

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS DE
3-(PIRIMIDIN-2-IL)-TIAZOLIDINONAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JOSÉ COAN CAMPOS JÚNIOR

Pelotas, RS, Brasil

2013

C186s Campos Junior, José Coan

Síntese e atividade antioxidante de derivados de 3-(PIRIMIDIN-2-IL)-TIAZOLIDINONAS / José Coan Campos Junior; orientador Geonir Machado Siqueira - Pelotas, 2013.

77 f. : il.

Dissertação de Mestrado do Programa de Bioquímica e Bioprospecção, CCQFA. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.tiazolidinonas 2.peneira molecular 3.atividade antioxidante I. Siqueira, Geonir Machado (orientador) II.Título.

CDD 574.192

Catálogo na fonte: Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Universidade Federal de Pelotas

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS DE
3-(PIRIMIDIN-2-IL)-TIAZOLIDINONAS**

por

José Coan Campos Júnior

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas (RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção)**

Orientador: Prof. Dr. Geonir Machado Siqueira

Pelotas, RS, Brasil

2013

Universidade Federal de Pelotas
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS DE
3-(PIRIMIDIN-2-IL)-TIAZOLIDINONAS**

elaborado por
José Coan Campos Júnior

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção)

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Geonir Machado Siqueira - Presidente/ Orientador –UFPel

Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Bobrowski

Prof. Dr. Cláudio Martin Pereira de Pereira

Pelotas, 28 de março de 2013.

Dedicatória

À toda minha família: esposa Vanise, filhos Augusto e Duda, mãe Daniza, irmãos Thaís e Alexandre, que tiveram toda compreensão e paciência nesse período onde ficamos quase que incomunicáveis.

E por fim, ao meu pai José, in memoriam, que do pouco tempo que esteve entre nós deixou de legado a sina de nunca desistir. Que Deus esteja contigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por estar sempre presente em minha vida, me iluminando e guiando em todos os momentos;

Agradecimento especial e desculpas ao meu orientador Prof. Geonir pelos auxílios e por eventuais atrasos que eu tenha cometido;

Agradeço, também, ao Prof. Wilson que na ausência do Prof. Geonir prestou-se em me ajudar com toda a vontade.

A minha parceira de laboratório Daniela, fundamental pelo sucesso do trabalho;

A minha parceria de bancada Camila pela ajuda, também, fundamental para entrega do trabalho a tempo.

A todos os colegas do LAQUIABIO pela ajuda, amizade e companheirismo;

Aos colegas do laboratório vizinho Marina, Vanderléia e Bruno pela amizade e eventuais auxílios;

Aos professores da banca examinadora Dr^a. Vera Lucia Bobrowski e Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira.

Aos funcionários Hélio, Marco, Elba, Isabel e Daiane pela ajuda prestada e pela paciência.

A Msc. Patrícia Neuenfeldt e o Prof. Dr. Alex Flores pelos auxílios nos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

E novamente ao Prof. Dr. Cláudio Martin Pereira de Pereira pelo auxílio nos espectros de CG-EM e CG.

RESUMO

SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS DE 3-(PIRIMIDIN-2-IL)-TIAZOLIDINONAS

Autor: José Coan Campos Júnior

Orientador: Prof. Dr. Geonir Machado Siqueira

Dados da literatura mostram que os anéis pirimidínicos e tiazolidinônicos apresentam atividade antioxidante, com isso o presente trabalho teve como objetivo sintetizar compostos heterociclos contendo essas duas classes e avaliar conjuntamente a atividade antioxidante das mesmas. A síntese de onze 3-(pirimidin-2-il)-tiazolidinonas foi realizada utilizando peneira molecular como um agente dessecante e no fim obteve-se bons rendimentos comparados a metodologia tradicional utilizando destilação azeotrópica com aparelho Dean-Stark. Por uma vez, a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados foi avaliada através de ensaios com os radicais DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS⁺• (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)). Seis compostos mostraram atividade antioxidante frente ao DPPH• com considerável EC₅₀ (16,13-49,94 ug/mL) e também excelente atividade em relação ao ABTS⁺• (10,32-53,52 TEAC). Portanto, os compostos 3-(pirimidin-2-il)-tiazolidinonas podem ser facilmente sintetizados por esta nova metodologia mais simples e servem de potenciais precursores para o desenvolvimento de um novo composto antioxidante.

Palavras chave: tiazolidinonas, peneira molecular, atividade antioxidante.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO

PELOTAS, 28 DE MARÇO DE 2013.

ABSTRACT

EFFICIENT SYNTHESIS AND ANTIOXIDANT EVALUATION OF THIAZOLIDINONES FROM 2-AMINOPYRIMIDINE

Author: José Coan Campos Júnior

Academic Advisor: Prof. Dr. Geonir Machado Siqueira

In the present work, we report the efficient synthesis of 11 3-(pyrimidin-2-yl)-thiazolidinones in good yields using molecular sieve as a desiccant agent. In addition, we have evaluate the antioxidant capacity of the synthesized compounds by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) and 2,20-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS⁺•) radicals scavenging assay. Six compounds showed antioxidant activity towards DPPH•with considerable EC₅₀ (16.13-49.94 µg/mL) and also showed excellent activity regarding ABTS⁺• (10.32-53.52 TEAC). These results showed that compounds 3-(pyrimidin-2-yl)-thiazolidinones may be easily synthesized by a less expensive procedure and could be a good starting point to development of a new antioxidant compounds.

Keywords:thiazolidinones, molecular sieves, antioxidant activity.

FEDERAL UNIVERSITY OF PELOTAS

POST-GRADUATE PROGRAM IN BIOCHEMISTRY AND BIOPROSPECTING

MASTER DISSERTATION IN BIOCHEMISTRY AND BIOPROSPECTING

PELOTAS, 28 DE MARÇO DE 2013.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cadeia do estresse oxidativo.	19
Figura 2. Decaimento da absorbância do DPPH•em contato com antioxidante. (a) cinética rápida – ác. ascórbico – (b) cinética lenta – guaiacol e (c) EC ₅₀ da zingerona.	24
Figura 3 – Estruturas de tiazolidinonas análogas do anel tiazolidina da penicilina. ..	27
Figura 4. Exemplo de tiazolidinona com atividade antioxidante 1	33
Figura 5. Exemplo de tiazolidinona com atividade antioxidante 2	34
Figura 6. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) do composto 2-(3-fluorfenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4c) em DMSO- <i>d</i> ₆	52
Figura 7. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) do composto 2-(3-metoxi)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4e) em DMSO- <i>d</i> ₆	53
Figura 8. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) do composto 2-(2-nitrofenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4f) em CDCl ₃	54
Figura 9. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) do composto 2-(3-nitrofenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4g) em CDCl ₃	55
Figura 10. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) do composto 2-(2,3-dimetoxi)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4i) em DMSO- <i>d</i> ₆	56
Figura 11. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(4-metilfenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4a).	58
Figura 12. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(2-clorofenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4b).	59
Figura 13. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(3-fluorfenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4c).	60
Figura 14. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(4-fluorfenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4d).	61

Figura 15. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(3-metoxifenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4e).....	62
Figura 16. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(2-nitrofenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4f).	63
Figura 17. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(3-nitrofenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4g).	64
Figura 18. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(2,4-diclorofenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4h).	65
Figura 19. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(2,3-dimetoxifenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4i).	66
Figura 20. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(3,4-dimetoxifenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4j).	67
Figura 21. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(2-cloro-6-fluorfenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (4l).	68

LISTA DE TABELAS

Esquema 1. Formação de superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) via (a) NADPH e via (b) ubiquinona na CTE.	16
Esquema 2. Reação global de obtenção do radical $\cdot\text{OH}$. (a) Reação de Fenton e (b) Reação de Haber-Weiss.	16
Esquema 3. Atuação da SOD na defesa contra o radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$).	17
Esquema 4. Biossíntese de óxido nítrico.	17
Esquema 5. Sistema de defesa antioxidante enzimática.	20
Esquema 6. Mecanismo de ação do antioxidante frente ao DPPH $\cdot$	23
Esquema 7. Reação de formação de tiazolidinonas por ciclocondensação de tiouréias.	28
Esquema 8. Reação de formação de tiazolidinonas por ciclocondensação de iminas	29
Esquema 9. Reação de formação de 2-imino-4-tiazolidinonas.	29
Esquema 10. Síntese de tiazolidinonas <i>one pot</i> por ciclocondensação de iminas.	30
Esquema 11. Síntese de tiazolidinonas em duas etapas por ciclocondensação de iminas.	30
Esquema 12. Síntese de tiazolidinonas utilizando ZnCl_2 e peneira molecular.	31
Esquema 13. Síntese de tiazolidinonas utilizando peneira molecular.	31
Esquema 14. Síntese de tiazolidinonas utilizando DCC.	32
Esquema 15. Provável mecanismo de ação e estabilização do radical livre formado após doação de hidrogênio do anel tiazolidinona.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATP	Adenosina Trifosfato
BF ₃	Trifluoreto de boro
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
DCC	1,3-diciclohexilcarbodiimida
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
HBTU	Hexafluorofosfato de 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
RMN	Ressonância magnética nuclear
SnCl ₂	Cloreto de estanho
t.a.	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
ZnCl ₂	Cloreto de zinco
NADPH	Adenina nicotinamida dinucleotídeo [fosfato]
SOD	Superóxido dismutase
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ER	Espécies Reativas
DA	Defesas Antioxidantes
RL	Radical Livre
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
PL	Peroxidação Lipídica
CAT	Catalase
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
BHA	Hidróxianisobutilado
BHT	Hidróxitoluenobutilado
TBHQ	Tert-butilhidroquinona
PG	Galato de propilo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS	15
3.2 ESTRESSE OXIDATIVO	18
3.2.1 SISTEMAS ENZIMÁTICOS E NÃO-ENZIMÁTICOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	19
3.2.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	21
3.2.2.1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR CAPTURA DO DPPH•	23
3.2.2.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR CAPTURA DO ABTS ⁺ •.....	25
3.3 TIAZOLIDINONAS	26
3.3.1 SÍNTESE DE 4-TIAZOLIDINONAS.....	27
3.3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS DE TIAZOLIDINONAS	33
4 ARTIGO CIENTÍFICO	36
5 CONCLUSÕES	43
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	44
ANEXOS	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

Há uma grande variedade de atividades biológicas exibidas pelas tiazolidin-4-onas e pirimidinas. Derivados de pirimidina constituem uma importante classe de agentes terapêuticos em química medicinal incluindo antimicrobiana, anticâncer, anti-inflamatórios, anti-HCV, anti-HIV, antioxidante e vários outros (Bukhari *et al.*, 2013). Os compostos contendo anel tiazolidinona são conhecidos por suas propriedades biológicas, por exemplo, atividade anticonvulsivante, hipnótico, antituberculosa, anticâncer e antiviral (Jain *et al.*, 2012).

Vários métodos para a síntese de tiazolidin-4-onas substituídas estão disponíveis na literatura. Essencialmente, a reação de três componentes, envolvendo uma amina primária, um composto carbonílico e o ácido mercaptoacético. É a abordagem mais comum utilizar a destilação azeotrópica com Dean-Stark para a remoção da água. Além disso, outros protocolos foram desenvolvidos utilizando agentes de desidratação entre estes Na_2SO_4 , peneiros moleculares, DCC e HBTU, com a finalidade de melhorar o rendimento do produto desejado (Prasad e Nath, 2012).

É sabido que os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio estão envolvidos na patogenicidade de várias doenças, muitas delas crônicas e relacionadas com a idade (Valko *et al.*, 2007). Deste modo, os antioxidantes foram recentemente identificados como alvos terapêuticos para combater diferentes doenças, tais como a inflamação, a carcinogênese e aterogênese (Wojcik, Burzynska-Pedziwiatr e Wozniak, 2010). Além disso, algumas tiazolidinonas têm demonstrado atividade antioxidante (Bardia, Singh e Rao, 2005), que abre o caminho para os ensaios com outros compostos com este anel.

Por conseguinte, a proposta deste trabalho é preparar tiazolidin-4-onas que contenham uma porção pirimidínica e explorar a vantagem terapêutica de combinação destes heterociclos. Além disso, explorar o potencial de aplicação de peneira molecular como desidratante para a síntese de 3 - (pirimidin-2-il) -1,3-tiazolidin-4-onas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e avaliar o potencial antioxidante de compostos derivados de 3-(pirimidin-2-il)-tiazolidinonas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sintetizar, caracterizar e comparar rendimentos dos compostos derivados de 3-(pirimidin-2-il)-tiazolidinonas tanto pela metodologia comumente empregada, via destilação azeotrópica utilizando um aparelho Dean-Stark, quanto utilizando peneira molecular;
- b) Avaliar a atividade antioxidante dos compostos derivados de 3-(pirimidin-2-il)-tiazolidinonas, por análises *in vitro* conforme metodologia empregando o cátion radical $ABTS^{+\bullet}$ (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) e também utilizando o radical DPPH $\bullet$ (2,2-difenil-1-picrilhidrazina).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS

Há mais de 50 anos que os primeiros estudos relatando a presença de radicais livres nos sistemas biológicos foram publicados. O interesse pelos radicais livres e posteriormente por antioxidantes vem despertando cada vez mais os pesquisadores, isso devido a associação entre a presença de radicais livres e determinadas doenças (Dröge, 2002; Halliwell e Gutteridge, 2007).

O radical livre (RL) é descrito como qualquer espécie (molécula ou átomo) que contém um ou mais elétrons não emparelhados em seus orbitais, sendo instável com uma meia vida muito curta (podendo variar de nano segundos a minutos) e altamente reativo. Os radicais livres são conhecidos por induzir a peroxidação lipídica (PL) e ao dano de macromoléculas celulares (Davies e Pryor, 2005; Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007).

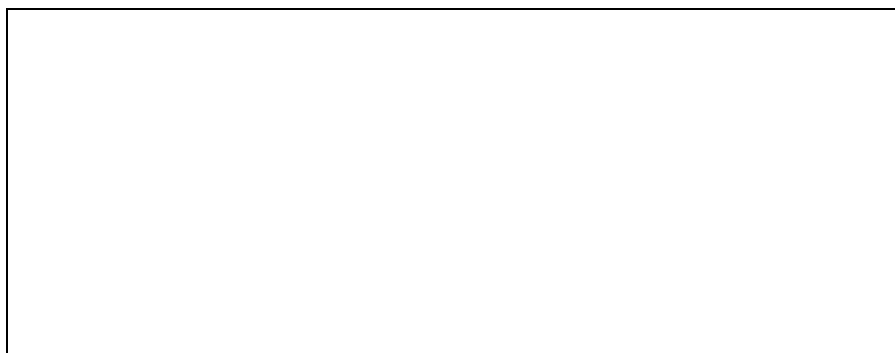
As espécies radicalares podem ser formadas pela perda de um único elétron ou pelo ganho de um elétron de outra substância não radical. A formação de radicais livres *in vivo* pode ser formada em qualquer compartimento celular, mas a principal fonte produtora é a mitocôndria através da cadeia transportadora de elétrons (CTE), pois é o principal sítio de consumo de O_2 (Cannio *et al.*, 2000; Halliwell, 2006).

As espécies reativas (ER) são divididas em: espécies reativas de cloro, espécies reativas de bromo, espécies reativas de enxofre e mais comumente apresentadas as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As ERO são geradas espontaneamente em células durante o metabolismo, tais como, *não-radicalares*, H_2O_2 e *radicalares*, como $\cdot O_2$, $\cdot OH$, $ROO\cdot$ e outros RL que são subprodutos do metabolismo biológicos aeróbios (Young e Woodside, 2001; Halliwell, 2006).

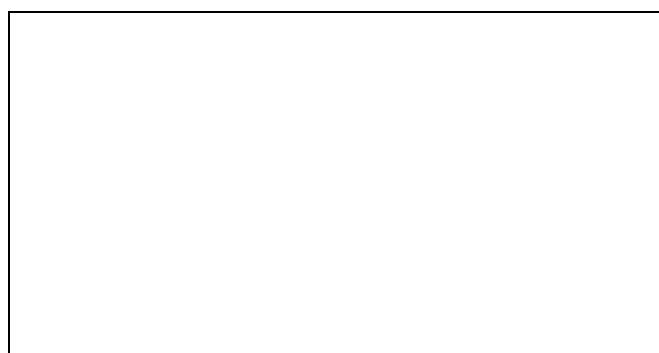
O superóxido ($\cdot O_2$) é a ERO mais importante do sistema biológico, possui um elétron desemparelhado, localizado no orbital antiligante π^* . É formado de várias maneiras, uma fonte é na CTE devido a uma falta de coordenação entre a taxa de entrada de elétrons e a transferência desses na cadeia fazendo com que o radical ubiquinona parcialmente reduzido ($\cdot Q$) doa um elétron para o O_2 formando o $\cdot O_2$ (Cannio *et al.*, 2000), outra importante, é através de fagócitos ou linfócitos durante o

processo inflamatório com gasto de uma molécula de NADPH (Diplock *et al.*, 1998)(Esquema 1). Após a formação, o radical superóxido atua sobre a acotinase, uma proteína 4Fe-4S, para liberar Fe^{2+} , que na presença de H_2O_2 gera o radical $\cdot\text{OH}$, altamente reativo e danoso as células (Reação de Fenton), ainda o Fe^{3+} produzido nessa reação, reage novamente com o $\cdot\text{O}_2^-$ para recompor o Fe^{2+} e gerar mais $\cdot\text{OH}$ (Reação de Haber-Weiss)(Halliwell, 2006; Styskal *et al.*, 2012).



Esquema 1. Formação de superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) via (a) NADPH e via (b) ubiquinona na CTE.

O radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) é uma espécie altamente reativa, formado em vários processos fisiológicos, pois pode reagir com qualquer enzima, lipídeos de membranas e ácidos nucleicos danificando-os. A formação de radicais $\cdot\text{OH}$ pode ser elucidada pela reação de Fenton e é catalisada por íons metálicos de transição (Esquema 2)(Diplock *et al.*, 1998; Cannio *et al.*, 2000).



Esquema 2. Reação global de obtenção do radical $\cdot\text{OH}$. (a) Reação de Fenton e (b) Reação de Haber-Weiss.

O radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$) possui um tempo de meia-vida relativamente longo com considerável difusão entre os sistemas biológicos. Pode ser gerado no processo de peroxidação lipídica (PL) pela abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado, ainda pode haver essa perda de H devido a

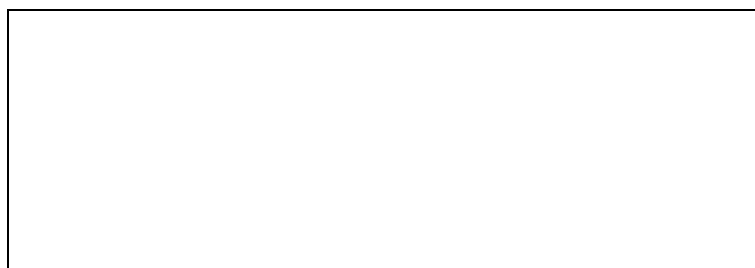
presença do radical $\cdot\text{OH}$. Ainda, a PL gera como subprodutos o radical ($\text{RO}\cdot$) e hidroperóxidos (ROOH), esse último, ocorre rearranjo com posterior clivagem e formação de aldeídos capazes de reagir com o grupamento amino ($-\text{NH}_2$) de aminoácidos alterando suas funções nas proteínas (Reaven e Witztum, 1996; Diplock *et al.*, 1998).

A ERO, não-radicalar, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido pela adição de prótons ao superóxido $\cdot\text{O}_2^-$ através de uma reação enzimática com a enzima superóxido dismutase (SOD). Algumas moléculas, como adrenalina e compostos tiólicos, podem oxidar-se com a presença do O_2 gerando $\cdot\text{O}_2^-$, que por consequência poderá produzir H_2O_2 e $\cdot\text{OH}$ como mencionado anteriormente (Esquema 3) (Cannio *et al.*, 2000; Young e Woodside, 2001).



Esquema 3. Atuação da SOD na defesa contra o radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$).

As ERN são espécies que apresentam nitrogênio na sua composição, tais como, o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), que é produzido a partir de reação enzimática entre a arginina e o O_2 mediado pela enzima NO-sintase formando o radical (Esquema 4). É um importante sinalizador e mensageiro celular envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos. Em excesso, o $\text{NO}\cdot$ é citotóxico reagindo diretamente com biomoléculas ou combinado com $\cdot\text{O}_2^-$ forma uma espécie reativa não-radicalar o peroxinitrito (ONOO^-), esse é capaz de induzir a PL em lipoproteínas, além de interferir na sinalização celular realizada pelo $\text{NO}\cdot$ (Beckman, 1996; Hopps *et al.*, 2010).



Esquema 4. Biossíntese de óxido nítrico.

3.2 ESTRESSE OXIDATIVO

A oxidação é a transferência de elétrons de um átomo para outro, que por consequência sofrem uma redução e é fundamental na vida aeróbia e, por conseguinte no metabolismo dos seres humanos. Nesse caso, o oxigênio desempenha um papel importante como o acceptor final de elétrons no sistema que produz energia na forma de ATP. No entanto, pode ocorrer a formação de ER nessa transferência gerando RL, que em alguns casos são benéficos, mas de acordo com diversos estudos o excesso desses radicais são fatores determinantes em várias patologias como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS(Sies, 1991; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em organismos saudáveis, em homeostase, há um equilíbrio entre a produção de ER e defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, contudo somente o excesso é combatido, já que alguns radicais livres possuem funções fisiológicas importantes no organismo. Algumas destas ER ajudam na produção de energia, a organizar os processos inflamatórios e a proteger no sistema imunológico(Halliwell, 2006; Styskal *et al.*, 2012).

Quando ocorrer um aumento de ER ou uma diminuição do nível de antioxidante o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes tende para o primeiro, com isso gera o estado que é chamado de estresse oxidativo. À medida que o estresse oxidativo se instaura o organismo aciona automaticamente os sistemas de defesas para restabelecer o equilíbrio (Figura 1)(Sies, 1991; Jones, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007; Styskal *et al.*, 2012).

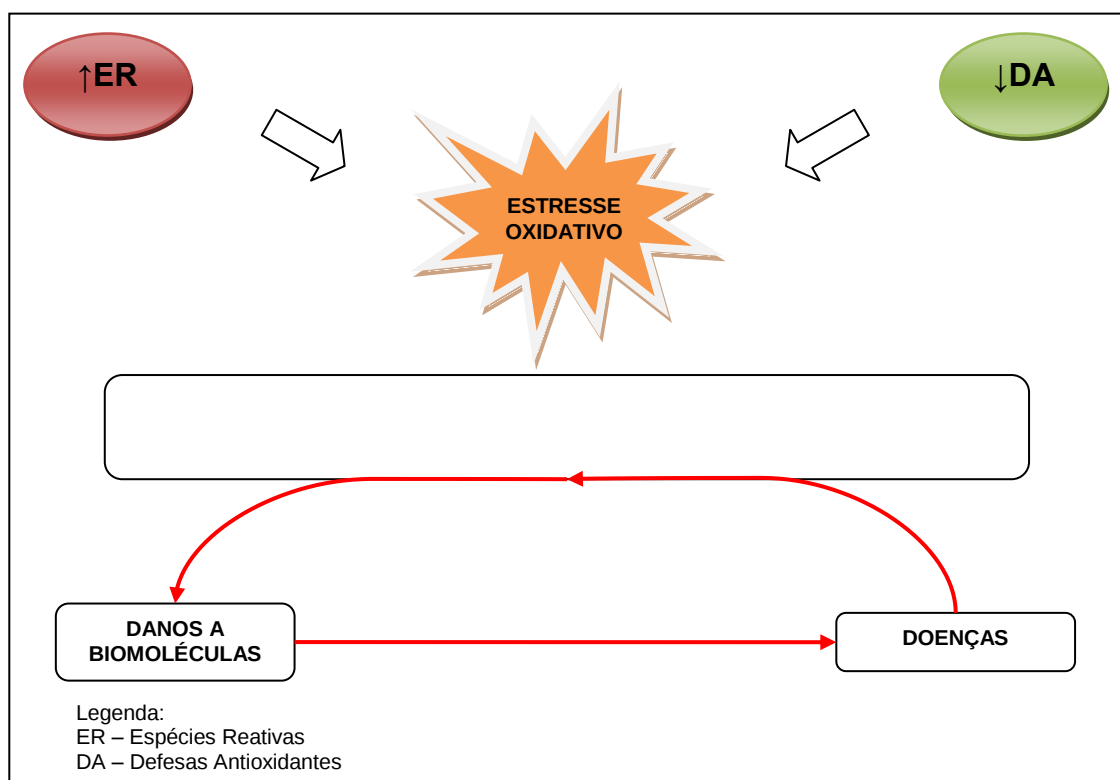


Figura 1. Cadeia do estresse oxidativo.

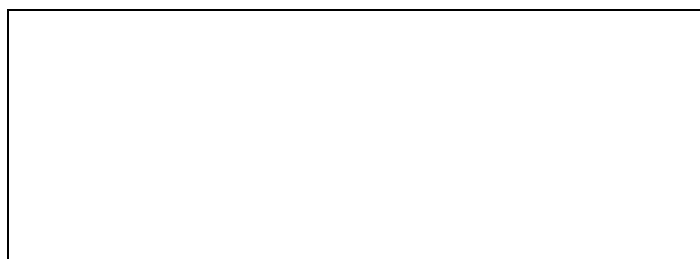
As fontes de ER podem ser de origem endógena e exógena, no primeiro caso, talvez a mais expressiva seja a produção do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) resultante da fuga de elétrons na formação de ATP na CTE dentro da mitocôndria, também são produzidos $\text{O}_2^{\bullet -}$ e óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$) como parte da defesa primária no sistema imune. Como fonte exógena pode-se citar o tabaco, poluentes, solventes orgânicos, pesticidas e alimentos que possuem pró-oxidantes naturais como, por exemplo, as quinonas (Diplock *et al.*, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2007; Styskal *et al.*, 2012).

3.2.1 SISTEMAS ENZIMÁTICOS E NÃO-ENZIMÁTICOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Os organismos celulares aeróbios possuem sistemas antioxidantes com ação neutralizadora de ER, estas se dividem em: sistema enzimático e não-enzimático (Halliwell e Gutteridge, 2007; Gil Del Valle, 2011).

As defesas antioxidantes enzimáticas, endógenas, tais como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathionaperoxidase (GPx) podem atuar diretamente contra as ER ou, também, na reparação do dano causado por essas

espécies. A decomposição do radical $\cdot\text{O}_2$ ocorre naturalmente, porém é lenta, com isso, dois tipos de SOD catalisam a conversão do radical $\cdot\text{O}_2$ em O_2 e H_2O_2 . A CAT, por exemplo, converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 . A GPx compartilha com a glutathione (GSH) o auxílio na redução do H_2O_2 a H_2O (Esquema 5)(Roberts e Sindhu, 2009; Gil Del Valle, 2011; Guo *et al.*, 2011).



Esquema 5. Sistema de defesa antioxidante enzimática.

As defesas antioxidantes não-enzimáticas são distinguidas como as provenientes da dieta alimentar e por antioxidantes produzidos pelo organismo. No primeiro caso, exemplos como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos como os flavonoides surgem com destacada atividade antioxidante. Já as produzidas pelo organismo destacam-se a glutathione (GSH), alguns peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e o ubiquinol (QH_2). Essas defesas atuam diretamente em ER neutralizando-as protegendo, assim, as células e biomoléculas importantes que poderiam ser destruídas por essas ER(Ilhami *et al.*, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007; Roberts e Sindhu, 2009; Guo *et al.*, 2011).

Ainda dentro das defesas não-enzimáticas, têm-se os antioxidantes sintéticos com destaque para os compostos fenólicos como o hidróxianisobutilado (BHA), o hidróxitoluenobutilado (BHT), o tert-butilohidroquinona (TBHQ) e o galato de propilo (PG). Esses antioxidantes sintéticos são comumente utilizados como conservantes alimentares e da indústria farmacêutica, todavia BHA e BHT tem seu restrito em alguns países devido a seus possíveis efeitos tóxicos e carcinogênicos. Por isso, que se tem investido mais em pesquisas na busca de encontrar novos compostos de origem natural e também de novas sínteses de compostos orgânicos com atividade antioxidante(Omura, 1995; Ilhami *et al.*, 2006).

3.2.2 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Atualmente há um grande interesse nos estudos de atividade antioxidante de alimentos e, mais recentemente, de produtos sintéticos. Isso se deve as implicações que as ER causam nas doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, além de envelhecimento e câncer (Frankel, 1996; Valko *et al.*, 2007). Com isso, surgiram diferentes procedimentos para testar a capacidade antioxidante total para isso devem atender alguns requisitos: 1) utilizar uma fonte de um radical biologicamente relevante; 2) ser simples; 3) utilizar uma metodologia com um final de ensaio definido e possuir mecanismo químico; 4) usar produtos químicos e instrumentação prontamente disponíveis; 5) possuir boa reprodutibilidade e 6) ser adaptado tanto para antioxidantes hidrofílicos quanto lipofílicos (Prior, Wu e Schaich, 2005; Magalhães *et al.*, 2006).

O método ideal para determinação de propriedades antioxidantes deve avaliar os efeitos de um composto protótipo a antioxidante em condições reacionais que mimetizem os efeitos desses quando o estresse oxidativo é induzido *in vivo* por ER. Atualmente, os métodos mais utilizados na tentativa de simular essas condições são divididos de acordo com o mecanismo reacional, ou seja, podem ser do tipo: método de transferência de átomo de hidrogênio (TAH) ou de transferência de um único elétron (TE). Em ambos os casos o resultado final é o mesmo, independentemente do mecanismo, porém a cinética e o potencial de formar reações paralelas são diferentes (Huang, Ou e Prior, 2005; Magalhães *et al.*, 2009).

Métodos TE detectam a habilidade que um potencial antioxidante possui de transferir um elétron reduzindo outro composto, incluindo metais, compostos carbonílicos e radicais. Nesses métodos ocorre alteração de cor quando o oxidante é reduzido. A reatividade nos métodos TE é baseada primeiramente na desprotonação e potencial de ionização do grupo funcional reativo. Assim, essas reações são pH dependente e, de modo geral, os valores de potencial de ionização diminuem com o aumento do pH. As reações de TE são lentas e necessitam de longos períodos para serem completadas, portanto os cálculos de capacidade antioxidante são baseados apenas na porcentagem de diminuição do produto (Huang, Ou e Prior, 2005).

Os principais ensaios utilizando a metodologia TE são:

1. Ensaio de compostos fenólicos totais com o reagente Folin-Ciocalteu;
2. Ensaio de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC);
3. Ensaio de capacidade do antioxidante em reduzir o íon férrico (Fe^{3+});
4. Ensaio de capacidade do antioxidante em reduzir o íon cúprico (Cu^{2+});
5. Ensaio de potencial antioxidante total utilizando um complexo de Cu^{2+} como um oxidante;
6. Ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•);
7. Ensaio com o radical ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS⁺•);
8. Ensaio com o radical *N,N*-dimetil-*p*-fenilenodiamina(DMPD⁺•).

Já os métodos TAH medem a habilidade de um antioxidante em neutralizar radicais livres por doação de hidrogênio. As reações envolvendo TAH são independentes em relação ao tipo de solvente e do valor de pH, além disso, são reações rápidas terminando em poucos segundos ou minutos. A presença de agentes redutores, como os metais é um fator limitante, pois pode levar a valores errôneos de atividade antioxidante. A reatividade dos métodos TAH é determinada pela energia de dissociação do hidrogênio ligado a um elemento eletronegativo contido nos antioxidantes e apresentam características como energia de dissociação em torno de ~ - 10 kcal/mol e potencial de ionização < - 36 kcal/mol(Huang, Ou e Prior, 2005; Prior, Wu e Schaich, 2005).

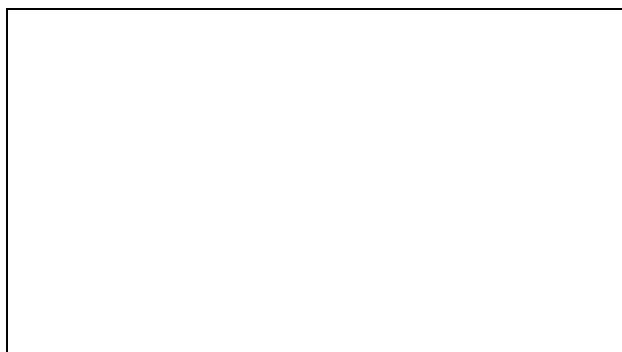
Os principais ensaios utilizando a metodologia TAH são:

1. Capacidade de absorção oxigênio radicalar (ORAC);
2. Inibição da oxidação induzida de LDL;
3. Ensaio de capacidade de *scavenging* oxiradicais (TOSCA);
4. Ensaio Crocin-bleaching;
5. Parâmetro de *radical-trapping* total do antioxidante;
6. Ensaios quimiluminescentes.

As metodologias mais empregadas na literatura são aquelas do tipo TE utilizando os radicais DPPH• e ABTS⁺• (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995; Re *et al.*, 1999). Abaixo, serão descritas essas metodologias juntamente com os seus idealizadores.

3.2.2.1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR CAPTURA DO DPPH•

Talvez seja o método indireto mais antigo para determinar atividade antioxidante, sendo utilizado desde a década de 50 na tentativa de descobrir doadores de hidrogênio em compostos naturais, posteriormente ocorreram adaptações capazes de determinarem o potencial antioxidante de compostos fenólicos, alimento e demais compostos de relevância biológica. O radical DPPH• é um dos poucos radicais orgânicos que são estáveis e apresentam uma coloração violeta. O teste envolvendo DPPH•, os antioxidantes reduzem o radical DPPH• estável a 2,2-difenil-1-picrilhidrazina DPPH-H de coloração amarela. Normalmente, a medida da capacidade antioxidante é realizada pelo decréscimo da absorbância, o qual o radical DPPH•apresenta absorbância máxima em 517 nm e à medida que vai sendo neutralizado pelo antioxidante a absorbância vai diminuindo (Esquema 6)(Prior, Wu e Schaich, 2005; Gülçin, 2009).



Esquema 6. Mecanismo de ação do antioxidante frente ao DPPH•.

Geralmente o teste com o radical DPPH•é avaliado em solventes orgânicos tais como etanol ou metanol e realizando um monitoramento da diminuição da absorbância a 517 nm até permanecer constante (Figura 2.). O progresso da reação é monitorado por um espectrofotômetro UV-Visível(Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995; Prior, Wu e Schaich, 2005).

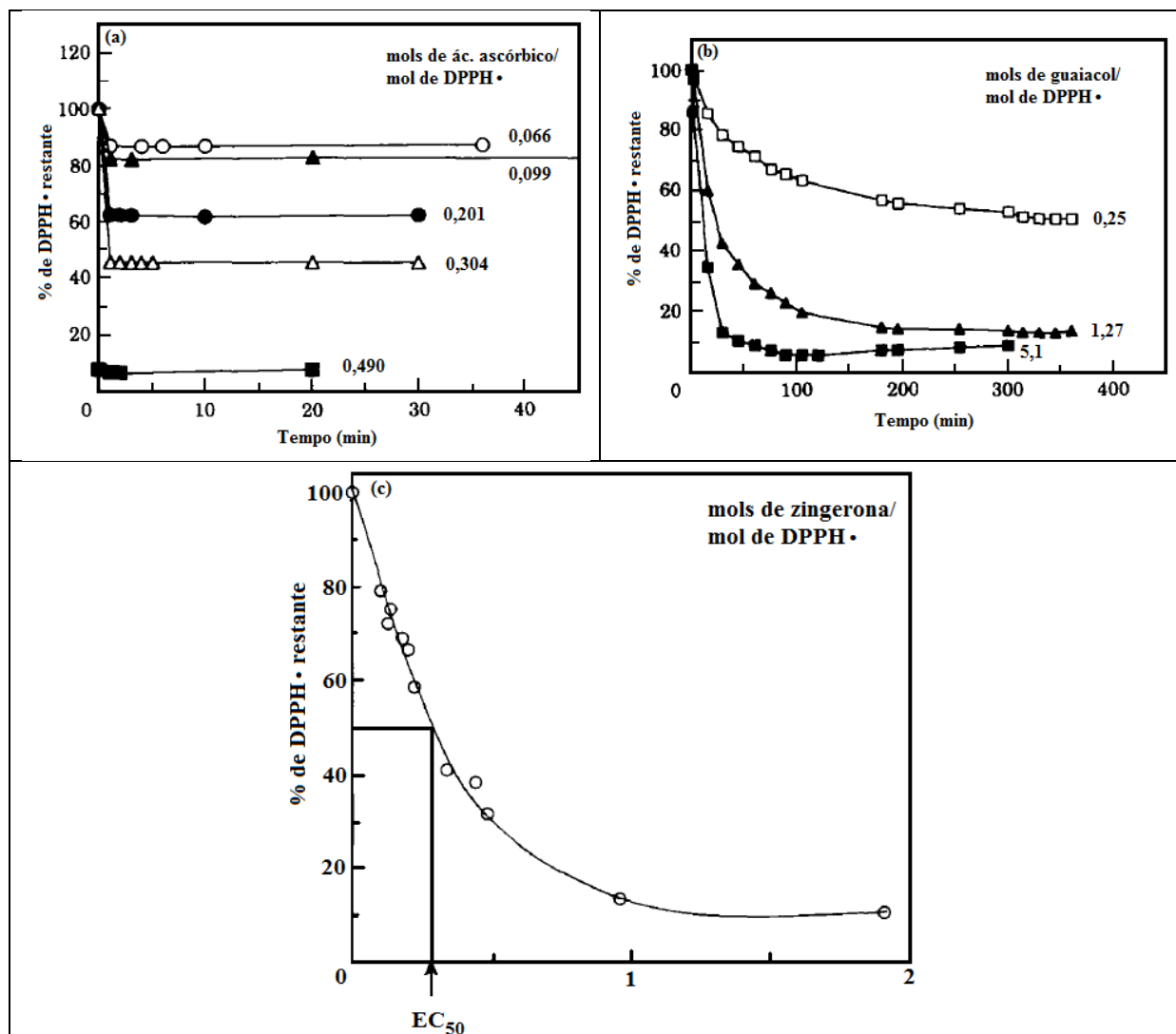


Figura 2. Decaimento da absorvência do DPPH• em contato com antioxidante. (a) cinética rápida – ácido ascórbico – (b) cinética lenta – guaiacol e (c) EC₅₀ da zingerona.

O ensaio com DPPH• normalmente é executada de acordo com o seguinte procedimento: A solução de DPPH (3,9 mL, 25 mg/L) em etanol é misturada com uma solução de amostra (0,1 mL). A absorvência é monitorizada a 517 nm durante 30 minutos ou até que a absorvência permaneça constante. Após a redução, a cor da solução desaparece (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995).

A porcentagem de DPPH• residual é proporcional às concentrações dos antioxidantes e a concentração que causa uma diminuição na concentração de DPPH• inicial em 50% é definida como EC₅₀. O tempo necessário para atingir o estado de equilíbrio com concentração de EC₅₀ é calculada a partir da curva de cinética e definido como T_{EC50}. A curva cinética de um ensaio de DPPH• é mostrada na Figura 2. (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995).

Sanchez-Moreno e colaboradores classificaram o comportamento cinético de compostos antioxidante utilizando o método DPPH• como: < 5 min (rápida), 5-30 min (intermediária) e > 30 min (lenta)(Gülçin, 2012).

3.2.2.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR CAPTURA DO ABTS⁺•

Neste ensaio, o ABTS é oxidado por oxidantes gerando o cátion radical, ABTS⁺•, que é intensamente colorido e a atividade antioxidante é medida pela redução da cor quando o antioxidante entra em contato com radical ABTS⁺•. O teste com ABTS⁺• é aplicável tanto para compostos lipofílicos e hidrofílicos, além disso, são mais reativos que os radicais DPPH•, e ao contrário das reações com o radical DPPH•, que envolvem TAH, as reações com ABTS⁺• envolvem tanto TAH quanto TE. A geração do cátion radical ABTS⁺• constitui a base de um dos métodos espectrofotométricos mais aplicados para medir a capacidade antioxidante total de substâncias puras, misturas aquosas e bebidas (Gülçin, 2009). O radical tem máximos de absorção no meio aquoso nas faixas de 414, 734 e 815 nm e em meio etanólico entre 414, 730 e 873 nm (Huang, Ou e Prior, 2005).

Os primeiros ensaios de captura por radical ABTS⁺• foram desenvolvidos por Miller e colaboradores. (Miller *et al.*, 1996). Esse método baseava-se na ativação de metamioglobina, atuando como uma peroxidase, com H₂O₂ para gerar o radical ferril-mioglobina, o qual em seguida reage com ABTS para formar o cátion radical ABTS⁺• (Re *et al.*, 1999).

Em termos de condições de ensaio, diferentes estratégias têm sido implementadas na geração do ABTS⁺•, detecção de comprimento de onda, tempo de reação aplicado e o antioxidante de referência escolhido. A obtenção comumente empregada de ABTS⁺• é gerada por reação química com persulfato de potássio K₂S₂O₈ (Gülçin, 2012). No que diz respeito ao comprimento de onda de detecção, a determinação em 734 nm é a preferida porque a interferência de outros componentes absorventes e da turbidez da amostra é minimizada. Em termos de quantificação, o valor de absorbância, proporcional a concentração restante de ABTS⁺•, é medida após um tempo de reação fixo (Magalhães *et al.*, 2008). Geralmente, a geração química requer um longo período de tempo (até 16 h utilizando K₂S₂O₈) ou temperaturas altas, enquanto que a geração enzimática é mais rápida e as condições de reação são mais suaves (Re *et al.*, 1999).

O método utilizando $ABTS^{+\bullet}$ pode ser realizado numa larga gama de pH, o que é útil para o estudo do efeito do pH sobre mecanismos de compostos antioxidantes. Além disso, o radical $ABTS^{+\bullet}$ é solúvel em água e solventes orgânicos, que permite a determinação da capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (Magalhães *et al.*, 2008).

Protocolos descritos na literatura estimaram tempo de reação variando de 1 a 30 min. Além disso, este ensaio tem sido criticado, pois o radical $ABTS^{+\bullet}$ não seria representativo em relação ao ataque a biomoléculas e nem mesmo encontrado em qualquer sistema biológico e alimentos. Termodinamicamente, um composto que tem um potencial redox inferior ao do $ABTS^{+\bullet}$ podem reagir com o radical tornando-se interferentes nesse método (Magalhães *et al.* 2008).

A técnica adaptada por Re e colaboradores é uma das mais utilizadas e envolve a produção direta do cromóforo azul/verde $ABTS^{+\bullet}$ através da reação entre ABTS e $K_2S_2O_8$. A adição de antioxidantes no cátion radical $ABTS^{+\bullet}$ anteriormente formado o reduz, de uma forma e numa escala de tempo que depende da atividade antioxidante, a concentração do antioxidante e a duração da reação. Assim, a extensão da descoloração como a inibição percentual de $ABTS^{+\bullet}$ é determinada em função da concentração e do tempo relacionando com a reatividade de um padrão como o Trolox, sob as mesmas condições (Re *et al.*, 1999).

3.3 TIAZOLIDINONAS

Um dos principais objetivos da química orgânica e da medicinal é a busca de novas moléculas capazes de tornarem-se futuros agentes terapêuticos. Existem inúmeras moléculas biologicamente ativas contendo anéis de cinco membros com dois heteroátomos, dentre essas, as que possuem o anel tiazolidinona apresentam um papel importante no desenvolvimento de novos protótipos devido a associação com algumas atividades biológicas (Jain *et al.*, 2012).

A partir da metade do século XX foram publicados trabalhos tanto de síntese quanto de atividade biológica de tiazolidinonas. Muitos, no intuito de sintetizar análogos do anel tiazolidina contido na estrutura da penicilina, encontraram no anel tiazolidinona propriedades físico-químicas e estruturais semelhantes ou até melhores àquele (Figura 3) (Surrey e Cutler, 1954; Singh *et al.*, 1981).

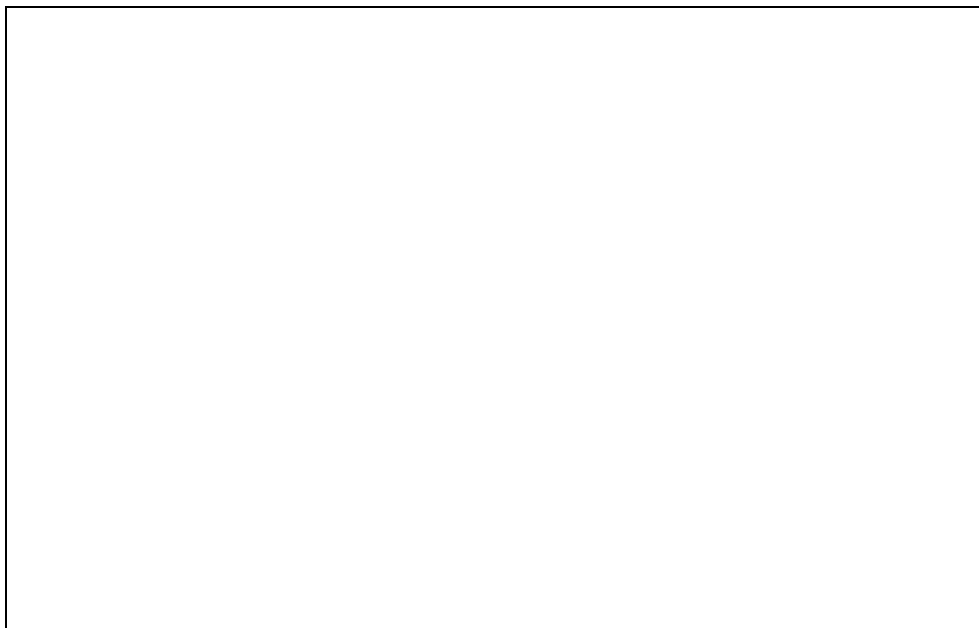


Figura 3 – Estruturas de tiazolidinonas análogas do anel tiazolidina da penicilina.

As tiazolidinonas são derivadas do anel tiazolidina, ou seja, heterociclos de cinco membros possuindo um átomo de enxofre na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 3 e uma carbonila na posição 2, 4 ou 5 (Figura 3)(Verma e Saraf, 2008).

Dentre os derivados de tiazolidinona, os que contêm uma carbonila na posição 4 são os que mais despertam interesse em química medicinal nos últimos anos. Além disso, há uma grande variedade de possibilidades de síntese dessas moléculas variando-se os substituintes na posição 2, 3 e 5, promovendo alterações que aumentem seus efeitos terapêuticos. Alguns derivados de 4-tiazolidinonas apresentam atividade antimicrobiana, antiprotzoária, antiviral, anti-inflamatória, antipsicótica, antioxidante entre outras, despertando ainda mais os estudos dos derivados de tiazolidinona(Ragab *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2009; Ravichandran *et al.*, 2011; Masoud *et al.*, 2012; Mistry e Jauhari, 2012).

3.3.1 SÍNTESE DE 4-TIAZOLIDINONAS

Diversas metodologias de síntese de 4-tiazolidinonas são amplamente publicadas na literatura. As duas rotas sintéticas mais destacadas são as que envolvem a ciclocondensação de tiouréias com derivados de ácidos haloacéticos, e a outra, envolve a ciclocondensação de iminas com derivados do ácido

mercaptoacético(Singh *et al.*, 1981; Cunico, Gomes e Vellasco, 2008; Jain *et al.*, 2012).

O primeiro método é utilizado na obtenção de 2-imino 4-tiazolidinonas, já no segundo obtém-se 4-tiazolidinonas 2,3 dissustituídas. Em ambos, ocorrem mudanças pontuais na tentativa de aumentar a eficiências das reações e diminuir fatores como: despesas com reagentes caros, solventes tóxicos, aquecimento prolongado e o número de etapas(Singh *et al.*, 1981; Ottanà *et al.*, 2005; Prasad e Nath, 2012).

Na ciclocondensação de tiouréiasreage-se tioureias simétricas ou assimétricas com derivados de ácidos haloalcanos na presença de uma base. A reação ocorre via o intermediário isotioureia que posteriormente cicliza em refluxo com solvente apropriado (Esquema 7)(Singh *et al.*, 1981; Liesen *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2012; Sawale, Bendre e Patil, 2012).



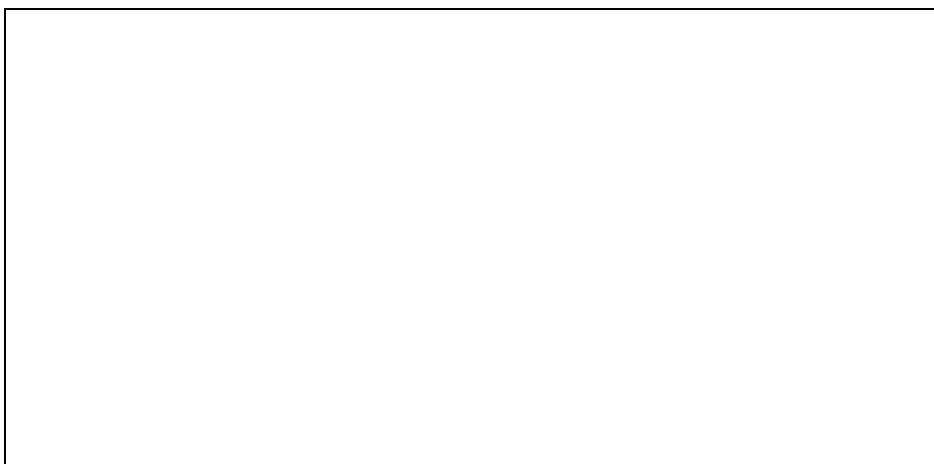
Esquema 7. Reação de formação de tiazolidinonas por ciclocondensação de tiouréias.

Quando envolver a ciclocondensação de iminas aplica-se, normalmente, três componentes: uma amina, um aldeído ou cetona e um ácido mercaptoacético. Essa síntese pode ser *one-pot*, ou seja, a reação ocorre em uma única etapa misturando-se os três componentes ao mesmo tempo, ou pode ser em duas etapas: (1) inicialmente com a formação da imina (reagindo a amina com o aldeído ou cetona) e (2) posteriormente a adição do ácido mercaptoacético, seguido da ciclizaçãointramolecular. Tanto em *one-pot* quanto em duas etapas há a formação de duas moléculas de água para cada 4-tiazolidinona formada (Esquema 8)(Cunico, Gomes e Vellasco, 2008; Gouvea *et al.*, 2012; Jain *et al.*, 2012).



Esquema 8. Reação de formação de tiazolidinonas por ciclocondensação de iminas

Masoud e colaboradores sintetizaram os derivados de 2-imino-4-tiazolidinonas refluxando as tioureias assimétricas abaixo com quantidade equimolar de bromoacetato de etila. Nesse caso, os autores não utilizaram base para favorecer a orientação do grupamento benzoimidazolil na posição 3 do anel tiazolidinona (Esquema 9) (Masoud *et al.*, 2013).



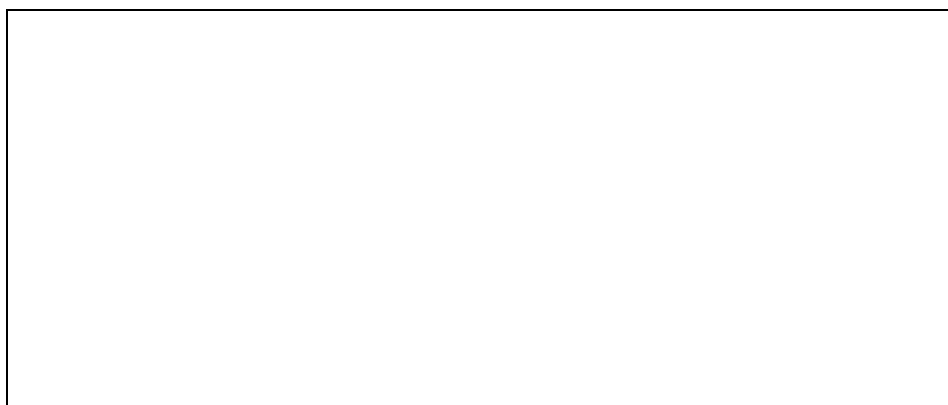
Esquema 9. Reação de formação de 2-imino-4-tiazolidinonas.

Como exemplo de síntese *one pot* pela ciclocondensação de iminas, Rawal e colaboradores obtiveram 2-(2,6-dibromofenil)-3-heteroaril-1,3-tiazolidin-4-onas, a partir da reação entre dibromobenzaldeído, amina aromática e o ácido mercaptoacético em refluxo de tolueno por 24 horas (Esquema 10) (Rawal *et al.*, 2008).



Esquema 10. Síntese de tiazolidinonas *one pot* por ciclocondensação de iminas.

Por outro lado, Gouvea e colaboradores sintetizaram 4-tiazolidinonas 2,3 dissustituídas em duas etapas: produzindo, primeiramente, a imina e logo após a tiazolidinona através da ciclização intramolecular com ácido mercaptoacético. A série consistiu de se fixar a amina (2-aminopiridina) e variar 15 benzaldeídos substituídos com auxílio, nas duas etapas, de um *trap* Dean-Stark para remover a água formada por destilação azeotrópica (Esquema 11) (Gouvea *et al.*, 2012).



Esquema 11. Síntese de tiazolidinonas em duas etapas por ciclocondensação de iminas.

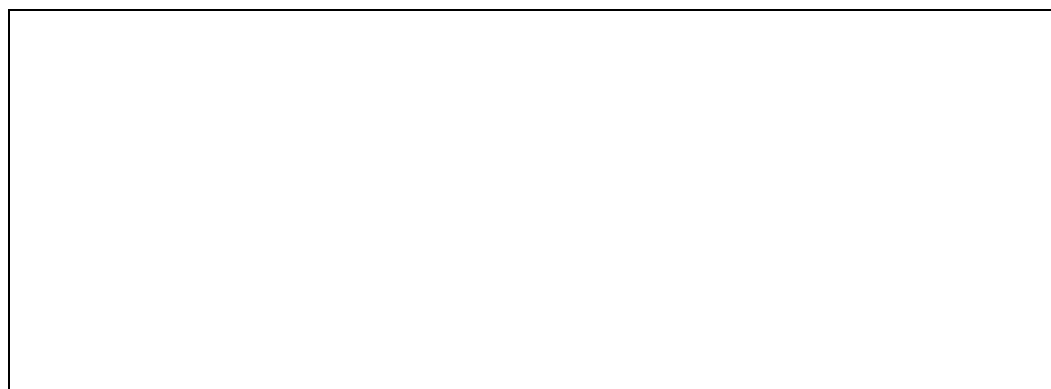
A síntese que envolve a ciclocondensação de iminas para obter 4-tiazolidinonas necessita de sistemas para remover a água formada do meio reacional e o mais comumente utilizado é a destilação azeotrópica utilizando um *trap* Dean-Stark (Pawar e Mulwad, 2004; Verma e Saraf, 2008; Gouvea *et al.*, 2012), além disso, tem-se utilizado vários agentes dessecantes como Na_2SO_4 (Sharma e Kumar, 2000) e peneira molecular (Holmes *et al.*, 1995; El Bialy, Nagy e Abdel-Rahman, 2011). Ácidos de Lewis como BF_3 , ZnCl_2 e SnCl_2 anidros, além de DCC e HBTU, têm sido utilizados como catalisadores obtendo melhores rendimentos dos produtos desejados (Srivastava, Haq e Katti, 2002; Rawal *et al.*, 2004).

Na tentativa de sintetizar tiazolidinonas através de técnicas da química verde, Thomas e colaboradores produziram uma série de cinco compostos com rendimentos em torno de 76,8 – 94% reagindo iminas com ácido mercaptoacético em THF sob agitação a baixas temperaturas (0-5°C) na presença de peneira molecular e ZnCl_2 , com isso minimiza os efeitos de se utilizar fontes de aquecimento e solvente tóxico como o tolueno (Esquema 12)(Thomas *et al.*, 2011).



Esquema 12. Síntese de tiazolidinonas utilizando ZnCl_2 e peneira molecular.

Ainda no mesmo caminho, Holmes e colaboradores sintetizaram tiazolidinonas e tiazanonas utilizando peneira molecular 3Å numa reação em suporte sólido num estudo comparativo com a metodologia empregando a destilação azeotrópica com *trap* Dean-Stark. Os autores trabalharam com quatro ésteres derivados de aminoácidos, quatro aldeídos e para a formação da tiazolidinona utilizaram o ácido mercaptoacético e para a tiazanona empregaram o ácido mercaptopropiônico (Esquema 13). Os rendimentos variaram de 60-99% na metodologia convencional e de 29-90% na metodologia com peneira molecular, contudo em alguns casos essa prevaleceu sobre aquela em termo de rendimento mais vantajoso(Holmes *et al.*, 1995).



Esquema 13. Síntese de tiazolidinonas utilizando peneira molecular.

Na tentativa de obter rendimentos melhores, Srivastava e colaboradores utilizaram DCC como catalisador da segunda etapa, ou seja, quando da adição do ácido mercaptoacético há, primeiramente, o ataque do grupamento tiol à imina e posteriormente o ataque do nitrogênio da imina à carbonila do ácido (Esquema 8). Nesse último ataque tem-se a formação de água, todavia se essa formação não é eficiente (rendimento baixo) o emprego de DCC forma um intermediário mais reativo do que se fosse o ácido livre, por consequência aumentando o rendimento da ciclização (Srivastava, Haq e Katti, 2002).

Com essa metodologia (Esquema 14), os autores obtiveram rendimentos de 54-95% de produto isolado sem a necessidade de aquecimento (0°C-t.a.) e agentes dessecantes, além de evitar limitações que outros métodos promovem.



Esquema 14. Síntese de tiazolidinonas utilizando DCC.

Outras metodologias de síntese interessantes são aquelas que utilizam como fonte de energia a sonoquímica e o emprego de micro-ondas. No primeiro, Gouvea e colaboradores, além de sintetizar pela metodologia convencional utilizaram o ultrassom obtendo em alguns casos rendimentos melhores que o método clássico (Gouvea *et al.*, 2012). Com a utilização de micro-ondas temos como exemplo a síntese de tiazolidinonas contendo um núcleo imidazol que mostrou ser eficiente e benéfico ao meio ambiente com tempos reacionais variando de 3-6 min e rendimentos em torno de 50-57%, sendo todos mais efetivos que o convencional (Desai *et al.*, 2013).

3.3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE DERIVADOS DE TIAZOLIDINONAS

Dentre as atividades biológicas que os derivados de tiazolidinona apresentam, a atividade antioxidante ainda é pouco difundida. Na literatura do gênero, a maioria das publicações existentes não comprova a ação antioxidante do anel tiazolidinona, mas sim dos substituintes que de outra forma apresentam tal atividade, como exemplo, Isloor e colaboradores sintetizaram derivados de tiazolidinona, que apresentaram substituintes na posição 2 e 3 do anel com grupos doadores de hidrogênio (H) capazes de transferi-lo ao radical DPPH• e ABTS⁺• demonstrando seu efeito *scavenger* (Figura 4)(Isloor *et al.*, 2012).



Figura 4. Exemplo de tiazolidinona com atividade antioxidante **1**.

Todas as tiazolidinonas apresentaram moderada atividade antioxidante nos ensaios com DPPH• e ABTS⁺•, variando o IC₅₀ entre 27,16 – 46,95 µg/mL em relação ao primeiro e 143,67 – 165,78 µg/mL com o segundo. Foram moderados, pois o padrão (ácido ascórbico) apresentou IC₅₀ = 18,74 (DPPH•) e IC₅₀ = 31,53 (ABTS⁺•)(Isloor *et al.*, 2012).

Outra tentativa de se realizar uma hibridização molecular entre um substituinte com ação antioxidante e o anel tiazolidinona foi feita por Nampurath e colaboradores que sintetizaram e avaliaram a atividade oxidante de um derivado de tiazolidinona contendo o substituinte BHT de considerável número de publicações tratando de sua ação antioxidante, conforme a Figura 5(Nampurath *et al.*, 2008).

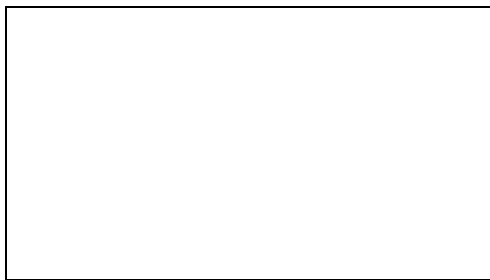
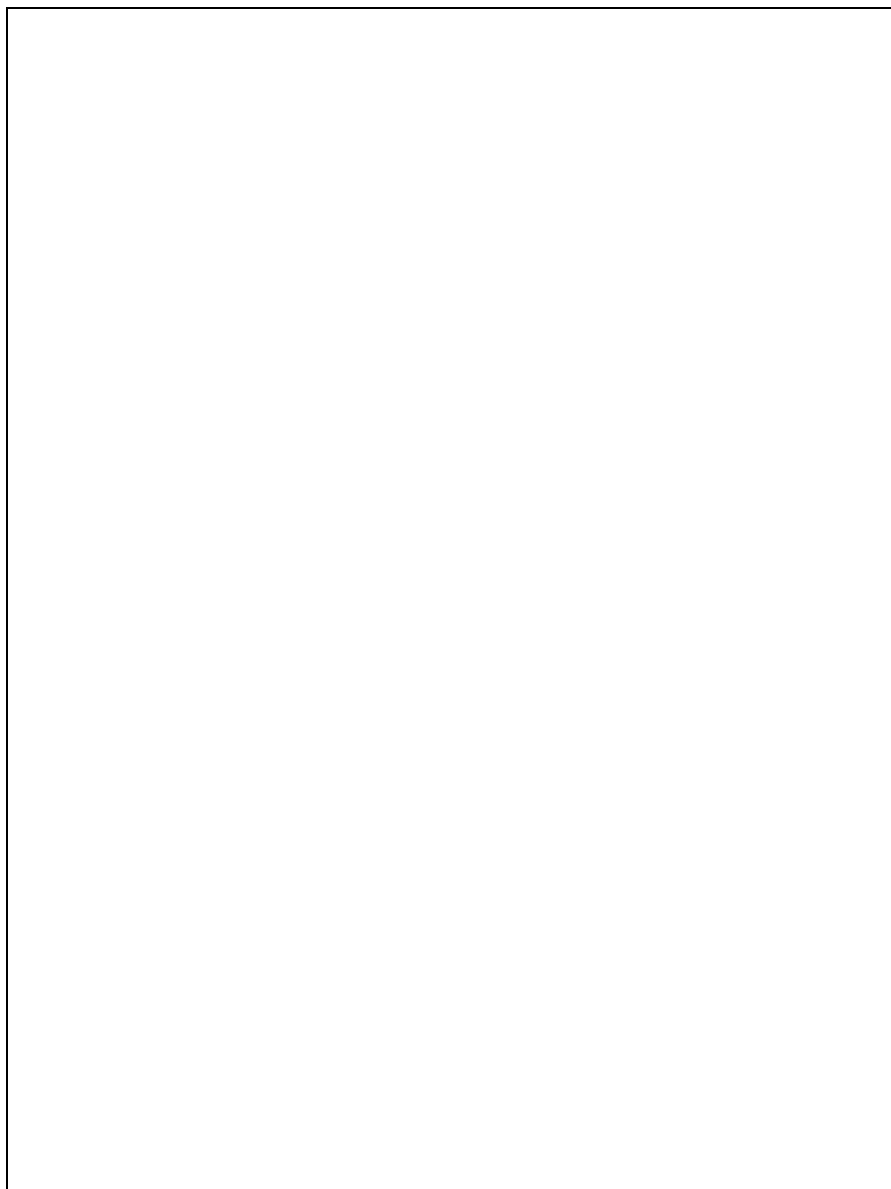


Figura 5. Exemplo de tiazolidinona com atividade antioxidante **2**.

Foram realizados testes em ratos com hiperlipidemia induzida para verificar o teor de colesterol e glicose no soro, após 20 e 40 dias administrando a tiazolidinona da Figura 5 e notaram uma considerável queda em relação ao controle e os autores associaram a atividade antioxidante do composto, que também foi medida através da quantidade de malondialdeídos nos fígados homogeneizados, apresentando também valores inferiores ao do controle.

Saundane e colaboradores sugeriram que o carbono 2 do anel tiazolidinona do composto 5 (Esquema 15) poderia atuar como doador de H frente ao DPPH• e como consequência toda molécula, agora um radical, seria estabilizada por fenômeno de ressonância (Saundane *et al.*, 2012).



Esquema 15. Provável mecanismo de ação e estabilização do radical livre formado após doação de hidrogênio do anel tiazolidinona.

A atividade antioxidante dos compostos foi realizada utilizando o radical DPPH• tendo como padrão o ácido ascórbico. Após os testes verificaram que os compostos apresentaram considerável porcentagem de inibição e sugeriram o mecanismo acima na tentativa de explicar tal atividade.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo abaixo foi submetido a revista *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* - ISSN: 1099-0461, no dia 23 de março de 2013, revisado no 16 de maio de 2013 e por fim aceito no dia 31 de maio de 2013, conforme documentos em anexo.

Agradecemos a editora John Wiley & Sons por aceitar e permitir a reprodução total do artigo em seu formato eletrônico nessa dissertação, conforme licença em anexo.

Efficient Synthesis and Antioxidant Evaluation of 2-Aryl-3-(Pyrimidin-2-yl)-Thiazolidinones

José C. Campos Júnior,¹ Daniela P. Gouvêa,¹ Camila da S. Ribeiro,¹ Filipe S. P. Dutra,² Francieli M. Stefanello,² Claudio M. P. Pereira,³ Wilson Cunico,¹ and Geonir M. Siqueira¹

¹Laboratório de Química (LAQUIABIO), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil; E-mail: siqueiragm@gmail.com

²Laboratório de Biomarcadores, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

³Laboratório de Heterociclos Bioativos e Bioprospecção (LAHBBIO), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

Received 21 March 2013; revised 16 May 2013; accepted 31 May 2013

ABSTRACT: In the present study, we reported the efficient synthesis of 11 3-(pyrimidin-2-yl)-thiazolidinones in good yields using molecular sieve as the desiccant agent. In addition, we have evaluated the antioxidant capacity of the synthesized compounds by the 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH[•]) and the 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS^{•+}) radicals scavenging assay. Six compounds showed antioxidant activity towards DPPH[•] (EC₅₀ between 16.13 and 49.94 µg/mL) and also demonstrated excellent activity regarding ABTS^{•+} (TEAC: 10.32–53.52). These results showed that compounds 3-(pyrimidin-2-yl)-thiazolidinones may be easily synthesized by a less expensive procedure and could be a good starting point to the development of new antioxidant compounds. © 2013 Wiley Periodicals, Inc. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 00:1–6, 2013; View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI 10.1002/jbt.21506

KEYWORDS: Thiazolidinones; Molecular Sieves; Antioxidant Activity

INTRODUCTION

There are a variety of biological activities exhibited by thiazolidinones and pyrimidines. Pyrimidine derivatives constitute an important class of therapeutic agents in medicinal chemistry including antimicrobial [1], anticancer [2], anti-inflammatory [3],

anti-HCV [4], anti-HIV [5], antioxidant [6], anti-aging [7], and several others. Thiazolidinones are also well known for their large biological properties [8], for instance, anticonvulsant activity [9], hypnotic [10], antitubercular [11], anticancer [12], antifungal [13], and antiviral activity [14]. In addition, thiazolidinones have also shown important antioxidant activity [15].

Several methods for the synthesis of thiazolidin-4-ones are described in the literature. Essentially, the three-component reaction involving a primary amine, a carbonyl compound, and the mercaptoacetic acid using the azeotropic distillation with Dean–Stark trap for water removal is the most common approach [16–19]. Besides, other protocols were developed by using dehydrating agents among these Na₂SO₄ [20], molecular sieves [21, 22], 1,3-dicyclohexylcarbodiimide [23], and O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate [24], with the purpose to improve the yield of the desired products.

It is well-known that free radicals and reactive oxygen species are involved in the pathogenicity of numerous diseases, including various chronic and age-related diseases [25]. In this way, antioxidants are recently identified as therapeutic targets to counter different disorders, such as carcinogenesis, inflammation, and atherogenesis [6, 26].

Therefore, the aim of this study is to prepare thiazolidin-4-ones containing the pyrimidine ring moiety and to explore the therapeutic advantage of this combination to antioxidant activity. Furthermore, to explore the application of molecular sieves as dehydrate agents for the synthesis of 3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-ones.

Correspondence to: Dr. Geonir Machado Siqueira.
© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

MATERIALS AND METHODS

Chemistry

All common reagents and solvents, including molecular sieve 4Å, were used as obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO without further purification. The progress of reactions and the purity of compounds were monitored by thin layer chromatography (TLC, using silica gel 60F₂₅₄ aluminum sheets from Merck, Darmstadt, Germany; visualization by ultraviolet light 254 nm) and by a Shimadzu Gas Chromatograph GC-2010, Column I.D., 0.25 mm; column length, 30 m; column head pressure, 14 psi, program: T_o = 50°C; t_o = 2.0 min; rate 16.0°C/min; T_f = 280°C; t_f = 10.0 min; Injector = 280°C; Detector = 280°C. Melting points were determined using open capillaries on a Fisatom model 430 apparatus and are uncorrected. The Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) analyses were performed on a GC 2010-plus GC-MS-QP2010SE system AOC-20i-auto injector. ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded using a Bruker DPX 400 spectrometer (¹H at 400.14 MHz and ¹³C at 100.61 MHz) in DMSO-*d*₆ or a Varian Oxford AS-400 spectrometer (¹H at 400.14 MHz and ¹³C at 100.61 MHz) in CDCl₃ containing trimethylsilane as an internal standard.

General Procedure for the Synthesis of Thiazolidin-4-ones under Azeotropic Distillation (4a-k)

In accordance with Gouvêa et al. [18], a mixture of 2-aminopyrimidine **1** (1 mmol), BF₃:MeOH 50% (10 drops), and corresponding arenaldehyde **2a-k** (1 mmol) in toluene (30 mL) was heated at reflux with a Dean-Stark trap for 3 h. Then, the mercaptoacetic acid **3** (3 mmol) was added and the mixture was heated until the reaction was complete, as shown by TLC and/or GC (about 16 h). The organic layer was washed with a saturated solution of NaHCO₃ (3 × 20 mL), dried with NaSO₄ anhydrous, and evaporated under vacuum to give the products. When necessary, the compounds were washed with a hot solution of hexane:ethyl acetate (9:1) to provide the pure products.

General Procedure for the Synthesis of Thiazolidin-4-ones (4a-k) with Molecular Sieve

To a solution of 2-aminopyrimidine **1** (1 mmol) in toluene (30 mL), arenaldehyde **2a-k** (1 mmol), 1 g of molecular sieves 4Å (previously activated in an oven at 250°C–300°C for 4 h) and BF₃:MeOH 50% (10 drops)

was added. The mixture was heated at 80°C for 3 h. After that, the mercaptoacetic acid **3** (3 mmol) was added and the mixture was heated (80°C) until the reaction was complete, as shown by TLC or GC (about 16 h). The solution was filtered and washed with a saturated solution of NaHCO₃ (3 × 20 mL), dried with NaSO₄ anhydrous, and evaporated under vacuum to give the products. When necessary, the compounds were washed with a hot solution of hexane:ethyl acetate (9:1) to provide the pure products.

Experimental Data for Compounds 4a-k

2-(4-Methylphenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one **4a** [27]

C₁₄H₁₃N₃OS, 271.34, melting point (mp) 147°C–150°C; GC-MS *m/z* (%): 271 (M, 37); 243 (13); 229 (43); 198 (100); 135 (20); 106 (46); 80 (71); 53 (33).

2-(2-Chlorophenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one **4b** [27]

C₁₃H₁₀ClN₃OS, 291.75, mp 172°C–175°C [178°C–179°C (27)]; GC-MS *m/z* (%): 291 (M-75, 3); 182 (79); 163 (3); 129 (4); 102 (8); 80 (100); 53 (33).

2-(3-Fluorophenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one **4c**

C₁₃H₁₀FN₃OS, 275.30, mp 166°C–168°C; ¹H NMR δ (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm, J_{H-H} = Hz): 8.3 (d, 2H, pyrim, J = 4.6); 8.2 (d, 1H, aryl, J = 9.5); 7.4 (m, 2H, aryl, and pyrim); 7.1 (s, 1H, aryl); 6.7 (s, 1H, H2); 6.6 (d, 1H, aryl, J = 9.7) 3.4 (d, 1H, H5a, J = 15.4); 3.2 (d, 1H, H5b, J = 15.4). ¹³C NMR δ (100 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): 170.9 (C4); 163.3; 161.2; 158.0 (2C); 142.9; 130.2; 123.1; 114.5; 113.8; 57.7 (C2); 32.9 (C5). GC-MS *m/z* (%): 201 (M-74, 14); 174 (2); 147 (6); 121 (8); 95 (8); 80 (100); 53 (25).

2-(4-Fluorophenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one **4d** [27]

C₁₃H₁₀FN₃OS, 275.30, mp 143°C–146°C; GC-MS *m/z* (%): 275 (M, 28); 247 (11); 233 (42); 202 (100); 153 (13); 122 (12); 106 (30) 80 (63); 53 (35).

2-(3-Methoxyphenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one **4e**

C₁₄H₁₃N₃O₂S, 287.34, mp 144°C–147°C; ¹H NMR δ (400 MHz, DMSO-*d*₆, ppm, J_{H-H} = Hz): 8.3 (d, 2H, pyrim, J = 4.7); 8.1 (d, 1H, aryl, J = 9.8); 7.3 (m, 1H, aryl); 7.2 (s, 1H, H2); 7.1 (m, 1H, aryl); 6.7 (t, 1H, pyrim, J = 4.7); 6.6 (d, 1H, J = 9.8); 3.8 (s, 3H, OMe); 3.4 (d, 1H, J = 15.3, H5a); 3.2 (d, 1H, J = 15.3, H5b). ¹³C NMR

δ (100 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 171.0 (C4); 161.2; 159.2; 158.0 (2C); 141.5; 129.3; 119.1; 113.2; 112.5; 111.3; 58.2 (C2); 55.0 (OMe) 32.9 (C5). GC-MS m/z (%): 212 (M-75, 43); 198 (3); 169 (3); 134 (3); 103 (4); 80 (100); 53 (25).

2-(2-Nitrophenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one 4f

$C_{13}H_{10}N_4O_3S$, 302.31, mp 174°C–177°C; 1H NMR δ (400 MHz, $CDCl_3$, ppm, J_{H-H} = Hz): 8.3 (d, 2H, pyrim, J = 4.8); 7.1–8.0 (m, 4H, aryl); 7.4 (s, 1H, H2); 6.6 (t, 1H, pyrim, J = 4.8); 3.8 (m, 2H, H5a, and H5b); ^{13}C NMR δ (100 MHz, ppm): 171.0 (C4); 160.3; 157.0 (2C); 147.2; 141.3; 132.5; 128.5; 121.7; 121.0; 110.8; 57.1 (C2); 32.3 (C5). GC-MS m/z (%): 228 (M-74, 1); 211 (100); 198 (10); 181 (20); 154 (19); 122 (38) 79 (2); 53 (52).

2-(3-Nitrophenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one 4g

$C_{13}H_{10}N_4O_3S$, 302.31, mp 175°C–178°C; 1H NMR δ (400 MHz, $CDCl_3$, ppm, J_{H-H} = Hz): 8.3 (d, 2H, pyrim, J = 4.8); 7.5–8.1 (m, 4H, aryl); 6.2 (s, 1H, H2); 6.2 (m, 1H, pyrim); 3.5 (d, 1H, H5a, J = 15.7); 3.3 (d, 1H, H5b, J = 15.7). ^{13}C NMR δ (100 MHz, ppm): 170.9 (C4); 161.1; 158.3 (2C); 154.2; 141.2; 129.6; 125.2; 121.7; 121.0; 110.8; 57.4 (C2); 32.7 (C5). GC-MS m/z (%): 228 (M-74, 4); 211 (2); 181 (3); 155 (3); 129 (4) 80 (100); 53 (22).

2-(2,4-Dichlorophenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one 4h [28]

$C_{13}H_9Cl_2N_3OS$, 326.20, mp 178°C–180°C; 1H NMR δ (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm, J_{H-H} = Hz): 8.7 (d, 2H, pyrim, J = 4.6); 7.6 (s, 1H, aryl); 7.4 (m, 1H, aryl); 7.3 (m, 2H, aryl, and pyrim); 6.8 (s, 1H, H2); 4.0 (d, 1H, H5a, J = 16.1); 3.9 (d, 1H, H5b, J = 16.1). ^{13}C NMR δ (100 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 169.8 (C4); 158.4 (2C); 156.3; 137.2; 133.0; 132.0; 129.2; 127.7; 127.0; 118.3; 58.8 (C2); 32.2 (C5). GC-MS m/z (%): 325 (M, 19); 297 (7); 290 (26); 248 (26); 216 (100); 126 (18); 80 (67); 53 (44).

2-(2,3-Dimethoxyphenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one 4i

$C_{15}H_{15}N_3O_3S$, 317.36, mp 131°C–135°C; 1H NMR δ (400 MHz, DMSO- d_6 , ppm, J_{H-H} = Hz) 8.7 (m, 2H, pyrim); 6.7–7.2 (m, 3H, aryl); 6.9 (s, 1H, H2); 6.7 (m, 1H, pyrim); 4.0 (d, 1H, H5a, J = 16.0); 3.8 (m, 4H, OMe, and H5b); 3.7 (s, 3H, OMe). ^{13}C NMR δ (100 MHz, DMSO- d_6 , ppm): 170 (C4); 158.0 (2C); 156.6; 145.4; 134.1; 123.9; 118.2; 116.6; 112.5; 60.1 (C2); 57.0 (OMe); 55.6 (OMe); 32.2 (C5). GC-MS m/z (%): 317 (M, 65); 286 (90); 258 (11); 244 (100); 227 (11); 212 (37); 201 (17); 126 (25); 108 (64); 96 (27); 79 (53); 53 (39).

2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one 4j [28]

$C_{15}H_{15}N_3O_3S$, 317.36, mp 102°C–105°C; GC-MS m/z (%): 317 (M, 51); 288 (14); 275 (32); 238 (100); 228 (8); 212 (6); 200 (4); 126 (18); 95 (8); 80 (94); 53 (31).

2-(2-Chloro-6-fluorophenyl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-one 4k [29]

$C_{13}H_9ClFN_3OS$, 309.74, mp 132°C–135°C, GC-MS m/z (%): 309 (M, 33); 281 (9); 267 (29); 232 (28); 216 (5); 200 (100); 138 (19); 80 (60); 53 (43).

Antioxidant Evaluation

DPPH Radical Scavenging Assay

Radical scavenging activity of synthetic compounds against stable 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH $\cdot$) was determined spectrophotometrically. When DPPH $\cdot$ reacts with an antioxidant compound which can donate hydrogen, it is reduced. The changes in color (from deep violet to light yellow) were measured at 515 nm on a UV-visible light spectrophotometer. Radical scavenging activity of compounds was measured by slightly modified method of Brand-Williams et al. [30], as described below. The solution of DPPH $\cdot$ in ethanol (60 μ M) was prepared daily, before UV measurements. Basically, 2 mL of an ethanolic solution of DPPH $\cdot$ (60 μ M) was added of 2 mL of an ethanolic solution of **4a-k** (200 μ g/mL) in 1 cm path length disposable microcuvettes. Diluted solutions of the standard ($\pm$)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) and 2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol (Eugenol) were treated in the same way. The decrease in absorbance at 515 nm was determined at 0–10 min. The antiradical activity was defined as the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH $\cdot$ concentration by 50% (EC₅₀).

ABTS Radical Scavenging Assay

The radical cation is performed by reaction between 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS $^{+\bullet}$) and $K_2S_2O_8$ in PBS medium, pH 7.4, according to Re et al. [31] with some modifications. The mixture was kept in the dark until the reaction was complete and absorbance at 734 nm stable. Spectroscopic measurements were performed in triplicate at 2, 1, 0.5, and 0.25 μ g/mL of an ethanolic solution of **4a-k**, with further conversion to μ M. Suitably diluted solutions of the standard Trolox were treated in the same way. In brief, 3 mL of diluted

TABLE 1. Yields and Antioxidant Activity of Compounds **4a-k**

Compound	R	Molecular Sieve Yield (%) ^a	Conventional Yield (%) ^a	DPPH* (EC ₅₀ - μ g/mL) ^b	ABTS+• (TEAC) ^c
4a (27)	4-CH ₃	35	53	296	10.47
4b (27)	2-Cl	54	77	22.44	36.85
4c	3-F	30	45	23.18	35.56
4d (27)	4-F	49	73	49.94	10.32
4e	3-OMe	37	60	16.13	53.52
4f	2-NO ₂	56	98	40.81	17.17
4g	3-NO ₂	52	76	56.65	19.03
4h (28)	2,4-Cl	46	73	1241	–
4i	2,3-OMe	52	82	638	–
4j (28)	3,4-OMe	38	63	451	–
4k (29)	2-Cl, 6-F	33	51	1223	–
Trolox				2.1	1
Eugenol				53	6.80

^a Yields of pure compounds.^b EC₅₀—Efficient concentration to decrease the initial DPPH* concentration by 50%.^c TEAC, Trolox equivalent antioxidant activity. This value is relative to the antioxidant activity given by Trolox (1 mM).

ABTS+• solution and 30 μ L of sample were mixed in a photometric cuvette and absorbance was measured at exactly 6 min after the mixing of the reagents ($T = 30^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$). Then, the relative antioxidant activity of samples is determined in relation to Trolox 1 mM (TEAC).

RESULTS

In attempting to work with a less toxic solvent, some reactions with molecular sieve were tested with ethanol, isopropanol, and tetrahydrofuran, however, toluene showed the best results. Moreover, high temperature ($>80^{\circ}\text{C}$) and BF_3 addition increased the efficiency of the reaction.

The 3-(pyrimidin-2-yl)thiazolidinones **4a-k** were synthesized using a molecular sieve in moderate yields when compared to the use of azeotropic distillation (Table 1). The progress of the reactions was monitored by GC and TLC and the compounds were confirmed by GC-MS and melting points. The novel compounds **4c**, **4e-g**, and **4i** were also characterized by ^1H and ^{13}C NMR (see the Experimental Data section for compounds **4a-k**).

As can be observed in Table 1, compounds **4b**, **4c**, **4d**, **4f**, **4g**, and **4h** showed significant antioxidant activity against DPPH*. EC₅₀ of two standard antioxidants Eugenol and Trolox were also measured for comparison. With respect to ABTS test, all compounds demonstrated antioxidant activity, especially thiazolidinones **4b**, **4c**, and **4f**.

DISCUSSION

Thiazolidinones were obtained under azeotropic distillation in good yield by the methodology widespread in our research program [18, 19, 32]. According to our recent work [18], a Lewis acid was necessary to increase the aldehyde electrophilicity, since the nitrogen of 2-aminopyrimidine **1** has low nucleophilicity.

Indeed, it is evident that toluene at 80°C and BF_3 promotes better conversion to thiazolidinone, perhaps caused by three reasons: (1) the low reactivity of nitrogen of 2-aminopyrimidine **1** that requires high energy, (2) water is most readily absorbed from solvents in which they are least soluble, and (3) toluene reflux temperature causes the effectiveness in water adsorption of molecular sieves.

The solvent change was not effective, however, the significant yields were obtained at 80°C rather than at toluene reflux. So, the alternative procedure for our synthesis consists of stirring a simple mixture of 2-aminopyrimidine, corresponding arenealdehyde, and the mercaptoacetic acid in the presence of molecular sieve at 80°C for about 19 h (Figure 1). The desired thiazolidinones **4a-k** were obtained in moderated yields (30%–56%) in good purity. When necessary, the crude products were purified by washing with hot mixture of hexane:ethyl acetate (9:1).

Some studies have demonstrated that thiazolidinone derivatives can present antioxidant effects in the DPPH, ABTS (TEAC), and others [15, 33–37]. Employing the DPPH assay to screen the antioxidant activity of the synthesized thiazolidinones, we found that compounds **4b**, **4c**, **4d**, **4f**, **4g**, and **4h** showed moderate to good antioxidant efficiency compared to standard Eugenol. In general, all compounds were more effective in the ABTS+• assay, with good to high TEAC values. The thiazolidinone **4e** showed the best EC₅₀ (16.4 $\mu\text{g/mL}$) and TEAC, being more active than the standard Eugenol. Compounds **4h-k** showed high EC₅₀ in DPPH assay and due to that, the ABTS were not evaluated for these thiazolidinones.

All compounds present one labile hydrogen (hydrogen of position-2 in thiazolidinone ring), which could be donated to the DPPH* and ABTS+• free radicals. The radical formed in compounds **4a-k** could be well stabilized by resonance [34]. The electronic effect (electron withdraw or electron release) and the position (*o*, *m*, and *p*) of substituent did not contribute significantly to the antioxidant activity with similar EC₅₀ and TEAC. However, we clearly observe that thiazolidinones from disubstituted arenealdehydes (**4h-k**) are less effective as antioxidants by DPPH assay.

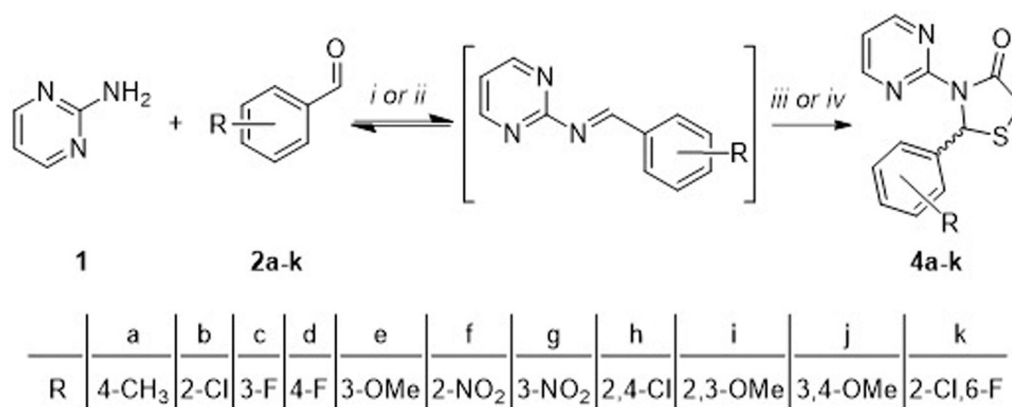


FIGURE 1. Synthesis of thiazolidin-4-ones **4a-k**. Reaction conditions: (i) toluene, BF₃:MeOH, reflux in Dean-Stark trap, 3 h. (ii) toluene, BF₃:MeOH, molecular sieve, 80°C, 3 h. (iii) HSCH₂COOH **3**, reflux in Dean-Stark trap, 16 h. (iv) HSCH₂COOH **3**, molecular sieve, 80°C, 16 h.

Finally, we report a procedure for the preparation of 2-(aryl)-3-(pyrimidin-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-ones using a molecular sieve that furnishes the desired products in a lower energy (80°C) than azeotropic distillation (110°C). This procedure showed advantages like operational simplicity, easy workup, moderate yields, and overall lower cost. Moreover, the compound **4e** showed the highest antioxidant activity in both radical scavenger assays. However, further studies are necessary to understand the structural features of thiazolidinones derivatives that contribute to their antioxidant activity.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Federal University of Pelotas, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). We also thank Dr. A. F. C. Flores (University of Santa Maria) and M.Sc. P. D. Neuenfeldt (Federal University of Santa Catarina).

REFERENCES

- Oza TD, Parikh A, Gudaparthi V. Synthesis and biological screening of some novel 3-amino-4-arylidene-5-pyrazolones and thiazolo[3,2-a]pyrimidines. *Pharma Sci Monit* 2012;3(4 (Suppl. 2)):2775–2785.
- Miyazaki Y, Matsunaga S, Tang J, Maeda Y, Nakano M, Philippe RJ, Shibahara M, Liu W, Sato H, Wang L, Nolte R. Novel 4-amino-furo[2,3-d]pyrimidines as Tie-2 and VEGFR2 dual inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15(9):2203–2207.
- Sondhi S, Singh J, Agrawal SK, Saxena AK, Roy P. Synthesis of pyrimidine and condensed pyrimidine derivatives and their evaluation for anti-inflammatory activity. *Med Chem Res* 2012;21(1):91–99.
- Varaprasad CVNS, Ramasamy KS, Girardet J-L, Gunic E, Lai V, Zhong W, An H, Hong Z. Synthesis of pyrrolo[2,3-d]pyrimidine nucleoside derivatives as potential anti-HCV agents. *Bioorg Chem* 2007;35(1):25–34.
- Malik V, Singh P, Kumar S. Unique chlorine effect in regioselective one-pot synthesis of 1-alkyl-/allyl-3-(o-chlorobenzyl) uracils: anti-HIV activity of selected uracil derivatives. *Tetrahedron* 2006;62(25):5944–5951.
- Bano T, Kumar N, Dudhe R. Free radical scavenging properties of pyrimidine derivatives. *Org Med Chem Lett* 2012;2(1):34.
- Babizhayev MA. Biological activities of the natural imidazole-containing peptidomimetics n-acetylcarnosine, carnosine and l-carnosine in ophthalmic and skin care products. *Life Sciences* 2006;78(20):2343–2357.
- Jain AK, Vaidya A, Ravichandran V, Kashaw SK, Agrawal RK. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. *Bioorg Med Chem* 2012;20(11):3378–3395.
- Ragab FA, Safwat HM, Hussien MM, Abd-El Gawad NM, Hassan GS, Kenawy SA. Synthesis and anticonvulsant activity of thiazolidin-4-one derivatives carrying a furochromone or benzofuran moiety. *Bull Fac Pharm (Cairo Univ)* 2006;44(3):71–82.
- Gupta A, Mishra P, Pandeya SN, Kashaw SK, Kashaw V, Stables JP. Synthesis and anticonvulsant activity of some substituted 1,2,4-thiadiazoles. *Eur J Med Chem* 2009;44(3):1100–1105.
- Mistry B, Jauhari S. Synthesis and in vitro antimicrobial and anti-tubercular evaluation of some quinoline-based azitidinone and thiazolidinone analogues. *Med Chem Res* 2012;1–12.
- Masoud G, Youssef A, Abdel Khalek M, Abdel Wahab A, Labouta I, Hazzaa AB. Design, synthesis, and biological evaluation of new 4-thiazolidinone derivatives substituted with benzimidazole ring as potential chemotherapeutic agents. *Med Chem Res* 2013;22(2):707–725.
- Kunzler A, Neuenfeldt PD, das Neves AM, Pereira CMP, Marques GH, Nascente PS, Fernandes MHV, Hübner SO, Cunico W. Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidinones. *Eur J Med Chem* 2013;64(0):74–80.
- Ravichandran V, Jain A, Kumar KS, Rajak H, Agrawal RK. Design, synthesis, and evaluation of thiazolidinone derivatives as antimicrobial and anti-viral agents. *Chem Biol Drug Des* 2011;78(3):464–470.

15. Shih M-H, Ke F-Y. Syntheses and evaluation of antioxidant activity of sydnonyl substituted thiazolidinone and thiazoline derivatives. *Bioorg Med Chem* 2004;12(17):4633–4643.
16. Pawar RB, Mulwad VV. Synthesis of Some Biologically Active Pyrazole, Thiazolidinone, and Azetidinone Derivatives. *Chem Heterocycl Compd* 2004;40(2):219–226.
17. Verma A, Saraf SK. 4-Thiazolidinone – A biologically active scaffold. *Eur J Med Chem* 2008;43(5):897–905.
18. Gouvêa DP, Bareno VDO, Bosenbecker J, Drawanz BB, Neuenfeldt PD, Siqueira GM, Cunico W. Ultrasonics promoted synthesis of thiazolidinones from 2-aminopyridine and 2-picolyamine. *Ultrason Sonochem* 2012;19(6):1127–1131.
19. Neuenfeldt PD, Drawanz BB, Aguiar ACC, Figueiredo Jr F, Krettl AU, Cunico W. Multicomponent Synthesis of New Primaquine Thiazolidinone Derivatives. *Synthesis*; 2011 (23):3866–3870.
20. Sharma RC, Kumar D. Synthesis of some new thiazolidin-4-ones as possible antimicrobial agents. *J Indian Chem Soc* 2000;77(10):492–493.
21. El Bialy SA, Nagy MM, Abdel-Rahman HM. Efficient Regioselective Three-Component Domino Synthesis of 3-(1,2,4-Triazol-5-yl)-1,3-thiazolidin-4-ones as Potent Antifungal and Antituberculosis Agents. *Arch Pharm* 2011;344(12):821–829.
22. Holmes CP, Chinn JP, Look GC, Gordon EM, Gallop MA. Strategies for Combinatorial Organic Synthesis: Solution and Polymer-Supported Synthesis of 4-Thiazolidinones and 4-Metathiazanones Derived from Amino Acids. *J Org Chem* 1995;60(22):7328–33.
23. Srivastava T, Haq W, Katti SB. Carbodiimide mediated synthesis of 4-thiazolidinones by one-pot three-component condensation. *Tetrahedron* 2002;58(38):7619–7624.
24. Rawal RK, Srivastava T, Haq W, Katti SB. An expeditious synthesis of thiazolidinones and tetrahydro-1,3-thiazin-4-ones. *J Chem Res* 2004 (5):368–369.
25. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44–84.
26. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr Med Chem* 2010;17(28):3262–3288.
27. Kolla S, Bhat AR. New chemotherapeutic agents: synthesis and biological activities of pyrimidinyl derivatives of thiazolidinones. *J Inst Chem (India)* 1998;70(4):146–148.
28. Bardia R, Singh RDK, Rao JT. Synthesis and insecticidal activity of 3-(2-pyrimidyl)-2-arylthiazolidin-4-ones. *J Inst Chem (India)* 2005;77(5):144–146.
29. Murugesan V, Prabhakar YS, Katti SB. CoMFA and CoMSIA studies on thiazolidin-4-one as anti-HIV-1 agents. *J Mol Graphics Modell* 2009;27(6):735–743.
30. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 1995;28(1):25–30.
31. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals Biol Med* 1999;26(9–10):1231–1237.
32. Neuenfeldt PD, Duval AR, Drawanz BB, Rosales PF, Gomes CRB, Pereira CMP, Cunico W. Efficient sonochemical synthesis of thiazolidinones from piperonylamine. *Ultrason Sonochem* 2011;18(1):65–67.
33. Gouda MA, Abu-Hashem AA. Synthesis, Characterization, Antioxidant and Antitumor Evaluation of Some New Thiazolidine and Thiazolidinone Derivatives. *Arch Pharm* 2011;344(3):170–177.
34. Saundane AR, Walmik P. Synthesis, antioxidant, antimicrobial, antimycobacterial, and cytotoxic activities of azetidinone and thiazolidinone moieties linked to indole nucleus. *J Chem* 2013;543815.
35. Saundane A, Yarlakatti M, Walmik P, Katkar V. Synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of thiazolidinone, azetidinone encompassing indolylthienopyrimidines. *J Chem Sci* 2012;124(2):469–481.
36. Ottana R, Maccari R, Giglio M, Del Corso A, Cappiello M, Mura U, Cosconati S, Marinelli L, Novellino E, Sartini S, La Motta C, Da Settimo F. Identification of 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives endowed with dual activity as aldose reductase inhibitors and antioxidant agents for the treatment of diabetic complications. *Eur J Med Chem* 2011;46(7):2797–2806.
37. Nampurath GK, Mathew SP, Khanna V, Zachariah RT, Kanji S, Chamallamudi MR. Assessment of hypolipidaemic activity of three thiazolidin-4-ones in mice given high-fat diet and fructose. *Chem-Biol Interact* 2008;171(3):363–368.

5 CONCLUSÕES

De acordo com o proposto nos objetivos desta dissertação, pode-se concluir pelos resultados:

- a) A utilização de peneira molecular em substituição a destilação azeotrópica apresentou rendimentos consideráveis (30-56%), porém não apresentou resultados melhores do que a metodologia clássica (45-98%). Aparentemente a metodologia com peneira é menos dispendiosa por reagir em temperatura menor (80°C) que a utilizada em destilação azeotrópica (>110°C), contudo estudos posteriores de variação das condições reacionais serão realizados na busca de melhores rendimentos.
- b) Quanto aos testes antioxidantes pode-se notar uma velocidade alta entre o antioxidante e os radicais DPPH• e ABTS⁺• e valores muito significativos de atividade antioxidante de seis compostos (4b-d, 4f-g e 4h) frente ao ensaio DPPH (EC₅₀ entre 16,13 e 49,94 µg/mL) e excelentes atividades em relação ao ensaio ABTS (TEAC: 10,32-53,52), por isso mais estudos devem complementar esse trabalho no intuito de se realizar um estudo toxicidade e de relação estrutura atividade desses compostos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BARDIA, R.; SINGH, R. D. K.; RAO, J. T. Synthesis and insecticidal activity of 3-(2-pyrimidyl)-2-arylthiazolidin-4-ones. **Journal of the Institution of Chemists (India)**, v. 77, n. 5, p. 144-146, 2005. ISSN 0020-3254.

BECKMAN, J. S. Oxidative Damage and Tyrosine Nitration from Peroxynitrite. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, n. 5, p. 836-844, 1996/01/01 1996. ISSN 0893-228X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/tx9501445>>. Acesso em: 2013/03/25.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, // 1995. ISSN 0023-6438. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>>.

BUKHARI, M. et al. Synthesis and biological studies of a novel series of 4-(4-(1H-imidazol-1-yl)phenyl)-6-arylpyrimidin-2-amines. **Medicinal Chemistry Research**, p. 1-7, 2013/02/01 2013. ISSN 1054-2523. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00044-013-0523-6>>.

CANNIO, R. et al. Oxygen: friend or foe? Archaeal superoxide dismutases in the protection of intra- and extracellular oxidative stress. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. D768-D779, 2000. ISSN 1093-4715. Disponível em: <<http://www.bioscience.org/2000/v5/d/cannio/cannio.pdf>>.

CUNICO, W.; GOMES, C. R. B.; VELLASCO, W. T., JR. Chemistry and biological activities of 1,3-thiazolidin-4-ones. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 336-344, 2008. ISSN 1570-193X.

DAVIES, K. J. A.; PRYOR, W. A. The evolution of Free Radical Biology & Medicine: A 20-year history. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 10, p. 1263-1264, 11/15/ 2005. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584905005149>>.

DESAI, N. C. et al. Microwave-assisted synthesis and antimicrobial screening of new imidazole derivatives bearing 4-thiazolidinone nucleus. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 4, p. 1893-1908, 2013/04/01 2013. ISSN 1054-2523. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00044-012-0190-z>>.

DIPLOCK, A. T. et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, v. 80, n. Supplement S1, p. S77-S112, 1998.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/content/82/1/47.abstract>>.

EL BIALY, S. A.; NAGY, M. M.; ABDEL-RAHMAN, H. M. Efficient Regioselective Three-Component Domino Synthesis of 3-(1,2,4-Triazol-5-yl)-1,3-thiazolidin-4-ones as Potent Antifungal and Antituberculosis Agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 344, n. 12, p. 821-829, 2011. ISSN 1521-4184. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ardp.201100001>>.

FRANKEL, E. N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 51-55, 9// 1996. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814696000672>>.

GIL DEL VALLE, L. Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 1// 2011. ISSN 2210-5220. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210522011000025>>. Acesso em: 2011/3//.

GOUVEA, D. P. et al. Ultrasonics promoted synthesis of thiazolidinones from 2-aminopyridine and 2-picolyamine. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 6, p. 1127-1131, 2012. ISSN 1350-4177.

GUO, T. et al. Antioxidant activities of extract and fractions from Tuber indicum Cooke & Massee. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1634-1640, 8/15/ 2011. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611002871>>.

GUPTA, A. et al. Synthesis and anticonvulsant activity of some substituted 1,2,4-thiadiazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 1100-1105, March 2009 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.06.015>>.

GÜLÇİN, İ. Antioxidant activity of l-adrenaline: A structure-activity insight. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, n. 2-3, p. 71-80, 5/15/ 2009. ISSN 0009-2797. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279708005000>>.

_____. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012/03/01 2012. ISSN 0340-5761. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>>.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal Of Neurochemistry**, England, v. 97, n. 6, p. 1634-1658, 2006. ISSN 0022-3042. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=16805774&lang=pt-br&site=ehost-live>>.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007. 851.

HOLMES, C. P. et al. Strategies for Combinatorial Organic Synthesis: Solution and Polymer-Supported Synthesis of 4-Thiazolidinones and 4-Metathiazanones Derived from Amino Acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, n. 22, p. 7328-33, 1995. ISSN 0022-3263.

HOPPS, E. et al. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 1, p. 72-77, 1// 2010. ISSN 0939-4753. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939475309001409>>.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005/03/01 2005. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf030723c>>. Acesso em: 2013/03/12.

ISLOOR, A. M. et al. Synthesis, characterization, anticancer, and antioxidant activity of some new thiazolidin-4-ones in MCF-7 cells. **Medicinal Chemistry Research**, p. Ahead of Print, 2012. ISSN 1054-2523.

JAIN, A. K. et al. Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 3378-3395, 6/1/ 2012. ISSN 0968-0896. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089612002696>>.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9 & 10, p. 1865-1879, 2006. ISSN 1523-0864.

LIESEN, A. P. et al. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. **Química Nova**, v. 31, p. 369-376, 2008. ISSN 0100-4042. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000200033&nrm=iso>.

MAGALHÃES, L. M. et al. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. **Talanta**, v. 77, n. 5, p. 1559-1566, 3/15/ 2009. ISSN 0039-9140. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008007807>>.

_____. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1-19, 4/14/ 2008. ISSN 0003-2670. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267008003863>>.

_____. Automatic Method for the Determination of Folin-Ciocalteu Reducing Capacity in Food Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5241-5246, 2006/07/01 2006. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf060324s>>. Acesso em: 2013/03/25.

MASOUD, G. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new 4-thiazolidinone derivatives substituted with benzimidazole ring as potential chemotherapeutic agents. **Medicinal Chemistry Research**, p. 1-19, 2012/05/01 2012. ISSN 1054-2523. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00044-012-0057-3>>.

_____. Design, synthesis, and biological evaluation of new 4-thiazolidinone derivatives substituted with benzimidazole ring as potential chemotherapeutic agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 2, p. 707-725, 2013/02/01 2013. ISSN 1054-2523. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00044-012-0057-3>>.

MILLER, N. J. et al. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **FEBS Letters**, v. 384, n. 3, p. 240-242, 4/22/ 1996. ISSN 0014-5793. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014579396003237>>.

MISTRY, B.; JAUHARI, S. Synthesis and in vitro antimicrobial and anti-tubercular evaluation of some quinoline-based azitidinone and thiazolidinone analogues. **Medicinal Chemistry Research**, p. 1-12, 2012/04/01 2012. ISSN 1054-2523. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00044-012-0060-8>>.

NAMPURATH, G. K. et al. Assessment of hypolipidaemic activity of three thiazolidin-4-ones in mice given high-fat diet and fructose. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, n. 3, p. 363-368, 2/15/ 2008. ISSN 0009-2797. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279707003031>>.

OMURA, K. Antioxidant synergism between butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 12, p. 1565-1570, 1995/12/01 1995. ISSN 0003-021X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02577855>>.

OTTANÀ, R. et al. 5-Arylidene-2-imino-4-thiazolidinones: Design and synthesis of novel anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4243-4252, 7/1/ 2005. ISSN 0968-0896. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089605003548>>.

PAWAR, R. B.; MULWAD, V. V. Synthesis of Some Biologically Active Pyrazole, Thiazolidinone, and Azetidinone Derivatives. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 40, n. 2, p. 219-226, 2004. ISSN 00093122. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=16622285&lang=pt-br&site=ehost-live>>.

PRASAD, D.; NATH, M. Three-component domino reaction in PPG: An easy access to 4-thiazolidinone derivatives. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 628-633, 2012. ISSN 1943-5193.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005/05/01 2005. ISSN 0021-8561. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf0502698>>. Acesso em: 2013/03/12.

RAGAB, F. A. E.-F. et al. Synthesis and anticonvulsant activity of new 4-thiazolidinones and 2-thioxo-4-imidazolidinones attached to 4-oxo and thioxobenzopyrans. **Bulletin of the Faculty of Pharmacy**, v. 44, n. 3, p. 83-93, 2006. ISSN 1110-0931.

RAVICHANDRAN, V. et al. Design, synthesis, and evaluation of thiazolidinone derivatives as antimicrobial and anti-viral agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 78, n. 3, p. 464-470, 2011. ISSN 1747-0277. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1747-0285.2011.01149.x/pdf>>.

RAWAL, R. K. et al. An expeditious synthesis of thiazolidinones and tetrahydro-1,3-thiazin-4-ones. **Journal of Chemical Research**, n. 5, p. 368-369, 2004.

_____. Design and synthesis of 2-(2,6-dibromophenyl)-3-heteroaryl-1,3-thiazolidin-4-ones as anti-HIV agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 12, p. 2800-2806, 12// 2008. ISSN 0223-5234. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523407004837>>.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231-1237, 5// 1999. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584998003153>>.

REAVEN, P. D.; WITZTUM, J. L. Oxidized Low Density Lipoproteins in Atherogenesis: Role of Dietary Modification. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 51-71, 1996/07/01 1996. ISSN 0199-9885. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nu.16.070196.000411>>. Acesso em: 2013/03/25.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 84, n. 21–22, p. 705-712, 5/22/ 2009. ISSN 0024-3205. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320509001003>>.

SAUNDANE, A. et al. Synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of thiazolidinone, azetidinone encompassing indolylthienopyrimidines. **Journal of Chemical Sciences**, v. 124, n. 2, p. 469-481, 2012/03/01 2012. ISSN 0974-3626. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12039-011-0180-6>>.

SAWALE, A. A.; BENDRE, R. S.; PATIL, P. R. Synthesis, characterization and biological screening of new 4-thiazolidinones having potentially active tetrazole moiety. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 415-420, 2012. ISSN 0975-8585. Disponível em: <[http://www.rjpbcs.com/pdf/2012_3\(3\)/\[48\].pdf](http://www.rjpbcs.com/pdf/2012_3(3)/[48].pdf)>.

SHARMA, R. C.; KUMAR, D. Synthesis of some new thiazolidin-4-ones as possible antimicrobial agents. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 77, n. 10, p. 492-493, 2000. ISSN 0019-4522.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, Supplement 3, p. S31-S38, 9/30/ 1991. ISSN 0002-9343. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002934391902812>>.

SINGH, S. P. et al. Chemistry and biological activity of thiazolidinones. **Chemical Reviews**, v. 81, n. 2, p. 175-203, 1981. ISSN 0009-2665.

SRIVASTAVA, T.; HAQ, W.; KATTI, S. B. Carbodiimide mediated synthesis of 4-thiazolidinones by one-pot three-component condensation. **Tetrahedron**, v. 58, n. 38, p. 7619-7624, 9/16/ 2002. ISSN 0040-4020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402002008669>>.

STYSKAL, J. et al. Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 46-58, 1/1/ 2012. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584911011051>>.

SURREY, A. R.; CUTLER, R. A. 4-Thiazolidones. VI. The preparation of some 2-substituted derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, p. 578-80, 1954. ISSN 0002-7863.

THOMAS, A. B. et al. Green route synthesis of 4-thiazolidinone analogs of isonicotinic acid hydrazide. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 4, n. 3, p. 211-217, 2011/09/01 2011. ISSN 1751-8253. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/17518253.2010.544261>>. Acesso em: 2013/01/13.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, // 2007. ISSN 1357-2725. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272506002196>>.

VERMA, A.; SARAF, S. K. 4-Thiazolidinone – A biologically active scaffold. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 897-905, 5// 2008. ISSN 0223-5234. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523407003054>>.

WOJCIK, M.; BURZYNSKA-PEDZIWIATR, I.; WOZNIAK, L. A. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. **Current Medicinal Chemistry**, Netherlands, v. 17, n. 28, p. 3262-3288, 2010. ISSN 1875-533X. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=20666718&lang=pt-br&site=ehost-live>>.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 3, p. 176-186, 2001. Disponível em: <<http://jcp.bmj.com/content/54/3/176.abstract>>.

İLHAMİ, G. et al. The antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-(β -d-glucopyranosyl)-hederagenin. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 2, p. 130-134, 2006. ISSN 1099-1573. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1821>>.

ANEXO I – Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C dos
Compostos 3-(pirimidin-2-il)-tiazolidin-4-onas.

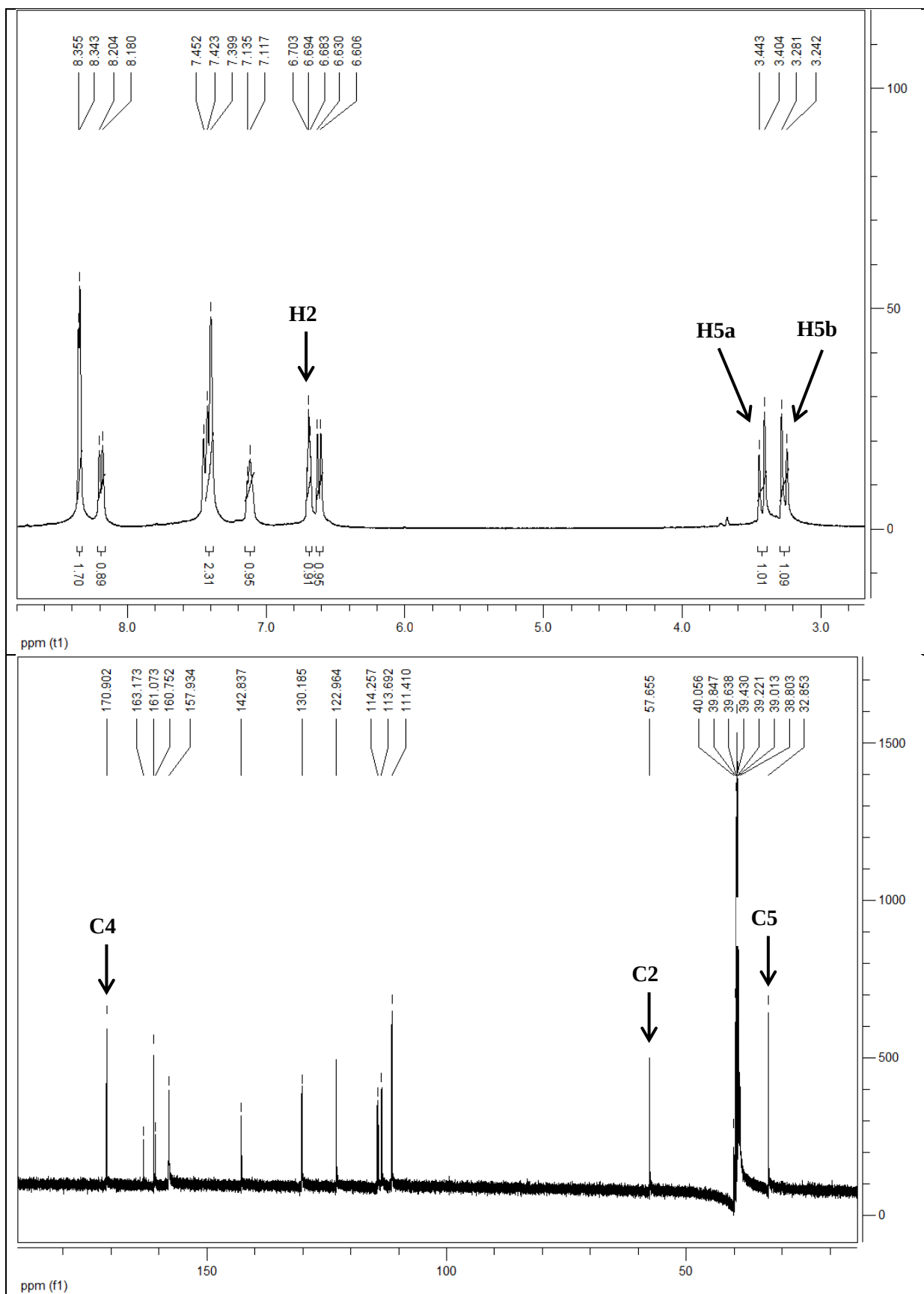


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto 2-(3-fluorfenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (**4c**) em $\text{DMSO}-d_6$.

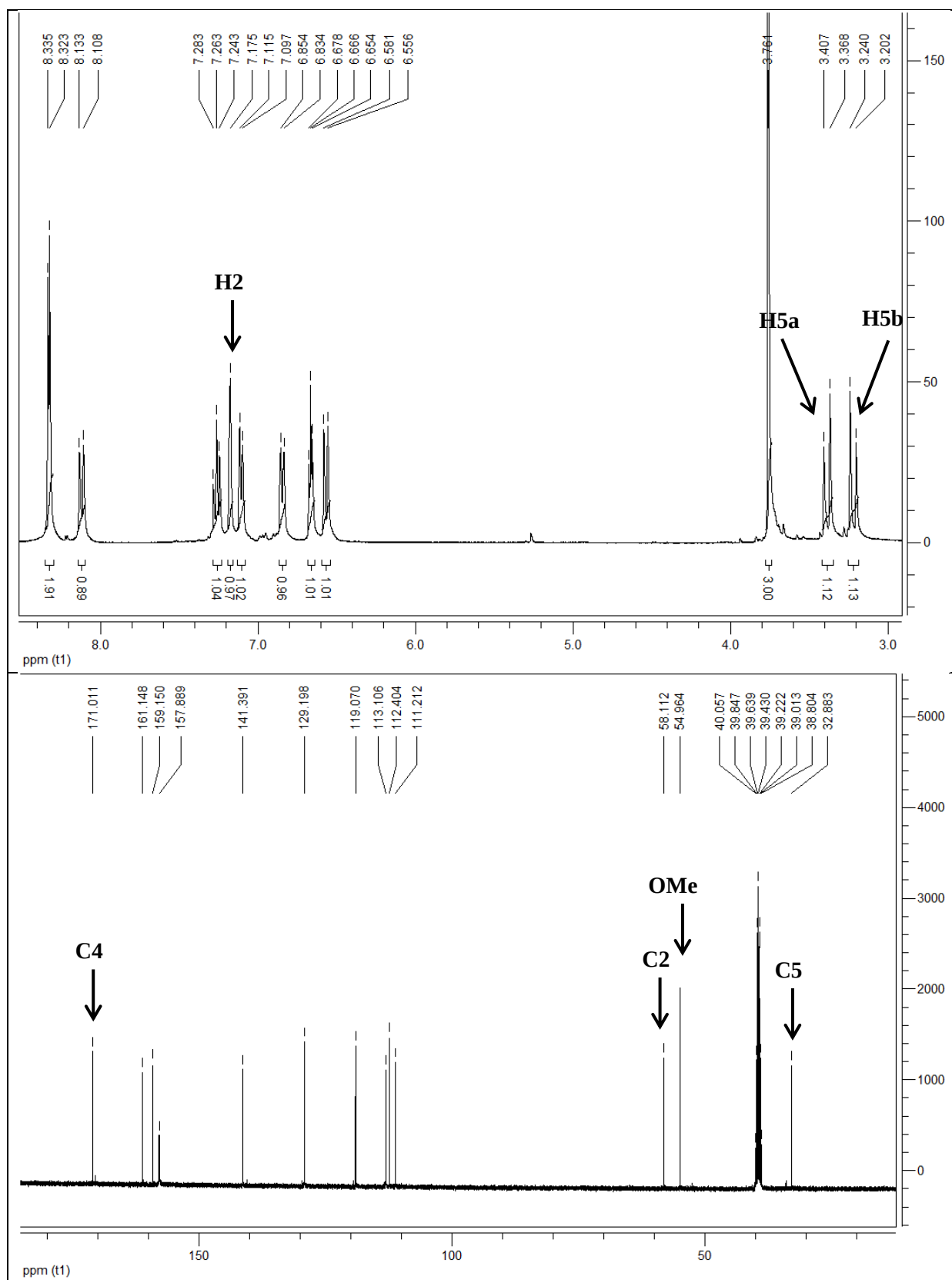


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto 2-(3-metoxi)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (**4e**) em $\text{DMSO-}d_6$.

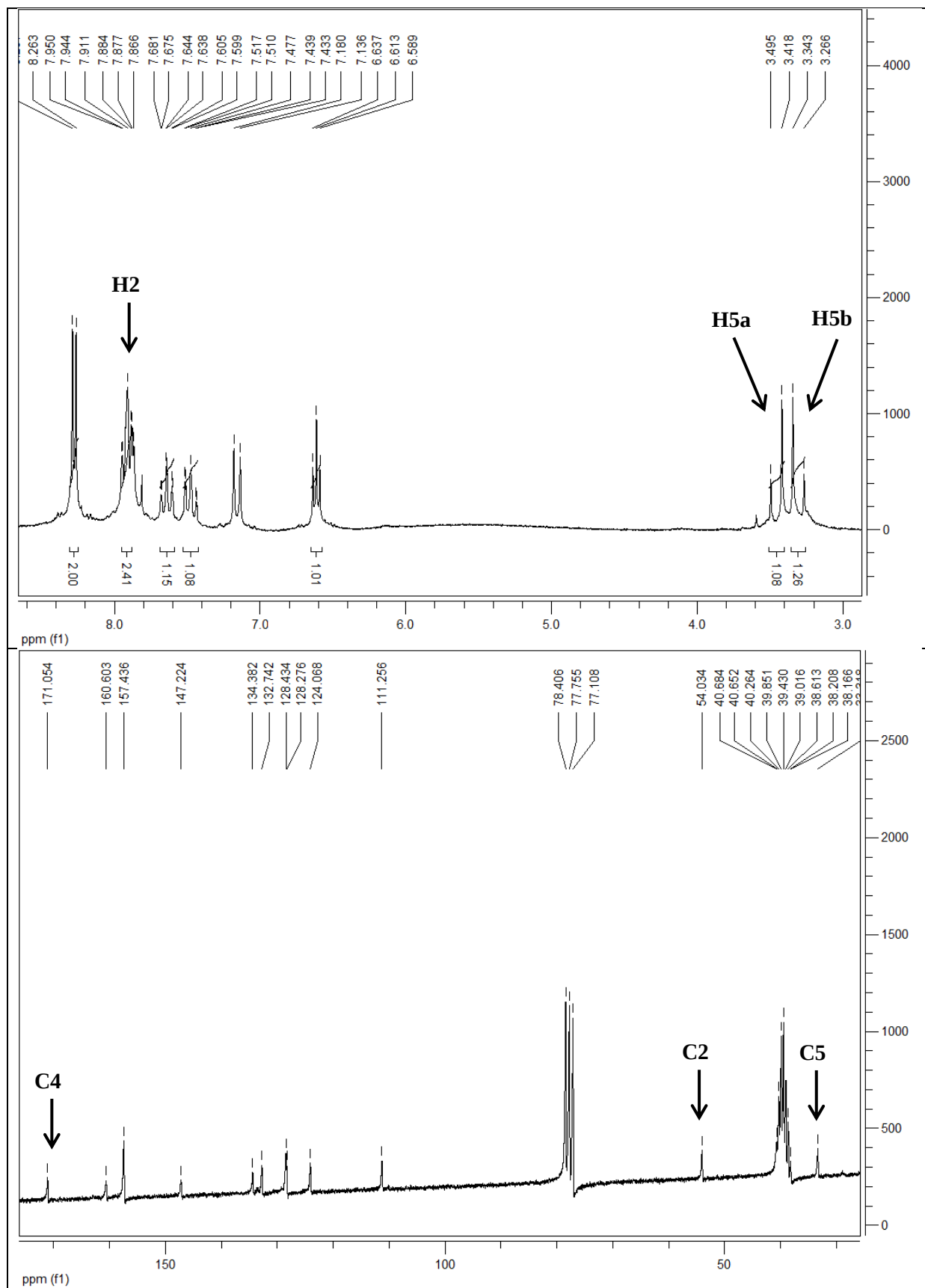


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto 2-(2-nitrofenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (**4f**) em CDCl_3 .

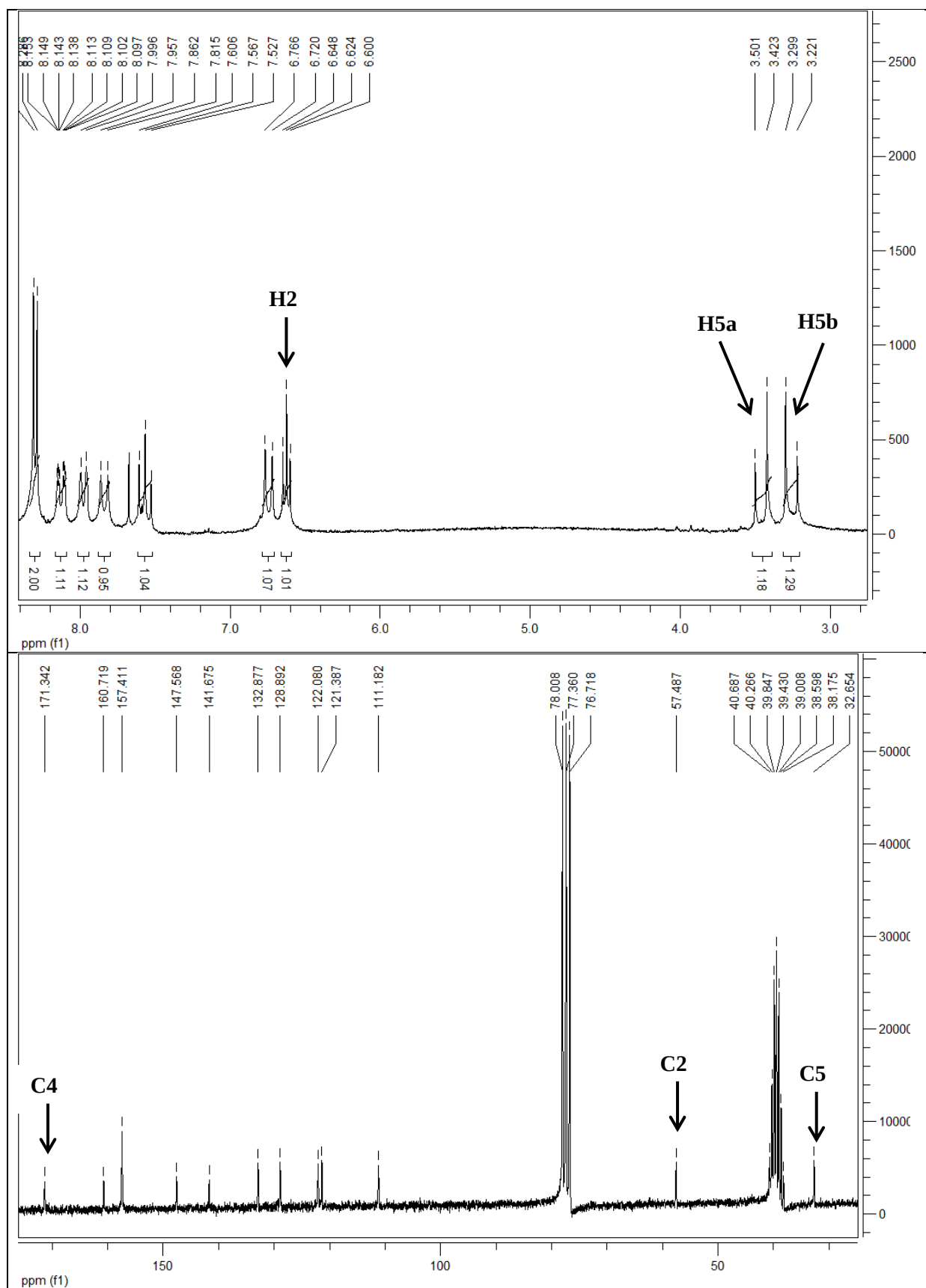


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto 2-(3-nitrofenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (**4g**) em CDCl_3 .

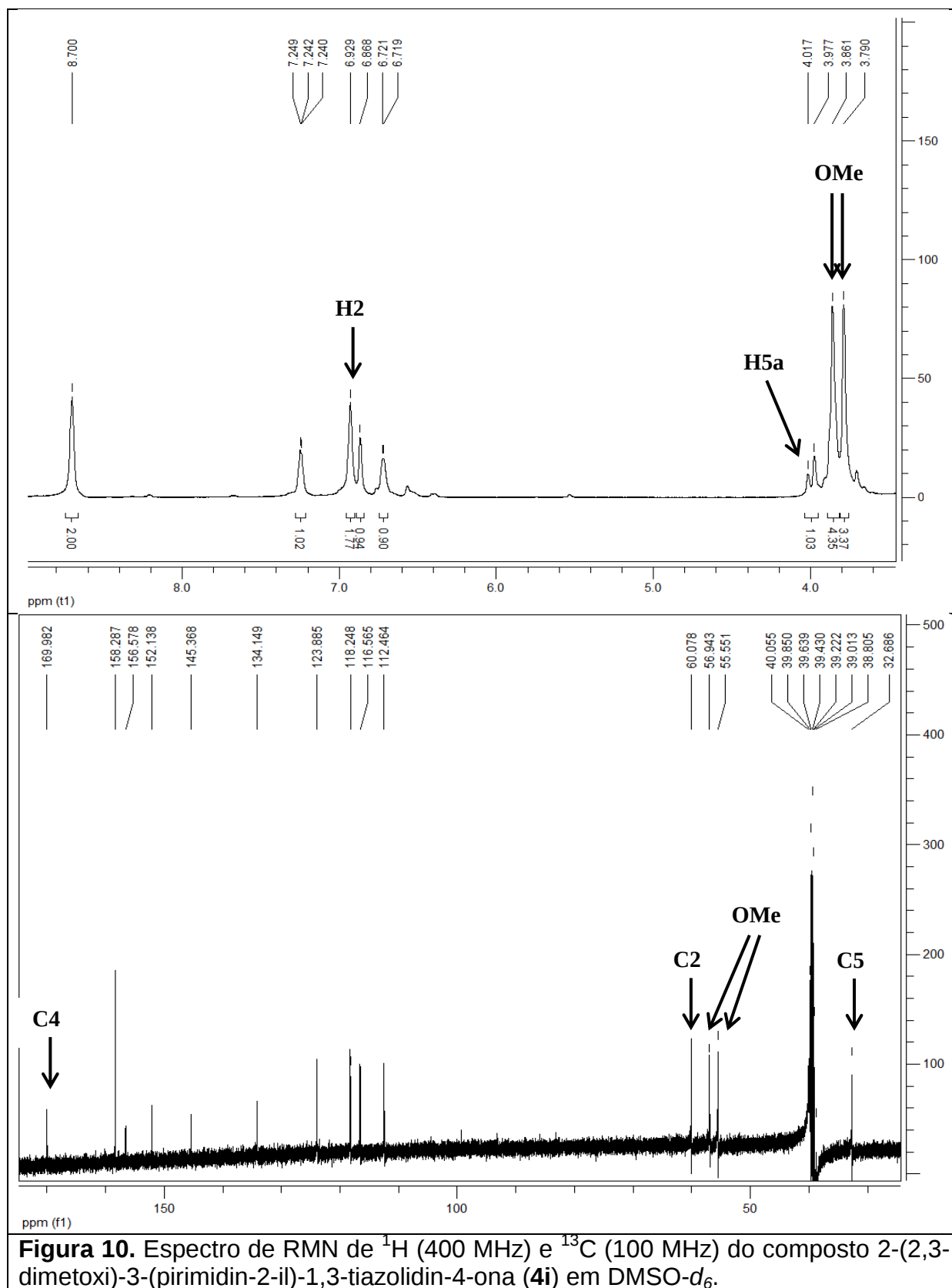
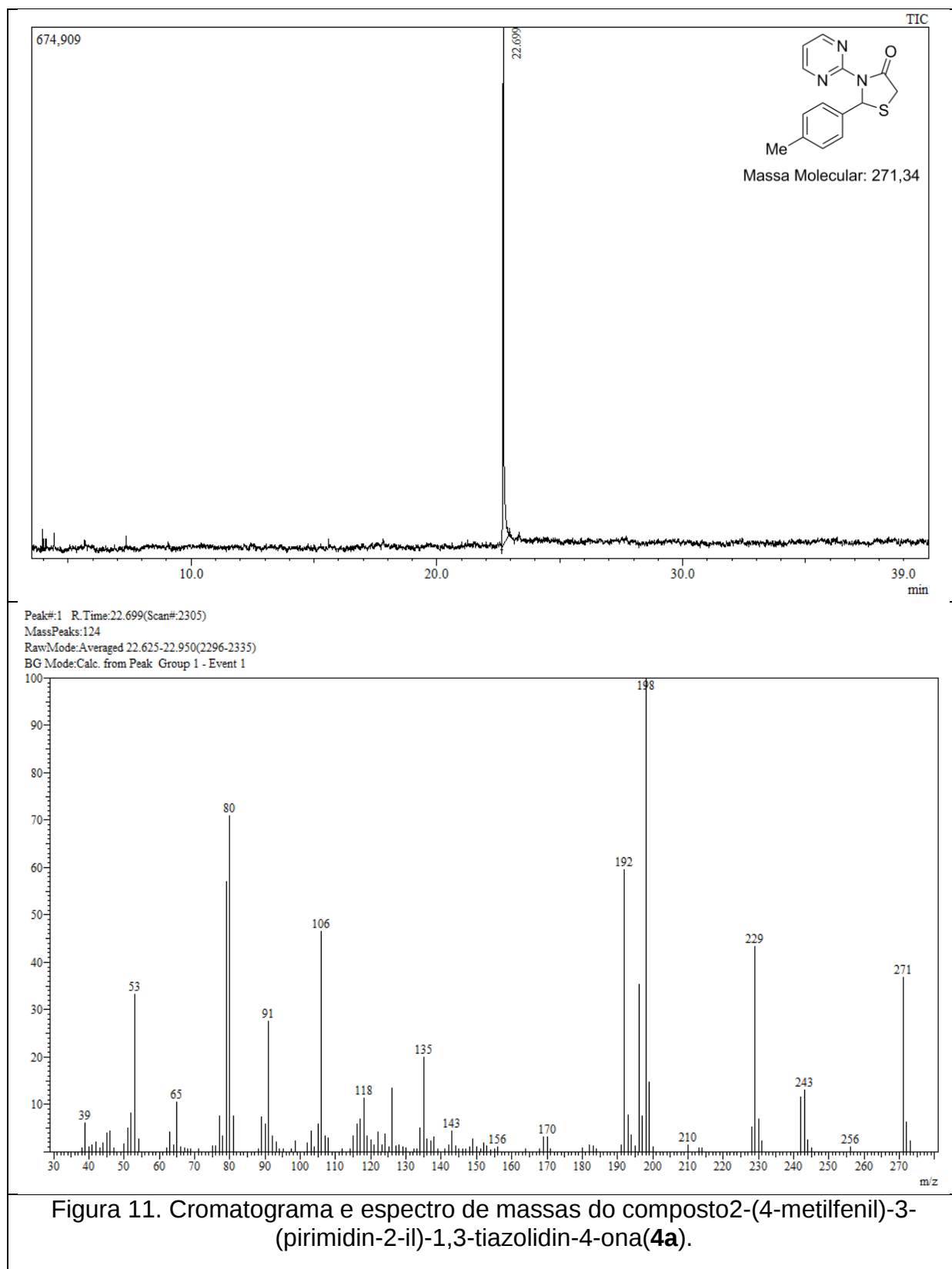
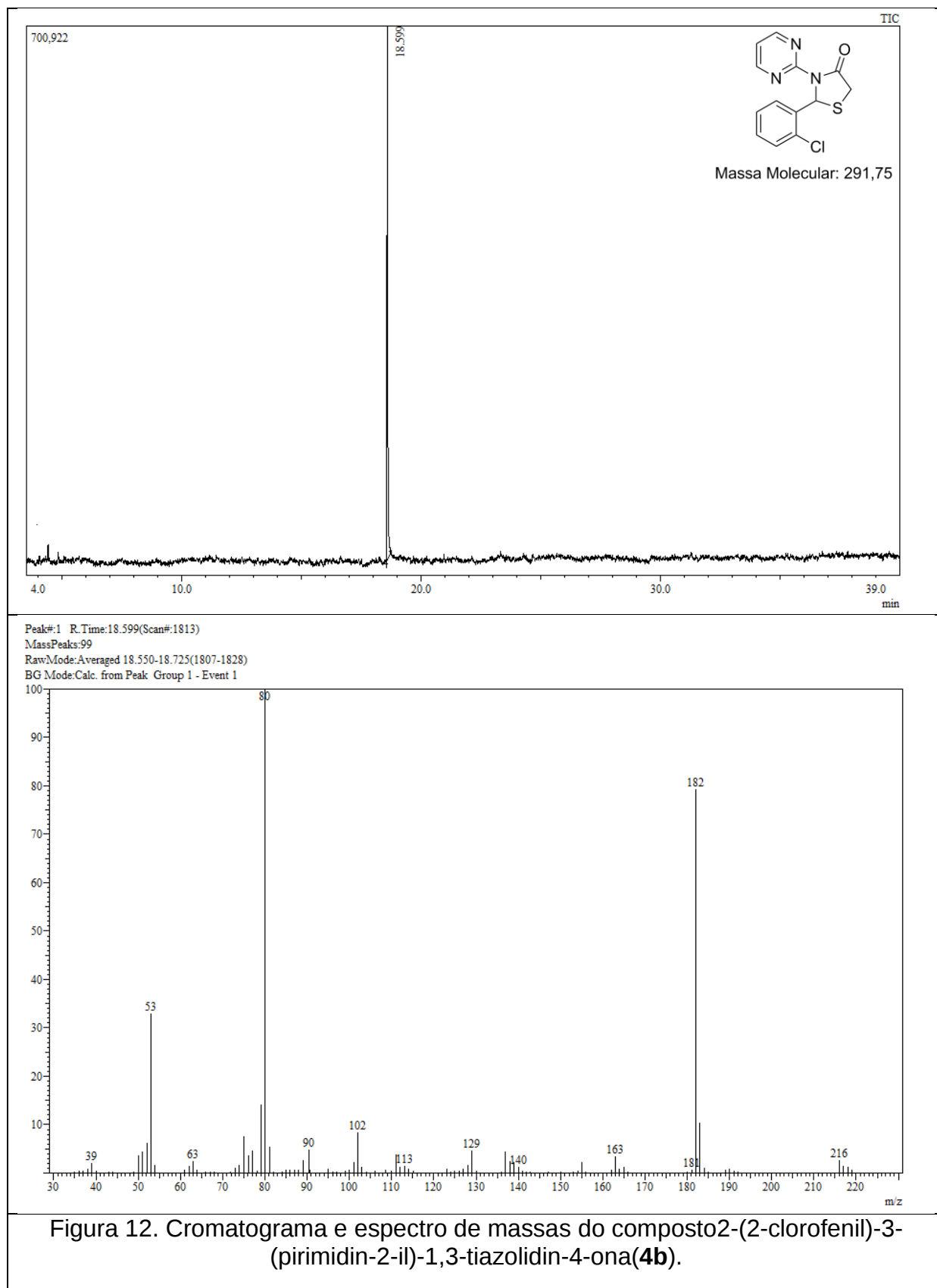
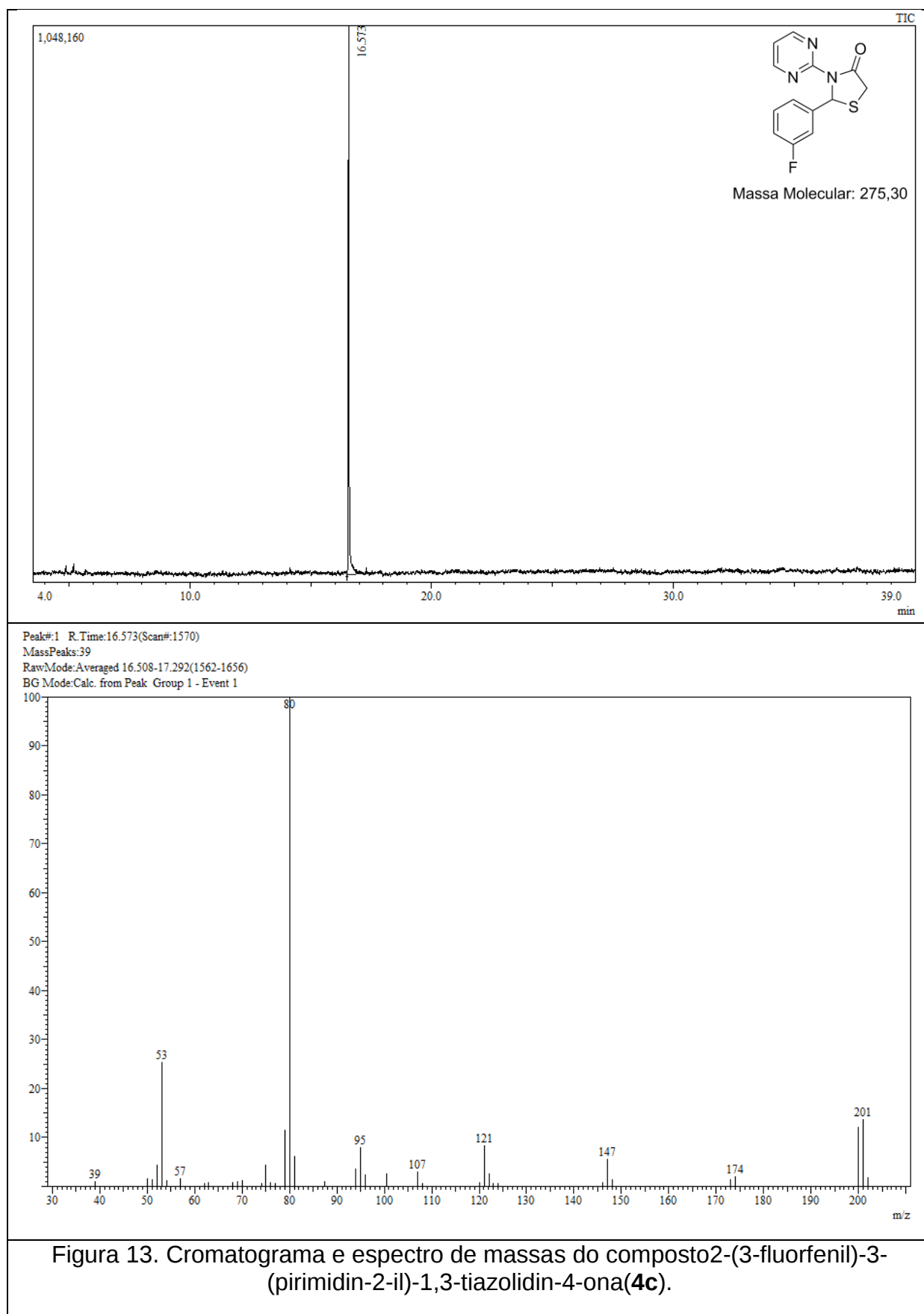


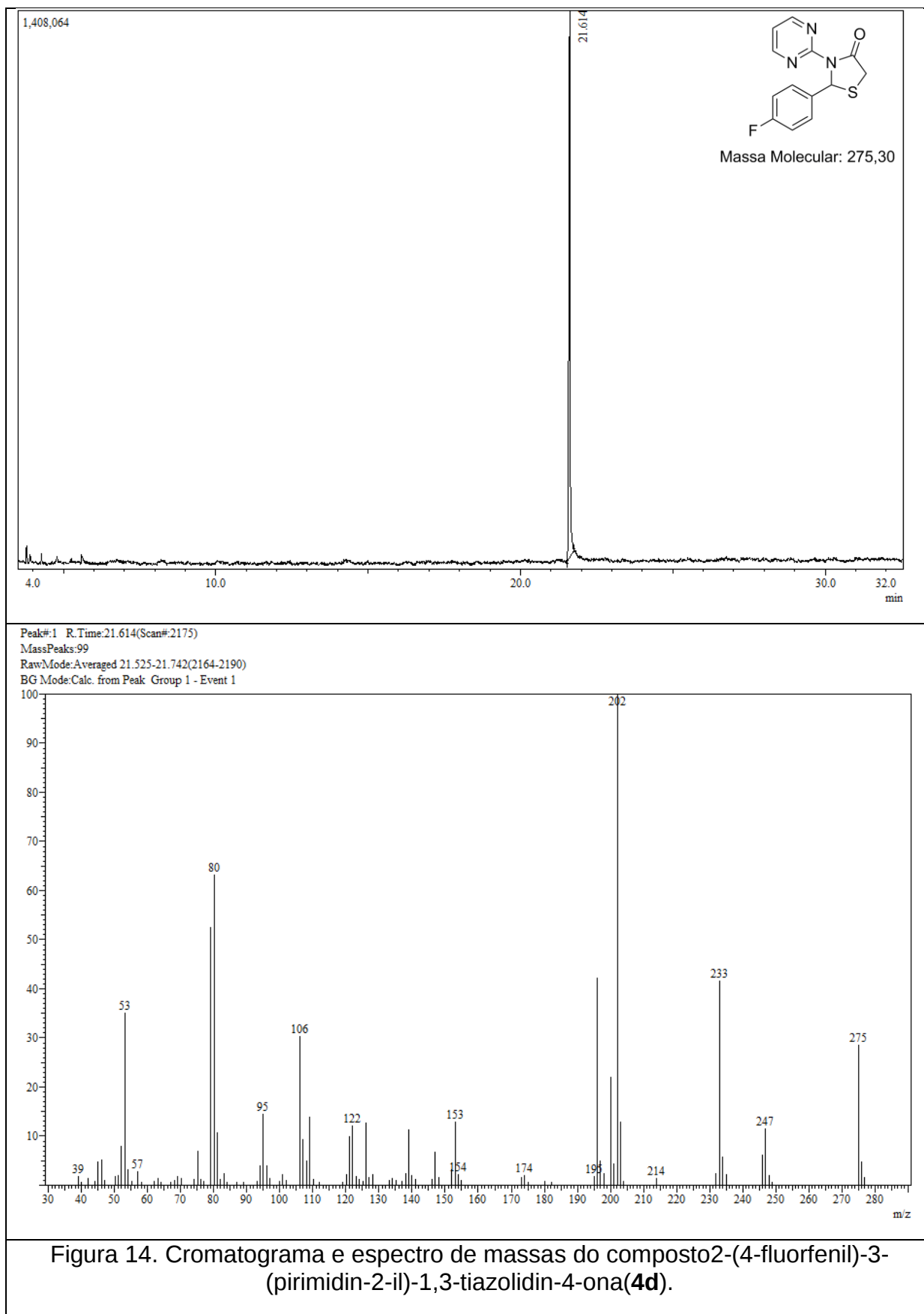
Figura 10. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto 2-(2,3-dimetoxi)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (**4i**) em DMSO-*d*₆.

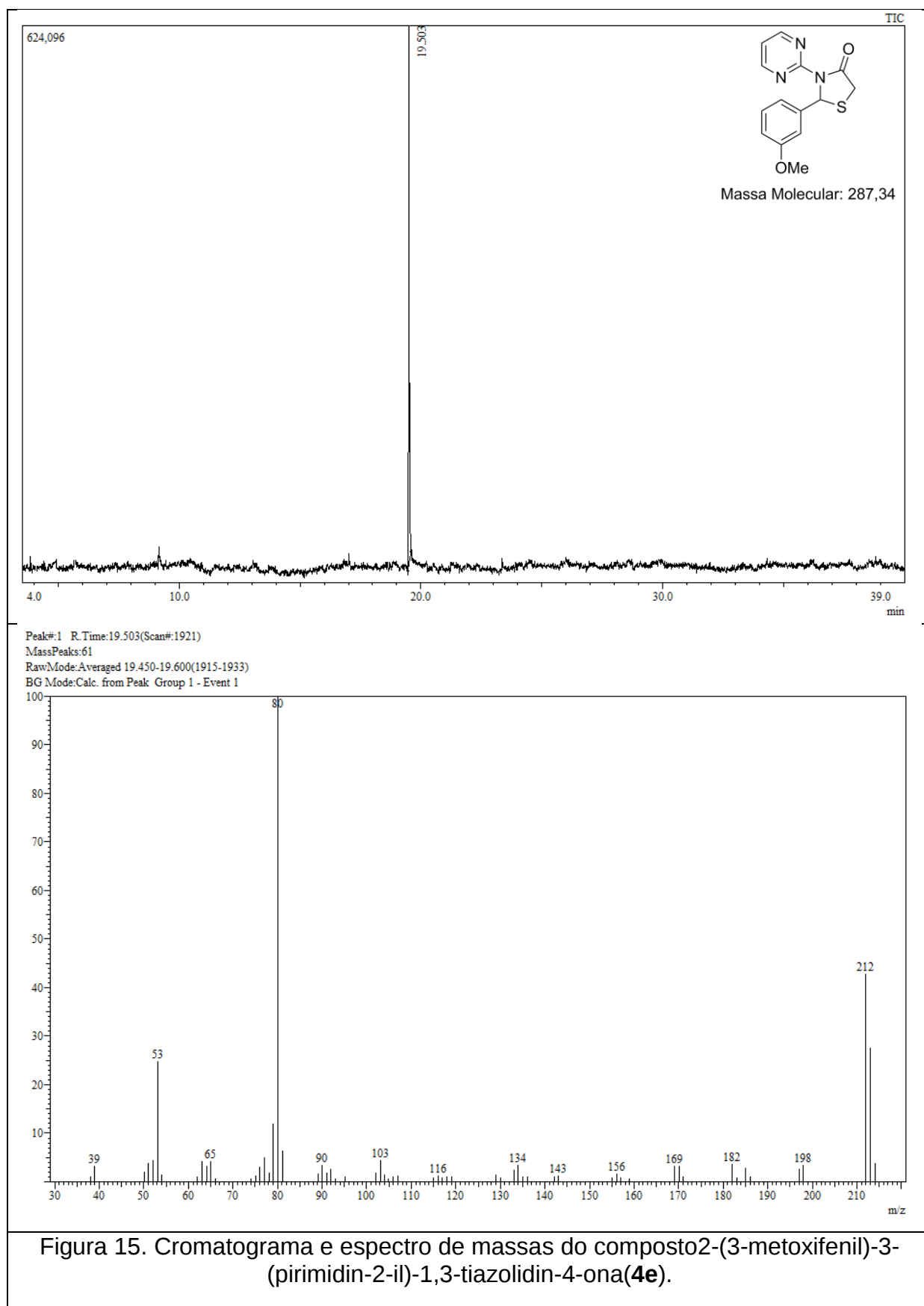
ANEXO II– Cromatogramas e Espectros de CG-
EM dos Compostos 3-(pirimidin-2-il)-tiazolidin-
4-onas.











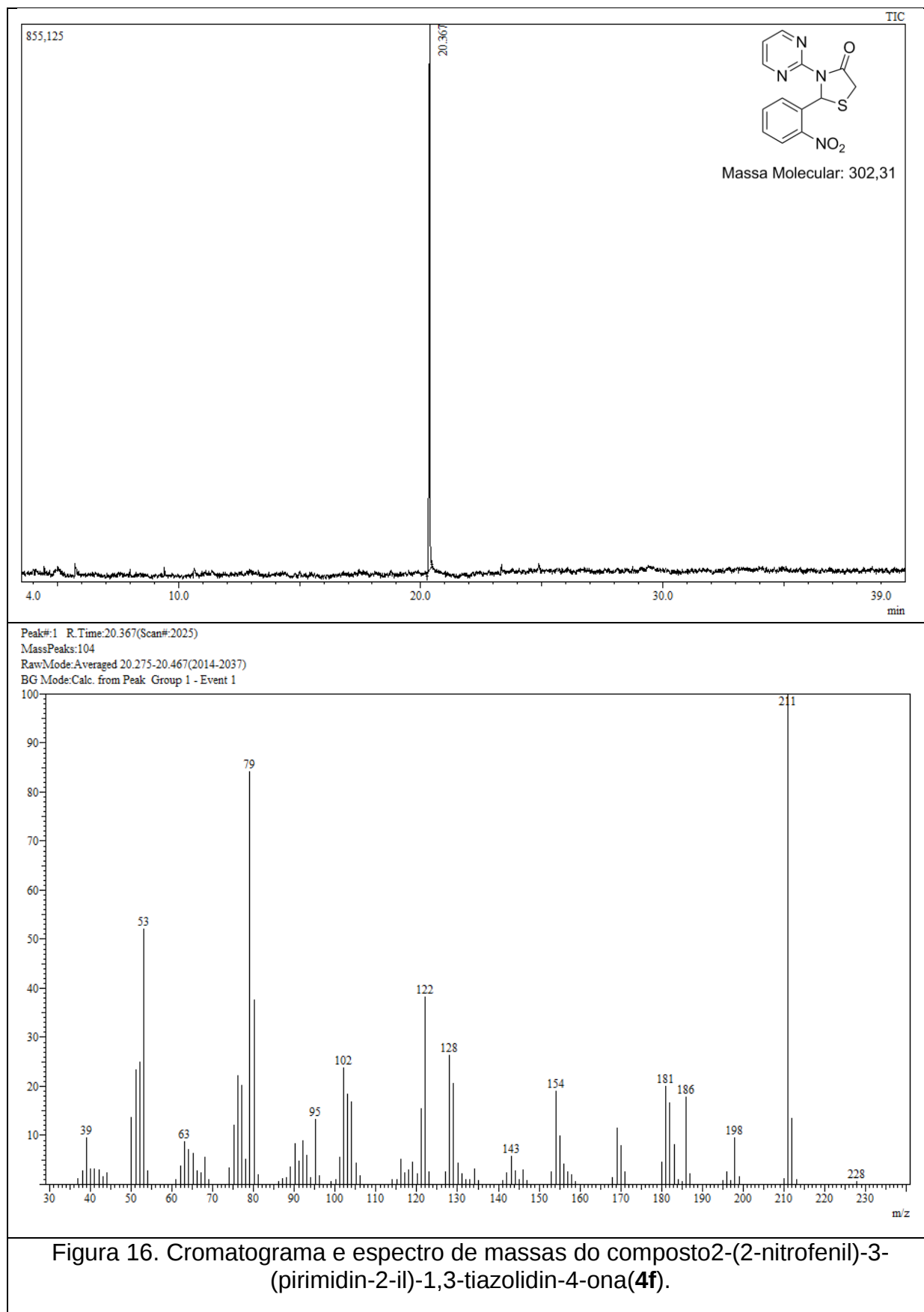
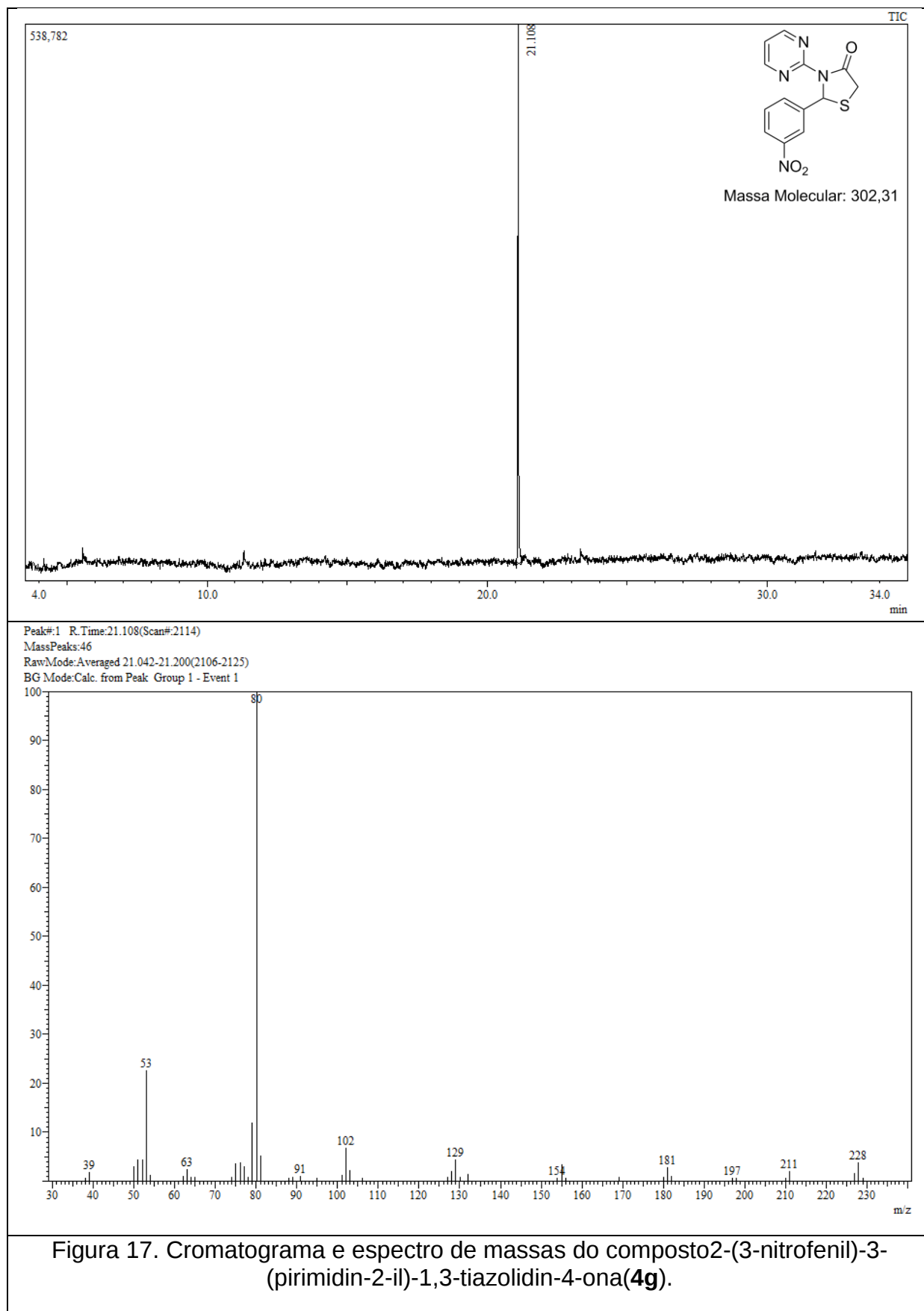
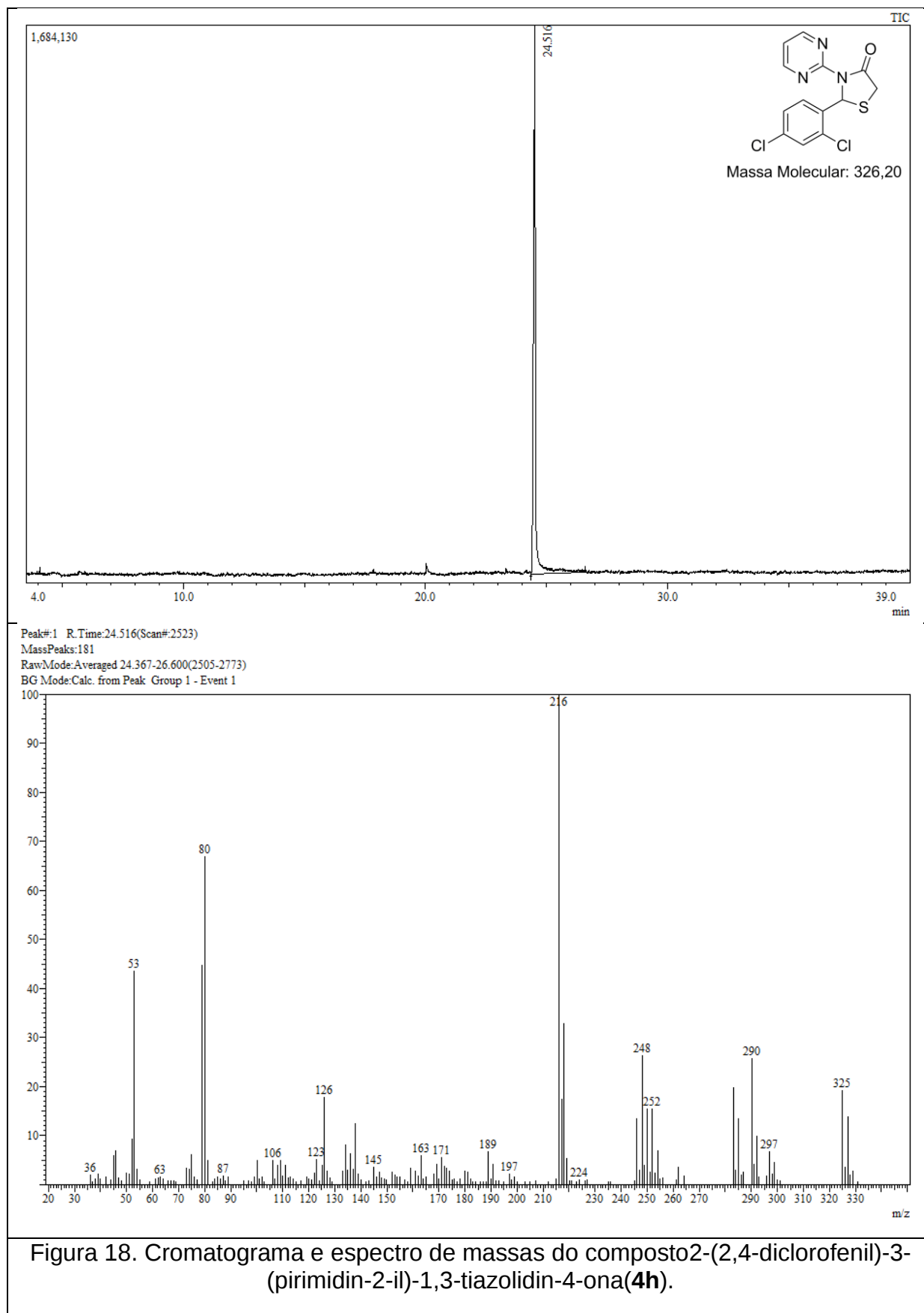


Figura 16. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(2-nitrofenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (**4f**).





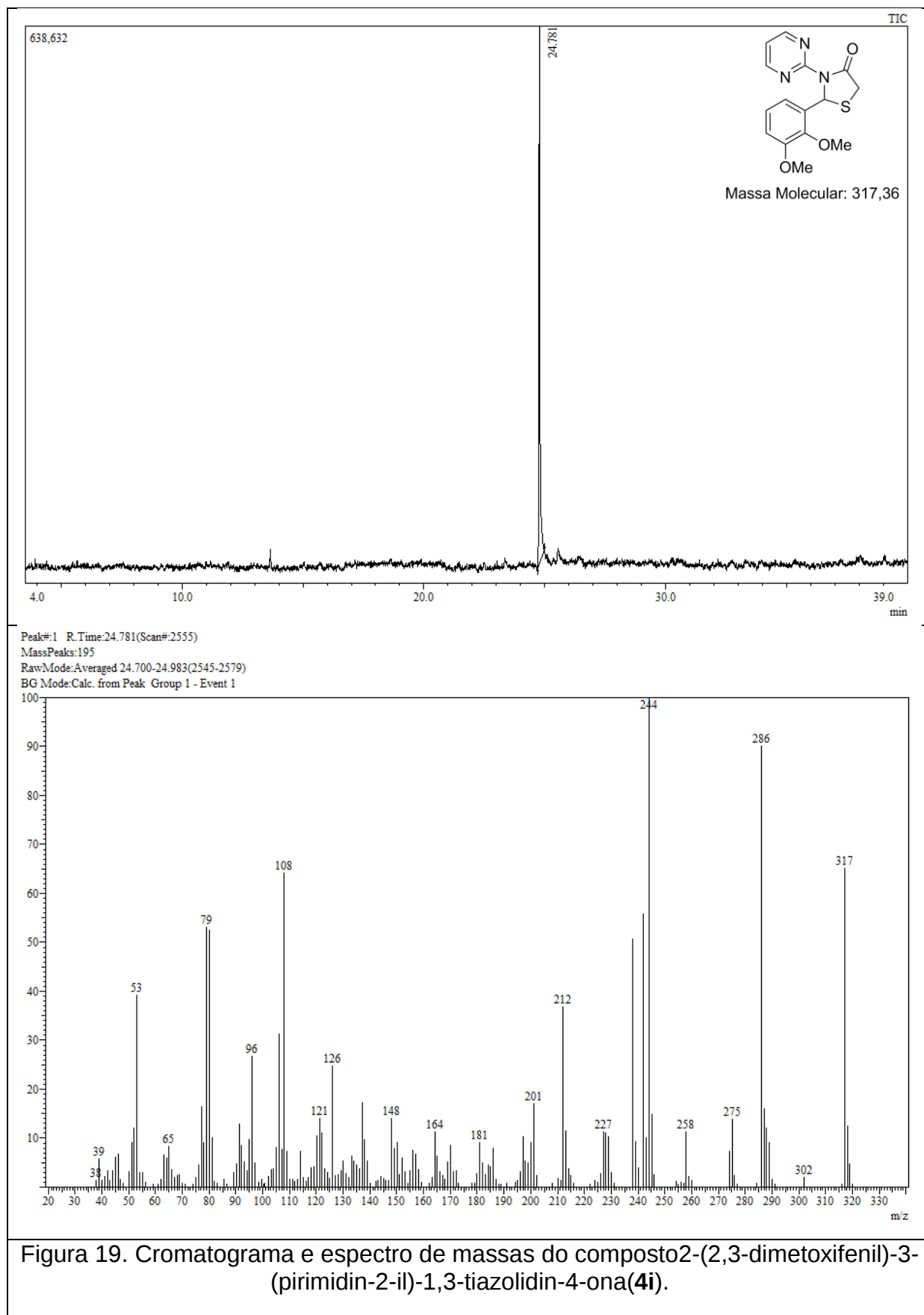
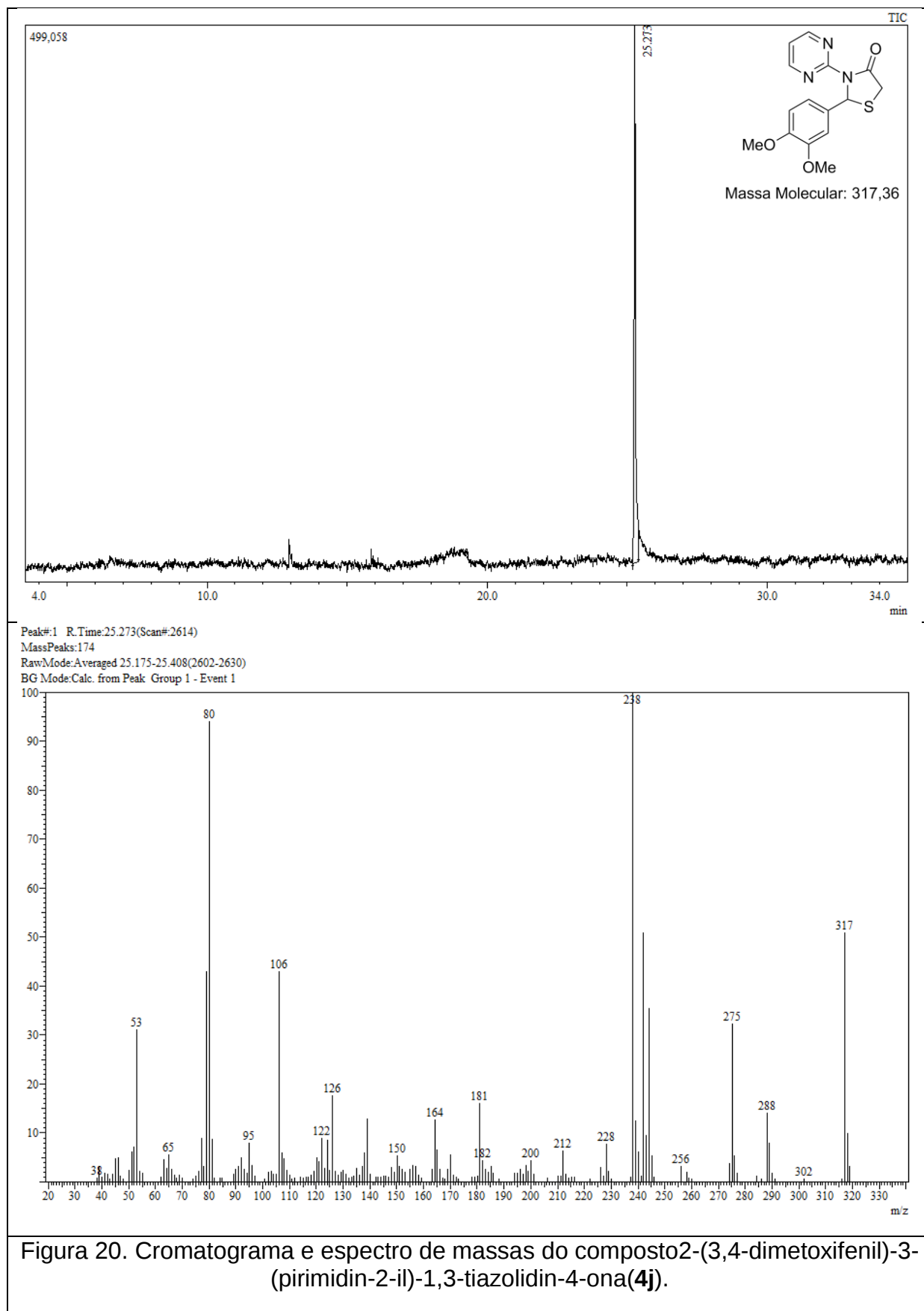
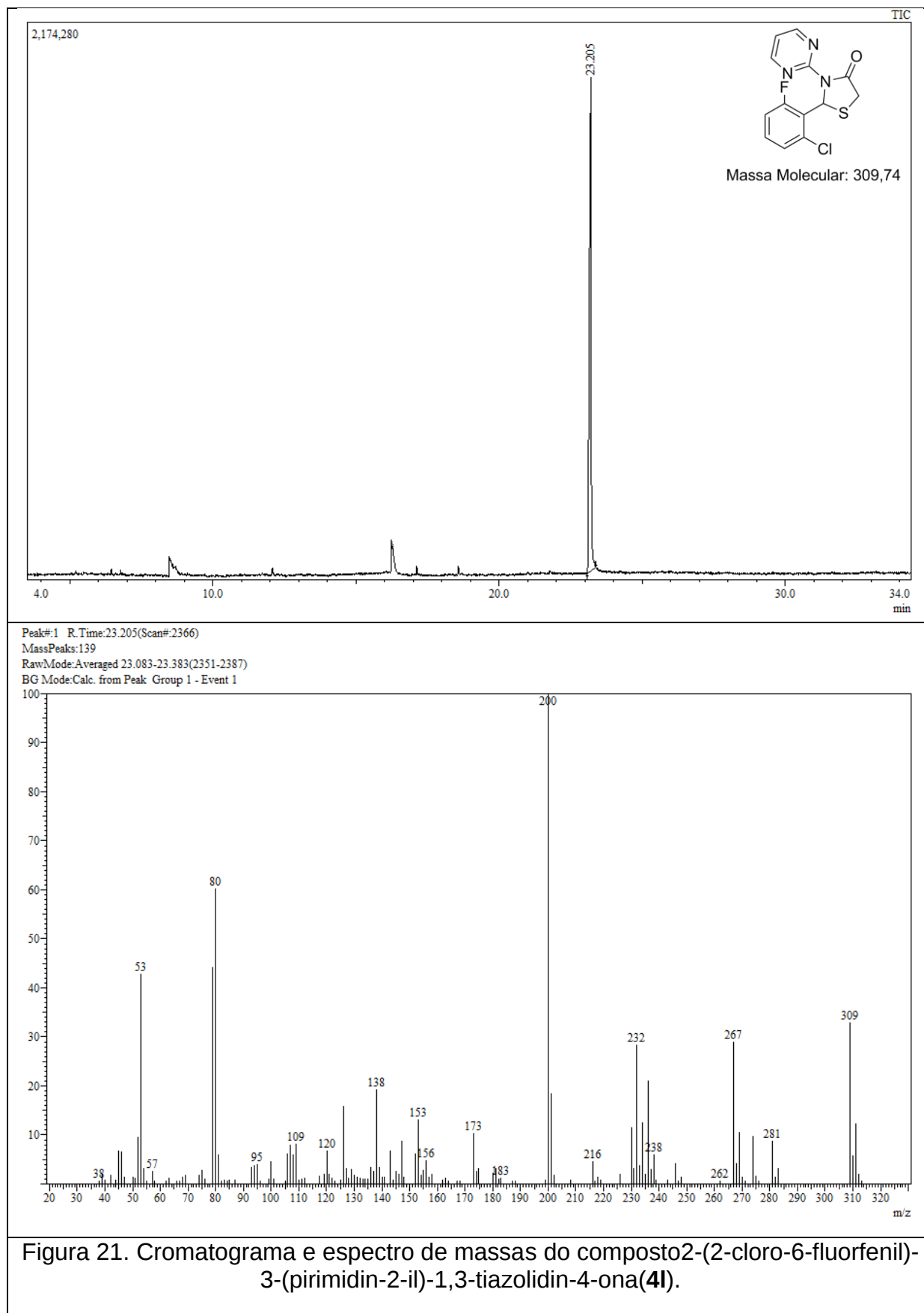


Figura 19. Cromatograma e espectro de massas do composto 2-(2,3-dimetoxifenil)-3-(pirimidin-2-il)-1,3-tiazolidin-4-ona (**4i**).





ANEXO III – Documentos de Submissão,
Aceitação e Licença de Reprodução do Artigo

[Main Menu](#) → [Authoring Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Geonir Siqueira

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*.

Manuscript ID: JBT-13-049

Title: Efficient synthesis and antioxidant evaluation of thiazolidinones from 2-aminopyrimidine

Authors: Campos Jr, José
Gouvea, Daniela
Ribeiro, Camila
Dutra, Filipe
Pereira, Claudio
Stefanello, Francieli
Cunico, Wilson
Siqueira, Geonir

Date Submitted: 21-Mar-2013



Print

[Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.11.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2013. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

[Follow ScholarOne on Twitter](#)[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)



José Coan <coanjunior@gmail.com>

Fwd: JBT-13-049.R1 - Decision

Geonir Machado Siqueira <siqueiragm@gmail.com>

31 de maio de 2013 23:47

Para: Wilson Cunico <wjcunico@yahoo.com.br>, Francieli Stefanello <fmstefanello@gmail.com>, José Coan <coanjunior@gmail.com>, "Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira" <claudiochemistry@gmail.com>

----- Forwarded message -----

From: <rclarson1310@att.net>

Date: 2013/5/31

Subject: JBT-13-049.R1 - Decision

To: siqueiragm@gmail.com

31-May-2013

Dear Dr. Siqueira,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Efficient synthesis and antioxidant evaluation of 2-aryl-3-(pyrimidin-2-yl)-thiazolidinones" in its current form for publication in Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.

Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Within the next few days the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

Please print the form, complete both sides and forward to the Production Department at:

Journal of Biochemical and Molecular Toxicology

Rebecca.Rivard@aptaracorp.com

You will receive your typeset proofs in due course.

Thank you for your contribution.

Sincerely,

Mr. Rob Larson

Journal of Biochemical and Molecular Toxicology

rclarson1310@att.net

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jul 29, 2013

This is a License Agreement between Jose C Campos ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by John Wiley and Sons, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3198241157339
License date	Jul 29, 2013
Licensed content publisher	John Wiley and Sons
Licensed content publication	Journal of Biochemical and Molecular Toxicology
Licensed content title	Efficient Synthesis and Antioxidant Evaluation of 2-Aryl-3-(Pyrimidin-2-yl)-Thiazolidinones
Licensed copyright line	© 2013 Wiley Periodicals, Inc.
Licensed content author	José C. Campos Júnior,Daniela P. Gouvêa,Camila da S. Ribeiro,Filipe S. P. Dutra,Francieli M. Stefanello,Claudio M. P. Pereira,Wilson Cunico,Geonir M. Siqueira
Licensed content date	Jun 24, 2013
Start page	n/a
End page	n/a
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or a society for whom a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular journal (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

1. The materials you have requested permission to reproduce (the "Materials") are protected by copyright.
2. You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sublicensable, non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Materials for the purpose specified in the licensing process. This license is for a one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process. Any form of republication granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before may be distributed thereafter). The Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Material. Any third party material is expressly excluded from this permission.
3. With respect to the Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Materials without the prior permission of the respective copyright owner. You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Materials, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
4. The Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc or one of its related companies (WILEY) or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto.
5. NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
6. WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.

7. You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.

8. IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

9. Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

10. The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.

11. This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.

12. Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt

13. These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.

14. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.

15. WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

16. This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was

misrepresented during the licensing process.

17. This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

Wiley Open Access Terms and Conditions

Wiley publishes Open Access articles in both its Wiley Open Access Journals program [<http://www.wileyopenaccess.com/view/index.html>] and as Online Open articles in its subscription journals. The majority of Wiley Open Access Journals have adopted the [Creative Commons Attribution License](#) (CC BY) which permits the unrestricted use, distribution, reproduction, adaptation and commercial exploitation of the article in any medium. No permission is required to use the article in this way provided that the article is properly cited and other license terms are observed. A small number of Wiley Open Access journals have retained the [Creative Commons Attribution Non Commercial License](#) (CC BY-NC), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Online Open articles - Authors selecting Online Open are, unless particular exceptions apply, offered a choice of Creative Commons licenses. They may therefore select from the CC BY, the CC BY-NC and the [Attribution-NoDerivatives](#) (CC BY-NC-ND). The CC BY-NC-ND is more restrictive than the CC BY-NC as it does not permit adaptations or modifications without rights holder consent.

Wiley Open Access articles are protected by copyright and are posted to repositories and websites in accordance with the terms of the applicable Creative Commons license referenced on the article. At the time of deposit, Wiley Open Access articles include all changes made during peer review, copyediting, and publishing. Repositories and websites that host the article are responsible for incorporating any publisher-supplied amendments or retractions issued subsequently.

Wiley Open Access articles are also available without charge on Wiley's publishing platform, **Wiley Online Library** or any successor sites.

Conditions applicable to all Wiley Open Access articles:

- The authors' moral rights must not be compromised. These rights include the right of "paternity" (also known as "attribution" - the right for the author to be identified as such) and "integrity" (the right for the author not to have the work altered in such a way that the author's reputation or integrity may be damaged).
- Where content in the article is identified as belonging to a third party, it is the obligation of the user to ensure that any reuse complies with the copyright policies of the owner of that content.
- If article content is copied, downloaded or otherwise reused for research and other purposes as permitted, a link to the appropriate bibliographic citation (authors, journal,

article title, volume, issue, page numbers, DOI and the link to the definitive published version on Wiley Online Library) should be maintained. Copyright notices and disclaimers must not be deleted.

- Creative Commons licenses are copyright licenses and do not confer any other rights, including but not limited to trademark or patent rights.
- Any translations, for which a prior translation agreement with Wiley has not been agreed, must prominently display the statement: "This is an unofficial translation of an article that appeared in a Wiley publication. The publisher has not endorsed this translation."

Conditions applicable to non-commercial licenses (CC BY-NC and CC BY-NC-ND)

For non-commercial and non-promotional purposes individual non-commercial users may access, download, copy, display and redistribute to colleagues Wiley Open Access articles. In addition, articles adopting the CC BY-NC may be adapted, translated, and text- and data-mined subject to the conditions above.

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of non-commercial Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee. Commercial purposes include:

- Copying or downloading of articles, or linking to such articles for further redistribution, sale or licensing;
- Copying, downloading or posting by a site or service that incorporates advertising with such content;
- The inclusion or incorporation of article content in other works or services (other than normal quotations with an appropriate citation) that is then available for sale or licensing, for a fee (for example, a compilation produced for marketing purposes, inclusion in a sales pack)
- Use of article content (other than normal quotations with appropriate citation) by for-profit organizations for promotional purposes
- Linking to article content in e-mails redistributed for promotional, marketing or educational purposes;
- Use for the purposes of monetary reward by means of sale, resale, license, loan, transfer or other form of commercial exploitation such as marketing products
- Print reprints of Wiley Open Access articles can be purchased from:
corporatesales@wiley.com

The modification or adaptation for any purpose of an article referencing the CC BY-

NC-ND License requires consent which can be requested from
RightsLink@wiley.com.

Other Terms and Conditions:

BY CLICKING ON THE "I AGREE..." BOX, YOU ACKNOWLEDGE THAT YOU HAVE READ AND FULLY UNDERSTAND EACH OF THE SECTIONS OF AND PROVISIONS SET FORTH IN THIS AGREEMENT AND THAT YOU ARE IN AGREEMENT WITH AND ARE WILLING TO ACCEPT ALL OF YOUR OBLIGATIONS AS SET FORTH IN THIS AGREEMENT.

v1.8

If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK501077532. Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.

**Make Payment To:
Copyright Clearance Center
Dept 001
P.O. Box 843006
Boston, MA 02284-3006**

For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: customercare@copyright.com or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.
