

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
BRUCE SOARES CARDOSO

**Síntese e avaliação biológica de derivados 5-arilidenosbarbitúrico obtidos via
condensação de Knoevenagel**

Brasília - DF
2025

BRUCE SOARES CARDOSO

**Síntese e avaliação biológica de derivados 5-arilidenosbarbitúrico obtidos via
condensação de Knoevenagel**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Patologia Molecular da Faculdade de Medicina –
Universidade de Brasília, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em patologia molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Machado Ramos

Brasília – DF

2025

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ss Soares Cardoso, Bruce
Síntese e avaliação biológica de derivados
5-arilidenos-barbitúrico obtidos via condensação de
Knoevenagel / Bruce Soares Cardoso; orientador José Raimundo
Corrêa; co-orientador Luciana Machado Ramos. Brasília, 2025.
133 p.

Tese (Doutorado em Patologia Molecular) Universidade de
Brasília, 2025.

1. Arilidenos. 2. Catálise básica. 3. Polietiloamina. 4.
Líquidos iônicos. 5. Ácido barbitúrico. I. Raimundo Corrêa,
José, orient. II. Machado Ramos, Luciana, co-orient. III.
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

Ata Nº: 09/2024

Aos **quatorze** dias do mês de **julho** do ano de dois mil e **vinte e cinco**, instalou-se a banca examinadora de Tese de Doutorado do(a) aluno(a) **Bruce Soares Cardoso**, matrícula **160165628**. A banca examinadora foi composta pelos professores **Dra. Patricia Elaine de Almeida / Membro Externo à Instituição/ UFJF**, **Dr. Leo Kei Iwai/ Membro Externo à Instituição/IB/SP**, **Dr. Carlos André Ornelas Ricart/ Membro Interno ao Programa/ UnB**, **Dr. Vicente de Paula Martins/ Membro Externo ao Programa/ UnB, (Suplente)** e **Dr. José Raimundo Corrêa/Orientador/Presidente/ UnB**. O(A) discente apresentou o trabalho intitulado: **"Síntese e avaliação biológica de derivados 5-arilidenosbarbitúrico obtidos via condensação de Knoevenagel"**.

Concluída a exposição, procedeu-se a arguição do(a) candidato(a), e após as considerações dos examinadores o resultado da avaliação do trabalho foi:

Pela aprovação do trabalho;

Pela aprovação do trabalho, com revisão de forma, indicando o prazo de até 30 dias para apresentação definitiva do trabalho revisado;

Pela reformulação do trabalho, indicando o prazo de (Nº DE MESES) para nova versão;

Pela reprovação do trabalho, conforme as normas vigentes na Universidade de Brasília.

Conforme os Artigos 34, 39 e 40 da Resolução 0080/2021 - CEPE, o(a) candidato(a) não terá o título se não cumprir as exigências acima.

Dr. José Raimundo Corrêa - UnB
(PRESIDENTE)

Dra. Patricia Elaine de Almeida- UFJF
(MEMBRO EXTERNO À INSTITUIÇÃO)

Dr. Leo Kei Iwai - IB/SP
(MEMBRO EXTERNO À INSTITUIÇÃO)

Dr. Carlos André Ornelas Ricart- UnB
(MEMBRO INTERNO AO PROGRAMA)

Dr. Vicente de Paula Martins- UnB
(MEMBRO EXTERNO AO PROGRAMA - SUPLENTE)

Bruce Soares Cardoso

(Doutorando)



Documento assinado eletronicamente por **Jose Raimundo Correa, Professor(a) de Magistério Superior da Faculdade de Medicina**, em 22/07/2025, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Andre Ornelas Ricart, Professor(a) de Magistério Superior da Faculdade de Medicina**, em 28/07/2025, às 09:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Leo Kei Iwai, Usuário Externo**, em 30/07/2025, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Elaine de Almeida, Usuário Externo**, em 30/07/2025, às 21:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



Documento assinado eletronicamente por **Bruce Soares Cardoso, Usuário Externo**, em 01/08/2025, às 12:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria 0003/2016 da Universidade de Brasília.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.unb.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **12833493** e o código CRC **7CD59EB9**.

Aos meus mestres, professora Dra. Luciana Machado Ramos e professor Dr. José Raimundo Corrêa, dedico a realização dessa tese como sinal de toda a minha gratidão por terem me aceitado como seu orientando e compartilhado comigo, de forma tão generosa, tantos dos seus conhecimentos.

Dedico ainda, à minha família, pela incansável determinação para me conceder a oportunidade libertadora de estudar e, assim, por meio da educação, ampliar minhas perspectivas e possibilidades para elaborar e realizar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, seja compartilhando de seus conhecimentos, de sua infraestrutura ou de seu tempo, seja dando suporte emocional, material e técnico necessários à sua realização plena.

Agradeço, ainda, à UEG, à FAPEG e CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

Síntese e avaliação biológica de derivados 5-arilidenos-barbitúrico obtidos via condensação de Knoevenagel.

A síntese orgânica de compostos, quando adequada aos postulados da química verde, é um caminho prático, rápido, de baixo custo e sustentável para obtenção de novas moléculas com propriedades de interesse comercial, inclusive farmacológica. Os derivados 5-arilidenos barbitúricos, que embora já acumulem relatos de sua síntese por diferentes metodologias, carecem de estudos biológicos que investiguem suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Dez derivados 5-arilidenos barbitúricos foram sintetizados via reação de Knoevenagel otimizada, adotando como catalisador a enzima sintética polietilenoimina suportada em líquido iônico (PEI.LI). Os 10 produtos foram purificados por recristalização em água a 60 °C seguida de cromatografia em camada delgada e espectroscopia em ultravioleta/visível e ainda tiveram seus pontos de fusão aferidos e rendimentos calculados. A caracterização dos produtos ocorreu pela concatenação de técnicas de espectroscopia de infravermelho e de ressonância magnética nuclear. Adicionalmente, foram avaliadas suas atividades biológicas realizando o teste de atividade antioxidante por meio do ensaio de sequestro do radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), os testes de atividade antibacteriana por meio dos ensaios de antibiograma, concentração inibitória mínima (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) e o teste de viabilidade de fibroblastos foi feito por ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). O processo de otimização das condições reacionais da reação de Knoevenagel proposta, obteve-se as seguintes condições reacionais ideais e adequadas aos postulados da química verde: mistura de 1 mmol dos reagentes 1:1 e 50 mg de PEI.LI, solubilizada em 5 mL de água, a 80°C, por 4 horas e sob agitação magnética. A reação otimizada mostrou-se satisfatória para produção de compostos com bons rendimentos, que variaram de 68-99%. Quando avaliadas as propriedades biológicas dos 10 compostos 5-arilidenos barbitúricos gerados, ficou evidente o potencial promissor dessas moléculas, especialmente do composto nitrado, o derivado **3** (5-(2-hidroxi)benzilideno de ácido barbitúrico), que apresentou atividade bactericida de espectro ampliado tanto contra a bactéria gram-negativa *E. coli* (CMI $\leq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$; CMB $< 2000 \mu\text{g mL}^{-1}$) como contra o bacilo gram-positivo *B. subtilis* (CMI $\leq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$; CMB $< 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Quando avaliada a atividade antifúngica, apenas os derivados 5-arilidenos barbitúricos **1** e **3** apresentaram atividade moderada contra a levedura *C. albicans* (CMI $\geq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Adicionalmente, os derivados **1** (5-benzilideno de ác. barbitúrico) e **5** (5-(3-nitro) benzilideno de ác. barbitúrico) mostraram atividade antioxidante e IC₅₀ (**1** - AAO%: 70,44; IC₅₀: 58,02 / **5** - AAO%: 69,95; IC₅₀: 57,82) semelhantes as do controle positivo quercetina (AAO%: 95,55; IC₅₀: 52,02) na maior concentração testada (400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Por fim, na avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos, os compostos 5-arilidenos barbitúricos testados não mostram citotoxicidade estatisticamente relevantes ($P \leq 0,05$). O estudo teórico estrutura-atividade usando a teoria do funcional da densidade, por meio do funcional de troca e correlação híbrido M062X e utilizando dos conjuntos de base 6-311++G(d,p) se mostrou eficaz na descrição qualitativa quanto aos descritores geométricos e eletrônicos dos compostos em questão. Diante dos resultados obtidos, novas investigações dessas e de outras propriedades biológicas, toxicológicas e farmacológicas desses compostos serão promissoras.

Palavras-chave: Síntese orgânica. Catálise básica. Polietilenoamina. Líquidos iônicos. Ácido barbitúrico.

ABSTRACT

Synthesis and biological evaluation of 5-arylidene-barbiturate derivatives obtained via Knoevenagel condensation.

The organic synthesis of compounds, when adapted to the postulates of green chemistry, is a practical, fast, low-cost and sustainable way to obtain new molecules with properties of commercial interest, including pharmacological ones. The 5-arylidene barbiturate derivatives, although there are already reports of their synthesis using different methodologies, lack biological studies that investigate their pharmacological and toxicological properties. Ten barbiturate 5-arylidene derivatives were synthesized via an optimized Knoevenagel reaction, adopting the synthetic enzyme polyethyleneimine (PEI.IL) supported in ionic liquid as catalyst. The 10 products were purified by recrystallization in water at 60 °C followed by thin layer chromatography and ultraviolet/visible spectroscopy and had their melting points measured and yields calculated. The characterization of the products occurred through the concatenation of infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. Additionally, their biological activities were evaluated by performing the antioxidant activity test using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, antibacterial activity tests using the antibiogram, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) assays and the fibroblast viability test was carried out using a standard assay using nitrogen bromide. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT). The process of optimizing the reaction conditions of the proposed Knoevenagel reaction obtained the following ideal reaction conditions, suitable for the postulates of green chemistry: mixture of 1 mmol of 1:1 reagents and 50 mg of PEI.IL, solubilized in 5 mL of water, at 80°C, for 4 hours and under magnetic stirring. The optimized reaction proved to be satisfactory for producing compounds with good yields, which ranged from 68-99%. When evaluating the biological properties of the 10 5-arylidene barbiturate compounds generated, the promising potential of these molecules became evident, especially the nitrated compound, the derivative 3 (5-(2-hydroxy)benzylidene of barbituric acid), which showed broad-spectrum bactericidal activity against both the gram-negative bacterium *E. coli* (MIC \leq 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; MBC $<$ 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) as well as against the gram-positive bacillus *B. subtilis* (MIC \leq 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; MBC $<$ 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). When evaluating antifungal activity, only the 5-arylidene barbiturate derivatives 1 and 3 showed moderate activity against the yeast *C. albicans* (MIC \geq 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Additionally, derivatives 1 (5-benzylidene of barbiturate acid) and 5 (5-(3-nitro)benzylidene of barbiturate acid) showed antioxidant activity and IC50 (1 - AAO%: 70.44; IC50: 58.02 / 5 - AAO%: 69.95; IC50: 57.82) similar to those of the positive control quercetin (AAO%: 95.55; IC50: 52.02) at the highest concentration tested (400 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Finally, in the evaluation of cytotoxicity in mammalian cells, the 5-arylidene barbiturate compounds tested do not show statistically relevant cytotoxicity ($P \leq 0.05$). The theoretical structure-activity study using density functional theory, through the hybrid exchange and correlation functional M062X and using the basis sets 6-311++G(d,p) proved to be effective in the qualitative description of the geometric and electronic descriptors of the compounds in question. Given the results obtained, further investigations of these and other biological, toxicological and pharmacological properties of these compounds will be promising.

Keywords: Organic synthesis. Basic catalysis. Polietilenoamine. Ionic liquids. Barbituric acid.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Núcleo de um derivado de 5-benzilideno-barbitúrico..... | 21 |
| Figura 2. Doze princípios da química verde propostos por Anastas e Warner (1998)... | 25 |
| Figura 3. Estrutura geral do ácido barbitúrico e alguns de seus derivados comerciais 5-substituídos..... | 37 |
| Figura 4 – Representação do receptor GABA A e dos sítios de ligação de seus ligantes, incluindo os barbitúricos..... | 38 |
| Figura 5. Núcleo pirimidina e alguns de seus derivados naturais e sintéticos..... | 39 |
| Figura 6. Cátions e ânions presentes em líquidos iônicos..... | 41 |
| Figura 7. Distribuição de poços-teste e poços-controle na placa de 96 poços para teste de concentração inibitória mínima dos derivados 5-arilidenos de ácido barbitúrico.... | 54 |
| Figura 8. Curva padrão para DPPH..... | 56 |
| Figura 9. Curva padrão para teste de atividade antioxidante dos compostos 5-arilidenos barbitúricos..... | 79 |
| Figura 10. Avaliação de citotoxicidade de 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico pelo teste de viabilidade de fibroblastos usando o método MTT | 80 |
| Figura 11 Representação da estrutura molecular da numerada do 5-arilidenos barbitúricos | 81 |
| Figura 12. Gráfico de escores representando as moléculas ativas e inativas. (b) Gráfico dos pesos para os descritores que exercem influência a atividade da <i>Bacillus subtilis</i> | 82 |
| Figura 13. Gráfico de escores para as moléculas ativas e inativas, (b) Gráfico dos pesos para os descritores que influenciam a atividade do <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) | 85 |
| Figura 14. Gráfico de escores para as moléculas ativas e inativas, (b) Gráfico dos pesos para os descritores que influenciam a atividade do <i>E. Coli</i> (ATCC 25312) | 87 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|----|
| Esquema 1. Metodologias de condensação descritas na literatura | 23 |
| Esquema 2. Reações de condensação intramoleculares..... | 24 |
| Esquema 3. Condensação de aminoácidos que leva à formação de polímeros peptídicos, as proteínas..... | 25 |
| Esquema 4. Reação de condensação aldólica..... | 26 |
| Esquema 5. Esquema geral para a reação de condensação de Knoevenagel empregada na síntese de 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico..... | 28 |
| Esquema 6. Síntese de 5-arilidenos-barbitúricos sob catálise nanomagnética..... | 29 |
| Esquema 7. Síntese de 5-arilideno-barbitúrico com propriedade sedativa..... | 29 |
| Esquema 8. Primeira etapa da síntese de 5-arilidenos-barbitúricos clorados..... | 30 |
| Esquema 9. Síntese de derivados 5-arilideno-barbitúricos por irradiação infravermelha..... | 31 |
| Esquema 10. Primeira etapa da síntese de inibidores da enzima purina nucleosídeo fosforilase de <i>P. falciparum</i> | 32 |
| Esquema 11. Síntese de derivados 5-arilideno-barbitúricos aceptores de ânions fluoretos..... | 32 |
| Esquema 12. Síntese de 4-arilideno-barbitúricos e 5-arilideno-tiobarbitúricos usando líquidos iônicos baseados em DABCO como catalisadores..... | 33 |
| Esquema 13. Síntese de 5-arilideno-barbitúricos sem solvente e com acetato de sódio em quantidades estequiométricas com os reagentes..... | 33 |
| Esquema 14. Síntese de derivados do ácido barbitúrico por irradiação de micro-ondas | 34 |
| Esquema 15. Síntese de derivados do ácido barbitúrico por irradiação de micro-ondas..... | 34 |
| Esquema 16. Síntese de derivados do ácido barbitúrico sob catálise de DBSA..... | 35 |

| | |
|--|----|
| Esquema 17. Síntese de derivados do ácido barbitúrico sob catálise de [bmin]BF ₄ | 35 |
| Esquema 18. Síntese de derivados do ácido barbitúrico sob catálise de nanopartículas de níquel estabilizadas em PVP..... | 36 |
| Esquema 19. Reação de ativação da PEI por alquilação..... | 43 |
| Esquema 20. Reação de marcação iônica da PEI..... | 43 |
| Esquema 21. Síntese do catalisador líquido iônico clorado | 49 |
| Esquema 22. Síntese do catalisador PEI.Li | 49 |
| Esquema 23. Síntese do catalisador líquido iônico MAI.Cl ⁻ | 50 |
| Esquema 24. Síntese do catalisador líquido iônico MSI | 50 |
| Esquema 25. Síntese do catalisador líquido iônico MAI.Fe ₂ Cl ₇ | 51 |
| Esquema 26. Variação da reação de Knoevenagel adotando ácido barbitúrico como β-cetoéster para síntese de 5-arilidenos..... | 51 |
| Esquema 27. Condições reacionais otimizadas para variação da reação de condensação de Knoevenagel adotando ácido barbitúrico para síntese de derivados 5-arilidenos..... | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Análise do efeito do catalisador na obtenção do produto | 62 |
| Tabela 2. Análise do efeito do solvente na obtenção do produto | 63 |
| Tabela 3. Análise do efeito do tempo na obtenção do produto | 64 |
| Tabela 4. Análise do efeito da quantidade de catalisador na obtenção do produto | 65 |
| Tabela 5. Análise do efeito da temperatura na obtenção do produto | 65 |
| Tabela 6. Análise do excesso dos reagentes de partida no meio reacional na obtenção do produto | 66 |
| Tabela 7. Relação dos derivados 5-arilidenos-barbitúricos sintetizados..... | 67 |
| Tabela 8. Antibiógramas dos 10 derivados de 5-arilidenos barbitúricos..... | 75 |
| Tabela 9. Determinação da atividade antibacteriana dos compostos 5-arilidenos barbitúricos | 76 |
| Tabela 10. Determinação da atividade antifúngica dos compostos 5-arilidenos barbitúricos | 77 |
| Tabela 11. Valores dos descritores moleculares calculadas utilizando o método de DFT M062X/6-311++G(d,p) e selecionadas pelo PCA perante a <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633). As energia de HOMO e a lacuna de energia (GAP) são medidas em hartree (Ha) | 83 |
| Tabela 12. Coeficientes de correlação de Person entre os descritores eletrônicos..... | 84 |
| Tabela 13. Valores das propriedades geométricas e eletrônica calculadas com método de DFT M062X/6-311++G**(d,p) selecionadas pelo PCA para o <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)..... | 85 |
| Tabela 14. Coeficientes de correlação entre os descritores GAP, ângulos A_1 e A_2 , torção T_1 e ordem de ligação O.L. 24..... | 86 |
| Tabela 15: Valores das propriedades geométricas e eletrônica calculadas com método de DFT M062X/6-311++G**(d,p) selecionadas pelo PCA para a <i>E. Coli</i> | 88 |

| | |
|--|----|
| Tabela 16. Coeficientes de correlação entre os descritores energia de LUMO, e as ordens de ligação 22 e 17 | 89 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------|---|
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| CLSI | <i>National Committee for Clinical and Laboratory Standards</i> |
| CMB | Concentração Mínima Bactericida |
| CFI | Concentração Mínima Inibitória |
| <i>d</i> | Dupleto |
| DABCO | 1,4-diazabicyclo[2.2.2] octano |
| <i>dd</i> | Duplo dupleto |
| DL ₅₀ | Dose Letal 50 |
| DMSO- <i>d</i> ₆ | Dimetilsulfóxido deuterado |
| EM | Espectroscopia de Massa |
| EtOH | Etanol |
| FT | Fourier Transform |
| IV | Infravermelho |
| <i>J</i> | Constante de acoplamento |
| LIs | Líquidos iônicos |
| <i>m</i> | Multiplete |
| MAI.Cl ⁻ | Metil-acetil-imidazol |
| PEI.Li | Polietilenoimina suportada em líquido iônico clorado |
| P.F | Ponto de Fusão |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| <i>p</i> -TSOH | Ácido <i>p</i> -toluenossulfônico |
| <i>q</i> | Quarteto |
| ¹³ C RMN | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono |
| ¹ H RMN | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| <i>s</i> | simpleto |
| T.A | Temperatura ambiente |
| <i>t</i> | Triplete |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônia |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 23 |
| 2.1 REAÇÕES DE CONDENSAÇÃO | 23 |
| 2.1.1 Reação aldólica | 26 |
| 2.1.2 Reação de condensação de Knoevanagel | 28 |
| 2.2 ÁCIDO BARBITÚRICO | 37 |
| 2.3 DERIVADOS 5-ARILIDENOS BARBITÚRICOS | 38 |
| 2.4 LÍQUIDOS IÔNICOS | 40 |
| 2.5 ENZIMA SINTÉTICAS | 42 |
| 2.5.1 Polietilenoimina ativada em líquido iônico clorado | 42 |
| 2.6 ESTUDO <i>IN SILICO</i> DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE | 44 |
| 3 OBJETIVOS | 46 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 46 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 46 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 47 |
| 4.1 SÍNTESE DE DERIVADOS 5-ARILIDENOS BARBITÚRICOS | 47 |
| 4.1.1 Reagentes e sistemas | 47 |
| 4.1.2 Purificação dos derivados 5-arilidenos barbitúricos | 47 |
| 4.1.2.1 Recristalização | 47 |
| 4.1.2.2 Cromatografia em camada delgada e espectroscopia UV-VIS | 47 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS 5-ARILIDENOS BARBITÚRICOS | 48 |
| 4.2.1 Espectroscopia IV | 48 |
| 4.2.2 Espectroscopia de RMN H^1/C^{13} | 48 |
| 4.2.3 Síntese dos líquidos iônicos | 49 |
| 4.2.3.1 Síntese de polietilenoimina marcada com líquido iônico clorado | 49 |
| 4.2.3.2 Síntese de MAI.Cl (1-Metil-3-acetil-imidazol). | 50 |
| 4.2.3.3 Síntese de MSI (1-metil-3-(3-sulfopropil) imidazólio zwitteriônico) | 50 |
| 4.2.3.4 Síntese MAI.Fe ₂ Cl ₇ (Heptato-bis-ferrato de 1-metil-3-carboximetilimidazólio) .. | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.4 A reação trivial | 51 |
| 4.3 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA | 52 |
| 4.3.1 Testes de atividade antibacteriana | 52 |
| 4.3.1.1 Linhagens | 52 |
| 4.3.1.2 Antibiograma | 52 |
| 4.3.1.3 Ensaio de inibição do crescimento | 52 |
| 4.3.2 Testes de atividade antifúngica | 54 |
| 4.3.2.1 Levedura | 54 |
| 4.3.2.3 Ensaio de inibição do crescimento | 55 |
| 4.3.3 Testes de atividade antioxidante | 56 |
| 4.3.3.1 A curva padrão de DPPH | 56 |
| 4.3.3.2 Preparo das soluções e montagem das placas | 57 |
| 4.3.3.3 Cálculo do percentual de atividade antioxidante (AAO%) | 57 |
| 4.3.3.4 Cálculo da metade da concentração inibitória máxima (IC ₅₀) | 57 |
| 4.3.4 Teste de citotoxicidade | 58 |
| 4.3.4.1 Manutenção das linhagens celulares de fibroblastos | 58 |
| 4.3.4.2 Teste de Viabilidade de fibroblastos pelo ensaio MTT | 58 |
| 4.4 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE | 59 |
| 4.4.1 Procedimentos Computacionais: Análises Conformacionais e Otimização de Geometria | 59 |
| 4.4.2 Descritores moleculares | 60 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 62 |
| 5.1 AVALIAÇÃO DOS CATALISADORES | 62 |
| 5.2 AVALIAÇÃO DOS SOLVENTES | 63 |
| 5.3 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO | 64 |
| 5.4 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE CATALISADOR | 64 |
| 5.5 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA | 65 |
| 5.6 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE REAGENTES | 65 |
| 5.7 CARACTERIZAÇÃO DOS 5-ARILIDENOS BARBITÚRICOS | 69 |
| 5.7.1 Caracterização do composto 5-benzilideno de ác. Barbitúrico | 69 |
| 5.7.2 Caracterização do composto 5-(3-nitro)benzilideno de ácido barbitúrico | 69 |
| 5.7.3 Caracterização do composto 5-(4-nitro)benzilideno de ácido barbitúrico | 70 |

| | |
|--|------------|
| 5.7.4 Caracterização do composto 5-(4-cloro)benzilideno de ácido barbitúrico | 70 |
| 5.7.5 Caracterização do composto 5-(2-hidroxi)benzilideno de ácido. Barbitúrico . | 71 |
| 5.7.6 Caracterização do composto 5-(4-metoxi)benzilideno de ácido barbitúrico | 71 |
| 5.7.7 Caracterização do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxi)benzilideno de ácido barbitúrico | 72 |
| 5.7.8 Caracterização do composto 5-(4-metil)benzilideno de ácido barbitúrico | 73 |
| 5.7.9 Caracterização do composto 5-(4-dimetilamino)benzilideno de ácido barbitúrico | 73 |
| 5.7.10 Caracterização do composto 5-(1,3-benzodioxol-5-carboxialdeído)benzilideno de ácido barbitúrico | 74 |
| | |
| 5.8 AVALIAÇÕES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA POTENCIAL | 75 |
| 5.8.1 Avaliação de atividade antibacteriana | 75 |
| 5.8.2 Avaliação de atividade antifúngica | 77 |
| 5.8.3 Avaliação de atividade biológica antioxidante por meio do ensaio de sequestro do radical livre DPPH | 78 |
| 5.8.4. Avaliação de citotoxicidade em células de mamíferos | 80 |
| 5.9 ANÁLISES CONFORMACIONAIS E OTIMIZAÇÃO DE GEOMETRIA..... | 81 |
| 5.9.1 Análise dos Componentes Principais | 82 |
| <i>5.9.1.1 Bacillus subtilis</i> | <i>82</i> |
| <i>5.9.1.2 Candida albicans</i> | <i>84</i> |
| <i>5.9.1.3 Escherichia coli</i> | <i>87</i> |
| | |
| 6 CONCLUSÃO..... | 90 |
| | |
| REFERÊNCIAS..... | 92 |
| | |
| APÊNDICES | 101 |

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos fármacos para a prevenção e o tratamento de doenças é um processo longo e oneroso, que envolve várias fases pré-clínicas, clínicas, regulatórias e mercadológicas, mas que, necessariamente, tem início com a descoberta e caracterização de uma nova molécula com propriedades farmacológicas, conhecida como princípio ativo (ANVISA, 2010).

Princípios ativos são substâncias que tanto podem ser extraídas da natureza, quanto podem ser sintetizadas em laboratório. A extração de produtos naturais farmacologicamente ativos pode ser norteadada pelo conhecimento tradicional, mas esbarra nos trâmites burocráticos estabelecidos pela lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético no Brasil, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade (Brasil, 2015).

Ademais, pode ser particularmente desafiador isolar o fármaco em meio ao complexo de substâncias presentes na solução extrativa, sem contar que a função farmacológica verificada nem sempre será fruto de uma molécula isolada, podendo resultar de uma intrincada combinação de substâncias presentes no extrato (Simões *et al.* 2016).

Por outro lado, a química sintética oferece uma interessante alternativa para o desenvolvimento de moléculas farmacologicamente ativas, uma vez que a produção, purificação e caracterização de uma grande diversidade de compostos pode ser obtida em um curto espaço de tempo, graças ao encadeamento de modernas técnicas, como cromatografia líquida de alta eficiência, a espectrometria de massas e a ressonância magnética nuclear, entre outras (Zhu; Bienayme, 2005).

Embora alguns compostos inorgânicos apresentem atividade farmacológica, como o carbonato de lítio, usado no tratamento de distúrbios do humor, é sabido que a imensa maioria dos fármacos são moléculas de natureza orgânica (Katzung; Trevor, 2022). Diante desse fato, a síntese orgânica emerge como uma poderosa via para inovação na química medicinal, disciplina voltada para o descobrimento de novas alternativas farmacológicas para o tratamento de doenças (Barreiro; Fraga, 2014).

Atualmente, graças aos avanços substanciais da bioinformática e da proteômica verificados nas últimas décadas, a síntese orgânica pode ser direcionada pelas predições da química computacional. Nesses casos, quando o receptor de um futuro fármaco pode ser previamente conhecido, é possível direcionar seu design baseando-se na estrutura do ligantes

que usualmente interagem com esse receptor ou na estrutura dos domínios de ligação do próprio receptor. Em ambos os casos, simulações *in silico* são usadas para definir a estrutura do novo fármaco e uma metodologia de síntese orgânica precisará ser desenvolvida para que a molécula predita pelas ferramentas de bioinformática seja produzida e testada *in vitro* e *in vivo* (Anderson, 2003; Acharya *et al.* 2012).

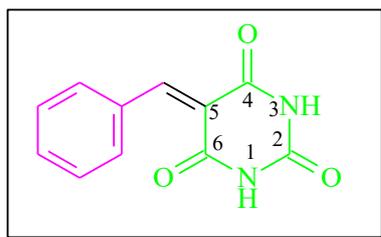
Todavia, nem sempre a estrutura do receptor é conhecida e pode ser usada para nortear o desenvolvimento do novo fármaco. Nesses casos, por meio de síntese orgânica tradicional, podem ser gerados compostos diversos, cujo potencial farmacológico é desconhecido. Após sua síntese, purificação e caracterização, essas novas moléculas são submetidas a ensaios biológicos nos quais suas propriedades farmacológicas são analisadas (Ekins *et al.* 2014).

Caso alguma atividade potencial seja verificada, novos estudos poderão ser desenvolvidos para identificar o receptor farmacológico do novo fármaco (mecanismo de ação), bem como a alteração bioquímica que a ligação fármaco-receptor provoca (efeito farmacológico) na célula. Também aqui, a bioinformática pode auxiliar no desenvolvimento de fármacos ao prever os parâmetros farmacocinéticos esperados para o novo princípio ativo sintetizado (Ekins *et al.* 2014).

Um exemplo de moléculas orgânicas farmacologicamente ativas e sintetizadas em laboratório são os 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico, onde um grupamento arila (derivado de um composto aromático) liga-se por meio de um grupo alquilideno (dupla ligação entre carbonos) a uma molécula de ácido barbitúrico, como mostra a figura 1. Quando o grupamento arila é o benzeno, os arilidenos também podem ser chamados de benzilidenos (Carey, 2011).

Formados a partir da reação de condensação de Knoevenagel, uma reação orgânica clássica proposta por Emil Knoevenagel, os 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico apresentam o núcleo pirimidina do ácido barbitúrico, cujos derivados têm se mostrado biologicamente ativos, especialmente quando substituídos na posição 5 (Pourgasemi-Lati *et al.* 2018).

Figura 1. Núcleo de um derivado de 5-benzilideno-barbitúrico.



Fonte: (Próprio autor).

Diante de tais fatos, foi proposto o desenvolvimento de moléculas do tipo 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico, sintetizadas por meio de uma variação da reação clássica de condensação de Knoevenagel, respeitando os princípios da química verde e adotando ácido barbitúrico (2,4,6-trioxoexaidropirimidina) como um dos reagentes de partida, em diferentes combinações com aldeídos aromáticos.

A escolha dos 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico justifica-se pelo largo espectro de atividades farmacológicas previamente identificadas e a síntese de novos derivados vem ao encontro da constante necessidade de buscar por alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças que afligem a humanidade. Ademais, a metodologia empregada adotou a reação clássica de condensação de Knoevenagel aos postulados da química verde, em um esforço que fica compreendido dentro da necessidade de desenvolvimento de processos de síntese orgânica ambientalmente sustentáveis.

Sendo assim, a síntese, a purificação e a caracterização química dos derivados de 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico, seguindo os postulados do parágrafo anterior, integram a primeira fase do desenvolvimento da presente tese de doutorado, em cuja segunda fase foram realizados os testes de atividade biológica *in vitro* e *in silico*.

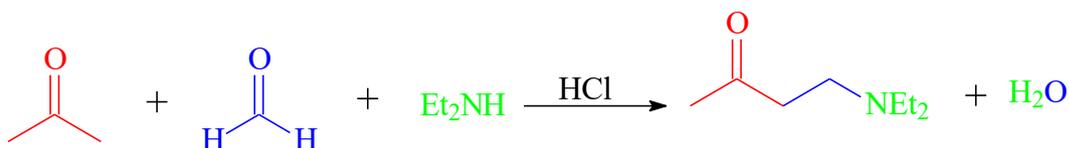
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 REAÇÕES DE CONDENSAÇÃO

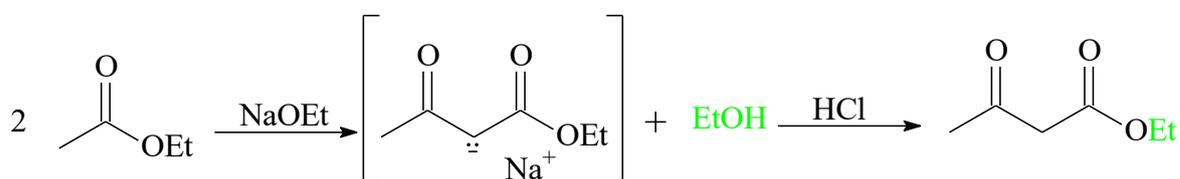
Em uma reação onde duas moléculas reagentes se combinam para formar um produto principal é conhecido por processo de condensação de moléculas orgânicas. Destaca-se na literatura diferentes metodologias de condensação como a anelação de Robinson, a condensação de Claisen, Mannich, Dieckmann, Mukaiyama, a reação de Wittig (Esquema 1), a reação aldólica e suas variações como a proposta por Knoevenagel, entre outras de metodologias de acetilação e olefinação de carbonos (Carey; Sunberg, 2007).

Esquema 1. Metodologias de condensação descritas na literatura

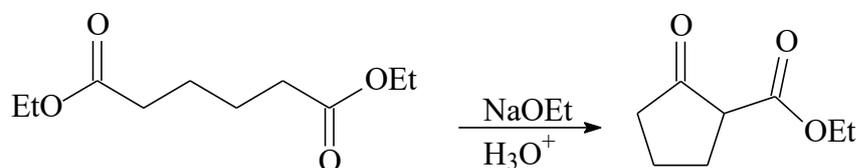
Reação de Mannich



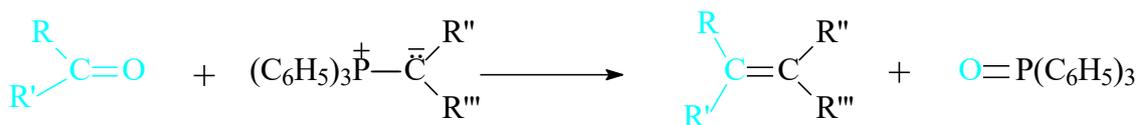
Reação de Claisen



Reação de Dieckmann



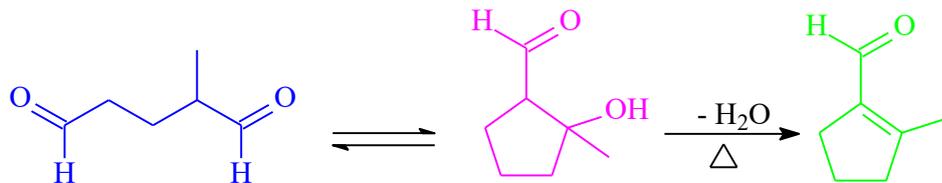
A reação de Wittig: a adição dos ilídeos



Fonte: Adaptado de Solomons e Fryhle (2018).

Mecanicamente, as reações de condensação partem da adição de um carbono nucleófilo estabilizado de um dos reagentes a um grupo carbonila presente no outro e os produtos gerados irão depender dos substituintes presentes em cada reagente. As reações de condensação podem ser do tipo intermoleculares, quando levam à formação de cadeias carbônicas alifáticas provenientes da fusão entre compostos carbonílicos, sejam eles aldeídos ou cetonas, como representado pelo esquema 2 (Solomons; Fryhle, Snyder, 2018).

Esquema 2. Reações de condensação intramoleculares.



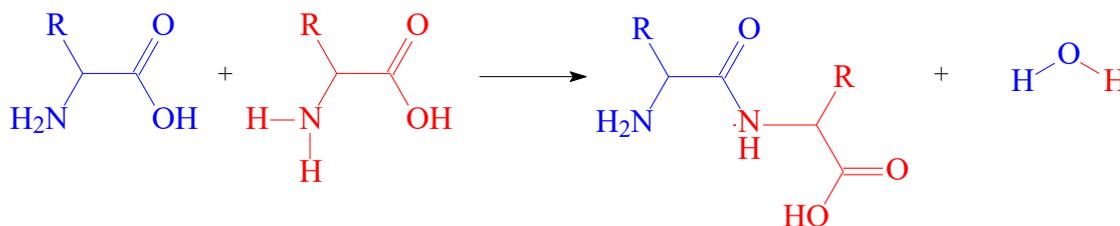
Fonte: Adaptado de Carey e Sunberg (2007).

Todavia, moléculas de 5 ou 6 membros contendo dois grupos aldeídos ou cetonas em suas extremidades podem sofrer autocondensação, dita intramolecular nesse caso, levando a ciclização de moléculas (Carey; Sunberg, 2007).

Sendo assim, as condensações inter e intramoleculares de compostos orgânicos é um processo reacional relativamente simples, e em alguns casos pode ocorrer em ambiente aquoso, sem requerer temperaturas elevadas e promovendo a formação de cadeias carbônicas alifáticas ou cíclicas. Não por acaso, a evolução selecionou as reações de condensação como via para síntese dos principais grupos de moléculas orgânicas que formam os seres vivos, como as proteínas, os lipídeos e os carboidratos. Tais importantes moléculas biológicas são obtidas a partir de reações de condensação que liberam água como produto secundário, podendo, portanto, serem revertidas por hidrólise (Nelson; Cox, 2018).

Nas proteínas, as ligações covalentes peptídicas são fruto da condensação da porção carboxílica de um aminoácido com o grupo amino de outro (Esquema 3).

Esquema 3. Condensação de aminoácidos que leva à formação de polímeros peptídicos: as proteínas.



Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2018.

As reações de condensação combinam economia atômica (a grande maioria dos átomos presentes nos reagentes está incorporada no produto final) com eficiência (a reação se dá em uma única etapa. Adicionalmente, as reações de condensação podem possibilitar bons rendimentos, segurança, economia de energia, uso de pequenas quantidades de solventes e de catalisadores de baixa toxicidade, como a água e os líquidos iônicos, e, ainda, baixo desperdício, alinhando-se, assim, a alguns dos principais postulados da química verde (Paprocki, 2018; De Marco *et al.* 2019), como mostra a figura 2.

Figura 2. Doze princípios da química verde propostos por Anastas e Warner (1998).



Fonte: Tradução livre de De Marco *et al.* (2019).

O interesse comercial pela síntese orgânica verde tem crescido, em grande parte pela força do movimento voltado à criação de práticas de desenvolvimento sustentável, haja vista a relevância que o tema sustentabilidade tem ganhado na última década. Muito graças ao contínuo esforço da indústria farmacêutica na busca por inovação, inúmeras variações das metodologias clássicas de síntese orgânica têm sido adaptadas aos postulados da química verde com o intuito de voltá-las para o desenvolvimento de novos fármacos (Carey; Sunberg, 2007; (Solomons; Fryhle, Snyder, 2018).

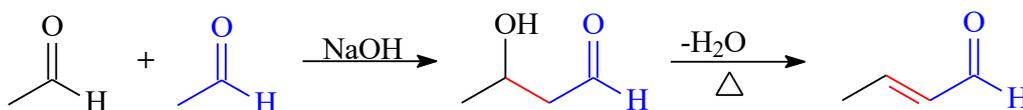
Dessa forma, para o desenvolvimento do presente trabalho científico, onde buscou-se gerar protótipos de fármacos partindo do ácido barbitúrico, o processo de condensação de moléculas, uma via de síntese orgânica clássica, ainda permitiu adequações aos postulados da química verde e emulando processos biológicos comuns a síntese de moléculas orgânicas. Sendo assim, foi aplicada a metodologia de reação de condensação proposta por Emil Knoevenagel, uma versão da reação aldólica, que foi realizada sob controle termodinâmico e meio catalítico básico obtido pelo uso de uma enzima sintética, a polietilonoimina suportada em líquido iônico, como catalisador (Nelson; Cox, 2018).

Portando, faz-se agora um breve resumo sobre as reações de condensação de moléculas orgânicas, com especial atenção à condensação aldólica e suas variações, como a condensação de Knoevenagel.

2.1.1 Reação aldólica

Trabalhando independentemente na segunda metade do século XIX, o químico russo Alexandre Borodin e o químico francês Charles-Adolphe Wurtz desenvolveram, em meio básico, uma reação clássica de condensação entre dois compostos carbonílicos que ficou conhecida como reação aldólica, termo proveniente da aglutinação das palavras aldeído e álcool, os dois grupos funcionais presentes no produto intermediário da reação, que sob aquecimento sofre desidratação, gerando α,β -aldeídos insaturados, como mostra o esquema 4 (Carey; Sunberg, 2007).

Esquema 4. Reação de condensação aldólica.



Fonte: Próprio autor.

A condensação aldólica pode levar à formação de moléculas complexas, desde que a cinética reacional seja controlada para garantir a regioquímica e a estereoquímica da reação. Sabe-se que para controlar a formação do produto em uma reação de condensação aldólica é necessário determinar que um reagente haja exclusivamente como nucleófilo e o outro como eletrófilo, conseqüentemente. Tal controle pode ser alcançado pela pré-formação do ânion nucleófilo enolato por desprotonação (Carey; Sunberg, 2007).

De fato as condições ideais para garantir poder de regiosseletividade e estereosseletividade à reação aldólica passam pelo controle da cinética reacional, com a literatura indicando como condições termodinâmicas ideais para gerar equilíbrio entre os enolatos do nucleófilo incluem a adoção de temperaturas reacionais elevadas, o uso de solventes dissociativos polares ou próticos e o uso de cátions de coordenação fracos, como lítio, o boro, o titânio, estanho e zircônio (Solomons; Fryhle, Snyder, 2018).

As reações de condensação entre moléculas orgânicas carbonílicas, sejam elas aldeídos ou cetonas, principiam pela adição do grupo nucleófilo ao grupo carbonila, todavia a reatividade dessa reação varia de acordo com as condições reacionais, dentre as quais podemos destacar:

- As características estruturais do composto carbonílico;
- A capacidade do próton ou ácido de Lewis de ativar o grupo carbonila para realizar o ataque nucleofílico;
- A reatividade das espécies nucleofílicas empregadas;
- A estabilidade do produto intermediário tetraédrico, ou seja, sua capacidade de formar o produto final ou de voltar ao estágio inicial (Carey; Sunberg, 2007; Solomons; Fryhle, Snyder, 2018).

Outro aspecto que pode influenciar na reatividade da reação e nas taxas de formação de produto é o meio catalítico empregado. Embora a reação de condensação aldólica tenha sido originalmente desenvolvida em meio catalítico básico, na presença de um solvente hidroxílico diluído, a catálise ácida também é possível, todavia os caminhos reacionais podem sofrer alterações (Carey; Sunberg, 2007).

Na catálise básica, sob temperatura ambiente e usando uma solução fracamente básica, o íon enolato é formado e, em seguida, adicionado ao grupo carbonila do aldeído ou cetona. Todavia, quando a temperatura ou o pH da solução reacional é aumentado, o intermediário aldólico sofre desidratação, gerando um α,β -aldeído insaturado ou cetona (Carey; Sunberg, 2007).

Tanto sob catálise básica, quanto sob catálise ácida, a reação aldólica é reversível na fase de adição e o equilíbrio depende das condições reacionais, que se forem forçadas levarão a reação a sua última etapa, a desidratação, gerando o produto final, um composto carbonílico α,β -insaturado (Carey; Sunberg, 2007).

Embora, classicamente, a reação aldólica ocorra usando como reagentes dois compostos carbonílicos idênticos, sejam eles duas cetonas ou dois aldeídos, existem as reações aldólicas mistas, com reagentes diferentes. Nas reações aldólicas mistas, o uso de aldeídos aromáticos é muito comum em combinações com cetonas, aldeídos alifáticos, compostos dicarbonílicos. As reações de condensação de Claisen-Schmidt e de Knoevenagel são exemplos de reações aldólicas mistas (Carey; Sunberg, 2007; Solomons; Fryhle, Snyder, 2018).

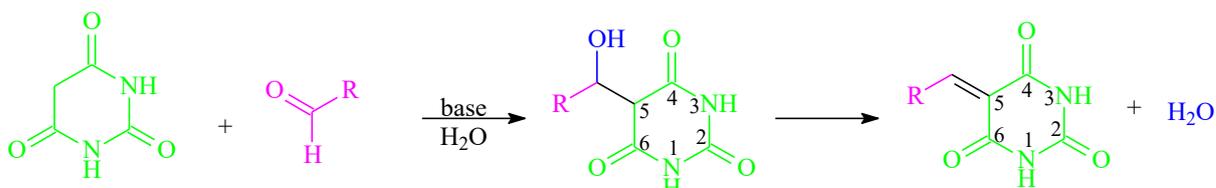
2.1.2 Reação de condensação de Knoevenagel

Criada pelo químico alemão Emil Knoevenagel no final do século XIX, a reação de condensação de Knoevenagel é uma reação catalisada por aminas fracamente básicas ou soluções tampão contendo uma amina e um ácido fracos. Na reação de Knoevenagel, o grupo carbonila que receberá o ataque do nucleófilo é o aldeído ou a cetona, enquanto o composto nucleófilo da reação deve conter dois grupamentos retiradores de elétrons, como os ésteres de malonato e de cianoacetato (Carey; Sunberg, 2007).

Uma particularidade da reação de Knoevenagel quando envolve o ácido malônico ou o ácido cianoacético como agentes nucleofílicos do processo de condensação é que ocorre uma descarboxilação do intermediário, levando, enfim, a formação do produto final insaturado, muitas vezes, um diácido insaturado ou uma enona (Carey; Sunberg, 2007).

A reação de condensação de Knoevenagel é utilizada para síntese de 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico (Pourghasemi-Lati, 2018), onde o aldeído age como nucleófilo, sob catálise básica, como mostra o esquema 5.

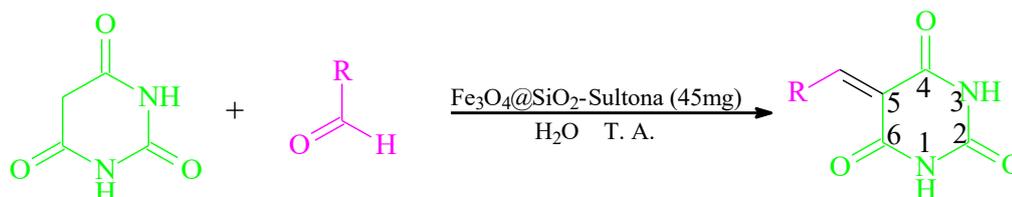
Esquema 5. Esquema geral para a reação de condensação de Knoevenagel empregada na síntese de 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico.



Fonte: Próprio autor.

Diversos meios catalíticos têm sido propostos para a reação de formação de 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico. Pourgasemi *et al.* (2018) obtiveram rendimentos de até 98% quando sintetizaram derivados 5-arilidenos-barbitúricos com tempos reacionais inferiores a uma hora, usando 25 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -Sultona como catalisador nanomagnético, dissolvido em solução aquosa sob temperatura ambiente, como mostra o esquema 6.

Esquema 6. Síntese de 5-arilidenos-barbitúricos sob catálise nanomagnética.

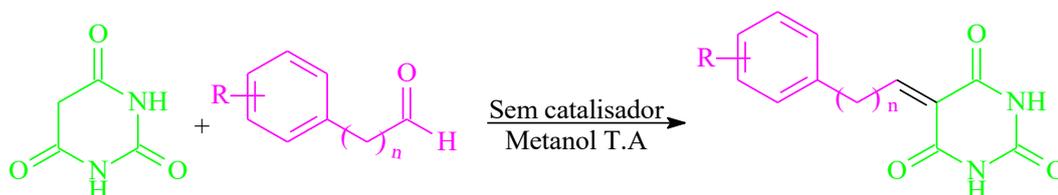


Fonte: Adaptado de Pourgasemi *et al.* (2018).

O método proposto por Pourgasemi *et al.* (2018) mostrou-se eficaz e sustentável, pois o catalisador metálico pode ser facilmente recuperado por atração magnética. Dessa forma, desvantagens comuns do uso de catalisadores metálicos, como sua incorporação ao produto da reação e dificuldade de extração não foram observadas.

Jursic (2001) propôs a síntese de derivados 5-arilidenos-barbitúricos de forma simplificada, adotando temperatura ambiente e usando metanol como solvente, sem usar quaisquer catalisadores (Esquema 7). Todavia, os tempos reacionais mostraram-se demasiadamente longos, demandando de algumas horas até 5 dias para formação dos produtos, com rendimentos que variaram entre 81 e 89%. Adicionalmente, Jursic (2001) não recomendou a purificação dos 5-arilidenos-barbitúricos a quente por considerá-los termosensíveis e alertou que seu método não permite a síntese de arilidenos usando aldeídos alifáticos, como o hexanal.

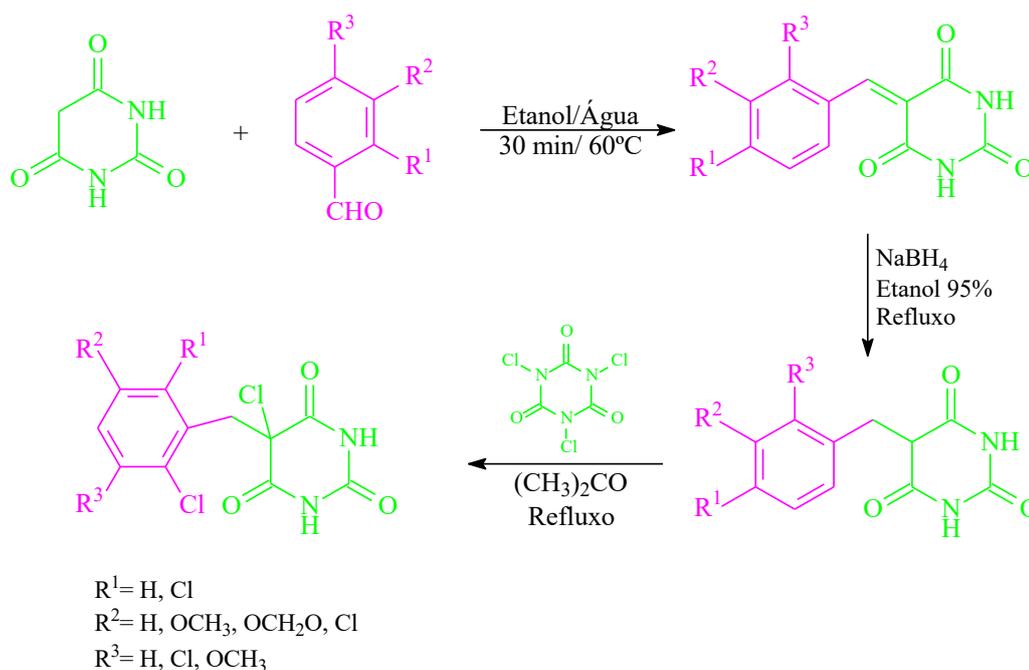
Esquema 7. Síntese de 5-arilideno-barbitúrico com propriedade sedativa.



Fonte: Adaptado de Jursic (2001).

Solubilizando ácido barbitúrico e benzaldeído em uma solução de hidroalcoólica, por 30 min e sob a temperatura de 60°C, Vieira *et al.* (2011) obteve derivados 5-benzilideno-barbitúricos com rendimentos entre 93% e 99%. Em seguida, o produto sofreu um processo de redução, seguido de um processo de halogenação com cloro, gerando 5-cloro-5-benzilideno-barbitúricos (Esquema 8), que apresentaram efeito sedativo em camundongos.

Esquema 8. Primeira etapa da síntese de 5-arilidenos-barbitúricos clorados.

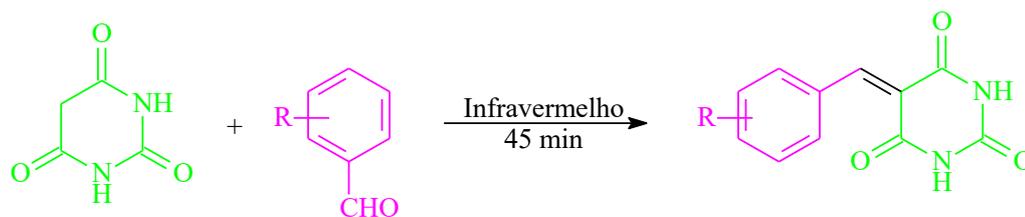


Fonte: Adaptado de Vieira *et al.* (2011).

A síntese em múltiplas etapas, todavia, pode ser mais trabalhosa e demandar um maior número de análises para caracterização e identificação dos compostos gerados em cada etapa, aumentando assim os custos analíticos da metodologia proposta por Vieira *et al.* (2011).

Alcerea *et al.* (2000) inovaram ao propor a síntese de dez derivados 5-arilideno-barbitúricos via reação de condensação de Knoevenagel usando apenas a irradiação dos reagentes (ácido barbitúrico e aldeídos aromáticos) por infra-vermelho, durante 45 minutos, com rendimentos que variaram entre 43-82% (Esquema 9). Todavia, como pode-se notar, houve grande variação nos rendimentos obtidos.

Esquema 9. Síntese de derivados 5-arilideno-barbitúricos por irradiação infravermelha.



R= H, 2-OCH₃, 2-Cl, 4-CH₃, 4-OCH₃, 4-F, 4-Cl, 4-Br

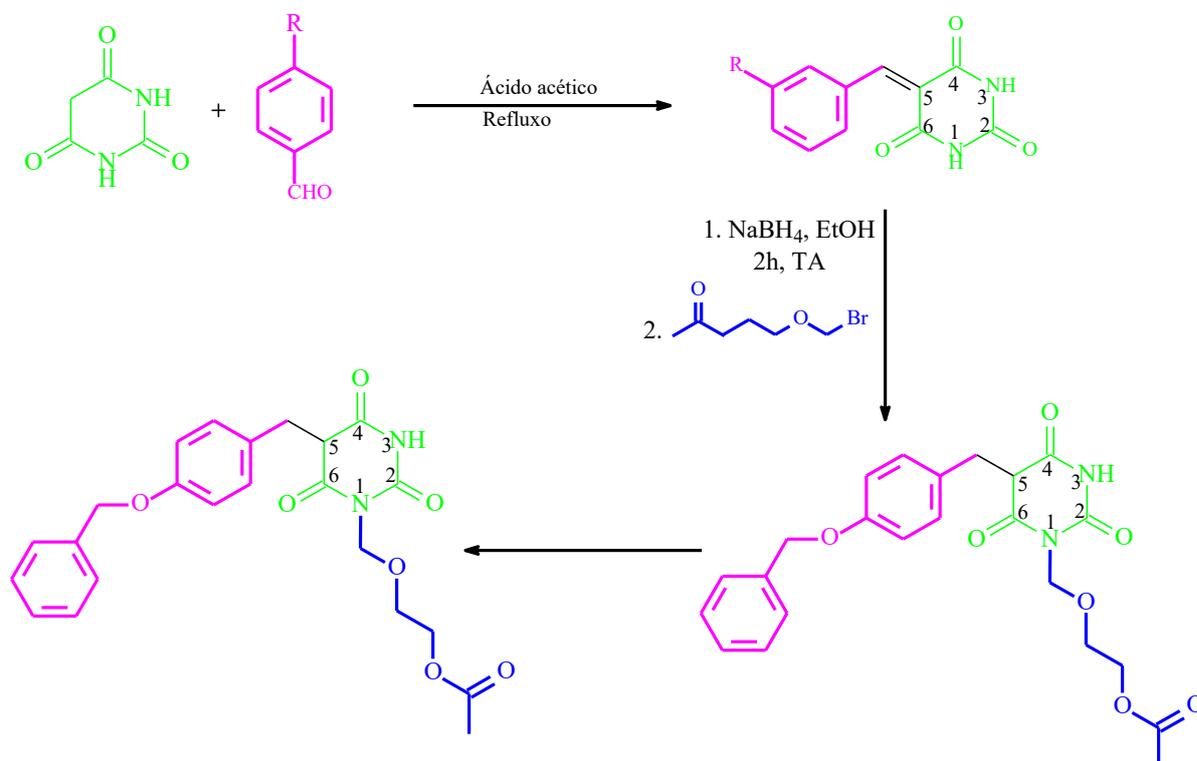
Fonte: Adaptado de Alcereca *et al.* (2000).

A busca de novas abordagens terapêuticas para tratar a malária segue necessária, pois essa antiga doença que aflige a humanidade desde a antiguidade, ainda hoje mata mais de 400 mil pessoas todos os anos, segundo a Organização Mundial de Saúde. Dessa forma, a síntese de novos antimaláricos é fundamental para aumentar o arsenal farmacoterapêutico disponível para o tratamento da malária, que hoje é limitado e envolve fármacos pouco seguros, como os derivados da quinina (Katzung; Trevor, 2022).

Na tentativa de buscar novos fármacos antimaláricos, Cui *et al.* (2010) sintetizaram inibidores da purina nucleosídeo fosforilase de *Plasmodium falciparum*, uma proposta interessante por tratar-se de uma nova via de inibição do crescimento do protozoário, reduzindo a disponibilidade de purinas para síntese de ácidos nucleicos, como RNA e DNA em *P. falciparum*.

Em um processo de 5 etapas, sendo a primeira delas uma reação de condensação de Knoevenagel usando ácido barbitúrico e aldeídos aromáticos como reagentes solubilizados em ácido acético sob refluxo, sob temperatura ambiente, Cui *et al.*, (2010) obtiveram rendimentos de 85% na síntese de ácido 5-(*m*-benziloxi)benzilbarbiturico e 90% na síntese de ácido 1-[(2-hidroxietoxi)metil]-5-(*m*-benziloxi)benzilbarbiturico (Esquema 10).

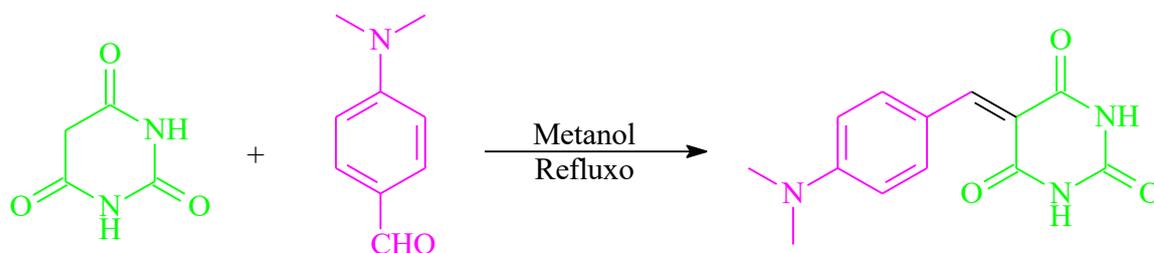
Esquema 10. Primeira etapa da síntese de inibidores da enzima purina nucleosídeo fosforilase de *P. falciparum*.



Fonte: Adaptado de Cui *et al.* (2010).

Em um estudo de desenvolvimento de quimiosensores orgânicos, Saravanan, Easwaramoorthi e Wang (2014) criaram dois derivados 5-arilidenos-barbitúricos com atividade de sensores do íon fluoreto adotando a reação de condensação de Knoevenagel entre 4-dimetilamino-benzaldeído com ácido barbitúrico e também com ácido barbitúrico metilado, usando metanol como solvente, sem adição de catalisador ou de temperatura, como mostra o esquema 11.

Esquema 11. Síntese de derivados 5-arilideno-barbitúricos aceptores de ânions fluoretos.

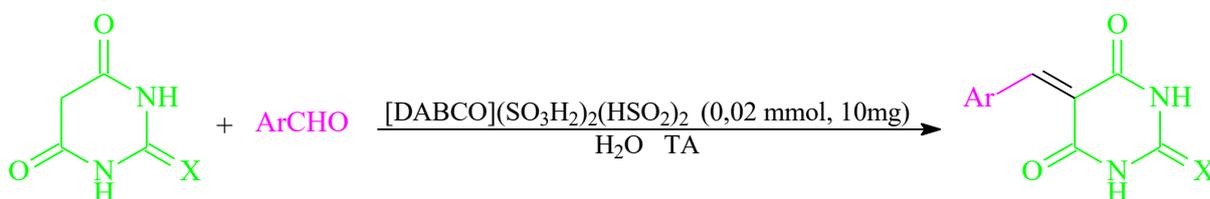


Fonte: Adaptado de Saravanan, Easwaramoorthi e Wang (2014).

Os sensores desenvolvidos por Saravanan, Easwaramoorthi e Wang (2014) para detecção do ânion fluoreto em solução veem ao encontro da necessidade de criar moléculas capazes de se ligarem com estabilidade e especificidade a ânions e, assim, minimizar seus impactos ambientais.

O uso de líquidos iônicos como catalisadores eficientes da reação de condensação de Knoevenagel também já foi demonstrado por Seyyedi, Shirini e Langarudi (2016), que usaram líquidos iônicos baseados em DABCO para a síntese de 25 derivados 5-arylideno-barbitúricos e 5-arylideno-tiobarbitúricos, usando água como solvente e realizando a reação em temperatura ambiente, como mostra o esquema 12.

Esquema 12. Síntese de 4-arylideno-barbitúricos e 5-arylideno-tiobarbitúricos usando líquidos iônicos baseados em DABCO como catalisadores.

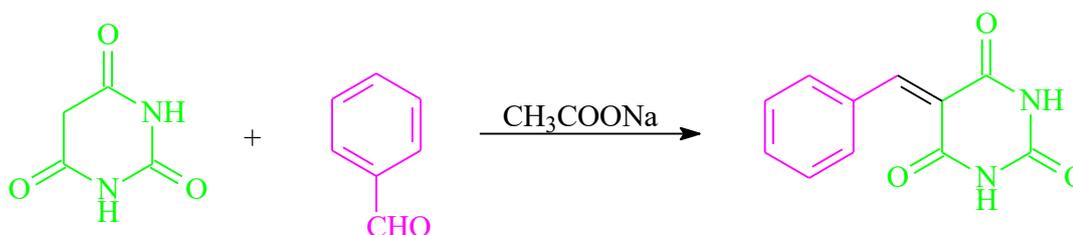


Fonte: Adaptado de Seyyedi, Shirini e Langarudi (2016).

Os rendimentos obtidos por Seyyedi, Shirini e Langarudi (2016) variaram entre 87 e 95%, em tempos reacionais muito curtos (< 10 minutos) e adotando um protocolo verde.

Uttam (2016) promoveu a síntese de 13 derivados de 5-arylidenos, com rendimentos variando entre 77-91% e tempos reacionais bastante curtos (7-20 minutos), usando quantidades estequiométricas de ácido barbitúrico e acetato de sódio, combinados com aldeídos aromáticos (10:10:10 mmol), a temperatura ambiente e sem solvente, como mostra o esquema 13.

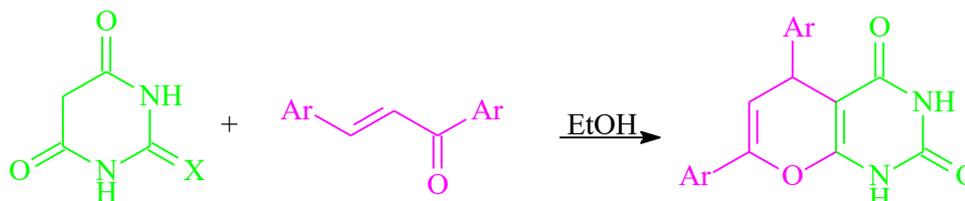
Esquema 13. Síntese de 5-arylideno-barbitúricos sem solvente e com acetato de sódio em quantidades estequiométricas com os reagentes.



Fonte: Adaptado de Uttam (2016).

Sattar *et al.* (2015) propuseram a síntese de derivados 5-arilideno-barbitúricos por meio da reação entre quantidades equimolares de ácido barbitúrico e arilideno acetofenona, dissolvidos em uma mistura de água e etanol retificado. A mistura foi irradiada por ultrassom (320w), durante 8 minutos, atingindo rendimentos de 97-98% (Esquema 14).

Esquema 14. Síntese de derivados do ácido barbitúrico por irradiação de micro-ondas.

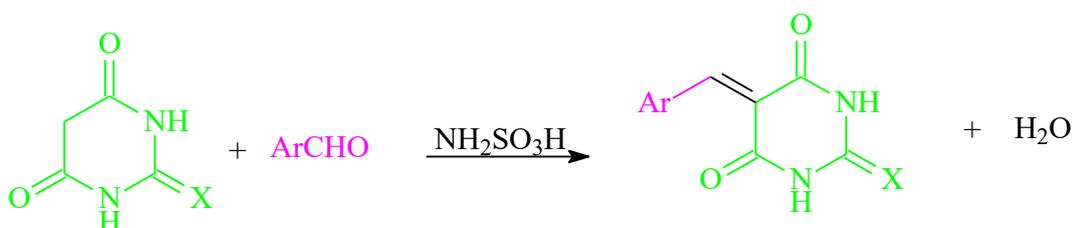


Fonte: Adaptado de Sattar *et al.* 2015.

Nos testes de letalidade, todos compostos mostraram-se altamente tóxicos para artêmia salina, atingindo 100% de letalidade nas doses de 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sattar *et al.* 2015). A letalidade elevada nos testes em artêmia salina são resultados positivos, pois podem indicar atividade antiproliferativa dos compostos testados, incluindo anticancerígena e pesticida. Todavia, Sattar *et al.* (2015) não realizaram tais testes de atividade antiproliferativa, apenas mencionaram tal potencial, que demandaria investigação em um estudo futuro.

Li *et al.* (2006) propuseram o uso de ácido aminosulfônico como catalisador da reação de condensação de Knoevenagel, obtendo 47-96% de rendimento na síntese de doze 5-arilideno-barbitúricos após 2 horas de reação sob método de Grinding (Esquema 15). O método pouco comum resultando em rendimentos de moderado a alto podem ser visto como uma desvantagem dessa metodologia, que ainda demanda 2 horas reação, a despeito de diversas outras metodologias onde os tempos reacionais são inferiores a trinta minutos, representando alternativas de maior economia de energia.

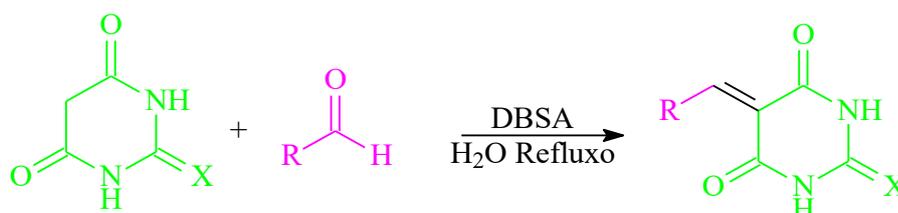
Esquema 15. Síntese de derivados do ácido barbitúrico por irradiação de micro-ondas.



Fonte: Adaptado de Li et al. (2006).

Hosseini, Sheikhhsseini e Ghazanfari (2015) realizaram a reação de condensação de Knoevenagel catalisada por ácido *p*-dodecilbenzenosulfônico (DBSA), misturando diversos aldeídos aromáticos, com ácido barbitúrico e tiobarbitúrico dissolvidos em água, sob refluxo (Esquema 16). Foram obtidos 13 derivados 5-arilídenos com rendimentos variando entre 61-95% e tempos reacionais entre 15 e 67 minutos.

Esquema 16. Síntese de derivados do ácido barbitúrico sob catálise de DBSA.



Fonte: Adaptado de Hosseini, Sheikhhsseini e Ghazanfari (2015).

As vantagens da metodologia de síntese proposta por Hosseini, Sheikhhsseini e Ghazanfari (2015) são que o método é sustentável e se adequa aos princípios da química verde, obtendo bons rendimentos em um tempo reacional relativamente curto. Todavia, a literatura descreve rendimentos ainda superiores, com tempos de reação menores, inclusive, em metodologias que adotam, por exemplo, líquidos iônicos (Seyyedi, Shirini e Langarudi (2016).

Adotando a metodologia de grinding, Wang *et al.* (2005) promoveram a síntese verde de derivados arilídênicos do ácido barbitúrico por duas vias: primeiro, maceraram a mistura de reagentes com o catalisador [BMIm]BF₄ por 5 minutos, deixando a mistura reagir por 2h e, assim, obtendo rendimentos de 77,9 a 96,2% (Esquema 17). Depois, a síntese foi realizada usando irradiação de micro-ondas (160W) por 20s e os rendimentos obtidos foram ainda maiores, variando de 81,8-98,7%.

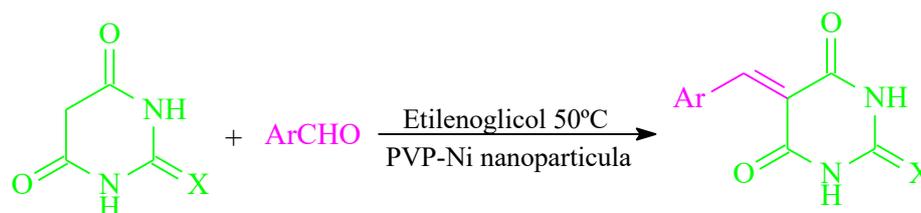
Esquema 17. Síntese de derivados do ácido barbitúrico sob catálise de [BMIm]BF₄.



Fonte: Próprio autor, adaptado de Wang *et al.* (2005).

Com rendimentos variando de 82-97% em reações de 10 a 15 minutos de duração, Khurama e Vij (2010) propuseram a síntese de 24 derivados dos ácidos barbitúrico e tiobarbitúrico usando nanopartículas de níquel estabilizadas em polivinil pirrolidona (PVP) como sistema catalítico em etilenoglicol a 50 °C, como mostra o esquema 18.

Esquema 18. Síntese de derivados do ácido barbitúrico sob catálise de nanopartículas de níquel estabilizadas em PVP.



X= H, CH, Fenil

Fonte: Adaptado de Khurama e Vij (2010).

A literatura ainda apresenta vasta gama de meios catalíticos propostos para a reação de condensação de Knoevenagel, como ZnCl (Rao; Venkataratnam, 1991), CdI₂ (Prajapati; Sandhu, 1993), KF/Alumina (Dai *et al.* 1995), Na₂CaP₂O₇ (Bennazha *et al.* 2001), NP, KF/NP e NaNO₃/NP (Sebti; Smahi; Solhy, 2002), K₂NiP₂O₇ (Maadi *et al.* 2003), BiCl₃ (Khan *et al.* 2009), SiO₂·12WO₃·24H₂O (Li; Sun, 2009), Ni-SiO₂ (Pullabhotla; Rahman; Jonnalagadda, 2009), Ce₁MgxZr_{1-x}O₂ (Rathod *et al.* 2010), CoFe₂O₄ (Rajput; Kaur, 2013) e nanopartículas de CuO (Dighore *et al.* 2014).

Dewans e Sigh, (2006) testaram vários meios catalíticos usando micro-ondas para acelerar a reação. Há até mesmo relatos da reação acontecendo sem a adição de qualquer meio catalítico e sem aquecimento (Deb; Bhuyan, 2005), todavia usando os compostos foram solubilizados em água e a mistura resultante foi colocada sob agitação, facilitando os encontros necessários entre os reagentes a serem condensados. No mais, a metodologia proposta por Deb e Bhuyan (2005), embora proponha economia de recursos e de energia, limitou-se a reações entre aldeídos e compostos metilênicos.

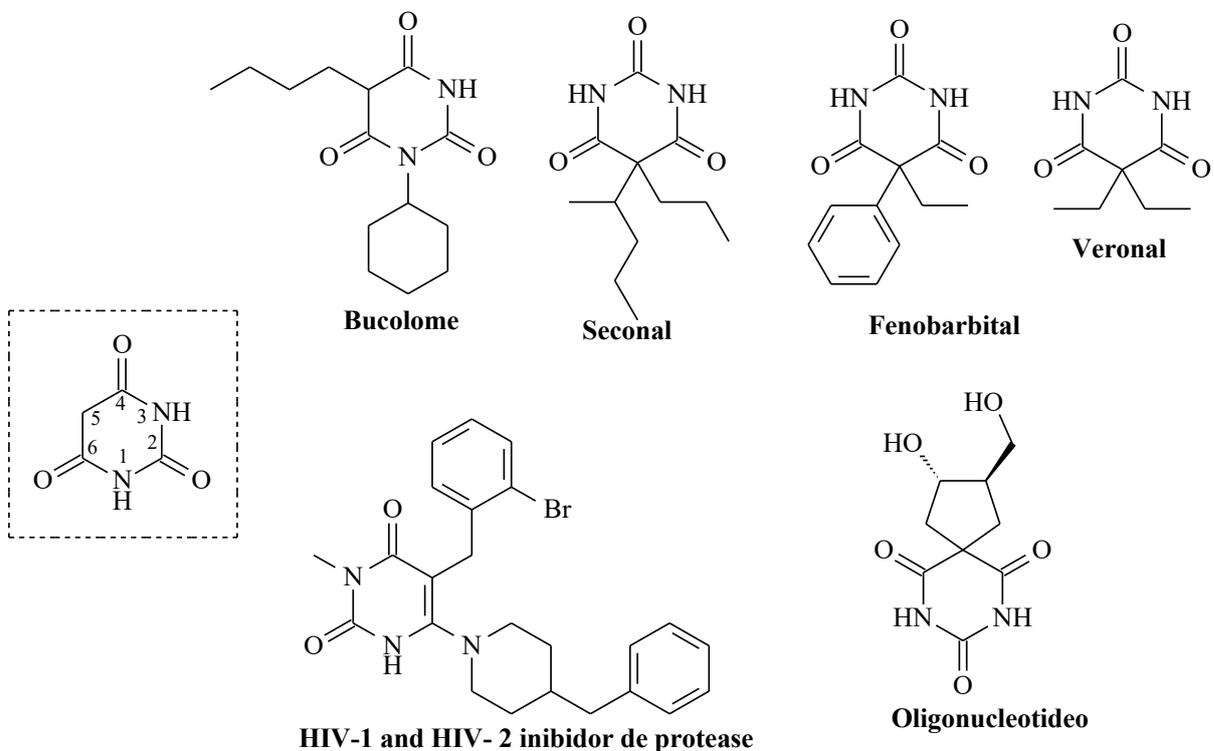
Como a reação de condensação proposta por Knoevenagel clássica demanda catálise por amina, em meio básico e uso de solvente polar, no presente trabalho optou-se por usar uma enzima sintética: a polietileimina ativada em líquido iônico clorado para promover catálise nas reações de síntese de derivados do ácido barbitúrico aqui propostas.

2.2 ÁCIDO BARBITÚRICO

O ácido barbitúrico, 2,4,6-trioxoexaidropirimidina, é uma molécula sem atividade biológica. Todavia, quando adicionado um grupamento arila ou alquila na posição C5, a molécula resultante passa a apresentar potentes atividades depressoras do sistema nervoso central, atuando como sedativos, hipnóticos, antiepiléticos e até anestésicos gerais. Amobarbital, butabarbital, butalbital, fenobarbital, mefobarbital, metoexital, pentobarbital, secobarbital, tiopental são alguns barbitúricos comercialmente disponíveis mundialmente, como mostra a figura 3 (Brunton; Dandan; Knollmann, 2018).

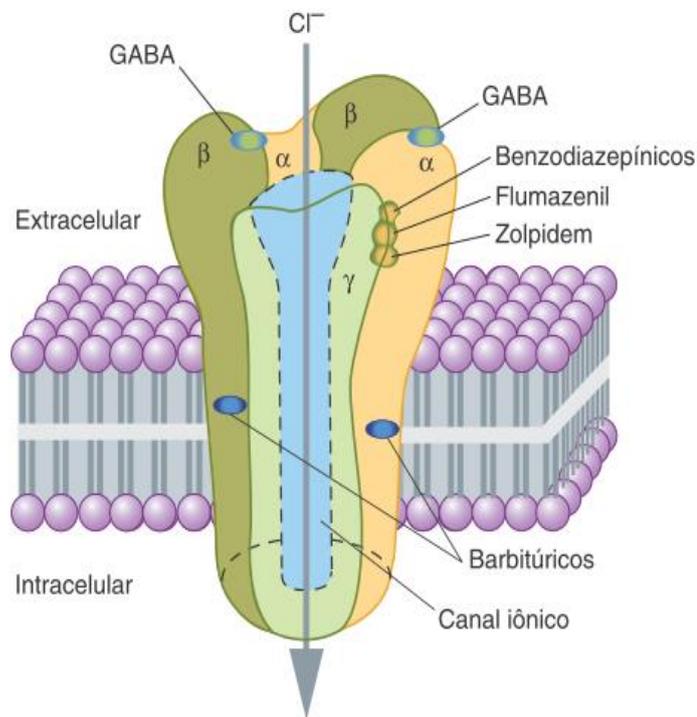
Os barbitúricos se ligam às subunidades α e β do receptor A do ácido γ -aminobutírico (GABA A), onde atuam como agonistas alostéricos do neurotransmissor inibitório ácido γ -aminobutírico GABA (Figura 4), que aumenta o influxo de íons cloreto para o meio intracelular neuronal, levando a hiperpolarização, justificando, assim, seus progressivos efeitos depressores sobre o sistema nervoso central (Katzung; Trevor, 2022).

Figura 3. Estrutura geral do ácido barbitúrico e alguns de seus derivados comerciais 5-substituídos.



Fonte: Adaptado de Katzung e Trevor (2017).

Figura 4. Representação do receptor GABA A e dos sítios de ligação de seus ligantes, incluindo os barbitúricos.



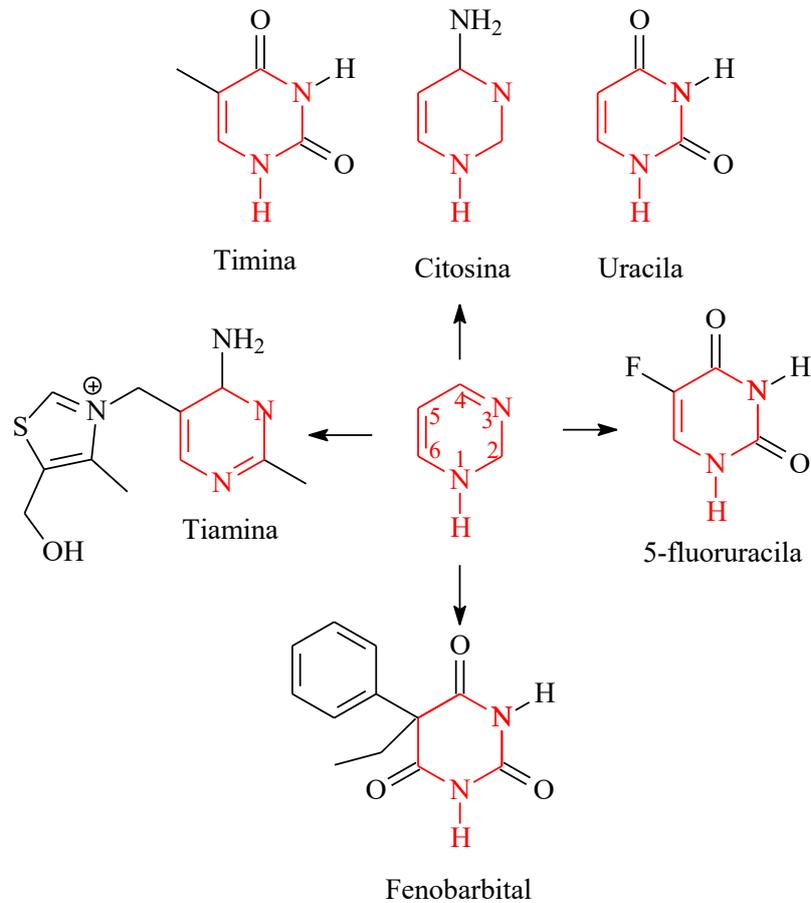
Fonte: Katzung e Trevor (2022)

Dependendo da dose, os barbitúricos podem exercer desde ações sedativo/hipnóticas até ações anestésicas gerais. Isso se deve ao fato dos barbitúricos apresentarem, possivelmente, mecanismo de ação que vai além da simples estimulação gabaérgica. Nesse sentido, acredita-se que os barbitúricos antagonizem a neurotransmissão glutamatérgica excitatória e desestabilizem membranas neuronais no sistema nervoso central, justificando, assim, sua capacidade de induzir anestesia cirúrgica plena. Por outro lado, essa multiplicidade de locais de ação, tornam os barbitúricos menos seguros, fato que fez com que esses fármacos perdessem espaço para os benzodiazepínicos (Katzung; Trevor, 2022).

2.3 OS 5-ARILIDENOS DERIVADOS DO ÁCIDO BARBITÚRICO.

Os 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico frutos da reação de condensação proposta por Knoevenagel caracterizam-se pela presença do núcleo pirimidina, proveniente do próprio ácido barbitúrico, uma estrutura heterocíclica onde dois átomos de nitrogênio substituem carbonos nas posições 1 e 3 de um anel de seis membros (Figura 5).

Figura 5. Núcleo pirimidina e alguns de seus derivados naturais e sintéticos.



Fonte: Próprio autor.

O núcleo pirimidina/primidinona do ácido barbitúrico está presente nas vitaminas tiamina (B1) e riboflavina (B2) e nas pirimidinas timina, uracila e citosina, componentes das moléculas de ácido ribonucleico (RNA) e desoxirribonucleico (DNA), sendo, portanto, estruturas básicas e comuns a todos seres vivos e, até mesmo, aos vírus (Nelson; Cox, 2018).

Há, ainda, os fármacos antineoplásicos derivados de pirimidinas, como o pemetrexede, 5-fluoruracila, capecitabina, citarabina e gencitabina, moléculas importantes nos esquemas quimioterapêuticos vigentes, onde atuam como inibidores da replicação do DNA na célula tumoral por diferentes mecanismos de ação (Katzung; Trevor, 2022). Adicionalmente, toda a classe dos sedativo-hipnótico-anestésicos barbitúricos é composta por fármacos que partilham o núcleo pirimidina, como fenobarbital e o tiopental, mostrados anteriormente na figura 5. Muitas dessas moléculas são, de fato, pirimidinonas, pois apresentam uma carbonila na posição 2 do núcleo pirimidina, como é o caso das bases nitrogenadas timina e uracila e dos fármacos 5-fluoruracila e fenobarbital (Katzung; Trevor, 2022).

Dessa forma, fica evidente que as moléculas com núcleo pirimidina ou pirimidinonas, como as 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico, podem apresentar grande relevância biológica, incluindo efeitos farmacológicos. Cientes de tal potencial, diversos pesquisadores têm se dedicado a desenvolver derivados do arilidenos com o intuito de gerar novas coleções de moléculas potencialmente bioativas e, assim, investigar suas propriedades terapêuticas. Nesse sentido, os estudos farmacológicos têm confirmado o grande potencial terapêutico dos arilidenos que inclui propriedades, como:

- o efeito ansiolítico verificado por Vieira *et al.* (2011) em teste realizado em camundongos com o produto 5-cloro-5benzil barbituratos.

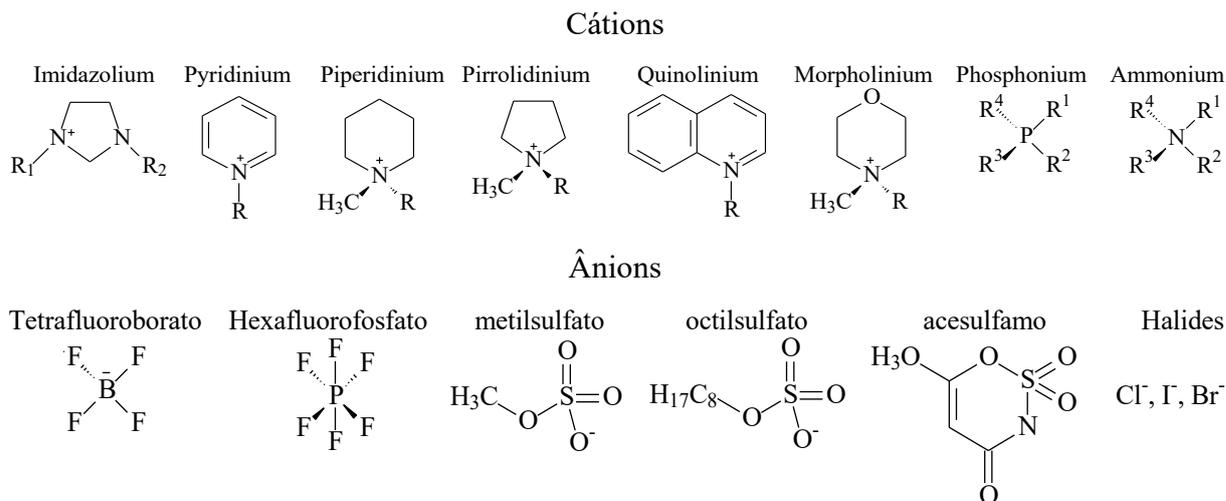
- o efeito inibitório, *in vitro*, sobre a urease observado por Khan *et al.* (2011), especialmente no composto 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico p-fluorados.

Evidentemente, a síntese de novos derivados de 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico bioativos é um trabalho em andamento, que vem sendo feito em paralelo por diversos centros de pesquisa públicos e privados em todo o mundo.

2.4 LÍQUIDOS IÔNICOS

Os líquidos iônicos (LIs) são sais ionizados positiva ou negativamente, com baixo ponto de fusão e vasta diversidade estrutural e funcional. Sua boa condutividade é, possivelmente, a única propriedade comum a todos os líquidos iônicos. Todavia, o que torna os líquidos iônicos compostos com larga aplicabilidade industrial é a possibilidade de serem planejados e sintetizados para apresentarem um conjunto de propriedades físico-químicas de interesse, como densidade, viscosidade, superfície de tensão, capacidade de aquecimento, condutividade térmica, entre outros, atendendo, assim, às necessidades de diferentes processos industriais, como, por exemplo, a catálise de reações químicas (Clare; Sirwardana; Macfarlane, 2009).

Líquidos em temperaturas abaixo de 100° C, os líquidos iônicos são sais fundidos formados por cátions volumosos e assimétricos e por ânions fracamente coordenados (Egorova; Gordeev; Ananikov, 2017), como mostra a figura 6.

Figura 6. Cátions e ânions presentes em líquidos iônicos.

Fonte: adaptado de Egorova, Gordeev e Ananikov (2017)

Adicionalmente, os líquidos iônicos atendem a, virtualmente, todos os 12 princípios da química verde, impulsionando ainda mais o seu uso como solvente/catalisador ideal na síntese orgânica sustentável (Sandhu; Sandhu, 2012). Diante disso, em reações químicas orgânicas, inclusive em condensações, os líquidos iônicos têm sido empregados como solventes, como suporte para ligação e ativação de catalisadores, como co-catalisadores e, finalmente, como catalisadores, facilitando, ainda, os processos de separação e isolamento das moléculas após serem sintetizadas (Wasserscheid; Welton, 2003).

Como solventes, os LIs apresentam a vantagem de permanecerem líquidos em uma grande faixa de temperatura e solubilizarem diversos compostos orgânicos e inorgânicos, formando uma teia de pontes de hidrogênio que estabilizam os núcleos iônicos em solução (Egorova; Gordeev; Ananikov, 2017). Quando ativos cataliticamente, os líquidos iônicos são capazes de formar complexos com intermediários aniônicos e/ou catiônicos da reação, estabilizando suas respectivas cargas e formando, assim, agregados supramoleculares, que direcionam e promovem as ligações químicas nos vários estados de transição (Neto; Spencer, 2012).

Recentemente, a atividade biológica e a toxicidade dos LIs estão sendo estudados com a finalidade de usá-los como veículos de transporte de fármacos e, até mesmo, desenvolver líquidos iônicos com propriedades farmacológicas próprias, como antitumoral e antibacteriana. Os efeitos citotóxicos dos líquidos iônicos têm sido avaliados tanto em células de vertebrados quanto de invertebrados e aparentemente são provocados por desestabilização da bicamada

lipídica das membranas das células. Os cátions imidazólio presentes em LIs podem, ainda, estar implicados em falência mitocondrial, estresse oxidativo e indução da apoptose (Egorova; Gordeev; Ananikov, 2017).

Flexíveis e verdes, os LIs não precisariam de maiores qualidades para ganharem vasto espaço no desenvolvimento de novas metodologias de síntese orgânica multicomponente, como a reação de condensação de Knoevenagel. Ainda assim, apresentam, como vantagem extra, uma boa interface com outras tecnologias modernas, podendo, por exemplo, ser ligados a suporte poliméricos orgânicos como polietilenoglicol (Cecchini et al. 2014; Elhamifar; Elhamifar; Shojaeipoor, 2017), aos mais variados tipos de nanocompostos simples ou magnéticos (Safari; Zarnegar, 2014) e a enzimas sintéticas como a polietilenoimina (PEI) (Ferreira et al, 2015).

2.5 ENZIMAS SINTÉTICAS

Embora as enzimas naturais apresentem extraordinária eficiência catalítica e alta especificidade pelos substratos, são proteínas de difícil e onerosa obtenção e, em sua maioria, termosensíveis, demandando ambiente aquoso para sua atividade ideal. No sentido de superar tais obstáculos relacionados ao uso de proteínas como biocatalisadores, sem, contudo, perder sua eficiência e especificidade catalíticas, começaram a ser desenvolvidas enzimas sintéticas, de obtenção menos onerosa, perfil de solubilidade mais amplo, incluindo solvente orgânicos, e maior resistência sob condições reacionais que adotem temperaturas superiores à temperatura fisiológica (Norris *et al.* 2017).

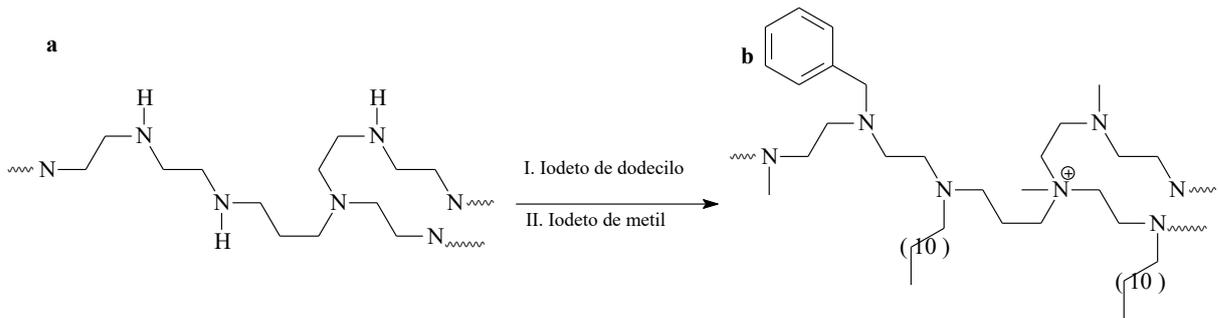
Uma enzima sintética demanda uma estrutura orgânica macromolecular que mescle sítios catalíticos (grupos funcionais específicos) com um arcabouço estrutural adjacente proporcionado pelo restante da molécula e que atua como um domínio acessório da atividade catalítica. Todavia, mimetizar o tamanho e os rearranjos estruturais das proteínas naturais ainda são um grande desafio (Meier; Barner-Kowollik, 2019).

A fosforilação e a desfosforilação de moléculas orgânicas estão entre os mais importantes processos bioquímicos catalisados por enzimas naturais e já podem ser artificialmente conduzidos por enzimas sintéticas, com ampla aplicação biológica, como é o caso da polietilenoimina (PEI), um polímero orgânico que pode apresentar propriedade catalíticas de fosfatase mediante ativação prévia (Pereira *et al.* 2015).

2.5.1 Polietilenoimina ativada em líquido iônico clorado

A PEI é um polímero catiônico formado por ligações entre radicais etileno com aminas primárias, secundárias e terciárias. Todavia, para adquirir propriedade catalítica, a PEI deve sofrer alquilação ou acilação de seus grupos amina, tornando-se, assim, uma enzima sintética, como mostra a esquema 19 (De Paiva, 2017).

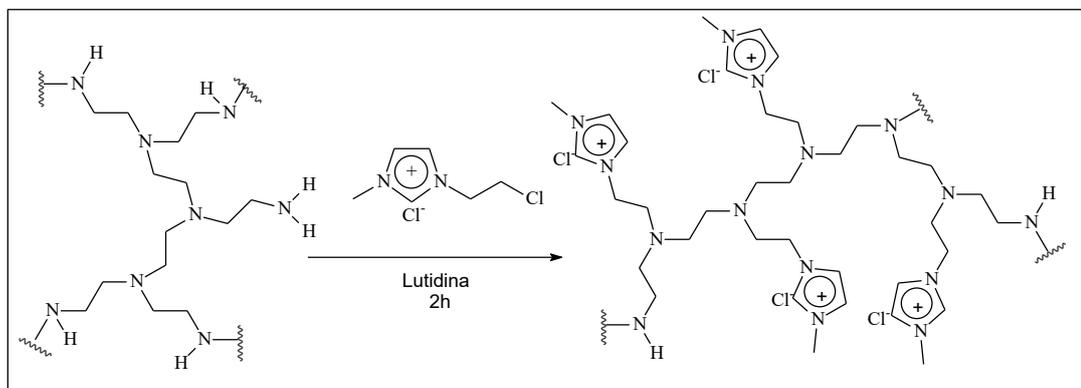
Esquema 19. Reação de ativação da PEI por alquilação.



Fonte: Adaptado de De Paiva (2018)

Adicionalmente, a polietilenoimina pode ser ionicamente marcada pela adição de íons imidazólio, um sítio catalítico comum a várias enzimas e núcleo de diversos fármacos, reunindo, assim, propriedades de líquidos iônicos e de fosfatase, como mostra o esquema 20 (Ferreira et al, 2015). A atividade de fosfatase tem grande relevância biológica, tendo em vista que os processos de desfosforilação de proteínas e nucleotídeos regulam grande parte das atividades vitais de uma célula, como o relaxamento da musculatura lisa que demanda desfosforilação das cadeias leves de miosina ou a liberação de energia para sustentar a atividade metabólica por meios da desfosforilação da fosfocreatina no músculo esquelético, por exemplo (Hall; Hall, 2021).

Esquema 20. Reação de marcação iônica da PEI.



Fonte: Adaptado de Ferreira (2015).

Assim como as enzimas naturais, a PEI é polimérica e apresenta grupamentos amino em sua estrutura, dessa forma, sua estrutura macromolecular permite abrigar sítios ativos e ainda oferecer domínios marginais que, embora desprovidas de atividade catalítica, irão auxiliar na promoção da reação, com ações sinérgicas, como, por exemplo, estabilizar ou favorecer a ligação ao substrato (Ferreira et al., 2015).

A marcação com íon imidazólio clorado fornece a PEI a propriedade de estabilizador de pares iônicos, cátion-ânion, característica dos LIs e que permite a formação de agregados supramoleculares com reagentes, dinamizando sua condensação e promovendo, assim, ganhos consideráveis no rendimento da reação (De Paiva, 2018; Ferreira, 2015).

2.5 ESTUDO *IN SILICO* DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

O processo de prospecção de novos compostos orgânicos com atividade biológica potencial pode ser otimizado ao se associar ferramentas de testes *in silico* aos já tradicionais testes *in vitro* e *in vivo*. Nesse contexto, os testes *in silico* como o estudo da relação de estrutura atividade (Structure activity-relationship - SAR) e as análises conformacionais das moléculas acabaram ganhando um papel chave nas fases iniciais de investigação de novos compostos com potencial para liderar um processo de desenvolvimento de novos medicamentos, conhecido pelo termo em inglês: *hit to lead* (Hoffer et al., 2018).

Os processos de otimização de moléculas com atividade biológica apresentam o triplo objetivo de aumentar a potência, reduzir a toxicidade e garantir biodisponibilidade suficiente dos compostos sob investigação. Nesse cenário, os testes SAR começam pela identificação da existência ou não de uma relação de estrutura-atividade entre a coleção de moléculas-teste e as propriedades a elas associadas. Detectada a relação, tal informação pode ser usada para guiar modificações estruturais que buscarão aumentar a atividade biológica, afinal de contas um teste SAR é antes de tudo um modelo de exploração do ambiente químico molecular visando identificar e otimizar as relações de estrutura-atividade (Hoffer et al., 2018; Guha, 2013).

A relação estrutura-atividade compreende, portanto, um estudo teórico baseado em cálculos computacionais que buscam prever os efeitos desencadeados pela estrutura química de um composto-teste decorrentes da sua interação com o receptor biológico. Tal relação pode ser investigada por meio da adoção de dois tipos diferentes de metodologias, sendo a primeira baseada em métodos estatísticos ou de mineração de dados e a segundo em métodos de abordagem física, como os modelos farmacofóricos (Guha, 2013).

A escolha da metodologia usada no teste de SAR pode aumentar o nível de detalhes obtidos da análise, por exemplo, estudos em 2D não identificarão relações de estrutura-atividade dependentes da quiralidade do composto-teste, que nesses casos demandarão metodologias baseadas em descritores 3D. Por outro lado, estudo tridimensional normalmente demandam que a estrutura cristalográfica do composto-teste esteja determinada (Zian; Borrel; Fourches, 2020). Atualmente, existe metodologias quantitativas de estudos da relação estrutura-atividade em 4D (4D-QSAR), associada ao molecular docking (MD) gerando modelos com elevada capacidade de predição computacional das atividades biológicas de uma estrutura química e do tipo de interação com alvos-biológicos, notadamente com enzimas (Fourches; Ash, 2019).

O teste de SAR, ao associar a coleção de compostos-teste a diversos descritores moleculares, gera uma matriz de dados complexos que devem ser refinados por uma ferramenta estatística de análise e redução de dados multivariados, conhecida como *Principal Component Analysis* – PCA (Yoo; Shahlaei, 2018).

Finalmente, é importante lembrar que testes computacionais servem para gerar modelos teóricos que contribuem significativamente como geradores de ideias que aumentam as possibilidades do pesquisador, ao mesmo tempo em que direcionam suas ações na pesquisa e desenvolvimento de novos compostos biologicamente ativos (Mahmud; Shallangua; Uzairu, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Promover a síntese e caracterização de protótipos de fármacos 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico, via reação de Knoevenagel modificada.

3.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições reacionais para a modificação proposta da reação de Knoevenagel;
- Identificar o mecanismo prioritário seguido pela reação de Knoevenagel modificada;
- Purificar os 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico gerados;
- Identificar as estruturas químicas dos 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico gerados;
- Investigar as atividades biológicas: antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes preliminares dos 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico gerados;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos 5-arilidenos barbitúricos.

4 METODOLOGIA

4.1 SÍNTESE DE DERIVADOS 5-ARILIDENOS BARBITÚRICOS

4.1.1 Reagentes e sistemas

Os reagentes como ácido barbitúrico e aldeídos (benzaldeído, 3-nitrobenzaldeído, 4-nitrobenzaldeído, 4-clorobenzaldeído, 2-hidroxibenzaldeído, vanilina, anisaldeído, toluilaldeído, dimetilaminobenzaldeído e piperaldeído) foram obtidos em grau analítico de pureza junto a Sigma Aldrich[®], bem como os solventes etanol, metanol, tolueno, tetrahidrofurano, hexano, acetonitrila, 1,4-dioxano e dimetilsulfóxico (DMSO) e a glicerina. Foram sintetizados catalisadores de LI: MAIFeCl₇, MSI, MAI.Cl e PEI.LI (de acordo com a literatura). Os catalisadores FeCl₃, CuCl₂, SnCl₂.2H₂O e *p*-TSOH, foram adquiridos de forma comercial.

Os reagentes foram pesados em balão de fundo, usando balança analítica. Cada sistema reacional com aquecimento por banho de óleo (glicerina) foi montado contendo uma chapa magnética, pote de vidro contendo glicerina, condensador conectado a fonte de água e termômetro. Os sistemas de filtragem das reações e de suas recristalizações foram montados com membrana filtrante de celulose, poro de 45 m, não estéril, funil de porcelana e erlenmeyer com saída lateral acoplado a bomba de vácuo simples.

Os pontos de fusão foram aferidos em fusômetro MQAPF301-Microquímica[®].

4.1.2 Purificação dos derivados 5-arilideno barbitúricos

4.1.2.1 Recristalização

Os produtos obtidos foram lavados e filtrados em água quente (60° C) para eliminar resquícios de reagentes, especialmente, do ácido barbitúrico, pouco solúvel em água a temperatura ambiente. Após a recristalização, os produtos secos tiveram, novamente aferidos, seus pontos de fusão e calculados seus rendimentos.

4.1.2.2 Cromatografia de camada delgada e espectroscopia em ultra-violeta/visível

Após a recristalização, uma amostra de cada um dos 10 derivados gerados foi dissolvida em DMSO e analisada em cromatografia de camada delgada (CCD), usando placas de sílica gel de 0,25 mm e metanol puro como eluente, para determinação de pureza das amostras. A revelação das placas foi feita usando cubas cromatográficas contendo vapores de iodo e a fluorescência dos compostos foi verificada em espectrofotômetro ultra-violeta/visível (UV/VIS) sob 254 nm (Câmara escura UV- Cienlab®).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DE DERIVAVOS 5-ARILIDENOS BARBITÚRICOS

A caracterização dos compostos derivados de 5-arilidenos barbitúricos obtidos foi feita mediando o encadeamento das técnicas de análise por espectrofotometria em infravermelho (IV), espectroscopia de ressonância magnética nuclear dos núcleos ^1H e ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$) e espectrometria de massas (EM).

4.2.1 Espectroscopia IV

Amostras dos derivados foram misturadas a brometo de potássio (KBr) e transformadas em pastilhas posteriormente submetidas a espectrofotometria IV (Spectrum frontier – Perkin Elmer®).

Os espectros gerados foram ajustados no software Origin 8.0 da OrignLab®, gerando gráficos de transmitância em porcentagem por nº de onda ajustado de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.2.2 Espectroscopia de RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ $\{^1\text{H}\}$

Os espectros de RMN dos núcleos $^1\text{H}/^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ foram gerados no Laboratório de LabRMN no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, usando o espectroscópio NMR Bruker Avance III 500 (11, 75T). A frequência do espectrofotômetro para a análise do ^1H RMN foi de 600 MHz, RMN ^{13}C de 150 MHz.

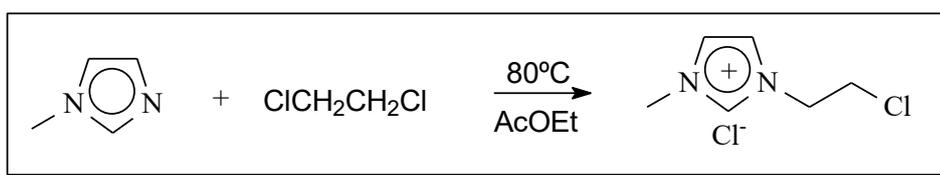
Os dados do RMN ^1H e RMN ^{13}C foram processados no programa ACD/Labs Software. O deslocamento químico (δ) foi dado em ppm e a constante de acoplamento (J) em hertz, sendo adotadas as seguintes abreviaturas para multiplicidades: s = simpleto, d = duplete, dd = duplo duplete, t = tripleto, q = quarteto e m = multiplete. As amostras dos compostos sintetizados foram solubilizadas em dimetilsulfóxico deuterado, DMSO- d_6 .

4.2.3 Síntese dos líquidos iônicos

4.2.3.1 Síntese de polietilenoimina marcada com líquido iônico clorado

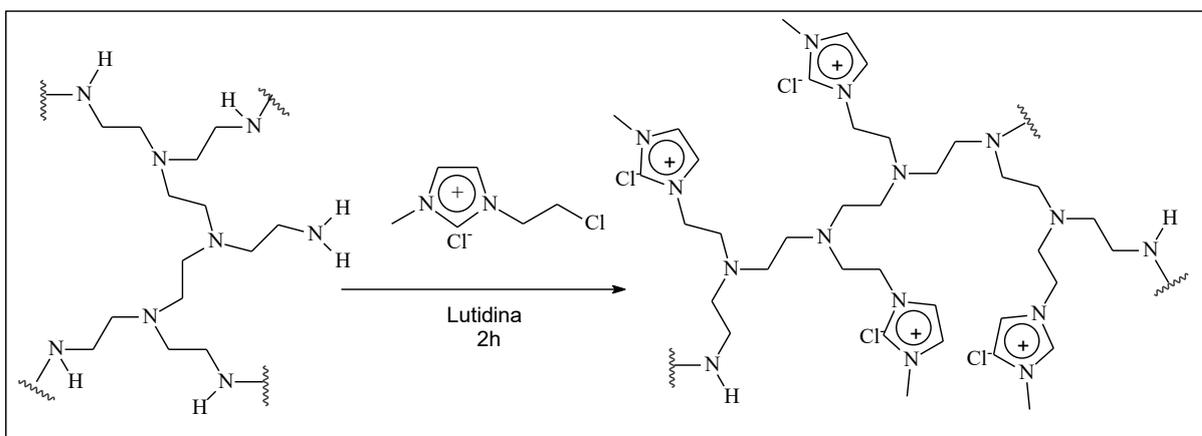
Inicialmente, o líquido iônico clorado foi sintetizado em um balão de fundo redondo de duas bocas no qual foram adicionados 45mL de 1,2 dicloroetano, 30mL de acetato de etila e 15mL de metilimidazol, esse último de forma lenta. O balão foi acoplado a sistema de banho maria em glicerina, aquecida à 80°C por 24 horas, sob refluxo (Esquema 21).

Esquema 21. Síntese do catalisador líquido iônico clorado



Para a marcação iônica da enzima sintética polietilenoimina, dissolveu-se 5g (12,5 mmol) de PEI seca em 10mL de diclorometano (CH₂Cl₂) e transferiu-se para um schlenk, onde adicionou-se 1,4g (7,9 mmol) de 1- (2-cloroetil)-3-metilimidazólio clorado (líquido iônico clorado) e 1,0g (10mmol) de 2,6-Lutidina (Esquema 22). A mistura foi mantida em refluxo por 2 horas a 100°C, para em seguida ser solubilizada em metanol e lavada com diclometano e acetato de etila, levando a formação de precipitado que foi rotaevaporado e seco a vácuo, com coloração fortemente laranja.

Esquema 22. Síntese do catalisador PEI.Li

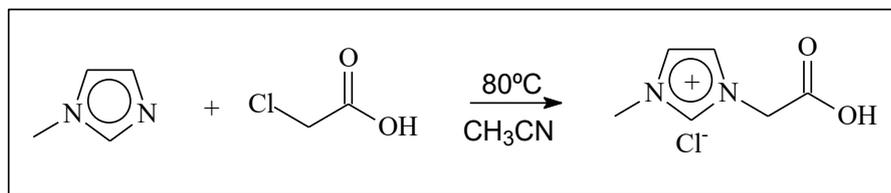


Fonte: Adaptado de Ferreira *et al.* (2015).

4.2.3.2 Síntese de MAI.Cl (1-Metil-3-acetil-imidazol)

A síntese do MAI.Cl foi realizada conforme Esquema 23.

Esquema 23. Síntese do catalisador líquido iônico MAI.Cl⁻

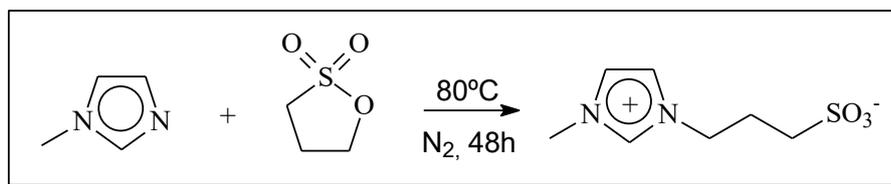


Em balão de fundo redondo de duas bocas, foi adicionado 200 mmol (16,42 g) de *N*-metil-imidazol, 50 mL de acetonitrila (CH₃CN), 312 mmol (29,48 g) de ácido cloroacético. A reação ocorreu em banho de óleo, sob agitação e refluxo à 80°C durante 48 horas. O produto obtido foi filtrado com acetonitrila em funil de vidro sinterizado e o sólido branco seco à vácuo.

4.2.3.3 Síntese de MSI (1-metil-3-(3-sulfopropil) imidazólio zwitteriônico)

A síntese do MSI foi realizada conforme Esquema 24.

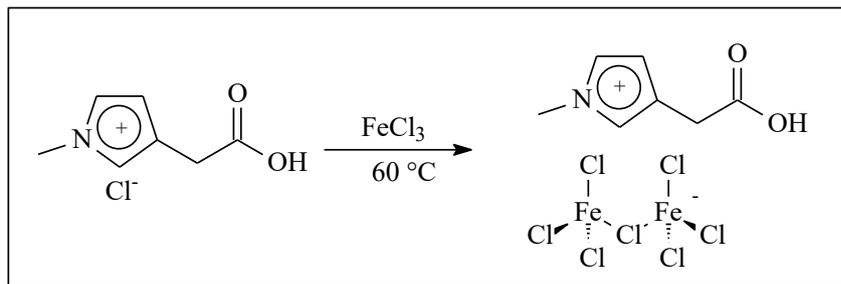
Esquema 24. Síntese do catalisador líquido iônico MSI



Em um balão de fundo redondo de duas bocas, adicionou-se 1 mol (82,11 g) de *N*-metil-imidazol e 10 mL de etanol, posteriormente adicionou-se lentamente 1,2 mols (146,57 g) de 1,3-propanosulfona. A mistura foi agitada por 48 horas à 80°C sob atmosfera inerte. O produto formado foi lavado com acetato de etila e seco à vácuo.

4.2.3.4 Síntese de MAI.Fe₂Cl₇ (Heptato-bis-ferrato de 1-metil-3-carboximetilimidazólio)

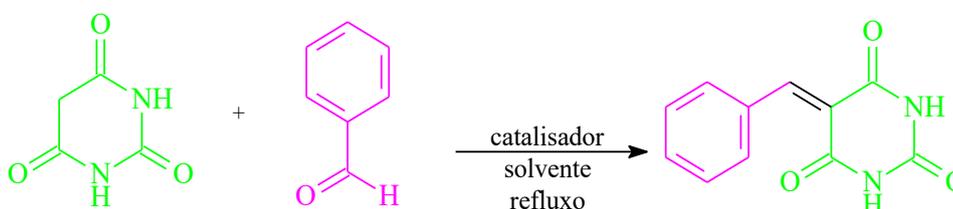
Para obtenção do catalisador MAI.Fe₂Cl₇, o MAI.Cl produzido conforme descrito no esquema 23 foi tratado com FeCl₃, conforme esquema 25.

Esquema 25. Síntese do catalisador líquido iônico MAI.Fe₂Cl₇

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, adicionou-se 1 mol (176,6 g) de MAI.Cl e 2 mol de cloreto férrico (436,1 g), sob agitação constante a 60°C e em atmosfera inerte.

4.2.4 A reação trivial

Os 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico foram gerados a partir de uma variação da reação de condensação de Knoevenagel, benzaldeído e ácido barbitúrico foram usados como reagentes de partida na reação trivial (Esquema 26).

Esquema 26. Variação da reação de Knoevenagel adotando ácido barbitúrico como β-cetoéster para síntese de 5-arilidenos.

A reação trivial anteriormente descrita foi submetida a processo de otimização para definição das condições experimentais ideais. Inicialmente, para avaliação do sistema catalítico, 20% mol os catalisadores FeCl₃, CuCl₂, MAIFeCl₇, MSI, MAI.Cl, SnCl₂.2H₂O, *p*-TSOH e 50mg de PEI.LI foram testados em variações da reação de Knoevenagel sob as seguintes condições experimentais: 3 mmol dos reagentes ácido barbitúrico e benzaldeído pesados em um balão de vidro de fundo redondo com capacidade para 100 mL e solubilizados em 1 mL de água, sob aquecimento em banho de glicerina a 80°C e agitação magnética por 2 horas.

Os produtos obtidos foram precipitados em água gelada e mantidos a -4°C por 24h, filtrados sob pressão reduzida usando papel de filtro, secados em estufas a 70°C. Após pesagem

do produto seco em balança analítica, foram aferidos os pontos de fusão e calculados os rendimentos.

O processo de otimização seguiu com variações da quantidade de catalisador, do tipo e da quantidade de solvente, da temperatura, do tempo de reação e, por fim, da quantidade de reagentes. Dessa forma, foram definidas as condições experimentais otimizadas para a reação trivial que, em seguida, foram aplicadas às reações de síntese de dez 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico gerados a partir de variações que sempre adotaram o ácido barbitúrico em diferentes combinações com 10 aldeídos aromáticos.

4.3 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.3.1 Testes de atividade antibacteriana

4.3.1.1 Linhagens

Nos testes de potencial atividade antibacteriana foram utilizadas linhagens das espécies gram-negativas como *Escherichia coli* ATCC 25312, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, bem como espécies gram-positivas como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633 da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás.

4.3.1.2 Antibiograma

Os testes de sensibilidade antibacteriana (antibiogramas) foram norteados pelo princípio de difusão em ágar, conforme protocolo do “*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*” M2-A13 e realizados em triplicata. Para tanto, as linhagens selecionadas foram previamente estriadas em placas de Petri de vidro 150x20mm contendo meio ágar nutriente sólido (Kasvi®), preparado conforme orientações do fabricante. Em seguida, os 10 derivados de 5-arilidenos barbitúricos foram distribuídos pelas placas, que foram incubadas a 35°C. Após 24 horas, os halos de inibição foram medidos com uso de régua visando identificar as espécies suscetíveis aos produtos testados.

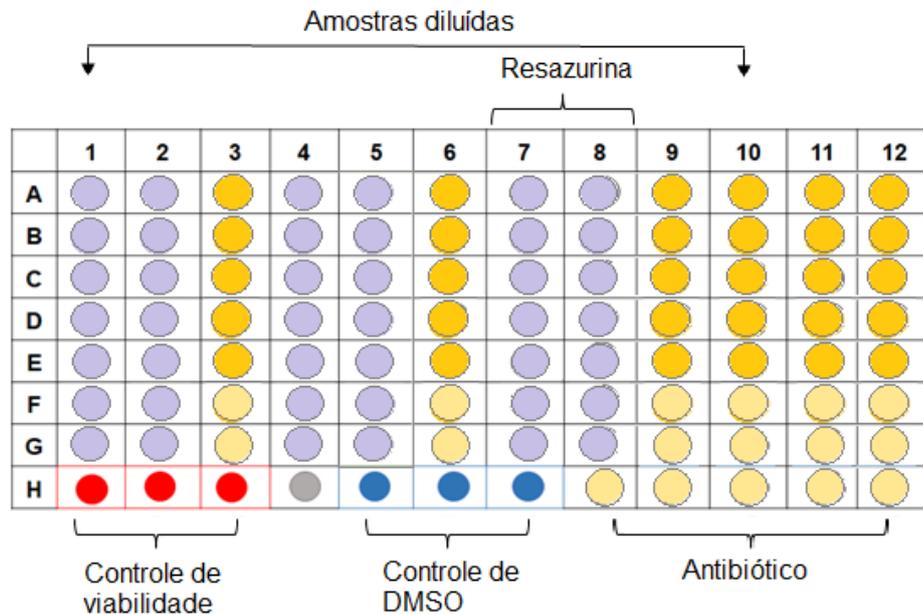
4.3.1.3 Ensaio de inibição do crescimento

O protocolo do “*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*” M07-A10, com alterações, foi adotado para o ensaio de inibição do crescimento visando determinar as concentrações inibitórias mínimas (CMI) de cada um dos 10 derivados de 5-arilidenos barbitúricos. Inicialmente, 2 a 4 colônias isoladas das linhagens de *Eschericia coli ATCC* e *Bacillus subtilis ATCC 6633* selecionadas foram coletadas das placas de petri e diluídas em tubos de ensaio contendo 5 mL de soro fisiológico 0,9% até obter-se turbidez correspondente ao padrão de referência ajustado para 0,5 da escala de Mafarland, que equivale a 10^8 UFC mL⁻¹. Dos tubos com turvação ajustada, foram aliqüotados 0,5mL para diluição em 4.5 mL (1:10) de soro fisiológico, gerando assim a solução inóculo a 10^7 UFC mL.

Para o preparo das soluções-estoque dos 10 derivados de 5-arilidenos barbitúricos a $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em caldo Mueller Hinton (Kasvi®), preparado e ajustado conforme orientação do fabricante, cada um dos 10 derivados testados foi, inicialmente, solubilizado em 5 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução-estoque do antibiótico cloranfenicol foi preparada a $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ e foi usada com controle positivo.

Na placa de 96 poços, cada derivado de 5-arilidenos barbitúricos foi diluído de forma seriada com volume final de 100 μL por poço e no dobro da concentração de interesse (2X). Em seguida, cada poço recebeu outros 100 μL de solução inóculo (7 μL de inóculo em 100 μL de caldo). Dessa forma, obteve-se uma suspensão contendo as substâncias-teste na concentração final de desejada de 1X: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a solução inóculo ajustada para 10^7 UFC mL⁻¹, com volume final de 200 μL por poço. Como controles, em triplicata na placa de 96 poços, foram usadas solução de cloranfenicol + meio + inóculo (Controle positivo), solução de meio + inóculo (controle negativo ou de viabilidade), solução de meio contendo DMSO 5% + inóculo (Controle do DMSO) e solução contendo a substância-teste + meio, sem inóculo (Controle esterilidade do meio). A distribuição dos poços-teste, bem como dos poços-controle na placa estão descritos na figura 7.

Figura 7. Distribuição de poços-teste e poços-controle na placa de 96 poços para teste de concentração inibitória mínima dos derivados de 5-arilidenos de ácido barbitúrico.



Legenda: A-G – Diluições seriadas em triplicata. H1-H3 (Vermelho): solução de meio + inóculo (controle negativo ou de viabilidade); H5-H7 (Azul escuro): solução de meio contendo DMSO 5% + inóculo (Controle do DMSO); H8-H12 (Amarelo claro) - Solução de cloranfenicol + meio + inóculo (Controle positivo).

Fonte: Adaptado de Wang *et al.* (2017).

Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato e após 24h de incubação em estufa a 35°C, o crescimento bacteriano foi aferido verificado visualmente pela turvação do poço ou pela formação de precipitado, com auxílio de lupa.

De cada poço-teste onde não se verificou turvação do meio, nem presença de precipitado, foram pipetados 100 µL da solução para realização do ensaio de concentração mínima bactericida (CMB). Os 100 µL de solução do poço-teste foram espalhados, com o auxílio de uma alça de vidro, em placas de petri contendo ágar nutriente sólido (Kasvi®). As placas foram incubadas a 35°C e o crescimento bacteriano foi verificado 24 horas depois.

4.3.2 Testes de atividade antifúngica

4.3.2.1 Levedura

O teste de atividade antifúngica dos dez compostos 5-arilidenos barbitúricos produzidos foi realizado com o microrganismo *Candida albicans* (ATCC 10231), da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás.

4.3.2.2 Ensaio de inibição do crescimento

O ensaio de inibição de crescimento para leveduras por microdiluição em caldo foi realizado de acordo com o protocolo do “*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*” M27-A2, com alterações. Inicialmente, 5 colônias isoladas de *C. albicans* estriadas 48h antes em ágar-sabouraud (Kasvi®) foram coletadas das placas de petri e diluídas em tubos de ensaio contendo 5 mL de soro fisiológico 0,85% até obter-se turbidez correspondente ao padrão de referência ajustado para 0,5 da escala de Mcfarland, o que equivale a 10^6 células mL^{-1} . Dos tubos com turvação ajustada, produziu-se uma diluição 1:100 seguida de uma diluição 1:20 em caldo, resultando em uma solução teste contendo $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células por mL.

Para o preparo das soluções-estoque dos 10 derivados de 5-arilidenos barbitúricos a 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em caldo Mueller Hinton (Kasvi®), preparado e ajustado conforme orientação do fabricante, cada um dos 10 derivados testados foi, inicialmente, solubilizado em 5 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução-estoque do antibiótico fluconazol foi preparada a 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e foi usada como controle positivo diluída de forma seriada na placa para obtenção das concentrações de 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Na placa de 96 poços, cada derivado de 5-arilidenos barbitúricos foi diluído de forma seriada com volume final de 100 μL por poço e no dobro da concentração de interesse (2X). Em seguida, cada poço recebeu outros 100 μL de solução inóculo. Dessa forma, obteve-se uma suspensão contendo as substâncias-teste na concentração final desejada de 1X, ou seja, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a solução inóculo ajustada para 10^3 células mL^{-2} , com volume final de 200 μL por poço. Como controles, em triplicata na placa de 96 poços, foram usadas solução de fluconazol + meio + inóculo (Controle positivo), solução de meio + inóculo (controle negativo ou de viabilidade), solução de meio contendo DMSO 5% + inóculo (Controle do DMSO) e solução contendo a substância-teste + meio, sem inóculo (Controle esterilidade do meio). A distribuição dos poços-teste, bem como dos poços-controle na placa seguiu mesmo padrão definido na figura 7 para o teste antibacteriano.

Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo redondo e após 24h e 48h de incubação em estufa a 35°C, o crescimento fúngico foi verificado visualmente pela turvação do poço ou

pela formação de precipitado, com auxílio de lupa. Dos poços onde verificou-se inibição do crescimento, 50 µL foram pipetados e transferidos para tubo contendo 3 mL de caldo Mueller Hinton para determinação da concentração fungicida mínima (CFM).

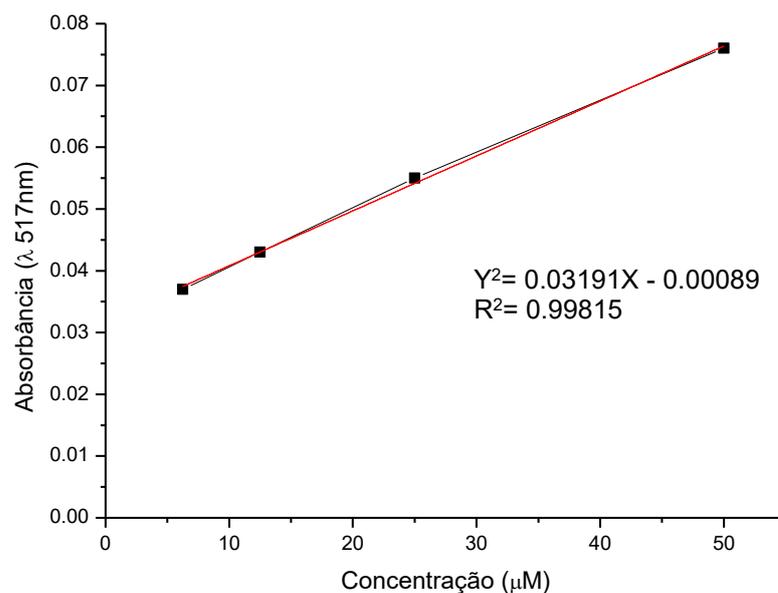
4.3.3 Testes de atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada *in vitro* por meio do ensaio de sequestro do radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), conforme metodologia proposta por (Sharma; Bhat, 2009).

4.3.3.1 A curva padrão de DPPH

Inicialmente, foi preparada uma curva padrão de DPPH, que foi previamente diluído em metanol para obtenção de uma solução estoque a 100 µM, a partir da qual foram realizadas diluições seriadas, em placas de 96 poços de fundo escuro, até a concentração 6,25 µM. Após 30 minutos de incubação da placa, que foi fotoprottegida, as absorvâncias do DPPH foram capturadas em espectrofotômetro UV-VIS a 550 nm (Epoch Biontek®), do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de Goiás. A partir das leituras obtidas, foi possível montar a curva de calibração, onde verificou-se que a relação entre absorvância e a concentração de DPPH se dão em uma função linear e são diretamente proporcionais (Figura 8).

Figura 8. Curva padrão para DPPH.



4.3.3.2 Preparo das soluções e montagem das placas

Além da solução estoque de DPPH para elaboração da curva de calibração previamente descrita, foram preparadas as seguintes soluções estoque: solução metanólica de DPPH a 0,1mM, solução metanólica de quercetina (controle positivo) e dos 10 compostos 5-arídenos barbitúricos diluídos em DMSO na concentração final de 400 μ M.

Nas placas de 96 poços, foram realizadas diluições seriadas das soluções estoque dos 10 compostos teste e da quercetrina, em duplicata, obtendo as concentrações 200 μ M; 100 μ M; 50 μ M; 25 μ M; 12,5 μ M; 6,25 μ M. Nos poços, foi acrescentado 50 μ L da solução metanólica de DPPH e, feito isso, a placa foi deixada ao abrigo da luz por 30 minutos, quando então procedeu-se a leitura das absorvâncias no comprimento de onda UV-VIS 500 nm.

4.3.3.4 Cálculo do percentual de atividade antioxidante (AAO%)

Foram calculadas as médias das leituras das absorvâncias de cada composto e a atividade sequestradora do radical de DPPH, em porcentagem, foi calculada mediante a fórmula:

$$AAO\% = \frac{\text{Abs do controle DPPH} - \text{Abs da amostra}}{\text{Abs do controle DPPH}} \times 100$$

Os resultados foram expressos em média de AAO% \pm Desvio padrão.

4.3.3.5 Cálculo da metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀)

Usando o software OriginPro 8 da Origin Lab[®] foram criados gráficos para obtenção das equações da reta geradas quando se relacionou as concentrações testadas (Eixo X) com as AAO% calculadas (Eixo Y) por composto. Assim, 10 equações da reta foram obtidas, no modelo: $y = ax + b$, onde x é o valor de IC₅₀ e y=50. Assim, a fórmula para calcular a IC₅₀ adotada foi:

$$IC_{50} = \frac{50 - b}{a}$$

Os dados obtidos foram sumarizados em tabelas apresentadas na seção Resultados.

4.3.4 Teste de citotoxicidade

4.3.4.1 Manutenção das linhagens celulares de fibroblastos

Para realização dos ensaios biológicos *in vitro* foram isolados fibroblasto humanos derivados da polpa dentária. O fibroblasto foi cultivado em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-HIGH). O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg L).

As células foram mantidas com meio de cultura em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. Os repiques foram realizados por meio da ação proteolítica de solução 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco, USA). A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão por Azul de Tripán (Sigma) para distinção de células viáveis.

4.3.4.2 Teste de Viabilidade de fibroblastos pelo ensaio MTT

O teste de viabilidade das células fibroblastos foi feito por ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), descrito anteriormente por Mosmann (1983). A solução de MTT interage com as desidrogenases mitocondriais de células viáveis, promovendo a redução do MTT ao composto formazan, o qual possui coloração púrpura. A viabilidade celular é indicada pela quantificação da produção de cristais de formazan. Para este experimento, foram plaqueadas 4×10^3 células em placas de 96 poços. Foi feito o tratamento com os compostos 5-arilidenos de ácido barbitúrico em diferentes concentrações (500, 31,25, e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) dispersas em meio de cultura (DMEM-High) no tempo de 24 horas.

O tratamento foi retirado e acrescentado 150 μL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e incubado por 4 horas a 37°C. Após incubação, esta solução foi retirada e foram adicionados 200 μL de DMSO para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA), utilizando comprimento de onda de 595 nm, com o auxílio do programa SoftMax Pro (Molecular Devices).

O ensaio de MTT foi realizado em triplicata e em três experimentos independentes. Os dados obtidos foram analisados no programa Graphpad Prism 10.0 submetidos a testes específicos com confiança estatística de 95%. Foram utilizados os testes de Anova One-Way.

4.4 ANÁLISE *IN SILICO* DA RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

O estudo da estrutura-atividade dos compostos sintetizados foi realizado através de dados computacionais que envolvem cálculos de mecânica quântica molecular realizados com a contribuição e parceria do Prof. Dr. Luciano Ribeiro - Grupo de Química Teórica e Estrutural da Universidade Estadual de Goiás. A otimização da geometria estrutural desses compostos foi realizada através do programa Gaussian 09 (Frisch *et al.* 2016). As otimizações foram realizadas com a teoria do funcional da densidade (Szabo; Ostuland, 2012) e usando o funcional de troca e correlação híbrido M062X (Morgon, 2013) com a função de base 6-311++G(d,p) (Jessen, 2013).

A relação entre a estrutura e a atividade (SAR) visa relacionar resultados computacionais que englobem cálculos de química quântica e estatística multivariada com as propriedades biológicas dos compostos estudados nesta tese. Para esse propósito, foram empregados cálculos de mecânica quântica, utilizando a teoria do funcional de densidade (DFT, do inglês), por meio do funcional de troca e correlação híbrido M062X, e empregando o conjunto de função base 6-311++G(d,p), todos implementados no *software* Gaussian 16 (Frisch *et al.* 2016). Os descritores derivados dos cálculos teóricos foram associados às atividades antibacterianas e fungicida por meio de métodos estatísticos multivariados, em particular, através da análise de componentes principais (em inglês, PCA). Os procedimentos adotados neste estudo seguiram os mesmos utilizados na literatura especializada (De Paiva *et al.* 2019; Vieira *et al.* 2018).

4.4.1 Procedimentos Computacionais: Análises Conformacionais e Otimização de Geometria

Para uma simples avaliação em química quântica, é essencial possuir a geometria de um composto químico, isto é, a configuração molecular em termos de suas posições no espaço tridimensional. Geralmente, há duas opções: uma geometria experimental, proveniente de

dados cristalográficos, ou uma geométrica advinda de métodos teóricos. Nesta tese, não dispomos da geometria experimental, portanto, optaremos por abordagens teóricas.

As etapas da seleção da geometria final de equilíbrio são entendidas como processo de otimização de geometria. Essa geometria é obtida pela minimização da energia eletrônica e das repulsões eletrostáticas intermoleculares do sistema em análise, usando conceitos da química quântica. Antes de decidir pela geometria final, é necessário realizar uma varredura em todos os ângulos e torções possíveis nas estruturas, uma etapa conhecida como análise conformacional.

A análise conformacional foi feita pelo método de mecânica molecular com o campo de força MM+. Os nove derivados sintetizados 1 ao 9 que apresentaram menor energia nas análises conformacionais tiveram as suas geometrias selecionadas, para uma otimização mais plana.

A obtenção final da otimização da geometria desses derivados foi realizada através do programa Gaussian 16 (Frisch, 2016). Três níveis de cálculos foram utilizados para a otimização de geometria: iniciamos com um método quântico semiempírico AM1 e finalizamos com dois métodos *ab initio*, o B3LYP e finalizamos com o M02XD com a base 6-311+G**.

No que tange aos métodos *ab initio*, ao iniciarmos com o B3LYP, por ser um funcional amplamente utilizado em estudos teóricos e obtenção de geometria. E escolhemos refinar a estrutura com o M062X, por ser um funcional híbrido mais moderno que o B3LYP. Destacamos que em todas as etapas as geometrias de mínimo global foram confirmadas pela ausência de frequências harmônicas imaginárias.

4.4.2 Descritores moleculares

Após concluir a otimização da geometria, foram adquiridos e registrados, em uma planilha, os seguintes descritores moleculares: energias de HOMO energia do orbital molecular mais alto ocupado (HOMO, do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*) e o LUMO, a energia do orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO, do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), momento de dipolo, energia do GAP (diferença entre HOMO e LUMO), energia de ionização (calculada como o negativo da energia de HOMO), afinidade eletrônica (calculada como o negativo da energia de LUMO), dureza, potencial químico eletrônico, índice de eletrofilicidade, área de superfície, volume, refatividade, polarizabilidade e Log P. Para os dez derivados, foram obtidas todas as distâncias, ângulos e torções (ângulos diedrais)

interatômicas possíveis. Por fim, foram registradas a ordem de ligação natural e as cargas atômicas derivadas do potencial eletrostático por meio do método CHELPG.

Todos esses descritores moleculares foram inseridos em uma planilha eletrônica. Em seguida, essa planilha foi transferida para o ambiente computacional R, onde estão disponíveis diversos algoritmos estatísticos e ferramentas de análise de dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DOS CATALISADORES

A otimização da síntese de 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico por meio de uma variação da reação de Knoevenagel que adotou mistura equimolar de ácido barbitúrico, e benzaldeído começou pela comparação entre os diferentes catalisadores e apontou, no geral, bons rendimentos para a reação trivial (Tabela 1). Os catalisadores contendo sais metálicos ficaram retidos no produto, que ficou escuro e, por isso, foram descartados. Quando a catálise foi mediada por MSI, MAI.Cl e *p*-TSOH, os reagentes de partida, especialmente o ácido barbitúrico, não foram completamente consumidos. Sendo assim, o catalisador selecionado dentro do processo de otimização foi a PEI.LI.

Tabela 1. Análise do efeito do catalisador na obtenção do produto

| Entrada | Catalisadores | Rendimento (%) | PF (°C) |
|---------|--------------------------------------|----------------|---------|
| 1 | FeCl ₃ | 75 | >300 |
| 2 | CuCl ₂ | 69 | - |
| 3 | MAI.Fe ₂ Cl ₇ | 79 | >300 |
| 4 | MSI | 71 | - |
| 5 | PEI. LI | 87 | 239-240 |
| 6 | SnCl ₂ .2H ₂ O | 85 | - |
| 7 | <i>p</i> -TSOH | 79 | - |

Condições: 3mmol benzaldeído, 3 mmol ácido barbitúrico, 80°C, 2 horas de reação, 5 mL de água. Catalisadores a 20% mol, exceto PEI.LI: 50 mg.

Os catalisadores, no geral, mostraram rendimentos superiores a 65%. Os catalisadores metálicos testados acabaram incorporados ao produto, gerando produtos da cor escura e, por esse motivo, foram descartados. Adicionalmente, se restaram incorporados ao produto, apresentaram impacto sobre os rendimentos aferidos, gerando valores superestimados.

Como o ácido barbitúrico empregado apresenta ponto de fusão entre 265 e 278°C, os catalisadores que geraram produtos com pontos de fusão semelhantes também foram descartados.

Por sua vez, o catalisador PEI.LI, apresentava elevado rendimento e ponto de fusão de 233°C. Adicionalmente, não foi identificado o uso de uma enzima sintética ativada em LI clorado como a PEI.LI na síntese de 5-arilideno-barbitúrico sendo, portanto, uma abordagem catalítica inovadora.

Por fim, o modelo clássico de catálise da reação de condensação de Knoevenagel postula o uso de um meio catalítico alcalinizado pela presença de um composto contendo grupamento

amina, vindo ao encontro da escolha de PEI.LI, que atende a ambas as especificações, pois é um catalisador ácido, com sítios básicos contendo aminas (Carey; Sunberg, 2007). Sendo assim, decidiu-se pelo uso de PEI.LI como catalisador da reação otimizada.

A PEI.Li é uma enzima sintética desenvolvida para atuar como um catalisador por reunir várias características de promoção da reação englobando tanto sítios ativos quanto domínios circundantes que podem favorecer a reação concentrando os reagentes em seu entorno. Adicionalmente, a PEI.Li apresenta sítios imidazois muito versáteis, pois possuem propriedades ácido-base (catalisador ácido com sítios básicos em sua estrutura). Finalmente, a PEI.Li, enquanto uma sintética suportada em líquido iônico estabiliza cátions e ânions, levando à formação de agregados supramoleculares que facilitam a ocorrência da reação (Ferreira et al., 2015).

5.2 AVALIAÇÃO DOS SOLVENTES

Foram testados sete solventes orgânicos e também a água, conforme mostra a tabela 2. A água foi selecionada como solvente ideal pois, sob aquecimento, é o solvente que melhor solubiliza o ácido barbitúrico a quente, com os produtos gerados mantendo-se insolúveis. Ademais, atende aos postulados da síntese verde.

Tabela 2. Análise do efeito do solvente na obtenção do produto

| Entrada | Solvente | Rendimento (%) | PF (°C) |
|---------|--------------|----------------|---------|
| 1 | Etanol | 81 | 245-246 |
| 2 | Água | 87 | 239-240 |
| 3 | Metanol | 65 | 252-253 |
| 4 | Tolueno | 70 | 255-256 |
| 5 | 1,4-Dioxano | 55 | 262-264 |
| 6 | Hexano | 69 | 267-268 |
| 7 | THF | 70 | 248-249 |
| 8 | Acetonitrila | 52 | 249-250 |

Condições: 3mmol benzaldeído, 3 mmol ácido barbitúrico, 80°C, 2 horas de reação, PEI.LI: 50mg. THF – Tetrahydrofurano

Na variação da quantidade de solvente, as reações com 5mL de água apresentaram rendimento superior (96,64%) ao verificado nas reações com apenas 1 mL do solvente (66,35%), onde a solubilização dos reagentes + catalisador não foi completa.

Embora a reação de condensação de Knoevenagel possa ocorrer até mesmo na ausência de solvente (UTTAM, 2016), optou-se pela adoção da água, que um solvente polar, que pode

auxiliar a maximizar os rendimentos de uma reação de condensação aldólica mais segura e sustentável (Carey; Sunberg, 2007).

5.3 AVALIAÇÃO DO TEMPO DE REAÇÃO

Além do tempo de 2h inicialmente testado, foram avaliados os tempos reacionais de 1h, 4h, 6h e 24h de reação, onde verificou-se que a reação de 4h de duração foi a mais eficaz na síntese de derivados 5-arylideno-barbitúrico (Tabela 3).

Tabela 3. Análise do efeito do tempo na obtenção do produto

| Entrada | Tempo (horas) | Rendimento (%) | PF (°C) |
|----------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| 1 | 1h | 40 | 220-222 |
| 2 | 2h | 87 | 223-225 |
| 3 | 4h | 97 | 239-240 |
| 4 | 6h | 43 | 232-233 |
| 5 | 24h | 43 | 249-250 |

Condições: 1mmol benzaldeído, 1 mmol ácido barbitúrico, 80°C, 5 mL de água, 50mg PEI.LI.

O tempo de reacional não deve ser o longo o bastante para aumentar o gasto de energia e impactar na praticidade e na aplicabilidade da reação proposta, mas deve durar o suficiente para que haja eficiência na síntese do composto esperado, sem desperdícios. Nesse sentido, o tempo de 4h mostrou melhor rendimento, mantendo o ponto de fusão ajustado aos relatos da literatura, sendo, portanto, o tempo adotado no processo de otimização. Finalmente, o tempo reacional de 4h mostrou um excelente rendimento, de 97%, o melhor dentre todos os tempos testados, indicando o período ideal para consumo pleno dos reagentes.

5.4 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE CATALISADOR

Em seguida, foram avaliadas as consequências da alteração das quantidades do catalisador PEI.LI (10, 30, 50 e 80 mg) na eficiência da reação de Knoevenagel proposta, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4. Análise do efeito da quantidade de catalisador na obtenção do produto

| Entrada | PEI.LI | Rendimento (%) | PF (°C) |
|---------|--------|----------------|---------|
| 1 | 10mg | 33 | 235-236 |
| 2 | 30mg | 45 | 245-246 |
| 3 | 50mg | 97 | 239-240 |
| 4 | 80mg | 58 | 248-249 |

Condições: 1mmol benzaldeído, 1 mmol ácido barbitúrico, 80°C, 5 mL de água, 4 horas de reação.

Não necessariamente o aumento da quantidade de catalisador significará aumento diretamente proporcional na eficiência da reação, como visto aqui, pois sabe-se que pode haver saturação do próprio catalisador no meio, como formação de agregados supramoleculares que atrapalharão no rendimento da síntese (Ramos, 2013).

5.5 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA

Nessa etapa, a variação da temperatura foi feita conforme descrito na tabela 5, mostrando que a temperatura de 80°C usada desde o princípio do experimento é a temperatura ideal para a variação de condensação adotada.

Tabela 5. Análise do efeito da temperatura na obtenção do produto

| Entrada | Temperatura (°C) | Rendimento (%) | PF (°C) |
|---------|------------------|----------------|---------|
| 1 | Ambiente | 76 | 228-230 |
| 2 | 60°C | 75 | 228-230 |
| 3 | 80°C | 97 | 239-240 |
| 4 | 90°C | 69 | 232-233 |
| 5 | 100°C | 59 | 262-263 |

Condições: 1mmol benzaldeído, 1 mmol ácido barbitúrico, 5 mL de água, 4 horas de reação, 50mg PEI.LI.

A temperatura altera o estado de agitação das moléculas, elevando a energia cinética do sistema reacional e facilitando a ocorrência de ligações entre os reagentes. Todavia, produtos termosensíveis podem acabar degradando sob aquecimento. Na temperatura de 100°C, o produto apresentou sinais de carbonização, adquirindo coloração escura, sendo a temperatura de 80°C aquela que possibilitou aferir os maiores rendimentos.

5.6 AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE REAGENTES

As variações nas proporções dos reagentes foram feitas para verificar se diante do excesso de um dos reagentes, a condensação de Knoevenagel poderia ser otimizada, mas o resultado mostrou que em caso de excesso de quaisquer dos reagentes, a síntese perde força (Tabela 6).

Tabela 6. Análise do excesso dos reagentes de partida no meio reacional na obtenção do produto

| Entrada | Aldeído | Ac. barbitúrico | Rendimento (%) | Ponto de fusão (°C) |
|---------|---------|-----------------|----------------|---------------------|
| 1 | 1 mmol | 1 mmol | 97 | 239-240 |
| 2 | 2 mmol | 1 mmol | 58 | 272-273 |
| 3 | 3 mmol | 1 mmol | 58 | 272-274 |

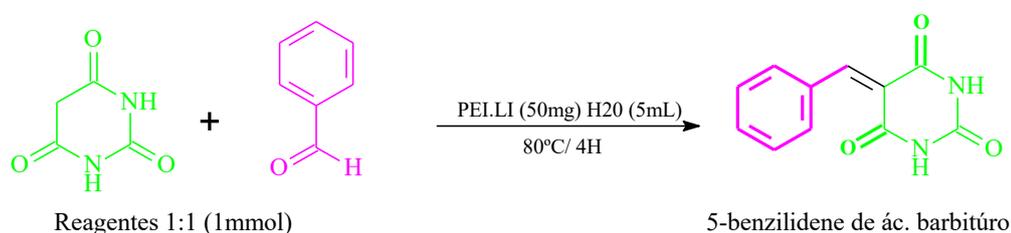
Condições: benzaldeído, ácido barbitúrico, 5 mL de água, 4 horas de reação, 80°C, 50mg PEI.LI.

Embora a lei da reação afirme que a presença de reagentes em excesso aumentará a eficiência da reação de acordo com De Paiva (2018), o mesmo não se viu aqui onde aumentos nas quantidades de aldeídos aromáticos reduziram a eficiência da reação.

Não foram variadas as quantidades de ácido barbitúrico tendo em vista que ele é o reagente que costuma estar presente no produto, portanto, seu excesso poderia dificultar o processo de purificação.

Concluídas as etapas de otimização da reação de Knoevenagel proposta, obteve-se as seguintes condições reacionais ideais: mistura de 1 mmol dos reagentes 1:1 e 50 mg de PEI.LI, solubilizada em 5 mL de água, a 80°C, por 4 horas, sob agitação magnética (Esquema 27).

Esquema 27. Condições reacionais otimizadas para variação da reação de condensação de Knoevenagel adotando ácido barbitúrico para síntese de derivados 5-arilídenos.

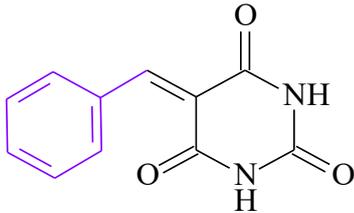
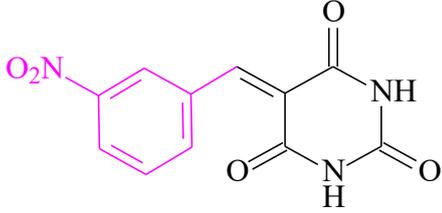
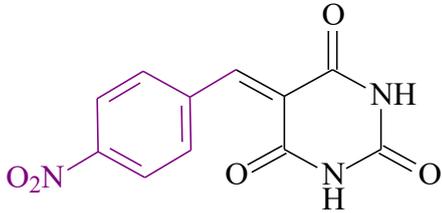
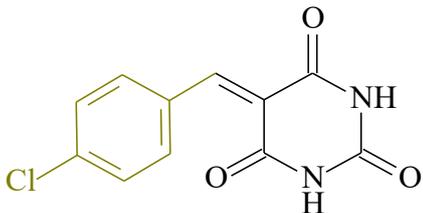
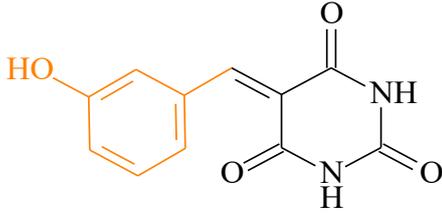


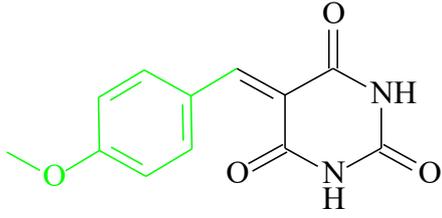
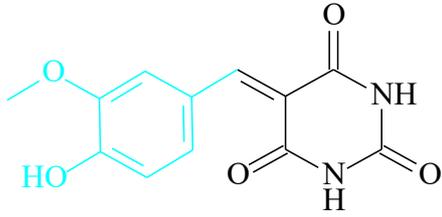
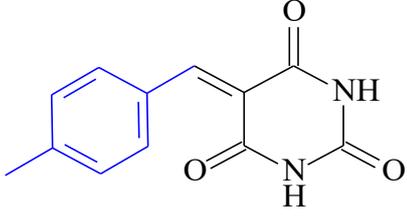
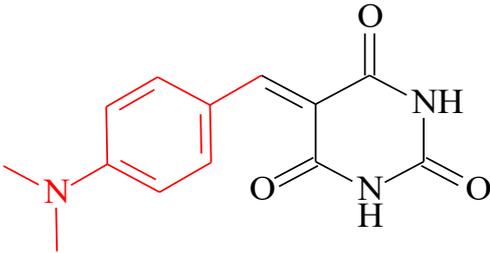
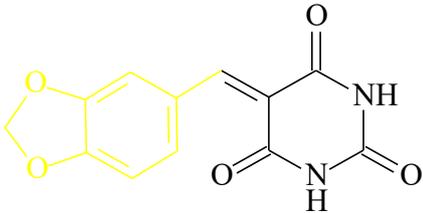
As estruturas dos 10 derivados sintetizados sob as condições reacionais otimizadas anteriormente descritas e caracterizados por espectroscopia IV, RMN H^1/C^{13} e EM estão

sumarizados na tabela 7. O rendimento, os pontos de fusão e o peso molecular dos derivados obtidos são informações adicionais destacadas em ambas as tabelas.

Os espectros em IV e RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de cada um dos 10 derivados gerados constam nos apêndices 1 e 2 (Página 102-131), respectivamente.

Tabela 7. Relação dos derivados 5-arilidenos-barbitúrico sintetizados

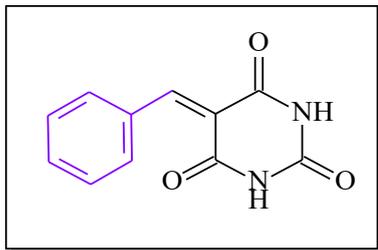
| Composto | Produto | Rendimento (%) | PF (°C) |
|----------|---|----------------|---------|
| <u>1</u> |  | 97 | 239-240 |
| <u>2</u> |  | 99 | 228-230 |
| <u>3</u> |  | 80 | 220-224 |
| <u>4</u> |  | 90 | 272-273 |
| <u>5</u> |  | 68 | 244-246 |

| | | | |
|-----------|---|----|---------|
| <u>6</u> |  | 86 | 286-287 |
| <u>7</u> |  | 82 | 275-277 |
| <u>8</u> |  | 89 | 241-243 |
| <u>9</u> |  | 77 | 285-286 |
| <u>10</u> |  | 78 | >300 |

Condições: 1 mmol benzaldeído, 1 mmol ácido barbitúrico, 5 mL de água, 4 horas de reação, 80°C, 50mg PEI. LI.

5.7 CARACTERIZAÇÃO DOS 5-ARILIDENOS DERIVADOS DE ÁCIDO BARBITÚRICO

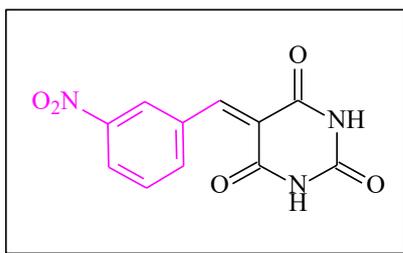
5.7.1 Caracterização do composto 5-benzilideno de ácido barbitúrico



$C_{11}H_8N_2O_3$, sólido branco, PF 239°C, rendimento de 97% após recristalização em água quente.

FT-IV (KBr, cm^{-1}): 3416 cm^{-1} , 3323 cm^{-1} ν (NH); 2975 cm^{-1} ν (C_{sp^2} -H); 2778 cm^{-1} (C_{sp^3} -H); 1702 cm^{-1} ν (C=O); 1645 cm^{-1} ν (C=C); 1494 cm^{-1} , 1419 cm^{-1} ν (C=C_{aromático}); 1236 cm^{-1} ν (C-CO-C) (Pág.102). **RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** δ 2.51 (DMSO); δ 3,34 (H₂O); δ 7,48 (t, 3H-Art); δ 8.06 (d, 2H, H-Art), δ 8,28 (s, 1H, C=CH); δ 11,23 (s, 1H, NH); δ 11,39 (s, 1H, NH) (Pág. 112) **RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** 119,33; 128,30; 132,46; 133,31; 150,45; 154,96; 161,81; 163,64; 193,54 (Pág. 113).

5.7.2 Caracterização do composto 5-(3-nitro)benzilideno de ácido barbitúrico.

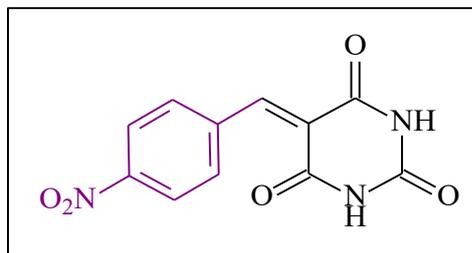


$C_{11}H_7N_3O_5$, sólido bege claro, PF 228°C, rendimento de 99% após recristalização em água quente.

FT-IV (KBr, cm^{-1}): 3442 cm^{-1} , 3388 cm^{-1} ν (NH); 3079 cm^{-1} ν (C_{sp^2} -H); 1727 cm^{-1} ν (C=O); 1695 cm^{-1} ν (C=C); 1530 cm^{-1} ν (C=C_{aromático}); 1346 cm^{-1} ν (NO₂); 1243 cm^{-1} ν (C-CO-C) (Pág. 103). **RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** δ 7,53 (d. 2H-Art); 8,07 (d. 2H-Art); 8,24

(s. 1H. C=CH); 11,26 (s. 1H. NH); 11,41 (s. 1H. NH) (Pág. 114). **RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** 127,3; 127,9; 129,2; 134,5; 136,5; 150,0; 152,8; 163,0; 192,0 (Pág. 115).

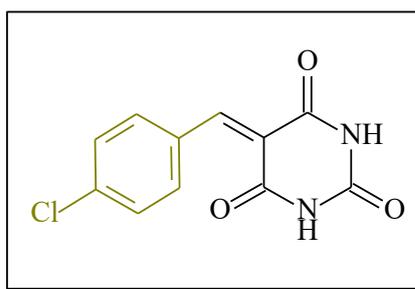
5.7.3 Caracterização do composto 5-(4-nitro)benzilideno de ácido barbitúrico.



$\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_5$, sólido bege claro, PF 220°C, rendimento de 80% após recristalização em água quente.

FT-IV (KBr, cm^{-1}): 3424 cm^{-1} , 3244 cm^{-1} ν (NH); 3108 cm^{-1} ν (C_{sp^2} -H); 1691 cm^{-1} ν (C=O); 1630 cm^{-1} ν (C=C); 1519 cm^{-1} ν (C=C_{aromático}); 1346 cm^{-1} ν (NO₂); 1222 cm^{-1} ν (C-CO-C) (Pág. 104). **RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** 7,53 (d. 2H-Art), 8,07 (d. 2H-Art), 8,24 (s. 1H. C=CH), 11,26 (s. 1H. NH), 11,41 (s. 1H. NH) (Pág. 116). **RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** 127,3, 127,9, 129,2, 134,5, 136,6, 150,0, 152,8, 163,1, 192,0 (Pág. 117).

5.7.4 Caracterização do composto 5-(4-cloro)benzilideno de ácido barbitúrico.

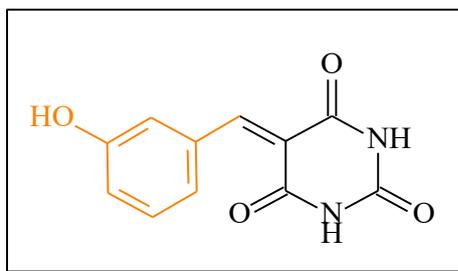


$\text{C}_{11}\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}_3$, sólido bege, PF 272°C, rendimento de 90% após recristalização em água quente.

FT-IV (KBr, cm^{-1}): 3424 cm^{-1} , 3216 cm^{-1} ν (NH); 3098 cm^{-1} ν (C_{sp^2} -H); 2850 cm^{-1} ν (C_{sp^3} -H); 1753 cm^{-1} ν (C=O); 1680 cm^{-1} ν (C=C); 1570 cm^{-1} , 1431 cm^{-1} , 1343 cm^{-1} ν (C=C_{aromático}); 1207 cm^{-1} ν (C-CO-C); 1086 cm^{-1} ν (C-O); 827 cm^{-1} ν (C-Cl) (Pág. 105). **RMN ^1H (DMSO-**

***d*₆, 500 MHz, δ em ppm):** δ 2,51 (DMSO); δ 3,34 (H₂O); δ 7,53 (d, 2H-Art); δ 8,07 (d, 2H-Art); δ 8,24 (s, 1H, C=CH); δ 11,26 (s, 1H, NH); δ 11,41 (s, 1H, NH) (Pág. 118). **RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ em ppm):** δ =127,32; 127,96, 129,25, 134,54; 136,58; 150,05; 152,83; 163,08; 192,05 (Pág. 119).

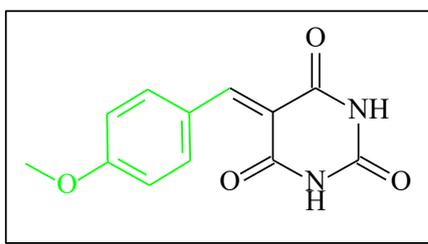
5.7.5 Caracterização do composto 5-(2-hidroxi)benzilideno de ácido barbitúrico.



C₁₁H₈N₂O₄, sólido branco, PF 244°C, rendimento de 68% após recristalização em água quente.

FT-IV (KBr, cm⁻¹): 3212 cm⁻¹ ν (NH); 3090 cm⁻¹ ν (C_{sp²}-H); 2846 cm⁻¹ (C_{sp³}-H); 1753 cm⁻¹ ν (C=O); 1670 cm⁻¹ ν (C=C); 1584 cm⁻¹, 1440 cm⁻¹ ν (C=C_{aromático}); 1287 cm⁻¹ ν (C-CO-C) (Pág. 106). **RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ em ppm):** 7,09-7,10 (d. 1H-Art), 7,14-7,16 (d. 1H-Art), 7,20-7,23 (t. 1H-Art), 10,98 (s. 1H. NH), 11,16 (s. 1H. NH); 11,28 (s. 1H. OH); ¹³C {¹H} (Pág. 120). **RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ em ppm):** 127,3; 127,9; 129,2; 134,5; 136,5; 150,0; 152,8; 163,0; 192,0 (Pág. 121).

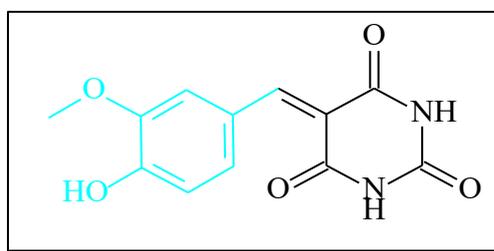
5.7.6 Caracterização do composto 5-(4-metoxi)benzilideno de ácido barbitúrico.



C₁₂H₁₀N₂O₄, sólido amarelo claro, PF 275°C, rendimento de 86% após recristalização em água quente.

FT-IV (KBr, cm^{-1}): 3266 cm^{-1} , cm^{-1} ν (NH); 3073 cm^{-1} ν (C_{sp^2} -H); 2850 cm^{-1} (C_{sp^3} -H); 1746 cm^{-1} ν (C=O); 1666 cm^{-1} ν (C=C); 1502 cm^{-1} ν (C=C_{aromático}); 1308 cm^{-1} ν (C-CO-C); 1186 cm^{-1} ν (C-O) (Pág. 107). **RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** δ 2,51 (DMSO); δ 3,34 (H_2O); 3,88 (s, 3H, -O-(CH_3)₂); δ 7,06 (d, 2H-Art); δ 8,26 (s, 1H, C=CH); δ 8,37 (d, 2H-Art); δ 11,16 (s, 1H, NH); δ 11,29 (s, 1H, NH) (Pág. 122). **RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** 116,1; 118,1; 122,4; 124,9; 128,2; 129,1; 130,8; 134,5; 134,6; 147,1; 150,1; 158,5 (Pág. 123).

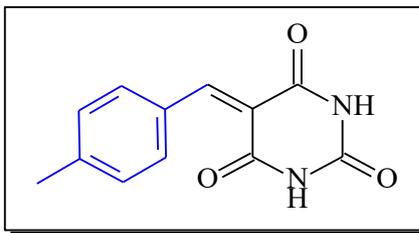
5.7.7 Caracterização do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxi)benzilideno de ácido barbitúrico.



$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5$, sólido laranja, PF 286°C, rendimento de 82% após recristalização em água quente

FT-IV (KBr, cm^{-1}): 3212 cm^{-1} ν (NH); 3073 cm^{-1} ν (C_{sp^2} -H); 2833 cm^{-1} ν (C_{sp^3} -H); 1727 cm^{-1} ν (C=O); 1666 cm^{-1} ν (C=C); 1551 cm^{-1} , 1394 cm^{-1} ν (C=C_{aromático}); 1179 cm^{-1} ν (C-CO-C); 1018 cm^{-1} ν (C-O) (Pág. 108). **RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** δ 2,51 (DMSO); δ 3,34 (H_2O); 3,82 (s, 3H, O- CH_3); δ 6,90 (, 1H-Art);); δ 7,79 (, 1H-Art); δ 8,22 (s, 1H, C=CH); δ 8,47 (s, 1H-Art); 10,56 (s, 1H, OH); δ 11,13 (s, 1H, NH); δ 11,26 (s, 1H, NH) (Pág. 124). **RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** δ = 55, 59; 114,03; 115,39; 118,04; 124,26; 132,62; 147,03; 150,29; 153,13; 156,00; 162,55; 164,26 (Pág. 125).

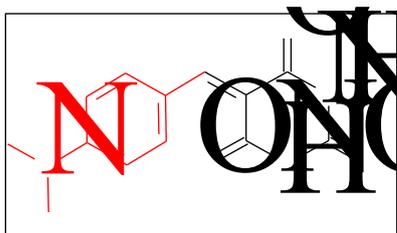
5.7.8 Caracterização do composto 5-(4-metil)benzilideno de ácido barbitúrico.



$C_{12}H_{10}N_2O_3$, sólido branco, PF 241°C, rendimento de 89% após recristalização em água quente.

FT-IV (KBr, cm^{-1}): 3216 cm^{-1} ν (NH); 3079 cm^{-1} ν (C_{sp^2} -H); 2843 cm^{-1} (C_{sp^3} -H); 1746 cm^{-1} ν (C=O); 1666 cm^{-1} ν (C=C); 1577 cm^{-1} , 1349 cm^{-1} ν (C=C_{aromático}); 1196 cm^{-1} ν (C-CO-C) (Pág. 109). **RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** 3,82 (s. 3H. O-CH₃), 6,89-6,91 (d. 1H-Art), 7,78-7,80 (t. 1H-Art), 8,22 (s. 1H. C=CH), 8,47 (s. 1H-Art), 11,13 (s. 1H. NH), 11,26 (s. 1H. NH); $^{13}C\{^1H\}$ (Pág. 126). **RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** 21,3; 103,5; 122,8; 124,7; 127,6; 128,5; 129,2; 129,9; 130,9; 132,7; 138,5; 139,0; 139,6; 141,1; 144,6; 156,3 (Pág. 127).

5.7.9 Caracterização do composto 5-(4-dimetilamino)benzilideno de ácido barbitúrico.

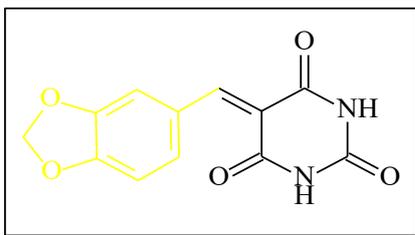


$C_{12}H_{13}N_3O_3$, sólido vermelho escuro, PF 285°C, rendimento de 77% após recristalização em água quente.

FT-IV (KBr, cm^{-1}): 3560 cm^{-1} , 3424 cm^{-1} , 3162 cm^{-1} ν (NH); 3065 cm^{-1} ν (C_{sp^2} -H); 2829 cm^{-1} (C_{sp^3} -H); 1652 cm^{-1} ν (C=O); 1526 cm^{-1} , 1401 cm^{-1} ν (C=C_{aromático}); 1211 cm^{-1} ν (C-CO-C) (Pág. 110). **RMN 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** δ 2,51 (DMSO); δ 3,34 (H₂O); 3,12 (s, 6H, -N-(CH₃)₂); δ 6,79 (d, 2H-Art); δ 8,15 (s, 1H, C=CH); δ 8,42 (d, 2H-Art); δ 10,91 (s,

1H, NH); δ 11,04 (s, 1H, NH) (Pág. 128). **RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** 12,3; 44,5; 96,5; 107,0; 110,3; 116,2; 131,3; 151,9; 153,3; 155,0; 157,5 (Pág. 129).

5.7.10 Caracterização do composto 5-(1,3-benzodioxol-5-carboxialdeído)benzilideno de ácido barbitúrico.



$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_5$, sólido amarelo intenso, PF $>300^\circ\text{C}$, rendimento de 78% após recristalização em água quente.

FT-IV (KBr, cm^{-1}): 3212 cm^{-1} ν (NH); 3100 cm^{-1} ν (C_{sp^2} -H); 2821 cm^{-1} (C_{sp^3} -H); 1731 cm^{-1} ν (C=O); 1666 cm^{-1} ν (C=C); 1544 cm^{-1} , 1451 cm^{-1} ν (C=C_{aromático}); 1255 cm^{-1} ν (C-CO-C); 1032 cm^{-1} ν (C-O) (Pág. 111). **RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** δ 2,51 (DMSO); δ 3,34 (H₂O); 6,18 (s, 2H, CH₂); δ 7,06 (d, 1H, H-Art), δ 7,75 (d, 1H, H-Art); δ 8,21 (s, 1H, C=CH); δ 8,26 (s, 1H, H-Art); δ 11,21 (s, 1H, NH); δ 11,33 (s, 1H, NH) ppm (Pág. 130). **RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz, δ em ppm):** 44,2; 44,5; 96,5; 107,0; 109,8; 110,3; 116,2; 125,9; 131,4; 152,0; 153,3; 155,0; 157,5; 158,5; 159,7 (Pág. 131).

5.8 AVALIAÇÕES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA POTENCIAL

5.8.1 Avaliação de atividade antibacteriana

Inicialmente, com o intuito de selecionar as espécies de bactérias mais sensíveis aos 10 derivados de 5-arilidenos barbitúricos sintetizados, foram realizados, em triplicata, antibiogramas das espécies gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis* e *pseudomonas aeruginosa*, bem como das espécies gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. As espécies bacterianas gram-negativa *E. coli* e gram-positiva *B. subtilis* mostraram maior sensibilidade aos derivados de 5-arilidenos barbitúricos testadas no geral e, por esse motivo, foram selecionadas como microrganismos de escolha para realização dos ensaios de inibição do crescimento (Tabela 8).

Tabela 8. Antibiogramas dos 10 derivados de 5-arilidenos barbitúricos.

| | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>S. choleraesuis</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>S. aureus</i> |
|-----------|------------------|----------------------|------------------------|----------------------|--------------------|------------------|
| | <i>Halo (cm)</i> | | | | | |
| 1 | 0,4 | | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 0,5 |
| 2 | 1 | | 0,7 | | 0,4 | |
| 3 | | 0,9 | 0,7 | | 1,7 | 0,4 |
| 4 | | | | | | 0,4 |
| 5 | 0,4 | | 0,6 | 0,8 | 0,6 | |
| 6 | 0,3 | | 0,5 | | 0,5 | 0,5 |
| 7 | 0,6 | | | | 0,4 | |
| 8 | | | | | 0,4 | 0,5 |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |

Legenda: Halo em cm.

Sendo assim, na avaliação primária do potencial de atividade farmacológica antibacteriana, foram verificadas, em duplicata, as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e mínimas bactericidas (CMB) dos 10 derivados de 5-arilidenos barbitúricos sintetizados sobre as bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, conforme mostra a tabelas 9.

Tabela 9. Determinação da atividade antibacteriana dos compostos 5-arilidenos barbitúricos.

| Compostos | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25312 | |
|-----------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| | MIC $\mu\text{g mL}^{-1}$ | MBC $\mu\text{g mL}^{-1}$ | MIC $\mu\text{g mL}^{-1}$ | MBC $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
| <u>1</u> | ≥ 500 | ≥ 1000 | ≥ 1000 | ≥ 2000 |
| <u>2</u> | ≥ 500 | ≥ 2000 | ≥ 250 | ≥ 1000 |
| <u>3</u> | $\geq 31,25$ | ≥ 250 | ≥ 125 | ≥ 2000 |
| <u>4</u> | ≥ 500 | ≥ 2000 | ≥ 250 | ≥ 1000 |
| <u>5</u> | ≥ 250 | ≥ 2000 | ≥ 500 | ≥ 500 |
| <u>6</u> | ≥ 1000 | ≥ 2000 | ≥ 2000 | ≥ 2000 |
| <u>7</u> | ≥ 2000 | ≥ 2000 | ≥ 2000 | ≥ 2000 |
| <u>8</u> | ≥ 500 | ≥ 2000 | ≥ 500 | ≥ 500 |
| <u>9</u> | ≥ 2000 | ≥ 2000 | ≥ 500 | ≥ 2000 |
| <u>10</u> | ≥ 2000 | ≥ 2000 | ≥ 2000 | ≥ 2000 |

Legenda: CP: Cloranfenicol: CMI $\geq 4 \mu\text{g mL}^{-1}$. CMI $\geq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Potencial de atividade antibacteriana elevado (CMI $\leq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$), moderado (CMI > 100 e $\leq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$), baixo (CMI > 500 e $\leq 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) e nula (CMI $\geq 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) (HOLETZ et al., 2002). CMB - Verificação visual de crescimento de colônia na placa. 5-A Ab: Derivados 5-arilidenos barbitúricos.

Os resultados da avaliação de potencial atividade antibacteriana dos 10 derivados de 5-arilidenos barbitúricos observados pelo teste de concentração inibitória mínima (CMI) mostraram o produto 3 com a mais promissora atividade bacteriostática, tendo em vista sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano da espécie gram-positiva *B. subtilis* de forma intensa (CMI $\leq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e da espécie gram-negativa *E. coli* de forma moderada (CMI > 100 e $\leq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Todavia, o produto 3 apresentou atividade bactericida na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *B. Subtilis* e $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *E. Coli* e o mesmo foi ainda o mais potente bactericida dentre os derivados testados para a espécie *B. subtilis* (CMB = $250 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os produtos 5 e 8 (CMB = $500 \mu\text{g mL}^{-1}$) tiveram resultados semelhantes com os melhores desempenhos contra a bactéria *E. coli* (Tabela 9).

As destacadas atividades bacteriostática e bactericida apresentadas pelo derivado de 5-arilidenos barbitúricos 3 pode ser devida a presença dos grupos nitro no derivado, tendo em vista que o grupamento nitro pode mediar interações de antibacterianos, como o cloranfenicol, como a subunidade 30S dos ribossomos bacterianos (Guimarães; Momesso; Pupo, 2010). Adicionalmente, deve-se destacar que os resultados potencialmente promissores para o derivado 3 foi verificado em bactérias tanto gram-negativas quanto gram-positivas, indicando, assim, um espectro de ação ampliado, que é uma característica apreciável em qualquer molécula candidata a fármaco antibacteriano e que pode indicar uma maior capacidade de penetração na membrana externa das espécies gram-negativas (Katzung; Trevor, 2022).

5.8.2 Avaliação de atividade antifúngica

No teste de inibição do crescimento da levedura *Candida albicans*, foram avaliadas, em triplicata, as concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos 10 derivados de 5-arilidenos barbitúricos sintetizados, conforme mostra a tabela 10.

Tabela 10. Determinação da atividade antifúngica dos compostos 5-arilidenos barbitúricos.

| Compostos | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | |
|-----------|------------------------------------|------------------------------|
| | MIC $\mu\text{g mL}^{-1}$ | CFM $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
| <u>1</u> | ≥ 500 | ≥ 2000 |
| <u>2</u> | ≥ 1000 | ≥ 2000 |
| <u>3</u> | ≥ 500 | ≥ 2000 |
| <u>4</u> | ≥ 2000 | ≥ 2000 |
| <u>5</u> | ≥ 1000 | ≥ 2000 |
| <u>6</u> | ≥ 2000 | ≥ 2000 |
| <u>7</u> | ≥ 2000 | ≥ 2000 |
| <u>8</u> | ≥ 2000 | ≥ 2000 |
| <u>9</u> | ≥ 2000 | ≥ 2000 |
| <u>10</u> | ≥ 2000 | ≥ 2000 |

Legenda: CP: Fluconazol: CMI $\geq 4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Potencial de atividade antifúngica elevado (CMI $\leq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$), moderado (CMI > 100 e $\leq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$), baixo (CMI > 500 e $\leq 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) e nula (CMI $\geq 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) (HOLETZ et al., 2002). CFM – Verificação visual de crescimento de colônia na placa. 5-A Ab: Derivados 5-arilidenos barbitúricos.

Embora tenham sido realizadas leituras com 24h e 48h, não foram observadas diferenças na inibição do crescimento da levedura. O fluconazol, substância usada como controle positivo, mostrou CMI de $\geq 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CFM $\geq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que permite classificar a cepa de *C. albicans* usada como sensível (S) a tal antifúngico, de acordo com o protocolo M27-A2 do CLSI.

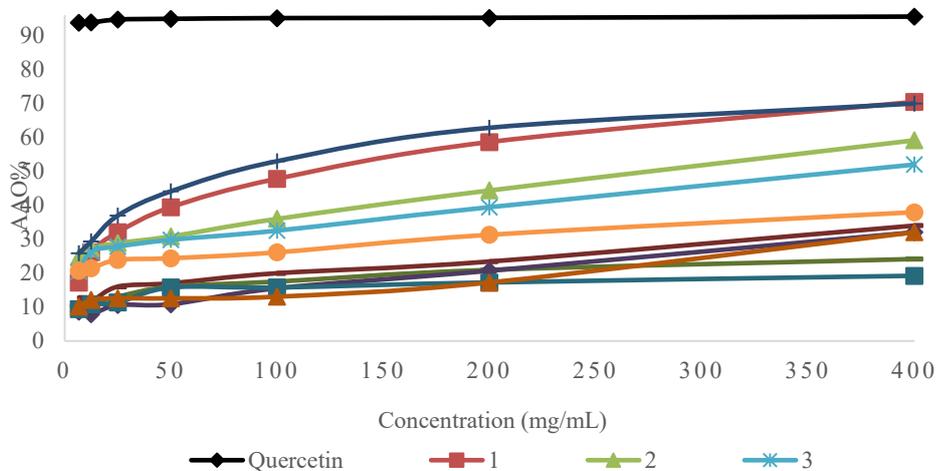
Dentre os dez produtos 5-arilidenos barbitúricos testados, apenas os compostos 1 e 3 mostraram atividade fraca ao inibir o crescimento fúngico nas concentrações $\geq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$. O teste de CFM, que foi realizado apenas para as concentrações dos compostos 1 e 3 $\geq 500 \mu\text{g mL}^{-1}$, mostrou crescimento fúngico constatado pela turvação do meio após 48h em todos os tubos, indicando que ambos os compostos não apresentam atividade fungicida. Infelizmente, a literatura é pobre em informações sobre a atividade biológica de compostos 5-arilidenos barbitúricos, de maneira que buscas em bases de dados científicos não retornaram nenhum outro trabalho que tenha testado o potencial antifúngico desses compostos. Ainda, Khan et al.

(2014) investigaram a atividade antifúngica de 22 compostos 5-arilidenos derivados do ácido barbitúrico dimetilado, compostos intimamente relacionados aos 5-arilidenos barbitúricos aqui avaliados, e só verificaram atividade antifúngica moderada contra *Candida albicans*, especialmente quando testados os compostos nitrados, como o composto **3**. Por fim, Shabeer *et al.* (2018) investigaram a atividade de diversos derivados tiobarbitúricos contra algumas espécies de fungos, incluindo *C. albicans* (ATCC 18804), e observaram ação antifúngica em três dos compostos testados, corroborando, assim, com a ideia de que compostos derivados do ácido barbitúrico devem ser melhor investigados quanto ao seu potencial antifúngico, em especial os compostos nitrados.

5.8.3 Avaliação de atividade biológica antioxidante por meio do ensaio de sequestro do radical livre DPPH

O teste de atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH, mostrou que nenhum dos 10 compostos 5-arilidenos barbitúricos apresentaram atividade antioxidante superior a da quercetina, tampouco foram capazes de manter os níveis de atividade antioxidante nas diluições seriadas testadas tal qual o controle positivo. Todavia, dentre os compostos 5-arilidenos barbitúricos testados, destacaram-se os compostos **1** e **5**, que apresentaram os percentuais de atividade antioxidante e os valores de IC₅₀ mais próximos do valor aferido com o controle positivo quercetina ao menos na maior concentração testada (400 µg mL⁻¹), como mostra o gráfico na figura 9.

Figura 9. Curva padrão para teste de atividade antioxidante dos compostos 5-arilidenos barbitúricos.



Legenda: AAO% - Atividade antioxidante em porcentagem; 1-10 compostos 5-arilidenos barbitúricos testados.

O composto **5** apresenta um grupamento hidroxila meta-substituído no anel aromático que tem seu hidrogênio abstraído pelo DPPH que, então, sofre redução. O radical oxigênio formado acaba estabilizado pela ressonância do núcleo aromático. Ao investigar a atividade antioxidante de compostos 5-arilidenos barbitúricos, Khan *et al.* (2008) analisaram compostos com 2 ou 3 hidroxilas como substituintes do anel aromático e apontaram, como derivado de maior potencial antioxidante, o composto contendo duas hidroxilas adjacentes ligadas ao núcleo aromático da porção aldeído. Todavia, o derivado trihidroxilado nesse estudo, de forma surpreendente, mostrou apenas atividade antioxidante moderada, inferior a do controle positivo adotado (t-butil-4-hidroxianisol). De forma semelhante, em um novo trabalho publicado em 2011, Khan e colaboradores reafirmaram o maior potencial antioxidante dos compostos 5-arilidenos *N,N*-dimetilbarbitúricos que apresentam hidroxilas como substituintes do anel aromático (Khan *et al.*, 2011).

Por outro lado, Khan *et al.* (2008) verificaram grande variação na atividade antioxidante entre os compostos 5-arilidenos barbitúricos apresentando grupamentos nitro como substituintes do núcleo aromático nas posições meta e para. Essa diferença não foi confirmada no presente estudo, onde ambos os compostos nitrosubstituídos apresentaram atividade antioxidante semelhante ao controle positivo (quercetina).

Não foram encontrados, para comparação, outros relatados na literatura de testes de atividade antioxidante dos compostos 5-arilidenos barbitúricos usando quercetina como

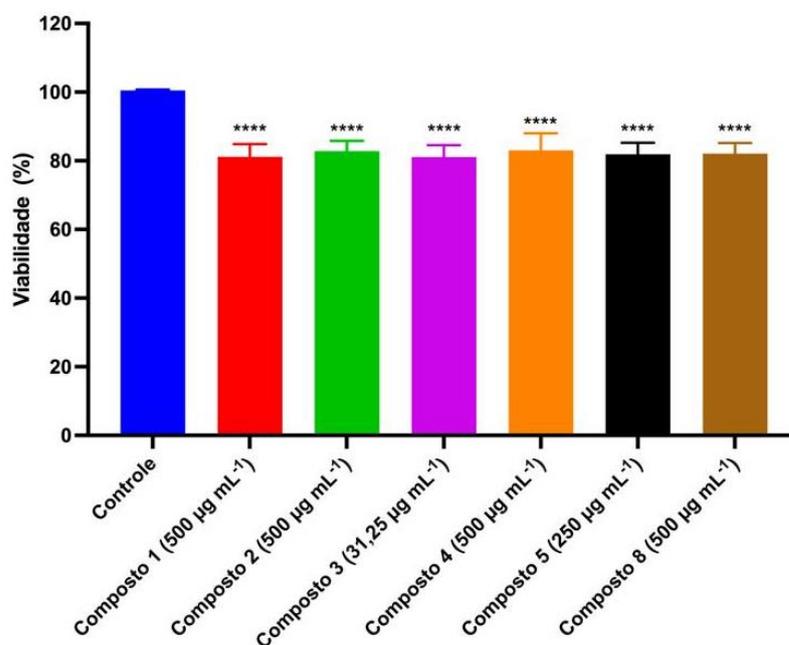
controle positivo e empregando a metodologia de sequestro do radical DPPH concomitantemente.

5.8.4 Avaliação de citotoxicidade em células de mamíferos

A figura 10 traz o resultado do teste de viabilidade de fibroblastos feito por ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), descrito anteriormente por Mosmann (1983). Foram testados, em triplicata, os compostos 1, 2, 3, 4, 5 e 8 nas concentrações de 31,25, 250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os compostos 1, 2 e 3, na maior concentração testada (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), provocaram redução da viabilidade de fibroblastos quando comparados ao controle negativo de citotoxicidade (sem tratamento), todavia o resultado não foi estatisticamente relevante ($p \leq 0,05$). Já os compostos 3 e 5 apresentaram atividade citotóxica mais intensa nas concentrações de 31,25 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, como mostra a figura 10, embora tal resultado também não tenha se mostrado estatisticamente relevante. Portanto, nenhum dos compostos 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico testados mostrou-se citotóxico.

Figura 10. Avaliação de citotoxicidade de 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico pelo teste de viabilidade de fibroblastos usando o método MTT.



Legenda: Os dados estão expressos em média±desvio padrão de absorbância em 595 nm. Controle: controle negativo de citotoxicidade (Meio de cultura). As comparações foram realizadas com o teste ANOVA oneway ($p \leq 0,05$).

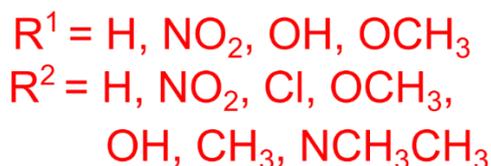
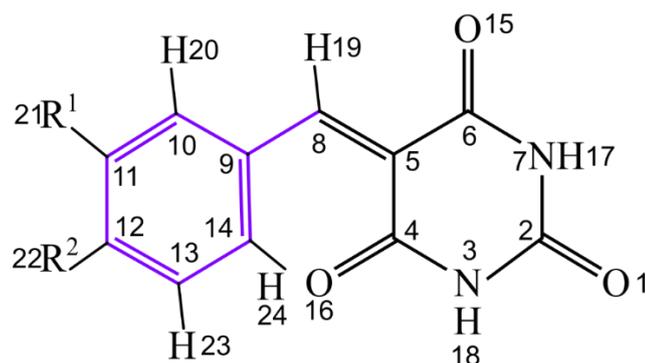
Não foram encontrados na literatura outros estudos de citotoxicidade de 5-arilidenos derivados de ácido barbitúrico em células de mamíferos ou mesmo em animais, indicando uma lacuna que ainda precisa ser sanada enquanto se avança no conhecimento sobre o potencial biológico desses compostos. Todavia, é sempre positivo que triagens iniciais de citotoxicidade em células de mamíferos resultem negativas quando compostos com atividades biológicas promissoras estão sendo investigados.

De fato, até mesmo um resultado positivo em um teste de citotoxicidade não encerra as possibilidades de uma molécula enquanto protótipo para desenvolvimento de um novo medicamento, tendo em vista que a citotoxicidade pode indicar um potencial antineoplásico para a molécula em questão, como é o caso dos arilidenos indanonas que têm sido investigados como agentes anticancerígenos justamente por sua atividade tóxica em células de mamíferos (OZDEMIR *et al.*, 2018).

5.9 ANÁLISES CONFORMACIONAIS E OTIMIZAÇÃO DE GEOMETRIA

O composto ilustrado na Figura 11 pode assumir várias conformações geométricas distintas por apresentar diversos graus de rotação nas ligações da sua composição estrutural. Da combinação de quatro substituintes R^1 e R^2 da Figura 1 formou-se dez derivados, como foram apresentados na Tabela 7.

Figura 21. Representação da estrutura molecular numerada dos 5-arilidenos barbitúricos.



Legenda: R^1 : radicais na posição meta. R^2 : radicais na posição para.

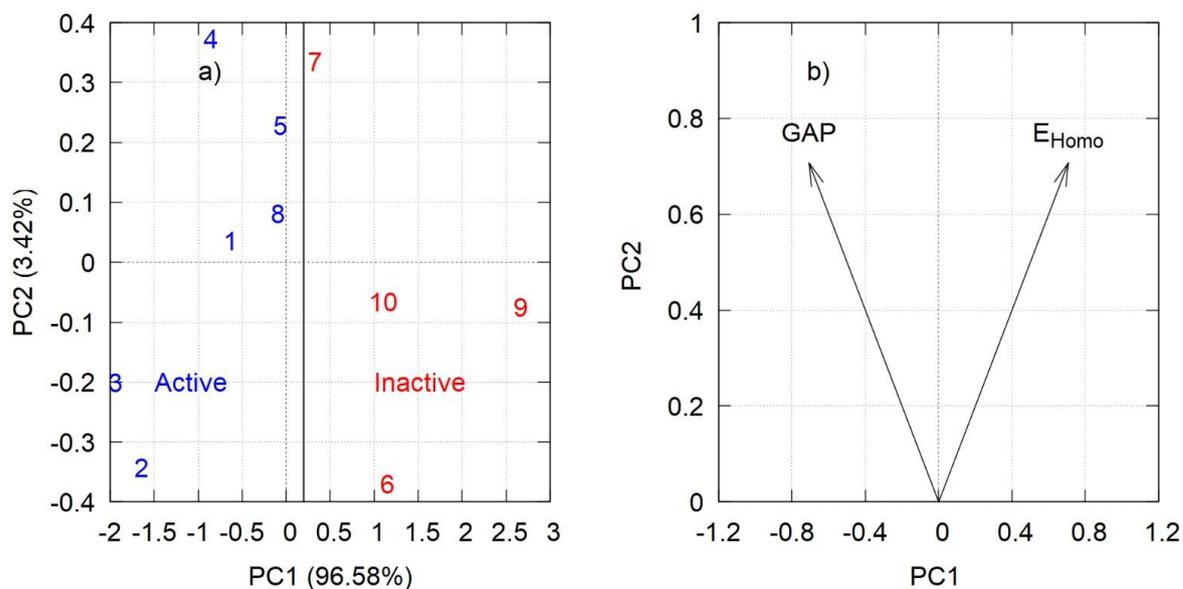
5.9.1 Análise dos Componentes Principais

5.9.1.1 *Bacillus subtilis*

Por meio da aplicação do método de análise dos componentes principais, diversas combinações de descritores moleculares foram avaliadas no ambiente R. A configuração que se destacou pela clara distinção entre os compostos ativos e inativos foi a combinação dos descritores moleculares eletrônicos relacionados à energia do orbital molecular mais alto ocupado (HOMO, do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*) e à diferença de energia entre o HOMO e o orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO) conhecida como GAP (do inglês *Energy Gap*). Essa combinação específica de descritores foi capaz de representar até 96,6% do componente principal PC1 da *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

A Figura 12 exibe as duas primeiras componentes principais, PC1 e PC2, com destaque para uma linha vertical contínua que distingue os derivados azuis (ativos) dos derivados vermelhos (inativos). Para proporcionar uma representação visual mais clara, apenas os números correspondentes aos derivados listados na Tabela 7 estão em evidência.

Figura 12. Gráfico de escores representando as moléculas ativas e inativas. (b) Gráfico dos pesos para os descritores que exercem influência a atividade da *Bacillus subtilis*.



Legenda: HOMO: do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*); energia do GAP (diferença entre HOMO e LUMO (LUMO, do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*)).

Analisando apenas a PC1 da Figura 11 é possível separar os compostos em ativos e inativos. A primeira PC (96.58%) os compostos ativos apresentaram mais valores negativos, contrastando com os compostos inativos que apresentam valores positivos, na mesma PC1.

Uma outra análise, de interesse está no gráfico da Figura 12, os pesos dos descritores, que permitiram uma caracterização de tendências, entres os descritores moleculares selecionados à atividade do composto.

Tabela 21. Valores dos descritores moleculares calculadas utilizando o método de DFT M062X/6-311++G(d,p) e selecionadas pelo PCA perante a *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). As energias de HOMO e a lacuna de energia (GAP) são medidas em hartree (Ha).

| Derivados | Atividade | E _{HOMO} [Ha] | GAP [Ha] |
|-----------|-----------|------------------------|----------|
| <u>1</u> | Ativa | -8.556896 | 7.025710 |
| <u>2</u> | Ativa | -9.190649 | 7.283402 |
| <u>3</u> | Ativa | -9.261671 | 7.462181 |
| <u>4</u> | Ativa | -8.503833 | 7.253198 |
| <u>5</u> | Ativa | -8.210767 | 6.872782 |
| <u>6</u> | Inativa | -7.926408 | 6.131000 |
| <u>7</u> | Inativa | -7.981647 | 6.754957 |
| <u>8</u> | Ativa | -8.289135 | 6.822985 |
| <u>9</u> | Inativa | -7.103263 | 5.635752 |
| <u>10</u> | Inativa | -7.810487 | 6.275764 |

As variáveis responsáveis pela separação das amostras capazes de distinguir as moléculas ativas e inativas para o *Bacillus subtilis* foram somente com descritores eletrônicos: energia de HOMO e lacuna de GAP. São frequentemente utilizados para compreender a reatividade química, estabilidade e outras propriedades relacionadas à estrutura eletrônica moleculares.

Ao combinarmos com os seus pesos podemos escrever a Equação 1,

$$PC1 = -0.7071GAP + 0.7071 E_{HOMO}. \quad (1)$$

Analisando-se a Equação 1 que relaciona as variáveis e coeficientes do componente principal PC1, a presença de pesos iguais indica que ambos GAP e E_{HOMO} estão contribuindo igualmente para o componente principal PC1. O sinal negativo para GAP e positivo para E_{HOMO}

sugere uma relação inversa entre esses dois descritores químicos, no contexto do PC1. Ou seja, quando um aumenta, o outro tende a diminuir, e vice-versa.

A matriz de correlação dos descritores é apresentada na Tabela 12. Esses valores nos ajudam a medir a relação entre as variáveis. Essa relação pode ser linearmente positiva, quando temos valores próximos de +1 e linearmente negativa ou inversa, quando temos valores que tendem a -1.

Tabela 12. Coeficientes de correlação de Person entre os descritores eletrônicos.

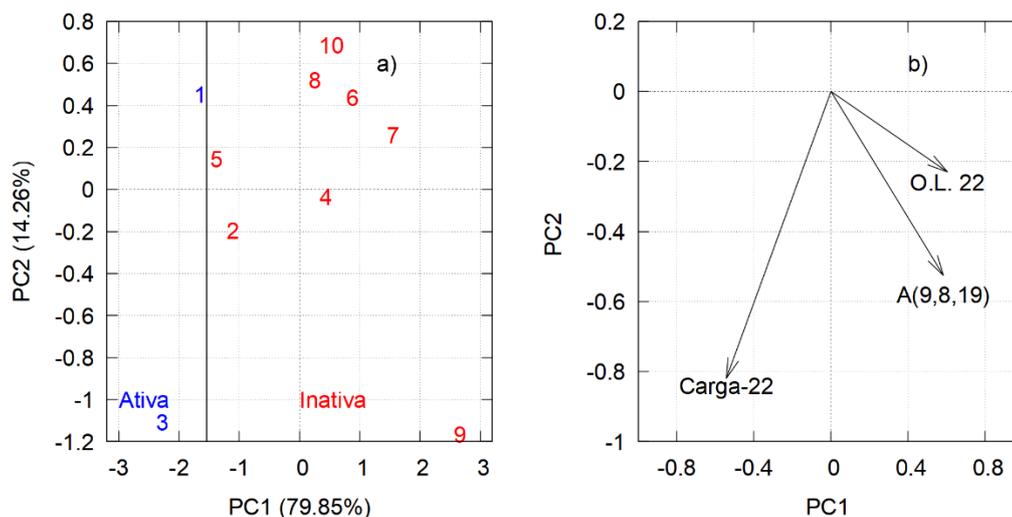
| | E_{HOMO} [Ha] | GAP [Ha] |
|------------------------|------------------------|----------|
| E_{HOMO} [Ha] | 1 | -0.9315 |
| GAP [Ha] | -0.9315 | 1 |

A correlação entre os descritores, selecionados na Figura 11, nos mostram uma forte correlação negativa entre a energia de GAP e a energia do HOMO. Isso significa que, à medida que o GAP aumenta, a energia do HOMO tende a diminuir, e vice-versa. Em termos mais simples, à medida que uma dessas propriedades aumenta, a outra tende a diminuir, e vice-versa. Isso significa que, em termos de variação de valores, uma grande parte da informação contida em um desses descritores pode ser explicada pela variação no outro.

5.9.1.2 *Candida albicans*

A Figura 13 mostra as porcentagens relacionadas aos componentes principais e sua capacidade em explicar a atividade biológica do fungo *Candida albicans* (ATCC 10231), em função da porcentagem dos componentes utilizados para separar as moléculas ativas das inativas. Dos valores presentes nos eixos da Figura 13, a primeira componente principal (PC1) explica 79,85% da variância total dos dados, a segunda componente principal (PC2) explica 14,26%, e a terceira componente principal (PC3), embora não esteja presente na visualização devido à escolha de um gráfico bidimensional, representa o restante, que equivale a 5,89% da variância total.

Figura 13. Gráfico de escores para as moléculas ativas e inativas, (b) Gráfico dos pesos para os descritores que influenciam a atividade do *Candida albicans* (ATCC 10231).



Legenda: O.L.: Ordem de ligação; A: Ângulo de ligação; Carga: Carga do radical.

Na análise da Figura 13, identificamos as variáveis responsáveis pela separação das amostras, destacando sua capacidade de distinguir moléculas ativas das inativas. Os descritores selecionados incluem a carga atômica CHELPG do elemento 22 (conforme mostrado na Figura 13), a ordem de ligação (O.L.) do carbono 12 com os elementos na posição 22 nos vários compostos sintetizados e o ângulo de ligação entre os elementos 9, 8 e 19 (Tabela 13).

Tabela 13. Valores das propriedades geométricas e eletrônica calculadas com método de DFT M062X/6-311++G**(d,p) selecionadas pelo PCA para o *Candida albicans* (ATCC 10231).

| Derivados | Atividade | Carga 22 [e] | O.L. 22 | A(9,8,19) [°] |
|-----------|-----------|--------------|---------|---------------|
| <u>1</u> | Ativa | 0.102514 | 0.9239 | 111.4113 |
| <u>2</u> | Inativa | 0.153015 | 0.9025 | 111.4837 |
| <u>3</u> | Ativa | 0.704368 | 0.8978 | 111.4470 |
| <u>4</u> | Inativa | -0.115132 | 1.0750 | 111.4827 |
| <u>5</u> | Inativa | 0.149239 | 0.9239 | 111.4362 |
| <u>6</u> | Inativa | -0.403487 | 1.0306 | 111.5173 |
| <u>7</u> | Inativa | -0.516912 | 1.0381 | 111.5677 |
| <u>8</u> | Inativa | -0.265089 | 1.0345 | 111.4681 |
| <u>9</u> | Inativa | -0.259573 | 1.1780 | 111.6283 |
| <u>10</u> | Inativa | -0.411169 | 1.0042 | 111.4970 |

A Equação 2 estabelece uma relação entre os descritores e seus valores de pesos no componente principal da PC1,

$$PC1 = -0,5432C_{22} + 0,60422O.L. + 0,5829A(9,8,19). \quad (2)$$

Em análise a Equação 2, ela fornece uma informação detalhada de como diferentes descritores contribuem para a variação no componente principal PC1. Nota-se que o coeficiente negativo associado a C_{22} sugere uma relação inversa com PC1. A carga atômica mais elevada no átomo 22 está associada a uma diminuição em PC1. Isso pode indicar que moléculas com cargas mais baixas neste átomo contribuem positivamente para PC1, e vice-versa.

A ordem de ligação (O.L.) entre o carbono 12 e o elemento 22 tem um coeficiente positivo, que indica um aumento na ordem de ligação está relacionado a um aumento em PC1. Isso sugere que ligações mais fortes ou de ordem superior entre o carbono 12 e o elemento 22 contribuem positivamente para PC1.

Já o ângulo de ligação A(9,8,19) entre os elementos 9, 8 e 19 possuem um coeficiente positivo associado ao ângulo A(9,8,19) indica que um aumento nesse ângulo está associado a um aumento em PC1. Isso sugere que determinados arranjos geométricos específicos entre os elementos 9, 8 e 19 contribuem positivamente para a variação observada em PC1.

Tabela 14. Coeficientes de correlação entre os descritores carga 22, ângulos A_1 e A_2 , torção T_1 e ordem de ligação O.L. 24.

| | Carga 22 [e] | O.L. 22 | A(9,8,19) [°] |
|---------------|--------------|---------|---------------|
| Carga 22 [e] | 1 | 0.6809 | -0.5945 |
| O.L. 22 | -0.6809 | 1 | 0.8117 |
| A(9,8,19) [°] | -0.5945 | 0.8117 | 1 |

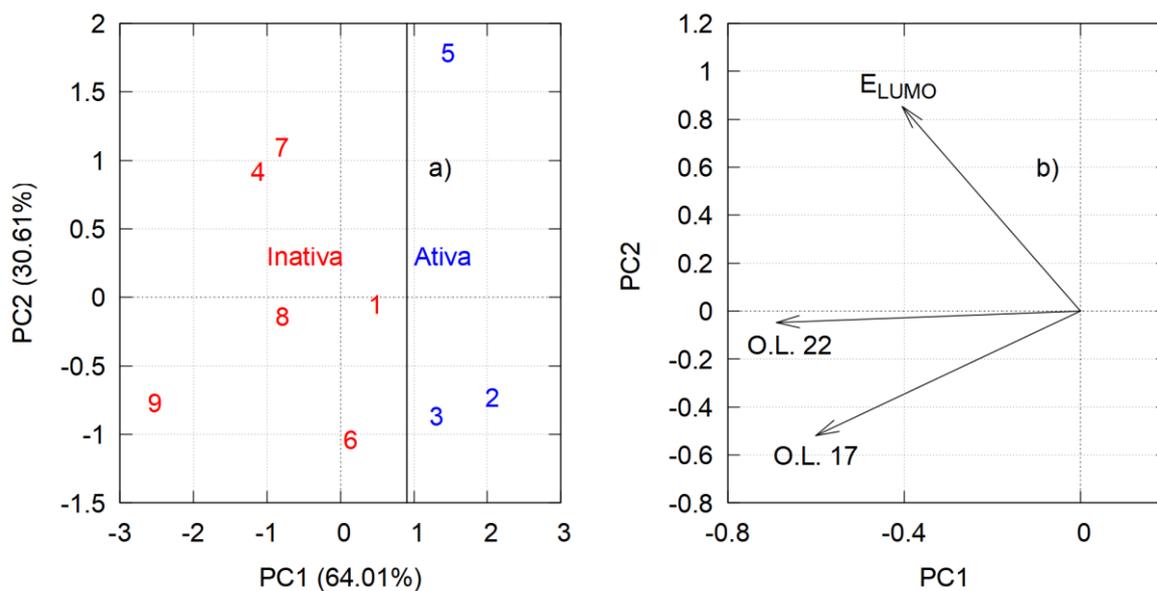
A matriz de correlação de Pearson desses descritores é apresentada na Tabela 14. A correlação negativa entre os descritores carga 22 e O.L. sugere uma relação inversa entre a carga do átomo 22 e a ordem de ligação 22. Isso significa que, em geral, conforme a carga do átomo 22 aumenta, a ordem de ligação 22 tende a diminuir, e vice-versa. Por outro lado, a carga 22 e "A21-A(9,8,19) tem correlação positiva e sugere uma relação direta entre eles. Em geral, conforme a ordem de ligação 22 aumenta, o ângulo também tende a aumentar, e vice-versa.

5.9.1.3 *Escherichia coli*

A Figura 14 apresenta as porcentagens dos componentes principais e sua contribuição para elucidar a atividade biológica da bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25312), com base na proporção de cada componente utilizada para diferenciar as moléculas ativas das inativas.

Na análise da Figura 14, identificamos as variáveis-chave responsáveis pela separação das amostras, ressaltando sua capacidade de distinguir moléculas ativas de inativas. Os descritores escolhidos compreendem a carga atômica CHELPG do elemento 22 (conforme ilustrado na Figura 1), a ordem de ligação (O.L. 22) entre o carbono 12 e os elementos na posição 22 nos compostos sintetizados, e a ordem de ligação (O.L. 17) entre os carbonos 10 e 11. Os valores numéricos desses descritores estão detalhados na Tabela 15.

Figura 14. Gráfico de escores para as moléculas ativas e inativas, (b) Gráfico dos pesos para os descritores que influenciam a atividade da *E. coli*.



Legenda: HOMO: do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*); LUMO: a energia do orbital molecular mais baixo desocupado; (LUMO, do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*); energia do GAP (diferença entre HOMO e LUMO).

Tabela 15. Valores das propriedades geométricas e eletrônica calculadas com método de DFT M062X/6-311++G**(d,p) selecionadas pelo PCA para a *E. Coli*.

| Derivados | Atividade | Carga 22 [e] | O.L. 22 | O.L. 17 |
|-----------|-----------|--------------|---------|---------|
| 1 | Inativo | 0.4823 | -0.0508 | -0.7301 |
| 2 | Ativo | 2.0663 | -0.7302 | 0.4070 |
| 3 | Ativo | 1.3039 | -0.8687 | -0.4026 |
| 4 | Inativo | -1.1168 | 0.9215 | 0.1388 |
| 5 | Ativo | 1.4659 | 1.7858 | 0.3308 |
| 6 | Inativo | 0.1443 | -1.0386 | 0.5280 |
| 7 | Inativo | -0.7946 | 1.0967 | -0.1112 |
| 8 | Inativa | -0.7848 | -0.1386 | -0.2393 |
| 9 | Inativo | -2.5206 | -0.7693 | 0.2756 |
| 10 | Inativo | -0.2459 | -0.2076 | -0.1968 |

A Equação 3 apresenta a relação entre os descritores e seus respectivos pesos no componente principal PC1,

$$PC1 = -0.4044 E_{LUMO} - 0.6897 \text{ O.L.22} - 0.6005 \text{ O.L.17.} \quad (3)$$

Na análise da Equação 3, ela revela como os diferentes descritores influenciam o componente principal PC1. O coeficiente negativo para E_{LUMO} indica uma relação inversa com PC1. A ordem de ligação entre o carbono 12 e o elemento 22 apresenta um coeficiente negativo, sugerindo que uma diminuição na ordem de ligação está associada a um aumento em PC1. Isso significa que ligações mais fortes ou de maior ordem entre o carbono 12 e o elemento 22 contribuem positivamente para PC1. A mesma relação é observada para o terceiro descritor, O.L. 17, entre os carbonos 10 e 11, onde uma redução na ordem de ligação está relacionada a um aumento em PC1.

Tabela 16. Coeficientes de correlação entre os descritores energia de LUMO, e as ordens de ligação 22 e 17.

| | E_LUMO | O.L. 22 | O.L. 17 |
|----------------|---------------|----------------|----------------|
| E_LUMO | 1 | 0.4597 | 0.0917 |
| O.L. 22 | 0.4597 | 1 | 0.7474 |
| O.L. 17 | 0.0917 | 0.8117 | 1 |

A matriz de correlação de Pearson desses descritores é apresentada na Tabela 16. O coeficiente de correlação entre E_{LUMO} e O.L. 22 é de aproximadamente 0.4597, o que indica uma correlação moderada positiva. Isso sugere que há uma relação moderada entre ambos termos. Se a E_{LUMO} aumentar, a ordem de ligação entre esses átomos também tende a aumentar, e vice-versa, mas essa relação não é muito forte. Já o coeficiente de correlação entre E_{LUMO} e O.L. 17 é de aproximadamente 0.0917, indicando uma correlação fraca. Isso sugere que não há uma relação significativa entre a E_{LUMO} e a ordem de ligação entre os átomos 10 e 11. A variação em uma variável não parece estar fortemente associada à variação na outra. Por outro lado, o coeficiente de correlação entre ordens de ligação é de aproximadamente 0.7474, indicando uma correlação forte e positiva. Isso sugere que há uma relação forte entre a ordem de ligação, um aumento na ordem de ligação entre um par de átomos está associado a um aumento correspondente na ordem de ligação entre o outro par de átomos.

6 CONCLUSÃO

A síntese orgânica mostrou-se uma ferramenta prática e barata para produção de compostos químicos voltados para a avaliação de potenciais propriedades biológicas, um dos primeiros passos dentro do longo e complexo processo de obtenção de novas moléculas candidatas a fármacos.

Aqui, a metodologia de síntese orgânica adotada propôs uma revitalização da clássica reação de condensação de Knoevenagel modernizada pela sua adequação aos postulados da química verde, o que pode ser obtido graças ao uso da enzima sintética polietilenoimina suportada em líquido iônico (PEI-LI) como catalisador. Adicionalmente, o processo de otimização das condições reacionais mostrou-se eficiente, permitindo ajustar as condições ideais para síntese de 5-arilidenos barbitúricos. Todavia, os processos de purificação e caracterização apresentaram-se mais desafiadores, diante da dificuldade de se retirar o reagente ácido barbitúrico de alguns dos produtos finais gerados, haja vista terem mostrado perfil de solubilidade muito semelhantes e restritos.

Quando avaliadas as propriedades biológicas dos 10 compostos 5-arilidenos barbitúricos gerados, ficou evidente o potencial promissor dessas moléculas, especialmente do composto nitrado, o derivado **(3)** (5-(2-hidroxi)benzilideno de ác. barbitúrico), que apresentou atividade bactericida de espectro ampliado tanto contra a bactéria gram-negativa *E. coli*, como contra o bacilo gram-positivo *B. subtilis* e dos derivados **1** (5-benzilideno de ác. barbitúrico) e **5** (5-(3-nitro)benzilideno de ác. barbitúrico), que no teste de atividade antioxidante, apresentaram ação antioxidante e IC₅₀ semelhantes as do controle positivo quercetina na maior concentração testada (400 µg mL⁻¹), bem como atividade antifúngica moderada contra a levedura *C. albicans*. Ademais, o ensaio de citotoxicidade com os compostos mostrou que não apresentam, numa primeira abordagem, toxicidade significativa contra células de mamíferos, o que mesmo preliminar, é um dado sempre positivo em moléculas com atividade biológica presente e possibilidade de avançarem no processo de seleção de moléculas líderes para desenvolvimento de novos fármacos.

O estudo teórico estrutura-atividade utilizando cálculos de mecânica quântica molecular realizados usando a teoria do funcional da densidade, por meio do funcional de troca e correlação híbrido M062X e utilizando dos conjuntos de base 6-311++G(d,p) se mostrou eficaz na descrição qualitativa quanto aos descritores geométricos e eletrônicos dos compostos em questão. Essa análise por PCA permitiu identificar os descritores que mais contribuíram para a

compreensão dos dados. De tal forma, mostrou que foi possível separar as estruturas em dois grupos, a partir dos descritores selecionados, separando-as em dois grupos distintos, as moléculas ativas e inativas frente às bactérias *Bacillus subtilis* e a *Escherichia coli* e o fungo *Candida albicans*.

Diante dos resultados promissores obtidos e cientes da escassez de estudos voltados para investigação das propriedades biológicas dos compostos 5-arilidenos barbitúricos, acredita-se que bons frutos poderão advir de futuras pesquisas voltadas para investigação de outras propriedades biológicas e farmacológicas desses compostos, sem esquecer dos estudos voltados para investigação toxicológica dos 5-arilidenos barbitúricos, especialmente em mamíferos.

REFERÊNCIAS

ACHARYA, C.; COOP, A.; POLLI, J. E.; MACKERELL JR, A. D. Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach. **Current comput-aided drug design**, v. 7 (1), p. 10-22, 2012.

ALCERRECA, G.; SANABRIA, R.; MIRANDA, R.; ARROYO, G.; TAMARIZ, J.; DELGADO, F. Preparation of benzylidene barbituric acids promoted by infrared irradiation in absence of solvent. **Synthetic communications**, v. 30, p. 1295-1301, 2000.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J.C. **Green Chemistry: Theory and Practice**. Oxford University Press: Nova York, 1998.

ANDERSON, A. C. The process of structure-based drug design. **Chemistry & Biology**, v. 10, p. 787-797, 2003.

ANVISA, 2010. Farmacopeia brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa. 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5%C2%AA+edi%C3%A7%C3%A3o+-+Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>>. Acesso em: 15/01/2022.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação de fármacos**. 1. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

BENNAZHA J.; ZAHOUILY M.; SEBTI S.; BOUKHARI, A.; HOLT, E. M. A Na₂CaP₂O₇, a new catalyst for Knoevenagel reaction. **Catalysis Communications**, v. 2, p. 101-104, 2001.

BRASIL. Presidência da República. **Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015**, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Lei/L13123.htm>. Acesso em 15/01/19.

BRUNTON, L. L.; DANDAN, R. H.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica**. 13.ed. Porto Alegre: AMGH, 2018.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced organic chemistry - Part A: structure and mechanisms**. 5. Ed. Berlim: Springer, 2007.

CAREY, F. A. **Química orgânica**. Porto Alegre:AMGH, 7. Ed.,2011.

CECCHINI, M. M.; CHARNAY, C.; DE ANGELIS, F.; LAMATY, F.; MARTINEZ, J.; COLACINO, E. Poly(ethylene glycol)-based ionic liquids: properties and uses as alternative solvents in organic synthesis and catalysis. **Chemistry sustainability energy materials**, v. 7(1), p. 45-65, 2014.

CLARE, B.; SIRWARDANA, A.; MACFARLANE, D. R. Synthesis, purification and characterization of ionic liquids. **Topics in current chemistry**, v. 290, p. 1-40, 2010.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Approved standard, 10th ed. CLSI document M7-A10. 10 ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for broth dilution antifungal susceptibility test for yeasts**. Approved standard, 4th ed. CLSI document M27-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**, 13th Edition. Approved standard, 13th ed. CLSI document M2-A13. 13 ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CUI, H.; RUDA, G. F.; CARRERO-LÉRIDA, J.; RUIZ-PÉREZ, L. M.; GILBERT, I. H.; GONZÁLEZ-PACANOWSKA, D. Exploring new inhibitors of Plasmodium falciparum purine nucleoside phosphorylase. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, p. 5140-5149, 2010.

DAI, G.; SHI, D.; ZHOU, L. Knoevenagel Condensation Catalysed by Potassium Fluoride/Alumina. **Chinese Journal Applied Chemistry**, v. 12, p. 104-108, 1995.

DE MARCO, B. A. RECHELO, B. S.; TÓTOLI, E.G.; KAGAWA, A.C.; SALGADO, H. R. N. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: a review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, p. 1-8, 2019.

DE PAIVA, R. K. C. **Síntese e avaliação biológica de derivados nitrogenados do tipo tiazolo-[3,4d]piridinas via reação de Biginelli, utilizando uma enzima sintética com efeito de líquido iônico**. 2017. 172 f. Dissertação (Mestrado em ciências moleculares) – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO, 2017.

de Paiva, R.; da Silva, J.; Moreira, H.; Pinto, O.; Camargo, L.; Naves, P.; Camargo, A.; Ribeiro, L.; Ramos, L. ;Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 30, n.1 p. 164-172, 1, 2019.

DEB, M. L.; BHUYAN, P. P. Uncatalysed Knoevenagel condensation in aqueous medium at room temperature. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 6453-6456, 2005.

DEWAN, S.; SINGH, R. One pot synthesis of barbiturates on reaction of barbituric acid with aldehydes under microwave irradiation using a variety of catalysts. **Synthetic Communications**, v. 33, p. 3081-3084, 2006.

DIGHORE, N. R., ANANDGAONKER, P. L., GAIKWAD, S. T., RAJBHOJ, A. S. Solvent free green synthesis of 5-arylidine barbituric acid derivatives catalyzed by copper oxide nanoparticles. **Research Journal of chemical sciences**, v. 4, 93–98, 2014.

EGOROVA, K. S.; GORDEEV, E. G.; ANANIKOV, V. P; Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceutics and Medicine. **Chemical reviews**, v. 117(10), p. 7132-7189, 2017.

EKINS, S.; CLARK, A. M.; SWAMIDASS, J.; LITTERMAN, N.; WILLIAMS, A. J. Bigger data, collaborative tools and future of predictive drug discovery. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 28 (10), p. 997-1008, 2014.

ELHAMIFAR, DAVAR.; ELHAMIFAR, DAWOOD.; SHOJAEIPOOR, F. Synthesis, characterization and catalytic application of a novel polyethylene-supported Fe/ionic liquid complex. **Journal of molecular catalysis A: chemical**, v. 426, p. 198-204, 2017.

FERREIRA, J. G. L.; RAMOS, L. M.; OLIVEIRA, A. L.; ORTH, E. S.; AMARO NETO, B. Na Ionically Tagged Water- Soluble Artificial Enzyme Promotes the Desphosforilation Reaction with nitroimidazole: Enhanced Ioninic Liquid Effect and Mechanism. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 80, p. 5979-5983, 2015.

FOURCHES, D.; ASH, J. 4D- quantitative structure–activity relationship modeling: making a comeback. **Expert Opinion on drug Discovery**, 2019.

ZIN, P. P. K.; BORREL, A.; FOURCHES, D. Benchmarking 2D/3D/MD-QSAR Models for Imatinib Derivatives: How Far Can We Predict? *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 60(7), p. 3342-3360, 2020

FRISCH, M. J.; G. W.; TRUCKS, H. B.; SCHLEGEL, G. E.; SCUSERIA, M. A.; ROBB, J. R.; CHEESEMAN, G.; SCALMANI, V.; BARONE, G. A.; PETERSSON, H.; NAKATSUJI, X.; LI, M.; CARICATO, A.; MARENICH, J.; BLOINO, B. G.; JANESKO, R.; GOMPERTS, B.; MENNUCCI, H. P.; HRATCHIAN, J. V. O.; D. J. F. (2016). *Gaussian 09, Revision A.02*. Wallingford CT.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; LI, X.; CARICATO, M.; MARENICH, A. V.; BLOINO, J.; JANESKO, B. G.; GOMPERTS, R.; MENNUCCI, B.; HRATCH, D. J. *Gaussian 16, Revision C.01* **2016**.

GUHA, R. On exploring structure activity relationships. **Methods of molecular biology**, v. 993, p. 81-94, 2013.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33 (3), p. 667-679, 2010.

HALL, J. E.; HALL, M. E. Guyton & Hall Tratado de fisiologia médica. 14.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

HOFFER, L.; MULLER, C.; ROCHE, P.; MORELLI, X. Chemistry-driven Hit-to-lead Optimization Guided by Structure-based Approaches. **Molecular information**, v. 37, p. e1800059, 2018.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97 (7), p. 1027–1031, 2002.

HOSSEINI, H.; SHEIKHHOSSEINI, E.; GHAZANFARI, D. Synthesis of arylidenebarbituric acid derivatives catalyzed by dodecylbenzenesulfonic acid (DBSA) in aqueous media. **Iranian journal of catalysis**, v. 6, p. 121–125, 2016.

JENSEN, F. Atomic orbital basis sets. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 3, n. 3, p. 273-295, 2013.

JURSIC, B. S. A Simple Method for Knoevenagel Condensation of α,β -Conjugated and Aromatic Aldehydes with Barbituric Acid. **Journal of heterocyclic chemistry**, v. 38, p. 655, 2001.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 15. Ed. Porto Alegre: AMGH, 2022.

KHAN, K. M.; ALI, M.; AJAZ, A.; PERVEEN, S.; CHOUDHARY, I.; RAHMAN, A. Synthesis of 5-arylidene barbiturates: a novel class of DPPH radical scavengers. **Letters in drug design & discovery**, v. 5, p. 286-291, 2008.

KHAN, K. M.; ALI, M.; FAROOQUI, T. A.; KHAN, M.; TAHA, M. An Improved Method for the Synthesis of 5-Arylidene Barbiturates using BiCl_3 . *Journal of chemical society of Pakistan*, v. 31(5), p. 823, 2009.

KHAN, K. M.; KHAN, M.; ALI, M.; TAHA, M.; HAMEED, A.; ALI, S.; PERVEEN, S.; CHOUDHARY, I. Synthesis and DPPH radical scavending activity of 5-arylidene-N,N-dimethylbarbiturates. **Medicinal chemistry**, v. 7, p. 231-236, 2011.

KHAN, K. M.; KHAN, M.; AHMAD, A.; IRSHAD, A.; KARDONO, L. B. S.; RAHIM, F.; HAIDER, S. M.; AHMED, S.; PARVEEN, S. Antibacterial and Antifungal Activities of 5-Arylidene-N,N-Dimethylbarbiturates Derivatives. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, Vol. 36, No. 6, 2014.

KHURANA, J.; VIJ, K. Nickel Nanoparticles Catalyzed Knoevenagel Condensation of Aromatic Aldehydes with Barbituric Acids and 2-Thiobarbituric Acids. **Catalysis Letters**, v. 138, p. 104-110, 2010.

LI, J.T.; DAI, H. G.; LIU D.; LI, T. S. Efficient Method for Synthesis of the Derivatives of 5-Arylidene Barbituric Acid Catalyzed by Aminosulfonic Acid with Grinding. **Synthetic Communications**, v. 36, p. 789-794, 2006.

LI J. T., SUN M. X.. $\text{SiO}_2 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$: A highly efficient catalyst for the synthesis of 5-arylidene barbituric acid in the presence of water. **Australian Journal Chemistry**, v. 62, 353–355, 2009.

MAADI, E. A.; MATTHIESEN, C.L.; ERSHADI, P.; BACKER, J.; HERRON, D. M.; HOLT, E. M. Knoevenagel condensation catalyzed by $\text{K}_2\text{NiP}_2\text{O}_7$. Synthesis of (E)-methyl α -cyanocinnamates in high yields. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 33, p. 757-763, 2003.

MAHMUD, A. W.; SHALLANGWA, G. A.; UZAIRU, A. QSAR and molecular docking studies of 1,3-dioxoisindoline-4-aminoquinolines as potent antiplasmodium hybrid compounds. **Heliyon**, v. 6(3), p. e03449, 2020.

MEIER, M.; BARNER-KOWOLLIK, C. A new class of materials: sequence-defined macromolecules and their emerging applications. **Advanced materials**, 2019.

MORGON, N. H. Estudo teórico das transições eletrônicas usando métodos simples e sofisticados. **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 593-599, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

NETO, B. A. D.; SPENCER, J. The impressive chemistry, applications and features of ionic liquids: properties, catalysis & catalysts and trends. **Journal of Brazilian chemical society**, v. 23(6), p. 987-1007, 2012.

NORRIS, V.; KRYLOV, S. N.; AGARWAL, P. K.; WHITE, G. J. Synthetic, Switchable Enzymes. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 27, p. 117-127, 2017.

OZDEMIR, A.; GOKBULUT, S.; SEVER, B.; CIFTCI G. A.; ALTINTOP, M. D. Synthesis and Evaluation of a New Series of Arylidene Indanones as Potential Anticancer Agents. **Anti-cancer agents in medical chemistry**, v. 18(10), p. 1394-1404, 2018.

PAPROCKI, D.; MADEJ, A.; KOZELEWSKI, D.; BRODZKA, A.; OSTASZEWSKI, R. Multicomponent reactions accelerated by aqueous micelles. **Frontiers in chemistry**, v. 6, artigo 502, 2018.

PEREIRA, J. G. L.; RAMOS, L. M.; DE OLIVEIRA, A. L.; ORTH, E. S.; NETO, B. A. D. An ionically tagged water-soluble artificial enzyme promotes the dephosphorylation reaction with

nitroimidazole: enhanced ionic liquid effect and mechanism. **The journal of organic chemistry**, v. 80, p. 5979-5983, 2015.

POURGASEMI-LATI, M.; SHIRINI, F.; ALINIA-ASLI, M.; REZVANI, M. A. Butane-1-sulfonic acid immobilized on magnetic Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles: A novel and heterogeneous catalyst for the one-pot synthesis of barbituric acid and pyrano[2,3-d] pyrimidine derivatives in aqueous media. **Applied organometallic chemistry**, v. 32, p. e4455, 2018.

PRAJAPATI, D.; SANDHU, J. S. Cadmium iodide as a new catalyst for Knoevenagel condensations. **Journal of Chemical Society Perkin Transactions**, v. 1, p. 739-740, 1993.

PULLABHOTLA, V. S. R.; RAHMAN, A.; JONNALAGADDA, S. B. Selective catalytic Knoevenagel condensation by Ni-SiO₂ supported heterogeneous catalysts: An environmentally benign approach. **Catalysis communications**, v. 10, p. 365-369, 2009.

RAJPUT, J. K., KAUR, G. CoFe₂O₄ nanoparticles: An efficient heterogeneous magnetically separable catalyst for “click” synthesis of arylidene barbituric acid derivatives at room temperature. **Chinese Journal Catalysis**, v. 34, 1697–1704, 2013.

RAO, P. S.; VENKATARATNAM, R. V. Zinc chloride as a new catalyst for Knoevenagel condensation. **Tetrahedron Letters**, v. 32, v. 5821-5822, 1991.

SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18(2):85–99, 2014.

SANDHU, S.; SANDHU, J. Past, present and future of the Biginelli reaction: a critical perspective. **Arkivoc**, v. p. 66-133, 2012.

SARAVANAN, C.; EASWARAMOORTHY, S.; WANG, L. Colorimetric detection of fluoride ion by 5-arylidenebarbituric acids: Dual interaction mode for fluoride ion with single receptor. **Dalton transactions**, v. 43 (13), 2014.

SATTAR, M. A.; KHATUN, M. S. T. K.; ISLAM, R.; SOHRAB, M. D. H.; AL-REZA, S. M. Synthesis of barbituric acid derivatives using microwave irradiation method and in vitro evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, p. 38-42, 2015.

SEBTI, S.; SMAHI, A.; SOLHY, A. Natural phosphate doped with potassium fluoride and modified with sodium nitrate: efficient catalysts for the Knoevenagel condensation. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 1813-1816, 2002.

SEYYEDI, N.; SHIRINI, F.; LANGARUDI, M. S. N.; DABCO-based ionic liquids: green and recyclable catalysts for the synthesis of barbituric and thiobarbituric acid derivatives in aqueous media. **RSC Advances**, v. 6 (50), p. 44630-44640, 2016.

SHABEER, M.; BARBOSA, L. C. A.; KARAK, M.; COELHO, A. C. S.; TAKAHASHI, J. A. Thiobarbiturates as potential antifungal agents to control human infections caused by *Candida* and *Cryptococcus* species. **Medicinal Chemistry Research**, 2018.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food chemistry**, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto ao medicamento**. 1. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Química orgânica**. 12. Ed. Barueri-SP: LTC, 2018.

SZABO, A.; OSTULAND, N. S. **Modern quantum chemistry: introduction to advanced electronic structure theory**. Courier Corporation, 2012.

UTTAM, B. M. A solvent free green protocol for synthesis of 5-arylidine barbituric acid derivatives. **Organic chemistry: an Indian journal**, v. 12, p. 1-6, 2016.

VIEIRA, A. A.; GOMES, N. M.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Synthesis and *In Vivo* Evaluation of 5-Chloro-5-benzobarbiturates as New Central Nervous System Depressants. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 364-371, 2011.

VIEIRA, I.; CAMARGO, L. T. F. M.; RIBEIRO, L.; RODRIGUES, A. C. C.; CAMARGO, A. J. ;J Mol Model 2019, 25, 116

WANG, C.; MA, J.; ZHOU, X.; ZANG, X. H.; WANG, Z.; GAO, Y.; CUI, P. 1-n-Butyl-3-Methylimidazolium Tetrafluoroborate–Promoted Green Synthesis of 5- Arylidene Barbituric Acids and Thiobarbituric Acid Derivatives. **Synthetic Communications**, v. 35, p. 2759-2764, 2005.

WASSERSCHIED, P.; WELTON, T. **Ionic liquids in synthesis**. 2. Ed. Weiheim: Wiley-VCH, 2005.

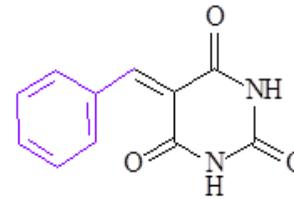
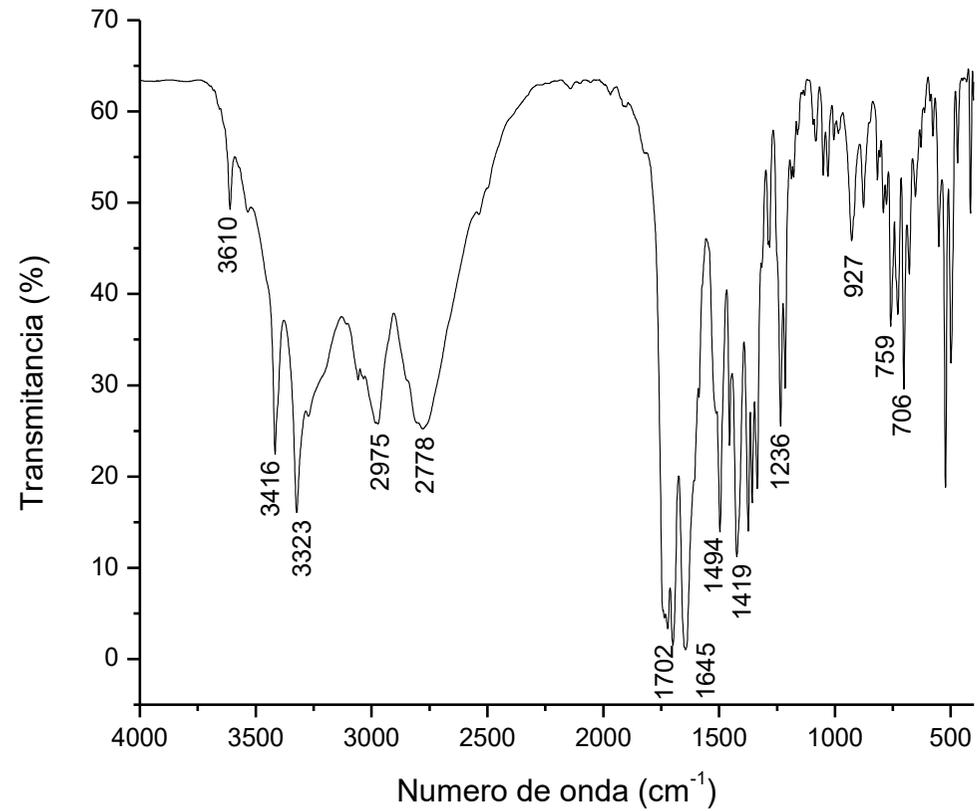
YOO, CHANGKYOO.; SHAHLAEI, M. The applications of PCA in QSAR studies: A case study on CCR5 antagonists. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 91(1), p. 137-152, 2018.

ZHU, J.; BIENAYMÉ, H. **Multicomponent reactions**. Weiheim: Wiley-VCH, 2005.

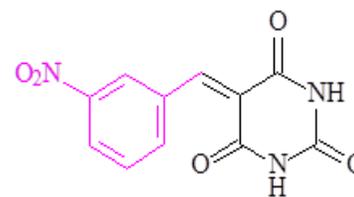
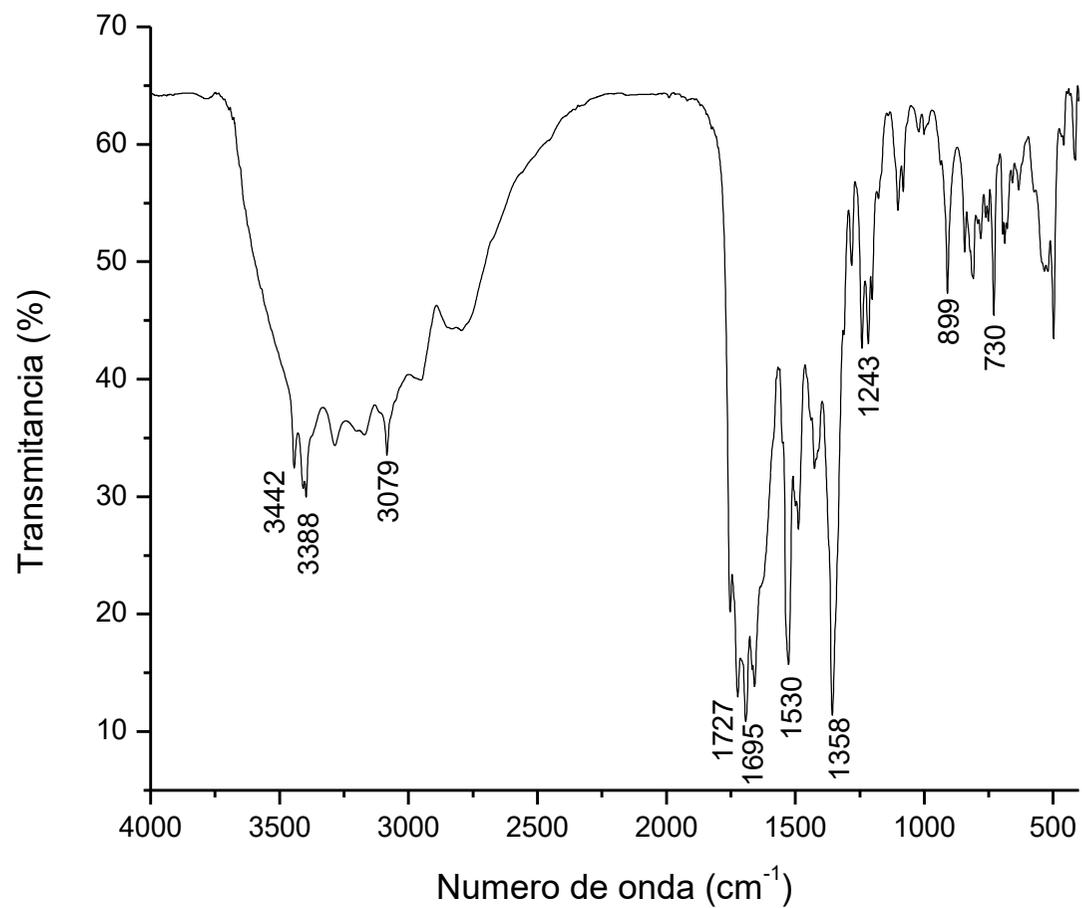
APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Espectroscopia em infravermelho dos derivados 5-arilidenos barbitúricos.

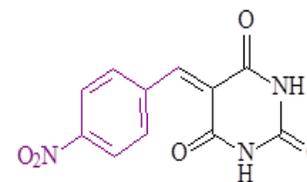
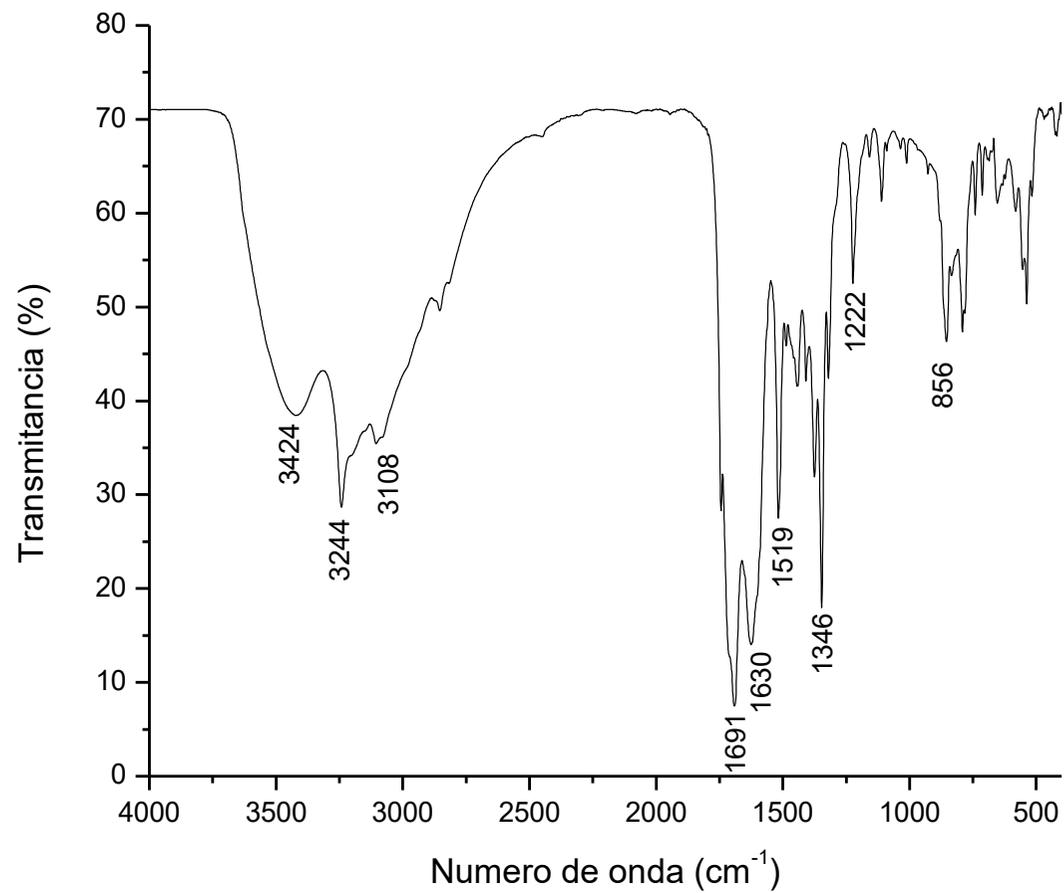
Espectro em infravermelho do composto 5-benzilideno de ácido barbitúrico.



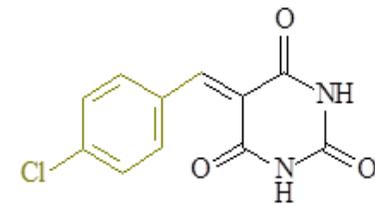
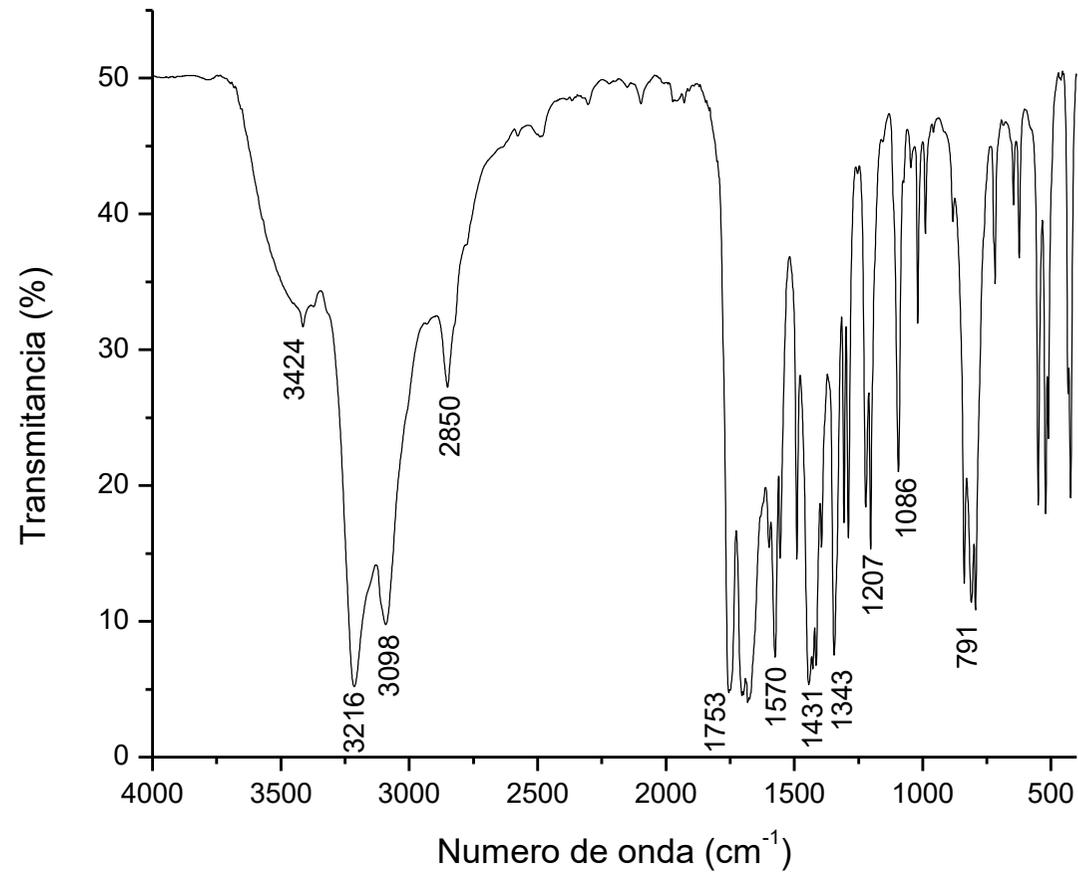
Espectro em infravermelho do composto 5-(3-nitro)benzilideno de ácido barbitúrico.



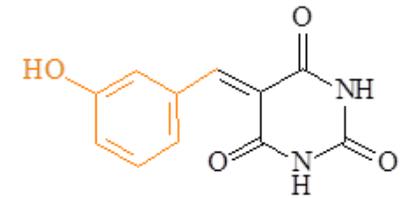
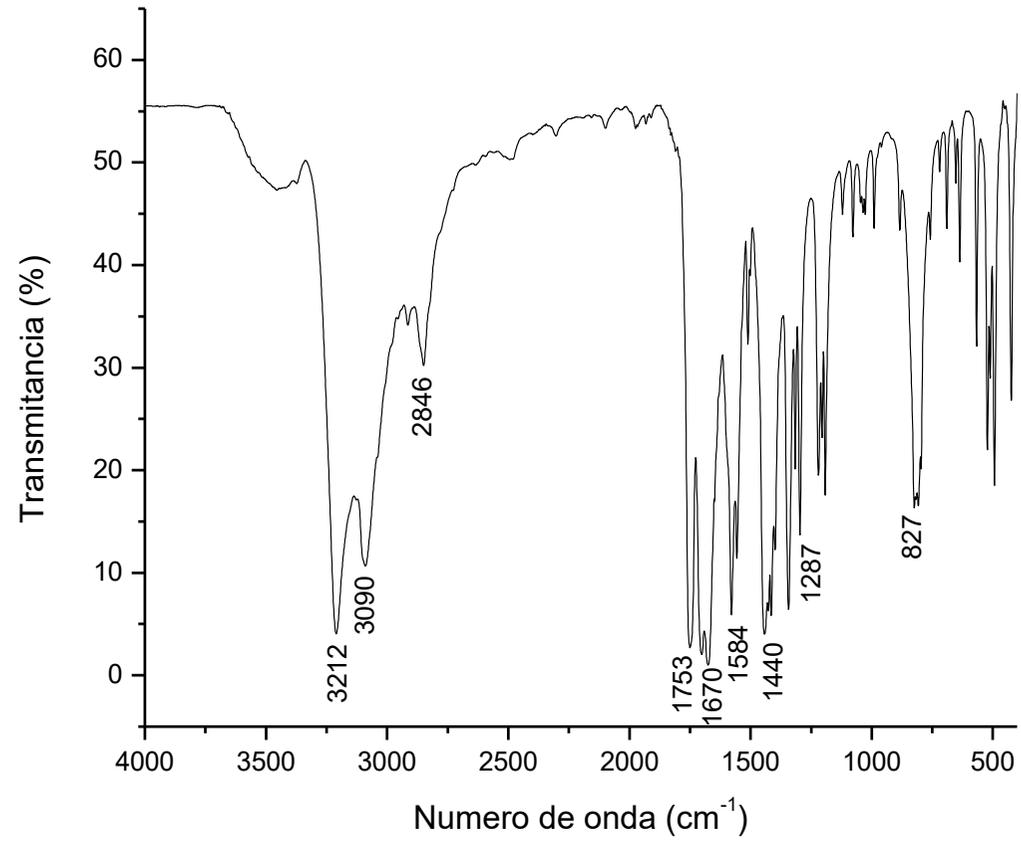
Espectro em infravermelho do composto 5-(4-nitro)benzilideno de ácido barbitúrico.



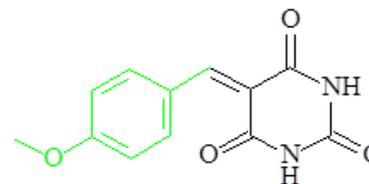
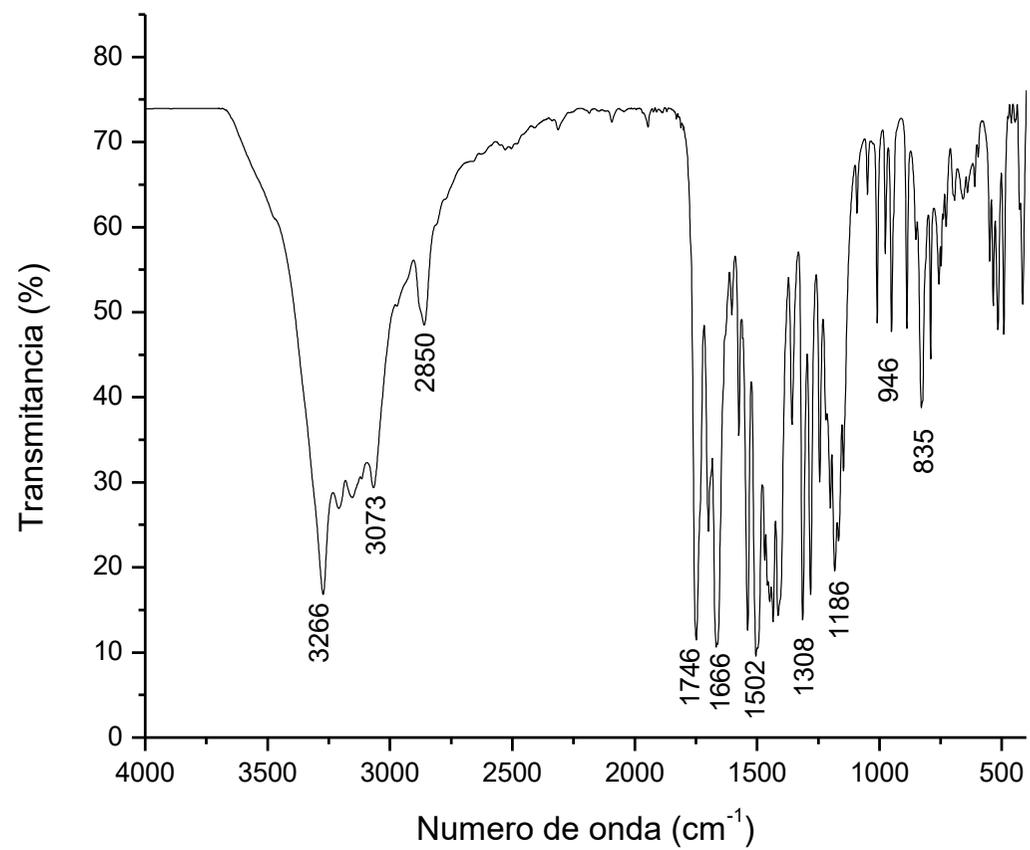
Espectro em infravermelho do composto 5-(4-cloro)benzilideno de ácido barbitúrico.



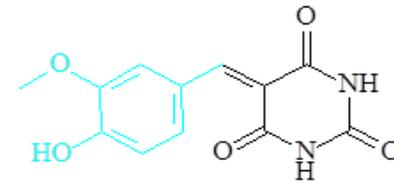
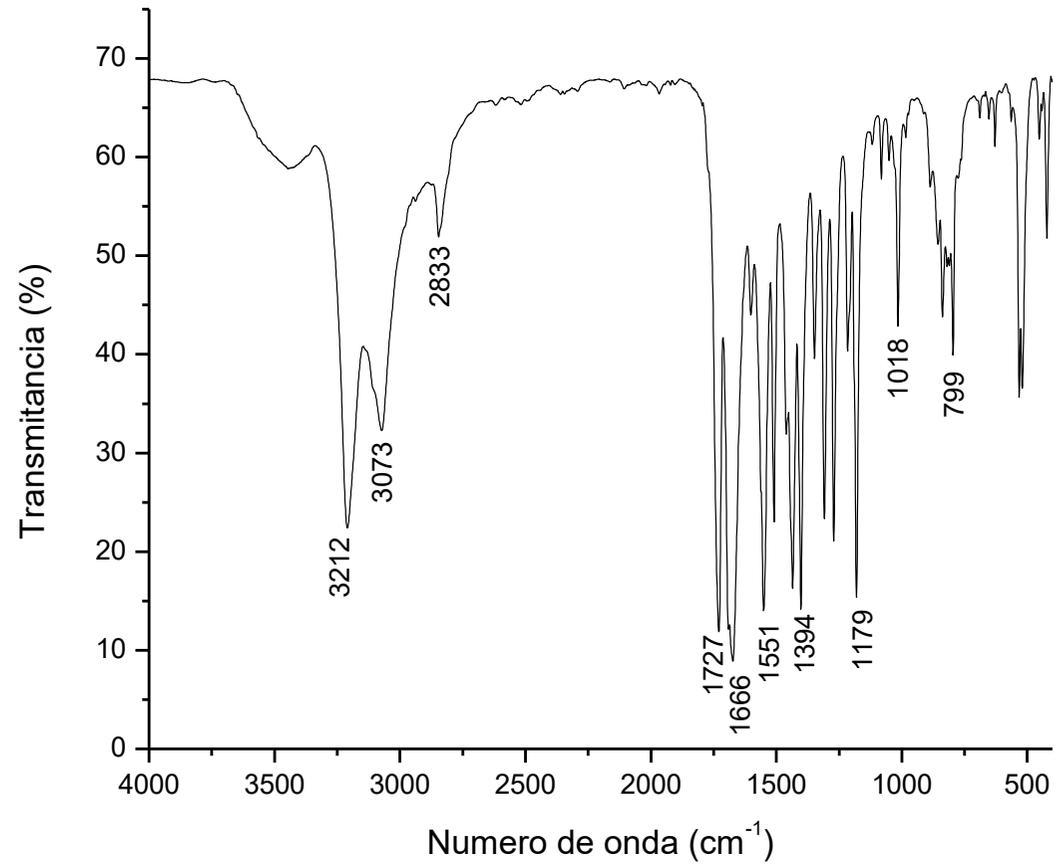
Espectro em infravermelho do composto 5-(2-hidroxi)benzilideno de ácido barbitúrico.



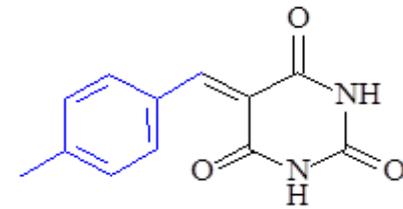
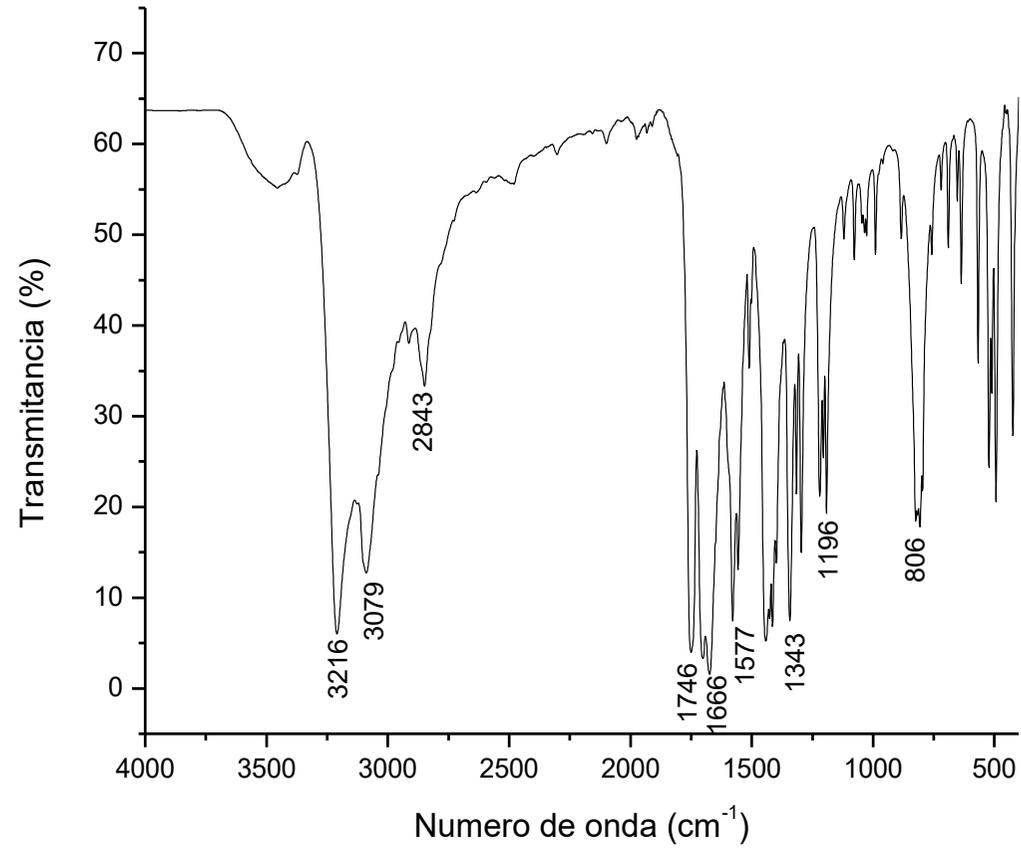
Espectro em infravermelho do composto 5-(4-metoxi)benzilideno de ácido barbitúrico.



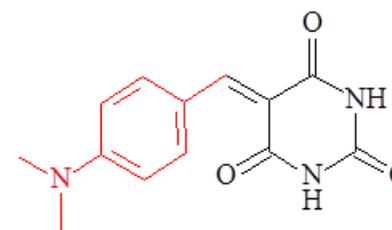
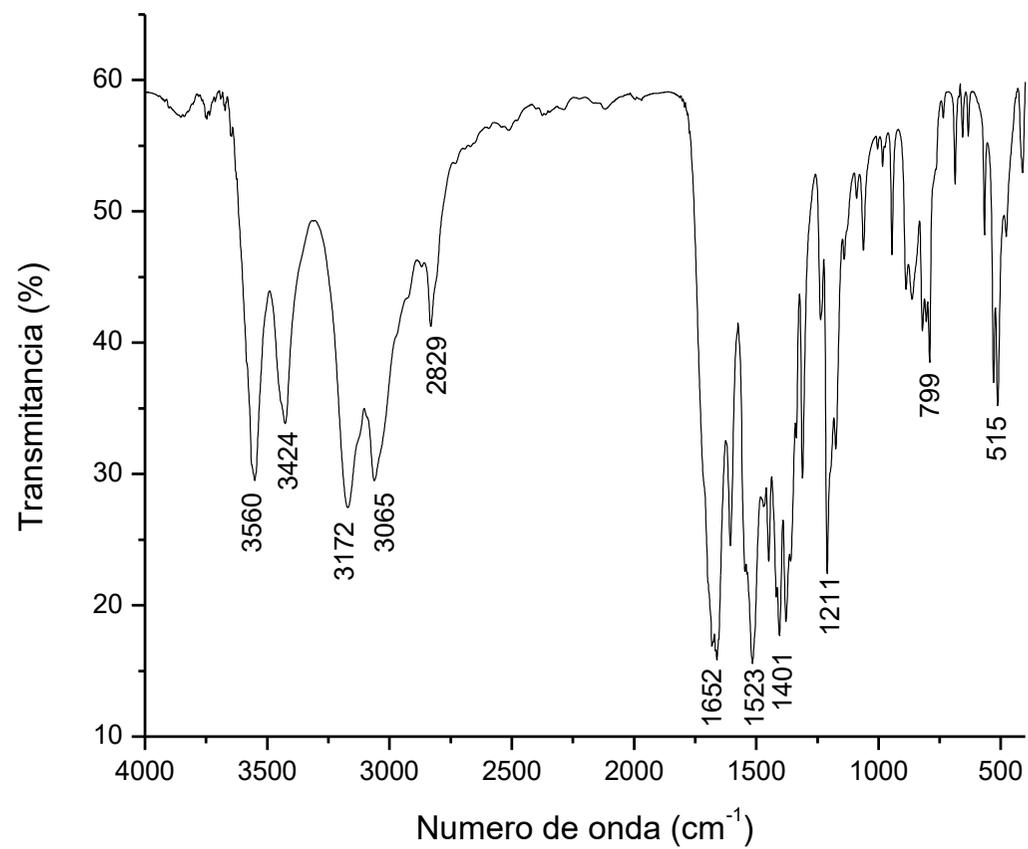
Espectro em infravermelho do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxi)benzilideno de ácido barbitúrico.



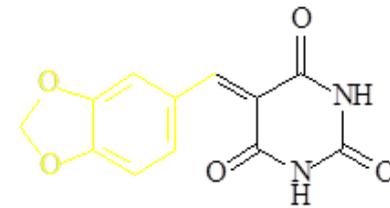
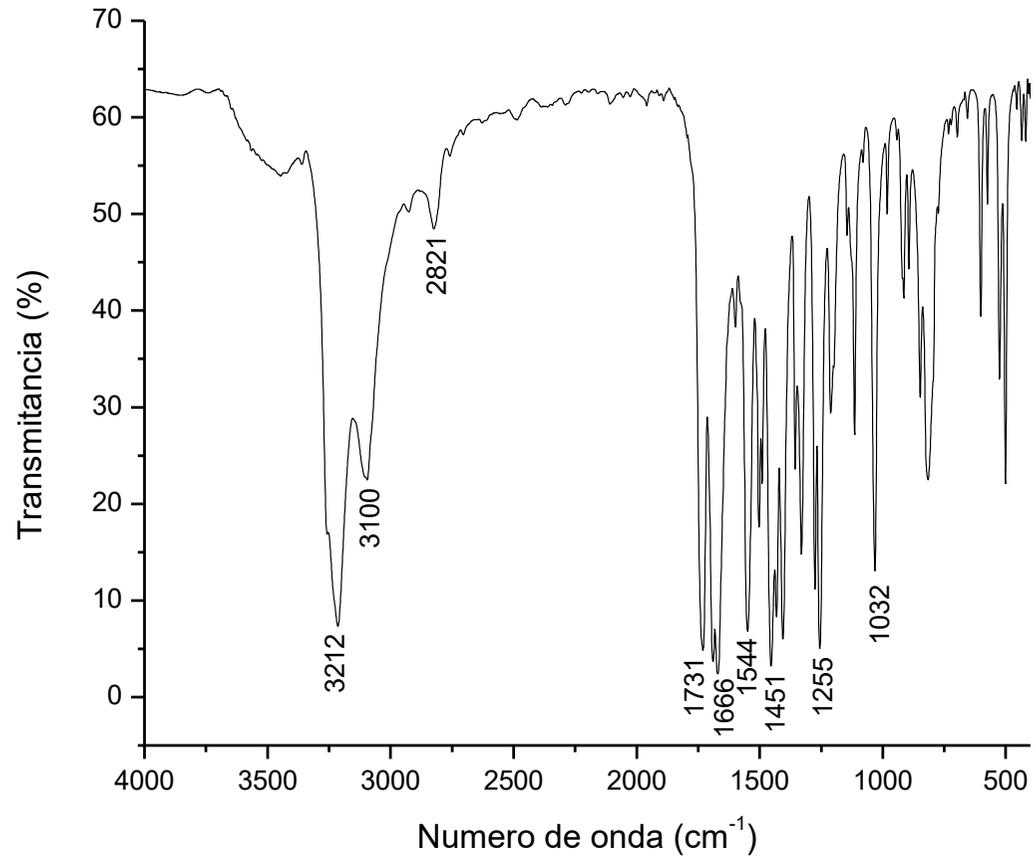
Espectro em infravermelho do composto 5-(4-metil)benzilideno de ácido barbitúrico.



Espectro em infravermelho do composto 5-(4-dimetilamino)benzilideno de ácido barbitúrico.

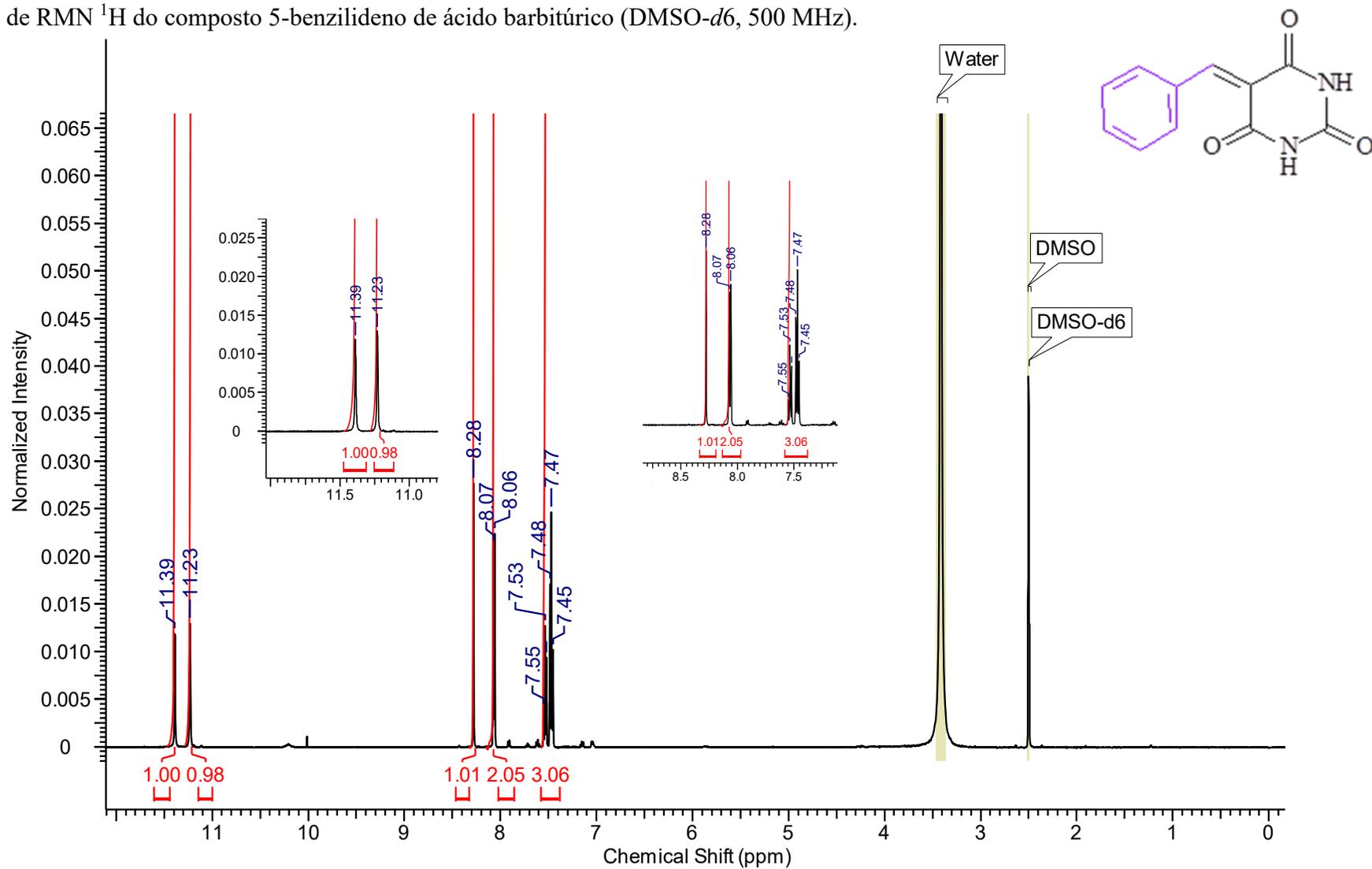


Espectro em infravermelho do composto 5-(1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído)benzilideno de ácido barbitúrico.

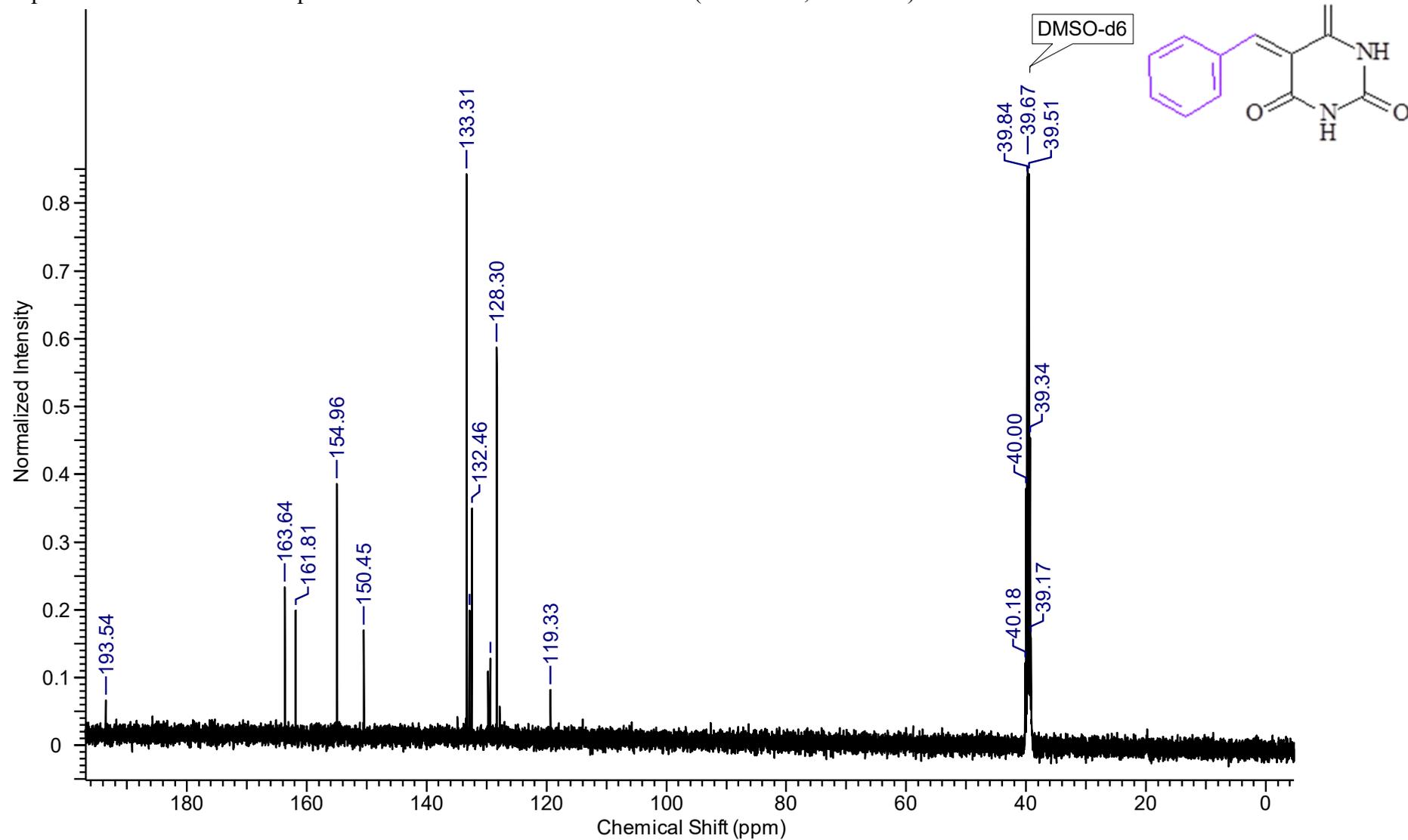


APÊNDICE 2 – Espectros por RMN ^1H e ^{13}C dos derivados 5-arilidenos barbitúricos.

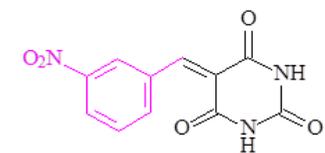
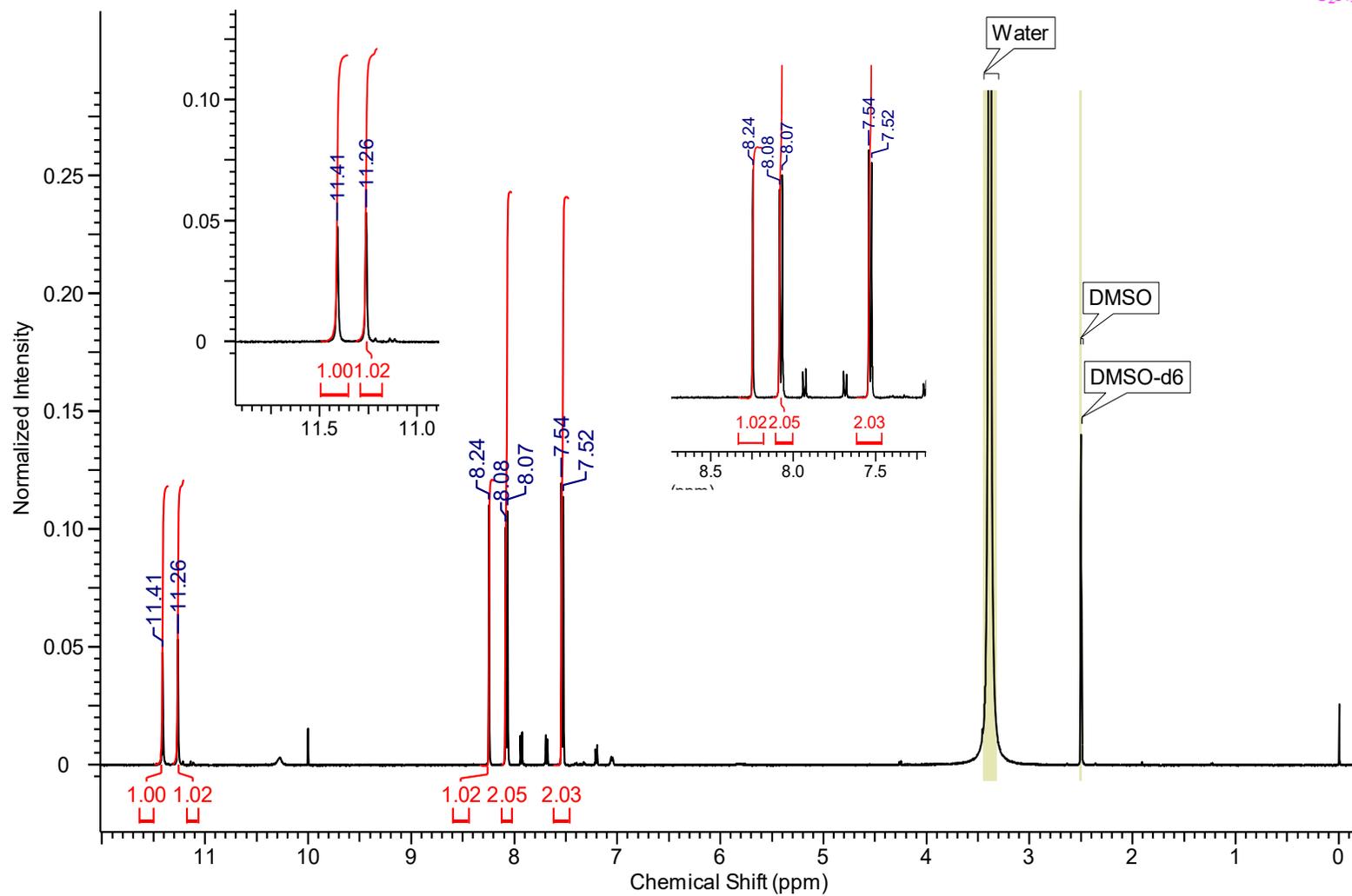
Espectro de RMN ^1H do composto 5-benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



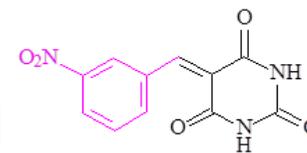
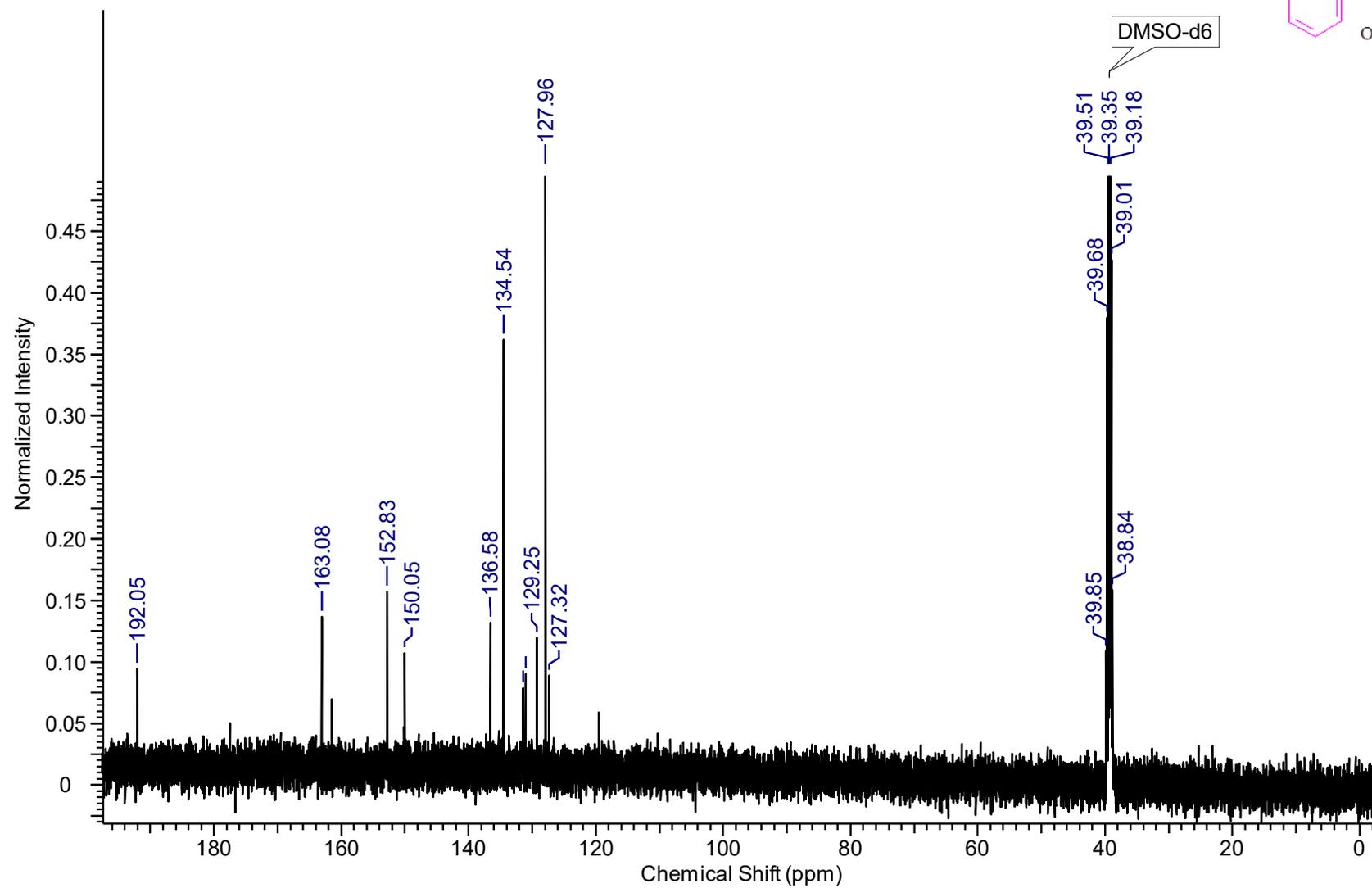
Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



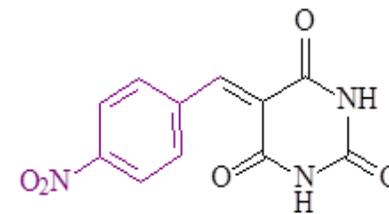
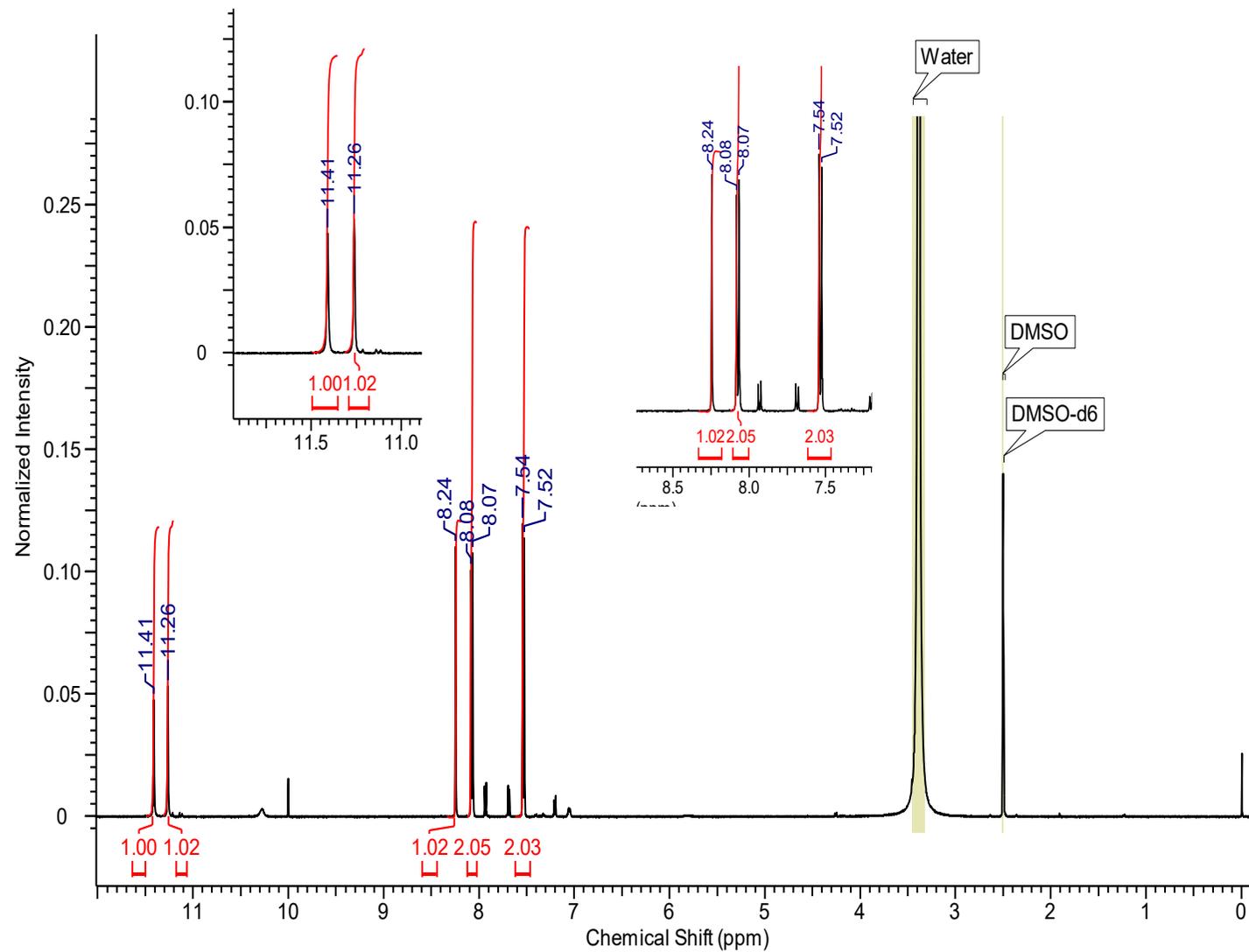
Espectro de RMN ^1H do composto 5-(3-nitro)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



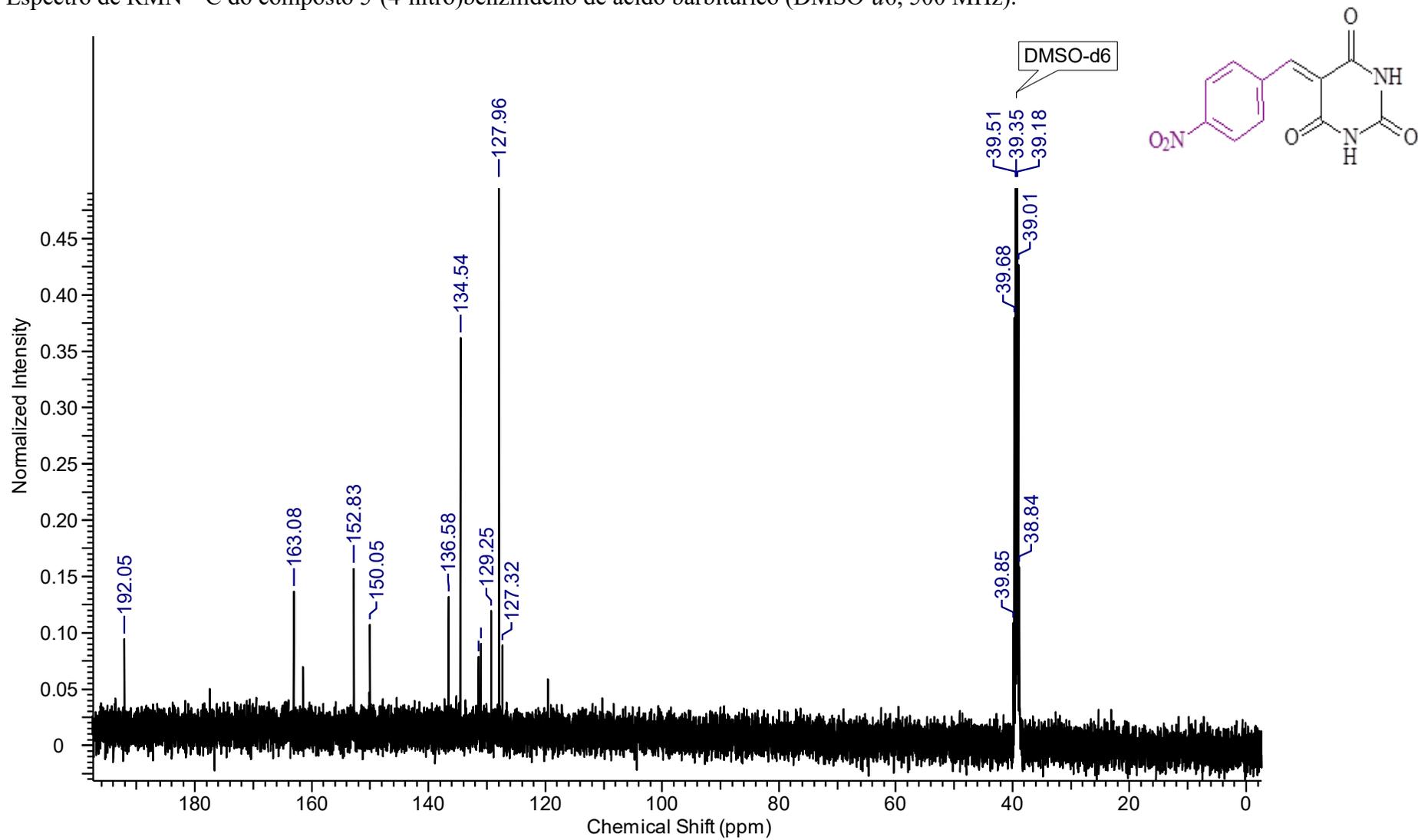
Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-(3-nitro)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



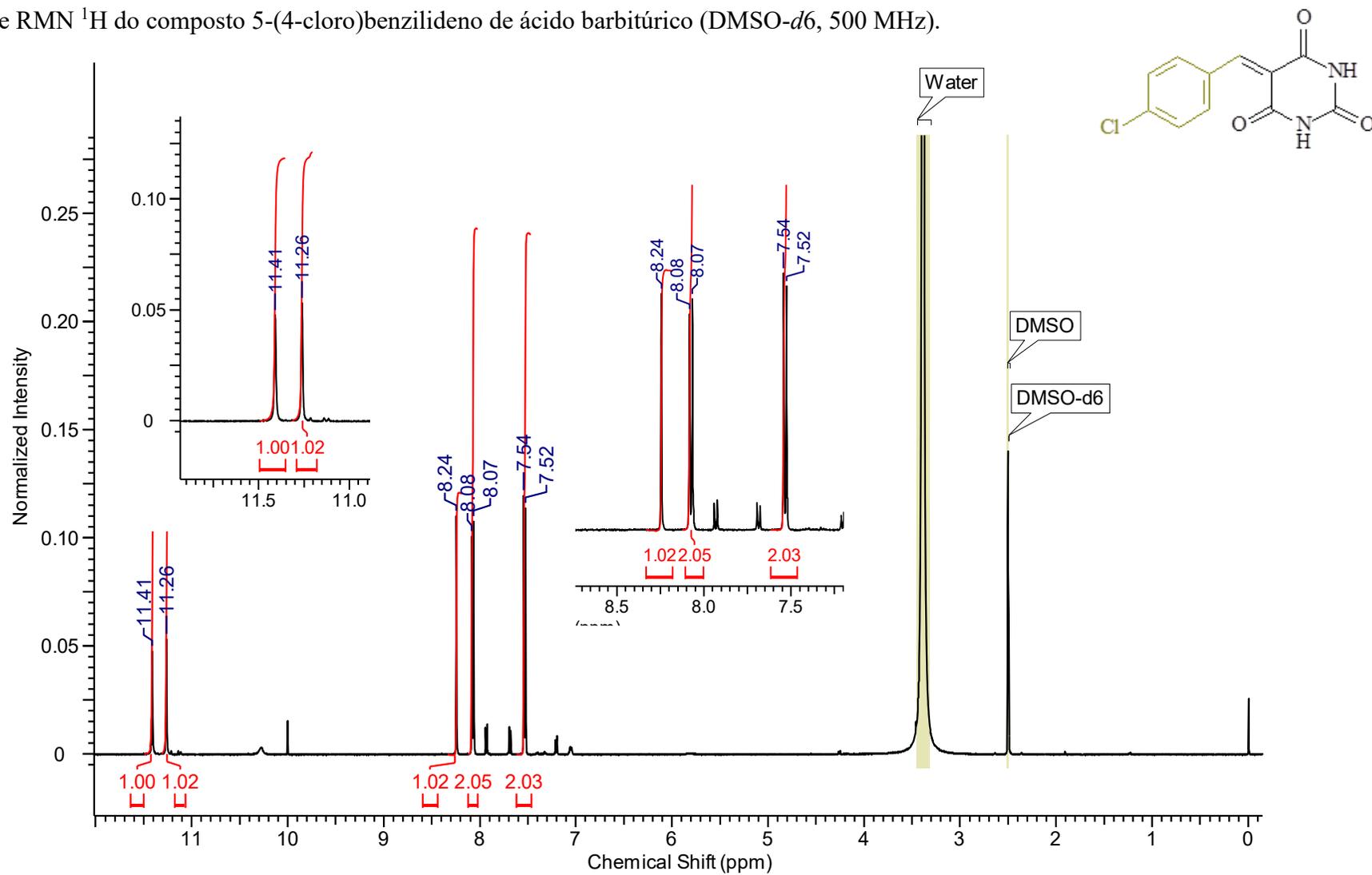
Espectro de RMN ^1H do composto 5-(4-nitro)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



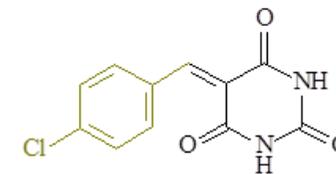
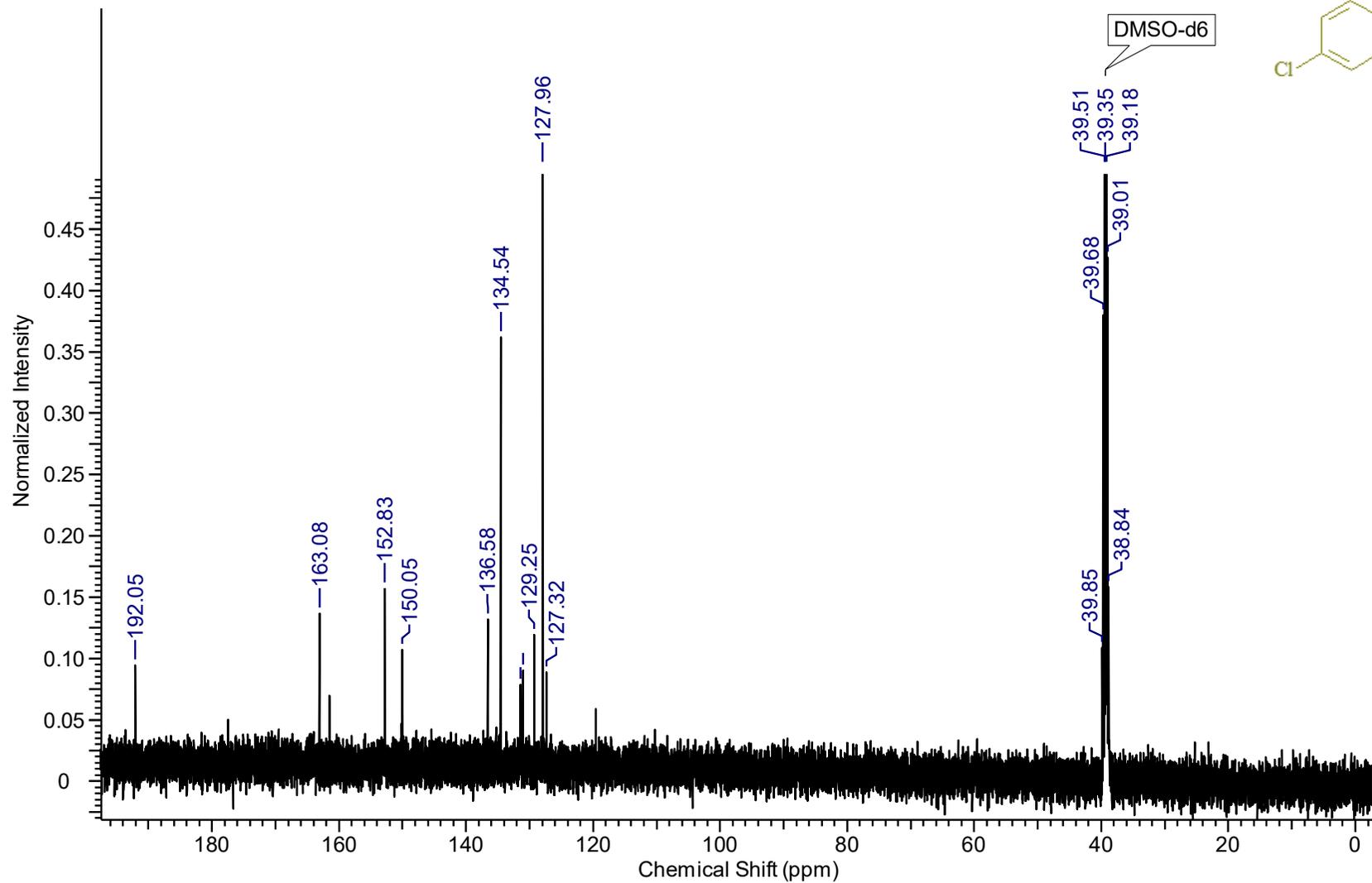
Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-(4-nitro)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



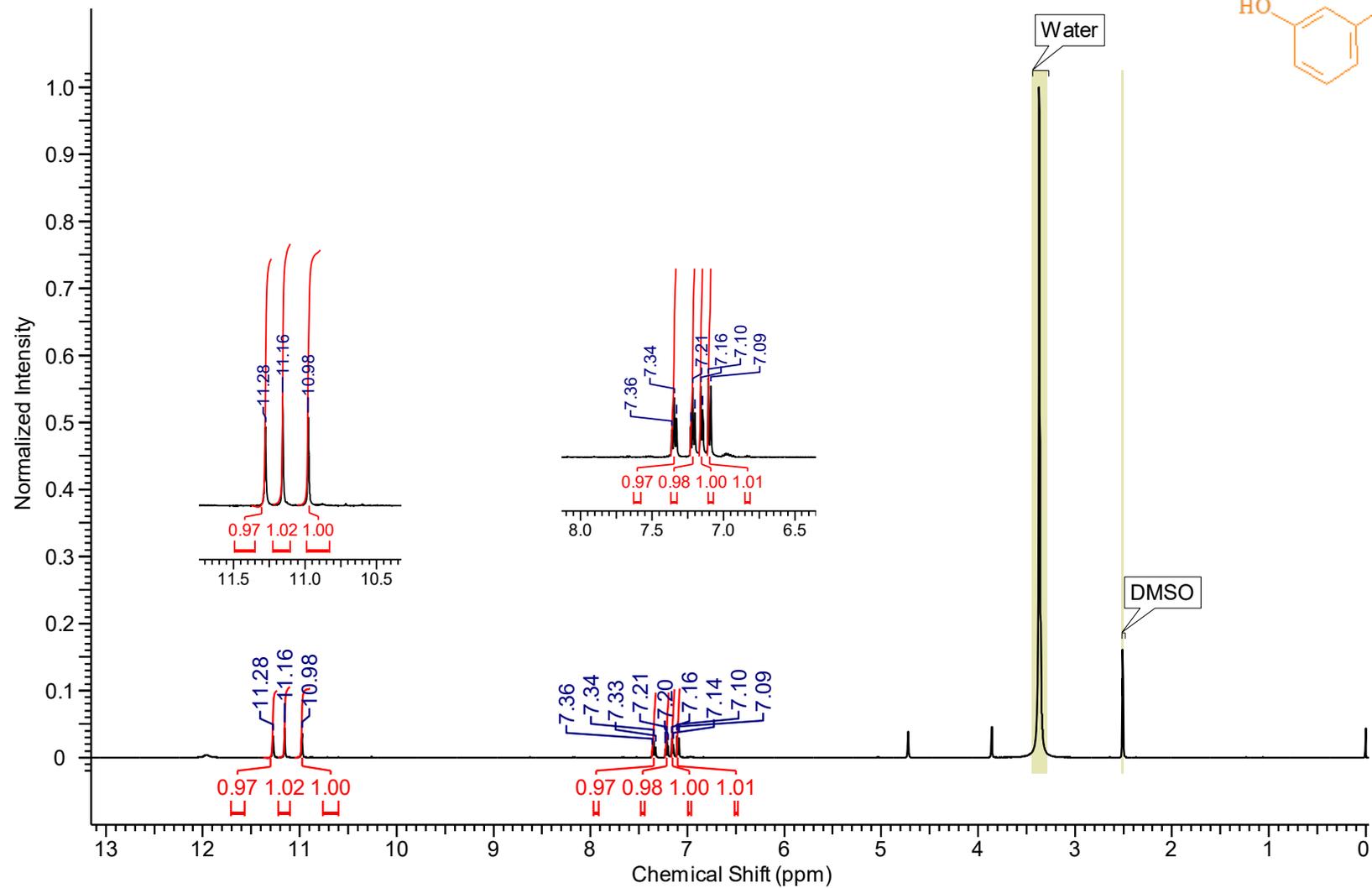
Espectro de RMN ^1H do composto 5-(4-cloro)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



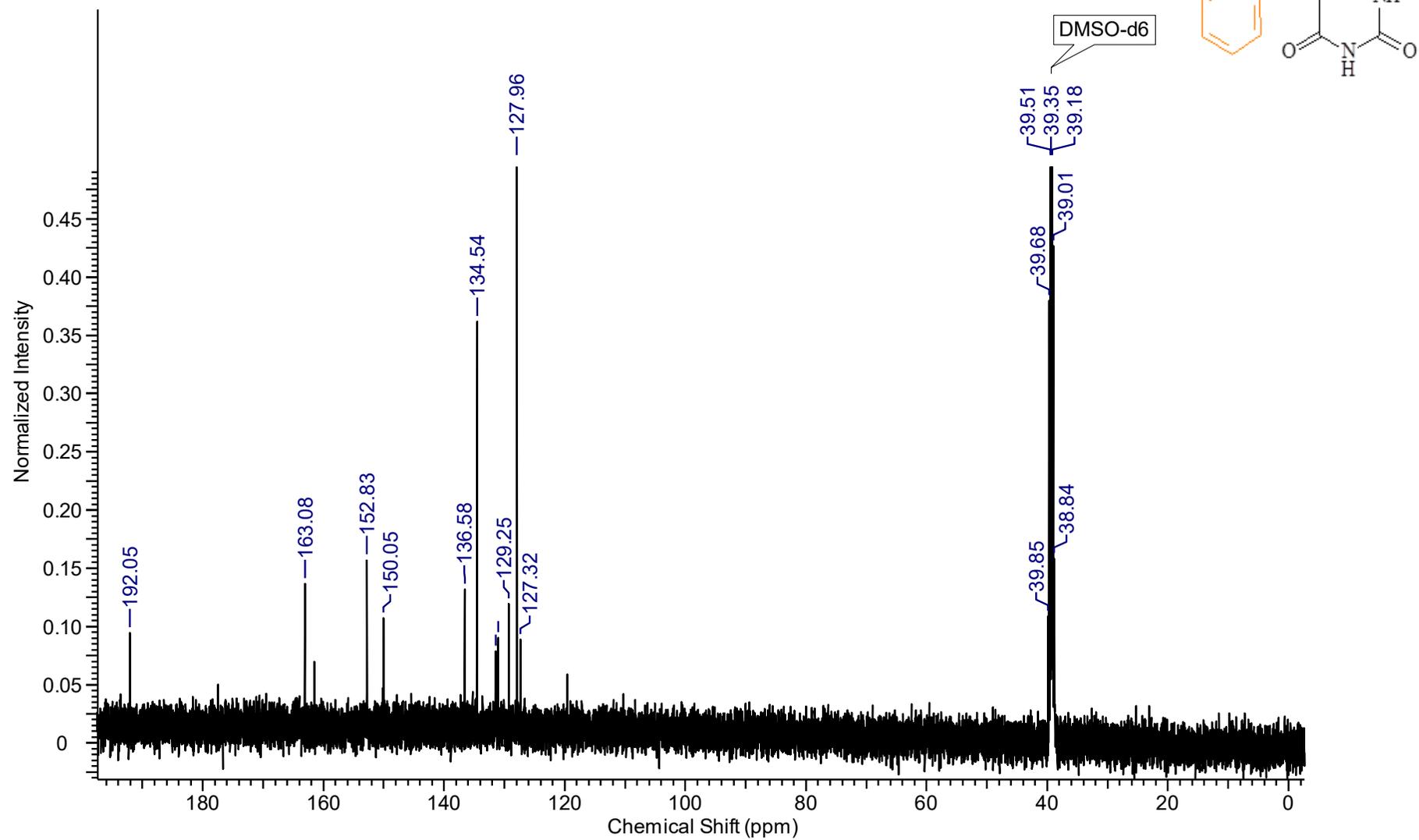
Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-(4-cloro)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



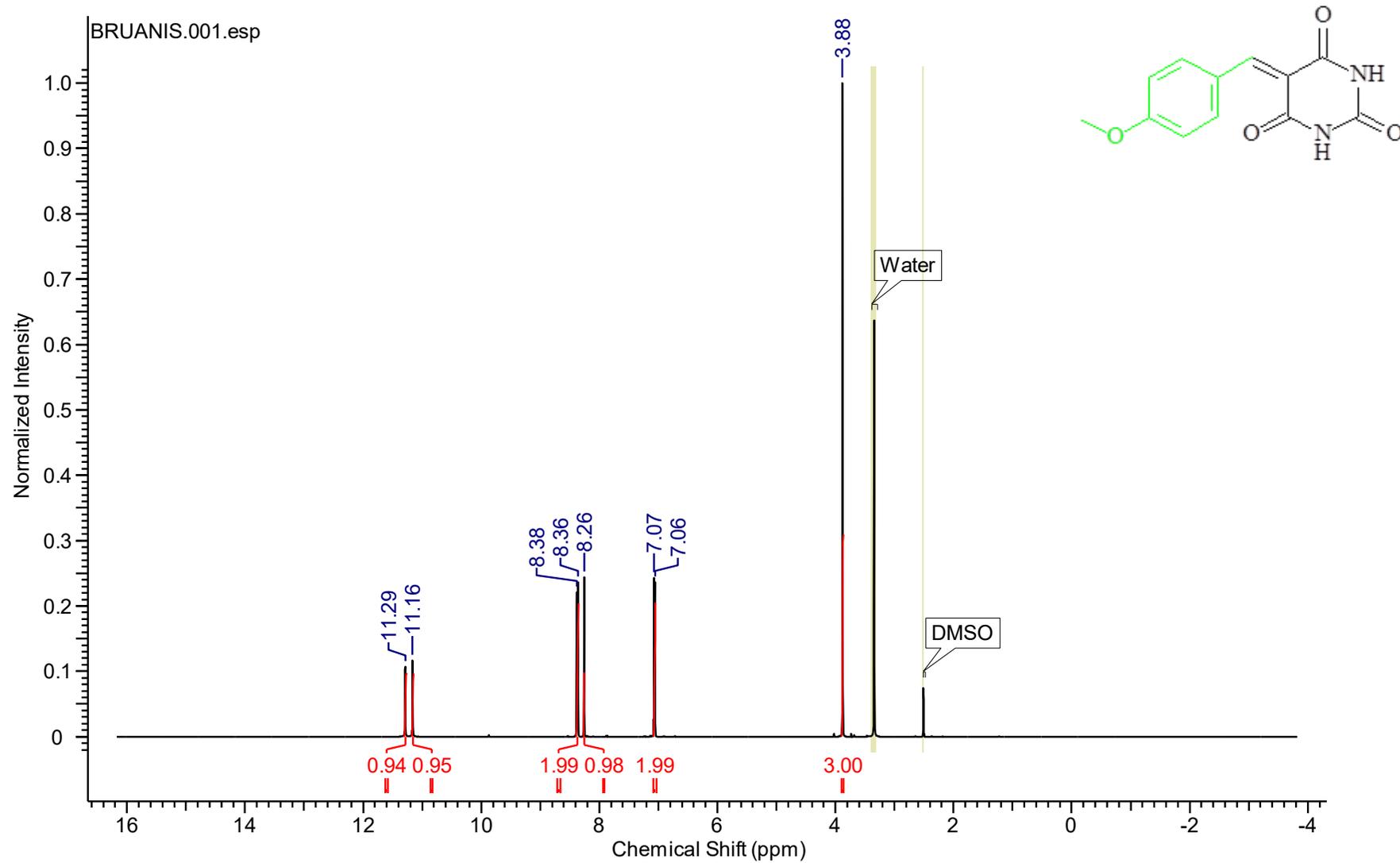
Espectro de RMN ^1H do composto 5-(2-hidroxi)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



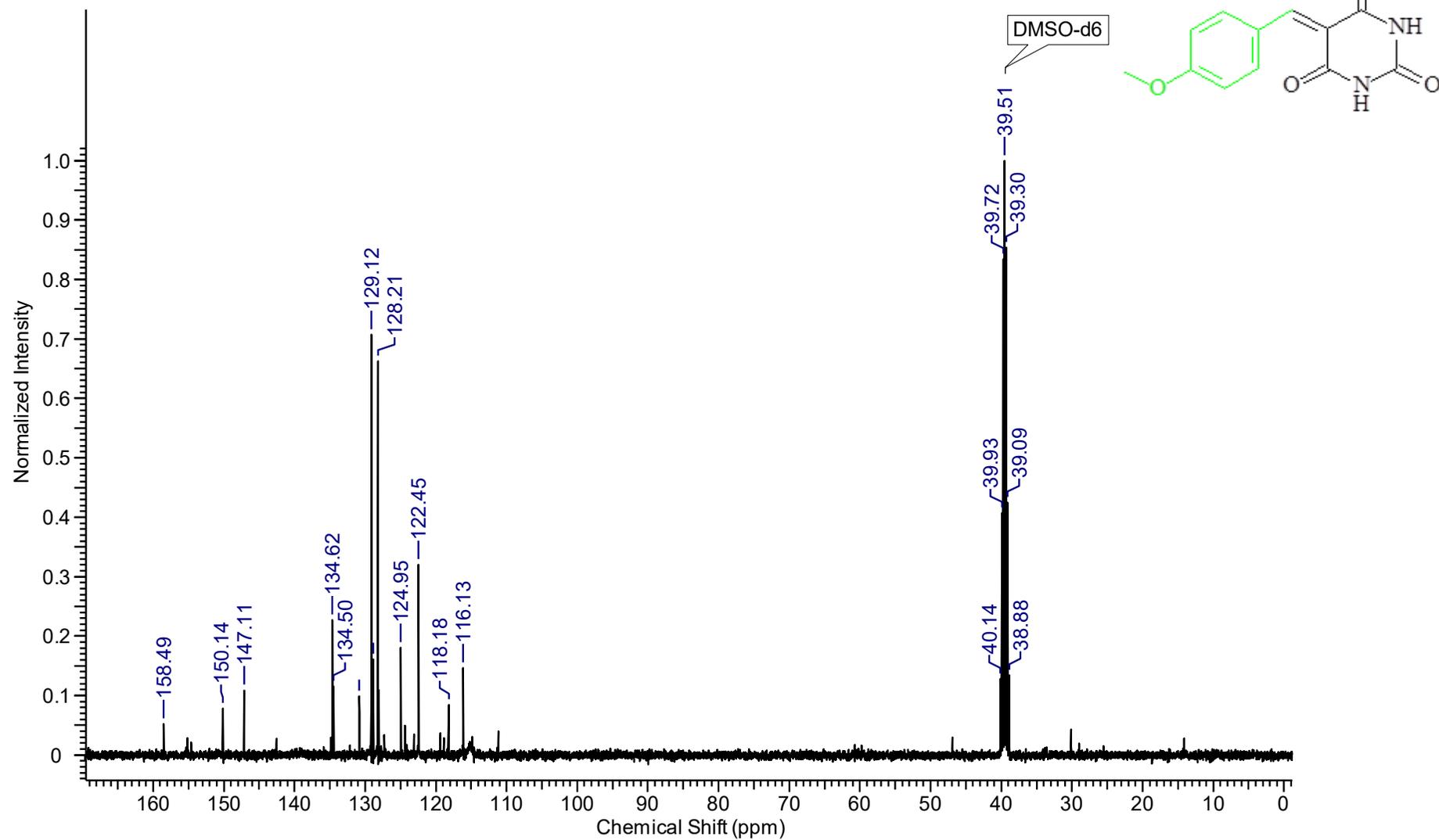
Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-(2-hidroxi)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



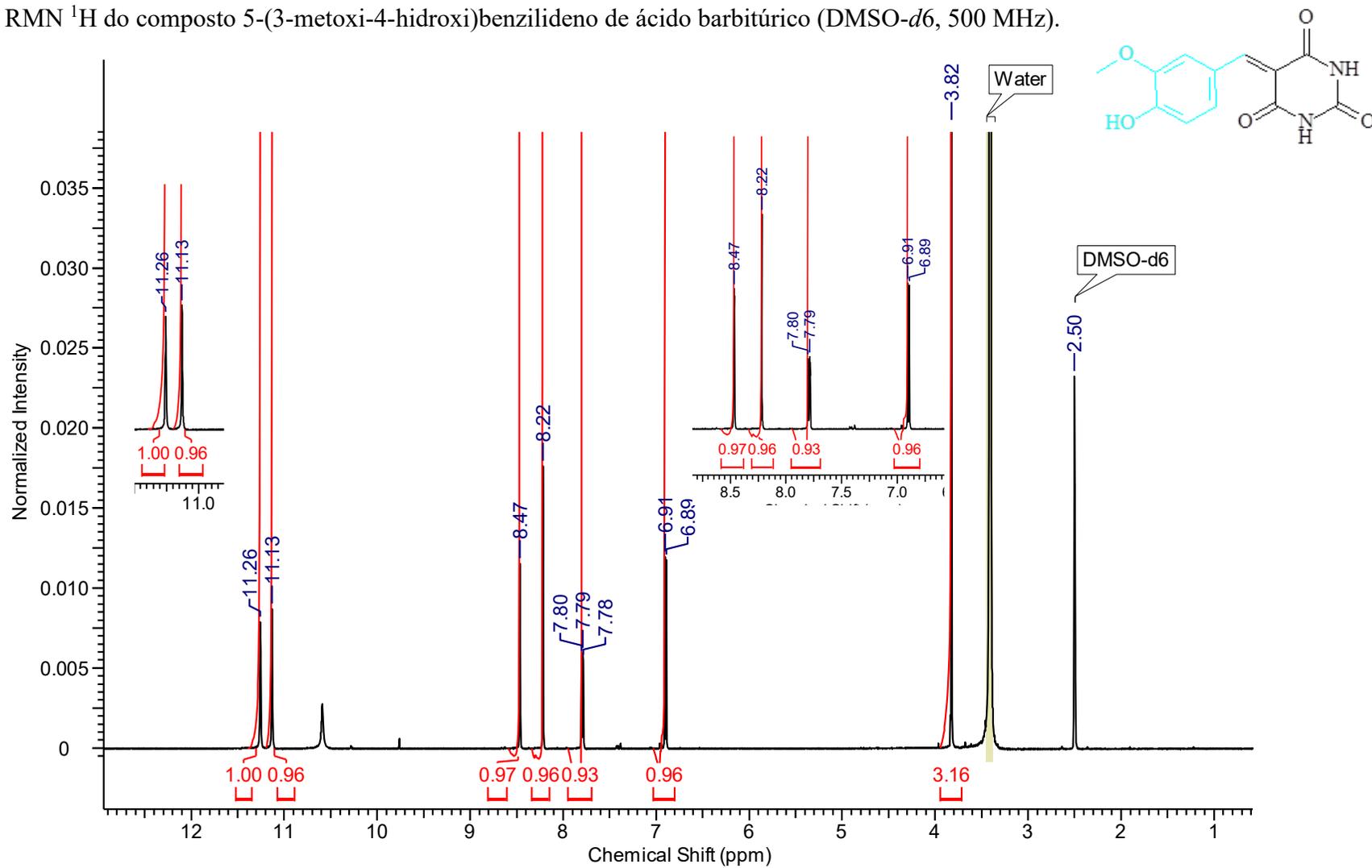
Espectro de RMN ^1H do composto 5-(4-metoxi)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



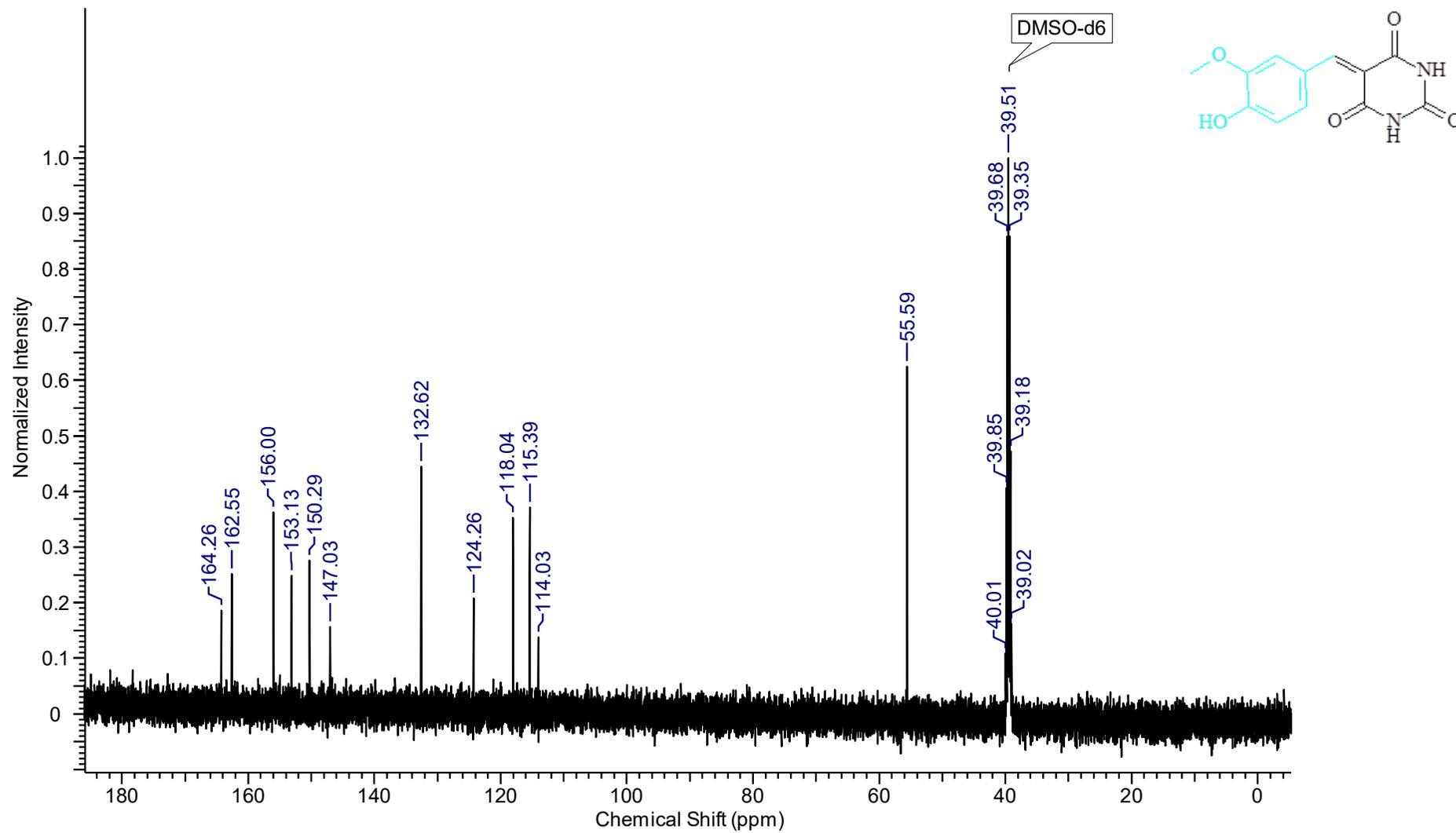
Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-(4-metoxi)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



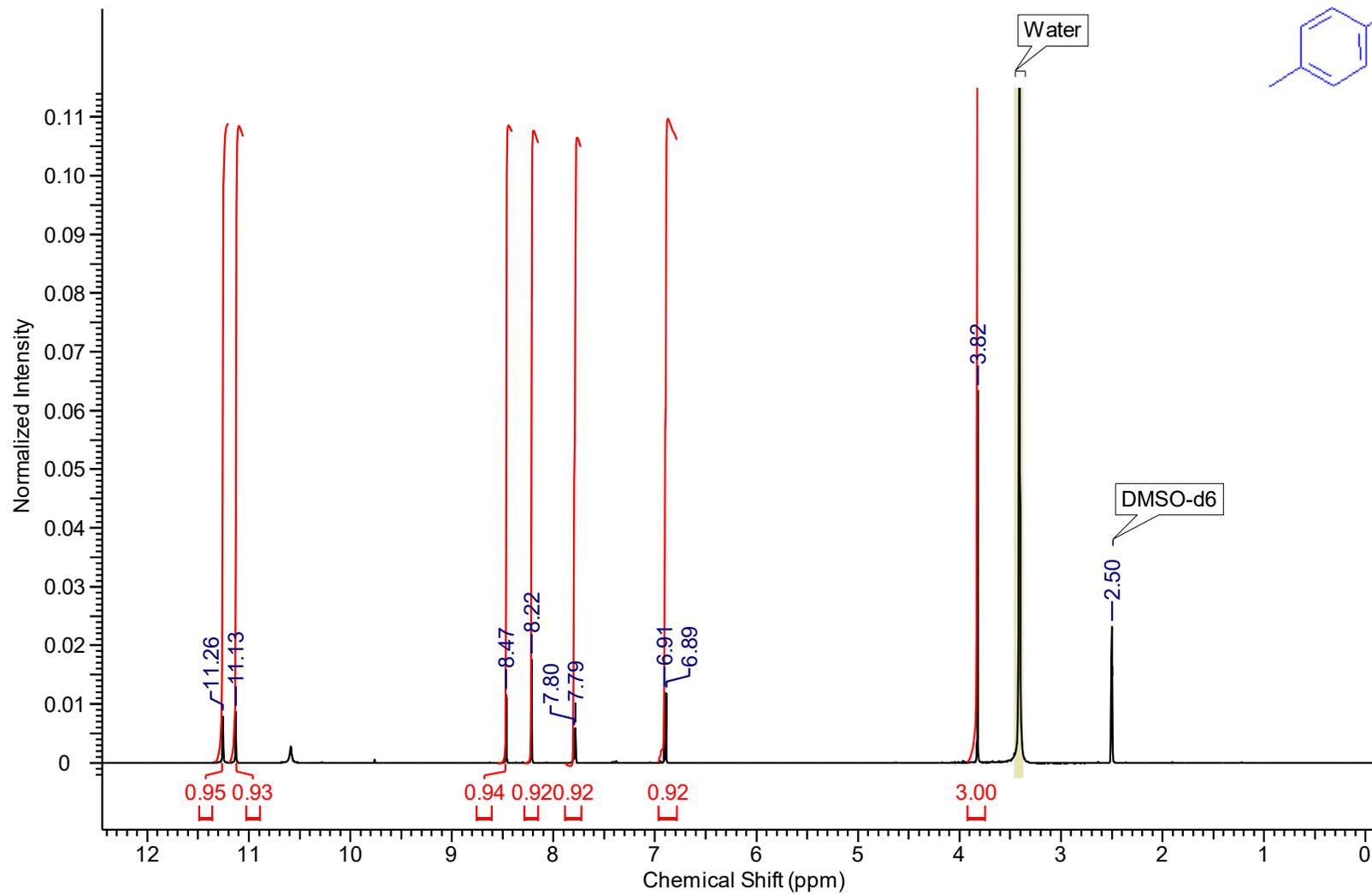
Espectro de RMN ^1H do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxi)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



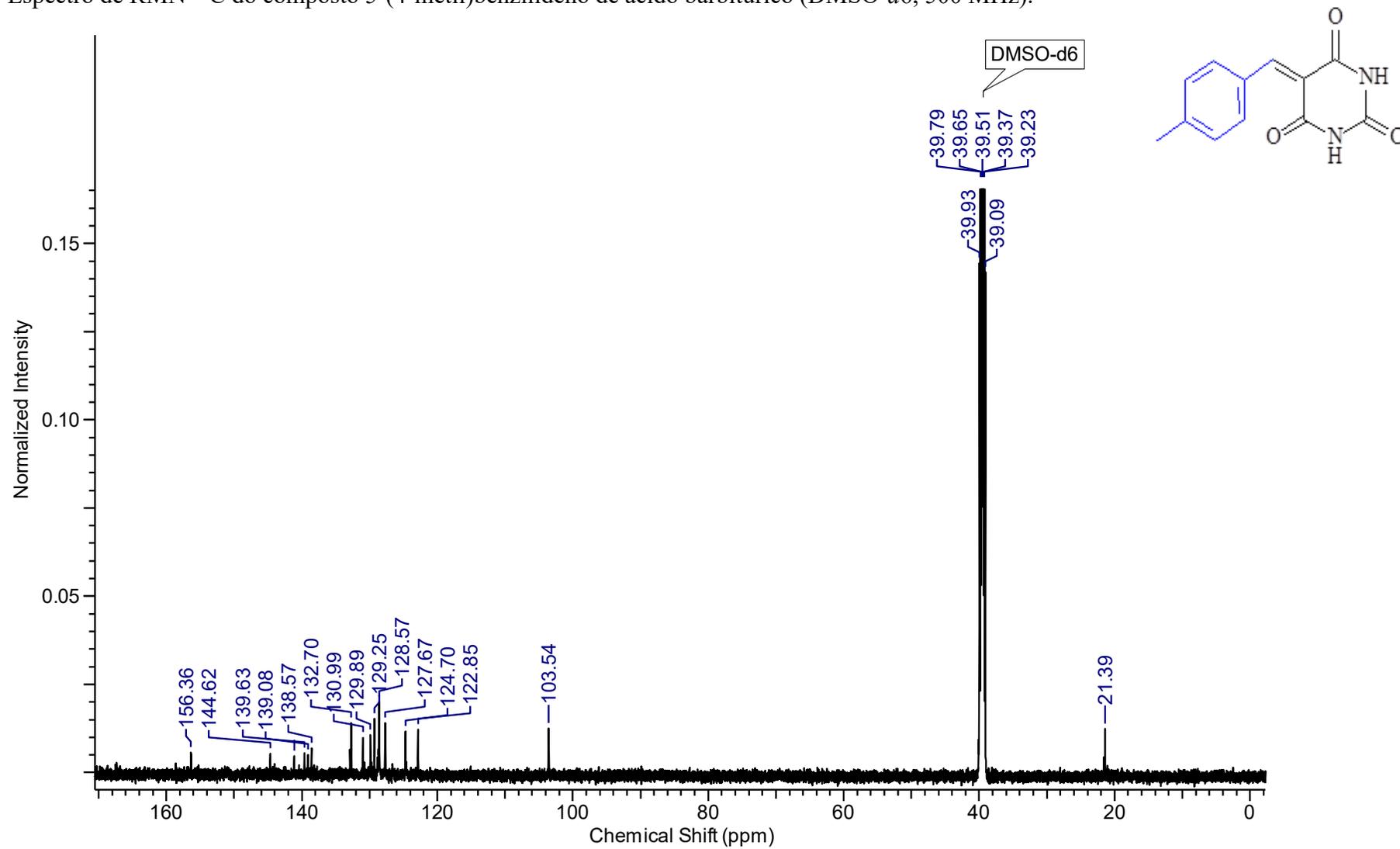
Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-(3-metoxi-4-hidroxi)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



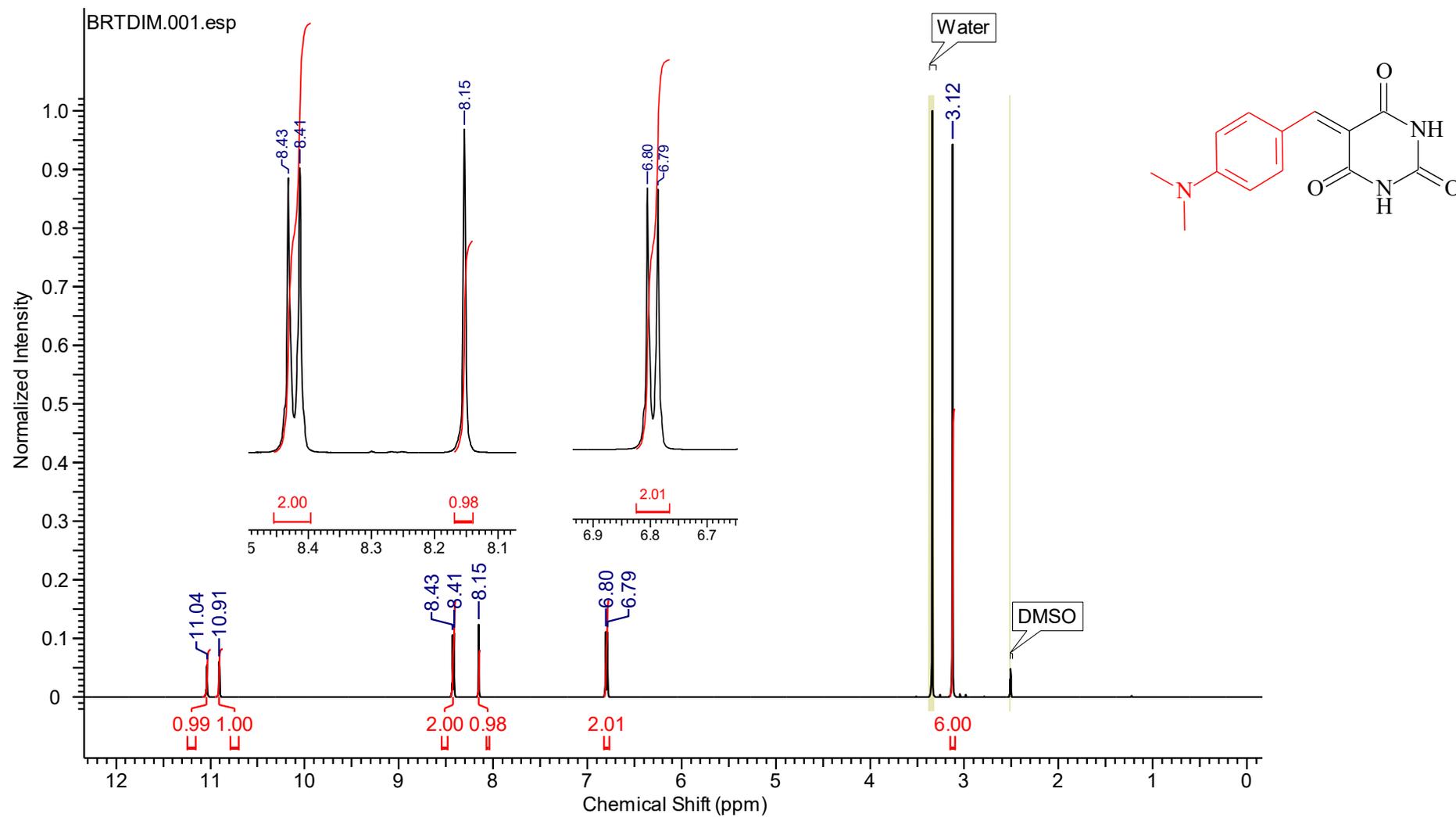
Espectro de RMN ^1H do composto 5-(4-metil)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



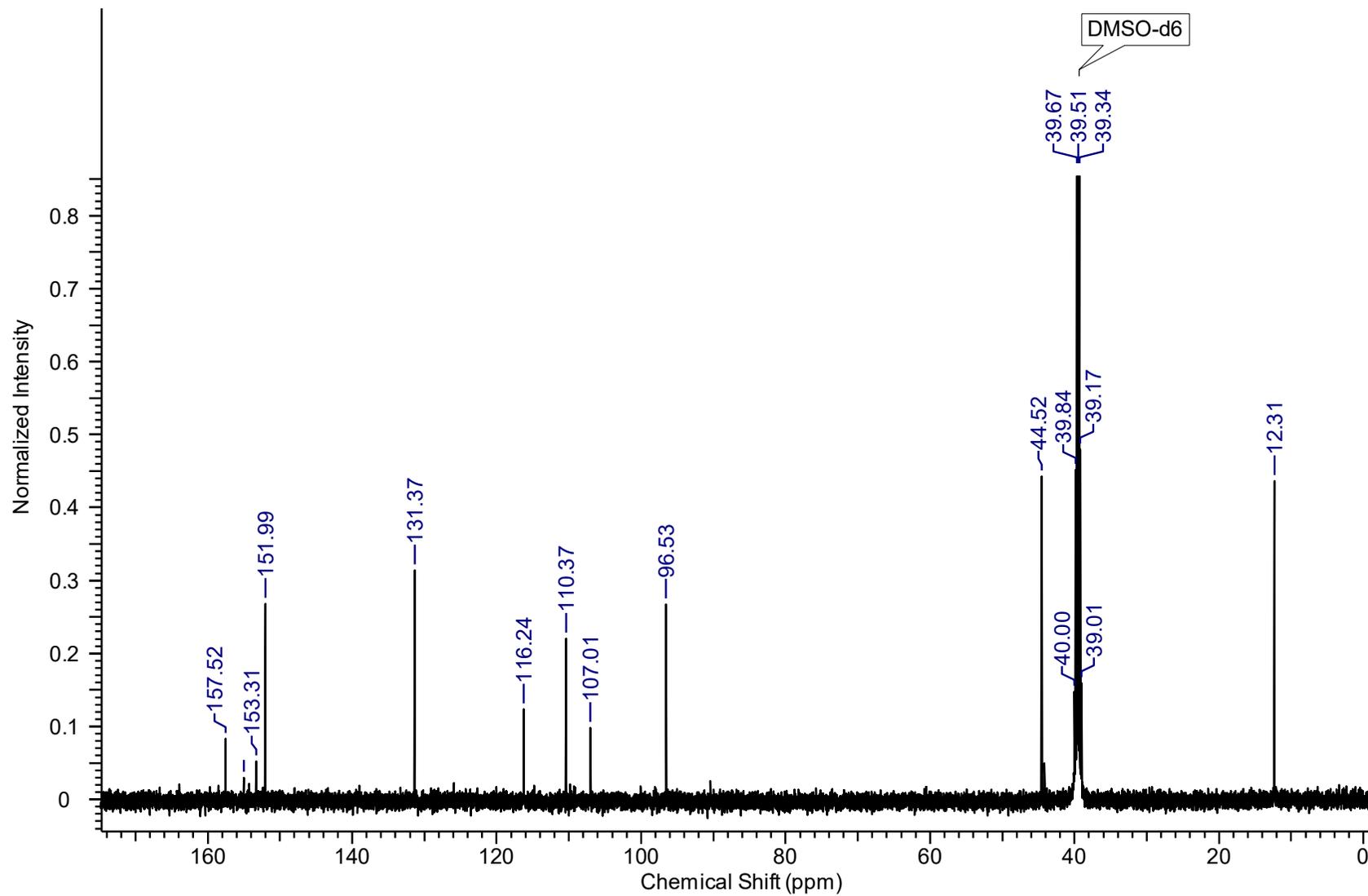
Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-(4-metil)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



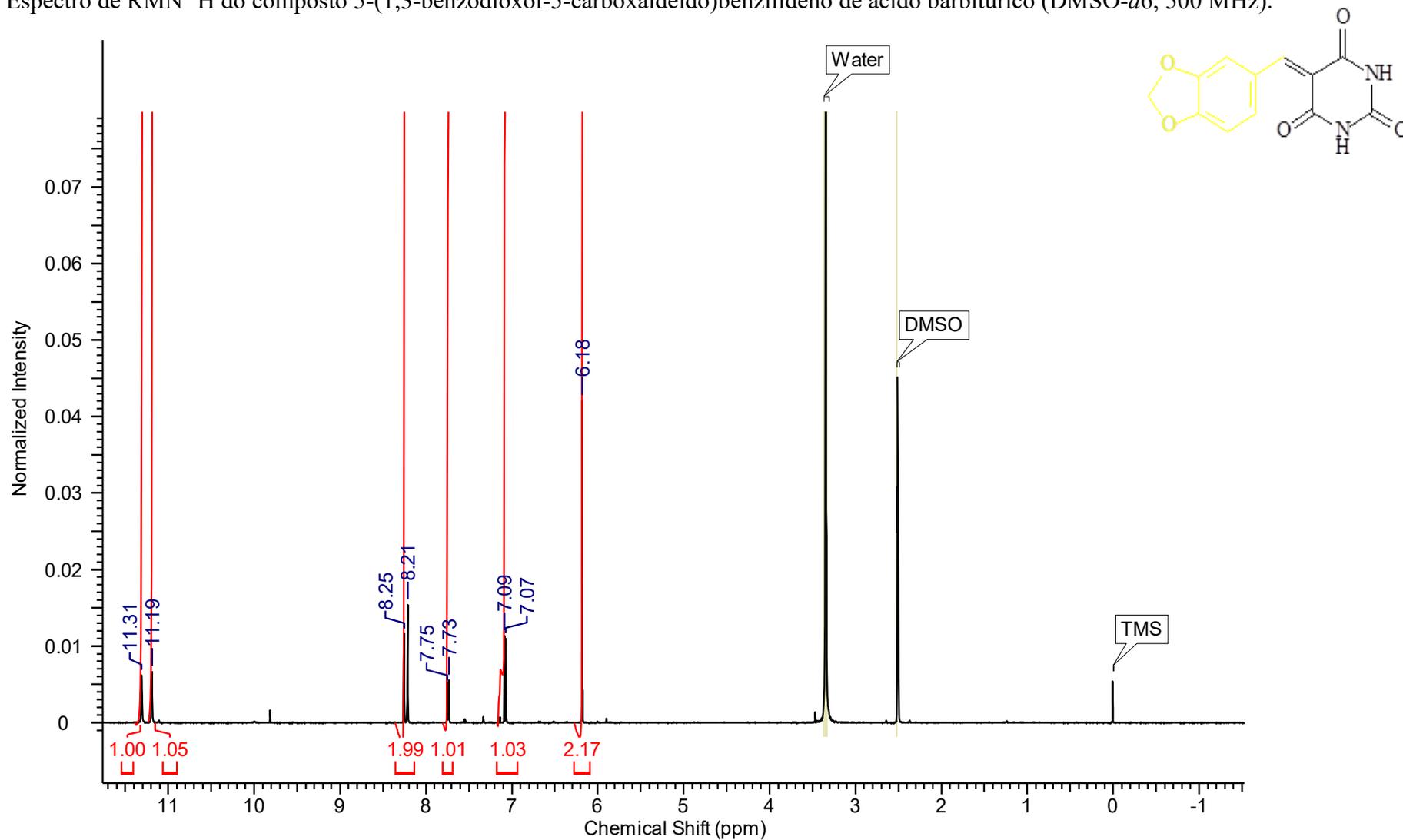
Espectro de RMN ^1H do composto 5-(4-dimetilamino)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



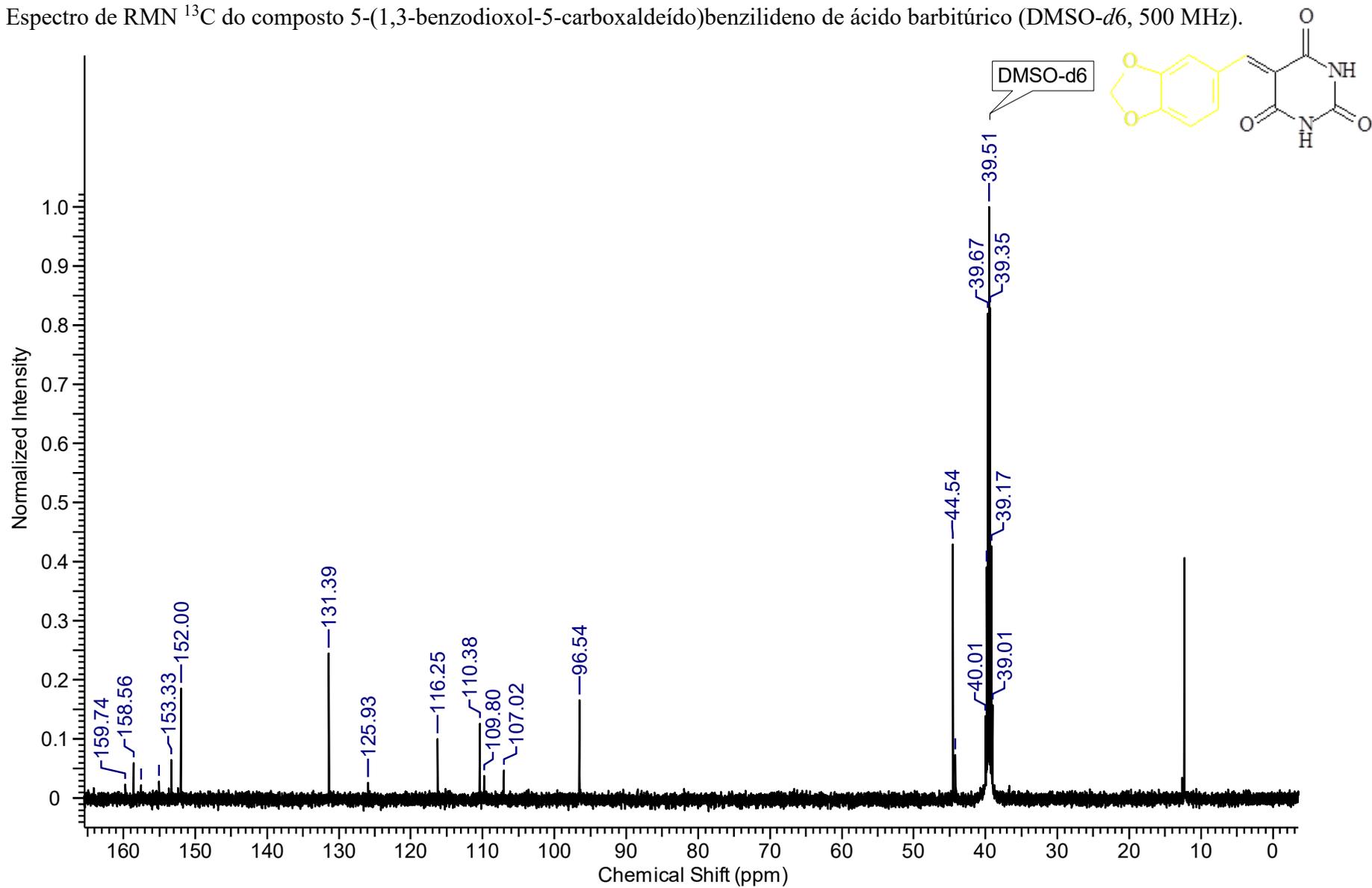
Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-(4-dimetilamino)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



Espectro de RMN ^1H do composto 5-(1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-(1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído)benzilideno de ácido barbitúrico (DMSO- d_6 , 500 MHz).



DESENVOLVIMENTO DE REAÇÕES MULTICOMPONENTES CATALISADAS COM DERIVADOS DE LÍQUIDOS IÔNICOS PARA SÍNTESE DE SISTEMAS HETEROCÍCLICOS COM APLICAÇÃO BIOLÓGICA

OPEN ACCESS



E:240115450

**Título**

DESENVOLVIMENTO DE REAÇÕES MULTICOMPONENTES CATALISADAS COM DERIVADOS DE LÍQUIDOS IÔNICOS PARA SÍNTESE DE SISTEMAS HETEROCÍCLICOS COM APLICAÇÃO BIOLÓGICA

Autores:

Juliana Gonzaga De Moraes Lima
 Jhonathan Renner Nunes Dos Santos
 Yasmine Batista Queiroz
 Bruce Soares Cardoso
 José Raimundo Corrêa
 Brenno Amaro Da Silveira Neto
 Luciana Machado Ramos

DOI
 10.37885/240115450
Publicado em

21/05/2024

Páginas

68-85

Capítulo

4



04

DESENVOLVIMENTO DE REAÇÕES MULTICOMPONENTES CATALISADAS COM DERIVADOS DE LÍQUIDOS IÔNICOS PARA SÍNTESE DE SISTEMAS HETEROCÍCLICOS COM APLICAÇÃO BIOLÓGICA

Juliana Gonzaga de Moraes Lima
 Universidade Estadual de Goiás (UEG)

Jhonathan Renner Nunes dos Santos
 Universidade Estadual de Goiás (UEG)

Yasmine Batista Queiroz
 Universidade Estadual de Goiás (UEG)

Bruce Soares Cardoso
 Universidade de Brasília (UnB)

José Raimundo Corrêa
 Universidade de Brasília (UnB)

Brenno Amaro da Silveira Neto
 Universidade de Brasília (UnB)

Luciana Machado Ramos
 Universidade Estadual de Goiás (UEG)

Disponível em: <https://www.editoracientifica.com.br/books/chapter/desenvolvimento-de-reacoes-multicomponentes-catalisadas-com-derivados-de-liquidos-ionicos-para-sintese-de-sistemas-heterociclicos-com-aplicacao-biologica>

Full Paper



<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20250057>
J. Braz. Chem. Soc. 2025, 36, 7, e-20250057, 1-12
 ©2025 Sociedade Brasileira de Química

E

Synthesis, Biological Evaluation and Principal Component Analysis of Arylidene Analogues of Barbituric Acid Obtained via Knoevenagel Condensation

Bruce S. Cardoso,^{a,b} Juliana G. M. Lima,^a Luciano Ribeiro,^c José R. Corrêa^b and Luciana M. Ramos^{a,*}

^aLaboratório de Química Medicinal e Síntese Orgânica (LaQuiMeSO), Universidade Estadual de Goiás, Campus Central Sede Anápolis CET-Henrique Santillo, CP 459, 75132-400 Anápolis-GO, Brazil

^bInstituto de Biologia, Universidade de Brasília, Campus Darci Ribeiro, 70910-900 Brasília-DF, Brazil

^cGrupo de Química Teórica e Estrutural de Anápolis (GQTEA), Universidade Estadual de Goiás, Campus Central Sede Anápolis CET-Henrique Santillo, CP 459, 75132-400 Anápolis-GO, Brazil

The synthesis of 5-arylidene barbiturates has been extensively documented through various methodologies. In this study, we synthesized ten derivatives of barbiturate 5-arylidenes using an optimized Knoevenagel reaction catalyzed by a synthetic enzyme supported in chloride ionic liquids, achieving satisfactory yields ranging from 68 to 97%. Upon evaluating the biological properties of these ten compounds, derivative **12** (5-(2-hydroxy)benzylidene of acid barbituric), a nitro compound, exhibited broad-spectrum bactericidal activity against both the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* and the Gram-positive bacillus *Bacillus subtilis*. Furthermore, it demonstrated moderate fungistatic activity against *Candida albicans*. Additionally, derivatives **10** (5-benzylidene of acid barbituric) and **11** (5-(3-nitro) benzylidene of acid barbituric) displayed antioxidant activity comparable to that of the positive control quercetin, albeit only at the highest concentration tested (400 µg mL⁻¹). This study integrates quantum chemistry calculations with multivariate statistical methods, specifically principal component analysis, to correlate theoretical descriptors with the antibacterial and fungicidal activities of the compounds. In conclusion, given the promising outcomes of this investigation and recognizing the scarcity of studies delving into the biological properties of 5-arylidene barbiturate compounds, it is suggested that future research should explore other biological and pharmacological aspects of these compounds.

Keywords: catalysis, polietilenoamine, ionic liquids, antibacterial, SAR, quantum chemistry calculations

