

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**EDSON CONRADO LUZ**

**SÍNTESE E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE MALEIMIDAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

**São José dos Campos, dezembro/2020**

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**EDSON CONRADO LUZ**

**SÍNTESE E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE MALEIMIDAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da  
Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes

**São José dos Campos, dezembro/2020**

# UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI

EDSON CONRADO LUZ

## SÍNTESE E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE MALEIMIDAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes**

Orientador

Mestrado em Engenharia Biomédica

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claire Juliana Francisco (externo)**

Universidade Nilton Lins

**Prof. Dr. Egberto Munin (interno)**

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro**

Coordenador

Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (Suplentes)**

Universidade Anhembi Morumbi

**São José dos Campos, dezembro/2020**

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade Anhembi Morumbi, do autor Edson Conrado Luz e do orientador Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes.

## EDSON CONRADO LUZ

Bacharel em Ciências Químicas pela Faculdade de Ciências e Letras de São Bernardo do Campo, com experiência em laboratórios didáticos da área de saúde e engenharia atuando como assistente dos professores e apoio aos trabalhos extracurriculares, TCCs junto aos docentes e discentes.

### Ficha Bibliográfica elaborada pela biblioteca UAM Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L995s Luz, Edson Conrado

Síntese e Atividade Farmacológica de Maleimidas /  
Edson Conrado Luz. – 2020.  
72f.: il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) –Universidade Anhembi  
Morumbi, São José dos Campos, 2020.

Bibliografia: f.61-65.

1. Engenharia Biomédica. 2. Farmacologia. 3 Maleimidas I.  
Título.

CDD 616.075

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus pelo dom da vida e por me permitir realizar tantos sonhos. Obrigado pelos erros, aprendizado, crescimento, por Sua infinita bondade e amor. Agradeço por nunca me deixar desistir ao longo deste caminho e por ter me dado uma família e amigos, que foram essenciais, me animando e torcendo por mim nesta jornada.

Ao Prof. Dr. Adjaci Uchôa Fernandes, pela orientação e profissionalismo. Muito obrigado por ter me corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar e por acreditar em mim.

A Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli e seus colaboradores do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras – UFLA, pela orientação e todo desenvolvimento da pesquisa na área microbiológica, a qual enriqueceu os meus conhecimentos.

Agradeço à minha esposa Andréa de Araujo Conrado Luz, familiares e amigos pela compreensão, amor e incentivo. Por serem privados da minha companhia e atenção. Obrigado pelo profundo apoio, me estimulando nos momentos mais difíceis. Sou grato pelo esforço que fizeram para que eu pudesse vencer cada obstáculo ao longo do caminho e pudesse chegar até aqui.

Agradeço especialmente aos meus queridos amigos Walter de Lima Filho e Tânia Marques, que foram essenciais ao longo desta caminhada e que oraram, incentivaram, apoiaram e aconselharam em muitos momentos de ansiedade e de luta interior. Foram usados por Deus para me ajudar a prosseguir e não desistir.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

“Vitória, sucesso não é o que você consegue no presente, mas é o que lhe sobrevém no futuro. O sucesso não é o que você conseguiu até agora. Sucesso é o que vai acontecer na sua vida quando acabar o presente.”

(Walter de Lima Filho, 2019)

## RESUMO

Estudos realizados anteriormente comprovaram que as imidas cíclicas e as suas subclasses apresentaram bons resultados nas atividades biológicas e potenciais terapêuticos, as quais citamos as antimicrobianas, analgésicas e antifúngicas, despertando o interesse da comunidade científica e da indústria farmacêutica, superando as expectativas em relação a certos medicamentos utilizados no mercado. Neste trabalho, foi realizado especificamente a síntese de uma das subclasses das imidas cíclicas denominada de maleimidas, pois são de fácil obtenção e com bons rendimentos, além de ser de fácil versatilidade na conjugação com outras moléculas. Os compostos sintetizados foram identificados por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , espectroscopia de massa e avaliação da atividade antimicrobiana. Concluiu-se que, com a obtenção desta plataforma de maleimidas com diferentes grupos funcionais, estas apresentaram resultados satisfatórios e com rendimentos dentro dos valores dos métodos já descritos em literatura. Concluiu-se também que, em trabalhos futuros, esses compostos possam ser conjugados com biomoléculas e fármacos.

**Palavras-chave:** Engenharia Biomédica. Maleimidas. Síntese. Caracterização. Atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

Previous studies have shown that cyclic imides and their subclasses have shown good results in biological activities and therapeutic potentials, which we cite as antimicrobial, analgesics and antifungal, arousing the interest of scientific community and the pharmaceutical industry, exceeding expectations in relation to certain medicines used on the market. In this work, the Synthesis of one of the subclasses of cyclic imides called maleimides was carried out specifically, as they are easy to obtain and have good yields, in addition to be being easy to combine with other molecules. The synthesized compounds were identified by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance, mass spectroscopy and evaluation of antimicrobial activity. It was concluded that, with the obtaining of this maleimide plataform with different functional groups, they presente satisfactory results and yields within the values of the methods already described in the literature. It was also concluded that, in future works, these compounds can be conjugated with biomolecules and drugs.

**Keywords:** Biomedical Engineering. Maleimides. Synthesis. Description. Antimicrobian activity.

## SUMÁRIO

Introdução.....	16
Objetivo Geral.....	17
Objetivo Específico.....	17
1. Métodos Inovadores Para Desenvolvimento de Novos Fármacos.....	17
1.1. Reação de Diels-Alder.....	19
2. Imidas Cíclicas.....	21
2.1. Métodos Sintéticos Gerais Para a Obtenção de Imidas Cíclicas.....	23
2.2. Propriedades Biológicas das Imidas Cíclicas.....	25
2.2.1. Atividade Antimicrobiana.....	27
2.2.2. Atividade Analgésica.....	28
2.2.3. Atividade Antitumoral.....	30
3. Maleimidas.....	31
3.1. Reações de Polimerização com Maleimidas.....	34
3.2. Precursores de Fotofármacos.....	37
3.3. Estruturas dos compostos obtidos a partir do Anidrido Maleico.....	39
4 Materiais e Métodos.....	40
4.1. Reagentes e solventes.....	40
4.2 Métodos.....	40
4.2.1. Sínteses das Maleimidas.....	40
4.3 Ensaio Biológico.....	41
4.3.1 Atividade Antimicrobiana.....	41
5 Resultados.....	42

5.1 Síntese.....	42
5.2 Caracterização Estrutural.....	43
Espectro de RMN <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> a 500 MHz P-fenilmaleimida.....	44
Espectro de RMN <sup>13</sup> C, em CDCl <sub>3</sub> a 125 MHz P-fenilmaleimida.....	45
Espectro de RMN <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> a 500 MHz P-metil acetato de fenilmaleimida.....	46
Espectro de RMN <sup>13</sup> C, em CDCl <sub>3</sub> a 125 MHz P-metil acetato de fenilmaleimida.....	47
Espectro de RMN <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> a 500 MHz P-butil-fenilmaleimida.....	48
Espectro de RMN <sup>13</sup> C, em CDCl <sub>3</sub> a 125 MHz P-butil fenilmaleimida.....	49
Espectro de RMN <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> a 500 MHz P-dodecil-fenilmaleimida.....	50
Espectro de RMN <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> a 500 MHz P-dimetilamina fenilmaleimida.....	51
Espectro de RMN <sup>13</sup> C, em CDCl <sub>3</sub> a 125 MHz P-dimetilamina fenilmaleimida.....	52
Espectro de RMN <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> a 500 MHz Octilmaleimida.....	53
Espectro de RMN <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> a 500 MHz Maleimida Coroa.....	54
Espectro de RMN <sup>13</sup> C, em CDCl <sub>3</sub> a 125 MHz Maleimida Coroa.....	55
5.3 Atividade Antimicrobiana.....	55
6 Discussão.....	57
7 Conclusão.....	59
8 Referências.....	61
Anexo1.....	66
Anexo 2.....	72

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura Geral das Imidas Cíclicas.....	22
Figura 2: Subclasses de Imidas Cíclicas: 1- Maleimidias, 2- Succinimidias, 3- Glutarimidias, 4- Ftalimidias, 5- Naftalimidias, R: Grupo Alquil, Aril e Outros.....	22
Figura 3: Inibição da Prostaglandina Endoperóxido Síntase.....	26
Figura 4: Estrutura Química da Filantimida.....	26
Figura 5: Estrutura Química da Talidomida.....	27
Figura 6: Estrutura Química da Buspirona (Glutarimida).....	29
Figura 7: Estrutura Química da Tiospirona (Glutarimida).....	29
Figura 8: Estrutura Química da Mitonafida.....	30
Figura 9: Estrutura Química da Amonafida.....	31
Figura 10: N-arilmaleimida, N-alkuilfenil-3, 4-Dicloromaleimida.....	33
Figura 11: N-fenetilmaleimidias.....	34
Figura 12: Composto com Antipirina Ligado Direto ao Anel Maleimídico.....	34
Figura 13: Materiais Poliméricos Contendo Maleimida (a) Polímeros Solúveis, (b) Revestimento de Nanopartículas, (c) Hidrogéis, (d) Revestimento de Superfície Planar.....	36
Figura 14: Mecanismo de Conversão de Grupos de Maleimidias em Radicais Livres.....	37
Figura 15: (3) Fenilmaleimida, (5) P-metil Acetato de Fenilmaleimida, (7) P-nitrofenilmaleimida, (9, 11, 13) P-butil-fenilmaleimida, (15) P-dimetilamina Fenilmaleimida, (17) Octilmaleimida, (19) Maleimida Coroa, (21) 4-tiol-fenilmaleimida.....	39
Figura 16: HALO DE INIBIÇÃO DA EPEC, PA, SA, LM.....	57

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema1: Metodologia mais comum empregada na formação das imidas cíclicas.....	23
Esquema 2: Formação de imidas cíclicas N-substituídas utilizando ácidos âmicos.....	24
Esquema 3: Formação de imidas cíclicas N-substituídas utilizando nitrílos e Dióis.....	25
Esquema 4: Rota de obtenção da Maleimida.....	31
Esquema 5: Composto formado através da adição do dimetilamina e substituição nucleófila do cloro.....	32
Esquema 6: Precursores fotofármacos.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade Antimicrobiana das maleimidas pelo método de difusão em ágar.....	56
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QSAR - Estrutura química e atividade biológica

QSPR - Estrutura química e propriedade físico-química

VS - Triagem biológica virtual

ADMET - Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

PM - Peso Molecular

CO - Óxido de carbono

CN - Nitreto de Carbono

DMSO - Dimetilsulfóxido

Ru - Rutênio

PGHS - Prostaglandina Endo Peróxido Síntase

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

CDCl<sub>3</sub> - Clorofórmio deuterado

TMS - tetrametilsilano

RMN <sup>1</sup>H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN <sup>13</sup>C - Ressonância magnética nuclear de carbono

PDT - Terapia fotodinâmica

UFLA - Universidade Federal de Lavras

Mm - milímetro

ATCC - American Type Culture Collection

EPEC – *Escherichia coli enteropatogênica*

PA – *Pseudomonas aureginosas*

SA – *Staphylococcus aureus*

LM – *Listéria monocytogenes*

## INTRODUÇÃO

Entende-se que saúde é um conjunto de ações, hábitos e condições que proporcionam bem-estar e qualidade de vida ao ser humano. Neste contexto é que surgiu a engenharia biomédica, após a Segunda Guerra Mundial. No início, a engenharia biomédica estava voltada a estudos de sistemas biológicos complexos e reabilitação dos soldados. Com o avanço crescente da tecnologia, ela foi direcionada para o desenvolvimento de dispositivos médicos. Por isso, a medicina se beneficiou grandemente dessas inovações tecnológicas. Pelo fato de ser um ramo interdisciplinar, a engenharia biomédica tem contribuído para a identificação, necessidades e resoluções dos problemas na saúde, utilizando a tecnologia existente e a metodologia de sistemas, com o intuito de prover serviços de saúde de qualidade e desenvolver novas tecnologias. A engenharia biomédica abrange o desenvolvimento de novos equipamentos destinados a saúde, metodologias de tratamento, e desenvolvimento de novas drogas para tratamento e diagnósticos. Neste contexto, a química tem contribuído com estas transformações. As sínteses têm contribuído com a obtenção de novas moléculas, que são designados princípios ativos de novos fármacos, cujas atividades biológicas possibilitam o tratamento e cura de novas patologias ou substituição das que já existem, com menor custo e adversidade nos seus efeitos <sup>[1]</sup>. A construção de moléculas orgânicas envolve cadeias lineares (alquílicas) e cíclicas (arílicas), assim como a presença de outros elementos (heteroátomos). Com muita frequência, temos a presença de estruturas heterocíclicas. A presença de um heteroátomo, como nitrogênio, traz mudanças na estrutura da molécula cíclica, devido à diferença de eletronegatividade em relação ao carbono e da disponibilidade de pares de elétrons não compartilhados do heteroátomo e carbono <sup>[2]</sup> e melhorias nas atividades anti-inflamatórias e antitumorais. Devido a sua estrutura heterocíclica, as imidas cíclicas são de grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos, pois são de fácil obtenção e versatilidade <sup>[1]</sup>, enfatizando a importância das imidas cíclicas para o desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos.

## OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é obter uma plataforma de maleimidias com diferentes grupos funcionais (R) e caracterização estrutural destes compostos e testar a atividade biológica.

## OBJETIVO ESPECÍFICO

- Sintetizar as maleimidias com as suas aminas correspondentes
- Purificar estes compostos em cromatografia de coluna
- Efetuar a caracterização estrutural através de espectroscopia de massa, espectroscopia de ressonância magnética de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$
- Avaliar a atividade biológica antimicrobiana.

## 1. MÉTODOS INOVADORES PARA DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Com o intuito de aperfeiçoar o desenvolvimento de substâncias biologicamente ativas, utiliza-se processos químicos que implicam em modificações moleculares, dependendo dos grupos reativos para que essas modificações sejam realizadas. Inicialmente, procura-se inserir grupos que apresentem alterações na hidrofobicidade da substância ou em seus grupos doadores/ e ou aceptores de elétrons que possibilitem a aplicação de algum método qualitativo e quantitativo correlacionado com a estrutura química e a atividade biológica [3], possibilitando a verificação da interação entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR) ou da estrutura química e alguma propriedade físico-química (QSPR) e os seus efeitos, os quais podem causar em uma substância (ligante) durante esta interação com o receptor biológico, justificando os fatores principais desta interação [4].

A substituição de um átomo de hidrogênio por um determinado substituinte (grupo alquila, grupo nitro, grupo ciano, grupo carboxilato, halogênio etc.) pode modificar profundamente a potência, duração e ainda a natureza do efeito farmacológico da molécula. Os estudos de correlação estrutura-atividade, fundamentados no efeito substituinte em um determinado anel aromático, são muito comuns na química medicinal, uma vez que 50% dos fármacos ou substâncias bioativas possuem este tipo de anel. As introduções de substituintes produzem modificações que podem atingir as propriedades físico-químicas da molécula, como a hidrofobicidade, a densidade eletrônica e a conformação estrutural, podendo orientar para novas sínteses. Um planejamento racional de fármacos permite estabelecer um grupo de substâncias-teste para a realização de uma análise quantitativa da relação estrutura-atividade [5].

Várias estratégias foram desenvolvidas para se obter uma melhor compreensão dos mais diversos parâmetros físico-químicos em uma pequena série de substâncias ou grupo de teste, as quais citamos os métodos de Hansch [6], Craig [7], Topliss [8], e o método modificado de Topliss [9].

Em particular o método manual de Topliss, também conhecido como Árvore de Decisão de Topliss, baseia-se na equação de Hansch [8]. Este método utiliza-se de uma chave para selecionar o análogo a ser sintetizado e este análogo específico tem a sua atividade comparada ao que precede a chave permitindo uma redução no número de compostos a serem sintetizados. A árvore de decisão de Topliss apresenta limitações, pois exige que o composto protótipo tenha um anel aromático não fusionado, o qual deve ser adicionado o substituinte da chave. Este método de correlação entre a estrutura química e atividade biológica tem como objetivo uma síntese mais reacional e precisa, possibilitando bons resultados com mais rapidez. Analisando e comparando os resultados da atividade biológica com a estrutura química, pode-se obter substâncias mais potentes devido às modificações estruturais iniciais.

A técnica de triagem biológica virtual (VS-virtual screening) é uma estratégia moderna utilizada para correlacionar a atividade biológica dos receptores das moléculas, que também são conhecidos como “*in silico*”, e é muito utilizada na avaliação dos parâmetros relacionados

aos problemas nas fases de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) [10].

Utiliza o método “*in silico*” a regra de Lipinski, (Lipinski rule) ou “regra dos cinco” (rule of five) [11]. Este método apresenta parâmetros incluídos na “regra dos 5” de Lipinski, os quais são utilizados na filtragem e seleção das substâncias que possuam as seguintes características de fármacos:

- Peso molecular (PM) não deve exceder a 500 g/mol
- Log P (valor limite é 5)
- Grupos doadores de hidrogênio (valor limite é 5)
- Grupos aceptores de hidrogênio (valor limite 10).

Esta análise é de grande importância para se planejar um fármaco, principalmente os de via oral. Os resultados obtidos podem prever as influências moleculares e estruturais de um fármaco quando absorvido em uma substância.

## 1.1 REAÇÃO DE DIELS-ALDER

A reação de Diels-Alder é um dos mais importantes processos para se formar um novo anel a partir de duas moléculas reagentes pois é muito versátil e aplicável [12, 13].

Nesta reação ocorre através de um dieno (1) reagindo com um dienófilo (2), que pode possuir uma ligação dupla ou tripla, formando um aduto (3), o qual possui um anel de seis membros, sendo carboxílico ou heterocíclico, com formação através da efetivação de duas novas ligações  $\sigma$  (vindas do consumo de duas ligações  $\pi$ ) no decorrer do rearranjo espacial cíclico, as ligações ocorrem de forma concertada tanto as de formação como as ligações que são rompidas [14].

No mecanismo concertado, requer um estado de transição simples, sem nenhum intermediário para conduzir a reação entre os reagentes e o aduto [15,16].

Em química orgânica, a reação de Diels-Alder é uma reação pericíclica que tem como característica a ocorrência em uma etapa simples sem intermediários, envolvendo o rearranjo de elétrons ligantes [14].

As reações de Diels-Alder inter-ou-intramoleculares são muito utilizadas na síntese orgânica e a maioria ocorre facilmente em temperatura ambiente ou ligeiramente acima. Nas reações mais demoradas, com reagentes termicamente instáveis ou que produzem produtos instáveis, podem ser aceleradas através de catalisadores ou submetidas altas pressões [17].

Muitas reações de Diels-Alder envolvem dienos substituídos por grupos eletrodoadores (alquil., alcóxi) e dienófilos que tenham substituintes que são eletrossacadores (CO, CN). Temos ainda algumas reações envolvendo dienófilos ricos em elétrons com dienos eletrodeficientes. Essas reações são denominadas de eletrônica inversa e são importantes e úteis na síntese orgânica [15,16].

Por ser de grande versatilidade, a reação de Diels-Alder é muito utilizada devido a sua alta régio e estéreo-seletividade e apresenta uma grande variedade de dienos e dienófilos, contendo diferentes tipos de grupos funcionais, podendo ser usada e formando tipos diferentes de estruturas cíclicas. Em uma ciclização (fechamento do anel), nem todos os átomos envolvidos precisam ser de carbono, já que todos os tipos de anéis carbocíclico ou heterocíclico podem ser formados na reação. Com muita frequência, a reação pode teoricamente formar produtos com estrutura isomérica e estereoisomérica. Os adutos de Diels-Alder são isolados em uma forma isomérica ou em uma forma proporcionalmente predominante [14,15,16].

Um dos fatores mais importante das reações de Diels-Alder é a sua aplicação na síntese de produtos naturais complexos. Em uma reação entre um dieno e um dienófilo podem ser formados mais de quatro centros quirais novos e vê-se com mais frequência que um dos vários racematos possíveis são formados em quantidade predominante ou exclusiva [16]. O arranjo espacial do principal produto pode ser previsto baseada em duas regras:

Regra CIS: Estabelece que o arranjo espacial dos átomos dos grupos substituintes no dieno e dienófilo mantêm-se no produto de cicloadição.

Regra ENDO: Afirma que o dieno e o dienófilo arranjam-se em planos paralelos havendo a máxima possibilidade de sobreposição orbital [16].

## 2. IMIDAS CÍCLICAS

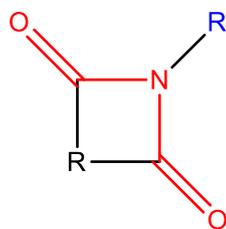
A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com grandes potenciais terapêuticos intensificou o processo de geração de novos conhecimentos científicos e tecnológicos nos setores de pesquisa, a fim de se obter resultados excelentes e relevantes experimentalmente, determinando uma notável elevação da quantidade e qualidade dos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico, onde a maioria é de origem natural [18,19,20].

A síntese orgânica tem sido um grande aliado junto à comunidade científica, ocasionando um crescimento significativo de novas moléculas, com resultados promissores nos efeitos biológicos e no avanço dos estudos pré-clínicos e clínicos, dentre as quais destacam-se as imidas cíclicas [1].

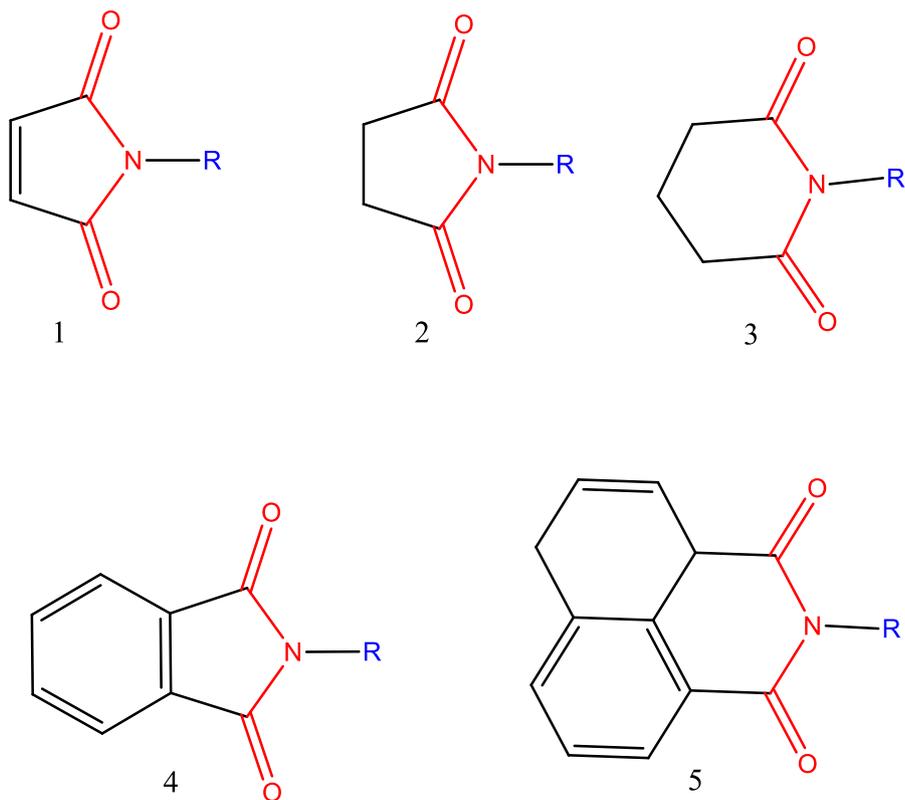
Imidas cíclicas são compostos que apresentam o grupo  $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})$  (**Fig. 1**), onde R pode ser um átomo de hidrogênio, um grupo alquila ou arila ligados a uma cadeia carbônica. As imidas cíclicas são divididas em classes (**Fig. 2**):

- (a) Maleimidas (1)
- (b) Succinimidas (2)
- (c) Glutarimidas (3)
- (d) Ftalimidas (4)
- (e) Naftalimidas (5),

E seus derivados [1].



**Figura 1:** Estrutura Geral das Imidas Cíclicas

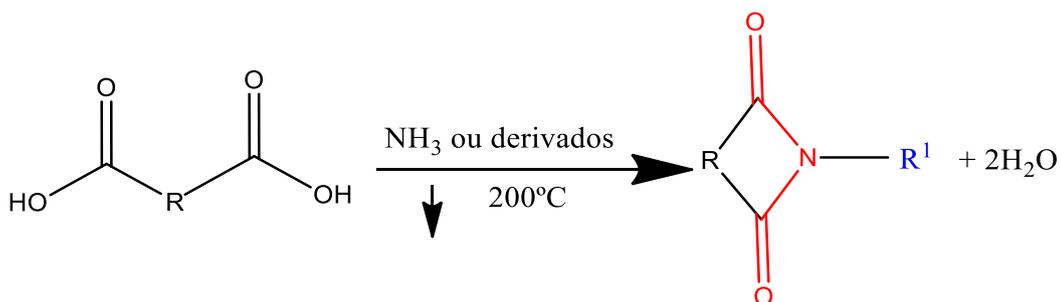


**Figura 2:** Subclasses de Imidas Cíclicas: 1- Maleimidas, 2- Succinimidas, 3- Glutarimidas, 4- Ftalimidas, 5- Naftalimidas, R: Grupo Alquil, Aril e Outros

Estes compostos são de natureza hidrofóbica com solubilidade em acetona e em estudos biológicos solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO) [21]. Há muitos métodos sintéticos de obtenção de imidas cíclicas descritas [21] sendo muito utilizadas com pequenas modificações.

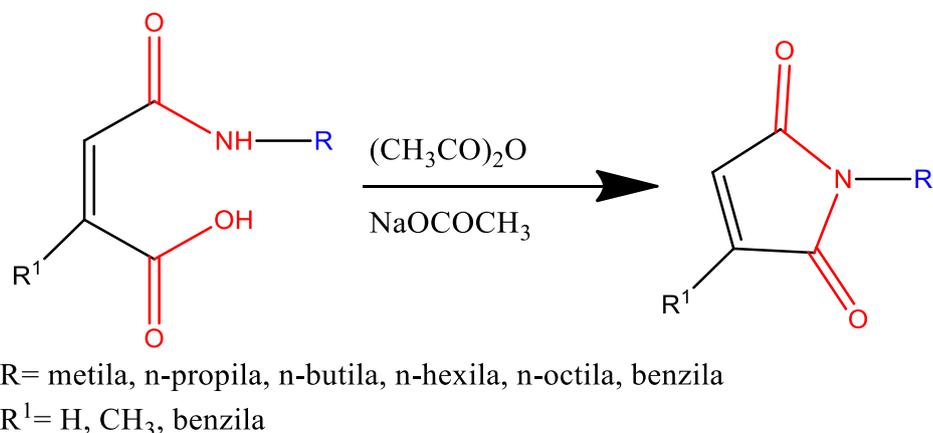
## 2.1 MÉTODOS SINTÉTICOS GERAIS PARA A OBTENÇÃO DE IMIDAS CÍCLICAS

Na literatura são descritos inúmeros métodos de preparação das imidas alifáticas simples [21]. Outros métodos aplicáveis para a obtenção das imidas cíclicas e aromáticas são aqueles em que o sistema anelar é conduzido a metodologias especiais de obtenção [1,21]. Citamos como método mais conveniente a utilização de ácidos dicarboxílicos em uma quantidade equimolar de amônia ou um derivado que possa produzir ou substituir a amônia, como as aminas, sob temperatura variando entre 150 até 200° C no máximo (**Esq. 1**), obtendo-se bons rendimentos (60-70%) quando utilizamos anidridos de ácidos na obtenção destas imidas cíclicas N-substituídas [21].



**Esquema1:** Metodologia mais comum empregada na formação das imidas cíclicas

Pode-se obter também as imidas cíclicas N-substituídas utilizando os ácidos âmicos, que são ciclizados na presença de anidrido acético e acetato de sódio anidro, formando maleimidas e citraconamidas com rendimentos de 50-70% (**Esq. 2**) [22].

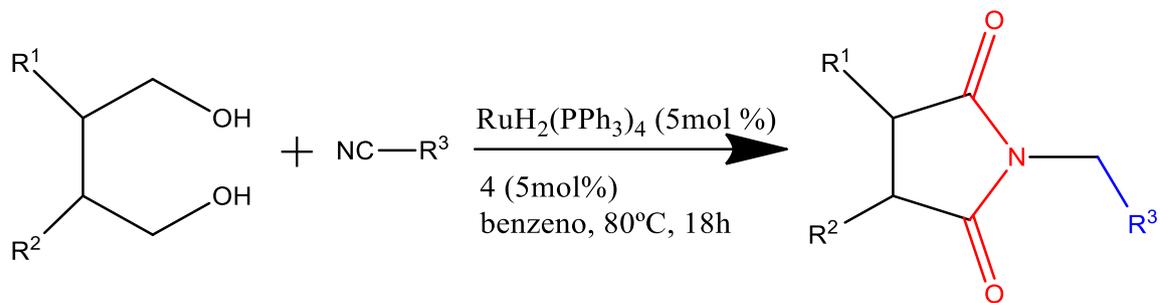


**Esquema 2:** Formação de imidas cíclicas N-substituídas utilizando ácidos âmicos

Outras metodologias foram desenvolvidas apresentando bons rendimentos as quais são muito utilizados, que consiste na reação de anidridos de ácidos dicarboxílicos dissolvidos em éter, tratados com amônias ou aminas substituídas, no qual temos a obtenção do ácido âmico, o qual é ciclizado através da reação do anidrido acético, sob aquecimento na presença de acetato de sódio anidro [1].

Em relação a preparação das imidas cíclicas e algumas de suas subclasses (maleimidas, succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas), deve-se que considerar as suas particularidades. Assim, estas subclasses são sintetizadas por diferentes metodologias com pequenas modificações, como mudança de alguns reagentes desidratante ou solventes [1].

Em 2014, foi publicado um protocolo para a síntese de imidas cíclicas a partir nitrílos e dióis que se encontram facilmente disponíveis. Esta síntese (**Esq. 3**) é realizada através da reação de transferência do hidrogênio Ru-catalisada, onde os substratos de dióis e nitrílos são ativados em lactonas e aminas reduzidas e neutras, obtendo-se as imidas cíclicas correspondentes e tendo o gás hidrogênio como um único subproduto [23].

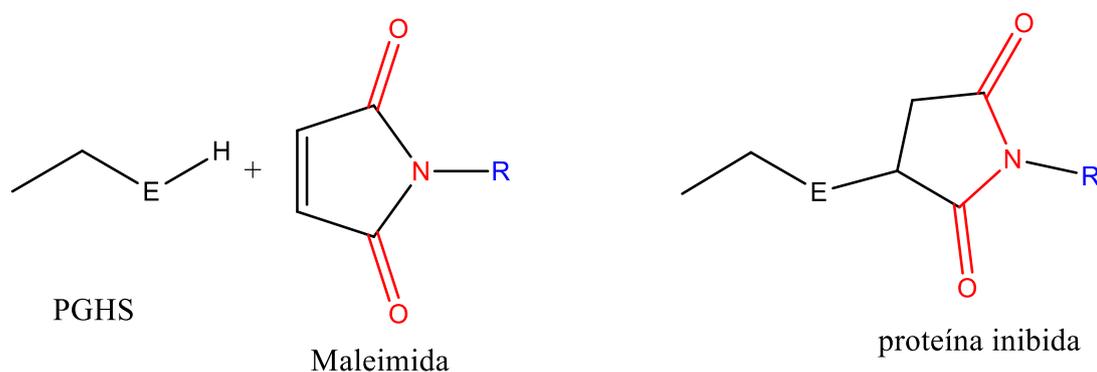


**Esquema 3:** Formação de imidas cíclicas N-substituídas utilizando nitrílos e dióis

Por essas razões, os estudos das imidas cíclicas têm mostrado grande progresso, pois são de fáceis obtenção, com rendimentos favoráveis e suas rotas sintéticas bem executadas, apresentando bons resultados nos estudos químicos e biológicos devido à versatilidade de incorporar qualquer grupo R na imida, desde que se reaja uma amina primária com um grupo desejado.

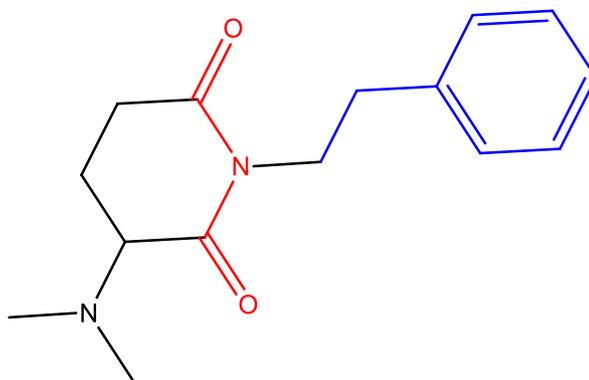
## 2.2 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS IMIDAS CÍCLICAS

As imidas cíclicas são inibidoras de PGHS (**Prostaglandina Endo Peróxido Síntase**) e isto ocorre por causa da ligação ao carbono olifínico (maleimidias) ou ao carbono carbonílico do anel imídico<sup>[24]</sup> (succinimidias e naftalimidias). Kalgutkar e colaboradores<sup>[24]</sup> realizaram estudos das maleimidias e succinimidias nesta enzima e sugeriram que a inibição era o resultado de uma ligação covalente com a proteína. Verificou-se que, com a variação do tamanho da cadeia alquílica das maleimidias, alterava também a velocidade, mas não a capacidade de inibição da enzima, ocorrendo uma interação não covalente com a argenina com carga positiva, proporcionando um posicionamento adequado ao fármaco. Após esta interação, ocorre a interação covalente do anel imídico e tirosina através da substituição nucleófila. **(Fig.3)**



**Figura 3:** Inibição da Prostaglandina Endoperóxido Sintase

Com a descoberta do alcalóide natural Filantimida (**Fig. 4**), isolada das partes aéreas do *Phyllanthus sellowianus* [25] composto derivado da glutarimida apresentando efeito moderado antimicrobiano [26], antiespasmódico [27] e analgésico [28], sendo utilizado como protótipo nas sínteses de compostos semelhantes, apresentando uma variedade de efeitos biológicos.

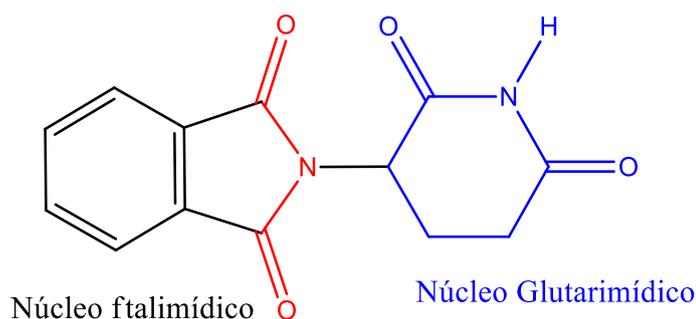


**Figura 4:** Estrutura Química da Filantimida

A relação do tamanho e a natureza dos grupos constituintes do anel imídico parecem estar relacionados com os efeitos farmacológicos, ocasionando numa possível mudança de suas propriedades estéricas e, conseqüentemente, também a sua atividade [1,29,30] podendo ser

utilizadas na síntese de moléculas com potenciais farmacológicos, como: atividade ansiolítica e antidepressiva, analgésico, antiangiogênicos, antineoplásico, anti-inflamatório, antibiótico etc. [1]

Para exemplificar, citamos o caso da Talidomida (**Fig. 5**), que tem um núcleo ftalimídico e um núcleo glutarimídico. Mesmo com efeitos danosos e adversos (forte teratogenicidade), foi liberado para uso terapêutico no tratamento de hanseníase, mieloma múltiplos, doenças crônicas degenerativas e algumas doenças oportunistas<sup>[31]</sup> as quais afetam portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os efeitos benéficos e promissores descritos tornam a Talidomida uma molécula líder para o desenvolvimento de futuros fármacos <sup>[32]</sup>.



**Figura 5:** Estrutura Química da Talidomida

Muitos derivados imídicos, como as succinimidas, glutarimidas e maleimidas apresentam importantes atividades biológicas, tanto no tratamento de infecções decorrentes de parasitas e bactérias (tuberculose), bem como no tratamento de convulsões e epilepsias <sup>[21]</sup>.

### 2.2.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As imidas cíclicas e suas subclasses apresentam efeitos biológicos de grande importância, a qual citamos a maleimida como o principal representante nas atividades antifúngica, antibacteriana e inseticida <sup>[1]</sup>.

Maleimidas, citraconimidas, 3-piperidinosuccinimidas, 3-morfolinosuccinimidas e seus derivados sulfonados apresentaram inibição nas estruturas de bactérias pelo método de infusão em ágar [33]. A N-(p-N', N'-dimetilsulfamoilfenil) -3-morfolinosuccinimida e a N-(p-N'-fenilsulfamoilbenzil) citraconimida foram avaliadas com diferentes fungos e apresentaram uma ativação principalmente contra *Candida albicans*, *Candida neoformans* e *Microsporum gypseum* na concentração de 6,3µg/ml e *Aspergillus flavus*, *Microsporum canis* e *Aspergillus parasiticus* na concentração de 25 µg/ml. Em geral, observou-se que, com a introdução do grupo sulfamoil (formação da sulfonamida), têm-se um aumento na atividade biológica e que, com a presença de grupos eletrodadores (metoxi ou dimetilamino), têm-se um aumento da atividade antimicrobiana. As densidades eletrônicas destes compostos podem estar relacionadas com a atividade antimicrobiana, pois segundo Rang et al. (2016) [34] estes efeitos poderiam ser dipolo, onde as estruturas ressonantes facilitam a interação fármaco-microorganismo sendo eficiente, pois a estrutura molecular da superfície da célula é muito polar.

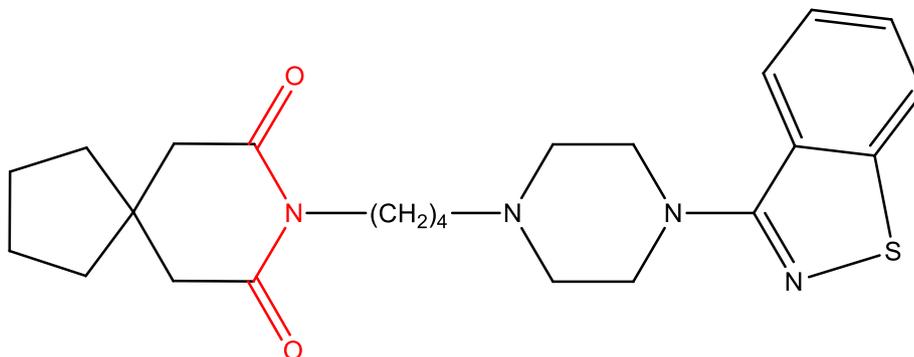
Algumas moléculas podem sofrer transformações “*in vivo*”, a derivados ativos, como o exemplo de sulfonamidas que efetua a ação bacteriostática resultante da sulfanilamida, seu metabólico ativo [35] e é considerada como um pró-fármaco.

### 2.2.2 ATIVIDADE ANALGÉSICA

Muitos estudos vêm demonstrando os efeitos analgésicos e anticonvulsivantes das imidas cíclicas e seus derivados [1].

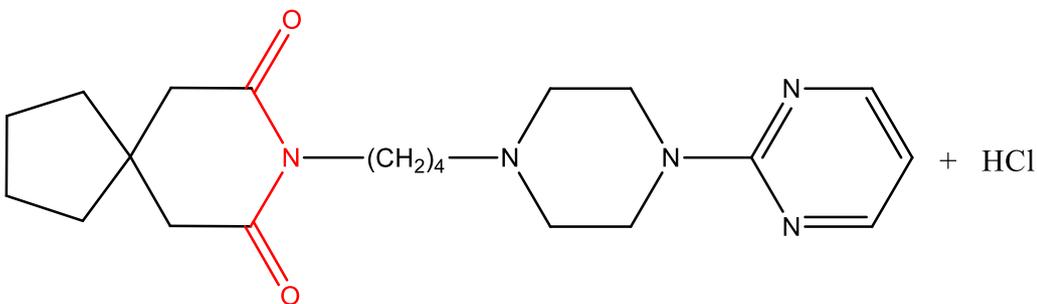
Os derivados da fenilsuccinimida e N-aminofenilsuccinimida comprovaram que tem forte ação anticonvulsivante e proteção no combate do derrame cerebral induzido por choques elétricos [36]. Lange et al, (1991)[37] observaram que o fragmento C-O-NR'-CO- das succinimidas, muito comum nos barbituratos e fármacos anticonvulsivantes, pode ser responsável pela ação convulsionante desses compostos.

Um importante efeito sobre o sistema nervoso central foi apresentado pelas glutarimidas devido a uma pequena alteração na molécula que pode atuar como um agente convulsivo ou depressivo [38]. Uma glutarimida, a buspirona (**Fig.6**), apresentou uma atividade ansiolítica equivalente ao diazepam [39].



**Figura 6:** Estrutura Química da Buspirona (Glutarimida)

As glutarimidas têm sido investigadas como um agente antipsicótico e houve uma redução nos efeitos colaterais e forte efeito antagonista serotoninérgico [40] em relação ao tiospirona (**Fig.7**) já utilizada na terapêutica.



**Figura 7:** Estrutura Química da Tiospirona (Glutarimida)

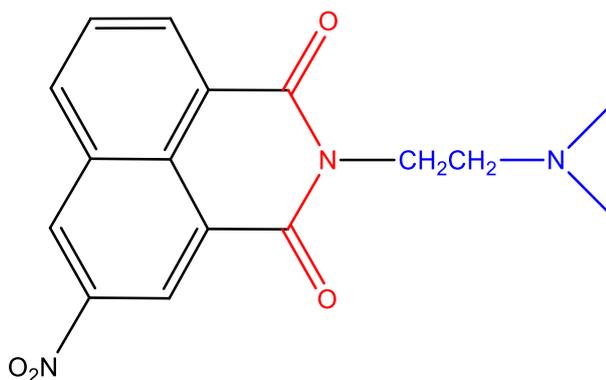
### 2.2.3 ATIVIDADE ANTITUMORAL

Muitas imidas cíclicas são reconhecidas por sua ação quimioterápica antitumoral [1]. A naftalimida apresenta atividade citostática e são utilizadas no tratamento oncológico.

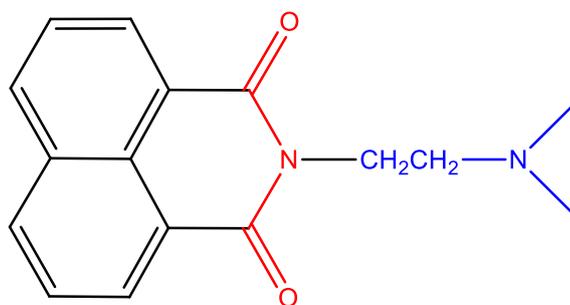
Zheng et al. (2000) [41] realizou um estudo comparativo entre 3-(alquiloetil) -3-divinilprupurina-18-N-hexilimidias com éster e amidas funcionais para investigar a seletividade tumoral e a eficácia fotossensibilizante *in vivo*. Este composto, como metil éster, teve um excelente efeito na redução do tumor.

Alguns derivados da talidomida apresentaram efeitos inibitórios sobre TNF $\alpha$  em pacientes com AIDS na produção do fator necrose tumoral- $\alpha$  nestes pacientes [42] e ativo contra o mieloma avançado [43]. Devido a esses efeitos e outros já observados, colocam a talidomida como uma molécula promissora para o desenvolvimento de novos fármacos [44,45], mesmo conhecendo os efeitos tóxicos apresentados por esta molécula, devido a um dos seus enantiômeros.

Na literatura, encontram-se estudos de outras imidas cíclicas, as quais citamos a mitonafida, a amonafida (**Fig.8 e Fig.9**) e seus derivados, que apresentaram uma atividade antitumoral em diversos tipos de tumores, como as leucemias, melanomas e tumores da mama [46,47], e os derivados ftalimídicos tricíclicos despontam como promissores no combate ao vírus HIV, pois foram desenvolvidos como novos inibidores do HIV-1 integrase, uma enzima essencial para a replicação viral [48].



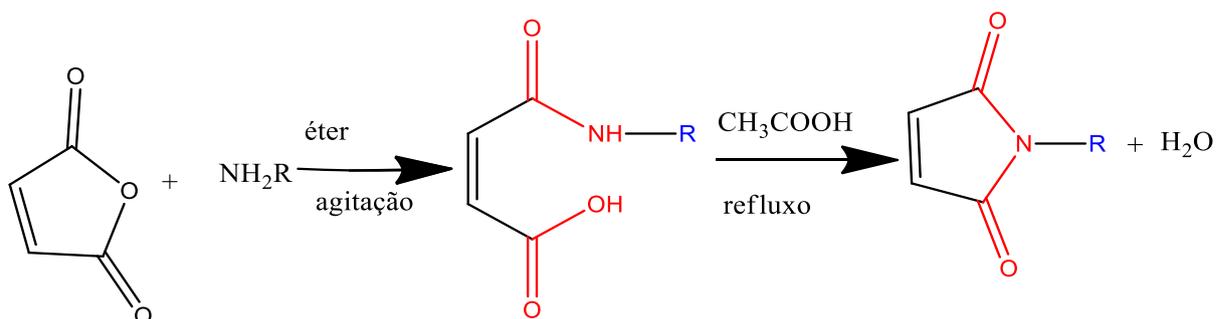
**Figura 8:** Estrutura Química da Mitonafida



**Figura 9:** Estrutura Química da Amonafida

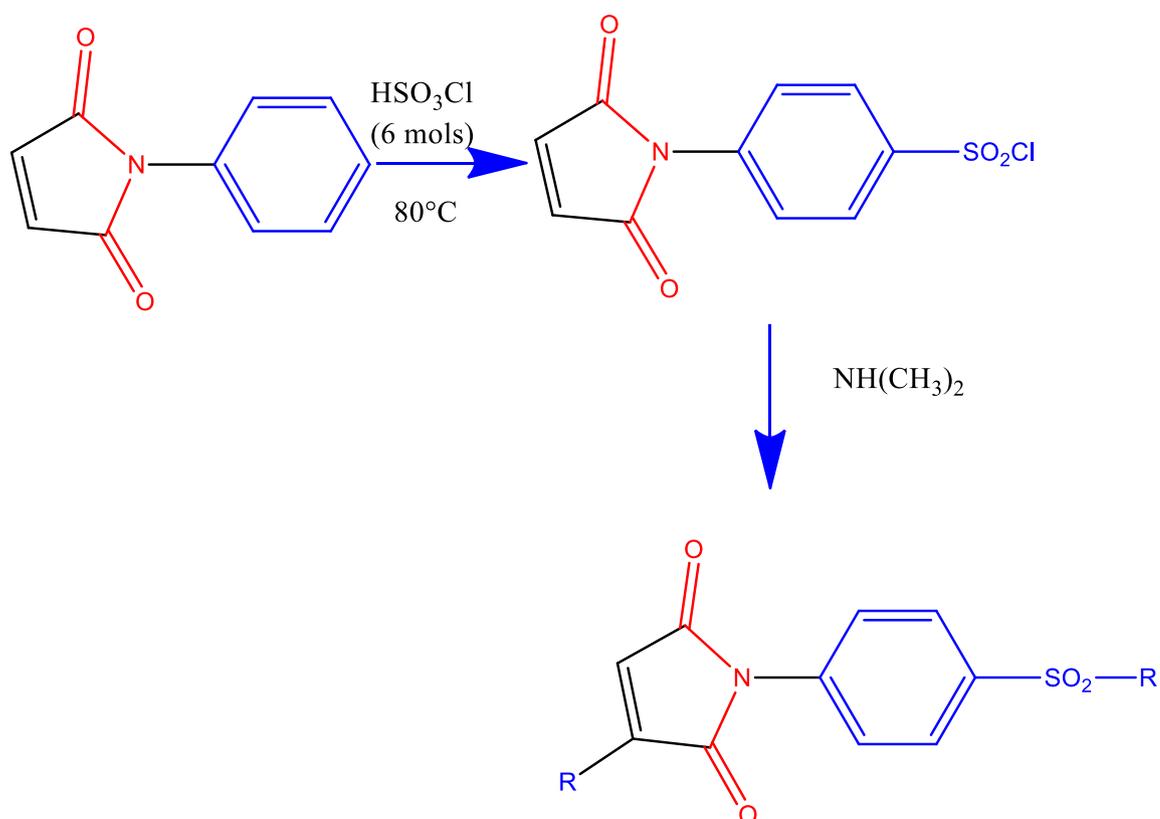
### 3. MALEIMIDAS

Hargreaves <sup>[21]</sup> mencionou muitas metodologias de obtenção das maleimidas, mas o método mais apropriado e versátil é a síntese destes compostos representados (**Esq. 4**). O anidrido maleico reage com a amina apropriada para a transformação do respectivo ácido maleâmico, que é ciclizado facilmente usando agentes desidratantes de fácil acesso, por exemplo, o ácido acético, anidrido acético, acetato de sódio anidro, entre outros, sob aquecimento, permitindo o uso de diferentes aminas, como as anilinas substituídas, obtendo-se derivados maleimídicos N-substituídos com bons rendimentos <sup>[1]</sup>.



**Esquema 4:** rota de obtenção da Maleimida

A N-fenilmaleimida, como outros substratos, têm um grande potencial farmacológico [28]. A N-fenilmaleimida reage com o ácido clorossulfônico em aquecimento, obtendo-se o cloreto de sulfonila e através deste composto obtêm-se diferentes sulfonamidas através de reações com aminas apropriadas, que são introduzidas na dupla ligação imídica.

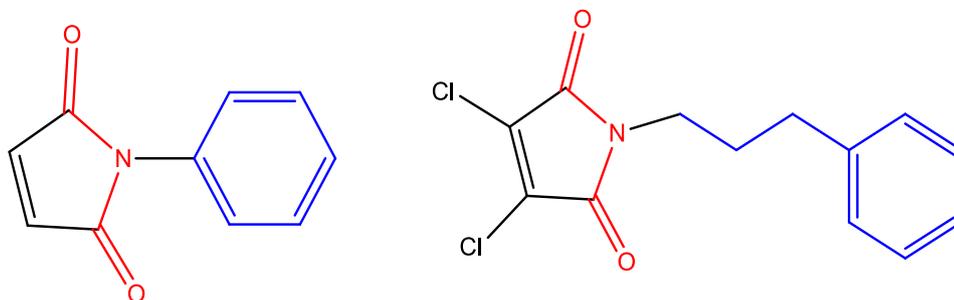


**Esquema 5:** Composto formado através da adição do dimetilamina e substituição nucleófila do cloro

Durante muitos anos, Hargreaves [21] e colaboradores estudavam os efeitos biológicos das maleimidas, as quais destacamos os efeitos antifúngico, antibacteriano e inseticida. Verificou-se que as maleimidas tem uma atividade antifúngica de maior efetividade em relação as succinimidas, comprovando a importância da dupla ligação imídica [49].

As N-alquilarilmaleimidias apresentaram atividades contra algumas bactérias patogênicas aos seres humanos, como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, que são encontradas com frequência em infecções do trato urinário ou intestinal. Também apresentaram atividade contra fungos leveduriformes e miscelais, causadores de micoses em humanos, como *Microsporum canis*, *Candida albicans*, *Penicilium* etc. [28],<sup>50]</sup>, enquanto as N-alquilarilmaleimidias substituídas apresentaram pouca variação nas atividades em relação as não substituídas, sugerindo que fatores estéricos foram os principais interferentes.

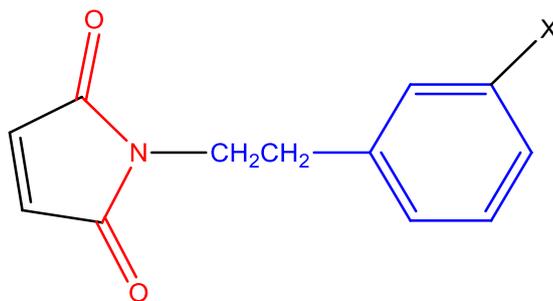
Os N-arilmaleimidias e N-alquilfenil-3, 4-dicloromaleimidias (**Fig. 10**) foram testados contra diferentes microorganismos e observou-se que alguns compostos apresentaram resultados inibitórios maior que o cetoconazol. Com a introdução de dois átomos de cloro na dupla ligação do anel imídico, não apresentou um aumento significativo do efeito inibitório da atividade antifúngica, mas um importante fator relacionado a esta atividade é a distância entre o anel aromático e o anel imídico destes compostos [50].



**Figura 10:** N-arilmaleimida, N-alquilfenil-3, 4-Dicloromaleimida

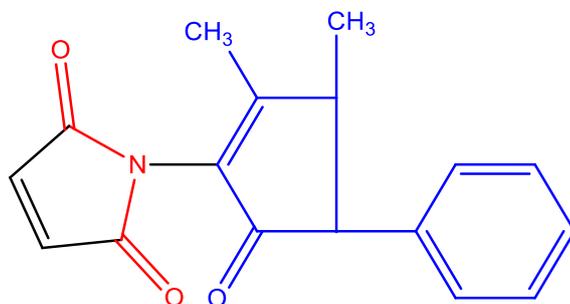
Foram também testados em diversos modelos *in vivo* e *in vitro* a atividade analgésica e antipasmódica com resultados satisfatórios [28]. O aumento da atividade analgésica pode ser explicado por causa da introdução de elétrons doadores no anel aromático do N-fenetilmaleimida (**Fig. 11**), os quais citamos 4-OCH<sub>3</sub>, 3,4-(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e 4-CH. Temos a diminuição

desta atividade quando se introduz o 4-Cl, um elétron-retirador, observando-se que os parâmetros eletrônicos devem estar envolvidos na atividade e que os elétrons-doadores aumentam a atividade analgésica<sup>[1]</sup>.



**Figura 11:** N-fenetilmaleimidás

Experimentos realizados contendo a antipirina ligada ao anel maleimídico resultou num aumento da atividade analgésico até em 50 vezes do que em certos fármacos. Porém, todos os animais foram a óbito, sugerindo uma alta toxicidade do composto (**Fig. 12**)<sup>[51]</sup>.



**Figura 12:** Composto com Antipirina Ligado Direto ao Anel Maleimídico

### 3.1 REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO COM MALEIMIDAS

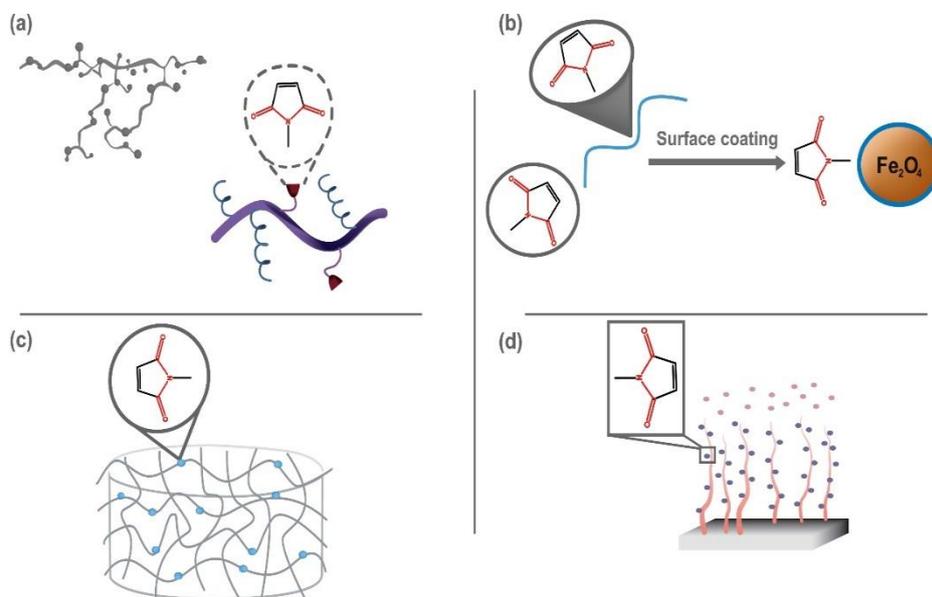
Os polímeros tornaram-se indispensáveis em diversas aplicações nos materiais e ciências biomédicas. Requer-se para estas aplicações uma modificação fácil e eficaz do

polímero com pequenas moléculas ligantes ou biomoléculas, as quais citamos os peptídeos, oligonucleotídeos e anticorpos. Esta capacidade de conjugar moléculas bioativas é importante para áreas como biossensibilização, distribuição direcionada de fármacos e engenharia de tecidos, sendo que uma ligação eficaz sob condições brandas e benignas do material polimérico com a biomolécula é essencial para estas modificações. É de suma importância que o polímero e a molécula de interesse suportem grupos reativos complementares, o qual exemplificamos um polímero com vários ésteres ativados, que provavelmente é ligado com facilidade a um peptídeo de grupo amina reativo. Temos grupos funcionais que não estão presentes em vários números, mas fornecem alças atraentes. Os grupos funcionais tiol estão presentes em sua forma reativa livre em números menores ou podem ser integrados através de modificações genéticas ou sintéticas em biomoléculas, sendo muito empregado para sintetizar e funcionalizar materiais poliméricos.

Em uma pesquisa realizada, revelou-se que as reações de conjugação do tipo tiol-Michael foram empregadas em biomoléculas pequenas e macromoléculas [52].

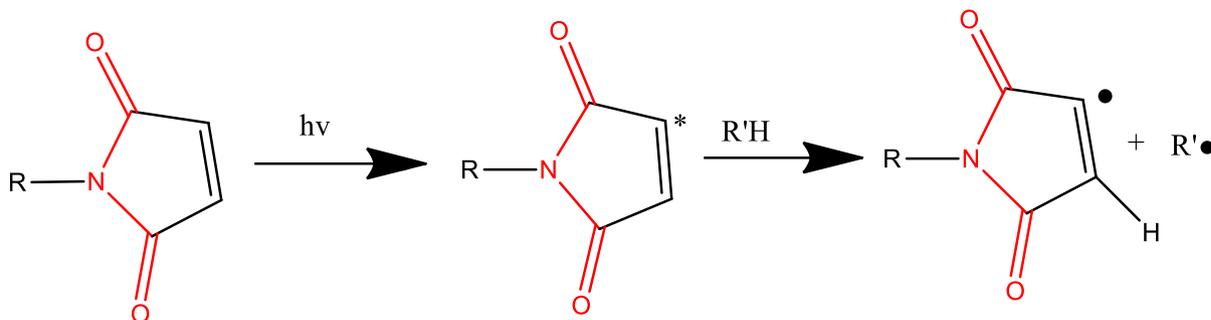
Esta conjugação ocorre devido as moléculas de tiol da maleimida ter uma grande deficiência em elétron, que por muitas vezes realiza-se sem uso de catalisadores ou iniciação térmica ou fotoquímica. O grupo maleimida também apresenta deficiência de elétrons reativos em relação aos dienos através da reação de cicloadição de Diels-Alder.

Um processo usualmente utilizado na síntese de materiais poliméricos que contenham grupos reativos é a utilização de um monômero reativo na etapa de polimerização [53]. Apesar de que neste processo trabalha-se com uma vasta variedade de monômeros reativos, ocorre-se falha em casos de monômeros contendo maleimida, uma vez que a dupla ligação da maleimida é muito reativa com radicais e núcleos resultantes em estruturas reticuladas ou ramificadas [54]. Muitos grupos de pesquisa adotaram a metodologia de pesquisa a qual envolve a proteção da maleimida durante o processo de polimerização e em seguida a sua ativação na forma reativa. Este processo tem como base a proteção-desproteção da maleimida e apareceu como uma metodologia de grande importância na síntese destes polímeros solúveis contendo maleimida, hidrogéis e revestimentos de superfícies planar e nanopartículas (**Fig.13**).



**Figura 13:** Materiais Poliméricos Contendo Maleimida (a) Polímeros Solúveis, (b) Revestimento de Nanopartículas, (c) Hidrogéis, (d) Revestimento de Superfície Planar

O grupo maleimida também tem como forte característica ser elétron-aceptor devido as duas carbonilas ligadas no sistema insaturado (C=C), favorecendo na atuação de fotopolimerização como iniciador <sup>[55,56]</sup>. Estes grupos maleimidados, quando expostos a radiação UV, sofrem transições para o estado excitado, iniciando a polimerização através do processo de isolamento dos átomos de hidrogênio. A presença destes átomos como doadores é de grande importância para o início da polimerização, e através da reação de transferência de elétrons/prótons são produzidos dois radicais: um radical succinimida e outro doador de átomos de hidrogênio. Na ausência deste radical doador de hidrogênio, este processo pode ocorrer via intramolecular <sup>[57,58]</sup>. **(Fig.14)**



**Figura 14:** Mecanismo de Conversão de Grupos de Maleimidas em Radicais Livres

### 3.2 PRECURSORES DE FOTOFÁRMACOS

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma técnica para o tratamento do câncer e outras doenças com base na foto oxidação do tecido biológico através da luz com a presença de um fotossensibilizador e oxigênio.

O fotossensibilizador tem que apresentar uma grande eficácia e de fácil entendimento no seu mecanismo de ação em relação entre a estrutura e atividade para termos um avanço da terapia fotodinâmica (PDT).

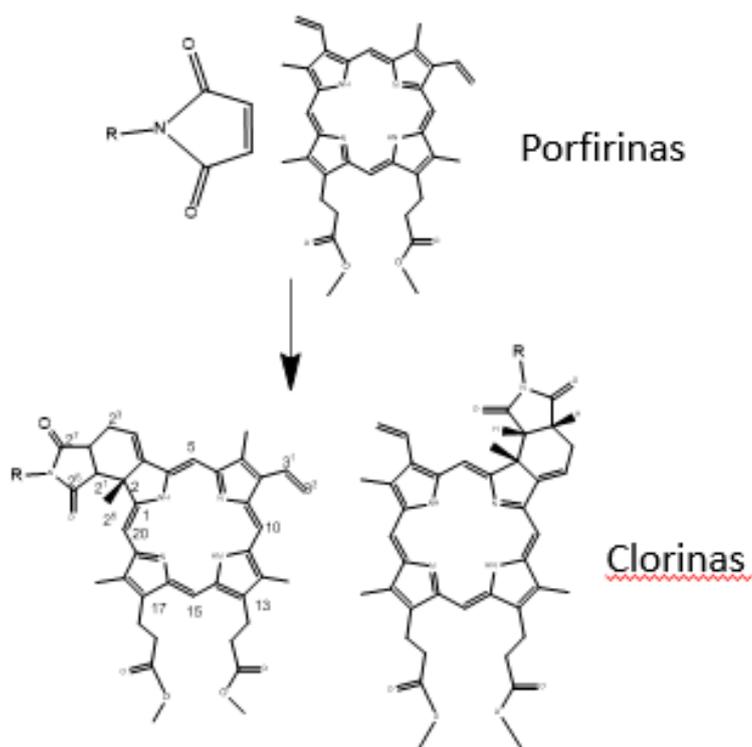
Como característica, o fotossensibilizador tem que apresentar uma absorção na janela terapêutica (600-800 nm). Características foto físicas favoráveis: alto rendimento na formação de tripletes, de oxigênio singlete, baixa citotoxicidade no escuro, farmacocinética favorável e de fácil eliminação pelo organismo, formulação definida, facilidade de obtenção com custos reduzidos, permeabilidade em tecidos e seletivo, com afinidade em tecido tumoral relacionado ao tecido saudável.

O Photofrin foi o primeiro fotossensibilizador autorizado pelos órgãos de saúde (Food and Drug Administration) no tratamento de câncer através da terapia fotodinâmica. Este fotossensibilizador possui uma formulação polimérica de hematoporfirina IX de constituição

indefinida, que é derivada de uma porfirina de origem natural, que constitui a hemoglobina, citocromo e de outras biomoléculas.

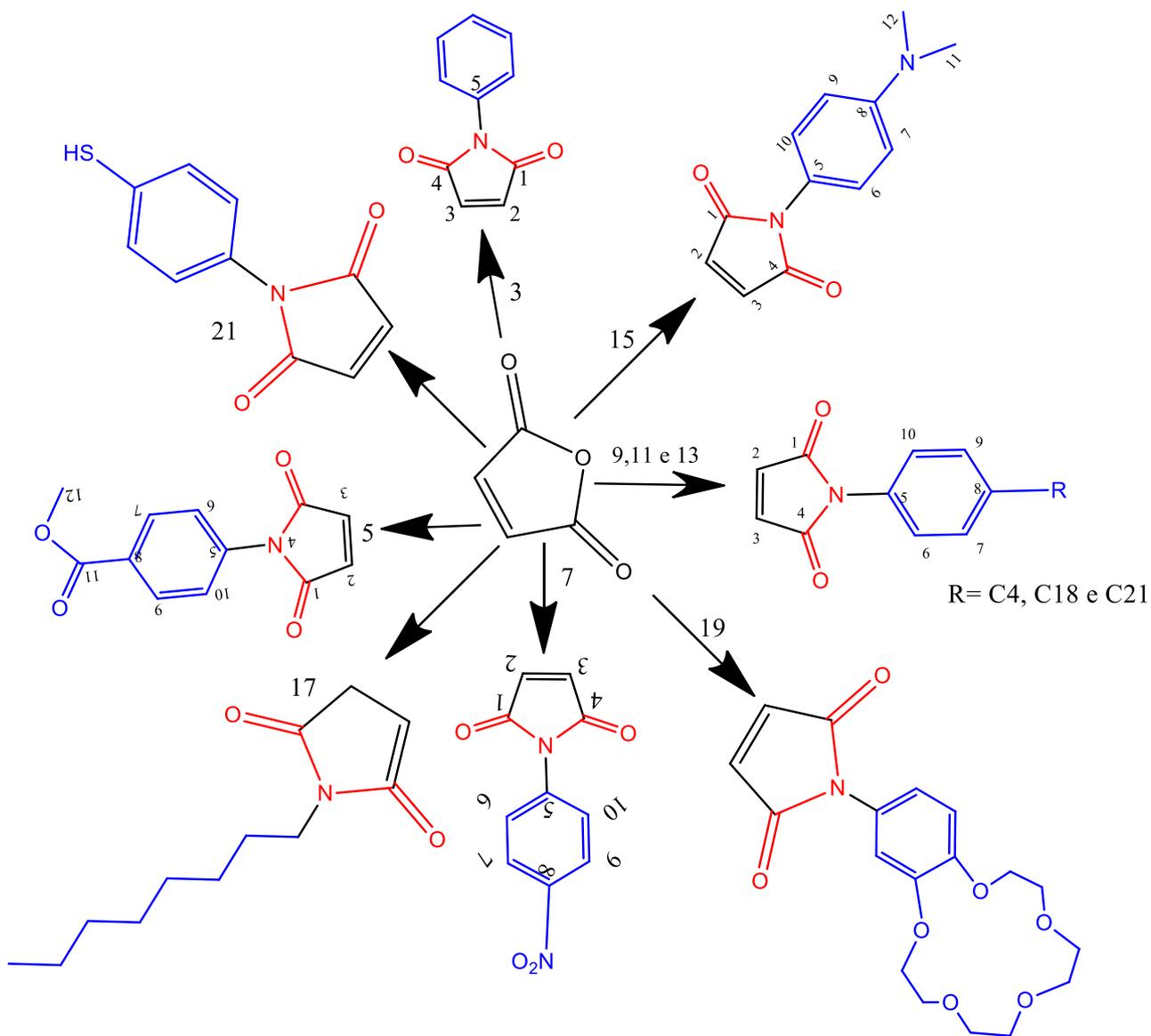
As porfirinas apresentam baixa solubilidade em solventes orgânico e água, podendo-se aumentar a solubilidade em solventes orgânicos com a introdução do grupo alquila.

Os precursores fotofármacos são sintetizados sem que ocorra a destruição do anel imida, possibilitando o estudo do sinergismo entre a ação farmacológica e a terapia fotodinâmica (**Esq. 6**)<sup>[59]</sup>.



**Esquema 6:** Precursores fotofármacos

## 3.3 ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS OBTIDOS A PARTIR DO ANIDRIDO MALEICO



**Figura 15:** (3) Fenilmaleimida, (5) P-Metil Acetato de Fenilmaleimida, (7) P-Nitrofenilmaleimida, (9, 11, 13) P-Butil-Fenilmaleimida, (15) P-Dimetilamina Fenilmaleimida, (17) Octilmaleimida, (19) Maleimida Coroa, (21) 4- Tiol- Fenilmaleimida

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 REAGENTES E SOLVENTES**

Para as sínteses, utilizamos as seguintes aminas: anilina, 4-nitroanilina, ácido p- amino benzoico, dimetilamina, todas de procedência da Sigma Aldrich, reagentes analíticos com alto teor de pureza. Todos os reagentes no início das sínteses foram dissolvidos em éter etílico e, após a síntese extraídos em clorofórmio.

A ressonância magnética de hidrogênio e de carbono foram realizadas a 500 e 125.77 MHz, utilizando clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente e TMS como referência.

### **4.2 MÉTODOS**

#### **4.2.1 SÍNTESES DAS MALEIMIDAS**

Em um erlenmeyer, foram dissolvidos 2 Mols de anidrido maleico em éter etílico e num segundo erlenmeyer foram dissolvidos 1 Mol da amina correspondente, ambos sob agitação por 30 minutos e em temperatura ambiente. Verteu-se o primeiro erlenmeyer ao segundo e formou-se um precipitado, o qual foi filtrado e lavado com porções de éter etílico e eliminado em estufa com circulação de ar à 50°C por 40 minutos. O produto foi submetido a ciclização em solução de acetato de sódio/anidrido acético, aquecido a 70° C com agitação, pelo período de 6 horas. A reação foi vertida numa mistura de água/gelo, neutralizada com hidróxido de amônio até atingir pH básico e extraídos em clorofórmio. O solvente eliminado através do equipamento rotaevaporador. Os componentes foram purificados em uma coluna cromatográfica com sílica,

utilizando clorofórmio como eluente e foi sendo monitorado por cromatografia de camada delgada.

### 4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos foram realizados no Departamento de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras- MG.

#### 4.3.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Utilizou-se o método de difusão radial em ágar nutriente, no qual as bactérias foram inoculadas e anteriormente ativadas em caldo Heart Brain Infusion. Após a ativação, foi preparada uma suspensão microbiana cuja turbidez foi comparável a escala de McFarland 0,5. Após a inoculação das bactérias, foram depositados discos de papel esterilizados e adicionou-se nestes discos uma solução dos compostos dissolvidos em DMSO na concentração de 250mmol/l. Estas placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e foram efetuadas as leituras dos halos de inibição (em mm). Foram realizados controles paralelos com o solvente utilizado para a dissolução dos compostos e um disco para diagnóstico do antibiótico chamado Estreptomicina na concentração de 10mcg.

Para o ensaio foram utilizadas as seguintes bactérias: *Pseudomonas aureginosas* ATCC 27853 (Gram negativa), *Escherichia coli enteropatogênica* ATCC 055 (Gram negativa), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram positivo) e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (Gram positivo), sendo que a *Listeria monocytogenes* foi infusa em caldo e em ágar nutriente com extrato de levedura. Todas as bactérias foram obtidas no Departamento de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 SÍNTESE

**Fenilmaleimida (3).** Este composto foi sintetizado conforme a metodologia descrita e purificado por cristalização em etanol com 74% de rendimento e caracterizado por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e por HPLC- Massa de alta resolução por infusão direta, determinando uma massa exata de 174,0582 para o íon molecular fenilmaleimida e o pico base de 206,0827 é referente a abertura do anel imida e a adição do metanol durante o processo de análise.

**P-Metilacetato de fenilmaleimida (5).** Após a esterificação do ácido 4-aminobenzóico obteve-se o 4- aminobenzoato de metila, com 95% de rendimento e seguindo o procedimento de obtenção similar ao anterior para a obtenção do composto 2 com rendimento de 68%. Foi realizada a caracterização por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e sua massa exata determinada é de 232,0609 referente ao íon molecular.

**Nitrofenilmaleimida (7).** Apresentou o maior rendimento em relação aos outros compostos maleimídicos e foi caracterizado por massa exata de 219,0400 referente ao íon molecular e o RMN foi enviado para análise. Rendimento: 78%.

**P-butil-fenilmaleimida (9, 11, 13).** Metodologia similar aos anteriores e purificado em cromatografia por coluna, apresentando um rendimento de 72% e sua caracterização foi realizada por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e sua massa determinada por aduto com sódio em 252,0993.

**P-Dimetilamina fenilmaleimida (15).** Metodologia similar aos anteriores com rendimento de 71% e caracterizado por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e massa de alta resolução com íon molecular em 217,0971.

**Octilmaleimida (17).** A metodologia de obtenção deste composto é similar ao composto 3 e purificado por cromatografia e coluna utilizando sílica gel como suporte. A recristalização do composto foi realizada por resfriamento a  $5^\circ\text{C}$ , com rendimento de 42%. A caracterização foi

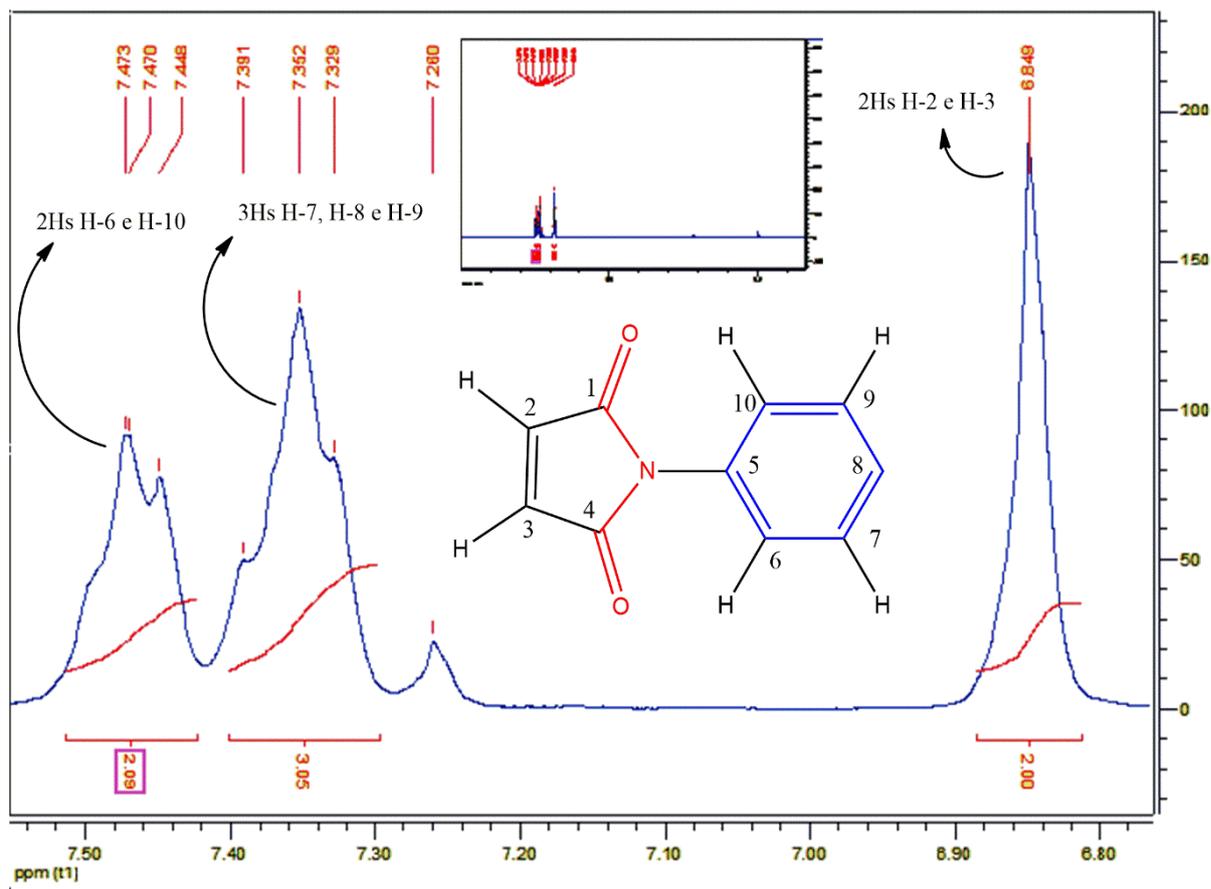
determinada por RMN  $^1\text{H}$  e por HPLC- Massa alta resolução por infusão direta, onde foi determinada uma massa de 210,1496 para o íon molecular, já o pico determinado em 279,1555 atribuído a adição de metanol e potássio.

**Maleimida coroa (19).** Este composto foi obtido com 69% de rendimento e purificada em cromatografia de coluna de sílica gel, e caracterizada por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e por espectrometria de massa.

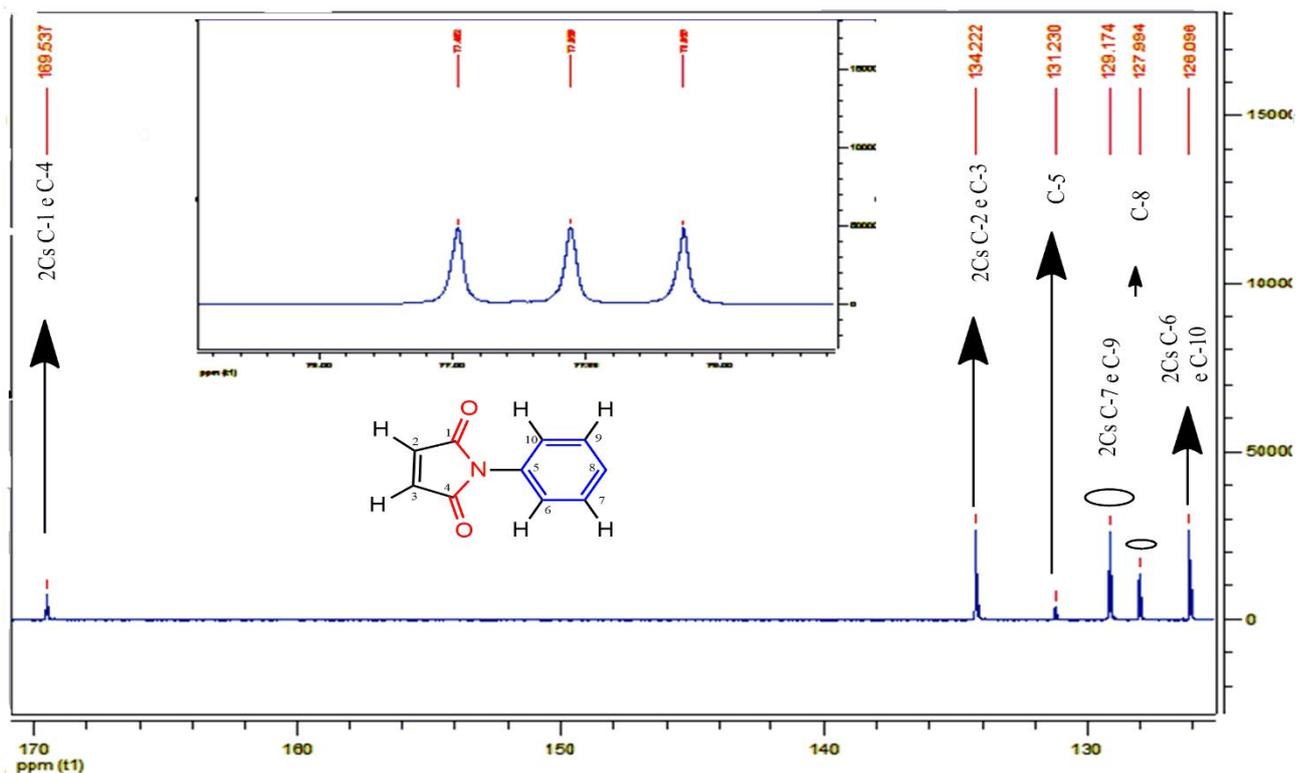
**4-tiol-Fenilmaleimida (21).** Este composto foi obtido e forma similar ao composto 3 e por apresentar baixa solubilidade na maioria dos solventes a sua purificação foi realizada por solubilização em DMSO e precipitação por adição de acetona. Está submetida a caracterização.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL:

**Fenilmaleimida (3).** Análise da caracterização de RMN $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz),  $\delta$  (ppm): 6,84 (br s, 2H, H-2 e H-3 grupo vinílico); 7.32-7.39 (m, H-7, H-8 e H-9); 7.44-7.47 (m, H-6 e H-10). RMN $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125.77 MHz);  $\delta$  (ppm): 126.0 (2C, C-6 e C-10); 127.9 (C-8); 129.1 (2C, C-7 e C-9); 131.2 (C-5); 134.2 (2C, C-2 e C-3); e 169.5 (2C, C-1 e C-4) HPLC-MS, m/z para  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_2$  calculada 174,0550 foi determinada em 174,0582. Com pico base em 206,0827 referente a abertura do anel imida e adição de metanol durante o processo. Rendimento: 74%.

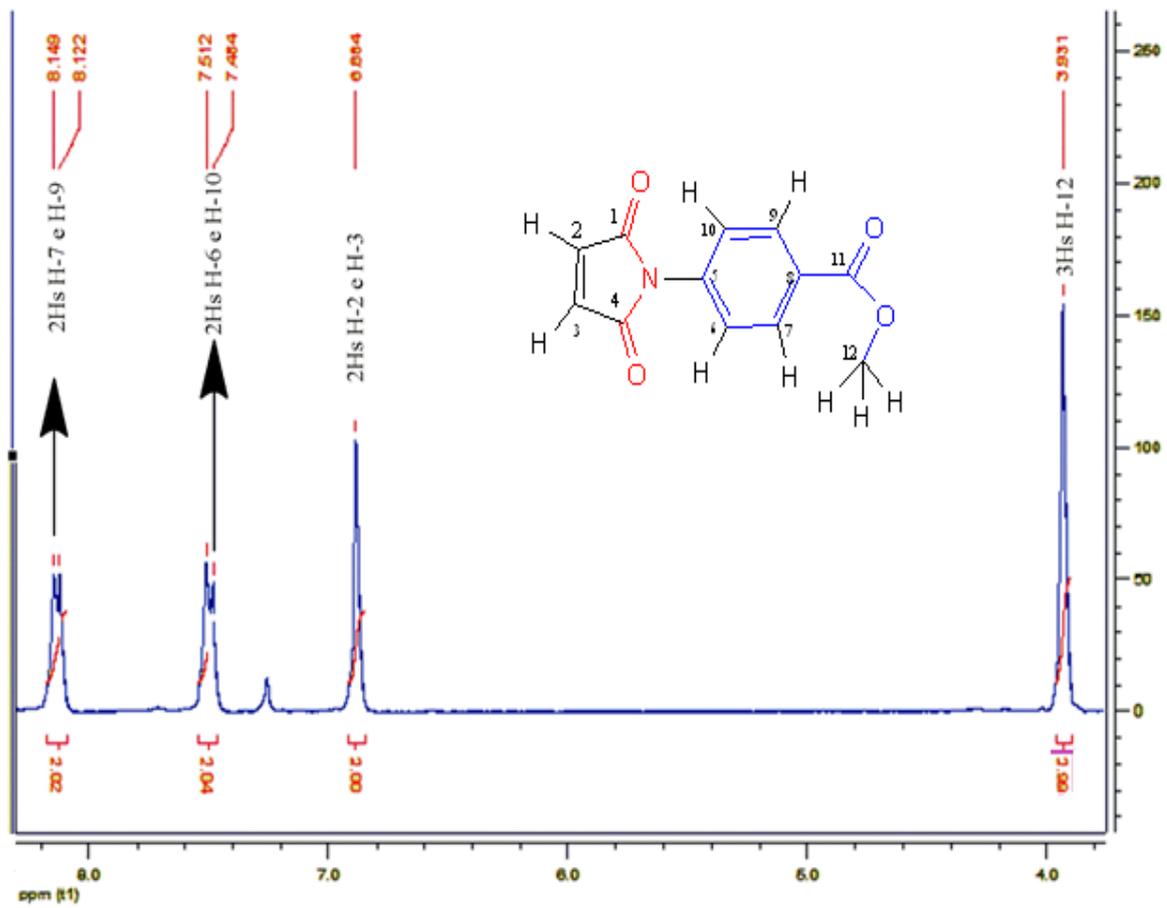


Espectro de RMN  $^1\text{H}$ , em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz P-fenilmaleimida

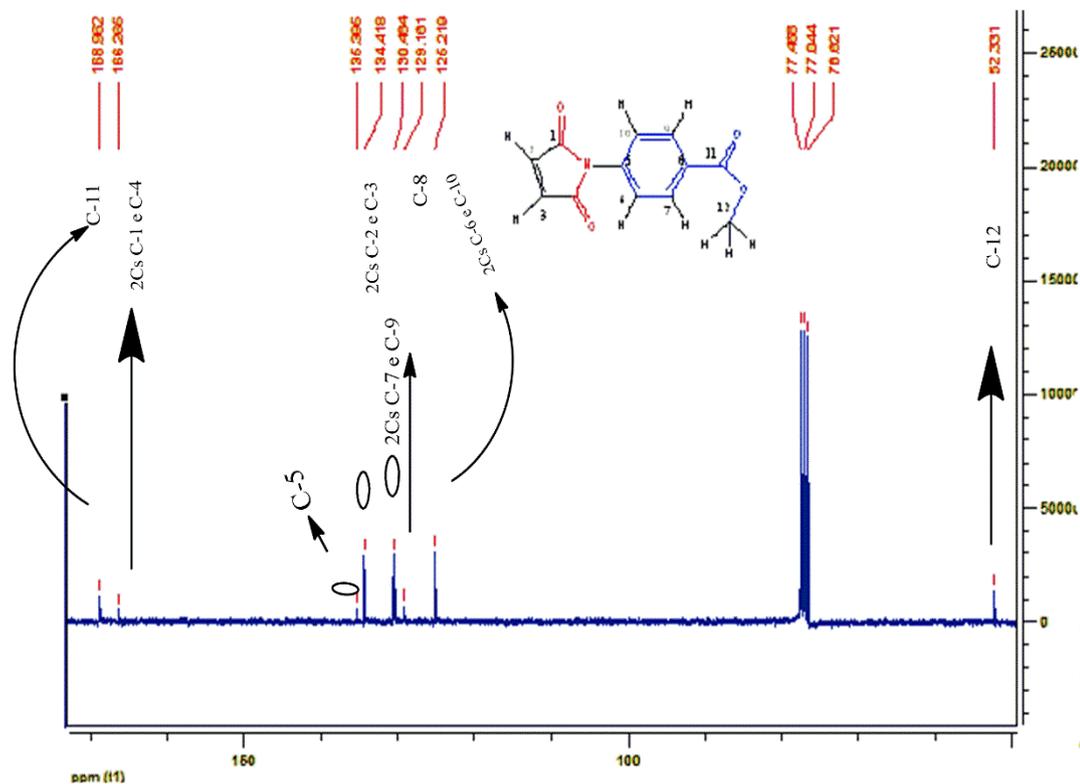


### Espectro de RMN <sup>13</sup>C, em CDCl<sub>3</sub> a 125 MHz P-fenilmaleimida

**P-Metilacetato de fenilmaleimida (5).** Análise da caracterização de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz), δ (ppm): 3.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-12); 6.88 (br s, 2H, H-2 e H-3 grupo vinílico); 7.48-7.51 (m, 2H, H-6 e H-10); 8.12-8.15 (m, 2H, H-7 e H-9). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125.77 MHz); δ (ppm): 52.3 (C-12); 125.2 (2C, C-6 e C-10); 129.1 (C-8); 130.4 (2C, C-7 e C-9); 134.4(2C, C-2 e C-3); 135.3(C-5); 166.2(2C, C-1 e C-4); e 168.9(C-11). HPLC-Massa exata calculada para C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>4</sub>, 232,0604 (M+1), foi determinada em 232,0609. Rendimento: 68%.



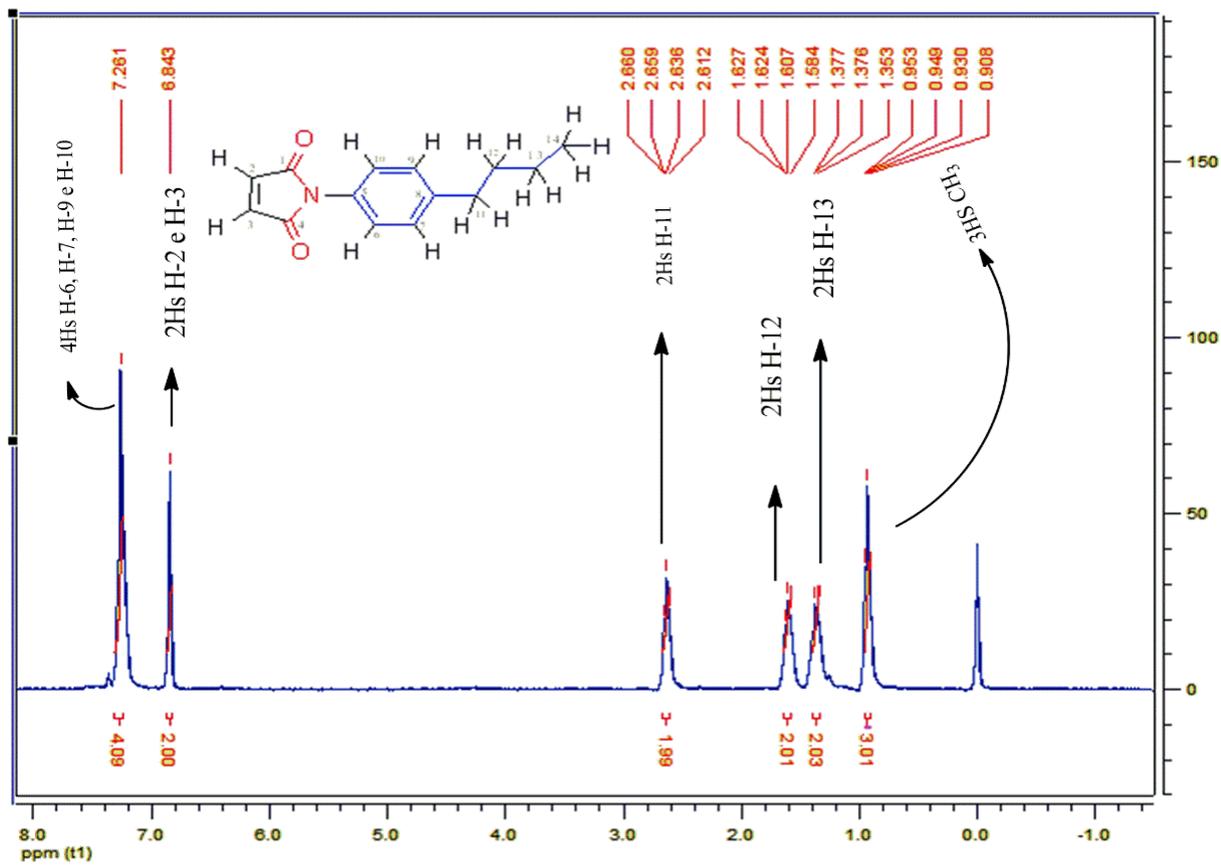
Espectro de RMN 1H, em CDCl<sub>3</sub> a 500 MHz P-metil acetato de fenilmaleimida



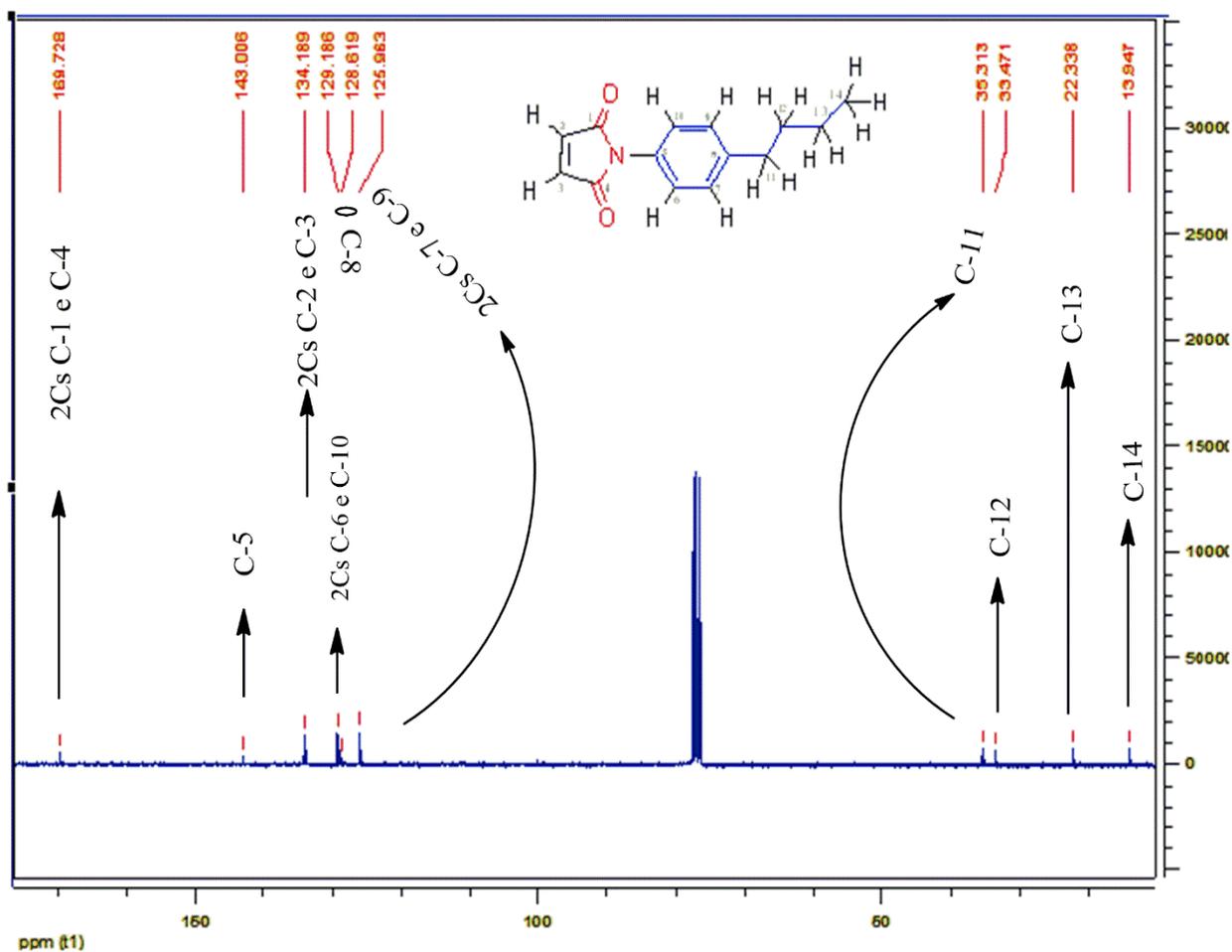
**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , em  $\text{CDCl}_3$  a 125 MHz P-metil acetato de fenilmaleimida**

**Nitrofenilmaleimida (7).** HPLC-Massa exata calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4$ , 219,0400 (M+1), foi determinada em 219,0400 para (M+1). Rendimento: 78%.

**P-butil-fenilmaleimida (9, 11, 13).** Análise da caracterização de RMN $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz),  $\delta$  (ppm): 0.93 (t, 3H, J= 11Hz,  $\text{CH}_3$ -14); 6.84 (br s, 2H, H-2 e H-3 grupo vinílico); 1.35-1.37 (m, 2H, H-13); 1.58-1.62 (m, 2H, H-12); 2.61-2.65(t, 2H, H-11); 7.26 (m, 4H, H-6, H-7, H-9, H-10). RMN $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125.77 MHz);  $\delta$  (ppm): 13.9 (C-14); 22.3 (C-13); 33.4 (C-12); 35.3 (C-11); 125.9(2C, C-7 e C-9); 128,5 (C-8) 129.1(2C, C-6 e C-10); 134.1(2C, C-2 e C-3); 143.0 (C-5); 169.7(2C, C-1 e C-4). HPLC-Massa exata calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ , 230,1176 (M+1), foi determinada em 230. O íon molecular e correspondente ao aduto com sódio em 252,1176. Rendimento: 72%.

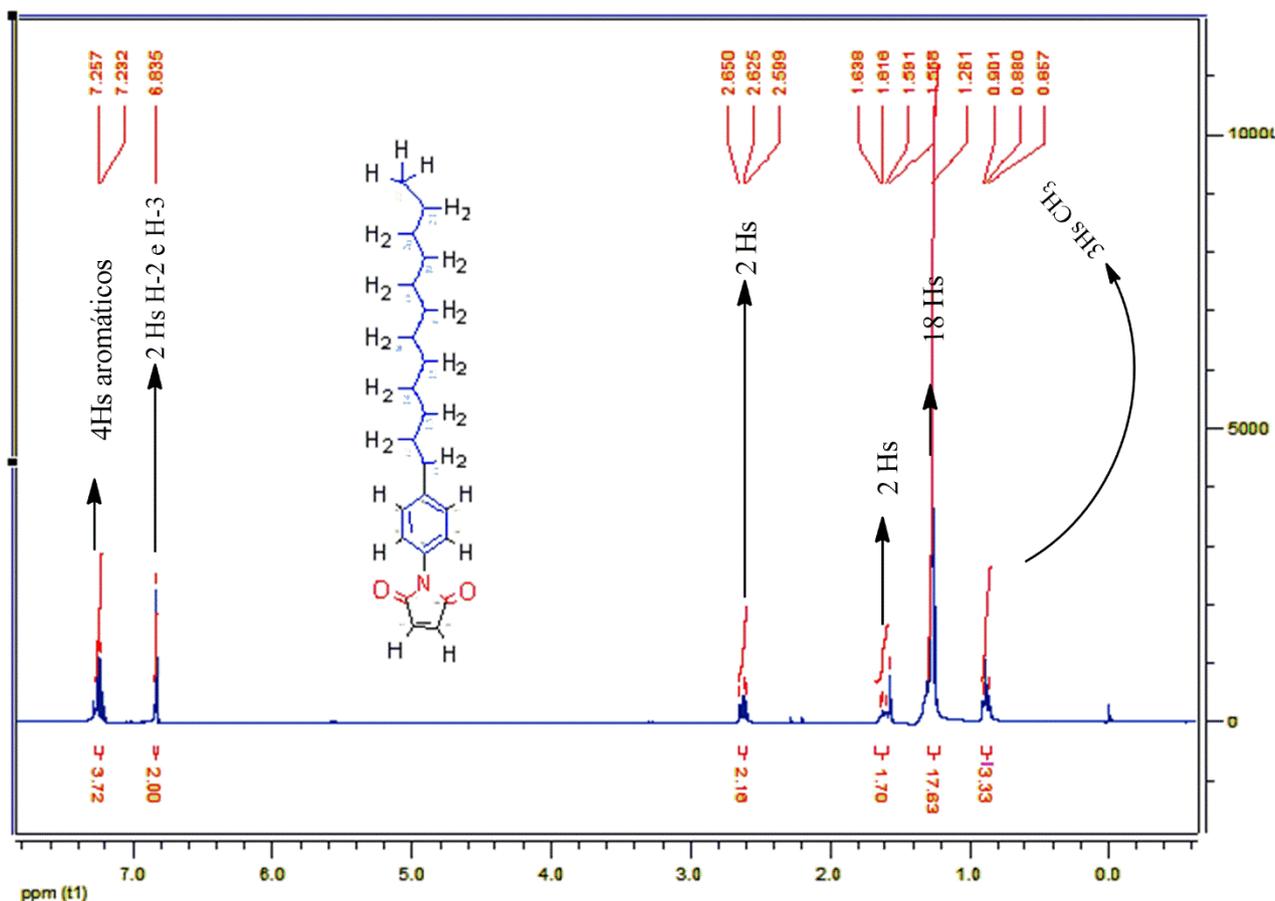


Espectro de RMN 1H, em CDCl<sub>3</sub> a 500 MHz P-butyl-fenilmaleimida



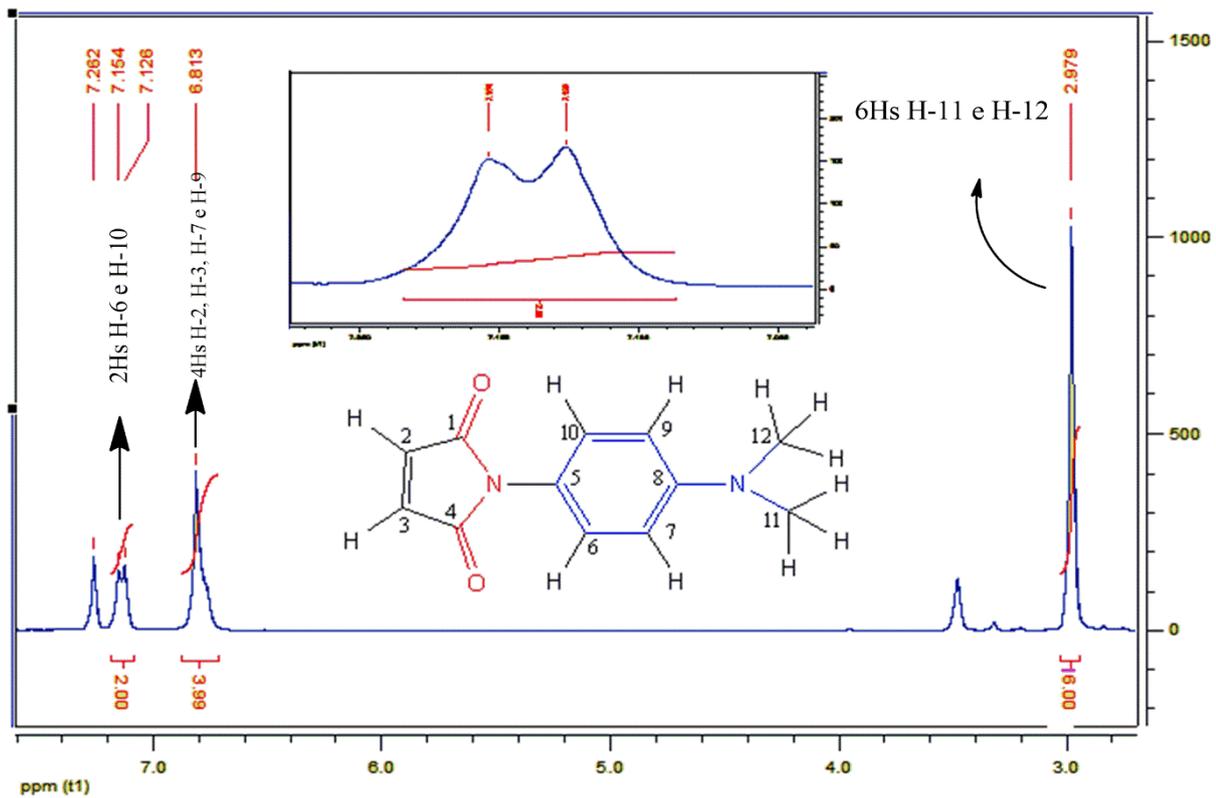
Espectro de RMN 13C, em CDCl<sub>3</sub> a 125 MHz P-butil fenilmaleimida

**P- Dodecil fenilmaleimida (13).** Análise da caracterização de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz),  $\delta$  (ppm): 0.85-0,90 (t.3Hs, CH<sub>3</sub>-22); 1.26 (m, 18Hs); 2.59-2,65 (t.2Hs); 6.83 (br s. 2Hs, H-2 e H-3 grupo vinílico); 7.23-7.25 (m, 4Hs aromático).

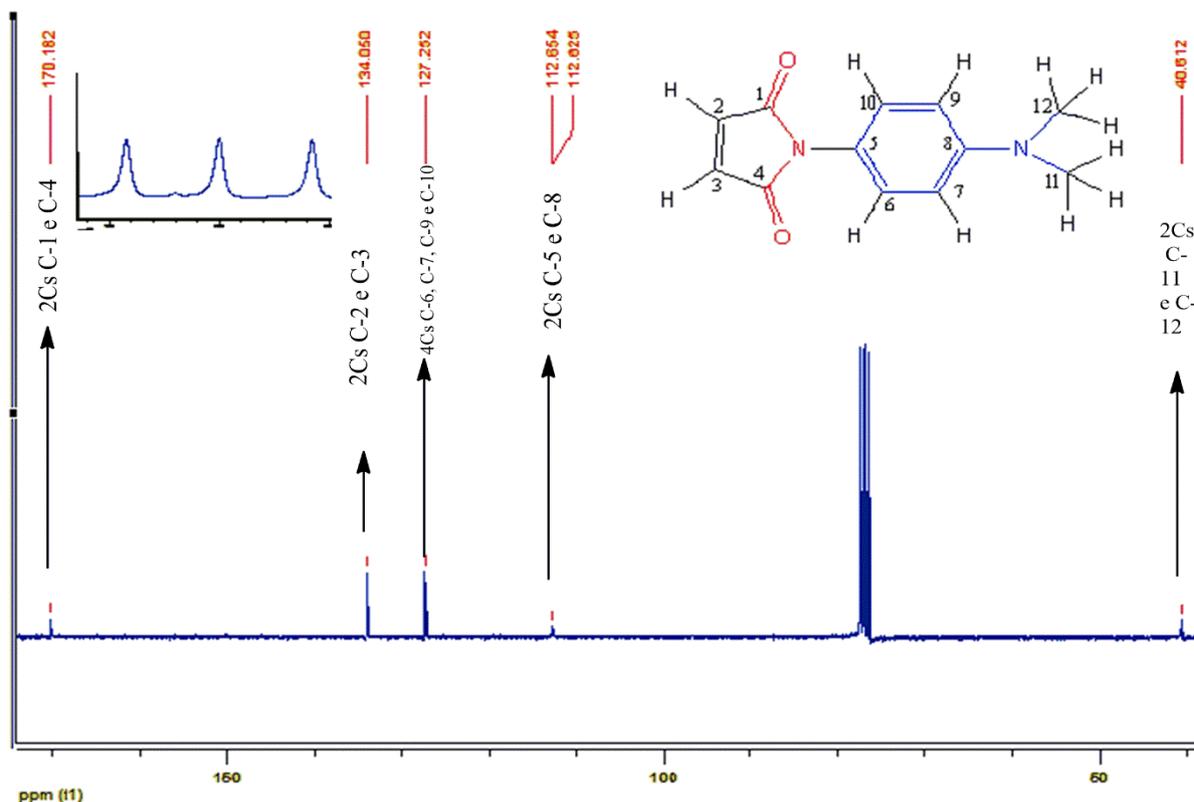


**Espectro de RMN 1H, em CDCl<sub>3</sub> a 500 MHz P-dodecil-fenilmaleimida**

**P-Dimetilamina fenilmaleimida (15).** Análise da caracterização de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz), δ (ppm): 2.97(s, 6H, 2CH<sub>3</sub>, H-11 e H-12); 6.81(m, 4H, H-2 e H-3, H-7 e H-9 grupo vinílico e aromático); 7.12-7.15 (2s, 2H, H-6, e H-10). RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125.77 MHz); δ (ppm): 40.6 (2C, C-11 e C-12); 112.62 e 112,65 (2C, C-5 e C-8); 127.2 (4C, C-6, C-7, C-9 e C-10); 134(2C, C-2 e C-3); 170.1 (2C, C-1 e C-4) HPLC-Massa exata calculada para C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 217,0972 (M+1) foi determinada em 217,0971. Rendimento: 71%.



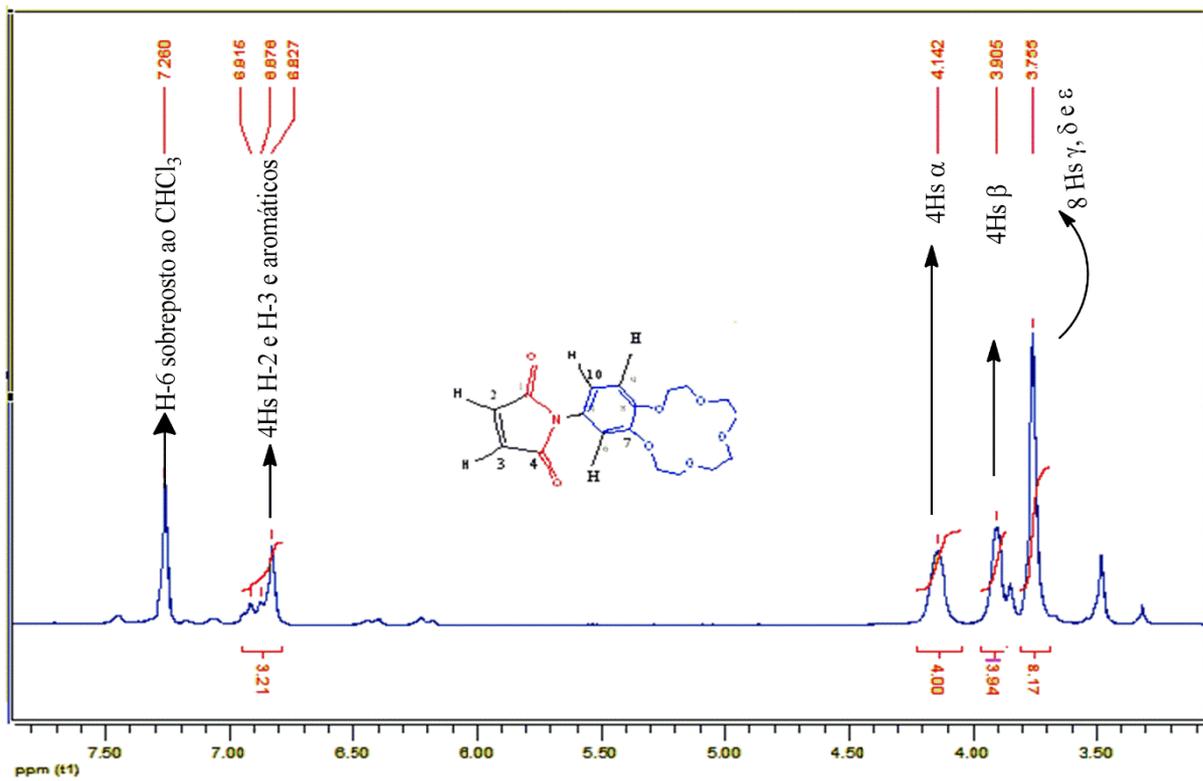
Espectro de RMN  $^1\text{H}$ , em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz P-dimetilamina fenilmaleimida



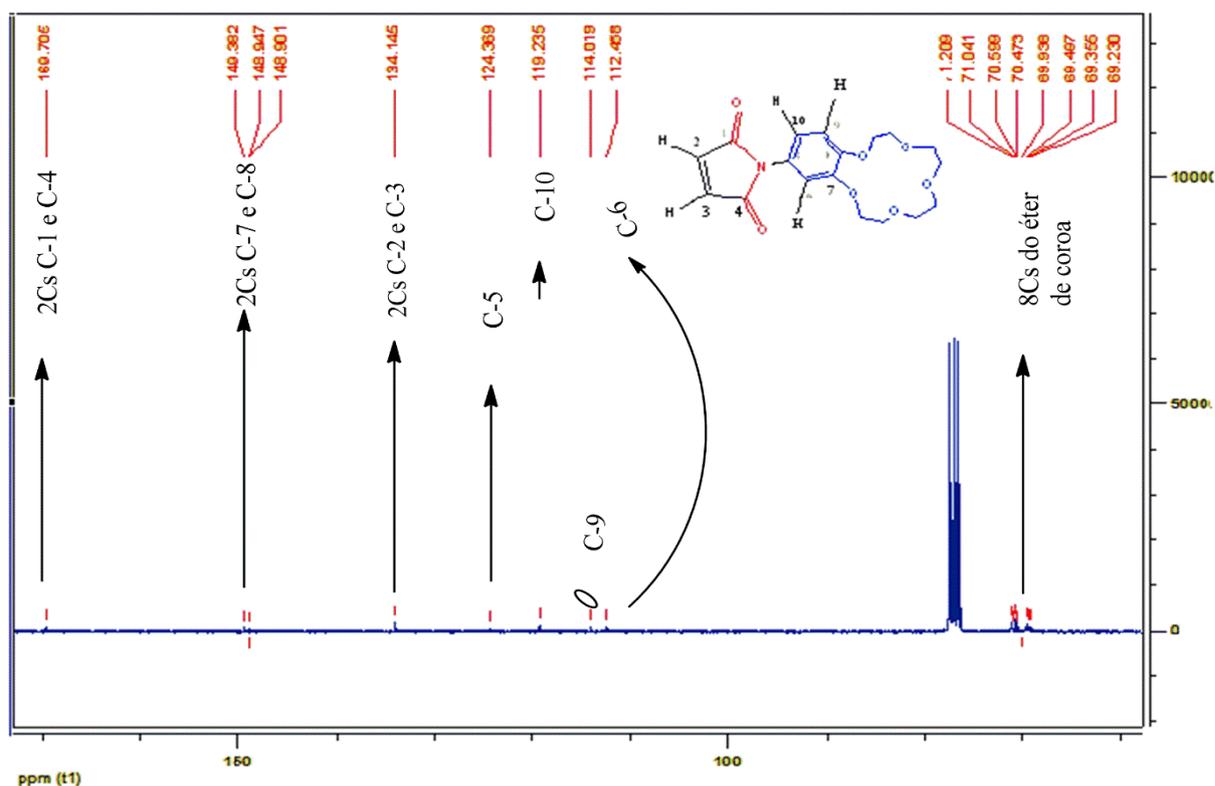
### Espectro de RMN 13C, em CDCl<sub>3</sub> a 125 MHz P-dimetilamina fenilmaleimida

**Octilmaleimida (17).** Análise da caracterização de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz), δ (ppm): 0,87 (t, 3H, J= 6,5 CH<sub>3</sub>), 1,25-1,27 (m, 10H), 1,56-1,60 (m, 2H, βCH<sub>2</sub>), 3,50 (t, J= 7,0 2H αCH<sub>2</sub>) 6,68 (br s, 2H, H-2 e H-3 grupo vinílico) HPLC-Massa exata calculada para C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>, 210,1489 (M+1) foi determinada em 210,1496 para íon molecular, pico base em 279,1555 atribuído a adição de metanol e potássio.





**Espectro de RMN  $^1\text{H}$ , em  $\text{CDCl}_3$  a 500 MHz Maleimida Coroa**



**Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , em  $\text{CDCl}_3$  a 125 MHz Maleimida Coroa**

**Maleimida de Enxofre (21).** A purificação foi realizada através da cristalização, onde a maleimida foi dissolvida em DMSO e cristalizada com adição lenta e gradual de metanol. O DMSO foi removido através das lavagens de dos cristais com metanol e por filtração de sucção de vácuo.

### 5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

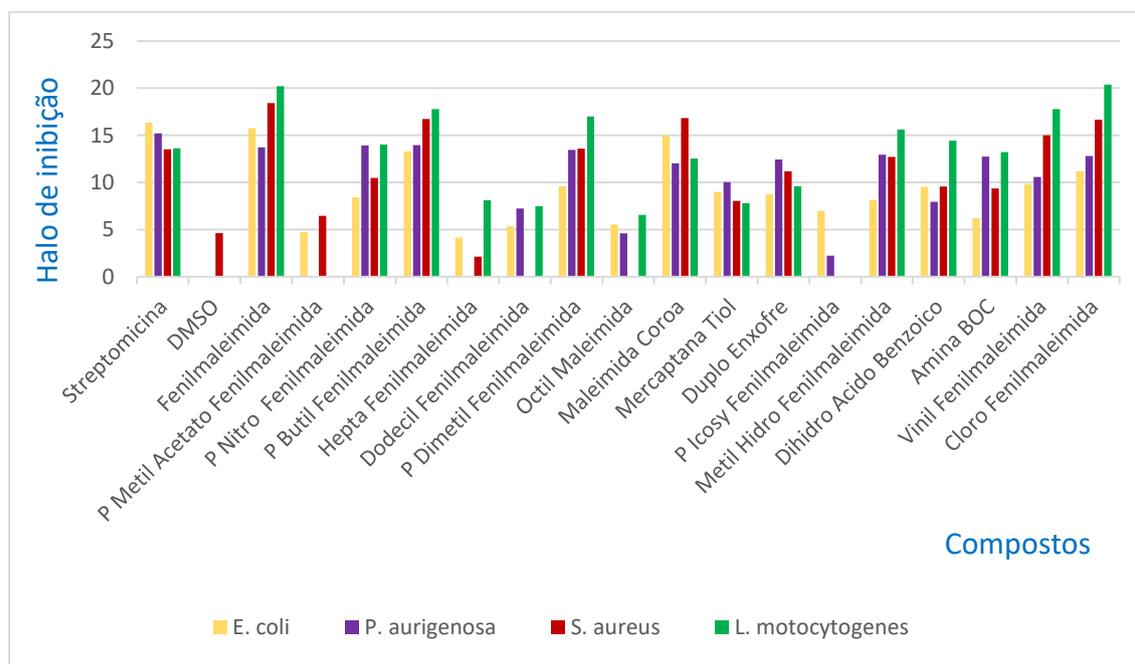
A atividade antimicrobiana dos compostos de maleimida foram determinadas pelo método de difusão do ágar em quatro cepas bacterianas, sendo duas gram positivas e duas gram negativas e como controle utilizou-se o solvente dos compostos, DMSO, pois este por apresentar toxicidade

as células poderia interferir nos halos de inibição dos compostos estudados e discos do antibiótico Streptomina<sup>[60]</sup>, um antibiótico utilizado no tratamento de infecções bacterianas como tuberculose e brucelose.

De acordo com a Tabela 1 observamos que foram obtidos valores de halos de inibição significativos dos compostos em relação ao disco controle do antibiótico, tanto para as bactérias gram positivas como para as bactérias gram negativas, sendo que a maioria dos compostos sintetizados apresentaram uma melhor atividade nas bactérias gram positivas. Observamos que as maleimidias não substituídas foram mais ativas que as maleimidias substituídas conforme já descrito em estudos anteriores e esses fatores podem estar relacionados ao receptor biológico com uma melhor interação com a planaridade da molécula, mudança de polaridade, comprimento da cadeia dos substituintes que podem interferir nas atividades biológicas.

**Tabela1. Atividade Antimicrobiana das maleimidias pelo método de difusão em ágar:**

Compostos	Zona de Inibição (mm)			
	<i>Escherichia coli</i> <i>enteropatogênica</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>aureginosas</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>
Streptomina	16	15	14	14
DMSO	-	-	-	-
3	16	14	18	20
5	5	-	6	-
7	8	14	11	14
9	13	14	17	18
11	4	-	2	8
13	5	7	-	8
15	10	14	14	17
17	6	6	-	7
19	15	12	17	13
21	9	10	8	8
23	9	12	11	10
25	7	2	-	-
27	8	13	13	16
29	10	8	10	14
31	6	13	9	13
33	10	11	15	18
35	11	13	17	20



**Figura 16:** HALO DE INIBIÇÃO DA EPEC, PA, SA, LM

## 6 DISCUSSÃO

De acordo com resultados obtidos para atividade antimicrobiana das maleimidas, verificou-se que, nas bactérias gram negativas, apresentou valores de halos de inibição inferiores em relação ao grupo controle do antibiótico estreptomicina, já as bactérias gram positivas apresentaram atividade inibitória de crescimento acima de 70% em grande parte dos compostos sintetizados, sendo que estes compostos foram dissolvidos em uma única concentração de 250 mmol/ml em DMSO.

Pode-se atribuir essa diferença de inibição a presença de grupos eletrodadores, densidades eletrônicas, interação com o receptor biológico em relação a estrutura molecular da superfície da célula, pois esta é muito polar [1,34].

Outro fator é o tamanho da cadeia que determina a hidrofiliicidade e a lipofiliicidade dos compostos, pois podem interferir na inibição, a qual cita-se o composto 17, que não apresentou nenhuma inibição, tanto nas bactérias gram positivas, como nas bactérias gram negativas.

Na plataforma de compostos que foram sintetizados, têm-se um grupo que pode avaliar a hidrofiliicidade e a lipofiliicidade, reagindo com enzimas a fim de tornar molécula mais polar ou menos polar, um composto de grupo funcional que apresenta um radical livre para a potencialização da atividade biológica e um composto com grupo tiol para a incorporação de nanopartículas e interação com tioproteínas através do aminoácido Cisteína na formação das pontes de enxofre.

Por esses fatores a maleimida é uma principal representante nas atividades biológicas [1].

Em relação a caracterização da estrutura, foi realizada a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , que através de suas principais características confirma-se estrutura da molécula, isto é, deslocamentos químicos, intensidades dos picos e acoplamentos spin-spin.

Em um espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , ignora-se um pico de deslocamento químico igual a zero que corresponde o valor de referência TMS e um pico de 7,25 ppm referente a impureza do clorofórmio do solvente  $\text{CDCl}_3$ .

O valor atribuído ao anel imídico da maleimida é bastante visível, pois aparece em um único sinal (singlete). Os prótons aromáticos são atribuídos em uma única região, como atribuído no espectro do composto (3), onde os cinco prótons aromáticos são representados em um sinal triplete e um sinal duplete.

Os compostos (5- 13), temos sinais atribuídos aos prótons do grupo metila ( $\text{CH}_3$ ) mais desblindados, representados em picos de sinais singlete e triplete e os prótons dos aromáticos representados em sinais multipletos são quimicamente equivalentes por estarem no mesmo plano de simetria. No composto (13) temos os prótons do grupo metilênico ( $\text{CH}_2$ ) é representado nas áreas de picos num sinal multiplete de dezoito prótons referente ao deslocamento químico de 1,26-1,58 ppm, e um grupo metilênico de dois prótons num sinal triplete com deslocamento

químico entre 2,59-2,65 ppm e dois prótons num sinal triplete com deslocamento químico de 1,59-1,63 ppm.

O composto (15) ocorreu que dois prótons do anel aromático foram atribuídos no mesmo sinal dos dois prótons do anel imídico com valor de deslocamento químico 6,80 ppm. Pode-se ter ocorrido que na atribuição dos sinais do deslocamento químico deste composto, ocorreu uma sobreposição de sinal, a esta atribuição, lê-se como duplete de duplete devido a esta sobreposição. Neste caso recorreremos ao espectro de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  para confirmação do deslocamento químico.

No composto (19) dois prótons do anel aromático foram atribuídos juntamente no mesmo sinal do solvente clorofórmio e dois prótons do anel aromático foram atribuídos no mesmo sinal dos dois prótons do anel imídico com valor de deslocamento químico 6,80-6,90 ppm devido a sobreposição de sinal.

Em nosso trabalho a espectroscopia de massa foi de suma importância para determinar a massa molecular precisa dos compostos, onde tem-se um pico mais alto (íon molecular), confirmando a estrutura proposta. Para alguns compostos a espectroscopia de massa apresentou um pico base mais aparente que o do íon molecular. Justifica-se a este pico uma adição de metanol ou sódio para a determinação da espectroscopia de massa.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo permitem as seguintes conclusões:

- As maleimidias sintetizadas apresentaram resultados de rendimentos satisfatórios, segundo Hargreaves et al., a partir do anidrido escolhido com as aminas aromáticas primárias, onde o nitrogênio está ligado diretamente ao anel aromático.

- As reações ocorreram normalmente em temperaturas ambiente e sob agitação e a ciclização do anel cíclico foi realizada através do refluxo com temperatura controlada e utilizando como agentes desidratantes anidrido acético e sulfato de sódio anidro.
- Os compostos obtidos foram caracterizados através da espectroscopia de massa, ressonância magnética de  $^1\text{H}$  e ressonância magnética de  $^{13}\text{C}$  para comprovar as estruturas dos compostos sintetizados.
- Os resultados obtidos na atividade antimicrobiana foram satisfatórios em relação a estudos anteriores [1].
- Devido a necessidade de novos fármacos para tratamento das mais variadas patologias as imidas cíclicas lideraram o desenvolvimento de novos e eficientes fármacos. Portanto há muito para avançar nas pesquisas principalmente em relação à sua eficácia nos estudos clínicos e a determinação do perfil toxicológico e a necessidade de elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nas ações biológicas, com possibilidade de obtenção de substâncias com potencial para atuar como novos e eficientes fármacos.

## 8 REFERÊNCIAS

1. CECHINEL FILHO, V.; 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.
2. VALVERDE, M. G.; TORROBA, T. Special Issue: Sulfur-Nitrogen Heterocycles. *Molecules*, v. 10, p. 318-320, 2005.
3. CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R.; VAZ, Z.; CALIXTO, J. B.; NUNES, R. J.; PINHEIRO, T.; ANDRICOPULO, A.; YUNES, R. Further studies on analgesic activity of cyclicimides. *Fármaco*, v. 53, p. 55-57, 1998.
4. ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F.; Propriedades Químico-Quânticas empregadas em estudo das relações estrutura-atividade. *Química Nova*, v.33, p. 694-699, 2010.
5. CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (ed.). *Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, Cap.2, p. 59-69, 2001.
6. HANSCH, C.; FUJITA, T.  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of American Chemical Association*, 86, 1616-1626, 1964.
7. CRAIG, P. N. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 14 (8), 680-684, 1971.
8. TOPLISS, J. G. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 15, 1006, 1972.
9. YUNES, R. A.; HIZEN, V. F.; CECHINEL FILHO, V.; LAZZAROTTO M. From the manual method of Topliss to a modified quantitative method. *Arzneimittel Forschung Drug Research*, 52 (2), 125-132, 2002.
10. 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.

11. LIPINSKI, A. C.; LOMBARDO, F.; DOMINY, W. B.; FEENEY, J. P.; *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, p. 3-26, 2001.
12. HUISGEN, R.; GRANSKEY, R.; SAVER, J., "The Chemistry of Alkenes". Ed. Patai, S., London: Interscience Publishers, p. 739, 1964.
13. HUISGEN, R. "Cycloadditions-Definition, Classification, and Characterization". *Angew. Chem. Internat. Edit.* 7, (5), 321-328, 1968
14. BROWN, W. H., "Organic Chemistry". New York: Saunders College Pub., 1995.
15. CAREY, F. A.; Sundberg, R. J. "Advanced Organic Chemistry - Part B - Synthesis". New York: Plenum Press, 1983.
16. CARRUTHERS, W. "Cycloaddition Reactions in Organic Synthesis". Oxford, Pergamon Press, 1990.
17. WASSERMAN, A.; "Diels-Alder Reactions". London: Elsevier Publishing Co. 1965.
18. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PORN FAR). *Revista Química Nova*. Rio de Janeiro, v.28, suplemento S56-S63, 2005.
19. BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Revista Química Nova*. Rio de Janeiro, v.32, n.3, p.679- 688, 2009.
20. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; LIMA, L. M. Natural Products as Lead compounds in medicinal Chemistry. In: CECHINEL FILHO, V. (org.). *Plant Bioactives and drug Discovery*. 1ª ed. New Jersey: Wiley, v.1, p.81-126, 2012.
21. HARGREAVES, M. K.; PRITCHARD, J., G.; DAVE, H., R. Cyclic carboxylic monoimides. *Chem. Rev. London*, v. 70, n.4, p.439-469, 1970.
22. MEHTA, N. B.; PHILLIPS, A. P.; FU, F.; LUI, F.; Brooks, R. E. *Journal of Organic Chemistry*, v. 25, p 1012, 1960.
23. KIM, J.; HONG, S. H. Synthesis of Cyclic Imides from Nitrile and Diols Using Hydrogen Transfer as a Substrate-Activating Strategy. *Organic Letters*, v. 16, p. 4404-4407, 2014.
24. KALGUTKAR, A. S.; CREWS, B. C.; MARNETT, L.J.; *J. Med.Chem.*, v. 39, p. 8, 1996.
25. TEMPESTA, M. S.; CORLEY, D. G.; BEUTLER, J. A.; METRAL, C. J.; YUNES, R. A.; GIACOMOZZI, C. A.; CALIXTO, J. B. Phyllanthimides, a new alkaloid from *Phyllanthus Sellowianus*. *Journal of Natural Products*, n. 3, p. 617, 1988.

26. 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. *Fármaco*, v. 49, p. 675-677, 1994.
27. CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; NETO, A. S. O.; VALLE, R. M. R.; ERA, G. A. Antiespasmotic Effects of an Alkaloid extracted from *Phyllanthus Sellowianus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, (s.1), v. 17, p. 313-321, 1984.
28. CECHINEL FILHO, V.; Tese de Doutorado da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 1995.
29. KIER, L. B.; ROCHE, E. B. Medicinal chemistry of the mesoioinc compounds. *American Pharmaceutical Association*, v. 56, n. 2, p.149-168, 1967.
30. HALL; WONG; Scovill, 1995.
31. BRANDÃO, A. Talidomida, sim, mas com o acompanhamento do farmacêutico. *Pharmacia Brasileira*, v. 50, p. 41-42, 2005.
32. 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.
33. ROSA, P. W.; Síntese e atividade biológica de compostos imídicos cíclicos. Monografia Curso de Farmácia. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 1997.
34. RANG, H., P.; RITTER, J., M.; FLOWER, R., J.; HENDERSON, G. *Pharmacology*. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2016. 760 p.
35. BRUNTON, L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMAN, B.; *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. Ed. 13; Ed. Mc Graw Hill Brasil, Porto Alegre, 2019.
36. Lange, J.; Rump, S.; Ilczuk, I. et al. Synthesis and properties of cyclic derivatives of succinic acid with anticonvulsant activity. *Pharmazie, Eschbon*, v. 32(10), p. 579581, 1977.
37. LANGE, J.; KÁZMIERSKI, W.; DAROSZEWSKI, J. A quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis of the effects of aromatic substitution on the anticonvulsant activity and toxicity of arylsuccinimides. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, Cracow, v. 43, p. 71-77, 1991.

38. NICHOLSON, G. M.; SPENCE, I.; JOHNSTON, G. A. R. Effects of a depressant/convulsant pair of glutarimides on neuronal activity in the isolated spinal cord of the immature rat. *Neuropharmacology*, Oxon, v. 24(6), p. 461-464, 1995.
39. RIBLET, L. A.; TAYLOR, D. P.; EISON, M. S.; STANTAN, H. C. Pharmacology and neurochemistry of buspirone. *J. Clin. Psychiatry*; Memphis, v. 43, p.11-18, 1982.
40. YEVICH, J. P.; NEW, J. S.; SMITH, D.W. Synthesis and biological evaluation of 1(1,2-benzisothiazol-3-yl) -and (1,2-benzisoxazol-3-yl) piperazine derivatives as 215 potential antipsychotic agents. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 29(3), p. 359-369, 1986.
41. ZHENG, G.; POTTER, W. R.; SUMLIN, A.; DOUGHERTY, T. J.; PANDEY, R. K.; Photosensitizers Related To Purupurin-18-N-Alkylimides: A Comparative In Vivo Tumoricidal Ability Of Ester Versus Amide Functionalities. *Bioorg. Med. Lett.*, Oxon, v. 10 (2), p. 123-127, 2000.
42. MIYACHI, H.; AZUMA, A.; OGASAWA, A.; UCHIMURA, E.; WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y.; KATO, F.; KATO, M.; HASHIMOTO, Y. Novel biological response modifiers: phtalimides with tumor necrosis factor- $\alpha$  production – regulation activity. *J. Med. Chem*, Washington, v. 40(18), p. 2858, 1997.
43. SINGHAL, S.; MEHTA, J.; DESIKAN, R.; AYERS, D.; ROBERSON, P.; EDDLEMON, P.; MUNSHI, N.; ANAISSIE, E.; WILSON, C.; DHODPKAR, M.; ZELDIS, J.; BARLOGIE, B.; SIEGEL, D.; CROWLEY, J. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *Engl. J. Med.*, Waltham, v. 18, p. 341-1565, 1999.
44. RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. *Eur. J. Pharmacol.*, Amsterdam, v. 391, p. 97-103, 2000.
45. SOMMER, C.; MARZINIAK, M.; MYERS, M. M. The effect of thalidomide treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve. *Pain*, Amsterdam, v. 74, p.83-91, 1998.
46. OTT, I.; XU, Y.; QIAN, X.J. Fluorescence properties and antiproliferative effects of mono-, bis-, and tris- thiophenylaphtalimides: results of a comparative pilot study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 105, n.1, p. 75-80, 2011.

47. MUKHERJEE, A.; DUTTA, S.; SHANMUGAVEL, M.; MONDHE, D. M.; SHARMA, P. R.; SINGH, S. K.; SANYAL, U. J. 6-Nitro-2-(3-hydroxypropyl)-1H-benz[de]isoquinoline-1,3-dione, a potente antitumor agent, induces cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, v. 29, p. 175, 2010.
48. VERSCHUEREN, W. G.; DIERRYNCK, 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. T. Design and optimization of tricyclic phthalimide analogues as novel inhibitors of HIV-1 integrase. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, p. 1930-1940, 2005.
49. NUNES, R. J., Tese de Doutorado, The Hatfield Polytechnic; England, 1986.
50. LIMA, E. O.; QUEIROZ, E. F.; ANDRICOPULO, A. D.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CORRÊA, R.; CECHINEL FILHO, V.; *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 44, 185, 1999.
51. CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R.; VAZ, Z.; CALIXTO, J. B.; NUNES, R. J.; PINHEIRO, T.; ANDRICOPULO, A.; YUNES, R. Further studies on analgesic activity of cyclic imides. *Fármaco*, v. 53, p. 55-57, 1998.
52. LOWE, A. B.; *Polym. Chem.* 1, p. 17-36, 2010.
53. GAUTHIER, M. A.; GIBSON, M. I.; KLOK, H. A.; Synthesis of Functional Polymers by Post – Polymerization Modification. *Angewandte Chem. Int.*, v. 48, p. 48-58, 2009.
54. MATSUMOTO, A.; KUBOTA, T.; OTSU, T.; *Macromolecules*, v. 23, p. 4508-4513, 1990.
55. HOYLE, C. E.; VISWANATHAN, K.; CLARK, S. C.; MILLER, C. W.; NGUYEN, C.; JÖNSSON, S.; SHAO, L.; *Macromolecules*, 32, 2793, 1999.
56. MILLER, C. W.; JÖNSSON, S.; HOYLE, C. E.; VISWANATHAN, K.; VALENTE, E. J.; *J. Phys. Chem. B*, v. 105, p. 2707, 2001.
57. WANG, Y.; YANG, W. *Langmuir*, v. 20, p. 6225, 2004.
58. HOYLE, C. E.; CLARK, S. C.; JÖNSSON, S.; SHIMOSE, M. *Polymer*, v. 38, p. 5681, 1998.
59. UCHOA, A. F., et al. *JOC*, p. 8824-8832, 2011.
60. CHIN, T. S.; NASIR, F. I.; HASSAN, N. I.; Synthesis And Antimicrobial Activities of Eleven N-Substituted Maleimides. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, v. 20, n.4, p. 741-750, 2016.

## Synthesis and antibacterial activity of maleimides

E. Conrado<sup>1</sup>, C. J. Fracisco<sup>2</sup>, R. H. Piccoli,<sup>3</sup> A.F. Uchoa.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Anhembi Morumbi, Instituto de Engenharia Biomédica, São José dos Campos – SP, Brasil <sup>2</sup>Universidade Nilton Lins

<sup>3</sup>Universidade de Federal de Lavras

**Abstract** — Previous studies have shown that cyclic imides and their subclasses have obtained positive results in biological activities, showing anti-microbial, analgesic and antifungal therapeutic potential. Arousing the interest of the scientific community and the pharmaceutical industry, surpassing expectations in relation to certain drugs used in the market. In this work we specifically perform the synthesis of one of the subclasses of cyclic imides, called maleimides, as they are easy to obtain and with good yields, in addition to being versatile for conjugation with other molecules. The synthesized compounds were identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance, mass spectroscopy and antimicrobial activity was analyzed. In this work, a maleimide platform was obtained with different functional groups. These molecules showed synthesis yields (90%) and the activity was superior to the antibiotic strepto-mycine.

**Key words**— Maleimides; Drugs; Antimicrobial activity.

### I. INTRODUCTION

With the development of humanity, new diseases have emerged, which may be of a bacteriological, fungal or viral nature. Often, of a complex nature such as AIDS and Covid19. The emergence of new diseases requires ingenious studies in the sense of designing, synthesizing and determining the biological activity of new molecules. In this sense,

organic synthesis has been a great ally with the scientific community, favoring the significant growth of new drugs. Which can show promising results in biological effects and in advancing pre-clinical and clinical studies. Among these compounds, cyclic imides stand out <sup>[1]</sup>. In order to enhance the biological activity, chemical processes are used that imply molecular changes, this depends on the pharmacological and pharmacophoric groups present in the molecule. In this way, we seek to insert groups that can alter the physico-chemical properties, such as: hydrophobicity of the substance; alteration of the potential of pharmacological groups. This change occurs through the insertion of donor groups and / or electron acceptors.

Which enable the application of qualitative and quantitative methods, and correlate with the chemical structure and biological activity <sup>[2]</sup>. These methods make it possible to verify the interaction between the chemical structure and biological

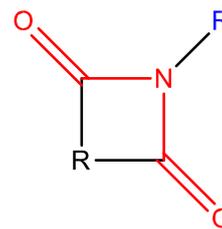
activity, or the chemical structure and some physical-chemical property. Additionally, it is possible to verify its effects caused in a substance (ligand) during the interaction with the biological receptor, justifying the main factors of this interaction [3]. The introduction of substituents produces changes in the physicochemical properties of the molecule (hydrophobicity, electronic density and structural conformation) and may lead to new syntheses [4]. Several methods have been developed to obtain a better understanding of the different physical-chemical

parameters, in a small series of substances or test group, which we mention the methods of Hansch [5], Craig [6], Topliss [7], and the modified Topliss method [7].

In this sense, cyclic imides are compounds that have great therapeutic potential. This family of compounds has the functional group characteristic of imides  $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})$  (Fig. 1), where R can be a hydrogen atom, an alkyl or aryl group linked to a carbon chain. Among the cyclic imides we can highlight: Maleimides, Succinimides, Glutarimides, Phthalimides, Naphtha-limides and their derivatives [1]. With relevance to

Maleimides, for being inhibitors of Prostaglandin Endo Peroxide Synthase (PGHS). This process occurs by enzymatic attack on olefinic and carbonyl carbons

[8]. Proving the importance of studying the biological activity of maleimides, as they are closely related to antimicrobial processes.



**Figure 1:** General Structure of Cyclic Imides

Cyclic imides and their subclasses have biological effects of great importance which we cite as maleimide as the main representative in anti-fungal, antibacterial and insecticidal activities [1]. The main objective of this work was to obtain a maleimide platform with different functional groups (R) and to determine the antibacterial activity of the compounds obtained in *Escherichia coli* ATCC 055, *Pseudomonas aureginosas* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

## II. MATERIAL AND METHODS

### *Synthesis*

Anilines and anhydride came from Sigma Aldrich; high purity analytical reagents. The solvents ethyl ether, acetic anhydride, chloroform, methanol and sodium acetate and from synthia do Brasil. Maleimides were synthesized in two stages: 1) the addition of anilines to maleic anhydride for the

formation of the corresponding acid and 2) reflux in acetic anhydride for the cyclization of the imide ring. This procedure was performed according to the process described in the literature [8], with a yield between 32-78%. The characterization was performed by nuclear magnetic resonance at 500 MHz, using deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) as a solvent and TMS as a reference.

#### Antimicrobial activity

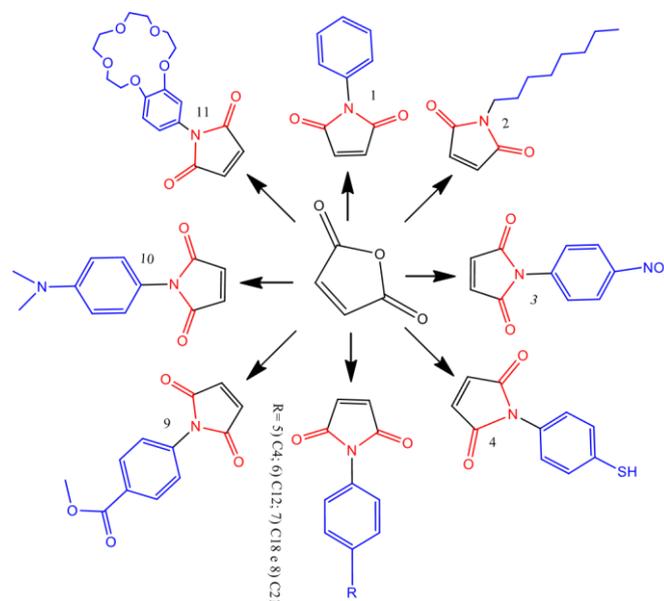
The radial diffusion method on nutrient agar was used, where the bacteria were activated in brain and heart broth by infusion and inoculated. After activation, the turbidity was corrected using the McFarland 0.5 scale. The sterile paper discs were immersed in a solution of the compounds dissolved in DMSO, at a concentration of 250mMol / mL. These plates were incubated at 37°C for 24 hours and the inhibition halos (mm) were read. Controls were performed with solvent (DMSO) and antibiotic (Streptomycin). The tests were carried out with the following bacteria: *Pseudomonas aureginosas* ATCC 27853 (gram negativa), *Escherichia coli* *Enteropatogênica* ATCC 055 (gram negativa), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (gram positivo) e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (gram positivo).

### III. RESULTS

#### A. Synthesis and structural characterization

In this research, 11 compounds were obtained, compound 1 has recognized antibacterial activity.

Compounds 2, 3 and 4, have already been synthesized, but never had their biological activities determined. The remaining compounds (5 to 11) are new. Figure 2 shows the synthetic scheme for obtaining these compounds.



**Figure 2:** Compound platform structure: (1) 1-phenyl-1H-pyrrole-2,5-dione; (2) 1-octyl-1H-pyrrole-2,5-dione; (3) 1-(4-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione; (4) 1-(4-mercaptophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione; (5) 1-(4-butylphenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione; (6) 1-(4-dodecylphenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione; (7) 1-(4-octadecylphenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione; (8) 1-(4-henicosylphenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione.

The 11 compounds were perfectly purified on a column with silica gel and characterized by high resolution mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance of Hydrogen (NMR1H) and carbon 13 (NMR13C). Only the spectra referring to methyl 4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1yl) benzoate (compound 9), are presented in figures 3, 4 and 5, respectively.

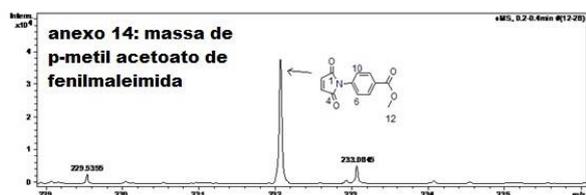


Figure 3: Mass spectrum of methyl 4-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)benzoate

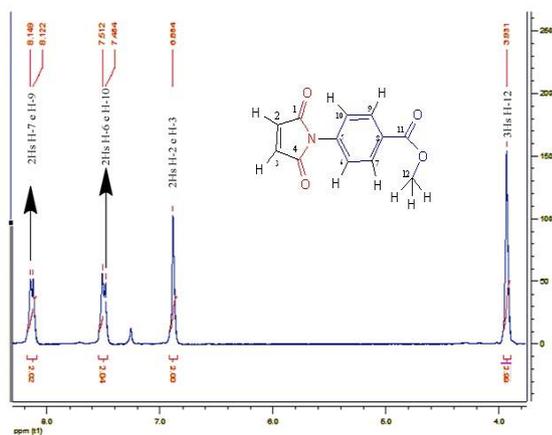


Figure 4: Spectrum of RMN 1H, in CDCl<sub>3</sub> a 500 MHz 4-(2,5-dioxo-2,5dihydro-1H-pyrrol-1-yl)benzoate

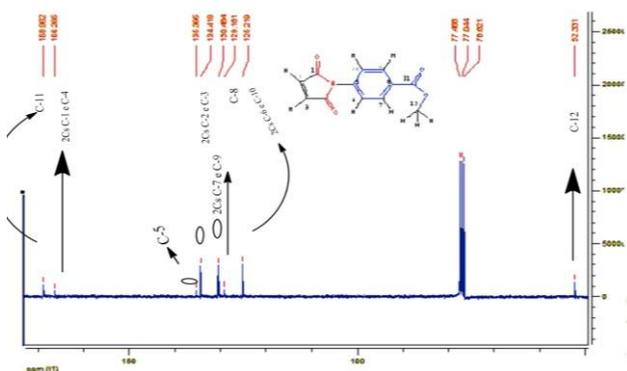


Figure 5: Spectrum of RMN 13C, in CDCl<sub>3</sub> a 125 MHz 4-(2,5-dioxo-2,5dihydro-1H-pyrrol-1-yl)benzoate

### B. Biological Activity

Antibacterial activity was determined in four strains of bacteria. Two gram positive

(*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria monocytogenes* ATCC two gram negative (*Pseudomonas aureginosas* ATCC 27853 e. *Escherichia coli* ATCC 055).

Table 1. Antimicrobial activity of maleimides by the agar diffusion method; Data are presented as mean and standard error of three independent experiments

Compound	Inhibition Zone (mm)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aureginosas</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Streptomycina	250mMol/mL	250mMol/mL	250mMol/mL	250mMol/mL
DMSO	16.4 ± 0.00	15.23± 0.00	13.51± 0.00	13.6 ± 0.00
1	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
2	15.8 ± 0.24	13.73 ± 0.84	18.4 ± 1.09	20.3 ± 0.57
3	8.43 ± 2.27	4.60 ± 1.88	0 ± 0.00	6.6 ± 0.13
4	8.4 ± 0.28	13.93 ± 0.67	10.5 ± 1.03	14.0 ± 0.75
5	9.0 ± 1.24	10.05 ± 1.44	8.1 ± 0.69	7.8 ± 0.60
6	13.3 ± 0.38	13.98 ± 1.05	16.7 ± 0.17	17.8 ± 0.09
7	4.2 ± 1.70	0 ± 0.00	2.1 ± 1.74	8.1 ± 0.36
8	5.4 ± 2.31	7.25 ± 0.18	0 ± 0.00	7.5 ± 0.14
9	8.8 ± 0.61	12.44 ± 0.95	11.2 ± 0.16	9.6 ± 1.01
10	4.7 ± 1.94	0 ± 0.00	6.4 ± 0.14	0.0 ± 0.00
11	9.6 ± 0.46	13.47 ± 0.82	13.6 ± 0.31	17.0 ± 0.46
11	15.0 ± 0.71	12.04 ± 0.59	16.8 ± 0.54	12.5 ± 1.25

The solvent (DMSO) had no inhibitory effect. Streptomycin (control) showed a regular inhibition pattern within the group of bacteria analyzed. With zone of inhibition of 15.2 - 16.4 mm for gram negative and 13.5 - 13.2 mm for gram positive. For gram negative bacteria, *E. coli* was most affected by compounds 1 and 11 (15.0 - 15.8 mm) and 5 (13.0 mm). *P. aureginosas* was more affected by

compounds 1, 3, 5 and 10 (13.47 -13.98 mm). For gram positive

*S. aureus* was more affected by 5, 11 and 1 (16.7-18.4 mm). *L. monocytogenes* was more affected by 10, 5 and 1 (17.0-20.3 mm).

#### IV. DISCUSSION

The maleimide resulting from the aliphatic amine octan-1-amine was obtained with 38% to obtain 1-octyl-1Hpyrrole-2,5-dione (compound 2). On the other hand, those obtained by anilines, showed much higher yields, between 78-92%. This reaction yield is related to the nucleophilicity of the amines. The higher yields were obtained for the

alkylated anilines of compounds 4, 5, 6, 7 and 8, all with yields greater than 85%. The higher yield of these compounds is related to the greater reactivity of these anilines, which was increased by the inductive effect of the alkyl chain donor. These compounds were perfectly purified by chromatography on silica gel, since the polarity of the products differs significantly from the reaction reagents and byproducts. The characterization was performed unequivocally by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR<sup>1H</sup>) and <sup>13</sup>CNMR at 500MHz and 125 MHz, respectively. The NMR<sup>1H</sup> spectra show a characteristic singlet in chemical

displacement ( $\sigma$ ) of 6.8 ppm for the 2H vinyls, characteristic of the maleimide ring. In the <sup>13</sup>CNMR the carbons of carbonyls 1 and 4 appear in  $\sigma \approx 170$  ppm.

Since it is known that the biological activity of maleimides is related to structural factors and their physiochemical properties, in this work a platform of maleimides with different functional groups was synthesized, which provided a study of the chemical structure related to biological activity. In *P. aereginosas* bacteria ATCC 27853, *E. coli* ATCC 055, *S. aureus* ATCC 25923 and *L. monocytogenes* ATCC 15313. Figure 1 presents a scheme of the synthesis strategy of the compounds that were used to study biological activity.

Within the concentrations used, no activity was observed for DMSO. The antibiotic Streptomycin did not show selectivity between gram positive and gram negative bacteria. For gram negative bacteria, compounds 11 and 1 showed a potential close to Streptomycin. The same was observed for compounds 10, 5, 1 and 3 in *P. aereginosas*. On the other hand, the gram positive results showed an inhibitory potential of the compounds in the following order 1, 11, and 5, higher than Streptomycin when applied to *S. aureus*. For *L. monocytogenes*, compounds 1, 5, and 10 also showed an inhibitory potential greater than Streptomycin.

Considering that these compounds have the maleimide ring as a pharmacological group, and that the mechanism of action occurs by enzymatic attack on the vinyl group conjugated to carbonyls and / or carbonyl group, and that they are present in all compounds; it is concluded that the differences between the activities seem to be related to the hydro / lipophilic balance. This relationship seems to be maximalized for compound 1, 5, 10 and 11 in gram positive.

#### V. CONCLUSIONS

For the synthetic process, it was found that the compounds obtained from anilines present a much higher yield than those obtained by aliphatic amines. Compounds 1, 5, 10 and 11 were the ones with the greatest potential. In some cases superior to the classic antibiotic Streptomycin. Since, the pharmacological group is the maleimide ring, and the mechanism of enzymatic attack on this ring is dependent on an internalization in microorganisms and specific organelles, it is concluded that this biological activity is dependent on the functionalization group, because allows adequate permeability, which is dependent on the hydro / lipophilic balance.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Fapesp, Process 2013 / 07937-8,

#### REFERENCES

1. Cechinel Filho V, Corrêa R, Yunes RA, Nunes RJ. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. *Química Nova*, 2003; v. 26, p. 230-241
2. Kalgutkar AS, Crews BC, Marnett L.J.; J. *Med.Chem.*1996; 39, 8
3. Hansch C, Fujita T.  $\rho$ - $\sigma$ - $\pi$  Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of American Chemical Association*, 1964; 86, 1616-1626
4. Craig PN. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1971; 14 (8), 680-684
5. Topliss JG. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1972; 15, 1006
6. Ferreira RS, 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*, 2011; v. 34, n. 10, p. 1770-1778
7. Huisgen R, Granskey R, Saver J. "The Chemistry of Alkenes". Ed. PATAI, S., London: Interscience Publishers, 1964; p. 739
8. Cava MP, Deana AA, Muth K. *et al. N-phenylmaleimide*. In: Baumgarten HE. *Org. Synth. Collective*. New York: John Wiley and Sons, 1973; v. 5, p. 944-946

Enter the information of the corresponding author:

Author: Claire Juliana Francisco

Institute: Universidade Nilton Lins

Street: Parque das Laranjeiras, Av. Prof. Nilton Lins, 3259 - Flores, Manaus - AM, 69058-030.

City: Manaus- AM

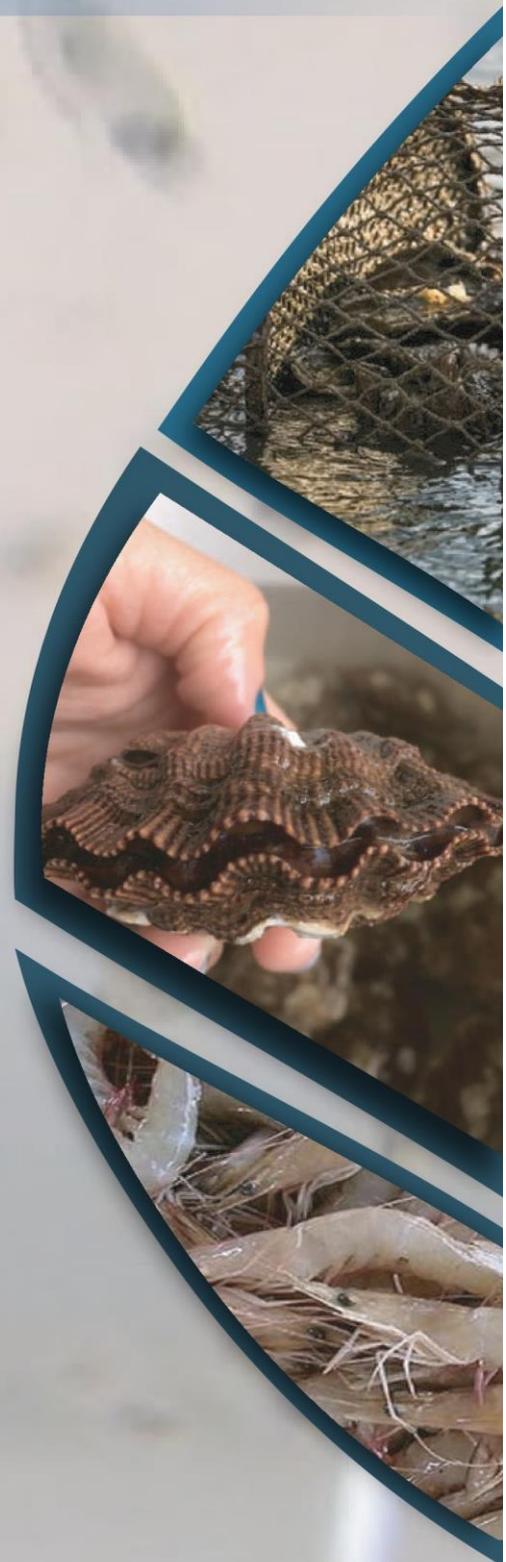
Country: Brasil

Email: clairejulianaf80@gmail.com

Multidisciplinarietà na

# Aquicultura:

Legislação, sustentabilidade e tecnologias



**Organizadoras:**  
Anita Rademaker Valença  
Poliana Ribeiro dos Santos  
Luciana Guzella



## ATIVIDADE BIOLÓGICA DE MALEIMIDAS CONTRA *Aeromonas* spp. ISOLADAS DE TAMBAQUI E CITOTOXICIDADE *IN SILICO*

Claire Juliana Francisco<sup>1</sup>; Sílvia Umeda Gallani<sup>2</sup>; Agnes Cecheto Trindade<sup>3</sup>; Edson Conrado Luz<sup>4</sup>; Renata Coelho Cavalcanti<sup>5</sup>; Gustavo Moraes Ramos Valladão<sup>6</sup>; Guilherme Campos Tavares<sup>7</sup>; Adjaci Fernandes Uchoa<sup>8</sup>.

### RESUMO

Bactérias destacam-se por causarem grandes perdas dentro da piscicultura (e.g. *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas jandaei*), e a síntese de novas moléculas com potencial para o controle das bacterioses é uma temática promissora dentro da aquicultura. Desta forma, moléculas denominadas maleimidas foram testadas contra bactérias isoladas de tambaqui *Colossoma macropomum* provenientes de pisciculturas do interior do estado do Amazonas. A técnica MALD TOF identificou *A. hydrophila* e *A. jandaei*. 100% das moléculas testadas apresentaram MIC=MBC. Apenas 2 moléculas apresentaram baixo risco de toxicidade teórico. O presente estudo, confirma o potencial das maleimidas para uso veterinário em aquicultura.

**Palavras-chave:** Imidas. Antibacteriana. Tratamento. Piscicultura.

### ABSTRACT

Bacteria stand out for causing great losses within fish farming (e.g. *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas jandaei*), and the synthesis of new molecules with potential for treatment becomes essential. Maleimides were tested on *Colossoma macropomum* bacteria from fish farms in the interior of the state of Amazonas. MALD TOF, identified *A. hydrophila* and *A. jandaei*. 100% of the tested molecules had MIC=MBC. Only 2 molecules had a low risk of theoretical toxicity. The present study confirms the potential of maleimides for veterinary use in aquaculture.

**Key words:** Imides. Antibacterial. Treatment. Fish-farming.

---

<sup>1</sup> Doutora em Biologia pela Universidade do Porto. MBR Technology LTDA  
<http://lattes.cnpq.br/8864707866294630>. [aquicultura2005@hotmail.com](mailto:aquicultura2005@hotmail.com).

<sup>2</sup> Doutora em Aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista. Professora do Departamento de Microbiologia Aplicada a Organismos Aquáticos da Universidade Nilton Lins.  
<http://lattes.cnpq.br/7315530238565999>. [silviaugallani@gmail.com](mailto:silviaugallani@gmail.com).

<sup>3</sup> Bacharel em Química pela Universidade do Vale do Paraíba. Mestranda em Engenharia Biomédica Universidade Anhembí Morumbi. <http://lattes.cnpq.br/8546885089800450>. [acecheto@gmail.com](mailto:acecheto@gmail.com).

<sup>4</sup> Bacharel em Química pela Faculdade São Bernardo dos Campos. Mestrando em Engenharia Biomédica, <http://lattes.cnpq.br/6621036244161640>. [ec\\_luz@hotmail.com](mailto:ec_luz@hotmail.com)

<sup>5</sup> Graduanda em Medicina Veterinária pela Universidade Nilton Lins. <http://lattes.cnpq.br/0750184633285299>. [rccavalcanti97@gmail.com](mailto:rccavalcanti97@gmail.com).

<sup>6</sup> Doutor em Aquicultura pelo Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista. Professor do Departamento de Parasitologia e Patologia de Organismos Aquáticos da Universidade Nilton Lins.  
<http://lattes.cnpq.br/3388795761978632>. [gmrvalladao@gmail.com](mailto:gmrvalladao@gmail.com).

<sup>7</sup> Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais. Professor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.  
<http://lattes.cnpq.br/0656314462372593>. [gcamposvet@hotmail.com](mailto:gcamposvet@hotmail.com).

<sup>8</sup> Doutor em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo. Professor no Programa Stricto Sensu Universidade Anhembí Morumbi. <http://lattes.cnpq.br/9073409107055774>. [adjaci@hotmail.com](mailto:adjaci@hotmail.com)

## INTRODUÇÃO

A aquicultura é caracterizada pela criação de organismos aquáticos em um ambiente controlado (SOFIA, 2020), sendo uma das cadeias produtivas mais importantes em todo o mundo. O mercado aquícola está em crescente desenvolvimento mundial sendo previsto atingir mais de \$ 208,9 bilhões até o ano 2025. Nos Estados Unidos, o crescimento será de 5,4% no mesmo período e na China de 4,3% nos próximos dois anos investindo em torno de \$ 9,4 bilhões em oportunidades de negócios dentro dessa área (RESEARCH e MARKETING, 2020).

Nos últimos seis anos, a produção aquícola brasileira apresentou um crescimento de 31%, e passou de 578.800 t (2014) para 758.006 t (2019). Somente a produção de peixes nativos representou 38% (288.042 t) de toda piscicultura brasileira em 2019 (ANUÁRIO PEIXE BR, 2020). No entanto, de acordo com SHIOGIRI et al., (2015), a realidade crescente da aquicultura dentro do agronegócio, possibilita maior contato dos animais com os diferentes tipos de patógenos por conta de alguns fatores:

i) aumento da densidade de animais em tanques; ii) falta de conhecimentos e tecnologias de manejo alimentar, que contribuem diretamente para a má qualidade da água. Isto contribui para o surgimento de surtos de doenças causadas por parasitas, fungos e bactérias. Tais doenças trazem grandes prejuízos, tanto para a qualidade e bem-estar animal quanto para o produtor, resultando em perdas econômicas. No Amazonas essas doenças ocorrem em peixes de grande importância na piscicultura, dentre eles está o tambaqui *Colossoma macropomum* um dos peixes mais consumidos na região norte do país. Tal espécie possui alta demanda na piscicultura por ter uma conversão alimentar satisfatória, fácil adaptabilidade ao ambiente e à ração artificial, além de fácil reprodução e rápido crescimento na fase larval e alevinagem.

Dentre as doenças infecciosas, as bacterioses destacam-se por causarem grandes perdas dentro da piscicultura e por terem algumas espécies consideradas como potencialmente zoonóticas. Bactérias do gênero *Aeromonas* são gramnegativas, estão presentes na água, e podem causar doenças em animais como mamíferos e anfíbios. Essas bactérias possuem uma vasta cadeia de fatores de virulência, o que permite criar resistência dentro do sistema de defesa do organismo do hospedeiro e, conseqüentemente levando-o a morte (RODRIGUES et al., 2019).

Na produção, a resistência antibacteriana está relacionada a transmissão vertical de plasmídeos (GUGLIELMETTI et al., 2009). Por esse motivo dentro do contexto atual, e visto que a resistência microbiana é desenvolvida há décadas, é urgente a descoberta de novos compostos para criação de alternativas de medicação eficazes no controle dessas doenças (SILVA e AQUINO, 2018) e para isso, a síntese química tem contribuído com essas descobertas. Para aperfeiçoar o desenvolvimento de

substâncias biologicamente ativas, dispõem-se processos químicos que acarretam em modificações moleculares. Tais modificações designam princípios ativos de novos fármacos. Essa construção de moléculas orgânicas, envolve cadeias lineares e cíclicas, assim como a presença de outros elementos (heteroátomos), onde a junção, implica em estruturas heterocíclicas, com a presença de um ou mais átomos diferentes do carbono. A partir dessa síntese, pode-se criar as chamadas imidas cíclicas, estruturas de grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos por ser de fácil obtenção, versatilidade e de menor custo. As imidas cíclicas e suas subclasses apresentam efeitos biológicos de grande importância, a qual citamos as maleimidas, como o principal representante nas atividades antifúngica, antibacteriana e inseticida (CECHINEL et al., 2003).

### **Desenvolvimento de novos fármacos**

A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com grande potencial terapêutico intensificou o processo de geração de novos conhecimentos científicos e tecnológicos nos setores de pesquisa, a fim de se obter resultados excelentes e relevantes experimentalmente, determinando uma notável elevação da quantidade e qualidade dos medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico, onde a maioria é de origem natural (BARREIRO et al., 2005; 2009). Assim síntese orgânica tem sido um grande aliado junto à comunidade científica, ocasionando um crescimento significativo de novas moléculas, com resultados promissores nos efeitos biológicos e no avanço dos estudos pré-clínicos e clínicos, dentre as quais destacam-se as imidas cíclicas (CECHINEL et al., 2003).

### **Síntese**

O desenvolvimento de substâncias biologicamente ativas, utiliza-se de processos químicos que implicam em modificações moleculares, dependendo dos grupos reativos para que essas modificações sejam realizadas. Inicialmente, procura se inserir grupos que apresentem alterações na hidrofobicidade da substância ou em grupos doadores/ e ou aceptores de elétrons que possibilitem a aplicação de algum método qualitativo e quantitativo correlacionado com a estrutura química e a atividade biológica (CECHINEL et al., 1998), possibilitando a verificação da interação entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR) ou da estrutura química e alguma propriedade físico-química (QSPR) e os efeitos que podem causar em uma substância (ligante) durante essa interação com o receptor biológico, justificando os fatores principais dessa interação (ARROIO et al., 2010).

A substituição de um átomo de hidrogênio por um determinado substituinte (grupo alquila, grupo nitro, grupo ciano, grupo carboxilato, halogênio etc.) pode modificar profundamente a potência, duração e ainda a natureza do efeito farmacológico da molécula. Os estudos de correlação estrutura-

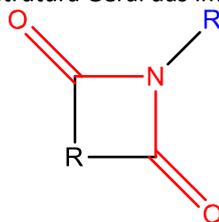
atividade, fundamentados no efeito substituinte em um determinado anel aromático, são muito comuns na química medicinal, uma vez que 50% dos fármacos ou substâncias bioativas possuem este tipo de anel. As introduções de substituintes produzem modificações que podem atingir as propriedades físico-químicas da molécula, como a hidrofobicidade, a densidade eletrônica e a conformação estrutural, podendo orientar para novas sínteses. Um planejamento racional de fármacos permite estabelecer um grupo de substâncias-teste para a realização de uma análise quantitativa da relação estrutura-atividade (CECHINEL et al., 2001).

### Imidas cíclicas

São compostos que apresentam o grupo  $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})$  (Fig. 1), onde R pode ser um átomo de hidrogênio, um grupo alquila ou arila ligados a uma cadeia carbônica.

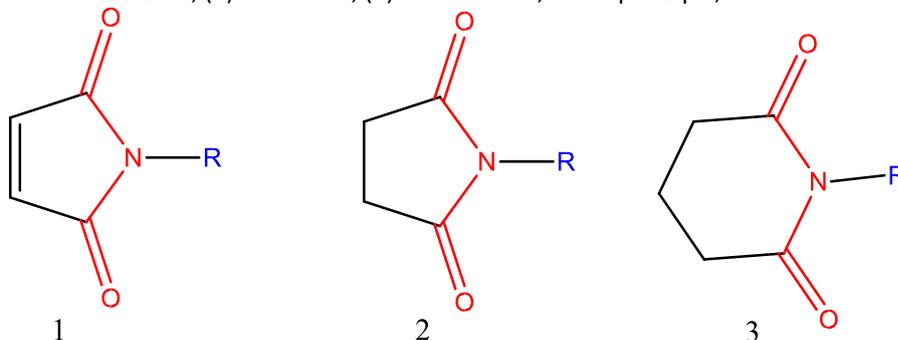
Podem ser divididas cinco classes: i) Maleimidas; ii) Succinimidas; iii) Glutarimidas; iv) Ftalimidas; v) Naftalimidas (Fig. 2), e seus derivados (CECHINEL et al., 2003).

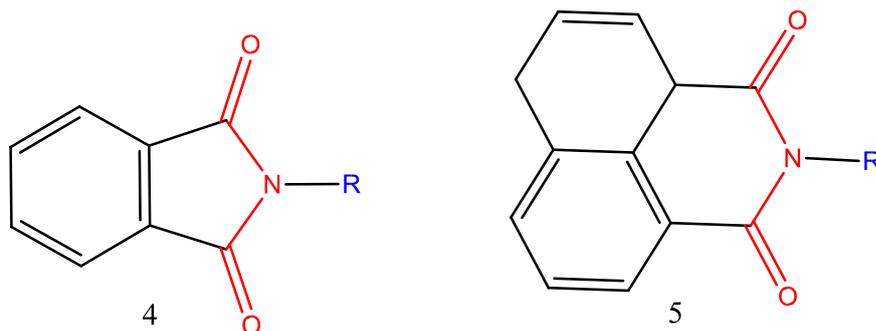
Figura 1: Estrutura Geral das Imidas Cíclicas



Fonte: Elaborado pelos autores

Figura 2: Diferentes subclasses de Imidas Cíclicas: (1) Maleimidas, (2) Succinimidas, (3) Glutarimidas, (4) Ftalimidas, (5) Naftalimidas, R: Grupo Alquil, Aril e outros





Fonte: Elaborado pelos autores

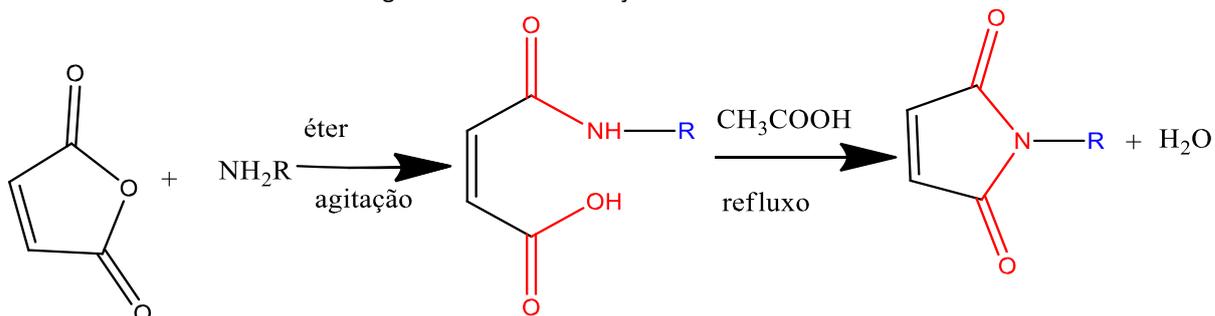
### Atividade antimicrobiana

Maleimidas, citraconimidas, 3-piperidinosuccinimidas, 3-morfolinosuccinimidas e seus derivados sulfonados já foram registradas há alguns anos com atividade contra bactérias (CORREA, 1997). A N-(p-N',N'-dimetilsulfamoilfenil)-3-morfolinosuccinimida e a N-(p-N'-fenilsulfamoilbenzil) citraconimida foram avaliadas com diferentes fungos e apresentaram uma ativação principalmente contra *Candida albicans*, *Candida neoformans* e *Microsporium gypseum* na concentração de 6,3µg/ml e *Aspergillus flavus*, *Microsporium canis* e *Aspergillus parasiticus* na concentração de 25 µg/ml. Em geral, observou-se que, com a introdução do grupo sulfamoil (formação da sulfonamida), têm-se um aumento na atividade biológica e que, com a presença de grupos eletrodoadores (metoxi ou dimetilamino), têm-se um aumento da atividade antimicrobiana, por facilitar a interação fármaco-microrganismo, pois a estrutura molecular da superfície da célula é muito polar (RANGE et al., 2016). Entretanto, algumas moléculas podem sofrer transformações “*in vivo*”, à derivados ativos (e.g. sulfonamidas), as quais possuem ação bacteriostática (BRUNTON et al., 2019) sendo considerada um pró-fármaco. Entretanto, com relação as imidas cíclicas e suas subclasses, a qual apresenta efeitos biológicos de grande importância, citamos a maleimida como o principal representante nas atividades biológicas (CECHINEL et al., 2003).

### Obtenção das maleimidas

Há muitas metodologias de obtenção das maleimidas, mas o método mais apropriado e versátil é a síntese destes compostos representados (Fig. 3) (HARGREAVES, 1970). O anidrido maleico reage com a amina apropriada para a transformação do respectivo ácido maleâmico, que é ciclizado facilmente usando agentes desidratantes de fácil acesso, por exemplo, o ácido acético, anidrido acético, acetato de sódio anidro, entre outros, sob aquecimento, permitindo o uso de diferentes aminas, como as anilinas substituídas, obtendo-se derivados maleimídicos N-substituídos com bons rendimentos (CECHINEL et al., 2003).

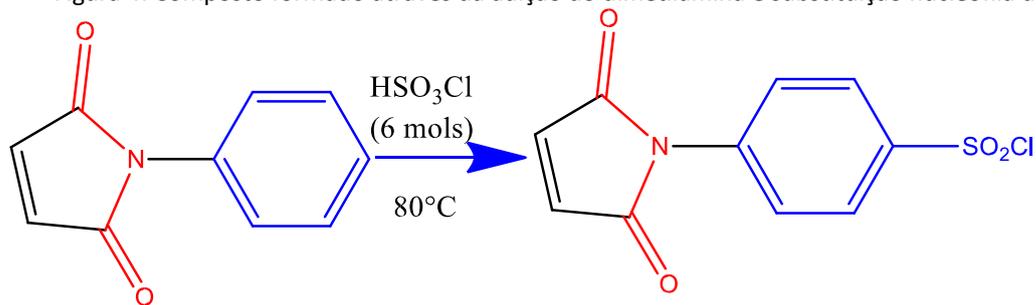
Figura 3: Rota de obtenção da Maleimida

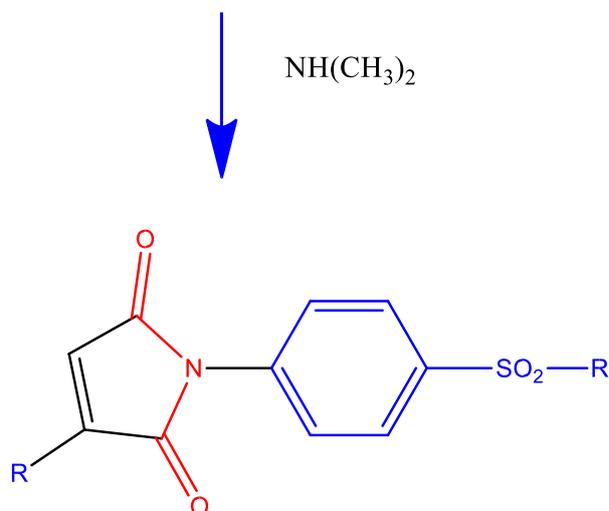


Fonte: Elaborado pelos autores

A N-fenilmaleimida, como outros substratos, tem um grande potencial farmacológico (CECHINEL; VALDIR, 1995). A N-fenilmaleimida reage com o ácido clorossulfônico em aquecimento, obtendo-se o cloreto de sulfonila e através deste composto obtêm-se diferentes sulfonamidas através de reações com aminas apropriadas, que são introduzidas na dupla ligação imídica (Fig. 4).

Figura 4: Composto formado através da adição do dimetilamina e substituição nucleófila do cloro





Fonte: Elaborado pelos autores

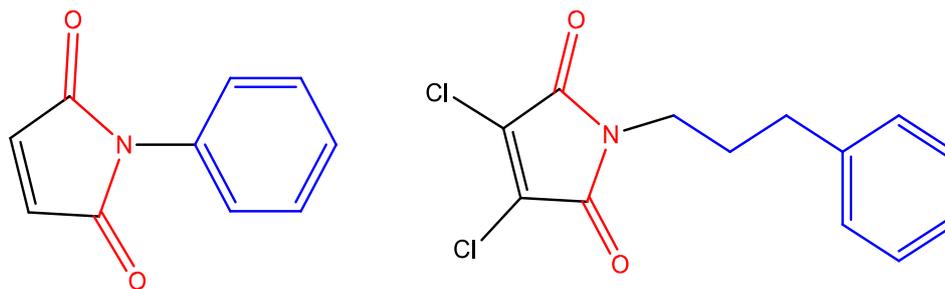
### Potencial farmacológico das maleimidas

Durante muitos anos, Hargreaves et al., (1970) estudou os efeitos biológicos das maleimidas, as quais destacamos os efeitos antifúngico, antibacteriano e inseticida. Verificou-se que as maleimidas tem uma atividade antifúngica de maior efetividade em relação as succinimidas, comprovando a importância da dupla ligação imídica (NUNES, 1986).

As N-alkilarilmaleimidas apresentaram atividades contra algumas bactérias patogênicas aos seres humanos, como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumonia*. Também apresentaram atividade contra fungos leveduriformes e micelais, causadores de micoses em humanos, como *Microsporium canis*, *Candida albicans*, *Penicilium* etc. (CECHINEL; VALDIR, 1995; LIMA et al., 1999), enquanto as N-alkularilmaleimidas substituídas apresentaram pouca variação nas atividades em relação as não substituídas, sugerindo que fatores estéricos foram os principais interferentes.

Os N-arilmaleimidas e N-alkuilfenil-3; 4-dicloromaleimidas (Fig. 5) foram testados contra diferentes microrganismos e observou-se que alguns compostos apresentaram resultados inibitórios maior que o cetoconazol. Com a introdução de dois átomos de cloro na dupla ligação do anel imídico, não apresentou um aumento significativo do efeito inibitório da atividade antifúngica, mas um importante fator relacionado a esta atividade é a distância entre o anel aromático e o anel imídico destes compostos (LIMA et al, 1999).

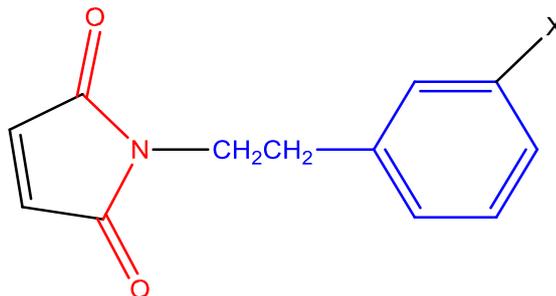
Figura 5: N-arilmaleimida, N-alkuilfenil-3, 4-Dicloromaleimida



Fonte: Elaborado pelos autores

Foram também testados a atividade analgésica e antipasmódica em diversos modelos “*in vivo*” e “*in vitro*” com resultados satisfatórios (CECHINEL; VALDIR, 1995). Verificou-se que o aumento da atividade analgésica pode ser explicado por causa da introdução de elétrons doadores no anel aromático do N-fenetilmaleimida (Fig. 6), os quais citamos 4-OCH<sub>3</sub>, 3,4-(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e 4-CH. A diminuição desta atividade quando se introduz o 4-Cl, um elétron-retirador, observando-se que os parâmetros eletrônicos devem estar envolvidos na atividade e que os elétrons-doadores aumentam a atividade analgésica (CECHINEL et al., 2003).

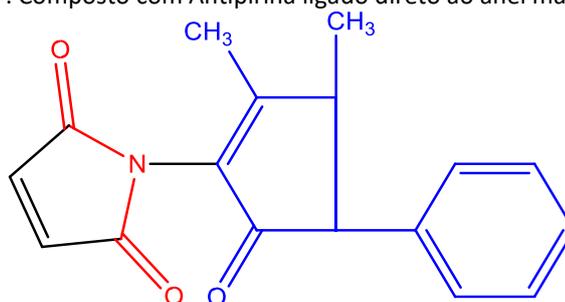
Figura 6: N -fenetilmaleimidias



Fonte: Elaborado pelos autores

Experimentos realizados contendo a antipirina ligada ao anel maleimídico resultou num aumento da atividade analgésico em 50 vezes maior do que em certos fármacos. Porém, todos os animais foram a óbito, sugerindo uma alta toxicidade do composto (Fig. 7) (CECHINEL et al., 1998).

Figura 7: Composto com Antipirina ligado direto ao anel maleimídico



Fonte: Elaborado pelos autores

No Brasil há somente duas moléculas autorizadas para uso veterinário para tratamento de bacterioses em peixes. Assim, testar novas moléculas sintetizadas a partir da reação de imidas cíclicas da subclasse maleimida para *Aeromonas* spp. causadoras de surtos de mortalidade em tambaqui cultivado em piscicultura, torna-se necessário como alternativa aos fármacos já existentes no mercado.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Localização

As maleimidas foram sintetizadas no laboratório da Faculdade de Química da Universidade de São Paulo – USP, São Paulo. As cepas bacterianas foram identificadas no Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Minas Gerais. O estudo para atividade biológica foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos do Departamento de Pesquisa em Aquicultura da Universidade Nilton Lins – UNL, Manaus.

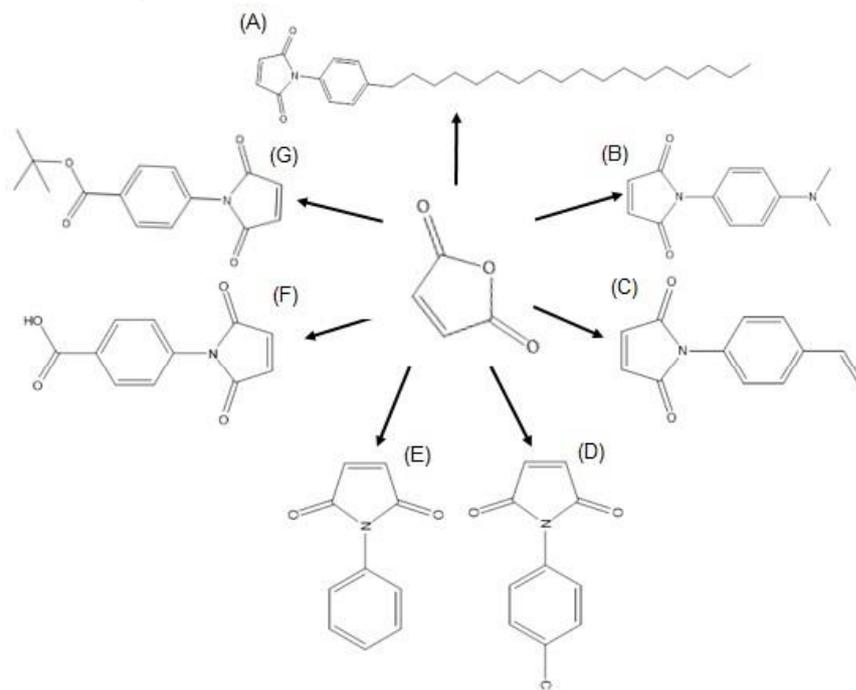
### Síntese de maleimidas

Em um erlenmeyer, foram dissolvidos 2 Mols de anidrido maleico em éter etílico e num segundo erlenmeyer foram dissolvidos 1 Mol da amina correspondente, ambos sob agitação por 30 minutos e em temperatura ambiente. Verteu-se o primeiro erlenmeyer ao segundo e formou-se um precipitado, o qual foi filtrado e lavado com porções de éter etílico e eliminado em estufa com circulação de ar à 50°C por 40 minutos. O produto foi submetido a ciclização em solução de acetato de sódio/anidrido acético, aquecido a 70° C com agitação, pelo período de 6 horas. A reação foi vertida numa mistura de água/gelo, neutralizada com hidróxido de amônio até atingir pH básico e extraídos em clorofórmio. O solvente eliminado através do equipamento rotaevaporador. Os componentes foram purificados em uma coluna cromatográfica com sílica, utilizando clorofórmio como eluente e foi sendo monitorado por cromatografia de camada delgada. Posteriormente, caracterizadas por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e por HPLC-massa de alta resolução por infusão direta.

Na Fig. (8) são apresentadas as estruturas das moléculas utilizadas no presente estudo: Molécula (A): 1-(4-octadecyphenyl) 1-H-pyrrole – 2,5- dione, com massa exata de 425,32938; Molécula (B): 1-(dimethylamino) phenyl) – 1H – pyrrole – 2,5 – dione, com massa exata de 216,08988; Molécula (C): 1-(4 – vinyphenyl) – 1H – pyrrole – 2,5 – dione, com massa exata de 199,0633; Molécula (D): 1 - (4 – chlorophenyl) – 1H pyrrole – 2,5 – dione, com massa exata de 207,00871; Molécula (E): 1 - phenyl – 1H – pyrrole – 2,5 dione, este composto teve 74% de rendimento e massa exata de 174,0582 para o íon molecular fenil-maleimida e o pico base de 206,0827 é referente a abertura do anel imida e a adição

do metanol durante o processo de análise. A fenil-maleimida foi sintetizada como padrão de referência para as outras moléculas sintetizadas para utilização no presente estudo, por se tratar de uma molécula com atividade biológica já comprovada em outros estudos (PRADO et al., 2004); Molécula (F): 4 – (2,5 – dihydro -1H – pyrrol -1-yl) benzoic acid, com massa exata de 217,03751; Molécula (G): *tert* – butyl 4 (2,5 – dioxo – 2,5 – dihydro – 1H – pyrrol – 1 – yl) benzoate, com massa exata de 273,10011.

Figura 8: Estruturas das moléculas utilizadas no estudo



Fonte: Elaborado pelos autores

### Caracterização molecular das bactérias

Cepas de *Aeromonas hydrophila* (AM-AE10) e *A. jandaei* (AM-AE02) isoladas durante surto de mortalidade em pisciculturas localizadas no interior de Manaus, foram identificadas pela espectrometria de massa MALDI-TOF. Esta ferramenta física permite a identificação de proteínas ribossômicas de uma determinada espécie bacteriana através da medida da relação massa/carga ( $m/z$ ) de espécies ionizadas em fase gasosa. Além disso, devido a limitada performance do MALDI-TOF para a identificação de isolados de *Aeromonas* oriundos de peixes a nível de espécie, a cepa que apresentou *score* inferior a 2.300, foi submetida ao sequenciamento do gene housekeeping *rpoD*, aumentando a confiabilidade taxonômica do isolado utilizado.

### Atividade antibacteriana

As culturas foram mantidas em Glicerol à -6 °C, reativadas em meio Ágar TSA em 28°C, durante 24 horas. Primeiramente, preparou-se uma suspensão de cada estirpe em estudo a partir de 2 a 3 colônias puras para 20 mL de PBS esterilizado, de forma a alcançar um padrão de turvação, com uso

de espectrofotômetro, absorvância entre 0,08 e 0,130 no comprimento de onda de 600 nm (BALOUIRI et al., 2016).

A atividade antibacteriana das maleimidás (n=7), foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando microplacas de 96 poços, com 180 µL do meio Müller Hinton II® (Sigma Aldrich) ajustado em relação a concentração de cálcio e magnésio. Para cada teste foram utilizados 20 µL de cada molécula, previamente dissolvidas em 1 mL DMSO. Cada solução estoque continha 20000 µg/mL da respectiva molécula em estudo, com exceção da molécula E, a qual foi preparada com 13330µg/mL. As moléculas A e G não apresentaram boa solubilidade em DMSO.

A Concentração Mínima Inibitória (CIM) de cada composto, frente à *Aeromonas hydrophila* e *A. jandeaí* foi definida como a menor concentração que promove a inibição do crescimento bacteriano. Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das novas moléculas, foram realizadas semeaduras em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Müller Hinton II® (Sigma Aldrich) a partir de todos os poços onde não houve revelação de crescimento bacteriano. Após o período de incubação de 24 horas a 28 °C, foi realizada leitura das placas, sendo a CBM correspondente à menor concentração onde não foi evidenciado crescimento bacteriano. Foram utilizados três controles: o controle de esterilidade com 200 µL de caldo MH; o controle de crescimento positivo, 200 µL de caldo MH e suspensão bacteriana e, por fim, o controle negativo com 200 µL de cada molécula. Para cada composto o ensaio foi realizado em triplicata.

A classificação de substâncias como agente bactericida ou bacteriostática foi definida de acordo com a razão CBM/CIM. Imidas com resultados entre 1-4 foram classificadas como bactericida e resultados ≥8 foram classificadas como bacteriostático (FRENCH, 2006).

### **Citotoxicidade *in silico***

A análise para cada *molécula* com relação a citotoxicidade *in silico*, foi efetuada no programa Osiris® (Osiris Property Explorer, Thomas Sander). Os parâmetros (MUT)=mutagênico; (TUM)=tumorigênico; (IRRI)=Irritante; (REP)=Interferência na reprodução; (PM)=peso molecular; (cLogP)=hidrofilicidade; (SOL)=solubilidade; (DL)=druglikeness e (DS)= drugscore foram calculados. As cores verde, amarelo e vermelho correspondem a baixo risco, médio risco e alto risco, respectivamente.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## Identificação dos isolados bacterianos

Na análise de MALDI-TOF, a cepa AM-AE10 foi identificada como *A. hydrophila* (score 2.599) enquanto que a cepa AM-AE02 foi identificada como *A. jandaei* (score 2.152). Após o sequenciamento do gene *rpoD* do isolado AM-AE02, foi obtida uma sequência consenso de 724 pb, posteriormente submetida a ferramenta blastn do banco de dados Genbank, confirmando o isolado como *A. jandaei* (cobertura de 99% e identidade de 98,9% com o a cepa *Aeromonas jandaei* strain 3348 – accession number CP043321.1).

## Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CBM)

Todas as moléculas apresentaram CIM=CBM, com efeito bactericida e valores das concentrações variando para cada molécula (Tabela 1).

Tabela 1- Valores de Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CBM) para *Aeromonas jandaei* e *A. hydrophila*;

Molécula	<i>A. jandaei</i> (µg/mL)			<i>A. hydrophila</i> (µg/mL)		
	CIM	CBM	CBM/CIM	CIM	CBM	CBM/CIM
A	>1000	-	-	>1000	-	-
B	62,5	62,5	1	125	125	1
C	62,5	62,5	1	62,5	62,5	1
D	62,5	62,5	1	250	250	1
E	166,25	166,25	1	166,25	166,25	1
F	500	500	1	500	500	1
G	>1000	-	-	>1000	-	-

Fonte: Elaborado pelos autores

Todos os compostos obtiveram um valor de concentração para CBM igual ao CIM, ou seja, as maleimidas causaram morte bacteriana atuando como bactericidas e não como bacteriostáticas (valor da razão CBM/CIM = 1). As moléculas A e G foram avaliadas, entretanto a CIM e CBM foi maior que 2000µg/ml, a provável justificativa para os maiores valores de CIM e CBM para estas moléculas se deve em decorrência da pouca solubilização com o DMSO, o que pode ter afetado negativamente a ação sobre as soluções bacterianas.

Com exceção das moléculas B e D, as demais moléculas, C, E e F apresentaram resultado CIM igual para ambas as espécies de *Aeromonas*, confirmando que as amostras sofrem, igualmente, lise celular e isto ocorre por que as moléculas avaliadas contêm um anel imida e a estrutura geral -CO-N (R) -CO-, caracterizando-as como hidrofóbicas e neutras e, portanto, podem atravessar membranas biológicas.

Nota-se que os valores foram similares entre as diferentes espécies de *Aeromonas* quando testadas com a mesma imida. As moléculas têm um anel imida. Isto indica que independente da espécie, a imida deve atuar de forma similar causando desestruturação da parede celular da bactéria. No entanto, em se tratando de diferentes gêneros de bactérias, os resultados podem ser significativamente alterados, pois a composição da parede celular pode ser significativamente diferente.

Prado et al., (2004), avaliou a atividade biológica de derivados de imidas cíclicas em cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli* comprovando a melhor eficácia da subclasse maleimidas na inibição do crescimento das bactérias no estudo. Recentemente, Jafari et al., (2017) investigou a atividade antimicrobiana da ftalimida, derivada de benzilamina, e certificou que, este fármaco derivado, exibiu notável atividade antimicrobiana contra *E. coli*, já que 16 g/mL foram suficientes para inibir o agente microbiano. Uma dose bem maior de 512 g/mL foi necessário para inibir *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Importante referir que no presente estudo 57,14% das moléculas, apresentaram valores entre 62,5 – 250 g/mL. Nos últimos anos, a descoberta de produtos químicos para o controle de patógenos tem demandado esforço intenso de pesquisadores, principalmente buscando fármacos eficazes, com propriedades toxicológicas e ambientais favoráveis para o controle seletivo de patógenos de peixes. Neste aspecto, os derivados de imidas cíclicas têm se mostrado fármacos em potencial, e de acordo com Lamberth (2019) isso ocorre porque essas moléculas aliam a potente atividade biológica da família dos heterocíclicos, bem como funções do grupo carboxila.

As imidas cíclicas possuem propriedades biológicas valiosas, como atividade citotóxica, antiinflamatória, antibacteriana e antifúngica (JAFARI et al., 2017). Porém, como o estudo destas moléculas é inédito, não se sabe qual o mecanismo de ação do fármaco (por exemplo, lise da parede celular, inibição da síntese protéica, inibição na síntese do ácido fólico), que permite a destruição dos agentes com potencial patogênico. Hwang et al., (2004) relata o modo de ação de um derivado de imida usado como herbicida com a inibição da biossíntese de clorofila. Recentemente, Luzzio (2019) relatou que o modo de ação de alguns derivados de imidas é baseado na interferência da via de transdução de sinal que regula a adaptação osmótica, e este tem sido o modo de ação mais relatado até o momento. Além disso, o autor afirma que sua ação não se restringe aos microrganismos, pois as imidas possuem modo de ação imunorregulatório, que permite redução dos níveis excessivos de TNF- $\alpha$ , o que aumenta ainda mais o potencial de aplicabilidade das imidas na aquicultura. De qualquer forma, independentemente do modo de ação destes fármacos, devido ao fato da lesão causada no agente ser irreversível (bactericida), a aplicação das moléculas nos permite maior segurança no que diz respeito ao controle do patógeno. As moléculas A e G foram avaliadas, entretanto, não obtivemos resultados na CIM pois elas não foram passíveis de dissolução em DMSO. Como a dissolução do

fármaco é um fator imprescindível para sua aplicabilidade, os fármacos derivados dessas duas moléculas não teriam potencial para uso na aquicultura comprovado neste estudo. Contudo, de acordo com Jafari et al., (2017), sua hidrofobicidade e estruturas neutras permitem o fácil atravessamento por membranas biológicas. Por isso, esses fármacos não devem ser desconsiderados, mas novos métodos de dissolução devem ser investigados.

### **Avaliação da citotoxicidade**

No desenvolvimento de novas moléculas é importante que uma atividade antibacteriana promissora não confira toxicidade para as células do hospedeiro. Muitos dos compostos que se apresentam inicialmente como promissores acabam por apresentar citotoxicidade em células do hospedeiro, não prosseguindo para avaliação *in vivo*. Assim, no presente trabalho foi avaliada *in silico*, a citotoxicidade dos compostos utilizados no experimento (Tabela 2).

Na análise *in silico* realizada no programa Osiris<sup>®</sup>, apenas duas moléculas (A e F) derivadas da subclasse maleimidias apresentaram baixo risco de toxicidade teórico (representadas na cor verde), as demais moléculas (B, C, D, E e G), apresentaram alto risco, alternando em mutagênico, tumorogênico e irritante (representados na cor vermelha), sendo a molécula C, apresentando médio risco (representada na cor amarela) com relação a ser irritante. Importante referir que os fármacos utilizados como referência, entre eles, o florfenicol, apresentou alto risco de toxicidade em todos os requisitos: i) mutagênico; ii) tumorogênico; iii) irritante; iv) interferência reprodutiva (sendo representados na cor vermelha).

Os pesos moleculares foram calculados e ficaram compreendidos em 273 e 425. Os valores de cLogP indicam a probabilidade da substância ser bem absorvida, devendo ficar abaixo de 5,0 (segundo informações contidas no programa). Os valores obtidos em nosso estudo, para o cLogP (hidrofilicidade) variam de 0,23 a 8,77, portanto, a única molécula que apresentou valor acima de 5 foi a A (C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>2</sub> = 8,77). A previsão de solubilidade segundo o programa Osiris<sup>®</sup> varia entre -3,06 e 2,33, sendo assim considerados bons candidatos para aspectos envolvendo absorção e biodisponibilidade. A solubilidade teórica calculada, apresentou valores compreendidos entre -6,9 e -2,07 para as moléculas (B, C, D, E e F), e a molécula G (C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>) apresentou solubilidade S= -3,0. Outro parâmetro calculado foi o *DrugLikeness*, onde verificamos os valores de -30,33 a -4,49, demonstrando que todas as estruturas testadas não apresentam similaridades com as estruturas de moléculas comercializadas.

Já o parâmetro de *DrugScore*, que representa o potencial da molécula tornarse um fármaco, variou de 0,12 a 0,48, ou seja, maiores que o florfenicol e menores que a oxitetraciclina, fármacos comerciais

utilizados como referência para o teste *in silico*. Entretanto a molécula F (C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub>) apresentou valor de 0,48, ficando então, próximo de 1, valor de referência do programa.

Tabela 2- Resultados do teste *in silico*. As cores verde, amarelo e vermelho correspondem a baixo risco, médio risco e alto risco, respectivamente. Os parâmetros (MUT)=mutagênico; (TUM)=tumorogênico; (IRRI)=Irritante; (REP)=Interferência na reprodução; (PM)=peso molecular; (cLogP)=hidrofilicidade; (SOL)=solubilidade; (DL)=druglikeness e (DS)=drugscore são apresentados.

	Fórmula	Riscos de toxicidade				Farmacocinético			Drug		
		MUT	TUM	IRRI	REP	PM	cLogP	SOL	DL	DS química	
(A)	C <sub>28</sub> H <sub>43</sub> N O <sub>2</sub>						425,0	8,77	-6,9	-24,9	0,12
(B)	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N 2O <sub>2</sub>						216,0	0,64	-2,11	-13,02	0,17
(C)	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> N O <sub>2</sub>						199,0	1,45	-2,88	-9,86	0,22
(D)	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> Cl NO <sub>2</sub>						207,0	1,35	-2,81	-6,31	0,28
(E)	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N O <sub>2</sub>						173,0	0,74	-2,07	-4,49	0,29
(F)	C <sub>11</sub> H <sub>7</sub> N O <sub>4</sub>						217,0	0,23	-2,09	-8,11	0,48
(G)	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N O <sub>4</sub>						273,0	1,8	-3,0	-30,33	0,27
	Oxitetraciclina						460,0	2,18	-1,45	5,36	0,8
	Florfenicol						357,0	0,2	-2,91	2,55	0,11

Fonte: Elaborado pelos autores

## CONCLUSÃO

Os efeitos biológicos observados, no presente estudo, confirmam o potencial das maleimidias para uso veterinário em aquicultura, principalmente em bacterioses causadas por *Aeromonas* spp. Além disso, ressalta-se a necessidade do desenvolvimento de estudos *in vivo*, especialmente, destinados à eficácia e toxicidade de tais moléculas para os peixes e demais organismos planctônicos (e.g. copépodos, rotíferos) e requisitos para segurança alimentar humana.

## REFERÊNCIAS

ARROIO, Agnaldo; HONÓRIO, Káthia M; SILVA, Albérico B. F; Propriedades Químico-Quânticas empregadas em estudo das relações estrutura-atividade. Rio de Janeiro, Química Nova, São Paulo, v.33, n.3, p. 694-699, fev. 2010.

BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods forin vitroevaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. Xiam, v.6, n. 2, p. 71-79, abr. 2016.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PORNFAR). *Química Nova*, São Paulo, v.28, p. 56s-63s, nov/dez. 2005. Supl.0.

BARREIRO, Eliezer J; BOLZANI, Vanderlan da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-688, mai/ jun. 2009.

BRUNTON, Laurence L; HILAL-DANDAN, Randa; KNOLLMANN, Björn C. Tradução:

Augusto Langeloh, Beatriz Araujo do Rosario, Carlos Henrique de Araujo Consedey, Denise Costa Rodrigues, Maria Elisabete Costa Moreira, Patricia Lydie Voeux. *As Bases Farmacológicas da Terapeutica de Goodman e Gilman*. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2019. 1760p.

CECHINEL Filho, Valdir; CORRÊA Ricardo; YUNES, Rosendo Augusto; NUNES, Ricardo Jose; Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 230-241, mar/abr. 2003.

CECHINEL Filho, Valdir; CORRÊA, Ricardo; VAZ, Zulma; CALIXTO Joao Batista;

NUNES, Ricardo Jose; PINHEIRO, Tania Roseli; ANDRICOPULO, Adriano Defini; YUNES, Rosendo Augusto. Further studies on analgesic activity of cyclic imides. *IL Fármaco*, Pavia, v. 53, n. 1, p. 55-57, jan. 1998.

CECHINEL Filho, Valdir; YUNES, Rosendo Augusto. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. *In: YUNES; Rosendo Augusto, CALISTO; Joao Batista. (org.). Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente*. Chapecó: Argos, 2001. 47-75p.

CECHINEL Filho, Valdir. Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais e correlação com estrutura química e atividade farmacológica. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Faculdade de Química de Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1995.

CORREA, Rogerio. Síntese de compostos imídicos cíclicos de interesse biológico. Tese (Mestrado em Química). Faculdade de Química de Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

FRENCH, Garry L. Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections – the potential role of daptomycin. *J Antimicrob Chemother.*, Birmingham, v.58, n. 6, p.1107-1117, out. 2006.

GUGLIELMETTI, Elena; KORHONEN, Jenni M.; HEIKKINEN, Jouni; MORELLI,

Lorenzo; WRIGHT, Atte von. Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. *FEMS Microbiol Lett.*, England, v. 293, n. 1, p. 28-34, abr. 2009.

HARGREAVES, Michael K; PRITCHARD, J. G.; DAVE, H. R. Cyclic carboxylic monoimides. *Chem. Rev.*, London, v. 70, n. 4, p. 439-469, ago.1970.

HWANG, In Taek, Hong, Kyung Sik; Choi, Jung Sup; Kim, Hyoung Rae; Jeon, Dong Ju; Cho, Kwang Yun. Protoporphyrinogen ix-oxidizing activities involved in the mode of action of a new compound N-[4-Chloro-2-Fluoro-5-{3-(2-Fluorophenyl)-5-Methyl-4, 5-Dihydroisoxazol-5-Yl-Methoxy}-Phenyl]-3, 4, 5, 6-Tetrahydrophthalimide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, San Diego, v.80, n. 2, p. 123-130, ago. 2004.

JAFARI, Elham; JARAH-NAJAFABADI, Najmeh Taghi; JAHANIAN-NAJAFABADI, Ali; POORIRANI, Safoora; HASSANZADEH, Farshid; SADEGHIAN-RIZI, Sedighe. Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of cyclic imides derived from phthalic and succinic anhydrides. *Research in pharmaceutical sciences*, Isfahan, v.12, n. 6, p. 526-534, dez. 2017.

LAMBERTH, Clemens. Synthesis and Applications of Cyclic Imides in Agrochemistry. *In: LUZZIO, Frederick A. (org.). Imides: Medicinal, Agricultural, Synthetic Applications and Natural Products Chemistry*. 1. ed. Cambridge: Elsevier, 2019. cap. 8, p. 335-352.

LIMA, Edeltrudes de Oliveira; QUEIROZ Emerson Ferreira; ANDRICOPULO, Adriano

Defini; NUNES Ricardo Jose; YUNES, Rosendo Augusto; CORRÊA, Ricardo;

CECHINEL Filho, Valdir. Evaluation of antifungal activity of N-arylmaleimides and N-phenylalkyl-3,4-dichloromaleimides. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, Concepción, v. 44, n. 2, p. 185-189, jun. 1999.

LUZZIO, Frederick A. Talidomida e Análogos. *In: LUZZIO, Frederick A. Imides: Medicinal, Agricultural, Synthetic Applications and Natural Products Chemistry*. 1. ed. Cambridge: Elsevier, 2019. cap. 10, p. 367-429.

NUNES, Ricardo Jose. The chemistry and biological activity of cyclic imidobenzenesulphonyl derivatives. Tese. (Doutorado em Química). Hatfield Polytechnic, University of Hertfordshire, Inglaterra, 1986.

PEIXE BR - Associação Brasileira de Piscicultura. Anuário 2020. São Paulo: PEIXE BR, 2019. 136 p. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/>. Acesso em: 04 outubro 2020.

PRADO, Silvia Regina Tozato; CECHINEL-Filho, Valdir; BUZZI, Fatima Campos;

CORREA, Rogerio; CADENA, Silvia Maria Correia Suter; OLIVEIRA, Maria Benigna

Martinelli. Biological Evaluation of Some Selected Cyclic Imides: Mitochondrial Effects and *in vitro* Cytotoxicity. *Zeitschrift fur Naturforschung*, Alemanha, v. 59c, n. 9-10, p. 663-672, set. 2004.

RANG, Humphrey P; RITTER, James M; FLOWER, Roderick J; HENDERSON,

Graeme. **Pharmacology**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2016. 760 p.

RESEARCH AND MARKET - Aquaculture Market Analysis, Trends, and Forecasts.

Dublin: Research and Market, 2020. 120 p. Disponível em:  
<https://www.researchandmarkets.com/reports/5007833/global-aquaculture-market2020-2024>.  
Acesso em: 02 abril de 2020.

RODRIGUES, Marianna Vaz; FALCONE-DIAS, Maria Fernanda; FRANCISCO,

Claire Juliana; DAVID, Gianmarco Silva; SILVA, Reinaldo José; ARAÚJO JÚNIOR,

João Pessoa. *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Brazilian aquaculture: a public health problem. Emer Life Sci Res., Kanpur, v. 5, n. 1, p. 48-55, mai. 2019.

SHIOGIRI, Natália Sayuri; CRUZ, Claudinei da; FERNANDES, Marisa Narciso.

Antimicrobianos utilizados no controle de doenças de peixes em sistemas de cultivo. *In*: Tavares-Dias, Mariano, Marcos; Wagner dos Santos (org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. v1. São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. cap. 13, p. 245-263.

SILVA, Moisés Oliveira; AQUINO, Simone. Resistência aos antimicrobianos: uma revisão dos desafios na busca por novas alternativas de tratamento. Rev. Epidemiol. Controle Infecç., Santa Cruz do Sul, v. 8, n. 4, p. 472-482, out. 2018.

SOFIA, 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma: FAO, 2020. 244 p Disponível em: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>. Acesso em: 10 de out 202

