



NOVA

NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Rita Alexandra Padinha Lopes

Licenciada em Química

Síntese e avaliação *in vitro* de novos derivados de tiossemicarbazonas como compostos biologicamente ativos.

MESTRADO EM QUÍMICA BIOORGÂNICA

Universidade NOVA de Lisboa

Dezembro, 2021

Síntese e avaliação *in vitro* de novos derivados de tiossemicarbazonas como compostos biologicamente ativos.

Rita Alexandra Padinha Lopes

Licenciada em Química

Orientador: Professora Doutora Susana Maria Martinho de Bastos Pinto Pina dos Santos, Professora auxiliar, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

Coorientador: Professora Doutora Maria Luísa Mourato de Oliveira Marques Serralheiro, Professora associada com agregação, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

Júri:

Presidente: Professora Doutora Paula Cristina de Sério Branco, Professora associada com agregação, NOVA School of Science and Technology, Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Professora Doutora Alexandra Maria Moita Antunes, Professora auxiliar, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa

Vogais: Professora Doutora Susana Maria Martinho de Bastos Pinto Pina dos Santos, Professora auxiliar, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

Síntese e avaliação *in vitro* de novos derivados de tiossemicarbazonas como compostos biologicamente ativos.

Copyright © Rita Alexandra Padinha Lopes, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

No decorrer deste último ano, tive a oportunidade de desenvolver a minha dissertação de mestrado, que só foi possível com a diligência e o apoio de várias pessoas, a quem não posso deixar de agradecer.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Susana Santos pela partilha de conhecimento, críticas e opiniões construtivas, pela confiança que depositou em mim e no meu trabalho, por todo o apoio e a paciência que teve para comigo, desde o início do meu percurso académico. Em si vejo um exemplo que eu quero seguir, que irei recordar para sempre com carinho.

À Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro, coorientadora desta dissertação, que eu tive o enorme prazer de trabalhar, não só pelo apoio científico na parte dos ensaios biológicos, como também pelo seu positivismo e espírito crítico que com toda a certeza enriqueceu o meu trabalho.

Gostaria de agradecer também à Professora Doutora Helena Gaspar, pela partilha de conhecimento científico no HPLC e por ter permitido que analisasse os meus compostos no aparelho do qual é responsável. A sua paixão por aprender e ensinar fascinou-me e por isso, espero no futuro poder vir a trabalhar consigo tal como idealizo.

Agradeço também à minha colega de laboratório, Raquel Ferro, pela amizade e companheirismo que construímos ao longo deste ano, por toda a entreatada, tanto a nível laboratorial como emocional.

Paralelamente, quero também agradecer à Laura Guedes pela disponibilidade e pela incansável ajuda prestada nos diversos ensaios com as linhas celulares, não serás esquecida!

A nível pessoal, quero expressar os meus especiais agradecimentos a três minhas amigas muito especiais:

À Sara Gomes que é de longe uma das pessoas mais importantes, a minha melhor amiga desde sempre, que me apoia em tudo e está sempre disponível para mim. As saídas à noite, as férias, as histórias que ficarão para mais tarde recordar, todos os momentos e gargalhadas...São 14 anos de amizade, és família!

À minha melhor amiga Sara Sofia, que foi sem dúvida o meu pilar nestes últimos dois anos. Graças às saídas à noite, aos almoços, às conversas 24/7 e às mil e umas aventuras, construímos uma amizade e conexão como nunca tivemos com alguém, ao ponto de dizermos que fomos irmãs noutra vida. Tornaste-te uma pessoa muito especial para mim, que jamais esquecerei... tu sabes que és para a vida!

À Sofia Matos, a minha primeira amiga da faculdade e hoje em dia melhor amiga. Acompanha-me e apoia-me incondicionalmente desde o início. As horas intensas de estudo, os passeios, os almoços, os conselhos são recordações que guardarei para sempre na memória e no coração. Sem ti esta jornada nunca teria sido igual.

Quero também agradecer às minhas amigas Ana Rita Cunha e Diana Borges por toda a amizade e carinho. Estão comigo desde o início do meu percurso académico e não tenho dúvidas que a nossa amizade será para a vida.

Um obrigada especial à Filipa Martins, ao Miguel Alves, Beatriz Carvalho e Nuno Figueira, que foram das melhores pessoas que tive a oportunidade de conhecer e por partilharem o mesmo amor comigo por sushi. Tornaram os meus anos de faculdade especiais.

Por último, deixo um imenso agradecimento à minha família, aos meus avós, tia Nela, tios, a minha prima Eva e padrinhos, por todo o amor e força que recebi e continuarei a receber de forma incondicional, seja nos momentos aflitivos ou de celebração. Um especial agradecimento às minhas duas estrelinhas, que estão lá em cima a torcer por mim, bisa e avó Celeste. À minha mãe e ao meu pai, que são os melhores pais do mundo, por nunca deixarem de acreditar em mim e nas minhas capacidades e essencialmente, por estarem presentes na minha vida, amo-vos do fundo do meu coração.

A todos, dedico o sucesso do meu trabalho.

Resumo

A produção de radicais livres é uma consequência normal do metabolismo celular. O equilíbrio entre a produção destas espécies e o sistema de defesa antioxidante é fundamental na manutenção das funções fisiológicas, uma vez que um excesso de oxidantes leva a uma situação de *stress* oxidativo. Devido a este fenómeno, a procura por antioxidantes exógenos tem-se intensificado. As tiossemicarbazonas têm sido estudadas em Química Medicinal devido às suas inúmeras propriedades biológicas, destacando-se as promissoras atividades antioxidante e anticancerígena.

Neste trabalho construiu-se uma pequena biblioteca de quinze derivados de tiossemicarbazonas (**4.a - 4.o**), dez dos quais novos (**4.a - 4.e, 4.h, 4.l, 4.m - 4.o**). Os compostos foram caracterizados por RMN (¹H, ¹³C-APT, COSY, HSQC, HMBC e, no caso de **4.b, 4.h, 4.m** e **4.o** por NOESY), IV e ESI-HRMS.

Avaliou-se a atividade antioxidante de todos os compostos segundo o método de sequestro do radical livre DPPH. Sete compostos (**4.a, 4.d, 4.f, 4.g, 4.m - 4.o**) revelaram uma capacidade antioxidante boa a moderada, com valores de EC₅₀ compreendidos entre 51,34 ± 1,93 μM e 252,16 ± 3,61 μM. O composto mais promissor foi a (*E*)-2-((3-metil-1*H*-indole-2-il)metileno)-*N*-fenilhidrazinacarbotoamida (**4.o**) com um EC₅₀ de 51,34 ± 1,93 μM, comparável ao da rutina 11,36 ± 0,38 μM e ácido ascórbico 23,66 ± 0,82 μM.

A citotoxicidade *in vitro* dos compostos (**4.b** e **4.f - 4.o**), foi avaliada em células de hepatocarcinoma humano Hep-G2, para uma indicação preliminar do potencial hepatotóxico e, células de cancro da mama hormono-dependente MCF-7, segundo o método colorimétrico do MTT. Os resultados demonstraram que, em ambas as linhas celulares, para uma concentração de 100 μM, não se obteve uma percentagem de morte celular significativa, portanto nenhum dos compostos testados é citotóxico.

Em suma, com os resultados obtidos foi possível concluir que as tiossemicarbazonas sintetizadas não apresentam citotoxicidade, nem para as células Hep-G2 nem para as MCF-7. Contudo, sustentam que alguns dos compostos apresentam um promissor potencial antioxidante, com destaque para o **4.o**, que poderá representar uma *lead* para o desenvolvimento de novos antioxidantes.

Palavras-Chave: radicais livres, antioxidantes, tiossemicarbazonas, atividade antioxidante, citotoxicidade.

Abstract

The production of free radicals is a common consequence of cellular metabolism. The balance between these species and the antioxidant defense system is essential in maintaining physiological functions since an excess of oxidants, leads to a situation of oxidative stress. Due to this phenomenon, the search for exogenous antioxidants has intensified. Thiosemicarbazones have been the subject of studies in medicinal chemistry due to their numerous biological properties, highlighting their promising antioxidant and anticancer activity.

In this project, a small library of fifteen thiosemicarbazones derivatives (**4.a - 4.o**) was built, ten of which were new (**4.a - 4.e, 4.h, 4.i, 4.m - 4.o**). All compounds were characterized by NMR (^1H , ^{13}C -APT, COSY, HSQC, HMBC, and in the case of **4.b, 4.h, 4.m** and **4.o** NOESY was used), IV and ESI-HRMS.

The antioxidant activity of all compounds was evaluated according to the DPPH free radical scavenging method. Seven compounds (**4.a, 4.d, 4.f, 4.g, 4.m - 4.o**) showed an antioxidant capacity from good to moderate, with EC_{50} values between $51,34 \pm 1,93 \mu\text{M}$ and $252,16 \pm 3,61 \mu\text{M}$. Compound (*E*)-2-((3-methyl-1*H*-indole-2-yl)methylene)-*N*-phenyl-hydrazinecarbothioamide (**4.o**) was the most promising with an EC_{50} of $51,34 \pm 1,93 \mu\text{M}$, comparable to the rutin $11,36 \pm 0,38 \mu\text{M}$ and ascorbic acid $23,66 \pm 0,82 \mu\text{M}$.

The *in vitro* cytotoxicity of the compounds (**4.b** and **4.f - 4.o**) was evaluated in Hep-G2 human hepatocarcinoma cells, for a preliminary indication of hepatotoxic potential and, hormone-dependent breast cancer cells MCF-7, according to the MTT colorimetric assay. The results demonstrated that, in both cell lines, at a $100 \mu\text{M}$ concentration, a significant percentage of cell death wasn't obtained, therefore none of the tested compounds is cytotoxic.

In summary, with the results obtained it was possible to conclude that the synthesized thiosemicarbazones don't show cytotoxicity, either for Hep-G2 cells or for MCF-7. Nonetheless, they support that some of the compounds have promising antioxidant potential, with emphasis on the **4.o**, which may represent a lead for developing new antioxidants.

Keywords: free radicals, antioxidants, thiosemicarbazones, antioxidant activity, cytotoxicity.

Índice de matérias

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xix
Índice de esquemas	xxiii
Abreviaturas	xxv
Símbolos	xxvii
1. Introdução	1
1.1. Radicais livres e <i>stress</i> oxidativo	3
1.2. Antioxidantes	4
1.3. Antioxidantes exógenos e o seu impacto na saúde humana	5
1.4. Tiossemicarbazonas: características estruturais e atividade biológica	6
1.4.1. Tiossemicarbazonas com atividade antibacteriana	8
1.4.2. Tiossemicarbazonas com atividade antiviral	9
1.4.3. Tiossemicarbazonas com atividade anticancerígena	10
1.4.4. Tiossemicarbazonas com atividade antioxidante	13
1.5. Enquadramento do presente trabalho	16
2. Apresentação e discussão de resultados	19
2.1. Síntese de derivados de glicosil tiossemicarbazona	21
2.1.1. Caracterização do isotiocianato de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil (2)	25
2.1.2. Caracterização da <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazida (3.a)	28
2.1.3. Caracterização da indole-3-carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona (4.a)	31
2.1.4. Caracterização da indole-2-carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona (4.b)	34
2.1.5. Caracterização da 2-benzofurano carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona (4.c)	37
2.2. Síntese e caracterização de derivados de tiossemicarbazona substituídos e não substituídos em <i>N</i> 3	40
2.3. Caracterização por espectroscopia de IV dos compostos 4.a - 4.c e 4.f - 4.o	57
2.4. Determinação da atividade antioxidante: capacidade de redução do radical DPPH	58
2.5. Ensaio citotóxicos em células	65
3. Materiais e Métodos	67
3.1. Síntese	69
3.1.1. Reagentes e Solventes	69
3.1.2. Materiais e equipamentos	70
3.2. Condições analíticas do HPLC-DAD	70
3.3. Síntese de derivados de glicosil tiossemicarbazona	72

3.3.1. Procedimento geral para a síntese do isotiocianato de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil, 2.....	72
3.3.2. Procedimento geral para a síntese da <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazida, 3.a.....	73
3.3.3. Procedimento geral para a síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbazona, 4.a – 4.c	74
3.3.3.1. Caracterização da indole-3-carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona, 4.a	75
3.3.3.2. Caracterização da indole-2-carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona, 4.b	76
3.3.3.3. Caracterização da 2-benzofurano carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona, 4.c.....	76
3.4. Síntese de derivados de tiossemicarbazona não substituídos e substituídos em <i>N</i> 3	77
3.4.1. Procedimento geral para a síntese dos derivados de tiossemicarbazona não substituídos (4.f – 4.l) e substituídos (4.m – 4.o) em <i>N</i> 3.....	77
3.4.1.1. Caracterização da (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida, 4.f.....	78
3.4.1.2. Caracterização da (<i>E</i>)-2-((1-metil-1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida, 4.g. 78	
3.4.1.3. Caracterização da (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida, 4.h....	79
3.4.1.4. Caracterização da (<i>E</i>)-2-((benzofuran-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida, 4.i... 79	
3.4.1.5. Caracterização da (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida, 4.j....	79
3.4.1.6. Caracterização da (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida, 4.k ...	80
3.4.1.7. Caracterização da (<i>E</i>)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida, 4.l ..	80
3.4.1.8. Caracterização da (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoioamida, 4.m 81	
3.4.1.9. Caracterização da (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazina carbotoioamida, 4.n.....	81
3.4.1.10. Caracterização da (<i>E</i>)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazina carbotoioamida, 4.o.....	82
3.5. Determinação da atividade antioxidante.....	82
3.6. Ensaio de citotoxicidade	83
3.6.1. Cultura de células	83
3.6.2. Contagem de células	84
3.6.3. Determinação da citotoxicidade celular	84
4. Conclusão e perspectivas futuras.....	87
5. Bibliografia	91
6. Apêndices	101
6.1. Apêndice 1 - isotiocianato de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil (2)	103
6.2. Apêndice 2 - <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazida (3.a)	106
6.3. Apêndice 3 - indole-3-carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona (4.a)	109

6.4. Apêndice 4 - indole-2-carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-β-D-glucopiranosil) tiossemicarbazona (4.b).....	113
6.5. Apêndice 5 - 2-benzofurano carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-β-D-glucopiranosil) tiossemicarbazona (4.c)	117
6.6. Apêndice 6 - (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.f)	124
6.7. Apêndice 7 - (<i>E</i>)-2-((1-metil-1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.g)	127
6.8. Apêndice 8 - (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.h)	130
6.9. Apêndice 9 - (<i>E</i>)-2-((benzofuran-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.i).....	134
6.10. Apêndice 10 - (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.j)	138
6.11. Apêndice 11 - (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.k).....	141
6.12. Apêndice 12 - (<i>E</i>)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.l).....	144
6.13. Apêndice 13 - (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoamida (4.m).....	148
6.14. Apêndice 14 - (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoamida (4.n).....	152
6.15. Apêndice 15 - (<i>E</i>)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoamida (4.o).....	156
6.16. Apêndice 16 – Atividade antioxidante	160

Índice de figuras

Figura 1.1: Formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e azoto (RNS) no corpo humano. Adaptado de ¹⁴	3
Figura 1.2: Estrutura fenólica dos principais antioxidantes sintéticos.	6
Figura 1.3: Estrutura geral das tiossemicarbazonas.	6
Figura 1.4: Isómeros <i>Z</i> e <i>E</i> das tiossemicarbazonas. O substituinte R ₃ tem maior prioridade que R ₄	7
Figura 1.5: Estrutura geral das conformações das tiossemicarbazonas (a e b) e respetivas formas tautoméricas (c e d). O substituinte R ₃ tem maior prioridade que R ₄	8
Figura 1.6: Estrutura química da tiacetazona.	9
Figura 1.7: Tiossemicarbazonas sintetizados pelo grupo de Marvadi <i>et al.</i> , adaptado de ⁶⁸	9
Figura 1.8: Estrutura química do Marboran [®]	10
Figura 1.9: Compostos 7a-7n sintetizados e estudados por Sevinçli <i>et al.</i> Adaptado de ⁷⁰	10
Figura 1.10: Estrutura química da tiossemicarbazona Triapina [®]	11
Figura 1.11: Estrutura geral dos derivados de di-2-piridilcetona tiossemicarbazona.	11
Figura 1.12: Estrutura química de duas tiossemicarbazonas em ensaios clínicos: DpC e COTI-2.	12
Figura 1.13: Estruturas dos compostos estudados por Ribeiro <i>et al.</i> Adaptado de ⁹⁷	13
Figura 1.14: Tiossemicarbazonas sintetizadas pelo grupo de Bakherad <i>et al.</i> , adaptado de ⁹⁸	14
Figura 1.15: Estruturas dos compostos sintetizados por Nguyen <i>et al.</i> Adaptado de ²⁹	14
Figura 1.16: Estrutura dos derivados de glicosil tiossemicarbazonas sintetizadas por Thanh <i>et al.</i> Adaptado de ⁹⁹	15
Figura 1.17: Estrutura dos derivados de tiossemicarbazona sintetizados neste trabalho.	16
Figura 2.1: Estrutura e numeração do composto 2.	25
Figura 2.2: Correlações observadas no espetro de COSY do composto 2.	27
Figura 2.3: Correlações observadas no espetro de HMBC do composto 2 para atribuição dos sinais de RMN ¹³ C dos carbonos quaternários.	27
Figura 2.4: Estrutura e numeração do composto 3.a.	28
Figura 2.5: Principais correlações observadas nos espetros de COSY e HMBC do composto 3.a.	29
Figura 2.6: Estrutura e numeração do composto 4.a.	31
Figura 2.7: Algumas correlações observadas no espetro de HMBC do composto 4.a.	33
Figura 2.8: Algumas correlações observadas nos espetros de COSY e HMBC do composto 4.a.	33
Figura 2.9: Estrutura e numeração do composto 4.b.	34
Figura 2.10: Algumas correlações observadas no espetro de HMBC do composto 4.b.	35
Figura 2.11: Algumas correlações observadas nos espetros de COSY e HMBC do composto 4.b.	36
Figura 2.12: Correlações NOESY observadas para o composto 4.b.	36

Figura 2.13: Estrutura numerada do composto 4.c.	37
Figura 2.14: Possíveis estruturas, relativas aos compostos 4.c, com as diferentes conformações possíveis e o equilíbrio tiona-tiol.	39
Figura 2.15: Correlações de COSY e HMBC, do composto 4.h, relativas a N(3)-H e N-H (endocíclico).	42
Figura 2.16: Correlações de HMBC dos compostos 4.f e 4.h relativas aos prótons H-2 e H-3, respetivamente.	43
Figura 2.17: Correlações de COSY e HMBC dos compostos 4.f e 4.h relativas à zona heteroaromática.	43
Figura 2.18: Correlações de HMBC, dos compostos 4.f e 4.h, para a identificação dos carbonos quaternários, presentes no anel heterocíclico.	44
Figura 2.19: Correlações de COSY e HMBC do composto 4.o relativas ao anel aromático.	45
Figura 2.20: Correlações NOESY observadas para os compostos 4.h, 4.m e 4.o.	45
Figura 2.21: Estrutura numerada da (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.f).	46
Figura 2.22: Estrutura numerada da (<i>E</i>)-2-((1-metil-1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.g).	47
Figura 2.23: Estrutura e numeração da (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.h).	48
Figura 2.24: Estrutura numerada da (<i>E</i>)-2-((benzofuran-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.i).	49
Figura 2.25: Estrutura e numeração da (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.j).	50
Figura 2.26: Estrutura numerada da (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.k).	51
Figura 2.27: Estrutura e numeração da (<i>E</i>)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.l).	52
Figura 2.28: Estrutura numerada da (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoamida (4.m).	53
Figura 2.29: Estrutura e numeração da (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoamida (4.n).	54
Figura 2.30: Estrutura e numeração da (<i>E</i>)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoamida (4.o).	55
Figura 2.31: Esquema geral do ensaio da capacidade de redução do radical DPPH na presença de uma amostra com propriedades antioxidantes. Adaptado de ¹³⁵	58
Figura 2.32: Mecanismos gerais HAT e ET que ocorrem entre os compostos antioxidantes e radicais livres. Adaptado de ¹⁴³	59
Figura 2.33: Capacidade antioxidante (%) dos compostos 4.a - 4.o, testados em diferentes concentrações (µM).	60

Figura 2.34: Valores de EC ₅₀ (μM) para a atividade antioxidante, segundo o método de DPPH, dos compostos 4.a - 4.o e dos controlos positivos (quercetina, rutina e ácido ascórbico) com o respetivo desvio padrão.....	60
Figura 2.35: Comparação dos valores de EC ₅₀ , segundo o método de DPPH, para os compostos 4.a, 4.d, 4.f e 4.g. Para um nível de confiança de 95%, A, B e C são estatisticamente diferentes.....	61
Figura 2.36: Comparação dos valores de EC ₅₀ , obtidos segundo o método de DPPH, para os compostos 4.a, 4.b, 4.f e 4.h. Para um nível de confiança de 95%, A, B e C são estatisticamente diferentes. Os valores de EC ₅₀ dos compostos 4.a e 4.f foram retirados da figura anterior, para comparar com 4.b e 4.h.	62
Figura 2.37: Comparação dos valores de EC ₅₀ , obtidos pelo método de DPPH, para os compostos 4.h, 4.m, 4.k, 4.n, 4.l, 4.o. Para um nível de confiança de 95%, A, B, C, D, E e F são estatisticamente diferentes.....	62
Figura 2.38: Comparação dos valores de EC ₅₀ , de acordo com o método de DPPH, para os compostos 4.b, 4.h e 4.m. Para um nível de confiança de 95%, A e B são estatisticamente diferentes.	63
Figura 2.39: Comparação dos valores de EC ₅₀ , obtidos pelo método de DPPH, para os compostos 4.m e 4.o. Para um nível de confiança de 95%, A e B são estatisticamente diferentes.	63
Figura 2.40: Comparação dos valores de EC ₅₀ , obtido pelo método de DPPH, para o composto 4.o e controlos positivos (quercetina, rutina e ácido ascórbico). Para um nível de confiança de 95%, A, B, C e D são estatisticamente diferentes.	64
Figura 2.41: Reação de redução do MTT em formazan pelo enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Adaptado de ¹⁵⁰	65
Figura 3.1: Gradientes utilizados na análise do grau de pureza dos compostos sintetizados por HPLC-DAD.....	72
Figura 6.1: Espetro de RMN ¹ H do composto 2, em CDCl ₃	103
Figura 6.2: Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 2, CDCl ₃	103
Figura 6.3: Espetro COSY do composto 2, em CDCl ₃	104
Figura 6.4: Espetro HSQC do composto 2, em CDCl ₃	104
Figura 6.5: Espetro HMBC do composto 2, em CDCl ₃	105
Figura 6.6: Espetro de RMN ¹ H do composto 3.a, em CDCl ₃	106
Figura 6.7: Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 3.a, em CDCl ₃	106
Figura 6.8: Espetro COSY do composto 3.a, em CDCl ₃	107
Figura 6.9: Espetro HSQC do composto 3.a, em CDCl ₃	107
Figura 6.10: Espetro HMBC do composto 3.a, em CDCl ₃	108
Figura 6.11: Espetro de RMN ¹ H do composto 4.a, em CDCl ₃	109
Figura 6.12: Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.a, em CDCl ₃	109
Figura 6.13: Espetro COSY do composto 4.a, em CDCl ₃	110

Figura 6.14: Espetro HSQC do composto 4.a, em CDCl ₃ .	110
Figura 6.15: Espetro HMBC do composto 4.a, em CDCl ₃ .	111
Figura 6.16: Espetro de IV do composto 4.a.	111
Figura 6.17: Espetro de HRMS do composto 4.a (principais fragmentos).	112
Figura 6.18: Espetro de RMN ¹ H do composto 4.b, em CDCl ₃ .	113
Figura 6.19: Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.b, em CDCl ₃ .	113
Figura 6.20: Espetro COSY do composto 4.b, em CDCl ₃ .	114
Figura 6.21: Espetro HSQC do composto 4.b, em CDCl ₃ .	114
Figura 6.22: Espetro HMBC do composto 4.b, em CDCl ₃ .	115
Figura 6.23: Espetro NOESY do composto 4.b, em CDCl ₃ (principais correlações).	115
Figura 6.24: Espetro de IV do composto 4.b.	116
Figura 6.25: Espetro de HRMS do composto 4.b (principais fragmentos).	116
Figura 6.26: Espetro de RMN ¹ H do composto 4.c, em CDCl ₃ .	117
Figura 6.27: Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.c, em CDCl ₃ .	117
Figura 6.28: Espetro COSY do composto 4.c, em CDCl ₃ .	118
Figura 6.29: Espetro HSQC do composto 4.c, em CDCl ₃ .	118
Figura 6.30: Espetro HMBC do composto 4.c, em CDCl ₃ .	119
Figura 6.31: Sobreposição dos espectros de RMN ¹ H do composto 4.c, em CDCl ₃ , efetuados aos t = 0 e 20 min e t = 9 h.	119
Figura 6.32: Sobreposição dos espectros de RMN ¹ H do composto 4.c, em CDCl ₃ , efetuados aos t = 0 e 20 min e t = 9 h (com aproximação).	120
Figura 6.33: Espetro de RMN ¹ H do composto 4.c, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	120
Figura 6.34: Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.c, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	121
Figura 6.35: Espetro COSY do composto 4.c, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	121
Figura 6.36: Espetro HSQC do composto 4.c, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	122
Figura 6.37: Espetro HMBC do composto 4.c, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	122
Figura 6.38: Espetro de IV do composto 4.c.	123
Figura 6.39: Espetro de HRMS do composto 4.c (principais fragmentos).	123
Figura 6.40: Espetro de RMN ¹ H do composto 4.f, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	124
Figura 6.41: Espetro de RMN ¹³ C-APT do composto 4.f, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	124
Figura 6.42: Espetro COSY do composto 4.f, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	125
Figura 6.43: Espetro HSQC do composto 4.f, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	125
Figura 6.44: Espetro HMBC do composto 4.f, em DMSO- <i>d</i> ₆ .	126
Figura 6.45: Espetro de IV do composto 4.f.	126

Figura 6.46: Espetro de RMN ^1H do composto 4.g, em $\text{DMSO-}d_6$.	127
Figura 6.47: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.g, em $\text{DMSO-}d_6$.	127
Figura 6.48: Espetro COSY do composto 4.g, em $\text{DMSO-}d_6$.	128
Figura 6.49: Espetro HSQC do composto 4.g, em $\text{DMSO-}d_6$.	128
Figura 6.50: Espetro HMBC do composto 4.g, em $\text{DMSO-}d_6$.	129
Figura 6.51: Espetro de IV do composto 4.g.	129
Figura 6.52: Espetro de RMN ^1H do composto 4.h, em $\text{DMSO-}d_6$.	130
Figura 6.53: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.h, em $\text{DMSO-}d_6$.	130
Figura 6.54: Espetro COSY do composto 4.h, em $\text{DMSO-}d_6$.	131
Figura 6.55: Espetro HSQC do composto 4.h, em $\text{DMSO-}d_6$.	131
Figura 6.56: Espetro HMBC do composto 4.h, em $\text{DMSO-}d_6$.	132
Figura 6.57: Espetro NOESY do composto 4.h, em $\text{DMSO-}d_6$ (principais correlações).	132
Figura 6.58: Espetro de IV do composto 4.h.	133
Figura 6.59: Espetro de HRMS do composto 4.h (principais fragmentos).	133
Figura 6.60: Espetro de RMN ^1H do composto 4.i, em $\text{DMSO-}d_6$.	134
Figura 6.61: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.i, em $\text{DMSO-}d_6$.	134
Figura 6.62: Espetro COSY do composto 4.i, em $\text{DMSO-}d_6$.	135
Figura 6.63: Espetro HSQC do composto 4.i, em $\text{DMSO-}d_6$.	135
Figura 6.64: Espetro HMBC do composto 4.i, $\text{DMSO-}d_6$.	136
Figura 6.65: Espetro de IV do composto 4.i.	136
Figura 6.66: Espetro de HRMS do composto 4.i (principais fragmentos).	137
Figura 6.67: Espetro de RMN ^1H do composto 4.j, em $\text{DMSO-}d_6$.	138
Figura 6.68: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.j, em $\text{DMSO-}d_6$.	138
Figura 6.69: Espetro COSY do composto 4.j, em $\text{DMSO-}d_6$.	139
Figura 6.70: Espetro HSQC do composto 4.j, em $\text{DMSO-}d_6$.	139
Figura 6.71: Espetro HMBC do composto 4.j, em $\text{DMSO-}d_6$.	140
Figura 6.72: Espetro de IV do composto 4.j.	140
Figura 6.73: Espetro de RMN ^1H do composto 4.k, em $\text{DMSO-}d_6$.	141
Figura 6.74: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.k, em $\text{DMSO-}d_6$.	141
Figura 6.75: Espetro COSY do composto 4.k, em $\text{DMSO-}d_6$.	142
Figura 6.76: Espetro HSQC do composto 4.k, em $\text{DMSO-}d_6$.	142
Figura 6.77: Espetro HMBC do composto 4.k, em $\text{DMSO-}d_6$.	143
Figura 6.78: Espetro de IV do composto 4.k.	143

Figura 6.79: Espetro de RMN ^1H do composto 4.l, em $\text{DMSO}-d_6$.	144
Figura 6.80: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.l, em $\text{DMSO}-d_6$.	144
Figura 6.81: Espetro COSY do composto 4.l, em $\text{DMSO}-d_6$.	145
Figura 6.82: Espetro HSQC do composto 4.l, em $\text{DMSO}-d_6$.	145
Figura 6.83: Espetro HMBC do composto 4.l, em $\text{DMSO}-d_6$.	146
Figura 6.84: Espetro de IV do composto 4.l.	146
Figura 6.85: Espetro de HRMS do composto 4.l (principais fragmentos).	147
Figura 6.86: Espetro de RMN ^1H do composto 4.m, em $\text{DMSO}-d_6$.	148
Figura 6.87: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.m, em $\text{DMSO}-d_6$.	148
Figura 6.88: Espetro COSY do composto 4.m, em $\text{DMSO}-d_6$.	149
Figura 6.89: Espetro HSQC do composto 4.m, em $\text{DMSO}-d_6$.	149
Figura 6.90: Espetro HMBC do composto 4.m, em $\text{DMSO}-d_6$.	150
Figura 6.91: Espetro NOESY do composto 4.m, em $\text{DMSO}-d_6$ (principais correlações).	150
Figura 6.92: Espetro de IV do composto 4.m.	151
Figura 6.93: Espetro de HRMS do composto 4.m (principais fragmentos).	151
Figura 6.94: Espetro de RMN ^1H do composto 4.n, em $\text{DMSO}-d_6$.	152
Figura 6.95: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.n, em $\text{DMSO}-d_6$.	152
Figura 6.96: Espetro COSY do composto 4.n, em $\text{DMSO}-d_6$.	153
Figura 6.97: Espetro HSQC do composto 4.n, em $\text{DMSO}-d_6$.	153
Figura 6.98: Espetro HMBC do composto 4.n, em $\text{DMSO}-d_6$.	154
Figura 6.99: Espetro de IV do composto 4.n.	154
Figura 6.100: Espetro de HRMS do composto 4.n (principais fragmentos).	155
Figura 6.101: Espetro de RMN ^1H do composto 4.o, em $\text{DMSO}-d_6$.	156
Figura 6.102: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.o, em $\text{DMSO}-d_6$.	156
Figura 6.103: Espetro COSY do composto 4.o, em $\text{DMSO}-d_6$.	157
Figura 6.104: Espetro HSQC do composto 4.o, em $\text{DMSO}-d_6$.	157
Figura 6.105: Espetro HMBC do composto 4.o, em $\text{DMSO}-d_6$.	158
Figura 6.106: Espetro NOESY do composto 4.o, em $\text{DMSO}-d_6$ (principais correlações).	158
Figura 6.107: Espetro de IV do composto 4.o.	159
Figura 6.108: Espetro de HRMS do composto 4.o (principais fragmentos).	159

Índice de tabelas

Tabela 2.1: Dados de RMN, ¹ H e COSY, do composto 2 em CDCl ₃	25
Tabela 2.2: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, do composto 2 em CDCl ₃	26
Tabela 2.3: Dados de RMN, ¹ H e COSY, do composto 3.a em CDCl ₃	28
Tabela 2.4: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, do composto 3.a em CDCl ₃	29
Tabela 2.5: Dados de RMN, ¹ H e COSY, do composto 4.a em CDCl ₃	31
Tabela 2.6: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, do composto 4.a em CDCl ₃	32
Tabela 2.7: Dados de RMN, ¹ H e COSY, do composto 4.b em CDCl ₃	34
Tabela 2.8: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, do composto 4.b em CDCl ₃	35
Tabela 2.9: Dados de RMN, ¹ H e COSY, do composto 4.c em CDCl ₃	37
Tabela 2.10: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, do composto 4.c em CDCl ₃	38
Tabela 2.11: Comparação dos dados de RMN ¹ H, em DMSO- <i>d</i> ₆ , dos N(3)-H, N(2)-H e próton imínico, nos compostos 4.f-4.o.....	41
Tabela 2.12: Comparação dos dados de RMN ¹ H, em DMSO- <i>d</i> ₆ , do anel heterocíclico dos compostos 4.f-4.o.....	42
Tabela 2.13: Comparação dos dados de RMN ¹³ C, em DMSO- <i>d</i> ₆ , dos carbonos quaternários presentes no anel heterocíclico dos compostos 4.f-4.o.....	44
Tabela 2.14: Dados de RMN, ¹ H e COSY, da (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.f), em DMSO- <i>d</i> ₆	46
Tabela 2.15: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, da (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.f), em DMSO- <i>d</i> ₆	46
Tabela 2.16: Dados de RMN, ¹ H e COSY, da (<i>E</i>)-2-((1-metil-1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.g), em DMSO- <i>d</i> ₆	47
Tabela 2.17: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, da (<i>E</i>)-2-((1-metil-1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.g), em DMSO- <i>d</i> ₆	47
Tabela 2.18: Dados de RMN, ¹ H e COSY, da (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.h), em DMSO- <i>d</i> ₆	48
Tabela 2.19: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, da (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.h), em DMSO- <i>d</i> ₆	48
Tabela 2.20: Dados de RMN, ¹ H e COSY, da (<i>E</i>)-2-((benzofuran-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.i), em DMSO- <i>d</i> ₆	49
Tabela 2.21: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, da (<i>E</i>)-2-((benzofuran-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.i), em DMSO- <i>d</i> ₆	49
Tabela 2.22: Dados de RMN, ¹ H e COSY, da (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.j), em DMSO- <i>d</i> ₆	50
Tabela 2.23: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, da (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.j), em DMSO- <i>d</i> ₆	50

Tabela 2.24: Dados de RMN, ¹ H e COSY, da (E)-2-((benzo[d]tiazol-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (4.k), em DMSO- <i>d</i> ₆	51
Tabela 2.25: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, da (E)-2-((benzo[d]tiazol-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (4.k), em DMSO- <i>d</i> ₆	51
Tabela 2.26: Dados de RMN, ¹ H e COSY, da (E)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (4.l), em DMSO- <i>d</i> ₆	52
Tabela 2.27: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, da (E)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (4.l), em DMSO- <i>d</i> ₆	52
Tabela 2.28: Dados de RMN, ¹ H e COSY, da (E)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoioamida (4.m), em DMSO- <i>d</i> ₆	53
Tabela 2.29: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, da (E)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoioamida (4.m), em DMSO- <i>d</i> ₆	53
Tabela 2.30: Dados de RMN, ¹ H e COSY, (E)-2-((benzo[d]tiazol-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoioamida (4.n), em DMSO- <i>d</i> ₆	54
Tabela 2.31: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, da (E)-2-((benzo[d]tiazol-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoioamida (4.n), em DMSO- <i>d</i> ₆	54
Tabela 2.32: Dados de RMN, ¹ H e COSY, (E)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoioamida (4.o), em DMSO- <i>d</i> ₆	55
Tabela 2.33: Dados de RMN, ¹³ C-APT, HSQC e HMBC, da (E)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotoioamida (4.o), em DMSO- <i>d</i> ₆	56
Tabela 2.34: Principais bandas de absorção de IV para os compostos 4.a, 4.b e 4.c.....	57
Tabela 2.35: Principais bandas de absorção de IV para os compostos 4.f - 4.o.....	57
Tabela 2.36: Valores de morte celular (%) a 100 μM obtidos às 24h e 48h, para os compostos 4.b, 4.f - 4.o, nas linhas celulares MCF-7 e Hep-G2 e para o tamoxifeno a 24h na linha celular MCF-7. Para um nível de confiança de 95%, A – Q e A' – P' são estatisticamente diferentes.	66
Tabela 3.1: Reagentes e solventes utilizados na síntese e análise dos compostos.....	69
Tabela 3.2: Solventes utilizados na análise do grau de pureza dos compostos sintetizados, por HPLC-DAD.....	71
Tabela 3.3: Resumo das quantidades de reagentes, produto e rendimento efetivo para a síntese do composto 2.....	73
Tabela 3.4: Condições reacionais de síntese do composto 3.a.....	74
Tabela 3.5: Condições reacionais para a síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbazona, 4.a - 4.c.....	75
Tabela 3.6: Condições reacionais para a síntese dos derivados de <i>N</i> 3 H-tiossemicarbazona, 4.f - 4.l.	78
Tabela 3.7: Condições reacionais para a síntese dos derivados de <i>N</i> 3-fenil-tiossemicarbazona, 4.m - 4.o.	81

Tabela 3.8: Reagentes e solvente utilizados no ensaio do DPPH.....	83
Tabela 3.9: Reagentes utilizados nos ensaios com as linhas celulares.	83
Tabela 6.1: Percentagem de atividade antioxidante dos compostos 4.a - 4.o, testados em diferentes concentrações (μM).....	160

Índice de esquemas

Esquema 2.1: Esquema reacional de síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbonas, 4.a-4.e.	21
Esquema 2.2: Mecanismo de síntese do isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil, 2.	22
Esquema 2.3: Mecanismo de síntese da N-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil) tiossemicarbazida, 3.a a partir do respetivo isotiocianato.	24
Esquema 2.4: Mecanismo de síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbona, 4.a-4.e a partir da correspondente hidrazida.....	24
Esquema 2.5: Esquema reacional da síntese dos derivados de N ³ H-tiossemicarbona e N ³ -fenil-tiossemicarbona, 4.f-4.o.	40

Abreviaturas

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
APT	Do inglês <i>Attached Proton Test</i>
BDE	Entalpia de dissociação da ligação (do inglês <i>Bond Dissociation Enthalpy</i>)
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butil-4-metilfenol
¹³ C RMN	<u>R</u> essonância <u>M</u> agnética <u>N</u> uclear de <u>C</u> arbono
C	Carbono quaternário
CH	Carbono terciário
CH ₂	Carbono secundário
(<i>n</i> -C ₄ H ₉) ₄ NBr	Brometo de tetrabutílamónio
CCF	Cromatografia em camada fina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
COSY	Espetroscopia de correlação Homonuclear (do inglês <i>Correlation Spectroscopy 2D NMR</i>)
d	Dupleto
dd	Dupleto de dupletos
ddd	Dupleto de dupleto de dupletos
DMEM	Meio de cultura celular (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
EC ₅₀	Concentração eficaz (do inglês <i>Effective Concentration</i>) que representa 50% da extinção do radical
ESI-HRMS	Espetrometria de massa de alta resolução com ionização por eletrospray (do inglês <i>Electrospray Ionisation High-Resolution Mass Spectrometry</i>)
ET	Mecanismo de transferência de eletrão (do inglês <i>Electron Transfer</i>)
FBS	Soro bovino fetal (do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>)
¹ H - RMN	<u>R</u> essonância <u>M</u> agnética <u>N</u> uclear de <u>P</u> rotão
HAT	Mecanismo de transferência de um átomo de hidrogénio (do inglês <i>Hydrogen Atom Transfer</i>)
HMBC	Espetroscopia de correlação heteronuclear a múltiplas ligações (do inglês <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)

HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fotodíodos (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector</i>)
HSQC	do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória (do inglês <i>Inhibitory Concentration</i>) que representa 50% de inibição
IV	Espetroscopia de Infra-vermelho
KBr	Brometo de potássio
KSCN	Tiocianato de potássio
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MIC	Concentração inibitória mínima (do inglês <i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NH ₂ NH ₂ .H ₂ O	Hidrazina hidratada
NOESY	do inglês <i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
Ph	Fenilo (do inglês <i>Phenyl</i>)
PI	Potencial de ionização (do inglês <i>Ionization Potential</i>)
ppm	Partes por milhão
psi	Libra-força por polegada quadrada (do inglês <i>Pound force per Square Inch</i>)
PTC	Catalisador de transferência de fase (do inglês <i>Phase-Transfer Catalyst</i>)
QSAR	Relação quantitativa estrutura-atividade (do inglês <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>)
R _f	Fator de Retenção (do inglês <i>Retention Factor</i>)
RNS	Espécie reativa de azoto (do inglês <i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Espécie reativa de oxigénio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RR	Enzima ribonucleotido reductase (do inglês <i>Ribonucleotide Reductase enzyme</i>)
s	Singuleto
SAR	Relação estrutura-atividade (do inglês <i>Structure-Activity Relationship</i>)
S _N 2	Reação de Substituição Nucleofílica bimolecular
TFA	Ácido trifluoroacético (do inglês <i>Trifluoroacetic Acid</i>)
TP	Transferência de próton
t	Triplete
td	Triplete de dupletos
UV-Vis	Espetroscopia de Ultravioleta-Visível

Símbolos

Å	Ångström
α	Alfa
β	Beta
J	Constante de acoplamento
xJ	Acoplamento a x ligações, x = 1, 2, 3
δ	Desvio químico
δ_H	Desvio químico de próton
δ_C	Desvio químico de carbono
γ	Gamma
°	Grau
g	Grama
g/mol	Grama por mol
Hz	Hertz
h	Horas
®	Marca registada
™	Marca registada
MHz	Mega Hertz
m/z	Razão massa/carga
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
mmol	Milimolar
M	Molar
nm	Nanómetro
ν	Número de onda
%	Porcentagem
unit/mg proteína	Unidade por mg de proteína (segundo o ramo da enzimologia “unit” corresponde à formação de 1 micromole (μ mol) de produto por minuto)
W	Watt (unidade de potência)

1º Capítulo

1. Introdução

1.1. Radicais livres e stress oxidativo

As reações químicas de oxidação-redução (redox), nas quais ocorre a mudança do estado de oxidação dos átomos, representam um principal constituinte da vida.¹ Os organismos aeróbios consomem o oxigénio molecular para a produção de energia nas mitocôndrias.^{2,3} Porém, durante diversos processos bioquímicos, existe uma pequena parte na qual a sua redução é incompleta, formando-se diversas espécies intermediárias, que por vezes podem ter efeitos nocivos.^{4,5,6}

As células possuem a capacidade de gerar radicais livres, como resultado da produção de ATP (trifosfato de adenosina) pelas mitocôndrias⁷ que, a baixas concentrações, desempenham funções importantes em processos biológicos e bioquímicos, como a transdução de sinal, transcrição de gene, na regulação da atividade do enzima guanilato ciclase solúvel, na proliferação, diferenciação e deteção de oxigénio.^{8,9} Existem espécies, como por exemplo o óxido nítrico, que são essenciais na regulação da proliferação das células musculares, adesão de leucócitos, angiogénese, podendo também atuar como neurotransmissores.¹⁰ Do ponto de vista químico, são moléculas com um eletrão desemparelhado na camada de valência e portanto, são espécies altamente instáveis e reativas.^{11,12} O radicais livres incluem as espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS).¹³

As espécies reativas de oxigénio (ROS) são geradas através de fontes endógenas (mitocôndrias, peroxissomas e citocromo P-450) e exógenas (poluentes, tabaco, radiação, drogas e metais).¹⁴ São pequenas moléculas derivadas de oxigénio que incluem os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($\cdot OH$), peróxido (RO_2^{\cdot}) e alcóxido (RO^{\cdot}), e ainda espécies não-radicalares como ácido hipocloroso (HOCl), ozono (O_3), oxigénio singuleto (1O_2) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2).¹⁵ A sub-classe de espécies reativas que contêm um azoto na sua composição, RNS, provêm da reação entre o oxigénio molecular e óxido nítrico, e incluem o radical óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o anião peroxinitrito ($ONOO^-$) (Figura 1.1).¹⁴

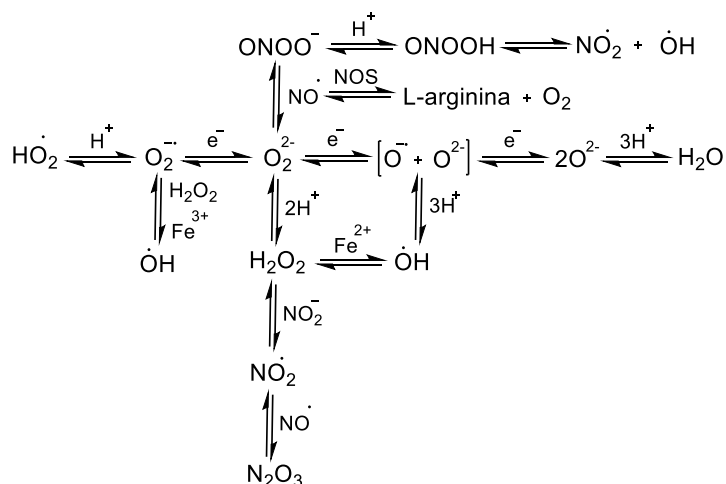


Figura 1.1: Formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e azoto (RNS) no corpo humano. Adaptado de ¹⁴.

Naturalmente, em organismos aeróbios saudáveis, a produção de ROS é equilibrada pelo sistema de defesa antioxidante que controla os seus níveis e a regulação de processos celulares, por fosforilação e desfosforilação de enzimas.¹⁶ No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas, isto é, ROS/RNS e, a sua eliminação por parte dos mecanismos de

defesa antioxidantes endógenos, ocorre uma situação de *stress* oxidativo.¹⁷ Este fenómeno apresenta diversas consequências para as células, e os danos resultantes dependem do tipo de célula ou tecido, bem como da gravidade e do período de tempo de exposição a oxidantes. Podem também ocorrer danos em alguns alvos moleculares como lípidos, DNA, proteínas, carbo-hidratos, entre outros, que podem estar associados ao aparecimento de diversas patologias como doenças oncológicas, arteriosclerose, doença de Alzheimer, asma, doenças cardiovasculares, entre outras¹⁸. O *stress* oxidativo, de acordo com algumas linhas de investigação^{19,20,21}, poderá também estar associado ao envelhecimento e ao fenómeno da senescência, isto é, morte celular, que pode ocorrer, entre outros mecanismos, por necrose e apoptose.²²

O excesso de ROS e RNS, como já foi referido anteriormente, leva ao desenvolvimento de lesões tecidulares através da libertação de citocinas e ativação de enzimas, como os lipoxigenases (LOXs), a partir de células inflamatórias. Estes enzimas desempenham um papel essencial na inflamação devido à sua envolvimento na biossíntese de mediadores lipídicos inflamatórios (leucotrienos e prostaglandinas). A sua inibição é considerada como um dos alvos na prevenção de certas doenças, cujo aparecimento e desenvolvimento está associado ao *stress* oxidativo e inflamação.²³

Para combater estes danos tecidulares surgiu a necessidade de realizar estudos que conduzissem a uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos, e de produzir compostos que inibissem a oxidação de biomoléculas por parte dos radicais livres, os denominados antioxidantes.

1.2. Antioxidantes

Um antioxidante é uma substância que atua na prevenção, redução ou reparação do dano oxidativo induzido pelo excesso de espécies reativas num determinado alvo, como biomoléculas. As biomoléculas, segundo os ramos da biologia e medicina, incluem proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, entre outros.²⁴ Assim, os antioxidantes conseguem atrasar ou inibir danos celulares através das suas propriedades de eliminação dos radicais livres.²⁵ Os antioxidantes podem ser classificados relativamente ao seu modo de ação, como primários e secundários, bem como pela sua forma de obtenção, podendo ser endógenos e exógenos. Na manutenção do equilíbrio entre a produção e inativação de ROS, os antioxidantes apresentam mecanismos de desativação de radicais livres, que podem envolver ou não atividade enzimática.

Relativamente ao seu modo de ação, os antioxidantes primários atuam na quebra de reações em cadeia dos radicais livres, retardando a iniciação ou interrompendo a propagação, pela conversão de espécies radicalares em radicais mais estáveis ou espécies não-radicalares.²⁶ Por outro lado, os antioxidantes secundários interrompem as reações em cadeia por mecanismos de decomposição dos peróxidos, complexação de metais, inibição de enzimas oxidativos ou através da absorção de radiação ultravioleta, originando espécies não-radicalares. Os antioxidantes secundários possuem a capacidade de regenerar os antioxidantes primários pela doação de um átomo de hidrogénio, quelação com iões metálicos e eliminação de oxigénio molecular.^{8,27}

Os antioxidantes endógenos são produzidos pelo organismo, estando subdivididos em duas classes: enzimáticos e não-enzimáticos. Os antioxidantes endógenos enzimáticos, que existem em todas as células eucarióticas, incluem os enzimas que atuam por mecanismos de prevenção,

impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicalares, protegendo as células e tecidos do *stress* oxidativo. Nesta classe de antioxidantes destacam-se os enzimas endógenos superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Os SOD catalisam a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio, a CAT catalisa a decomposição do peróxido de hidrogénio em água e oxigénio e o GPx tem como função proteger o organismo do dano oxidativo e reduzir os hidroperóxidos lipídicos aos respetivos álcoois, bem como na redução do peróxido de hidrogénio em água.^{28,29,30} Nos antioxidantes endógenos não-enzimáticos estão incluídas a glutathione (GSH), ácido úrico, ácido lipóico, NADPH, co-enzima Q, albumina e bilirrubina.³¹

1.3. Antioxidantes exógenos e o seu impacto na saúde humana

O sistema de defesa antioxidante endógeno por vezes não é suficiente para prevenir o dano oxidativo nas células, como tal surge a necessidade de obter antioxidantes, de uma forma exógena, para manter a concentração de radicais livres num nível baixo.³¹ Este grupo de compostos antioxidantes contribuem igualmente para a manutenção ou restabelecimento da homeostasia redox.³²

Os antioxidantes exógenos não-enzimáticos atuam na terminação de reações em cadeia dos radicais livres, com a formação de espécies não-radicalares e não-reativas. Este grupo de antioxidantes tem também o objetivo de transferir o radical para um local da célula onde a oxidação seja menos prejudicial, isto é, transferência de um oxidante de fases hidrofóbicas para fases hidrofílicas, por exemplo da membrana para o citosol, ou das lipoproteínas para a fase aquosa do plasma. Este grupo de compostos antioxidantes subdivide-se em antioxidantes naturais e sintéticos.²⁸

Os antioxidantes naturais provêm naturalmente de origem dietética, sendo o seu consumo feito a partir de frutas e vegetais. Destacam-se principalmente as vitaminas C e E, os carotenoides e compostos fenólicos (estilbenos, ácidos fenólicos, derivados do ácido cinâmico e hidroxicinâmico e flavonoides).^{33,34} As plantas são a principal fonte de vitamina C e E, bem como de compostos fenólicos.³⁵ A vitamina C ou ácido ascórbico, é uma substância derivada do metabolismo dos açúcares, solúvel em água e atua na redução e neutralização das ROS.^{12,36} Este antioxidante exerce efeitos benéficos na inibição da peroxidação lipídica, sendo considerado um dos antioxidantes de maior relevância.³⁷ A vitamina E, nome genérico que abrange, na realidade, um conjunto de compostos estruturalmente relacionados (α , β , γ e δ tocoferóis e tocotrienóis)³⁸, exerce a ação por inibição da peroxidação de lípidos poli-insaturados através da interrupção da cadeia de radicais livres, nas membranas e lipoproteínas.³⁹ Apesar da vitamina E parecer ser eficaz contra doenças cardiovasculares e demência, pode também ser fatal se for tomada em doses excessivas.⁴⁰

Os antioxidantes sintéticos são produzidos através da síntese ou biossíntese, no ramo da indústria, sendo altamente testados a fim de proteger os seus consumidores e evitar possíveis riscos para a saúde humana.⁴¹

Os compostos fenólicos apresentam na sua estrutura um anel benzénico, com pelo menos um grupo hidroxilo, que confere à molécula um potencial antioxidante promissor, devido à sua elevada capacidade em inibir ou eliminar radicais livres gerados *in vivo*, quebrando o ciclo de geração de novos radicais. Esta característica pode ser explicada, não só pela facilidade que estes compostos possuem

em doar um átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo, mas também pela possibilidade em quelatar iões metálicos.^{42,43} Os antioxidantes sintéticos, como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propilo (PG) e *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ), cujas estruturas se encontram representadas na Figura 1.2, são exemplos de antioxidantes desta categoria. Pensa-se que os antioxidantes desta classe possuam a capacidade de evitar a deterioração dos alimentos bem como nos seus efeitos benéficos nos sistemas de enzimas humanos e no DNA.^{35,44,45,46}

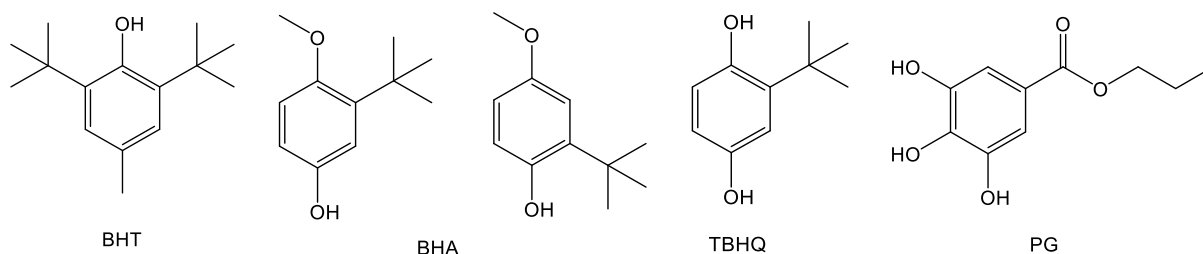


Figura 1.2: Estrutura fenólica dos principais antioxidantes sintéticos.

1.4. Tiossemicarbazonas: características estruturais e atividade biológica

As tiossemicarbazonas ($R^1R^2N^3-C^1(=S)-N^2(H)-N^1=C^2R^3R^4$) têm sido alvo de pesquisa por parte da comunidade científica, pois apresentam um leque vasto de atividades biológicas e como tal, têm vindo a ser consideradas uma classe de compostos muito importante na área da Química Medicinal.⁴⁷ São compostos obtidos pela reação de condensação quimiosseletiva entre uma tiossemicarbazida e um aldeído ou cetona, podendo apresentar estruturas muito variadas, de acordo com os substituintes presentes na tiossemicarbazida ou no composto carbonílico de partida. A sua estrutura encontra-se representada na Figura 1.3.

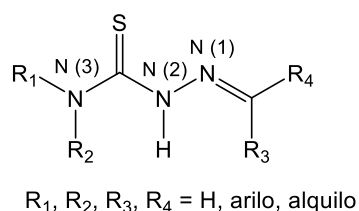


Figura 1.3: Estrutura geral das tiossemicarbazonas.

Geralmente esta família de compostos é obtida como uma mistura de isómeros *E* e *Z*, em torno da dupla ligação do grupo imina, tal como se mostra na Figura 1.4. Em solução pode ocorrer a isomerização de *Z* para *E*, termodinamicamente mais estável, devido à diminuição das repulsões eletrónicas. As tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos existem maioritariamente na forma *E*, enquanto que as derivadas de cetonas assimétricas são obtidas como misturas de isómeros *E* e *Z*, cuja proporção, depende dos substituintes ligados ao grupo carbonilo inicial. A distinção entre os dois isómeros pode ser efetuada por espetroscopia de RMN ¹H, visto que o sinal do protão imínico na configuração *E* aparece a um campo magnético mais baixo, em relação ao do isómero *Z*, em diversos solventes.⁴⁸

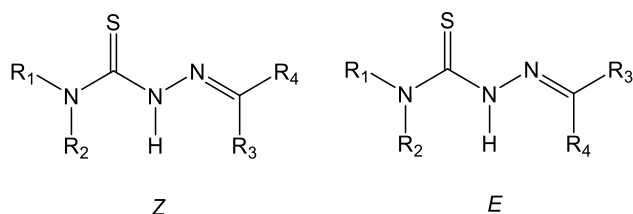


Figura 1.4: Isómeros *Z* e *E* das tiossemicarbazonas. O substituinte *R3* tem maior prioridade que *R4*.

Adicionalmente, as tiossemicarbazonas substituídas e não-substituídas na posição *N3*, em solução, apresentam duas conformações possíveis *cis* e *trans* (Figura 1.5, estruturas a e b), relativamente à posição entre o átomo de enxofre e o azoto da função imina. As tiossemicarbazonas não substituídas ou mono-substituídas em *N3*, apresentam uma estrutura aproximadamente planar e o seu arranjo estrutural é favorecido na conformação *trans* (Figura 1.5, estrutura b). Esta conformação permite a formação de uma ponte de hidrogénio intramolecular entre o hidrogénio da função tioamida e o azoto da imina, que a torna mais estável. Porém, a substituição completa em *N3*, torna impossível a formação de uma ponte de hidrogénio e portanto, a tiossemicarbazona adota a conformação *cis* (Figura 1.5, estrutura a).⁴⁹

À semelhança de outros compostos carbonílicos e tiocarbonílicos, nas tiossemicarbazonas existe ocorrência em solução de tautomeria tiona-tiol, cujo equilíbrio está apresentado na Figura 1.5, estruturas c e d. A forma tiona é predominante no estado sólido, enquanto que, em solução, pode existir um equilíbrio entre as formas tiona e tiol. Este equilíbrio é comprovado pelos comprimentos das ligações em N-C-N e C=S, visto que o primeiro fragmento possui um comprimento de ligação semelhante ao das duplas ligações e o grupo tiocarbonilo, apresenta um comprimento de ligação próximo ao de uma ligação simples.⁴⁸ Este equilíbrio é especialmente favorecido no sentido da forma tiona. Diversos estudos reportaram que o equilíbrio tautomérico depende da natureza do solvente bem como da respetiva polaridade.^{50,51,52} A existência dos tautómeros pode também ser confirmada por espectroscopia de IV, visto que o aparecimento de uma banda de *stretching* S-H na região de 2500 – 2600 cm⁻¹ confirma a presença da forma tiol e portanto, a ausência desta banda e aparecimento de uma banda intensa de estiramento C=S indica a predominância da forma tiona.⁵³

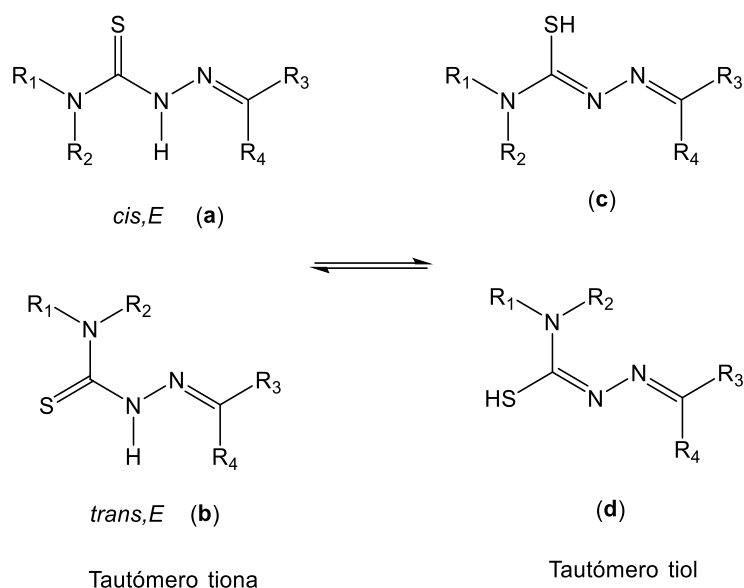


Figura 1.5: Estrutura geral das conformações das tiossemicarbazonas (a e b) e respectivas formas tautoméricas (c e d). O substituinte R_3 tem maior prioridade que R_4 .

O interesse por esta família de compostos manifestou-se no início do século XX, sendo que em meados da década de 1950, surgiram as suas primeiras aplicações médicas contra a tuberculose e a doença de Hansen^{54,55}. Nos anos 60, foram descobertas as suas propriedades antivirais.⁵⁶ Nos últimos anos, o estudo das tiossemicarbazonas tem-se intensificado devido ao reconhecimento do seu largo espectro de ação biológica, que abrange propriedades antibacterianas, antifúngicas^{57,58,59}, antivirais⁶⁰, anticancerígenas e antioxidantes.⁵⁵

1.4.1. Tiossemicarbazonas com atividade antibacteriana

As propriedades antibacterianas dos compostos da família das tiossemicarbazonas foram descobertas por Domagk *et al.*⁶¹, em 1946. Neste estudo os autores tinham como principal objetivo sintetizar um conjunto de sulfatiadiazóis e testar a sua atividade antitubercular. Durante a síntese ocorreu a formação de dois compostos, o produto final e um composto intermediário - uma tiossemicarbazona - que demonstrou ser ativa contra a *Mycobacterium tuberculosis*.⁶² Os autores demonstraram que algumas tiossemicarbazonas, derivadas de aldeídos ou cetonas aromáticos/as, exibiam atividade antitubercular *in vitro* e, nalguns casos, *in vivo*. Desde então, têm vindo a ser estudados os efeitos que as alterações estruturais têm na atividade antibacteriana das tiossemicarbazonas, principalmente nas que são derivadas de benzaldeídos com substituintes na posição *para* ou aldeídos heterocíclicos.⁶³

O único composto das tiossemicarbazonas a ser testado clinicamente foi a 4-acetamidobenzaldeído tiossemicarbazona, comercialmente reconhecida como tiacetazona (Figura 1.6). Foi sintetizada por Behnisch e Schmidt e clinicamente estudada por Domagk em meados de 1940, sendo ativa contra a *Mycobacterium tuberculosis*. É considerado um fármaco antitubercular de segunda-linha, exibindo um MIC (concentração inibitória mínima) compreendido entre 0,1 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, e de acordo com a Organização Mundial de Saúde está inserida no Grupo 5.^{64,65,66} No início da década de 90, o uso da tiacetazona foi restrito devido à sua toxicidade e ao aparecimento de reações cutâneas

graves, que podem ser mortais em pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV), bem como a ampla disponibilidade de alternativas mais seguras e acessíveis, como a isoniazida.⁶⁷ Em países subdesenvolvidos, a tiacetazona é ainda utilizada no tratamento da tuberculose, combinada com a isoniazida, devido aos seus baixos custos e facilidade de produção.⁶⁴

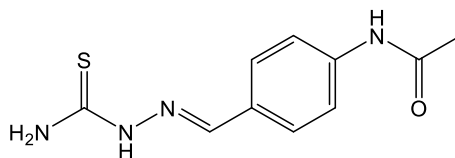


Figura 1.6: Estrutura química da tiacetazona.

Recentemente, Marvadi *et al.*⁶⁸, em 2020, publicaram um estudo no qual reportaram a síntese de 22 derivados de tiossemicarbazona, como se pode observar na Figura 1.7, e a respetiva avaliação das atividades antibacterianas, *in vitro* e *in vivo*, na estirpe *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* H37Rv. Estes investigadores observaram que a substituição em R₁ não contribuía favoravelmente para o aumento da atividade antibacteriana, e que o valor de MIC variava consoante o substituinte em R: naftilo, clorotiofenilo (MIC = 0,39 µg/mL) < fenilo, 4-cloro-fenilo, bromotiofenilo (MIC = 0,78 µg/mL) < 4-metil-fenilo, 4-metoxi-fenilo, 4-fluor-fenilo, 4-bromo-fenilo e tiofenilo (MIC = 3,13 µg/mL).

4a – 4v

Composto	R	R ₁	Composto	R	R ₁
4a	Ph	H	4l	Ph	CH ₃
4b	<i>p</i> -CH ₃ -Ph	H	4m	<i>p</i> -CH ₃ -Ph	CH ₃
4c	<i>p</i> -OCH ₃ -Ph	H	4n	<i>p</i> -CH ₃ -Ph	CH ₃
4d	<i>p</i> -Ph-Ph	H	4o	<i>p</i> -Ph-Ph	CH ₃
4e	C ₁₀ H ₇	H	4p	C ₁₀ H ₇	CH ₃
4f	<i>p</i> -F-Ph	H	4q	<i>p</i> -F-Ph	CH ₃
4g	<i>p</i> -Cl-Ph	H	4r	<i>p</i> -Cl-Ph	CH ₃
4h	<i>p</i> -Br-Ph	H	4s	<i>p</i> -Br-Ph	CH ₃
4i	C ₄ H ₃ S	H	4t	C ₄ H ₃ S	CH ₃
4j	5-Cl-C ₄ H ₂ S	H	4u	5-Cl-C ₄ H ₂ S	CH ₃
4k	5-Br-C ₄ H ₂ S	H	4v	5-Br-C ₄ H ₂ S	CH ₃

Figura 1.7: Tiossemicarbazonas sintetizados pelo grupo de Marvadi *et al.*, adaptado de ⁶⁸.

1.4.2. Tiossemicarbazonas com atividade antiviral

Hamre *et al.*⁶⁹, em 1950, foram os primeiros a avaliar a atividade antiviral de tiossemicarbazonas derivadas de benzaldeídos.

O primeiro composto da classe das tiossemicarbazonas a ser formalmente considerado antiviral foi a metisazona, comercialmente reconhecida como Marboran[®] (Figura 1.8). Este fármaco foi utilizado no tratamento da varíola e infeções causadas pelo vírus *herpes simplex* (HSV), sendo o seu modo de ação a inibição da síntese de mRNA viral.⁵⁵

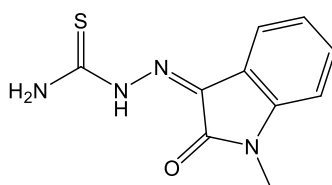
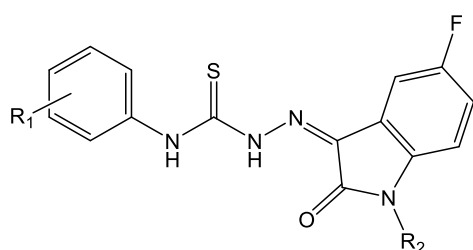


Figura 1.8: Estrutura química do Marboran®.

Recentemente, em 2020, Sevinçli *et al.*⁷⁰ publicaram um estudo sobre o potencial antiviral de derivados de 5-fluor-1-metil/etil-1*H*-indole-2,3-dione-3-[4-(fenilo substituído) tiossemicarbazona], Figura 1.9, baseando-se na estrutura química do Marboran®, contra o vírus *herpes simplex* 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), HSV-1 TK· KOS ACV^r e VV em células de fibroblasto de pulmão embrionário humano HEL. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que os compostos com um grupo metilo no azoto indólico ($R_2 = \text{CH}_3$), revelaram-se inativos contra todos os vírus testados. Por outro lado, os autores concluíram que os compostos mais potentes apresentam na sua estrutura um substituinte eletroatrator como *p*-CF₃, *p*-OCH₃, *m*-Cl e *p*-Br no anel aromático ligado a N3, bem como a substituição do azoto endocíclico com um grupo etilo.



Composto (R ₂ = C ₂ H ₅)	R ₁	Composto (R ₂ = C ₂ H ₅)	R ₁
7a	H	7h	<i>p</i> -SCH ₃
7b	<i>m</i> -CH ₃	7i	<i>p</i> -OCF ₃
7c	<i>p</i> -CH ₃	7j	<i>m</i> -F
7d	<i>p</i> -CF ₃	7k	<i>p</i> -F
7e	<i>p</i> -C ₂ H ₅	7l	<i>m</i> -Cl
7f	<i>m</i> -OCH ₃	7m	<i>p</i> -Cl
7g	<i>p</i> -OCH ₃	7n	<i>p</i> -Br

Figura 1.9: Compostos 7a-7n sintetizados e estudados por Sevinçli *et al.* Adaptado de ⁷⁰.

1.4.3. Tiossemicarbazonas com atividade anticancerígena

Entre os atuais tratamentos existentes para o cancro, a quimioterapia é o mais comum, contudo não é eficaz em certos cancros mais agressivos.

As tiossemicarbazonas têm vindo a ser estudadas nesta área devido à sua capacidade em formar complexos metálicos, bem como na interação com alvos, que poderão ser responsáveis pelo aparecimento de doenças oncológicas, com destaque para o enzima ribonucleotido reductase (RR) e o complexo clivável topoisomerase II – DNA.⁷¹ O enzima ribonucleotido reductase (RR) está presente em todas as células vivas e comporta-se como um catalisador na redução dos ribonucleotídeos nos correspondentes desoxirribonucleotídeos, através da substituição do grupo hidroxilo na posição 2' por um hidrogénio, sendo responsável por fornecer os precursores necessários para a replicação e tradução do DNA.^{72,73} As topoisomerasas são enzimas responsáveis pela resolução de intermediários topológicos de DNA, formados durante as etapas de replicação, transcrição e tradução, como DNA superenrolado, *relaxed*, *knotted* e *catenated*.⁷⁴

Brockman *et al.* em 1956 ⁷⁵, foram os primeiros a avaliar a atividade anticancerígena de tiossemicarbazonas, derivadas de heterocíclicos aromáticos. Neste ensaio *in vivo*, os investigadores relataram que a (*E*)-2-(piridin-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida foi a mais promissora no prolongamento de tempo de vida de ratinhos xenoenxertados com a linha celular L1210 (leucemia). Como consequência dos resultados obtidos nesta investigação, foi possível o desenvolvimento de diversos estudos SAR (Relação Estrutura-Atividade), nos quais se verificou que a atividade anticancerígena nesta família de compostos se manifesta essencialmente em tiossemicarbazonas que contenham na sua estrutura grupos fenólicos, bem como as que são derivadas de heterociclos aromáticos, ligados em posição α relativamente à função tiossemicarbazona.^{76,77}

Posteriormente, no estudo da otimização da solubilidade de tiossemicarbazonas derivadas de isoquinolina e piridina, os investigadores Sartorelli *et al.* descobriram, em 1992, a Triapina[®] ou 3-AP (Figura 1.10).⁷⁸ Esta tiossemicarbazona foi inicialmente sintetizada como um fármaco potente na inibição do enzima ribonucleotido reductase ⁷⁹ e apresentou a capacidade em inibir o crescimento de células leucémicas L1210, em ensaios *in vivo* e *in vitro*.⁸⁰ Para além disso, em ensaios *in vivo* demonstrou um potencial antitumoral muito promissor em ratinhos xenoenxertados, com as linhas celulares L1210 (leucemia), M109 (carcinoma pulmonar) e A2780 (carcinoma do ovário). Devido ao sucesso nos ensaios preliminares, esta tiossemicarbazona já passou por ensaios clínicos de fase I e II ⁸¹. Nos ensaios clínicos foi avaliada a toxicidade associada a esta tiossemicarbazona, onde se registou diversos efeitos secundários. Atualmente a Triapina[®] encontra-se em ensaios clínicos de fase III ⁸², combinada com a cisplatina e radioterapia, em pacientes portadores de cancro no colo do útero ou vaginal.

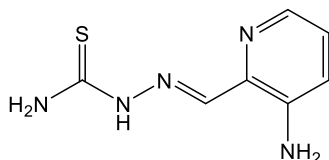
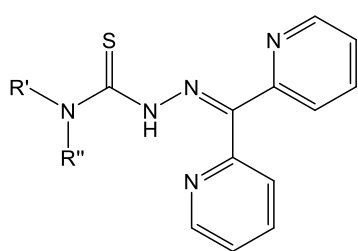


Figura 1.10: Estrutura química da tiossemicarbazona Triapina[®].

A Triapina[®] é considerada um eficiente agente quelante de ferro, por meio do átomo de enxofre e dos dois átomos doadores de azoto. Um estudo publicado em 2006, por Shao *et al.*⁸³ reporta a eficácia que o complexo Triapina-Fe(II) possui na inibição do enzima RR ao contrário da Triapina[®].⁸⁴ Assim, devida à fraca inibição do enzima RR pela Triapina[®], observada por Shao *et al.*, aliada aos efeitos secundários registados nos ensaios clínicos, foi necessário o desenvolvimento de uma série de compostos providos de maior eficácia e seletividade para quelarem com o ião ferro, derivados de di-2-piridilcetona tiossemicarbazonas (Figura 1.11).



Composto	R'	R''
DpT	H	H
Dp4mT	H	CH ₃
Dp44mT	CH ₃	CH ₃
Dp4eT	H	C ₂ H ₅
Dp4aT	H	C ₃ H ₆
Dp4pT	H	Ph

Figura 1.11: Estrutura geral dos derivados de di-2-piridilcetona tiossemicarbazona.

Num estudo preliminar *in vitro*, realizado em 2006,⁸⁵ dos análogos da série de compostos DpT, o Dp44mT quelatado ao ferro foi o que mais se destacou na medida em que revelou uma atividade anticancerígena muito promissora em 28 linhas celulares incluindo em células humanas K562 (leucemia), SK-Mel-28 (melanoma) e T-47D (câncer da mama) com valores de IC₅₀ de 0,01, 0,009 e 0,009 µM, respectivamente. Num estudo publicado em 2009⁸⁶, verificou-se que a Dp44mT é citotóxica contra a linha celular do adenocarcinoma da mama humano não hormono-dependente MDA-MB-231 devido ao seu caráter inibitório da atividade enzimática do topoisomerase II α , com concentrações na ordem do nanomolar. Adicionalmente, verificou-se que esta tiossemicarbazona é também citotóxica em células leucêmicas Nalm-6.⁸⁷ Contudo, a administração do composto Dp44mT em doses elevadas e sobredosagem induziu fibrose cardíaca em ratinhos de testes, o que levou à síntese de uma segunda geração de derivados tiossemicarbazonas. O *design* desta família de compostos foi baseado em estudos SAR, nos quais se constatou que a substituição em N3 com um grupo alquila melhorava a atividade anticancerígena. Desta nova família de compostos, o di-2-piridilcetona-4-ciclo-hexil-4-metil-3-tiossemicarbazona (DpC) foi o candidato mais promissor.^{88,89,90} Em ensaios *in vivo*, em ratinhos xenoenxertados com células da linha celular do adenocarcinoma do pâncreas PANC-1, a DpC demonstrou um potencial anticancerígeno mais eficaz do que o fármaco Gemcitabina, utilizado no tratamento deste tumor.⁹¹ Adicionalmente, verificou-se que a sua administração por via oral e intravenosa não revelou ser tóxica, bem como não desenvolveu fibrose cardíaca em ensaios *in vivo* e *in vitro*.⁹⁰ Em 2016 esta tiossemicarbazona entrou em ensaios clínicos de fase I para o tratamento de tumores resistentes e num estado avançado.⁹²

Simultaneamente, a *Cotinga Pharmaceuticals* desenvolveu uma nova tiossemicarbazona, de terceira geração, estruturalmente diferente das anteriores: a 4-(piridin-2-il)-N-([(8E)-5,6,7,8-tetrahydroquinolin-8-ilideno]amino)piperazina-1-carbotioamida ou COTI-2 (Figura 1.12). Estudos *in vitro* e *in vivo*, realizados em 2016⁹³ e 2019⁹⁴, demonstraram a eficácia desta tiossemicarbazona em diversos tipos de tumores, com valores de IC₅₀ na escala nanomolar. Descobriu-se ainda que o seu modo de ação se baseia no restauro das funções do gene supressor de tumor p53, e por conseguinte da proteína p53, que regula o ciclo celular e, portanto, funciona como um supressor tumoral.⁹⁵ A COTI-2 entrou em ensaios clínicos de fase Ib/IIa, como monoterapia ou combinado com a cisplatina, para o tratamento de diversos cânceres vaginais, do pulmão, do pâncreas entre outros.⁹⁶

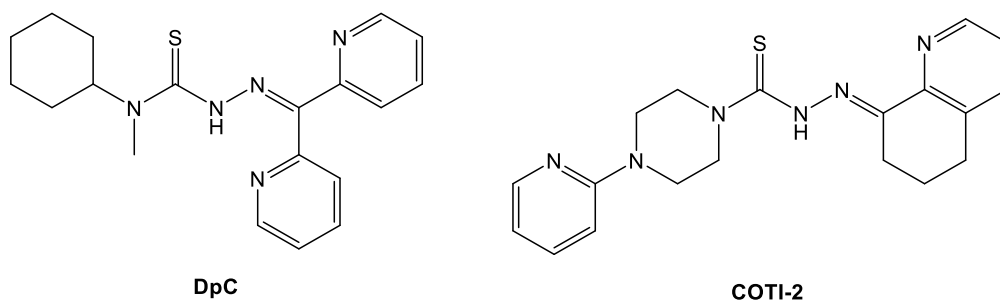
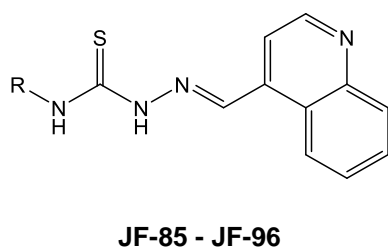


Figura 1.12: Estrutura química de duas tiossemicarbazonas em ensaios clínicos: DpC e COTI-2.

O grupo de Ribeiro *et al.*⁹⁷ em 2019, sintetizou 12 tiossemicarbazonas derivadas de 4-quinolina substituídas na posição N3, Figura 1.13, com o intuito de determinar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos em duas linhas celulares do cancro da mama, MCF-7 e T-47D. Obtiveram-se valores de IC₅₀ compreendidos entre 0,81 – 1,10 μM e 1,07 – 1,48 μM, para as linhas celulares MCF-7 e T-47D, respetivamente, o que pode ser indicativo que são compostos seletivos para o cancro da mama hormono-dependente, por demonstrar um intervalo de valores de IC₅₀ inferior ao da linha celular T-47D. Os compostos **JF-89**, **JF-90** e **JF-92** apresentaram-se como potenciais “leads” pois revelaram um grau de citotoxicidade muito promissor, com valores de IC₅₀ de 0,88, 0,81 e 0,82 μM, respetivamente. Os autores verificaram também que a não substituição e a presença de pelo menos um átomo de halogénio no anel aromático, diminui o grau citotóxico dos compostos na linha celular MCF-7. Estudos de *docking molecular* realizados com o composto **JF-92** indicaram que esta tiossemicarbazona inibe parcialmente a topoisomerase IIα podendo ser considerado como um inibidor anti tumoral interfacial.

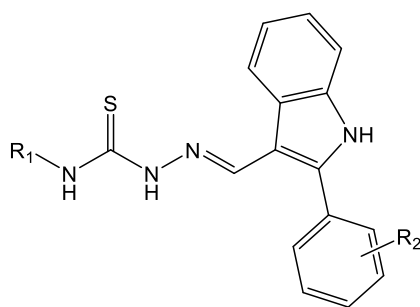


Composto	R	Composto	R
JF-85	<i>p</i> -F-Ph	JF-91	<i>p</i> -CH ₃ -Ph
JF-86	C ₂ H ₄ -Ph	JF-92	<i>p</i> -C ₂ H ₅ -Ph
JF-87	C ₅ H ₄ N	JF-93	<i>p</i> -Br-Ph
JF-88	<i>p</i> -Cl-Ph	JF-94	<i>p</i> -OCH ₃ -Ph
JF-89	C ₁₀ H ₇	JF-95	C ₃ H ₅
JF-90	<i>p</i> -NO ₂ -Ph	JF-96	Ph

Figura 1.13: Estruturas dos compostos estudados por Ribeiro *et al.* Adaptado de ⁹⁷.

1.4.4. Tiossemicarbazonas com atividade antioxidante

Vários estudos reportados na literatura comprovam que os derivados de tiossemicarbazonas apresentam uma atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* muito promissora. Bakherad *et al.*⁹⁸, em 2019 sintetizaram 16 tiossemicarbazonas (Figura 1.14) possuindo um núcleo de indole. A atividade antioxidante dos compostos **6a – 6p** foi avaliada segundo o método colorimétrico do DPPH, tendo os autores constatado que os compostos **6a – 6l** apresentam uma promissora capacidade em reduzir o radical de DPPH (semelhante à do ácido ascórbico usado como controle), sendo os compostos **6a** e **6h** os mais promissores com valores de EC₅₀ de 0,117 ± 0,01 μM e de 0,043 ± 0,001 μM. Os autores atribuíram à presença de um grupo fenilo na posição N3 ao acréscimo da atividade antioxidante. Adicionalmente, verificou-se que a presença de substituintes volumosos no anel aromático, ligado na posição 2 do grupo indolilo, provoca um decréscimo na atividade antioxidante, e que a presença de substituintes eletrodadores, como é o caso do grupo hidroxilo, em **6b**, **6i** e **6m**, acrescem o potencial antioxidante.



Composto (R ₁ = <i>p</i> -N(CH ₃) ₂ -Ph)	R ₂	Composto (R ₁ = <i>p</i> -CH ₃ -Ph)	R ₂	Composto (R ₁ = CH ₃)	R ₂
6a	H	6h	H	6m	<i>p</i> -OH
6b	<i>p</i> -OH	6i	<i>p</i> -OH	6n	<i>p</i> -OCH ₃
6c	<i>o</i> , <i>m</i> , <i>p</i> -OCH ₃	6j	<i>p</i> -OCH ₃	6o	<i>p</i> -Cl
6d	<i>p</i> -OCH ₃	6k	<i>p</i> -Cl	6p	<i>p</i> -Br
6e	<i>p</i> -Cl	6l	<i>p</i> -Br		
6f	<i>p</i> -Br				
6g	<i>p</i> -CH ₃				

Figura 1.14: Tiossemicarbazonas sintetizadas pelo grupo de Bakherad et al, adaptado de ⁹⁸.

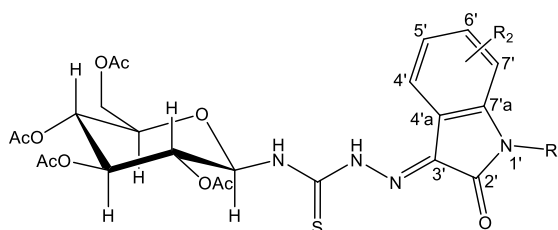
Por outro lado, a química dos derivados de tiossemicarbazonas com uma sub-unidade glicosídica tem vindo a ser considerada muito interessante. A glicosilação, por norma, melhora as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de potenciais fármacos, uma vez que pode reduzir a toxicidade associada a fármacos não glicosilados.⁵⁵

Nguyen et al.²⁹ publicaram em 2013 um estudo que demonstrou que os derivados de glicosil tiossemicarbazona também têm propriedades antioxidantes. Neste trabalho de investigação, os autores reportaram a síntese de 13 derivados de glicosil tiossemicarbazona, Figura 1.15, e avaliaram o efeito do tipo de substituinte no anel aromático e respetiva posição, na atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Os autores constataram que os compostos que possuem na sua estrutura substituintes eletrodadores no anel aromático, **4a**, **4b**, **4c** e **4f**, apresentam uma capacidade antioxidante muito promissora, com valores de EC₅₀ de 56, 71, 75 e 108 μM, o que se deve à elevada estabilização do radical formado, valores inferiores ou próximos ao do Resveratrol, um conhecido antioxidante natural.

Composto	R	Composto	R
4a	<i>p</i> -N(CH ₃) ₂	4h	<i>p</i> -CH ₃
4b	<i>m</i> -OC ₂ H ₅ ; <i>p</i> -OH	4i	<i>p</i> -Br
4c	<i>m</i> -OCH ₃ ; <i>p</i> -OH	4j	<i>p</i> -Cl
4d	<i>m</i> -OH; <i>p</i> -OCH ₃	4k	<i>p</i> -F
4e	<i>m</i> -OCH ₃	4l	<i>m</i> -NO ₂
4f	<i>p</i> -OH	4m	<i>p</i> -NO ₂
4g	<i>p</i> -i-C ₃ H ₇		

Figura 1.15: Estruturas dos compostos sintetizados por Nguyen et al. Adaptado de ²⁹.

Posteriormente, em 2016 Thanh *et al.*⁹⁹ publicaram um estudo que demonstrou que as tiossemicarbazonas derivadas de isatina (Figura 1.16) com um fragmento glicosídico apresentaram eficácia no aumento da atividade de enzimas como o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px), em ensaios *in vivo*, realizados em ratos. Neste ensaio, o resveratrol foi utilizado como controle positivo.



Composto (R ₁ = H)	R ₂	Composto (R ₂ = H)	R ₁
4a	H	4m	CH ₃
4b	5'-NO ₂	4n	C ₂ H ₅
4c	5'-Cl-7'-NO ₂	4o	<i>n</i> -C ₃ H ₇
4d	5'-Br-7'-NO ₂	4p	<i>n</i> -C ₄ H ₉
4e	5', 7'-Br	4q	<i>i</i> -C ₄ H ₉
4f	5'-F	4r	C ₃ H ₅
4g	5'-Cl	4s	CH ₂ -Ph
4h	5'-Br	4t	(CH ₂) ₂ -Ph
4i	5'-I		
4j	5'-CH ₃		
4k	7'-CH ₃		
4l	5'- <i>i</i> -C ₃ H ₇		

Figura 1.16: Estrutura dos derivados de glicosil tiossemicarbazonas sintetizadas por Thanh *et al.* Adaptado de ⁹⁹

Os autores constataram que a presença de halogénios, com exceção do flúor, contribui para o aumento do potencial antioxidante dos compostos, enquanto que a presença de grupos alquila na posição 1' da isatina, assim como a presença de grupo volumosos, em **4m** – **4t**, tinham um efeito negativo na atividade antioxidante, devido, possivelmente, a efeitos estereoquímicos. O composto mais ativo nos três enzimas foi a 5', 7'-di-bromoisatina *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-*D*-glucopiranosil) tiossemicarbazona, **4e**, cuja concentração inibitória mínima foi de 10,76 ± 0,33 unit/mg proteína para o enzima SOD. Para os enzimas GSH-Px e CAT os compostos mais promissores foram o **4r** e **4i** com valores de concentração inibitória mínima de 0,27 ± 0,01 unit/mg proteína e de 399,75 ± 12,12 unit/mg proteína, respetivamente.

1.5. Enquadramento do presente trabalho

Apesar da existência de diversos tipos de antioxidantes naturais, este grupo de compostos apresenta uma fraca biodisponibilidade e baixa eficácia¹⁰⁰ derivado à sua instabilidade¹⁰¹, permeabilidade e solubilidade fraca e ainda degradação extracelular¹⁰². Assim, o principal objetivo na investigação na área dos radicais livres e *stress* oxidativo envolve a necessidade de explorar novos antioxidantes, mais eficientes e seletivos, de modo a ultrapassar as desvantagens associadas aos antioxidantes naturais, sendo uma área que continua em expansão.

Decorrente dos resultados promissores publicados sobre a atividade antioxidante e anticancerígena dos derivados de tiossemicarbazonas, propôs-se para o presente trabalho a síntese de quinze derivados de tiossemicarbazonas, dez dos quais novos (**4.a – 4.e, 4.h, 4.l – 4.o**)¹, Figura 1.17, e avaliar o seu potencial antioxidante e anticancerígeno. Pretende-se sintetizar uma série de novas tiossemicarbazonas derivadas de aldeídos heteroaromáticos (indole, benzofurano, benzotiofeno e benzotiazol), variando a sua posição relativamente à função tiossemicarbazona, bem como o grupo substituinte ligado ao azoto *N3* (grupo glicosídico per-acetilado, fenilo ou um hidrogénio).

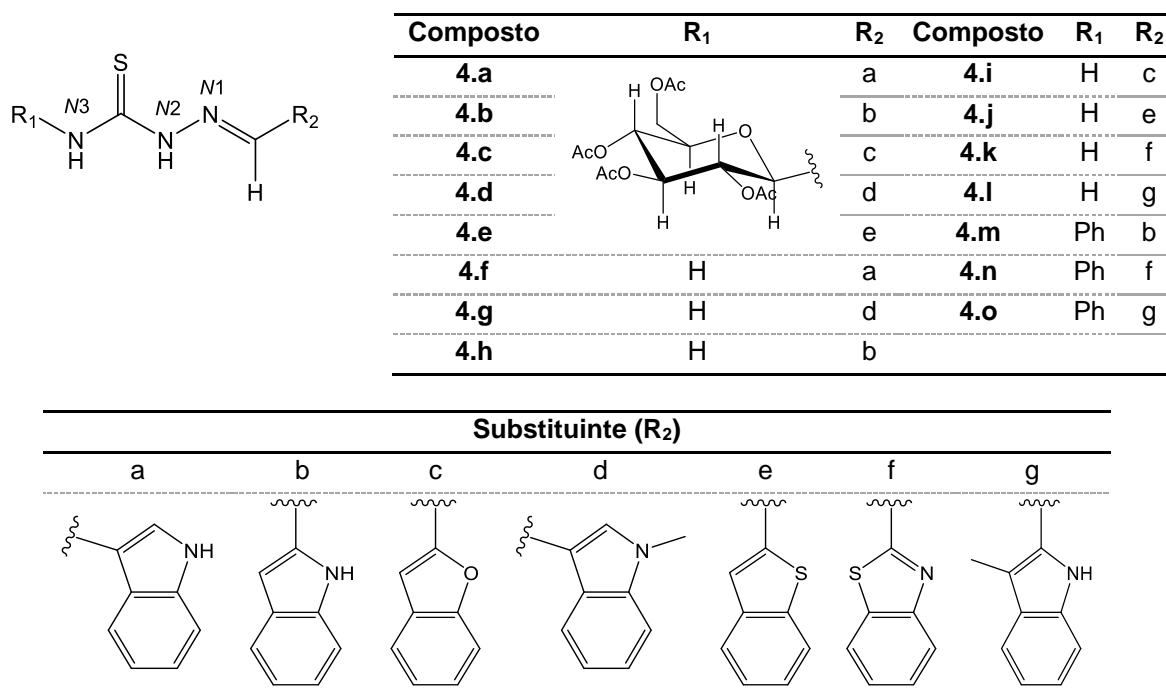


Figura 1.17: Estrutura dos derivados de tiossemicarbazona sintetizados neste trabalho.

A atividade antioxidante de todos os compostos será determinada segundo o método *in vitro* de captura do radical livre de DPPH. As atividades anticancerígenas serão avaliadas na linha celular do carcinoma hepatocelular humano Hep-G2, para uma indicação preliminar do seu potencial hepatotóxico, bem como na linha celular do cancro da mama hormono-dependente MCF-7, com recurso ao método colorimétrico do MTT. A síntese dos quinze compostos possibilita a criação de uma pequena biblioteca de derivados de tiossemicarbazonas, para a realização de um estudo preliminar de

¹ Os compostos **4.d** e **4.e** foram anteriormente sintetizados em projetos de licenciatura.

Relação Estrutura-Atividade (SAR), que permitirá antever quais as particularidades estruturais que poderão conferir melhor atividade contra os alvos estudados.

O trabalho realizado no decorrer desta dissertação de mestrado está descrito nos capítulos seguintes. No capítulo 2 apresenta-se a síntese e a caracterização por técnicas espectroscópicas de RMN (^1H , ^{13}C -APT, COSY, HSQC, HMBC e NOESY) e IV dos compostos sintetizados, bem como os resultados obtidos dos estudos *in vitro* da atividade antioxidante e dos ensaios de citotoxicidade. A descrição experimental é incluída no capítulo 3, onde está inserida uma explicação pormenorizada de todos os reagentes utilizados, das sínteses efetuadas e o protocolo experimental dos métodos colorimétricos do DPPH e MTT. Finalmente, a conclusão e trabalho futuro são apresentados no capítulo 4 deste trabalho, seguido do capítulo 5 e 6 onde estão incluídos a bibliografia utilizada e os apêndices, respetivamente.

2º Capítulo

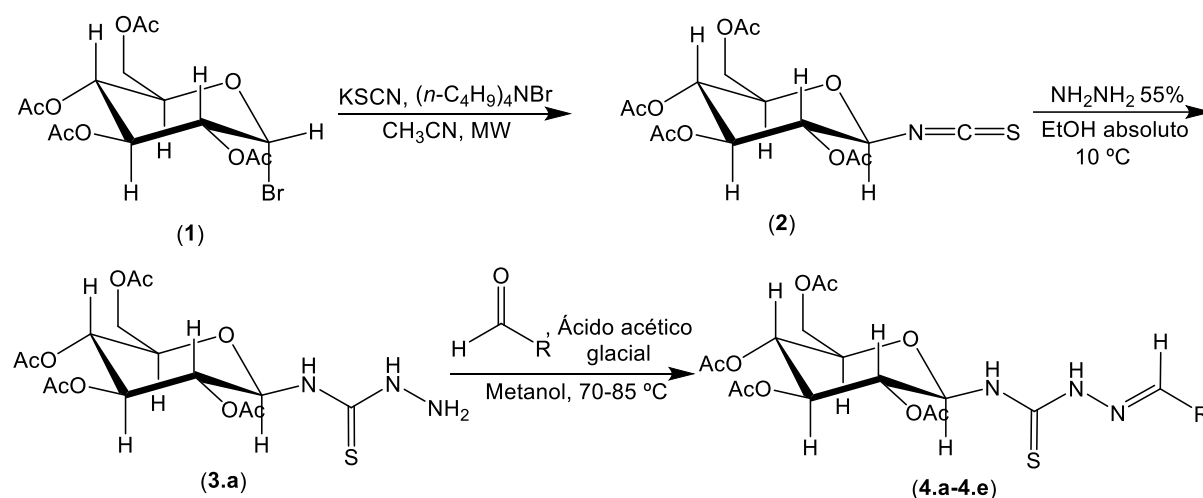
2. Apresentação e discussão de resultados

2.1. Síntese de derivados de glicosil tiossemicarbazona

Como já foi referido, um dos principais objetivos do presente trabalho foi elaborar uma pequena biblioteca de novos derivados de glicosil tiossemicarbazona e avaliar a sua capacidade antioxidante, bem como a sua atividade citotóxica nas linhas celulares do cancro da mama hormono-dependente (MCF-7) e do carcinoma hepatocelular humano (Hep-G2).

Primeiramente, foram sintetizadas cinco novas glicosil tiossemicarbazona que se diferenciam pelo anel heterocíclico ligado ao azoto *N1*. As glicosil tiossemicarbazonas **4.d** e **4.e** foram anteriormente sintetizadas no grupo de investigação onde este trabalho foi desenvolvido, contudo foram utilizados no presente trabalho para se poderem avaliar as respetivas atividades biológicas.^{103,104}

A síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbazona (**4.a - 4.e**) foi realizada em três passos reacionais, Esquema 2.1. No primeiro passo reacional efetuou-se a síntese do isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil (**2**), por meio de duas reações de substituição nucleofílica S_N2 entre o brometo de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil (**1**), brometo de tetrabutilamónio ((*n*-C₄H₉)₄NBr) e, posteriormente com o tiocianato de potássio (KSCN). O segundo passo da via sintética consistiu na síntese da *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazida (**3.a**), por reação de adição entre o composto (**2**) e hidrazina hidratada (NH₂NH₂.H₂O). O terceiro, e último passo reacional é caracterizado pela síntese de derivados de glicosil tiossemicarbazona (**4.a - 4.e**), que consiste numa reação de substituição no grupo carbonilo com perda de oxigénio, entre a *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazida (**3.a**) e o aldeído correspondente.

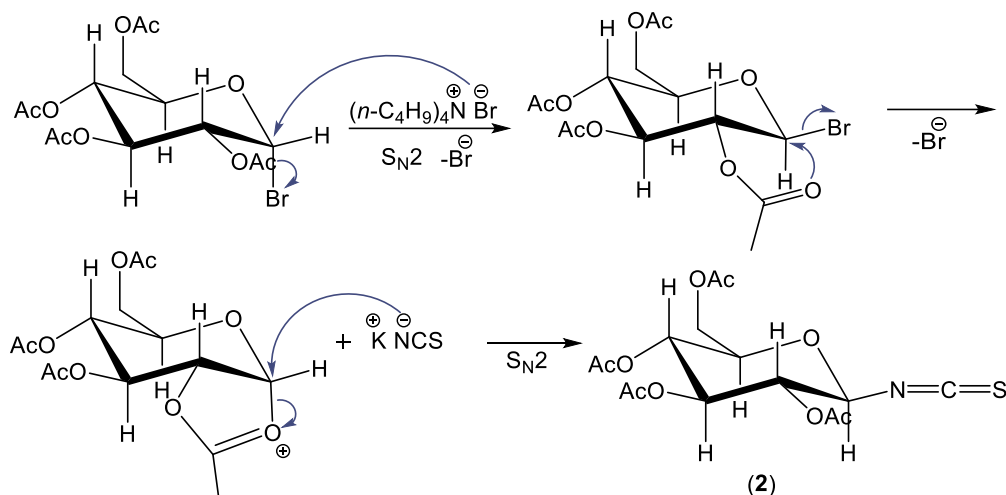


- | | | |
|-------|---|-----------------------------------|
| (4.a) | Indole-3-carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona | R=C ₈ H ₆ N |
| (4.b) | Indole-2-carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona | R=C ₈ H ₆ N |
| (4.c) | 2-benzofurano carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona | R=C ₈ H ₅ O |
| (4.d) | 1-metilindole-3-carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona | R=C ₉ H ₈ N |
| (4.e) | 2-benzo[<i>b</i>]tiofeno carboxaldeído <i>N</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona | R=C ₈ H ₅ S |

Esquema 2.1: Esquema reacional de síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbazonas, 4.a-4.e.

Do ponto de vista mecanístico, Esquema 2.2, o primeiro passo da via sintética consiste, primeiramente numa reação de substituição nucleofílica S_N2 , com a prévia ativação da posição anomérica através do brometo de tetrabutilamónio (PTC). Posteriormente, ocorre a formação de uma

ligação glicosídica 1,2-*trans*, presente no composto **2**, com a participação do grupo vizinho, que neste caso é um grupo acetilo. Esta reação de glicosilação ocorre por meio da formação de um composto intermediário cíclico, o íon oxônio que, posteriormente é aberto pelo ataque nucleofílico S_N2 anti do isotiocianato, com a correspondente inversão de configuração do carbono anomérico, passando de anômero α para anômero β e, portanto a formação estereosseletiva de um derivado de glicosilo 1,2-*trans*.¹⁰⁵



Esquema 2.2: Mecanismo de síntese do isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil, **2**.

Este passo reacional requer o uso de um catalisador de transferência de fase (PTC), como é considerado o brometo de tetrabutilamônio ((n-C₄H₉)₄NBr), embora a reação se dê apenas numa fase.¹⁰⁶ Pensa-se que o brometo de tetrabutilamônio seja utilizado com dois propósitos: atuar como um catalisador nucleofílico permitindo a conversão do α-Br inicial em β-Br, mais lábil; e, promover a conversão *in situ* do tiocianato em isotiocianato sob condições moderadas.¹⁰⁷ Esta conversão revelou ser muito útil na medida em que veio solucionar um problema proveniente da reação entre o brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil com sais de tiocianato, visto que, sem o uso de catalisadores de transferência de fase, o produto resultante desta síntese seria o isômero de tiocianato cineticamente mais estável. Os sais de tiocianato de baixo custo vieram substituir o tiocianato de prata utilizado num estudo publicado por Emil Fisher em 1914.^{108,109}

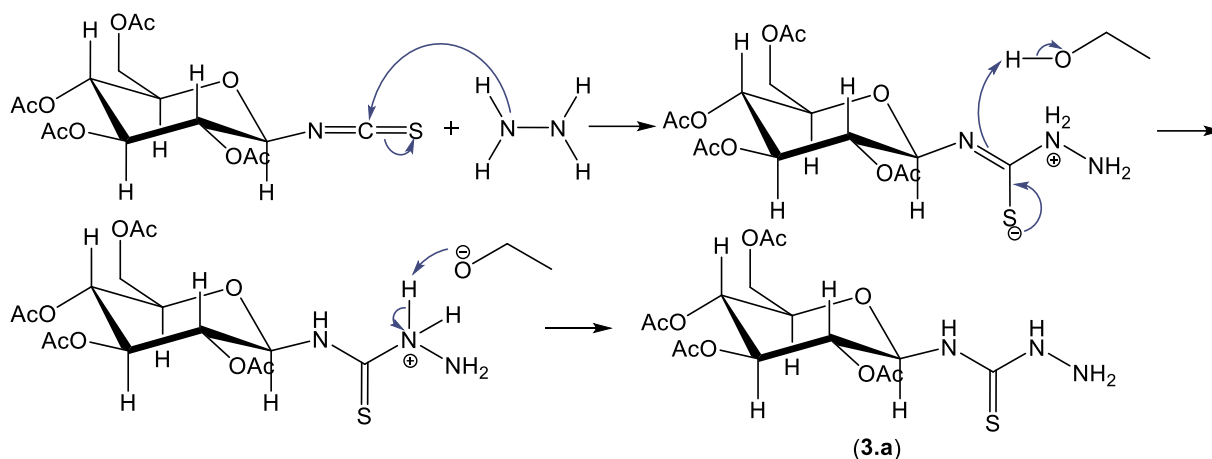
Em trabalhos anteriores^{103,104}, tentou-se três abordagens para a obtenção do composto **2**. Numa primeira abordagem, optou-se por realizar a síntese sob condições anidras e sem uma pré-secagem dos reagentes. Posteriormente, tentaram-se outras duas alternativas de síntese, a primeira em meio anidro, atmosfera inerte de azoto, bem como uma pré-secagem da acetobromo-α-D-glucose e o uso de acetonitrilo anidro, e a segunda síntese em meio não anidro. Constatou-se na primeira abordagem efetuada, a formação dos anômeros α e β, numa proporção de 1:1. Já na segunda e na terceira sínteses, através dos espectros de RMN ¹H da misturas reacionais, pela integração dos prótons homólogos, verificou-se que a reação não foi completa, visto que a proporção entre o composto **2** e a acetobromo-α-D-glucose foi de aproximadamente 2:1 e 1:1, indicando que a realização da reação em ambiente anidro é um fator importante. Na primeira abordagem o composto **2** foi obtido com rendimentos efetivos muito baixos de 3 – 5% e na segunda abordagem obtiveram-se rendimentos efetivos, igualmente fracos de 13% e 17% na 1^a e 2^a síntese, respetivamente. Estes baixos valores de

rendimentos poderão ser explicados pela decomposição do brometo de glicosilo, uma vez que, sendo o bromo um excelente grupo rejeitado é facilmente suscetível ao ataque da água em condições que não sejam rigorosamente anidras. Devido à atual situação de pandemia não foi possível o cálculo do rendimento efetivo na 3ª aproximação.

Assim, no presente trabalho, tentou-se primeiramente melhorar o rendimento deste passo reacional, fazendo diversas aproximações. Numa primeira aproximação, a reação foi realizada igualmente em meio anidro e atmosfera inerte de azoto, bem como um pré-tratamento de todos os reagentes e do solvente reacional. Num segunda abordagem manteve-se as condições experimentais utilizadas anteriormente, mas utilizou-se um excesso de tiocianato de potássio (6 mmol). Em ambas as sínteses os espectros de RMN ¹H das misturas reacionais eram igualmente complexos e a proporção dos dois anômeros manteve-se 1:1. Foi ainda efetuada uma 3ª síntese utilizando o método de *solvent-free*, porém este protocolo experimental não foi eficaz na medida em que o composto se degradou. Por último, ensaiou-se a síntese assistida por micro-ondas, que efetivamente demonstrou ser mais promissora. Nesta última abordagem todos os reagentes foram submetidos a uma pré-secagem, a mistura reacional foi preparada em atmosfera inerte de azoto e usou-se acetonitrilo recém-destilado. Este procedimento experimental, para além de ser considerado mais sustentável em relação aos anteriormente reportados, levou à obtenção de misturas reacionais menos complexas, bem como a formação maioritária do anômero β. Nesta abordagem o composto **2** foi obtido com rendimentos efetivos superiores aos das sínteses descritas anteriormente, de 28,2% e 38,4%. Estes valores de rendimento poderão ser explicados pela forma como estas reações ocorrem - a irradiação de micro-ondas produz um aquecimento dielétrico direto dos reagentes e solventes da reação, que possuem a capacidade de transformar a radiação eletromagnética em calor, acelerando as reações químicas devido à absorção seletiva de energia micro-ondas por moléculas polares. A reação é realizada num *vial* adequado para que o aumento de temperatura seja uniforme por toda a amostra, levando conseqüentemente a menos produtos secundários ou à sua decomposição, resultando em rendimentos superiores quando comparados a métodos convencionais.^{110,111}

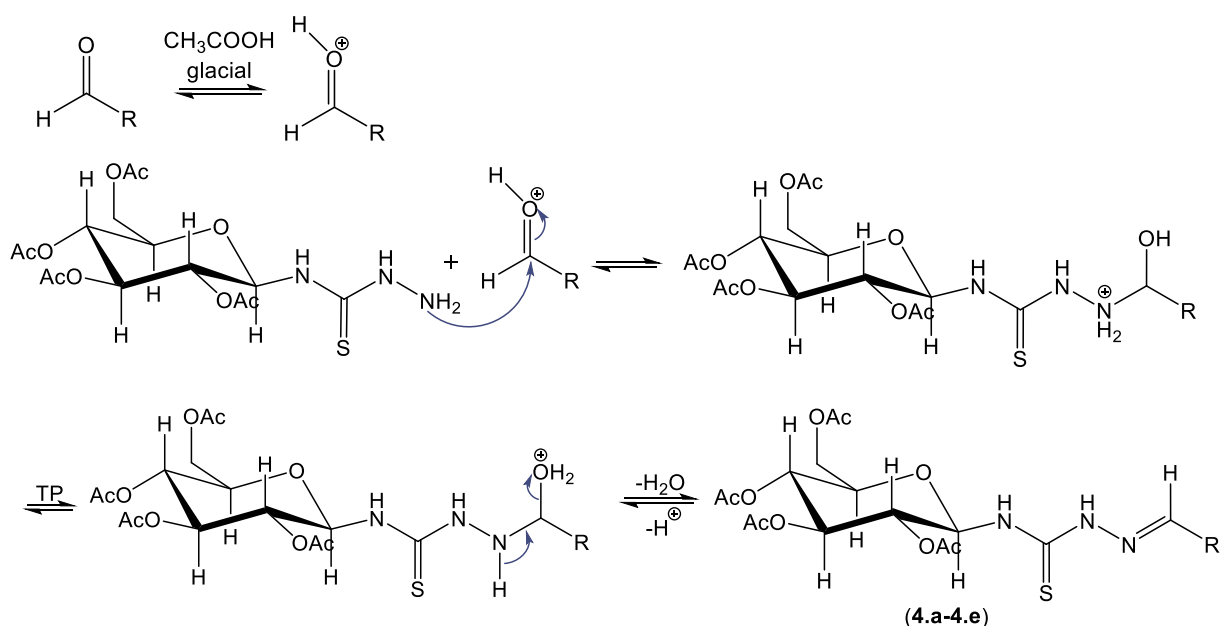
O isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosilo (**2**) foi utilizado na formação da *N*-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil) tiossemicarbazida (**3.a**) por adição de hidrazina hidratada (NH₂NH₂.H₂O). Do ponto de vista mecanístico, Esquema 2.3, este passo reacional consiste na adição nucleofílica da hidrazina ao carbono da função isotiocianato, seguida de uma transferência de próton mediada pelo meio reacional.

Geralmente, procede-se à conversão do composto (**2**) em (**3.a**) usando um solvente aprótico, porém, o rendimento desta reação demonstrou ser superior num solvente prótico, como o etanol absoluto. Esta reação deve ser também realizada a temperaturas baixas (< 10 °C), de modo a evitar, a decomposição do isotiocianato em derivados do ácido tiocarbâmico. O uso de etanol absoluto nesta etapa reacional revelou ser uma vantagem, devido à baixa solubilidade do composto (**3.a**) neste solvente (a baixas temperaturas), levando à sua precipitação à medida que se vai formando.^{99,112}



Esquema 2.3: Mecanismo de síntese da *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -*D*-glucopiranosil) tiossemicarbazida, 3.a a partir do respetivo isotiocianato.

O composto **3.a** foi utilizado na síntese de derivados de glicosil tiossemicarbazonas (**4.a - 4.e**), numa reação de substituição nucleofílica no aldeído correspondente, com perda do oxigénio, Esquema 2.4. Esta reação inicia-se com a protonação do oxigénio do grupo carbonilo, levando à formação de um ião oxónio intermediário. De seguida, o ataque nucleofílico do átomo de azoto *N1* da *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -*D*-glucopiranosil) tiossemicarbazida (**3.a**) leva à formação de um intermediário hemiaminal protonado que, após eliminação de uma molécula de água e desprotonação dá origem aos derivados de glicosil tiossemicarbazona (**4.a - 4.e**). A formação deste tipo de compostos dá-se mais rapidamente se for efetuada em condições de catálise ácida com valores de pH entre 4 e 5, visto que a valores de pH inferiores a 4 pode ocorrer a protonação de *N1* da tiossemicarbazida e a um pH superior a 5 a protonação do grupo carbonilo é menor. Estes dois efeitos levam, conseqüentemente, a uma diminuição da velocidade reacional.¹¹³



Esquema 2.4: Mecanismo de síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbazona, 4.a-4.e a partir da correspondente hidrazida.

2.1.1. Caracterização do isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil (**2**)

O composto **2** foi obtido segundo o procedimento geral descrito em 3.3.1 e o seu rendimento é reportado à quantidade de produto bruto purificado. Na 1ª e 2ª síntese foram purificados, respectivamente, 0,387 g e 0,349 g de produto bruto obtendo-se o produto purificado com um rendimento efetivo de 28,2% e 38,4%. A Figura 2.1 ilustra a estrutura e numeração do composto **2**, para efeitos de caracterização espectroscópica. A atribuição dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C -APT, Tabela 2.1 e Tabela 2.2, realizou-se recorrendo às experiências de RMN ^1H , ^{13}C -APT, COSY, HSQC e HMBC, estando os respetivos espectros reunidos no Apêndice 1 (Figura 6.1 – Figura 6.5).

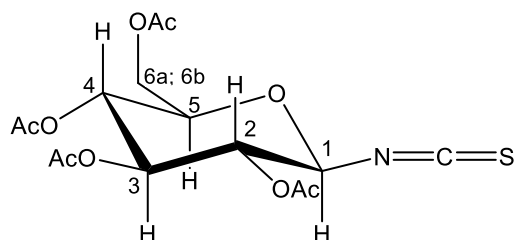


Figura 2.1: Estrutura e numeração do composto **2**.

Tabela 2.1: Dados de RMN, ^1H e COSY, do composto **2** em CDCl_3 .

δ ^1H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
2,02	6H, multipletto	-	OAc CH_3 -C-2 OAc CH_3 -C-3
2,11	6H, singuleto	-	OAc CH_3 -C-4 OAc CH_3 -C-6
3,74	1H, multipletto	-	H-5
4,14	1H, dupletto de dupletos, $J = 12,5$	3,74	H-6a; H-6b
4,24	1H, dupletto de dupletos, $J = 12,5$	3,74	H-6a; H-6b
5,02	1H, dupletto, $J = 9,0$	5,11	H-1
5,11	2H, tripleto, $J = 9,2$	3,74; 5,02	H-2; H-4
5,20	1H, tripleto, $J = 9,3$	5,11	H-3

Tabela 2.2: Dados de RMN, ¹³C-APT, HSQC e HMBC, do composto 2 em CDCl₃.

δ ¹³ C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
170,51	C	-	4,14; 4,24	OAc C-6
170,25	C	-	5,20	OAc C-3
169,23	C	-	-	-
169,06	C	-	5,11	OAc C-2; OAc C-4
144,15	C	-	5,02	C=S
83,46	CH	5,02	5,11	C-1
74,01	CH	3,74	-	C-5
72,45	CH	5,20	5,02; 5,11	C-3
71,81	CH	-	5,20	C-2
67,58	CH	5,11	4,14; 5,20	C-4
61,46	CH ₂	4,14; 4,24	5,11	C-6
20,71	CH ₃	-	-	OAc <u>C</u> H ₃ -C-2; OAc <u>C</u> H ₃ -C-3;
20,53	CH ₃	2,02; 2,11	-	OAc <u>C</u> H ₃ -C-4; OAc <u>C</u> H ₃ -C-6

A análise dos espectros de RMN permitiu a identificação de todos os sinais de próton e carbono pertencentes ao composto **2**. Segundo o espectro de HMBC, o sinal de ¹³C-APT a δ 144,25 ppm correlaciona-se com sinal de próton a δ 5,02 ppm que, como se pode observar no espectro de RMN ¹H é um duplete, que integra para um próton e possui uma constante de acoplamento de 9,0 Hz. O sinal de carbono a δ 144,25 ppm está em conformidade com o valor descrito na literatura para o carbono N=C=S.¹¹⁴ Assim, o sinal a δ 5,02 ppm corresponde ao próton anomérico H-1 que, no espectro de HSQC, acopla com o carbono a δ 83,46 ppm.

A constante de acoplamento $J_{H-1,H-2}$ permite identificar a configuração do carbono anomérico, visto ser diretamente proporcional ao ângulo diedro. No anômero α , o próton anomérico encontra-se em posição equatorial, estando *cis* em relação a H-2 que está em posição axial, originando assim, um ângulo diedro de 60° e, conseqüentemente, um valor de J de aproximadamente 4 Hz. No anômero β os prótons mencionados encontram-se em posição *trans*-di axial, resultando num ângulo diedro de 180°, implicando assim um valor de J superior: 7- 8 Hz.^{115,116,117} O valor de 9,0 Hz no sinal a δ 5,02 ppm, atribuído ao próton anomérico, indica que o composto **2** se encontra na forma de anômero β e, portanto, ocorreu a esperada inversão de configuração no centro anomérico durante a reação.

No espectro de HSQC, verifica-se que os dois sinais a δ 4,14 ppm e 4,24 ppm correlacionam-se com o mesmo carbono, a δ 61,46 ppm, que no espectro de ¹³C-APT se apresenta como um carbono secundário, correspondendo portanto a C-6. A partir dos sinais de H-6a/ H-6b e através do espectro de COSY foi possível estabelecer as correlações H-H direta, Figura 2.2. Os prótons diastereotópicos H-6a/ H-6b correlacionam-se, no espectro de COSY, um com o outro, bem como, com o sinal a δ 3,74 ppm, correspondente a H-5. Este próton, no espectro de HSQC acopla com o carbono a δ 74,01 ppm que se atribui a C-5.

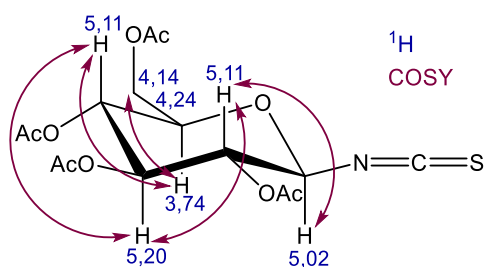


Figura 2.2: Correlações observadas no espectro de COSY do composto 2.

O sinal de próton a δ 5,02 ppm, atribuído a H-1 e, o sinal a δ 3,74 ppm, atribuído a H-5, correlacionam ambos, em COSY, com o tripleto a δ 5,11 ppm que integra para 2 prótons, pelo que, este sinal deverá ser atribuído aos prótons H-2 e H-4. A correlação no espectro de COSY entre o sinal a δ 5,11 ppm e o tripleto a δ 5,20 ppm, permite atribuir este último sinal a H-3, que no espectro de HSQC, correlaciona-se com o sinal de carbono a δ 72,45 ppm. A distinção entre dois sinais de carbono a δ 67,58 e 71,81 ppm, acoplados em HSQC com o tripleto a δ 5,11 ppm, foi feita com recurso ao espectro de HMBC onde é possível verificar uma correlação entre o sinal a δ 67,58 ppm com um dos prótons H-6 (δ 4,14 ppm), que deverá portanto corresponder a C-4, enquanto que o sinal a δ 71,81 ppm correlaciona apenas com sinal a δ 5,20 ppm, e portanto deverá ser atribuído a C-2.

Os sinais a δ 2,02 e 2,11 ppm integram cada um para 6 prótons, correspondendo aos prótons dos grupos acetilo. Por último, a atribuição dos carbonos quaternários dos grupos acetilo foi feita de acordo com as respetivas correlações de HMBC com os prótons do carbono da glucose a que estão ligados, representadas na seguinte figura:

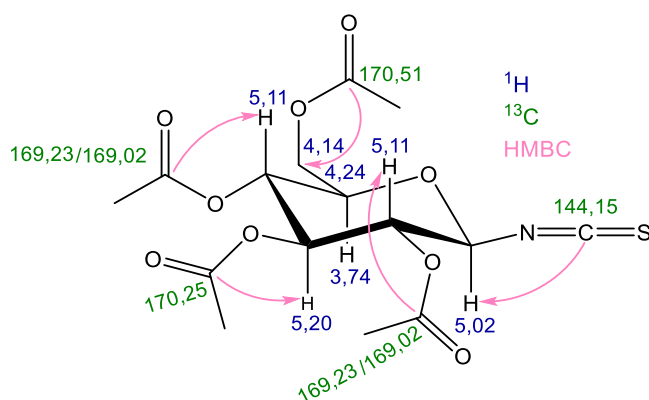


Figura 2.3: Correlações observadas no espectro de HMBC do composto 2 para atribuição dos sinais de RMN ^{13}C dos carbonos quaternários.

2.1.2. Caracterização da *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazida (3.a)

Os composto **3.a** foi obtido pela reação entre o correspondente derivado de isotiocianato e hidrazina hidratada segundo o procedimento geral descrito em 3.3.2. O composto foi obtido com um rendimento de 97,0%, 98,6% e 100% na 1^a, 2^a e 3^a sínteses, respetivamente. A Figura 2.4 representa a estrutura e numeração do composto **3.a**, de acordo com as regras utilizadas para o composto **2**.

O composto **3.a** foi caracterizado pelas mesmas técnicas espectroscópicas utilizadas para o composto **2**, estando a atribuição do sinais de RMN ¹H e ¹³C-APT nas Tabelas 2.3 e 2.4. Os espectros de RMN (¹H, ¹³C-APT, COSY, HSQC e HMBC) podem ser observados no Apêndice 2 (Figura 6.6 – Figura 6.10).

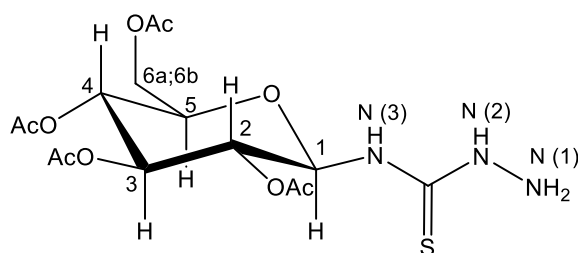


Figura 2.4: Estrutura e numeração do composto 3.a.

Tabela 2.3: Dados de RMN, ¹H e COSY, do composto 3.a em CDCl₃.

δ ¹ H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
2,04	9H, multipeto	-	OAc CH ₃ -C-2 OAc CH ₃ -C-3
2,09	3H, singuleto	-	OAc CH ₃ -C-4 OAc CH ₃ -C-6
3,79	2H, singuleto	-	N(1)-H
3,89	1H, dupleto, J = 10,0	-	H-5
4,12	1H, dupleto, J = 12,1	-	H-6a; H-6b
4,33	1H, dupleto, J = 13,0	4,12; 3,88	
5,07	2H, multipeto	-	H-2
5,12		3,89	H-4
5,38	1H, tripleto, J = 9,5	5,07; 5,12	H-3
5,77	1H, tripleto, J = 9,2	5,07	H-1
7,44	1H, singuleto	-	N(2)-H
8,15	1H, dupleto, J = 7,6	5,77	N(3)-H

Tabela 2.4: Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 3.a em CDCl_3 .

δ ^{13}C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
184,29 ²	C	-	7,44	C=S
171,19	C	-	2,04; 5,07; 5,12	OAc C-2; OAc C-4
170,72	C	-	2,09; 4,12; 4,33	OAc C-6
170,04 ²	C	-	2,04; 5,38	OAc C-3
169,91	C	-	2,04; 5,07; 5,12	OAc C-2; OAc C-4
82,16	CH	5,77	5,07	C-1
73,53	CH	3,89	5,12	C-5
72,74	CH	5,38	5,07; 5,12	C-3
70,71	CH	5,07	5,38	C-2
68,26	CH	5,12	5,38; 4,12	C-4
61,64	CH ₂	4,12; 4,33	-	C-6
20,81	CH ₃	-	-	OAc $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -C-2;
20,79	CH ₃	2,04; 2,09	-	OAc $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -C-3;
20,63	CH ₃	-	-	OAc $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -C-4;
				OAc $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -C-6

A fração glicosídica no composto 3.a, não sofreu alterações significativas nos desvios químicos de RMN, com exceção do próton anomérico, pelo que as principais diferenças nos desvios químicos entre os compostos 2 e 3.a estão associadas à função tiossemicarbazida.

Comparando os valores de desvios químicos do próton anomérico dos compostos 2 e 3.a, δ 5,02 e δ 5,77 ppm, respectivamente, verifica-se que no composto 3.a o sinal está mais desblindado, o que pode ser explicado, em parte, por um efeito eletroatrator mais forte do grupo tiossemicarbazida. O sinal correspondente ao próton anomérico, apresenta um valor de constante de acoplamento de 9,2 Hz indicando assim a presença do anômero β , como previsto.

A Figura 2.5 apresenta as principais correlações COSY e HMBC no composto 3.a.

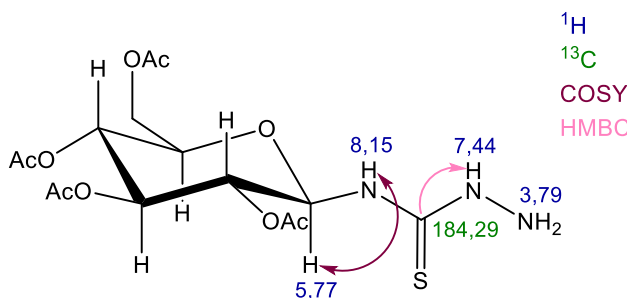


Figura 2.5: Principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC do composto 3.a.

Os sinais de próton a δ 3,79, 7,44 e 8,15 ppm não acoplam com carbonos, pelo que deverão ser atribuídos aos prótons diretamente ligados a átomos de azoto. O sinal do próton anomérico a δ 5,77 ppm acopla em COSY com o sinal a δ 8,15 ppm, o qual deverá corresponder, portanto, a N(3)-H. No espectro de HMBC, o sinal do carbono quaternário a δ 184,29 ppm, atribuível ao carbono do grupo tiocarbonilo, apresenta uma correlação a duas ligações com o sinal a δ 7,44 ppm, que integra para um

² Desvio químico retirado do espectro de HMBC

protão, sendo este sinal atribuído a N(2)-H. Verifica-se que os sinais protão de N(1)-H e N(2)-H apresentam um elevado valor de desvio químico, que poderá ser explicado pela desblindagem causada pelo efeito indutivo do grupo tiocarbonilo. Por último, o singuleto a δ 3,79 ppm, com integração de 2 prótons, deverá corresponder a N(1)-H.

2.1.3. Caracterização da indole-3-carboxaldeído *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona (4.a)

O terceiro passo reacional da síntese para a obtenção do composto **4.a** foi conseguido com um rendimento de 51,1% e seguiu o procedimento geral descrito em 3.3.3. Os derivados de glicosil tiossemicarbazona foram caracterizados recorrendo às técnicas de IV, RMN ^1H , ^{13}C -APT, COSY, HSQC e HMBC e ESI-HRMS. A estrutura do composto **4.a** apresenta-se na Figura 2.6, com a respetiva numeração, para fins de caracterização espetroscópica.

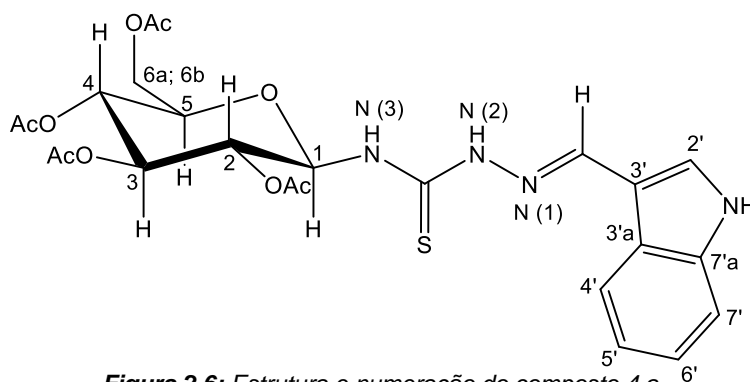


Figura 2.6: Estrutura e numeração do composto 4.a.

A análise dos espetros de RMN em CDCl_3 permitiu atribuir os sinais de RMN ^1H e ^{13}C -APT, Tabela 2.5 e Tabela 2.6, estando os espetros apresentados no Apêndice 3 (Figura 6.11 – Figura 6.15).

Tabela 2.5: Dados de RMN, ^1H e COSY, do composto 4.a em CDCl_3 .

δ ^1H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
2,04	3H, singuleto		OAc CH_3 -C-2
2,06	6H, singuleto		OAc CH_3 -C-3
			OAc CH_3 -C-4
2,09	3H, singuleto		OAc CH_3 -C-6
3,93	1H, duplete de dupletos de dupletos $J = 10,2; 4,4; 2,0$	5,17; 4,38; 4,15	H-5
4,15	1H, duplete de dupletos, $J = 12,5; 2,0$	3,93; 4,15	H-6a; H-6b
4,38	1H, duplete de dupletos, $J = 12,5; 4,4$		
5,17	1H, tripleto, $J = 9,8$	3,93	H-4
5,28	1H, tripleto, $J = 9,5$	-	H-2
5,43	1H, tripleto, $J = 9,4$	5,17; 5,28	H-3
5,82	1H, tripleto, $J = 9,3$	5,28	H-1
7,32	2H, multiplete	-	H-6'
7,39		-	H-5'
7,43	1H, duplete, $J = 7,5$	7,32	H-7'
7,53	1H, duplete, $J = 2,7$	-	H-2'
7,95	1H, singuleto	-	N=CH
8,06	1H, duplete, $J = 9,1$	5,82	N(3)-H
8,24	1H, duplete, $J = 7,4$	7,39	H-4'
8,54	1H, singuleto	7,53	N-H (indole)
9,06	1H, singuleto	-	N(2)-H

Tabela 2.6: Dados de RMN, ¹³C-APT, HSQC e HMBC, do composto 4.a em CDCl₃.

δ ¹³ C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
178,37	C	-	9,06	C=S
171,00	C	-	2,09; 2,04	OAc C-2
170,95	C	-	2,09	OAc C-3
170,18	C	-	2,06	OAc C-4
169,89	C	-	2,06	OAc C-6
140,57	CH	7,95	9,06	N=C <u>H</u>
136,99	C	-	7,32; 7,53; 8,24	C-7'a
129,66	CH	7,53	7,95	C-2'
124,40	C	-	7,53; 7,95	C-3'a
124,30	CH	7,32	7,39; 7,43; 8,24	C-6'
122,54	CH	8,24	7,32	C-4'
122,34	CH	7,39	7,43	C-5'
112,15	C	-	7,53; 7,95	C-3'
111,61	CH	7,43	7,39	C-7'
82,62	CH	5,82	5,28	C-1
73,72	CH	3,93	-	C-5
73,16	CH	5,43	5,28	C-3
70,47	CH	5,28	5,43	C-2
68,61	CH	5,17	4,15; 5,43	C-4
61,87	CH ₂	4,15; 4,38	-	C-6
21,03	CH ₃	-	-	OAc C <u>H</u> ₃ -C-2
20,91	CH ₃	2,04; 2,06; 2,09	-	OAc C <u>H</u> ₃ -C-3
20,86	CH ₃	-	-	OAc C <u>H</u> ₃ -C-4
				OAc C <u>H</u> ₃ -C-6

Uma vez que as únicas diferenças entre o composto **4.a** e **3.a** são a presença do grupo heterocíclico e a função imina, as alterações mais notórias nos espectros de RMN foram atribuídas a essa fração da molécula.

O sinal do carbono no grupo tiocarbonilo foi imediatamente identificado devido ao seu elevado valor de desvio químico a δ 178,37 ppm, confirmando que a tiossemicarbazona foi obtida na forma tiona não tendo, portanto, ocorrido tautomerização tiona-tiol. Os prótons N(2)-H e N(3)-H foram identificados de forma análoga à do composto **3.a**. No espectro de HMBC, a correlação do próton N(2)-H com o sinal a δ 140,57 ppm permite atribuir este sinal ao carbono imínico (N=CH), cujo próton aparece a δ 7,95 ppm, de acordo com o espectro de HSQC. Ambos os valores de desvio químico deste grupo funcional estão concordantes com o reportado na literatura.²⁹ Como se observa na Figura 2.7, o singuleto a δ 7,95 ppm correlaciona-se em HMBC, com os sinais de carbono a δ 112,15 (C), 124,40 (C) e 129,66 (CH) ppm, sendo este último sinal atribuído a C-2', cujo próton aparece a δ 7,53 ppm.²⁹ Os sinais a δ 112,15 ppm e 124,40 ppm são referentes aos carbonos C-3' e C-3'a, respetivamente, encontrando-se de acordo com os valores encontrados na literatura.¹¹⁸ O último sinal de carbono quaternário - δ 136,99 ppm - será consequentemente referente a C-7'a.

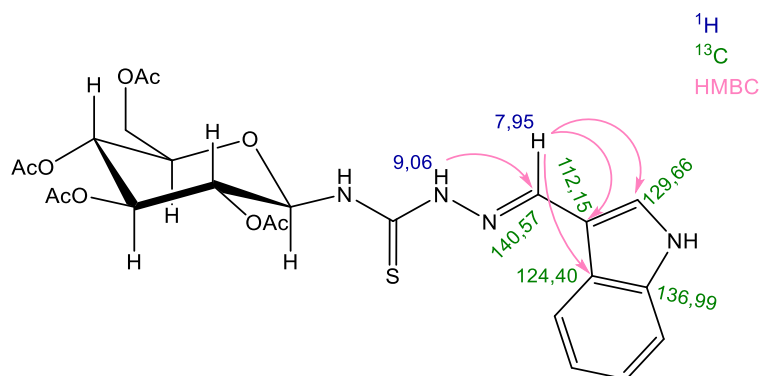


Figura 2.7: Algumas correlações observadas no espectro de HMBC do composto 4.a.

Os sinais de próton presentes no anel heteroarômico, foram atribuídos de acordo com as correlações COSY entre H-4' e H-5'; H-6' e H-7', e HMBC entre o carbono quaternário C-7'a e o próton H-6', como está apresentado na Figura 2.8. Pelas correlações em HSQC, identificam-se C-7', C-5', C-4' e C-6' a δ 111,61, 122,34, 122,54 e 124,30 ppm, respectivamente. Por último, o sinal a δ 8,54 ppm atribui-se ao próton diretamente ligado ao átomo de azoto no grupo indolilo.

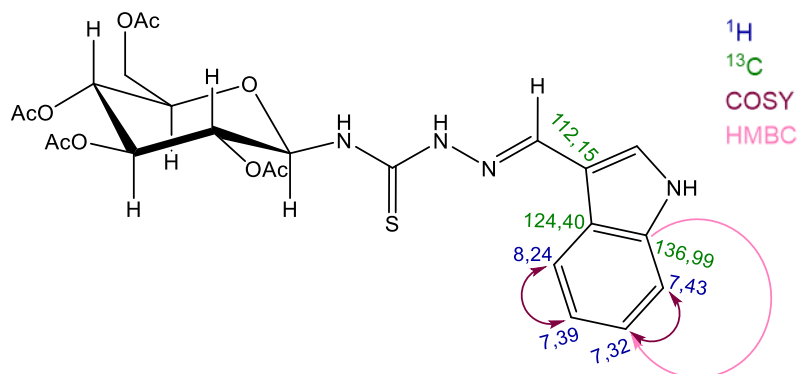


Figura 2.8: Algumas correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC do composto 4.a.

2.1.4. Caracterização da indole-2-carboxaldeído *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona (**4.b**)

À semelhança do composto **4.a**, a indole-2-carboxaldeído *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona **4.b** foi sintetizada de acordo com o procedimento geral descrito no ponto 3.3.3. O composto foi obtido com um rendimento de 70,4%. Na Figura 2.9 apresenta-se a estrutura numerada do composto **4.b**, para posterior caracterização espectroscópica.

O composto **4.b** foi igualmente caracterizado pelas mesmas técnicas espectroscópicas utilizadas para o composto **4.a**, de IV, RMN ^1H , ^{13}C -APT, COSY, HSQC e HMBC e ESI-HRMS. A análise dos espectros de RMN em CDCl_3 permitiu atribuir os sinais de RMN ^1H e ^{13}C -APT, Tabela 2.7 e Tabela 2.8, estando os espectros apresentados no Apêndice 4 (Figura 6.18 – Figura 6.23).

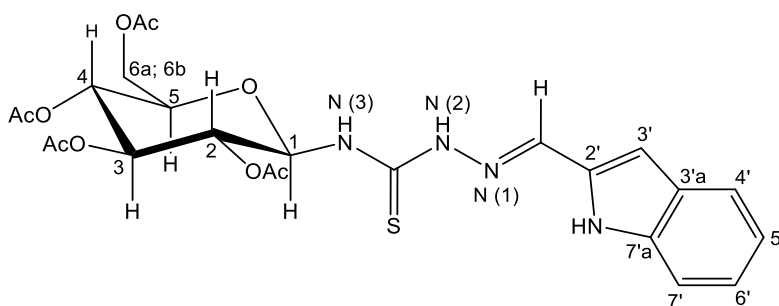


Figura 2.9: Estrutura e numeração do composto **4.b**.

Tabela 2.7: Dados de RMN, ^1H e COSY, do composto **4.b** em CDCl_3 .

δ ^1H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
2,07	9H, multipeto	-	OAc CH_3 -C-2 OAc CH_3 -C-3 OAc CH_3 -C-4 OAc CH_3 -C-6
2,10	3H, singuleto	-	OAc CH_3 -C-2 OAc CH_3 -C-3 OAc CH_3 -C-6
3,93	1H, dupleto de dupleto de dupletos, $J = 10,1; 4,4; 2,0$	-	H-5
4,16	1H, dupleto ³ , $J = 12,1$	3,93	H-6a; H-6b
4,39	1H, dupleto de dupletos, $J = 12,4; 4,3$	-	H-6a; H-6b
5,15	1H, tripleto, $J = 9,8$	3,93	H-4
5,21	1H, tripleto, $J = 9,7$	-	H-2
5,44	1H, tripleto, $J = 9,5$	5,15	H-3
5,50	1H, tripleto	5,21	H-1
6,80	1H, singuleto	-	H-3'
7,11	1H, tripleto, $J = 7,5$	-	H-5'
7,28	1H, multipeto	7,11	H-6'
7,41	1H, dupleto, $J = 8,2$	7,28	H-7'
7,62	1H, dupleto, $J = 7,9$	7,11	H-4'
7,85	1H, singuleto alargado	-	N=CH
8,64	1H, dupleto, $J = 7,6$	5,51	N(3)-H
9,68	1H, singuleto	-	N-H (indole)
10,18	1H, singuleto	-	N(2)-H

³ Deveria ser um dupleto de dupletos

Tabela 2.8: Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, do composto 4.b em CDCl_3 .

δ ^{13}C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
179,00	C	-	5,50; 10,18	C=S
173,28	C	-	2,07; 5,21	OAc C-2
171,02	C	-	2,10; 4,16; 4,39	OAc C-6
170,12	C	-	2,07; 5,44	OAc C-3
169,91	C	-	2,07; 5,15	OAc C-4
137,92	C	-	6,80; 7,28; 7,62; 9,68	C-7'a
134,77	CH	7,85	6,80; 10,18	N=C-H
132,23	C	-	6,80; 7,85; 9,68	C-2'
128,32	C	-	6,80; 7,11; 7,41; 9,68	C-3'a
125,10	CH	7,28	7,62	C-6'
121,84	CH	7,62	7,28	C-4'
120,62	CH	7,11	7,41	C-5'
111,57	CH	7,41	7,11	C-7'
109,22	CH	6,80	7,62; 9,68	C-3'
82,50	CH	5,50	5,21; 8,64	C-1
73,58	CH	3,93	5,15; 4,16	C-5
72,51	CH	5,44	5,21	C-3
71,44	CH	5,21	5,44; 8,64	C-2
68,71	CH	5,15	4,16; 5,44	C-4
61,83	CH ₂	4,16; 4,39	5,15	C-6
21,31	CH ₃	-	-	OAc C-2
21,04	CH ₃	-	-	OAc C-3
20,88	CH ₃	2,07; 2,10	-	OAc C-4
20,86	CH ₃	-	-	OAc C-6

A única diferença entre os compostos **4.a** e **4.b** é a posição da ligação do grupo indolilo à função tiossemicarbazona, que no composto **4.b** se encontra na posição 2, pelo que as principais diferenças nos desvios químicos dos espectros de RMN se encontram nos átomos do heterociclo.

Como representado na Figura 2.10, os sinais a δ 7,85 ppm e δ 134,77 ppm, acoplam em HMBC, com δ 132,23 ppm e δ 6,80 ppm, respetivamente, sendo possível atribuir-se inequivocamente, o carbono quaternário C-2' a δ 132,23 ppm e H-3' a δ 6,80 ppm, que se correlaciona em HSQC com o sinal a δ 109,22 ppm.

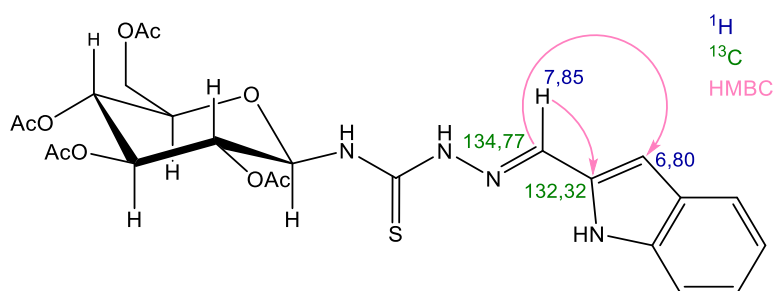


Figura 2.10: Algumas correlações observadas no espectro de HMBC do composto 4.b.

De acordo com a Figura 2.11, o sinal a δ 109,22 ppm (C-3'), correlaciona-se em HMBC, apenas com o próton H-4', que deverá portanto corresponder ao sinal a δ 7,62 ppm. Os sinais a δ 7,62 e 7,41 ppm (H-7') correlacionam-se em COSY com os sinais a δ 7,11 e 7,28 ppm, respectivamente, que se identificam como H-5' e H-6'. Os carbonos quaternários a δ 137,92 e 128,32 ppm correspondem a C-7'a e C-3'a. Esta atribuição foi efetuada pela existência de duas correlações-chave em HMBC, entre o próton H-6' e C-7'a, bem como H-5' e C-3'a.

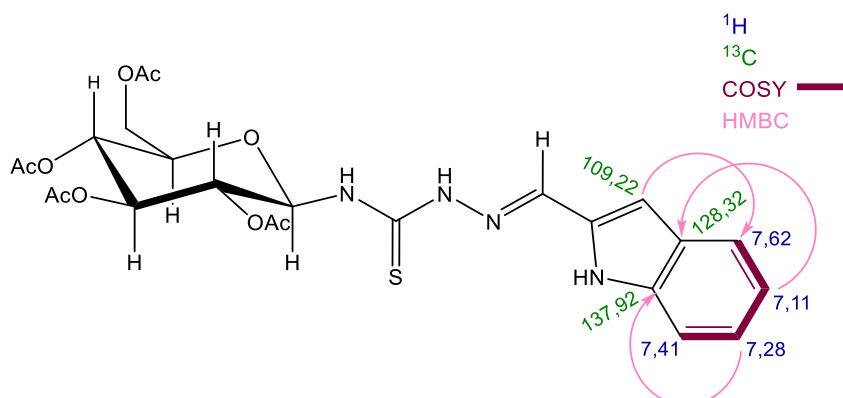


Figura 2.11: Algumas correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC do composto 4.b.

O sinal a δ 9,68 ppm atribui-se ao próton diretamente ligado ao átomo de azoto no grupo indolilo.

No conjunto dos derivados de glicosil tiossemicarbazona selecionou-se o composto **4.b** para a identificação da geometria da dupla ligação C=N, com recurso à experiência de NOESY, Apêndice 4 - Figura 6.23, utilizando CDCl_3 como solvente. De acordo com as correlações apresentadas na Figura 2.12, verifica-se que o isômero predominante é o *E*, devido à correlação entre o próton imínico (N=CH) e o próton em N(2)-H.

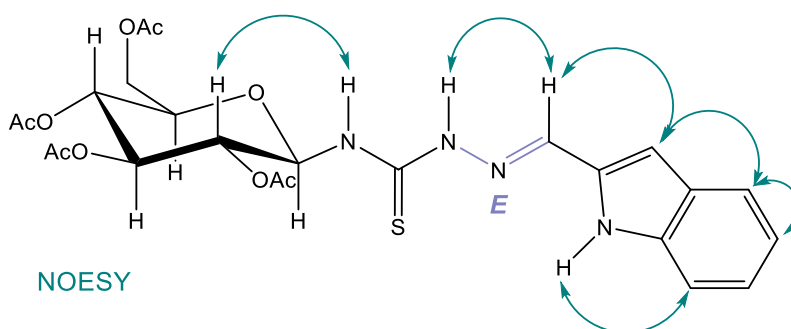


Figura 2.12: Correlações NOESY observadas para o composto 4.b.

2.1.5. Caracterização da 2-benzofurano carboxaldeído *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona (4.c)

A síntese do composto **4.c**, Figura 2.13, foi realizada segundo o mesmo procedimento dos compostos anteriores, tendo-se obtido o produto com um rendimento de 46,8%.

O composto **4.c** foi igualmente caracterizado pelas mesmas técnicas espectroscópicas utilizadas para os compostos anteriores, de IV, RMN ^1H , ^{13}C -APT, COSY, HSQC e HMBC e ESI-HRMS, sendo a identificação dos sinais de próton e carbono efetuada de forma análoga ao composto **4.b**. Na Tabela 2.9 e Tabela 2.10 estão apresentadas as atribuições dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C -APT em CDCl_3 , respetivamente, estando os espectros reunidos no Apêndice 5 (Figura 6.26 – Figura 6.30). Foi também efetuada a caracterização em $\text{DMSO}-d_6$, estando a atribuição dos sinais e os espectros correspondentes no ponto 3.3.3.3 e no Apêndice 5 (Figura 6.31 – Figura 6.35), respetivamente.

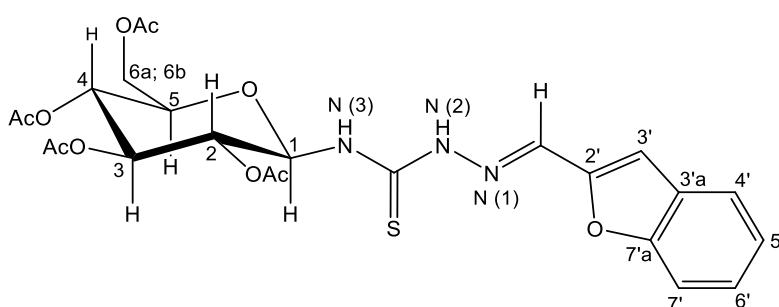


Figura 2.13: Estrutura numerada do composto 4.c.

Tabela 2.9: Dados de RMN, ^1H e COSY, do composto 4.c em CDCl_3 .

δ ^1H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
2,04	6H, singuleto		OAc CH_3 -C-3
2,05	3H, singuleto		OAc CH_3 -C-4
2,10	3H, singuleto		OAc CH_3 -C-6 OAc CH_3 -C-2
3,92	1H, duplete de duplete de dupletos, $J = 10,2, 4,4, 2,0$	-	H-5
4,14	1H, duplete de dupletos alargado, $J = 12,4; 2,0$	3,92	H-6a; H-6b
4,38	1H, duplete de dupletos, $J = 12,5; 4,4$	3,92; 4,14	
5,16	1H, tripleto, $J = 9,7$	3,92	H-4
5,21	1H, tripleto, $J = 9,6$	-	H-2
5,41	1H, tripleto, $J = 9,5$	5,16; 5,21	H-3
5,81	1H, tripleto, $J = 9,2$	5,21	H-1
7,19	1H, singuleto	-	H-3'
7,28	1H, tripleto, $J = 7,3$	-	H-5'
7,39	1H, tripleto de dupletos	-	H-6'
7,55	1H, duplete, $J = 8,3$	7,39	H-7'
7,63	1H, duplete, $J = 7,6$	7,28	H-4'
7,77	1H, singuleto	-	N=CH
8,25	1H, duplete, $J = 9,0$	5,81	N(3)-H
9,54	1H, singuleto	-	N(2)-H

Tabela 2.10: Dados de RMN, ¹³C-APT, HSQC e HMBC, do composto 4.c em CDCl₃.

δ ¹³ C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
179,15	C	-	5,81; 9,54	C=S
170,96	C	-	2,05; 4,38	OAc C-6
170,91	C	-	2,10; 5,21	OAc C-2
170,20	C	-	2,04; 5,41	OAc C-3
169,81	C	-	2,04; 5,16	OAc C-4
155,87	C	-	7,19; 7,39; 7,63	C-7'a
150,10	C	-	7,19; 7,77	C-2'
133,19	CH	7,77	9,54	N=C $\underline{\text{H}}$
128,08	C	-	7,19; 7,28; 7,55	C-3'a
126,79	CH	7,39	7,63	C-6'
123,85	CH	7,28	7,55	C-5'
122,11	CH	7,63	7,39	C-4'
111,94	CH	7,55	7,28	C-7'
110,52	CH	7,19	7,63; 7,77	C-3'
82,57	CH	5,81	5,21	C-1
73,90	CH	3,92	4,14; 5,16	C-5
73,08	CH	5,41	5,16	C-3
70,82	CH	5,21	5,41	C-2
68,42	CH	5,16	4,14; 5,41	C-4
61,84	CH ₂	4,14; 4,38	3,92; 5,16	C-6
21,01	CH ₃	-	-	OAc $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -C-2
20,89	CH ₃	2,04; 2,05; 2,10	-	OAc $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -C-3
20,84	CH ₃	-	-	OAc $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -C-4
				OAc $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -C-6

A atribuição dos sinais de RMN ¹H em CDCl₃ foi feita com base num espectro adquirido imediatamente a seguir à preparação da amostra, Apêndice 5 (Figura 6.26). Constatou-se que, após o composto **4.c** estar em solução durante cerca de vinte minutos, o espectro de RMN ¹H apresentava mais sinais de protão do que seria esperado, havendo uma duplicação de praticamente todos os sinais, bem como o aparecimento de um singuleto a δ 11,01 ppm (Apêndice 5 – Figura 6.31 e 6.32). Ao fim de 9 horas repetiu-se a experiência de RMN ¹H da mesma amostra e observou-se um aumento de intensidade de todos os sinais duplicados do espectro, bem como do sinal a δ 11,01 ppm (Apêndice 5 – Figura 6.32). Estas diferenças observadas nos três espectros de RMN ¹H ao longo do tempo são indicativas de que o composto **4.c**, em solução de CDCl₃, sofre um processo de transformação tautomeria tiona-tiol. Este equilíbrio encontra-se apresentado na Figura 2.14, onde é também possível verificar a possibilidade de existência de confórmeros, mantendo a configuração *E* na dupla ligação C=N.⁵⁰ O aparecimento de um sinal de protão a campo baixo, δ 11,01 ppm¹¹⁹, poderá corresponder ao grupo S-H no tiol *ZE*, cuja estabilização do arranjo estrutural poderá estar associada à formação de uma ponte de hidrogénio entre S-H e *M1*.^{120,121}

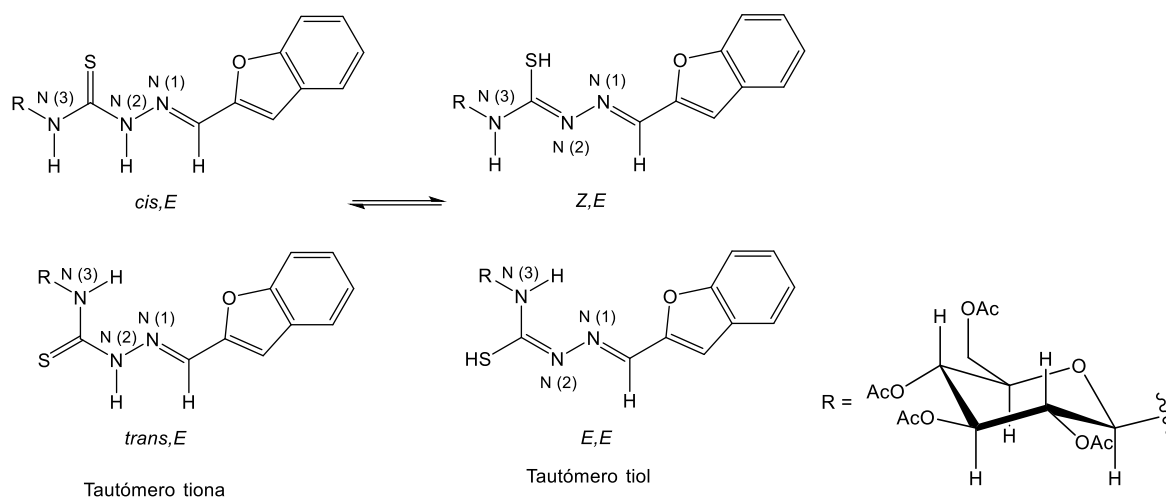


Figura 2.14: Possíveis estruturas, relativas aos compostos 4.c, com as diferentes conformações possíveis e o equilíbrio tiona-tiol.

As frações glicosídica e aromática presentes no composto **3.c**, não sofreram alterações significativas nos desvios químicos de RMN, em comparação com o composto **3.b**, à exceção dos carbonos quaternários adjacentes ao heteroátomo endocíclico.

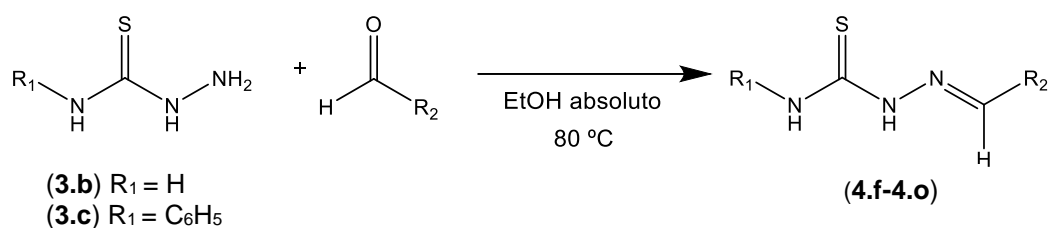
Comparando os valores de desvio químico ^{13}C relativamente aos carbonos quaternários C-2' e C-7'a, presentes nos compostos **4.b** e **4.c**, verifica-se que a substituição de um átomo de azoto pelo oxigénio provoca o desvio do sinal para campo mais baixo, passando de δ 132,23 ppm para δ 150,10 ppm e δ 137,92 ppm para δ 155,87 ppm, respetivamente. Esta diferença de desvio químico poderá ser explicada pelo facto dos carbonos C-2' e C-7'a, em **4.c**, possuírem uma densidade eletrónica inferior aos do **4.b**, devido à maior eletronegatividade do oxigénio comparativamente à do azoto, o que provoca um desblindamento significativo do carbono.

2.2. Síntese e caracterização de derivados de tiossemicarbazona substituídos e não substituídos em N3

Posteriormente, um dos principais objetivos do presente trabalho foi sintetizar um conjunto de derivados de tiossemicarbazona N3 não substituída e N3 substituída com um grupo fenilo e avaliar o seu potencial antioxidante e anticancerígeno, na linha celular do carcinoma hepatocelular humano Hep-G2, e no cancro da mama hormono-dependente MCF-7.

Foram sintetizados dez derivados tiossemicarbazonas, cinco dos quais novos (**4.h**, **4.i**, **4.m** – **4.o**) que se diferenciam pelo anel heterocíclico e pelo substituinte ligados aos azotos N1 e N3, respetivamente.

A síntese dos derivados de N3 H-tiossemicarbazona (**4.f** - **4.l**) e N3-fenil-tiossemicarbazona (**4.m** - **4.o**) foi realizada num único passo reacional, Esquema 2.5, por reação de condensação entre a tiossemicarbazida ou N4-fenil-tiossemicarbazida e o aldeído pretendido.



(4.f) (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotioamida	R ₁ =H, R ₂ =C ₈ H ₆ N
(4.g) (<i>E</i>)-2-((1-metil-1 <i>H</i> -indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotioamida	R ₁ =H, R ₂ =C ₉ H ₈ N
(4.h) (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotioamida	R ₁ =H, R ₂ =C ₈ H ₆ N
(4.i) (<i>E</i>)-2-((benzofuran-2-il)metileno)hidrazinacarbotioamida	R ₁ =H, R ₂ =C ₈ H ₅ O
(4.j) (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)metileno)hidrazinacarbotioamida	R ₁ =H, R ₂ =C ₈ H ₅ S
(4.k) (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)metileno)hidrazinacarbotioamida	R ₁ =H, R ₂ =C ₇ H ₄ NS
(4.l) (<i>E</i>)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotioamida	R ₁ =H, R ₂ =C ₉ H ₈ N
(4.m) (<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotioamida	R ₁ =C ₆ H ₅ , R ₂ =C ₈ H ₆ N
(4.n) (<i>E</i>)-2-((benzo[<i>d</i>]tiazol-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotioamida	R ₁ =C ₆ H ₅ , R ₂ =C ₇ H ₄ NS
(4.o) (<i>E</i>)-2-((3-metil-1 <i>H</i> -indole-2-il)metileno)- <i>N</i> -fenil-hidrazinacarbotioamida	R ₁ =C ₆ H ₅ , R ₂ =C ₉ H ₈ N

Esquema 2.5: Esquema reacional da síntese dos derivados de N3 H-tiossemicarbazona e N3-fenil-tiossemicarbazona, 4.f-4.o.

Do ponto de vista mecanístico, a síntese dos compostos **4.f** – **4.o** dá-se de forma análoga aos derivados de glicosil tiossemicarbazonas, como representado no Esquema 2.4.

Os derivados de N3 H-tiossemicarbazona (**4.f** – **4.l**) e N3-fenil-tiossemicarbazona (**4.m** – **4.o**) foram conseguidos com rendimentos compreendidos entre 41,1 - 94,0% e 31,7 - 83,5%, respetivamente. Os compostos **4.f**, **4.h**, **4.l** e **4.m** foram obtidos com rendimentos mais baixos de 48,6%, 60,9%, 41,1% e 31,7%, respetivamente. Estes baixos valores de rendimento poderão ser explicados pela ausência de ácido acético glacial na reação e, conseqüentemente o pH da reação possivelmente não ser o adequado.

Todos os derivados de tiossemicarbazona (**4.f** – **4.o**) foram caracterizados recorrendo às técnicas de IV, RMN ¹H, ¹³C-APT, COSY, HSQC e HMBC e, no caso de **4.h**, **4.m** e **4.o** por NOESY, e

também por HRMS. A atribuição dos sinais de protão e carbono das tiossemicarbazonas **4.f**, **4.g**, **4.i** e **4.j** foi confirmada de acordo com o que está descrito na literatura.^{122,123,124,125,126}

Tendo em conta as semelhanças estruturais entre os compostos sintetizados, a atribuição dos sinais iniciou-se pela identificação do protão imínico e dos protões diretamente ligados a átomos de azoto, estando os respetivos desvios químicos apresentados na Tabela 2.11.

Tabela 2.11: Comparação dos dados de RMN ¹H, em DMSO-d₆, dos N(3)-H, N(2)-H e protão imínico, nos compostos 4.f-4.o.

	Composto	δ ¹ H (ppm)			
		N(3)-H	N(2)-H	N-H (endocíclico)	N=CH
R ₁ = H R ₂ = Grupo heteroaromático ligado na posição 3	4.f	7,41; 8,03	11,60	11,18	8,30
	4.g	7,41; 8,00	11,14	-	8,27
R ₁ = H R ₂ = Grupo heteroaromático ligado na posição 2	4.h	8,19; 8,34	11,59	11,42	8,01
	4.i	7,80; 8,36	11,66	-	8,10
	4.j	7,62; 8,34	11,64	-	8,36
	4.k	8,00; 8,62	11,96	-	8,36
	4.l	8,18; 8,31	11,49	11,12	8,18
R ₁ = C ₆ H ₅ R ₂ = Grupo heteroaromático ligado na posição 2	4.m	10,19	11,98	11,51	8,14
	4.n	10,23	12,33	-	8,48
	4.o	10,20	11,91	11,25	8,32

Nos espetros de RMN ¹H é possível constatar que todos os compostos sintetizados, à exceção do **4.f**, apresentam dois singuletos característicos dos grupos funcionais imina (N=CH) e hidrazona (N(2)-H), com desvios químicos compreendidos entre δ 8,01 – 8,48 ppm e δ 11,14 – 12,33 ppm, respetivamente, a integrar para 1H. O valor destes dois sinais está de acordo com os desvios reportados na literatura.⁴⁷ No composto **4.f**, o sinal do protão imínico apresenta-se como um duplete devido, possivelmente, a um acoplamento ⁴J à distância do tipo alílico. Para os compostos **4.j** e **4.l** o sinal do protão imínico encontra-se sobreposto com um dos protões N(3)-H. Na Tabela 2.11, pode ainda verificar-se que, para os compostos **4.f**, **4.h**, **4.l**, **4.m** e **4.o**, os espetros apresentam um singuleto, com desvios químicos entre δ 11,12 e 11,51 ppm, a integrar para 1H, correspondente ao protão diretamente ligado ao átomo de azoto endocíclico. Esta atribuição é confirmada pela correlação em HMBC com o carbono quaternário C-2, para **4.h**, **4.l**, **4.m** e **4.o**, como é exemplificado na Figura 2.15.

Os protões (N3)-H da função tioamida em **4.f** – **4.l** foram atribuídos através da correlação em HMBC com o carbono quaternário do tiocarbonilo e, das correlações COSY (Figura 2.15). Estes dois protões aparecem como dois singuletos com desvios químicos compreendidos entre δ 7,41 e 8,62 ppm, sendo, portanto, magneticamente não-equivalentes. Este facto deve-se à deslocalização eletrónica nas tioamidas, que confere à ligação C-N um caráter parcial de ligação dupla, fazendo com que a rotação da ligação seja restrita e, se for suficientemente lenta, provoque o surgimento de dois sinais distintos de protão no espetro de RMN.^{127,128,129}

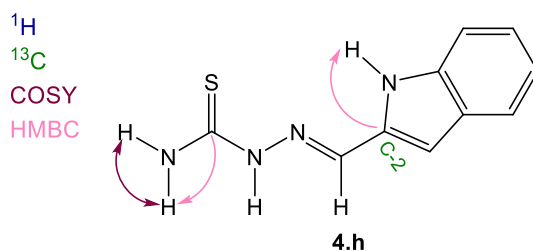


Figura 2.15: Correlações de COSY e HMBC, do composto 4.h, relativas a N(3)-H e N-H (endocíclico).

Verifica-se ainda na Tabela 2.11, que o desvio químico do protão imínico nos compostos **4.j**, **4.k** e **4.n** está ligeiramente menos blindado, sendo o sinal desviado para campo mais baixo, comparativamente com o sinal de N=CH nos restantes compostos. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto destes protões possuírem baixas densidades eletrónicas, devido ao efeito eletronegativo induzido pelos átomos de azoto e enxofre, presentes no anel heteroaromático,

Após a atribuição dos protões anteriores prosseguiu-se com a identificação dos protões do grupo heterocíclico (H-4; H-5; H-6 e H-7), cujos desvio químicos se encontram reunidos na Tabela 2.12.

Tabela 2.12: Comparação dos dados de RMN ^1H , em DMSO- d_6 , do anel heterocíclico dos compostos 4.f-4.o.

	Composto	δ ^1H (ppm)							
		H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-7	N-CH $_3$	H-8
R $_1$ = H R $_2$ = Grupo heteroaromático ligado na posição 3	4.f	7,81	-	8,22	7,12	7,19	7,42	-	-
	4.g	7,79	-	8,23	7,17	7,26	7,48	3,80	-
R $_1$ = H R $_2$ = Grupo heteroaromático ligado na posição 2	4.h	-	6,77	7,54	7,00	7,17	7,35	-	-
	4.i	-	7,40	7,69	7,28	7,38	7,59	-	-
	4.j	-	7,76	7,83	7,38	7,39	7,93	-	-
	4.k	-	-	8,01	7,54	7,48	8,11	-	-
	4.l	-	-	7,52	6,99	7,17	7,30	-	2,31
R $_1$ = C $_6$ H $_5$ R $_2$ = Grupo heteroaromático ligado na posição 2	4.m	-	6,86	7,58	7,03	7,20	7,40	-	-
	4.n	-	-	8,03	7,54	7,49	8,13	-	-
	4.o	-	-	7,56	7,02	7,21	7,36	-	2,36

A identificação dos protões H-2 e H-3 foi possível através da correlação em HMBC com o carbono imínico (atribuído através da correlação em HQSC com o protão correspondente), como é exemplificado na Figura 2.16, para os compostos **4.f** e **4.h**. Os sinais correspondentes aos protões H-2 e H-3 apresentam-se como um singuleto, com desvios químicos compreendidos entre δ 7,79 – 7,81 ppm e δ 6,77 – 7,76 ppm, respetivamente, cada um a integrar para 1H.

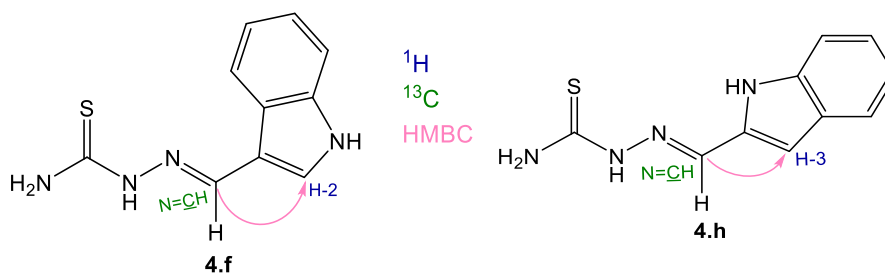


Figura 2.16: Correlações de HMBC dos compostos 4.f e 4.h relativas aos prótons H-2 e H-3, respetivamente.

Quando se insere um grupo metilo no anel heterocíclico, o aparecimento de um singuleto, com desvios químicos compreendidos entre δ 2,31 – 3,80 ppm, cada um a integrar para 3H, evidencia este tipo de substituição nos compostos **4.g**, **4.i** e **4.o**. Para além disso, na Tabela 2.12, verifica-se que o sinal de próton do grupo metilo no composto **4.g**, apresenta um ligeiro desvio para campo mais baixo, em comparação nos compostos **4.i** e **4.o**, o que poderá ser explicado pelo facto do grupo metilo, em **4.g**, estar diretamente ligado a um azoto.

Os restantes sinais de próton no grupo heterocíclico (H-4; H-5; H-6; H-7) variam entre δ 6,99 e 8,23 ppm que, segundo a literatura, são característicos da zona heteroaromática.¹³⁰ A identificação destes prótons foi corroborada através das correlações em HMBC, entre o carbono C-3 e um dos dupletos no anel (H-4) e, em COSY nos quais se verificou a existência de correlações entre os prótons H-4 e H-5, bem como, H-7 e H-6, como é apresentado Figura 2.17, para os compostos **4.f** e **4.h**, a título de exemplo.

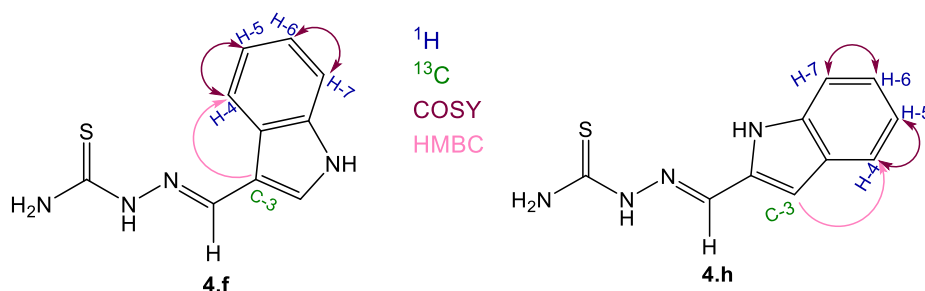


Figura 2.17: Correlações de COSY e HMBC dos compostos 4.f e 4.h relativas à zona heteroaromática.

O sinal de carbono quaternário do tiocarbonilo foi imediatamente identificado em todos os compostos, devido ao seu elevado valor de desvio químico, o que era esperado desta função química. A presença deste sinal confirma assim, a existência dos compostos na forma de tiona e, portanto, não ocorreu a tautomerização para a forma tiol.

Igualmente, a análise dos espetros de HMBC, permitiu proceder à atribuição dos sinais dos carbonos quaternários C-7a, C-3a, C-2 (**4.h**, **4.i**, **4.j**, **4.k**, **4.l**, **4.m**, **4.n** e **4.o**) e C-3 (**4.f**, **4.g**, **4.l** e **4.o**), cujos desvios químicos se encontram na Tabela 2.13. Os carbonos quaternários C-7a e C-3a, presentes em todos os compostos, podem ser identificados através das correlações em HMBC com H-6 e H-5, respetivamente (Figura 2.18); os sinais correspondentes aos carbonos C-2 e C-3 podem ser atribuídos, por apresentarem uma correlação em HMBC, com o próton do grupo imina (Figura 2.18).

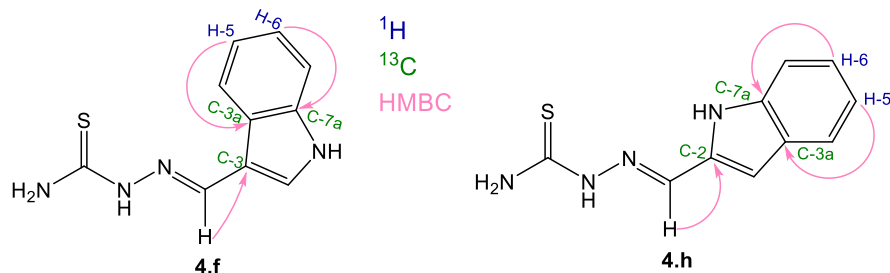


Figura 2.18: Correlações de HMBC, dos compostos 4.f e 4.h, para a identificação dos carbonos quaternários, presentes no anel heterocíclico.

Tabela 2.13: Comparação dos dados de RMN ^{13}C , em DMSO- d_6 , dos carbonos quaternários presentes no anel heterocíclico dos compostos 4.f-4.o.

	Composto	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)				
		C=S	C-7a	C-3a	C-2	C-3
$R_1 = \text{H}$ $R_2 =$ Grupo heteroaromático ligado na posição 3	4.f	176,46	137,03	123,95	-	111,12
	4.g	176,47	137,55	124,32	-	110,12
$R_1 = \text{H}$ $R_2 =$ Grupo heteroaromático ligado na posição 2	4.h	177,91	137,13	127,97	133,84	-
	4.i	178,05	154,67	127,92	151,27	-
	4.j	177,79	139,39; 139,33	139,17	-	-
	4.k ⁴	178,36	134,24	153,14	164,65	-
	4.l	177,68	136,76	128,50	130,04	114,25
$R_1 = \text{C}_6\text{H}_5$ $R_2 =$ Grupo heteroaromático ligado na posição 2	4.m	175,63	137,22	128,05	133,55	-
	4.n ⁴	176,41	134,40	153,14	164,49	-
	4.o	175,34	136,85	128,54	129,81	115,14

De acordo com a tabela anterior, é possível verificar que a variação do heteroátomo no anel aromático faz com que os desvios químicos de ^{13}C , associados aos carbonos quaternários também variem. Os carbonos C-7a (4.i), C-3a (4.k e 4.n) e C-2 (4.i, 4.k e 4.n), em comparação com os restantes compostos, sofreram um desblidamento significativo e, conseqüentemente um desvio do respetivo sinal de ^{13}C para campo mais baixo, aparecendo a δ 154,67, 153,14, 151,27, 164,65 e 164,49 ppm, respetivamente. Este fenómeno poderá ser explicado pelo facto destes carbonos possuírem baixas densidades eletrónicas devido ao efeito de eletronegatividade induzido pelos heteroátomos, efeito esse que provoca um desvio para campo mais baixo dos sinais carbonos adjacentes. É de salientar que o desvio químico do carbono quaternário C-2, em 4.k e 4.n, é ligeiramente superior devido à presença de dois átomos eletronegativos, azoto e enxofre, no anel heteroaromático.

Por último, a atribuição dos sinais correspondentes da zona aromática nos derivados de *N*-3-fenil-tiossemicarbazona (4.m – 4.o), foi conseguida através das correlações apresentadas na Figura 2.19, tendo como exemplo o composto 4.o.

⁴ A numeração da zona heteroaromática nos compostos 4.k e 4.n foi efetuada de forma distinta dos restantes compostos.

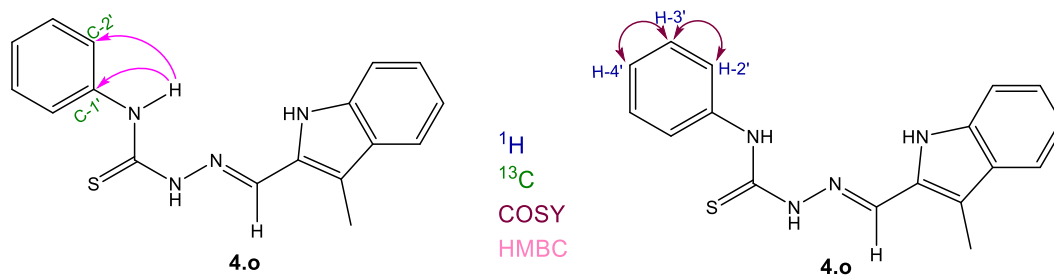


Figura 2.19: Correlações de COSY e HMBC do composto 4.o relativas ao anel aromático.

A identificação dos sinais de carbono C-2' e C-1' foi conseguida através da correlação em HMBC com o próton N(3)-H, como é exemplificado na Figura 2.19. Os restantes sinais de próton do anel aromático foram atribuídos pelas correlações COSY entre H-2' e H-3', e H-3' e H-4', encontrando-se concordantes com os valores descritos na literatura¹³⁰, para prótons de anéis benzênicos sem substituições no anel, entre δ 7,24 – 7,64 ppm.

Os compostos 4.h, 4.m e 4.o foram selecionados para a identificação da geometria da dupla ligação C=N, por NOESY, utilizando DMSO-*d*₆ como solvente (Apêndice 8 – Figura 6.57 e Apêndice 13 – Figura 6.91, Apêndice 15 – Figura 6.106, respetivamente). De acordo com as correlações apresentadas na Figura 2.20, verifica-se que o isómero predominante é o *E*, devido à presença das correlações entre o próton imínico (N=CH) e o próton em N(2)-H. Nas tiossemicarbazonas já sintetizadas anteriormente no grupo de investigação, verificou-se igualmente a predominância do isómero *E*.¹³¹ Foi ainda possível verificar que os compostos 4.m e 4.o apresentam uma conformação *trans* entre a posição do átomo de enxofre e o azoto da função imina, devido à presença de uma correlação entre o próton diretamente ligado ao átomo de azoto endocíclico e o próton N(3)-H. Esta conformação será igualmente expectável no composto 4.n.

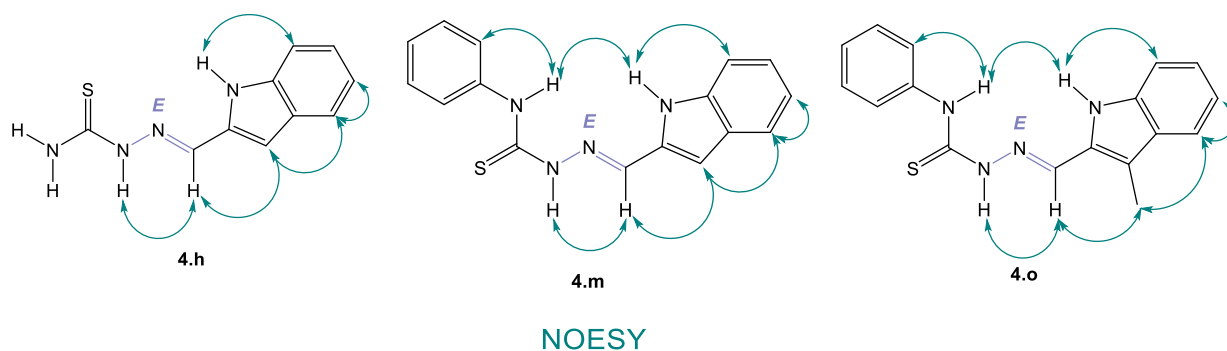


Figura 2.20: Correlações NOESY observadas para os compostos 4.h, 4.m e 4.o.

De seguida apresentam-se as tabelas referentes às atribuições dos sinais nos espetros de RMN compostos 4.f – 4.o.

Na Figura 2.21 apresenta-se a estrutura numerada do composto **4.f** e nas Tabelas 2.14 e 2.15 apresentam-se os dados obtidos nos espectros 1D e 2D de RMN. Os espectros estão apresentados no Apêndice 6 (Figura 6.40 – Figura 6.44).

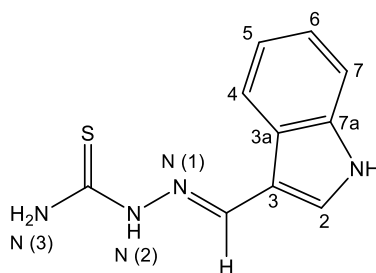


Figura 2.21: Estrutura numerada da (*E*)-2-((1*H*-indole-3-*il*)metileno)hidrazinacarbotoamida (**4.f**).

Tabela 2.14: Dados de RMN, ^1H e COSY, da (*E*)-2-((1*H*-indole-3-*il*)metileno)hidrazinacarbotoamida (**4.f**), em $\text{DMSO-}d_6$.

δ ^1H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
7,12	1H, tripleto	-	H-5
7,19	1H, tripleto de dupletos ⁵	-	H-6
7,41	1H, singuleto	-	N(3)- <u>H</u>
7,42	1H, dupleto, $J = 7,9$	7,19	H-7
7,81	1H, singuleto	-	H-2
8,03	1H, singuleto	7,41	N(3)- <u>H</u>
8,22	1H, dupleto, $J = 7,7$	7,12	H-4
8,30	1H, dupleto, $J = 1,5$	-	N= <u>CH</u>
11,18	1H, singuleto	-	N- <u>H</u> (indole)
11,60	1H, singuleto	-	N(2)- <u>H</u>

Tabela 2.15: Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, da (*E*)-2-((1*H*-indole-3-*il*)metileno)hidrazinacarbotoamida (**4.f**), em $\text{DMSO-}d_6$.

δ ^{13}C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
176,46	C	-	7,41; 8,03	C=S
140,81	CH	8,30	7,81	N= <u>CH</u>
137,03	C	-	7,19; 7,81; 8,22	C-7a
131,00	CH	7,81	8,30	C-2
123,95	C	-	7,12; 7,42; 7,81; 8,22	C-3a
122,63	CH	7,19	8,22	C-6
122,17	CH	8,22	7,19	C-4
120,62	CH	7,12	7,42	C-5
111,74	CH	7,42	7,12; 7,19	C-7
111,12	C	-	7,81; 8,22; 8,30	C-3

⁵ Não é possível retirar o valor de J .

Na Figura 2.22 apresenta-se a estrutura e respectiva numeração do composto **4.g**. A análise dos espectros 1D e 2D de RMN permitiu atribuir os desvios químicos reunidos nas Tabelas 2.16 e 2.17. No Apêndice 7 (Figura 6.46 – Figura 6.50) estão apresentados os espectros de RMN deste composto.

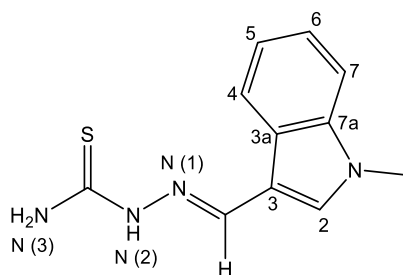


Figura 2.22: Estrutura numerada da (E)-2-((1-metil-1H-indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (4.g).

Tabela 2.16: Dados de RMN, ^1H e COSY, da (E)-2-((1-metil-1H-indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (4.g), em DMSO-d_6 .

δ ^1H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
3,80	3H, singuleto	-	N-CH ₃
7,17	1H, tripleto de dupletos ⁵	-	H-5
7,26	1H, tripleto de dupletos ⁵	-	H-6
7,41	1H, singuleto	-	N(3)-H
7,48	1H, duplete, J = 8,1	7,26	H-7
7,79	1H, singuleto	-	H-2
8,00	1H, singuleto	7,41	N(3)-H
8,23	1H, duplete, J = 7,9	7,17	H-4
8,27	1H, singuleto	-	N=CH
11,14	1H, singuleto	-	N(2)-H

Tabela 2.17: Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, da (E)-2-((1-metil-1H-indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (4.g), em DMSO-d_6 .

δ ^{13}C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
176,47	C	-	11,14	C=S
140,33	CH	8,27	7,79	N=CH
137,55	C	-	3,80; 7,26; 7,79; 8,23	C-7a
134,62	CH	7,79	3,80; 8,27	C-2
124,32	C	-	7,17; 7,48; 7,79; 8,27	C-3a
122,70	CH	8,23	7,26	C-4
122,32	CH	7,26	8,23	C-6
120,86	CH	7,17	7,48	C-5
110,12	C	-	7,79; 8,27	C-3
110,10	CH	7,48	7,17; 7,26	C-7
32,80	CH ₃	3,80	7,79	N-CH ₃

A estrutura numerada do composto **4.h**, encontra-se apresentada na Figura 2.23 e nas Tabela 2.18 e 2.19, os dados obtidos dos espectros de 1D e 2D de RMN. Os espectros estão reunidos no Apêndice 8 (Figura 6.52 – Figura 6.57).

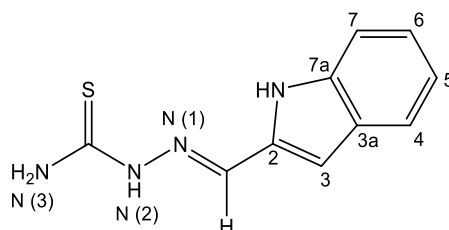


Figura 2.23: Estrutura e numeração da (*E*)-2-((1*H*-indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (**4.h**).

Tabela 2.18: Dados de RMN, ^1H e COSY, da (*E*)-2-((1*H*-indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (**4.h**), em $\text{DMSO-}d_6$.

δ ^1H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
6,77	1H, singuleto	-	H-3
7,00	1H, tripleto, $J = 7,4$	-	H-5
7,17	1H, tripleto ⁵	7,00	H-6
7,35	1H, dupleto, $J = 8,2$	7,17	H-7
7,54	1H, dupleto, $J = 8,0$	7,00	H-4
8,01	1H, singuleto	-	N=C <u>H</u>
8,19	1H, singuleto	-	N(3)-H
8,34	1H, singuleto	8,19	N(3)-H
11,42	1H, singuleto	-	N-H (indole)
11,59	1H, singuleto	-	N(2)-H

Tabela 2.19: Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, da (*E*)-2-((1*H*-indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (**4.h**), em $\text{DMSO-}d_6$.

δ ^{13}C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
177,91	C	-	8,19; 8,34	C=S
137,13	C	-	6,77; 7,17; 7,54; 11,42	C-7a
133,84	C	-	6,77; 8,01; 11,42	C-2
133,15	CH	8,01	6,77	N=C <u>H</u>
127,97	C	-	6,77; 7,00; 7,35; 7,54; 11,42	C-3a
123,50	CH	7,17	7,00; 7,54	C-6
120,93	CH	7,54	7,17	C-4
119,47	CH	7,00	7,35	C-5
111,11	CH	7,35	7,00; 7,17; 7,54	C-7
106,06	CH	6,77	7,00; 7,54; 11,42	C-3

A Figura 2.24 representa a estrutura numerada do composto 4.i. O dados dos espectros de RMN 1D e 2D estão inseridos nas Tabelas 2.20 e 2.21, que permitiu atribuir os sinais de cada espécie, estando os espectros apresentados no Apêndice 9 (Figura 6.60 – Figura 6.64).

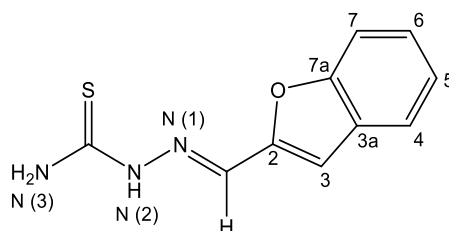


Figura 2.24: Estrutura numerada da (E)-2-((benzofuran-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.i).

Tabela 2.20: Dados de RMN, ^1H e COSY, da (E)-2-((benzofuran-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.i), em $\text{DMSO}-d_6$.

δ ^1H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
7,28	1H, tripleto ⁵	-	H-5
7,38	1H, multipeto	7,28	H-6
7,40	1H, singuleto	-	H-3
7,59	1H, dupeto, J = 8,2	7,38	H-7
7,69	1H, dupeto, J = 7,8	7,28	H-4
7,80	1H, singuleto	-	N(3)-H
8,10	1H, singuleto	-	N=CH
8,36	1H, singuleto	7,80	N(3)-H
11,66	1H, singuleto	-	N(2)-H

Tabela 2.21: Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, da (E)-2-((benzofuran-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.i), em $\text{DMSO}-d_6$.

δ ^{13}C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
178,05	C	-	-	C=S
154,67	C	-	7,40; 7,38; 7,59; 7,69	C-7a
151,27	C	-	7,40; 8,10	C-2
132,23	CH	8,10	7,40	N=CH
127,92	C	-	7,28; 7,40; 7,59	C-3a
126,04	CH	7,38	7,69	C-6
123,60	CH	7,28	7,59	C-5
121,85	CH	7,69	7,38	C-4
111,37	CH	7,59	7,28	C-7
109,18	CH	7,40	7,69; 8,10	C-3

Na Figura 2.25 apresenta-se a estrutura numerada composto **4.j**. A análise dos espectros de RMN 1D e 2D, permitiu a atribuição dos respectivos desvios químicos, Tabela 2.22 e Tabela 2.23. Os espectros estão apresentados no Apêndice 10 (Figura 6.67 – Figura 6.71).

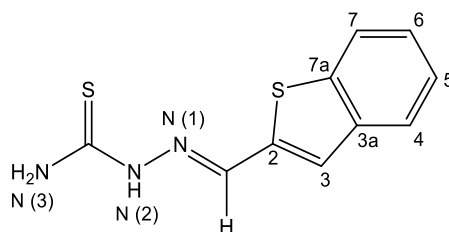


Figura 2.25: Estrutura e numeração da (*E*)-2-((benzo[*b*]tíofen-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (*4.j*).

Tabela 2.22: Dados de RMN, ¹H e COSY, da (*E*)-2-((benzo[*b*]tíofen-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (*4.j*), em DMSO-*d*₆.

δ ¹ H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento <i>J</i> (Hz)	COSY	Atribuição
7,38		-	H-5
7,39	2H, multipletto	-	H-6
7,62	1H, singuleto	-	N(3)-H
7,76	1H, singuleto	-	H-3
7,83	1H, multipletto	7,38	H-4
7,93	1H, multipletto	7,39	H-7
8,34	1H, singuleto aberto	7,62	N(3)-H
8,36	1H, singuleto	-	N=CH
11,64	1H, singuleto	-	N(2)-H

Tabela 2.23: Dados de RMN, ¹³C-APT, HSQC e HMBC, da (*E*)-2-((benzo[*b*]tíofen-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (*4.j*), em DMSO-*d*₆.

δ ¹³ C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
177,79	C	-	-	C=S
139,39	C	-	7,83	C-7a; C-3a
139,33	C	-	7,93	C-7a; C-3a
139,17	C	-	7,76	C-2
137,82	CH	8,36	-	N=CH
127,78	CH	7,76	7,83; 8,36	C-3
126,02	CH	7,39	7,83	C-6
124,86	CH	7,38	7,93	C-5
124,33	CH	7,83	7,38; 7,76	C-4
122,61	CH	7,93	7,39	C-7

A Figura 2.26 apresenta o composto **4.k**, devidamente numerado e nas Tabelas 2.24 e 2.25 os dados obtidos dos espectros de 1D e 2D de RMN. No Apêndice 11 (Figura 6.73 – Figura 6.77) estão reunidos os espectros de RMN deste composto.

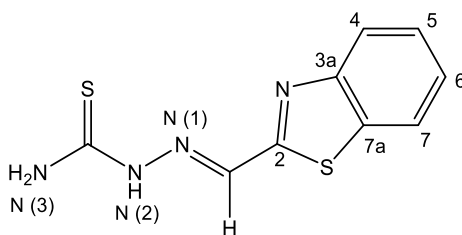


Figura 2.26: Estrutura numerada da (E)-2-((benzo[d]tiazol-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.k).

Tabela 2.24: Dados de RMN, ^1H e COSY, da (E)-2-((benzo[d]tiazol-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.k), em DMSO-d_6 .

δ ^1H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
7,48	1H, multipletto	-	H-6
7,54	1H, multipletto	-	H-5
8,00	1H, multipletto	8,60	N(3)-H
8,01	1H, dupletto, $J = 7,5$	7,54	H-4
8,11	1H, dupletto, $J = 8,0$	7,48	H-7
8,36	1H, singuleto	-	N=CH
8,62	1H, singuleto	8,01	N(3)-H
11,96	1H, singuleto	-	N(2)-H

Tabela 2.25: Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, da (E)-2-((benzo[d]tiazol-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.k), em DMSO-d_6 .

δ ^{13}C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
178,36	C	-	8,00; 8,62; 11,96	C=S
164,65	C	-	8,36	C-2
153,14	C	-	7,54; 8,11	C-3a
136,79	CH	8,36	11,96	N=CH
134,24	C	-	7,48; 8,01	C-7a
126,66	CH	7,54	8,11	C-5
126,47	CH	7,48	8,01	C-6
123,15	CH	8,01	7,48	C-4
122,41	CH	8,11	7,54	C-7

Na Figura 2.27 apresenta-se a estrutura e respetiva numeração do composto **4.I**. Nas Tabelas 2.26 e 2.27 estão reunidos os dados obtidos nos espetros de 1D e 2D de RMN, cujos espetros se encontram apresentados no Apêndice 12 (Figura 6.79 – Figura 6.83).

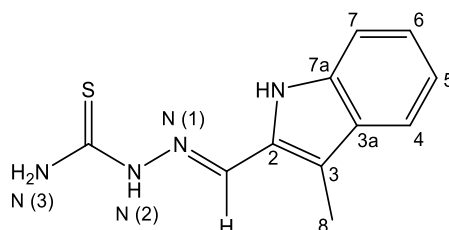


Figura 2.27: Estrutura e numeração da (*E*)-2-((3-metil-1H-indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (**4.I**).

Tabela 2.26: Dados de RMN, ^1H e COSY, da (*E*)-2-((3-metil-1H-indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (**4.I**), em $\text{DMSO-}d_6$.

δ ^1H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
2,31	3H, singuleto	-	H-8
6,99	1H, tripleto, $J = 7,5$	-	H-5
7,17	1H, tripleto ⁵	6,99	H-6
7,30	1H, duplete, $J = 8,1$	7,17	H-7
7,52	1H, duplete, $J = 8,0$	6,99	H-4
8,18	2H, singuleto alargado	-	N(3)-H; N=CH
8,31	1H, singuleto	8,18	N(3)-H
11,12	1H, singuleto	-	N-H (indole)
11,49	1H, singuleto	-	N(2)-H

Tabela 2.27: Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, da (*E*)-2-((3-metil-1H-indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (**4.I**), em $\text{DMSO-}d_6$.

δ ^{13}C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
177,68	C	-	8,18; 8,31; 11,49	C=S
136,76	C	-	7,17; 7,52; 11,12	C-7a
131,98	CH	8,18	11,49	N=CH
130,04	C	-	2,31; 8,18; 11,12	C-2
128,50	C	-	2,31; 6,99; 7,30; 7,52; 11,12	C-3a
123,87	CH	7,17	6,99; 7,52	C-6
119,23	CH	7,52	7,17	C-4
118,83	CH	6,99	7,30	C-5
114,25	C	-	2,31; 7,52; 11,12	C-3
110,87	CH	7,30	6,99; 7,52	C-7
8,27	CH ₃	2,31	-	C-8

A Figura 2.28 representa o composto **4.m** devidamente numerado. A análise dos espectros de RMN 1D e 2D, Tabela 2.28 e Tabela 2.29, em DMSO-*d*₆, permitiu atribuir os sinais de cada espécie, estando os espectros apresentados no Apêndice 13 (Figura 6.86 – Figura 6.91).

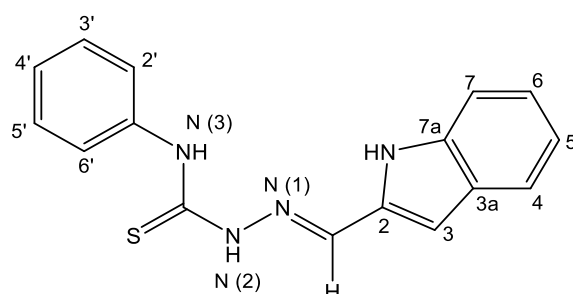


Figura 2.28: Estrutura numerada da (*E*)-2-((1*H*-indole-2-*il*)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotoamida (**4.m**).

Tabela 2.28: Dados de RMN, ¹H e COSY, da (*E*)-2-((1*H*-indole-2-*il*)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotoamida (**4.m**), em DMSO-*d*₆.

δ ¹ H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
6,86	1H, singuleto	-	H-3
7,03	1H, tripleto, J = 7,4	7,58; 7,20	H-5
7,20	1H, tripleto, J = 7,6	7,40; 7,03	H-6
7,25	1H, tripleto, J = 7,4	7,44	H-4'
7,40	1H, duplete, J = 7,5	7,20	H-7
7,44	2H, tripleto, J = 7,6	7,61; 7,25	H-3'/ H-5'
7,58	1H, duplete, J = 7,9	7,03	H-4
7,61	2H, duplete, J = 7,7	7,44	H-2'/ H-6'
8,14	1H, singuleto	-	N=CH
10,19	1H, singuleto	-	N(3)-H
11,51	1H, singuleto	-	N-H (indole)
11,98	1H, singuleto	-	N(2)-H

Tabela 2.29: Dados de RMN, ¹³C-APT, HSQC e HMBC, da (*E*)-2-((1*H*-indole-2-*il*)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotoamida (**4.m**), em DMSO-*d*₆.

δ ¹³ C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
175,63	C	-	11,98	C=S
138,76	C	-	7,44; 7,61; 10,19	C-1'
137,22	C	-	6,86; 7,20; 7,58; 11,51	C-7a
133,84	CH	8,14	-	N=CH
133,55	C	-	6,86; 8,14; 11,51	C-2
128,31	CH	7,44	7,25; 7,61	C-3'; C-5'
128,05	C	-	6,86; 7,03; 7,40; 11,51	C-3a
125,74	CH	7,61	7,25; 10,19	C-2'; C-6'
125,58	CH	7,25	7,61	C-4'
123,74	CH	7,20	7,58	C-6
121,05	CH	7,58	7,20	C-4
119,58	CH	7,03	7,40	C-5
111,17	CH	7,40	7,03; 7,20	C-7
106,89	CH	6,86	7,58; 11,51	C-3

Na Figura 2.29 apresenta-se a estrutura e respetiva numeração do composto **4.n**. Nas Tabelas 2.30 e 2.31 estão apresentados os dados obtidos dos espectros de RMN 1D e 2D, reunidos no Apêndice 14 (Figura 6.94 – Figura 6.98).

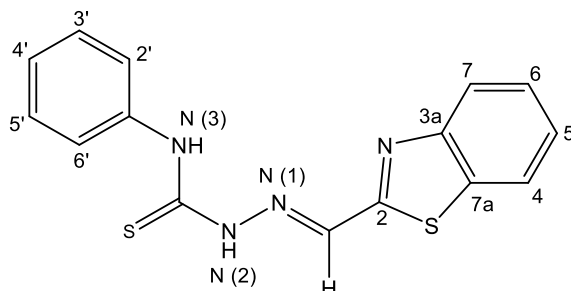


Figura 2.29: Estrutura e numeração da (*E*)-2-((benzo[*d*]tiazol-2-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotoamida (*4.n*).

Tabela 2.30: Dados de RMN, ^1H e COSY, (*E*)-2-((benzo[*d*]tiazol-2-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotoamida (*4.n*), em $\text{DMSO-}d_6$.

δ ^1H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
7,24	1H, tripleto, $J = 7,3$	-	H-4'
7,40	2H, tripleto ⁵	7,24	H-3'/ H-5'
7,49	1H, tripleto de dupletos ⁵	8,13	H-6
7,54	1H, tripleto de dupletos ⁵	-	H-5
7,58	2H, dupleto, $J = 7,6$	-	H-2'/H-6';
8,03	1H, dupleto, $J = 8,0$	7,54	H-4
8,13	1H, dupleto, $J = 7,6$	7,49	H-7
8,48	1H, singuleto	-	N=CH
10,23	1H, singuleto	-	N(3)-H
12,33	1H, singuleto	-	N(2)-H

Tabela 2.31: Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, da (*E*)-2-((benzo[*d*]tiazol-2-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotoamida (*4.n*), em $\text{DMSO-}d_6$.

δ ^{13}C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
176,41	C	-	-	C=S
164,49	C	-	8,48	C-2
153,14	C	-	7,54; 8,13	C-3a
138,86	C	-	7,40; 7,58	C-1'
134,18	CH	8,48	-	N=CH
134,40	C	-	7,49; 8,03	C-7a
128,28	CH	7,40	7,24; 7,58	C-3'/C-5'
126,69	CH	7,54	8,13	C-5
126,52	CH	7,49	8,03	C-6
125,82	CH	7,57	7,24; 10,23	C-2'/C-6'
125,74	CH	7,24	7,40; 7,58	C-4'
123,18	CH	8,03	7,49	C-4
122,44	CH	8,13	7,54	C-7

A Figura 2.30 apresenta a estrutura numerada do composto **4.o**. Os dados obtidos nos espectros de 1D e 2D de RMN, apresentados no Apêndice 15 (Figura 6.101 – Figura 6.106) , estão reunidos nas Tabelas 2.32 e 2.33.

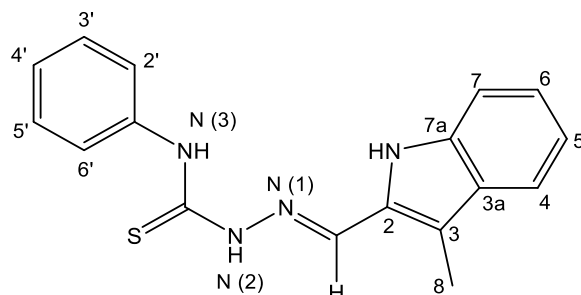


Figura 2.30: Estrutura e numeração da (E)-2-((3-metil-1H-indole-2-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoioamida (4.o).

Tabela 2.32: Dados de RMN, ¹H e COSY, (E)-2-((3-metil-1H-indole-2-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoioamida (4.o), em DMSO-d₆.

δ ¹ H (ppm)	Integração [H], multiplicidade (m), constante de acoplamento J (Hz)	COSY	Atribuição
2,36	3H, singuleto	-	H-8
7,02	1H, tripleto, J = 7,5	-	H-5
7,21	1H, tripleto, J = 7,4	7,02; 7,36	H-6
7,25	1H, tripleto, J = 7,4	-	H-4'
7,36	1H, duplete, J = 8,2	7,21	H-7
7,43	2H, tripleto, J = 7,9	7,25	H-3'/ H-5'
7,56	1H, duplete, J = 7,9	7,02	H-4
7,64	2H, duplete, J = 7,9	7,43	H-2'/H-6'
8,32	1H, singuleto	-	N=CH
10,20	1H, singuleto	-	N(3)-H
11,25	1H, singuleto	-	N-H (indole)
11,91	1H, singuleto	-	N(2)-H

Tabela 2.33: Dados de RMN, ^{13}C -APT, HSQC e HMBC, da (E)-2-((3-metil-1H-indole-2-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida (4.o), em DMSO- d_6 .

δ ^{13}C (ppm)	Tipo de carbono	HSQC	HMBC	Atribuição
175,34	C	-	11,91	C=S
138,84	C	-	7,43; 7,64; 10,20	C-1'
136,85	C	-	7,21; 7,56; 11,25	C-7a
132,61	CH	8,32	11,91	N=C $\bar{\text{H}}$
129,81	C	-	2,36; 8,32; 11,25	C-2
128,54	C	-	2,36; 7,02; 7,36; 11,25	C-3a
128,35	CH	7,43	-	C-3'/ C-5'
125,68	CH	7,64	7,25; 7,43; 10,20	C-2'/ C-6'
125,55	CH	7,25	7,64	C-4'
124,14	CH	7,21	7,02; 7,36; 7,56	C-6
119,37	CH	7,56	7,21	C-4
118,96	CH	7,02	7,21	C-5
115,14	C	-	2,36; 7,56; 8,32; 11,25	C-3
110,95	CH	7,36	7,02; 7,56	C-7
8,33	CH ₃	2,36	-	C-8

2.3. Caracterização por espectroscopia de IV dos compostos 4.a - 4.c e 4.f - 4.o

Os espectros de IV dos compostos **4.a - 4.c** (Apêndices 3, 4, 5 – Figuras 6.16, 6.24, 6.38, respetivamente) e **4.f - 4.o** (Apêndices 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 – Figuras 6.45, 6.51, 6.58, 6.65, 6.72, 6.78, 6.84, 6.92, 6.99 e 6.107, respetivamente) permitiram a confirmação dos principais grupos funcionais presentes nas moléculas. Apresentam-se nas Tabelas 2.34 e 2.35 as frequências de vibração dos principais grupos funcionais presentes nos compostos sintetizados, que se encontram dentro dos correspondentes valores tabelados.^{132,133}

Como já foi referido anteriormente os compostos do tipo tiossemicarbazona, em solução podem existir como um equilíbrio tautomérico entre as formas tiona e tiol. Em todas as tiossemicarbazonas sintetizadas verifica-se a existência de um conjunto de bandas nas regiões 1225 – 1232 cm^{-1} (**4.a – 4.e**), 1095 – 1254 cm^{-1} (**4.f – 4.l**) e 1186 – 1200 cm^{-1} (**4.m – 4.o**), atribuíveis às vibrações da ligação C=S. Nos espectros de IV, pode-se observar a ausência de bandas entre 2550 a 2600 cm^{-1} característica da vibração da ligação S-H e, portanto, pode-se confirmar que, no estado sólido, os compostos **4.a – 4.o** encontram-se na forma de tiona.

A presença dos grupos acetilo na fração glicosídica, nos compostos **4.a – 4.c** foi também confirmada a partir das bandas a 1745 – 1751 cm^{-1} , característica da vibração da ligação C=O (éster).

Tabela 2.34: Principais bandas de absorção de IV para os compostos 4.a, 4.b e 4.c.

Composto	$\nu_{\text{C=S}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{C=N}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{C=O}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{N-H}}$ (cm^{-1})
4.a	1228	1614	1749	3413 – 3350
4.b	1232	1618	1751	3467 – 3261
4.c	1225	1618	1745	3467 – 3294

Tabela 2.35: Principais bandas de absorção de IV para os compostos 4.f - 4.o.

Composto	$\nu_{\text{C=S}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{C=N}}$ (cm^{-1})	$\nu_{\text{N-H}}$ (cm^{-1})
4.f	1252	1612	3452; 3330; 3311; 3234
4.g	1254	1595	3367; 3248; 3221
4.h	1232	1603	3491; 3280; 3244; 3111
4.i	1254	1595	3454; 3330; 3307
4.j	1232	1591	3402; 3276; 3163
4.k	1120	1620	3400; 3261; 3130
4.l	1095	1606	3492; 3332; 3275; 3161
4.m	1200	1604	3346; 3313; 3267
4.n	1186	1616	3317; 3124
4.o	1198	1599	3388; 3286; 3151

2.4. Determinação da atividade antioxidante: capacidade de redução do radical DPPH

Neste trabalho pretendeu-se estudar a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados (**4.a** – **4.o**), usando método de captura do radical livre DPPH. O ensaio *in vitro* do DPPH é um método colorimétrico, amplamente usado para avaliar a capacidade antioxidante de um composto, por ser considerado um método rápido, simples, reprodutivo e de custo relativamente baixo.^{29,134}

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um radical livre estável, devido à deslocalização do eletrão desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização é responsável pela coloração púrpura da molécula, que apresenta um espectro de visível um máximo de absorção ao comprimento de onda de 517 nm. Quando o radical DPPH reage com um agente redutor ocorre a formação de uma nova ligação, com vista a tornar-se uma molécula diamagnética estável, ocorrendo simultaneamente a mudança da coloração púrpura para uma tonalidade amarela. Esta descoloração é proporcional ao número de eletrões que são transferidos (Figura 2.31).^{135,136,137} Assim sendo, quanto menor for a absorvância ao comprimento de onda de 517 nm, maior será a capacidade antioxidante do composto em estudo. Esta metodologia, originalmente desenvolvida por Blois em 1958¹³⁸, foi posteriormente submetida a diversos desenvolvimentos e melhorias, por Brand-Williams, em 1995,¹³⁹ de modo a tornar-se adaptável a cada caso cinético.¹³⁶

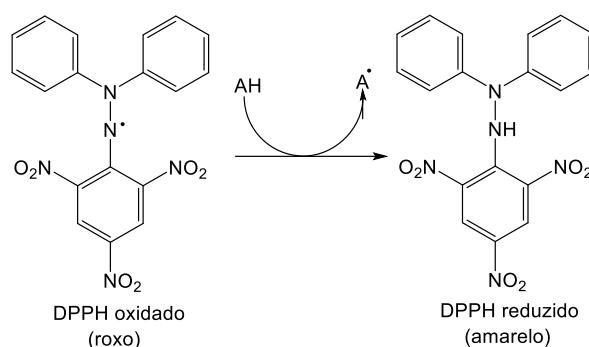


Figura 2.31: Esquema geral do ensaio da capacidade de redução do radical DPPH na presença de uma amostra com propriedades antioxidantes. Adaptado de ¹³⁵.

O ensaio *in vitro* do DPPH pode ocorrer de acordo com dois mecanismos: transferência de um átomo de hidrogénio (HAT) e/ou transferência de um eletrão (ET), Figura 2.32.¹⁴⁰ Em ambos os mecanismos a cinética da reação e as reações colaterais são distintas. Para além disso, a reação entre o DPPH e um composto antioxidante pode dar-se segundo uma combinação entre os mecanismos HAT e ET, contudo o mecanismo reacional é determinado pela estrutura, solubilidade e coeficiente de partilha do antioxidante, bem como pelo sistema de solventes. A energia de dissociação da ligação e o potencial de ionização são dois parâmetros que determinam o mecanismo de reação e o potencial antioxidante dos compostos.^{141,142} A reação por meio de HAT é definida como um mecanismo concertado de um próton e de um eletrão numa única etapa cinética, na qual é avaliada a capacidade que o radical livre possui, em remover um átomo de hidrogénio do antioxidante, tornando-se num radical. A entalpia de dissociação da ligação (BDE) é um parâmetro importante neste mecanismo, visto que quanto menor for a BDE do grupo dador de hidrogénio, mais simples será a inativação dos radicais

livres. No caso da reação ser baseada em ET, o composto antioxidante transfere um eletrão para o radical livre, tornando-se num catião radicalar. Neste mecanismo o potencial de ionização (PI) associado ao antioxidante é o fator energético a ter em consideração, visto que quanto menor for o PI, mais fácil será a transferência do eletrão.¹⁴³

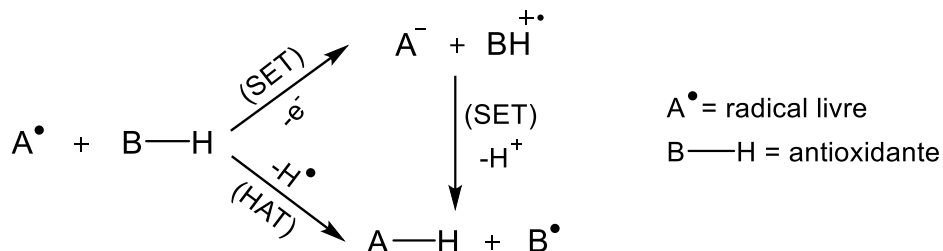


Figura 2.32: Mecanismos gerais HAT e ET que ocorrem entre os compostos antioxidantes e radicais livres. Adaptado de ¹⁴³.

Os ensaios de redução do radical de DPPH desenvolvidos neste trabalho, permitiram obter uma informação preliminar sobre a potencialidade dos compostos sintetizados como antioxidantes, bem como tentar identificar as particularidades estruturais que podem influenciar a eficácia antioxidante.

De acordo com a literatura ^{29,144}, a presença de pelo menos um grupo N-H, pertencente à hidrazona ou à função tioamida, pode sofrer uma quebra homolítica e doar um átomo de hidrogénio, por meio de um mecanismo HAT, levando à neutralização dos radicais livres. Assim, os derivados de tiossemicarbazonas podem tornar-se espécies radicalares e a sua estabilização sucede devido à deslocalização do eletrão desemparelhado pelo(s) grupo(s) aromático(s), produzindo híbridos de ressonância estáveis.

Para a determinação da atividade antioxidante de cada composto em estudo, recorreu-se ao procedimento descrito no ponto 3.5. Os resultados obtidos foram expressos graficamente, correlacionando-se as concentrações das soluções dos compostos com a correspondente percentagem de atividade antioxidante, de modo a obter por interpolação o valor de EC₅₀. O valor de EC₅₀ é definido como a concentração molar de composto necessária para produzir 50% na absorção, correspondendo a uma redução do radical de DPPH. Os valores obtidos de percentagem de atividade antioxidante e EC₅₀ são apresentados no Apêndice 16 – Tabela 6.1, como uma média de quatro ensaios independentes e o desvio padrão associado às medições, que permitiu construir o gráfico apresentado na Figura 2.33. Foram usados como controlos positivos quercetina, rutina e ácido ascórbico, antioxidantes disponíveis no mercado, que serviram não só para validar o protocolo experimental, como também como termo de comparação para os valores de EC₅₀ dos compostos **4.a** – **4.o**.

Nos ensaios *in vitro* da atividade antioxidante, todos os compostos foram primeiramente testados numa gama de concentração de 12,5 – 300 μM, na qual se obteve uma relação de linearidade entre a percentagem de atividade antioxidante com a correspondente concentração, à exceção de **4.o**. Nesta tiossemicarbazona verificou-se que, a partir de uma concentração superior a 90 μM, atingiu-se um nível de saturação de redução do radical de DPPH, com valores de percentagem de atividade antioxidante superiores a 80%. Assim sendo, foi necessário testar esta tiossemicarbazona numa gama

de concentração inferior, 12,5 – 85 μM . O mesmo sucedeu para a quercetina, rutina e ácido ascórbico que foram testados em gamas de concentração ainda mais baixas de 2 – 12,5 μM , 4 – 15 μM e 6 – 25 μM , respetivamente.

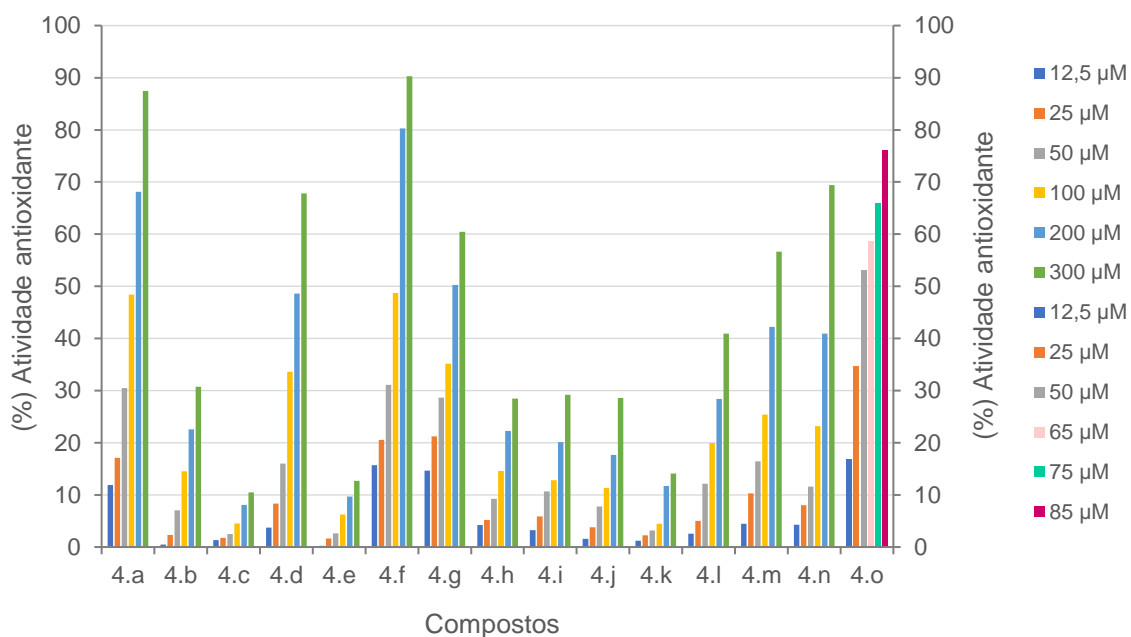


Figura 2.33: Capacidade antioxidante (%) dos compostos 4.a - 4.o, testados em diferentes concentrações (μM).

Determinados os valores de EC_{50} para todos os compostos, Figura 2.34 é possível verificar que as tiossemicarbazonas **4.a**, **4.d**, **4.f**, **4.g**, **4.m**, **4.n** e **4.o** exibem uma atividade antioxidante boa a moderada, apresentando valores de EC_{50} compreendidos entre $51,34 \pm 1,93 \mu\text{M}$ e $252,16 \pm 3,61 \mu\text{M}$, enquanto que os restantes compostos possuem valores de EC_{50} superiores a 300 μM .

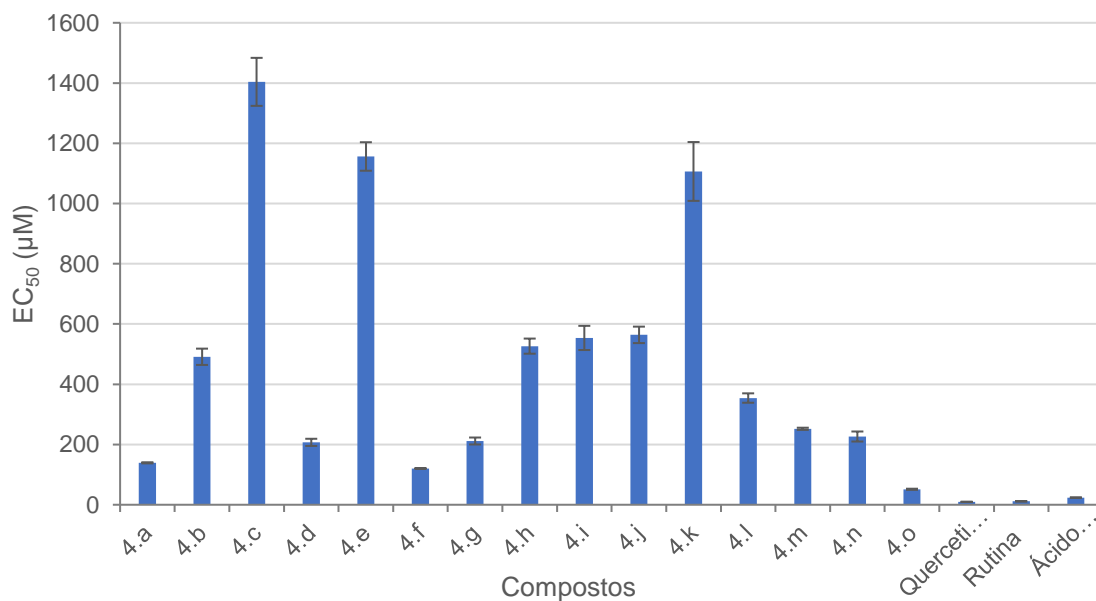


Figura 2.34: Valores de EC_{50} (μM) para a atividade antioxidante, segundo o método de DPPH, dos compostos 4.a - 4.o e dos controlos positivos (quercetina, rutina e ácido ascórbico) com o respetivo desvio padrão.

Foi realizado um tratamento estatístico dos valores de EC_{50} , pela análise de variância de um fator (ANOVA), disponível no programa *Microsoft Excel*, utilizando-se um nível de probabilidade de $p \leq 0,05$, como uma diferença significativa entre os derivados de tiossemicarbazonas. Em primeiro lugar, verificou-se que os compostos que possuem, na sua estrutura, os substituintes benzofurano (**4.c** e **4.i**) e benzotiofeno (**4.e** e **4.j**), ligados na posição 2 relativamente à tiossemicarbazona, apresentam um valor de EC_{50} superior a $300 \mu\text{M}$ e, por isso, não são considerados compostos ativos. Como se pode observar na Figura 2.35, para os compostos substituídos com o grupo indolilo (**4.a** e **4.f**) e 1-metilindolilo (**4.d** e **4.g**) ligados na posição 3 à função tiossemicarbazona, contendo na posição $N(3)$ um grupo glicosilo per-acetilado, ou um hidrogénio, obtiveram-se os seguintes valores de EC_{50} : $139,21 \pm 1,80 \mu\text{M}$, $120,41 \pm 0,59 \mu\text{M}$, $207,11 \pm 11,92 \mu\text{M}$, e $211,62 \pm 11,58 \mu\text{M}$, respetivamente. Verifica-se que a existência de um grupo metilo no átomo de azoto endocíclico, em **4.d** e **4.g** provoca um acréscimo no valor de EC_{50} , que poderá estar relacionado com o facto do radical, neste anel heteroaromático, não ser tão estabilizado por ressonância, como em **4.a** e **4.f**. Contudo, os valores de EC_{50} obtidos para os compostos **4.d** e **4.g** são estatisticamente semelhantes, pelo que não se pode correlacionar, para estes dois compostos, o papel do substituinte em $N(3)$ e a atividade antioxidante. Adicionalmente, entre os compostos **4.a** e **4.f**, verifica-se que a presença em $N(3)$ de um grupo glicosídico per-acetilado, em **4.a**, provoca um acréscimo no valor de EC_{50} . Portanto, neste subconjunto de derivados de tiossemicarbazonas, o composto **4.f** foi o que se revelou ser mais promissor.

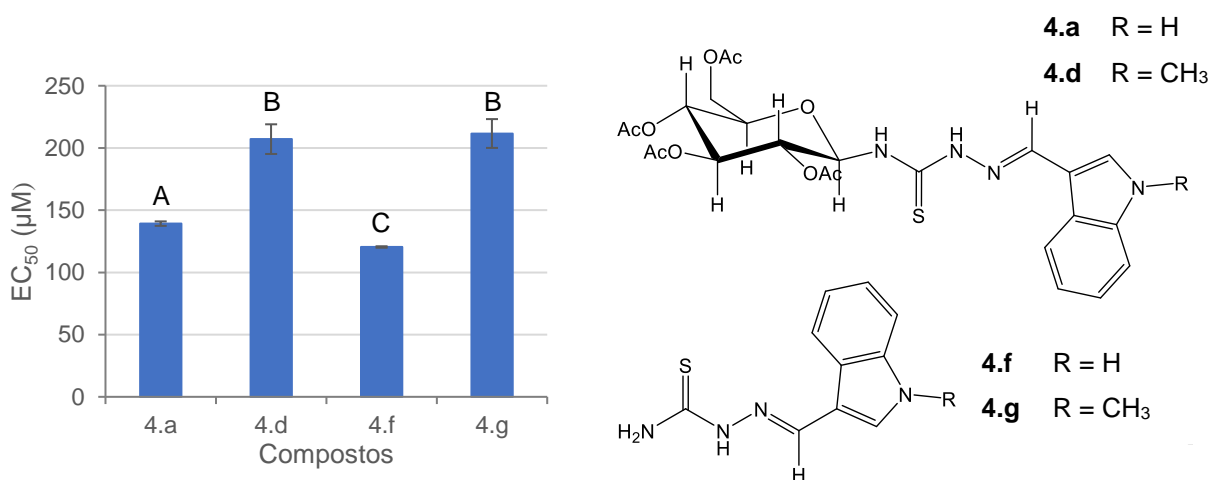


Figura 2.35: Comparação dos valores de EC_{50} , segundo o método de DPPH, para os compostos **4.a**, **4.d**, **4.f** e **4.g**. Para um nível de confiança de 95%, A, B e C são estatisticamente diferentes.

Para avaliar o efeito da posição da ligação do anel de indole à função tiossemicarbazona, foram comparados os valores de EC_{50} dos compostos com este substituinte na posição 3 (**4.a** e **4.f**) e na posição 2 (**4.b** e **4.h**), contendo em $N(3)$, um grupo glicosídico per-acetilado, ou um hidrogénio. Na Figura 2.36 pode verificar-se que os compostos **4.a** e **4.f** apresentam valores de EC_{50} inferiores aos dos compostos **4.b** e **4.h**, que possuem valores de EC_{50} superiores a $300 \mu\text{M}$. A discrepância entre os valores de EC_{50} destes dois pares de compostos, poderá estar associada à estabilidade das estruturas de ressonância originadas pela deslocalização do eletrão desemparelhado: quando o grupo indolilo se encontra ligado na posição 2, relativamente à tiossemicarbazona, o efeito de ressonância do eletrão

provoca a rutura da estrutura aromática do anel benzénico, e a estrutura radicalar perde a sua estabilidade; quando o anel indólico se encontra ligado na posição 3 à função tiossemicarbazona o eletrão desemparelhado fica apenas deslocado no anel de 5 membros, o que torna o radical mais estável.

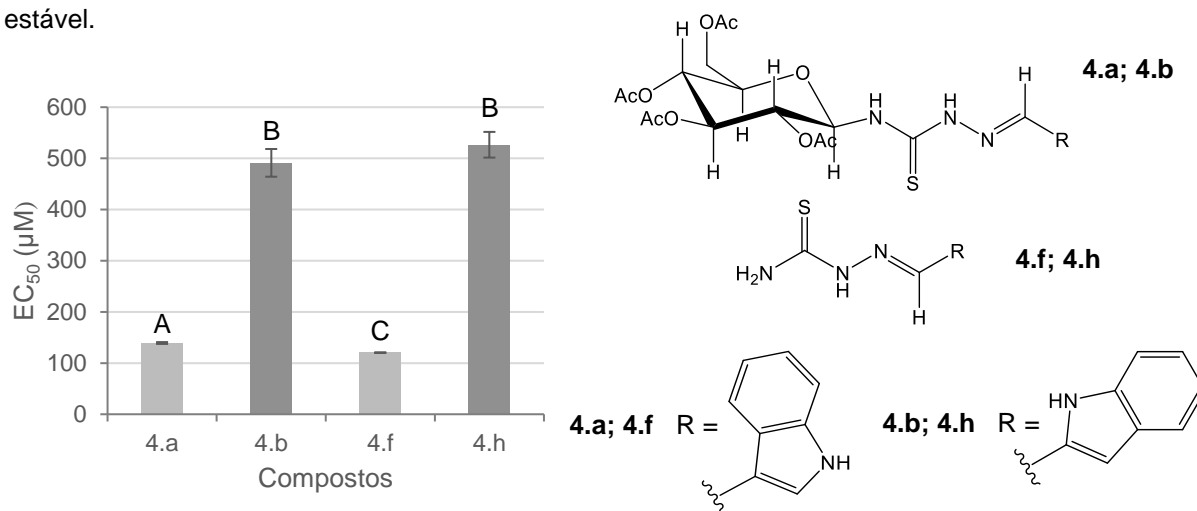


Figura 2.36: Comparação dos valores de EC_{50} , obtidos segundo o método de DPPH, para os compostos 4.a, 4.b, 4.f e 4.h. Para um nível de confiança de 95%, A, B e C são estatisticamente diferentes. Os valores de EC_{50} dos compostos 4.a e 4.f foram retirados da figura anterior, para comparar com 4.b e 4.h.

Posteriormente, avaliou-se o efeito da substituição de um hidrogénio por um grupo fenilo em $N(3)$ no valor de EC_{50} . Apresenta-se na Figura 2.37 um gráfico com a comparação dos EC_{50} dos derivados de $N(3)$ -fenil-tiossemicarbazona, 4.m, 4.n e 4.o e a respetiva $N(3)$ H-tiossemicarbazona, 4.h, 4.k e 4.l. Ficou evidente neste caso, que a substituição em $N(3)$ com um grupo fenilo, faz diminuir o valor de EC_{50} em relação aos compostos com um hidrogénio na mesma posição. Esta variação poderá estar associada à presença de dois substituintes aromáticos, em 4.m, 4.n e 4.o, com a capacidade de estabilizar por ressonância o radical formado, tornando-o mais estável. Verifica-se igualmente, que os compostos 4.h, 4.k e 4.l, apresentam um valor de EC_{50} superior a 300 μM, pelo que não são considerados ativos. De acordo com esta análise, para este subconjunto de compostos, é possível constatar que a presença de um grupo fenilo diminui significativamente os valores de EC_{50} .

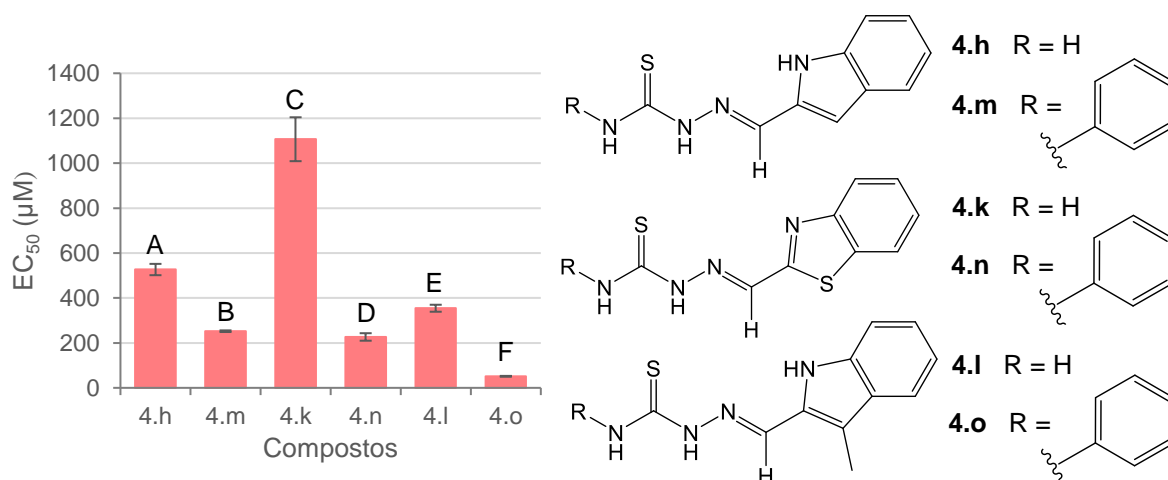


Figura 2.37: Comparação dos valores de EC_{50} , obtidos pelo método de DPPH, para os compostos 4.h, 4.m, 4.k, 4.n, 4.l, 4.o. Para um nível de confiança de 95%, A, B, C, D, E e F são estatisticamente diferentes.

Os compostos **4.b**, **4.h** e **4.m** diferem entre si pelo substituinte em *N*(3), que varia entre um hidrogênio, grupo fenilo ou grupo glicosilo per-acetilado, respetivamente. A partir do gráfico apresentado na Figura 2.38, verifica-se que o composto **4.m** é o que apresenta o menor valor de EC_{50} , possivelmente devido à presença de dois substituintes aromáticos capazes de estabilizar o radical tornando-o mais estável. Por outro lado, os compostos **4.b** e **4.h**, ao possuírem apenas um substituinte heteroaromático, o efeito de ressonância do elétron desemparelhado não deverá conferir a mesma estabilização ao radical, que em **4.m**, refletindo-se no elevado valor de EC_{50} . Contudo, as diferenças estruturais entre **4.b** e **4.h** parecem não interferir na diferença de valor de EC_{50} , que são estatisticamente semelhantes.

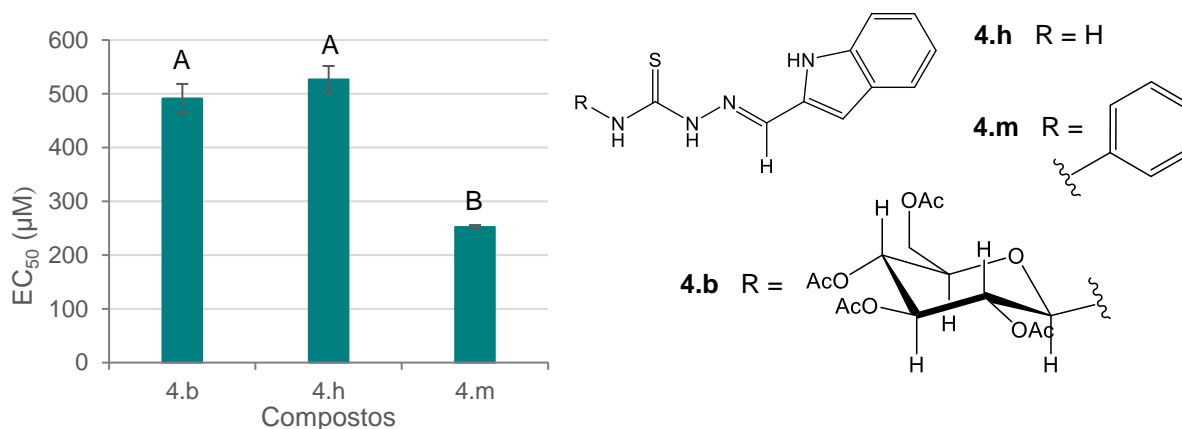


Figura 2.38: Comparação dos valores de EC_{50} , de acordo com o método de DPPH, para os compostos **4.b**, **4.h** e **4.m**. Para um nível de confiança de 95%, A e B são estatisticamente diferentes.

De acordo com a Figura 2.39, verifica-se que para os compostos **4.m** e **4.o**, obtiveram-se, respetivamente, valores de EC_{50} de $252,16 \pm 3,61 \mu\text{M}$ e $51,34 \pm 1,93 \mu\text{M}$. Os dois compostos contêm um grupo fenilo em *N*(3), no entanto, diferem entre si na presença de um grupo metilo na posição 3 do anel indolilo. Em ambos os casos, a estabilização do radical ocorre tanto no grupo fenilo como no anel heteroaromático, contudo, a presença de um grupo metilo na estrutura do composto **4.o** poderá conferir uma maior estabilidade ao radical formado, refletindo-se no seu baixo valor de EC_{50} .

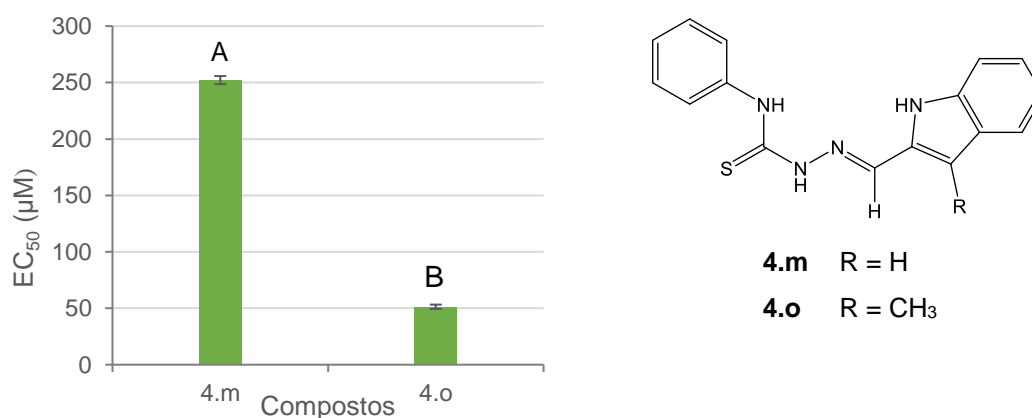


Figura 2.39: Comparação dos valores de EC_{50} , obtidos pelo método de DPPH, para os compostos **4.m** e **4.o**. Para um nível de confiança de 95%, A e B são estatisticamente diferentes.

Finalmente, pode constatar-se que o composto **4.o**, para um valor de concentração mais baixo de 85 μM , é o que apresenta uma maior percentagem de atividade antioxidante, com cerca de 76% (Apêndice 16 – Tabela 6.1), bem como o valor de EC_{50} mais baixo, de $51,34 \pm 1,93 \mu\text{M}$. Este valor de EC_{50} , sugere que o composto **4.o** é o melhor dador de hidrogénio e que a deslocalização do eletrão desemparelhado confere ao radical uma maior estabilidade, pelos possíveis motivos mencionados anteriormente. Na Figura 2.40 está representado um gráfico com os valores de EC_{50} obtidos para **4.o** e para os controlos positivos utilizados nos ensaios da atividade antioxidante.

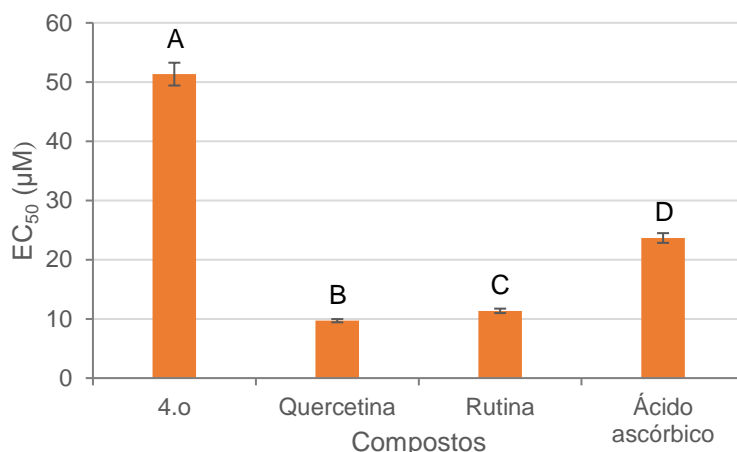


Figura 2.40: Comparação dos valores de EC_{50} , obtido pelo método de DPPH, para o composto **4.o** e controlos positivos (quercetina, rutina e ácido ascórbico). Para um nível de confiança de 95%, A, B, C e D são estatisticamente diferentes.

Segundo a Figura 2.40 verifica-se que o composto **4.o** apresentou um valor de EC_{50} comparável a dois dos três padrões comerciais utilizados neste ensaio, a rutina e o ácido ascórbico, para os quais se registaram valores de EC_{50} de $11,36 \pm 0,38 \mu\text{M}$ e $23,66 \pm 0,82 \mu\text{M}$, respetivamente, por se apresentarem na mesma ordem de grandeza. Para além disso, o valor de EC_{50} reportado na literatura para o antioxidante sintético, BHT, é de $15,7 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}^{145}$ ($71,25 \mu\text{M}$), sendo possível concluir que o composto **4.o** demonstra um potencial antioxidante superior em relação ao BHT. Assim sendo, é válido considerar que o composto **4.o** possui uma capacidade de reduzir o radical DPPH muito promissora.

2.5. Ensaios citotóxicos em células

Os ensaios de avaliação de citotoxicidade *in vitro* em linhas celulares são muito usados para testar uma série de compostos e determinar, se possuem a capacidade de inibir a proliferação celular ou efeitos citotóxicos que poderão levar à morte celular.¹⁴⁶ Neste trabalho, realizaram-se ensaios *in vitro* nas linhas celulares cancerígenas Hep-G2 e MCF-7, com o objetivo de determinar, segundo o método colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), o potencial citotóxico de alguns dos derivados de tiossemicarbazonas (**4.b**, **4.f – 4.o**).

O MTT é um sal solúvel em água de coloração amarela, com a capacidade de penetrar as células viáveis que, graças ao seu metabolismo ativo, reduzem o MTT formando cristais roxos de formazan ((*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan), Figura 2.41. A quantidade de cristais de formazan formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis e inversamente proporcional ao grau citotóxico. Em contrapartida, o desaparecimento de cor e a diminuição da quantidade de formazan formada, são parâmetros indicativos da ocorrência de morte celular, que sucede devido à perda de capacidade que as células têm em converter o MTT em formazan.^{147,148,149} O ensaio do MTT ¹⁵⁰ foi introduzido por Tim Mosmann em 1983 ¹⁵¹, tendo sido modificado e adaptado de modo a ser utilizado extensivamente em trabalho laboratorial.¹⁵²

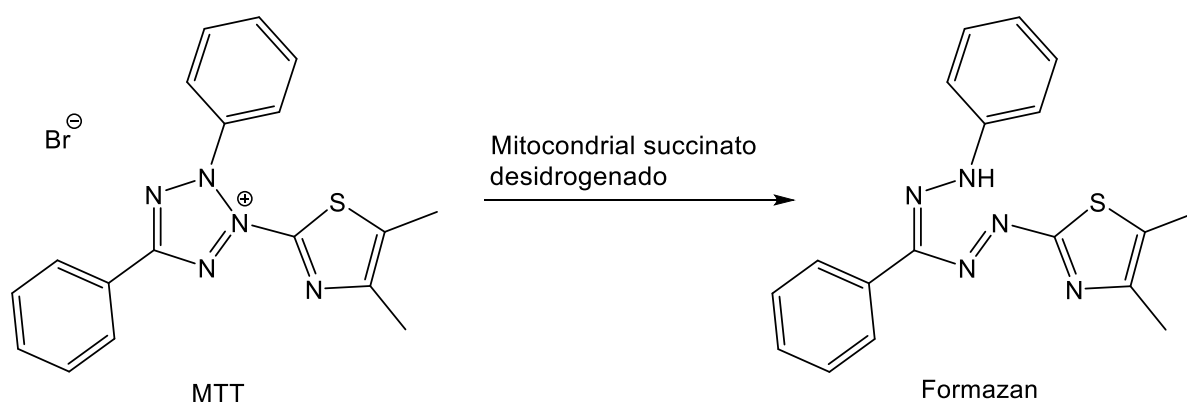


Figura 2.41: Reação de redução do MTT em formazan pelo enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Adaptado de ¹⁵⁰.

Os ensaios de citotoxicidade, na linha celular carcinoma hepatocelular humano (Hep-G2), permitiram obter uma informação preliminar sobre o potencial hepatotóxico dos compostos **4.f – 4.o**, quando em contacto com as células alvo. Adicionalmente e, com base em diversos estudos reportados na literatura ^{71,97,126,153}, os compostos, **4.b**, **4.f – 4.o** foram igualmente testados na linha celular do cancro da mama hormono-dependente MCF-7, devido a semelhanças estruturais com os compostos descritos na literatura. Importa realçar que os ensaios de citotoxicidade foram realizados de acordo com o método colorimétrico de redução MTT, descrito no ponto 3.6, tendo sido apenas testados onze dos quinze dos compostos sintetizados, por motivos de escassez dos restantes produtos. Neste ensaio foi apenas testada uma concentração de 100 μ M, nas linhas celulares Hep-G2 e MCF-7, a 24h e 48h, estando os correspondentes valores de percentagem de morte celular reunidos na Tabela 2.36. Os resultados são apresentados como uma média de diversos ensaios e o respetivo desvio padrão.

Tabela 2.36: Valores de morte celular (%) a 100 μM obtidos às 24h e 48h, para os compostos 4.b, 4.f - 4.o, nas linhas celulares MCF-7 e Hep-G2 e para o tamoxifeno a 24h na linha celular MCF-7. Para um nível de confiança de 95%, A – Q e A' – P' são estatisticamente diferentes.

Composto	Morte celular (%) – MCF-7		Morte celular (%) – Hep-G2	
	24h	48h	24h	48h
4.b	-	4,55 \pm 4,84	-	-
4.f	6,86 \pm 3,60 ^A	18,51 \pm 7,60 ^B	42,61 \pm 4,93 ^A	38,78 \pm 3,78 ^A
4.g	3,28 \pm 2,60 ^C	16,44 \pm 3,58 ^D	21,31 \pm 7,78 ^B	6,51 \pm 5,38 ^B
4.h	14,66 \pm 4,71 ^E	12,44 \pm 8,57 ^E	43,95 \pm 3,82 ^C	17,81 \pm 5,31 ^D
4.i	10,51 \pm 3,06 ^F	16,83 \pm 4,52 ^G	16,46 \pm 1,01 ^E	6,98 \pm 6,02 ^E
4.j	9,60 \pm 3,09 ^H	24,28 \pm 7,32 ^I	17,47 \pm 6,67 ^F	7,53 \pm 4,37 ^G
4.k	11,71 \pm 4,84 ^J	24,29 \pm 5,44 ^K	6,84 \pm 6,82 ^H	39,35 \pm 3,25 ^I
4.l	8,07 \pm 4,36 ^L	20,34 \pm 3,88 ^M	42,71 \pm 4,60 ^J	36,49 \pm 3,02 ^K
4.m	18,64 \pm 3,46 ^N	18,18 \pm 2,57 ^N	49,16 \pm 3,30 ^L	53,91 \pm 4,29 ^L
4.n	9,84 \pm 7,37 ^O	34,32 \pm 3,79 ^P	3,92 \pm 1,73 ^M	33,88 \pm 5,37 ^N
4.o	44,42 \pm 5,33 ^Q	46,62 \pm 3,01 ^Q	44,92 \pm 5,71 ^{O'}	34,27 \pm 6,38 ^{P'}
Tamoxifeno	99,02 \pm 0,12	-	-	-

As diferenças estatísticas entre os valores de percentagem de morte celular, para cada composto às 24h e 48h, foram avaliadas pela análise de variância de um fator (ANOVA), disponível no programa *Microsoft Excel*. No tratamento estatístico, utilizou-se um nível de probabilidade de $p \leq 0,05$, como uma diferença significativa entre os derivados de tiossemicarbazonas, às 24h e 48h em cada linha celular.

Tendo em conta a Tabela 2.36, ainda que se verifique na maioria dos compostos, diferenças significativas entre a percentagem de morte celular às 24h e 48h, obtiveram-se valores de citotoxicidade inferiores a 50%, exceto para o composto **4.m**, no qual se registou uma atividade citotóxica de 53,91 \pm 4,29%, quando em contacto com as células Hep-G2 durante 48h. Analisando os resultados obtidos, conclui-se que nenhum dos derivados de tiossemicarbazonas se revelou citotóxico dado que, segundo as diretrizes reportadas pelo *National Cancer Institute*, foi estipulado um limite de concentração inferior a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^{154,155} (18,15 μM), que é considerada tóxica para as células, quando se utilizam compostos com um elevado grau de pureza.

3º Capítulo

3. Materiais e Métodos

3.1. Síntese

3.1.1. Reagentes e Solventes

Todos os reagentes e solventes usados nas sínteses foram adquiridos comercialmente e utilizados sem purificação prévia, com exceção do acetonitrilo, que foi previamente destilado segundo um método descrito na literatura¹⁵⁶ e, mantido em peneiras moleculares. Os reagentes e solventes utilizados, bem como as suas características, encontram-se reunidos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Reagentes e solventes utilizados na síntese e análise dos compostos.

Reagente/Solvente	Característica	Marca	Referência
Acetobromo- α -D-glucose	$\geq 95\%$	Sigma-Aldrich	A1750
Acetonitrilo	$\geq 99,9\%$	Honeywell Riedel-de Haën	34851
Acetato de etilo	$\geq 99,9\%$	Carlo Erba	448254
Ácido acético glacial	99,7%	AnalaR analytical reagent	2369100
Benzofurano-2-carboxaldeído	97,0%	Sigma-Aldrich	493449
Benzotiazol-2-carboxaldeído	97,0%	Sigma-Aldrich	707643
Benzo[<i>b</i>]tiofeno-2-carboxaldeído	97,0%	Sigma-Aldrich	674540
Brometo de tetrabutilamónio	$\geq 98,0\%$	Sigma-Aldrich	426288
Celite	-	Serva Feinbiochemica	-
Clorofórmio deuterado (CDCl ₃)	99,8% de deutério	Sigma-Aldrich	151823
Diclorometano	$\geq 99,9\%$	Honeywell Riedel-de Haën	32222
Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- <i>d</i> ₆)	99,9% de deutério	Euroisotop	-
Etanol absoluto	$\geq 99,8\%$	Honeywell Riedel-de Haën	32221
Éter dietílico	$\geq 99,8\%$	Honeywell Riedel-de Haën	32203
4-Fenil-tiossemicarbazida	99,0%	Sigma-Aldrich	131482
<i>n</i> -Hexano	$> 98,5\%$	Carlo Erba	446903
Hidrazina hidratada	50-60 %	Sigma-Aldrich	225819
Indole-2-carboxaldeído	$> 97,0\%$	TCI	10852
Indole-3-carboxaldeído	$> 98,0\%$	TCI	10027
Metanol	$\geq 99,9\%$	Carlo Erba	524102
1-Metil-indole-3-carboxaldeído	97,0%	Fluorochem	040213
3-Metil-indole-2-carboxaldeído	96,0%	Sigma-Aldrich	774464
Peneiras moleculares 4Å	-	Sigma-Aldrich	208590
Sulfato de magnésio anidro <i>technical grade</i>	96,0%	PanRec AppliCham ITW Reagents	212486.1211
Isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil	$> 98,0\%$	TCI	A5514
Tiocianato de potássio	98,5%	Alfa Aesar	14318
Tiossemicarbazida	síntese	Sigma-Aldrich	8.21119.0250

3.1.2. Materiais e equipamentos

As experiências de RMN 1D (^1H , ^{13}C -APT) e 2D (COSY, HSQC, HMBC e NOESY) foram obtidas num aparelho da marca *Bruker 400 Ultra ShieldTM*, operando a uma frequência de 400,1 MHz para ^1H e 100,6 MHz para ^{13}C ; os espectros adquiridos foram processados com recurso o programa *TopSpin*, versão 4.0.6. Os desvios químicos foram reportados em partes por milhão (ppm), sendo usado como referência os valores dos sinais residuais dos solventes utilizados: CDCl_3 (clorofórmio deuterado) - $\delta_{\text{H}} = 7,26$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 77,23$ ppm; $\text{DMSO-}d_6$ (dimetilsulfóxido deuterado) - $\delta_{\text{H}} = 2,50$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39,50$ ppm; e as constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hertz (Hz).

Os espectros de ESI-HRMS foram realizados num espectrómetro de massa *Bruker Impact II quadrupole time-of-flight*, operando em modo negativo e, para a obtenção dos dados recorreu-se ao *software Data Analysis* na versão 4.4. Utilizaram-se os seguintes parâmetros otimizados: voltagem capilar: 3500 V; gás secante: 4,0 L/min; temperatura de secagem: 200 °C; nebulizador: 0,3 Bar; m/z: 50 – 1500.

A monitorização das reações e a escolha dos eluentes para a purificação dos compostos foram realizadas através de cromatografia em camada fina (CCF), nas quais foram utilizadas placas de sílica gel 60 F₂₅₄ em alumínio (ref. Merck® 5554). A visualização das manchas foi feita através de irradiação com luz ultravioleta ao comprimento de onda de 254 nm e, em certas reações foi ainda necessário a revelação em câmara de iodo.

A técnica de cromatografia em coluna para o composto **2** foi efetuada em sílica gel 60, como fase estacionária, com um poro de 0,040 – 0,063 nm, ref Carlo Erba 2050017. O eluente que mais se adequou a este composto foi previamente estudado e ajustado – *n*-hexano/acetato de etilo 7:3, de modo a alcançar um R_f de 0,35.

O isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil (**2**) foi sintetizado com recurso a um aparelho de microondas da marca *CEM*, e foi usado o *software Synergy* para definir as seguintes condições experimentais: temperatura: 80 °C; tempo: 10 minutos; pressão: 250 psi; potência de 300 W e agitação vigorosa.

As pesagens dos reagentes utilizados para as sínteses foram efetuadas numa balança da marca *Mettler Toledo PR1203* com uma precisão $\pm 0,001$ g; para a preparação das soluções a serem utilizadas na análise por HPLC-DAD e ensaios biológicos, as pesagens foram realizadas numa balança da marca *PIONEERTM* com uma precisão de $\pm 0,0001$ g.

A evaporação de solvente sob vácuo foi realizada com recurso a um evaporador rotativo da marca *Büchi R-200*, equipado com uma bomba de pressão *Büchi Vao[®] V - 500* e um banho térmico *Büchi B-490*.

Os espectros de IV dos compostos sintetizados foram obtidos num espectrofotómetro *Nicolet 6700* (*Thermo Electron Corporation*) em pastilhas de KBr.

3.2. Condições analíticas do HPLC-DAD

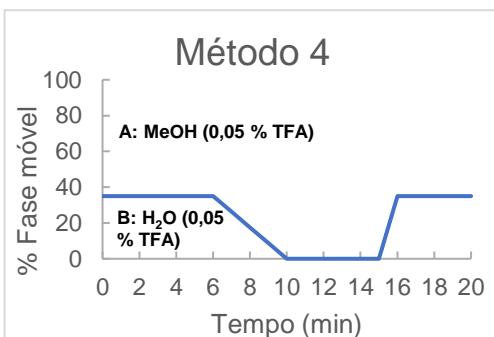
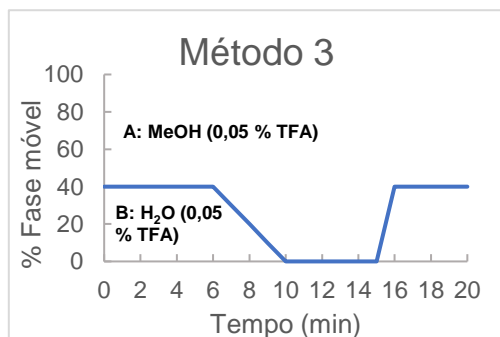
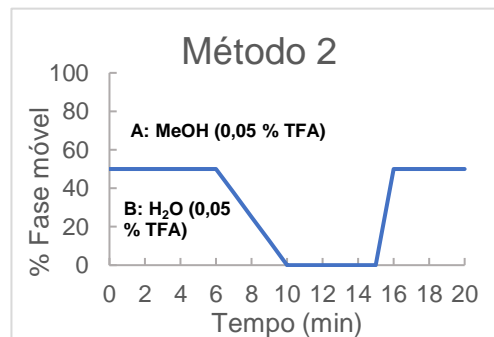
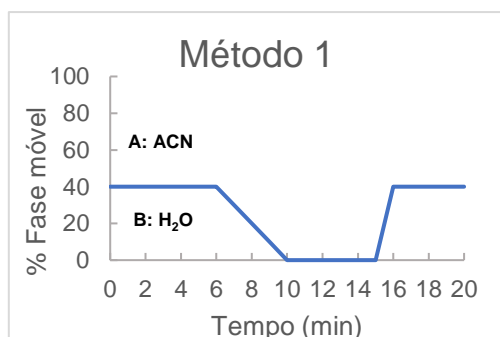
A análise por HPLC dos compostos sintetizados foi efetuada num aparelho *DionexTM UltiMate 3000*, equipado com um detetor de fotodíodos DAD-3000 e uma coluna *ACE[®] C18*, 150 x 4,6 mm, com uma dimensão de poro e partícula de 100 Å e 3 μm , respetivamente. O *software* utilizado na aquisição

de dados foi o *Dionex Chromeleon* na versão 6.80. Os solventes utilizados foram adquiridos comercialmente, sem necessidade de purificação, e encontram-se apresentados na Tabela 3.2, com exceção da água Milipore (resistividade 18,2 MΩ cm, a 25 °C), que foi produzida num sistema de purificação de água *Mili-Q Academic* da Merck.

Tabela 3.2: Solventes utilizados na análise do grau de pureza dos compostos sintetizados, por HPLC-DAD.

Solvente	Característica	Marca	Referência
Acetonitrilo para HPLC	≥99,9%	Honeywell Riedel-de Haën	34851
	≥99,95%	Carlo Erba	412342
Ácido trifluoroacético	≥99,9%	VWR	20060.320
	≥99,9%	VWR	84578.290
Metanol para HPLC	≥99,9%	Honeywell Riedel-de Haën	34885

Na análise do grau de pureza dos compostos por HPLC utilizou-se como fase móvel um sistema binário, que, dependendo da polaridade de cada composto, era constituído por ACN ou MeOH + 0,05% de TFA (A) e por H₂O ou H₂O + 0,05% TFA (B), como é observado na Figura 3.1. Em cada corrida foi utilizado um fluxo de 0,75 mL/min e foram injetados 10 µL das soluções preparadas para cada composto [10⁻⁵ M]. A determinação do grau de pureza foi efetuada através da análise dos resultados de dois replicados de cada solução de composto, intercalados com brancos, calculando-se a média da área relativa do pico, ao comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção no espetro de UV-Vis.



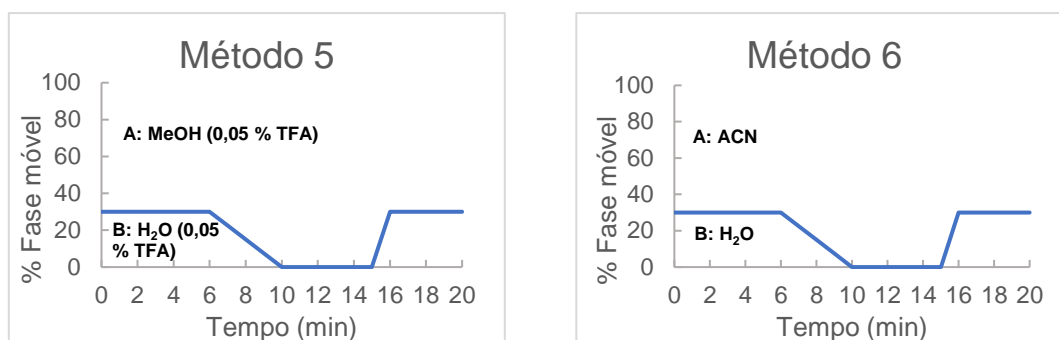


Figura 3.1: Gradientes utilizados na análise do grau de pureza dos compostos sintetizados por HPLC-DAD.

3.3. Síntese de derivados de glicosil tiossemicarbazona

3.3.1. Procedimento geral para a síntese do isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glicopiranosil, **2**

A síntese do composto **2** foi realizada tendo por base o trabalho de Thanh *et al.*¹¹² no qual o isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil foi preparado através de irradiação assistida por microondas.

A uma mistura de acetobromo- α -D-glucose (**1**) (10 mmol) e tiocianato de potássio (25 mmol) (previamente secos sob vácuo) em acetonitrilo adicionou-se, sob agitação, brometo de tetrabutilamónio (10 mmol) (previamente seco sob vácuo), em atmosfera inerte de azoto e à temperatura ambiente. A mistura reacional foi irradiada a 300 W durante 2 horas e a evolução da reação foi controlada por CCF, a cada 30 minutos de reação, usando como eluente uma mistura de *n*-hexano/ acetato de etilo (7:3). Posteriormente, procedeu-se ao *work-up* da reação, filtrando-se a mistura reacional e evaporando-se o solvente sob vácuo. Obteve-se um resíduo gomoso que foi dissolvido em diclorometano (10 mL) e a solução assim obtida lavada com água (4×15 mL). A fase orgânica extraída foi seca com sulfato de magnésio de anidro, filtrada e o solvente evaporado à securo no evaporador rotativo, obtendo-se um óleo laranja/ amarelo.

Seguidamente, procedeu-se à purificação do produto bruto **2** por cromatografia em coluna. Utilizou-se como eluente uma mistura de *n*-hexano/ acetato de etilo (7:3), uma coluna de aproximadamente 3,5 cm de diâmetro, uma altura de sílica de 15 cm e recolheram-se frações de 5 mL. A eluição da coluna foi acompanhada por CCF, dando-se por terminada a recolha de frações quando não se verificou a presença de produto. Agruparam-se as frações que continham o composto **2** cromatograficamente puro, evaporou-se o solvente e obteve-se um sólido branco. Por fim, efetuou-se apenas uma experiência de RMN ¹H e COSY em CDCl₃, dado que a caracterização completa deste composto foi anteriormente realizada pelo grupo de trabalho. Na Tabela 3.3 encontram-se reunidas as quantidades de reagentes usados e massa de produto, bem como o rendimento efetivo correspondente de cada síntese.

Tabela 3.3: Resumo das quantidades de reagentes, produto e rendimento efetivo para a síntese do composto 2.

Síntese	Acetobromo- α -D-glucose g (mmol)	Tiocianato de potássio g (mmol)	Brometo de tetrabutilamônio g (mmol)	Massa de produto bruto (g)	Massa de produto puro g (mmol)	Rendimento efetivo (η)
1 ^a	0,500 (1,22)	0,299 (3,08)	0,395 (1,23)	0,387	0,109 (0,28)	28,2%
2 ^a	0,750 (1,82)	0,443 (4,56)	0,588 (1,82)	0,349	0,134 (0,34)	38,4%

Estado físico: sólido amorfo branco.

¹H RMN [400,1 MHz, CDCl₃, δ / ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 2,02 (m, 6H, OAc CH₃-C2/ OAc CH₃-C3/ OAc CH₃-C4/ OAc CH₃-C6); 2,11 (m, 6H, OAc CH₃-C2/ OAc CH₃-C3/ OAc CH₃-C4/ OAc CH₃-C6); 3,74 (m, 1H, H-5); 4,14 (dd, 1H, 12,5, H-6a; H-6b); 4,24 (dd, 1H, 12,5, H-6a; H-6b); 5,02 (d, 1H, 9,0, H-1); 5,11 (t, 2H, 9,2, H-2; H-4); 5,20 (t, 1H, 9,3, H-3).

¹³C RMN [100,6 MHz, CDCl₃, δ / ppm (atribuição)]: 170,51 (OAc C-6); 170,25 (OAc C-3); 169,23 (OAc C-2/ OAc C-4); 169,06 (OAc C-2/ OAc C-4); 144,15 (C=S); 83,46 (C-1); 74,01 (C-5); 72,45 (C-3); 71,81 (C-2); 67,58 (C-4); 61,46 (C-6); 20,71, 20,53 (OAc CH₃-C-2; C-3; C-4; C-6).

3.3.2. Procedimento geral para a síntese da *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazida, 3.a

A síntese do composto **3** foi realizada tendo por base o trabalho de Thanh *et al.*⁹⁹ no qual a *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazida foi preparada através da reação entre o derivado de isotiocianato correspondente e hidrazina hidratada.

Dissolveu-se, num balão de 100 mL, o isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil (**2**) (10 mmol) em etanol absoluto e arrefeceu-se a solução até atingir uma temperatura de 8 °C. De seguida, adicionou-se hidrazina hidratada (10 mmol) e manteve-se a mistura reacional sob agitação, por um tempo variável, a 8 °C, tendo-se verificado a formação de um precipitado branco. A evolução da reação foi avaliada por CCF usando como eluente uma mistura de acetato de etilo/ *n*-hexano (7:3). Dando-se a reação por terminada, a mistura reacional foi evaporada à securo no evaporador rotativo, dando origem a um sólido branco, com rendimentos entre 97 e 100%. Adicionalmente, realizou-se apenas um espetro de RMN ¹H, em CDCl₃, visto que a caracterização deste composto foi anteriormente realizada pelo grupo de trabalho. Na Tabela 3.4 encontram-se reunidas as condições experimentais, as quantidades de reagentes usados e de produto obtido em cada síntese, bem como rendimento respetivo de cada reação.

Tabela 3.4: Condições reacionais de síntese do composto 3.a.

Síntese	Isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil g (mmol)	Hidrazina hidratada μL (mmol)	Tempo total de reação (horas)	Massa de produto g (mmol)	Rendimento (η)
1 ^a	0,109 (0,28)	16 + 2 (excesso 3%) (0,31)	4h30	0,114 (0,28)	97,0%
2 ^a	0,134 (0,34)	20 (0,34)	4h20	0,143 (0,34)	98,6%
3 ^a	0,125 (0,32) ⁶	18,5 (0,32)	5h	0,135 (0,32)	100,0%

Estado físico: sólido amorfo branco.

¹H RMN [400,1 MHz, CDCl₃, δ/ ppm (multiplicidade, integração, J/ Hz, atribuição)]: 2,04 (m, 9H, OAc CH₃-C2/ OAc CH₃-C3/ OAc CH₃-C4/ OAc CH₃-C6); 2,09 (m, 3H, OAc CH₃-C2/ OAc CH₃-C3/ OAc CH₃-C4/ OAc CH₃-C6); 3,79 (s, 2H, N(1)-H); 3,89 (d, 1H, 10,0, H-5); 4,12 (d, 1H, 12,1, H-6a/ H-6b); 4,33 (d, 1H, 13,0, H-6a/ H-6b); 5,07 e 5,12 (m, 2H, H-2 e H-4, respetivamente); 5,38 (t, 1H, 9,5, H-3); 5,77 (t, 1H, 9,2, H-1); 7,44 (s, 1H, N(2)-H); 8,15 (d, 1H, 7,6, N(3)-H).

¹³C RMN [100,6 MHz, CDCl₃, δ/ ppm (atribuição)]: 184,29 (C=S); 171,19 (OAc C-2/ OAc C-4); 170,72 (OAc C-6); 170,04 (OAc C-3); 169,91 (OAc C-2/ OAc C-4); 82,16 (C-1); 73,53 (C-5); 72,74 (C-3); 70,71 (C-2); 68,26 (C-4); 61,64 (C-6); 20,81, 20,79, 20,63 (OAc CH₃-C-2; C-3; C-4; C-6).

3.3.3. Procedimento geral para a síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbazona, 4.a – 4.c

A síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbazona foi realizada tendo por base o trabalho de Tenchiu *et al.*¹⁵⁷, no qual foram preparados derivados de glicosil tiossemicarbazona recorrendo à condensação entre a *N*-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil) tiossemicarbazida e o respetivo aldeído/cetona.

A uma solução aquecida de *N*-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil) tiossemicarbazida (**3.a**) em metanol, adicionou-se gota-a-gota e sob agitação, uma solução aquecida do respetivo aldeído em metanol. A mistura reacional foi aquecida a refluxo com proteção de humidade, por um tempo variável. Na síntese dos compostos **4.b** e **4.c** foi ainda adicionada uma quantidade catalítica de ácido acético glacial.

A monitorização das reações foi avaliada por CCF. Dando-se as reações por terminadas, as misturas reacionais foram arrefecidas até à temperatura ambiente e deixadas no frigorífico/congelador durante a noite, tendo-se formado um precipitado, na síntese dos compostos **4.a** e **4.c**; para o composto **4.b** concentrou-se a mistura reacional até metade do volume e adicionou-se água para formar um precipitado. O precipitado de cada síntese foi filtrado e, posteriormente, seco sob vácuo.

A síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbazona foi conseguida com rendimentos compreendidos entre 46,8% e 70,4%, tendo-se realizado espetros de RMN ¹H, ¹³C-APT, HSQC,

⁶ Na 3^a síntese do composto **3.a**, o isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil foi adquirido comercialmente, estando as suas características reunidas na Tabela 3.1. Não foi necessária uma purificação prévia deste reagente.

COSY, HMBC e NOESY, em CDCl₃ e DMSO-*d*₆. Na Tabela 3.5 encontram-se reunidas as condições experimentais, as quantidades de reagentes usados e de produto obtido em cada síntese, bem como o tempo de refluxo e rendimento, correspondente de cada reação.

Tabela 3.5: Condições reacionais para a síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbazona, 4.a - 4.c.

Composto	Glicosil tiossemicarbazona g (mmol)	Aldeído g (mmol)	Ácido acético glacial (μL)	Eluente (CCF)	Tempo de refluxo (horas)	Massa de produto g (mmol)	Rendimento (η)
4.a	0,143 (0,339)	0,049 (0,338)	-	acetato de etilo/ <i>n</i> -hexano 5,5:4,5	4h	0,095 (0,17)	51,1%
4.b	0,135 (0,320)	0,053 (0,364)	10,0	acetato de etilo/ <i>n</i> -hexano 7:3	23h	0,124 (0,23)	70,4%
4.c	0,100 (0,237)	0,035 (0,235)	23,5	<i>n</i> -hexano/acetato de etilo/diclorometano 6:4:4	4h30	0,061 (0,11)	46,8%

3.3.3.1. Caracterização da indole-3-carboxaldeído *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-*D*-glucopiranosil) tiossemicarbazona, 4.a

Estado físico: sólido amorfo branco.

RMN ¹H [400,1 MHz, CDCl₃, δ/ ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 2,04 (s, 3H, OAc CH₃-C2/ OAc CH₃-C3/ OAc CH₃-C4/ OAc CH₃-C6); 2,06 (s, 6H, OAc CH₃-C2/ OAc CH₃-C3/ OAc CH₃-C4/ OAc CH₃-C6); 2,09 (s, 3H, OAc CH₃-C2/ OAc CH₃-C3/ OAc CH₃-C4/ OAc CH₃-C6); 3,93 (ddd, 1H, 10,2; 4,4; 2,0, H-5); 4,15 (dd, 1H, 12,5, 2,0, H-6a/ H-6b); 4,38 (dd, 1H, 12,5, 4,4, H-6a/ H-6b); 5,17 (t, 1H, 9,8, H-4); 5,28 (t, 1H, 9,5, H-2); 5,43 (t, 1H, 9,4, H-3); 5,82 (t, 1H, 9,3, H-1); 7,32 e 7,39 (m, 2H, H-6'; H-5', respectivamente); 7,43 (d, 1H, 7,5, H-7'); 7,53 (d, 1H, 2,7, H-2'); 7,95 (s, 1H, N=CH); 8,06 (d, 1H, 9,1, N(3)-H); 8,24 (d, 1H, 7,4, H-4'); 8,54 (s, 1H, N-H (indole)); 9,06 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ¹³C [100,6 MHz, CDCl₃, δ/ ppm (atribuição)]: 178,37 (C=S); 171,00, 170,95, 170,18, 169,89 (OAc C-2; C-3; C-4; C-6); 140,57 (N=CH); 136,99 (C-7'a); 129,66 (C-2'); 124,40 (C-3'a); 124,30 (C-6'); 122,54 (C-4'); 122,34 (C-5'); 112,15 (C-3'); 111,61 (C-7'); 82,62 (C-1); 73,72 (C-5); 73,16 (C-3); 70,47 (C-2); 68,61 (C-4); 61,87 (C-6); 21,03, 20,91, 20,86 (OAc CH₃-C-2; C-3; C-4; C-6).

IV (KBr) ν_{máx}/ cm⁻¹: 3413 – 3350 (elongação N-H); 1749 (elongação C=O); 1614 (elongação C=N); 1228 (elongação C=S).

HRMS (ESI(-), *m/z*) [C₂₄H₂₈N₄O₉S-H]⁻: calculado: 547,1504; experimental: 547,1504.

HPLC [método, *t_R* (min), área relativa do pico (%): 1, 3,70, 99,58.

3.3.3.2. Caracterização da indole-2-carboxaldeído *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona, 4.b

Estado físico: sólido amorfo amarelo.

RMN ^1H [400,1 MHz, CDCl_3 , δ / ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 2,07 (m, 9H, OAc CH_3 -C2/ OAc CH_3 -C3/ OAc CH_3 -C4/ OAc CH_3 -C6); 2,10 (s, 3H, OAc CH_3 -C2/ OAc CH_3 -C3/ OAc CH_3 -C4/ OAc CH_3 -C6); 3,93 (ddd, 1H, 10,1, 4,4, 2,0, H-5); 4,16 (d, 1H, 12,1, H-6a/ H-6b); 4,39 (dd, 1H, 12,4; 4,3; H-6a/ H-6b); 5,15 (t, 1H, 9,8, H-4); 5,21 (t, 1H, 9,7 H-2); 5,44 (t, 1H, 9,5, H-3); 5,50 (t, 1H, H-1); 6,80 (s, 1H, H-3'); 7,11 (t, 1H, 7,5, H-5'); 7,28 (m, 1H, H-6'); 7,41 (d, 1H, 8,2, H-7'); 7,62 (d, 1H, 7,9, H-4'); 7,85 (s alargado, 1H, N=CH); 8,64 (d, 1H, 7,6, N(3)-H); 9,68 (s, 1H, N-H (indole)); 10,18 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ^{13}C [100,6 MHz, CDCl_3 , δ / ppm (atribuição)]: 179,00 (C=S); 173,28 (OAc C-2); 171,02 (OAc C-6); 170,12 (OAc C-3); 169,91 (OAc C-4); 137,92 (C-7'a); 134,77 (N=CH); 132,23 (C-2'); 128,32 (C-3'a); 125,10 (C-6'); 121,84 (C-4'); 120,62 (C-5'); 111,57 (C-7'); 109,22 (C-3'); 82,50 (C-1); 73,58 (C-5); 72,51 (C-3); 71,44 (C-2); 68,71 (C-4); 61,83 (C-6); 21,31, 21,04, 20,88, 20,86 (OAc CH_3 -C-2; C-3; C-4; C-6).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm^{-1} : 3467 – 3261 (elongação N-H); 1751 (elongação C=O); 1618 (elongação C=N); 1232 (elongação C=S).

HRMS (ESI(-), *m/z*) [$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_9\text{S-H}$]: calculado: 547,1504; experimental: 547,1501.

HPLC [método, t_R (min), área relativa do pico (%): 1, 5,78, 99,74.

3.3.3.3. Caracterização da 2-benzofurano carboxaldeído *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazona, 4.c

Estado físico: sólido amorfo branco.

RMN ^1H [400,1 MHz, CDCl_3 , δ / ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 2,04 (s, 6H, OAc CH_3 -C2/ OAc CH_3 -C3/ OAc CH_3 -C4/ OAc CH_3 -C6); 2,05 (s, 3H, OAc CH_3 -C2/ OAc CH_3 -C3/ OAc CH_3 -C4/ OAc CH_3 -C6); 2,10 (s, 3H, OAc CH_3 -C2/ OAc CH_3 -C3/ OAc CH_3 -C4/ OAc CH_3 -C6); 3,92 (ddd, 1H, 10,2, 4,4, 2,0, H-5); 4,14 (dd alargado, 1H, 12,4, 2,0, H-6a/ H-6b); 4,38 (dd, 1H, 12,5, 4,4, H-6a/ H-6b); 5,16 (t, 1H, 9,7, H-4); 5,21 (t, 1H, 9,6, H-2); 5,41 (t, 1H, 9,5, H-3); 5,81 (t, 1H, 9,2, H-1); 7,19 (s, 1H, H-3'); 7,28 (t, 1H, 7,3, H-5'); 7,39 (td, 1H, H-6'); 7,55 (d, 1H, 8,3, H-7'); 7,63 (d, 1H, 7,6, H-4'); 7,77 (s, 1H, N=CH); 8,25 (d, 1H, 9,0, N(3)-H); 9,54 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ^{13}C [100,6 MHz, CDCl_3 , δ / ppm (atribuição)]: 179,15 (C=S); 170,96 (OAc C-6); 170,91 (OAc C-2); 170,20 (OAc C-3); 169,81 (OAc C-4); 155,87 (C-7'a); 150,10 (C-2'); 133,19 (N=CH); 128,08 (C-3'a); 126,79 (C-6'); 123,85 (C-5'); 122,11 (C-4'); 111,94 (C-7'); 110,52 (C-3'); 82,57 (C-1); 73,90 (C-5); 73,08 (C-3); 70,82 (C-2); 68,42 (C-4); 61,84 (C-6); 21,01, 20,89, 20,84 (OAc CH_3 -C-2; C-3; C-4; C-6).

RMN ^1H [400,1 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ / ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 1,94, 1,97 (s, 3H, OAc CH_3 -C3/ OAc CH_3 -C4); 2,01 (s, 6H, OAc CH_3 -C2/ OAc CH_3 -C6); 3,99 (d, 1H, 12,0, H-6a; H-6b); 4,11 (m, 1H, H-5); 4,22 (dd, 1H, 12,4, H-6a; H-6b); 4,98 (t, 1H, 9,7, H-4); 5,34 (t, 1H, 9,1, H-2); 5,43 (t, 1H, 9,5, H-3); 6,01 (d alargado, 1H, 8,6, H-1); 7,31 (t, 1H, 7,4, H-5'); 7,42 (td, 1H, H-6'); 7,49 (s, 1H, H-3'); 7,63 (d, 1H, 8,3, H-7'); 7,72 (d, 1H, 7,8, H-4'); 8,14 (s, 1H, N=CH); 8,70 (s, 1H, N(3)-H); 12,07 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ^{13}C [100,6 MHz, DMSO- d_6 , δ / ppm (atribuição)]: 178,21 (C=S); 170,06 (OAc C-6); 169,60 (OAc C-3); 169,45 (OAc C-4); 169,38 (OAc C-2); 154,80 (C-7'a); 150,85 (C-2'); 133,65 (N=C-H); 127,81 (C-3'a); 126,33 (C-6'); 123,69 (C-5'); 121,96 (C-4'); 111,46 (C-7'); 110,25 (C-3'); 81,45 (C-1); 72,68 (C-3); 72,27 (C-5); 71,00 (C-2); 67,80 (C-4); 61,82 (C-6); 20,61, 20,42, 20,37 (OAc C-CH_3 -C-2; C-3; C-4; C-6).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm^{-1} : 3467 – 3294 (elongação N-H); 1745 (elongação C=O); 1618 (elongação C=N); 1225 (elongação C=S).

HRMS (ESI(-), m/z) [$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S-H}$]: calculado: 548,1344; experimental: 548,1343.

HPLC [método, t_{R} (min), área relativa do pico (%)]: 1, 5,31, 97,32.

3.4. Síntese de derivados de tiossemicarbazona não substituídos e substituídos em N3

3.4.1. Procedimento geral para a síntese dos derivados de tiossemicarbazona não substituídos (4.f – 4.l) e substituídos (4.m – 4.o) em N3

A síntese dos derivados de tiossemicarbazona substituídos e não substituídos em N3 foi realizada tendo por base o trabalho de Matsa *et al.*¹⁵⁸, no qual se adicionou o composto carbonílico e uma quantidade catalítica de ácido acético glacial a uma solução de tiossemicarbazida.

Repetiu-se o procedimento descrito na síntese dos derivados de glicosil tiossemicarbazona (3.3.3), contudo, utilizou-se tiossemicarbazida ou N4-fenil-tiossemicarbazida como reagente de partida e etanol absoluto como solvente da reação. Na síntese dos compostos **4.g**, **4.i**, **4.j**, **4.k**, **4.n** e **4.o** foi ainda adicionada 2 a 3 gotas de ácido acético glacial.

A monitorização das reações foi avaliada por CCF. Dando-se as reações por terminadas, as misturas reacionais foram arrefecidas até à temperatura ambiente, tendo-se formado um precipitado que foi filtrado, lavado com etanol absoluto gelado e, posteriormente, seco sob vácuo.

A síntese dos derivados de N3 H-tiossemicarbazona foi conseguida com rendimentos compreendidos entre 41,1% e 94,0%, tendo-se realizado espectros de RMN ^1H , ^{13}C -APT, HSQC, COSY, HMBC e NOESY em DMSO- d_6 . Na Tabela 3.6 encontram-se reunidas as condições experimentais, as quantidades de reagentes usados e de produto obtido em cada síntese, bem como o tempo de refluxo e rendimento, correspondente.

Tabela 3.6: Condições reacionais para a síntese dos derivados de N3 H-tiossemicarbazona, 4.f - 4.l.

Composto	Tiossemicarbazida g (mmol)	Aldeído g (mmol)	Eluente (CCF)	Tempo de refluxo (horas)	Massa de produto g (mmol)	Rendimento (η)
4.f	0,285 (3,13)	0,500 (3,44)	acetato de etilo/ <i>n</i> - hexano 5,5:4,5	4h30	0,332 (1,52)	48,6%
4.g	0,261 (2,86)	0,503 (3,16)	acetato de etilo/ <i>n</i> - hexano 6:4	6h30	0,623 (2,68)	94,0%
4.h	0,285 (3,13)	0,500 (3,44)	<i>n</i> -hexano/ acetato de etilo 7:3	3h30	0,416 (1,91)	60,9%
4.i	0,285 (3,13)	0,500 (3,42)	<i>n</i> -hexano/ acetato de etilo 6:4	3h	0,429 (1,96)	63,0%
4.j	0,255 (2,80)	0,500 (3,08)	<i>n</i> -hexano/ acetato de etilo 7:3	6h	0,526 (2,24)	79,8%
4.k	0,254 (2,79)	0,500 (3,06)	acetato de etilo/ <i>n</i> - hexano 6:4	4h30	0,549 (2,32)	83,3%
4.l	0,229 (2,51)	0,400 (2,75)	<i>n</i> -hexano/ acetato de etilo 7:3	4h	0,239 (1,03)	41,1%

3.4.1.1. Caracterização da (*E*)-2-((1*H*-indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotioamida, 4.f

Seguiu-se o procedimento descrito no ponto 3.4.1. e o composto foi ainda purificado por recristalização com etanol absoluto.

Estado físico: sólido cristalino branco.

RMN ¹H [400,1 MHz, DMSO-*d*₆, δ / ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 7,12 (t, 1H, H-5); 7,19 (td, 1H, H-6); 7,41 (s, 1H, N(3)-H); 7,42 (d, 1H, 7,9, H-7); 7,81 (s, 1H, H-2); 8,03 (s, 1H, N(3)-H); 8,22 (d, 1H, 7,7, H-4); 8,30 (d, 1H, 1,5, N=CH); 11,18 (s, 1H, N-H (indole)); 11,60 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ¹³C [100,6 MHz, DMSO-*d*₆, δ / ppm (atribuição)]: 176,76 (C=S); 140,81 (N=CH); 137,03 (C-7a); 131,00 (C-2); 123,95 (C-3a); 122,63 (C-6); 122,17 (C-4); 120,62 (C-5); 111,74 (C-7); 111,12 (C-3).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm^{-1} : 3452, 3330, 3311, 3234 (elongação N-H); 1612 (elongação C=N); 1252 (elongação C=S).

HRMS (ESI(+), *m/z*) [C₁₀H₁₁N₄S+H]⁺: calculado: 219,0704; experimental: 219,0713.¹⁵⁹

HPLC [método, *t_R* (min), área relativa do pico (%)]: 2, 4,83, 95,67.

3.4.1.2. Caracterização da (*E*)-2-((1-metil-1*H*-indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotioamida, 4.g

Seguiu-se o procedimento descrito no ponto 3.4.1.

Estado físico: sólido amorfo branco.

RMN ¹H [400,1 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 3,80 (s, 3H, N-CH₃); 7,17 (td, 1H, H-5); 7,26 (td, 1H, H-6); 7,41 (s, 1H, N(3)-H); 7,48 (d, 1H, 8,1, H-7); 7,79 (s, 1H, H-2); 8,00 (s, 1H, N(3)-H); 8,23 (d, 1H, 7,9, H-4); 8,27 (s, 1H, N=CH); 11,14 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ¹³C [100,6 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (atribuição)]: 176,47 (C=S); 140,33 (N=CH); 137,55 (C-7a); 134,62 (C-2); 124,32 (C-3a); 122,70 (C-4); 122,32 (C-6); 120,86 (C-5); 110,12 (C-3); 110,10 (C-7); 32,80 (N-CH₃).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm⁻¹: 3367, 3248, 3221 (elongação N-H); 1595 (elongação C=N); 1254 (elongação C=S).

HRMS (EI(+), m/z) [C₁₁H₁₂N₄S+H]⁺: calculado: 232,0783; experimental: 232,0786.¹⁶⁰

HPLC [método, t_R (min), área relativa do pico (%)]: 3, 4,38, 99,94.

3.4.1.3. Caracterização da (*E*)-2-((1*H*-indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida, 4.h

Seguiu-se o procedimento descrito no ponto 3.4.1. e o composto foi ainda purificado por recristalização com etanol absoluto.

Estado físico: sólido cristalino bege.

RMN ¹H [400,1 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 6,77 (s, 1H, H-3); 7,00 (t, 1H, 7,4, H-5); 7,17 (t, 1H, H-6); 7,35 (d, 1H, 8,2, H-7); 7,54 (d, 1H, 8,0, H-4); 8,01 (s, 1H, N=CH); 8,19 (s, 1H, N(3)-H); 8,34 (s, 1H, N(3)-H); 11,42 (s, 1H, N-H (indol)); 11,59 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ¹³C [100,6 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (atribuição)]: 177,91 (C=S); 137,13 (C-7a); 133,84 (C-2); 133,15 (N=CH); 127,97 (C-3a); 123,50 (C-6); 120,93 (C-4); 119,47 (C-5); 111,11 (C-7); 106,06 (C-3).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm⁻¹: 3491, 3280, 3244, 3111 (elongação N-H); 1603 (elongação C=N); 1232 (elongação C=S).

HRMS (ESI(-), m/z) [C₁₀H₁₀N₄S-H]⁻: calculado: 217,0553; experimental: 217,0532.

HPLC [método, t_R (min), área relativa do pico (%)]: 3, 6,15, 100,00.

3.4.1.4. Caracterização da (*E*)-2-((benzofuran-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida, 4.i

Seguiu-se o procedimento descrito no ponto 3.4.1. e o composto foi ainda purificado por recristalização com etanol absoluto.

Estado físico: sólido cristalino branco.

RMN ¹H [400,1 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 7,28 (t, 1H, H-5); 7,38 (m, 1H, H-6); 7,40 (s, 1H, H-3); 7,59 (d, 1H, 8,2, H-7); 7,69 (d, 1H, 7,8, H-7); 7,80 (s, 1H, N(3)-H); 8,10 (s, 1H, N=CH); 8,36 (s, 1H, N(3)-H); 11,66 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ¹³C [100,6 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (atribuição)]: 178,05 (C=S); 154,67 (C-7a); 151,27 (C-2); 132,23 (N=CH); 127,92 (C-3a); 126,04 (C-6); 123,60 (C-5); 121,85 (C-4); 111,37 (C-7); 109,18 (C-3).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm⁻¹: 3454, 3330, 3307 (elongação N-H); 1595 (elongação C=N); 1254 (elongação C=S).

HRMS (ESI(-), m/z) [C₁₀H₉N₃OS-H]⁻: calculado: 218,0394; experimental: 218,0372.

HPLC [método, t_R (min), área relativa do pico (%)]: 3, 5,25, 100,00.

3.4.1.5. Caracterização da (*E*)-2-((benzo[*b*]tiofen-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida, 4.j

Seguiu-se o procedimento descrito no ponto 3.4.1. e o composto foi ainda purificado por recristalização com etanol absoluto.

Estado físico: sólido cristalino amarelo.

RMN ¹H [400,1 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 7,38 (m, 2H, H-5); 7,39 (m, 2H, H-6); 7,62 (s, 1H, N(3)-H); 7,76 (s, 1H, H-3); 7,83 (m, 1H, H-4); 7,93 (m, 1H, H-7); 8,34 (s aberto, 1H, N(3)-H); 8,36 (s, 1H, N=CH); 11,64 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ¹³C [100,6 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (atribuição)]: 177,79 (C=S); 139,39 (C-7a ou C-3a); 139,33 (C-7a ou C-3a); 139,17 (C-2); 137,82 (N=CH); 127,78 (C-3); 126,02 (C-6); 124,86 (C-5); 124,33 (C-4); 122,61 (C-7).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm^{-1} : 3402, 3276, 3163 (elongação N-H); 1591 (elongação C=N); 1232 (elongação C=S).

HRMS (EI(+), *m/z*) [C₁₀H₉N₃S₂+H]⁺: calculado: 235,0238; experimental: 235,0234.¹²⁶

HPLC [método, *t_R* (min), área relativa do pico (%)]: 3, 7,23, 100,00.

3.4.1.6. Caracterização da (*E*)-2-((benzo[*d*]tiazol-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida, 4.k

Seguiu-se o procedimento descrito no ponto 3.4.1.

Estado físico: sólido amorfo amarelo.

RMN ¹H [400,1 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 7,48 (m, 1H, H-6); 7,54 (m, 1H, H-5); 8,00 (m, 1H, N(3)-H); 8,01 (d, 1H, 7,5, H-4); 8,11 (d, 1H, 8,0, H-7); 8,36 (s, 1H, N=CH); 8,62 (s, 1H, N(3)-H); 11,69 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ¹³C [100,6 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (atribuição)]: 178,36 (C=S); 164,55 (C-2); 153,14 (C-3a); 136,79 (N=CH); 134,24 (C-7a); 126,66 (C-5); 126,47 (C-6); 123,15 (C-4); 122,41 (C-7).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm^{-1} : 3400, 3261, 3130 (elongação N-H); 1620 (elongação C=N); 1120 (elongação C=S).

HRMS (EI(+), *m/z*) [C₉H₈N₄S₂+H]⁺: calculado: 236,0190; experimental: 236,0190.¹²⁶

HPLC [método, *t_R* (min), área relativa do pico (%)]: 4, 4,00, 95,07.

3.4.1.7. Caracterização da (*E*)-2-((3-metil-1*H*-indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida, 4.l

Seguiu-se o procedimento descrito no ponto 3.4.1.

Estado físico: sólido amorfo amarelo.

RMN ¹H [400,1 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 2,31 (s, 3H, H-8); 6,99 (t, 1H, 7,5, H-5); 7,17 (t, 1H, H-6); 7,30 (d, 1H, 8,1, H-7); 7,52 (d, 1H, 8,0, H-4); 8,18 (s alargado, 2H, N(3)-H e N=CH); 8,31 (s, 1H, N(3)-H); 11,12 (s, 1H, N-H (indole)); 11,49 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ¹³C [100,6 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (atribuição)]: 177,68 (C=S); 136,76 (C-7a); 131,98 (N=CH); 130,04 (C-2); 128,50 (C-3a); 123,87 (C-6); 119,23 (C-4); 118,83 (C-5); 114,25 (C-3); 110,87 (C-7); 8,27 (C-8).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm^{-1} : 3492, 3332, 3275, 3161 (elongação N-H); 1606 (elongação C=N); 1095 (elongação C=S).

HRMS (ESI(-), *m/z*) [C₁₁H₁₂N₄S-H]⁻: calculado: 231,0710; experimental: 231,0684.

HPLC [método, *t_R* (min), área relativa do pico (%)]: 5, 5,08, 100,00.

A síntese dos derivados de *N*3-fenil-tiossemicarbazona foi conseguida com rendimentos compreendidos entre 31,7% e 83,5%, tendo-se realizado espectros de RMN ¹H, ¹³C-APT, HSQC, COSY, HMBC e NOESY, em DMSO-*d*₆. Na Tabela 3.7 encontram-se reunidas as condições

experimentais, as quantidades de reagentes usados e de produto obtido em cada síntese, bem como o tempo de refluxo e rendimento, correspondente.

Tabela 3.7: Condições reacionais para a síntese dos derivados de N3-fenil-tiossemicarbazona, 4.m - 4.o.

Composto	N4-Fenil-tiossemicarbazida g (mmol)	Aldeído g (mmol)	Eluente (c.c.f)	Tempo de refluxo (horas)	Massa de produto g (mmol)	Rendimento (η)
4.m	0,274 (1,64)	0,262 (1,80)	n-hexano/acetato de etilo 8:2	6h	0,153 (0,52)	31,7%
4.n	0,372 (2,22)	0,400 (2,45)	n-hexano/acetato de etilo 7:3	3h50	0,581 (1,86)	83,5%
4.o	0,417 (2,49)	0,400 (2,75)	n-hexano/acetato de etilo 8:2	3h40	0,503 (1,63)	65,2%

3.4.1.8. Caracterização da (E)-2-((1H-indole-2-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida, 4.m

Seguiu-se o procedimento descrito no ponto 3.4.1.

Estado físico: sólido amorfo amarelo.

RMN ¹H [400,1 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 6,86 (s, 1H, H-3); 7,03 (t, 1H, 7,4, H-5); 7,20 (t, 1H, 7,6, H-6); 7,25 (t, 1H, 7,4, H-4'); 7,40 (d, 1H, 7,5, H-7); 7,44 (t, 2H, 7,6, H-3'/H-5'); 7,58 (d, 1H, 7,9, H-4); 7,61 (d, 2H, 7,7, H-2'/H-6'); 8,14 (s, 1H, N=CH); 10,19 (s, 1H, N(3)-H); 11,51 (s, 1H, N-H (indole)); 11,98 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ¹³C [100,6 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (atribuição)]: 175,63 (C=S); 138,76 (C-1'); 137,22 (C-7a); 133,84 (N=CH); 133,55 (C-2); 128,31 (C-3'/ C-5'); 128,05 (C-3a); 125,74 (C-2'/ C-6'); 125,58 (C-4'); 123,74 (C-6); 121,05 (C-4); 119,58 (C-5); 111,17 (C-7); 106,89 (C-3).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm^{-1} : 3346, 3313, 3267 (elongação N-H); 1604 (elongação C=N); 1200 (elongação C=S).

ESI-HRMS (ESI(-), *m/z*) [C₁₆H₁₄N₄S-H]: calculado: 293,0866; experimental: 293,0822.

HPLC [método, *t_r* (min), área relativa do pico (%)]: 6, 4,57, 99,81.

3.4.1.9. Caracterização da (E)-2-((benzo[d]tiazol-2-il)metileno)-N-fenil-hidrazina carbotoamida, 4.n

Seguiu-se o procedimento descrito no ponto 3.4.1.

Estado físico: sólido amorfo amarelo.

RMN ¹H [400,1 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (multiplicidade, integração, *J*/ Hz, atribuição)]: 7,24 (t, 1H, 7,3, H-4'); 7,40 (t, 2H, H-3'/ H-5'); 7,49 (td, 1H, H-6); 7,54 (td, 1H, H-5); 7,58 (d, 2H, 7,6, H-2'/ H-6'); 8,03 (d, 1H, 8,0, H-4); 8,13 (d, 1H, 7,6, H-7); 8,48 (s, 1H, N=CH); 10,23 (s, 1H, N(3)-H); 12,33 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ¹³C [100,6 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (atribuição)]: 176,41 (C=S); 164,49 (C-2); 153,14 (C-3a); 138,86 (C-1'); 134,18 (N=CH); 134,40 (C-7a); 128,28 (C-3'/ C-5'); 126,69 (C-5); 126,52 (C-6); 125,82 (C-5'/ C-6'); 125,74 (C-4'); 123,18 (C-4); 122,44 (C-7).

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ / cm^{-1} : 3317, 3124 (elongação N-H); 1616 (elongação C=N); 1186 (elongação C=S).

ESI-HRMS (ESI(-), m/z) [C₁₅H₁₂N₄S₂-H]: calculado: 311,0431; experimental: 311,0383.

HPLC [método, t_R (min), área relativa do pico (%): 6, 4,48, 100,00.

3.4.1.10. Caracterização da (E)-2-((3-metil-1H-indole-2-il)metileno)-N-fenil-hidrazina carbotioamida, 4.o

Seguiu-se o procedimento descrito no ponto 3.4.1.

Estado físico: sólido amorfo amarelo.

RMN ¹H [400,1 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (multiplicidade, integração, J/ Hz, atribuição)]: 2,36 (s, 3H, H-8); 7,02 (t, 1H, 7,5, H-5); 7,21 (t, 1H, 7,4, H-6); 7,25 (t, 1H, 7,4, H-4'); 7,36 (d, 1H, 8,2, H-7); 7,43 (t, 2H, 7,9, H-3'/ H-5'); 7,56 (d, 1H, 7,9, H-4); 7,64 (d, 1H, 7,9, H-2'/ H-6'); 8,32 (s, 1H, N=CH); 10,20 (s, 1H, N(3)-H); 11,25 (s, 1H, N-H (indole)); 11,91 (s, 1H, N(2)-H).

RMN ¹³C [100,6 MHz, DMSO-*d*₆, δ/ ppm (atribuição)]: 175,34 (C=S); 138,84 (C-1'); 136,85 (C-7a); 132,61 (N=CH); 129,81 (C-2); 128,54 (C-3a); 128,35 (C-3'/ C-5'); 125,68 (C-2'/ C-6'); 125,55 (C-4'); 124,14 (C-6); 119,37 (C-4); 118,96 (C-5); 115,14 (C-3); 110,95 (C-7); 8,33 (C-8).

IV (KBr) ν_{máx}/ cm⁻¹: 3388, 3286, 3151 (elongação N-H); 1599 (elongação C=N); 1198 (elongação C=S).

ESI-HRMS (ESI(-), m/z) [C₁₇H₁₆N₄S-H]: calculado: 307,1023; experimental: 307,0973.

HPLC [método, t_R (min), área relativa do pico (%): 6, 5,48, 98,04.

3.5. Determinação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos compostos foi avaliada segundo o método de captura do radical livre DPPH utilizando a metodologia descrita por Falé *et al.*¹⁶¹, com algumas alterações.

A 500 µL de uma solução de DPPH (0,004% em metanol) adicionou-se o volume adequado de solução de composto (proveniente de uma solução com uma concentração de 1 mg/mL) e fez-se o volume de 1000 µL com metanol, de modo a serem obtidas as concentrações de 12,5, 25, 50, 100, 200 e 300 µM. Para o composto **4.o** foi ainda necessário preparar soluções com as concentrações de 12,5, 25, 50, 65, 75 e 85 µM. De seguida, as soluções foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos e mediou-se a absorvância num aparelho UV-Vis (Shimadzu UV-1603) a 517 nm, contra um branco de metanol. O ensaio de controlo continha 500 µL de metanol e 500 µL da solução de DPPH e, como controlo positivo utilizou-se a quercetina, rutina e ácido ascórbico. Para cada composto, o ensaio do DPPH foi realizado em quadruplicado.

A percentagem de atividade antioxidante de cada composto foi calculada de acordo com a seguinte expressão:

$$AA (\%) = 100 \times ((A_{DPPH} - A_{amostra}) / A_{DPPH})$$

onde, AA (%) corresponde à percentagem de atividade antioxidante, *A*_{amostra} e *A*_{DPPH} representam a absorvância de cada composto e da solução controlo, respetivamete.

A concentração de composto necessária para produzir 50% da atividade antioxidante (EC₅₀) foi obtida através da representação gráfica da percentagem de atividade antioxidante em função das

diferentes concentrações, estando os resultados apresentados como a média e desvio padrão associado aos quatro replicados.

Os reagentes e solvente utilizados neste ensaio, bem como as suas características, encontram-se reunidos na seguinte tabela:

Tabela 3.8: Reagentes e solvente utilizados no ensaio do DPPH.

Reagente/Solvente	Característica	Marca	Referência
Ácido ascórbico	≥99,7%	Merck	-
DPPH	-	Sigma-Aldrich	D9132
Quercetina	≥95,0%	Sigma-Aldrich	Q4951
Rutina	≥95,0%	Sigma-Aldrich	R-5143
Metanol	≥99,8%	Honeywell Riedel-de Haën	32213

3.6. Ensaio de citotoxicidade

No estudo das atividades biológicas dos compostos sintetizados utilizou-se a linha celular do cancro da mama hormono-dependente MCF-7 (ATCC HTB-22) e a linha celular do carcinoma hepatocelular humano Hep-G2 (ATCC HB-8065). Os ensaios foram realizados numa câmara de fluxo laminar *Esco*® *Class II Biohazard Safety Cabinet* de modo a garantir as condições de esterilidade necessárias. Todos os reagentes usados, bem como as suas características, encontram-se reunidos na Tabela 3.9.

Tabela 3.9: Reagentes utilizados nos ensaios com as linhas celulares.

Reagente	Marca	Referência
Antimicótico (100x)	Sigma-Aldrich	A5955
Azul de tripano	Sigma-Aldrich	T6146
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio	VWR	0793
Dimetilsulfóxido	Merck	1.02952.1000
L-glutamina (200 mM)	BioWhittaker® Lonza	BE17-605E
Meio DMEM	BioWhittaker® Lonza	12-614F
Metanol	Carlo Erba	524102
Soro fetal bovino	Biowest	S1810-500
Tampão fosfato salino	Corning	21-040-CV
Tripsina 10x	BioWhittaker® Lonza	BE02-007E

3.6.1. Cultura de células

As células das linhas celulares, MCF-7 e Hep-G2 foram colocadas a crescer em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (com 4,5 g/L de glucose) suplementado com 10% de FBS, 1% de L-glutamina e 1% de antimicótico (com 10000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina) em frascos de 25 cm³ (T25), tendo-se trocado o meio a cada 48/72h. Quando se atingia uma confluência de, aproximadamente, 90% as células eram tripsinizadas e divididas para um máximo de cinco frascos T25. As células foram incubadas numa estufa *Shel Lab CO₂ Series* da Sheldon Mfg. Inc® com uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

3.6.2. Contagem de células

Quando as células atingiram a confluência pretendida, foram tripsinizadas, lavando-se com uma solução de PBS e, incubadas nas condições descritas anteriormente, com 850 µL de tripsina 1x (células MCF-7) e 2x (células Hep-G2) durante 5 minutos. Este passo experimental tem como objetivo a quebra das ligações peptídicas que possibilitam a aderência das células ao frasco.

Após a tripsinização, preparou-se uma suspensão das células com 2 mL de DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de L-glutamina e 1% de antimicótico, que foi visualizada num microscópio ótico MOTIC® AE21 e contada no hemacitómetro (*Superior Marienfeld Germany Neubauer improved*), usando uma solução de azul tripano. Por fim, preparou-se uma suspensão de células com uma concentração final de 50×10^4 células/mL, para ambas as linhas celulares, que foi cultivada em microplacas de 96 poços, tendo-se adicionado 100 µL da suspensão em cada poço, e incubada durante 72h.

3.6.3. Determinação da citotoxicidade celular

Para os ensaios de citotoxicidade recorreu-se ao método colimétrico de redução do MTT, tendo por base o procedimento descrito por Riss *et al.* ¹⁴⁶.

Após o tempo de incubação das células, retirou-se o meio de cultura e, primeiramente, aplicou-se em contacto com as células, 100 µL de solução de cada composto com uma concentração de 100 µM, dissolvido em meio de cultura DMEM suplementado com 1% de L-glutamina contendo 0,5% de DMSO. Foram efetuados 8 replicados da concentração de 100 µM de cada composto.

Os compostos foram colocados em contacto com as células das linhas células MCF-7 e Hep-G2 durante 24h e 48h. Findado este tempo, adicionou-se 100 µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) em DMEM suplementado com 1% de L-glutamina e incubou-se as microplacas, nas mesmas condições referidas anteriormente, durante 3h e 2h30 para as células das linhas celulares MCF-7 e Hep-G2, respetivamente. Foi também efetuado um ensaio de controlo negativo, correspondente a 100% de viabilidade celular, no qual as células foram submetidas a condições idênticas somente em meio de cultura DMEM suplementado com 1% de L-glutamina contendo 0,5% de DMSO. Posteriormente, retirou-se a solução de MTT, dissolveram-se os cristais de formazan com 100 µL de metanol e, leu-se a absorvância a 595 nm, com referência a 630 nm, num leitor de microplacas (TECAN Sunrise A-502), sendo que para a aquisição dos dados recorreu-se ao *software* RdrOle na versão 4.30.

A percentagem de morte celular foi calculada através da seguinte expressão:

$$MC (\%) = 100 - ((A_{Composto} \times 100) / A_{Controlo})$$

na qual, MC (%) corresponde à percentagem de morte celular, $A_{Composto}$ é o valor de absorvância nas células que estiveram em contacto com os compostos e $A_{Controlo}$ é a absorvância registada para as células controlo.

O tamoxifeno, um fármaco de referência de mercado para o cancro da mama hormono-dependente, foi utilizado como controle positivo e obtido a partir de comprimido comerciais. Três comprimidos foram macerados em metanol, tendo-se dividido o volume em diversos *ependorfs*, que

foram centrifugados numa centrífuga Minispin® 5415D da Eppendorf®, a uma velocidade de 12 g durante 5 minutos. Posteriormente, reuniu-se o sobrenadante dos *eppendorfs* e secou-se ao ar, de modo a se obter apenas o tamoxifeno puro em forma de precipitado. Nos ensaios com a linha celular MCF-7, preparou-se soluções do tamoxifeno puro, com diferentes concentrações, em meio DMEM suplementado com 1% de L-glutamina contendo 0,5% de DMSO e realizou-se o mesmo procedimento descrito anteriormente. Foram efetuados 8 replicados de cada concentração.

4º Capítulo

4. Conclusão e perspectivas futuras

A finalidade do presente trabalho foi criar uma pequena biblioteca de tiossemicarbazonas, derivadas de aldeídos heteroaromáticos e avaliar as suas atividades antioxidantes e anticancerígena, na linha celular do carcinoma hepatocelular humano Hep-G2, para uma indicação do seu potencial hepatotóxico, bem como na linha celular do cancro da mama hormono-dependente MCF-7, obtendo assim informação preliminar para a realização de estudos de SAR.

Assim, sintetizaram-se com sucesso quinze derivados de tiossemicarbazona, dez dos quais novos (**4.a – 4.c, 4.h, 4.l, 4.m – 4.o**). A via sintética seguida para obter os derivados de glicosil tiossemicarbazona (**4.a – 4.c**) consistiu em três passos reacionais consecutivos: formação do isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil (**2**), síntese da *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazida (**3.a**) e formação dos derivados de glicosil tiossemicarbazona pretendidos (**4.a – 4.c**). Os compostos **4.a, 4.b** e **4.c** foram conseguidos com rendimentos de 51,1%, 70,4% e 46,8%, respetivamente. O tempo de reação, em **4.a** e **4.c**, e a utilização de catálise ácida na síntese de **4.c**, poderão ser as causas dos baixos rendimentos obtidos. Os restantes derivados de tiossemicarbazona (**4.f – 4.o**) foram obtidos num único passo reacional, por reação entre uma tiossemicarbazida ou *N*4-fenil-tiossemicarbazida e o aldeído pretendido. Os derivados de tiossemicarbazona *N*3 não substituídos (**4.f – 4.l**) e *N*3-fenil-tiossemicarbazona (**4.m – 4.o**) foram obtidos com rendimentos compreendidos entre 41,1 - 94,0% e 31,7 - 83,5%, respetivamente. Os compostos **4.f, 4.h, 4.l** e **4.m** foram conseguidos com rendimentos mais baixos de 48,6%, 60,9%, 41,1% e 31,7%, respetivamente, que poderão ser explicados pela ausência de catálise ácida e, conseqüentemente, a reação ter ocorrido a um valor de pH não adequado.

As tiossemicarbazonas foram extensivamente caracterizadas por técnicas espectroscópicas de RMN, IV e HRMS. Concluiu-se que todas se apresentam na forma *trans*. A partir das experiências de NOESY realizadas em **4.b, 4.h, 4.m** e **4.o**, foi possível inferir uma geometria *E* em torno da ligação C=N em todos os compostos sintetizados. Adicionalmente, verificou-se que os compostos **4.m** e **4.o** apresentam-se como na conformação *trans* relativamente à posição entre o átomo de enxofre e o átomo de azoto da imina, sendo expectável que o composto **4.n** apresente igualmente esta conformação.

Nos ensaios de atividade antioxidante, sete derivados de tiossemicarbazonas (**4.a, 4.d, 4.f, 4.g, 4.m – 4.o**) demonstraram uma capacidade em reduzir o radical de DPPH boa a moderada com valores de EC₅₀ inferiores a 300 μ M. Nos derivados de *N*3 H-tiossemicarbazona (**4.f – 4.l**), os compostos que possuem o grupo indolilo ligado na posição 3 relativamente à tiossemicarbazona, **4.f** e **4.g**, apresentaram boas atividades antioxidantes, com destaque para o composto **4.f**, cujo valor de EC₅₀ indicia que a não substituição no azoto endocíclico tem influência na atividade antioxidante. Por comparação do EC₅₀ das tiossemicarbazonas substituídas no azoto *N*3 com um anel aromático (**4.m, 4.n** e **4.o**), com o EC₅₀ das correspondentes tiossemicarbazonas substituídas com um grupo glicosídico per-acetilado (**4.b**) ou não substituídas (**4.h, 4.k** e **4.l**) em *N*3, concluiu-se que a presença de um grupo fenilo exerce um efeito positivo no potencial antioxidante. O composto (*E*)-2-((3-metil-1*H*-indole-2-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotoioamida (**4.o**) foi o que apresentou uma atividade antioxidante mais promissora, possivelmente devido a uma maior estabilização por ressonância do radical formado. Obteve-se um valor de EC₅₀ de 51,34 \pm 1,93 μ M, para **4.o**, comparável ao da rutina 11,36 \pm 0,38 μ M e

ácido ascórbico $23,66 \pm 0,82 \mu\text{M}$. É de realçar que este composto apresentou um valor de EC_{50} inferior ao de um antioxidante sintético, formalmente conhecido como BHT. Conclui-se, então, que o composto **4.o**, poderá representar uma *lead* para o desenvolvimento de novos antioxidantes sintéticos.

Relativamente aos ensaios de citotoxicidade nas linhas celulares Hep-G2 e MCF-7 verificou-se que os compostos **4b**, **4.f** – **4.o**, quando em contacto com as células alvo, durante 24h ou 48h não demonstraram ser citotóxicos. Conclui-se, portanto, os compostos se forem usados como antioxidantes não são tóxicos.

Os resultados obtidos ao longo do trabalho laboratorial revelaram-se bastante promissores, assim sendo para a continuação deste trabalho propõe-se:

- I. Sintetizar os seguintes derivados de *N*-3-fenil-tiossemicarbazona: (*E*)-2-((1*H*-indole-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotioamida, (*E*)-2-((1-metil-1*H*-indole-3-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotioamida, (*E*)-2-((benzofuran-2-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotioamida e (*E*)-2-((benzo[*b*]tiofen-2-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazinacarbotioamida e avaliar a capacidade antioxidante, segundo o método de DPPH, de modo a completar o estudo preliminar SAR;
- II. Realizar estudos de SAR e eventualmente QSAR, de modo a poder determinar quais as propriedades relevantes para a atividade biológica destes compostos;
- III. Testar a atividade antioxidante dos compostos sintetizados por outros protocolos experimentais, como o método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e inibição da captura de radicais de óxido nítrico.

5º Capítulo

5. Bibliografía

1. Chio, I. & Tuveson, D. A. ROS in Cancer: The Burning Question. *Trends Mol. Med.* **23**, 411–429 (2017).
2. Datta, K., Sinha, S. & Chattopadhyay, P. Reactive oxygen species in health and disease. *Natl. Med. J. India* **13**, 304–310 (2000).
3. Halliwell, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* **141**, 312–322 (2006).
4. Haider, K., Haider, M., Neha, K. & Yar, M. S. Free radical scavengers: An overview on heterocyclic advances and medicinal prospects. *Eur. J. Med. Chem.* **204**, 1–16 (2020).
5. Nakai, K. & Tsuruta, D. What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–16 (2021).
6. Sabharwal, S. S. & Schumacker, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* **14**, 709–721 (2014).
7. Pham-huy, L. A., He, H. & Pham-huy, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* **4**, 89–96 (2008).
8. Pisoschi, A. M. *et al.* Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *Eur. J. Med. Chem.* **209**, (2021).
9. Sarmiento-Salinas, F. L. *et al.* Reactive oxygen species: Role in carcinogenesis, cancer cell signaling and tumor progression. *Life Sci.* **284**, 1–13 (2021).
10. Fang, Y., Yang, S. & Wu, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition* **18**, 872–879 (2002).
11. Matschke, V., Theiss, C. & Matschke, J. Oxidative stress: the lowest common denominator of multiple diseases. *Neural Regen. Res.* **14**, 238–241 (2018).
12. Adwas, A. A., Sedik, A., Elsayed, I., Azab, A. E. & Quwaydir, F. A. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng.* **6**, 43–47 (2019).
13. Qin, J., Kosten, T. R. & Yang, X. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **46**, 200–206 (2013).
14. Roleira, F. M. F. *et al.* Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chem.* **183**, 235–258 (2015).
15. Prasad, S., Gupta, S. C. & Tyagi, A. K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* **387**, 95–105 (2017).
16. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. *Free Radicals in Biology and Medicine.* (2015).
17. Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. & Aggarwal, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 1603–1616 (2010).
18. Liguori, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging* **13**, 757–772 (2018).
19. Stadtman, E. R. & Levine, R. L. Protein Oxidation in *Annals of the New York Academy of Sciences* 191–208 (2000).
20. Matos, L., Gouveia, A. & Almeida, H. Copper ability to induce premature senescence in human fibroblasts. *Age (Omaha)*. **34**, 783–794 (2012).
21. Tavana, O. *et al.* Absence of p53-dependent apoptosis leads to UV radiation hypersensitivity, enhanced immunosuppression and cellular senescence. *Cell Cycle* **9**, 3328–3336 (2010).
22. Höhn, A. *et al.* Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol.* **11**, 482–501 (2017).
23. Dzoyem, J. P. & Eloff, J. N. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. *J. Ethnopharmacol.* **160**, 194–201 (2015).
24. Li, R., Jia, Z. & Trush, M. A. Defining ROS in Biology and Medicine. *React. Oxyg. Species* **1**, 9–21 (2016).
25. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods:

- Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **4**, 118–126 (2010).
26. Substances, S. 10 - Antioxidant Properties of Seaweed-Derived Substances. in *Bioactive Seaweeds for Food Applications 202* (Elsevier Inc., 2018).
 27. Ambrogi, V., Carfagna, C., Cerruti, P. & Marturano, V. Additives in Polymers. in *Modification of Polymer Properties* 90.
 28. Barbosa, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* **23**, 629–643 (2010).
 29. Thanh, D., Le, T. & Bui, T. Antioxidant activities of thiosemicarbazones from substituted benzaldehydes and *N*-(tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranosyl)thiosemicarbazide. *Eur. J. Med. Chem.* **60**, 199–207 (2013).
 30. Singh, P. P. Dietary Antioxidants and Infectious Diseases. in *Infectious Diseases and Your Health* 307–316 (2018).
 31. Bouayed, J. & Bohn, T. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **3**, 228–237 (2010).
 32. Poljsak, B., Šuput, D. & Milisav, I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, (2013).
 33. Sies, H. Physiological Society Symposium: Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function in Oxidative Stress Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Exp. Physiol.* **82**, 291–295 (1997).
 34. Pisoschi, A. M. & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 55–74 (2015).
 35. Bursal, E. & Gülçin, İ. Polyphenol contents and *in vitro* antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Res. Int.* **44**, 1482–1489 (2011).
 36. Shankar, K. & Mehendale, H. Oxidative Stress. *Encyclopedia of Toxicology* **3**, 735–737 (2014).
 37. Sen, S. & Chakraborty, R. The Role of Antioxidants in Human Health. in *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy* 24 (2011).
 38. Zehiroglu, C., Beyza, S. & Sarikaya, O. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *J. Food Sci. Technol.* **56**, 4757–4774 (2019).
 39. Atkinson, J., Manor, D. & Parker, R. Vitamin E. in *Encyclopedia of Biological Chemistry* 545–550 (2013).
 40. Qi, J. & Dong, F. The relevant targets of anti-oxidative stress: a review. *J. Drug Target.* 1–10 (2021).
 41. Pokorny, J. Are natural antioxidants better - and safer - than synthetic antioxidants? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**, 629–642 (2007).
 42. Castellano, G. & Medialdea, J. T. Classification of Phenolic Compounds by Chemical Structural Indicators and Its Relation to Antioxidant Properties of Posidonia Ocea *Match Commun. Math. Comput. Chem.* **67**, 231–250 (2012).
 43. Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191–203 (2006).
 44. Xu, X. *et al.* Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. *Food Chem.* **353**, 1–15 (2021).
 45. Neha, K., Haider, R., Pathak, A. & Yar, M. S. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **178**, 687–704 (2019).
 46. Ito, N. *et al.* Studies on Antioxidants: Their Carcinogenic and Modifying Effects on Chemical Carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol. J.* **24**, 1071–1082 (1986).
 47. He, Z. *et al.* Novel thiosemicarbazone derivatives containing indole fragment as potent and selective anticancer agent. *Eur. J. Med. Chem.* **184**, 1–16 (2019).

48. Tenório, R. P. *et al.* Tiossemicarbazonas: Métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Quim. Nova* **28**, 1030–1037 (2005).
49. Khalilian, M. H., Mirzaei, S. & Arman, A. Comprehensive insights into the structure and coordination behavior of thiosemicarbazone ligands: a computational assessment of the *E* - *Z* interconversion mechanism during coordination †. *New J. Chem.* **39**, 9313–9324 (2015).
50. Hussain, M., Jawaria, R., Sha, Z., Abbas, G. & Moazzam, M. Ferrocene-based thiosemicarbazones: Solvent effect on thiol-thione tautomerism and conformational polymorphism. *J. Organomet. Chem.* **846**, 121–128 (2017).
51. Poorhaji, S., Pordel, M. & Ramezani, S. New heterocyclic green, blue and orange dyes from indazole: Synthesis, tautomerism, alkylation studies, spectroscopic characterization and DFT/TD-DFT calculations. *J. Mol. Struct.* **1119**, 151–156 (2016).
52. Reza, A., Ghorbani, S., Karimzadeh, M. & Jajarmi, S. A DFT approach for simple and solvent assisted-proton movement: Biurea as a case of study. *Comput. Theor. Chem.* **1084**, 67–74 (2016).
53. Srinivasan, B. R., Raghavaiah, P. & Nadkarni, V. S. Reinvestigation of growth of urea thiosemicarbazone monohydrate crystal. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **112**, 84–89 (2013).
54. Ryrie, G. A. & Edin, M. B. Thiosemicarbazone in the treatment of Leprosy. *The Lancet* **256**, 286–287 (1950).
55. Czubatka-Bienkowska, A. *et al.* Thio-functionalized carbohydrate thiosemicarbazones and evaluation of their anticancer activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 2713–2720 (2017).
56. Pelosi, G. Thiosemicarbazone Metal Complexes: From Structure to Activity. *Open Crystallogr. J.* **3**, 16–28 (2010).
57. El-Sabbagh, O. I., El-Sadek, M. E., Lashine, S. M., Yassin, S. H. & El-Nabtity, S. M. Synthesis of new 2(1*H*)-quinoxalinone derivatives for antimicrobial and antiinflammatory evaluation. *Med. Chem. Res.* **18**, 782–797 (2009).
58. Abdel-rahman, H. M. & Hussein, M. A. Synthesis of β -Hydroxypropanoic Acid Derivatives as Potential Anti-inflammatory, Analgesic and Antimicrobial Agents. *Arch. der Pharm. Chem. Life Sci.* **339**, 378–387 (2006).
59. Kerimov, I., Ayhan-kilcigil, G., Can-ekke, B., Altanlar, N. & Iscan, M. Synthesis, antifungal and antioxidant screening of some novel benzimidazole derivatives. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **22**, 696–701 (2007).
60. Küçükgülzel, G., Kocatepe, A., Clercq, E. De, Fikrettin, Ş. & Güllüce, M. Synthesis and biological activity of 4-thiazolidinones, thiosemicarbazides derived from diflunisal hydrazide. *Eur. J. Med. Chem.* **41**, 353–359 (2006).
61. Domagk, G., Behnisch, R., Mietzsch, F. & Schimdt, H. S. Über eine neue, gegen Tuberkelbazillen *in vitro* wirksame Verbindungsklasse. *Naturwissenschaften* **33**, 315 (1946).
62. Kanso, F., Khalil, A., Noureddine, H. & El-makhour, Y. Therapeutic perspective of thiosemicarbazones derivatives in inflammatory pathologies: A summary of *in vitro* / *in vivo* studies. *Int. Immunopharmacol.* **96**, 1–14 (2021).
63. Beraldo, H. Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Quim. Nova* **27**, 461–471 (2004).
64. Grayson, M. L. *et al.* *Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic and Antiviral Drugs.* (2503).
65. Trotsko, N. *et al.* Design, synthesis and antimycobacterial activity of thiazolidine-2,4-dione-based thiosemicarbazone derivatives. *Bioorg. Chem.* **97**, 1–9 (2020).
66. Fox, G. J. *et al.* Group 5 drugs for multidrug-resistant tuberculosis: individual patient data meta-analysis. *Eur. Respir. J.* **49**, 1–11 (2017).
67. Organization, W. H. *WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis.* (2016).
68. Marvadi, S. K. *et al.* Synthesis, *in vitro*, and *in vivo* (Zebra fish) antitubercular activity of 7,8-

- dihydroquinolin-5(6*H*)-ylidenehydrazinecarbothioamides. *Bioorg. Chem.* **96**, (2020).
69. Hamre, D., Bernstein, J. & Donovick, R. Activity of *p*-Aminobenzaldehyde, 3-Thiosemicarbazone on Vaccinia Virus in the Chick Embryo and in the Mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **73**, 275–278 (1950).
 70. Sevinçli, Z. Ş., Duran, G. N., Özbil, M. & Karalı, N. Synthesis, molecular modeling and antiviral activity of novel 5-fluoro-1*H*-indole-2,3-dione 3-thiosemicarbazones. *Bioorg. Chem.* **104**, 1–12 (2020).
 71. Mrozek-wilczkiewicz, A., Malarz, K., Rejmund, M., Polanski, J. & Musiol, R. Anticancer activity of the thiosemicarbazones that are based on di-2-pyridine ketone and quinoline moiety. *Eur. J. Med. Chem.* **171**, 180–194 (2019).
 72. Krishnan, K. *et al.* Synthesis and Ribonucleotide reductase inhibitory activity of thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 6248–6250 (2008).
 73. Popović-Bijelić, A. *et al.* Ribonucleotide reductase inhibition by metal complexes of Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone): A combined experimental and theoretical study. *J. Inorg. Biochem. J.* **105**, 1422–1431 (2011).
 74. Hu, W. *et al.* Discovery of Novel Topoisomerase II Inhibitors by Medicinal Chemistry Approaches. *J. Med. Chem.* **61**, 8947–8980 (2018).
 75. Brockman, R. W., Thomson, J. R., Bell, M. J. & Skipper, H. E. Observations on the Antileukemic Activity of Pyridine-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone and Thiocarbohydrazone*. *Cancer Res.* **16**, 167–170 (1956).
 76. Hussein, M. A., Adnan, M., Umar, M. I., Haque, R. A. & Guan, T. S. Synthesis, structural elucidation and cytotoxicity of new thiosemicarbazone derivatives. *Arab. J. Chem.* **12**, 3183–3192 (2019).
 77. Gou, Y. *et al.* α -*N*-heterocyclic thiosemicarbazone Fe(III) complex: Characterization of its antitumor activity and identification of anticancer mechanism. *Eur. J. Med. Chem.* **123**, 354–364 (2016).
 78. Sartorelli, A. C., Liu, M. & Lin, T. Synthesis and Antitumor Activity of Amino Derivatives of Pyridine-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone. *J. Med. Chem.* **35**, 3672–3677 (1992).
 79. Tsimberidou, A., Alvarado, Y. & Giles, F. J. Evolving role of ribonucleoside reductase inhibitors in hematologic malignancies. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2**, 437–448 (2002).
 80. Kalinowski, D. S., Quach, P. & Richardson, D. R. Thiosemicarbazones: The new wave in cancer treatment. *Future Med. Chem.* **1**, 1143–1151 (2009).
 81. Miah, A. B. & Harrington, K. J. Triapine in Clinical Practice. *European J. Clin. Med. Oncol.* 1–6 (2010).
 82. ClinicalTrials.gov. *Testing the Addition of a New Anti-Cancer Drug, Triapine, to the Usual Chemotherapy Treatment (Cisplatin) During Radiation Therapy for Advanced-stage Cervical and Vaginal Cancers* Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02466971>. (Consultado a 16 de Novembro 2021)
 83. Shao, J. *et al.* A Ferrous-triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 586–593 (2006).
 84. Yu, Y., Wong, J., Lovejoy, D. B., Kalinowski, D. S. & Richardson, D. R. Chelators at the Cancer Coalface: Desferrioxamine to riapine and Beyond. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6876–6884 (2006).
 85. Whitnall, M., Howard, J., Ponka, P. & Richardson, D. R. A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14901–14906 (2006).
 86. Rao, V. A. *et al.* The Iron Chelator Dp44mT Causes DNA Damage and Selective Inhibition of Topoisomerase II α in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **69**, 948–958 (2009).
 87. Yalowich, J. C. *et al.* The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II α . *Biochem. Pharmacol.* **84**, 52–58 (2012).

88. Yu, Y., Rahmanto, Y. S. & Richardson, D. Bp44mT: an orally active iron chelator of the thiosemicarbazone class with potent anti-tumour efficacy. *Br. J. Pharmacology* **165**, 148–166 (2012).
89. Kalinowski, D. S. *et al.* Redox cycling metals: Pedaling their roles in metabolism and their use in the development of novel therapeutics. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 727–748 (2016).
90. Lovejoy, D. B. *et al.* Novel Second-Generation Di-2-Pyridylketone Thiosemicarbazones Show Synergism with Standard Chemotherapeutics and Demonstrate Potent Activity against Lung Cancer Xenografts after Oral and Intravenous Administration *in Vivo*. *J. Med. Chem.* **55**, 7230–7244 (2012).
91. Kovacevic, Z., Chikhani, S., Lovejoy, D. B. & Richardson, D. R. Novel Thiosemicarbazone Iron Chelators Induce Up-Regulation and Phosphorylation of the Metastasis Suppressor N-myc Down-Stream Regulated Gene 1: A New Strategy for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Mol. Pharmacol.* **80**, 598–609 (2011).
92. ClinicalTrials.govs. *Dose-finding and Pharmacokinetic Study of DpC, Administered Orally to Patients With Advanced Solid Tumors* Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02688101>. (Consultado a 17 de Novembro 2021)
93. Salim, K. Y., Vareki, S. M., Danter, W. R. & Koropatnick, J. COTI-2, a novel small molecule that is active against multiple human cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget* **7**, 41363–41379 (2016).
94. Lindemann, A. *et al.* COTI-2, A Novel Thiosemicarbazone Derivative, Exhibits Antitumor Activity in HNSCC through p53-dependent and -independent Mechanisms. *Clin. Cancer Res.* **25**, 5650–5663 (2019).
95. Liu, Y. *et al.* The past, present and future of potential small-molecule drugs targeting p53-MDM2/MDMX for cancer therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **176**, 92–104 (2019).
96. Nunes, J. H. B. *et al.* Cancer Cell Resistance Against the Clinically Investigated Thiosemicarbazone COTI-2 Is Based on Formation of Intracellular Copper Complex Glutathione Adducts and ABCC1-Mediated Efflux. *J. Med. Chem.* **63**, 13719–13732 (2020).
97. Ribeiro, A. *et al.* Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: Synthesis, antiproliferative activity, *in vitro* and *in silico* biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition. *Eur. J. Med. Chem.* **182**, 1–16 (2019).
98. Bakherad, Z. *et al.* Anti-cancer, anti-oxidant and molecular docking studies of thiosemicarbazone indole-based derivatives. *Res. Chem. Intermed.* **45**, 2827–2854 (2019).
99. Thanh, N. D., Giang, N. T. K., Quyen, T. H., Huong, D. T. & Toan, V. N. Synthesis and evaluation of *in vivo* antioxidant, *in vitro* antibacterial, MRSA and antifungal activity of novel substituted isatin *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)thiosemicarbazones. *Eur. J. Med. Chem.* **123**, 532–543 (2016).
100. Ge, W. *et al.* Characterization and antioxidant activity of β -carotene loaded chitosan-graft-poly (lactide) nanomicelles. *Carbohydr. Polym.* **117**, 169–176 (2015).
101. Chen, Y. *et al.* Dietary vitamin C requirement and its effects on tissue antioxidant capacity of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture* **435**, 431–436 (2015).
102. Soomets, U., Zilmer, M. & Langel, Ü. Manual Solid-Phase Synthesis of Glutathione Analogs. in *Methods in Molecular Biology* **298**, 241–257 (2005).
103. Lopes, R. A. P. *Síntese e caracterização de glicosil tiosemicarbazonas com potencial atividade antioxidante*. [Trabalho não publicado]. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, (2019).
104. Clemente, D. B. *Novas glicosil tiosemicarbazonas com potencial atividade farmacológica*. [Trabalho não publicado]. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, (2020).
105. Demchenko, A. V. General Aspects of the Glycosidic Bond Formation. in *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance* 1–28 (2008).
106. Camarasa, J. M. *et al.* A New Procedure for the Synthesis of Glycosyl Isothiocyanates. *Communications* 509–510 (1984).

107. Davis, B. & Fairbanks, A. *Carbohydrate Chemistry*. (Oxford University Press, 2002).
108. Fernandez, J. & Mellet, C. The Thiocarbonyl Group in Carbohydrate Chemistry. *Sulfur Reports* **19**, 61–159 (1996).
109. Fernandez, J. & Mellet, C. *Chemistry and Developments of N-Thiocarbonyl Carbohydrate Derivatives: Sugar Isothiocyanates, Thioamides, Thioureas, Thiocarbamates, and Their Conjugates*. **55**, (2000).
110. Hoz, A. De, Díaz-Ortiz, A. & Prieto, P. Microwave-Assisted Green Organic Synthesis. in *Alternative Energy Sources for Green Chemistry* 1–33.
111. Shah, J. J. & Mohanraj, K. Comparison of Conventional and Microwave-assisted Synthesis of Benzotriazole Derivatives. *Indian J. Pharm. Sci.* **76**, 46–53 (2014).
112. Thanh, N. D., Van, H. T. K. & Thu, T. T. Synthesis and Characterization of Some Novel Thiosemicarbazones of Substituted Benzaldehydes and *N*-(Hepta-*O*-Acetyl- β -D-Lactosyl)Thiosemicarbazide. *J. Carbohydr. Chem.* **34**, 514–544 (2015).
113. Tenório, R. P. *et al.* Tiossemicarbazonas: Métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Quim. Nova* **28**, 1030–1037 (2005).
114. Blanco, J., Sylla, B., Mellet, C. & Fernández, J. Synthesis of α - and β -Glycosyl Isothiocyanates via Oxazoline Intermediates. *J. Org. Chem.* **72**, 4547–4550 (2007).
115. Duus, J., Gottfredsen, C. & Bock, K. Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern Methods and Limitations. *Chem. Rev.* **100**, 4593 (2000).
116. Bubb, W. A. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. *Carbohydr. NMR Prim.* **19**, 1–19 (2003).
117. Magritek. *Application Note 5: Glucose Anomers*.
118. Moretto, C., Pereira, D. S., Paiva, R. D. O., Kneipp, L. F. & Echevarria, A. Microwave-Assisted Synthesis of New *N1,N4*-Substituted Thiosemicarbazones. *Molecules* **16**, 10675–10676 (2011).
119. Yousef, T. A., El-reash, G. M. A., El-gammal, O. A. & Bedier, R. A. Synthesis, characterization, optical band gap, *in vitro* antimicrobial activity and DNA cleavage studies of some metal complexes of pyridyl thiosemicarbazone. *J. Mol. Struct.* **1035**, 307–317 (2013).
120. Bernhardt, P. V., Martinez, M., Rodríguez, C. & Vazquez, M. Biologically active thiosemicarbazone Fe chelators and their reactions with ferrioxamine B and ferric EDTA; a kinetic study †. *Dalt. Trans.* **41**, 2122–2130 (2012).
121. Metwally, N. M. E., Arafa, R. & El-ayaan, U. Molecular modeling, spectral, and biological studies of 4-formylpyridine-⁴*N*-(2-pyridyl) thiosemicarbazone (HFPTS) and its Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Cd(II), Hg(II), and UO₂(II) complexes. *J. Therm. Anal. Calorim.* **115**, 2357–2367 (2014).
122. Haribabu, J. *et al.* Synthesis of Ni(II) complexes bearing indole-based thiosemicarbazone ligands for interaction with biomolecules and some biological applications. *J. Biol. Inorg. Chem.* **22**, 461–480 (2017).
123. Yi, W. *et al.* Refinement of arylthiosemicarbazone pharmacophore in inhibition of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4330–4335 (2011).
124. Maillard, L. T. *et al.* Synthesis and anti-*Candida* activity of novel 2-hydrazino-1,3-thiazole derivatives. **23**, 1803–1807 (2013).
125. Rosada, B. *et al.* Benzo[*b*]thiophene-thiazoles as potent anti-*Toxoplasma gondii* agents: design, synthesis, tyrosinase/tyrosine hydroxylase inhibitors, molecular docking study, and antioxidant activity. *Eur. J. Med. Chem.* 111765 (2019).
126. Huang, H. *et al.* A Series of α -Heterocyclic Carboxaldehyde Thiosemicarbazones Inhibit Topoisomerase II α Catalytic Activity. *J. Med. Chem.* **53**, 3048–3064 (2010).
127. Kemp, W. *NMR in Chemistry: A Multinuclear Introduction*. (1986).
128. Bakkar, M. S., Siddiqi, M. Y. & Monshi, M. S. Preparation and Investigation of the Bonding Mode in the Complexes of Pt(II) with Thiosemicarbazone Ligands. *Synth. ans React. Inorg. Met.*

- Chem.* **33**, 1164–1165 (2003).
129. Venkatachalam, T. K., Pierens, G. K. & Reutens, D. C. Synthesis, NMR structural characterization and molecular modeling of substituted thiosemicarbazones and semicarbazones using DFT calculations to prove the *syn/anti* isomer formation. *Magn. Resonance Chem.* **52**, 98–105 (2014).
 130. Pretsch, E., Bühlmann, P. & Badertscher, M. *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*. (Springer Berlin Heidelberg, 2009).
 131. Poeta, A. C. E. *Desenvolvimento de potenciais metalofármacos para a terapia do cancro*. [Dissertação de mestrado]. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa (2015). Retirado de <https://repositorio.ul.pt/handle/10451/20/browse?type=author&order=ASC&rpp=20&value=Poeta%2C+Ana+Cristina+Eufr%C3%A1sio>
 132. Robert, S., Webster, F. & Kiemle, D. *Silverstein - Spectrometric Identification of Organic Compounds*. (John Wiley & Sons, 2005).
 133. Tipson, R. S. *Infrared Spectroscopy Of Carbohydrates A Review of the Literature*. (1968).
 134. Sazeli, S. *et al.* Semicarbazide and thiosemicarbazide containing butylated hydroxytoluene moiety: new potential antioxidant additives for synthetic lubricating oil. *R. Soc. Chem.* **11**, 7138–7145 (2021).
 135. Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J. & Borges, F. Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *Biomed Res. Int.* (2013).
 136. Kedare, S. B. & Singh, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48**, 412–422 (2011).
 137. Oliveira, A. *et al.* Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. *Quim. Nova* **32**, 689–702 (2009).
 138. Blois, M. Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **181**, 1199–1200 (1958).
 139. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **28**, 25–30 (1995).
 140. Amarowicz, R. & Pegg, R. B. Natural antioxidants of plant origin. in *Advances in Food and Nutrition Research* **90**, 1–81.
 141. Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290–4302 (2005).
 142. Ndhlala, A. R., Moyo, M. & Staden, J. Van. Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules* **15**, 6905–6930 (2010).
 143. Liang, N. & Kitts, D. D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules* **19**, 19180–19208 (2014).
 144. Ambhore, A. N. *et al.* Design, synthesis and in silico study of pyridine based 1,3,4-oxadiazole embedded hydrazinecarbothioamide derivatives as potent anti-tubercular agent. *Comput. Biol. Chem.* **80**, 54–65 (2019).
 145. Mata, A. T. *et al.* Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.* **103**, 778–786 (2007).
 146. Riss, T. *et al.* Cell Viability Assays. in *Assay Guidance Manual* 317–322 (2016).
 147. Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W. & Villanueva, Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* **114**, 785–796 (2012).
 148. Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **89**, 271–277 (1986).
 149. Senthilraja, P. & Kathiresan, K. *In vitro* cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF-7 cell lines study of Marine Yeast. *J. Appl. Pharm. Sci.* **5**, 80–84 (2015).

150. Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T. & Capanoglu, E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front.* 332–349 (2020).
151. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
152. Berridge, M. V, Herst, P. M. & Tan, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. in *Biotechnology Annual Review* **11**, 127–152 (2005).
153. Zhang, X. *et al.* Thiosemicarbazone-based lead optimization to discover high- efficiency and low-toxicity anti-gastric cancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **199**, 112349 (2020).
154. Nordin, M. L., Kadir, A. A., Zakaria, Z. A., Abdullah, R. & Abdullah, M. *In vitro* investigation of cytotoxic and antioxidative activities of *Ardisia crispa* against breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. *BMC Complement. Altern. Med.* 1–10 (2018).
155. Alabsi, A. M., Lim, K. L., Paterson, I. C., Ali-saeed, R. & Muharram, B. A. Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction via Modulation of Mitochondrial Integrity by Bcl-2 Family Members and Caspase Dependence in *Dracaena cinnabari*-Treated H400 Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res. Int.* **2016**, 1–14 (2016).
156. Armarego, W. & Chai, C. *Purification of Laboratory Chemicals.* (2009).
157. Tenchiu, A., Kostas, I. D., Kovala-demertzi, D. & Terzis, A. Synthesis and characterization of new aromatic aldehyde/ketone 4-(β -D-glucopyranosyl)thiosemicarbazones. *Carbohydr. Res.* **344**, 1352–1364 (2009).
158. Matsa, R., Makam, P., Kaushik, M., Hoti, S. L. & Kannan, T. Thiosemicarbazone derivatives: Design, synthesis and *in vitro* antimalarial activity studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **137**, 1–12 (2019).
159. Haribabu, J. *et al.* Water-Soluble Mono- and Binuclear Ru(η^6 -*p*-cymene) Complexes Containing Indole Thiosemicarbazones: Synthesis, DFT Modeling, Biomolecular Interactions, and *In Vitro* Anticancer Activity through Apoptosis. *Organometallics* **37**, 1242–1257 (2018).
160. Du, X. *et al.* Synthesis and Structure - Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. *J. Med. Chem.* **45**, 2695–2707 (2002).
161. Falé, P. L., Ferreira, C., Rodrigues, A. M., Cleto, P. & Amorim, P. J. Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after *in vitro* gastrointestinal digestion. *J. Med. Plant Res.* (2013).

6º Capítulo

6. Apêndices

6.1. Apêndice 1 - isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil (2)

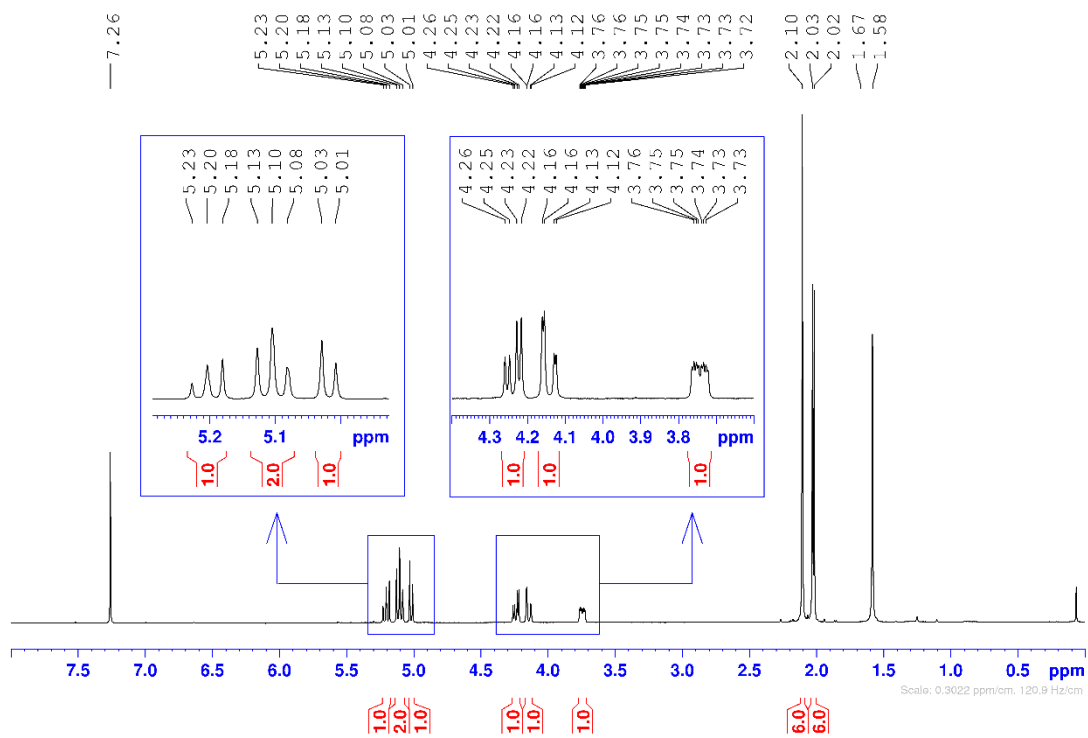


Figura 6.1: Espectro de RMN ^1H do composto 2, em CDCl_3 .

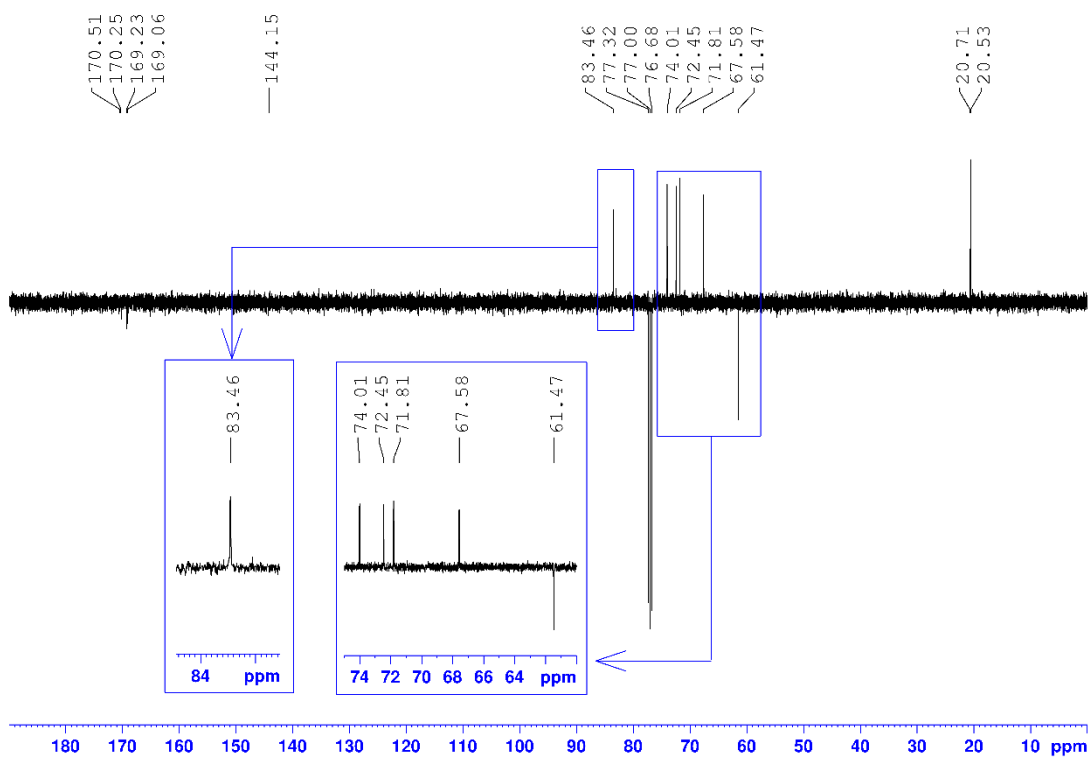


Figura 6.2: Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 2, CDCl_3 .

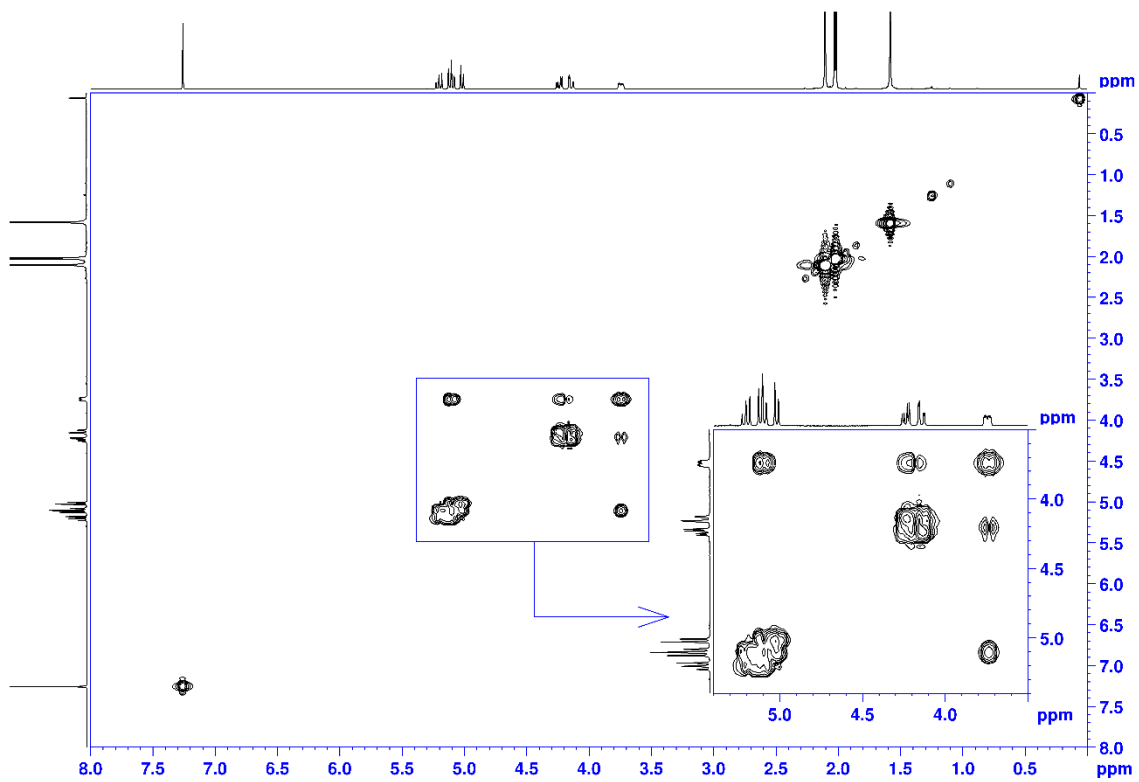


Figura 6.3: Espectro COSY do composto 2, em $CDCl_3$.

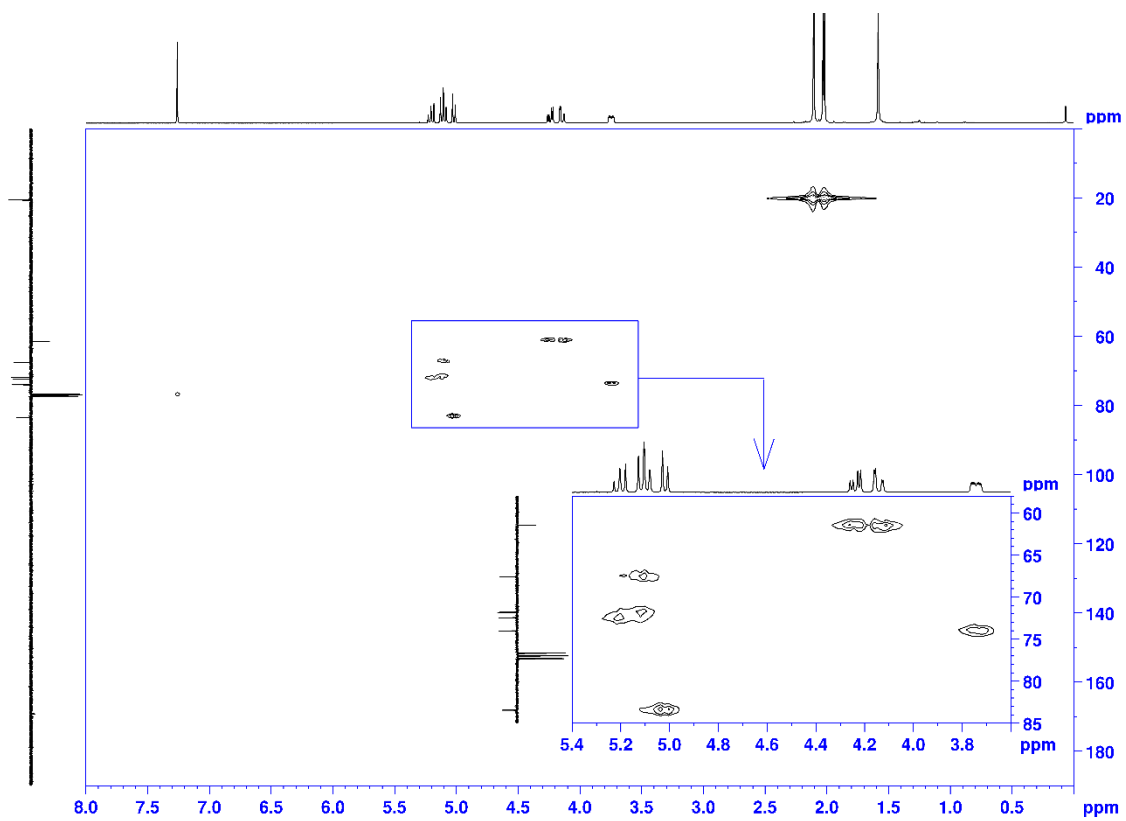


Figura 6.4: Espectro HSQC do composto 2, em $CDCl_3$.

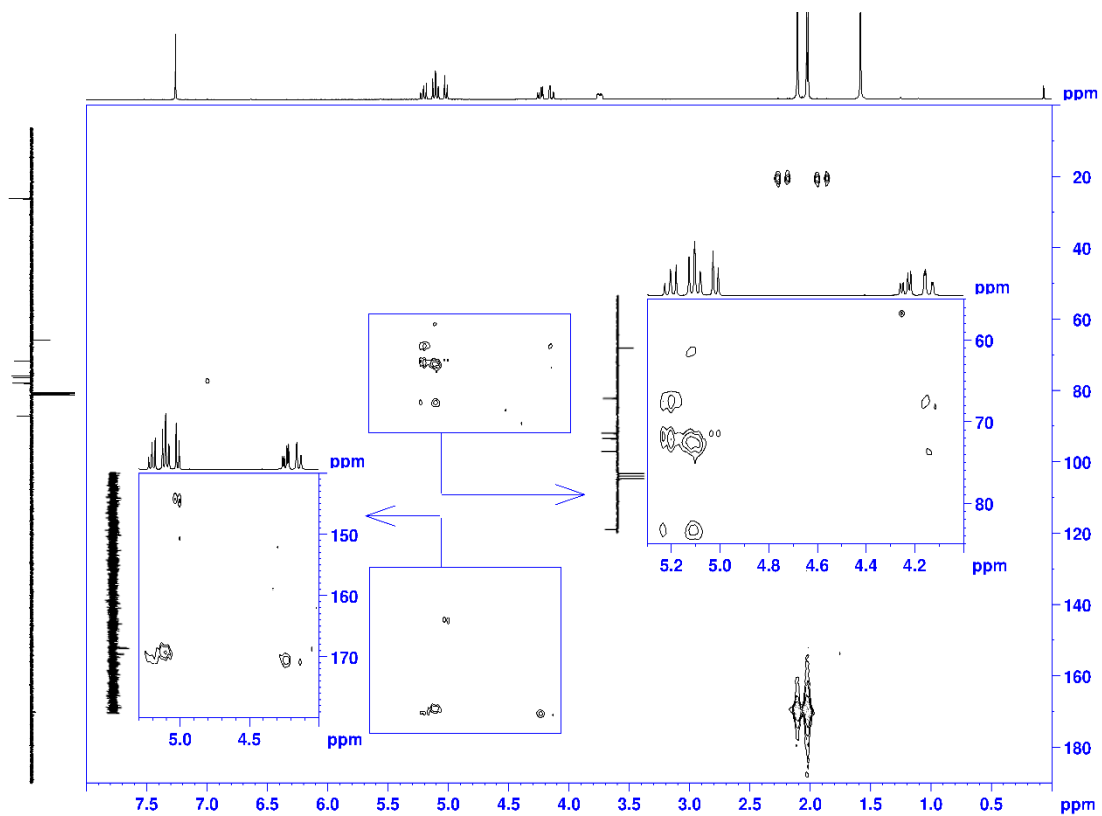


Figura 6.5: Espectro HMBC do composto 2, em $CDCl_3$.

6.2. Apêndice 2 - *N*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil) tiossemicarbazida (3.a)

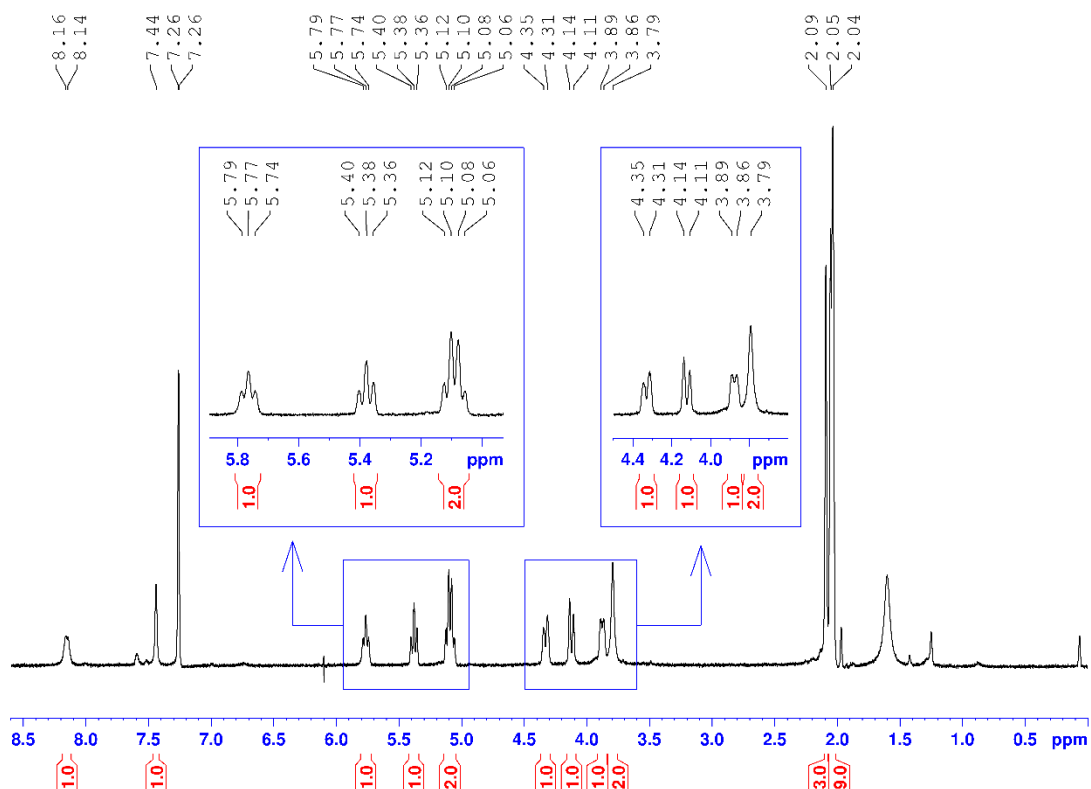


Figura 6.6: Espectro de RMN ^1H do composto 3.a, em CDCl_3 .

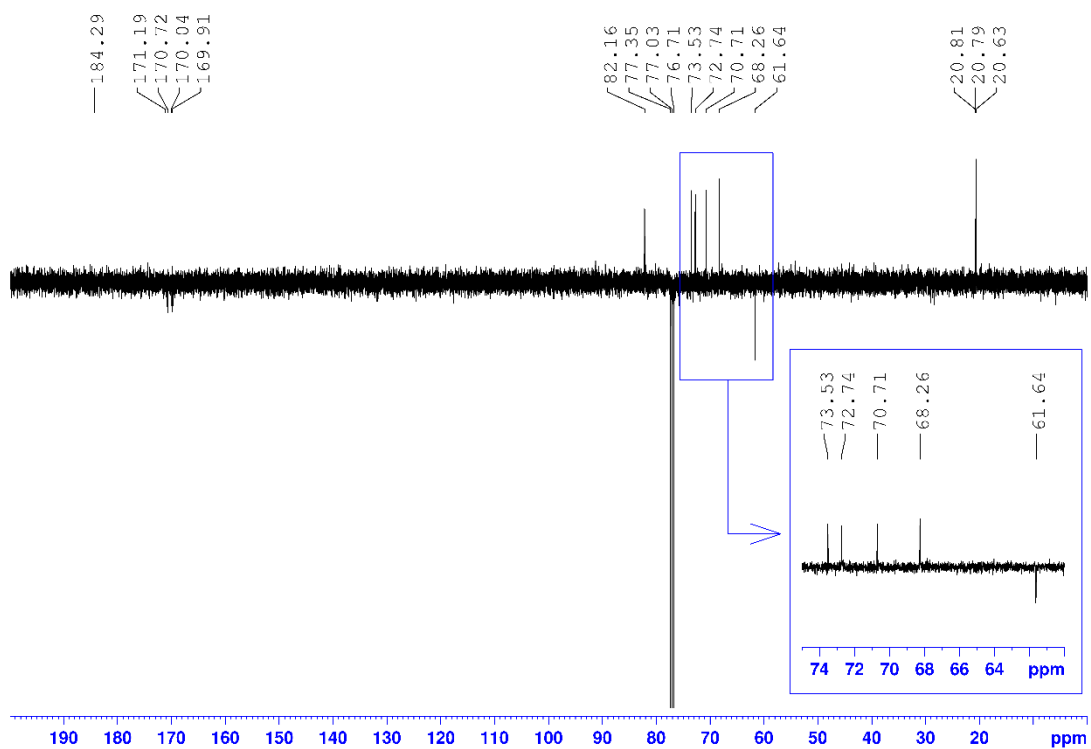


Figura 6.7: Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 3.a, em CDCl_3 .

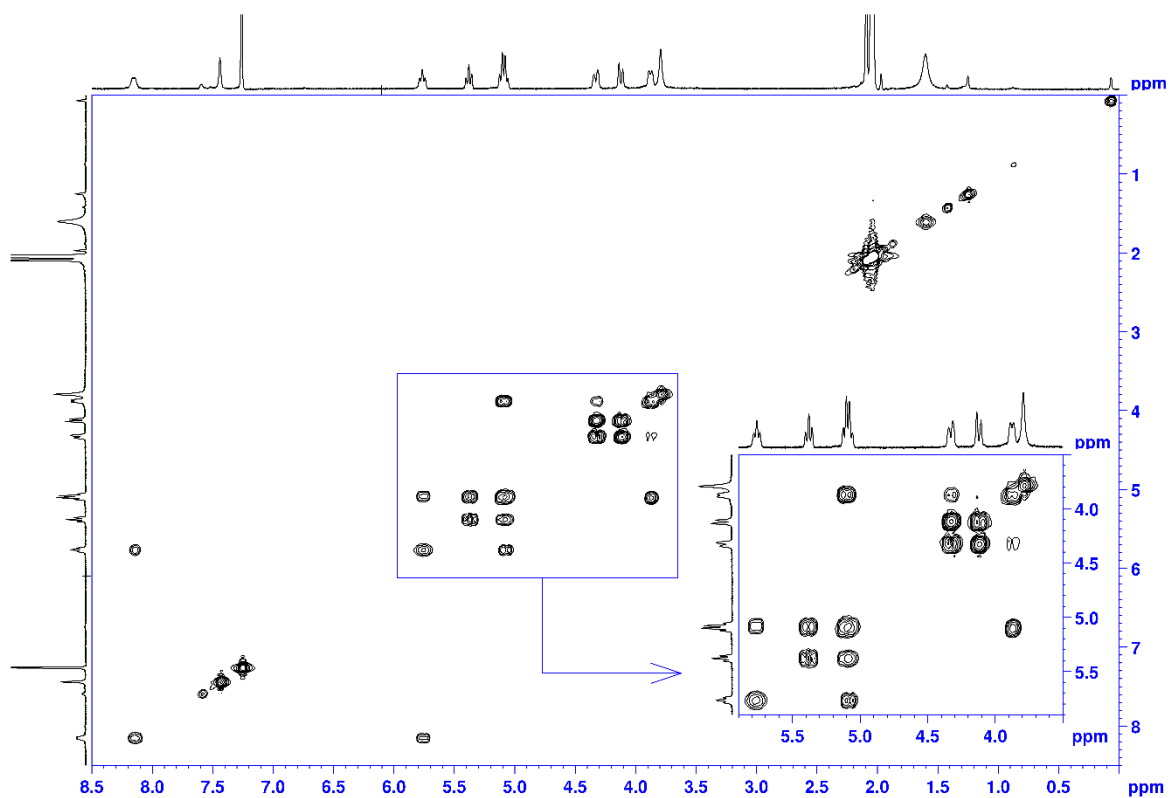


Figura 6.8: Espetro COSY do composto 3.a, em CDCl_3 .

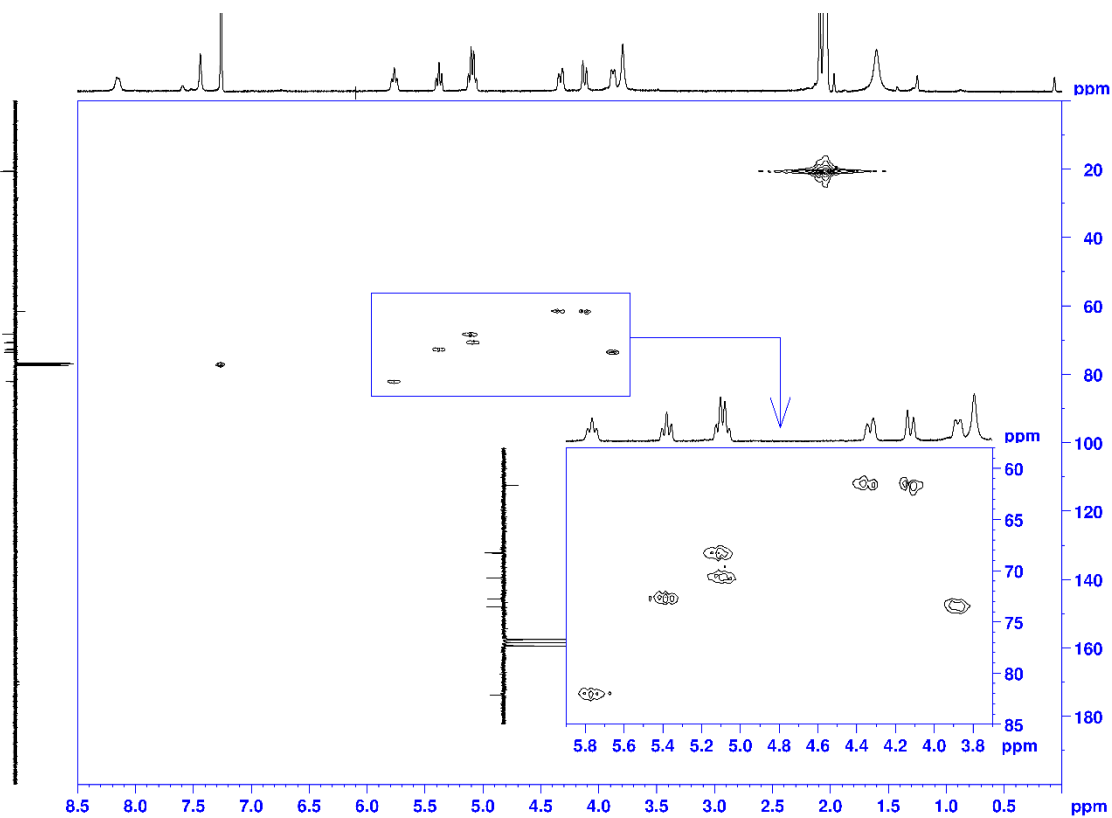


Figura 6.9: Espetro HSQC do composto 3.a, em CDCl_3 .

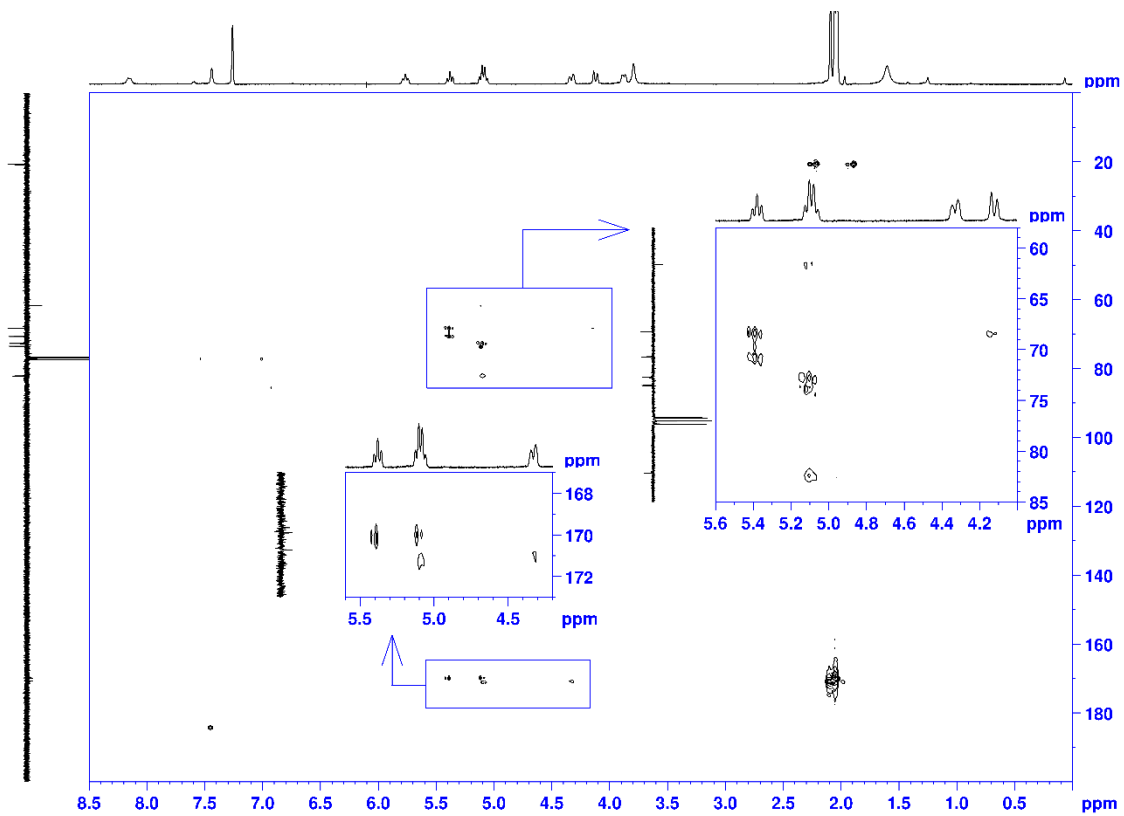


Figura 6.10: Espectro HMBC do composto 3.a, em CDCl₃.

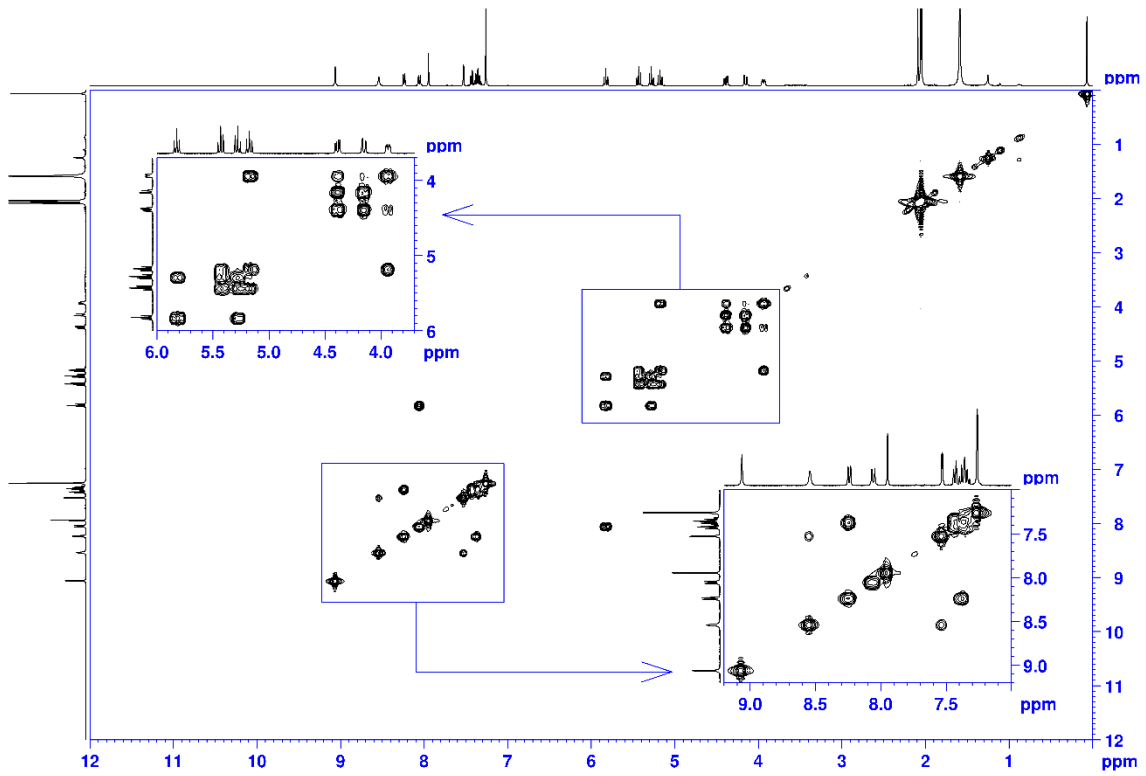


Figura 6.13: Espectro COSY do composto 4.a, em CDCl_3 .

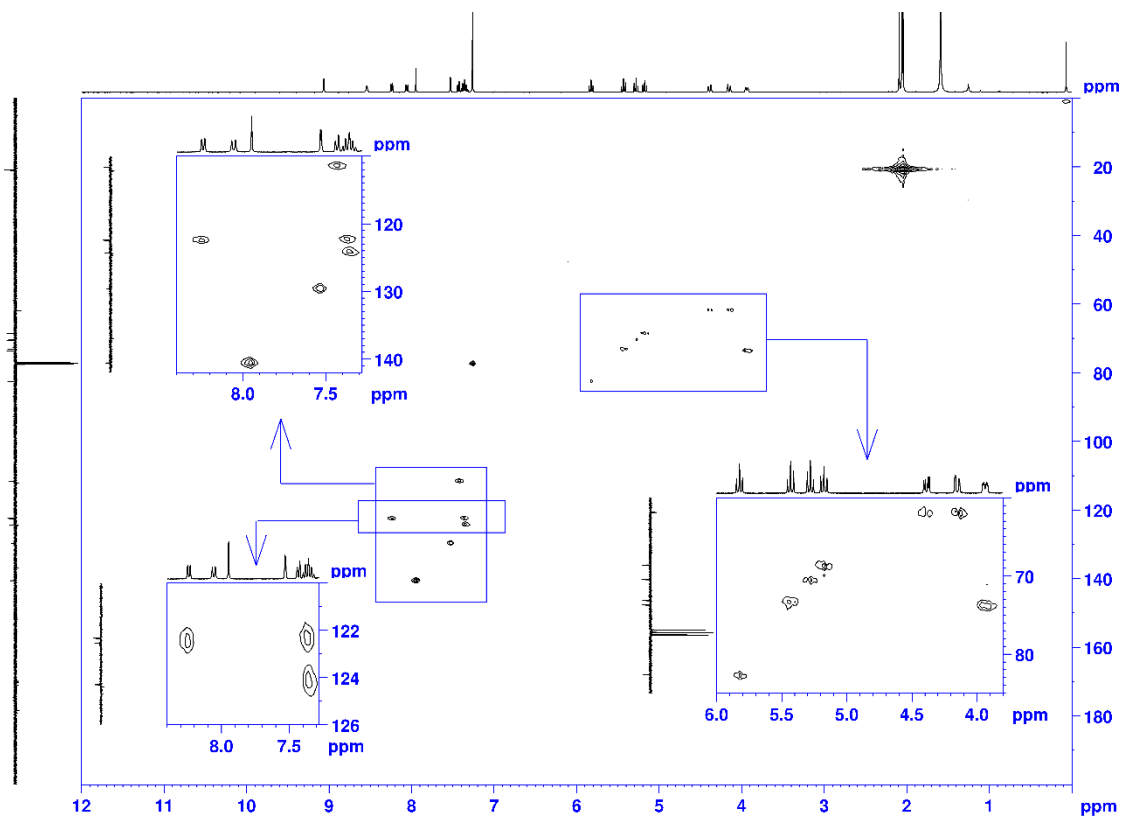


Figura 6.14: Espectro HSQC do composto 4.a, em CDCl_3 .

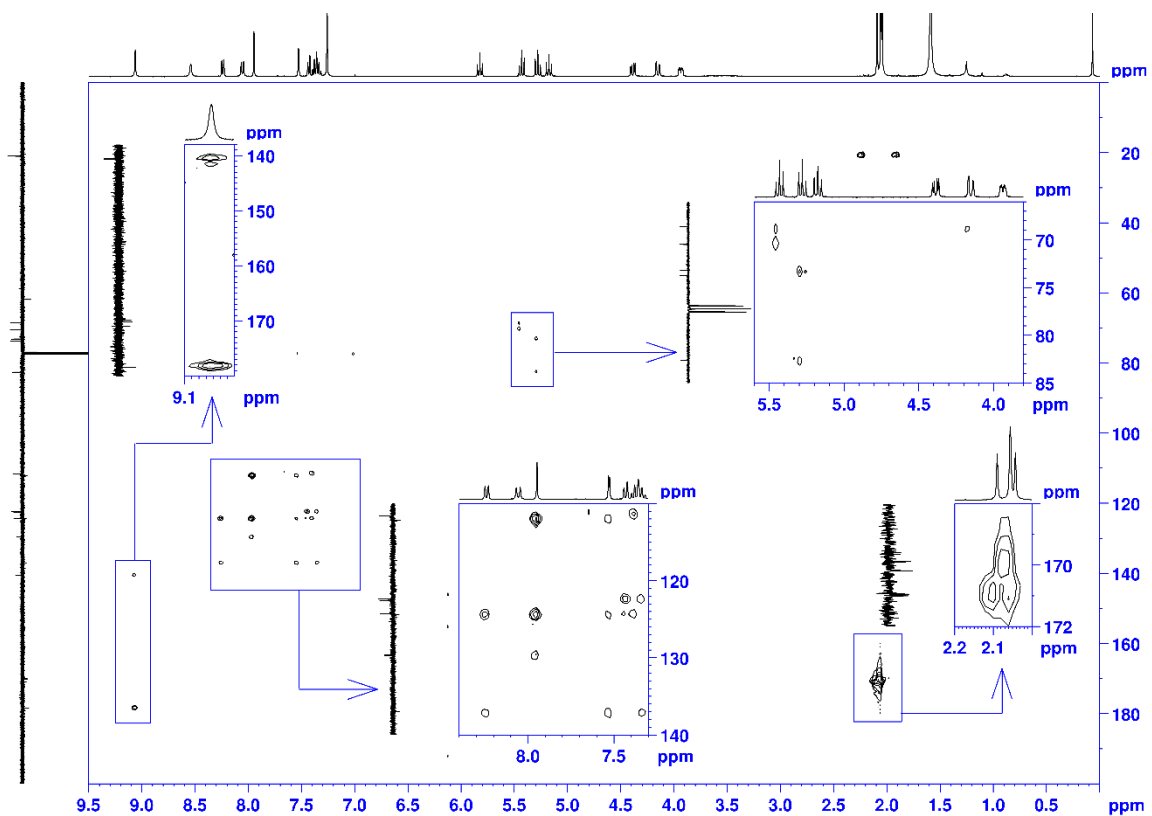


Figura 6.15: Espetro HMBC do composto 4.a, em CDCl_3 .

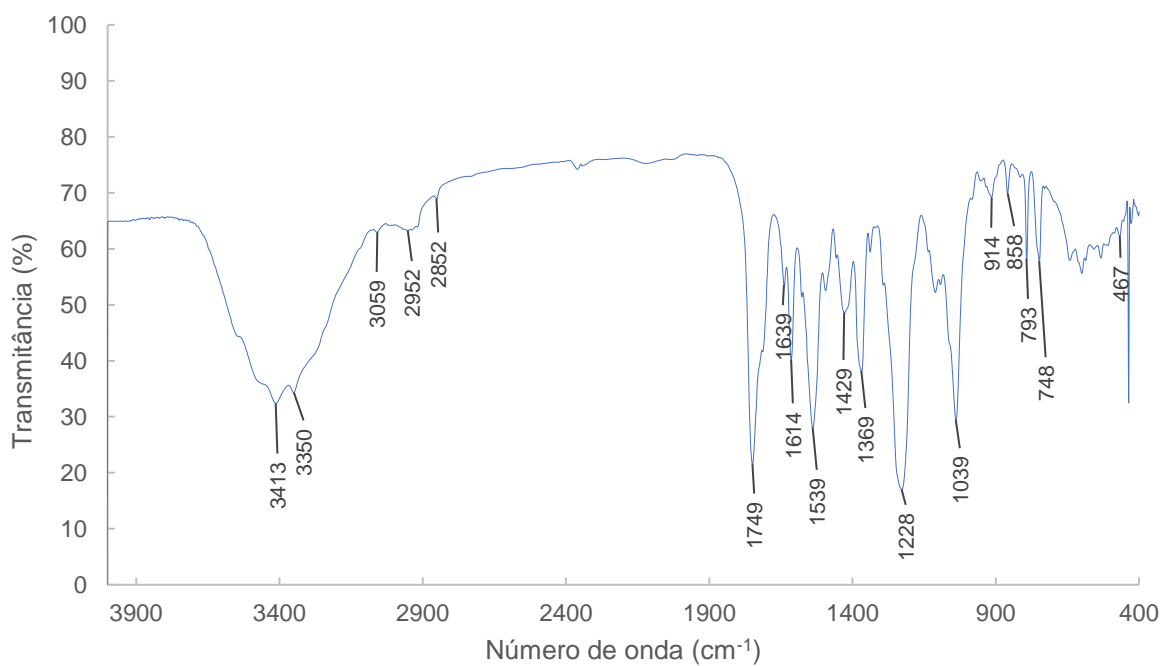


Figura 6.16: Espetro de IV do composto 4.a.

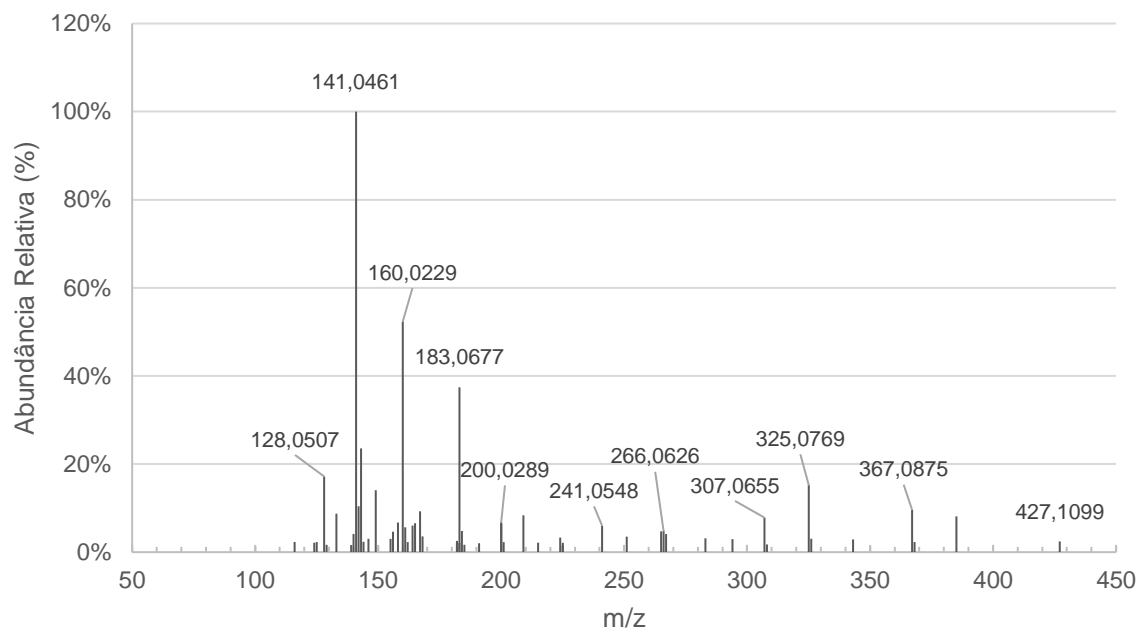


Figura 6.17: Espectro de HRMS do composto 4.a (principais fragmentos).

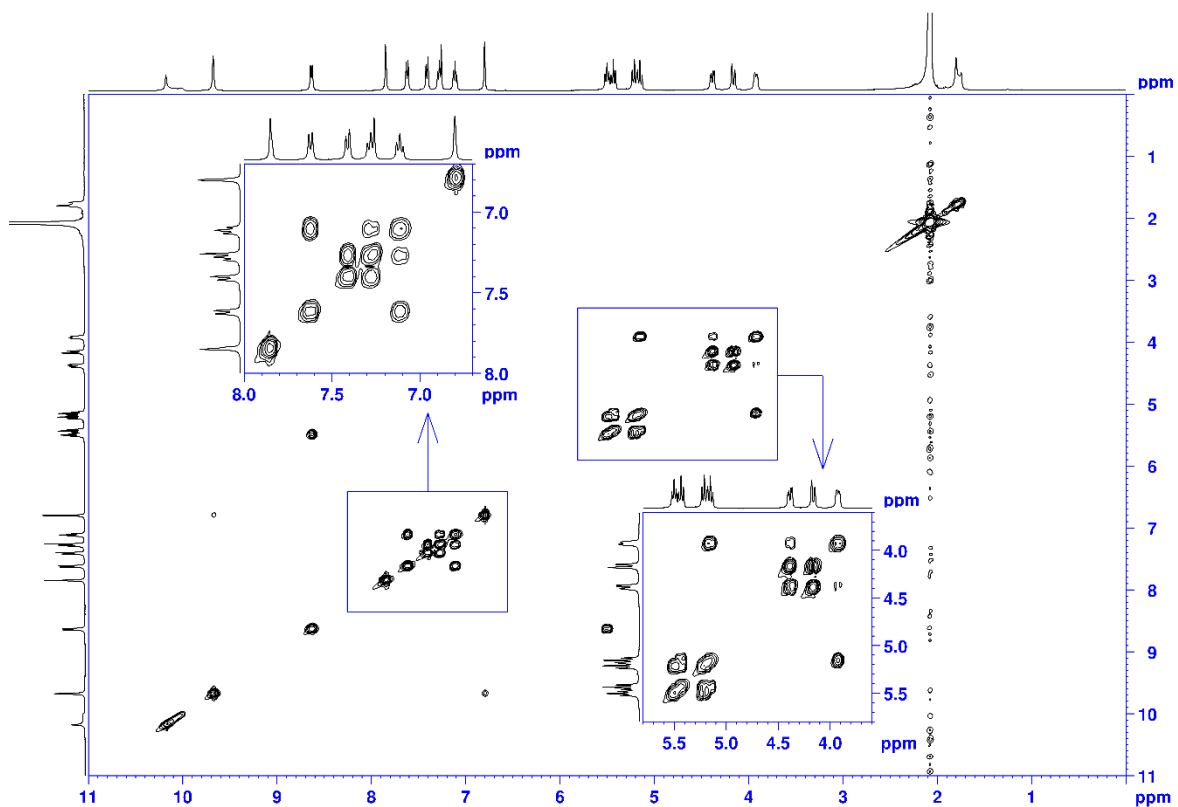


Figura 6.20: Espectro COSY do composto 4.b, em CDCl_3 .

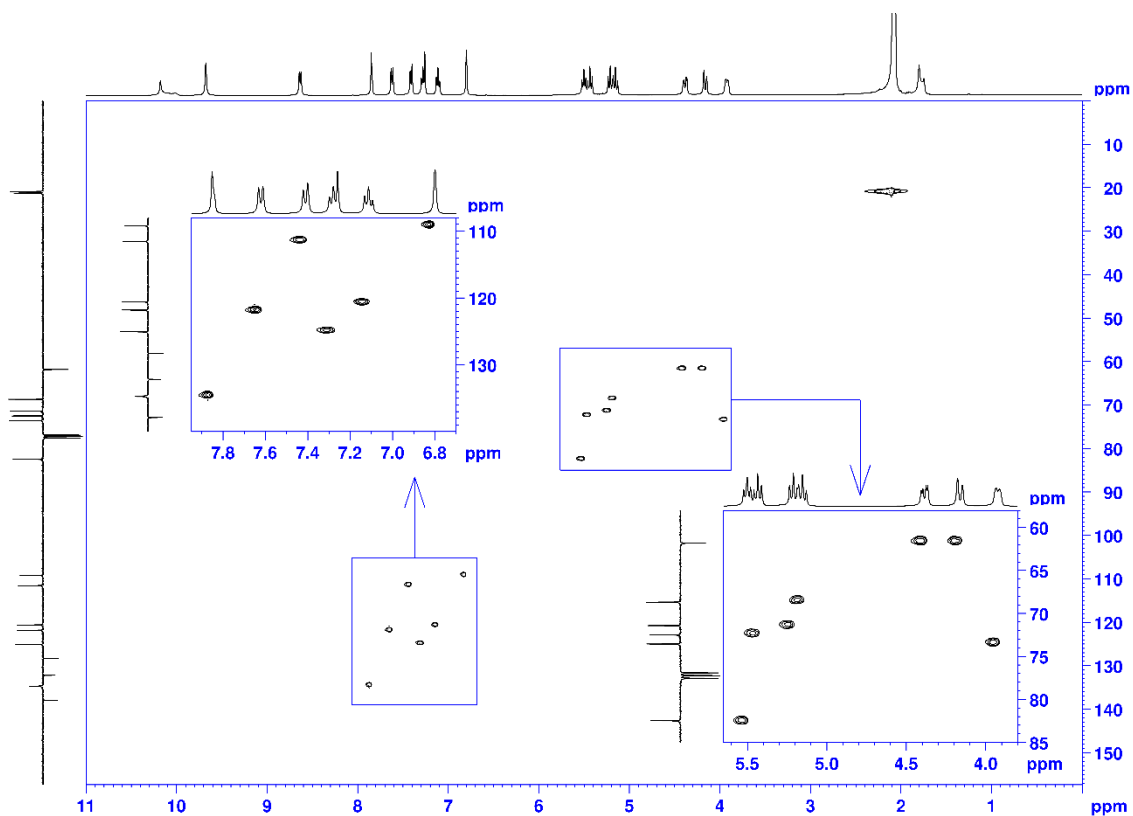


Figura 6.21: Espectro HSQC do composto 4.b, em CDCl_3 .

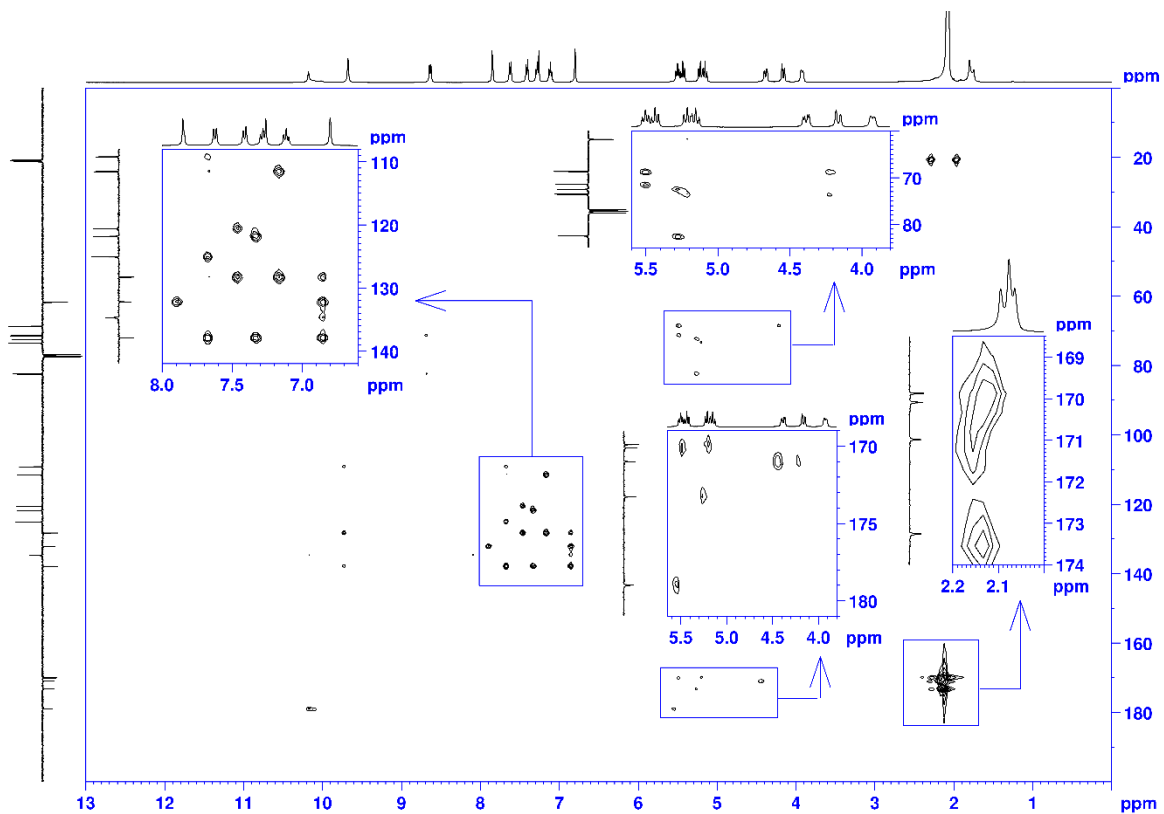


Figura 6.22: Espectro HMBC do composto 4.b, em $CDCl_3$.

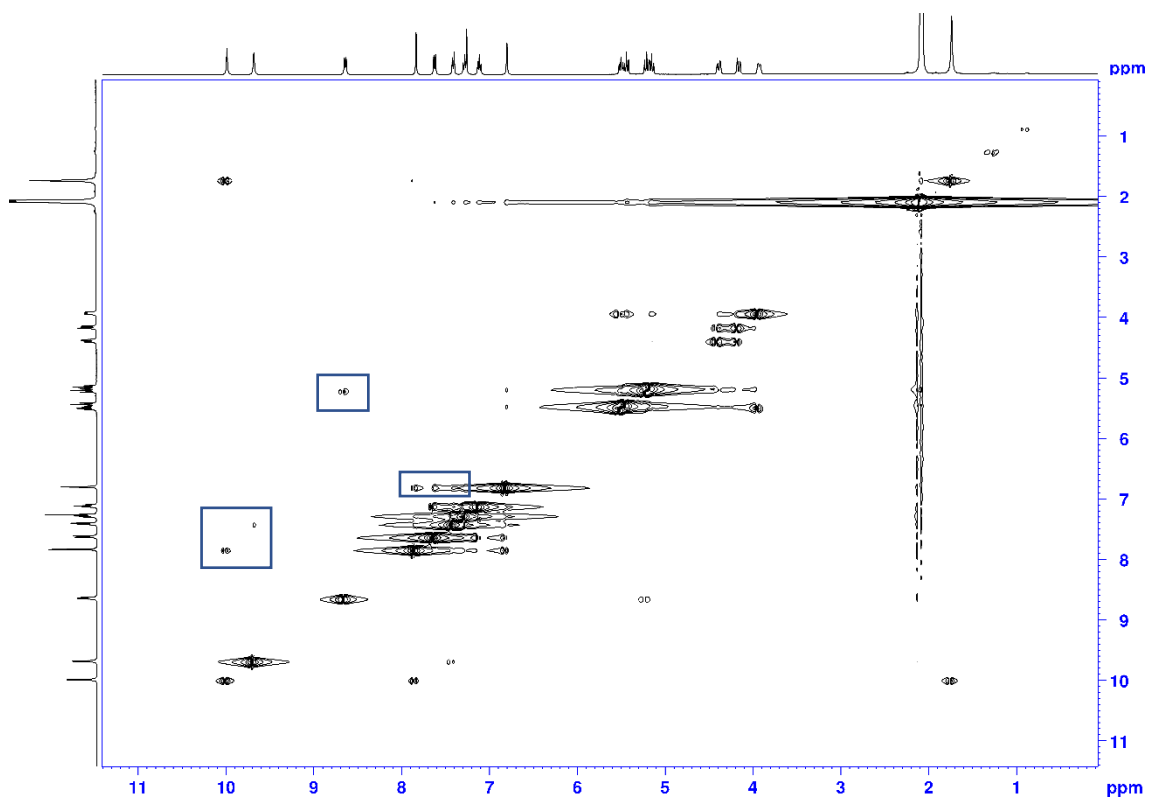


Figura 6.23: Espectro NOESY do composto 4.b, em $CDCl_3$ (principais correlações).

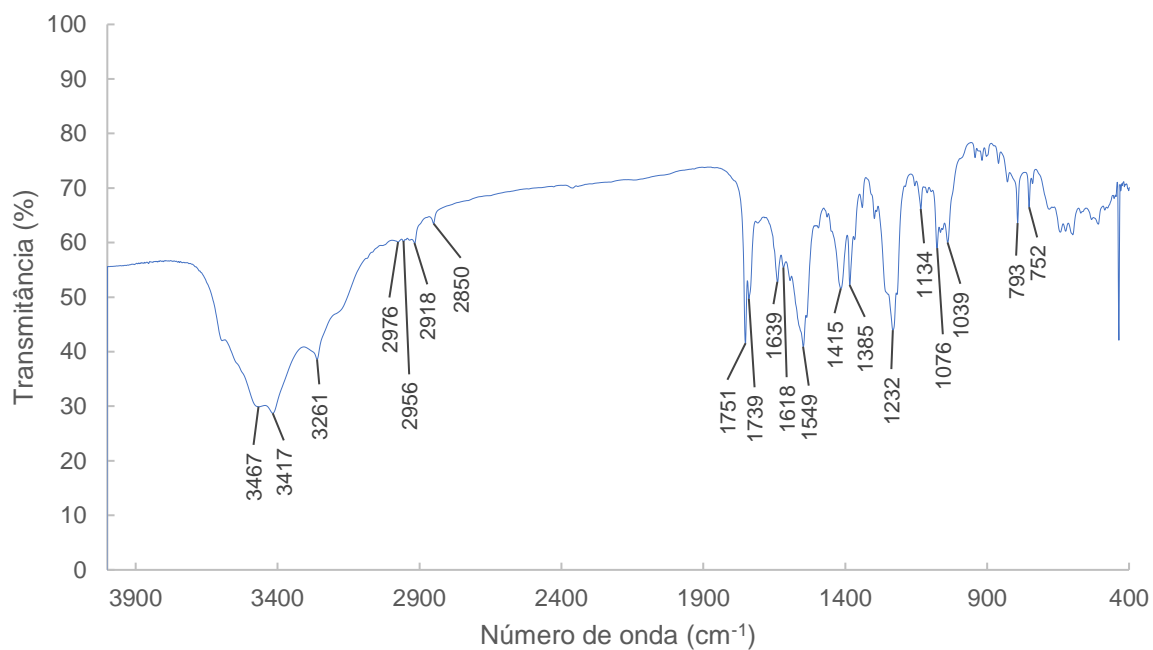


Figura 6.24: Espectro de IV do composto 4.b.

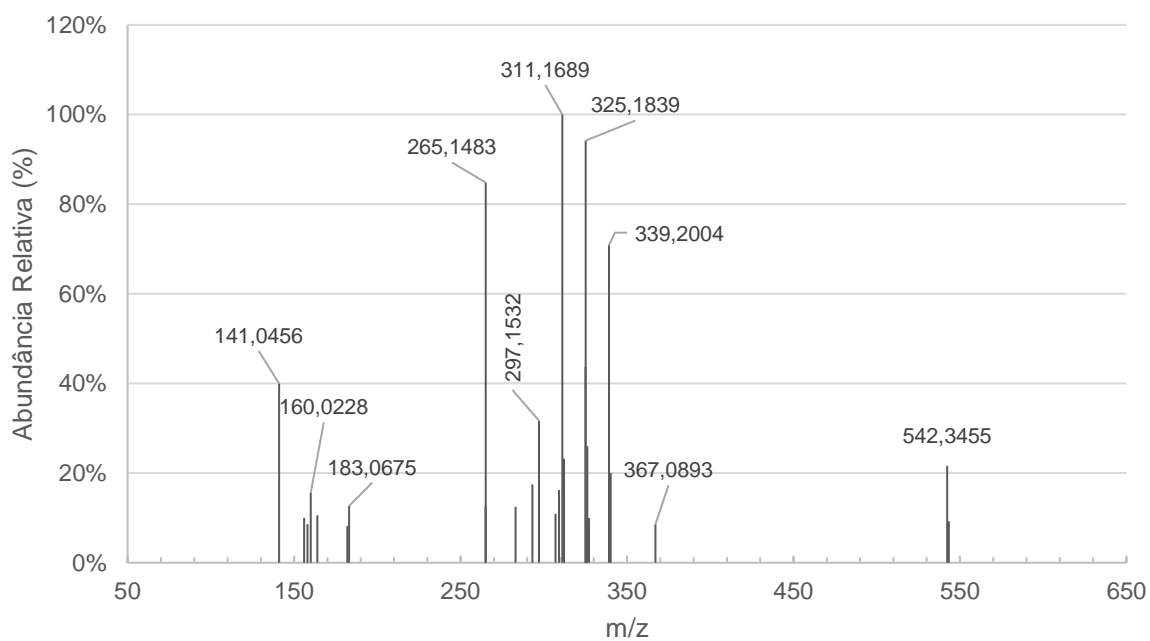


Figura 6.25: Espectro de HRMS do composto 4.b (principais fragmentos).

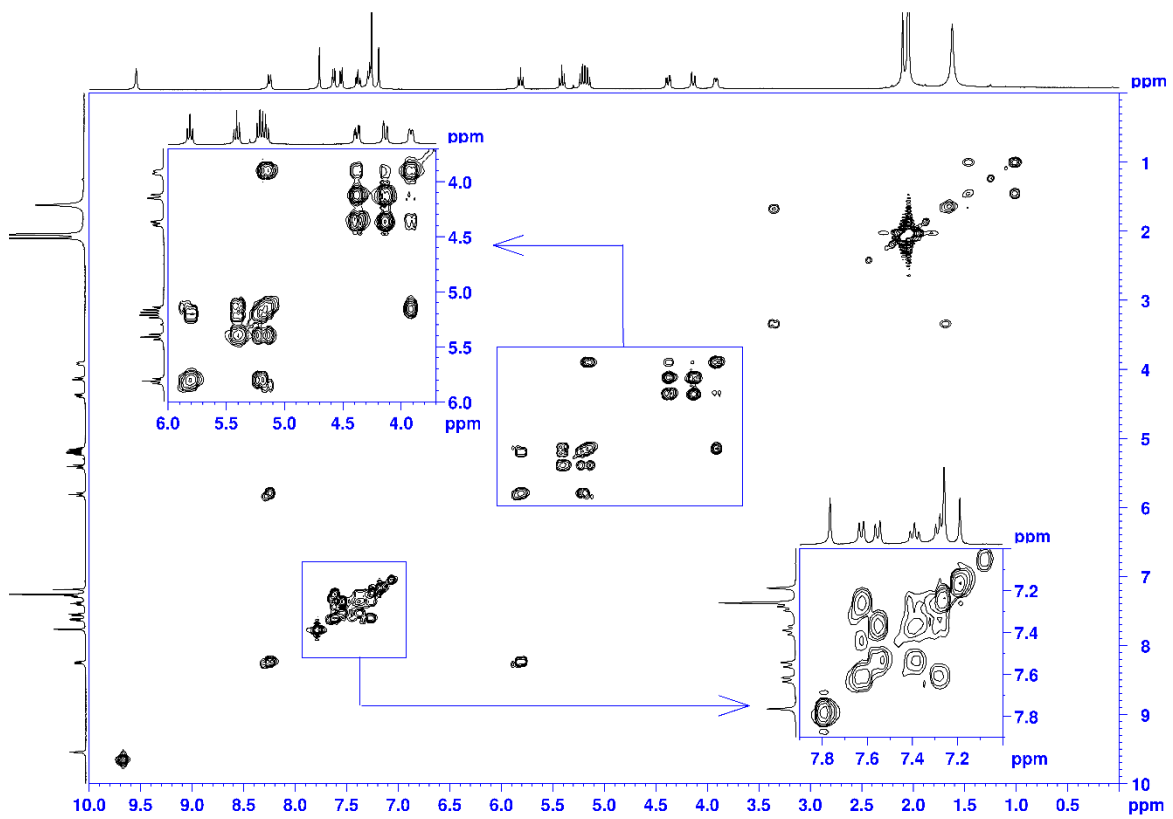


Figura 6.28: Espectro COSY do composto 4.c, em $CDCl_3$.

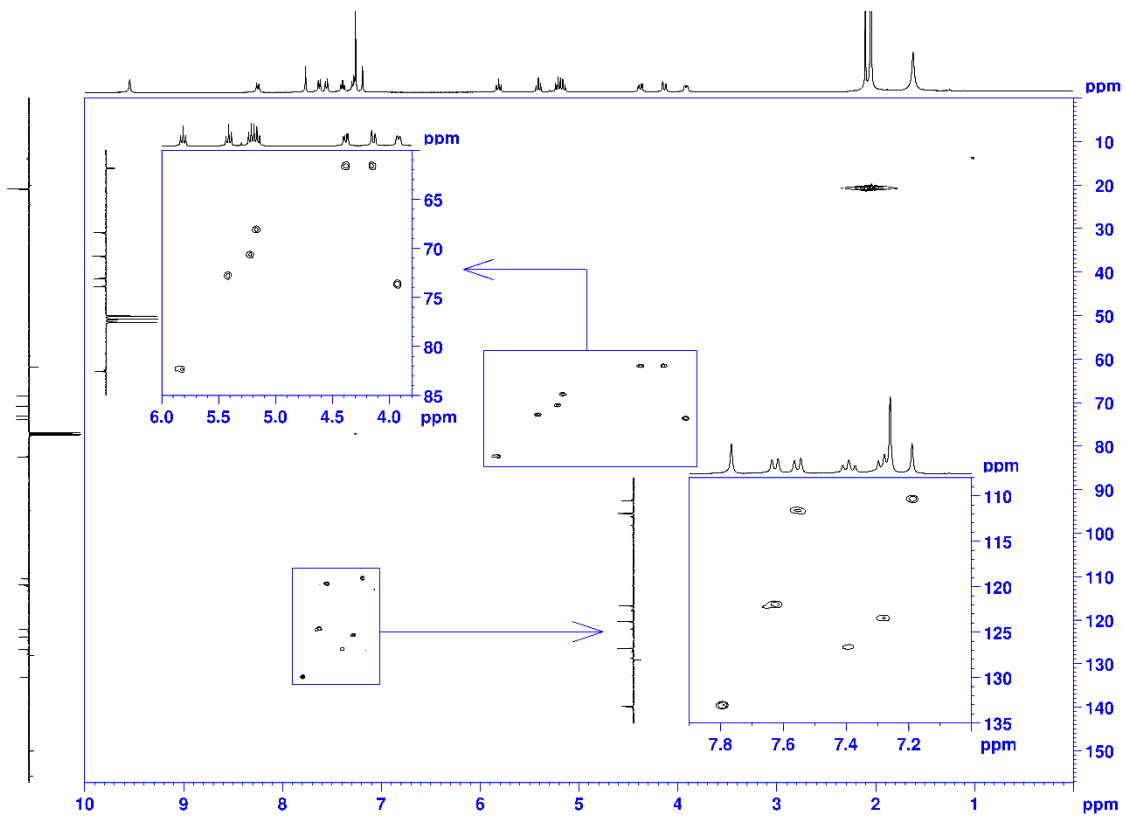


Figura 6.29: Espectro HSQC do composto 4.c, em $CDCl_3$.

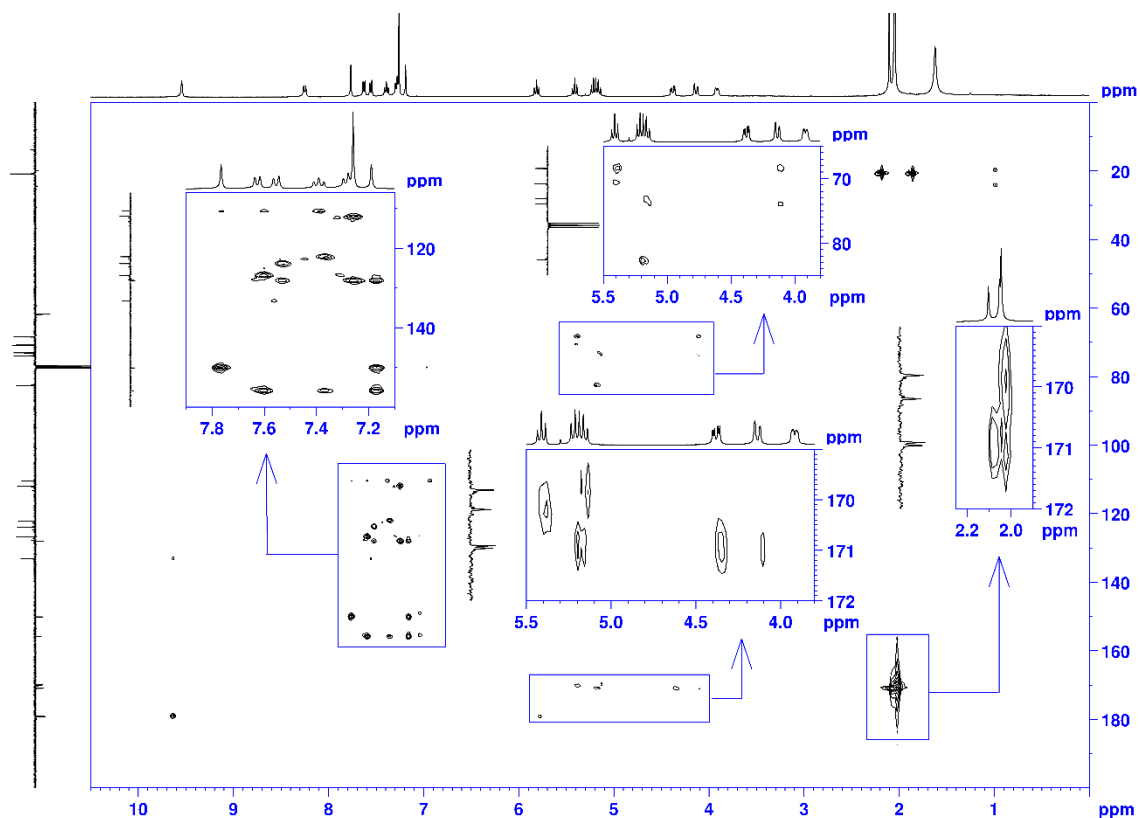


Figura 6.30: Espectro HMBC do composto 4.c, em CDCl_3 .

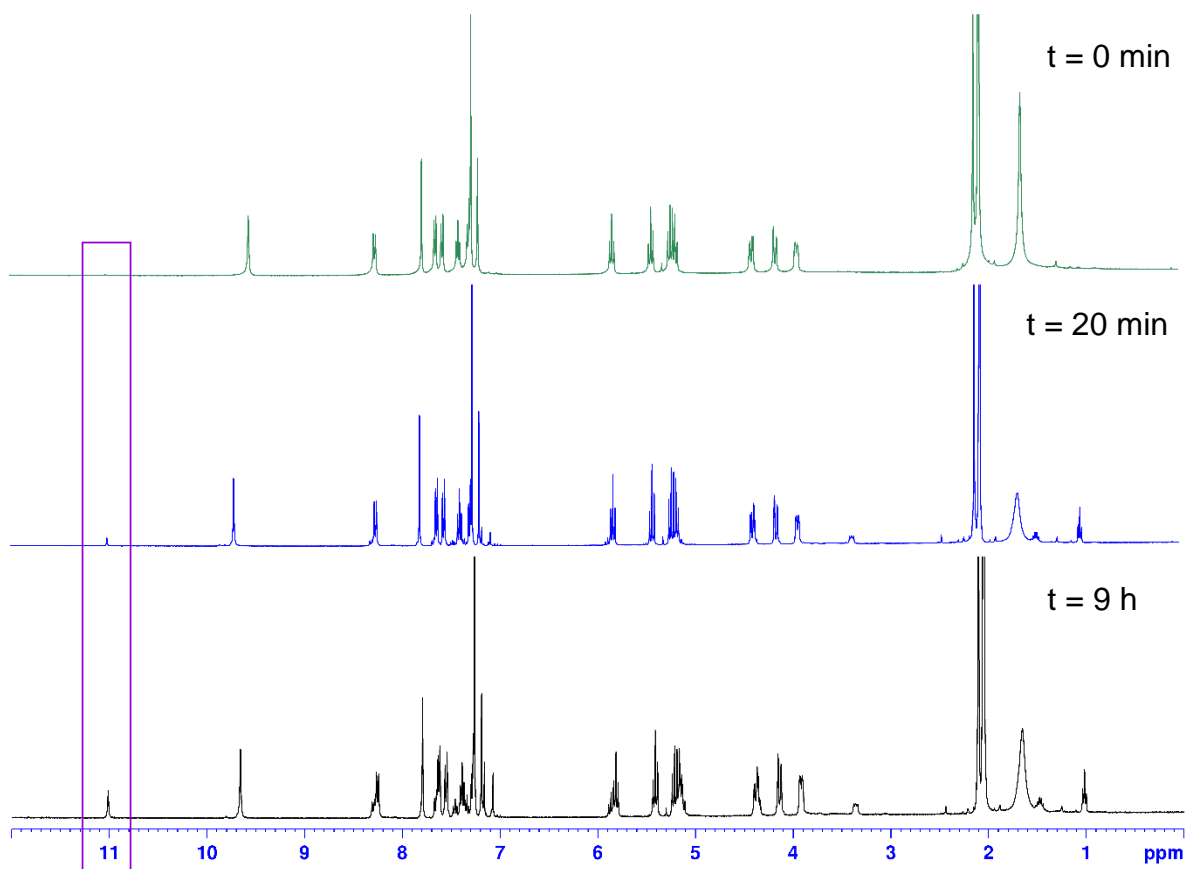


Figura 6.31: Sobreposição dos espectros de RMN ^1H do composto 4.c, em CDCl_3 , efetuados aos $t = 0$ e 20 min e $t = 9$ h.

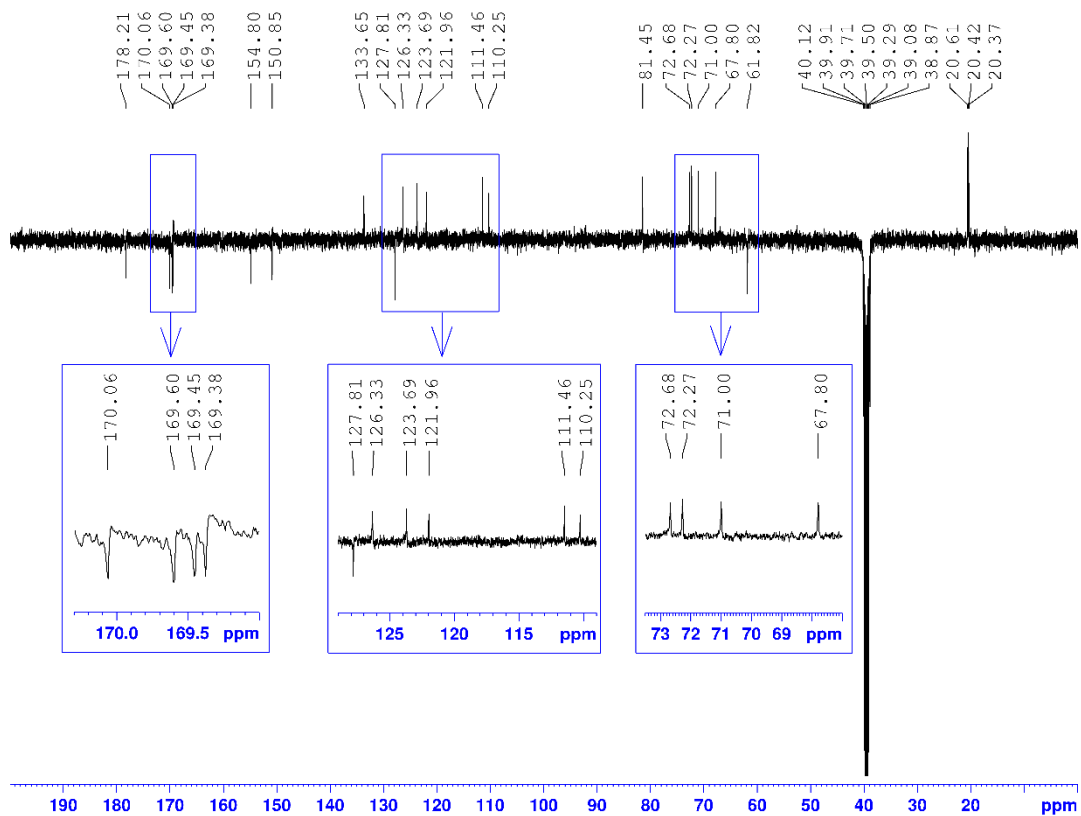


Figura 6.34: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.c, em DMSO-d_6 .

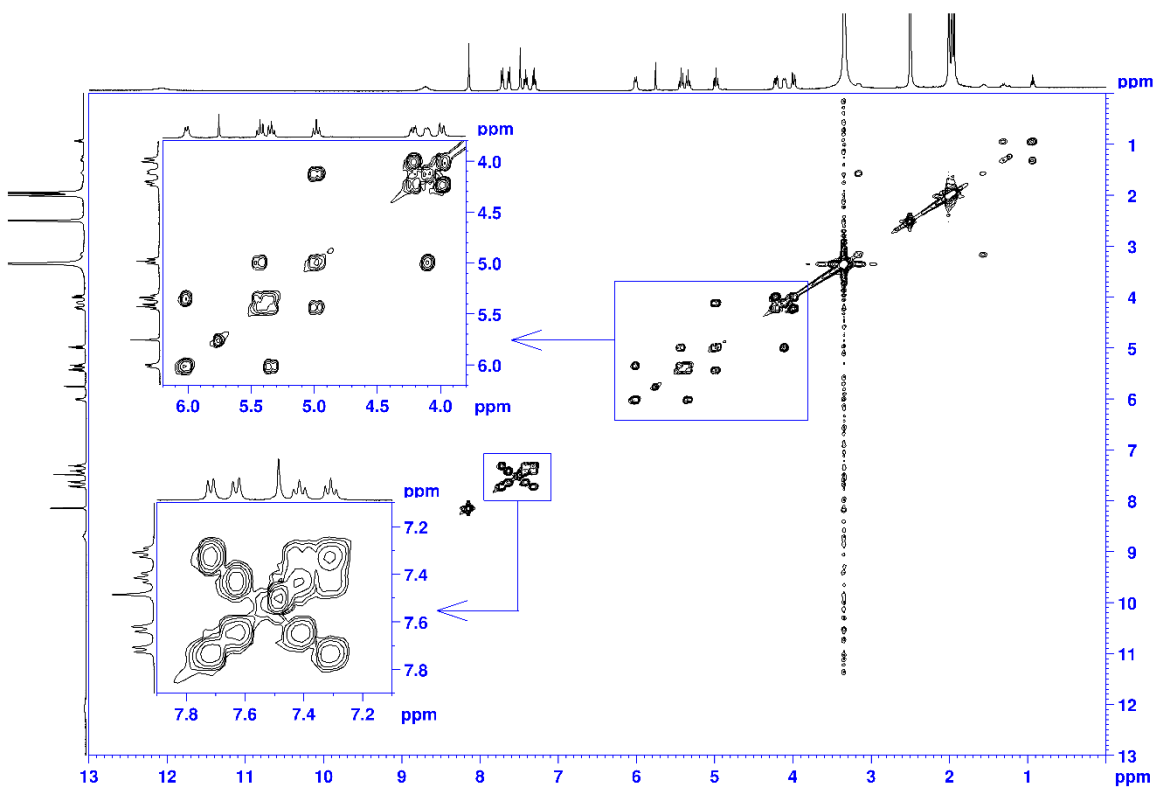


Figura 6.35: Espetro COSY do composto 4.c, em DMSO-d_6 .

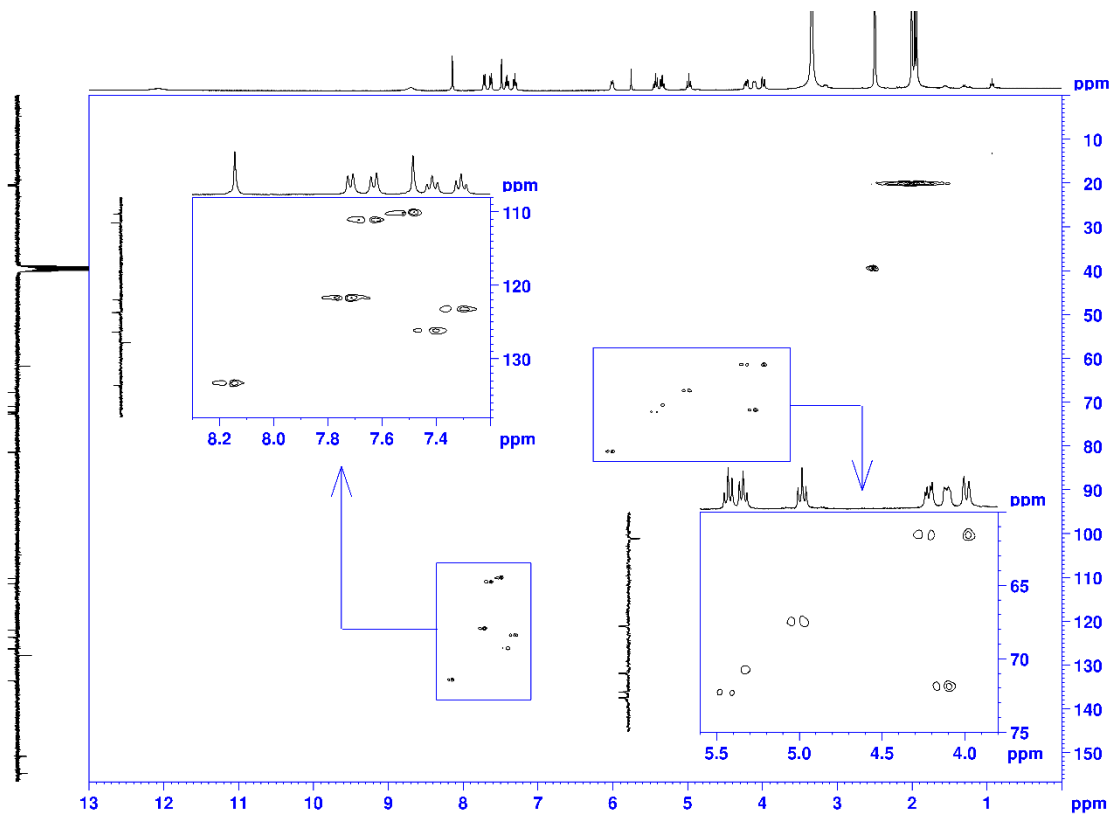


Figura 6.36: Espectro HSQC do composto 4.c, em DMSO-*d*₆.

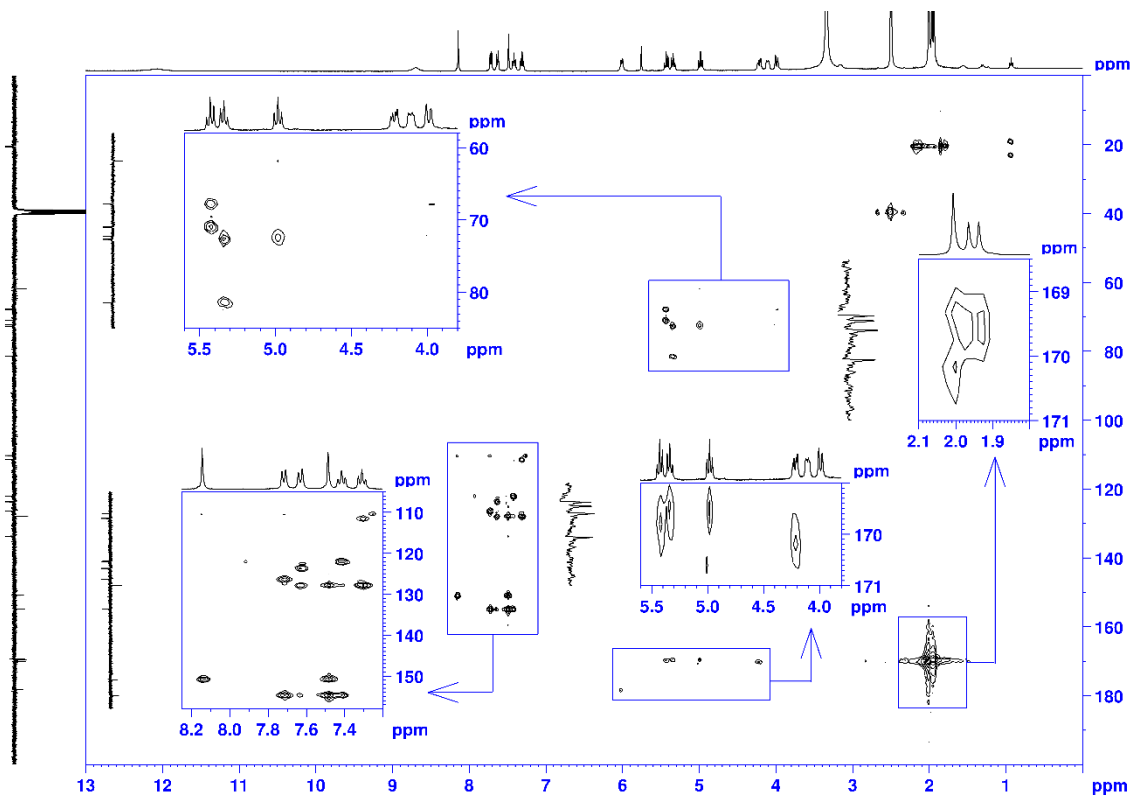


Figura 6.37: Espectro HMBC do composto 4.c, em DMSO-*d*₆.

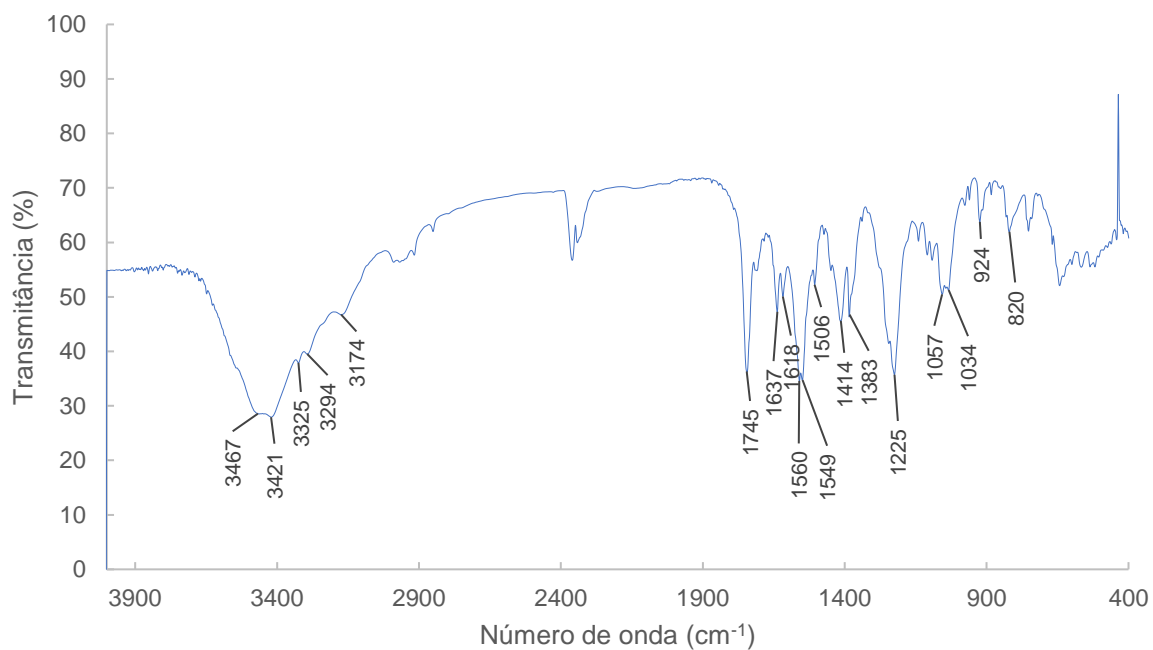


Figura 6.38: Espectro de IV do composto 4.c.

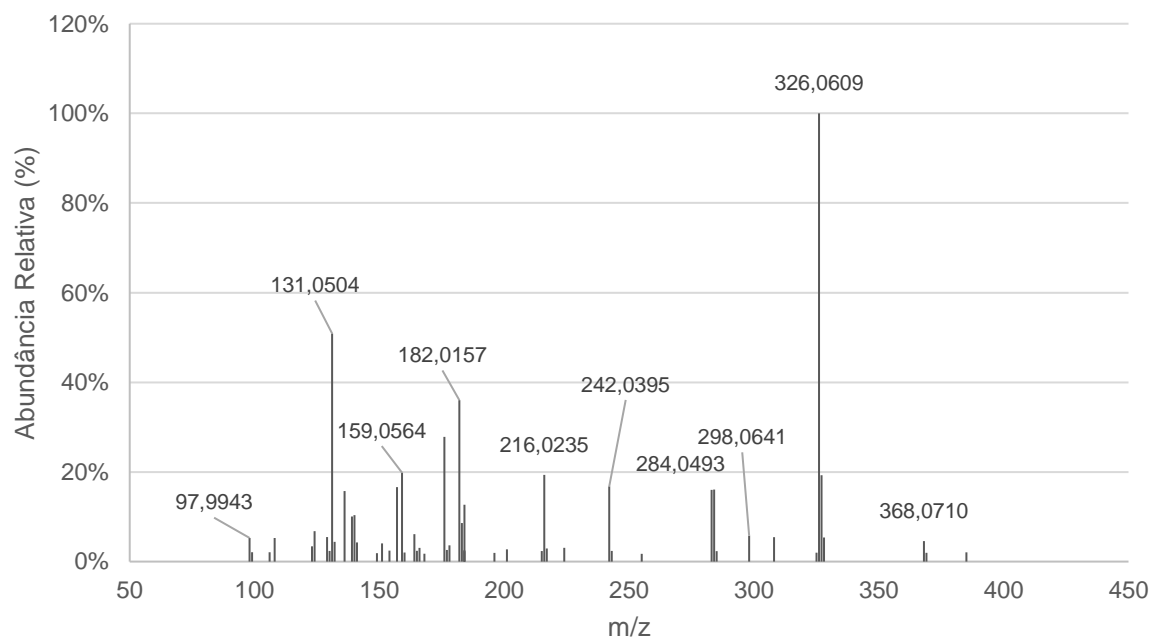


Figura 6.39: Espectro de HRMS do composto 4.c (principais fragmentos).

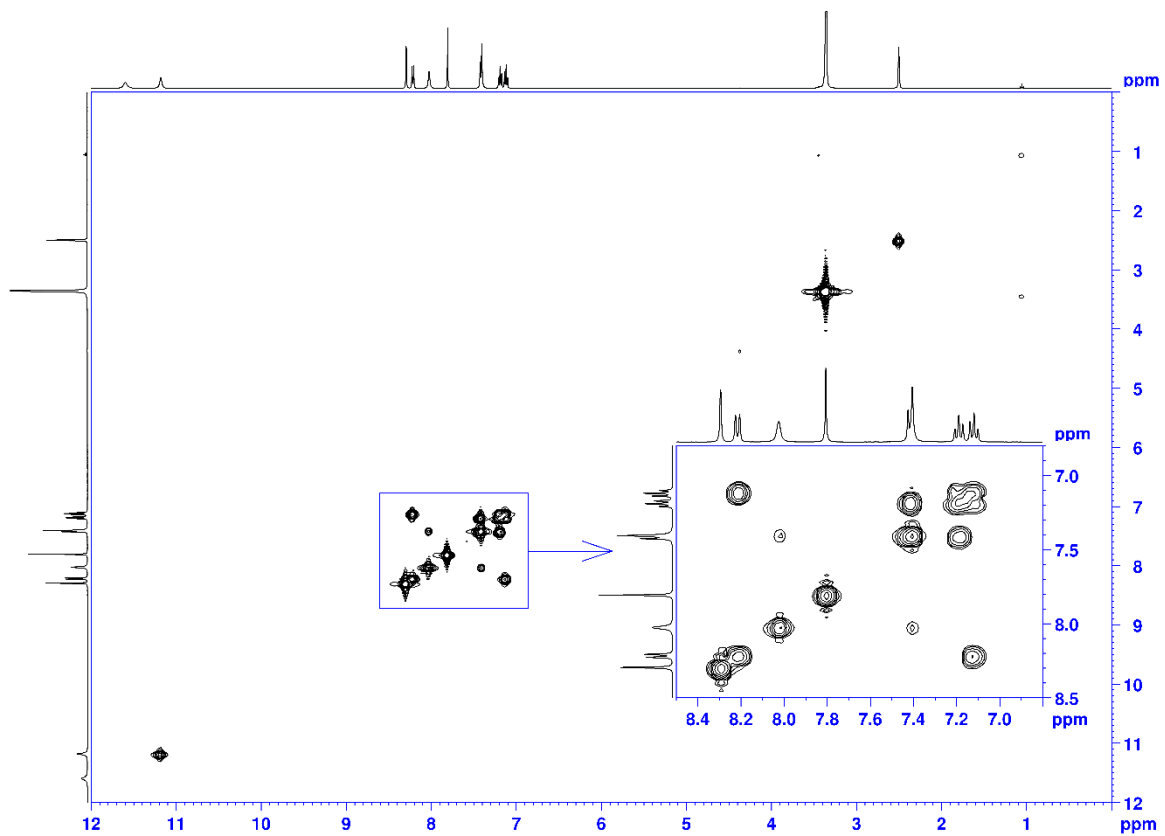


Figura 6.42: Espectro COSY do composto 4.f, em DMSO- d_6 .

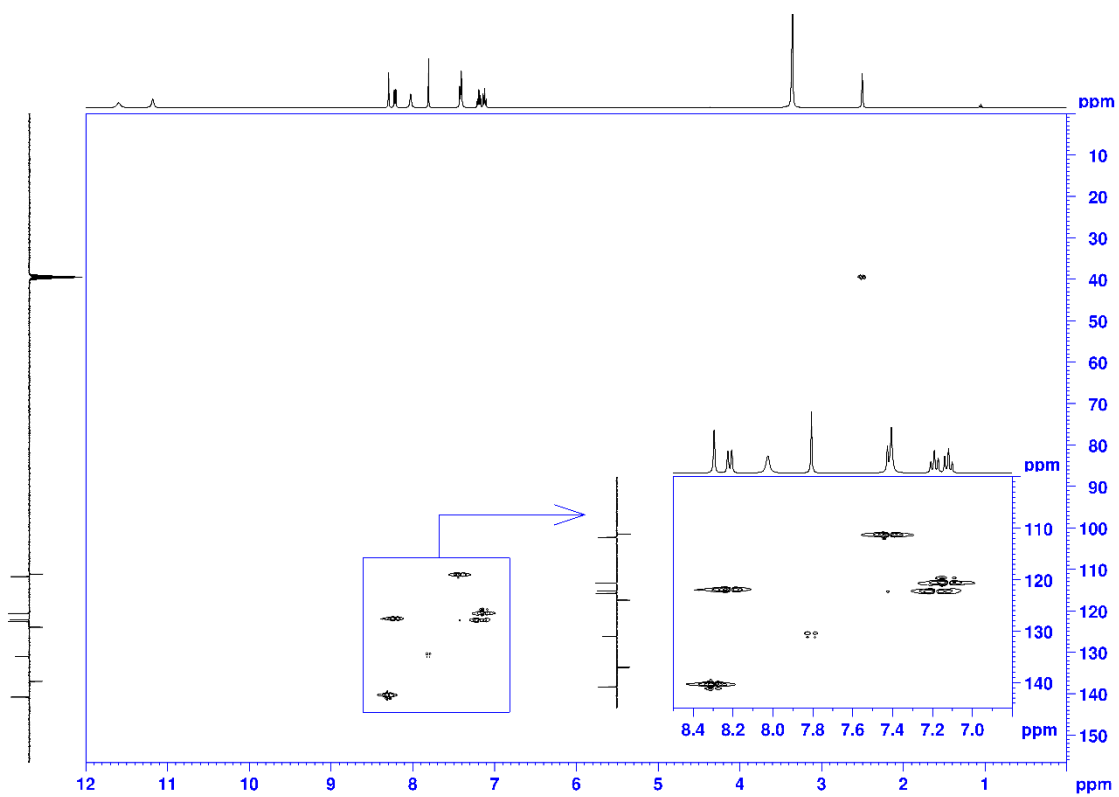


Figura 6.43: Espectro HSQC do composto 4.f, em DMSO- d_6 .

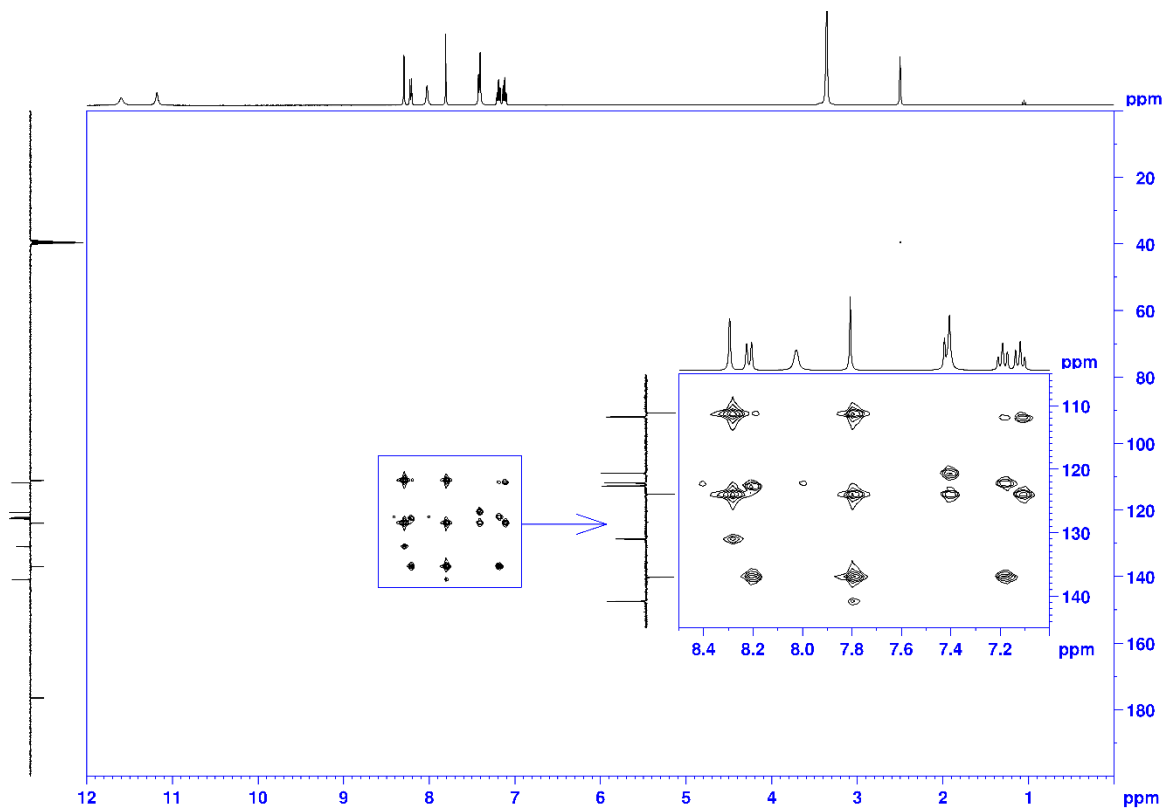


Figura 6.44: Espectro HMBC do composto 4.f, em DMSO-d_6 .

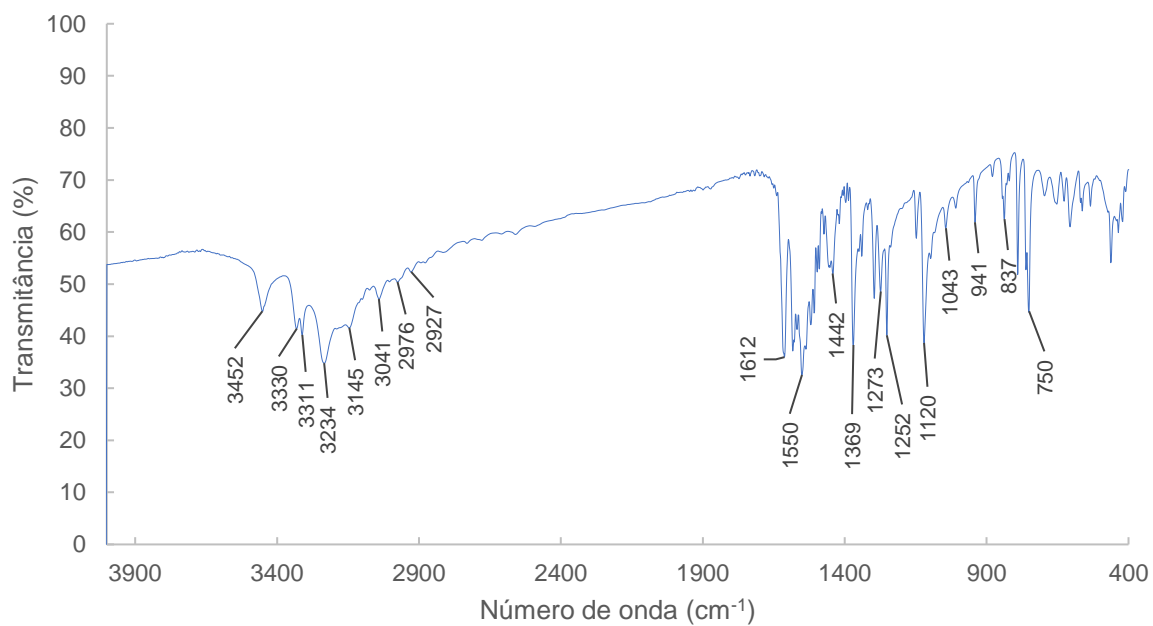


Figura 6.45: Espectro de IV do composto 4.f.

6.7. Apêndice 7 - (E)-2-((1-metil-1H-indole-3-il)metileno)hidrazinacarbotoiameda (4.g)

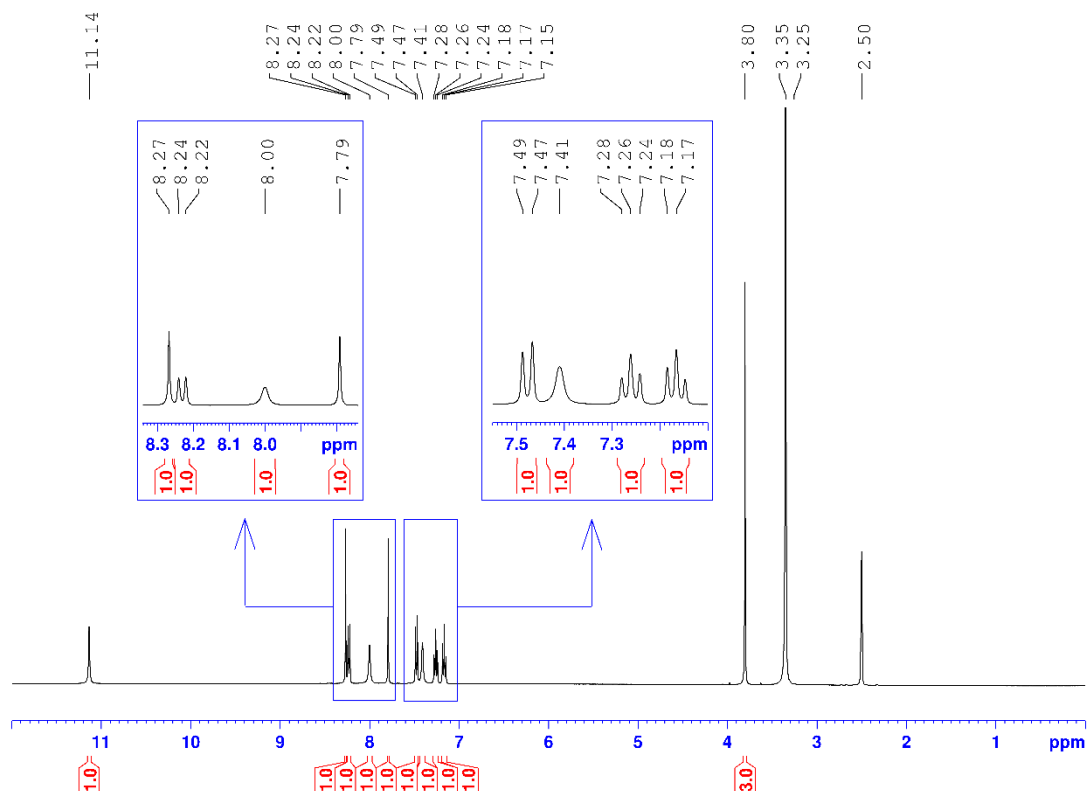


Figura 6.46: Espetro de RMN ^1H do composto 4.g, em DMSO-d_6 .

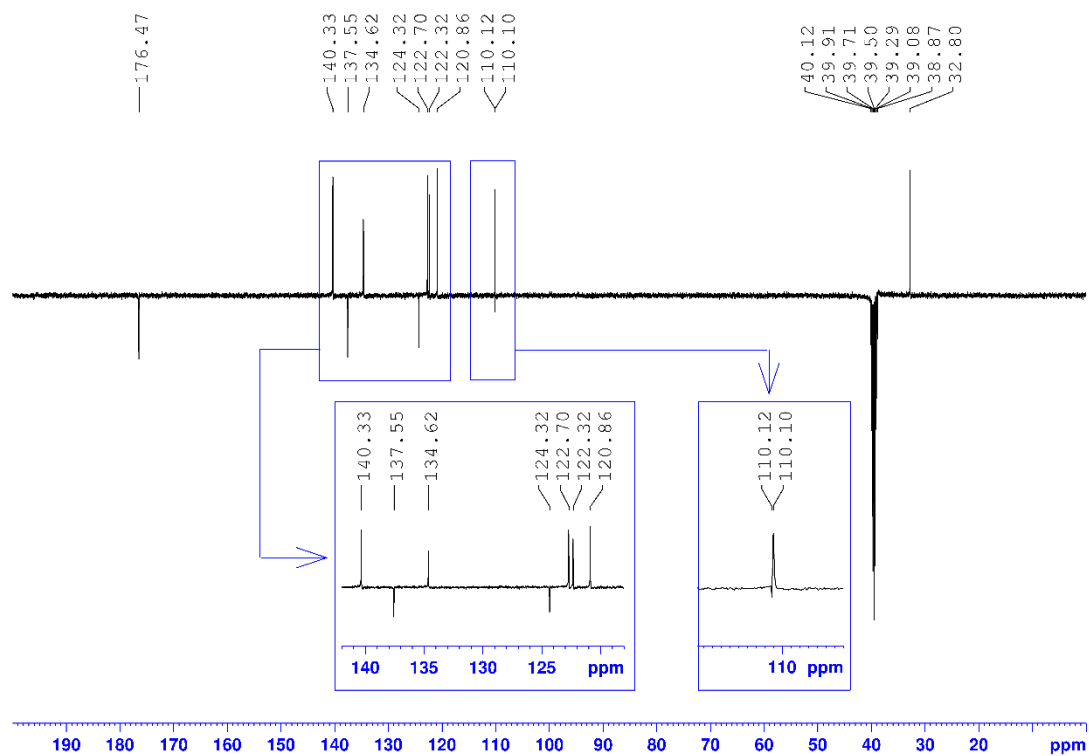


Figura 6.47: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.g, em DMSO-d_6 .

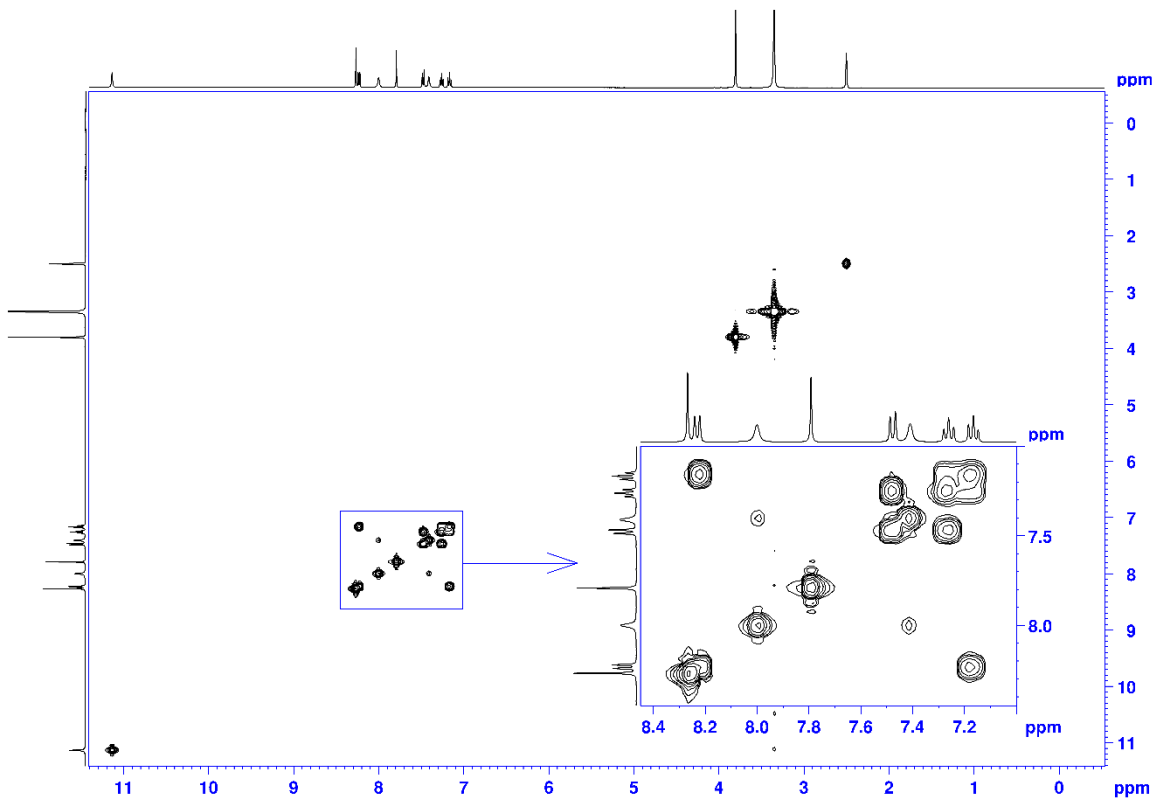


Figura 6.48: Espectro COSY do composto 4.g, em DMSO- d_6 .

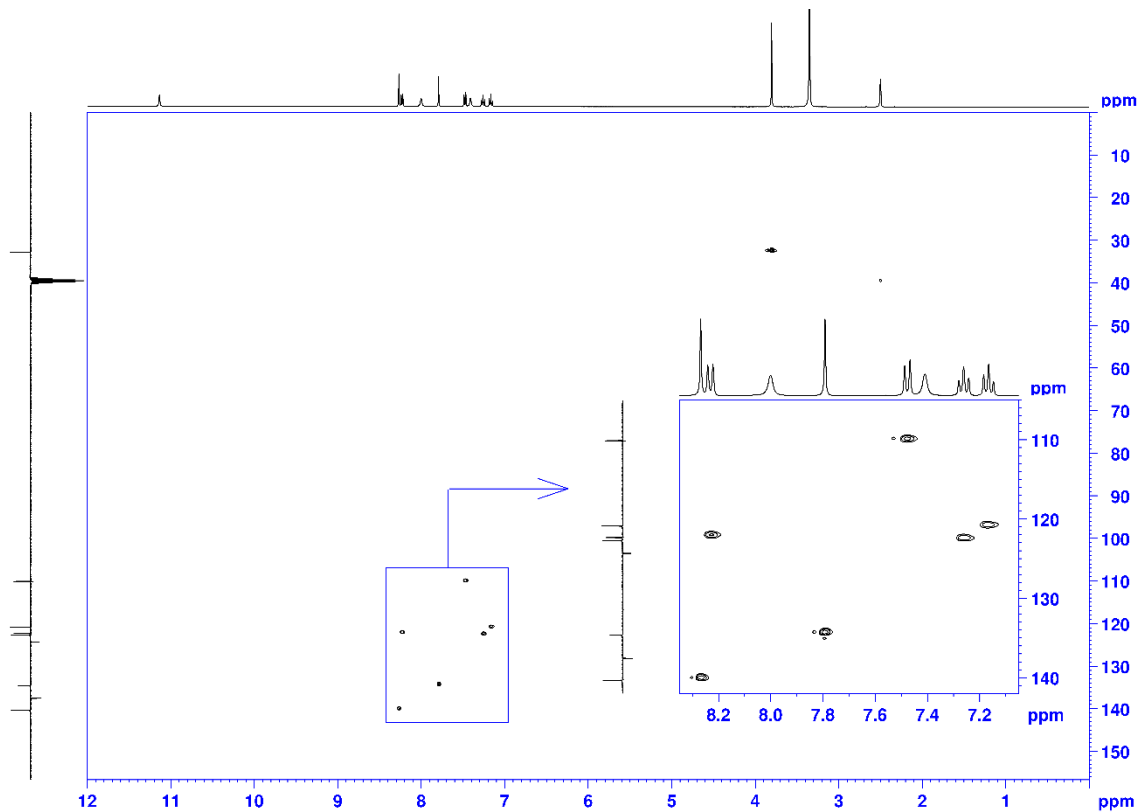


Figura 6.49: Espectro HSQC do composto 4.g, em DMSO- d_6 .

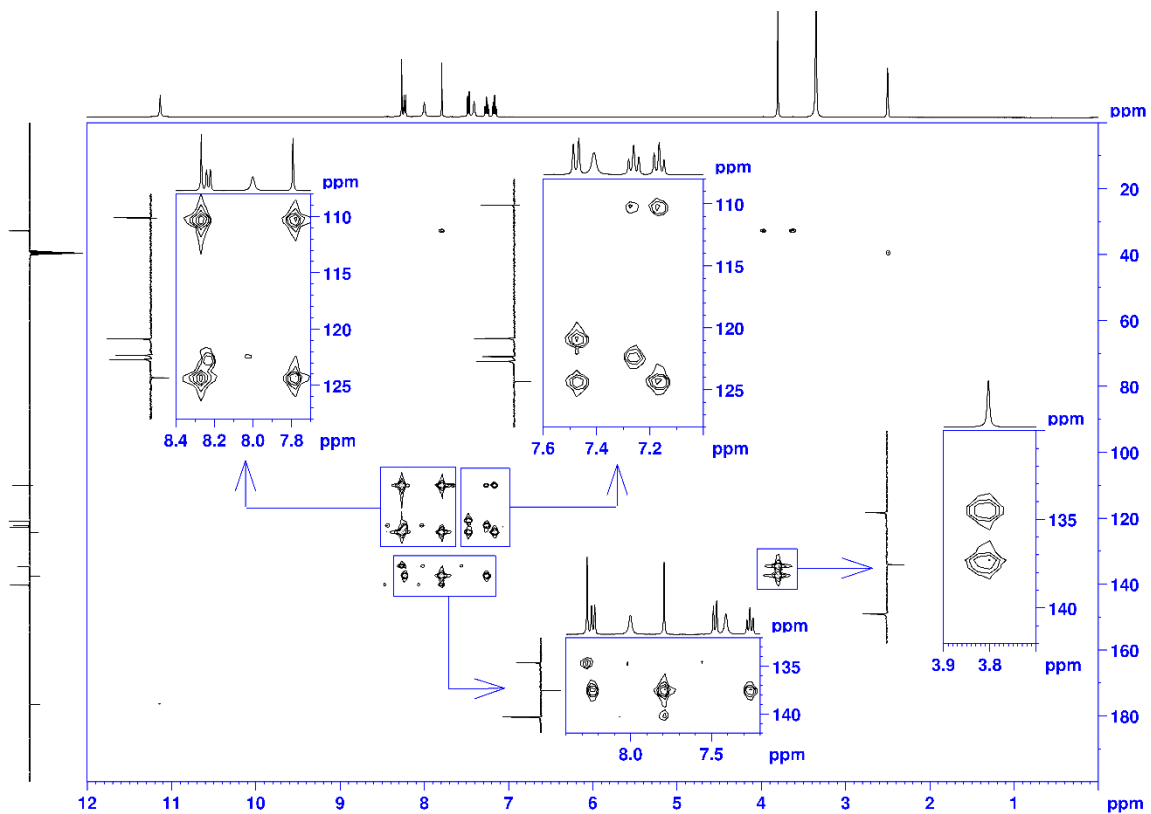


Figura 6.50: Espectro HMBC do composto 4.g, em DMSO- d_6 .

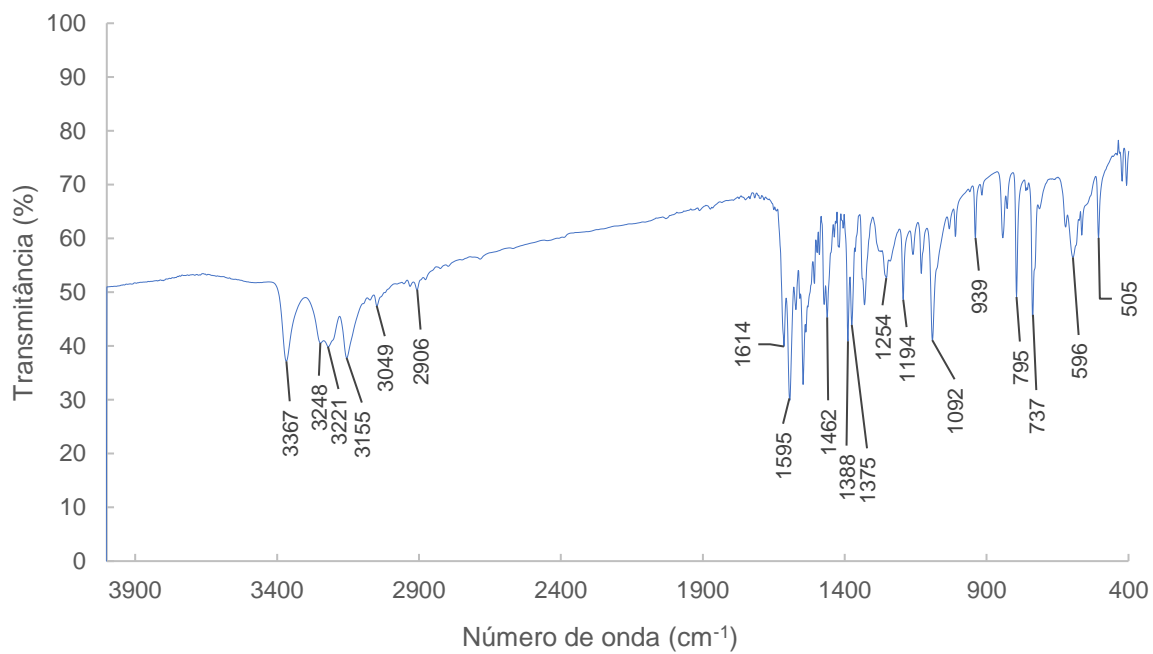


Figura 6.51: Espectro de IV do composto 4.g.

6.8. Apêndice 8 - (E)-2-((1H-indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (4.h)

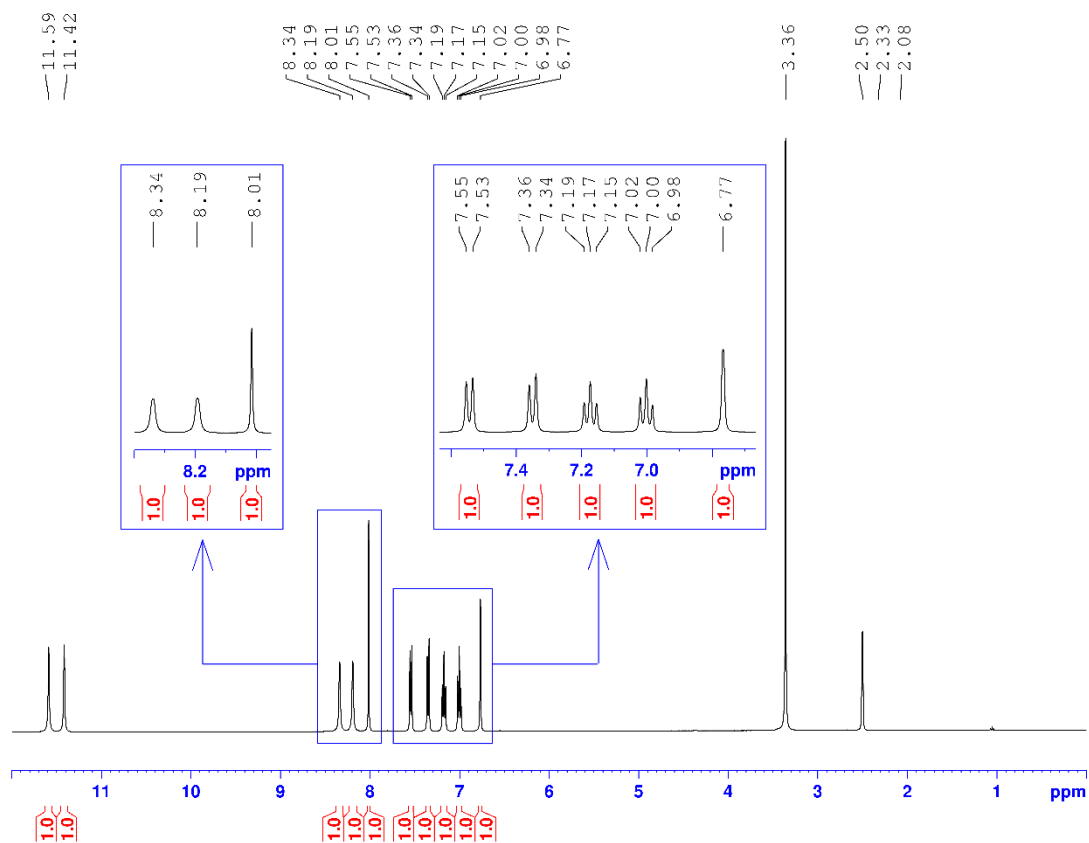


Figura 6.52: Espectro de RMN ¹H do composto 4.h, em DMSO-d₆.

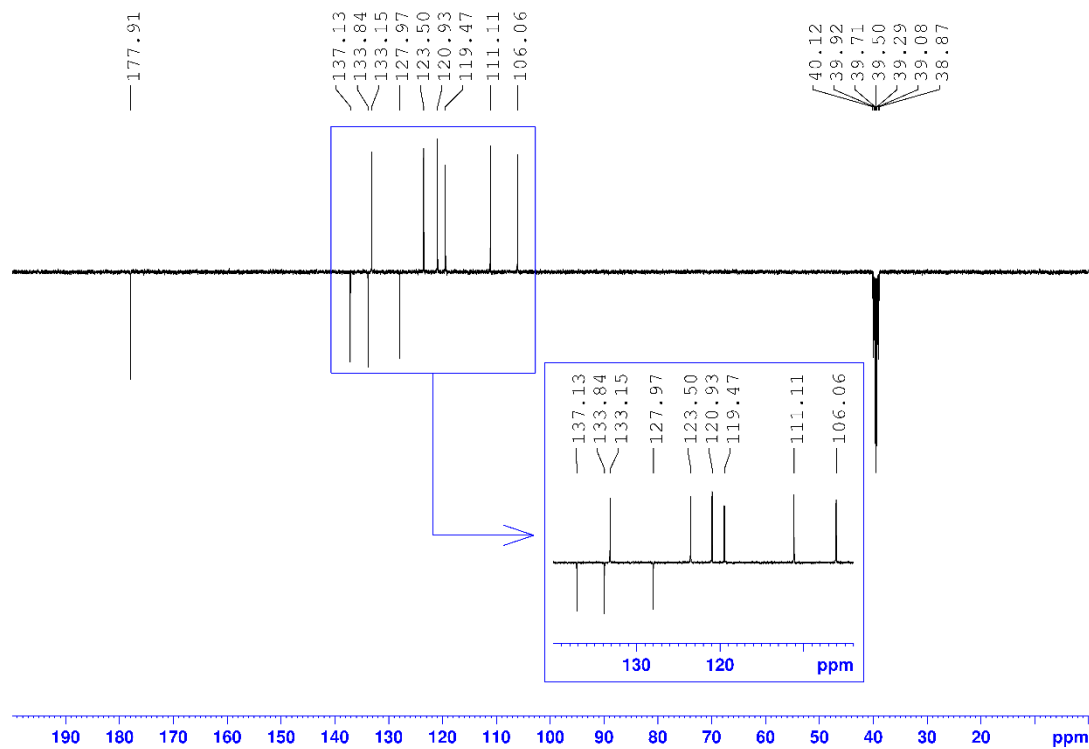


Figura 6.53: Espectro de RMN ¹³C-APT do composto 4.h, em DMSO-d₆.

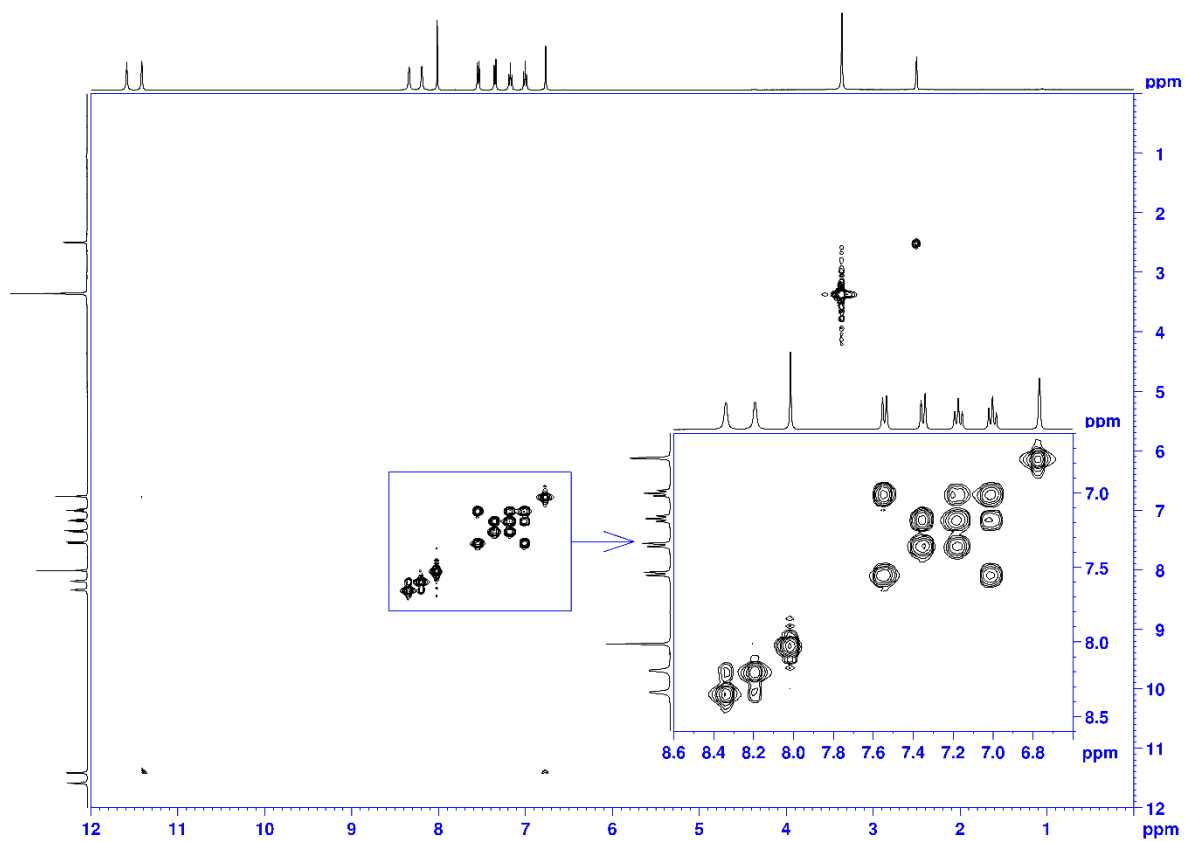


Figura 6.54: Espectro COSY do composto 4.h, em DMSO- d_6 .

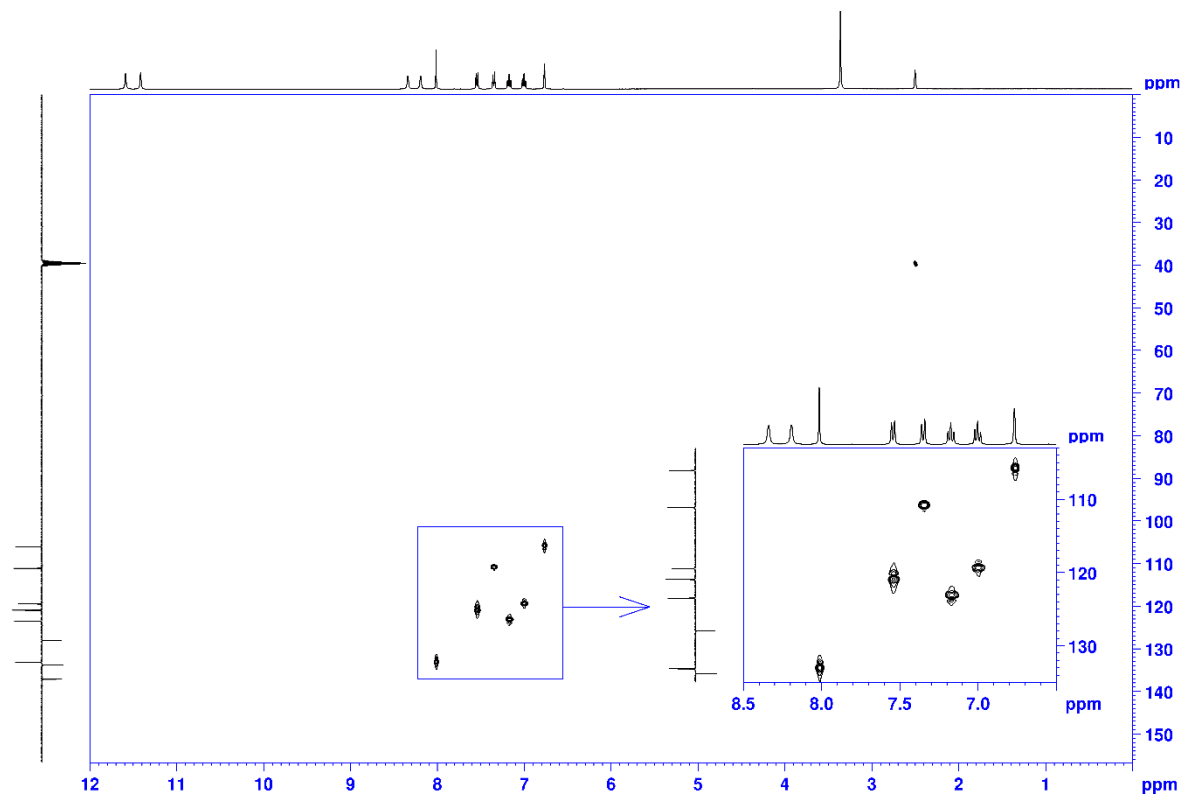


Figura 6.55: Espectro HSQC do composto 4.h, em DMSO- d_6 .

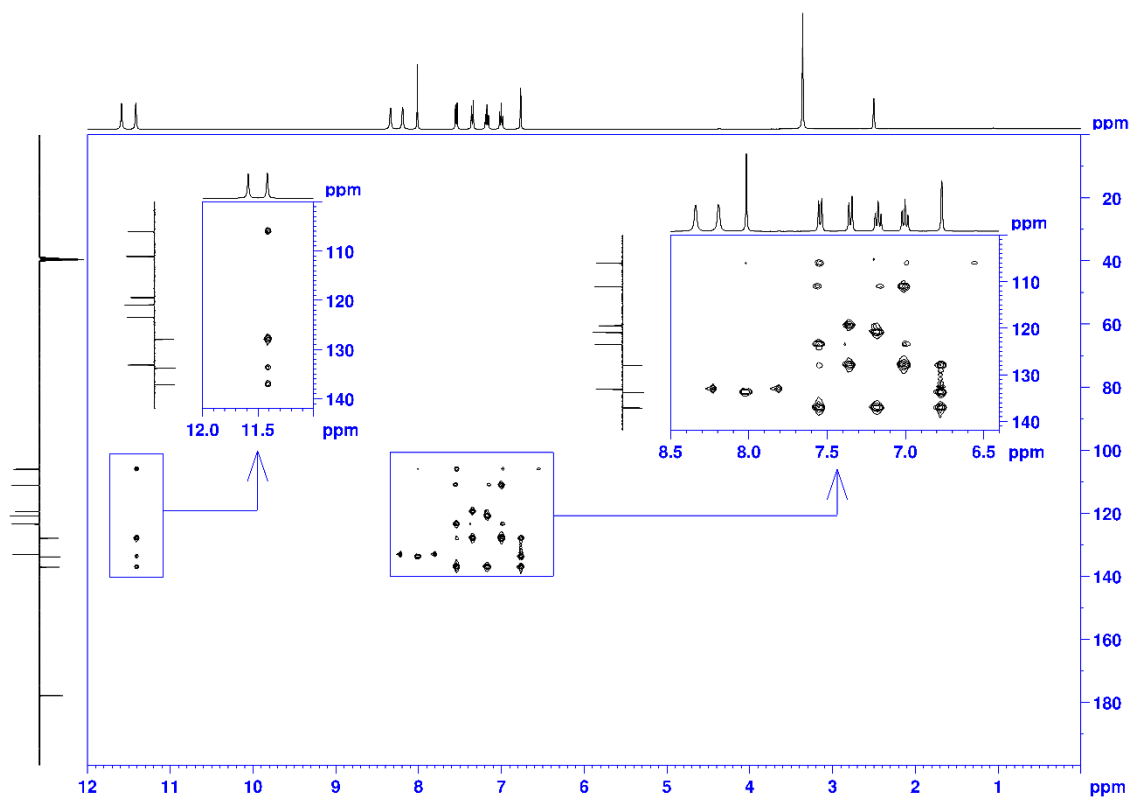


Figura 6.56: Espectro HMBC do composto 4.h, em DMSO-d₆.

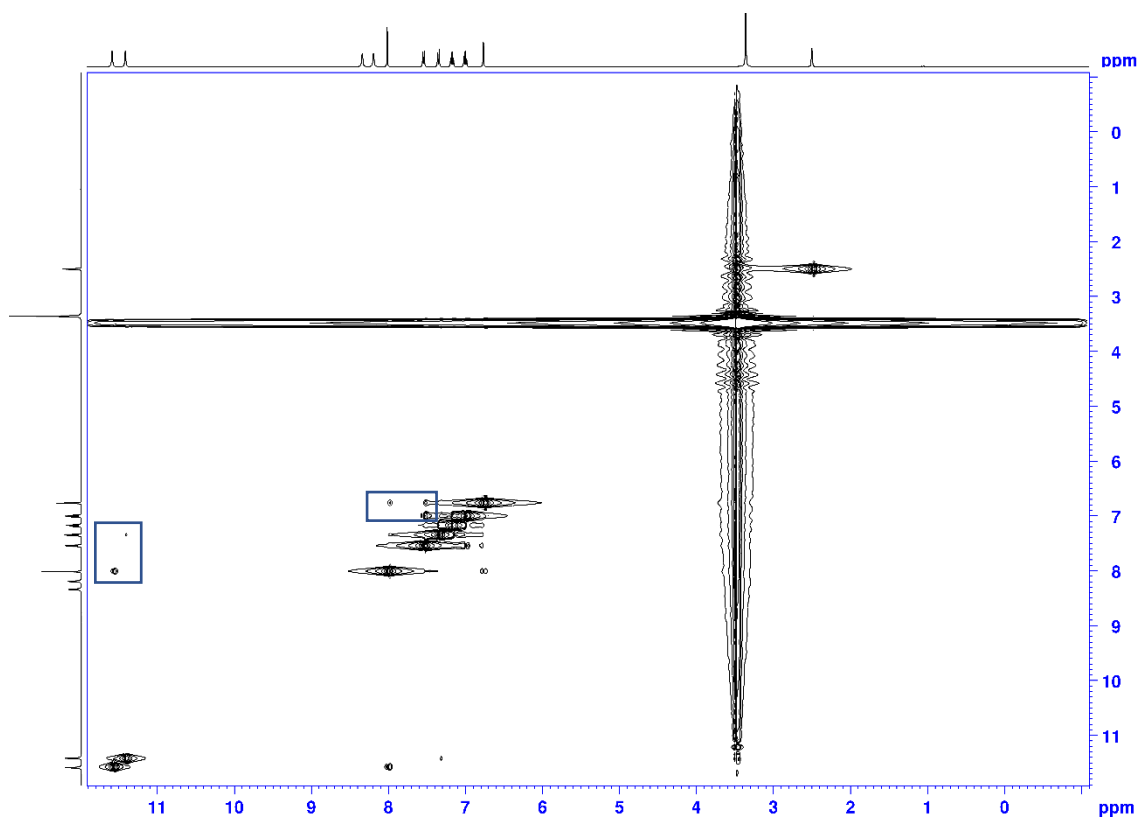


Figura 6.57: Espectro NOESY do composto 4.h, em DMSO-d₆ (principais correlações).

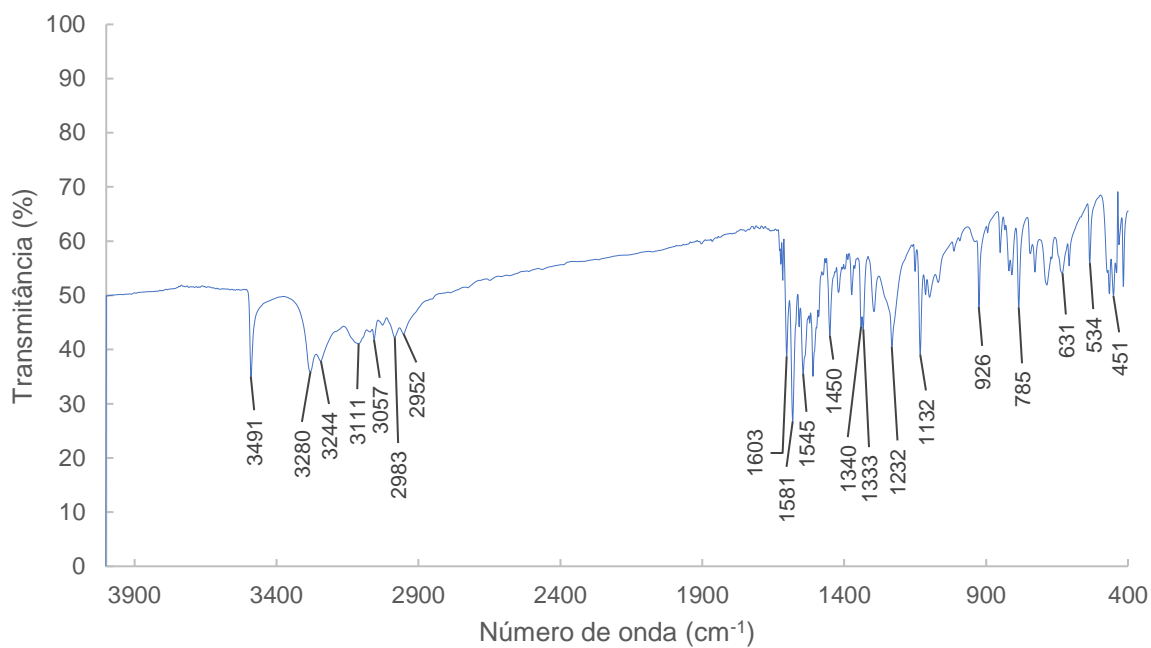


Figura 6.58: Espectro de IV do composto 4.h.

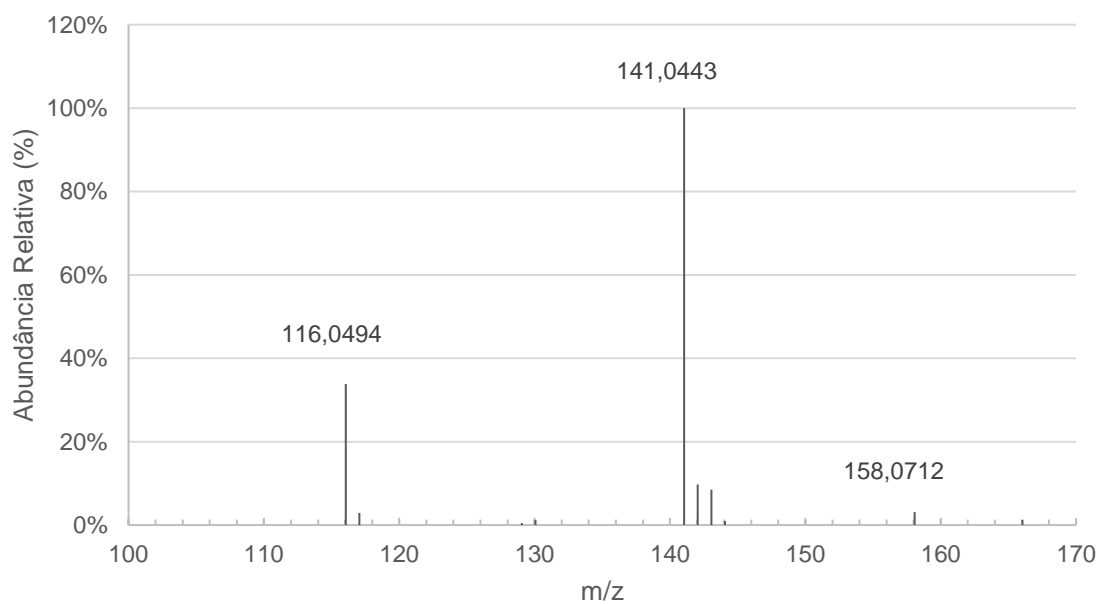


Figura 6.59: Espectro de HRMS do composto 4.h (principais fragmentos).

6.9. Apêndice 9 - (E)-2-((benzofuran-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.i)

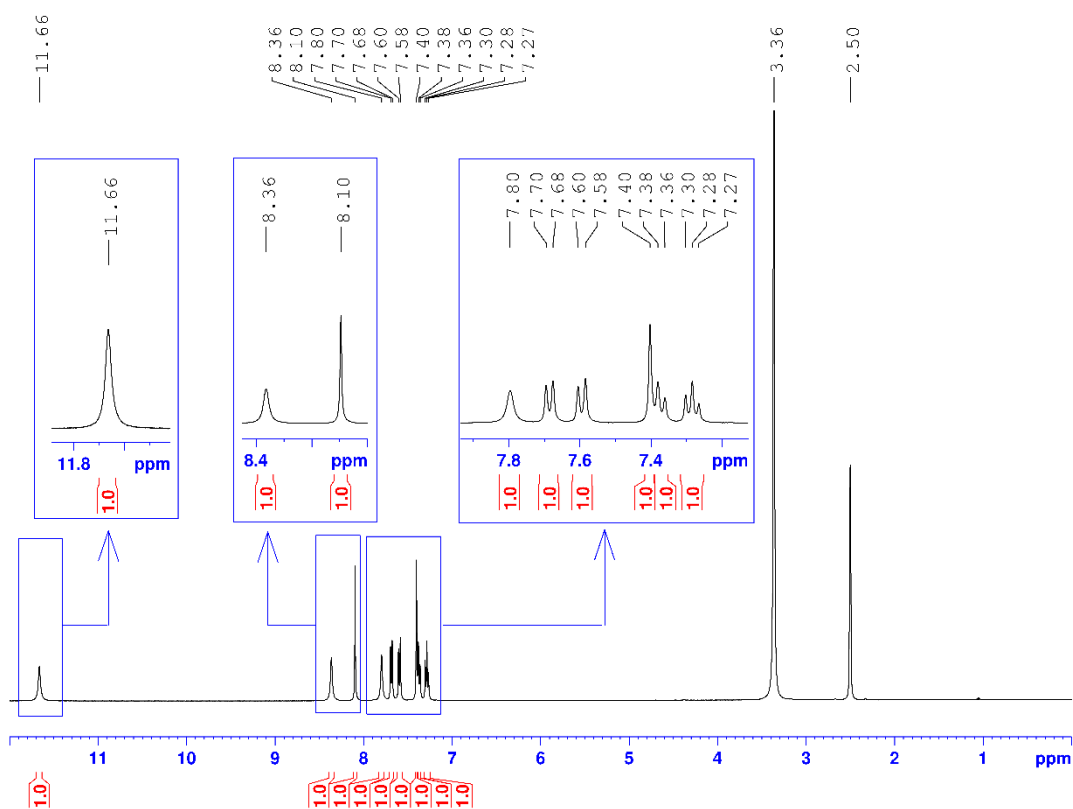


Figura 6.60: Espectro de RMN ^1H do composto 4.i, em DMSO-d_6 .

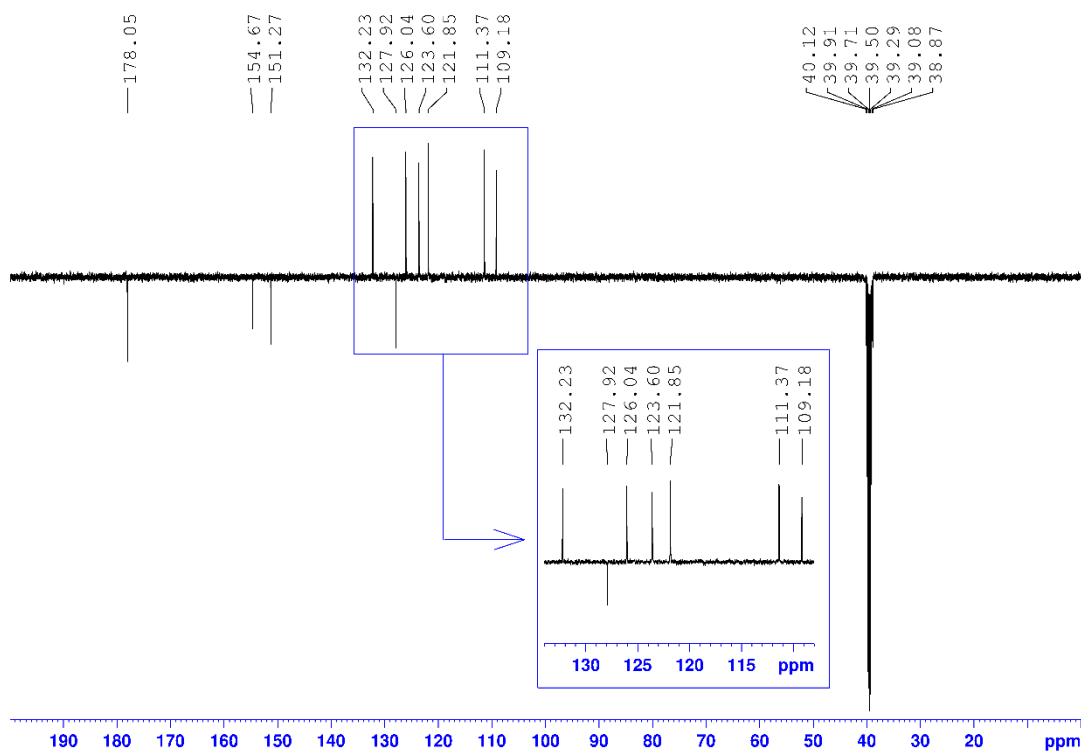


Figura 6.61: Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.i, em DMSO-d_6 .

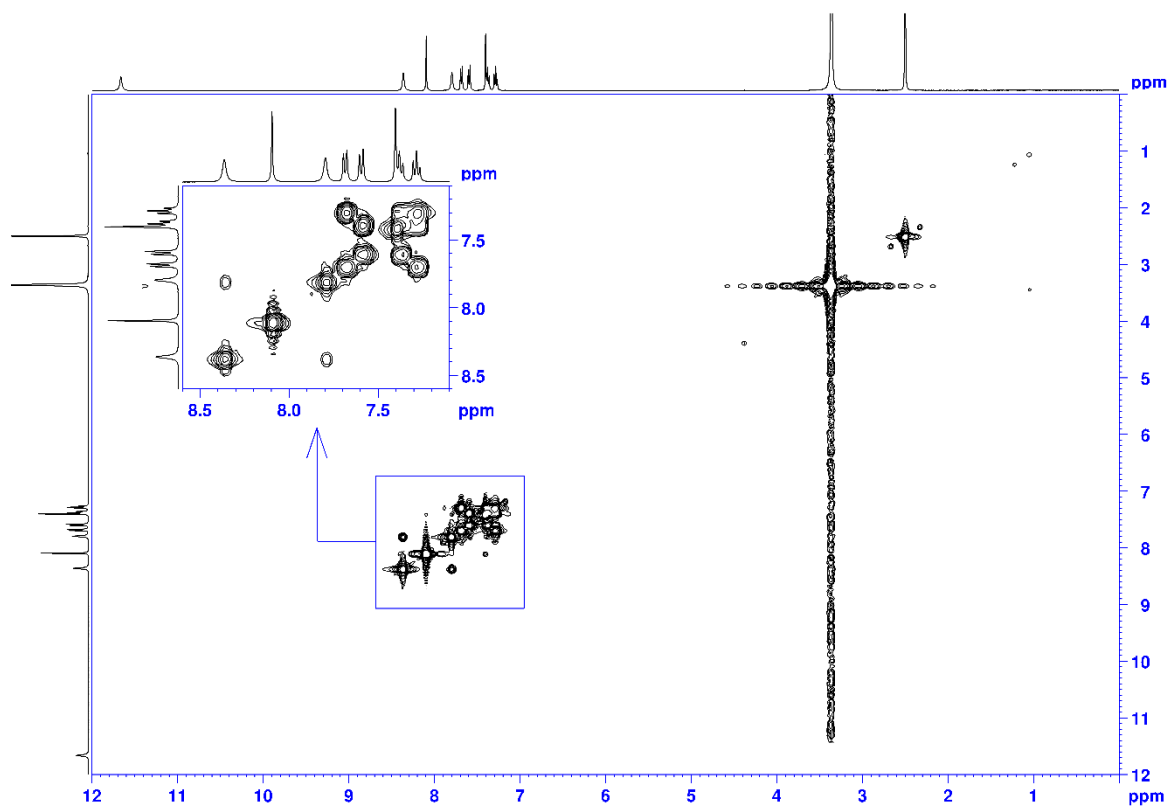


Figura 6.62: Espectro COSY do composto 4.i, em DMSO- d_6 .

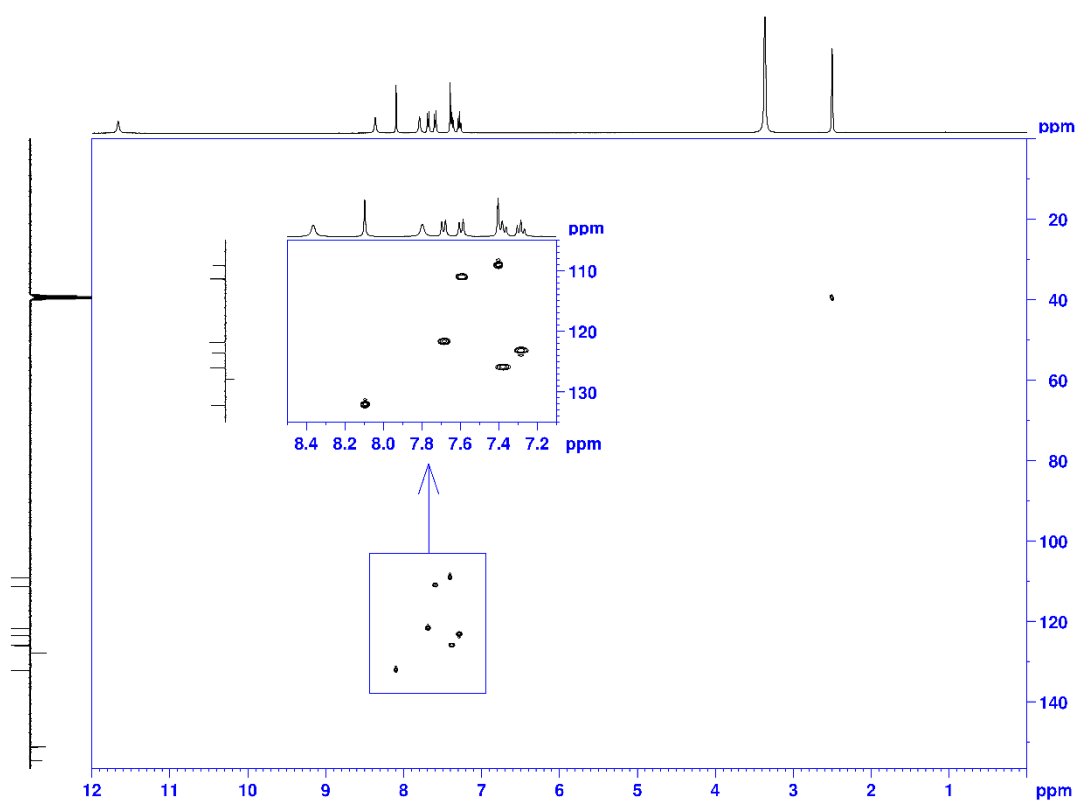


Figura 6.63: Espectro HSQC do composto 4.i, em DMSO- d_6 .

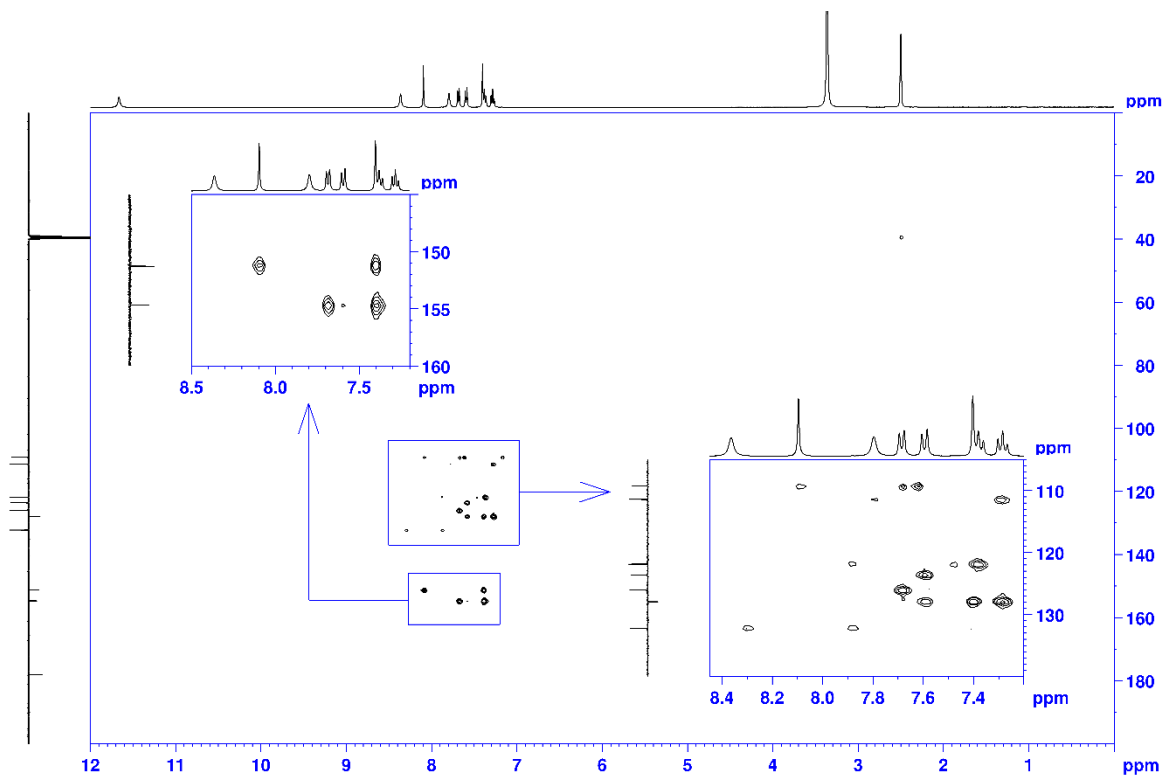


Figura 6.64: Espectro HMBC do composto 4.i, DMSO-d₆.

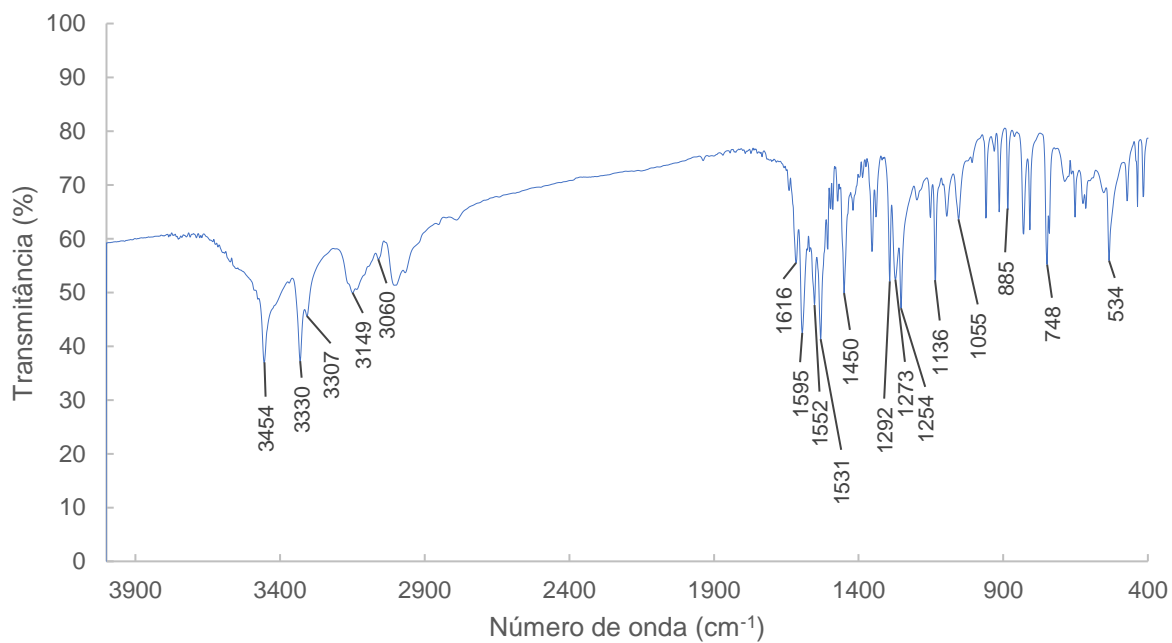


Figura 6.65: Espectro de IV do composto 4.i.

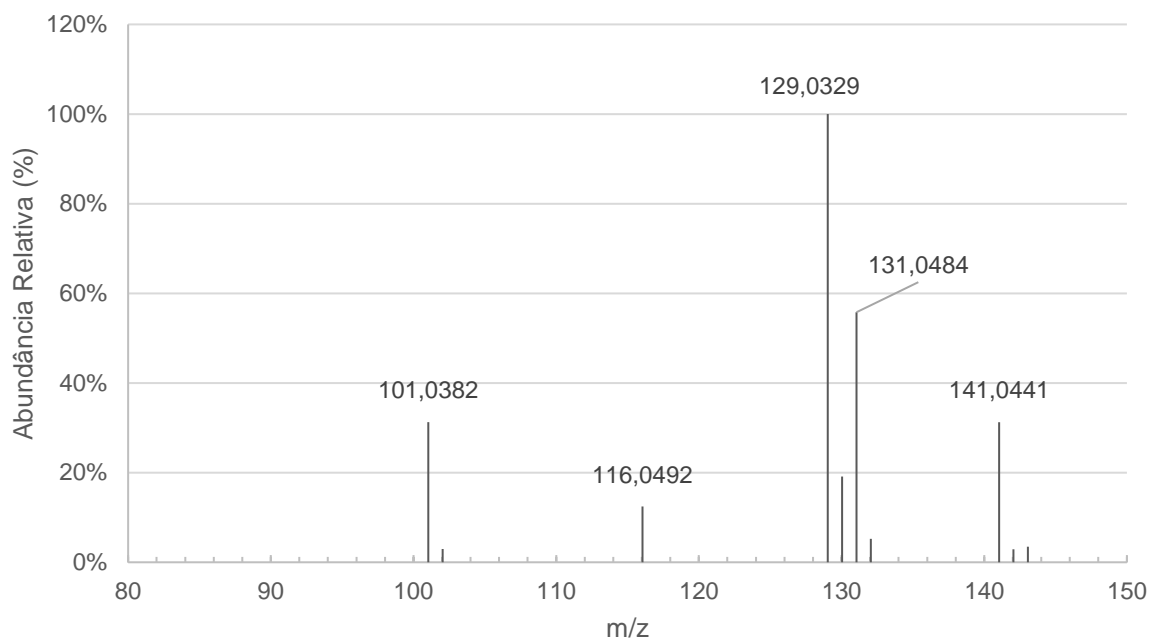


Figura 6.66: Espectro de HRMS do composto 4.i (principais fragmentos).

6.10. Apêndice 10 - (E)-2-((benzo[b]tiofen-2-il)metileno)hidrazinacarbotoioamida (4.j)

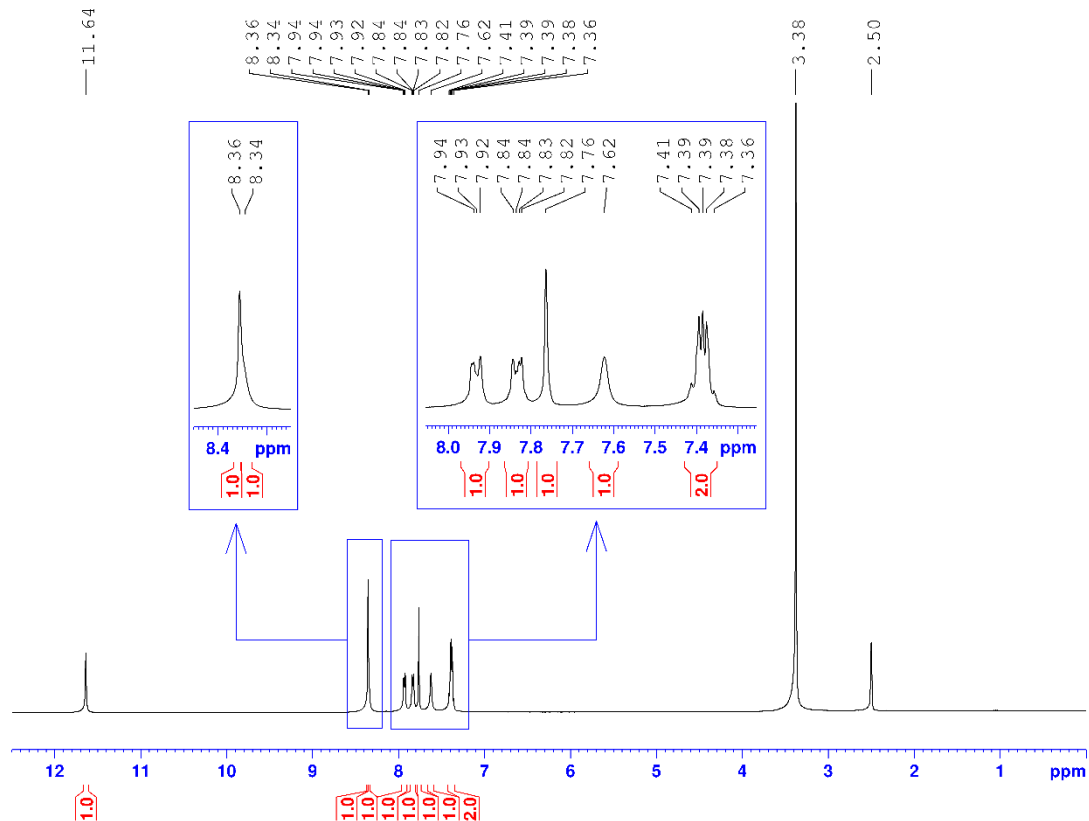


Figura 6.67: Espetro de RMN ^1H do composto 4.j, em DMSO-d_6 .

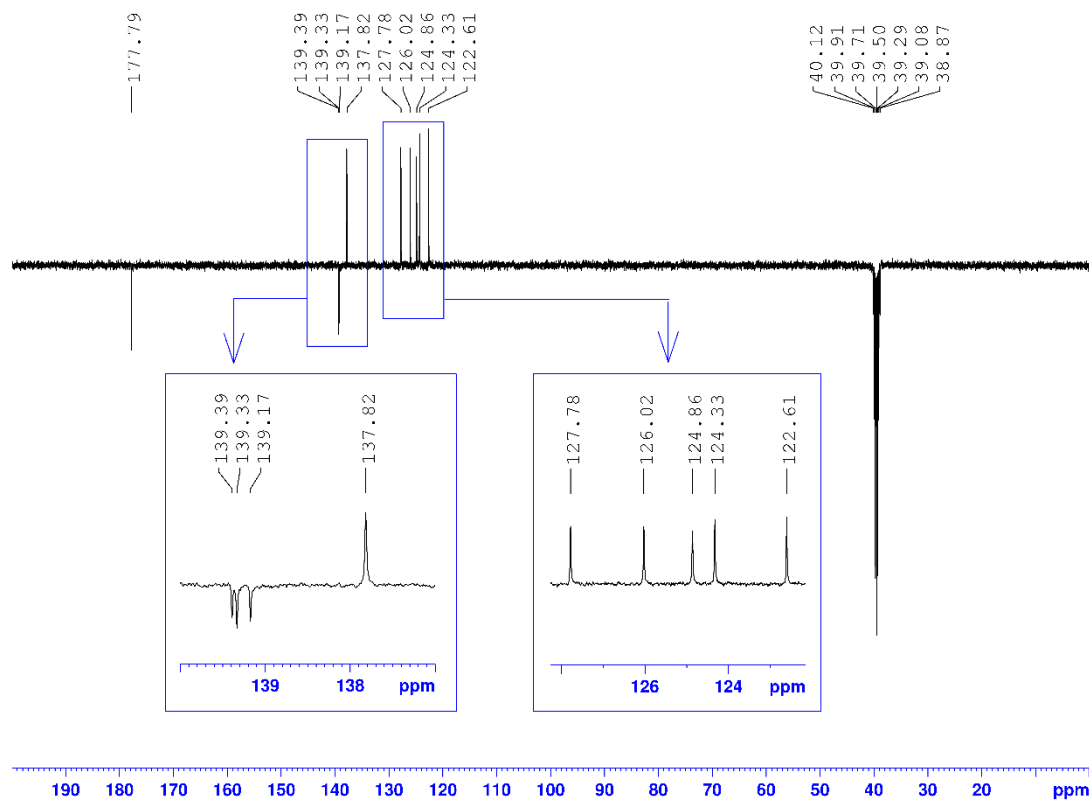


Figura 6.68: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.j, em DMSO-d_6 .

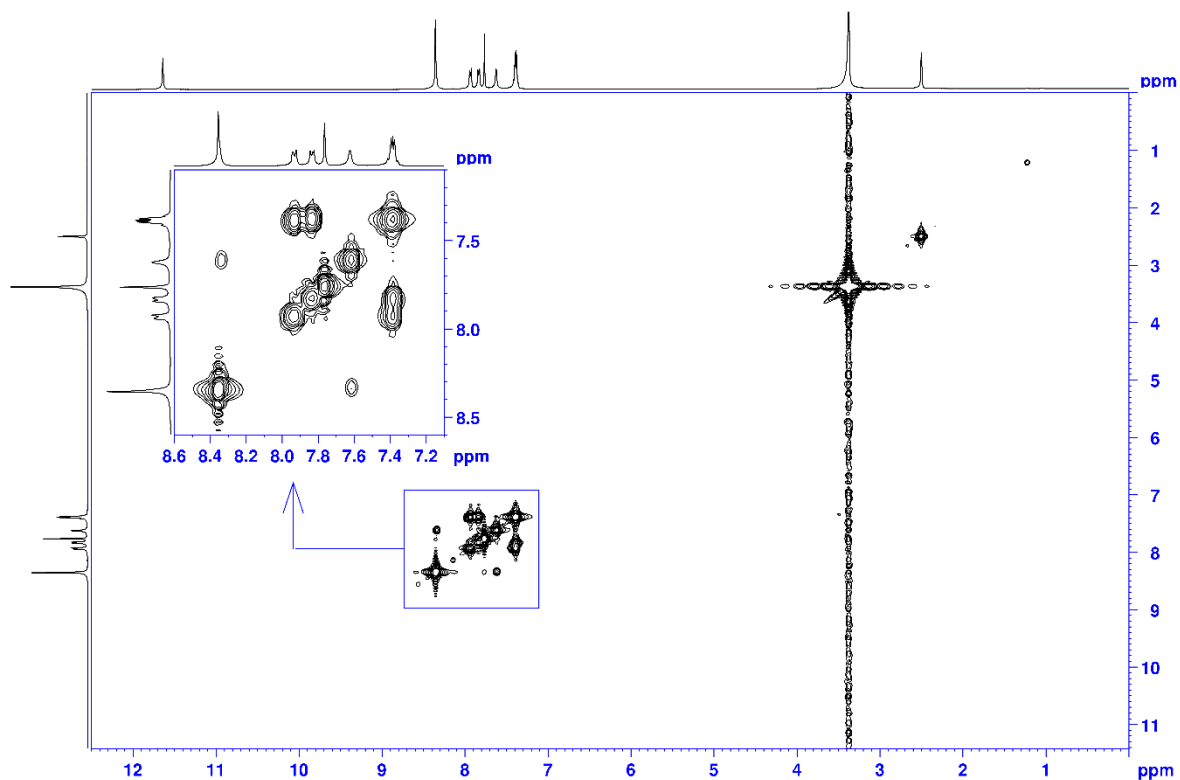


Figura 6.69: Espectro COSY do composto 4.j, em DMSO-d₆.

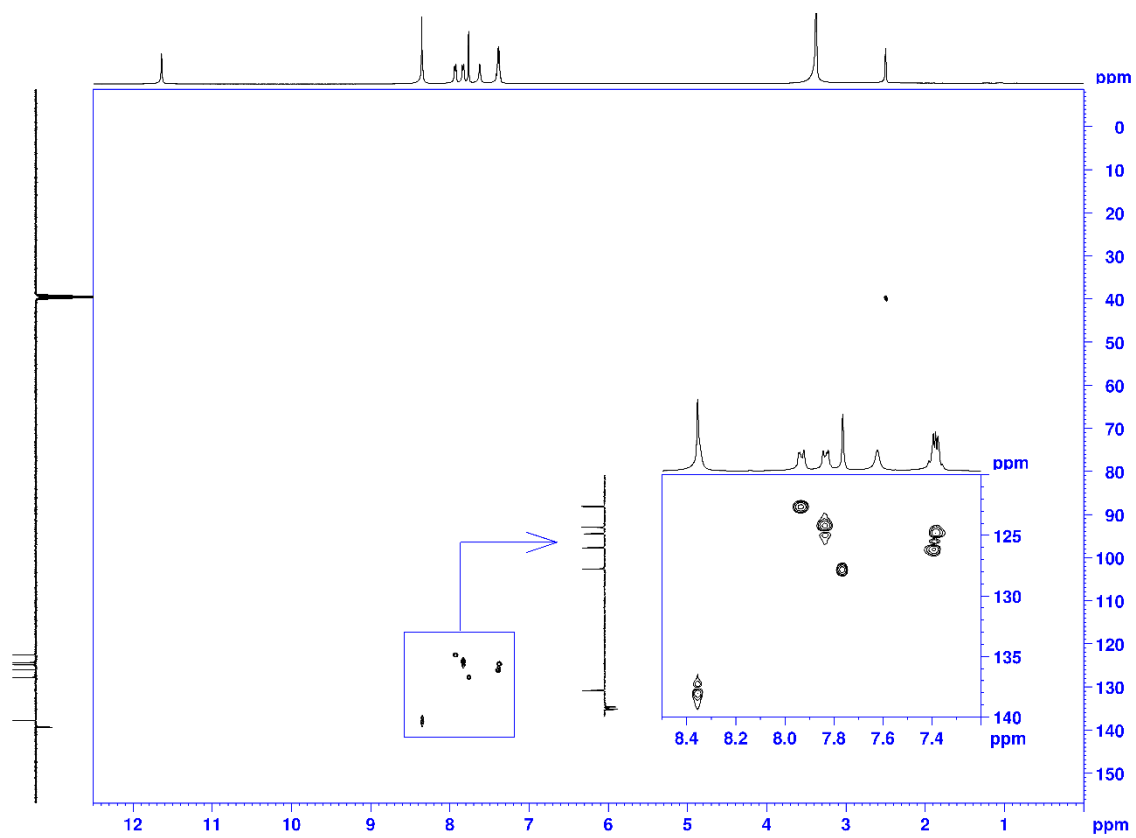


Figura 6.70: Espectro HSQC do composto 4.j, em DMSO-d₆.

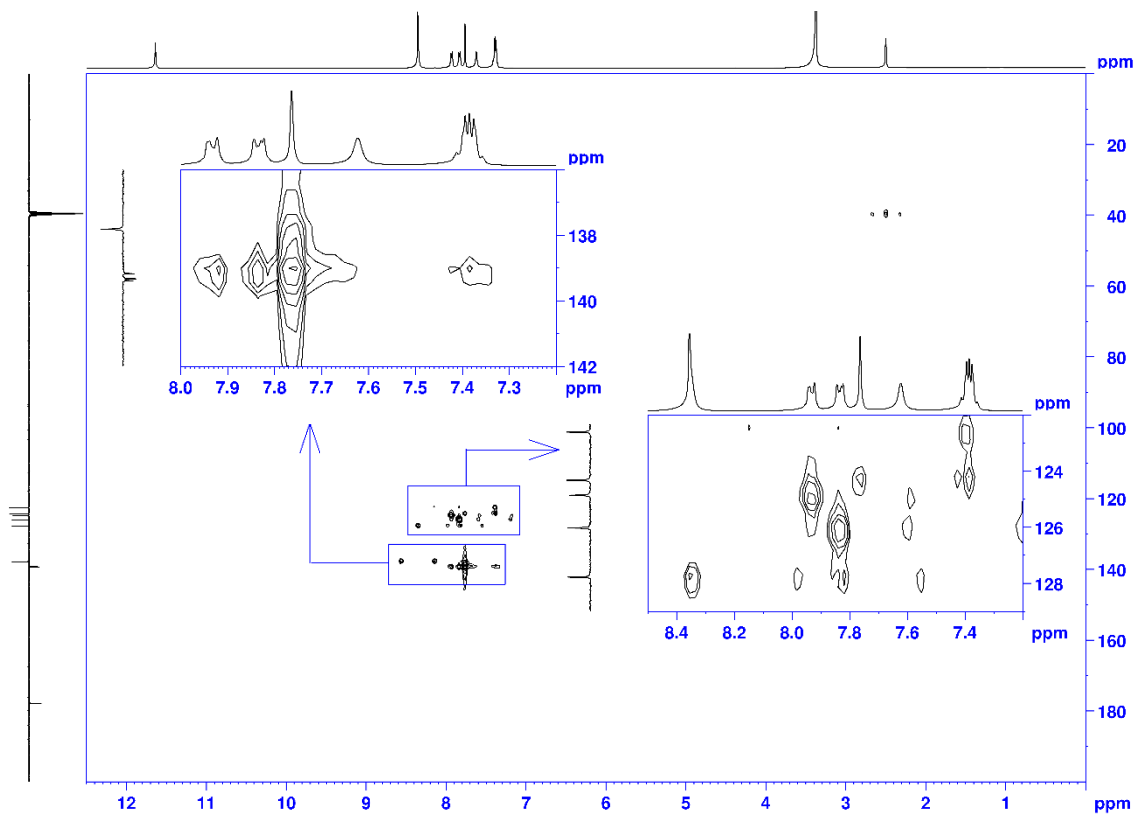


Figura 6.71: Espectro HMBC do composto 4.j, em DMSO-d_6 .

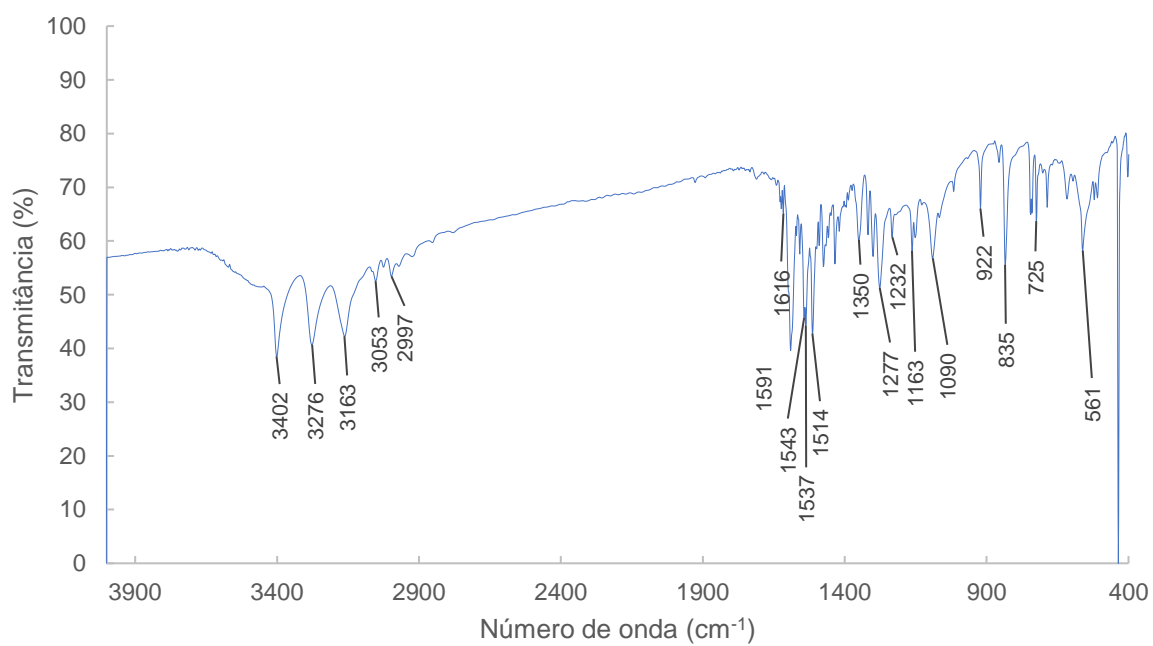


Figura 6.72: Espectro de IV do composto 4.j.

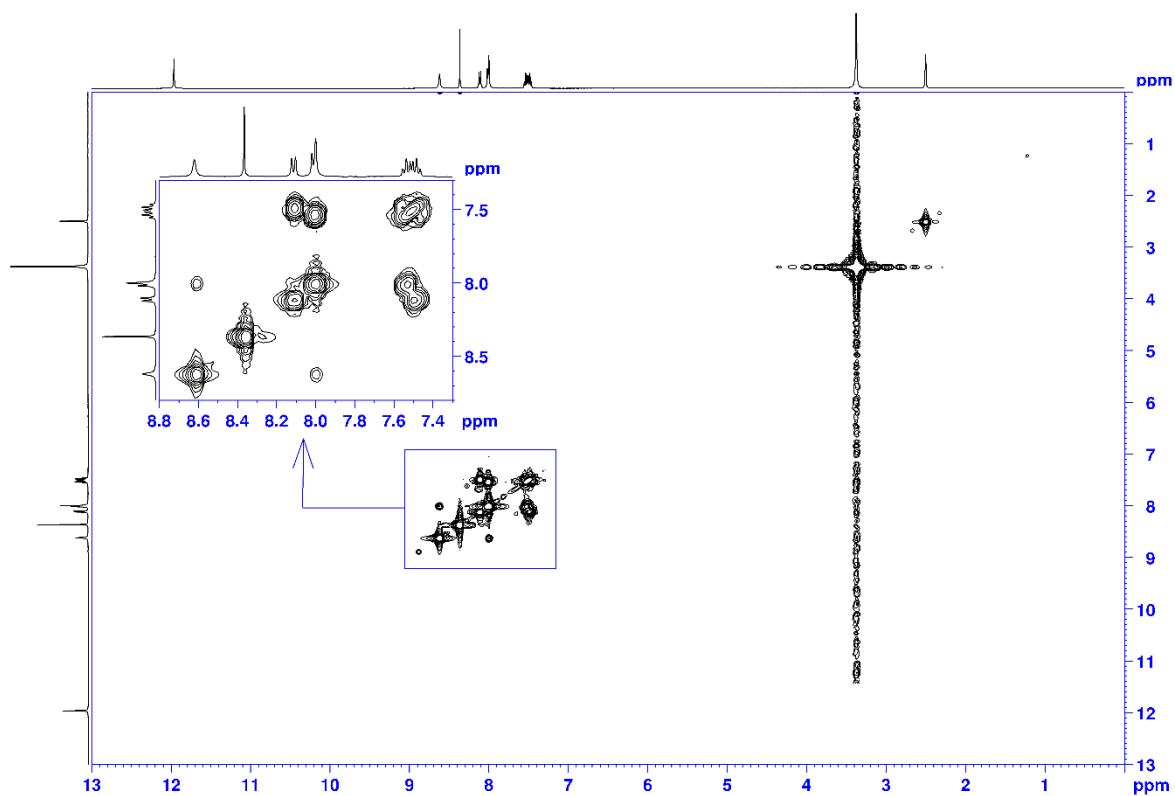


Figura 6.75: Espectro COSY do composto 4.k, em DMSO-d₆.

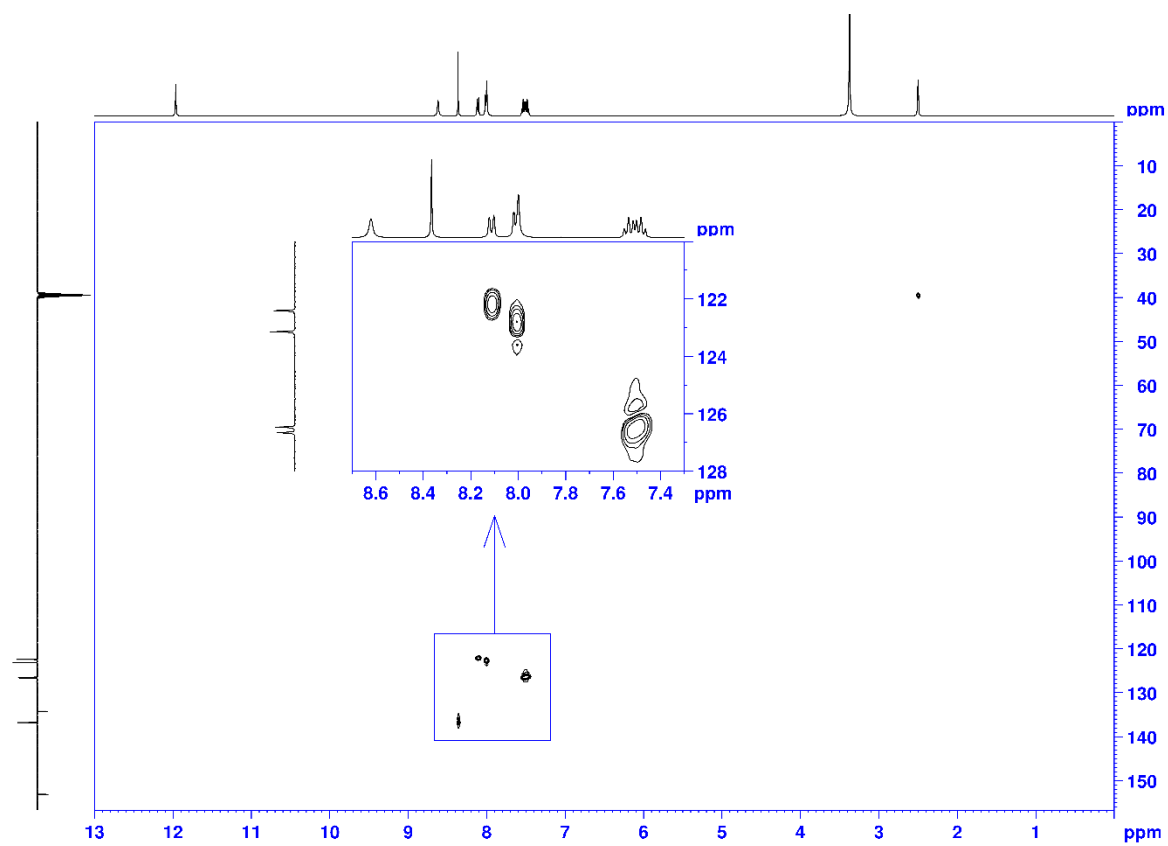


Figura 6.76: Espectro HSQC do composto 4.k, em DMSO-d₆.

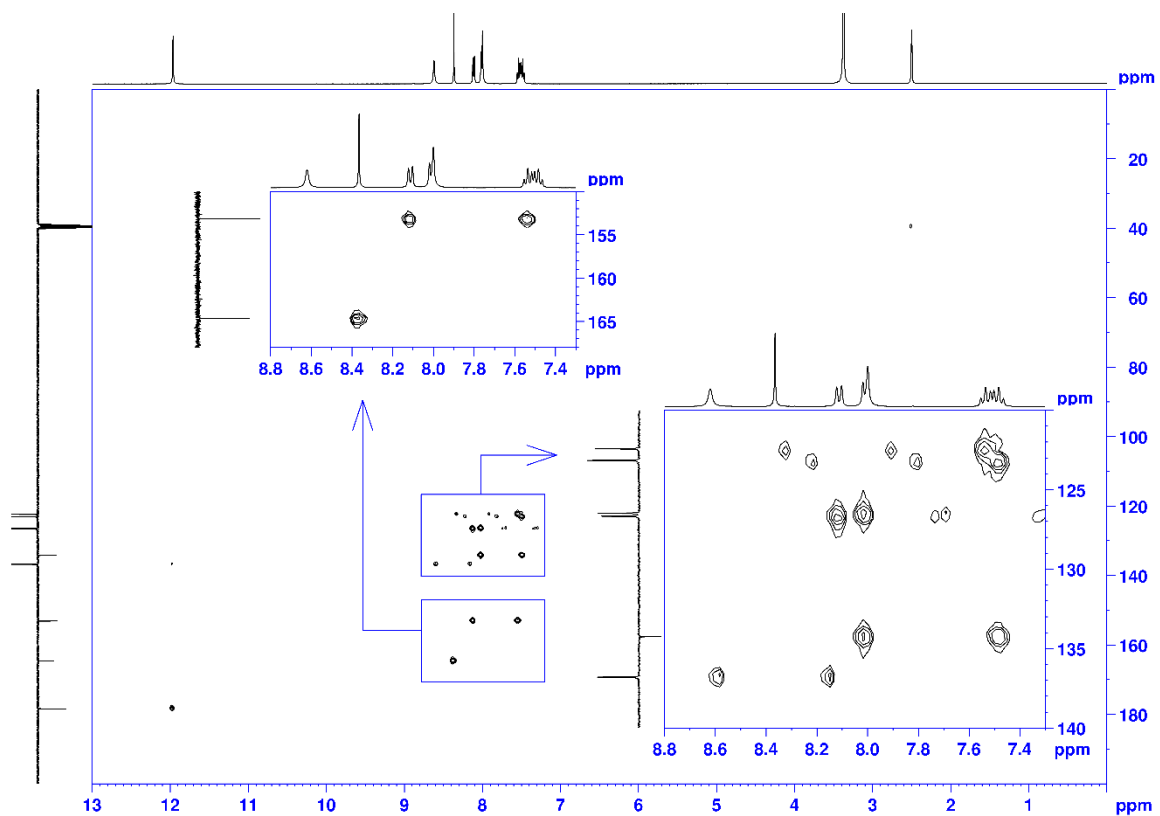


Figura 6.77: Espectro HMBC do composto 4.k, em DMSO-d₆.

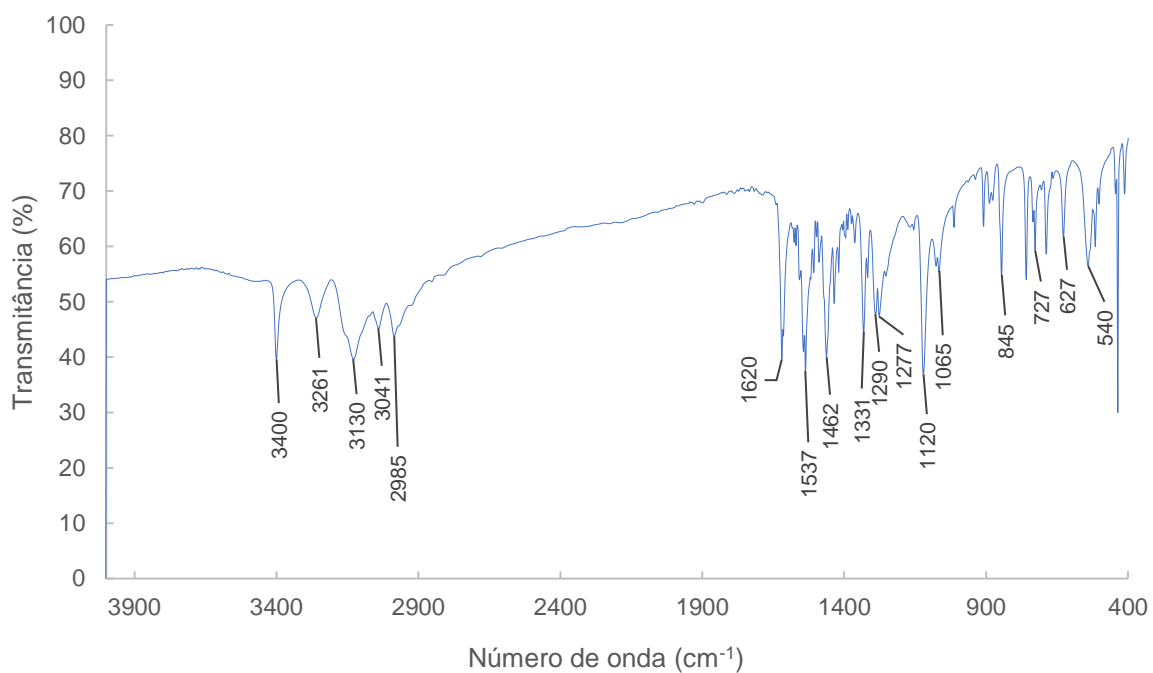


Figura 6.78: Espectro de IV do composto 4.k.

6.12. Apêndice 12 - (E)-2-((3-metil-1H-indole-2-il)metileno)hidrazinacarbotoamida (4.I)

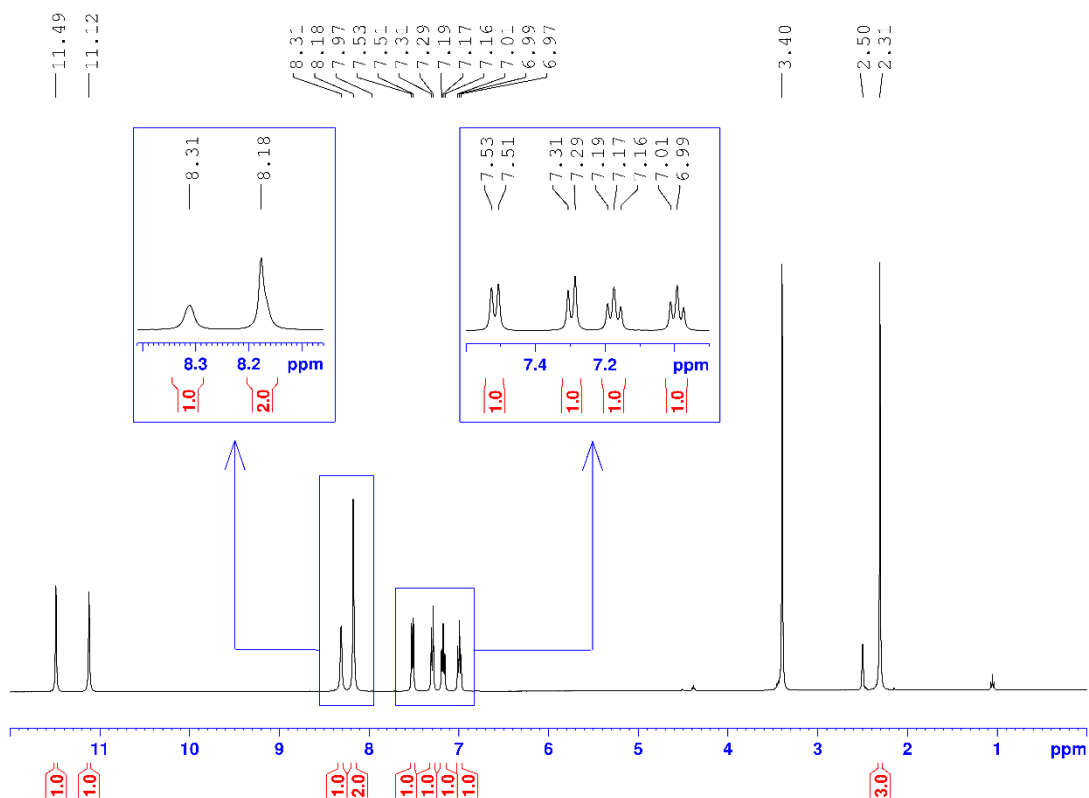


Figura 6.79: Espetro de RMN ^1H do composto 4.I, em DMSO-d_6 .

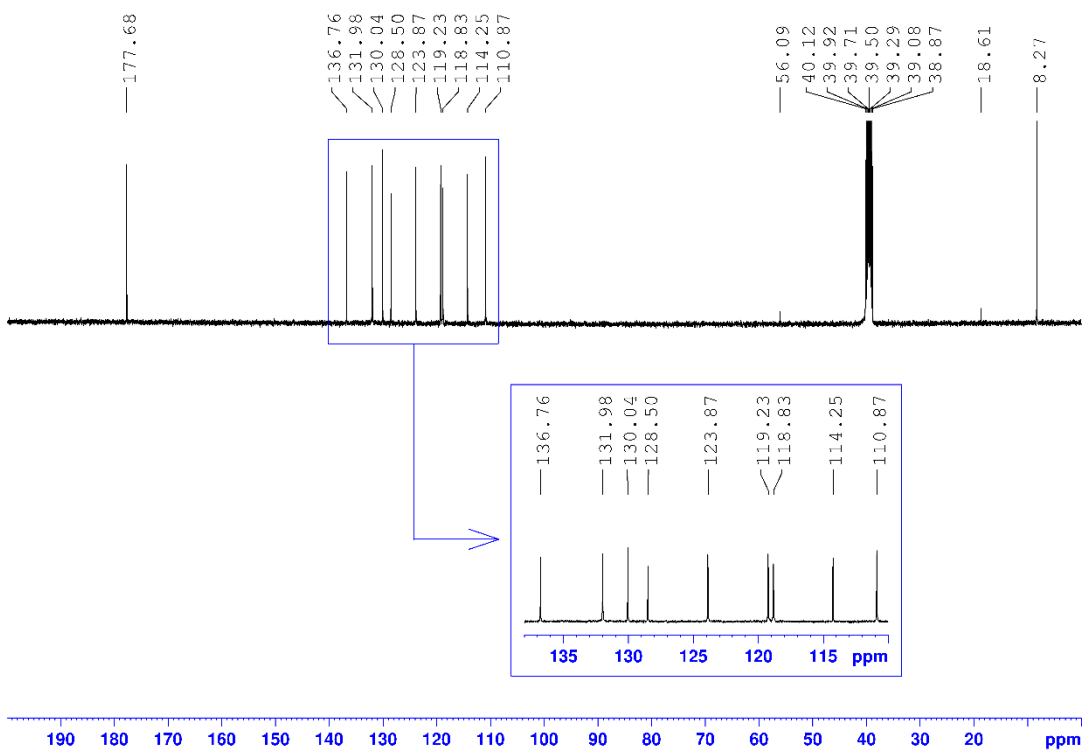


Figura 6.80: Espetro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.I, em DMSO-d_6 .

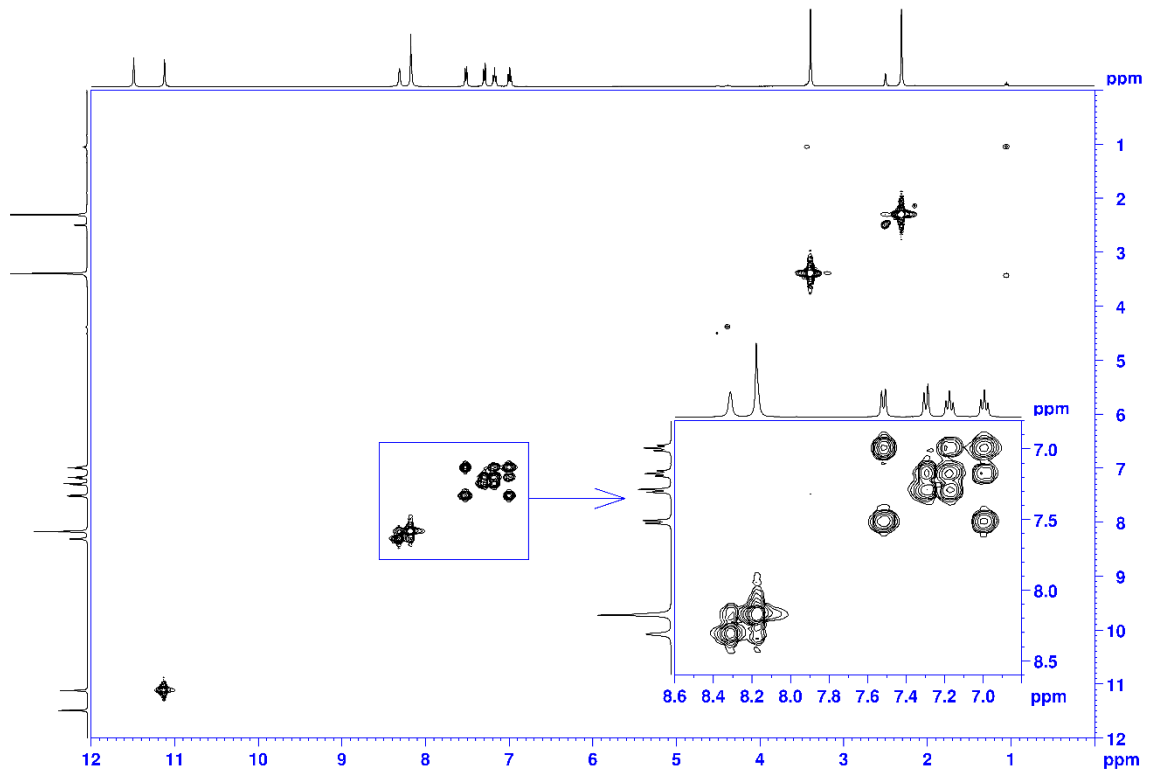


Figura 6.81: Espetro COSY do composto 4.I, em DMSO- d_6 .

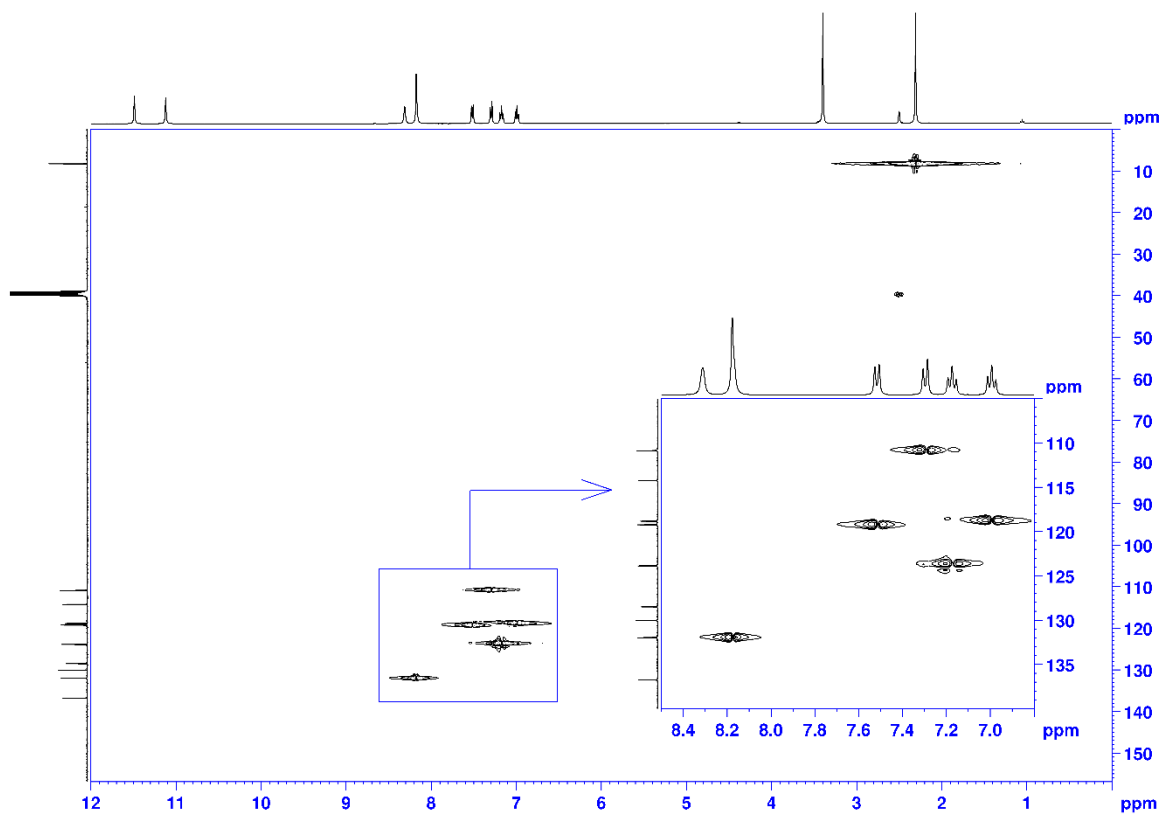


Figura 6.82: Espetro HSQC do composto 4.I, em DMSO- d_6 .

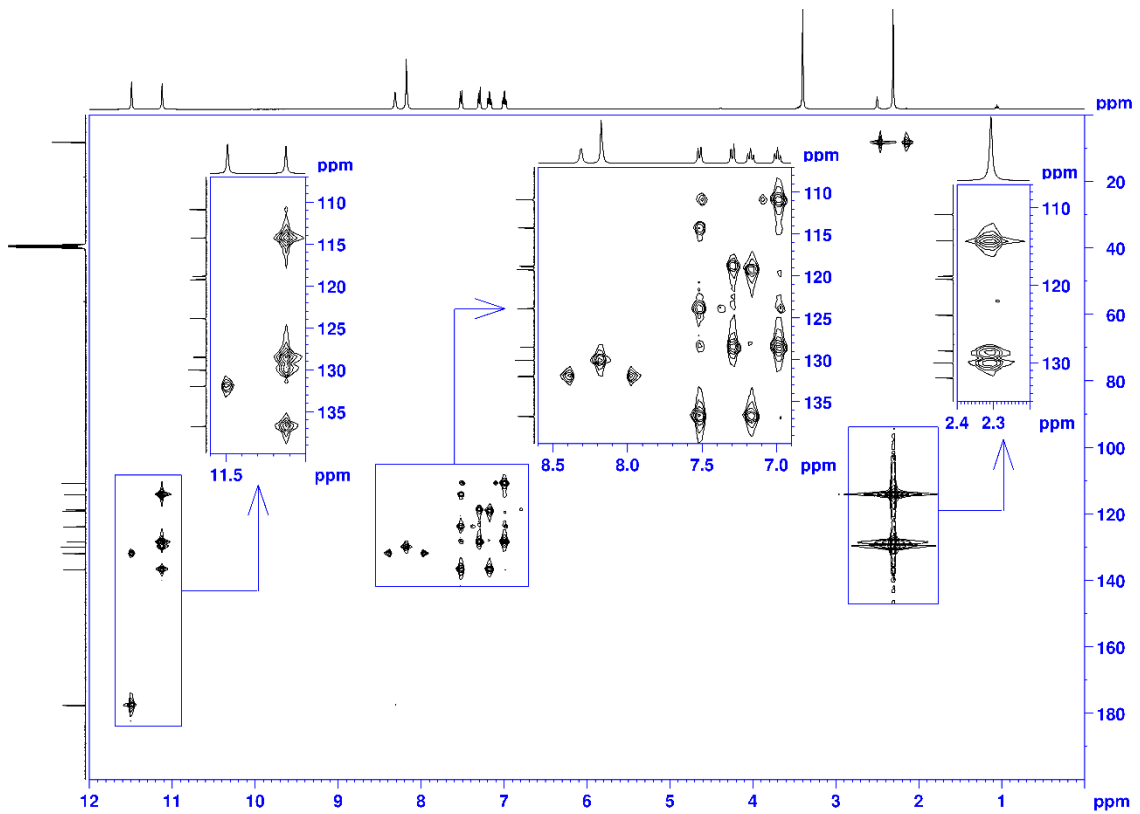


Figura 6.83: Espectro HMBC do composto 4.I, em DMSO- d_6 .

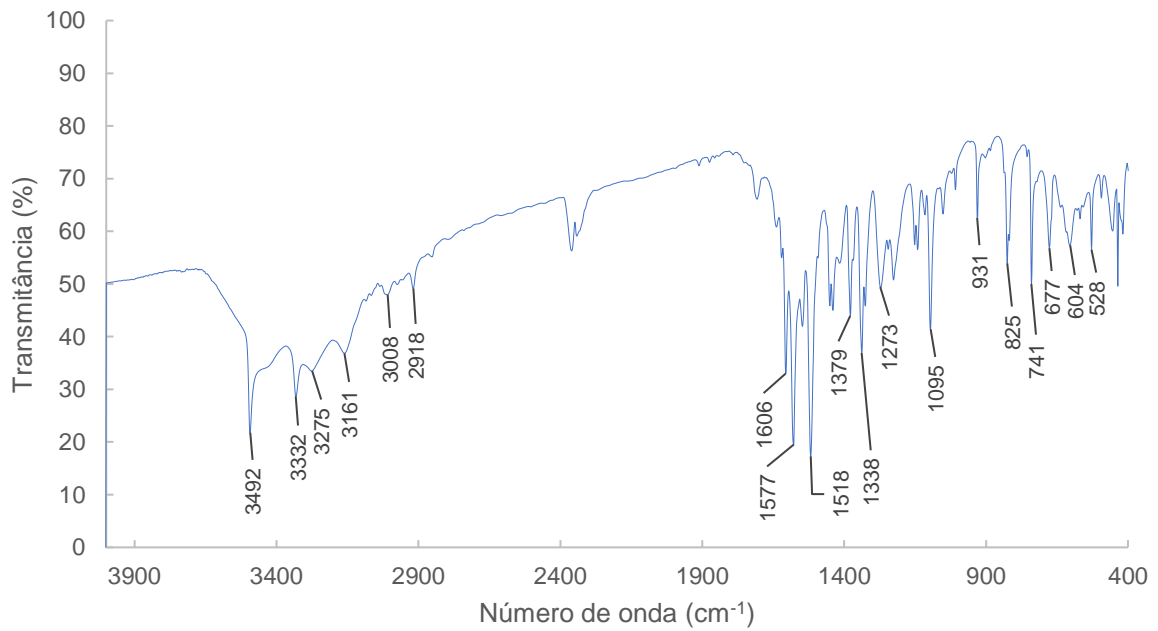


Figura 6.84: Espectro de IV do composto 4.I.

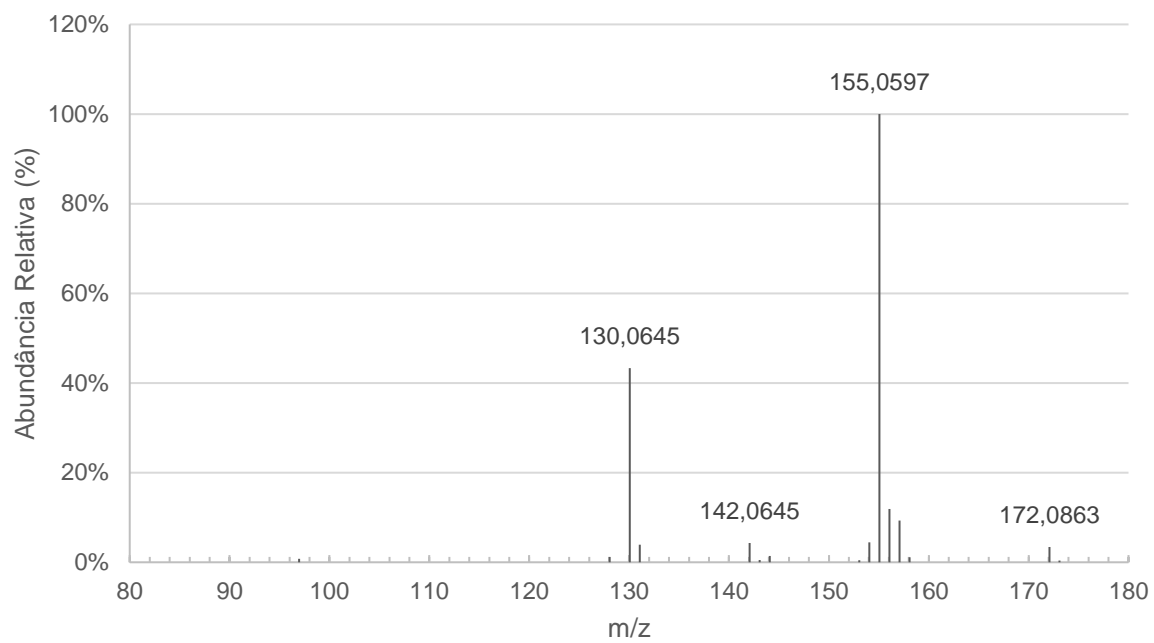


Figura 6.85: Espectro de HRMS do composto 4.I (principais fragmentos).

6.13. Apêndice 13 - (E)-2-((1H-indole-2-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotoamida (4.m)

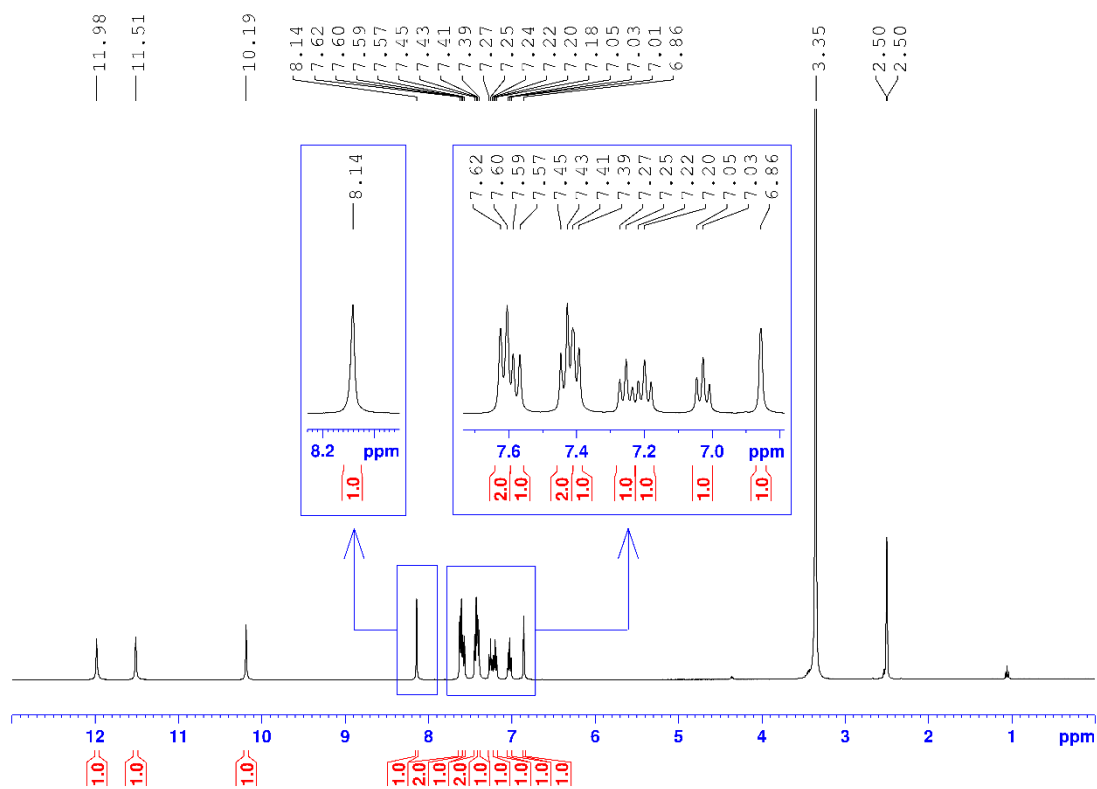


Figura 6.86: Espectro de RMN ^1H do composto 4.m, em DMSO-d_6 .

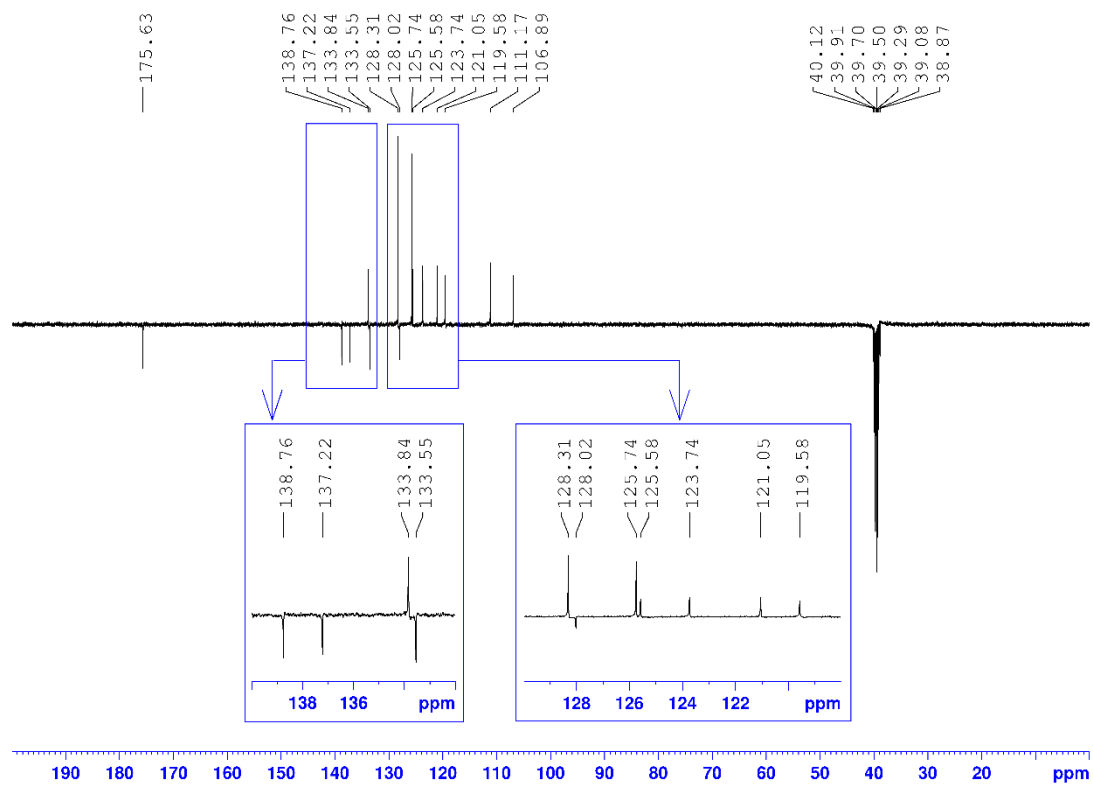


Figura 6.87: Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.m, em DMSO-d_6 .

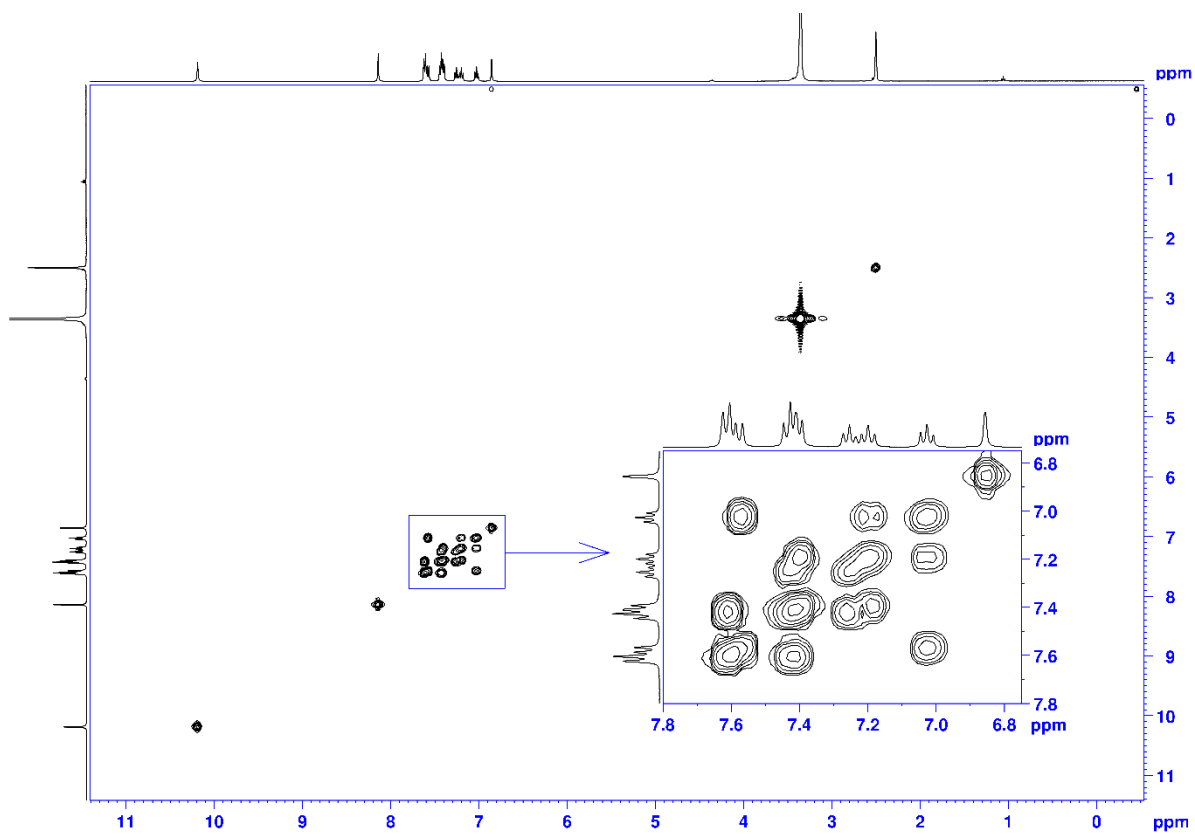


Figura 6.88: Espectro COSY do composto 4.m, em DMSO-d₆.

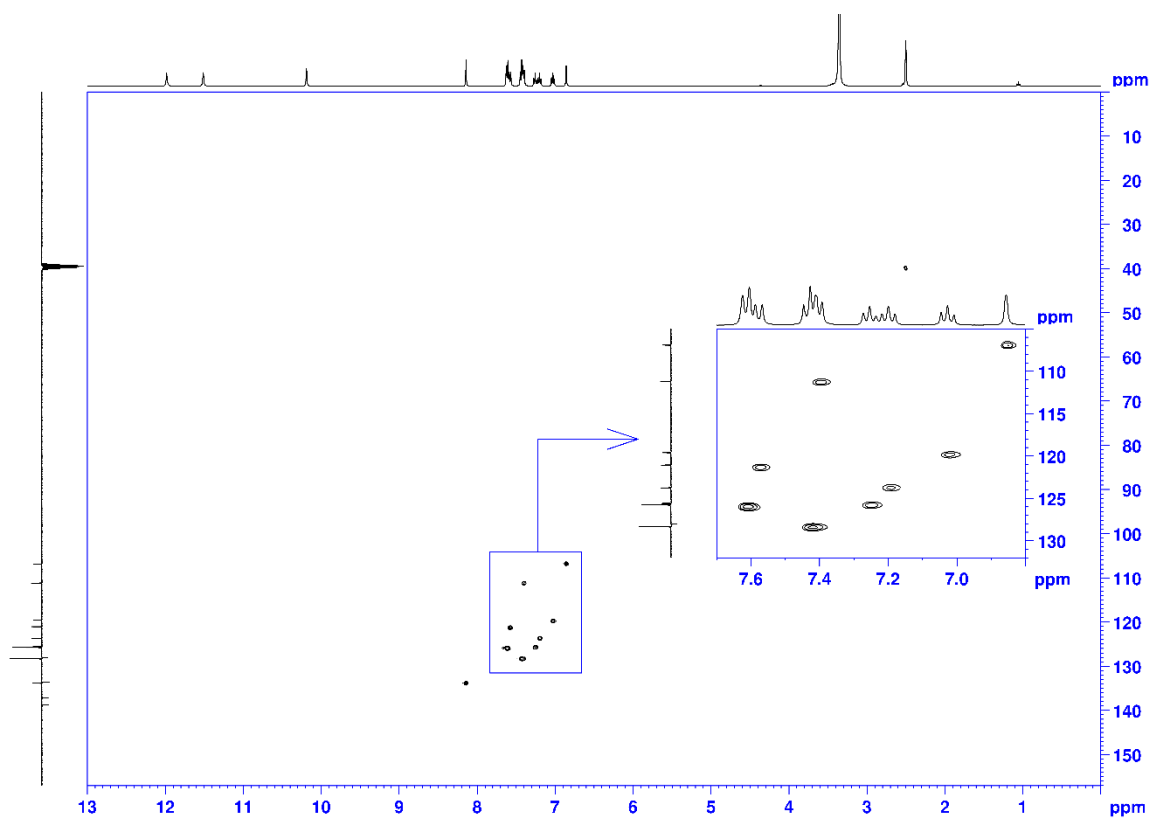


Figura 6.89: Espectro HSQC do composto 4.m, em DMSO-d₆.

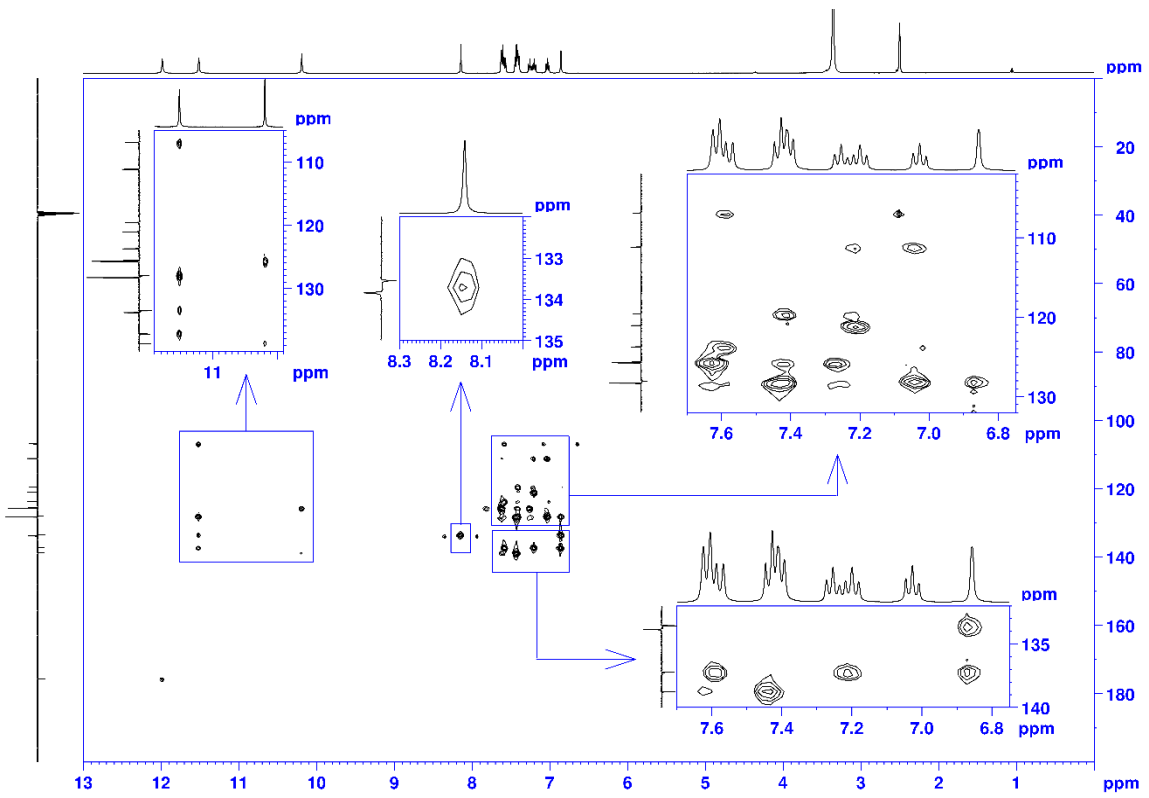


Figura 6.90: Espectro HMBC do composto 4.m, em DMSO- d_6 .

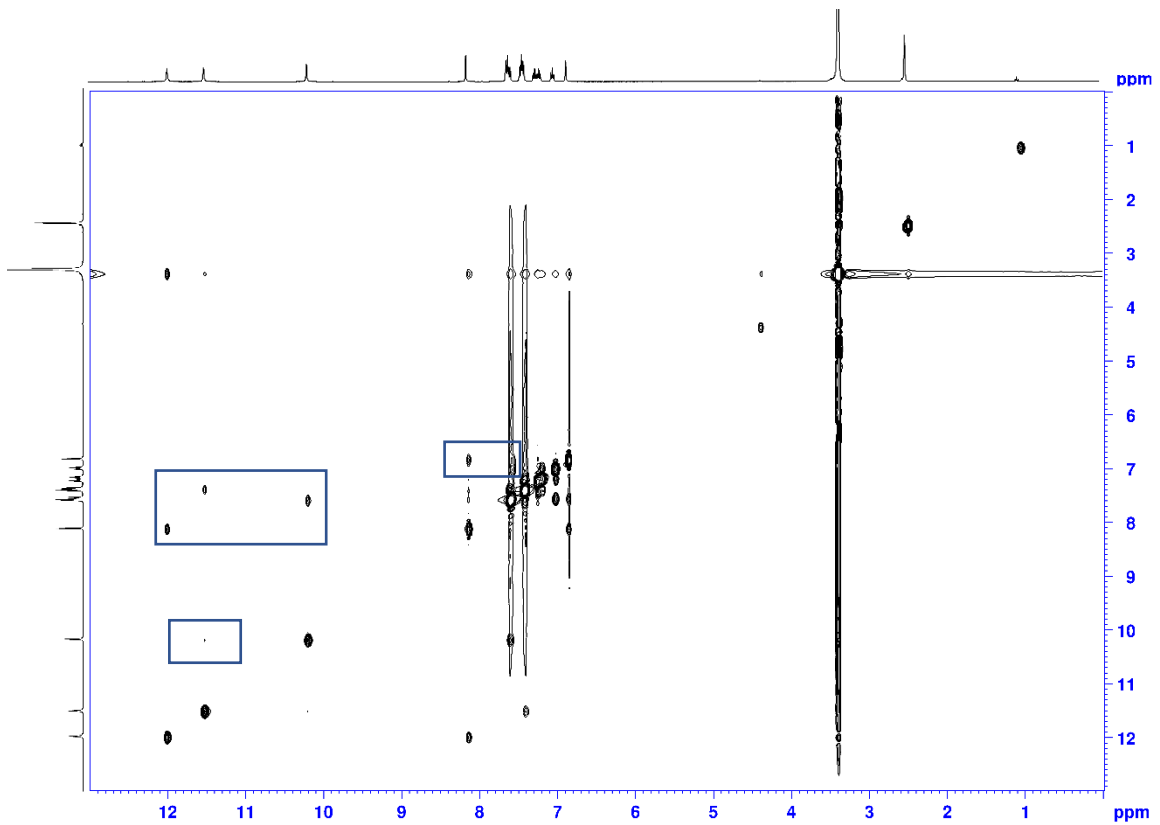


Figura 6.91: Espectro NOESY do composto 4.m, em DMSO- d_6 (principais correlações).

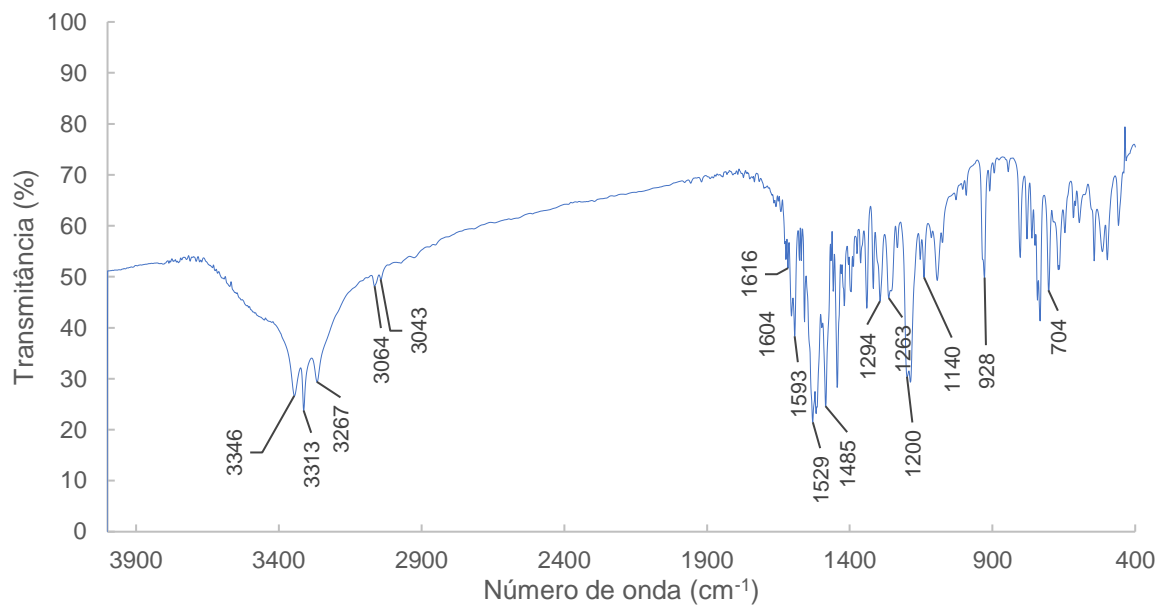


Figura 6.92: Espectro de IV do composto 4.m.

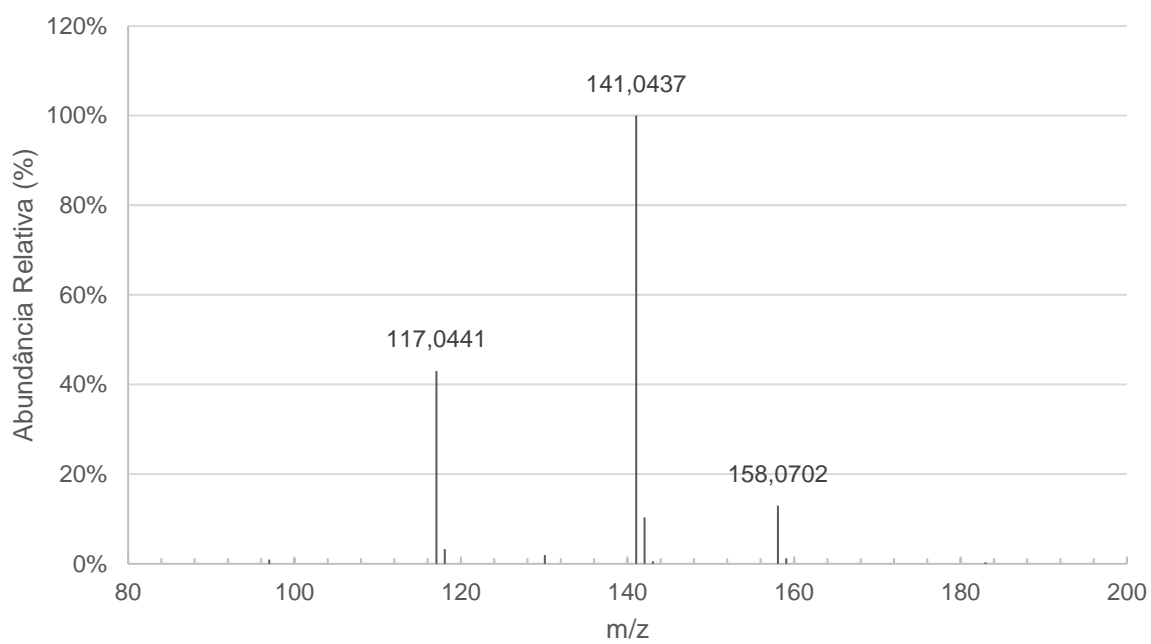


Figura 6.93: Espectro de HRMS do composto 4.m (principais fragmentos).

6.14. Apêndice 14 - (E)-2-((benzo[d]tiazol-2-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida (4.n)

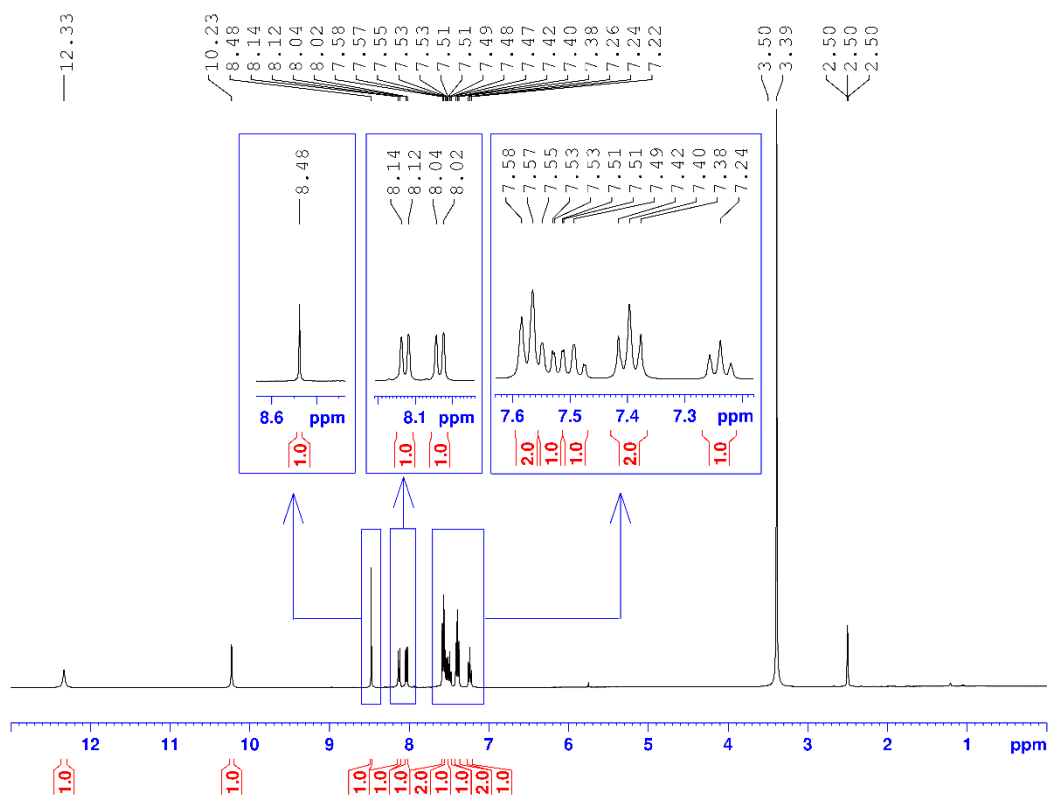


Figura 6.94: Espectro de RMN ^1H do composto 4.n, em DMSO- d_6 .

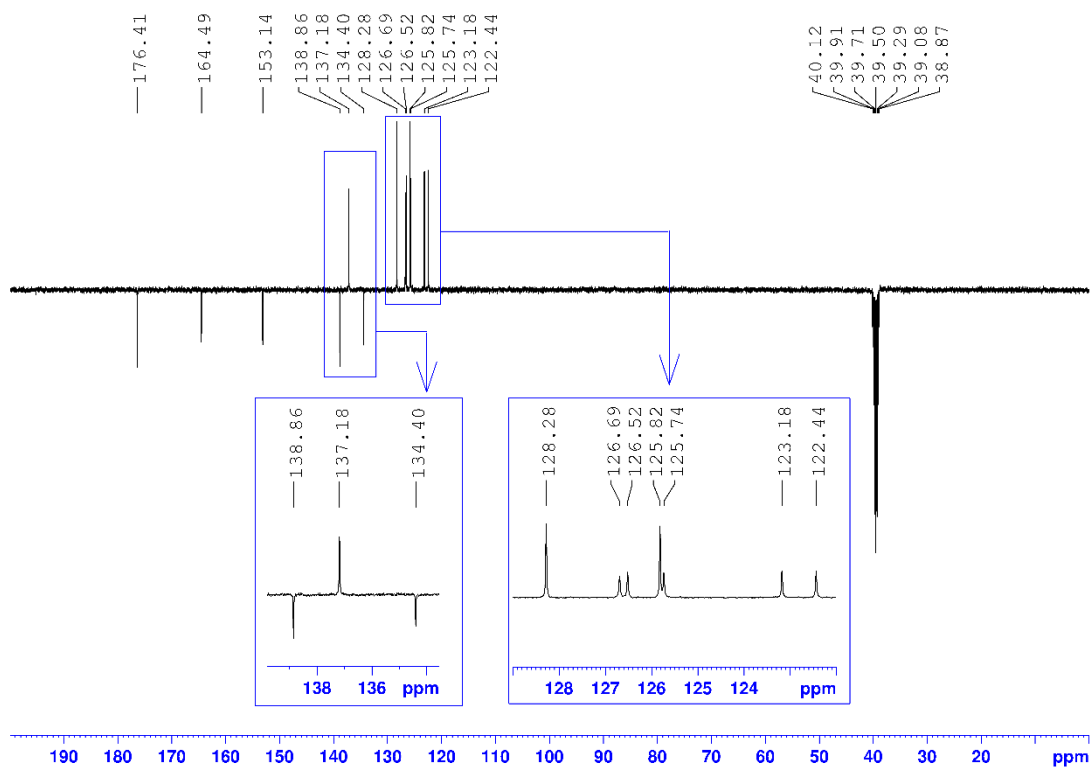


Figura 6.95: Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.n, em DMSO- d_6 .

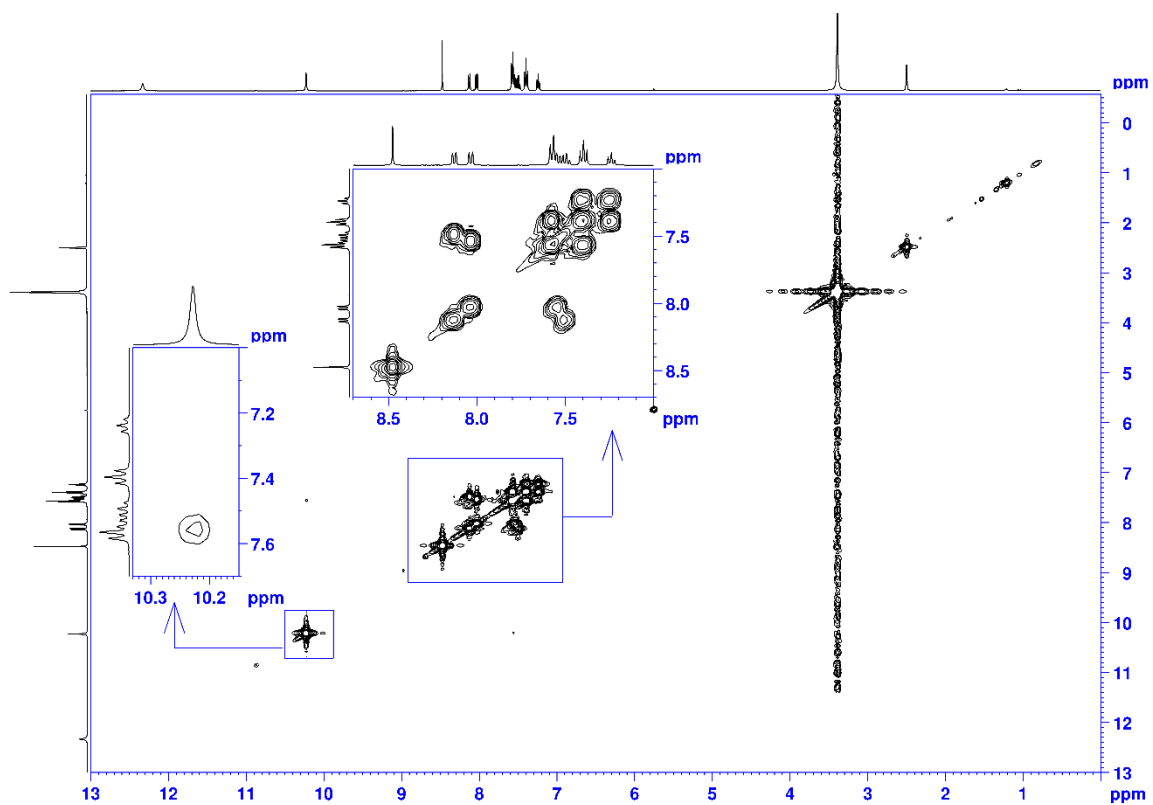


Figura 6.96: Espectro COSY do composto 4.n, em DMSO-d₆.

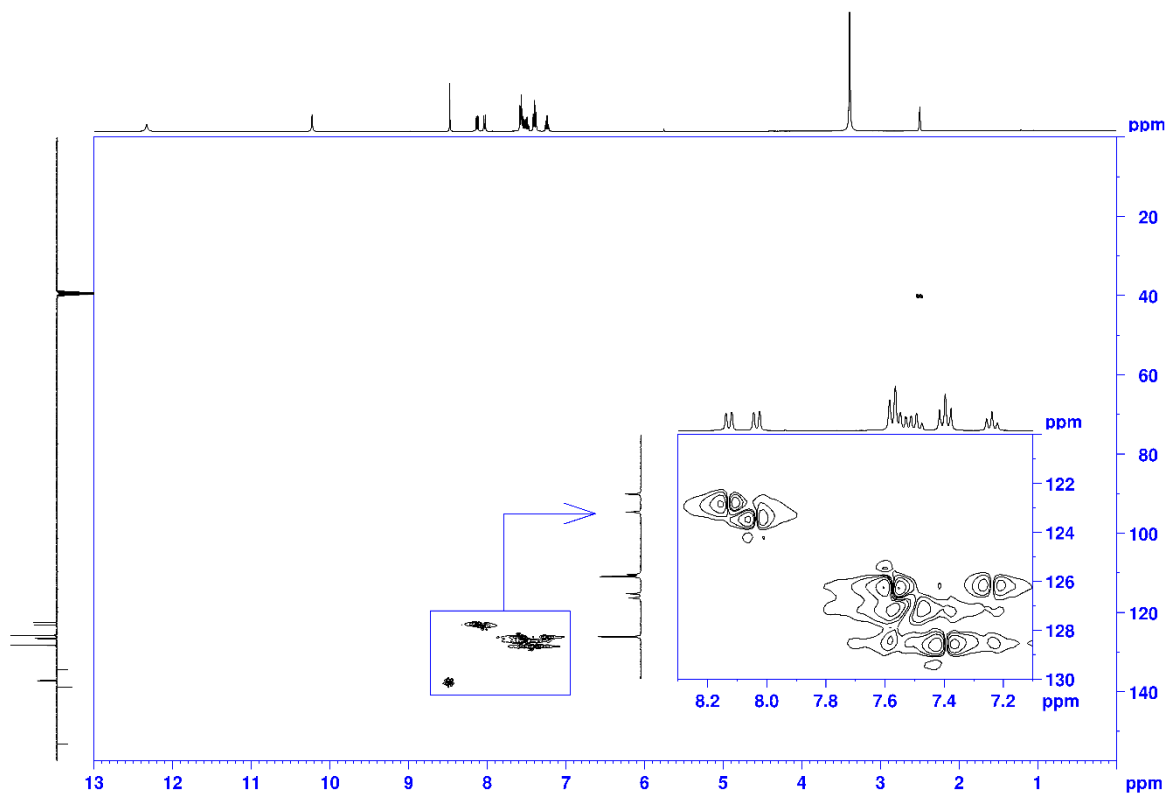


Figura 6.97: Espectro HSQC do composto 4.n, em DMSO-d₆.

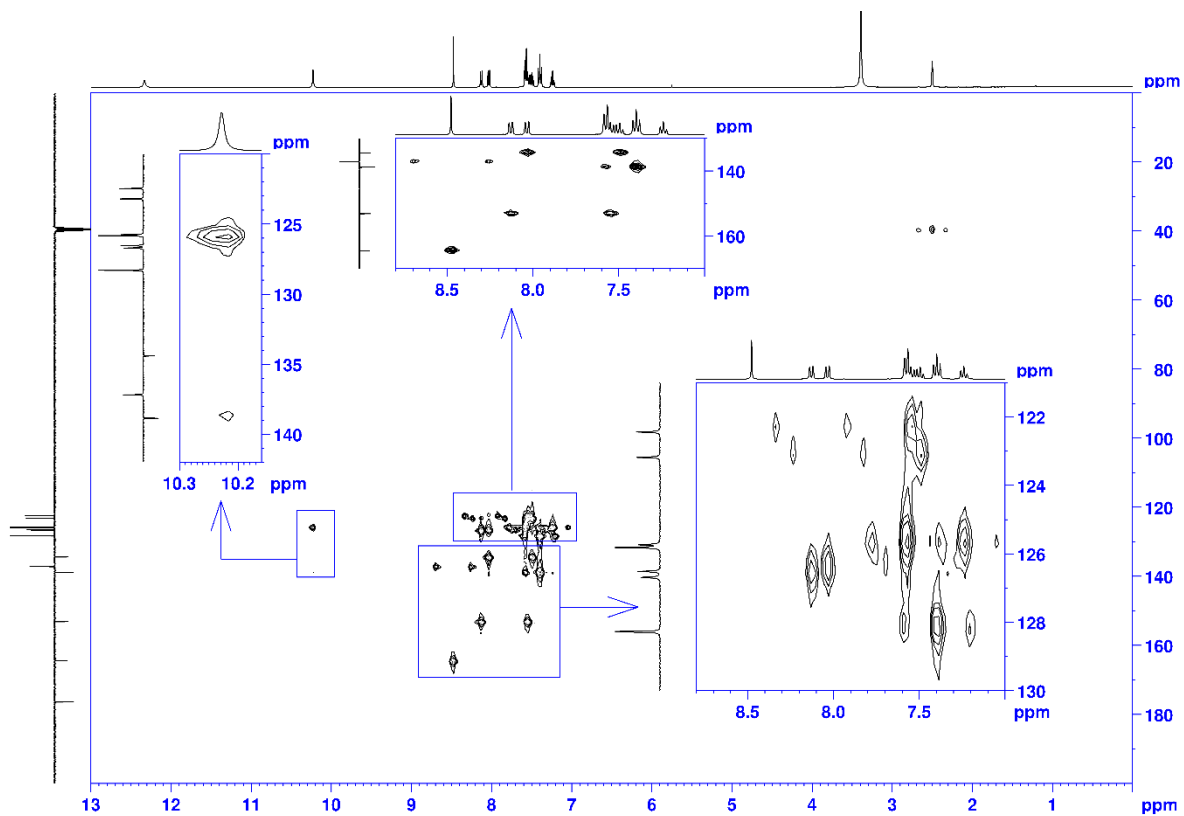


Figura 6.98: Espectro HMBC do composto 4.n, em DMSO-d₆.

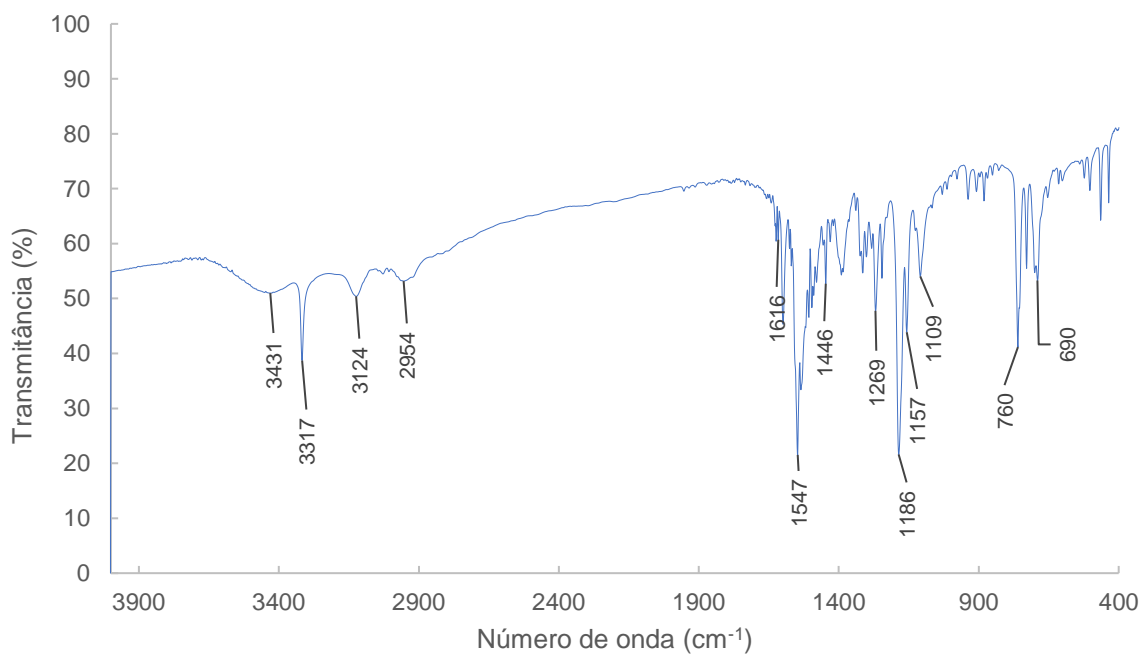


Figura 6.99: Espectro de IV do composto 4.n.

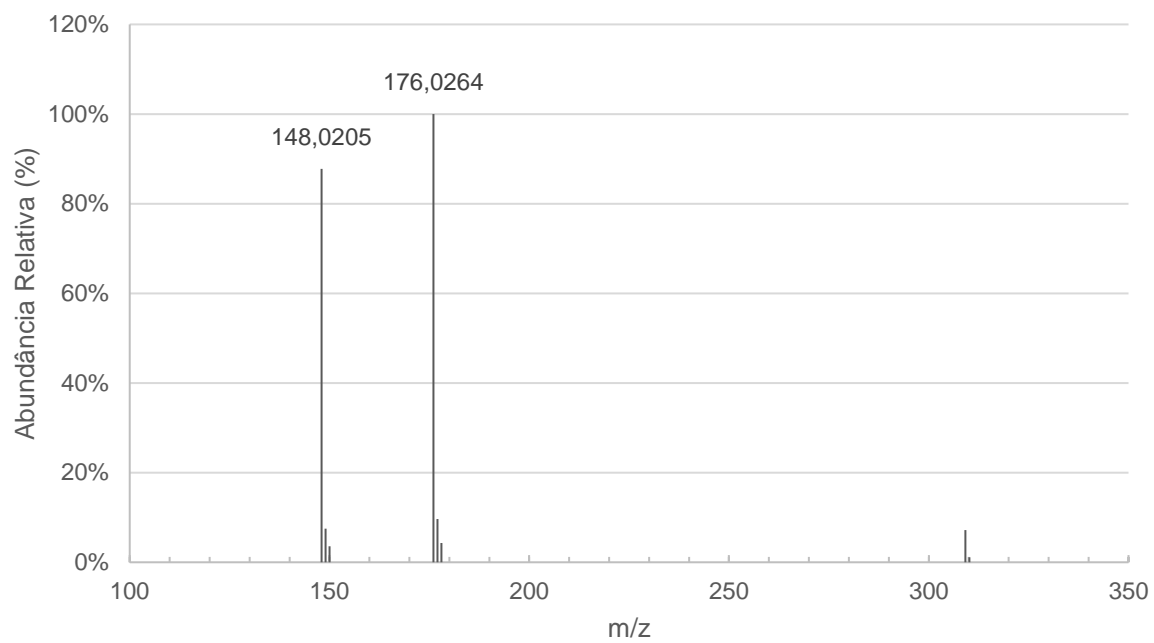


Figura 6.100: Espectro de HRMS do composto 4.n (principais fragmentos).

6.15. Apêndice 15 - (E)-2-((3-metil-1H-indole-2-il)metileno)-N-fenil-hidrazinacarbotioamida (4.o)

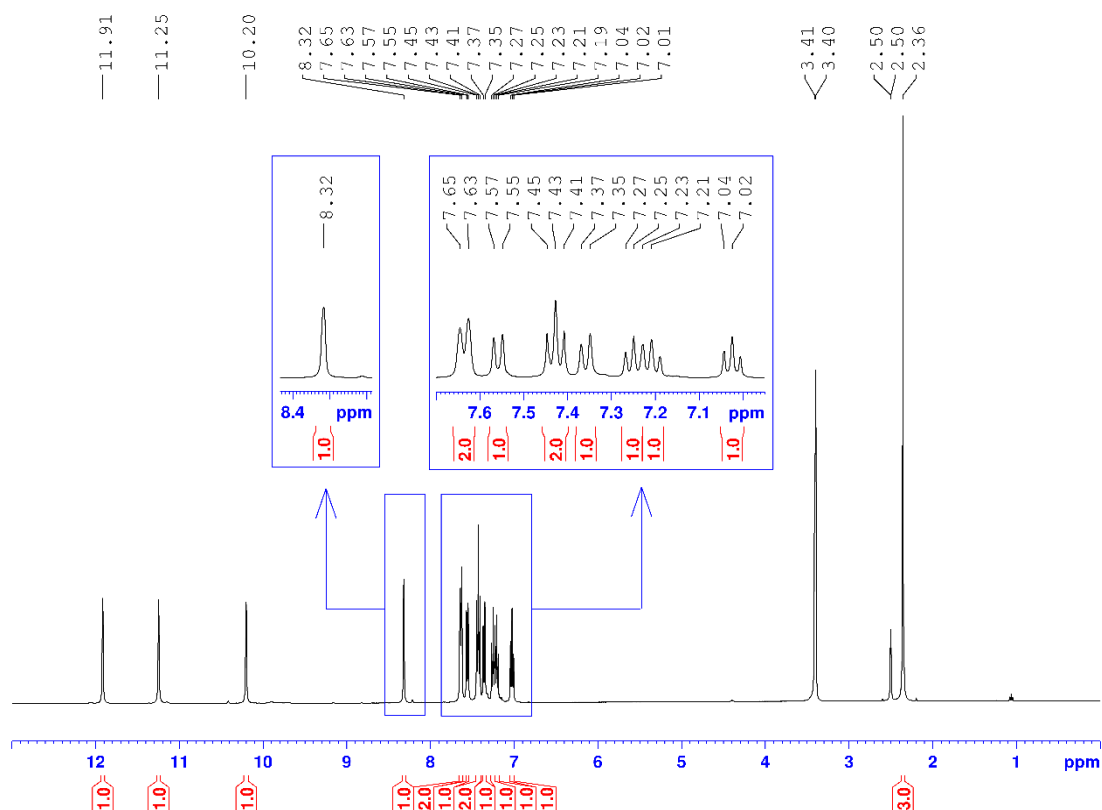


Figura 6.101: Espectro de RMN ^1H do composto 4.o, em DMSO-d_6 .

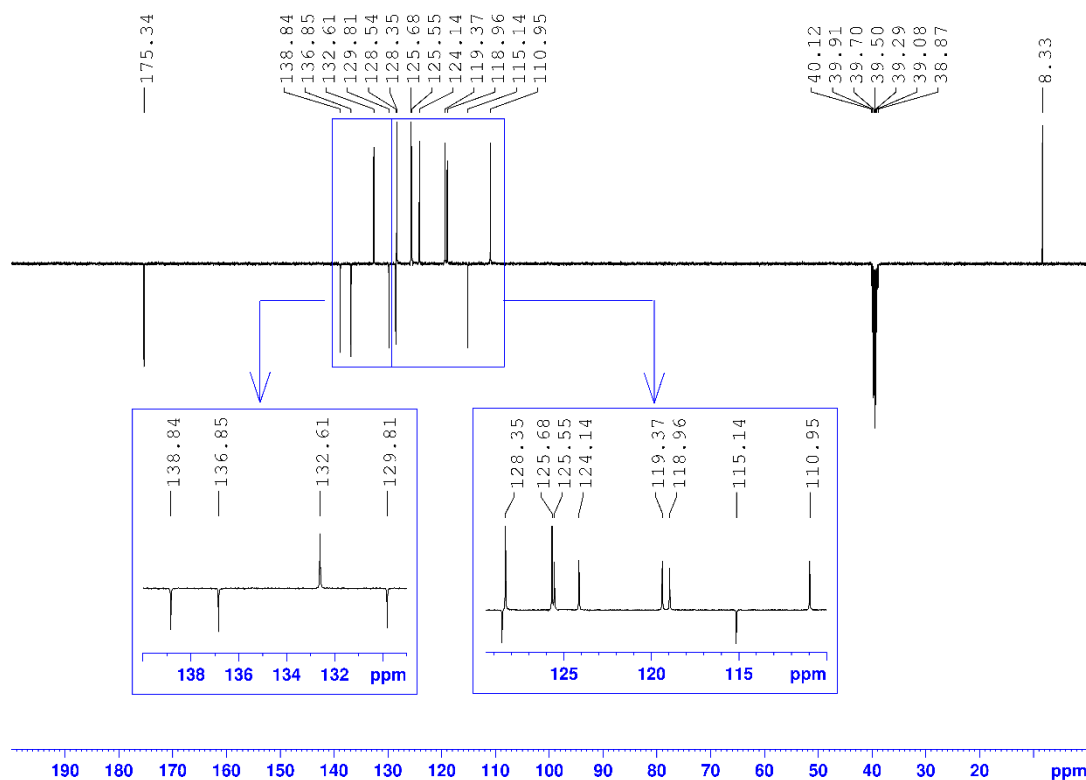


Figura 6.102: Espectro de RMN ^{13}C -APT do composto 4.o, em DMSO-d_6 .

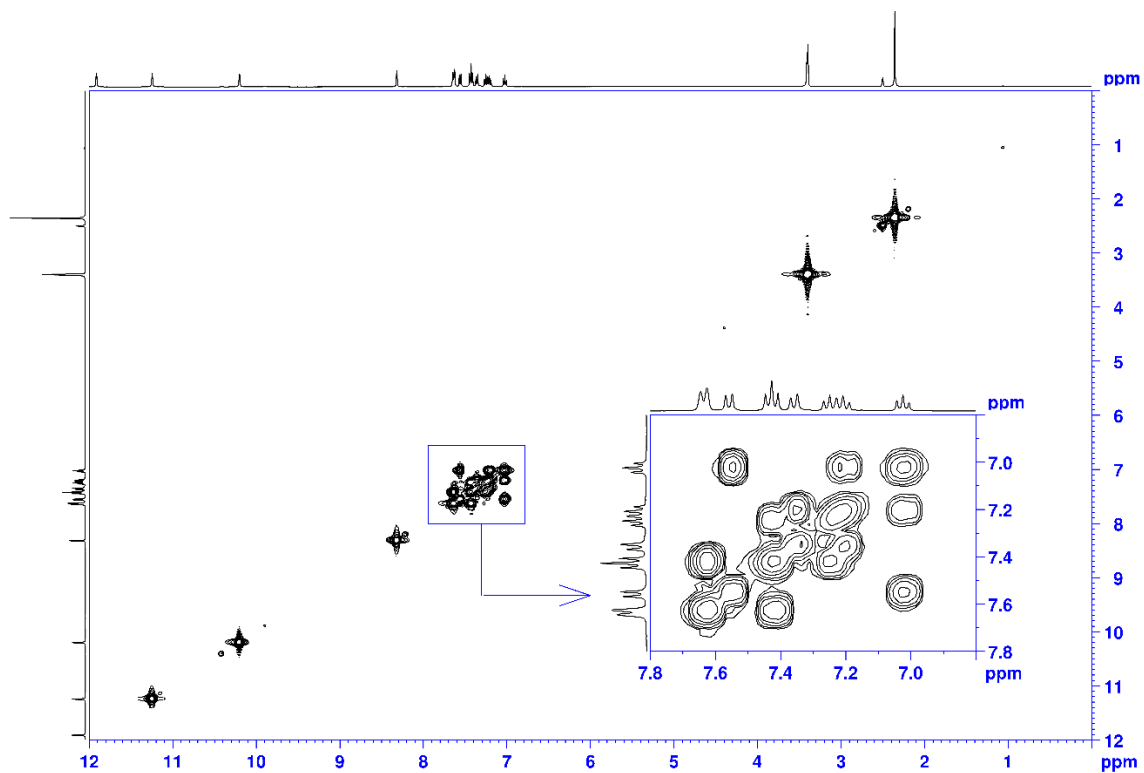


Figura 6.103: Espetro COSY do composto 4.o, em DMSO-d₆.

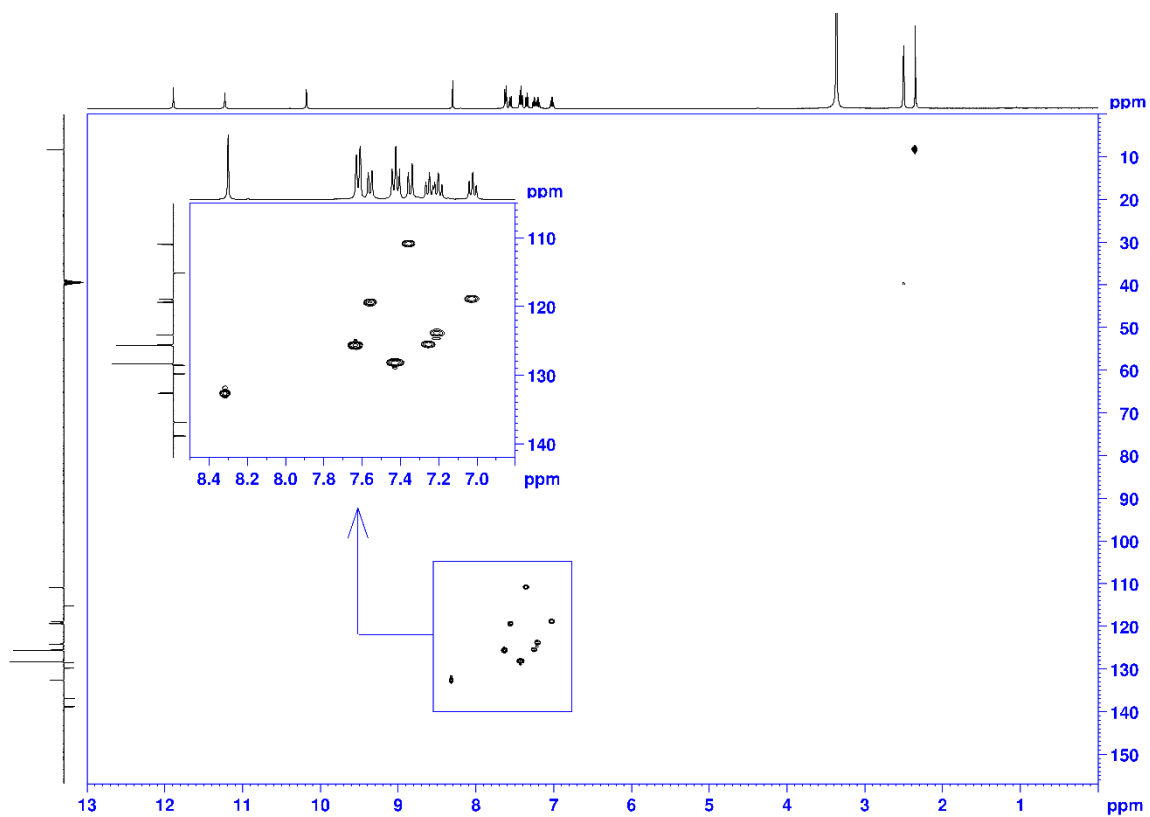


Figura 6.104: Espetro HSQC do composto 4.o, em DMSO-d₆.

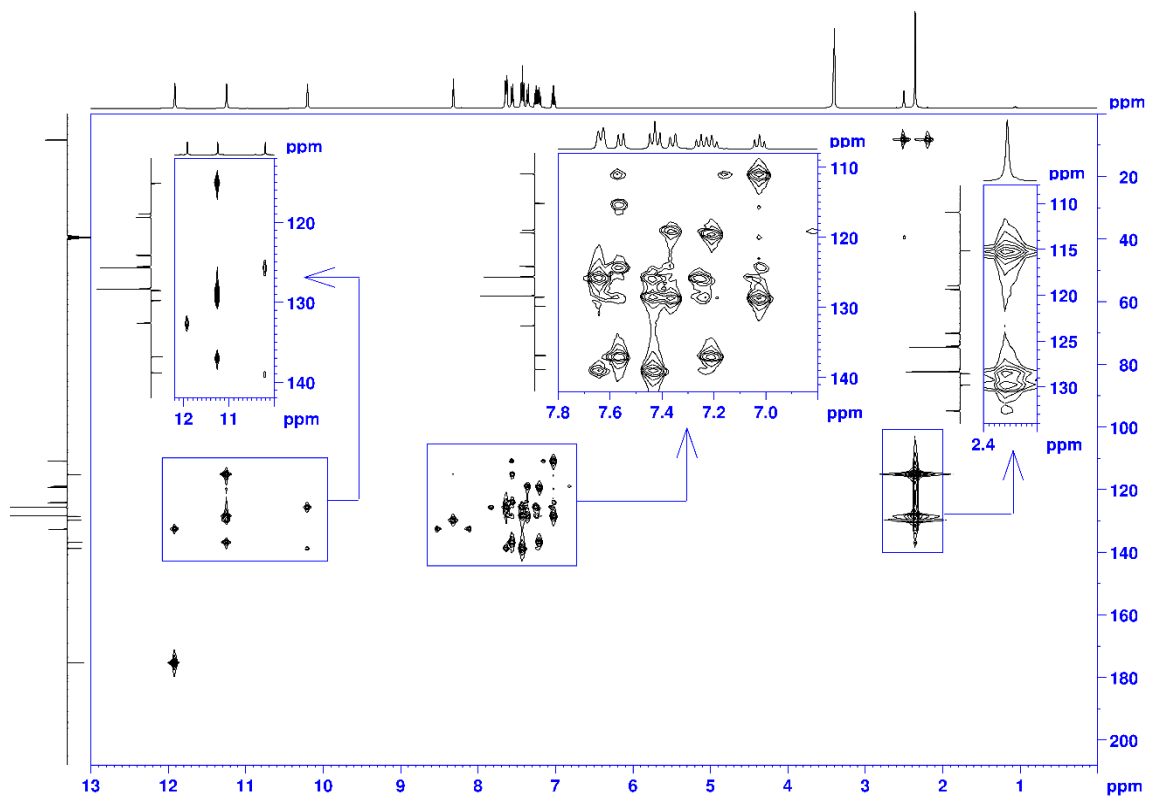


Figura 6.105: Espectro HMBC do composto 4.o, em DMSO-d₆.

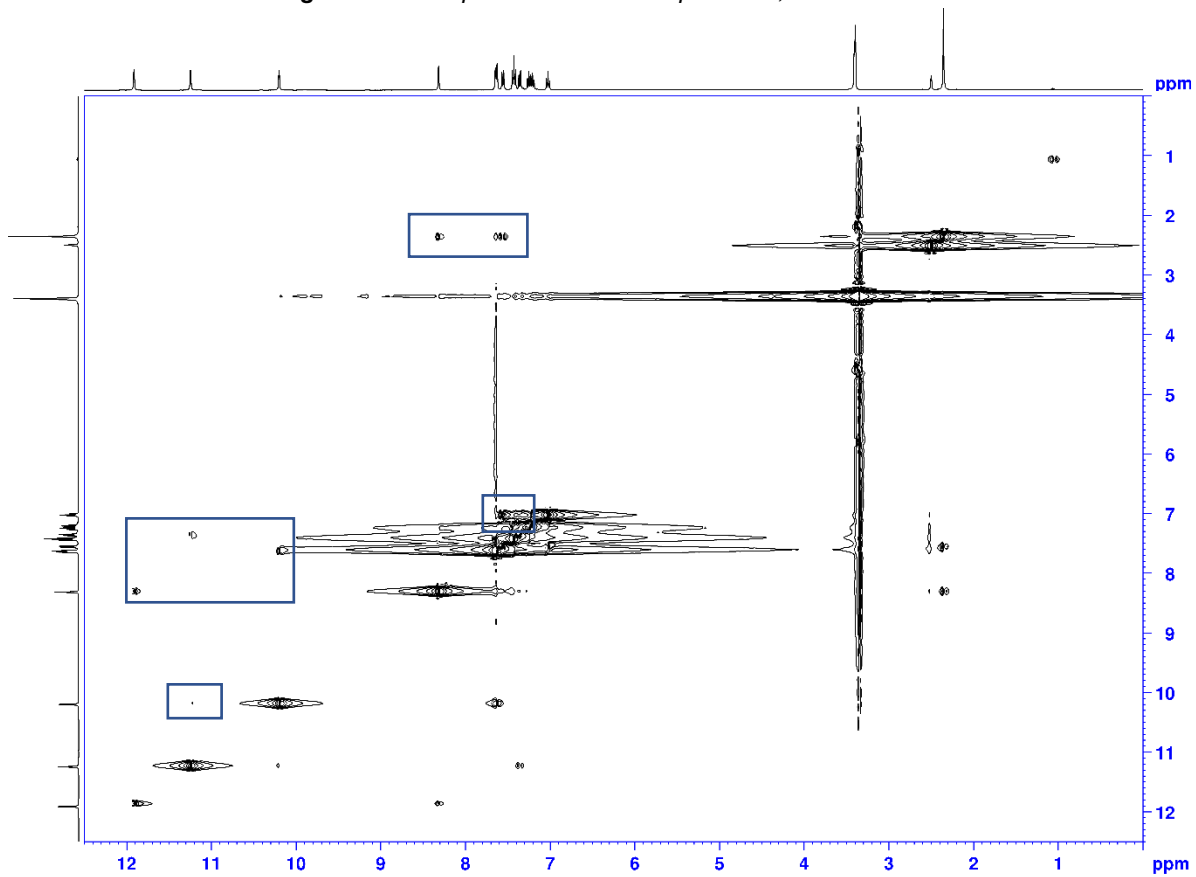


Figura 6.106: Espectro NOESY do composto 4.o, em DMSO-d₆ (principais correlações).

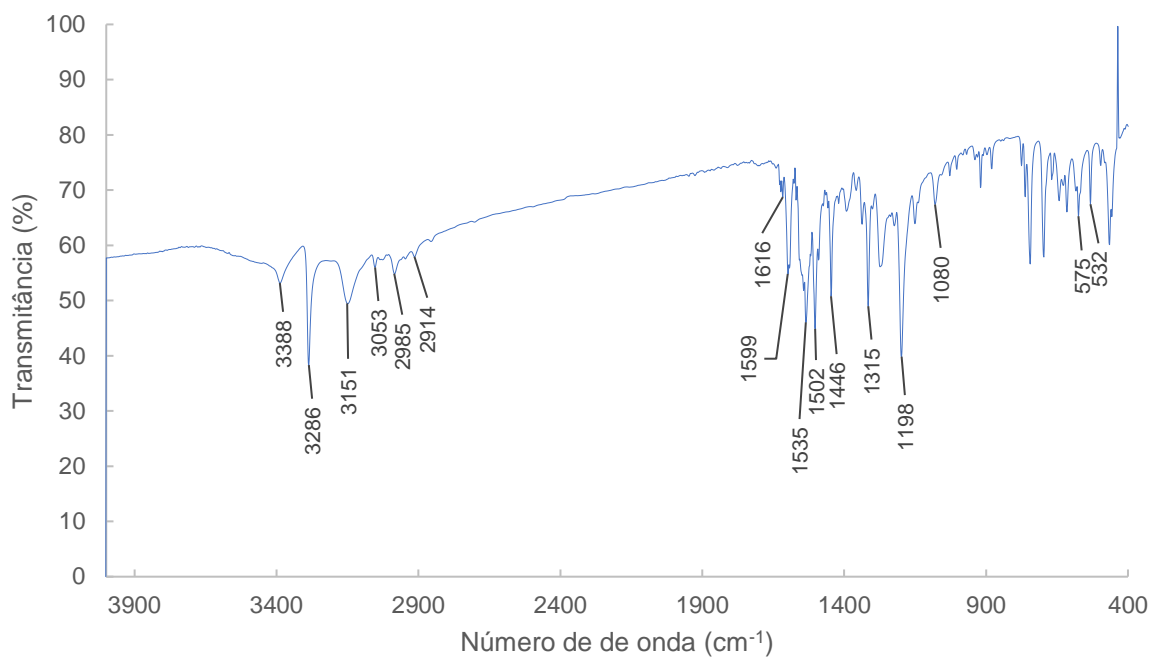


Figura 6.107: Espectro de IV do composto 4.o.

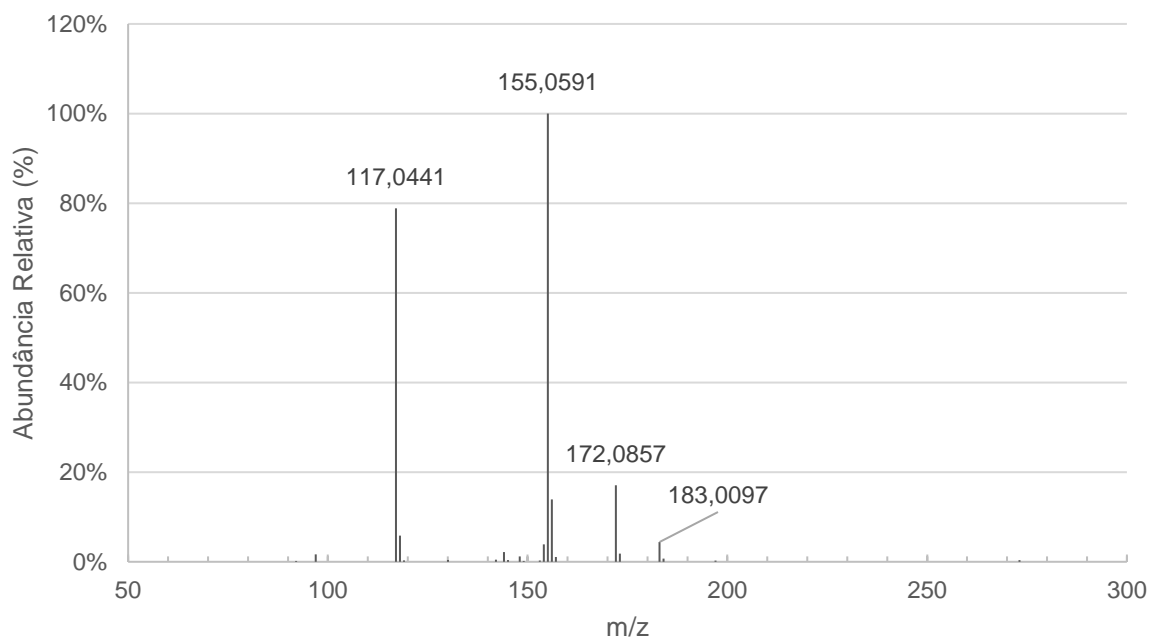


Figura 6.108: Espectro de HRMS do composto 4.o (principais fragmentos).

6.16. Apêndice 16 – Atividade antioxidante

Tabela 6.1: Percentagem de atividade antioxidante dos compostos 4.a - 4.o, testados em diferentes concentrações (μM).

	% Atividade antioxidante						EC ₅₀ (μM)
	Concentração (μM)						
	12,5	25	50	100	200	300	
4.a	11,92 ± 2,63	17,13 ± 2,90	30,52 ± 0,37	48,40 ± 1,69	68,10 ± 0,45	87,44 ± 0,52	139,21 ± 1,80
4.b	0,45 ± 0,12	2,32 ± 0,57	7,01 ± 0,57	14,55 ± 1,50	22,57 ± 0,59	30,76 ± 1,14	>300
4.c	1,50 ± 0,07	1,87 ± 0,13	2,48 ± 0,36	4,50 ± 0,24	8,09 ± 0,66	10,59 ± 0,76	>300
4.d	3,70 ± 0,49	8,33 ± 0,7	15,98 ± 0,66	33,60 ± 0,35	48,61 ± 1,66	67,81 ± 0,62	207,11 ± 11,92
4.e	0,23 ± 0,01	1,64 ± 0,03	2,63 ± 0,25	6,24 ± 0,45	9,66 ± 0,78	12,66 ± 0,21	>300
4.f	15,70 ± 0,18	20,52 ± 0,95	31,11 ± 0,83	48,74 ± 1,31	80,30 ± 0,33	90,27 ± 1,26	120,41 ± 0,59
4.g	14,63 ± 0,64	21,20 ± 1,44	28,67 ± 0,23	35,15 ± 0,45	50,28 ± 1,55	60,47 ± 1,54	211,62 ± 11,58
4.h	4,18 ± 0,23	5,22 ± 0,12	9,24 ± 0,53	14,57 ± 0,38	22,25 ± 1,14	28,44 ± 0,75	>300
4.i	3,22 ± 0,14	5,88 ± 0,40	10,63 ± 0,41	12,83 ± 0,03	20,13 ± 0,76	29,19 ± 1,30	>300
4.j	1,61 ± 0,08	3,76 ± 0,26	7,78 ± 0,37	11,33 ± 0,76	17,68 ± 0,85	28,57 ± 0,34	>300
4.k	1,19 ± 0,07	2,24 ± 0,11	3,15 ± 0,21	4,47 ± 0,52	11,73 ± 0,50	14,10 ± 0,59	>300
4.l	2,57 ± 0,11	5,00 ± 0,30	12,12 ± 0,33	19,91 ± 0,52	28,42 ± 0,86	40,95 ± 1,35	>300
4.m	4,43 ± 0,05	10,32 ± 0,28	16,41 ± 0,90	25,37 ± 0,82	42,19 ± 0,88	56,62 ± 0,75	252,16 ± 3,61
4.n	4,28 ± 0,09	8,03 ± 0,43	11,59 ± 0,76	23,17 ± 0,79	40,95 ± 1,23	69,43 ± 1,83	226,54 ± 16,66
4.o	12,73 ± 0,57	27,18 ± 0,19	52,57 ± 1,70	79,05 ± 0,89	89,38 ± 0,89	96,21 ± 1,42	-

	% Atividade antioxidante						EC ₅₀ (μM)
	Concentração (μM)						
	12,5	25	50	65	75	85	
4.o	16,82 ± 0,53	34,70 ± 0,78	53,04 ± 1,45	58,62 ± 0,87	65,93 ± 0,57	76,00 ± 0,74	51,34 ± 1,93