



Ana Maria Branco Alves

DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE COMPOSTOS NATURAIS MONOTERPÉNICOS: PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Dissertação de Mestrado em Design e Desenvolvimento de Fármacos, orientada pelo Professor Doutor Alcino Jorge Leitão e pela Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre em Design e Desenvolvimento de Fármacos, sob a orientação científica do Professor Doutor Alcino Jorge Leitão e da Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes, no laboratório de química farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e no laboratório do grupo de “Inflamação e controlo de qualidade celular no envelhecimento da cartilagem e na osteoartrite”, do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

AGRADECIMENTOS

A vontade de continuar a evoluir e a trabalhar na área científica, fizeram com que quisesse prosseguir a minha formação, de forma a ter mais valências e uma especialização numa área que apesar de similar à minha formação base, tem bastantes especificidades: a farmácia. Assim, no ano letivo 2013/2014, ingressei no Mestrado em Design e Desenvolvimento de Fármacos lecionado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, que culmina com a apresentação deste projeto.

Não poderia acabar esta caminhada sem demonstrar a minha gratidão às pessoas que a tornaram possível.

Ao Professor Doutor Alcino Jorge Leitão e à Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes, meus orientadores neste projeto, por todos os conhecimentos que me transmitiram, pela disponibilidade, pelo apoio, pelo incentivo demonstrados e, muitas vezes, pela paciência ao longo de todo este percurso.

À Professora Doutora Maria João Moreno, minha orientadora no Mestrado em Química, por me ter transmitido o gosto pela ciência e que vale sempre a pena todo o nosso esforço, pois no final o sentimento de realização supera todos os obstáculos encontrados.

Ao laboratório UCQFarma da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e ao Dr. Rui Manadas pelos espectros de infravermelhos dos compostos sintetizados.

Ao Professor Doutor Carlos Cavaleiro do Laboratório de Bromatologia e Farmacognosia e Ciências Analíticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela pronta disponibilidade na análise de GC-MS dos compostos sintetizados.

Os dados de RMN foram coletados no laboratório de RMN da Universidade de Coimbra, que é apoiado em parte pelo FEDER, através do Programa COMPETE e pelos Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia por meio de doações REEQ/ 481/ QUI/2006, RECI/ QEQ-QFI/ 0168/ 2012, CENTRO-07-CT62-FEDER-002012, e Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (RNRMN).

Aos meus colegas de laboratório, pela ajuda sempre que necessário.

Aos meus amigos, que por estarem sempre disponíveis para me ajudar, por me incentivarem sempre a continuar, por todos os momentos bons que foram proporcionados dentro de todos os momentos maus.

Aos meus pais e irmão, por mais esta oportunidade, por continuarem a confiar e a acreditar em mim, mesmo quando já nem eu o consigo fazer. Obrigada por continuarem a realizar os meus sonhos.

ÍNDICE

	Página
Resumo	I
Abstract	III
Lista de Figuras	V
Lista de Esquemas	VI
Abreviaturas	VIII
Objetivos e conteúdos da dissertação	IX
Capítulo I – Introdução	I
1.1 Compostos naturais como fármacos: uma breve abordagem	I
1.2 Compostos monoterpénicos: os mais promissores	2
1.3 Quiralidade: influência na atividade biológica	4
1.4 Carvona: um monoterpeneo quiral	5
Capítulo II – Síntese e caracterização dos derivados semissintéticos da carvona	9
2.1 Derivados epoxidados: epoxidação na dupla ligação exocíclica e na cetona α,β -insaturada	10
2.2 Abertura do epóxido: redutiva e por meio de nucleófilos	15
Capítulo III – Avaliação da citotoxicidade dos derivados semissintéticos da carvona	21
Capítulo IV – Conclusões e perspectivas futuras	28
Capítulo V – Procedimentos Experimentais	30
5.1 Aparelhagem utilizada	31
5.2 Reagentes e solventes	31
5.3 Síntese dos compostos semissintéticos da carvona	32

5.3.1 Síntese do composto (S)-2-metil-5-(2-metiloxiran-2-il)-ciclohex-2-enona (8s)	32
5.3.2 Síntese do composto (R)-2-metil-5-(2-metiloxiran-2-il)-ciclohex-2-enona (8r)	33
5.3.3 Síntese do composto (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metileteno)ciclohexanona (9s)	34
5.3.4 Síntese do composto (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metileteno)ciclohexanona (9r)	35
5.3.5 Síntese do composto (3S,5S)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (10s)	36
5.3.6 Síntese do composto(3R,5R)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (10r)	37
5.3.7 Síntese do composto(1R,5S)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohex-2-enol (11s)	38
5.3.8 Síntese do composto(1S,5R)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohex-2-enol (11r)	39
5.3.9 Síntese do composto(2S,3R,5S)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (12s)	39
5.3.10 Síntese do composto (2R,3S,5R)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (12r)	40
5.3.11 Síntese do composto (2R,3S,5R)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (13r)	41
5.3.12 Síntese do composto(2S,3R,5S)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (13s)	42
5.3.13 Síntese do composto (2R,3S,5R)-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)-3-propoxiciclohexanona (14r)	42
5.3.14 Síntese do composto (2S,3R,5S)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (15s)	43
5.3.15 Síntese do composto (2R,3S,5R)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (15r)	44
Capítulo IV - Bibliografia	45

RESUMO

A pesquisa de produtos naturais continua a explorar uma grande quantidade de compostos *lead* que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos pela indústria farmacêutica.

Existe uma imensa e variada quantidade de compostos monoterpênicos que já deram provas dos seus efeitos biológicos, atuando como agentes bacterianos, sedativos, anti-tumorais e anti-inflamatórios.

A carvona é um composto monoterpênico, encontrado naturalmente em diversos óleos essenciais de plantas, sendo abundante em plantas como a alcaravia (*Carumcarvi*), o endro (*Anethumgraveolens*) e a hortelã (*MenthaSpicata*). Este monoterpene aparece na natureza sob as suas formas enantioméricas: a R-(-)-carvona e a S-(+)-carvona.

A carvona já deu provas dos seus potenciais efeitos farmacológicos, bem como alguns dos seus derivados semissintéticos. Contudo, alguns dos compostos que mostram potencial em atuar farmacologicamente, principalmente na modulação de mecanismos de inflamação, apresentam uma elevada toxicidade, o que muitas vezes anula o seu potencial terapêutico. Considerando isto, a avaliação da citotoxicidade de compostos é uma prioridade e um ensaio prévio necessário para que a partir deste se possam selecionar os compostos sintetizados para avaliação do potencial farmacológico.

Neste trabalho, procedeu-se à síntese de derivados semissintéticos da carvona (isómero R e S), utilizando métodos já usados pelo grupo de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, local onde se desenvolveu também este projeto. Numa primeira fase, obtiveram-se derivados epoxidados (resultantes da epoxidação na dupla ligação exocíclica ou na cetona α,β -insaturada) de ambos os isómeros da carvona, seguidos da abertura do epóxido, tanto redutiva, como por meio de nucleófilos. Obtiveram-se vários derivados com a função epóxido, a função álcool e a função éter, além das funções cetona e dupla ligação existentes nos enantiómeros da carvona.

Na segunda parte deste trabalho realizada no grupo de “Inflamação e controlo de qualidade celular no envelhecimento da cartilagem e na osteoartrite” do Centro de Neurociências e Biologia Celular, procedeu-se à avaliação da citotoxicidade dos derivados semissintéticos da carvona obtidos. Para isso, foi cultivada uma linha celular de macrófagos murinos, a linha RAW 264.7, na presença dos vários compostos teste em diferentes concentrações e a viabilidade celular das células foi avaliada pelo método da redução da

resazurina. Os resultados obtidos foram usados para estabelecer uma correlação estrutura-atividade dos compostos derivados da carvona obtidos e a sua capacidade para pôr em causa a viabilidade celular. Foi observado que os compostos que possuem o grupo epóxido na sua estrutura apresentam citotoxicidade na concentração mais alta em estudo, e que todos os outros compostos testados ou não apresentam citotoxicidade em nenhuma das concentrações estudadas ou apresentam citotoxicidade muito perto do valor de corte, para a concentração mais alta em estudo.

Estes resultados permitem estabelecer a base necessária para o futuro estudo de relação estrutura-atividade, quer para a atividade anti-inflamatória, quer para outros efeitos farmacológicos que venham a ser considerados pertinentes.

ABSTRACT

Natural products research continues to explore a variety of lead structures, which may be used as templates for the development of new drugs by the pharmaceutical industry.

There is an enormous variety and quantity of monoterpene compounds which have given evidence of their biological effects by acting as antibacterial, sedatives, anti-tumor and anti-inflammatory agents.

Carvone is a monoterpene compound found naturally in many essential oils from a variety of plants, being abundant in plants as caraway (*Carum carvi*), dill (*Anethum graveolens*) and mint (*Mentha spicata*). This monoterpene appears in nature in its enantiomeric forms: R-(-)-carvone and S-(+)-carvone.

Carvone has proven its potential pharmacological effects, as well as some of its semisynthetic derivatives. However, some of the compounds that show potential to act pharmacologically, mainly modulating inflammatory mechanisms, have high toxicity, which often nullifies their therapeutic potential. Considering this, the early evaluation of the cytotoxicity of compounds is a priority and it is a necessary prior test to select the synthesized compounds for the evaluation of the potential therapeutic.

In this work, we synthesized semisynthetic derivatives of carvone (isomer R and S), using methods already used by the Pharmaceutical Chemistry group of the Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, where this project was also developed. Initially, we obtained epoxidized derivatives (resulting from the epoxidation exocyclic double bond or ketone α , β -unsaturated) of both isomers of carvone, followed by epoxide opening, both reductive and by means of nucleophiles. We obtained several derivatives with the epoxide function, alcohol function and ether function, besides the ketone and double bond function observed in the carvone enantiomers.

In the second part of this work developed at the "Inflammation and cellular quality control in cartilage aging and osteoarthritis" group of the Centre for Neuroscience and Cell Biology, we proceeded further by performing the cytotoxicity evaluation of the semisynthetic derivatives of carvone obtained. For this, the murine macrophage cell line, RAW 264.7, was cultured in the presence of various concentrations of the test compounds and cell viability assessed by the method of reduction of resazurin. The results obtained were used to set up structure-activity relationships regarding the cytotoxic potential of the carvone derivatives obtained. It was observed that compounds having an epoxy group in

their structure exhibit cytotoxicity at the highest concentration tested, and all other compounds tested or did not show cytotoxicity at any of the concentrations studied or present cytotoxicity very close to the cutoff value to the highest concentration tested.

These results establish the basis for future studies of structure-activity regarding anti-inflammatory activity or other pharmacological effects that may be considered relevant.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura molecular do isopreno (**1**), exemplos de estruturas moleculares de monoterpenos (**2**), sesquiterpenos (**3**) e diterpenos (**4**).**3**
- Figura 2.** Representação espacial das imagens especulares de isómeros óticos.**4**
- Figura 3.** Enantiómero R-(-)-carvona (**5r**) e S-(+)-carvona (**5s**), respetivamente.**6**
- Figura 4.** Estrutura química da Ciano-carvona (**6**), hidroxidihidrocarvona (**7**), 7,8-epoxi-carvona (**8s**) e α,β -epoxi-carvona (**9r**).**8**
- Figura 5.** Espectro RMN de protão do composto **5s**.....**12**
- Figura 6.** Espectro de RMN de protão do composto **8s**.**12**
- Figura 7.** Espectro de RMN de protão do composto **9s**.**13**
- Figura 8.** Interferência da concentração mais elevada (200 $\mu\text{g/mL}$) dos compostos teste, sintetizados a partir dos enantiómeros da carvona, no ensaio de redução da resazurina. ...**24**
- Figura 9.** Gráficos representando a viabilidade relativa das células RAW 264.7, tratadas com os derivados semissintéticos da carvona nas concentrações indicadas (12.5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$), durante 18h. Apresentam-se também as fórmulas de estrutura dos compostos testados. *P<0.05 relativamente ao controlo (células tratadas com o veículo).**25-27**

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Mecanismo da reação de epoxidação de um alceno por um peróxi-ácido. Adaptado de Mak *et al*, 2009. **11**
- Esquema 2.** Mecanismo da reação de epoxidação de uma cetona α,β - insaturada pelo H_2O_2 alcalino. Adaptado de Mak *et al*, 2009. **11**
- Esquema 3.** Síntese do (R)-2-metil-5-(2-metiloxiran-2-il)-ciclohex-2-enona (**8r**) a partir da R-(-)-carvona (**5r**). **13**
- Esquema 4.** Síntese do (S)-2-metil-5-(2-metiloxiran-2-il)-ciclohex-2-enona (**8s**) a partir da S-(+)-carvona (**5s**). **14**
- Esquema 5.** Síntese da (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9r**), a partir da R-(-)-carvona (**5r**). **14**
- Esquema 6.** Síntese da (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9s**), a partir da S-(+)-carvona (**5s**). **14**
- Esquema 7.** Síntese do composto (3R,5R)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (**10r**), a partir do composto (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9r**). **15**
- Esquema 8.** Síntese do composto (3S,5S)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (**10s**), a partir do composto (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9s**)..... **16**
- Esquema 9.** Síntese do composto (1S,5R)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohex-2-enol (**11r**), a partir do composto (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9r**). . **16**

Esquema 10. Síntese do composto (1R,5S)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hex-2-enol (11s), a partir do composto (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (9s). 16

Esquema 11. Síntese de (2R,3S,5R)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (12r), do composto (2R,3S,5R)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (13r), e do composto (2R,3S,5R)-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)-3-propoxiciclohexanona (14r), a partir de (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (9r). 18

Esquema 12. Síntese dos compostos (2S,3R,5S)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (12s) e (2S,3R,5S)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (13s), a partir do composto (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (9s). 19

Esquema 13. Síntese do composto (2R,3S,5R)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (15r), a partir do composto (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (9r). 19

Esquema 14. Síntese do composto (2S,3R,5S)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (15s), a partir do composto (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (9s). 20

LISTA DE ABREVIATURAS

EC – α,β -Epóxi-Carvona

EOs – Óleos Essenciais

GC-MS - Cromatografia Gasosa com espectrometria de massa acoplada

HC – Hidroxidihidrocarvona

IC 50 – Concentração inibitória de 50%

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IV – Infravermelho

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SNC – Sistema Nervoso Central

TLC - Cromatografia de Camada Fina, do inglês *Thin Layer Chromatography*

OBJETIVOS E CONTEÚDOS DA DISSERTAÇÃO

O objetivo deste estudo é sintetizar uma variedade de derivados semissintéticos dos enantiómeros *S* e *R* da carvona, a fim de estabelecer uma relação estrutura-atividade baseada nos resultados de citotoxicidade obtidos para os mesmos compostos. Para isso, tivemos em conta alguns trabalhos realizados pelo laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para proceder à síntese dos derivados, bem como o conhecimento em biologia celular e molecular e farmacologia do grupo de “Inflamação e controlo de qualidade celular no envelhecimento da cartilagem e na osteoartrite”, do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

Esta dissertação encontra-se dividida em seis capítulos.

O primeiro capítulo compreende uma introdução geral sobre os compostos naturais, dando ênfase aos compostos monoterpênicos, nos quais a carvona está incluída. Uma explicação sobre a forma como a quiralidade influencia a atividade biológica foi também incluída, uma vez que o nosso trabalho incluí os dois enantiómeros da carvona, a *R*-(-)-carvona e a *S*-(+)-carvona. Neste capítulo são ainda descritas algumas propriedades farmacológicas da carvona e de alguns dos seus derivados.

No capítulo II é apresentada a síntese e caracterização dos derivados semissintéticos da carvona. Começa com a descrição dos primeiros derivados da carvona sintetizados: as epoxi-carvonas, resultantes da epoxidação da dupla ligação exocíclica e da epoxidação da cetona α,β -insaturada. De seguida é descrito o processo de abertura do anel oxirano característico do epóxido, sob condições suaves, quer a abertura redutiva, como a abertura por meio de nucleófilos.

A avaliação da citotoxicidade dos compostos sintetizados, é exposta no capítulo III. A partir da análise dos resultados obtidos, pode-se estabelecer uma relação entre a citotoxicidade dos derivados enantioméricos da carvona e a sua estrutura.

O capítulo IV evidencia os principais resultados e conclusões deste trabalho e sugere algumas perspetivas futuras.

Os reagentes e solventes, equipamentos e todos os procedimentos experimentais são apresentados e descritos no capítulo V.

O último capítulo fornece as referências de apoio utilizadas nesta dissertação.

Capítulo I

INTRODUÇÃO

I.1 COMPOSTOS NATURAIS COMO FÁRMACOS: UMA BREVE ABORDAGEM

Os seres vivos, como plantas e animais, são uma das maiores fontes de diversidade de substâncias químicas, apesar de apenas cerca de 5% da biodiversidade mundial ter sido alvo de avaliação científica. Isto faz com que haja um grande interesse na Natureza como potencial fonte de agentes quimioterapêuticos. A comprovar estas afirmações, sabemos que hoje em dia os produtos naturais são a base de cerca de 50% de todos os fármacos em uso clínico no mundo (Gurib-Fakim, 2006).

Os produtos naturais, quando comparados com a química combinatória padrão, oferecem uma diversidade estrutural única, que faz com que estes sejam fontes praticamente inesgotáveis para a descoberta de novos compostos *lead* de baixo peso molecular. O processo para a descoberta de compostos *lead* é exaustivo e, exige uma série de passos e critérios a ter em conta, o que a longo prazo provoca alguma saturação para a sua descoberta. Assim, nos últimos anos, houve um interesse renovado em moléculas provenientes de produtos naturais (Dias *et al.*, 2012).

Pondo isto em consideração, as plantas voltam a estar em voga e são muitas as áreas que estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias oriundas destas, como a fitoquímica que trabalha o isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos, a etnofarmacologia, que se pode definir como o ramo da farmacologia que se dedica à caracterização farmacológica de compostos ou produtos usados em medicina tradicional, e a farmacologia, que estuda os efeitos nos organismos vivos (da célula ao indivíduo) de qualquer composto químico ou mistura de compostos (Albuquerque e Hanazaki, 2006).

Nem sempre é fácil atribuir o poder curativo de uma planta a uma única substância, já que alguns extratos são complexos. Uma excelente fonte de substâncias são os óleos essenciais (OEs) característicos de muitas plantas. Os OEs são misturas de compostos voláteis de origem vegetal, caracterizados pela sua capacidade de gerar sabor e aroma. Estes são constituídos, essencialmente, por duas classes de terpenóides, os monoterpenos e os sesquiterpenos (Loza-Tavera, 1999). Houve então necessidade de começar a isolar os compostos dos OEs provenientes de plantas para testar cada uma das substâncias e identificar qual delas era o princípio ativo.

A produção dos OEs das plantas pode ser influenciada por diversos fatores, onde se destacam os fatores ambientais (temperatura, luz, água, solo, altitude), genéticos e

fitotécnicos (época e forma de colheita, transporte, secagem, armazenamento) (Martins et al., 2006). Estes fatores, em conjunto com o método de extração utilizado, irão influenciar severamente a qualidade e concentração dos componentes dos OEs (Loza-Tavera, 1999).

A extração de OEs e o isolamento dos seus compostos pode ser uma tarefa árdua que tem vindo a ser otimizada, pois é sem dúvida a alternativa mais promissora a encontrar novas moléculas *lead* que podem ser modificadas estruturalmente em laboratório, produzindo fármacos potencialmente mais ativos e mais seguros (Rates, 2001).

De ressaltar que nem todos os produtos naturais podem ser totalmente sintetizados devido às suas estruturas extremamente complexas que tornam o processo muito difícil e dispendioso (Lahlou, 2013).

1.2 COMPOSTOS MONOTERPÉNICOS: OS MAIS PROMISSORES

As plantas possuem dois tipos de metabolismo: o metabolismo primário – engloba todos os processos químicos que todas as plantas têm de executar continuamente para conseguir reproduzir a sua linhagem; e o metabolismo secundário – engloba os processos químicos que são exclusivos de uma determinada planta (Firn e Jones, 2009).

O produto do metabolismo secundário das plantas gera uma ampla e diversa gama de compostos orgânicos que são conhecidos como metabolitos secundários e dividem-se essencialmente em terpenos e fenilpropanóides.

Os hidrocarbonetos terpénicos e os seus derivados oxifuncionalizados (terpenóides) constituem a classe de substâncias mais diversas na natureza, possuindo uma vasta diversidade química, física e biológica (Hill, 1993).

Os terpenos de baixo peso molecular encontram-se sobretudo como componentes dos OEs, enquanto que os de peso molecular médio ou elevado constituem o esqueleto dos esteróides, carotenóides e da borracha (Zhang, 2002). Estes compostos derivam, biossinteticamente, de sucessivas unidades de isopreno (**1**), que possui a fórmula molecular C_5H_8 e, são classificados de acordo com o número de unidades que os constitui. Nas plantas aromáticas, aquelas de onde se podem obter os OEs, predominam os monoterpenos (10 carbonos) (**2**), os sesquiterpenos (15 carbonos) (**3**) e os diterpenos (20 carbonos) (**4**) (Figura 1).

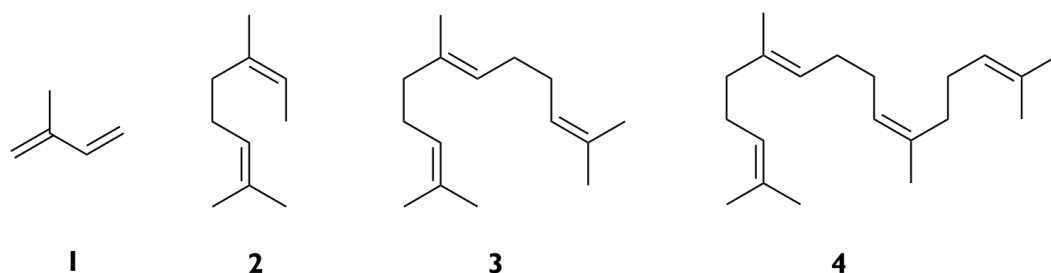


Figura 1. Estrutura molecular do isopreno (1), exemplos de estruturas moleculares de monoterpenos (2), sesquiterpenos (3) e diterpenos (4).

Na natureza existem cerca de 1000 compostos monoterpênicos conhecidos, e um número ainda maior de compostos relacionados com estes (Bernays e Chapman, 1994).

Os monoterpenos são, por norma, incolores, contudo, os seus derivados oxigenados tendem a apresentar uma coloração amarelada no estado líquido e branca no estado sólido.

A estrutura carbonada é determinante na classificação dos monoterpenos, podendo estes ser: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos e irregulares. Derivados funcionalizados, em particular os oxigenados tais como: aldeídos, álcoois, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, contribuem para a diversidade dos monoterpenos naturais.

Um mesmo composto monoterpênico pode possuir diferentes propriedades organolépticas, estando estas propriedades ligadas à concentração do composto e à quiralidade, assunto que irá ser aprofundado no próximo sub-capítulo. Quando concentrados, estes compostos tendem a apresentar aromas fortes e desagradáveis, ao serem diluídos apresentam características suaves e aprazíveis (Martins *et al*, 2006). Mais importante que a concentração que apenas acentua as características, é o aroma que varia entre enantiómeros. Um bom e conhecido exemplo disso mesmo é o limoneno, em que o enantiómero (S)-limoneno é responsável pelo cheiro característico do limão e o enantiómero (R)-limoneno é responsável pelo cheiro da laranja (Paiva, 2006). O mesmo composto monoterpênico, com a mesma fórmula química, as mesmas propriedades químicas e, no entanto, o facto de serem enantiómeros confere-lhes características diferentes.

Biologicamente, tem-se vindo a descobrir que os monoterpenos possuem uma variedade considerável de efeitos biológicos, podendo actuar como agentes antibacterianos, sedativos, anti-tumorais, anti-inflamatórios e inseticidas (Zhang, 2002).

I.3 QUIRALIDADE: INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA

A maioria das moléculas que constituem as plantas e animais são quirais. Alguns compostos orgânicos são excelentes exemplos da manifestação de quiralidade, devido à sua constituição por átomos de carbono, e ao facto de este poder formar quatro ligações covalentes simples. Para que um composto seja quiral, é necessário que tenha pelo menos um átomo de carbono (carbono assimétrico ou carbono quiral) com quatro substituintes diferentes, pois só assim há possibilidade de assimetria na molécula (Paiva, 2006).

As moléculas que apresentam um elemento de quiralidade, apresentam enantiomeria. Os enantiómeros ou isómeros óticos são estereoisómeros relacionados entre si por uma simetria em relação a um plano, existem sob a forma de dois pares de isómeros, não sobreponíveis (Figura 2) (Lima, 1997).

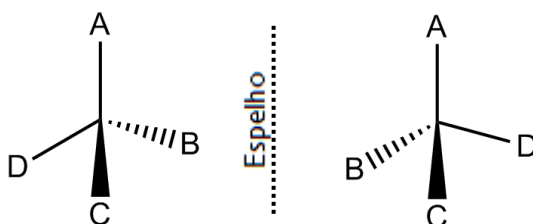


Figura 2. Representação espacial das imagens especulares de isómeros óticos.

Estes isómeros óticos podem apresentar diferentes aromas, sabor, toxicidade e atividade biológica. Mas possuem características físicas idênticas, como a solubilidade ou o ponto de fusão, exceto a atividade ótica de cada um.

O método mais usado para a identificação de enantiómeros é baseado no desvio da luz polarizada. Quando a luz polarizada atravessa de forma linear e interage com uma amostra enantiomérica, esta sofre rotação ótica. Se o enantiómero gira o plano de luz polarizada para a direita, este é denominado dextro-rotatório, identificado com a terminologia d- ou (+). Se o enantiómero gira o plano para a esquerda, este é denominado como levo-rotatório e identificado com a terminologia l- ou (-). A dextro e a levo-rotação dos enantiómeros, possui a mesma magnitude em termos absolutos, mas em direção oposta (Orlando *et al.*, 2007).

A especificação de um centro quiral pode ser feita sem ambiguidade utilizando o sistema de Cahn-Ingold-Prelog (sistema utilizado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC)), em que de acordo com o arranjo espacial, os enantiómeros recebem os prefixos R ou S. Este é demonstrado pela ordem decrescente de prioridade do número atômico dos átomos ligados ao carbono quiral. Se a ordem de prioridade se der no sentido horário, é

designado como (R), se a ordem de prioridade for no sentido é anti-horário, é designado como (S) (McMurray, 2010).

As denominações R-S e (+)-(-) são independentes e, por isso, podemos ter enantiómeros (+)-(S) ou (-)-(S), e da mesma maneira para o enantiómero (+)-(R) ou (-)-(R).

Todos os processos biológicos, bem como as suas interações, a sua alta eficiência e estreita seletividade, baseiam-se na forma estrutural como as moléculas interagem, que é determinada essencialmente pela especificidade da organização espacial das mesmas: estereoespecificidade. Propriedade que quase todas as biomoléculas possuem (Smirnova et al., 2012).

A quiralidade e a atividade biológica possuem uma estreita afinidade, uma vez que o grau de estereosseletividade dos recetores biológicos e das enzimas aos enantiómeros é bastante consistente (Mitra e Chopra, 2011).

Espera-se, então, que existam quatro tipos de comportamentos biológicos, no que respeita a compostos quirais:

- a) A atividade biológica desejada é atribuída a apenas um dos enantiómeros, e o outro enantiómero é inativo;
- b) Os enantiómeros possuem propriedades farmacológicas idênticas, tanto qualitativamente como quantitativamente;
- c) A atividade é qualitativamente idêntica, mas quantitativamente diferente;
- d) As atividades dos dois enantiómeros são qualitativamente diferentes (Eliel e Wilen, 1994).

Neste contexto achou-se interessante utilizar neste estudo os dois enantiómeros da carvona e os respetivos derivados de cada um dos enantiómeros de modo a avaliar a possível influência da estereoquímica na atividade farmacológica.

1.4 CARVONA: UM MONOTERPENO QUIRAL

A 2-metil-5-(1-metileteno)-2-ciclohexenona ou 5-isopropenil-2-metil-2-ciclohexenona, comumente chamada de carvona, é uma cetona insaturada monoterpénica, de fórmula

molecular $C_{10}H_{14}O$, caracterizada por possuir uma coloração amarelo pálida e odor penetrante.

Devido à presença de um centro quiral, no carbono 5 do anel (ligado ao isopropenil), alguns vegetais biossintetizam a carvona nas suas formas enantioméricas, obtendo-se o isómero levogiro R-(-)-carvona (**5r**) e o isómero dextrogiro S-(+)-carvona (**5s**) (Figura 3) que podem coexistir na mesma planta na sua forma racémica.

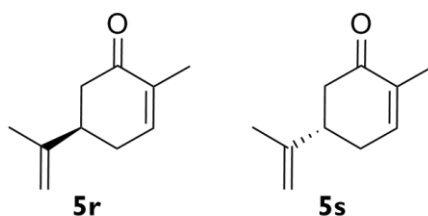


Figura 3. Enantiómero R-(-)-carvona (**5r**) e S-(+)-carvona (**5s**), respetivamente.

A S-(+)-carvona é o constituinte maioritário, cerca de 50-70%, do óleo essencial de alcaravia (*Carum carvi*) e do óleo das sementes de endro (40-60%), enquanto que a R-(-)-carvona pode ser encontrada no óleo essencial da hortelã (*Mentha spicata*), sendo o constituinte maioritário do mesmo, cerca de 51% (Carvalho e Fonseca, 2006).

Os enantiómeros da carvona não diferem apenas no odor e sabor, eles possuem diferentes usos na indústria alimentar e farmacêutica (Baser e Buchbauer, 2009).

O enantiómero (S)-(+)-carvona funciona como um bom inibidor da germinação de batatas, em termos de toxicidade para os humanos e de destruição do ozono, quando comparado com as misturas químicas utilizadas tradicionalmente, sobretudo quando o armazenamento é feito a longo prazo. Para além do que, também mostra atividade antifúngica contra *Fusarium sulphureum*, *Phoma exigua* var. *foveata* e *Helminthosporium solani* (Hartmans *et al*, 1995).

Ambos os enantiómeros da carvona possuem atividade antifúngica e antibacteriana. A S-(+)-carvona atua na inibição da proliferação de fungos e bactérias e a R-(-)-carvona atua tanto como antifúngico como antibacteriano contra vários agentes patogénicos, causadores de doenças.

Os óleos extraídos da hortelã, onde a R-(-)-carvona está patente, podem ser utilizados como inseticidas contra vários tipos de mosquitos, larvas e ácaros (Carvalho e Fonseca, 2006).

Nos últimos anos, a carvona tem sido aplicada na síntese de diferentes compostos, alguns com alta relevância médica. Num estudo levado a cabo por McGeady *et al.* (2002), o enantiómero S da carvona mostrou potencial para inibir a transformação, da forma *coccus*

para a forma filamentosa, de um dos agentes patogênicos humanos mais comuns, a *Candida albicans*. O tratamento deste fungo utilizando a S-(+)-carvona mostrou-se mais eficaz e com menos efeitos colaterais que os tratamentos utilizados até então.

Num estudo realizado por Zheng *et al.* (1992), em que o objetivo era rastrear potenciais inibidores químicos da carcinogênese, com base na indução da enzima glutationa-S-transferase desintoxicante, a S-(+)-carvona provou ser um potencial agente quimiopreventivo, melhor que os seus compostos relacionados em estudo: o anethofuran e o limoneno.

Em murganhos femininos A/J, a S-(+)-carvona combinada com o (+)-limoneno reduziu em cerca de 60% as formações tumorais no estômago induzidas por N-nitrosodietilamina, e a formação de adenoma pulmonar em cerca de 35%, devido às capacidades destes compostos de interferirem com a ação da N-nitrosodietilamina, composto que induz a carcinogênese (Wattenberg, 1989).

Existem vários estudos (Kline, 2001; Micklefield, 2000; May, 2000) que associam o óleo extraído da hortelã, cujo principal componente é a R-(-)-carvona, à melhoria da função gastro-intestinal, minimizam sintomas de algumas doenças como por exemplo o síndrome do intestino irritável.

A R-(-)-carvona é ainda utilizada como material de partida para a produção de derivados de pentilo e octilo endoperóxido que demonstram um razoável potencial anti-malárico em testes *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* HB3 (O'Neill *et al.*, 1998).

Várias propriedades de alguns derivados da carvona também já são conhecidas, como por exemplo, da ciano-carvona, hidrodihidrocarvona, 7,8-epoxi-carvona e α,β -epoxi-carvona.

Num estudo levado a cabo por Costa *et al.* (2012a), a ciano carvona (Figura 4, **6**) mostrou potencial antioxidante em testes *in vitro*, pela sua capacidade de inibir a formação de radicais hidroxilo, de remover óxido nítrico e de impedir a produção de ácido tiobarbitúrico. Num outro estudo, Costa e os seus colaboradores (2012b), mostraram que a ciano-carvona possui também atividade anticonvulsivante, provavelmente devido à modulação do sistema colinérgico e redução do stress oxidativo neuronal *in vivo*, principalmente através da eliminação de radicais livres. Mostraram assim que a ciano-carvona pode ser útil na proteção neuronal, sendo considerada como um anticonvulsivante natural.

Marques *et al.* (2014) demonstraram ainda que a ciano-carvona possui ação antinocetiva em murganhos em testes de dor induzida pela formalina e pelo ácido acético e

mostra efeito anti-inflamatório em testes de edema de pata induzidos por carragenina em murganhos.

Outro derivado sintético preparado pela hidratação da carvona é a hidroxidihidrocarvona (HC, Figura 4, **7**). Este composto possui grupos funcionais e uma estrutura semelhante à de alguns monoterpenos que exercem um efeito depressivo sobre o sistema nervoso central (SNC). De Sousa e os seus colaboradores (2010) revelaram que a HC tem efeitos anti-nocicetivos, dependendo da dose administrada e que inibe alguns mediadores inflamatórios, quando administrada oralmente, caracterizado pela redução do edema da pata induzido pela carragenina e da migração de neutrófilos.

A 7,8-epoxi-carvona (Figura 4, **8s**) tem um efeito anti-ulcerativo gástrico *in vivo*. Em comparação com a carvona, esta molécula exibe um menor efeito, indicando que a modificação da molécula original altera a atividade farmacológica (Sepúlveda-Arias *et al*, 2014).

A α,β -epoxi-carvona (EC, Figura 4, **9r**) é um monoterpeno encontrado nos óleos essenciais de muitas espécies de plantas. Este composto, pode também ser obtido por síntese orgânica. A EC exerce efeitos antidepressivos sobre o SNC e é também conhecida por ter efeitos anticonvulsivantes, anti-microbianos e anti-oxidantes (Rocha *et al*, 2013). Este composto tem quatro isómeros cuja estereoseletividade farmacológica ainda é desconhecida. Estes estereoisómeros podem ser obtidos utilizando os enantiómeros da carvona como materiais de partida; apresentam ainda diferenças na atividade anticonvulsivante, devido à influência da configuração do seu centro estereogénico (Salgado *et al*, 2015).

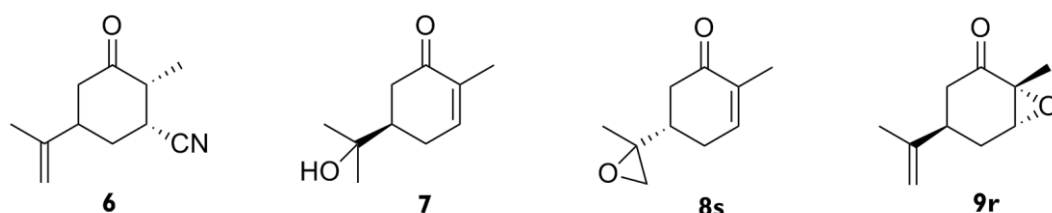


Figura 4. Estrutura química da ciano-carvona (**6**), hidroxidihidrocarvona (**7**), 7,8-epoxi-carvona (**8s**) e α,β -epoxi-carvona (**9r**).

Capítulo II

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS
DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DA
CARVONA**

Os OEs das plantas são obtidos apenas por extração dos mesmos das plantas, contudo este processo depende de diversos fatores externos como: tempo de crescimento da planta, condições climáticas, composição do solo e fertilizantes, agressões por parte de outros seres vivos. O que faz com que a obtenção dos mesmos, e por consequência dos seus componentes, não seja tão fácil e tão rápida como o que se deseja (Carvalho e Fonseca, 2006).

Assim, houve uma necessidade de começar a desenvolver outros métodos para a obtenção dos componentes presentes nos OEs, surgindo então o processo sintético ou semi-sintético, que através de pequenas ou drásticas modificações estruturais em moléculas iniciais, permite a obtenção dos compostos alvo com rendimentos variáveis

No final dos anos 50 e durante os anos 60 houve um rol de publicações (Linder e Greenspan (1957); Waida e Terauchi (1961); Vig *et al.* (1966)) a descrever as primeiras sínteses da carvona a partir de diferentes materiais de partida. Mais tarde, também Hareau *et al.* (1999), sintetizaram ambos os isómeros da carvona com rendimentos acima dos 90%, a partir da reação de derivados 6-substituídos do (5R)-(tert-butildimetilsiloxi)-2-ciclohexenona e (5S)-(tert-butildimetilsiloxi)-2-ciclohexenona com (2-propenil)₂Cu(CN)Li₂, e posterior tratamento dos produtos obtidos com DBU (1.8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-eno).

Neste trabalho, a R-(-)-carvona e a S-(+)-carvona, utilizadas como material de partida para as sínteses dos derivados semissintéticos da carvona, foram adquiridas da Sigma-Aldrich.

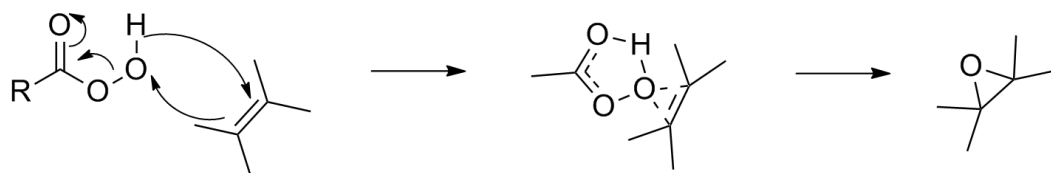
Todas as reações realizadas foram controladas e avaliadas qualitativamente por cromatografia de camada fina (TLC), utilizando acetato etilo/ hexano (1:3) como eluente.

2.1 DERIVADOS EPOXIDADOS: EPOXIDAÇÃO NA DUPLA LIGAÇÃO EXOCÍCLICA E NA CETONA α,β -INSATURADA

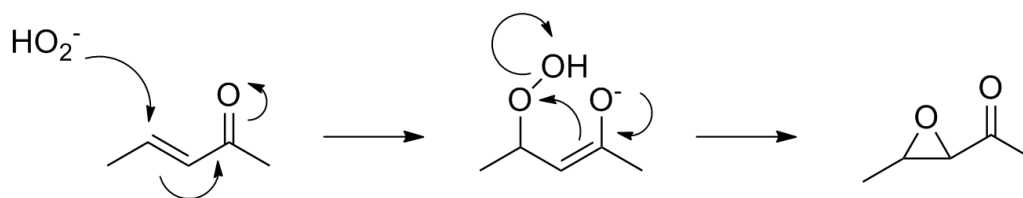
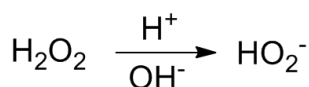
Uma das primeiras modificações foi a epoxidação. Em síntese orgânica, a transformação de alcenos em epóxidos é uma conversão de grupo funcional bastante útil, uma vez que o anel oxirano, característico de epóxidos, apresenta elevada reatividade. Por outro lado, são conhecidos compostos ativos com a função epóxido. A seletividade de reações de epoxidação pode ser controlada, entre outros fatores, pela escolha dos reagentes. Os peróxi-ácidos (RCO₃H) e o peróxido de hidrogénio alcalino (H₂O₂) são dois reagentes muito utilizados nas reações de epoxidação. Os peróxi-ácidos funcionam muito bem em

reações com alcenos ricos em eletrões, enquanto que o peróxido de hidrogénio é, normalmente, seletivo para alcenos com défice de eletrões como é o caso de cetonas e aldeídos α,β insaturados (Mak et al, 2009).

Nos Esquemas 1 e 2, são apresentados os mecanismos propostos para a reação de epoxidação de um alceno por um peróxi-ácido e para a reação de epoxidação de uma enona pelo H_2O_2 alcalino, respetivamente.



Esquema 1. Mecanismo da reação de epoxidação de um alceno por um peróxi-ácido. Adaptado de Mak et al, 2009.



Esquema 2. Mecanismo da reação de epoxidação de uma cetona α,β - insaturada pelo H_2O_2 alcalino. Adaptado de Mak et al., 2009.

A seletividade destes reagentes na epoxidação de alcenos e compostos carbonilo α,β -insaturados, pode ser demonstrada pela escolha de um substrato que contenha as duas funcionalidades, como é o caso da carvona, o substrato utilizado neste trabalho (Mak et al, 2009). A seletividade pode ser facilmente confirmada pela análise estrutural dos compostos formados, nomeadamente os espetros de ressonância magnética nuclear (RMN) de protão. As Figuras 5, 6 e 7, apresentam os espetros de RMN de protão do composto **5s**, **8s** e **9s**, para que se possa fazer uma análise comparativa entre os espetros e consequentemente entre a seletividade das reações que permitem obter os diferentes compostos.

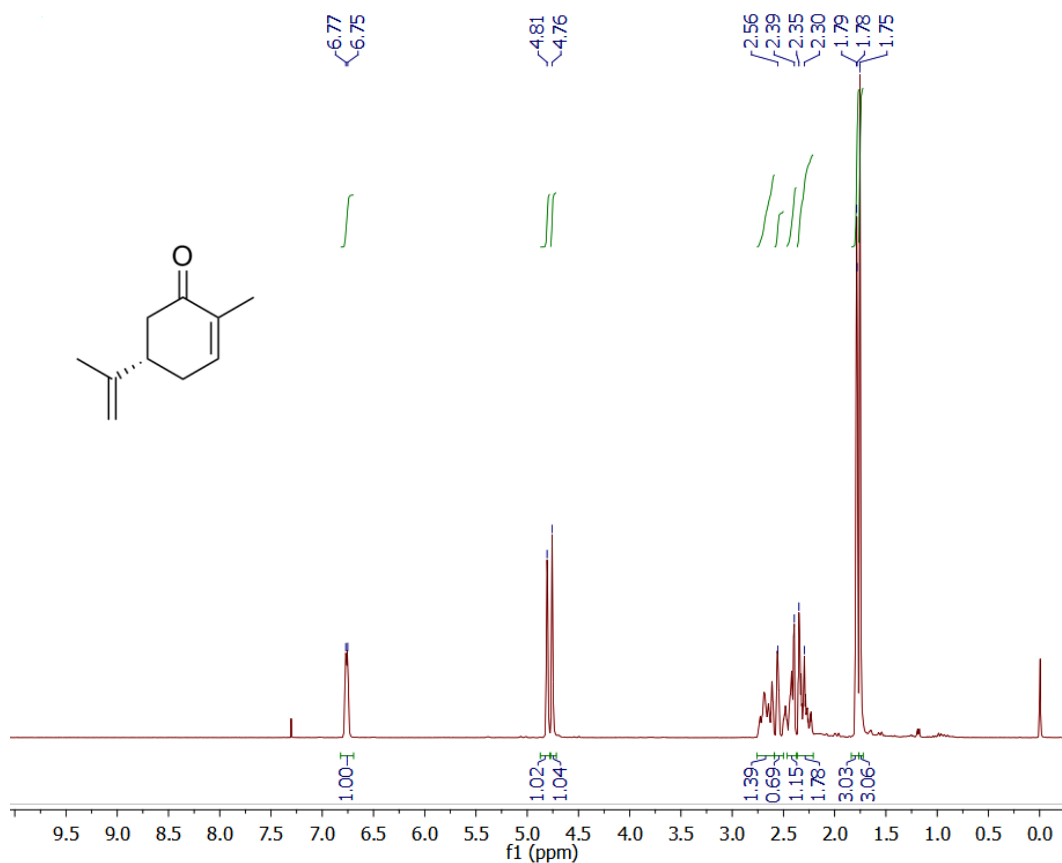


Figura 5. Espectro RMN de próton do composto 5s.

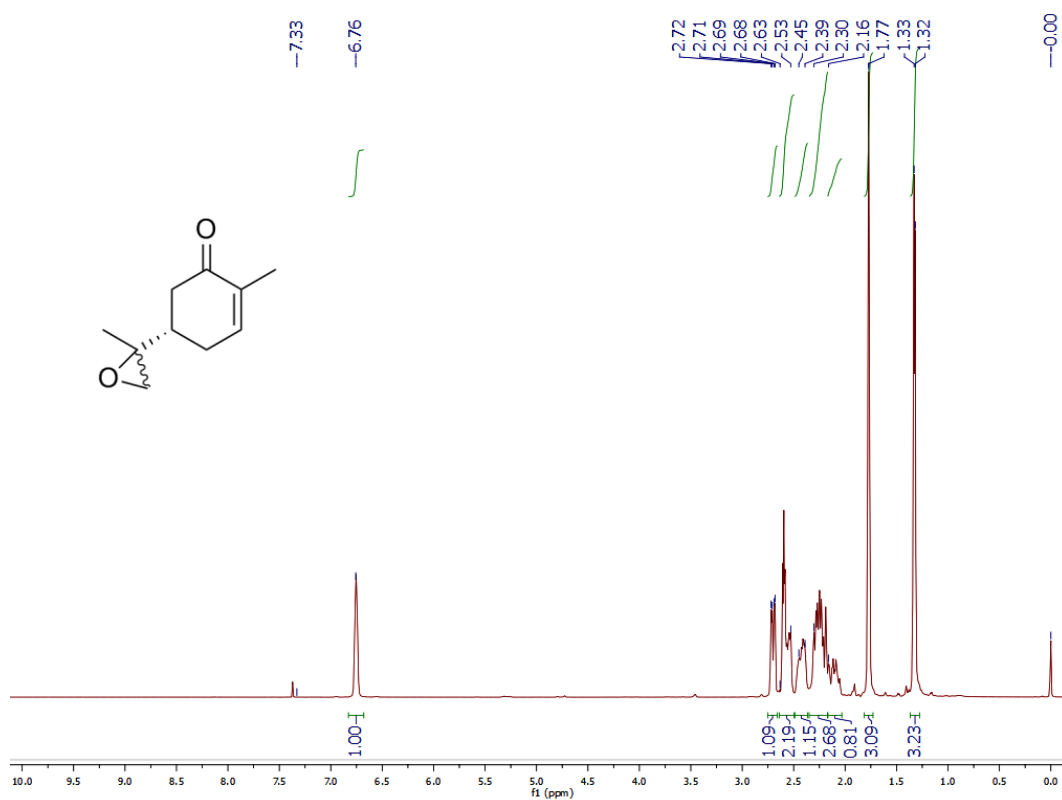


Figura 6. Espectro de RMN de próton do composto 8s.

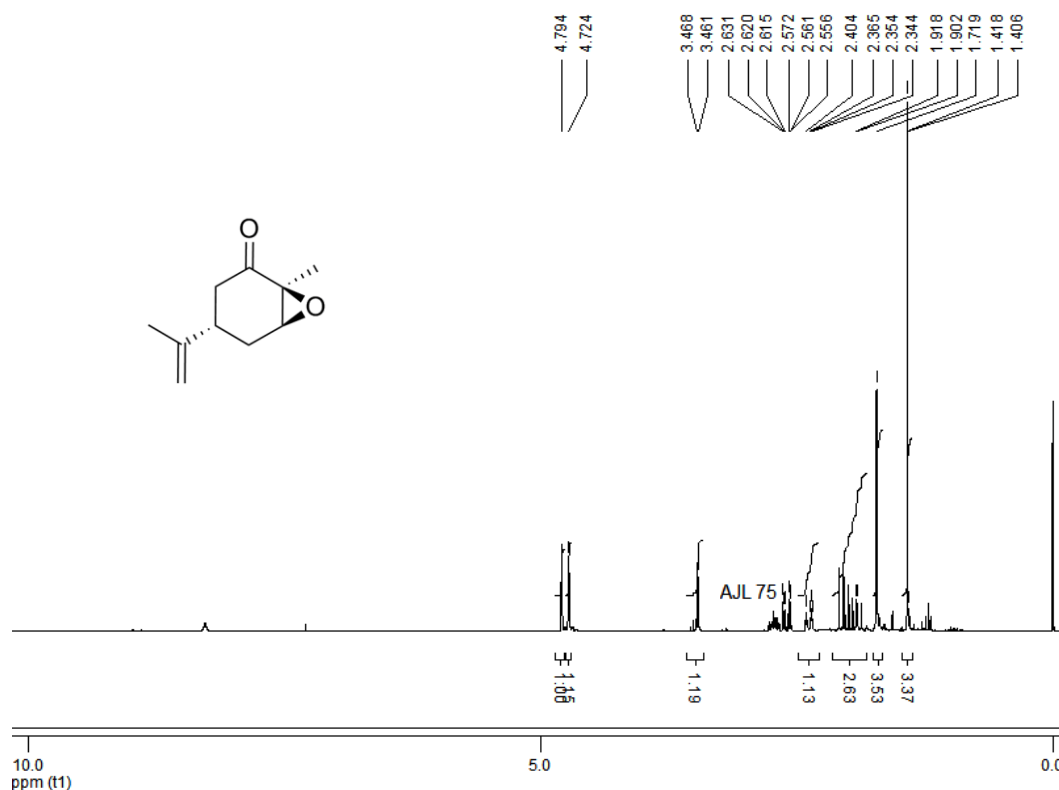
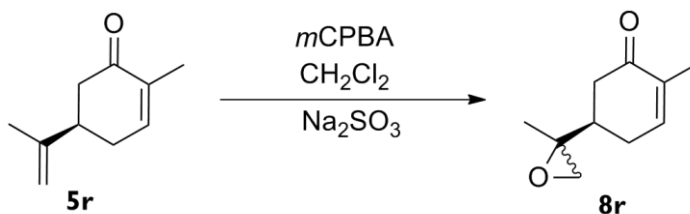


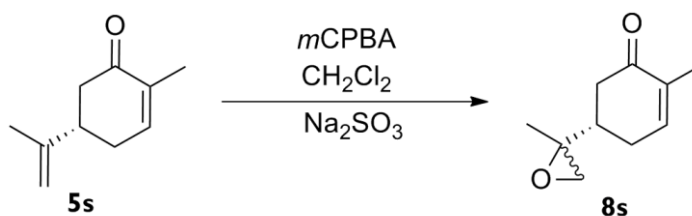
Figura 7. Espectro de RMN de próton do composto **9s**.

Mak e os seus colaboradores (2009) descreveram a reação da R(-)-carvona com o ácido *m*-cloroperoxibenzóico (*m*CPBA) demonstrando que esta era regioespecífica, sendo a transformação obtida na dupla ligação exocíclica presente no composto, tal como o esperado pela presença deste perácido.

Com base neste conhecimento, sintetizou-se a 7,8-epóxi-carvona (**8r** e **8s**) utilizando como substrato a R(-)-carvona (Esquema 3) e a S-(+)-carvona (Esquema 4). O substrato foi dissolvido em diclorometano (CH_2Cl_2). À solução previamente arrefecida a 0° foi adicionado gota-a-gota uma solução de *m*CPBA em CH_2Cl_2 , durante 10 minutos. A reação decorreu à temperatura ambiente durante aproximadamente 16 horas (controlo por TLC) originando o composto pretendido que foi posteriormente purificado por coluna cromatográfica. Tendo em conta a análise dos resultados de GC-MS e de RMN (próton e carbono), podemos afirmar que em ambas as reações, o produto é uma mistura de diastereoisómeros (1:1).



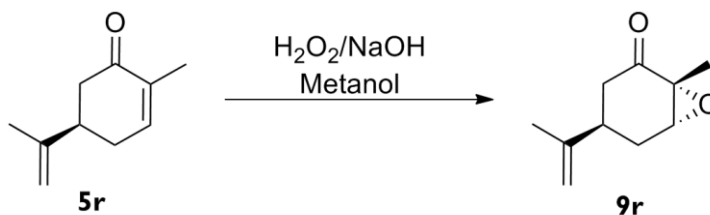
Esquema 3. Síntese do (R)-2-metil-5-(2-metiloxiran-2-il)-ciclohex-2-enona (**8r**) a partir da R(-)-carvona (**5r**).



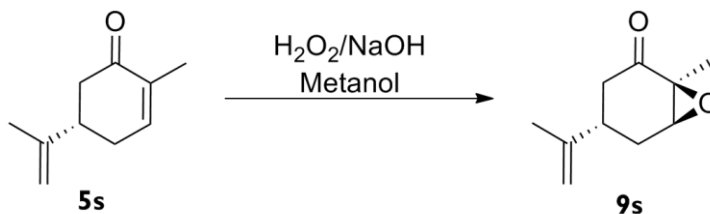
Esquema 4. Síntese do (S)-2-metil-5-(2-metiloxiran-2-il)-ciclohex-2-enona (**8s**) a partir da S-(+)-carvona (**5s**).

As α,β -epóxi-cetonas, resultantes da epoxidação de cetonas α,β -insaturadas, são importantes *building blocks* em síntese orgânica, uma vez que se obtêm vários grupos funcionais a partir destas. Tal como referido anteriormente, a epoxidação de cetonas α,β -insaturadas é geralmente levada a cabo com H_2O_2 em condições alcalinas extremas, utilizando para o efeito bases ou sais como NaOH e KOH ou Na_2CO_3 e K_2CO_3 (Yamaguchi *et al*, 2000).

Tendo em consideração o protocolo descrito por Mak *et al.* (2009), sintetizou-se α,β -epóxi-cetonas (**9r** e **9s**) usando como material de partida o enantiómero *R* da carvona (Esquema 5) e o enantiómero *S* (Esquema 6), usando uma mistura de soluções de H_2O_2 e NaOH , em metanol (MeOH). A reação decorre geralmente a 0°C durante menos de uma hora. O epóxido final é purificado por coluna cromatográfica.



Esquema 5. Síntese da (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metileteno)ciclohexanona (**9r**), a partir da R-(-)-carvona (**5r**).



Esquema 6. Síntese da (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metileteno)ciclohexanona (**9s**), a partir da S-(+)-carvona (**5s**).

2.2 ABERTURA DO EPÓXIDO: ABERTURA REDUTIVA E POR MEIO DE NUCLEÓFILOS

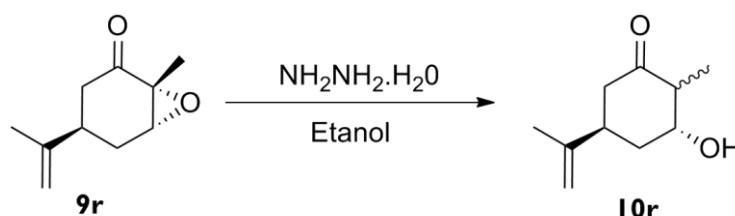
Para além da sua utilidade como *building blocks*, os epóxidos tornaram-se muito populares como intermediários sintéticos. Para além de serem compostos de fácil preparação através de uma grande quantidade de substratos, o anel oxirano característico dos epóxidos, é muito reativo e facilmente aberto sob uma ampla gama de condições, obtendo-se um largo espetro de produtos régio e estereoseletivos (Tangesaninejad *et al.*, 2006).

Salvador *et al.* (2005) descreveram um processo eficiente e muito versátil para a clivagem redutiva de α,β -epóxi-cetonas com obtenção das β -hidroxi-cetonas correspondentes, sob condições suaves, utilizando hidrato de hidrazina ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) como catalisador da reação e etanol como solvente.

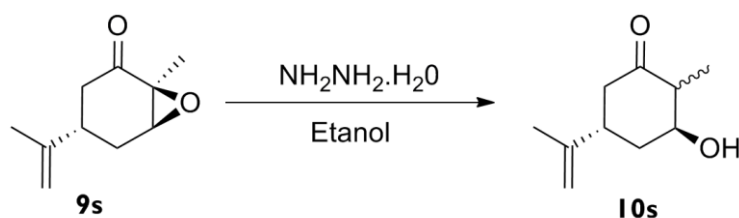
Tendo como base este trabalho, também realizado no laboratório de química farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, procedeu-se à abertura do anel oxirano da α,β -epóxi-carvona.

Os autores descrevem a temperatura como fator primordial para a reação, por isso, para cada substrato efetuou-se uma reação a 0 °C e outra sob refluxo. Após verificar o termo da reação, a solução é neutralizada com HCl e extraída com solvente apropriado.

A 0° C, quando o composto de partida foi o composto **9r**, o produto da reação foi uma mistura de diastereoisómeros (2:1), representada pelo composto (3R,5R)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (**10r**) (Esquema 7). Submetendo o composto **9s** às mesmas condições, obteve-se também, uma mistura de diastereoisómeros (2:1), representada pelo composto (3S,5S)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (**10s**) (Esquema 8).

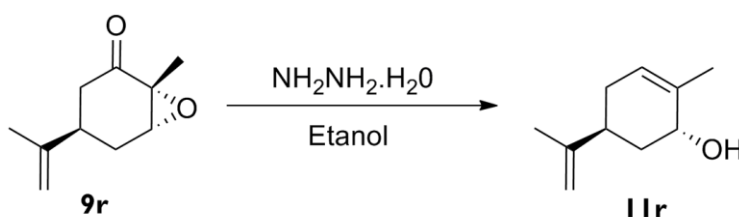


Esquema 7. Síntese do composto (3R,5R)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (**10r**), a partir do composto (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metileteno)ciclohexanona (**9r**).

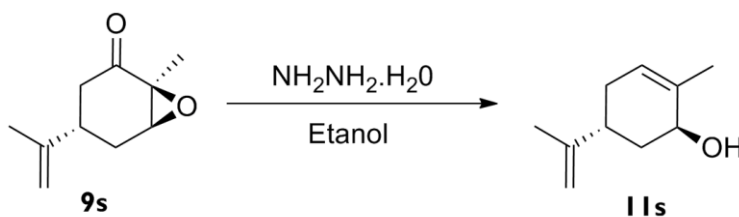


Esquema 8. Síntese do composto (3S,5S)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (**10s**), a partir do composto (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9s**).

Sob refluxo, espera-se que em vez da β -hidroxicetona se obtenha o álcool alílico através de um mecanismo que leva à eliminação do grupo carbonilo. Quando o composto de partida foi o composto **9r**, o produto da reação foi o composto (1S,5R)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hex-2-enol (**11r**) (Esquema 9). O substrato **9s**, originou o composto (1R,5S)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hex-2-enol (**11s**) (Esquema 10).



Esquema 9. Síntese do composto (1S,5R)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hex-2-enol (**11r**), a partir do composto (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9r**).



Esquema 10. Síntese do composto (1R,5S)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hex-2-enol (**11s**), a partir do composto (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9s**).

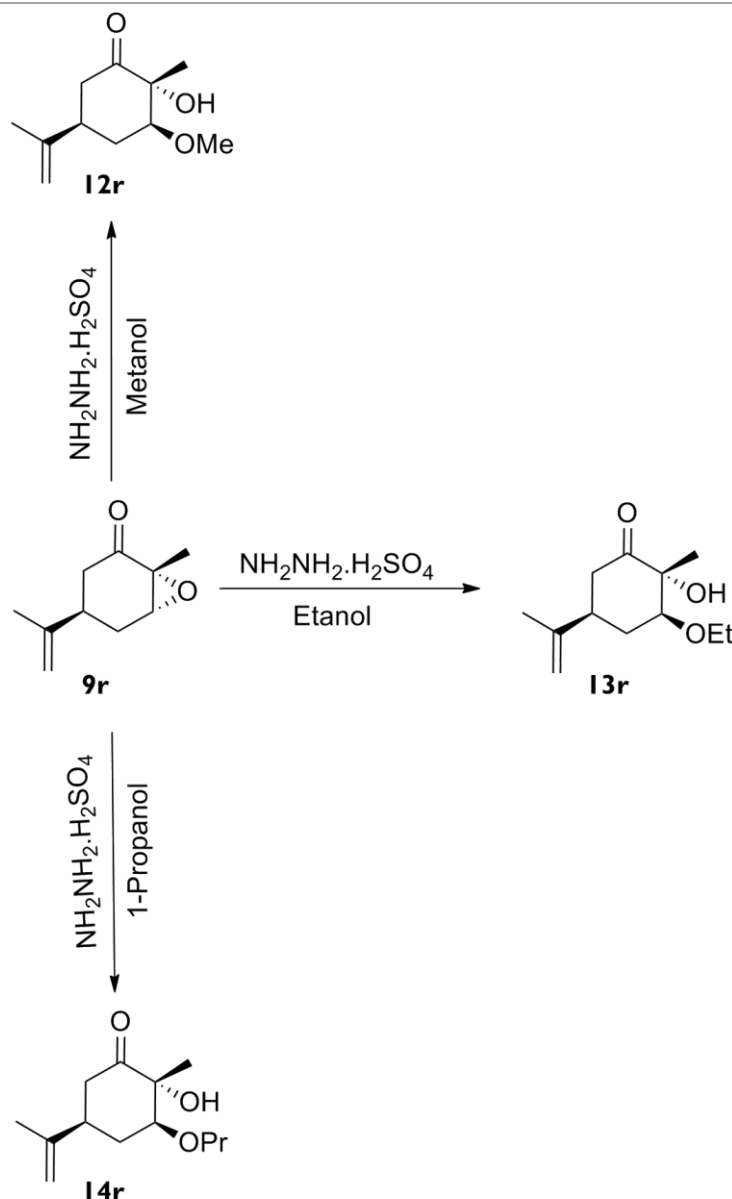
Outra aproximação para a abertura do anel oxirano dos epóxidos é através de reagentes nucleófilos, que resulta em produtos 1,2-disubstituídos. O protocolo mais comum e mais simples para a síntese de β -alcóxi-álcoois é a abertura do anel do epóxido com o álcool apropriado sob condições ácidas ou básicas extremas. É relevante saber que os β -alcóxi-álcoois são intermediários essenciais na preparação de α -alcóxi-cetonas, α -alcóxi-ácidos e de compostos de interesse farmacêutico (Leitão *et al.*, 2008).

Leitão *et al.* (2008) mostraram que o sulfato de hidrazina ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$) é um catalisador apropriado para a abertura do anel de óxido de estireno com álcoois primários, secundários e terciários, à temperatura ambiente.

Baseando-nos neste conhecimento, sintetizaram-se sete produtos, utilizando-se três álcoois primários: o metanol, o etanol e o 1-propanol. Os álcoois funcionam simultaneamente como nucleófilos e como solventes. Inicialmente as reações começaram por ser feitas à temperatura ambiente, tal como as descritas por Leitão *et al.*, mas sem sucesso, por isso mesmo, as nossas reações foram realizadas sob refluxo, utilizando o $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ como catalisador.

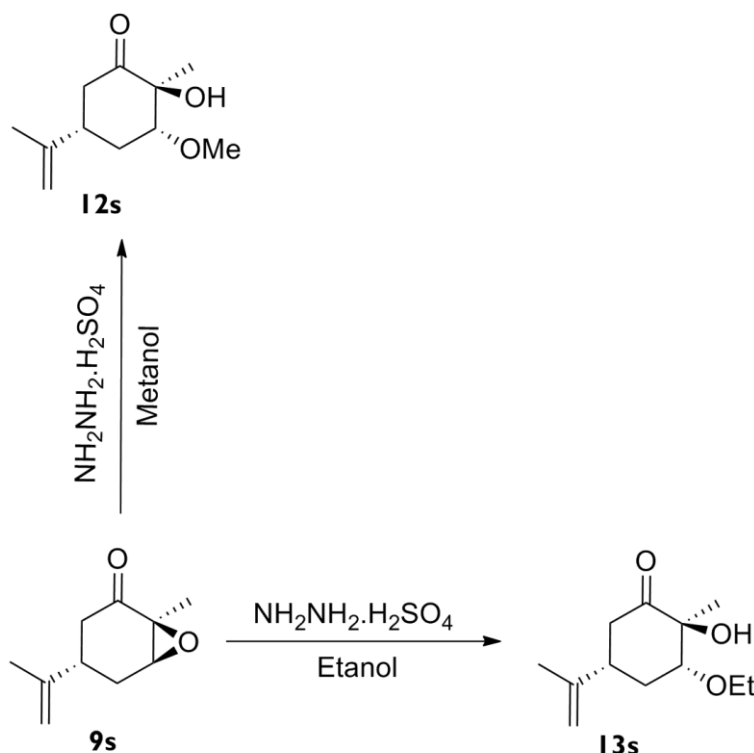
Na avaliação qualitativa da reação, percebeu-se que a reação tinha dois produtos finais bastante distinguíveis. Por isso mesmo, fez-se coluna de separação para poder isolar os produtos obtidos.

A reação com o composto **9r**, originou como produtos principais: o composto (2R,3S,5R)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (**12r**), a partir da reação com o metanol; o composto (2R,3S,5R)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (**13r**), a partir da reação com o etanol; o composto (2R,3S,5R)-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)-3-propoxiciclohexanona (**14r**), a partir da reação com o propanol (Esquema 11).



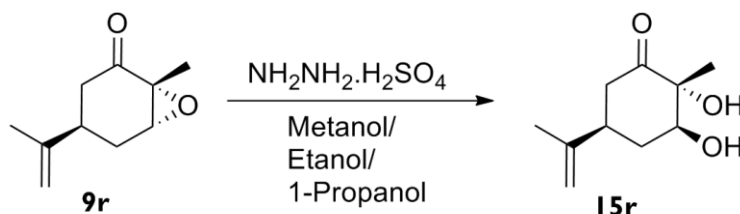
Esquema 11. Síntese de (2R,3S,5R)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (**12r**), do composto (2R,3S,5R)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (**13r**), e do composto (2R,3S,5R)-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)-3-propoxi-ciclohexanona (**14r**), a partir de (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9r**).

Quando o material de partida foi o composto **9s**, obteve-se o composto (2S,3R,5S)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (**12s**), a partir da reação com o metanol e da reação com o etanol, obteve-se o composto (2S,3R,5S)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (**13s**) (Esquema 12).

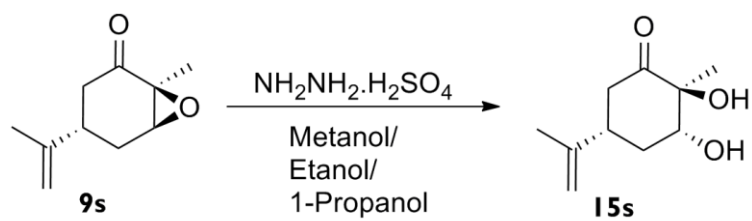


Esquema 12. Síntese dos compostos (2S,3R,5S)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (**12s**) e (2S,3R,5S)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (**13s**), a partir do composto (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9s**).

Tal como referido anteriormente, da realização destas reações obteve-se ainda um composto secundário, mais polar que o composto principal, que por análise estrutural se verificou ser o respetivo diol, provavelmente resultado da água funcionar como nucleófilo. A partir do composto **9r**, obteve-se o composto (2R,3S,5R)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (**15r**) (Esquema 13) e a partir do composto **9s** sintetizou-se o enantiómero do composto **15r**, o composto (2S,3R,5S)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (**15s**) (Esquema 14).



Esquema 13. Síntese do composto (2R,3S,5R)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (**15r**), a partir do composto (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9r**).



Esquema 14. Síntese do composto (2S,3R,5S)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (**15s**), a partir do composto(2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9s**).

Capítulo III

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE
DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS
DA CARVONA**

Quando o objetivo é avaliar a biocompatibilidade de um material, os primeiros testes a serem realizados são os testes de citotoxicidade *in vitro*. Nestes, para que o estudo possa prosseguir, o produto não pode causar morte celular nem afetar qualquer função celular. Ou seja, quando um composto químico provoca danos celulares graves pode comprometer a viabilidade celular perturbando a integridade estrutural e/ou metabólica das células, conduzindo a uma série de efeitos destrutivos. Urge assim, a utilização de técnicas de culturas de células, em que a partir de vários testes se pode detetar a ocorrência de metabolismo celular deficiente e a lise celular que, em última instância, pode resultar na morte celular (Costa, 2013).

Muitos métodos *in vitro* foram normalizados e otimizados para avaliar a citotoxicidade dos biomateriais utilizando culturas celulares. Nestes testes, o material é colocado direta ou indiretamente em contato com uma cultura celular, monitorizando as alterações celulares por diferentes mecanismos, incluindo a incorporação de corantes vitais (Rogerio *et al.*, 2003).

O parâmetro mais comum para a avaliação da citotoxicidade de um composto é a viabilidade celular. Por isso, existe uma panóplia de testes para esse fim, como é o caso dos testes colorimétricos, que englobam o teste do MTT, o mais conhecido, e da resazurina, cujo fundamento é avaliar a atividade metabólica da célula (Kroll *et al.*, 2009).

Neste trabalho, o teste escolhido foi o teste da redução da resazurina.

A resazurina, conhecida comercialmente como Alamar Blue, é um indicador de oxidação-redução. Este composto é reduzido por enzimas mitocondriais nas células vivas, ou seja, quanto maior o número de células vivas, maior será a quantidade de resazurina reduzida, que pode ser avaliada pela medição da absorvância ótica do meio de cultura a 570 e a 620 nm, comprimentos de onda nos quais as formas reduzidas e oxidadas, respetivamente, atingem o seu máximo de absorvância (Riss *et al.*; Rampersad, 2012).

As células viáveis com metabolismo ativo, reduzem a resazurina, de cor azul e não fluorescente, a resofurina, de cor rosa e fluorescente (Rampersad, 2012). Assim, a diferença entre absorvâncias da forma reduzida (resofurina) e da forma oxidada (resazurina) é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura celular.

A resazurina é um corante solúvel em água que já foi usado na quantificação da viabilidade *in vitro* de várias células. Este corante permite que seja feita uma monitorização das culturas celulares ao longo do tempo, já que é extremamente estável e não tóxico para as células. Estas propriedades fazem com que o teste da resazurina seja considerado mais

adequado que os testes clássicos utilizados para a detecção da viabilidade celular, como é o caso dos testes que utilizam sais de tetrazólio, como o MTT (Al-Nasiry et al., 2006).

Neste trabalho, os ensaios de citotoxicidade dos derivados semissintéticos da carvona foram realizados em células de mamífero, utilizando a linha celular de macrófagos murinos, RAW 264.7. Os compostos testados foram dissolvidos em dimetil sulfoxido (DMSO) para as concentrações pretendidas. Uma vez que este é um composto antioxidante e pode interferir com a viabilidade celular, recomenda-se que as concentrações de DMSO em culturas celulares não excedam os 0.1% v/v. A quantidade de DMSO presente na cultura celular é então considerada como um fator limitante para as concentrações máximas dos compostos que podem ser usadas nos ensaios. Concentrações elevadas de compostos altamente lipofílicos, como a carvona e os seus derivados semissintéticos, podem necessitar de concentrações de DMSO superiores a 0.1% para atingir a mistura adequada em solução aquosa. Como tal, a concentração máxima usada nos nossos ensaios foi de 200 µg/mL, o que permitiu uma mistura adequada dos compostos teste no meio de cultura celular. Os compostos foram ainda testados em concentrações mais baixas de 50 µg/mL e 12.5 µg/mL. Os compostos designados 8r, 8s, 10s e 10r, são misturas de diastereoisómeros, por isso não foram testados separadamente, uma vez que não foi possível, através dos métodos utilizados, obter os diastereoisómeros respetivos com o grau de pureza e em quantidade suficiente.

Após 18 horas de incubação a 37 °C na presença dos compostos teste, foi adicionada resazurina à cultura celular numa concentração final de 1 mg/mL, e após mais duas horas de incubação, foi medida a absorvância a 570 e a 620 nm. Foram ainda utilizadas culturas celulares tratadas apenas com o veículo dos compostos teste, isto é, 0.1% DMSO, como controlo. Os resultados obtidos a partir destas foram fixados em 100% de viabilidade celular e os resultados dos compostos teste expressos em percentagem correspondente.

Eventuais interferências dos compostos teste com o ensaio de redução da resazurina foram também avaliadas por incubação da concentração mais alta de cada composto teste em meio de cultura isento de células durante 18+2h, a 37 °C. Os resultados obtidos (Figura 8) mostram que nenhum dos compostos teste alterou significativamente a quantidade de resazurina reduzida/oxidada.

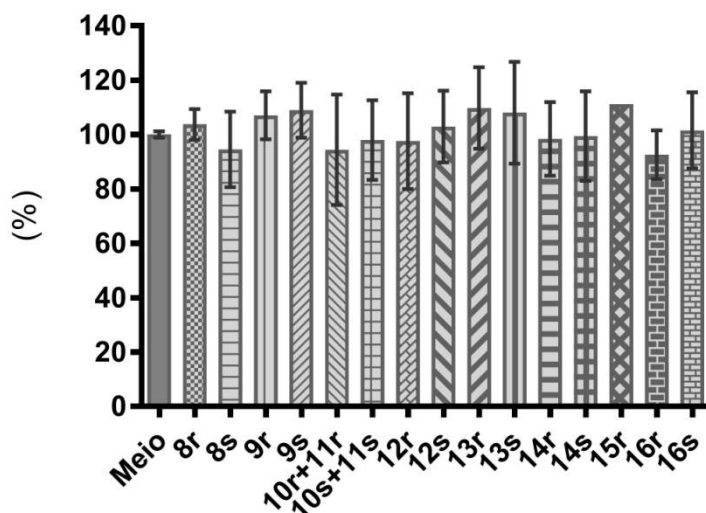


Figura 8. Interferência da concentração mais elevada (200 µg/mL) dos compostos teste, sintetizados a partir dos enantiômeros da carvona, no ensaio de redução da resazurina.

Os resultados obtidos no teste de redução da resazurina são apresentados na Figura 9. Pela análise dos resultados, verifica-se que alguns compostos diminuem significativamente a viabilidade celular, pelo menos na maior concentração testada. Tendo em conta a análise estatística dos resultados, é também claro que não há diferenças significativas entre os enantiômeros.

De acordo com a ISO 10993-5, que define os padrões para a avaliação de dispositivos médicos (2009), valores de viabilidade celular acima dos 80%, em comparação com o controlo, são considerados não-citotóxicos, entre 80-60% já é considerado que os compostos apresentam fraca citotoxicidade, 60-40% moderada e abaixo dos 40% citotoxicidade elevada.

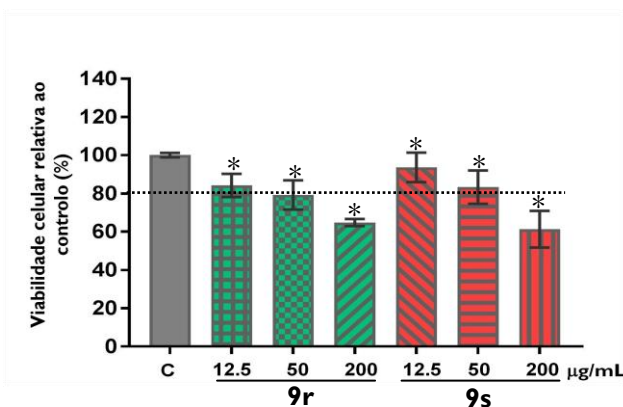
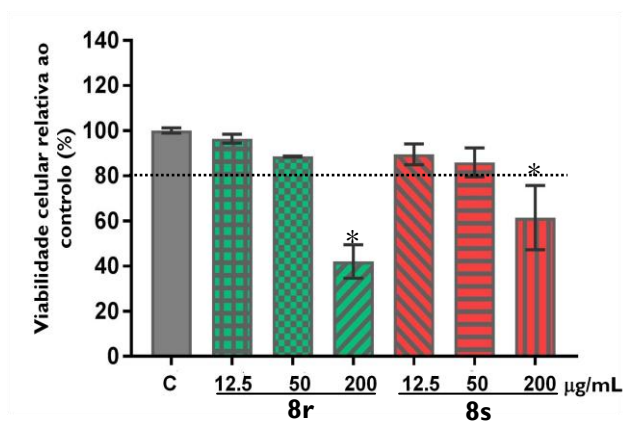
Tendo em conta estas considerações, os resultados obtidos mostram que os compostos que possuem um grupo epóxido na sua estrutura (compostos **8r**, **8s**, **9r** e **9s**) são citotóxicos na concentração mais alta testada (200 µg/mL). Em particular, os compostos **8r** e **8s** possuem toxicidade moderada e os compostos **9r** e **9s** apresentam fraca citotoxicidade. Compostos que não possuem este grupo na sua estrutura apresentam valores relativos de viabilidade celular acima ou no limiar dos 80% para todas as concentrações estudadas.

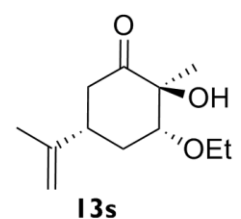
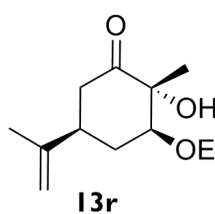
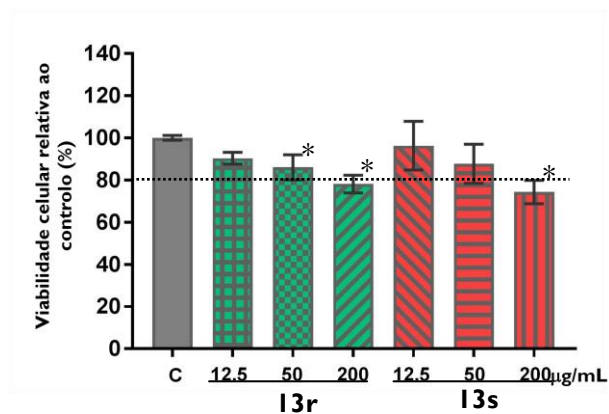
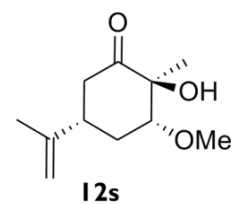
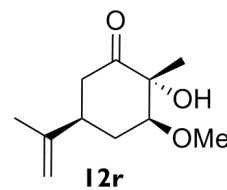
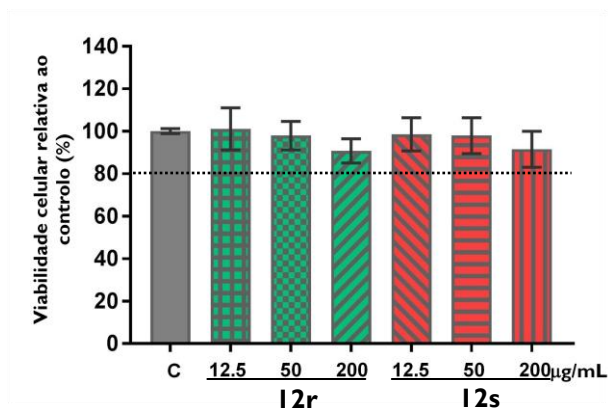
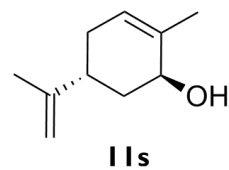
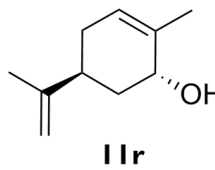
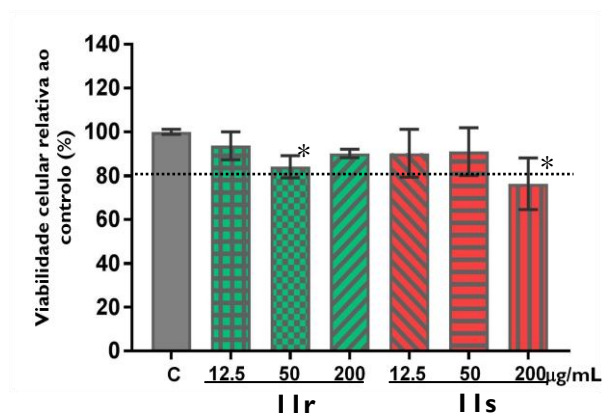
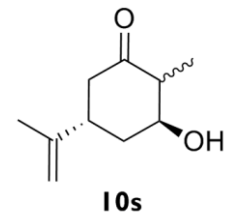
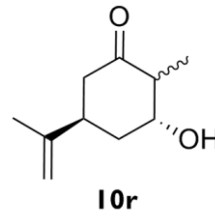
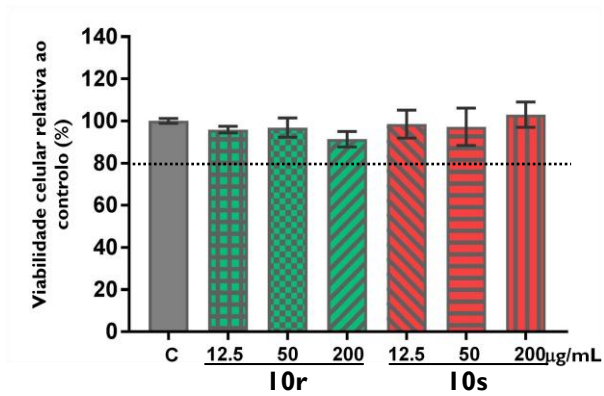
No entanto, as maiores concentrações dos compostos **11s**, **13r** e **13s** apresentam resultados de viabilidade celular ligeiramente abaixo do valor de corte, 80%, relativamente ao controlo, sugerindo que mesmo pequenos aumentos da sua concentração podem induzir uma toxicidade celular significativa. Assim, estes três compostos podem não ter tanto

interesse para estudos subsequentes como os compostos que apresentam valores mais elevados de viabilidade celular na mesma concentração (200 $\mu\text{g/mL}$).

Três das reações de abertura do epóxido utilizadas foram feitas por meio de nucleófilos, no caso, três álcoois: metanol, etanol, e 1-propanol. A diferença entre os compostos resultantes é o comprimento da cadeia alquílica.

Os resultados obtidos em termos de viabilidade celular são consistentes e similares entre os cinco compostos enantioméricos obtidos (**12r**, **12s**, **13r**, **13s** e **14r**), o que permite afirmar que o comprimento da cadeia alquílica dos álcoois resultantes da abertura do epóxido, não afeta a viabilidade celular nas condições experimentais usadas. No entanto, e como referido anteriormente, a viabilidade das células atingiu o limite mais baixo aceite para a ausência de citotoxicidade na concentração 200 $\mu\text{g/mL}$, nos compostos **13r** e **13s**, sugerindo que de alguma forma uma cadeia lateral de etanol pode aumentar a toxicidade.





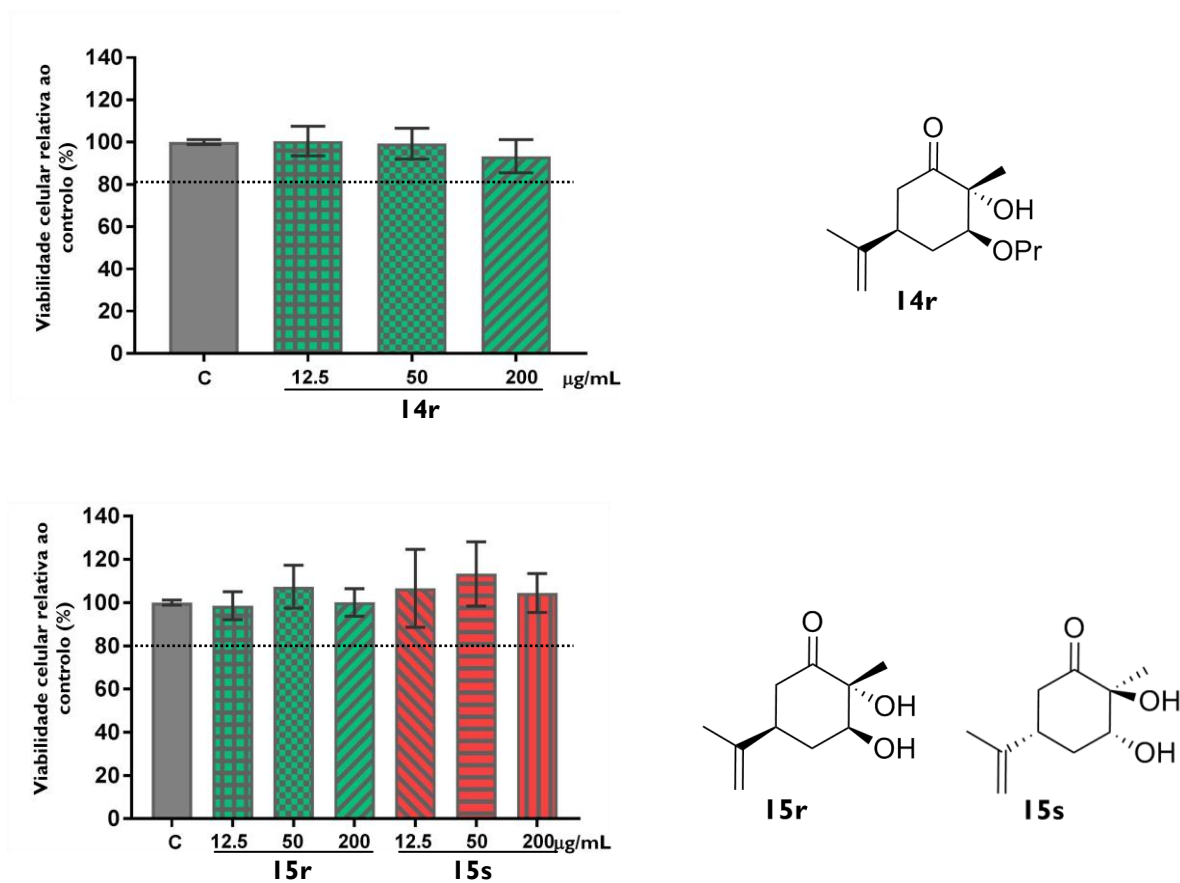


Figura 9. Gráficos representando a viabilidade relativa das células RAW 264.7, tratadas com os derivados semissintéticos da carvona nas concentrações indicadas (12.5 µg/mL, 50 µg/mL e 200 µg/mL), durante 18h. Apresentam-se também as fórmulas de estrutura dos compostos testados. *P<0.05 relativamente ao controlo (células tratadas com o veículo).

Capítulo IV

**CONCLUSÃO E PERSPETIVAS
FUTURAS**

Todas as reações realizadas foram de encontro às perspetivas teóricas iniciais. Os derivados epoxidados foram obtidos com rendimentos bastante satisfatórios. Alguns dos compostos remanescentes tiveram um rendimento ligeiramente mais baixo que o esperado, por isso mesmo, uma otimização do processo pode ser necessária.

A execução de testes de citotoxicidade é uma prioridade, para se afirmar se os compostos estudados são ou não biocompatíveis e se apresentam potencial para posteriormente serem caracterizados farmacologicamente.

Os ensaios de citotoxicidade permitem estabelecer relações entre a estrutura e a atividade. Os resultados apresentados na Figura 8 permitem concluir que a quiralidade não afeta a citotoxicidade dos derivados da carvona estudados, uma vez que a viabilidade celular não foi significativamente diferente entre os pares de enantiómeros. Além disso, o comprimento da cadeia alquilo do álcool substituinte após abertura do epóxido também não tem nenhum efeito sobre a viabilidade celular. No entanto, os compostos **11r**, **13r** e **13s** na maior concentração testada (200 µg/mL) apresentam uma diminuição da viabilidade celular perto do limite aceite para os classificar como não-tóxicos. Por outro lado, a modificação da dupla ligação exocíclica ou da cetona α,β -insaturada presente na estrutura da carvona por um anel oxirano é suficiente para causar uma toxicidade significativa, tal como observado com os compostos **8s** e **8r** e **9s** e **9r**, respetivamente. É interessante notar que a posição do grupo epóxido parece ter alguma relevância no potencial citotóxico, uma vez que os compostos **8** e **9** parecem diferir em termos de intensidade do efeito citotóxico. São ainda necessários estudos adicionais, fora do âmbito deste projeto, para determinar a concentração de cada composto que provoca um decréscimo de 50% na viabilidade celular (concentração inibitória a 50%, IC₅₀), o parâmetro que permite tais comparações.

Em resumo, este projeto suscitou a síntese e avaliação biológica preliminar de quinze derivados da carvona, dos quais oito apresentaram citotoxicidade suficientemente baixa para serem candidatos a uma posterior avaliação farmacológica. Isto não exclui, porém, que os compostos que apresentaram citotoxicidade devam ser excluídos de qualquer avaliação farmacológica. De facto, isso demonstra que esses compostos interagem com componentes celulares e, em concentrações mais baixas não citotóxicas, poderão exercer efeitos farmacológicos de potencial interesse. Assim, os resultados deste estudo, ao identificarem a concentração máxima não citotóxica de cada composto testado, são úteis para definir as condições experimentais em estudos farmacológicos futuros.

Capítulo V

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1 APARELHAGEM UTILIZADA

Cromatografia

Para o acompanhamento das reações por TLC, utilizaram-se placas de sílica 60 F₂₅₄, com suporte de alumínio.

Para as cromatografias em coluna utilizou-se gel de sílica 60 (0.063-0.200 mm) fornecido pela Merck.

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos no espectrômetro Bruker Avance III operando a 400 MHz (¹H) ou a 100 MHz (¹³C), onde TMS foi utilizado como padrão interno, os desvios químicos vêm referidos em δ , e as constantes de acoplamento, J, em Hz.

Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos num espectrômetro Perkin Elmer Spectrum 400, FT-IR e FT-NIR.

Cromatografia Gasosa com espectrometria de massa acoplada (GC-MS)

A análise por GC-MS foi efetuada num cromatógrafo HP 6890 Series acoplado a um detetor de massa (MS) HP 5973.

ELISA

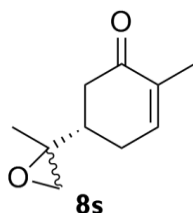
Nos ensaios de avaliação da viabilidade celular, a absorvância das amostras foi lida no espectrofotômetro de microplacas ELISA Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader.

5.2 REAGENTES

Todos os solventes e reagentes foram obtidos comercialmente e utilizados diretamente, sem qualquer tipo de purificação adicional.

5.3 SÍNTESE DOS DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DA CARVONA

5.3.1 Síntese do composto (S)-2-metil-5-(2-metiloxiran-2-il)-ciclohex-2-enona (8s)



Usou-se o método descrito na referência Mak *et al.*, 2009.

A uma solução de S-(+)-carvona (0.5 g; 3.3 mmol) adicionou-se diclorometano (8 ml) arrefecido a 0 °C. Posteriormente, adicionou-se à reação, uma solução de ácido cloroperbenzóico 75% (mCPBA) (0.85 g; 3.69 mmol) diluído em diclorometano (4 ml), gota-a-gota durante cerca de 10 minutos. A reação deve permanecer a 0 °C, com agitação, durante aproximadamente 16 horas (controlo por TLC). Concluída a reação, adicionou-se 1 ml de solução de sulfito de sódio 10% durante 1-2 minutos. A mistura foi filtrada e o resíduo sólido lavado com várias porções de diclorometano. O líquido orgânico foi lavado com solução de carbonato sódio 10% (3 x 15 ml) e solução saturada de cloreto de sódio (15 ml). Após secagem com Sulfato de sódio anidro, a solução foi filtrada e o solvente evaporado.

Após coluna de separação obteve-se 0.36 g (62%) do composto **8s** um óleo de cor amarelo-pálido.

Dados analíticos do (S)-2-metil-5-(2-metiloxiran-2-il)-ciclohex-2-enona

Fórmula química: C₁₀H₁₄O₂

Massa molar: 166.22 g/mol

Massa Exata: 166.10 g/mol

¹H RMN (ppm) (400 MHz, CDCl₃): δδ 1.33 (s, 3H); 1.77 (s, 3H); 2.16-2.32 (m, 3H); 2.36-2.47 (m, 1H); 2.51-2.63 (m, 2H); 2.70 (dd, 1H, J= 4 Hz, J= 12Hz); 6.76 (s, 1H).

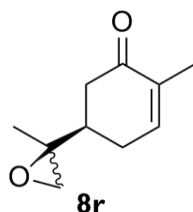
¹³C RMN (ppm) (100 MHz, CDCl₃): δ 15.59; 18.34/18.82; 27.65/27.86; 39.83/40.21/40.71/41.20; 52.37/52.76; 57.78/57.88; 76.85/77.17/77.49; 135.42; 143.94/144.16; 198.71.

FTIR-ATR(cm⁻¹): 2925, 1667, 1434, 1366, 1103, 1042, 900, 832.

GC: t_r= 33.61 min.; %= 51.47 %; t_r= 33.87 min.; %= 48.53%.

MS: m/z= 39, 53, 81, 107, 121, 149.

5.3.2 Síntese do composto (R)-2-metil-5-(2-metiloxiran-2-il)-ciclohex-2-enona (8r)



Usou-se o método descrito na referência Mak *et al.*, 2009.

Todo o procedimento utilizado para esta reação é o mesmo do mencionado na síntese 5.3.1. A diferença encontra-se no material de partida, neste caso, foi uma solução de R(-)-carvona (0.5 g; 3.3 mmol).

Após coluna de separação, obteve-se 0.46 g (83%) do composto **8r**, um óleo amarelo.

Dados analíticos do (R)-2-metil-5-(2-metiloxiran-2-il)-ciclohex-2-enona

Fórmula química: C₁₀H₁₄O₂

Massa molar: 166.22 g/mol

Massa Exata: 166.10 g/mol

¹H RMN (ppm) (400 MHz, CDCl₃): Igual ao isómero **8s**.

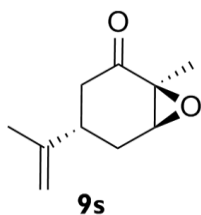
¹³C RMN (ppm) (100 MHz, CDCl₃): Igual ao isómero **8s**.

FTIR-ATR (cm⁻¹): 2925, 1667, 1434, 1366, 1103, 1042, 900, 832.

GC: t_r= 33.65 min.; %= 49.11 %; t_r= 33.91 min.; %= 45.75%.

MS: m/z= 39, 53, 81, 107, 121, 149.

5.3.3 Síntese do composto (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (9s)



Usou-se o método descrito na referência Mak *et al.*, 2009.

Num balão de fundo redondo adicionou-se uma solução de S-(+)-carvona (1 g; 6.6 mmol) e 11 mL de metanol. O balão é colocado numa mistura de gelo-água durante 5 minutos. Com o frasco no banho frio, é ainda adicionado 2 mL de H₂O₂ e começa-se a agitar a mistura vigorosamente. Adiciona-se 1.4 mL de NaOH 6M durante 1-2 minutos e a mistura continua em agitação a 0 °C durante 15 minutos. Após isto, o frasco é retirado do banho frio e a mistura continua sob agitação durante mais 20 minutos à temperatura ambiente.

O processo extrativo começa com a adição de 14 mL de CH₂Cl₂ à mistura e com uma lavagem da solução orgânica com água (2 x 14 mL) e depois com uma solução saturada de NaCl (14 mL). A solução orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e, após filtração, o solvente foi evaporado. Após coluna de separação obteve-se 0.68 g (62%) do composto (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona sendo o produto um óleo incolor.

Dados analíticos do (2S,3S,5S)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona

Fórmula química: C₁₀H₁₄O₂

Massa molar: 166.22 g/mol

Massa Exata: 166.10 g/mol

¹H RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃): δ 1.42 (s, 3H); 1.72 (s, 3H); 1.91 (dd, 1H, J= 1.2Hz, J=3.6 Hz); 2.34-2.42 (m, 1H); 2.56 (dd, 1H, J= 1.2 Hz, J= 4.5 Hz); 2.62 (dd, 1H, J= 1.5 Hz, J= 4.8 Hz); 2.67-2.78 (m, 1H), 3.46 (dd, 1H, J= 0.9 Hz, J= 3 Hz); 4.72 (s, 1H); 4.79 (s, 1H).

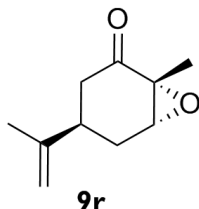
¹³C RMN (ppm) (75.5 MHz, CDCl₃): δ 14.72; 20.02; 28.09; 34.41; 41.21; 58.23/60.79; 76.15/ 76.57/ 76.99; 109.04; 145.74; 205.06

FTIR-ATR (cm⁻¹): 2976, 2937, 1703, 1645, 1444, 1382, 1119, 885, 802.

GC: t_r= 24.31 min.; %= 75.36 %; t_r= 24.34 min.; %= 16.76%.

MS: m/z= 43, 67, 81, 94, 121, 136.

5.3.4 Síntese do composto (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona (**9r**)



Usou-se o método descrito na referência Mak *et al.*, 2009.

Todo o procedimento utilizado para esta reação é o mesmo do mencionado na síntese 5.3.3, apenas o material de partida passou a ser uma solução de R-(-)-carvona (1 g; 6.6 mmol).

Após coluna de separação, obteve-se 0.89 g (81%) do composto **9r**, sendo o produto um óleo incolor.

Dados analíticos do (2R,3R,5R)-2,3-epóxi-2-metil-5-(1-metiletileno)ciclohexanona

Fórmula química: C₁₀H₁₄O₂

Massa molar: 166.22 g/mol

Massa Exata: 166.10 g/mol

¹H RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃): igual ao isômero **9s**.

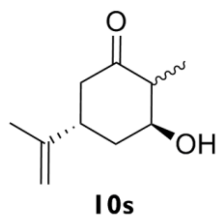
¹³C RMN (ppm) (75.5 MHz, CDCl₃): igual ao isômero **9s**.

FTIR-ATR (cm⁻¹): 2976, 2937, 1703, 1645, 1444, 1382, 1119, 885, 802.

GC: τ_r= 24.14 min.; %= 84.17 %.

MS: m/z= 43, 67, 81, 94, 121, 136.

5.3.5 Síntese do composto (3S,5S)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (10s)



Usou-se o método descrito na referência Salvador *et al.*, 2005.

A uma solução do epóxido da S-(+)-carvona sintetizado na descrição 5.3.3 (0.2 g; 12 mmol) em 5 mL de etanol a 0°C, foi adicionado hidrato de hidrazina (1 mL; 20 mmol). Após 2h de agitação, a solução foi temperada com HCl (10% sol. Aq.) e após, aproximadamente 10 minutos, extraída com CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). A camada orgânica combinada foi lavada com porções de NaHCO₃ saturado (aq.) (2 x 25 mL) e água (25 mL). Após o processo extrativo, a mistura foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente evaporado. Obteve-se 0.032g (16%) do composto **10s**, um óleo amarelo-pálido.

Dados analíticos do (3S,5S)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona

Fórmula química: C₁₀H₁₆O₂

Massa molar: 168.23g/mol

Massa Exata: 168.12 g/mol

¹H RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) (isómero principal): δ 1.12 (3H,d, J = 7.0 Hz), 1.76 (s, 3H), 4.32 (m, 1H), 4.77 (s, 1H), 4.80 (s, 1H); Relação de isómeros determinada por RMN através da integração do sinal do 2-metilo (1.18 (d, 3H, J = 7.0 Hz) para o isómero secundário)

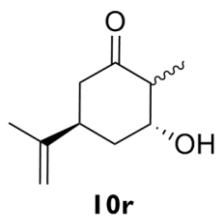
¹³C RMN (ppm) (75.5 MHz, CDCl₃): δ 10.7; 20.6; 37.6; 39.9; 46.5; 49.2; 73.6; 110.0; 147.2; 210.9.

FTIR-ATR (cm⁻¹): 3462, 3083, 2971, 2936, 1711, 1664, 1450, 1375, 1208, 1154, 1061, 985, 893.

GC: t_r = 41.01 min.; %= 74.26 %.

MS: m/z = 41, 67, 92, 107, 121, 148, 166.

5.3.6 Síntese do composto (3R,5R)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona (10r)



Usou-se o método descrito na referência Salvador *et al.*, 2005.

Todo o procedimento utilizado para esta reação é o mesmo do mencionado na síntese 5.3.5, apenas o material de partida passou a ser uma solução de epóxido da R-(-)-carvona sintetizado na descrição 5.3.4 (0.2 g; 12 mmol). Obteve-se 0.036g (18%) do composto **10r**, um óleo amarelo pálido.

Dados analíticos do (3R,5R)-3-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclohexanona:

Fórmula química: C₁₀H₁₆O₂

Massa molar: 168.23g/mol

Massa Exata: 168.12 g/mol

¹H RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃): igual ao isômero **10s**.

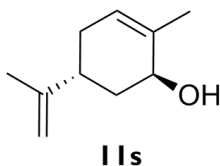
¹³C RMN (ppm) (75.5 MHz, CDCl₃): igual ao isômero **10s**.

FTIR-ATR (cm⁻¹): 3462, 3083, 2971, 2936, 1711, 1664, 1450, 1375, 1208, 1154, 1061, 985, 893

GC-MS: t_r= 41.00 min.; %= 74.85 %.

MS: m/z= 41, 67, 92, 107, 121, 148, 166.

5.3.7 Síntese do composto (1R,5S)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hex-2-enol (II_s)



Usou-se o método descrito na referência Salvador *et al.*, 2005.

A uma solução do epóxido da S-(+)-carvona sintetizado na descrição 5.3.3 (0.2 g; 12 mmol) em 5 mL de etanol em refluxo, foi adicionado hidrato de hidrazina (1 mL/ 20 mmol). Após 2h de agitação, a solução foi temperada com HCl (10% sol. Aq.) e após, aproximadamente 10 minutos, extraída com CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). A camada orgânica combinada foi lavada com porções de NaHCO₃ saturado (aq.) (2 x 25 mL) e água (25 mL). Após o processo extrativo, a mistura foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente evaporado. Obteve-se 0.067g (37%) do composto **II_s**, um óleo de cor laranja-acastanhado.

Dados analíticos do (1R,5S)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hex-2-enol:

Fórmula química: C₁₀H₁₆O

Massa molar: 152.23g/mol

Massa Exata: 152.12 g/mol

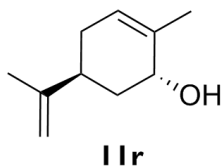
¹H RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃): 1.15 (dd, 1H, J= 6 Hz, J= 18Hz); 1.63 (dd, 1H, J= 6 Hz, J= 15 Hz); 1.75 (s, 3H); 1.81 (s, 3H); 1.91-1.98 (m, 2H); 2.10-2.19 (m, 1H); 2.28-2.37 (M, 1H); 4.03 (s, 1H); 4.74 (d, 2H, J= 6 Hz); 5.59 (d, 1H, J= 6 Hz).

FTIR-ATR (cm⁻¹): 2914, 1654, 1444, 1376, 1042, 967, 881, 804.

GC: t_r= 24.28 min.; %= 65.03 %.

MS: m/z= 41, 55, 83, 108, 122, 136, 150.

5.3.8 Síntese do composto (1S,5R)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hex-2-enol (11r)



Usou-se o método descrito na referência Salvador *et al.*, 2005.

Todo o procedimento utilizado para esta reação é o mesmo do mencionado na síntese 5.3.7, apenas o material de partida passou a ser uma solução de epóxido da S-(+)-carvona sintetizado na descrição 5.3.4 (0.2 g; 12 mmol). Obteve-se 0.04 g (22%) do composto **11r**, um óleo laranja.

Dados analíticos do (1S,5R)-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hex-2-enol:

Fórmula química: C₁₀H₁₆O

Massa molar: 152.23g/mol

Massa Exata: 152.12 g/mol

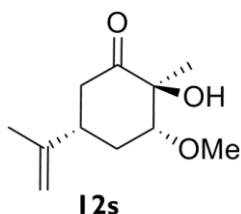
¹H RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃): igual ao isómero **11s**.

FTIR-ATR (cm⁻¹): 2914, 1654, 1444, 1376, 1042, 967, 881, 804.

GC: t_r = 24.29 min.; %= 66.05 %.

MS: m/z = 41, 55, 83, 108, 122, 136, 150.

5.3.9 Síntese do composto (2S,3R,5S)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (12s)



Usou-se o método descrito na referência Leitão *et al.*, 2008.

A uma solução do epóxido da S-(+)-carvona sintetizado na descrição 5.3.3 (0.15 g; 0.9 mmol) em 5 mL de metanol foi adicionado 1 mg de NH₂NH₂·H₂SO₄. A reação foi procedida em refluxo durante cerca de 3 horas (controlo por TLC). No final, a solução é filtrada e o

solvente evaporado. Após coluna cromatográfica, obteve-se 0.045g (25%) do composto **12s**, um óleo amarelo pálido.

Dados analíticos do (2S,3R,5S)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona:

Fórmula química: C₁₁H₁₈O₃

Massa molar: 198.26 g/mol

Massa Exata: 198.13 g/mol

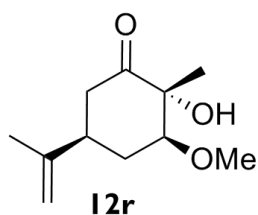
¹H RMN (ppm) (400 MHz, CDCl₃): δ 1.31 (s, 3H); 1.35 (s, 1H); 1.76 (s, 3H); 1.78 (s, 1H); 2.31 (t, 2H, J= 2.3 Hz); 2.65-2.81 (m, 2H); 3.17 (d, 3H, J= 3.17 Hz); 4.02 (s, 1H); 4.79 (d, 2H, J= 4.8 Hz).

¹³C RMN (ppm) (100 MHz, CDCl₃): δ 13.90, 20.57, 32.72, 39.71, 43.01, 51.37, 75.53, 82.08, 110.31, 147.05, 211.59.

GC: t_r= 22.94 min.; %= 74.74 %.

MS: m/z= 43, 59, 72, 85, 101, 125, 198.

5.3.10 Síntese do composto (2R,3S,5R)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (**12r**)



Usou-se o método descrito na referência Leitão *et al.*, 2008.

Todo o procedimento utilizado para esta reação é o mesmo do mencionado na síntese 5.3.9, apenas o material de partida passou a ser uma solução de epóxido da R-(-)-carvona sintetizado na descrição 5.3.4 (0.1 g; 0.9 mmol). Obteve-se 0.042 g (35%) do composto **12r**, um óleo amarelo forte.

Dados analíticos do (2R,3S,5R)-2-hidroxi-3-metoxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona:

Fórmula química: C₁₁H₁₈O₃

Massa molar: 198.26 g/mol

Massa Exata: 198.13 g/mol

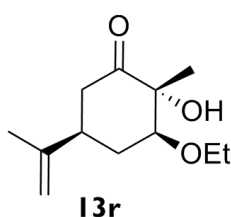
¹H RMN (ppm) (400 MHz, CDCl₃): igual ao isómero **12s**.

¹³C RMN (ppm) (100 MHz, CDCl₃): igual ao isómero **12s**.

GC: t_r = 22.83 min.; %= 84.11 %.

MS: m/z = 43, 59, 72, 85, 101, 125, 198.

5.3.11 Síntese do composto (2R,3S,5R)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (**13r**)



Usou-se o método descrito na referência Leitão *et al.*, 2008.

Todo o procedimento utilizado para esta reação é o mesmo do mencionado na síntese 5.3.9, apenas o solvente foi diferente, nesta reação foram utilizados 8 mL de etanol. A partir do epóxido da R-(-)-carvona (0.2g; 12 mmol) obteve-se, após coluna cromatográfica, 0.13g (51%) do composto **13r**, um óleo amarelo.

Dados analíticos do (2R,3S,5R)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona:

Fórmula química: C₁₂H₂₀O₃

Massa molar: 212.29 g/mol

Massa Exata: 212.14 g/mol

¹H RMN (ppm) (400 MHz, CDCl₃): δ 1.18 (t, 3H, J = 8 Hz); 1.31 (s, 3H); 1.76 (s, 3H); 1.81 (s, 1H); 2.34 (q, 2H, J = 12 Hz); 2.68-2.81 (m, 2H); 3.08-3.15 (m, 1H); 3.45-3.53 (m, 1H); 4.03 (s, 1H); 4.79 (d, 2H, J = 8 Hz).

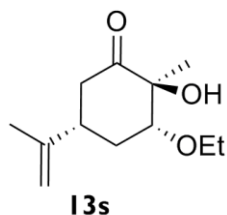
¹³C RMN (ppm) (100 MHz, CDCl₃): δ 14.59, 15.83, 20.41, 32.68, 39.93, 43.02, 59.24, 75.78, 81.89, 110.22, 147.15, 212.23.

FTIR-ATR (cm⁻¹): 2923, 1711, 1644, 1444, 1367, 1053, 1024, 958, 890, 804.

GC: t_r = 41.64 min.; %= 83.72 %.

MS: m/z = 43, 71, 88, 101, 114, 138, 163, 181, 210.

5.3.12 Síntese do composto (2S,3R,5S)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (13s)



Usou-se o método descrito na referência Leitão *et al.*, 2008.

Todo o procedimento utilizado para esta reação é o mesmo do mencionado na síntese 5.3.11, apenas o material de partida passou a ser uma solução de epóxido da S-(+)-carvona sintetizado na descrição 5.3.4 (0.2 g; 12 mmol). Após coluna de separação, obteve-se 0.16g (63%) do composto **13s**, um óleo amarelo pálido.

Dados analíticos do (2S,3R,5S)-3-etoxi-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona:

Fórmula química: C₁₂H₂₀O₃

Massa molar: 212.29 g/mol

Massa Exata: 212.14 g/mol

¹H RMN (ppm) (400 MHz, CDCl₃): igual ao isômero **13r**.

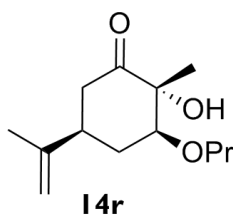
¹³C RMN (ppm) (100 MHz, CDCl₃): igual ao isômero **13r**.

FTIR-ATR (cm⁻¹): 2923, 1711, 1644, 1444, 1367, 1053, 1024, 958, 890, 804.

GC: τ_r = 41.70 min.; %= 81.01 %.

MS: m/z = 43, 70, 86, 114, 138, 163, 181, 210.

5.3.13 Síntese do composto (2R,3S,5R)-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)-3-propoxiciclohexanona (14r)



Usou-se o método descrito na referência Leitão *et al.*, 2008.

Todo o procedimento utilizado para esta reação é o mesmo do mencionado na síntese 5.3.9, apenas o solvente foi diferente, nesta reação foram utilizados 4 mL de 1-propanol. A

partir do epóxido da R-(-)-carvona (0.06g; 12 mmol) obteve-se, após coluna cromatográfica, 0.008g (9%) do composto **14r**, um óleo amarelo pálido.

Dados analíticos do (2R,3S,5R)-2-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)-3-propoxiciclohexanona:

Fórmula química: C₁₃H₂₂O₃

Massa molar: 226.16 g/mol

Massa Exata: 226.14 g/mol

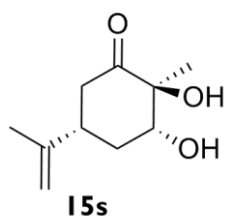
¹H RMN (ppm) (400 MHz, CDCl₃): δ 0.9-0.96 (t, 3H, J= 12Hz); 1.25 (s, 3H); 1.31 (s, 2H), 1.41-1.42 (m, 1H); 1.54-1.59 (m, 4H); 1.76 (s, 3H); 2.28-2.40 (m, 1H); 2.68-2.79 (m, 1H); 2.98 (q, 1H, J=8 Hz, J= 16Hz); 3.39-3.45 (m, 1H); 4.03-4.04 (m, 1H); 4.78-4.80 (m, 1H).

¹³C RMN (ppm) (100 MHz, CDCl₃): δ 10.81, 14.53, 20.36, 23.42, 29.71, 32.72, 39.93, 43.09, 65.20, 75.98, 81.54, 110.23, 147.16.

GC: t_r= 27.83 min.; %= 86.66 %.

MS: m/z= 43, 71, 87, 111, 129, 153, 226.

5.3.14 Síntese do composto (2S,3R,5S)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona (**15s**)



Usou-se o método descrito na referência Leitão *et al.*, 2008.

O procedimento experimental para este composto é o mesmo do utilizado nas secções 5.3.10, 5.3.11 e 5.3.13, uma vez que o mesmo provem dessas reações, sendo o composto secundário isolado a partir da coluna cromatográfica. Quando o solvente utilizado foi o metanol, obteve-se 0.027 g (12%) do composto **15s**, e quando o solvente foi 1-propanol obteve-se 0.037 g (16%). O produto obtido foi um óleo amarelo.

Dados analíticos do (2S,3R,5S)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(prop-1-en-2-il)ciclo-hexanona:

Fórmula química: C₁₀H₁₆O₃

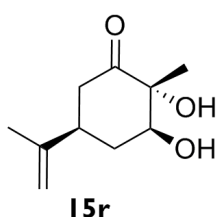
Massa molar: 184.23 g/mol

Massa Exata: 184.11 g/mol

¹H RMN (ppm) (400 MHz, CDCl₃): δ 1.26 (s, 1H); 1.42 (s, 3H); 1.76 (s, 1H); 1.77 (s, 3H); 1.86-1.93 (m, 1H); 2.15-2.21 (m, 1H); 2.49-2.56 (m, 2H); 2.91 (sl, 1H); 4.07-4.08 (m, 1H); 4.79 (s, 1H); 4.83 (s, 1H).

¹³C RMN (ppm) (100 MHz, CDCl₃): δ 20.63, 23.47, 33.08, 40.00, 41.69, 75.91, 78.29, 110.42, 145.49, 213.14.

5.3.15 Síntese do composto (2R,3S,5R)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(*-en-2-il-prop-1*)ciclo-hexanona (15r)



Usou-se o método descrito na referência Leitão *et al.*, 2008.

O procedimento experimental para este composto é o mesmo do utilizado nas secções 5.3.9 e 5.3.12, uma vez que o mesmo provem dessas reações, sendo o composto secundário isolado a partir da coluna cromatográfica. Quando o solvente utilizado foi o metanol, obteve-se 0.022 g (13%) do composto **15r**, e quando o solvente foi 1-propanol obteve-se 0.018 g (8.6%). O produto obtido foi um óleo amarelo forte.

Dados analíticos do composto (2R,3S,5R)-2,3-di-hidroxi-2-metil-5-(*-en-2-il-prop-1*)ciclo-hexanona:

Fórmula química: C₁₀H₁₆O₃

Massa molar: 184.23 g/mol

Massa Exata: 184.11 g/mol

¹H RMN (ppm) (400 MHz, CDCl₃): igual ao isómero **15s**.

¹³C RMN (ppm) (100 MHz, CDCl₃): igual ao isómero **15s**.

GC: t_r = 17.26 min.; %= 94.32 %.

MS: m/z = 43, 56, 68, 87, 109, 125, 141, 166, 184.

Capítulo VI

BIBLIOGRAFIA

AL. NASIRY, S. [et.al] (2007) - The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. "Human Reproduction. Oxford Journals". 22(5) (2007) 1304-1309.

ALBUQUERQUE, U. P. [et.al] (2006) - As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. "Brazilian Journal of Pharmacognosy". 16 (2006) 678-689

BASER, K. H. C. e BUCHBAUER, G, (2009) - Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. "CRC Press" p. 213 (capítulo 8)

BERNAYS E. A. e CHAPMAN R. F. (1994) – Host-Plant Selection by Phytophagous Insects. "Chapman & Hall" New York (1994)

CARVALHO, C. e FONSECA, M., (2006) - Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene, "Food Chemistry". 95(3) (2006) 413-422.

COSTA, A. D. A. (2013) – Avaliação da citotoxicidade de diferentes nanotransportadores sem substância ativa em função da sua densidade populacional. "Dissertação de mestrado"

COSTA, D. A. [et.al] (2012b) - Avaliação do potencial antioxidante in vitro 310 do composto ciano-carvona. "Rev Ciênc Farm Básica Apl". 33(4) (2012b) 567–75

COSTA, D.A. [et.al] (2012a) - Anticonvulsant and antioxidant effects of cyano-carvone and its action on acetylcholinesterase activity in mice hippocampus."Cellular and Molecular Neurobiology". 32(4) (2012a) 633–640.

DE SOUSA, D. P. [et.al] (2010) - Anti-Inflammatory Activity of Hydroxydihydrocarvone. "Zeitschrift Fur Naturforschung Section C-a Journal of Biosciences". 65(9-10) (2010) 543-550.

DIAS, D. A. [et.al] (2012) - A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. "Metabolites". 2 (2) (2012) 303-336

ELIEL, E. L. e WILEN, S. H., (1994) - Stereochemistry of organic compounds. "New York: Wiley Interscience". 1ª edição

FIRN, R. D. e JONES, C. G.,(2009) - A Darwinian view of metabolism: molecular properties determine fitness. "Journal of Experimental Botany". 60(3) (2009) 719-726

GURIB-FAKIM, A., (2006) - Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. "Molecular Aspects of Medicine".. 27 (2006) 1-93

HAREAU, G. P. J [et.al] (1999) – Synthesis of optically active 5-(tert-butyl-dimethylsiloxy)-2-cyclohexenone and its 6-substituted derivatives as useful chiral building blocks for the synthesis of cyclohexane rings. Syntheses of carvone, penienone, and penihidrone. "Journal of the American Chemical Society". 121 (1999) 3640–3650.

HARTMANS, K. J., [et.al] (1995) - The use of carvone in agriculture – sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato-tuber and other plant-diseases." Industrial Crops and Products". 4 (1995) 3–13.

HILL, R. A., (1993) - The chemistry of Natural Products. "Chapman and Hall". Capítulo 3 (1993) 106-139

ISO 10993-5:2009 – Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.

KLINE, R. M. [et.al] (2001) - Enteric-coated, pH-dependent peppermint oil capsules for the treatment of irritable bowel syndrome in children. "The Journal of Pediatrics". 138 (2001) 125–128.

KROLL A., [et.al] (2009) - Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. "Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics" 72 (2009) 370-377.

LAHLOU, M., (2013) - The success of Natural Products in Drug Discovery. "Pharmacology and Pharmacy".. 4 (2001) 17-31

LEITÃO, A. J. L. [et.al] (2008) - Hydrazine sulphate: a cheap and efficient catalyst for the regioselective ring-opening of epoxides. A metal-free procedure for the preparation of β -alkoxy alcohols. "Tetrahedron Letters". 49 (2008) 1694-1697.

LIMA, V., (1997) - Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. “Revista Química Nova”. 20(6) (1997) 657-663

LINDER, S. M., e GREENSPAN, F. P. (1957) - Reactions of limonene monoxide – the synthesis of carvone. “Journal of Organic Chemistry”. 22 (1957) 949–951.

LOZA-TAVERA, H., (1999) - Monoterpenes in essential oils. “Biosynthesis and properties, Advances in Experimental Medicine and Biology”.. 464 (1999) 49-62

MAK, K. K. W. [et.al] (2006) - Regiospecific Epoxidation of Carvone: A Discovery-Oriented Experiment for Understanding the Selectivity and Mechanism of Epoxidation Reactions. “Journal of Chemical Education”. 83(7) (2006) 1058-1061.

MARQUES, T.H. [et.al] (2014) - Cyane-carvone, a synthetic derivative of carvone, inhibits inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress and shows antinociceptive effect in mice. “Inflammation”. 37(3) (2014) 966-77.

MARTINS, F.T. [et.al] (2006) - Variação química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) sob condições de cultivo. “Dissertação de mestrado” (2006)

MAY, B. [et.al] (2000) - Efficacy and tolerability of a fixed combination of peppermint oil and caraway oil in patients suffering from functional dyspepsia. “Alimentary Pharmacology and Therapeutics”. 14 (2000) 1671–1677.

MCGEADY, P. [et.al] (2002) - Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth. “Journal of Natural Products”. 65 (2002) 953–955.

MCMURRAY, J., (2010) - Fundamentals of Organic Chemistry. “Brooks Cole”, 7ª edição (2010)

MICKLEFIELD, G. H., [et.al] (2000) - Effects of peppermint oil and caraway oil on gastroduodenal motility. “Phytotherapy Research” 14 (2000) 20–23.

MITRA, S. e CHOPRA, P., (2011) - Chirality and anaesthetic drugs: A review and an update. “Indian Journal Anaesth”. 55(6) (2011) 556-562

O'NEILL, P. M. [et.al] (1998) - A carbonyl oxide route to antimalarial yingzhaosu A analogues: synthesis and antimalarial activity. "Tetrahedron Letters". 39 (1998) 6065–6068.

ORLANDO, R.M. [ET.AL] (2007) - Importância farmacêutica de fármacos quirais. "Revista eletrónica de farmácia".. 5 (2007) 8-14

PAIVA, A., (2006) - O fenómeno da quiralidade – bases de estereoquímica. "Boletim da Sociedade Portuguesa de Química".. 103 (2006) 56-61.

RAMPERSAD, S. N. (2012) – Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. "Sensors (Basel)". 12(9) (2012) 12347-12360.

RATES, S. M. K., (2001) - Plants as source of drugs. "Toxicon". 39 (2001) 603-613

RISS, T. L. [et.al]. - Assay Guidance Manual.

ROCHA, M. L. [et.al] (2013) - Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice. "Journal Nat Med.". 67(4) (2013) 743-749

ROGERO, S. O. [et.al] (2003) – Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. "Materials Research" 6(3) (2003)

SALGADO, P. R. R., [et.al] (2015) - Comparative Anticonvulsant Study of Epoxycarvone Stereoisomers. "Molecules". 20 (2015) 19660-19673.

SALVADOR, J. A. R. [et.al] (2005) - Hydrazine hydrate induced cleavage of α,β -epoxy ketones: an efficient procedure for the preparation of β -hydroxy ketones. "Tetrahedron Letters" 46 (2005) 1067-1070.