



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

FREDERICO FÁVARO RIBEIRO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NOVOS
DERIVADOS SINTÉTICOS 2-[(BENZILIDENO)AMINO]-4,5,6,7-TETRAIDRO-4H-
BENZO[*b*]TIOFENO-3-CARBONITRILA FRENTE À *Artemia salina***

JOÃO PESSOA – PB

2011

FREDERICO FÁVARO RIBEIRO

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NOVOS
DERIVADOS SINTÉTICOS 2-[(BENZILIDENO)AMINO]-4,5,6,7-TETRAIDRO-4H-
BENZO[*b*]TIOFENO-3-CARBONITRILA FRENTE À *Artemia salina*

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: Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior

João Pessoa– PB

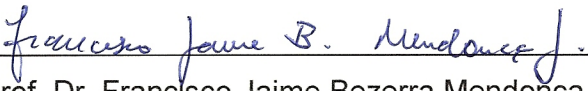
2011


FREDERICO FÁVARO RIBEIRO

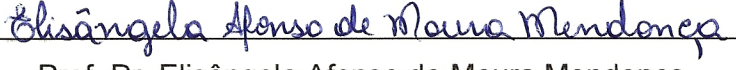
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE FRENTE À
Artemia salina DE NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS 2-[(BENZILIDENO)AMINO]-
4,5,6,7-TETRAIDRO-4H-BENZO[b]TIOFENO-3-CARBONITRILA

Aprovado em 22 de 06 de 2011

BANCA EXAMINADORA


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


Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura
Examinador – UEPB


Prof. Dr. Elisângela Afonso de Moura Mendonça
Examinador – UEPB

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL CAMPUS V – UEPB

R484s

Ribeiro, Frederico Fávaro.

Síntese, caracterização e avaliação da citotoxicidade de novos derivados sintéticos 2-[(benzilideno)amino]-4,5,6,7-tetraidro-4h-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila frente à *Artemia salina* / Frederico Favaro Ribeiro. – 2011.

87f. : il.

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. Benzo[b]tiofeno. 3. Citotoxicidade. I. Título.

21. ed. CDD 595.32

DEDICATÓRIA

A minha avó materna, Nadir, aos meus pais, Silvio e Syuzan, ao meu irmão, Silvio e a minha namorada, Bruna.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior e ao Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, por todo o apoio e conhecimento que me foi passado no decorrer desses anos na graduação, aos meus companheiros de laboratório, Rodrigo, Rayssa e Jaismary, por toda contribuição dada e ao CNPq, PRPGP/UEPB e PIBIC/UEPB pelo apoio financeiro.

“No pain, no gain.”

Rabbi Ben Hei Hei

RESUMO

Compostos tiofênicos vêm se destacando na síntese de novos medicamentos devido sua vasta gama de atividades biológicas associadas. Contudo é necessário conhecer a toxicidade dos mesmos, para que assim seja possível avaliar a viabilidade desses compostos como medicamentos. Uma alternativa aos caros e complexos testes de citotoxicidade é a utilização do microcrustáceo *Artemia salina*, que consiste em um método rápido, barato e eficiente para avaliação de citotoxicidade. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar a síntese, caracterização e avaliação da citotoxicidade frente à *Artemia salina* de novos derivados 2-[(benzilideno)amino]-4,5,6,7-tetraidro-4*H*-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila. Para obtenção dos compostos desejados foi sintetizado inicialmente o intermediário sintético 2-amino-4,5,6,7-tetraidro-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila obtido através da clássica reação de Gewald, fazendo reagir quantidades equimolares de ciclohexanona, malononitrila e enxofre elementar na presença de morfolina como base. Em seguida, esse, teve seu grupo 2-amino condensado a diferentes aldeídos aromáticos, em reação ácido catalisada, fornecendo as iminas finais. Os testes de citotoxicidade com artemias foram baseados na metodologia proposta por Meyer *et al.* (1982) com modificações, onde foram utilizadas 5 diferentes concentrações dos compostos teste: 1000, 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL. Os valores da concentração letal 50% (CL₅₀) foram calculados através do método estatístico PROBIT. Os 14 compostos finais sintetizados foram obtidos com rendimentos variando entre 50 e 96%, apresentando-se sob a forma de pó na cor amarela ou branca e tiveram suas estruturas químicas confirmadas através das análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono (RMN ¹³C), de Infravermelho e espectrometria de massas. Onze compostos tiveram suas citotoxicidades avaliadas frente à *Artemia salina*, onde foi possível observar que 3 foram atóxicos (CL₅₀ > 1000 µg/ml), 4 moderadamente tóxicos (CL₅₀ entre 100 e 800 µg/ml) e 4 muito tóxicos (CL₅₀ entre 0,1 e 100 µg/ml). Dessa forma, conclui-se que a rota sintética utilizada se demonstrou eficaz na síntese dos novos compostos e que os bioensaios com *Artemia salina*, mostraram-se aptos e viáveis para a determinação da CL₅₀ dos derivados.

Palavras-chave: Benzo[*b*]tiofeno, Reação de Gewald, Citotoxicidade, *Artemia salina*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do tiofeno.....	16
Figura 2. Compostos 2-benzo[<i>b</i>]tiofeno substituídos com atividade analgésica e antiinflamatória.....	17
Figura 3. Derivados tiofênicos com atividade anti-inflamatória.....	18
Figura 4. Derivados tiofênicos com atividade antitumoral.....	18
Figura 5. Derivados tiofênicos com atividade antibiótica (I - III) e antimitótica (IV e V).....	19
Figura 6. Tabela de conversão do percentual da média de mortes para o Probit.....	31

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Esquema da reação de Gewald.....	16
Esquema 2. Esquema da reação de Paal-Knorr.....	17
Esquema 3. Reação de obtenção do composto 6CN.....	26
Esquema 4. Rota sintética para obtenção dos novos derivados do tiofeno.....	27
Esquema 5. Mecanismo reacional da reação de Gewald.....	33
Esquema 6. Mecanismo reacional da formação da imina.....	33
Esquema 7. Segunda via de obtenção do 6CN por Gewald <i>et al.</i> (1966).....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Gráfico de dispersão com linha de tendência.....	31
Gráfico 2. Espectro de RMN ^1H do composto 6CN03.....	36
Gráfico 3. Espectro de RMN ^{13}C do composto 6CN09.....	36
Gráfico 4. Espectro de infravermelho do composto 6CN06.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela criada para realizar o cálculo do Probit.....	30
Tabela 2. Características físico-químicas dos compostos sintetizados.....	34
Tabela 3. Valores de CI_{50} frente <i>Artemia salina</i>	41

LISTA DE SIGLAS

CL₅₀	- Concentração Letal 50%
CL₉₀	- Concentração Letal 90%
DL₅₀	- Dose Letal 50%
DMSO	- Dimetilsulfóxido
LDH	- Lactato Desidrogenase
MTT	- Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio
QPT	- Quantificação de Proteínas Totais
R_f	- Fator de retenção
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 COMPOSTOS DERIVADOS DO TIOFENO E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA	16
2.2 CITOTOXICIDADE	19
2.2.1 <i>Artemia salina</i>	21
3 OBJETIVOS	23
3.1. OBJETIVO GERAL	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 METODOLOGIA.....	24
4.1 Materiais e equipamentos.....	24
4.1.1 Reagentes e solventes.....	24
4.1.2 Balança	24
4.1.3 Cromatografia	25
4.1.4 Ponto de fusão	25
4.1.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H) e de Carbono (RMN ¹³ C).....	25
4.1.6. Espectroscopia de Infravermelho.....	25
4.1.7 Espectrometria de massas.....	25
4.1.8 Aparato para avaliação da citotoxicidade.....	26
4.2 SÍNTESE	26
4.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	27
4.4 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	28
4.4.1 Cultivo e coleta.....	28
4.4.2 Compostos testados.....	29
4.4.3 Preparo das amostras	29
4.4.4 Obtenção dos dados	30

4.4.5 Análise dos dados.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	33
5.2 TESTES DE CITOTOXICIDADE	41
6 CONCLUSÕES	44
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	45
8 ANEXOS	51
ANEXO I – Espectros de Infravermelho	52
ANEXO II – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	67
ANEXO III – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono	82

1 INTRODUÇÃO

Em decorrência da resistência microbiana potencializada pelo uso indiscriminado de antibióticos, se torna evidente a necessidade de se desenvolver e descobrir novos compostos que possuam atividade antimicrobiana.

Sendo assim, a síntese de novos medicamentos vem sendo o foco de estudo dos pesquisadores das áreas de farmácia, química e biologia que buscam por novas moléculas bioativas que possam atuar como antibióticos.

Uma estratégia eficaz e muito empregada nessa busca consiste na modificação molecular de agentes antibacterianos preexistentes. Esse processo consiste na modificação química de um composto matriz que possui estrutura química e atividades biológicas bem conhecidas, mantendo seu grupo farmacofórico, para se obter compostos análogos ou homólogos, sem que haja perda das propriedades do composto matriz (MONTANARI, 1995), ou seja, como a resistência consiste no reconhecimento da estrutura do fármaco pelos microorganismos, realizar uma substituição ou adição de algum grupamento químico (Radical) em um antibiótico já existente, pode garantir que esse medicamento não seja mais reconhecido restaurando e potencializando seu efeito (MADIGAN *et al.*, 2010).

Os compostos com maior destaque para a realização de modificações moleculares são os compostos heterocíclicos, os quais correspondem a 65% dos medicamentos encontrados no mercado (BARREIRO & FRAGA, 2001). Dentre eles, os derivados do tiofeno são dotados de grande atividade biológica, como por exemplo, anti-inflamatória (FAKHR *et al.*, 2008), antitumoral (DALLEMAGNE *et al.*, 2003; NAIR & ABRAHAM, 1993), antimitótico (ROMAGNOLI *et al.*, 2007), antibacteriana (WANG *et al.*, 1975) e antifúngica (REDDY K; REDDY; SWAMY, 2009).

Apesar do grande número de atividade biológica associados a esses compostos, é necessário conhecer bem a toxicidade dos mesmos, para assim avaliar a sua viabilidade como medicamento. Desta forma, testes como os ensaios da liberação de lactato desidrogenase (LDH), de quantificação de proteínas totais (QPT), MTT e o vermelho neutro, são comumente usados para detectar a citotoxicidade de compostos químicos (ABREU, 2008; COSTA *et al.*, 2009; FOTAKIS & TIMBRELL, 2006).

Contudo, é comum a esses testes, apesar de sua eficácia, a característica de serem muito caros e exigirem equipamentos, ambiente e treinamento especializado (MEYER *et al.*, 1982). Uma boa alternativa para minimizar essas desvantagens é a utilização do microcrustáceo *Artemia salina* como modelo para a avaliação da citotoxicidade de compostos químicos, uma vez que podem ser obtidos a baixo custo em “pet-shops”, são testes rápidos, fáceis e ainda não exigem condições especiais para seu cultivo (MEYER *et al.*, 1982; BARBOSA *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2009).

Ao longo desse trabalho serão apresentados novos compostos derivados do heterociclo tiofeno sintetizados via reação de Gewald, demonstrando o mecanismo e as condições reacionais, a caracterização físico-química e espectroscópica desses compostos, bem como a avaliação de suas citotoxicidade frente à *Artemia salina*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COMPOSTOS DERIVADOS DO TIOFENO E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA

O tiofeno (**Figura 1**) consiste em um anel heterocíclico aromático pentagonal, onde um carbono metilênico é substituído por um átomo de enxofre (ZHONGHAI, 2005).

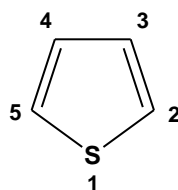
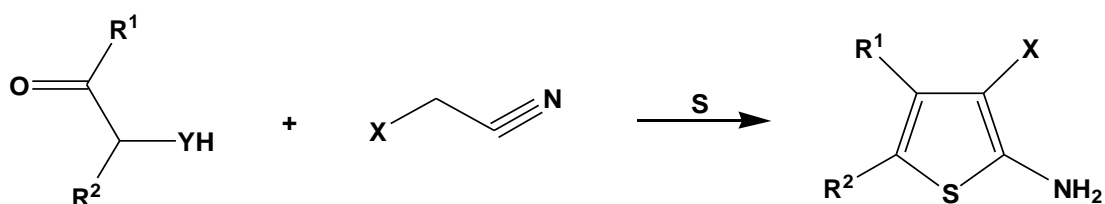


Figura 1. Estrutura do tiofeno.

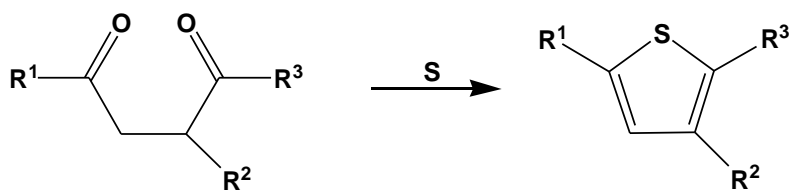
Uma das reações sintéticas empregadas na obtenção de tiofeno e seus derivados é através da reação de Gewald, relatada pela primeira vez em 1961 por Karl Gewald (ERTÜZÜN, 1986; GEWALD, 1961). Consiste na condensação multicomponente entre uma acetonitrila α -substituída com cetonas ou aldeídos alifáticos α -não substituídos em presença de uma base e enxofre elementar, formando 2-aminotiofenos substituídos em bons rendimentos (PUTEROVÁ; KRUTOŠÍKOVÁ; VÉGH, 2010) (**Esquema 1**).



Y= SH, H

Esquema 1. Esquema da reação de Gewald.

Uma das metodologias mais antigas para obtenção de tiofenos é a reação de Paal-Knorr, que consiste na reação de compostos 1,4-dicarbonílicos com alguma fonte de enxofre (por exemplo: ácido sulfídrico (H_2S)), em especial os sulfatos de fósforo como o Reagente de Lawesson ou sulfato de bis-(trimetilsilila) obtendo o anel tiofênico também em bons rendimentos (HEWTON; KIMBER; TAYLOR, 2002) (**Esquema 2**).



Esquema 2. Esquema da reação de Paal-Knorr.

Segundo Fakhr *et al.* (2008), os compostos derivados do tiofeno, em especial os benzo[*b*]tiofeno 2-substituídos (I) possuem grande variedade de propriedades farmacêuticas, sendo comprovado em seus experimentos, boa atividade anti-inflamatória e analgésica nos compostos 5-nitro-benzo[*b*]tiofeno-2-carbohidrazida (II), 4-(5-nitro-benzo[*b*]tiofeno-2-il)-semicarbazida (III) e 1-(5-nitro-benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-4-fenil-tiosemicarbazida (IV), até mais eficazes que o medicamento comercial, Piroxicam (**Figura 2**).

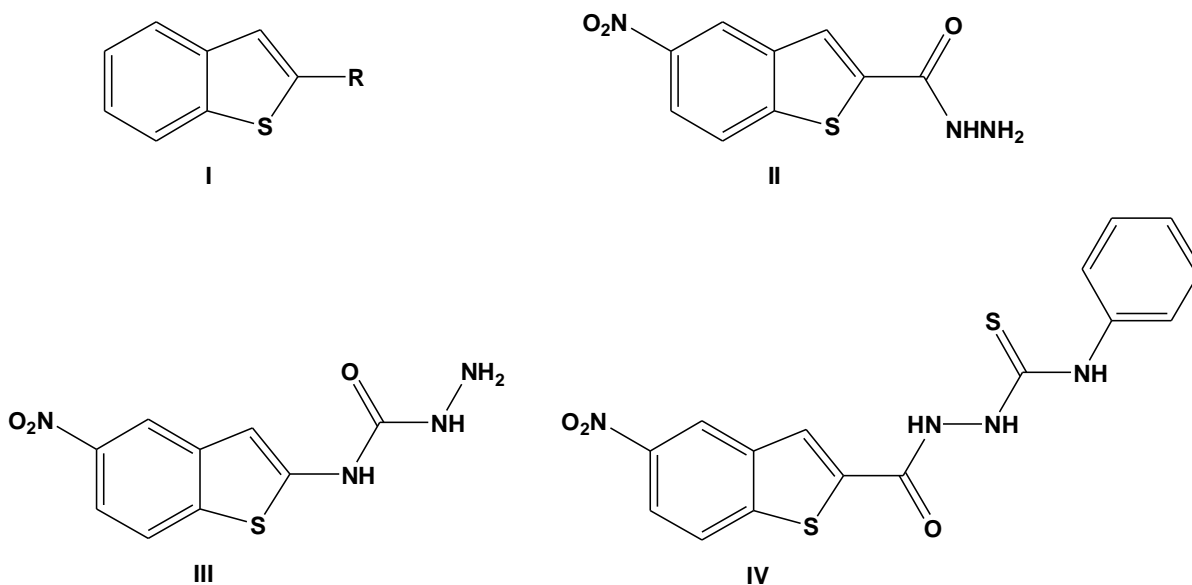


Figura 2. Compostos 2-benzo[*b*]tiofeno substituídos com atividade analgésica e anti-inflamatória.

Outro estudo mostra além de atividade anti-inflamatória, atividade antioxidante em derivados 2-amino-4,5,6,7-tetraidro-benzo[*b*]tiofeno-3-carboxamida-*N*-substituídos (I), onde segundo os autores, a presença do grupo hidroxila na posição *orto* contribui para a atividade dos compostos (REDDY K.; REDDY P.; SWAMY S.R., 2009). Ramanathan *et al.* (1978) sintetizaram derivados 2-amino-

4,5,6,7-tetrahydro-benzo[*b*]tiofeno (II e III) e avaliaram suas atividades anti-inflamatória e analgésica, obtendo atividade comparável à Aspirina (Figura 3).

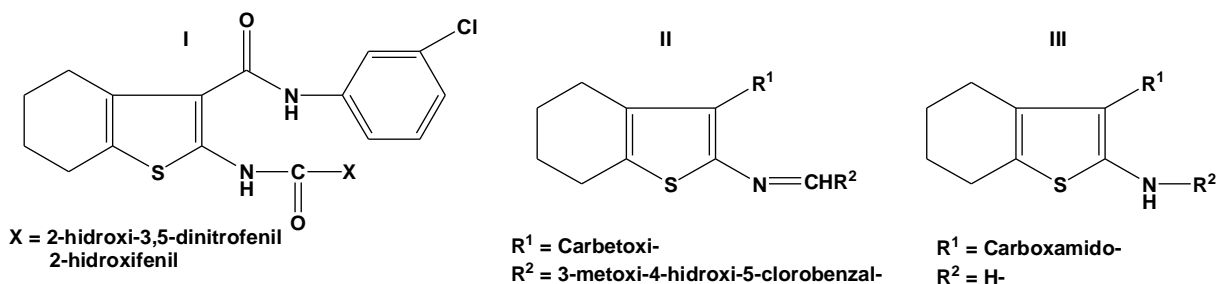


Figura 3. Derivados tiofênicos com atividade anti-inflamatória.

Atividade antitumoral foi descrita por Ferreira *et al.* (2009) em derivados 2-acil-3-ferrocenil-benzo[*b*]tiofenos (I) contra algumas linhagens de células tumorais humanas (MCF-7, MCF-7 ADR, A431, HCT-15, A549, 2008, C13*, RH4), obtendo resultados melhores que a droga referência Cisplatina. Shchekotikhin *et al.* (2009) realizaram testes com derivados antra[2,3-*b*]tiofeno-5,10-dionas (II) comprovando atividade contra linhagens de células tumorais (L1210, Molt4/C8, CEM, K562, K562/4) (Figura 4).

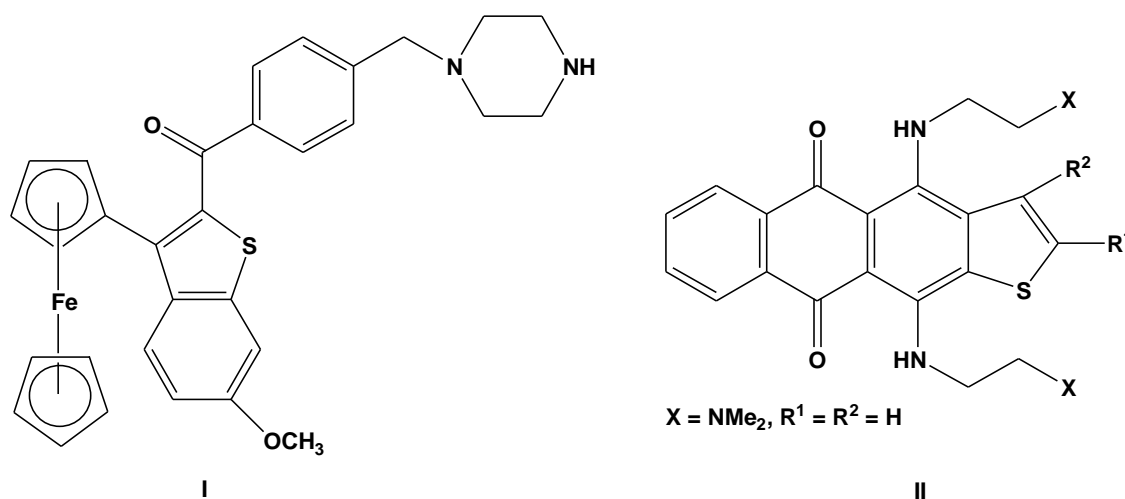


Figura 4. Derivados tiofênicos com atividade antitumoral.

São relatadas ainda: atividades antibacterianas e antifúngicas por Ferreira *et al.* (2004) em derivados *N*-fenil-(2,3,5-trimetil-benzo[*b*]tiofeno-6-il)-amino (I) e por Pinto *et al.* (2008) no éster etílico do 2-ácido-3-fenilamino-benzo[*b*]tiofeno-carboxílico (II); atividade antimicobacteriana em 5,5'-dinitro-2-(2,3-diaza-4-(2'-tienil)buta-1,3-

dienil)tiofeno (RANDO *et al.*, 2006) (III); bem como atividade antimitótica, comprovada por Romagnoli *et al.* (2007) e Pinkerton *et al.* (2007) em 2-amino-6-metil-3-(3',4',5'-trimetoxibenzoil)-benzo[*b*]tiofeno (IV) e 5-metil-2-[(tiofeno-2-carbonil)-amino]-benzo[*b*]tiofeno-3-*N,N*-dietil-carboxamida (V) respectivamente (Figura 5).

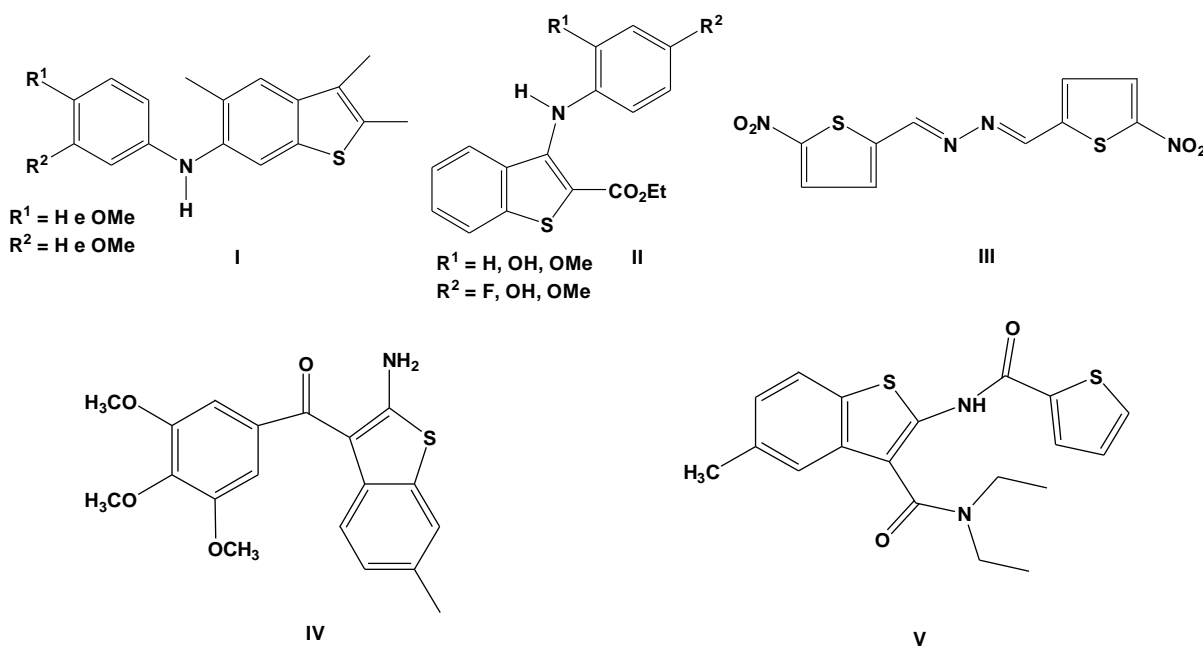


Figura 5. Derivados tiofênicos com atividade antibiótica (I - III) e antimitótica (IV e V).

Esses e outros resultados presentes na literatura comprovam a ampla gama de atividades biológicas dos compostos derivados do tiofeno e acabam por intensificar sua importância para a química medicinal.

Apesar disso, ensaios preliminares de avaliação da toxicidade são necessários, para que assim seja possível avaliar a viabilidade desses compostos como medicamentos. Desta forma, diversos ensaios foram desenvolvidos e são amplamente utilizados para detectar a citotoxicidade desses compostos, dentre os quais podemos citar: ensaios de liberação de lactato desidrogenase (LDH), de quantificação de proteínas totais (QPT), MTT e vermelho neutro (ABREL, 2008; COSTA *et al.*, 2009; FOTAKIS & TIMBRELL, 2006).

2.2 CITOTOXICIDADE

No ensaio de LDH, quando ocorre a morte celular por danos membranares, a lactato desidrogenase é liberado para o meio extracelular, onde é medida sua atividade revelando a citotoxicidade do composto (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). Segundo os autores esse tipo de teste fornece resultados confiáveis em pouco tempo além da relativa simplicidade para sua avaliação.

O teste colorimétrico de QPT demonstra indiretamente o crescimento/proliferação celular durante a exposição da substância que se deseja avaliar a citotoxicidade. Diz-se indireta, pois ela não quantifica as células, mas sim a quantidade de proteínas totais em seu interior que são coradas pelo Azul Brillhante de Coomassie (CBB-R250). Esse teste tem como vantagem a rapidez, sensibilidade e a possibilidade de ser reprodutível, contudo os resultados são dependentes do tipo celular aplicado no teste (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006; ABREU, 2008; COSTA, 2009).

O ensaio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio) consiste em uma técnica colorimétrica que determina a proliferação celular a partir da conversão de um sal tetrazólio amarelo hidrossolúvel em formazam azul insolúvel pela clivagem do anel tetrazólio pela succinato desidrogenase dentro da mitocôndria. Como o formazam é impermeável à membrana celular, ele se acumula dentro das células sadias (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006), dessa forma a proliferação celular pode ser medida espectrofotometricamente (LIU *et al.*, 1997).

Assim como o QPT e MTT, o vermelho neutro (Hidroclorido de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina-hidroclorido) é em um ensaio colorimétrico onde o corante é absorvido pelas células viáveis através de difusão não-iônica se concentrando no meio intracelular, mais especificamente nos lisossomos. Ao sofrer alguma modificação na sua membrana ou na membrana do lisossomo ocorrerá diminuição na concentração de vermelho neutro na célula, podendo-se medir espectrofotometricamente a viabilidade celular (PARIS *et al.* 2005). Em outras palavras a concentração de vermelho neutro em um meio de cultura é equivalente ao número de células viáveis (TRIGLIA *et al.*, 1991).

Apesar da sua eficácia, esses testes possuem a desvantagem de ter um custo elevado e exigirem equipamentos, ambientes e treinamento especializado (MEYER *et al.*, 1982; LIMA *et al.*, 2009). Com base nisso, a utilização de *Artemia salina* como modelo animal, vem sendo empregado como uma alternativa aos testes de citotoxicidade.

2.2.1 *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo da ordem Anostraca (LIMA *et al.*, 2009) que vive em habitats de água salgada, capaz de tolerar um gradiente de salinidade e temperatura de 4 a 250 g/L e 6 a 35°C respectivamente (VARÓ *et al.*, 2002). Possui ciclo de vida curto, e se reproduzem por parternogenia (KOUTSAFTIS & AOYAMA, 2007; NUNES *et al.*, 2006).

São comercializadas como alimento para peixes, podendo ser obtidos a baixo custo em pet-shops ou lojas de aquarismo na forma de cistos dormentes, o que permite que sejam armazenados por anos sem eclodirem se mantidos devidamente desidratados (KOUTSAFTIS & AOYAMA, 2007; MILANI & ZIOLLI, 2007).

Por esses motivos o modelo animal usando *Artemia salina* tem como característica ser rápido, barato, dispensa equipamentos e treinamento especializado podendo ser realizado em qualquer laboratório se demonstrando como uma alternativa eficiente para avaliação da citotoxicidade de compostos naturais e sintéticos (BARBOSA *et al.* 2007; LIMA *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.* 2008).

Meyer *et al.* (1982) ao utilizarem Artemias em testes de citotoxicidade frente extratos de sementes de 41 espécies de euforbiácea obtiveram resultados de CL₅₀ (Concentração Letal 50%) entre 2,4 e > 1000 µg/mL, sendo os valores acima de 1000 µg/ml considerados atóxicos. Lima *et al.* (2009) também realizaram testes com extratos de espécies vegetais (*Sonchus oleraceus*), obtendo DL₅₀ (Dose letal 50%) de 5,120 ppm, o que indicou uma baixa toxicidade.

As artemias também foram usadas por Varó *et al.* (2002) para avaliar a toxicidade de pesticidas organofosforados e carbamatos obtendo, após 24 horas, valores de CL₅₀ de 9,3 e 3,19 mg/L nos pesticidas testados.

Foram realizados ainda testes com sal potássico de isolapachol e lapachol, demonstrando alta toxicidade (CL₉₀ de 1,54 ppm) para o isolapachol, enquanto o lapachol (CL₉₀ de 176.3 ppm) foi considerado não tóxico (LIMA *et al.*, 2002).

Hoque & Islam (2008) fizeram uso das artemias frente à indofeninas sintetizadas a partir de derivados do tiofeno, tiazol e isatina obtendo CL₅₀ que variaram de 0,99 a 1,77µg/ml, demonstrando-se tóxicos para as artemias.

Sendo assim, com base em dados de atividade antifúngica obtidas recentemente por nosso grupo de pesquisa com alguns derivados sintéticos de tiofeno, e com o intuito de aprofundar esses estudos e viabilizar possíveis ensaios de atividade *in vivo*, sentimos a necessidade de sintetizar novas moléculas derivadas do tiofeno e realizar testes de citotoxicidade frente à *Artemia salina* a fim de determinar uma possível dose terapêutica desses compostos bem como prever seus efeitos tóxicos.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Obter, caracterizar e avaliar a atividade citotóxica de novos derivados sintéticos 2-[(benzilideno)amino]-4,5,6,7-tetraidro-4*H*-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila frente à *Artemia salina*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e purificar os novos derivados tiofênicos;
- Caracterizar e comprovar estruturalmente os novos compostos;
- Otimizar e adaptar a técnica de avaliação de citotoxicidade em modelo da *Artemia salina* para os novos compostos;
- Determinar a citotoxicidade dos novos compostos frente à *Artemia salina*, calculando a CL₅₀ através do método estatístico PROBIT.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.1.1 Reagentes e solventes

Para a obtenção e caracterização dos novos derivados propostos neste trabalho, como também para a avaliação da citotoxicidade, foram utilizados os seguintes solventes e reagentes, comerciais e P.A.:

- 2,3-dicloro-benzaldeído
- 2,4-dicloro-benzaldeído
- 2,6-dicloro-benzaldeído
- 3,4-dicloro-benzaldeído
- 3,4,5-trimetoxi-benzaldeído
- 4-bromo-benzaldeído
- 4-cloro-benzaldeído
- 4-dimetilamino-benzaldeído
- 4-flúor-benzaldeído
- 4-metil-benzaldeído
- 4-metoxi-benzaldeído
- 4-nitro-benzaldeído
- 5-bromo-2-metoxi-benzaldeído
- Acetato de etila
- Ácido acético
- Benzaldeído
- Clorofórmio
- Clorofórmio deuterado
- Ciclohexanona
- Dimetilsulfóxido
- Enxofre
- Etanol
- Hexano
- KBr
- Malononitrila
- Metanol
- Morfolina
- Tween 20

4.1.2 Balança

Para a pesagem dos reagentes e produtos foi utilizado uma balança analítica com quatro casas decimais OHAUS, modelo Adventurer.

4.1.3 Cromatografia

As cromatografias analíticas em camada delgada foram efetuadas em placas FLUKA Analytical sílica gel de 0,2mm de espessura com indicador fluorescente de 254nm. As revelações foram feitas por luz ultravioleta (254 ou 365nm).

4.1.4 Ponto de fusão

Os pontos de fusão dos compostos sintetizados foram determinados através do aparelho Micro Química Modelo MQAPF – 302 e não foram corrigidos.

4.1.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono (RMN ¹³C)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono foram obtidos em espectrômetros: Varian VNMRS de 400 MHz, Varian Unity Plus de 300 MHz, Varian Mercury de 200MHz e FT-NMR 60 MHz - ANASAZI e o tratamento dos espectros foi feito no software MestReC 4.8.6.0.

4.1.6. Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos através da leitura dos discos de KBr+compostos em um espectrômetro IRPrestige-21, com os dados tratados com auxílio do software Origin 6.0.

4.1.7 Espectrometria de massas

As medidas das massas exatas dos íons moleculares foram obtidas em um Eletrospray Shimadzu LC/MS-IT-TOF em modo positivo.

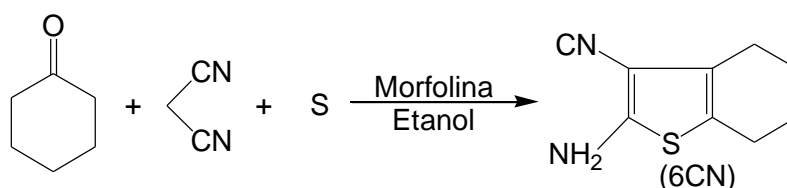
4.1.8 Aparato para avaliação da citotoxicidade

Foi utilizado um aquário de vidro com 25cm de comprimento 12cm de largura e 15 cm de altura. Para o preparo da água marinha sintética, foi utilizado sal marinho da marca Real Sea[®], sendo preparado de acordo com as instruções do produto. As artemias foram obtidas comercialmente na forma de cistos.

4.2 SÍNTESE

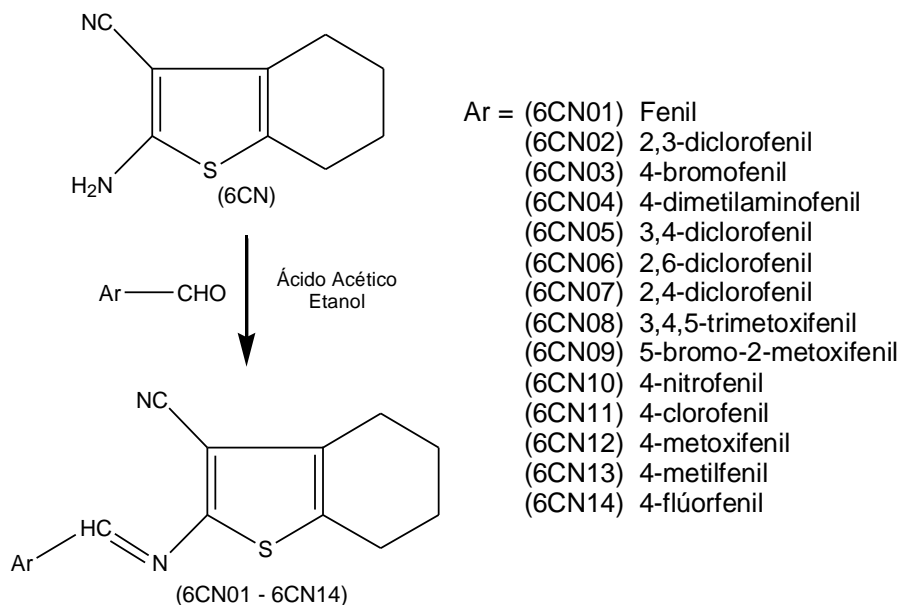
Os compostos sintetizados, tiveram como produto de partida o composto 2-amino-4,5,6,7-tetraidro-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (**6CN**), sendo obtido pela reação de Gewald (**Esquema 3**) seguindo o procedimento experimental a seguir:

Em um balão foi adicionado 19 g (0,193 mols) de ciclohexanona, 6,1845 g (0,193 mols) de enxofre elementar, 12,7558 g (0,193 mols) de malonitrila e 150 ml de etanol. Em seguida sob temperatura de 0 - 5°C foi adicionando gota a gota, durante 30 minutos, 10,13 ml (0,117 mols) de morfolina. Após constatado término da reação (através de cromatografia em camada delgada), o produto foi colocado em geladeira por 30 minutos. O precipitado formado foi filtrado em funil sintetizado e lavado com etanol gelado duas vezes. Os cristais restantes foram separados e secos em dessecador sob vácuo.



Esquema 3. Reação de obtenção do composto **6CN**.

Para a síntese dos novos derivados do tiofeno proposto nesse projeto, foram realizadas reações de substituição na função 2-amino do composto **6CN** através da condensação com diferentes aldeídos aromáticos, conforme **Esquema 4**.



Esquema 4. Rota sintética para obtenção dos novos derivados do tiofeno.

O procedimento geral de síntese dos compostos finais foi: A um balão de fundo redondo Foi adicionado 500 mg (2,8 mmols) do composto **6CN** mais um equivalente do aldeído aromático na presença de 10 ml de etanol e 5-10 gotas de ácido acético como catalisador da reação. A solução foi então agitada a temperatura ambiente até se constatar consumo total dos reagentes de partida.

4.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Após ter sido confirmado o término das reações (através de cromatografia em camada delgada), foi adicionado água destilada (50 ml) aos balões das reações, em seguida o precipitado foi filtrado em papel filtro e lavado sucessivas vezes com água destilada. Depois de lavados e filtrados, os compostos foram colocados em dessecador sob vácuo para secagem.

Para saber se o produto seco ainda continha impurezas, uma amostra de cada produto foi colocada em placas de sílica para o processo de cromatografia em camada delgada utilizando como sistema eluente uma mistura binária 8:2 (hexano/acetato de etila).

Depois de confirmada a pureza dos compostos, eles tiveram suas características físico-químicas determinadas (fator de retenção, ponto de fusão, aparência, solubilidade) assim como os cálculos de rendimento.

O fator de retenção (R_f) foi obtido a partir da cromatografia em camada delgada pela fórmula $R_f = d_c / d_s$, onde d_c é a distância percorrida pelo composto e d_s é a distância percorrida pelo sistema.

Para o ponto de fusão, uma pequena amostra do produto foi colocada entre duas lamínulas e então colocada no aparelho de ponto de fusão.

A aparência dos compostos (cor e textura) foi avaliada visualmente pela observação do produto sob fundo claro e escuro.

O rendimento foi calculado, pesando-se a massa do produto obtido em gramas e em seguida calculado o número de mols referente à massa através da fórmula $n^\circ = m / PM$. Por fim foi calculada a porcentagem de rendimento pela fórmula:

$$\frac{\text{número de mols do produto obtido} \times 100}{\text{número de mols do produto de partida}} = x$$

Na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foi realizado, primeiramente, testes de solubilidade das substâncias (1-2mg) em metanol, clorofórmio e dimetilsulfóxido (DMSO) para definir qual solvente seria o melhor. Em seguida, cerca de 10 mg de cada um dos produtos foram solubilizados com o solvente de escolha, sendo estes acondicionados em tubos de RMN. Por fim, os tubos foram colocados no espectrômetro de RMN.

Para a espectroscopia de infravermelho foram preparados discos transparentes, comprimindo uma amostra do produto (1-2mg) junto ao KBr, utilizando uma prensa hidráulica numa pressão de 7 toneladas. Os discos obtidos após prensagem foram lidos em espectrofotômetro de infravermelho.

4.4 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os testes de citotoxicidade frente à *Artemia salina* foram baseados na metodologia proposta por Meyer *et al.* (1982) com algumas modificações para que se adequasse a realidade dos compostos utilizados nesse trabalho.

4.4.1 Cultivo e coleta

A eclosão dos cistos ocorreu em um aquário adaptado com uma divisória com poros de 2mm, dividindo-o em duas partes desiguais, ficando o lado maior protegido da luz, enquanto o outro iluminado por uma lâmpada. O aquário foi completado com uma solução salina sintética preparada segundo o rotulo do produto e uma bomba de ar foi responsável por oxigenar a água.

No lado protegido da luz foram adicionados os cistos de *Artemia salina* Leach, adquiridos comercialmente, que após 24-48 horas eclodiram. Devido seu caráter fototrópico, os náuplius migraram através dos poros para o lado iluminado, onde foram coletados para o experimento com uma pipeta Pasteur de vidro com o auxílio de uma lupa.

4.4.2 Compostos testados

O teste de citotoxicidade frente à *Artemia salina* foi realizado com 11 dos 15 compostos sintetizados, sendo eles: **6CN**, **6CN01**, **6CN03**, **6CN04**, **6CN05**, **6CN07**, **6CN08**, **6CN09**, **6CN11**, **6CN12**, **6CN14**.

4.4.3 Preparo das amostras

Foram pesados em balança analítica, 100 mg de cada um dos compostos a serem testados, sendo posteriormente colocados em um béquer juntamente com 5 gotas de Tween 20 e 9,75 ml de solução salina sintética, formando 10 mL de uma solução (solução mãe). Em seguida foram diluindo 1 ml da solução mãe em 9 ml de solução salina formando uma segunda concentração C-2 do, qual foi retirado 1 ml que posteriormente foi diluído em 9 ml de solução salina (C-3) e assim sucessivamente ate termos um total de 10 mL de 5 soluções com um gradiente de concentrações variando a cada diluição 1/10.

1 ml de cada uma dessas soluções estoque foi adicionada a tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina e 10 náuplius recém eclodidos de *Artemia salina*, de forma a cada tubo ficar respectivamente com concentrações finais de 1000 µg/mL, 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL. Quando necessário, foram preparadas

concentrações intermediárias a partir da diluição das concentrações citadas, a fim de se obter maior precisão na determinação das CL_{50} .

Visando evitar possíveis erros de amostragem, pipetagem, entre outros e para o teste ter maior validade estatística, cada uma das doses foi realizada em quintuplicata, e em cada ensaio foi preparado um tubo controle negativo, contendo apenas 10 ml de solução salina e 10 náuplius recém eclodidos.

4.4.4 Obtenção dos dados

Após 24 horas da exposição dos náuplius aos compostos, o número de náuplius vivos e mortos em cada tubo foi contabilizado manualmente com auxílio de uma lupa. Posteriormente foi calculada a média de mortes para cada concentração de cada composto testado.

4.4.5 Análise dos dados

A partir dos dados obtidos, foi determinado a CL_{50} dos compostos pela análise de regressão linear através do método estatístico Probit, de acordo com os seguintes procedimentos:

Utilizando o software Microsoft Excel 2010, foi criada uma tabela com quatro colunas (**Tabela 1**), onde na primeira foi colocado às concentrações usadas no experimento, na segunda o percentual da média de mortes para cada concentração, na terceira o logaritmo na 10^a base das concentrações e na última coluna, o valor de Probit, referente ao percentual da media de mortes, obtido a partir da tabela de Finney (1952) (**Figura 6**).

Tabela 1. Tabela criada para realizar o cálculo do Probit.

	A	B	C	D
1	Concentração	% M.M.	Log. Conc.	Probit
2	1000	92	3	6,41
3	100	90	2	6,28
4	10	80	1	5,84
5	1	52	0	5,05
6	0,1	30	-1	4,48

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Figura 6. Tabela de conversão do percentual da média de mortes para o Probit.

Fonte: Finney (1952)

Em seguida foi criado um gráfico de dispersão com linha de tendência com os valores do logaritmo na 10ª base das concentrações pelo valor de Probit obtendo o seguinte gráfico (**Gráfico 1**).

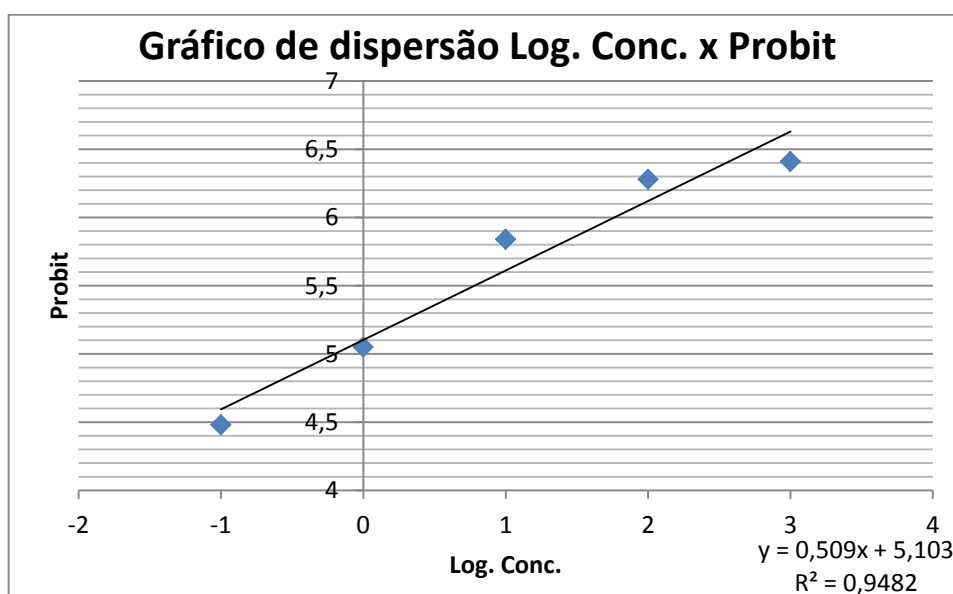


Gráfico 1. Gráfico de dispersão com linha de tendência.

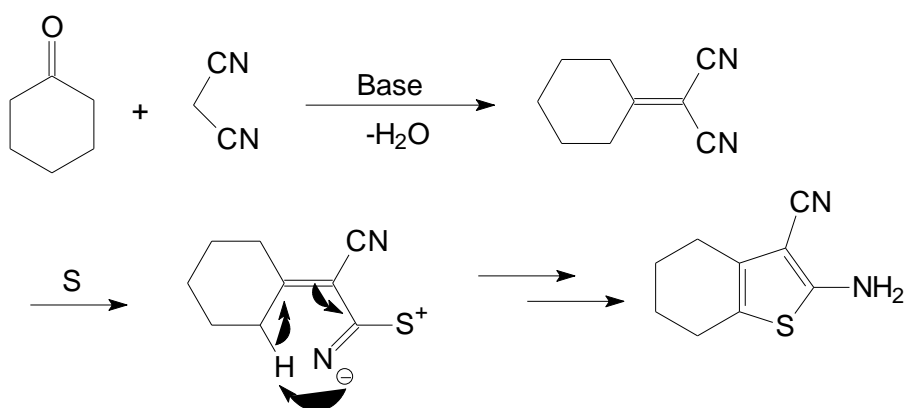
Como mostra o **Gráfico 1**, o programa fornece junto ao gráfico a equação da regressão linear, onde “y” se refere aos valores de Probit e “x” ao log das concentrações. É ainda é fornecido o R^2 que representa a confiabilidade dos dados (coeficiente de linearidade), ou seja, quanto mais próximo de 1 for o R^2 mais linear é a reta e mais confiáveis são os dados.

Sendo assim, como queremos saber a concentração que mata 50% dos indivíduos, substituímos o “y” da equação pelo valor 5, e a resolvemos obter o valor de “x”, que é o logaritmo da concentração, no caso o logaritmo da CL_{50} . Feito isso calculamos o inverso do logaritmo, obtendo assim o valor da CL_{50} .

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

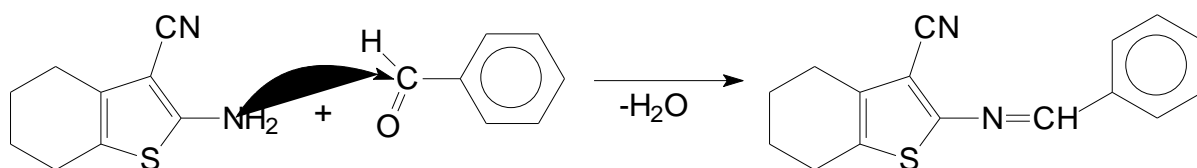
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

Para a síntese dos novos compostos desenvolvidos nesse projeto, utilizamos a clássica reação de Gewald e também reações de adição de aminas à carbonila. O mecanismo reacional da reação de Gewald consiste inicialmente na condensação de Knoevenagel, com posterior reação de substituição e ciclização por intermédio do meio básico e do enxofre elementar (**Esquema 5**)



Esquema 5. Mecanismo reacional da reação de Gewald.

O mecanismo reacional da reação de adição da amina à carbonila de um aldeído é representado na **Esquema 6**. A formação da imina se dá através do ataque nucleofílico do nitrogênio da amina à carbonila do aldeído (que nas condições reacionais (meio ácido) encontra-se ainda mais eletrofílico) com perda de uma molécula de água.



Esquema 6. Mecanismo reacional da formação da imina.

Os resultados referentes à caracterização físico-química e rendimentos das reações encontram-se sumarizados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Características físico-químicas dos compostos sintetizados.

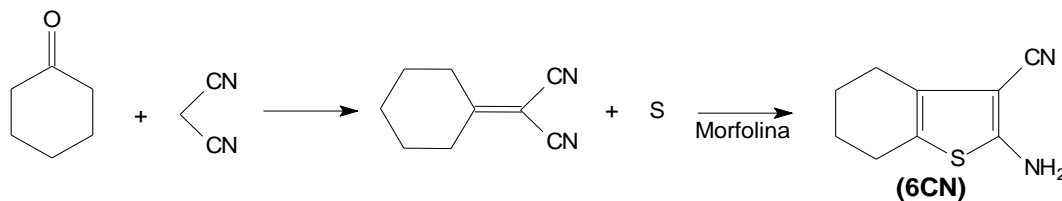
Composto	FM	Aparência	Rendimento (%)	PF (°C)	R _f	PM
6CN	C ₉ H ₁₀ N ₂ S	Pó branco	82	144 - 145	0,44	178
6CN01	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ S	Pó amarelo	91	147 - 148	0,44	266
6CN02	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ S	Pó amarelo	89	189 - 196	0,75	334
6CN03	C ₁₆ H ₁₃ BrN ₂ S	Pó amarelo	90	156 - 158	0,66	345
6CN04	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ S	Pó amarelo	85	195 - 199	0,70	309
6CN05	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ S	Pó amarelo	79	191 - 194	0,77	335
6CN06	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ S	Pó amarelo	86	183 - 185	0,61	335
6CN07	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ S	Pó amarelo	89	183 - 184	0,75	335
6CN08	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	Pó amarelo	89	193 - 194	0,27	356
6CN09	C ₁₇ H ₁₅ BrN ₂ OS	Pó amarelo	89	150 - 152	0,48	375
6CN10	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₂ S	Pó amarelo	96	160 - 173	0,25	311
6CN11	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ S	Pó amarelo	86	146 - 149	0,56	300
6CN12	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ OS	Pó amarelo	95	123 - 126	0,7	296
6CN13	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ S	Pó amarelo	60	152 - 154	0,59	280
6CN14	C ₁₈ H ₁₉ FN ₂ S	Pó amarelo	50	112 - 115	0,61	314

FM: Fórmula molecular; **PF:** Ponto de fusão; **R_f:** Fator de Retenção; **PM:** Peso molecular.

Diferentemente dos compostos finais sintetizados (que são todos inéditos), o **6CN** (produto usado como intermediário) já foi descrito na literatura.

Gewald (1965) sintetizou o composto **6CN** com rendimento de 70% (PF 147-148°C). Em outra publicação Gewald, Schinke & Bottcher (1966) obtém o mesmo produto através de duas vias, a primeira via consiste na citada nesse projeto (reação *one pot*) (**Esquema 3**) onde conseguiu 86% de rendimento, já a segunda via consistiu primeiramente na reação entre ciclohexanona e malononitrila, em seguida

o produto reagiu com o enxofre elementar e morfolina (**Esquema 7**), obtendo um rendimento de 90%.



Esquema 7. Segunda via de obtenção do 6CN por Gewald *et al.* (1966).

Sridhar *et al.* (2007) relatam a síntese de **6CN** utilizando também a reação de Gewald, contudo substituindo a morfolina (usada originalmente na reação de Gewald) por KF-alumina. A reação ocorreu de forma convencional e por microondas, os resultados de rendimento foram 91% e 92% respectivamente (PF 147-148°C).

Comparando esses resultados com os nossos, a reação obteve um rendimento satisfatório, sendo melhor que o obtido por Gewald (1965) e equivalente a primeira via de Gewald, Schinke & Bottcher (1966). Em relação aos rendimentos obtidos por Sridhar *et al.* (2007), o nosso não foi tão eficaz devido ao fato da substituição da morfolina por KF-alumina, que comprovadamente causa boa dispersão do sitio ativo do reagente e melhora sua seletividade.

Dessa forma, o nosso rendimento obtido (82%) é consideravelmente bom devido às condições reacionais utilizadas. O ponto de fusão obtido (144-145°C) foi dois graus inferior às reações citadas (147-148°C), mas isso pode ser devido às especificações e calibrações dos aparelho utilizado para aferição em cada um dos casos.

Os demais compostos, se apresentaram na forma de pó na coloração amarela, variando apenas a tonalidade. A maioria dos compostos tiveram bons rendimentos, sendo superior a 70%, contudo os compostos **6CN13** (60%) e **6CN14** (50%) foram exceções. Com relação ao ponto de fusão, a variação geral foi de 1 a 4°C, no caso dos compostos **6CN02** (7°C) e **6CN10** (13°C) essa maior variação pode estar relacionada com a presença de diferentes estruturas cristalinas nos pós obtidos.

A análise espectroscópica dos compostos sintetizados, resultaram em espectros (gráficos) como o **Gráfico 2, 3 e 4** (Em anexo encontram-se os gráficos de RMN ^1H , ^{13}C e IV referentes aos demais compostos sintetizados).

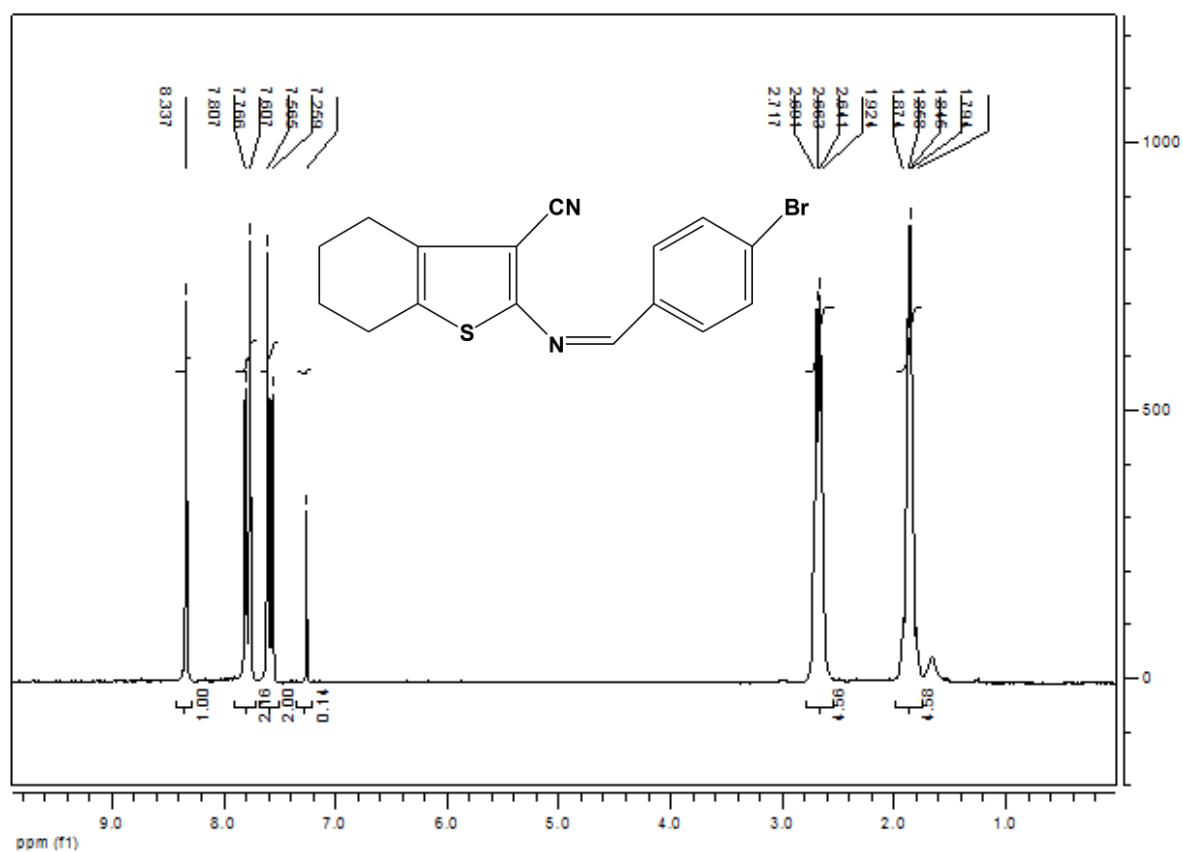


Gráfico 2. Espectro de RMN ¹H do composto 6CN03.

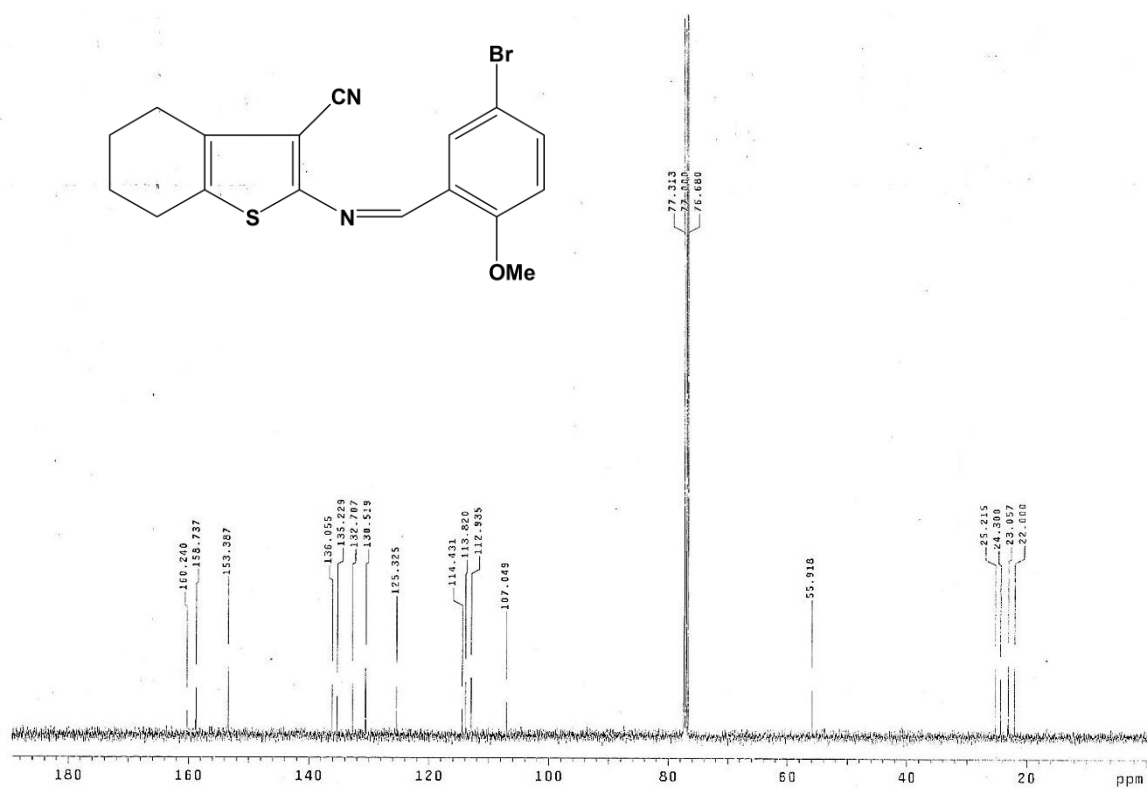


Gráfico 3. Espectro de RMN ¹³C do composto 6CN09.

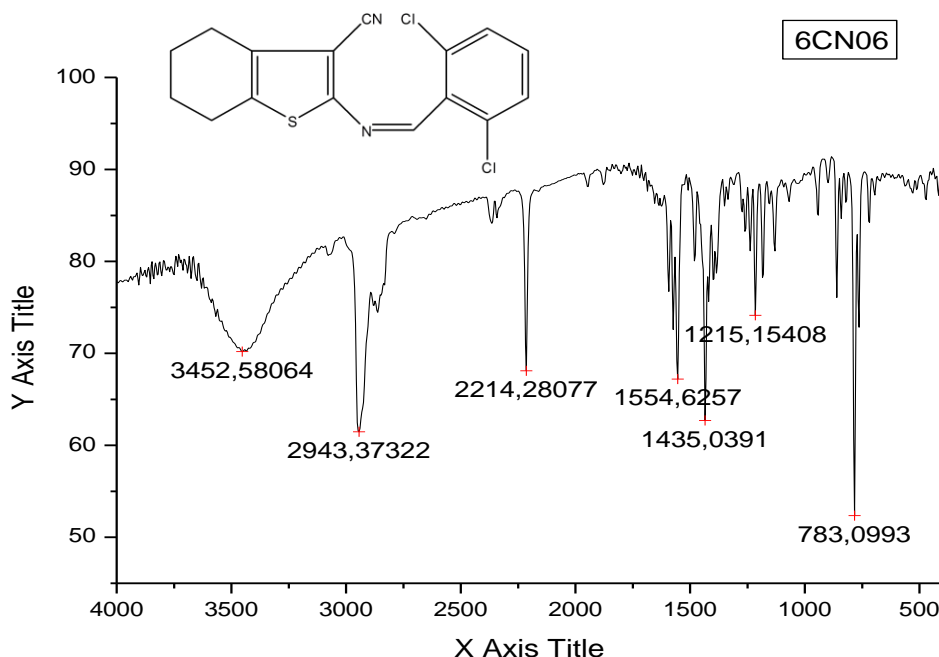


Gráfico 4. Espectro de infravermelho do composto **6CN06**.

Em seguida são descritos, os resultados da interpretação dos espectros de RMN, Infravermelho e Massa:

2-amino-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN):

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ : 4,38 (2H, s, NH_2); 2,38 – 2,44 (4H, m); 1,68 – 1,78 (4H, m). Infravermelho: 1524 (C=C); 2200 (CN); 2832 (-C-H); 2929 (=C-H);

2-[(benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN01):

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ : 8.40 (1H, s, N=CH); 7,92 (2H, d, $J = 2,0$ Hz); 7,41 – 7,50 (3H, m); 2,63 – 2,70 (4H, m); 1,83 – 1,86 (4H, m); Infravermelho: 1566 (C=C); 2214 (CN); 2834 (-C-H); 2923 (=C-H). Massa calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{S}$: 266,088, M+1 encontrado: 267,094.

2-[(2,3-dicloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN02):

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ : 8,29 (1H, s, N=CH); 8,27 (1H, dd, $J = 8,0, 1,6$ Hz); 7,57 (1H, dd, $J = 7,8, 1,6$ Hz); 7,30 (1H, t, $J = 8,0$ Hz); 2,62 – 2,74 (4H, m); 1,80 –

1,93 (4H, m). Infravermelho: 802 (C-Cl em *meta*); 1554 (C=C); 2221 (CN); 2947 (=C-H);

2-[(4-bromo-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila

(6CN03):

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ: 8,33 (1H, s, N=CH); 7,78 (2H, d, *J* = 8,2 Hz); 7,58 (2H, d, *J* = 8,4 Hz); 2,64 – 2,71 (4H, m); 1,79 – 1,92 (4H, m). Infravermelho: 813 (C-Br); 1558 (C=C); 2221 (CN); 2943 (=C-H);

2-[(4-dimetilamino-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila

(6CN04):

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ: 8,19 (1H, s, N=CH); 7,72 (2H, d, *J* = 9,0 Hz); 6,62 (2H, d, *J* = 9,0 Hz); 3,00 (6H, s, N(CH₃)₂); 2,39 – 2,59 (4H, m); 1,69 – 1,78 (4H, m). Infravermelho: 1524 (C=C); 2217 (CN); 2929 (=C-H);

2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila

(6CN05):

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ: 8,31 (1H, s, N=CH); 7,99 (1H, d, *J* = 1,6Hz); 7,75 (1H, dd, *J* = 8,4, 1,6Hz); 7,53 (1H, d, 8,4Hz); 2,66 – 2,71 (4H, m); 1,86 – 1,87 (4H, m).
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ: 21,92; 22,99; 24,28; 25,26; 108,03; 114,17; 128,09; 130,62; 130,94; 133,48; 133,62; 134,99; 135,56; 136,32; 155,78; 158,55.
Infravermelho: 819 (C-Cl); 1550 (C=C); 2217 (CN); 2832 (-C-H); 2950 (=C-H). Massa calculada para C₁₆H₁₂Cl₂N₂S: 334,010, M+1 encontrado: 335,013.

2-[(2,6-dicloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila

(6CN06):

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ: 8,75 (1H, s, N=CH); 7,38 (2H, dd, *J* = 7,0Hz); 7,28 (1H, t, *J* = 6,4 Hz); 2,65 – 2,74 (4H, m); 1,79 – 1,92 (4H, m). Infravermelho: 783 (C-Cl em *orto*); 1554 (C=C); 2214 (CN); 2943 (-C-H);

2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila

(6CN07):

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ : 8,74 (1H, s, N=CH); 8,27 (1H, d, $J = 8,6$ Hz); 7,41 (1H, d, $J = 2,0$ Hz); 7,32 (1H, dd, $J = 8,6, 1,2$ Hz); 2,64 – 2,73 (4H, m); 1,79 – 1,92 (4H, m). Infravermelho: 671 (C-Cl em *orto*); 1562 (C=C); 2217 (CN); 2931 (-C-H);

2-[(2,4,5-trimetoxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN08):

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ : 8,31 (1H, s, N=CH); 7,17 (2H, s); 3,93 (9H, d, $J = 6,4$, OCH_3); 2,65 – 2,71 (4H, m); 1,84 – 1,89 (4H, m). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ : 22,00; 23,07; 24,32; 25,19; 56,28; 61,02; 106,33; 106,44; 114,49; 130,41; 132,17; 135,20; 142,03; 153,52; 158,55; 159,84. Infravermelho: 1127 (C-O-C axial simétrico); 1329 (C-O-C axial assimétrico); 2212 (CN); 2832 (-C-H); 2935 (=C-H). Massa calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 356,119, M+1 encontrado: 357,123.

2-[(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN09):

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ : 8,76 (1H, s, N=CH); 8,31 (1H, s, $J = 2,4$ Hz); 7,51 (1H, dd, $J = 2,8$ Hz); 6,81 (1H, d, $J = 8,8$ Hz); 3,89 (3H, s); 2,65 – 2,71 (4H, m); 1,83 – 1,88 (4H, m). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ : 22,00; 23,05; 24,30; 25,21; 55,91; 107,04; 112,93; 113,82; 114,43; 125,32; 130,51; 132,70; 135,22; 136,05; 153,38; 158,73; 160,24. Infravermelho: 804 (C-Br); 1270 (C-O-C axial simétrico); 1472 (C-O-C axial assimétrico); 2215 (CN); 2834 (-C-H); 2943 (=C-H). Massa calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{BrN}_2\text{OS}$: 374,009, M+1 encontrado: 375,014.

2-[4-nitro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN10):

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ : 8,41 (1H, s, N=CH); 8,27 (2H, t, $J = 8,8$ Hz); 8,06 (2H, t, $J = 8,8$ Hz); 2,63 – 2,73 (4H, m); 1,84 – 1,87 (4H, m). Infravermelho: 2947 (=C-H); 2221 (CN); 1596 (C=C); 1335 (NO_2).

2-[(4-cloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN11):

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ : 8,32 (1H, s, N=CH); 7,83 (2H, d, $J = 8,4$ Hz); 7,33 (2H, d, $J = 8,4$ Hz); 2,65 (4H, d, $J = 58$ Hz); 1,83 (4H, s). Infravermelho: 818 (C-Cl); 2221

(CN); 2838 (-C-H); 2943 (=C-H). Massa calculada para $C_{16}H_{13}ClN_2S$: 300,049, M+1 encontrado: 301,054.

2-[(4-metoxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila

(6CN12):

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ : 8,34 (1H, s, N=CH); 7,86 – 7,89 (2H, m); 6,95 – 6,97 (2H, m); 3,87 (3H, s, O- CH_3); 2,64 – 2,69 (4H, m); 1,83 – 1,88 (4H, m); RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ : 22,03; 23,11; 24,30; 25,17; 55,49; 105,85; 114,38; 114,69; 128,04; 131,39; 131,46; 134,88; 158,41; 160,61; 163,14. Infravermelho: 1162 (C-O-C axial simétrico); 1251 (C-O-O axial assimétrico); 1559 (C=C); 2213 (CN); 2836 (-C-H); 2935 (=C-H). Massa calculada para $C_{17}H_{16}N_2OS$: 296,098, M+1 encontrado: 297,103.

2-[(4-metil-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila

(6CN13):

RMN 1H (60 MHz, $CDCl_3$): δ : 8,41 (1H, s, N=CH); 7,80 – 7,94 (2H, m); 7,23 – 7,37 (2H, m); 2,72 (4H, m); 2,47 (3H, s); 1,79 – 2,01 (4H, m). Infravermelho: 1591 (C=C); 2219 (CN); 2861 (-C-H); 2925 (=C-H).

2-[(4-flúor-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila

(6CN14):

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ : 8,36 (1H, s, N=CH); 7,90 – 7,95 (2H, m); 7,11 – 7,16 (2H, m); 2,63 – 2,70 (4H, m); 1,80 – 1,90 (4H, m). RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ : 21,94; 23,01; 24,26; 25,17; 107,03; 114,45; 116,01; 116,31; 131,35; 131,44; 131,57; 132,50; 135,15; 157,31; 159,49; 163,52. Infravermelho: 1574 (C=C); 2219 (CN); 2861 (-C-H); 2922 (=C-H).

Os espectros de RMN foram realizados utilizando $CDCl_3$ como solvente. As multiplicidades dos sinais são indicadas pelas seguintes abreviações: simpleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd), duplo tripleto (dt), tripleto (t), quadruplete (q), multiplete (m). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamentos (J) em Hz.

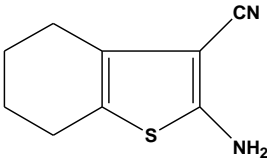
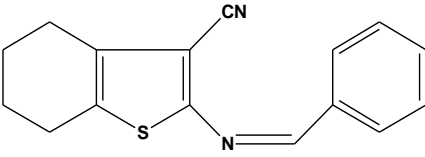
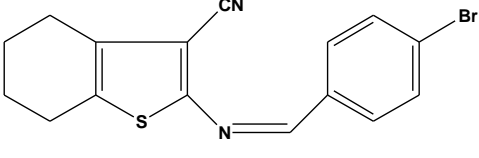
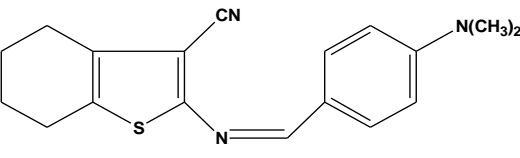
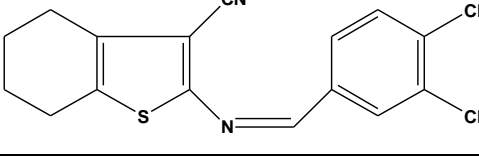
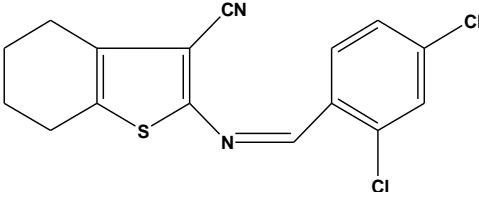
Os valores de deslocamento químico e constante de acoplamento do RMN 1H e RMN ^{13}C encontrados, bem como as bandas de absorção do espectro de

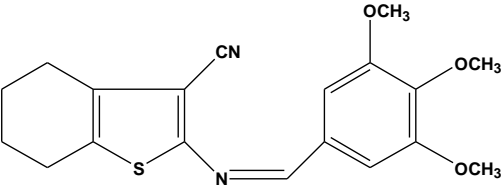
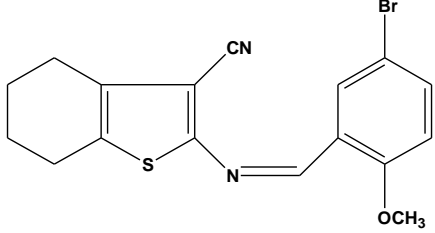
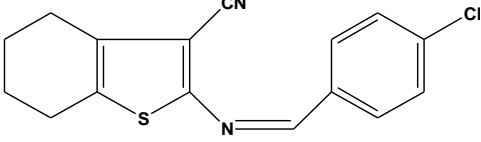
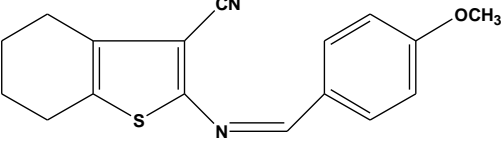
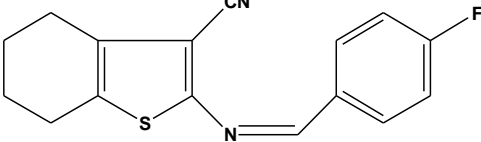
infravermelho e os valores das massas exatas dos íons moleculares encontrados estão todos de acordo com os valores esperados, o que confirma e comprova a estrutura química das moléculas.

5.2 TESTES DE CITOTOXICIDADE

Os valores de CL_{50} bem como a estrutura química dos compostos testados frente à *Artemia salina* encontram-se na Tabela 2.

Tabela 3. Valores de CL_{50} frente *Artemia salina*.

Composto	Estrutura	CL_{50} em $\mu\text{g/ml}$
6CN		22,84
6CN01		187,1
6CN03		>1000
6CN04		91,62
6CN05		>1000
6CN07		369,65

6CN08		>1000
6CN09		0,63
6CN11		76,03
6CN12		749,45
6CN14		679,61

O composto de partida **6CN** (22,84 $\mu\text{g/ml}$) se apresentou muito citotóxicos. Ao ser comparado com o **6CN01** (187,1 $\mu\text{g/ml}$), observa-se que a adição do aldeído aromático tende a reduzir a sua citotoxicidade, o que pode ser comprovado ao observar os demais compostos testados. A única exceção é o **6CN09** que teve o menor valor de CL_{50} (0,63 $\mu\text{g/ml}$) entre os compostos, demonstrando-se altamente tóxico frente às artemias.

Com relação aos compostos com aldeídos *p*-monosubstituídos, o **6CN03** é o único que se apresentou atóxico, uma vez que sua CL_{50} é superior a 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Meyer *et al.*, 1982). Já o **6CN12** e **6CN14** demonstraram moderada citotoxicidade possuindo CL_{50} entre 1000 e 500 $\mu\text{g/ml}$, enquanto os compostos **6CN04** (91,62 $\mu\text{g/ml}$) e **6CN11** (76,03 $\mu\text{g/ml}$) tiveram CL_{50} inferior a 100 $\mu\text{g/ml}$, possuindo assim alta citotoxicidade.

O **6CN07** também se demonstrou tóxico ao teste realizado, tendo CL_{50} de 369,65 $\mu\text{g/ml}$. Contudo, ao modificar a posição do radical cloro no aldeído, de *orto* para *meta*, o composto se torna atóxico, como é observado em **6CN05**.

Assim como o **6CN03** e o **6CN05**, o composto **6CN08** também se apresentou atóxico.

6 CONCLUSÕES

Foram sintetizados 14 novos derivados 2-[(benzilideno)amino]-4,5,6,7-tetraidro-4*H*-benzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila todos sob a forma de pó na cor amarela variando apenas de tonalidade, e um intermediário sob a forma de pó de cor branca.

A rota sintética empregada se apresentou eficiente para a síntese dos compostos, uma vez que eles apresentaram bons rendimentos, variando de 79% (**6CN05**) a 96% (**6CN10**), tendo como exceção apenas os compostos **6CN13** (60%) e **6CN14** (50%), e ainda tendo uma grande facilidade de purificação, não havendo necessidade da utilização de processos cromatográficos, como por exemplo cromatografia em coluna.

Todos os compostos tiveram suas características físico-químicas determinadas, como também sua estrutura comprovada pelas técnicas de espectroscopia de Infravermelho, espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio de Carbono e espectrometria de massas.

O ensaio de citotoxicidade frente ao modelo animal *Artemia salina* mostrou-se apto e viável na determinação da CL₅₀ dos compostos, onde 11 compostos tiveram sua citotoxicidade avaliada, desses 3 se apresentaram atóxicos (**6CN03**, **6CN05** e **6CN08** com valores de CL₅₀ superiores a 1000 µg/ml), enquanto os demais apresentaram de moderada a alta citotoxicidade com valores de CL₅₀ variando de 0,63 a 749,45 µg/ml.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABREU, C. L. C. **Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3t3**. 2008. 104 p. Tese (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz.

BARBOSA, T. P. *et al.* Síntese e avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* Leach. de adultos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH). In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA - SBQ**, 30., 2007, Águas de Lindóia - SP. Disponível em: <<https://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0642-1.pdf>>. Acesso em: 03 de fev. 2010.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**: As bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2001. 243 p.

COSTA, R. N. *et al.* Estudo da aplicabilidade do ensaio de citotoxicidade por quantificação de proteínas totais na avaliação do potencial irritante ocular de tensoativos. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 7, n. 1, p. 29-43, 2009.

DALLEMAGNE, P. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Five-Membered Heterocycles Fused to Cyclopenta[c]thiophene as New Antitumor Agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p.1161-7, 2003.

ERTÜZÜN, V. The synthesis of 2-amino furan from a nitrile bearing active methylene and α -hydroxyketone and investigation of its properties. **Communications de la Faculté des Sciences de l'Université d'Ankara**, v. 32, p. 41-54, 1986.

FAKHR, I. M. I. *et al.* 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, p. 1718-25, 2008.

FERREIRA, A. P. *et al.* Synthesis and Characterization of New Organometallic Benzo[b]thiophene Derivatives with Potential Antitumor Properties. **Organometallics**, v. 28, n. 18, p.5412-5423, 2009.

FERREIRA, I. C. F. R. *et al.* Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[b]thiophenes series: a structure-activity evaluation study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p.5831-3, 2004.

FINNEY, D. J. Probit analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve. **Cambridge: Cambridge University Press**, p. 318, 1952.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p.171-177, 2005.

GEWALD, K. Zur Reaktion von α -Oxo-mercaptanen mit Nitrilen. **Angewandte Chemie**, v. 73, n. 3, p. 114, 1961.

GEWALD, K. 2-Amiono-thiophene aus α -oxo-mercaptanen und methylenaktiven nitrilen. **Chemische Berichte**, v. 98, p. 3571-7, 1965.

GEWALD, K.; SCHINKE, E.; BOTTCHE, H. 2-Amiono-thiophene aus methylenaktiven nitrilen, Carbonylverbindungen und schwefel. **Chemische Berichte**, v. 99, p. 94-100, 1966.

HEWTON, C. E.; KIMBER, M. C.; TAYLOR, D. K. A One-pot synthesis of thiophene and pyrrole derivatives from readily accessible 3,5-dihydro-1,2-dioxines. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 17, p. 3199-201, 2002.

HOQUE, M. & ISLAM, R. Cytotoxicity study of some indophenines and isatin derivatives. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, Bangladesh, v. 3, n. 1, p. 21-6, 2008.

KOUTSAFTIS, A.; AOYAMA, I. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. **The Science of the total environment**, v. 387, p. 166-74, 2007.

LIMA, J. M. *et al.* PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.27, n. 1, p. 7-11, 2009.

LIMA, N. M. F. *et al.* Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni cercariae*, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. **Acta Tropica**, v. 83, n. 1, p. 43-7, 2002.

LIU, Y. *et al.* Mechanism of Cellular 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**. v. 69, n. 2, pp. 581-93, 1997.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-4, 1982.

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: **Seminário de Iniciação Científica PUC-Rio**, 15, 2007 Rio de Janeiro.

MONTANARI, C. A. Química Medicinal: contribuição e Perspectiva no desenvolvimento da Farmacoterapia. **Química Nova**, v. 18, n. 1, p. 56-64, 1995.

NAIR, M. G.; ABRAHAM, A. Thiophene substitutes antitumor antifolates **US Patent** nº 5,260,296; 9 nov. 1993.

NASCIMENTO, J. E. *et al.* Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach . de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p.143-8, 2008.

NUNES, B. S. *et al.* Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental pollution**, v. 144, n. 2, p. 453-62, 2006.

PARIS, M. *et al.* Protocol optimization during a validation study to evaluate *in vitro* cytotoxicity assays for estimating rodent acute systemic toxicity. In: **World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences**, 5., 2005, Berlim - Alemanha. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/meetings/5wcprst/5WCstrick.pdf>>. Acesso em: 15 de nov. 2010.

PINKERTON, A. B. *et al.* Synthesis and SAR of thiophene containing Kinesin spindle protein (KPS) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 13, p. 3562-9, 2007.

PINTO, E. *et al.* Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 16, n. 17, p. 8172-7, 2008.

PUTEROVÁ, Z.; KRUTOSÍKIVÁ, A.; VÉGH, D. Gewald reaction: synthesis , properties and applications of substituted 2-aminothiophenes. **Arkivoc**, v. 1, p. 209-46, 2010.

RAMANATHAN, J. D. *et al.* Biological Activity of Some 2-Amino 4,5,6,7-Tetrahydro Benzo[b]thiophenes and Their Derivatives. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 55, p. 822-5, 1978.

RANDO, D.G. *et al.* A duplicated nitroienyl derivative with antimycobacterial activity: synthesis, X-ray crystallography, biological and mutagenic activity tests. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 41, p.1196-1200, 2006.

REDDY K., P. K.; REDDY., V. C.; SWAMY S. R., R. Anti-inflammatory & antioxidant of some new acid chloride derivatives of 2-amino-*N*-(3-chlorophenyl)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[*b*]thiophene-3-carboxamide. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 572-4, 2009.

ROMAGNOLI, R. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of 2- and 3-Aminobenzo[*b*]thiophene Derivatives as Antimitotic Agents and Inhibitors of Tubulin Polymerization. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 9, p.2273-7, 2007.

SHCHEKOTIKHIN, A. E. *et al.* Synthesis and cytotoxic properties of 4,11-bis[(aminoethyl)amino]anthra-[2,3-*b*]thiophene-5,10-diones, novel analogues of antitumor anthracene-9,10-diones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p.1861-9, 2009.

SRIDHAR, M. *et al.* Microwave accelerated Gewald reaction: synthesis of 2-aminothiophenes. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p.3171-2, 2007.

TRIGLIA, D. *et al.* *In vitro* toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model. **In vitro cellular & developmental biology**, v. 27, n. 3, p. 239-244, 1991.

WANG, C. Y. *et al.* Antibacterial activity of nitropyrroles, nitrothiophenes, and aminothiophenes *in vitro*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 8, n. 2, p. 216-9, 1975.

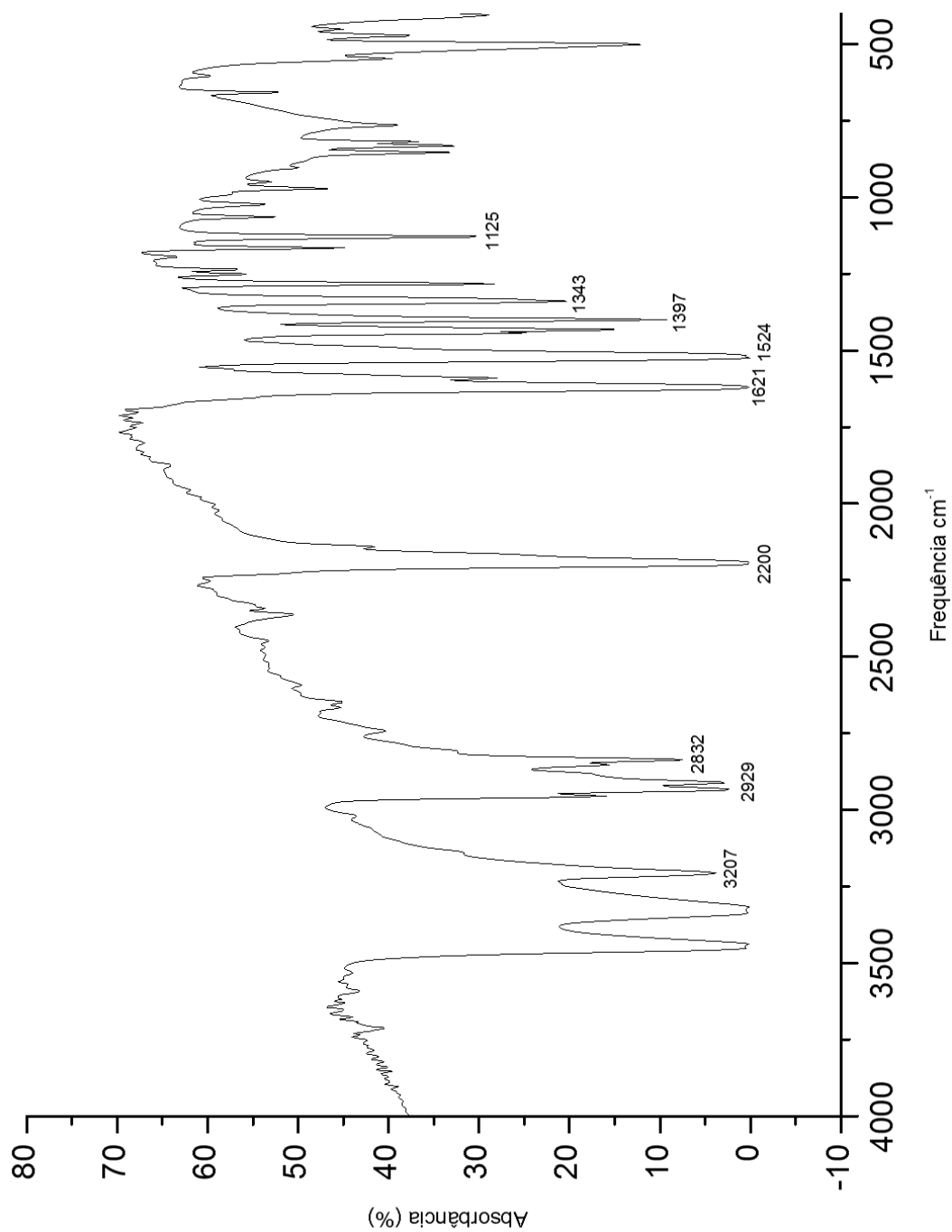
VARÓ, I. *et al.* Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. **Chemosphere**, v. 48, n. 6, p. 563-9, 2002.

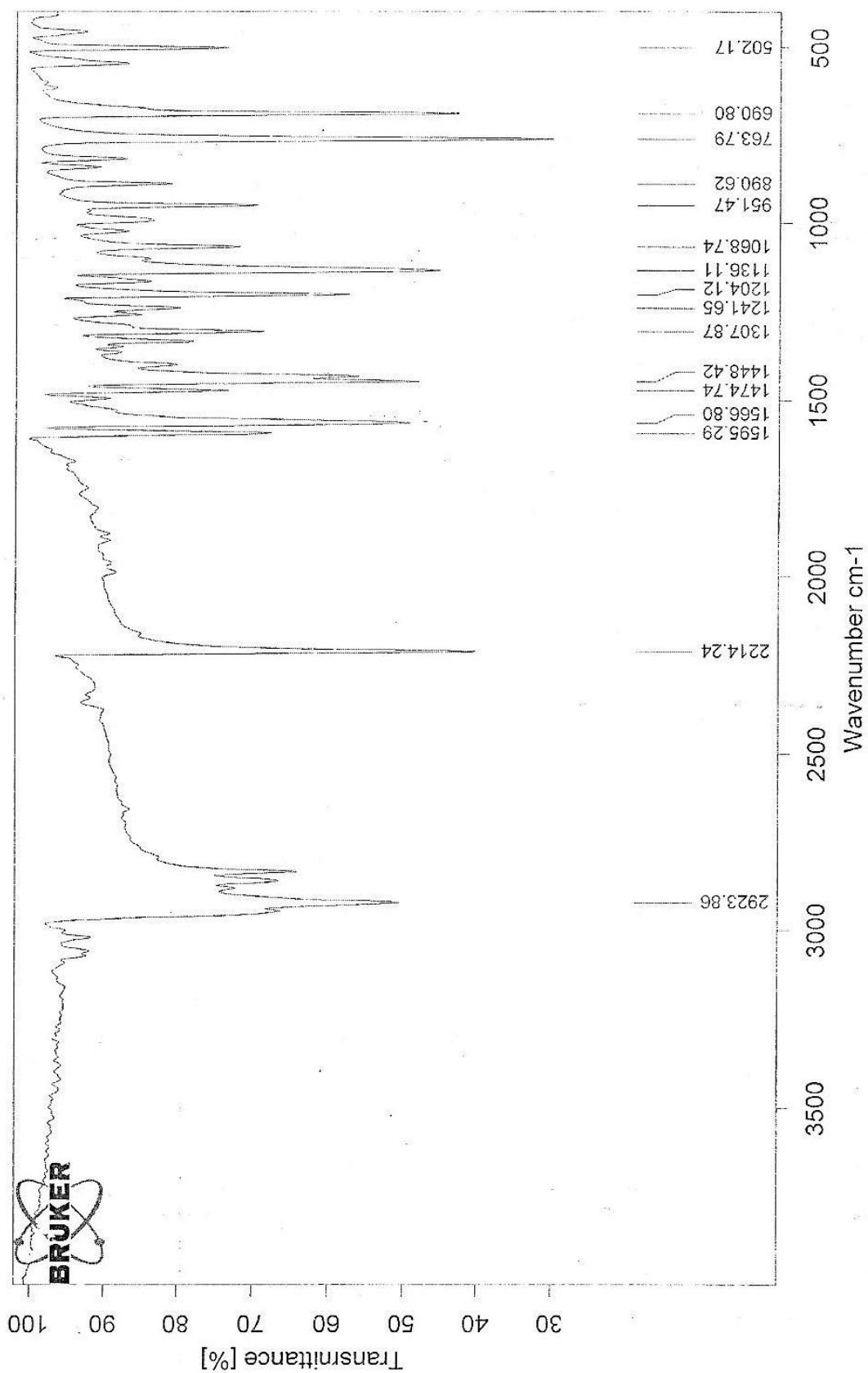
WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida?. **Uso Racional de Medicamentos: Temas Selecionados, Brasília**, v. 1, n. 4, p.1-6, mar. 2004. Disponível em:

<http://www.opas.org.br/medicamentos/temas_documentos_detalhe.cfm?id=46&iddoc=267>. Acesso em: 02 jan. 2009.

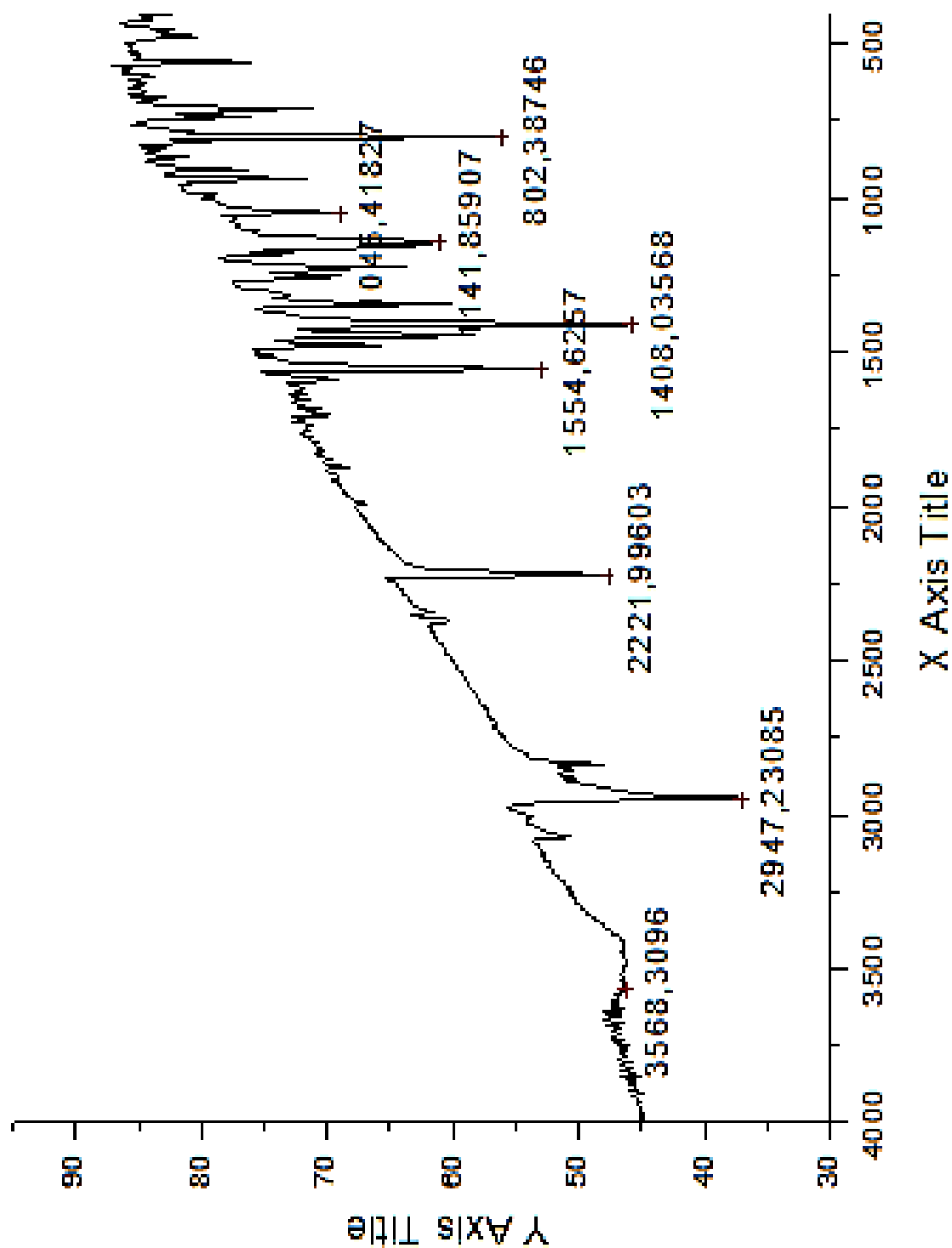
ZHONGHAI, W. **Experimental and theoretical studies on organic attachment to silicon surfaces**. 2005. 203 p. Tese (Doutorado em Filosofia) - Departamento de Química, Universidade Nacional de Singapura.

8 ANEXOS

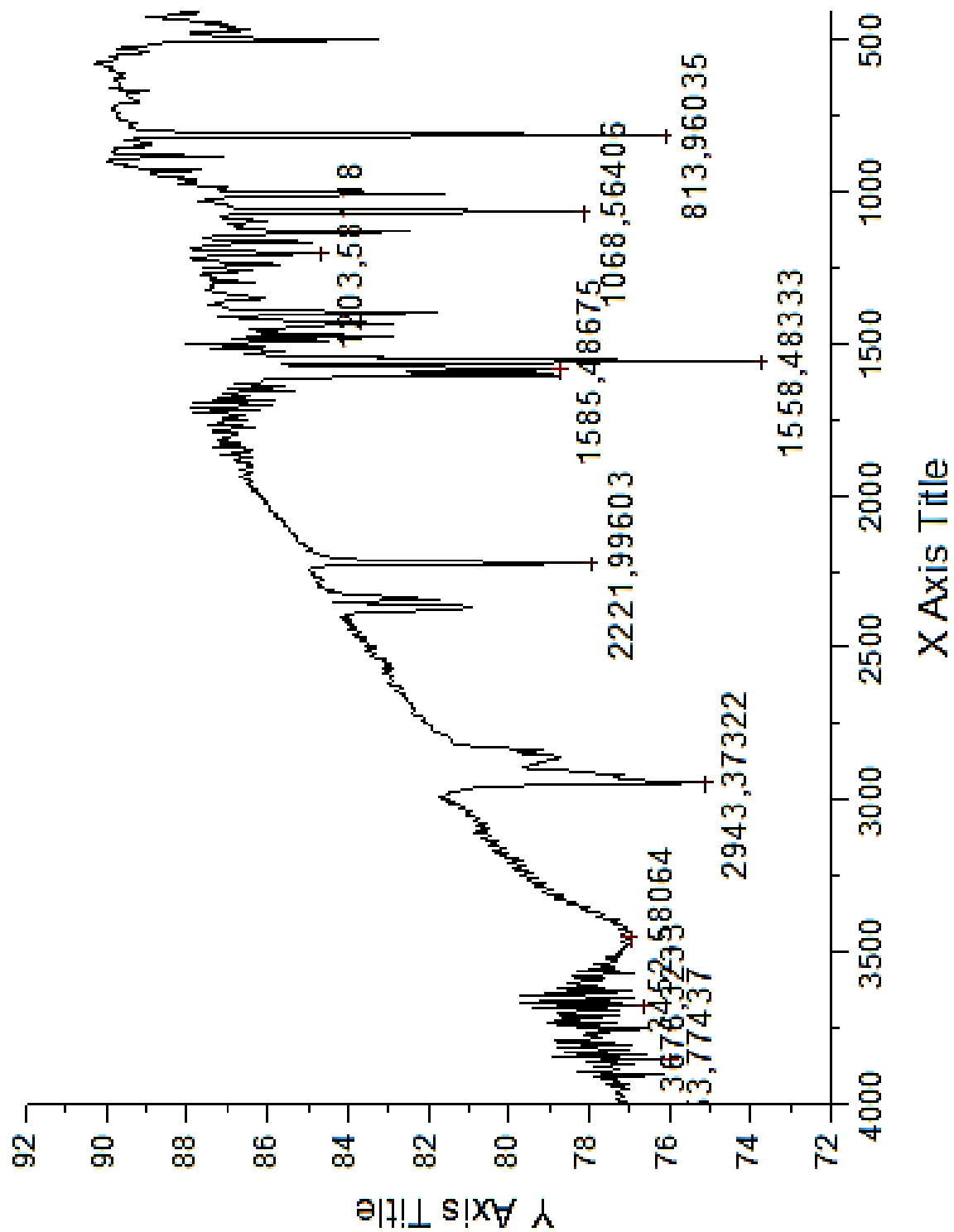
ANEXO I – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO2-amino-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (**6CN**)

2-[(benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (**6CN01**)

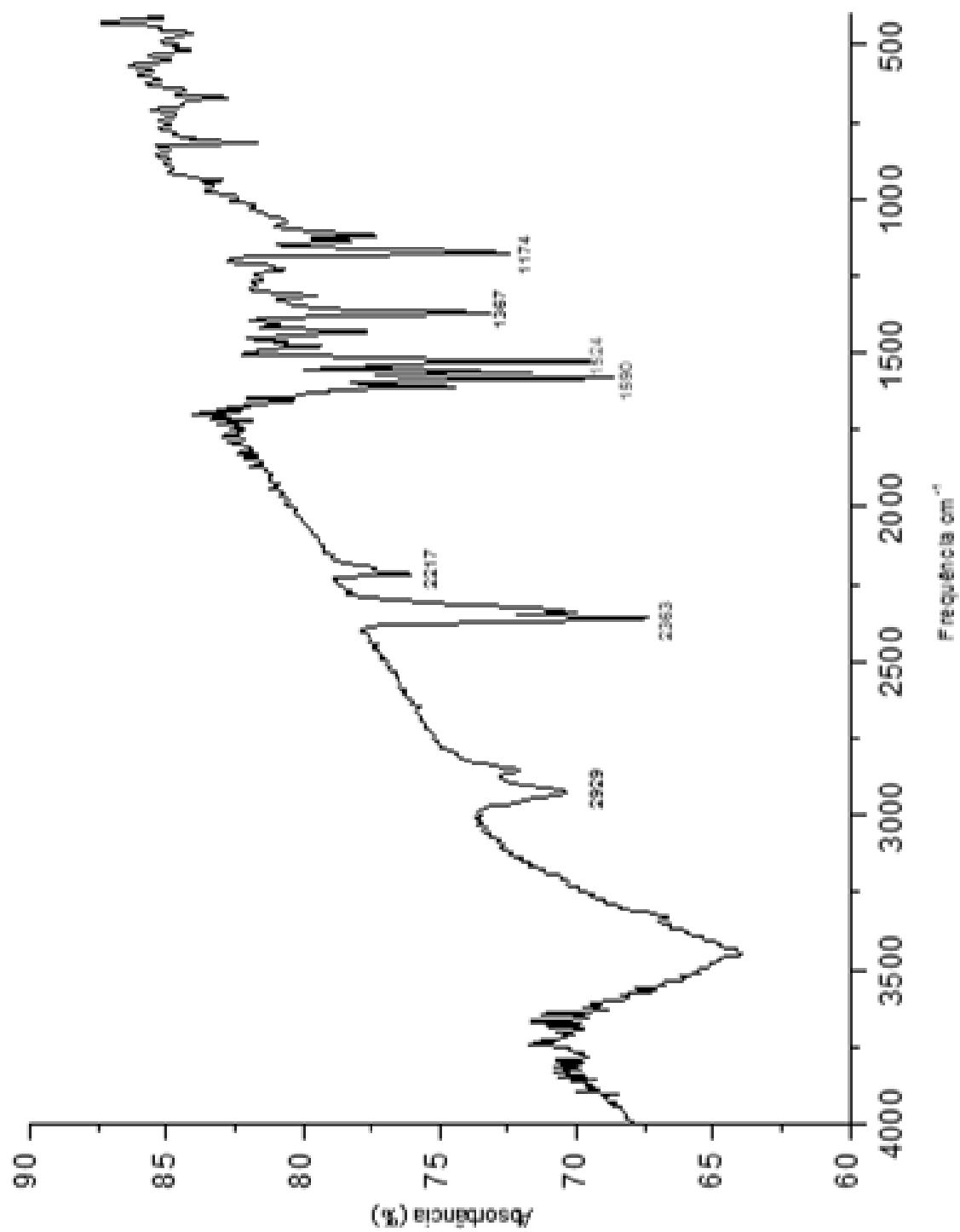
2-[(2,3-dicloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila
(6CN02)



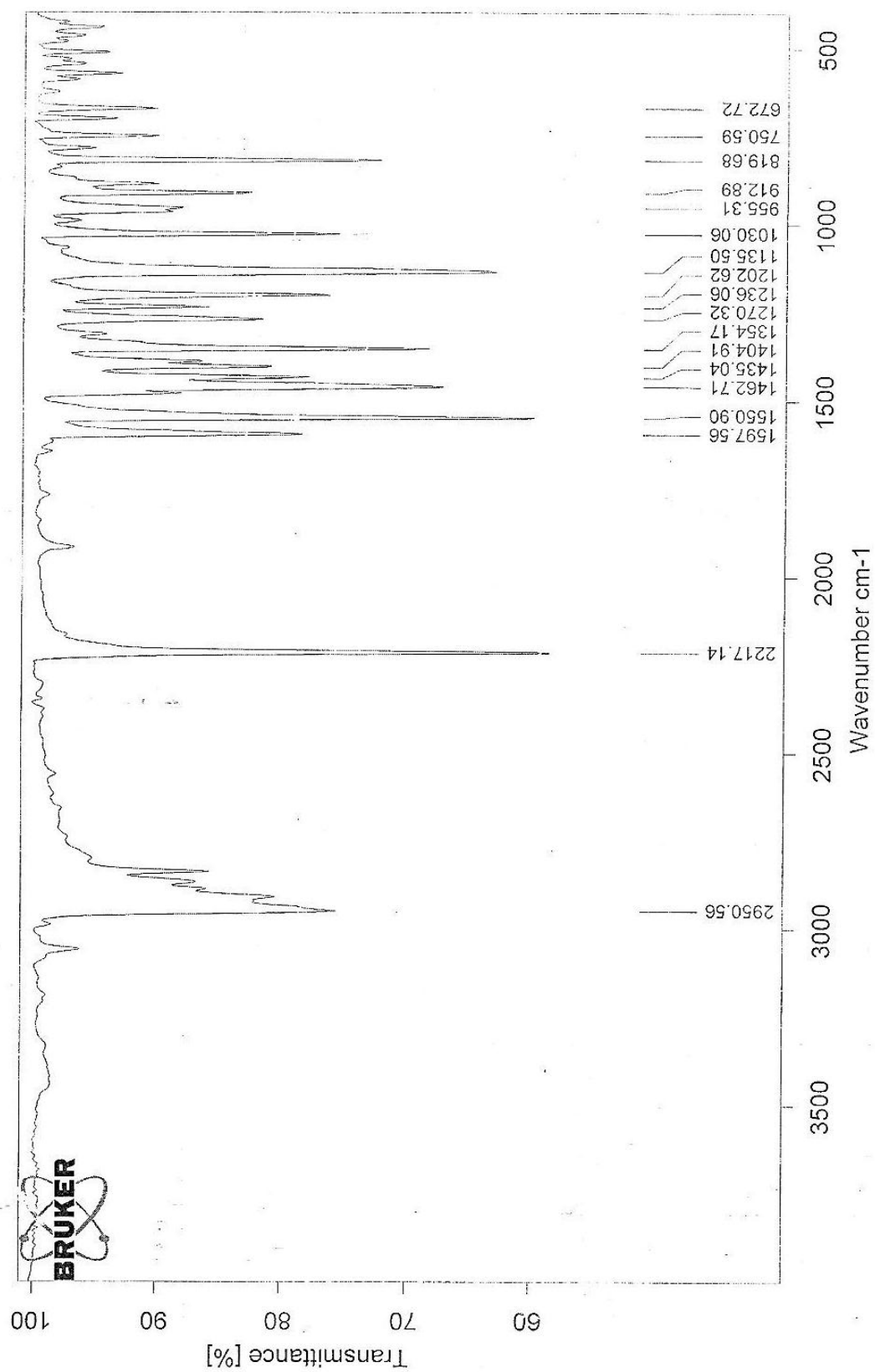
2-[(4-bromo-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila
(6CN03)



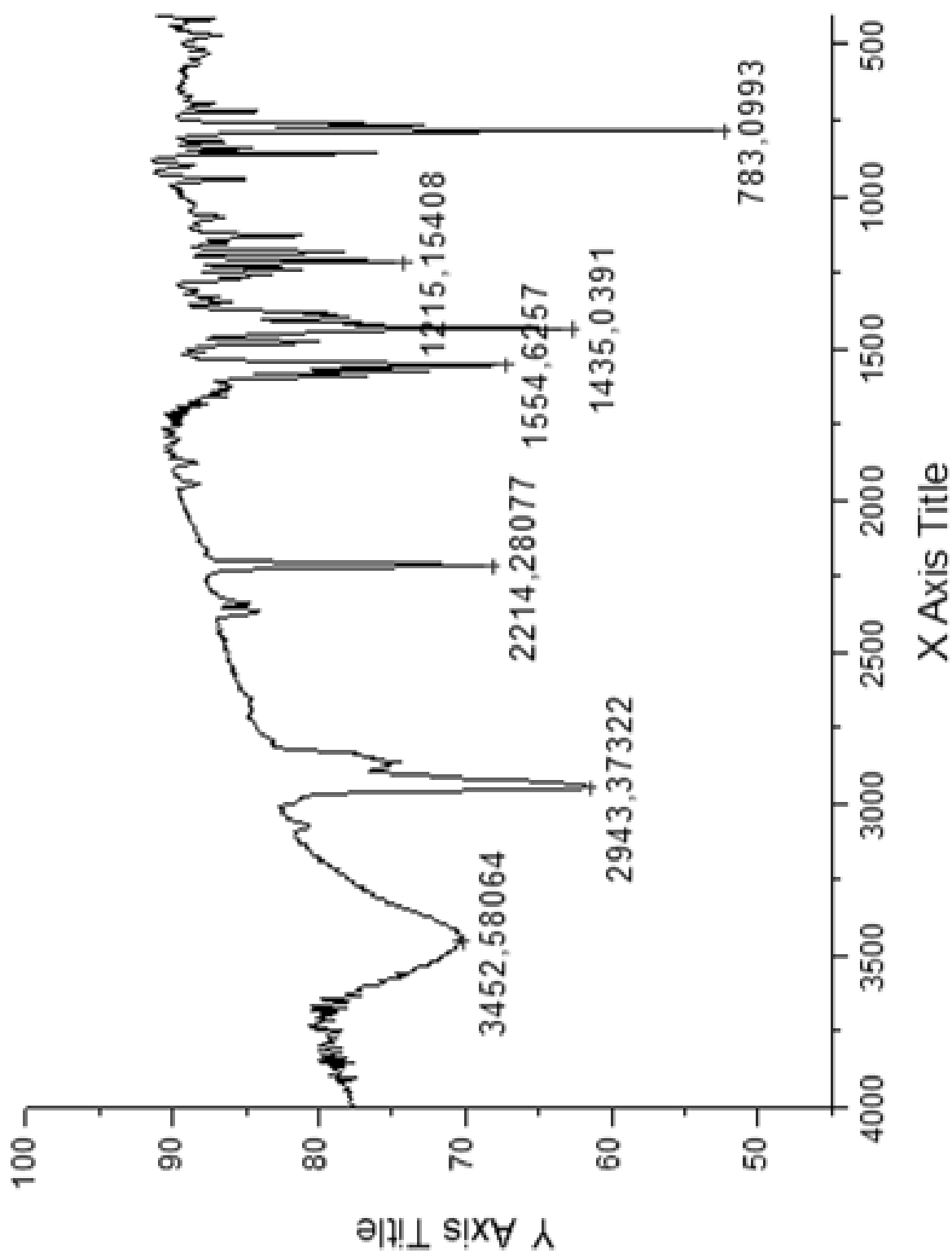
2-[(4-dimetilamino-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (**6CN04**)



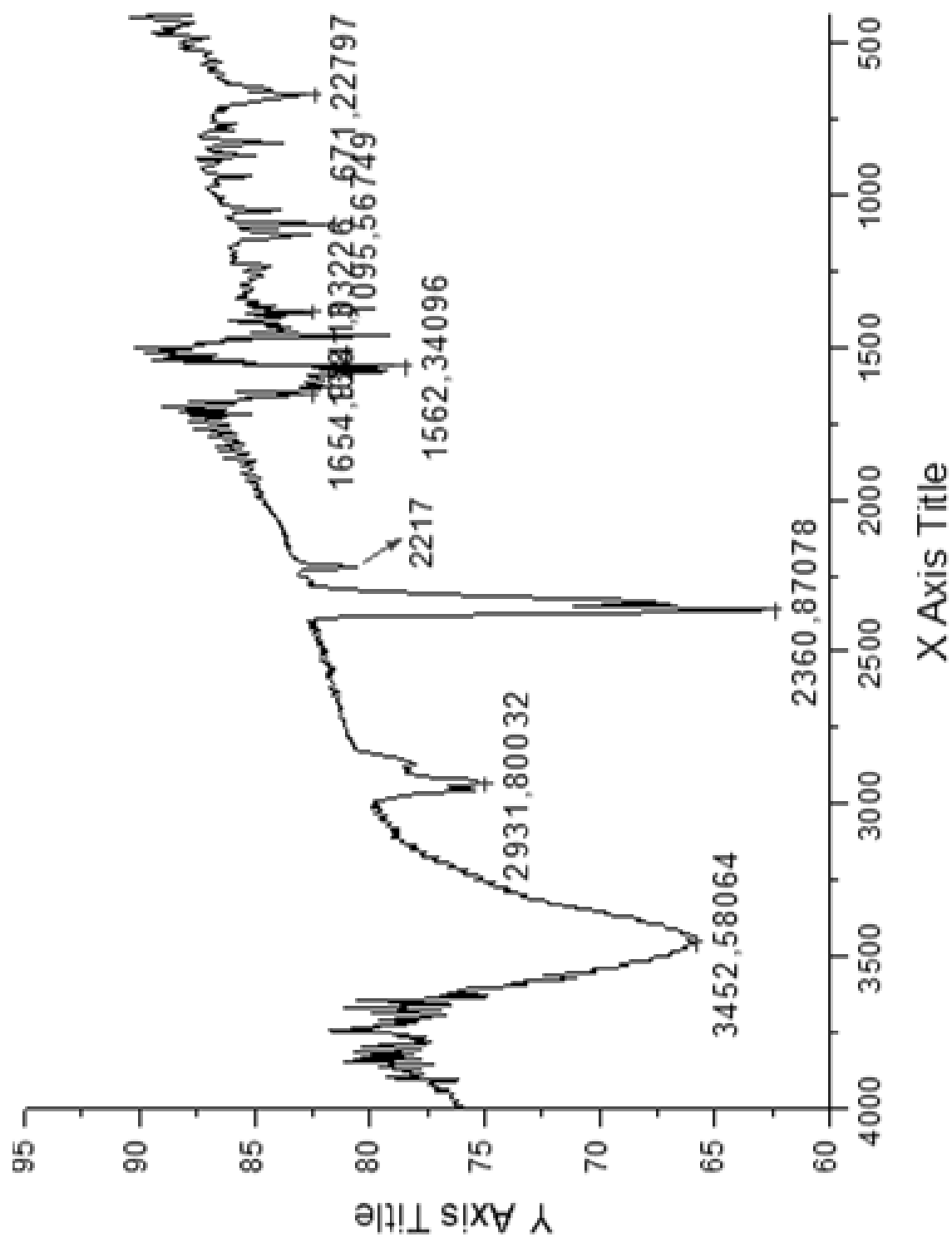
2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila
(6CN05)



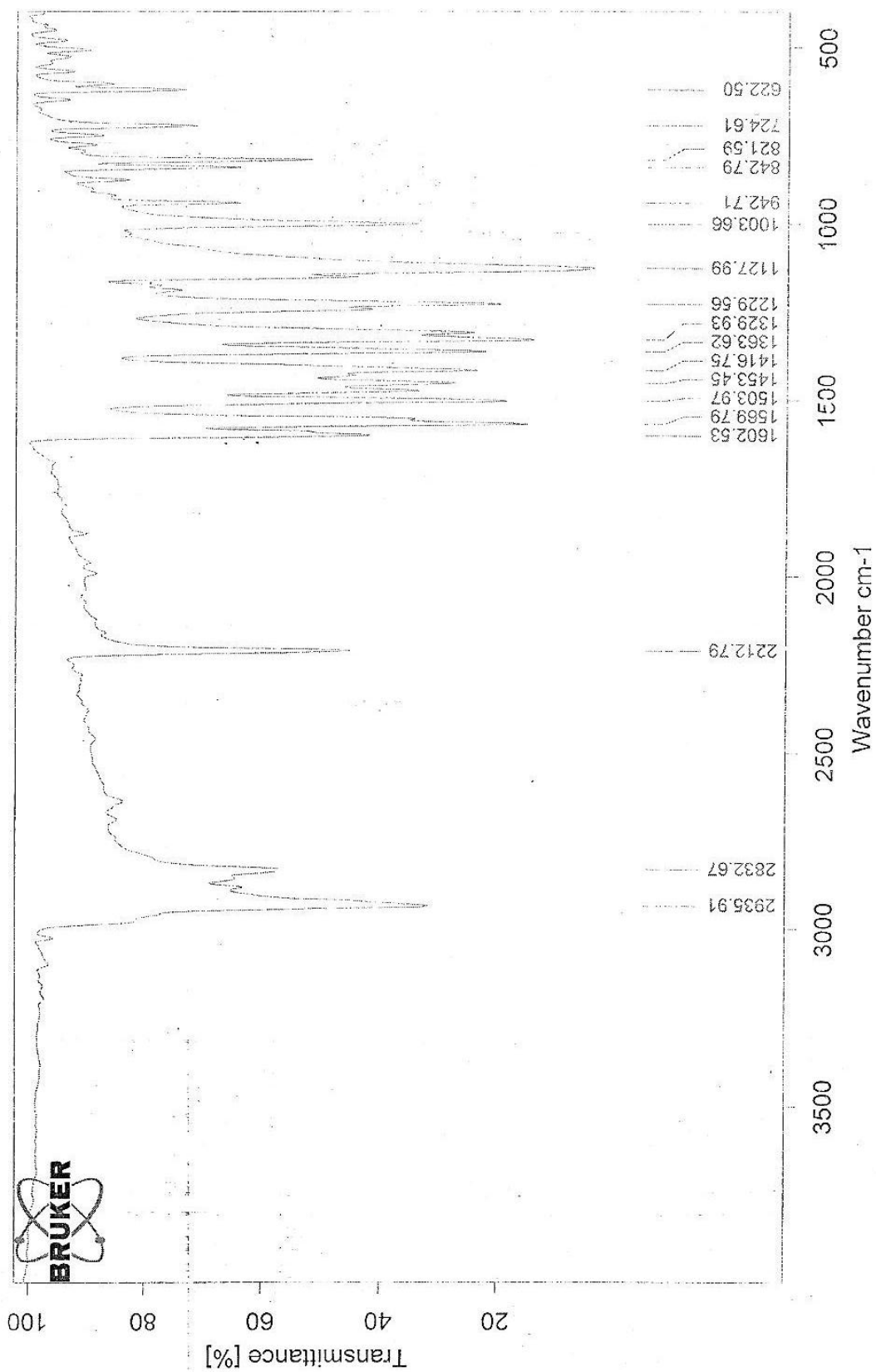
2-[(2,6-dicloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila
(6CN06)



2-[(2,4-dicloro-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila
(6CN07)



2-[(2,4,5-trimethoxy-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (**6CN08**)



2-[(5-bromo-2-metoxi-benzilideno)-amino]-4,5,6,7-tetraidro-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (**6CN09**)

