



**UNIVALI**

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**

**DORIMAR SERAFIM STIZ**

**SÍNTESE DE NOVAS IMIDAS CÍCLICAS E AVALIAÇÃO DO  
POTENCIAL BIOLÓGICO**

Itajaí

2015





UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

**“SÍNTESE DE NOVAS IMIDAS CÍCLICAS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO: RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE”**

**DORIMAR SERAFIM STIZ**

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

Professor Clóvis Antônio Rodrigues, Doutor  
Coordenador PPGCF

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

  
Prof. Dr. VALDIR CECHINEL FILHO (UNIVALI) – Presidente e Orientador  
Prof. Dr. ROGÉRIO CORRÊA (UNIVALI) – Co-orientador  
Prof<sup>a</sup>. Dra. FÁTIMA DE CAMPOS BUZZI (UNIVALI) – Membro Interno  
Prof. Dr. ALEXANDRE BELLA CRUZ (UNIVALI) – Membro Interno  
Prof<sup>a</sup>. Dra. SIMONE ANDRADE GUALBERTO (UESB) – Membro Externo

Itajaí, 30 de março de 2015.

---

VICE-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E CULTURA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - PPGCF  
Rua Uruguai, 458 – Bloco F6 – Sala 311 – Cx.Postal 360 –  
Fone/Fax: (047)3341-7932  
CEP: 88302-901 – Itajaí – Santa Catarina  
[poscf.ccs@univali.br](mailto:poscf.ccs@univali.br)      [www.univali.br/pmcf](http://www.univali.br/pmcf)

PROGRAMA DE Mestrado Profissional em  
SAÚDE E GESTÃO DO TRABALHO - PMSGT  
Rua Uruguai, 458 – Bloco F6 – Sala 311 – Cx.Postal 360 –  
Fone/Fax: (047)3341-7932  
CEP: 88302-901 – Itajaí – Santa Catarina  
[msf.ccs@univali.br](mailto:msf.ccs@univali.br)      [www.univali.br/mestradosaude](http://www.univali.br/mestradosaude)



**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E**  
**SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS**

**DORIMAR SERAFIM STIZ**

**SÍNTESE DE NOVAS IMIDAS CÍCLICAS E AVALIAÇÃO DO**  
**POTENCIAL BIOLÓGICO**

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho  
Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Corrêa

Itajaí, março de 2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

S59s Stiz, Dorimar Serafim, 1974-  
Síntese de novas imidas cíclicas e avaliação do potencial biológico / Dorimar Serafim Stiz, 2015.  
115f. ; il., tab. ; fig.

Cópia de computador (Printout(s)).  
Dissertação (Mestrado) Universidade do Vale do Itajaí,  
Mestrado em Ciências Farmacêuticas.  
"Orientador : Prof . Dr. Valdir Cechinel Filho "  
Bibliografia : p.110-115

1. Imidas – Síntese Química. 2. Antineoplásicos. 3. Biodisponibilidade.  
4. Antifúngicos. 5. Química Farmacêutica. I. Título.

CDU: 615.32

Este trabalho é dedicado especialmente à minha esposa Alessandra, a qual de forma especial e carinhosa, deu-me força e coragem e à minha filha Júlia, que é a flor do campo que embeleza o meu dia.

Aos meus pais Arnaldo e Teresinha Stiz por tudo que fizeram por mim ao longo da minha vida.

Aos meus sogros Nabor e Salete Lessa pela valorização e amizade.





## **AGRADECIMENTOS**

Inicio meus agradecimentos à Deus, pois Ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente eu não teria dado conta!

A minha esposa pelo carinho, amor, ajuda, companheirismo e dedicação, mesmo nos momentos em que não pude estar presente. Obrigado Alessandra por sempre acreditares em mim e por me amares e pelo apoio dedicado a mim neste momento em que vivo. Não há palavras suficientes para que eu possa demonstrar todo o meu amor, gratidão e admiração que sinto por você.

A filha querida, flor do campo que embeleza o meu dia, dedico o meu amor. Que a felicidade que você me dá por existires, se reflita em toda a tua vida.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Arnaldo e Teresinha Stiz, por todo apoio, confiança, amor, carinho e atenção dedicados a mim durante toda a minha vida. Por terem iluminado meus caminhos com afeto e dedicação para que os trilhasse sem medo e por terem renunciados a muitos sonhos, para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus. Por serem exemplos de integridade e serenidade.

Aos meus sogros Nabor e Salete Lessa por sempre me incentivarem a continuar e principalmente por terem cuidado da minha “filhotinha” querida neste tempo em que me dediquei a esta dissertação.

As minhas irmãs, meus cunhados e familiares, que perto ou longe, sempre torceram por mim. Saibam que sou muito grato por tê-los em minha vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Valdir Cechinel Filho, agradeço sinceramente o seu incansável apoio, dedicação, sabedoria, compreensão, partilha e ensinamentos não só a nível científico, mas também a nível pessoal. Por tudo isto, e muito mais, é para mim um orgulho ter feito parte do seu grupo de Pesquisa e um privilégio ter sido seu aluno ao longo desta trajetória. A sua força de vontade é um grande exemplo para mim. Muito obrigado.

Ao co-orientador prof. Dr. Rogério Corrêa, amigo e mestre, meu muito obrigado pelo apoio, incentivo, por ter auxiliado nas análises estatísticas e pelos momentos de descontração no laboratório.

Ao prof. Dr. Rivaldo Niero, por ter acompanhado de perto o meu trabalho, agradeço a sua amizade, paciência, honestidade, o seu incansável apoio e pelas dúvidas sanadas em laboratório.

À professora Fátima de Campos Buzzi, por toda a força, colaboração, disposição e por todas as dúvidas sanadas no laboratório de síntese.

Ao Prof. Sérgio Faloni pelo auxílio nas análises do meu trabalho.

Aos colegas de mestrado, em especial às colegas Adriana Campos, Viviane Cappi Budal Arins e Gislaine Francieli Da Silva, pela colaboração nos ensaios microbiológicos e farmacológicos, juntamente com a equipe de professores.

Aos colegas de laboratório Elaine Cristina Kormann, Cassiano Beshaira Bueno, Marcel Petreanu, e a Auxiliar de laboratório Karen Petry Porres, por todo o auxílio na parte experimental e análise do meu trabalho.

Ao Pedro, do Laboratório de Instrumentação Analítica, pela realização dos Espectros que possibilitou a elucidação das substâncias sintetizadas.

À comissão interna de avaliação, composta pelos professores Alexandre Bella Cruz e Fátima de Campos Buzzi pelas importantes sugestões que contribuíram para o melhoramento do trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Univali, agradeço o apoio e as condições disponibilizadas para a execução deste trabalho.

A todos os docentes e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Univali, demonstro a minha gratidão pelos ensinamentos, trocas de informações e a disponibilidade demonstrada para me apoiar sempre que foi necessário.

Ao FUMDES (Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior), pela bolsa de mestrado e pelos recursos financeiros para a realização desta pesquisa.

À Secretária Municipal de Saúde, Márcia Cansian, que com muita sabedoria, discernimento e bom senso, acreditou e apoiou a minha decisão, liberando das minhas obrigações de Funcionário Público a fim de dedicar-me a este projeto. Obrigado.

A todos os meus amigos que acompanharam indiretamente o desenvolvimento deste trabalho, um grande obrigado.

Enfim, a todos aqueles que não foram citados e que colaboraram para que este trabalho pudesse ser realizado com êxito.

“Aquele que lê muito e anda muito,  
Vê muito e sabe muito”

Miguel de Cervantes Saavedra



# SÍNTESE DE NOVAS IMIDAS CÍCLICAS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO

**DORIMAR SERAFIM STIZ**

**Março/2015**

Orientador: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Corrêa

Área de concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas

Número de Páginas: 115

As imidas cíclicas pertencem a uma importante classe de substâncias orgânicas de interesse medicinal, cujas perspectivas de potencial terapêutico tem atraído a atenção da comunidade científica e da indústria farmacêutica. Considerando os relevantes resultados obtidos anteriormente com as imidas cíclicas, sintetizou-se três séries de substâncias originadas a partir dos anidridos itacônicos (série A), 4-metilftálico (série B) e 1,2,4-benzenotricarboxílico (série C), obtendo-se diferentes sub-classes de imidas. Foram utilizados procedimentos convencionais relacionados à síntese de imidas cíclicas. As substâncias foram purificadas e caracterizadas por ponto de fusão e métodos espectroscópicos (RMN-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e IV), cujos rendimentos foram satisfatórios. A análise computacional foi avaliada e verificou-se que nenhuma das três séries apresentou violações das regras propostas por Egan, Lipinski e Veber, demonstrando possuírem perfil de biodisponibilidade por via oral, boas condições para absorção intestinal passiva e permeação celular. Estudos da ação anti-inflamatória foram realizados com as substâncias da série A, destacando-se a substância 1 que apresentou uma boa inibição para a COX-1 e também para a COX-2. A substância 8 da série C, apresentou uma atividade inibitória bem superior aos demais (91%) na inibição da MAO-A. Foram encontrados resultados anticâncer promissores para algumas substâncias, dentre elas a 15, pertencente a série A que, apresentou efeitos significativos contra glioma humano (U251), com uma inibição total de crescimento celular na concentração de 0,95 µg/mL, quando comparado com o controle. A série A foi a mais promissora entre os testados contra linhagens celulares cancerígenas. Algumas imidas foram também muito promissoras contra fungos patogênicos, especialmente as da série A. Os resultados obtidos permitem concluir que algumas imidas apresentaram promissores efeitos biológicos de interesse medicinal, motivando a continuidade destes estudos na busca de novos agentes terapêuticos.

**Palavras-chave:** Imidas Cíclicas. Síntese. Biodisponibilidade. Antineoplásicos. Anti-inflamatório. Antifúngicos.



# SYNTHESIS OF NEW CYCLIC IMIDES AND EVALUATION OF THEIR BIOLOGICAL POTENTIAL

DORIMAR SERAFIM STIZ

March / 2015

Supervisor: Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho

Co-supervisor: Prof. Dr. Rogério Corrêa

Area of concentration: Natural Products and Synthetic Bioactive Substances

Number of Pages: 115

Cyclic imides belong to an important class of organic substances of medicinal interest, whose therapeutic potential has attracted the attention of the scientific community and the pharmaceutical industry. Considering the promising results obtained previously with this class, three sets of substances originated from itaconic (Series A), 4-methylphthalic (Series B) and 1,2,4-benzenetricarboxylic acid (Series C) anhydrides were synthesized to give different subclasses of imides. Conventional procedures related to the synthesis of cyclic imides were used. The substances were purified and characterized by melting point and spectroscopic methods ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, IR). Computational analysis was assessed, and it was found that none of the three sets caused violations of the rules presented by Egan, Lipinski and Veber, demonstrating that they possess good bioavailability and oral conditions for passive intestinal absorption and cell permeation. Anti-inflammatory assays of the studied compounds were conducted with the substance of series A, especially the -substance that showed good inhibition for COX-1 and also for COX-2. Substance 8 (Series C) showed inhibitory activity of 91% against MAO-A. Promising anticancer -results were found for certain substances, including compound 15 belonging to -series A, which showed significant effects against human glioma (U251), with- complete inhibition of cell growth at a concentration of 0.95 mg / mL when compared to the control group. Series A was the most promising among the tested against cancer cell lines. Some imides, especially series A, were also very promising against pathogenic fungi. The results showed that some imides showed promising biological effects of medicinal interest, encouraging the continuation of these studies in the search for new therapeutic agents.

Keywords: Cyclic Imides. Synthesis. Bioavailability. Antineoplastic. Anti-inflammatory. Antifungals.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral das imidas cíclicas .....	32
Figura 2: Subclasses de imidas cíclicas: maleimidas (1), succinimidas (2), glutarimidas (3), ftalimidas (4) e naftalimidas (5) .....	32
Figura 3: Estrutura química da Filantimida .....	33
Figura 4: Estrutura química da Talidomida .....	344
Figura 5: Estruturas químicas de algumas N-aril-glutarimidas .....	34
Figura 6: Estrutura química da 7-tia-2-aza-biciclo[2,2,1]hept-2-en-3-amino[5,6-c]succinimida .....	35
Figura 7: Estrutura química do derivado das 3,4-dicloromaleimidas .....	35
Figura 8: Estruturas químicas de substâncias que apresentam o núcleo imídico ...	36
Figura 9: Metodologia mais comum empregada na formação das imidas cíclicas..	37
Figura 10: Formação de imidas cíclicas N-substituídas utilizando ácidos âmicos...	37
Figura 11: Formação de imidas cíclicas N-substituídas utilizando ácido de Lewis e HMDS .....	37
Figura 12: Formação de imidas cíclicas N-substituídas utilizando nitrilos e dióis ...	38
Figura 13: Estruturas do anidrido itacônico (Série A), 4-metilftálico (Série B) e 1,2,4-benzenotricarboxílico ou 4-carboxilftálico (Série C).....	43
Figura 14: Mecanismo proposto para a formação das imidas cíclicas em estudo...	54
Figura 15: Esquema geral proposto para as reações de síntese de imidas cíclicas derivadas do anidrido itacônico (Série A) .....	55
Figura 16: Espectro de IR da substância 15 .....	61
Figura 17: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da substância 15 .....	62
Figura 18: Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da substância 15.....	63
Figura 19: Esquema geral proposto para as reações de síntese de imidas cíclicas derivadas do anidrido 4-metilftálico (Série B) .....	73
Figura 20: Espectro de IV da substância 4.....	77
Figura 21: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da substância 4.....	78

Figura 22: Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da substância 4.....	79
Figura 23: Avaliação da atividade gastroprotetora da N-fenil-4-carboxilftalimida sintetizada nesta série, <i>in vivo</i> , no modelo de úlcera induzida por etanol .....	88
Figura 24: Esquema geral proposto para as reações de síntese de imidas cíclicas derivadas do anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico ou 4-carboxilftálico...	89
Figura 25: Espectro de IV da substância 2.....	93
Figura 26: Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da substância 2.....	94
Figura 27: Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da substância 2.....	95
Figura 28: Avaliação da atividade gastroprotetora da N-fenil-4-ácido carboxiftalimida sintetizada nesta série, <i>in vivo</i> , no modelo de úlcera induzida por etanol .....	102
Figura 29: Rota sintética para obtenção da imido-chalcona derivada da imida 4-acetilfenil-4-metilftalimida .....	103
Figura 30: Estrutura molecular de uma híbrida imida-chalcona 2-{4-[(2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enoil]fenil}-5-metil-1H-isoindole-1,3(2H)-diona .....	104
Figura 31: Espectro de massas da substância amarela da CCD (imido-chalcona 2-{4-[(2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enoil]fenil}-5-metil-1H-isoindol 1,3 (2H)-diona) .....	105

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Ordem de potência para diversos parâmetros físico-químicos proposta por Topliss .....	40
Tabela 2: Proposta de Topliss para a seleção de novos substituintes em função dos prováveis parâmetros mais ativos .....	41
Tabela 3: Rendimentos, purificação e ponto de fusão das substâncias sintetizadas na Série A, a partir do respectivo ácido âmico .....	59
Tabela 4: Descritores envolvidos na avaliação teórica ADME da Série A.....	65
Tabela 5: Efeito anti-proliferativo de imidas cíclicas (Série A) em diversas linhagens de células cancerígenas .....	67
Tabela 6: Atividade <i>in vitro</i> nas enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B) e da substância sintetizada N-4'-metil-fenil-2-metilftalimida (3) .	68
Tabela 7: Atividade antifúngica da substância sintetizada N-4'-metil-fenil-2-metilftalimida (3), Série A, contra diversas cepas de fungos .....	70
Tabela 8: Atividade antiparasitária das substâncias da Série A <i>in vitro</i> nas formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>L. brasiliensis</i> , através do método colorimétrico XTT.....	71
Tabela 9: Rendimento, purificação e ponto de fusão das imidas cíclicas da Série B, a partir do respectivo ácido âmico .....	76
Tabela 10: Descritores envolvidos na avaliação teórica ADME para a Série B.....	81
Tabela 11: Efeito anti-proliferativo de imidas cíclicas (Série B) em diversas linhagens de células cancerígenas.....	83
Tabela 12: Atividade <i>in vitro</i> nas enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e -B), das substâncias ftalimidicas da Série B .....	84
Tabela 13: Atividade da inibição da enzima COX-1 / COX-2 para as substâncias da Série B.....	85
Tabela 14: Atividade antiparasitária das substâncias da Série B <i>in vitro</i> nas formas promastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i> e <i>L. brasiliensis</i> através do método colotimétrico XTT .....	87
Tabela 15: Rendimentos e Purificação das substâncias sintetizadas na Série C ...	92
Tabela 16: Descritores envolvidos na avaliação teórica ADME da Série C .....	97

Tabela 17: Efeito anti-proliferativo de imidas cíclicas (Série C) em diversas linhagens de células cancerígenas.....	99
Tabela 18: Atividade <i>in vitro</i> nas enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e – B), das substâncias ftalimídicas da Série C.....	100
Tabela 19: Atividade antiparasitária das substâncias da Série C <i>in vitro</i> através do método colotimétrico XTT.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**786-0:** Linhagens celulares de câncer de rim

**AA:** Aminoácido

**ABS:** Escore de biodisponibilidade

**ADME:** Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

**AlogP:** Método de previsão do coeficiente de partição octanol-água que foi desenvolvido com 12908 moléculas, a partir do banco de dados PHYSPROP.

**Ar:** Aromático

**B6-F10:** Linhagem específica de células de melanoma

**CAT:** Alcaloide de *Galipea Longiflora*

**CBN:** Carbenoxolona

**CC:** Cromatografia em coluna

**CCD:** Cromatografia em Camada Delgada

**CD:** Clorofórmio deuterado

**CEP:** Comissão de ética em pesquisa

**CIM:** Concentração inibitória mínima

**COBEA:** Colégio brasileiro de experimentação animal

**COX:** Ciclooxygenase

**CPQBA:** Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas

**d:** Dupleto

**DA:** Doença de Alzheimer

**DI50:** Dose de uma substância necessária para inibir 50 % da resposta desejada em relação a um grupo controle (experimentos laboratoriais).

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DSM11959:** Cepas fungícas de *Cryptococcus neoformans*

**DSM6972:** Cepas fungícas de *Cryptococcus neoformans*

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EIA:** Ensaio imunoenzimático

**EPM:** Erro padrão da média

**ES:** Fatores estéricos

**EVC:** Contagem de violações de Egan

**FT-IR:** Espectrofotômetro por transformada de Fourier

**HaCat:** Linhagem não-tumoral humana de queratinócito

**HBA:** Número de aceptores de ligações hidrogênio

**HBD:** Número de doadores de ligações hidrogênio

**HIV:** Vírus da imunodeficiência humana

**HT29:** Linhagens celulares de câncer de cólon,

**MHz:** Megahertz

**IC:** Índice de cura

**IC<sub>50</sub>:** Concentração de uma substância necessária para reduzir o crescimento populacional de um organismo em 50%, *in vitro*.

**IR:** Infravermelho

**K562:** Linhagem de célula leucêmica

**K562:** Linhagens celulares de câncer de leucemia

**Lma:** Linhagens celulares de *Leishmania amazonenses*

**LogP:** Coeficiente de partição octano/água

**LRF:** Contagem de violações da regra dos 5 – Lipinski

**m:** Multipleteo

**M2904:** Linhagens celulares de *Leishmania brasiliensis*

**MCF7:** Linhagens celulares de câncer de mama

**MeOD:** Metanol deuterado

**MIC:** Concentração inibitória mínima

**MFC:** concentração fungicida mínima

**MM:** Método mecânico molecular

**MW:** Peso molecular

**NC + NHET:** Método de previsão do logP baseado no número de carbonos (NC) e no número de heteroátomos (NHET)

**NCI-ADR/RES:** Linhagens celulares de câncer de ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos

**NCI-H460:** Linhagens celulares de câncer de pulmão

**NHA:** Grupos aceptores de hidrogênio

**NHD:** Grupos doadores de hidrogênio

**NIQFAR:** Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas

**nR:** Número de rotações

**NT:** Não testado

**OVCAR-03:** Linhagens celulares de câncer de ovário,

**p.f.:** Ponto de fusão

**PBS:** Solução tampão fosfato

**PC-3:** Linhagens celulares de câncer de próstata,

**PF. Recrist.:** Ponto de fusão da substância recristalizada

**PF:** Ponto de fusão

**PGH<sub>2</sub>:** Prostaglandinas derivada do ácido araquidônico

**pH:** Potencial de hidrogênio iônico (índice que indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de um meio qualquer)

**PM:** Peso molecular

**PMC2102:** Cepas fungicas de *Cryptococcus neoformans*

**R:** Grupo substituinte

**RBC:** Número de ligações rotacional

**Rf:** Fator de retenção

**RMN-<sup>13</sup>C:** Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

**RMN-<sup>1</sup>H:** Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

**RPMI:** Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

**RS<sub>1</sub>:** Rota sintética 1

**RS<sub>2</sub>:** Rota sintética 2

**s:** Simpleto

**SFB:** Soro fetal bovino

**SI:** Índice de seletividade

**SRB:** Corante proteico sulforrodamina B

**t:** Tripleto

**TCA:** Ácido tricloroacético

**TGI:** Inibição do crescimento total

**TMZ:** Temozolomida

**TNF-  $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral  $\alpha$

**TPSA:** Área total de superfície polar

**TZD:** 2,4-Tiazolidinodiona

**U251:** Linhagens celulares de câncer de glioma

**VVC:** Contagem de violações de Veber

**XlogP:** Método átomo-aditivo para o cálculo do coeficiente de partição octanol-água (logP)

**XTT:** Método colorimétrico do sal 2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil-5-fenilalanina-carbonil-2H-tetrazolium-hidróxido

**$\mu\text{M}$** : Micro-molar

**$\pi$** : Parâmetros hidrofóbicos

**$\sigma$** : Parâmetros eletrônicos



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 Objetivo geral .....	29
2.2 Objetivos específicos .....	29
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>31</b>
3.1 Imidas cíclicas.....	31
3.1.1 Conceito e histórico.....	31
3.1.2 Efeitos biológicos .....	33
3.1.2 Métodos sintéticos gerais para a obtenção de imidas cíclicas .....	36
3.1.3 Inovação tecnológica e o planejamento de fármacos .....	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
4.1. Síntese.....	43
4.2 Purificação e Caracterização .....	44
4.3 Análise <i>In silico</i> : Cálculos teóricos computacionais .....	44
4.4 Atividades biológicas.....	45
4.4.1 Animais .....	45
4.4.2 Atividade <i>in vitro</i> da inibição das enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B).....	46
4.4.3 Atividade anti-proliferativa <i>in vitro</i> .....	47
4.4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> da COX-1 e COX-2.....	48
4.4.5 Atividade antifúngica .....	50
4.4.6 Atividade antiparasitária .....	50
4.4.7 Avaliação da atividade gastroprotetora induzida por etanol.....	51
4.5 Análise Estatística.....	52
4.6 Relação Estrutura-Atividade - Método de Topliss .....	52
4.7 Obtenção de híbridos imido-chalconas .....	52
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>PARTE 1</b> .....	<b>55</b>
5.1 Imidas cíclicas derivadas do anidrido itacônico (Série A) .....	55
5.1.1 Síntese.....	55
5.1.2 Procedimento para a obtenção das imidas derivadas do anidrido itacônico (Série A) .....	56
5.1.3 Purificação e Caracterização .....	58
5.1.4 Análise <i>in silico</i> : Cálculos teóricos computacionais (Séries A).....	63
5.1.4 Atividade Biológica.....	66

5.1.4.1	<i>Atividade anticâncer in vitro</i> .....	66
5.1.4.2	<i>Atividade in vitro da substância 3 (N-4'-metil-fenil-2-metilftalimida) para inibição das enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B)</i> .....	67
5.1.4.3	<i>Atividade antifúngica</i> .....	69
5.1.4.4	<i>Atividade antiparasitária</i> .....	71
<b>PARTE 2</b>	.....	<b>73</b>
5.2	Imidas cíclicas derivadas do anidrido 4-metilftálico (Série B) .....	73
5.2.1	Síntese .....	73
5.2.2	Procedimento para a obtenção das imidas derivadas do anidrido 4-metilftálico (Série B) .....	73
5.2.3	Purificação e Caracterização .....	75
5.2.4	Análise <i>In silico</i> : Cálculos teóricos computacionais (Série B) .....	79
5.2.5	Atividade Biológica .....	82
5.2.5.1	<i>Atividade anticâncer in vitro</i> .....	82
5.2.5.2	<i>Atividade in vitro das substâncias ftalimídicas da Série B para inibição das enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B)</i> .....	83
5.2.5.3	<i>Atividade antifúngica</i> .....	84
5.2.5.4	<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro de inibidores da COX-1 e COX-2</i> .....	84
5.2.5.5	<i>Atividade antiparasitária</i> .....	86
5.1.4.5	<i>Avaliação da atividade gastroprotetora induzida por etanol</i> .....	87
<b>PARTE 3</b>	.....	<b>89</b>
5.3	Imidas cíclicas derivadas do anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico ou 4-carboxilftálico (Série C) .....	89
5.3.1	Síntese .....	89
5.3.2	Procedimento para a obtenção das imidas derivadas do anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico ou 4-carboxilftálico (Série C) .....	89
5.3.3	Purificação e Caracterização .....	91
5.3.4	Análise <i>In silico</i> : Cálculos teóricos computacionais (Séries C) .....	95
5.3.5	Atividade Biológica .....	98
5.3.5.1	<i>Atividade anticâncer in vitro</i> .....	98
5.3.5.2	<i>Atividade in vitro das substâncias sintetizadas na inibição das enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B)</i> .....	99
5.3.5.3	<i>Atividade antifúngica</i> .....	100
5.3.5.4	<i>Atividade antiparasitária</i> .....	100
<b>PARTE 4</b>	.....	<b>103</b>
5.4	Imida-chalcona derivada da imida cíclica N-4'-acetilfenil-4-metilftalimida ..	103
<b>6 CONCLUSÕES</b>	.....	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	.....	<b>111</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A química orgânica apresenta um dos principais papéis na busca por moléculas que apresentem potencial biológico e que possam ser utilizadas como fármacos, principalmente para cura de doenças que ainda não possuem tratamentos apropriados ou que sejam capazes de substituir aqueles já existentes, minimizando custos e efeitos adversos (CECHINEL FILHO et al., 2003).

A necessidade de novos fármacos tem impulsionado a comunidade científica a novas pesquisas nesta área. A síntese orgânica se encaixa neste contexto, sendo a principal fonte de medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico (MENEGATTI et al., 2001). Porém, pode-se dizer que muitos desses fármacos são provenientes de protótipos advindos de produtos naturais, especialmente de plantas, que têm, ao longo dos anos, possibilitado a descoberta de inúmeras moléculas bioativas (LOZOYA, 1994; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; CECHINEL FILHO et al., 2003; BUZZI; CORRÊA; CECHINEL FILHO, 2003; NEWMAN et al., 2003).

Nas últimas décadas, muitas classes de substâncias orgânicas estão sendo estudadas, principalmente as que em geral apresentam estruturas heterocíclicas. A explicação para este fato reside na estrutura destas moléculas que permitem uma grande variação dos substituintes ao seu redor. Além disto, tem a presença de heteroátomos, como o nitrogênio, proporcionando grande mudança na estrutura da molécula cíclica, devido à diferença de eletronegatividade em relação ao átomo de carbono e acrescida da disponibilidade dos pares de elétrons não ligantes do heteroátomo (VALVERDE; TORROBA, 2005).

As imidas cíclicas, justamente por serem heterocíclicas, despertam interesse dos pesquisadores no mundo todo. A possibilidade de utilizar uma estrutura cíclica contendo um átomo de nitrogênio localizado entre dois grupos acilas, de fácil obtenção e alta versatilidade, torna essa classe excelente precursora para a síntese de moléculas derivadas de produtos naturais, bem como para a síntese de outras mais complexas (CECHINEL FILHO et al., 2003).

Considerando-se a importância químico-medicinal das imidas cíclicas e de seus derivados, pretendeu-se neste trabalho desenhar e sintetizar diferentes imidas cíclicas e derivados, com potencial para uso como moléculas-protótipo para a síntese de novos e eficientes fármacos. Além disso, procurou-se analisar as

substâncias do ponto de vista farmacológico e microbiológico, fazendo-se, quando possível, o emprego de métodos clássicos de correlação entre estrutura química e atividade biológica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Sintetizar diferentes séries de imidas cíclicas e derivados relacionados com potencial terapêutico e avaliar indícios de relação estrutura-atividade no intuito de obter substâncias mais ativas.

### 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar novas imidas cíclicas a partir de anidridos cíclicos (itacônico, 4-metilftálico e 4-carboxilftálico), usando reagentes de fácil obtenção e baixo custo, contemplando os substituintes sugeridos por Topliss.
- ✓ Purificar e caracterizar espectroscopicamente as substâncias sintetizadas;
- ✓ Analisar a biodisponibilidade por via oral e a permeabilidade das substâncias sintetizadas, de acordo com os parâmetros estipulados na regra dos 5 de Lipinski "*in silico*";
- ✓ Avaliar as substâncias sintetizadas em modelos de atividade biológica, no intuito de identificar as mais ativas, a fim de verificar indícios de relação estrutura-atividade, proposto pelo método de Topliss, atingindo-se uma ação otimizada em futuros ensaios de avaliação e modificação estrutural;
- ✓ Sintetizar uma imido-chalcona a partir da reação da imida cíclica N-4'-acetilfenil-4-metilftalimida com 4-cloro-benzaldeído.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

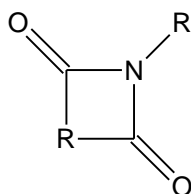
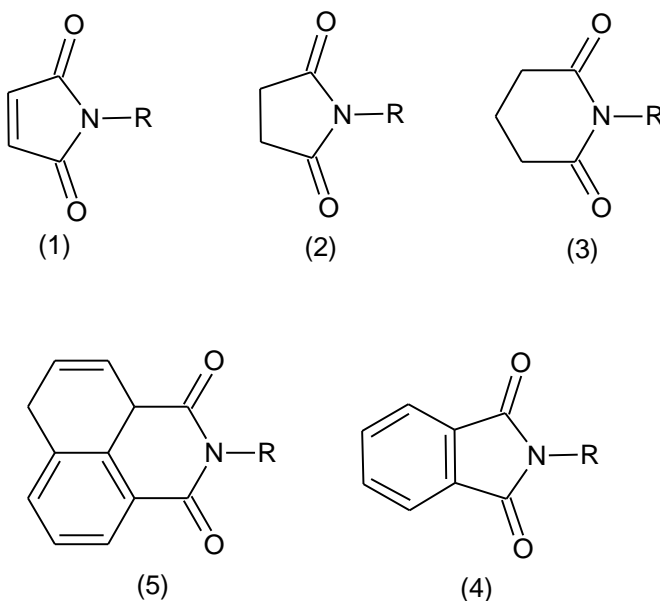
A descoberta de novas substâncias, com potenciais terapêuticos, candidatos a novos fármacos, compreende uma cadeia multidisciplinar complexa e que necessita estar bem articulada para ser efetiva. A velocidade de geração de novos conhecimentos científicos e tecnológicos tem sido difundida rapidamente nos setores de pesquisa em função da obtenção de excelentes e relevantes resultados experimentais, os quais têm sido determinantes na notável elevação da quantidade e da qualidade dos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico, muitos deles de origem natural (BARREIRO; FRAGA, 2005; BARREIRO; BOLZANI, 2009; BARREIRO; FRAGA; LIMA, 2012).

Inúmeras classes de substâncias orgânicas têm demonstrado, em estudos pré-clínicos e clínicos, promissores efeitos biológicos. As imidas cíclicas podem ser inseridas entre estas classes, pois tem ressurgido e atraído à atenção de cientistas, devido, principalmente, aos seus vastos potenciais terapêuticos. Essa classe ainda está sendo bastante estudada devido a sua alta aplicabilidade já encontrada (MACHADO et al., 2005).

#### 3.1 Imidas cíclicas

##### 3.1.1 Conceito e histórico

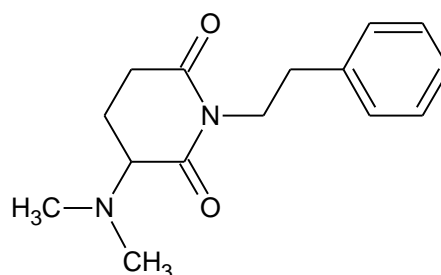
As imidas cíclicas são substâncias orgânicas heterocíclicas que contém o grupo funcional  $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$  (Figura 1), sendo R um átomo de hidrogênio, grupo alquila ou aromático, onde existe a junção desses grupos acila por meio de uma cadeia carbônica. Os representantes mais comuns dessa classe de substâncias são as maleimidas, succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas e seus respectivos derivados (Figura 2). Essas substâncias são assim nomeadas por serem obtidas a partir de anidrido maléico, anidrido succinico, anidrido glutárico, anidrido ftálico e anidrido 1,8-naftálico, respectivamente (CECHINEL FILHO, 1995; BUZZI; CORRÊA; CECHINEL FILHO, 2003; CECHINEL FILHO et al., 2003; CECHINEL FILHO, 2009; ABDEL AZIZ et al., 2011).

**Figura 1:** Estrutura geral das imidas cíclicas**Figura 2:** Subclasses de imidas cíclicas: maleimididas (1), succinimididas (2), glutarimididas (3), ftalimididas (4) e naftalimididas (5)

R: radical alquil, aril ou outros

Os estudos com esta classe de substâncias iniciaram a partir da descoberta do alcaloide natural Filantimida (Figura 3), isolado das partes aéreas do *Phyllanthus sellowianus*, planta conhecida como quebra-pedra (TEMPESTA et al., 1988) e utilizada pela medicina popular de vários países, incluindo o Brasil (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998). Esta substância, derivada da glutarimida, apresentou moderado efeito antimicrobiano (CECHINEL FILHO et al., 1994), anti-espasmódico (CALIXTO et al., 1984) e analgésico (CECHINEL FILHO, 1995).



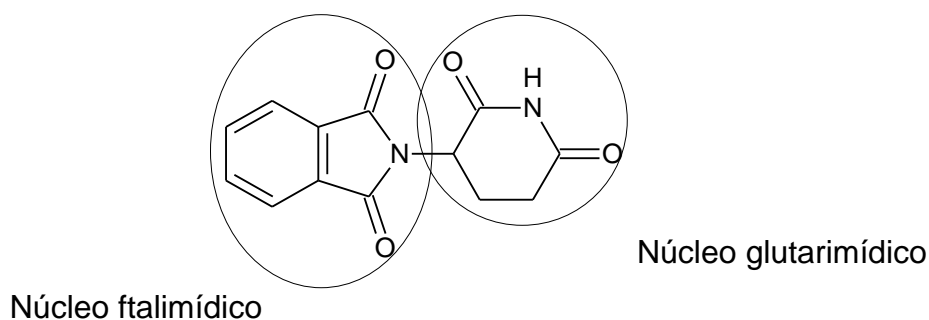
**Figura 3:** Estrutura química da Filantimida

### 3.1.2 Efeitos biológicos

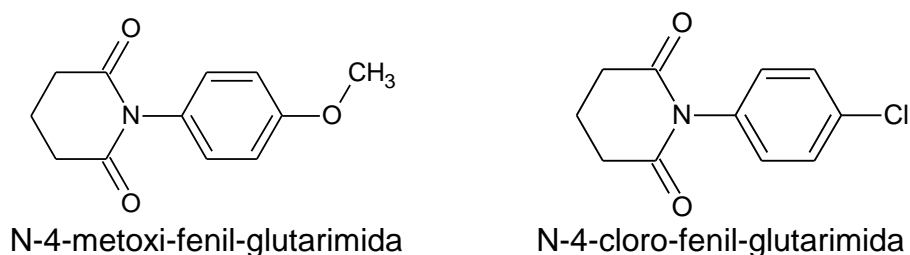
Os efeitos farmacológicos atribuídos às imidas cíclicas parecem estar relacionados com o tamanho e natureza dos grupos substituintes do anel imídico, que podem mudar suas propriedades estéricas, alterando, conseqüentemente, sua atividade (KIER; ROCHE, 1967; HALL; WONG; SCOVILL, 1995; CECHINEL FILHO et al, 2003). Esses efeitos contribuem para que ocorra um aumento significativo no interesse pelas imidas cíclicas, pois podem ser utilizadas na formação de várias moléculas com potencial farmacológico como: atividade ansiolítica e antidepressiva, analgésico, antiangiogênicos, antineoplásico, anti-inflamatório, antibiótico, etc. (CECHINEL FILHO et al., 2003).

Pode-se citar o caso da Talidomida (Figura 4), que possui um núcleo ftalimídico e um núcleo glutarimídico. Apesar dos conhecidos e danosos efeitos adversos do passado, foi liberada para uso terapêutico, pela Lei 10.651, de 16 de abril de 2003, para o tratamento da hanseníase, de mieloma múltiplo, doenças crônico-degenerativas e algumas doenças oportunistas que afetam portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BRANDÃO, 2005). Os efeitos benéficos e promissores relatados para a Talidomida, estão tornando-a uma molécula-líder para o futuro desenvolvimento de novos fármacos (BUZZI et al., 2003).

Recentemente, foi demonstrado que a administração de Talidomida em ratos obesos, induziu a uma redução na adiposidade acompanhada por uma redução de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), leptina e MCP-1, a produção de tecido adiposo, a infiltração de macrófagos e a ativação de JNK. Os níveis de TNF- $\alpha$  e leptina no soro também foram reduzidos. In vitro, a liberação de TNF- $\alpha$  basal e lipopolissacarídeo (LPS), induzida por MCP-1, foi inibida em células 3T3-L1 (NAKAMITSU et al., 2014).

**Figura 4:** Estrutura química da Talidomida

Em um estudo desenvolvido no NIQFAR-Univali, determinou-se que algumas N-aril-glutarimidas foram efetivas contra processos dolorosos (Figura 5), verificados pelo modelo do ácido acético e da formalina, ambos em camundongos (STIZ et al., 2000).

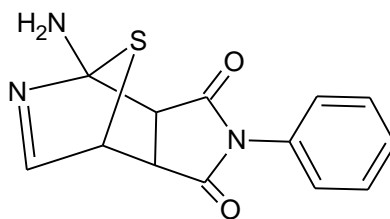
**Figura 5:** Estruturas químicas de algumas N-aril-glutarimidas

Outras imidas cíclicas já foram estudadas e seus resultados encontram-se na literatura, como a mitonafida, a amonafida e seus derivados, que demonstraram significativa atividade antitumoral sobre diversos tipos de tumores, especialmente leucemias, melanomas e tumores de mama (OTT et al., 2011; MUKHERJEE et al., 2010).

Uma série de derivados ftalimídicos tricíclicos parecem promissores contra o vírus HIV, pois foram planejados como novos inibidores da HIV-1 integrase, uma enzima essencial para a replicação viral (VERSCHUEREN et al., 2005).

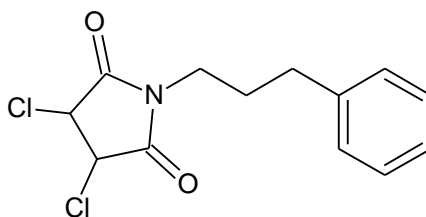
A substância 7-tia-2-aza-biciclo[2,2,1]hept-2-en-3-amino[5,6-c]succinimida (Figura 6) é um bom inibidor do *Trichophyton rubrum*, o maior agente etiológico de todas as infecções produzidas por dermatófitos (LOPEZ et al., 2003).

**Figura 6:** Estrutura química da 7-tia-2-aza-biciclo[2,2,1]hept-2-en-3-amino[5,6-c]succinimida



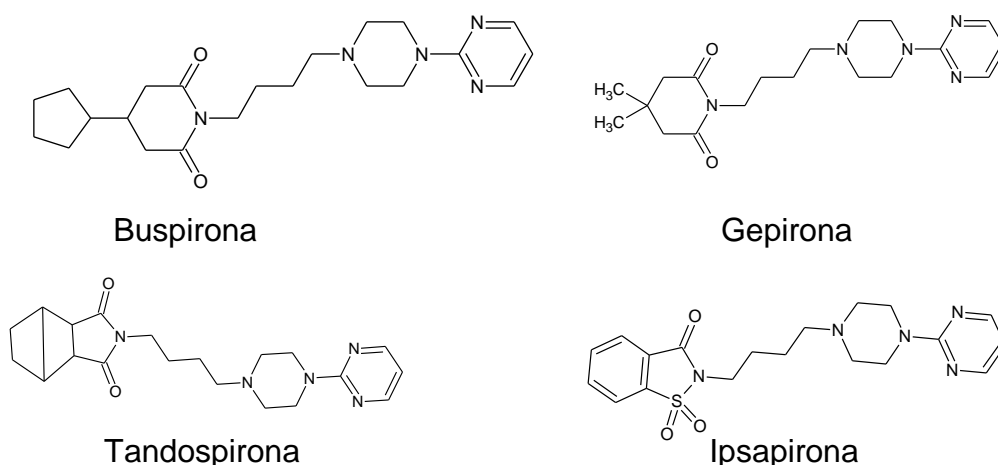
As substâncias N-fenil-, N-aril-, N-fenilalquil-maleimidas possuem similares e significantes propriedades antifúngicas contra fungos patogênicos oportunistas como *Cryptococcus neoformans* e dermatófitos, e entre as 3,4-dicloromaleimidas um derivado (Figura 7) apresentou o mais amplo espectro de ação e as mais baixas concentrações inibitórias mínimas contra todos os fungos testados (LOPEZ et al., 2005).

**Figura 7:** Estrutura química do derivado das 3,4-dicloromaleimidas



Num estudo realizado por Maximiliano e colaboradores, as substâncias N-fenil e N-fenilalquil-maleimida exerceram atividade fungicida e fungistática sobre as cepas de *Candida spp* (MAXIMILIANO; CECHINEL FILHO; CORRÊA, 2008).

Além dessas substâncias, outras apresentam o núcleo imídico (Figura 8) e estão disponibilizadas no mercado farmacêutico como ansiolíticos e antidepressivos (Buspirona, Gepirona, Tansospirona e Ipsapirona) (KELLER et al., 2005).

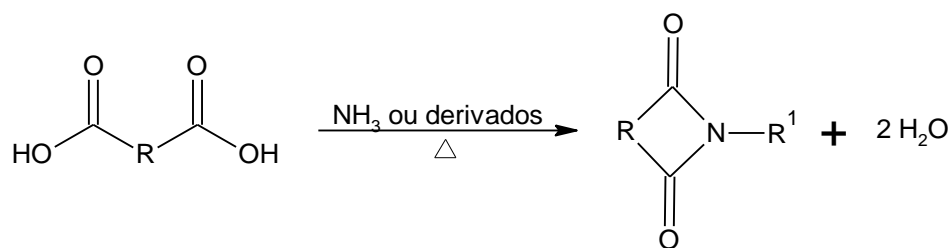
**Figura 8:** Estruturas químicas de substâncias que apresentam o núcleo imídico

Os últimos resultados obtidos em nossos laboratórios com as imidas cíclicas tem permitido evidenciar, além do já exposto, que substâncias derivadas de imidas N-fenilmaleimidas possuem ação sobre mecanismo de resistência tumoral e apoptose sobre células de linhagem de melanoma murino B16F10 e tipos de leucemias mielóide humanas (CAMPOS et al., 2014).

### 3.1.2 Métodos sintéticos gerais para a obtenção de imidas cíclicas

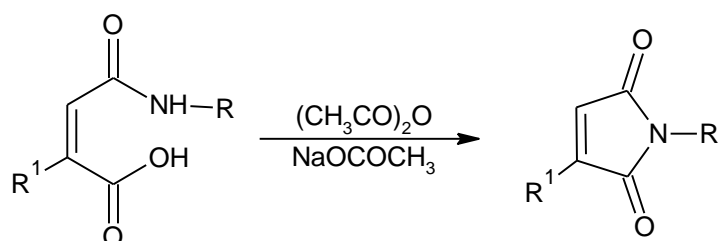
Na literatura são encontradas inúmeras metodologias para a preparação das imidas cíclicas as quais são empregadas com modificações casuais. Um dos procedimentos mais convenientes consiste na utilização de ácidos dicarboxílicos com uma quantidade equimolar de amônia ou de uma substância que possa produzir amônia no meio reacional, ou ainda, de um derivado substituído da amônia, como aminas em aquecimento, onde a temperatura pode variar numa gama entre 150-200 ° C (Figura 9). Utilizando esta metodologia, podem-se obter bons rendimentos (60-70%) quando são utilizados anidridos de ácidos na obtenção de imidas cíclicas N-substituídas (HARGREAVES; PRITCHARD; DAVE; 1970)

**Figura 9:** Metodologia mais comum empregada na formação das imidas cíclicas.



Outra possibilidade aplicada à síntese de imidas cíclicas N-substituídas (Figura 10), com bons rendimentos (50-70%), seria a utilização de ácidos âmicos, que na presença de anidrido acético e acetato de sódio anidro são ciclizados em sua forma imídica, formando maleimidas e citraconamidas (MEHTA et al.; 1960).

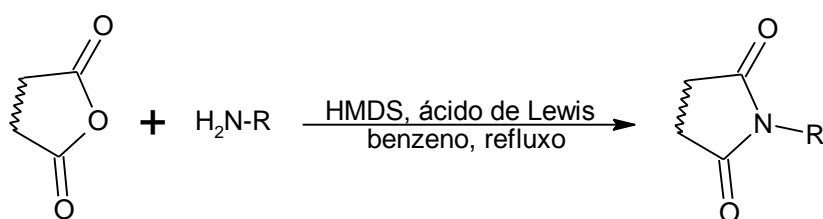
**Figura 10:** Formação de imidas cíclicas N-substituídas utilizando ácidos âmicos



R = metila, n-propila, n-butila, n-hexila, n-octila, benzila  
 R<sup>1</sup> = H, CH<sub>3</sub>, benzila

Em 1997, outra metodologia foi proposta para sintetizar imidas cíclicas N-alquiladas utilizando anidridos de ácido e a amina substituída desejada na presença de ácidos de Lewis e 1,1,1,3,3,3-hexametildisililazano (HMDS), alcançando rendimentos elevados (73-97%) em condições bastante brandas (Figura 11) (REDDY et al., 1997).

**Figura 11:** Formação de imidas cíclicas N-substituídas utilizando ácido de Lewis e HMDS

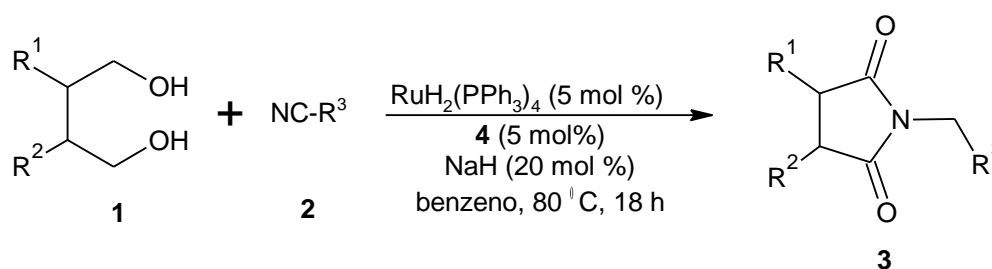


Há outras metodologias desenvolvidas que apresentam bons rendimentos e são amplamente utilizadas. Consistem na utilização de anidridos de ácidos dicarboxílicos que são dissolvidos em éter, tratados com amônia ou amina substituída, obtendo-se os respectivos ácidos âmicos. Estes são ciclizados para obter a forma imídica, através da ação do anidrido acético, sob aquecimento, na presença de acetato de sódio anidro (CECHINEL FILHO et al., 2003). Esta metodologia pode ser utilizada para obtenção de ftalimidas, succinimidas e maleimidas, utilizando síntese em fase sólida (BARN; MORPHY, 1999).

No que diz respeito à preparação das imidas cíclicas, algumas sub-classes como as glutarimidas, maleimidas, succinimidas, ftalimidas, etc., tem que ser levado em conta as suas particularidades. Portanto, são sintetizadas por diferentes metodologias, eventualmente com pequenas modificações, como mudança de alguns reagentes desidratantes ou solventes (CECHINEL FILHO et al., 2003).

Recentemente Kim e Hong publicaram, em 2014, um protocolo versátil para a síntese de imidas cíclicas a partir de nitrilos e dióis, materiais iniciais facilmente disponíveis. A reação (Figura 12) envolve uma reação de transferência de hidrogênio Ru-catalisada, em que os substratos, dióis e nitrilos, são ativados simultaneamente em lactonas e aminas de uma forma reduzida e neutra para, em seguida, se obter as imidas cíclicas correspondentes, tendo o gás de hidrogênio como o único subproduto. Este método sintético fornece uma rota sustentável, rentável e de fácil acesso para as imidas cíclica (KIM; HONG, 2014).

**Figura 12:** Formação de imidas cíclicas N-substituídas utilizando nitrilos e dióis



Há fortes razões para o progresso e continuidade dos estudos químicos e biológicos das imidas cíclicas, pois são facilmente obtidas, com bons rendimentos e rotas sintéticas exequíveis. A reação é extremamente versátil uma vez que é possível incorporar qualquer grupo R na imida, desde que haja uma amina primária com o grupo desejado.

### 3.1.3 Inovação tecnológica e o planejamento de fármacos

A fim de otimizar a atividade de substâncias biologicamente ativas, utiliza-se procedimentos químicos que envolvam modificações moleculares, e dependendo dos grupos reativos, muitas mudanças podem ser realizadas. Na primeira etapa da modificação molecular, procura-se introduzir grupos que alterem a hidrofobicidade da substância em estudo, ou grupos doadores e/ou aceptores de elétrons, permitindo, posteriormente, a aplicação de algum método qualitativo ou quantitativo de correlação entre a estrutura química e a atividade biológica (BARREIRO,1991; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Desta forma, é possível verificar através do estudo das relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR), ou entre a estrutura química e algum tipo de propriedade físico-química (QSPR), quais os efeitos que a estrutura química de uma substância (ligante) pode causar durante sua interação com o receptor biológico e, conseqüentemente, racionalizar os principais fatores que governam esta interação (ARROIO; HONÓRIO; SILVA., 2010).

A substituição de um átomo de H por um determinado substituinte (grupo alquila, grupo nitro, grupo ciano, grupo carboxilato, halogênio, etc) pode modificar profundamente a potência, duração e ainda natureza do efeito farmacológico de uma molécula. Os estudos de correlação estrutura-atividade, fundamentados no efeito do substituinte em um determinado anel aromático, são muito comuns na química medicinal, uma vez que mais de 50% dos fármacos ou substâncias bioativas possuem este tipo de anel (CECHINEL FILHO, 1995; CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

Objetivando promover um planejamento racional de novas moléculas ativas, foram desenvolvidas várias estratégias para compreender os mais diversos parâmetros físico-químicos numa pequena série de substâncias ou grupo de teste. Entre estas, podemos indicar os métodos de Topliss, Hansch e Leo (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

Hansch propôs, em 1971, através de uma equação, que a atividade biológica pode ser influenciada através da análise dos parâmetros hidrofóbicos, eletrônicos e estéricos de substâncias estruturalmente similares, porém, com substituintes diferentes (HANSCH; KIM; SARMA, 1973; TOPLISS, 1993).

Topliss sugeriu, em 1977, um método não estatístico e não computadorizado, denominado manual, para aplicar o método de Hansch. Este método consiste na análise dos resultados da atividade farmacológica de cinco substâncias que possuam anel aromático na sua estrutura e que estejam presentes os seguintes substituintes: H, 4-Cl, 3,4-Cl<sub>2</sub>, 4-CH<sub>3</sub> e 4-OCH<sub>3</sub> (TOPLISS, 1993). A avaliação da atividade biológica depende basicamente dos parâmetros hidrofóbicos ( $\pi$ ), eletrônicos ( $\sigma$ ) e estéricos (Es) que provocam os substituintes no anel aromático, demonstrados na Tabela 1, possibilitando a modulação da atividade farmacológica das substâncias em estudo. O método manual, além de geralmente usar a mesma quantidade de substâncias para construir a série inicial para a correlação, possui como vantagem que as primeiras substâncias podem ser sintetizadas sem a preocupação inicial de serem testadas para quantificar suas respectivas atividades.

**Tabela 1:** Ordem de potência para diversos parâmetros físico-químicos proposta por Topliss

Substituintes	<i>Parâmetros físico-químicos de Topliss</i>									
	$\pi$	$2\pi - \pi^2$	$\sigma$	$-\sigma$	$\pi + \sigma$	$2\pi - \sigma$	$\pi - \sigma$	$\pi - 2\sigma$	$\pi - 3\sigma$	$E_s$
3,4-Cl <sub>2</sub>	1	1-2	1	5	1	1	1-2	3-4	5	2-5
4-Cl	2	1-2	2	4	2	2-3	3	3-4	3-4	2-5
4-CH <sub>3</sub>	3	3	4	2	3	2-3	1-2	1	1	2-5
4-OCH <sub>3</sub>	4-5	4-5	5	1	5	4	4	2	2	2-5
H	4-5	4-5	3	3	4	5	5	5	3-4	1

À seleção de novos substituintes que podem melhorar as atividades farmacológicas das substâncias em estudo estão descritos na Tabela 2.



**Tabela 2:** Proposta de Topliss para a seleção de novos substituintes em função dos prováveis parâmetros mais ativos

Prováveis parâmetros mais ativos	Seleção de novos substituintes
$\pi, \pi + \sigma, \sigma$	3-CF <sub>3</sub> , 4-Cl; 3-CF <sub>3</sub> , 4-NO <sub>2</sub> ; 4-CF <sub>3</sub> ; 2,4-Cl <sub>2</sub> ; 4-C-C <sub>5</sub> H <sub>9</sub>
$\pi, 2\pi - \sigma, \pi - \sigma$	4-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ; 3,4(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 4- O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> ; 4-OCH <sub>2</sub> Ph; 4-NEt <sub>2</sub>
$\pi - 2\sigma, \pi - 3\sigma, \sigma$	4-N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> ; 4-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 4-NH <sub>2</sub> ; 4-NHC <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ; 4-OH; 4-OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 3-CH <sub>3</sub> ; 4-OCH <sub>3</sub>
$2\pi - \pi^2$	4-Br, 3CF <sub>3</sub> ; 3,4(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 4-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ; 3Cl; 3-CH <sub>3</sub> ; 3-OCH <sub>3</sub> ; 3-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 3-CF <sub>3</sub> ; 3,5-Cl <sub>2</sub>

A aplicação deste método de correlação entre estrutura e atividade visa uma síntese mais reacional e objetiva, possibilitando bons resultados rapidamente. Desta forma, fazendo a análise e comparação dos resultados da atividade biológica com a estrutura química das substâncias, pode-se determinar futuras modificações estruturais a fim de se obter substâncias ainda mais potentes que os iniciais.

Outro método utilizado é através do aproveitamento das inovações tecnológicas que vêm trazendo reconhecimento e auxiliando no desenvolvimento de novos produtos, gerando competitividade entre empresas (LIMA, 2007).

A técnica de triagem biológica virtual (VS- *virtual screening*), se destaca entre as estratégias modernas para o planejamento de fármacos, utilizada para modular a atividade biológica dos diversos receptores das moléculas, sendo conhecidos como *in silico* e está sendo amplamente utilizada para a avaliação de parâmetros relacionados aos problemas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

Neste sentido, utilizam-se no método *in silico*, a regra de Lipinski, (Lipinski *rule*) ou “regra dos cinco” (*rule of five*). Este nome se deve aos parâmetros envolvidos, que usam valores múltiplos do número 5 (NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009).

Os parâmetros incluídos na “regra dos 5” de Lipinski utilizados como elementos para “filtrar” e selecionar substâncias que possam ter características de fármacos são: Peso molecular (PM) (não deve exceder a 500 g/mol), logP (valor limite é 5), grupos doadores de hidrogênio (valor limite é 5) e grupos aceptores de

hidrogênio (valor limite é 10). Geralmente esta regra é utilizada pelas indústrias farmacêuticas para estimar a solubilidade e a permeabilidade de fármacos administrados pela via oral. A partir dos resultados obtidos, podem-se prever as influências moleculares e estruturais de um fármaco na absorção de uma substância (BUZZI; CORRÊA; CECHINEL FILHO, 2010).

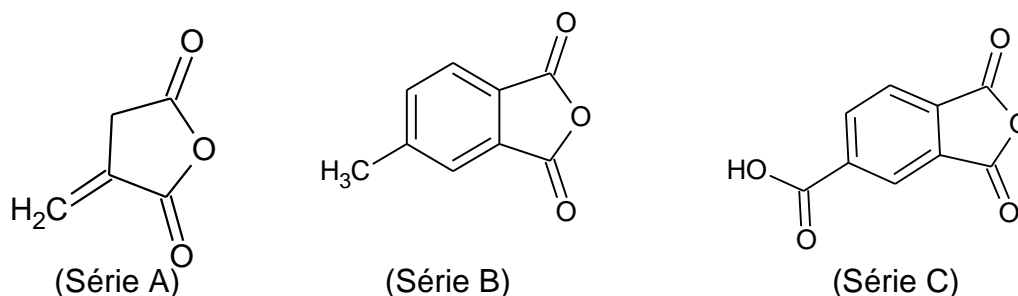
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Síntese

As substâncias imídicas foram sintetizadas baseando-se no princípio de Topliss na tentativa de verificar uma possível relação entre a estrutura química e atividade biológica.

Nas reações deste trabalho, foram formadas três séries diferentes de imidas cíclicas derivadas do anidrido itacônico (Série A), 1,2,4-benzenotricarboxílico ou 4-carboxilftálico (Série B) e 4-metilftálico (Série C) (Figura 13), e aminas aromáticas, nas quais o nitrogênio está ligado diretamente ao anel aromático.

**Figura 13:** Estruturas do anidrido itacônico (Série A), 4-metilftálico (Série B) e 1,2,4-benzenotricarboxílico ou 4-carboxilftálico (Série C)



Para a realização da síntese utilizou-se um método descrito na literatura, com pequenas modificações, onde a substância imídica pode ser preparada a partir do ácido âmico, o qual é formado pela agitação em meio etéreo do anidrido escolhido com a amina apropriada, na proporção molar 1:1, cujo ácido âmico formado é adicionado ao ácido acético e deixado em refluxo por 2 horas (ANDRICOPULO, et al.; 1998). Este método constitui-se numa forma segura (no que se refere à pureza do produto) de obter imidas cíclicas e apresenta bons rendimentos (CECHINEL FILHO et al., 1994; CECHINEL FILHO 1995; BUZZI et al., 2003) e será descrito e analisado no item Resultados e Discussões.

## **4.2 Purificação e Caracterização**

À formação dos produtos da síntese foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de sílica gel Merck 60 F 254 pré-revestidas, com espessura de 200  $\mu\text{m}$ , em base de alumínio, as quais foram visualizadas através de luz UV (ondas curtas).

Os produtos obtidos que apresentaram impurezas ou produtos indesejáveis, foram submetidos à purificação por recristalização (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998) ou por Cromatografia de Coluna (CC), utilizando empacotamento com sílica Merck 60 (70-230 mesh-ATMS), onde as amostras sólidas foram solubilizadas em solventes voláteis e misturadas a porções da sílica gel, fase estacionária. Após a evaporação do solvente, as amostras foram depositadas no topo da coluna cromatográfica, à qual, em seguida, recebeu a mistura eluente (método do empastilhamento) (COSTA; PASZCUK, 2000). Para a purificação por recristalização e por CC foram utilizados vários solventes.

As substâncias obtidas foram analisadas e caracterizadas quimicamente utilizando dados espectroscópicos usuais como infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $^1\text{H}$ ), carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e determinação do ponto de fusão (CORRÊA, et al., 1997; STIZ, 2000).

A medida dos pontos de fusão foi feita em aparelho Microquímica APF-301, no Laboratório de Química da UNIVALI.

Os Espectros de IV das substâncias foram obtidos em espectrofotômetro por Transformada de Fourier (FT-IR), Bomem MB-100, no Laboratório de Química da UNIVALI, através do registro da transmitância versus número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), foram obtidos em espectrômetro de RMN AC-300 (Bruker) do Curso de Farmácia da UNIVALI.

## **4.3 Análise *In silico*: Cálculos teóricos computacionais**

A previsão dos parâmetros ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo, e Excreção), envolvidos na biodisponibilidade molecular, foram realizados através de cálculos teóricos computacionais executados através de um software chamado de

*ChemDoodle* (versão 6.0.1 - *iChemLabs, LLC*), gentileza do prof. Dr. Rogério Corrêa – Univali.

Todas as estruturas foram energeticamente minimizadas através de software HyperChem 7.1, usando a seqüência: minimização energética, dinâmica molecular e minimização energética. Para a minimização energética, foi utilizado o método mecânico molecular (MM), por Polak - algoritmo Ribieri.

#### **4.4 Atividades biológicas**

Os experimentos farmacológicos *in vitro* e *in vivo*, bem como os ensaios microbiológicos, foram realizados por professores e acadêmicos vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIVALI. Houve também a colaboração de outras Instituições de pesquisa, tanto do Brasil (UFRGS e UNICAMP) como de outros países (Itália e Bolívia), onde o grupo de pesquisa mantém parceria.

##### **4.4.1 Animais**

Para os ensaios farmacológicos de gastroproteção foram utilizados camundongos pesando entre 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, acondicionadas em sala climatizada ( $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), com fotoperíodo claro e escuro, de 12 horas, controlado automaticamente, tendo livre acesso à ração e água. Os animais foram mantidos em jejum nas doze horas anteriores ao experimento, somente com água *ad libitum*.

Quanto aos aspectos éticos da experimentação animal, foram respeitadas as normas preconizadas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) com parecer de aprovação número CEUA nº. 016/12.

#### **4.4.2 Atividade *in vitro* da inibição das enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B)**

A avaliação da atividade *in vitro* da inibição da MAO-A e MAO-B foi realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, por Luiz Carlos Klein, sob supervisão da Profa. Dra. Amélia Henriques.

Para a realização desta avaliação foram utilizados os seguintes materiais: Leitor de microplacas 2104 EnVision® (Multilabel Reader, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA). Kinuramina, pargilina, clorgilina e DMSO, adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA). 4-hidroxiquinolina, fosfato de potássio e hidróxido de sódio foram fornecidos por Fluka (Buchs, CH). As enzimas MAO-A e MAO-B foram obtidas da BD Gentest (Woburn, MA).

Os ensaios de inibição das enzimas monoamino-oxidases foram realizados por método de fluorescência (ponto final de leitura), utilizando kinuramina como substrato não seletivo para MAO-A e MAO-B, conforme descrito previamente por Novaroli et al. (2006) e adaptado por Passos et al. (2013). Resumidamente, as reações ocorreram em microplacas (96 poços; poliestireno escuro; fundo plano) (FluoroNunc/LumiNund, Max-iSorp™ surface, NUNC, Roskild, Denmark) nas quais adicionou-se tampão fosfato de potássio (158 µL), solução aquosa de kinuramina 0,5 µM, e solução das amostras preparados em DMSO. Esta mistura foi incubada a 37 °C, e depois diluída com MAO-A e MAO-B recombinante humana, obtendo uma concentração final de 0,009 e 0,015 mg/mL, respectivamente. Como controles positivos foram utilizados clorgilina (MAO-A) e pargilina (MAO-B). A incubação ocorreu a 37 °C, e as reações foram interrompidas por adição de 75 µL de uma solução de NaOH 2 M.

A formação de 4-hidroxiquinolina foi quantificada nas microplacas de 96 poços em leitor de fluorescência (2104 Perkin-Elmer EnVision®), nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 315/380 nm. A análise de dados foi realizada pelo programa GraphPad Prism 5.0.

#### 4.4.3 Atividade anti-proliferativa *in vitro*

A avaliação da atividade anti-proliferativa *in vitro* das substâncias sintetizadas, foi realizada pela aluna de doutorado do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Univali, Adriana Campos, no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) na Universidade de Campinas (UNICAMP), através da Rede Iberoamericana de Investigação em Câncer (RIBECANCER/CYTED/CNPq), sob a supervisão do Professor Dr. João Ernesto de Carvalho.

A atividade antiproliferativa *in vitro* foi avaliada contra as seguintes linhagens tumorais humanas: MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), U251 (glioma), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT29 (cólon), K562 (leucemia); e em uma linhagem não-tumoral humana: HaCat (queratinócito).

Para a avaliação desta atividade foram utilizados os valores de Total Growth Inhibition (TGI) na concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular.

No primeiro dia de experimento, a suspensão celular foi preparada com meio RPMI (meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*) com 5% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina-estreptomicina (2 mg/L) e ajustada em sua respectiva densidade de inoculação. Foram aplicados 100 µL de suspensão celular em placas de microtitulação de 96 compartimentos, que foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e ambiente úmido. Foi também preparada uma placa controle, com todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

As substâncias foram diluídas em solução estoque de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1 g/mL. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas em RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L), o que evita a toxicidade do DMSO. As amostras foram adicionadas nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL, (100 µL por compartimento) em triplicata, e incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e ambiente úmido. Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL (100 µL por compartimento) em triplicata.

No momento de adição das amostras, as células inoculadas na placa controle foram fixadas com a adição de 50 µL, por compartimento, de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma®), para a determinação da quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram aplicadas, sendo este o valor basal 0. O TCA atua como um fixador, precipitando proteínas. Células viáveis se mantêm fixas na placa, enquanto células não viáveis se desprendem, sendo lavadas.

Após 48 horas de tratamento, as células foram fixadas com a adição de 50 µL de TCA a 50% e incubadas por 1 hora a 4°C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente, para a remoção dos resíduos de TCA, meio RPMI, SFB e metabólitos secundários e mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Após a secagem, foram adicionados 50 µL por compartimento do corante protéico sulforrodamina B (SRB) (Sigma®) a 0,4% (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1% e, a seguir, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Estas foram então lavadas por 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético a 1% e, após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL por compartimento de Trizma Base (10 µM, pH 10,5) (Sigma®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

#### **4.4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* da COX-1 e COX-2**

Estudos da ação anti-inflamatória foram realizados em parceria com o programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Univali, no Laboratório de Farmacologia da Univali, pela aluna de mestrado Viviane Coppi Budal Arins, sob orientação das Profas. Dra. Fátima de Campos Buzzi e Dra. Karina Elisa Machado – Univali.

As substâncias selecionadas foram submetidas a ensaios *in vitro* para a determinação da atividade inibitória para COX-1 e COX-2 através do kit para ensaio imunoenzimático (EIA) (número de catálogo 560101, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.



Na primeira etapa procedeu-se a reação de COX *in vitro*. As substâncias selecionadas foram dissolvidas em DMSO, na concentração final de 100  $\mu\text{M}$ .

Foram preparados tubos branco, atividade total 100%, tubos controle e tubos dos inibidores (substâncias). Os testes para COX-1 e COX-2 foram realizados separadamente.

Em todos os tubos foi adicionado 960  $\mu\text{L}$  de tampão. No tubo branco adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  enzima inativa (COX-1 ou COX-2), e nos demais tubos adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  da enzima (COX-1 ou COX-2) ativa; 10  $\mu\text{L}$  de heme e 10  $\mu\text{L}$  dos controles e substâncias nos respectivos tubos. A reação foi incubada por 5 minutos a 37°C. Na sequência, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de ácido araquidônico (AA) e após 2 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico (HCl), ocorrendo a formação de  $\text{PGH}_2$ . Em seguida, adicionou-se o cloreto de estanho ( $\text{SnCl}_2$ ), que reduz o  $\text{PGH}_2$  em  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , concluindo a primeira etapa da reação de COX *in vitro*.

A  $\text{PGF}_{2\alpha}$  produzida na primeira etapa, foi quantificada através da reação imunoenzimática realizada em microplaca com 96 poços. Os poços da microplaca são revestidos com uma proteína de bloqueio e em cada poço encontra-se fixado anticorpos IgG de captura. Foram adicionados nos respectivos poços, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , obtidos na primeira etapa de reação de COX, acrescentou-se 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  marcada com acetilcolinesterase e 100  $\mu\text{L}$  de antisoro anti-IgG (disponíveis no Kit). Ocorreu, nesta etapa, a ligação do antisoro anti-IgG no anticorpo IgG de captura, fixos nos poços, e na sequência ocorreu a competição entre a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , obtida na reação de COX e a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  marcada com acetilcolinesterase pelo sítio de ligação do antisoro. Salientamos que, a concentração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , obtida na reação de COX, variou conforme a capacidade de inibição das substâncias testadas e a concentração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , marcada com acetilcolinesterase, é constante.

Após o período de incubação de 18 horas, sob agitação no escuro, o conteúdo da placa foi vertido e os poços foram lavados 5 vezes com tampão de lavagem a fim de eliminar quaisquer resíduos. Adicionou-se o reagente de Ellman que, ao reagir com a acetilcolinesterase formou um produtos de coloração amarela. Passado o período de incubação de 1 hora o produto formado foi quantificado em equipamento de ELISA em 405 nm.

A absorbância obtida é inversamente proporcional a quantidade de prostaglandinas, ou seja, quanto maior a absorbância maior a inibição, significando

que uma menor quantidade de prostaglandina foi formada na reação de COX, indicando uma maior atividade inibitória da substância testada.

Todas as análises foram realizadas em duplicada e através dos dados obtidos foi possível calcular a IC<sub>50</sub> através do software da Cayman, disponíveis em: <http://www.myassays.com/kit.aspx?id=560101&manu=caymanchem&referral=caymanchem>.

#### **4.4.5 Atividade antifúngica**

A atividade antifúngica foi realizada em parceria com a equipe da Profa. Dra. Giovanna Simonetti, da Universidade de Roma "La Sapienza" – Itália, contra vários fungos patógenos, incluindo leveduriformes (*Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*) e dermatofitos (*Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*).

As imidicas cíclicas testadas foram dissolvidas em solução de dimetilsufóxido (DMSO) e água destilada estéril (4:6), posteriormente adicionadas em frascos de 5 mL, nas concentrações de 10 a 100 µg/mL. Em seguida, a cada frasco foi adicionado 1 mL de meio ágar Mueller-Hinton para as bactérias e 1 mL de ágar Sabouraud dextrosado para os fungos leveduriformes e filamentosos, seguido de imediata homogeneização da mistura. Após a solidificação dos respectivos meios de cultura, os microrganismos previamente ativados, foram inoculados nas séries correspondentes, sendo então, incubados a 35 °C por 18 a 24 horas para as bactérias e 35 °C por 24 a 48 horas para os fungos leveduriformes, e à temperatura ambiente (25 °C) por 5 a 15 dias para os fungos filamentosos. O Fluconazol foi utilizado como fármaco de referência (FEROCI et al., 2014).

#### **4.4.6 Atividade antiparasitária**

A Atividade antiparasitária foi realizada em parceria com a equipe do Prof. Dr. Alberto Gimenez do Instituto de Investigações Fármaco Bioquímicas (IIFB) da Universidad Mayor de San Andrés – UMSA - La Paz, Bolívia. Foram verificadas as evoluções antiparasitárias pelo método colorimétrico XTT sobre promastigotes de

Leishmania, de algumas substâncias sintetizadas. Para este teste foram utilizadas duas cepas a *Leishmania amazonensis* clon 1 (Lma MHOM/BR/76/LTB-012) e a *Leishmania braziliensis* (M2904 C192 RJA).

Os parasitas foram cultivados em culturas *in vitro* a 26°C em meio Schneider® suplementado com 5% de inativos (56°C x 30 minutos) em SFB. Os parasitas, na fase logarítmica de crescimento com uma concentração de  $1 \times 10^6$  parasitas/mL, foram distribuídos em microplacas de 96 “poços” contendo diferentes concentrações das substâncias sintetizadas (100, 50 e 25 µg/mL).

Como grupo controle, foram utilizados CAL (Alcaloide de *Galipea Longiflora*) e Anfotericina B durante as avaliações, as quais foram feitas em triplicata. A concentração inibitória  $CI_{50}$  das substâncias ativas foi determinado pela interpolação linear da curva típica obtida plotando o logaritmo da concentração versus o percentual de inibição, usando como programas de informática para o Logit, o Probit e análise da regressão polinomial (CECHINEL FILHO et al., 2013).

#### **4.4.7 Avaliação da atividade gastroprotetora induzida por etanol**

A atividade gastroprotetora da substância imídica 7 (Série B) e 8 (Série C) foi avaliada, pela equipe do Prof. Dr. Sérgio Faloni da Univali, através do modelo de indução de lesão gástrica pelo álcool (etanol), descrito por Morimoto et al. (1991), com modificações. Os camundongos foram divididos em diferentes grupos ( $n = 5$  e/ou 6), pesados e tratados com veículo (controle negativo – água destilada), carbenoxolona na dose de 200 mg/kg (controle positivo) e grupo tratado com 30 mg/kg de cada substância analisada.

Após uma hora, foi administrado aos animais 1 mL de etanol a 96 % (agente lesivo) por via oral e, uma hora após a administração do agente lesivo, os mesmos foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, foram retirados os estômagos dos camundongos e abertos ao longo da curvatura maior, sendo esticados em placas de parafina e, posteriormente, colocados entre placas de vidro onde, através de *Scanner*, as imagens obtidas foram captadas e analisadas por *software* de análise de imagens EARP, a fim de determinar o número de lesões e o tamanho destas. Posteriormente, foi realizada a determinação da área total de lesão, porcentagem de área lesada e índice de cura (IC).

Os resultados foram expressos em quantidade total de área lesada (mm<sup>2</sup>), porcentagem de área lesada (%) e índice de cura (IC - %). Para análise estatística utilizou-se o teste de variância ANOVA e teste de comparações múltiplas de Dunnett. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

#### **4.5 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As concentrações inibitórias cinquenta por cento foram determinadas por regressão linear utilizando GraphPad Prism 6.0<sup>®</sup>.

#### **4.6 Relação Estrutura-Atividade - Método de Topliss**

Foram sintetizadas diversas imidas cíclicas em cujas estruturas estão presentes os seguintes substituintes: H, 4-Cl, 3,4-Cl<sub>2</sub>, 4-CH<sub>3</sub> e 4 -OCH<sub>3</sub> ligados a um anel aromático (TOPLISS, 1993). Estas substâncias foram avaliadas quanto à atividade citotóxica e antibacteriana e, então foi determinada a ordem de potência dos parâmetros hidrofóbicos, eletrônicos e estéricos, conforme Tabela 1. A partir desta análise sugere-se sintetizar novos derivados segundo a Tabela 2.

#### **4.7 Obtenção de híbridos imido-chalconas**

Procurou-se também obter híbridos imido-chalconas a partir da reação entre a imida cíclica N-4'-acetilfenil-4-metilftalimida com 4-cloro-benzaldeído, através do convencional método de condensação aldólica (BROWN, 1995). No entanto, foi obtida uma mistura complexa de substâncias como produto. Para verificar se a imido-chalcona almejada estava entre as substâncias formadas, a mancha amarela, observada em CCD, clássica de chalconas no visível, foi extraída com espátula e submetida à análise do Espectro de Massas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram utilizados como reagentes de partida, anidridos cíclicos de ácidos dicarboxílicos [anidrido itacônico (Série A), anidrido 4-metilftálico (Série B) e anidrido, 2,4-benzenotricarboxílico (Série C)] e aminas aromáticas. Como o objetivo da pesquisa foi testar a ação das substâncias sintetizadas em vários modelos de atividades biológicas, veio a escolha de trabalhar com diferentes substituintes nos anéis aromáticos. Estes foram selecionados segundo os substituintes propostos por Topliss: H, 4-Cl, 3,4-Cl<sub>2</sub>, 4-OCH<sub>3</sub>, 4-CH<sub>3</sub>, diretamente ligados ao anel aromático, formando as respectivas imidas cíclicas.

Estes substituintes já são conhecidos por nosso grupo de pesquisa, por já terem sido estudados utilizando outros heterocíclicos e apresentarem bons resultados frente às atividades biológicas analisadas. Além disso, a utilização de diferentes substituintes é interessante para a obtenção de diferentes estruturas capazes de apresentar alguma atividade biológica, potencializar algumas propriedades conhecidas ou desconhecidas dessas substâncias sintetizadas.

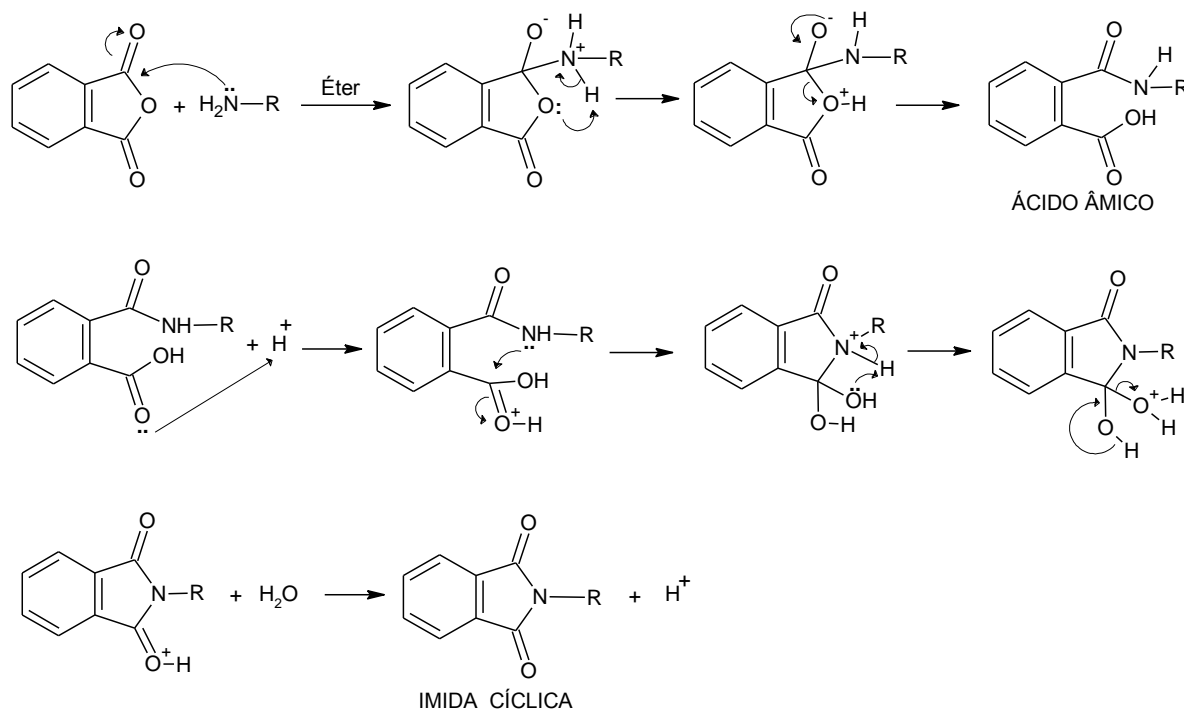
As reações para obtenção das imidas cíclicas, derivadas dos anidridos das Séries (A, B e C) foram realizadas utilizando metodologia já conhecida e descrita na literatura (BELLA CRUZ et al.1996), com pequenas modificações e ocorreram sem dificuldades.

O mecanismo de formação das imidas cíclicas deste trabalho, ocorreu por etapas, conforme Figura 14, onde temos, primeiramente, a formação do ácido âmico e, após, a formação da imida cíclica correspondente. Desta forma, inicialmente ocorre o ataque nucleofílico do grupo amino à carbonila do anel imídico, devido ao fato do carbono da dupla ligação ser muito polarizado, tendo carga parcial positiva. Assim, permite-se a entrada do nucleófilo e, conseqüentemente, a ruptura do anel através da saída de uma molécula de H<sub>2</sub>O, formando a imida cíclica desejada. Segundo Costa (2012), a escolha do solvente para esta reação depende da reatividade da amina primária, no caso deste trabalho optou-se pelo ácido acético.

O baixo tempo de reação, realizado apenas sob agitação (5 a 10 minutos), em temperatura ambiente, para obtenção dos ácidos âmicos e após sob refluxo de

2 horas, obtendo a imida cíclica desejada, demonstram a grande reatividade entre os anidridos e as aminas aromáticas utilizadas na síntese destas séries. Os rendimentos reacionais foram satisfatórios.

**Figura 14:** Mecanismo proposto para a formação das imidas cíclicas em estudo



As substâncias sintetizadas e descritas no presente estudo, não são inéditas em termos de obtenção, porém grande parte está disponível em periódicos antigos, de difícil ou impossível acesso. No entanto, cabe destacar que os efeitos biológicos descritos no presente estudo são todos inéditos para as 3 classes de imidas obtidas.

Os resultados e discussões foram divididos em quatro partes para uma melhor compreensão, a saber:

#### **PARTE 1: Derivados do anidrido itacônico (Série A)**

#### **PARTE 2: Derivados do anidrido 4-metilftálico (Série B)**

#### **PARTE 3: Derivados do anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico (Série C)**

#### **PARTE 4: Obtenção de híbridos imido-chalconas**

## PARTE 1

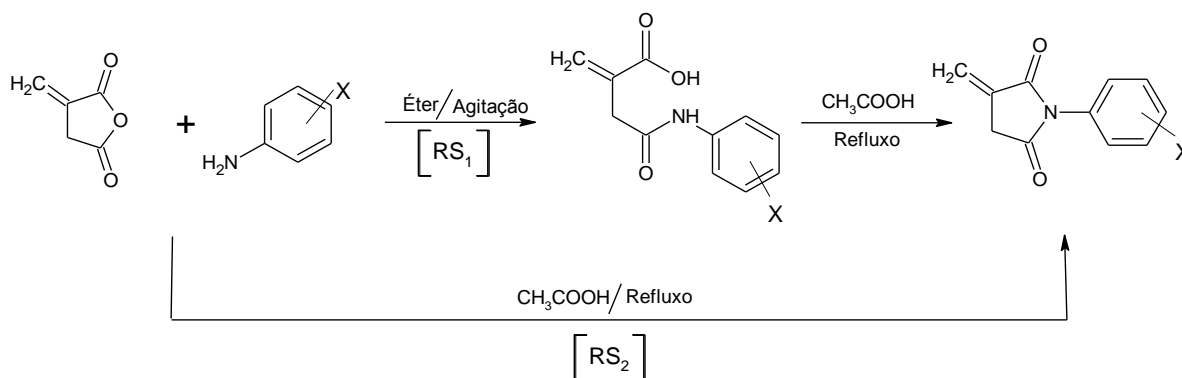
### 5.1 Ímidas cíclicas derivadas do anidrido itacônico (Série A)

#### 5.1.1 Síntese

As substâncias obtidas nesta Série A estão descritas no item 5.1.2 e foram obtidas seguindo a rota sintética do esquema geral proposto da Figura 15, onde utilizou-se como reagente de partida o anidrido itacônico com diferentes anilinas aromáticas, representadas pela Rota Sintética 1 (RS<sub>1</sub>). Porém, em um segundo momento, foram sintetizadas algumas substâncias imídicas cíclicas desta mesma série, utilizando a Rota Sintética 2 (RS<sub>2</sub>).

As duas rotas sintéticas foram realizadas para verificação do melhor procedimento em termos de tempo e rendimento reacional, sem preocupação de otimização reacional.

**Figura 15:** Esquema geral proposto para as reações de síntese de ímidas cíclicas derivadas do anidrido itacônico (Série A)



X= 4-CH<sub>3</sub>, 4-O-CH<sub>3</sub>, 4-H, 3,4-Cl<sub>2</sub> e 4-Cl

[RS<sub>1</sub>]= Rota Sintética 1

[RS<sub>2</sub>]= Rota Sintética 2

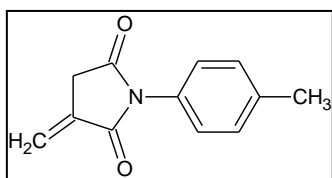
Verificou-se que na RS<sub>1</sub>, onde ocorre a formação do ácido âmico e, em seguida, o fechamento do anel através de uma desidratação, as substâncias obtidas apresentaram maior rendimento que aquelas obtidas pelo fechamento direto do anel (RS<sub>2</sub>), em refluxo. Observa-se que a RS<sub>1</sub> é mais viável quando se

deseja obter as substâncias com um maior rendimento (Tabela 3). Quanto a RS<sub>2</sub>, esta é mais vantajosa quando se deseja obter a imida cíclica em um espaço de tempo menor, pois não há a formação da substância intermediária (ácido âmico) (COSTA; PASZCUK, 2000).

Para uma melhor organização dos resultados cada reação esta descrita, a seguir, em detalhes quanto as quantidades utilizadas, os rendimentos e a caracterização de cada substância obtida.

### 5.1.2 Procedimento para a obtenção das imidas derivadas do anidrido itacônico (Série A)

#### Obtenção da N-4'-metil-fenil-Itaconimída (3)

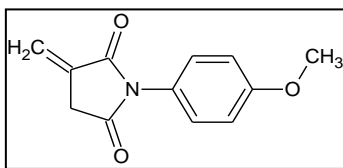


Em um Erlenmeyer foi adicionado (1 g) anidrido itacônico em (10 mL) éter etílico e (0,875 g) p-toluidina. A reação foi mantida sob agitação mecânica, em temperatura

ambiente, por aproximadamente 5 minutos. O precipitado formado foi filtrado em funil de Büchner, lavado com éter gelado e mantido em dessecador à vácuo por 24 horas. A substância formada foi um pó branco. Em seguida, foi submetida a refluxo com (10 mL) ácido acético glacial, durante um período de 2 horas. Após o término deste, foi vertido sobre banho água-gelo e não formou precipitado. Após 24 horas na geladeira, foi realizada a extração com clorofórmio e formou um pó branco que, em seguida, foi submetido a recristalização com álcool etílico a quente. Contudo, observou-se por CCD a formação de 2 manchas com R<sub>f</sub> próximos, então os cristais obtidos foram submetidos à purificação por Cromatografia de Coluna (CC), obtendo-se cristais brancos. Fórmula Molecular: C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>. Massa Molar: 201.22124. IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>): 3043.7 (=C-H); 1708.9 (C=O, imida). RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (ppm): 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 3.49 (t, 2H, CH<sub>2</sub>); 5.72 (t, 1H, CH<sub>2</sub>=C); 6.45 (t, 1H, CH<sub>2</sub>=C); 7.18-7.30 (4H, 2Ar). RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) (ppm): 21.24 (CH<sub>3</sub>); 33.97 (CH<sub>2</sub>); 121.61 (CH<sub>2</sub>); 126.19-138.7 (6 C; Ar); 168.65 (C=O, imida); 163.0 (C=O, imida).



### Obtenção da N-4'-metoxi-fenil-2-metil-itaconimida (6)

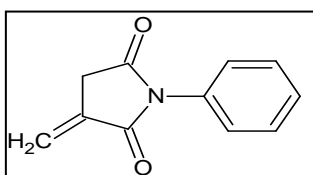


Metodologia similar à obtenção da substância 3, utilizando o anidrido itacônico (1 g) e p-anisidina (1,098 g) como nucleófilo. Formou um pó bege que, em

seguida, foi purificado por Cromatografia de Coluna (CC), obtendo cristais brancos.

Num segundo momento, foi obtida esta molécula através do método direto, sem a formação do ácido âmico (intermediário). Os reagentes foram colocados diretamente sob refluxo com ácido acético por 2 horas. Após o término, o produto foi vertido sobre banho de água-gelo, formando um precipitado bege que foi filtrado e mantido em dessecador a vácuo, com sílica gel por 24 horas. Após, foi realizada a purificação por Cromatografia de Coluna (CC), obtendo cristais brancos. Fórmula Molecular:  $C_{12}H_{11}NO_3$ . Massa Molar: 217.22064. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3008.9 (=C-H); 1705.7 (C=O, imida). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 3.48 (t, 2H,  $CH_2$ ); 3.82 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 5.72 (t, 1H,  $CH_2=C$ ); 6.45 (t, 1H,  $CH_2=C$ ); 7.22-7.25 (4H, Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 33.38 ( $CH_2$ ); 55.46 ( $OCH_3$ ); 121.52 ( $CH_2$ ); 114.45-159.52 (6 C; Ar); 168.72 (C=O, imida); 173.06 (C=O, imida).

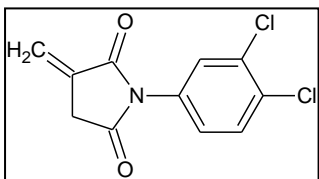
### Obtenção da N-fenil-2-metil-itaconimida (9)



Metodologia similar à obtenção da substância 3, utilizando o anidrido itacônico (1 g) e anilina (0,83 g) como nucleófilo. Formou um pó branco que, em seguida, foi purificado por

Cromatografia de Coluna (CC), obtendo cristais brancos. Num segundo momento foi obtida esta molécula através do método direto, metodologia similar à obtenção da substância 6, obtendo cristais brancos. Fórmula Molecular:  $C_{11}H_9NO_2$ . Massa Molar: 187.19466. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3055.2 (=C-H); 1708.9 (C=O, imida). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 3.49 (t, 2H,  $CH_2$ ); 5.72 (t, 1H,  $CH_2=C$ ); 6.45 (t, 1H,  $CH_2=C$ ); 7.31-7.51 (4H, Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 33.87 ( $CH_2$ ); 121.66 ( $CH_2$ ); 126.32-132.89 (6 C; Ar); 168.42 (C=O, imida); 172.78 (C=O, imida).

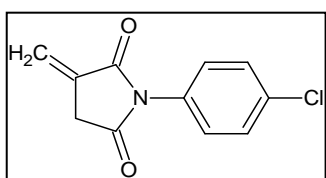
### Obtenção da N-3',4' - diclorofenil-itaconimida (12)



Metodologia similar à obtenção da substância 3, utilizando o anidrido itacônico (1 g) e 3,4-dicloro anilina (0,72 g) como nucleófilo. Formou um pó marrom que, em seguida, foi

recristalizado com etanol a quente, gerando 0,293 g de cristais marrons. Fórmula Molecular:  $C_{11}H_7Cl_2NO_2$ . Massa Molar: 256.08478. IR (KBr)  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 3088.0 (=C-H); 1715.5 (C=O, imida). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 3.51 (t, 2H,  $CH_2$ ); 5.78 (t, 1H,  $CH_2=C$ ); 6.49 (t, 1H,  $CH_2=C$ ); 7.26-7.56 (3H, Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 33.77 ( $CH_2$ ); 120.59 ( $CH_2$ ); 118.73-139.02 (6 C; Ar); 168.84 (C=O, imida); 172.45 (C=O, imida).

### Obtenção da N-(4-cloro)-fenil-itaconimida (15)



Metodologia similar à obtenção da substância 3, utilizando o anidrido itacônico 1 g) e 4-cloro-anilina (1,13 g) como nucleófilo. Formou um pó branco que, em seguida, foi

purificado por Cromatografia de Coluna (CC), obtendo cristais brancos, porém, continuava aparecendo mais de duas manchas na CCD. Foi realizado nova purificação por Cromatografia de Coluna (CC), obtendo cristais brancos. Fórmula Molecular:  $C_{11}H_8ClNO_2$ . Massa Molar: 221.63972. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 1714.7 (C=O, imida). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 3.50 (t, 2H,  $CH_2$ ); 5.75 (t, 1H,  $CH_2=C$ ); 6.47 (t, 1H,  $CH_2=C$ ); 7.29-7.47 (4H, Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 33.87 ( $CH_2$ ); 122.09 ( $CH_2$ ); 127.54-134.73 (6 C; Ar); 168.13 (C=O, imida); 172.47 (C=O, imida).

### 5.1.3 Purificação e Caracterização

Para todas as itaconimidas obtidas nas duas Rotas Sintéticas foram determinados os rendimentos e realizadas purificações, a fim de se obter as substâncias mais puras. Observando a Tabela 3, verifica-se que a substância 6 apresentou maior rendimento bruto (44,70%), obtida através da RS<sub>1</sub>, enquanto que na RS<sub>2</sub>, a substância 15-A foi a que demonstrou o rendimento maior (28,9%).

Há inúmeros fatores que podem interferir no desenvolvimento da reação como impurezas dos reagentes, tempo reacional, proporção de reagentes e seus

diferentes substituintes. A RS<sub>1</sub> e RS<sub>2</sub> apresentaram diversos rendimentos, o que pode ser justificado pelas interferências citadas.

Todas as substâncias obtidas, com exceção de 12 e 12-A, foram submetidas à purificação por Cromatografia de Coluna (CC), utilizando uma mistura de hexano/acetato de etila como eluente. Durante a purificação houve perdas significativas mas o *R<sub>f</sub>* foi mantido. Estas reações também foram de fácil realização e ocorrem de forma quase limpas, com pouca formação de subprodutos.

Após a purificação, foram determinados os pontos de fusão, havendo uma variação entre 115,6°C a 194,6°C, dependendo do tamanho do grupo R substituinte do anel aromático. Os pontos de fusão encontrados possuem um pequeno intervalo, o que pode ser considerado um indicativo de pureza.

**Tabela 3:** Rendimentos, purificação e ponto de fusão das substâncias sintetizadas na Série A, a partir do respectivo ácido âmico

Código	R	RENDIMENTO BRUTO (%)	PURIFICAÇÃO	RENDIMENTO PURO (%)	P.F.(°C) Recrist.
3	-CH <sub>3</sub>	40,45	Purificação por CC (hexano/acetato de etila 8:2)	5,01	133 - 134.2
3-A	-CH <sub>3</sub>	13,37	Purificação por CC (hexano/acetato de etila 8:2)	4,32	132,9 – 134
6	-O-CH <sub>3</sub>	44,70	Purificação por CC (hexano/acetato de etila 8:2)	8,2	115,8 – 116.9
6-A	-O-CH <sub>3</sub>	27,62	Purificação por CC (hexano/acetato de etila 8:2)	7,22	115.6 – 117
9	-H	37,8	Purificação por CC (hexano/acetato de etila 8:2)	26,2	120,9 – 121.7
9-A	-H	23	Purificação por CC (hexano/acetato de etila 8:2)	10,59	120,9- 122
12	3,4-Cl <sub>2</sub>	38	Recristalização com etanol	23,6	135,3 – 137

12-A	3,4-Cl <sub>2</sub>	26	Recristalização com etanol	17	Continua 135 – 136.3
15	-Cl	37,8	Purificação por CC (hexano/acetato de etila 7:3)	23,9	194,6 – 196
15-A	-Cl	28,9	Purificação por CC (hexano/acetato de etila 7:3)	8,3	194,6- 196.5

**Legenda:** Código= Ftalimidas obtidas na Série A; R: Grupo substituinte; P.F.(°C) Recrist. = Ponto de Fusão das substâncias Recristalizadas; 3<sub>A</sub>, 6<sub>A</sub>, 9<sub>A</sub> e 12<sub>A</sub> = Substâncias que foram sintetizadas pela RS<sub>2</sub>

As itaconimidas obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e ao término das reações as substâncias foram isoladas, analisadas e caracterizadas quimicamente utilizando dados espectroscópicos usuais, como infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de próton (RMN <sup>1</sup>H) e carbono13 (RMN<sup>13</sup>C).

Os espectros de IR (Figura 16), RMN <sup>1</sup>H (Figura 17) e RMN <sup>13</sup>C (Figura 18) da substância 15, foram selecionados a título de ilustração para esta série.

Em relação aos dados de Infravermelho descritos na Figura 16, pode-se evidenciar claramente uma banda característica das duas carboxilas simétricas na região de 1700cm<sup>-1</sup>, confirmando o fechamento do anel imídico da substância 15.

As figuras 17 e 18 ilustram os espectros de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para a substância 15, cujos sinais correspondem à estrutura proposta, e estão indicados no próprio espectro.

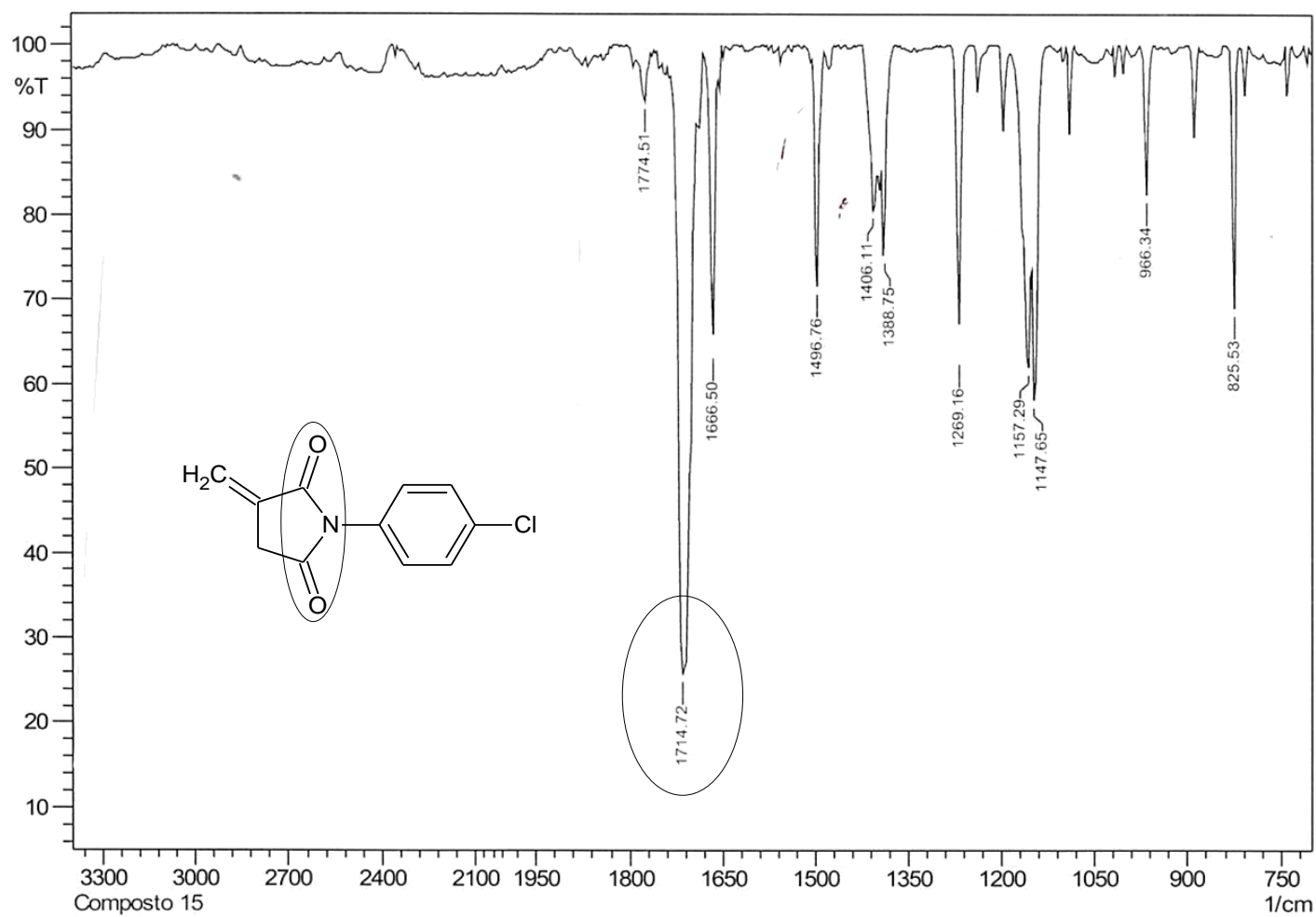
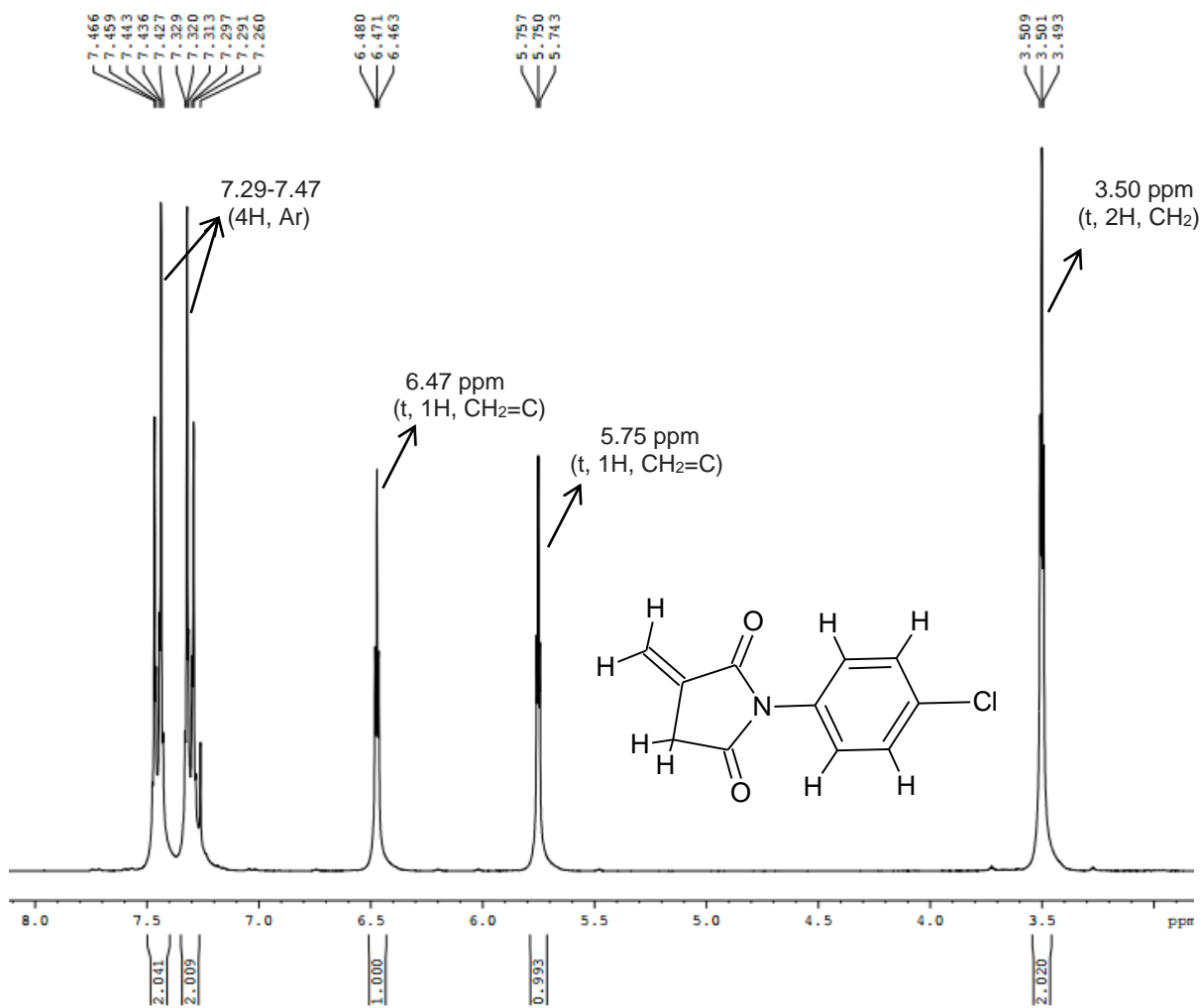
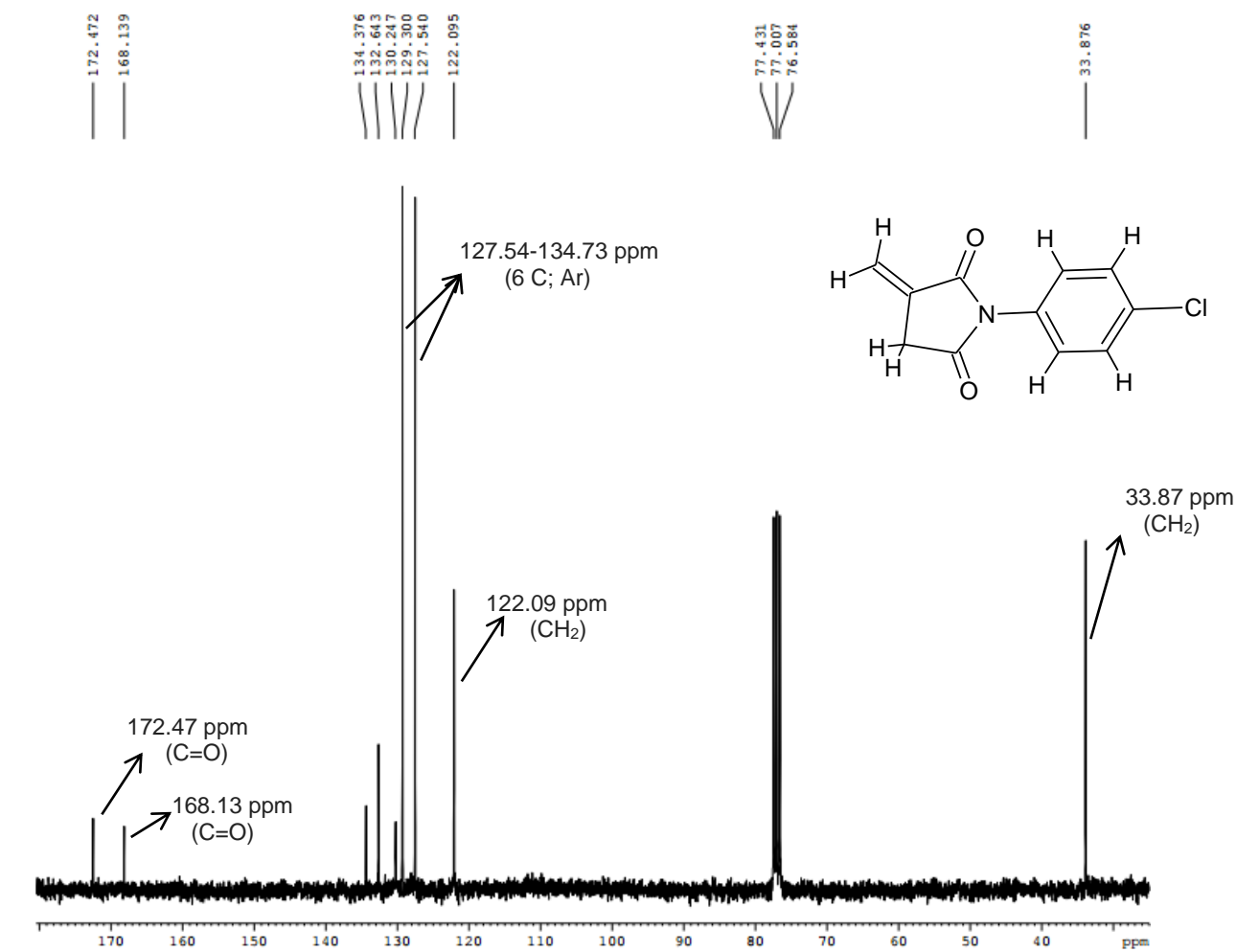
**Figura 16:** Espectro de IR da substância 15

Figura 17: Espectro de RMN-  $^1\text{H}$  da substância 15

**Figura 18:** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C da substância 15



#### 5.1.4 Análise *in silico*: Cálculos teóricos computacionais (Séries A)

Na avaliação *in silico* da predição das propriedades moleculares das substâncias sintetizadas para esta Série (Tabela 4), foram calculados os parâmetros disponíveis no *software ChemDoodle (versão 6.0.1 - iChemLabs, LLC)*, utilizando-se quatro métodos, discutidos separadamente.

O Índice de Biodisponibilidade (ABS) para todas as substâncias é de 0,55 indicando a probabilidade destas serem biodisponíveis para estudos *in vivo* (em ratos) e *in vitro* (em células).

Na Contagem de Violações de Egan (EVC), todas as substâncias não mostraram nenhuma violação. Isto significa que, estas substâncias possuem boas condições para a absorção intestinal passiva, que pode ser decisivo para alguns

fármacos, tais como o omeprazol (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000; DELGADO; REMERS, 1998)

Para a Contagem de Violações de Veber (VVC), as substâncias também não apresentaram violações, demonstrando possuírem perfil de biodisponibilidade oral, conforme descrito na literatura (VEBER et al., 2002).

O mesmo ocorre para a regra dos 5 de Lipinski (LRF), em que não se observou quaisquer violações para esta série (LIPINSKI, 2004).

O TPSA (área de superfície polar total) ficou entre 37.380 e 46.610, valores inferiores ao limite de 140 Å<sup>2</sup>, demonstrando que as substâncias não possuem limitações para permeação celular (SWATHI et al., 2013). Além disso, para que ocorra biodisponibilidade por via oral o número de ligações rotacionais (RBC) devem ser menor ou igual a 10. As substâncias analisadas apresentaram de 1 a 2 RBC (BAKHT et al., 2010; KELER; PICHOTA; YIN, 2006).

Salienta-se que, a permeação da membrana celular e a biodisponibilidade são associadas ao logP, massa molecular e ao número de doadores e aceptores de hidrogênio presentes na molécula. As substâncias avaliadas não apresentaram doadores de ligações hidrogênio (HBD) e o número de aceptores de ligações hidrogênio (HBA) variou entre 3 e 4. Isto, sugere dizer que, estas substâncias apresentam boa permeação celular e boa biodisponibilidade, pois possuem menos de 5 e 10 doadores e aceptores de hidrogênio, respectivamente (BALI; OHRI; DEB, 2012).



**Tabela 4:** Descritores envolvidos na avaliação teórica ADME da Série A

Código	R	MW (amu)	HBD	HBA	RBC	logP			TPSA (Å <sup>2</sup> )	ABS	EVC	VVC	LRF
						NC+NHET	XlogP	AlogP					
03	-CH <sub>3</sub>	201.2212	0	3	1	2.4500	2.4560	1.3811	37.380	0,5500	0	0	0
06	-O-CH <sub>3</sub>	217.2206	0	4	2	2.3400	1.7230	1.0813	46.610	0,5500	0	0	0
09	-H	187.1946	0	3	1	2.3400	1.8080	1.0727	37.380	0,5500	0	0	0
12	3,4-Cl <sub>2</sub>	256.0847	0	3	1	2.1200	3.0520	2.3795	37.380	0,5500	0	0	0
15	-Cl	221.6397	0	3	1	2.2300	2.4300	1.7261	37.380	0,5500	0	0	0

**Legenda:** Código= ftalimidas obtidas na Série C; R= grupo substituinte; MW= peso molecular ; HBD= nº doadores de ligações hidrogênio ; HBA= nº aceptores de ligações hidrogênio; RBC = nº de ligações rotacionais; TPSA = área total de superfície polar; ABS = escore de biodisponibilidade; EVC= contagem de violações de Egan; VVC= contagem de violações de Veber; LRF= contagem de violações da regra dos 5 – Lipinski; logP= coeficiente de partição octano/água; NC + NHET= método de previsão do logP baseado no número de carbonos (NC) e no número de heteroátomos (NHET); XlogP= método átomo-aditivo para o cálculo do coeficiente de partição octanol-água (logP); AlogP= método de previsão do coeficiente de partição octanol-água que foi desenvolvido com 12908 moléculas, a partir do banco de dados PHYSPROP.

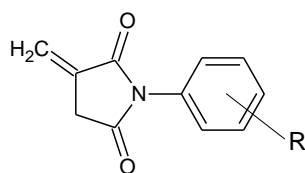
## 5.1.4 Atividade Biológica

### 5.1.4.1 Atividade anticâncer *in vitro*

Esta Série A foi a mais promissora das Séries na avaliação da atividade anti-proliferativa, das imidas cíclicas sintetizadas neste trabalho, onde observa-se, na Tabela 5, que todas as substâncias apresentaram atividade contra praticamente todas as linhagens, principalmente contra glioma (U251), rim (786-0), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), leucemia (K562) e ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES). Destaca-se a substâncias 15 que apresenta efeitos significativos contra glioma (U251), com uma inibição total de crescimento celular na concentração de 0,95 µg/mL, quando comparado com o controle Doxorrubicina.

Numa análise estrutural, verifica-se que a substância 15, com a inserção de um grupamento substituinte volumoso ou eletro retirador (Cloro), ligado na posição quatro do anel benzeno, aumentou a atividade antiproliferativa, contra glioma (U251), sugerindo a influência de parâmetros estéricos. A partir destes resultados preliminares, sugere-se estudos mais aprofundados de relação estrutura atividade, pois os resultados atuais são confirmados pelos trabalhos anteriormente citados, onde derivados de imidas cíclicas apresentaram atividades anticancerígenas (CECHINEL FILHO et al., 2003; FOURNEL et al., 2002; KENDALL et al., 2007; LOH; COSBY; SARTORELLI, 1980; PRADO et al., 2004).

**Tabela 5:** Efeito anti-proliferativo de imidas cíclicas (Série A) em diversas linhagens de células cancerígenas



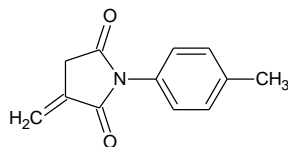
Código	R	T									NT
		2	m	a	7	4	p	o	h	k	Q
Controle	-	0,042	>25	>25	0,93	21,5	1,9	3,7	>25	1,7	12,9
3	-CH <sub>3</sub>	1,3	>250	>250	2,3	13,7	2,1	9,7	>250	3,3	250
6	-O-CH <sub>3</sub>	1,1	10,6	3,2	1,6	4,4	2,2	3,2	>250	1,7	14,3
9	-H	1,1	15,3	3,5	1,4	5,2	1,5	5,7	113,0	1,7	15,7
15	-Cl	0,95	3,1	3,1	1,3	2,2	1,5	1,3	>250	2,1	250

**Legenda:** Código= Ftalimidas obtidas na Série A; Linhagens tumorais humanas: 2= U251 (glioma); m= MCF-7 (mama); a= NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7= 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p= PC-3 (próstata); o= OVCAR-03 (ovário); h= HT29 (colon); k= K562 (leucemia). NT: Linhagem não-tumoral humana: Q= HaCat (queratinócito); Controle= Doxorubicina; R= Grupo substituinte; TGI= Inibição total do crescimento (µg/mL)

#### 5.1.4.2 Atividade *in vitro* da substância 3 (N-4'-metil-fenil-2-metilftalimida) para inibição das enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B)

Avaliou-se o efeito da substância sintetizada N-4'-metil-fenil-2-metilftalimida (3) nas enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B), através de um ensaio *in vitro* de leitura de ponto final utilizando como fonte enzimática supersomas de enzimas humanas recombinantes. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 6.

**Tabela 6:** Atividade *in vitro* nas enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B) e da substância sintetizada N-4'-metil-fenil-2-metilftalimida (3)



Código	R	Inibição (%)	
		MAO-A	MAO-B
3	-CH <sub>3</sub>	71	< 50
Clorgilina	-	100	N.T.
Pargilina	-	N.T.	100

**Legenda:** Código= Ftalimida obtida na Série A (100 µM); IC<sub>50</sub> da clorgilina= 0,004 µM; IC<sub>50</sub> da pargilina= 0,13 µM; N.T.= Não testado; MAO-A= Enzima monoamina oxidase A; MAO-B= Enzima monoamina oxidase B; R= Grupo substituinte.

Conforme os resultados obtidos, pode-se observar que a substância fitalimídica 3 apresentou uma inibição da atividade enzimática de 71%, indicando que seu IC<sub>50</sub> deverá ficar próximo à 100 µM para MAO-A e resultado pouco promissor para a MAO-B.

Monoaminas oxidases (MAO) são enzimas mitocondriais encontradas no cérebro e em tecidos periféricos, responsáveis por catalisar a desaminação oxidativa de amins biogênicas (YOUDIM, et al., 2006; HERRAIZ, 2007). A oxidação de amins biogênicas pelas MAOs resulta na produção de peróxido de hidrogênio e de aldeídos, produtos que podem provocar dano celular oxidativo (COHEN et al., 1997). Considerando a seletividade por diferentes substratos e inibidores, as MAOs são classificadas em duas isoformas: MAO-A, que apresenta maior afinidade por serotonina, sendo inibida de forma seletiva por clorgilina, moclobemida e harmina; e MAO-B, que apresenta maior afinidade pelos substratos benzilamina e feniletilamina, sendo seletivamente inibida por *L*-deprenil e pargilina (HERRAIZ; CHAPARRO, 2006).

MAO-A e MAO-B constituem dois alvos interessantes para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas. Inibidores da MAO-A são empregados no tratamento de depressão e transtornos de ansiedade, enquanto que inibidores da MAO-B são utilizados em associação com L-DOPA ou agonistas dopaminérgicos para o tratamento sintomático da Doença de Parkinson (LA REGINA et al., 2008). Ambas as isoformas da enzima parecem estar envolvidas na etiologia da Doença de Alzheimer (DA), havendo relatos relacionados ao aumento

da atividade da MAO-B ou ao aumento da expressão do mRNA que codifica esta enzima em hipocampus e córtex cerebrais de pacientes com DA. As alterações na MAO-A induzidas pela DA parecem ser mais complexas, uma vez que atividade enzimática aumentada ou expressão elevada de mRNA são observadas em um maior número de áreas cerebrais, incluindo o lobo frontal do neocórtex, o córtex parietal, o córtex occipital, o córtex temporal e o córtex frontal (KENNEDY et al., 2003).

#### 5.1.4.3 Atividade antifúngica

Os resultados da atividade antifúngica para Série A, na concentração de 50 e 100 µg/mL, estão descritos na Tabela 7, onde observa-se que todas as substâncias apresentaram atividades.

Para os fungos dermatófitos destacamos, na concentração de 0.5 µg/mL de CIM, as substâncias 3 e 12 para *Microsporium gypseum* DSM3824 e *Trichophyton mentagrophytes* DSM4870, enquanto que 6 apresentou melhor atividade na concentração de 1 µg/mL contra *Microsporium gypseum* DSM3824. Para *Cryptococcus neoformans*, a substância 9, 12 e 15 apresentaram valores de CIM de 1 µg/mL contra DSM6972I.

Para esta atividade, destaca-se a substância 15 por apresentar CIM de 1 µg/mL para *Candida.albicans* ATCC2089, *Cryptococcus neoformans* DSM11959 e DSM6972 e dermatófitos *Microsporium gypseum* DSM3824. Resalta-se que para *Trichophyton mentagrophytes* DSM4870 a CIM foi de 0,25 µg/mL.

As substâncias 3, 12 e 15 apresentam inserido nas suas estruturas moleculares o grupamento metila ou cloro no anel aromático, os quais conferem as moléculas algumas características como mudanças eletrônicas, lipofilicidade, biodisponibilidade, estereoquímica, etc., contribuindo para o evidenciado aumento dos efeitos antifúngicos (BARREIRO et al., 2011).

Os resultados antifúngicos para as 5 substâncias da série-itaconimidas foram avaliados quanto a relação estrutura-atividade, usando o método manual de Topliss (Topliss, 1972). No entanto, embora algumas tendências tenham sido verificadas, somente para o efeito contra *C. albicans* ATCC 10231, seguiu a ordem correta proposta por Topliss em relação aos parâmetros avaliados,  $\pi$  (constante de hidrofobicidade),  $\alpha$  (constante de Hammett) e ambos relacionados. Neste caso,

foram consideradas as MIC 100, com a seguinte ordem crescente de atividade: 6 < 9 < 3 < 15 < 12, sendo as substâncias com cloro como substituintes os mais ativos (substância 15 e 12).

A ordem seguiu os parâmetros  $\pi$  e  $\pi+\alpha$ , indicando, conforme demonstra a Tabela 2, que os substituintes 3-CF<sub>3</sub>, 4-Cl; 4-NO<sub>2</sub>; 4-CF<sub>3</sub>; 2,4-Cl<sub>2</sub>; etc., ou ainda alguns substituintes de caráter mais hidrofóbicos, como 3,4-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 4-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> etc., poderiam aumentar a potência contra o micro-organismo indicado, sugerindo a continuidade destes estudos.

Por outro lado, é importante ressaltar que, em geral, as substâncias substituídas com 4-Cl foram os mais ativos, sugerindo a importância deste halogênio no efeito indicado, possivelmente devido a sua capacidade de modificar as características físico-químicas das moléculas em estudo.

**Tabela 7:** Atividade antifúngica da substância sintetizada N-4'-metil-fenil-2-metilftalimida (3), Série A, contra diversas cepas de fungos

Substância	3 (-CH <sub>3</sub> )			6 (-O-CH <sub>3</sub> )			9 (-H)			12 (3,4-Cl)			15 (-Cl)		
	50	100	MFC	50	100	MFC	50	100	MFC	50	100	MFC	50	100	MFC
<i>C. tropicalis</i> PMC0912	32	64	nd	16	>64	>64	32	64	>64	16	64	64	16	32	32
<i>C. krusei</i> DSM6128	8	16	nd	32	32	32	16	16	16	8	8	16	4	4	8
<i>C. parapsilosis</i> DSM11224	8	16	nd	8	32	64	8	16	16	4	8	16	8	8	8
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	4	16	16	4	16	16	4	16	16	4	16	16	2	4	4
<i>C. glabrata</i> 103 IC	2	8	nd	8	64	64	8	8	8	8	16	16	4	4	8
<i>C. glabrata</i> 29IC	2	8	nd	4	8	64	4	16	32	4	8	8	4	4	16
<i>C. glabrata</i> 23IC	16	16	16	8	32	32	16	32	32	16	64	64	4	8	8
<i>C. albicans</i> ATCC10231	8	32	32	32	128	>64	32	64	64	8	8	32	16	16	16
<i>C. albicans</i> ATCC24433	16	32	32	16	64	64	16	16	64	8	8	16	4	4	8
<i>C. albicans</i> ATCC20891	4	8	8	8	64	64	8	8	16	2	16	16	1	4	8

Continua

<i>C. albicans</i> 3153	32	32	32	64	64	64	64	64	64	8	16	16	16	16	16	
<hr/>																
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>MFC</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>MFC</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>MFC</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>MFC</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>MFC</b>	
<i>DSM11959</i>	4	4	nd	2	8	nd	4	4	nd	4	8	nd	1	2	nd	
<i>DSM6972</i>	2	4	nd	2	4	nd	1	4	nd	1	1	nd	1	1	nd	
<i>PMC2102</i>	4	16	nd	4	8	nd	2	4	nd	4	8	nd	2	4	nd	
<hr/>																
dermatofitos	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>MFC</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>MFC</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>MFC</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>MFC</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>MFC</b>	
<hr/>																
<i>M. gypseum</i> <i>DSM3824</i>	0,5	2	nd	1	2	nd	2	2	nd	0,5	2	nd	1	1	nd	
<i>T. mentagrophytes</i> <i>DSM4870</i>	0,5	2	nd	2	8	nd	2	4	nd	0,5	4	nd	0,2	5	2	nd

**Legenda:** Substâncias= Ftalimidas obtidas na Série A; MIC= Concentração inibitória mínima que baseia-se em concentrações mais baixas de droga e que impediram o crescimento em relação ao controlo,  $\geq 50\%$  (50  $\mu\text{g/mL}$ ) ou  $\geq 80\%$  (80  $\mu\text{g/mL}$ ) ou  $100\%$  (100  $\mu\text{g/mL}$ ); MFC= Concentração fungicida mínima.

#### 5.1.4.4 Atividade antiparasitária

Na busca por novos agentes antiparasitários, três substâncias da Série A foram avaliadas *in vitro* nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. brasiliensis*, através do método colotimétrico XTT.

Os resultados estão demonstrados na Tabela 8, onde as moléculas em estudo não apresentaram indícios de atividade antileishmanicida contra a Lma e M290, respectivamente. Porém, isto não implica na exclusão destas moléculas em outros estudos de atividade antiparasitária.

**Tabela 8:** Atividade antiparasitária das substâncias da Série A *in vitro* nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. brasiliensis*, através do método colorimétrico XTT

Código	R	CI <sub>50</sub> Lma	CI <sub>50</sub> M2904
CAT	-	19,3±0,3	20,2±0,2
Anfotericina B	-	0,25±0,05	0,07±0,01
3	-CH <sub>3</sub>	>100	>100
6	-O-CH <sub>3</sub>	>100	>100
9	-H	>100	>100

**Legenda:** Valores de CI<sub>50</sub>  $\mu\text{g/mL}$ = Avaliações a 100 – 50 – 25 - 12,5 - 6,2 - 3,1 - 1,5  $\mu\text{g/mL}$ ; CAT= alcaloides totais de *Galipea longiflora*; Anfotericina B= droga controle; Código= Ftalimida obtida na Série A; Lma= Cepa de *Leishmania amazonensis*; 50M2904= Cepa de *L. brasiliensis*.





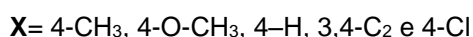
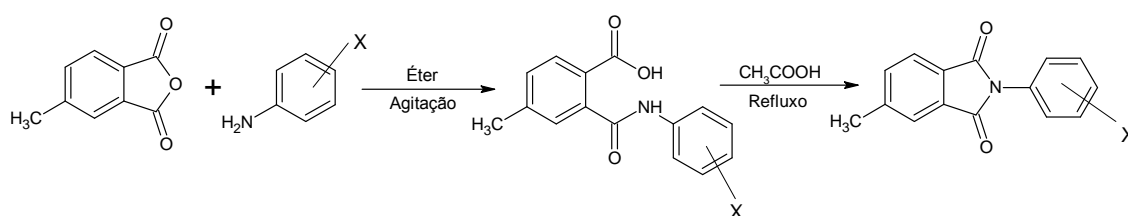
## PARTE 2

### 5.2 Imidas cíclicas derivadas do anidrido 4-metilftálico (Série B)

#### 5.2.1 Síntese

As substâncias obtidas nesta Série B foram obtidas seguindo a rota sintética do esquema geral proposto na Figura 19, onde utilizou-se como reagente de partida o anidrido 4-metilftálico com diferentes anilinas n-substituídas.

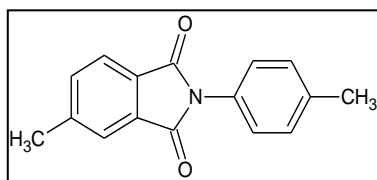
**Figura 19:** Esquema geral proposto para as reações de síntese de imidas cíclicas derivadas do anidrido 4-metilftálico (Série B)



Para uma melhor organização dos resultados cada reação está descrita a seguir, em detalhes quanto as quantidades utilizadas, os rendimentos e a caracterização de cada substância obtida.

#### 5.2.2 Procedimento para a obtenção das imidas derivadas do anidrido 4-metilftálico (Série B)

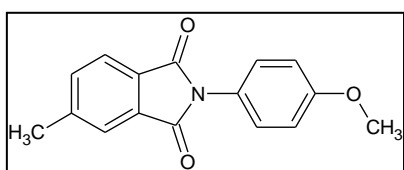
##### Obtenção da N-(4-metil-fenil)-4-metilftalimida (1)



Em um Erlenmeyer foi adicionado anidrido 4-metilftálico (1 g) em éter etílico (10 mL) e p-toluidina (0,6 g). A reação foi mantida sob agitação mecânica, em temperatura ambiente, por aproximadamente 5 minutos. O precipitado formado foi filtrado em funil de Büchner, lavado com éter gelado e mantido em dessecador a vácuo por 24 h. A substância formada foi um pó branco. Em seguida, foi submetida a refluxo com (10 mL) ácido acético glacial, durante um período de 2 horas. Após o término deste, o produto foi vertido sobre banho de água-gelo, formando um precipitado. Este foi filtrado e mantido em dessecador a vácuo com sílica gel por

24h. O sólido obtido foi recristalizado em etanol, a quente, formando-se cristais brancos. Fórmula Molecular:  $C_{16}H_{13}NO_2$  e Massa Molecular: 251.27992. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 1703.1 (C=O, imida); 1614.4 (C=C, Ar). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 2.40 (s, 3H,  $CH_3$ ); 2.55 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.30 – 7.83 (7H, 2 Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 21.21 ( $CH_3$ ); 22.06 ( $CH_3$ ); 123.60 -145.66 (12 C, 2 Ar); 167.51 (C=O, imida); 167.63 (C=O, imida).

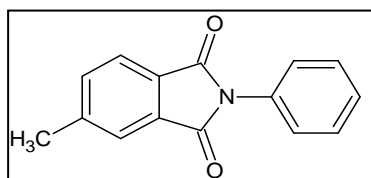
#### Obtenção da N-(4-metoxi-fenil)-4-metilftalimida (4)



Metodologia similar à obtenção da substância 1, utilizando o anidrido 4-metilftálico (1 g) e p-anisidina (0,732 g) como nucleófilo. Formou um pó branco

que, em seguida, foi recristalizado com etanol a quente, gerando a formação de cristais brancos. Fórmula Molecular:  $C_{16}H_{13}NO_3$  e Massa Molecular: 267.27932. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 1718.6 (C=O, imida); 1610.6 (C=C, Ar). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 2.54 (s, 3H,  $CH_3$ ); 3.84 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 6.99 – 7.83 (7H, 2 Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 22.07 ( $CH_3$ ); 55.51 ( $OCH_3$ ); 114.45 – 159.18 (11 C, 2 Ar); 167.79 (2 C=O, imida).

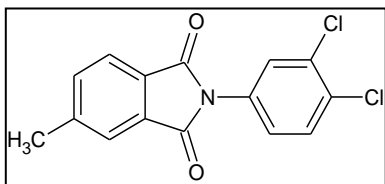
#### Obtenção da N-fenil-4-metilftalimida (7)



Metodologia similar à obtenção da substância 1, utilizando o anidrido 4-metilftálico (1 g) e anilina (0,55 g) como nucleófilo. Formou um pó branco que,

em seguida, foi realizado a recristalização com uma mistura de etanol e clorofórmio (8:2) a quente, formando cristais brancos. Fórmula Molecular:  $C_{15}H_{11}NO_2$  e Massa Molecular: 237.25334. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 1705.1 (C=O, imida); 1610.6 (C=C, Ar). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 2.55 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.39 – 7.85 (8H, 2 Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 22.07 ( $CH_3$ ); 123.67–145.77 (12C, 2 Ar); 167.37 (C=O, imida); 167.49 (C=O, imida).

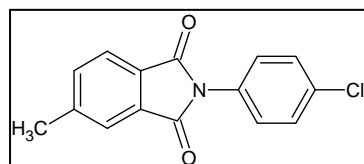
### Obtenção da N-(3,4-diclorofenil)-4-metilftalimida (10)



Metodologia similar à obtenção da substância 1, utilizando o anidrido 4-metilftálico (1g) e 3,4-dicloro anilina (0,5 g) como nucleófilo. Formou um pó

branco que, em seguida, foi recristalizado com uma mistura de etanol e clorofórmio (8:2) a quente, formando cristais brancos. Fórmula Molecular:  $C_{15}H_9Cl_2NO_2$  e Massa Molecular: 306.14346. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 1707.2 (C=O, imida); 1614.4 (C=C, Ar). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 2.56 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.26 – 7.85 (6H, 2 Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 22.12 ( $CH_3$ ); 123.92 – 146.25 (12 C, 2 Ar); 167.5 (2 C=O, imida).

### Obtenção da N-(4-clorofenil)-4-metilftalimida (14)



Metodologia similar à obtenção da substância 1, utilizando o anidrido 4-metilftálico (1 g) e 4-cloro-anilina (0,78 g) como nucleófilo. Formou um pó branco

que, em seguida, foi recristalizado com uma mistura de etanol e clorofórmio (8:2) a quente, formando cristais brancos. Fórmula Molecular:  $C_{15}H_{10}ClNO_2$  e Massa Molecular: 271.6984. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 1714.7 (C=O, imida); 1614.4 (C=C, Ar). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 2.55 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.38 – 7.84 (7H, 2 Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 22.09 ( $CH_3$ ); 123.78-146.00 (12 C; 2 Ar); 167.05(C=O, imida); 156.18 (C=O, imida).

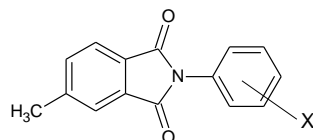
### 5.2.3 Purificação e Caracterização

Na análise da Tabela 9, observa-se que a imida cíclica obtida com maior rendimento bruto foi a 14 (62,86%), porém, quando submetidas à recristalização com álcool etílico ou uma mistura de solventes (etanol/clorofórmio 8:2), para aumentar o grau de pureza, houve uma diminuição no rendimento, variando entre 15,30% a 48,2%, sem alteração do *R<sub>f</sub>*.

Após a purificação, foram determinados os pontos de fusão (Tabela 9), havendo uma variação entre 174,8°C a 201°C dependendo do tamanho do grupo R substituinte do anel aromático, onde os pontos de fusão encontrados possuem um pequeno intervalo, o que pode ser considerado um indicativo de pureza.

Esta Série também foi de fácil obtenção e as reações ocorreram de forma quase limpas, com pouca formação de subprodutos.

**Tabela 9:** Rendimento, purificação e ponto de fusão das imidas cíclicas da Série B, a partir do respectivo ácido âmico



Código	R	RENDIMENTO BRUTO (%)	PURIFICAÇÃO	RENDIMENTO PURO (%)	P.F.(°C) Recrist.
1	-CH <sub>3</sub>	31	Recristalização com etanol	19,22	174,8 - 176
4	-O-CH <sub>3</sub>	35,45	Recristalização com etanol	24,45	179 - 178
7	-H	41,78	Recristalização com etanol/clorofórmio 8:2	33,69	201 – 202,8
10	3,4-Cl <sub>2</sub>	22,7	Recristalização com etanol/clorofórmio 8:2	15,30	198.1 – 199,6
14	-Cl	62,86	Recristalização com etanol/clorofórmio 8:2	48,2	195 - 197

**Legenda:** Código= Ftalimidas obtidas na Série B; R= Grupo substituinte; P.F.(°C) Recrist.= Ponto de Fusão das substâncias Recristalizadas

As reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e ao término das reações os produtos foram isolados analisados e caracterizados quimicamente utilizando dados espectroscópicos usuais, como infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de próton (RMN <sup>1</sup>H) e carbono13 (RMN<sup>13</sup>C).

Os espectros de IV (Figura 20), RMN <sup>1</sup>H (Figura 21) e RMN <sup>13</sup>C (Figura 22) da substância 4, foram selecionados a título de ilustração para esta série.

Em relação aos dados de Infravermelho da substância 4, descritos na Figura 20, pode-se evidenciar uma banda característica das duas carboxilas simétricas na região de 1718.6 cm<sup>-1</sup>, confirmando o fechamento do anel imídico e uma outra banda na região de 1610.6 cm<sup>-1</sup> das ligações C=C aromáticas.

As figuras 21 e 22 ilustram os espectros de RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para a substância 4, cujos sinais correspondem à estrutura proposta, e estão indicados no próprio espectro.

Figura 20: Espectro de IV da substância 4

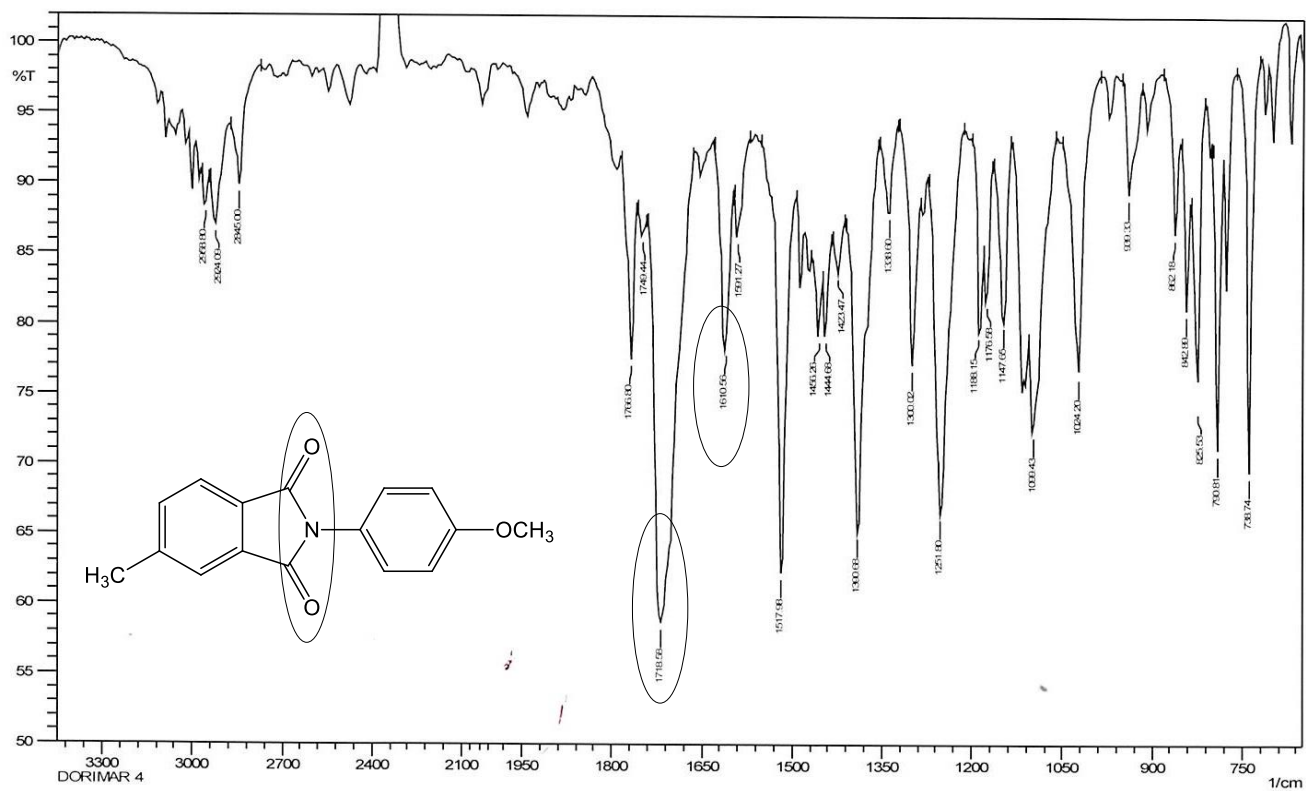
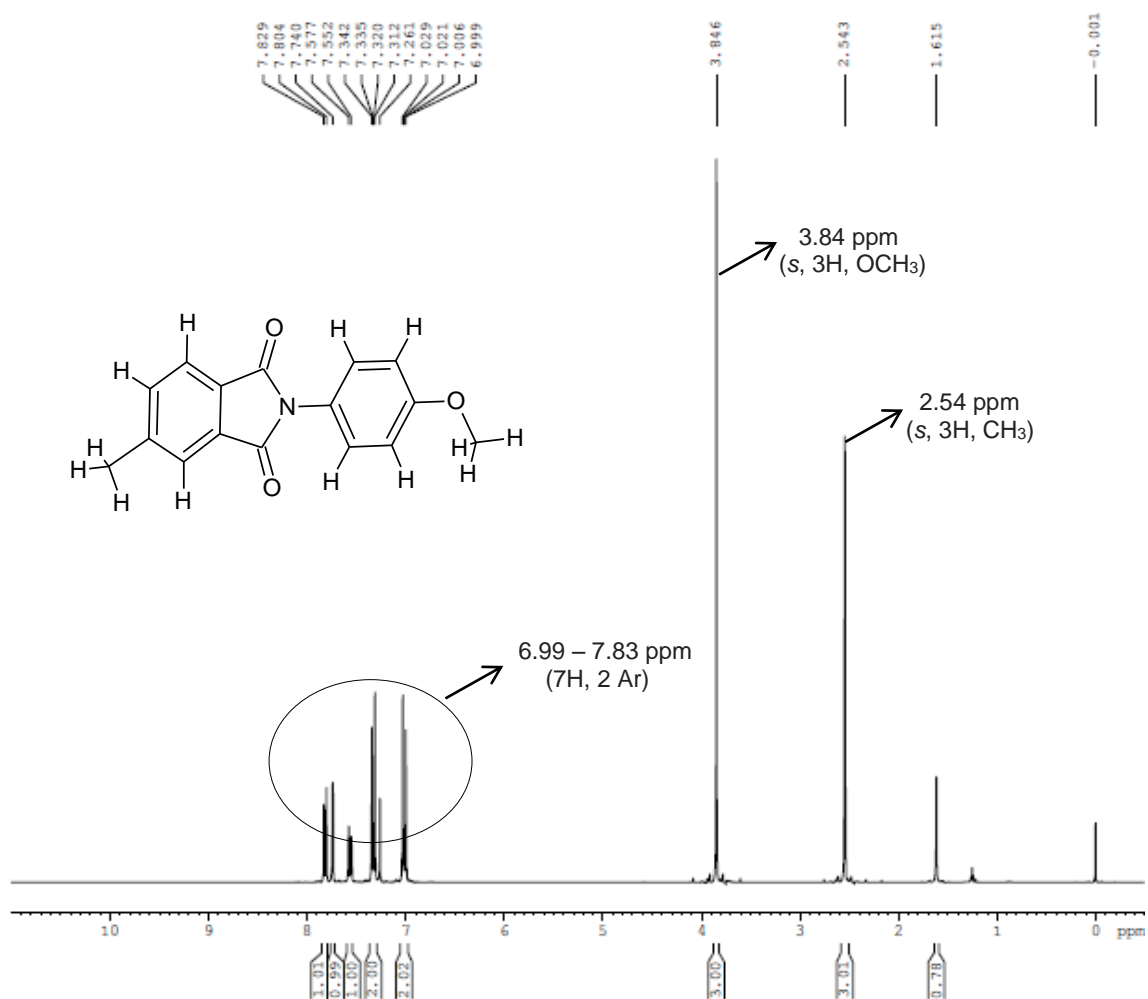
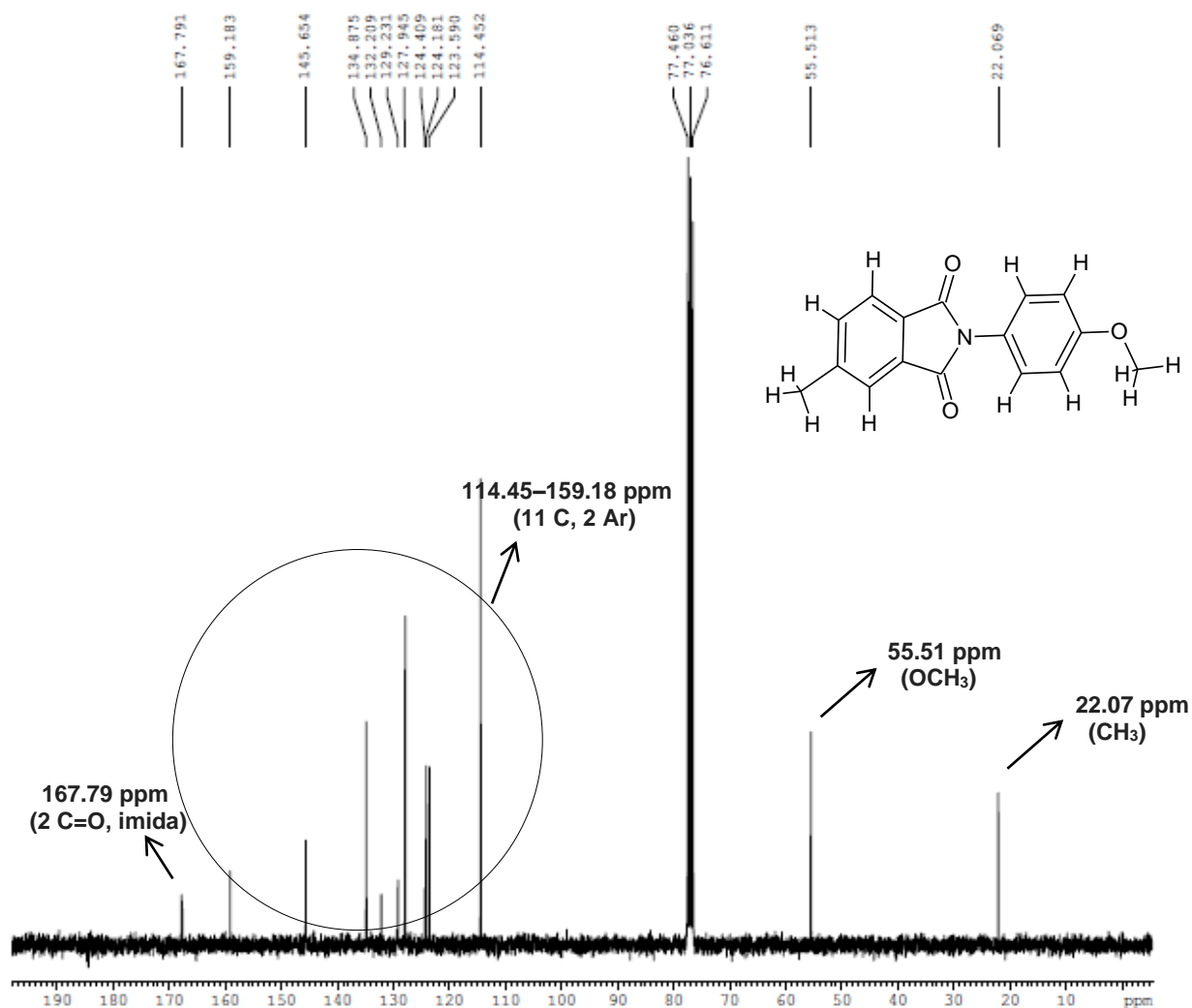


Figura 21: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da substância 4

**Figura 22:** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C da substância 4



#### 5.2.4 Análise *In silico*: Cálculos teóricos computacionais (Série B)

Na avaliação *in silico* da predição das propriedades moleculares das substâncias sintetizadas para esta Série B (Tabela 10), foi utilizado o mesmo método de cálculos teóricos e computacionais dos parâmetros descritos no item 5.1.4.

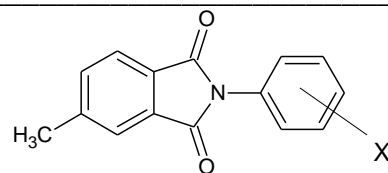
Verificou-se que o Índice de Biodisponibilidade (ABS) para todas as substâncias é de 0,55 e para a Contagem de Violações de Egan (EVC), também não houve nenhuma violação por parte das moléculas desta Série.

Para a Contagem de Violações de Veber (VVC) e para a regra dos 5 de Lipinski (LRF), não se verificou quaisquer violações por parte da Série.

O TPSA (área de superfície polar total) variou entre 39.07 e 48.30 e o número de ligações rotacionais (RBC) ficou entre 1 e 2. As substâncias avaliadas não apresentaram doadores de ligações hidrogênio (HBD) e o número de aceptores de ligações hidrogênio (HBA) variou entre 3 e 4. Além disso, as substâncias analisados apresentaram de 1 a 2 ligações rotacionais (RBC).

Para esta Série de substâncias, sugere-se dizer que apresentam boa permeação celular e biodisponibilidade oral (BALI; OHRI; DEB, 2012)



**Tabela 10:** Descritores envolvidos na avaliação teórica ADME para a Série B

Código	R	MW (amu)	HBD	HBA	RBC	logP			TPSA (Å <sup>2</sup> )	ABS	EVC	VVC	LRF
						NC+NHET	XlogP	AlogP					
01	-CH <sub>3</sub>	251.2799	0	2	1	2.8900	4.0000	2.4055	39.070	0,5500	0	0	0
04	-O-CH <sub>3</sub>	267.2793	0	3	2	2.7800	3.2670	2.1057	48.300	0,5500	0	0	0
07	-H	237.2533	0	2	1	2.7800	3.3520	2.0971	39.070	0,5500	0	0	0
10	3,4-Cl <sub>2</sub>	306.1434	0	2	1	2.5600	4.5960	3.4039	39.070	0,5500	0	0	0
14	-Cl	271.6983	0	2	1	2.6700	3.9740	2.7505	39.070	0,5500	0	0	0

**Legenda:** Código= ftalimidas obtidas na Série B; R= grupo substituinte; MW = peso molecular ; HBD = nº doadores de ligações hidrogênio ; HBA = nº aceptores de ligações hidrogênio; RBC = nº de ligações rotacional; TPSA = área total de superfície polar; ABS = escore de biodisponibilidade; EVC = contagem de violações de Egan; VVC = contagem de violações de Veber; LRF = contagem de violações da regra dos 5 – Lipinski; logP = coeficiente de partição octano/água; NC + NHET= método de previsão do logP baseado no número de carbonos (NC) e no número de heteroátomos (NHET); XlogP= método átomo-aditivo para o cálculo do coeficiente de partição octanol-água (logP); AlogP= método de previsão do coeficiente de partição octanol-água que foi desenvolvido com 12908 moléculas, a partir do banco de dados PHYSPROP.

## 5.2.5 Atividade Biológica

### 5.2.5.1 Atividade anticâncer *in vitro*

A partir dos resultados descritos na Tabela 11, é possível observar o efeito citotóxico de imidas cíclicas (Série B), em diferentes linhagens de células cancerígenas. Como pode ser observada, a substância 14 apresentou efeito citotóxico contra as linhagens de próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03) e leucemia (K562), com inibição total de crescimento celular nas concentrações de 54,9, 101,6 e 53,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Por outro lado, as substâncias 1 e 4 apresentaram atividade somente contra células do ovário (OVCAR-03). A substância 4 reduziu significativamente a viabilidade celular para esta linhagem, quando comparado com o controle Doxorubicina, na concentração de 3,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Analisando os resultados frente à linhagem OVCAR-03 (ovário) observa-se que não seguem efetivamente os parâmetros propostos por Topliss, porém as substâncias mais ativas foram aquelas contendo os substituintes  $\text{CH}_3$  e  $-\text{OCH}_3$ , grupos que apresentam a característica eletrônica  $\sigma^+$ , deslocando a densidade eletrônica da molécula para a porção imídica. É importante salientar que as substâncias 1 e 4 apresentam nas suas estruturas moleculares substituintes diferentes na posição 4 ( $\text{CH}_3$  e  $-\text{OCH}_3$ ), o que sugere a interferência destes no efeito observado. No entanto, estudos adicionais devem ser conduzidos na tentativa de melhorar a atividade antiproliferativa e verificar seus possíveis mecanismos de ação.

Vários estudos demonstram que imidas cíclicas N-substituídas apresentam atividade antitumoral e que a atividade citotóxica pode ser atribuída a natureza hidrofóbica do anel imídico e ao seu potencial eletricamente neutro, o que facilita a penetração das substâncias através da membrana celular. Além disto, outros estudos relatam que os efeitos citotóxicos possam estar relacionados com as características e com o tamanho dos grupamentos substituintes do anel imídico, e que estes teriam a capacidade de modificar as propriedades eletrônicas e estéricas das substâncias, alterando assim, a sua atividade citotóxica (LOH; COSBY; SARTORELLI, 1980; FOURNEL et al., 2002; CECHINEL FILHO et al., 2003; PRADO et al., 2004; KENDALL et al., 2007).

**Tabela 11:** Efeito anti-proliferativo de imidas cíclicas (Série B) em diversas linhagens de células cancerígenas

Código	R	T									NT
		2	m	a	7	4	p	o	h	k	Q
Controle	-	0,025	<0,025	0,13	0,028	0,041	<0,025	0,092	0,23	0,10	0,029
1	-CH <sub>3</sub>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	6,9	>250	>250	>250
4	-O-CH <sub>3</sub>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	3,0	>250	>250	>250
7	-H	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
10	3,4-Cl <sub>2</sub>	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
14	-Cl	>250	>250	>250	>250	>250	54,9	101,6	>250	53,6	>250

**Legenda:** T= Linhagens tumorais humanas: 2= U251 (glioma); m= MCF-7 (mama); a= NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7= 786-0 (rim); 4= NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p= PC-3 (próstata); o= OVCAR-03 (ovário); h= HT29 (colon); k= K562 (leucemia). NT= Linhagem não-tumoral humana: Q= HaCat (queratinócito). Código= Ftalimidas obtidas na Série B; Controle= Doxorrubicina; R= Grupo substituinte; TGI= Inibição total de crescimento ( $\mu\text{g/mL}$ ).

### 5.2.5.2 Atividade *in vitro* das substâncias ftalimídicas da Série B para inibição das enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B)

Avaliou-se o efeito das substâncias sintetizadas nas enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e B), sendo os resultados obtidos descritos na Tabela 12.

As substâncias desta série apresentaram uma inibição da atividade enzimática pouco promissora para MAO-A, enquanto que as substâncias 1, 4, 10 e 14 apresentaram inibição da atividade enzimática para MAO-B entre 59 a 68%, indicando que seu IC<sub>50</sub> deverá ficar próximo à 100  $\mu\text{M}$ . A ftalimida 7 apresentou uma inibição da atividade enzimática pouco promissora para MAO-A e MAO-B.

As substâncias 1, 4, 10 e 14 apresentam nas suas estruturas moleculares grupos substituintes na posição três e/ou quatro, sugerindo que parâmetros estéricos ou conformacionais podem estar diretamente envolvidos nos efeitos observados.

**Tabela 12:** Atividade *in vitro* nas enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e -B), das substâncias ftalimidicas da Série B

Código	R	Inibição (%)	
		MAO-A	MAO-B
1	-CH <sub>3</sub>	< 50	68
4	-O-CH <sub>3</sub>	< 50	59
7	-H	< 50	< 50
10	3,4-Cl <sub>2</sub>	< 50	63
14	-Cl	< 50	61
Clorgilina	-	100	N.T.
Pargilina	-	N.T.	100

**Legenda:** Código= Ftalimidias obtidas na Série B (100 µM); IC<sub>50</sub> da clorgilina= 0,004 µM; IC<sub>50</sub> da pargilina= 0,13 µM; N.T.= Não testado; MAO-A= Enzimas monoamina oxidase A; MAO-B= Enzima monoamina oxidase B; R= Grupo substituinte.

### 5.2.5.3 Atividade antifúngica

Quanto aos resultados da avaliação antifúngica, verificou-se que esta Série B não apresentou atividade contra as inúmeras cepas avaliadas.

### 5.2.5.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro* de inibidores da COX-1 e COX-2

A ciclo-oxigenase é a enzima limitante da velocidade na síntese de prostaglandinas durante o processo inflamatório. Os níveis de prostaglandina, em especial PG<sub>2</sub>, são muitas vezes utilizados como uma medição da atividade da ciclo-oxigenase (BASILE et al., 2012). A COX-1 e COX-2 são enzimas que catalisam a conversão do ácido araquidônico em PGG<sub>2</sub> (por via da atividade da ciclo-oxigenase) e a conversão subsequente de PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> (por via da atividade da peroxidase). A atividade anti-inflamatória, pela inibição da ciclo-oxigenase foi medida por teste imuno-enzimático para PG<sub>2</sub>α.

A partir dos resultados, verifica-se que todas as substâncias mostraram uma inibição potencial da COX-1, quando comparados com a nimesulida (COX-1

de controle). Destaque para a substância 1 que também apresentou uma boa inibição da COX-2.

Com estes resultados, foi possível calcular o  $IC_{50}$  para todas as substâncias, descrito na Tabela 13, onde observa-se que para a COX-1 os resultados variaram de 2,63 a 0,21  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , tendo a substância 14 resultado próximo da nimesulida  $IC_{50}$  (COX-1 controle). Para a COX-2, a  $IC_{50}$  variou de 2,24 a 1,15  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , sendo que a substância 1 apresentou  $IC_{50}$  melhor que a nimesulida. Os índices de seletividade foram calculados, demonstrando que as substâncias, com exceção da substância 1, apresentam atividade melhor para a COX-1.

Estes resultados colaboram com os estudos, que mostram a inibição da atividade da enzima COX-1 / COX-2 por substâncias imídicas (SANO et al., 2004; ANANA et al., 2006). Outros estudos descrevem que algumas estruturas imídicas possuem seletividade para COX-2 (ABDEL-AZIZ et al.; 2011; STEFANI et al., 2012; AL-SUWAIDAN et al., 2013).

**Tabela 13:** Atividade da inibição da enzima COX-1 / COX-2 para as substâncias da Série B

Código	R	COX-1 $IC_{50}$ ( $\mu\text{M}/\text{mL}$ )	COX-2 $IC_{50}$ ( $\mu\text{M}/\text{mL}$ )	SI
1	-CH <sub>3</sub>	2.63	1.15	2.29
4	-O-CH <sub>3</sub>	1.13	2.02	0.56
7	-H	1.75	2.24	0.78
10	3,4-Cl <sub>2</sub>	1.33	2.04	0.65
14	-Cl	0.21	2.11	2.07
Nimesulida	-	0.12	1.70	0,07

**Código**= Ftalimidas obtidas na Série B;  $IC_{50}$ = Concentração de substâncias requerida para produzir 50% inibição; SI= Índice de seletividade ( $COX-1\ CI_{50} / COX-2\ CI_{50}$ )

Os resultados indicam que somente para COX 2 pode-se observar uma relação estrutura-atividade com base no método manual proposto por Topliss. A ordem de potência observada (ordem crescente) é: 7<14 <10 <4 <1, que de acordo

com a Tabela 1 de Topliss tem como parâmetro preponderante  $\pi-2\sigma$ . Sugerindo que os substituintes 4-N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, 4-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4-NH<sub>2</sub>, 4-NHC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, 4-OH, 4-OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 3-CH<sub>3</sub> e 4-OCH<sub>3</sub> (Tabela 2) podem aumentar o efeito biológico observado neste estudo, porém novos estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

#### **5.2.5.5 Atividade antiparasitária**

A região amazônica abriga uma grande variedade dermatológica de Leishmania (RANGEL; LAINSON, 2009), onde a avaliação da toxicidade de substâncias novas, candidatas a fármacos, deve ser um dos primeiros passos para a utilização destas substâncias em modelos animais. Atualmente, os fármacos utilizados para parasitas como *L. braziliensis* mostram uma alta toxicidade, pois metabólitos formados, a partir dos fármacos utilizados, afetam tecidos do hospedeiro devido a sua alta reatividade (DIAS; DESSOY, 2009).

Na busca por novos agentes antiparasitários, quatro substâncias desta Série B, foram testadas contra linhagens celulares de *Leishmania amazonenses* (Lma) e *L. brasiliensis* (M2904 C192 RJA). Os resultados foram comparados com padrões de referência e a viabilidade celular foi determinada pelo método XTT. As concentrações inibitórias mínimas obtidas para cada substância estão descritas na Tabela 14.

A substância 1 foi a única que apresentou uma pequena atividade antiparasitária com IC<sub>50</sub> de 98 µg/mL, contra *L. braziliensis*.

**Tabela 14:** Atividade antiparasitária das substâncias da Série B *in vitro* nas formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* e *L. brasiliensis* através do método colotimétrico XTT

Código	R	IC <sub>50</sub> Lma	IC <sub>50</sub> M2904
CAT	-	19,3±0,3	20,2±0,2
Anfotericina B	-	0,25±0,05	0,07±0,01
1	-CH <sub>3</sub>	>100	98±2
4	-O-CH <sub>3</sub>	>100	>100
7	-H	>100	>100
10	3,4-Cl	>100	>100

Valores de IC<sub>50</sub> µg/mL= Avaliações a 100 – 50 – 25 - 12,5 - 6,2 - 3,1 - 1,5 µg/mL; Código= Ftalimidas obtidas na Série B; CAT= Alcaloides totais de *Galipea longiflora*; Anfotericina B= Droga controle; Lma= *L. amazonenses*; M2904= *L. brasiliensis*.

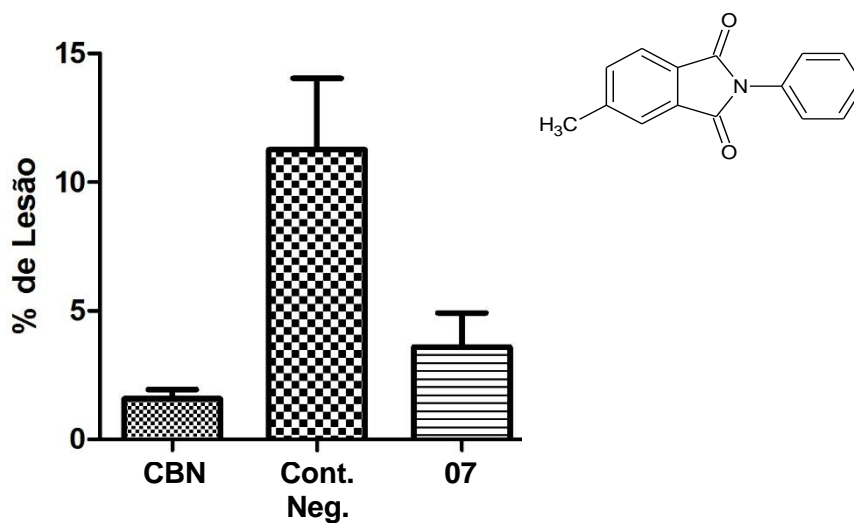
#### 5.1.4.5 Avaliação da atividade gastroprotetora induzida por etanol

No modelo de lesões gástricas induzidas por etanol (Figura 23), a substância ftalimídica sintetizada nesta série, N-fenil-4-metilftalimida (7), apresentou diminuição significativa no índice de lesões, na dose de 30 mg/Kg, quando comparados com o controle negativo (veículo). Além disso, apresentou similaridade na diminuição da porcentagem de lesões, quando comparada ao controle positivo (carbenoxolona, 200 mg/kg).

Sugerem-se futuros ensaios com doses menores e/ou modificações estruturais para verificar a manutenção do efeito gastroprotetor e a possível diminuição dos efeitos toxicológicos.

Esse modelo de avaliação é comum na triagem de fármacos com atividade gastroprotetora, fornecendo indícios relevantes de mecanismos de ação das substâncias em estudo, podendo estar associados a fatores anti-inflamatórios e/ou fatores antioxidantes, na redução da secreção ácida e produção de muco (RAIHA et al.; 1988; LEMOS et al., 2011).

**Figura 23:** Avaliação da atividade gastroprotetora da N-fenil-4-carboxilftalimida sintetizada nesta série, *in vivo*, no modelo de úlcera induzida por etanol



Os resultados expressos como média ± Erro Padrão da Média (EPM) de % de lesões gástricas induzidas por etanol. Os animais foram tratados com veículo (água destilada), carbenoxolona (200 mg/kg), substância 7 (30 mg/kg). \* $p < 0,05$  substância 7; \*\* $p < 0,01$  carbenoxolona (controle positivo). Testes realizados pela comparação múltipla de Dunnett's.



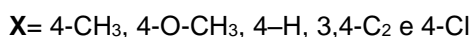
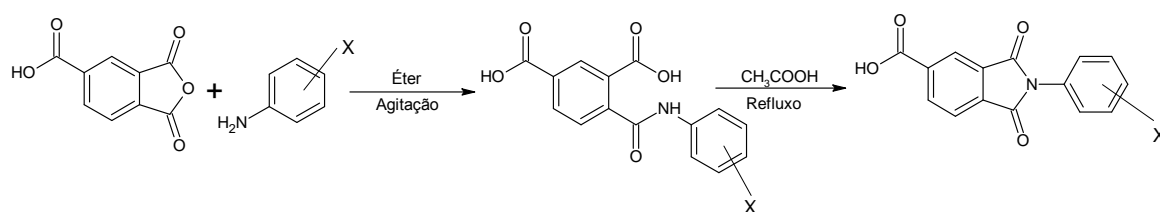
## PARTE 3

### 5.3 Imidas cíclicas derivadas do anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico ou 4-carboxilftálico (Série C)

#### 5.3.1 Síntese

As substâncias obtidas nesta série, foram obtidas seguindo a rota sintética do esquema geral proposto na Figura 24, onde utilizou-se como reagente de partida o anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico ou 4-carboxilftálico com diferentes anilinas n-substituídas.

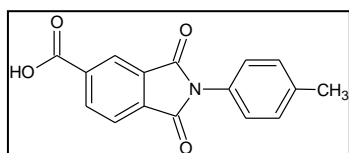
**Figura 24:** Esquema geral proposto para as reações de síntese de imidas cíclicas derivadas do anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico ou 4-carboxilftálico



Para uma melhor organização dos resultados cada reação esta descrita, a seguir, em detalhes quanto as quantidades utilizadas, os rendimentos e a caracterização de cada substâncias obtida.

#### 4.3.2 Procedimento para a obtenção das imidas derivadas do anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico ou 4-carboxilftálico (Série C)

##### Obtenção da N-(4-metil)-fenil-4-ácido carboxifalimida (2)

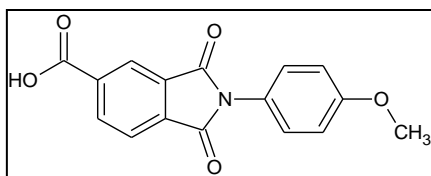


Em um Erlenmeyer foi adicionado (1 g) anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico em (10 mL) de éter etílico e (0,51 g) p-toluidina. A reação foi mantida sob agitação mecânica,

em temperatura ambiente, por aproximadamente 5 minutos. O precipitado formado foi filtrado em funil de Büchner, lavado com éter gelado e mantido em dessecador a vácuo por 24 horas. A substância formada foi um pó branco que, em seguida, foi

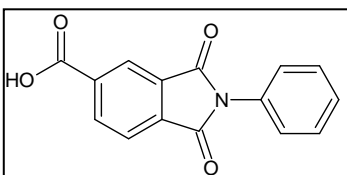
submetido a um refluxo com 10mL de ácido acético glacial, durante um período de 2 horas. Após o término deste, o produto foi vertido sobre banho de água-gelo, formando um precipitado. Este foi filtrado e mantido em dessecador a vácuo com sílica gel por 24 horas. O sólido obtido foi recristalizado em etanol a quente, formando-se cristais brancos. Fórmula Molecular:  $C_{16}H_{11}NO_4$ , Massa Molecular: 281.26284. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3250.5 (OH); 1716.5 (C=O, carboxil); 1699.3 (C=O; imida); 1217.1 (C-OH). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$  + gotas MeOD) (ppm): 2.33 (s, 3H,  $CH_3$ ); 7.19-8.49 (7H, 2 Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 21.00 ( $CH_3$ ); 22.06 ( $CH_3$ ); 123.58-138.40 (12 C, 2 Ar); 166.48 (2 C=O, imida); 166.67 (C=O, carboxila). Estes dados estão de acordo com aqueles reportados na literatura (DABIRIA et al., 2007).

#### Obtenção da N-4'-metoxi-fenil-4-ácido carboxiftalimida (5)



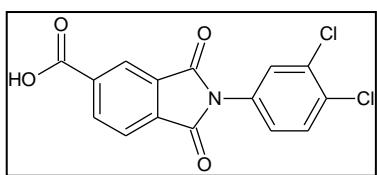
Metodologia similar à obtenção da substância 2, utilizando o anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico (1 g) e 4-anisidina (0,64 g) como nucleófilo. Formou um pó amarelo que, em seguida, foi recristalizado com álcool etílico a quente, formando-se cristais amarelos. Fórmula Molecular:  $C_{16}H_{11}NO_5$ . Massa Molar: 297.26224. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3250.5 (OH); 1715.7 (C=O, carboxil); 1707.0 (C=O; imida); 1253.7 (C-OH). RMN- $^1H$  ( $DMSO_{d6}$ ) (ppm): 3.81 (s, 3H,  $OCH_3$ ); 7.06 – 8.42 (7H, 2 Ar). RMN- $^{13}C$  ( $DMSO_{d6}$ ) (ppm): 55.56 ( $OCH_3$ ); 114.33-159.14 (12 C, 2 Ar); 166.17 (C=O, imida); 166.72 (C=O, carboxila).

#### Obtenção da N-fenil-4-ácido carboxiftalimida (8)



Metodologia similar à obtenção da substância 2, utilizando o anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico (1 g) e anilina (0,48 g) como nucleófilo. Formou um pó branco que, em seguida, foi recristalizado com uma mistura de álcool etílico e clorofórmio (8:2) a quente, formando-se cristais brancos. Fórmula Molecular:  $C_{15}H_9NO_4$ . Massa Molecular: 267.23626. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3509.1 (OH); 1715.5 (C=O, carboxil); 1710.9 (C=O; imida); 1296.1 (C-OH). RMN- $^1H$  ( $DMSO_{d6}$ ) (ppm): 7.44-8.43 (8H, 2 Ar). RMN- $^{13}C$  ( $DMSO_{d6}$ ) (ppm): 123.56-136.61(12C, 2Ar); 166.00 (C=O, imida); 166.48 (C=O, carboxila).

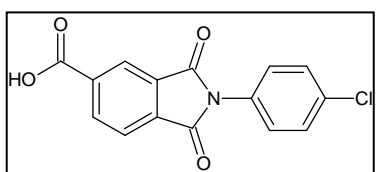
### Obtenção da N-3,4-diclorofenil-4-ácido carboxiftalimida (11)



Metodologia similar à obtenção da substância 2, utilizando anidrido 1,2,4-benzenotricarboílico (1 g) e 3,4-dicloro anilina (0,42 g) como nucleófilo. Formou

um pó amarelo que, em seguida, foi recristalizado com uma mistura de metanol e clorofórmio 1:1 a quente, formando-se cristais amarelos. Fórmula Molecular:  $C_{15}H_7Cl_2NO_4$ . Massa Molecular: 336.12638. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3091.1 (C=O); 1724.4 (C=O, carboxil); 1683.9 (C=O, imida); 1220.9 C-OH). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3/DMSO_{d6}$  1:1) (ppm): 6.65-7.67 (6H, 2Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 122.38-135.39 (12 C; 2 Ar); 164.13 (2 C=O, imida); 164.22 (C=O, carboxila).

### Obtenção da N-4'-clorofenil-4-ácido carboxiftalimida (13)



Metodologia similar à obtenção da substância 2, utilizando o anidrido 1,2,4-benzenotricarboxílico (1 g) e 4-cloro-anilina (0,66 g) como nucleófilo. Formou um pó

branco que, em seguida, foi recristalizado com uma mistura de metano e clorofórmio 1:1 a quente, formando-se cristais brancos. Fórmula Molecular:  $C_{15}H_8ClNO_4$ . Massa: 301.68132. IR (KBr) ( $cm^{-1}$ ): 3059.1 (C=O); 1724.4 (C=O, carboxil); 1701.2 (C=O, imida); 1220.9 C-OH). RMN- $^1H$  ( $CDCl_3/DMSO_{d6}$  1:1) (ppm): 6.92-7.98 (7H, 2Ar). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) (ppm): 122.71-136.16 (12 C; 2 Ar); 164.96(2 C=O, imida; C=O, carboxila).

### 5.3.3 Purificação e Caracterização

Na análise da Tabela 15, observa-se que a imida cíclica obtida com maior rendimento bruto foi a 8 (39,49 %), porém, quando submetidas à recristalização com etanol ou uma mistura de solventes, para aumentar o grau de pureza, houve uma diminuição no rendimento, variando entre 10% a 39,49%, sem alteração do *Rf*.

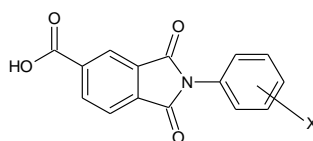
Após a purificação, foram determinados os pontos de fusão (Tabela 16), havendo uma variação entre 174,8°C a 201°C dependendo do tamanho do grupo R substituinte do anel aromático, onde os pontos de fusão encontrados possuem um pequeno intervalo, o que pode ser considerado um indicativo de pureza.

Esta Série C também foi de fácil obtenção e as reações ocorreram de forma limpa, com pouca formação de subprodutos. Todas as substâncias obtidas foram submetidas à recristalização com etanol ou uma mistura de solventes (álcool etílico/clorofórmio 8:2 e metanol/clorofórmio 1:1) para aumento do grau de pureza havendo perdas significativas, mas o Rf foi mantido. Após, foram analisadas e caracterizadas.

Na mesma Tabela 15, estão descritos os rendimentos e purificações das substâncias, tendo a 11 com maior rendimento bruto (60,90%), através da Rota Sintética indireta, ou seja, primeiro houve a formação do ácido âmico para em seguida, ocorrer o fechamento do anel.

Após a recristalização as substâncias foram caracterizadas através da determinação do ponto de fusão (Tabela 15), havendo uma variação entre 243 °C a 296 °C.

**Tabela 15:** Rendimentos e Purificação das substâncias sintetizadas na Série C



Código	R	RENDIMENTO BRUTO (%)	PURIFICAÇÃO	RENDIMENTO PURO (%)	P.F.(°C) Recrist.
2	-CH <sub>3</sub>	37,37	Recristalização com etanol	21,0	268 -269,3
5	-O-CH <sub>3</sub>	54	Recristalização com etanol	19,44	265 - 267
8	-H	53,81	Recristalização com etanol/clorofórmio 8:2	39,49	243,3 – 244,4
11	3,4-Cl <sub>2</sub>	60,9	Recristalização com metanol/clorofórmio 1:1	10,0	291 – 292,9
13	p-Cl	56,05	Recristalização com metanol/cloroformio1:1	37,45	296 – 297.5

Código= Ftalimidas obtidas para a Série C. R= Grupo substituinte; P.F.(°C) Recrist.= Ponto de Fusão das substâncias Recristalizadas,

Os espectros de IV (Figura 25), RMN <sup>1</sup>H (Figura 26) e RMN <sup>13</sup>C (Figura 27) da substância 2, foram selecionados a título de ilustração para esta série.

Em relação aos dados de Infravermelho descritos na Figura 25, pode-se evidenciar a presença de absorção de C-OH na região de 1217.1 cm<sup>-1</sup> e de absorção de OH do grupo carboxila na região de 3250.5 cm<sup>-1</sup>. Na região de 1699.3

$\text{cm}^{-1}$ , há uma banda característica das duas carboxilas simétricas, confirmando que o anel imídico esta fechado. Pode-se evidenciar também presença de uma absorção de na região de  $1716.5 \text{ cm}^{-1}$  correspondentes à carboxila  $\text{C}=\text{O}$ , de ácido carboxílico, para a substância 2.

As figuras 26 e 27 ilustram os espectros de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a substância 2, cujos sinais correspondem à estrutura proposta, e estão indicados no próprio espectro.

**Figura 25:** Espectro de IV da substância 2

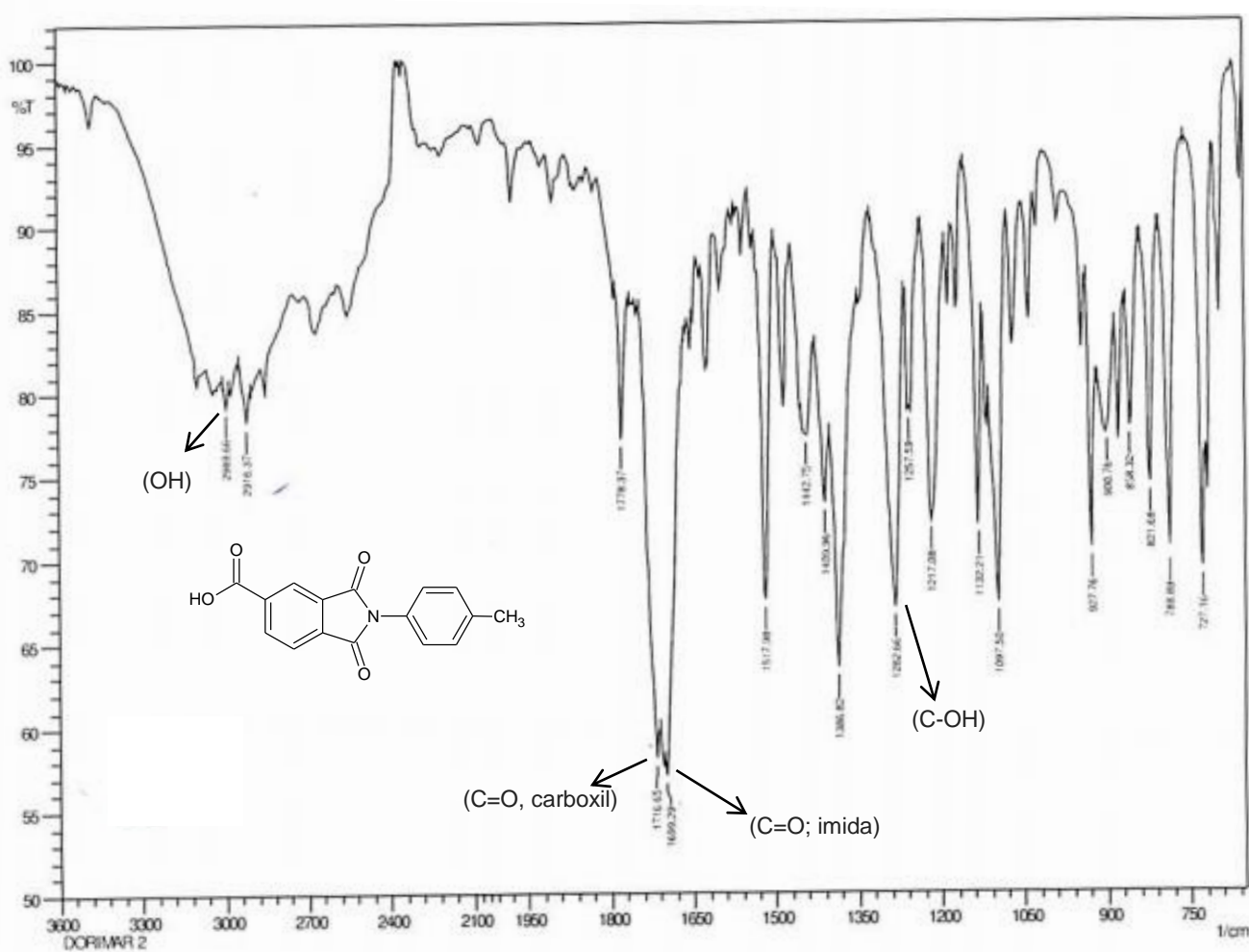
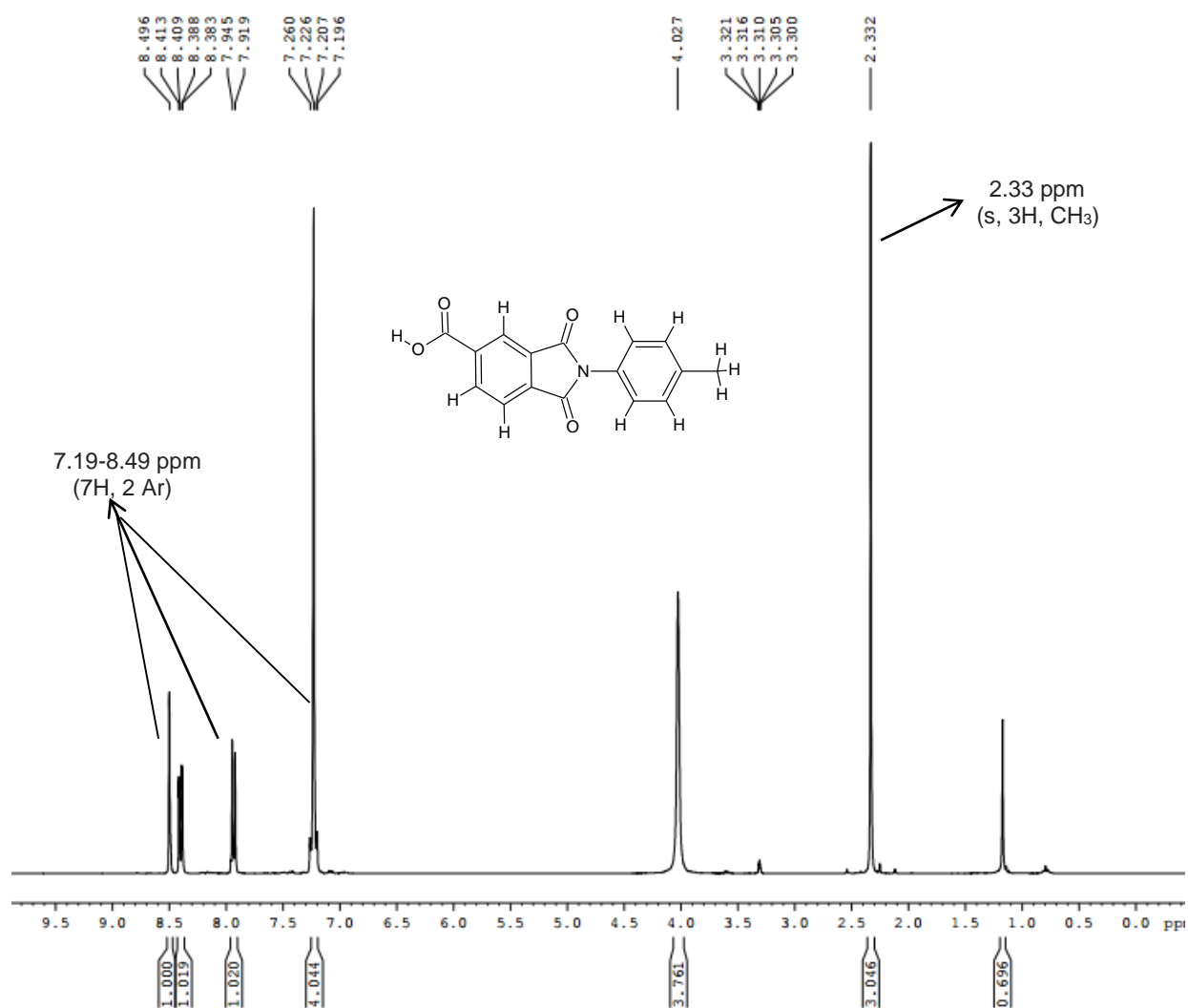
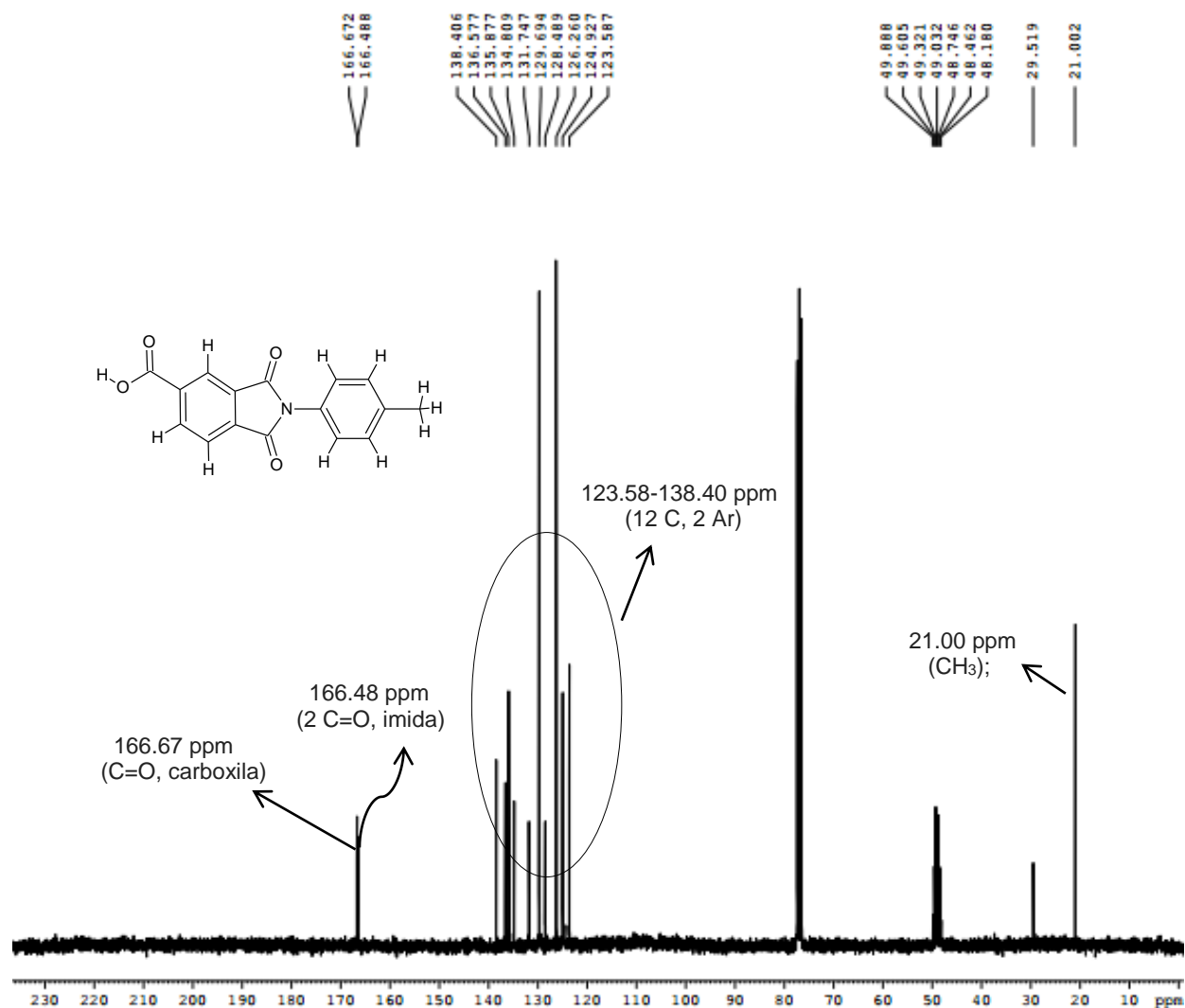


Figura 26: Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da substância 2

**Figura 27:** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C da substância 2



#### 5.3.4 Análise *In silico*: Cálculos teóricos computacionais (Séries C)

Na avaliação *in silico* da predição das propriedades moleculares das substâncias sintetizadas para esta Série (Tabela 16), foi utilizado o mesmo método de cálculos teóricos e computacionais dos parâmetros descritos no item 5.1.3.

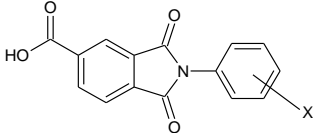
Verifica-se que o Índice de Biodisponibilidade (ABS) para todas as substâncias é de 0,55 e para a Contagem de Violações de Egan (EVC), não houve nenhuma violação por parte dessas substâncias.

Para a Contagem de Violações de Veber (VVC) e para a regra dos 5 de Lipinski (LRF), não se observou quaisquer violações para esta série.

O TPSA (área de superfície polar total) ficou entre 76.370 e 85.600 e o número de ligações rotacionais (RBC) ficou entre 2 e 3. As substâncias avaliadas apresentaram 1 doador de ligações hidrogênio (HBD) e o número de aceptores de ligações hidrogênio (HBA) variou entre 4 e 5. Além disso, apresentaram de 1 a 2 ligações rotacionais (RBC).

Após esta análise, sugere-se dizer que estas substâncias apresentam boa permeação celular e boa biodisponibilidade (BALI; OHRI; DEB, 2012)



**Tabela 16:** Descritores envolvidos na avaliação teórica ADME da Série C


Código	R	MW (amu)	HBD	HBA	RBC	logP			TPSA (Å <sup>2</sup> )	ABS	EVC	VVC	LRF
						NC+NHET	XlogP	AlogP					
02	-CH <sub>3</sub>	281.2628	1	4	2	2.6700	2.9670	1.7953	76.370	0,5500	0	0	0
05	-O-CH <sub>3</sub>	297.7622	1	5	3	2.5600	2.6560	1.4955	85.600	0,5500	0	0	0
08	-H	267.2362	1	4	2	2.5600	2.7410	1.4869	76.370	0,5500	0	0	0
11	3,4-Cl <sub>2</sub>	336.1263	1	4	2	2.3400	3.9850	2.7937	76.370	0,5500	0	0	0
13	-Cl	301.6813	1	4	2	2.4500	2.4300	1.7261	76.370	0,5500	0	0	0

Código= ftalimidas obtidas na Série C; R= grupo substituinte; MW = peso molecular ; HBD = nº doadores de ligações hidrogênio ; HBA = nº aceptores de ligações hidrogênio; RBC = nº de ligações rotacional; TPSA = área total de superfície polar; ABS = escore de biodisponibilidade; EVC = contagem de violações de Egan; VVC = contagem de violações de Veber; LRF = contagem de violações da regra dos 5 – Lipinski; logP = coeficiente de partição octano/água; NC + NHET= método de previsão do logP baseado no número de carbonos (NC) e no número de heteroátomos (NHET); XlogP= método átomo-aditivo para o cálculo do coeficiente de partição octanol-água (logP); AlogP= método de previsão do coeficiente de partição octanol-água que foi desenvolvido com 12908 moléculas, a partir do banco de dados PHYSPROP.

### 5.3.5 Atividade Biológica

#### 5.3.5.1 Atividade anticâncer *in vitro*

Nos resultados descritos na Tabela 17, o efeito citotóxico das ftalimidas da Série C foi testado em inúmeras linhagens de células cancerígenas. Pode ser observado que as substâncias sintetizadas apresentam atividade antiproliferativa contra a maioria das linhagens principalmente câncer de ovário (OVCAR-03), onde a variação de inibição total de crescimento celular ocorreu entre as concentrações de 34,5 a 1,1  $\mu\text{g/mL}$ . A ftalimída 13 apresentou melhor efeito citotóxico contra esta linhagem, com uma inibição total de 1,1  $\mu\text{g/mL}$ , quando comparado com o controle.

Salienta-se que a substância 13 apresenta na sua estrutura molecular o átomo de cloro na posição quatro, sugerindo que parâmetros estéricos ou conformacionais estão envolvidos no efeito observado.

Durante a avaliação da atividade biológica verifica-se que parâmetros hidrofóbicos ( $\pi$ ), eletrônicos ( $\sigma$ ) e estéricos (Es) dos substituintes no anel aromático influenciam diretamente na melhora da atividade farmacológica das substâncias (BUZZI; CECHINEL FILHO; CORRÊA, 2010; CAMPOS; MALHEIROS; NIERO; CECHINEL FILHO, 2014).

Novos estudos e testes mais complexos devem ser realizados, com outras linhagens celulares, a fim de verificar novas possibilidades para estas moléculas e descrever seus possíveis mecanismos de ação. Estes estudos serão promissores, pois estão de acordo com os trabalhos anteriormente citados, onde derivados de imidas cíclicas apresentaram atividade anticancerígena (CECHINEL FILHO et al., 2003; FOURNEL et al., 2002; KENDALL et al., 2007; LOH; COSBY; SARTORELLI, 1980; PRADO et al., 2004).

**Tabela 17:** Efeito anti-proliferativo de imidas cíclicas (Série C) em diversas linhagens de células cancerígenas

Código	R	T									NT
		2	m	a	7	4	p	o	h	k	Q
Controle	-	0,025	<0,025	0,13	0,028	0,041	<0,025	0,092	0,23	0,10	0,029
2	-CH <sub>3</sub>	>250	>250	>250	>250	>250	149,7	32,9	>250	>250	>250
5	-O-CH <sub>3</sub>	>250	>250	217,1	>250	>250	241,2	34,5	>250	>250	>250
8	-H	>250	>250	>250	>250	>250	>250	21,9	>250	>250	>250
11	3,4-Cl	116,9	103,0	191,6	>250	48,5	49,6	26,9	117,3	>250	250
13	p-Cl	>250	>250	>250	>250	>250	123,4	1,1	>250	>250	>250

T: Linhagens tumorais humanas - 2 = U251 (glioma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-03 (ovário); h = HT29 (colon); k = K562 (leucemia); NT: Linhagem não-tumoral humana - Q = HaCat (queratinócito); Código= Ftalimidas obtidas na Série C; Controle= Doxorubicina; R= Grupo substituinte; TGI= Inibição total de crescimento (µg/mL)

### 5.3.5.2 Atividade *in vitro* das substâncias sintetizadas na inibição das enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B)

Observando a Tabela 18, verifica-se que as substâncias desta série apresentaram resultados pouco promissores para inibição da atividade enzimática da MAO-B, enquanto 2 e 11 também apresentaram resultados pouco promissores para MAO-A. As substâncias 5 e 13 apresentaram uma seletividade para MAO-A, tendo uma inibição da atividade enzimática de aproximadamente 60%, indicando que seu IC<sub>50</sub> deverá ficar próximo à 100 µM. Por fim, a ftalimida 8 se destaca por ter apresentado uma atividade inibitória bem superior aos demais (91%) na inibição da MAO-A, indicando que esta é uma substância que apresenta uma promissora atividade, necessitando de futuros testes na tentativa de melhorar a atividade para MAO-A.

**Tabela 18:** Atividade in vitro nas enzimas monoamina oxidase A e B (MAO-A e -B), das substâncias ftalimídicas da Série C

Código	R	Inibição (%)	
		MAO-A	MAO-B
2	-CH <sub>3</sub>	< 50	< 50
5	-O-CH <sub>3</sub>	60	< 50
8	-H	91	< 50
11	3,4-Cl <sub>2</sub>	< 50	< 50
13	-Cl	62	< 50
Clorgilina	-	100	N.T.
Pargilina	-	N.T.	100

**Código**= Ftalimidas obtidas na Série C (100 µM); **IC<sub>50</sub> da clorgilina**= 0,004 µM; **IC<sub>50</sub> da pargilina**= 0,13 µM; **N.T.**= Não testado; **MAO-A**= Enzima monoamina oxidase A; **MAO-B**= Enzimas monoamina oxidase B; **R**= Grupo substituinte.

### 5.3.5.3 Atividade antifúngica

Os resultados das atividades antifúngicas da Série C, foram pouco promissores, onde a substância 13 que apresentou melhor atividade antifúngica contra a linhagem *M. gypseum* DSM3824, com uma inibição mínima de 16 µg/mL, quando comparado com o controle Fluconazol. Esta substância apresenta na sua estrutura molecular o átomo de cloro na posição quatro, sugerindo mais uma vez que os parâmetros estéricos ou conformacionais estão envolvidos no efeito observado.

Futuros testes devem ser conduzidos na tentativa de melhorar a atividade antifúngica, com outros micro-organismos, a fim de verificar seus possíveis mecanismos de ação.

### 5.3.5.4 Atividade antiparasitária

Os resultados de concentração inibitória mínima obtida na atividade antiparasitária para a Série C, estão descritos na Tabela 19. Observa-se o resultado da substância 11, onde apresenta concentração inibitória mínima

contra a Lma na concentração de 43,4  $\mu\text{L}$  e 74  $\mu\text{L}$  para M2904. As demais substâncias apresentaram inibição somente contra cepas de M2904. Na estrutura da substância 11, observa-se que há dois átomos de cloro ligados, na posição três e quatro do anel benzênico, sugerindo, em função do cloro ser um átomo elétron retirador, uma interferência eletrônica sobre o grupo farmacofórico.

A análise através do método de Topliss, mostra que esta série seguiu os parâmetros físico-químicos (Tabela 1), apresentando atividade contra *L. braziliensis*, sendo mais efetivo aquele que possui dois átomos de cloro nas posições 3 e 4 (substância 11), seguido pela substância 13 (cloro na posição quatro), o que não possui substituintes (substância 8), com grupo metil na posição quatro (substância 2), finalizando com aquele que possui grupo metóxi na posição quatro (substância 5). Baseado nestas observações, sugere-se que os parâmetros eletrônicos ( $\pi$ ) estão relacionados com o efeito encontrado. Pode ser observado que a substância 11 apresentou uma atividade inibitória mais significativa contra *L. amazonensis*, reforçando a hipótese da importância dos efeitos eletrônicos.

**Tabela 19:** Atividade antiparasitária das substâncias da Série C *in vitro* através do método colotimétrico XTT

Código	R	IC <sub>50</sub> Lma	IC <sub>50</sub> M2904
CAT	-	19,3±0,3	20,2±0,2
Anfotericina	-	0,25±0,05	0,07±0,01
<b>B</b>			
<b>2</b>	-CH <sub>3</sub>	>100	98±2
<b>5</b>	-O-CH <sub>3</sub>	>100	>100
<b>8</b>	-H	>100	92±4
<b>11</b>	3,4-Cl	43,4±5	74±2,6
<b>13</b>	p-Cl	>100	78±5

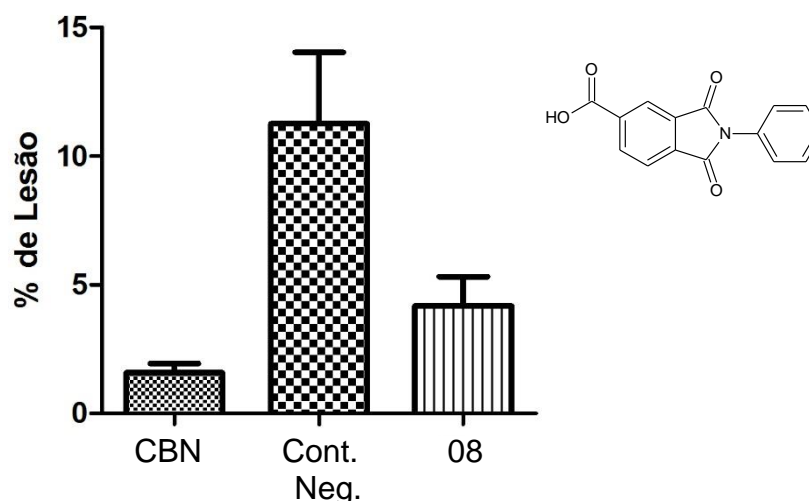
Valores de IC<sub>50</sub>  $\mu\text{g/mL}$ = Avaliações a 100 – 50 – 25 - 12,5 - 6,2 - 3,1 - 1,5  $\mu\text{g/mL}$ ; Código= Ftalimidas obtidas na Série C; CAT= alcaloides totais de *Galipea longiflora*; Anfotericina B= droga controle; Lma= *L. amazonensis*; M2904= *L. braziliensis*.

### 5.3.5.5 Avaliação da atividade gastroprotetora induzida por etanol

No modelo de lesões gástricas induzidas por etanol (Figura 28), a substância ftalimídica sintetizada nesta série, N-fenil-4-carboxiftalimida (8), apresentou diminuição significativa no índice de lesões, na dose de 30 mg/Kg, quando comparada com o controle negativo (veículo). Além disso, apresentou similaridade na diminuição da porcentagem de lesões, quando comparada ao controle positivo (carbenoxolona, 200 mg/kg).

Por outro lado, foi possível observar, em alguns animais, emese e hematúria. Várias hipóteses podem ser sugeridas entre elas o uso de uma dose concentrada da substância em teste, a estrutura molecular apresenta um grupamento sacador de elétrons (ácido carboxílico) no anel aromático da porção ftalimídica, o que pode estar relacionado com a toxicidade encontrada. Sugere-se futuros ensaios com doses menores e/ou modificações estruturais para verificar a manutenção do efeito gastroprotetor e a possível diminuição dos efeitos toxicológicos.

**Figura 28:** Avaliação da atividade gastroprotetora da N-fenil-4-ácido carboxiftalimida sintetizada nesta série, *in vivo*, no modelo de úlcera induzida por etanol



Os resultados expressos como média ± Erro Padrão da Média (EPM) de % de lesão induzidas por etanol. Os animais foram tratados com veículo (água destilada), carl (200 mg/kg), substância 8 (30 mg/Kg). \* $p < 0,05$  substância 8; \*\* $p < 0,01$  carbenoxolona (controle positivo). Testes realizados pela comparação múltipla de Dunnett's.

## PARTE 4

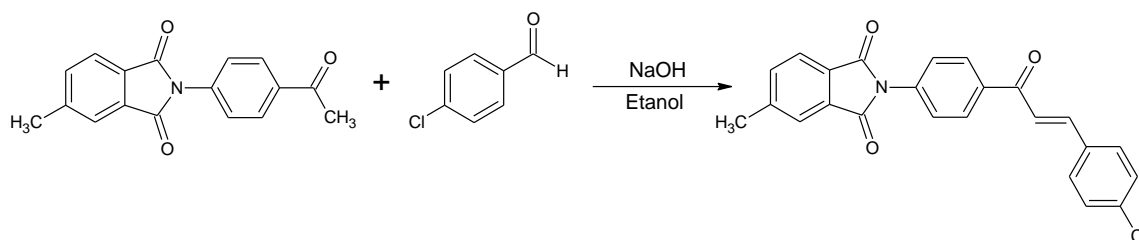
### 5.4. Imida-chalcona derivada da imida ciclica N-4'-acetilfenil-4-metilftalimida

Várias tentativas foram utilizadas para obter a imida-chalcona da figura 30, a partir da reação da imida N-4'-acetilfenil-4-metilftalimida com 4-clorobenzaldeído, usando-se o método convencional de condensação aldólica ou ainda uso de micro-ondas, porém os rendimentos foram muito baixos, com formação de outros produtos indesejáveis. Um destes, possivelmente, é a substância imídica (ácido âmico) aberto.

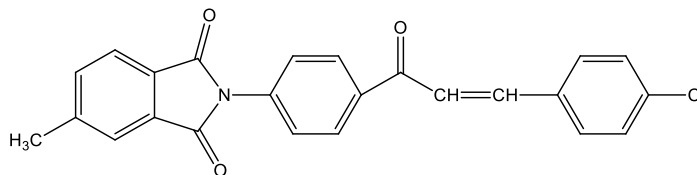
Por outro lado, é importante mencionar que há a formação da imida-chalcona 2-{4-[(2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enil]fenil}-5-metil-1H-isoindole-1,3(2H)-diona (Figura 30), conforme demonstrado pelo espectro de massas da substância extraída da CCD com *R<sub>f</sub>* em cerca de 0,4 e mancha amarela no visível, característica de ligação CH=CH de chalconas.

A reação seguiu a rota sintética da Figura 29, utilizando etanol como solvente e hidróxido de sódio como catalisador, sob agitação magnética por uma hora e trinta minutos, à temperatura ambiente, conforme descrito por Vogel em 1989, com pequenas modificações. Após confirmação do término da reação, através de CCD, verteu-se o produto da reação sob água-gelo e neutralizou-se com HCl 1 Molar, formando um precipitado branco. Este foi filtrado e mantido em dessecador a vácuo com sílica gel por 24 horas. Uma nova CCD indicou vários produtos, 3 majoritários, incluindo um de mancha amarela.

**Figura 29:** Rota sintética para obtenção da imido-chalcona derivada da imida 4-acetilfenil-4-metilftalimida



**Figura 30:** Estrutura molecular de uma híbrida imida-chalcona 2-{4-[(2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enil]fenil}-5-metil-1H-isoindeole-1,3(2H)-diona

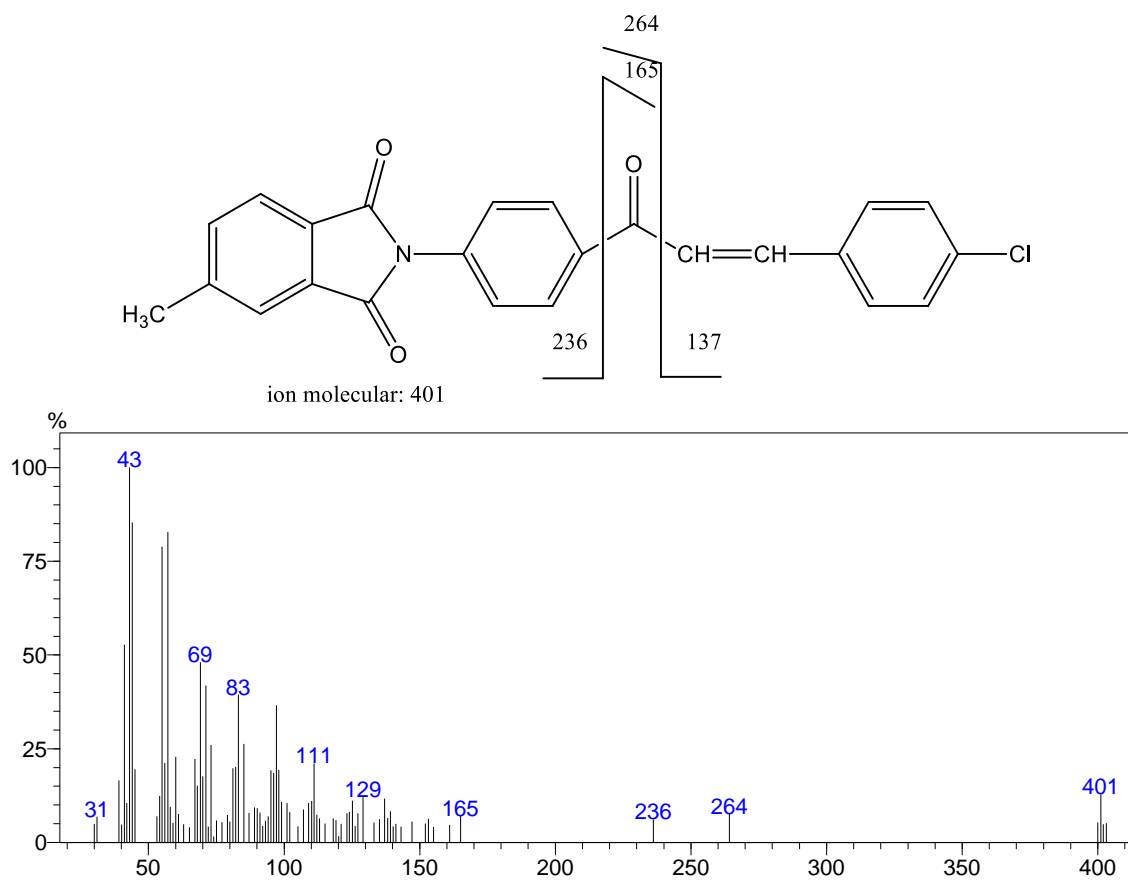


Formula Molecular:  $C_{24}H_{16}ClNO_3$   
Massa Molecular: 401.84174

O Espectro de massas da imido-chalcona (Figura 31) indica claramente o PM de 401, e as seguintes rupturas na cadeia principal, indicadas a seguir, com PM de 137, 165, 236 e 264, confirmando a estrutura proposta. Embora o rendimento seja ainda baixo em função da mistura complexa formada, a substância-alvo é obtida, abrindo perspectivas para novas tentativas e aprimoramento de metodologia de síntese desta e outras imido-chalconas a partir das imidas em estudo.



**Figura 31:** Espectro de massas da substância amarela da CCD (imido-chalcona 2-{4-[(2E)-3-(4-clorofenil)prop-2-enoil]fenil}-5-metil-1H-isoindol 1,3 (2H)-diona)





## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- ✓ Foram sintetizadas com rendimentos satisfatórios 3 séries de imidas cíclicas bioativas a partir dos anidridos cíclicos de ácidos dicarboxílicos: anidrido itacônico (Série A), anidrido 4-metilftálico (Série B) e anidrido 2,4-benzenotricarboxílico (Série C) e aminas aromáticas, nas quais o nitrogênio está ligado diretamente ao anel aromático, com substituintes.
- ✓ Duas rotas diferentes foram utilizadas com o intuito de obter substâncias capazes de atuarem em diferentes alvos terapêuticos e serem candidatas a fármacos. Entre elas, a RS<sub>1</sub> foi escolhida por apresentar maior rendimento reacional, sendo viável a formação das respectivas imidas cíclicas.
- ✓ As reações ocorreram normalmente, sob agitação e temperatura ambiente, embora à formação das imidas cíclicas necessitassem condições especiais, ou seja, da formação de uma substância intermediária (ácido âmico) e do refluxo na ciclização do anel imídico, utilizando como agente desidratante o ácido acético, apresentando rendimentos moderados a satisfatórios.
- ✓ As substâncias estudadas foram caracterizadas inequivocamente através de espectro de IV, no qual pôde-se detectar a formação do anel imídico, através da presença das bandas de absorção características de hidroxilas e de grupos carbonila. Por meio dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C, foi possível comprovar que as substâncias sintetizadas foram as propostas por este trabalho.
- ✓ As substâncias sintetizadas foram analisadas *in silico*, a fim de avaliar a probabilidade das substâncias serem bons candidatos a fármacos por via oral, Percebeu-se que nenhuma das três séries de substâncias apresentaram violações das regras propostas por Egan, Lipinski e Veber,

demonstrando possuírem perfil de biodisponibilidade por via oral, boas condições para absorção intestinal passiva e permeação celular.

- ✓ Os Estudos biológicos *In Vitro* realizados para verificar a atividade antifúngica mostraram que as substâncias da Série B não apresentaram atividade frente às inúmeras cepas testadas. Dentre as substâncias da Série C, destaca-se a substância 13, que apresentou melhor atividade contra *M. gypseum* DSM3824, na concentração de 16 µg/mL. Já na Série A, que foi a mais promissora, a substância 15 apresentou baixa concentração mínima inibitória 0,25 µg/mL para *T. mentagrophytes* DSM4870, demonstrando potência promissora.
- ✓ A maioria das substâncias sintetizadas foram avaliadas quanto a inibição da MAO-A e MAO-B, onde apresentaram uma inibição da atividade enzimática de aproximadamente 60% (substâncias 3, 5 e 13 para MAO-A e substâncias 1, 4, 10 e 14 para MAO-B). Destaca-se a substância 8, tendo apresentado uma atividade inibitória bem superior aos demais (91%) na inibição da MAO-A, indicando apresentar uma promissora atividade.
- ✓ A avaliação da atividade anticâncer *in vitro* das substâncias, demonstrou que a maioria das imidas sintetizadas, apresentam atividade antitumoral onde as substâncias 4 (Série B) e 13 (Série C) reduzem significativamente a viabilidade celular da linhagem de células do ovário (OVCAR-O3), na concentração de 3.0 µg/mL e 1,1 µg/mL, respectivamente. Destaca-se a substância 15 (Série A), que apresenta efeitos significativos contra glioma (U251), na concentração de 0,95 µg/mL.
- ✓ Estudos da ação anti-inflamatória foram realizados com as substâncias da Série B, demonstrando que todas apresentam inibição potencial da COX-1 e COX-2, destacando-se a substância 1. Para COX-2 observou-se a

relação estrutura-atividade seguindo Topliss, tendo como ordem crescente de potência o parâmetro  $\pi-2\sigma$ .

- ✓ Para a atividade antiparasitária verifica-se que as substâncias da Série A não apresentam atividade frente as cepas de *Leishmania* testadas, enquanto a substância 1 (Série B) apresentou baixa atividade contra *L. braziliensis*, com CI de 98  $\mu\text{g/mL}$ . O destaque é da substância 11 da Série C, que apresentou concentração inibitória mínima contra a Lma na concentração de 43,4  $\mu\text{g/mL}$  e 74  $\mu\text{g/mL}$  para M2904.
- ✓ A atividade gastroprotetora para as substâncias 7 e 8, apresentaram diminuição significativa no índice de lesões, na dose de 30 mg/Kg, quando comparados com o controle negativo. Ambos apresentaram similaridade na diminuição da porcentagem de lesões, quando comparadas ao controle positivo. Porém, a substância 8 apresentou, em alguns animais, êmese e Hematúria.
- ✓ Foi sintetizada uma imida-chalcona derivada da imida N-4'-acetilfenil-4-metilftalimida com 4-cloro-benzaldeído, usando o método convencional de condensação aldólica. A reação resultou em um baixo rendimento da substância desejada, a qual foi caracterizada através de espectroscopia de massas.

Em virtude da quantidade de novas moléculas desenvolvidas neste trabalho e das possibilidades de estudos que elas podem desencadear, abrem-se perspectivas para a continuidade deste, modificando outras partes das moléculas, como a distância entre o anel imídico e aromático, introdução de novos substituintes no anel aromático e em outras partes das moléculas, com a possibilidade de obtenção de substâncias com potencial para atuar como novos e eficientes fármacos.



## REFERÊNCIAS

- BARREIRO, E. J.; KUMMERLE, A. E.; FRAGA, C. A. M.; The methylation effect in medicinal chemistry. **Chemical Reviews**, n. 111, p. 5215-5246, 2011.
- BELLA CRUZ, A.; BELLA CRUZ, R. C.; CECHINEL FILHO, V. et al. Avaliação, estrutura-atividade. **Revista Latina Americana de Química**, v. 25, n. 1, 1996.
- BRANDÃO, A. Talidomida, sim, mas com o acompanhamento do farmacêutico. **Pharmacia Brasileira**, v. 50, p. 41-42, 2005.
- BROWN, W. H. Organic Chemistry. **Saunders College Publishing**, Orlando – USA, p. 891, 1995.
- BUZZI, F. C.; CORRÊA, R.; CECHINEL FILHO, V. Síntese de moléculas bioativas: O exemplo das imidas cíclicas. In: CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. (Org.). **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**; Itajaí: UNIVALI, p. 57-105, 2003.
- BUZZI, F. C.; CORRÊA, R.; CECHINEL FILHO, V. Contribuição da Química Medicinal para Planejamento de Novos Fármacos. In: CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B., (Org.). **Fármacos e Medicamentos – Uma abordagem Multidisciplinar**; Itajaí: UNIVALI, p. 57-105, 2010.
- BUZZI, F. C.; CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R. In: CECHINEL FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B., (Eds). **Fármacos e Medicamentos, uma Abordagem Multidisciplinar**. Ed. Santos, São Paulo, 2010.
- CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; NETO, A. S. O.; VALLE, R. M. R.; ERA, G. A. Antispasmodic Effects of an Alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, (s.1), v. 17, p. 313-321, 1984.
- CAMPOS, A.; MELHEIROS, A.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V. Substâncias sintéticas anticâncer obtidas a partir de produtos naturais: o exemplo das imidas. In: FELICIANO, A.; CECHINEL FILHO, V. **Descoberta, desenho e desenvolvimento de novos agentes anticâncer no âmbito do Programa IberoAmericano – CYTED**; Itajaí : Univali, p. 207-218, 2014.
- CECHINEL FILHO, V. **Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais. Correlação estrutura química - atividade biológica**. Tese (Doutorado em Química), - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1995.
- CECHINEL FILHO, V.; BELLA CRUZ, A.; MORETTO, E.; PINHEIRO, T.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A. Antibacterial activity of N-phenylmaleimides, N-phenylsuccinimides and related compounds: *structure-activity relationships*. **Farmaco**, v. 49, p. 675-677, 1994.

CECHINEL FILHO, V.; BUZZI, F. C.; CORRÊA, R.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. **Química Nova**, v. 26, p. 230-241, 2003.

CECHINEL FILHO, V.; SILVA, C. M.; NIERO, R.; MARIANO, L. N. B.; NASCIMENTO, F. G.; FARIAS, I. V.; GAZONI, V. F.; SILVA, B. S.; GIMÉNEZ, A.; GUTIERREZ-YAPU, D.; SALAMANCA, E.; MALHEIROS, M. Evaluation of Antileishmanial Activity of Selected Brazilian Plants and Identification of the Active Principles. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 7, 2013.

CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R.; VAZ, Z.; CALIXTO, J. B.; NUNES, R. J.; PINHEIRO, T.; ANDRÍCOPULO, A.; YUNES, R. Further studies on analgesic activity of cyclic imides. **Farmaco**, v. 53, p. 55-57, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; MIGUEL, O. G.; NUNES, R. J.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Antispasmodic activity of xantoxiline derivatives: *structure-activity relationships*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, p. 160-162, 1995.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. In: **Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. **Argos**, Chapecó, cap. 1, p. 47-75, 2001.

COHEN, G.; FAROOQUI, R.; KESLER, N. Parkinson disease: a new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 4890-4894, 1997.

CORRÊA, R.; CECHINEL FILHO, V.; SCHLEMPER, V.; ROSA, P. W.; PEREIRA, C. I.; NUNES, R. Synthesis of new succinimides and sulphonated derivatives with analgesic action. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 67-71, 1997.

COSTA, B. B. C.; PASZCUK, H. C. **Síntese de N-alquilaril-3,4-dicloromaleimidas e avaliação dos efeitos analgésicos e antifúngicos**. Monografia de Conclusão de Curso (farmácia). Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2000.

COSTA, N. A. S. **Síntese, caracterização e avaliação biológica de novas imidas planejadas a partir do safrol**. Dissertação de Mestrado (Química), Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2012.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. **Química Nova**, v. 32, p. 2444-2457, 2009.

DELGADO, J. N.; REMERS, W. A. Parkinson disease: a new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow Philadelphia. **Proceedings National Academy Sciences**, v. 10, p. 974, 1998.



EGAN, W. J.; MERZ, K. M.; BALDWIN, J. J. Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 3867-3877, 2000.

FEROCI, M.; CHIAROTTO, I.; FORTE, F.; SIMONETTI, G.; DIODATA D'AURIA, F.; MAES, L.; VITA, D. D.; SCIPIONE, L.; FRIGGERI, L.; SANTO, R. DI; TORTORELLA, S. Efficient Electrochemical N-Alkylation of N-Boc-Protected 4-Aminopyridines: Towards New Biologically Active Compounds. **Organic Chemistry**, v. 2014, p. 10, 2014.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1770-1778, 2011.

FOURNEL, M.; TRACHY-BOURGET, M. C.; YAN, P. T.; KALITA, A.; BONFILS, C.; BEAULIEU, C.; FRECHETTE, S.; LEIT, S.; ABOU-KHALIL, E.; WOO, S. H.; DELORME, D.; MACLEOD, A. R.; BESTERMAN, J. M.; LI, Z. Sulfonamide anilides, a novel class of histone deacetylase inhibitors, are antiproliferative against human tumors. **Cancer Research**, v. 62, n. 15, p. 4325-30, 2002.

HALL, I. H.; WONG, O. T.; SCOVILL, J. P. The cytotoxicity of Npyridinyl and N-quinolinyl substituted derivatives of phthalimide and succinimide. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 5, p. 251-258, 1995.

HANSCH, C.; KIM, K. H.; SARMA, R. H. Structure-activity relationships in benzamides inhibiting alcohol dehydrogenase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 95, n. 19, p. 6447-6449, 1973.

HARGREAVES, M. K.; PRITCHARD, J. G.; DAVE, H. R. Cyclic carboxylic monoimides. **Chemical Reviews**, v. 70, n. 4, p. 439-469, 1970.

HERRAIZ, T.; CHAPARRO, C. Analysis of monoamine oxidase enzymatic activity by reversed-phase high performance liquid chromatography and inhibition by  $\beta$ -carboline alkaloids occurring in foods and plants. **Journal of Chromatography**, v. 1120, p. 237-243, 2006.

HERRAIZ, T. Identification and Occurrence of  $\beta$ -Carboline Alkaloids in Raisins and Inhibition of Monoamine Oxidase (MAO). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 8534-8540, 2007.

KELLER, T. H.; PICHOTA, A.; YIN, Z. A pratica view of 'druggability'. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 357-361, 2006.

KELLER, M. B.; RUWE, F. J. L.; JANSSENS, C. J. J. G.; SITSSEN, J. M. A.; JOKINEN, R.; JANCCZEWSKI, J. Relapse prevention with gepirone in outpatients with major depression. **Journal of Clinical Psychopharmacologia**, v. 25, p. 79-84, 2005.

KENDALL, J. D.; REWCASTLE, G. W.; FREDERICK, R.; MAWSON, R.; DENNY, W. A.; MARSHALL, E. S.; BAGULEY, B. C.; CHAUSSADE, C.; JACKSON, S. P.; SHEPHERD, P. R. Synthesis, biological evaluation and molecular modelling of sulfonohydrazides as selective PI3K p110 $\alpha$  inhibitors. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 24, p. 7677-7687, 2007.

KENNEDY, B. P.; ZIEGLER, M. G.; ALFORD, M.; HANSEN, L. A.; THAL, L. J.; MASLIAH, E. Early and persistent alterations in prefrontal cortex MAO-A and

MAO-B in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 110, p. 789-801, 2003.

KIER, L. B.; ROCHE, E. B. Medicinal chemistry of the mesoionic compounds. **American Pharmaceutical Association**, v. 56, n. 2, p. 149-168, 1967.

KIM, J.; HONG, S. H. Synthesis of Cyclic Imides from Nitriles and Diols Using Hydrogen Transfer as a Substrate-Activating Strategy. **Organic Letters**, v. 16, p. 4404-4407, 2014

LEMOS, M.; SANTIN, J. R.; KLEIN JUNIOR, L. C.; NIERO, R.; ANDRADE, S. F. Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* DC in different animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 503-507, 2011.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

LIPINSKI, C. A. Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, p. 337- 464, 2004.

LOPEZ, S. N.; CASTELLI, M. V.; BUZZI, F. C.; CORREA, R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; ZAMORA, M. A.; ENRIZ, R. D.; RIBAS, J. C.; FURLAN, R. L.; ZACCHINO, S. A. In vitro antifungal properties structure-activity relationships and studies on the mode of action of N-phenyl, N-aryl, N-phenylalkyl maleimides and related compounds. **Arzneimittelforschung**, v. 55, p. 123-132, 2005.

LOPEZ, S. N.; SORTINO, M.; ESCALANTE, A.; BUZZI, F. C.; CORRÊA, R.; CECHINEL FILHO, V.; NUNES, R. J.; ZACCHINO, S. A. Antifungal properties of novel N- and alpha. beta- substituted succinimides against dermatophytes. **Arzneimittelforschung**, v. 53, p. 280-288, 2003.

LOH, W.; COSBY, L. A.; SARTORELLI, A. C. J. Synthesis and antineoplastic activity of phenyl-substituted benzenesulfonylhydrazones of 2-pyridinecarboxyaldehyde 1-oxide. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 631-634, 1980.

LOZOYA, X. Two decades of Mexican ethnobotany and research in plant drugs. **Ciba Foundation Symposium**, v. 185, p. 130-140, 1994.

MACHADO, A. L.; LIMA, L. M.; ARAÚJO, J. X.; FRAGA, C. A.; KOATZ, V. L. G.; BARREIRO, E. J. Design, synthesis and antiinflammatory activity of novel phthalimide derivatives, structurally related to thalidomide. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1169-1172, 2005.

MAXIMILIANO, S.; CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R. N-Phenyl and N-phenylalkyl-maleimides acting against *Candida* spp.: time-to-kill, stability, interaction with maleamic acids. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 560-568, 2008.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos. **Química Nova na Escola**, n. 3, p. 16-22, 2001

MEHTA, N. B.; PHILLIPS, A. P.; FU, F.; LUI, F.; BROOKS, R. E. **Journal of Organic Chemistry**, v. 25, p. 1012, 1960.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMORO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those terpenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology**, n. 57, p. 955-6053, 1991.

MUKHERJEE, A.; DUTTA, S.; SHANMUGAVEL, M.; MONDHE, D. M.; SHARMA, P. R.; SINGH, S. K.; SAXENA, A. K.; SANYAL, U. J. 6-Nitro-2-(3-hydroxypropyl)-1H-benz[de]isoquinoline-1,3-dione, a potent antitumor agent, induces cell cycle arrest and apoptosis. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 29, p. 175, 2010.

NAKAMITSU, P. Z.; COMPRI, C. M.; FRAIA PINTO, L. D.; GOTARDO E. M.; OLIVEIRA C. C.; RIBEIRO, M. L.; PEDRAZZOLI, J.; GAMBERO, A. Thalidomide Controls Adipose Tissue Inflammation Associated with High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. **Endocrine, Metabolic Immune Disorders - Drug Targets**, v. 14, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981 – 2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022 – 1037, 2003.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 227-240, 2009.

OTT, I.; XU, Y.; QIAN, X. J. Fluorescence properties and antiproliferative effects of mono-, bis-, and tris- thiophenyl-naphthalimides: results of a comparative pilot study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.105, n.1, p.75-80, 2011.

PRADO, S.; CECHINEL FILHO, V.; CAMPOS BUZZI, F.; CORRÊA, R.; CADENA, S.; OLIVEIRA, M. Biologics evaluation of some selected cyclic imides: mitochondrial effects and in vitro cytotoxicity. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, p. 663-672, 2004.

RAIHA, I.; KEMPPAINEN, H.; KAPRIO, J.; KOSKENVUO, M.; SOURANDER, L. Lifestyle, stress, and genes in peptic ulcer disease: a nationwide twin cohort study. **Archives of internal medicine**, v. 158, n. 7, p. 698-704, 1998.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectores of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

REDDY, P. Y.; KONDO, S.; TORU, T.; UENO, Y. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 2652, 1997.

STEFANI, H. A.; BOTTESELLE, G. V.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CARACELLI, I.; CORRÊA, D. S.; FARSKY, S. H. P.; MACHADO, I. D.; SANTIN,

J. R.; HEBEDA, C. B. Synthesis, anti-inflammatory activity and molecular docking studies of 2,5-diarylfuran amino acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 52-58, 2012.

STIZ, D. S.; SOUZA, M. M.; GOLIM, V.; NETTO, R. E.; CORRÊA, R.; NUNES, R. J.; YUNES, A.; CECHINEL FILHO, V. Antinociceptive properties of glutarimides. **Pharmazie**, v. 55, p. 12, 2000.

SWATHI, N; KUMAR, T. D. A; SUBRAHMANYAM, C. V. S; SATYANARAYANA, K. Synthesis and in silico drug likeness evaluation of N,5-disubstituted-1,3-thiazolidine-2,4-dione analogues. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 7, p. 885-892, 2013.

TEMPESTA, M. S.; CORLEY, D. G.; BEUTLER, J. A.; METRAL, C. J.; YUNES, R. A.; GIACOMOZZI, C. A.; CALIXTO, J. B. Phyllanthimide, a new alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. **Journal of Natural Products**, n. 3, p. 617, 1988.

TOPLISS, G. J. Utilization of Operacional Schemes for Analog Synthesis in Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15(10), p. 1006-1011, 1072.

TOPLISS, G. J. Some observations on classical QSAR. Perspect. **Drug Discovery and Design**, v. 1, p. 253-268, 1993.

VALVERDE, M. G.; TORROBA, T. Special Issue: Sulfur-Nitrogen Heterocycles. **Molecules**, v. 10, p. 318-320, 2005.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG H. Y.; SMITH, B. R.; et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, n. 45, p. 2615-2623, 2002.

VERSCHUEREN, W. G.; DIERYNCK, I.; AMSSOMS, K. I. E.; HU, L.; BOONANTS, P. M. J. G.; PILLE, G. M. E.; DAEYAERT, F. F. D.; HERTOOGS, K.; SURLERAUX, D. L. N. G.; WIGERINCK, P. B. P. T. Design and optimization of tricyclic phtalimide analogues as novelinhibitors of HIV-1 integrase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p.1930-1940, 2005.

YOUDIM, M. B. H.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nature Reviews in Neuroscience**, v. 7, p. 295-309, 2006.