente (Figura 3). Bellina et al. (2006) sintetizaram imidazóis que apresentaram uma significativa atividade antitumoral, destacando-se os derivados (**9-10**) frente às linhagens de células tumorais de colo HCT-15 ($IC_{50} < 0,01$ e 0,017 μ M, respectivamente) e de pulmão NCL-H460 ($IC_{50} < 0,01$ e 0,018 μ M, respectivamente) (Figura 5).

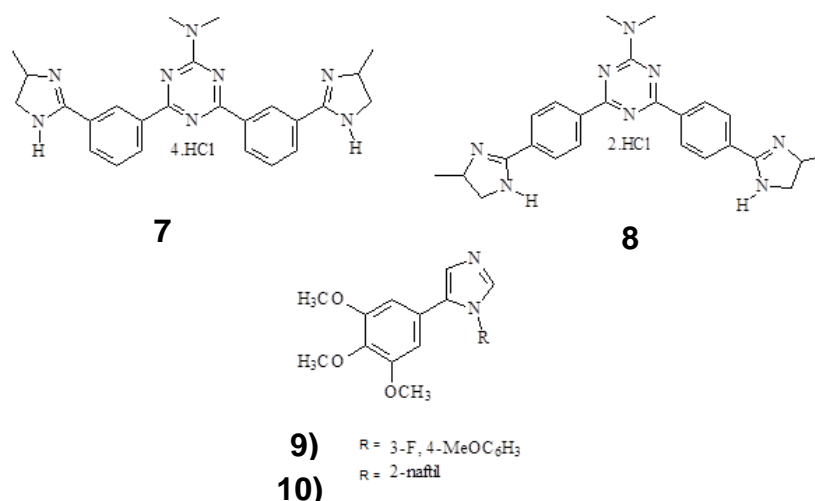


Figura 5- Compostos imidazólicos que apresentam atividade antitumoral.
Fonte: Spychaia (2008); Bellina et al (2006).

Uma série de derivados contendo o grupo imidazol (Figura 6) foi relatada por Srinivas et al., (2009), com potente atividade frente às formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, destacando-se os derivados (**11-15**) com inibição *in vivo* na faixa de 55,0 a 77,9%, sobressaindo-se o composto (**11**). Foroumadi et al., (2005) sintetizaram uma série de novos derivados contendo o grupo imidazol (Figura 6) e foram avaliados frente às formas promastigotas de *L. major*. Os valores de IC_{50} indicaram que todos os compostos testados exibiram potente atividade, com IC_{50} menor que 1,77 μ M, destacando-se o composto (**15**), com IC_{50} de 0,19 μ M. Poorrajab et al., (2009) sintetizaram análogos do derivado mais ativo (**16**), e avaliaram a atividade frente *L. major*. Os resultados constataram que houve uma

redução na atividade destes análogos, destacando-se como derivado mais ativo desta nova série o composto **(17)**, com IC_{50} de 9,35 μ M (Figura 6).

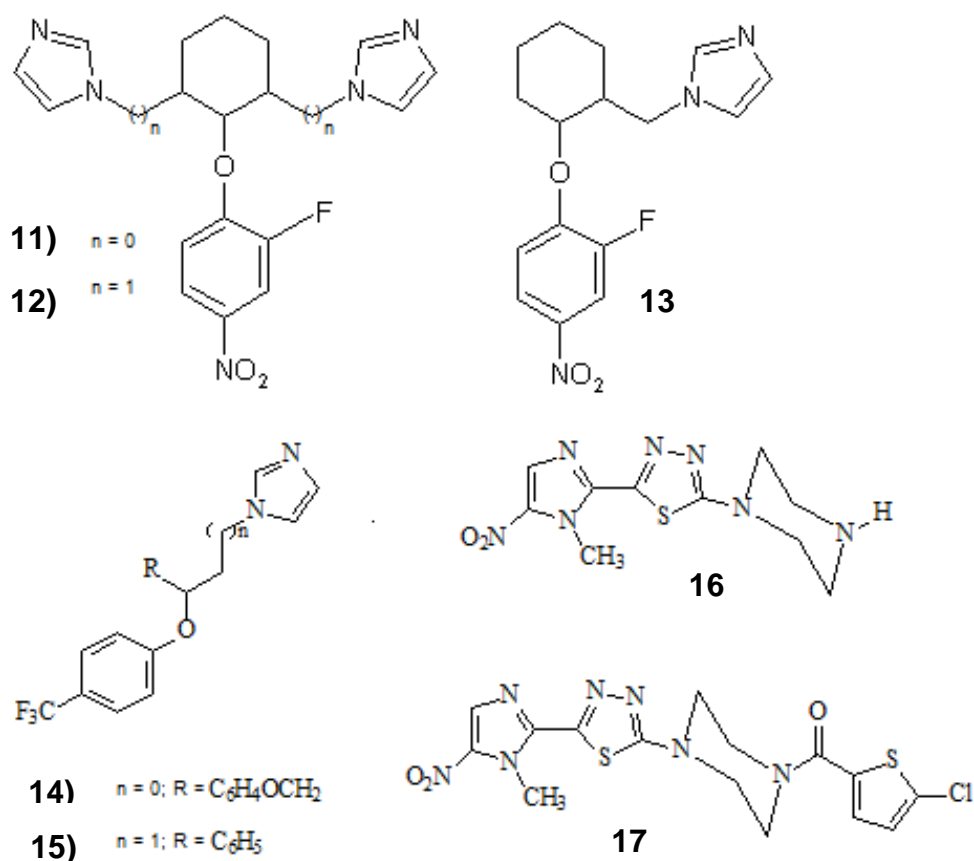


Figura 6- Compostos imidazólicos que apresentam atividade anti-Leishmania.
 Fonte: Srinivas et al. (2009); Foroumadi et al. (2005); Poorrajab et al. (2009).

Novos compostos imidazopiridinil indol (Figura 7) foram sintetizados por Biradar, Rajesab e Somappa (2014). Posteriormente avaliaram seu potencial antioxidante, destacando-se os compostos **(18-21)** como potentes sequestradores do radical livre DPPH. Estes compostos também destacaram-se pela sua atividade antibacteriana frente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* e antifúngica frente *Candida tropicalis* e *Candida albicans*.

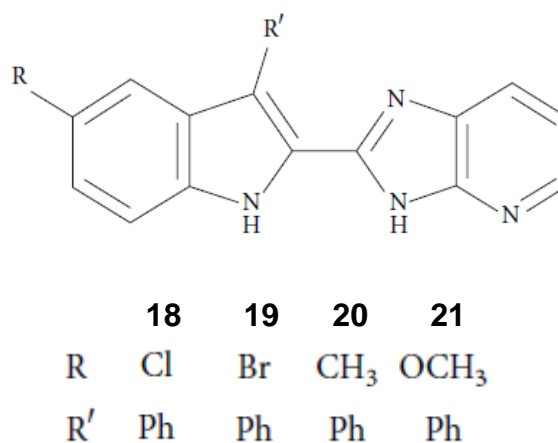


Figura 7- Compostos imidazólicos que apresentam atividade antioxidante, antibacteriana.

Fonte: Biradar; Rajesab e Somappa (2014).

Abdel-Wahab, Awad e Badria (2011) avaliaram a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH, de novos compostos contendo o núcleo imidazol (Figura 8), e obtiveram resultados satisfatórios, destacando-se os compostos **(22-24)** com IC₅₀ de 6,25 mg mL⁻¹ seguido do composto **(25)** com IC₅₀ de 12,5 mg mL⁻¹. Os autores relataram também uma significativa atividade antibacteriana para o composto **(26)** frente diferentes bactérias.

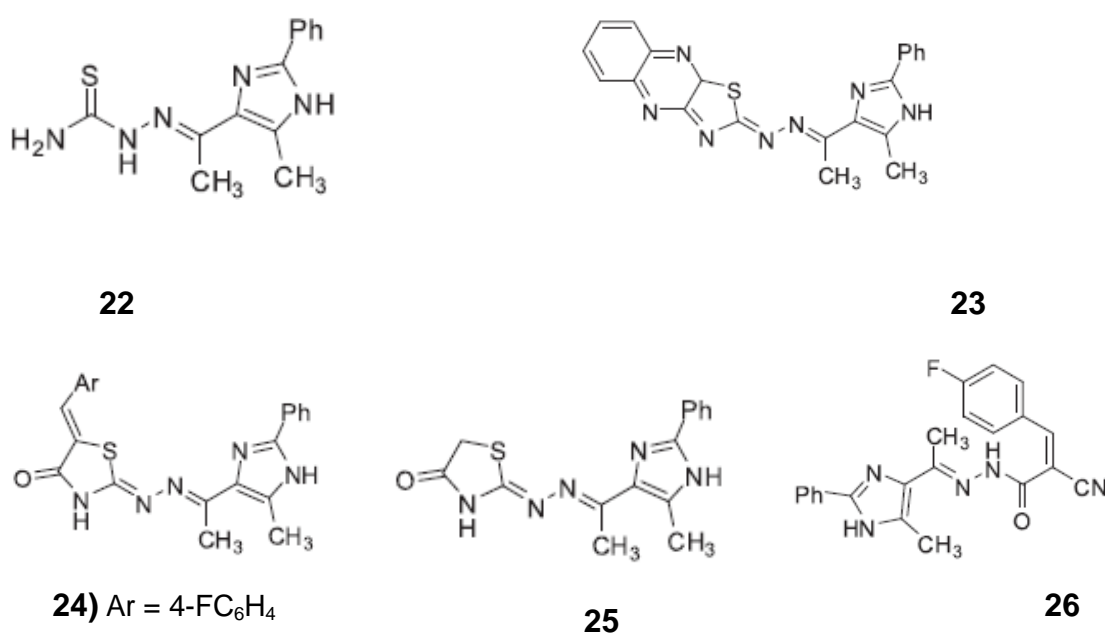


Figura 8- Compostos imidazólicos que apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana.

Fonte: Abdel-Wahab, Awad e Badria (2011).

Puerstinger et al. (2006) sintetizaram uma série de derivados 5-benzil-2-fenil-5H-imidazo[4,5-c]piridinas, semelhantes a **(27)**, e constataram ser potentes inibidores da pestivírus BVDV (vírus da diarreia viral bovina) (Figura 9).

Puerstinger et al. (2007), sintetizaram uma série de novos derivados 2,5 dissustituído imidazo[4,5-c]piridina e avaliaram a atividade frente o vírus da hepatite C, sendo o composto **(28)** o mais eficaz com EC_{50} de 0,10 μ M (Figura 9).

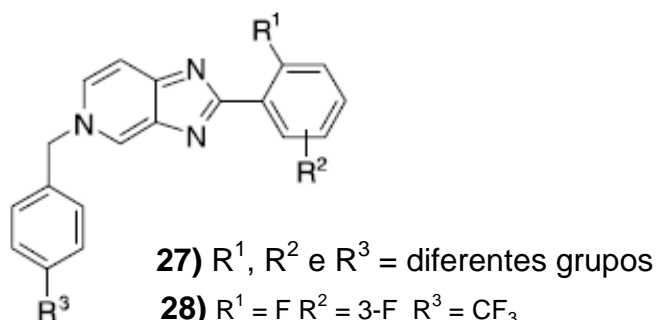


Figura 9- Compostos imidazólicos que apresentm atividade antiviral.
 Fonte: Puerstinger et al. (2006); Puerstinger et al. (2007).

3.4 METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO DE COMPOSTOS CONTENDO O GRUPO IMIDAZOL

Encontram-se diversos relatos na literatura sobre diferentes métodos de síntese de compostos imidazólicos.

A reação de Pictet-Spengler pode ser realizada a partir da L-histidina (**29**) ou histamina (**30**) utilizando-se diferentes condições reacionais, como ilustrado nas Figuras 10 e 11.

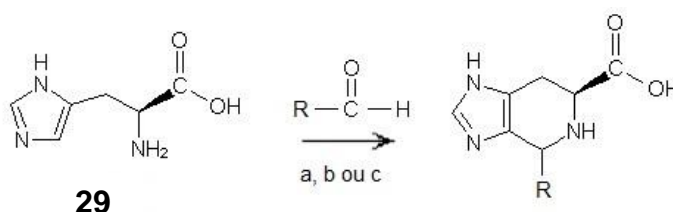


Figura 10- Reação de Pictet-Spengler da L-Histidina. a) NaOH/MeOH/H₂O/Aldeído, b) Na₂CO₃/EtOH/Aldeído, c) Aldeído/HCl/H₂O. Fonte : KARUSO et al. (2009); SMOLYAR et al. (2009) RUPRECHT et al. (2005).

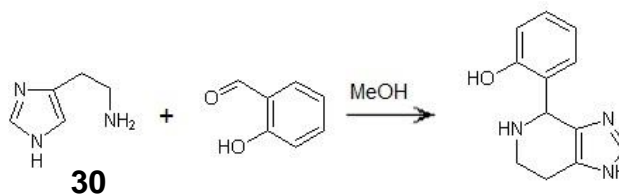
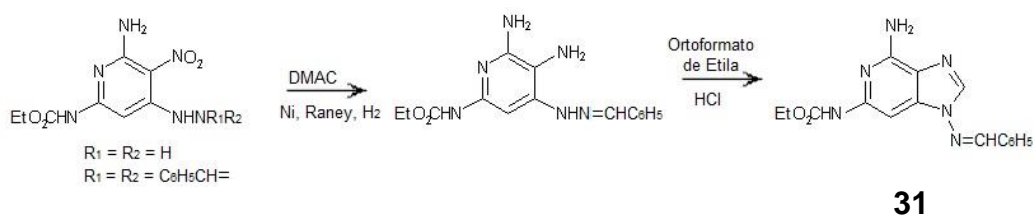


Figura 11- Reação de Pictet-Spengler da Histamina
Fonte: Türkyilmaz, Özdemir e Baran (2011).

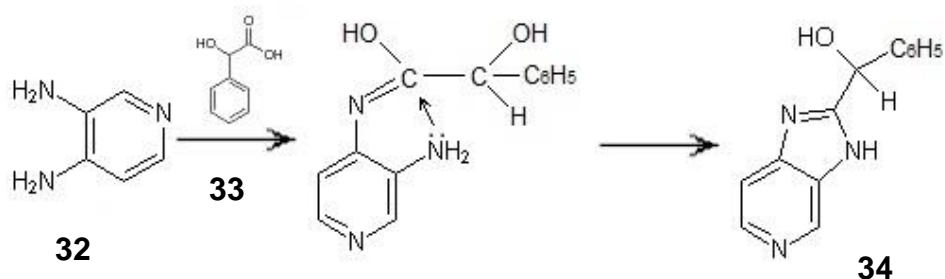
Outras metodologias foram encontradas na literatura para síntese de compostos contendo o grupo imidazol (**31**), como por exemplo, a realizada por Temple, Carrol Jr. (1990) e Temple et al. (1987) ilustrada na Figura 12.



31

Figura 12- Rota sintética para síntese do imidazol (31).
Fonte: Temple, Carrol Jr., (1990); Temple et al., (1987).

Berner (1973) sintetizou o composto imidazo[4,5-c]piridina (**34**) a partir da reação do 3,4-diaminopiridina (**32**) com o ácido mandélico (**33**) (Figura 13).



34

Figura 13- Rota sintética para síntese de imidazo{4,5-c}piridina proposta por Berner (1973).
Fonte: Berner (1973).

Ando e Terashima (2010) sintetizaram derivados contendo o grupo imidazol **(35)** utilizando o 3-bromo-1,1-dimetóxiropa-2-ona conforme ilustrado na Figura 14.

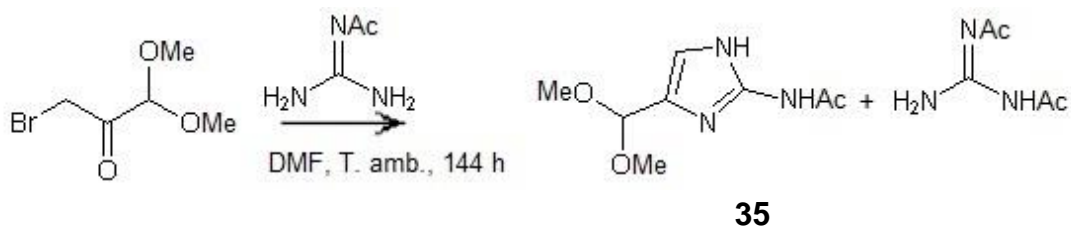


Figura 14- Rota sintética para síntese do imidazol **(35)**.
Fonte: Ando e Terashima (2010).

4 METODOLOGIA

4.1 PROCEDIMENTO GERAL PARA SÍNTESE DOS DERIVADOS

4.1.1 Síntese dos compostos 6-carbóxi-4-fenilsubstituído-imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (**36a** e **36b**)

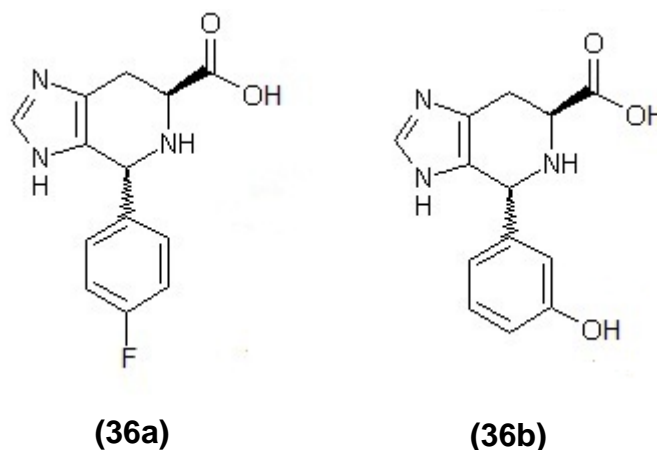


Figura 15 - Estrutura dos compostos sintetizados 36a e 36b.
Fonte: Autoria própria

À uma suspensão de 5,00 g de L-histidina **29** (6 mmol), em 150 mL de etanol (EtOH), foram adicionados 6,0 equivalentes de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (20,35 g) e 1,0 equivalentes do aldeído aromático correspondente: **a**) 4-fluorbenzaldeído e **b**) 3-hidroxibenzaldeído. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 48 horas para a reação com o aldeído **a** e 24 horas para a reação com o aldeído **b** e acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 40% e revelador vapores de iodo. Após resfriada, a mistura foi filtrada e lavada com EtOH. O filtrado foi recolhido e o solvente removido em evaporador rotatório, obtendo-se uma mistura dos diastereoisômeros *cis* e *trans* para **36a**. Para **36b** foi necessário uma purificação do produto bruto obtido da filtração por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando-se como eluentes

misturas em gradiente de polaridade de clorofórmio/metanol ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) 20%, 40% e 100% MeOH. Assim, foi obtido a mistura dos diastereoisômeros *cis* e *trans* para **36b** (KARUSO et al., 2009).

4.1.2 Síntese do composto 6-carbometóxi-4-fenilsubstituído-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetrahidropiridina (**37b**)

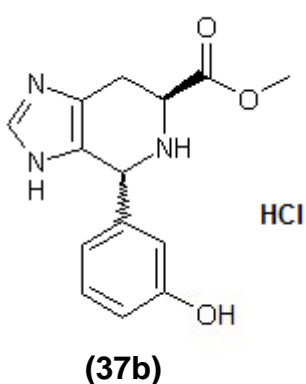


Figura 16 - Estrutura do composto sintetizado 37b.
Fonte: autoria própria

A um balão de fundo redondo foi adicionado 1,0 g de **36b** com 30 mL de MeOH (HPLC). Adicionou-se, gota-a-gota, em banho de gelo, 4 equivalentes de cloreto de tionila. A mistura foi mantida sob refluxo e acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) por 24 horas (eluente: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 40%; revelador: vapores de iodo). Após resfriar, o solvente foi removido em evaporador rotatório, e para completa retirada do cloreto de tionila (SOCl_2) o resíduo foi evaporado diversas vezes com MeOH. A reação forneceu a mistura dos diastereoisômeros *cis* e *trans* de **37b**.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS

A elucidação estrutural dos compostos sintetizados foi realizada através da análise dos dados espectrais de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H). Os espectros foram obtidos no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá em espectrômetro VARIAN modelo Mercury Plus BB 300 e 500 MHz, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS).

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para a determinação da atividade antioxidante foram utilizados os seguintes métodos descritos abaixo:

4.3.1 Determinação da atividade antioxidante através do método DPPH

A atividade antioxidante dos compostos sintetizados foi realizada segundo o método descrito por Kulisic et al (2004). Foram preparadas soluções com diferentes concentrações dos compostos sintetizados. 1,0 mL desta solução foi adicionado a 2,0 mL de uma solução de DPPH ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$; 0,10 mM em metanol). Após 30 minutos de incubação, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV (DR 2800 – Hach) a 515 nm. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi expressa em relação ao controle, de acordo com a equação:

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

Onde:

A_c = absorbância do controle negativo (solução DPPH + Metanol)

A_a = absorbância da amostra após 30 minutos.

A quantidade de amostra necessária para diminuir a absorvância do DPPH em 50% (IC_{50}) foi calculada através da equação da reta obtida a partir do gráfico de concentração *versus* porcentagem de inibição. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.3.2 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre $ABTS^{\bullet+}$

A solução de ABTS foi preparada dissolvendo-se 192 mg de ABTS em água destilada completando-se o volume em balão volumétrico de 50,0 mL e armazenado-o em frasco de vidro âmbar sob refrigeração.

Preparou-se uma solução de persulfato de potássio (140 mM) dissolvendo-se 378,4 mg de persulfato de potássio em água destilada completando-se o volume em balão volumétrico de 10,0 mL e armazenando-o em frasco de vidro âmbar devidamente etiquetado em temperatura ambiente.

O radical $ABTS^{\bullet+}$ 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, foi diluído 1,0 mL desta mistura em álcool etílico até obter-se uma absorvância de 734 nm.

Adicionou-se 30 μ L das amostras nas concentrações de 1000 e 100 μ g mL⁻¹, a 3,0 mL do radical $ABTS^{\bullet+}$ e agitou-se a solução em agitador de tubos. Após 6 minutos foi realizada a leitura da absorvância (734 nm) utilizando-se álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro. O di-terc-butil metil fenol (BHT) foi utilizado como padrão nas concentrações de 1000 e 100 μ g mL⁻¹. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A porcentagem de sequestro (%S) do radical ABTS foi calculada pela relação:

$$\%S = [(A_c - A_a)/A_c] \times 100$$

Onde:

A_c = absorvância do controle negativo (solução ABTS)

A_a = absorvância da amostra após 6 minutos.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Statistica versão 8.0. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão, $n=3$. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($p \leq 0,05$) aplicando-se Análise de Variância (ANOVA), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS OBTIDOS

Os derivados imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina **36** e **37** foram preparados a partir da L-histidina **29** conforme ilustrado na Figura 17.

A L-histidina **29**) foi escolhida como composto de partida por se tratar de um reagente barato, de fácil manipulação e que contém grupos que podem sofrer alterações simples, como por exemplo, reação de Pictet-Spengler e esterificação do grupo ácido carboxílico.

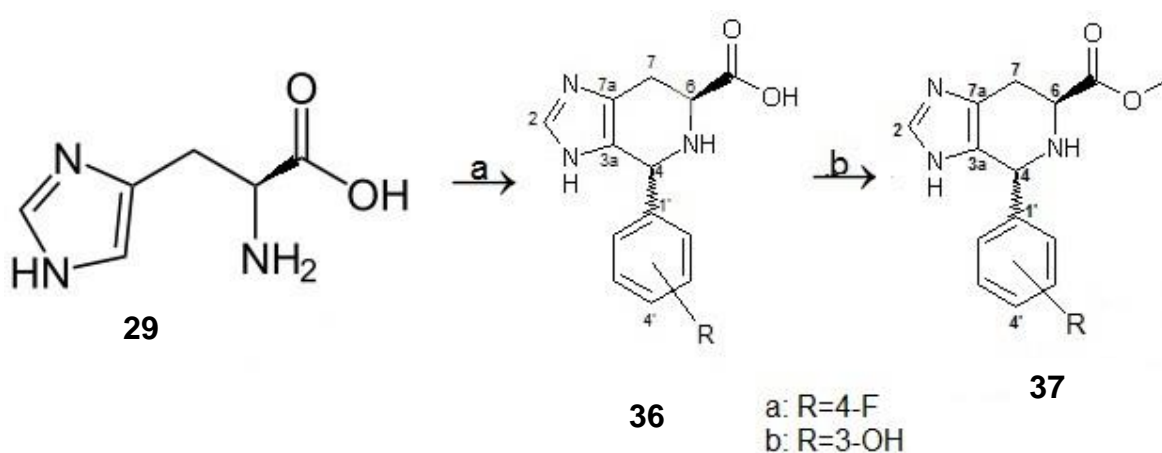


Figura 17- Rota sintética para preparação dos compostos. Condições: a) Aldeído, Etanol, Na_2CO_3 , refluxo; b) SOCl_2 , MeOH.
 Fonte: KARUSO et al (2009).

Na primeira etapa da reação, a L-histidina **29** foi condensada com os aldeídos aromáticos **(a)** 4-fluorbenzaldeído e **(b)** 3-hidroxibenzaldeído via reação de Pictet-Spengler, catalisada por base (KARUSO et al., 2009; SMOLYAR et al., 2009). Observou-se a formação da mistura dos diastereoisômeros (*cis*; 4S, 6S) e (*trans*; 4R, 6S) **36a** e **36b** cuja formação foi confirmada pelos dados espectroscópicos de RMN ^1H .

O mecanismo de condensação da reação de Pictet-Spengler pode ser proposto conforme ilustrado na Figura 18. Trata-se de uma reação de adição nucleofílica à carbonila de um aldeído, com a formação do íon imínio como intermediário.

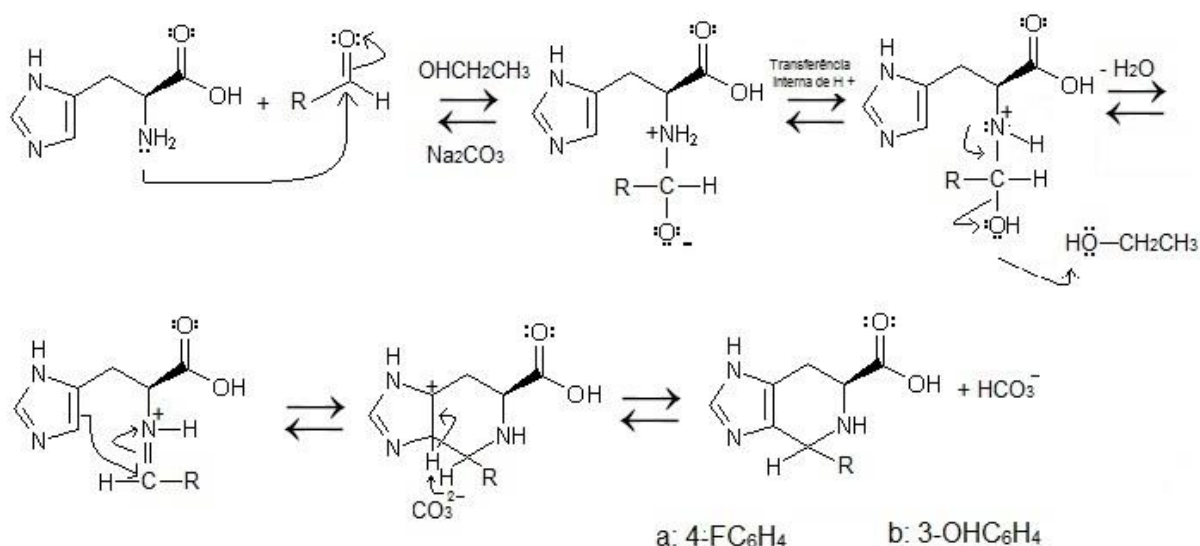


Figura 18 - Proposta mecanística para síntese de imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina via reação de Pictet-Spengler.
Fonte: autoria própria.

Observou-se a formação da mistura dos diastereoisômeros *cis* (4S, 6S) e *trans* (4R, 6S) do derivado 6-carbóxi-4-(4-fluorfenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina **36a** com um rendimento de 86,4%, confirmada pelos dados espectroscópicos de RMN ¹H (Figura 19).

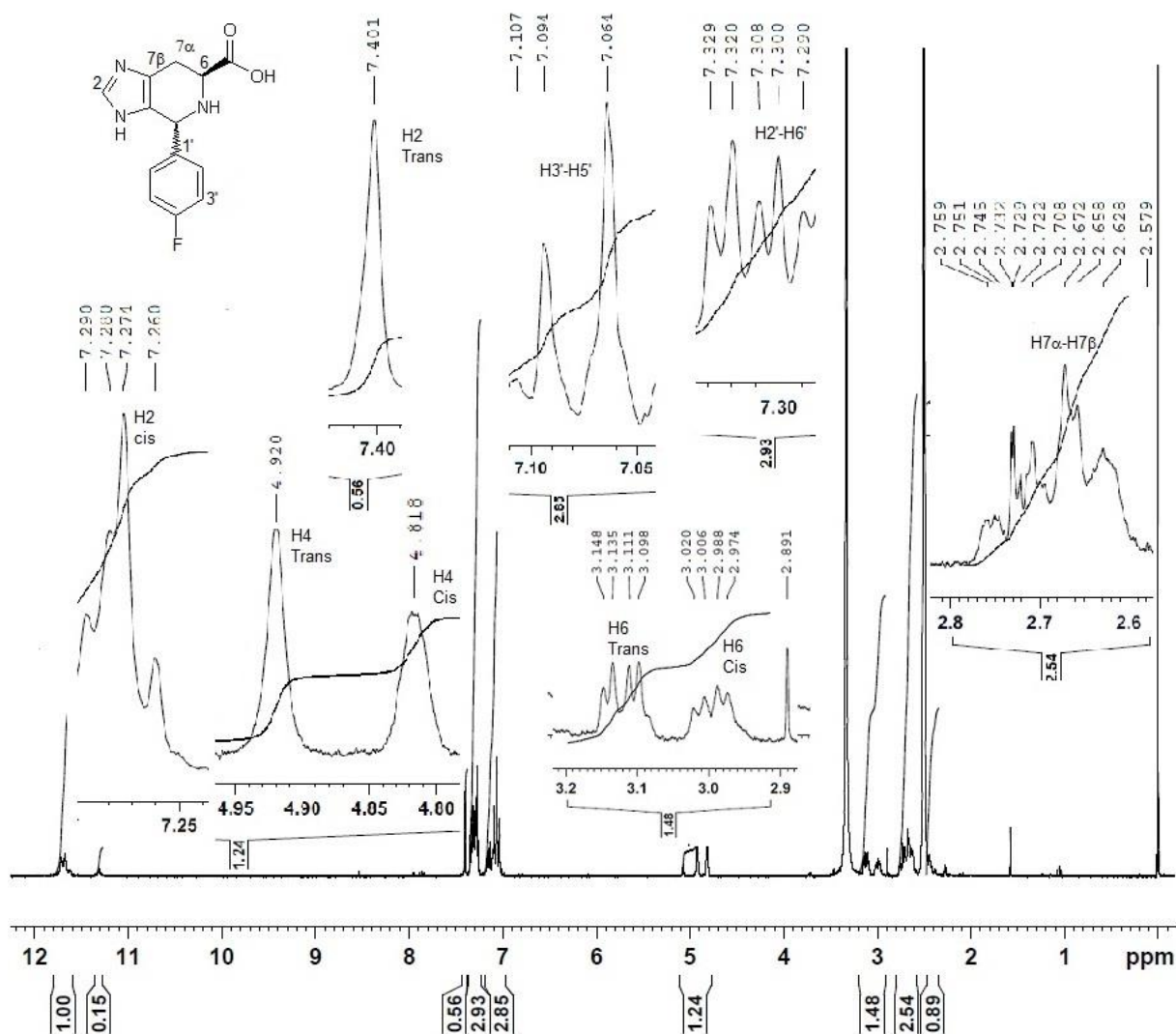


Figura 19 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) 6-carbóxi-4-(4-flúorfenil)-imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahidropiridina (**36a**) em $\text{DMSO-}d_6$.

A formação da unidade imidazo-[4,5-c]4,5,6,7-tetrahidropiridina foi confirmada pela presença dos sinais no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 7,27 (*cis*) e δ_{H} 7,40 (*trans*) como um simpleto para H-2, δ_{H} 4,82 (*cis*) e δ_{H} 4,92 (*trans*) atribuídos ao H-4, δ_{H} 3,00 e δ_{H} 3,12 atribuídos ao H-6 (*cis* e *trans*) e δ_{H} 2,63-2,76 (*cis* e *trans*) atribuídos ao H-7. Além da presença dos sinais dos hidrogênios do sistema aromático do substituinte fenil da posição-4. Os dados de todos os sinais do RMN ^1H para **36a** encontram-se representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de RMN ^1H para 6-carbóxi-4-(4-flúorfenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (**36a**)

	(36a) <i>cis</i>	(36a) <i>trans</i>
H	δ_{H} (<i>multiplicidade</i> , $J = \text{Hz}$)	δ_{H} (<i>multiplicidade</i> , $J = \text{Hz}$)
2	7,27 (s)	7,40 (s)
4	4,82 (s)	4,92 (s)
6	3,0 (<i>dd</i> , 4,2; 9,6)	3,12 (<i>dd</i> , 3,9; 11,1)
7	2,63-2,76 (<i>m</i>)	2,63-2,76 (<i>m</i>)
2'/6'	7,31 (<i>d</i> , 8,7)	7,31 (<i>d</i> , 9,0)
3'/5'	7,05 (<i>d</i> , 8,7)	7,08 (<i>d</i> , 9,0)

Observou-se a formação da mistura dos diastereoisômeros *cis* (4S, 6S) e *trans* (4R, 6S) do derivado 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina **36b** com um rendimento de 49,4%. A confirmação da obtenção do composto **36b** foi realizada pela análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H (Figura 20, Tabela 2).

A formação da unidade imidazo-[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina foi confirmada pela presença dos sinais no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 7,31 (*cis*) e δ_{H} 7,43 (*trans*) como um simpleto para H-2, δ_{H} 4,83 (*cis*) e δ_{H} 4,98 (*trans*) atribuídos ao H-4, δ_{H} 3,24-3,30 atribuído ao H-6 (*cis* e *trans*), δ_{H} 2,77 atribuído ao H-7 α (*cis* e *trans*) e δ_{H} 2,56-2,61 atribuído ao H-7 β (*cis* e *trans*). Além da presença dos sinais dos hidrogênios do sistema aromático.

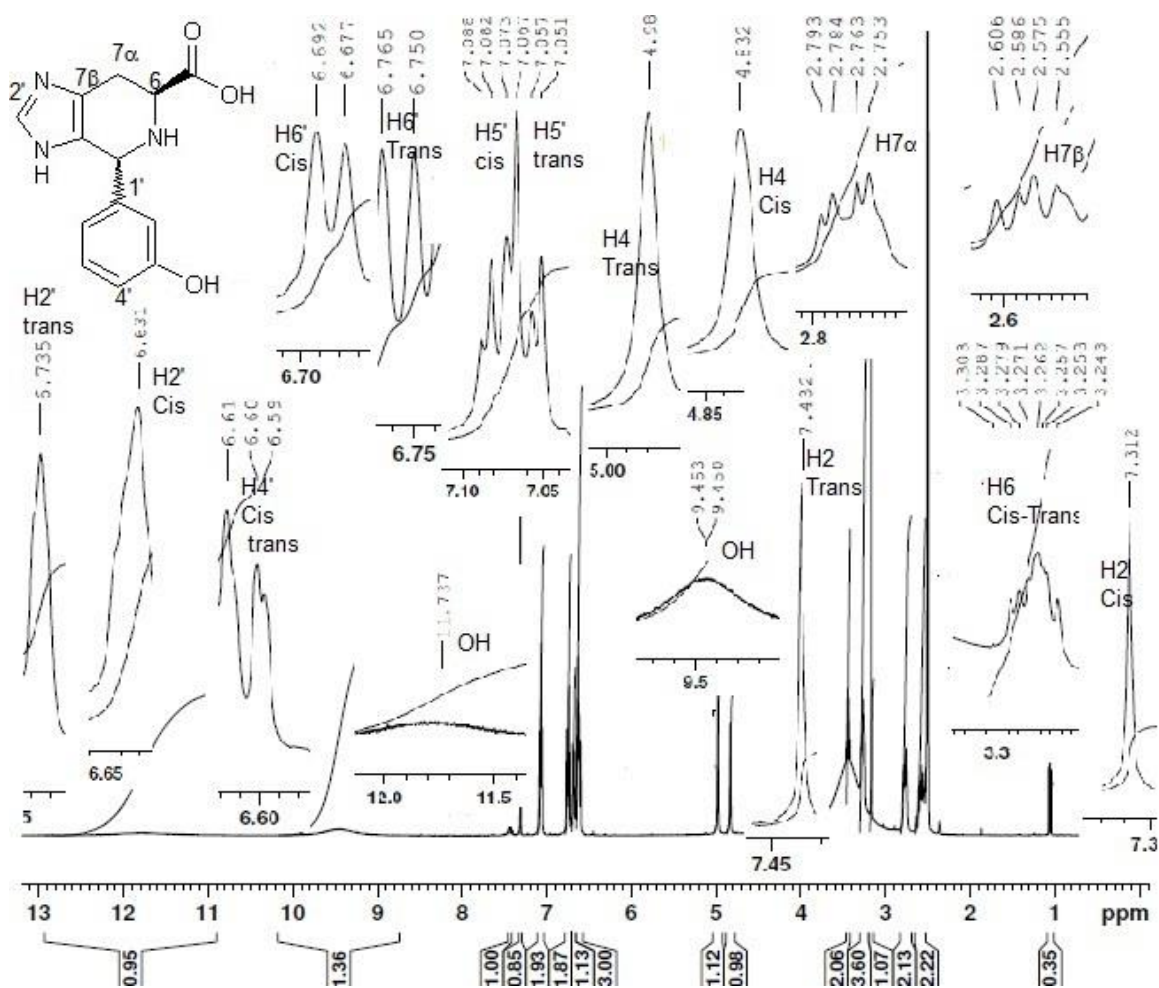


Figura 20 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz) 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina (36b) em $\text{DMSO-}d_6$.

Tabela 2 - Dados de RMN ^1H para 6-carbóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina (**36b**)

	(13b) <i>cis</i>	(13b) <i>trans</i>
H	δ_{H} (<i>multiplicidade</i> , J = Hz)	δ_{H} (<i>multiplicidade</i> , J = Hz)
2	7,31 (s)	7,43 (s)
4	4,83 (s)	4,98 (s)
6	3,24-3,30 (<i>m</i>)	3,24-3,30 (<i>m</i>)
7 α	2,77 (<i>dd</i> , 4,7; 15,3)	2,77 (<i>dd</i> , 4,7; 15,3)
7 β	2,56-2,61 (<i>m</i>)	2,56-2,61 (<i>m</i>)
2'	6,63 (s)	6,74 (s)
4'	6,61 (<i>d</i> , 8,0)	6,61 (<i>d</i> , 8,0)
5'	7,07 (<i>dd</i> , 7,5; 8,0)	7,07 (<i>dd</i> , 7,5; 8,0)
6'	6,68 (<i>d</i> , 7,5)	7,26 (<i>d</i> , 7,5)
OH	11,7 (<i>sl</i>)	9,45 (<i>sl</i>)

Os derivados obtidos (**36a** e **36b**) foram submetidos à reação de esterificação, conforme mecanismo ilustrado na Figura 21. Inicialmente preparou-se o cloreto de acila utilizando-se cloreto de tionila e posterior reação de substituição nucleofílica acílica utilizando o metanol como nucleófilo, para formação dos compostos (**37a** e **37b**). A análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H de **37a** revelou que a esterificação não ocorreu, obtendo-se portanto somente o composto **37b**, com um rendimento de 93,3%.

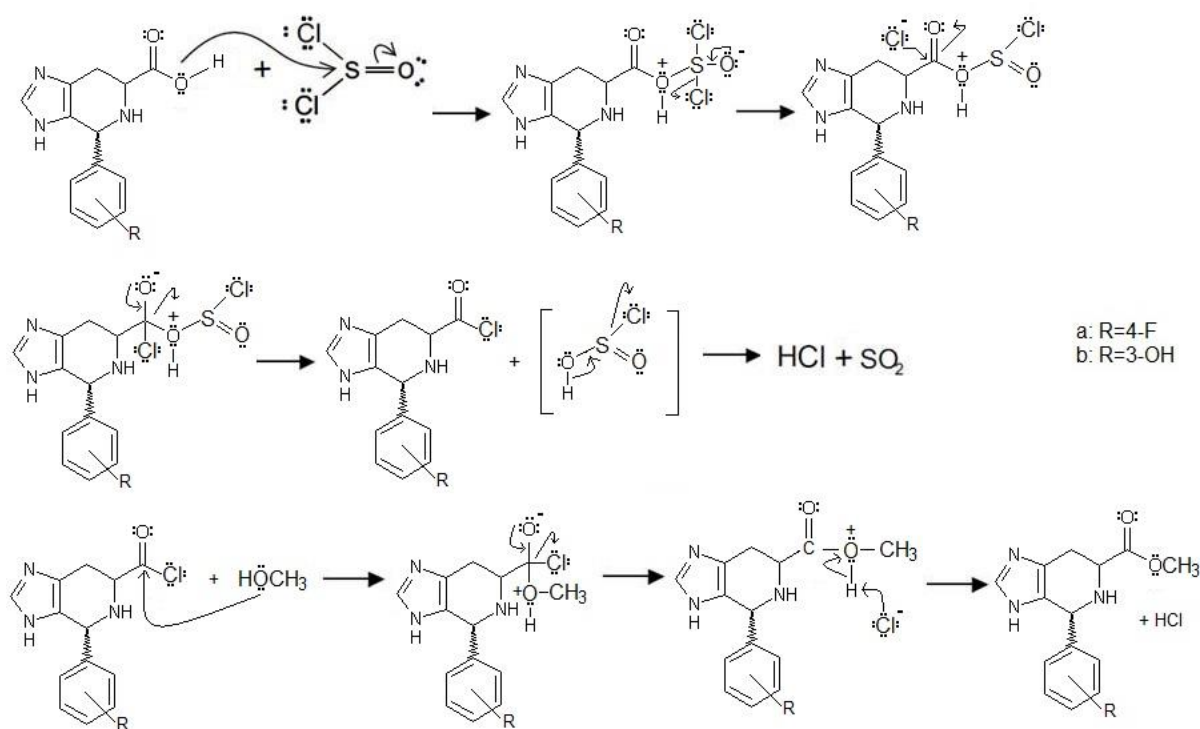


Figura 21 - Proposta mecanística para síntese do derivado 6-carbometóxi-4-(4-hidróxifenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetrahidropiridina (**37b**).

A confirmação da obtenção do composto **37b** foi realizada pela análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H (Figura 22). Os dados obtidos estão representados na Tabela 3.

A formação do grupo metil éster do composto **37b** foi confirmada pela presença dos sinais em δ_{H} 3,93 e δ_{H} 3,90 (*cis* e *trans*) com integração para três hidrogênios. Observou-se a formação da mistura dos diastereoisômeros *cis* e *trans*, através dos sinais em δ_{H} 5,94 e δ_{H} 6,05 atribuídos ao H4. Foram observados ainda os sinais referentes à unidade imidazo-[4,5-c]4,5,6,7-tetrahidropiridina em δ_{H} 9,00 e δ_{H} 9,03 (*cis* e *trans*) como um simpleto para H2, δ_{H} 4,76 (*cis* e *trans*) atribuído ao H6, δ_{H} 3,61 e δ_{H} 3,70 (*cis* e *trans*) atribuídos ao H-7 α e δ_{H} 3,45 (*cis* e *trans*) atribuído ao H7 β além dos sinais dos hidrogênios do anel aromático.

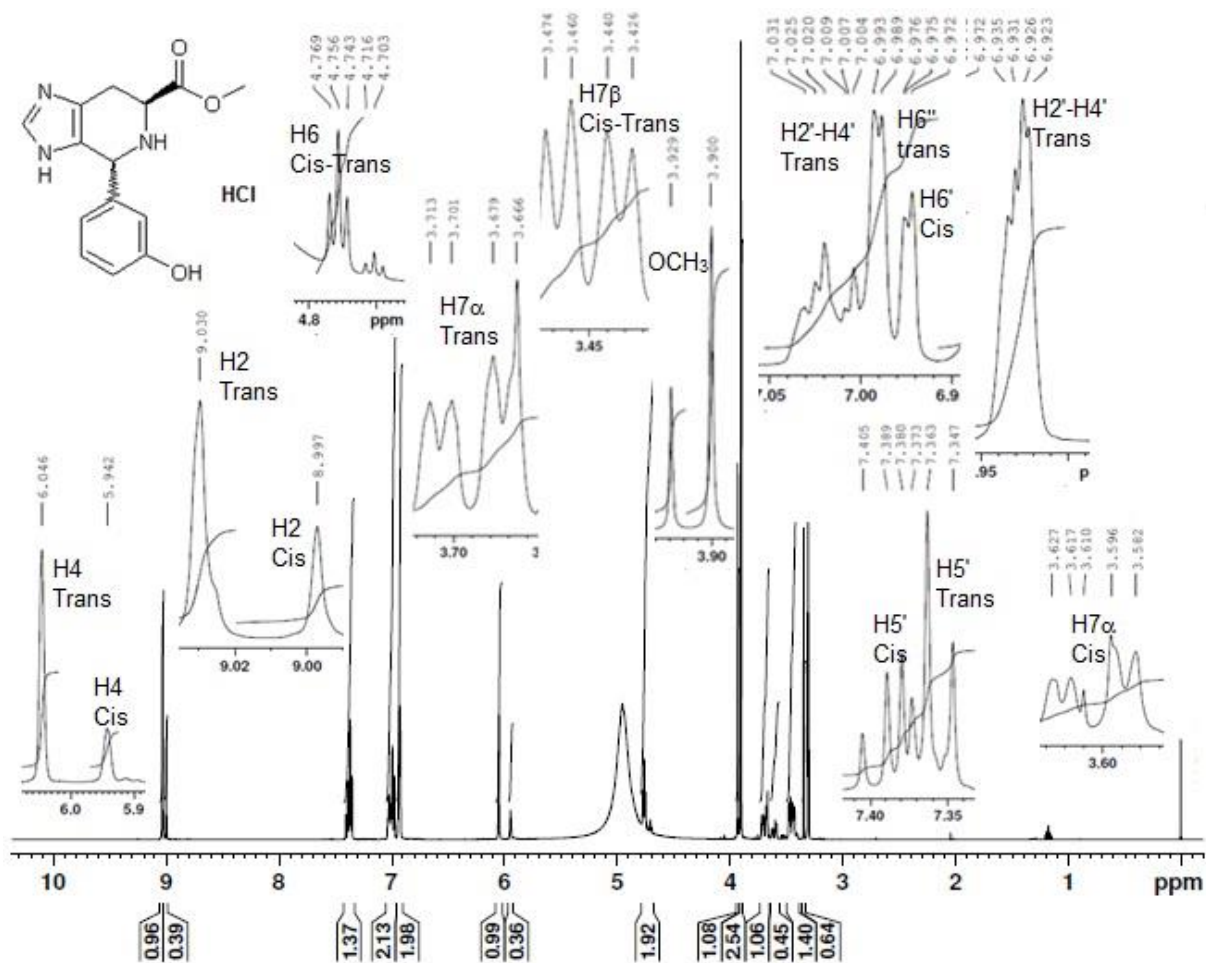


Figura 22 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz) 6-carbometóxi-4-(3-Hidróxifenil)-imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetrahidropiridina (37b) em $\text{DMSO-}d_6$.

Tabela 4 - Dados de RMN ¹H para 6-carbometóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetrahidropiridina (**37b**)

	(37b) <i>cis</i>	(37b) <i>trans</i>
H	δ_{H} (<i>multiplicidade, J = Hz</i>)	δ_{H} (<i>multiplicidade, J = Hz</i>)
2	9,00 (s)	9,03 (s)
4	5,94 (s)	6,05 (s)
6	4,76 (t, 6,5)	4,76 (t, 6,5)
7 α	3,61 (dd, 6,0; 16,5)	3,70 (dd, 6,5; 17,2)
7 β	3,45 (dd, 7,0; 17,0)	3,45 (dd, 7,0; 17,0)
2'	7,00-7,03 (m)	6,92-6,94 (m)
4'	7,00-7,03 (m)	6,92-6,94 (m)
5'	7,07 (t, 8,0)	7,36 (t, 8,5)
6'	6,98 (d, 8,5)	6,98 (d, 8,5)
OCH ₃	3,93 (s)	3,90 (s)

5.2 RESULTADOS DOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.2.1 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH

As Tabelas 5-8 apresentam os valores de porcentagem de inibição (%) para os compostos **36a**, **36b**, **37b** e o padrão BHT, respectivamente, obtidos pelo método de sequestro do radical livre DPPH. Os valores representam a média de três experimentos.

Tabela 5 - Valores de porcentagem de inibição do radical DPPH para (**36a**) em diferentes concentrações

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%I
2000	2,87 \pm 1,00 ^a
4000	8,22 \pm 1,16 ^b

Valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 6 - Valores de porcentagem de inibição para **(36b)** em diferentes concentrações

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%I
500	4,97 \pm 0,84 ^a
1000	7,44 \pm 1,06 ^b
2000	13,91 \pm 1,48 ^b
4000	13,50 \pm 1,86 ^b

Valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 7 - Valores de porcentagem de inibição para **(37b)** em diferentes concentrações

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%I
500	61,93 \pm 1,03 ^a
1000	76,57 \pm 0,35 ^b
2000	85,36 \pm 0,46 ^c
4000	90,36 \pm 0,08 ^d

Valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 8 - Valores de porcentagem de inibição para BHT em diferentes concentrações

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%I
25	41,53 \pm 3,73 ^a
50	67,01 \pm 1,14 ^b
100	85,78 \pm 1,00 ^c
1000	94,26 \pm 0,09 ^d

Valores representam a média \pm desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A partir dos valores das %I obtidos, foi possível obter um gráfico (Figura 23) de concentração *versus* %I para o BHT. A equação da reta nos forneceu o valor de IC₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$), que foram transformados em mM (Tabela 9).

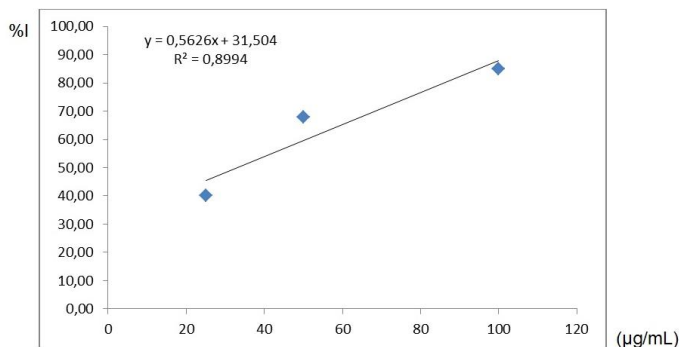


Figura 23: Gráfico de concentração ($\mu\text{g/mL}$) versus %I para o BHT.

Tabela 9 - Valores de atividade antioxidante em IC_{50} para os compostos sintetizados.

Composto	IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MM	IC_{50} (mM)
36a	> 4.000	262,24	> 15,25
36b	> 4.000	260,25	> 15,37
37b	<500	274,23	<1,82
BHT	32,88	220,35	0,15

O ensaio frente o radical DPPH indicou que a capacidade dos compostos sintetizados de sequestrar o radical livre aumentou com o aumento da concentração de cada composto testado.

Os resultados de IC_{50} obtidos para os derivados analisados demonstraram que o composto **37b** foi o que apresentou maior atividade antioxidante pelo método DPPH em relação aos outros compostos sintetizados, porém menor potencial que o padrão BHT. Ao comparar-se a atividade antioxidante entre os compostos que possuem o grupo carbóxi na posição-6 (**36a** e **36b**) observa-se que ambos apresentaram alto valor de IC_{50} , superior à $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Contudo, se analisarmos os valores de %I, pode-se sugerir que o derivado **36b**, com o grupo 3-hidróxifenil na posição-4, mostrou-se mais ativo.

Os resultados de atividade antioxidante demonstraram que a substituição do grupo carbóxi pelo carbometóxi na posição-6 dos derivados **36b** e **37b**, que possuem o grupo 3-hidróxifenil na posição-4, influenciou positivamente no potencial

antioxidante. Uma explicação para este fato é que o derivado **37b** foi solúvel em metanol, solvente utilizado no preparo das soluções e no ensaio de atividade, enquanto que o composto **36b** foi apenas parcialmente solúvel.

Nossos resultados corroboram com os trabalhos de Carvalho (2014) e Nunes (2014), os quais relatam o aumento da atividade antioxidante com a presença do grupo carbometóxi na posição-6 (**39a**) (IC_{50} 4,44 mM) e (**41a**) (IC_{50} 5,05 mM) em relação a seus derivados com o grupo carbóxi nesta posição (**38a**) (IC_{50} 30,92 mM) e (**40a**) (IC_{50} >14 mM) (Figuras 24 e 25).

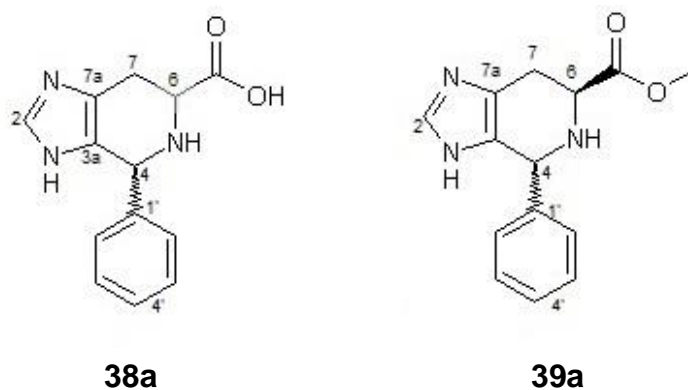


Figura 24: Compostos imidazólicos que apresentam atividade antioxidante.
 Autoria: Carvalho (2014).

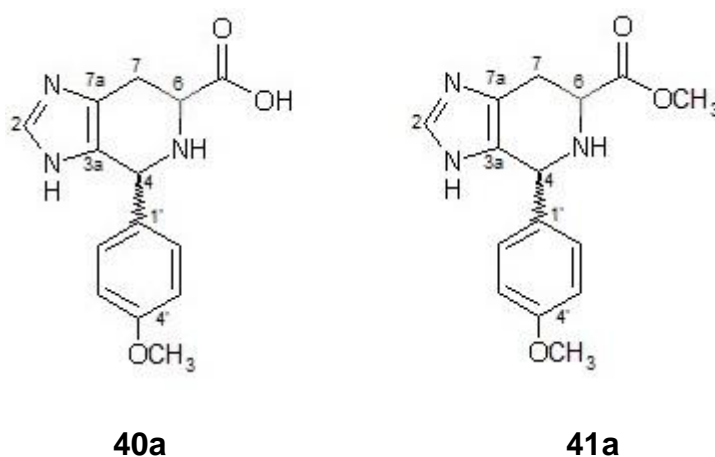


Figura 25: Compostos imidazólicos que apresentam atividade antioxidante.
 Autoria: Nunes (2014).

Comparando-se os valores de IC₅₀ entre os compostos contendo o grupo carbometóxi na posição-6 **37b**, **39a** e **41a**, observa-se um maior potencial antioxidante para o composto contendo o grupo 3-hidróxifenil na posição-4. Isto pode ser justificado pela doação do H[•] do grupo OH e estabilização do radical formado por ressonância.

5.2.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A Tabela 10 apresenta os valores de porcentagem de sequestro do radical ABTS (%S) para os compostos sintetizados e o padrão BHT nas concentrações de 1000 µg mL⁻¹ e 100 µg mL⁻¹.

Tabela 10 - Valores de porcentagem de sequestro (%S) do radical ABTS para os compostos sintetizados e o padrão BHT.

Composto	% (100 µg mL ⁻¹)	% (1000 µg mL ⁻¹)
36^a	0,94±0,67 ^a	2,64±0,62 ^a
36b	7,17±1,94 ^b	47,27±4,11 ^b
37b	2,06±0,21 ^a	6,99±1,98 ^a
BHT	15,46±1,33 ^c	73,03±1,33 ^c

O ensaio frente o radical ABTS indicou que a capacidade dos compostos sintetizados de sequestrar o radical livre aumentou com a concentração do composto testado.

Os resultados de %S obtidos para os derivados sintetizados demonstraram que o composto **36b** foi o que apresentou maior atividade antioxidante pelo método ABTS, porém menor potencial que o padrão BHT.

Comparando-se os valores de %S para os compostos contendo o grupo 3-hidroxifenill na posição-4 **36b** e **37b**, observa-se que a substituição do grupo carbóxi na posição-6 pelo grupo carbometóxi diminuiu a atividade antioxidante, resultado diferente do observado pelo método DPPH, no qual o grupo carbometóxi contribuiu

para um aumento da atividade antioxidante. Da mesma maneira, foi observado que os derivados carbóxi foram pouco solúveis em etanol, solvente utilizado neste ensaio, sugerindo que a atividade antioxidante do derivado **36b** pode ser ainda melhor do que a relatada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram sintetizados e caracterizados os derivados 6-carbóxi-4-fenilsubstituído-imidazo[4,5-c]4,5,6,7-tetraidropiridina **36a** e **36b** a partir da reação de Pictet-Spengler da L-histidina com os aldeídos: 4-flúorbenzaldeído e 3-hidróxibenzaldeído, com rendimentos de 86,4% e 49,4%. O derivado 6-carbometóxi-4-(3-hidróxifenil)-imidazo[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina **37b** foi obtido a partir da reação de esterificação de **36b** com rendimento de 93,3%. A confirmação da formação dos derivados foi realizada pela análise dos espectros de RMN ¹H.

Os resultados de atividade antioxidante obtidos pelo método de sequestro do radical livre DPPH demonstraram que o composto **37b** foi o que apresentou maior potencial ($IC_{50} < 1,82$ mM). Através do método ABTS o derivado **36b** foi o que demonstrou maior potencial antioxidante. Os resultados revelam a influência dos substituintes nas posições 4 e 6 da unidade imidazo-[4,5-c]-4,5,6,7-tetraidropiridina na atividade antioxidante destes compostos.

REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, B. F., AWAD, G. E. A., BADRIA, F. A.; Synthesis, antimicrobial, antioxidant, anti-hemolytic and cytotoxic evaluation of new imidazole-based heterocycles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, P. 1505-1511, 2011.

ANDO, N.; TERASHIMA, S.; J. A novel synthesis of the 2-amino-1*H*-imidazol-4-carbaldehyde derivatives and its application to the efficient synthesis of 2-aminoimidazole alkaloids, oroidin, hymenidin, dispacamide, monobromodispacamide, and ageladine A. **Tetrahedron**, v. 66, p. 6224-6237, 2010 .

BARREIROS, A. L. B. S; DAVID, J. M; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química. Nova**, V.29, p. 113-123, 2006.

BELLINA, F.; CAUTERUCCIO, S.; MONTI, S.; ROSSI, R. Novel imidazole-based combretastatin A-4 analogues: Evaluation of their in vitro antitumor activity and molecular modeling study of their binding to the colchicine site of tubulin. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 5757-5762, 2006.

BERNER, H.; REINSHAGEN, H.; KOCH, A. M. Antiviral. 1.2-(α -hidroxibenzil)imidazo[4,5-c]pyridine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 16, p 1296-1298, 1973.

BIRADAR, J. S.; RAJESAB, P.; SOMAPPA, S. B.; Microwave Assisted Synthesis of Novel Imidazolopyridinyl Indoles as Potent Antioxidant and Antimicrobial Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

BOLLINI, M.; CASAL, J.J.; ALVAREZ, D.E.; BOIANI, L.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO H.; BRUNO, A.M. New potent imidazoisoquinolinone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Biological evaluation and structure-activity relationships, **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 1437-1444, 2009.

BORGES, L. L; LÚCIO, C.T; GIL, S.E; BARBOSA, F.E. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, Centro científico Conhecer, v. 7, p.1-19, 2011.

BUCHLI, L. Radicais livres e antioxidantes. **CosmeticsToiletries**, Ed. Port., São Paulo, v. 14, n. 2, p. 54-57, 2002.

CADET, J.; DELATOUR, T.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET, J. P.; RAVANAT J. L.; SAUVAIGO, S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. **Mutation. Research**, v. 424, p. 9-21, 1999.

CAMPOS, AM; LISSI, E.A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics**. v. 29, P. 219–224. 1997.

CARVALHO, Priscila Goes Camargo. **Preparação de novos compostos imidazo[4,5-c]piridina contendo os núcleos fenil e 4-dimetilaminofenil na posição-4, avaliação de suas atividades antioxidante e ensaio toxicológico frente à *Artemia salina***. 2014. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2014.

CARVALHO, S.A.; LOPES, F.A.S.; SALOMÃO, K.; ROMEIRO, N.C.; WARDELL, S.M.S.V., CASTRO, S.L de, SILVA, E.F. da, FRAGA, C.A.M. Studies toward the structural optimization of new brazilzone-related trypanocidal 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters** , v. 16, p. 413-421, 2008.

CHATQILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. **Exp. Gerontol**, v. 36, p.1459-71, 2001.

DORKO, C.; Antioxidants used in foods. **Food Technology**, v.48, n.4, p.33, 1994.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Review article oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-47, 2000

FOROUMADI, A.; EMAMI, S.; POURNOURMOHAMMADI, S.; KHARAZMI, A.; SHAFIEE, A. Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of 2-(1-methyl-5-nitro-1H-imidazol-2-yl)-5-substituted-1,3,4-thiadiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 1346-1350, 2005.

GAZIANO, J. M.; Antioxidants in cardiovascular disease: randomized trials. **Nutrition**. v. 12, p.583-8,. 1996.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLINGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and chemical toxicology**. v. 33, p. 601-617, 1995.

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.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. . **Mutation. Research** . v. 443, p. 37-52, 1999.

HO, C. T.; FERRARO, T.; CHEN, Q.; HOSEN, R. T.; HUANG, M. T. Food Phytochemicals for Cancer Prevention II. **American Chemical Society: Washington DC**, p. 4, 1994.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2489-2491, 1987.

KARUSO, P.H.; SHENGULE, S.R. Synthesis of ageladine A and analogs thereof for treatment of hyperproliferative disorders or angiogenic diseases, PTC Int. Appl., 2009152584, 20 JUN. 2008, 23 DEZ. 2009

KULISIC, T., RADONICB, A., KATALINICC, V. and MILOS, M,. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Journal of Food Chemistry** 85: 633–640, 2004

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

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-metóxilfenil e 4-hidróxilfenil na posição-4**. 2014. 51 p. relatório de estágio obrigatório – universidade tecnológica federal do paraná, 2014.

MAGALHÃES, J. O uso de cosméticos através dos tempos, envelhecimento cutâneo. In: **Cosmetologia: com questões de avalia o**. Rio de Janeiro: Rubio, p.33-42, 2000.

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. **Clinical Science**, v. 84, p 407-412, 1993.

OLIVEIRA, A. C; VALENTIM, I. B; GOULART, M. O. F; SILVA, C .A; BECHARA, E. J. H; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, V. 32, p. 689-702, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

POORRAJAB, F.; ARDESTANI, S.K.; EMAMI, S.; BEHROUZI-FARDMOGHDAM, M.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Nitroimidazolyl-1,3,4-thiadiazole-based anti-leishmanial agents: Synthesis and in vitro biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry** , v. 44, p. 1758-1762, 2009.

PUERSTINGER, G.; PAESHUYSE, J.; HEINRICH, S.; MOHR, J; SCHRAFFL, N.; CLERCQ, E. D.; NEYTS, J. Antiviral 2,5-disubstitued imidazo[4,5-c]pyridines: Further optimization of anti-hepatitis C virus activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 5111-5114, 2007.

PUERSTINGER, G.; PAESHUYSE, J.; HERDEWINJ, P.; ROZENSKI, J.; CLERCQ, E. D.; NEYTS, J. Substitued 5-benzyl-2-phenyl-5H-imidazo[4,5-c]pyridines: A new class of pestivirus inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 5345-5349, 2006.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.;BRITO, E.S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Comunicado Técnico - Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. Fortaleza: **Embrapa**, v. 128, p.1-4, 2007.

SCOTTI, L; SCOTTI, T.M; CARDOSO, C; PAULETTI, P; CASTRO-GAMBOA, I; BOLZANI, S.V; VELASCO, R. V .M; MENEZES; FERREIRA, I. E. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**. v. 43, P. 1-14, 2007.

SILVA, FAM, BORGES, MFM, FERREIRA, MA. Metodos para avaliacao do grau de oxidacao lipidica e da capacidade antioxidante. **Quimica Nova**. v.22, P. 94-103, 1999.

SMOLYAR, N.N.; ABRAMYANTS, M.G.A.; ZAVYAZKINA, T.I.; MATVEEVA, D.I.; BORODKIN, Y.S.; VOLOSKII, I.A. Synthesis and dehydrogenation of Spinaceamine and Spinacine 4-hetaryl derivatives. **Russian Journal of organic Chemistry**, v. 45, p. 1219-1223, 2009.

SPYCHALA, J. The usefulness of cyclic diamidines with different core-substituents as antitumor agents, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 36, p. 183-189, 2008.

SRINNIVAS, N.; PALNE, S.; NISHI, GUPTA, S.; BHANDARI, K.; Aryloxy cyclohexyl imidazoles: A novel class of antileishmanial agents, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 324-327, 2009.

STANNER, S. A.; HUGHES, J.; KELLY, C. N. M.; BUTTRISS, J. A review of the epidemiological evidence for the antioxidant . **Public Health Nutrition**.v. 7, p. 407, 2004.

TEMPLE, C. Jr.; ROSE, J. R.; COMBER, R. N.; RENER, G. A. J. Synthesis of potential anticancer agents: imidazo[4,5-c]pyridines and imidazo[4,5-b]pyridines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v 30, p. 1746-1751, 1987.

TEMPLE, C. Jr. Antimitotic agents. Synthesis of imidazo[4,5-c]pyridine-6-ylcarbamates and imidazo[4,5-b]pyridine-5-ylcarbamates. **Journal of Medicinal Chemistry** , v. 33, p. 656-661, 1990.

TOMEI, R. R; SALVADOR, J.M. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **XI Encontro Latino de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação-Universidade do Vale do Paraíba**. 2007.

TÜRKYILMAZ, M.; ÖZDEMİR, N.; BARAN, Y. Synthesis, spectroscopic characterization, X-ray structure and DFT studies on 4-(2-hydroxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-5-ium chloride hydrate. **Spectrochica acta. Part A, Molecular and biomoleculas spectroscopy**. v. 82, p. 360-367, 2011.

VISIOLI, F.; KEANEY JR., J. F.; HALLIWELL, B. Spotlight on: antioxidants in the cardiovascular system. **Cardiovascular. Research.**, v. 47, p. 409-631, 2000.

WISEMAN, H.; KAUR, H.; HALLIWELL, B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. **Cancer Leitner**, v. 93, p. 113-133, 1995.

ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y.; FOO, L.; TEHRANI, P.; ULREICH, J.; WATSON, R.; Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans **Nutrition. Research**,.v. 27, p.408-416, 2007.