Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Avaliação da atividade antimicrobiana de curcuminoides e estudo de suas reações de fragmentação em fase gasosa por espectrometria de massas sequencial”

Tatiana Manzini Vieira

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2019

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Avaliação da atividade antimicrobiana de curcuminoides e estudo de suas reações de fragmentação em fase gasosa por espectrometria de massas sequencial”

Tatiana Manzini Vieira

Orientador: Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Versão Corrigida

RIBEIRÃO PRETO - SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Vieira, Tatiana Manzini

Avaliação da atividade antimicrobiana de curcuminoides e estudo de suas reações de fragmentação em fase gasosa por espectrometria de massas sequencial. Ribeirão Preto, 2019.

256 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Crotti. Antônio Eduardo Miller.

1. curcuminoides monocetônicos. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Química de íons em fase gasosa.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota. ”

Theodore Roosevelt

Dedicatória

Ao meu pai Aloísio e à minha mãe Márcia: por todo apoio, paciência e carinho; por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos, tanto nos bons como nos ruins, além de me aconselharem e de me orientarem a sempre seguir o caminho correto; por serem as pessoas em que tento espelhar todos os dias; por nunca terem desistido dos meus sonhos; por compartilharem comigo angústias, alegria e, principalmente, amor! A vocês dois todo o meu amor, carinho e saudade – saudade esta que agora me acompanha todos os dias por estarem vivendo em outra cidade;

Ao meu noivo, Hebert, que sempre esteve ao meu lado, fazendo com que eu nunca desistisse do meu sonho, tendo paciência e dedicando sempre muito amor, carinho e companheirismo. Uma pessoa por quem sinto orgulho e admiração pela força de vontade de vencer na vida e por não desistir jamais. Obrigado por ser aquele com quem quero viver o resto dos meus dias. Foi graças a você, que sempre me motivou, que consegui chegar até aqui;

À minha Vó Cecília, que nunca deixou de acreditar em mim, mesmo nos momentos em que eu deixei de acreditar;

Aos meus amigos e familiares, que de alguma forma estiveram presentes nesses dois anos, por mais difíceis que tenham sido, por todo carinho, amor e, principalmente, por sempre me motivarem.

Agradecimentos

A Deus, por ouvir-me em todas as minhas orações e por dar-me saúde para enfrentar os obstáculos que surgiram nos últimos dois anos, por mais difíceis que tenham sido;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti, por toda a paciência e preocupação com minha formação. Agradeço por todos os seus conselhos, tanto no âmbito profissional como no pessoal, bem como pela confiança e pelo incentivo durante esses 3 anos de trabalho. Obrigado por ser meu “pai científico”, que me ajudou a ser forte e a reerguer-me nos dias em que me sentia derrotada. Hoje entendo que suas broncas e seu posicionamento severo, mesmo à distância, na etapa final deste trabalho, foram indispensáveis para o meu amadurecimento e para a conclusão deste trabalho. Agradeço a Deus todos os dias pela oportunidade de ter ido estudar em Portugal, pois graças a isso tive que fazer disciplinas com o bacharelado, onde acabei sendo sua aluna de Química Orgânica e me interessando pelo seu trabalho. Só tenho uma palavra para expressar meu sentimento: GRATIDÃO! Obrigada por tudo Miller, obrigada por ter sido o pilar mais importante de minha vida acadêmica neste período!

Ao meu grande e eterno amigo/irmão, Dr. Herbert Júnior Dias, que me ajudou a todo instante, desde o meu primeiro dia no laboratório, como estagiária de iniciação científica. Obrigada “Heberto”, por toda amizade e companheirismo nesses anos de trabalho juntos! Mais que um amigo, você tornou-se meu irmãozinho de coração, por quem sinto imenso orgulho e admiração. Espero que um dia eu consiga ser a pessoa amorosa e carinhosa que você é, sempre adepto a ajudar as pessoas, independente do que isto te custe. Você tem um coração enorme e eu gostaria de tê-lo sempre ao meu lado, tenha certeza disso, meu grande amigo!

Ao Me. Wesley Romário Silva, pela capacidade de motivar-me a continuar caminhando quando a estrada me parecia muito íngreme. Você se tornou um grande amigo, “Wesleco”, e gostaria muito de me espelhar nessa grande pessoa que você é. Obrigada por todos esses anos de amizade!

Ao Dr. Daniel Previdi, por não ser apenas amigo, mas também “consultor” durante as longas horas de trabalho no laboratório. Agradeço-lhe pelos ensinamentos, tanto na parte experimental quanto na parte conceitual de Química Orgânica;

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e seus alunos, pelo grande empenho na realização dos ensaios antimicrobianos e pela atenção dedicada nos momentos de dúvida;

Ao Prof. Dr. Renato Luís Tame Parreira e aos seus alunos, pelo empenho e disponibilidade na realização dos cálculos computacionais deste trabalho. Obrigado por toda a prestatividade, pelas explicações quando tive dúvidas e pela grande receptividade no dia em que fui conhecê-los.

À Prof. Dra. Lizandra Guidi Magalhães (Universidade de Franca) e aos seus alunos, pelo empenho nos experimentos biológicos, ainda em andamento, pela amizade e parceria;

Ao Dr. Eduardo José Crevelin, pelo empenho em ajudar-me e me ensinar durante os experimentos na espectrometria de massas, sempre com paciência e muita alegria! Pelas risadas e conselhos enquanto estávamos congelando fazendo os experimentos, e que você tenha a paciência para me aguentar nos próximos quatro anos de doutorado. Obrigada, por tudo!

Ao José Carlos Tomaz, pelo empenho na aquisição dos dados de alta resolução, além do carinho e receptividade todas as vezes que o procurei;

Ao Prof. Dr. Paulo Marcos Donate, por todos os ensinamentos sobre Síntese Orgânica e pela oportunidade de realizar minha iniciação científica com bolsa;

Ao Me. Vinícius Palaretti, pela amizade e, principalmente, prestatividade e cuidado com os experimentos de ressonância magnética nuclear. Obrigado por ser sempre acessível e disposto a ajudar-me sempre que precisei;

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, primeiramente por aceitar orientar-me durante o estágio sabático do prof. Miller, e por todos os ensinamentos e conselhos durante meu exame de qualificação;

Ao Prof. Dr. Ricardo Vessecchi, por todo o ensinamento de Química Computacional e pela prestatividade quando o procurei;

À minha grande amiga e irmã, Thaís Oliveira (Jade), por todos esses anos de amizade e companheirismo, não só durante o mestrado como também durante os 5 anos de graduação. Obrigada por ser o ponto de escape e o ouvido de que às vezes tanto preciso, e por ser uma pessoa na qual me inspiro todos os dias, pela sua força de vontade e foco. Obrigada, minha amiga maravilhosa!

Aos alunos de iniciação científica e de pós-graduação e agregados que passaram pelo Laboratório de Síntese Orgânica, Matheus (Raje), Guilherme (Gaúcho), Kimie, Alexandre, Stephanie, Mike, Matheus (Loiro), Henrique (Farmacêutico), Eliane, Talita, Carlismari, Miqueias, Isabela, Lívia, Ana Carla, Julia, Natalia, Giovane, Shirley, Norberto (Norba), Mayla, Douglas, Jader. A vocês agradeço pelos dias que passamos juntos, pela horas e horas sofridas de calor intermitente dentro do laboratório, por todo o conhecimento compartilhado, pelas risadas que tornavam nossos dias menos árduos e, principalmente, pela amizade, que levarei comigo para sempre;

Aos meus grandes amigos Camila, Thaís, Otavio e Eduardo, que estiveram comigo e me acompanham em todos os momentos, sempre me aconselhando. Vocês são pessoas maravilhosas, das quais tenho um orgulho gigante. Muito obrigada por toda a amizade!

Aos funcionários do Departamento de Química, pela dedicação em seu trabalho. Meu grande agradecimento, em especial aos técnicos Vinicius Banhos, Tiago Cavalini, Celso, Geraldo, ao pessoal da secretaria (Fernando, Lâmia e André), pela prestatividade e eficiência em todos os momentos em que mais precisamos deles, principalmente no laboratório. E um agradecimento especial à Camila, pela prestatividade, pela limpeza e por todo o carinho com o nosso laboratório e com todos que lá trabalham;

A todos os familiares, que de alguma forma estiveram presentes, principalmente pelo incentivo nesse período;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. Fapesp 2016/19272-9), pela concessão da bolsa, sem a qual este trabalho não teria sido possível.

Sumário

Lista de Figuras	13
Lista de Tabelas	15
Lista de Esquemas	17
Lista de Anexos	19
Lista de Abreviaturas	25
1. Introdução.....	27
1.1. A Cárie.....	28
1.2. Curcuminoides	30
1.3. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray	33
1.4. Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS)	34
1.5. Aplicações da ESI-MS/MS no estudo de curcuminoides monocetônicos	36
2. Objetivos	39
3. Materiais e Métodos.....	42
3.1. Reagentes, solventes, métodos e equipamentos.....	43
3.2. Síntese dos curcuminoides monocetônicos	45
3.2.1. Síntese dos curcuminoides monocetônicos 1-11	45
3.2.2. Síntese dos curcuminoides 12-31	48
3.3. Elucidação estrutural	49
3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> contra bactérias cariogênicas	49
3.4.1. Micro-organismos utilizados.....	49
3.5. Preparo das soluções, meios de cultura e inóculos	50
3.6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo.....	51
3.7. Estudos das vias de fragmentação de curcuminoides por ESI-MS/MS.....	53
3.8. Métodos computacionais.....	54
4. Resultados e Discussão	55
4.1. Sobre a síntese dos compostos 1-31 e elucidação estrutural.....	56
4.2. Elucidação estrutural.....	59
4.2.1. Elucidação estrutural dos compostos 1-11.....	59
4.2.2. Elucidação estrutural dos compostos 12-21.....	66
4.2.3. Elucidação estrutural dos compostos 22-31.....	71
4.3. Atividade antibacteriana.....	78
4.4. Estudo de fragmentação de curcuminoides monocetônicos protonados.....	82

4.4.1. Correlação estrutura-fragmentação	82
4.4.2. Sítio de protonação.....	93
4.4.3. Íons fragmentos gerais.....	95
4.4.4. Formação dos íons diagnósticos.....	102
5. Conclusões	110
6. Referências	113
7. Anexos	123

Resumo

Neste trabalho, uma série de curcuminoides monocetônicos foram sintetizados por meio da condensação entre acetona e 11 diferentes aldeídos aromáticos. Esses curcuminoides foram posteriormente convertidos em seus álcoois e cetonas saturados correspondentes por meio de reações de hidrogenação catalítica. Os compostos obtidos foram avaliados quanto às suas atividades antimicrobianas frente a um painel representativo de bactérias cariogênicas empregando o método de microdiluição em microplacas. Além disso, as vias de fragmentação em fase gasosa dos curcuminoides monocetônicos protonados foram investigadas por espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) em combinação com dados de massas acuradas, dados de experimentos de espectrometria de massas de estágios múltiplos (MS^n) e de troca de deutério, bem como em dados termoquímicos estimados por Química Computacional. Dentre os 31 curcuminoides avaliados, a curcumina A (**10**), 1*E*,4*E*)-1,5-*bis*(4-hidroxifenil)penta-1,4-dien-3-ona, e o (1*E*,4*E*)-1,5-*bis*(4-hidroxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (**11**), apresentaram a atividade antimicrobiana mais efetiva, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 50 µg/mL contra *Streptococcus mutans* e de 50 µg/mL contra *Streptococcus mitis*. Os valores de CIM obtidos foram menores que os valores de CIM previamente relatados para a curcumina, que é o análogo β-dicetônico do composto **10**. As relações estrutura-atividade inferidas sugerem que o grupo hidroxila ligado aos anéis aromáticos e a ligação dupla entre C2-C3 e C2'-C3' e o grupo carbonila e C1 são as características responsáveis pela atividade antimicrobiana. Os resultados mostraram que o íon **H** e o íon acílio **D**, resultantes de dois rearranjos de hidrogênio competitivos, são os mais intensos no espectro de íons produtos dos curcuminoides protonados. Além da identificação de alguns íons diagnósticos, este trabalho comprovou que a formação de alguns íons produtos ocorreu a partir de um íon intermediário resultante de uma ciclização de Nazarov da molécula protonada, cuja ocorrência foi reportada previamente na literatura. Os dados termoquímicos suportaram as estruturas dos íons propostos e mostraram que a posição da hidroxila fenólica no anel aromático desempenha um papel fundamental sobre a ciclização de Nazarov. Os resultados deste trabalho poderão contribuir futuramente na identificação dos produtos resultante do metabolismo dos estudos *in vitro* e *in vivo* sem a necessidade de padrões ou isolamento desses metabolitos.

Palavras chave: curcuminoides monocetônicos, atividade antimicrobiana, fragmentação, química em fase gasosa.

Abstract

In this work, a series of monoketone curcuminoids were synthesized by condensation between acetone, and 11 (eleven) different aromatic aldehydes. These curcuminoids were subsequently converted to their corresponding saturated alcohols and ketones by means of catalytic hydrogenation reactions. The obtained compounds were evaluated for their antimicrobial activities against a representative panel of cariogenic bacteria using microdilution plating method. In addition, the gas-phase fragmentation pathways of the protonated monoketone curcuminoids were investigated by ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) in combination with accurate mass data, multi-stage mass spectrometry (MSⁿ), and deuterium exchange experiments, as well as in thermochemical data estimated by Computational Chemistry. Among the 31 curcuminoids evaluated, curcumin A (**10**), (1*E*,4*E*)-1,5-*bis*(4-hydroxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one, and (1*E*,4*E*)-5-*bis*(4-hydroxyphenyl)penta-1,4-dien-3-one (**11**) showed the most effective antimicrobial activity, with minimum inhibitory concentration (MIC) values of 50 µg/mL against *Streptococcus mutans* and 50 µg/mL against *Streptococcus mitis*. MIC values of curcumin A (**10**) were lower than the previously reported MIC values for its β-diketone analog of compound **10**. The inferred structure-activity relationships indicated that the hydroxyl group attached to the aromatic rings and the double bond between C2-C3 and C2'-C3' and the carbonyl group and C1 are the characteristics responsible for the antimicrobial activity. The results showed that the ion **H** and the acylium ion **D**, resulting from two competitive hydrogen rearrangements, are the most intense in the spectrum of proton curcuminoids product ions. Besides the identification of some diagnostic ions, this work proved that the formation of some product ions occurred from an intermediate ion resulting from a Nazarov cyclization of the protonated molecule, whose occurrence has been previously reported in the literature. The thermochemical data supported the structures of the proposed ions and showed that the position of the phenolic hydroxyl in the aromatic ring plays a key role in the Nazarov cyclization. The results of this work may contribute in future to the identification of products from the *in vitro* and *in vivo* metabolism studies without the need for standards or isolation of these metabolites.

Keywords: monoketone curcuminoids, antimicrobial activity, fragmentation, gas-phase chemistry.

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas químicas do gluconato de clorexidina (I), cloreto de cetilpiridínio (II), triclosan (III), mentol (IV), eucaliptol (V) e salicilato de metilo (VI).	30
Figura 2. Estruturas químicas da curcumina (VII), demetoxicurcumina (VIII) e bis-demetoxicurcumina (IX).	31
Figura 3. Estrutura básica de curcuminoides monocetônicos (X), 4-hydroximetilênicos (XI) e 4-arilidênicos (XII).	32
Figura 4. Esquema geral de uma fonte de ionização por eletrospray em um espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ) operando no modo varredura de íons produtos (do inglês <i>product ion scan mode</i>), baseado na referência [64].	34
Figura 5. Estrutura dos compostos utilizados por Cyriac e colaboradores em seu trabalho [84].	37
Figura 6. Estrutura dos aldeídos aromáticos utilizados na síntese dos curcuminoides monocetônicos.	46
Figura 7. Esquema do preparo da amostra e do inóculo para o teste da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) [101].	52
Figura 8. Reação de redução da resazurina à resofurina.	52
Figura 9. Numeração das posições do esqueleto básico dos curcuminoides monocetônicos descritos neste trabalho.	59
Figura 10. Expansões dos sinais dos hidrogênios H2a e H2b (a) e H3a e H3b (b) do composto 22 , com os respectivos diagramas de chaves e constantes de acoplamento.	73
Figura 11. Expansões dos sinais do hidrogênio H1 do composto 22 , com os respectivos diagramas de chaves e constantes de acoplamento.	74
Figura 12. Estrutura dos curcuminoides 1-31	80
Figura 13. Gráficos da intensidade relativa (%) dos principais íons produtos dos curcuminoides monocetônicos 1-11 protonados em função energia de colisão (E_{lab} , em eV).	84
Figura 14. Espectro de íons produtos dos curcuminoides monocetônicos 1-11 protonados (gás de colisão Ar, E_{lab} = 20 eV).	86

Figura 15. Afinidade protônica (PA) para os curcuminoides monocetônicos **1-11**. Os valores de PA foram calculados em nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Todos os valores de PA estão em kcal/mol. 95

Lista de Tabelas

Tabela 1. Protocolo experimental utilizado para a obtenção dos compostos 1-11	47
Tabela 2. Micro-organismos Gram-positivos avaliados, morfotipos e cultura utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.	50
Tabela 3. Características e rendimentos dos curcuminoides monocetônicos 1-31	57
Tabela 4. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) do composto 1 e comparação os da literatura (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl_3 [99].....	60
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos 2-6 , em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, e os J estão expressos em Hz.....	63
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos 7-11 , em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, e os J estão expressos em Hz.....	65
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) do composto 12 e comparação a literatura (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl_3 [110].....	68
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos 13-17 , em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, e os J estão expressos em Hz.....	69
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos 18-21 , em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm e os J estão expressos em Hz.....	70
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) do composto 22 e comparação com o composto 1 (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), em CDCl_3	75
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos 23-27 , em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm e os J estão expressos em Hz.....	76
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos 28-31 , em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm e os J estão expressos em Hz.....	77
Tabela 13. Valores da concentração inibitória mínima (CIM), em $\mu\text{g/mL}$, dos curcuminoides monocetônicos frente ao painel representativo de bactérias cariogênicas avaliadas.....	79
Tabela 14. Íons produtos dos curcuminoides monocetônicos 1-11 em energia de colisão (E_{lab}) de 20 eV. As intensidades relativas (%) estão demonstradas entre parênteses. Abaixo das razões m/z, em <i>itálico</i> , estão demonstrados os dados dos experimentos de troca por deutério.	87

Tabela 15. Íons produtos mais significativos (intensidade relativa maior que 5 %) curcuminoides monocetônicos **1-11** protonados, na energia de colisão $E_{\text{lab}}=30$ eV. As intensidades relativas (%) estão demonstradas entre parênteses..... 90

Lista de Esquemas

Esquema 1. Etapas da elucidação das vias de fragmentação em fase gasosa utilizando espectrometria de massas e dados termoquímicos estimados por Química Computacional.	36
Esquema 2. Ciclização de Nazarov em fase gasosa envolvendo o curcuminóide monocetônico XIII e subseqüentes eliminações de ceteno e anisol [84].....	38
Esquema 3. Formação do intermediário comum para os compostos XIII e XIV [84].	38
Esquema 4. Preparação dos curcuminóides monocetônicos 1-11	46
Esquema 5. Preparação dos curcuminóides 12-31	49
Esquema 6. Proposta para o mecanismo de formação dos curcuminóides monocetônicos por meio de uma condensação aldólica cruzada, adaptado de Hambecker e colaboradores [46].	57
Esquema 7. Formas de ressonância de uma carbonila α,β - insaturada representando a desproteção da posição β	61
Esquema 8. Possíveis confôrmeros envolvidos na formação da ligação dupla pelo mecanismo E1cb.	62
Esquema 9. Efeito de desblindagem de H3 devido à hiperconjugação.	67
Esquema 10. Correlações estrutura-fragmentação para os curcuminóides monocetônicos protonados 1-11 . As correlações acima foram suportadas por experimentos de MS ³ e MS ⁴ (Anexo A145-A155).	89
Esquema 11. Formação dos íons produto D, G e H dos Curcuminóides monocetônicos protonados de 1-11 . Os valores das Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.	97
Esquema 12. Formação dos íons produto B, C, E e F dos CMs protonados de 1-9 . Os valores das Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.	99
Esquema 13. Diferença na posição da hidroxila no anel dos composto XVII [84] e compostos 10 e 11	100
Esquema 14. Proposta para a formação dos íons produtos B, C, E e F para os compostos 10 e 11	102
Esquema 15. Formação dos íons produto P, S, T, U e V dos Curcuminóides monocetônicos protonados 5, 7 e 9 e suas respectivas Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.	104
Esquema 16. Formação dos íons produto Q e R do composto 3 protonado e suas respectivas Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.	105
Esquema 17. Formação dos íons diagnósticos J, L, O, K e I dos Curcuminóides monocetônicos protonados de 1-9 . Os valores das Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.	106

Esquema 18. Formação dos íons diagnósticos M e N dos curcuminoides monocetônicos protonados. Os valores das Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.....	107
Esquema 19. Formação dos íons produtos diagnósticos W para o composto 10 e Z para os compostos 10 e 11	108
Esquema 20. Formação do íon diagnóstico Y para o composto 10	108
Esquema 21. Formação do íon diagnóstico X dos curcuminoides monocetônicos protonados 1 , 2 e 3 . Os valores das Entalpias e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.....	109

Lista de Anexos

Figura A1. Espectro de massas do composto 1 (EI, 70eV). -----	125
Figura A2. Espectro de absorção no infravermelho do composto 1 (em pastilha de KBr).-----	125
Figura A3. Espectro de RMN de ^1H do composto 1 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	126
Figura A4. Espectro de DEPT 135 do composto 1 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	127
Figura A5. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	128
Figura A6. Espectro de massas do composto 2 (EI-MS). -----	129
Figura A7. Espectro de absorção no infravermelho do composto 2 (em pastilha de KBr).-----	129
Figura A8. Espectro de RMN de ^1H do composto 2 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	130
Figura A9. Espectro de DEPT 135 do composto 2 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	131
Figura A10. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2 (CDCl_3 , 100 MHz). -----	132
Figura A11. Espectro de massas do composto 3 (EI-MS). -----	133
Figura A12. Espectro de absorção no infravermelho do composto 3 (em pastilha de KBr). -----	133
Figura A13. Espectro de RMN de ^1H do composto 3 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	134
Figura A14. Espectro de DEPT 135 do composto 3 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	135
Figura A15. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 3 (CDCl_3 , 100 MHz). -----	136
Figura A16. Espectro de massas do composto 4 (EI-MS). -----	137
Figura A17. Espectro de absorção no infravermelho do composto 4 (em pastilha de KBr). -----	137
Figura A18. Espectro de RMN de ^1H do composto 4 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	138
Figura A19. Espectro de DEPT 135 do composto 4 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	139
Figura A20. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4 (CDCl_3 , 100 MHz). -----	140
Figura A21. Espectro de massas do composto 5 (EI-MS). -----	141
Figura A22. Espectro de absorção no infravermelho do composto 5 (em pastilha de KBr). -----	141
Figura A23. Espectro de RMN de ^1H do composto 5 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	142
Figura A24. Espectro de DEPT 135 do composto 5 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	143
Figura A25. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5 (CDCl_3 , 100 MHz). -----	144
Figura A26. Espectro de absorção no infravermelho do composto 6 (em pastilha de KBr). -----	145
Figura A27. Espectro de RMN de ^1H do composto 6 (CDCl_3 , 400 MHz,). -----	146

Figura A28. Espectro de DEPT 135 do composto 6 (CDCl ₃ , 400 MHz).	147
Figura A29. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 6 (CDCl ₃ , 100 MHz).	148
Figura A30. Espectro de massas do composto 7 (EI-MS).	149
Figura A31. Espectro de absorção no infravermelho do composto 7 (em pastilha de KBr).	149
Figura A32. Espectro de RMN de ¹ H do composto 7 (CDCl ₃ , 400 MHz).	150
Figura A33. Espectro de DEPT 135 do composto 7 (CDCl ₃ , 400 MHz).	151
Figura A34. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 7 (CDCl ₃ , 100 MHz).	152
Figura A35. Espectro de absorção no infravermelho do composto 8 (em pastilha de KBr).	153
Figura A36. Espectro de RMN de ¹ H do composto 8 (CDCl ₃ , 400 MHz).	154
Figura A37. Espectro de DEPT 135 do composto 8 (CDCl ₃ , 400 MHz).	155
Figura A38. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 8 (CDCl ₃ , 100 MHz).	156
Figura A39. Espectro de massas do composto 9 (EI-MS).	157
Figura A40. Espectro de absorção no infravermelho do composto 9 (em pastilha de KBr).	157
Figura A41. Espectro de RMN de ¹ H do composto 9 (CDCl ₃ , 400 MHz).	158
Figura A42. Espectro de DEPT 135 do composto 9 (CDCl ₃ , 400 MHz).	159
Figura A43. Espectro de RMN ¹³ C do composto 9 (CDCl ₃ , 100 MHz).	160
Figura A44. Espectro de absorção no infravermelho do composto 10 (em pastilha de KBr).	161
Figura A45. Espectro de RMN de ¹ H do composto 10 (CDCl ₃ , 400 MHz).	162
Figura A46. Espectro de DEPT 135 do composto 10 (CDCl ₃ , 400 MHz).	163
Figura A47. Espectro de RMN ¹³ C do composto 10 (CDCl ₃ , 100 MHz).	164
Figura A48. Espectro de absorção no infravermelho do composto 11 (em pastilha de KBr).	165
Figura A49. Espectro de RMN de ¹ H do composto 11 (acetona-d ₆ , 400 MHz).	166
Figura A50. Espectro de DEPT 135 do composto 11 (acetona-d ₆ , 400 MHz).	167
Figura A51. Espectro de RMN ¹³ C do composto 11 (acetona-d ₆ , 100 MHz).	168
Figura A52. Espectro de massas do composto 12 (EI-MS).	169
Figura A53. Espectro de absorção no infravermelho do composto 12 (em pastilha de KBr).	169
Figura A54. Espectro de RMN de ¹ H do composto 12 (CDCl ₃ , 400 MHz).	170
Figura A55. Espectro de DEPT 135 do composto 12 (CDCl ₃ , 400 MHz).	171
Figura A56. Espectro de RMN ¹³ C do composto 12 (CDCl ₃ , 100 MHz).	172

Figura A57. Espectro de massas do composto 13 (EI-MS).-----	173
Figura A58. Espectro de absorção no infravermelho do composto 13 (em pastilha de KBr).-----	173
Figura A59. Espectro de RMN de ^1H do composto 13 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	174
Figura A60. Espectro de DEPT 135 do composto 13 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	175
Figura A61. Espectro de RMN ^{13}C do composto 13 (CDCl_3 , 100 MHz). -----	176
Figura A62. Espectro de massas do composto 14 (EI-MS).-----	177
Figura A63. Espectro de absorção no infravermelho do composto 14 (em pastilha de KBr).-----	177
Figura A64. Espectro de RMN de ^1H do composto 14 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	178
Figura A65. Espectro de DEPT 135 do composto 14 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	179
Figura A66. Espectro de RMN ^{13}C do composto 14 (CDCl_3 , 100 MHz). -----	180
Figura A67. Espectro de massas do composto 15 (EI-MS).-----	181
Figura A68. Espectro de absorção no infravermelho do composto 15 (em pastilha de KBr).-----	181
Figura A69. Espectro de RMN de ^1H do composto 15 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	182
Figura A70. Espectro de DEPT 135 do composto 15 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	183
Figura A71. Espectro de RMN ^{13}C do composto 15 (CDCl_3 , 100 MHz). -----	184
Figura A72. Espectro de absorção no infravermelho do composto 16 (em pastilha de KBr).-----	185
Figura A73. Espectro de RMN de ^1H do composto 16 (CDCl_3 , 400 MHz) -----	186
Figura A74. Espectro de DEPT 135 do composto 16 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	187
Figura A75. Espectro de RMN ^{13}C do composto 16 (CDCl_3 , 100 MHz). -----	188
Figura A76. Espectro de massas do composto 17 (EI-MS).-----	189
Figura A77. Espectro de absorção no infravermelho do composto 17 (em pastilha de KBr).-----	189
Figura A78. Espectro de RMN de ^1H do composto 17 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	190
Figura A79. Espectro de DEPT 135 do composto 17 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	191
Figura A80. Espectro de RMN ^{13}C do composto 17 (CDCl_3 , 100 MHz). -----	192
Figura A81. Espectro de massas do composto 18 (EI-MS).-----	193
Figura A82. Espectro de absorção no infravermelho do composto 18 (em pastilha de KBr).-----	193
Figura A83. Espectro de RMN de ^1H do composto 18 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	194
Figura A84. Espectro de DEPT 135 do composto 18 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	195
Figura A85. Espectro de RMN ^{13}C do composto 18 (CDCl_3 , 100 MHz). -----	196

Figura A86. Espectro de absorção no infravermelho do composto 19 (em pastilha de KBr).-----	197
Figura A87. Espectro de RMN de ^1H do composto 19 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	198
Figura A88. Espectro de DEPT 135 do composto 19 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	199
Figura A89. Espectro de RMN ^{13}C do composto 19 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	200
Figura A90. Espectro de massas do composto 20 (EI-MS). -----	201
Figura A91. Espectro de absorção no infravermelho do composto 20 (em pastilha de KBr).-----	201
Figura A92. Espectro de RMN de ^1H do composto 20 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	202
Figura A93. Espectro de DEPT 135 do composto 20 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	203
Figura A94. Espectro de RMN ^{13}C do composto 20 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	204
Figura A95. Espectro de absorção no infravermelho do composto 21 (em pastilha de KBr).-----	205
Figura A96. Espectro de RMN de ^1H do composto 21 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	206
Figura A97. Espectro de DEPT 135 do composto 21 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	207
Figura A98. Espectro de RMN ^{13}C do composto 21 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	208
Figura A99. Espectro de massas do composto 22 (EI-MS). -----	209
Figura A100. Espectro de absorção no infravermelho do composto 22 (em pastilha de KBr). -----	209
Figura A101. Espectro de RMN de ^1H do composto 22 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	210
Figura A102. Espectro de DEPT 135 do composto 22 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	211
Figura A103. Espectro de RMN ^{13}C do composto 22 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	212
Figura A104. Espectro de absorção no infravermelho do composto 23 (em pastilha de KBr). -----	213
Figura A105. Espectro de RMN de ^1H do composto 23 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	214
Figura A106. Espectro de DEPT 135 do composto 23 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	215
Figura A107. Espectro de RMN ^{13}C do composto 23 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	216
Figura A108. Espectro de massas do composto 24 (EI-MS). -----	217
Figura A109. Espectro de absorção no infravermelho do composto 24 (em pastilha de KBr). -----	217
Figura A110. Espectro de RMN de ^1H do composto 24 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	218
Figura A111. Espectro de DEPT 135 do composto 24 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	219
Figura A112. Espectro de RMN ^{13}C do composto 24 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	220
Figura A113. Espectro de massas do composto 25 (EI-MS). -----	221
Figura A114. Espectro de absorção no infravermelho do composto 25 (em pastilha de KBr).-----	221

Figura A115. Espectro de RMN de ^1H do composto 25 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	222
Figura A116. Espectro de DEPT 135 do composto 25 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	223
Figura A117. Espectro de RMN ^{13}C do composto 25 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	224
Figura A118. Espectro de massas do composto 26 (EI-MS). -----	225
Figura A119. Espectro de absorção no infravermelho do composto 26 (em pastilha de KBr).-----	225
Figura A120. Espectro de RMN de ^1H do composto 26 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	226
Figura A121. Espectro de DEPT 135 do composto 26 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	227
Figura A122. Espectro de RMN ^{13}C do composto 26 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	228
Figura A123. Espectro de massas do composto 27 (EI-MS). -----	229
Figura A124. Espectro de absorção no infravermelho do composto 27 (em pastilha de KBr). -----	229
Figura A125. Espectro de RMN de ^1H do composto 27 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	230
Figura A126. Espectro de DEPT 135 do composto 27 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	231
Figura A127. Espectro de RMN ^{13}C do composto 27 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	232
Figura A128. Espectro de absorção no infravermelho do composto 28 (em pastilha de KBr). -----	233
Figura A129. Espectro de RMN de ^1H do composto 28 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	234
Figura A130. Espectro de DEPT 135 do composto 28 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	235
Figura A131. Espectro de RMN ^{13}C do composto 28 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	236
Figura A132. Espectro de absorção no infravermelho do composto 29 (em pastilha de KBr). -----	237
Figura A133. Espectro de RMN de ^1H do composto 29 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	238
Figura A134. Espectro de DEPT 135 do composto 29 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	239
Figura A135. Espectro de RMN ^{13}C do composto 29 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	240
Figura A136. Espectro de massas do composto 30 (EI-MS). -----	241
Figura A 137. Espectro de absorção no infravermelho do composto 30 (em pastilha de KBr).-----	241
Figura A138. Espectro de RMN de ^1H do composto 30 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	242
Figura A139. Espectro de DEPT 135 do composto 30 (CDCl_3 , 400 MHz). -----	243
Figura A140. Espectro de RMN ^{13}C do composto 30 (CDCl_3 , 100 MHz).-----	244
Figura A141. Espectro de absorção no infravermelho do composto 31 (em pastilha de KBr).-----	245
Figura A142. Espectro de RMN de ^1H do composto 31 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	246
Figura A143. Espectro de DEPT 135 do composto 31 (CDCl_3 , 400 MHz).-----	247

Figura A144. Espectro de RMN ^{13}C do composto 31 (CDCl_3 , 100 MHz).	248
Figura A145. Espectro de ESI- MS^n do composto 1 .	249
Figura A146. Espectro de ESI- MS^n do composto 2 .	249
Figura A147. Espectro de ESI- MS^n do composto 3 .	250
Figura A148. Espectro de ESI- MS^n do composto 4 .	251
Figura A149. Espectro de ESI- MS^n do composto 5 .	252
Figura A150. Espectro de ESI- MS^n do composto 6 .	253
Figura A151. Espectro de ESI- MS^n do composto 7 .	253
Figura A152. Espectro de ESI- MS^n do composto 8 .	254
Figura A153. Espectro de ESI- MS^n do composto 9 .	254
Figura A154. Espectro de ESI- MS^n do composto 10 .	254
Figura A155. Espectro de ESI- MS^n do composto 11 .	254

Lista de Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etila
Hex	Hexano
EtOH	Etanol
DMSO	Dimetilsulfóxido
CCC	Cromatografia em coluna clássica
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CEM	<i>Chain ejection model</i> , modelo de ejeção do íon
CID	<i>Collision induced dissociation</i> , dissociação induzida por colisão
CRM	<i>Charge residual model</i> , modelo da carga residual
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (do inglês <i>gas chromatography flame ionization detection</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
dddd	Duplo duplo duplo dupleto
dt	Duplo tripleto
m	Multiplete
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
E_{lab}	Energia de colisão (eV)
ESI	Eletrospray (do inglês <i>electrospray ionization</i>)
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (do inglês <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>)
ESI-MS/MS	Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (do inglês <i>electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>)
ESI-MSⁿ	Espectrometria de massas de múltiplos estágios com ionização por eletrospray (do inglês <i>electrospray ionization multiple stage mass spectrometry</i>)
ESI-TOF	Ionização por eletrospray acoplada a analisador do tipo tempo de voo
GA	Acidez em fase gasosa
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPLC-ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry</i>)

HPLC-ESI-MS/MS	Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>)
UV/vis	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta/visível
δ	Deslocamento químico (ppm)
ΔG	Variação da energia de Gibbs
ΔH	Variação da entalpia
TSB	Caldo triptona soja (do inglês <i>tryptic soy broth</i>)
UFC	Unidades formadoras de colônia
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>

1. Introdução

1.1. A Cárie

A saúde bucal tem um reflexo importante na saúde e na qualidade de vida de um indivíduo. De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer, em 2013 o câncer bucal foi a terceira doença que mais matou entre os homens e a sétima entre as mulheres, sendo responsável por aproximadamente 5500 mortes naquele ano [1]. Embora esta doença possa ser diagnosticada precocemente pelo dentista, dados da literatura mostraram que apenas 44,4% da população brasileira têm procurado assistência odontológica, sendo que na maioria dos casos esta procura deve-se à perda dos dentes [2]. No Brasil, 40% das crianças na faixa de 0 a 5 anos de idade e 53% das crianças com 12 anos têm cárie. Além disso, 11% das pessoas com 18 anos ou mais de idade já perderam todos os dentes (aproximadamente 16 milhões de pessoas), mesmo com a fluoretação da água [2,3].

Biologicamente, a cárie é uma doença infecciosa e transmissível que acomete 69% da população brasileira [4] e 75% da população mundial [5,6]. Esta patologia caracteriza-se por uma desintegração molecular progressiva e localizada da estrutura dental, que resulta do acúmulo de certas bactérias acidogênicas e acidúricas residentes na cavidade bucal [7–9]. Na presença de glicoproteínas salivares e, principalmente, de matrizes ricas em polissacarídeos, algumas destas bactérias podem formar colônias que se aderem firmemente às superfícies bucais, formando uma camada chamada de biofilme [10], cujo acúmulo é considerado um fator crítico para o desenvolvimento da cárie [11]. Dentre as bactérias formadoras de colônias presentes na microbiota bucal, destaca-se *Streptococcus mutans*, que após sua adesão produz substâncias que favorecem a adesão e o acúmulo de outros microrganismos, formando uma matriz extracelular resistente. Este mecanismo de adesão é conhecido como co-agregação [9,12]. Dados atuais da literatura relatam ainda que numerosas outras bactérias orais, principalmente aquelas que são produtoras de ácido, trabalham em conjunto com *Streptococcus mutans* na formação de biofilmes, como por exemplo, *Lactobacillus acidophilus*, que tem sido comumente encontrado em grande número na superfície dental [13]. Além da cárie, as bactérias cariogênicas podem desencadear outras doenças de maior gravidade, como o câncer bucal, já mencionado anteriormente [14].

O desenvolvimento da cárie depende de vários fatores, tais como dieta, presença de placa bacteriana, susceptibilidade da superfície dental e o tempo de interação, entre outros. Uma dieta associada ao elevado consumo de açúcar e à rápida conversão destes carboidratos em produtos de fermentação ácida são fatores que contribuem de maneira significativa para o desenvolvimento da cárie [15]. Nestas condições, os ácidos orgânicos produzidos pela fermentação promovem a redução do pH e, conseqüentemente, provocam a desmineralização do substrato dentário, além de facilitar a síntese de polissacarídeos extracelulares que atuam como reserva energética [16]. As condições de baixo pH na cavidade bucal também fortalecem as espécies de bactérias acidogênicas (capazes de produzir ácidos a partir de carboidratos) e ácido-tolerantes no biofilme dental, especialmente o *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp. e *Actinomyces* sp. [7,17]. Além de *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus casei* também são importantes bactérias cariogênicas [7].

Tendo em conta os riscos que as bactérias cariogênicas oferecem a seus hospedeiros, o acúmulo do biofilme dental deve ser evitado. Dessa forma, a maneira mais eficaz de prevenir a cárie e outras doenças periodontais se dá por meio da higienização oral e conseqüente controle do biofilme empregando métodos mecânicos (escovação e uso do fio dental). No entanto, a maioria das pessoas não consegue evitar o acúmulo de biofilme por meio da remoção mecânica, principalmente em locais de difícil contato mecânico, como áreas entre os dentes, subgingival e fissuras, o que torna necessário o uso de produtos químicos como adjuvantes na higienização para o controle de micro-organismos bucais [18,19]. Dentre os métodos químicos mais utilizados para o controle do biofilme, destacam-se os enxaguatórios bucais com ação antimicrobiana, que promovem a redução da adesividade das bactérias à superfície dental e inibem o crescimento e proliferação microbiana [20]. Os agentes antimicrobianos mais utilizados nestas formulações são a clorexidina (**I**), cloreto de cetilpiridíneo (**II**), triclosan (**III**) e alguns componentes de óleos essenciais, como mentol (**IV**), eucaliptol (**V**) e salicilato de metilo (**VI**), entre outros (**Figura 1**) [21,22]. Destes compostos, a clorexidina (**I**) é considerada o agente anticariogênico mais efetivo na redução da placa bacteriana [19]. Quimicamente, a clorexidina é uma *bis*-guanidina de natureza catiônica, geralmente comercializada na forma de sal gluconato na concentração de 0,12% [19,23]. Seu espectro de ação é amplo, atuando contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras, dermatófitos e alguns vírus lipofílicos [23–25].

Figura 1. Estruturas químicas do gluconato de clorexidina (I), cloreto de cetilpiridínio (II), triclosan (III), mentol (IV), eucaliptol (V) e salicilato de metilo (VI).

O mecanismo de ação da clorexidina (I) está relacionado à interação eletrostática entre sua carga positiva e a carga negativa da parede celular bacteriana, que resulta no aumento da permeabilidade da parede e na ruptura do citoplasma [23]. Além disso, a clorexidina impede a formação da película adquirida e altera a aderência microbiana [19,23]. No entanto, apesar de ela promover grandes benefícios, a utilização diária de formulações à base de clorexidina, que possuem sabor extremamente amargo, pode causar efeitos adversos, tais como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar, sensação de queimação na mucosa oral e distúrbio da flora oral e intestinal [19,21]. Em conjunto com estes efeitos, o aumento da resistência microbiana aos compostos geralmente utilizados em enxaguatórios bucais tem despertado a comunidade científica para a necessidade de novos compostos tão eficientes quanto a clorexidina frente às bactérias cariogênicas, mas que não apresentem tantos efeitos adversos [26].

1.2. Curcuminoides

A curcumina ([1,7-*bis*(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona)] (VII, **Figura 2**) é um composto fenólico hidrofóbico majoritário nos rizomas da *Curcuma longa* (família Zingiberaceae), componente primário encontrado no açafrão [27]. Quimicamente, a curcumina é uma *bis*- β -dicetona α,β -insaturada, comumente chamada de diferuloilmetano, que se apresenta na forma de tautômero ceto em soluções ácidas

ou neutras e na forma enólica em meio alcalino [28]. O termo "curcuminóide" é usado para descrever a curcumina e outros análogos *bis*- β -dicetonônicos α,β -insaturados. Além da curcumina, outros curcuminoides também são encontrados nos rizomas da *C. longa*, tendo como destaque a demetoxicurcumina (**VIII**) e a *bis*-demetoxicurcumina (**IX**).

Figura 2. Estruturas químicas da curcumina (**VII**), demetoxicurcumina (**VIII**) e *bis*-demetoxicurcumina (**IX**).

Na literatura, diversas atividades biológicas têm sido reportadas para a curcumina, tais como inseticida [29], antioxidante [30–32], anti-inflamatória [33], antimicrobiana [32,34], anticarcinogênica [35,36], tripanocida [37] e esquistossomicida [38,39], entre outras. No entanto, apesar de sua eficácia e segurança – vários estudos em humanos e modelos animais provarem que a curcumina é extremamente segura, mesmo em altas doses – a curcumina ainda não foi aprovada como agente terapêutico devido à sua biodisponibilidade relativamente baixa. Essa biodisponibilidade baixa deve-se à sua baixa absorção e ao seu rápido metabolismo [28]. Dados da literatura também indicam que estudos *in vitro* com a curcumina são dificultados devido à sua rápida decomposição em presença de luz e à sua baixa solubilidade em água [40]. Por esses motivos, a curcumina tem sido utilizada como modelo para a síntese de curcuminoides mais efetivos, tais como os monocetônicos (**X**) [41–46], os 4-hidroximetilênicos (**XII**) [42] e os 4-arilidênicos (**XI**) [42,47] (**Figura 3**).

Figura 3. Estrutura básica de curcuminoides monocetônicos (X), 4-hidroximetilênicos (XI) e 4-arylídênicos (XII).

Nos últimos anos, a atividade antibacteriana da curcumina frente a patógenos bucais tem sido bastante investigada. Song e colaboradores mostraram que a curcumina suprime a aderência de *Streptococcus mutans* à superfície dental e a proteínas da matriz extracelular [48]. Posteriormente, Hu e colaboradores demonstraram que o efeito supressor da curcumina sobre a formação de biofilmes de *S. mutans* se dá por meio da inibição da atividade da enzima sortase A [49,50]. Mais recentemente, a atividade da curcumina contra bactérias periodontais foi também reportada [51]. No entanto, a maioria dos trabalhos recentes tem se voltado para o estudo do potencial da curcumina em terapia fotodinâmica visando à inativação de biofilmes multiespécies usando luz LED [52–55]. Por outro lado, os estudos sobre o potencial antimicrobiano de curcuminoides frente a bactérias cariogênicas disponíveis na literatura ainda estão restritos a curcuminoides dicetônicos [56].

1.3. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray

O desenvolvimento dos métodos de ionização à pressão atmosférica (API, do inglês *atmosphere pressure ionization*), ocorrido na década de 80, representou um marco para a espectrometria de massas (EM). Esses avanços fizeram com que a espectrometria de massas, que até então se limitava à análise de compostos orgânicos voláteis (ou volatilizáveis após derivatização), de baixo peso molecular e/ou termicamente estáveis [57,58], alcançasse aplicabilidade mais ampla [59].

Dentre os métodos de API, merece destaque a ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*) [60,61]. Em ESI, a amostra é dissolvida em um solvente orgânico, geralmente polar, e introduzida em um capilar metálico submetido a uma alta voltagem (3-5 kV). A ionização propriamente dita (ou seja, a geração de íons a partir de espécies neutras) ocorre no interior deste capilar por meio de reações ácido-base (protonação ou desprotonação) e/ou coordenação/complexação com espécies iônicas presentes em solução (**Figura 4**). Devido à alta voltagem, as espécies carregadas formadas migram para a interface metal-solução, formando uma dupla camada elétrica. Na ponta do capilar, devido ao fluxo coaxial de um gás nebulizante (geralmente N₂), forma-se uma superfície cônica conhecida como cone de Taylor [61,62], onde as gotas com carga de mesmo sinal se aproximam e começam a se repelir. Inicialmente, essas forças de repulsão coulômbicas entre as cargas de mesmo sinal são contrabalanceadas pela tensão superficial do líquido. No entanto, quando o limite de Rayleigh é atingido, as forças repulsivas se sobrepõem à tensão superficial, ocasionando a explosão da gota – fenômeno conhecido como “explosão coulômbica” [61]. Devido à ação de um gás secante, a repulsão entre as cargas nas gotículas formadas tornam-se cada vez maior devido à evaporação do solvente, ocasionando novas explosões coulômbicas que resultam em gotas cada vez menores até que íons individuais sejam formados e direcionados para o analisador de massas [62,63].

Figura 4. Esquema geral de uma fonte de ionização por eletrospray em um espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ) operando no modo varredura de íons produtos (do inglês *product ion scan mode*), baseado na referência [64].

1.4. Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS)

A espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) produz íons simples e/ou multiplamente carregados (no caso de compostos polifuncionalizados), que conservam em comum um baixo conteúdo de energia interna. Como consequência, espectros de massas obtidos por ESI-MS apresentam poucos ou nenhum íon fragmento, o que, em princípio, acaba limitando a utilização da técnica como ferramenta de elucidação estrutural. Por essa razão, quando se deseja obter informações sobre a estrutura do analito, utiliza-se a espectrometria de massas sequencial (MS/MS, do inglês *tandem mass spectrometry*).

Na técnica ESI-MS/MS, um íon de m/z específica, chamado de “íon precursor”, é selecionado no primeiro estágio de MS e ativado para fragmentar-se, produzindo íons de m/z menor, chamados de “íons fragmentos” (íons produtos), que são então analisados em um segundo estágio de MS. Dentre os vários métodos de ativação atualmente conhecidos, o mais utilizado é a dissociação induzida por colisão (CID, do

inglês *collision-induced dissociation*). Este método consiste em promover a colisão do íon precursor com moléculas de um gás inerte (Ar, He ou N₂) em condições energéticas controladas [65]. Em espectrômetros híbridos, tais como os do tipo triplo quadrupolo (QqQ) e quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), os dois estágios de MS ocorrem em analisadores distintos (*tandem mass spectrometry in space*), enquanto que em outros, como nos do tipo captor de íons (do inglês *ion trap*), os dois estágios de MS ocorrem em um mesmo analisador (*tandem mass spectrometry in time*) [66]. No caso destes últimos, é possível realizar vários estágios de MS, de modo que íons fragmentos podem ser utilizados como íons precursores e ativados para fragmentação. Este processo pode ser repetido *n* vezes e é conhecido como espectrometria de massas de múltiplos estágios (MSⁿ, do inglês *sequential mass spectrometry*), que é considerada como uma poderosa ferramenta na elucidação de vias de fragmentação e em estudos de determinação estrutural.

Nas últimas décadas, a técnica ESI-MS/MS tem se tornado umas das principais ferramentas analíticas empregadas em estudos de desreplicação (identificação de compostos conhecidos sem a necessidade de isolamento) de misturas complexas, tais como extratos de plantas e de micro-organismos e de produtos de metabolismo [62]. Contudo, apesar dos grandes avanços alcançados recentemente no sentido de se estabelecer plataformas de dados de ESI-MS/MS, ainda não há uma biblioteca espectral comercial disponível que possa ser utilizada em tais estudos [67,68]. Por essa razão, a identificação de compostos por ESI-MS/MS depende, na maioria dos casos, de dados disponíveis na literatura, que são utilizados em combinação com tempos de retenção cromatográficos de padrões autênticos [69,70]. Por outro lado, tem sido ressaltado na literatura recente que a identificação baseada apenas em dados de ESI-MS/MS pode ser feita mesmo na ausência de padrões autênticos, desde que as rotas de fragmentação em fase gasosa do analito estejam bem estabelecidas [71]. Neste sentido, estudos sistemáticos sobre as reações de fragmentação em fase gasosa do analito ou de uma série de compostos similares, que conservam entre si um mesmo núcleo estrutural com pequenas diferenças estruturais, tais como natureza e posição de substituintes e insaturações, tornam-se de grande importância [72]. A comparação entre os dados de ESI-MS/MS destes compostos, obtidos nas mesmas condições experimentais, conduz a relações estrutura-fragmentação, que permitem identificar íons que são comuns à série – comumente denominados de “íons comuns” ou de “íons gerais” – e íons que estão

associados aos substituintes e insaturações, denominados de “íons diagnósticos”. Na sequência, dados de experimentos com troca de deutério, dados de MSⁿ e dados de massas acuradas são utilizados em combinação com as relações estrutura-fragmentação para a elaboração das propostas de fragmentação. Finalmente, dados termoquímicos [entalpias, energias de Gibbs, afinidade protônica (PA), basicidade em fase gasosa (GB) e acidez em fase gasosa (GA)], estimados por Química Quântica Computacional, são empregados não apenas para sustentar as estruturas dos íons propostos, mas também para explicar suas intensidades nos espectros (Esquema 1).

Esquema 1. Etapas da elucidação das vias de fragmentação em fase gasosa utilizando espectrometria de massas e dados termoquímicos estimados por Química Computacional.

1.5. Aplicações da ESI-MS/MS no estudo de curcuminoides monocetônicos

A espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-EM/EM) vem sendo empregada em hifenação com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a identificação da curcumina em extratos de *Curcuma longa* [73–77] e de seus produtos de metabolismo [78–81] em concentrações muito baixas, sem a necessidade de isolá-los. Dados da literatura descreveram ainda a utilização da técnica de LC-ESI-MS/MS para a detecção de curcuminoides plasmáticos após ingestão de alimentos ricos em cúrcuma, além de demonstrar a utilidade clínica do método através da aplicação a um estudo voluntário em humanos [82]. Além disso, estudos recentes mostraram que a espectrometria de massas com ionização por eletrospray

acoplado a mobilidade iônica (IM-MS) como técnica de separação pode ser utilizada na identificação dos tautômeros da curcumina, na qual se tem a estabilização preferencial da forma enólica da curcumina em presença de piperina [83].

No caso de curcuminoides monocetônicos, apesar do potencial biológico promissor de alguns destes compostos, existem na literatura poucos estudos sobre as reações de fragmentação desses compostos ionizados por eletrospray. O trabalho mais completo sobre o assunto foi publicado por Cyriac e colaboradores, que relataram a ocorrência de uma ciclização de Nazarov previamente às eliminações de anisol e/ou de ceteno a partir dos curcuminoides **XIII-XVII** protonados (**Figura 5**) [84].

Figura 5. Estrutura dos compostos utilizados por Cyriac e colaboradores em seu trabalho [84].

De acordo com os autores, a formação dos íons fragmentos de m/z 253 e 187 a partir da divinilcetona **XIII** protonada, que é proveniente da eliminação de ceteno e anisol, é precedida pela formação do íon intermediário **a**. Este intermediário é formado devido a uma ciclização de Nazarov em fase gasosa e se rearranja para o intermediário **b** devido à abstração do próton em C-3 pelo grupo metoxi presente no anel aromático (**Esquema 2**) [84].

Esquema 2. Ciclização de Nazarov em fase gasosa envolvendo o curcuminoide monocetônico **XIII** e subseqüentes eliminações de ceteno e anisol [84].

Os autores também reportaram que as fragmentações dos compostos **XIII** e **XIV** são semelhantes entre si e atribuíram as semelhanças à ocorrência de uma migração 1,2 de grupo arila que ocorre após a ciclização de Nazarov e leva à formação de um intermediário comum (**Esquema 3**) [84].

Esquema 3. Formação do intermediário comum para os compostos **XIII** e **XIV** [84].

Da mesma forma que os compostos **XIII** e **XIV**, a ciclização de Nazarov e as subseqüentes eliminações de anisol e ceteno, assim como a eliminação de uma molécula de água, também ocorrem para os compostos **XV-XVII**. No entanto, no caso do composto **XV**, é necessária uma energia de colisão mais alta que a utilizada para os compostos **XIII** e **XIV**. Além disso, para o composto **XVI** foi também reportada a formação dos íons produtos de m/z 193 e 157, correspondentes às eliminações de ceteno e de benzeno,

respectivamente. Entretanto, a principal via descrita pelos autores para o composto **XVI** foi a eliminação de uma molécula de H₂O (m/z 217).

Os autores também compararam a fragmentação dos curcuminoides que exibem grupos metoxi (**XIV** e **XV**) e hidroxí (**XVII**) e concluíram que os grupos CH₃ têm apenas um papel limitado nos processos de fragmentação. Por outro lado, foi estabelecido que o par de elétrons não ligantes nos átomos de oxigênio devem desempenhar um papel fundamental na fragmentação, facilitando a transferência de próton que sucede a ciclização de Nazarov. Além disso, para o composto **XVII**, o íon acílio de m/z 147 foi descrito como íon produto mais abundante, sendo que para o composto **XIII** o íon correspondente (m/z 171) não foi observado. Esta diferença levou os autores a sugerirem os prótons ácidos das hidroxilas fenólicas devem desempenhar um papel fundamental na formação deste íon produto [84]. Em suma, os principais íons produtos descritos pelos autores para os curcuminoides investigados foram resultantes da perda de água, ceteno ou anisol/benzeno, além do íon acílio. A intensidade destes íons varia de composto para composto e com as energias de colisão utilizadas, que foram otimizadas individualmente para cada composto [84].

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

- Sintetizar e identificar uma série de curcuminoides monocetônicos a partir de reações de condensação entre acetona e diferentes aldeídos aromáticos;
- Obter derivados dos curcuminoides monocetônicos por meio de reações de hidrogenação catalítica;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos curcuminoides sintetizados frente a um painel representativo de bactérias cariogênicas;
- Determinar possíveis relações entre a estrutura dos curcuminoides monocetônicos e de seus derivados reduzidos e suas respectivas atividades antimicrobianas;
- Investigar as vias de fragmentação dos curcuminoides e de seus derivados em fase gasosa utilizando combinação de espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) com espectrometria de massas de estágios múltiplos (MSⁿ), dados de massas acuradas e dados termoquímicos, estimados por Química Quântica Computacional.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes, solventes, métodos e equipamentos

Para a execução desse projeto, todos os reagentes utilizados tiveram sua pureza previamente verificada por cromatografia gasosa ou por ressonância magnética nuclear e, quando necessário, foram purificados conforme a literatura [85]. Para a dissolução dos reagentes e produtos e/ou como solventes de reação foram utilizados acetato de etila, acetona, hexano e éter etílico, que foram previamente tratados por meio de destilação e posteriormente submetidos ao processo de refluxo na presença de sódio para secagem.

As análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram realizadas em folhas de alumínio Merck KGaA recobertas por uma camada de sílica gel F254. Para visualização das manchas foi utilizada revelação com irradiação de luz ultravioleta em 254 nm e 365 nm, emitida por lâmpada UV da marca Osram, e por revelação química com vanilina sulfúrica (aquecimento da cromatoplaça em chapa de aquecimento após ter sido mergulhada na solução de vanilina sulfúrica). As separações por cromatografia em coluna clássica (CCC) foram realizadas em tubo de vidro de dimensões 70 x 1,8 cm e 3,5 x 45 cm, equipado com torneira na parte inferior e recheadas com sílica gel (tamanho de poro de 60 Å, 230-400 mesh), marca Sigma-Aldrich, aproximadamente na proporção de 100 g de sílica/g de amostra. As amostras foram concentradas em rotaevaporador marca Buchi modelo R-215.

As análises por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu modelo 2010, equipado com injetor automático AOC20i+s. Uma coluna Restek Rtx-5®, de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme, composto por 5% de difenilpolisiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano, foi utilizada nessas análises. Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio (99,999%) a uma velocidade linear de 36,8 cm/s. A programação de aquecimento da coluna foi a seguinte: 80 °C por 2 min, em seguida 30 °C/min até atingir 320 °C e essa temperatura foi mantida por 10 min. As análises foram realizadas a partir de 1 mg do composto, que foi dissolvido em 1 mL de acetato de etila e adicionado a um vial de 2 mL.

As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu modelo GCMS2010 Plus, equipado com injetor automático AOC-20i, coluna de sílica fundida marca Restek, modelo Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm), composta por 5% de fenilpolisiloxano e

95% de metilpolisiloxano. As condições para análise no GC-MS foram as mesmas do GC-FID descritas anteriormente. A fonte de ionização por elétrons (EI-MS) operou a 70 eV e analisador do tipo quadrupolar. Hélio (99,999% de pureza) foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/min. As amostras (1 mg) foram solubilizadas em acetato de etila e analisadas no modo split na razão de 1:20. A identificação dos compostos foi feita por comparação de seus respectivos espectros de massas com os da biblioteca Wiley 7.0 disponível no equipamento.

As reações de hidrogenação catalítica foram realizadas em reator de aço inox de alta pressão (pressão máxima de 50-500 psi) no volume de 100 mL da marca Famabras.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer modelo Spectrum Two (Perkin Elmer). As amostras foram maceradas com KBr e fundidas sob pressão até a formação de pastilhas.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetros Bruker DRX-400, operando em frequência de 400 MHz para ^1H e em 100 MHz para ^{13}C , respectivamente. Clorofórmio deuterado [CDCl_3 , 99,9% de átomos de D, Aldrich – EUA] e acetona- d_6 [$(\text{CD}_3)_2\text{O}$; 99,9% de átomos de D; Aldrich –EUA] como solventes. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) em relação ao sinal residual do solvente. A multiplicidade dos sinais foi deduzida conforme a quantidade de sinais obtidos nos espectros. A constante de acoplamento (J ; em Hz) foi calculada a partir da comparação dos picos do mesmo sinal e o número de hidrogênios foi deduzido a partir da integral relativa. (ver Seção de Espectros (**ANEXO 1**)).

3.2. Síntese dos curcuminoides monocetônicos

3.2.1. Síntese dos curcuminoides monocetônicos 1-11

Os compostos **1-9** foram sintetizados por meio de uma condensação aldólica cruzada (Condensação de Claisen-Schmidt) entre acetona e os aldeídos aromáticos **I-IX** (**Figura 6**, p. 46), conforme metodologias previamente descritas na literatura [85] (**Esquema 4**) com algumas modificações [46]. Neste procedimento, 25 mL de uma solução aquosa previamente preparada de NaOH (2,5 mol/L) foi adicionada a etanol (20 mL), para a preparação de uma solução de etóxido de sódio. A solução resultante foi adicionada a um balão de 100 mL contendo aldeídos aromáticos (26 mmol) e acetona (0,95 mL, 13 mmol) e mantida os sob agitação a 0 °C durante 1-24 h (**Tabela 1**). Após o término da reação (monitoramento por CCDC e cromatografia gasosa), a mistura reacional foi lavada com água fria para remover o excesso de base e filtrada sob pressão reduzida (**Tabela 1**). Os produtos sólidos resultantes foram então mantidos em dessecador sob pressão reduzida e em seguida e purificados por recristalização com hexano/etanol obtendo-se os compostos **1-9**, respectivamente.

Os compostos **10** e **11** foram obtidos por condensação aldólica em condições ácidas de acordo com metodologias previamente descritas na literatura [46,86]. Neste procedimento, ácido acético (50 mL) foi saturado com HCl a 0 °C (HCl gasoso foi preparado por meio do gotejamento de H₂SO₄ em HCl líquido). Em seguida, foi adicionado lentamente ao ácido acético uma mistura de acetona (580 mg, 10 mmol) com vanilina (20 mmol) para a síntese do composto **10** ou com 4-hidroxibenzaldeído (20 mmol) para a síntese do composto **11**. A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente durante 24 h (**Tabela 1**). Ao término da reação, a mistura reacional foi vertida em água gelada (200 mL) e submetida à extração com acetato de etila (3 x 30 mL). A porção orgânica das reações foi então seca com MgSO₄ e filtrada. Em seguida, o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida. Os produtos resultantes foram purificados por cromatografia em coluna flash, utilizando tubo de vidro de dimensões 3,5 x 45 cm, contendo sílica gel flash (tamanho de poro de 60 Å, 230-400 mesh) na proporção de 60 g/g de amostra utilizando eluição isocrática com hexano: acetato de etila 1:1 (v/v) para o composto **10** e hexano: acetato de etila 7:3 (v/v) para o composto **11**. Durante o monitoramento por CCDC, as frações de 13-31 para o composto **10**, e

as frações 53-100 do composto **11**, que apareceram com uma única mancha nas cromatoplaças foram coletadas e agrupadas de acordo com seus perfis cromatográficos e concentradas em rotaevaporador, obtendo-se o composto **10** e **11**. Os rendimentos das reações, assim como as características dos compostos de **10** e **11** estão na **Tabela 3** (seção Resultados e Discussão, **item 4.1**), respectivamente. Todos os compostos foram identificados com base nas análises de ESI-MS, IV e RMN de ^1H e ^{13}C (ver seção Resultados e Discussão, **item 4.1**).

Esquema 4. Preparação dos curcuminoides monocetônicos **1-11**.

Figura 6. Estrutura dos aldeídos aromáticos utilizados na síntese dos curcuminoides monocetônicos.

Tabela 1. Protocolo experimental utilizado para a obtenção dos compostos **1-11**.

Condições reacionais em meio básico						
Composto	Aldeído Aromático (g)	Acetona (mL)	Sol. NaOH (2,5 mol/L)	Etanol (mL)	Volume do balão reacional (mL)	Tempo reacional (min ou h)
1	I: 2,75 (26 mmol)	0,95	25	20	100	30 min
2	II: 3,53 (26 mmol)	0,95	25	20	100	30 min
3	III: 3,12 (26 mmol)	0,95	25	20	100	1 h
4	IV: 4,32 (26 mmol)	0,95	25	20	100	1 h 30 min
5	V: 3,65 (26 mmol)	0,95	25	20	100	30 min
6	VI: 5,10 (26 mmol)	0,9	25	20	100	2 h
7	VII: 1,0 (5 mmol)	0,14	5,20	4,15	25	2 h
8	VIII: 5,10 (26 mmol)	0,95	25	20	100	24 h
9	IX: 3,65 (26 mmol)	0,95	25	20	100	30 min
Condições reacionais em meio ácido						
Composto	Aldeídos Aromáticos (g)	Acetona (mL)	Ácido Acético (mL)		Volume do balão reacional (mL)	Tempo reacional (min ou h)
10	X: 3,04 (20 mmol)	0,73	50		125	24 h
11	XI: 2,44 (20 mmol)	0,73	50		125	24 h

3.2.2. Síntese dos curcuminoides 12-31

Os curcuminoides **12-31** foram preparados com base na metodologia previamente descrita por Franco e colaboradores [87] com algumas modificações. Neste procedimento, os curcuminoides monocetônicos (500 mg, 1 mmol) foram completamente dissolvidos em 30 mL de acetato de etila grau HPLC e transferidos para um reator de alta pressão. Em seguida, foram adicionados aproximadamente 22 mg de Pd/C (10%) ao meio, que foi mantido sob agitação magnética e em atmosfera de H₂, a uma pressão de 500 psi, à temperatura ambiente por 18 h (**Esquema 5**). As misturas reacionais foram filtradas à pressão reduzida em celite para a retirada do catalisador. Em seguida, o solvente foi removido em rotaevaporador, obtendo-se, em todos os casos, um sólido branco. Para a separação dos dois produtos formados (compostos com duplas reduzidas e compostos tanto com a redução das duplas como do grupo carbonila), os sólidos foram submetidos a fracionamento por CC utilizando tubo de vidro de dimensões 1,8 cm x 70 cm, contendo sílica gel flash na proporção de 60 g/g de amostra, e eluição isocrática com Hex:AcOEt 9:1 (v/v) para os compostos **3**, **5** e **9**, Hex:AcOEt 8:2 (v/v) para os compostos **2** e **8**, Hex:AcOEt 1:1 (v/v) para os compostos **1**, **6**, **7** e **10** e Hex:Éter 1:1 (v/v) para o composto **5**. Dessa forma, após o monitoramento por CCDC, as frações que apresentaram apenas uma mancha na cromatoplaça referente ao primeiro produto da reação (compostos com apenas as duplas ligações reduzidas), assim como para o segundo produto (redução tanto das duplas ligações como do grupo carbonila) foram reagrupadas de acordo com seus perfis cromatográficos e concentradas em rotaevaporador, obtendo-se os produtos **12-31**. Os rendimentos e as características dos produtos obtidos de todas as reações estão listados na **Tabela 3** (ver seção Resultados e Discussão, **item 4.1**), respectivamente.

Esquema 5. Preparação dos curcuminoides 12-31.

3.3. Elucidação estrutural

A elucidação estrutural dos curcuminoides **1-31** foi feita a partir da comparação de seus dados de RMN de ^1H e de ^{13}C com os disponíveis na literatura e, no caso dos compostos **22-31**, com os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C dos curcuminoides dos quais foram obtidos, como será discutido na seção Resultados e Discussão, **item 4.1**.

3.4. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias cariogênicas

Os ensaios para avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* dos curcuminoides monocetônicos foram realizados no Laboratório de Pesquisas em Microbiologia Aplicada (LAPEMA) da Universidade de Franca, sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

3.4.1. Micro-organismos utilizados

Os micro-organismos utilizados na realização dos ensaios, assim como seus morfotipos e condições de crescimento estão listados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Micro-organismos Gram-positivos avaliados, morfotipos e cultura utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.

Micro-organismos	Padrão ATCC
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175
<i>Streptococcus mitis</i>	ATCC 49456
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 25975
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 10556
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 33478
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 4082
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 11578

3.5. Preparo das soluções, meios de cultura e inóculos

Para o preparo dos inóculos, cepas de cada micro-organismo armazenadas a -20 °C foram suspendidas em caldo TSB (meio de cultura líquido). Em seguida, os micro-organismos foram repicados no meio de cultura ágar sangue (Difco®) e incubados em estufa a 37 °C com atmosfera apropriada durante 24 h para a confirmação da pureza das cepas. Após a confirmação, as culturas de 24h dos micro-organismos indicadores (desenvolvidos em ágar sangue) foram transferidas com o auxílio de uma alça de platina esterilizada para tubos contendo 5 mL de solução salina 0,9 %. Todas as amostras bacterianas preparadas foram padronizadas por comparação com o tubo da escala de 0,5 de McFarland [88]. Após essa comparação, as amostras foram diluídas em solução salina esterilizada (1 mL de suspensão em 9 mL salina), obtendo-se inóculos de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Em seguida, os inóculos foram diluídos em caldo triptonsoja (2 mL de suspensão em 10 mL caldo), obtendo-se assim inóculos de $2,5 \times 10^6$ UFC/mL e uma concentração final no poço de inóculo de 5×10^5 UFC/mL, conforme metodologia CLSI [88].

Para o preparo da solução dos curcuminoides monocetônicos, 2 mg de amostra foram solubilizados em 250 µL em DMSO (Sigma®) com auxílio de um banho de ultrassom. Após completa

solubilização, foram adicionados 1000 µL de caldo triptona soja. A solução aquosa de diidrocloridrato de clorexidina, da Sigma® (0,1 mg/mL), utilizada como controle positivo, foi diluída em TSB, obtendo-se uma concentração final de 0,02 mg/mL. As atividades foram avaliadas para concentrações finais da clorexidina (nos poços das microplacas) na faixa de 0,115 µg/mL a 59,0 µg/mL.

3.6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo

Para a determinação da concentração inibitória mínima, adicionou-se às microplacas o caldo TSB, a solução da amostra (curcuminoides monocetônicos) e a suspensão padronizada dos micro-organismos a microplacas esterilizadas de 96 orifícios, totalizando 100 µL, (**Figura 7**, p. 52). As amostras foram avaliadas nas concentrações de 0,115 µg/mL a 400 µg/mL. Estas concentrações foram obtidas através do método de microdiluição em microplaca, sendo que a solução de menor concentração onde ocorreu a inibição do crescimento microbiano, detectado após a adição de resazurina (Sigma®), correspondeu ao valor da concentração inibitória mínima (CIM). Esta técnica foi realizada segundo a metodologia padronizada na literatura pelo CLSI [88].

Para os controles negativos, foram realizados os seguintes testes: controle de esterilidade do caldo TSB (100 µL de TSB), controle das culturas - inóculo (que devem apresentar crescimento microbiano, devido à ausência de agentes antimicrobianos) (80 µL caldo triptona soja + 20 µL do inóculo) e controle de esterilidade do sistema solvente utilizado na solubilização das amostras (99 µL de caldo triptona soja e 1 µL de DMSO), que devem apresentar ausência de crescimento. Além disso, foi realizado também o controle do DMSO (mistura de 1 a 5 µL de DMSO, de 75 a 79 µL de caldo TSB e 20 µL de inóculo em 5 orifícios), que deve apresentar crescimento bacteriano, indicando a ausência de interferência do DMSO no crescimento dos micro-organismos.

Como controle positivo frente aos micro-organismos indicadores utilizou-se diidrocloridrato de clorexidina (Sigma®) a 0,02 mg/mL. Conforme mencionado anteriormente, as atividades foram avaliadas para concentrações finais da clorexidina (nos poços das microplacas) na faixa de 0,115 µg/mL a 59,0 µg/mL. As

microplacas foram seladas com filme plástico e incubadas a 37 °C por 24 h, respeitando-se as exigências de atmosfera de cada bactéria testada.

Figura 7. Esquema do preparo da amostra e do inóculo para o teste da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) [101].

Posteriormente, foram adicionados em cada orifício 30 µL de solução aquosa de resazurina a 0,02%, como revelador do crescimento microbiano [89]. A resazurina apresenta-se na forma oxidada, com coloração azul, podendo se reduzir à resofurina (coloração rosa) na presença da enzima bacteriana desidrogenase ativa (**Figura 8**, p. 52) [90]. Dessa forma, a atividade antimicrobiana nos poços das microplacas foi avaliada de acordo com sua coloração, sendo então observada a manutenção da cor azul (sem crescimento bacteriano) ou alteração para a cor rosa (crescimento bacteriano).

Figura 8. Reação de redução da resazurina à resofurina.

3.7. Estudos das vias de fragmentação de curcuminoides por ESI-MS/MS

As análises por espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (ESI-MS/MS) dos compostos curcuminoides **1-11** foram feitas em um espectrômetro de massas Acquity H-Class triplo quadrupolo (QqQ) Xevo TQS (Waters, Milford, MS, USA) equipado com uma fonte de ionização Z-spray, operando no modo positivo. Soluções das amostras na concentração de 1,0 µg/mL foram dissolvidas em MeOH:H₂O (80:20 v/v) com 0,1% de ácido fórmico e infundidas diretamente na fonte de ionização a um fluxo de 0,1 mL/min. No caso dos experimentos com troca por deutério, os compostos **1-11** foram dissolvidos em MeOH:D₂O (1:1 v/v). As voltagens do capilar e do cone foram otimizadas para 3,2 kV e 40 V, respectivamente. Foi utilizado N₂ como gás de dessolvatação, a uma temperatura de 250 °C. A temperatura da fonte de ionização foi de 150 °C. O volume de amostra injetado foi de 5 µL.

Para o estabelecimento das vias de fragmentação, dados de espectrometria de massas de múltiplos estágios (ESI-MSⁿ) foram obtidos em espectrômetro de massas AmaZon Speed (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com analisador do tipo *ion trap* e fonte de ESI, operando em modo positivo. N₂ foi utilizado tanto para nebulização (6 psi) como para a secagem (8 mL/min, 220 °C). A voltagem utilizada no capilar e no endplate foram de 3,5 kV e 500 V, respectivamente. A faixa de massas utilizada nos experimentos foi de m/z 50-450.

Os dados de massas acuradas foram obtidos em equipamento híbrido QTOF Bruker micrOTOF™-QII, equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI-MS). As amostras dos curcuminoides monocêtonicos foram solubilizados em MeOH:H₂O (9:1 v/v + 0,1% de ácido fórmico) e infundidos diretamente na fonte de ionização. Foi empregado uma voltagem no capilar de 3,0 kV, temperatura da fonte 180°C e uma faixa varredura de m/z 50-50. Como gás de colisão foi utilizado N₂ em energias de 10 a 40 eV. Trifluoroacetato de sódio foi utilizado como padrão para calibração do equipamento.

3.8. Métodos computacionais

Os cálculos termoquímicos obtidos neste trabalho foram realizados pelo professor Dr. Renato L. T. Parreira e seu aluno Renato Pereira Orenha da Universidade de Franca em conjunto com o professor Dr. Ricardo Vessecchi do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo. A análise conformacional e a otimização de geometria foram obtidos empregando o modelo B3LYP e sistema de base 6-31 + G(d, p)[91] utilizando o software Gaussian 09 [92]. A análise das frequências vibracionais demonstrou que todos os compostos estudados estão no mínimo em suas respectivas superfícies de energia potencial.

Os valores de afinidade protonica (PA) foram obtidos a partir de variações nas entalpias de uma reação de protonação $M + H^+ \rightarrow MH^+$, conforme descrito em estudos anteriores sobre produtos naturais e compostos orgânicos sintéticos que utilizaram a espectrometria de massas [93]. A entalpia experimental e a energia de Gibbs para prótons foram consideradas como sendo 1,48 e -6,28 kcal/mol [94]. Para estudar as vias de fragmentação, as estruturas iônicas mais estáveis foram propostas e as rotas de fragmentação foram sugeridas comparando as energias de Gibbs e as entalpias calculadas a 298,15 K. As energias de Gibbs foram usadas durante este trabalho, porque não foi possível alcançar as condições de equilíbrio durante os experimentos de CID [95–97].

4. Resultados e Discussão

4.1. Sobre a síntese dos compostos 1-31 e elucidação estrutural

Conforme mencionado anteriormente (p. 49), os curcuminoides monocetônicos **1-11** foram sintetizados por meio da reação de condensação de Claisen-Schmidt entre acetona e os aldeídos aromáticos **I-IX** em meio básico para os compostos de **1-9** e em meio ácido para os compostos **10** e **11**, resultando na formação dos curcuminoides monocetônicos **1-11** como produtos finais [46]. Para os compostos **1-9** (**Esquema 6**), inicialmente, tem-se a formação do íon enolato devido à desprotonação do carbono α da acetona, com posterior ataque nucleofílico à carbonila do aldeído aromático. Em seguida, a desprotonação do carbono α promovida pela base leva à formação de um carbânion intermediário, cujo par de elétrons assiste na eliminação do íon hidróxido para a formação de uma ligação dupla conjugada com a carbonila e o anel aromático (mecanismo E1cb). Para assegurar que a condensação com uma segunda molécula de benzaldeído ocorra pelo mesmo mecanismo, resultando na formação dos curcuminoides monocetônicos **1-9** como produtos finais, emprega-se excesso deste reagente, conforme mostrado na **Tabela 1** (p. 47). Os compostos **12-31** são produtos de hidrogenação catalítica dos curcuminoides monocetônicos **1-10**. A hidrogenação de cada curcuminóide resultou em dois produtos – uma cetona, resultante da redução das ligações duplas C2–C3 e C2'–C3' e um álcool, formado pela redução das ligações duplas C2–C3 e C2'–C3' e da carbonila α,β -insaturada. Os compostos, em sua maioria, foram obtidos na forma de sólidos brancos. Alguns também se apresentaram na forma de um óleo amarelado ou sólido rosa claro. A **tabela 3** a seguir reúne o aspecto físico dos compostos **1-31** descritos neste trabalho e seus respectivos rendimentos.

Esquema 6. Proposta para o mecanismo de formação dos curcuminoides monocetônicos por meio de uma condensação aldólica cruzada, adaptado de Hambecker e colaboradores [46].

Tabela 3. Características e rendimentos dos curcuminoides monocetônicos 1-31.

Composto	Característica	Rendimento (%)
(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (1)	Sólido amarelo	24
(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5- <i>bis</i> (4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (2)	Sólido amarelo	64
(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5-di- <i>p</i> -tolilpenta-1,4-dien-3-ona (3)	Sólido amarelo	69
(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5- <i>bis</i> (3,4-dimetoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (4)	Sólido amarelo	83
(1 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-1,5- <i>bis</i> (2-clorofenil)penta-1,4-dien-3-ona (5)	Sólido amarelo	20

4. Resultados e Discussão

Tatiana Mançini Vieira

(1E,4E)-1,5- <i>bis</i> (3,4,5-trimetoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (6)	Sólido amarelo	72
(1E,4E)-1,5- <i>bis</i> (4-bromofenil)penta-1,4-dien-3-ona (7)	Sólido amarelo	45
(1E,4E)-1,5- <i>bis</i> (2,4,6-trimetoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (8)	Sólido amarelo	97
(1E,4E)-1,5- <i>bis</i> (4-clorofenil)penta-1,4-dien-3-ona (9)	Sólido amarelo	44
(1E,4E)-1,5- <i>bis</i> (4-hidroxi-3-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (10)	Sólido amarelo	21
(1E,4E)-1,5- <i>bis</i> (4-hidroxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (11)	Sólido amarelo	44
1,5-difenilpentan-3-ona (12)	Óleo amarelado	29
1,5- <i>bis</i> (4-metoxifenil)pentan-3-ona (13)	Sólido branco	60
1,5-di- <i>p</i> -tolilpentan-3-ona (14)	Sólido branco	28
1,5- <i>bis</i> (3,4-dimetoxifenil)pentan-3-ona (15)	Sólido branco	53
1,5- <i>bis</i> (2-clorofenil)pentan-3-ona (16)	Sólido branco	47
1,5- <i>bis</i> (3,4,5-trimetoxifenil)pentan-3-ona (17)	Sólido branco	60
1,5- <i>bis</i> (4-bromofenil)pentan-3-ona (18)	Sólido branco	31
1,5- <i>bis</i> (2,4,6-trimetoxifenil)pentan-3-ona (19)	Sólido branco	45
1,5- <i>bis</i> (4-clorofenil)pentan-3-ona (20)	Sólido branco	30
1,5- <i>bis</i> (4-hidroxi-3-metoxifenil)pentan-3-ona (21)	Sólido rosa claro	37
1,5-difenilpentan-3-ol (22)	Óleo amarelo claro	65
1,5- <i>bis</i> (4-metoxifenil)pentan-3-ol (23)	Sólido branco	18
1,5-di- <i>p</i> -tolilpentan-3-ol (24)	Sólido branco	72
1,5- <i>bis</i> (3,4-dimetoxifenil)pentan-3-ol (25)	Sólido branco	43
1,5- <i>bis</i> (2-clorofenil)pentan-3-ol (26)	Sólido branco	50
1,5- <i>bis</i> (3,4,5-trimetoxifenil)pentan-3-ol (27)	Sólido branco	23
1,5- <i>bis</i> (4-bromofenil)pentan-3-ol (28)	Sólido branco	63
1,5- <i>bis</i> (2,4,6-trimetoxifenil)pentan-3-ol (29)	Sólido branco	32
1,5- <i>bis</i> (4-clorofenil)pentan-3-ol (30)	Sólido branco	66
4,4'-(3-hidroxipentano-1,5-diil) <i>bis</i> (2-metoxifenol) (31)	Sólido amarelo claro	35

Os dados dos espectros de massas (EI, 70 eV) e de absorção na região do infravermelho foram incluídos neste trabalho após a discussão sobre os dados de RMN de cada um dos compostos. Vale ressaltar que na literatura não há consenso quanto à numeração do esqueleto dos curcuminoides monocetônicos, logo optamos por utilizar neste trabalho uma numeração proposta na **Figura 9**, em que a numeração é feita a partir do carbono da carbonila.

Figura 9. Numeração das posições do esqueleto básico dos curcuminoides monocetônicos descritos neste trabalho.

Para facilitar a discussão, os curcuminoides e seus respectivos derivados descritos neste trabalho foram divididos em três grupos: 1) compostos **1-11**, que apresentam a carbonila em C1 e as ligações duplas entre C2-C3 e C2'-C3'; 2) compostos **12-21**, que apresentam a carbonila em C1 e ligações simples entre C2-C3 e C2'-C3'; e 3) compostos **22-31**, que apresentam hidroxila em C1 e ligações simples entre C2-C3 e C2'-C3'. Considerando que todos os compostos de cada grupo foram elucidados da mesma maneira, e com o intuito de evitar discussões repetitivas e exaustivas, será discutida a elucidação de apenas um dos compostos de cada grupo. Para os demais, os dados espectroscópicos serão apenas listados e atribuídos por comparação com a literatura.

4.2. Elucidação estrutural

4.2.1. Elucidação estrutural dos compostos 1-11

A elucidação estrutural dos curcuminoides **1-11** foi feita com base nos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , de infravermelho e de espectrometria de massas. Como os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C dos curcuminoides **1-11** reportados na literatura foram obtidos em CDCl_3 [87], os espectros de RMN dos compostos **1-11** descritos nesse trabalho também foram obtidos com as amostras dissolvidas em CDCl_3 . Para esses compostos, a comparação entre os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos com os da literatura revelou

que os mesmos são muito similares. Contudo, para a maioria dos compostos, os deslocamentos químicos de alguns sinais do espectro de RMN de ^1H foram reportados na literatura apenas como uma faixa de deslocamento químico. Neste trabalho, procuramos, sempre que possível, atribuir corretamente esses deslocamentos químicos.

Para a atribuição dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **1-11**, foram inicialmente analisados os espectros de RMN de ^1H dos compostos **1-11** para atribuição dos deslocamentos químicos, das integrais e das multiplicidades de cada sinal no espectro. Em seguida, foram analisados os espectros RMN de ^{13}C e de DEPT 135. A combinação dos dados destes espectros permitiu identificar quais carbonos são metílicos, metínicos e quais não estão ligados a átomos de hidrogênio. Os espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT 135 dos compostos de **1-11** se encontram na **Seção de espectros (ANEXO 1)**. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do curcuminoide **1** se encontram reunidos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) do composto **1** e comparação com os da literatura (75 MHz e 300 MHz, respectivamente), ambos em CDCl_3 [99].

	Composto 1 (CDCl_3)		Literatura (CDCl_3) [98]	
	^{13}C (ppm)**	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)
1	189,0 (C)	—	188,6	—
2,2'	125,6 (CH)	7,10 (2H, d, $J_{2,3=2',3'}=16,0$)	125,4	7,10 (2H, d, $J=13,0$)
3,3'	143,4 (CH)	7,76 (2H, d, $J_{3,2=3',2'}=16,0$)	143,3	7,75 (2H, d, $J=13,0$)
4,4'	134,9 (C)	—	128,4	—
5,5'=9,9'	128,5 (CH)	7,62 (2H, m)	128,9	
6,6'=8,8'	129,1 (CH)	7,42 (2H, m)	130,4	
7,7'	130,6 (CH)	7,40 (2H, m)	134,8	7,40–7,63 (10H, m)

*Dados de IV (em pastilha de KBr) de **1** ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}$): ν_{max} / cm^{-1} : 3053 ($\nu_{\text{Csp}^2-\text{H}}$), 1651 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1591 ($\nu_{\text{C=C}}$). EI-MS (m/z intensidade relativa, %): 234 (100%, M^{+}), 131 (45%, $\text{M}^{+}-\text{C}_8\text{H}_7\bullet$), 103 (86%, $\text{M}^{+}-\text{C}_8\text{H}_7\bullet-\text{CO}$), 77 (48%, C_6H_5^{+}). ** Multiplicidades atribuídas com base em sequência de pulsos DEPT 135).

No espectro de RMN de ^1H do composto **1** (**Figura A3, ANEXO 1**), a maioria dos sinais estão na região entre δ_{H} 6,0 e 7,9, que é característica de hidrogênios ligados a carbonos olefinicos ou anéis aromáticos. Os sinais em δ_{H} 7,10 (2H, *d*, $J=16,0$ Hz) e δ_{H} 7,76 (2H, *d*, $J=16,0$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios olefinicos H2/H2' e H3/H3', respectivamente. A grande diferença entre os deslocamentos químicos destes hidrogênios pode ser atribuída ao efeito mesomérico elétron-retirador da carbonila e o anel benzênico, que torna a posição β de sistemas carbonílicos α,β -insaturados mais desprotegida que a posição α . Isto pode ser melhor visualizado através das formas de ressonância representadas no **Esquema 7**.

Esquema 7. Formas de ressonância de uma carbonila α,β -insaturada representando a desproteção da posição β .

O valor da constante de acoplamento entre H3/H3' e H2/H2' é característico da configuração *E* da ligação dupla entre C2 e C3. A estereosseletividade na formação desta ligação dupla é resultante tanto de fatores estéricos como de fatores estereoeletrônicos. A reação E1cb é *estereoespecífica* e requer que o orbital p do carbânion (ion enolato) esteja em *anti* em relação ao orbital σ^* da ligação C–OH [99]. Dentre os dois confôrmeros (**A** e **B**, **Esquema 8**), que possibilita o arranjo *anti* entre esses orbitais, o (confôrmero **B**) é o mais estável devido ao menor congestionamento estérico (os grupos fenil e o grupo acetil, mais volumosos, estão dispostos lados opostos da conformação). Consequentemente, este confôrmero reagirá mais rapidamente (passagem por um estado de transição de menor energia) e levará à formação da ligação dupla com configuração *E*.

Esquema 8. Possíveis conformêros envolvidos na formação da ligação dupla pelo mecanismo E1cb.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **1** (**Figura A5, ANEXO 1**) é possível observar a presença de apenas sete sinais. Este número de sinais é menor que o número de carbonos na estrutura de **1** devido à presença de simetria, que também está presente na estrutura dos compostos **2-11**. Todos os sinais deste espectro estão na região dos carbonos de hibridização sp^2 (seis carbonos aromáticos ou olefínicos, entre δ_{C} 100 e 160) e um na região de carbonos carbonílicos (δ_{C} 188,6, C1), corroborando com a estrutura esperada para o curcuminóide **1**. Nas **tabelas 5 e 6** a seguir se encontram os dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos **compostos 2-11**.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos **2-6**, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, e os J estão expressos em Hz.

	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)
1	188,6	—	189,2	—	188,4	—	188,9	—	188,8	—
2,2'	123,2	6,96 (2H, d , $J_{2,3=2',3'}=15,8$)	124,7	7,07 (2H, d , $J_{2,3=2',3'}=16,0$)	123,5	6,98 (2H, d , $J_{2,3=2',3'}=15,8$)	127,3	7,08 (2H, d , $J_{2,3=2',3'}=16,0$)	125,1	6,97 (2H, d , $J_{2,3=2',3'}=15,8$)
3,3'	142,4	7,71 (2H, d , $J_{3,2=3',2'}=15,8$)	143,3	7,75 (2H, d , $J_{3,2=3',2'}=16,0$)	142,9	7,70 (2H, d , $J_{3,2=3',2'}=15,8$)	139,5	8,11 (2H, d , $J_{3,2=3',2'}=16,0$)	143,7	7,66 (2H, d , $J_{3,2=3',2'}=15,8$)
4,4'	127,5	—	132,3	—	127,8	—	135,5	—	130,6	—
5,5'	129,7	7,56 (4H, d , $J_{5,6=5',6'}=8,7$)	128,5	7,54 (4H, d , $J_{5,6=5',6'}=8,0$)	123,0	7,22 (2H, dd , $J_{5,6=5',6'}=8,3$ e $J_{5,9=5',9'}=1,8$)	131,4	7,45 (2H, d , $J_{5,6=5',6'}=9,3$)	106,1	6,84 (4H, s)
6,6'	114,6	6,93 (4H, d , $J_{6,5=6',5'}=8,7$)	129,8	7,25 (4H, d , $J_{6,5=6',5'}=8,0$)	111,0	6,80 (2H, d , $J_{6,5=6',5'}=8,3$)	127,7	7,33 (4H, dd , $J_{6,5=6',5'}=9,3$)	153,8	—
7,7'	161,4	—	141,0	—	151,6	—	130,4	7,33 (4H, dd , $J_{7,6=7',6'}=9,3$)	140,9	—
8,8'	114,6	6,93 (4H, d , $J_{8,9=8',9'}=8,7$)	129,8	7,25 (4H, d , $J_{8,7=8',7'}=8,0$)	149,2	7,55 (4H, dd , $J_{6,8=6',8'}=8,4$)	133,2	7,73 (2H, d , $J_{8,7=8',7'}=9,3$)	153,8	—
9,9'	129,7	7,56 (4H, d , $J_{9,8=9',8'}=8,7$)	128,5	7,54 (4H, d , $J_{9,8=9',8'}=8,0$)	110,0	7,16 (2H, d , $J_{9,5=9',5'}=1,8$)	135,6	7,40 (4H, d , $J_{5,6=5',6'}=8,5$)	106,1	6,84 (4H, s)
10,10'	55,4	3,85 (3 H, s)	21,65	2,55 (3 H, s)	55,9	4,00 (6H, s)	—	—	56,5	3,84 (6H, s)
11,11'	—	—	—	—	55,9	4,00 (6H, s)	—	—	60,9	3,84 (6H, s)
12,12'	—	—	—	—	—	—	—	—	56,5	3,84 (6H, s)

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos **7-11**, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, e os J estão expressos em Hz.

	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)
1	188,5	—	201,1	—	188,6	—	189,2	—	188,8	—
2,2'	125,2	7,04 (2H, d , $J_{2,3=2',3'}=16,0$)	106,1	7,07 (2H, d , $J_{2,3=2',3'}=16,5$)	126,0	7,05 (2H, d , $J_{2,3=2',3'}=16,0$)	123,5	6,93 (2H, d , $J_{2,3=2',3'}=15,8$)	123,6	7,10 (2H, d , $J_{2,3=2',3'}=16,0$)
3,3'	134,0	7,66 (2H, d , $J_{3,2=3',2'}=16,0$)	135,4	7,94 (2H, d , $J_{3,2=3',2'}=16,5$)	142,2	7,68 (2H, d , $J_{3,2=3',2'}=16,0$)	143,3	7,67 (2H, d , $J_{3,2=3',2'}=15,8$)	142,9	7,70 (2H, d , $J_{3,2=3',2'}=16,0$)
4,4'	132,6	—	128,0	—	133,3	—	127,6	—	127,4	—
5,5'	126,1	7,45 (4H, dd , $J_{5,6=5',6'}=8,4$ e $J_{5,9=5',9'}=5,0$)	163,5	—	129,7	7,40 (4H, d , $J_{5,6=5',6'}=8,5$)	123,4	7,17 (2H, dd , $J_{5,6=5',6'}=8,2$ e $J_{5,9=5',9'}=1,4$)	116,6	7,60 (4H, d , $J_{5,6=5',6'}=8,5$)
6,6'	130,1	7,55 (4H, dd , $J_{6,5=6',5'}=8,4$ e $J_{6,8=6',8'}=5,0$)	90,2	6,12 (4H, s)	129,4	7,55 (4H, d , $J_{6,5=6',5'}=8,5$)	115,0	6,94 (2H, d , $J_{6,5=6',5'}=8,2$)	130,9	6,90 (4H, d , $J_{6,5=6',5'}=8,5$)
7,7'	142,0	—	161,9	—	136,6	—	146,9	—	160,5	—
8,8'	130,1	7,55 (4H, dd , $J_{8,9=8',9'}=8,4$ e $J_{8,6=8',6'}=5,0$)	90,2	6,12 (4H, s)	129,4	7,55 (4H, d , $J_{8,9=8',9'}=8,5$)	129,4	—	130,9	6,90 (4H, d , $J_{8,9=8',9'}=8,5$)
9,9'	126,1	7,45 (4H, dd , $J_{9,8=9',8'}=8,4$ e $J_{9,5=9',5'}=5,0$)	163,5	—	129,7	7,40 (4H, d , $J_{9,8=9',8'}=8,5$)	109,8	7,11 (2H, d , $J_{9,5=9',5'}=1,4$)	116,6	7,60 (4H, d , $J_{9,8=9',8'}=8,5$)
10,10'	—	—	56,2	3,88 (6H, s)	—	—	56,2	3,95 (6H, s)	—	—
11,11'	—	—	56,2	3,88 (6H, s)	—	—	—	—	—	—
12,12'	—	—	56,2	3,88 (6H, s)	—	—	—	—	—	—

4.2.2. Elucidação estrutural dos compostos 12-21

A elucidação estrutural dos compostos **12-21**, assim como dos curcuminoides **1-11**, foi feita com base nos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , infravermelho e de espectrometria de massas. Para facilitar a comparação com os dados da literatura, os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C destes os compostos foram obtidos em clorofórmio deuterado [87].

Assim como foi feito para os curcuminoides **1-11**, foram inicialmente analisados os espectros de espectros de RMN de ^1H desses compostos para atribuição dos deslocamentos químicos, integrais e multiplicidades de cada sinal nos espectros. Em seguida, foram analisados os RMN de ^{13}C e de DEPT 135 dos compostos **12-21** para identificar quais carbonos são metílicos, metilênicos, metínicos e quais não estão ligados a átomos de hidrogênio. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C e de DEPT 135 dos compostos de **12-21** estão em anexo na **Seção de espectros (ANEXO 1)**.

Para exemplificar como foi feita a elucidação dos compostos **12-21**, será discutida a elucidação do composto **12**, cujos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C encontram-se reunidos na **Tabela 7**. Analisando o espectro de RMN de ^{13}C (**Figura A56, ANEXO 1**), é possível observar a presença de sete sinais. Assim como no caso do curcuminóide **1**, a presença de um número de sinais menor que o número de carbonos total se deve à presença de simetria na estrutura desse composto. A maioria dos sinais foi observada na região de carbonos hibridizado em sp^2 (aromáticos ou olefínicos, entre δ_{C} 100 e 160), além do sinal referente ao carbono carbonílico (δ_{C} 188,6, C1). No entanto, como principal diferença em relação aos dados de RMN de ^{13}C do composto **1** devem ser ressaltadas a presença de dois sinais entre δ_{C} 20 e 50 (região dos carbonos de hibridização em sp^3), que foram atribuídos aos carbonos metilênicos $\text{C2}=\text{C2}'$ e $\text{C3}=\text{C3}'$ (CH_2). O carbono C2 (δ_{C} 44,6) que se encontra na posição α à carbonila, aparece mais desprotegido que C3 (δ_{C} 29,8) devido ao efeito indutivo elétron-retirador da carbonila.

Comparando-se os dados do espectro de RMN de ^1H (**Figura A54, ANEXO 1**) deste composto com o do curcuminóide **1** (**Figura A3, ANEXO 1**), foi possível observar a presença de dois sinais na região entre δ_{H} 2,0 e 3,0 – em δ_{H} 2,70 (4 H, t , $J=7,5$ Hz) e 2,88 (4 H, t , $J=7,5$ Hz) – que são característicos de hidrogênios ligados a carbonos metilênicos com hibridização sp^3 . Esses sinais foram atribuídos aos hidrogênios H2 e H3,

que no espectro de RMN de ^1H do composto **1** foram observados em δ_{H} 7,76 e δ_{H} 7,10, respectivamente. Estes dados confirmam que a hidrogenação das ligações duplas conjugadas com a carbonila do composto **1** (material de partida) para a obtenção de **12** foi bem-sucedida. O sinal de H3 encontra-se mais desblindado que o de H2 devido ao efeito anisotrópico do cone de desproteção da carbonila (**Esquema 9**). Tanto o sinal de H2 como o de H3 aparecem como tripletos devido ao acoplamento vicinal entre eles ($J = 7,5 \text{ Hz}$). Nas **tabelas 8 e 9** a seguir encontram-se os dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos **compostos 13-21**.

Esquema 9. Efeito de desblindagem de H3 devido à hiperconjugação.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) do composto **12** e comparação a literatura (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), ambos em CDCl_3 [110].

	Composto 12 (CDCl_3)		Literatura (CDCl_3) [98]	
	^{13}C (ppm)**	^1H (δ , ppm; J , Hz)	^{13}C (ppm)	^1H (δ , ppm; J , Hz)
1	209,2 (C)	—	208,9	—
2,2'	44,6 (CH_2)	2,70 (4H, t, $J_{2,3}=2,3';3'=7,5$)	44,4	2,67 (4H, d, $J=7,5$)
3,3'	29,8 (CH_2)	2,88 (4H, t, $J_{3,2,3';2'}=7,5$)	29,7	2,88 (4H, d, $J=7,5$)
4,4'	141,2 (C)	—	141,0	—
5,5'=9,9'	128,4 (CH)	7,17 (4H, m)	129,2	
6,6'=8,8'	128,6 (CH)	7,27 (4H, m)	129,2	
7,7'	126,2 (CH)	7,17 (2H, m)	126,4	7,14–7,27 (10H, m)

*Dados de IV (em pastilha de KBr) de **12** ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}$): ν_{max} / cm^{-1} : 3027 ($\nu_{\text{C}_{\text{sp}2}-\text{H}}$), 1714 ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$), 2927 ($\nu_{\text{C}_{\text{sp}3}-\text{H}}$).

EI-MS (m/z , intensidade relativa, %): 238 (37,7%, M^+), 133 (73,6%, $\text{M}^+-\text{C}_8\text{H}_9$), 105 (100%, C_8H_9^+), 91 (90,6%,

C_7H_7^+). ** Multiplicidade atribuída com base em sequência de pulsos DEPT 135.

4. Resultados e Discussão

Tatiana Mançini Vieira

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos **13-17**, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, e os J estão expressos em Hz.

^{13}C	^1H (δ , J, Hz)		^{13}C	^1H (δ , J, Hz)		^{13}C	^1H (δ , J, Hz)		^{13}C	^1H (δ , J, Hz)		^{13}C	^1H (δ , J, Hz)	
1	209,6	—	209,2	—		209,5	—		208,6	—		209,2	—	
2	44,9	2,64 (4H, t, $J_{2,3=2',3'}=7,8$)	44,9	2,68 (4H, t, $J_{2,3=2',3'}=7,6$)		123,5	2,68 (4H, t, $J_{2,3=2',3'}=7,6$)		42,5	2,73 (4H, t, $J_{2,3=2',3'}=7,3$)		42,4	2,71 (4H, t, $J_{2,3=2',3'}=7,6$)	
3	29,0	2,82 (4H, t, $J_{3,2=3',2'}=7,8$)	29,5	2,83 (4H, t, $J_{3,2=3',2'}=7,6$)		142,9	2,83 (4H, t, $J_{3,2=3',2'}=7,6$)		28,0	3,00 (4H, t, $J_{3,2=3',2'}=7,3$)		17,6	2,84 (4H, t, $J_{3,2=3',2'}=7,6$)	
4	133,1	—	133,7	—		127,8	—		138,6	—		110,1	—	
5	129,3	6,81 (4H, dd, $J_{5,6=5',6'}=7,0$)	120,2	6,67 (4H, m, $J_{5,6=5',6'}=6,5$)		123,0	6,67 (2H, dd, $J_{5,6=5',6'}=8,3$ e $J_{5,9=5',9'}=1,8$)		127,0	7,17 (6H, m)		158,8	6,38 (4H, s)	
6	114,0	7,05 (4H, dd, $J_{6,5=6',5'}=7,0$)	111,4	6,76 (2H, dd, $J_{6,5=6',5'}=6,7$)		111,0	6,80 (2H, d, $J_{6,5=6',5'}=8,3$)		127,8	7,17 (6H, m)		90,6	—	
7	158,1	—	147,5	—		151,6	—		129,6	7,17 (6H, m)		159,5	—	
8	114,0	7,05 (4H, dd, $J_{8,9=8',9'}=7,0$)	149,4	7,92 (8H, m)		149,2	—		130,7	7,32 (2H, m)		90,6	—	
9	129,3	6,81 (4H, dd, $J_{9,8=9',8'}=7,0$)	111,9	6,67 (4H, m, $J_{9,8=9',8'}=6,5$)		110,0	6,67 (2H, d, $J_{9,5=9',5'}=1,8$)		138,0	—		158,8	6,38 (4H, s)	
10	55,3	3,78 (6H, s)	56,0	3,84 (6H, s)		55,9	3,85 (6H, s)		—	—		55,7	3,82 (6H, s)	
11	—	—	56,0	—		55,9	3,85 (6H, s)		—	—		55,4	3,82 (6H, s)	
12	—	—	--	—		—	—		—	—		55,4	3,82 (6H, s)	

4. Resultados e Discussão

Tatiana Manzini Vieira

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos **18-21**, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm e os J estão expressos em Hz.

	^{13}C	^1H (δ , J, Hz)	^{13}C	^1H (δ , J, Hz)	^{13}C	^1H (δ , J, Hz)	^{13}C	^1H (δ , J, Hz)
1	205,3	—	209,2	—	208,6	—	209,7	—
2	60,2	2,71 (4H, t, $J_{2,3=2',3'} = 7,4$)	44,8	2,54 (4H, t, $J_{2,3=2',3'} = 7,6$)	44,4	2,67 (4H, t, $J_{2,3=2',3'} = 7,4$)	45,0	2,66 (4H, t, $J_{2,3=2',3'} = 7,4$)
3	29,4	2,88 (4H, t, $J_{3,2=3',2'} = 7,4$)	30,2	2,83 (4H, t, $J_{3,2=2',3'} = 7,6$)	29,0	2,84 (4H, t, $J_{3,2=3',2'} = 7,4$)	29,6	2,81 (4H, t, $J_{3,2=2',3'} = 7,4$)
4	171,0	—	136,5	—	139,5	—	133,0	—
5	128,4	7,17 (8H, m)	105,6	—	129,8	7,07 (4H, dd, $J_{5,6=5',6'} = 9,7$ e $J_{5,9=5',9'} = 3,0$)	120,8	6,65 (2H, dd, $J_{5,6=5',6'} = 7,9$ e $J_{5,9=5',9'} = 1,9$)
6	128,6	7,17 (8H, m)	153,4	6,12 (4H, s)	128,7	7,22 (4H, dd, $J_{6,5=6',5'} = 9,7$ e $J_{6,8=6',8'} = 3,0$)	114,4	6,80 (2H, d, $J_{6,5=6',5'} = 7,9$)
7	126,2	—	136,9	—	132,0	—	144,0	—
8	128,6	7,17 (8H, m)	153,4	6,12 (4H, s)	128,7	7,22 (4H, dd, $J_{8,9=8',9'} = 9,7$ e $J_{8,6=8',6'} = 3,0$)	146,6	—
9	128,4	7,17 (8H, m)	105,6	—	129,8	7,07 (4H, dd, $J_{9,8=9',8'} = 9,7$ e $J_{9,5=9',5'} = 3,0$)	111,1	6,62 (2H, d, $J_{9,5=9',5'} = 1,9$)
10	—	—	56,2	3,82 (6H, s)	—	—	55,9	3,85 (6H, s)
11	—	—	60,9	3,82 (6H, s)	—	—	—	—
12	—	—	56,2	3,82 (6H, s)	—	—	—	—

4.2.3. Elucidação estrutural dos compostos 22-31

A elucidação estrutural dos compostos **22-31**, assim como para os demais compostos descritos neste trabalho, foi feita com base nos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , de infravermelho e de espectrometria de massas. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C destes compostos também foram obtidos em clorofórmio deuterado. Assim como foi feito para os curcuminoides **1-11**, foram inicialmente analisados os espectros de RMN de ^{13}C e de DEPT 135 dos compostos **22-31** para identificar quais carbonos são metílicos, metilênicos, metínicos e quais não estão ligados a átomos de hidrogênio. Em seguida, foram analisados os espectros de RMN de ^1H desses compostos para atribuição dos deslocamentos químicos, integrais e multiplicidades de cada sinal nos espectros. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C e de DEPT 135 dos compostos de **22-31** encontram-se em anexo a este relatório, na **Seção de espectros (ANEXO 1)**.

Assim como foi feito para os compostos **1-11** e **12-21**, será discutida nesta seção apenas a elucidação do composto **22**. Para os derivados **23-31**, cujas estruturas foram elucidadas da mesma forma que o composto **22**, serão apenas listados os dados de IV, de espectrometria de massas e de RMN de ^1H e de ^{13}C . Neste trabalho, será discutida apenas a elucidação do composto **22**, cujos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C encontram-se reunidos na **Tabela 10**. Neste caso, no entanto, não foi possível comparar os dados de RMN deste composto com os da literatura, uma vez que os mesmos estão disponíveis em patentes, às quais não foi possível ter acesso. Desta forma, os dados de RMN do composto **22** serão comparados com os do curcuminóide **1**, do qual este composto foi obtido.

Analisando-se o espectro de RMN de ^{13}C (**Figura A103, ANEXO 1**), foi possível observar a presença de sete sinais. Assim como no caso do curcuminóide **1**, o reduzido número de sinais deve-se à presença de simetria na estrutura desse composto. Entretanto, ao contrário do que ocorreu com o composto **1**, em que todos os sinais apareceram na região dos carbonos com hibridização sp^2 , três sinais foram observados na região de carbonos de hibridização sp^3 (em δ_{C} 32,1, 30,3 e 70,9). O sinal em δ_{C} 70,9, que é característico de carbonos oxigenados, indicou que a reação de hidrogenação também levou à conversão do grupo $\text{C}=\text{O}$ em $\text{CH}-\text{OH}$ e, conseqüentemente, à formação de um carbono pró-quiral em C1. A presença

deste carbono metínico aumenta consideravelmente a complexidade do espectro de RMN de ^1H (**Figura A101, ANEXO 1**). As expansões dos sinais dos hidrogênios H2a (δ_{H} 1,82), H2b (δ_{H} 1,89), H3a (δ_{H} 2,74) e H3b (δ_{H} 2,85), se encontram na **Figura 10**, juntamente com o diagrama de chaves para determinação das constantes de acoplamento spin-spin. Neste diagrama, as maiores constantes de acoplamento devem-se aos acoplamentos geminais (2J) entre H2a e H2b ($J = 13,8$ Hz) e entre H3a e H3b ($J = 13,8$ Hz). As demais constantes são devido aos acoplamentos vicinais de H2a e H2b com H1 (7,7 e 4,5 Hz, respectivamente) e com H3a (6,0 e 9,3 Hz, respectivamente) e com H3b (9,3 e 6,8 Hz, respectivamente). Na **Figura 11** encontra-se a expansão do sinal de H1 (δ_{H} 3,72). A partir do diagrama de chaves deste sinal, foi possível determinar as constantes de acoplamento com H2a ($J=7,7$ Hz) e H2b (4,5 Hz). Os demais sinais do espectro de RMN de ^1H do composto **22** são referentes aos hidrogênios dos anéis aromáticos, que são muito similares aos do composto **1**.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto **22**, juntamente com os do curcuminóide **1** do qual o mesmo foi obtido, encontram-se reunidos na **Tabela 10** (p. 74). Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C dos compostos **23 a 31** assim como os dados de seus espectros de IV e de massas, se encontram nas **Tabelas 11 e 12**.

Figura 10. Expansões dos sinais dos hidrogênios H2a e H2b (a) e H3a e H3b (b) do composto **22**, com os respectivos diagramas de chaves e constantes de acoplamento.

Figura 11. Expansões dos sinais do hidrogênio H1 do composto **22**, com os respectivos diagramas de chaves e constantes de acoplamento.

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) do composto **22** e comparação com o composto **1** (300 MHz e 75 MHz, respectivamente), em CDCl_3 .

Composto 22 (CDCl ₃)			Composto 1 (CDCl ₃)	
	¹³ C (ppm)**	¹ H (δ, ppm; J, Hz)	¹³ C (ppm)	¹ H (δ, ppm; J, Hz)
1	70,9 (CH)	3,72 (1H, <i>tt</i> , J _{1,2a} =1',2a' = 7,7, J _{1,2b} =1',2b' = 4,5)	189,0 (C=O)	—
2,2'	39,3 (CH ₂)	1,82 (2 H, <i>dddd</i> , J _{2a,2b} =2a',2b' = 13,8, J _{2a,3b} =2a',3b' = 9,3, J _{2a,1} =2a',1 = 7,7, J _{2a,3a} =2a',3a' = 6,0, H2a,2a') 1,89 (2 H, <i>dddd</i> , J _{2b,2a} =2b',2a' = 13,8, J _{2b,3a} =2b',3a' = 9,3, J _{2b,3b} =2b',3b' = 6,8, J _{2b,1} =2b',1 = 4,5, H2b,2b')	125,6 (CH)	7,10 (2H, d, J _{2,3} =2';3'=16,0)
3,3'	32,1 (CH ₂)	2,74 (2 H, <i>ddd</i> , J _{3b,3a} =3b',3a' = 13,8, J _{3b,2a} =3b',2a' = 9,3, J _{3b,2b} =3b',2b' = 6,8, H3b,3b') 2,85 (2 H, <i>ddd</i> , J _{3a,3b} =3a',3b' = 13,8, J _{3a,2b} =3a',2b' = 9,3, J _{3a,2a} =3a',2a' = 6,0, H3a,3a')	143,4 (CH)	7,76 (2H, d, J _{3;2',3';2'} =16,0)
4,4'	142,1 (C)	—	134,9 (C)	—
5,5'=9,9'	128,5 (CH)	7,25 (6H, <i>m</i>)	128,5 (CH)	7,62 (2H, <i>m</i>)
6,6'=8,8'		7,34 (4H, <i>m</i>)	129,1 (CH)	7,42 (2H, <i>m</i>)
7,7'	125,9 (CH)	7,25 (6H, <i>m</i>)	130,6 (CH)	7,40 (2H, <i>m</i>)

*Dados de IV (em pastilha de KBr) de **22** ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}$): ν_{max} / cm^{-1} : 3419 (ν_{OH}), 2859 ($\nu_{\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}}$), 1602 ($\nu_{\text{C-O}}$), 2857 ($\nu_{\text{C-H}}$). *Não foi possível obter o espectro de massas deste composto por EI-EM (70 eV). ** Multiplicidade atribuída com base em sequência de pulsos DEPT 135.

4. Resultados e Discussão

Tatiana Mançini Vieira

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos **23-27**, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm e os J estão expressos em Hz.

	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)
1	71,0	3,64 (1H, <i>dt</i> , $J_{1,2a}=7,7$, $J_{1,2b}=4,5$)	71,0	3,68 (1H, <i>dt</i> , $J_{1,2a}=7,7$, $J_{1,2b}=4,5$)	71,1	3,67 (1H, <i>dt</i> , $J_{1,2a}=7,7$, $J_{1,2b}=4,5$)	70,9	3,70 (1H, <i>dt</i> , $J_{1,2a}=7,7$, $J_{1,2b}=4,5$)	71,1	3,70 (1H, <i>dt</i> , $J_{1,2a}=7,7$, $J_{1,2b}=4,5$)
2a,2a'		1,72 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2a,2b}=13,8$, $J_{2a,3b}=9,3$, $J_{2a,1}=7,7$, $J_{2a,3a}=6,0$)		1,77 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2a,2b}=13,8$, $J_{2a,3b}=9,4$, $J_{2a,1}=7,7$ e $J_{2a,3a}=6,0$)		1,76 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2a,2b}=13,8$, $J_{2a,3b}=9,3$, $J_{2a,1}=7,7$, $J_{2a,3a}=6,3$)		1,79 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2a,2b}=13,8$, $J_{2a,3b}=9,3$, $J_{2a,1}=7,7$, $J_{2a,3a}=5,5$)		1,77 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2a,2b}=13,8$, $J_{2a,3b}=9,5$, $J_{2a,1}=7,7$, $J_{2a,3a}=6,0$)
2b,2b'	39,5	1,80 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2b,2a}=13,8$, $J_{2b,3a}=9,3$, $J_{2b,3b}=6,8$, $J_{2b,1}=4,5$)	39,4	1,82 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2b,2a}=13,8$, $J_{2b,3a}=9,4$, $J_{2b,3b}=6,8$, $J_{2b,1}=4,5$)	39,5	1,81 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2b,2a}=13,8$, $J_{2b,3a}=9,3$, $J_{2b,3b}=6,8$, $J_{2b,1}=4,5$)	37,5	1,85 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2b,2a}=13,8$, $J_{2b,3a}=10,3$, $J_{2b,3b}=10,0$, $J_{2b,1}=4,5$)	39,4	1,84 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2b,2a}=13,8$, $J_{2b,3a}=9,4$, $J_{2b,3b}=6,8$, $J_{2b,1}=4,5$)
3a,3a'		2,72 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3a,3b}=13,8$ e $J_{3a,2b}=9,3$, $J_{3a,2a}=6,0$)		2,74 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3a,3b}=13,8$, $J_{3a,2b}=9,3$, $J_{3a,2a}=6,0$)		2,73 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3a,3b}=13,8$, $J_{3a,2b}=9,3$, $J_{3a,2a}=6,3$)		2,92 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3a,3b}=13,8$, $J_{3a,2b}=10,3$, $J_{3a,2a}=5,5$)		2,75 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3a,3b}=13,8$, $J_{3a,2b}=9,5$, $J_{3a,2a}=6,0$)
3b,3b'	31,3	2,61 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3b,3a}=13,8$, $J_{3b,2a}=9,3$, $J_{3b,2b}=6,8$)	31,7	2,65 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3b,3a}=13,8$, $J_{3b,2a}=9,3$, $J_{3b,2b}=6,8$)	31,8	2,63 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3b,3a}=13,8$, $J_{3b,2a}=9,3$, $J_{3b,2b}=6,8$)	29,9	2,81 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3b,3a}=13,8$, $J_{3b,2a}=10,0$, $J_{3b,2b}=6,4$)	33,0	2,62 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3b,3a}=13,8$, $J_{3b,2a}=9,3$, $J_{3b,2b}=6,8$)
4,4'	145,5	—	139,0	—	134,9	—	139,7	—	137,9	—
5,5'	129,4	7,10 (4H, <i>dd</i> , $J_{5,6}=6,6$, $J_{5,9}=2,0$)	128,4	7,10 (8H, <i>dd</i>)	120,3	6,67 (4H, <i>dd</i>)	127,5	7,19 (6H, <i>m</i>)	105,6	6,41 (4H, <i>s</i>)
6,6'	113,8	6,85 (4H, <i>dd</i> , $J_{6,5}=6,6$, $J_{6,8}=2,0$)	129,2	7,10 (8H, <i>dd</i>)	111,9	6,67 (4H, <i>dd</i>)	127,0	7,19 (6H, <i>m</i>)	153,4	—
7,7'	154,4	—	135,4	—	147,1	—	129,6	7,19 (6H, <i>m</i>)	136,3	—
8,8'	113,8	6,85 (4H, <i>dd</i> , $J_{8,9}=6,6$, $J_{8,6}=2,0$)	129,2	7,10 (8H, <i>dd</i>)	149,1	7,10 (8H, <i>dd</i>)	130,6	7,35 (2H, <i>d</i> , $J_{8,7}=7,7$)	153,4	—
9,9'	129,4	7,10 (4H, <i>dd</i> , $J_{9,8}=6,6$, $J_{9,5}=2,0$)	128,4	7,10 (8H, <i>dd</i>)	111,5	6,79 (2H, <i>dd</i>)	134,0	—	105,6	6,41 (4H, <i>s</i>)
10,10'/12,12'	55,3	3,79 (6H, <i>s</i>)	21,0	2,34 (6H, <i>s</i>)	56,1	3,87 (12H, <i>s</i>)	—	—	56,5	3,81 (12H, <i>s</i>)
11,11'	—	—	--	3,84 (12 H, <i>s</i>)	56,1	3,87 (12H, <i>s</i>)	—	—	60,9	3,84 (6H, <i>s</i>)

4. Resultados e Discussão

Tatiana Mançini Vieira

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e de ^{13}C (100 MHz) dos compostos **28-31**, em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm e os J estão expressos em Hz.

	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C	^1H (δ , J , Hz)	^{13}C
1	71,0	3,73 (1H, <i>dt</i> , $J_{1,2a}=7,7$, $J_{1,2b}=4,5$)	70,7	3,40 (1H, <i>dt</i> , $J_{1,2a}=7,7$, $J_{1,2b}=4,5$)	71,0	3,61 (1H, <i>dt</i> , $J_{1,2a}=7,7$, $J_{1,2b}=4,5$)	71,0	3,67 (1H, <i>dt</i> , $J_{1,2a}=7,7$, $J_{1,2b}=4,5$)	
2a,2a'		,84 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2a,2b}=13,8$, $J_{2a,3b}=9,5$, $J_{2a,1}=7,7$, $J_{2a,3a}=6,0$)		1,57 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2a,2b}=13,8$, $J_{2a,3b}=9,5$, $J_{2a,1}=7,7$, $J_{2a,3a}=6,0$)		1,74 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2a,2b}=13,8$, $J_{2a,3b}=9,1$, $J_{2a,1}=7,7$, $J_{2a,3a}=6,1$)		1,74 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2a,2b}=13,8$, $J_{2a,3b}=9,5$, $J_{2a,1}=7,7$, $J_{2a,3a}=6,0$)	
2b,2b'	39,3	1,89 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2b,2a}=13,8$, $J_{2b,3a}=9,3$, $J_{2b,3b}=6,8$, $J_{2b,1}=4,5$)	36,7	1,61 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2b,2a}=13,8$, $J_{2b,3a}=9,4$, $J_{2b,3b}=6,8$, $J_{2b,1}=4,5$)	39,3	1,78 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2b,2a}=13,8$, $J_{2b,3a}=8,8$, $J_{2b,3b}=7,1$, $J_{2b,1}=4,5$)	39,3	1,80 (2H, <i>dddd</i> , $J_{2b,2a}=13,8$, $J_{2b,3a}=9,4$, $J_{2b,3b}=6,8$, $J_{2b,1}=4,5$)	
3a,3a'		2,84 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3a,3b}=13,8$, $J_{3a,2b}=9,5$, $J_{3a,2a}=6,0$)		2,72 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3a,3b}=13,8$, $J_{3a,2b}=9,5$, $J_{3a,2a}=6,0$)		2,75 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3a,3b}=13,8$, $J_{3a,2b}=8,8$, $J_{3a,2a}=6,3$)		2,71 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3a,3b}=13,8$, $J_{3a,2b}=9,2$, $J_{3a,2a}=6,5$)	
3b,3b'	32,0	2,74 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3b,3a}=13,8$, $J_{3b,2a}=9,5$, $J_{3b,2b}=6,7$)	18,8	2,62 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3b,3a}=13,8$, $J_{3b,2a}=9,3$, $J_{3b,2b}=6,9$)	31,4	2,64 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3b,3a}=13,8$, $J_{3b,2a}=9,1$, $J_{3b,2b}=7,1$)	32,0	2,61 (2H, <i>ddd</i> , $J_{3b,3a}=13,8$, $J_{3b,2a}=9,3$, $J_{3b,2b}=6,8$)	
4,4'	42,1	—	111,2	—	40,4	—	134,0	—	
5,5'	26,0	7,25 (4H, <i>m</i>)	158,8	6,12 (4H, <i>s</i>)	28,6	7,10 (4H, <i>dd</i> , $J_{5,6}=9,8=6,5$ e $J_{5,9}=6,8=1,8$)	120,9	3,68 (2H, <i>dd</i>)	
6,6'	28,5	7,33 (4H, <i>m</i>)	90,7	6,12 (4 H, <i>s</i>)	29,8	7,25 (4H, <i>dd</i> , $J_{6,5}=8,9=6,5$ e $J_{8,6}=9,5=1,8$)	114,4	6,82 (2H, <i>d</i>)	
7,7'	28,5	—	159,2	—	31,7	—	143,7	—	
8,8'	28,5	7,33 (4H, <i>m</i>)	90,7	6,12 (4 H, <i>s</i>)	29,8	7,25 (4H, <i>dd</i> , $J_{6,5}=8,9=6,5$ e $J_{8,6}=9,5=1,8$)	146,5	7,55 (4H, <i>d</i> , $J_{6,5}=8,5$)	
9,9'	26,0	7,25 (4H, <i>m</i>)	158,8	—	28,6	7,10 (4H, <i>dd</i> , $J_{5,6}=9,8=6,5$ e $J_{5,9}=6,8=1,8$)	111,1	6,64 (2H, <i>d</i>)	
10,10' / 12,12'	--	—	55,8	3,80 (12H, <i>s</i>)	--	—	56,1	3,84 (6H, <i>s</i>)	
11,11'	--	—	55,4	3,78 (6H, <i>s</i>)	--	—	--		

4.3. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos curcuminoides monocetônicos frente às principais bactérias cariogênicas foi avaliada segundo o método da microdiluição em microplacas. A atividade destes compostos foi analisada a partir dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos, que se encontram na **Tabela 13** (p. 79). Os compostos foram testados nas concentrações de 0,115 µg/mL a 400 µg/mL e o controle positivo (diidrocloridrato de clorexidina) foi utilizado nas concentrações de 0,115 µg/mL a 59,0 µg/mL.

Segundo critérios da literatura, valores de CIM inferiores a 100 µg/mL, entre $100 \leq \text{CIM} < 500$ µg/mL e $500 \leq \text{CIM} < 1000$ µg/mL correspondem a atividades promissora, moderada e fraca, respectivamente, enquanto valores de $\text{CIM} > 1000$ µg/mL denotam inatividade [100–103]. A partir destes critérios, a maioria dos compostos apresentaram atividade antimicrobiana ($\text{CIM} \leq 400$ µg/mL) frente a pelo menos um dos microrganismos selecionados. Os valores mais baixos de CIM foram obtidos para os compostos **10** e **11** (**Tabela 13**). Estes compostos apresentaram atividade promissora contra *Streptococcus mutans* (CIM = 50 µg/mL; 0,15 mM e CIM = 50 µg/mL; 0,18 mM) e *Streptococcus mitis* (CIM = 50 µg/mL; 0,15 mM e CIM = 50 µg/mL; 0,18 mM) bem como atividade moderada contra *Streptococcus sanguinis* (CIM = 100 µg/mL; 0,30 mM e CIM = 100 µg/mL; 0,37 mM), *Lactobacillus casei* (CIM = 100 µg/mL; 0,30 mM e CIM = 25 µg/mL; 0,09 mM) e *Streptococcus salivarius* (CIM = 200 µg/mL; 0,61 mM e CIM = 200 µg/mL; 0,75 mM). O composto **11** também apresentou atividade moderada contra *Streptococcus sobrinus* (CIM = 200 µg/mL; 0,75 mM). A atividade dos compostos **10** e **11** contra *S. mutans* é um resultado promissor, visto que poucos compostos naturais são capazes de inibir este micro-organismo, que é um dos principais agentes causadores da cárie dentária [9]. Os compostos **14** e **28** também apresentaram atividade moderada contra *Streptococcus mitis* (MIC = 100 µg/mL, 0,37 mM e 0,27 mM), respectivamente. No entanto, estes compostos foram fracamente ativos ou inativos contra todas as outras bactérias cariogênicas testadas (valores de CIM superiores a 400 µg/mL).

Tabela 13. Valores da concentração inibitória mínima (CIM), em µg/mL, dos curcuminoides monocetônicos frente ao painel representativo de bactérias cariogênicas avaliadas.

Microorganismo	<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	<i>Streptococcus mitis</i> (ATCC 49456)	<i>Streptococcus salivarius</i> (ATCC 25975)	<i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556)	<i>Streptococcus sobrinus</i> (ATCC 33478)	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 4082)	<i>Lactobacillus casei</i> (ATCC 11578)
1	>400 (1,70) ^a	400 (1,70) ^a	>400 (1,70) ^a	400 (1,70) ^a	>400 (1,70) ^a	>400 (1,70) ^a	>400 (1,70) ^a
2	>400 (1,36) ^a	>400 (1,36) ^a	400 (1,36) ^a	400 (1,36) ^a	>400 (1,36) ^a	>400 (1,36) ^a	>400 (1,36) ^a
7	>400 (1,02) ^a	400 (1,02) ^a	400 (1,02) ^a	>400 (1,02) ^a	400 (1,02) ^a	>400 (1,02) ^a	>400 (1,02) ^a
8	400 (0,96) ^a	400 (0,96) ^a	400 (0,96) ^a	>400 (0,96) ^a	>400 (0,96) ^a	400 (0,96) ^a	>400 (0,96) ^a
10	50 (0,15) ^a	50 (0,15) ^a	200 (0,61) ^a	100 (0,30) ^a	400 (1,22) ^a	>400 (1,22) ^a	100 (0,30) ^a
11	50 (0,18) ^a	50 (0,18) ^a	200 (0,75) ^a	100 (0,37) ^a	200 (0,75) ^a	400 (1,50) ^a	25 (0,09) ^a
12	>400 (1,68) ^a	>400 (1,68) ^a	400 (1,68) ^a	400 (1,68) ^a	>400 (1,68) ^a	>400 (1,68) ^a	>400 (1,68) ^a
13	>400 (1,34) ^a	>400 (1,34) ^a	>400 (1,34) ^a	>400 (1,34) ^a	400 (1,34) ^a	>400 (1,34) ^a	>400 (1,34) ^a
14	200 (0,75) ^a	100 (0,37) ^a	200 (0,75) ^a	200 (0,75) ^a	400 (1,50) ^a	>400 (1,50) ^a	>400 (1,50) ^a
22	400 (1,66) ^a	200 (0,83) ^a	400 (1,66) ^a	400 (1,66) ^a	>400 (1,66) ^a	>400 (1,66) ^a	>400 (1,66) ^a
23	400 (1,33) ^a	400 (1,33) ^a	400 (1,33) ^a	>400 (1,33) ^a	400 (1,33) ^a	400 (1,33) ^a	>400 (1,33) ^a
28	>400 (1,01) ^a	100 (0,27) ^a	200 (0,50) ^a	400 (1,01) ^a	>400 (1,01) ^a	>400 (1,01) ^a	>400 (1,01) ^a
31	200 (0,60) ^a	100 (0,30) ^a	>400 (1,20) ^a	200 (0,60) ^a	400 (1,20) ^a	>400 (1,20) ^a	200 (0,60) ^a
Controle Positivo	0,92 ^b (0,0015) ^a	1,84 ^b (0,00318) ^a	1,84 ^b (0,00318) ^a	0,92 ^b (0,0015) ^a	0,92 ^b (0,0015) ^a	7,37 ^b (0,012) ^a	0,92 ^b (0,0015) ^a

^a Valores em mM. ^b Diidrocloreto de clorexidina. *Compostos 3, 24, 4, 15, 25, 5, 16, 26, 6, 17, 27, 18, 19, 29, 9, 20, 30 e 21 foram inativos nas concentrações testadas (MIC > 400 µg/mL) e por isso não foram incluídos.

Figura 12. Estrutura dos curcuminoides 1-31.

A comparação entre os valores de CIM dos curcuminoides testados indicaram que a maioria dos compostos que contem ligação dupla entre C2 e C3, e entre C2' e C3' foram inativos contra os microrganismos testados na faixa de concentrações avaliadas, exceto para os compostos **1**, **2**, **8**, **10** e **11**. Considerando que os compostos **2**, **8** e **10** possuem grupo metoxi ligado ao anel aromático, a presença deste substituinte pode estar relacionada à atividade antimicrobiana desses curcuminoides. Estas conclusões estão de acordo com relatos anteriores sobre a atividade antibacteriana de chalconas (cetonas α , β -insaturadas), que é potencializada pela presença de grupos doadores de elétrons no anel aromático, tais como os grupos metoxi e hidroxí [104]. Esse comportamento pôde também ser observado para o composto **11**, o qual contém apenas um grupo hidroxí ligado ao aromático. Contudo, os compostos **4** e **6**, que também têm grupos metoxi ligados aos anéis aromáticos, foram inativos na faixa de concentrações testadas. Estes resultados podem indicar que a presença de dois grupos metoxi em carbonos adjacentes do anel aromático diminuem a atividade antimicrobiana contra as bactérias cariogênicas testadas.

Para compostos que possuem uma ligação dupla entre C2 e C3 e entre C2' e C3', a presença de um grupo metilo ou de um halogênio (Cl ou Br) no anel aromático não afetou a atividade antimicrobiana. Os compostos **12** e **13** exibiram atividade semelhante à dos compostos **1** e **2**, a partir do qual foram obtidos por hidrogenação. Por outro lado, os compostos **14** e **18** tiveram atividade aumentada em comparação com precursores **3** e **7**. Embora a hidrogenação da ligação dupla entre C2 e C3 (ou C2' e C3') tenda a aumentar ligeiramente a atividade antimicrobiana contra as bactérias cariogênicas testadas, o papel desempenhado pela ligação dupla entre estes dois carbonos parece estar associado à natureza do substituinte presente no anel aromático. Isso pôde ser observado para o composto **10**, que apresentou atividade promissora contra o *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis* apenas na presença da ligação dupla, enquanto seu derivado hidrogenado **21** apresentou apenas atividade fraca contra essas bactérias. Além disso, a redução da carbonila cetônica para produzir um álcool secundário teve pouco ou nenhum efeito sobre a atividade antimicrobiana da maioria dos curcuminoides, exceto para os compostos **22**, **28** e **31**. No caso de **22**, **28** e **31**, a maior atividade em relação a de seus precursores **12**, **18** e **21** pode estar associada ao aumento da hidrofilicidade destes compostos devido à presença do grupo hidroxila no C1.

A atividade antimicrobiana de curcumina A (**10**) foi também comparada com a da curcumina, que é a sua análoga β -dicetona [86]. Como mencionado anteriormente no **item 1.1**, a capacidade da curcumina em suprimir a adesão do *S. mutans* à superfície do dente, inibindo a atividade da enzima sortase A, já foi descrita na literatura [48–50]. Apesar da atividade anti-HIV da curcumina A [86], sua atividade contra bactérias cariogênicas ainda não havia sido relatada anteriormente. Segundo a literatura, a curcumina é eficaz contra *S. mutans* (CIM = 250 $\mu\text{g/mL}$; 0,68 mM) e *S. mitis* (CIM = 62,5 $\mu\text{g/mL}$; 0,17 mM) [105,106], enquanto a curcumina A foi ativa a 50 $\mu\text{g/mL}$ (0,15 mM) contra *S. mutans* e *S. mitis*. Portanto, os dados indicaram que a curcumina A (**10**) é mais eficaz contra essas duas bactérias cariogênicas que a própria curcumina. Além disso, a atividade promissora do composto **11** contra as mesmas bactérias cariogênicas demonstrou que a atividade desse composto, assim como a curcumina A, está relacionada à presença do grupo hidroxil no anel aromático e da ligação dupla entre os carbonos C2 e C3 e C2' e C3'.

4.4. Estudo de fragmentação de curcuminoides monocetônicos protonados

4.4.1. Correlação estrutura-fragmentação

As correlações estrutura-fragmentação são geralmente deduzidas a partir da comparação entre espectros de íons produtos obtidos em uma energia de colisão “ótima” (E_{lab}), na qual a intensidade relativa do pico da molécula protonada no espectro de íons produtos torna-se menor que 50%, sem que ocorra fragmentação extensiva. A utilização de um mesmo valor de E_{lab} para uma série de compostos tem como objetivo minimizar os efeitos dos parâmetros experimentais sobre o perfil do espectro de íons produtos e, com isso, fazer com que as diferenças entre os espectros de dois compostos estruturalmente semelhantes possam ser intimamente associadas às diferenças estruturais existente entre eles.

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa demonstrou a importância de correlações estrutura-fragmentação na elucidação das vias de fragmentação de diversas séries de compostos que possuem o mesmo núcleo estrutural, tais como alcaloides, lactonas sesquiterpênicas e benzofuranos [107–109]. Neste trabalho, a comparação entre as intensidades relativas (RI,%) e E_{lab} (eV) evidenciou que o valor de E_{lab} ótimo para o desenvolvimento do estudo de fragmentação dos curcuminoides monocetônicos **1-11** foi 20 eV

(Figura 12). Com relação aos curcuminoides (12-31), o pico correspondente à molécula protonada não foi observado nos respectivos espectros de massas (ESI-MS). Apesar das alterações feitas nos parâmetros experimentais (capilar e potencial do cone extrator, por exemplo), verificou-se que a perda de água a partir das moléculas protonadas desses compostos ocorre com grande facilidade na fonte de ionização, possivelmente devido à ausência da ligação dupla entre C2–C3 e C2'–C3'. Por essa razão, e levando-se também em conta que esses compostos apresentaram atividade antimicrobiana pouco expressiva, esta etapa do trabalho foi realizada apenas com os compostos 1-11.

Os espectros de íons produtos dos curcuminoides monocetônicos 1-11 obtidos em $E_{lab} = 20$ eV encontram-se na Figura 14 e seus principais íons produtos (com intensidade relativa maior que 5%) estão listados na Tabela 14. A análise desses espectros mostrou que o íon produto **H** é o mais intenso no espectro de íons produtos da maioria dos compostos analisados. Este íon resulta da eliminação direta de $C_{10}H_3OR_1R_2R_3R_4R_5$ a partir da molécula protonada (**A**). A formação do íon **D** a partir de **A** se dá por meio da eliminação de $C_8H_3R_1R_2R_3R_4R_5$, que compete com a formação de **H**, conforme mostrado no Esquema 11. Outros íons produto comuns incluem **B** (**A** - H_2O) e **C** (**A** - $C_6HR_1R_2R_3R_4R_5$). Os íons produtos **F** (**C** - C_2H_2O) e **E** (**C** - CO) também foram observados nos espectros da maioria dos curcuminoides investigados, exceto para o composto 7. Além disso, apenas os compostos 1 e 2 foram investigados na literatura por Cyriac e colaboradores [84].

Figura 13. Gráficos da intensidade relativa (%) dos principais íons produtos dos curcuminoides monocetônicos 1-11 protonados em função energia de colisão (E_{lab} , em eV).

Figura 14. Espectro de íons produtos dos curcuminoides monocetônicos 1-11 protonados (gás de colisão Ar, E_{lab} = 20 eV).

Tabela 14. Íons produtos dos curcuminoides monocetônicos **1-11** em energia de colisão (E_{lab}) de 20 eV. As intensidades relativas (%) estão demonstradas entre parênteses. Abaixo das razões m/z (em *itálico*), estão demonstrados os dados dos experimentos de troca por deutério.

Atribuição	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A ($[M+H]^+$)	235 (40) <i>236</i>	295 (36) <i>296</i>	263 (62) <i>264</i>	355 (38) <i>356</i>	303 (56) <i>305</i>	415 (15) <i>416</i>	391 (90) <i>392</i>	415 (9) <i>416</i>	303 (42) <i>304</i>	327 (100) <i>328</i>	267 (36) <i>268</i>
B (A -H ₂ O)	217 (28) <i>217</i>	277 (9) <i>277</i>	245 (23) <i>245</i>	337 (7) <i>337</i>	285 (10) <i>285</i>	397 (5) <i>397</i>	373 (9) <i>373</i>	397 (5) <i>397</i>	285 (9) <i>285</i>	309 (9) <i>309</i>	249 (7) <i>249</i>
Q (B •CH ₃)	—	—	230 (50) <i>230</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
R (Q •CH ₃)	—	—	215 (55) <i>215</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
S (A •X)	—	—	—	—	268 (12) <i>268</i>	—	312 (59) <i>312</i>	—	268 (20) <i>268</i>	—	—
X (A -C ₂ H ₂ O)	193 (5) <i>193</i>	253 (10) <i>253</i>	221 (14) <i>221</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
T (B •X)	—	—	—	—	250 (16) <i>250</i>	—	294 (11) <i>294</i>	—	250 (10) <i>250</i>	—	—
U (S •X)	—	—	—	—	233 (15) <i>233</i>	—	233 (72) <i>233</i>	—	233 (5) <i>233</i>	—	—
V (T •X)	—	—	—	—	215 (69) <i>215</i>	—	215 (55) <i>215</i>	—	215 (42) <i>215</i>	—	—
Y (E •CH ₃)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	160 (13) <i>160</i>	—
C (A - C ₆ HR ₁ R ₂ R ₃ R ₄ R ₅)	157 (53) <i>157</i>	187 (56) <i>187</i>	171 (88) <i>171</i>	217 (65) <i>217</i>	191 (27) <i>191</i>	247 (22) <i>247</i>	235 (25) <i>235</i>	247 (33) <i>247</i>	191 (25) <i>191</i>	203 (98) <i>203</i>	173 (43) <i>173</i>
D (A - C ₈ H ₃ R ₁ R ₂ R ₃ R ₄ R ₅)	131 (42) <i>131</i>	161 (78) <i>161</i>	145 (62) <i>145</i>	191 (100) <i>191</i>	165 (14) <i>165</i>	221 (100) <i>221</i>	209 (30) <i>209</i>	221 (100) <i>221</i>	165 (30) <i>165</i>	131 (42) <i>131</i>	147 (77) <i>147</i>
E (C -CO)	129(80) <i>129</i>	159 (42) <i>159</i>	143 (85) <i>143</i>	189 (20) <i>189</i>	163 (18) <i>163</i>	219 (8) <i>219</i>	—	219 (5) <i>219</i>	163 (16) <i>163</i>	129(80) <i>129</i>	145 (45) <i>145</i>
F (C -C ₂ H ₂ O)	115 (22) <i>115</i>	145 (15) <i>145</i>	129 (32) <i>129</i>	175 (10) <i>175</i>	149 (5) <i>149</i>	205 (5) <i>205</i>	—	205 (15) <i>205</i>	149 (5) <i>149</i>	161 (12) <i>161</i>	131 (15) <i>131</i>
G (D -CO)	103 (80) <i>103</i>	133 (72) <i>133</i>	117 (73) <i>117</i>	163 (28) <i>163</i>	137 (21) <i>137</i>	193 (18) <i>193</i>	181 (15) <i>181</i>	193 (5) <i>193</i>	137 (35) <i>137</i>	149 (23) <i>149</i>	119 (61) <i>119</i>
H (A -C ₁₀ H ₈ O)	91 (100) <i>91</i>	121 (100) <i>121</i>	105 (100) <i>105</i>	151 (62) <i>151</i>	125 (100) <i>125</i>	181 (28) <i>181</i>	169 (100) <i>169</i>	181 (7) <i>181</i>	125 (100) <i>125</i>	137 (98) <i>137</i>	107 (100) <i>107</i>
W (D -CH ₃ OH)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	145 (85) <i>145</i>	—
Z (Z ₁ -CO)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	117 (23) <i>117</i>	117 (22) <i>117</i>
J (G •CH ₃)	—	118 (12) <i>118</i>	—	148 (10) <i>148</i>	—	—	—	—	—	—	—
O (H •CH ₃)	—	—	—	136 (12) <i>136</i>	—	166 (5) <i>166</i>	—	—	—	—	—
K (D •CH ₃)	—	—	—	—	—	206 (12) <i>206</i>	—	206 (20) <i>206</i>	—	—	—
I (K -CO)	—	—	—	—	—	178 (5) <i>178</i>	—	178 (17) <i>178</i>	—	—	—
P (G •X)	—	—	—	—	102 (13) <i>102</i>	—	102 (15) <i>102</i>	—	102 (12) <i>102</i>	—	—
L (H -CH ₂ O)	—	91 (8) <i>91</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M (D -C ₂ H ₂ /CO)	77 (12) <i>77</i>	—	91 (32) <i>91</i>	—	111 (5) <i>111</i>	—	155 (10) <i>155</i>	—	111 (5) <i>111</i>	—	—
N (H •CH ₃)	—	—	77 (5) <i>77</i>	—	—	—	—	—	—	—	—

Uma análise detalhada dos espectros de íons produtos dos compostos **1-11** permitiu identificar alguns íons diagnósticos que permitem distinguir a natureza dos substituintes no anel aromático desses compostos, como mostrado no **Esquema 10**. As eliminações consecutivas de dois radicais metilo (15 Da cada um) a partir de **B** para produzir **Q** (m/z 230) e **R** (m/z 215) são diagnósticos para o composto **3**, que exibe um grupo metilo no anel aromático. Similarmente, a formação de **T** (m/z 250 para **5** e m/z 294 para **9**) a partir de **B**, e **V** (m/z 215) a partir de **T** devido a eliminações radicalares de $X^\bullet$ ($Cl^\bullet$ para **5** e **9** e um $Br^\bullet$ para **7**) são diagnósticos para os compostos **5**, **7** e **9**. As eliminações radicalares de $X^\bullet$ também podem ocorrer diretamente do íon precursor (**A**) para produzir **S** (m/z 268 e m/z 312) e **U** (m/z 233) ou de **G** para formar **P** (m/z 102), que também são considerados também diagnósticos para **5**, **7** e **9**. Eliminações de radical metilo provenientes de outros íons produtos também foram observadas e resultaram na formação de íons produtos que são diagnósticos para o grupo metoxi no anel aromático e específico para cada composto. Por exemplo, a eliminação de $\bullet CH_3$ proveniente de **H**, **G**, **D** e **E** produz os íons **O** (m/z 136), **K** (m/z 206), **J** (m/z 118) e **Y** (m/z 160), que são diagnósticos para os compostos **2**, **4**, **6**, **8** e **10**, respectivamente. Todas as vias foram suportadas por experimentos de MS^3 e MS^4 (**Anexos A145-A155**).

Esquema 10. Correlações estrutura-fragmentação para os curcuminoides monocetônicos protonados 1-11. As correlações acima foram suportadas por experimentos de MS³ e MS⁴ (Anexo A145-A155).

Tabela 15. Íons produtos mais significativos (intensidade relativa maior que 5 %) dos curcuminoides monocetônicos **1-11** protonados, na energia de colisão $E_{lab}=30$ eV.

	<i>m/z</i> Observado	<i>m/z</i> Teórico	Erro (ppm)	Fórmula do íon	Atribuição
1	235,1127	235,1117	+4,2	C ₁₇ H ₁₅ O ⁺	A ([M+H] ⁺)
	217,1015	217,1012	+1,3	C ₁₇ H ₁₃ ⁺	B (A-H ₂ O)
	193,1013	193,1012	+0,5	C ₁₅ H ₁₃ ⁺	Y (A-C ₂ H ₂ O)
	157,0658	157,0648	+6,3	C ₁₁ H ₉ O ⁺	C (A-C ₈ H ₅)
	131,0489	131,0491	-1,5	C ₉ H ₇ O ⁺	D (A-C ₈ H ₈)
	129,0691	129,0699	-6,1	C ₁₀ H ₉ O ⁺	E (C-CO)
	115,0548	115,0542	+5,2	C ₉ H ₇ O ⁺	F (C-C ₂ H ₂ O)
	103,0545	103,0542	+2,9	C ₈ H ₇ ⁺	G (D-CO)
2	295,1310	295,1329	-6,4	C ₁₉ H ₁₉ O ₃ ⁺	A ([M+H] ⁺)
	277,1203	277,1223	-7,2	C ₁₉ H ₁₇ O ₂ ⁺	B (A-H ₂ O)
	253,1225	253,1223	+0,8	C ₁₇ H ₁₇ O ₂ ⁺	Y (A-C ₂ H ₂ O)
	187,0746	187,0754	-4,3	C ₁₂ H ₁₁ O ₂ ⁺	C (A-C ₇ H ₇ O)
	161,0598	161,0597	+0,6	C ₁₀ H ₉ O ₂ ⁺	D (A-C ₉ H ₁₀ O)
	159,0810	159,0804	+3,8	C ₁₁ H ₁₁ O ⁺	E (C-CO)
	145,0647	145,0648	-0,7	C ₁₀ H ₉ O ⁺	F (C-C ₂ H ₂ O)
	133,0654	133,0648	+4,5	C ₉ H ₉ O ⁺	G (D-CO)
	121,0652	121,0648	+3,3	C ₈ H ₉ O ⁺	H (A-C ₁₁ H ₁₀ O ₂)
3	118,0487	118,0491	-3,4	C ₈ H ₇ O ⁺	J (G-CH ₃)
	263,1425	263,1430	-1,9	C ₁₉ H ₁₉ O ⁺	A ([M+H] ⁺)
	245,1320	245,1325	-2,0	C ₁₉ H ₁₇ ⁺	B (A-H ₂ O)
	230,1091	230,1090	+0,4	C ₁₈ H ₁₄ ⁺	Q (B-CH ₃)
	221,1334	221,1325	+4,1	C ₁₇ H ₁₇ ⁺	Y (A-C ₂ H ₂ O)
	215,0841	215,0855	-6,5	C ₁₇ H ₁₁ ²⁺	R (Q-CH ₃)
	171,0791	171,0804	-7,6	C ₁₂ H ₁₁ O ⁺	C (A-C ₇ H ₇)
	145,0652	145,0648	+2,8	C ₁₀ H ₉ O ⁺	D (A-C ₉ H ₁₀)
	143,0858	143,0855	+2,1	C ₁₁ H ₁₁ ⁺	E (C-CO)
	129,0702	129,0699	+2,3	C ₁₀ H ₉ ⁺	F (C-C ₂ H ₂ O)
	117,0700	117,0699	+0,9	C ₉ H ₉ ⁺	G (D-CO)

4	355,1559	355,1540	+5,3	$C_{21}H_{23}O_5^+$	A ($[M+H]^+$)
	337,1437	337,1434	+0,9	$C_{21}H_{21}O_4^+$	B (A -H ₂ O)
	217,0866	217,0859	+3,2	$C_{13}H_{13}O_3^+$	C (A -C ₈ H ₁₀ O ₂)
	191,0709	191,0703	+3,1	$C_{11}H_{11}O_3^+$	D (A -C ₁₀ H ₁₃ O ₂)
	189,0915	189,0910	+2,6	$C_{12}H_{13}O_2^+$	E (C -CO)
	175,0753	175,0754	-0,6	$C_{11}H_{11}O_2^+$	F (C -C ₂ H ₂ O)
	163,0757	163,0754	+1,8	$C_{10}H_{11}O_2^+$	G (D -CO)
	151,0758	151,0754	+2,6	$C_9H_{11}O_2^+$	H (A -C ₁₀ H ₁₃ O ₂)
	148,0520	148,0524	-2,7	$C_9H_8O_2^+$	J (G -CH ₃)
	136,0515	136,0519	-2,9	$C_8H_8O_2^{+}$	O (H -CH ₃)
5	303,0349	303,0338	+3,6	$C_{17}H_{13}Cl_2O^+$	A ($[M+H]^+$)
	285,0222	285,0232	-3,5	$C_{17}H_{11}Cl_2^+$	B (A -H ₂ O)
	268,0652	268,0649	+1,1	$C_{17}H_{13}ClO^{+}$	S (A -X)
	250,0540	250,0544	-1,6	$C_{17}H_{11}Cl^{+}$	T (B -X)
	233,0966	233,0961	+2,1	$C_{17}H_{13}O_2^{+}$	U (S -X)
	215,0856	215,0855	+0,5	$C_{17}H_{11}O_2^{+}$	V (T -X)
	191,0256	191,0258	-1,0	$C_{11}H_8ClO^+$	C (A -C ₆ H ₆ Cl)
	165,0105	165,0102	+1,8	$C_9H_6ClO^+$	D (A -C ₈ H ₇)
	163,0311	163,0309	+1,2	$C_{10}H_8Cl^+$	E (C -CO)
	149,0158	149,0153	+3,4	$C_9H_6Cl^+$	F (C -C ₂ H ₂ O)
	137,0152	137,0153	-0,7	$C_8H_6Cl^+$	G (D -CO)
	125,0154	125,0153	+0,8	$C_7H_6Cl^+$	H (A -C ₁₀ H ₇ O)
	102,0461	102,0464	-2,9	$C_8H_6^{+}$	P (G -CH ₃)
	415,1745	415,1751	-1,4	$C_{23}H_{27}O_7^+$	A ($[M+H]^+$)
6	397,1621	397,1646	-6,3	$C_{23}H_{25}O_6^+$	B (A -H ₂ O)
	247,0970	247,0965	+2,0	$C_{14}H_{15}O_4^+$	C (A -C ₉ H ₁₁ O ₃)
	221,0812	221,0808	+1,8	$C_{12}H_{13}O_4^+$	D (A -C ₁₁ H ₁₄ O ₃)
	219,1014	219,1016	-0,9	$C_{13}H_{15}O_3^+$	E (C -CO)
	206,0578	206,0574	+1,9	$C_{11}H_{10}O_4^{+}$	K (D -CH ₃)
	205,0545	205,0859	-2,9	$C_{12}H_{13}O_3^+$	F (C -C ₂ H ₂ O)
	193,0853	193,0865	-4,1	$C_{11}H_{13}O_3^+$	G (D -CO)
	181,0860	181,0859	+0,6	$C_{10}H_{13}O_3^+$	H (A -C ₁₃ H ₁₄ O ₄)

7	178,0623	178,0624	-0,6	$C_{10}H_{10}O_3^{+}$	I (K-CO)
	166,0633	166,0624	+5,4	$C_9H_{10}O_3^{+}$	O (H-CH₃)
	390,9322	390,9328	-1,5	$C_{17}H_{13}Br_2O^{+}$	A ([M+H]⁺)
	372,9246	372,9222	+6,4	$C_{17}H_{11}Br_2^{+}$	B (A-H₂O)
	312,0149	312,0144	+1,6	$C_{17}H_{13}BrO^{+}$	S (A-X)
	294,0041	294,0039	+0,7	$C_{17}H_{11}Br^{+}$	T (B-X)
	234,9750	234,9753	-1,3	$C_{11}H_8BrO^{+}$	C (A-C₆H₆Br)
	233,0958	233,0961	-1,3	$C_{17}H_{13}O_2^{+}$	U (S-X)
	215,0858	215,0855	+1,4	$C_{17}H_{11}^{2+}$	V (T-X)
	208,9589	208,9597	-3,8	$C_9H_6BrO^{+}$	D (A-C₈H₇)
	180,9643	180,9647	-2,2	$C_8H_6Br^{+}$	G (D-CO)
	168,9650	168,9647	+1,8	$C_7H_6Br^{+}$	H (A-C₁₀H₇O)
	154,9492	154,9491	+0,6	$C_6H_4Br^{+}$	M (D-C₂H₂/-CO)
	415,1762	415,1751	+2,6	$C_{23}H_{27}O_7^{+}$	A ([M+H]⁺)
8	397,1654	397,1646	+2,0	$C_{23}H_{25}O_6^{+}$	B (A-H₂O)
	247,0960	247,0965	-2,0	$C_{14}H_{15}O_4^{+}$	C (A-C₉H₁₁O₃)
	221,0810	221,0808	+0,9	$C_{12}H_{13}O_4^{+}$	D (A-C₁₁H₁₄O₃)
	219,1012	219,1016	-1,8	$C_{13}H_{15}O_3^{+}$	E (C-CO)
	206,0572	206,0574	-1,0	$C_{11}H_{10}O_4^{+}$	K (D-CH₃)
	205,0851	205,0859	-3,9	$C_{12}H_{13}O_3^{+}$	F (C-C₂H₂O)
	193,0862	193,0865	-1,6	$C_{11}H_{13}O_3^{+}$	G (D-CO)
	181,0855	181,0859	-2,2	$C_{10}H_{13}O_3^{+}$	H (A-C₁₃H₁₄O₄)
9	178,0632	178,0630	+1,1	$C_{10}H_{10}O_3^{-}$	I (K-CO)
	303,0341	303,0338	1,0	$C_{17}H_{13}Cl_2O^{+}$	A ([M+H]⁺)
	285,0219	285,0232	-4,6	$C_{17}H_{11}Cl_2^{+}$	B (A-H₂O)
	268,0641	268,0649	-3,0	$C_{17}H_{13}ClO^{+}$	S (A-X)
	250,0536	250,0544	-3,2	$C_{17}H_{11}Cl^{+}$	T (B-X)
	233,0952	233,0961	-3,9	$C_{17}H_{13}O_2^{+}$	U (S-X)
	215,0849	215,0855	-2,8	$C_{17}H_{11}^{2+}$	V (T-X)
	191,0266	191,0258	4,2	$C_{11}H_8ClO^{+}$	C (A-C₆H₆Cl)
	165,0108	165,0102	3,6	$C_9H_6ClO^{+}$	D (A-C₈H₇)
	163,0315	163,0309	3,7	$C_{10}H_8Cl^{+}$	E (C-CO)

10	149,0154	149,0153	0,7	C ₉ H ₆ Cl ⁺	F (C -C ₂ H ₂ O)
	137,0158	137,0153	3,6	C ₈ H ₆ Cl ⁺	G (D -CO)
	125,0157	125,0153	3,2	C ₇ H ₆ Cl ⁺	H (A -C ₁₀ H ₇ O)
	110,9995	110,9996	-0,9	C ₆ H ₄ Cl ⁺	M (D -C ₂ H ₂ / -CO)
	327,1198	327,1227	-8,9	C ₁₉ H ₁₉ O ₅ ⁺	A ([M+H] ⁺)
	309,1089	309,1121	-10,4	C ₁₉ H ₁₇ O ₄ ⁺	B (A -H ₂ O)
	203,0693	203,0703	-4,9	C ₁₂ H ₁₁ O ₃ ⁺	C (A -C ₇ H ₇ O ₂)
	177,0537	177,0546	-5,1	C ₁₀ H ₉ O ₃ ⁺	D (A -C ₉ H ₉ O ₂)
	175,0737	175,0754	-9,7	C ₁₁ H ₁₁ O ₂ ⁺	E (C -CO)
	161,0580	161,0597	-10,6	C ₁₀ H ₉ O ₂ ⁺	F (C -C ₂ H ₂ O)
	160,0525	160,0519	3,7	C ₁₀ H ₈ O ₂ ⁺	Y (E -CH ₃)
	149,0591	149,0597	-4,0	C ₉ H ₉ O ₂ ⁺	G (D -CO)
	145,0276	145,0284	-5,5	C ₉ H ₅ O ₂ ⁺	W (D -CH ₃ OH)
	137,0587	137,0597	-7,3	C ₈ H ₉ O ₂ ⁺	H (A -C ₁₁ H ₁₀ O ₃)
11	117,0342	117,0335	6,0	C ₈ H ₅ O ⁺	Z (W -CO)
	267,0994	267,1016	-8,2	C ₁₇ H ₁₅ O ₃ ⁺	A ([M+H] ⁺)
	249,0921	249,0910	4,4	C ₁₇ H ₁₃ O ₂ ⁺	B (A -H ₂ O)
	173,0591	173,0597	-3,5	C ₁₁ H ₉ O ₂ ⁺	C (A -C ₆ H ₅ O)
	147,0441	147,0441	0,0	C ₉ H ₇ O ₂ ⁺	D (A -C ₉ H ₈ O)
	145,0655	145,0648	4,8	C ₁₀ H ₉ O ⁺	E (C -CO)
	131,0487	131,0491	-3,1	C ₉ H ₇ O ⁺	F (C -C ₂ H ₂ O)
	119,0502	119,0491	9,2	C ₈ H ₇ O ⁺	G (D -CO)
	117,0340	117,0335	4,3	C ₈ H ₅ O ⁺	Z (D -CH ₃ OH)
	107,0491	107,0498	-6,5	C ₇ H ₇ O ⁺	H (A -C ₁₀ H ₈ O ₂)

4.4.2. Sítio de protonação

A importância da determinação do sítio de protonação em reações de fragmentação em fase gasosa em condições de dissociação induzida por colisão (CID) tem sido amplamente discutida nos últimos anos e, de forma geral, duas possibilidades são consideradas. A primeira possibilidade, conhecida como “teoria do próton móvel” [110], assume que o próton liga-se inicialmente ao sítio mais básico da molécula,

podendo migrar para sítios mais básicos em condições de CID, sendo que a fragmentação ocorre a partir das espécies resultantes desta migração. A segunda possibilidade presume que o próton permanece ligado ao sítio mais básico da molécula no estado pós-colisional. Neste caso, a energia translacional é convertida em energia interna, desencadeando então as reações de fragmentação [111].

Recentemente, Hu e colaboradores estudaram a fragmentação de cetonas aromáticas α,β -insaturadas (chalconas) por espectrometria de massas. Assim como as chalconas, os curcuminoides monocetônicos investigados neste trabalho também possuem uma unidade vinílica entre os grupos carbonila e fenila. Os autores demonstraram que o oxigênio da carbonila é o sítio mais suscetível à protonação, embora a protonação no carbono α à carbonila possa também ocorrer. Os autores descreveram a migração de prótons do oxigênio da carbonila para locais menos favoráveis, como o carbono α , como um processo energeticamente desfavorecido e que envolve certa barreira energética [112].

Na **figura 14** encontram-se os valores das afinidades protônicas (PA), estimados por Química Computacional, de diferentes sítios das estruturas dos compostos **1-11**. Estes dados indicam que o oxigênio carbonílico é o mais suscetível à protonação para todos os curcuminóides monocetônicos. Consequentemente, em nosso estudo, consideramos apenas a espécie protonada no oxigênio carbonílico como íon precursor.

Figura 15. Afinidade protônica (PA) para os curcuminoides monocetônicos **1-11**. Os valores de PA foram calculados em nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). Todos os valores de PA estão em kcal/mol.

4.4.3. Íons fragmentos gerais

Os íons produtos **H** ($\text{A-C}_{10}\text{H}_3\text{OR}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4\text{R}_5$) e **D** ($\text{A-C}_8\text{H}_3\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4\text{R}_5$) são os mais intensos nos espectros de íons produtos dos compostos **1-11** (Tabela 14, p. 87). Esses íons são originados diretamente do íon precursor (molécula protonada) por meio de dois rearranjos competitivos de hidrogênio, como mostrado no Esquema 11. A formação do íon acílio **D** (via II, Esquema 11) por meio de um rearranjo de hidrogênio é semelhante ao reportado anteriormente para 2-aroilbenzofuranos [109] e chalconas [112]. Este mecanismo foi totalmente suportado pelos dados dos experimentos com troca de deutério (Tabela 14). Para os compostos **1** e **2**, a estrutura do íon produto **D** já foi previamente proposta por Cyriac e colaboradores [84]. Dados experimentais revelaram que o íon produto **H** é o mais intenso nos espectros de íons produto de **1-3**, **5**, **7**, **9-11** em $E_{\text{lab}} = 20$ eV, enquanto o íon produto **D** é mais intenso que **H** nos espectros correspondentes dos compostos **4**, **6** e **8** obtidos nas mesmas condições experimentais. Os valores de ΔH

estimados para a formação de **H** e **D** indicaram que a formação de **A'** (que leva à formação de **H**) a partir de **A** (ΔH variando de $-3,24$ a $5,50$ kcal/mol) é energeticamente mais favorecida que a formação de **D** a partir de **A** ($\Delta H=31,12-38,58$ kcal/mol, **Esquema 11**). Consequentemente, a maioria dos íons precursores (**A**) é convertida em **A'** em vez de **D**, fazendo com que a intensidade de **H** seja maior que a de **D** nos espectros de **1-3, 5, 7, 9-11**. O íon produto **D** pode ser posteriormente convertido em **G** após eliminação de CO por meio de clivagem heterolítica da ligação C1-C2. Entretanto, os cálculos revelaram que o íon vinílico **G** resultante é instável e se rearranja espontaneamente para **G1** durante a otimização de sua geometria. Os valores de ΔH para a conversão **D** $\rightarrow$ **G1** são relativamente baixos para a maioria dos compostos analisados, exceto para os curcuminoides **4** ($\Delta H = 50,56$ kcal/mol), **6** ($\Delta H = 51,03$ kcal/mol) e **8** ($\Delta H = 38,61$ kcal/mol). Uma possível razão para esta discrepância pode ser a presença de mais de um grupo metoxilo nos anéis aromáticos, que estabilizam a estrutura de **D** em relação ao **G1** devido ao efeito mesomérico elétron-doador desses grupos. Devido à maior estabilidade do produto íon **D** proveniente de **4, 6 e 8**, um número menor de íons **D** é convertido em **G**, fazendo com que um número maior de íons **D** intactos alcancem o detector. Isto pode explicar, pelo menos em princípio, a razão pela qual o pico do íon fragmento **D** é o mais intenso nos espectros de íons produto dos compostos **4, 6 e 8** (**Tabela 14**).

A natureza do substituinte nos anéis aromáticos também desempenha um papel fundamental na formação de **G** a partir de **D** (**Esquema 11**). Para os compostos **2 e 3**, que apresentam substituintes metilo e metoxilo na posição *para* do anel aromático, a intensidade relativa de **G** é superior a 70%. Por outro lado, para os compostos **5, 7 e 9**, que têm um halogênio (F ou Cl) ligado aos anéis aromáticos, a intensidade de **G** é inferior a 35%. Essas intensidades relativas são consistentes com os valores estimados de ΔH para a decomposição **D** $\rightarrow$ **G**; estes valores são menores para **2** ($\Delta H = 27,11$ kcal/mol) e **3** ($\Delta H = 29,16$ kcal/mol) quando comparados com **5** ($\Delta H = 30,70$ kcal/mol), **7** ($\Delta H = 30,18$ kcal/mol) e **9** ($\Delta H = 30,11$ kcal/mol). Este aumento na intensidade relativa de **G** nos compostos **2 e 3** em comparação com **5, 7 e 9** pode ser estar associado ao efeito hiperconjugativo do grupo metilo em **3** e ao efeito mesomérico elétron-doador do grupo metoxilo em **2**, que contribuem para a estabilização do cátion vinílico **G1** (**Esquema 11**).

Esquema 11. Formação dos íons produto **D**, **G** e **H** dos Curcuminoides monocetônicos protonados de **1-11**. Os valores das **Entalpias** e energia de Gibbs encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.

A ocorrência da ciclização de Nazarov em curcuminoides protonados foi reportada na literatura tanto em solução como em fase gasosa [84]. Para os compostos **1-9**, esta ciclização ocorre a partir de **A1**, que é o confôrmere mais estável do equilíbrio com **A**, levando à formação do íon intermediário **A1'** (via III,

Esquema 12). A eliminação da água a partir de **A1** para produzir **B** é precedida por uma migração de grupo arilo de C3 para C2 e pela consequente formação do íon intermediário **A1'**. Tanto a migração de arilo como os mecanismos de eliminação de água para os compostos **1** e **2** foram previamente investigados por Cyrac e colaboradores [84]. Os íons produtos **B** (**A1**-H₂O) e **C** (**A1**-C₆HR₁R₂R₃R₄R₅), que são estabilizados por ressonância, são formados competitivamente a partir de **A1'**. Entretanto, o pico correspondente a **C** é mais intenso que **B** nos espectros de íons produtos de **A** obtidos em $E_{lab} = 20$ eV. Essa diferença entre as intensidades de **B** e **C** pode ser interpretada em termos dos valores de ΔH estimados para as vias **a** e **b** (**Esquema 12**). Estes valores indicaram que a formação de **C** a partir de **A1'** (via **a**, ΔH entre -8,2 e 5,5 kcal/mol) é energeticamente mais favorecida que a formação de **A1''** (via **b**, ΔH entre -17,08 e 18,52 kcal/mol) para todos os curcuminoides monocetônicos investigados neste trabalho.

A formação dos íons produto **E** e **F** ocorre a partir de **C**, conforme evidenciado pelos experimentos de MS³ (**Esquema 12**). Estes íons são resultantes de duas contrações do anel competitivas a partir da cetona cíclica **C1** (tautômero mais estável no equilíbrio com **C**) que levam a eliminações de CO (28 Da) e ceteno (42 Da), respectivamente [92]. Os valores estimados de ΔH e ΔG para a conversão de **C1** em **E** são 30,6–39,0 kcal/mol e 16,7 kcal/mol para **E** e de **C1** para **F1** são de 53,6 kcal/mol e 39,7 kcal/mol, respectivamente. Embora o íon produto **F** seja aromático, a intensidade de seu pico correspondente é menor que a de **E** nos espectros de íons produtos da maioria dos curcuminoides monocetônicos investigados neste trabalho. Esses valores estão em concordância com o fato de a intensidade de **E** ser maior que a de **F**. No caso do composto **7**, os íons produtos **E** e **F** não foram observados no espectro de íons produtos. Uma possível explicação para este fato é que a via que leva à formação de **E** ($\Delta H=28,67$ kcal/mol) e **F** ($\Delta H=58,35$ kcal/mol) compete com a via que leva à formação dos íons diagnósticos **S** e **U** ($\Delta H= 0,13$ kcal/mol) e **T** e

V ($\Delta H = -9,27$ kcal/mol), sendo esta última mais favorável energeticamente, o que também está de acordo com a intensidade relativa desses íons.

Esquema 12. Formação dos íons produto **B**, **C**, **E** e **F** dos CMs protonados de **1-9**. Os valores das **Entalpias** e **energia de Gibbs** encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.

Os compostos **10** e **11** apresentaram um comportamento diferente dos demais compostos, uma vez que o íon intermediário **A1'** destes compostos converteu-se espontaneamente em **A1** durante a otimização da geometria. Este resultado indicou que para esses curcuminoides a formação dos íons produtos **B**, **C**, **E** e **F** deve ocorrer por uma via de fragmentação que não envolve a ciclicização de Nazarov. Esta diferença pode estar associada aos grupos hidroxila. Entretanto, Cyriac e colaboradores reportaram a ocorrência da ciclicização de Nazarov para o composto **XVII** (figura 5, p. 38), que é isômero *orto* do composto **11** [84]. Para verificar se a posição da hidroxila também exerce algum efeito sobre a formação e/ou estabilidade do íon **A1'**, a estrutura do íon intermediário **A1** correspondente ao composto **XVIII** foi também otimizada. Neste caso, entretanto, não ocorreu conversão de **A1'** em **A1** durante a otimização da geometria. Este resultado não apenas corroborou as propostas da literatura como também indicou que a posição da hidroxila desempenha um papel importante na via de formação dos íons **B**, **C** e **F**. Uma possível explicação para esta diferença entre as estabilidades dos íons **A1'** dos compostos com hidroxila em *orto* (**XVII**) e em *para* (**10** e **11**) pode ser a interação do tipo ligação de hidrogênio entre as hidroxilas em *orto*, que estabilizam a estrutura de **A1'** do composto **XVII**. Esta interação estabilizante não ocorre no composto **11**, em cuja estrutura os grupos hidroxila encontram-se em *para* (Esquema 13).

Esquema 13. Diferença na posição da hidroxila no anel dos composto **XVII** [84] e compostos **10** e **11**.

Assim, a via de fragmentação para a formação dos íons produtos **B**, **C**, **E** e **F** dos compostos **10** e **11** envolveu a eliminação de água a partir de **A2''** e a formação de **B**, na qual sua formação é precedida pela migração do grupo arila de C3 para C4 e consequente formação do íon intermediário **A2'**. A formação de **C1.1** de **A2'** (**Esquema 14**) é energeticamente mais favorecida para o composto **10** ($\Delta H = 12,5$ kcal/mol) do que para o composto **11** ($\Delta H = 25,1$ kcal/mol), o que está de acordo com sua intensidade relativa nos espectros de íons de produtos (**Tabela 14**). Já a formação de **E** de **C1.1** (contração do anel e eliminação do CO) é precedida pela formação de **C1.1'''**, que é formada após a migração do hidrogênio do grupo hidroxila presente no anel aromático (**C1.1''**) a carbonila cetônica (prototropismo) (**Esquema 14**). A formação de **C1.1'''** para o composto **11** ($\Delta H = 12,5$ kcal/mol) é ligeiramente mais favorecida do que para o composto **10** ($\Delta H = 18,8$ kcal/mol). No entanto, o pico correspondente ao íon **E** para o composto **10** é mais intenso do que **11**. Os valores de ΔH para a formação de **E** a partir de **C1.1'''** mostraram que a formação de **E** para o composto **10** é energeticamente mais favorecido ($\Delta H = 6,9$ kcal/mol) do que para o composto **11** ($\Delta H = 13,1$ kcal/mol). Essa diferença entre as intensidades de **E** para os compostos **10** e **11** pode estar associada a presença do grupo metoxilo no composto **10**, o qual por ressonância contribui para a estabilização do íon. Além disso, a formação de **F** de **C1.1''** (sua formação também envolve a contração do anel seguida da eliminação de ceteno) mostrou um comportamento diferente do íon produto **E** para os compostos **10** e **11**. Embora a formação de **C1.1''** para o composto **10** ($\Delta H = -25,1$ kcal/mol) seja mais favorecido do que **11** ($\Delta H = -6,2$ kcal / mol), a formação de **F** para o composto **11** é mais favorecida do que a **10**.

Esquema 14. Proposta para a formação dos íons produtos **B**, **C**, **E** e **F** para os compostos **10** e **11**.

4.4.4. Formação dos íons diagnósticos

Uma série de íons produzidos por clivagem homolítica da ligação C–X (X = Cl ou Br) e consequente eliminação de X• são diagnósticos da presença de Cl e Br nas estruturas dos compostos **5**, **7** e **9**. As formações de **T** a partir de **B**, de **V** (m/z 215) a partir de **T** e de **P** (m/z 102) a partir de **G** estão representadas no **Esquema 15**. A formação de **Q** a partir de **B** envolve a clivagem homolítica da ligação C–X. Os valores estimados de ΔH para a conversão de **B** em **T** para **5**, **7** e **9** são 90,97 kcal/mol, 100,62 kcal/mol e 89,79 kcal/mol, respectivamente. As formações de **S** (m/z 268 e m/z 312) a partir de **A**, de **U** (m/z 233) a partir de **S** e de **P** a partir de **G** ocorrem de maneira similar (**Esquema 15**). Os valores de ΔH envolvidos na formação de **U** são 85,9 kcal/mol para **5**, 88,7 kcal/mol para **7** e 89,1 kcal/mol para **9**. Para a formação de **P**, os valores de ΔH estimados foram de 90,5 kcal/mol para **5**, de 90,4 kcal/mol para **7** e 100,3 kcal/mol para **9**. As formações de **T** e de **S** violam a Regra do Elétron Par e, portanto, são desfavorecidas pela entalpia [59,113,114]. Por outro lado, a formação de **V** e **U** a partir de **T** e **S** estão de acordo com a Regra do Elétron

Par. Isto poderia explicar, pelo menos em princípio, a maior intensidade relativa de **V** e **U** em comparação à de seus íons precursores **T** e **S**.

Apesar de as formações dos íons produtos **U** e **V** estarem de acordo com a Regra do Elétron Par, os valores de ΔH ainda são altos, possivelmente devido ao fato de serem íons birradicais. Essa discrepância provavelmente ocorre devido a uma maior estabilização dos dirradicais neutros *orto* e *para* no seu estado eletrônico singlete devido às suas formas de ressonância mais estáveis, enquanto que o estado tripleto excitado não, pois os elétrons radicais estão no mesmo plano do anel aromático, tornando-os incapazes de conjugar com o sistema aromático [115]. Além disso, quando se compara os valores de ΔH para os íons **U** e **V** dos curcuminoides **7** e **9** com os do composto **5**, é possível notar que para **5** os valores de ΔH são menores. Isso se deve à aproximação dos sítios em que se encontram os radicais, o que permite um decréscimo da energia devido à ocorrência do acoplamento entre os dois elétrons, tornando o estado tripleto menor em energia do que o estado singlete, o que é consistente com a regra de multiplicidade de Hund [115]. No caso do composto **7**, que tem um átomo de bromo ligado ao anel aromático, a maior intensidade relativa de **S** e **U**, em comparação com os compostos **5** e **9**, deve-se provavelmente à menor energia de ligação de C-Br em comparação à da ligação C-Cl.

Esquema 15. Formação dos íons produto **P**, **S**, **T**, **U** e **V** dos Curcuminoides monacetônicos protonados **5**, **7** e **9** e suas respectivas **Entalpias** e *energia de Gibbs* encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.

Os íons produto **Q** (m/z 230) e **R** (m/z 215) também são diagnósticos para um grupo metilo no anel aromático (**Esquema 16**). Esses íons são formados por meio de um mecanismo semelhante ao envolvido na formação de **T** e **S**, e **U** e **V**, como discutido anteriormente neste trabalho (**Esquema 15**). Os valores de ΔH envolvidos na formação de **Q** e **R** são 116,33 kcal/mol e 100,8 kcal/mol, respectivamente. Já os íons produto **J** (m/z 118) a partir de **G** (composto **2**), **O** (m/z 136 e m/z 166) a partir de **H** (compostos **4** e **6**) e de **K** a partir de **D** (compostos **6** e **8**) são diagnósticos de grupos metoxilo nos anéis aromáticos dos curcuminoides monacetônicos **2**, **4**, **6** e **8** respectivamente. Eles são formados como resultado da clivagem homolítica da ligação C10-O e da consequente eliminação de um radical metilo (**Esquema 16**).

Esquema 16. Formação dos íons produto **Q** e **R** do composto **3** protonado e suas respectivas **Entalpias** e **energia de Gibbs** encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.

Para os compostos **6** e **8**, a eliminação de CO do anel aromático para produzir **I** (m/z 178) envolve uma contração de anel e posterior expulsão de CO da forma cetona do radical fenoxilo (**Esquema 17**). A eliminação de um radical metilo seguida por descarbonilação foi relatada anteriormente para vários compostos que exibem grupos metoxilo aromáticos [114]. A eliminação de radical metilo a partir de **D** para formar **K** viola a Regra do Elétron Par [59,113,114] e é energeticamente desfavorecida ($\Delta H = 64,5$ kcal/mol para **6** e $65,3$ kcal/mol para **8**) devido à perda da aromaticidade, o que está de acordo com sua intensidade relativa nos espectros de íons produtos. Por outro lado, a formação de **L** (m/z 91) a partir de **H**, que é diagnóstica para a presença de um grupo metoxilo no anel aromático do curcuminoide **2**, resultou de um rearranjo de hidrogênio remoto e consequente eliminação de CH_2O (30 unidades de massa), como mostrado no **Esquema 17**. A formação do íon **L** a partir de **H** ocorreu apenas para o composto **2** e é resultante da presença de um único grupo metoxilo no anel aromático. Para os compostos **4**, **6** e **8**, que possuem mais de um grupo metoxilo no anel, a perda de CH_2O e a consequente formação do íon **L** não ocorrem. Isso provavelmente deve-se à presença de mais de um grupo metoxilo no anel aromático desses compostos em posições específicas, que acabam favorecendo outras vias (por exemplo, formação dos íons **K** e **O**) em competição com a formação de **L**. Os valores estimados de ΔH e ΔG para a conversão de **H** em **L** foram de $24,5$ kcal/mol e $12,3$ kcal/mol, respectivamente.

Esquema 17. Formação dos íons diagnósticos **J**, **L**, **O**, **K** e **I** dos Curcuminoides monocetônicos protonados de **1-9**.

Os valores das **Entalpias** e *energia de Gibbs* encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol

A eliminação de C_2H_2 seguida da perda de CO a partir de **D** produz **M**, conforme mostrado no **Esquema 18**. Embora a formação de **M** não envolva a participação de qualquer substituinte específico, este íon produto foi observado apenas nos espectros dos compostos **1**, **3**, **5**, **7** e **9**. Isto se deve possivelmente ao fato de que a formação de **M** compete com a formação de **G**. Os valores de ΔH revelaram que a formação de **G** ($\Delta H = 27,10$ - $52,80$ kcal/mol) é energeticamente mais favorecida do que a formação de **M** ($\Delta H = 118,09$ - $124,54$ kcal/mol), além de que a conversão de **D** em **M** é endotérmica ($\Delta H = 118$ a 124 kcal/mol) e endergônica ($\Delta G = 96$ a 103 kcal/mol), o que está consistente com a intensidade relativa de **M** no espectro de íons produtos. Além disso, para os demais compostos, a presença de substituintes favorece a formação de outros íons produtos em competição com a formação de **M**. Por exemplo, a formação de **K** (m/z 206) a partir de **D** é diagnóstica para compostos **6** e **8**, enquanto as formações de **W** para o composto **10** (m/z 145)

e de **Z** (m/z 117) para os compostos **10** e **11** competem com a formação de **M** de **D**. A eliminação adicional de um radical metilo (CH_3) a partir de **M** produz o íon distônico **N** (m/z 77), que é diagnóstico para o composto **3**. Apesar de os baixos valores de ΔH e ΔG favorecerem a formação de **N** ($\Delta H = 103$ e $\Delta G = 91$ kcal/mol), sua intensidade relativamente baixa no espectro de íons produtos do curcuminóide **3** pode ser atribuída à competição com a formação dos íons diagnósticos **Q** e **R**. Além disso, o íon produto **M** provém de **D**, cuja formação a partir de **A** é favorecida em comparação com a de **H** apenas para os compostos **4**, **6** e **8**. Consequentemente, a maior parte dos íons produto provenientes de **G** apresenta baixa intensidade relativa nos espectros de íons produtos (Tabela 14).

Esquema 18. Formação dos íons diagnósticos **M** e **N** dos curcuminóides monocetônicos protonados. Os valores das **Entalpias** e *energia de Gibbs* encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.

No caso do composto **10**, as formações dos íons diagnósticos **W** (m/z 145) a partir de **D** e de **Z** (m/z 117) a partir de **W** ocorrem com a participação do grupo hidroxila em C7, como mostrado no **Esquema 19**. A formação do íon diagnóstico **Z** (m/z 117) também ocorre para o composto **11**, porém se dá diretamente do íon produto **D**. A conversão de **D** em **W** para o composto **10** é endotérmica ($\Delta H = 79,97$ kcal/mol), o que está de acordo com a baixa intensidade relativa no espectro de íon produto. Já a conversão do íon produto **W** em **Z** é endotérmica ($\Delta H = 39,88$ kcal/mol) e endergônica ($\Delta G = 72,07$ kcal/mol), o que também está em concordância com a baixa intensidade relativa no espectro de íon produto. Para o composto **11**, a formação do íon produto **Z** se dá diretamente do íon produto **D**. No entanto, no caso do composto **11**, o valor de ΔH , é menor quando comparado com o mesmo íon para o composto **10** ($\Delta H = -38,0$ kcal/mol para

11 e $\Delta H = 39,9$ kcal/mol para **10**). Essa diferença pode estar associada a diferença entre as estruturas dos intermediários **D2** para os dois compostos.

Esquema 19. Formação dos íons produtos diagnósticos **W** para o composto **10** e **Z** para os compostos **10** e **11**.

Por outro lado, o íon produto **Y**, que também é diagnóstico para **10**, é originado da eliminação do radical metilo a partir de **E** (**Esquema 20**). A formação de **Y** a partir de **E** é energeticamente desfavorecida pela entalpia ($\Delta H = 64,17$ kcal/mol), o que está de acordo com a baixa intensidade do íon produto **Y** no espectro de íons produtos do curcuminoide **10**.

Esquema 20. Formação do íon diagnóstico **Y** para o composto **10**.

Finalmente, o íon produto **X** resulta de uma eliminação de ceteno (42 Da) diretamente do íon precursor. A formação deste íon produto é precedida pela conversão de **A1** em **A2**, que resulta da ciclização de Nazarov, conforme mostrado no **Esquema 21** [84]. Assim como descrito para o íon **B**, a formação de **X** envolve a conversão do intermediário **A2** (-32,1 kcal/mol a -34,7 kcal/mol) em **A2'**, que é formado a partir do intermediário **A1'**. As energias envolvidas nesta via estão consistentes com a baixa intensidade relativa do

íon produto **X**. No caso dos compostos **4**, **6** e **8**, o efeito mesomérico elétron-doador dos grupos metoxilo estabiliza **A2** em comparação com o **A2** correspondente de outros compostos, aumentando assim a barreira de energia para a sua conversão em **X**. Consequentemente, o íon produto **X** não foi observado no espectro de íons produto dos compostos **4**, **6** e **8** obtido em $E_{lab} = 20$ eV.

Esquema 21. Formação do íon diagnóstico **X** dos curcuminoides monocetônicos protonados **1**, **2** e **3**. Os valores das **Entalpias** e **energia de Gibbs** encontram-se abaixo das estruturas, em kcal/mol.

5. Conclusões

As modificações feitas nas metodologias utilizadas neste trabalho para a síntese dos curcuminoides **1-31** permitiram obter os compostos de forma simples, rápida e com rendimentos, na maioria dos casos, satisfatório.

Dentre os 31 curcuminoides avaliados neste trabalho quanto à atividade antimicrobiana, a curcumina A (**10**), assim como o composto **11**, foram os mais ativos frente às bactérias cariogênicas. Os valores de CIM obtidos nestes curcuminoides contra *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus mitis* foram menores do que os valores de CIM previamente relatados na literatura para sua análoga β -dicetona, curcumina. As relações estrutura-atividade inferidas neste trabalho indicaram que o grupo hidroxila ligado aos anéis aromáticos e a ligação dupla entre C2-C3 e C2'-C3' e o grupo carbonila em C1 são características estruturais importantes para a atividade antimicrobiana.

O estudo das vias de fragmentação dos curcuminoides monocêtonicos, foi observado que as formações do íon acílico **D** e do íon produto resultante da eliminação de um dos anéis aromáticos (íon tropílio **H**) por meio de rearranjos de hidrogênio competitivos são as principais vias de fragmentação desses compostos protonados. A formação de outros íons produtos intensos no espectro ocorre a partir de um íon intermediário resultante de uma ciclização de Nazarov da molécula protonada, cuja ocorrência já havia sido reportada previamente na literatura. Em relação aos estudos prévios realizados com os compostos **1** e **2**, o presente trabalho complementou o conhecimento sobre a Química de fase gasosa desses compostos e expandiu o número de compostos investigados, contribuindo ainda com relações mais intrínsecas entre os diferentes substituintes e a formação e intensidade de íons diagnósticos e íons comuns. Dados de massas acuradas e de experimentos de MSⁿ e de troca com deutério foram também obtidos neste trabalho para suportar as vias de fragmentação estabelecidas. De modo geral, os dados termoquímicos estimados por Química Computacional em nível B3LYP/6-31+G(d,p) apresentaram boa concordância com as intensidades dos íons nos espectros obtidos em E_{lab}=20 eV. Contudo, os dados obtidos por Química Computacional tiveram importância fundamental na identificação do efeito da posição da hidroxila fenólica sobre a ciclização de Nazarov. Este efeito, no entanto, ainda não pôde ser totalmente esclarecido até a conclusão deste trabalho. Os dados deste estudo de fragmentação deverão ser utilizados futuramente em estudos de

metabolismo *in vitro* e *in vivo*, que já se encontram em andamento, para a identificação dos produtos deste metabolismo sem a necessidade de padrões ou isolamento desses metabolitos.

6. Referências

- INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Câncer da boca. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca>>. Acesso em: 25 setembro 2018.
- [2] IBGE. Pesquisa nacional de saúde: 2013, acesso e utilização dos serviços de saúde, acidentes e violências: Brasil, grandes regiões e unidades da federação/IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento, (2013). Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf>>. Acesso em: 28 setembro 2018.
- [3] Bagramian, R. A.; Garcia, G. F. The global increase in dental caries: a pending public health Crisis. *Am. J. Dent.* **2009**, 22, 3–8.
- [4] M. Saúde, Conheça a política que faz muitos brasileiros voltarem a sorrir, (n.d.). Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/cartilha_saude_bucal.pdf>. Acesso em: 24 setembro 2018.
- [5] George, S. A. The prevalence of impacted third molars in their associated pathologies in adult patients with age group 25-60. *J. Pharm. Sci. Res.* **2015**, 7, 871–872.
- [6] Ozdemir, D. Dental caries: the most common disease worldwide and preventive strategies. *Int. J. Biol.* **2013**, 5, 55–61.
- [7] Chandki, R.; Banthia, P. Biofilms: a microbial home. *J. Indian Soc. Periodontol.* **2011**, 15, 111–114.
- [8] Veale, A.; Ajwani, M.; Johnson, S.; Nash, M.; Patterson, L.; George, T. The early childhood oral health program: a qualitative study of the perceptions of child and family health nurses in South Western Sydney. Australia, *BMC Oral Health.* **2016**, 16, 56.
- [9] Arweiler, L. B.; Netuschil, L. The Oral Microbiota. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, 902, 45–60.
- [10] K. Taheur, K.; Kouidhi, F. B.; Fdhila, B.; Elabed, K.; Slama, H.; Mahdouani, R. B.; Backhrouf, K.; Chaieb, A. Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microb. Pathog.* **2016**, 97, 213–220.
- [11] Pleszczyńska, J.; Wiater, M.; Bachanek, A.; Szczodrak, T. Enzymes in therapy of biofilm-related oral diseases. *Biotechnol Appl Biochem.* **2017**, 64, 337–346.
- [12] Yan, X.; Jingmei, Z.; Dingyu, Y.; Yi, D. Progress in study of oral biofilm dispersal-inducing agents. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* **2014**, 32, 625–630.
- [13] Sheryl, Z.; Song, H. B.; Bowman, C. N. Evaluation of biofilm formation on novel copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC)-based resins for dental restoratives. *Dent. Mater.* **2018**, 34, 657–666.
- [14] Atanasova, O.; Yilmaz, K. R. Prelude to oral microbes and chronic diseases: past, present and future. *Microbes Infect.* **2015**, 17, 473–483.
- [15] Cai, J. G.; Jung, J. N.; Dang, J. E.; Kim, M. H.; Yi, M. A.; Jeon, H. K. Functional relationship between sucrose and a cariogenic biofilm formation. *PLoS One.* **2016**, 11, e0157184.
- [16] Martins, M. L.; Leite, K. L. F.; Pacheco-Filho, E. F.; Pereira, A.F. M.; Romanos, M. T. V.; Maia, L. C.; Gonçalves, A. F.; Padilha, W.W.N.; Cavalcanti, Y. W. Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract

in controlling *Streptococcus mutans* biofilm build-up and dental enamel demineralization. *Arch. Oral Biol.* **2018**, 93, 56–65.

[17] Biradar, P. Devi, B. Quorum sensing in plaque biofilmes: challenges and future prospects. *J. Contemp. Dent. Pr.* **2011**, 12, 479–485.

[18] Marín, M. J.; Figueró, E.; González, I.; O'Connor, A.; Diz, P.; Álvarez, M.; Herrera, D.; Sanz, M. Comparison of the detection of periodontal pathogens in bacteraemia after tooth brushing by culture and molecular techniques. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* **2016**, 21, e276-284.

[19] Walsh, D.; Oliveira-Neto, T.; Moore, J. M. Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, 4, CD008457.

[20] Jafer, S.; Patil, M.; Hosmani, S.; Bhandi, J.; Chalisserry, S. H.; Anil, E. P. Chemical plaque control strategies in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *J. Contemp. Dent. Pr.* **2016**, 17, 337–343.

[21] Choo, L. B.; Delac, A.; Messer, D. M. Oral hygiene measures and promotion: review and considerations. *Aust. Dent. J.* **2001**, 46, 166–173.

[22] Ferreira, G. L. S.; Bezerra, L. M. D.; Ribeiro, I. L. A.; Moraes Júnior, R. C. D.; Castro, R. D. Susceptibility of cariogenic microorganisms to phytoconstituents. *Braz. J. Biol.* **2018**, 78, 691–696.

[23] Rabe, P.; Twetman, S.; Kinnby, B.; Svensäter, G.; Davies, J. R. Effect of fluoride and chlorhexidine digluconate mouthrinses on plaque biofilms. *Open Dent. J.* **2015**, 9, 106–111.

[24] Ximenes, M.; Cardoso, M.; Astorga, F.; Arnold, R.; Pimenta, L. A.; Viera, R. S. Antimicrobial activity of ozone and NaF-chlorhexidine on early childhood caries. *Braz. Oral Res.* **2017**, 31, e2.

[25] Jones, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periodontol.* **1997**, 15, 55–62.

[26] Kowidhi, K.; B.; Al Qurashi, Y. M. Chaieb, K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microb Pathog.* **2015**, 80, 39–49.

[27] Marini, E.; Di Giulio, M.; Magi, G.; Di Lodovico, S.; Cimorelli, M. E.; Brenciani, A.; Nostro, A.; Cellini, L.; Facinelli, B. Curcumin, an antibiotic resistance breaker against amultiresis tant clinical isolate of *Mycobacterium abscessus*. *Phyther. Res.* **2018**, 32, 488–495.

[28] Anand, P.; Kunnumakkara, A. B.; Newman, R. A.; Aggarwal, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises reviews. *Mol. Pharm.* **2007**, 4, 807–818.

[29] Anstrom, D. M.; Zhou, X.; Kalk, C. N.; Song, B.; Lan, Q. Mosquitocidal properties of natural product compounds isolated from Chinese herbs and synthetic analogs of curcumin. *J. Med. Entomol.* **2012**, 49, 350–355.

[30] Sharma, O. P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem. Pharmacol.* **1976**, 25, 1811–1812.

[31] Ruby, A. J.; Kuttan, G.; Dinesh Babu, K.; Rajasekharan, K. N.; Kuttan, R. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett.* **1995**, 94, 79–83.

- [32] Canciana, M. A. Q.; Almeida, F. G.; Terhaaga, M. M.; Oliveira, A. G.; Rocha, D.; Aparecida, W.; Spinosa, T. S. Curcuma longa L.- and Piper nigrum-based hydrolysate, with high dextrose content, shows antioxidant and antimicrobial properties. *Food Sci. Technol.* **2018**, 96, 386–394.
- [33] Jung, E.; Noh, J.; Kang, C.; Yoo, D.; Song, C.; Lee, D. Ultrasound imaging and on-demand therapy of peripheral arterial diseases using H₂O₂-Activated bubble generating anti-inflammatory polymer particles. *Biomaterials.* **2018**, 179, 175–185.
- [34] Teow, S. Y.; Liew, K.; Ali, A. S. B.; Khoo, A. S.; Peh, S. C. Antibacterial action of curcumin against *Staphylococcus aureus*: A brief review. *J. Trop. Med.* **2016**, 2016, 1–10.
- [35] Stewart, T. M.; Dunworth, M.; Lui, Y.; Giardiello, F. M.; Woster, P. M.; Casero Jr, R. A. Curcumin mediates polyamine metabolism and sensitizes gastrointestinal cancer cells to antitumor polyamine-targeted therapies. *PLoS One.* **2018**, 13, 1–23.
- [36] Kuttan, R.; Bhanumathy, P.; Nirmala, K.; George, M.C. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett.* **1985**, 27, 197–202.
- [37] Nagajyothi, F.; Zhao, D.; Weiss, L. M.; Tanowitz, H. B. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Res.* **2012**, 110, 2491–2499.
- [38] Hussein, A.; Rashed, S.; Hayawan, I.; El-Sayed, R.; Ali, H. Evaluation of the anti-schistosomal effects of turmeric (*Curcuma longa*) versus praziquantel in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Iran. J. Parasitol.* **2017**, 12, 587–596.
- [39] Chen, Y. Q.; Xu, Q. M.; Li, X. R.; Yang, S. L.; Zhu-Ge, H. X. In vitro evaluation of schistosomicidal potential of curcumin against *Schistosoma japonicum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2012**, 14, 1064–1072.
- [40] Chakraborti, S.; Dhar, G.; Dwivedi, V.; Das, A.; Poddar, A.; Chakraborti, G.; Basu, G.; Chakrabarti, P.; Surolia, A.; Bhattacharyya, B. Stable and potent analogues derived from the modification of the dicarbonyl moiety of curcumin. *Biochemistry.* **2013**, 52, 7449–7460.
- [41] Alkhalidi, A. A. M.; Creek, D. J.; Ibrahim, H.; Kim, D. H.; Quashie, N. B.; Burgess, K. E.; Changtam, C.; Barrett, M. P.; Suksamrarn, A.; Koning, H. P. Potent Trypanocidal Curcumin Analogs Bearing a Monoenone Linker Motif Act on *Trypanosoma brucei* by Forming an Adduct with Trypanothione. *Mol. Pharmacol.* **2015**, 87, 451–464.
- [42] Qiu, X.; Du, Y.; Lou, B.; Zuo, Y.; Shao, W.; Huo, Y.; Huang, J.; Yu, Y.; Zhou, B.; Du, J.; Fu, H.; Bu, X. Synthesis and identification of new 4-arylidene curcumin analogues as potential anticancer agents targeting nuclear factor- κ B signaling pathway. *J. Med Chem.* **2010**, 53, 8260–73.
- [43] Robinson, T.P.; Hubbard IV, R.B.; Ehlers, T.J.; Arbiser, J.L.; Goldsmith, D.J.; Bowen, J.P. Synthesis and biological evaluation of aromatic enones related to curcumin. *Bioorganic Med. Chem.* **2005**, 13, 4007–4013.
- [44] Changtam, C.; Hongmanee, P.; Suksamrarn, A. Isoxazole analogs of curcuminoids with highly potent multidrug-resistant antimycobacterial activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 4446–4457.
- [45] Changtam, C.; Koning, H.P.; Ibrahim, H.; Sajid, M.S.; Gould, M.K.; Suksamrarn, A. Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 941–956.

- [46] Vieira, T.M.; Santos, I.A.; Silva, T.S.; Martins, C.H.G.; Crotti, A.E.M. Antimicrobial activity of monoketone curcuminoids against cariogenic bacteria. *Chem. Biodivers.* **2018**, *8*, 5–12.
- [47] Mishra, A.; Karmodiya, S.; Surolia, K.; Surolia, N. Synthesis and exploration of novel curcumin analogues as anti-malarial agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2894–2902.
- [48] Song, J.; Choi, B.; Jin, E.J.; Yoon, Y.; Choi, K.H. Curcumin suppresses *Streptococcus mutans* adherence to human tooth surfaces and extracellular matrix Proteins. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *31*, 1347–1352.
- [49] Hu, P.; Huang, P.; Chen, M.W. Curcumin reduces *Streptococcus mutans* biofilm formation by Inhibiting Sortase A activity, *Arch. Oral Biol.* **2013**, *58*, 1343 – 1348.
- [50] Hu, P.; Huang, P.; Chen, M.W. Curcumin inhibits the sortase A activity of the *Streptococcus mutans* UA159. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *171*, 396 – 402.
- [51] Izui, H.; Sekine, S.; Maeda, S.; Kuboniwa, K.; Takada, M.; Amano, A.; Nagata, A. Antibacterial activity of curcumin against periodontopathic bacteria. *J. Periodont.* **2016**, *87*, 83–90.
- [52] Cunha, D.; Bonifácio, C.; Martins, B.; David, C.; Lemons, M.G.P.M.S.; Neves, A.; Almeida, D.C.G.A.; Pinto, M.A.F.; Faustino, Â. Photodynamic inactivation of *Listeria innocua* biofilms with food-grade photosensitizers: a curcumin-rich extract of *Curcuma longa* vs commercial curcumin. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 282–294.
- [53] Sanitá, P.V.; Pavarina, A.C.; Dovigo, L.N.; Ribeiro, A.P.D.; Andrade, M. C. Mima, E.G.O. Curcumin-mediated anti-microbial photodynamic therapy against *Candida dubliniensis* biofilms. *Lasers Med. Sci.* **2018**, *33*, 709–717.
- [54] Paschoal, S.; Lin, M. A.; Pinto, S.M.; Duarte, L. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidine blue activated by a novel LED device. *Lasers Med. Sci.* **2015**, *30*, 885–890.
- [55] Florez, H.; Oliveira, F. L. E.; Júnior, M. R. M.; Hiers, O. B. O.; Khajotia, R. D.; Pretel, S. S. Bioluminescence Analysis of Antibacterial Photodynamic Therapy Using Methylene Blue Mediated by Low-Intensity Level Laser Against Cariogenic Biofilms, *Photomed. Laser Surg.* **2018**, *36*, 258-265.
- [56] Araujo, M.E.M.; Fontana, N. C.; Bagnato, C. R.; Gerbi, V. S. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomed. Laser Surg.* **2012**, *30*, 393–399.
- [57] Fenn, J.B.; Mann, M.; Meng, C. K. A. I.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* **1989**, *246*, 64-71.
- [58] McLafferty, F. W. Mass spectrometry across sciences. *PNAS.* **2008**, *105*, 18088–18089.
- [59] McLafferty, F. W.; Turecek, F. *Interpretation of Mass Spectra*, 4º Ed. Sausalito, EUA: University Science Books, **1993**.
- [60] Dias, H. J.; Bento, M. V. B.; Silva, E. H.; Júnior, A. S.; Oliveira, M. F.; Vessecchi, R.; Parreira, R. L. T.; Crotti, A.E.M. Gas-phase fragmentation reactions of protonated cocaine: New details to an old story. *J. Mass Spectrom.* **2018**, *53*, 203–213.

- [61] Fenn, C. M.; Mann, J. B.; Meng, M.; Wong, C. K.; Whitehouse, S. F. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **1989**, 246, 64–71.
- [62] Dias, H. J.; Melo, N. I.; Crotti, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview. *Sect. Title Org. Anal. Chem.* **2012**, 595–618.
- [63] Konermann, S.; Ahadi, L.; Rodriguez, E.; Vahidi, A. D. Unraveling the mechanism of electrospray ionization. *Anal. Chem.* **2012**, 85, 2–9.
- [64] Dias, H. J.; Melo, N. I.; Crotti, A. E. M. Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview. In Prasain, J.K. Applications of Tandem Mass Spectrometry, Rijeka, Croatia: InTech Open Access Publisher, **2011**.
- [65] Cooks, G. Special feature: Historical. Collision-induced dissociation: Readings and commentary. *J. Mass Spectrom.* **1995**, 30, 1215–1221.
- [66] Watson, O. D.; Sparkman, J. T. Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation, 4th ed., Chichester, England, **2007**.
- [67] Kind, O.; Fiehn, T. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal. Rev.* **2010**, 2, 23–60.
- [68] Ralph, G.; Conesa, J.; Williamson, M. T. G. Simple preparation of 8-5-coupled diferulate. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 2531–2532.
- [69] Herrera-Lopez, S.; Hernando, M. D.; García-Calvo, E.; Fernández-Alba, A. R.; Ulaszewska, M. M. Simultaneous screening of targeted and nontargeted contaminants using an LC-QTOF-MS system and automated MS/MS library searching. *J. Mass Spectrom.* **2014**, 49, 878–893.
- [70] Oberacher, B.; Whitley, H.; Bernd, G. Evaluation of the sensitivity of the “Wiley registry of tandem mass spectral data, MSforID” with MS/MS data of the “NIST/NIH/EPA mass spectral library”. *J. Mass Spectrom.* **2013**, 48, 487–496.
- [71] Schaab, E. H.; Crotti, A. E. M.; Iamamoto, Y.; Kato, M. J.; Lotufo, L. V. C.; Lopes, N. P. Biomimetic oxidation of piperine and pipartine catalyzed by iron(III) and manganese(III) porphyrins. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, 33, 912–916.
- [72] Demarque, D. P.; Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 432–455.
- [73] Dall'Acqua, S.; Stocchero, M.; Boschiero, I.; Schiavon, M.; Golob, S.; Udding, J.; Voinovich, D.; Mammi, S.; Schievano, E. New findings on the in vivo antioxidant activity of *Curcumuna longa* extract by an integrated ¹H NMR and HPLC-MS metabolomic approach. *Fitoterapia*. **2016**, 109, 125–131.
- [74] Ashraf, K.; Mujeeb, M.; Ahmad, A.; Amir, M. Determination of curcuminoids in *Curcuma longa* Linn. by UPLC/Q-TOF-MS: an application in turmeric cultivation. *J. Chromatogr. Sci.* **2015**, 53, 1346–1352.

- [75] Shen, Y.; Han, C.; Chen, X.; Hou, X.; Long, Z. Simultaneous determination of three curcuminoids in *Curcuma wenyujin* Y. H. chen et C. Ling by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with pressure liquid extraction. *J. Pharm. Biom. Anal.* **2013**, 81–82, 146–150.
- [76] Goren, A.; Cikrikci, S.; Cergel, M.; Bisel, K. Rapid quantitation of curcumin in turmeric via NMR and LC tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2009**, 113, 1239–1242.
- [77] Jiang, H. L.; Timmermann, B. N.; Gang, D. R. Use of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to identify diarylheptanoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) rhizome. *J. Chromatogr. A.* **2006**, 111, 21–31.
- [78] Gao, D.; Chen, X.; Yang, X.; Wu, Q.; Jin, F.; Wen, H.; Jiang, Y.; Liu, H. Stable isotope labeling strategy for curcumin metabolite study in human liver microsomes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2015**, 26, 686–694.
- [79] Gordon, O. N.; Luis, P. B.; Sintim, H. O. Unraveling curcumin degradation autoxidation proceeds through spiroepoxide and vinyl ether intermediates en route to the main bicyclopentadione. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 4817–4828.
- [80] Li, R.; Qiao, X.; Li, Q.; He, R.; Ye, M.; Xiang, C.; Lin, X.; Guo, D. Metabolic and pharmacokinetic studies of curcumin, demethoxycurcumin and *bisdemethoxycurcumin* in mice tumor after intragastric administration of nanoparticle formulations by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **2011**, 2011, 2751–2758.
- [81] Tamvakopoulos, C.; Sofianos, Z. D.; Garbis, S. D.; Pantazis, P. Analysis of the in vitro metabolites of diferylolmethane (curcumin) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry on a hybrid quadrupole linear ion trap system: newly identified metabolites. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2007**, 32, 61–57.
- [82] Mahale, J.; Singh, R.; Howells, L. M.; Britton, R. G.; Khan, S. M.; Brown, K. Detection of Plasma curcuminoids from dietary intake of turmeric containing food in human Volunteers. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, 62, 1800267.
- [83] Nag, A.; Chakraborty, P.; Natarajan, G.; Ananya Baksi, S. K. M.; Venkatesan T. P. S. Bent Keto form of curcumin, preferential stabilization of enol by piperine, and isomers of curcumin cyclodextrin complexes: insights from ion mobility mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 8776–8784.
- [84] Cyriac, J.; Paulose, J.; George, M.; Ramesh, M.; Srinivas, R.; Giblin, D.; Gross, M. L. The role of methoxy group in the nazarov cyclization of 1,5-*bis*-(2-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one in the gas phase and condensed phase. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, 25, 398–409.
- [85] Hawbecker, B. L.; Kurtz, D. W.; Putnam, T. D.; Ahlers, P. A.; Gerber, G. D. The aldol condensation: a simple teaching model of organic laboratory. *J. Chem. Ed.* **1978**, 55, 4–5.
- [86] Kumari, N.; Kulkarni, A. A.; Lin, X.; McLean, C.; Ammosova, T.; Ivanov, A.; Hipolito, M.; Nekhai, S.; Nwulia, E. Inhibition of HIV-1 by curcumin A, a novel curcumin analog. *Drug. Des. Devel. Ther.* **2015**, 9, 5051–5060.
- [87] Franco, L. L.; Almeida, M. V.; Vieira, P. P.; Pohit, A. M. Synthesis and antimalarial activity of dihydroperoxides and tetraoxanes conjugated with *bis*-(benzyl)acetone derivatives. *Chem Biol Drug Des.* **2012**, 79, 790–797.

- [88] CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. *Clin. Lab. Stand. Inst.* **2009**, 29, M07-A08.
- [89] Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, S. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 2720–2722.
- [90] Brouwer, H. Testing for chemical toxicity using bacteria. *J. Chem. Educ.* **1991**, 68, 695–697.
- [91] Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648–5652.
- [92] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P. C.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian Inc.* **2003**.
- [93] Vessecchi, R.; Galembeck, S. E.; Lopes, N. P.; Nascimento, P. G. B. D.; Crotti, A. E. M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. *Quím. Nov.* **2008**, 31, 840–853.
- [94] McQuarrie, J. D.; Simon, D. A. Physical Chemistry: A molecular approach. *Sausalito Univ. Sci. Books.* **1997**.
- [95] Spezia, R.; Martínez-Núñez, E.; Vazquez, S.; Hase, W. L. Theoretical and computational studies of non-equilibrium and non-statistical dynamics in the gas phase, in the condensed phase and at interfaces. *Phil. Trans. R. Soc. A.* **2017**, 375, 20170035.
- [96] Martín-Sómer, A.; Yáñez, M.; Gaigeot, M. P.; Spezia, R. Unimolecular fragmentation induced by low-energy collision: statistically or dynamically driven. *J. Phys. Chem. A.* **2014**, 118, 10882–10893.
- [97] Martín-Sómer, A.; Spezia, R.; Yáñez, M. Gas-phase reactivity of [Ca(formamide)]²⁺ complex: an example of different dynamical behaviours. *Phil. Trans. R. Soc. A.* **2017**, 375, 20160196.
- [98] Franco, L. L.; Almeida, M. V.; Silva, L. F. R.; Vieira, P. P. R.; Pohlit, A. M.; Valle, M. S. Synthesis and antimalarial activity of dihydroperoxides and tetraoxanes conjugated with *bis*(benzyl)acetone derivatives. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, 79, 790–797.
- [99] Carey, F. A.; Sundberg, R. J. Advanced organic chemistry part A: structure and mechanisms. 5th edition, *University of Virginia Charlottesville, Virginia.* **2007**.
- [100] Szkaradkiewicz, K. T. A. Microbiology of dental caries. *J. Biol. Earth Sci.* **2013**, 3, 21–24.

- [101] Gibbons, S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21, 263–267.
- [102] Ríos, J.; Recio, M. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 100, 80–84.
- [103] Saleem, M.; Nazir, M.; Ali, M. S.; Hussain, H.; Lee, Y. S.; Riaz, N.; Jabbar, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 238–254.
- [104] Gaonkar, S. L.; Vignesh, U. N. Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review. *Res. Chem. Intermed.* **2017**, 43, 6043 – 6077.
- [105] Helalat, L.; Zarejavid, A.; Ekrami, A.; Haghighizadeh, M. H.; Nasab, M. S. The effect of curcumin on growth and adherence of major microorganisms causing tooth decay. *Middle East J. Fam. Med.* **2007**, 15, 214–220.
- [106] Shahzad, M.; Millhouse, E.; Culshaw, S.; Edwards, C. A.; Ramage, G.; Combet, E. Selected dietary (poly)phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. *Food Funct.* **2015**, 6, 719–729.
- [107] Crotti, A. E. M.; Cunha, W. R.; Lopes, N. P.; Lopes, J. L. C. Sesquiterpene lactones from *Minasia alpestris*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, 16, 677–680.
- [108] Dias, H. J.; Stefani, R.; Tomaz, J. C.; Vessecchi, R.; Crotti, A.E.M. Differentiation between 3,4- and 4,15-epoxyeudesmanolides by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Anal. Methods Chem.* **2017**, 2017, 1–9.
- [109] Dias, H. J.; Vieira, T. M.; Crevelin, E. J.; Donate, P. M.; Crotti, A. E. M. Fragmentation of 2-aroylbenzofuran derivatives by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2017**, 52, 809–816.
- [110] Boyd, R.; Somogyi, Á. The mobile proton hypothesis in fragmentation of protonated peptides: a perspective. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, 21, 1275–1278.
- [111] Sleno, L.; Volmer, D. A. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2004**, 39, 1091–1112.
- [112] Hu, N.; Tu, Y.P.; Liu, Y.; Jiang, K.; Pan, Y. Dissociative protonation and proton transfers: fragmentation of α , β -unsaturated aromatic ketones in mass spectrometry. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 3369–3376.
- [113] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P. C.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Dannenberg, J. J. Gaussian 09. Revision B.01*. Wallingford CT Gaussian, **2009**.

- [114] Schäfer, M.; Dray, M.; Springer, A.; Zacharias, P.; Meerholz, K. Radical cations in electrospray mass spectrometry: formation of open-shell species, examination of the fragmentation behavior in ESI-MSⁿ and reaction mechanism studies by detection of transient radical cations. *Eur J. Org Chem.* **2007**, 2007, 5162-5174.
- [115] Karni, M. A. The “even-electron rule”. *Org Mass Spectrom.* **1980**, 15, 53-64.
- [116] Nelson, D. J.; Gichuhi, W. K.; Nichols, C. M.; Bierbaum, V. M.; Lineberger, W. C.; Lehman, J. H. Photoelectron spectroscopy and thermochemistry of *o*-, *m*-, and *p*-methylenephenoxy anions. *Phys. Chem.* **2018**, 20, 25203.

7. Anexos

ANEXO 1. SEÇÃO DE ESPECTROS

Figura A1. Espectro de massas do composto **1** (EI, 70eV).

Figura A2. Espectro de absorção no infravermelho do composto **1** (em pastilha de KBr).

Figura A3. Espectro de RMN de ^1H do composto **1** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A4. Espectro de DEPT 135 do composto 1 (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A5. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **1** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A6. Espectro de massas do composto **2** (EI-MS).

Figura A7. Espectro de absorção no infravermelho do composto **2** (em pastilha de KBr).

Figura A8. Espectro de RMN de ^1H do composto **2** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A9. Espectro de DEPT 135 do composto **2** (CDCl₃, 400 MHz).

Figura A10. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **2** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A11. Espectro de massas do composto **3** (EI-MS).

Figura A12. Espectro de absorção no infravermelho do composto **3** (em pastilha de KBr).

Figura A13. Espectro de RMN de ^1H do composto **3** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A14. Espectro de DEPT 135 do composto **3** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A15. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **3** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A16. Espectro de massas do composto **4** (EI-MS).

Figura A17. Espectro de absorção no infravermelho do composto **4** (em pastilha de KBr).

Figura A18. Espectro de RMN de ^1H do composto **4** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A19. Espectro de DEPT 135 do composto **4** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A20. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **4** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A21. Espectro de massas do composto **5** (EI-MS).

Figura A22. Espectro de absorção no infravermelho do composto **5** (em pastilha de KBr).

Figura A23. Espectro de RMN de ^1H do composto **5** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A24. Espectro de DEPT 135 do composto **5** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A25. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **5** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A26. Espectro de absorção no infravermelho do composto **6** (em pastilha de KBr).

Figura A27. Espectro de RMN de ^1H do composto **6** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A28. Espectro de DEPT 135 do composto **6** (CDCl₃, 400 MHz).

Figura A29. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **6** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A30. Espectro de massas do composto 7 (EI-MS).

Figura A31. Espectro de absorção no infravermelho do composto 7 (em pastilha de KBr).

Figura A32. Espectro de RMN de ^1H do composto **7** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A33. Espectro de DEPT 135 do composto **7** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A34. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **7** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A35. Espectro de absorção no infravermelho do composto **8** (em pastilha de KBr).

Figura A36. Espectro de RMN de ^1H do composto **8** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A37. Espectro de DEPT 135 do composto **8** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A38. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **8** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A39. Espectro de massas do composto **9** (EI-MS).

Figura A40. Espectro de absorção no infravermelho do composto **9** (em pastilha de KBr)

Figura A41. Espectro de RMN de ^1H do composto **9** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A42. Espectro de DEPT 135 do composto **9** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A43. Espectro de RMN ^{13}C do composto **9** (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura A44. Espectro de absorção no infravermelho do composto **10** (em pastilha de KBr).

Figura A45. Espectro de RMN de ^1H do composto **10** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A46. Espectro de DEPT 135 do composto **10** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A47. Espectro de RMN ^{13}C do composto **10** (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura A48. Espectro de absorção no infravermelho do composto **11** (em pastilha de KBr).

Figura A49. Espectro de RMN de ^1H do composto **11** (acetona- d_6 , 400 MHz).

Figura A50. Espectro de DEPT 135 do composto **11** (acetona- d_6 , 400 MHz).

Figura A51. Espectro de RMN ^{13}C do composto **11** (acetona- d_6 , 100 MHz).

Figura A52. Espectro de massas do composto 12 (EI-MS).

Figura A53. Espectro de absorção no infravermelho do composto 12 (em pastilha de KBr).

Figura A54. Espectro de RMN de ^1H do composto **12** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A55. Espectro de DEPT 135 do composto **12** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A56. Espectro de RMN ¹³C do composto **12** (CDCl₃, 100 MHz).

Figura A57. Espectro de massas do composto **13** (EI-MS). Figura A58. Espectro de absorção no infravermelho do composto **13** (em pastilha de KBr).

Figura A59. Espectro de RMN de ^1H do composto **13** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A60. Espectro de DEPT 135 do composto **13** (CDCl₃, 400 MHz).

Figura A61. Espectro de RMN ¹³C do composto **13** (CDCl₃, 100 MHz).

Figura A62. Espectro de massas do composto 14 (EI-MS).

Figura A63. Espectro de absorção no infravermelho do composto 14 (em pastilha de KBr).

Figura A64. Espectro de RMN de ^1H do composto **14** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A65. Espectro de DEPT 135 do composto **14** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A66. Espectro de RMN ¹³C do composto **14** (CDCl₃, 100 MHz).

Figura A67. Espectro de massas do composto 15 (EI-MS).

Figura A68. Espectro de absorção no infravermelho do composto 15 (em pastilha de KBr).

Figura A69. Espectro de RMN de ¹H do composto **15** (CDCl₃, 400 MHz).

Figura A70. Espectro de DEPT 135 do composto **15** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A71. Espectro de RMN ¹³C do composto **15** (CDCl₃, 100 MHz).

Figura A72. Espectro de absorção no infravermelho do composto **16** (em pastilha de KBr).

Figura A73. Espectro de RMN de ^1H do composto **16** (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura A74. Espectro de DEPT 135 do composto **16** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A75. Espectro de RMN ¹³C do composto **16** (CDCl₃, 100 MHz).

Figura A76. Espectro de massas do composto 17 (EI-MS).

Figura A77. Espectro de absorção no infravermelho do composto 17 (em pastilha de KBr).

Figura A78. Espectro de RMN de ^1H do composto **17** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A79. Espectro de DEPT 135 do composto **17** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A80. Espectro de RMN ^{13}C do composto **17** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A81. Espectro de massas do composto 18 (EI-MS).

Figura A82. Espectro de absorção no infravermelho do composto 18 (em pastilha de KBr).

Figura A83. Espectro de RMN de ^1H do composto **18** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A84. Espectro de DEPT 135 do composto **18** (CDCl₃, 400 MHz).

Figura A85. Espectro de RMN ¹³C do composto **18** (CDCl₃, 100 MHz).

Figura A86. Espectro de absorção no infravermelho do composto **19** (em pastilha de KBr).

Figura A87. Espectro de RMN de ^1H do composto **19** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A88. Espectro de DEPT 135 do composto **19** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A89. Espectro de RMN ¹³C do composto **19** (CDCl₃, 100 MHz).

Figura A90. Espectro de massas do composto **20** (EI-MS).

Figura A91. Espectro de absorção no infravermelho do composto **20** (em pastilha de KBr).

Figura A92. Espectro de RMN de ¹H do composto **20** (CDCl₃, 400 MHz).

Figura A93. Espectro de DEPT 135 do composto **20** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A94. Espectro de RMN ¹³C do composto **20** (CDCl₃, 100 MHz).

Figura A95. Espectro de absorção no infravermelho do composto **21** (em pastilha de KBr).

Figura A96. Espectro de RMN de ¹H do composto **21** (CDCl₃, 400 MHz).

Figura A97. Espectro de DEPT 135 do composto **21** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A98. Espectro de RMN ¹³C do composto **21** (CDCl₃, 100 MHz).

Figura A99. Espectro de massas do composto 22 (EI-MS).

Figura A100. Espectro de absorção no infravermelho do composto 22 (em pastilha de KBr).

Figura A101. Espectro de RMN de ^1H do composto **22** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A102. Espectro de DEPT 135 do composto **22** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A103. Espectro de RMN ^{13}C do composto **22** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A104. Espectro de absorção no infravermelho do composto **23** (em pastilha de KBr).

Figura A105. Espectro de RMN de ¹H do composto **23** (CDCl₃, 400 MHz).

Figura A106. Espectro de DEPT 135 do composto **23** (CDCl₃, 400 MHz).

Figura A107. Espectro de RMN ^{13}C do composto **23** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A108. Espectro de massas do composto 24 (EI-MS).

Figura A109. Espectro de absorção no infravermelho do composto 24 (em pastilha de KBr).

Figura A110. Espectro de RMN de ^1H do composto **24** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A111. Espectro de DEPT 135 do composto **24** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A112. Espectro de RMN ^{13}C do composto **24** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A113. Espectro de massas do composto 25 (EI-MS).

Figura A114. Espectro de absorção no infravermelho do composto 25 (em pastilha de KBr).

Figura A115. Espectro de RMN de ^1H do composto **25** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A116. Espectro de DEPT 135 do composto **25** (CDCl₃, 400 MHz).

Figura A117. Espectro de RMN ¹³C do composto **25** (CDCl₃, 100 MHz).

Figura A118. Espectro de massas do composto **26** (EI-MS).

Figura A119. Espectro de absorção no infravermelho do composto **26** (em pastilha de KBr).

Figura A120. Espectro de RMN de ^1H do composto **26** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A121. Espectro de DEPT 135 do composto **26** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A122. Espectro de RMN ^{13}C do composto **26** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A123. Espectro de massas do composto 27 (EI-MS).

Figura A124. Espectro de absorção no infravermelho do composto 27 (em pastilha de KBr).

Figura A125. Espectro de RMN de ^1H do composto **27** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A126. Espectro de DEPT 135 do composto **27** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A127. Espectro de RMN ¹³C do composto **27** (CDCl₃, 100 MHz).

Figura A128. Espectro de absorção no infravermelho do composto **28** (em pastilha de KBr).

Figura A129. Espectro de RMN de ^1H do composto **28** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A130. Espectro de DEPT 135 do composto **28** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A131. Espectro de RMN ^{13}C do composto **28** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A132. Espectro de absorção no infravermelho do composto **29** (em pastilha de KBr).

Figura A133. Espectro de RMN de ^1H do composto **29** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A134. Espectro de DEPT 135 do composto **29** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A135. Espectro de RMN ^{13}C do composto **29** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A136. Espectro de massas do composto **30** (EI-MS). Figura A 137. Espectro de absorção no infravermelho do composto **30** (em pastilha de KBr).

Figura A138. Espectro de RMN de ^1H do composto **30** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A139. Espectro de DEPT 135 do composto **30** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A140. Espectro de RMN ^{13}C do composto **30** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A141. Espectro de absorção no infravermelho do composto **31** (em pastilha de KBr).

Figura A142. Espectro de RMN de ^1H do composto **31** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A143. Espectro de DEPT 135 do composto **31** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura A144. Espectro de RMN ^{13}C do composto **31** (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura A145. Espectro de ESI-MSⁿ do composto 1

Figura A146. Espectro de ESI-MSⁿ do composto 2.

Figura A147. Espectro de ESI-MSⁿ do composto 3.

Figura A148. Espectro de ESI-MSⁿ do composto 4.

Figura A149. Espectro de ESI-MSⁿ do composto 5.

Figura A150. Espectro de ESI-MSⁿ do composto 6. Figura A151. Espectro de ESI-MSⁿ do composto 7.

Figura A152. Espectro de ESI-MSⁿ do composto 8. Figura A153. Espectro de ESI-MSⁿ do composto 9.

Figura A154. Espectro de ESI-MSⁿ do composto 10. Figura A155. Espectro de ESI-MSⁿ do composto 11.