



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**Obtenção de uma nova classe de sais imidazólicos com  
potencial atividade antifúngica via metátese cruzada de  
derivados naturais**

*Júlia Lacerda Couto*

**Dissertação de Mestrado**

Porto Alegre, outubro de 2018.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**Obtenção de uma nova classe de sais imidazólicos com  
potencial atividade antifúngica via metátese cruzada de  
derivados naturais**

*Júlia Lacerda Couto*

**Dissertação de Mestrado**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre em Química.

Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker  
Orientador

Porto Alegre, outubro de 2018.

## DECLARAÇÃO

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais foram devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre 03/2016 e 08/2018, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação do Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Nicolau dos Santos – UFMG

Prof. Dr. Marco Antônio Ceschi – PPGQ/UFRGS

Prof. Dr. Diogo Seibert Lüdtke – PPGQ/UFRGS

Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker

Orientador

Júlia Lacerda Couto

*Á minha mãe Sônia e minha avó Hélia.*

## AGRADECIMENTOS

Certamente esse trabalho não seria possível sem o auxílio e apoio de diversas pessoas presentes tanto no âmbito familiar, na universidade, no círculo de amigos ou na mesa do bar.

Agradeço primeiramente a minha família que sempre incentivou-me e ofereceu-me afeto e apoiou, principalmente minha mãe Sônia e minha avó Hélia. Também agradeço as minhas irmãs, Camila, Carolina e Natália, minhas amadas sobrinhas Maria Clara, Cloé, Ana Beatriz e o sobrinho Enzo.

Ao Prof. Dr. Henri Stephan Schrekker, pela confiança em mim depositada para o desenvolvimento desse trabalho.

Durante o período de mestrado no Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise tive a oportunidade de compartilhar o mesmo com vários alunos de graduação e pós-graduação. Esses colegas tornaram meus dias mais agradáveis. Muito obrigada pelo conhecimento compartilhado, pelas piadas e risadas, pelos muitos copos de café e pelos vários canecos de cerveja. São eles: Débora Kélen, Yuri Sokolovicz, Vinícius Demétrio, Angela Lopez-Vinasco, Joice Klitzke, Joana Zanchetti, Kauana Nunes, Juliana Silva, Larissa Capeletti, Eduardo Karazinski, David Rivillo, Marcos Bergamim, Eduardo Soares e Gabriel Maciel. Não poderia deixar de prestar um agradecimento especial ao Leonildo Ferreira, muito obrigada pelos ensinamentos, pelas trocas de ideias e pelo auxílio sem tamanho na execução desse trabalho.

À Sabrina Moraes do LAMOCA, minha sincera gratidão por todos os “galhos quebrados” e pelas muitas risadas. A Edilma, minha colega de corredor, obrigada pelas conversas, companhia e fatias de torta no “Chiks”.

Às amigas Geise, Mariana, Kenia, Juliana e Flávia, apesar de não nos vermos com a frequência que gostaríamos, sei que posso sempre contar com vocês.

Ao Prof. Dr. Robert A. Burrow, do Departamento de Química da UFSM, pelas difrações de raios X, e à Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Luiza Ziulkoski do Laboratório de

Citotoxicidade da Feevale, pelos testes de atividade antioxidante e citotoxicidade. À Dra. Larissa Capeletti e à Me. Clarissa Schrekker pelo auxílio com os testes microbiológicos.

Aos técnicos e funcionários do Instituto de Química, pelos serviços prestados e pela execução de várias análises.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos, muito obrigada!

Júlia

# SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>V</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ESTADO DE ARTE</b> .....	<b>5</b>
2.1. Sais Imidazólicos.....	5
2.1.1. Propriedades biológicas dos sais imidazólicos .....	5
2.2. Catálise.....	8
2.3. Metátese de Olefinas.....	9
2.3.1. Catalisadores de metátese de olefinas .....	12
2.3.2. Mecanismo da metátese de olefinas com catalisadores de rutênio .....	14
2.3.3. Metátese cruzada de olefinas .....	17
2.4. Ácido cinâmico e seus análogos .....	18
2.5. Estilbenoides e suas propriedades biológicas .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
3.1. Objetivo geral .....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>24</b>
4.1. Considerações gerais.....	24
4.2. Procedimento geral das reações de metátese cruzada dos fenilpropenoides com ácido maleico.....	25
4.3. Procedimento geral de síntese das cinamamidas .....	27
4.4. Procedimento geral de síntese dos <i>N-n</i> -alquilimidazóis .....	28
4.5. Síntese dos sais imidazólicos .....	30
4.6. Procedimento geral de autometátese dos fenilpropenoides .....	32
4.7. Testes biológicos.....	37
4.7.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição.....	37
4.7.2. Testes in vitro de potencial antioxidante e citotoxicidade .....	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
5.1. Metátese cruzada dos fenilpropenoides com ácido maleico.....	41
5.1.1. Otimização.....	41
5.1.2. Metátese cruzada dos substratos isoeugenol e isosafrol com ácido maleico ....	46
5.2. Síntese das cinamamidas .....	47
5.3. Síntese dos sais imidazólicos .....	49
5.4. Estilbenóides obtidos através de autometátese dos fenilpropenoides .....	51
5.4.1. Atividade antioxidante dos estilbenoides .....	54
5.4.2. Citotoxicidade dos estilbenoides .....	55

5.5. Atividade antifúngica .....	57
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>69</b>
Anexo A – Fórmulas de cálculo de conversão, rendimento e seletividade das reações de metátese cruzada e autometátese.....	69
Anexo B – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ dos ácidos cinâmicos, cinamamidas e sais imidazólicos.....	73

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Alguns azóis utilizados no tratamento de doenças causadas por espécies de <i>Candida</i> .....	1
<b>Figura 2.</b> Estrutura genérica de uma molécula fenilpropenoide.....	3
<b>Figura 3.</b> Ácido cinâmico e cinamamida .....	4
<b>Figura 4.</b> a) Cloreto de 1- <i>n</i> -hexadecil-3-metilimidazólio. b) Representação esquemática do mecanismo de ação do SI. Permeação do SI na célula fúngica e sua interferência na síntese de ergosterol.....	7
<b>Figura 5.</b> Vários tipos de reações de metátese de olefinas.....	11
<b>Figura 6.</b> Catalisador de Schrock.....	12
<b>Figura 7.</b> a) Primeiro complexo Ru-alquilideno bem definido ativo para metátese de olefinas; b) Primeira e segunda geração de complexos de rutênio para metátese de olefinas.....	14
<b>Figura 8.</b> Categorização das olefinas e regras de seletividade.....	18
<b>Figura 9.</b> Estrutura C6-C3 do ácido cinâmico.....	18
<b>Figura 10.</b> Ácidos cinâmicos e derivados.....	20
<b>Figura 11.</b> Estrutura das moléculas estilbeno, resveratrol e DMU-212.....	21
<b>Figura 12.</b> Diagrama ORTEP da estrutura molecular do ( <i>E</i> )-4,4'-dimetoxiestilbeno ( <b>5a</b> ).....	34
<b>Figura 13.</b> Diagrama ORTEP da estrutura molecular do ( <i>E</i> )-1,2-di-(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno .....	36
<b>Figura 14.</b> Placa de 96 poços.....	39
<b>Figura 15.</b> a) Espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura reacional em CDCl <sub>3</sub> da reação de CM entre anetol e MA-H com conversão de 95 %, obtido em um equipamento Bruker de 400 MHz. b) Espectro de RMN <sup>1</sup> H detalhado da mistura reacional em CDCl <sub>3</sub> da reação de CM entre anetol e MA-H com conversão de 95 % com os picos característicos identificados.....	45
<b>Figura 16.</b> Espectro de IV da <i>N</i> -(2-cloroetil)-4-metoxicinamamida ( <b>2b</b> ).....	49
<b>Figura 17.</b> Sobreposição dos espectros de IV da <i>N</i> -(2-cloroetil)-4-metoxicinamamida ( <b>2b</b> ) e do cloreto de ( <i>E</i> )-1-(2-(4-metoxicinamamida)etil)-3- <i>n</i> -decilimidazólio ( <b>4c</b> ) .....	50
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H em CDCl <sub>3</sub> , do cloreto de ( <i>E</i> )-1-(2-(4-metoxicinamamida)etil)-3- <i>n</i> -decilimidazólio ( <b>4c</b> ).....	51

<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H do produto de AM do isosafrol ( <i>E</i> )-1,2-di-(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno ( <b>5c</b> ), com região dos hidrogênios aromáticos ampliada.....	53
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C do produto de AM do isosafrol ( <i>E</i> )-1,2-di-(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno ( <b>5c</b> ).....	54
<b>Figura 21.</b> Curva de viabilidade celular das substâncias <b>5a</b> , <b>5b</b> e <b>5c</b> submetidas a teste de citotoxicidade com células HaCaT com incorporação do biomarcador MTT.....	56
<b>Figura 22.</b> Curva de viabilidade celular das substâncias <b>5a</b> , <b>5b</b> e <b>5c</b> submetidas a teste de citotoxicidade com células Vero com incorporação do biomarcador vermelho neutro.....	57
<b>Figura 23.</b> Curva de viabilidade celular das substâncias <b>5a</b> , <b>5b</b> e <b>5c</b> submetidas a teste de citotoxicidade com células Vero com incorporação do biomarcador MTT.....	57
<b>Figura 24.</b> Substâncias testadas no ensaio de CIM.....	59
<b>Figura 25.</b> Estruturas do substrato e produtos para CM entre anetol e MA-H e espectro de RMN <sup>1</sup> H com região referente aos hidrogênios das metoxilas ampliada da reação de metátese cruzada entre anetol e MA-H com razão molar de G2 em relação ao anetol = 0,25 mol %, razão anetol:MA-H =1:2, THF = 1,5 mL, T= 50 °C, t = 30 min e conversão de anetol de 95 %.....	70
<b>Figura 26.</b> Estruturas do substrato e produtos para CM entre isoeugenol e MA-H e espectro de RMN <sup>1</sup> H com região referente aos hidrogênios das metoxilas ampliada da reação de metátese cruzada entre isoeugenol e MA-H com razão molar de G2 em relação ao isoeugenol = 0,25 mol %, razão isoeugenol:MA-H =1:2, THF = 1,5 mL, T= 50 °C, t = 30 min e conversão de isoeugenol de 99 %.....	71
<b>Figura 27.</b> Estruturas do substrato e produtos para CM entre isosafrol e MA-H e espectro de RMN <sup>1</sup> H com região referente aos hidrogênios dos metilenos ampliada da reação de metátese cruzada entre isosafrol e MA-H com razão molar de G2 em relação ao isosafrol = 0,25 mol %, razão isosafrol:MA-H =1:2, THF = 1,5 mL, T= 50 °C, t = 30 min e conversão de isosafrol de 86 %.....	72

<b>Figura 28.</b> a) Espectros de RMN <sup>1</sup> H e b) RMN <sup>13</sup> C do ácido <i>trans</i> -4-metoxicinâmico ( <b>1a</b> ) em DMSO- <i>d</i> 6.....	73
<b>Figura 29.</b> a) Espectros de RMN <sup>1</sup> H e b) RMN <sup>13</sup> C do ácido <i>trans</i> -ferúlico ( <b>1b</b> ) em DMSO- <i>d</i> 6.....	74
<b>Figura 30.</b> a) Espectros de RMN <sup>1</sup> H e b) RMN <sup>13</sup> C do ( <i>E</i> )- <i>N</i> -(2-cloroetil)cinamamida ( <b>2a</b> ) em CDCl <sub>3</sub> .....	75
<b>Figura 31.</b> a) Espectros de RMN <sup>1</sup> H e b) RMN <sup>13</sup> C do <i>N</i> -(2-cloroetil)-4-metoxicinamamida ( <b>2b</b> ) em CDCl <sub>3</sub> .....	76
<b>Figura 32.</b> a) Espectros de RMN <sup>1</sup> H e b) RMN <sup>13</sup> C do cloreto de ( <i>E</i> )-1-(2-cinamidoetil)- <i>n</i> -3-decilimidazólio ( <b>4a</b> ) em CDCl <sub>3</sub> .....	77
<b>Figura 33.</b> a) Espectros de RMN <sup>1</sup> H e b) RMN <sup>13</sup> C do cloreto de ( <i>E</i> )-1-(2-cinamidoetil)-3- <i>n</i> -hexadecilimidazólio ( <b>4b</b> ) em CDCl <sub>3</sub> .....	78
<b>Figura 34.</b> a) Espectros de RMN <sup>1</sup> H e b) RMN <sup>13</sup> C do cloreto de ( <i>E</i> )-1-(2-(4-metoxicinamamida)etil)-3- <i>n</i> -decilimidazólio ( <b>4c</b> ) em CDCl <sub>3</sub> .....	79
<b>Figura 35.</b> a) Espectros de RMN <sup>1</sup> H e b) RMN <sup>13</sup> C do ( <i>E</i> )-4,4'-dimetoxiestilbeno ( <b>5a</b> ) em CDCl <sub>3</sub> .....	80
<b>Figura 36.</b> a) Espectros de RMN <sup>1</sup> H e b) RMN <sup>13</sup> C do cloreto de ( <i>E</i> )-3,3'-dimetoxi-4,4'-dihidroxiestilbeno ( <b>5b</b> ) em CDCl <sub>3</sub> .....	81
<b>Figura 37.</b> a) Espectros de RMN <sup>1</sup> H e b) RMN <sup>13</sup> C do cloreto de ( <i>E</i> )-1,2-di-(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno ( <b>5c</b> ) em CDCl <sub>3</sub> .....	82

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Síntese do SI cloreto de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio.....	5
<b>Esquema 2.</b> Reação de Metátese de Olefinas.....	10
<b>Esquema 3.</b> Mecanismo da reação de metátese proposta por Chauvin.....	11
<b>Esquema 4.</b> Mecanismo de iniciação para catalisadores do tipo Grubbs e Hoveyda-Grubbs.....	15
<b>Esquema 5.</b> Mecanismo de propagação dos catalisadores de rutênio para metátese de olefinas.....	16
<b>Esquema 6.</b> a) Captura do complexo Ru-metilideno pela fosfina. b) Desativação do complexo Ru-metilideno.....	17
<b>Esquema 7.</b> Condensação de Knövenagel-Döbner para produção de ácido trans-cinâmico a partir de benzaldeído.....	19
<b>Esquema 8.</b> Algumas reações do ácido cinâmico.....	19
<b>Esquema 9.</b> Obtenção dos sais imidazólicos a partir dos fenilpropenoides.	22
<b>Esquema 10.</b> Rota de obtenção dos sais imidazólicos.....	23
<b>Esquema 11.</b> Metátese cruzada de um fenilpropenoide e MA-H.....	25
<b>Esquema 12.</b> Síntese das cinamamidas <b>2a-b</b> .....	27
<b>Esquema 13.</b> Síntese dos <i>N-n</i> -alquilimidazois <b>3a-b</b> .....	29
<b>Esquema 14.</b> Síntese dos sais imidazólicos ( <b>4a-c</b> ) a partir das cinamamidas ( <b>2a-b</b> ).....	30
<b>Esquema 15.</b> Reação de autometátese dos fenilpropenoides.....	32
<b>Esquema 16.</b> Reação de metátese entre os substratos fenilpropenoides e MA-H e os possíveis produtos.....	42
<b>Esquema 17.</b> a) Mecanismo de obtenção dos cloretos de ácido. b) Mecanismo de obtenção das cinamamidas.....	48
<b>Esquema 18.</b> Mecanismo de síntese dos sais imidazólicos.....	49
<b>Esquema 19.</b> Reação de autometátese dos fenilpropenoides.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados da estrutura cristalina/molecular do ( <i>E</i> )-4,4'-dimetoxiestilbeno.....	33
<b>Tabela 2.</b> Dados da estrutura cristalina/molecular do ( <i>E</i> )-1,2-di-(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno.....	36
<b>Tabela 3.</b> Efeito da razão molar do catalisador G2 com relação ao anetol, sobre a CM entre anetol e MA-H.....	42
<b>Tabela 4.</b> Efeito da razão molar anetol:MA-H sobre a metátese cruzada entre anetol e ácido maleico (MA-H).....	43
<b>Tabela 5.</b> Efeito da concentração dos substratos sobre a metátese cruzada entre anetol e MAH.....	43
<b>Tabela 6.</b> Efeito da temperatura sobre a metátese cruzada entre anetol e ácido MA-H.....	44
<b>Tabela 7.</b> Reações de metátese cruzada com os fenilpropenoides.....	47
<b>Tabela 8.</b> Conversão e rendimento dos produtos de autometátese.....	52
<b>Tabela 9.</b> Relação das absorvâncias e atividade em função da concentração molar obtidos no FRAP para os estilbenoides.....	55
<b>Tabela 10.</b> Atividade antifúngica <i>in vitro</i> das cinamamidas e SI.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$  – Primeira posição em relação a um átomo ou grupo específico.

$\beta$  – Segunda posição em relação a um átomo ou grupo específico.

$\delta$  – Deslocamento químico, expresso em ppm (partes por milhão – RMN).

**ADMET** – Polimerização via metátese de dieno acíclico, do inglês *Acyclic diene metathesis polymerization*.

**AM** – Autometátese.

**ATCC** – *American Type Culture Collection*.

**ATR** – Refletância total atenuada, do inglês *Attenuated total reflectance*.

**CIM** – Concentração inibitória mínima.

**CLSI** – *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

**C<sub>16</sub>MImCl** – Cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólio.

**CM** – Metátese cruzada, do inglês *cross metathesis*.

**d** – Duplete (RMN).

**dd** – Duplo duplete (RMN).

**E**- Se refere a dois grupos de mais alta prioridade em uma ligação C=C dispostos em lados opostos.

**e<sup>-</sup>** – Elétron.

**ESI** – Ionização por eletronebulização, do inglês *Electrospray ionization*.

**EYM** – Metátese de enino, do inglês *Enyne metathesis*.

**FRAP** – Método de redução de ferro, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*.

**G1** – Catalisador de Grubbs de primeira geração.

**G2** – Catalisador de Grubbs de segunda geração.

**GC-MS** – Cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas.

**HG1** – Catalisador Hoveyda-Grubbs de primeira geração.

**HG2** – Catalisador Hoveyda-Grubbs de segunda geração.

**IUPAC** – *International Union of Pure and Applied Chemistry*.

**IV** – Infravermelho.

**J** – Constante de acoplamento, expressa em Hz (RMN).

**LI** – Líquido iônico.

**m** – multiplete (RMN).

**MA-H** – Ácido maleico, do inglês *maleic acid*.

**MOPS** – ácido 3-(*n*-*N*-morfolino)propanosulfônico.

**MTT** – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio].

**NHC** - Carbeno *N*-heterocíclico.

**ORTEP** - *Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot*.

**q** – Quarteto (RMN).

**RCM** – Metátese de fechamento de anel, do inglês *Ring-closing metathesis*.

**RMN <sup>13</sup>C** – Ressonância magnética nuclear de carbono treze.

**RMN <sup>1</sup>H** – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

**ROCM** – Metátese cruzada de abertura do anel, do inglês *Ring opening cross metathesis*.

**ROMP** – Polimerização via metátese de abertura de anel, do inglês *Ring-opening metathesis polymerization*.

**RPMI 1640** – meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*.

**s** – Singleto (RMN).

**SHOP** - *Shell Higher Olefin Process*.

**SI** – Sal(is) imidazólico(s).

**t** – tripleto (RMN).

**UFC** – Unidades formadoras de colônias.

**VN** – Vermelho neutro.

**Z**- Se refere a dois grupos de mais alta prioridade em uma ligação C=C dispostos do mesmo lado.

## RESUMO

O desenvolvimento de novos medicamentos para tratamento de infecções graves causadas por fungos do gênero *Candida* é de suma importância, tendo em vista o aumento dos casos de pacientes contaminados com cepas resistentes aos medicamentos disponíveis. Diante desse quadro, é também interessante que novos medicamentos possam ser obtidos por rotas sustentáveis, partindo de substratos provenientes de fontes naturais.

Os substratos fenilpropenoides foram submetidos a reações de metátese cruzada (CM, do inglês *cross metathesis*) com ácido maleico (MA-H, do inglês *maleic acid*), obtendo-se ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, da classe dos ácidos cinâmicos, utilizando como catalisador o complexo de rutênio Grubbs de segunda geração (G2). Nas reações de CM dos fenilpropenoides com MA-H, a molécula de anetol foi tomada como substrato modelo. A CM entre anetol e MA-H foi investigada e vários parâmetros foram otimizados, como razão molar do catalisador em relação ao anetol, razão anetol:MA-H, concentração do substrato e temperatura. Todas as reações foram realizadas em 30 minutos. Se obteve uma condição otimizada com 0,25 mol% de catalisador G2 em relação ao substrato, razão anetol:MA-H de 1:2, concentração de substrato de 2,53 mol.L<sup>-1</sup> e temperatura igual a 50 °C, onde a conversão foi de 95% e a seletividade para o produto de CM foi de 52%. As condições otimizadas foram aplicadas aos fenilpropenoides isoeugenol e isosafrol. Para o isoeugenol se obteve a melhor conversão, acima de 99% e rendimento para o produto de CM de 99%. Ácido cinâmico e ácido 4-metoxicinâmico foram convertidos em moléculas do tipo *N*-2-cloroetilcinamamidas. As *N*-2-cloroetilcinamamidas foram aplicadas na alquilação de *n*-alquilimidazóis, para obtenção de uma nova classe de sais imidazólicos (SI). As propriedades antifúngicas desses sais foram avaliadas através do ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) com cepas de *Candida*. No ensaio de CIM foram testadas as *N*-2-cloroetilcinamamidas e os SI em comparação com o fármaco comercial fluconazol. As cepas foram sensíveis a todas as moléculas testadas, porém as cinamamidas mostraram valores de CIM pouco significativos. Todos os SI apresentaram valores de CIM próximos ao do fluconazol. O SI com melhor

valor de CIM foi o cloreto de (*E*)-1-(2-cinamamidoetil)-3-hexadecilimidazólio, que foi de  $1 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  para *Candida albicans* e *C. tropicalis*.

Foram também realizadas reações de autometátese (AM) dos fenilpropenoides anetol, isoeugenol e isosafrol, se obtendo como produtos moléculas estilbenoides com conversões  $\geq 90\%$  e rendimentos  $\geq 88\%$ . Ensaio antioxidantes e de citotoxicidade foram realizados com os estilbenóides, a fim de avaliar tais propriedades nessas moléculas. O ensaio antioxidante foi realizado pelo método FRAP (Método de Redução do Ferro) e somente a molécula proveniente da AM do anetol, (*E*)-4,4'-dimetoxiestilbeno, apresentou potencial antioxidante. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com células HaCaT com e o marcador mitocondrial MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]) e também com células Vero utilizando os marcadores MTT e o marcador lisossomal vermelho neutro (VN) (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina). Os ensaios utilizando células HaCaT apontou citotoxicidade considerada relevante apenas para o estilbeno (*E*)-3,3'-dimetoxi-4,4'-dihidroxiestilbeno, derivado do isoeugenol. No ensaio com células Vero e marcador lisossomal apenas o estilbeno derivado do isoeugenol apresentou viabilidade celular acima de 70% para todas as concentrações, enquanto que para o marcador mitocondrial essa mesma molécula foi a única a apresentar viabilidade celular inferior a 70%, na concentração mais alta.

## ABSTRACT

The development of new drugs to treat severe infections caused by fungi of the genus *Candida* is of paramount importance in view of the increase in cases of patients contaminated with strains resistant to the available drugs. Simultaneously, it is also of interest to develop sustainable routes for the preparation of new drugs, using substrates from natural sources like phenylpropenoids.

Phenylpropenoid substrates were submitted to cross-metathesis (CM) reactions with maleic acid (MA-H).  $\alpha,\beta$ -Unsaturated carboxylic acids of the cinnamic acid class were obtained when the second-generation Grubbs ruthenium complex (**G2**) was applied as catalyst. In the CM reactions of phenylpropenoids with MA-H, anethole was taken as model substrate. The CM between anethole and MA-H was investigated and several parameters were optimized, such as molar ratio of the catalyst to anethole, anethole:MA-H molar ratio, substrate concentration and temperature. The reaction time was kept constant at 30 minutes, and the optimized conditions were as follows: 0.25 mol% of catalyst **G2** in relation to the substrate, anethole:MA-H molar ratio of 1:2, substrate concentration of 2.53 mol.L<sup>-1</sup> and temperature of 50 °C; resulting in a conversion of 95% and a CM selectivity of 52%. Both phenylpropenoids isoeugenol and isosafrole were applied under the optimized conditions. The best conversion and CM yield were achieved with isoeugenol, being  $\geq 99\%$  and 99%, respectively. Commercial cinnamic acid and 4-methoxycinnamic acid obtained through CM were converted to *N*-2-chloroethylcinnamamide molecules. The *N*-2-chloroethylcinnamamides were applied in the alkylation of *n*-alkylimidazoles to obtain a new class of imidazolium salts (IS). The antifungal properties of both *N*-2-chloroethylcinnamamides and IS were tested in the minimum inhibitory concentration (MIC) assay with *Candida* strains, using the commercial drug fluconazole as comparison. The strains were sensitive to all the molecules tested, but the *N*-2-chloroethylcinnamamides showed less significant MIC values. All IS had MIC values close to those of fluconazole, and the best MIC value of 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  against *Candida albicans* and *C. tropicalis* was obtained with (*E*)-1-(2-cinnamidethyl)-3-*n*-hexadecylimidazolium chloride, outperforming fluconazole.

Self-metathesis (AM) reactions with the phenylpropenoids anethole, isoeugenol and isosafrol resulted in the formation of stilbenoids with conversions  $\geq 90\%$  and yields  $\geq 88\%$ . These stilbenoids were submitted to antioxidant and cytotoxicity assays. The antioxidant assay was performed by the FRAP (FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*) method, which showed antioxidant potential for the molecule from the anethole AM, (*E*)-4,4'-dimethoxystilbene. Cytotoxicity assays were performed with HaCaT cells and the MTT mitochondrial marker ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]), and also with Vero cells using the MTT and the neutral red (VN) lysosomal markers (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine). Assays using HaCaT cells demonstrated relevant cytotoxicity only for (*E*)-3,3'-dimethoxy-4,4'-dihydroxystilbene, derived from isoeugenol. In the assay with Vero cells and the lysosomal marker, the stilbene derived from isoeugenol presented cell viabilities above 70% for all tested concentrations. In contrast, when applying the mitochondrial marker, the same molecule was the only one to present cell viability of less than 70% at the highest concentration tested.

“... traz na capa, em letras garrafais e amigáveis,  
a frase NÃO ENTRE EM PÂNICO.”

“Eu posso não ter ido para onde eu pretendia ir, mas eu acho que acabei  
terminando onde eu pretendia estar.”

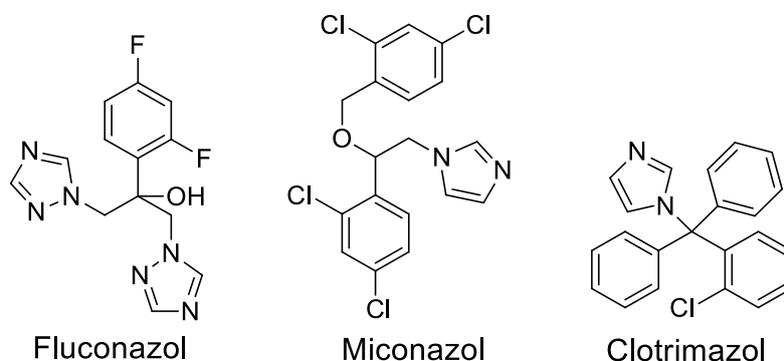
Douglas Adams

“O guia do Mochileiro das Galáxias”

# 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas ocorreu um aumento de relatos de casos de infecções fúngicas em diferentes populações de pacientes. Em aproximadamente 80% dos casos relatados de infecções na corrente sanguínea causadas por fungos, os microrganismos responsáveis pertencem às espécies de *Candida*.<sup>1</sup> Espécies de *Candida* são patógenos oportunistas fúngicos, que estão presentes na microbiota humana e são o segundo maior agente causador de doenças fúngicas no mundo. Dentre as doenças causadas por *Candida spp.* estão desde as mais superficiais e manifestações clínicas leves, como a candidíase esofágica e a orofaríngea, até infecções sérias, como infecções da corrente sanguínea (candidemia). O aumento dos casos de infecções graves causadas por *Candida spp.* é associado ao aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, especialmente aqueles infectados por HIV, pacientes recebendo quimioterapias agressivas, transplantados, pacientes que passaram por procedimentos médicos invasivos.<sup>2,3</sup>

Dentre os principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento de infecções por *Candida*, estão os polienos, a flucitosina e os azóis. Os azóis estão entre as substâncias mais utilizadas no tratamento de candidíase, sendo o fluconazol, a droga mais utilizada.<sup>4</sup> Os azóis atuam inibindo a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase (14DM), que é responsável pela produção de ergosterol. Ergosterol é um análogo ao colesterol em células animais e a substância mais abundante da membrana celular nos fungos. A inibição da produção de ergosterol causa a ruptura da membrana celular.<sup>5</sup>



**Figura 1.** Alguns azóis utilizados no tratamento de doenças causadas por espécies de *Candida*.

O aumento dos casos de infecções por *Candida* spp., assim como, o uso generalizado de medicamentos antifúngicos, devido à limitada disponibilidade, levaram a evolução da resistência a essas drogas.<sup>4</sup> O desenvolvimento da resistência aos medicamentos configura um sério quadro de saúde pública e torna extremamente importante o desenvolvimento de uma nova geração de agentes antifúngicos.

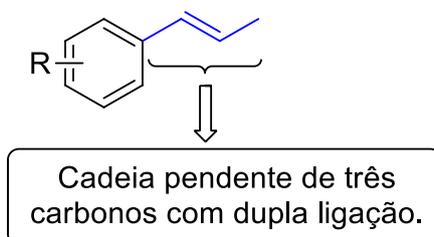
Em um estudo do meu grupo de pesquisa foram relatados excelentes resultados envolvendo o uso de sais imidazólicos (SI) em testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) com cepas de *Candida*. No estudo realizado, o SI metanossulfonato de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazolio, apresentou um CIM de 0,9 µg.mL<sup>-1</sup> para isolados resistentes de *Candida*, um valor muito menor que o encontrado para os antifúngicos escolhidos para o estudo, fluconazol e cetoconazol.<sup>6</sup> Outro ponto relevante sobre os sais imidazólicos, é que eles também demonstraram alta atividade antibiofilmes de *Candida*.<sup>7,8</sup>

Os SI são usualmente obtidos a partir de derivados fósseis, via rotas de quaternização.<sup>9</sup> Para que os SI se tornem “mais verdes” se faz necessária a investigação de novas rotas sintéticas mais sustentáveis. Há relatos de trabalhos em que os SI são obtidos total ou parcialmente a partir de fontes renováveis, como aminoácidos<sup>9,10</sup> e terpenos.<sup>11</sup>

O 7º Princípio da Química Verde estabelece que matérias primas devem ser provenientes de fontes renováveis ao invés de fontes esgotáveis, sempre que for técnica e economicamente praticável.<sup>12</sup> Logo, a dependência de recursos fósseis pode ser minimizada utilizando matérias-primas provenientes de fontes renováveis. Tais matérias-primas podem ser derivadas de plantas e são chamadas de biomassa vegetal.<sup>13</sup>

Extratos de plantas são utilizados na medicina popular, desde as épocas mais remotas, para tratar uma variedade de males. Muitas ervas possuem na composição de seus óleos essenciais moléculas fenilpropenoides. Estes, são sintetizados metabolicamente por plantas<sup>14</sup> e são amplamente utilizados na indústria alimentícia e cosmética como flavorizantes e fragrâncias,<sup>15</sup> além de desempenharem importante papel como reagentes de partida em química fina para obtenção de produtos com alto valor associado.<sup>16-18</sup> Essas moléculas

possuem eficaz atividade inseticida<sup>19-21</sup> e são ambientalmente seguros. Além disso, os fenilpropenoides apresentam variada atividade biológica contra uma série de microrganismos problemáticos para a indústria alimentícia.<sup>14</sup> Tais compostos são também de interesse na indústria farmacêutica como agentes antimicrobiais,<sup>21</sup> incluindo atividade contra fungos leveduriformes patogênicos.<sup>22</sup>



**Figura 2.** Estrutura genérica de uma molécula fenilpropenoide.

A cadeia pendente com três carbonos, contendo uma dupla ligação, presente na estrutura dos fenilpropenoides permite que uma variedade de transformações sejam exploradas nessa classe de moléculas como oxidações, adições, reações de formação de ligações carbono-carbono, em particular, reações de metátese de olefinas.

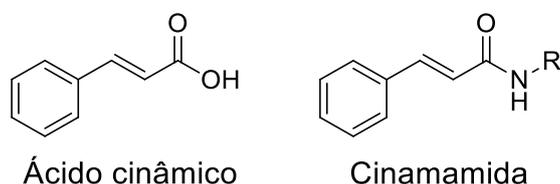
A reação de metátese de olefinas consiste na reorganização de duplas ligações carbono-carbono, através da utilização de um catalisador organometálico, sendo que os catalisadores de rutênio são os mais empregados atualmente. Fenilpropenoides já demonstraram grande potencial sintético como substratos em reações de metátese cruzada,<sup>23,24</sup> sendo esta uma promissora estratégia na síntese de produtos com alto valor associado.

Uma publicação recente mostra a utilização de ácido maleico como substrato na metátese de olefinas com ácidos graxos derivados de óleos vegetais.<sup>25</sup> Essa estudo apresenta uma excelente estratégia para síntese ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados.

Os ácidos cinâmicos são ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, produzidos na mesma rota metabólica em que os fenilpropenoides são sintetizados. Estão presentes em uma série de extratos naturais e são de grande interesse para a indústria cosmética e farmacêutica, devido às suas propriedades antimicrobiana e antioxidante. Além disso, são interessantes blocos de

construção na química sintética, podendo dar origem a uma variedade de substâncias. Dentre essas substâncias estão as cinamamidas.<sup>26</sup>

As cinamamidas são obtidas principalmente através de uma rota sintética que envolve a conversão de um de ácido cinâmico ou análogo, no respectivo cloreto de ácido e posterior reação desse cloreto de ácido com uma amina na presença de uma base.<sup>27</sup> Muitos relatos têm sido feitos ao longo dos anos a respeito das propriedades biológicas das cinamamidas. Em destaque estão suas propriedades neurológicas<sup>28</sup>, como anticonvulsiantes,<sup>29</sup> antidepressivos<sup>30</sup> e também atividade anticâncer<sup>31</sup> e atividade contra uma variedade de microrganismos patogênicos<sup>32,33</sup>.



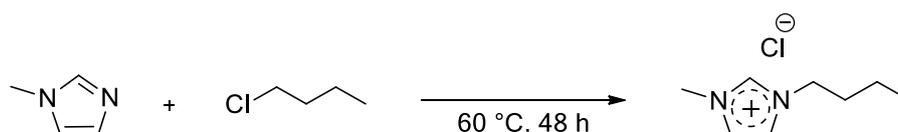
**Figura 3.** Ácido cinâmico e cinamamida.

Com base no exposto acima, este projeto de pesquisa teve por objetivo a síntese de novos sais imidazólicos com potencial fungicida, contendo fragmentos derivados de fenilpropenoides de ocorrência natural. A síntese dos compostos tem como etapas chave a metátese cruzada entre os fenilpropenoides com ácido maleico para produzir análogos do ácido cinâmico e, posterior conversão destes em cinamamidas que possam ser utilizadas como alquilantes para a síntese dos sais imidazólicos.

## 2. ESTADO DE ARTE

### 2.1. Sais Imidazólicos

Sais imidazólicos (SI) são sais orgânicos em que o cátion é derivado do anel imidazol. Esses sais são sintetizados através da protonação ou alquilação dos nitrogênios do anel. Muitos SI são também conhecidos como líquidos iônicos (LI), que são sais com ponto de fusão de até 100 °C.



**Esquema 1.** Síntese do SI cloreto de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio.

#### 2.1.1. Propriedades biológicas dos sais imidazólicos

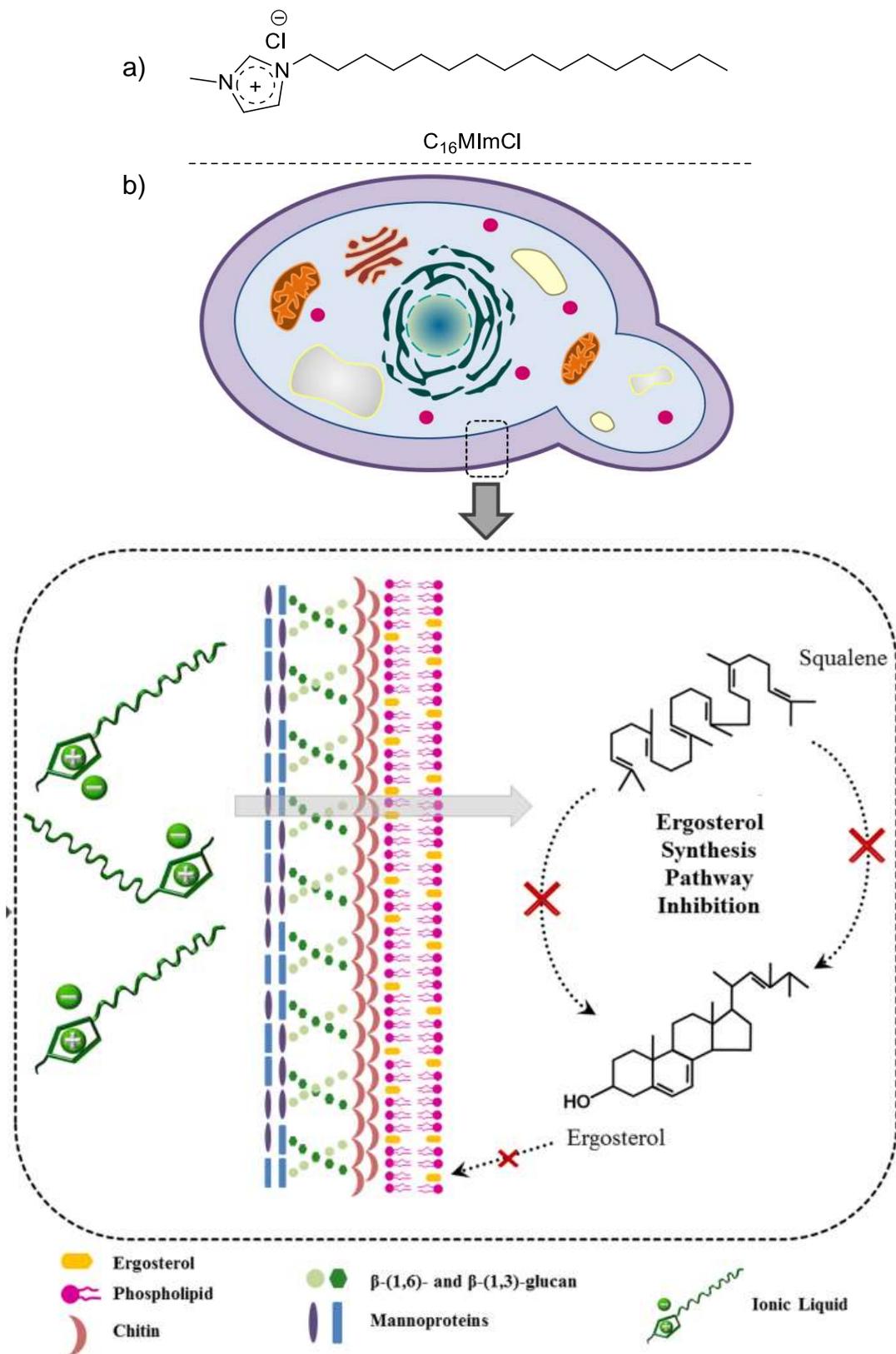
Dentre as aplicações biológicas dos SI, encontram-se em destaque pesquisas em torno do uso dessas substâncias como agentes antimicrobianos e antitumorais.<sup>34,35</sup>

O mecanismo de ação com que os SI exercem suas atividades biológicas não é totalmente compreendido. Dados coletados em diversos estudos permitiram observar algumas características estruturais determinantes para as atividades biológicas desses sais, tais como: tamanho de cadeia dos cátions, presença ou ausência de grupos funcionais e natureza do ânion.<sup>35</sup>

Muitos SI com propriedades antimicrobianas compartilham estruturas semelhantes à de surfactantes e biocidas catiônicos: um grupo carregado hidrofílico e longas cadeias hidrofóbicas, as quais conferem a propriedade de formar micelas. Essas propriedades têm sido relacionadas com o aumento da lipofilicidade, que pode ser o indicativo de um mecanismo de ação em comum. Estudos apontam que assim como os surfactantes e biocidas, os SI podem causar danos a integridade da membrana celular. Outros estudos relacionam a tensão superficial e atividade biológica dos sais. Existem evidências que mostram que o comprimento de cadeia ligada ao nitrogênio do anel imidazólico exerce influência diretamente proporcional à eficiência antimicrobiana dos SI.

Além da atividade antimicrobiana a atividade anticâncer também é influenciada pelo comprimento da cadeia substituinte no nitrogênio do anel.<sup>35</sup>

Um estudo *in vitro* onde se avaliou a atividade antifúngica de uma série de SI *N*-substituídos, com diferentes comprimentos de cadeia alquílica, frente a uma variedade de isolados clínicos de *Candida*, mostrou excelente atividade para o SI cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólio (C<sub>16</sub>MImCl), com CIM de 0,9 µg.mL<sup>-1</sup> para todos os isolados. Diante desse resultado e sabendo que, antifúngicos imidazólicos atuam inibindo a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase responsável pela biossíntese de ergosterol na célula fúngica, tal estudo também investigou se C<sub>16</sub>MImCl atuava inibindo a produção de ergosterol nos isolados clínicos. Os resultados apontaram que os SI *N*-substituídos são capazes de inibir a biossíntese de ergosterol. A partir desses resultados foi proposto um mecanismo de ação dos SI sobre a célula fúngica composto de duas etapas. Na primeira etapa o SI necessita permear a membrana celular onde a síntese de ergosterol ocorre, o que explicaria a permeabilidade exclusiva de SI com longas cadeias alquílicas, as quais possuem estruturas anfifílicas similares a dos fosfolipídios biliares da membrana celular. A segunda etapa seria o real efeito de inibição de produção de ergosterol. Além disso, sendo os SI sais orgânicos, podem intervir no equilíbrio osmótico da célula fúngica, induzindo um efeito “*salting out*”, causando coagulação proteica e consequentemente a ruptura celular.<sup>6</sup>



**Figura 4.** a) Cloreto de 1-*n*-hexadecil-3-metilimidazólio. b) Representação esquemática do mecanismo de ação do SI. Permeação do SI na célula fúngica e sua interferência na síntese de ergosterol.<sup>6</sup>

## 2.2. Catálise

O vasto desenvolvimento da indústria no século 20 se deve à catálise, a qual permite que processos sejam realizados em um regime termodinamicamente mais favorável. Aproximadamente 85-90 % dos produtos da indústria química são feitos através de processos catalíticos. Os catalisadores são indispensáveis para a indústria petroquímica, na produção de produtos químicos em massa e na química fina.<sup>36</sup>

De acordo com a definição da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), catálise é um processo onde ocorre ação de uma substância que aumenta a taxa de uma reação, sem alterar a energia total padrão de Gibbs na reação global.<sup>37</sup> A substância que proporciona tais mudanças é o catalisador. O catalisador oferece para a reação um caminho alternativo mais complexo, porém mais favorável, onde a energia de ativação é mais baixa que na reação não catalisada. Se uma reação não for termodinamicamente favorável, um catalisador não fará com que ela ocorra, pois este interfere apenas na cinética da reação.<sup>36</sup>

A catálise pode ser classificada como heterogênea, homogênea ou biocatálise, de acordo com características específicas que são atribuídas a cada classe.

- Catálise homogênea: tanto catalisador, quanto reagentes se encontram na mesma fase. A catálise homogênea proporciona condições reacionais de temperatura e pressão brandas, além de alta seletividade e capacidade da modulação das propriedades do catalisador. Suas propriedades permitem que catalisadores homogêneos, sejam utilizados na transformação de matérias-primas renováveis, o que é um importante aspecto na química verde;<sup>36</sup>
- Catálise heterogênea: catalisador e reagentes encontram-se em fases distintas. Nesse tipo de catalisador, uma vantagem importante é a fácil separação e recuperação do catalisador, além da resistência à condições de altas temperaturas e pressão. A catálise heterogênea possui importante papel na indústria petroquímica;<sup>36</sup>

- Biocatálise: são utilizados catalisadores naturais, que na maioria dos casos são enzimas. Catalisadores naturais são geralmente mais ativos que os catalisadores homogêneos e heterogêneos, porém, a principal vantagem desse tipo de catalisador é a alta especificidade que podem apresentar, de modo a converter um reagente específico em um produto específico. Por exemplo, determinadas enzimas são capazes de modificar um determinado substrato enantiomérico, porém não o outro. Essa enantioespecificidade é de extrema importância para as áreas farmacêutica e alimentícia.<sup>38</sup>

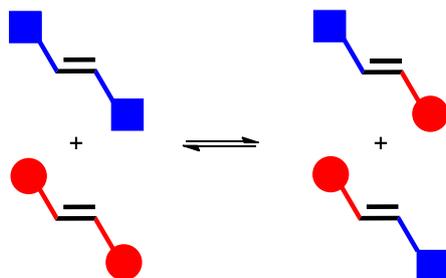
A catálise é um dos 12 princípios da Química Verde. A Química Verde, cunhada assim por Anastas, engloba uma série de princípios que tem por objetivo a redução ou eliminação do uso ou geração de substâncias perigosas na produção e processamento de produtos químicos. Ao longo dos anos, a Química Verde tem ganhado cada vez mais espaço, tanto na pesquisa quanto na indústria, na busca de processos ambientalmente mais seguros e também economicamente vantajosos.<sup>12,39</sup>

Devido a pressões das legislações ambientais que foram implementadas durante o século 20, surgiu a necessidade da união entre catálise e síntese orgânica. Essa união proporcionou a minimização da geração de resíduos, pois a catálise permite rotas alternativas com altas seletividades e maior eficiência e menor produção de produtos indesejáveis, além de viabilizar o uso de matérias-primas provenientes de fontes renováveis. Tais características estão completamente de acordo com os princípios da Química Verde.<sup>39</sup>

### **2.3. Metátese de Olefinas**

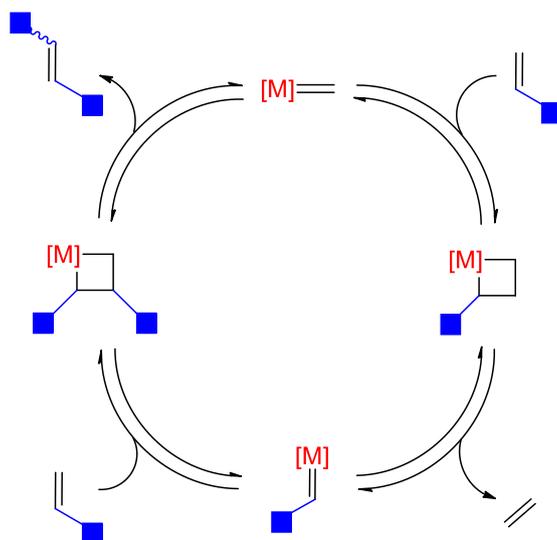
A reação de metátese de olefinas é uma estratégia poderosa e versátil para formação de duplas ligações carbono-carbono, que atrai grande interesse tanto por parte da indústria, quanto da academia. Essa reação foi observada pela primeira vez na década de 50.<sup>40</sup> Em 1954, químicos industriais da Dupont obtiveram um copolímero propileno-etileno, após alimentar um reator contendo um catalisador de molibdênio suportado em alumina. A análise do gás remanescente da reação mostrou que o mesmo era composto de uma mistura

de propileno, etileno e 1-buteno. Quando o mesmo experimento foi aplicado ao ciclopenteno, se obteve um polímero que foi descrito como sendo como se uma tesoura tivesse cortado as duplas ligações e as mesmas tivessem depois sido costuradas. Em 1960, químicos da Standard Oil Co. verificaram que ao se combinar propileno com oxido de molibdênio em alumina, se obtinha uma mistura de etileno e buteno. O mesmo resultado foi observado por químicos da Phillips Petroleum em 1964, a reagir propileno na presença de um catalisador de molibdênio suportado em alumina.<sup>41</sup> Sendo assim, em 1967, Calderon e colaboradores do grupo Goodyear descobriram que os inexplicáveis produtos eram devido a ocorrência de clivagem e reformação das duplas ligações das olefinas e cunharam o termo “Metátese de Olefinas”, onde a palavra metátese é derivada do grego e significa troca de lugar.<sup>40-42</sup>



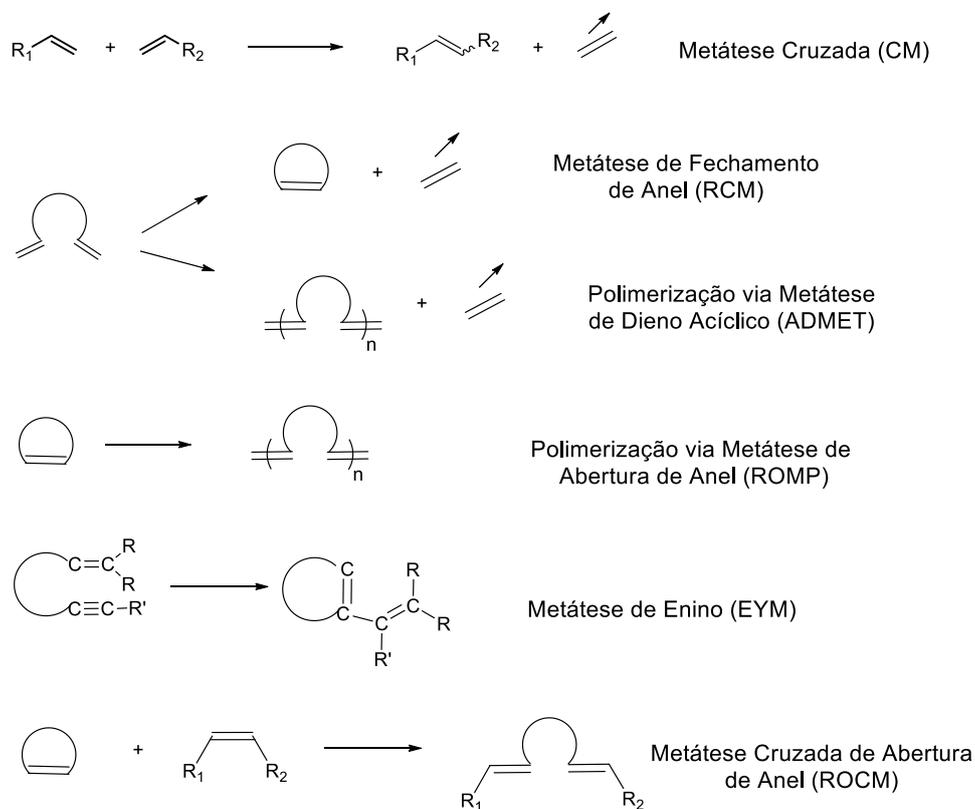
**Esquema 2.** Reação de Metátese de Olefinas.

Alguns mecanismos de metátese foram propostos e embora explicassem o processo das reações, não estavam de acordo com os resultados dos experimentos. Em 1971, Chauvin propôs um elegante mecanismo de reação consistente com as observações experimentais (Esquema 3). No mecanismo proposto a reação é iniciada por uma espécie metalcarbeno, através da coordenação da olefina ao átomo metálico, seguida pela formação de um intermediário metalaciclobutano, que cliva formando uma nova olefina e um novo metalcarbeno. O metalaciclobutano é o intermediário chave na reação de metátese de olefinas. O mecanismo postulou por Chauvin introduziu uma variedade de novas ideias e estimulou que a pesquisa em torno do desenvolvimento de catalisadores para esse tipo de reação.<sup>40-44</sup>



**Esquema 3.** Mecanismo da reação de metátese proposta por Chauvin.

A metátese de olefinas pode ser empregada para as mais diversas aplicações. Dependendo das condições reacionais, um mesmo catalisador pode ser utilizado para mais de um tipo de transformação. As reações podem ser categorizadas pelo tipo de substrato utilizado e pelo produto resultante. Na Figura 5 estão relacionados exemplos práticos de reações de metátese.<sup>40,42-44</sup>



**Figura 5.** Vários tipos de reações de metátese de olefinas.

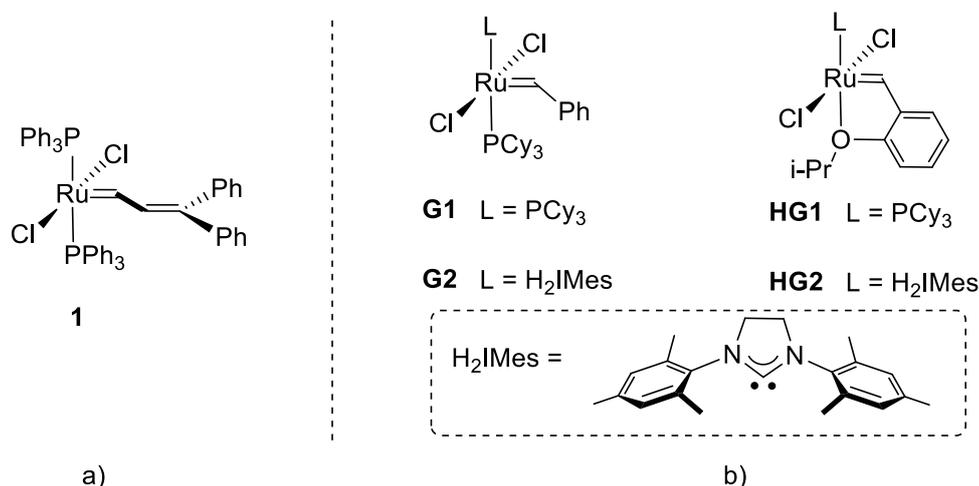


relatos foram reportados em torno da ROMP de derivados de norbornenos promovida por  $\text{RuCl}_3(\text{H}_2\text{O})_n$  em refluxo com etanol e em emulsões aquosas. Apesar do baixo rendimento, foi um importante precedente de que reações de ROMP poderiam ocorrer em solventes polares próticos. Na década de 80 a atenção se voltou novamente para ROMP utilizando catalisadores de rutênio. Verificou-se que os hidratos de rutênio necessitavam de períodos de iniciação de 20 horas ou mais quando se utilizava solventes orgânicos, enquanto que em soluções aquosas a ROMP iniciava após 30 minutos, o que sugeria que a água beneficiava o sistema.<sup>40,42,45</sup>

Apesar da falta de compreensão sobre o processo de iniciação, numerosos relatos indicavam que a espécie ativa era um rutênio alquilideno. Baseado nisso, em 1992, o primeiro complexo rutênio alquilideno estável de 16 elétrons e ativo para metátese de olefinas foi sintetizado (**1**, Figura 7).<sup>40,43,45,47</sup> Esse complexo foi não somente ativo para polimerização de norbornenos, como também estável na presença de solventes próticos. Como esse complexo apresentou atividade somente para olefinas tensionadas e ricas em elétrons, novos esforços foram empregados para o desenvolvimento de complexos com maior atividade. Sabendo que a atividade aumenta quando o centro metálico se torna mais eletrofílico, ligantes aniônicos foram modificados para formar complexos catiônicos, na intenção de fornecer sistemas mais ativos. Tais sistemas não apresentaram sucesso e então ligantes mais básicos foram empregados.<sup>40,43,45</sup> A trifenilfosfina foi substituída por tricicloexilfosfina, o que produziu um complexo com a atividade desejada, polimerizando olefinas não tensionadas e induzindo reações em olefinas acíclicas.<sup>40,43,45,48</sup>

Novos complexos foram desenvolvidos visando melhor atender as necessidades de maior atividade catalítica frente a diferentes tipos de reações de metátese, tolerância a grupos funcionais e estabilidade térmica. Embora a estrutura básica dos atuais catalisadores de rutênio continue remetendo a estrutura do complexo original, composta de um rutênio alquilideno com dois ligantes aniônicos e dois ligantes neutros, os catalisadores contemporâneos (Figura 7b) são muito mais robustos e tolerantes a grupos funcionais. O catalisador de Grubbs de primeira geração (**G1**)<sup>49</sup> é muito mais compatível com grupos funcionais e possui maior estabilidade térmica que os anteriores. A

substituição de uma tricicloexilfosfina por um ligante do tipo carbeno *N*-heterocíclico (NHC) mais volumoso, como no catalisador de Grubbs de segunda geração (**G2**),<sup>50</sup> melhora a atividade catalítica, mantendo a tolerância a grupos funcionais e estabilidade térmica. A substituição do segundo ligante fosfina por um alquilideno bidentado, como nos complexos Hoveyda-Grubbs de primeira geração (**HG1**)<sup>51</sup> e Hoveyda-Grubbs de segunda geração (**HG2**),<sup>52</sup> leva a um catalisador termodinamicamente mais estável.<sup>42,43,45</sup> Os estudos em torno de complexos de rutênio alquilideno seguem buscando melhorias em termos de desenvolvimento de complexos para metátese de olefinas assimétricas, aplicações em meios aquosos e sistemas em solventes próticos, assim como a formação de produtos com dupla ligação C-C tetrasubstituídas.<sup>40,42,43,53</sup>



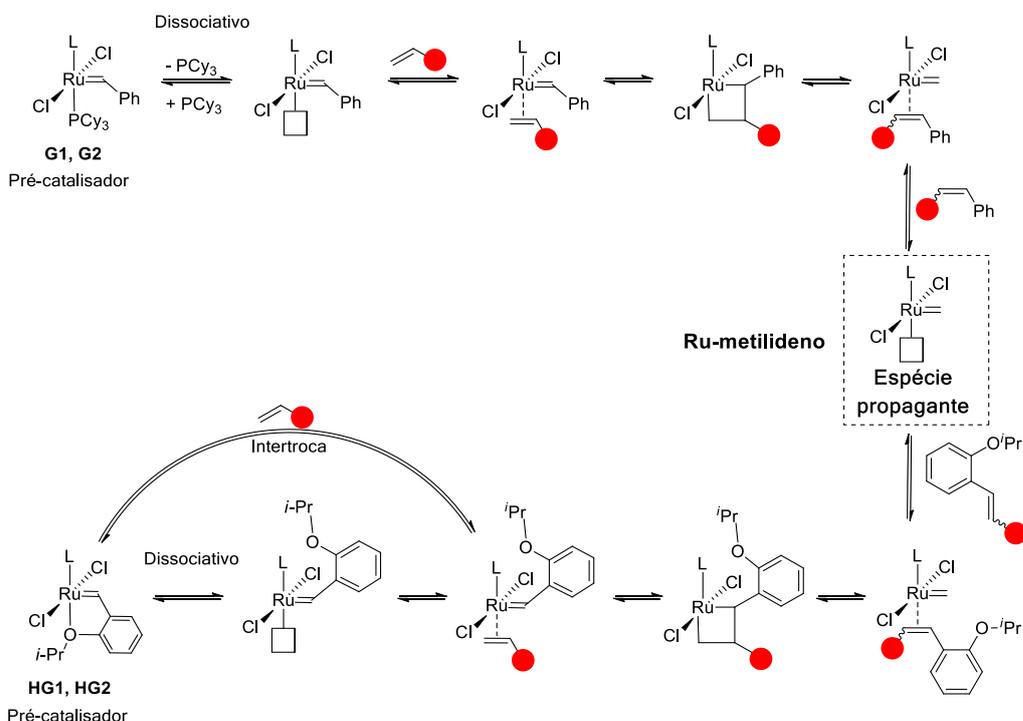
**Figura 7.** a) Primeiro complexo Ru-alquilideno bem definido ativo para metátese de olefinas; b) Primeira e segunda geração de complexos de rutênio para metátese de olefinas.

### 2.3.2. Mecanismo da metátese de olefinas com catalisadores de rutênio

O mecanismo das reações de metátese de olefinas tem sido constantemente estudado para diferentes complexos. Complexos de rutênio são majoritariamente empregados nesse tipo de transformação química, em especial, aqueles que possuem ligantes NHC. O mecanismo básico da reação é o mesmo para todos os complexos baseados em rutênio, que envolve as etapas de iniciação, propagação e desativação do catalisador.<sup>54</sup>

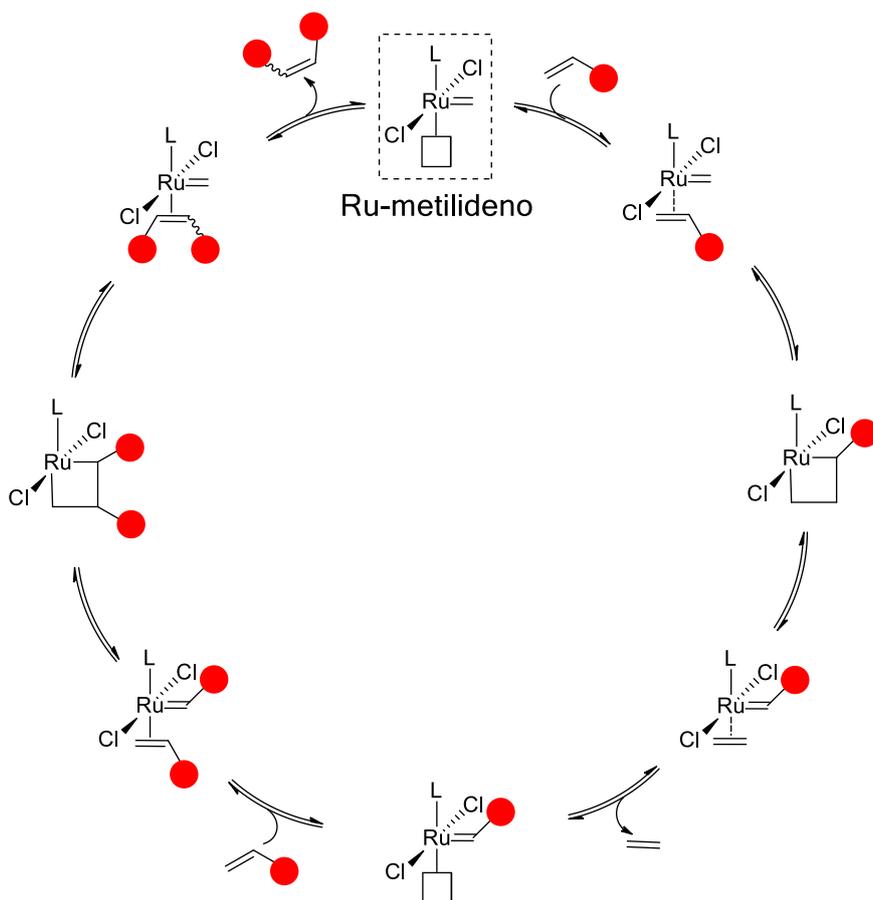
A iniciação é a etapa determinante da velocidade da reação de metátese de olefinas. Para complexos do tipo Grubbs (**G1** e **G2**), na etapa de iniciação o pré-catalisador estável de  $16e^-$  perde um ligante fosfina por via dissociativa e se torna uma espécie ativa de  $14e^-$ , podendo então se coordenar ao substrato olefínico, ou então recuperar a fosfina dissociada, restituindo a espécie de  $16e^-$ . Após a coordenação do substrato ao centro metálico, ocorre a formação do rutenaciclobutano, seguido pela cicloreversão e dissociação da nova olefina formada, resultando na exclusão do grupo fenila e na formação de uma nova espécie Ru-alkilideno, que é a espécie propagante.<sup>54</sup>

Complexos do tipo Hoveyda-Grubbs (**HG1** e **HG2**) chegam a mesma espécie propagante dos complexos do tipo Grubbs, porém, sua etapa de iniciação ocorre tanto por dissociação, como por intertroca com caráter associativo, dependendo dos substratos e dos substituintes do isopropoxiestireno. Olefinas pouco volumosas e ricas em elétrons favorecem o mecanismo de iniciação por intertroca com caráter associativo, enquanto olefinas volumosas e menos ricas em elétrons tem como mecanismo de iniciação preferencial a rota dissociativa. Complexos do tipo Hoveyda-Grubbs com ligantes volumosos tendem a uma iniciação por dissociação.<sup>54</sup>



**Esquema 4.** Mecanismo de iniciação para catalisadores do tipo Grubbs e Hoveyda-Grubbs.

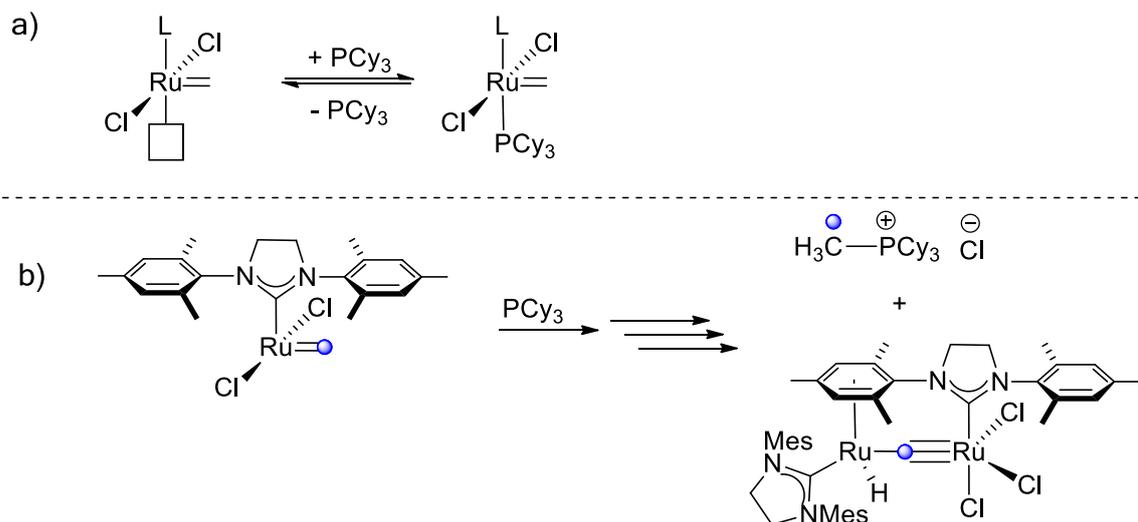
Uma vez gerada a espécie propagante, sucessivos ciclos de metátese estão aptos para ocorrer. As etapas envolvidas na propagação são praticamente as mesmas da iniciação, exceto pela dissociação da fosfina no caso de **G1** e **G2**, e dissociação do isopropoxiestireno para **HG1** e **HG2**. O substrato olefínico se coordena à espécie propagante de  $14e^-$  Ru-metilideno, formando um complexo de  $16e^-$ . As etapas seguintes são a formação do intermediário rutenociclobutano e a cicloreversão que dá origem a um complexo com um etileno coordenado. Esse etileno é dissociado, e uma molécula de substrato olefínico novamente se coordena ao complexo intermediário de rutênio, formando outro rutenociclobutano, que resulta em nova cicloconversão para em seguida dissociar a olefina formada, restaurando a espécie propagante Ru-metilideno.<sup>54</sup>



**Esquema 5.** Mecanismo de propagação dos catalisadores de rutênio para metátese de olefinas.

Complexos Ru-metilidenos, formados na presença de substratos contendo ligações C=C terminais são considerados espécies muito reativas em

reações de metátese. Durante a propagação esses complexos podem recoordenar o ligante fosfina, formando o metilideno correspondente de  $16e^-$ . Esse não é o produto de decomposição, porém, essa espécie sofre rápida decomposição. Uma fosfina dissociada pode reagir com o Ru-metilideno formando um ílideo fosfônio e uma espécie dinuclear de rutênio.<sup>54</sup>

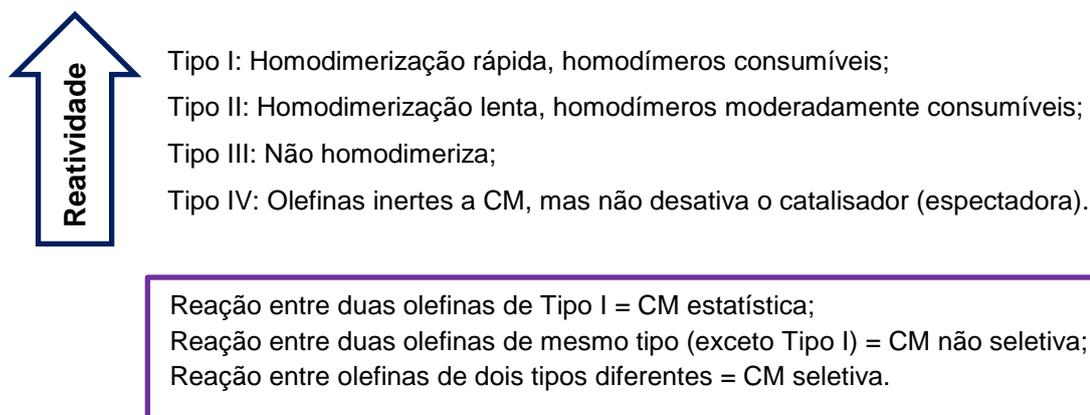


**Esquema 6.** a) Captura do complexo Ru-metilideno pela fosfina. b) Desativação do complexo Ru-metilideno.

### 2.3.3. Metátese cruzada de olefinas

A metátese cruzada (CM) de olefinas é uma rota conveniente para obtenção de moléculas funcionalizadas a partir de alcenos simples. A inserção de elementos estruturais mais complexos em produtos naturais para subsequentes transformações sintéticas podem ser realizadas por CM, utilizando catalisadores de metátese tolerantes a uma variedade de grupos funcionais. Comparada às reações de ROMP e RCM, nota-se que as reações de CM são muito menos exploradas. Isso se deve em grande parte a baixa atividade do catalisador para efetuar uma reação sem uma forte força motriz entálpica ou a vantagem entrópica das reações intramoleculares, como em reações de ROMP e RCM respectivamente, resultante em produtos com baixa seletividade. Porém, diferentes tipos de olefinas podem ser apropriadamente combinadas de forma a se obter os produtos de CM com alta seletividade. Grubbs et al. criaram um modelo que categoriza as olefinas de acordo com a

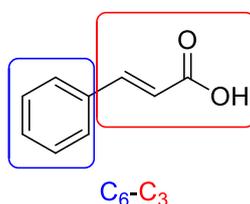
facilidade destas em homodimerizar e na reatividade dos homodímeros frente as reações de metátese.<sup>54</sup>



**Figura 8.** Categorização das olefinas e regras de seletividade.<sup>54</sup>

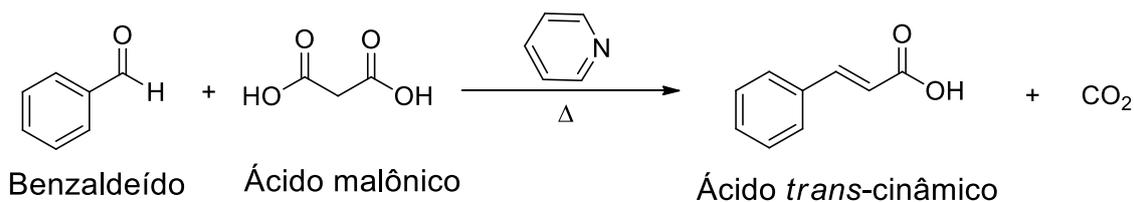
## 2.4. Ácido cinâmico e seus análogos

Ácidos cinâmicos são um grupo de ácidos carboxílicos aromáticos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) de ocorrência natural em plantas. São formados em uma rota biosintética onde também são formados também os fenilpropenoides, cumarinas, isoflavonóides, flavonóides, estilbenos, antocianinas e taninos. Estão presentes em uma variedade de grãos, frutas e legumes, como grãos de café, cacau, maçãs e peras, frutas cítricas, uvas, espinafre, beterraba, batata, tomate e vários outros. Os ácidos cinâmicos frequentemente aparecem como ésteres conjugados com outros ácidos, açúcares ou lipídios, ou também podem formar amidas com aminas aromáticas e alifáticas.<sup>26</sup>



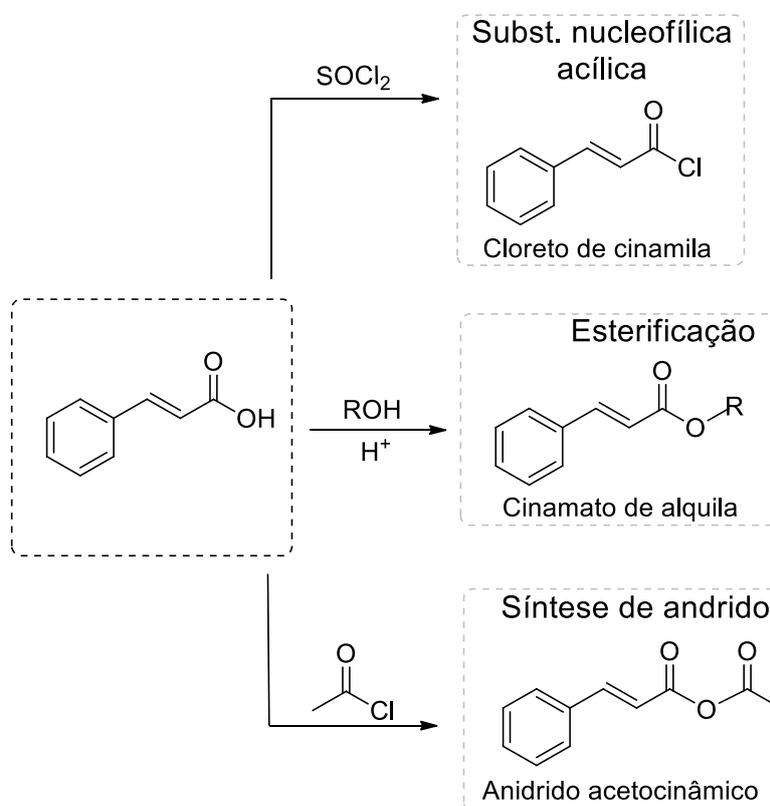
**Figura 9.** Estrutura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> do ácido cinâmico.

Os ácidos cinâmicos são usualmente obtidos através da condensação de Knövenagel-Döbner (Esquema 6). A condensação de Knövenagel-Döbner envolve a condensação de um aldeído e ácido malônico dissolvidos em piridina, através de uma etapa de desidratação seguida pela descarboxilação.<sup>56</sup>



**Esquema 7.** Condensação de Knoevenagel-Döbner para produção de ácido *trans*-cinâmico a partir de benzaldeído.

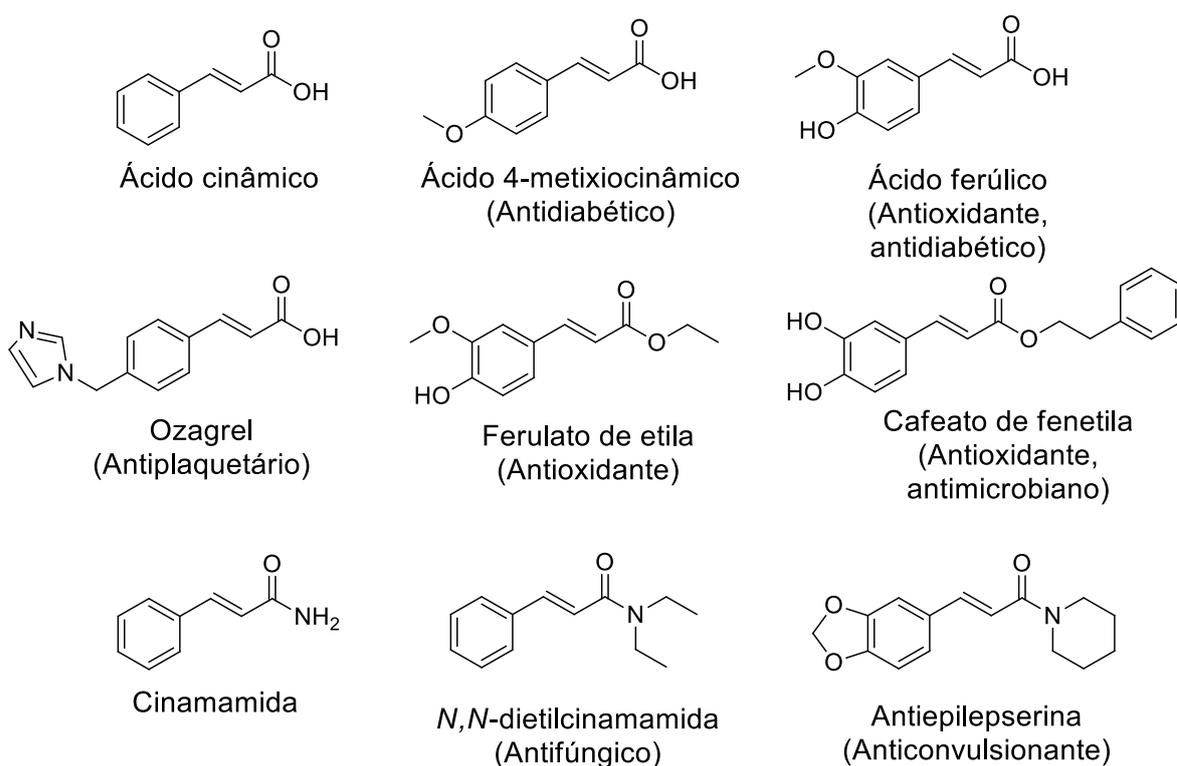
Devido a estrutura molecular dos ácidos cinâmicos, essa classe de moléculas pode sofrer uma série de modificações químicas, atuando como blocos de construção de grande valor em química sintética.<sup>57</sup>



**Esquema 8.** Algumas reações do ácido cinâmico.

Ácidos cinâmicos e seus derivados têm sido amplamente utilizados na química medicinal por alterar a potência, permeabilidade, solubilidade e outros parâmetros de uma droga ou farmacóforo selecionado. Dentre as aplicações medicinais dos ácidos cinâmicos e derivados estão os usos como agente anticâncer, antioxidante, antimicrobial e antiaterogênico.<sup>26</sup>

Devido a presença do grupo vinila, os derivados de ácidos cinâmicos, principalmente os ésteres, exibem alta atividade antioxidante, o que atrai especial atenção do uso dessas substâncias no tratamento de patologias relacionadas a peroxidação lipídica na membrana celular.<sup>26</sup> Além dos ésteres cinâmicos, as cinamamidas são derivados que também exibem atividade antimicrobiana elevada e também atividade neurológica já bastante explorada.<sup>26,58,59</sup>



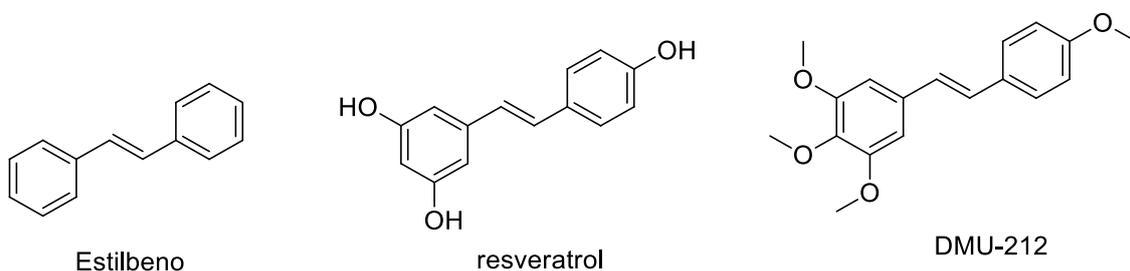
**Figura 10.** Ácidos cinâmicos e derivados.

## 2.5. Estilbenoides e suas propriedades biológicas

Estilbenoides são moléculas com estrutura caracterizada por dois anéis aromáticos unidos por uma ponte de etileno. Essas moléculas são compostos de defesa, produzidos por algumas plantas em respostas a ataques patógenos ou algum outro estresse. Estilbenoides são abundantes em produtos naturais e possuem propriedades biológicas importantes, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer.<sup>60</sup>

Dentre os estilbenoides encontrados na natureza se destaca o resveratrol ((*E*)-3,4',5-trihidroxiestilbeno), conhecido por suas propriedades antioxidantes, antiplaquetária, anti-inflamatória e anticâncer. Resveratrol pode ser encontrado em pequenas quantidades em uvas, amoras, amendoim e cacau.<sup>61</sup>

Além do resveratrol, outra molécula que se destaca dentro dessa classe de substâncias é o DMU-212 ( (*E*)-3,4,5,4'-tetrametoxiestilbeno). Essa molécula possui potente atividade anticâncer, superior a do resveratrol.<sup>62</sup>

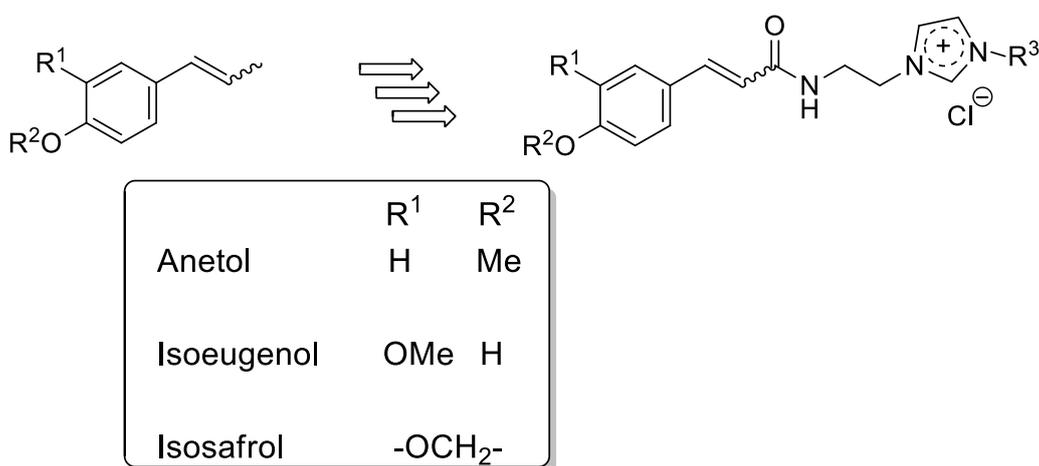


**Figura 11.** Estrutura das moléculas estilbeno, resveratrol e DMU-212.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

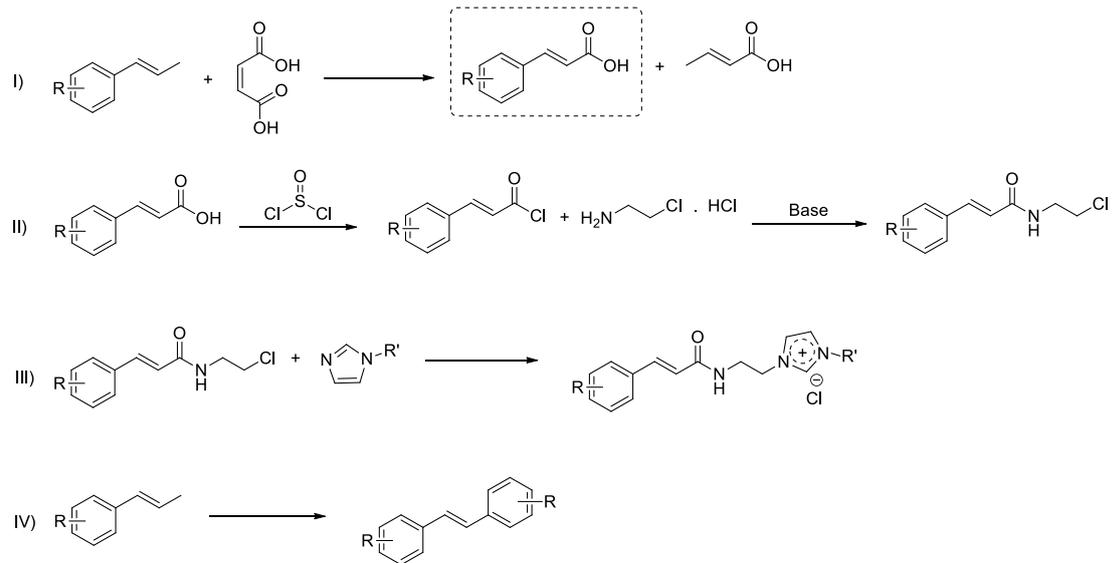
Obtenção de uma nova classe de sais imidazólicos híbridos com propriedades antifúngicas a partir de fenilpropenoides de ocorrência natural.



**Esquema 9.** Obtenção dos sais imidazólicos a partir dos fenilpropenoides.

#### 3.2. Objetivos específicos

- I) Realizar o estudo das reações de metátese cruzada dos substratos fenilpropenoides anetol, isoeugenol e isosafrol, com ácido maleico, tendo em vista obter como produtos, ácidos carboxílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados, análogos ao ácido cinâmico;
- II) Obtenção de *N*-2-cloroetilcinamamidas a partir de ácidos cinâmicos, por meio de reações de amidação;
- III) Obtenção de sais imidazólicos através da alquilação de *n*-alquilimidazois com as *N*-2-cloroetilcinamamidas e realizar testes antifúngicos com essas moléculas;
- IV) Obtenção de estilbenoides através da autometátese dos fenilpropenoides e avaliação das propriedades antioxidantes e citotoxicidade dessas moléculas.



**Esquema 10.** Rota de obtenção dos sais imidazólicos.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

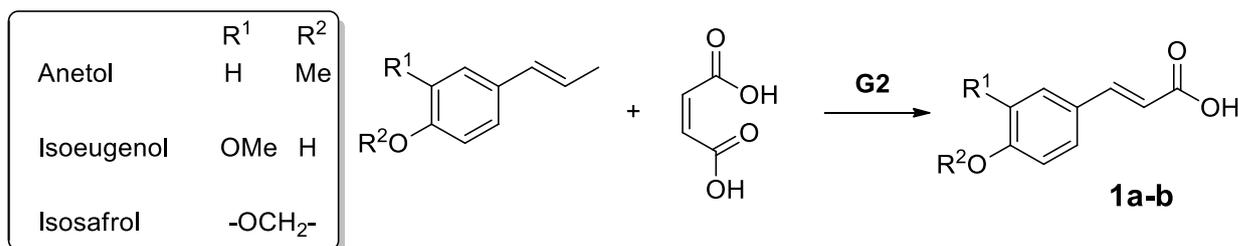
### 4.1. Considerações gerais

Todas as manipulações envolvendo solventes ou compostos sensíveis a oxigênio e/ou umidade foram realizadas utilizando técnicas padrão de tubo Schlenk em atmosfera inerte de argônio. *trans*-Anetol  $\geq 99$  %, isoeugenol mistura *cis-trans* 98 % e isosafrol mistura *cis-trans* (Sigma-Aldrich) foram filtrados em uma coluna de alumina básica. O catalisador Grubbs de segunda geração **G2** (Sigma-Aldrich) foi utilizado como recebido. THF (Vetec) foi destilado sobre Na/benzofenona e armazenado sobre peneiras moleculares com porosidade 0,3 nm ativadas, e sob atmosfera de argônio. Ácido maleico (Sigma-Aldrich), ácido cinâmico (Sigma-Aldrich), imidazol (Sigma-Aldrich), cloreto de *n*-decila (Alpha), cloreto de *n*-hexadecila (Sigma-Aldrich), cloridrato de 2-cloroetilamina (Alpha), benzofenona (Sigma-Aldrich), óxido de alumínio básico (Sigma-Aldrich), sílica gel para cromatografia 0,035 – 0,070 mm (Acros Organics), sulfato de magnésio anidro (Vetec), bicarbonato de sódio anidro (Vetec), cloreto de sódio (Vetec), ácido acético glacial (Nuclear), diclorometano (Vetec), acetonitrila (Nuclear), acetato de etila (Vetec), hexano (Vetec), sódio metálico (Sigma-Aldrich) e argônio (Air Liquid, 99,999 % de pureza) foram utilizados como recebidos. Cloreto de tionila (Merck Millipore) foi purificado por destilação fracionada a pressão atmosférica e utilizado logo após a destilação. Peneira molecular (Merck – porosidade 0,3 nm) foi ativada a 200 °C sob vácuo por 3 horas e atmosfera de argônio. Nos testes biológicos foram utilizados cloreto de sódio (Vetec) para preparo de solução salina 0,85%, meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma-Aldrich), ácido 3-(*n*-morfolino)propanosulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich), DMSO (Vetec), e fluconazol (Sigma-Aldrich).

Os espectros de RMN foram adquiridos em um equipamento Bruker (400 MHz) ou Varian Inova (300 MHz) a temperatura ambiente. Os deslocamentos químicos são dados em partes por milhão (ppm) e referenciados pelo sinal residual do solvente ( $\text{CDCl}_3 = 7,26$  ( $^1\text{H}$ ),  $77,16$  ( $^{13}\text{C}$ );  $\text{DMSO-}d_6 = 2,50$  ( $^1\text{H}$ ),  $39,52$  ( $^{13}\text{C}$ )). Os espectros de infravermelho foram adquiridos em um espectrômetro Bruker ALPHA FT-IR ATR. Os espectros de

espectrometria de massas foram adquiridos por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas (GC-MS) em um equipamento Shimadzu GCMS-QP2010, como coluna HP-5MS (fase estacionária de (5%-fenil)-dimetilpolisiloxano; comprimento: 30 m; diâmetro interno: 0,25 mm; espessura do filme: 0,25  $\mu\text{m}$ ) ou em um equipamento Micromass Q-ToF Micro<sup>TM</sup> com ionização por eletronebulização (ESI) em modo positivo. O ponto de fusão das substâncias foi medido em equipamento analógico, a uma taxa de aquecimento de 5 °C/min em tudo capilar de vidro. Os dados da coleta de difração de raio-X em monocristal foram obtidos em um difratômetro Bruker Kappa APPEX II CCD com radiação de Mo K $\alpha$  (0,71073 Å) com monocromador de grafite, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, pelo Prof. Dr. Robert A. Burrow.

#### 4.2. Procedimento geral das reações de metátese cruzada dos fenilpropenoides com ácido maleico

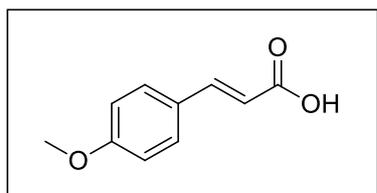


**Esquema 11.** Metátese cruzada de um fenilpropenoide e MA-H.

A quantidade adequada de fenilpropenoide (3,37 mmol, 1 eq.) e MA-H (6,74-20,22 mmol, 2-6 eq.) foram transferidos para um tubo Schlenk equipado com barra magnética e desgaseificados por cinco ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento sob vácuo e em seguida dissolvidos na quantidade apropriada de THF seco. Então uma solução recentemente preparada do catalisador em THF seco, com concentração conhecida foi adicionada a solução dos substratos e o tubo Schlenk foi imerso em um banho de óleo previamente aquecido na temperatura de reação. A reação foi mantida em fluxo constante de argônio por 30 minutos. Ao final da reação uma alíquota da mistura reacional foi coletada para análise de RMN <sup>1</sup>H. O restante da mistura reacional foi filtrado e solubilizado em diclorometano e em seguida

filtrado novamente através de uma coluna de sílica gel, para remoção do excesso de MA-H e catalisador. Por último o solvente foi removido a pressão reduzida. O cálculo da conversão foi realizado a partir do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura reacional não purificada (Anexo A).

**Produto de metátese cruzada do anetol – ácido *trans*-4-metoxicinâmico (1a)**



Produto isolado em coluna cromatográfica com fase estacionária de sílica gel e fase móvel de *n*-hexano e acetato de etila (9:1).

**Ponto de fusão:** 171-172 °C.

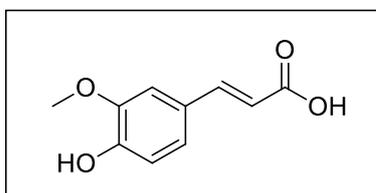
**RMN  $^1\text{H}$**  - (400 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm) 12,23 (s, 1H), 7,63 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 7,54 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H), 6,96 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 6,37 (d,  $J = 16,0$  Hz, 1H), 3,79 (s, 3H).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  - (100 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm) 167,9, 161,0, 143,8, 130,0, 126,9, 116,5, 114,4, 55,3.

**IV** - (Puro, ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3017, 2970, 2939, 2844, 2360, 1738, 1674, 1622, 1593, 1506, 1441, 1429, 1374, 1313, 1216, 1167, 1114, 1029, 974, 933, 863, 821, 773, 741, 686, 563, 511.

**ESI(+)-MS** -  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3^-$  - calculado: 177,0557, obtido 177,1186.

**Produto de metátese do isoeugenol – ácido *trans*-ferúlico (1b)**



Produto isolado em coluna cromatográfica com fase estacionária de sílica gel e fase móvel de hexano e acetato de etila (7:3).

**Ponto de fusão:** 162-163 °C.

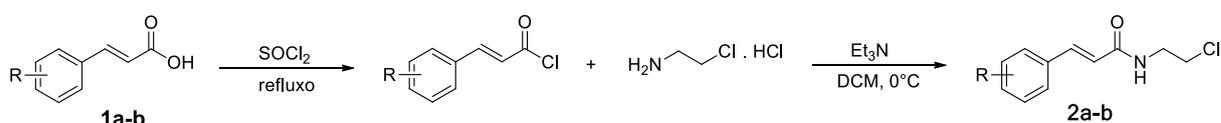
**RMN  $^1\text{H}$**  - (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9,56 (s, 1H), 7,49 (d,  $J = 15,9$  Hz, 1H), 7,28 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H), 7,09 (dd,  $J = 8,1, 1,9$  Hz, 1H), 6,79 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 6,36 (d,  $J = 15,9$  Hz, 1H), 6,27 (s, 1H), 3,82 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C** - (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 166,8, 149,0, 147,9, 144,6, 125,7, 122,9, 115,6, 115,5, 111,2, 55,7.

**IV** - (Puro, ATR, cm<sup>-1</sup>) 3437, 3018, 2970, 2949, 2358, 1742, 1664, 1619, 1592, 1514, 1457, 1432, 1377, 1326, 1266, 1203, 1162, 1111, 1034, 969, 938, 849, 802, 750, 688, 600, 574, 519.

**ESI(+)-MS** - C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> - calculado: 177,0546, obtido: 177,1120.

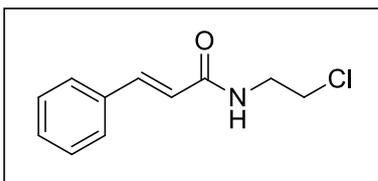
### 4.3. Procedimento geral de síntese das cinamamidas



#### Esquema 12. Síntese das cinamamidas 2a-b.

A um balão foi adicionado o ácido cinâmico apropriado (7,44 mmol, 1 eq.) e 5,40 mL de cloreto de tionila (74,41 mmol, 10 eq.) recentemente destilado. O balão foi acoplado a um condensador de refluxo e imerso em banho de óleo. A mistura foi mantida por 24 horas, sob refluxo e constante fluxo de nitrogênio. Deixou-se a mistura reacional esfriar a temperatura ambiente e o excesso de cloreto de tionila foi removido sob pressão reduzida. O balão foi mantido sob vácuo por 24 horas a temperatura ambiente. Ao balão foram adicionados 1,47 g de cloridrato de 2-cloroetilamina (12,60 mmol, 1,7 eq) e 20 mL de diclorometano seco. O balão foi imerso em um banho de gelo e então 4 mL de trietilamina (28,3 mmol, 3,8 eq.) foram adicionados gota-a-gota ao balão por aproximadamente 40 minutos, sob fluxo de nitrogênio e agitação constante. Ao final da adição o banho de gelo foi removido e a agitação foi mantida por uma hora. A mistura reacional foi filtrada e o filtrado foi lavado com duas vezes com 10 mL de solução aquosa 10% de ácido acético, duas vezes de 10 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e duas vezes com 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi tratada com MgSO<sub>4</sub> anidro, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi cristalizado em etanol.

#### (*E*)-*N*-(2-cloroetil)cinamamida (2a)



Sólido branco. Rendimento: 69 % (1,075 g).

**Ponto de fusão:** 97 – 98 °C.

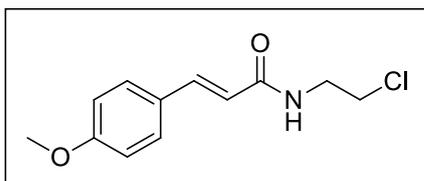
**RMN <sup>1</sup>H** - (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7,66 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H), 7,55 – 7,47 (m, 2H), 7,41 – 7,34 (m, 3H), 6,43 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H), 6,09 (s, 1H), 3,78 – 3,67 (m, 4H).

**RMN <sup>13</sup>C** – (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 166,3, 141,8, 134,7, 130,0, 128,9, 128,0, 120,2, 44,1, 41,6.

**IV** - (Puro, ATR, cm<sup>-1</sup>) 3255, 3066, 2969, 1739, 1656, 1622, 1556, 1493, 1449, 1361, 1341, 1256, 1224, 1187, 1095, 1074, 1049, 1021, 968, 863, 801, 765, 734, 710, 674, 576, 525.

**ESI(+)-MS** - C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>NO<sup>+</sup> - calculado: 174, 0913, obtido: 174,1322.

#### ***N*-(2-cloroetil)-4-metoxicinamamida (2b)**



Sólido branco. Rendimento: 61% (1,086 g)

**Ponto de fusão:** 132-133 °C.

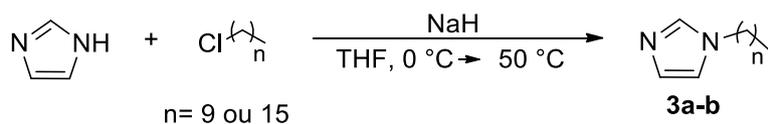
**RMN <sup>1</sup>H** - (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7,61 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H), 7,50 – 7,42 (m, 2H), 6,93 – 6,85 (m, 2H), 6,29 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H), 5,99 (s, 1H), 3,83 (s, 3H), 3,77 – 3,67 (m, 4H).

**RMN <sup>13</sup>C** – (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 166,4, 161,2, 141,6, 129,6, 127,5, 117,7, 114,4, 55,5, 44,4, 41,5.

**IV** - (Puro, ATR, cm<sup>-1</sup>) 3229, 3048, 2957, 2914, 2851, 1741, 1651, 1599, 1550, 1509, 1443, 1422, 1363, 1348, 1307, 1289, 1259, 1225, 1174, 1109, 1054, 1028, 981, 955, 856, 823, 788, 747, 713, 679, 635, 553, 528, 515.

**ESI(+)-MS** - C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup> - calculado: 204,1019, obtido: 204,1506.

#### **4.4. Procedimento geral de síntese dos *N-n*-alquilimidazois**



### Esquema 13. Síntese dos *N-n*-alquilimidazóis **3a-b**.

A uma suspensão de hidreto de sódio 60% em óleo mineral (1,3 g, 32,5 mmol, 1,15 eq) em DMF seco (40 mL), a uma temperatura de 0 °C, sob agitação e atmosfera de N<sub>2</sub>, foi lentamente adicionada uma solução de imidazol (2,0 g, 29,4 mmol, 1,05 eq.) em THF seco (20 mL). Após a adição, a mistura foi agitada a temperatura ambiente por duas horas. O cloreto de alquila (28,2 mmol, 1 eq.) correspondente foi adicionado gota-a-gota e a mistura foi agitada a 50 °C por 18 horas. Após, deixou-se a mistura reacional resfriar à temperatura ambiente, e então foi tratada cuidadosamente com 10 mL de água deionizada para decompor o excesso de hidreto de sódio. O solvente foi removido em rotaevaporador e o resíduo solubilizado em 40 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (3x 20 mL) e seca com MgSO<sub>4</sub>. O acetato de etila foi removido em rotaevaporador e o produto seco sob vácuo por 10 horas.

#### *N-n*-decilimidazol (**3a**)

Óleo amarelo. Rendimento: 50% (2,938 g).

**RMN** <sup>1</sup>H – (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7,49 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 6,89 (s, 1H), 3,91 (t, *J* = 7,2 Hz, 4H), 1,76 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H), 1,48 – 1,18 (m, 14H), 0,87 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

**RMN** <sup>13</sup>C – (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 137,19, 129,48, 118,88, 47,17, 31,97, 31,21, 29,59, 29,55, 29,37, 29,19, 26,68, 22,78, 14,22.

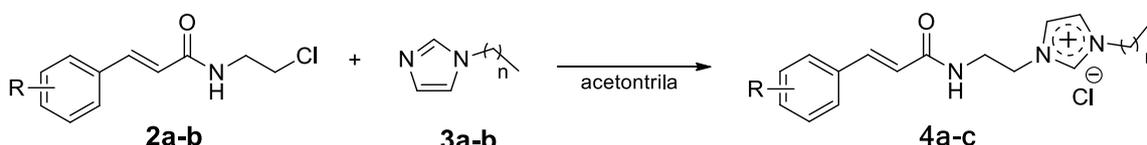
#### *N-n*-hexadecilimidazol (**3b**)

Sólido branco. Recristalizado em hexano. Rendimento: 63% (5,194 g).

**RMN** <sup>1</sup>H – (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7,45 (s, 1H), 7,04 (s, 1H), 6,89 (s, 1H), 3,91 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,81 – 1,71 (m, 2H), 1,34 – 1,20 (m, 26H), 0,87 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C** – (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 137,07, 129,35, 118,76, 47,05, 29,70, 29,69, 29,68, 29,66, 29,64, 29,60, 29,53, 29,43, 29,36, 29,08, 26,56, 22,70, 14,13.

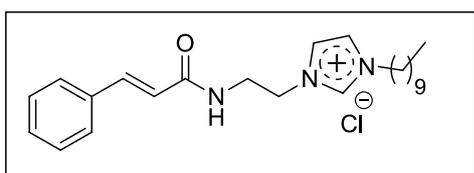
#### 4.5. Síntese dos sais imidazólicos



**Esquema 14.** Síntese dos sais imidazólicos (**4a-c**) a partir das cinamamidas (**2a-b**).

A um balão de 10 mL equipado com barra magnética foram adicionados 82 mg de *N*-(2-cloroetil)cinamamida (391 μmol, 1 eq.) e, o apropriado *N*-*n*-alquilimidazol (430 μmol, 1,1 eq.) e 1 mL de acetonitrila. O balão foi acoplado a um condensador de refluxo e imerso em um banho de óleo com temperatura ajustada para 60 °C. A reação foi mantida sob aquecimento e agitação constantes por 72 horas. Então o solvente foi evaporado e o produto foi lavado com éter etílico (3 x 3 mL) e hexano (3 x 3 mL) em banho de ultrassom. O produto foi seco sob pressão reduzida por oito horas a 40 °C.

#### Cloreto de (*E*)-1-(2-cinamidoetil)-*n*-3-decilimidazólio (**4a**)



Sólido branco. Rendimento: 73% (0,108 g).

**Ponto de fusão:** 133-134 °C.

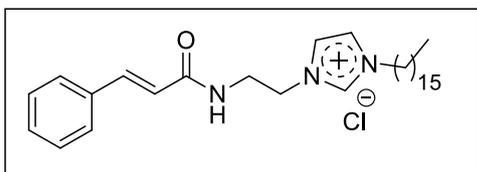
**RMN <sup>1</sup>H** – (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10,35 (s, 1H), 9,08 – 9,01 (m, 1H), 7,57 – 7,52 (m, 3H), 7,34 – 7,29 (m, 4H), 7,13 – 7,10 (m, 1H), 6,80 (d, *J* = 15,8 Hz, 1H), 4,69 – 4,63 (m, 2H), 4,15 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 3,92 (q, *J* = 11,0 Hz, 2H), 1,84 (m, 2H), 1,31 – 1,12 (m, 14H), 0,87 (t, *J* = 7,0 Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C** – (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 167,4, 140,9, 137,7, 134,9, 129,7, 128,8, 128,2, 122,8, 121,4, 121,0, 50,5, 49,2, 38,9, 31,9, 31,3, 29,5, 29,4, 29,3, 29,0, 26,3, 22,8, 14,2.

IV - (Puro, ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3464, 3429, 3222, 3028, 2922, 2853, 1739, 1660, 1619, 1547, 1449, 1365, 1217, 1165, 1071, 985, 764, 726, 654, 526.

ESI(+)-MS –  $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}^+$  - calculado: 382,2853, obtido: 382,3387.

#### Cloreto de (*E*)-1-(2-cinamidoetil)-3-*n*-hexadecilimidazólio (4b)



Sólido branco. Rendimento: 78% (0,140 g).

Ponto de fusão: 157-158 °C.

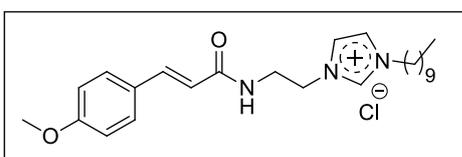
RMN  $^1\text{H}$  – (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 10,29 (s, 1H), 9,04 (t,  $J = 5,2$  Hz, 1H), 7,57 – 7,49 (m, 3H), 7,38 (s, 1H), 7,35 – 7,29 (m, 3H), 7,12 (s, 1H), 6,79 (d,  $J = 15,8$  Hz, 1H), 4,69 – 4,62 (m, 2H), 4,15 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 3,97 – 3,88 (m, 2H), 1,83 (q (5),  $J = 8,0$  Hz, 2H), 1,34 – 1,11 (m, 26H), 0,87 (t,  $J = 6,8$  Hz, 3H).

RMN  $^{13}\text{C}$  – (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 167,3, 140,7, 137,7, 134,7, 129,6, 128,7, 128,1, 122,7, 121,3, 120,8, 50,4, 49,1, 38,8, 30,2, 29,7, 29,7, 29,6, 29,5, 29,5, 29,4, 29,3, 28,9, 26,2, 22,7, 14,1.

IV - (Puro, ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3468, 3202, 3165, 3028, 2919, 2845, 1739, 1665, 1624, 1551, 1448, 1365, 1336, 1218, 1167, 990, 874, 746, 677, 640, 570, 527.

ESI(+)-MS –  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}^+$  - calculado: 466,3792, obtido 466,3637.

#### Cloreto de (*E*)-1-(2-(4-metoxicinamamida)etil)-3-*n*-decilimidazólio (4c)



Sólido branco. Rendimento: 74% (0,118 g).

Ponto de fusão: 161-162 °C.

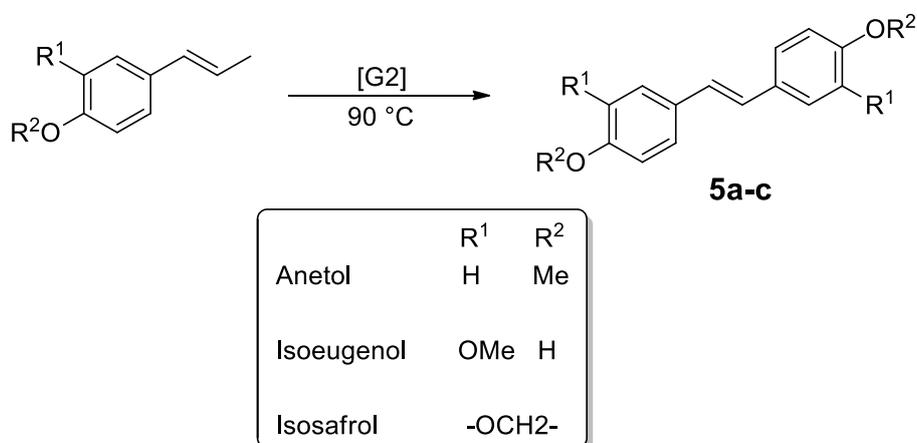
RMN  $^1\text{H}$  – (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 10,23 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 7,54 – 7,43 (m, 3H), 7,37 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 6,84 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H), 6,63 (d,  $J = 15,6$  Hz, 1H), 4,64 (s, 2H), 4,16 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 3,91 (s, 2H), 3,80 (s, 3H), 1,39 – 1,06 (m, 16H), 0,86 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C** – (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 167,7, 161,0, 140,5, 137,9, 129,8, 127,7, 122,8, 121,4, 118,6, 114,2, 55,4, 50,6, 49,3, 38,8, 30,3, 29,5, 29,4, 29,3, 29,0, 26,3, 22,8, 14,2.

**IV** - (Puro, ATR, cm<sup>-1</sup>) 3467, 3192, 3149, 3098, 2923, 2851, 1732, 1660, 1603, 1551, 1508, 1464, 1367, 1333, 1305, 1252, 1218, 1167, 1111, 1035, 987, 880, 836, 778, 724, 655, 635, 614, 526.

**ESI(+)-MS** – C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> - calculado: 412,2959, obtido: 412,3536.

#### 4.6. Procedimento geral de autometátese dos fenilpropenoides

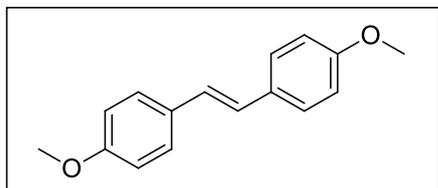


#### Esquema 15. Reação de autometátese dos fenilpropenoides.

As reações foram realizadas de acordo com procedimento descrito na literatura.<sup>63</sup> A um frasco do tipo Schlenk foi adicionado 0,5 g substrato que foi desgaseificado por cinco ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento sob vácuo. Sob fluxo de argônio, 0,1 mol% do catalisador G2 foi adicionado ao Schlenk que foi submetido a um banho de óleo a uma temperatura de 90 °C, sob constante agitação por 30 minutos. A mistura reacional tornou-se sólida após aproximadamente cinco minutos. A mistura reacional foi resfriada a temperatura ambiente e uma alíquota foi coletada para determinação da conversão de substrato em produto através de espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H (Anexo A). O produto bruto foi suspenso em DCM (1 x 3 mL) e MeOH gelado (2 x 3 mL) foi adicionado. A mistura foi agitada a 0 °C por 1 hora,

filtrada e lavada com 4 x 3 mL de MeOH. O produto foi seco sob vácuo e os compostos foram obtidos puros segundo os espectros de RMN <sup>1</sup>H.

### Produto de autometátese do anetol – (*E*)-4,4'-dimetoxiestilbeno (5a)



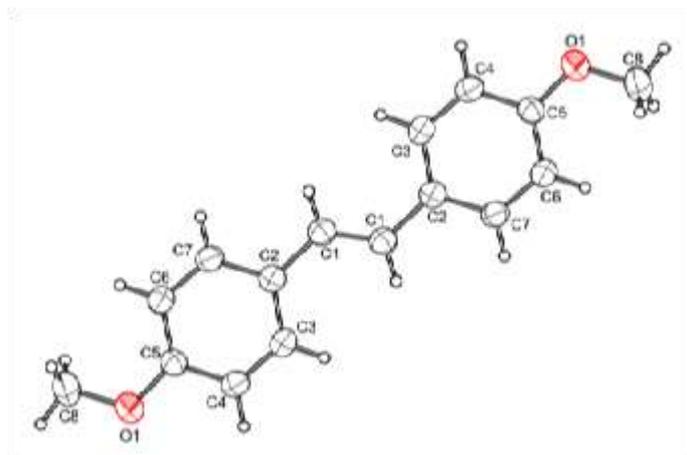
Anetol (0,502 g, 3,374 mmol) e **G2** (2,86 mg, 3,373 μmol). Produto obtido como um sólido branco. Rendimento: 90% (0,362 g).

**Ponto de fusão:** 212-213 °C.

Cristais adequados para difração de raios-X de monocristal foram obtidos por cristalização do produto em acetona. Foram solubilizados 60 mg de produto em 20 mL de acetona. A mistura foi aquecida até a ebulição e deixou-se esfriar a temperatura ambiente.

**Tabela 1.** Dados da estrutura cristalina/molecular do (*E*)-4,4'-dimetoxiestilbeno

<b>Fórmula empírica</b>	<b>C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub></b>	
Peso molecular (g)	240,24	
Cor/forma	Incolor/placa	
Temperatura (K)	296(2)	
Comprimento de onda (Å)	1,54178	
Sistema cristalino	Ortorrômbico	
Parâmetros de cela	a = 7,4363(3)	α = 90 °
	b = 6,2315(2)	β = 90 °
	c = 27,9982(10)	γ = 90 °
Volume (Å <sup>3</sup> )	1297,42(8)	
Número de fórmulas elementares (Z)	4	
Densidade calculada (g/cm <sup>3</sup> )	1,230	
Coeficiente linear de absorção mm <sup>-1</sup>	0,634	
F(000)	512,0	
Tamanho de cristal mm <sup>3</sup>	0.20 × 0.20 × 0.05	
θ (min)	3,160	
θ (max)	74,630	
Transmissão máxima e mínima	0,880, 0,970	
Total de dados exclusivos	20256	
Dados independentes	1323	
Parâmetros refinados	83	
Goodness of Fit on F <sup>2</sup>	1,053	
Reflexões (R)	0,0524	
Pico máximo na última diferença Mapa de Fourier (e.Å <sup>-3</sup> )	0,140	



**Figura 12.** Diagrama ORTEP da estrutura molecular do (*E*)-4,4'-dimetoxiestilbeno (**5a**).

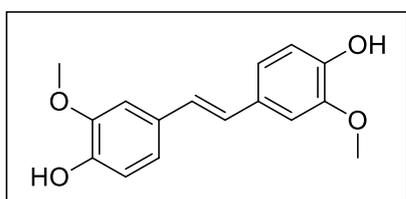
**RMN <sup>1</sup>H** - (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7,46 – 7,40 (m, 4H), 6,93 (s, 2H), 6,92 – 6,86 (m, 4H), 3,83 (s, 6 H).

**RMN <sup>13</sup>C**- (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159,1, 130,6, 127,6, 126,3, 114,2, 55,5.

**IV** – (Puro, ATR, cm<sup>-1</sup>) 3021, 2957, 2939, 2840, 1606, 1594, 1512, 1466, 1457, 1442, 1361, 1306, 1269, 1249, 1225, 1177, 1112, 1027, 968, 832, 744, 641, 542.

**GC-MS, (m/z (%))** – 241 (18) [M<sup>+</sup> + 1], 240 (100.0) [M<sup>+</sup>], 225 (62) [M<sup>+</sup> – CH<sub>3</sub>], 165 (50), 153 (45).

**Produto de autometátese do isoeugenol – (*E*)-3,3'-Dimetoxi-4,4'-dihidroxiestilbeno (**5b**)**



Isoeugenol (0,505 g, 3,075 mmol) e **G2** (2,61 mg, 3,075 μmol). Produto obtido como um sólido rosa. Rendimento: 88% (0,366 g).

**Ponto de fusão:** 213-214 °C.

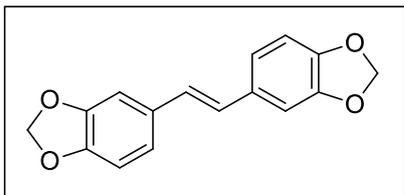
**RMN <sup>1</sup>H** - (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7,04 – 6,97 (m, 4H), 6,90 (m, 4H), 5,64 (s, 2H), 3,95 (s, 6H).

**RMN <sup>13</sup>C**- (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 146,8, 145,4, 130,4, 126,6, 120,3, 114,7, 108,1, 56,0.

**IV** – (Puro, ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3397, 3035, 2982, 2944, 2851, 1599, 1510, 1462, 1433, 1387, 1327, 1277, 1256, 1223, 1157, 1119, 1027, 963, 948, 873, 847, 816, 799, 729, 637, 570, 551.

**GC-MS, ( $m/z$  (%))** – 273 (18) [ $M^+ + 1$ ], 272 (100.0) [ $M^+$ ], 211(13), 169 (10).

**Produto de autometátese do isosafrol – (*E*)-1,2-di-(3',4'-metilendioxfenil)-etileno (5c)**



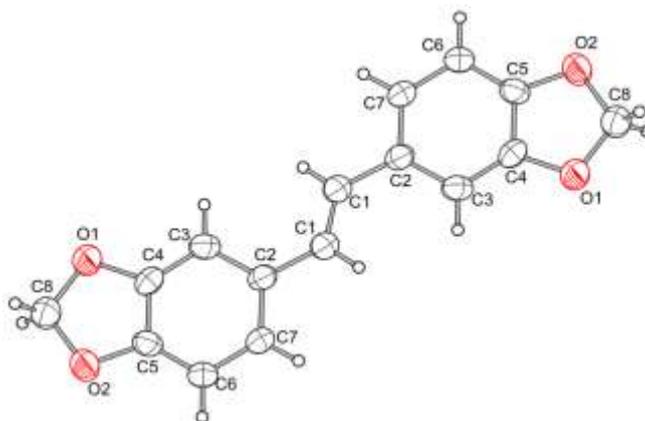
Isosafrol (0,501 g, 3,089 mmol) e **G2** (2,62 mg, 3,089  $\mu\text{mol}$ ). Produto obtido como um sólido branco. Rendimento: 94% (0,340 g).

**Ponto de fusão:** 200 – 201 °C.

Cristais adequados para difração de raios-X de monocristal foram obtidos por cristalização do produto em acetona. Foram solubilizados 60 mg de produto em 20 mL de acetona. A mistura foi aquecida até a ebulição e deixou-se esfriar a temperatura ambiente.

**Tabela 2.** Dados da estrutura cristalina/molecular do (*E*)-1,2-di-(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno.

<b>Fórmula empírica</b>	<b>C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub></b>	
Peso molecular (g)	268,26	
Cor/forma	Incolor/bloco	
Temperatura (K)	296(3)	
Comprimento de onda (Å)	1,54178	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Parâmetros de cela	a = 5,2396(1)	α = 90 °
	b = 9,8935(3)	β = 94,301(1) °
	c = 11,8554(3)	γ = 90 °
Volume (Å <sup>3</sup> )	612,83(3)	
Número de fórmulas elementares (Z)	2	
Densidade calculada (g/cm <sup>3</sup> )	1,454	
Coefficiente linear de absorção mm <sup>-1</sup>	0,869	
F(000)	280,0	
Tamanho de cristal mm <sup>3</sup>	0,52 × 0,41 × 0,34	
θ (min)	5,830	
θ (max)	72,350	
Transmissão máxima e mínima	0,700, 0,760	
Total de dados exclusivos	30708	
Dados independentes	1212	
Parâmetros refinados	183	
Goodness of Fit on F <sup>2</sup>	1,070	
Reflexões (R)	0,0252	
Pico máximo na última diferença Mapa de Fourier (e.Å <sup>-3</sup> )	0,106	



**Figura 13.** Diagrama ORTEP da estrutura molecular do (*E*)-1,2-di-(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno.

**RMN <sup>1</sup>H** - (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7,03 (d, *J* = 1,7 Hz, 2H), 6,90 (dd, *J* = 8,0, 1,7 Hz, 2H), 6,85 (s, 2H), 6,79 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 5,97 (s, 4H).

**RMN <sup>13</sup>C-** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 148,3, 147,3, 132,1, 126,9, 121,3, 108,6, 105,5, 101,2.

**IV** – (Puro, ATR, cm<sup>-1</sup>) 3072, 2989, 2894, 2785, 1856, 1600, 1498, 1482, 1442, 1375, 1379, 1293, 1256, 1230, 1192, 1129, 1099, 1035, 983, 944, 925, 860, 815, 773, 713, 630.

**GC-MS, (m/z (%))** – 269 (18) [M<sup>+</sup> + 1], 268 (100.0) [M<sup>+</sup>], 152 (44).

#### **4.7. Testes biológicos**

##### *4.7.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição*

As *N*-2-cloroetilcinamamidas **2a-b** e os SI **4a-c** foram submetidos a testes de CIM. A realização da CIM foi realizada conforme o protocolo M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2008).<sup>64</sup> Foram utilizadas placas estéreis de 96 poços e de fundo em “U”. O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640, tamponado com ácido 3-(*n*-*N*-morfolino)propanosulfônico (MOPS). Todos os testes foram realizados em duplicata. As cepas utilizadas nos testes foram *Candida tropicalis* (ATCC 13803), *Candida albicans* (ATCC 44858) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019).

**Preparo do inóculo:** As leveduras foram incubadas por 24 horas em meio sólido de ágar Sabouraud com cloranfenicol a 36,6 °C. O inóculo foi preparado suspendendo as leveduras em solução salina estéril 0,85%, até atingir a faixa de 89-91% de transmitância a 520 nm, medida no turbidímetro. Esse procedimento forneceu uma suspensão-padrão de levedura contendo 1-5 x 10<sup>6</sup> Unidades formadoras de colônia/mL. A suspensão de trabalho foi produzida fazendo-se uma diluição de 1:50 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640, obtendo uma solução com concentração de 1-5 x 10<sup>3</sup> UFC/mL.

**Preparo das soluções das substâncias testadas:** Para as substâncias solúveis em água (**4a-c**), foram preparadas soluções mãe com concentração de 5,12 mg.mL<sup>-1</sup> em água previamente esterilizada. A partir das soluções mãe foram preparadas as soluções de trabalho, realizando uma diluição 1:5 da

solução mãe no meio de cultura RPMI 1640, obtendo uma solução com concentração  $1,024 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

As substâncias insolúveis em água (**2a-b**) foram preparadas solubilizando-as em DMSO e em seguida adicionando o meio RPMI 1640, para se obter uma solução de trabalho com concentração  $1,024 \text{ mg.mL}^{-1}$ , com 2% de DMSO.

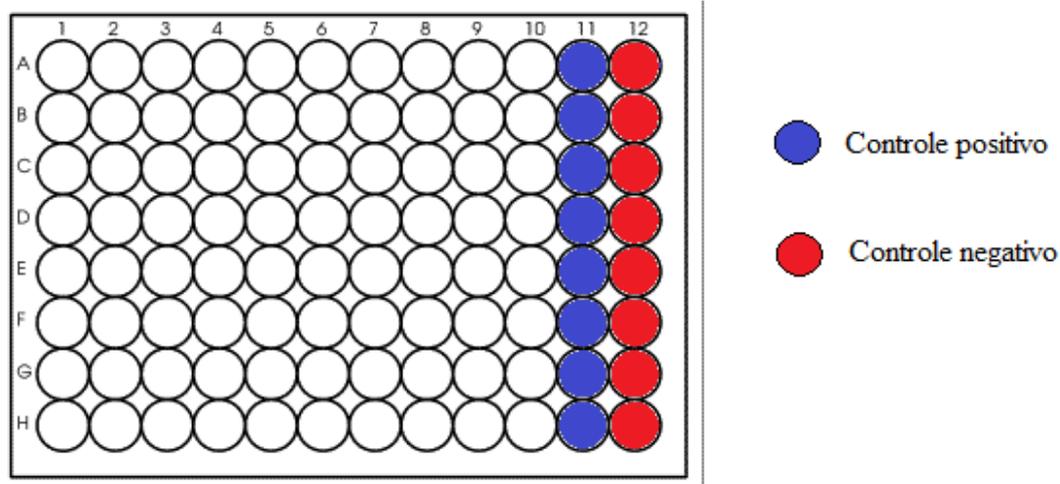
O fármaco de referência utilizado foi o fluconazol. A solução mãe de fluconazol foi preparada obtendo uma concentração de  $1,024 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A partir dessa solução foi realizada uma diluição 1:16 em meio RPMI 1640, obtendo uma solução de trabalho com concentração de  $64 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### **Montagem da placa:**

- Foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI 1640 aos poços da coluna 2 até a 11;
- Foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de meio RPMI 1640 aos poços da coluna 12, sendo o controle negativo;
- Foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de solução de trabalho das substâncias aos poços da coluna 1;
- Então se fez a diluição seriada, pegando metade do conteúdo adicionado aos poços da coluna 1 e realizando uma diluição 1:1 sucessivamente, até os poços da coluna 10;
- Foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de inóculo aos poços da coluna 1 até a coluna 11, sendo a coluna 11 o controle positivo.

A faixa de teste das substâncias foi de 512-1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A faixa de teste para o fluconazol foi de 32-0.062  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

As placas foram incubadas por 48 horas. Após esse período foi realizada a interpretação do teste, verificando em quais poços houve crescimento fúngico. A menor concentração de amostra em que não houve crescimento fúngico foi considerada o valor da CIM.



**Figura 14.** Placa de 96 poços.

#### 4.7.2. Testes *in vitro* de potencial antioxidante e citotoxicidade

Os estilbenoides obtidos a partir das reações de autometátase dos fenilpropenoides foram submetidos a testes *in vitro* para determinar o potencial antioxidante e a citotoxicidade, os quais foram realizados em parceria com a Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Luiza Ziulkoski do Laboratório de Citotoxicidade da Universidade Feevale.

A atividade antioxidante foi avaliada pelo Método de Redução do Ferro (FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power), que se baseia na capacidade de uma substância em reduzir em condições de baixo pH, o complexo  $\text{Fe}^{+3}$ /tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -TPZ), presente em excesso estequiométrico, para o complexo ferroso  $\text{Fe}^{+2}$ /tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ -TPZ), de cor intensa azul e absorção máxima a 593 nm.<sup>65</sup>

Os valores do ensaio FRAP foram obtidos para a referida redução do ferro, através da medida de absorbância da amostra a 593 nm, lida contra um branco de reagentes em um intervalo de tempo pré-determinado após a mistura entre reagentes e amostra. Obteve-se uma regressão linear relacionando os valores de absorbância e concentrações conhecidas de soluções padrão de sulfato ferroso. Os valores de atividade para as substâncias foram calculados a partir da curva de calibração traçada para as soluções de sulfato ferroso.

Os testes de citotoxicidade foram realizados em culturas de células HaCaT e células Vero. As células HaCaT são linhagens de queratinócitos humanos imortalizados que mantêm a capacidade de diferenciação epidérmica. Foi utilizado o método do MTT, que tem como princípio a determinação de células vivas em reduzirem o brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT), formando cristais insolúveis de formazan, de cor violeta.<sup>66</sup> As células Vero são linhagens de epitélio renal de macaco verde africano, que podem ser replicadas através de muitos ciclos sem envelhecer, são aneuploidias (possuem número anormal de cromossomos) e são muito utilizadas em pesquisas para desenvolvimento de vacinas e em microbiologia.<sup>67</sup> Com as células Vero também foi utilizado o método do MTT e foi utilizado ainda, o método VN (vermelho neutro). O método VN utiliza o corante cloreto de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina para tingir células vivas, sendo incorporado aos lisossomos dessas células.<sup>68</sup>

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

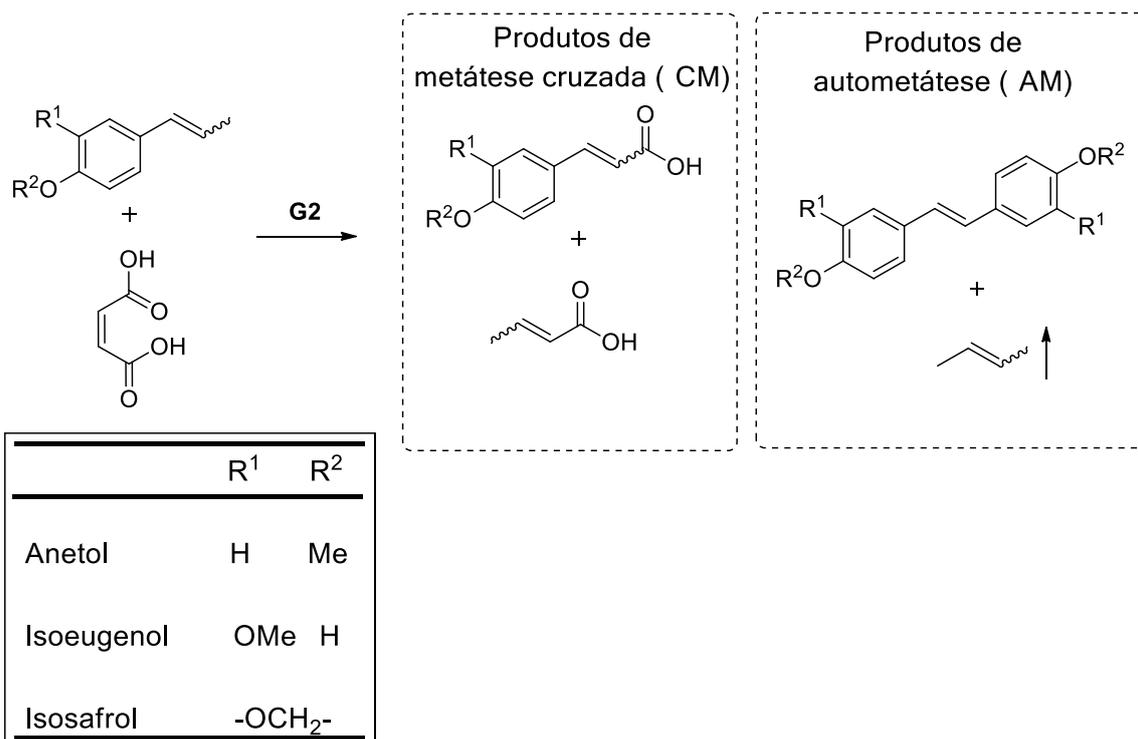
### 5.1. Metátese cruzada dos fenilpropenoides com ácido maleico.

A estratégia inicial do projeto era a utilização de halogenetos de alila como substrato nas reações de CM com os fenilpropenoides para obtenção de um alquilante para ser utilizado na síntese de sais imidazólicos. Apesar de se ter observado o consumo dos substratos no meio reacional, não se observou formação dos produtos esperados para a reação de CM. Através de análise de GC-MS se constatou a presença de produtos com massa molecular superior a esperada para os produtos de CM, o que pode indicar a ocorrência de polimerização. Sendo assim, a estratégia foi reformulada e se optou por utilizar ácido maleico como substrato.

#### 5.1.1. Otimização

O fenilpropenoide anetol foi o substrato escolhido como modelo para otimização das reações. O catalisador utilizado foi o G2, que foi escolhido por já existirem relatos de que exibe boa atividade em reações com MA-H, dentre esses relatos está incluído um estudo realizado em nosso grupo de pesquisa, onde se realizou um estudo sobre reações de CM entre ésteres derivados de ácidos graxos e MA-H.<sup>25</sup> O tempo de reação foi de 30 minutos para todas as reações de CM, também porque já se verificou em estudos anteriores do grupo utilizando MA-H como substrato, que esse tempo é suficiente para se obter a conversão máxima dos substratos.

A primeira etapa da otimização foi a investigação da influência da razão molar catalisador com relação ao fenilpropenoide, sobre a conversão e seletividade dos produtos. A razão molar entre anetol e MAH utilizada inicialmente foi de 1:2. O aumento da razão molar de catalisador G2 de 0,05 para 0,25 mol% em relação ao anetol, resultou em um aumento evidente da conversão e também do rendimento dos produtos de CM. Com respeito a seletividade dos produtos *E*, observa-se que o aumento da razão molar de catalisador não exerceu influência significativa. A razão molar de 0,25 mol% de G2 (Tabela 3, entrada 3), com conversão de 95% e rendimento para CM de 52% foi a escolhida para dar seguimento a otimização.



**Esquema 16.** Reação de metátese entre os substratos fenilpropenoides e MA-H e os possíveis produtos.

**Tabela 3.** Efeito da razão molar do catalisador G2 com relação ao anetol, sobre a CM entre anetol e MA-H.

Entrada	G2 (mol %)	Conversão (%)	Rendimento (%)		% E (CM)
			CM	AM	
1	0,05	49	22	27	82
2	0,10	64	30	34	79
3	0,25	95	52	43	83

Condições: THF = 1,5 mL, anetol = 3,38 mmol, razão molar anetol:MAH = 1:2, T = 50 °C e tempo = 30 minutos.

A etapa seguinte do processo de otimização foi a investigação do efeito da razão molar anetol:MA-H sobre a conversão e rendimento de CM. O aumento da razão anetol:MA-H de 1:2 para 1:6 resultou no decréscimo da conversão e também no rendimento para produtos de metátese cruzada, que não é significativo quando a razão molar foi de 1:3 (Tabela 4, entrada 2), mas se torna mais pronunciado a medida que a razão molar anetol:MA-H aumentou. Quando a razão molar aumentou de 1:3 para 1:4 ocorreu um pequeno aumento de 3% na conversão do substrato, porém ocorreu o decréscimo no rendimento do produto de CM. O mesmo comportamento foi observado na etapa anterior, de otimização da razão molar de catalisador, em que não ocorre significativa

variação na porcentagem de produto *E* de CM. A condição escolhida para a próxima etapa de otimização, foi onde se utilizou uma razão molar anetol:MA-H de 1:2, onde se obteve a maior conversão e maior rendimento para CM.

**Tabela 4.** Efeito da razão molar anetol:MA-H sobre a metátese cruzada entre anetol e ácido maleico (MA-H).

Entrada	Anetol:MA-H	Conversão (%)	Rendimento (%)		% <i>E</i> (CM)
			CM	AM	
1	1:2	95	52	43	83
2	1:3	75	51	24	80
3	1:4	78	46	32	80
4*	1:6	53	35	18	81

Condições: THF = 1,5 mL, anetol = 3,38 mmol, razão molar de G2 em relação ao anetol = 0,25 mol %, T = 50 °C e tempo = 30 minutos. \* THF = 2,5 mL.

A quantidade de solvente pode influenciar o resultado de uma reação de metátese, como no caso das reações de metátese de fechamento de anel, pois influencia diretamente na concentração dos reagentes. A quantidade de solvente foi aumentada em duas e três vezes com a finalidade de avaliar sua influência na reação (Tabela 5). A redução da concentração dos substratos ocasionou em pequena redução da conversão, assim como no rendimento para CM. O aumento da concentração dos substratos não foi factível, devido ao limite da solubilidade do MA-H em THF. A concentração ótima foi a de 2,53 mol.L<sup>-1</sup> de anetol, com maior conversão e maior rendimento para produtos de CM (Tabela 5, entrada 1).

**Tabela 5.** Efeito da concentração dos substratos sobre a metátese cruzada entre anetol e MA-H.

Entrada	Concentração anetol (mol.L <sup>-1</sup> )	Conversão (%)	Rendimento (%)		% <i>E</i> (CM)
			CM	AM	
1	2,53	95	52	43	83
2	1,27	89	47	42	84
3	0,84	88	44	44	84

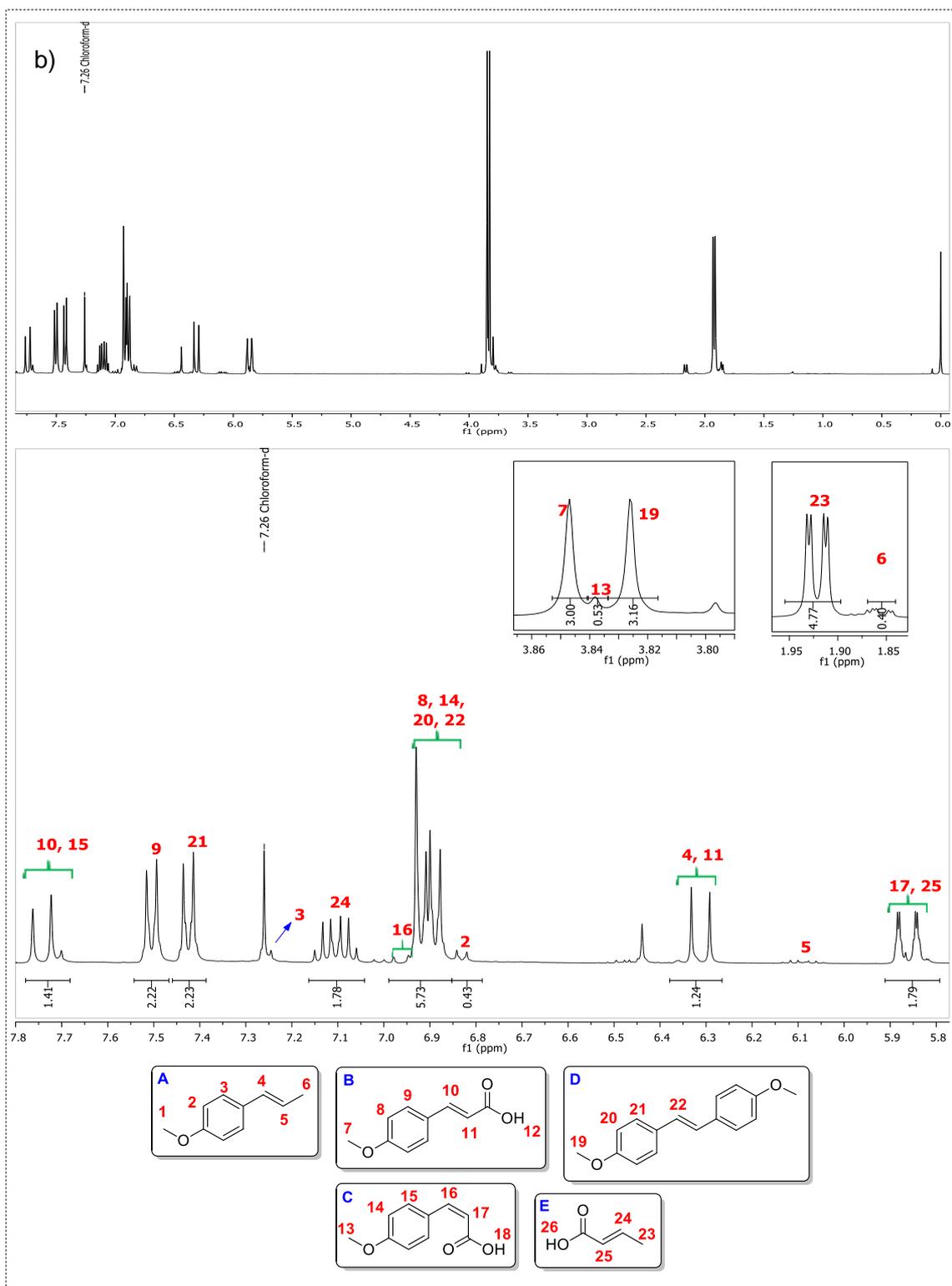
Condições: Anetol = 3,38 mmol, razão molar anetol:MAH = 1:2, razão molar de G2 em relação ao anetol = 0,25 mol%, T = 50 °C e tempo = 30 minutos.

O último parâmetro avaliado foi a influência da temperatura. O resultado mostrou que a temperatura exerce significativa influência sobre a conversão, rendimento e seletividade da reação. Através da variação da temperatura se observou que este parâmetro exerce uma influência significativa sobre a conversão e rendimento dos produtos (Tabela 6). Quando a reação foi realizada a 25 °C, a conversão obtida foi de 42%, com apenas 5% de rendimento para produto de CM. Quando a reação é realizada a 50 °C a conversão aumenta 53%, assim como o rendimento para CM aumenta 47%. Em todas as reações de CM entre anetol e MA-H, cerca de três minutos após o início da reação ocorreu precipitação de um sólido, que foi identificado como produto de AM. Os resultados indicam que um aumento da temperatura pode favorecer os produtos de CM, uma vez que manterá maior concentração dos produtos de AM no meio reacional. Entretanto, o aumento da temperatura para 70 °C resultou em uma conversão 27% menor que a 50 °C. Estima-se que tenha ocorrido a decomposição rápida do catalisador, devido à temperatura. Avaliando a proporção entre os produtos de CM e AM, observou-se que o aumento da temperatura apesar de proporcionar menor conversão, de fato favorece os produtos de CM, obtendo-se um rendimento para CM 1,5 vezes maior que para AM na temperatura de 70 °C, enquanto que a 50 °C tem-se um rendimento para CM 1,2 vezes maior que para AM. A temperatura ótima para as reações de metátese foi a temperatura de 50 °C, onde se obteve maior conversão e rendimento para metátese cruzada.

**Tabela 6.** Efeito da temperatura sobre a metátese cruzada entre anetol e ácido MA-H.

Entrada	Temperatura (°C)	Conversão (%)	Rendimento (%)		% E (CM)
			CM	AM	
1	25	42	5	37	n. d.
2	50	95	52	43	83
3	70	68	41	27	82

Condições: THF = 1,5 mL, anetol = 3,38 mmol, razão molar anetol:MA-H = 1:2, razão molar de **G2** em relação ao anetol = 0,25 mol% e tempo = 30 minutos. n. d.= não determinado.



**Figura 15.** a) Espectro de RMN <sup>1</sup>H da mistura reacional em CDCl<sub>3</sub> da reação de CM entre anetol e MA-H com conversão de 95%, obtido em um equipamento Bruker de 400 MHz. b) Espectro de RMN <sup>1</sup>H ampliado da mistura reacional em CDCl<sub>3</sub> da reação de CM entre anetol e MA-H com conversão de 95 % com os picos característicos identificados.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura reacional da reação de CM entre anetol e MA-H com conversão de 95%, foi obtido em  $\text{CDCl}_3$  em um equipamento Bruker de 400 MHz é apresentado na Figura 15a. Na Figura 15b é apresentado o espectro ampliado e com os sinais identificados. Os sinais referentes aos hidrogênios da dupla ligação dos produtos *trans* e *cis* foram atribuídos levando em conta a constante de acoplamento que é maior para hidrogênios em posição *trans*. Para o produto *trans*, com hidrogênios identificados pelos índices 10 e 11,  $J = 16,0$  Hz, e para o produto *cis*, com hidrogênios identificados pelos índices 16 e 17,  $J = 12,8$  Hz.

Após estabelecer as condições ótimas de razão molar de catalisador em relação ao fenilpropenoide, razão molar dos substratos, concentração dos substratos e temperatura, pode-se aplicá-las aos demais substratos.

#### 5.1.2. *Metátese cruzada dos substratos isoeugenol e isosafrol com ácido maleico*

As condições otimizadas foram aplicadas nas reações de metátese do isoeugenol e isosafrol com MA-H. Para o isoeugenol se obteve a maior conversão e alta seletividade para produto de metátese cruzada. Tal seletividade é associada ao fato de que o produto de AM do isoeugenol é mais solúvel no meio reacional, fazendo com que a pequena quantidade formada do mesmo, se mantenha no meio reacional e não favoreça o deslocamento do equilíbrio para formação de produtos de AM. Para o isosafrol se obteve tanto menor conversão, quanto menor seletividade para produto CM, o que confirma a hipótese de que a precipitação de produto de AM desfavorece o equilíbrio da reação para formação de produto CM. Mesmo aumentando a quantidade de solvente na reação de metátese com isosafrol (Tabela 7, entrada 4), não foi possível aumentar a seletividade para produto de CM.

**Tabela 7.** Reações de metátese cruzada com os fenilpropenóides.

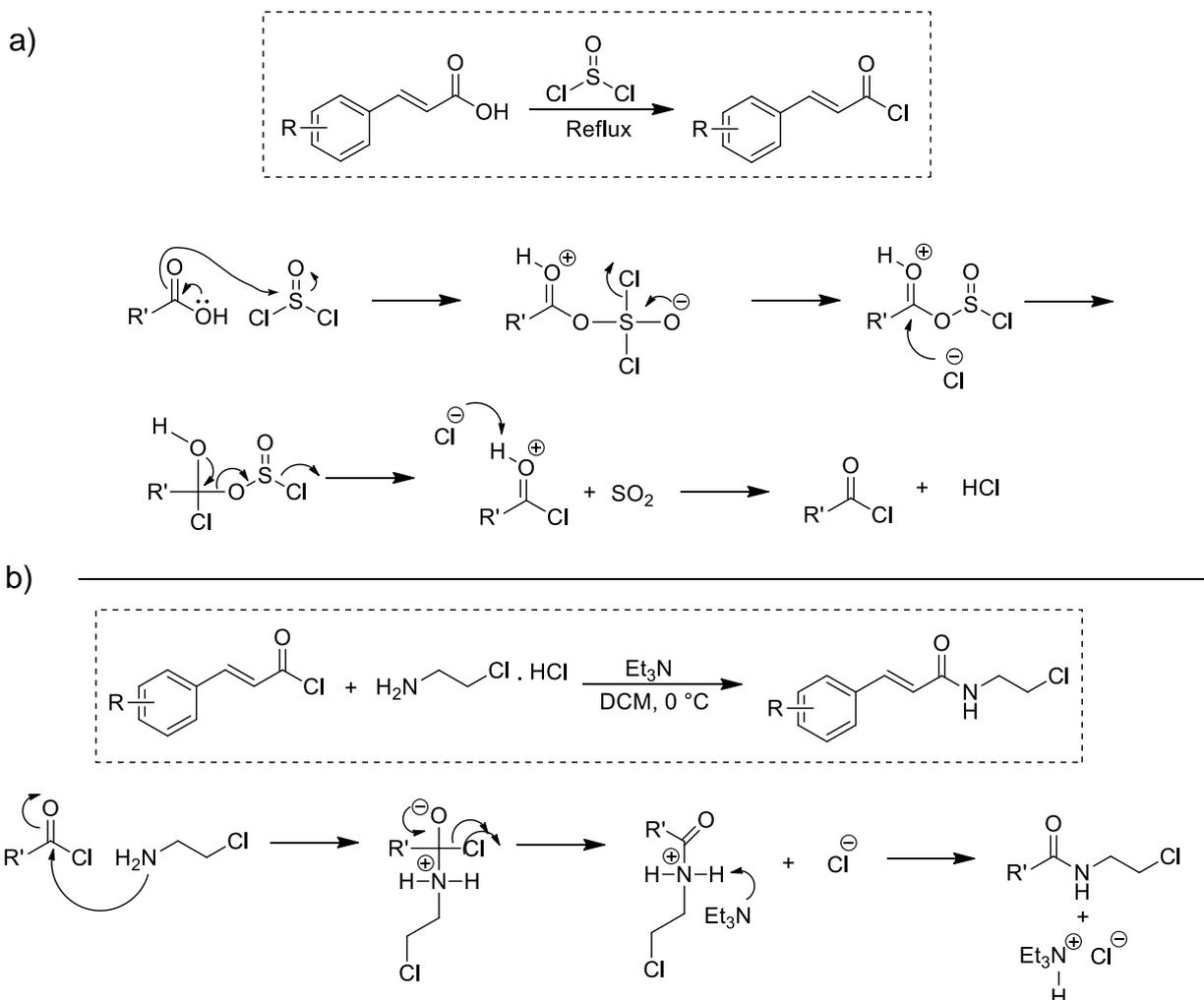
Entrada	Substrato	Conversão (%)	Rendimento (%)		% E (CM)
			CM	AM	
1	Anetol	95	52	43	83
2	Isoeugenol	>99	99	-	60
3	Isosafrol	86	28	58	49
4*	Isosafrol	82	16	67	46

Condições: THF = 1,5 mL, substrato = 3,38 mmol, razão molar substrato:MA-H = 1:2, razão molar G2 com relação aos fenilpropenóides = 0,25 mol% e T = 50 °C tempo = 30 minutos. \* THF = 3 mL.

## 5.2. Síntese das cinamamidas

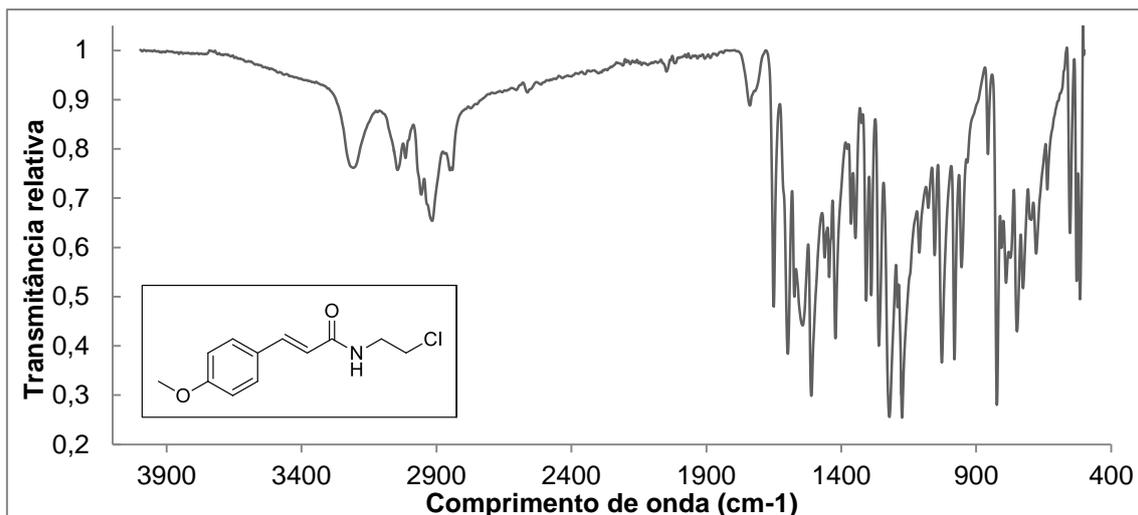
As *N*-2-cloroetilcinamamidas são uma classe de moléculas derivadas do ácido cinâmico e seu análogos. São descritas como moléculas com inúmeras propriedades biológicas.<sup>27-33</sup>

As *N*-2-cloroetilcinamamidas **2a-b** foram obtidas em duas etapas. A primeira etapa consistiu na conversão do ácido cinâmico e do ácido *trans*-4-metoxicinâmico em seus respectivos cloretos de ácidos, que foram obtidos a partir da reação dos ácidos cinâmicos com excesso de cloreto de tionila, na temperatura de refluxo. Após a reação o excesso de cloreto de tionila foi removido sob vácuo e devido a dificuldade em destilar o produto, estes foram utilizados na etapa seguinte sem prévia purificação. As cinamamidas foram obtidas através de uma versão modificada da reação de Schotten-Baumann,<sup>69</sup> onde os cloretos de ácido foram reagidos com cloridrato de *N*-2-cloroetilamina na presença de trietilamina. Os produtos obtidos foram purificados através de cristalização em etanol. O mecanismo para as duas etapas de síntese das cinamamidas está representado no Esquema 17.



**Esquema 17.** a) Mecanismo de obtenção dos cloretos de ácido. b) Mecanismo de obtenção das cinamamidas.

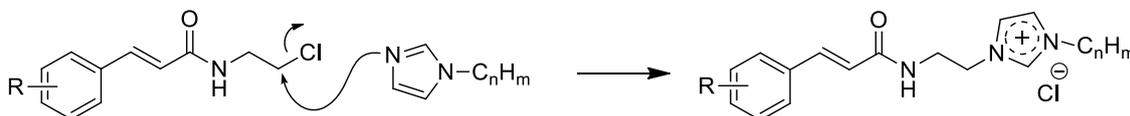
No espectro de infravermelho da *N*-2-cloroetilcinamamida **2b** (Figura 15) se observa bandas características de amida em  $3229\text{ cm}^{-1}$  (estiramento N-H),  $1651\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=O),  $1550\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular N-H) e em  $713\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular N-H). Identifica-se também bandas em  $1225$  e  $1028\text{ cm}^{-1}$  características de estiramento para éteres arílicos e em  $823\text{ cm}^{-1}$  banda típica de deformação angular em moléculas aromáticas para substituídas.



**Figura 16.** Espectro de IV da *N*-(2-cloroetil)-4-metoxicinamamida (**2b**).

### 5.3. Síntese dos sais imidazólicos

Os sais imidazólicos **4a-c** preparados através da alquilação das bases *N-n*-alquilimidazóis com as cinamamidas **2a-b** que contém a função 2-cloroetil. As reações de alquilação ocorrem por meio de mecanismo de substituição nucleofílica (Esquema 18), geralmente em condições branda de temperatura, na presença ou ausência de solvente.<sup>70</sup>

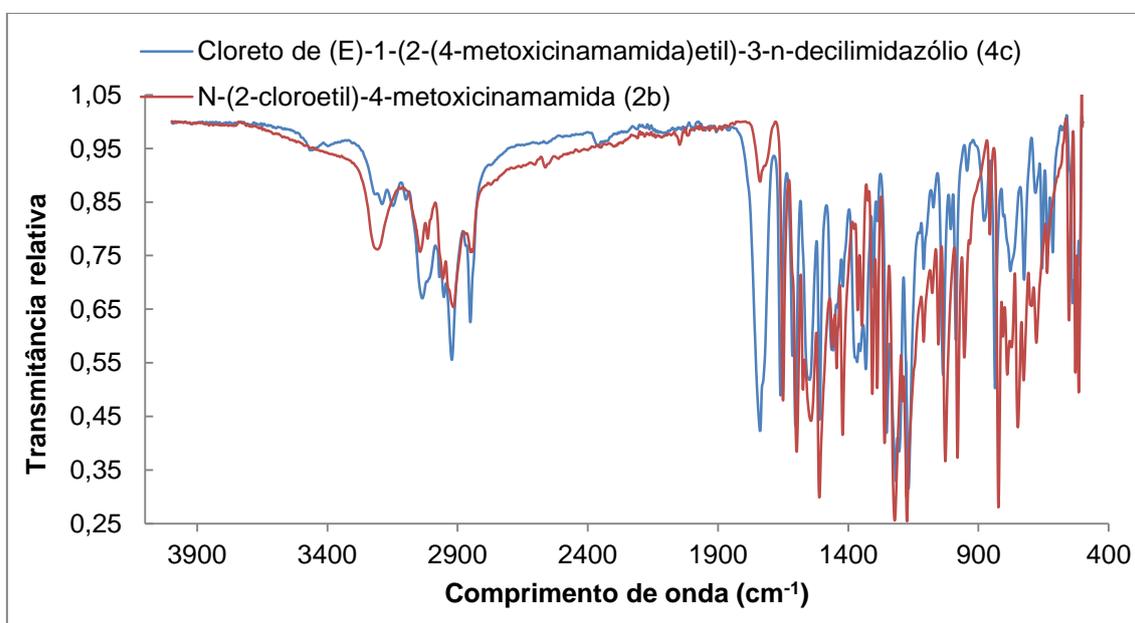


**Esquema 18.** Mecanismo de síntese dos sais imidazólicos.

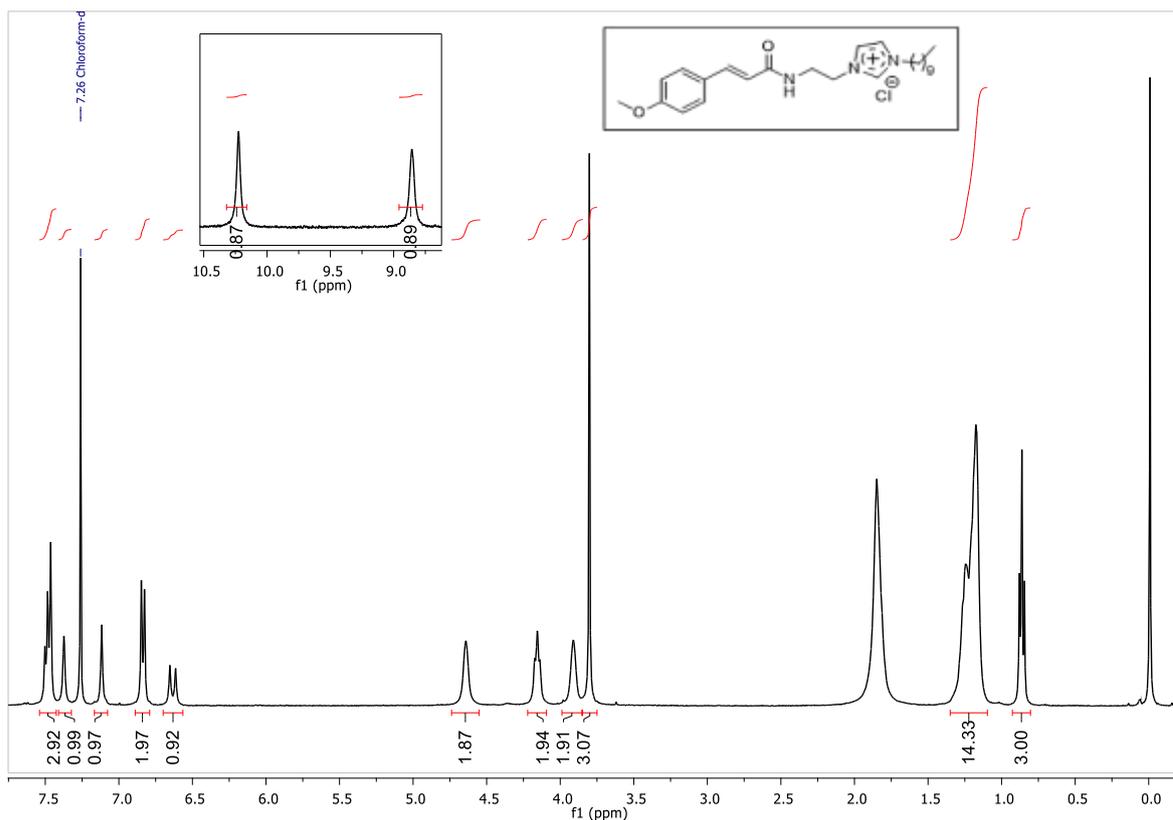
Através da sobreposição dos espectros da *N*-2-cloroetilcinamamida **2b** e do sal imidazólico **4c** (Figura 16) se verifica o aparecimento de bandas características à esse tipo de substância. São observadas bandas características do anel imidazólico de fraca intensidade referentes a estiramento C-H em 3192, 3149 e 3098  $\text{cm}^{-1}$  C-H e em 1732  $\text{cm}^{-1}$  banda de média intensidade característica de estiramento C-N.

Na figura 17 é apresentado o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do SI **4c**, obtido a partir da *N*-2-cloroetilcinamamida derivada do ácido *trans*-4-metoxicinâmico. São observados singletos característicos de hidrogênios de anel imidazólico de SI, em 10,28, 8,89 e 7,37 ppm. Nos deslocamentos químicos 4,64 e 3,91 ppm

são observados singletos referentes aos hidrogênios do grupo etila, ligados ao carbono vizinho ao nitrogênio do anel imidazólico e ao carbono vizinho ao nitrogênio do grupo amida, respectivamente. Em 6,63 ppm se observa um dubleto, com constante de acoplamento de 15,6 Hz, referente ao hidrogênio ligado ao carbono vizinho a carbonila, da dupla ligação do grupo cinamamida. O dubleto referente ao hidrogênio ligado ao carbono da dupla ligação do grupo cinamamida que é vizinho ao anel aromático se encontra no deslocamento químico 7,48 ppm, sobreposto ao dubleto referente aos hidrogênios em posição *orto* ao grupo metoxila, em 7,47 ppm e constante acoplamento 8,8 Hz. Os hidrogênios em posição *meta* ao grupo metoxila são representados pelo dubleto em 6,84 ppm, com mesmo deslocamento químico.



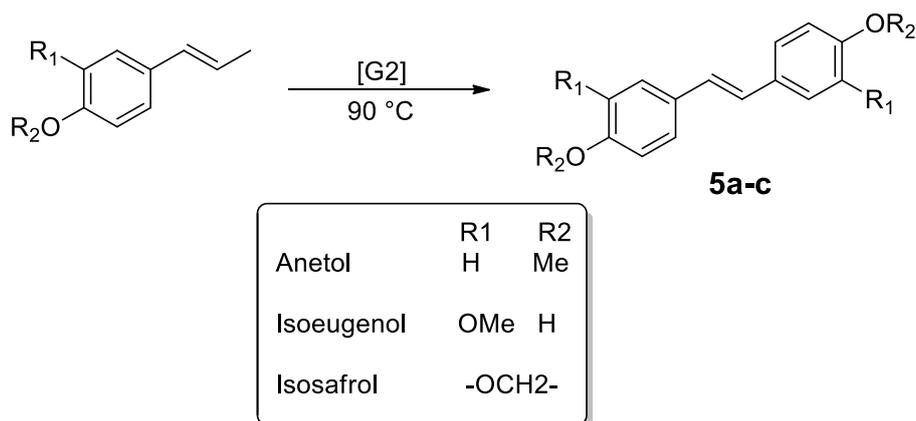
**Figura 17.** Sobreposição dos espectros de IV da *N*-(2-cloroetil)-4-metoxicinamamida e do Cloreto de (*E*)-1-(2-(4-metoxicinamamida)etil)-3-*n*-decilimidazólio.



**Figura 18.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ , do cloreto de (*E*)-1-(2-(4-metoxicinamamida)etil)-3-*n*-decilimidazólio (**4c**).

#### 5.4. Estilbenóides obtidos através de autometátese dos fenilpropenoides

Os substratos fenilpropenoides foram submetidos a reações de AM, com catalisador G2, utilizando condições já otimizadas, que foram relatadas na literatura.<sup>63</sup> As reações foram realizadas sem a presença de solvente, com 0,1 mol% de catalisador, a 90 °C e somente o isômero *trans* foi obtido. Os produtos obtidos são estilbenóides análogos ao resveratrol. As conversões e rendimento obtidos para cada um dos substratos constam na tabela 8. De forma geral, se obteve ótimos resultados nas reações de AM, com altas conversões e rendimentos, compatível com o que já foi relatado para esse tipo de reação. A conversão e rendimento mais altos foram os obtidos para o produto **5c**, resultante da AM do isosafrol. Os produtos obtidos foram avaliados quanto ao potencial antioxidante e citotoxicidade.



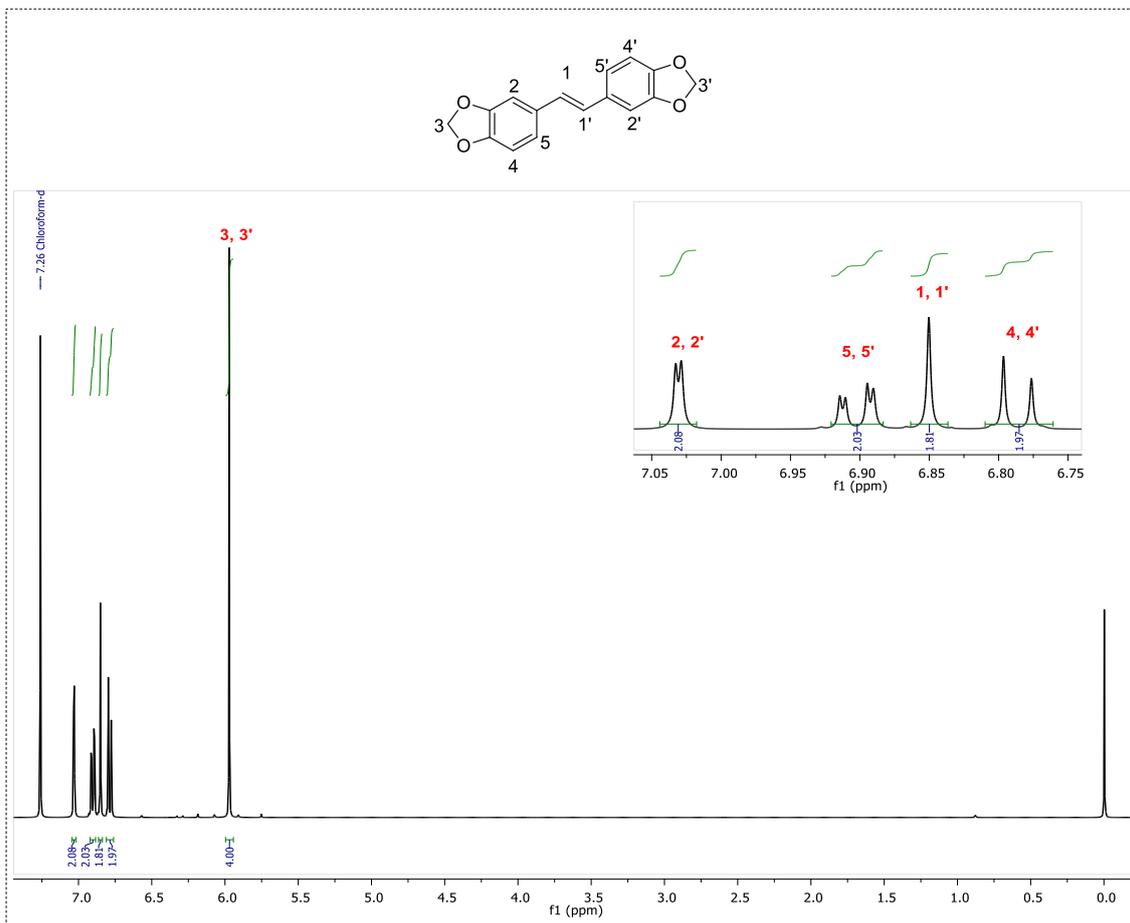
**Esquema 19.** Reação de autometátese dos fenilpropenoides.

**Tabela 8.** Conversão e rendimento dos produtos de autometátese.

Entrada	Substrato	Produto	Conversão (%)	Rendimento (%)
1	 Anetol	 1a	94	90
2	 Isoeugenol	 1b	92	88
3	 Isosafrol	 1c	96	94

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do produto de AM do isosafrol, (*E*)-1,2-di-(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno (5c) foi obtido em  $\text{CDCl}_3$ . Através dos sinais presentes na região dos hidrogênios aromáticos, entre 6,75 e 7,05 ppm, se observa claramente que a molécula analisada contém um anel aromático trissubstituído. Se observou acoplamento a três ligações entre os hidrogênios 4

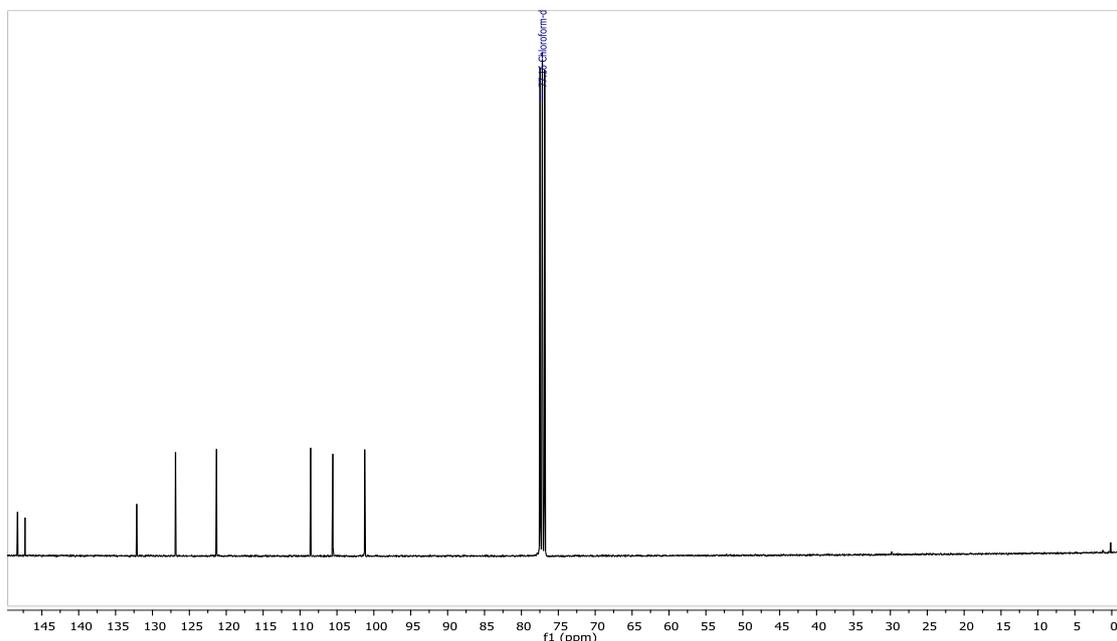
(4') (duplete em  $\delta = 6,79$  ppm) e 5 (5') (duplo duplete em  $\delta = 6,90$  ppm), constatado pela constante de acoplamento  $^3J_{H-H} = 8,0$  Hz. Se verificou também acoplamento a quatro ligações entre os hidrogênios 5 (5') e 2 (2') (duplete em  $\delta = 7,03$  ppm) os quais apresentam constante de acoplamento  $^4J_{H-H} = 1,7$  Hz.



**Figura 19.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do produto de AM do isosafrol (*E*)-1,2-di-(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno (**5c**), com região dos hidrogênios aromáticos ampliada.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  também obtido em  $\text{CDCl}_3$  (Figura 18) mostra que a molécula contém oito tipos de átomos de carbono, o que se deve a presença de simetria na mesma. Através da intensidade dos sinais se identificou três tipos de carbonos quaternários sendo os que possuem deslocamento químico em 147,27 e 148,28 ppm são os carbonos do anel aromático ligados aos oxigênios e o sinal em 132,13 ppm atribuído ao carbono do anel ligado ao carbono da dupla ligação. O sinal em 126,88 ppm foi

atribuído aos carbonos da dupla ligação e o sinal em 101,24 ppm ao carbono disposto entre os oxigênios do anel dioxol. Os sinais em 105, 55, 108,56 e 121,32 ppm foram atribuídos aos carbonos terciários do anel aromático.



**Figura 20.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do produto de AM do isosafrol (*E*)-1,2-di(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno (**5c**).

#### 5.4.1. Atividade antioxidante dos estilbenoides

Estilbenoides possuem aplicações nas indústrias cosmética, farmacológica e alimentícia devido as suas propriedades antioxidantes. Se uma molécula é facilmente oxidada, isso significa que será oxidada antes das outras e que possui potencial antioxidante *in vitro*. A atividade antioxidante das moléculas foi avaliada pelo Método de Redução do Ferro (FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*). A atividade é a concentração de  $\text{Fe}^{3+}$  que foi reduzido para  $\text{Fe}^{2+}$ . Uma alta atividade significa que a molécula foi facilmente oxidada.

Os resultados para as substâncias testadas pelo método FRAP se encontram na Tabela 9. Dentre as três substâncias testadas apenas **5a** apresentou potencial antioxidante para uso direto, nas concentrações de 50, 250 e 2500  $\mu\text{M}$ , apresentando atividade antioxidante bastante expressiva nessas concentrações. Um estudo utilizando o método FRAP para avaliação de

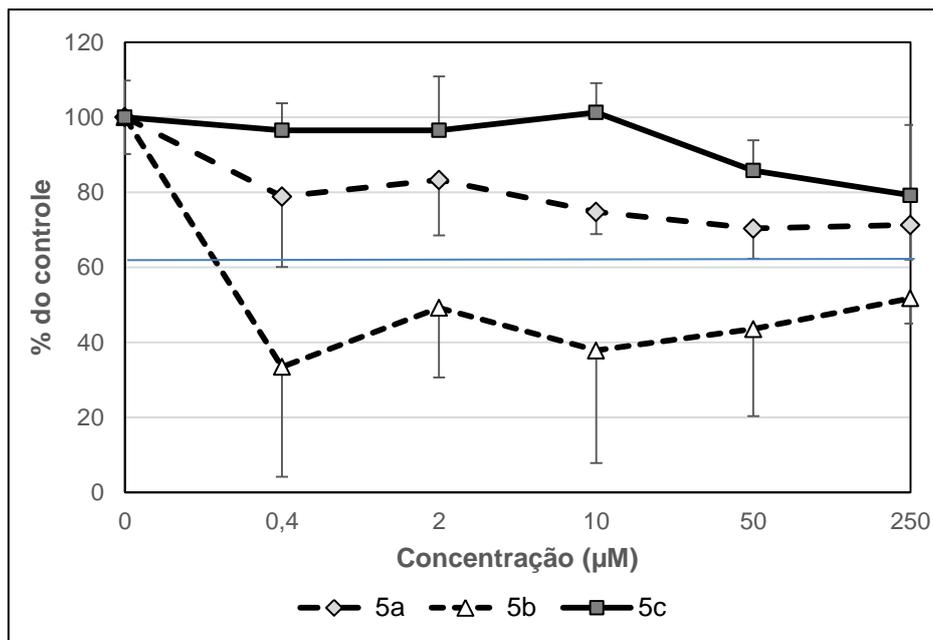
uma série de substâncias antioxidantes encontradas na natureza, incluindo resveratrol, mostrou atividade de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  para a concentração de 497  $\mu\text{M}$  de resveratrol.<sup>71</sup> A substância **5a** em uma concentração de 50  $\mu\text{M}$ , concentração quase cinco vezes menor que a de resveratrol no estudo citado, obteve uma atividade de 192  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ . Sendo assim, a molécula **5a** tem maior potencial antioxidante que resveratrol, pelo método FRAP.

**Tabela 9.** Relação das absorvâncias e atividade em função da concentração molar obtidos no FRAP para os estilbenoides.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	5a		5b		5c	
	Abs.	Atividade ( $\mu\text{M FeSO}_4$ )	Abs.	Atividade ( $\mu\text{M FeSO}_4$ )	Abs.	Atividade ( $\mu\text{M FeSO}_4$ )
0,4	0,0223	8,83	-0,0425	0	-0,0142	0
2	- 0,0300	0	-0,1019	0	-0,0103	0
10	- 0,0173	0	-0,0373	0	-0,1039	0
50	0,1322	192,00	-0,0960	0	-0,0099	0
250	1,2048	1979,67	-0,0915	0	-0,0103	0
2500	2,0184	3335,67	-0,1795	0	0,1104	155,67

#### 5.4.2. Citotoxicidade dos estilbenoides

O efeito citotóxico gerado pelos estilbenóides foi avaliado nas linhagens celulares HaCaT e Vero. Para as células HaCaT utilizou-se MTT como indicador da viabilidade celular e para as células Vero utilizou-se MTT e Vermelho Neutro (VN). Os resultados para a linhagem de células HaCaT encontram-se na Figura 19, onde são apresentadas as curvas de viabilidade celular das culturas que foram postas em contato com os estilbenóides. Para a linhagem de queratinócitos humanos HaCaT, a substância **5b** foi mais tóxica que **5a**, e esta mais tóxica que **5c**, que não apresentou toxicidade relevante. Apenas **5b** atingiu valores de toxicidade celular superiores a 30%. No entanto, para esse composto os efeitos tóxicos já foram pronunciados a partir de 0,4  $\mu\text{M}$ , indicando incompatibilidade com esse tipo celular.

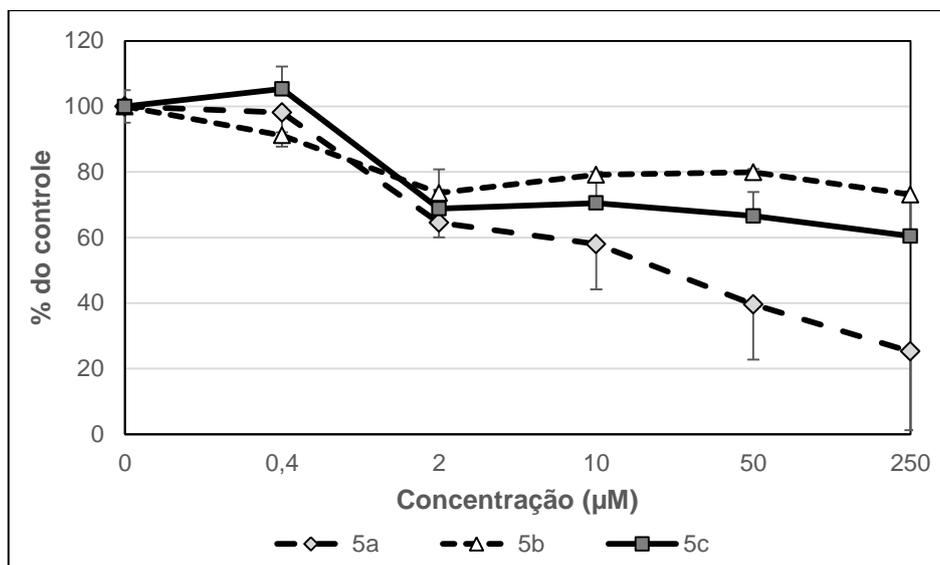


**Figura 21.** Curva de viabilidade celular das substâncias **5a**, **5b** e **5c** submetidas a teste de citotoxicidade com células HaCaT com incorporação do biomarcador MTT.

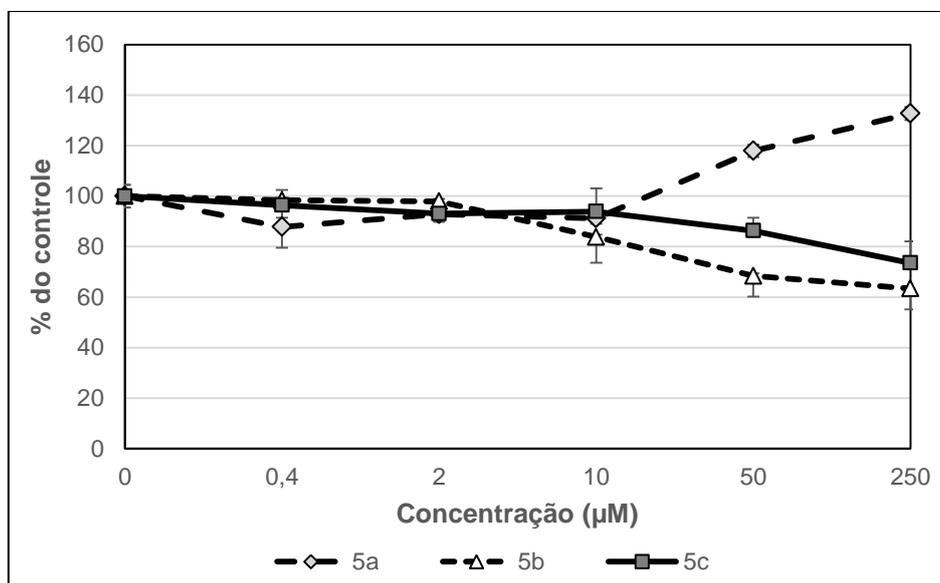
Os resultados para o teste com as células Vero usando o marcador lisossomal VN são apresentados na Figura 20. A substância **5a** demonstrou efeito citotóxico (menos de 70% de viabilidade celular) pelo biomarcador lisossomal a partir de 2 µM. A substância **5b** demonstrou menor viabilidade que os controles, mas não atinge o limiar de *cut-off* para toxicidade. A substância **5c** demonstrou efeito citotóxico (menos de 70% de viabilidade) pelo biomarcador lisossomal apenas na maior concentração (250 µM).

Para a linhagem de células Vero, onde a viabilidade foi avaliada com MTT (Figura 21), nenhum dos três compostos apresentou toxicidade mitocondrial superior a 30%, com exceção da maior concentração de **5b**. As duas maiores concentrações foram diferentes do controle para todas as substâncias. A substância **5a** causou um aumento da atividade mitocondrial nas concentrações de 50 e 250 µM (20 e 30%, respectivamente). Um aumento de atividade mitocondrial acompanhado de diminuição da viabilidade lisossomal (mesmas concentrações e tempo, Figura 20) indicam morte por estresse mitocondrial. Em células Vero, a toxicidade foi maior para o

biomarcador lisossomal VN que para o biomarcador mitocondrial MTT, para todos as substâncias.



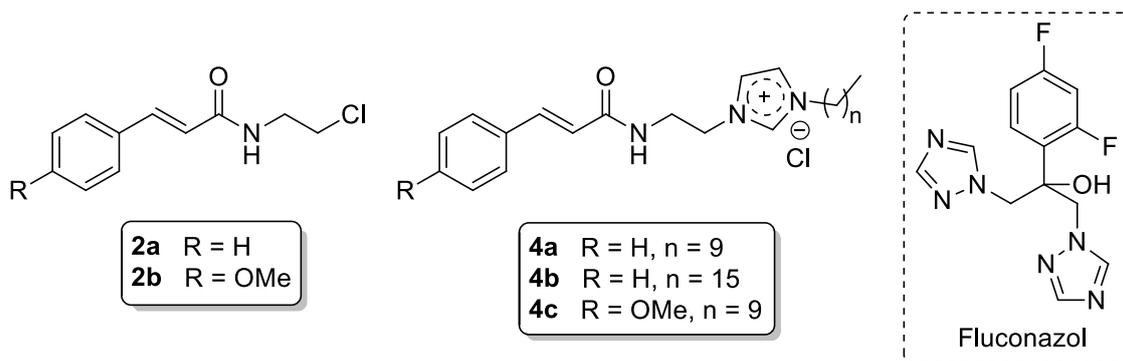
**Figura 22.** Curva de viabilidade celular das substâncias **5a**, **5b** e **5c** submetidas a teste de citotoxicidade com células Vero com incorporação do biomarcador vermelho neutro.



**Figura 23.** Curva de viabilidade celular das substâncias **5a**, **5b** e **5c** submetidas a teste de citotoxicidade com células Vero com incorporação do biomarcador MTT.

### 5.5. Atividade antifúngica

As *N*-2-cloroetilcinamamidas **2a-b** e SI **4a-b** obtidos a partir dos ácidos cinâmicos foram submetidos a teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), com espécies de fungos leveduriformes *Candida* sp. Os testes foram realizados com a intenção de avaliar o potencial antifúngico dessas substâncias e os resultados obtidos se encontram na Tabela 10. As substâncias foram testadas em uma faixa de 1-512 µg/mL e como comparativo foi utilizado o fármaco triazólico fluconazol, que é bastante utilizado como medicamento antifúngico, em uma faixa de 32 – 0,062 µg/mL. As cepas utilizadas no ensaio foram: *Candida tropicalis* (ATCC 13803), *C. albicans* (ATCC 44858) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019). Todas as cepas foram sensíveis às substâncias testadas e os SI apresentaram valores bastante expressivos de CIM. A substância **4b** apresentou maior atividade antifúngica frente às cepas testadas, observando-se um CIM de 1 µg.mL<sup>-1</sup> para as cepas de *C. tropicalis* e *C. albicans*, que é quatro vezes menor que o valor de CIM observado para o fluconazol, que foi de 4 µg.mL<sup>-1</sup> para todas as cepas testadas. Comparando **4a** e **4b**, verifica-se que o comprimento da cadeia linear, ligada a um dos nitrogênios do anel imidazólico dos sais, exerce influência significativa sobre a atividade antifúngica. Tal constatação é coerente com o que já foi observado em estudos anteriores do grupo de pesquisa, onde o SI C<sub>16</sub>MImCl apresentou CIM de 0,9 µg.mL<sup>-1</sup> para espécies de *Candida*, valor inferior ao apresentado por SI análogos com cadeias alquílicas menores.<sup>6</sup> A presença do grupo metoxi em posição *para* à função propenamida na molécula **4c** apresenta uma pequena influência sobre a atividade antifúngica do sal imidazólico, tendo como comparação a molécula análoga **4a**, que não possui o grupo metoxi e apresentou melhor atividade. As substâncias **2a** e **2b** apresentaram atividade antifúngica frente às leveduras testadas, porém não foi tão significativa, em comparação com os SI.



**Figura 24.** Substâncias testadas no ensaio de CIM.

**Tabela 10.** Atividade antifúngica *in vitro* das *N*-2-cloroetilcinamamidas e SI.

Levedura	CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					Fluconazol
	2a	2b	4a	4b	4c	
<i>C. tropicalis</i>	256	512	8	1	4	4
<i>C. albicans</i>	256	512	2	1	8	4
<i>C. parapsilosis</i>	128	512	4	4	8	4

## 6. CONCLUSÕES

A CM dos fenilpropenoides com MA-H foi otimizada utilizando a molécula de *trans*-anetol como substrato modelo. Os parâmetros otimizados de razão molar de catalisador em relação ao anetol, razão anetol:MAH, concentração de anetol e temperatura foram de 0,25 mol %, 1:2, 2,53 mol.L<sup>-1</sup> e 50 °C, respectivamente. Nestas condições, a reação com isoeugenol foi a que apresentou melhores resultados, com conversão superior a 99% de conversão e seletividade para produtos de CM de 99%. Para o isosafrol se obteve a menor conversão e também baixa seletividade. Os resultados obtidos para o isosafrol podem ser explicados pelo fato de ocorrer precipitação dos produtos de AM no meio reacional, deslocando o equilíbrio da reação desfavorecendo a CM.

De forma geral, as reações de CM dos fenilpropenoides com MA-H mostraram ser uma forma promissora para obtenção de ácidos cinâmicos, por meio de uma rota mais sustentável e direta de obtenção desses ácidos a partir de moléculas de ocorrência natural. Devido às limitações de seletividade apresentadas para alguns dos substratos as condições reacionais podem ser mais exploradas.

As N-2-cloroetilcinamamidas **2a-b** e os SI **4a-c** foram obtidos de forma satisfatória, e por meio da síntese dessas substâncias foi possível explorar mecanismos de reação de grande valor para a síntese orgânica.

As cepas *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* mostraram-se sensíveis tanto as N-2-cloroetilcinamamidas quanto aos SI, porém os valores de CIM obtidos para as N-2-cloroetilcinamamidas muito superiores aos obtidos para os SI, de forma que o potencial antifúngico das mesmas foi considerado baixo. Todos os SI apresentaram excelentes valores de CIM. O SI **4b** (cloreto de (*E*)-1-(2-cinamidoetil)-3-*n*-hexadecilimidazolio) apresentou eficácia superior ao fluconazol (CIM=4 µg.mL<sup>-1</sup>), com CIM de 1 µg.mL<sup>-1</sup> para *C. tropicalis* e *C. albicans* 4 µg.mL<sup>-1</sup> para *C. parapsilosis*. Analisando a estrutura de **4a** (cloreto de (*E*)-1-(2-cinamidoetil)-3-*n*-decilimidazolio) e **4b** apresentou CIM ligeiramente mais alto, se evidenciou que longas cadeias *n*-alquil ligadas ao nitrogênio do

anel imidazólico dos sais exerce grande influência sobre a atividade dos mesmos, fato esse já constatado em estudos anteriores do grupo.

Em suma, os SI apresentaram excelentes valores de CIM, fazendo necessário que os mesmos sejam testados em concentrações mais baixas para se obter uma visão mais ampla com respeito a atividade antifúngica dos SI. Os resultados também tornam imprescindível a exploração dessa nova classe de SI visando a utilização de outros ácidos análogos ao ácido cinâmico na síntese dos sais.

Os estilbenoides foram obtidos com altas conversões e rendimentos, utilizando os componentes de óleos essenciais anetol, isoeugenol e isosafrol como substratos. Isto demonstra que a autometátese de fenilpropenoides é uma excelente estratégia para obtenção de estilbenoides.

Apenas o estilbenoide **5a** (*E*)-4,4'-dimetoxiestilbeno demonstrou possuir potencial para aplicação como antioxidante. Essa substância apresentou boa biocompatibilidade frente a células HaCaT com marcador mitocondrial MTT, porém, não se mostrou biocompatível as células Vero com os marcadores mitocondrial MTT e lisossomal VN.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Motta, A. L.; Almeida, G. M. D.; Junior, J. N. A.; Burattini, M. N. e Rossi, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Braz. J. Infect. Dis.* **2010**, *14*, 441.
2. Brown, G. D.; Denning, D. W.; Gow, N. A.; Levitz, S. M.; Netea, M. G. e White, T. C. Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *16*, 165.
3. Yapar, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther. Clin. Risk. Manag.* **2014**, *10*, 95.
4. Sheikh, N.; Jahagirdar, V.; Kothadia, S. e Nagoba, B. Antifungal Drug Resistance in Candida Species. *Eur. J. Gen. Med.* **2013**, *10*, 254.
5. Spampinato, C. e Leonardi, D. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *Biomed. Res. Int. Volume* **2013**, 13 páginas.
6. Schrekker, H. S.; Donato, R. K.; Fuentefria, A. M.; Bergamo, V.; Oliveira, L. F. e Machado, M. M. Imidazolium salts as antifungal agents: activity against emerging yeast pathogens, without human leukocyte toxicity. *Med. Chem. Commun.*, **2013**, *4*, 1457.
7. Bergamo, V. Z.; Balbuena, E. A.; Hatwig, C.; Pippi, B.; Dalla Lana, D. F.; Donato, R. K.; Schrekker, H. S. e Fuentefria, A. M. 1-*n*-Hexadecyl-3-methylimidazolium methanesulfonate and chloride salts with effective activities against *Candida tropicalis* biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* **2015**, *61*, 504.
8. Schrekker, C. M. L.; Sokolovicz, Y. C. A.; Raucci, M. G.; Selukar, B. S.; Klitzke, J. S.; Lopes, W.; Leal, C. A. M.; de Souza, I. O. P.; Galland, G. B.; dos Santos, J. H. Z.; Mauler, R. S.; Kol, M.; Dagorne, S.; Ambrosio, L.; Teixeira, M. L.; Morais, J.; Landers, R.; Fuentefria, A. M. e Schrekker, H. S. Multitask Imidazolium Salt Additives for Innovative Poly(L-lactide) Biomaterials: Morphology Control, *Candida spp.* Biofilm Inhibition, Human Mesenchymal Stem Cell Biocompatibility, and Skin Tolerance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 21163.

9. Kirchhecker, S.; Antonietti, M. e Esposito, D. Hydrothermal decarboxylation of amino acid derived imidazolium zwitterions: a sustainable approach towards ionic liquids. *Green Chem.* **2014**, *16*, 3705.
10. Wang, Z.; Wang, Q.; Zang, Y. e Bao, W. Synthesis of new chiral ionic liquids from natural acids and their applications in enantioselective Michael addition. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4657.
11. Feder-Kubis, J.; Flieger, J.; Tatarczak-Michalewska, M.; Płazinska, A.; Madejskab, A. e Swatko-Ossor, M. Renewable sources from plants as the starting material for designing new terpene chiral ionic liquids used for the chromatographic separation of acidic enantiomers. *RSC Adv.*, **2017**, *7*, 32344.
12. Anastas, P. e Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Praticce. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301.
13. Marshall, A. e Alaimo, P. J. Useful Products from Complex Starting Materials: Common Chemicals from Biomass Feedstocks. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4970.
14. Kubo, I.; Fujita, K. e Nihei, K. Antimicrobial activity of anethole and related compounds from aniseed. *J. Sci. Food Agr.* **2008**, *88*, 242.
15. Kurkin, V. A. Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity. *Chem. Nat. Compd.* **2003**, *39*, 123.
16. da Silva, A. C.; de Oliveira, K. C. B.; Gusevskaya, E. V. e dos Santos, E. N. Rhodium-catalyzed hydroformylation of allylbenzenes and propenylbenzenes: effect of phosphine and diphosphine ligands on chemo- and regioselectivity. *J. Mol. Catal. A - Chem.* **2002**, *179*, 133.
17. Axet, M. R.; Castillon, S. e Claver, C. Rhodium-diphosphite catalysed hydroformylation of allylbenzene and propenylbenzene derivatives. *Inorg. Chim. Acta.* **2006**, *359*, 2973.
18. Melean, L. G.; Rodriguez, M.; Romero, M.; Alvarado, M. L.; Rosales, M, e Baricelli, P. J. Biphasic hydroformylation of substituted allylbenzenes with water-soluble rhodium or ruthenium complexes. *Appl. Catal. A – Gen.* **2001**, *394*, 117.
19. Ngho, S. P.; Choo, L. E. W.; Pang, F. Y.; Huang, Y.; Kini, M. R. e Ho, S. H. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential

- oils against the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *Pestic. Sci.* **1998**, *54*, 261.
20. Kihampa, C.; Nkunya, M. H. H.; Joseph, C. C. e Magesa, S. M. Antimosquito Phenylpropenoids from the Stem and Root Barks of *Uvariadendron pycnophyllum* (Diels) R.E.Fr. *J. Appl. Sci. Environ. Man.* **2010**, *14*, 29.
21. Nuñez, L. e D'Aquino, M. Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*). *Braz. J. Microbiol.* **2012**, *43*, 1255.
22. Kubo, I. e Himejima, M. Anethole, a synergist of polygodial against filamentous microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 2290.
23. Bilel, H.; Hamdi, N.; Zagrouba, F.; Fischmeister, C. e Bruneau, C. Eugenol as a renewable feedstock for the production of polyfunctional alkenes via olefin cross-metathesis. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 9584.
24. Lummiss, J. A. M.; Oliveira, K. C.; Pranckevicius, A. M. T.; Santos, A. G.; dos Santos, E. N. e Fogg, D. E. Chemical Plants: High-Value Molecules from Essential Oils. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18889.
25. Ferreira, L. A. e Schrekker, H. S. Augmentation of productivity in olefin cross-metathesis: maleic acid does the trick! *Catal. Sci. Technol.* **2016**, *6*, 8138.
26. Guzman, J. D. Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules* **2014**, *19*, 19292.
27. Xiao, Y.; Yang, X.; Li, B.; Yuan, H.; Wan, S.; Xu, Y. e Qin, Z. Design, Synthesis and Antifungal/Insecticidal Evaluation of Novel Cinnamide Derivatives. *Molecules.* **2011**, *16*, 8945.
28. Gunia-Krzyżak, A.; Panczyk, K.; Waszkielewicz, A. M. e Marona, H. Cinnamamide Derivatives for Central and Peripheral Nervous System Disorders — A Review of Structure – Activity Relationships. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1302.
29. Gunia-Krzyżak, A.; Żeślawska, E.; Bareyre, F. M.; Nitek, W.; Waszkielewicz, A. M. e Marona, H. Physicochemical and biological evaluation of a cinnamamide derivative *R,S*-(2*E*)-1-(3-hydroxypiperidin-1-yl)-3-phenylprop-2-en-1-one (KM-608) for nervous system disorders. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *90*, 244.
30. Han, M.; Ma, X.; Jin, Y.; Zhou, W.; Cao, J.; Wang, Y.; Zhou, S.; Wang, G. e Zhu, Y. Synthesis and structure-activity relationship of novel cinnamamide

- derivatives as antidepressant agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5284.
31. Shaik, B.; Kapure, J. S. e Kamal, A. Design, synthesis and biological evolution of trimethoxyphenyl cinnamide derivatives as anticancer agents. *IJASEAT.* **2016**, *4*, 50.
32. Sappanimuthu, T.; Kilambi, N.; Sundaram, S. e Susaimanickam, A. A. Antimicrobial activity of new dumbbell-shaped phenothiazine cinnamides. *Res. Chem. Intermed.* **2017**, *43*, 2401.
33. Tardugno, R.; Giancotti, G.; De Burghgraeve, T.; Delang, L.; Neyts, J.; Leyssen, P.; Brancale, A. e Bassetto, M. Design, synthesis and evaluation against Chikungunya virus of novel small-molecule antiviral agents. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26*, 869.
34. Egorova, K. S.; Gordeev, E. G. e Ananikov, V. P. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7132.
35. Ferraz, R.; Teixeira, C.; Gomes, P. e Prudêncio, C. **Bioactivity of Ionic Liquids.** Em *Ionic Liquid Devices*. Royal Society of Chemistry, 2017, 404-422.
36. Chorkendorff, I. e Niemantsverdriet, J. W. **Concepts of Modern Catalysis and Kinetics.** WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Alemanha, 2003.
37. IUPAC Compendium of Chemical Terminology - Gold Book; IUPAC, 2014.
38. Rothenberg, G. **Catalysis: Concepts and Green Applications.** WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Alemanha, 2008.
39. Sheldon, R. A.; Arends, I. e Hanefeld, U. **Green Chemistry and Catalysis.** WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Alemanha, 2007.
40. Trnka, T. M. e Grubbs, R. H. The Development of  $L_2X_2Ru=CHR$  Olefin Metathesis Catalysts: An Organometallic Success Story. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18.
41. Rouhi, A. M. C&EN: Cover Story - Olefin metathesis: the early days. *C&EN.* **2002**, *80*, 34.
42. Astruc, D. Olefin Metathesis Reactions: From a Historical Account to Recent Trends. **Olefin Metathesis: Theory and Practice;** John Wiley & Sons, Inc., 2014, 5-36.

43. Grubbs, R. H. Olefin Metathesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7117.
44. Chauvin, Y. Olefin Metathesis: The Early Days (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3740.
45. Vougioukalakis, G. C. e Grubbs, R. H. Ruthenium-Based Heterocyclic Carbene-Coordinated Olefin Metathesis Catalysts. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1746.
46. a) Schrock, R. R. High-Oxidation-State Molybdenum and Tungsten Alkylidyne Complexes. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 342. b) Schrock, R. R.; Murdzek, J. S.; Bazan, G. C.; Robbins, J.; DiMare, M. e O'Regan, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3875.
47. Nguyen, S. T.; Johnson, L. K.; Grubbs, R. H. e Ziller, J. W. Ring-Opening Metathesis Polymerization (ROMP) of Norbornene by a Group VI11 Carbene Complex in Protic Media. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3974.
48. Schwab, P.; France, M. B.; Ziller, J. W. e Grubbs, R. H. A Series of Well-Defined Metathesis Catalysts-Synthesis of  $[\text{RuCl}_2(=\text{CHR}')(\text{PR}_3)_2]$  and Its Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2039.
49. Schwab, P.; Grubbs, R. H. e Ziller, J. W. Synthesis and Applications of  $\text{RuCl}_2(=\text{CHR}')(\text{PR}_3)_2$ : The Influence of the Alkylidene Moiety on Metathesis Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 100.
50. Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C. W. e Grubbs, R. H. Synthesis and Activity of a New Generation of Ruthenium-Based Olefin Metathesis Catalysts Coordinated with 1,3-Dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene Ligands. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953.
51. Kingsbury, J. S.; Harrity, J. P. A.; Bonitatebus, P. J., Jr. e Hoveyda, A. H. A Recyclable Ru-Based Metathesis Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 791.
52. Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B. L. e Hoveyda, A. H. Efficient and Recyclable Monomeric and Dendritic Ru-Based Metathesis Catalysts *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168.
53. Samojłowicz, C.; Bieniek, M. e Grela, K. Ruthenium-Based Olefin Metathesis Catalysts Bearing N-Heterocyclic Carbene Ligands. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3708.

54. Nelson, D. J.; Manzini, S.; Urbina-Blanco, C. A. e Nolan, S. P. Key processes in ruthenium-catalysed olefin metathesis. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10355.
55. Chatterjee, A. K.; Choi, T.; Sanders, D. P. e Grubbs, R. A General Model for Selectivity in Olefin Cross Metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 37, 11360.
56. Jones, G. The Knoevenagel Condensation. **Organic Reactions**. ACS. Vol. 15. 1967. 218-225.
57. Clayden, J.; Warren, S.; Greeves, N. e Wothers, P. **Organic Chemistry**. Oxford, 1<sup>a</sup> Ed. 2001, 279-303.
58. Peperidou, A.; Pontiki, E.; Hadjipavlou-Litina, D.; Voulgari, E. e Avgoustakis, K. Multifunctional Cinnamic Acid Derivatives. *Molecules* **2017**, *22*, 1247.
59. Gunia-Krzyzak, A.; Panczyk, K.; Waszkielewicz, A. M. e Marona, H. Cinnamamide Derivatives for Central and Peripheral Nervous System Disorders – A Review of Structure-Activity Relationships. *ChemMedChem*. **2015**, *10*, 1302.
60. De Filippis, B.; Ammazalorso, A.; Fantacuzzi, M.; Giampetro, L.; Maccallini, C. e Amoroso, R. Anticancer Activity of Stilbene-Based Derivatives. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 558.
61. Zarychta, B.; Gianopoulos, C. G. e Pinkerton, A. A. Revised structure of trans-resveratrol: Implications for its proposed antioxidant mechanism. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1416.
62. Piotrowska, H.; Kujawska, M.; Nowicki, M.; Petzke, E.; Ignatowicz, E.; Krajka-Kuzniak, V.; Zawierucha, P.; Wierzchowski, M.; Murias, M. e Jodynis-Liebert, J. Effect of resveratrol analogue, DMU-212, on antioxidant status and apoptosis-related genes in rat model of hepatocarcinogenesis. *Hum. Exp. Toxicol.* **2017**, *36*, 160.
63. Hitce, J.; Crutizat, M.; Bourdon, C.; Vivès, A.; Marat X. e Dalko-Csiba, M. Flash-metathesis for the coupling of sustainable (poly)hydroxyl  $\beta$ -methylstyrenes from essential oils. *Green Chem.* **2015**, *17*, 3756.
64. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard** – Third Edition. CLSI Document M27-A3. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

65. Benzie, I. F. F. e Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, 239, 70.
66. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**, 65, 55.
67. Ammerman, N. C.; Beier-Sexton, M. e Azad, A. F. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2008**, Apêndice 4E.
68. Borenfreund, E. e Puerner, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* **1985**, 24, 119.
69. Taylor, J.E. e Bull, S.D. *N*-Acylation Reactions of Amines. **Comprehensive Organic Synthesis**. Elsevier Science Ltd. 2<sup>a</sup> Ed. Vol. 6. 2014. 427-472.
70. MacFarlane, D. R.; Kar, M. e Pringle, J. M. **Fundamentals of Ionic Liquids: From Chemistry to Applications**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Alemanha, 2017. 81-99.
71. Pulido, F.; Bravo, L. e Saura-Calixto, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 3396.

## ANEXOS

### Anexo A – Fórmulas de cálculo de conversão, rendimento e seletividade das reações de metátese cruzada e autometátese.

Para as reações de CM e AM envolvendo anetol e isoeugenol os cálculos de conversão, rendimento e seletividade foram realizados utilizando o valor referente à área da integral dos sinais dos hidrogênios do grupo metoxila do substrato e produtos. Para as reações de CM e AM com isosafrol se utilizou o valor referente à área da integral dos sinais dos hidrogênios do grupo metileno.

O rendimento para as reações de autometátese foi calculado baseado na massa de produto obtida.

Conversão:

$$Conv (\%) = \frac{\sum \text{Área } H_P}{\sum \text{Área } H_{P+S}} \times 100 \quad (1)$$

Rendimento:

$$Rend (\%) = \frac{\sum \text{Área } H_{Pe}}{\sum \text{Área } H_{P+S}} \times 100 \quad (2)$$

Seletividade *E*:

$$E (\%) = \frac{\text{Área } H_{PE}}{\text{Área } H_{PE} + \text{Área } H_{PZ}} \times 100 \quad (3)$$

Onde,

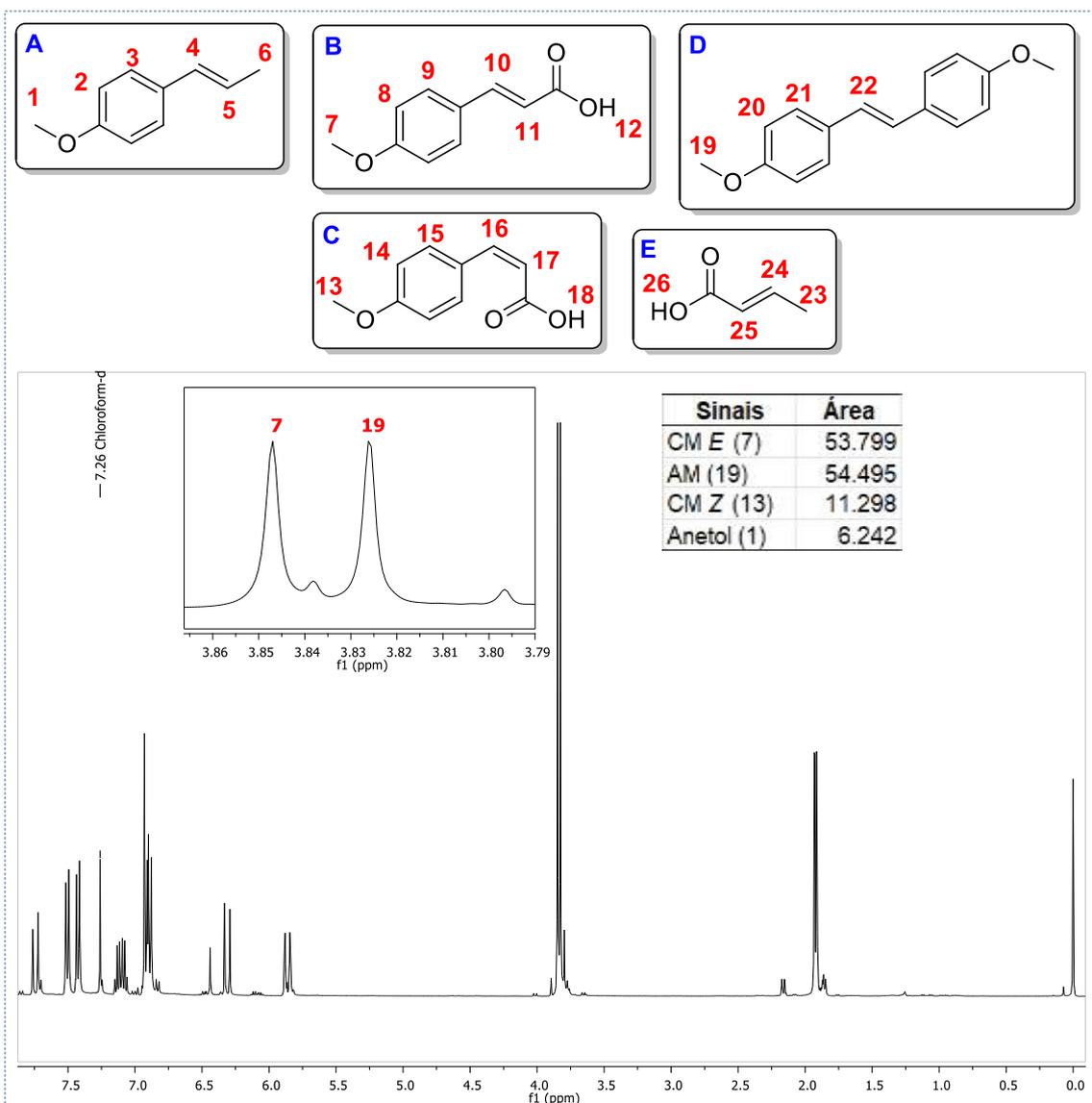
$H_P$  = Hidrogênios dos produtos;

$H_{P+S}$  = Hidrogênios dos produtos e do substrato;

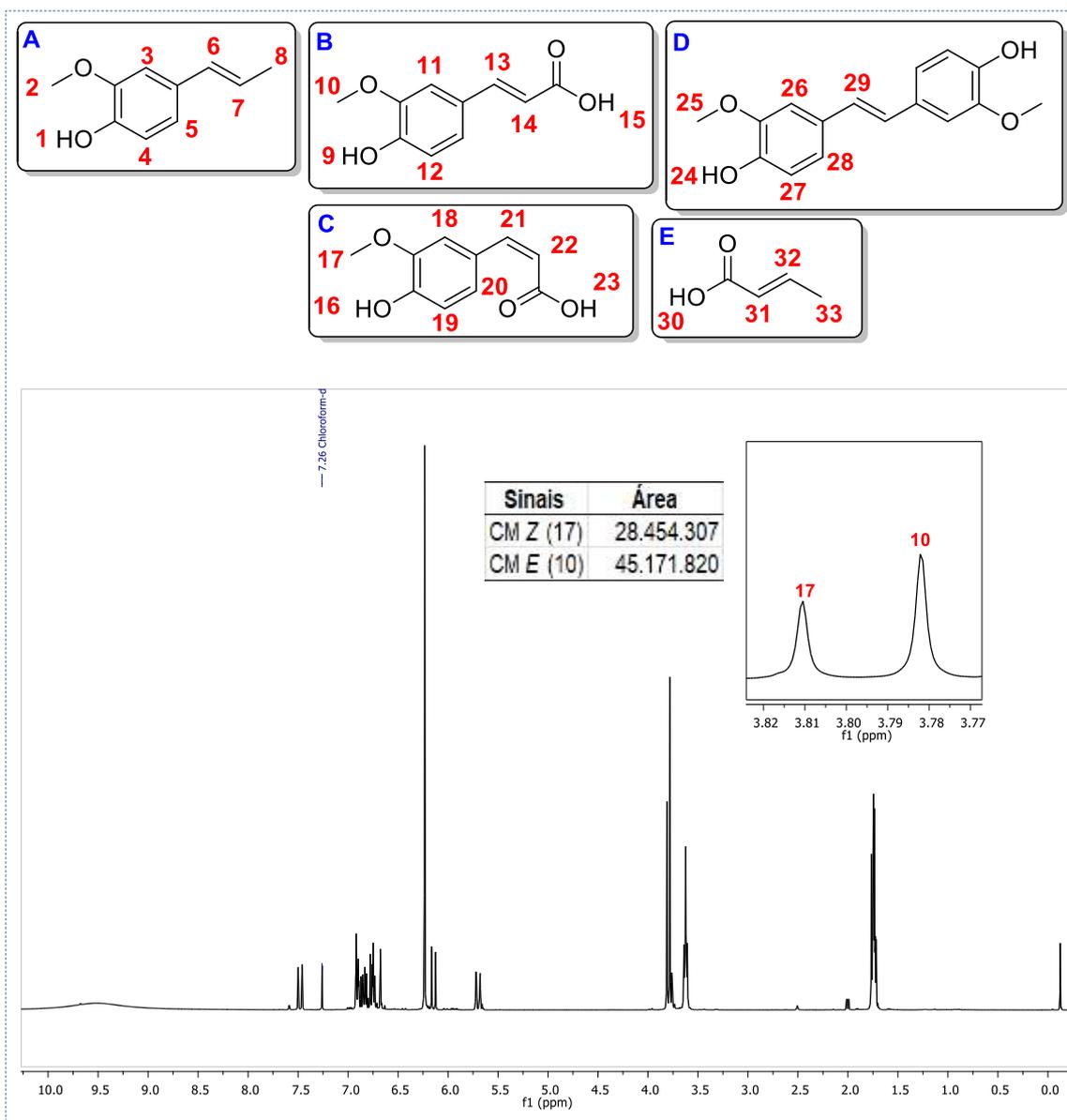
$H_{Pe}$  = Hidrogênios de produtos específicos (produtos de CM ou AM);

$H_{PE}$  = Hidrogênios dos produtos de CM com isomeria *E*;

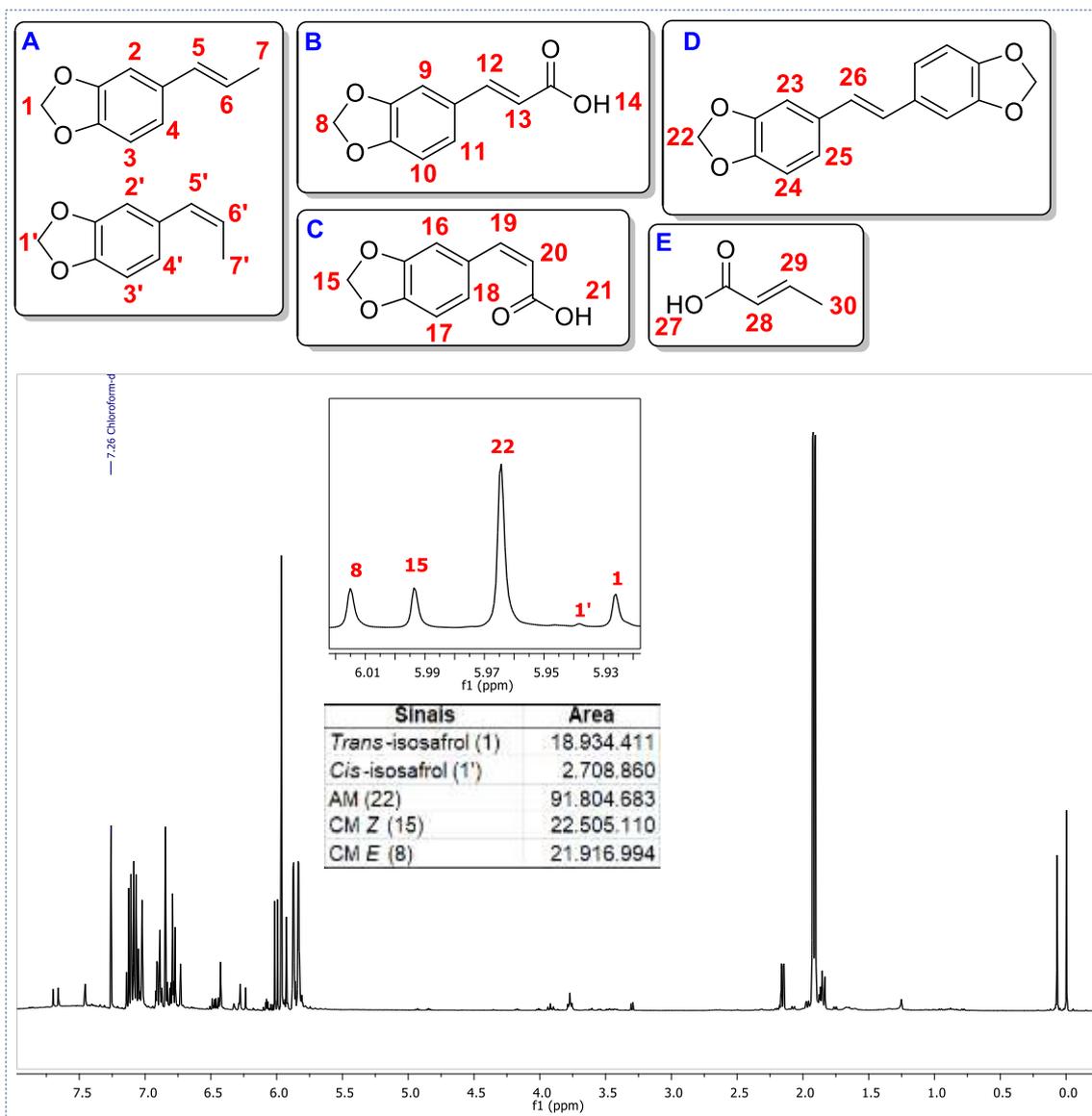
$H_{PZ}$  = Hidrogênios dos produtos de CM com isomeria *Z*.



**Figura 25.** Estruturas do substrato e produtos para CM entre anetol e MA-H e espectro de RMN  $^1\text{H}$  com região referente aos hidrogênios das metoxilas ampliada da reação de metátese cruzada entre anetol e MA-H com razão molar de G2 em relação ao anetol = 0,25 mol%, razão anetol:MA-H = 1:2, THF = 1,5 mL, T= 50 °C, t = 30 min e conversão de anetol de 95%.



**Figura 26.** Estruturas do substrato e produtos para CM entre isoeugenol e MA-H e espectro de RMN  $^1\text{H}$  com região referente aos hidrogênios das metoxilas ampliada da reação de metátese cruzada entre isoeugenol e MA-H com razão molar de G2 em relação ao isoeugenol = 0,25 mol%, razão isoeugenol:MA-H =1:2, THF = 1,5 mL, T= 50 °C, t = 30 min e conversão de isoeugenol de 99%.



**Figura 27.** Estruturas do substrato e produtos para CM entre isosafrol e MA-H e espectro de RMN  $^1\text{H}$  com região referente aos hidrogênios dos metilenos ampliada da reação de metátese cruzada entre isosafrol e MA-H com razão molar de G2 em relação ao isosafrol = 0,25 mol%, razão isosafrol:MA-H = 1:2, THF = 1,5 mL, T = 50 °C, t = 30 min e conversão de isosafrol de 86%.

Anexo B – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos ácidos cinâmicos, cinamamidas e sais imidazólicos.

Ácido *trans*-4-metoxicinâmico (1a)

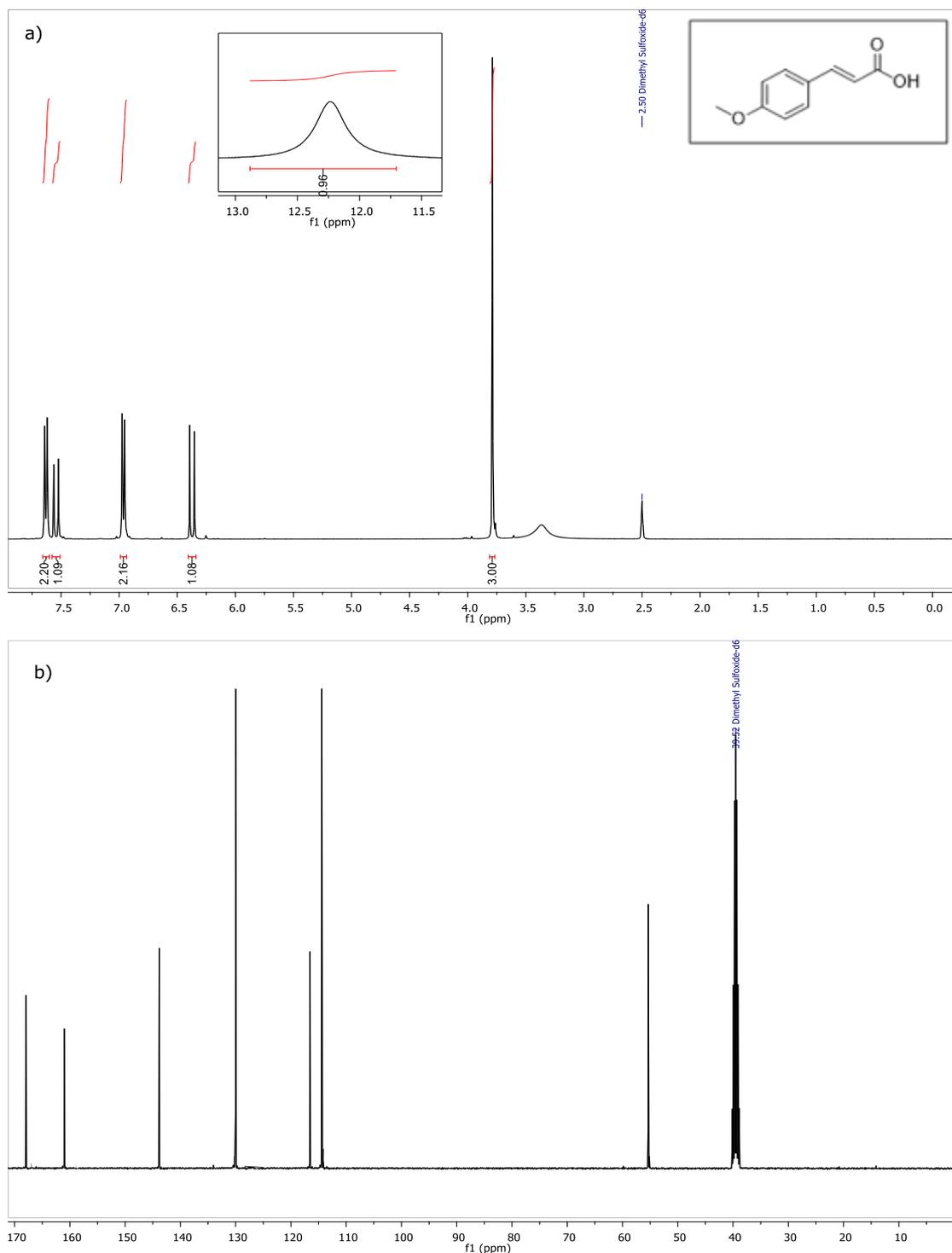


Figura 28. a) Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e b) RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido *trans*-4-metoxicinâmico (1a) em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

## Ácido *trans*-ferúlico (1b)

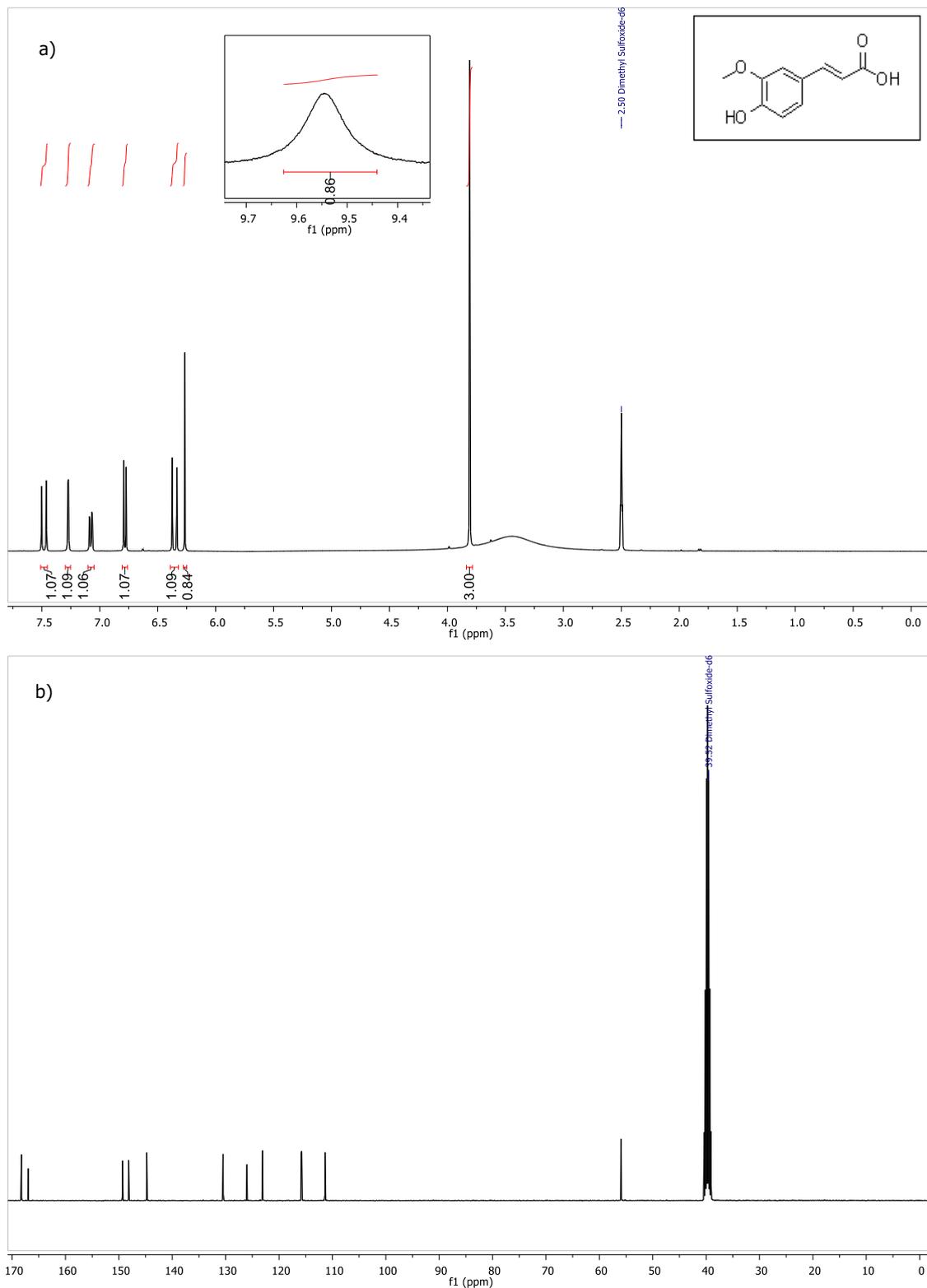
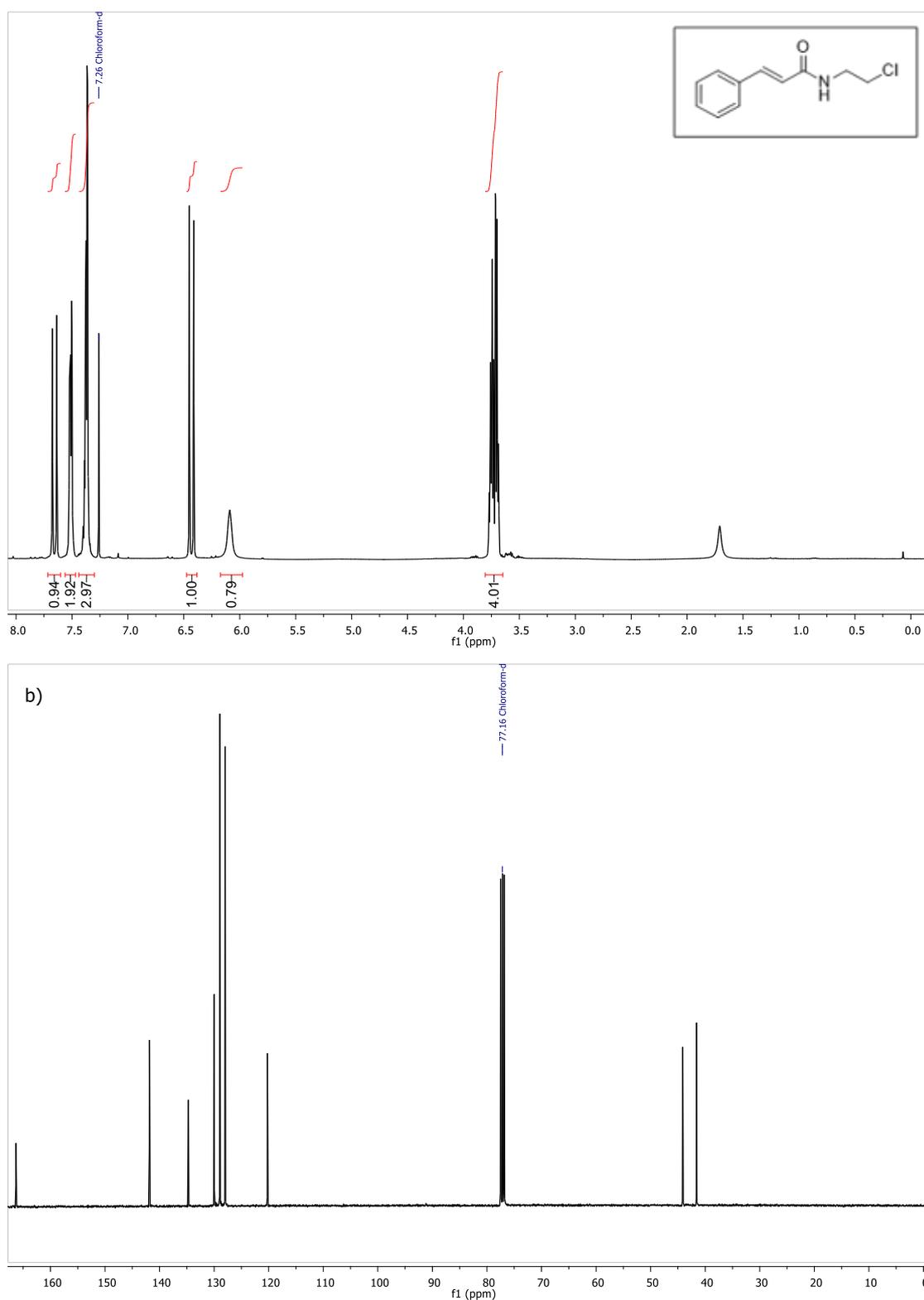


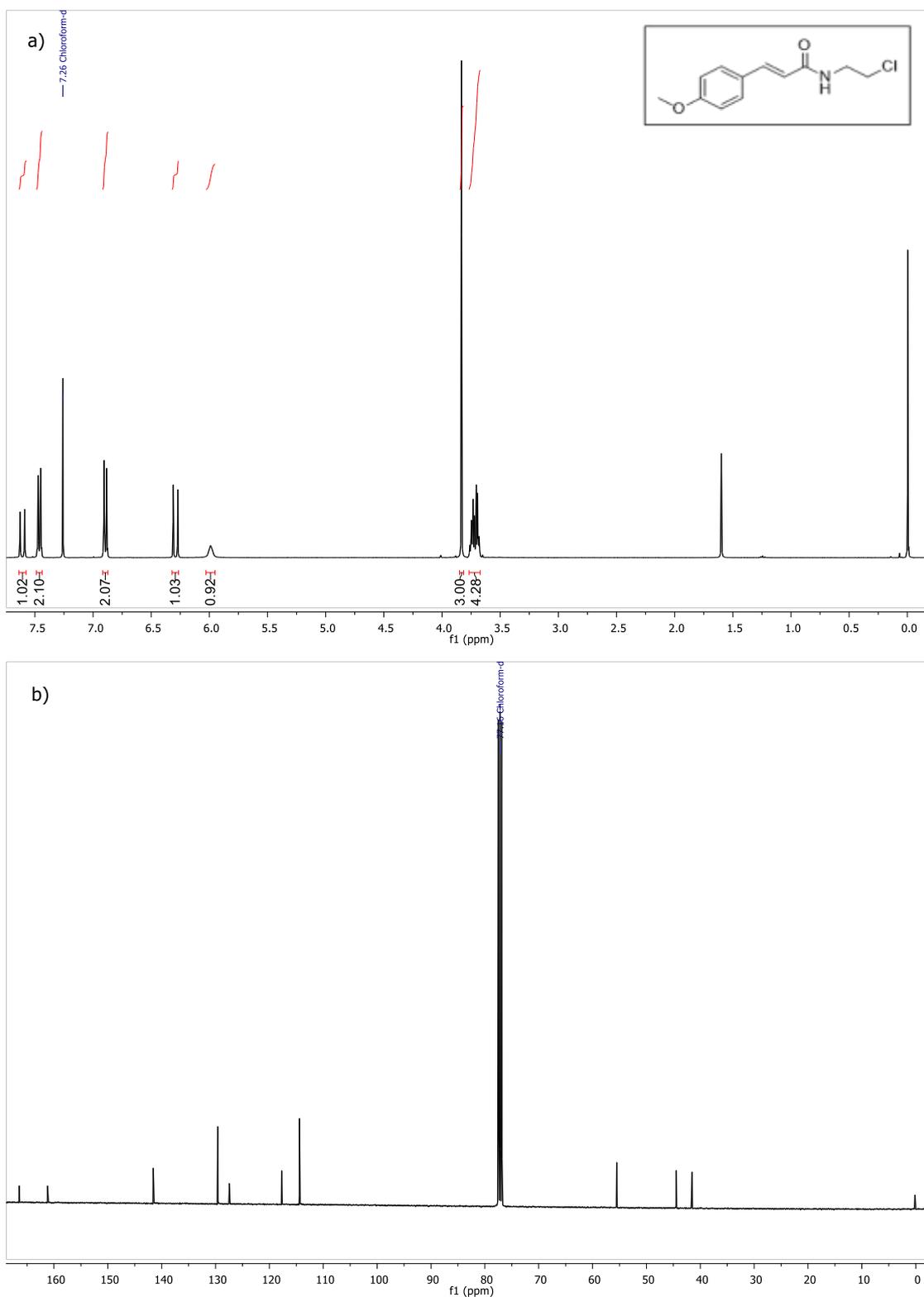
Figura 29. a) Espectros de RMN <sup>1</sup>H e b) RMN <sup>13</sup>C do ácido *trans*-ferúlico (1b) em DMSO-*d*<sub>6</sub>.

**(E)-N-(2-cloroetil)cinamamida (2a)**



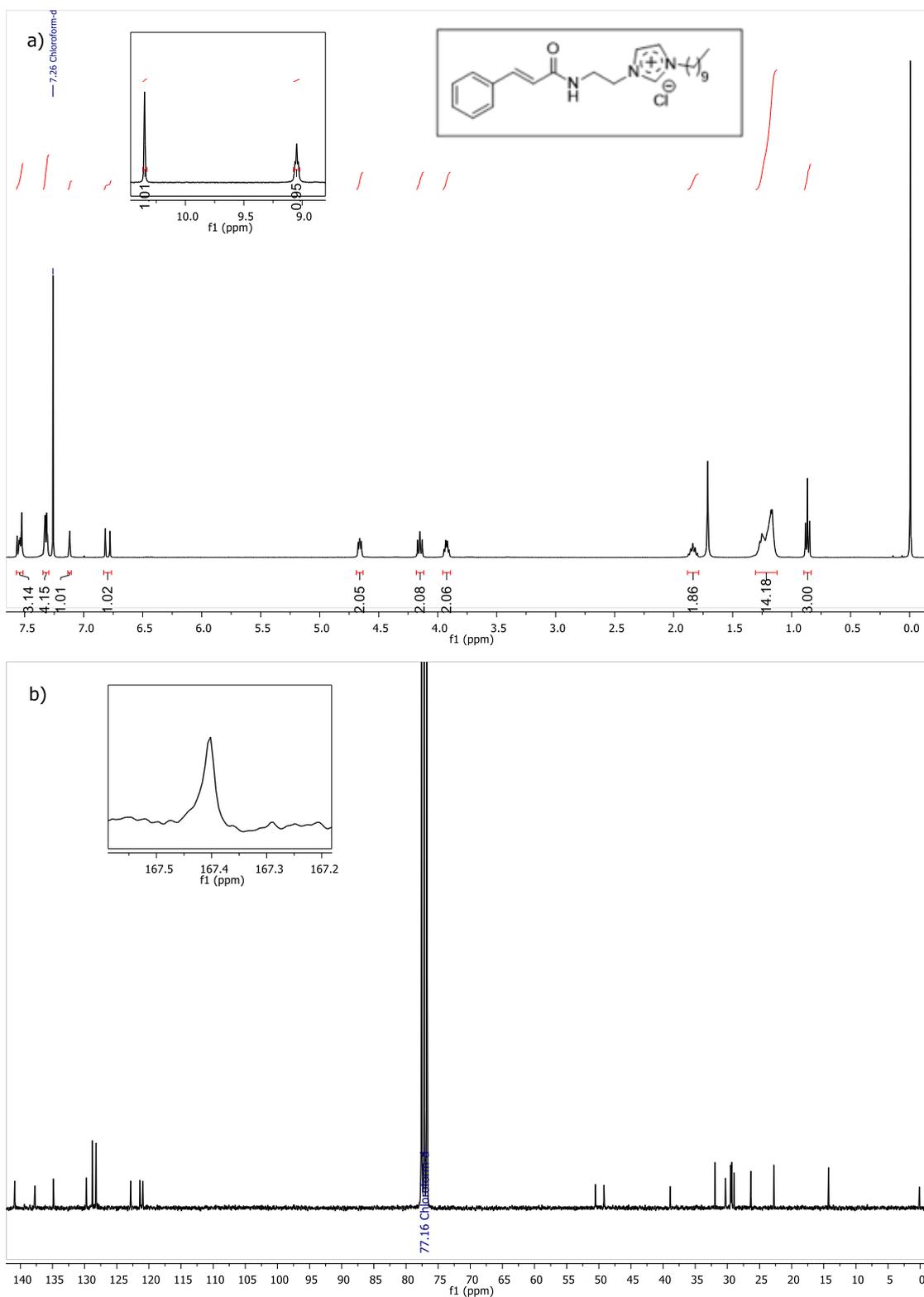
**Figura 30.** a) Espectros de RMN <sup>1</sup>H e b) RMN <sup>13</sup>C do (E)-N-(2-cloroetil)cinamamida (2a) em CDCl<sub>3</sub>.

***N*-(2-cloroetil)-4-metoxicinamamida (2b)**



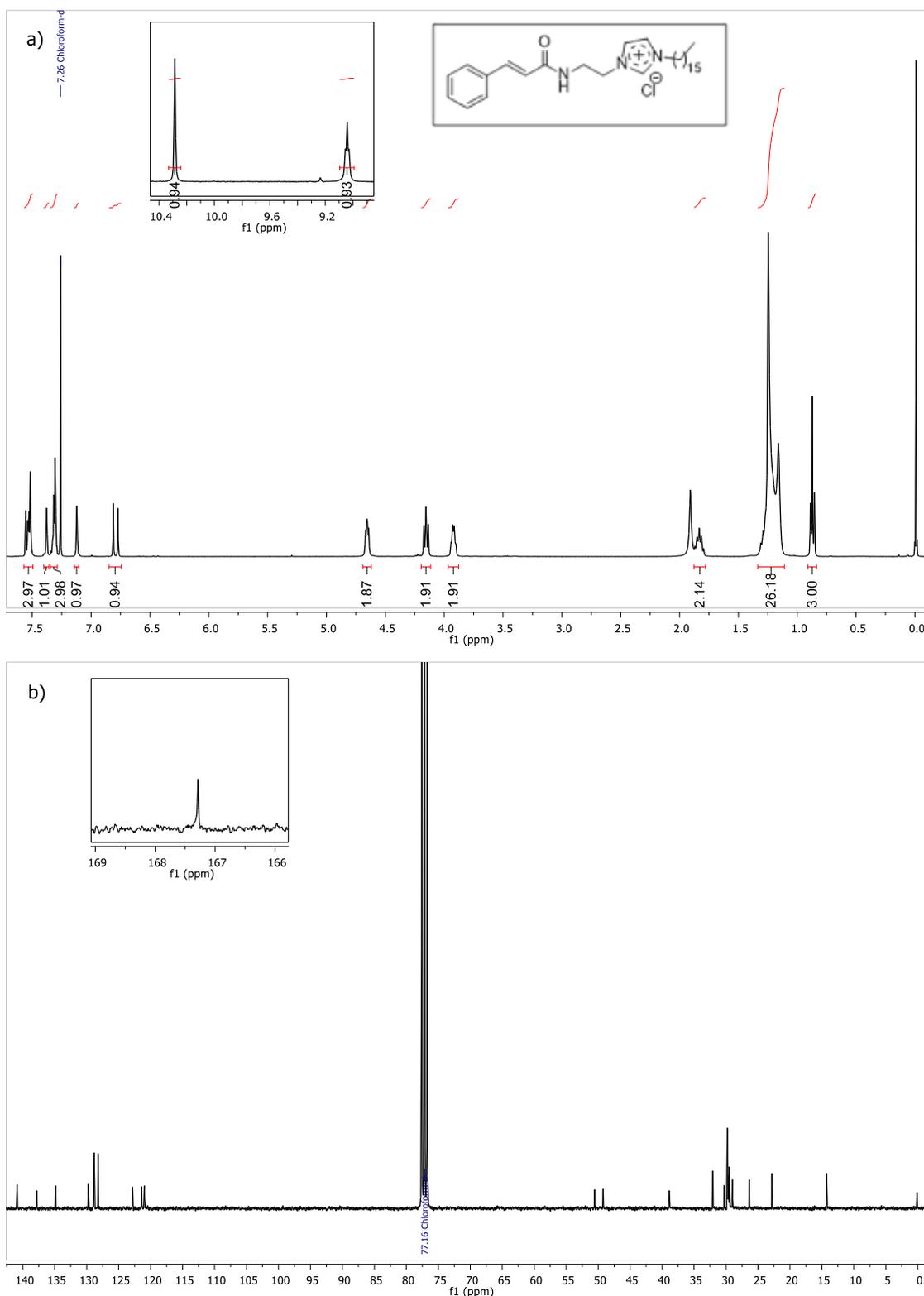
**Figura 31.** a) Espectros de RMN <sup>1</sup>H e b) RMN <sup>13</sup>C do *N*-(2-cloroetil)-4-metoxicinamamida (2b) em CDCl<sub>3</sub>.

### Cloreto de (*E*)-1-(2-cinamidoetil)-*n*-3-decilimidazólio (4a)



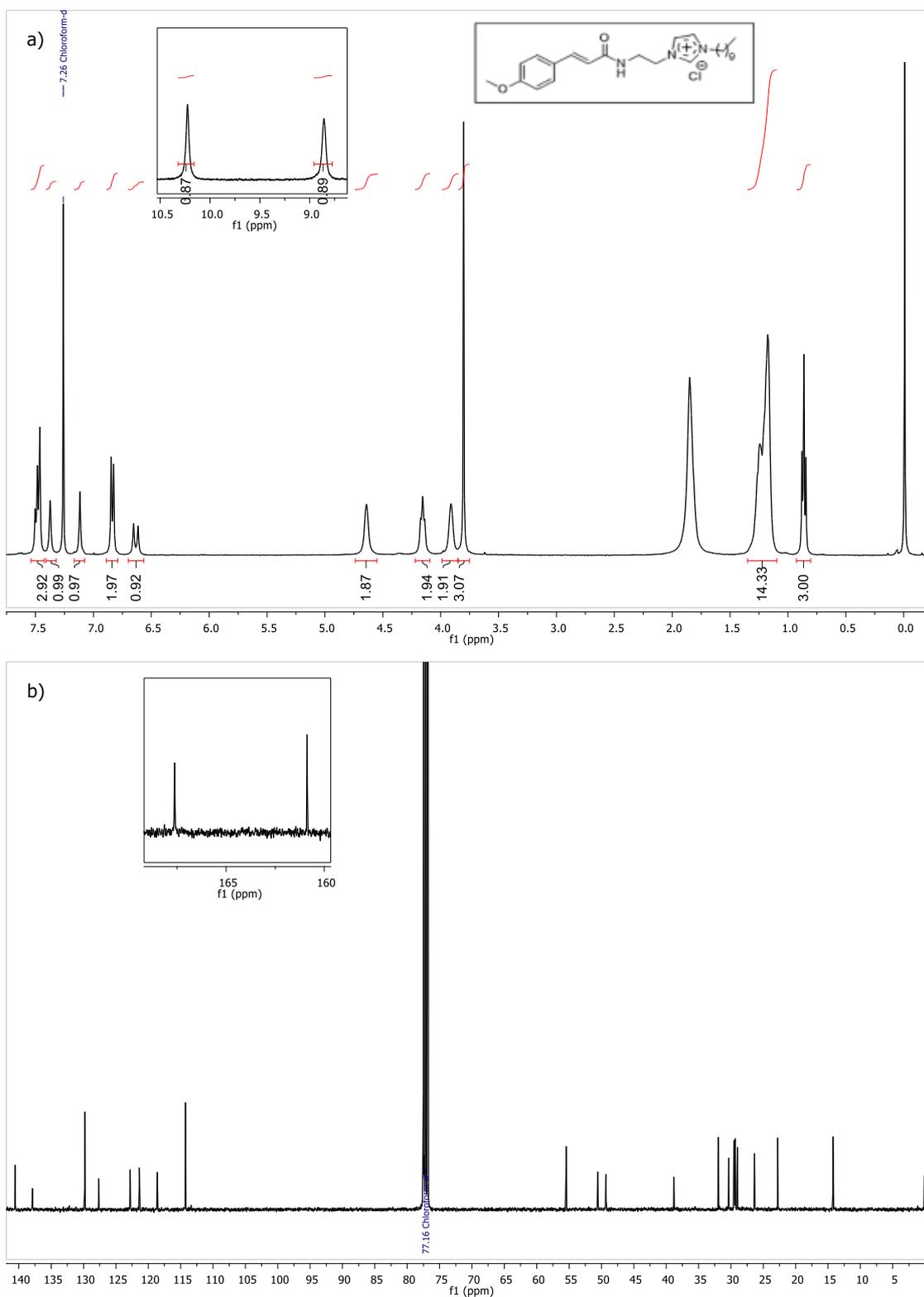
**Figura 32.** a) Espectros de RMN <sup>1</sup>H e b) RMN <sup>13</sup>C do cloreto de (*E*)-1-(2-cinamidoetil)-*n*-3-decilimidazólio (4a) em CDCl<sub>3</sub>.

**Cloreto de (*E*)-1-(2-cinamidoetil)-3-*n*-hexadecilimidazólio (4b)**



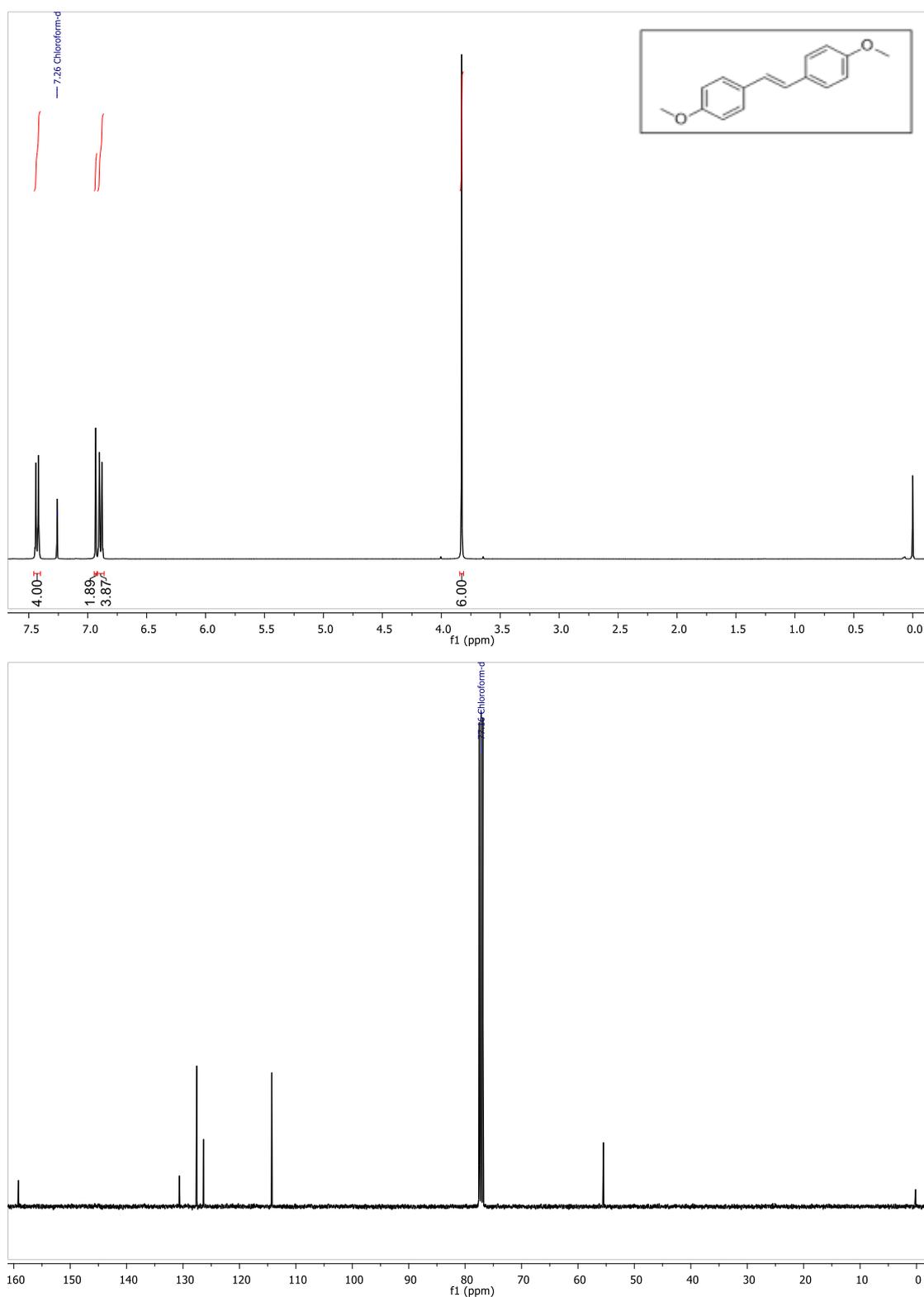
**Figura 33.** a) Espectros de RMN <sup>1</sup>H e b) RMN <sup>13</sup>C do cloreto de (*E*)-1-(2-cinamidoetil)-3-*n*-hexadecilimidazólio (4b) em CDCl<sub>3</sub>.

### Cloreto de (*E*)-1-(2-(4-metoxicinamida)etil)-3-*n*-decilimidazólio (4c)



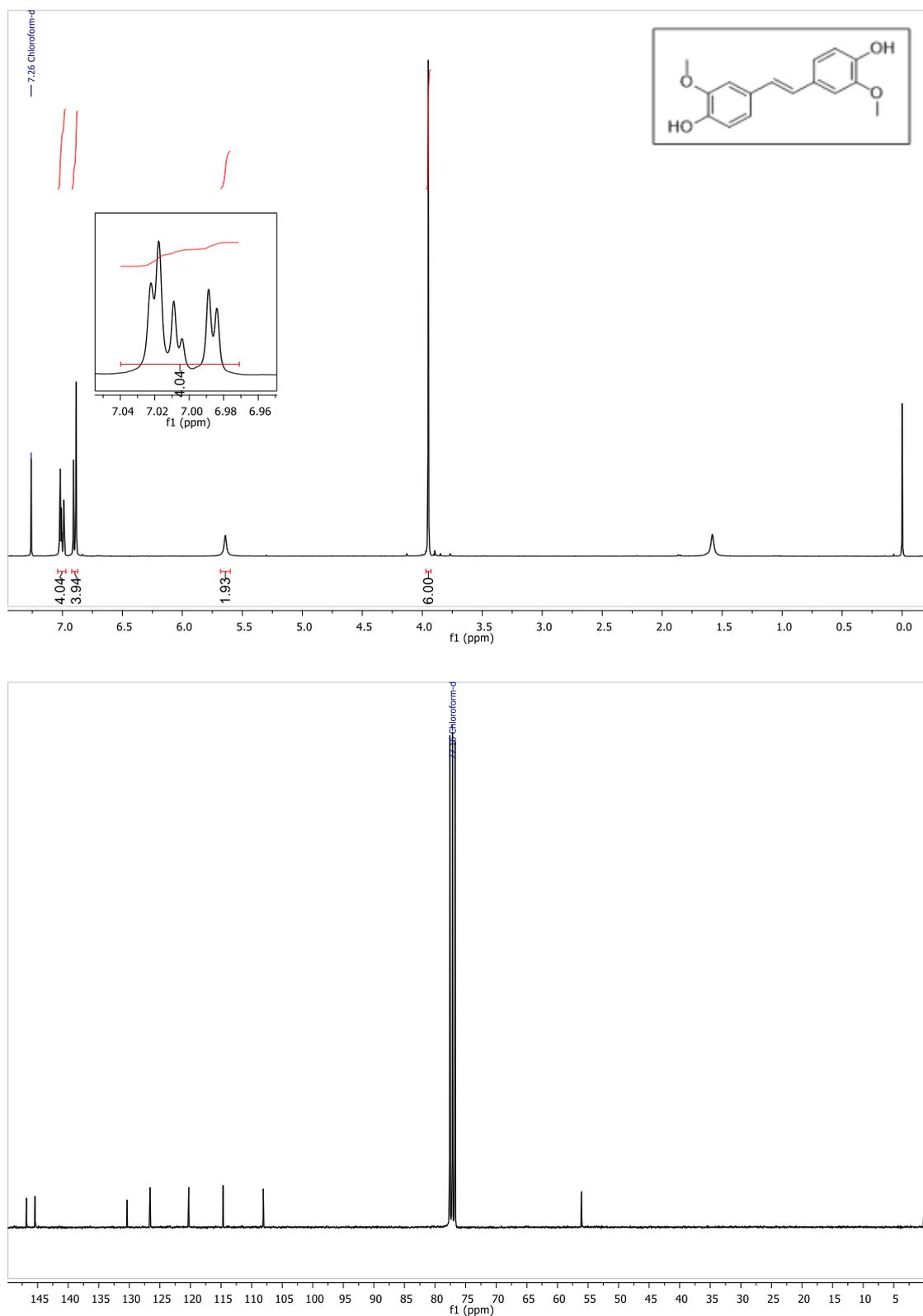
**Figura 34.** a) Espectros de RMN <sup>1</sup>H e b) RMN <sup>13</sup>C do cloreto de (*E*)-1-(2-(4-metoxicinamida)etil)-3-*n*-decilimidazólio (4c) em CDCl<sub>3</sub>.

**(E)-4,4'-dimetoxiestilbeno (5a)**



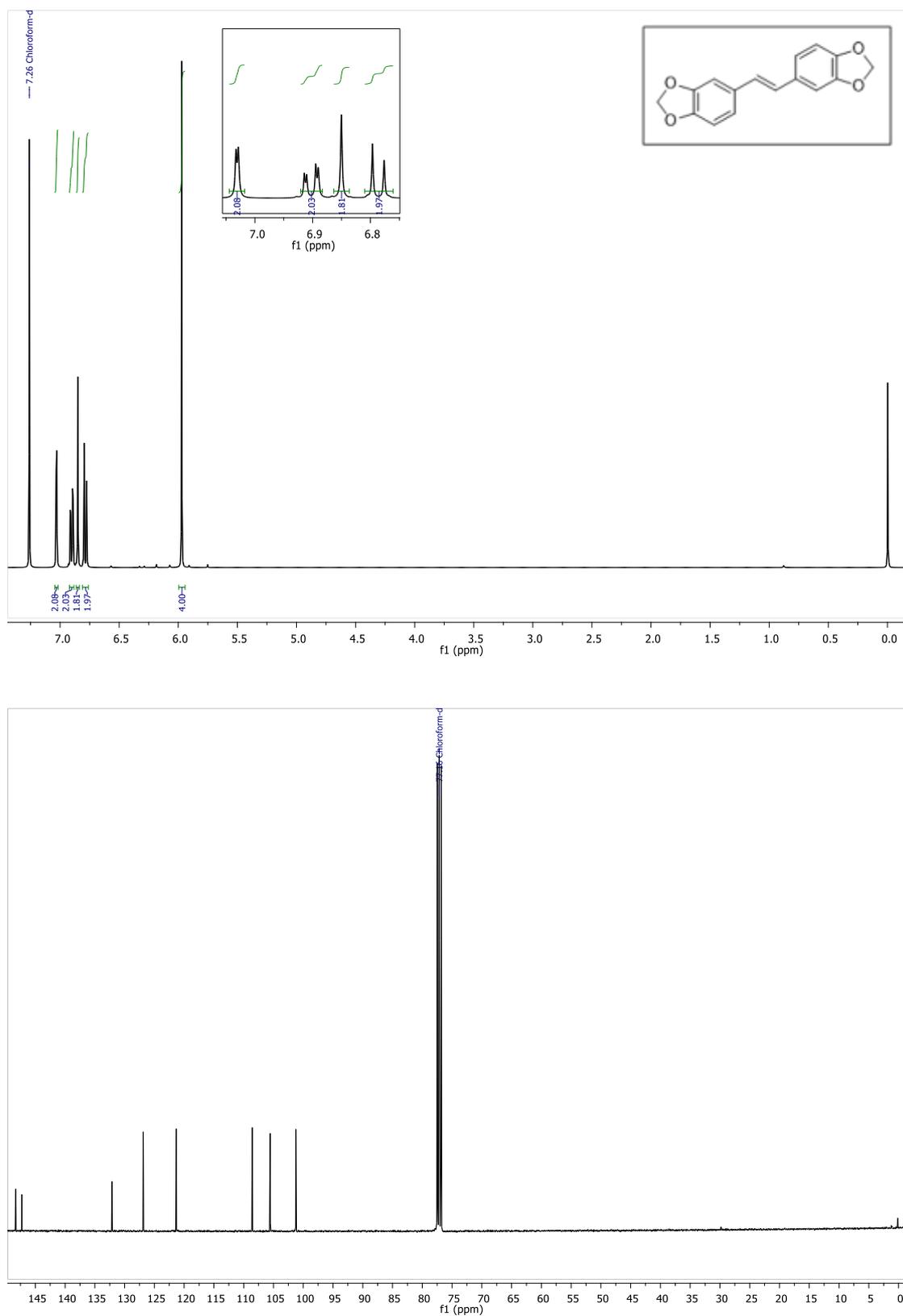
**Figura 35.** a) Espectros de RMN <sup>1</sup>H e b) RMN <sup>13</sup>C do (E)-4,4'-dimetoxiestilbeno (5a) em CDCl<sub>3</sub>.

**(E)-3,3'-Dimetoxi-4,4'-dihidroxiestilbeno (5b)**



**Figura 36.** a) Espectros de RMN <sup>1</sup>H e b) RMN <sup>13</sup>C do cloreto de (E)-3,3'-dimetoxi-4,4'-dihidroxiestilbeno (5b) em CDCl<sub>3</sub>.

**(E)-1,2-di-(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno (5c)**



**Figura 37.** a) Espectros de RMN <sup>1</sup>H e b) RMN <sup>13</sup>C do cloreto de (E)-1,2-di-(3',4'-metilenodioxifenil)-etileno (5c) em CDCl<sub>3</sub>.