



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SOCIAIS APLICADAS
CAMPUS V – MINISTRO ALCIDES CARNEIRO
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAYSSA MARQUES DUARTE DA CRUZ

SÍNTESE, ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E BIOENSAIOS DE *Artemia salina*
PARA DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NOVOS DERIVADOS 2-
[(BENZILIDENO)AMINO]-5,6,7,8-TETRAIDRO-4H-
CICLOHEPTA[b]TIOFENO-3-CARBONITRILA

JOÃO PESSOA – PB

2011

RAYSSA MARQUES DUARTE DA CRUZ

SÍNTESE, ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E BIOENSAIOS DE *Artemia salina*
PARA DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NOVOS DERIVADOS 2-
[(BENZILIDENO)AMINO]-5,6,7,8-TETRAIDRO-4H-
CICLOHEPTA[b]TIOFENO-3-CARBONITRILA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

Co-Orientador: Dr. Ricardo Olímpio de Moura

João Pessoa-PB

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL CAMPUS V – UEPB

C957s Cruz, Rayssa Marques Duarte da.

Síntese, estudos espectroscópicos e bioensaios de *Artemia salina* para determinação da citotoxicidade de novos derivados 2-[(benzilideno)amino]-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila / Rayssa Marques Duarte da Cruz. – 2011.

88f. : il. color

Digitado.

Trabalho Acadêmico Orientado (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Departamento de Ciências Biológicas, 2011.

“Orientação: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior”.

1. *Artemia salina*. 2. 2-Aminotiofeno. 3. Citotoxicidade. I. Título.

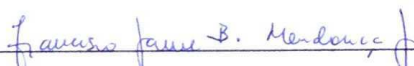
21. ed. CDD 595.32


RAYSSA MARQUES DUARTE DA CRUZ

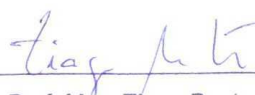
SÍNTESE, ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E BIOENSAIOS DE *Artemia salina*
PARA DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NOVOS DERIVADOS 2-
[(BENZILIDENO)AMINO]-5,6,7,8-TETRAIDRO-4H-
CICLOHEPTA[b]TIOFENO-3-CARBONITRILA

Aprovado em 22 de 06 de 2011

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior
Orientador – UEPB


Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino
Examinador – UFPE


Prof. Msc. Tiago Bento de Oliveira
Examinador – UFPE

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, aquele que me deu toda coragem, perseverança e apoio em todos momentos, nunca me permitindo desistir dos meus objetivos e me fazendo lutar para alcançar meus sonhos.

Aos meus pais, Elenilda Marques D. da Cruz e Renato da Cruz, que são meu maiores exemplos de vida. Nunca duvidaram da minha capacidade, ensinando-me a seguir pelo melhor caminho e dando-me a liberdade de escolher na minha jornada. Sou grata e devo tudo a eles.

A minha querida irmã e amiga, Ryldene Marques D. da Cruz, que sempre enriqueceu minha vida com cuidado, apoio e amor, acreditando no meu potencial. Ajudou-me de todas as formas quando mais precisei.

A Ednilson L. Cavalcanti Júnior, companheiro e amigo, por ter seguido comigo nessa trajetória, sendo minha sustentação, e por acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador, prof. Dr. Francisco Jaime B. Mendonça Junior, por ter me guiado por esse caminho, ter tido toda paciência para me ensinar, incentivar e ajudar na construção da minha formação acadêmica.

A meu co-orientador, prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, que foi um verdadeiro professor, motivando o nosso trabalho, e nunca medindo esforços para ensinar e estar presente nas horas em que mais precisamos.

Aos meus companheiros de laboratório Rodrigo Santos, Frederico Fávaro e Jaismary Gonzaga que seguiram comigo nessa caminhada, crescendo e aprendendo o verdadeiro valor do trabalho. Em especial a Jaismary Gonzaga, que além de uma colega de trabalho, é uma verdadeira amiga e companheira de todas horas. E a todos integrantes do Laboratório de síntese e vetorização de moléculas.

A Ryldene Marques pelo auxílio na realização dos testes biológicos.

As minhas colegas de turma Jaismary Gonzaga e Paola Ramos, pelo companheirismo e ajuda ao longo do curso.

A meus amigos do curso de farmácia pelo apoio dado ao longo dessa dupla árdua jornada. E aos meus amigos queridos pela compreensão e amparo.

A minha família por toda paciência e por ser serem um refúgio nos momentos que mais necessitei.

A Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e CNPq, pelo suporte financeiro, o qual permitiu o desenvolvimento do trabalho.

O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; os insensatos desprezam a sabedoria e a instrução (Provérbios 1:7).

RESUMO

A síntese de novas substâncias bioativas necessita de ensaios preliminares que determinem a toxicidade, antes de serem realizados testes *in vivo*. Tais testes são importantes indicativos para a viabilidade da condução dos testes *in vivo*. A *Artemia salina* é um microcrustáceo largamente utilizado como modelo animal para determinar a taxa de mortalidade de diversas substâncias químicas sintéticas, advindas de fontes naturais, entre outras. Esse trabalho avaliou a citotoxicidade através do ensaio de letalidade por *Artemia salina*, através do método de Meyer modificado, de 14 derivados 2-[(benzilideno)amino]-3-ciano-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno. Esses derivados foram sintetizados no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da UEPB em duas etapas reacionais, iniciando pela reação multicomponentes de Gewald entre: malononitrila, cicloheptanona, enxofre elementar e morfolina em meio etanólico, que forneceu o precursor 2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (7CN), que por condensação com diversos aldeídos aromáticos substituídos em meio ácido forneceu os compostos finais em bons rendimentos (55,8% a 99%), com extrema facilidade de purificação. As estruturas moleculares tiveram suas características físico-químicas determinadas e foram comprovadas através das técnicas de RMN ¹H, RMN ¹³C, MS e IV. Os testes de citotoxicidade foram conduzidos segundo metodologia proposta por Meyer *et al.* (1982) modificada. Os valores da concentração letal 50% (CL₅₀) foram calculados através do método estatístico PROBIT e as doses efetivas 50% (ED₅₀) através das CL₅₀ determinadas. Dos quinze compostos avaliados, 11 mostraram-se atóxicas (CL₅₀ > 1000 µg/mL) e apenas 4 (7CN, 7CN02, 7CN10 e 7CN11) apresentaram alguma toxidez. De forma que a série estudada apresentou citotoxicidade moderada a fraca, sendo a maioria das moléculas atóxicas dentro das concentrações avaliadas.

Palavras-chave: *Artemia salina*, citotoxicidade, 2-aminotiofenos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Náuplio recém-eclodido livre e náuplio saindo do cisto.	17
Figura 2. Derivados com atividades antibacterianas e antifúngicas.	21
Figura 3. Derivado com atividade antifúngica.	22
Figura 4. Derivados 2-aminotiofênicos como potenciadores alostéricos no receptor da Adenosina A1 (I e II).	23
Figura 5. Derivado intermediário na síntese do 3-diazatiamino.	24
Figura 6. Derivado antineoplásico.	24
Figura 7. Derivado inibidor de herpes.	25
Figura 8. Espectro de infravermelho do composto 7CN01.	40
Figura 9. Espectro de RMN H ¹ do composto 7CN09.	42
Figura 10. Espectro de RMN de C ¹³ do composto 7CN08.	43
Figura 11. Espectro de Massa do composto 7CN01.	44

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Exemplo de uma síntese de Gewald para obtenção de 2-amino-tiofenos substituídos. 22
- Esquema 2.** 2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (7CN). 29
- Esquema 3.** Rota de obtenção dos novos derivados 2-(amino-arilideno)-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (2). 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Novos derivados e seus respectivos aldeídos.	32
Tabela 2. Características físico-químicas dos compostos sintetizados.	37
Tabela 3. Dados dos espectros de IV.	39
Tabela 4. Dados dos espectros de RMN ¹ H (δ em ppm).	41
Tabela 5. Dados dos espectros de RMN ¹³ C (δ em ppm).	42
Tabela 6. Dados referentes às massas exatas dos íons moleculares. Valores obtidos e calculados.	44
Tabela 7. Teste de solubilidade preliminar com o 7CN (1).	46
Tabela 8. Dados dos testes com artêmias com o compostos 7CN03, 7CN09 e 7CN10.	47
Tabela 9. Valores obtidos de ED ₅₀ e os valores de CI ₅₀ dos compostos testados.	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráfico de regressão linear PROBIT para o composto 7CN03.	48
Gráfico 2. Gráfico de regressão linear PROBIT para o composto 7CN09.	48
Gráfico 3. Gráfico de regressão linear do PROBIT para o composto 7CN10.	49
Gráfico 4. Comparação de todas CL_{50} da série estudada.	50
Gráfico 5. Gráfico comparativo das CL_{50} entre os grupos: sem substituição, monossustituídos e os dissustituídos.	51
Gráfico 6. CL_{50} dos compostos substituídos no anel aromático com átomos de cloro.	52

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
EPÍGRAFE	6
RESUMO	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ESQUEMAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE GRÁFICOS	11
1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 <i>Artemia salina</i>	16
2.2 Testes biológicos e sua importância	17
2.3 Bioensaios com <i>Artemia salina</i>	18
2.4 Química medicinal e a síntese química	20
2.5 Importância biológica de derivados de heterociclos tiofênicos	21
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Parte química	29
4.1.1. Síntese dos novos compostos	29
4.1.1.1 Obtenção do composto de partida (2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclopenta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila (7CN)	29
4.1.1.1.1 Procedimento experimental	29
4.1.1.2 Obtenção dos compostos finais	30
4.1.1.2.1 Procedimento experimental	31

4.1.2 Caracterização e comprovação estrutural dos novos compostos	33
4.2. Parte biológica	33
4.2.1 Ensaio de citotoxicidade	33
4.2.1.1 Preparação de aparato e eclosão dos cistos de <i>A. salina</i>	33
4.2.1.2 Preparação das amostras	34
4.2.1.3 Avaliação da atividade biológica	35
4.2.1.4 Análise dos dados	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Parte química	37
5.2 Parte biológica	45
6. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	64
ANEXO A – ESPECTROS DE INFRAVERMELHOS	64
ANEXO B – ESPECTROS DE RESSONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹³ C	72
ANEXO C – ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹ H	73
ANEXO D – ESPECTROS DE MASSA	80

1. INTRODUÇÃO

Os microcrustáceos da espécie *Artemia salina* são organismos habitantes de ecossistemas aquáticos salinos. São animais facilmente adquiridos, manuseados e de fácil desenvolvimento (CARVALHO et al, 2007). Essas características tornam esses microcrustáceos uma boa opção de modelo animal para realização de testes biológicos.

Dentro desse contexto, *A. salina* Leach vêm sendo utilizada com frequência em bioensaios de determinação de toxicidade, que utilizam a CL₅₀ (concentração letal a 50%) para a avaliação de atividades biológicas (NUNES et al., 2008). Esses testes têm se mostrado úteis tanto para avaliar a toxicidade de compostos orgânicos químicos sintéticos, quanto de compostos ou extratos advindos de fontes naturais. Sendo também possível a avaliação ecotoxicológica em ambientes aquáticos.

Assim, como alternativa para o uso de animais de laboratório, a utilização de bioensaios para avaliar a bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas vem se tornando uma prática comum nos laboratórios de pesquisa em nível mundial (NUNES et al., 2008).

Os testes com artêmias são uma opção de ensaiar a citotoxicidade de diversos compostos, de maneira mais barata e mais acessível aos pesquisadores e aos laboratórios menos providos de equipamentos e materiais mais elaborados.

Atualmente, milhares de novas moléculas químicas são sintetizadas e isoladas de diferentes fontes naturais, contudo a maior parte de suas atividades biológicas/farmacológicas e aspectos de toxicidade, ainda são muito pouco estudadas ou desconhecidas para aqueles que as isolaram ou produziram.

A síntese de novas substâncias bioativas requer ensaios preliminares de determinação da toxicidade, antes de serem pensados quaisquer outros testes biológicos *in vivo*, pois fornecem importantes indicativos da viabilidade da condução dos testes *in vivo*, como por exemplo: indicação da dose máxima tolerável, DL₅₀, dose terapêutica, efeitos adversos, entre outros.

Diante do exposto nos propomos a utilizar o modelo do bioensaio de letalidade utilizando *A. salina* Leach como modelo para avaliar o potencial citotóxico de novos derivados 2-amino-tiofênicos sintetizados em nosso laboratório.

Os heterociclos tiofênicos são conhecidos por apresentar uma ampla gama de atividades biológicas. Atividade herbicida (EDWARDS, 1976; SANDMEIER & SECKIMGER, 1984; HIROTA et al., 1984;), atividades antiprotozoárias, contra o formas tripomastigotas do *T. cruzi* e as formas promastigotas de *Leishmania* (RAM et al., 1997; VALDERRAMA et al., 1999), atividade antitumoral (DALLEMAGNE et al., 2003), analgésica e antiinflamatória (HARRINGTON, MOORE & GERSTER, 1972; FAKHR et al., 2008), entre outras também são bem relatadas.

Comparando-se o volume de informações relatadas referente à avaliação das atividades biológicas de compostos derivados de tiofeno, com o volume de informação relativo aos ensaios de toxicidade desses compostos, verifica-se claramente um grande déficit desse último (onde existe uma ênfase maior em ensaios de citotoxicidade em linhagens de células tumorais para avaliação do potencial anticancerígeno, e muito pouco estudo sobre linhagens celulares humanas ou animais). Como alguns exemplos, podemos citar:

- Atividade citotóxica em linhagens celulares com tumores (LUKERVICS et al., 2000);
- Ensaios citotóxicos *in vitro* e testes em animais (ratos) com moléculas do tiofeno isoladas de extratos de plantas que possuem efeitos inibitórios contra as linhagens de células humanas com tumores (JIN et al., 2008);

Diante do exposto, foi realizado um levantamento bibliográfico sobre o tiofeno e suas diversas atividades biológicas, associado à síntese, caracterização e comprovação estrutural de uma série de 2-amino-tiofenos. Assim como a ampliação dos testes biológicos dos derivados tiofênicos que estão sendo continuamente obtidos em nosso grupo de pesquisas, com a finalidade de determinar e avaliar a citotoxicidade de novos derivados 2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila através do ensaio que utiliza *Artemia salina*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Artemia salina*

As artêmias (Figura 1) são crustáceos branquiopodos da ordem Anostraca, família Artemiidae, que vivem em ambientes aquáticos salinos. As artêmias são organismos partenogenéticos que possuem os dois sexos bem definidos (VARÓ et al. 2002).

São animais que detêm um alto grau de sobrevivência, tanto os indivíduos adultos, quanto os ovos. As artêmias suportam grandes variações de salinidade (3,5 a 70%) e seus ovos podem permanecer longos períodos desidratados, pois possuem um metabolismo inativo (MILANI & ZIOLLI, 2008; MAYORGA et al., 2010).

As artêmias também são consideradas bioindicadores de contaminação de águas marinhas por agentes químicos (CARVALHO et al, 2007).

Esses animais são muito sensíveis, pois, diferem entre espécies, estágios de vida e linhagens, quando expostos a um mesmo agente tóxico (VARÓ et al., 1998).

A *Artemia salina* Leach é facilmente encontrada, sob a forma de cistos, em lojas de aquaristas, pois são utilizadas como alimento para peixes. Tais cistos permanecem dormentes por longos períodos de tempo, podendo ser facilmente armazenados, desde que se tenha o cuidado de mantê-los secos e sob ausência de iluminação (animais com fototaxia (MICHAEL, THOMPSON & ABRAMOVITZ, 1956; MAYORGA et al., 2010).

A eclosão dos ovos (cistos) (Figura 1) ocorre cerca de 24 horas após sua hidratação, e os náuplios eclodidos chegam à fase adulta após 20-30 dias de vida (MILANI & ZIOLLI, 2008).



Figura 1. Náuplio recém-eclodido livre e náuplio saindo do cisto (Fotografia extraída de MAYORGA et al, 2010).

2.2. Testes citotóxicos e sua importância

Os ensaios são formas de avaliar a segurança de uma molécula bioativa e os futuros riscos envolvidos no uso de um novo fármaco. Após a síntese de uma molécula com possível atividade biológica são requeridos testes preliminares bem antes destas serem avaliadas *in vivo* (THOMAS, 2003). Os testes de citotoxicidade são um desses ensaios preliminares essenciais, que permite avaliar a toxicidade de novas moléculas.

Avaliar a bioatividade de compostos orgânicos não é uma das tarefas mais fáceis. Os laboratórios de química dispõem apenas de materiais destinados a parte química, excluindo-se os aparatos que dão suporte aos testes biológicos. Geralmente faz-se necessária à parceria com biólogos ou farmacologistas para realização desses testes, contudo nem sempre essa parceira é possível.

Essas dificuldades resultaram na busca de ensaios mais simples, porém eficazes, a fim de suprir a grande demanda da quantidade de moléculas sintetizadas ainda não testadas frente a organismos vivos.

Organismos vivos mais simples, que não necessitam de aparatos mais elaborados, vem sendo bastante utilizados com intuito de realizar esses testes de uma forma descomplicada e rápida, até mesmo dentro dos próprios laboratórios de química. Um desses animais usados é um camarão de água salgada, a *Artemia salina*.

2.3 Bioensaios com *Artemia salina*

Os camarões marinhos começaram a ser utilizados em bioensaios há várias décadas e desde então vem sendo amplamente utilizados em testes de letalidade (MICHAEL, THOMPSON & ABRAMOVITZ, 1956).

Os bioensaios de citotoxicidade com *Artemia salina* testam as moléculas bioativas indicando a sua citotoxicidade. Esses testes também são indicadores de moléculas com algumas atividades farmacológicas, como: anticancerígenas, antivirais, inseticidas, pesticidas, etc (ZAHAN et al., 2004).

O método de monitoramento de toxicidade empregado utilizando microcrustáceos de água salgada, como o utilizando *A. salina*, é um teste rápido, de baixo custo e uma eficiente ferramenta para avaliar as atividades citotóxicas de substâncias químicas em bioensaios (MEYER et al., 1982; MILANI & ZIOLLI, 2007; MILANI & ZIOLLI, 2008). Tais testes requerem uma baixa quantidade da amostra (2-20 mg), não necessitam de métodos de assepsia, nem de equipamentos especiais (SIQUEIRA et al., 1998).

Outras vantagens são:

- Esses ensaios permitem o uso de um amplo número de animais, que resultam numa melhor validação estatística (MCLAUGHLIN, ROGERS & ANDERSON, 1998);

- Não existe objeção em relação a bioética, já que esses animais são invertebrados (GUL, 2005);

- Sua capacidade de formação de cistos dormentes é bastante eficaz para o seu armazenamento, pois o material biológico pode ser guardado por anos, dispensando as culturas contínuas de organismo-teste. (CALDWELL, BENTLEY & OLIVE, 2003; LIMA et al., 2009).

Foram considerados seguros e práticos para auxiliar na investigação da bioatividade de compostos sintéticos e apresentam uma boa correlação com testes de atividade antitumoral (CARBALLO et al., 2002), inseticida (MEYER et al., 1982; MCLAUGHLIN, ROGERS & ANDERSON, 1998) e anti-*Trypanosoma cruzi* (ALVES et al., 2000) para substâncias que possuem o $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ (ALMEIDA et al., 2002 apud SILVA et al., 2007).

Mclaughlin, Rogers e Anderson (1998) afirmam que os testes com artêmias podem ser usados primeiramente para analisar a citotoxicidade de novos compostos, e permitem obter os valores de ED₅₀ (dose efetiva a 50%) que geralmente são 1/10 dos valores de CL₅₀ avaliados nos testes com *A. salina*.

Estes microcrustáceos já foram largamente utilizados como modelos animais para determinar a taxa de mortalidade de diversas substâncias químicas sintéticas (CAVALCANTE et al., 2000; IQBAL et al., 2007;) e/ou extraídas de fontes naturais, seja de plantas superiores (PADMAJA et al., 2002; URREA-BULLA, SUÁREZ & MORENO-MURILLO, 2004; CUADRA et al., 2005; SANTOS et al., 2007;) ou de algas (CALDWELL, BENTLEY & OLIVE, 2003). Além de serem usados também em testes de ecotoxicologia (NUNES et al., 2006).

O Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI, USA) afirmou que existe uma correlação entre os bioensaios com artêmias e os testes *in vitro* de inibição do crescimento de células tumorais sólidas, demonstrando assim a importância do valor dos testes com *A. salina* como um teste preliminar que define possíveis drogas antitumorais. (ANDERSON et al, 1991 apud SILVA et al., 2007).

Os testes com artêmias são ensaios intermediários aos testes com antitumorais, que são mais caros e necessitam de mais tempo de teste (GUL, 2005).

Carballo et al. (2002) relatam testes realizados com *Artemia sp.* que detectaram cerca de 50% da atividade de espécies de produtos naturais marinhos que são consideradas ativas contra carcinomas humanos no pulmão e cólon. Mclaughlin, Rogers e Anderson (1995) afirmam que existe uma correlação boa entre os testes com artêmias e a atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos. Ferraz et al. (2009) observam em seus estudos que os testes de DL₅₀ (dose letal a 50%) realizados com *A. salina* permitem selecionar as moléculas que tem um baixo DL₅₀, e que assim podem possuir propriedades antineoplásicas.

Meyer et al. (1982) foi um dos primeiros pesquisadores a padronizar o método que utiliza as artêmias em testes de citotoxicidade, e esse método vem sofrendo pequenas adaptações ao longo do tempo. Tal método utiliza o método estatístico PROBIT (FINNEY, 1974) e o principal parâmetro avaliado é a porcentagem de animais mortos e vivos em cada uma das doses testadas.

Métodos estatísticos que utilizam a regressão são particularmente usados em estudos onde há variáveis dicotômicas. Estes vêm sendo aplicados em pesquisas na biologia e medicina. Um desses métodos é o PROBIT, que é um método de regressão linear que permite determinar através de uma simples equação do primeiro grau a DL_{50} (LEMONTE & VANEGAS, 2005).

O fácil monitoramento da resposta biológica (vida ou morte), a fácil preparação do aparato e a rapidez dos ensaios foram alguns dos principais motivos que levaram as artêmias a serem grandes atuantes no campo da determinação da citotoxicidade.

2.4. Química medicinal e a síntese química

A descoberta de novos fármacos é uma tarefa árdua e demorada. A química medicinal é uma área promissora no desenho, na descoberta e no desenvolvimento dessas novas entidades químicas candidatas a fármacos (THOMAS, 2003).

Muitos grupos de pesquisa, multidisciplinares (biólogos, farmacêuticos, médicos, toxicologistas, microbiologista, entre outros) vêm expandindo suas pesquisas na síntese de novas moléculas com potencial biológico e como futuras candidatas a fármacos, proporcionando, possíveis curas para diversas enfermidades que acometem nossa civilização (THOMAS, 2003).

O avanço da síntese orgânica de novas moléculas veio com a carência da produção de novos fármacos com uma toxicidade menor daqueles compostos advindos da natureza. Os novos compostos podem ser modificações de modelos de moléculas naturais, como a benzocaína e procaína originadas da cocaína (THOMAS, 2003).

Além de elaborar estratégias de síntese de novas moléculas potencialmente bioativas, é necessário confirmar se aquela molécula inicialmente proposta corresponde àquela sintetizada. A química orgânica conta com métodos que auxiliam na caracterização desses compostos sintetizados, que são nomeados de métodos espectroscópicos, e são ferramentas muito úteis na elucidação e confirmação de uma estrutura molecular. É importante conhecer a estrutura da molécula obtida, pois, assim podemos definir sua reatividade, propriedades físicas e sua atividade biológica.

As técnicas mais utilizadas pelos pesquisadores da área são: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa (MS) e espectroscopia de infravermelho (IV) (SOLOMONS & FRYHLE, 2005).

2.5. Importância biológica de derivados de heterociclos tiofênicos

O anel tiofênico é um importante heterociclo existente em diversas moléculas com atividades biológicas presentes em diversas drogas de origem natural e sintética (PUTEROVÁ, KRUTOSIKOVÁ & VÉGH, 2009).

A atividade antibacteriana de tiofenos (HARRINGTON, MOORE & GERSTER, 1972) foi comprovada em derivados do fenil-(2,3,5-trimetil-benzo[*b*]tiofeno-6-il)-amino (I) (FERREIRA et al., 2004) e em 3-fenilamino-benzo[*b*]tiofeno-2-ácido carboxílico-etil-éster (II) (PINTO et al., 2008) (figura 2).

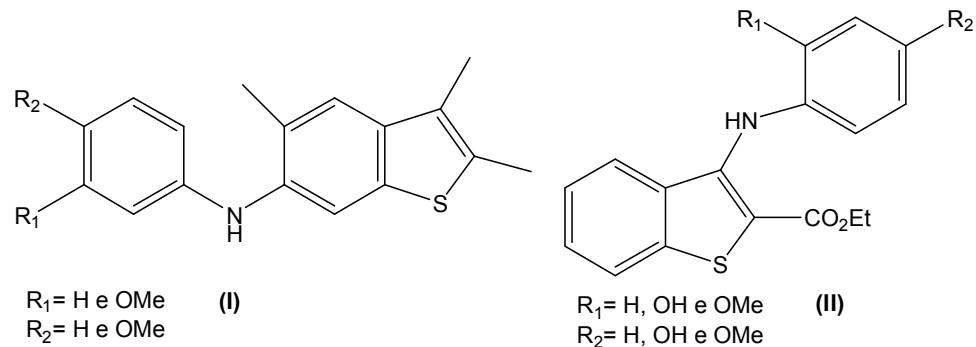


Figura 2. Derivados com atividades antibacterianas e antifúngicas.

Ferreira et al. (2004) e Pinto et al. (2008) relataram também o potencial antifúngico de derivados tiofênicos como o benzo[*b*]tiofeno-3-il-piridina-3-il-amina (Figura 3).

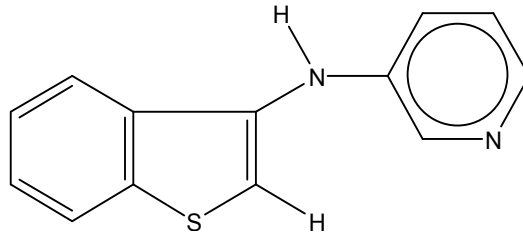
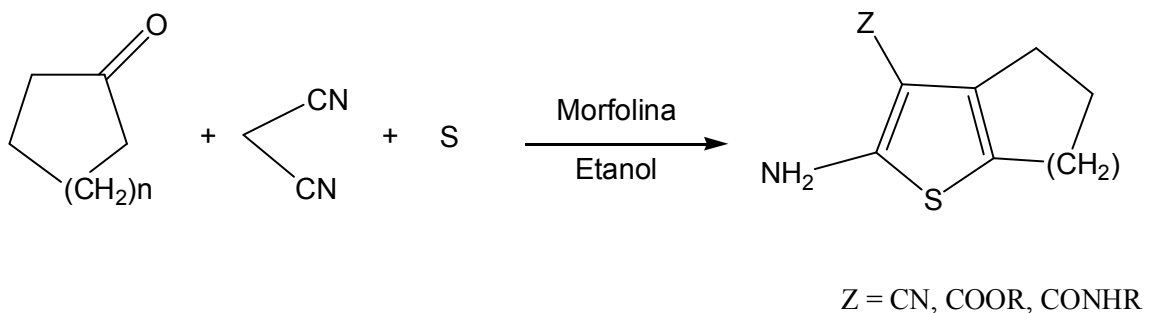


Figura 3. Derivado com atividade antifúngica.

Dentre os heterociclos tiofênicos, destacam-se os compostos 2-aminotiofeno, que têm sido bastante relatados nos estudos de investigação de novas drogas, principalmente depois das inovações da rota de síntese da reação de Gewald (PUTEROVÁ, KRUTOSIKOVÁ & VÉGH, 2009).

Karl Gewald foi um químico alemão que revolucionou a síntese de tiofenos ao inovar com a síntese multicomponentes que fornece 2-aminotiofenos. Nos anos de 1965 e 1966, Gewald sintetizou 2-aminotiofenos através da reação entre compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas), nitrilas ativadas e enxofre em presença de aminas secundárias sob temperatura ambiente (Esquema 1) (GEWALD, 1965; GEWALD, SCHINKE & BOTTCHER, 1966; HUANG & DOMLING, 2011).



Esquema 1. Exemplo de uma síntese de Gewald para obtenção de 2-amino-tiofenos substituídos.

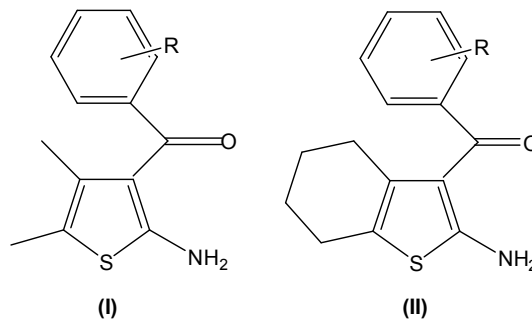
A reação de Gewald vem constantemente sofrendo variações e o próprio inventor em 1988 já descrevia 4 diferentes variações (Gewald et al., 1988). Atualmente

cerca de 15 modificações são descritas (GRONOWITZ & HORNFELODT, 2004 apud PUTEROVÁ, KRUTOSIKOVÁ & VÉGH, 2009).

Os compostos sintetizados através da reação de Gewald, utilizando como base os 2-amino-tiofenos (Figura 4), são importantes intermediários da síntese de compostos farmacologicamente ativos (CHAKRABARTI et al., 1980; CHAKRABARTI, J. K.; HOTTEN, T. M.; TUPPER, D. E., 1993; CALLIGARO et al., 1998). Tais compostos vem sendo cada vez mais introduzidos no grupo de compostos com atividade farmacológica (HUANG & DOMLING, 2011), como por exemplo, o caso da substituição do grupo fenila (presente em fármacos ativos) pelo anel tiofênico (PUTEROVÁ, KRUTOSIKOVÁ & VÉGH, 2009).

Estas moléculas são relatadas com as seguintes atividades na literatura:

- Potenciadores alostéricos no receptor da Adenosina A1 (NIKOLAKOPOULOS et al., 2006; BARALDI et al., 2006) (Figura 4);



R= H, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 3,4-di-Cl, 4-CH₃, 3-CF₃, 4-CF₃, 4-NO₂, 4-CO₂⁻H, etc.

Figura 4. Derivados 2-aminotiofênicos como potenciadores alostéricos no receptor da Adenosina A1 (I e II).

- Inibidores da elastase leucocitária humana (HLE) (GUSTSCHOW & NEUMANN, 1999);
- Como intermediários de uma síntese mais econômica e rápida de 3-diazatiamino (HAWSKEY, GRIFFIN & LEEPER, 2001) (Figura 5);

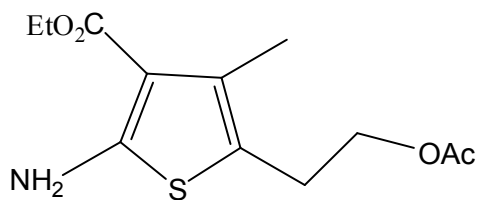
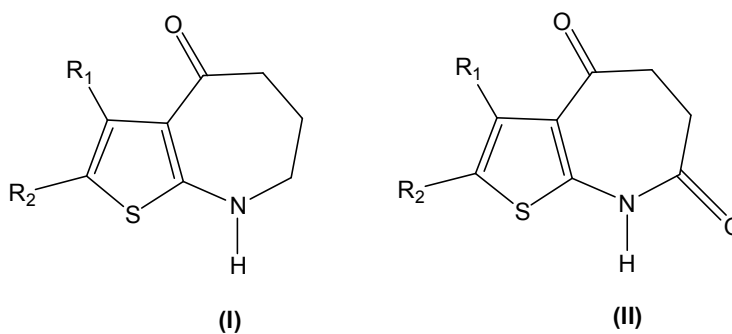


Figura 5. Derivado intermediário na síntese do 3-diazatiamino.

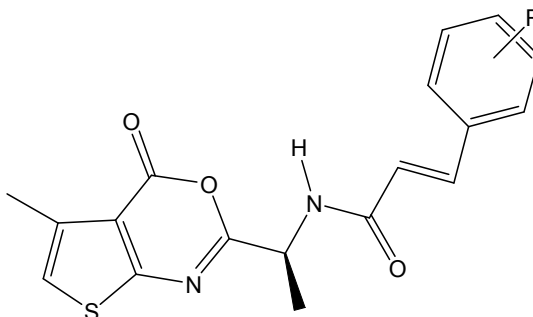
- Agentes antineoplásicos (KOEDEL et al., 1975 apud PUTEROVÁ, KRUTOSIKOVÁ & VÉGH, 2009) (Figura 6);



$R_1 = R_2 = \text{Me}$, $R_1 = \text{Ph}$, $R_2 = \text{Me}$, $R = \text{benzoíla ou tosila}$.

Figura 6. Derivado antineoplásico.

- Inibidores da protease de herpes em células infectadas com HSV-2 (JARVEST et al, 1997 e 1999 apud PUTEROVÁ, KRUTOSIKOVÁ & VÉGH, 2009) (Figura 7);



R = H, 2-Cl, 2-Br, 2-Me, 2-NO₂, 2-EtO, 4-CHO

Figura 7. Derivado inibidor de herpes.

- Atividades antibacteriana contra *S. aureus* e *S. epidermidis* (derivado também testado a citotoxicidade contra *S. aureus* resistente a rifampicina) (ARHIN et al, 2006);
- Antagonistas de receptores de glucagon hepáticos humanos (DUFFY et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar novas moléculas derivados do 2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila e avaliar sua citotoxicidade através de bioensaios utilizando *Artemia salina*.

3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar e purificar os novos compostos.
- Promover a caracterização físico-química e a comprovação estrutural dos derivados através de diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométricas.
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos em bioensaios utilizando *Artemia salina* através do cálculo da CL₅₀ (concentração letal a 50%).
- Obter os valores de ED₅₀ (dose efetiva a 50%) a partir da CL₅₀ (concentração letal a 50%).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Reagentes e solventes

- Cicloheptanona
- Enxofre
- Malononitrila
- Morfolina
- Benzaldeído
- 4-Bromo-benzaldeído
- 4-Dietilamina-benzaldeído
- 2,3-Dicloro-benzaldeído
- 2,4-Dicloro-benzaldeído
- 3,4,5-Trimetóxi-benzaldeído
- 2,6-Dicloro-benzaldeído
- 3,4-Dicloro-benzaldeído
- 5-Bromo-2-metóxi-benzaldeído
- 4-Nitro-benzaldeído
- 4-Cloro-benzaldeído
- 4-Metóxi-benzaldeído
- 4-Flúor-benzaldeído
- *p*-Tolualdeído

Solventes

- Acetato de etila
- Ácido acético glacial
- Clorofórmio deuterado

- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Etanol
- Hexano
- Metanol
- Tween 20
- Tween 80

Equipamentos

- Ponto de Fusão - Micro química modelo MQAPF-302
- Balança - OHAUS modelo Adventurer
- I.V. – Espectrofotômetro modelo IRPrestige-21
- R.M.N. – Espectrofotômetro Varian Mercury/200 MHz, Varian VNMR5/400 MHz e FT-NMR 60 MHz - ANASAZI
- Banho de ultra-som UNIQUE - Modelo ULTRA CLEANER 1400A
- Espectro de massas - As medidas das massas exatas dos íons moleculares foram obtidas em um Eletrospray Shimadzu LC/MS-IT-TOF em modo positivo.

Softwares

- R.M.N. - MestReC 4.8.6.0.
- I.V. - Origin 6.0
- Excel – Windows 7

Cromatografia

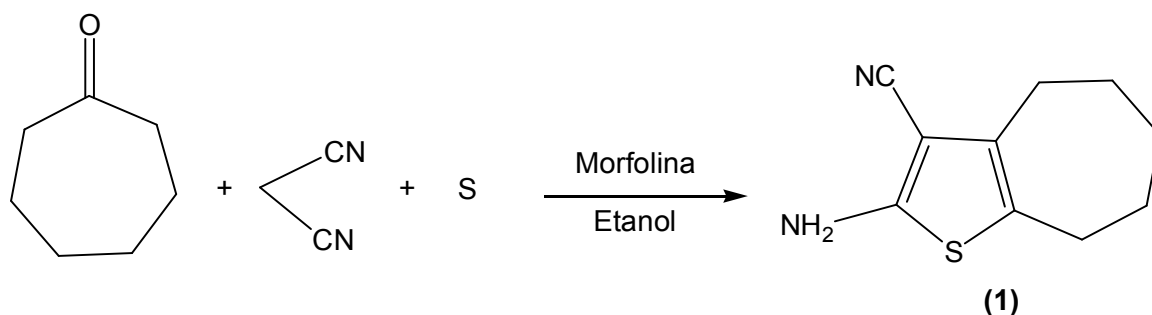
Para a realização das cromatografias analíticas em camada delgada foram utilizadas as placas Fluka sílica gel 60 F254, de 0,20mm de espessura. As revelações das mesmas foram feitas sob a luz ultravioleta (254 ou 366 nm). Nos sistemas para eluição foram utilizados solventes com especificações P.A.

4.1 Parte química

4.1.1 Síntese dos novos compostos

4.1.1.1 Obtenção do composto de partida (2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (7CN)

O composto de partida 2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (1) (7CN) (Esquema 2) foi obtido através da reação de Gewald. Tal reação ocorreu através da condensação multicomponente entre uma cetona cíclica (cicloheptanona) com um composto metileno ativo (malononitrila) em meio básico (morfolina) e enxofre elementar.



Esquema 2. Obtenção do 2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-ciclohepta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (7CN).

4.1.1.1.1 Procedimento experimental

Em balão de fundo redondo foram colocados para reagir, sob banho de gelo quantidades equimolares de cicloheptanona (85mmol), enxofre (85mmol) e malononitrila (85 mmol) e 0,6 equivalente de morfolina que foi adicionado lentamente gota a gota. Após a adição da base, a reação aconteceu a temperatura ambiente. Após constatado término da reação por cromatografia em camada delgada (2h) o balão foi colocado em freezer.

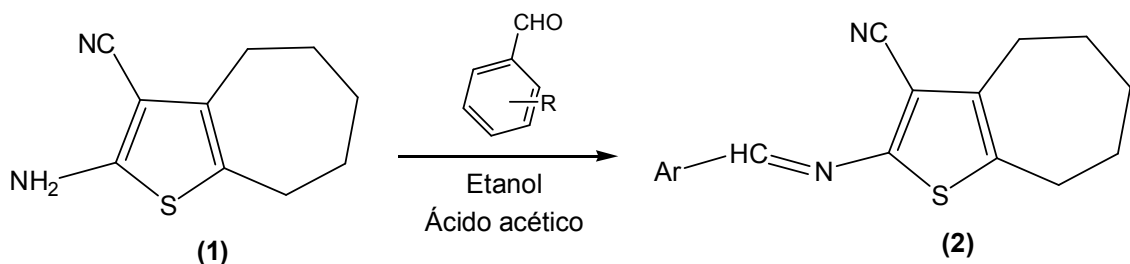
A purificação do composto 7CN foi inicialmente através da filtração dos cristais e

lavagem com etanol gelado, obtendo os primeiros cristais. O líquido resultante da filtração (água-mãe) foi colocado no freezer para segunda precipitação. Os novos cristais foram retirados do freezer e lavados com etanol. Após essa segunda filtração, o líquido resultante foi evaporado, e os terceiros cristais lavados com etanol gelado seguido de água destilada.

Para os cristais mais impuros, foi realizada também uma recristalização, inicialmente dissolvendo os cristais com etanol quente e depois filtrando esse líquido, removendo alguma impureza insolúvel no meio. Logo após, este líquido foi resfriado lentamente, formando cristais puros, que foram filtrados e lavados com etanol gelado.

4.1.1.2 Obtenção dos compostos finais

A partir do composto (1) (7CN) foram sintetizados quatorze novos compostos derivados tiofênicos da série 2-(amino-arilideno)-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila. Os novos derivados foram originados de reações de substituição na função 2-amino de (1), condensando nessa função diferentes aldeídos aromáticos, resultando em iminas (2) (Esquema 3).



Esquema 3. Rota de obtenção dos novos derivados 2-(amino-arilideno)-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (2).

4.1.1.2.1 Procedimento experimental

O procedimento reacional foi o mesmo para os quatorze derivados. Em balão de fundo redondo, sob temperatura ambiente e sob agitação magnética, foram colocados os reagentes em quantidades equimolares, da reação: 7CN (2,604 mmol), aldeído (2,604mmol), etanol (5 a 8mL) e ácido acético (0,25mL a 0,5mL). Após constatado término da reação por cromatografia em camada delgada, foi adicionado água destilada ao balão (20mL), e o precipitado formado foi filtrado (filtração à vácuo em kitassato ou em funil simples e papel de filtro) e lavado consecutivas vezes com água destilada. A massa sólida formada foi posta em dessecador até atingir uma massa constante.

Foram utilizados quatorze aldeídos para obtenção dessa série, que estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Novos derivados e seus respectivos aldeídos.

Derivado	Nomenclatura IUPAC	Aldeído substituído
7CN01	2-[(benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	Benzaldeído
7CN02	2-[(4-bromo-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	4-bromo-benzaldeído
7CN03	2-[(4-dietilamino-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	4-dietilamino-benzaldeído
7CN04	2-[(2,3-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	2,3- dicloro-benzaldeído
7CN05	2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	2,4-dicloro-benzaldeído
7CN06	2-[(3,4,5-trimetóxi-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	3,4,5-trimetóxi-benzaldeído
7CN07	2-[(2,6-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	2,6-dicloro-benzaldeído
7CN08	2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	3,4-dicloro-benzaldeído
7CN09	2-[(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	5-bromo-2-metóxi-benzaldeído
7CN10	2-[(4-nitro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	4-nitro-benzaldeído
7CN11	2-[(4-cloro-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	4-cloro-benzaldeído
7CN12	2-[(4-metóxi-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	4-metóxi-benzaldeído
7CN13	2-[(4-flúor-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	4-flúor-benzaldeído
7CN14	2-[(4-metil-benzilideno)-amino]-5,6,7,8-tetraidro-4 <i>H</i> -ciclohepta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila	<i>p</i> -tolualdeído

4.1.2 Caracterização e comprovação estrutural dos novos compostos

Após a síntese, os compostos tiveram suas características físico-químicas determinadas, sendo estas: aparência, solubilidade, cálculo do fator de retenção (R_f), faixa de fusão, assim como os cálculos dos rendimentos.

As moléculas sintetizadas também tiveram suas estruturas comprovadas através dos métodos físico-químicos, que incluíram: espectroscopia de infravermelho (I.V.), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e algumas dessas moléculas também foram comprovadas através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) e espectrometria de massas (EM).

4.2 Parte biológica

4.2.1 Ensaios de citotoxicidade

O teste de letalidade frente à *Artemia salina* Leach foi realizado através do método descrito por Meyer et al. (1982) com modificações, de forma a permitir a avaliação das moléculas derivadas do anel tiofeno de interesse.

4.2.1.1 Preparação de aparato e eclosão dos cistos de *A. salina*

Para a realização do experimento foi preparado um aquário retangular (20cm comprimento x 11cm largura x 13cm altura), contendo uma tela divisória com poros de 2 mm. Um dos lados desse aquário foi coberto e protegido da luz e o outro lado possuía uma lâmpada (luz artificial) presa por um suporte. Esse recipiente foi completado com uma solução salina sintética (marca Real Sea[®]) na concentração de 1Kg para 30L, indicada no rótulo.

Esse sistema foi abundantemente oxigenado com auxílio de uma bomba de ar, para acelerar o processo de eclosão dos cistos. O sistema foi submetido a temperatura

ambiente (28-32°C) até o período de eclosão das larvas, o qual se completou após cerca de 24/48 horas do início do experimento.

Para eclosão dos cistos, uma quantidade em gramas, cerca de uma colher de chá, de cistos de *Artemia salina* Leach (adquiridos comercialmente) foram adicionados no lado protegido da luz do aquário. Sob um sistema aerado, os cistos se desenvolvem, em uma média de 24 a 48h, e eclodem, passando para a fase de náuplio. Após esse período, os náuplios por apresentarem fototropismo, atravessaram a tela, sendo atraídos pelo lado iluminado do aquário.

Os náuplios foram retirados do aquário e levados para realização imediata dos ensaios de citotoxicidade.

4.2.1.2 Preparação das amostras

Os derivados de tiofeno selecionados para realização dos testes foram pesados analiticamente, cada um com uma massa de 50 mg, e a partir de cada um deles, foram preparadas soluções estoques numa concentração final de 10.000 µg/mL. Os compostos, sob a forma de pó, foram misturados a um tensoativo qs para formar uma pasta, com a finalidade de melhorar solubilidade destes em meio aquoso.

Antes de escolher o tensoativo para ser utilizado nas amostras, foi realizado um teste de solubilidade preliminar em água, utilizando o composto de partida (7CN) e diversos coadjuvantes (tensoativos e solventes orgânicos polares) para avaliar qual traria maiores benefícios (solubilizaria melhor os compostos) quanto a solubilidade. O teste de solubilidade teve três concentrações:

- Concentração 1: 5 mL de água marinha + 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO);
- Concentração 2: 5 mL de água marinha + 0,5 mL de TWEEN 80;
- Concentração 3: 5 mL de água marinha +0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) + 0,05mL de TWEEN 80.

O tensoativo escolhido para a realização dos testes foi o TWEEN 20.

As substâncias, já solubilizadas em Tween 20, foram dissolvidas em um volume suficiente de água salina até completar o volume de 5 mL. Esta se caracterizou como a

solução-mãe com concentração final de 10.000 µg/mL. Partindo desta solução-mãe, foram feitas outras soluções, através de dissoluções seriadas para as concentrações utilizadas nos testes (1000, 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL), retirando sempre uma alíquota de 0,5ml da solução anterior (previamente colocada em ultrassom por um período de 15 minutos) e completando com o volume de 4,5mL de água salina. Depois de preparadas, as soluções foram imediatamente utilizadas nos testes.

Além das concentrações padrões anteriormente definidas, foram ensaiadas, em alguns compostos, concentrações intermediárias com a finalidade de melhor determinar a CL₅₀ do composto em questão.

4.2.1.3 Avaliação da atividade biológica

Para realização dos bioensaios, foram separados dez náuplios de *Artemia salina* recém eclodidos, com o auxílio de pipeta Pasteur, de acordo com procedimento do item anterior, e estes foram adicionados à tubos de ensaio.

Em cada um dos tubos foi adicionado um volume de 0,5ml de cada solução estoque de cada um dos derivados e logo após foi acrescentando um volume de água salina sintética até chegar num volume final de 5mL, de forma que os compostos ensaiados ficassem dissolvidos em 5 diferentes concentrações padrões (1000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL).

Também foi utilizado um tubo controle negativo, contendo apenas o solvente utilizado (TWEEN 20) para dissolver os compostos, água salina e os 10 náuplios.

O controle será usado para se certificarmos que a mortalidade dos náuplios será resultante da toxicidade dos compostos e não devido à falta de alimentação ou outros fatores (CARBALLO et al., 2002).

Todos os testes (tubos), com cada uma das doses testadas foram realizados em quintuplicata e após o período de observação (24 horas) foram contabilizados, o número de náuplios mortos e vivos em cada tubo com auxílio de uma lupa. A determinação da vida ou morte dos animais foi através da verificação visual de suas mobilidades. Náuplios imóveis ou sem mobilidade foram considerados mortos (MICHAEL, THOMPSON & ABRAMOVITZ, 1956).

4.2.1.4 Análise dos dados

Os resultados foram analisados estatisticamente (para cada um dos compostos testados) determinando-se a média da porcentagem de mortes em cada uma das doses, e através de regressão linear foi determinada a CL_{50} (concentração letal média), através do método estatístico PROBIT.

A CL_{50} representa a concentração do composto que tem capacidade de reduzir o população total de náuplios em 50% (ARIFUZZAMAN, KANDAHARY & ISLAM, 2009).

O programa Microsoft Office Excel foi utilizado como suporte para as análises PROBIT.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parte química

A tabela 2 apresenta as principais características físico-químicas dos compostos da série sintetizada.

Tabela 2. Características físico-químicas dos compostos sintetizados.

Composto	Aparência e cor	Rend. (%)	PF (°C)	R _f	F.M.	PM
7CN	Pó marrom claro	55,8	115,2-124,2	0,44 ^a	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ S	192
7CN01	Pó amarelo	57,7	132,5-134	0,77 ^a	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ S	280
7CN02	Pó amarelo	90,4	149-151	0,73 ^b	C ₁₇ H ₁₅ N ₂ SBr	359
7CN03	Pó alaranjado	96,4	169,2-170,7	0,84 ^c	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ S	323
7CN04	Pó amarelo	87,3	204 - 206,15	0,8 ^a	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ SCl ₂	349
7CN05	Pó amarelo	99	176 – 178	0,52 ^b	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ SCl ₂	349
7CN06	Pó amarelo	97	139 – 141	0,41 ^b	C ₂₀ H ₂₃ O ₃ N ₂ S	370
7CN07	Pó amarelo claro	85,4	151,5-151,8	0,66 ^b	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ SCl ₂	349
7CN08	Pó amarelo claro	96,1	195-199	0,53 ^b	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ SCl ₂	349
7CN09	Pó amarelo	94,3	178,5 – 179	0,53 ^b	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ SBr	389
7CN10	Pó alaranjado	93	145-149	0,48 ^c	C ₁₇ H ₁₅ O ₂ N ₃ S	309
7CN11	Pó amarelo	95,3	139-141	0,82 ^c	C ₁₇ H ₁₅ N ₂ SCI	314,5
7CN12	Pó amarelo	99	106-110	0,74 ^c	C ₁₈ H ₁₈ ON ₂ S	310
7CN13	Pó amarelo	73	160-162,5	0,63 ^a	C ₁₇ H ₁₅ N ₂ SF	298
7CN14	Pó amarelo	92,3	118-122	0,66 ^a	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ S	294

LEGENDA: P.F. – Ponto de fusão; R_f – Fator de retenção(solventes hexano:acetato de etila nas concentrações: a)9:1, b)8:2, c)7:3); PM – Peso molecular.

Como podem ser observados na tabela 2, os rendimentos das reações de obtenção dos compostos foram satisfatórios, variando entre 55,8 a 99%, o que demonstra uma grande viabilidade da rota utilizada, associado a uma grande facilidade de purificação, que foi realizada apenas por filtração e lavagem com água destilada dos precipitados obtidos.

A faixa de fusão dos compostos, também foi pequena, oscilando entre 0,3°C a 4°C, (excetuando-se pelo 7CN (1) que possui uma faixa de fusão de 9°C), indicando que a estratégia de purificação foi suficiente e adequada.

Todos os compostos foram obtidos sob forma de pó amorfo, com coloração característica, da maior parte dos produtos foi, amarelo, tendo oscilações entre o amarelo a marrom e laranja.

Os compostos também foram submetidos a técnicas espectroscópicas para a comprovação de suas estruturas. Sendo estas: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , espectroscopia de infravermelho (IV) e espectrometria de massa (MS).

O RMN é um método que consiste na submissão dos compostos estudados a um campo magnético forte, onde tais moléculas irão absorver energia através de núcleos de ^1H ou ^{13}C , e resultando em espectros característicos (SOLOMONS & FRYHLE, 2005).

A técnica de IV tem como resultado um espectro que caracteriza toda a molécula, tendo seus grupos em bandas e frequências características (SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2006).

A espectrometria de massa não utiliza radiação magnética. Esta técnica resulta em espectros com massas de íons que estão relacionados ao peso atômico da molécula usada ou aos fragmentos da molécula característicos (SOLOMONS & FRYHLE, 2005).

Os dados resultantes das caracterizações das moléculas estão descritos nas tabelas 3 (IV), tabela 4 (RMN ^1H), tabela 5 (RMN ^{13}C) e tabela 6 (MS). Cada uma dessas técnicas, respectivamente, está exemplificada através de um espectro (Figuras 8, 9, 10 e 11).

As absorções, do IV, em compostos aromáticos monossustituídos ocorrem em 600-800 cm^{-1} (forte intensidade); aromáticos orto-dissustituídos ocorrem em 600 – 800 cm^{-1} (intensidade forte) e 1000-1200 cm^{-1} (intensidade média); aromáticos para-sustituídos aparecem em 800-1000 cm^{-1} (com intensidade forte) e em 1000-1200 cm^{-1} (com intensidade média). (SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2006).

As nitrilas (R-CN) (presentes em todos compostos) tem a característica da tripla ligação que tem uma absorção de fraca a média. Esta ligação ocorre na faixa de frequência de 2200-2400 cm^{-1} (intensidade média) (SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2006). A ligação C-H alquila aparece em 2853-2962 cm^{-1} , com intensidade de média a forte (SOLOMONS & FRYHLE, 2005).

As ligações das aminas primárias alifáticas (N-H₂) ocorrem com média e fraca intensidade em 3200-3600 cm^{-1} . No espectro de IV do composto 7CN observamos a ligação da amina em 3442-3207 cm^{-1} (Tabela 3). Quanto aos grupos halogênicos, os estiramentos C-Cl ocorrem com intensidade forte em 600-800 cm^{-1} . Os estiramentos C-Br ocorre geralmente com intensidade forte de 600-800 cm^{-1} . As ligações do grupo nitro (O-N-O) em compostos aromáticos aparecem com média intensidade em 1200-1400 cm^{-1} e em forte intensidade em 1400-1600 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2006).

Tabela 3. Dados dos espectros de IV.

COMPOSTO	IV (KBr) (valores em cm^{-1})
7CN	3442,3207 (NH ₂), 2926,2839 (CH alifático), 2202 (CN),
7CN01	3056,2845 (CH alifático), 2220 (CN), 1569 (C=N)
7CN02	2917,2850 (CH alifático), 2225 (CN), 817 (CBr), 1585 (C=N)
7CN03	2924,2844 (CH alifático), 2216 (CN), 1579 (C=N)
7CN04	2925,2846 (CH alifático), 2223 (CN), 795 (CCl), 1588 (C=N)
7CN05	2912 (CH alifático), 2225 (CN), 821, 790 (CCl), 1577 (C=N)
7CN06	2935 (CH alifático), 2214 (CN), 1130,1330 (COC), 1570 (C=N)
7CN07	2924 (CH alifático), 2221 (CN), 779 (CCl), 1577 (C=N)
7CN08	2931 (CH alifático), 2221 (CN), 825 (CCl), 1546 (C=N)
7CN09	2924 (CH alifático), 2221 (CN), 1180,1269 (COC), 817 (CBr), 1579 (C=N)
7CN10	2927 (CH alifático), 2360 (CN), 1338 (NO ₂), 1597(C=N)
7CN11	2920,2851 (CH alifático), 2225 (CN), 822 (CCl), 1561 (C=N)
7CN12	2923 (CH alifático), 2216 (CN), 1164,1251 (COC), 1563 (C=N)
7CN13	2922,2847 (CH alifático), 2219 (CN), 1220 (CF), 1579 (C=N)
7CN14	2912,2846 (CH alifático), 2223 (CN), 1555 (C=N)

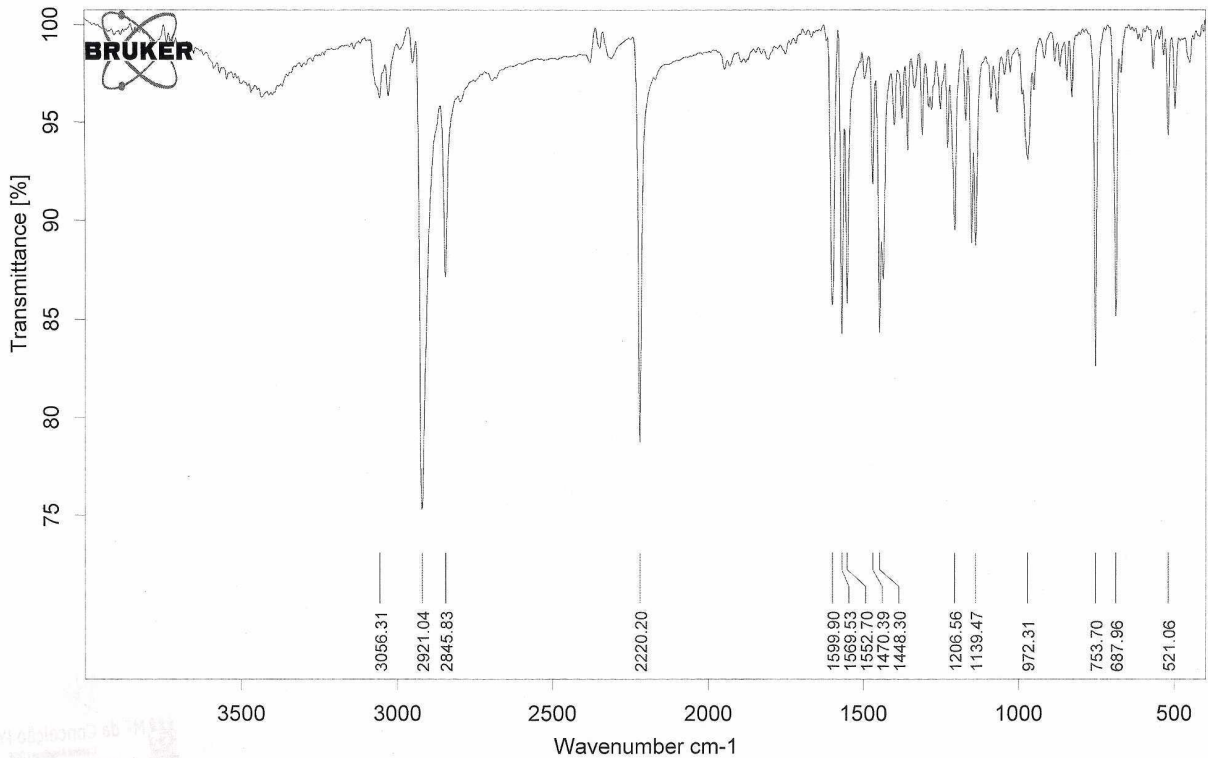


Figura 8. Espectro de infravermelho do composto 7CN01.

Nos espectros de RMN ^1H , os hidrogênios pertencentes ao anel cicloheptano aparecem como uma série de sinais (dois ou três grupos de sinais, a depender da resolução do aparelho utilizado) com deslocamentos químicos entre 1,78 – 2,80 ppm (SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2006). Conforme a tabela 4, valores próximos a esse foram encontrados nos espectros avaliados.

Os hidrogênios presentes nas aminas surgem na região δ 1,0 a 5,0 ppm (SOLOMONS & FRYHLE, 2005). Os hidrogênios da amina presente no composto 7CN teve deslocamento químico de 4,54 ppm.

A região δ 6,0 e 9,0 ppm é característica dos hidrogênios dos aromáticos e heteroaromáticos (SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2006).

Tabela 4. Dados dos espectros de RMN ^1H (δ em ppm).

Comp.	NH_2		Cicloheptano
7CN^b	4,54 (2H, s)		2,53 (4H,m) 1,69-1,74 (6H, m)
Comp.	CH=N	Aromáticos e substituintes	Cicloheptano
7CN01^b	8,47 (1H, s)	7,87-8,08 (2H, m); 7,45-7,56 (3H, m)	2,76-2,92 (4H, m); 1,64-1,84 (6H,m)
7CN02^b	8,40 (1H, s)	7,69-7,78 (2H, s; 2H, s)	2,80-2,93 (4H, m); 1,61-1,84 (6H, m)
7CN03^b	8,31(1H, s)	7,84 (2H, d) $J = 9$ 6,73 (2H, d) $J = 7,7$ 3,11 (6H, s)	2,73 (4H, m); 1,64-1,82 (6H, m)
7CN04^b	8,86 (1H, s)	8,19-8,35 (1H, m) 7,40-7,68 (2H, m)	2,74-2,89 (4H, m); 1,79 (6H, m)
7CN05^a	8,78 (1H, s)	8,29 (1H, d), $J = 8,6$ 7,44 (1H, d), $J = 2$ 7,34 (1H, dd), $J = 2; J = 8,6$	2,78-2,85 (4H m); 1,85-1,90 (2H, m); 1,64-1,75 (4H, m)
7CN06^a	8,30 (1H,s)	7,19 (2H, s) 3,92 (2 OCH ₃ , s); 3,90 (OCH ₃ , s)	2,73-,2,81 (4H, m); 1,61-1,71 (4H, m) 1,84-1,86 (2H, m)
7CN07^a	8,77 (1H, s)	7,39 (2H, d), $J = 7,2$ 7,29 (1H, d), $J = 7,2$	2,80-2,85 (4H, m); 1,84-1,89 (2H, m) 1,63-1,74 (4H, m)
7CN08^a	8,30 (1H, s)	7,97 (1H,d), $J = 1,8$ 7,73 (1H, dd), $J = 1,8; J = 8,4$ 7,51 (1H, d), $J = 8,4$	2,76-2,82 (4H, m); 1,82-1,87 (2H, m) 1,64-1,72 (4H, m)
7CN09^a	8,74(1H, s)	8,28 (1H, d), $J = 2,6$ 7,48 (1H, dd), $J = 2,6; J = 9$ 6,78 (1H, d), $J = 8,8$ 3,87 (OCH ₃ , s)	2,73-2,81 (4H, m); 1,81-1,86 (2H, m) 1,61-1,71 (4H,m)
7CN10^a	8,44(1H, s)	8,28 (2H, d), $J = 8,8$ 8,06 (2H, d), $J = 9$	2,78-2,82 (4H, m); 1,56-1,72 (4H, m) 1,83-1,88 (2H,m)
7CN11^a	8,34 (1H, s)	7,83 (2H, d), $J = 8,4$ 7,40 (2H, d), $J = 8,4$	2,73-2,81 (4H, m); 1,81-1,86 (2H, m) 1,66-1,71 (4H, m)
7CN12^a	8,33 (1H, s)	7,86 (2H,d), $J = 8,8$ 6,94 (2H, d), $J = 8,8$ 3,85 (OCH ₃ , s),	2,74-2,77 (4H, m); 1,78-1,86 (2H, m) 1,65-1,70 (4H, m)

^a200 Hz, ^b60 Hz

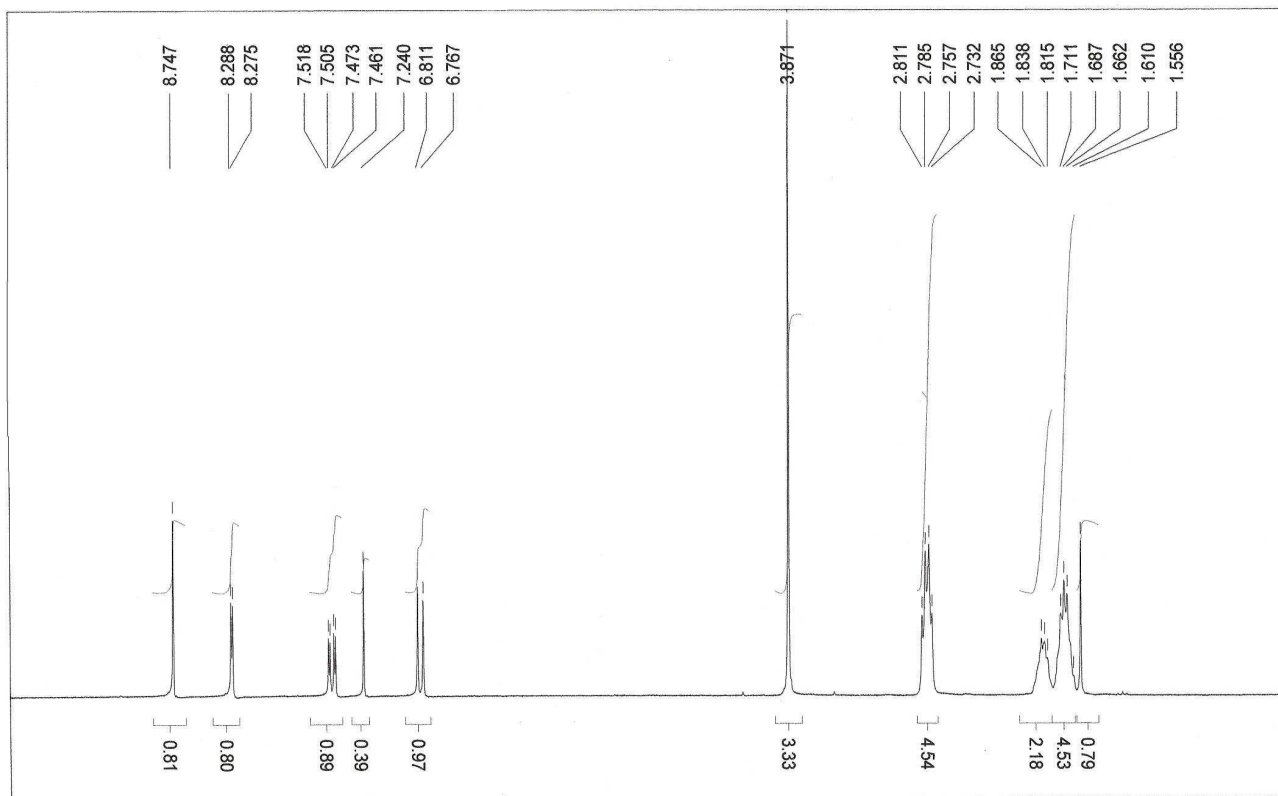


Figura 9. Espectro de RMN H^1 do composto 7CN09.

Através dos espectros de RMN ^{13}C avaliados pode-se confirmar a quantidade de carbonos presente em cada uma das moléculas. A quantidade de carbonos totais do 7CN06 pode variar entre 17 e 19 carbonos, dependendo da absorção dos carbonos homotópicos da molécula. No espectro do 7CN06 foram encontrados um total de 17 carbonos. No espectro do 7CN08 foram encontrados um total de 16 carbonos.

Tabela 5. Dados dos espectros de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz).

Composto	Deslocamentos químicos (δ em ppm)
7CN06	26,00-31,99; 56,25; 59,26; 106,23; 108,68; 115,04; 130,48; 135,88; 140,18; 141,57; 153,48; 157,48; 158,38.
7CN08	26,98; 27,66; 29,05; 30,59; 31,87; 110,22; 114,67; 127,92; 130,45; 130,85; 133,36; 134,94; 136,35; 137,29; 140,49; 155,52.

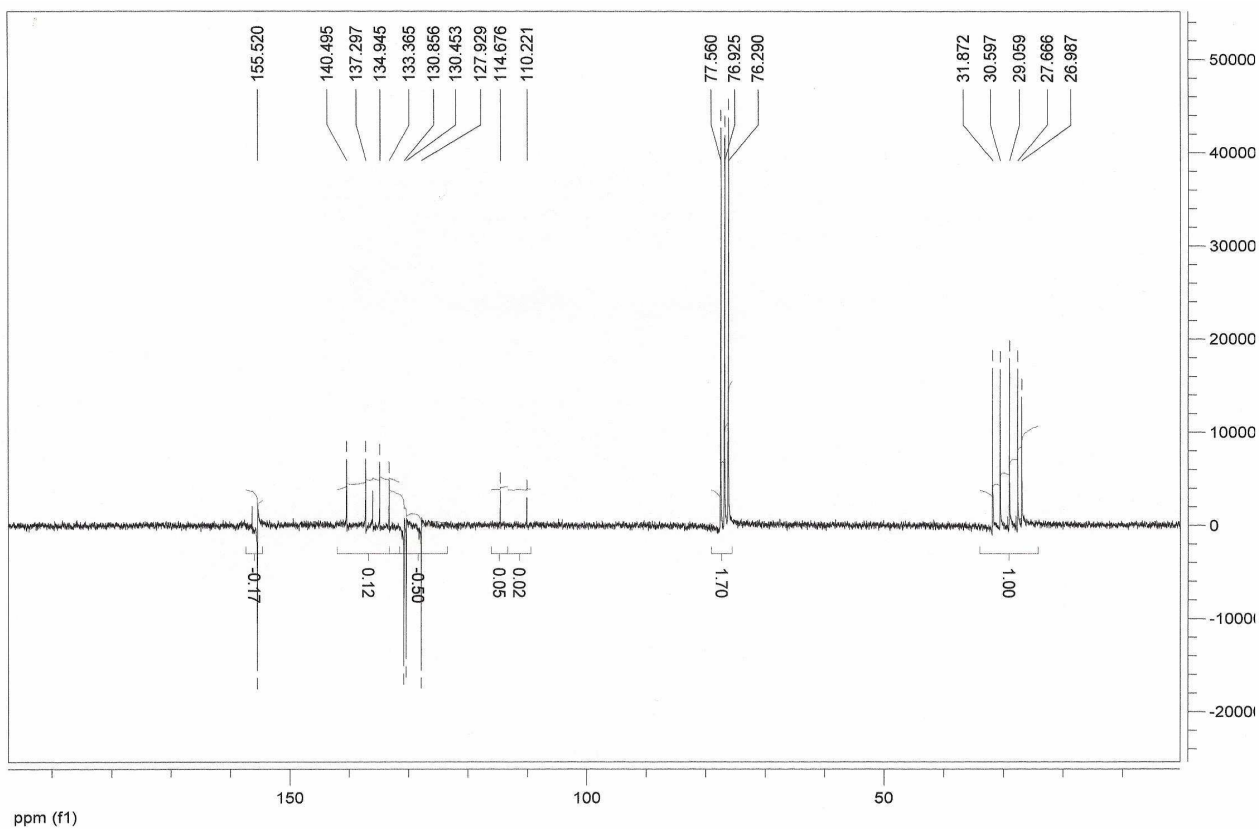


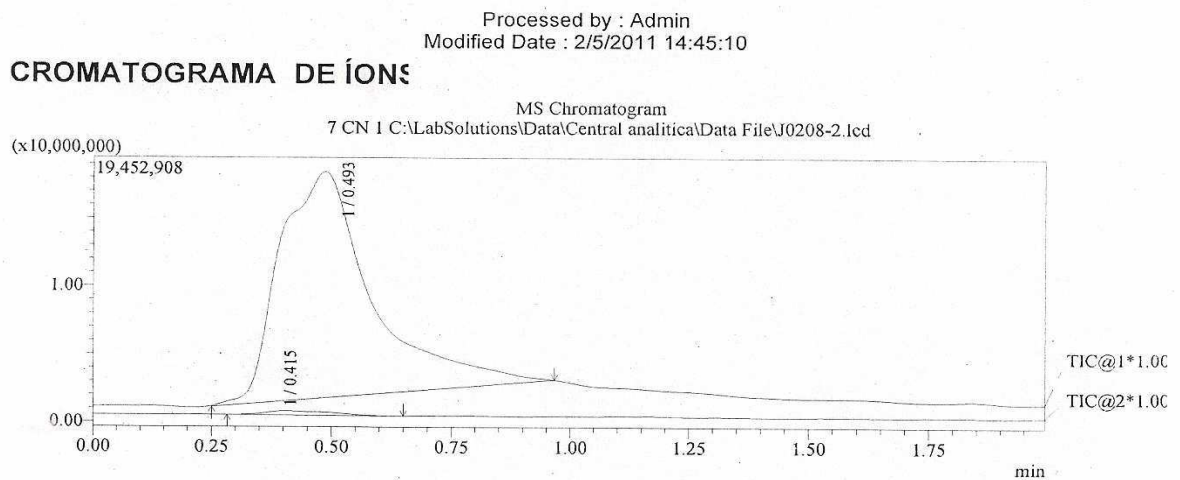
Figura 10. Espectro de RMN de C^{13} do composto 7CN08.

Na tabela 6 observa-se que todos os compostos tiveram uma diferença entre a massa calculada e a massa encontrada de seus íons moleculares menor ou igual a 0,3, dado que comprova a estrutura molecular dos compostos, e que demonstra que o íon molecular é de fato um íon estável.

Tabela 6. Dados referentes às massas exatas dos íons moleculares. Valores obtidos e calculados.

Composto	Massa calculada	Massa encontrada ^a
7CN	192,2817	193,0774*
7CN01	280,3889	281,1089*
7CN02	359,2851	359,0152
7CN03	323,4567	324,1484*
7CN04	349,2795	349,0304
7CN11	314,8342	315,0690*
7CN12	310,4149	311,1171*
7CN13	298,3794	299,0996*
7CN14	294,4155	295,1242*

*M + 1; ^a íons moleculares encontrados com aparelho em modo positivo.



ESPECTRO DE MASSAS

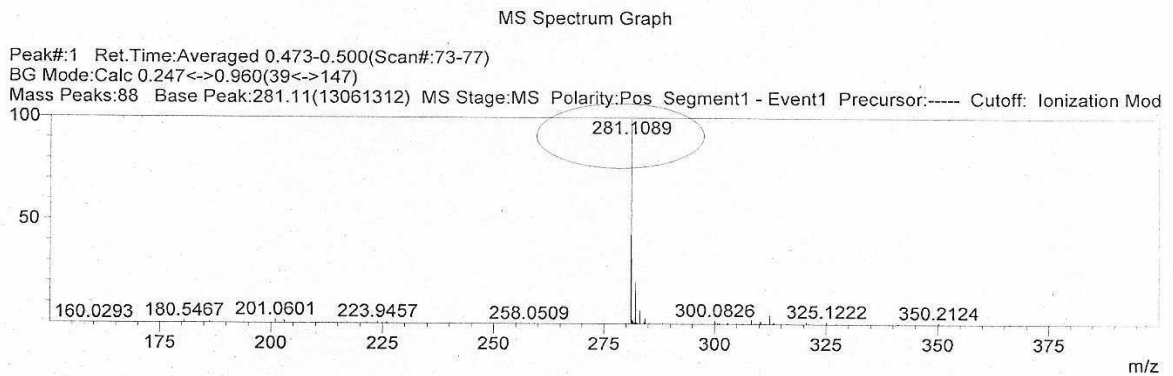


Figura 11. Espectro de Massa do composto 7CN01.

Através desses espectros, podemos comprovar a estrutura química dos compostos assim como avaliar a sua pureza, demonstrando assim que a síntese resultou nos produtos desejados.

5.2 Parte biológica

Para realização dos ensaios biológicos, os aquários que foram utilizados como aparatos para eclosão dos cistos de *A. salina* foram construídos e demonstraram serem eficazes para tal tarefa. A água do mar artificial foi preparada a partir do sal marinho sintético, e apresentou-se como um ótimo meio de cultura para os náuplios de artemia.

Os cistos de artêmias adquiridos foram testados inicialmente em relação a sua capacidade de eclodir, colocando uma quantidade de 1 grama de cistos no aparato com 500ml de água salgada artificial. Quase todos cistos colocados eclodiram, evidenciando que os tais cistos são úteis para os futuros experimentos.

Anteriormente a realização dos ensaios de citotoxicidade propriamente ditos, foi necessária a realização de adaptações do método proposto por Meyer e colaboradores (1982) visto que, as moléculas desse trabalho apresentam característica hidrofóbica, sendo, portanto insolúveis em água, o que poderia inviabilizar o estudo.

Utilizou-se um tensoativo para solubilizar as moléculas sintetizadas em meio aquoso. Antes da escolha deste, foram realizados teste com o composto 7CN, tensoativos e solventes orgânicos polares (juntamente com água marinha), a fim de encontrar a melhor solução e substância capaz de melhorar a solubilidade da amostra. Os resultados encontrados com tais testes estão descritos no tabela 7.

Tabela 7. Teste de solubilidade preliminar com o 7CN (1).

Composto 7CN		
Concentração	Precipitação	Coloração/aparência
C¹	Sim	Esbranquiçada
C²	Não	Amarela clara transparente
C³	Sim	Esbranquiçada turva

C¹ DMSO e água marinha; C² TWEEN 80 e água marinha e C³; TWEEN 80, DMSO e água marinha.

Como visto na tabela 7, a solução que utilizava o TWEEN 80 (C²) foi a que obteve melhor resultado. A partir do observado no ensaio de solubilidade do 7CN, podemos inferir que a série apresenta pouca solubilidade, apenas sendo um pouco mais solúvel com o tensoativo TWEEN 80.

Posteriormente, foi realizado o mesmo teste com o tensoativo TWEEN 20, e este apresentou resultados ainda mais satisfatórios, quanto a solubilização das amostras, sendo assim usado como coadjuvante padrão nos testes subseqüentes.

Após a realização dos ensaios, que em suma caracterizam-se pela exposição dos animais às diferentes concentrações dos compostos com posterior contagem no número de animais vivos e mortos em cada tubo após 24 horas, os dados obtidos foram agrupados em tabelas, como está exemplificado na tabela 8 pelos compostos 7CN03, 7CN09 e 7CN10.

Os dados usados para a confecção dos gráficos de regressão linear foram: a concentração testada, a porcentagem do número de animais mortos em cada concentração, o logaritmo de cada concentração e o valor PROBIT relativo ao percentual de animais mortos (valor retirado da tabela preconizada por FINNEY, 1947).

Tabela 8. Dados dos testes com artêmias com os compostos 7CN03, 7CN09 e 7CN10.

Concentração (µg/mL)	Porcentagem de náuplios mortos	Log da concentração	PROBIT
7CN03			
1000	40	3	4,75
100	12	2	3,82
1	4	0	3,25
0,1	2	-1	2,95
7CN09			
1000	24	3	4,29
100	8	2	3,59
10	4	1	3,25
1	4	0	3,25
0,1	1	-1	2,67
7CN10			
1000	100	3	8,09
200	94	2,30103	6,55
100	40	2	4,75
50	48	1,69897	4,95
10	1	1	2,67

Correlacionando os valores do PROBIT com o logaritmo das concentrações, tivemos como resultado um gráfico de regressão linear para cada composto testado. A seguir temos exemplares de alguns gráficos resultantes para os compostos 7CN03, 7CN09 e 7CN10. (Gráficos 1, 2 e 3).

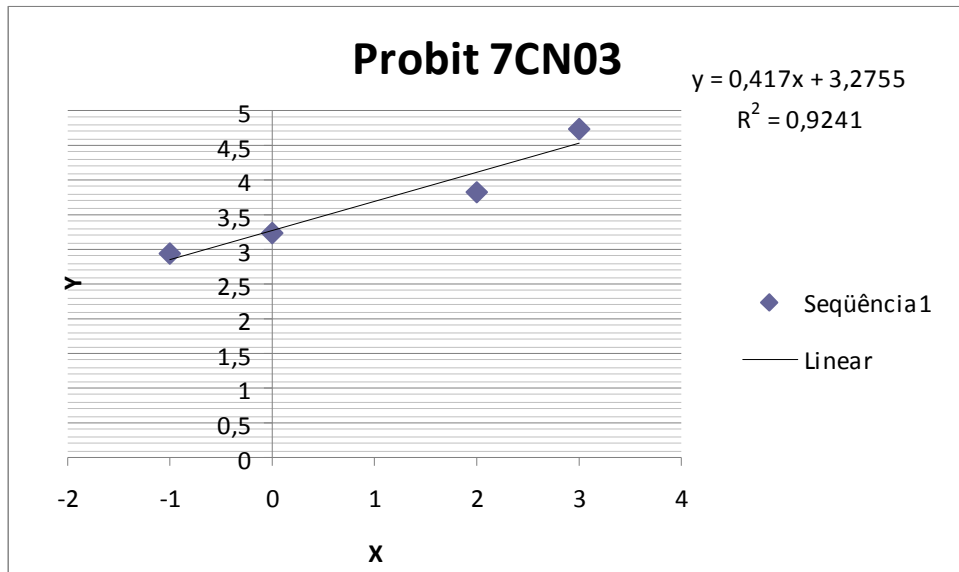
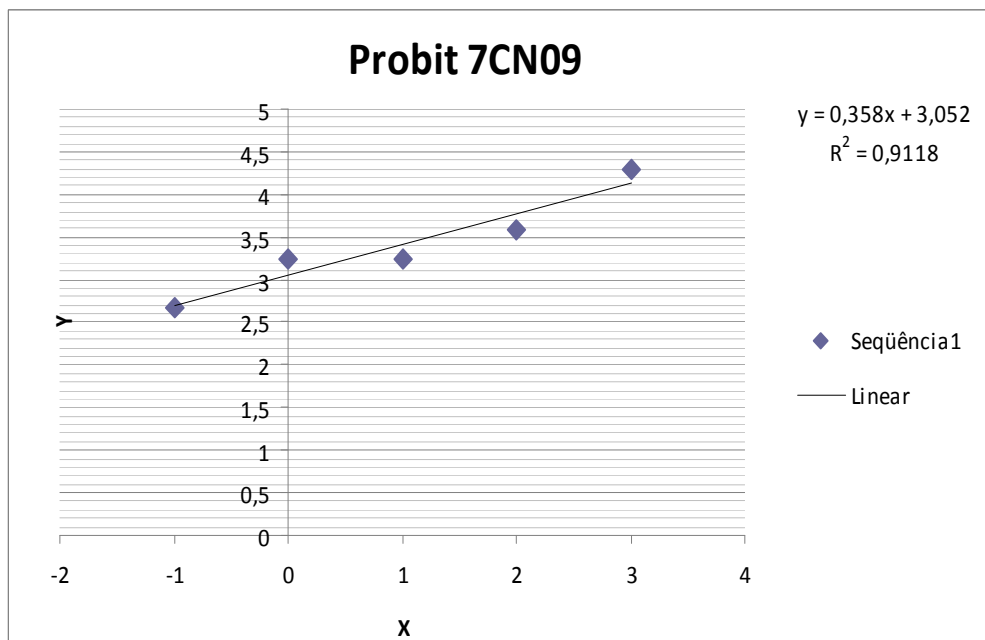
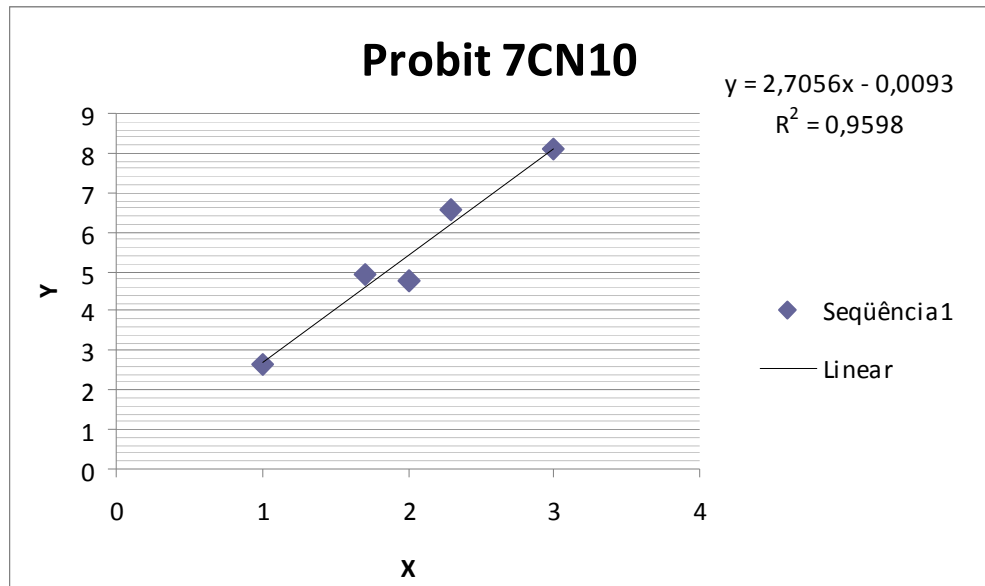
Gráfico 1. Gráfico de regressão linear PROBIT para o composto 7CN03.**Gráfico 2.** Gráfico de regressão linear PROBIT para o composto 7CN09.

Gráfico 3. Gráfico de regressão linear do PROBIT para o composto 7CN10.



Como visto nos gráficos que se seguiram, os valores dos coeficientes de linearidade (R^2) apresentaram-se, em sua grande maioria das vezes, superiores a 0,9, o que indica uma forte correlação entre as duas variáveis presentes no gráfico (X log e Y probit), e nos comprova que a linha de tendência nos gráficos são bastante confiáveis.

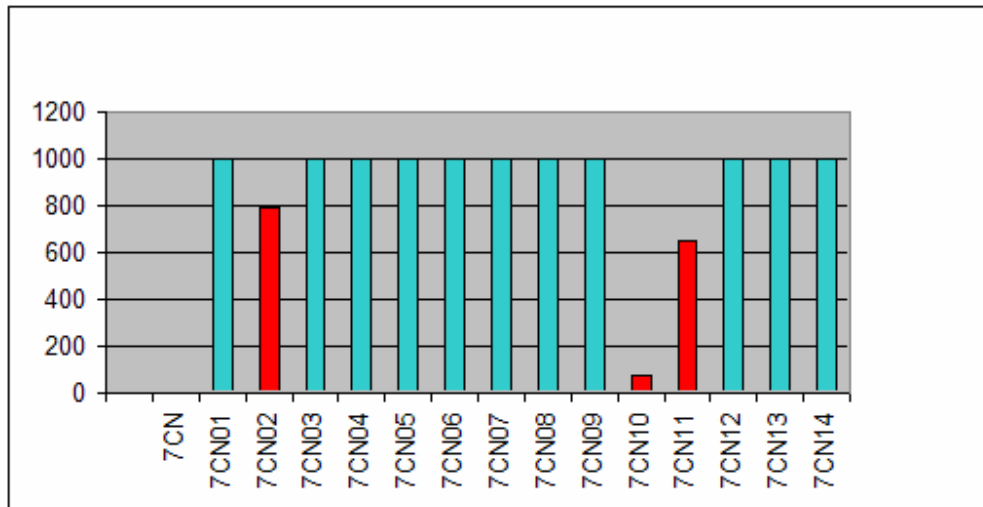
Observam-se também nos gráficos de regressão linear a proximidade dos pontos a linha de tendência, o que mostra um baixo desvio padrão e uma boa correlação entre as variáveis estudadas.

Utilizando as equações das retas geradas a partir dos gráficos é possível se determinar o valor das CL_{50} , promovendo a substituição do valor de “Y” por 5, que corresponde a dose onde obtêm-se 50% de sobrevivência da população. O antilogaritmo do valor encontrado de “X” corresponde ao valor da CL_{50} .

Calculados os valores de CL_{50} , foram elaborados gráficos de barra comparando os diversos grupos dentro na mesma série.

No gráfico 4 temos todas as CL_{50} dos compostos da série, onde as barras azuis representam aqueles compostos que obtiveram como CL_{50} valores maiores que $1000\mu\text{g/mL}$, e as barras vermelhas os valores reais menores que $1000\mu\text{g/mL}$.

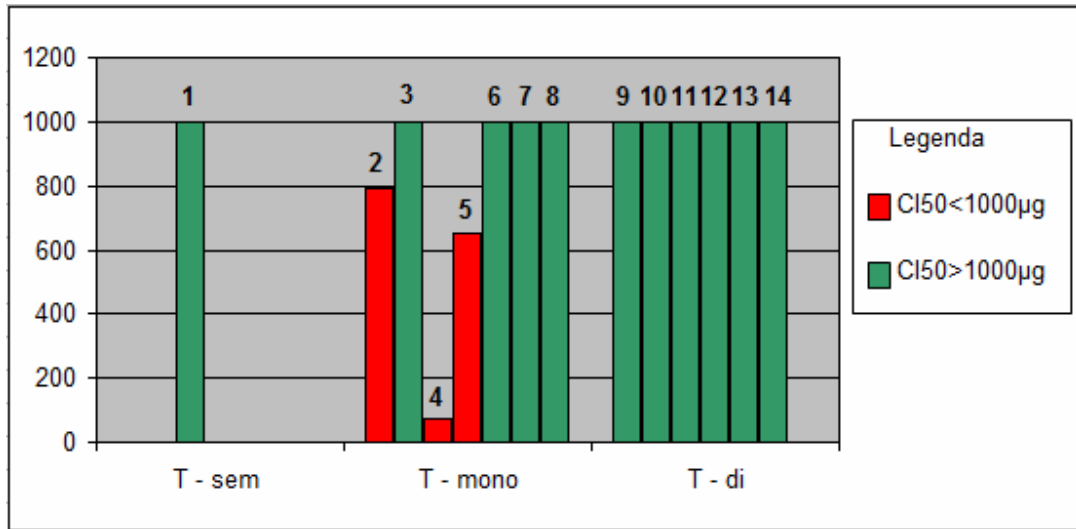
Gráfico 4. Comparação de todas CL_{50} da série estudada.



Dentre os compostos testados, apenas o 7CN, 7CN02, 7CN10 e 7CN11 apresentaram CL_{50} inferiores a $1000\mu\text{g/mL}$, e puderam ter os valores determinados com exatidão, sendo respectivamente: 10,35, 789,49, 71,03 e $652,57\mu\text{g/mL}$.

No gráfico 5 foram comparadas as citotoxicidades com o padrão de substituição do benzilideno para os compostos finais. Os compostos foram separados em: grupos sem substituição, monossustituídos e dissustituídos. As barras em vermelho demonstram as $CL_{50} < 1000\mu\text{g/mL}$, e as barras em verde são os compostos que possuem CL_{50} superiores a $1000\mu\text{g/mL}$, onde: compostos sem substituição: **1** = 7CN01; monossustituídos: **2** = 7CN02, **3** = 7CN03, **4** = 7CN10, **5** = 7CN11, **6** = 7CN12, **7** = 7CN13, **8** = 7CN14; dissustituídos: **9** = 7CN04, **10** = 7CN05, **11** = 7CN06, **12** = 7CN07, **13** = 7CN08 e **14** = 7CN09.

Gráfico 5. Gráfico comparativo das CL_{50} entre os grupos: sem substituição, monossubstituídos e os dissustituídos.

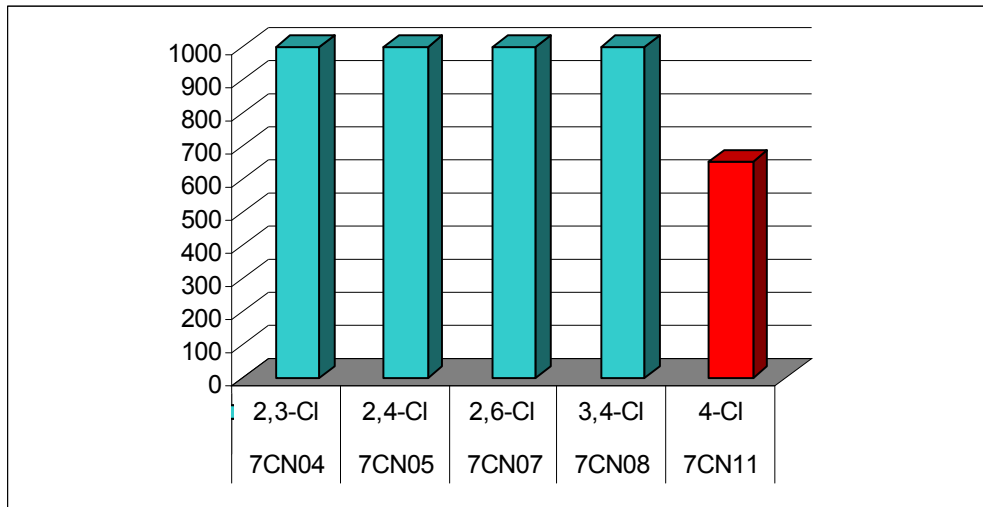


No gráfico 5, observamos a prevalência das CL_{50} acima de $1000 \mu\text{g/mL}$ no grupo dos composto dissustituídos. Nos monossustituídos, os compostos que possuíram maiores toxicidades foram respectivamente: 7CN10 ($71,03 \mu\text{g/mL}$), 7CN11 ($652,57 \mu\text{g/mL}$) e 7CN02 ($789,49 \mu\text{g/mL}$), os demais se mostraram atóxicos ao teste com artêmias dentro das doses testadas.

A adição de grupamentos metila aumenta hidrofobicidade da molécula, diminuindo a solubilidade em meio aquoso. Esta característica aumenta a solubilidade em membranas biológicas (THOMAS, 2003). O composto 7CN014, que possui um grupamento metila substituído no anel aromático, atingiu uma CL_{50} maior que $1000 \mu\text{g/mL}$. Esse valor pode ser resultante de uma menor solubilidade em meio aquoso, e conseqüente maior sobrevivência dos animais testados.

No gráfico 6 comparamos todos os compostos que apresentavam o grupo benzilideno substituído com átomos de cloro.

Gráfico 6. CL₅₀ dos compostos substituídos no anel aromático com átomos de cloro.



Os compostos dissustituídos com o átomo de cloro apresentaram CL₅₀ atóxicos, ou seja, valores superiores a 1000µg/mL, enquanto que o derivado 7CN11, que possui uma monossustituição com o cloro, apresentou valor de CL₅₀ de 652,57µg/mL, sendo uma molécula mais tóxica.

Os halogênios aumentam a hidrofobicidade dos compostos e conseqüente melhoram a entrada da molécula em membranas biológicas (THOMAS, 2003). Os compostos diclorados (7CN04, 7CN05, 7CN07 e 7CN08) apresentaram uma CL₅₀ > 1000 µg/mL. Uma hipótese que pode ser usada nesse caso é que com o aumento da solubilidade em meio lipídico, essas moléculas não solubilizaram bem no meio aquoso que se encontravam, dificultando assim a entrada nos organismos, matando poucos indivíduos, e obtendo uma CL₅₀ > 1000 µg/mL.

O Flúor é um átomo diferenciado dentre os halogênios. Ele tem a característica ser mais hidrofílico que os outros halogênios. Essa propriedade pode ser explicada através da capacidade do flúor realizar ligações de pontes de hidrogênio com a água, sendo assim mais solvatado pela água e, portanto o deixando mais hidrofílico. E quando substitui-se um átomo de H por um de F, a molécula se torna mais hidrofóbica em relação ao hidrogênio, porém o F se torna mais hidrofílico em relação a outros halogênios (WERMUTH, 2008).

Essa hidrofiliçidade facilita a dispersão da molécula, na qual ele está inserido, em meio aquoso, porem deve dificultar a entrada dessa molécula nas membranas biológicas. Esse fato deve ter influenciado a CL_{50} ($> 1000 \mu\text{g/mL}$) do composto 7CN13, substituído com o radical flúor.

O composto 7CN02, substituído também com um halogênio: o 4-bromo apresentou, perfil de citotoxicidade semelhante ao derivado 4-cloro (7CN11), com CL_{50} inferior a $1000 \mu\text{g/mL}$ ($789,49 \mu\text{g/mL}$).

A outra molécula que apresentava substituição com átomo de bromo era a 7CN09. Entretanto, a substituição concomitante com outro radical (metoxila) resultou em um composto atóxico ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), apesar do grupo metoxila, já haver sido relatado como grupamento tóxico para organismos aquáticos (SIR, 2011).

Também obtivemos os valores de ED_{50} através das CL_{50} encontradas. ED_{50} é a dose efetiva que elimina 50% da população de organismos testados. É importante determiná-la, pois essa dose determina a quantidade de droga máxima que pode ser usada nos testes sem que mate os animais testados (JACOBI, 1975). A determinação da ED_{50} é útil em estudos farmacológicos, correlacionando a dose da droga com a resposta de vida do animal.

Estudos com *A. salina* demonstram que as drogas com os valores de CL_{50} inferiores a $1000 \mu\text{g/mL}$ podem ser futuras drogas antineoplásicas (FERRAZ et al., 2009). A ED_{50} desses compostos com propriedades antitumorais podem ser determinadas a partir de 1/10 desses valores de CL_{50} (MCLAUGHLIN, ROGERS & ANDERSON, 1998).

Os valores de ED_{50} foram estimados a partir de 1/10 dos valores de CL_{50} resultantes dos testes com artêmias (Tabela 9). Logo, para valores de CL_{50} maiores que $1000 \mu\text{g/mL}$, teremos uma dose efetiva a 50% (valores de ED_{50}) maiores que $100 \mu\text{g/mL}$. E, para àquelas moléculas que apresentaram valores de CL_{50} inferiores a $1000 \mu\text{g/mL}$, os valores de ED_{50} puderam ser determinados com exatidão.

Tabela 9. Valores obtidos de ED₅₀ e os valores de CL₅₀ dos compostos testados.

Composto	Substituintes	CL₅₀ (µg/mL)	ED₅₀ (µg/mL)
7CN	-	10,35	1,035
7CN01	H	> 1000	> 100
7CN02	4-Br	789,49	78,949
7CN03	4- N(CH ₃) ₂	> 1000	> 100
7CN04	2,3-Cl	> 1000	> 100
7CN05	2,4-Cl	> 1000	> 100
7CN06	3,4,5-OCH ₃	> 1000	> 100
7CN07	2,6-Cl	> 1000	> 100
7CN08	3,4-Cl	> 1000	> 100
7CN09	5-Br, 2-OCH ₃	> 1000	> 100
7CN10	4-NO ₂	71,03	7,103
7CN11	4-Cl	652,57	65,257
7CN12	4-OCH ₃	> 1000	> 100
7CN13	4-F	> 1000	> 100
7CN14	4-CH ₃	> 1000	> 100

6. CONCLUSÃO

Quinze moléculas foram sintetizadas com bons rendimentos (55,8% a 99%), sendo a sua obtenção através de métodos fáceis, que não exigiram purificações difíceis, demonstrando-se assim uma série viável.

Todos os compostos tiveram suas estruturas químicas comprovadas através de diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométrica.

A série sintetizada apresentou pouca solubilidade em meio aquoso, necessitando de um tensoativo capaz de solubilizá-la nos testes biológicos. O TWEEN 80 e o TWEEN 20 apresentaram um melhor poder de solubilização, sendo o TWEEN 20 o escolhido para ser usado nos testes com artêmias.

Quanto os ensaios biológicos com artêmias, a metodologia adaptada mostrou-se apta e viável para a realização dos experimentos.

Os testes biológicos foram ótimos avaliadores da citotoxicidade dos compostos, tendo estes uma moderada a fraca toxicidade. Das quinze moléculas sintetizadas, apenas quatro (7CN, 7CN02, 7CN10 e 7CN11) tiveram um indicativo de toxidez, com CL_{50} menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$. O composto de partida, 7CN, foi o composto que obteve maior toxicidade, com CL_{50} de 10,35 $\mu\text{g/mL}$. As outras onze moléculas obtiveram CL_{50} maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$, sendo assim consideradas atóxicas.

A partir dos valores determinados de CL_{50} , foi possível a determinação da ED_{50} dos compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, T. M. A.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro. v. 95, n.3, p. 367-373, 2000.

ARHIN, F.; BÉLANGER, O.; CIBLAT, S.; DEHBI, M.; DELORME, D.; DIETRICH, E.; DIXIT, D.; LAFONTAINE, Y.; LEHOUX, D.; LIU, J.; McKAY, G. A.; MOECK, G.; REDDY, R.; ROSE, Y.; SRIKUMAR, R.; TANAKA, K.S.E.; WILLIAMS, D.M.; GROS, P.; PELLETIER, J.; PARR, T.R.; RAFAI FAR, A. Triaminotriazine DNA helicase inhibitors with antibacterial activity. **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v.16, p.1286-1290, 2006

BARALDI, P. G.; PAVANI, M. G.; LEUNG, E.; MOORMAN, A. R.; VARANI, K.; VINCENZI, F.; BOREA, P. A.; ROMAGNOLI, R. Synthesis and biological characterization of [3H](2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophen-3-yl)-(4-chlorophenyl)-methanone, the first radiolabelled adenosine A1 allosteric enhancer. **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v. 16, p. 1402–1404, 2006.

CALDWELL, G. S.; BENTLEY, G. B.; OLIVE, P. J. W. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. **Toxicon.** v. 42, p. 301–306, 2003.

CALLIGARO, D. O.; FAIRHURST, J.; HOTTEN, T. M.; NICHOLAS A. MOORE, N. A.; TUPPER, D. E. The Synthesis and Biological activity of some known and putative metabolites of the atypical antipsychotic agent olanzapine (Ly170053). **Bioor. Med. Chem. Lett.**, vol. 7, n. 1, p. 25-30, 1998.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology.** v. 2, n. 17, p 1-5, 2002.

CARVALHO, F. G.; DESTEFANI, A.; FANTIN, L. H.; GALINDO, L. A.; RICARDO, T. M.; SOUZA, J. Z. ARTÊMIA COMO BIOINDICADOR. In: MOSTRA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA (MCT), 6., 2007, Araquari. **Resumo expandido**. Araquari: Instituto Federal Catarinense- Cefet-sc, 2007. Disponível em: <<http://ifc-araquari.edu.br/1/mct/2007/saude/saude3.pdf>>. Acesso em: 24 fev. 2011.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* LEACH. **Quim. Nova**. v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

CHAKRABARTI, J. K.; HORSMAN, L.; HOTTEN, T. M.; PULLAR, I. A.; TUPPER, D. E.; FRANCESCA C. WRIGHT, F. C. 4-Piperazinyl-10*H*-thieno[2,3*b*][1,5]benzodiazepines as potential neuroleptics. **J. Med. Chem.** vol. 23, n.8, p.878-884, 1980.

CHAKRABARTI, J. K.; HOTTEN, T. M.; TUPPER, D. E. 2-Methyl-thieno-benzodiazepine. **US Patent** n° 5,229,382; 20 jul 1993.

CUADRA, P.; FURRIANCA, M.; OYARZÚN, A.; YÁÑEZ, E.; GALLARDO, A.; FAJARDO, V. Biological activity of some Patagonian plants. **Fitoterapia**. v. 76, p. 718-721, 2005.

DALLEMAGNE P.; KHANH, L. P.; ALSAÏDI, A.; VARLET, I.; COLLOT, V.; PAILLET, M.; BUREAU, R.; RAULT, S. Synthesis and biological evaluation of five-membered heterocycles fused to cyclopenta[*c*]thiophene as new antitumor agents. **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v. 11, p.1161-1167, 2003.

DUFFY, J.L.; KIRK, B.A.; KONTEATIS, Z.; CAMPBELL, E.L.; LIANG, R.; BRADY, E. J.; CANDELORE, M.R.; DING, V.D.H.; JIANG, G.; LIU, F.; QURESHI, S.A.; SAPERSTEIN, R.; SZALKOWSKI, D.; TONG, S.; TOTA, L.M; XIE, D.; YANG, X.; ZAFIAN, P.; ZHENG, S.; CHAPMAN, K.T.; ZHANG, B.B.; TATA, J.R. Discovery and investigation of a novel class of thiophene-derived antagonists of the human glucagon receptor. **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v.15, p.1401-1405, 2005.

EDWARDS, L. H. Fungicidal 2-(N-haloalkylthiosulfonamido)-thiophenes. **US Patent** n° 3,991,081; 9 nov. 1976.

FAKHR, I. M.; RADWAN, M. A.; EL-BATRAN, S.; ABD EL-SALAM, O. M.; EL-SHENAWY, S. M. Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted benzo[b]thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** . v.44, n. 4, v. p. 1718-25, 2008.

FERRAZ, K. O. ; WARDELL, S. M. S. V. ; WARDELL, J. L. ; LOUROC, S. R. W ; BERALDO, H. Copper(II) complexes with 2-pyridineformamide-derived thiosemicarbazones: Spectral studies and toxicity against *Artemia salina*. **Spectrochimica Acta Part A**. v.73, p. 140-145, 2009.

FERREIRA, I. C. F. R.; CALHELHA, R.C.; ESTEVINHO, L.M.; QUEIROZ, M.-J.R.P. Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[b]thiophenes series: a structure-activity evaluation study. **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v. 14, p. 5831-5833, 2004.

FINNEY, D. J. Probit Analysis: A statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve. Cambridge: Cambridge University Press, p.256, 1974.

GEWALD, K. 2-Amino-thiophene aus α -Oxo-mercaptanen und Methylenaktiven Nitrile. **Chem Ber.** p. 3571-7, 1965.

GEWALD, K.; SCHINKE, E.; BÖTTCHER, H. 2-Amino-thiophene aus Methylenaktiven Nitrile, Carbonylverbindungen und Schwefel. **Chem Ber.** p. 94-9, 1966.

GUL, M. **Cytotoxic and antifungal acetophenone-derived mannich bases:** Effects on redox thiols and heat shock proteins. 2005. 68 f. Doutorado - Curso de Medicina, Departamento de Fisiologia, Universidade de Kuopio, Kuopio, 2005.

GÜTSCHOW, M.; NEUMANN, U. Novel thieno[2,3-d][1,3]oxazin-4-ones as inhibitors of human leukocyte elastase. **J. Med. Chem.**, v.41, p.1729-1740, 1998.

HARRINGTON, J.K.; MOORE, G.L.; GERSTER, J.F. Thiophene derivatives, **US Patent** n° 3,696,122; 3 out. 1972.

HAWSKEY, D.; GRIFFIN, D.A.; LEEPER, F.J. Synthesis of 3-deazathiamine. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, v.1, p.144-148, 2001.

HIROTA, Y.; SHINHANA, K.; SATO, K.; WADA, T. Thiophene derivatives, **US Patent** n° 4,454,131; 12 jun. 1984.

HUANG, Y.; DÖMLING, A. The Gewald multicomponent reaction. **Mol Divers.** v.15, p.3-33, 2011.

IQBAL, A. ; SIDDIQUI, H. L. ; ASHRAF, C. M. ; BUKHARI, M. H. ; AKRAM, C. M. Synthesis, Spectroscopic and Cytotoxic Studies of Biologically Active New Schiff Bases Derived from p-Nitrobenzaldehyde. **Chem. Pharm. Bull.** v.55, n.7, p.1070-1072, 2007.

JACOBI, W. The concept of effective dose - A proposal for the combination of organ doses. **Radiat. Environ. Biophys.** v.12, n.2, p. 101–109, 1975.

JIN, W.; SHI, Q.; HONG, C.; CHENG, Y.; MA, Z.; QU, H. Cytotoxic properties of thiophenes from *Echinops grijissi* Hance. **Phytomedicine.** v.15, n.9, p. 768–774, 2008.

LEMONTE, A. J.; VANEGAS, L. H. Una comparación entre la inferencia basada en las estadísticas de Wald y razón de verosimilitud en los modelos logit y probit vía Monte Carlo. **Rev. Colomb. Estad.**, Bogotá, v. 28, n. 1, p. 77-96, 2005.

LIMA, J. M ET AL. SILVA, C. A.; ROSA, M. B.; SANTOS, J.B.; OLIVEIRA, T.G.; SILVA, M.B. Prospecção Fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**. v. 27, n. 1, p. 7-11, 2009.

LUKEVICS, E.; ARSENYAN, P.; SHESTAKOVA, I.; ZHARKOVA, O.; KANEPE, I.; MEZAPUKE, R.; PUDOVA, O. Cytotoxic Activity silyl- and germyl-substituted 4,4-dioxo-3a,6a-dihydrothieno[2,3-d] isoxazolines-2. **Metal-Based Drugs**. v. 7, n. 2, p. 63 - 66, 2000.

MAYORGA, P.; PÉREZ, K. R.; CRUZ, S. M.; CÁCERES, A.; Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.20, n.2, p. 897-903, 2010.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**. v.32, p.513-524, 1998.

MEYER, B. N. ; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**. v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. 1956. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. **Science**. v. 123, p.464, 1956.

MILANI, M. G.; ZIOLLI, R. L. Avaliação do Potencial Tóxico de novos compostos e de compostos de interesse ambiental através do ensaio de Toxicidade Aguda utilizando *Artemia Salina*. In: XV Seminário de Iniciação Científica Puc-Rio, 15, 2007., Rio de Janeiro. **Resumo expandido**. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2007. p.1-9.

MILANI, M. G.; ZIOLLI, R. L. Avaliação do Potencial Citotóxico de n(4)-para-Toluitiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe(III) e de n-4-metil-

Tiossemicarbazonas e seus complexos de Mn(II) expostos à *Artemia sp.* In: Seminário de Iniciação Científica da Puc-Rio, 16, 2008., Rio de Janeiro. **Resumo expandido.** Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2008.

NIKOLAKOPOULOS, G.; FIGLER, H.; JOEL LINDEN, J.; SCAMMELLS, P. J. 2-Aminothiophene-3-carboxylates and carboxamides as adenosine A1 receptor allosteric enhancers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 14, p. 2358–2365, 2006.

NUNES, B. S. CARVALHO, F. D. ; GUILHERMINO, L. M. ; STAPPEN, G. V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental Pollution.** v. 144, p. 453-462, 2006.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F ; SILVA, D. A.; LIRA, D. P. ; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B. ; Xavier, A. L. ; DINIZ, M. F. F. M. ; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Rev. bras. farmacogn.** v. 18, p. 718-723, 2008.

PADMAJA, R.; ARUN, P.C.; PRASHANTH, D.; DEEPAK, M.; AMIT, A.; ANJANA, M. Brine shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. **Fitoterapia.** v.73, p. 508-510, 2002.

PINTO, E.; QUEIROZ, M.R.P.; VALE-SILVA, L.A.; OLIVEIRA, J.F.; BEGOUIN, A.; BEGOUIN, J.-M.; KIRSCH, G. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry,** v.16, p. 8172-8177, 2008.

PUTEROVÁ, Z.; KRUTOŠÍKOVÁ, A.; VÉGH, D. APPLICATIONS SUBSTITUTED 2-AMINOTHIOPHENES IN DRUG DESIGN. **Nova Biotechnologica.** v.9,n.2, p. 167-173, 2009.

RAM, V. J.; ATUL GOEL, P. K.; SHUKLA, A. K. A. Synthesis of thiophenes and thieno[3,2-c]pyran-4-ones as antileishmanial and antifungal agents. **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v. 7, n. 24, p. 3101-3106, 1997.

SANDMEIER, R.; SECKIMGER, K. Thiophene Derivatives, **US Patent** n° 4,472,425; 18 set. 1984.

SANTOS, A. F.; AZEVEDO, D. P.L.; MATA, R. C. S.; MENDONÇA, D. I. M. D.; SANT'ANA, A. E. G. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina*. **Bioresource Technology**. v.98, p. 135-139, 2007.

SILVA, T. M. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; BATISTA, M. M.; AGRA, M. F.; CAMARA, C. A. Brine shrimp bioassay of some species of Solanum from Northeastern Brazil. **Rev. bras. farmacogn.** v.17, n.1, p. 35-38, 2007.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* –Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**. v.21, n.5, 1998.

SIR: Sistema de Informação Rural. Portal promovido pela Associação de Agricultores da Madeira. Disponível em: <http://www.sir-madeira.org/epages/Sir.sf/pt_PT/?ObjectPath=/Shops/sir-madeira/Products/MetoxiPoliEtoxiPropilHeptametiltrisiloxano>. Acesso em: 12 abr. 2011.

THOMAS, Gareth. **QUÍMICA MEDICINAL**: Uma introdução. Guanabara Koogan, 2003. 432 p.

URREA-BULLA, A.; SUÁREZ, M.; MORENO-MURILLO, B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**. v. 75, p. 392-394, 2004.

VALDERRAMA, J.; FOURNET, A.; VALDERRAMA, C.; BASTIAS, S.; ASTUDILLO, C.; ROJAS DE ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G. Synthesis and in Vitro Antiprotozoal Activity of Thiophene Ring-Containing Quinones. **Chem. Pharm. Bull.** v. 47, n. 9, p. 1221-1226, 1999.

VARÓ, I.; SERRANO, R.; NAVARRO, J.C.; LÓPEZ, F.J.; AMAT, F. Acute lethal toxicity of the organophosphorus pesticide chlorpyrifos to different species and strains of *Artemia*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** v.61, p. 778–785, 1998.

VARÓ, I.; NAVARRO; J. C.; AMAT, F.; GUILHERMINO, L. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. **Chemosphere.** v.48, p. 564-569, 2002.

WERMUTH, Camille Georges (Ed.). **The Practice of Medicinal Chemistry.** 3. ed. AP, 2008.

ZAHAN, K. E.; HOSSAIN, M. S.; SARKAR, S.; RAHMAN, M. M.; FAROOQUE, M. A.; KARIM, M. N.; NAHAR, L.; HOSSAIN, M. A. Evaluation of In vitro antimicrobial and in vivo cytotoxic properties of peroxo coordination complexes of Mg (II), Mn (II), Fe (II) & Ni (II). **Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.** v.3, p. 43-47, 2004.

ANEXO

ANEXO A – ESPECTROS DE INFRAVERMELHOS

