

## SINTESE DE DIHIDROPIRIMIDINONAS EMPREGANDO ÁCIDO SALICÍLICO COMO CATALISADOR E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

**POSSIGNOLLO, Jéssica<sup>1</sup>; RITTER, Marina<sup>2</sup>; FARIAS, Marília D.<sup>2</sup>; OLIVEIRA, Priscila<sup>2</sup>; FERREIRA, Mauricio M.<sup>2</sup>; MARTINS, Rosiane M.<sup>2</sup>; PERLEBERG, Marisani B.<sup>2</sup>; OLIVEIRA, Simone<sup>3</sup>; LUND, Rafael G.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Farmácia; <sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção; <sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Faculdade de Odontologia. E-mail: rafael.lund@gmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

Atualmente a preocupação com o meio ambiente está tendo destaque na indústria química, que está investindo em processos mais limpos, utilizando catalisadores seletivos ou menos tóxicos. Têm sido utilizadas novas estratégias para contribuir com o desenvolvimento sustentável como: as reações em líquidos iônicos, utilizando solventes biorenováveis, e fonte de energia alternativa como ultrassom.

Em 1893, Pietro Biginelli relatou a síntese de dihidropirimidinonas, que são heterociclos de seis membros contendo dois átomos de nitrogênio na posição 1 e 2. Esta síntese foi realizada através de uma reação multicomponente de ciclocondensação, que é definida como um processo em que três reagentes são combinados em uma única etapa para formar um produto que incorpora as características estruturais de cada reagente (BIGINELLI, 1893).

Esta reação é efetuada pela mistura de aldeído aromático, acetoacetato de etila, uréia ou tiouréia como dinúcleofilos e catalisada por meio ácido e refluxo. No entanto os catalisadores empregados são tóxicos, tornando essa via agressiva ao meio ambiente. Por isso, vários estudos têm investigado novos catalisadores e condições reacionais para esta síntese (VDOVINA, MAMEDOV, 2008).

Os produtos provenientes deste tipo de reação possuem algumas atividades biológicas comprovadas, como por exemplo, ação antibacteriana e antifúngica (ASHOK et al., 2007), anti-inflamatória (KAPPE, 2000) e antioxidante (STEFANI et al., 2006, VASCONCELOS et al., 2012).

Tendo em vista a necessidade de processos mais ambientalmente corretos este estudo objetivou o desenvolvimento de uma reação menos agressiva ao meio ambiente para a síntese desses compostos, em ultrassom utilizando como catalisador o ácido salicílico, e etanol como solvente. A partir dos compostos resultantes desta reação analisou-se a atividade antifúngica dos mesmos através da técnica de microdiluição em caldo com base no documento de referência (M27A3) (CLSI, 2008) adaptado, frente a quatro cepas de *Candida* spp.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

#### 2.1 SINTESE DE DIHIDROPIRIMIDINONAS

Em um frasco, adicionaram-se os seguintes reagentes: 5 mmol de aldeído, 0,6 g (10 mmol) de uréia, e 0,65 mL (5 mmol) de acetoacetato de etila. Após adicionou-se 10 mL de solvente etanol e o catalisador ácido salicílico (1g).

Levou-se ao ultrassom, para a reação por trinta minutos na amplitude de 24%. Extraiu-se a fase orgânica com 20 mL de clorofórmio e lavou-se duas vezes

com 20 mL de água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro para retirar a água restante da reação, filtrada e o solvente evaporado em um rotaevaporador.

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada. Verificou-se o ponto de fusão de cada composto e comparando-se os mesmos com a literatura. O esquema desta reação está mostrado na Fig. 1.

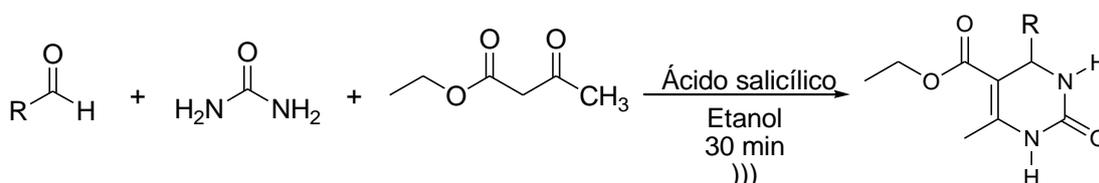


Figura 1 – Esquema para a síntese de dihidropirimidinonas a partir de diferentes aldeídos.

## 2.2 TESTES PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

### 2.2.1 Compostos químicos e diluição

Para os testes de suscetibilidade, foram utilizados três produtos derivados de dihidropirimidinonas. Pesou-se 500 µg destes compostos e dissolvendo-se os mesmos em 1 mL de álcool etílico 70%. A partir da solução mãe (500 µg/mL) foram obtidas sucessivas diluições em uma progressão geométrica de razão 0,5, obtendo-se desse modo uma variação de concentração de 0,49 a 500 µg/mL. Posteriormente 20 µL das diluições foram suspensas em 1980 µL de meio de cultura.

### 2.2.2 Preparo do inóculo

Foram selecionadas e cultivadas 24h antes do teste, quatro cepas diferentes para a preparação dos inóculos. Essas cepas após serem cultivadas por 24h a 37°C, foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril até turvação correspondente a 0.5 do padrão de McFarland (1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL). Em seguida, a suspensão foi ajustada para 10<sup>7</sup> UFC/mL, dissolvendo-se 50 µL dessa suspensão inicial em 4,95 mL de salina estéril. Então, 250 µL dessa suspensão foram diluídos em 9,75 mL de meio de cultura.

### 2.2.3 Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima)

O teste de susceptibilidade antifúngica foi realizado em placas de 96 poços de fundo chato (Nuclon<sup>®</sup>), constituídos em oito séries identificadas de A à H, cada qual com doze poços. Em cada micropoço da placa de microcultivo foram adicionadas 100 µL de inóculo e mais 100 µL de cada concentração dos compostos, exceto nas colunas de controle positivo e negativo, em que foram empregados 100 µL de inóculo mais 100 µL de meio de cultura e 100 µL da suspensão do extrato mais 100 µL de meio de cultura, respectivamente. As placas de microcultivo foram então incubadas a 37 °C por 48 h.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tab. 1 estão relacionados os compostos sintetizados e os respectivos pontos de fusão encontrados experimentalmente, comparando-os com os da literatura.

Tabela 1 – Dihidropirimidinonas sintetizadas e seus pontos de fusão.

Comp.	R	Peso molecular (g/mol)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de fusão da literatura (°C)	Rend. (%)
<b>A</b>	Ph	260,12	155-165	206-208 (KARADE, et al 2007)	50
<b>B</b>	Ph-4-OH	276,11	222-225	198-200 (GANGADASU, et al 2006)	80
<b>C</b>	Ph-4-Br	338,03	205-208	213-215 (KARGAR, et al 2011)	55
<b>D</b>	Ph-4-F	278,11	120-125	182-184 (KARADE, et al 2007)	60
<b>E</b>	Ph-4-OCH <sub>3</sub>	290,13	190-198	203 (KARGAR, et al 2011)	93
<b>F</b>	C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O	250,1	198-203	208-210 (KARGAR, et al 2011)	75

Na Tab.1 observa-se que os compostos **C**, **E** e **F** foram os que apresentaram os pontos de fusão experimentais mais próximos aos da literatura (KARGAR, et al 2011), enquanto que o composto **B** mostrou uma ligeira diferença (GANGADASU, et al 2006). Já os compostos **A** e **D** apresentaram uma diferença maior, indicando que estes não estavam totalmente puros ou havia umidade (KARADE, et al 2007). Os rendimentos dos compostos foram de moderados a bons.

Os compostos foram confirmados por espectroscopia de massas, em um Espectrômetro LC/MS/MS Applied Biosystems Sistema de Trap Linear modelo 3200 QTRAP. Os parâmetros foram: Cortina de Gás (CUR)=10, Ion Source Gas (GS2)=0.

Na Fig. 2 está demonstrado o espectro de massas para o composto **B**, onde se pode observar o íon molecular corresponde ao composto esperado.

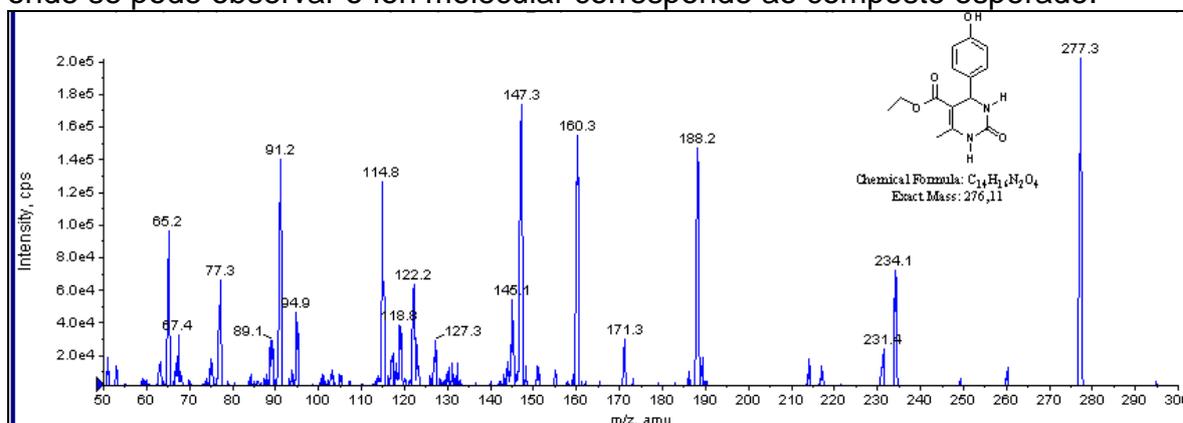


Figura 2 – Espectrometria de massa do composto **B**.

A leitura do teste antifúngico foi realizada por comparação visual do crescimento das cepas nos poços 1 a 10 com os do controle positivo, onde não foi colocado o composto testado. Observou-se crescimento dos fungos em todos os poços, mostrando que o composto não teve atividade contra as cepas testadas. O único poço em que não ocorreu crescimento foi o de número 11, que correspondia ao controle negativo, mostrando que o teste estava livre de contaminações. Se o resultado tivesse sido positivo a menor concentração capaz de produzir proeminente inibição (50%) do crescimento das cepas em relação ao poço controle-positivo seria identificada como a CIM (Concentração Inibitória Mínima).

## 4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos concluiu-se que a técnica utilizada é eficiente para a síntese dos compostos, além de utilizar reagentes mais baratos e menos tóxicos como o ácido salicílico e etanol. Em relação à avaliação antifúngica os resultados não foram positivos para as quatro cepas de *Candida* spp. testadas.

## 5 REFERÊNCIAS

ASHOK, M.; HOLLA, B. S.; KUMARI, N. S. Convenient one pot synthesis of some novel derivatives of thiazolo[2,3-b]dihydropyrimidinone possessing 4-methylthiophenyl moiety an evaluation of their antibacterial and antifungal activities. **Eur J Me Chem**, v. 42, n. 3, p. 380-385, 2007.

BIGINELLI, P. Derivati aldeiduredidi degli eteri acetil- e dssal- acetico. **Gazz Chim Ital**, v. 23, p. 360-416, 1893.

GANGADASU, B.; NARENDER, P.; RAJU, B.C.; RAO, V. J. Calcium chloride catalyzed three component, one-pot condensation reaction: an efficient synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones. **Indian J Chem**, v. 45 B, p. 1259-1263, 2006.

KAPPE, C. O. Recent advances in the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. New tricks from an old dog. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, p. 879-888, 2000.

KARADE, H. N.; SATHE, M.; KAUSHIK, M. P. Synthesis of 4-Aryl Substituted 3,4-Dihydropyrimidinones Using Silica-chloride Under Solvent Free Conditions. **Molecules**, v. 12, p. 1341-1351, 2007.

KARGAR, M.; HEKMATSHOAR, R.; MOSTASHARI, A.; HASHEMI, Z. Efficient and green synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones using imidazol-1-yl-acetic acid as a novel, reusable and water-soluble organocatalyst. **Catal Commun**, v. 15, p. 123-126, 2011.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (CLSI) Método de Referência para teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – segunda edição. Tradução de Silvia Figueiredo Costa. São Paulo, 2008.

SANSEVERINO, A. M. Síntese Orgânica limpa. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 102-107, 2000.

STEFANI, H. A.; OLIVEIRA, C. B.; ALMEIDA, R.B.; PEREIRA, C. M. P.; BRAGA, R. C.; CELLA, R.; BORGES, V. C.; SAVEGNARO, L.; NOGUEIRA, C. W. Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents a new class of potential antioxidant agents. **Eur J Med Chem**, v. 41, p. 513-518, 2006.

VASCONCELOS, A. de; OLIVEIRA, S. P.; RITTER, M.; FREITAG, R. A.; ROMANO, R. L.; QUINA, F. H.; PIZZUTI, L.; PEREIRA, C. M. P.; STEFANELLO, F. M.; BARSCHAK, A. G. Antioxidant Capacity and Environmentally Friendly Synthesis of Dihydropyrimidin-(2H)- ones Promoted by Naturally Occurring Organic Acids. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 26, p. 155-161.

VDOVINA, S. V.; MAMEDOV, V.A. New potential of the classical Biginelli reaction. **Russ Chem Rev**, v. 77, n. 12, p. 1017- 1053, 2008.